

Table 1 Recoveries of aflatoxins spiked in various spices

Spices	Spiked level (ng/g)	aflatoxins			
		B1	B2	G1	G2
Red pepper	5	82.7±4.2	89.7±3.8	91.6±3.8	86.8±3.0
	10	94.1±3.9	103.3±3.4	101.7±3.0	105±4.7
Black pepper	5	95.8±3.0	102.3±3.0	104.4±2.2	97.7±6.0
	10	98.0±4.2	96.7±3.5	97.3±4.4	85.0±2.5
White pepper	5	101.2±3.0	101.6±5.2	102.6±4.5	87.9±4.6
	10	90.2±5.0	90.0±3.9	85.1±5.5	91.0±5.9
Nutmeg	5	82.8±5.2	85.3±3.9	82.9±4.6	89.5±4.3
	10	82.3±4.7	86.7±3.5	94.6±2.3	85.0±5.0
Tear grass	5	88.5±5.2	85.0±5.8	90.2±3.2	92.5±4.2
	10	96.3±4.7	95.5±4.1	98.4±4.6	98.8±2.0

## Ⅱ．分担研究報告書

### 3．必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

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長

研究要旨 1999年から2000年の間に公表された好酸球増多筋肉痛症(EMS)、有毒油症(Toxic Oil Syndrome)、5-hydroxytryptophan (5-OH Trp)および Melatonin 健康補助食品に関する情報をまとめた。EMSの発症への関与が疑われている昭和電工製 L-tryptophan に含まれる6種類の不純物のうち Peak C と Peak FF の構造がそれぞれ、3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2-3b]-indole-2-carboxylic acid および 2-[2-hydroxy-indoline]-tryptophan であると決定された。他の既知の不純物と異なり、両不純物がインドール環を有するために、求電性および求核性 attack に対して反応し易いことが予測され、EMSの起因物質である可能性が浮上している。5-OH Trp は不定愁訴、セロトニン欠乏症への有効性を証明されぬまま現在も店頭にて大量に販売されているが幸いなことに1991年のカナダ人女性にEMS様症状が起こって以来、新たな被害報告はなされていない。時差ボケに対して処方されることもある Melatonin もまた店頭で販売され、本品も melatonin-formaldehyde 縮合産物をはじめとした不純物を含んでいることが判明している。Melatonin についての重要な知見はこれら縮合産物が5-OH Trp 中にも見い出され、L-tryptophan 中の major な不純物の一つである Peak E の構造同族体であるという事実である。

有毒油症発症のリスクと個体の遺伝学的感受性に関する新知見が得られている。すなわち、HLA class II 抗原である DR-DQ の subtype である DR2 を発現し、NAT-2 遺伝子に変異を持つヒトにおいて、本症で死亡した例が有意に多く、また、発症へのリスクも増加するという報告がなされた。

協力研究者

齊藤博士（国立相模原病院 臨床研究センター）

佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部）

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)、アニリンで変性したナタネ油の摂取

により発生した有毒油症 (TOS, toxic oil 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, TOS 研究の現状を概観し、現時点における結論を演繹した。さらに、不眠、不安感、憂鬱、時差ボケや、いわゆるセロトニン欠乏症に奏功するといわれる 5-hydroxytryptophan (5-OH-Trp) や Melatonin 製品に関

する研究についても同様なアプローチを行った。

## B. 研究方法

1999年から2000年の間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, SCISEARCHを用いて検索した結果、17報に到達することができた。

## C. 研究結果及び考察

1999年に“Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Application”というタイトルの書籍がAdvances in Experimental Medicine and Biologyの467巻として刊行され、これまでのEMS関連の研究成果がまとめられている。論文としては既に報告してあるが、その中で報告されている結果(文献1、3、5、7、8、17)も含めて、1999年から2000年に公表された論文内容を、以下に概説する。

### 1. L-Tryptophan

昭和電工製L-tryptophan事故品(SD-Trp)中の6種類の不純物のうち、Peak CとPeak FFの構造が決定された。HPLC-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)およびHPLC-in source collision induced dissociation-MS-MS分析により、Peak Cが3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2-3b]-indole-2-carboxylic acid、Peak FFが2-[2-hydroxyindoline]-tryptophanであることが判明した。Peak C、Peak FFは他の不純物とは異なり、いずれもインドール環を有するが、この構造はelectrophilic attackやnucleophilic attackに反応しやすいことから、EMSの起因物質である可能性が指摘されている<sup>1,2)</sup>。

SimatらはSD-Trpの5ロットを調べ、Majorな不純物としてPeak C (PICと表記)、tryptophanの2位が置換された2-(3-indolylmethyl)-L-tryptophan (IMT)やPeak FF (HITと表記)等を同定している。IMTはtryptophanとindole-3-methanolあるいはindole-3-acetaldehydeから合成された。この事実を根拠にして、tryptophan代謝物が高pHまたは低pHで分解して共鳴安定化したアルキル陽イオンを形成し、それが過剰に存在するtryptophanの反応性の高い2位と反応して2-置換体を形成すると提案している。このtryptophan代謝物の分解は、イオン交換カラムでの製造工程の、高pH、低pHいずれの条件下でも起こり得るといふ。IMTは調剤ないし飼料グレードのtryptophan製品中に<20-1,400 mg/kg程度含まれており、tryptophanとacetaldehydeから酸性条件下で1,1'-Ethylidenebis-(L-tryptophan) (EBT)が生成すること、3-(Phenylamino) alanine (PAA)はSD-Trpの飼料グレード品中にのみ20 mg/kg程度検出されることが明らかになっている。1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid (TCCA), formaldehyde, acetaldehydeやindole-3-acetaldehydeも<10-13,500 mg/kg程度検出されるがEMS発症への関与は薄いとされている<sup>3)</sup>。

TCCAやもう一つのmajorな不純物、1-methyltetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid (MTCA)はbenzodiazepine受容体の拮抗剤であるβ-carboline-3-carboxylateの前駆体として作用することでEMSの病態形成に関与する可能性があり、MTCAの二種類のdiastereoisomerは鼠チフス菌に変異を誘導するN-nitroso化合物の前駆体でもある。これらを踏まえ、急性、慢性的に経口でラットに投与した場合のTCCA、MTCAの組織内分布お

よび代謝パターンが EBT, PAA と共に検討されている。それによれば、投与した EBT のかなりの部分は胃液中で分解されずに大腸に移行すること、MTCA を与えた場合、EBT と同様、血中や尿中で検出されることから MTCA が EBT の主たる代謝物であろう事が示唆された。一方、PAA は急性、慢性投与の如何にかかわらず脳に蓄積したが、慢性的に投与した MTCA は腎臓に蓄積することが判明した。結論として、TCCA や MTCA の生成は投与した L-tryptophan に起因し、エタノールやアセトアルデヒドからの MTCA 生成はヒトや動物では内因性に起こるとしている<sup>9)</sup>。

Müller らは SD-Trp 中の Peak C に次ぐ major な不純物である IMT が L-tryptophan と 3-indolylmethanol (IM) から生成する際の両化合物の至適モル比が 100:1 であり、indole, formaldehyde と tryptophan との組み合わせでも生成することを見い出している<sup>9)</sup>。

EMS の臨床的な解析もなされている。EMS の主徴は末梢血好酸球増多筋肉痛であるが、病変は肺、皮膚や末梢神経にも及び、組織レベルでの好酸球浸潤は腸管内腔を含め、胃、肝臓、小腸にも認められることが報告されている。Hepburn らは胆嚢にも好酸球浸潤が及び、EMS の後期に胆嚢炎が併発してくる可能性を指摘している。すなわち、腹腔鏡的胆嚢摘出術を施行した 43 才の EMS 病歴を持つ急性胆嚢炎患者からの胆嚢に著しい好酸球浸潤を認め、これを以て胆嚢炎が形成されたと結論付けた<sup>6)</sup>。

従前から、EMS と自己免疫性疾患である線維性筋肉痛症(FMS)が臨床的、血清学的類似性を持つと指摘されており、筋肉、関節痛を呈し、セロトニン、ガングリオシドならびにリン脂質に対する自己抗体を共通して持つことが判っている。Barth らは、慢性期を迎えてい

る 16 人の EMS 患者と 100 人の FMS 患者を対象に、両疾患の臨床学的ならびに免疫学的パラメーターを比較し、改めてその類似性を検証している。加えて、同時に行った 12 人の FMS 患者と健常者由来の末梢血単核白血球(PBMC)を EMS 発症に関連した異なるロットの Tryptophan で刺激し、サイトカイン産生パターンを調べている。その結果、健常者では 2 例に過ぎなかったが、FMS 患者の半数において Th2 型サイトカインである Interleukin (IL)-5, IL-10 の産生が認められたことを根拠に、より強い免疫原性を有する事故 tryptophan を摂取した FMS 患者において、ある種のアレルギー反応の結果として EMS が発症するのではないかと述べている<sup>7)</sup>。

## 2. 5-Hydroxytryptophan

前年度の報告書においても触れたが、販売禁止となった L-tryptophan に代わって肥満、不眠、頭痛をはじめ、いわゆる“セロトニン欠乏症”への奏功をうたった 5-hydroxy-tryptophan (5-OH Trp) が店頭販売されている状況は今でも変わらない。5-OH Trp には L-tryptophan 事故品中の不純物と化学的な構造が同一な“Peak X” family と命名された 3-4 種類の不純物が含まれていることは周知の事である。Peak X family は 6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline を主体とした同族体から構成されている。店頭で販売されている 8 種類の 5-OH Trp を分析した Klarskov らは全てにこれら Peak X family が含まれていることを指摘している<sup>8)</sup>。

Mayo Clinic のホームページからは本健康食品購入者に向けての警鐘が配信されている。それによれば、tryptophan とは異なり、5-OH Trp は“天然物”由来故に“安全”であることをうたっているが、本品の臨床効果は確認さ

れておらず、タネからの抽出物で自然食品であることをプロモートしている本品も Peak X を含んでおり、歴史的に明らかとなっている多くの毒物が“天然物”由来であるという事実を前にすると、“天然物”への安全信仰は改宗されるべきであり、事実、店頭から入手した6種類の5-OH Trp 中には、1991年にカナダ人女性を発症させた量の2.9-14.1%の Peak X が含まれていると結んでいる<sup>9)</sup>。

### 3. Toxic Oil Syndrome (TOS, 有毒油症)

アニリンで変性したナタネ油を摂取した二万人以上が被害を受け、発生から最初の2年間に400人以上の死亡者を出したスペインでの有毒油症の大惨事は記憶に新しいが、原因究明に関する結論は出ていない。従前から有毒油症の起因物質と目されていた3-phenylamino-1,2-propanediol (PAP)よりも本症発症へのリスクが数倍高いとされるエステル化合物の3-oleoyl ester (MEPAP)および1,2-di-oleoyl ester (DEPAP)を high responder の A/J マウスに与えると、重篤な体重減少が起こった後に半数が死亡した。主な組織病理学的変化は肺で顕著であった。さらに、PAP の linolein di-ester を投与した場合にも、体重減少、肺出血、鬱血、気腫といった症状に加え、末梢血好酸球増多も起った。かかる症状は実際の有毒油症に酷似していることから、PAP や、そのエステル化合物が、本症の急性期の病態形成に関与することが推測されている<sup>10)</sup>。

DEPAP の本症発症へのリスクを推測統計学的に解析した Paz らは、PAP と比較した場合、odds ratio で6.5倍高いことを明らかにしており、本化合物が事故油中にのみ存在するという事実と併せ、本症の起因物質である可能性が極めて高いとしている<sup>11)</sup>。

しかしながら、この検討結果を以て、本症

の起因物質を DEPAP と断ずることは出来ないと思われる。実際、PAP の生体内変換およびクリアランスの動態を検討した Ladona らの研究グループから、興味ある成績が得られている。彼等は、A/J、C57BL/6 といった high responder マウスの腹腔に PAP を投与すると、24時間後迄に70%-36%が尿中に排泄されること、また、尿中に出てくる PAP の major な代謝産物がマウスの系統を問わず、2-hydroxy-3-PAP であり、高度に極性を有する3-[(4'-hydroxyphenyl) amino] propane-1,2-diol と 2-hydroxy-3-[(4'-hydroxyphenyl) amino] propanoic acid も PAP から代謝されて尿中に出てくることを突き止めている。著者らは PAP が生体内変換されて反応性に富む分子種を生成する過程が、有毒油症の発症に関与するとの見解を述べている<sup>12)</sup>。

一方、PAP やその代謝産物以外に原因を求めた研究もなされている。すなわち、事故油中に不純物として混入しているフリーのアニリンや脂肪酸由来のアニリンと個体が元来持っている内因性脂肪酸との間で起こる脂肪酸再合成こそが、本症の早期の病態形成の鍵を握るとするアプローチである。Kaphalia らはアニリン塩酸塩(2 mmol/kg)を与えたラットにおける脂肪酸再合成を検討している。それによれば、脂肪酸再合成は投与後速やかに起こり、パルミチン酸、オレイン酸の濃度はそれぞれ15、30分後に全血、褐色脂肪、肝臓で最高レベルに達する。リノレン酸は脾臓のみに、また、ステアリン酸は肝臓で高濃度検出される。これらの結果は摂取された脂肪酸が迅速に再合成、代謝され、かつまた新たな脂肪酸合成の基質となっていること、とりわけ、アニリンとの conjugation が起こる際にはオレイン酸とパルミチン酸が最適な基質になっていることを示唆している。また、アニリン塩

酸塩非投与ラットの組織においても前述した脂肪酸が極低濃度検出されるが、これらは内因性に合成されたものであろうとしている。脂肪酸は多くの実験動物や一次培養された細胞に対し広汎な toxicity を示すことが知られており、in vivo でのかかる脂肪酸形成が有毒油症発症の trigger に成り得るとしている<sup>13)</sup>。

EMS と同様、有毒油症においても、その発症の有無に遺伝学的な背景が存在する可能性は以前から指摘されている。Cardaba らは HLA class II 抗原である DR-DQ (DR3, DR4, DR2 および DQ8) 抗原を発現する個体が事故油摂取を契機にして高頻度で本症を発症したとする報告を、256 人を対象として再検証している。慢性期を迎えている有毒油症患者 (117 人)、発症した患者の未発症家族 (71 人) および本症に無関係の疾患を有する对照患者 (77 人) の 3 群に加えて、有毒油症を原因とする死亡者 (34 人) 及び別の疾患による死亡者 (13 人) における HLA class II 抗原の発現状況を調べ、有毒油症発症との関連が検討された。生存する有毒油症患者には HLA class II 抗原発現の偏りを認めなかったが、本症で死亡した患者の 73.5% が DR2 抗原を発現していることが判った。ちなみに、生存有毒油症患者、未発症の家族、無関係な疾患を有する患者およびそれら疾患を原因とした死亡者での DR2 抗原陽性割合は、それぞれ 25.6%、28.5%、23.9% および 38.4% であった<sup>14)</sup>。

WHO, スペイン厚生省ならびに新たに設立された Toxic Oil Research Center (CISAT) の三者で構成された研究チームは、現在までに事故油と有毒油症発症との間に明らかな因果関係を認めてはいるものの、起因物質の確定はできていない。現段階では DPAP が最有力候補であることに変わりはないが、第三の不純物の可能性も存在するとしている<sup>15)</sup>。

石油精製品であるミネラル油にも多くの添加物や不純物が共存していることに着目した Hard らにより、かかる油の未知なる疾患発症への関与の可能性が検証されている。ミネラル油はその粘稠性ゆえ、これを摂取した際には脂質性肺炎を起こすと予測される。しかしながら、70 種を超える油中の化合物が、有毒油症に観られる T cells の活性化やサイトカイン産生といった一連の免疫学的反応に起因する広汎な症候群を惹起する可能性は低いとの結論を下している<sup>16)</sup>。

#### 4. Melatonin

メラトニンに関する新知見は報告されていないが、1999 年に店頭販売されているメラトニンを分析し不純物の共存を指摘した Mayo Clinic の研究チームによる総説が公表されている。種々のルートから入手したメラトニン健康補助食品の全てに 0.1-0.5% の同一不純物が含まれていた。分析結果によれば、これら不純物が MH<sup>+</sup>=249 を有する二種類のメラトニン加水分解産物、MH<sup>+</sup>=265 を有する hydroxymelatonin の C2 位酸化物、さらに、MH<sup>+</sup>=477 を持つ四つの regioisomer で構成されるメラトニン-ホルムアルデヒド縮合産物から成っていることが判明している。重要なことは、これら縮合産物が EMS 発症の起因物質と目されている SD-Trp 中の Peak E および 5-OH Trp 中の Peak X の構造同族体であるという事実である。幸いなことに、現在までにメラトニン摂取に伴った疾患発症の報告は無いが、潜在的な危険性ははらんでいるとの警鐘を鳴らししている<sup>9,17)</sup>。

#### D. 結論

SD-Trp 中の major な不純物である Peak C、Peak FF の構造上の特徴から、これら化合物

の EMS へのより強い関与が浮上した。これら不純物を含め、SD-Trp 中で既に同定されている個々の不純物による動物モデルを用いた EMS の急性期症状の再現は未だ成功していないが、求電子性及び求核性 attack に反応し易いという既知の不純物に無い Peak C、Peak FF の性質から、それ自身の toxic effects 以外に生体内外でより反応性に富む分子種が生成する可能性がある。同様なことは TOS の起因物質候補の一つである PAP についても言える。現時点では DPAP を最有力視する向きが多いが、PAP の代謝物である高度に極性を有する二種類の化合物の存在は、SD-Trp 中の Peak C、Peak FF と同様に、生体内での代謝過程における高反応性物質生成の可能性につながる。EMS、TOS に関しての今後の研究においては、合成した個々の不純物が動物体内で如何なる代謝を受け、どのような産物が生じるのか、という疑問を解かねばならないと考える。

5-OH Trp やメラトニンがうたっている様な症状に奏功するという科学的根拠は無い。“天然物、自然食品” = “安全” という図式で、多くの人々の購入意欲をあおり続けることの危険性は高い。摂取量の少なさ故に EMS 様疾患発生の報告はされていないが、大々的なプロモーションに後押しされる形でより多くの人々がこれらを購入し、摂取量が増加して行く可能性はある。事実、うたわれている様な症状の一層の改善のため、より多量を摂取することを奨めているとの情報もある。FDA をはじめとする行政当局により 10 年来の努力がなされているものの、前述した健康補助食品や今後も出現するであろう関連品の店頭販売を完全に規制することは困難であるとの見方が強い。科学的証拠を示し、購入者に警鐘を鳴らし続けることが大切である。また、わが国においても、注意が必要と考えられる。

## E. 健康危険情報

米国では、5-OH Trp やメラトニンの市販製品中に、L-tryptophan 事故品中の重要不純物と類似構造の化合物が見いだされており、摂取量は少ないものの、注意が喚起されている。

## F. 文献

- 1) Naylor, S., Williamson, B.L., Johnson, L., Gleich, G.J., “Structural characterization of case-associated contaminants peak C and FF in L-tryptophan implicated in eosinophilia-myalgia syndrome”. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 453-460 (1999)
- 2) 寺尾 岳、堀 広子、中村 純、 “V. 中毒性疾患 (薬物・化学物質) 非薬物性化学物質、アミノ酸類”、*日本臨床*、57、650-651 (1999)
- 3) Simat, T.J., Kleeberg, K.K., Muller, B., Sierts, A., “Synthesis, formation, and occurrence of contaminants in biotechnologically manufactured L-tryptophan”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 453-460 (1999)
- 4) Adachi, J., Asano, M., Ueno, Y., “Tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids and contaminants of L-tryptophan”, *J Chromatography A*, 881, 501-515 (2000)
- 5) Müller, B., Pacholski, C., Simat, T., Steinhart, H., “Synthesis and formation of an EMS correlated contaminant in biotechnologically manufactured L-tryptophan”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 481-486 (1999)
- 6) Hepburn, A., Coady, A., Livingstone, J., Pandit, N., “Eosinophilic cholecystitis as



- a possible late manifestation of the eosinophilia-myalgia syndrome", *Clin Rheumatol.* 19, 470-472 (2000)
- 7) Barth, H., Berg, P.A., Klein, R., "Is there any relationship between eosinophilia-myalgia syndrome (EMS) and fibromyalgia syndrome (FMS)? an analysis of clinical and immunological data", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 487-496 (1999)
  - 8) Klarskov, K., Johnson, K.L., Benson, L.M., Gleich, G.J., Naylor, S., "Eosinophilia-myalgia syndrome case-associated contaminants in commercially available 5-hydroxytryptophan". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 461-468 (1999)
  - 9) Mayo Clinic Health Oasis., "Confused about a health condition?", <http://www.mayohealth.org/mayo/9808/htm/diet.htm>
  - 10) Susanne, A.B., Christian, S., Inge, K., Rene, C., "The acute pathology of fatty acid anilides and linoleic diester of 3-phenyl- amino-1,2-propandiol in mice: possible implication as aetiologic agents for the toxic oil syndrome", *Arch. Toxicol*, 73, 493-495 (1999)
  - 11) Paz, M.P., Philen, R.M., Schurz, H., Hill, R.H., Ribota, O.G., Camara, A.G., Kilbourne, E.M., Abaitua, I., "Epidemiologic evidence for a new class of compounds associated with toxic oil syndrome", *Epidemiology*, 10,130-134 (1999)
  - 12) Ladona, M.G., Bujons, J., Messeguer, A., Ampurdances, C., Morato, A., Corbella, J., "Biotransformation and clearance of 3- (phenylamino) propane-1,2-diol, a compound present in samples related to toxic oil syndrome, in C57BL/6 and A/J mice", *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1127-1137 (1999)
  - 13) Kaphalia, B.S., Khan, M.F., Ansari, G.A.S., "Fatty acid anilides: in vivo formation and relevance to toxic oil syndrome", *J Biochem. Mol. Toxicol*, 13(5), 269-277 (1999)
  - 14) Cardaba, B., Ezendam, J., Gallardo, S., del Pozo, V., Izquierdo, M., Martin, C., Cortegano, I., Aceituno, E., Rojo, M., Arrieta, I., Palomino, P., Posada, M., Lahoz, C., " DR2 antigens are associated with severity of disease in toxic oil syndrome (TOS)", *Tissue Antigens*, 55, 110-117 (2000)
  - 15) Posada, M., Gelpi, E., "Foreword", *Human and Experimental Toxicol*, 19, 155-157 (2000)
  - 16) Hard, G.C., "Short-term adverse effects in humans of ingested mineral oils, their additives and possible contaminants - A review", *Human and Experimental Toxicol*, 19, 158-172 (2000)
  - 17) Naylor, S., Johnson, K.L., Williamson, B.L., Klarskov, K., Gleich, G.J., "Structural characterization of contaminants in commercial preparations of melatonin by on- line HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467, 769-777 (1999)

## Ⅱ．分担研究報告書

### 4．菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

内山 貞夫

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）

研究課題：食品中の有害物質等の評価に関する研究

分担研究項目：菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

分担研究者： 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

協力研究者： I. 川崎 勝 食品衛生外部精度管理調査事業部 調査事業管理班長  
II. 大原直樹 研究部 薬理研究室長

研究要旨

脳卒中易発性ラット（SHR-SP）への投与で大豆油などに比べ生存期間が短縮されるとの報告があった菜種油において、菜種油に含有する植物ステロールの動物細胞に対する作用と菜種油投与による膜機能変化について調べた。

植物ステロールの動物細胞に対する作用を検討するためにヒト鼻咽癌細胞(KB細胞)に対する増殖阻害作用試験とステロールの細胞内への取り込み実験を行いコレステロール含量の比較を検討した。KB細胞に対する増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用（それぞれIC<sub>50</sub> 78、80 μg / mL）が観察されたがその他のステロールには100 μg / mLの濃度までは増殖阻害作用は観察されなかった。培地中にブラジカステロール、カンペステロール、β-シトステロールを添加して培養したグループはコレステロールの他それぞれ添加したステロールが1.072 ~1.165 μg / mLの濃度で検出された。コレステロールはコントロールが2.189 μg / mLでブラジカステロール添加群は1.812 μg / mL、β-シトステロール添加群は1.899 μg / mLで有意差があった。カンペステロールには有意差はなかった。この結果はブラジカステロールとβ-シトステロールのようにコレステロールの含量を減少させる作用を持つステロールが、心筋と血管の細胞膜のコレステロール含量を低下させて膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こす可能性を支持する結果となったが今後更に検討を加える必要があった。

菜種および大豆油中のコレステロール、ブラジカステロール、カンペステロールおよびスチグマステロールを定量し、平成11（1999）年度に得た血漿中あるいは赤血球膜中のステロール量と比較した。その結果、菜種油または大豆油を28~42日間強制経口投与した後の血漿あるいは赤血球膜中には、摂取した油に含まれる植物ステロールが、その量および組成に応じて取り込まれることがわかった。この結果に基づき、SHRSP に、脂肪源として、大豆油、大豆油+β-シトステロール、菜種油あるいは菜種油+スチグマステロールを加えた飼料を与え、生存日数を調べた。この実験では油中のトコフェロール量を一定にし、大豆油および菜種油に含まれる植物ステロールの違いが、生存日数をどの程度変えるかを調べることを目的とした。

## I. 菜種油中に含有する植物ステロールのヒト細胞に対する作用。細胞毒性試験と細胞内への取り込み実験

### A. 研究目的

菜種油は、わが国で主に消費する食用油の一つとして重要であり、大部分が外国から輸入されている食用油である。最近、国内の研究者によって菜種油を投与した脳卒中易発性ラット (SHR-SP) では大豆油など他の食用油に比べ平均寿命が短縮されるとの報告があった。菜種油の安全性の確認のため、分担研究者らのグループでは新たにSHRラット及びWKYラットを用いた実験を行った結果、菜種油投与群で大豆油投与群に比べ、血圧の上昇が観察され、生存期間の短縮は別の要因であることが判明している。

本研究では、この原因物質として菜種油中に多く含まれる植物ステロール類等の未知物質と考え、昨年度までに菜種油中の植物ステロール類のより詳細な検索による帰属と、菜種油及び対照群として大豆油を自然発症高血圧ラット (SHR ラット) と正常血圧ラット (WKY ラット) に投与して心臓及び血管中の蓄積植物ステロールを量的に検討した。菜種油と大豆油には植物ステロールが含有しているが、この油を投与したSHR ラットの心筋と大動脈にこれらの植物ステロールが蓄積していることが明らかとなった。

今回は植物ステロールの動物細胞に対する作用を検討するためにヒト鼻咽癌細胞 (KB 細胞) に対する増殖阻害作用試験とステロールの細胞内への取り込み実験を行いコレステロール含量の比較を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 細胞中のステロール類の定量

#### 1-a) GC-MS サンプルの調製

KB 細胞  $10^6$  個の細胞を EtOH 性カリウム EtOH 溶液 5mL で  $100^{\circ}\text{C}$  1時間還流した。その後水 15mL を加え ether 15 mL で 2回振盪抽出を行った。有機層を合わせ、水 30mL で 5回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥濾過して濃縮乾涸して残渣を ether 1 mL に溶解した。溶液 1 mL を  $\text{N}_2$  気流中で乾涸し、残渣に BSTFA ( $500\ \mu\text{L}$ ) を加え  $100^{\circ}\text{C}$  で 1時間反応した。反応生成物を  $\text{N}_2$  気流中で乾涸し、残渣をヘキサン 5 mL に溶解しバリアン (社) 製 Bond elute FL ( $500\ \text{mg} / 10\ \text{mL}$ ) に負荷しヘキサン 5mL, ヘキサン/アセトン ( $17:3$ ) 5 mL, で順次溶出し、ヘキサン/アセトン層を GC/MS 用の試料とした。

#### 1-b) GC-MS 測定条件

GC-MS の測定条件は以下の通りである。  
カラム : DB5-ms 30m X 0.25 I.D.;  $0.25\ \mu\text{m}$  ; キャリアーガス : He ( $20\text{ml}/\text{min}$ ); オープン :  $50^{\circ}\text{C}$  ( $1.5\ \text{min}$ )  $\rightarrow$   $300^{\circ}\text{C}$  ( $20\ \text{min}$ ),  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; 気化室温度 :  $250^{\circ}\text{C}$ 、  
注入量 :  $1\ \mu\text{L}$  (スプリットレス); サンプル  
ング時間 :  $1.00\ \text{min}$

MS 条件 : イオン化法 EI, イオン化電圧  $70\text{eV}$  ; スキャンパラメーター : 検出器ゲイン  $2.5\ \text{kV}$  ; 測定時間 :  $15.00 - 26.00\ \text{min}$ ; 測定質量数:  $m/z\ 100 \sim 550$ .

### 2. 細胞中のステロール類の確認と定量

生細胞数を血球計算盤で測定後、全量を前項目 1-a) に準じて反応し、最終液の濃度

を溶剤で適宜希釈して、GC-MS 用の試料とした。ピークの確認試験は GC-MS(SIM) 法により、保持時間と GC-MS(SIM)のクロマトグラムが一致することにより行った。検出されたステロール類の定量は絶対検量線法による選択的イオンモニター(SIM) 法により行った。

### 3. 細胞培養

#### 3-a)細胞と培地

ヒト鼻咽癌細胞(KB)は ATCC CCI-17 を大日本製薬(株)より購入した。培地はイーグル MEM 培地 (アール液) (コスモバイオ(株))に 10 %牛胎児血清(FBS、GIBCO Co. Ltd.),0.292 mg/mL L-グルタミン(和光純薬(株)),0.08 mg/mLカナマイシン(コスモバイオ(株))を添加して用いた。

#### 3-b) KB 細胞に対する増殖阻害作用試験

コラーゲン TYPE I コート 24 ウェル平底プレート (IWAKI(株))に 1 mL の培地をくわえ KB 細胞を  $10^5$  cells / mL の濃度で播種し 24 時間培養した。培養後培地を除去し、最終ステロール濃度が 5,10,20,50,100  $\mu$ g/mL になるように調製した培地に交換し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下 72 時間培養した。培地除去後、単層培養の細胞をトリプシン EDTA で剥離してトリパンブルーで染色後、血球計算盤で生細胞数を数えコントロールと比較した。増殖阻害率を片対数グラフにプロットして 50%阻害率 (IC<sub>50</sub>) を求めた。

#### 3-c)KB 細胞へのステロールの取り込み実験

添加するステロールはブラジカステロ

ール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロールであるが夫々に対して n=5 で行った。コラーゲン TYPE I コート 25 cm<sup>2</sup>フラスに培地 5 mL を加え、KB 細胞を  $10^4$  cells / mL の濃度で播種して、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下 72 時間培養した。培養後ステロールを 20  $\mu$ g / mL の濃度で含む培地に交換後、更に 72 時間培養した。培養後培地を除去し、PBS を加え細胞をセルスクレーパーで剥離してパスツールピペットでピペッティングを行ったのち 5 °C、800 rpm で 10 分間遠心分離した。更に PBS で細胞を洗う同様の操作を 3 回繰り返した。遠心分離後の細胞を凍結保存した。

## C. 結果

### 1. KB 細胞に対する増殖阻害作用

ブラジカステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スティグマステロール、 $\beta$ -シトステロール、ラノステロールについて増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用 (夫々 IC<sub>50</sub> 78、80  $\mu$ g / mL) が観察されたがその他のステロールには 100  $\mu$ g / mL の濃度までは増殖阻害作用は観察されなかった (表 1、図 1、図 2)。

### 2. KB 細胞へのステロールの取り込み実験

菜種油から検出された 3 種のステロール (ブラジカステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロール) について取り込み実験を行った。ステロールの培地中の濃度は KB 細胞に対する増殖阻害作用の実験で比較的増殖阻害作用が出にくい 20  $\mu$ g / mL の濃度を選択した。図 3 に示すようにコン

トロールは、コレステロールのみ検出されるに対して、ブラジカステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロールを添加したグループはコレステロールの他それぞれ添加したステロールが検出された。定量結果は表 2 と図 4 に示した。ステロールは  $1.072\sim 1.165\ \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で検出された(図 3、表 2)。コレステロールはコントロールが  $2.189\ \mu\text{g}/\text{mL}$  でブラジカステロールは  $1.812\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $\beta$ -シトステロールは  $1.899\ \mu\text{g}/\text{mL}$  で有意差があった。カンペステロールには有意差はなかった。

#### D. 考察

##### 1. KB 細胞に対する増殖阻害作用

今回 KB 細胞に対する増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用(夫々  $\text{IC}_{50}$  78、 $80\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) が観察されたがその他のステロールには  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度までは増殖阻害作用は観察されなかった(表 1、図 1、図 2)。

##### 2. KB 細胞へのステロールの取り込み実験

前年度までの動物実験を用いた調査で菜種油投与群は総植物ステロールは菜種油の方が 2 倍含有した。これらの食用油を 29 週間混餌投与した SHR 及び WKY ラットの心臓及び大動脈血管中には、共に菜種油投与でカンペステロール及び  $\beta$ -シトステロールの蓄積が観察されたが、ブラジカステロールが検出されなかった。大豆油ではカンペステロール及び  $\beta$ -シトステロールの蓄積が観察されたが、ステイグマステロールは検出されなかった。菜種油投与で蓄積

された総植物ステロール量は、心臓で 3 倍弱、血管で 2 倍弱、大豆油より多く蓄積されており、細胞膜の脆弱化になんらかの影響を与える可能性があった。

そこで食用油中のステロールが細胞中に取り込まれ何らかの生理作用を行うことを *in vitro* の系を用いて確認するために、菜種油から検出された 3 種のステロール(ブラジカステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロール)について取り込み実験を行った。ステロールの培地中の濃度は KB 細胞に対する増殖阻害作用の実験で比較的増殖阻害作用が出にくい  $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度を選択した。培地中にブラジカステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロールを添加して培養したグループはコレステロールの他それぞれ添加したステロールが検出された(図 3)。定量結果は表 2 と図 4 に示した。各植物ステロールは  $1.072\sim 1.165\ \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で検出された(図 3、表 2)。コレステロールはコントロールが  $2.189\ \mu\text{g}/\text{mL}$  でブラジカステロール添加群は  $1.812\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $\beta$ -シトステロール添加群は  $1.899\ \mu\text{g}/\text{mL}$  で有意差があった。カンペステロールには有意差はなかった。このことはブラジカステロールと  $\beta$ -シトステロールが細胞中に取り込まれた後コレステロール含量がコントロールに比べて有意に減少しているのでコレステロール代謝系に対し阻害作用を持つことが推定された。動物実験の結果では  $\beta$ -シトステロールは心筋と大動脈に蓄積されたがブラジカステロールの蓄積は観察されなかった。 $\beta$ -シトステロールは菜種油に約 2 倍含まれているにも拘わらず、動物実験の結果では心筋と大動脈に菜種油投与群と大豆油投与群共

に等量蓄積されていた。このことは $\beta$ -シトステロールが生理作用を持つために、代謝された可能性があるが今後更に検討を要する。菜種油に特有に観察されるブラジカステロールは今回の実験では細胞内に蓄積が観察され、弱い細胞毒性作用とコレステロール含量を減少させる作用が観察された。このことはブラジカステロールも生体内で代謝された可能性があり、今後更に検討を加える必要がある。一方動物実験の菜種油投与群で心筋と大動脈に最も蓄積の多かったカンペステロールを比較すると細胞毒性がなく、コレステロール含量もコントロールと有意差は観察されなかった。

以上今回の実験で植物ステロールは細胞内に取り込まれ、ブラジカステロールと $\beta$ -シトステロールにコレステロール含量を減少させる現象が観察されカンペステロールにはその現象が観察されなかった。カナダの Ratnayake (Health & Welfare Canada)は、植物油のラットの早死傾向の原因について、植物ステロールが細胞膜を構成するコレステロールに作用して膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こすという仮説を提唱している。今回の細胞を用いた実験ではこの仮説を支持する結果となった。さらに、ステロールにはブラジカステロールと $\beta$ -シトステロールのようにコレステロールの含量を減少させる作用を持つステロールがあり、このコレステロール含量を減少させる作用のあるステロールを喫食することにより、心筋と血管の細胞膜のコレステロール含量が減少し膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こす可能性を支持する結果となった。因みに SHR ラットの心筋と

大動脈のコレステロール含量は菜種油投与群は大豆油投与群の 66.98%と 63.82%であり、コレステロール含量を減少させる作用をもつステロールの合計は菜種油が大豆油に比べ 2.2 倍多かった。

#### D. 結論

KB 細胞に対する増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用(それぞれ $IC_{50}$  78、 $80 \mu g / mL$ ) が観察されたがその他のステロールには  $100 \mu g / mL$  の濃度までは増殖阻害作用は観察されなかった。培地中にブラジカステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロールを添加して培養したグループはコレステロールの他それぞれ添加したステロールが  $1.072 \sim 1.165 \mu g / mL$  の濃度で検出された。コレステロールはコントロールが  $2.189 \mu g / mL$  でブラジカステロールは  $1.812 \mu g / mL$ 、 $\beta$ -シトステロールは  $1.899 \mu g / mL$  で有意差があった。カンペステロールには有意差はなかった。この結果はステロールにはブラジカステロールと $\beta$ -シトステロールのようにコレステロール含量を減少させる作用を持つステロールがあり、このコレステロール含量を減少させる作用のあるステロールを喫食することにより、心筋と血管の細胞膜のコレステロール含量が現象し膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こす可能性を支持する結果となった。

表1 KB細胞に対する増殖阻害作用

sterol	IC50 ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
brassicasterol	78
ergosterol	80
campesterol	100<
stigmasterol	100<
$\beta$ -sitosterol	100<
lanosterol	100<



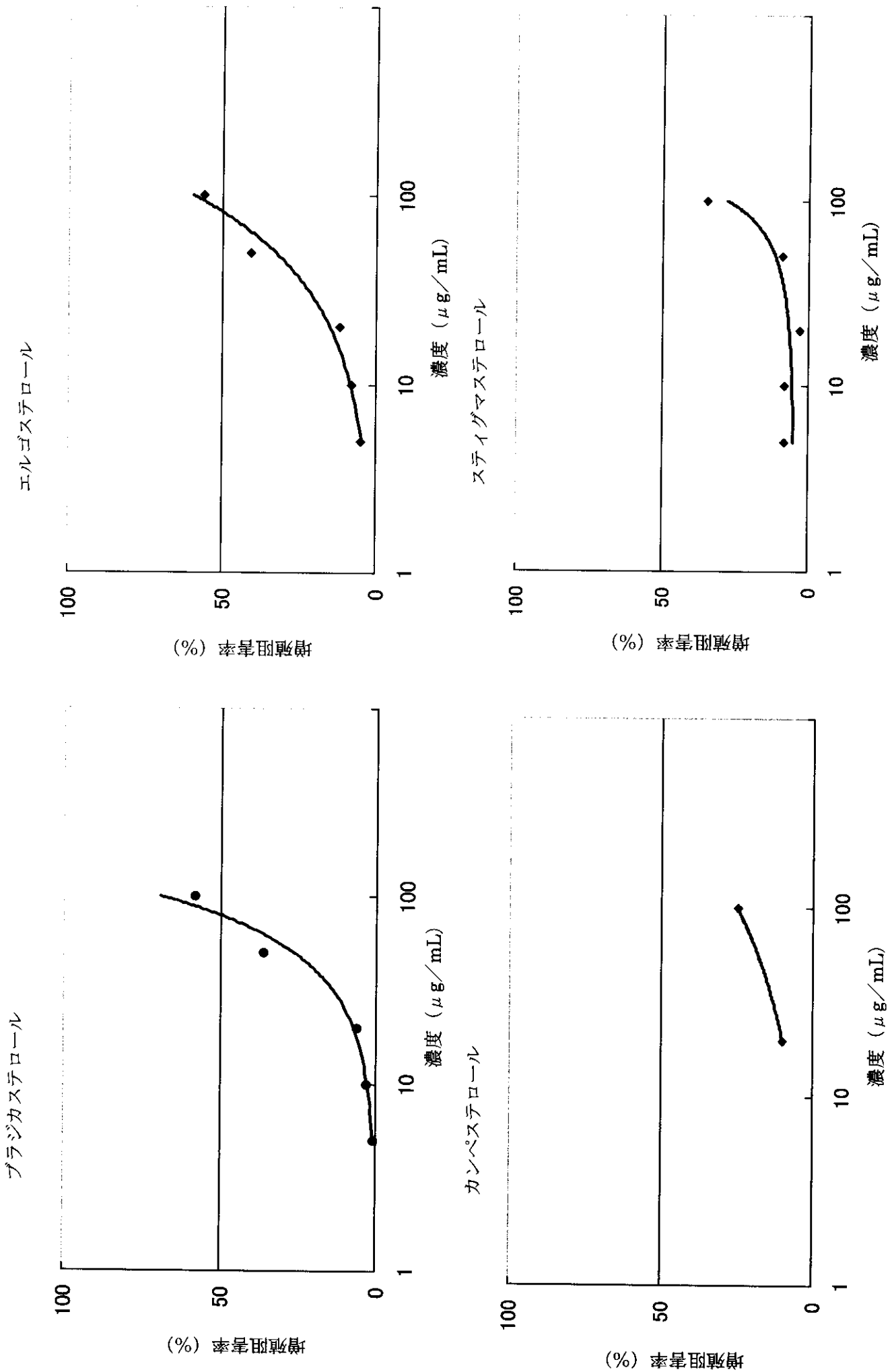


図1 ステロールのKB細胞に対する増殖阻害曲線

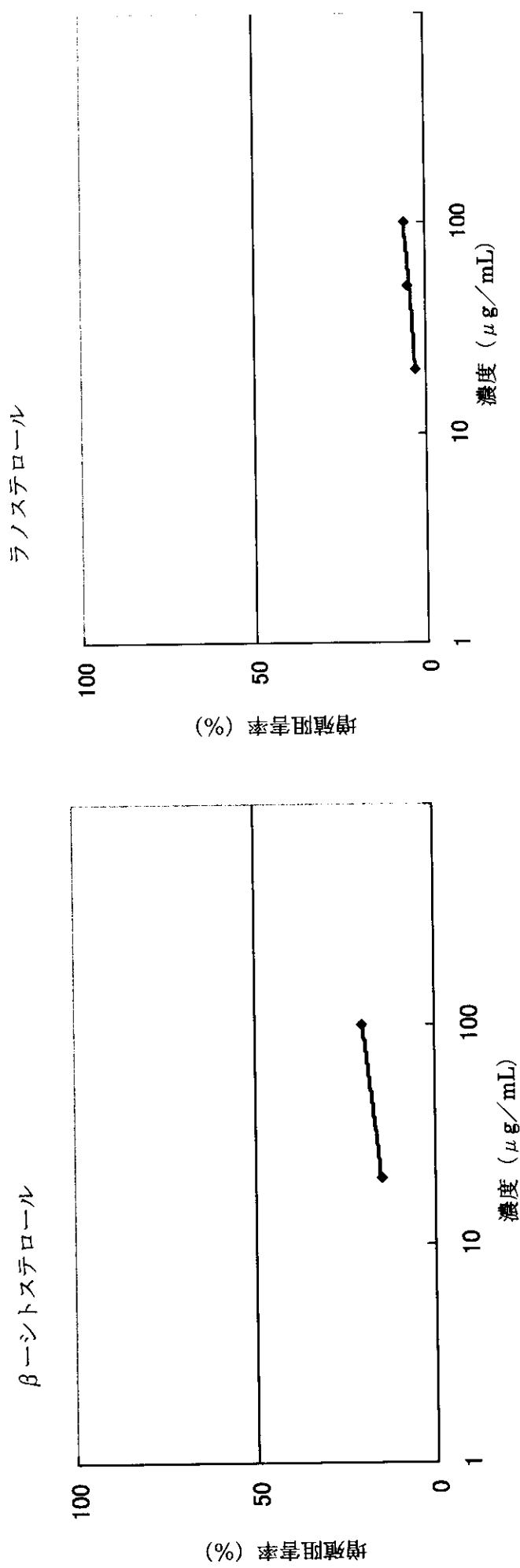


図2 ステロールのKB細胞に対する増殖阻害曲線

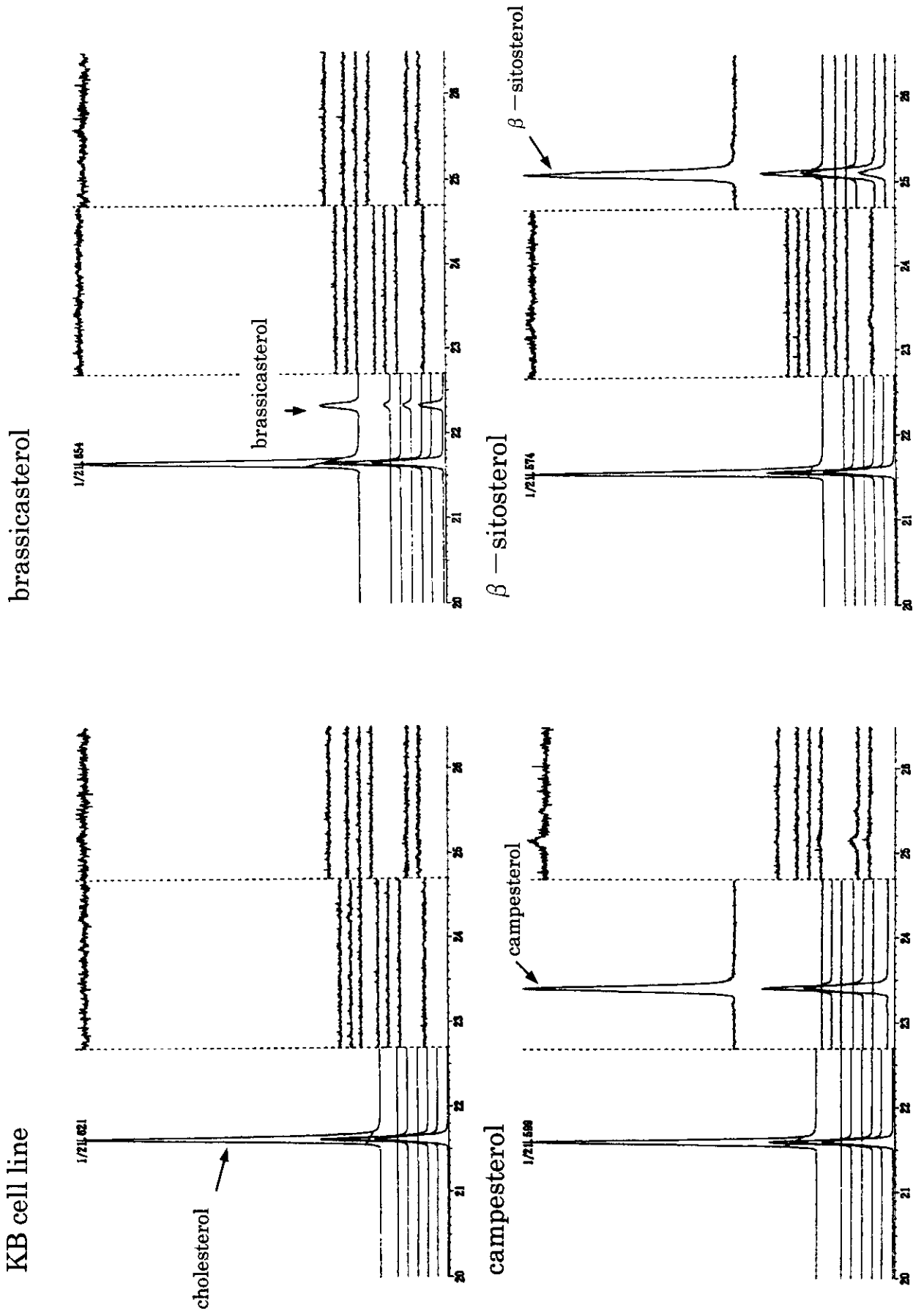


図3 ステロールのKB細胞に対する取り込み GC-MS(SIM)

表2 Brassicasterol、campesterol、 $\beta$ -sitosterolのKB細胞に対する取り込みとcholesterol含量の比較  
(n = 5)

	$\mu\text{g} / 10^6 \text{ cells}$			
sterol	KB cell line (control)	brassicasterol	campesterol	$\beta$ -sitosterol
cholesterol	2.189 $\pm$ 0.030	1.812 $\pm$ 0.024 **	2.127 $\pm$ 0.054	1.899 $\pm$ 0.066 **
brassicasterol		1.137 $\pm$ 0.007		
campesterol			1.165 $\pm$ 0.002	
$\beta$ -sitosterol				1.072 $\pm$ 0.016

\*\* : P < 0.01