

## D 結論

なし

本研究班では、トータルダイエツト試料を用いて、有害化学物質の摂取量推定を行っている。その対象となっている農薬類は、有機塩素系農薬である HCH 類、DDT 類、ディルドリン、ヘプタクロルエポキサイド、および有機リン系農薬であるマラチオン、フェニトロチオン、ダイアジノンである。これらの農薬は大部分の食品群試料から検出されることがなく、摂取量もきわめて低い。Fig. II-1 に示すように、生鮮野菜類においてもマラチオン、フェニトロチオンの検出率は 1%以下であり、これがトータルダイエツト試料から検出される確率は極めて低いものと考えられる。

一方、有機リン系農薬であってもクロルピリホスの検出率は 3-4%であり、また、イミダクロプリド・アセタミプリド・クロチアニジン・チアメトキサムのようなネオニコチノイド系農薬の検出率も上昇傾向にあり、摂取量を正確に把握し、リスクを評価する必要があると考えられる。

本研究では、最近 13 年間の農薬等の検査データを解析し、農薬ごとに検出率の変動があることを明らかにした。この手法により、摂取量を評価すべき化学物質を選択することの可能性が明らかとなった。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

松田りえ子、五十嵐敦子、渡邊敬浩  
食品から検出される残留農薬等の年次推移  
第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 2010

### 3. その他

Table II-1 検査データ数, 検出率の推移 (1998-2010)

年度	検査数	検出数	検出率 %	試料数	検出試料数	試料ベース 検出率 %	試料当たり 農薬数
1998	182,439	2,646	1.45	7,154	1,186	16.6	26
1999	198,025	2,326	1.17	6,359	1,052	16.5	31
2000	242,488	2,652	1.09	7,611	1,277	16.8	32
2001	218,048	2,359	1.08	8,403	1,120	13.3	26
2002	192,213	1,426	0.74	7,811	858	11.0	25
2003	214,838	2,823	1.31	7,115	1,128	15.9	30
2004	292,218	2,145	0.73	7,075	1,144	16.2	41
2005	315,218	2,301	0.73	6,608	1,117	16.9	48
2006	375,403	2,299	0.61	7,083	1,199	16.9	53
2007	516,414	2,853	0.55	7,065	1,379	19.5	73
2008	586,327	2,995	0.51	6,835	1,371	20.1	86
2009	634,725	2,593	0.41	7,270	1,237	17.0	87
2010	662,948	2,308	0.35	6,571	1,308	19.9	101

Table II-2 検査数の多い食品の推移 (1998-2010)

年度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1998	鶏肉	牛肉	ぶた肉	卵	牛乳	グレープフルーツ	バナナ	オレンジ	きゅうり	玄米
1999	ぶた肉	卵	牛肉	鶏肉	牛乳	バナナ	グレープフルーツ	グレープフルーツ	トマト	オレンジ
2000	卵	牛肉	鶏肉	ぶた肉	牛乳	バナナ	グレープフルーツ	きゅうり	トマト	オレンジ
2001	牛肉	卵	ぶた肉	鶏肉	トマト	牛乳	きゅうり	バナナ	グレープフルーツ	なす
2002	牛肉	ぶた肉	きゅうり	卵	いちご	鶏肉	トマト	なす	ブロッコリー	グレープフルーツ
2003	日本なし	ぶた肉	牛肉	卵	ほうれんそう	鶏肉	りんご	りんご	グレープフルーツ	バナナ
2004	牛肉	ぶた肉	卵	鶏肉	牛乳	きゅうり	キャベツ	グレープフルーツ	ほうれんそう	りんご
2005	卵	ぶた肉	牛肉	鶏肉	きゅうり	トマト	グレープフルーツ	キャベツ	牛乳	バナナ
2006	ぶた肉	ぶた肉	牛肉	鶏肉	きゅうり	トマト	ほうれんそう	グレープフルーツ	牛乳	キャベツ
2007	ぶた肉	牛肉	鶏肉	卵	きゅうり	トマト	牛乳	だいこんの根	ブロッコリー	キャベツ
2008	ぶた肉	加工食品	鶏肉	卵	牛肉	きゅうり	牛乳	トマト	ブロッコリー	なす
2009	ぶた肉	卵	牛肉	鶏肉	加工食品	きゅうり	牛乳	ほうれんそう	ブロッコリー	だいこん
2010	牛肉	ぶた肉	卵	鶏肉	トマト	ブロッコリー	きゅうり	なす	グレープフル	牛乳

Table II-3 農薬検出率の多い食品の推移 (1998-2010)

年度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1998	オレンジ	グレープフル	レモン	日本なし	バナナ	りんご	しゅんぎく	小麦粉	ねぎ	かんきつ類
1999	レモン	オレンジ	りんご	グレープフル	貝類	かんきつ類	バナナ	日本なし	いちご	牛乳
2000	西洋なし	おうとう	オレンジ	レモン	グレープフル	日本なし	ぶどう	小麦粉	かんきつ類	こまつな
2001	おうとう	レモン	グレープフル	オレンジ	さやえんどう	こまつな	淡水魚類	かんきつ類	アブラナ科野菜	ピーマン
2002	レモン	グレープフル	茶類	かんきつ類	おうとう	オレンジ	バナナ	あぶらな科野菜	こまつな	りんご
2003	グレープフル	レモン	オレンジ	かんきつ類	水産加工品	えだまめ	西洋なし	ピーマン	りんご	こまつな
2004	おうとう	かんきつ類	りんご	オレンジ	日本なし	レモン	グレープフル	ぶどう	ピーマン	バナナ
2005	おうとう	りんご	オレンジ	レモン	日本なし	かんきつ類	グレープフル	ぶどう	いちご	ピーマン
2006	りんご	オレンジ	レモン	グレープフル	ピーマン	かんきつ類	日本なし	いちご	にら	チンゲンサイ
2007	オレンジ	かんきつ類	りんご	レモン	えだまめ	ピーマン	ぶどう	いちご	グレープフル	トマト
2008	りんご	レモン	日本なし	オレンジ	ぶどう	グレープフル	いちご	かんきつ類	えだまめ	もも
2009	おうとう	レモン	りんご	グレープフル	日本なし	ぶどう	オレンジ	ピーマン	かんきつ類	きゅうり
2010	りんご	オレンジ	レモン	グレープフル	ぶどう	えだまめ	日本なし	いちご	もも	きゅうり

Table II-4 検査数の多い農薬の推移 (1998-2010)

年度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1998	クロルピリホス	マラチオン	フェントロチオン	ダイアジノン	ハラチオン	エトリムホス	ハラチオンメチル	ジクロルホス	EPN	ピリミホスメチル
1999	フェントロチオン	クロルピリホス	マラチオン	ダイアジノン	ハラチオンメチル	ハラチオン	エトリムホス	ピリミホスメチル	EPN	ジクロルホス
2000	クロルピリホス	マラチオン	フェントロチオン	ダイアジノン	ピリミホスメチル	シベルメトリン	ハラチオンメチル	ヘルメトリン	エトリムホス	シハロトリン
2001	クロルピリホス	マラチオン	フェントロチオン	ダイアジノン	ヘルメトリン	エトリムホス	ピリミホスメチル	ハラチオンメチル	シベルメトリン	ハラチオン
2002	マラチオン	クロルピリホス	ダイアジノン	フェントロチオン	ハラチオンメチル	エトリムホス	トルクロホスメチル	ピリミホスメチル	ヘルメトリン	EPN
2003	クロルピリホス	マラチオン	MEP	トルクロホスメチル	ヘルメトリン	ダイアジノン	シベルメトリン	ピリミホスメチル	ハラチオンメチル	フェンハレレート
2004	クロルピリホス	マラチオン	フェントロチオン	ダイアジノン	EPN	プロチオホス	ハラチオンメチル	ピリミホスメチル	エトリムホス	ヘルメトリン
2005	クロルピリホス	フェントロチオン	マラチオン	ダイアジノン	ピリミホスメチル	ハラチオンメチル	エトリムホス	プロチオホス	EPN	トルクロホスメチル
2006	クロルピリホス	マラチオン	ピリミホスメチル	フェントロチオン	ダイアジノン	エトプロホス	プロチオホス	エトリムホス	トルクロホスメチル	ハラチオンメチル
2007	クロルピリホス	マラチオン	フェントロチオン	ダイアジノン	プロチオホス	ピリミホスメチル	ハラチオンメチル	トルクロホスメチル	フェンチオン	フェンハレレート
2008	マラチオン	クロルピリホス	フェントロチオン	ダイアジノン	フェントエート	フェンチオン	プロチオホス	ピリミホスメチル	EPN	ハラチオンメチル
2009	マラチオン	ダイアジノン	クロルピリホス	プロチオホス	フェントロチオン	フェントエート	ピリミホスメチル	EPN	ハラチオンメチル	トルクロホスメチル
2010	マラチオン	クロルピリホス	ダイアジノン	プロチオホス	ピリミホスメチル	フェントロチオン	EPN	トルクロホスメチル	ハラチオンメチル	フェントエート

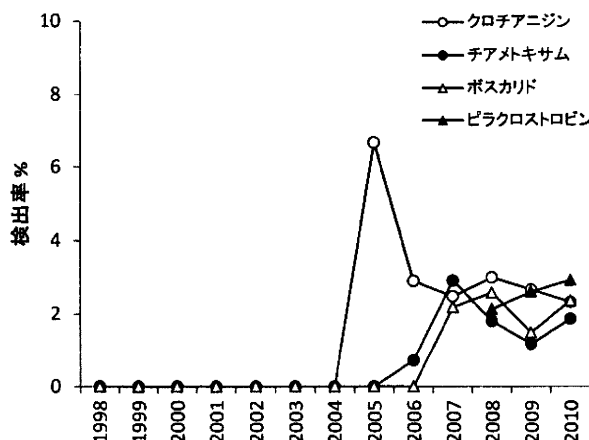
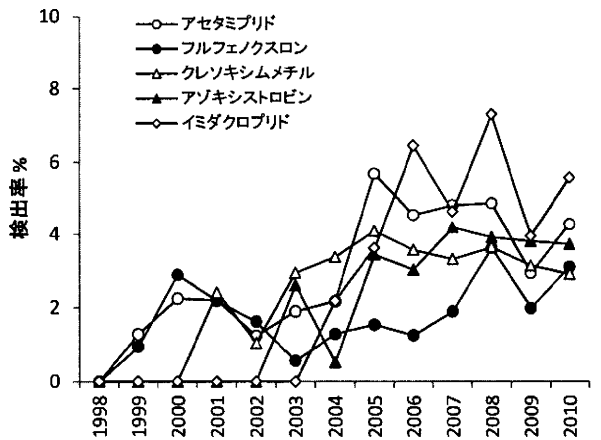
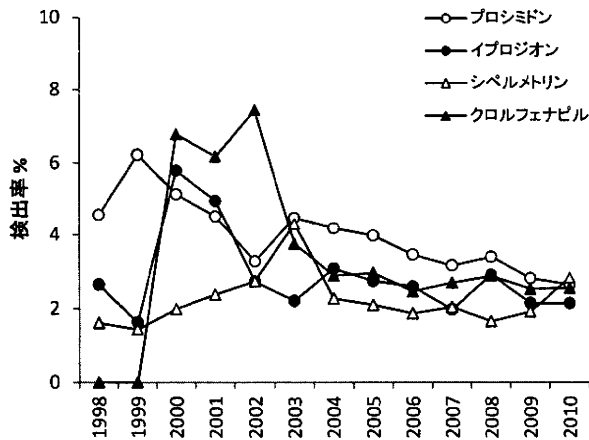
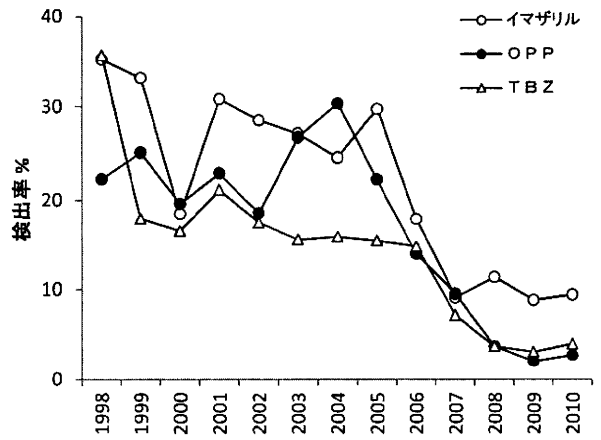
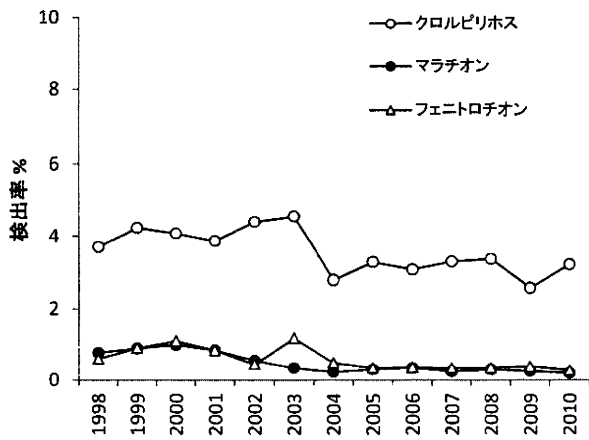


Fig. II-1 農薬等検出率の推移

# 分 担 研 究 報 告

難分解性汚染物（POPs）の摂取量推定に必要な分析法の開発

天倉 吉章

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と  
その手法開発に関する研究

研究分担報告書

難分解性汚染物 (POPs) の摂取量推定に必要な分析法の開発

(1) ダイオキシン類迅速測定法の開発研究

(1-1) 高感度 CALUX アッセイによる魚中のダイオキシン類分析

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部

分担研究者 天倉 吉章 松山大学 薬学部

研究要旨

ダイオキシン類のスクリーニング法である高感度 CALUX アッセイの魚試料に対する適用性を評価した。本法の種々のダイオキシン類に対する応答性は WHO-TEF とよく一致し、スクリーニング法として適切な応答性を有していた。魚試料は硫酸シリカゲルカラムと活性炭カラムにより精製し、PCDD/Fs と Co-PCBs に分画後、本法により測定した。魚試料に対する添加回収試験の結果は 61~107%でありスクリーニング法としては適切であった。7 検体の魚試料に対して本法と従来法 (HRGC/HRMS 分析) の比較試験を行ったところ、PCDD/Fs 及び Co-PCBs の両分画で従来法の毒性等量濃度に対し良好な相関係数 ( $r > 0.93$ ) が得られた。本法は従来法と比較し、数分の一の時間及び費用で魚中のダイオキシン類濃度の把握が可能であり、スクリーニング法として有用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

堤 智昭

株式会社 日吉

中村 昌文、半田 洋士

ら検討されている<sup>1, 2)</sup>。しかし、食品中のダイオキシン類濃度は低いため、CALUX アッセイの高感度化が望まれていた。我々は、過去の厚生労働科学研究費により高感度のルシフェラーゼレポーター遺伝子細胞株 (pGL7.3) を作製し、それをを用いた高感度 CALUX アッセイの開発を行ってきた<sup>3)</sup>。高感度 CALUX は、従来の CALUX と比較し、2 倍以上、高感度であることが明らかになっているが、食品への適用性については検討が十分でない。本研究では日本人におけるダイオキシン類摂取量の大半を占める魚を対象に、高感度 CALUX の適用に関する性能評価を実施した。

A. 研究目的

我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多いため、市販魚における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。魚などの食品を対象にした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遺伝子アッセイ (CALUX アッセイ) が早くか

## B. 研究方法

### 1. 試薬

試薬は既報<sup>2)</sup>に従った。

### 2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを、ホモジナイザーで均一化し使用した。

### 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、ルミノメーターはBerthold社製のCentro LB960を、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. 前処理

均一化した試料(10 g)を採取し、アセトン(15 mL)を加え、振とう(2分)した。その後、ジクロロメタン/ヘキサン(1:2)(10 mL)を加え、振とう抽出(2分×3回)を行った。抽出液を抽出液ろ過用カラムに添加し、ジクロロメタン/ヘキサン(1:2)(10 mL)で溶出させた後、溶出液を濃縮した。溶出物の重量(脂肪重量)測定後、ヘキサン(20 mL)に懸濁し、硫酸シリカゲルカラムに添加後、ヘキサン(25 mL)で溶出した。溶出液は濃縮後、さらに活性炭カラムに添加し、ヘキサン(10 mL)で洗浄後、トルエン/酢酸エチル/ヘキサン(1:1:8)(15 mL)でCo-PCBs画分を溶出、さらにトルエン(20 mL)でPCDD/Fs画分を溶出した。各画分は濃縮後、ヘキサン(4 mL)に置換した。

### 5. 高感度 CALUX アッセイ

pGL7.3細胞を75,000個/wellで96wellマイクロプレートに播種し、CO<sub>2</sub>インキュ

ベーター内(37°C)で一晩、前培養した。Minimum Essential Medium (MEM)に、10%の牛胎児血清及びG418(500 µg/mL)を加え細胞培養培地とした。被検溶液は、前処理済みのヘキサン溶液を試験管に一部分取(最大量1.5 mL)し、DMSOを1%含む培地(300 µL)に置換した。被検溶液は3well(95 µL/well)に分け、CO<sub>2</sub>インキュベーター内(37°C)で20~24時間、細胞に暴露した。暴露後、培地を取り除き、ルシフェラーゼアッセイシステムにより、誘導されたルシフェラーゼ活性(相対発光強度;RLU)を、ルミノメーターにより測定した。試料中のダイオキシン類濃度は、得られたRLUからバックグラウンド(溶媒対照のRLU)を差し引いた後、検量線のRLUと比較し、2,3,7,8-TCDD換算濃度(TCDD eq.)として表した。検量線はHillの式により近似を行い、Excel(マイクロソフト)により、測定値を算出した。本法の典型的な検量線の一例を図1に示す。

### 6. HRGC/HRMS 分析

既報<sup>2)</sup>に従い、ダイオキシン類を定量した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 種々のダイオキシン類に対する応答性

本法の種々のダイオキシン類異性体に応答性を確認した。WHO-TEFが定められている29種の異性体に対する標準曲線を作製し、2,3,7,8-TCDDに対する応答性を1とした時の相対的な各異性体の応答性(CALUX-TEF)を表1に示す。各異性体に対する応答性はWHO-TEFと比較すると、多くの異性体で数倍以内の比率に収まっており、よく一致した値となっている。特に、魚の毒性等量濃度において占める割合の高い異性体である、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD、2,3,7,8-TCDF、

1, 2, 3, 7, 8-PeCDF、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 及び 3, 3', 4, 4', 5-PeCB (#126)については、本法の応答性は良好であった。従って、魚を対象にした毒性等量のスクリーニング法として本法は適した特性を有していると考えられた。なお、表1の結果については複数回の試験による再現性を確認していないため、暫定的な結果である。

## 2. 希釈直線性試験

前処理後のマトリックスの影響を検討するため、希釈直線性試験を行った。HRGC/HRMSによりダイオキシン類汚染が認められた魚試料（サーモン、スズキ及びブリ）の前処理済み試験液をヘキサンで段階希釈し、希釈測定時の定量値を初期濃度と比較した（図2）。その結果、PCDD/Fs測定及びCo-PCBs測定の両者において、希釈操作により得られる定量値が最大で2倍程度増加する場合が認められ、マトリックスの影響が疑われた。スクリーニング法としては高めの測定値が得られるほうが、偽陰性が少ない安全な方法と考えられる。従って、魚試料を分析する際は、数段階の希釈系列による測定を実施し、最大の定量値を試料濃度とした。

## 3. 添加回収試験

本法が魚試料中のダイオキシン類を正確に測定可能か検討するため、魚試料に対して添加回収試験を行った。低濃度及び高濃度のダイオキシン類を添加した魚試料（サーモン及びマグロ）を前処理後、本法によりPCDD/Fs及びCo-PCBsを分析した（表2）。サーモンにおける回収率は、PCDD/Fs分画で76~99%、Co-PCBs分画で81~107%であった。マグロにおける回収率は、PCDD/Fs分画で平均61~84%、Co-PCBs分画で75~102%であった。マグロ試料のPCDD/Fs分画で、高濃度の2, 3, 7, 8-TCDDを添加した回収

率が61~69%とやや低め値が得られたが、スクリーニング法としては許容できる回収率であると考えられた。

## 4. HRGC/HRMS分析との比較試験

市販魚試料（7試料）を高感度CALUXにより分析し、得られた分析値を従来法（HRGC/HRMS分析）のダイオキシン毒性等量濃度と比較した（図3）。PCDD/Fs測定における相関係数は $r = 0.93$ 、Co-PCBs測定における相関係数は $r = 0.99$ であり、両者とも相関係数は良好であった。比較検体数をさらに増やす必要があるが、本法は市販魚中のダイオキシン類毒性等量濃度のスクリーニング法として有用であると考えられる。なお、本法は従来法と比較し、PCDD/Fs測定で約4倍の分析値、Co-PCBs測定で約0.8倍の分析値が得られた。本法と従来法の分析値の違いについては解析を行っていないが、本法のダイオキシン類に対する応答性とWHO-TEFの違いが反映されていると考えられる。

本法は従来法と比較すると、短時間（5日以内）で分析結果が判明し、多数の検体を一度に処理可能であることから、1検体あたりのコストも約5分の1程度である。従って、本法をスクリーニング法として使用できれば、検査の効率化が期待できる。

## D. 結論

- 1) 高感度CALUXのダイオキシン類に対する相対的な応答性は、WHO-TEFとよく一致していた。
- 2) 魚試料に対する添加回収試験を行った結果、回収率は61~107%であり、スクリーニング法として許容できる値であった。
- 3) 従来法（HRGC/HRMS分析）と良い相関が得られたことから、魚中のダイオキシン類の毒性等量濃度をスクリーニングする方法として期待できる。



## E. 参考文献

1) Besselink H, Leonards P, Felzel E, Brouwer B. Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and biphenyls (PCB) in fish using DR-CALUX<sup>®</sup> and GC/MS: A comparison. *Organohalogen Compounds*, 58 (2002) 413-415.

2) 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)

3) 平成 21 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

なし

### 2. 学会発表

なし

表1 高感度 CALUX のダイオキシン類異性体に対する応答性及び WHO-TEF との比較<sup>1)</sup>

	異性体	ダイオキシン類応答性 <sup>2)</sup> (CALUX-TEF)	WHO-TEF 2005	比率 (CALUX-TEF/WHO-TEF)
PCDDs	2,3,7,8-TCDD	1	1	1
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.72	1	0.7
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.18	0.1	1.8
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.10	0.1	1.0
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.10	0.1	1.0
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.046	0.01	4.6
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0.0021	0.0003	7.0
PCDFs	2,3,7,8-TCDF	0.22	0.1	2.2
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.14	0.03	4.7
	2,3,4,7,8-PeCDF	0.94	0.3	3.1
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.21	0.1	2.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.13	0.1	1.3
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.13	0.1	1.3
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.27	0.1	2.7
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.016	0.01	1.6
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.054	0.01	5.4
	OCDF	0.0019	0.0003	6.3
Co-PCBs	3,3',4,4'-TCB (#77)	0.00014	0.0001	1.4
	3,4,4',5'-TCB (#81)	0.0065	0.0003	21.8
	3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	0.073	0.1	0.7
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	0.0014	0.03	0.05
	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	0.000022	0.00003	0.7
	2,3,4,4',5'-PeCB (#114)	0.00014	0.00003	4.8
	2,3',4,4',5'-PeCB (#118)	0.000026	0.00003	0.9
	2',3,4,4',5'-PeCB (#123)	0.000051	0.00003	1.7
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#156)	0.000047	0.00003	1.6
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	0.000052	0.00003	1.7
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	0.000067	0.00003	0.2
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	0.000064	0.00003	0.2

1)本結果は複数回の試験による再現性を確認していないため、暫定的な結果である。

2)各異性体で得られた標準曲線の50%結合濃度を比較して算出した。

表 2 魚試料に対する添加回収試験

		添加した ダイオキシン類	添加濃度 TCDD eq.	回収率(%), $n = 3$		
				平均	最小	最大
サーモン	PCDD/Fs分画	2,3,7,8-TCDD	5.8	95	89	99
			24.7	84	76	98
	Co-PCBs分画	#126	8.0	95	81	107
			22.7	86	84	88
マグロ	PCDD/Fs分画	2,3,7,8-TCDD	5.7	80	75	84
			26.2	66	61	69
	Co-PCBs分画	#126	7.6	86	75	102
			24.2	87	79	101

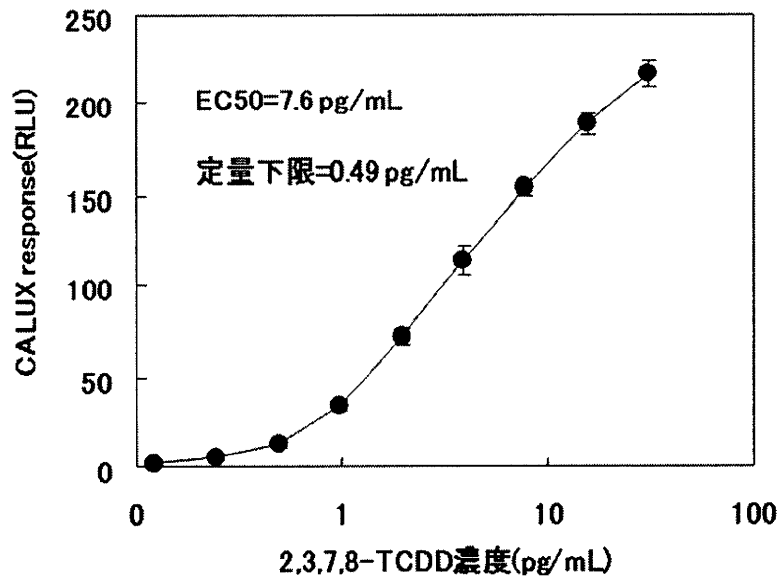


図1 高感度 CALUX の検量線の一例

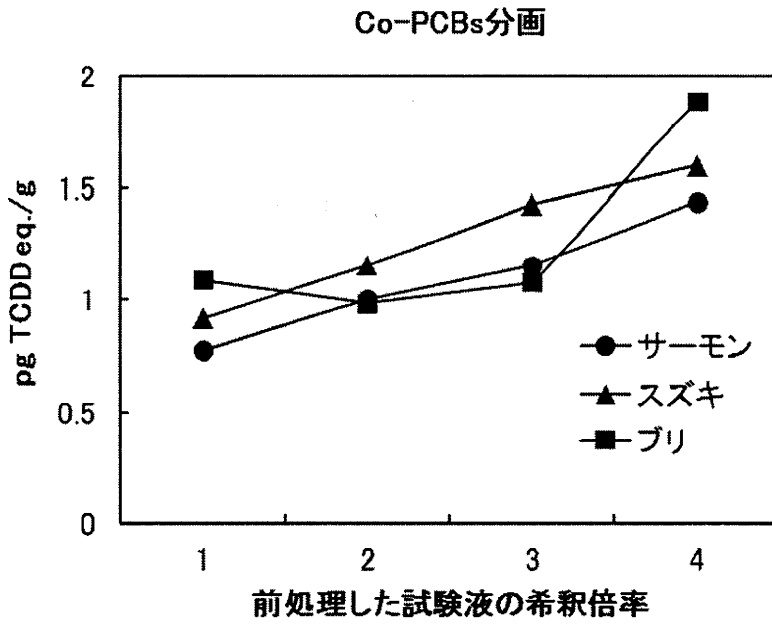
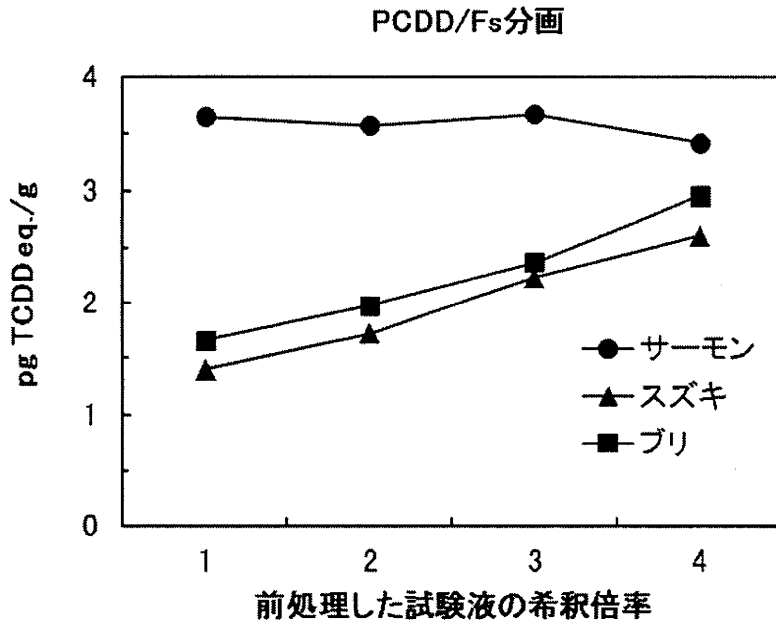


図2 希釈直線性試験

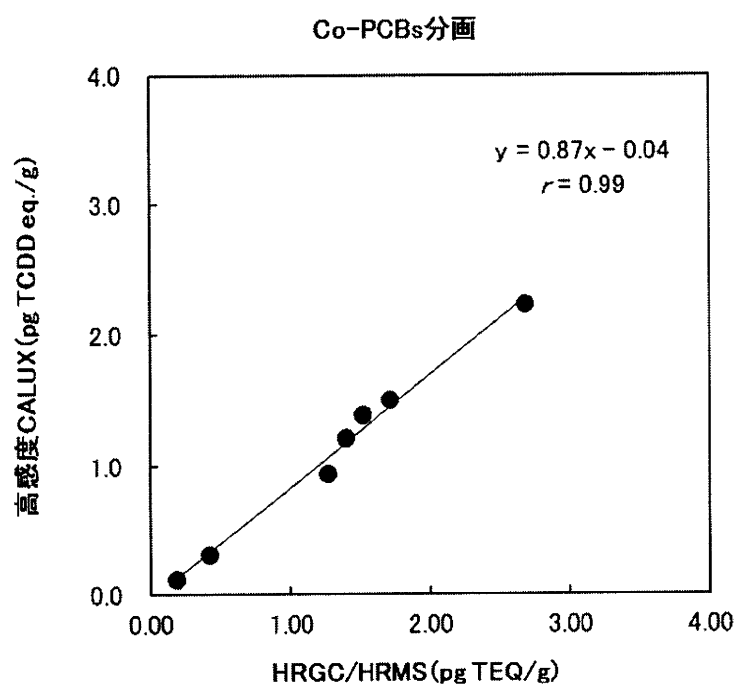
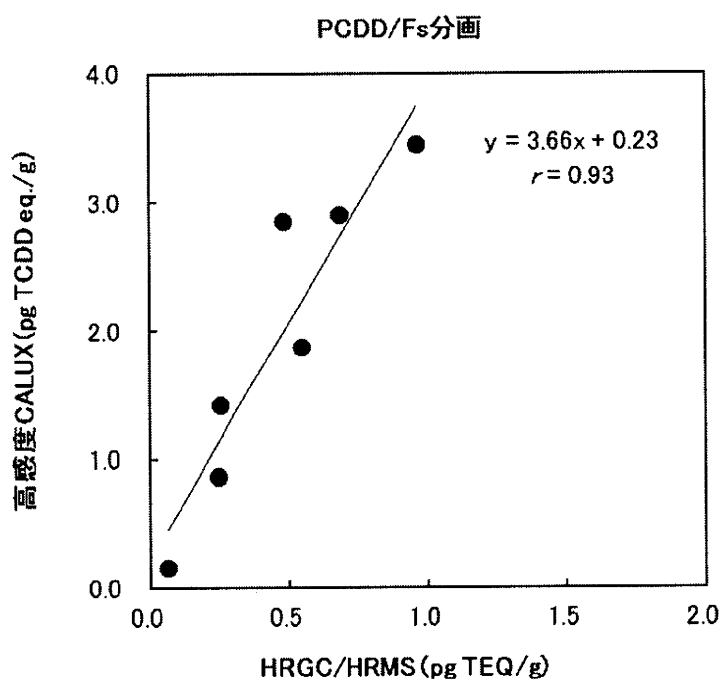


図3 魚試料のダイオキシン類分析における高感度 CALUX アッセイと HRGC/HRMS 法

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と  
その手法開発に関する研究

研究分担報告書

難分解性汚染物 (POPs) の摂取量推定に必要な分析法の開発

(1) ダイオキシン類迅速測定法の開発研究

(1-2) 食品由来ダイオキシン様物質の探索

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部

分担研究者 天倉 吉章 松山大学 薬学部

研究要旨

食品中のダイオキシン類分析に簡易測定生物検定法 (バイオアッセイ) を適用する場合、食品試料由来の芳香族炭化水素レセプター (AhR) アゴニスト (ダイオキシン様物質) による分析値への影響が示唆されている。本研究では、食品中の AhR アゴニストのタイプを明らかにし、分析値への影響および健康影響について考察することを目指すため、まず各種食品の抽出物について AhR 活性を評価した。野菜、果物、ハーブ 22 種、健康食品エキス原料 8 種の計 30 種を選択し、それぞれ抽出物を調製し、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。その結果、野菜ではハウレンソウ、ブロッコリー、セロリ、ジャガイモ、ハーブではセージ、ローズマリーにダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD) と比べ 10~100 万倍の濃度領域で、AhR 活性が認められた。今回、高濃度ではあるが、一部試料に AhR 活性を示すことが明らかになったことから、今後これら抽出物に含まれる天然 AhR アゴニストを精査し、食品中の AhR アゴニストのタイプを明らかにする。

研究協力者

松山大学 薬学部

好村 守生、吉田 隆志

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、半田 洋士

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。このダイオキシンの毒性機構 (AhR 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<sup>1)</sup>。バイオアッセイは迅速で低廉であるため、スクリーニ

A. 研究目的

アリル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

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、バイオアッセイの場合、必要となる試料量が機器分析法よりも少量で可能なことが長所として挙げられている。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り、バイオアッセイを適用する場合、ダイオキシン以外のダイオキシン様物質の影響をいかに取り除くかが課題となる。これまでの検討から、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 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<sup>2)4)</sup>。しかし食品中のダイオキシン様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。またそれらデータは、天然のダイオキシン様活性物質として、健康影響の観点からも調査すべき重要な課題であると考えられ、AhR の機能解明への応用が期待される。

このような背景に基づき、本研究では食頻度の高い野菜、果物、ハーブ、健康食品エキス原料の計 30 種を選択し、含有する天然 AhR 活性（ダイオキシン様）物質を精査し、食品中の AhR アゴニストに関する情報のさらなる集積を目的とする。本年度は、それら試料のダイオキシン様活性について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）により評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料

愛媛県内で 2010 年に購入した野菜、果物、ハーブ（カボチャ、キャベツ、グレープフルーツ、コマツナ、ジャガイモ、セージ、セロリ、ダイコン、タマネギ、トマト、ナシ、ナス、ニンジン、バナナ、ピーマン、ブロッコリー、ハウレンソウ、モモ、リンゴ、レタス、レモン、ローズマリー）、健康食品エキス原料（ウラジログシ、カンゾウ、キキョウ、ケイヒ、ソヨウ、タイソウ、チンピ、ニンジン）、計 30 種を試料とした。試料の選別に際しては、再現性の確認を含め、評価実績があるものも選んだ。

### 2. 試薬、試液

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。マイクロプレートリーダーは Anthos 社製の Lucy 1 microplate luminometer、Molecular Devices 社製の SpectraMax M2 を使用した。

### 3. 試料調製

野菜、果物については、各生鮮品をミキサーでジュース状にして試料とした。各試料（2 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、ろ液を減圧濃縮し、凍結乾燥したものを試料抽出物とした。ハーブおよび健康食品エキス原料については、粉碎機を使って粉末化したものを試料とした。ハーブは各試料（2 g）については、エタノール/水（4:1）（30 mL）を加え、同様に調製した。健康食品エキス原料は、各試料（3~5 g）を沸騰水（400 mL）中で煮出して煎液を調



製し、冷後減圧濃縮したものを凍結乾燥し、試料抽出物とした。

#### 4. 評価方法

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）〕により行った。

ケイラックスアッセイ：試料抽出物を DMSO に溶解し、試料溶液とした（コントロールは DMSO）。試料溶液は 4 段階の濃度（0.01～100 mg/mL の範囲で 4 段階）に DMSO で希釈して調製した。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 H1L6.1（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、顕微鏡下で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度（RLU）を測定した。

#### C. 研究結果及び考察

野菜、果物、およびハーブ、健康食品エキス原料の試料 30 種類について、ケイラックスアッセイによる AhR（ダイオキシン様）活性を測定した。その結果、試料の大半は 10～100 mg/mL の高濃度領域においても AhR 活性は認められなかった。一方で、一部試料は高濃度で AhR 活性を示した。図 1 にダイオキシン様活性を示した試料の用量-反応曲線を示す。

野菜試料においては、ハウレンソウ、ブロッコリー、ジャガイモ、セロリに 10～100

mg/mL 濃度領域で AhR 活性が認められた。ハウレンソウについては、以前の調査においても AhR 活性が認められており<sup>4)</sup>、本結果で再現性を確認することが出来た。緑黄色野菜に含まれるインドール化合物は AhR 活性を示すことが報告されており<sup>5)</sup>、それらの影響が考えられるが、AhR 活性を指標とした活性成分の探索は殆ど報告がなく、今後の課題としてあげられる。

果物においては、レモン、グレープフルーツの高濃度領域で若干の AhR 活性が認められた。これらも以前の調査で AhR 活性が認められたもので、本試験において再現性を確認することができた。最近、オランダのグループがママレードに含まれる AhR アゴニストについて検討し、bergapten などのフラノクマリン類の AhR 活性について報告しており<sup>6)</sup>、それら化合物による影響が示唆される。

ハーブでは、ローズマリー、セージともに高濃度領域で AhR 活性が認められた。これらについても、以前の調査においても AhR 活性を認めており、再現性が確認された。健康食品エキス原料においては、カンゾウに若干の AhR 活性が認められたが、その他のものでは活性は認められなかった。今回、健康食品エキス原料については、煎液の AhR 活性を検討しており、主に高極性画分を対象としている。さらに、調製法を変えた低極性画分についても検討する予定である。

#### D. 結論

野菜、果物、およびハーブ、健康食品エキス原料計 30 種を試料とし、各抽出物を調製し、レポータージーンアッセイにより AhR 活性を評価した。その結果、ハウレンソウ、ブロッコリー、ジャガイモ、セロリ、セージ、ローズマリーの高濃度領域（10～100 mg/mL）に AhR 活性が認められた。こ

れらのうち、現在、ブロッコリーおよびローズマリー中の天然 AhR 活性 (ダイオキシン様活性) 因子について、その解明を行っている。

#### 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 (2003), 532–539.
  - 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 (2004), 31–33.
  - 5) Denison, MS., Nagy, SR., Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43 (2003), 309–334.
  - 6) van Ede, K., Li, A., Antunes-Fernandes, E., Mulder, P., Peijnenburg, A., Hoogenboom, R., Bioassay directed identification of natural aryl hydrocarbon-receptor agonists in marmalade, *Anal. Chim. Acta.*, 617 (2008), 238–245.
- #### F. 研究業績
1. 論文発表
    - 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R., Yoshida, T.: Tectochrysin in propolis is a potent natural aryl hydrocarbon receptor ligand. *Planta Medica*, 76 (2010), 1380.
    - 2) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R., Yoshida, T.: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods. *Food Chemistry*, 126, (2011) 1515–1520.
  2. 学会発表
    - 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R., Yoshida, T.: Tectochrysin in propolis is a potent natural aryl hydrocarbon receptor ligand. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research and the 7th Tannin Conference (Presymposium). (2010. 8).
    - 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: 生薬主要成分の AhR 結合活性. 日本生薬学会第 57 回年会 (2010. 9)
    - 3) Amakura, Y.: Characterization of natural ligands for aryl hydrocarbon receptor using a reporter gene assay, 2010 FIP (International Pharmaceutical Federation) PSWC (Pharmaceutical Sciences World Congress) /AAPS (American Associate of Pharmaceutical Scientists) Annual Meeting. (2010. 11).
    - 4) 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: フラボノイドの AhR 活性について. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3).
    - 5) 天倉吉章、高岡昌司、堤 智昭、中村

昌文、半田洋士、好村守生、松田りえ子、吉田隆志：ケツメイシに含まれる天然 AhR 活性化成分. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3).

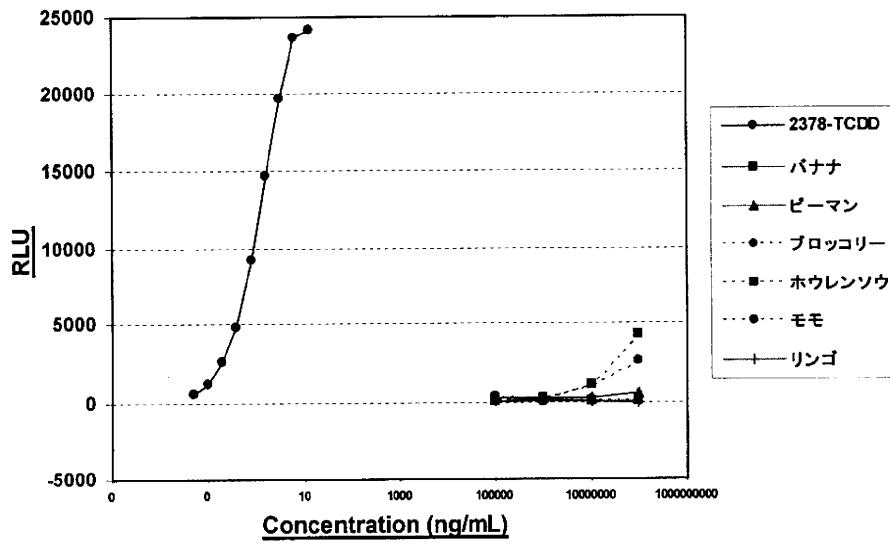
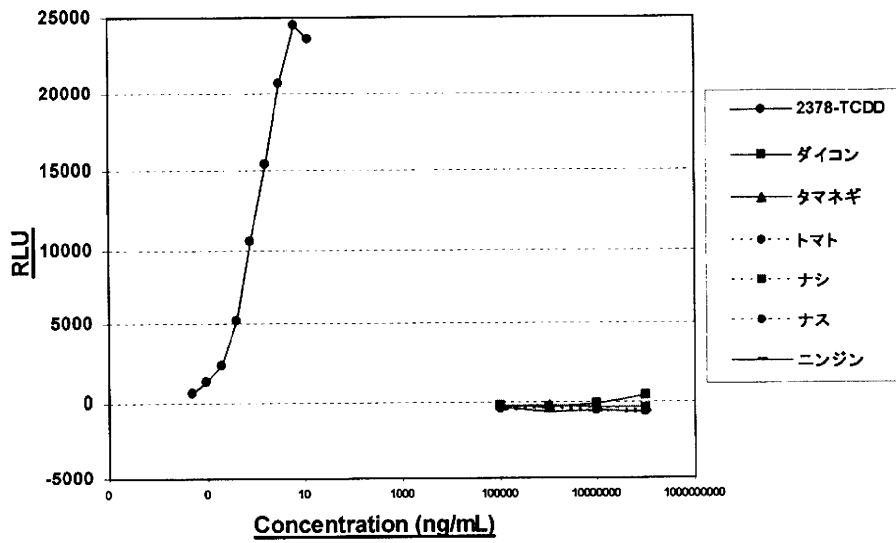
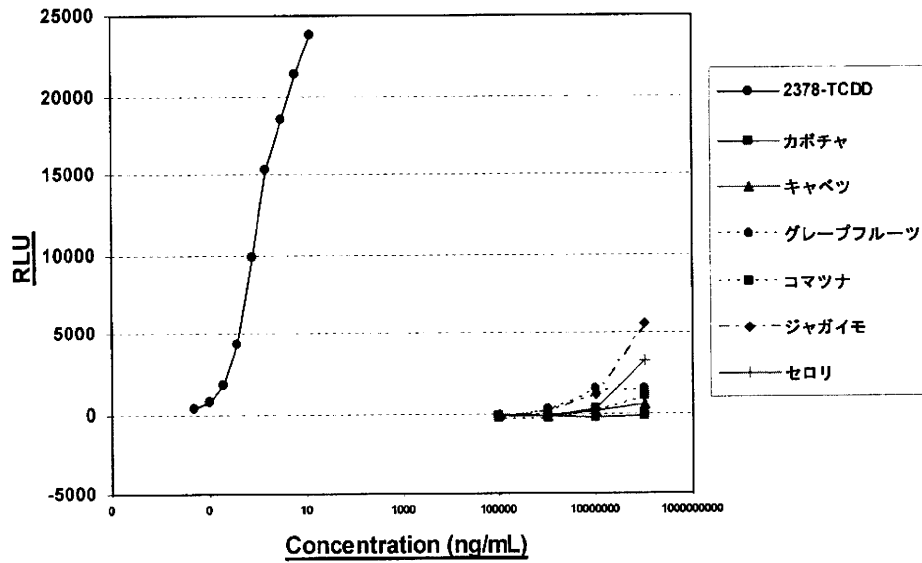


図1. 試料抽出物のAhR活性(用量-反応曲線)