

Table II-1 ブランク試料中の各農薬の濃度の平均値($\mu\text{g/g}$)

食品群	アセタミプリド	クレソキシム メチル	クロルピリホス	プロシミドン	マラチオン
1	<u>0.0230</u>	0.0022	0.0019	0.0010	0.0030
2	<u>0.1036</u>	0.0044	0.0049	0.0029	<u>0.0056</u>
3	<u>0.0696</u>	0.0024	0.0028	0.0019	0.0029
5	<u>0.2720</u>	0	0.0038	0.0039	<u>0.0063</u>
6	<u>0.0330</u>	0.0030	0.0000	0	0
7	<u>0.0379</u>	<u>0.1451</u>	0	0.0019	0.0008
8	<u>0.0616</u>	<u>0.0182</u>	0.0006	0.0024	<u>0.1006</u>
9	<u>0.0188</u>	0	0	0.0005	0.0006
10	<u>0.0331</u>	0.0013	0.0016	0.0007	0.0050
11	<u>0.0424</u>	0.0005	0.0004	0.0004	0.0029
12	<u>0.0147</u>	<u>0.0055</u>	0.0007	0.0005	0.0044
13	<u>0.1569</u>	<u>0.0052</u>	0.0027	0.0040	0.0042

0.005 $\mu\text{g/g}$ を超えるものに二重下線を付した。

Table II-2 ブランク試料中の各農薬の濃度の標準偏差($\mu\text{g/g}$)

食品群	アセタミプリド	クレソキシム メチル	クロルピリホス	プロシミドン	マラチオン
1	<u>0.0068</u>	0.0017	0.0017	0.0012	0.0016
2	<u>0.0291</u>	0.0007	0.0009	0.0012	0.0022
3	<u>0.0392</u>	0.0014	0.0011	0.0011	0.0007
5	<u>0.0615</u>	0	0.0010	0.0016	0.0019
6	<u>0.0070</u>	0.0018	0.0001	0	0
7	<u>0.0121</u>	<u>0.0443</u>	0	0.0015	0.0017
8	<u>0.0493</u>	<u>0.0100</u>	0.0016	0.0025	<u>0.0459</u>
9	<u>0.0105</u>	0	0	0.0010	0.0013
10	<u>0.0156</u>	0.0013	0.0012	0.0006	<u>0.0075</u>
11	<u>0.0271</u>	0.0007	0.0005	0.0006	0.0033
12	<u>0.0091</u>	0.0019	0.0007	0.0007	0.0021
13	<u>0.0798</u>	0.0024	0.0015	0.0031	0.0031

Table II-3 真度の推定値 (%)

食品群	クレソキシム メチル	クロルピリホス	プロシミドン	マラチオン
1	122	95	105	111
2	170	128	131	
3	133	94	105	142
5	215	144	177	
6	134	122	122	160
7		169	127	232
8		125	96	
9	138	138	118	176
10	120	123	104	
11	111	106	97	134
12		92	93	105
13		80	85	112

Table II-4 併行精度及び室内精度の推定値 (RSD%)

併行精度

食品群	クレソキシム メチル	クロルピリホス	プロシミドン	マラチオン
1	30	6	3	10
2	13	13	10	
3	10	9	8	9
5	8	27	13	
6	12	9	11	16
7		6	3	8
8		4	11	
9	11	8	10	9
10	15	26	14	
11	18	13	16	47
12		10	9	56
13		15	23	12

室内精度

食品群	クレソキシム メチル	クロルピリホス	プロシミドン	マラチオン
1	39	33	19	30
2	13	13	10	
3	27	25	13	40
5	41	68	50	
6	26	9	11	42
7		75	80	92
8		36	51	
9	11	24	10	28
10	101	86	64	
11	22	13	16	47
12		18	19	56
13		43	45	44

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研究

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 アッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング

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 アッセイの市販魚試料への適用性を詳細に検討した。試料溶液及び魚試料への添加回収試験の結果、本法は魚試料中のダイオキシン類を良好に測定することが可能であった。本アッセイの魚試料中のダイオキシン類測定の再現性について、繰り返し分析を 5 回実施した結果、得られる測定値は最大で約 2 倍程度の差が認められた。そのため、試験溶液の調製操作も含めた 2 回の測定を行い、その平均値を試料中のダイオキシン類濃度とした。本アッセイにより魚試料 (32 試料) を分析し、得られた測定値を従来法 (HRGC/HRMS 分析) のダイオキシン類毒性等量濃度 (PCDD/Fs+Co-PCBs) と比較した。その結果、両者に良好な相関 ($r = 0.99$) が認められた。相関図より得られた回帰直線の予測区間を用いることで、本アッセイをダイオキシン類が一定濃度以上含まれる魚のスクリーニングに使用することが可能であると考えられた。

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

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ジーンアッセイが既に検討されているが^{1,2)}、魚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、高感度のルシフェラーゼレポータージーン細胞株 (pGL7.3) を作製し、それを用いた高感度 CALUX アッセイの開発を行ってきた。平成 22 年度及び平成 23 年度に高感度 CALUX アッセイの魚、牛乳、鶏卵、及び豚肉への適用性の予備検討を実施した^{3,4)}。その結果、魚試料中のダイオキシン類については比較的良好に測定できることが示された。そこで、今年度は高感度 CALUX アッセイの魚試料への適用

A. 研究目的

ダイオキシン類の人体への暴露については、その殆どが食品由来とされている。特に我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多く、市販魚に含まれ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。魚中のダイオキシン類を対象に

性について詳細に検討し、スクリーニング法としての利用について考察した。

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、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. 試験溶液の調製

均一化した試料(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7.3g)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16g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3.4g、33%硫酸シリカゲル0.7g、45%硫酸シリカゲル4g)に添加しヘキサン(10ml×2回)で洗浄し、硫酸シリカゲルカラムをヘキサン(25 mL)で溶出した。溶出液は濃縮後、さらに活性炭カラムXCARB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、試験溶液とした。

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、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。試験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 µL/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により、測定値を算出した。定量下限は0.49 pg TCDD/mL(0.047 pg TCDD/assay)であり、試料10 gを使用した場合の試料中の定量下限は0.039 pg TCDD eq./gであった。

6. HRGC/HRMS分析

既報²⁾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. 試料マトリックスが高感度CALUXアッセイに与える影響

試験溶液中に存在する試料マトリックスが本アッセイに与える影響を検討するため、試験溶液に対してダイオキシン類の添加回収試験を実施した。2種の魚試料より調製したPCDD/Fs分画及びCo-PCBs分画の試験溶液に、既知濃度のPCDD/Fs、あるいはCo-PCBsとしてPCB 126

を添加した後、CALUX アッセイにより測定し回収率を求めた。その結果、PCDD/Fs の回収率は 90~110%、Co-PCBs の回収率は 93~105%であった (表 1)。回収率は良好であったことから、調製した試験溶液中に含まれる試料マトリックスは、本アッセイの測定に大きな影響を与えないと考えられた。

2. 魚試料に対するダイオキシン類の添加回収試験

試験液の調製操作におけるダイオキシン類の回収率を検討するため、魚試料に対して添加回収試験を行った。2 種の魚試料に既知濃度の PCDD/Fs、あるいは PCB 126 を添加し試験液の調製操作を行った後、本アッセイにより測定し回収率を求めた。その結果、PCDD/Fs の回収率は 74~95%、PCB 126 の回収率は 76~95%であった (表 2)。回収率は良好であったことから、試験液の調製の際にダイオキシン類の大きな損失はなく、魚試料中のダイオキシン類を良好に定量できることが示唆された。

3. 魚試料の繰り返し測定

本アッセイのダイオキシン類測定の再現性について検討するため、ダイオキシン類が含まれていることが判明している 2 種の魚試料の分析を複数回行った。試験溶液の調製から測定までの一連の操作を異なる日に 5 回実施した結果、PCDD/Fs 測定の変動係数は 17~21%、Co-PCBs 測定の変動係数は 12~23%であった (表 3)。スクリーニング法としては許容範囲内の変動であると考えられるが、サバの Co-PCBs 測定では 4th の測定値が顕著に低くなり、最大値と比較すると約 1/2 倍であった。スクリーニング法としての利用を考えると、顕著に低い測定値が得られた場合、偽陰性の発生が懸念される。そこで、測定値のばらつきによる偽陰性の発生を抑えるため、本アッセイでは魚試料を 2 試行で測定し、その平均値を試料濃度とすることとした。

4. 高感度 CALUX アッセイと HRGC/HRMS 分析との比較試験

本アッセイ法の測定値と、従来法である HRGC/HRMS 分析のダイオキシン類毒性等量を比較するため、市販魚試料 (32 試料) について比較試験を行った。本アッセイと従来法の分析結果を表 4 に示した。両者の相関係数は、PCDD/Fs については 0.94、Co-PCBs については 0.96、それらの合計値したダイオキシン類については 0.97 であった (図 1)。

両者の測定値にはいずれの場合も良好な相関が認められた。従って、本アッセイ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た。

5. 高感度 CALUX アッセイのスクリーニング法としての利用

比較試験の結果を使用して、本アッセイのダイオキシン類毒性等量濃度に対するスクリーニング法としての利用について検討した。図 2 は比較試験で得られた本アッセイの測定値と、ダイオキシン類毒性等量濃度 (PCDD/Fs+Co-PCBs) の相関を示しており、図中の点線は回帰直線の 95% 予測区間を示している。例えば、ダイオキシン類毒性等量濃度が 2.0 pg-TEQ/g の試料は、本アッセイで 2.4~3.8 pg TCDD eq./g に相当することが予測される。従って、これらの予測範囲の下限値を本アッセイにおけるカットオフ値に設定することで、2.0 pg-TEQ/g 以上のダイオキシン類を含む魚試料のスクリーニングに利用することが可能であると考えられた。今後はより多数の比較検体の追加測定を行い、本法の実用性を高めていく必要がある。

D. 結論

- 1) 本アッセイは魚試料中のダイオキシン類を良好に測定することが可能であった。
- 2) 比較試験を行った結果、HRGC/HRMS 分析の

ダイオキシン類毒性等量値と良好な相関が認められた。

3) 相関図より得られた回帰直線の予測区間を用いることで、本アッセイをダイオキシン類が一定濃度以上含まれる魚のスクリーニングに使用することが可能であると考えられた。

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® 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 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 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)

4) 平成 23 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 アッセイの乳、卵および肉への適用拡大の検討)

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

表1 魚試料の試験溶液に対するダイオキシン類の添加回収試験¹⁾

		ダイオキシン類添加濃度 ²⁾ (TCDD eq./g)	回収率(%), n = 3	
			平均	標準偏差
イワシ	PCDD/Fs分画	0.50	110	7
		2.5	100	5
	Co-PCBs分画	0.63	105	7
		2.0	98	9
マグロ	PCDD/Fs分画	0.52	99	1
		2.7	90	14
	Co-PCBs分画	0.67	104	20
		2.2	93	5

1) 魚試料より調製したPCDD/Fs分画あるいはCo-PCBs分画に、既知量のダイオキシン類を添加し、CALUXアッセイにより測定した(3併行)。

2) PCDD/Fs分画にはPCDD/Fs混合溶液を、Co-PCBs分画にはPCB 126を添加した。

表2 魚試料に対するダイオキシン類の添加回収試験¹⁾

		ダイオキシン類添加濃度 (TCDD eq./g)	回収率(%), n = 3	
			平均	標準偏差
サーモン	PCDD/Fs	0.58	95	6
		2.5	84	12
	PCB 126	0.80	95	13
		2.3	86	2
マグロ	PCDD/Fs	0.57	80	5
		2.6	74	9
	PCB 126	0.86	76	13
		2.4	87	12

1) 既知量のPCDD/FsあるいはPCB 126を添加した魚試料より試験溶液を調製し、CALUXアッセイにより測定した(3併行)。

表 3 魚試料の繰り返し測定¹⁾

		TCDD eq./g					平均	標準偏差	変動係数(%)
		1st	2nd	3rd	4th	5th			
アジ	PCDD/Fs分画	0.44	0.52	0.37	0.33	0.32	0.40	0.084	21
	Co-PCBs分画	0.23	0.27	0.24	0.23	0.30	0.25	0.031	12
サバ	PCDD/Fs分画	0.95	1.32	0.94	1.07	0.85	1.03	0.18	17
	Co-PCBs分画	0.91	0.90	0.77	0.48	0.86	0.78	0.18	23

1) ダイオキシン類を含むことが判明しているアジ及びサバより試験液を調製し、CALUXアッセイにより測定した。異なる日に試験液調製及びCALUX測定を5回実施した。HRGC/HRMSにより測定したアジのPCDD/Fs濃度は0.19 pg TEQ/g、Co-PCBs濃度は0.34 pg TEQ/gであった。また、サバのPCDD/Fs濃度は0.36 pg TEQ/g、Co-PCBs濃度は1.1 pg TEQ/gであった。

表 4 高感度 CALUX アッセイと HRGC/HRMS 分析のダイオキシン類分析結果¹⁾

試料 No.	魚種	PCDD/Fs		Co-PCBs		Total (PCDD/Fs + Co-PCBs)	
		高感度CALUX (pg TCDD eq./g)	HRGC/HRMS (pg TEQ/g)	高感度CALUX (pg TCDD eq./g)	HRGC/HRMS (pg TEQ/g)	高感度CALUX (pg TCDD eq./g)	HRGC/HRMS (pg TEQ/g)
1	アジ	0.76	0.25	0.37	0.42	1.1	0.67
2		0.48	0.19	0.25	0.34	0.73	0.53
3		0.96	0.51	0.40	0.59	1.4	1.1
4	イワシ	0.31	0.15	0.35	0.55	0.66	0.71
5		0.24	0.12	0.22	0.43	0.46	0.55
6	カツオ	0.49	0.16	0.22	0.65	0.70	0.81
7		0.13	0	0.040	0.047	0.16	0.047
8	サーモン	1.3	0.26	0.96	1.3	2.3	1.5
9		1.3	0.29	0.52	0.80	1.8	1.1
10		0.17	0.0050	0.072	0.076	0.24	0.081
11		2.5	0.48	1.2	1.4	3.7	1.9
12		0.92	0.18	0.97	0.86	1.9	1.0
13		0.25	0.066	0.37	0.32	0.62	0.39
14	サバ	2.1	0.70	1.5	1.2	3.7	1.9
15		0.98	0.39	0.67	0.84	1.6	1.2
16		0.16	0.064	0.13	0.19	0.29	0.25
17		2.6	0.69	1.3	1.5	4.0	2.2
18		1.1	0.36	0.90	1.1	2.0	1.4
19		0.83	0.25	0.56	0.74	1.4	1.0
20	タイ	0.15	0.0020	0.058	0.054	0.21	0.056
21		0.25	0.072	0.14	0.28	0.39	0.35
22		0.12	0.0020	0.063	0.11	0.18	0.11
23	ブリ	0.71	0.32	0.42	0.87	1.1	1.2
24		1.8	0.55	1.4	1.7	3.2	2.3
25		0.41	0.17	0.28	0.47	0.69	0.64
26		0.74	0.25	0.65	0.94	1.4	1.2
27		3.4	0.96	2.1	2.7	5.6	3.6
28	マグロ	0.11	0.045	0.19	0.29	0.30	0.33
29		0.20	0.0030	0.093	0.13	0.29	0.13
30		0.45	0.14	0.51	0.72	0.96	0.86
31		0.15	0.0080	0.068	0.17	0.22	0.18
32		0.12	0.0086	0.064	0.081	0.19	0.089

1) 高感度CALUXについては、各魚試料について試験液調製から測定までの一連の操作を2試行で行い、その平均値を示した。HRGC/HRMSについては、1試行の測定値を示した。

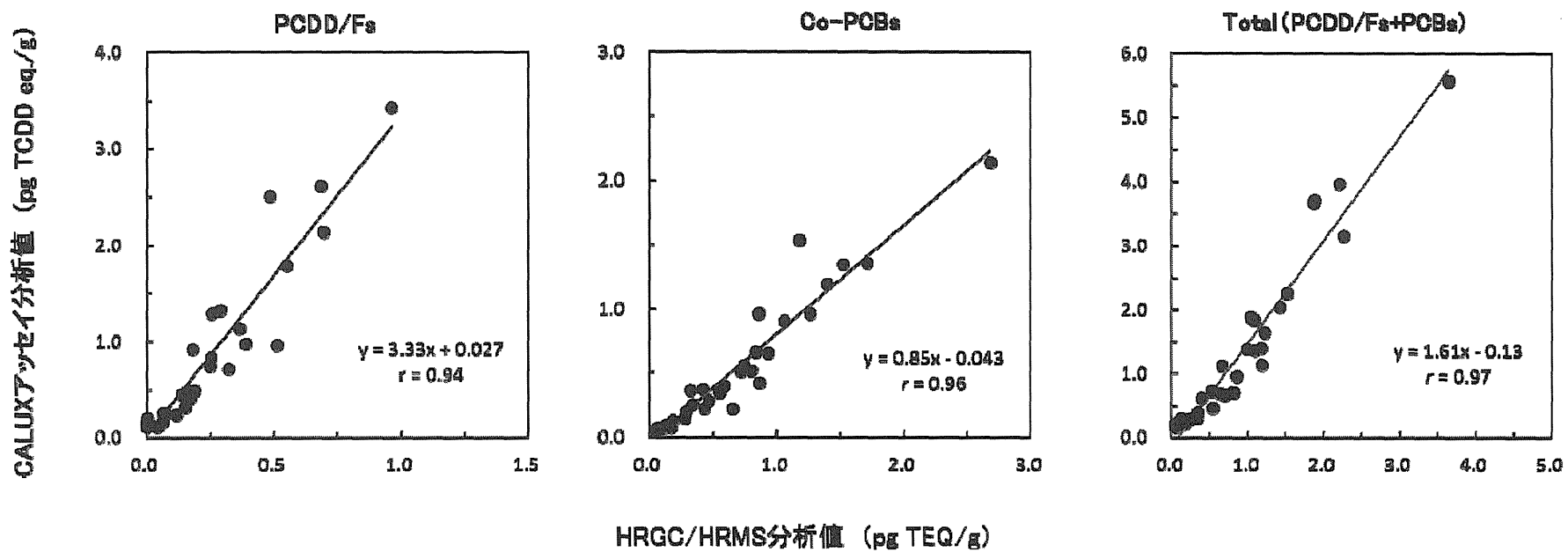


図1 高感度 CALUX アッセイと HRGC/HRMS のダイオキシン類分析結果の相関(魚 32 試料)

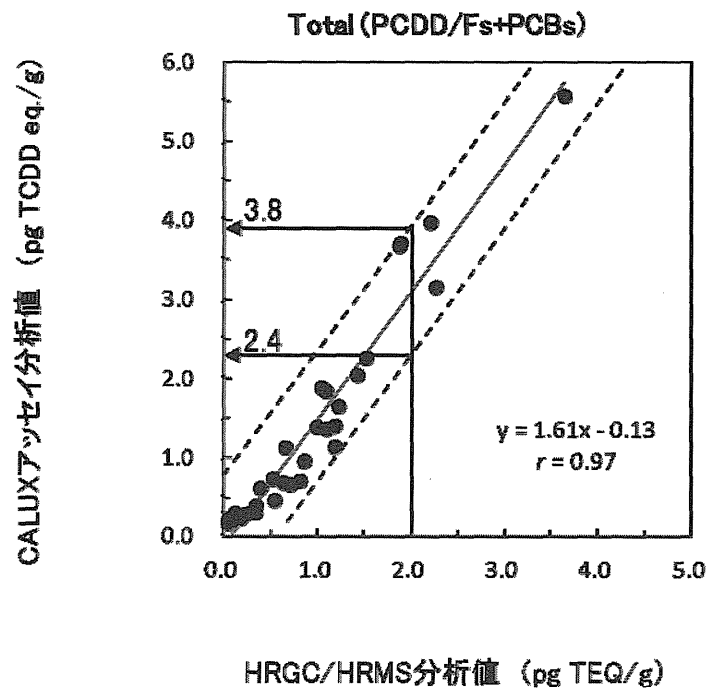


図2 比較試験結果における回帰直線の95%予測区間(魚32試料)
グラフの点線は回帰直線の95%予測区間を示す。

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。23 年度は各種食品 (野菜、果物、ハーブ等) の中で特に 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、天然 AhR アゴニストとして配糖体である nepitrin を明らかにした。今年度は、さらにローズマリーエキスの活性画分について精査し、新たに 6 種の化合物を単離、同定した。それらの AhR 活性を評価した結果、cirsimatrין 等が天然 AhR 活性成分として明らかとなった。また、植物由来 (生薬) エキス 30 種について AhR 活性を評価し、活性の認められたオウゴンについて分析し、検出された 5 種の成分について AhR 活性を評価した。その結果、baicalin 等に AhR 活性が認められた。また生薬由来の天然化合物 38 種について AhR 活性を評価した結果、evodiamine、imperatorin に顕著な AhR 活性が認められた。さらに AhR 活性成分の特徴の 1 つとされるインドール骨格を有する化合物 17 種について活性を評価した結果、indole-3-acetone 等に顕著な AhR 活性が認められた。これまでの結果から、天然 AhR 活性成分の特徴をみると、フラボン、インドール、フラノクマリン骨格を有するものがあげられる。これらタイプの成分を含有する食品のバイオアッセイ測定時には、天然 AhR 活性成分の影響も考慮し、サンプル調製を行う必要性が示唆された。

研究協力者

松山大学 薬学部

好村 守生、山上 沙織、米原 茜

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

こ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、総合的な一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あげられている。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。23 年度は 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、配糖体リガンドとし

て nepitrin を明らかにした。今年度は、さらにローズマリーの AhR 活性画分について成分精査を行い、新たに得られた化合物について AhR 活性を評価した。さらに、主な生薬エキス 30 種について AhR 活性を測定し、活性の強かったオウゴンについて、含有成分の分析とそれらの AhR 活性について評価した。また、入手できた天然由来成分 38 種について AhR 活性を評価し、構造的特徴を考察した。また、AhR 活性成分の構造的特徴とされるインドール骨格を有する化合物を入手し、AhR 活性を評価した。

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。市販生薬 30 種 (ウコン、オウギ、オウゴン、オウバク、オウレン、オンジ、カッコン、カンキョウ、カンゾウ、キキョウ、クジン、ケイヒ、ゲンノショウコ、コウブシ、サンシュユ、ジオウ、シャクヤク、シヨウキョウ、センキュウ、ソウジュツ、ソヨウ、ダイオウ、タイソウ、チョウトウコウ、トウキ、トウニン、ニンジン、ハマボウフウ、ビャクジュツ、ボウフウ) はウチダ和漢薬製または栃本天海堂製を用いた。インドール化合物 (3,3'-methylenebisindole、3-indoleacetic acid、indole-3-acetone、indole-3-carbaldehyde、indole-4-carbaldehyde、indole-5-carbaldehyde、indole-6-carbaldehyde、indole-7-carbaldehyde、2-indolecarboxylic acid、indole-3-carboxylic acid、indole-4-carboxylic acid、indole-5-carboxylic acid、indole-6-carboxylic acid、indole-7-carboxylic acid、3-indoleethanol、indole-3-propionic acid、3-indolemethanol)、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。オウゴンの成分 (baicalein、baicalin、wogonin、wogonoside、chrysin-6-C-glucoside) は、以前、オウゴンより得られた研究室保有のものを使用した。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 Perkin Elmer 社製の Enspire を使用した。

2. 装置および測定条件

NMR : Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社) ($^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 126 MHz) により、測定溶媒として methanol- d_4 (CD_3OD) 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。

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. \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→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) をブレンダーで粉砕し、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。AhR 活性の認められた酢酸エチル分画物 (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、新たに caffeic

acid (1.5 mg)、6''-*O*-(*E*)-feruloylnepitron (3.2 mg)、homoplantagin (6.0 mg)、cirsimaritin (9.1 mg)、salvigenin (7.2 mg)、landanein (6.2 mg) を単離、同定した。化合物の同定は、文献値との比較、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。

生薬試料については、粉砕した試料をそれぞれエタノールでホモジナイズし、ろ過、濃縮後、抽出物を得た。各抽出物を DMSO に溶解し、AhR 活性評価の試料溶液とした。

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 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 を加えて攪拌後、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肝ガン細胞 H1L6.1 (約 1.5×10^5 cell/well) に 1 ウェルずつ暴露し、 CO_2 インキュベーター (37°C, 5% CO_2 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 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度 (RLU) を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. ローズマリーエキスの AhR 活性成分

昨年度からの続きで、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、顕著な AhR

活性が認められ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、6種の化合物を単離することが出来た。単離した化合物1~5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⁵⁾⁻⁸⁾。各化合物の構造式を図1Aに示す。以下に化合物1~5の分析データを記す。

Landanein (1) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.95 (2H, d, *J*=9, H-2', 6'), 7.07 (2H, d, *J*=9, H-3', 5'), 6.82 (1H, s, H-8), 6.65 (1H, s, H-3), 3.98, 3.88 (each 3H, s, -OMe). ¹³C-NMR δ 184.3 (C-4), 166.1 (C-2), 164.4 (C-4'), 155.8 (C-7), 152.0 (C-9), 147.2 (C-5), 131.8 (C-6), 130.5 (C-2', 6'), 124.7 (C-1'), 114.9 (C-3', 5'), 106.7 (C-10), 104.1 (C-3), 92.0 (C-8), 57.0, 56.1 (-OMe). ESI-MS *m/z* 313 [M-H].

Cirsimaritin (2) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.86 (2H, d, *J*=9, H-2', 6'), 7.07 (2H, d, *J*=9, H-3', 5'), 6.79 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, s, H-3), 3.96, 3.83 (each 3H, s, -OMe). ¹³C-NMR δ 184.3 (C-4), 166.7 (C-2), 162.9 (C-4'), 160.6 (C-7), 154.9 (C-9), 153.7 (C-5), 133.7 (C-6), 130.0 (C-2', 6'), 123.2 (C-1'), 117.0 (C-3', 5'), 106.7 (C-10), 103.8 (C-3), 92.3 (C-8), 61.7, 57.0 (-OMe). ESI-MS *m/z* 313 [M-H].

Homoplantagin (3) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.87 (2H, d, *J*=8.5, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, *J*=8.5, H-3', 5'), 6.94 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, s, H-3), 5.11 (1H, d, *J*=7.5, glc H-1), 3.95 (1H, dd, *J*=2, 12, glc H-6), 3.71 (1H, dd, *J*=6, 12, glc H-6'), 3.41-3.58 (4H, m, glc H-2-5), 3.88 (3H, s, -OMe). ¹³C-NMR δ 184.3 (C-4), 166.9 (C-2), 162.9 (C-4'), 157.9 (C-7), 154.3 (C-9), 154.0 (C-5), 133.7 (C-6), 129.7 (C-2', 6'), 123.1 (C-1'), 117.0 (C-3', 5'), 107.8 (C-10), 103.7 (C-3), 95.8 (C-8), 61.5 (-OMe), 102.0 (glc C-1), 74.8 (glc C-2), 78.5 (glc C-3), 71.3 (glc C-4), 78.0 (glc C-5), 62.6 (glc C-6). ESI-MS *m/z* 461 [M-H].

Caffeic acid (4) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.42 (1H, d, *J*=16, H-8), 7.01 (1H, d, *J*=2, H-2), 6.89 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6), 6.75 (1H, d, *J*=8, H-5), 6.24 (1H, d,

J=16). ESI-MS *m/z* 179 [M-H].

Salvigenin (5) : ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.97 (2H, d, *J*=9, H-2', 6'), 7.08 (2H, d, *J*=9, H-3', 5'), 6.83 (1H, s, H-8), 6.69 (1H, s, H-3), 3.97, 3.90, 3.82 (each 3H, s, -OMe). ESI-MS *m/z* 327 [M-H].

6''-O-(E)-Feruloylnepitrin (6): ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7.23 (2H, m, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, *J*=9, H-5'), 6.76 (1H, s, H-8), 6.35 (1H, s, H-3), 7.39 (1H, d, *J*=16, H-7''), 6.71 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-1''), 6.55 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6''), 6.49 (1H, d, *J*=8, H-5''), 6.18 (1H, d, *J*=16, H-8''), 5.13 (1H, d, *J*=7.5, glc H-1), 4.71 (1H, dd, *J*=2.5, 11.5, glc H-6), 4.28 (1H, dd, *J*=8.5, 11.5, glc H-6'), 3.41-3.84 (5H, m, glc H-2-5), 3.89, 3.63 (each 3H, s, -OMe). ¹³C-NMR δ 166.5 (C-2), 103.4 (C-3), 184.2 (C-4), 154.0 (C-5), 134.3 (C-6), 157.5 (C-7), 95.6 (C-8), 154.0 (C-9), 107.5 (C-10), 61.5 (-OMe), 123.2 (C-1'), 114.1 (C-2'), 146.9 (C-3'), 151.0 (C-4'), 116.6 (C-5'), 120.4 (C-6'), 127.3 (C-1''), 111.1 (C-2''), 149.0 (C-3''), 149.0 (C-4''), 116.3 (C-5''), 123.7 (C-6''), 147.3 (C-7''), 114.9 (C-8''), 168.8 (C-9''), 61.5 (-OMe), 56.0 (-OMe), ESI-MS *m/z* 653 [M-H].

単離した6種の化合物について、AhR活性を評価した。その結果を図1Bに記す。図に示すように、landanein、cirsimaritin、homoplantagin、caffeic acidにおいて10⁵~10⁶ nMの濃度領域でAhR活性が認められた。Landanein、cirsimaritinはフラボンのアグリコンであるが、homoplantaginは配糖体で、これは昨年度の結果から明らかとなったフラボン配糖体nepitrinに次ぐ例となった。Nepitrinとhomoplantaginの違いは、フラボン骨格のB環の3位の水酸基の有無のみである。これまでの結果、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、また水酸基が増えることにより極性が高まり、活性が減弱する傾向が考察されていたが、これら2配糖体を比べると水酸基の数が一つ多いnepitrinの方が強

い活性を示す結果となった。

2. 植物由来エキスの AhR 活性成分

植物由来（生薬）試料 30 種のエタノール抽出エキスについて AhR 活性を評価した結果、大半の試料は AhR 活性を示さなかったが、一部エキスに活性が認められた。結果を図 2 に示す。特に、オウゴン、カンゾウ、カッコン、次いでクジン、チョウトウコウに強い AhR 活性が認められた。例外もあるが、これまでの検討からフラボノイド、アントラキノン、インドール化合物等が本アッセイにおいて活性を示すことが示唆されている。活性が認められた抽出エキスには、それら化合物の含有が知られていることから、活性に寄与していることが考えられる。そこで、活性の高かったオウゴンに含まれる AhR 活性成分について検討を行った。オウゴン抽出エキスについて HPLC 分析を行った結果、図 3A に示すクロマトグラムが得られた。オウゴン由来の 5 成分 (baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside, chrysin-6-C-glucoside) (図 3B) について分析した結果、ピーク①～⑤に相当することが確認された。そこで、これら 5 成分について AhR 活性を測定した結果、 $10^5 \sim 10^6$ nM の濃度領域で活性を示した。結果を図 3C に示す。個々をみると、baicalin、chrysin-6-C-glucoside、wogonoside といった配糖体の方が若干ではあるが活性が強い結果を得た。

3. 天然由来成分の AhR 活性

天然由来（生薬）成分 38 種 (図 4) について AhR 活性を評価した。その結果、evodiamine、imperatorin、paeonol、puerarin 等に活性が認められた。結果を図 5 に示す。特に、インドール骨格をもつ evodiamine、フラノクマリン骨格をもつ imperatorin には顕著な AhR 活性が認められた。フラノクマリンをみると、bergaptene、bergamottin についてはほとんど活性を示さなかった。Imperatorin はイソプレン単位が側鎖として結合した構造を有する。その結合位置が

bergaptene、bergamottin とは異なっており、それが影響していることも考察された。

4. インドール化合物の AhR 活性

入手したインドール化合物 17 種 (図 6) について AhR 活性を評価した。その結果、大半の化合物が $10^5 \sim 10^6$ nM の濃度領域で AhR 活性を示した。結果を図 7 に示す。特に、indole-3-acetone、indole-4-carboxylic acid、3-indoleethanol 等は顕著な AhR 活性が認められた。

D. 結論

昨年度に引き続き、ローズマリーエキスに含有する天然 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 6 種の化合物を単離、同定した。それらの AhR 活性を評価した結果、cirsimarin 等、フラボン類が活性を示した。また、植物由来（生薬）エキス 30 種について AhR 活性を評価し、活性の認められたオウゴンについて成分分析を行った。検出された 5 種の成分について AhR 活性を評価した結果、baicalin 等に AhR 活性が認められた。また、天然由来成分 38 種について AhR 活性を評価した結果、evodiamine、imperatorin に顕著な AhR 活性が認められた。さらに AhR 活性成分の特徴の 1 つとされるインドール骨格を有する化合物 17 種について活性を評価した結果、indole-3-acetone 等に顕著な AhR 活性が認められた。例外もあるが、これまでの結果から天然 AhR 活性成分の特徴をみると、フラボン、インドール、フラノクマリン骨格を有するものがあげられる。それゆえ、これらタイプの成分を含有する食品のバイオアッセイ測定時には、天然 AhR 活性成分の影響も考慮し、サンプル調製を行う必要性が示唆された。一方、明らかとなった天然 AhR 活性成分は、ダイオキシン様の毒性報告はなく、健康影響はないものと考察される。

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) Naisheng B, Kan H, Marc R, Ching S.L, Xi S, Min H.P, Chi T.H: Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), 5363-5367.
- 6) Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie E.J, Huang T.C, Ho C.T: Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998), 4869-4873.
- 7) Perez-Fons L, Garzon M.T, Micol V: Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), 161-171.
- 8) Begum S, Wahab A, Siddiqui B.S, Qamar F: Nematicidal Constituents of the Aerial Parts of *Lantana camara*, *J. Nat. Prod.* 63 (2000), 765-767.

F. 研究業績

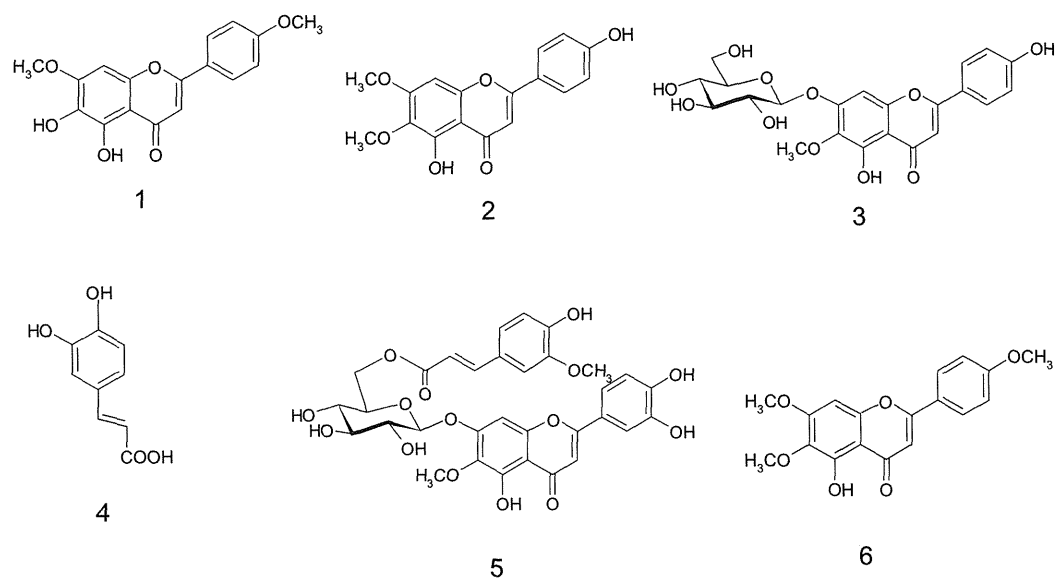
1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

- 1) 戸田陽香、好村守生、堤 智昭、中村昌文、半田洋士、松田りえ子、吉田隆志、天倉吉章：ローズマリーエキスに含まれる天然 AhR 活性成分，第 51 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（2012. 11）。
- 2) Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Handa H, Yoshimura M, Matsuda R, Yoshida T: Characterization of natural AhR ligands in vegetables and crude drugs. *Bioactive Okayama* (2012.9).
- 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：生薬抽出物の AhR 活性化作用について，第 29 回和漢医薬学会学術大会（2012.9）。

(A)



(B)

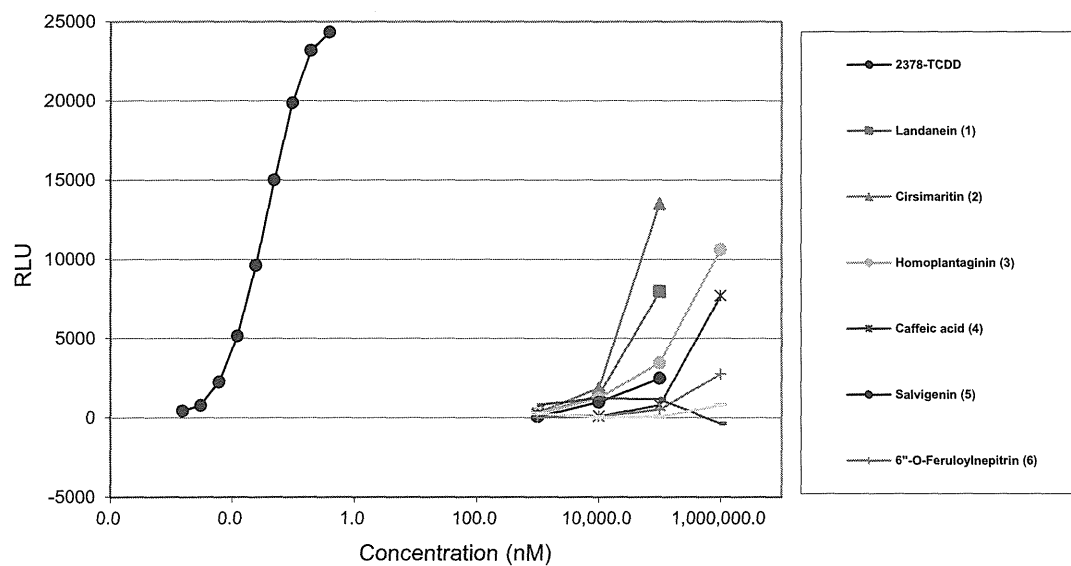


図 1. (A) ローズマリーエキスから得られた化合物 1~6 の化学構造

(B) 化合物 1~6 の AhR 活性

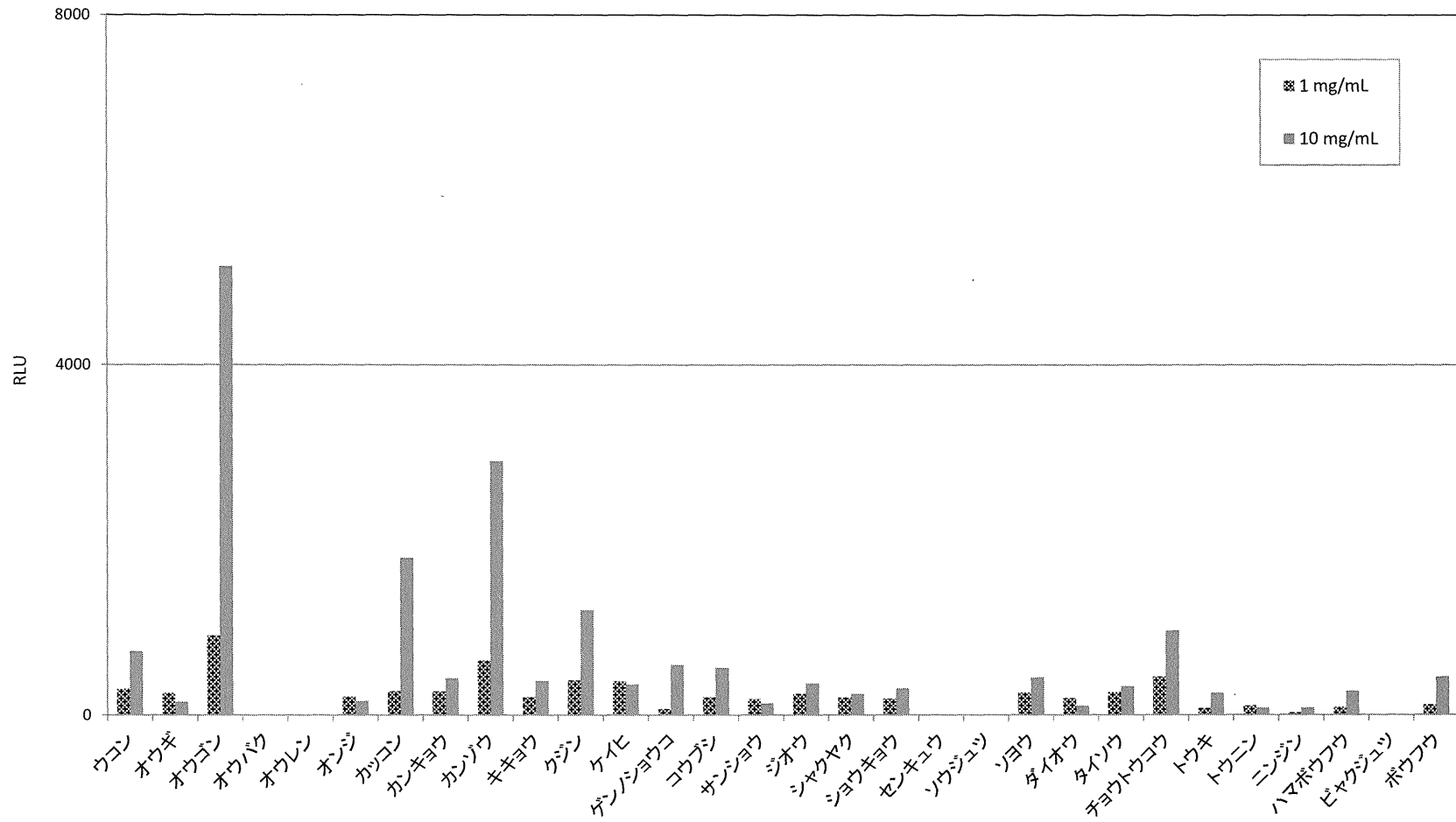
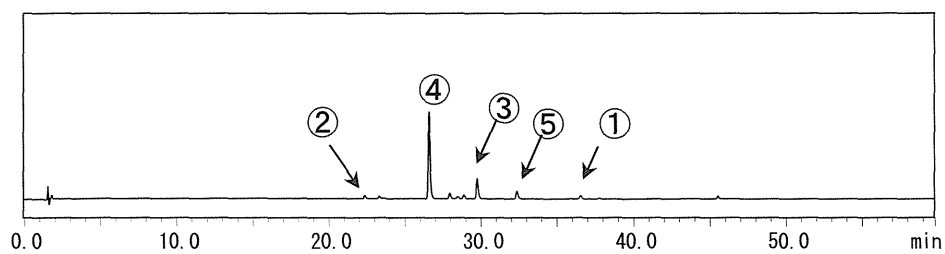


図2. 植物由来(生薬)エキスの AhR 活性

(A)



(B)

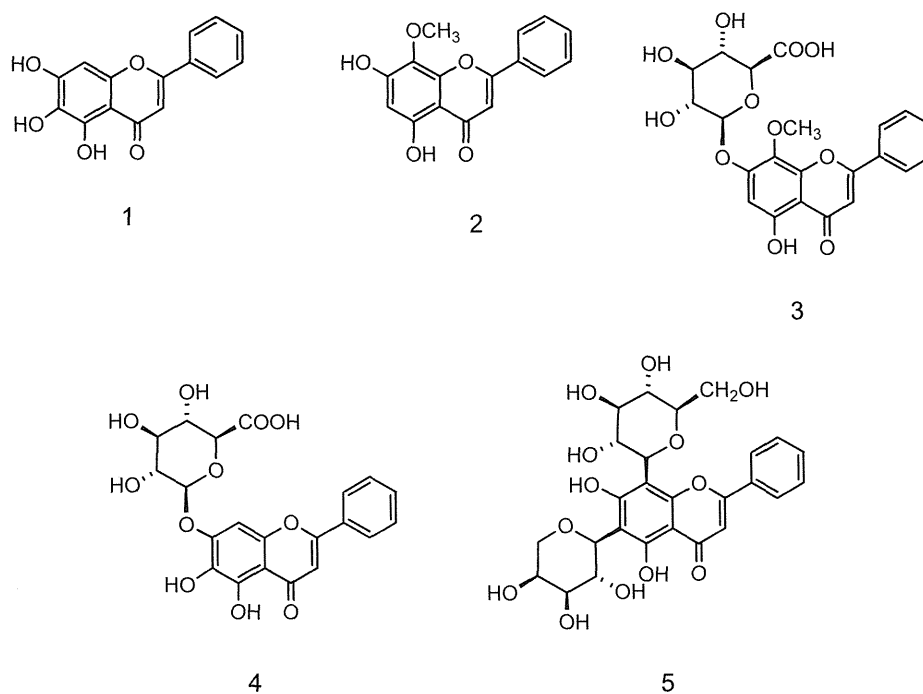


図 3. (A) オウゴンエキスの HPLC クロマトグラム(at 280 nm)
(B) 化合物 1~5 の化学構造
(C) 化合物 1~5 の AhR 活性