

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究

(2)食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発

(2-1)ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類に対する芳香族炭化水素レセプターレポータージーンアッセイの高感度化を目的として、新規ダイオキシン類応答性レポーターベクターを用いて安定発現細胞株の作製を行った。20年度に作製した細胞株(pGL7.3)を使用したルシフェラーゼレポータージーンアッセイ(高感度CALUXアッセイ)について、ダイオキシン類標準品を用いた性能評価と、魚試料に対する適用を予備的に検討した。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 検量線を作製し、測定精度について検討した結果、定量下限は0.49 pg/mLであった。また、本アッセイの種々のダイオキシン類に対する応答性を検討した。その結果、試験したダイオキシン類に対する応答性は、各々のダイオキシン類が有する毒性等価係数に類似していた。従って、ダイオキシン類の毒性をスクリーニングするために適した選択性を有していた。また、前処理した魚試験液中でダイオキシン類が検出可能か検討するため、マグロ及びブリを前処理し得られたPCDD/Fs分画、及びCo-PCBs分画に対し添加回収試験を実施した。ダイオキシン類として該当分画に対しPCDD/Fs混合品あるいはCo-PCB(#126)を添加した結果、回収率はPCDD/Fs分画では67~92%、Co-PCBs分画では79~100%であった。試験液中に含まれるマトリックスの影響により回収率がやや低くなることが考えられたが、スクリーニング法として使用する場合は許容できる回収率であった。本レポータージーンアッセイは高感度であるため、食品などを対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法として期待できる。

研究協力者

株式会社 日吉

中村 昌文、半田 洋士

A.研究目的

人が暴露するダイオキシン類の殆ど全ては食品の摂取に由来するため、食品中のダイオキシン類に対するスクリーニング法が開発できれば、食品衛生上有意義である。食品を対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法としては、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイ^{1,2)}や、酵素免疫測定法³⁻⁵⁾が検討されている。しかし、食品ではダイオキシン類の汚染濃度が環境試料と比較し低いことから、スクリ

ーニング法の高感度化が強く望まれてきた。

レポータージーンアッセイではダイオキシン類の芳香族炭化水素レセプター(AhR)を介した毒性発現機構を利用し、ダイオキシン類を検出する。これらのアッセイでは、例えばルシフェラーゼをレポーター遺伝子にしたダイオキシン類応答性ベクターをDNAに組み込んだ培養細胞を使用する。ダイオキシン類は細胞内のAhRに結合した後、ダイオキシン類応答性ベクターのダイオキシン類応答性領域(DRE:Dioxin Responsive Element)に結合しプロモーター領域を活性化することで、定量指標となるルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導する。しかし、汎用されているダイオキシン

類応答性ベクターは4個のDREしか含んでおらず⁶⁾、微量のダイオキシン類が十分にルシフェラーゼ遺伝子を誘導できない可能性が考えられた。

19年度に我々はDREを多く含んだルシフェラーゼレポーター(pGL7.1~7.5)の特性を詳細に解析した結果、DREの数が増えると2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(2,3,7,8-TCDD)応答性が上昇することを確認した⁷⁾。そこで、20年度は本レポーターベクターを使用して安定細胞株の作製を行った。最も誘導倍率が高かったpGL7.3細胞株では、汎用されている細胞株であるHepa6.1と比較し、2,3,7,8-TCDDに対する応答性の上昇が認められた⁸⁾。そこで今年度は、pGL7.3細胞株を使用したレポータージーンアッセイ(高感度CALUXアッセイ)の性能評価として、定量下限の設定、種々のダイオキシン類に対する応答性の確認、及び魚試料に対する適用を予備的に検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

MEM培地、牛胎児血清(FBS)はインビトロジェン社より購入した。G418はシグマアルドリッチ社製、ジメチルスルホキシド(DMSO)は和光純薬工業製を使用した。また、細胞溶解液(CCLR)及びルシフェラーゼ定量システム(スタンダードタイプ)はプロメガ社より購入した。2,3,7,8-TCDDは和光純薬より購入した。その他のダイオキシン類についてはAccuStandard社、及びCambridge Isotope Laboratories社より購入した。

2. 装置

ルミノメーターはベルトールド社製のCentro LB960を使用した。

3. 魚試料の前処理

魚試料の前処理については、平成13年度

厚生科学研究費補助金研究報告書¹⁾に従った。

4. ルシフェラーゼアッセイ

pGL7.3細胞株はMEM培地(10%FBS及び500 µg/ml G418を含む)を用いてCO₂インキュベーター内で培養した(37°C、5%CO₂)。96ウェルプレートに細胞を播種(75,000個/well)し、約24時間培養後、種々の濃度の2,3,7,8-TCDDあるいは試験液(DMSOの最終濃度は1%)に暴露した(95 µl/well)。一定時間培養後、培地を除きウェルをリン酸緩衝液で2回洗浄した。CCLRを加え(50 µl/well)、プレートミキサーで15分間振とう後、ルシフェラーゼ定量試薬を加え(100 µl/well)、ルミノメーターにより発光強度(RLU)を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. 高感度CALUXアッセイの定量限界

本法の定量範囲を設定するため、2,3,7,8-TCDD標準溶液の繰返し測定を行い、測定精度及び正確度に関する検討を実施した(表1)。標準溶液を異なる日に複数回測定した結果、0.49~31.3 pg/mLの間では、変動係数が6%以内、得られた定量値も理論値から±5%以内であり、良好な結果であった。そこで定量下限は0.49 pg 2,3,7,8-TCDD/mL(0.047 pg 2,3,7,8-TCDD/assay)とした。本定量下限は現在、汎用されているCALUXアッセイ¹⁾と比較し、2倍ほど高感度であった。また、図1には典型的な2,3,7,8-TCDD標準曲線を示した。

2. 高感度CALUXアッセイの種々のダイオキシン類に対する応答性

食品中には2,3,7,8-TCDD以外にも毒性を有する種々のダイオキシン類異性体が存在する。そのため、本法をダイオキシン類のスクリーニング法として利用を考えた場合、毒性の強い異性体を検出する必要がある。そこで、

一部のダイオキシン類異性体に対して本アッセイ法の応答性を調べた。図 2 には、2,3,7,8-TCDDを含む7種のダイオキシン類に対する標準曲線を示した。また、表 2 には EC50(得られた最大の応答性を 100%とした場合に、50%の応答性を与える濃度)より算出した各異性体に対する応答性と、WHO により定められた毒性等価係数(WHO TEF 2005)を示した。本アッセイの各異性体に対する応答性は TEF と良く類似していた。このように、本アッセイは毒性の強い異性体に対して高い応答性を示すことから、ダイオキシン類の毒性等量を知るためのスクリーニング法として適切な特性を有していた。

3. 前処理した魚試験液に対する添加回収試験

本アッセイが魚試料中のダイオキシン類を測定可能か検討するため、前処理した魚試料液に対する添加回収試験を実施した。マグロ及びブリを前処理し、PCDD/Fs 分画と Co-PCBs 分画を調整した。PCDD/Fs 分画には PCDD/Fs 混合液、Co-PCBs 分画には#126を既定量添加し、本アッセイにより供した(表3)。PCDD/Fs のマグロにおける回収率は67~88%、ブリにおける回収率は69~92%であった。#126のマグロにおける回収率は89~100%、ブリにおける回収率は79~100%であった。PCDD/Fs 分画ではやや低い回収率が得られているが、試験液に含まれるマトリックスによる大きな影響は無いと考えられた。本アッセイは魚試料などを対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法として有望であると考えられる。

D. 結論

- 1) pGL7.3 細胞株を使用したレポーター遺伝子アッセイの定量下限は 0.49 pg 2,3,7,8-TCDD/mL (0.047 pg 2,3,7,8-TCDD /assay)であった。
- 2) 本アッセイは毒性の強いダイオキシン類

異性体に選択的に応答するため、毒性等量のスクリーニング法に適した特性を有していた。

- 3) 前処理した魚試料液に対する回収率は、スクリーニング法としては許容できる範囲内であった。従って本アッセイは魚中のダイオキシン類に対するスクリーニング法として有望であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 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」(分担報告書 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)
- 2) Hoogenboom L, Goeyens L, Carbonnelle S, Van Loco J, Beernaert H, Baeyens W, Traag W, Bovee T, Jacobs G, Schoeters G. The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. Trends Analytical Chem., 25 (2006) 410-420.
- 3) 平成 15 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」(分担報告書 3-1 ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発)
- 4) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 PCB ELISA と Ah イムノアッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法)
- 5) 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のダイオキシン類スクリーニング法)
- 6) Denison MS, Zhao B, Baston DS, Clark GC, Murata H, Han D. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related

chemicals. Talanta, 63 (2004) 1123-1133.

7) 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-1 ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発)

8) 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-1 ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発)

F.研究業績

1.論文発表

1) Tsutsumi, T., Ishizuka, N., Denison, MS., Watanabe, T., Matsuda, R. A new reporter gene assay for dioxins using green fluorescent protein: increased responsiveness using amplification of the dioxins responsive element, Organohalogen Compounds 2009: 71: 1349-1352.

2.学会発表

1) 堤 智昭、石塚菜穂子、渡邊敬浩、松田りえ子: 緑色蛍光タンパク質を用いたダイオキシン類に対する新規レポータージーンアッセイ. 第 18 回環境化学討論会(2009.6).

表 1 2,3,7,8-TCDD 標準溶液の繰返し測定結果

2,3,7,8-TCDD (pg/mL)	2,3,7,8-TCDD (n=5)			
	平均±SD (pg/mL)		CV (%)	理論濃度からの 乖離 (%)
0.12	—		—	—
0.24	0.30	± 0.04	13.5	22.29
0.49	0.48	± 0.03	6.0	-2.59
0.98	0.94	± 0.03	2.7	-3.31
1.95	1.94	± 0.05	2.6	-0.57
3.91	3.99	± 0.03	0.8	2.04
7.81	7.72	± 0.10	1.4	-1.12
15.6	15.62	± 0.51	3.3	-0.01
31.3	32.24	± 1.00	3.1	3.17

表 2 高感度 CALUX の各異性体に対する反応性

	応答性 ¹⁾	WHO TEF 2005
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.72	1
OCDD	0.0021	0.0003
2,3,7,8-TCDF	0.22	0.1
OCDF	0.0019	0.0003
#118	0.000026	0.00003
#126	0.073	0.1

1) EC50を与える濃度を比較した応答性

表3 前処理した魚試験液に対する添加回収試験結果¹⁾

試料液	測定分画	添加濃度 pg/mL ²⁾	回収率(%), n=3		
			平均	最小	最大
マグロ	PCDD/Fs 分画	1.1	79	67	88
		4.2	80	68	87
	Co-PCBs分画	1.3	95	89	100
		4.1	92	90	94
ブリ	PCDD/Fs 分画	1.0	88	80	92
		3.9	75	69	79
	Co-PCBs分画	1.2	84	79	91
		3.9	89	80	100

1) マグロ及びブリより得られた前処理済の試験溶液に、PCDD/Fs混合物およびCo-PCB(#126)を既知量添加後、本アッセイにより測定した。

2) 本アッセイにより得られた2,3,7,8-TCDD換算濃度

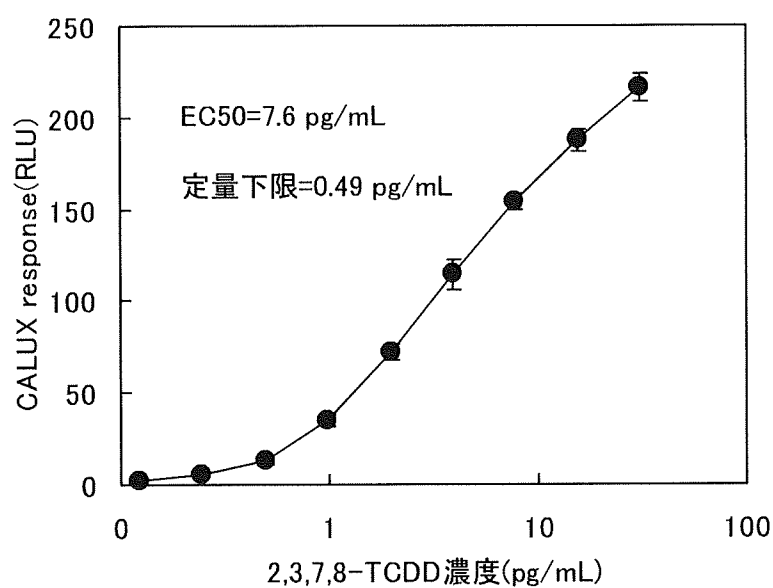


図1 2,3,7,8-TCDD 標準曲線

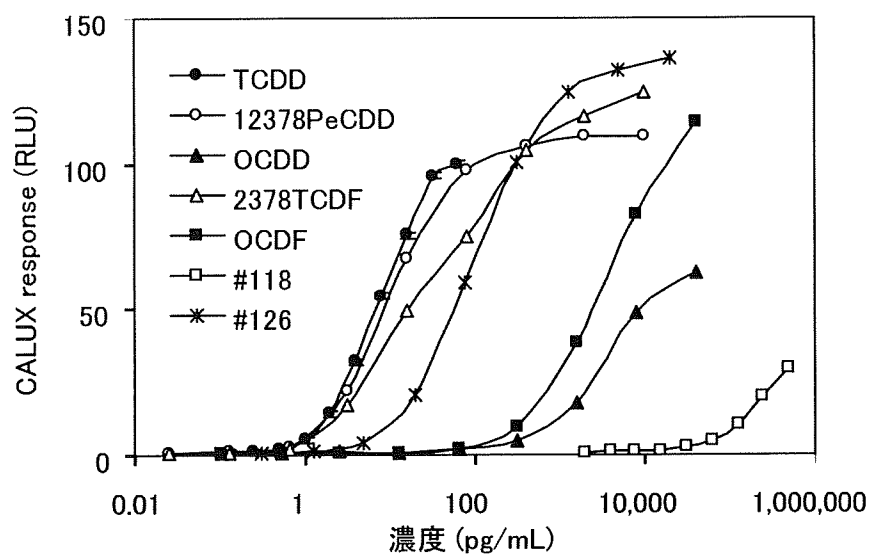


図2 種々のダイオキシン類による標準曲線

Ⅱ. 分担研究報告書

2. 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定 法の開発

2-2. 食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査

研究分担者 堤 智昭

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究
(2)食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-2)食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中のダイオキシン類の簡易測定生物検定法(バイオアッセイ)の信頼性確保に関する基礎的検討を目的に、食品試料の芳香族炭化水素レセプター(AhR)結合活性(ダイオキシン様活性)について実態調査を行った。本年度は、19、20年度の調査でAhR活性が認められた天然物濃縮加工食品の各分画物(大豆およびゴマ抽出物含有試料の酢酸エチル分画物、プロポリス抽出物含有試料のヘキサン分画物)の含有成分について精査し、同定した化合物のAhR活性をレポータージーンアッセイ(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バイオアッセイ)により評価した。含有成分については、大豆含有試料から2種のイソフラボン類(formononetin, biochanin A)、プロポリス試料から8種の化合物(isorhamnetin, pinobanksin, chrysin, pinocembrin, galangin, tectochrysin, pinostrombin, artemisinin)を新たに単離、同定した。またこれら化合物のうち、tectochrysinは顕著なAhR活性を示した。本結果から、イソフラボン類やフラボン類を含有する食品について本バイオアッセイを使用する際には、その影響も考慮した前処理やデータ解析が必要であることが考察された。

またこれまでの結果から、AhR活性を示す食品成分としてフラボノイドがあげられるため、未検討のフラボノイド類25種についてAhR活性を評価したところ、3',4'-dimethoxy flavone、4',6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetinに強いAhR活性が認められ、特にtamarixetinは2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)より強いAhR活性を示した。一方で、その他のものはAhR活性を殆ど示さなかった。

本研究により明らかになったAhR活性成分の特性をみると、イソフラボンのように過剰摂取により健康影響が懸念されるものもあるが、一方で有効成分として報告されているものであり、ダイオキシンのような蓄積性はないことから健康影響はないものと判断される。

研究協力者

松山大学 薬学部

天倉 吉章、好村 守生、吉田 隆志

株式会社 日吉

中村 昌文、半田 洋士

芳香族炭化水素レセプター(AhR)は、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に関与していることが指摘されている。リガンドとなるダイオキシンは負の人工産物であり、AhRの元来の生理的機能については不明な部分が多い。

A. 研究目的

このダイオキシンの毒性機構 (AhR 結合活性) に基づいた生物検定法 (バイオアッセイ) によるダイオキシン類簡易測定技術が確立され、環境試料においては公定法として認められている¹⁾。バイオアッセイは迅速で低廉であるため、スクリーニングとして有用である。しかし、ダイオキシン類の各異性体のみを個々に分析してデータを合算する従来の高分解能 GC/MS による機器分析法と比較し、総合的な数値のみが得られるため、ダイオキシン類のみをいかに信頼性高く測定できるかが問題となる。特に通常の食品試料の場合、環境試料と比較してダイオキシン類の検出は超微量である。それゆえ、食品中のダイオキシン類分析にバイオアッセイを適用する場合、ダイオキシン様活性を示す食品成分を明確にしておくことが信頼性の高いデータを確保することに繋がる。これまでの検討から、このバイオアッセイにより検出する天然 AhR アゴニスト (ダイオキシン様物質) が同定され、ダイオキシンと比較してかなり高濃度で AhR 結合活性 (ダイオキシン様活性) を示すことが明らかになっている²⁾⁴⁾。しかし食品中のダイオキシン様活性物質に関する情報は少なく、バイオアッセイによる迅速測定法の信頼性確保のためにはより多くの基礎データの集積が必要不可欠となる。本研究では、食品成分が高濃度に存在する濃縮物加工食品であるサプリメントや健康食品を試料とし、含有する食品中のダイオキシン様物質を精査することを目的とする。19 年度は試料 50 種を対象にダイオキシン類迅速測定法で食品試料の実績もあるケイラックスアッセイ⁵⁾による AhR 活性の実態調査を行った。その結果、大豆、ゴマ、プロポリス抽出物などの含有加工食品が高濃度で AhR 活性を示す結果を得た⁶⁾。20 年度はそれら活性が認められた試料抽出物について、AhR 活性成分をスクリーニングする目的で分画物を調製し、それらの AhR 活性を評価

して活性が認められた分画物について逆相 HPLC 分析を実施した⁷⁾。今年度は、活性の認められた試料分画物に含まれる成分について精査し、単離、同定した化合物の AhR 活性を評価した。さらにこれまでの研究結果から AhR 活性成分としてフラボノイドがあげられることから、未検討のフラボノイド類 25 種について AhR 活性を測定し、本研究で明らかとなった AhR 活性成分の特性から、迅速測定法への影響および健康影響について考察した。

B. 研究方法

1. 試料

19 年度検討した天然物濃縮加工食品 (サプリメントおよび健康食品) 50 種のうち、AhR 活性が認められた試料の中で 5 種 [プロポリス抽出物含有食品 (PP)、ゴマ加工食品 (SM)、大豆抽出物含有食品 (SB) (A~C)] を選択し、それら分画物を試料として用いた。分画物の調製については、各食品 (1 g) にエタノール/水 (4:1) (30 mL) を加え 10 分間超音波処理し、抽出液を吸引ろ過後、ろ液を濃縮して水 (10 mL) を加え、*n*-ヘキサン、酢酸エチル (各 30 mL) で順次振とう抽出後、得られた各溶媒分画物を濃縮し、それぞれヘキサン、酢酸エチル各分画物とした。また水画分を濃縮し水分画物とした。

2. 試薬、試液および機器

ジメチルスルホキシド [DMSO (生化学用)] 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。ルミネッセンスマイクロプレートリーダは BERTHOLD 社製の Centro LB960 を使用した。逆相 HPLC

は島津製作所製 Simadzu Prominence システムを使用した。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Diaion HP-20(三菱化学)、MCI GEL CHP20P (75-150 μm) (三菱化学)、Toyoparl HW-40 (fine) (東ソー)、YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシー) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

3. 方法

AhR 活性の評価は、レポータージーンアッセイ [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 (ケイラックスアッセイ)] により、以下のように行った¹⁾⁻⁵⁾。試料溶液 (コントロールは DMSO) を 5 段階の濃度に DMSO で希釈して調製し、各 4 μL 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 μL を加えて攪拌した。そのうち 200 μL を一晩前培養した 96 穴マイクロプレート中のマウス H1L6.1c2 細胞 (約 1.5×10^5 cell/well) に 1 ウェルずつ暴露し、CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂ 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 μL 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 μL を加え、ルミノメーターにより発光量 (RLU) を測定した。

また逆相 HPLC は以下の条件で測定した。カラム: L-column ODS (2.1 I.D. \times 150 mm) (化学物質評価研究機構)、カラム温度: 40°C、流速: 0.3 mL/min、測定波長: 200-400 nm、移動相: (A) 5%酢酸水溶液および (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0 \rightarrow 30 min (0 \rightarrow 50%)、30 \rightarrow 35 min (50 \rightarrow 85%)、35 \rightarrow 40 min (85%)、40 \rightarrow 50 min (85 \rightarrow 90%)、50 \rightarrow 55 min (90 \rightarrow 100%)、55 \rightarrow 60 min (100%)]。

C. 研究結果及び考察

試料 50 種の中で AhR 活性の認められた試料のうち、5 種 [プロポリス抽出物含有食品 (PP)、ゴマ加工食品 (SM)、大豆抽出物含有食品 (SB) (A~C)] の抽出物について、ヘキサン、酢酸エチルおよび水分画物を調製し、得られた各分画物の AhR (ダイオキシン様) 活性をケイラックスアッセイにより測定した。併せて、各分画物の成分分布を確認するため、HPLC による分析を実施した。その結果を図 1 に示す。

PP 抽出物については、ヘキサン分画物において 1~10 mg/mL の濃度領域で TCDD と同等の AhR 活性が認められた。一方、SM および SB 抽出物では、共通して酢酸エチル分画物の 0.1~10 mg/mL の濃度領域で顕著な AhR 活性が認められた。この AhR 活性に寄与する化合物を明らかにする目的で、PP 抽出物ヘキサン分画物の HPLC 検出ピークについて、各種カラムクロマトによる分離精製を行った。その結果、8 種の化合物 (isorhamnetin、pinobanksin、chrysin、pinocembrin、galangin、tectochrysin、pinostrombin、artepillin C) を単離、同定することが出来、これら化合物について AhR 活性を評価した。結果を図 2 に示す。試験した化合物の中で tectochrysin に顕著な AhR 活性が認められ、次いで artemisinin に活性が認められた。AhR 活性を示したヘキサン分画物の HPLC チャートを見ると、tectochrysin、pinostrombin、artepillin C が主成分として検出されており、PP 抽出物の AhR 活性本体は主に tectochrysin によるところが大きいことが示された。

一方、SM および SB 抽出物で AhR 活性が示された酢酸エチル分画物の HPLC 分析結果は、共通して daidzein など既に本アッセイにより AhR 活性成分として明らかになっているイソフラボン類が検出された。さらに、

SM 抽出物からは sesamin、一部の SB 抽出物からは新たにイソフラボン類 2 種 (formononetin、biochanin A) が単離、同定された。それらの AhR 活性を評価したところ、sesamin は活性が認められず、formononetin および biochanin A については弱い AhR 活性が認められた(図 2)。従って、SM および SB 抽出物の AhR 活性本体は daidzein などのイソフラボン類であることが示唆される。

また、これまでの研究成果から食品中の AhR 活性成分としてフラボノイドがあげられるため、さらなる研究データの集積を目的に未検討のフラボノイド類 25 種について AhR 活性を測定した。供試したフラボノイドの化学構造とその結果を図 3 に示す。結果、一部のフラボノイド (3',4'-dimethoxyflavone、4',6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetin) に強い AhR 活性が認められ、特に tamarixetin の活性は TCDD より強く、顕著であった。一方で、その他の試料は AhR 活性が殆ど認められなかった。これまでの結果から、フラボノイドの AhR リガンドとしての構造活性相関を考察すると、配糖体よりアグリコンの活性が強いことはこれまでの傾向と同じであった。フラボン類においては、B 環の官能基数が 2 個以内で、全て水酸基よりもメトキシ基を含む方が活性の強い傾向にあった。A 環については、官能基数は 2 個以内で 3 個になると活性が弱まる傾向にあり、水酸基とメトキシ基での違いは認められなかった。イソフラボン類においては、daidzein と formononetin、biochanin A を比較すると、B 環の 4 位がメトキシ基になることで活性は弱くなる傾向が認められた。

AhR 活性を示した画分に分布した成分の特性をみると、大豆イソフラボン (daidzein、glycitein、genistein など) のように過剰摂取により健康影響が懸念されるものもあるが、一方で有効成分として報告されているもの

であった。これらはダイオキシンのような蓄積性もないことから、健康影響はないものと判断される。一方で最近、AhR 活性の免疫調節への関与が報告されており⁸⁾、食品由来の天然 AhR 活性成分が有効成分であることを考えると、AhR を介して免疫系制御などに有効に作用している可能性が示唆される。

D. 結論

19、20 年度の結果に基づき、AhR 活性を示した天然物濃縮加工食品 (大豆、ゴマ、プロポリス抽出物を含有する 5 品目) の各分画物 (ヘキサン、酢酸エチル、水分画) について AhR 活性を評価し、各活性本体を精査した。その結果、プロポリス抽出物含有試料ではヘキサン分画物に検出されたフラボン類の tectochrysin に強い AhR 活性が認められ、本化合物による寄与が示唆された。他の試料では酢酸エチル分画物に検出された大豆イソフラボン類による影響が示された。また未検討のフラボノイド 25 種について AhR 活性を検討したところ、一部のフラボノイド (3',4'-dimethoxyflavone、4,6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetin) に強い AhR 活性が認められ、特に tamarixetin の活性は顕著であった。バイオアッセイで特にこれら化合物を含有する食品中のダイオキシンを測定する際は、その影響を考慮して測定する必要がある。

またこれら天然 AhR 活性成分の特性をみると、有効成分として報告されているものであり、さらにダイオキシン様の蓄積性もないことを考え合わせると、これらによる健康影響はないものと判断される。

E. 参考文献

- 1) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室：「ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル (排ガス、ばいじん及び燃え殻)」，平成 20 年 3 月。

- 2) 平成 14 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「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」(分担報告書 4 食品中のダイオキシン類のリスク低減に関する研究).
- 3) 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).
- 4) 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, *Nat. Med.*, **58**, 31–33 (2004).
- 5) Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M., Brown D.J., Clark, G.C., Sasaki, K., Toyoda, M., Maitani, T., Validation of the CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish, *Analyst*, **128**, 486–492 (2003).
- 6) 平成 19 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-2 食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査).
- 7) 平成 20 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-2 食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査).
- 8) Quintana, FJ., Basso, AS., Iglesias, AH., Korn, T., Farez, MF., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, HL., Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor, *Nature*, **453**, 65–71 (2008).

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Yoshida, T.: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods, in preparation.

2. 学会発表

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R., Yoshida, T.: Estimation of aryl hydrocarbon receptor binding activity of health food extracts using *in vitro* reporter gene assay. The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy (2009.9).
- 2) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 半田洋士, 好村守生, 松田りえ子, 吉田隆志:健康食品素材の AhR 結合活性について. 第 3 回食品薬学シンポジウム(2009. 11).
- 3) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 半田洋士, 好村守生, 松田りえ子, 吉田隆志:天然物濃縮加工食品の AhR 結合活性と成分分析. 日本薬学会第 130 年会(2010. 3).

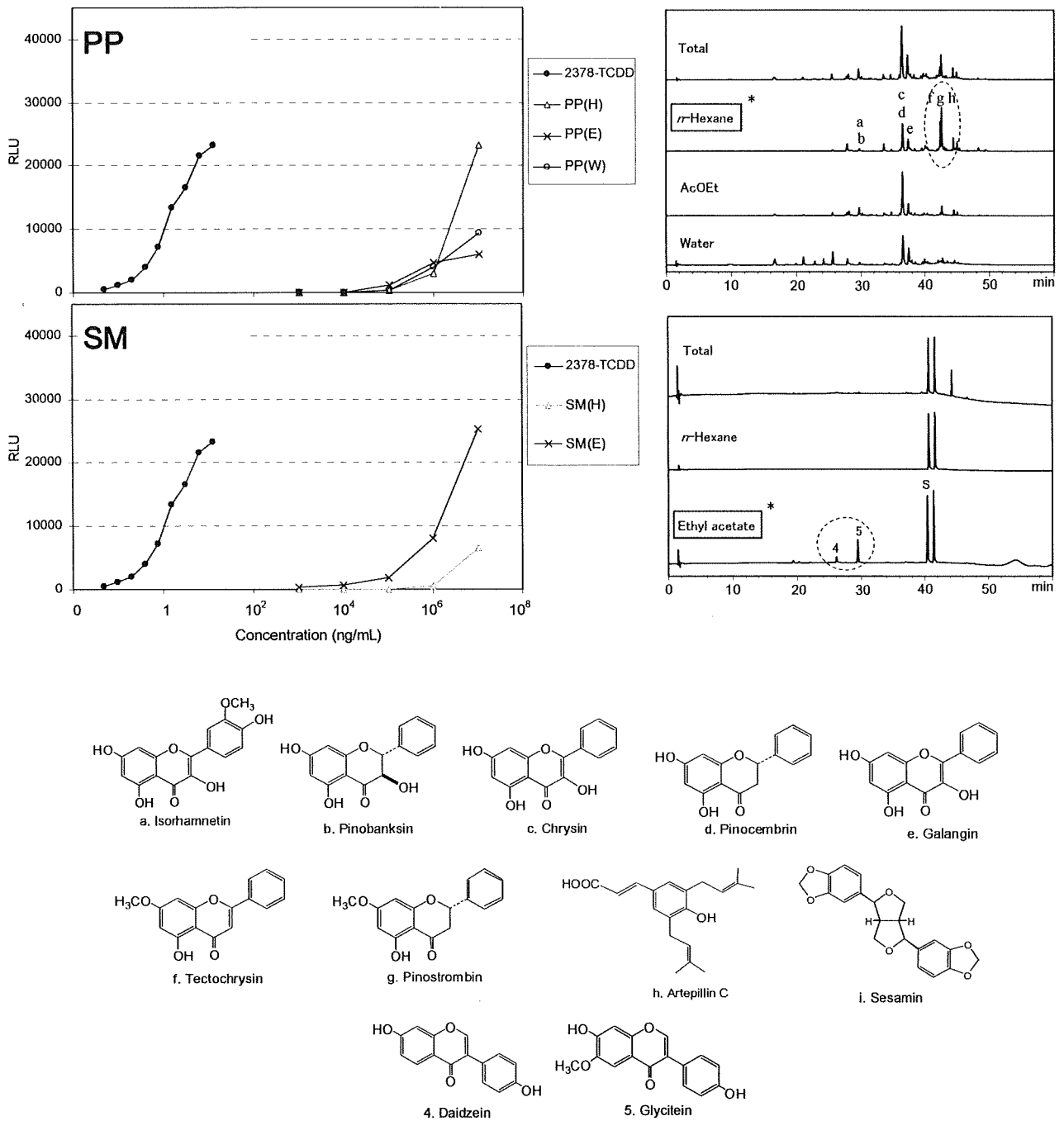


図1a. 試料分画物の AhR 活性(用量-反応曲線)と成分分布(HPLC)および同定した化合物の構造
 PP, プロポリス抽出物含有食品抽出物; SM, ゴマ加工食品抽出物; 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin;
 H, ヘキサン分画物; E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物, *AhR 活性画分
 a, isorhamnetin; b, pinobanksin; c, chrysin; d, pinocembrin; e, galangin; f, tectochrysin; g, pinostrombin; h, artepillin C;
 i, sesamin; 4, daidzein; 5, glycitein
 分析条件, 研究方法参照

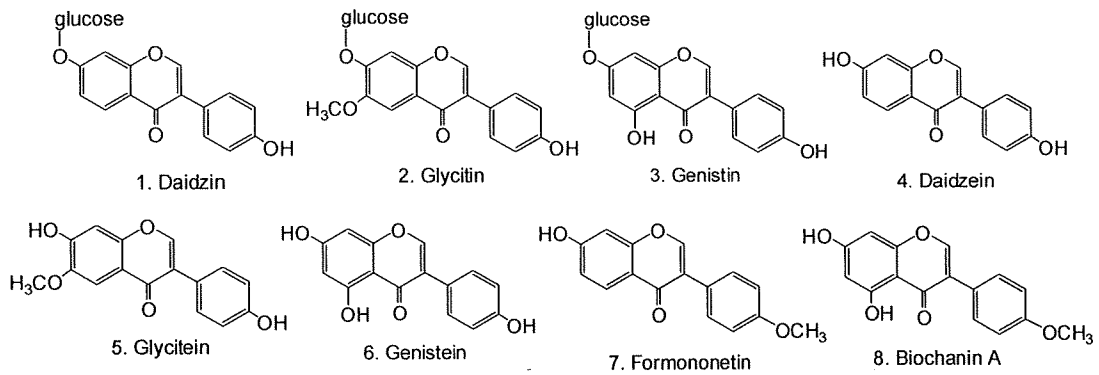
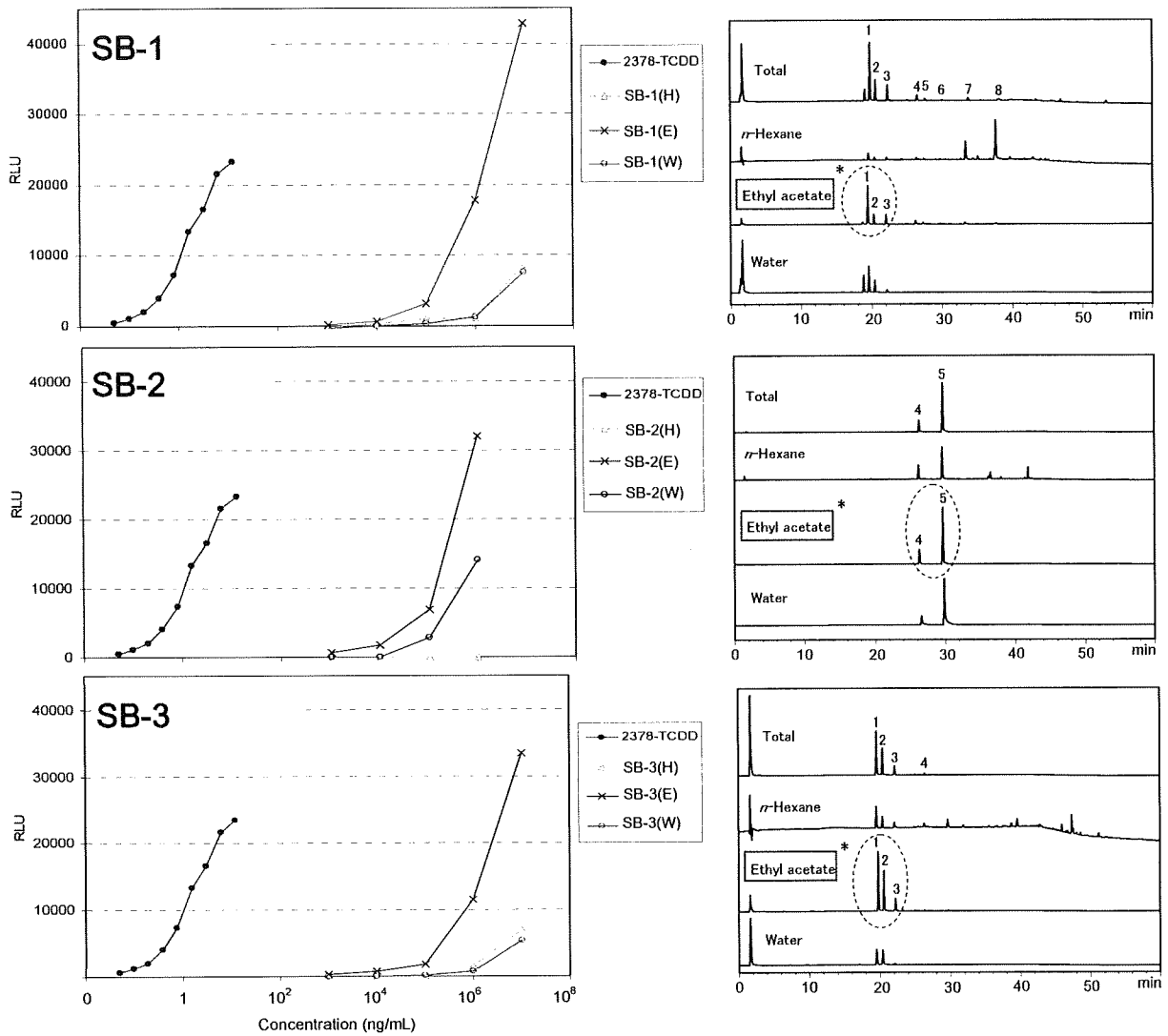


図1b. 試料分画物の AhR 活性(用量-反応曲線)と成分分布(HPLC)および同定した化合物の構造
 SB, 大豆抽出物含有食品, 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; H, ヘキササン分画物; E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物, *AhR 活性画分
 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, daidzein; 5, glycitein; 6, genistein; 7, formononetin; 8, biochanin A
 分析条件, 研究方法参照

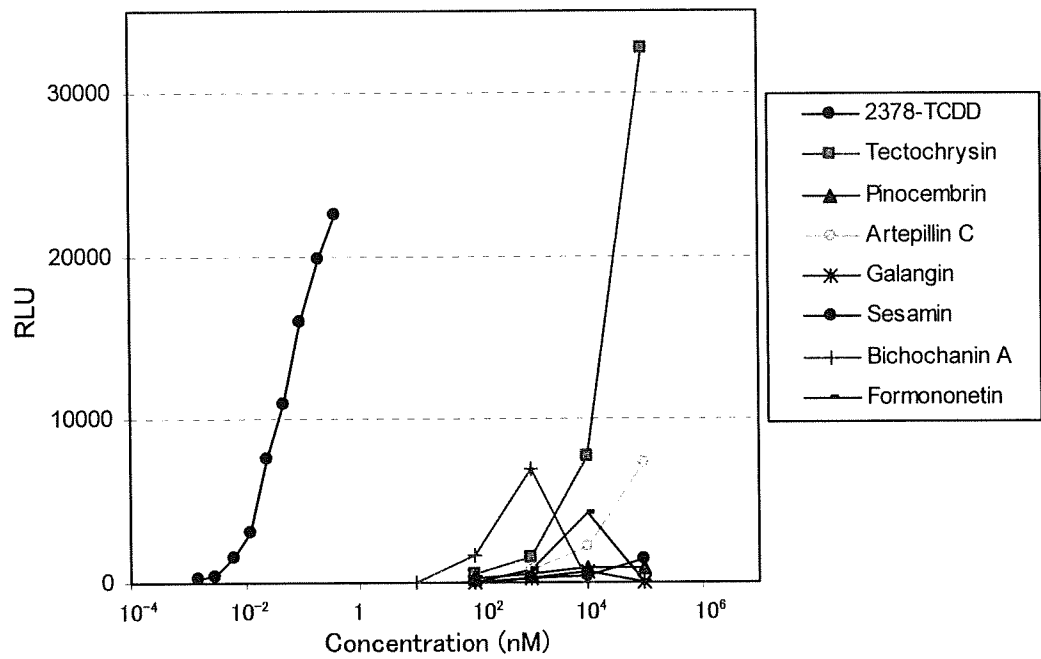


図2. 同定した化合物の AhR 活性(用量-反応曲線)
 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
 分析条件, 研究方法参照

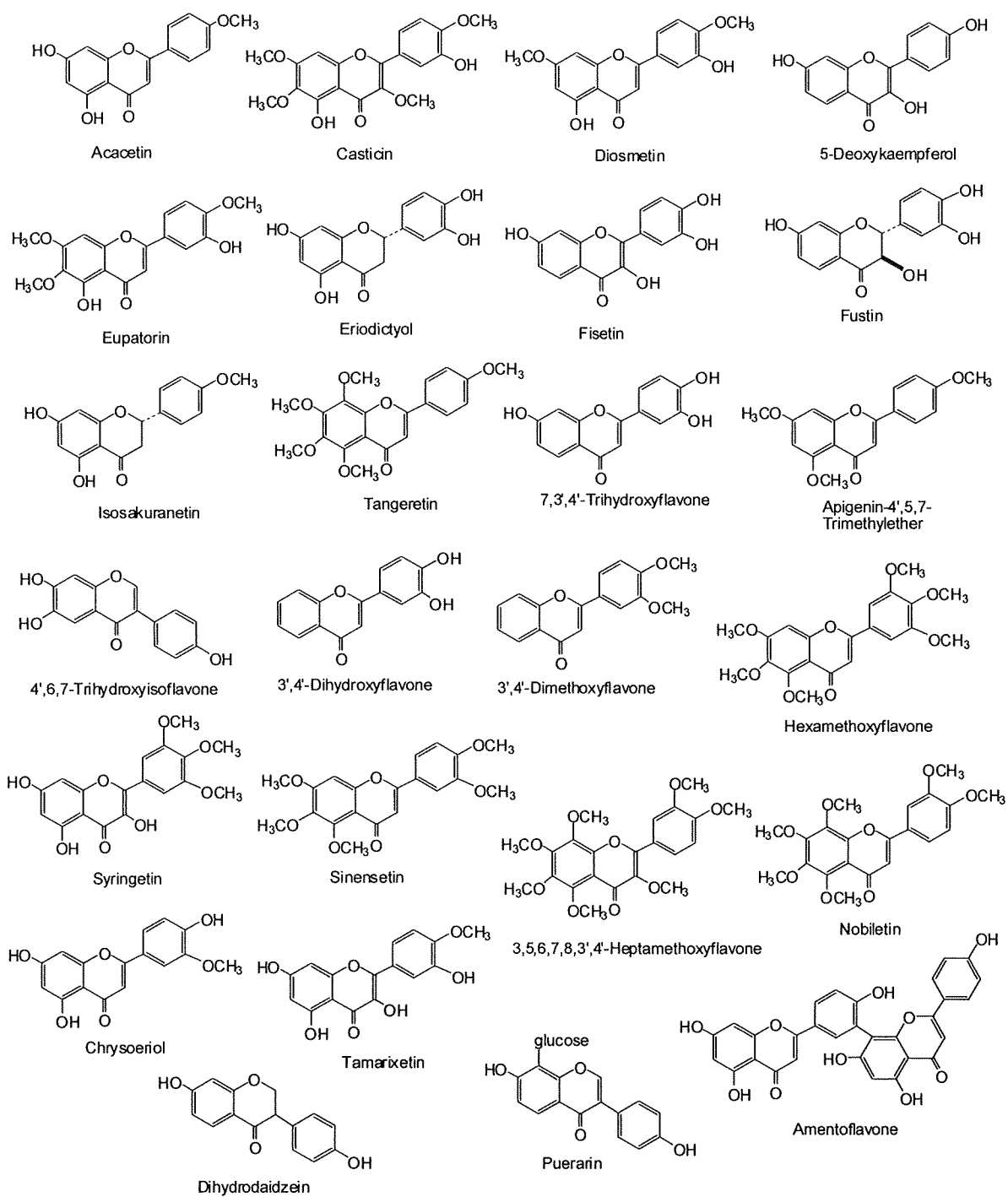


図3a. 供試したフラボノイド 25 種の化学構造

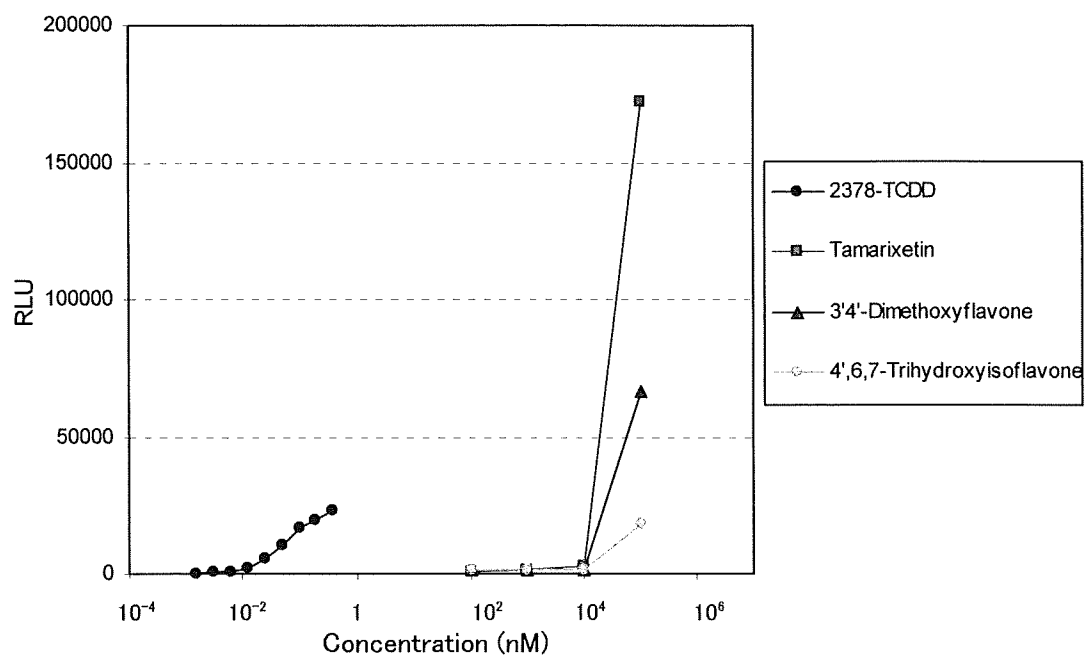


図3b. フラボノイド*の AhR 活性(用量-反応曲線)

*AhR 活性が認められたものを選択

2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

分析条件, 研究方法参照

Ⅱ. 分担研究報告書

2. 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定 法の開発

2-3. 食品中ダイオキシン類および PCBs の迅速一斉分析法の検討

研究分担者 堤 智昭

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究

(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発

(2-3) 食品中ダイオキシン類および PCBs の迅速一斉分析法の検討

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品試料中ダイオキシン類およびポリ塩化ビフェニル (PCBs) の迅速一斉分析法の開発を行った。本研究課題で検討した分析法は主に4つの工程、①高速溶媒抽出法(ASE)による自動迅速抽出、②多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムによる試料精製、③ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による試料の迅速精製、④高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(HRGC/HRMS)によるダイオキシン類・PCBsの異性体分離分析、から構成される。本年度は、確立した迅速一斉分析法の妥当性評価試験を行った。生鮮サケの均一化共通試料を調製し、迅速一斉分析法(開発法)とアルカリ分解・溶媒抽出法(従来法)で各々の分析操作を3回繰り返し、得られた定量値を比較した。その結果、両試験法から得られたPCBs異性体(32種類)の定量値はよく一致した。また、繰り返し分析による定量値の再現性を、相対標準偏差(%)を指標として確認したところ、著しい定量値のばらつきは認められなかった。開発法の実用性を例証するために、生鮮カンパチの均一化試料を用いて全試験操作を試行した。ダイオキシン類・PCBsの計226化合物を同定し、ダイオキシン類の毒性評価値(Total TEQ濃度)及び総PCBs濃度等を算出した。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

堀 就英、安武大輔、中川礼子

するものとなっている。一方、ガイドラインは収載の分析法と同等あるいはそれ以上の性能を有する方法は、分析精度を確保したうえでこれを使用できる、としている。

A.研究目的

厚生労働省が策定した「食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン」¹⁾(以下ガイドライン)は、食品に残留するダイオキシン類を同定・定量するための標準的な分析手法を示している。

ガイドラインは、分析時に達成すべき検出限界値(目標検出下限)を0.01~1pg/gと定めており、食品中に残留する微量のダイオキシン類を高い精度で同定することを求めている。収載されている分析手法はいずれも煩雑で工程が長く、測定値の最終確定まで長期間を要

これまでに我々は、食品中ダイオキシン類分析法の改良・迅速化を目的として検討を行った²⁾⁴⁾。まず、従来のダイオキシン類分析法で最も時間を要していた抽出工程の効率化を検討した。その結果、高速溶媒抽出法(ASE)を使用し、食品試料からダイオキシン類を迅速かつ精密に抽出する条件を確立した。従来の抽出方法では最長で1件あたり約20時間を要していたが、ASEの使用によって1件あたり約30分に短縮化した。また抽出に使用する溶媒量も1/3程度に少量化することが可能となった。同時に、ASEの抽出効率は従来法に比べ