

図4 モンテカルロシミュレーションにより推定した魚介類13区分からのDXNs1日摂取量

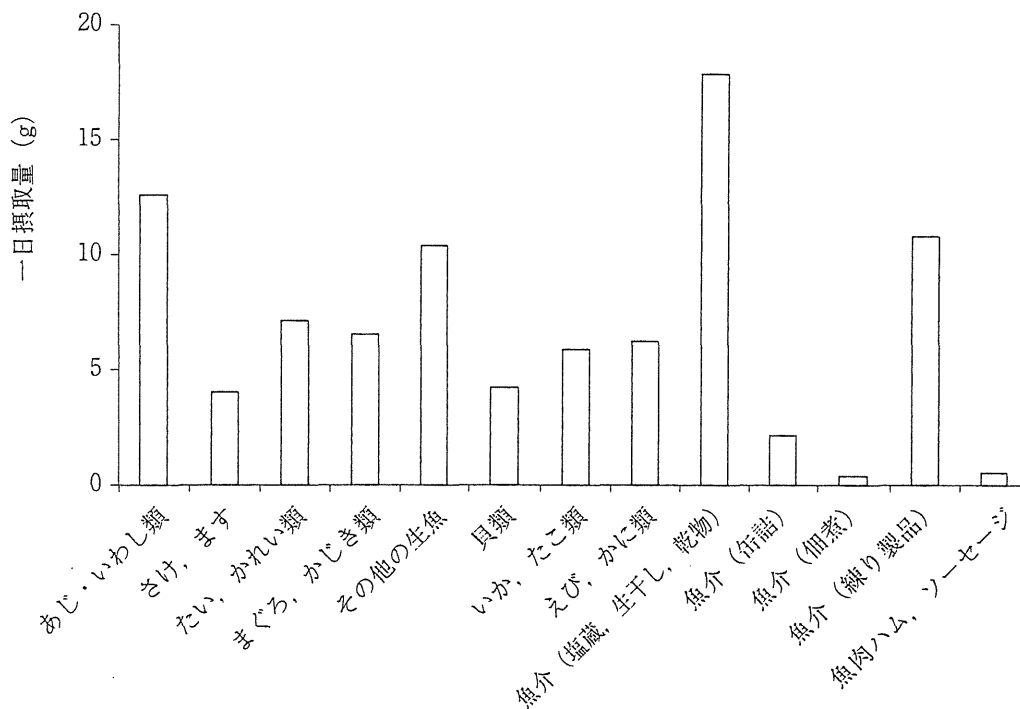


図5 魚介類13区分の1日摂取量

#### IV おわりに

TD 調査により推定された DXNs 摂取量は、政府の行政施策の効果等もあり徐々に低下する傾向

が示唆されている。しかし、依然として TDI の 17% 程度を占めており、この値は DDT 等の塩素系農薬や PCBs の摂取量がそれらの TDI に占める割合と比べると非常に高い値である。モンテカ

ルロシミュレーションによる魚介類からの DXNs 摂取量推定では摂取量分布が得られ、より詳細なリスク評価が可能であった。魚介類の一部は依然として比較的高い DXNs を含有することから、一部の食品を過度に摂取するのではなく、バランスのとれた食生活がリスク低減化においても重要であるといえる。今後も DXNs 摂取量調査を継続し、DXNs 摂取量の動向を見守る必要があると考えられる。

## V 謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金研究事業（平成 10 年～24 年度）により行われた。TD 試料の調製にご協力いただきました研究機関および国民健康・栄養調査結果の特別集計にご協力いただいた独立行政法人国立健康・栄養研究所の諸氏に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Van den Berg, M. *et al.*: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences* 93, 223-241 (2006).
- 2) 中央環境審議会環境保健部会 生活環境審議会 食品衛生調査会：ダイオキシンの耐容 1 日摂取量 (TDI) について, 平成 11 年 6 月 (<http://www.env.go.jp/chemi/dioxin/report/TDI/all.pdf>)
- 3) Van Leeuwen, F. X. *et al.*: Dioxins : WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40, 1095-1101 (2000).
- 4) 食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン, 食安監発第 0228003 号 (平成 20 年 2 月 28 日)
- 5) Toyoda, M. *et al.*: Decreased Daily Intake of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs from Foods in Japan from 1977 to 1998. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)* 40, 494-499 (1999).
- 6) Kiviranta H. *et al.*: Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environ Int.* 30, 923-932 (2004).
- 7) Department of the Environment and Heritage, Australian Government. Human health risk assessment of dioxins in Australia - technical report No. 12. Revised July 2005.
- 8) Fattore E. *et al.*: Current dietary exposure to polychlorodibenzo-*p*-dioxins, polychlorodibenzofurans, and dioxin-like polychlorobiphenyls in Italy. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 915-921 (2006).
- 9) Tard A. *et al.*: Dioxins, furans and dioxin-like PCBs : Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Addit. Contam.* 24, 1007-1017 (2007).
- 10) Windal I. *et al.*: Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. *Chemosphere* 79, 334-340 (2010).
- 11) Marin S. *et al.*: Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). *Chemosphere* 79, 1253-1261 (2011).
- 12) Perelló G. *et al.*: Assessment of the temporal trend of the dietary exposure to PCDD/Fs and PCBs in Catalonia, over Spain : Health risks. *Food and Chemical Toxicology* 50, 399-408 (2012)
- 13) Mortimer D. *et al.*: Consumer exposure to chlorinated and brominated dioxins and biphenyls and polybrominated diphenyl ethers : New UK total diet study. Abstracts from the 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs, Daegu, Korea (2013)

Article

## Characterization of Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists from Cassia Seed and Rosemary

Yoshiaki Amakura <sup>1,\*</sup>, Morio Yoshimura <sup>1</sup>, Masashi Takaoka <sup>1</sup>, Haruka Toda <sup>1</sup>, Tomoaki Tsutsumi <sup>2</sup>, Rieko Matsuda <sup>2</sup>, Reiko Teshima <sup>2</sup>, Masafumi Nakamura <sup>3</sup>, Hiroshi Handa <sup>3</sup> and Takashi Yoshida <sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University; 4-2 Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan; E-Mails: myoshimu@cc.matsuyama-u.ac.jp (M.Y.); matakaoka@shikoku-cc.go.jp (M.T.); aranharu.0205@gmail.com (H.T.); tyoshida@gem.e-catv.ne.jp (T.Y.)

<sup>2</sup> Division of Foods, National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; E-Mails: tutumi@nihs.go.jp (T.T.); matsuda@nihs.go.jp (R.M.); rteshima@nihs.go.jp (R.T.)

<sup>3</sup> Hiyoshi Corporation, 908 Kitanosho-cho, Omihachiman, Shiga 523-8555, Japan; E-Mails: m.nakamura@hiyoshi-es.co.jp (M.N.); handa@hiyoshi-es.co.jp (H.H.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: amakura@cc.matsuyama-u.ac.jp; Tel.: +81-89-925-7111; Fax: +81-89-926-7162.

Received: 8 February 2014; in revised form: 14 April 2014 / Accepted: 15 April 2014 /

Published: 17 April 2014

---

**Abstract:** Many recent studies have suggested that activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) reduces immune responses, thus suppressing allergies and autoimmune diseases. In our continuing study on natural AhR agonists in foods, we examined the influence of 37 health food materials on the AhR using a reporter gene assay, and found that aqueous ethanol extracts of cassia seed and rosemary had particularly high AhR activity. To characterize the AhR-activating substances in these samples, the chemical constituents of the respective extracts were identified. From an active ethyl acetate fraction of the cassia seed extract, eight aromatic compounds were isolated. Among these compounds, aurantio-obtusin, an anthraquinone, elicited marked AhR activation. Chromatographic separation of an active ethyl acetate fraction of the rosemary extract gave nine compounds. Among these compounds, cirsimaritin induced AhR activity at  $10\text{--}10^2$   $\mu\text{M}$ , and nepitrin and homoplantagenin, which are flavone glucosides, showed marked AhR activation at  $10\text{--}10^3$   $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** aryl hydrocarbon receptor; health food; cassia seed; rosemary; reporter gene assay

---

## 1. Introduction

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor that is present in mammalian cells and tissues. The AhR has also been referred to as dioxin receptor because it binds environmental pollutants (e.g., dioxins) and is involved in biotoxicity linked to xenobiotic AhR ligand exposure in animals, including cancer, reproductive impairment, and immunological impairment [1–3]. Although studies have identified numerous xenobiotic ligands for the AhR, such as dioxins, the essential functions of the AhR are largely unknown; therefore, the AhR is still regarded as an orphan receptor.

Functional elucidation of AhR activation by non-toxic ligands such as food constituents has been reported in recent years [4–6]. The AhR has been identified as a target of several signaling pathways that cross-talk with its own regulatory pathway, such as proteasomal degradation, redox-sensitive transcription factors, and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [7,8]. Several studies have also found that the AhR plays an important role in immune system function [9–12]. For example, activation of the AhR is associated with various effects on dendritic cells (DCs) and regulatory T cells and has been shown to mediate the Th1/Th2 cell balance. These cells play a major role in the development of food allergies, an increasing health problem in both humans and animals. Despite existing knowledge regarding the risk factors of and cellular mechanisms underlying food allergies, no approved treatments are yet available. Activation of the AhR by dioxin-like compounds has been shown to suppress allergic sensitization by reducing the absolute number of precursor and effector T cells, preserving CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells, and affecting DCs and their interactions with effector T cells. Additionally, tranilast, an anti-allergy drug, has been shown to cause significant upregulation of *microRNA (miR)-302* by activation of the AhR [13]. Thus, dietary ligands of the AhR may have anti-inflammatory, anti-allergy, anti-cancer, and immunoregulatory effects. However, while although the role of the AhR in the response to environmental toxins is widely accepted, its broader role in adapting the response to natural ligands is limited. Therefore, it is necessary to characterize various natural AhR ligands.

In the current study, we sought to further characterize AhR agonists present in foods. We examined the AhR activities of 37 health food materials using an *in vitro* reporter gene assay called the chemical-activated luciferase gene expression (CALUX) assay [14–16]. Active sample extracts were subsequently fractionated, and chromatography was performed to characterize the fractions containing AhR activity and associated individual constituents.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. AhR Activities of Health Food Materials

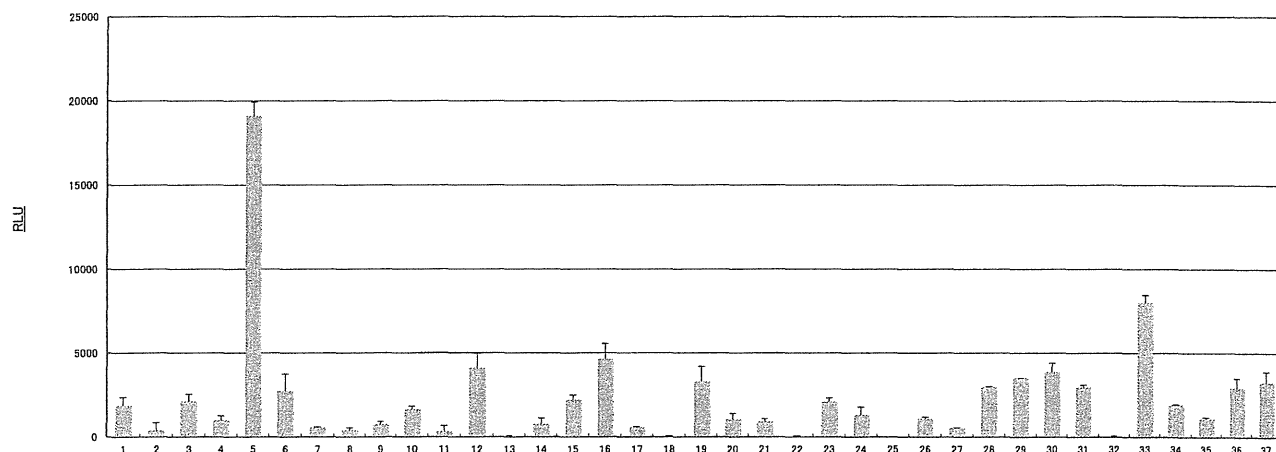
The *in vitro* AhR activation potencies of 37 samples, including the fruits and herbs listed in Table 1, were estimated using the CALUX assay, and the results are shown in Figure 1. Of the samples tested, sample 5 (cassia seed extract) showed the most remarkable induction of luciferase activity, followed

by sample 33 (rosemary extract), with luciferase activity producing more 8,000 relative light units (RLU). Samples 12 (*Eleutherococcus senticosus* rhizome), 16 (fenugreek), 19 (giant crape-myrtle), 29 (parsley), 30 (perilla herb), and 37 (yarrow) also exhibited luciferase activity higher than 3,000 RLU. The data suggest that cassia seed and rosemary may contain significant natural AhR agonists.

**Table 1.** List of health food materials used for the estimation of AhR activity

No.	Materials
1	Ashitaba (Japanese name) ( <i>Angelica keiskei</i> )
2	Aloe ( <i>Aloe arborescens</i> )
3	Amachazuru (Japanese name) ( <i>Gynostemma pentaphyllum</i> )
4	Bitter melon ( <i>Momordica charantia</i> )
5	Cassia seed ( <i>Cassia obtusifolia</i> )
6	Celery ( <i>Apium graveolens</i> )
7	Coix seed ( <i>Coix lacryma-jobi</i> )
8	Cornus fruit ( <i>Cornus officinalis</i> )
9	Crataegus fruit ( <i>Crataegus cuneata</i> )
10	Echinacea ( <i>Echinacea purpurea</i> )
11	Elder ( <i>Sambucus racemosa</i> )
12	<i>Eleutherococcus senticosus</i> rhizome ( <i>Eleutherococcus senticosus</i> )
13	Eucalyptus leaf ( <i>Eucalyptus globulus</i> )
14	Eucommia bark ( <i>Eucommia ulmoides</i> )
15	Fennel ( <i>Foeniculum vulgare</i> )
16	Fenugreek ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> )
17	Field horsetail ( <i>Equisetum arvense</i> )
18	Garcinia ( <i>Garcinia verrucosa</i> )
19	Giant crape-myrtle ( <i>Lagerstroemia speciosa</i> )
20	Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> )
21	Ginkgo ( <i>Ginkgo biloba</i> )
22	Gymnema ( <i>Gymnema sylvestre</i> )
23	Kaki persimmon ( <i>Diospyros kaki</i> )
24	Lemon balm ( <i>Melissa officinalis</i> )
25	Lemon grass ( <i>Cymbopogon citratus</i> )
26	Linden ( <i>Tilia europaea</i> )
27	Maca ( <i>Lepidium meyenii</i> )
28	Mugwort ( <i>Artemisia indica</i> )
29	Parsley ( <i>Petroselinum crispum</i> )
30	Perilla herb ( <i>Perilla frutescens</i> )
31	Plantago herb ( <i>Plantago asiatica</i> )
32	Rabdosia herba ( <i>Rabdosia japonica</i> )
33	Rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )
34	Sesame ( <i>Sesamum indicum</i> )
35	Star anise ( <i>Illicium verum</i> )
36	Sweet hydrangea leaf ( <i>Hydrangea macrophylla</i> )
37	Yarrow ( <i>Achillea millefolium</i> )

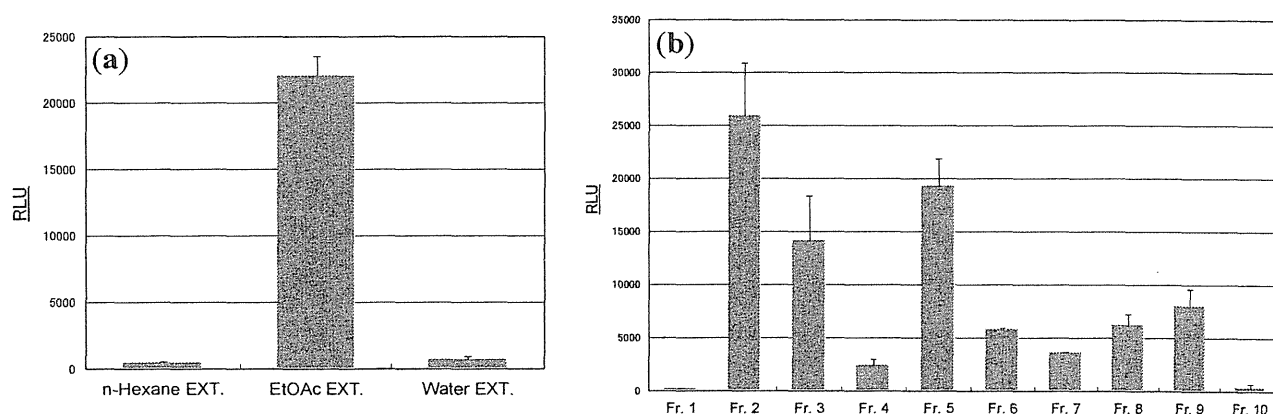
**Figure 1.** Induction of luciferase activity by health food materials in the CALUX assay. The numbers on the x-axis describe the components listed in Table 1. Sample extracts were used at a final concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . Results are expressed as means  $\pm$  SDs.



## 2.2. Identification and AhR Activity of Constituents

To characterize the active components in sample 5 (cassia seed extract), the extract was first partitioned with organic solvent for separation into *n*-hexane-, ethyl acetate-, and water-soluble fractions. As shown in Figure 2a, AhR activity was present only in the ethyl acetate extract, which was separated by chromatography over Sephadex LH-20 with ethanol to afford 10 fractions (Frs. 1–10).

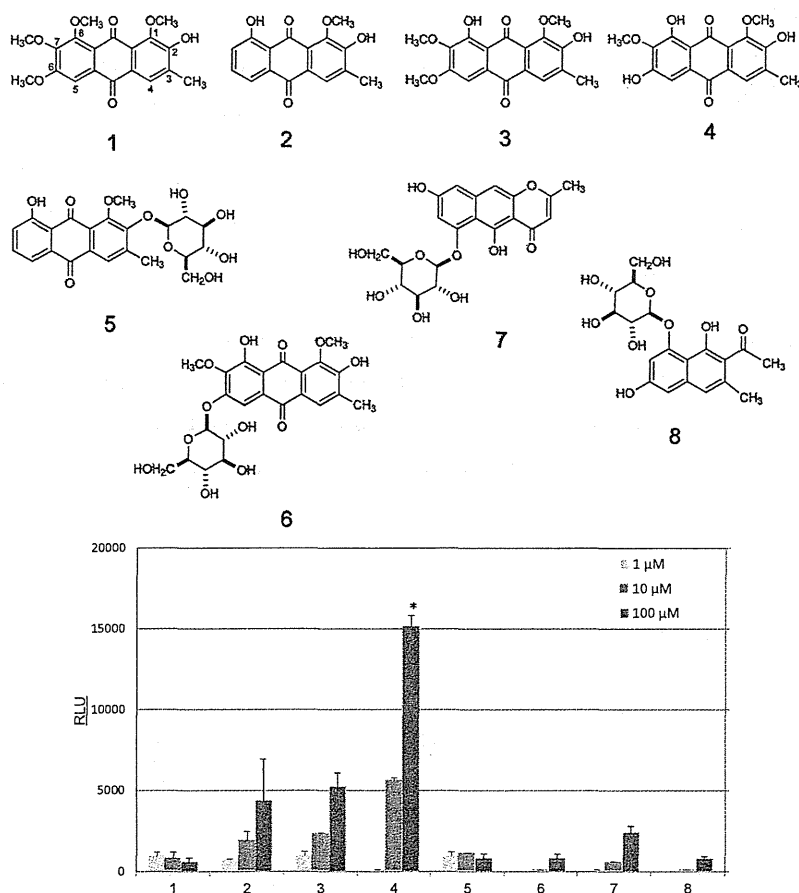
**Figure 2.** Induction of luciferase activity by cassia seed extracts in the CALUX assay. (a) Extracts from cassia seed. (b) Fractions from ethyl acetate extracts. Sample extracts were used at a final concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . Results are expressed as means  $\pm$  SDs.



Fractions 2, 3, and 5, which exhibited marked AhR activation (Figure 2b), were purified by preparative TLC to afford eight compounds: chryso-obtusin (1), obtusifolin (2), obtusin (3), aurantio-obtusin (4), obtusin 2-*O*-glucoside (5), aurantio-obtusin 6-*O*-glucoside (6), nor-rubrofusarin 6-*O*-glucoside (7), and 6-hydroxymusizin 8-*O*-glucoside (8). Among these isolates, aurantio-obtusin (4) elicited marked AhR activation, followed by obtusifolin (2) and obtusin (3). In contrast, the glycosides [obtusifolin 2-*O*-glucoside (5), aurantio-obtusin 6-*O*-glucoside (6), nor-rubrofusarin 6-*O*-glucoside (7), and 6-hydroxymusizin 8-*O*-glucoside (8)] showed only slight activation of AhR (Figure 3). The

influence of this glycosidic feature on the activity of the related anthraquinones was similar to our previous findings that the AhR activity of isoflavones tended to be weakened by glycosidation [4]. It is notable that the presence of a hydroxyl group at C-8 on the anthraquinone skeleton is necessary for AhR activation.

**Figure 3.** Induction of luciferase activity in the CALUX assay of compounds isolated from cassia seeds. **1**, chryso-obtusin; **2**, obtusifolin; **3**, obtusin; **4**, aurantio-obtusin; **5**, obtusin 2-*O*-glucoside; **6**, aurantio-obtusin 6-*O*-glucoside; **7**, nor-rubrofusarin 6-*O*-glucoside; **8**, 6-hydroxymusizin 8-*O*-glucoside. \*  $p < 0.05$  vs. IAA.

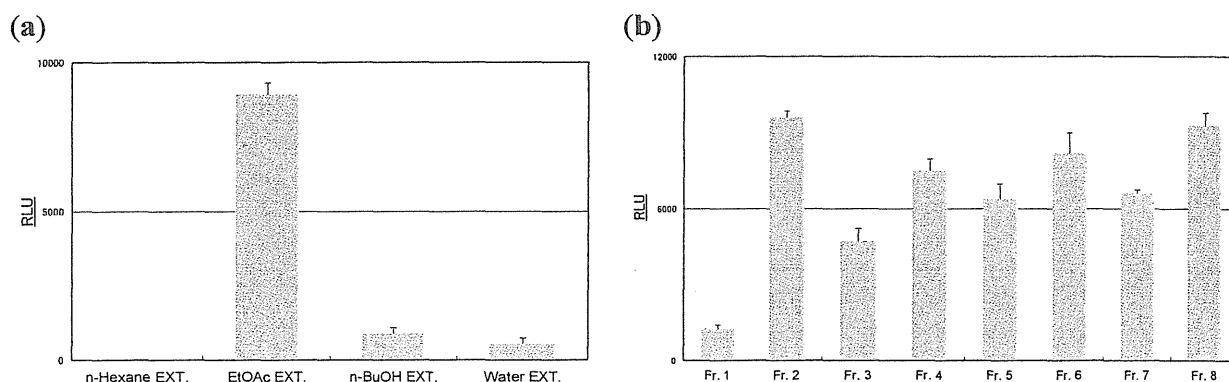


Additionally, aurantio-obtusin (**4**), which was the most active compound, had a hydroxyl group at C-7 and C-9, which may also contribute to AhR activation. However, to discuss the structure-activity relationships in anthraquinones, additional data from more compounds are required. The results of the present study revealed that AhR activation by the cassia seed extract is associated with anthraquinones and that aurantio-obtusin (**4**) may be an important natural AhR agonist.

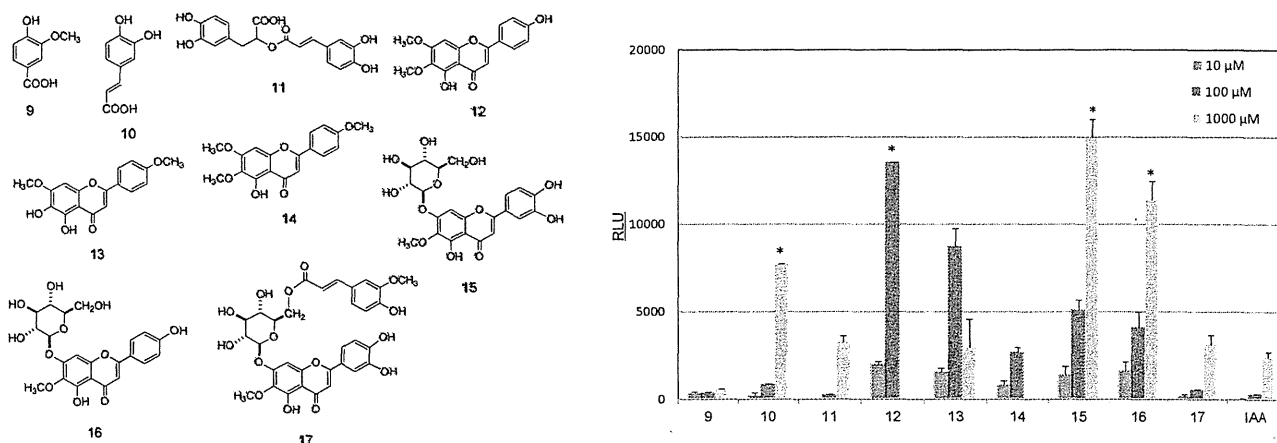
For the rosemary extract, AhR activation was also shown by the ethyl acetate-soluble fraction (Figure 4a). To identify the active compounds present, the ethyl acetate extract was subjected to chromatographic purification and chromatographed over a Sephadex LH-20 column with ethanol to afford eight fractions (Frs. 1–8). Fractions 2–8, which exhibited marked AhR activation (Figure 4b), were purified using a MCI-gel CHP-20P and YMC gel ODS-AQ column to give rosmarinic acid (**11**) as a major component and other eight compounds, *i.e.*, vanillic acid (**9**), caffeic acid (**10**), cirsimaritin (**12**),

ladanein (**13**), salvigenin (**14**), nepitrin (**15**), homoplantaginin (**16**), and 6''-*O*-(*E*)-feruloylnepitrin (**17**), as UV-sensitive constituents (Figure 5).

**Figure 4.** Induction of luciferase activity by rosemary extracts in the CALUX assay. (a) Extracts from rosemary. (b) Fractions from ethyl acetate extracts. Sample extracts were used at a final concentration of 100 µg/mL. Results are expressed as means ± SDs.



**Figure 5.** Induction of luciferase activity by compounds isolated from rosemary. The CALUX assay was used to measure luciferase activity. **9.** vanillic acid; **10.** caffeic acid; **11.** rosmarinic acid; **12.** cirsimaritin; **13.** ladanein; **14.** salvigenin, **15:** nepitrin, **16.** homoplantaginin; **17.** 6''-*O*-(*E*)-feruloylnepitrin; IAA. indole 3-acetic acid. \*  $p < 0.05$  vs. IAA.



The ability of compounds **9**–**15**, isolated from rosemary extract, to activate the AhR were examined using reporter gene assays. As shown in Figure 5, cirsimaritin (**12**) and ladanein (**13**) exhibited significant AhR activation at 10–10<sup>2</sup> µM. In contrast, compounds **12**–**14** induced cell death at 10<sup>3</sup> µM (Figure 5). Moreover, nepitrin (**15**) and homoplantagenin (**16**), which are flavone glucosides, showed marked AhR-binding activity at concentrations ranging from 10–10<sup>3</sup> µM lower than those required for binding by indole 3-acetic acid (IAA), a typical natural AhR ligand [8].

As mentioned earlier, AhR activation tends to be weakened by glycosidation of the parent AhR ligand. This tendency has been observed even for flavonoid ligands [4]. In the present study, nepitrin (**15**) and homoplantagenin (**16**), which are flavone glucosides, were found to have noticeable AhR activity.



Some compounds characterized as potential AhR agonist candidates in the current study have been reported to have various biological functions beneficial to human health. For example, lipolytic, antilipogenic, and antiproliferative activities have been identified as biological properties of cirsimaritin (**14**) [17], and nepitrin (**15**) has been reported to have anti-inflammatory and gastroprotective activity [18,19]. Recently, several studies have reported that activation of AhR may be involved in various immune responses as described above; therefore, natural AhR ligands are expected to have beneficial regulatory roles in humans, mediating anti-allergy and anti-cancer effects. Further studies on AhR-activating ingredients derived from natural foods may clarify both the physiological significance of the AhR and the benefits derived from food constituents.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

$^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 126 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) were recorded on a Bruker AVANCE 500 instrument (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA), and chemical shifts are given in ppm values relative to those of the solvents [chloroform-*d* ( $\delta_{\text{H}}$  7.26;  $\delta_{\text{C}}$  77.16), methanol-*d*<sub>4</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.30;  $\delta_{\text{C}}$  49.0), dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*<sub>6</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.50;  $\delta_{\text{C}}$  39.5), and acetone-*d*<sub>6</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.04;  $\delta_{\text{C}}$  49.0)] on a tetramethylsilane scale. The standard pulse sequences programmed for the instrument (AVANCE 500) were used for each 2D measurement (COSY, HSQC, and HMBC).  $J_{\text{CH}}$  was set at 10 Hz in HMBC. Electrospray ionization (ESI)-MS, and high-resolution (HR) ESI-MS spectra were obtained using a micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) mass spectrometer with acetonitrile as the solvent. UV spectra were recorded on a Shimadzu UVmini-1240 system (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The reversed-phase (RP) HPLC conditions were as follows: column, L-column ODS (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  2.1 mm i.d.) (Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan); mobile phase, 5% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) (0–30 min, 0%–50% B in A; 30–35 min, 50%–85% B in A; 35–40 min, 85%–85% B in A); injection volume, 2  $\mu\text{L}$ ; column temperature, 40  $^{\circ}\text{C}$ ; flow rate, 0.3 mL/min; and detection, 200–400 nm. TLC was performed on Silica Gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck, Darmstadt, Germany), and the spots were visualized under a UV lamp (254 nm). Column chromatography was conducted using Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Little Chalfont, England), MCI Gel CHP-20P (75–150  $\mu\text{m}$ ) (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan), YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan), and Silica Gel 60 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) columns.

#### 3.2. Samples and Reagents

The reagents used in the present study were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) and Nacalai Tesque, and 37 health food materials, as shown in Table 1, were obtained from Uchida Wakanyaku Ltd. (Tokyo, Japan), Tochimoto Tenkaido Ltd. (Osaka, Japan), and Nagaoka Perfumery Ltd. (Osaka, Japan). The species were identified by the Herbarium of the College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, where the voucher specimens were deposited. All other chemicals were of analytical reagent grade.

### 3.3. Extraction

The health food samples were prepared as follows: The materials (1 g) were homogenized in aqueous ethanol [ethanol/water (4:1)] (30 mL) for 10 min and filtered. The filtrates were concentrated under reduced pressure and freeze-dried.

### 3.4. Isolation of Compounds from Cassia Seeds

Cassia seeds (400 g) purchased from Uchida Wakanyaku Ltd. were homogenized in 80% ethanol [ethanol/H<sub>2</sub>O (8:3)] (4 L), and a concentrated solution (*ca.* 0.15 L) was extracted successively with *n*-hexane (0.45 L) and ethyl acetate (0.45 L) to obtain the respective *n*-hexane (6.14 g), ethyl acetate (1.54 g), and water (34.47 g) extracts.

The ethyl acetate extract (0.7 g) was chromatographed over a Sephadex LH-20 column with ethanol to give 10 fractions (Frs. 1–10). Frs. 2 and 3 (50 mg) were subjected to preparative TLC [ethyl acetate/methanol (3:1), *n*-hexane/ethyl acetate/acetic acid (10:5:2), and then chloroform/methanol (95:5)] to give chryso-obtusin (**1**) (2 mg), obtusifolin (**2**) (2 mg), obtusin (**3**) (2 mg), aurantio-obtusin (**4**) (2 mg), and obtusin 2-*O*-glucoside (**5**) (2.6 mg). Fr. 5 (100 mg) was similarly purified with preparative TLC [chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O (14:6:1)] to afford aurantio-obtusin 6-*O*-glucoside (**6**) (2.7 mg), nor-rubrofusarin 6-*O*-glucoside (**7**) (11 mg), and 6-hydroxymusizin 8-*O*-glucoside (**8**) (2.1 mg). Fr. 4 (180 mg) was subjected to column chromatography over silica gel 60 ( $\phi$  2.0 × 20 cm) with chloroform/methanol (9:1) to give obtusin 2-*O*-glucoside (**5**) (4.1 mg). These known compounds were identified by direct comparison with valid standards or by comparison of their spectral data with those reported in the literature [20,21].

### 3.5. Isolation of Compounds from Rosemary

Rosemary leaves (526 g) provided by Nagaoka Perfumery Co. Ltd. were homogenized in 80% ethanol (ethanol/H<sub>2</sub>O 8:2) (5 L), and a concentrated solution (*ca.* 0.15 L) was extracted successively with *n*-hexane (4 L), ethyl acetate (4 L), and *n*-butanol (4 L) to give the respective *n*-hexane (6.14 g), ethyl acetate (1.54 g), *n*-butanol (14.84 g), and water (34.47 g) extracts. The ethyl acetate extract (1 g) was chromatographed over Sephadex LH-20 with ethanol to give eight fractions (Frs.1–8). Frs. 2–8 (876 mg in total) were combined and further subjected to column chromatography over YMC GEL ODS-AQ and MCI Gel CHP-20P columns with aqueous methanol to yield vanillic acid (**9**) (2 mg), caffeic acid (**10**) (2 mg), rosmarinic acid (**11**) (82.8 mg), cirsimaritin (**12**) (2 mg), ladanin (**13**) (2 mg), salvigenin (**14**) (1.5 mg), nepitrin (**15**) (13.5 mg), homoplantagin (**16**) (6 mg), and 6''-*O*-(*E*)-feruloylnepitrin (**17**) (2 mg). These compounds were identified by direct comparison with authentic specimens or by comparison of their spectral data with those reported in the literature [22–25].

### 3.6. Estimation of AhR Ligand Activity

The extracts and compounds were dissolved in DMSO and evaluated for AhR-binding activity using a luciferase assay (CALUX assay). The CALUX assay for AhR ligand activity was conducted as follows. Mouse hepatoma HIL1 cells (*ca.*  $1.5 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 96-well culture plates, and the samples were dissolved in DMSO and then added at final concentrations of  $1-10^2$   $\mu$ g/mL (or

$\mu\text{M}$  in compound)] in three steps in fractions. The final DMSO concentration was 1% in the cell culture medium. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h for optimal expression of luciferase activity. After incubation, cell viability was confirmed using a microscope. Subsequently, the medium was removed and the cells were lysed. After addition of luciferin as the substrate, luciferase activity was determined using a luminometer (Centro LB960; Berthold, Bad Wildbad, Germany) and recorded as RLU. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least two or three independent determinations for each experiment. Statistical significance was analysed using the Student's *t* test.

#### 4. Conclusions

In this study, we examined the effects of 37 health food materials on AhR activity using a reporter gene assay and found that cassia seed and rosemary extracts elicited notable AhR activation. To characterize the AhR-activating substances within these extracts, the respective extracts were subjected to fractionation followed by estimation of AhR activity. Eight compounds were isolated and identified from the active fractions of the cassia seed extract. Among them, aurantio-obtusin (**4**), an anthraquinone, was characterized as an effective AhR-activating ligand. In rosemary, nine compounds were isolated from the active extract. Nepitrin (**15**) and homoplantagenin (**16**), which are flavone glucosides, showed marked AhR-binding activity.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, as well as Grants-in-Aid for Scientific Research (C) (No. 23500989).

#### Author Contributions

The listed authors contributed as follows: MT and HT carried out the extraction and isolation. MY and TY participated in the structural elucidation. MN and HH conducted the CALUX assay and analyzed the data. TT, RM, and RT helped interpreting the results. YA organized the study and participated in the structural elucidation. All authors approved the final version.

#### Conflicts of Interest

The authors have declared that there are no conflicts of interest associated with this study.

#### References

1. Machala, M.; Vondráček, J.; Bláha, L.; Ciganek, M.; Neča, J. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using *in vitro* reporter gene assay. *Mutat. Res.* **2001**, *31*, 347–364.
2. Fujii-Kuriyama, Y.; Mimura, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 311–317.

3. Nebert, D.W.; Dalton, T.P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 947–960.
4. Amakura, Y.; Tsutsumi, T.; Sasaki, K.; Nakamura, M.; Yoshida, T.; Maitani, T. Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by *in vitro* bioassay. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3117–3130.
5. Ashida, H.; Nishiumi, S.; Fukuda, I. An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1429–1447.
6. Wang, H.K.; Yeh, C.H.; Iwamoto, T.; Satsu, H.; Shimizu, M.; Totsuka, M. Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2171–2178.
7. Tan, Z.; Chang, X.; Puga, A.; Xia, Y. Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 771–780.
8. Kawajiri, K.; Kobayashi, Y.; Ohtake, F.; Ikuta, T.; Matsushima, Y.; Mimura, J.; Pettersson, S.; Pollenz, R.S.; Sakaki, T.; Hirokawa, T.; *et al.* Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice with natural ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13481–13486.
9. Kimura, A.; Naka, T.; Nohara, K.; Fujii-Kuriyama, Y.; Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9721–9726.
10. Quintana, F.J.; Basso, A.S.; Iglesias, A.H.; Korn, T.; Farez, M.F.; Bettelli, E.; Caccamo, M.; Oukka, M.; Weiner, H.L. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **2008**, *453*, 65–71.
11. Veldhoen, M.; Hirota, K.; Westendorf, A.M.; Buer, J.; Dumoutier, L.; Renaud, J.; Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **2008**, *453*, 106–110.
12. Kiss, E.A.; Vonarbourg, C.; Kopfmann, S.; Hobeika, E.; Finke, D.; Esser, C.; Diefenbach, A. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* **2011**, *334*, 1561–1565.
13. Hu, W.; Zhao, J.; Pei, G. Activation of aryl hydrocarbon receptor by tranilast, an anti-allergy drug, promotes miR-302 expression and reprogramming. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 22972–22984.
14. 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* **2003**, *128*, 486–492.
15. Overmeire, I.V.; Clark, G.C.; Brown, D.J.; Chu, M.D.; Cooke, W.M.; Denison, M.S.; Baeyens, W.; Srebrnik, S.; Goeyens, L. Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Environ. Sci. Policy* **2001**, *4*, 345–357.
16. Han, D.; Nagy, S.R.; Denison, M.S. Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists. *BioFactors* **2004**, *20*, 11–22.
17. Moghaddam, G.; Ebrahimi, S.A.; Rahbar-Roshandel, N.; Foroumadi, A. Antiproliferative activity of flavonoids: Influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1023–1028.

18. Agarwal, O.P. The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid. *Agents Actions* **1982**, *12*, 298–302.
19. Nugroho, A.; Kim, M.H.; Choi, J.; Beak, N.I.; Park, H.J. *In vivo* sedative and gastroprotective activities of *Salvia plebeian* extract and its composition of polyphenols. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 1403–1411.
20. Li, X.C.; Dunbar, D.C.; Elsohly, H.N.; Jacob, M.R.; Nimrod, A.C.; Walker, L.A.; Clark, A.M. A new naphthopyrone derivative from *Cassia quinquangulata* and structural revision of quinquangulin and its glycosides. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1153–1156.
21. Yun-Choi, H.S.; Kim, J.H. Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, V. Anthraquinones from seeds of *Cassia obtusifolia* and related compounds. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 630–633.
22. Begum, S.; Wahab, A.; Siddiqui, B.S.; Qamar, F. Nematicidal constituents of the aerial parts of *Lantana camara*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 765–767.
23. Ly, T.N.; Shimoyamada, M.; Yamauchi, R. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3786–3793.
24. Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E.; Huang, T.C.; Ho, C.T. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4869–4873.
25. Pérez-Fons, L.; Garzón, 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.* **2010**, *58*, 161–171.

*Sample Availability:* Samples of the compound **11** are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## Ⅱ. 寄稿『食の安心・安全に関する情報』

### 1. 食の安全とは

敵山 智香子

(国立医薬品食品衛生研究所安全情報部)

#### 1. 食品の安全性について

この会報には食品の安全性について何度か寄稿させて頂いており、繰り返しになるが改めて食品の安全性を消費者を中心に考えるとどうなるか、ということについて記述してみたい。出発点は、食品は膨大なリスクのかたまりである、というところである。

食中毒や食生活のバランスの悪さに由来する生活習慣病などは食物媒介性疾患Food-borne diseaseと呼ばれる。人類にとっては、生きるために必要な食料の確保が大切だった時代が長く、多くの人に十分な食料がいきわたるようになったのはつい最近の、先進国のみでの特殊事情でしかない。とりあえず食べてもすぐにはおなかをこわしたり病気になったりしないものを我々は食品としてきた。普通に食べている食品が安全だとみなされている根拠は「食習慣があるから」である。つまり今までの経験上、目に見える有害影響が知られていない、ということ。「安全」だと解釈しているだけである。しかしながら平均寿命80年を超えるというのはごく最近の出来事であり、たとえば80年間食べ続けてやっとな有害影響が出る、というようなものがあったとしたら、それはこれまでの経験からはわかるはずがないのである。典型的な例として、数年前に秋田県を中心にスギヒラタケというキノコを食べたことに関連する脳症の事例が報告されたが<sup>1)</sup>、その患者の多くは腎臓透析患者であった。透析患者ではスターフルーツでも脳症の症例報告があり、台湾では透析患者はスターフルーツを食べないようにという注意が出されている。腎臓透析や臓器移植のような、重大な基礎疾患をもちながら長生きする人たちがそれなりの数になる、という状況は最近のことであり、「食経験」などはない。それでも食べなければ生きられない以上、我々は壮大な人体実験をしている、というのが現状である。もちろん我々にはこれまで積み重ねた知識があるので、やみくもに突き進んでいるわけではないのだが、それでもわからないことだらけであり、食品のリスクがすべて理解できて管理できるようになる時代が来るとは誰も思っていない。

#### 2. 「安全」の意味は時代や地域によって変わる

「安全」という言葉は専門家とそうでない人たちとの間で意味が全く違うようである。食品の場合、安全である、というのは「リスクがないこと」を意味するのではなく、「リスクが許容できる程度に小さいこと」を意味する。しかも「それが意図された用途で適切に使用された場合に」という条件がつく。当然のことであるが、食品は食べるものである。食品を注射したり顔や皮膚に塗ったりするのは食品としての使用範囲を逸脱しているので、安全性は保証されない。注射は論外として、小麦の加水分解物を含む石鹸で小麦アレルギーになったという事例があった<sup>2)</sup>が、食品を皮膚に塗ることによってアレルギーになったという事例はそれほど稀ではない。野菜や果物を「天然だから安全」として食品以外の用途で使うことは避けるべきである。また特定の食品にアレルギーのある人もいるが、誰かがその食品でアレルギーになったか

らといって食品そのものを安全でないとして排除することはできない。アレルギーのある人は避ける、というのも適切な使用条件になる。加熱して食べるものを生で食べる、というのも不適切使用であり、熱すぎるものや冷たすぎるもので怪我をする場合もある。液体窒素を入れたカクテルを飲んで胃を切除することになったという事例が最近海外で報告されている。食べ物を凍らせるのに液体窒素を扱う店は日本にもあるが、一般常識があれば液体窒素そのものを飲食することにリスクがあるのはわかるはずであり、だから飲食店での液体窒素の使用を禁止する、ということにはならないであろう。包丁が傷害事件に使われたからといって包丁を禁止しないのと同様に、食品を「安全」に取り扱い、飲食するにはそれなりに条件がある。逆に言うと調理を含めて、「食べる」という行為には常に相当なリスクが伴うのである。

より大きな問題は「許容できる程度」とはどの程度か、ということである。図1は昭和の中期から最近までの、厚生労働省に届け出があった食中毒による死者数である。あくまで食中毒として届け出られたもののみなので実数はこの数十倍はあるであろうと考えられているものではあるが、昭和30年代には届け出があったものだけで年間数百人が食中毒で死亡していたのである。それが関係者の努力により改善されてきたことがわかる。この図からは、昭和の時代には「当然」あるいは「しかたない」とされたことが、平成になってからは「許容できない」と判断されるであろうことが予想できる。ところで現在の多くの消費者運動の起源がこの昭和の時代にある。残留農薬や食品添加物のような化学物質による有害影響の可能性が世間の注目を集めた時代は同時に毎年三ケタの食中毒による死亡者が報告されていた時代でもあった。当時も、そして現在も、死因のほとんどが細菌やウイルスなどの微生物やフグやキノコといった天然毒によるもので、食品に残留する農薬や許可されて使用されている食品添加物が死者を出したということはほとんどない。そして消費者運動の高まりも寄与して食品添加物や残留農薬の管理も含め、食品を製造する側の管理は大きく前進した。昭和の時代と現在とでは、食品の安全性の考え方も管理の仕方も大きく変わってきたのは食中毒患者の数だけをみても理解されるであろう。

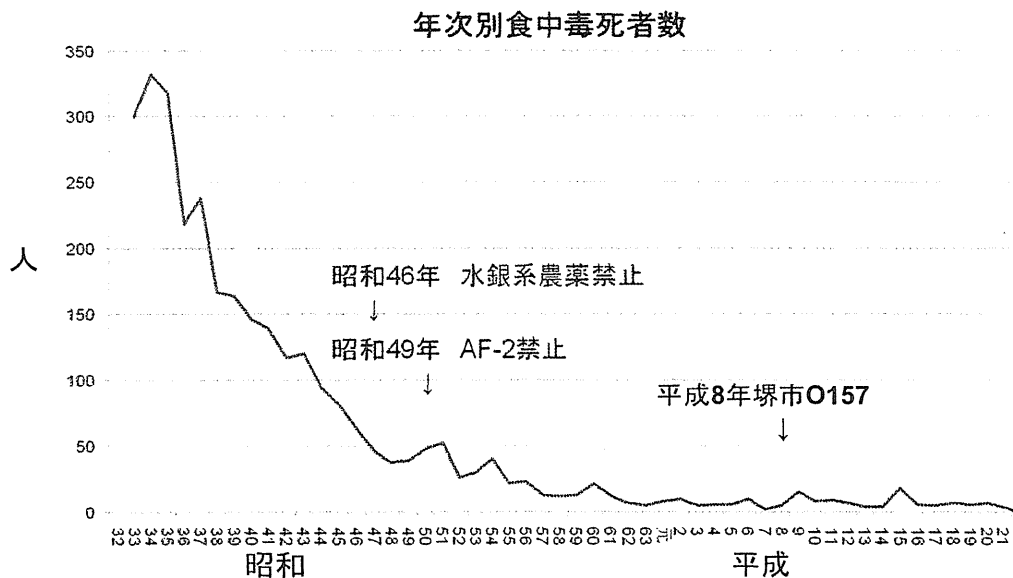


図1 食中毒による死者数

### 3. 農場から食卓まで一全ての人が役割をもつ

近年の食の安全は「農場から食卓までFrom Farm to Fork」「一貫して科学的に、脆弱なところをみつけて対処する」という基本になっている。食品の安全性のレベルを決めるのは一番レベルの低いところなのであるから、生産されてから食べるまでのすべてのルートで漏れなく安全性を確保する必要がある。生産者には生産者の責任があるし流通過程も大切であるが食べる場所では消費者自身も注意すべきことがある。たとえば発がん性については、指定添加物は全く心配なくていいという状況になっている一方で、家庭で料理をする場合に、ちょっとよそ見をしていて焦がした、とか焼きすぎた、という場合には食品添加物なら到底許容できない量の遺伝毒性発がん物質ができてしまうのである。つまりアクリルアミドや多環芳香族炭化水素といった遺伝毒性発がん物質をできるだけ減らしたいと思うのであれば、食品添加物を気にすることは全く意味がなく、むしろ家庭での調理の温度や条件を気にするべきなのである。ほかに、農場から早朝冷蔵庫つきの輸送車で店舗までコールドチェーンを保って新鮮な野菜を運んできて、家庭での保管状況が悪かったら意味がない。新鮮な野菜を宅配、というような場合でも、「昨日とれた野菜を室温で配送して玄関前におきっぱなし」より「三日前採取の野菜をコールドチェーンを保って保管」のほうが鮮度がいい場合がある。そういう生産から消費までの全ての工程を俯瞰して見ていくと、一番リスクが大きく、管理ができていない部分が家庭だということがあり得る。市販品には品質管理や流通工程で複数の人の手を経るため何らかのチェックが働く場合が多いが、家庭で栽培したもの、あるいは山野から狩猟・採集したものについては他人の目による監視はなく全て自己責任になる。

また先進国では食品が原因となる健康影響の最大のもは肥満や高血圧などの非伝染性疾病、生活習慣病であり、これについては個人が何をどのくらい食べるのか、による部分が大きい。行政などが生産者や製造業者に対して市販されている個々の商品の安全性をいくら厳しく指導し管理しても、それをひとりひとりの消費者に「適切な量食べさせる」ことまではできない。多くの国が肥満の増加に悩み、食生活についての教育・啓発キャンペーンやテレビCMなどの宣伝についての規制、食品の栄養成分表示、脂肪や炭酸飲料などへの課税など、様々な政策でなんとか消費者の行動を変化させようと努力してきたが、これまでほとんど成果はあがっていない。企業に対して特定の添加物の使用を禁止したり食品のカロリー表示を求めたりするような場合には、企業は大抵指示に従う。ところが一般消費者に対して「健康的な食生活」を薦めてもほとんど効果がない。消費者の立場からこれを考えると、「健康的な食生活」というのは一人一人具体的内容が異なるので、漠然と薦められても何をどうすればいいのか不明であるし、自分が「健康的」だと思っていることが実際には健康的ではないような場合もあるであろう。ここで必要になるのは自分の健康状態と食品に関する正確で適切な情報の入手と日々の実践のための援助であろう。そうすると消費者の学習機会の拡大と適切な情報提供のために、管理栄養士などの専門家の知識を活用する一方、間違った健康情報を拡散しているメディアや「いわゆる健康食品」販売企業などの問題を指摘する活動がより活発になることが望ましい。実際消費者庁の栄養成分表示検討会では、食品の栄養成分表示を生かすためには消費者が「関心を持ち、内容を理解し、適切な食生活の実践のための活用が図られるよう」普及啓発を進めることが重要である、という報告書を発表している<sup>3)</sup>が、この消費者への普及啓発が最も困難な課



題であると認識されていた。現実には管理栄養士は一般の健康な人とはなかなか接点がないし、消費者団体は安全性とは関係のない産地表示などを事業者に求めることに終始しているようであるのが残念である。

#### 4. 消費者も食品のリスク管理方法を決めている

食品の安全性についてのリスク評価は、科学的に行われるのでほぼ一定の結論がでる。一方そのリスクをどう管理するか、については、方法は一つではない。仮に生活習慣病の予防のための対策を考えた場合、個人の選択に任せて全く何もしない、という選択肢から、実験動物並みに全てを管理して決まったものしか食べさせない、という選択肢までの間に多様なバリエーションがあり得る。どのような対策が一番望ましいかは科学のみでは決めることができない。どれだけのお金と手間（資源）を費やすことができるのかという、主に経済的な制約もあるし、消費者の行動も関係する。

例えば魚には天然にメチル水銀が含まれ、これは特に胎児の神経系の発育に有害影響があることがわかっている。どのくらいの量を食べると胎児に影響が出る可能性があるのかを科学的評価で決めることはできる<sup>4)</sup>。食品安全委員会は妊娠している人または妊娠可能性のある人を対象に、メチル水銀の耐容週間摂取量を $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週（Hgとして）という数字を出した。それを達成するために具体的にはどういう管理をするかについては様々なオプションがあり得る。魚に水銀の基準値を設定してそれを超える魚を販売しない、というのがひとつの方法ではあるが、基準値を設定する場合にもどういう食べ方をするという仮定を用いるか、実行可能かなどによって数値は変わってくる<sup>5)</sup>。もともとが天然物であるため魚の種類によって含まれる濃度が違い、高濃度のものを全て禁止するという方法を採用すると、マグロや鯨といったものは食べられなくなる。一方比較的高濃度の水銀を含む魚については、ハイリスクグループである妊婦に対して注意喚起をするという方法も採用されている<sup>6)</sup>。「基準値」の運用に関しても、数をたくさん検査して少しでも基準値違反があれば廃棄するという対応も可能だし、妊婦さんのような特定の集団がきちんと助言に従っていればそれほど大きな問題はないためあまり細かい検査はしない、という対応も可能なのである。日本人は特にマグロが大好きで、大きなマグロには何百万円という高値が付く。水銀は魚が大きいほど濃度が高くなる傾向があるので、高価なマグロほど、もし厳密に検査をしたら「基準値を超える」可能性が高い。しかし高価なマグロは高価であるがために一人の人が大量に食べることはありそうにないとも言える。多分日本では、初セリなどで高値が付いたマグロに水銀の検査を主張するのはあまり良いこととは思われないであろう。（一方で放射性物質については検査数も膨大でわずかな超過も見逃すことは許されないかのようなようである。それどころか、基準値以内でも検出されたら販売しないとしているところすらある。）魚の水銀については、米国なら、FDAはそういうことはしないが、水銀を懸念する市民団体などが検査をして食べるなど主張している。また妊婦さん向けの助言にしても、どの種類の魚をどのくらい食べればいいのかというのはそれほど単純なことではないので、伝える側の工夫ももちろん必要であるが受け止める側の理解度も重要になる。妊婦向けの助言なのに子どもを産むこととは関係がなさそうな高齢男性まで魚を食べなくなったり、あるいは妊婦がどういう魚を食べるのがいいのか考えるのが面倒だから全く魚を食べなくなって

胎児の神経系の発育に必須のオメガ3脂肪酸まで不足してしまうようなことは望ましくない。消費者に選択させても無理だと見なされるような社会では、魚を食べることを一切禁止した上で脂肪酸サプリメントを摂らせた方がいいという結論になるかもしれない。このように消費者の嗜好や助言に対する理解度などによってリスク管理の方法は多様である。リスクがある場合でも法による規制だけが管理の方法ではない。消費者自身が意識しているかどうかとは別に、消費者もリスク管理の方法を決めるのに関与しているのである。従って、資源を無駄にすることなく、消費者の選択の自由も確保しつつ、より合理的なリスク管理を行うためには消費者の「力」が必要になる。

## 5. 食の安全確保に終わりはない、常に進歩し続ける

食品がもともと未知のリスクの塊であることから、新たにリスク要因が発見されることもある。また既知の膨大なリスクのうちでもとりあえず大きなリスクから順番に対策していくとして、一つのリスクへの対策ができたなら次の優先順位別のリスクの管理方法を検討する必要がある。新しい技術による変化もあれば消費者のライフスタイルの変化により変わってしまうリスクもある。また日本は順調な経済の発展とともに、食品の安全性は年々向上してきたが、国が貧しくなるようなことがあれば安全性の水準を下げてでも食料を確保する必要に迫られることがあるかもしれない。これからの時代には、そういう困難な状況であっても対応できるような、しっかりした科学的根拠をもとに判断できる柔軟な能力が消費者にも求められている。そのような望ましい能力を身につけた消費者を増やしていくためには、日本食品安全協会のような活動がもっと盛んになる必要があるだろう。

### <参考資料>

- 1) スギヒラタケの摂取について（注意喚起）食品安全委員会  
<http://www.fsc.go.jp/sonota/sugihiratake/index.html>
- 2) 小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく」を使用したことにより発症する小麦アレルギーに関する情報センター  
<http://www.allergy.go.jp/allergy/flour/001.html>
- 3) 栄養成分表示検討会情報  
<http://www.caa.go.jp/foods/index9.html>
- 4) 魚介類等に含まれるメチル水銀について 食品安全委員会  
<http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyouka-methylmercury.pdf>
- 5) 食品安全に関するリスクプロファイルシート（メチル水銀）農林水産省  
[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/pdf/090306\\_me\\_hg.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/090306_me_hg.pdf)
- 6) これからママになるあなたへ お魚について知っておいてほしいこと-厚生労働省  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/051102-2a.pdf>

# 食品中化学物質のリスク評価について

## —自社製品についてリスクプロファイルを作成しよう

国立医薬品食品衛生研究所  
安全情報部 第三室長

畝山 智香子



### 要 旨

食品は化学的には無数の化合物のかたまりであり、その中には構造や性質がわかっているものから全く不明のものまでが多数存在する。私たちはその全てについて知っているわけではないが、それでも製品を安全だとして販売したり、購入して調理して食べたりしている。加工食品の場合、製造業者は食品をゼロから合成するわけではなく原材料を購入し、加工して販売しているのであるが、消費者にとってはその製品の安全性については製造・販売業者に全責任があると考えられるだろう。実際に商品の原材料や加工工程について最も多くの情報をもっているのは製造業者であろう。従ってその製品にとって何がリスクになりうるのか、どういう注意が必要なのかについては事業者自らが評価しておくことが望ましい。カラメル色素の不純物を例に、リスクプロファイルの作成を薦める。

\*\*\*\*\*

### <Summary>

Food consists of many chemical components which properties are known or unknown. We don't know them exactly, though we are selling, buying, cooking and consuming them as deemed safe. Food manufacturers produce prepackaged foods from many ingredients bought from other companies or farmers. They do not synthesize food from pure chemical, but it is manufactures' responsibility for safety and quality of the products from consumer's point of view. Actually, it is the manufacture that knows best about the products, for example, how they are processed, what ingredients are used and so on. It is the reason why manufactures are recommended to assess the risk and provide risk management procedure ahead. This paper presents an example, 4-methylimidazole, a contaminants in caramel colors.

### 1. はじめに

食品には意図的に加えられたものも、そうでないものもあわせて無数の化合物が含まれているが、その全てを知ることは不可能である。現代の日本でも食中毒はそれなりの頻度で発生しているのだが、消費者の間には食べることが時に命の危険を伴うものだという認識はほとん

どなく、食品は「安全で安心」なのが当然だという感覚が広がっているようだ。そして近年の分析技術の進歩もあって、時に思いがけないものが食品から検出されたということがニュースになる。問題なのはそれがどの程度の量でどの範囲の食品に入っているか、なのであるが、検出されただけで危険だ、許されない、といった論調が相変わらず多い。食品中に含まれる化学物質のリスク

Risk Assessment of Chemicals in  
Food - Recommendation of Voluntary  
Assessment of Your Own Products

CHIKAKO UNEYAMA Ph.D.  
Division of Safety Information on Drug, Food and Chemicals  
National Institute of Health Sciences  
Ministry of Health and Welfare

は、残留農薬や食品添加物のように意図的に使用されるものについては極めて低くなるように管理されている。しかし意図せず含まれるものについては必ずしもそうではなく、さらにリスク評価ができるほどのデータが無い場合もある。それでもその食品の製造・販売業者には消費者の疑問に答える、あるいは不安に対応する必要がある。そこで推奨したいのが自社製品に存在するハザードについて、リスクプロファイルを準備しておくことである。もともと製品についてよく知っているのは事業者のほうである。食品の安全性を担当している行政機関は、どんなに優れた能力を持っていたとしても、個別製品の製造工程や原材料の入手先などの詳細については企業からの情報提供がない限り、わからないのである。最も良く知っているところが最も良いプロファイルを作ることができるはずである。

## 2. カラメル色素の 4-MEI を例に

最近米国で話題になり、韓国や日本でも一部が取り上げたカラメル色素中の不純物である 4-メチルイミダゾール (4-MEI) を例にリスクプロファイルを考えて

みよう。なおこれは、筆者が公開されているデータのみをもとに試作したものであり、事業者であれば個別の製品の実際の使用量などのデータが使えるはずである。

### (1) レベル 1 ― 目でわかる簡単なまとめ

できるだけ簡単に、一目で全体が把握できるようなものを作る。順番として最初にもってきたのは、情報を知りたい人 (例えば消費者相談窓口のオペレーターが消費者からの質問にすぐに答えたい時など) にとってそれが真っ先にあると便利だからで、作成手順としては詳細データをレビューした上で、最後になる。

BfR (ドイツ連邦リスク評価研究所) のリスクプロファイルの様式を一部改変して使うと表 1 のようになる。このフォーマットは全ての化合物に共通で、どこに色が付いているかで判断する。コーラ飲料に使われるカラメル色素中の不純物としての 4-MEI については比較的簡単に、安全上問題となることはない判断できる。

### (2) レベル 2 ― リスクプロファイルシートの作成

よく使われるリスクプロファイルシートの形 (表 2) を使ってみた。

表 1 カラメル色素の 4-MEI  
Table 1 Risk Profiles of 4-MEI in Caramel Colors (short version)

対象となる集団	コーラを飲む一般人			
健康被害の可能性	通常の摂取で健康被害ができる可能性はない			
健康被害の重症度	なし	僅かな影響 可逆/不可逆	中程度の影響 可逆/不可逆	重大な影響 可逆/不可逆
入手できるデータの信頼性	高い 最も重要なデータがあり 整合性がある	平均的 いくつかの重要なデータが不足しているあるいは矛盾がある		低い 重要なデータが無い、 あるいは矛盾する
消費者によるコントロール	コントロールの必要はない	予防的措置で コントロールできる	摂取を差し控えることで コントロールできる	コントロールできない

表 2 4-MEI の安全性に関するリスクプロファイルシート  
Table 2 Risk Profiles of 4-MEI in Caramel Colors (full version)

(○年○月○日)

項目	内容
ハザードの名称	4-メチルイミダゾール 4-methylimidazole CAS 番号 822-36-6 化学式 C4H6N2 分子量 82.11 同義語 1H-Imidazole, 4-methyl (9CI); imidazole, 4-methyl; 4 (5) -methylglyoxaline; 4 (5), 4 (5) -methylimidazole; 5-methylimidazole (他に構造式など)