

健康食品に関する有害事象の聞き取り票（追加様式1）

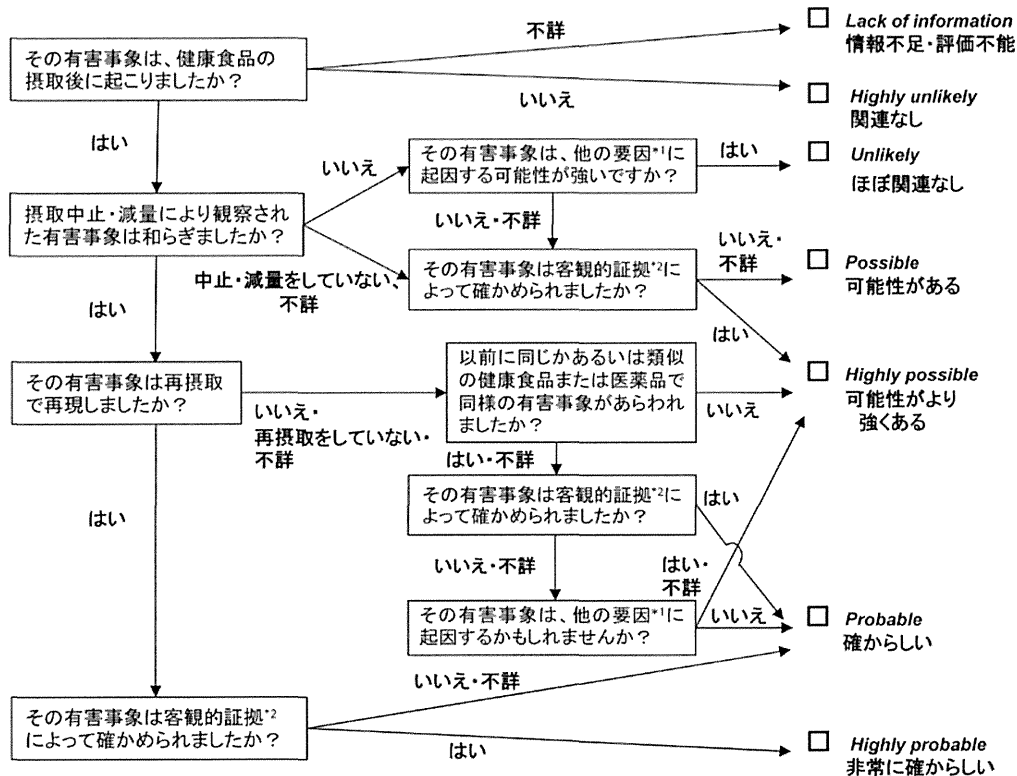
該当箇所に○印または空欄に記入してください。従来の「受付票」にもある項目で、重複するときはこの票に記入する必要はありません。この票は必要な情報項目を示したもので詳しい情報の収集を制限するものではありません。

ID	聞き取り日	2013年	月	日
報告者（該当に○）	本人	家族	医療関係者	その他（ ）
**** 以下は有害事象を受けた人に関する情報 ****				
1	性別（該当に○）	男	女	不詳
2	年齢	歳代		
3	居住地	郵便番号、住所、固定電話の市外局番のいずれか		
4	製品名			
5	症状 （該当に○ または記入）	発疹・発赤・掻痒 吐き気・嘔吐 胃痛・腹痛 下痢 便秘 肝機能障害（肝機能検査値の上昇） 腎機能障害（むくみ、尿タンパクの出現） 呼吸器障害（息切れ、呼吸困難） 循環器障害（血圧上昇、動悸・頻脈） 神経障害（頭痛、めまい） 血液障害（貧血症状、出血症状） その他（ ）		
6	症状の発生時期	年	月	日
7	医療機関受診 （該当に○または 記入）	無	有（医学的検査： 無 有）	不詳
8	転帰（該当に○）	自然治癒	外来で治療	入院 後遺症 死亡 （ 年 月 日）
9	製品の摂取状況 （該当箇所に記入） （該当に○）	期間 年 月 日 から 年 月 日 まで 摂取量 錠・カプセル・包（粉末） 摂取頻度 回 日 / 週 減量・中止の有無： 無 有 （減量・中止後の症状： 改善 変化なし 不詳） 再摂取の有無： 無 有		
10	他の 健康食品・医薬品の 併用状況 （該当に○ または記入）	健康食品 無 有（製品名： ）	不詳	
		医薬品 無 有（製品名： ）		
11	基礎疾患・体質 （該当に○ または記入）	基礎疾患： 無 有 （疾患名： ）	不詳	
		アレルギー体質： 無 有 （食物・医薬品・花粉・ハウスダスト）		
相談者からの返品の要求（参考情報）（該当に○）		無	有	不詳

図1 有害事象の「聞き取り票」

因果関係評価票 (I と II の両方を評価) 追加様式2
 <Shizuoka Adverse Reaction Causality Assessment Tool for Health Food>¹⁾

I: ここから開始して評価してください。
 (□のチェックボックスにレ点を入れてください。)



*1 他の要因としては、基礎疾患や合併症の病態、併用薬やほかの健康食品の摂取、年齢などを考慮します。
 *2 客観的証拠とは、当該健康食品に含まれる成分に関してDLST、パッチテストなどの特異的な検査によって確認されたものです。

II: 健康被害の重篤度²⁾をチェックしてください。

- 軽微な健康被害と考えられるもの
- 軽度な健康被害と考えられるもの(例: 医療機関で治療を要した。)
- 中等度の健康被害と考えられるもの(重篤ではないが軽度でもない。)(例: 30日以上の治療、または入院・入院の延長を要するものなど)
- (死亡・後遺症を残すなど)重篤な健康被害と考えられるもの

参考文献: 1) 山田 浩ほか. 臨床薬理. 2012; 43(6):399-402.
 2) 副作用の重篤度分類基準. 厚生労働省課長通知 平成4年6月29日薬安第80号

図2 因果関係評価法 (樹枝状アルゴリズム)

調査方法—聞き取り手順

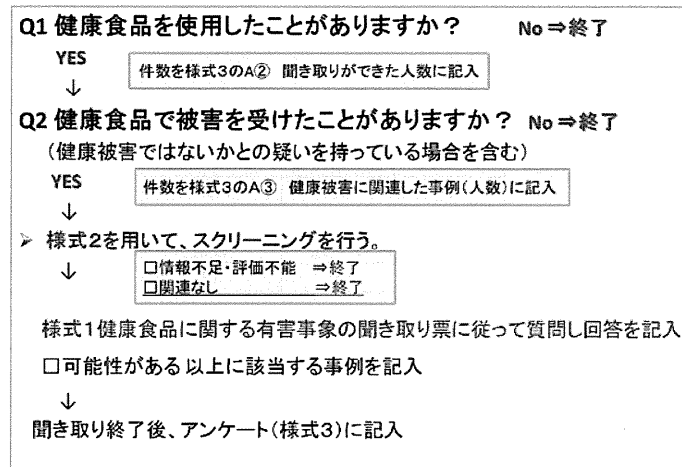


図3 薬局における健康被害の聞き取り手順など

有害事象(苦情)の聞き取り票に関するアンケート(様式3)

健康食品に関する有害事象(苦情)の聞き取り票(以下、「聞き取り票」と有害事象の「因果関係評価票」)についてお答えください。

A. 「聞き取り票」の内容及び使用した際の影響についてお答えください。

1. 聞き取り項目数と内容について

あてはまるところに○を付けてください。

a. 多すぎる b. 妥当である c. 少なすぎる

2. 現状と比較したときの、各聞き取り項目に関する聞き取りの難易度について

あてはまるところに○を付けてください。

1 性別	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
2 年齢	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
3 居住地	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
4 製品名	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
5 症状	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
6 症状の発生時期	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
7 医療機関受診	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
8 転帰	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
9 製品の摂取状況	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
10 他の健康食品・医薬品の併用状況	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易
11 基礎疾患・体質	a. 難	b. やや難	c. 普通	d. やや易	e. 易

3. 「聞き取り票」を使用したときの聞き取り作業への影響について

あてはまるところに○を付けてください。

a. 聞き取りやすくなる b. 変わらない c. 聞き取りにくくなる

B. 消費者からの相談への対応として、「因果関係評価票」の利用についてお答えください

1. 「因果関係評価票」の消費者対応への影響について

あてはまるところに○を付けてください。

a. 役立つ b. 変わらない c. 役立たない

2. 有害事象の扱いと厚生労働省への報告のしやすさについて

あてはまるところに○を付けてください。

a. 報告しやすくなる b. 変わらない c. 報告しにくくなる

C. 消費者からの「聞き取り票」と「因果関係評価票」の両方について、改善点や問題点などがあればご意見をご記入ください。(あるいは、メール umegaki@nih.go.jp 件名:有害事象評価の意見、でお知らせください。)

図4 「聞き取り票」と「樹枝状アルゴリズム(因果関係評価票)」の実用性に関するアンケート

A 「聞き取り票」について

聞き取り項目数と内容について	多すぎる	妥当である	少なすぎる		
	0	17	0		
聞き取りの難易度: 性別	難 0	やや難 0	普通 13	やや易 0	易 4
聞き取りの難易度: 年齢	難 0	やや難 0	普通 14	やや易 0	易 3
聞き取りの難易度: 居住地	難 0	やや難 0	普通 14	やや易 0	易 3
聞き取りの難易度: 製品名	難 0	やや難 0	普通 14	やや易 0	易 3
聞き取りの難易度: 症状	難 0	やや難 4	普通 8	やや易 4	易 1
聞き取りの難易度: 症状の発生時期	難 1	やや難 0	普通 12	やや易 3	易 1
聞き取りの難易度: 医療機関受診	難 0	やや難 0	普通 13	やや易 2	易 2
聞き取りの難易度: 転帰	難 1	やや難 0	普通 11	やや易 4	易 1
聞き取りの難易度: 製品の摂取状況	難 1	やや難 1	普通 8	やや易 6	易 1
聞き取りの難易度: 他の健康食品・医薬品の併用状況	難 1	やや難 0	普通 10	やや易 5	易 1
聞き取りの難易度: 基礎疾患・体質	難 0	やや難 2	普通 8	やや易 5	易 2
聞き取り票を使用した時の聞き取り 作業への影響について	聞き取りやすくなる 9		変わらない 7	聞き取りにくくなる 0	未回答 1

B 「因果関係評価票」について

「因果関係評価票」の消費者対応の 影響について	役立つ 10	変わらない 4	役立たない 3	
有害事象の扱いと報告のしやすさ について	役立つ 5	変わらない 9	報告しにくくなる 2	未回答 1

図5 保健所担当者の「情報の聞き取り票」と「樹枝状アルゴリズム(因果関係評価票)」の印象(n=17)

A 「聞き取り票」について						
聞き取り項目数と内容について	多すぎる	妥当である	少なすぎる	未回答		
	46	86	0	3		
聞き取りの難易度: 性別	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	0	0	42	4	88	1
聞き取りの難易度: 年齢	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	0	2	47	8	77	1
聞き取りの難易度: 居住地	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	1	4	52	21	56	1
聞き取りの難易度: 製品名	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	20	50	44	13	7	1
聞き取りの難易度: 症状	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	3	19	67	30	14	2
聞き取りの難易度: 症状の発生時期	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	21	54	42	13	3	2
聞き取りの難易度: 医療機関受診	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	5	14	65	25	24	2
聞き取りの難易度: 転帰	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	13	29	60	22	9	2
聞き取りの難易度: 製品の摂取状況	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	14	41	50	17	11	2
聞き取りの難易度: 他の健康食品・医薬品の併用状況	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	14	27	61	23	8	2
聞き取りの難易度: 基礎疾患・体質	難	やや難	普通	やや易	易	未回答
	4	25	68	23	13	2
聞き取り票を使用した時の聞き取り作業への影響について	聞き取りやすくなる	変わらない	聞き取りにくくなる	未回答		
	86	36	11	2		
B 「因果関係評価票」について						
「因果関係評価票」の消費者対応の影響について	役立つ	変わらない	役立たない	未回答		
	92	40	2	1		
有害事象の扱いと報告のしやすさについて	役立つ	変わらない	報告しにくくなる	未回答		
	89	37	8	1		

図 6 薬局薬剤師の「情報の聞き取り票」と「樹枝状アルゴリズム (因果関係評価票)」の印象 (n=135)

聞き取り票・因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)についての意見

(保健所関係)

【因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)の利用について】

- ・聞き取りを実施したが、該当者はなかった。
- ・食品の情報については、従来の受付票と同様に賞味期限、製造者(販売者)などの詳細な情報が記入できると情報が集約されてよい。医師の診断名や所見についても記入できると、症状との因果関係の程度がわかる。(役立たないと評価したところの意見)
- ・入院患者で持参薬の識別を行う際に、健康食品を合わせて持参してくる方があるので、その機会をもらえて聞き取りを実施しようとしたが、該当者はなかった。3人の患者に健康食品の摂取の有無を尋ねたが、摂取経験はあるものの特に変化はなかったとの回答。有害事象の聞き取りは詳細であるべきだが、あまり細かすぎると一般消費者には不安を助長する可能性もある。(役立たないと評価したところの意見)
- ・当事者からの情報の聞きだし方によって因果関係に変動が生じてくる可能性があるため、検討が必要だと思われる。聞き取り票が従来の健康被害受付処理票に変わるのであれば使いやすいものとなるが、当事者にとって自覚の難しい項目や、医療機関を受信した結果があつての記載可能な項目等が混在しているので内容については、もう少し検討する必要があるのではないかと。事例を照らし合わせたところ矛盾が生じた(役立たないと評価した保健所の意見)
- ・実施期間内に健康被害に関する問い合わせがなかったので、書式は使用していないが、受付処理票1枚で全て聞き取りができる形式にした方が使いやすいと思われる。
- ・実際に使用した事例がないので、現時点で意見はない。
- ・専門用語が多いため、分かり難い部分がある(例:DLST)。健康被害受付処理票と聞き取り票が1枚にまとまった票であると、聞き取りやすい。今回の実施期間中に健康食品に関する有害事象がなかったため、実際に使用した事例はない。

【厚労省への報告のしやすさについて】

- ・1名の有症事例について、評価票により因果関係の有無を評価するのは、疫学調査の考え方と離れているので、監視員に浸透しにくいのではないか。「他の要因に起因する可能性」や「健康被害の重症度」など、医師の所見が必要かと思われる項目については、届出者や監視員が記入するのは難しいと思われる。(報告しにくくなると評価したところの意見)

(薬局)

【因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)】に関する意見・感想

- ・スクリーニングを目的に使用するには、使いやすいものだったと思う。
- ・有害事象が健食摂取による可能性の判断として有効に使用できる。
- ・何も無い状態から聞き取るのではなく、ある程度目安となる症状があつたり、聞く順番がフローチャートになっていたりするので、聞き取りやすいように思った。
- ・因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)により、事象が聞きとれた場合は有効となるが、その前段階(販売時)での確認伝達が必要ではないかと感じた。
- ・すっきり見やすくしてほしい。
- ・健康食品を利用している患者が少なく、十分な評価ができなかった。
- ・客観的証拠を患者さんに推奨してもその後、フォローできるか?が課題です。

【聞き取り票】に関する意見・感想

- ・「居住地」記載の必要性が理解しにくい。
- ・項目によっては聴取が難しいものもあると感じた(「製品の摂取状況」、「他の健康食品・医薬品の併用状況」、「基礎疾患・体質」の3項目)。
- ・「他の健康食品・医薬品の併用状況」欄は、数多くの併用が考えられる為、記載欄をより大きく確保してほしい。
- ・過去の事例の聞き取りだと年月日が不明であるケースが多くなると思われる。直近で起きた場合は、聞き取り票を上手く活用出来る。
- ・アンケート内容が過去に遡るので、記憶が詳細さに欠ける。質問も答え易い工夫が必要だと思う。(例;製品の摂取状況の期間 ○年○月○日～○年○月○日 だけでなく、「○年○月頃～○日間服用」にする。)
- ・患者情報の内容をもう少し詳しく記入できるようにしてほしい。
ex. 副作用歴、併用薬、他の健食摂取状況、食生活、アルコール、タバコの摂取状況など
- ・薬局では、重篤度までは不明な事も多いと感じた。
- ・患者の体格により過量摂取と考えられる事もあるので、身長、体重欄があつた方がよい。
- ・自由に書ける欄が少ないと感じた。
- ・大変詳しい情報を得るには適している。
- ・都薬版「情報共有シート」との比較に関して・・・因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)で健康食品による有害事象の可能性の判断がつかうので、聞き取り票への記載はスムーズになる。このため、都薬版と比べて記載し易いと思う。「聞き取り票」の方が内容が具体的であるが、「情報共有シート」がB5判でなくA4判だったら、それほど違いはないような気がする。都薬版より今回の「聞き取り票」の方が書きやすいように思う。・都薬版より今回の「聞き取り票」の方が気軽に記入できるように感じた。都薬版は、チェックする項目が多すぎると感じた。必要な項目を記入し、それに対して報告する方が記入し易いと感じた。・都薬版は、摂取品と患者情報がわかれているが、「聞き取り票」は聞き取っていく順になっていて、確認しながらの記入がスムーズだった。「症状」、「重篤度」の項は、都薬版と比較して記入しやすと思う。
- ・市中で相談を受ける場合、肝機能検査値上昇、尿たんぱくなどは、医療機関でないと症状としてとらえるのは難しい。
- ・肝機能検査値上昇→倦怠感という症状で置き換えるの
- ・尿たんぱくの出現→尿が泡立つようになった(サポニンなども関係するため難しい?)

【その他】

- ・健康食品の製品名をきちんと答えられる方が少なかった。
- ・意外に健康食品を利用している人が多いと感じた。
- ・今回アンケートを取った事で、健康食品の摂取状況について一度確認して薬歴に記載しても、更新していないケースが多々あることに気付いた。頻度を決めて再確認する必要があると認識した。
- ・精神疾患の患者に慣れない質問をするには、十分な配慮が必要となるため、実施困難であった。
- ・有害事象があつた方はいなかったため、因果関係評価法(樹枝状アルゴリズム)、聞き取り票、ともにあまり活用できなかったが、必要時に系統立てて確認、報告ができるので必要なものだと考えた。
- ・健康被害の重症度チェックは、治療、後遺症、死亡などの情報は、医療機関より情報を収集するのが課題である。
- ・健康食品を販売しているところでは、健康被害について質問すると不安を煽ることになり、聞きづらい。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

肝臓とくに薬物代謝酵素（cytochrome P450: CYP）の活性・遺伝子発現等
への影響を指標とするハーブ製品の安全性評価法に関する研究

研究分担者 志村二三夫 十文字学園女子大学
研究協力者 山崎 優子 十文字学園女子大学
佐々木菜穂 十文字学園女子大学
端田 寛子 昭和学院短期大学

研究要旨

ハーブ類を素材とする製品には、植物の多彩な二次代謝産物を関与成分とし、抽出・部分精製等の操作によって成分を濃縮し、ソフトゲルや錠剤等の形状で利用するものが多い。恐らくそのために、ハーブ製品の利用にともなう健康被害は、脂溶性生体異物の処理器官である肝臓を標的とするものが多い。そこで、製品の品質と原材料の安全性に関する研究の一環として、今年度はこれまでの成果を踏まえ、下記2つのアプローチから動物実験を進めた。

I. 肝臓への有害作用のメカニズムから見た安全性に関する研究

一昨年度の報告書で触れたコレウス・フォルスコリエキス（CFE）投与マウスで生じる脂肪肝の発症メカニズムについて脂肪代謝関連遺伝子の発現を詳しく検討し、CFEが Pparg、Cidec/FSP27、Elov16 等の発現を著しく、また ACC β 等の遺伝子発現を上昇させることが明確となり、論文発表を行った。

II. 肝臓とくに薬物代謝酵素（cytochrome P450: CYP）の活性・遺伝子発現等への影響を指標とする安全性評価法に関する研究： 食品添加物の無毒性量（NOAEL）から一日許容摂取量（ADI）を算出する際に、通常、不確定係数として100を用いることを参考に、製品の一日摂取目安量の100倍量を実験動物に投与してその影響を調べる。

1. バターバー（Butterbur : Petasites hybridus）について

平成25年度の研究では、インターネット通販で購入したソフトゲル製品（2種）を投与したラットで、肝重量の軽度増大、CYP2B 遺伝子発現の軽度亢進とともに、 $\alpha 2$ μ グロブリンの蓄積によると推定される腎尿細管硝子滴沈着を生じた。一方、ハードカプセル製品1種について行った今年度の研究では、このような所見はなかった。同じ素材を謳っていても、製品ごとに、もたらされる生体応答が大きく異なることが明らかとなった。

2. アマチャヅル（Sweet tea vine : Gynostemma pentaphyllum）について

米国のインターネットサイトから購入したハードカプセル製品（GP-US）を一日摂取目安量の100倍量で投与したSDラットでは、肝重量には変化はなかったが、4種のアルコキシレゾルフィン-デアルキラーゼ活性全てが、有意に上昇した。ただし、mRNAレベルでの遺伝子発現については、CYP1Aの軽微な上昇が認められた。2型糖尿病モデルのGKラットでは、CYP1A1・CYP1A2 遺伝子発現が軽度ではあるが有意に上昇した。ベトナムの店舗で購入した製品（GP-VN）を投与したSDラットにおいても概ね同様の結果であったが、GP-USに比べて影響がやや強かった。肝CYP遺伝子の発現における製品また実験動物の系統の差が明らかになった。

以上より、ハーブ製品の安全性確保には、事業者サイドにおいて、個別製品を対象に、本研究で示した方法に準じて、肝臓とくにCYPへの影響を指標とする安全性評価試験を実施し、結果に応じた対策を立てることが有益であると提案する。

A. 研究目的

研究 I：有害事象のメカニズムから見た安全性に関する研究

コレウス・フォルスコリ (Coleus forskohlii) エキスについてコレウス・フォルスコリエキス (CFE) 投与マウスでは、肝機能障害・CYP 活性の増大とともに、脂肪肝を生じる。CFE の特徴的成分であるフォルスコリンは、このような作用を示さない。脂肪肝発症の機序について、初年度の報告書では、PPAR γ 、ACC β 、ELOVL6、FSP27/Cidec の発現を上昇させる可能性があることの概略に触れた。今年度は、英文専門学術誌に公表できるよう、この知見を点検・確認した。

研究 II - 1：肝臓とくに薬物代謝酵素 (cytochrome P450: CYP) の活性・遺伝子発現等への影響を指標とする安全性評価法に関する研究バターバー (Butterbur: Petasites hybridus) について

厚生労働省は 2012 年 2 月に、英国医薬品庁がバターバーについて自主回収等の措置を講じていることを受け、バターバーまたはバターバーを含む食品の摂取については、消費者に対し念のため控えるよう注意喚起するとともに、事業者に対し当面販売を中止するよう指導した。一方、この通知にやや遅れて、the American Academy of Neurology and the American Headache Society の品質基準小委員会によるシスマティックレビューでは、バターバーは片頭痛の予防に有効であり、片頭痛発作の頻度および重篤度を低下させるために患者に推奨すべきであるとし、有効性を高水準のレベル A と評価されている。Canadian Headache Society Prophylactic Guidelines Development Group も、片頭痛に対して利用を強く推奨している 11 種の予防薬等の 1 つにバターバーを上げている。バターバー北米では人気が高く、日本でも米国のダイエタリーサプリメント製品をインターネット取引で入手できる。

その有効性や安全性に関して、国立健

康・栄養研究所の「健康食品」の素材情報データベースでは次のように記載されている。“俗に「鼻づまり、花粉症によい」「片頭痛によい」「尿管の炎症によい」などといわれている。ヒトでの有効性については、ドイツのコミッション E モノグラフ (薬用植物評価委員会) が尿路の急性の痙れん痛に対する使用を承認している。また、特定の製剤では片頭痛に対する有効性が示唆されている。安全性については、ピロリジジナルカロイドを含有する製品はおそらく危険と思われる。また、ピロリジジナルカロイドを除去した製品でも肝障害が報告されたためヨーロッパ諸国ではバターバー製品は承認されていないか、制限されている。欧州評議会のカテゴリーでは「食品では使用されない」とされている。妊娠中・授乳中の摂取は避けたほうがよい。”

バターバーの食薬区分に関しては、日本では「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料)」にも「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質 (原材料)」にも該当しない。欧州評議会 (Council of Europe) のカテゴリーでは「食品では使用されない」 (not used in food) とされている。しかし、米国ではソフトゲル等の形状のバターバー製品が新型食品の一つのジャンルである dietary supplement として販売されている。したがって、バターバー製品はインターネット取引によって日本国内でも入手できる可能性がある。ただし、その安全性評価のために行われた試験研究ほとんど見当たらない。

一方、著者らは、重篤な肝障害を多発させたカバ (Piper methysticum) 製品について、食品添加物のリスク評価の考え方を参考とし、また環境化学物質への経口曝露の鋭敏な指標とされる肝臓における CYP1A の遺伝子発現への影響を評価指標として検討した。その結果、製品の一日摂取目安量は、食品添加物等について設定されている許容一日摂取量 (ADI) を超

過している可能性が示された。

食品添加物のリスク評価では、動物試験で得られた無毒性量 (NOAEL) を不確実係数 (通常は 100) で割ることによって、ヒトが一生にわたり毎日摂取しても健康上悪影響がないと推定される最大摂取量である ADI が重量 / 体重 kg / 日として設定されている。不確実係数 100 は、動物試験における NOAEL をヒトへと外挿して ADI を設定する際に、経験的に種の違いによる毒性の差 (種差) は 10 倍を超えず、また個体の違いによる毒性の差も 10 倍を超えないということで、両者を乗算して設定された値である。

これらを勘案し、平成 25 年度の研究では、バターバーのソフトゲル製品 2 種について、一日摂取目安量の 100 倍量 (体重 kg 当たり) をラットに投与する試験を行った。その結果、肝重量の軽度増大、CYP2B 遺伝子発現の軽度亢進とともに、 $\alpha 2\mu$ グロブリンの蓄積によると推定される腎尿細管硝子滴沈着を生じた。そこで今年度は、ハードカプセル製品 1 種について試験を行い、このような影響がバターバー製品に普遍的なものかどうかを明らかにすることを目的とした。

研究 II - 2 : 肝臓とくに薬物代謝酵素 (cytochrome P450: CYP) の活性・遺伝子発現等への影響を指標とする安全性評価法に関する研究: アマチャヅル (Sweet Tea Vine : *Gynostemma pentaphyllum*) について

国立健康・栄養研究所のウェブページには、概ね次のような記載がある。アマチャヅルは、東～東南アジアに分布するウリ科アマチャヅル属の多年生、つる性草本植物で、乾燥葉を薬用部分として使用する。中国語名は絞股藍で、古くから咳や慢性気管支炎の民間療法に使われてきた。短期間の適切な摂取については安全性が示唆されているが、ヒトでの有効性については、信頼できる十分なデータは見当たらない。

一方、近年、ベトナムの研究者によっ

て、ヒト対象無作為化二重盲検において、アマチャヅルの耐糖能改善効果が報告されている。また、アマチャヅルないしその成分によるインスリン分泌能の改善、インスリン作用の増強等を示す動物試験、無細胞系での成績がやはりベトナムの研究者によって報告されており、ベトナムではアマチャヅルの人気が高まっているようである。

アマチャヅル製品はアメリカではダイエタリーサプリメントとして販売されており、日本でも大手のインターネット取引サイトから入手可能である。しかし、アマチャヅル製品の安全性試験はほとんど行われていない。そこで、食品添加物の安全性評価法を参考に、肝臓とくに CYP の活性・遺伝子発現等への影響を指標に取り入れた手法の妥当性を検討することを目的に、アマチャヅル製品を被験物として動物実験を行った。

B. 研究方法

研究 I

研究発表リスト 1-1) に記載のとおりを実施した。

研究 II - 1

(1) 試薬等

米国ブランドのバターバー抽出物のハードカプセル製品 (BBE3) は、インターネット通販により購入した。1 カプセル中にペタシン含有率 15% で規格化された根抽出物を 75mg 含み、1 日摂取目安量は 2 カプセル (抽出物として 150mg) である。CYP 酵素活性の測定には、蛍光源基質として、

7-ethoxyresorufin (ER) 、
methoxyresorufin (MR)、
pentoxyresorufin (PR)、
benzyloxyresorufin (BR)
dibenzylfluorescein (DBF) を用いた。

(2) 動物実験

体重約 200 g の SD 系雄ラットを(株)埼玉実験動物供給所より入手し、飲用水、AIN93G 飼料 (オリエンタル酵母製) は自由に摂取させた。

ハードカプセルより取り出したバターバー抽出物はプールして、25mg/mlとなるよう純水に懸濁し、サフィード・フィーディングチューブ Fr. 5 (テルモ)を用いて、1ml/100 g BWの割合でラット胃内に投与した。ラットへの投与量は、ヒトの体重を60 kgと仮定し、ヒト一日摂取目安量の100倍量(250mg/kg)となるように設定し、1日1回(11-13時)、8日間、反復投与した。対照群には同量の純水を投与した。

飼育最終日の前日より絶食(~18時間)させたラットを熟練者が物理的に安楽死させ、血液を採取した後、臓器を速やかに摘出し、質重量を測定した。組織病理検査用の試料は、10%ホルマリン中で固定させた。total RNA調製用の試料は、RNAlater RNA Stabilization Reagent中に保存した。

(3) 肝臓・腎臓の病理組織学的検査

ホルマリン固定した肝臓および腎臓試料について、(株)札幌病理研究所にHE染色組織標本の作成および病理組織学的検査を委託した。

(4) 肝臓マイクロソーム画分の調製

新鮮肝臓組織1 gより常法にて調製し0.5 mLの50 mM Tris-HCl/1 mM EDTA/1 mM DTT/20% (v/v) glycerol、pH 7.4に懸濁させてマイクロソーム画分とし、使用時まで-80°Cに保存した。

(5) CYP分子種の酵素活性の測定

CYP分子種の酵素活性は、resorufin誘導体の蛍光原基質alkoxyresorufinを用いalkoxyresorufin O-dealkylase (EROD、MROD、PROD、BROD)活性を測定するKennedyらの方法、あるいは蛍光原基質DBFを用いてdibenzylfluorescein-debenzylase (DBFDB)活性を測定するStresserらの方法に準じて測定した。ただし、それぞれの原法がエンドポイントアッセイであるのに対して、本研究ではMx3000PリアルタイムPCR装置を蛍光マイクロプレートリーダー

一として利用し、反応産物の増加に伴う蛍光強度の増加を経時的にモニターするレートアッセイ法に改良して測定した。

(6) Real-time RT-PCR法によるCYP分子種のmRNA発現量の解析

Total RNAは、RNAlater Stabilization Reagent中に保存しておいた肝臓組織細片より、自動核酸抽出システムQuick Gene-800 (Fuji film)を用いて抽出した。RNA濃度および純度(A260/A280=1.8~2.0)は、NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies、Inc. DE、USA)を用いて測定した。

Real-time RT-PCR法によるCYP分子種のmRNA発現量は、SYBR Greenベースのインターカレーション法によるOne-Step SYBR RT-PCR kit (Takara Bio)を使用し、Mx3000PリアルタイムPCRシステムを用いて測定した。

Real-time RT-PCRに用いたプライマーは、GenBankより得た対象遺伝子のDNA塩基配列をもとにタカラバイオのPerfect Real-Time Primer検索(<http://www.takara-bio.co.jp/realtime/search.php>)を用いて得た同社推奨の配列とし、同社に合成を依頼した。

Real-time RT-PCRによるmRNAの発現量の解析では、増幅が指数関数的に起こる領域で、増幅産物が一定量に達するサイクル数(threshold cycle ; Ct値)を用いて算出し、ハウスキーピング遺伝子としてGapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子を採用し、Gapdh mRNAに対する標的遺伝子のmRNAの量比を算出し、定量的に解析した。

(7) 統計解析

統計解析にはソフトウェアSPSS Ver.17.0 (SPSS Inc.、Japan)を用いた。各群間における平均値の差の検定については、一元配置分散分析のDunnnettの下位検定を実施し、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

(8) 動物実験委員会の承認

本動物実験は、十文字学園女子大学・同短期大学部全学委員会通則規定に定める動物実験委員会による承認を得た上で、関連指針・規定等を遵守して実施した。

研究 II-2

ハードカプセル入りのアマチャヅル製品を用いた。米国ブランドの抽出物製品 (GP-US) はインターネット通販により入手し、ベトナムブランドの乾燥葉粉末製品 (GP-VN) は現地の栄養学研究者がハノイの店頭で購入したものを用いた。GP-US の 1 日摂取目安量は 1 カプセル (抽出物として 250mg)、GP-VN の 1 日摂取目安量は最大で 6 カプセル (乾燥葉粉末として 3.6g) であった。

体重約 200 g の SD 系雄ラットは(株)埼玉実験動物供給所より、また GK (Goto-Kakizaki : II 型糖尿病自然発症モデル) および Wistar 系雄ラット (10 週齢) は(株)日本エスエルシー株式会社より入手した。

ハードカプセルより取り出してプールした GP-US は 41.7mg/ml となるように、GP-VN は 600 mg/ml となるように、純水に懸濁し、サフィード・フィーディングチューブ Fr. 5 (テルモ) を用いて、1ml/100 g BW の割合でラット胃内に投与した。ラットへの投与量は、ヒトの体重を 60 kg と仮定し、ヒト一日摂取目安量の 100 倍量となるように設定し、1 日 1 回 (11-13 時)、8 日間、反復投与した。対照群には同量の純水を投与した。

GP-US の試験は SD ラットおよび GK ラットで、GP-VN の試験は SD ラットのみで行った。

ラットは、イソフルラン麻酔下で腹大動脈からの全採血により安楽死させた。

他の方法は II-1 と同様に実施した。

C. 研究結果

研究 I

詳細は研究発表リスト 1-1) に述べたが、結果を取りまとめると表 1 のとおりである。

研究 II-1

BBC を、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量で、ラットの胃内に 8 日間反復投与した場合、腎臓の相対重量が対照群に比べて軽度ではあるが有意に低下していた (対照群、 $0.85 \pm 0.01\text{g}/100\text{g BW}$: BBC 群、 $0.76 \pm 0.04\text{g}/100\text{g BW}$) が、体重増加、肝臓実重量・相対重量等には有意差は認められなかった。

肝臓および腎臓の病理組織学的検査所見には BBC 投与の影響は認められなかった。

BBC 投与群の肝臓ミクロソームでは、対象群と比較して、PROD 活性が対照群の 1.6 倍と有意な増加を示したが、MROD、PROD、BROD、DBFDB の活性には有意な群間差は認められなかった。

CYP2B2 および CYP3A2 の mRNA 発現はいずれも、BBC 投与群では対照群の約 45% へと有意な低下を示したが、その他の CYP 分子種の発現には有意な影響は認められなかった。

これらの結果の一部は、表 1 に示した。

研究 II-2

GP-US を、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量で、SD 系雄ラットの胃内に 8 日間反復投与した場合、体重増加、臓器重量への有意な影響はなかった。

肝ミクロソームの CYP 活性については、DBFB には群間差はなかったが、EROD (5.5 倍)、MROD (3.9 倍)、PROD (4.3 倍)、BROD (2.5 倍) は GP-US 投与群で有意に高かった。

一方、CYP 遺伝子の mRNA レベルでの発現に関しては、CYP 1A2 が GP-US 群で対照群の 3.6 倍と有意に増大し、CYP1A1 は上昇傾向にあったが、CYP2B、CYP3A その他主要な CYP には群間差は認められなかった。

Wistar 系および GK ラットを用いた実験においても、SD 系ラットの場合とほぼ同じ結果が得られた。すなわち、体重増加、臓器重量への GP-US の影響は認められなかったが、EROD、MROD、PROD、

BROD 活性は GP-US 投与群で有意に高かった。CYP 1 A2 遺伝子の mRNA レベルでの発現も、Wistar 系および GK ラットのいずれにおいても GP-US 群で有意な増大を示した。なお、CYP1A1 の発現への GP-US 投与の影響は、Wistar 系では認められなかったが、GK ラットでは有意な増大を示した。

GP-VN を SD 系ラットに投与した場合には、GP-US を GK ラットに投与した場合とほぼ同じ結果が得られた。すなわち、CYP1A1・CYP1A2 発現の有意な増大が認められた。加えて、CYP2B2 発現も軽度増大していた。

これらの結果の一部は、表 2 に示した。

D. 考察

研究 I

詳細は研究発表リスト 1-1) に述べたが、さらに次を加える。

PPAR γ は遺伝子発現を制御する転写カスケードのマスター制御因子として働くことが知られている。したがって、CFE の成分が PPAR γ の遺伝子発現を亢進させ、その結果として、下流に位置する脂肪肝関連遺伝子群の遺伝子発現が亢進した可能性がある。今回の知見は、脂肪肝発症のメカニズムの一つを解明するための糸口を提供している可能性も考えられる。PPAR γ の遺伝子発現を亢進させる成分の特定ができれば、その成分を除去する等の手法によって、CFE の安全性を高めることも可能であろう。また、特定された成分を抗脂肪肝・抗肥満物質等の開発のシード物質として利用する方向も考えられる。

研究 II-1

昨年度の研究では、米国ブランドのソフトゲル製品 2 種について、一日摂取目安量の 100 倍量（体重 kg 当たり）をラットに投与する試験を行った。その結果、肝重量の軽度増大、CYP2B 遺伝子発現の軽度亢進とともに、 $\alpha 2\mu$ グロブリンの蓄積によると推定される腎尿細管硝子滴沈

着を生じた。

$\alpha 2\mu$ グロブリンの蓄積によると推定される腎尿細管硝子滴沈着は、オスラットに特有な現象であり、ヒトでは生じない。したがって、その起因物質は、他の影響を示さなければ、ヒトへの外挿の面では、安全上の問題はないとされる。

しかし、肝重量の軽度増大、CYP2B 遺伝子発現の軽度亢進は、安全性の面から、とくに CYP 2 B により代謝される化学物質との相互作用に留意する必要がある。動物試験で得られた NOAEL から ADI を算出する際に用いる不確実係数（通常 100）を考慮すると、試験に用いたソフトゲル製品の日摂取目安量は ADI を超えている可能性があり、ラットで観察されたと同様の肝臓への影響がヒトでも生じる可能性を否定できない。

一方、今年度の研究で用いたアメリカブランドのハードカプセル製品は、肝重量、CYP2B 遺伝子発現、腎尿細管への影響は示さなかった。ただし、CYP2B2、CYP3A2 発現の軽度低下を生じた。このように、ハードカプセル製品はソフトゲル製品とは全く異なる生体応答を生じた。

両タイプの製品の生体応答が異なる理由としては、同じくバターバー抽出物を素材とすることを謳っていても、成分の組成が異なる可能性や、内容物の物理的様態（ソフトゲル製品では油状：ハードカプセル製品では粉末状）の違いにより吸収性やバイオアベイラビリティが異なる可能性も考えられる。

いずれにしても、今年度の研究では、食品添加物の安全性評価手法を参考に、製品の一日摂取目安量の 100 倍量を実験動物に投与すると、同じバターバーを素材とする製品であっても、安全性の評価指標である肝臓とくに CYP の活性・遺伝子発現等への影響が、製品ごとに大きく異なることが明らかとなった。

事業者サイドにおいて自社製品について本研究で示されたと同様の知見が得られれば、安全性確保の対策を立てることが可能となる。消費者の健康被害の未然

防止、延いては自社の危機管理の観点からも役立つ。

研究 II-2

米国ブランドの抽出物製品 (GP-US) とベトナムブランドの粉末製品 (GP-VN) は、カプセル内容物の質また量が大きく異なっていた。しかし、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量を投与したラットにおける肝臓とくに CYP の活性・遺伝子発現等への影響は、製品間で若干の相違はあったが、概ね同様であった。

とくに、alkoxyresorufin O-dealkylase 活性また CYP1A2 遺伝子の発現は、GP-US・GP-VN いずれの投与においても、またラットの系統差によらず、有意に増大していた。なお、CYP 分子種の遺伝子発現に関しては、この alkoxyresorufin O-dealkylase 活性の増大を説明できる変化は認められなかった。この点は、今後解決すべき課題であるが、ヒトにおいても CYP 分子種の酵素活性がアマチャヅル摂取にともなって増大する可能性は否定できない。

GP-US は、SD 系また Wistar 系ラットでは CYP1A1 の誘導作用を示さなかったが、JK ラットでは有意な誘導作用を示した。JK ラットは CYP1A1 の誘導に関して感受性が高い可能性が推定される。なお、GP-VN は SD 系ラットにおいても、CYP1A1 および CYP2B2 の遺伝子発現を軽度上昇させた。CYP1A1 の遺伝子発現の亢進は、ベンゾ[a]ピレン等の環境化学物質への曝露の指標とされている。GP-VN にはアマチャヅル本来の成分か、混在物かは不明であるが、CYP1A1 誘導作用を有する環境化学物質様の物質が GP-US より多く含まれている可能性も否定はできない。

カプセル内容物の性状が大きく異なるアマチャヅル製品であっても、共通して、alkoxyresorufin O-dealkylase 活性また CYP1A2 遺伝子の発現の増大が認められた。医薬品等との相互作用への留意が必要と考えられる。なお、製品によっては、

環境化学物質様作用を有する物質が相対的に多く含まれる場合もあると推定される。

事業者サイドにおいて自社製品について本研究で示されたと同様の知見が得られれば、安全性確保の対策を立てることが可能となる。消費者の健康被害の未然防止、延いては自社の危機管理の観点からも役立つ。

E. 結論

研究 I

CFE には転写調節因子 PPAR γ の遺伝子発現を亢進させる成分が含まれており、その作用の結果として、下流に位置する脂肪肝関連遺伝子群の発現が亢進し、CFE 投与にともなう脂肪肝が発症した可能性が推定される。

研究 II-1・II-2

ハーブ製品の安全性確保には、事業者サイドにおいて、個別製品を対象に、本研究で示した方法に準じて、肝臓とくに CYP への影響を指標とする安全性評価試験を実施し、結果に応じた対策を立てることが有益であると提案する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umegaki K, Yamazaki Y, Yokotani K, Chiba T, Sato Y, Shimura F. Induction of fatty liver by coleus forskohlii extract through enhancement of de novo triglyceride synthesis in mice. *Toxicology Reports*. 1:787-794, 2014.

2. 学会発表

- 1) Bui Thi Ngoc Ha、倉若美咲樹、佐々木菜穂、山崎優子、端田寛子、志村二三夫. ラット肝臓における cytochrome P450 (CYP) 分子種の遺伝子発現へのアマチャヅル sweet tea vine (*Gynostemma pentaphyllum*) の影響. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、札幌、2014.5.

- 2) 浅見まり子、端田 寛子、慶野千尋、有田安那、佐々木菜穂、山崎優子、志村二三夫. バターバー (BB) 製品の安全性評価：ラット肝臓・腎臓への影響を指標として. 第 61 回日本栄養改善学会学術総会、神奈川、2014.8.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表1 研究 I の結果のとりまとめ

	0.3%CFE	1%CFE		0.3%CFE	1%CFE
	Glycolysis			Triglyceride synthesis	
Gck	—	—	Gpam	—	↑
Gapdh	—	↑	Dgat1	—	—
Pklr1	—	—	Dgat2	—	↑
Pklr2	—	—		Transcriptional factors	
	Lipogenesis, chain elongation, and desaturation		ChREBP	—	—
			SREBP-1c	—	—
			Nr1h2 (LXR)	—	—
Acly	—	—	Nr1h3 (LXR)	—	—
ACC1	↑	↑	Ppara	—	—
ACC2	—	↑	Ppard	—	↑
Fasn	—	↑	Pparg	—	↑↑
Elov16	↑	↑↑		CIDE proteins	
Scd1	—	↑	Cidea	—	—
			Cideb	—	—
			Cidec (Fsp27)	—	↑↑

* 0.3%CFE, 1%CFE: マウスの食餌中のCFE含有量.

* Gck, glucokinase; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Pklr1 and Pklr2, pyruvate kinase liver and red blood cell (Pklr) 1 and 2; Acly, ATP-citrate synthase; ACC1 and ACC2, acetyl-coenzyme A carboxylase 1 and 2; Fasn, fatty acid synthase; Elov16, long-chain elongase; Scd1, acyl-CoA desaturase 1; Gpam, glycerol-3-phosphate acyltransferase; Dgat1 and Dgat2, diacylglycerol acyltransferase 1 and 2; ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding protein; Srebp1, sterol regulatory element binding factor 1; Nr1h2 and Nr1h3, liver X receptor (LXR) beta and alpha; Ppara, Pparg and Ppard, peroxisome proliferator-activated receptors alpha, gamma, and delta; Cidea, Cideb and Cidec/Fsp27, cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effectors (CIDEs) A, B, and C.

*遺伝子発現量の変化(対照群に対する比):—, 有意差なし;↑, 5倍未満;↑↑, 5倍以上. P <0.05.

表2 研究Ⅱの結果のとりまとめ

	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2B1	CYP2B2	CYP2E1	CYP3A1	CYP3A2	肝臓 相対重量	腎臓 組織病理 所見	文献等
Kava	↑↑↑	↑	—	↑↑	↑↑	↓	↑↑	—	1.41*	検討なし	既報
St John's Wort	—	—	—	—	—	—	↑↑	↑	1.12*		未発表 データ
Ginkgo Biloba	—	—	—	↑↑	—	—	↑	—	1.12*		未発表 データ
Butterbur A (♂)	—	↑	—	↑	↑	—	↑	—	1.14*	腎尿細管井 硝子滴沈着	平成25年度 報告書
Butterbur B (♂)	—	—	—	↑	↑	—	↑	—	1.09*	腎尿細管 硝子滴沈着	平成25年度 報告書
Butterbur A (♀)	—	—	—	↑	↑	—	↑	—	1.10*	—	平成25年度 報告書
Butterbur C (♂)	—	—	—	—	↓	—	—	↓	0.94*	—	本研究
Sweet Tea Vine GP-US (SD rat)	—	↑	—	—	—	—	—	—	—	検討なし	本研究
Sweet Tea Vine GP-US (Wistar rat)	—	↑	—	—	—	—	—	—	—		本研究
Sweet Tea Vine GP-US (GK rat)	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—		本研究
Sweet Tea Vine GP-VN (SD rat)	↑	↑	—	—	↑	—	—	—	—		本研究

遺伝子発現量の変化(対照群に対する比):—, 有意差なし;↑↓, 10倍以下;↑↑, 10倍以上;↑↑↑, 50倍以上。* P < 0.05.

腎尿細管硝子滴沈着: α2μグロブリンの沈着によると推定されるオスラットに特有な病変。ヒトでは生じない。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

製品の品質と原材料の安全性に関する研究
～セレン酵母を用いた化学種別分析について～

研究分担者 石見 佳子 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部
研究協力者 松本 輝樹 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部
市田 尚子 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部

研究要旨

食品に起因する健康被害との因果関係の解析において、製品中の原材料に関する安全性の検証は重要である。本研究では、安全性評価の一環として、天然・自然を標榜した原材料のなかでも、食品添加物に代替されているミネラル酵母に着目した検討を行った。

本年度は、昨年度に構築した化学種別分画方法を、認証標準物質のセレン酵母と亜セレン酸標準物質を用いた添加試験を行い、その回収率を指標に妥当性を確認すると共に、その動態について検討を行った。無機セレンと有機セレンを分画可能とするイオン交換樹脂を用いた検討では、樹脂に対する無機イオンの吸着量について検討を行った。さらに、市販サプリメントに関して実態検討を行い、セレンの化学種別及びその他のミネラル含有量に関する調査を行った。

その結果、外因性の無機セレンは、酵母を直接水抽出することにより一部溶出され、酵素処理することにより全て検出可能であることが明らかとなった。また、イオン交換樹脂で精製することにより選択的に無機イオンを検出可能であることも明らかとなった。また、市販サプリメントに関する検討から、無機セレンの過剰摂取や酵母を用いることによる目的以外のミネラル摂取につながる恐れは、本検討結果からは、ないと考えられた。

A. 研究目的

研究代表者によるこれまでの検討から、健康食品による健康被害発生には、天然・自然を標榜した製品の品質の問題、ハイリスクグループによる安易な利用が関係していることが示唆されている。また、健康被害との因果関係の解析において、製品中の原材料の安全性の検証が必要である。

そこで本研究では、安全性評価の一環として、天然・自然を標榜した原材料に着目した実験的検討として、食品添加物の規定のないミネラルに対して利用される、ミネラル酵母について実態調査を行った。

昨年度、酵母に含まれるミネラルの化学種別分画方法について構築したが、本

年度も引き続きセレンに注目し、認証標準物質であるセレン酵母と無機セレン標準物質として亜セレン酸を用いた添加回収試験により、分画操作の妥当性確認と無機セレンの動態について検討を行った。また、市販サプリメントに関しても検討を行い、無機セレンの存在について確認すると共に、ミネラル酵母の利用による弊害がないか、共存するミネラルについて調査を行った。

B. 研究方法

- ・使用機器
誘導プラズマ質量分析（ICP-MS）装置: NexION 300D（パーキンエルマー株式会社）
酸分解システム: DigiPREP Jr.（SCP

science, Canada)

・使用試薬

硝酸: 金属濃度 0.1 ng/ mL 以下の超高純度試薬 (関東化学株式会社、Ultrapur-100 超高純度試薬)

過酸化水素: 特級

酢酸: 原子吸光分析用

セレン (Se) 標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液 (亜セレン酸水溶液) を純水で希釈したものを使用した。インジウム標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、1 μ g/mL の濃度の標準溶液を調製し、ポリプロピレン瓶にて室温で保存した。

希釈液: 硝酸 100 mL 及び酢酸 20 mL を混和し、純水 1 L に定容した。

・使用検体

セレン酵母認証標準物質 SELM-1 (National Research Council, Canada、認証値: 総セレン、2059 \pm 64 mg/ kg; セレノメチオニン、3448 \pm 146 mg/ kg; メチオニン、5758 \pm 277 mg/ kg) 及び栄養成分表示にセレンの表記があり、酵母を用いたことが記載された市販サプリメント 13 種類

1) セレン酵母の化学種別分析方法の確認 (Fig. 1)

a. 酵母に含まれる水溶性セレンの評価

試料 0.25 g を遠沈管に精密に量り、純水 10 mL を加え、10 分間振とう抽出を行った。抽出混合物は、3000 rpm、5 分間で遠心分離後上澄み液を回収し、この操作を 3 回行った。上澄み液は、0.20 μ m ろ過フィルターにて不溶物をろ過し、純水を用いて 50 mL に定容した。

b. Driselase による細胞壁の分解

試料 0.25 g を遠沈管に精密に量り、Driselase (Sigma Aldrich) 200 mg、純水 5 mL を加え、振とうしながら 18 時間室温で処理した。分解液は、3000 rpm、5 分間で遠心分離後、上澄み液を 0.20 μ m ろ過フィルターにてろ過したものを回収した。残渣は、純水 5 mL を加え、洗浄し、

洗浄液も同様に処理し併せて回収し、純水を用いて 50 mL に定容した。

c. イオン交換樹脂を用いた分画方法

強酸性陽イオン交換樹脂 (Amberlite 200CT Na, オルガノ) 20 mL をポリエチレン製カラム (σ 30 \times 130 mm) に充填し、試料 (a. 水抽出液または b. 酵素分解液) 負荷後、純水 20 mL を通液し、溶出液を全て回収した。なお、流速は、1 drop/ sec とした。

2) イオン交換樹脂に対する無機イオンの吸着能

強酸性陽イオン交換樹脂 (Amberlite 200CT Na, オルガノ) 及び弱塩基性陰イオン交換樹脂 (Amberlite IRA 67, オルガノ) 20 mL をポリエチレン製カラム (σ 30 \times 130 mm) に充填し、Se 標準溶液 (10, 30, 100, 300 及び 1000 ng/ mL) 1 mL を負荷し、純水 20 mL で通液後、溶出液を全て回収した。なお、流速は、1 drop/ sec とした。

3) 市販サプリメントに関する検討

市販サプリメント 13 種は、約 0.25 g を直接湿式灰化し、セレン総量を確認すると共に、共存するミネラル (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Zn) についても ICP-OES により定量化した 1)。また、水溶性セレンの抽出を別途行い、そのセレン含有量について評価すると共に、一部検体については、酵素処理後、イオン交換樹脂を用いた分画操作を行った。

4) 共通項目

a. 湿式灰化

溶出液及び抽出液は、酸分解システム専用ガラス容器に回収し、110 $^{\circ}$ C を上限に蒸発乾固させたのち、硝酸 5 mL を加え、時計皿で蓋をし、135 $^{\circ}$ C を上限に加熱した。激しい反応が終了した後、適宜過酸化水素 1 mL を加え、再び加熱した。内容液が褐色~ 黒色となったらただちに硝酸 2 mL を加え、内容液が無色~ 淡黄色となったことを確認し、白煙を生じるま

で加熱を続けた。蒸発乾固させ放冷後、炭化物がなくなるまで分解操作を繰り返し行い、残留物を希釈液でよく洗い込み、不溶物をろ過した後、50 mL に定容し、試験溶液とした。

最終溶液 50 mL 中には、ICP-MS 測定時の内部標準物質として 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の In 標準溶液を 0.5 mL 添加した。

b. ICP-MS による定量化

Se 測定用標準溶液 (10, 20, 50, 100, 200, 500 及び 1000 ng/mL) について、内部標準物質 (In: 10 ng/mL) とのイオンカウント比を ICP-MS から求め、標準溶液の濃度により検量線を作成した。同様に、試料溶液は、あらかじめ作成した検量線から試料溶液中の Se 濃度を求めた。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈した後測定に用いた。ICP-MS 装置の測定条件は、以下の通りである。

試料導入速度: 0.4 mL/min

プラズマ条件:

RF パワー, 1.6 kW

プラズマガス, 18 L/min (Ar)

キャリアガス, 1.2 L/min (Ar)

メイクアップガス, 1.02 L/min (Ar)

ネブライザ: 標準ネブライザ

測定質量数: Se, 78 (内部標準: In, 115)

ガスモード: He ガス (3.9 mL/min)

c. 妥当性確認

各操作の妥当性については、標準物質を用いた添加回収試験を指標に評価した。無機イオンの挙動確認には亜セレン酸を用い、イオン交換樹脂を用いた検討では、セレノメチオニンを用い、各検体 2 併行以上検討を行い、その回収率から操作の妥当性を評価した。なお、数値は全て平均値 \pm 標準偏差 (SD) として表記した。

(倫理面への配慮)

本研究において倫理面に配慮が必要とされる検討は行っていない。

C. 研究結果

1) セレン酵母の化学種別分析方法の確認

SELM-1 は、総セレンの認証値として 2059 \pm 64 mg/kg が付与されていたが、今回の直接灰化によるセレン総量の検討では 1630 \pm 69 mg/kg と認証値の 79 % しか検出されなかった。0.25 g の SELM-1 に 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se 標準溶液 0.5 mL を添加した回収試験では、3559 \pm 816 mg/kg (回収率 97 %) であった。

水抽出による SELM-1 に含まれる水溶性セレンは、244 \pm 6 mg/kg であった。また、0.25 g の SELM-1 に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se 標準溶液 2.0 mL を添加した回収試験では、297 \pm 30 mg/kg (回収率 33 %) であった。

SELM-1 を driselase 酵素処理したところ、943 \pm 86 mg/kg のセレンが検出された。酵素処理前、0.25 g の SELM-1 に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se 標準溶液 2.0 mL を添加し、回収率を評価したところ、1094 \pm 38 mg/kg (回収率 94 %) であった。

酵素処理液の一部は、陽イオン交換樹脂にて水溶性のセレン含有ペプチド等を除去し、溶出液に含まれる無機セレンの定量を行った。その結果、55 \pm 10 mg/kg の無機セレンが検出され、その割合はセレン酵母全体の 3 % と推定された。また、酵素処理前、0.25 g の SELM-1 に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se 標準溶液 2.0 mL を添加した回収試験では、45 \pm 8 mg/kg と添加した量が全く検出されず、何らかの影響を受けていることが示唆された。

2) イオン交換樹脂に対する無機イオンの吸着能

各イオン交換樹脂に対する、亜セレン酸の結合能について評価した結果、陽イオン交換樹脂には全く吸着しないこと、陰イオン交換樹脂は、カウンターイオンが OH⁻ または Cl⁻ によって、300 μg 以下または 1000 μg 以上と結合能に差があることが明らかとなった。また 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se-Met 溶液 1 mL を用いた添加試験において、両樹脂とも Se-Met の流出は確認されなかった。

3) 市販サプリメントに関する検討

市販サプリメント13種に含まれるセレン含有量を表示値と比較したところ、42.8~227.7%まで開きがあることが明らかとなった (Table 1)。また、含有量に対する水溶性画分への移行率は、概ね20%以下であった (Table 1)。

検体4は、水溶性セレンの存在が他の検体に比べて多かったことから、イオン交換樹脂を用いた分画操作を行ったところ、無機セレンとして $32 \pm 14 \mu\text{g/g}$ 含まれることが明らかとなった。

また、各サプリメントに共存するミネラルについて公定法1)を用いて評価したところ、一部のミネラルが高濃度存在していることが明らかとなった (Table 2)。

D. 考察

1) セレン酵母の化学種別分析方法の確認

SELM-1に含まれるセレン量が認証値よりも低い結果となったが、このことは測定条件の違いに起因するものと考えられる。SELM-1を提供しているNRCでは、セレンの定量化に際し、灰化にマイクロ波試料分解装置を用いていること、試験溶液に1% HNO_3 を用いていることや、観測質量数(82)の違いが挙げられる。特に、試験溶液に1% HNO_3 を用いた場合、灰化が不十分な際、共存する炭化物によるICP-MS測定時の増感効果の影響が無視できないため、結果として定量値が高くなることが考えられる。また、マイクロ波試料分解装置による分解では温度や圧力の管理が一定でない場合、均質な灰化が出来ず、未灰化物が残っていることも考えられる。本検討では試験溶液に予め酢酸を添加することにより、その影響を回避した。

本検討では、回収率の評価の際、SDが大きく再現性に優れていないが、酵母の湿式灰化に長時間を要するため、今回の灰化条件でも一部のセレンが揮発してい

る可能性があると考えられる。

水抽出時、添加回収試験の結果が回収率33%と低い値を示した。今回使用したSELM-1は、凍結乾燥した酵母に対して他の物質等の添加は行われておらず、最低限の γ 線処理のみ行ったのみである2)。よって、酵母が不活化していない可能性があるため、亜セレン酸を添加する前に 70°C 、30分で酵母を不活化し、改めて検討を行った。その結果、不活化することにより水溶性セレンの量は、 $278 \pm 29 \text{ mg/kg}$ と若干増え、0.25gのSELM-1に $20 \mu\text{g/mL}$ Se標準溶液2.0mLを添加した回収試験では、 $404 \pm 15 \text{ mg/kg}$ と回収率は79%まで改善したことから、添加した亜セレン酸が酵母に吸着または取り込まれていることが示唆された。また、0.25gのSELM-1に $20 \mu\text{g/mL}$ Se標準溶液2.0mLを添加し60分放置した後不活化した際、 $319 \pm 33 \text{ mg/kg}$ と回収率は26%に留まり、一度吸着または取り込まれた亜セレン酸は抽出できないことが明らかとなった。また、水以外の溶媒として1% HCl を用いた抽出についても検討を行ったが満足いく抽出結果は得られなかった。

酵母の細胞壁の消化に用いた driselase は、Laminarinase、Xylanase 及び Cellulase を含む粗製粉末であり、消化条件については、 37°C 、 $\text{pH}=4.5$ が最適とされるが、著しく条件を変更しない限り消化は可能であることから、溶媒として水を用いた。予備検討として Tris 緩衝液を用いた際、%SD は5%以下であり、安定な消化条件を維持できることが示されたが、消化液をイオン交換樹脂に用いることも視野に入れているため、不必要な溶質の使用は控えた。

消化液(上澄み液-2, Fig. 1)をイオン交換樹脂にて分画した結果、無機セレンの存在は極わずかであることが明らかとなった。また、亜セレン酸を添加したものについては、回収率が低く何らかの影響を受けていることが示唆された。消化液をイオン交換樹脂に負荷する際、Se-Met を同時に添加した吸着能の評価か