

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

油脂加工食品中に生成する脂質酸化物の安全性に関する研究

平成15年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 和田 俊

平成17(2005)年 4月

1/2

目 次

I. 総合研究報告書	
油脂加工食品中に生成する脂質酸化物の安全性に関する研究 -----	1
和田 俊	
(資料1) 実験報告書 株式会社富士ジネンテックファーム	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-1)	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-2)	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-3)	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-4)	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-5)	
・株式会社富士ジネンテックファーム “ラットを用いた急性経口投与毒性試験” (試験番号No.03-055FGF-6)	
(資料2) 病理組織学的検査報告書 株式会社札幌総合病理研究所	
・株式会社札幌総合病理研究所 “マウス70匹の安全性試験” (受託番号：RE-3642)	
(資料3) 油脂の酸化と毒性に関する論文の一覧と主要論文	
(資料4) Codex提出書類 (The Hague, the Netherlands, 25-29 April 2005)	
(資料5) 関連する新聞記事	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	461
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	分冊2/2

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
（総合）研究報告書

油脂加工食品中に生成する脂質酸化物の安全性に関する研究
主任研究者 和田 俊 東京海洋大学（旧東京水産大学）教授

研究要旨

現在、油脂加工食品の油脂酸化に係る安全性を確保する観点から、食品衛生の基準として、即席麺、菓子、惣菜、弁当について過氧化物価（PV）及び酸価（AV）が定められているが、設定後、既に20年以上が経過しており、食品の一層の安全性確保を図るために、基準値の妥当性についての検証が求められている。特に即席麺におけるPVおよびAVの基準値に関しては、現在、日本の基準値をCodexへ世界基準として提案を行っているが、PVを設定する意義、およびその基準値の根拠が問題となっており、その規格化がペンディング状態となっている。そこで本研究では、これら問題を解決するために、

- 1) 世界15カ国より収集した即席麺のAVおよびPV測定
- 2) 各種条件下で即席麺を保存した際の、酸化指標変化の精査
- 3) 加速劣化即席より抽出した油脂を用いた急性毒性試験
- 4) 即席麺中油脂の太陽光線による酸化と各種酸化指標変化の精査
- 5) 異食症（PICA）を指標とした酸化劣化油脂の神経毒性試験
- 6) 自発運動量低下を指標とした酸化劣化油脂の神経毒性試験
- 7) 神経毒性試験で使用した酸化劣化油脂を用いた亜急性毒性試験
- 8) 油脂の酸化と毒性に関する論文の収集と整理

を実施し、以下のような結果を得た。

- ①即席麺中でのAVとPV変化には相関がないことを明確にし、毒性との関連よりPV測定の必要性を再確認した。
- ②即席麺中の油脂の酸化に光が大きな影響を与えることを確認した。
- ③加速試験で、PV=40meq/kgあたりから急激な酸化が起ることを確認し、食品衛生法で規定されているPV=30meq/kgという値が、急激な酸化を起こす手前の値としてCodexへの提案にも適切であることが示唆された。
- ④急性毒性試験の結果から、一般毒性は観察されなかった。
- ⑤急性毒性試験において、油脂の酸化劣化時間と、自発運動量低下の間に有意な相関が認められた。
- ⑥太陽光線による即席麺の劣化試験では、誘導期を持たずに酸化が進行し、60℃での加速劣化よりもその酸化速度は大きかった。
- ⑦PICAおよび自発運動量低下の観察結果より、酸化劣化油脂に強い神経毒性が備わっていることが示唆された。

⑧PICAおよび自発運動量低下の観察試験で使用した酸化劣化油を用いて28日間の亜急性毒性試験を実施したが、一般毒性は観察されなかった。

これらのことより、食品中の油脂のPVを30meq/kg未満に保つことで、食品の急激な劣化を防ぐことが出来ることを明らかに出来た。さらに、PV=40meq/kgを越えると急激に酸化が進行することより、短い期間で食品中油脂のPVは100meq/kgに達し、神経毒性症状を呈する危険性が示唆された。よって、食品安全の観点から、そして食品の品質維持の観点から、過酸化生成の指標であるPVを測定する意義は大きいと考えられた。

なおこれら研究とあわせて、油脂の酸化と毒性に関する論文も収集・整理し、CodexにおけるPV不要論払拭のための資料とした。

A. 研究目的

現在、油脂加工食品の油脂酸化に係る安全性を確保する観点から、食品衛生の基準として、即席麺、菓子、惣菜、弁当について過酸化価 (PV) 及び酸価 (AV) が定められているが、設定後、既に 20 年以上が経過しており、食品の一層の安全性確保を図るために、基準値の妥当性についての検証が求められている。中でも即席麺は日本で誕生した食品で、主に日本および東南アジアを中心に製造され、年間 652 億食 (2003 年データ) が世界で消費されている。そこで日本は、製品の品質と安全性の保持が重要との認識から、即席麺の世界規格 (Codex 規格) を策定すべく提案を行った。ところが、アジア調整部会において、日本が提案した含有脂質の規格基準において、AV 測定だけで即席麺の品質管理は十分との意見が多く、PV の不要論から、現在、PV 測定の規格化はペンディング状態となっている。日本は昭和 39 年~40 年に、即席ラーメン中の脂質酸化による集団食中毒を経験している。そしてこれは即席麺中の脂質酸化が原因であることが報告されている。食品中の脂質の酸化状態は、AV 測定のみでは把握することは出来ず、しか

も過酸化脂質や、さらにそれから生成する二次酸化生成物には毒性が備わっていることが報告されており、PVを測定することは食品品質保全、食品安全の観点より必須と考える。事実、食品衛生法で即席麺の規格値としてPV値30以下、AV値3以下を規定したことにより、即席麺による中毒は日本では皆無となっている。PV不要論の理由として、「AVとPVは、即席麺の劣化過程において同時に増加する指標であるため、AV測定のみで油脂劣化状況は十分把握可能。」とする根拠の無い理由付けが背景にある。実際、即席麺の酸化挙動についての科学的研究は希薄で、油脂そのものの酸化劣化過程はかなり解明されているものの、即席麺そのものの酸化劣化挙動についてはほとんど理解されていない。また、酸化状態と様々な毒性との関係に関する基礎的知見も乏しい。

そこで本研究では、油脂加工食品の油脂酸化物に係る安全性を評価に資することを目的に、喫緊の課題となっている我が国から提案した即席麺に係る Codex 規格の、PV 値、AV 値の妥当性について、具体的な即席麺の酸化試験から検討するものである。すなわち即席麺を、地域や

保存性を考慮して、各種劣化（温度、湿度、光、太陽光線など）条件下に保存（もしくは放置）し、その際の脂質の酸化劣化挙動を PV 変化に着目してから明らかにする。さらに、酸化劣化させた即席麺から抽出した油脂を用い、急性毒性試験、亜急性毒性試験、異食症（PICA）試験、自発運動量低下試験なども実施し、毒性的観点からも PV の必要性を訴える。そしてこれらを総合して、油脂加工食品中の品質と安全性を担保する指標としての PV 値、AV 値の意義をさらに明確にする。

B. 研究方法

提出した計画案に従い、以下の研究および文献調査・整理を行った。

1. 世界中で入手した即席麺中の AV および PV の測定

Codex アジア調整部会において、「AV と PV は、即席麺の劣化過程において同時に増加する指標であるため、AV 測定のみで油脂劣化状況は十分把握可能。」との考えが東南アジア諸国より示された。そこでこの考え方の真意を確認するため、世界から集めた全 218 種類の袋麺およびカップ麺の AV および PV を測定した。これら即席麺は、社団法人日本即席食品工業協会に依頼し、日本を含む世界 15 カ国より集めた。

集めた袋麺およびカップ麺は JAS 法に従い、油脂抽出および AV 測定を行った。さらに電位差滴定法（社団法人日本油化学会制定・基準油脂分析法）により PV 測定を行った。

2. 即席麺含有油脂の各種保存条件における酸化指標の変化

市販されている袋麺およびカップ麺を以下の条件で保存し、即席麺油脂中の、AV および PV 変化を精査した。測定は 1 カ月おきを実施した。

保存条件

- ① 温度 23℃、湿度 75%（那覇市の平均気温および平均湿度）
- ② 温度 30℃、湿度 75%
- ③ 温度 23℃、湿度 60%
- ④ 温度 60℃（加速試験）
- ⑤ 光酸化、温度 23℃、湿度 75%
- ⑥ 光酸化（展示用 Gondola で明所、室温保存）
- ⑦ 温度 50℃（加速試験）

油脂の抽出方法および測定方法は、前述の方法に従った。

保存条件①を軸にし、温度が変化した際の影響を見る条件を②に設定した。また湿度が変化した場合の影響を見るために③の条件を設定した。④および⑦の条件は、加速試験のための条件である。⑤は食品のショーケース内での展示を仮定した条件であり、⑥は東京都内で室温下にて保存・販売された場合を仮定した条件である。サンプリングは 4 週間おきに行い、油脂抽出後、PV および AV 分析に供した。

3. 酸化即席麺およびその抽出油の急性毒性試験

温度 60℃で保存した即席麺を一定期間ごとにサンプリングし、それら劣化即席麺から JAS 法に従い抽出した油脂をラットに単回投与し、急性毒性試験を行った。

試験動物は4週齢のSDラットを用い、各群、雄5匹、雌5匹とした。試料は各劣化即席麺から抽出した油脂を用い、胃ゾンデによる強制経口投与を行った。試験は、以下の3種類の試験を実施した。

- ①最大投与可能容量における急性毒性試験
- ②無影響量を調べる試験
- ③無影響量における急性毒性試験

試験油脂を投与後、各ラットのうずくまり状態（クラウチング）、自発運動量低下、立毛、糞便状態（下痢）について、熟練者による観察を6時間行った。その後、通常の餌を用い14日間飼育を行い、その間の、体重変化、食餌摂食量変化に関して測定した。最終観察（14日）終了後、各群代表例として雌雄1例をとりあげ、過麻酔による安楽死後、剖検を行い、主要臓器について肉眼観察した。

（倫理面への配慮）

本研究は、株式会社富士ジネンテックファーム動物倫理委員会の規定に則り実施された。

本試験は、株式会社富士ジネンテックファームに依頼して行った。実験報告書を資料1に添付する。

【実験報告書】

1. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-1）
2. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-2）
3. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-3）

3. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-4）

4. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-5）

5. 株式会社富士ジネンテックファーム
“ラットを用いた急性経口投与毒性試験”（試験番号 No.03-055FGF-6）

4. 太陽光線による即席麺の酸化と、各種酸化指標の変化

約40年前に日本で起こった即席麺の食中毒事件は、店の外で展示していた袋麺が劣化し、食中毒を引き起こしたと言われている。そこで、包装状態の袋麺、もしくは袋から麺を取り出し透明ビニール袋に詰め直した状態のものを、真夏日に、ビルの屋上に並べて劣化させた。なお日射時には、カラスによるサンプルの持ち去りを避けるため、袋麺の上に2mm厚のアクリル板を敷いた。また、太陽光線の積算強度、温度、湿度も同時に測定した。サンプリングは20時間おきに実施した。分析は、油脂を抽出後、PV、AV、AnVおよび各種二次酸化生成物に関して実施した。油脂抽出方法、PV、AVおよびAnV測定方法は前述の方法に従ったが、各種二次酸化生成物の測定は、ジニトロヒドラジンで二次酸化生成物をシッフ塩基へ誘導化した後、蛍光検出器を装備した高速液体クロマトグラフィーに供して、定性および定量分析を行った。

本実験で得られた油脂は、亜急性毒性試験、PICA試験、自発運動量測定試験に供する試料としても使用した。

5. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いた PICA 試験

イヌ、フェレットなど一部の動物を除いて、動物は嘔吐することが出来ない。よって、これまで一般毒性試験に使用されてきた、ラットやマウスは嘔吐が出来ない動物である。そのため、即席麺の食中毒症事件で観察された「嘔吐」などは、ラットやマウスでは観察されてこなかった。そこで、気分が悪くなると動物は、鉋物であるカオリンのペレットを摂取する (PICA: 異食症) 性質を利用し、カオリン摂取量からラットの気分の悪さを定量化する実験を行った。

試験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用い、各群 8 匹とした。ラットは、3 日間ケージ内で事前飼育した。その際、カオリンペレットの存在に慣れさせるため、ペレットもケージ内に置いた。試験日初日には、太陽光線で酸化劣化させた即席麺より抽出した油脂を含んだ試験食のみを与え、2 日目には試験食とカオリンペレットを与えた。結果は、2 日目の 24 時間後のカオリンペレットの摂取量を用いて考察した。

6. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いた自発運動量低下測定試験

急性毒性試験結果より、酸化が進んだ油脂は、ラットの自発運動量低下を引き起こすことが判明した。そこで自発運動量を定量的に測定するために、ビデオ画像行動解析装置を用いて自発運動量の定量化を行った。試験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用い、各群、6 匹とした。ラットは、3 日間ケージ内で事前飼育した。その後、太陽光線で酸化劣化させた即席麺よ

り抽出した油脂を含んだ試験食のみを与え、ビデオ画像行動解析装置 (SMART) により 12 時間移動距離を、暗室、赤外線ライト下で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、戸板女子短期大学の動物倫理委員会の規定に則り実施された。

7. 太陽光酸化即席麺から抽出した油を用いた亜急性毒性試験

PICA 試験および自発運動量低下試験で使用したのと同じ酸化劣化油脂を用い、亜急性毒性試験を実施した。試験動物は 5 週齢の C57BL/6J 系マウスを用い、各群、雄 6 匹、雌 6 匹とした。本試験では、飼料の油脂量が急性毒性試験よりはるかに多くなるため、試験動物にマウスを使用した。マウスは、1 ケージで 6 匹飼育し、餌および水は自由摂取とした。2 日に 1 回、餌の摂餌量および体重測定を行った。翌朝 9 時より採血 (測定項目: 赤血球数、白血球数、血液像、血小板数、血色素、ヘマトクリット、血清総蛋白、アルブミン、A/G 比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、GOT、GPT、 γ -GTP、アルカリホスファターゼ、電解質) し、屠殺。その後、胃、小腸、肝臓、腎臓、副睾丸脂肪組織の各重量を測定し、胃、小腸、肝臓、腎臓については、ホルマリン固定し、顕微鏡による病理組織学的検査を行った。なお、病理組織学的検査は、株式会社札幌総合病理研究所に依頼して行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、戸板女子短期大学の動物倫理委員会の規定に則り実施された。

なお、株式会社札幌総合病理研究所からの報告書を資料2に添付する。

【病理組織学的検査報告書】

・株式会社札幌総合病理研究所“マウス70匹の安全性試験”(受託番号:RE-3642)

8. 油脂の酸化と毒性に関する論文の収集と整理

上記研究とあわせて、油脂の酸化と毒性に関する論文も収集・整理した。収集した論文の一覧と主要論文を、資料3に添付する。なお、これら資料を元に作成された、2005年4月開催(オランダ)のCodex委員会提出書類もあわせて資料4に添付した。

C. 研究結果

1. 世界中で入手した即席麺中のAV、およびPVの測定

測定した結果を、x軸にAV、y軸にPVをプロットし、相関を観察した。AVとPVが同時に増加するのであれば、これらプロットは右肩上がりの傾向を示すはずである。そこでAVとPVの相関を、ピアソンの相関係数(Pearson's product-moment coefficient of correlation)にて確認した結果、2因子間に正の相関は全く認められず(相関係数: -0.1083)、逆に相関係数は負の値となった。また、相関係数が絶対値で0.2より小さくなった。

2. 即席麺中の油脂の保存期間中での酸化(PVに対する結果)

①、②、③、⑥の条件では、PVは5meq/kg以下で、賞味期限内(6ヶ月)に食品衛生法で定められた、PV: 30meq/kgの値を超えることはなかった。特にカップ麺ではほとんど変化が起こっていなかった。ところが条件⑤では、袋麺中のPV値

が6ヶ月目で50meq/kgに達した。またカップ麺でも10meq/kg近くまで達していた(条件①のカップ麺の3倍の値)。④の60℃加速試験においては、PV値が40meq/kgを越えた地点から急激なPV上昇が始まり、150meq/kgを超えた時点から減少が始まった。⑦の50℃加速試験においては、PV値が30meq/kgを越えた地点から急激なPV上昇が開始した。

3. 酸化即席麺およびその抽出油の急性毒性試験

試験(1)では、60℃で酸化した即席麺から抽出した油2g(最大投与可能容量)を投与し、経過を観察した。劣化油脂は、60℃で0、4、8、10、12、14、16、18週間劣化させた即席麺から抽出したものを使用した。その結果、脂質酸化が進むに従い、立毛や下痢などの状態が観察されたが、これら現象の変化は過酸化脂質の上昇とは関係なく、PV減少後もこれら状態が観察される頻度が増加した。ただし立毛に関しては、酸化0週間の油脂を用いた場合でも観察され、胃中へ過剰の油脂が強制投与されたことによる物理的な影響が大きいもの判断した。そこで試験(2)を行い、物理的な影響が現れない量(無作用量)を求めた。方法としては投与量を、1g、500mg、250mg、100mgと減少させ、立毛や下痢などが起こるか否かを観察した。結果、250mg投与(体重換算で60kgの人間が即席麺を2.5袋食べたときの摂取油量)で立毛が観察されなくなった。試験(3)では、試験(2)でも求めた投与量を用いて同様の試験を実施した。その結果、12週間以上酸化させた油脂を投与した場合に下痢が起こることが

判明したが、立毛に関しては、18週間酸化させた油脂を投与したときだけ検察された。なお今回の急性毒性試験で、試験期間14日以内での死亡は認められなかった。

一方、最大可能投与量において、即席麺の酸化時間、PV、AVもしくはAnVと、うずくまり状態、自発運動量低下、立毛もしくは下痢の頻度の相関を分析した結果、PV、AV、AnV、酸化期間と下痢、うずくまり延べ数、立毛延べ回数間に優位な相関(回帰分析)は得られなかった。しかし、酸化期間と自発運動量低下(延べ数)との間に優位な相関($p < 0.005$)が得られた。

4. 太陽光線による即席麺の酸化と、各種酸化指標の変化

太陽光線による即席麺の、酸化劣化試験の結果、50℃の恒温器や強制的な光酸化では達成されなかった速度で、即席麺中油脂の酸化が進行することが判明した。この際、過酸化生成において誘導期が観察されなかった。この過酸化の速度は、現在使用されている袋麺のフィルムにより強く抑制された。

5. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いたPICA試験

カオリン摂取量は即席麺の酸化劣化度が進むに従い増加し、PV=138.5meq/kgの油脂でコントロール群と比較して有意な差を認めた。

6. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いた自発運動量低下測定試験

12時間の移動距離を元に自発運動量を測定した結果、PV=107.2meq/kgの油脂でコントロール群と比較して有意な自発

運動量低下を認めた。

7. 太陽光酸化即席麺から抽出した油脂を用いた亜急性毒性試験

太陽光線により酸化劣化させた即席麺より抽出した油脂(PV: 85.0-334.7 meq/kg)を用いて亜急性毒性を行った。結果、28日間の飼育で、雄:一匹、雌:一匹が死亡したが、体毛の脱落や傷が多く認められ、喧嘩により死亡したものと考えられた。マウスの体重増加は、油脂の酸化が進むに従い小さくなったが、成長を妨げるものではなかった。その一方で、肝重量増加、コレステロール値上昇、消化管重量の減少なども観察されたが、これらは油脂の酸化度に依存して増加するというものではなく、酸化油脂投与群全体に観察されたものであった。また病理組織学的検査の結果より、胃で好中球の浸潤、十二指腸で自己融解、肝臓で胆管炎などが認められたが、これらも、油脂の酸化が進むに従い頻度が上がるのではなく、酸化劣化油脂投与群全体で観察されたものであった。

8. 油脂の酸化と毒性に関する論文の収集と整理

油脂酸化と毒性に関する論文を調査した結果、以下の内容が判明した。

①油脂の酸化と毒性に関する研究には大きく2つの流れがある。1つは、1920年代に日本及び米国で始まった、魚油(主にタラ肝油の研究)の毒性に関する研究である。この研究は、魚油の栄養価調査のために行われた研究で、実験動物が斃死することより始まった研究である。魚油の毒性の原因は過酸化脂質であることを、1953年に、日本の金田らが発見し、

「魚油それ自信は毒でないが、その酸化物は毒性を有する」との結論を得た。もう1つの流れは、1940年代に米国で主に行われていた、加熱した植物油および動物脂の栄養価の変化に関する研究である。この実験でも、極度に加熱した油脂を動物へ投与すると成長が妨げられたり、斃死したりすることが観察されていた。これら2つの研究の流れは、1950年代後半より合流し、世界中で油脂の酸化と毒性に関する研究が盛んに行われた。1980年代に入り、生体脂質の酸化と活性酸素の関係が注目され始めると、この分野の中心的な研究者は、生体脂質の酸化の分野にシフトしていき、油脂の酸化と毒性に関する研究はほとんど行われなくなってしまった。

②これまで脂質酸化で毒性が確認されているものとして、過酸化脂質、二次酸化生成物、脂質重合体、環状化脂肪酸がある。その一方で、遊離脂肪酸の強い毒性は観察されていない。過酸化脂質自身の毒性は、毒性を有する他の物質と比較して強くはないが、他の毒性物質は過酸化脂質を経由して生成することより、油脂の酸化による毒性を考慮する際、過酸化脂質は非常に重要である。脂質の二次酸化生成物としては数多くの物質が知られているが、特に毒性が強い成分としては、4-ヒドロキシノネナール、4-ヒドロペルオキシノネナールが報告されている。脂質重合体は、極度に油脂を酸化した場合、もしくは酸素を絶って高温で加熱した場合に多量に生成する毒性物質である。しかしながら、現実的な油脂の使用方法からかなり逸脱した方法で実験が行

われているため、油脂重合体は、実生活で人どの程度意味のあるものかは疑問が残る。環状化脂肪酸も、油脂重合体と同様な条件下で生成する物質であるが、レストランの廃油中に数%含有されているとの報告もあり、油脂の毒性を考慮するに当たり、無視することは出来ない物質といえる。なお、環状化脂肪酸に関する研究は、1990年代まで続けられていた。

③油脂酸化物もしくは油脂の酸化で生成する物質の毒性に関する研究は、主に、一般毒性試験（急性毒性試験、亜急性毒性試験、慢性毒性試験）、細胞毒性試験、遺伝毒性試験で評価されてきた。その結果、PVが400meq/kg以下の酸化劣化油脂は、ほとんど毒性を有しないと報告されてきている。

④昭和39年～40年に日本で発生した即席麺中油脂の食中毒事件では、死者は出ていない。この際、中毒を起こした即席麺中油脂のPVは118meq/kg～1000meq/kgで、かなりの幅があった。ヒト食中毒試験で観察された症状は、嘔吐、吐き気、胃痛、腹痛、下痢、頭痛、悪寒などであった。

D. 考察

1. 世界中で入手した即席麺中のAV、およびPVの測定(完了)

ピアソンの相関係数にて相関を確認したところ、2因子間に正の相関は全く認められず（相関係数：-0.1083）、逆に相関係数は負の値となった。また、相関係数が絶対値で0.2より小さくなった。よってプロットは相関を持たないものと判断された。

これらの結果より、AVを用いてPVを予測することは不可能であること。即席麺中の脂質過酸化の程度を知るためには、AVとは別にPVの測定が必須であり、AVおよびPVの両方を測定する必要があることが判明した。さらに東南アジア諸国の認識は完全な誤りであることも明らかとなった。

2. 即席麺中の油脂の保存期間中での酸化 (PVに対する結果)

⑤の保存試験結果と、①、②、③、⑥の結果との比較より、即席麺中の油脂の酸化劣化には光が大きく関係することが判明した。

また、④の加速試験においては、PV値が40meq/kgを越えた地点から急激なPV上昇が始まり、150meq/kgを超えた時点から減少が始まった。これは、PV=40 meq/kg付近で即席麺中の油脂の抗酸化性が急激に低下したことを意味する。一方、150meq/kgを超えた地点で頭打ちとなったのは、脂質過酸化物の分解速度が脂質過酸化物の生成速度より速くなったためと考えられる。⑦においても結果は同様であった。これらのことより、(あくまでも加速試験のデータであるが、)食品衛生法で定められているPV=30meq/kg以下にPVを抑えれば、即席麺中の油脂の急激な酸化は抑制することが可能であることがわかった。さらにこの値以下に保つことで、過酸化脂質の分解を抑制し、ひいては毒性の強い二次酸化生成物の発生を抑制することが可能となるものと考えられる。

昭和39年～40年に起きた即席麺による食中毒事件では、即席麺中の油脂のPVが、

高いもので1000meq/kg近くまで達していた。これは60℃の保存試験での結果と大きく異なる。この理由として、

1. 実際の即席麺では、保存温度の値が高く、40℃ぐらいの酸化であったため、生成した過酸化脂質の分解が抑制されていたこと。
2. 光による酸化(ene反応)が主であったため、ラジカルを生成することなく過酸化脂質を蓄積したこと。

が考えられる。実際に条件①と⑤の比較でも示した通り、光は過酸化脂質生成に非常に大きな影響を与える。当時の即席麺の販売時における保管状態を考えると、当時は個人商店主体の販売であり、太陽光線に直接曝される機会も多かったものと考えられる。さらにインターネットで当時の即席麺の包装を調べた結果、袋麺の中央部が透明になっており、中の麺を意図的に見せる構造となっていたことも判明した。即席麺はこのことによりさらに太陽光線の影響を強く受けたものと考えられる。

3. 酸化即席麺およびその抽出油の急性毒性試験

即席麺の60℃における強制劣化試験において、PVは8週目まで上昇し、その後減少している。これは8週目以降に急激な二次酸化生成物の生成が開始されたことを意味している。このことより、下痢などの症状は、過酸化脂質の量(PV)よりは二次酸化生成量と関係があるものと推察された。現在、脂質過酸化により発生する毒物としては、4-ヒドロペルオキシ-2-ノネナール、4-ヒドロキシ-2-ノネナール、マロンジアルデヒドなどが知ら

ているが、これらはすべて脂質の二次酸化生成物である。今後、これら生成物と毒性との関係を精査する必要があると考える。酸化期間と自発運動量低下（延べ数）との間に優位な相関（ $p < 0.005$ ）が得られた。このことより、油脂の劣化が進むにつれ、ラットの自発運動量に大きく影響を与える物質が食品中に蓄積してくる可能性が示唆された。

4. 太陽光線による即席麺の酸化と、各種酸化指標の変化

即席麺中の油脂は 30～40℃の酸化においても、光による酸化が加わればその酸化力は相乗的に強くなることが判明した。この結果は、上記の保存試験で考察した内容を支持しているものであった。

5. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いた PICA 試験

40 年前の食中毒事件で、PV=118 meq/kg 程度の即席麺でも食中毒を起こしているが、今回の結果より、PV=100meq/kg 程度の油脂を食した場合でもラットは気持ちが悪くなること、すなわち神経毒性を呈することが判明し、これまで考えられてきたレベルより低い酸化レベルで食中毒は十分起こりうることが示唆された。

6. 酸化劣化即席麺から抽出した油脂を用いた自発運動量低下測定試験

このことから、酸化した油脂を摂取することで、神経毒性を呈し自発運動量が低下するものと考えられた。また同様の結果が、急性毒性試験結果からも得られている。よって本試験からも、PV=100meq/kg程度の油脂は神経毒性を有し、十分食中毒の原因となりうることが示唆され

た。

7. 太陽光酸化即席麺から抽出した油を用いた亜急性毒性試験

亜急性毒性試験結果では、体重増加に影響はあるものの、他の測定項目に関しては、毒性は認められなかった。よって、本試験で使用した酸化劣化油脂には毒性は備わっていないものと判断した。

E. 結論

・AVとPVとの間には相関がないことを明確にし、毒性との関連よりPV測定の必要性を再確認した。

・加速試験で、PV=40meq/kg辺りから急激な酸化が起こることを確認し、食品衛生法で規定されているPV=30meq/kgという値が、急激な酸化を起こす手前の値としてCodexへ提案する値として適切であることが示唆された。

・これまで油脂の酸化と毒性の関係は、主に一般毒性試験で観察されてきた。しかし、40年前の即席麺による食中毒事件において死者は出ておらず、嘔吐や吐き気などの、中枢神経と関連の深い症状のみが観察されている。さらに、食中毒を起こした即席麺中油脂のPVは100meq/kg程度のももあり、この程度の酸化油脂の一般毒性は報告されてこなかった。そこで本試験で神経毒性に関わる、PICA試験と自発運動量低下試験を実施した結果、100meq/kg程度の酸化油脂においても神経毒性症状が観察された。このことより、40年前の食中毒事件は、神経毒性と深く関係があると考えられた。

・PV=100meq/kg程度の酸化劣化油脂は、

一般毒性は呈しないが、神経毒性を呈することを明らかにした。よって食品中油脂のPVを30meq/kg未満に維持しないと、急激な酸化が開始し、短い期間で食品中油脂のPVは100meq/kgに達し、神経毒性症状を呈する危険性があることを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Naohiro Gotoh, Ai Iwasawa, Jiro Yokota and Shun Wada, "Distribution of Peroxide Value and Acid Value in Instant Noodles Collected in the commercial market of the world.", submitting to *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Naohiro Gotoh, Hiroyuki Watanabe, Reiko Osato, Ai Iwasawa, Keiko Inagaki and Shun Wada, "New Sight on the Possibility of the Neurotoxic Behavior Affected by the Oxidized Compounds in Fats and Oils" accepted by *Journal of Oleo Science*.
- Naohiro Gotoh, Hiroyuki Watanabe, Reiko Osato, Ai Iwasawa, Keiko Inagaki and Shun Wada, "Novel approach on the risk assessment of oxidized fats and oils for perspectives of food safety and quality (I) - Oxidized fats and oils induces neurotoxicity relating pica behavior and hypoactivity-"submitting to *Food and Chemical Toxicology*.
- Naohiro Gotoh, Hiroyuki Watanabe, Reiko Osato, Ai Iwasawa, Keiko

Inagaki and Shun Wada, "Novel approach on the risk assessment of oxidized fats and oils for perspectives of food safety and quality (II) - Sub acute toxicity test with oxidized fats and oils -" submitting to *Food and Chemical Toxicology*.

- Naohiro Gotoh, Hiroyuki Watanabe, Reiko Osato, Ai Iwasawa, Keiko Inagaki and Shun Wada, "Variation of factors on oxidation of fats and oils in processed food stored under several kinds of conditions" preparing.
 - Naohiro Gotoh, Hiroyuki Watanabe, Reiko Osato, Ai Iwasawa, Keiko Inagaki and Shun Wada, "Review: Toxicity of oxidized fats and oils" preparing.
- ### 2. 学会発表
- Shun Wada, "The quality and safety evaluation using peroxide value on instant noodles for worldwide distribution." *The 4th World Ramen Summit*, 2004.03.10, Shanghai, China.
 - Naohiro Gotoh, Ai Iwasawa and Shun Wada, "Distribution of Peroxide Value and Acid Value in Instant Noodles Obtained in Asian Countries.", *JS2004*, 2004.05.10, Cincinnati, OH.
 - Naohiro Gotoh, Ai Iwasawa, Keiko Inagaki and Shun Wada, "Oxidation of Fats and Oils Contained in Instant Noodle.", *JOCS -MPOB Joint Symposium*. 2004.11.01, Osaka,

Japan.

- Shun Wada and Naohiro Gotoh,
“Recognition of Lipid Oxidation on
Pre-Cooked Instant Noodle regarding
for Food Safety and Quality.”, *59th
Annual convention and National
Seminar of OTAI*, 2004.12.04, New
Delhi, India.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

資料 1

実験報告書

株式会社富士ジネンテックファーム

試 験 結 果 報 告 書

0 3 - 0 5 5 F G F - 1

株式会社 富士ジネンテックファーム

試験結果報告書

試験番号 No.03-055FGF-1

- 1. 表 題** 『ラットを用いた急性経口投与毒性試験』
- 2. 試験委託者** 社 名：東京海洋大学 海洋科学部 海洋食品科学科 様
住 所：東京都港区港南 4-5-7
代表者：教 授 和 田 俊 様
- 3. 試験受託者** 社 名：株式会社 富士ジネンテックファーム
住 所：山梨県北巨摩郡小淵沢町 10208
代表者：代表取締役社長 仲 澤 政 雄
- 4. 試験実施期間**
- | | |
|-----------|----------------------------------|
| 試験開始日 | 平成 15 年 12 月 9 日 |
| 動物受入日 | 平成 15 年 12 月 9 日 |
| 投 与 日 | 平成 15 年 12 月 17 日 |
| 観察終了(剖検)日 | 平成 15 年 12 月 31 日 |
| 試験期間 | 平成 15 年 12 月 9 日～平成 16 年 4 月 7 日 |
- 5. 使用機器・材料** 本文中に記載
- 6. 試験方法** 本文中に記載
- 7. 試験結果** 本文中に記載
- 8. 添付書類等**
- | | |
|------------------------|-----|
| 1) 経日死亡表 | |
| 2) 一般状態観察表 | |
| 3) 体重測定表 | |
| 4) 投与確認記録の写し | |
| 5) ビデオ撮影記録の写し | |
| 6) 被験物質使用記録の写し | |
| 7) ビデオテープ(投与日撮影) | 1 本 |
| 8) CD-R(剖検写真：第 1～6 回分) | 1 枚 |

以上の通りご報告致します。

平成 16 年 4 月 7 日

株式会社 富士ジネンテックファーム

I 試験目的

本試験は、被験物質の安全性に関する非臨床試験の一環として、ラットに単回経口投与し、その毒性について検討した。

1. 被験物質

(1) 被験物質

1) 名称

- ① 0week めん粉砕物
- ② 0week めん抽出油脂
- ③ 4week めん抽出油脂
- ④ 8week めん抽出油脂
- ⑤ 12week めん抽出油脂

2) 提供者

試験委託者

3) 保管条件

冷暗所

(2) 投与検体

袋麵粉砕物は、必要量を測り取り、乳鉢を用いて細粒化し、媒体(局方注射用蒸留水)で、投与濃度になるよう懸濁して使用した。ラーメン抽出油脂は、試験委託者から提供されたままの状態で使用した。

(3) 被験物質の返却

試験終了後、残量は試験委託者に返却した。但し、調製した袋麵懸濁液は、使用后破棄した。

2. 使用動物および飼育環境

4 週齢のラット、Slc : SD、SPF 雄 28 匹、雌 28 匹を日本エス エル シー株式会社より平成 15 年 12 月 9 日に購入し、受入時に外観の検査を行い全例に異常のないことを確認した後、飼育室へ搬入した。馴化飼育は 8 日間行い、その間一般状態の観察を毎日、体重測定を受入翌日および馴化最終日に実施した。なお、投与日の体重範囲は雄 111.9~125.5g、雌 100.3~112.9g であった。

温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (許容範囲 : $19 \sim 25^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $55 \pm 15\%$ (許容範囲 : $30 \sim 70\%$)、換気回数 12 回/時、明暗時間 12 時間に設定した飼育室で、投与後 24 時間までは金網製ケージ(15×30×17 cm)を用いて、それ以降 14 日まではプラスチック製ケージ(23.5×32.5×17.0cm)を用いて、それぞれ 1 匹ずつ飼育した。飼料は固型飼料 CRF-1(Lot No.030904A3、オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲料水は公共水道水をそれぞれ自由に摂取させた。但し、飼料は投与前日(約 16~18 時間)から投与後約 4 時間まで絶食させ、その後給餌した。

3. 個体およびケージの識別方法

個体識別は、受入翌日に各動物の尾根部に油性マジックで記入する個体番号により行った。ケージには、受入から群分けまでは試験番号および個体番号を記したラベルを、群分け以降はさらに被験物質名および動物番号を記したラベルを付けて識別した。

4. 群分け

馴化最終日に馴化期間中の体重増加および一般状態が良好な動物を雌雄各 25 匹選び、各群の平均体重がなるべく等しくなるよう 5 群 (1 群雌雄各 5 匹) に割り付けた。その後、動物には動物番号を付けた。余剰動物は群分け終了後、試験系から除外した。

5. 投 与

(1) 投与区分

以下の通り 5 群とした。

群	投与区分	投与液量 mL/body	動物数 (動物番号)	
			♂	♀
1	0week めん粉碎物	3.0	5 (111~115)	5 (211~215)
2	0week めん抽出油脂	2.0	5 (121~125)	5 (221~225)
3	4week めん抽出油脂	1.5	5 (131~135)	5 (231~235)
4	8week めん抽出油脂	1.5	5 (141~145)	5 (241~245)
5	12week めん抽出油脂	1.5	5 (151~155)	5 (251~255)

(2) 投与経路および方法

ラット用金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて強制経口投与した。投与は午前中に実施した。なお、投与量(投与液量)は以下の通りとした。

①劣化袋麺：300mg/kg(60mg/3mL/body)、②劣化ラーメン抽出油脂：上記区分表通り

(3) 投与期間

単 回

6. 観察および測定

(1) 一般状態

急性症状ならびに糞便状態について、投与日は投与前、投与直後～投与後 6 時間(投与直後、30分、1、2、3、4、5、6 時間)まで頻繁に、投与翌日以降は投与後 14 日まで 1 日 1 回以上観察した。

(2) 体 重

全例について、投与日の投与前、投与投与後 1、2、4、7 および 14 日(剖検日)に測定した。

(3) ビデオ撮影

全例について、投与後 1 時間および必要に応じて撮影した。

7. 剖 検

各群代表例雌雄各 1 例について、最終観察(投与後 14 日)終了後、過麻酔による安楽死後、主要臓器(心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓)について肉眼的に観察した。なお、代表例雌雄各 1 例については、胸腔および腹腔内の写真撮影を行った。

II 試験結果

1. 経日死亡

経日死亡を Table1 に示した。

全例において、試験期間中死亡は認められなかった。

2. 一般状態

一般状態を Table2-1,2 に示した。

全例において、投与後 1 時間より自発運動の低下、うずくまりおよび立毛が認められ、投与後 3 時間をピークに、それ以降徐々に回復し、投与後 6 時間以降 24 時間でほぼ全例回復した。その後投与後 14 日まで異常は認められなかった。

1 群は、投与後 1 時間に 7/10 例、2 時間 7/10 例、3 時間 10/10 例、4 時間 3/10 例、5 時間 2/10 例、6 時間 1/10 例であった。

2 群は、投与後 1 時間に 8/10 例、2 時間 8/10 例、3 時間 10/10 例、4 時間 9/10 例、5 時間 4/10 例あり、6 時間は認められなかった。

3 群は、投与後 1 時間に 7/10 例、2 時間 5/10 例、3 時間 10/10 例、4 時間 6/10 例、5 時間 5/10 例(内 1 例は自発運動の低下のみ)、6 時間 1/10 例であった。

4群は、投与後1時間に6/10例、2時間9/10例、3時間10/10例、4時間7/10例、5時間6/10例、6時間5/10例、投与後第1日1/10例であった。

5群は、投与後1時間に6/10例、2時間10/10例(内1例横臥位含む)、3時間10/10例、4時間5/10例、5時間4/10例、6時間5/10例、投与後第1日1/10例であった。

この他、A.No.221(投与後1,3,6時間)、A.No.135(投与後1,3,6時間)、A.No.241(投与後1,6時間)、A.No.153(投与後6時間)、A.No.155(投与後1,3,6時間)、A.No.252(投与後6時間)、A.No.253(投与後6時間)、A.No.254(投与後4時間)、A.No.255(投与後6時間)に水様便、軟便あるいは粘液便が観察された。

3. 体重

体重をTable3-1,2に示した。

全例において、特に顕著な変化は認められなかった。

4. 剖検所見

各群代表例において、特に異常は認められなかった。

III 結論

全雌雄5群共に死亡例はなかった。

全雌雄動物において、投与後3時間をピークとして投与後1時間から自発運動の低下、立毛およびうずくまりが認められ、その後徐々に回復し、投与後6時間では上記症状は1,2および3群はほぼ終息した。2および3群で投与後3,6時間に軟便あるいは水様便を散見した。4および5群は上記症状を投与後6時間まで持続し、投与後3~6時間に粘液便、軟便、水様便を認めた。

IV 試験委託者の署名

東京海洋大学 海洋科学科 海洋食品科学科

氏名:

年 月 日

V 試験受託者の署名

株式会社 富士ジネンテックファーム

氏名:

2004年4月7日

中澤政広 