

ダイエット食品「天天素」の突然変異原性について

吉田 誠二*, 藤田 博*, 小縣 昭夫*, 上村 尚*

Mutagenicity of “Tentenso”

Seiji YOSHIDA*, Hiroshi FUJITA*, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA*

Keywords: 健康食品 dietary supplements, 天天素清脂胶囊 “tentenso”, シブトラミンsibutramine, フェノールフタレイン phenolphthalein, エームス試験 Ames test, 染色体分析chromosome analysis, チャイニーズハムスター chinese hamster

はじめに

これまで健康食品による健康被害は数多く報告されているが、中でもダイエット食品がその殆どを占めている¹⁾。

2005年5月、厚生労働省は中国製ダイエット食品である「天天素清脂胶囊」（以下、天天素と略す）による健康被害を発表した²⁾。

同年6月、都は、天天素服用が原因と疑われる2件の健康被害を発表するとともに、製品から国内未承認である、肥満症の治療薬「シブトラミン」と下剤成分の「フェノールフタレイン」、向精神薬の「マジンドール」及び生薬の下剤である「ダイオウ」を検出した⁴⁾。このことにより、健康被害を未然に防止するため、都民に対し、天天素を服用しないよう注意を喚起した。

我々は、いわゆる健康食品の安全性点検の一環として、これまでに健康被害報告がなされている中国製健康茶の花紅柳緑茶と染色体への影響が懸念されるパーラ茶に関してエームス試験及び哺乳動物骨髄細胞染色体試験を行い、変異原性を検討し、報告した^{5,6)}。

一般に、変異原性試験は、発癌性の原因予測及び次世代におよぼす影響等を検討する際の有用な基礎資料となり、試験物質の変異原性の有無を検討しておくことは安全性の検討に必須である。また、一向に衰えない、健康食品ブームを考えると、いわゆる健康食品の突然変異誘発性を含めた生体影響に関する情報の蓄積は重要である。

これらの事を考慮し、今回、天天素清脂胶囊及び検出された医薬品成分のうち、フェノールフタレインとシブトラミンのエームス試験及び哺乳動物染色体試験を行い、その遺伝的安全性の検討を行ったので報告する。

実験方法及び材料

1. エームス試験

1) 試料: 天天素及びシブトラミンは純水に溶解し用いた。フェノールフタレインは、ジメチルスルホキシド（和光純薬）に溶解し用いた。

2) エームス試験: *Salmonella typhimurium* TA98, TA 100, TA97及びTA102⁷⁾を用いた。試験はAmes法の変法であるブレインキューベーション法⁸⁾により行った。代謝活性化には、フェノバルビタール及びβ-ナフトフラボンを投与した雄性SD系ラット (Crj:CD 日本チャールス・リバー) の肝臓ホモジネートから調製したS9¹⁾を用いた。S9 mix^{7, 8)}中のS9量は、10% (50 µL/プレート) とした。

試料溶液0.1 mLを小試験管に入れ、S9mix 0.5 mLまたはリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mLを加えた。一夜培養した菌液を0.1mL加え、37°Cで20分間の前培養を行った。これに、45°Cに保温した軟寒天⁷⁾ 2mLを加え混合後、最少グルコース寒天培地⁷⁾に重層した。37°Cで2日間培養後、プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した。

各濃度3枚のプレートを用い、統計解析は、Kruskal-Wallis検定を行い、更にMooreら⁹⁾のプログラムによる回帰分析を行い、両検定において有意な場合に変異原性陽性と判断した。

2. チャイニーズハムスターを用いた単回投与染色体試験

1) 実験動物: 当部動物室で繁殖・維持を行っている、8週令のチャイニーズハムスターの雄を用いた。

2) 試料: 天天素清脂胶囊製品1錠 (約335 mg) を蒸留水にて、672~0.67mg/kgとなるように公比10の割合で調製し、経口投与した。なお、最高用量の672 mg/kgは成人 (60 kgとして) が約200錠摂取するものである。

シブトラミンは最大溶解度である、50~6.25mg/kgまで蒸留水にて公比2の割合で希釈し、調製した。なお、フェノールフタレインはジメチルスルホキシドを用いて、2000~250 mg/kg間を公比2の割合で調製した。

投与量は、全実験群すべて10mL/kgとし、一群4匹の動物を用いた。陰性対照は蒸留水のみを同容量投与したものとした。

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 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

3) 試験方法：投与後, 6 時間, 24 時間, 48 時間及び72 時間目に動物をエーテル麻酔下にてと殺し, 常法¹⁰⁾に従い, 大腿骨より骨髓細胞の染色体標本を作製した. 染色体分析はよく拡がった分裂中期細胞を1匹について50個以上観察し, 染色体の構造異常及び数的異常の有無について調べた. 染色体異常誘発の有無の判定は染色体異常誘発頻度が5%以上を示したものを陽性(+)とし, それ以下を陰性(-)とした.

結果及び考察

1. エームス試験

天天素1 mg/プレート以上の濃度では試験菌株の増殖の抑制が見られたことから, 最高濃度を1 mg/プレートとし5濃度段階で試験を行った. その結果, TA100及びTA102のS9添加の場合に復帰コロニー数が増加した(図1). これらの復帰コロニー数増加は, TA100ではコントロールの1.6倍, TA102では2.1倍となり, 統計的には有意な用量相関であった. 他の実験条件であるTA98, TA97のS9添加及び4菌株のS9無添加の場合には復帰コロニー数の有意な増加は見られなかった. TA100及びTA102のS9添加で見られた復帰コロニー数の増加は, 倍率が2倍程度で少ないものであったが, 統計的には有意であり, 変異原性陽性と判断した.

天天素はTA100及びTA102のS9添加でエームス試験菌株に対する変異原性が見られたことから, その変異原性の原因となっている化合物の検討を行った. 検体の天天素には, いくつかの成分が含まれていることが守安らの報告⁴⁾で示されており, 比較的含有量が多いシブトラミン及びフェノールフタレインの2成分についてエームス試験を実施した. 試験は, 天天素で増加が見られた TA100及びTA102のS9添加の条件で行ったが, 2化合物とも陰性の結果であった.

2. チャイニーズハムスターを用いた単回投与染色体試験

天天素を経口投与し, 6, 24, 48時間後に染色体分析を行った結果を表1に示す.

投与後6時間目の結果における, 天天素投与群の染色体の構造異常及び数的異常の出現頻度は, 0.25~1.0%と低く, 陰性対照の出現頻度の0.25%に比べ顕著な増加は見られなかった. また, 観察された異常についても交換や数的異常細胞のような重篤なものは一例も観察されず, 全てがgapであった. 同様に, 24時間及び48時間目においても, 天天素投与群の異常誘発頻度は, それぞれ0.75~1.0%, 0.5~0.75%であり, 陰性対照の0.5%に比べ, 増加は全く見られなかった. しかも, 観察された異常は全て, gapであった.

本試験法における染色体異常誘発性の有無の陽性基準は染色体異常誘発頻度が5%以上であることを原則としてお

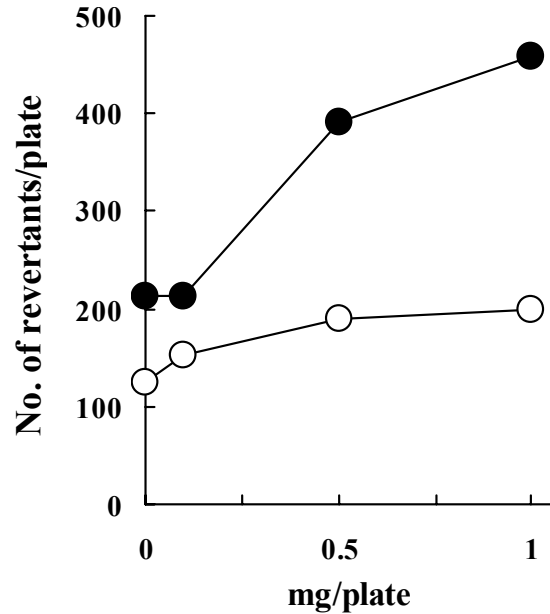


図1. 天天素のエームス試験.
○ : TA100 S9添加, ● : TA102 S9添加.

り, これは, マウスおよびチャイニーズハムスターで別に行った試験において陰性対照として用いた1000匹以上の無処理動物の自然発生異常が常に3%以下であることを踏まえたものである. また, 観察されたgapは切断や交換を誘発するものに比べると, DNAに対する障害はかなり低いものと定義されており, 染色体の構造異常としては最軽度ものである. これらの結果により, 本実験条件下においては天天素の染色体異常誘発性はないものと結論した.

次に, シブトラミンの結果を表2に示す.

投与後24時間目の結果における, シブトラミン投与群の染色体の構造異常及び数的異常の出現頻度は, 0~1.0%であり, 陰性対照の0.5%に比べ, 増加は見られなかった. また, 48時間目における異常頻度についても, 0~0.25%であり, 染色体異常細胞の増加は見られなかった. 観察された全ての異常細胞は染色体異常としては軽度のgapのみであったことから, 本実験条件下においてはシブトラミンの染色体異常誘発性はないものと結論した.

フェノールフタレインの結果を表3に示す.

投与後24時間目の結果における, フェノールフタレイン投与群の染色体の構造異常及び数的異常の出現頻度は, 全ての用量において, 0~1.0%の範囲であり, 染色体異常細胞の増加はみられなかった. 同様に, 48時間目においても, 陰性対照の0.5%に比べ, 増加はみられなかった. また, 48時間目における異常頻度についても, 0~0.25%であり, 染色体への影響は認められなかった. このことから, 本実験条件下においてはフェノールフタレインの染色体異常誘発性はないものと結論した.

天天素, シブトラミン, フェノールフタレインの単回投与染色体試験をチャイニーズハムスターを用いて行っ

表 1. 天天素清脂 結果

| 処理時間 | 用量 (mg/kg) | 観察細胞数 | 異常細胞数 | 異常% |
|------|------------|-------|-------|------|
| 6 | 672.0 | 400 | 4 | 1.0 |
| | 67.2 | 400 | 3 | 0.75 |
| | 6.72 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 0.67 | NT | | |
| | 0 | 400 | 1 | 0.25 |
| 24 | 672.0 | 400 | 4 | 1.0 |
| | 67.2 | 400 | 3 | 0.75 |
| | 6.72 | 400 | 4 | 1.0 |
| | 0.67 | 400 | 4 | 1.0 |
| | 0 | 400 | 1 | 0.25 |
| 48 | 672.0 | 400 | 3 | 0.75 |
| | 67.2 | 400 | 3 | 0.75 |
| | 6.72 | 400 | 2 | 0.5 |
| | 0.67 | 400 | 3 | 0.75 |
| | 0 | 400 | 2 | 0.5 |

観察された異常は全てクロマチッドギャップ

たが、上記の結果が示すように、いずれも染色体異常細胞の増加は見られず、本実験条件化においては染色体異常誘発性はないものと判断した。

シブトラミンは国内未承認の肥満症の治療薬であるが、これまでも様々なダイエット食品に違法に含まれており、変異原性についての報告はないが、健康被害例が報告されている¹¹⁾。

フェノールフタレインは、1998年以降、医薬品の承認成分から削除されているものであるが、ダイエット食品に含まれていた例があり、現在まで健康被害報告はないが、IARC¹²⁾の発がん性分類によれば、動物実験において、発がん性を示唆するに十分な証拠があるとされている、「2B」にランクされている。その変異原性についてもエームス試験及び培養細胞での姉妹染色分体交換試験では、ともに陰性の結果であるが、染色体試験及び小核試験では陽性の報告がある¹³⁾。

一方、今回は試験を行っていないが、天天素に含有されていたマジンドールは医師の処方のもとに食欲抑制剤として用いられているものであるが、培養細胞において、DNAの合成阻害及びアルカリ溶出性など、遺伝子突然変異性を示唆する報告がある¹⁴⁾。ダイオウは漢方薬に含まれ、寒性の瀉下薬として、熱積の便秘に適用されるものだが、マウス骨髄細胞における染色体異常及び小核を誘発することが報告¹⁵⁾されている。

表 2. シブトラミンの染色体試験結果

| 処理時間 | 用量 (mg/kg) | 観察細胞数 | 異常細胞数 | 異常% |
|------|------------|-------|-------|------|
| 24 | 50.0 | 400 | 4 | 1.0 |
| | 25.0 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 12.5 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 6.25 | 400 | 0 | 0 |
| | 0 | | 1 | 0.25 |
| 48 | 50.0 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 25.0 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 12.5 | 400 | 0 | 0 |
| | 6.25 | 400 | 0 | 0 |
| | 0 | 400 | 0 | 0 |

観察された異常は全てクロマチッドギャップ

表 3. フェノールフタレインの染色体試験結果

| 処理時間 | 川量 (mg/kg) | 観察細胞数 | 異常細胞数 | 異常% |
|------|------------|-------|-------|------|
| 24 | 2000 | 400 | 2 | 1.0 |
| | 1000 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 500 | 400 | 0 | 0 |
| | 250 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 48 | 2000 | 400 | 0 | 0 |
| | 1000 | 400 | 1 | 0.25 |
| | 500 | 400 | 0 | 0 |
| | 250 | 400 | 0 | 0 |
| | 0 | 400 | 0 | 0 |

観察された異常は全てクロマチッドギャップ

今回、我々の行った哺乳動物を用いた染色体試験では、天天素は陰性の結果であり、染色体への影響は見られなかったが、エームス試験においては変異原性を示した。この結果、天天素の変異原性は、シブトラミン及びフェノールフタレインに由来するのではなく、含有が確認されているマジンドールまたはダイオウ、あるいは他の微量の含有成分に由来するものと考えられる。

ま と め

市販ダイエット食品である天天素、混入物質である、シブトラミン、フェノールフタレインの微生物を用いた変異原性試験及び哺乳動物である、チャイニーズハムスターを

用いた染色体異常誘発試験を行った。天天素のエームス試験において、TA100及びTA102のS9添加の場合に復帰コロニー数が有意に増加し、変異原性を認めたが、シブトラミン及びフェノールフタレインは陰性の結果であり、天天素の変異原性は、シブトラミン及びフェノールフタレインに由来するものではないと思える。

染色体異常誘発試験においては、天天素、シブトラミン、フェノールフタレインのいずれも本試験条件下においては陰性の結果であり、染色体への影響はないものと判断した。

文 献

- 1) 厚労省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：中国製ダイエット用健康食品（未承認医薬品）による健康被害事例等，2003年7月12日
- 2) 厚労省医薬食品局監視指導・麻薬対策課資料：マジンドール等を含有する無承認無許可医薬品によると疑われる健康被害について，2003年5月24日
- 3) 平成17年6月6日東京都福祉保健局報道発表：ダイエット食品「天天素」が原因と疑われる健康被害事例の発生
- 4) 守安貴子，簗輪佳子，安田一郎，他：東京衛研年報，**56**, 81-86, 2005.
- 5) 吉田誠二，藤田博，小縣昭夫，上村尚：東京健安研年報，**55**, 327-330, 2004.
- 6) 吉田誠二，小縣昭夫，上村尚：東京健安研年報，**56**, 363-366, 2005.
- 7) Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 8) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**, 1178-1189, 1975.
- 9) Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 10) Seller, M.J. and Mends, A.A.: *Stain Technol.*, **46**, 285, 1971.
- 11) 厚労省医薬食品局監視指導・麻薬対策課資料：健康被害情報・無承認無許可医薬品情報，医薬品成分（シブトラミン、脱N-ジメチルシブトラミン）が検出されたいわゆる健康食品について
- 12) International Agency for Research on Cancer. <http://www.iarc.fr/>
- 13) National Toxicology Program : *Rep Carcinog.*, **10**, 195-7, 2002.
- 14) Slamenova, D. and Budayova, E., *Mutation Res.*, **169**, 171-177, 1986.
- 15) Yin, X.J., *Mutation Res.*, **260**, 73-82, 1991.