

図5 ELISAとHRGC/HRMS分析のダイオキシン類測定における相関

グラフの実線は回帰直線、点線は回帰直線の95%予測信頼区間を示す。ELISAの測定値が定量下限以下の場合には0として、相関係数を算出した。なお、(c)では高濃度汚染の2検体、及びELISAで定量下限以下であった5検体を除いて、相関係数を算出した。

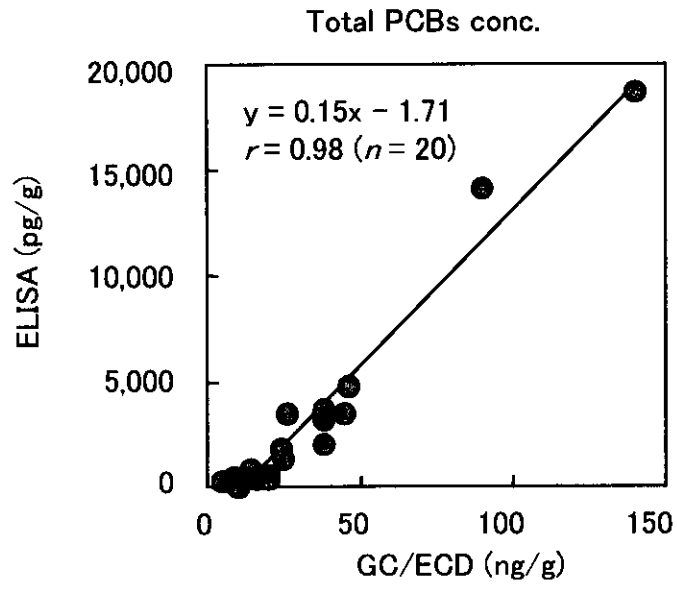


図6 ELISAとGC/ECD分析の総PCBs測定における相関

付表1 ELISAの交差反応性

Coplanar PCBs	IUPAC #	% CR	Predominant PCBs	IUPAC #	% CR
3,4,3',4'-TeCB	77	17.8	2,3-DiCB	5	< 0.1
3,4,4',5'-TeCB	81	< 3.0	2,4'-DiCB	8	< 0.1
3,3',4,4',5'-PeCB	126	< 3.0	2,2',5'-TriCB	18	< 0.1
3,3',4,4',5,5'-HexCB	169	< 0.1	2,3,3'-TriCB	20	< 0.1
2,3,3',4,4'-PeCB	105	2.5	2,4,4'-TriCB	28	3.5
2,3,4,4',5'-PeCB	114	3.4	2,4',5'-TriCB	31	12.9
<b>2,3',4,4',5'-PeCB</b>	<b>118</b>	<b>100</b>	2',3,4'-TriCB	33	2.6
2',3,4,4',5'-PeCB	123	< 0.1	2,2',3,5'-TeCB	44	< 0.1
2,3,3',4,4',5'-HexCB	156	7.2	2,2',5,5'-TeCB	52	< 0.1
2,3,3',4,4',5'-HexCB	157	< 0.1	2,3',4,4'-TeCB	66	15.2
2,3',4,4',5,5'-HexCB	167	< 0.1	2,3',4',5'-TeCB	70	14.9
2,3,3',4,4',5,5'-HepCB	189	< 0.1	2,2',3,5',6'-PeCB	95	< 0.1
			2,2',4,5,5'-PeCB	101	< 0.1
			2,3,3',4,4'-PeCB	105	2.5
			2,3,3',4',6'-PeCB	110	0.88
			<b>2,3',4,4',5'-PeCB</b>	<b>118</b>	<b>100</b>
			2,2',3,4,4',5'-HexCB	138	< 0.1
			2,2',3,4',5',6'-HexCB	149	< 0.1
			2,2',4,4',5,5'-HexCB	153	< 0.1
			2,2',3,3',4,4',5'-HepCB	170	< 0.1
			2,2',3,3',4,5,6'-HepCB	174	< 0.1
			2,2',3,4,4',5,5'-HepCB	180	< 0.1
			2,2',3,4',5,5',6'-HepCB	187	< 0.1
			2,2',3,3',4,4',5,5'-OctCB	194	< 0.1
			2,2',3,3',4,4',5',6'-OctCB	196	< 0.1
			2,2',3,3',4,5,5',6'-OctCB	199	< 0.1
			2,2',3,4,4',5,5',6'-OctCB	203	< 0.1
			Other related compounds	% CR	
			Biphenyl	< 0.1	
			1,2-dichlorobenzene	< 0.1	
			3,4-dichloroaniline	< 0.1	
			3,4-dichloroanisole	< 0.1	
			3,4-dichloronitro-benzene	< 0.1	
			3,4-dichlorophenol	< 0.1	
			3,4-dichlorotoluene	< 0.1	
			1,2,3-trichlorobenzene	< 0.1	
			3,4,5-trichloroaniline	< 0.1	
			3,4,5-trichlorophenol	< 0.1	
			2,3,7,8-TCDD	< 0.1	
			2,3,7,8-TCDF	< 0.1	

PCB preparations	% CR	
	Expected*	Observed
KC-300	3.55	3.87
KC-400	6.75	7.36
KC-500	9.12	9.14
KC-600	0.77	1.69

\* KC中の各主要異性体の存在比 (PCB 処理技術ガイドブックより) に抗体の交差反応性を掛け合わせた総和より算出

PAHs	% CR
Acenaphthene	< 0.1
Acenaphthene	< 0.1
Anthracene	< 0.1
Benzo(a)anthracene	< 0.1
Benzo(a)pyrene	< 0.1
Benzo(b)fluoranthene	< 0.1
Benzo(ghi)perylene	< 0.1
Benzo(k)fluoranthene	< 0.1
Chrysene	< 0.1
Dibenzo(ah)anthracene	< 0.1
Fluoranthene	< 0.1
Hexachlorobenze	< 0.1
Indeno(123cd)pyrene	< 0.1
Naphthalene	< 0.1
Phenanthrene	< 0.1
Pyrene	< 0.1
Hexachlorobenze	< 0.1

\* ELISAキット (EnBio Coplanar-PCB EIA system) のパンフレットより引用

## 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 堤 智昭

（国立医薬品食品衛生研究所）

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
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) 寿司ネタコンボジット試料中ダイオキシン類濃度測定への CALUX アッセイの応用

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

魚介類を主原料に用いている寿司試料についてそのダイオキシン類濃度を簡易に知る目的で、CALUX アッセイを用いて測定したダイオキシン類の毒性等量と従来法（HRGC/HRMS 法）を用いて測定した毒性等量との相関を検討した。寿司一人前のネタの混合試料である 15 コンボジット試料を用いて検討した結果、従来法による総ダイオキシン濃度（TEQ 換算値）は 0.26～7.23 pgTEQ/g（平均 1.74 pgTEQ/g）であった。総ダイオキシンの内 Co-PCBs と PCDDs/PCDFs の濃度は、それぞれ 0.20～6.53 pgTEQ/g（平均 1.46 pgTEQ/g）及び 0.06～0.96 pgTEQ/g（平均 0.28 pgTEQ/g）であった。一方 CALUX アッセイによる総ダイオキシン濃度（CALUX-TEQ 換算値）は 0.69～2.71 pgCALUX-TEQ/g（平均 1.23 pgCALUX-TEQ/g）であった。総ダイオキシンの内 Co-PCBs と PCDDs/PCDFs の濃度は、それぞれ 0.19～0.92 pgCALUX-TEQ/g（平均 0.38 pgCALUX-TEQ）及び 0.50～1.79 pgCALUX-TEQ/g（平均 0.85 pgCALUX-TEQ/g）であった。HRGC/HRMS 法と CALUX アッセイとの相関係数は PCDDs/PCDFs 濃度については  $r=0.918$ 、Co-PCBs 濃度については  $r=0.798$  であり、総ダイオキシン濃度では  $r=0.770$  となった。このことから CALUX アッセイと HRGC/HRMS 法とは良い相関があることが分かり、CALUX アッセイは寿司一人前試料のダイオキシン類濃度のスクリーニング法として有用であることが分かった。

なお、HRGC/HRMS 法による分析値から求めた寿司ネタ一食分からのダイオキシン類摂取量を、日本人の平均体重を 50 kg として体重当たりの摂取量に換算すると、0.4～18.9 pgTEQ/kgbw であり、一部の試料では TDI を超えていたことから、バランスの取れた食生活が重要である。なお、総摂取量の内 PCDDs/PCDFs 由来が 16.4%、Co-PCBs 由来が 83.6%を占めていた。

研究協力者

実践女子大学 豊田正武  
(財)冷凍食品検査協会 田形 肇  
株式会社日吉 中村昌文

実績がある。

本研究では、魚介類を主原料に用いている寿司試料についてダイオキシン類濃度を簡易に知る目的で、CALUX アッセイを用いて測定した毒性等量と従来法（HRGC/HRMS 法）を用いて測定した毒性等量との間の相関を検討した。

A. 研究目的

迅速・安価にダイオキシン毒性等量（CALUX-TEQ）が測定できる CALUX アッセイは、スクリーニングの手段として広く利用されており、水質・大気・土壌などの環境試料の他、母乳・血液・脂肪などの生体試料、魚類などの食品試料に関する分析においても

さらに、本研究班で平成 13、14 年度に実施したトータルダイエット調査によると、ダイオキシン類一日摂取量のうち魚介類からの摂取量が 77%と大部分を占めており、食品由来のダイオキシン類摂取量には魚介類の寄与が

もっとも大きいことから、魚介類摂取の多い代表的な食事として考えられる寿司一食分からのダイオキシン類摂取量を HRGC/HRMS 法により得られたダイオキシン類濃度から推定した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

2002年10月から2003年10月にかけて東京都及び神奈川県で購入した寿司15試料を用いた。12試料はミックス寿司で3試料はマグロ寿司であった。全ての寿司試料はネタとシャリに分け、各寿司試料毎に全てのネタをフードプロセッサーにかけて均一にしたものをコンポジット試料とし、分析に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保管した。

表1に使用した寿司試料の内訳としてネタの種類と重量及びシャリの重量を示した。

### 2. 試験方法

HRGC/HRMS 法については、「食品中のダイオキシン類測定方法ガイドライン」(厚生労働省, 平成11年10月)に従った。CALUX アッセイについては平成13年度の分担研究(1-2)の報告書と同じ方法を用いた。

HRGC/HRMS 法は1連の結果を用い、CALUX アッセイは3連の結果の平均値を用いた。CALUX アッセイでは不検出は定量下限値の1/2の $0.08\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ を用いた。

## C. 研究結果及び考察

### 1. HRGC/HRMS 法による寿司コンポジット試料中のダイオキシン類濃度

表2に15試料の総ダイオキシン濃度(TEQ換算値)を示した。その範囲と平均値は $0.26\sim 7.23\text{ pgTEQ/g}$ 及び $1.74\text{ pgTEQ/g}$ であった。総ダイオキシンの内 Co-PCBs と PCDDs/PCDFs の濃度範囲と平均値は、それぞれ $0.20\sim 6.53\text{ pgTEQ/g}$  (平均 $1.46\text{ pgTEQ/g}$ ) 及び $0.06\sim 0.96\text{ pgTEQ/g}$  (平均 $0.28\text{ pgTEQ/g}$ ) であった。TEQにおける各異性体の占める割

合では、Co-PCBs の内 3,3',4,4',5-PeCB (#126) が最も多く、No.8、13、11の3試料でそれぞれ57.3%、55.3%、49.0%とほぼ半分を占めた。

なお、寿司コンポジット試料にダイオキシン各異性体 $0.5\text{ pg/g}$ 及びCo-PCBs 各異性体 $500\text{ pg/g}$ を添加した場合、回収率は2連の平均値で77.7~108.8%と良好であった。

### 2. CALUX アッセイによる寿司コンポジット試料中のダイオキシン類濃度

CALUX アッセイでは分析値の変動係数(C.V.)が4.3~66.1%と大きなバラツキが認められたため、同一試料について3連で分析しその平均値を用いることとした。

表2に示すように15試料の総ダイオキシン濃度(CALUX-TEQ換算値)の範囲は $0.69\sim 2.71\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ 、平均値は $1.23\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ であった。総ダイオキシンの内 Co-PCBs と PCDDs/PCDFs の濃度範囲と平均値は、それぞれ $0.19\sim 0.92\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ (平均 $0.38\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ ) 及び $0.50\sim 1.79\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$  (平均 $0.85\text{ pgCALUX}\cdot\text{TEQ/g}$ ) であった。

なお、寿司コンポジット試料に添加したPCDDs/PCDFs 及びCo-PCBs (#126)の回収率は2連の平均値でそれぞれ70.5%及び67.2%と良好であった。

### 3. HRGC/HRMS 法と CALUX アッセイによるダイオキシン類濃度の相関

寿司コンポジット15試料についてHRGC/HRMS 法とCALUXアッセイとで求めたダイオキシン類濃度の相関係数はPCDDs/PCDFs については $r=0.918$ 、Co-PCBs については $r=0.798$ であり、総ダイオキシンでは、 $r=0.770$ となった(図1)。このことからCALUXアッセイとHRGC/HRMS 法とは良い相関があることが分かり、CALUXアッセイは寿司一人前試料のダイオキシン類濃度のスクリーニング法として有用であることが分かった。

#### 4. 寿司ネタ由来のダイオキシン類摂取量の推定

HRGC/HRMS 法による分析値から求めた寿司ネタ一食分からのダイオキシン類摂取量を表3及び図2に示す。日本人の平均体重を50 kgとして体重当たりの摂取量に換算すると、0.4~18.9 pgTEQ/kgbw (平均5.0 pgTEQ/kgbw)であった。なお米のダイオキシン類濃度はかなり低いことから、寿司のシャリ由来の摂取量は0.1 pgTEQ/kgbw以下と考えられ、殆ど無視できると考えられた。総摂取量の内PCDDs/PCDFs由来が16.4%、Co-PCBs由来が83.6%を占めていた。

No.7 (5.2 pgTEQ/kgbw)、No.8 (18.9 pgTEQ/kgbw)、No.13 (11.2 pgTEQ/kgbw)、No.15 (18.6 pgTEQ/kgbw)の4試料では日本のTDIである4 pgTEQ/kgbw/dayを超えた。しかし、TDIは一生摂取し続けた場合を想定していることから、寿司一食分からのダイオキシン類摂取量がTDIを超えても直ちに問題にはならない。No.8、13はマグロのみの寿司であるため、また、No.7、15は地場物等の表示があり東京湾周辺で採れた魚介類が多く入っているために摂取量が多くなったと思われる。1999年から実施されている水産庁の調査によると、脂の多いマグロ類やブリなどの大型魚類や、東京湾、大阪湾などの大都市周辺で採れた魚介類のダイオキシン類濃度が高いことが分かっている。しかし、No.12のようにマグロ寿司であるにもかかわらず濃度が低いものもあった。

包装に地場物、マグロ寿司等の強調表示の見られないNo.1~No.6、No.9~No.11及びNo.14の普通のミックス寿司10試料からの平均摂取量は1.82 pgTEQ/kgbwとなり、平成13、14年度のトータルダイエツト調査による我が国のダイオキシン類の平均一日摂取量1.63及び1.49 pgTEQ/kgbw/dayと比べてそれほど多くない。ミックス寿司由来の摂取量を1.9 pgTEQ/kgbwとし、他の二食由来の摂

取量をトータルダイエツト調査の数値の2/3である1.0 pgTEQ/kgbwと仮定すると、それらをあわせた三食からの一日摂取量は2.9 pgTEQ/kgbw/dayとなりTDIより低く、著しく多い量とはなっていない。

ダイオキシン類濃度は寿司ネタの魚種あるいは摂食部位の違いにより異なることと、体内のダイオキシン類濃度は食物繊維等のような同時に摂取する食品によっては減少することから、偏りのないバランスの取れた食生活が望まれる。

#### D. 結論

魚介類を主原料に用いている寿司試料についてそのダイオキシン類濃度を簡易に知る目的で、CALUXアッセイを用いて測定したダイオキシン類の毒性等量と従来法(HRGC/HRMS法)を用いて測定した毒性等量との相関を検討した。寿司コンボジット15試料についてHRGC/HRMS法とCALUXアッセイとで求めたダイオキシン類濃度の相関係数はPCDDs/PCDFsについては $r=0.918$ 、Co-PCBsについては $r=0.798$ であり、総ダイオキシンでは $r=0.770$ となった。このことからCALUXアッセイとHRGC/HRMS法とは良い相関があることが分かり、CALUXアッセイは寿司一人前の試料のダイオキシン類濃度のスクリーニング法として有用であることが分かった。またダイオキシン類の寿司由来摂取量については、一部の試料では一食分の摂食によりTDIを超えていたことから、偏りのないバランスの取れた食生活が望まれる。

#### E. 参考文献

- 1) Tsutsumi, T., Yanagi, T., Nakamura, M., Kono, Y., Uchibe, H., Iida, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Matsuda, R., Sasaki, K., Toyoda, M., Update of daily intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs from food in Japan, *Chemosphere*, 45, 1129-1137 (2001)
- 2) Fujino, J., Tsutsumi, T., Amakura, Y.,

Nakamura, M., Kitagawa, H., Yamamoto, T., Sasaki, K., Toyoda, M., Application of the CALUX™ assay to the analysis of DXNs in fish(the first report), Organohalogen Compounds, 51, 348-351 (2001)

3) Yabushita, H., Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M., Fujino, J., Murata, H., Sasaki, K., Maitani, T., Toyoda, M., Application of the CALUX™ assay to the analysis of DXNs in fish (the second report), Organohalogen Compounds, 58, 385-388 (2002)

4) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書「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」

5) 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「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」

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

1) Toyoda, M., Nishida, K., Tagata, H., Kawakami, H., Nagasaki, T., Nakamura, M., Yabushita, H., Murata, H., Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Application of the CALUX™ assay to the analysis of DXNs in a composite from sushi samples (the third report), Organohalogen Compounds, 60, 251-254 (2003)



表1 寿司ネタの種類と重量

(g)

食 材	試料 No.														
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15
マグロ	30.0	32.4	19.2	25.4	46.0	16.4	—	130.9	34.4	28.6	22.4	117.6	119.1	19.9	35.2
ハマチ	—	13.9	—	—	—	—	—	—	12.9	15.3	—	—	—	19.7	—
アナゴ	—	7.5	53.0	10.9	7.4	8.8	14.1	—	—	—	11.8	—	—	—	29.0
アジ	—	—	—	—	—	—	9.4	—	—	—	12.6	—	—	—	—
サケ	24.5	16.3	6.4	9.9	6.8	14.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
サバ	10.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
タイ	—	10.2	—	—	—	—	10.9	—	—	—	—	—	—	—	—
ヒラメ	—	—	—	—	—	—	8.8	—	—	—	—	—	—	—	12.6
コハダ	—	—	—	—	—	—	—	—	12.8	—	—	—	—	—	—
キンメダイ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.0	—	—	—	—
イカ	25.5	10.0	12.2	8.3	8.6	7.3	10.9	—	—	11.1	7.2	—	—	—	—
タコ	—	—	—	—	—	7.2	—	—	10.9	—	—	—	—	—	—
イクラ	15.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.6	—	—	10.0	20.1
エビ(ボイル)	19.3	6.9	—	9.2	6.6	7.4	—	—	—	11.8	18.4	—	—	16.3	16.0
エビ(生)	—	—	—	—	—	—	11.2	—	—	—	—	—	—	—	—
シヤコ	—	—	—	—	—	—	7.7	—	—	—	—	—	—	—	—
カニ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.3	—	—	—	—	—
ウニ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.8	—	—	9.8	23.0
ホタテ	—	9.0	15.5	11.6	—	—	—	—	14.4	14.1	—	—	—	—	—
ミル貝	—	8.2	—	—	—	4.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
赤貝	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14.6
タイラ貝	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.2	—	—	—	—
アワビ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.4	—
数の子	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.1	—
ネギトロ	—	—	—	8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
鉄火巻き	3.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.6	—	—	27.6	18.0
ゲソ巻き	—	—	—	—	—	—	13.5	—	—	—	—	—	—	—	—
カリフォルニア巻き	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21.0
たまご	65.0	30.4	24.3	14.0	—	13.4	65.2	—	39.9	48.9	33.8	—	—	45.2	—
シャリ(飯)	122.8	236.0	145.7	226.6	163.5	162.1	213.3	144.9	158.0	185.1	222.0	101.9	132.2	180.3	128.1

表2 HRGC/HRMS 及び CALUX アッセイによる寿司コンポジット試料中ダイオキシン濃度の比較

試料 番号	PCDDs/PCDFs 濃度		Co-PCBs 濃度		総ダイオキシン濃度	
	HRGC/MRMS	CALUX アッセイ	HRGC/MRMS	CALUX アッセイ	HRGC/MRMS	CALUX アッセイ
	(pgTEQ/g)	(pgCALUX-TEQ/g)	(pgTEQ/g)	(pgCALUX-TEQ/g)	(pgTEQ/g)	(pgCALUX-TEQ/g)
	n=1	n=3	n=1	n=3	n=1	n=3
No.1	0.12	0.69	0.52	0.28	0.64	0.97
No.2	0.16	0.67	0.48	0.26	0.64	0.93
No.3	0.18	0.69	0.57	0.34	0.75	1.02
No.4	0.08	0.56	0.28	0.30	0.36	0.86
No.5	0.08	0.64	0.20	0.22	0.28	0.86
No.6	0.12	0.85	0.47	0.39	0.59	1.24
No.7	0.54	1.61	1.19	0.42	1.73	2.03
No.8	0.74	1.27	6.53	0.71	7.23	1.98
No.9	0.24	0.63	0.51	0.20	0.75	0.83
No.10	0.06	0.50	0.20	0.19	0.26	0.69
No.11	0.16	0.73	0.92	0.35	1.07	1.08
No.12	0.08	0.60	1.08	0.42	1.15	1.02
No.13	0.46	1.02	4.27	0.43	4.71	1.45
No.14	0.23	0.57	0.80	0.25	1.01	0.82
No.15	0.96	1.79	3.95	0.92	4.91	2.71
平均 値	0.28	0.85	1.46	0.38	1.74	1.23

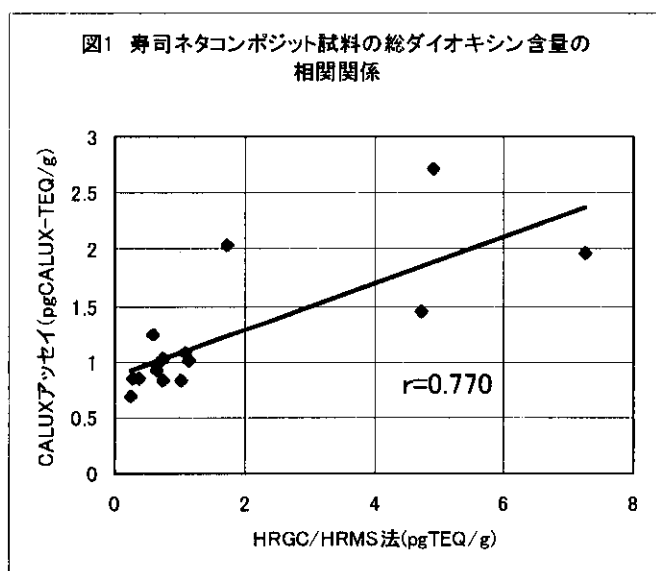
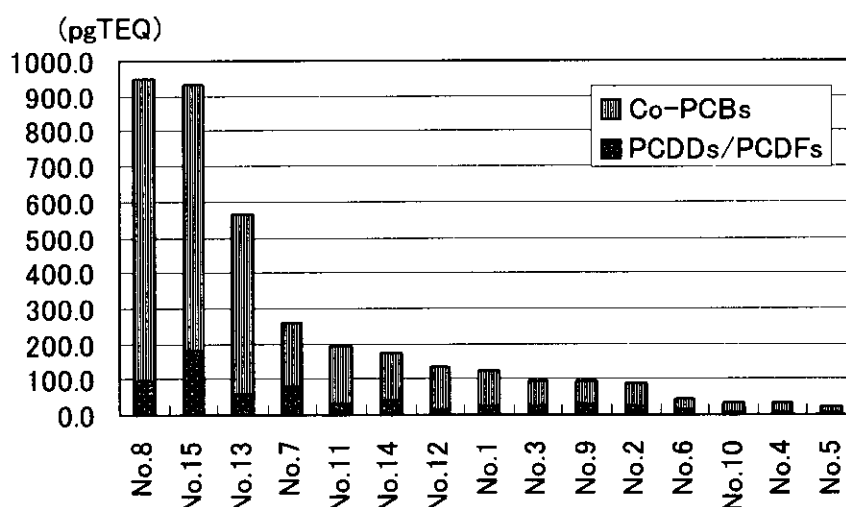


表3 HRGC/HRMS法による寿司由来ダイオキシン類摂取量

試料番号	ダイオキシン類濃度 (pgTEQ/g)	ネタ重量 (g)	1食中のダイオキシン類量 (pgTEQ)	摂取量 (pgTEQ/kgbw)
No.1	0.64	192.6	123.3	2.5
No.2	0.64	144.8	92.7	1.9
No.3	0.75	130.6	98.0	2.0
No.4	0.36	97.7	35.2	0.7
No.5	0.28	75.4	21.1	0.4
No.6	0.59	79.5	46.9	0.9
No.7	1.73	151.7	262.4	5.2
No.8	7.23	130.9	946.4	18.9
No.9	0.75	125.3	94.0	1.9
No.10	0.26	141.1	36.7	0.7
No.11	1.07	178.4	190.9	3.8
No.12	1.15	117.6	135.2	2.7
No.13	4.71	119.1	561.0	11.2
No.14	1.01	169.0	170.7	3.4
No.15	4.91	189.5	930.4	18.6
平均摂取量			249.7	5.0

図2 HRGC/HRMS法による寿司1食中のダイオキシン類量



## 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(食品安全確保研究事業)  
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

—ダイオキシンによる毒性バイオアッセイ系に対する植物性食品成分の抑制効果—

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

ダイオキシン類毒性バイオアッセイ法 (Ah イムノアッセイ) を利用し、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)によるバイオアッセイ系活性化に対する植物性食品成分の抑制効果について予備的検討を行った。フラボノイド、タンニン、サポニン、テルペン類など、95種の植物性食品成分についてインビトロで評価した。そのうち、フラボン類、フラボノール類、アントラキノン類、piperine、coumestrol、brevifolincarboxylic acid、resveratrolに、TCDDによるアッセイ系活性化に対する抑制効果が認められた。また、curcumin、carnosol、capsaicinも本アッセイ系活性化に対して抑制効果を示した。今回の結果は、あくまでも予備的なスクリーニングデータとしてとらえるべきであるが、いくつかの植物性食品成分にはダイオキシン類の毒性発現を抑える可能性が示唆された。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

堤 智昭

岡山大学薬学部

吉田隆志

る目的で、レポータージーンアッセイを用い検討した。今年度は Ah イムノアッセイを利用し、各種植物性食品成分を対象に、TCDD によるダイオキシン毒性バイオアッセイ系活性化に対する抑制効果について予備的検討を行った。

A. 研究目的

一般生活の中で、ダイオキシン類のリスクとして特に問題になるのは、環境レベルでの汚染による影響(慢性毒性)である。ヒトへの暴露の大半は食品を介してであると考えられているが、現在の汚染状況を見るとそれをゼロにすることは不可能である。我々は、ダイオキシンの暴露の大半が食品由来であることから、逆に食品の利点を追求することでダイオキシンのリスク低減化を指向しており、これまでその毒性発現に関与するアрил炭化水素レセプター(AhR)リガンド活性に対する植物性食品抽出物の抑制効果について、ダイオキシン類毒性バイオアッセイ法(Ah イムノアッセイおよびレポータージーンアッセイ)をインビトロ実験モデルとして適用し、検討してきた。さらに AhR と植物性食品成分との相互作用に関する情報を集積す

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 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。Agrimoniin は *Agrimonia japonica* 由来、brevifolincarboxylic acid は *Phyllanthus flexuosus* 由来、gemin A、pedunculagin、tellimagrandin II は *Geum japonicum* 由来、geraniin は *Geranium thunbergii* 由来、procyanidin B2、C1 は *Theobroma cacao* 由来、casuarinin、procyanidin B4 は *Cowania mexicana* 由来のものをを用いた。Pentagalloylglucose はタンニン酸をメタノリシスすることにより得た。Naringin 4'-*O*- $\alpha$ -glucose は食品添加物「酵素処理ナリンジン」由来のものをを用いた。純度は全て 90 % 以上であることを HPLC で確認した。他の試料は、フナコシ、和光純薬工業、東京化成、

シグマ アルドリッチ、ナカハラ科学から購入した。化合物を図 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。Ah イムノアッセイキットはクボタから購入した。マイクロプレートリーダーは TECAN 社製サンライズクラシックを用いた。

## 3. 評価方法

評価は Ah イムノアッセイを実験モデルとして使用した。96 穴マイクロプレート 1 ウェルに対し、活性化サイトソル〔哺乳動物肝細胞抽出物に dioxin response element (DRE) AhR translocator (Arnt)を加えたもの〕(200  $\mu$ L) および試料溶液 (コントロールは DMSO) (1  $\mu$ L) を加え、プレートミキサーで 20 分間振とうした。振とう後、5 nM TCDD (DMSO 溶液) (1  $\mu$ L) を暴露した。ブランクには DMSO (1  $\mu$ L) のみを加えた。さらにプレートミキサーで 5 分間振とう後、30  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。ウェルを洗浄後、ELISA キットにより検出し、マイクロプレートリーダー (405 nm) により吸光度を求めた。

AhR のリガンド活性は以下により求めた。

$$(\%) = \{1 - [(A - B) - (C - D)] / (A - B)\} \times 100$$

A: TCDD 添加時のコントロールの吸光度

B: DMSO 添加時のコントロールの吸光度

C: TCDD 添加時の試料の吸光度

D: DMSO 添加時の試料の吸光度

すべて試験は 2 ~ 3 回ずつ行い、試料無添加で得られた値をコントロール 100 % とした。化合物濃度 - AhR 活性の反応曲線より、TCDD による AhR リガンド活性を 70 % に抑制する濃度を EC<sub>70</sub> とし、化合物の活性度を表した。

## C. 研究結果

Ah イムノアッセイによる評価の結果を、図 2 に化合物濃度 - AhR リガンド活性を示したグラフ、表 1 に EC<sub>70</sub> 値として示す。図 2 に示すように、いくつかの化合物は 0.5 ~ 2.5  $\mu$ M の

低濃度で顕著な抑制効果を示した。他の多くの化合物は 50  $\mu$ M 付近の高濃度で、TCDD による AhR 活性化に対して約 20 % の抑制を示した。

供試した化合物群の中では、フラボノイド類が強い抑制効果を示した。その中では、フラボン、フラボノール類が TCDD による AhR 活性化に対して強い抑制効果を示した。個々を見ると、フラボン類では chrysin, luteolin, apigenin, baicalein が EC<sub>70</sub> 値それぞれ、0.7, 1.8, 1.9, 5.1  $\mu$ M の抑制効果を示した。フラボン配糖体では、アグリコンよりも抑制効果が低かった。フラボノール類では、kaempferol, quercetin, myricetin, morin で、それぞれ 2.1, 2.7, 4.3, 5.3  $\mu$ M の EC<sub>70</sub> 値を示した。その配糖体では、spiraeoside, tiliroside (それぞれ EC<sub>70</sub> 値 2.1, 34.4  $\mu$ M) は抑制効果を示したが、その他のフラボノール配糖体は EC<sub>70</sub> レベルの抑制効果を示さなかった。フラバノン類では、hesperetin, naringenin が 14.6, 27.7  $\mu$ M の EC<sub>70</sub> 値を示した。その配糖体は EC<sub>70</sub> レベルの抑制効果を示さなかった。

イソフラボン類では、ほとんどの化合物が抑制効果を示さず、25 ~ 50  $\mu$ M の高濃度で 10 ~ 20 % という弱い抑制効果を示した。Genistin は EC<sub>70</sub> 値が 40.8  $\mu$ M、イソフラボン類の最終代謝物として知られている equol は 41.2  $\mu$ M であった。

アントラキノン類は、フラボン、フラボノール類と同様、強い抑制効果を示した。Aloe-emodin, emodin で EC<sub>50</sub> 値 0.5, 0.6  $\mu$ M と、強い抑制効果を示し、また alizarin は 3.2  $\mu$ M と抑制効果を示した。

他の化合物、piperin, resveratrol, brevifolincarboxylic acid, coumestrol, shikonin も抑制効果を示した (EC<sub>70</sub> 値 : 2.7, 3.9, 3.9, 5.6, 5.6  $\mu$ M)。また capsaicin, carnosol, curcumin も EC<sub>50</sub> 値が 28.1, 30.7, 35.4  $\mu$ M で、抑制効果を示した。また、加水分解性タンニン類も本アッセイ系において抑制効果を示した。

## D. 考察

TCDD によるダイオキシン類毒性バイオアッセイ系活性化 (AhR リガンド活性) に対する植物性食品成分の抑制効果について、本評価結果を概略すると、

① フラボノイド類は、フラボン類、フラボ

ノール類>>フラバノン類>イソフラボン類の順で抑制効果を示した。一方、これらの配糖体は効果を減弱した。

② フラボノイド類以外では、アントラキノン類、piperine、resveratrol、brevifolincarboxylic acid、coumestrol > capsaicin、curcumin、carnosolの順で抑制を示した。

③ ①、②に示した化合物とは構造特性が異なる加水分解性タンニン類も抑制効果を示した。

図 3 に TCDD によるバイオアッセイ系活性化に対して抑制効果を示した化合物の分子モデルを示す。このように、TCDD と同様の分子サイズ、平面構造を有していることがわかり、それゆえにこれらはアンタゴニスト様に作用していることが示唆される。したがって、抑制因子としていくつかの要因が考えられるが、その一つとしてこの分子サイズと平面性が挙げられる。

一方、加水分解性タンニン類は、その分子サイズが大きいことから、アンタゴニスト様に作用することは考えにくい。ピフェニル部分を分子内に有するため、部分的アンタゴニストとしての作用も考えられるが、本ピフェニル構造はアトロブ異性を有し、平面ではないため考えにくい。これらはタンパク質などと複合体を形成するという特有の性質をもつため、バイオアッセイ系のいずれかを阻害した可能性があるが、さらなる検討を必要とする。

昨年度のレポータージーンアッセイを用いた AhR と植物性食品成分との相互作用についての検討で、いくつかの化合物において高濃度で AhR 活性化作用を示すことについて報告した。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、構造的に TCDD と類似している結果を示した。Chrysin のようなフラボン類は、高濃度でバイオアッセイ系活性化 (AhR リガンド活性化) を示した。一方で、今回の検討において、TCDD によるバイオアッセイ系活性化に対する強い抑制効果を示した。このことは、大部分のフラボン、フラボノール類などは AhR に対して、アンタゴニストあるいはアゴニストの両方で作用する性質を有することを示唆する。

フラボノイドの摂取量や吸収量に関する報告

は極めて少ないが、例えば、フラボン、フラボノイドの一日摂取量は 3 ~ 80 mg と報告がある。また quercetin 64 mg を摂取すると、3 時間後、650 nM が血漿濃度として認められた報告がある。別の研究では、10 人のボランティアに quercetin 87 mg を投与すると、3 時間後、129 ~ 843 nM の血中濃度であった報告がある。これらを考慮し、実際の体内への吸収量を考察すると、通常の摂取においてフラボノイド類は、AhR に対してアンタゴニスト様に作用していることが示唆される。

さらに前回の検討から、イソフラボンも高濃度で AhR 活性を示した。本研究においては、genistein、equal は EC<sub>70</sub> レベルの抑制効果を示したが、大部分のイソフラボン類は EC<sub>70</sub> レベル以下の弱い抑制効果を示した。きなこ 60 g の摂取により、数 μM の genistein、equal が血中に現れることが報告されていることを考えると、通常の摂取においては、アゴニスト様に作用しないことが推測できる。

いくつかのアントラキノン類も、高濃度で弱い AhR 活性化を示した。本研究では、大部分のアントラキノン類は TCDD による AhR リガンド活性化に対して強い抑制効果を示した。

一方、coumestrol、piperine、carnosol、capsaicin 等はそれ自体、AhR 活性を示さず、抑制効果のみを示した。

このように、今回検討を行った植物性食品成分は、インビトロアッセイ系において、アゴニストとアンタゴニストの両作用を示すことが示され、それらは通常の摂取ではアンタゴニスト様に作用している可能性が推測された。それゆえに、ダイオキシンの毒性低減化においてもバランスの取れた食生活が重要であることが支持された。今回の結果は、あくまでも予備的な検討であるが、いくつかの食品成分は、ダイオキシンのリスク低減のために作用している可能性が示された。

## E. 結論

TCDD によるダイオキシン類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抑制効果について、Ah イムノアッセイを実験モデルとして用いた検討した結果、フラボン類、フラボノール類、アントラキノン類、piperine、coumestrol、brevifolincarboxylic acid、resveratrol

に TCDD によるアッセイ系活性に対する顕著な抑制効果が認められた。また、curcumin、carnosol、capsaicin も本アッセイ系活性化に対する抑制効果を示した。今回の結果は、あくまでも予備的なスクリーニングデータとしてとらえるべきであるが、いくつかの植物性食品成分にはダイオキシン類の毒性発現を抑える可能性が示唆された。

## F. 参考文献

- ・ Fries, G.F.: A review of the significance of animal food products as potential pathways of human exposures to dioxins, *J. Anim. Sci.*, **73**, 1639-1650 (1990).
- ・ Travis, C.C., Hattermer-Frey, H.A.: Human exposure to dioxin, *Sci. Total Environ.*, **104**, 97-127 (1991).
- ・ Liem, A.K., Furst, P., Rappe, C.: Exposure of populations to dioxins and related compounds, *Food Addit. Contam.*, **17**, 241-260 (2000).
- ・ Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Kitagawa, H., Fujino, J., Sasaki, K., Yoshida, T., Toyoda, M.: Preliminary screening of the inhibitory effect of food extracts on activation of the aryl hydrocarbon receptor induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 272-274 (2002).
- ・ 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).
- ・ Taniguchi, S., Takeda, S., Yabu-uchi, R., Yoshida, T., Yazaki, K.: Production of tannic acid by *Rhus javanica* cell cultures, *Phytochemistry*, **46**, 279-282 (1997).
- ・ Kobayashi, Y., Lundquist, A., Uechi, T., Ashieda, K., Sasaki, K., Hughes, B., Kaise, T.: Dioxin screening in environmental samples using the Ah-Immunoassay, *Organohalogen Comp.*, **58**, 337-340 (2002).
- ・ Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stamper, M.J., Willett, W.C.: Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Ann. Intern. Med.*, **125**, 384-389

(1996).

- ・ Hollman, P.C., vd Gaag, M., Mengelers, M.J., van Trijp, J.M., de Vries, J.H., Katan, M.B.: Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man, *Free Radical Biol. Med.*, **21**, 703-707 (1996).
- ・ Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Lett.*, **426**, 331-336 (1998).
- ・ Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wähälä, K., Adlercreutz, H.: Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako), *J. Nutr.*, **128**, 1710-1715 (1998).

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Yoshida, T., Maitani, T.: Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the AhR-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1754-1760 (2003).
- 2) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Sasaki, K., Yoshida, T., Maitani, T.: Interaction of some plant food extracts with aryl hydrocarbon receptor determined by in vitro reporter gene assay, *Natural Medicines*, **58**, 31-33 (2004).

### 2. 学会発表

- 1) 天倉吉章, 堤 智昭, 佐々木久美子, 吉田隆志, 米谷民雄: ダイオキシンの AhR 結合活性に対する植物性食品成分の抑制効果, 日本薬学会第 123 年会 (2003. 3).



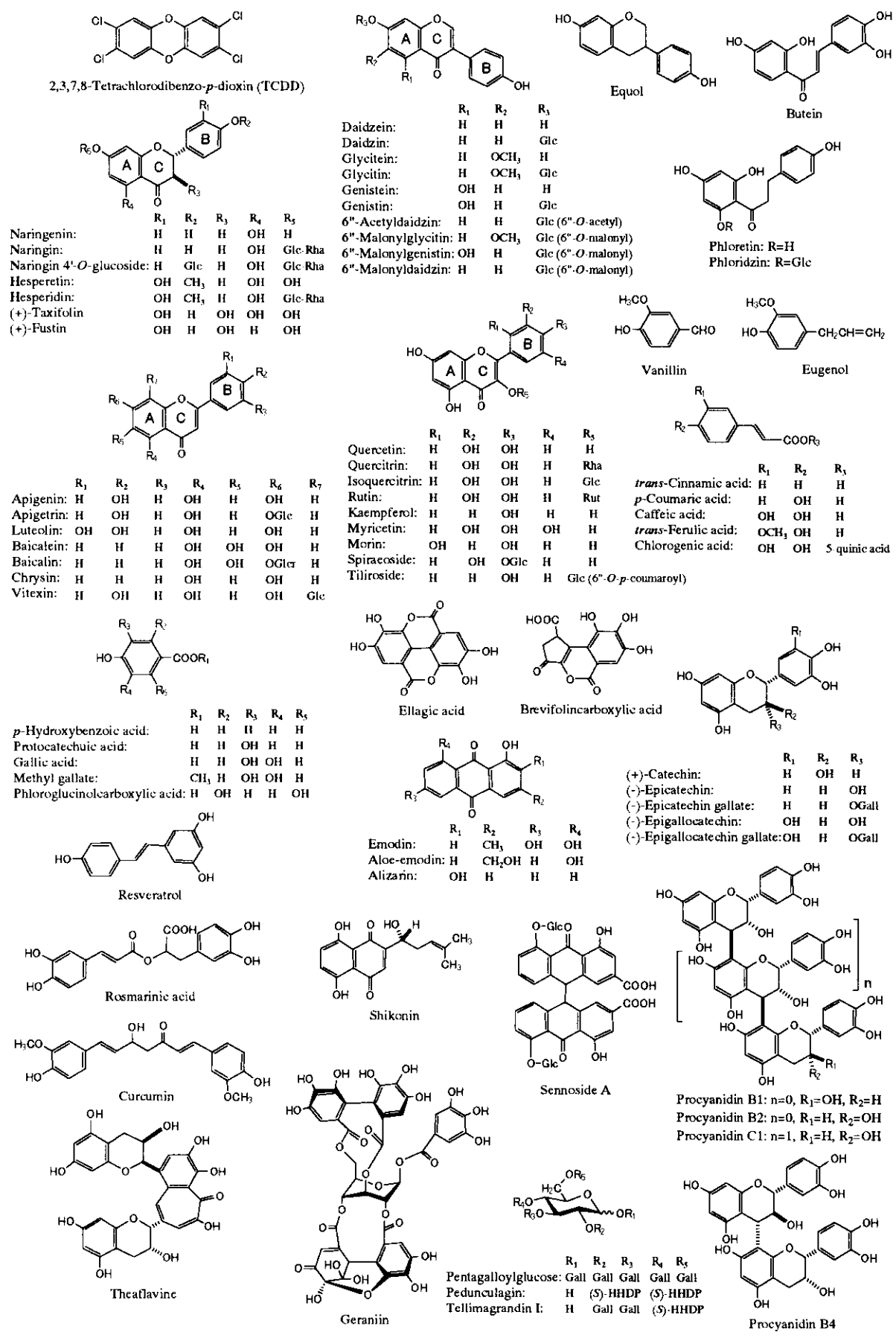


図 1. 試料の化学構造

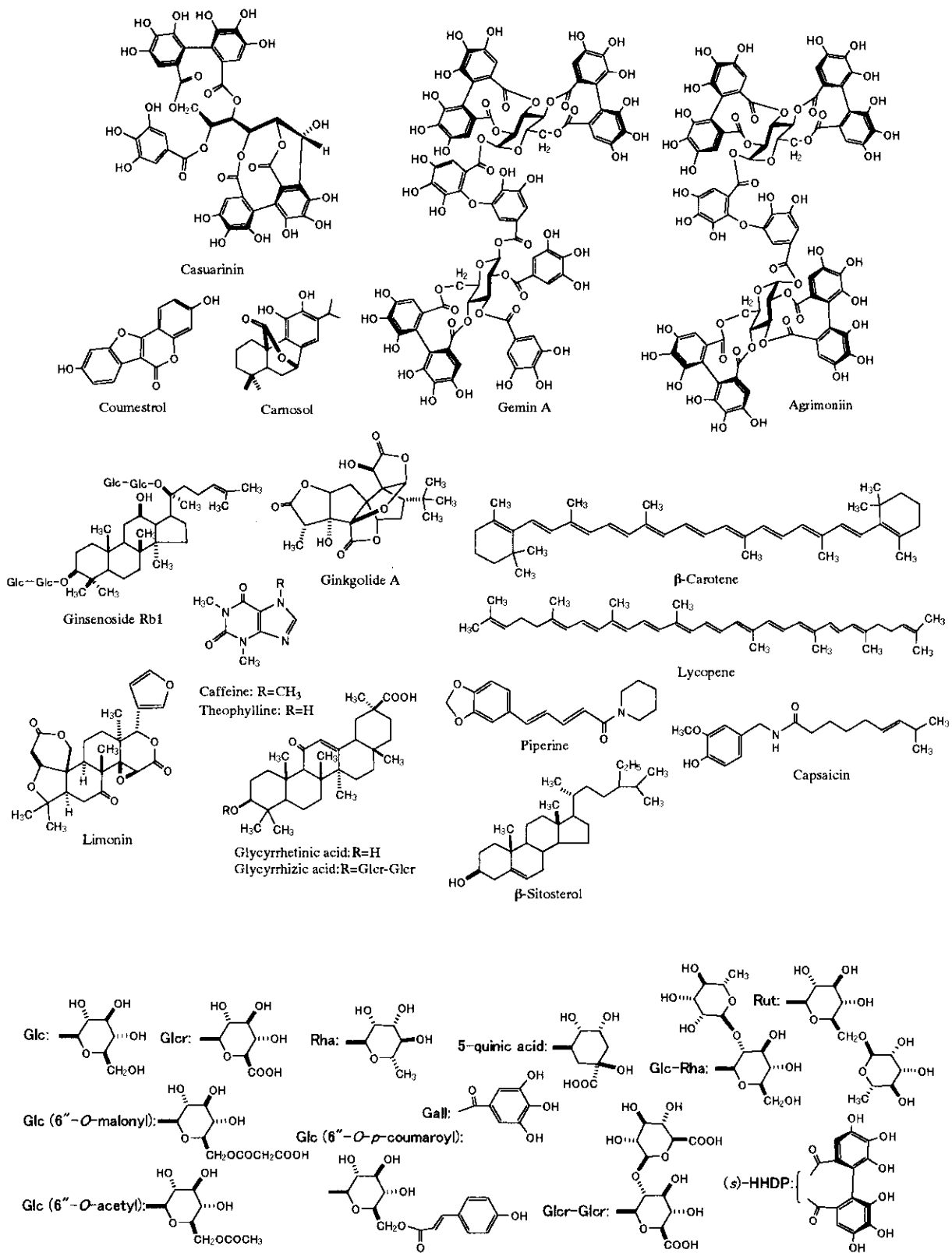


図 1. 試料の化学構造 (続き)

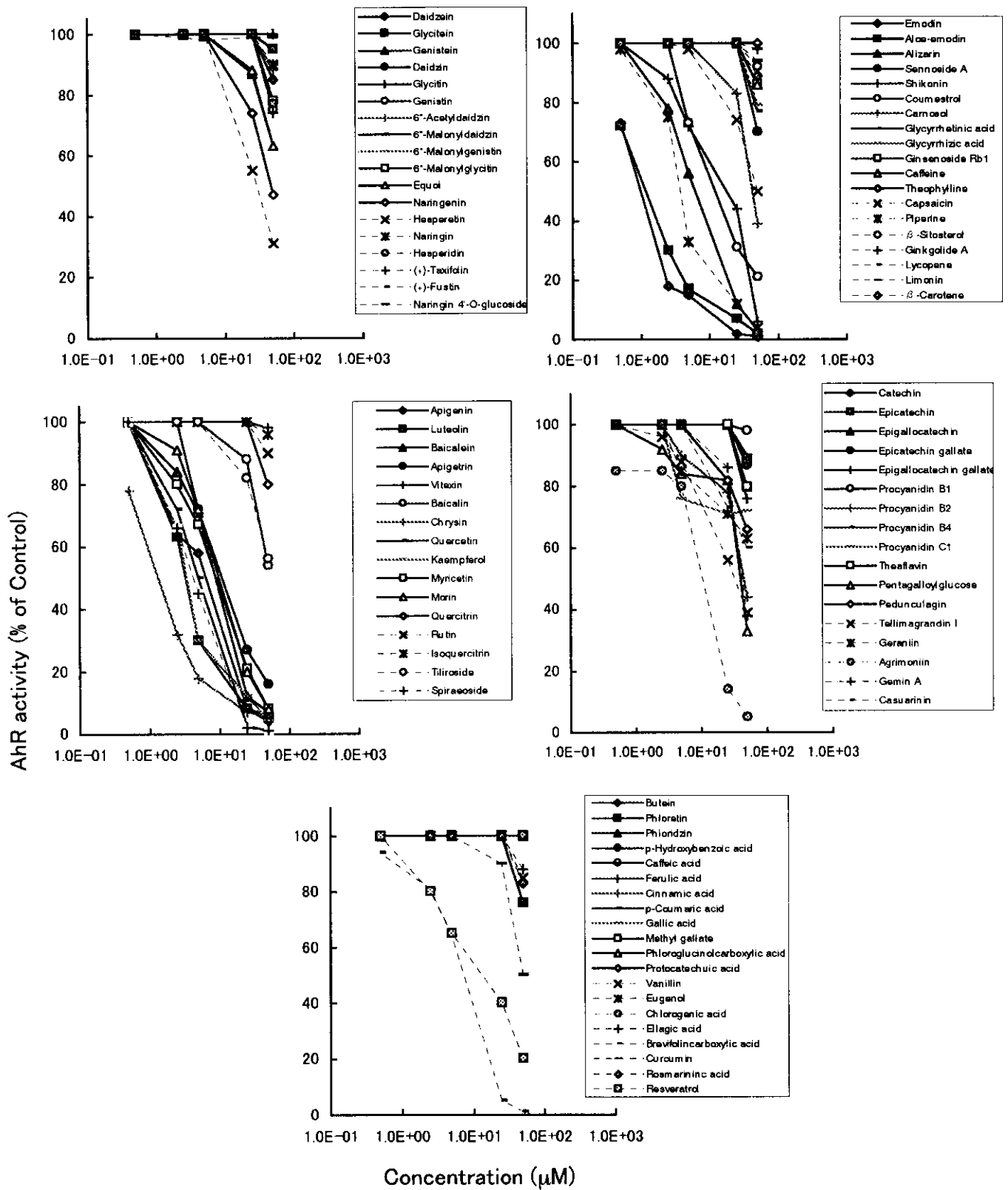


图 2. 用量反应曲线

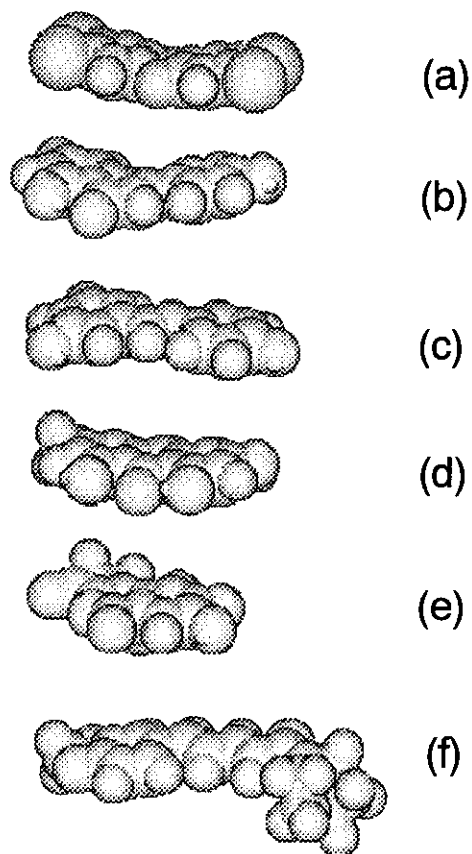


図3. ダイオキシンによる毒性バイオアッセイ系活性化抑制化合物の分子モデル  
(MM2計算により求めた最小化エネルギー構造)

(a) TCDD; (b) apigenin; (c) resveratrol; (d) emodin; (e) brevifolincarboxylic acid; (f) piperine