

Diss ETH No. 11071

Ochratoxin A in Humans: Exposure, Kinetics and Risk Assessment

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Irène Studer-Rohr

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born April 7, 1966

citizen of Lucerne

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ch. Schlatter, examiner

Dr. J. Schlatter, co-examiner

PD Dr. D. Dietrich, co-examiner

1995

Zusammenfassung

Ochratoxin A (OA) ist ein Mycotoxin, das von zwei ubiquitären Schimmelpilzarten (*Aspergillus* und *Penicillium*) produziert wird. OA weist eine relativ geringe akute Toxizität auf. Es wurden jedoch grosse Speziesunterschiede beobachtet. Die LD₅₀ nach oraler Applikation lag für Mäuse zwischen 46-58mg/kg KG, für Schweine, Katzen, Kaninchen und Hunde jedoch zwischen 0.2-1mg/kg KG. In allen bisher untersuchten Tierarten fand man Nierenschäden nach chronischer Verfütterung von OA. Nephropathien in Schweinen und Geflügel konnten auf kontaminiertes Futter, welches hohe OA-Konzentrationen aufwies, zurückgeführt werden. Im 2-Jahres Versuch an der Ratte erwies sich OA als starkes Nierenkanzerogen. Grosse Unterschiede in der Tumorzinzidenz wurden jedoch zwischen den Geschlechtern beobachtet, wobei die männlichen Tiere viel höhere Tumorraten als die Weibchen aufwiesen. Ähnliche Beobachtungen wurde bei Mäusen gemacht, wobei jedoch 20x höhere Dosen notwendig waren, um vergleichbare Schäden zu erzeugen.

Hauptsächlich findet man OA auf Getreide, aber auch in Bier, Kaffee, getrockneten Früchten und sekundär auch im Fleisch von Nutztieren nach Verfütterung verschimmelten Getreides.

Eigene Untersuchungen von 31 Getreideproben des Schweizerischen Detailhandels, zusammen mit 2 anderen Studien, ebenfalls durchgeführt mit Getreideproben vom Schweizer Markt (n=152, OA-Konzentrationen: 0.1-3.8µg/kg), haben gezeigt, dass die OA-Konzentrationen in der Schweiz in demselben Bereich liegen wie in anderen europäischen und nordamerikanischen Ländern. In der vorliegenden Studie waren 7 der 31 Proben positiv und wiesen Konzentrationen zwischen 0.1-1.4µg/kg auf. In der Schweiz wurde vor kurzem ein Toleranzwert von 2µg/kg für Getreide und die daraus hergestellten Produkte festgesetzt. Würde dieser Wert auf die obengenannten Proben angewendet, so hätten lediglich 6 der 183 analysierten Proben zurückgewiesen werden müssen. Auf Grund der vor allem in Deutschland erhobenen Cerealien und Fleischproben wurde eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von OA von ca. 80ng/Person berechnet. Dieser Wert kann jedoch je nach Essgewohnheiten auch erheblich höher liegen.

Das Vorkommen von OA in grünem Kaffee ist schon öfter beschrieben worden. Über den Einfluss des Röstens von Kaffee auf den OA-Gehalt wurden hingegen sehr unterschiedliche Daten publiziert. In der vorliegenden Studie wurde in 13 von 25 grünen Kaffee-Proben OA nachgewiesen, was gut mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt. Mit einer verbesserten Analysenmethode konnte aber gezeigt werden, dass das OA beim Rösten nicht zerstört wird und, dass auch bei der Zubereitung des Kaffeegetränks das OA vom Pulver in das Gebräu übergeht. In 40 Kaffeegetränkeproben, die aus Mustern des schweizerischen Detailhandels hergestellt wurden, wiesen 18 nachweisbare Mengen an OA auf (0.4-7.8µg OA/kg Kaffeebohnen). Wird daraus die täglich via Kaffee aufgenommene Menge OA berechnet, so ergibt dies ca. 25ng/Person. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass regelmässiger Kaffeeconsum wesentlich zur Belastung des Menschen mit OA beitragen könnte.

Auf Grund der grossen Häufigkeit kontaminierter Esswaren wurde OA auch in menschlichen Blutproben untersucht. Grosse Studien wurden zunächst im Balkangebiet durchgeführt, da man einen Zusammenhang zwischen OA und der endemischen Balkannephropathie vermutete. Später wurde jedoch OA auch in verschiedenen anderen europäischen Ländern in Humanblutproben nachgewiesen. Durch verbesserte Analysenmethoden konnte die Nachweisgrenze ständig gesenkt werden, was dazu führte, dass in den neuesten Studien in sämtlichen analysierten Blutproben OA nachgewiesen werden konnte. Die Konzentrationen lagen zwischen 0.06-14.0ng/ml, wobei die Mittelwerte zwischen 0.2-0.6ng/ml lagen.

In der vorliegenden Arbeit interessierte vor allem der Verlauf des Plasmaspiegels in einzelnen Personen über längere Zeit. Bei 8 Personen wurde über 2 Monate hinweg regelmässig Blut untersucht. Die OA-Konzentrationen im Plasma lagen zwischen 0.2-0.9ng/ml. Der Verlauf der Plasmaspiegel war bei den jeweiligen Personen stark unterschiedlich. Bei einzelnen ergaben sich praktisch keine Unterschiede zwischen den Messpunkten, während bei anderen riesige Schwankungen auftraten.

Nicht nur bei der akuten Toxizität, auch bei den pharmakokinetischen Parametern existieren grosse Speziesunterschiede. Die Halbwertszeiten variieren von 0.7h beim Fisch bis zu 510h beim Affen. Da auf Grund dieser Daten eine Voraussage bezüglich der OA Kinetik im Menschen schwierig war, wurde von einem freiwilligen männlichen Probanden 395ng

radiomarkiertes OA eingenommen. Die Eliminationskurve konnte am besten durch ein offenes 2-Kompartimente Modell beschrieben werden. Die Halbwertszeit wurde auf 35.5 Tage berechnet. Im Gegensatz zur Anfangsphase, in der nur ein Teil des OA im Urin wiedergefunden wurde (was auf eine Verteilung im Körper hindeutet), wurde während der Eliminationsphase praktisch das gesamte Ochratoxin und dessen Metaboliten via der Nieren ausgeschieden. Auf Grund der langen Halbwertszeit wurde nur eine sehr kleine renale Clearance gefunden (ca. 0.05ml/Min.). Basierend auf diesen kinetischen Daten und einer mittleren Plasma Konzentrationen wurde die tägliche Aufnahme von OA auf ca. 85ng/Person geschätzt. Dieser Wert korreliert gut mit der geschätzten täglichen Aufnahme, die mittels OA-Konzentrationen in Lebensmitteln berechnet wurde.

Eine präzise Risikovoraussage für den Menschen, basierend auf den Tierdaten und den hier präsentierten Daten vom Menschen ist dennoch sehr schwierig zu machen, da der Kanzerogenitätsmechanismus nach wie vor unbekannt ist.

Summary

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin which is produced by two ubiquitous fungal species (*Aspergillus* and *Penicillium*). Ochratoxin A has a relatively low acute toxicity, however large species differences were observed. After oral application the LD₅₀ was found to be in the range of 46-58mg/kg bw in mice and between 0.2-1mg/kg bw in pigs, cats, rabbits and canines, respectively. It was found to be nephrotoxic in all species tested so far. Nephropathies in swine and poultry were found to be induced by feed containing high concentrations of OA. In a 2-year-study with rats OA was shown to be a potent kidney carcinogen. However, large sex differences in the tumor incidence were observed, with the males being much more sensitive to OA than the females. Similar observations were made in mice but a 20-fold higher dose was needed to induce similar damage.

OA is a frequent feed and food contaminant, i.e. is found predominantly in cereals including corn, but also in beer, coffee and dried fruit. The contamination of OA found in meat is due to indirect transmission of contaminated feed into the tissue of cattle.

One of the goals of this study was to look at the degree of OA contamination in cereals of the Swiss retail market. Our results of 31 analysed cereal samples together with the results of two other studies with totally 152 samples (OA-levels: 0.1-3.8µg/kg) from the Swiss retail market revealed that the levels measured were in the same range as they were found in other European and Northern American countries. In our study 7 positive samples were found containing OA in the range of 0.1-1.4µg OA/kg. Switzerland only recently established a tolerance level for OA contamination in cereals and its products of 2.0µg/kg. Applying this tolerance level to the 183 samples analysed from the Swiss retail market only 6 would have had to be rejected. Based on a large data base of cereal and meat samples especially from Germany it was calculated that the average daily intake via food is around 80ng/person, but depending on nutritional habits it may also be considerably higher.

The frequent contamination of green coffee beans with OA was also reported several times. Inconsistent results, however, have been published regarding the influence of roasting on the OA content in roasted beans and the transfer into the coffee brew. In our investigations we detected OA in

13 of 25 green coffee samples, which is in line with the results of the literature. With an improved method of analysis it could be shown, that OA is not destroyed by the roasting process and that it is eluted from the powder into the brew. It was further found, that of 40 coffee brews prepared from coffee samples from the Swiss retail market, 18 contained OA in the range of 0.4-7.8 μ g OA/kg. Applying these results for calculating the daily intake of OA it was found that around 25ng OA/person and day are taken up via coffee. This indicates that regular coffee consumption may contribute significantly to human OA exposure.

As a result of the frequent contamination of OA in food items OA was also analysed in human blood samples. Large studies with human blood samples were carried out mainly in the Balkan area where a link between the Balkan endemic nephropathy and OA was suggested. But OA was also found in many other European countries in human blood samples. With improved analytical methods the detection limit could be lowered and as a result the percentage of blood samples, in which OA could be detected, increased. Already several groups from different European countries reported that 100% of the analysed samples were positive with levels ranging from 0.06-14.0ng OA/ml plasma. The mean concentrations were usually around 0.2-0.6ng OA/ml.

In order to get more distinct informations about the variation of the plasma levels the following trial was carried out: the intraindividual variations of OA were measured in plasma levels in 8 volunteers over a period of two months. The concentrations detected in the 8 persons ranged from 0.2-0.9ng OA/ml. The levels in some individuals remained nearly constant, whereas others varied considerably during the observation period.

Regarding the toxicokinetic profile of OA large species differences were observed. Half-lives varied from 0.7 hours in fish up to 510h in monkeys. Based on these results a prediction of the human kinetic parameters seemed to be difficult. The half-life of OA in human and the clearance was therefore studied by giving 395ng radio labelled OA to one male volunteer. The elimination was best described by a two compartment open model. The elimination half-life of the plasma was calculated to be 35.5 days. In contrary to the first phase, where only part of the OA was excreted via urine (which could be a result of concomitant distribution of OA within the body), in the elimination phase most of the OA and its metabolites were

found to be excreted via urine. The renal clearance was therefore very low (around 0.05ml/min). Based on these kinetic data and a mean plasma level a daily uptake of 85ng OA/person was calculated, which compares well with the daily uptake calculated from intake of contaminated food.

A precise risk prediction for humans, based on the data of the animal assays and the known human data, is however difficult to achieve, as the mechanism of carcinogenesis is still unknown.