

分担研究報告書

ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び  
分析の精密化に関する研究（その2）

分担研究者 豊田 正武

（実践女子大学）

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)  
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究

(3)ダイオキシン類の迅速測定法及び分析の精密化に関する研究  
(3-2)食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解・溶媒抽出法の評価

分担研究者 豊田正武 実践女子大学教授(元国立医薬品食品衛生研究所・食品部長)

研究要旨

アルカリ(水酸化カリウム水溶液)分解・ヘキサン抽出法の食品中ダイオキシン類分析における評価を行った。アルカリ分解のダイオキシン類(17種 PCDD/Fs 及び 12種 Co-PCBs)に対する影響を実試料に対する添加回収試験により検討したところ、ほとんどの検体で良好な回収率(79-107%)が得られ、アルカリ分解によるダイオキシン類の分解は認められなかった。マグロでは、アルカリ分解による OCDF の損失(回収率<61%)が認められたが、対応するクリーンアップスパイクをアルカリ分解前に加えることで、定量値への影響は防止することができた。また、一般的な抽出法であるソックスレー抽出と魚試料を用いて比較試験を行ったところ、同等のダイオキシン類定量値が得られた。さらに、本法を用いてダイオキシン類濃度の認証値つき試料を分析したところ、ほとんどの場合で認証範囲内の定量値が得られた。本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法であると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部  
堤 智昭、天倉吉章

A.研究目的

魚介類・乳製品等の食品はダイオキシン類の主要な摂取経路であり、汚染実態を把握することが重要な課題となっている<sup>1)</sup>。これら食品中のダイオキシン類分析では、試料由来の強力なマトリックスのため、アルカリ分解によりマトリックスを分解後、溶媒抽出を行う方法が汎用されている。しかし、高温条件でアルカリ分解を行った場合は、一部の高塩素化ダイオキシン類が損失する恐れが指摘されている<sup>2-5)</sup>。日本においては、室温条件でアルカリ分解後、ヘキサン抽出する方法が汎用されているが、ダイオキシン類分析に対する詳細な評価は行われていない。

そこで、本研究では汎用されている方法の一つである、水酸化カリウム水溶液分解(室温で一晩放置条件)・ヘキサン抽出法のダイオキシン類分析における評価を行った。

B.研究方法

1.試薬、試液及び器具

使用した溶媒は、全てダイオキシン類分析用(関東化学㈱)を使用した。シリカゲルは PCB 分析用(和光純薬工業㈱)、10%硝酸シリカゲルはダイオキシン分析用(和光純薬工業㈱)、アルミナはダイオキシン分析用(ICN 社)、活性炭は活性炭分散シリカゲル(関東化学㈱)を使用し、各カラムは食品のダイオキシン分析暫定ガイドライン<sup>6)</sup>に従い作製した。ダイオキシン類標準品は Wellington 社製を使用した。

2.試料

牛乳及び魚試料(スズキ、ムキカレイ及びマグロ(赤身))は、東京都内のスーパーマーケットで購入した。魚試料は筋肉部を採取後、ホモジナイザーで均一化し使用した。また、アルカリ分解・ヘキサン抽出法とソックスレー抽出法の比較試験には、スズキ試料を凍結乾燥し、使用した。認証試料は CRM607 (European Commission) と、CARP-1 (National Research Council Canada)を購入し使用

した。

### 3. 装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)は日本電子製(JMS-700)を使用した。

### 4. 水酸化カリウム水溶液分解・ヘキサン抽出

魚試料にクリーンアップスパイク(CS)(WHO-TEFが定められている17種PCDD/Fs及び12種Co-PCBsの<sup>13</sup>Cラベル化異性体混合液)を添加した。2 mol/L水酸化カリウム水溶液(200 ml)を加えた後、室温で16時間放置し、アルカリ分解を行った。アルカリ分解後、メタノール(150 ml)を加え、ヘキサン(100 ml)で振とう抽出(10分×3回)を行った。その後、抽出液は2%(w/v)塩化ナトリウム水溶液(150 ml)により2回洗浄した。

### 5. ソックスレー抽出

魚試料(凍結乾燥品)にCS添加後、ソックスレー抽出(アセトン/ヘキサン=1/1(300 ml)により16時間抽出)を行った。抽出液は減圧濃縮し、ヘキサン(200 ml)に溶媒置換した。

### 6. クリーンアップ及びHRGC/HRMS分析

平成13年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)分担研究報告書(1-2)(ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)と同様に行った。

### 7. 添加回収試験

既知量のダイオキシン類混合液(17種PCDD/Fs及び12種Co-PCBs)を実試料(牛乳、スズキ、カレイ及びマグロ、各100 g)に添加し、上述したアルカリ分解を行った。試料中におけるダイオキシン類の添加濃度は、0.8~4.0 pg/gであった。アルカリ処理後、CSを添加し精製及びダイオキシン類の定量を行った。また、他の汎用されているアルカリ分解条件である、1 mol/L水酸化カリウムエタノール溶液(200 ml)による室温放置条件(約16時間)についても、本アルカリ分解と比較のため、一部の試料について適用した。無添加試料からダイオキシン類が定量された場合は、添加試料から定量値を差し引いて回収率を求めた。

## C. 研究結果及び考察

### 1. アルカリ分解がダイオキシン類に与える影響

アルカリ分解がダイオキシン類に与える影響を、実試料に対するダイオキシン類(29異性体混合物)の添加回収試験により検討した。表1には、各試料を室温でアルカリ分解した後の平均回収率を示した。水酸化カリウム水溶液分解では、マグロを除き良好な回収率(79-107%)が添加した全異性体について得られた。マグロ#1ではOCDFの損失(回収率61%)が認められ、同様の傾向が異なるマグロ#2でも確認された。OCDFの損失が認められた場合でも、低塩素側の異性体(TCDFs-HpCDFs)の回収率に大きな上昇が見られないことから、脱塩素反応による低塩素側の2,3,7,8位塩素置換体の生成は生じていないようであった。なお、マグロ#2の括弧内に示したように、定法どおりアルカリ処理前にCSを添加した場合は、OCDFの損失は対応する<sup>13</sup>CラベルOCDFにより補正されるため、定量値への影響は防止できた(99%)。この場合における<sup>13</sup>CラベルOCDFの回収率は、アルカリ分解中に損失するため他の<sup>13</sup>Cラベル異性体よりも低くなったが、ガイドライン<sup>6)</sup>の下限値以上(>40%)の数値であった。

他の汎用されているアルカリ分解条件である、水酸化カリウムエタノール溶液を用いた場合は、マグロにおけるOCDFの損失はさらに大きくなった。さらに、他の高塩素化PCDFs(1,2,3,4,7,8,9-HpCDF)についても損失が認められた。一部の低塩素側のPCDFs異性体(1,2,3,7,8-及び2,3,4,7,8-PeCDFs)の回収率が100%を大きく超えていることから、高塩素化PCDFsの損失に脱塩素反応が関わっていると考えられた。

図1には、OCDF損失が認められたマグロ#2において、添加したダイオキシン類(2,3,7,8位塩素置換体)以外の低塩素側ダイオキシン類の生成が生じていないか確認するため、SIMクロマトグラム(TCDFs-HpCDFs)を示した。本アルカリ分解では、OCDFの損失が生じたにもかかわらず、新たな低塩素側の異性体の生成は認められなかった(図1(a))。従って、本アルカリ分解のOCDFの損失メカニズムは脱塩素反応によるものでない可能性が示唆された。一方、水酸化カリウムエタノール溶液を使用した場合は、添加したダイオキシン類以外の異性体(アスタリスクを付けたピーク)が多く認めら

れた。これらの異性体は未添加試料に存在しないことから、アルカリ分解中に脱塩素反応により生じたと考えられる。

## 2. アルカリ分解・溶媒抽出法とソックスレー抽出法のダイオキシン類定量値の比較

本アルカリ分解・ヘキサン抽出法のダイオキシン類分析における信頼性を検討するため、本法とソックスレー抽出法のダイオキシン類定量値の比較を行った。表 2 には、同一のスズキ試料を分析した時の、両法におけるダイオキシン類の平均定量値及び標準偏差を示した。本法により得られた平均値はソックスレー抽出の平均値と非常に近く、標準偏差も同程度であった。また、CS の回収率も本法で 54-105%、ソックスレー抽出法で 62-105%と同程度の範囲であった。

さらに、両法により得られた SIM クロマトグラムにも、大きな違いは認められなかった。最も複雑なクロマトグラムのパターンが得られた PeCDFs 及び mono-*ortho* PeCBs の SIM クロマトグラムを、図 2 に示した。このように、本法により得られたクロマトグラムのパターンは、ソックスレー抽出法の場合とほぼ同一であり、定量ピークに対する夾雑物の妨害ピークは認められなかった。以上の結果より、本法を用いた場合でも、一般的な他の方法と同等のダイオキシン類定量値が得られると考えられる。

## 3. アルカリ分解・溶媒抽出法による認証試料のダイオキシン類分析

ダイオキシン類分析における信頼性をより評価するため、本法により 2 種類のダイオキシン類の認証試料を分析した。表 3(a)には、本法による粉乳試料(CRM-607)の定量値と認証値を示した。粉乳試料の分析は 2 回行い、ほとんどの異性体の定量値が認証値の範囲内であった。一部の異性体(1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF 及び 1,2,3,4,7,8-HxCDF)の定量値が認証値の範囲から外れたが、そのずれは小さかった。また、表 3(b)には、本法による鯉試料(CARP-1)の定量値と認証値を示した。鯉試料の分析は 3 回行い、全ての定量値が認証値の範囲内であった。このように本法を用いた場合でも認証値に近い定量値が得られ、さらに本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法であると考えられる。

## D. 結論

- 1) 水酸化カリウム水溶液によるアルカリ分解法は、ほとんどの検体でダイオキシン類の損失を生じさせず、マトリックスを分解することが可能であった。
- 2) マグロでは本アルカリ分解による OCDF の損失が認められたが、CS で補正されるため定量値への影響は防止できた。
- 3) 本アルカリ分解後にヘキサン抽出を行うことで、他の抽出法と比較し、同等のダイオキシン類定量値が得られた。さらに、本法により認証試料を分析した結果、認証値に近い定量値が得られた。本法は特別な器具を必要とせず、操作が簡便であることから有用な方法と考えられる。

## E. 参考文献

- 1) Tsutsumi T, Iida T, Hori T, Nakagawa R, Tobiishi K, Yanagi T, Kono Y, Uchibe H, Matsuda R, Sasaki K, Toyoda M. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, 45 (2001) 1129-1137.
- 2) Ryan JJ, Lizotte R, Panopio LG, Lau BPY, Masuda Y. The effect of strong alkali on the determination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs). *Chemosphere*, 18 (1989) 149-154.
- 3) Firestone D. Determination of dioxins and furans in foods and biological tissues: review and update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 (1991) 375-384.
- 4) 高菅卓三、青野さや香、秋月哲也、中川貴之、渡邊清彦、井上毅:アルカリ分解法を用いた PCB、ダイオキシン分析の課題。第 10 回環境化学討論会講演要旨集(2001) 28-29.
- 5) 大高広明、牧野和夫:生体試料のダイオキシン類分析における加熱アルカリ分解法の可否について。第 10 回環境化学討論会講演要旨集(2001) 128-129.
- 6) 厚生省生活衛生局“食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定方法暫定ガイドライン”平成 11 年 10 月

## F.研究業績

### 1.論文発表

1) Tsutsumi T, Amakura Y, Sasaki K, Toyoda M, Maitani T. Evaluation of an aqueous KOH digestion followed by hexane extraction for analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retailed fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375 (2003)

792-798.

### 2.学会発表

1) 堤 智昭、天倉吉章、佐々木久美子、豊田正武、米谷民雄. 食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解の影響. 第 11 回環境化学討論会 (2002.6)

表1 各試料のアルカリ分解後におけるダイオキシン類回収率<sup>a</sup>

Isomers	Recovery, % <sup>b</sup>					
	Aqueous KOH					Ethanol KOH
	牛乳	ムキカレイ	スズキ	マグロ#1	マグロ#2	マグロ#2
<b>PCDDs</b>						
2378-TCDD	93	106	95	97	84 (96) <sup>c</sup>	87
12378-PeCDD	96	100	99	92	96 (96)	92
123478-HxCDD	90	93	97	98	85 (96)	94
123678-HxCDD	94	96	91	91	93 (91)	97
123789-HxCDD	97	100	97	93	92 (100)	96
1234678-HpCDD	94	95	94	101	98 (101)	108
OCDD	99	100	101	85	97 (98)	87
<b>PCDFs</b>						
2378-TCDF	102	94	94	98	83 (89)	108
12378-PeCDF	96	98	104	86	97 (106)	142
23478-PeCDF	93	97	95	86	92 (100)	131
123478-HxCDF	101	96	99	88	103 (99)	74
123678-HxCDF	103	94	103	94	98 (102)	82
123789-HxCDF	98	104	101	85	91 (96)	62
234678-HxCDF	97	98	97	97	90 (95)	77
1234678-HpCDF	95	95	94	94	91 (101)	81
1234789-HpCDF	107	105	102	81	76 (97)	39
OCDF	92	96	90	61	57 (99)	15
<b>Non-ortho PCBs</b>						
33'44'-TCB (#77)	101	93	95	92	86 (100)	95
344'5'-TCB (#81)	101	101	100	93	80 (97)	93
33'44'5'-PeCB (#126)	96	101	91	89	88 (95)	95
33'44'55'-HxCB (#169)	83	79	83	93	80 (83)	79
<b>Mono-ortho PCBs</b>						
233'44'-PeCB (#105)	101	- <sup>d</sup>	-	91	93 (101)	104
2344'5'-PeCB (#114)	107	-	96	91	102 (108)	100
23'44'5'-PeCB (#118)	105	-	-	90	79 (89)	104
2'344'5'-PeCB (#123)	103	-	102	95	87 (105)	110
233'44'5'-HxCB (#156)	93	-	99	94	97 (96)	95
233'44'5'-HxCB (#157)	103	-	95	93	101 (108)	103
23'44'55'-HxCB (#167)	101	-	105	92	98 (103)	97
233'44'55'-HpCB (#189)	104	-	90	102	103 (97)	94

<sup>a</sup> ダイオキシン類標準混合液(29異性体)を各試料に添加(添加濃度は0.8-4.0 µg/g)

<sup>b</sup> Mean (n = 2)

<sup>c</sup> クリーンアップスパイクをアルカリ分解前に添加した時の回収率

<sup>d</sup> 添加濃度に対し汚染濃度が高いため算出不能

表2 アルカリ分解・溶媒抽出とソックスレー抽出によるダイオキシン類測定値の比較 (スズキ)

Isomers	Dioxin levels, pg/g <sup>a</sup>				Ratio <sup>b</sup>
	アルカリ分解・溶媒抽出		ソックスレー抽出		
<b>PCDDs</b>					
2378-TCDD	0.19 ± 0.01	(85) <sup>c</sup>	0.20 ± 0.02	(89)	1.0
12378-PeCDD	0.74 ± 0.02	(91)	0.73 ± 0.05	(96)	1.0
123478-HxCDD	0.16 ± 0.01	(95)	0.18 ± 0.01	(92)	0.9
123678-HxCDD	0.54 ± 0.04	(92)	0.59 ± 0.03	(91)	0.9
123789-HxCDD	0.07 ± 0.01	(98)	0.08 ± 0.01	(100)	1.0
1234678-HpCDD	0.23 ± 0.01	(92)	0.27 ± 0.02	(85)	0.9
OCDD	0.62 ± 0.06	(65)	* <sup>d</sup>	(64)	-
<b>PCDFs</b>					
2378-TCDF	1.31 ± 0.05	(105)	1.49 ± 0.04	(99)	0.9
12378-PeCDF	0.39 ± 0.03	(90)	0.41 ± 0.01	(93)	1.0
23478-PeCDF	1.83 ± 0.07	(98)	2.10 ± 0.03	(91)	0.9
123478-HxCDF	0.14 ± 0.01	(90)	0.13 ± 0.00	(91)	1.1
123678-HxCDF	0.17 ± 0.01	(87)	0.16 ± 0.01	(85)	1.0
123789-HxCDF	<LOQ	(91)	<LOQ	(93)	-
234678-HxCDF	0.33 ± 0.01	(98)	0.33 ± 0.03	(95)	1.0
1234678-HpCDF	0.06 ± 0.01	(82)	0.06 ± 0.01	(75)	0.9
1234789-HpCDF	<LOQ	(83)	<LOQ	(85)	-
OCDF	<LOQ	(54)	<LOQ	(62)	-
<b>Non-ortho PCBs</b>					
33'44'-TCB (#77)	52.7 ± 1.7	(74)	57.8 ± 2.8	(78)	0.9
344'5'-TCB (#81)	2.4 ± 0.1	(75)	2.5 ± 0.2	(75)	0.9
33'44'5'-PeCB (#126)	33.4 ± 0.2	(86)	32.9 ± 0.9	(85)	1.0
33'44'55'-HxCB (#169)	10.4 ± 0.1	(100)	9.9 ± 0.1	(105)	1.0
<b>Mono-ortho PCBs</b>					
233'44'-PeCB (#105)	1180.2 ± 14.7	(88)	1118.8 ± 9.4	(82)	1.1
2344'5'-PeCB (#114)	87.4 ± 2.3	(93)	87.9 ± 6.2	(86)	1.0
23'44'5'-PeCB (#118)	3588.6 ± 100.5	(94)	3532.9 ± 104.7	(91)	1.0
2'344'5'-PeCB (#123)	57.5 ± 2.9	(90)	57.3 ± 4.7	(90)	1.0
233'44'5'-HxCB (#156)	490.8 ± 16.9	(96)	466.8 ± 6.4	(91)	1.1
233'44'5'-HxCB (#157)	127.8 ± 6.1	(95)	116.8 ± 3.0	(88)	1.1
23'44'55'-HxCB (#167)	245.7 ± 7.1	(94)	248.3 ± 7.5	(92)	1.0
233'44'55'-HpCB (#189)	58.5 ± 0.4	(103)	62.3 ± 4.4	(92)	0.9

<sup>a</sup> Mean ± SD (n = 3)

<sup>b</sup> アルカリ分解測定値/ソックスレー抽出測定値

<sup>c</sup> クリーンアップスパイクの平均回収率

<sup>d</sup> 高い操作ブランクが認められたため数値化不能

表3 アルカリ処理・溶媒抽出による認証検体のダイオキシン類測定値

a) 粉乳試料 (CRM-607)

Isomers	Measured conc., pg/g		Certified conc., pg/g	
	1st	2nd	Mean	Uncertainty <sup>a</sup>
<b>PCDDs</b>				
2378-TCDD	0.25	0.24	0.25	0.03
12378-PeCDD	<u>0.74</u> <sup>b</sup>	0.76	0.79	0.04
123478-HxCDD	0.45	0.44	0.42	0.07
123678-HxCDD	0.88	0.90	0.98	0.11
123789-HxCDD	0.30	0.33	0.34	0.05
<b>PCDFs</b>				
2378-TCDF	0.03	0.03	0.05	0.03
12378-PeCDF	0.05	0.05	0.054	0.013
23478-PeCDF	<u>1.50</u>	<u>1.67</u>	1.81	0.13
123478-HxCDF	<u>0.84</u>	<u>0.79</u>	0.94	0.04
123678-HxCDF	0.94	0.98	1.01	0.09
234678-HxCDF	1.04	1.09	1.07	0.05

<sup>a</sup> 95%信頼区間

<sup>b</sup> 95%信頼区間外の値

b) 鯉試料 (CARP-1)

Isomers	Measured conc., pg/g <sup>a</sup>		Certified conc., pg/g	
	Mean	Range	Mean	Uncertainty <sup>b</sup>
<b>PCDDs</b>				
2378-TCDD	6.19	6.02 - 6.31	6.6	0.6
12378-PeCDD	3.86	3.68 - 4.04	4.4	1.1
123478-HxCDD	1.89	1.76 - 2.01	1.9	0.7
123678-HxCDD	5.36	5.24 - 5.45	5.6	1.3
123789-HxCDD	0.63	0.61 - 0.66	0.7	0.4
1234678-HpCDD	5.78	5.65 - 6.04	6.5	1.8
OCDD	5.00	4.97 - 5.05	6.3	1.9
<b>PCDFs</b>				
2378-TCDF	10.58	10.40 - 10.78	11.9	2.7
12378-PeCDF	4.37	4.26 - 4.52	5.0	2.0
<b>Mono-ortho PCBs</b>				
233'44'-PeCB (#105)	58306	57447 - 59773	54000	24000
23'44'5'-PeCB (#118)	152752	151422 - 153752	132000	60000

<sup>a</sup> n = 3

<sup>b</sup> 95%信頼区間



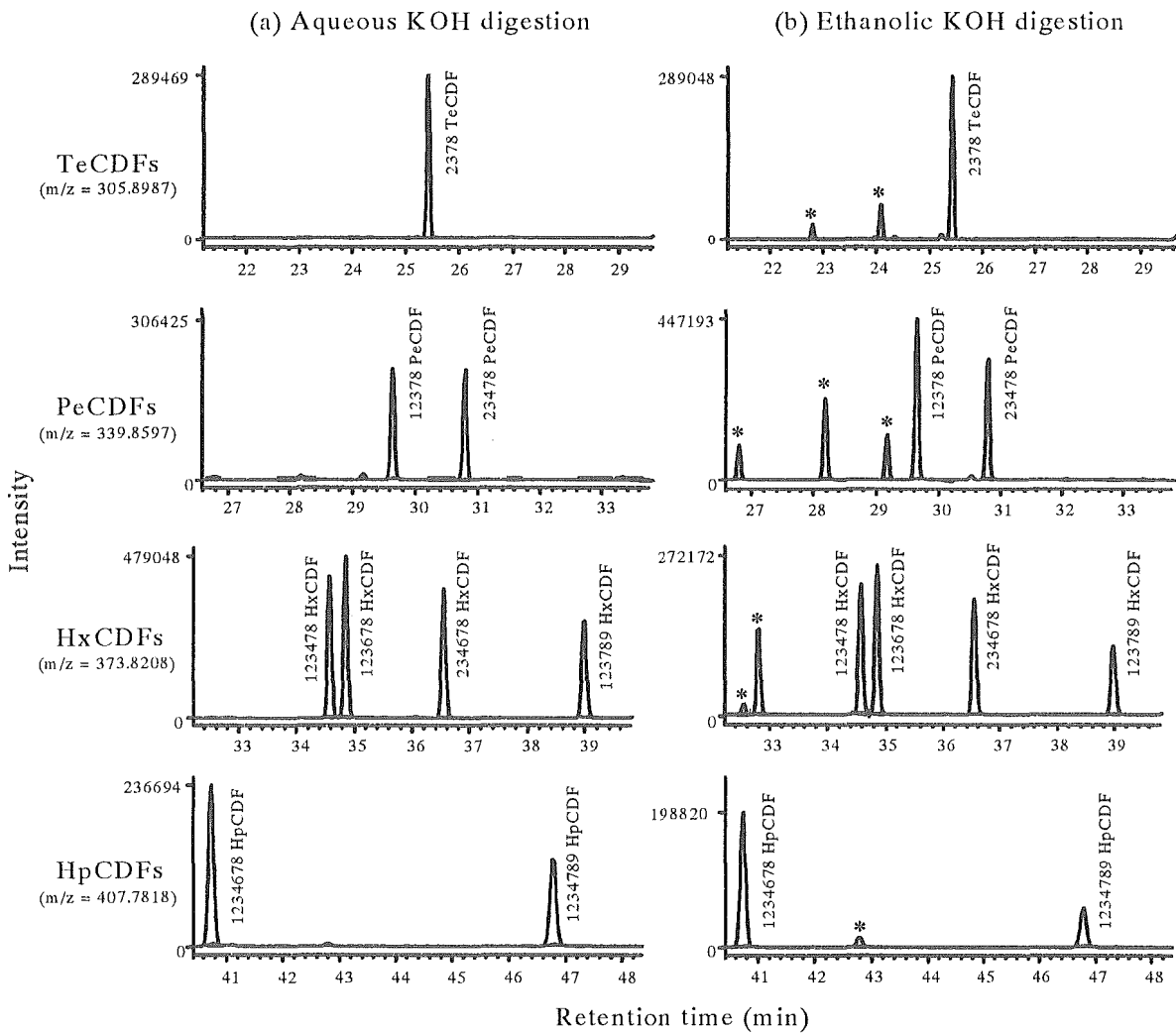


図 1 ダイオキシン類を添加したマグロ試料の SIM クロマトグラム (tetra- to heptachlorinated dibenzofurans): (a) KOH 水溶液分解; (b) KOH エタノール溶液分解.  
アルカリ分解により新たに認められたピークはアスタリスクを付けた。

(a) Aqueous KOH digestion-extraction

(b) Soxhlet extraction

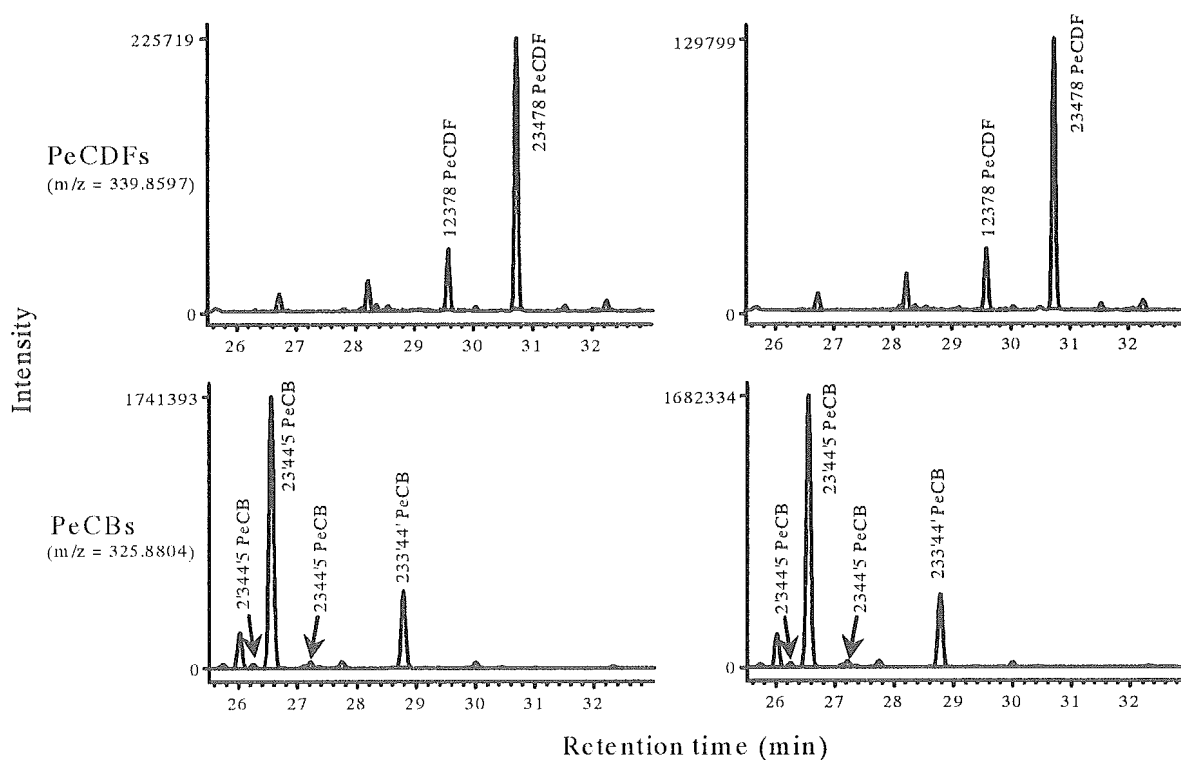


図2 スズキ試料における PeCDFs と mono-*ortho* PeCBs の SIM クロマトグラム: (a) アルカリ分解・溶媒抽出; (b) ソックスレー抽出.

分担研究報告書

食品中のダイオキシン類のリスク低減に関する研究

分担研究者 天倉 吉章

(国立医薬品食品衛生研究所)

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)  
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究  
(4) 食品中ダイオキシン類のリスク低減に関する研究  
—植物性食品成分のダイオキシン類毒性バイオアッセイ系への影響—

分担研究者 天倉吉章 国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

食品中ダイオキシン類のリスク低減化に寄与する情報を得るため、植物性食品成分のダイオキシン類毒性バイオアッセイ系への影響を検討した。評価には、ダイオキシン類の毒性発現に関与するアрил炭化水素レセプター(AhR)を介したメカニズムに基づくバイオアッセイ法、ケイラックスアッセイ(ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用したレポータージーンアッセイ)を利用し、入手出来た95種の植物性食品成分について検討した。その結果、大部分の化合物は作用を示さなかったが、大豆イソフラボンの他、一部のフラボノイド、スチルベン骨格を有するresveratrolなど、いわゆる植物エストロゲンといわれるものの一部に、高濃度でアッセイ系の活性化が認められた。今回のデータはあくまでも予備的なものであるが、現段階でいえることは、一部食品の過度の摂取を避けたバランスのとれた食事が重要で、ダイオキシンのリスク低減化においても大切であるといえる。

### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

堤 智昭

株式会社日吉

中村昌文

岡山大学薬学部

吉田隆志

割を果たしていたのかもしれない。しかし、食品成分と AhR との相互作用に関する詳細な検討はほとんど見られない。一方、一般生活レベルでのダイオキシンのヒトへの摂取は、その大半が通常食する食品を媒体とするため、そのリスクを考察する上での情報として、食品成分の AhR への影響については検討が必要とされる。さらにその本質を明確にすることで、食品の利点を追求でき、ダイオキシンのリスク低減化を指向した研究が期待される。

そこで本研究では、植物性食品成分の AhR との相互作用について、AhR を介した毒性発現メカニズムに基づくダイオキシン類バイオアッセイ法であるケイラックスアッセイ(ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用し、ダイオキシン類と AhR との結合をルシフェラーゼ活性により検出するレポータージーンアッセイ)を用いて検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

入手可能な様々なタイプの植物性食品成分 95

### A. 研究目的

アрил炭化水素レセプター(AhR)は、哺乳動物などの細胞、組織内に存在する受容体型転写因子で、ダイオキシンなどの環境汚染物質をリガンドとするためダイオキシンレセプターとも呼ばれ、それらの生体毒性発現へ関与することが指摘されている。近年、そのメカニズムに関する研究が数多く行われ、様々な知見が得られているが、このレセプターに関しては未解明な部分も多く、依然、オーファンレセプターの一つにあげられている。リガンドとなるダイオキシンなどは、近年、人類が生み出した産物であるため、AhR は元来、食物などの外来性天然物による誘導現象の受容体として何らかの役

種(フラボノイド類、タンニン類、サポニン類、テルペン類など)を試料とした。Procyanidin B2、C1は *Theobroma cacao* 由来、procyanidin B4は *Cowania mexicana* 由来、brevifolincarboxylic acidは *Phyllanthus flexuosus* 由来、geraniinは *Geranium thunbergii* 由来、agrimoniinは *Agrimonia japonica* 由来、oenothein Bは *Eugenia uniflora* 由来、gemin A、pedunculagin、tellimagrandin Iは *Geum japonicum* 由来、pentagalloylglucose、rugosin Dは *Loropetalum chinensis* 由来、sanguiin H-6は *Rubus parvifolius* 由来のものを用いた。Naringin 4'-O- $\alpha$ -glucoseは食品添加物、酵素処理ナリンジン由来のものを用いた(純度はすべて90%以上であることをHPLCで確認した)。他の試料は、フナコシ(株)、和光純薬工業(株)、東京化成(株)、シグマ アルドリッチ、ナカハラ科学(株)から購入した。試料の化学構造を図1に示す。

## 2. 試薬、試液及び装置

ジメチルスルホキシド(DMSO)(生化学用)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD、98%)は和光純薬工業社製を用いた。RPMI1640培地、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、リン酸緩衝生理食塩水、0.25%トリプシン溶液はナカライテスク社製を用いた。牛胎児血清(FBS)はInvitrogen社製を、Lysis試薬、ルシフェラーゼアッセイシステムはPromega社製を用いた。ルミノメーターはAnthos社製Lucy 1 microplate luminometerを使用した。

## 3. 評価方法

評価はケイラックスアッセイにより行った。試料溶液(コントロールはDMSO)は終濃度0.01~100,000 nMの範囲で8段階にDMSOで希釈して調製した(TCDDは終濃度0.0015~0.39 nMの範囲で9段階に希釈)。試料4  $\mu$ Lを試験管に入れ、RPMI1640培地(+8% FBS+1%ペニシリン/ストレプトマイシン)400  $\mu$ Lを加えて攪拌後、そのうち200  $\mu$ Lを一晩前培養した96穴マイクロプレート中のマウス肝ガン細胞HIL6.1(約 $1.5 \times 10^5$  cell/well)に1ウェルずつ暴露し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>濃度)で20~24時間培養した。培養後、培地を取り除き、ウェルを洗浄

後、顕微鏡下、細胞の生存を確認した。Lysis試薬300  $\mu$ Lで細胞壁を溶解後、プレートミキサーで10分間振とうした。振とう後、10分間放置し、基質としてルシフェリン50  $\mu$ Lを加え、ルミノメーターにより発光量(RLU)を測定した。試料濃度-ルシフェラーゼ活性の反応曲線より、TCDDの最高値を100としたときの25%活性値(EC<sub>25</sub>値： $1.3 \times 10^2$  nM)を誘導する濃度をEC<sub>TCDD25</sub>とし、試料の活性度を表した。またTCDDのEC<sub>25</sub>値を1.0として換算した値を誘導等価係数(IEF)とし、その度合いを評価した。試験はすべて3回ずつ行い、その平均値で示した。

## C. 研究結果

ケイラックスアッセイの結果、一部の成分において $10^3 \sim 10^5$  nMレベルの高濃度でルシフェラーゼ活性を認めたが、ほとんどの化合物は $10^5$  nMレベルにおいても活性を示さなかった。図2にケイラックスアッセイによる用量反応曲線、表1にEC<sub>TCDD25</sub>値及びIEF値で示した各試料のダイオキシン類バイオアッセイ系活性能を示す。活性を認めたほとんどはフラボノイド類であった。最も活性が高かったものは、daidzein、glycitein、genistein(それぞれ、EC<sub>TCDD25</sub>値： $3.0 \times 10^3$ 、 $4.2 \times 10^3$ 、 $2.4 \times 10^3$  nM、IEF値： $4.3 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $5.4 \times 10^6$ )といったイソフラボン類で、これらの配糖体化(daidzin、glycitin、genistin)は活性が弱くなる傾向が認められた(それぞれ、EC<sub>TCDD25</sub>値： $1.2 \times 10^4$ 、 $2.0 \times 10^4$ 、 $4.2 \times 10^3$  nM、IEF値： $1.1 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^7$ 、 $3.1 \times 10^6$ )。フラバン、フラボン類においては、naringenin、hesperetinがイソフラボンよりは弱い活性を認め(それぞれ、EC<sub>TCDD25</sub>値： $5.3 \times 10^4$ 、 $3.8 \times 10^4$ 、IEF値： $2.5 \times 10^7$ 、 $3.4 \times 10^7$ )、これらも配糖体化により活性が低減した。フラボン、フラボノール類では全体的に高濃度で若干の活性を示したが、baicalein、baicalin(それぞれ、EC<sub>TCDD25</sub>値： $2.8 \times 10^3$ 、 $3.2 \times 10^3$ 、IEF値： $4.6 \times 10^6$ 、 $4.1 \times 10^6$ )以外はEC<sub>TCDD25</sub>レベル以下であった。フラボノイド類以外では、スチルベン骨格を有するresveratrol(EC<sub>TCDD25</sub>値： $7.3 \times 10^3$ 、IEF値： $1.8 \times 10^6$ )、アントラキノン構造を有するalizarin(EC<sub>TCDD25</sub>値： $3.1 \times 10^3$ 、IEF値： $4.2 \times 10^6$ )にイソフラボン類に匹敵するアッ

セイ系活性化能が認められた。

#### D. 考察

結果から、植物性食品成分の構造とダイオキシン類バイオアッセイ系活性化能の相関を概略すると、

①フラボノイド類: イソフラボン類 >> フラボノール類 (B 環に水酸基のないもの) > フラバノン類 (3-ol 以外) > その他のフラボノール、フラボン類、フラバノン類の順で活性能を示した。

②その他: トランススチルベン骨格を有する resveratrol に活性が認められた。アントラキノン構造を有する alizarin に活性が認められたが、その一部がアシル化された化合物では活性が認められなかった。

③水酸基の影響: AhR リガンドとして疎水性、平面性のものが多く知られている。今回も水酸基の多いタンニン類など、親水性の高いものは活性が認められず、平面構造に近いものでも活性は乏しかった。しかしイソフラボン類では水酸基の影響は少なく、活性は水酸基とその構造特性の両方に依存するところが大きいことが考えられる。供試した化合物の構造的相違からみると、フラバン構造のものでは、C 環 3 位の水酸基が活性に影響を及ぼすことが示唆された。

④分子サイズ、構造平面性の影響: 図 3 に活性化化合物の最小化エネルギー構造を示す。(a) が TCDD の分子モデルであるが、活性を示した化合物の安定構造はすべて平面構造で、TCDD に近い分子サイズを有しており、それらの非平面化及び配糖体化による分子の増大化は活性を低減させた。

活性の認められたすべての化合物はいわゆる植物エストロゲンとして知られているものである。しかし植物エストロゲンに分類される coumestrol、 $\beta$ -sitosterol など、活性を示さないものもあり、このことはエストロゲン作用のメカニズムの多様性を示唆した。また大豆イソフラボン類は食品の第三次機能成分として知られており、今回の結果から AhR は beneficial regulator として何らかの作用をしている可能性も示唆されたが、これについては今後さらなる検討を必要とする。

大豆イソフラボンなどの一部食品成分に、非現実的な高濃度でアッセイ系の活性化(ダイオキシン様作用)が認められた。しかしその一方で、それらは低濃度で、ダイオキシンによるバイオアッセイ系の活性化に対して弱い抑制効果も示されており、AhR 自体が毒性発現のみでなく、食品を介して毒性を制御している可能性も示唆された。今後、これら食品成分をプローブとしたさらなる機能解明が必要とされる。これまでの結果は、あくまでも予備的で途上なものであるが、現段階でいえることは一部食品の過度の摂取は控えるべきで、バランスのとれた食事がダイオキシンのリスク低減化においても大切であることが考察された。

#### E. 結論

今回、大豆イソフラボンなどに高濃度で、ダイオキシン類毒性バイオアッセイ系の活性化が認められた。一方、低濃度では逆に弱い抑制作用が示されており、この結果はあくまでも予備的なものであるが、現段階でいえることは一部食品の過度の摂取を控えたバランスのとれた食生活が重要で、ダイオキシンのリスク軽減化も期待できる。

今後、これまでのデータを基に、ダイオキシンによる毒性バイオアッセイ系活性化に対する植物性食品成分の影響、及びその活性化抑制作用が示されているほうれんそう、こまつななどに含まれる活性化抑制因子を明らかにし、ダイオキシンの毒性低減化を指向した食品の役割について予備的検証を行う。

#### F. 参考文献

- ・ Akiyama, T., Yamada, M., Yamada, T., Maitani, T., Naringin glycosides alpha-glucosylated on ring B found in the natural food additive, enzymatically modified naringin, Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 2246-2249 (2000).
- ・ Denison, M., Brouwer, A., Clark, G., U.S. Patent 5,854,010 (1998).
- ・ Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., Yoshida, T., Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant

effects, *Phytochemistry*, **59**, 749-758 (2002).

• Informational Brochure of Dioxins (2001), Office of Dioxins Control, Administration Division, Environmental Management Bureau, Ministry of the Environment, Japan.

• Landers, J.P., Bunce, N.J., The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity, *Biochem. J.*, **276**, 273-287 (1991).

• Miura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakano, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y., Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor, *Genes to Cells*, **2**, 645-654 (1997).

• Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Hydrolyzable tannins and related polyphenols, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **66**, 1-102 (1995).

• Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models, *Pharmacol. Rev.*, **46**, 483-549 (1994).

• Poland, A., Knutson, J.C., 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554 (1982).

• Safe, S.H., Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371-399 (1986).

• Whitlock, J.P.Jr., Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin action, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 251-277 (1990).

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Kitagawa H., Fujino, J., Sasaki, K., Toyoda, M., Yoshida, T., Maitani, T., Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using *in vitro* reporter gene assay, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 532-539 (2003).

### 2 . 学会発表

1) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 北川宏子, 藤野潤子, 佐々木久美子, 豊田正武, 吉田隆志, 米谷民雄: 植物性食品成分のアリル炭化水素レセプター活性化に関する検討, フォーラム 2002 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2002. 10) .

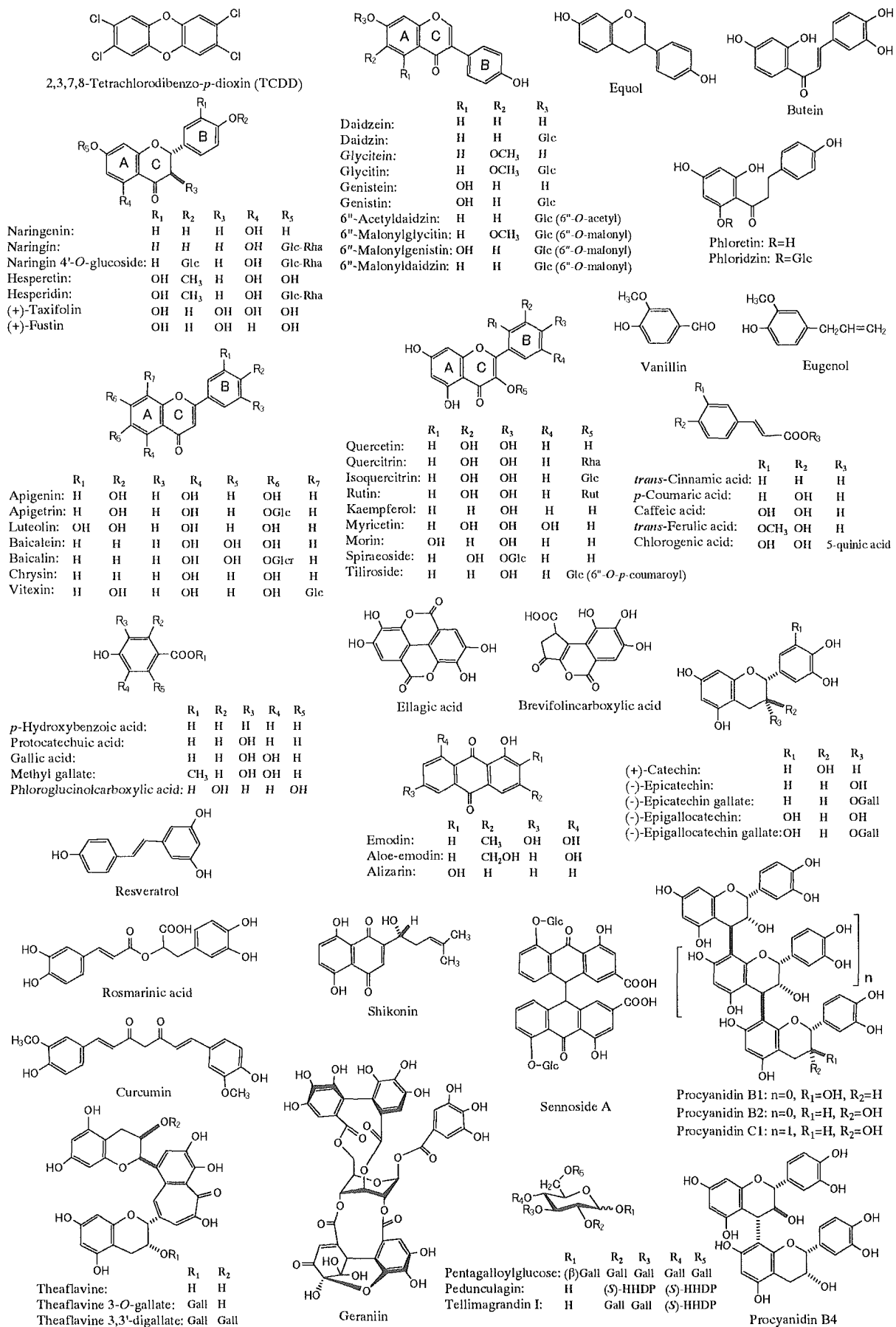


図 1. 試料の化学構造



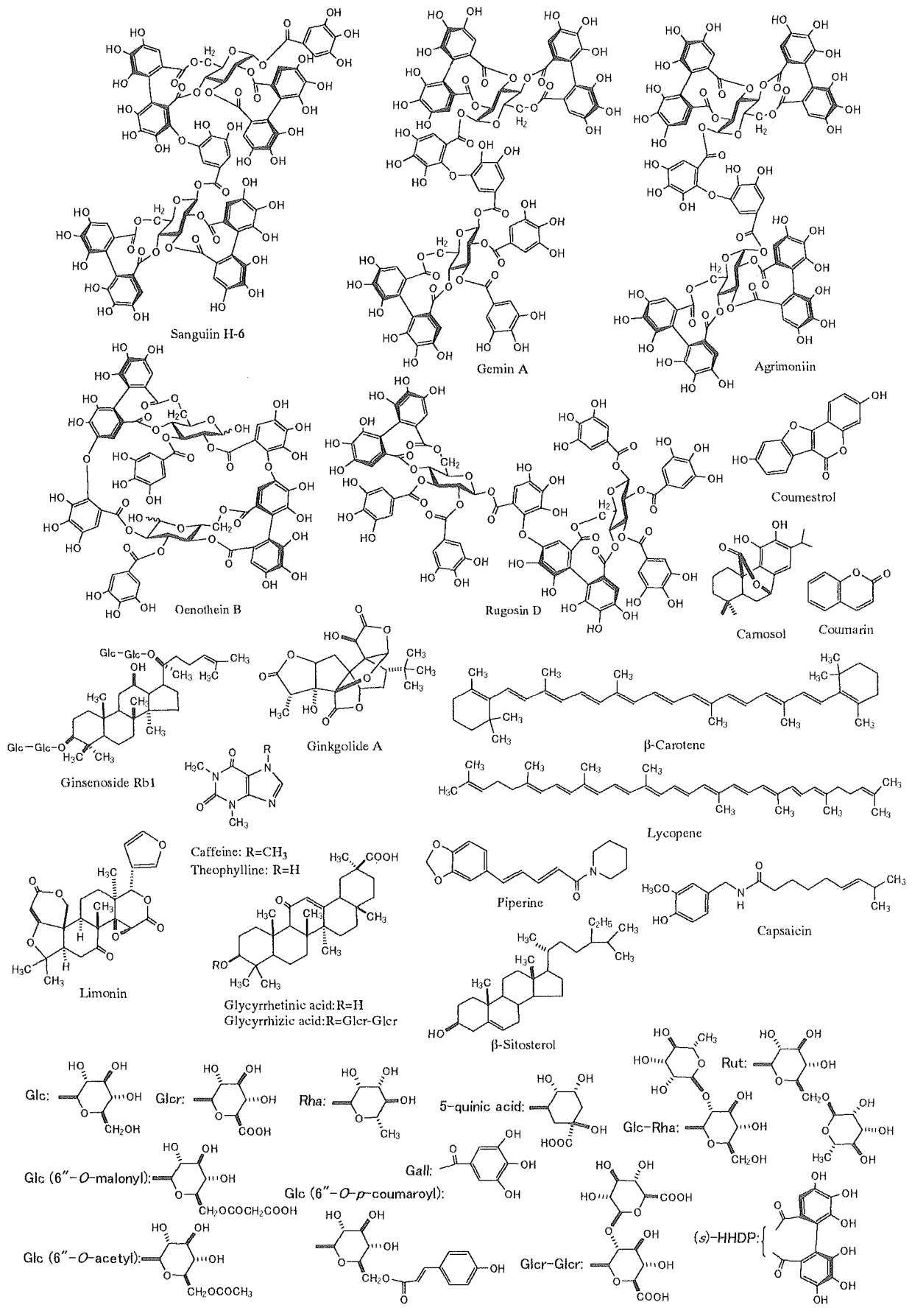


図1 試料の化学構造 (続き)

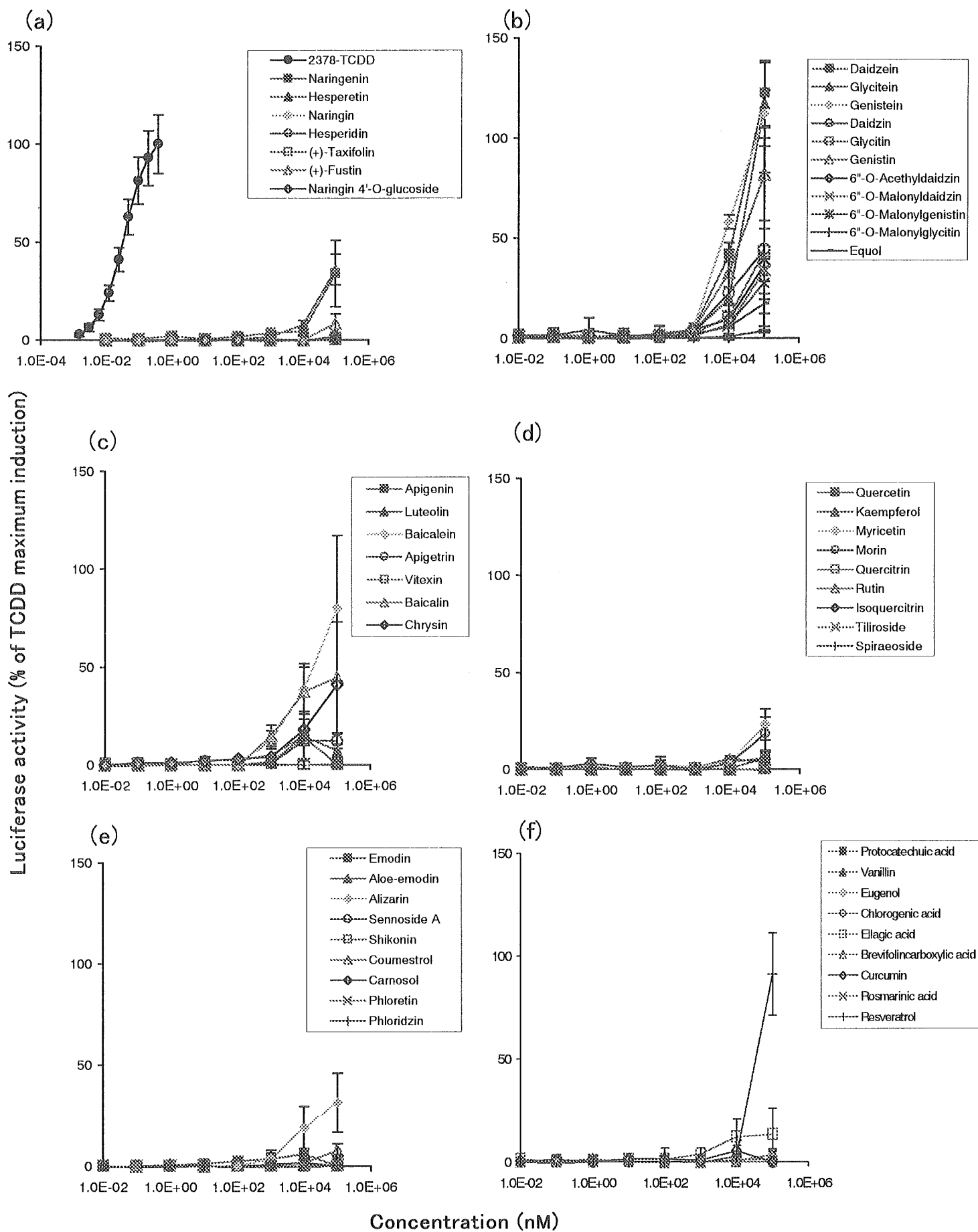


図2. ケイラックスアッセイによる用量反応曲線 (一部)

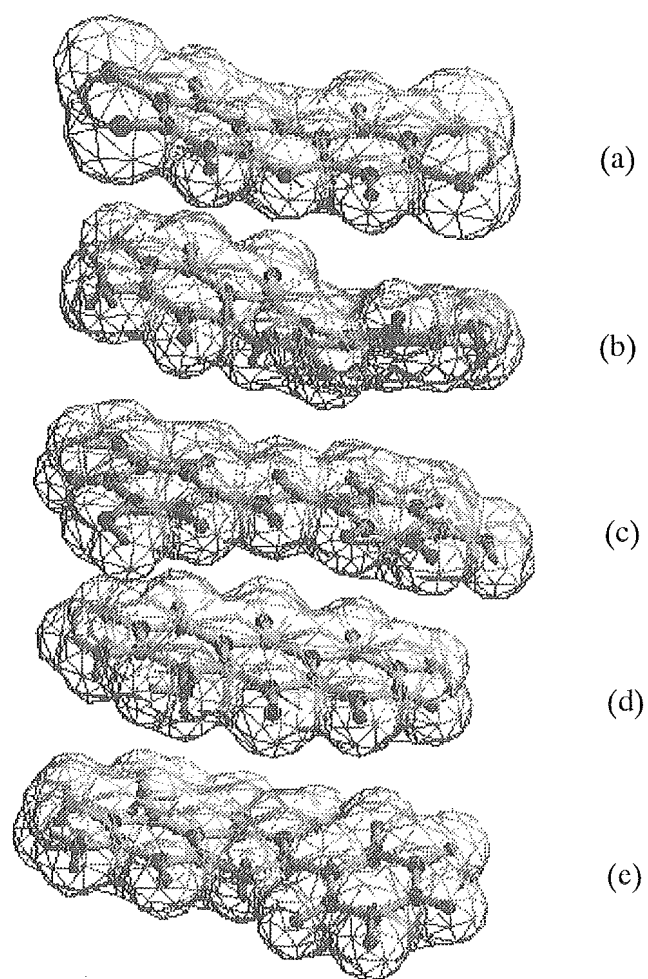


図3. バイオアッセイ系活性化化合物の分子モデル  
(MM2計算により求めた最小化エネルギー構造)  
(a) TCDD, (b) Daidzein, (c) Resveratrol, (d) Alizarin, (e) Baicalein

表 1. 各試料のダイオキシン類バイオアッセイ系活性化能

	EC <sub>TCDD25</sub> <sup>a)</sup> (nM)	IEF <sup>b)</sup>		EC <sub>TCDD25</sub> (nM)	IEF
2,3,7,8-TCDD	$1.3 \times 10^{-2}$	1.0	Vanillin	nc	nc
<i>Isoflavones</i>			Eugenol	nc	nc
Daidzein	$3.0 \times 10^3$	$4.3 \times 10^{-6}$	Chlorogenic acid	nc	nc
Glycitein	$4.2 \times 10^3$	$3.1 \times 10^{-6}$	Ellagic acid	nc	nc
Genistein	$2.4 \times 10^3$	$5.4 \times 10^{-6}$	Brevifolincarboxylic acid	nc	nc
Daidzin	$1.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^{-6}$	Curcumin	nc	nc
Glycitin	$2.0 \times 10^4$	$6.5 \times 10^{-7}$	Rosmarinic acid	nc	nc
Genistin	$4.2 \times 10^3$	$3.1 \times 10^{-6}$	Resveratrol	$7.3 \times 10^3$	$1.8 \times 10^{-6}$
6''-Acetyldaidzin	$3.2 \times 10^4$	$4.1 \times 10^{-7}$	<i>Anthraquinones and naphthoquinones</i>		
6''-Malonyldaidzin	$4.8 \times 10^4$	$2.7 \times 10^{-7}$	Emodin	nc	nc
6''-Malonylgenistin	$9.8 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{-7}$	Aloe-emodin	nc	nc
6''-Malonylglycitin	nc <sup>c)</sup>	nc	Alizarin	$3.1 \times 10^3$	$4.2 \times 10^{-6}$
Equol	nc	nc	Senoside A	nc	nc
<i>Flavanones</i>			Shikonin	nc	nc
Naringenin	$5.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^{-7}$	<i>Condensed tannins</i>		
Hesperetin	$3.8 \times 10^4$	$3.4 \times 10^{-7}$	(+)-Catechin	nc	nc
Naringin	nc	nc	(-)-Epicatechin	nc	nc
Hesperidin	nc	nc	(-)-Epigallocatechin	nc	nc
(+)-Taxifolin	nc	nc	(-)-Epicatechin gallate	nc	nc
(+)-Fustin	nc	nc	(-)-Epigallocatechin gallate	nc	nc
Naringin 4'-O-glucoside	nc	nc	Procyanidin B1	nc	nc
<i>Flavones</i>			Procyanidin B2	nc	nc
Apigenin	nc	nc	Procyanidin B4	nc	nc
Luteolin	nc	nc	Procyanidin C1	nc	nc
Baicalein	$2.8 \times 10^3$	$4.6 \times 10^{-6}$	Theaflavin	nc	nc
Apigenin	nc	nc	Theaflavin 3-O-gallate	nc	nc
Vitexin	nc	nc	Theaflavin 3,3'-di-O-gallate	nc	nc
Baicalin	$3.2 \times 10^3$	$4.1 \times 10^{-6}$	<i>Hydrolyzable tannins</i>		
Chrysin	$1.4 \times 10^4$	$9.3 \times 10^{-7}$	Pentagalloylglucose	nc	nc
<i>Flavonols</i>			Pedunculagin	nc	nc
Quercetin	nc	nc	Tellimagrandin I	nc	nc
Kaempferol	nc	nc	Geraniin	nc	nc
Myricetin	nc	nc	Agrimoniin	nc	nc
Morin	nc	nc	Gemin A	nc	nc
Quercitrin	nc	nc	Rugosin D	nc	nc
Rutin	nc	nc	Sanguin H-6	nc	nc
Isoquercitrin	nc	nc	Oenothetin B	nc	nc
Tiliroside	nc	nc	<i>Others</i>		
Spiraeoside	nc	nc	Coumestrol	nc	nc
<i>Chalcones</i>			Carnosol	nc	nc
Butein	nc	nc	Glycyrrhetic acid	nc	nc
Phloretin	nc	nc	Glycyrrhizic acid	nc	nc
Phloridzin	nc	nc	Ginsenoside Rb1	nc	nc
<i>Phenolcarboxylic acid and related compounds</i>			Coumarin	nc	nc
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	nc	nc	Caffeine	nc	nc
Caffeic acid	nc	nc	Theophylline	nc	nc
<i>trans</i> -Ferulic acid	nc	nc	Capsaicin	nc	nc
<i>trans</i> -Cinnamic acid	nc	nc	Piperine	nc	nc
<i>p</i> -Coumaric acid	nc	nc	$\beta$ -Sitosterol	nc	nc
Gallie acid	nc	nc	Ginkgolide A	nc	nc
Methyl gallate	nc	nc	Lycopene	nc	nc
Phloroglucinolcarboxylic acid	nc	nc	Limonin	nc	nc
Protocatechuic acid	nc	nc	$\beta$ -Carotene	nc	nc

各試料 3 回測定.

a) TCDD の最高値を 100 とした時の 25%ルシフェラーゼ活性度と等しい各試料の濃度.

b) TCDD の EC<sub>25</sub> 値に対する各試料の EC<sub>TCDD25</sub> 値 ( $1.3 \times 10^{-2} / EC_{TCDD25}$ ).

c) Not calculated; EC<sub>TCDD25</sub> レベルのルシフェラーゼ活性が認められなかった.