

ヒト好酸球の走化性とケモカインレセプター発現に及ぼす 不純物 PAA の影響

岡本威明¹⁾, 田頭歩佳²⁾, 中野広輔³⁾, 加藤匡宏⁴⁾, 田中守⁵⁾

1) 愛媛大学教育学部家政教育講座, 2) 愛媛大学大学院連合農学研究科, 3) 愛媛大学教育学部特別支援教育講座
4) 愛媛大学教育学部附属教育実践センター, 5) 高知県立大学健康栄養学部

Effects of the contaminant, 3-phenylamino-L-alanine,
on chemotaxis and expression of chemokine receptors in
human eosinophils

Takeaki OKAMOTO, Ayuka TAGASHIRA, Kosuke NAKANO,
Tadahiro KATO, Mamoru TANAKA

(平成28年 7 月 28 日受理)

The objective of this study was to clarify the mechanism of the allergic reaction induced by tryptophan supplement byproducts, based on empirical data on chemotactic activity, and the expression of the Interleukin (IL)-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, and the eotaxin receptor, CCR3, in human eosinophils exposed to the contaminant 3-phenylamino-L-alanine (PAA). Chemotactic activity and CXCR1 and CXCR2 expression increased after PAA exposure in a dose-dependent manner. The CXCR2 expression level was higher than that of CXCR1. These data suggest a strong correlation between chemotactic activity and IL-8 receptor expression in eosinophils exposed to PAA. In contrast, the expression of CCR3 was inhibited by PAA in a dose-dependent manner. These results suggest that the eosinophils partially lost their original character and partially adopted the character of neutrophils upon exposure to PAA. Therefore, we suggest an eosinophilia-myalgia syndrome (EMS) onset mechanism, based on the findings that PAA increased the expression of IL-8 receptors in human eosinophils, which then developed chemotaxis to IL-8, an inflammatory chemokine, leading to further inflammation that may result in EMS onset.

Keywords: tryptophan, human eosinophils, chemotaxis, chemokine receptors,
3-phenylamino-L-alanine

1. 背景および目的

今日、健康食品やサプリメントは薬局やコンビニエンスストアなどの店頭、インターネットなどあらゆる場所で購入が可能となり、消費者にとって身近な存在である。また、消費者の美容やアンチエイジングに対する意識の向上、糖尿病や心疾患などの生活習慣病の増加により、機能的健康食品の一つであるサプリメントにも注目が集まっている¹⁾。その一方で、健康食品やサプリメントが原因となった健康被害も発生している。平成19年度から23年度の5年間において、健康食品に関する危害情報は平均として年間500件前後報告されている²⁾。

過去のサプリメントの代表的な事故例として、1989年秋、米国でトリプトファンサプリメント摂取により、激しい筋肉痛と好酸球の異常増加を伴う好酸球増多筋痛症候群 {Eosinophilia-Myalgia Syndrome(EMS)} が挙げられる³⁾。当時約200万人がトリプトファンサプリメントを摂取しており、その中で1,531人がEMSを発症し、そのうち38人の死亡が確認されている³⁾。EMS発症時の血中好酸球数は1 μ Lあたり1,000個程度と通常の3倍から5倍程度に増加しており、EMSを発症した人が摂取していたトリプトファンサプリメントの95%は、日本のS社の製造した特定の時期のロットであった⁴⁾。トリプトファンサプリメントの通常摂取量においてもEMS発症に至っている例もあることから、S社が製造したトリプトファンサプリメント中における不純物の毒性が原因の一つであると考えられる。その不純物に関して、これまでの研究により主に3種同定されている⁵⁾。1つ目は、アニリン誘導体である3-phenylamino-L-alanine(PAA)であり、この物質は、芳香性・疎水性・塩基性を兼ね備えている未報告のアミノ酸である⁶⁾。2つ目は3-phenylamino-1,2-propanediol(PAP)でR体・S体のものが含まれており、1981年に起きたスペイン毒性油事件で問題となったものと同じのものである。3つ目は1,1'-ethylidenebis-L-tryptophan(EBT)で2つのトリプトファンが結合したものである。神戸大の足立らにより、ラットの体内動態に及ぼすEBTおよびPAAの影響について検討がなされた。EBTおよびPAAをラットに同量投与し、投与後5時間の体内分布を調べたところ、EBTは未分解のまま大腸に移行し、投与5時間以内に投与量の25%が排泄された。また、EBTは胃液で分解

され、1-methyl-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid(MTCA)が生成される。MTCAにおいても同様に検討が行われたところ、投与後5時間以内に56%が吸収されない状態で体外に排出され、吸収されても31%は24時間以内に排出された。一方、PAAは分解されずに吸収され、様々な臓器、特に脳に著しい蓄積が確認された。血液中のPAA濃度が最も低かったが、EBTの血中濃度と比べると25倍高い濃度であった。これらのことから、PAAは分解されずに体内に吸収され、血管脳関門を通過して中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性がある⁷⁾と示唆された。

トリプトファン事故品に特有の問題として、①原料基質がアントラニル酸(2-アミノ安息香酸)であること、②発酵工程に遺伝子組換えを行った菌株を導入したこと、③活性炭カラムや逆浸透膜などの精製工程を中間製品の脱色度などの肉眼的な判断により選択、省略されていたことが挙げられ、これらが原因でトリプトファンサプリメント製造過程に不純物が生成されたと考えられている^{2) 6)}。特にPAAに関しては、トリプトファンの基質として発酵培地中に加えられるアントラニル酸からアニリンが生成し、培地中に存在するセリンと反応することにより生成される。また、PAAは陽イオン交換樹脂処理、または活性炭処理しても生成されるため、製造原料あるいは工程中で生成を抑制しなければ、製造過程での除去は難しい。そのため、現在は製造原料にアントラニル酸ではなくインドールが利用されており、アニリンが製造過程において生成されることはないため、不純物が生成される可能性は非常に低いと考えられる⁷⁾。

また、発症の原因となったロット中のPAA含量は100~150ppm(0.010-0.015%)であった。当時の含量規格は過塩素酸による滴定法で98.5%以上(日本薬局方)および98.0~102.0%(食品添加物公定書)であったため、発症の原因となったロット製品中の不純物は規格に適合していた⁶⁾。よって、本規格は当時、製品の安全性を評価するには不十分であったと推察される。

一般的に好酸球は、末梢血中の白血球の約1~3%を占めており、アレルギー反応の制御を行う⁸⁾。好酸球数はアレルギー反応により増加する傾向が認められるため、アレルギー検査などの際によく指標として用いられる⁹⁾。通常、ヒト正常好酸球にはCRTH2レセプター

ならびに CCR3 レセプターが発現しており、走化性因子プロスタグランジン D₂ (PGD₂) ならびに Eotaxin に対して感受性を示すが、走化性因子インターロイキン (IL)-8 に対しては感受性を示さない。一方、好中球は CXCR1 および CXCR2 レセプターを発現し、IL-8 に対して感受性を示し、遊走することが報告されている¹⁰⁾。

前述したように、EMS 発症時には好酸球が異常増加し、激しい筋肉痛を伴うことから、EMS 発症における原因の一つとして、トリプトファンサプリメント中の不純物が何らかの影響を及ぼしたと推察される。そこで本研究では、PAA 曝露条件下で、走化性因子 IL-8 に対する好酸球の走化性を細胞動態解析装置にて検討するとともに、好酸球における各種ケモカインレセプターの発現レベルに与える影響を検討した。

2. 材料および方法

(1) 試薬および機器

血液凝固阻害剤には、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を用いた。白血球分離用デキストラン200,000 は Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Lymphoprep は COSMO BIO Co., Ltd. より購入した。Eosinophil isolation kit は、Miltenyi Biotec K.K. より購入した。ギムザ染色液は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. より購入した。培養培地は、RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 血清は Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Co. LLC.; ロット No.11J499), 抗生物質は Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を用いた。PAA は純度95%のレベルで化学合成され、ジメチルスルホキシド (DMSO; nacalai tesque, Inc.) を用いて溶解した。

タンパク抽出に用いた Cell lysis Buffer は Cell Signaling Technology, Inc. より購入した。電気泳動におけるゲルは4-15% Mini-PROTEAN TGX Gel, タンパク質の分子量マーカーは Precision Plus Protein Dual Color Standards, 泳動装置は Mini-PROTEAN Tetra Cell, 電源装置は PowerPac HC, 転写装置は, Wet/Tank Blotting Systems を Bio-Rad Laboratories, Inc. より購入した。ブロッキング溶液は、ブロックエース粉末 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) を使用した。各種ケモカインレセプターの検討には、1次抗体として、抗 CXCR1 抗体 (Rabbit polyclonal to CXCR1; ab13920), 抗 CXCR2

抗体 (Rabbit polyclonal to CXCR2; ab65968), 抗 CCR3 抗体 (Rabbit polyclonal to CCR3; ab36829) を Abcam plc. より購入した。2次抗体には ECL Anti-Rabbit IgG, Horeseradish Peroxidase-Linked Whole antibody (General Electric Co.), 化学発光には, ECL Prime Western Blotting Detection system 溶液 (General Electric Co.), バンドの検出には ChemiDocMP System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用した。Stripping Buffer は, Thermo Fisher Scientific K.K. より購入した。抗 GAPDH 抗体 {GAPDH (14C10) Rabbit mAb (HRP Conjugate)} は, Cell Signaling Technology, Inc. より購入した。

(2) 好酸球分離および試料調製

健康人男性より末梢血を100mL 採血し、生理リン酸緩衝液 (PBS) に溶かしたデキストランを血液の半量加えた。常温で15分間静置させた後、上清を回収し2倍量の PBS を加え300×g, 5分間遠心した。遠心後、細胞懸濁液を上清と等量の Lymphoprep の上に重層し400×g, 20分間遠心した。遠心後、顆粒球を含む赤血球ペレットに滅菌水を加えて、赤血球を溶血させ顆粒球を分離した。分離された顆粒球に、PBS で溶解された0.5%BSA 2mM EDTA (MACS バッファー) を加えて懸濁し、Eosinophil Biotin-Antibody Cocktail を加えて冷蔵で静置した。さらに MACS バッファーを加え、Anti-Biotin MicroBeads を加え再び冷蔵で静置した。遠心後、細胞懸濁液を LS カラム (Miltenyi Biotec K.K.) を用いて好酸球を分離した。分離された好酸球を PAA 各濃度で一定時間曝露した。また、好酸球精製度合いを確認するため、好酸球画分を一部用いてギムザ染色を行った。

尚、本研究は愛媛大学研究倫理委員会第4号にて審査済みである。

(3) ヒト正常好酸球および PAA 曝露好酸球の遊走活性

ヒト正常好酸球による遊走活性に関しては、調製された好酸球を37°Cで静置した後、0.1%BSA/RPMI/HEPES 培地を加え、各走化性因子 PGD₂, IL-8 に対する遊走活性を測定した。

PAA 曝露による遊走活性に関しては、調製された好酸球に各濃度の PAA 含有の培地を加え、37°Cで2時間静置した後、上清を捨て0.1%BSA/RPMI/HEPES 培

地を加え各走化性因子に対する遊走活性を測定した。遊走活性に関しては簡易型細胞走化性測定装置 (EZ-TAXIScan;ECL.Inc) を用いて行った (図 1)。

TAXIScan チップ, カバーガラス, 41番ガラス等を超音波洗浄機で10分間洗浄した後, EZ-TAXIScan ホルダーを組み立て, 微細流路を形成し EZ-TAXIScan 本体の撮影条件を設定した。走化性因子のより安定な濃度勾配を作成するため, 部品内の気泡を抜き, 正常好酸球, PAA 曝露好酸球を投入した。好酸球懸濁液 (好酸球100個程度) をある微細流路の一方に投入し, 細胞をスタートラインに並ばせ, 撮影を開始した後に, 走化性因子 ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) を他方に投入し濃度勾配を形成した。その後30分間, 正常好酸球および PAA 曝露好酸球の走化性因子に対する走化性をリアルタイムで解析した。

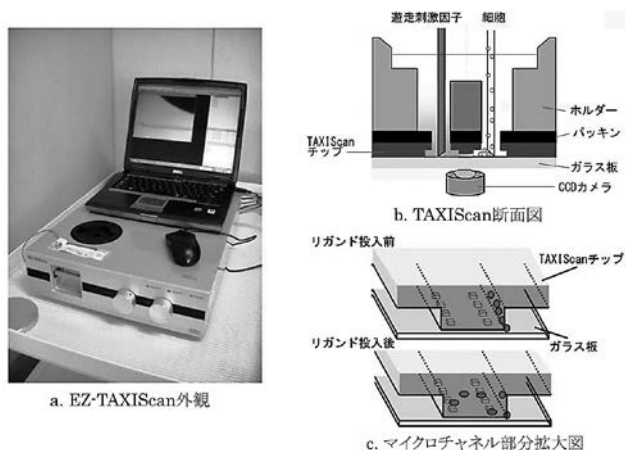


図 1 簡易型細胞走化性測定装置 (EZ-TAXIScan)

(4) ヒト好酸球における各種レセプターの検出

ヒト正常好酸球および PAA 曝露好酸球をタンパク抽出した後, ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後, Western Blotting 法を用いて, 各種レセプターの検出を行った。得たバンドを数値化し, 目的のバンドの数値を内在性コントロールである GAPDH のバンドの数値で補正することにより, 各サンプルのタンパク質量の相対値を求めた。

(5) 統計解析

各実験における測定点を 3 点とし, 統計解析ソフト SPSS Statistics 22.0 を用いて統計処理を行った。独立した 2 群の差の検定には Student の t 検定を用いた。危険率は 5% 未満を採用した。

3. 結果および考察

(1) ヒト正常好酸球の走化性評価

遊走活性の評価には, 簡易型細胞走化性測定装置 (EZ-TAXIScan) を用いた。EZ-TAXIScan は, 投入後の細胞 100 個程度を一直線に並べることでできる構造となっており, あたかも細胞がスタートラインに並ぶ格好となる。遊走因子投入により数分以内に安定な濃度勾配が形成され, それを感知して遊走していく細胞はガラス下面から CCD カメラで撮影される。遊走細胞数の自動定量ができ, 遊走像を直接モニターするので経時変化が追跡できる。また, 解析用ソフトにより短時間で簡単に多くの情報が得られ, 分析に必要とする細胞数が極少量で済むため, 生体内から分離できる数が少ないために今まで不可能だった各種の細胞の走化性を定量解析できる¹¹⁾。

ヒト好酸球の走化性因子 PGD_2 , IL-8 に対する遊走活性を評価した (図 2-a)。結果, ヒト好酸球は PGD_2 に対して強い走化性を示したが, IL-8 に対しては走化性を示さなかった。この条件下において, 各種走化性因子投入後 30 分間で約 $260 \mu\text{m}$ 遊走した細胞をカウントしたところ, PGD_2 では 14 個, IL-8 では 2 個の好酸球の遊走が確認された (図 2-b)。これらの結果から, ヒト正常好酸球は PGD_2 に対して感受性を示す一方, IL-8 に対して

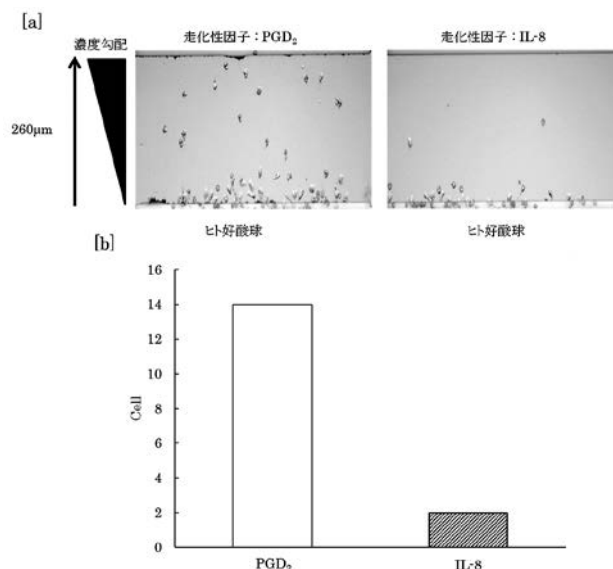


図 2 EZ-TAXIScan を用いた正常好酸球の走化性

a. 調製されたヒト好酸球の走化性因子 PGD_2 , IL-8 に対する遊走活性の評価について示した。遊走の測定には EZ-TAXIScan を用いた。上端に走化性因子, 下端に好酸球を 100 個程度投入し, 30 分間それぞれの走化性をリアルタイムで解析した。左: 走化性因子 PGD_2 右: 走化性因子 IL-8
b. 約 $260 \mu\text{m}$ 遊走した正常好酸球の個数を測定した。縦軸は約 $260 \mu\text{m}$ 遊走した細胞個数, 横軸は各走化性因子を示す。

は感受性が低いことが確認され、ヒト正常好酸球にはPGD₂レセプター (CRTH2) が高発現し、IL-8レセプター (CXCR1およびCXCR2) が低発現していることが推察された。

(2) ヒト好酸球の走化性に及ぼすPAAの影響

ヒト好酸球のPAA曝露によるIL-8に対する遊走活性を図3-a,bに示した。各濃度のPAAを2時間曝露した後、IL-8に対する走化性を前実験と同様に検討した。その結果、PAA曝露により好酸球はIL-8に対して、PAA濃度依存的に強い走化性を示した。PAA濃度0.5 μ M曝露条件下では、Control群に比べ約5倍量の細胞がIL-8に対して遊走活性を示した。このことから、ヒト正常好酸球にPAAを曝露することで、好酸球上にIL-8レセプターが高発現したのではないかと推察された。

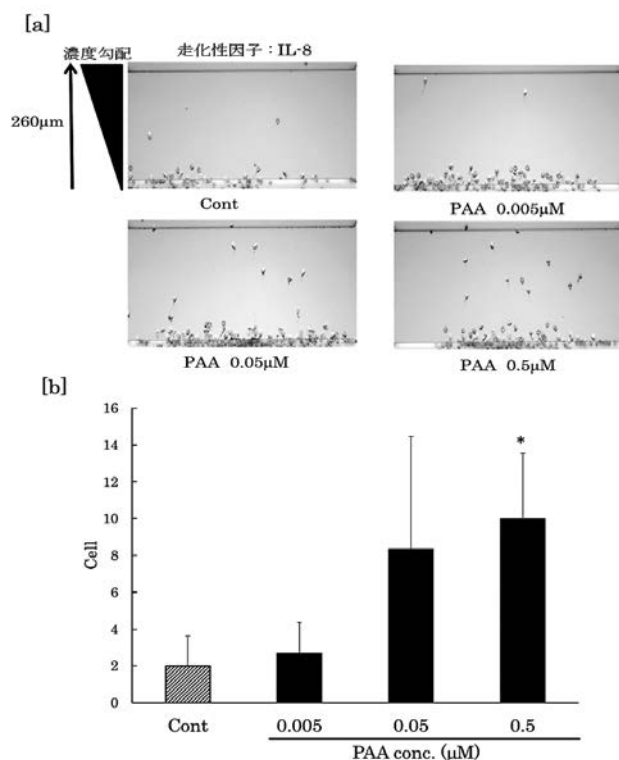


図3 好酸球の走化性に及ぼすPAAの影響

a. ヒト好酸球の不純物PAA曝露によるIL-8に対する遊走活性を示した。遊走の測定にはEZ-TAXIScanを用いた。それぞれのアッセイで上端に走化性因子IL-8、下端にPAA曝露好酸球を100個程度投入し、30分間それぞれの走化性をリアルタイムで解析した。

左上: Control (PAAなし) 右上: PAA濃度0.005 μ M 左下: PAA濃度0.05 μ M 右下: PAA濃度0.5 μ M

b. 遊走したPAA曝露好酸球の個数を測定した。

また、細胞運動には細胞骨格タンパク質であるアクチンが中心的な役割を担っている¹²⁾。PAAを曝露したことで、細胞骨格タンパク質であるアクチンやコフィリン、ゲルゾリンなどのアクチン調節タンパク質に何らかの影響があり、細胞の遊走が促進されたのではないかと推察された。

また、データには示していないが、2時間曝露した後、PAAを除去してからさらに100分後にEZ-TAXIScanを用いて再度、遊走測定を行ったところ、IL-8に対する走化性は低減しており、PAAによる好酸球のIL-8に対する走化性に及ぼす影響は可逆的なものであると示唆された。

(3) 各種ケモカインレセプターの発現に及ぼすPAAの影響

ヒト好酸球において、PAA曝露により各種ケモカインレセプターの発現レベルが増強されるか否かの検討を、ヒト好酸球にPAAを6時間曝露し、SDS-PAGE法ならびWestern Blotting法を用いて行った。図4a, 5aに示されるように、ヒト好酸球にPAAを曝露することでIL-8レセプター (CXCR1およびCXCR2) の発現レベルがPAA濃度依存的に増強されることが確認された。PAA曝露によるCXCR1およびCXCR2発現レベルを評価した結果、PAA無曝露群と比べPAA濃度0.5 μ M曝露条件下でCXCR1発現が1.3倍、CXCR2発現が1.8倍に増強された(図4b, 5b)。これらの結果は、好酸球の走化性に及ぼすPAAの影響と同傾向であることから、PAA曝露好酸球の走化性の誘導とIL-8レセプター発現の増大が深い関連を持つことが示唆された。また、PAA曝露によってIL-8レセプター発現が増大されたが、各種レセプター間で発現の増大に差が認められ、PAAは特にCXCR1よりもCXCR2レセプター発現に強い影響を与えることが確認された。よって、PAA曝露によりCXCR2レセプター発現が増大することにより好酸球のIL-8に対する走化性が誘導されることが示唆された。

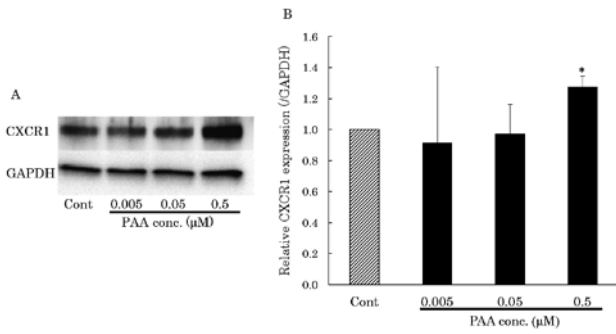


図4 ヒト好酸球における CXCR1 発現に及ぼす PAA の影響

6 時間曝露条件下における CXCR1 発現に及ぼす不純物 PAA の影響を示した。

A. PAA 曝露好酸球における CXCR1 レセプター発現の変化
B. 縦軸に相対 CXCR1 発現量 (CXCR1/GAPDH), 横軸に Control (1%DMSO 添加) および各 PAA 濃度を示した。

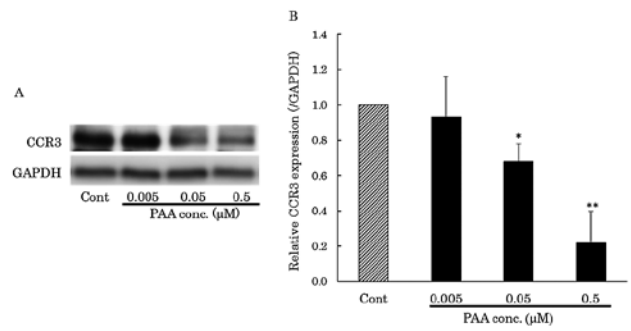


図6 ヒト好酸球における CCR3 発現に及ぼす PAA の影響

6 時間曝露条件下における CCR3 発現に及ぼす不純物 PAA の影響を示した。

A. PAA 曝露好酸球における CCR3 レセプター発現の変化
B. 縦軸に相対 CCR3 発現量 (CCR3/GAPDH), 横軸に Control (1%DMSO 添加) および各 PAA 濃度を示した。

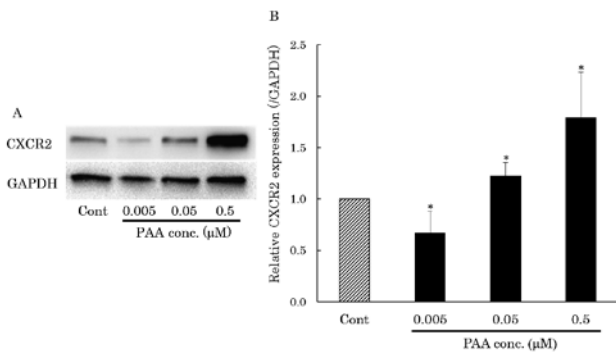


図5 ヒト好酸球における CXCR2 発現に及ぼす PAA の影響

6 時間曝露条件下における CXCR2 発現に及ぼす不純物 PAA の影響を示した。

A. PAA 曝露好酸球における CXCR2 レセプター発現の変化
B. 縦軸に相対 CXCR2 発現量 (CXCR2/GAPDH), 横軸に Control (1%DMSO 添加) および各 PAA 濃度を示した。

一方, PAA 曝露により CCR3 レセプター発現が PAA 濃度依存的に抑制されることが確認された (図 6 a)。PAA 曝露による CCR3 発現レベルを評価した結果, PAA 無曝露群と比べ, PAA 濃度 0.5 μM 曝露条件下で CCR3 発現が約 5 分の 1 にまで抑制された (図 6 b)。本来 CCR3 は主に好酸球や好塩基球に発現しており, Eotaxin を介して好酸球を遊走する¹³⁾。これらの結果より, ヒト好酸球において, 正常な好中球に高発現している IL-8 レセプターが PAA 濃度依存的に増強され, 正常な好酸球に高発現している Eotaxin レセプターが PAA 濃度依存的に抑制されたことから, PAA 曝露により好酸球が本来の性質を一部失い, 好中球の性質を部分的に獲得したのではないかと推察された。

また, PAA 曝露時間を 12 時間に設定し, 同様にヒト好酸球における IL-8 レセプター発現に及ぼす影響を確認した (data not shown)。その結果, 各種 IL-8 レセプターにおいて PAA 濃度 0.005 μM で最も強い発現増大がみられ, それ以上の濃度では CXCR1, CXCR2 レセプターともに増強効果は低減した。これらの結果は, PAA 6 時間曝露条件下と異なるものであり, 原因として PAA による長時間曝露の影響が考えられ, その 1 つとして高濃度領域においては細胞死が誘導されるのではないかと予想された。しかし, 好酸球分離後のトリパンブルー染色法による生存率の評価では, 全試験区において 98% 以上と変化が認められなかったことから, 高濃度領域で PAA による細胞への細胞死以外の何らかの影響があったのではないかと推察された。

以上の結果から, PAA 曝露された好酸球の走化性の誘導には, CXCR2 レセプターの発現の増大が強く関与していることが明らかとなった。また, 先行研究において好酸球増多筋痛症候群発症患者の PAA 血中濃度は約 0.08 ~ 0.1 μM であると報告されており⁶⁾, 本実験における処理濃度範囲と重なっている。これらのことから, EMS 発症の原因の一つとして, トリプトファン事故関連物質である不純物 PAA が好酸球の CCR3 レセプターの発現を抑制し, IL-8 レセプターの発現を増大し, 炎症性ケモカインである IL-8 への走化性を強めたことにより, 更なる炎症が惹起されたと推察された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切なご助言を頂きました川崎医科大学学生化学教室の山内明先生に深謝致します。

本研究はJSPS 科研費（25460804）の助成を受けたものである。

開示すべき利益相反はない。

参考文献・資料

- 1) 清水俊雄, 日本における機能性食品の現状, 臨床栄養105, 44-49 (2004)
- 2) 米谷民雄ら, L-トリプトファン製品による好酸球増多筋痛症候群 (EMS) および変性ナタネ油による有毒油症候群 (TOS), 食品衛生学雑誌50 (6), 279-291 (2009)
- 3) 戸田 清, 昭和電工トリプトファン食品公害事件 (下) 製造過程に潜む危険, 消費者レポート (日本消費者連盟), 第828号, 2-3 (1992)
- 4) Slutsker L, Hosely Fc, Miller L., et al, Eosinophilia-myalgia syndrome associated with exposure to tryptophan from a single manufacturer, JAMA 264, 213-217 (1990)
- 5) Goda Y, Suzuki J, Maitani T, Yoshihira K, Takeda M, Uchiyama M, 3-Anilino-L-alanine, structural determination of UV-5, a contaminant in EMS-associated L-tryptophan samples, Chem.Pharm.Bull, 40, 2236-2238 (1992)
- 6) 内山 充, L-トリプトファン摂取による EMS (好酸球増多筋痛症候群) 事例の概要と我が国における研究経過について, 食品衛生学雑誌 40 (5), 335-355 (1999)
- 7) 及川利洋, 福原信裕, L-トリプトファンの製造方法, 特開2000-342294
- 8) 子安 重夫, 免疫学最新イラストレイテッド, 羊土社, 151-152 (2003)
- 9) 谷崎 勝朗, 周藤 眞康, 貴谷 光ら, 気管支喘息の発症病態における好酸球の臨床的意義, 環境病態研報告 61, 89-97 (1990)
- 10) 内藤眞, Alexander S. Savchenko, 井上聡, 好中球と PTX3, 生物試料分析 Vol.33, No4, 329-338 (2010)
- 11) 岡本威明ら, 生物機能実験法 第6章 細胞動態の可視化による機能評価 ;TAXIScan 法の応用, 生物機能研究所, 53-65 (2013)
- 12) 榎本 篤, 細胞運動におけるアクチン細胞骨格と膜輸送の協調, 生化学誌 第80巻 第3号, 233-240 (2008)
- 13) 義江修, ケモカインとアレルギー, アレルギー 62 (8), pp.911-923 (2013)

引用 URL

- i) 内閣府消費者委員会, 「健康食品」の表示等の在り方に関する調査報告,
http://www.cao.go.jp/consumer/iinkaikouhyou/2013/houkoku/201301_kenkoshokuhin_houkoku.html
(2015,9,17)