

おうとう	7	ジノテフラン, ジフェノコナゾール, シフルトリン, テブコナゾール, ビフェントリン, ピラクロストロビン, ボスカリド
おうとう	7	イプロジオン, エトキサゾール, ジノテフラン, ジフェノコナゾール, テブコナゾール, デルタメトリン, フェンブコナゾール
おうとう	7	アゾキシストロビン, シペルメトリン, デルタメトリン, ビフェントリン, ブプロフェジン, ペルメトリン, ボスカリド
トマト	7	アゾキシストロビ, クロルフェナピル, ジェトフェンカルブ, トルフェンピラド, フルバリネート, ベノミル, ペルメトリン, ボスカリド

Table 4 検査数の多い農薬

2010年		2009年		2008年	
汚染物名	検査数	汚染物名	検査数	汚染物名	検査数
マラチオン	5137	マラチオン	4449	マラチオン	4615
クロルピリホス	5007	クロルピリホス	4374	ダイアジノン	4587
ダイアジノン	5004	ダイアジノン	4350	クロルピリホス	4533
ピリミホスメチル	4963	プロチオホス	4258	プロチオホス	4387
フェニトロチオン	4814	ピリミホスメチル	4235	フェニトロチオン	4384
パラチオンメチル	4668	フェニトロチオン	4222	フェントエート	4350
プロチオホス	4592	E P N	4156	ピリミホスメチル	4302
フェントエート	4555	トルクロホスメチル	4065	E P N	4283
メチダチオン	4477	パラチオンメチル	4027	パラチオンメチル	4281
トルクロホスメチル	4444	フェントエート	3951	トルクロホスメチル	4197
キナルホス	4429	クロルピリホスメチル	3909	フェンチオン	4128
ホサロン	4364	メチダチオン	3850	ジメトエート	4086
E P N	4299	パラチオン	3806	ブタミホス	4068
クロルピリホスメチル	4252	エトプロホス	3701	クロルピリホスメチル	3922
エディフェンホス	4195	フェンバレレート	3691	キナルホス	3920
ペルメトリン	4182	ペルメトリン	3681	メチダチオン	3912
プロシミドン	4182	ホサロン	3652	パラチオン	3816
テフルトリン	4141	ブタミホス	3616	エトプロホス	3789
ミクロブタニル	4071	テブフェンピラド	3585	シアノホス	3734
チオベンカルブ	4068	シハロトリン	3566	エチオン	3715
ブタミホス	4055	キナルホス	3565	ホサロン	3668
フェナリモル	4032	テフルトリン	3558	ペルメトリン	3602
シアノホス	4002	フェナリモル	3547	エディフェンホス	3561
テブフェンピラド	3964	フェンチオン	3530	テフルトリン	3474
クロルプロファム	3959	シペルメトリン	3517	フルシトリネート	3404
エトプロホス	3921	ペンディメタリン	3456	エトリムホス	3383
シハロトリン	3912	ミクロブタニル	3451	シハロトリン	3380
パラチオン	3864	クレソキシムメチル	3450	ビフェントリン	3365
アラクロール	3851	エチオン	3425	テルブホス	3322
ジエトフェンカルブ	3835	プロシミドン	3420	プロフェノホス	3322

Table 5 検出率の高い農薬

農薬名	分析数	検出数	検出率(%)
ジノテフラン	80	18	22.5
イマザリル	1594	183	11.5
カルベンダジム	132	12	9.1
ジクロルプロップ	139	11	7.9
チアベンダゾール	2368	153	6.5
イミダクロプリド	2986	179	6.0
アセタミプリド	2403	119	5.0
ボスカリド	1975	94	4.8
モキシデクチン	53	2	3.8
オルトフェニルフェノール	570	21	3.7
アゾキシストロビン	3029	96	3.2
プロシミドン	4182	129	3.1
クロチアニジン	2232	63	2.8
クロルピリホス	5007	141	2.8
クレソキシムメチル	3824	104	2.7
クロルフェナピル	3573	97	2.7
スピノシンA	77	2	2.6
ジベレリン	77	2	2.6
シペルメトリン	3513	81	2.3
フルフェノクスロン	2046	44	2.2

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開発測定法の研究開発

(1-1) 高感度 CALUX アッセイの乳、卵および肉への適用拡大の検討

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

研究分担者 天倉 吉章 松山大学 薬学部

研究要旨

ダイオキシン類の迅速測定法である高感度 CALUX アッセイの牛乳、鶏卵および豚肉に対する適用性を評価した。添加回収試験により得られた PCDD/Fs の回収率は、牛乳で 42~157%、鶏卵で 41~92%、豚肉で 63~117%であった。Co-PCBs の回収率は、牛乳で 32~80%、鶏卵で 33~60%、豚肉で 44~95%であった。回収率の変動は大きく、また低回収率の場合があった。精製処理済みの試験溶液を使用した場合の回収率はほぼ 100%であったことから、前処理操作におけるダイオキシン類の損失が考えられた。そこで、豚肉の抽出液を使用して活性炭カラム操作における添加回収試験を実施した。その結果、PCDD/Fs の回収率は 69%および 102%、Co-PCBs の回収率は 62%および 81%であった。回収率が大きく低下する場合があります、ダイオキシン類の損失に活性炭カラムにおける精製操作が関与していることが示唆された。今回検討した食品については、本カラムの精製操作について再検討する必要がある。

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

我々が開発した高感度 CALUX アッセイの魚試料に対する適用性を評価した¹⁾。しかし、その他の動物性食品への適用性については未検討であった。近年、諸外国では鶏卵、豚肉等でダイオキシン汚染が報告されており、これらの試料についても迅速にダイオキシン濃度を把握できる方法が望まれている。そこで本研究では、高感度 CALUX アッセイの牛乳、鶏卵、豚肉への適用性について検討した。

A. 研究目的

ダイオキシン類の主な暴露経路は食品摂取であるため、食品中に含まれるダイオキシン類を迅速に把握できる測定法の開発が望まれている。我々は、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイ (CALUX アッセイ) による食品中のダイオキシン類のスクリーニング法を検討してきた。昨年度は

B. 研究方法

1. 試薬

試薬は既報²⁾に従った。

2. 試料

魚試料は、滋賀県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

ホモジナイザーは松下電器産業(株)フードプロセッサーMK-K58を用いた。また、ルミノメーターは Berthold 社製の Centro LB960 を使用した。

4. 前処理

4-1. 牛乳

試料 (80 g) を採取し、アセトン(240 mL)を加え、5 分間振とう抽出した。ヘキサン (40 mL) を加え、振とう抽出 (5 分×1 回) を行った。ヘキサン層を採取し、抽出カラム(セライト 1g、無水硫酸ナトリウム 7.3g) に添加し、ヘキサン (10 mL) で溶出させた。溶媒を留去後、重量を測定し脂肪重量とした。脂肪をヘキサン (20 mL) に溶解し 45%硫酸シリカゲル (16 g) を添加し 30 分間静置した。その後、硫酸シリカゲルカラム(無水硫酸ナトリウム 3.4 g、33%硫酸シリカゲル 0.7 g、45%硫酸シリカゲル 4 g) に添加しヘキサン (25 mL) でダイオキシン類を溶出した。溶出液は濃縮後、さらに活性炭カラム (XCARB カラム) に添加した。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。フローチャートを図 1 示す。

4-2. 鶏卵

試料 (20 g) を採取し、アセトン(40 mL)を加え、振とう抽出 (2 分×1 回) を行った。ヘキサン (20 mL) を加え、振とう抽出 (2 分×3 回) を行った。ヘキサン層を採取

し、抽出カラム (セライト 1g、無水硫酸ナトリウム 7.3g) に添加し、ヘキサン (10 mL) で溶出させた。溶媒を留去後、重量を測定し脂肪重量とした。脂肪をヘキサン (20 mL) に溶解し 45%硫酸シリカゲル (16 g) を添加し 30 分間静置した。その後、硫酸シリカゲルカラム(無水硫酸ナトリウム 3.4 g、33%硫酸シリカゲル 0.7 g、45%硫酸シリカゲル 4 g) に添加しヘキサン (25 mL) でダイオキシン類を溶出した。以降の操作は 4-1. 牛乳と同様に実施した。フローチャートを図 2 示す。

4-3. 豚肉

試料 (10 g) を採取し、アセトン(15 mL)を加え、5 分間振とう抽出した。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。ジクロロメタン/ヘキサン層を採取し、抽出カラム (セライト 1g、無水硫酸ナトリウム 7.3 g) に添加し、ヘキサン (10 mL) で溶出させた。溶媒を留去後、重量を測定し脂肪重量とした。脂肪をヘキサン (20 mL) に溶解し 45%硫酸シリカゲル(16 g)を添加し 30 分間静置した。その後、硫酸シリカゲルカラム(無水硫酸ナトリウム 3.4 g、33%硫酸シリカゲル 0.7 g、45%硫酸シリカゲル 4 g) に添加しヘキサン (25 mL) でダイオキシン類を溶出した。以降の操作は 4-1. 牛乳と同様に実施した。フローチャートを図 3 示す。

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、CO₂ 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 3 well

(95 μ L/well) に分け、CO₂ 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。

C. 研究結果および考察

本法が牛乳、鶏卵および豚肉中のダイオキシン類を正確に測定可能か検討するため、これらの試料を用いて添加回収試験を行った。PCDD/Fs 及び Co-PCBs 添加液は、過去に調査した畜肉類でダイオキシン類汚染濃度が高かった試料の異性体組成に類似させた。PCDD/Fs 添加液の異性体組成を表 1 に示した。また、Co-PCBs 添加液は PCB 126 を使用した。

低濃度及び高濃度のダイオキシン類を添加した牛乳、鶏卵および豚肉を前処理後、本アッセイにより PCDD/Fs 及び Co-PCBs を測定した (表 2)。牛乳における回収率は、PCDD/Fs 分画で 42~157%、Co-PCBs 分画で 32~80%であった。鶏卵における回収率は、PCDD/Fs 分画で 41~92%、Co-PCBs 分画で 33~60%であった。豚肉における回収率は、PCDD/Fs 分画で 63~117%、Co-PCBs 分画で 44~95%であった。ダイオキシン類の回収率の変動は大きく、回収率が低い場合が多かった。また、前処理した試験溶液に含まれる夾雑物の本アッセイへの影響についても検討した。豚肉の前処理済みの試験溶液を用いて添加回収試験を実施した。PCDD/Fs

及び PCB 126 を試料濃度に換算し 2 pg TCDD eq. /g 添加し、本アッセイにより測定した。回収率は共に 100%となり、試験溶液に含まれる夾雑物の本アッセイに対する影響は無いと考えられた。以上の結果から、前処理のいずれかの操作でダイオキシン類が損失したため、回収率の低下が生じたと考えられた。

抽出操作において、ダイオキシン類は脂溶性であるため脂肪と同じ挙動を示す。そのため、抽出操作におけるダイオキシン類の挙動は、抽出できた脂肪重量を測定することである程度推定できる。添加回収試験における抽出操作後に測定した脂肪重量を表 3 に示した。各食品において脂肪重量の変動は小さく、再現性よく脂肪が抽出できていた。従って、ダイオキシン類の回収率が大きく変動し低回収率になった要因は、抽出後の精製操作に起因すると考えられた。

そこで、活性炭カラム操作が回収率に与える影響を検討した。抽出後の溶液に PCDD/Fs 及び PCB 126 を試料濃度に換算し 2 pg TCDD eq. /g 添加し、本アッセイにより測定した。2 試行実施した結果、1 試行目の PCDD/Fs および Co-PCBs の回収率は、69%および 62%であった。2 試行目の PCDD/Fs および Co-PCBs の回収率は 102%および 81%であった。このように、回収率は大きく変動し、低回収率になる場合が認められ、回収率の低下に活性炭カラムにおける精製操作が関与していることが示唆された。活性炭カラムにおける何らかの操作によりダイオキシン類が大きく損失することが考えられる。今回検討した食品については、活性炭カラムの精製操作について再検討する必要があった。

D. 結論

1) 牛乳、鶏卵、豚肉に対する添加回収試

験を実施した結果、ダイオキシン類の回収率は大きく変動し、低回収率の場合が多かった。

2) 今回検討した食品について、活性炭カラムにおけるダイオキシン類の損失が示唆され、本カラムの精製操作を再検討する必要がある。

E. 参考文献

- 1) 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「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」(分担報告書 高感度 CALUX アッセイによる魚中のダイオキシン類分析)
- 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)

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 堤 智昭, 天倉吉章, 中村昌文, 半田洋士, 松田りえ子: 高感度 CALUX アッセイによる市販魚中のダイオキシン類分析, 第 20 回環境化学討論会(2011.7)

表1 添加回収試験に使用した PCDD/Fs 添加液の異性体組成

	異性体	TEQ濃度の割合 (WHO-TEF 2005)
PCDDs	2,3,7,8-TCDD	5
	1,2,3,7,8-PeCDD	29
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	3
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	12
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	3
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	8
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0
PCDFs	2,3,7,8-TCDF	1
	1,2,3,7,8-PeCDF	0
	2,3,4,7,8-PeCDF	8
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	5
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	4
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0
	OCDF	0

表2 牛乳、鶏卵および豚肉における添加回収試験

		ダイオキシン類添加濃度 (pg TCDD eq./g)	回収率(%), <i>n</i> = 3		
			平均	最小	最大
牛乳	PCDD/Fs分画	0.051	92	59	157
		0.31	74	42	104
	Co-PCBs分画	0.082	55	32	80
		0.37	54	43	70
鶏卵	PCDD/Fs分画	0.28	59	41	92
		1.3	62	43	79
	Co-PCBs分画	0.32	44	33	55
		1.6	54	50	60
豚肉	PCDD/Fs分画	0.49	92	69	117
		2.8	80	63	93
	Co-PCBs分画	0.59	72	44	95
		2.9	74	67	86

表 3 添加回収試験において抽出できた脂肪含量

		ダイオキシン類添加濃度 (pg TCDD eq./g)	脂肪含量(%)				
			1st	2nd	3rd	平均	標準偏差
牛乳	PCDD/Fs分画	0.051	3.4	3.5	3.6	3.5	0.1
		0.31	3.3	3.5	3.6	3.5	0.1
	Co-PCBs分画	0.082	3.3	3.6	3.7	3.5	0.2
		0.37	3.5	3.6	3.6	3.5	0.1
鶏卵	PCDD/Fs分画	0.28	11.2	11.2	11.6	11.3	0.3
		1.3	11.3	11.2	11.7	11.4	0.3
	Co-PCBs分画	0.32	11.2	11.2	11.6	11.3	0.2
		1.6	11.2	11.3	11.7	11.4	0.2
豚肉	PCDD/Fs分画	0.49	17.7	17.8	17.2	17.6	0.3
		2.8	17.1	17.5	17.3	17.3	0.2
	Co-PCBs分画	0.59	17.2	17.1	17.4	17.2	0.2
		2.9	17.5	16.4	17.1	17.0	0.5

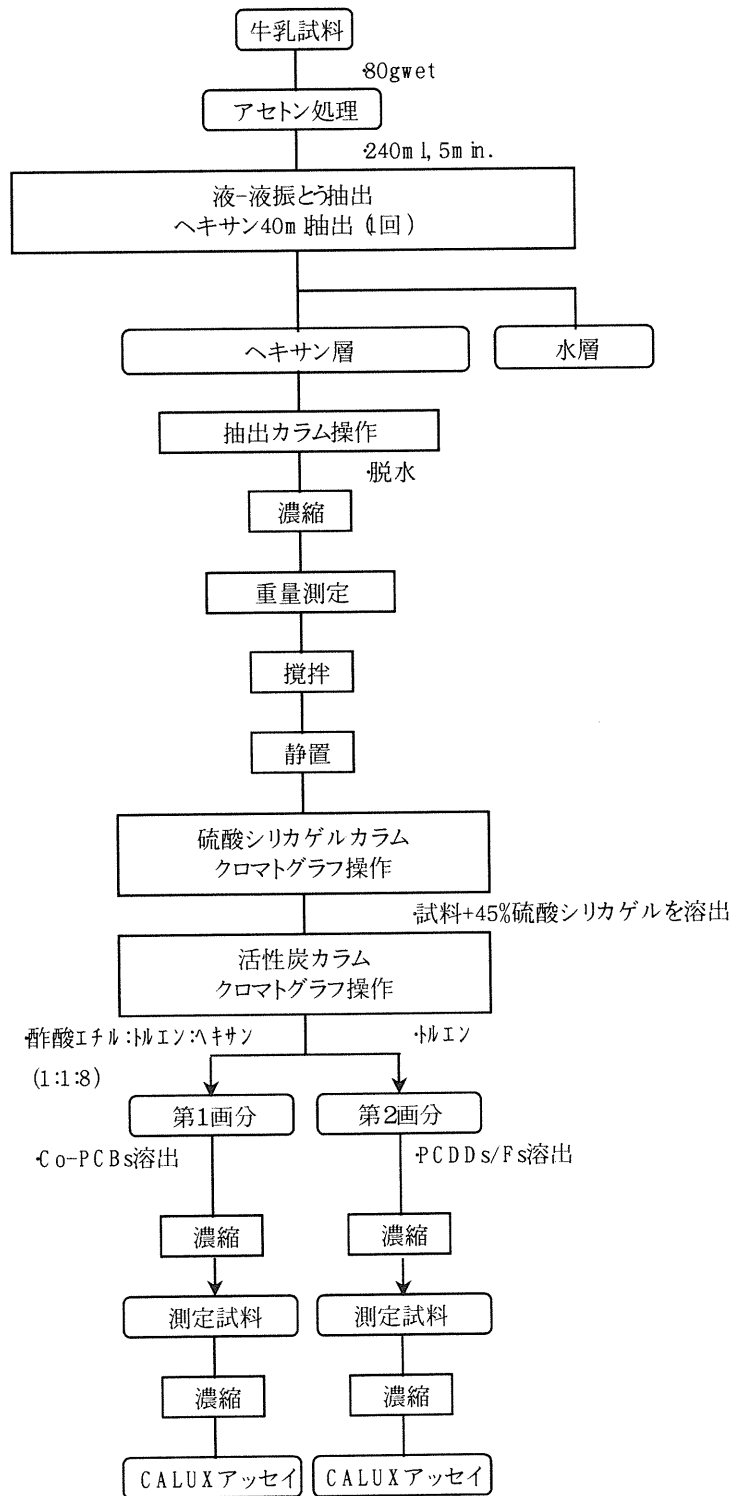


図1 牛乳の前処理操作

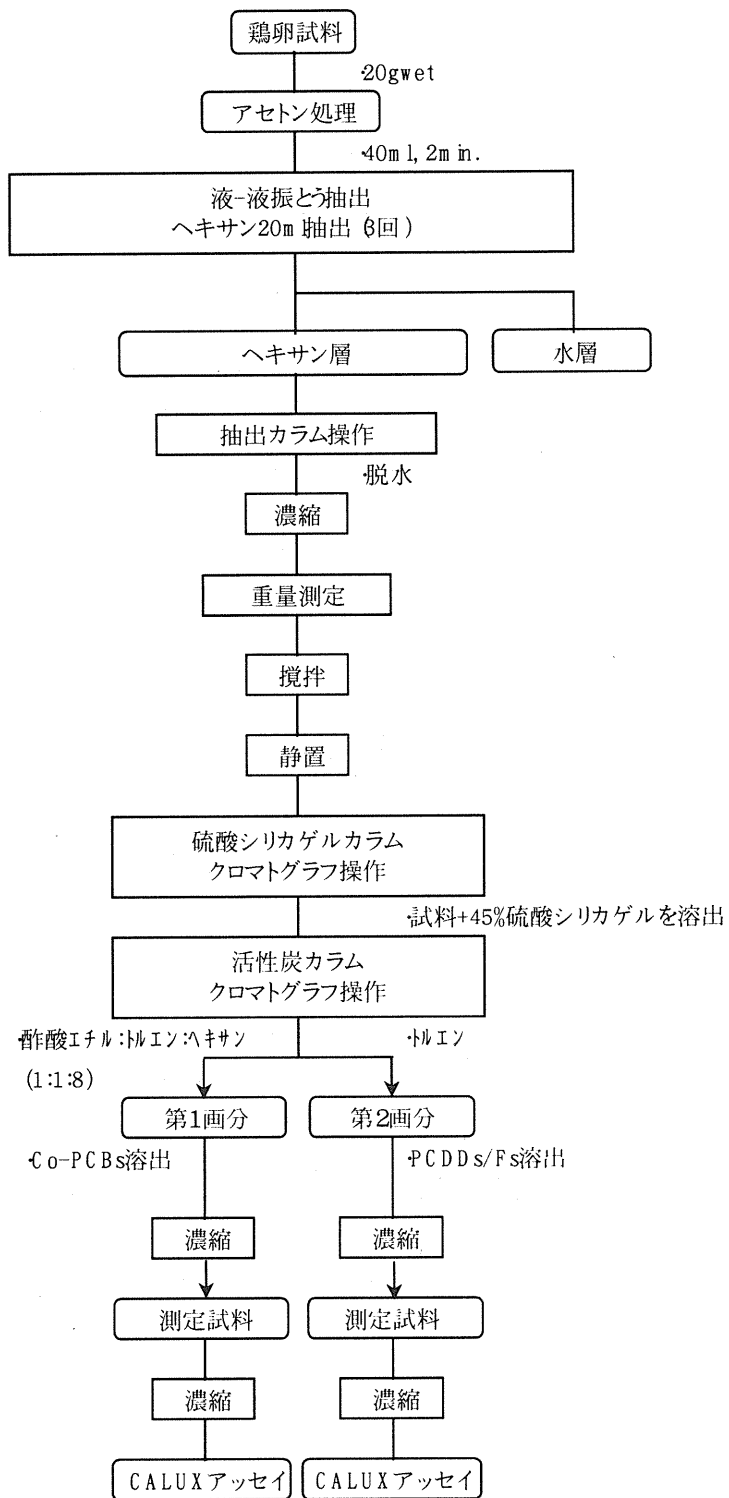


図2 鶏卵の前処理操作

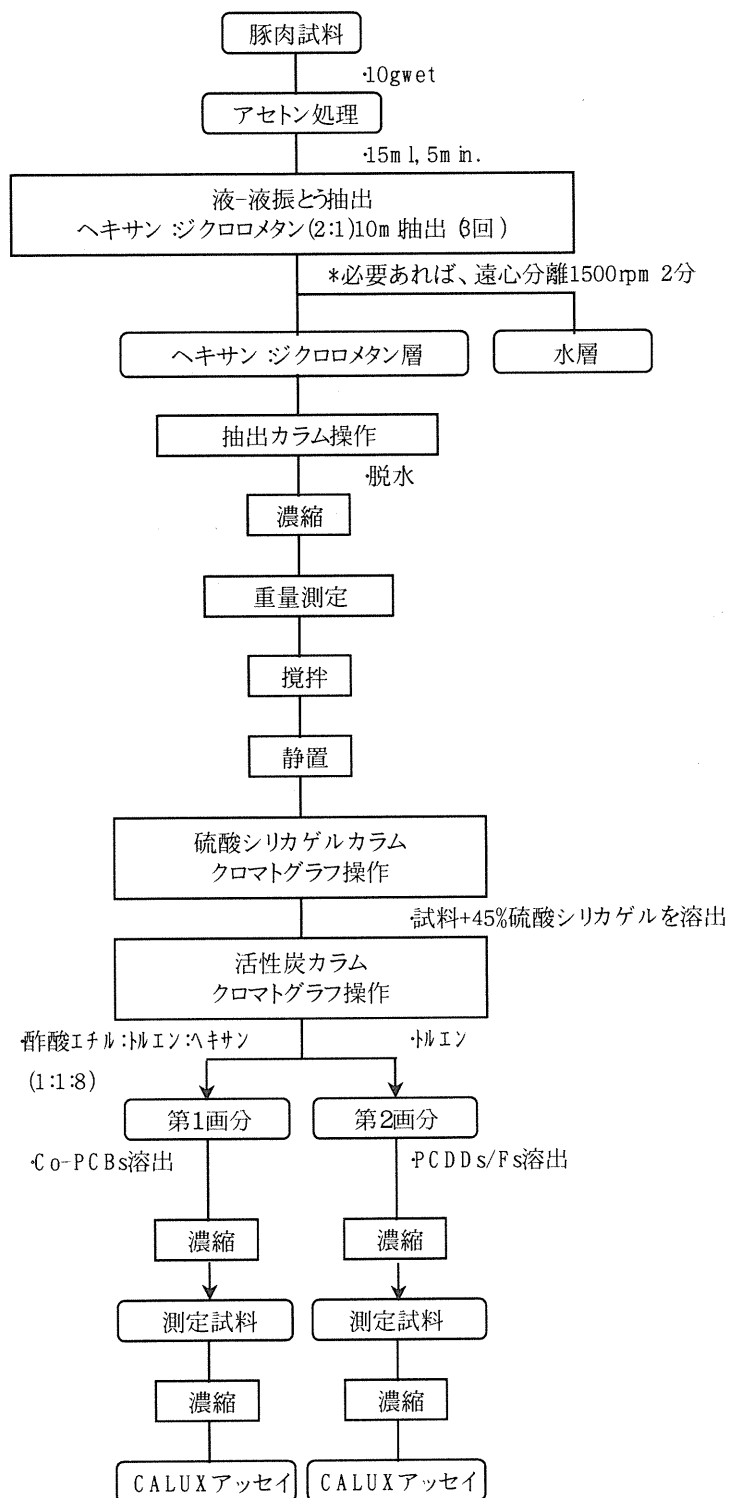


図3 豚肉の前処理操作

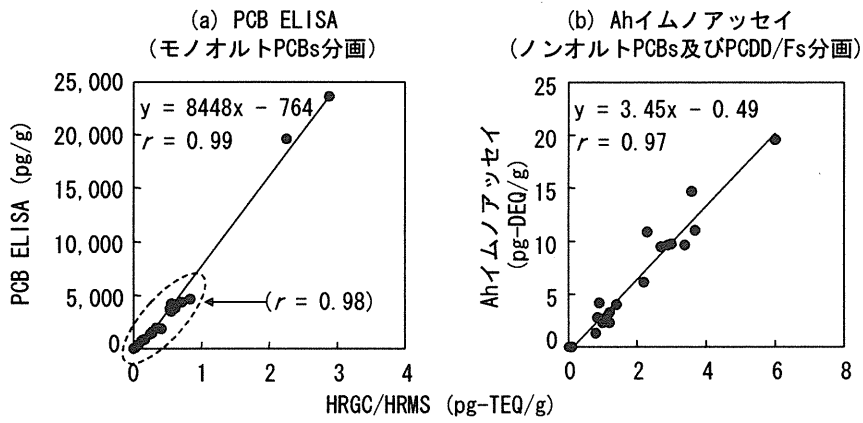


図4 HRGC/HRMSによる毒性等量濃度との比較 ($n = 20$)

市販魚(カジキ、サケ、サバ、スズキ、ブリ、マグロなど)を比較検体として測定した。

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開発測定法の研究開発

(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

研究分担者 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的としている。22 年度は各種食品 (野菜、果物、ハーブ等) 計 30 種を選択し、それぞれ抽出物の AhR 活性を評価し、野菜ではハウレンソウ、ブロッコリー、ローズマリーなどにダイオキシンと比べ $10^5 \sim 10^6$ 倍の濃度領域で AhR 活性が認められることを報告した。今年度は 22 年度の結果に基づき、特に AhR 活性が強かったローズマリーについて、含有する天然 AhR アゴニストについて検討した。ローズマリーエキスを *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配し、各エキスについて AhR 活性を評価したところ、酢酸エチル画分が最も強い AhR を示した。本画分について各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い、主成分として rosmarinic acid、次いで nepitrin が単離、同定された。これら 2 成分について AhR 活性を評価したところ、いずれも活性が認められたが、nepitrin の活性は特に強かった。Rosmarinic acid についてはこれまで AhR との相互作用に関する報告があるが、nepitrin の天然 AhR アゴニストに関する報告は本研究がはじめてである。これまでの検討から、AhR アゴニストの構造的特徴として、アグリコンの方の活性が強く、配糖体化により活性が減弱することを考察していたが、nepitrin は配糖体であり、別の要因も考察される。

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

A. 研究目的

アрил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。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、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高濃度領域で 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²⁾⁴⁾。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課題であると考えられ、AhR の機能解明への応用も期待される。

このような背景に基づき、22 年度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、エキスの AhR 活性 (ダイオキシン様) を検討した。今年度は 22 年度の結果から、AhR 活性の強か

ったローズマリーについて、天然 AhR アゴニストの探索を実施した。また試験したローズマリー原料中のダイオキシン類含量についても高分解能 (HR) GC/MS により測定した。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

ローズマリーは 22 年度使用したものと同一ロットのものを用いた。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。

2. 装置および測定条件

NMR : Brucker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社) (¹H-NMR : 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) により、測定溶媒として methanol-*d*₄ (CD₃OD) を使用し、ケミカルシフトはすべて TMS 基準のシフト値を δ 値で表示した。

高分解能 (HR) ESI-MS : microTOF-Q 質量分析装置 (ブルカー・ダルトニクス社) でアセトニトリルまたはメタノールを溶媒として測定した。

UV : Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。

逆相 HPLC : Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 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→30 min (0→50%)、30→35 min (50→85%)、35→40 min (85%)、40→50 min (85→90%)、50→55 min (90→100%)、55→60 min (100%)〕。

3. 試料調製

原料のローズマリー (500 g) をブレンダーで粉碎し、80%エタノール〔エタノール水 (8:2)〕 (5 L) 中でホモジナイズ後、抽出液を吸引ろ過した。得られたろ液を濃縮し、*n*-ヘキサン (3 L)、酢酸エチル (3 L)、*n*-ブタノール (3 L) で順次分画した。各分画物を濃縮し、分画濃縮物〔*n*-ヘキサン分画物 (4.0 g)、酢酸エチル分画物 (16.5 g)、*n*-ブタノール水分画物 (14.8 g)〕を得た。この酢酸エチル分画物 (1.0 g) について MCI-gel CHP20P、YMC gel ODS-AQ および Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、rosimarinic acid (1) (187 mg)、nepitrin (2) (28.5 mg) を単離、同定した。化合物の同定は、文献値との比較^{5), 6)}、あるいは標品との機器分析データを直接比較することにより行った。

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 μ 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 μ L を加えて攪拌後、そのうち 200 μ 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 1.5×10^5

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、顕微鏡下で細胞の生存を確認した。Lysis 試薬 300 μ 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 μ L を加え、ルミノメーターにより発光度 (RLU) を測定した。

5. ダイオキシン量測定

ダイオキシンの分析は、「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 20 年 2 月)」⁷⁾ に従った。

C. 研究結果及び考察

ローズマリーの 80%エタノール抽出物について、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配し、これら分画物を得た。抽出分画のフローチャートを図 1-A に示す。各分画物について AhR 活性を評価した結果、酢酸エチル分画物に顕著な AhR 活性が認められた。図 1-B に AhR 活性を示した試料の用量-反応曲線を示す。図 2 (a~e) には 80%エタノール抽出物および各分画物の HPLC クロマトグラムを示す。

活性の強かった酢酸エチル分画物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行ったところ、2 種の化合物を単離することが出来た。単離した化合物 1、2 については、NMR データに基づいた構造解析および標品との直接比較により同定した。

各化合物の構造式を図 3-A に示す。以下に化合物 1、2 の分析データを記す。

Rosmaninic acid (1) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.55 (1H, d, $J=15.5$, H-7), 7.03 (1H, d, $J=1.5$, H-2), 6.93 (1H, dd, $J=2, 8$, H-6), 6.75 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.70 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.61 (1H, dd, $J=2, 8$, H-6'), 6.24 (1H, d, $J=15.5$, H-8),

5.19 (1H, dd, $J=4, 8$, H-8'), 3.10, (1H, dd, $J=8, 14.5$, H-7'), 3.01 (1H, dd, $J=4, 14.5$, H-7'). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 173.5 (C-9'), 168.4 (C-9), 149.6 (C-4), 147.7 (C-7), 146.7 (C-3), 146.0 (C-3'), 145.1 (C-4'), 129.3 (C-1'), 127.6 (C-1), 123.1 (C-6), 121.8 (C-6'), 117.6 (C-2'), 116.5 (C-5'), 116.3 (C-5), 115.2 (C-2), 114.4 (C-8), 74.7 (C-8'), 37.8 (C-7'). ESI-MS m/z 359 [M-H].

Nepitrin (6-Methoxyluteolin 7-glucoside) (2) :
 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.30 (1H, brs, H-2'), 7.29 (1H, brd, $J=8$, H-6'), 6.83 (1H, d, $J=8$, H-5'), 5.08 (1H, d, $J=8.5$, glc H-1), 3.97 (1H, dd, $J=2, 12$, glc H-6), 3.73 (1H, dd, $J=8, 12$, glc H-6), 3.80, (1H, m, glc H-5), 3.41 (1H, m, glc H-4), 3.57-3.59 (2H, m, glc H-2, 3), 3.86 (3H, s, -OMe). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 184.1 (C-4), 166.7 (C-2), 157.7 (C-7), 154.1 (C-5), 153.9 (C-9), 151.0 (C-4'), 146.9 (C-3'), 134.0 (C-6), 123.4 (C-1'), 120.5 (C-6'), 116.7 (C-5'), 114.3 (C-2'), 107.4 (C-10), 103.7 (C-3), 102.0 (glc C-1), 95.7 (C-8), 78.4, 77.9 (glc C-3, 5), 74.7 (glc C-2), 71.3 (glc C-4), 62.6 (glc C-6), 61.5 (-OMe). ESI-MS m/z 477 [M-H].

単離した2化合物について、AhR活性を評価した。その結果を図3-Bに記す。図に示すように、2化合物いずれも、 $10^5 \sim 10^6$ nM領域においてAhR活性が認められた。Rosmarinic acidについては、過去にAhRのアゴニスト、アンタゴニストとしての報告があり、今回の検討においても天然AhRアゴニストとしての結果が示された。一方、rosmarinic acidよりも活性の強かったnepitrinについての報告はこれまでになく、本研究においてはじめて天然AhRアゴニストとしての活性が明らかとなった。

Nepitrinはフラボノイド配糖体であり、これまでの検討から、フラボノイドのAhRアゴニストに関する構造活性的考察として、

配糖体になることによりAhR活性を減弱することが言われており、アグリコンの活性が強い傾向が例外なく認められている。今回の結果を見ると、これまでアゴニスト活性の認められたフラボノイド(アグリコン)よりもnepitrinの活性が強いことが示された。

一方で、ローズマリー中のAhR活性因子が、天然由来成分であることを確認する目的で、ローズマリー原料およびAhR活性の強かった酢酸エチル分画物について、ダイオキシン類含有量をHR-GC/MSにより測定した。その結果を表1に示す。いずれもダイオキシン含有量は検出限界近くの低濃度であり、このことはローズマリーのAhR活性はダイオキシン類以外の天然物由来であることを示しており、天然アゴニストの存在を確認することができた。

また、ローズマリー酢酸エチル分画物から今回単離した2化合物以外に、マイナー成分の存在も確認されており、それらの成分精査およびAhR活性については現在検討中である。今後、それらの活性評価も加え、さらに他の野菜原料についても検討予定であり、新たなタイプの天然AhR活性成分の探索を目指す。

D. 結論

ローズマリーに含有する天然AhRアゴニストについて精査し、最もAhR活性の強かった酢酸エチルエキスから主成分としてrosmarinic acid、次いでnepitrinが単離、同定された。これら2成分についてAhR活性を評価したところ、いずれにも活性が認められたが、nepitrinの活性は特に強かった。これまでの検討から、AhRアゴニストの構造的特徴として、アグリコンの方がAhR活性は強く、配糖体化により活性が弱まることを考察していたが、nepitrinは配糖体であり、別の要因も考察される。

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 (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) Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT: Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998), 4869-4873.
- 6) Park EJ, Kim Y, Kim J: Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula Britannica*, *J. Nat. Prod.* 63 (2000), 34-36.
- 7) 厚生労働省「食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン」, 平成 20 年 2 月.

F. 研究業績

1. 論文発表

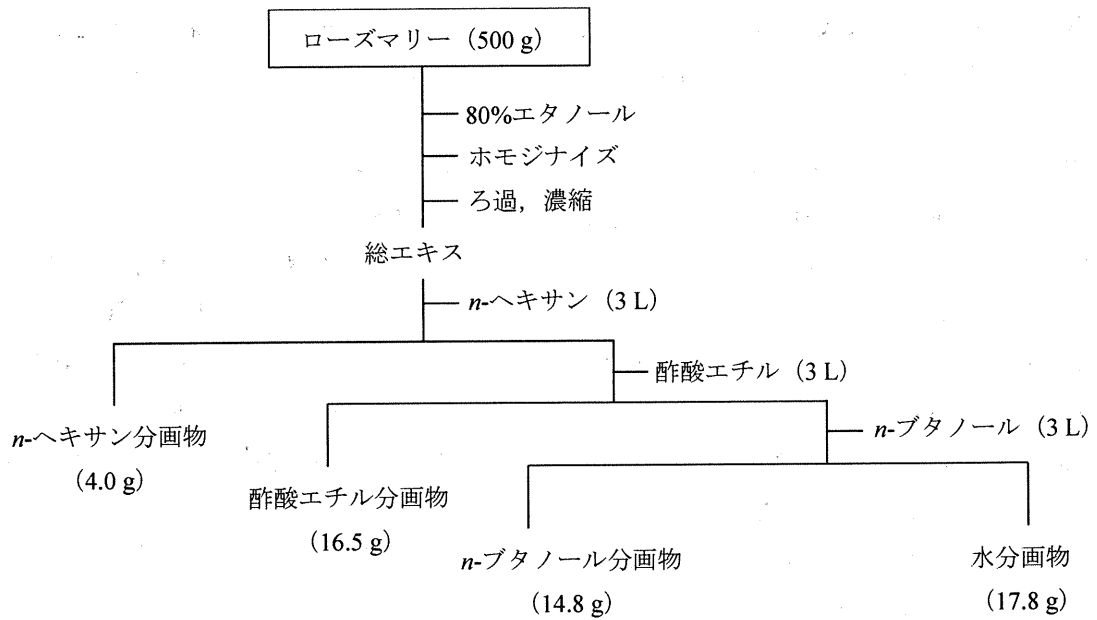
- 1) Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Handa H, Yoshimura M, Matsuda R,

Yoshida T: Characterization of natural AhR ligands in health foods estimated by *in vitro* reporter gene assay, *Organohalogen Compd.*, 73, (2011) 738-741.

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章、堤 智昭、中村昌文、半田洋士、福田寿之、好村守生、松田りえ子、吉田隆志: 松の実脱脂エキスに含まれる天然 AhR 活性成分, 第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2011. 11).
- 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: 天然食品成分の AhR 活性, 第 4 回食品薬学シンポジウム (2010.10).
- 3) Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Handa H, Yoshimura M, Matsuda R, Yoshida T: Characterization of natural AhR ligands in health foods estimated by *in vitro* reporter gene assay, 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2011. 8).

(A)



(B)

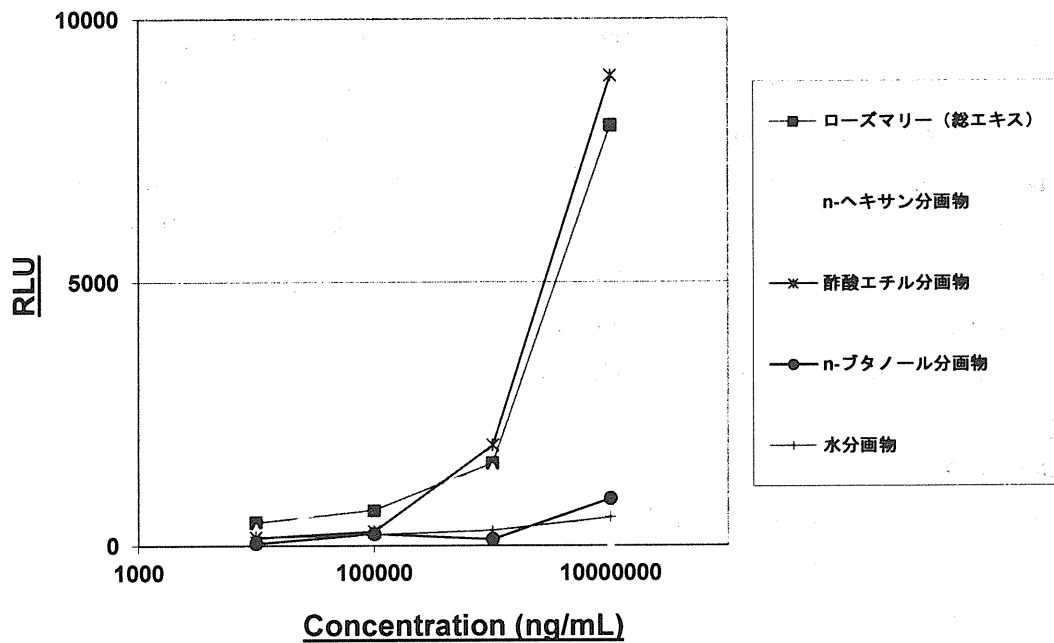


図1. (A) ローズマリーの抽出・分画のフローチャート、(B) 各分画物の AhR 活性