

中国製ダイエット用健康食品から検出された N-ニトロソフェンフルラミンの経口投与試験 —病理学的検索—

多田幸恵*, 佐藤かな子**, 野中良一**, 山田有紗***, 佐藤毅***,
福森信隆*, 藤谷知子*, 矢野範男*, 高橋博*, 湯澤勝廣*, 安藤弘*,
久保喜一*, 長澤明道*, 長井二三子**, 小縣昭夫*, 上村尚*

Oral Toxicity Test of N-nitrosfenfluramine in Chinese Weight-loss Dietary Supplement —Pathological Study—

Yukie TADA*, Kanako SATOH**, Ryouichi NONAKA**, Arisa YAMADA***, Tsuyoshi SATOH***,
Nobutaka FUKUMORI*, Tomoko FUJITANI*, Norio YANO*, Hiroshi TAKAHASHI*, Katsuhiko YUZAWA*, Hiroshi ANDOH*,
Yoshikazu KUBO*, Akemichi NAGASAWA*, Fumiko NAGAI**, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA*

Keywords : 中国製ダイエット用健康食品 chinese weight-loss dietary supplements, N-ニトロソフェンフルラミン
N-nitrosfenfluramine, マウス mouse, 経口投与 oral administration, 病理学的検索 pathological study

はじめに

平成13年～平成14年にかけて中国製ダイエット用健康食品を服用した人に肝障害が多数報告された。厚生労働省の中国製ダイエット用健康食品に関する調査結果¹⁾によると、健康被害事例の半数以上は、「御芝堂減肥こう囊」、「せん之素こう囊」、「茶素減肥」の3製品が原因とされている。これら3製品に共通の成分として、N-ニトロソフェンフルラミン（以下N-fenとする）、フェンフルラミン（以下Fenとする）、甲状腺末、ニコチン酸アミド、リボフラビン、カフェイン、カテキン類、クロロゲン酸等が検出されたが、N-fen以外の成分については生理活性に関する知見は存在するが、肝障害性は知られておらず、肝障害の原因物質はN-fenであろうと推測された¹⁾。N-fenは自然に存在する物質ではなく化学的に合成された物質であるが、その毒性に関してはほ乳動物を用いた実験報告が無く、生体影響が明らかにされていない。今回我々は、マウスを用いて1週間の連続経口投与試験を行いN-fenの肝臓に及ぼす影響を中心に病理学的に検索した。

実験方法

1. 被検物質

N-fenの合成を以下の条件で行った。(±)-Fen塩酸塩0.535g(2mmol)を水8mlに溶解し、塩酸酸性条件下で水1mlに溶解した亜硝酸ナトリウム0.425g(5mmol)を氷冷下攪拌しながら滴下した。約1時間反応後、反応液をクロロホルムで抽出した。抽出液を減圧留去し、得られた黄色の油

状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒はヘキサン-酢酸エチル=2:1）で精製して(±)-N-fenを得た。収率は90%であった。合成したN-fenは、IR、H-NMR及びマススペクトルを測定して既知データ²⁾と比較確認した。純度をこれらのスペクトルデータおよび高速液体クロマトグラフィー（装置：資生堂 ナノスペースSI-1、フォトダイオードアレイ検出器：WATERS 996、カラム：ナカライテスクCOSMOSIL 5C₁₈-AR-II、測定波長210nm、移動層：アセトニトリル-水-リン酸-SDS = 100 ml:100 ml:0.2 ml:1.2 g）で確認したところ、95%以上であった。

2. 動物

Cj:CD-1 (ICR)雄マウスを日本チャールス・リバーから4週齢で購入し、クリーンチップを敷いたプラスチック製ケージに収容し、温度22-24°C、湿度50-60%、照明12時間の飼育室で、基礎飼料CE-2（日本クレア）及び水を自由に摂取させ飼育した。1週間馴化飼育後、異常の見られないことを確認し実験に使用した。

3. 投与

N-fenをオリーブオイル（日本薬局方）に懸濁させ、投与用量0（対照群）、0.52（低濃度）、5.2（中濃度）、52.0（高濃度）mg/kgBW、投与容量10mL/kgBWで、1群10匹のマウスに1日1回7日間、胃ゾンデを用いて連続強制経口投与した。投与用量0.52mg/kgBWは、中国製ダイエット用健康食品茶素減肥カプセルを分析した結果1.9%の

* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科

*** 東京理科大学理学部

N-fen が含有されていたことから算出したヒトの 1 日常用量である。

4. 体重・摂餌量の測定及び一般症状の観察

投与期間中、毎日、体重測定及び一般症状の観察を行った。摂餌量は、投与餌量から翌日の残餌量を差し引き、マウスの体重 1 kg あたりの値で示した。

5. 病理学的検査

投与終了後 24 時間後に、脳内トランスポーター測定のため、エーテル無麻酔下で断頭屠殺し放血致死させた。肉眼観察の後、脾臓、心臓、肺、肝臓、腎臓を摘出し、重量測定後 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し顕微鏡観察した。それぞれの器官重量は絶対重量及び体重 100 g あたりの相対重量で示した。

6. 統計解析

対照群と投与群間の差を、Dunnett の多重比較検定³⁾ で解析した。有意水準は P<0.05 とした。

結 果

1. 一般症状

投与期間中、各投与群のマウスに食欲低下は見られず対照群のマウスと同様に摂食していた。また対照群、投与群とも試験期間中下痢は観察されなかった。異常歩行、異常姿勢、立毛など神経症状の異常は観察されなかった。

2. 体重及び摂餌量

投与期間中の摂餌量を図 1 に、体重の推移を図 2 に示した。摂餌量、体重とも対照群との比較で有意な差は認められず、N-fen による食欲抑制及び体重増加抑制はマウスでは明らかでなかった。

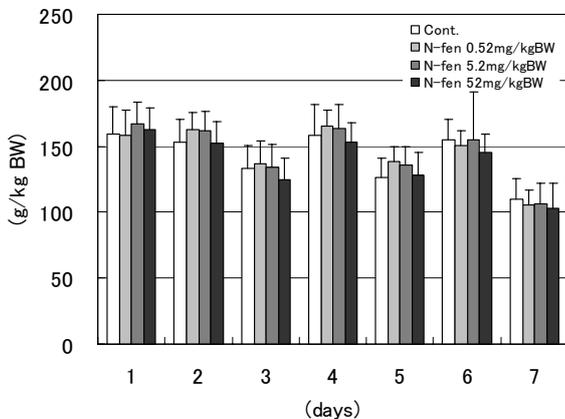


図 1. N-ニトロソフェンフルラミン 7 日間経口投与マウスの摂餌量 (値は 1 群 10 匹の平均値±SD を表す)

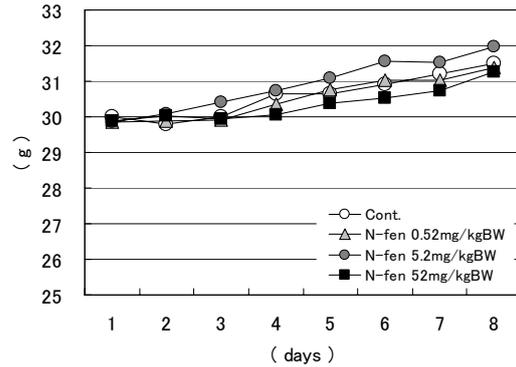


図 2. N-ニトロソフェンフルラミン 7 日間経口投与マウスの体重推移 (値は 1 群 10 匹の平均値を表す)

3. 器官重量

最終体重及び器官重量を表 1 に示した。対照群と投与群の最終体重はほぼ同じ値を示し、有意差はみられなかった。脾臓及び腎臓は絶対重量、相対重量とも、投与群で対照群よりやや高い値を示したが、統計的に有意差は認められなかった。心臓は絶対重量、相対重量ともに対照群と比較し投与群で高く、中濃度群で有意差が認められた。肝臓は絶対重量、相対重量ともに投与群でやや高い値を示したが、統計的に有意差は認められなかった。

4. 病理学的検査

組織標本の観察結果を表 2 に示した。肝臓では、中心静脈周囲の肝細胞の軽度な腫大が、対照群に 10 例中 1 例、低濃度群に 10 例中 4 例、中濃度群に 10 例中 3 例、高濃度群に 10 例 (全例) 認められた。これら中心静脈周囲の肝細胞は好酸性を増していた。リンパ球、好中球及び好酸球の浸潤を伴った限局性肝細胞壊死が対照群と各投与群それぞれに 10 例中 4 例認められた。門脈域の細胞浸潤は対照群と投与群で同程度の発現であった。腎臓では、近位あるいは遠位尿細管の拡張が対照群に 10 例中 1 例、中濃度群に 10 例中 2 例、高濃度群に 10 例中 4 例認められた。脾臓の髄外造血及び腎臓の尿細管再生等は、投与に関連無く対照群及び投与群に同程度観察された。

考 察

N-ニトロソフェンフルラミン (N-fen) はフェンフルラミン (Fen) のニトロソ化合物である。Fen は米国で 1973 年に食欲抑制薬として承認されたが、肺高血圧症、心臓弁膜症等の重篤な副作用のため 1997 年に市場から回収されている。Fen に関しては食欲抑制作用⁴⁾、神経作用⁵⁾、免疫抑制作用⁶⁾、染色体異常誘発性⁷⁾等の報告がある。N-fen は Fen と類似の効果を期待してダイエット健康食品に添加されたものと推測される。N-fen に関しては、ヒトでの症例報告⁸⁻¹⁰⁾の他、中川ら¹¹⁾がラットの遊離肝細胞を用い

表 1. N-ニトロソフェンフルラミン7日間経口投与マウスの最終体重及び器官重量

	N-ニトロソフェンフルラミン (mg/kg BW)			
	0 (対照群)	0.52 (低濃度群)	5.2 (中濃度群)	52 (高濃度群)
最終体重 (g)	31.8±1.0 ^a	31.7±1.3	32.5±1.2	31.6±1.5
器官重量 (絶対重量 mg)				
脾臓	98.6±10.7	98.4±17.4	102.7±11.4	101.5±20.3
心臓	145.4±10.6	152.6±11.3	162.5±14.0 *	154.1±12.7
肺	267.1±131.5	253.6±69.9	232.8±34.1	285.9±49.9
肝臓	1915.7±119.7	2010.5±252.2	2002.6±162.4	1961.7±220.0
腎臓	520.0±61.4	532.9±35.6	552.6±44.9	556.1±37.1
器官重量 (相対重量 mg/100g 体重)				
脾臓	309.9±31.4	310.0±49.2	315.9±34.9	319.8±53.9
心臓	457.3±36.5	481.4±24.2	499.7±42.4 *	487.6±32.5
肺	839.1±408.7	804.4±239.4	717.5±116.4	906.9±166.2
肝臓	6014.3±231.1	6337.5±650.3	6150.0±364.6	6194.0±485.5
腎臓	1632.1±168.8	1681.7± 81.8	1700.6±157.3	1760.4±102.3

a: 値は 1 群 10 匹の平均値±SD を表す

* Dunnet の検定で有意 (p<0.05)

表 2. N-ニトロソフェンフルラミン7日間経口投与マウスの病理組織所見

		N-ニトロソフェンフルラミン (mg/kg BW)			
		0 (対照群)	0.52	5.2	52
脾臓	髄外造血の増加	5 ^a	5	4	7
肺	肺胞/気管上皮細胞の過形成	0	1	0	0
肝臓	肝細胞の軽度腫大	1	4	3	10
	限局性肝細胞壊死	4	4	4	4
	細胞浸潤	8	8	6	8
腎臓	尿細管の再生像	1	1	0	2
	尿細管の拡張	1	0	2	4
	嚢胞	0	0	0	1
	尿細管の萎縮	0	1	0	1
	尿細管の巣状壊死	0	1	0	0

a: 数値は マウス 10 匹を観察中変化を示した匹数

て細胞毒性を検討し、ミトコンドリアの機能障害あるいは酸化ストレスを介してN-fenが肝細胞を障害することを報告している。しかしながらこれまでは乳動物を用いてN-fenの生体影響を報告した論文は認められない。今回我々は、N-fenを7日間連続経口投与し、その生体影響を観察した。検討にあたりFenで報告されている食欲抑制作用、神経症状、心臓弁膜の変化等、またダイエット用健康食品で健康被害が報告された肝障害に注目して観察を行った。N-fenはダイエット効果を期待して添加されたものと思われるが、N-fen投与群の摂餌量及び体重は対照群の値とほとんど変わらず、N-fenの食欲抑制効果及びダイエット効果はマウスでは明らかでなかった。一般症状の観察では、N-fen投与群のマウスに異常歩行、異常姿勢、立毛などの神経症状は観察されず、対照群マウスと同様の動作が観察された。一般症状の

観察からはN-fenが神経系に及ぼす影響を認めることはできなかった。

今回病理学的検査で、高濃度群マウスの肝臓に中心静脈周囲の肝細胞の軽度な腫大が認められ、これら肝細胞では好酸性が増していた。代謝酵素を誘導する物質の多くは、滑面小胞体の増加及び薬物代謝酵素の活性上昇を引き起こし、組織学的に小葉中心性の好酸化を伴った肝細胞肥大を発現させる。この変化は毒性変化のみならず生体の適応反応と捉えることもできるが、今回N-fenの1週間投与で高濃度群の肝臓に見られたこれらの変化は、N-fenの投与期間を長期間にした場合、あるいは高用量投与にした場合、どのような推移をたどるか興味深い。

Fenの副作用として肺高血圧症、心臓弁膜症等の重篤な所見が報告されていたため、今回投与期間が7日間と短期

間ではあったが、心臓及び肺の組織観察も併せて行った。心筋、心臓弁膜、心内膜、肺実質及び肺の血管系の観察で N-fen 投与に関連した変化は観察されなかった。

Adachi らは中国製ダイエット用健康食品を服用して肝障害を発症した 12 名の患者の症例報告をしている⁹⁾。それによると、生検あるいは切除を行った肝臓を病理検索した結果、リンパ球及び好中球の非特異的炎症性浸潤を伴った広汎な出血性壊死、非特異的炎症性浸潤を伴った限局性壊死、リンパ球及び貪食細胞浸潤を伴った散在性肝細胞壊死、胆管の増生及び好酸球浸潤を伴った肝細胞壊死が見られたと述べている⁹⁾。今回の試験では、これらの所見に注目して組織観察を行った。好中球、リンパ球及び好酸球の浸潤を伴った限局性肝細胞壊死の発現頻度は対照群と投与群のマウスで同程度であり、ヒトでの症例報告とは異なっていた。

今回設定した N-fen の投与用量 0.52 mg/kgBW (低濃度群) は、肝障害を発症した患者が実際に服用した茶素減肥カプセルを分析した結果から算出したヒトの 1 日常用量である。今回の 7 日間投与試験では重症な肝障害の発現は認められなかったが、健康食品服用者には規定の用量を大幅に超えて服用しているケースも考えられる。また N-fen による肝障害の発現は薬物代謝酵素の違いにより大きく異なるとの報告もある¹⁰⁾。N-fen の生体影響を明らかにするためにはさらに高濃度、長期間投与あるいは動物種を変えた検討が必要であると思われる。

ま と め

中国製ダイエット用健康食品から検出された N-ニトロソフェンフルラミン (N-fen) を、ICR 雄マウスに 0.52 (ヒトの常用量) ~52 mg/kg 体重の投与用量で 7 日間、胃ゾンデを用いて連続経口投与し病理学的に検索した。

1. 投与群マウスに摂餌量の低下及び体重減少は認められず、N-fen のダイエット効果は明らかでなかった。また下痢及び異常行動、異常姿勢などの神経症状は観察されなかった。

2. 肝臓は絶対重量、相対重量とも投与群でやや高い値を示したが、統計的に有意な差ではなかった。

3. 顕微鏡による組織観察で、投与群マウスの肝臓に、中心静脈周囲の肝細胞の腫大が用量相関性に認められた。リンパ球、好中球及び好酸球の浸潤を伴った肝細胞の壊死は、対照群と投与群のマウスに同程度の発現頻度で認められた。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課報道発表資料：中国製ダイエット用健康食品（未承認医薬品）に関する調査結果（概要），
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/02/h0212-1.html>
- 2) Beckett, A.H. and Grookes, G. : *Tetrahedron.*, **24**, 1283-1287, 1967.
- 3) Gad, S.C. and Weil, C.S. : Statistics for toxicologists. In Hayes, A.W. (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edn., 221-274, 1994. Raven Press, New York.
- 4) Mennini, T., Bizzi, A., Caccia, S. et al. : *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **343**, 483-490, 1991.
- 5) Itzhak, Y., Ali, SF. and Anderson, KL. : *J. Neurochem.*, **87**, 268-271, 2003.
- 6) Connor, TJ. and Kelly JP. : *Eur. J. Pharmacol.*, **455**, 175-185, 2002.
- 7) Sen, S., Agarwal, K., Mukherjee, A. et al. : *Drug. Chem. Toxicol.*, **17**, 113-124, 1994.
- 8) Kanda T., Yokosuka O., Tada M. et al. : *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 999-1000, 2003.
- 9) Adachi, M., Saito, H., Kobayashi, H. et al. : *Ann. Intern. Med.*, **139**, 488-492, 2003.
- 10) Kawaguchi T., Harada M., Arimatsu H. et al. : *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **19**, 349-350, 2004.
- 11) Nakagawa, Y., Suzuki, T., Kamimura, H. et al. : *Arch. Toxicol.*, 2005 (in press).