

## **II. 分担研究報告 5**

**ダイオキシン様活性を有する新規有害物質に関する研究**

**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

ダイオキシン様活性を有する新規有害物質に関する研究

研究代表者 渡邊 敬浩 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 (DXNs) 簡易測定生物検定法 (バイオアッセイ) の他有害物質への評価応用のための基礎検討を行った。まず、基礎データの構築も目指し、そのバイオアッセイの鍵となっているアрил炭化水素レセプター (AhR) と有害物質の相互作用 (DXNs 様活性) について評価した。今回対象としたのは、まだデータの乏しい多環芳香族炭化水素類 (PAHs) およびその誘導体 (ニトロ化体, ハロゲン化体, アミノ化体) 39 種, 食品中の残留農薬 23 種, さらに食品中アミノ酸およびその代謝物 14 種について, それらの AhR 活性をバイオアッセイ (ケイラックスアッセイ) により測定した。その結果, PAHs の多くは, 顕著な AhR 活性を濃度依存的に示した。PAHs の誘導体については, 環の数が多くなれば活性が強くなる傾向が認められた。ハロゲン化体は, 塩素の数が多くなるほど活性が弱まった。ニトロ化およびアミノ化体では, 本検討だけでは置換基の数や位置で活性の強弱は考察できなかった。これら結果を踏まえ, PAHs 検出の報告がある食品 (ウイスキー, かつお節, 紅茶) について抽出物を調製し, AhR 活性を測定した。その結果, すべての試料において濃度依存的に AhR 活性が認められた。一方, 農薬では, インドール骨格を有する carbendazim, thiabendazole の 2 種の化合物に強い活性が認められた。アミノ酸およびその代謝物についても同様, インドール化合物 tryptamine に活性が認められた。

**研究協力者**

松山大学 薬学部

好村 守生, 米原 茜

国立医薬品食品衛生研究所食品部

堤 智昭

株式会社 日吉

中村 昌文, 半田 洋士

**A. 研究目的**

食品中には多様な有害物質が存在しており, これら摂取による健康リスクを評価・管理することが課題の一つとしてあげられている<sup>1)</sup>。対象となる有害物質は, 通常の食品に極微量しか含まれてないものもある。それらの健康へのリスクは非常に低く, 残

留上限の基準値を設定することがリスク管理施策となる。食品中の残留有害物質であるダイオキシン類 (DXNs) や多環芳香族炭化水素 (PAHs) といった環境汚染物質はその一例としてあげられる。

DXNs や PAHs は化合物群の種類が多く、現在の分析法においては標準品を指標に、GC/MS 分析による定量結果の総和を評価値として用いる等としている<sup>2)</sup>。一方で、分析法が煩雑で費用が高価であることから、簡易分析法の提案もなされている。例えば、DXNs においては、バイオアッセイによる簡易分析法が環境分野における公定法として採用されている<sup>3)</sup>。そのバイオアッセイで鍵となっているアрил炭化水素レセプター (AhR) は、DXNs 等の環境汚染物質をリガンドとするため別名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。DXNs の簡易分析法は、このメカニズムを利用したバイオアッセイであり、スクリーニングとして用いることが可能となっている。一方で、AhR は一部 PAHs をリガンドとし活性化されることが報告されている<sup>4)</sup>。

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。もし上述したような有害物質を簡便に、総合的にスクリーニングできるようなシステムがあり、それをを用いて総合的なリスク管理値のようなものが算出できれば、食品の安全性における新たなリスク評価・管理の施策実施に有意義である。そこで本研究では、DXNs の簡便測定法として採用されている AhR を用いた技術開発を進める。AhR については、DXNs および一部 PAHs 以外の有害物質との相互作用に関する情報が少ない。まずは基礎データの構築として、DXNs 様活性を有する有害物質の探索および活性と物質の構造相関の解明を試みる。本年度は

まだデータの乏しい PAHs (ニトロ化体、ハロゲン化体、アミノ化体を含む) 39 種および食品に残留する農薬 23 種、さらに食品成分としてあげられるアミノ酸およびその代謝物 14 種等について、AhR 活性をバイオアッセイにより評価した。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

PAHs (ニトロ化、ハロゲン化、アミノ化を含む) (39 種): benzo[*c*]fluorene, 1,2-benzanthracene (benzo[*a*]anthracene), cyclopenta[*c,d*]pyrene, chrysene, 5-methylchrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*j*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene, benzo[*g,h,i*]perylene, dibenzo[*a,l*]pyrene, dibenzo[*a,e*]pyrene, dibenzo[*a,i*]pyrene, dibenzo[*a,h*]pyrene, 1-amino-4-nitronaphthalene, 9,10-dinitroanthracene, 1,3-dinitronaphthalene, 1,5-dinitronaphthalene, 1,8-dinitronaphthalene, 2-nitroanthracene, 9-nitroanthracene, 7-nitrobenzo[*a*]anthracene, 6-nitrobenzo[*a*]pyrene, 1-nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene, 1-chloronaphthalene, 2-chloronaphthalene, 1,4-dichloronaphthalene, octachloronaphthalene, 1,2,3,4-tetrachloronaphthalene, 1-aminoanthracene, 2-aminoanthracene, 1-aminonaphthalene, 1,8-diaminonaphthalene, naphthalene, anthracene, fluorene(いずれも関東化学製)を用いた。

農薬 (23 種): malathion, chlorpyrifos, diazinon, prothiofos, pirimiphos methyl, fenitrothion, ethyl-*p*-nitrophenyl phenylthiophosphonothiate (EPN), tolclofos methyl, parathion methyl, phenthoate, chlorpyrifos methyl, methidathion, imazalil,

carbendazim, leucomalachite green, imadacloprid, acetamiprid, thiabendazole, azoxystrobin, tribenuron methyl, flufenoxuron, pyraclostrobin, kresoxim methyl (いずれも関東化学製) を用いた。

アミノ酸およびその代謝物 (14 種): tryptamine, L-tryptophan, 4-aminobutanoic acid, L-glutamic acid, tyramine, L-tyrosine, putrescine, cadaverine, L-lysine, L-arginine, histamine, histidine (和光純薬工業製), L-ornithine, agmatine (東京化成工業製) を用いた。

ウイスキー, かつお節, 紅茶は, 市販のものを用いた。抽出 (かつお節, 紅茶) は 80% エタノールでホモジナイズ後, 吸引ろ過し, ろ液を減圧濃縮して調製した。ウイスキーは原液を減圧濃縮した。

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 Perkin Elmer 社製の Enspire を使用した。

## 2. 評価方法

評価はレポーター遺伝子アッセイ [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遺伝子アッセイ (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は, ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポーター遺伝子アッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法 (ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 は, ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流域に 4 個のダイ

オキシン応答配列 DRE を含むシトクロム P450 (CYP1A1) プロモーターを持つプラスミド pGudLuc6.1 をマウス肝ガン細胞 Hepa1c1c7 に導入した細胞) である<sup>5)</sup>。具体的な評価方法を以下に記す。

ケイラックスアッセイ: 化合物および抽出物を 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 4~6 段階の濃度 (0.1~100,000 nM の範囲で 4~6 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ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 (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

供試した化合物の化学構造を図 1 に示す。また, 活性を示した化合物の AhR 活性の結果を図 2 に記す。

### 1. PAHs

PAHs (19 種) の AhR 活性について, ケイラックスアッセイによる評価した結果, cyclopenta[*c,d*]pyrene, benzo[*g,h,i*]perylene, dibenzo[*a,l*]pyrene, anthracene を除く 15 種の化合物に, 濃度依存的に顕著な活性が認められ, fluorene に弱い活性が認められた。PAHs の誘導体 (ニトロ化, ハロゲン化, アミノ化 PAHs) (20 種) について, AhR 活

性を評価した結果，強い活性が認められたのは，7-nitrobenzo[*a*]anthracene, 6-nitrobenzo[*a*]pyrene, 2-chloronaphthalene, 1,4-dichloronaphthalene, 1-aminonaphthalene で，次いで 2-nitroanthracene, 2-aminoanthracene が若干の活性を示した．このように，供試した PAHs の大半は顕著な AhR 活性を示した．一方，一部化合物（dibenzo[*a,l*]pyrene, benzo[*g,h,i*]perylene）に活性が認められなかった．PAHs の毒性に関する科学的知見の“発がん性”をみると<sup>6)</sup>，活性を示さなかった dibenzo[*a,l*]pyrene はグループ 2A（ヒトに対しておそらく発がん性がある）に，一方の benzo[*g,h,i*]perylene はグループ 3（ヒトに対する発がん性について分類できない）にリスト化されており，今回の結果だけでは本活性の有無と対応しなかった．これらが PAHs の毒性の度合いと関連しているのかどうかについては，さらなる検討が必要とされる．

近年，PAHs の誘導体（ニトロ化体，ハロゲン化体，アミノ化体）の食品への含有も懸念されている<sup>7)</sup>．そこでそれら化合物について AhR 活性を検討した結果，全体として環の数が多くなれば活性が強くなる傾向が認められた．ハロゲン化体（塩素化物）をみると，塩素の数が多い化合物は活性が弱まる傾向が認められた．ニトロ化体では，ニトロ基の数や位置で活性の強弱は考察できなかったが，環の数が 4 以上になると活性が認められた．アミノ化体では，1-aminonaphthalene で活性が認められたのみで，構造活性相関的考察はできなかった．

PAHs のケイラックスアッセイとの感度は，TCDD と比較すると約 1000 倍弱い傾向であったが，最大となる RLU は約 2 倍の値が観察された．ケイラックスアッセイでは評価する上で TCDD を基準に比較を行っているが，細胞への暴露 24 時間後の代謝物を

検出しており，TCDD より代謝物量の多い PAHs が多く認められた．DXNs と PAHs では代謝速度や関与する遺伝子が若干異なること等，起因する可能性がある．一方で，本結果は本アッセイの食品中 PAHs 分析への応用を示唆するデータでもあり，今後の応用が期待できる．

## 2. 残留農薬

食品の残留農薬 23 種について検討した結果，carbendazim, thiabendazole の 2 種の化合物に強い活性が認められた．活性を示した化合物はいずれもインドール骨格を有する化合物であった．これまでの報告から，インドール骨格を有する化合物は AhR 活性を示す傾向があるという構造活性相関的考察が示唆されており<sup>2)</sup>，本結果も同様の結果であった．

## 3. アミノ酸およびその代謝

14 種について検討した結果，tryptamine のみ活性を認めた．Tryptamine もインドール骨格を有する化合物であり，同様の結果であった．

## 4. 食品分析

PAHs の簡易分析への応用が示唆されたため，PAHs を検出した報告のある食品について抽出物を調製し，AhR 活性を評価した．その結果，ウイスキー，かつお節，紅茶のいずれの抽出物においても濃度依存的に AhR 活性が認められた．特にかつお節は活性が強く，この結果は市販食品の PAHs 分析した結果<sup>2)</sup>と対応した．

## D. 結論

DXNs 様活性を有する新規有害物質の探索および活性と物質の構造相関の解明を試みるため，PAHs（ニトロ化体，ハロゲン化

体, アミノ化体を含む) 39 種および食品に残留する農薬 23 種, さらに食品中のアミノ酸およびそれら代謝物約 14 種について, AhR 活性をバイオアッセイにより評価した。その結果, 供試した PAHs の大半は, 顕著な AhR 活性を示した。PAHs の誘導体については, 全体として環の数が多くなれば活性が強くなる傾向が認められた。ハロゲン化体は塩素の数が多くなるほど, 活性が弱まる傾向が認められた。ニトロ化およびアミノ化体では, 本検討だけでは置換基の数や位置で活性の強弱は考察できなかった。

## E. 参考文献

- 1) 松田りえ子, 渡邊敬浩: 食品からの有害物質摂取量推定とその意義, *ファルマシア*, 49 (2013), 17-21.
- 2) 平成 24 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「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 2 食品からの塩素化ダイオキシン類の摂取量調査研究, 5 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)。
- 3) 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。
- 4) Misaki K, Kawami H, Tanaka T, Handa Y, Nakamura F, Matsui S, Matsuda T: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones, *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 (2007), 1370-1379.
- 5) Tsutsumi T, Amakura Y, Nakamura M, Brown DJ, Clark GC, Sasaki K, Toyoda M: Validation of the CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs

in retail fish, *Analyst*, 128 (2003), 486-492.

- 6) 国際がん研究機構 (IARC): Some Non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 29 (2010).
- 7) 早川和夫, 唐寧, 鳥羽陽, 亀田貴之: 東アジアの有害大気汚染 - 多環芳香族炭化水素とニトロ多環芳香族炭化水素 -, *ぶんせき* (2008), 278-284.

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

- 1) Amakura, Y., Yoshimura, M., Takaoka, M., Toda, H., Tsutsumi, T., Matsuda, R., Teshima, R., Nakamura, M., Handa, H., Yoshida, T.: Characterization of natural aryl hydrocarbon receptor agonists from cassia seed and rosemary, *Molecules*, **19**, 4956-4966 (2014).

### 2. 学会発表

なし

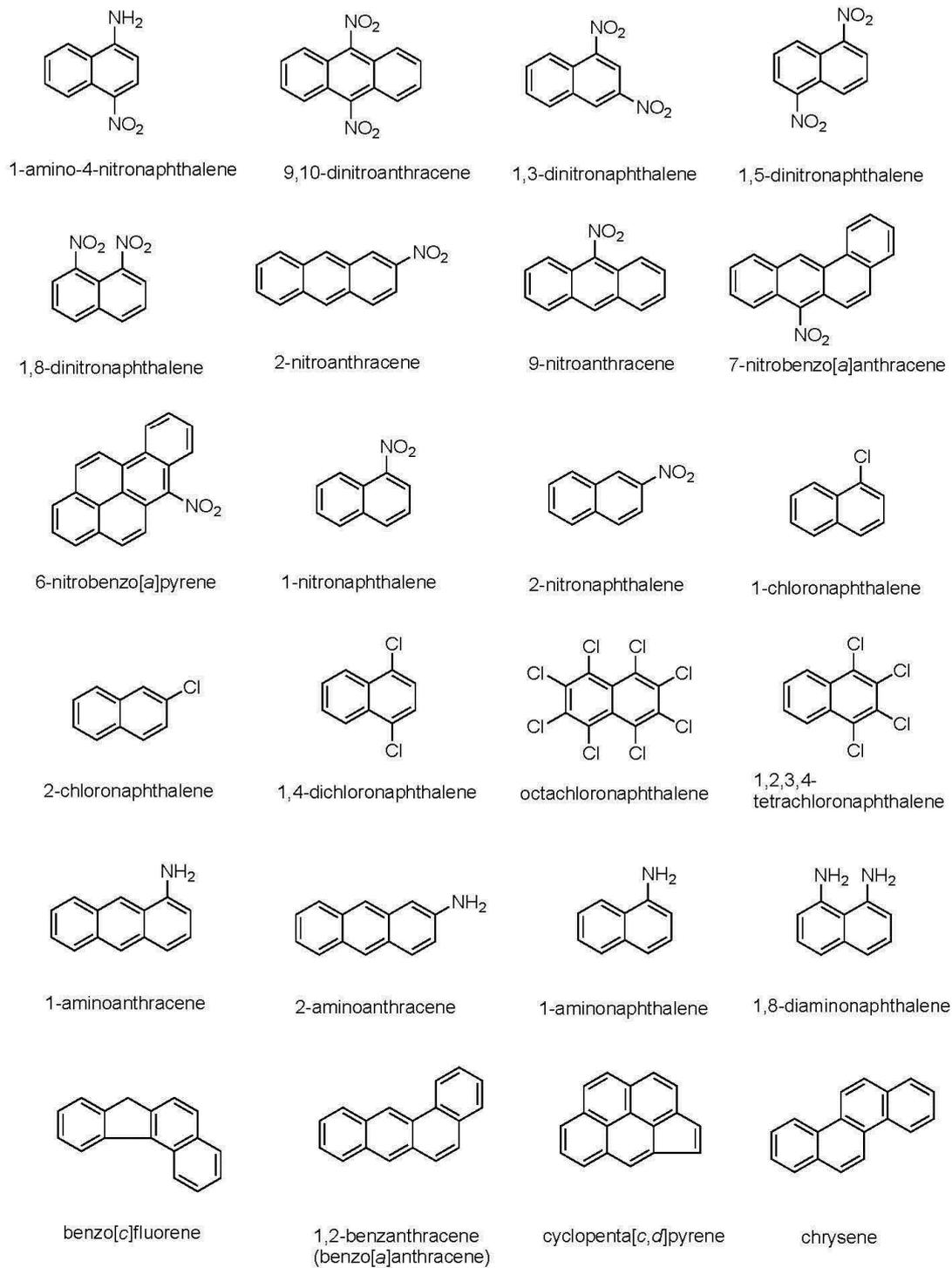


図 1 . 供試した化合物の化学構造

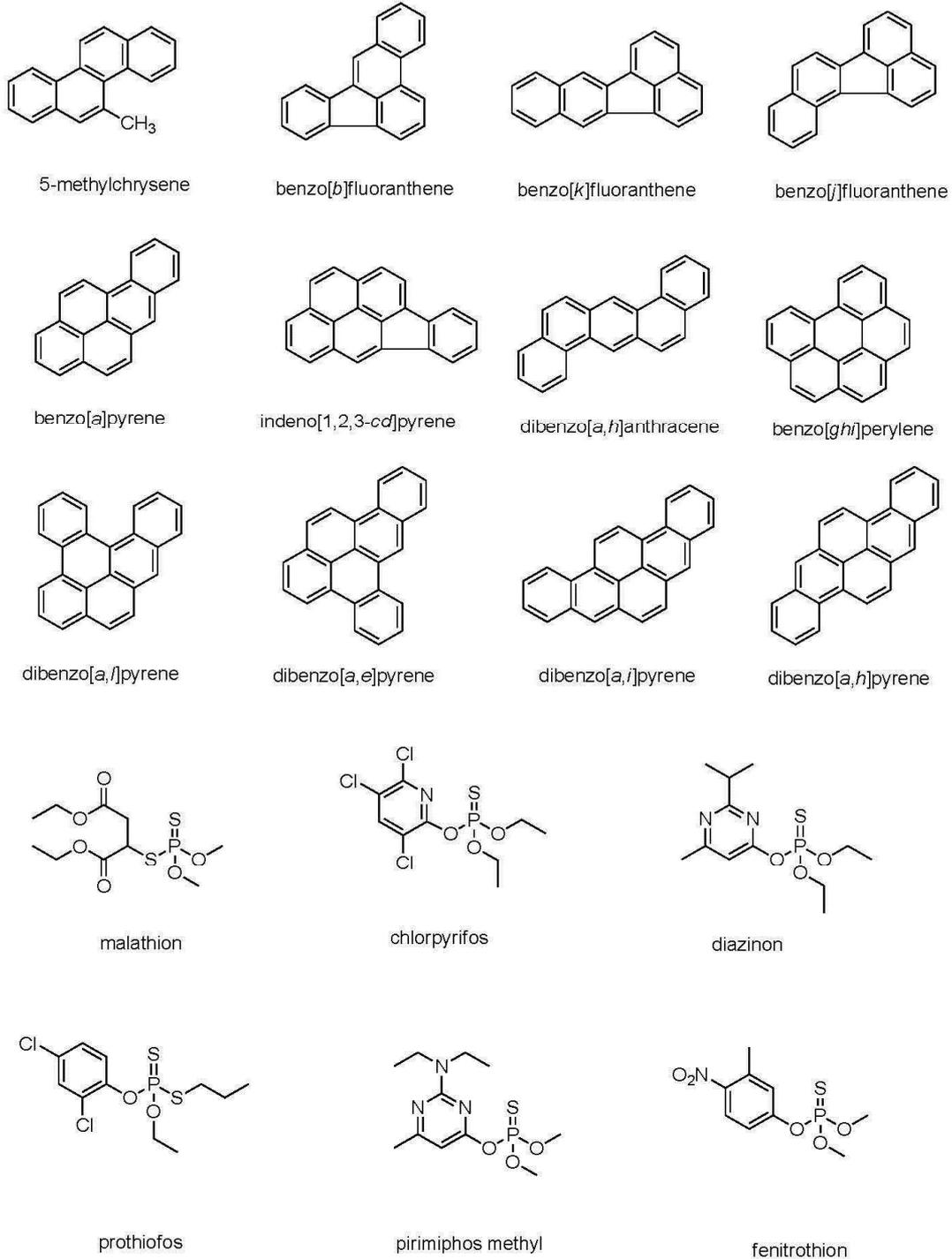
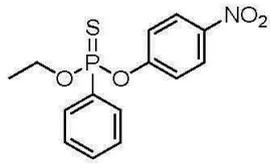
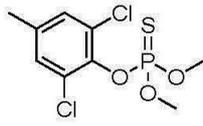


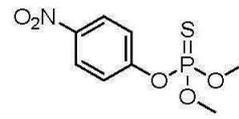
図 1 ( 続き )



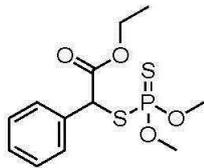
EPN



tolclofos methyl



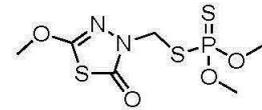
parathion methyl



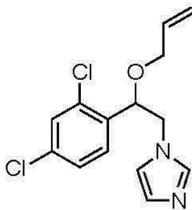
phenthoate



chlorpyrifos methyl



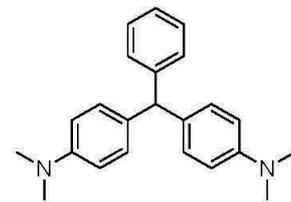
methidathion



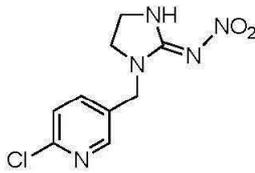
imazalil



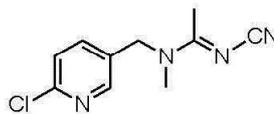
carbendazim



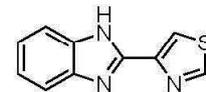
leucomalachite green



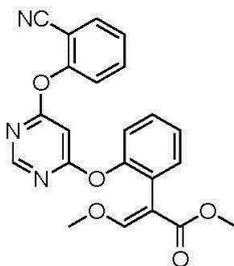
imidacloprid



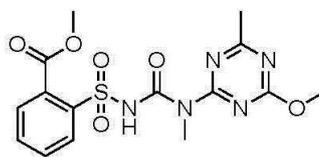
acetamiprid



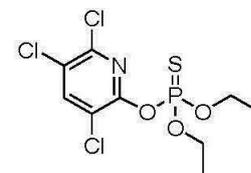
thiabendazole



azoxystorbin



tribenuron methyl

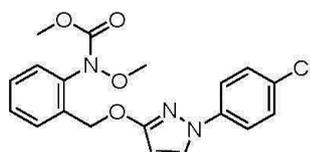


chlorpyrifos

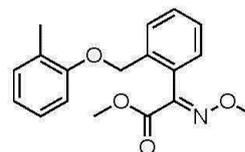
図 1 ( 続き )



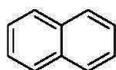
flufenoxuron



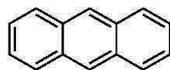
pyraclostrobin



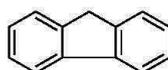
kresoxim methyl



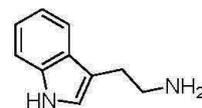
naphthalene



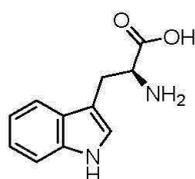
anthracene



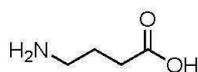
fluorene



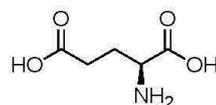
tryptamine



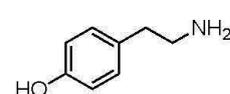
L-tryptophan



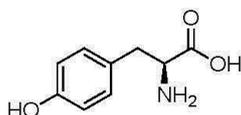
4-aminobutanoic acid



L-glutamic acid



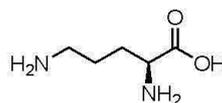
tyramine



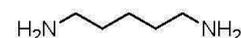
L-tyrosine



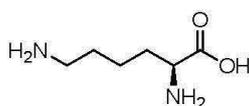
putrescine



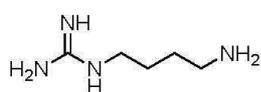
L-ornithine



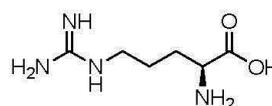
cadaverine



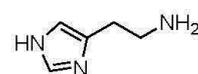
L-lysine



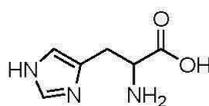
agmatine



L-arginine



histamine



histidine

図 1 ( 続き )

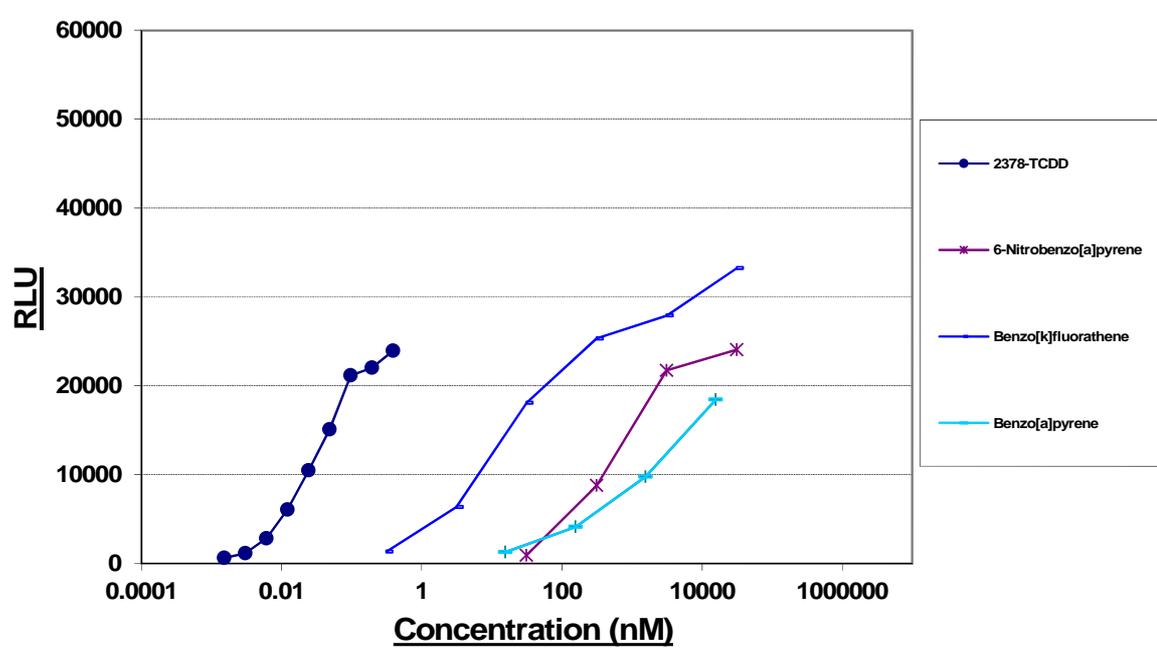
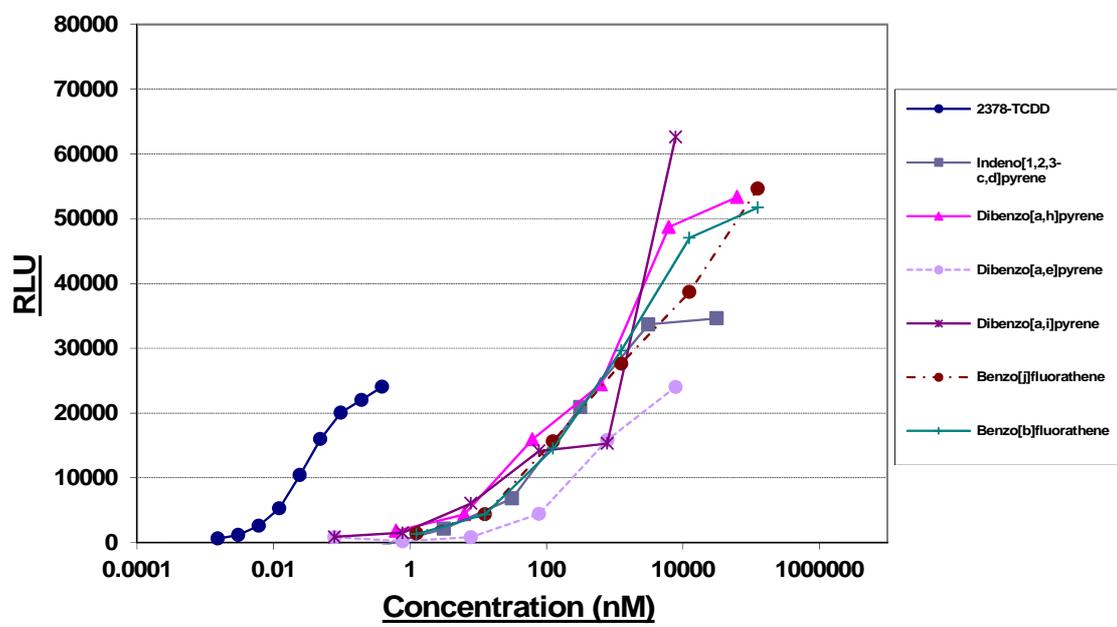


図2. 化合物の AhR 活性

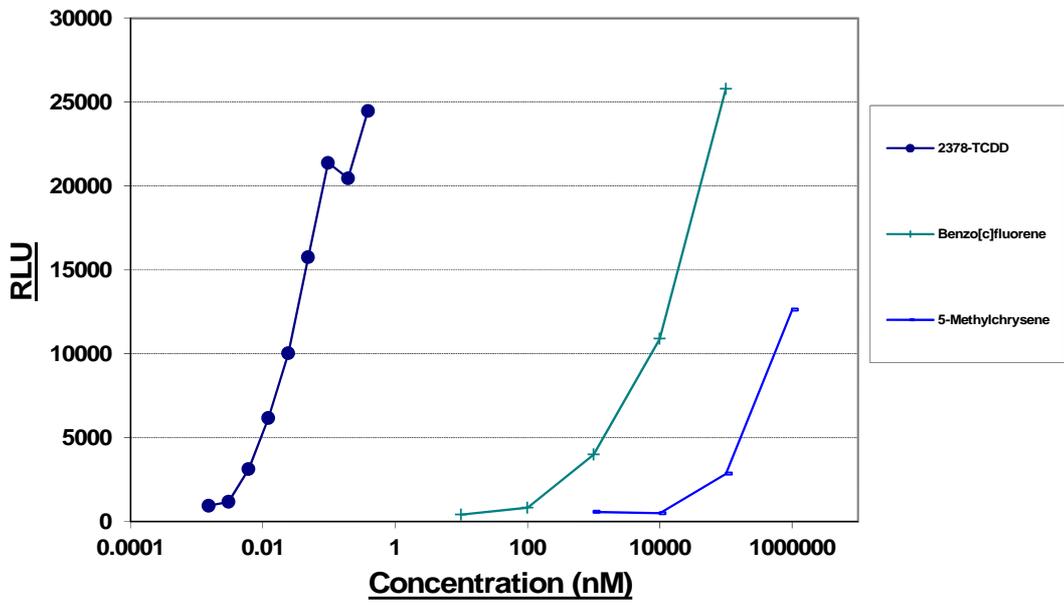
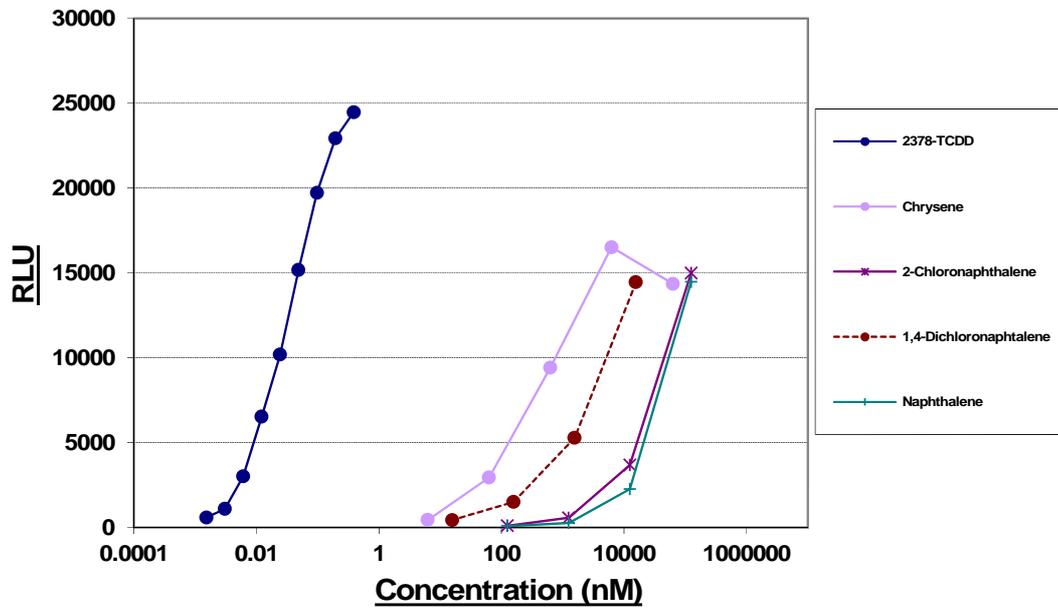


図 2 ( 続き )

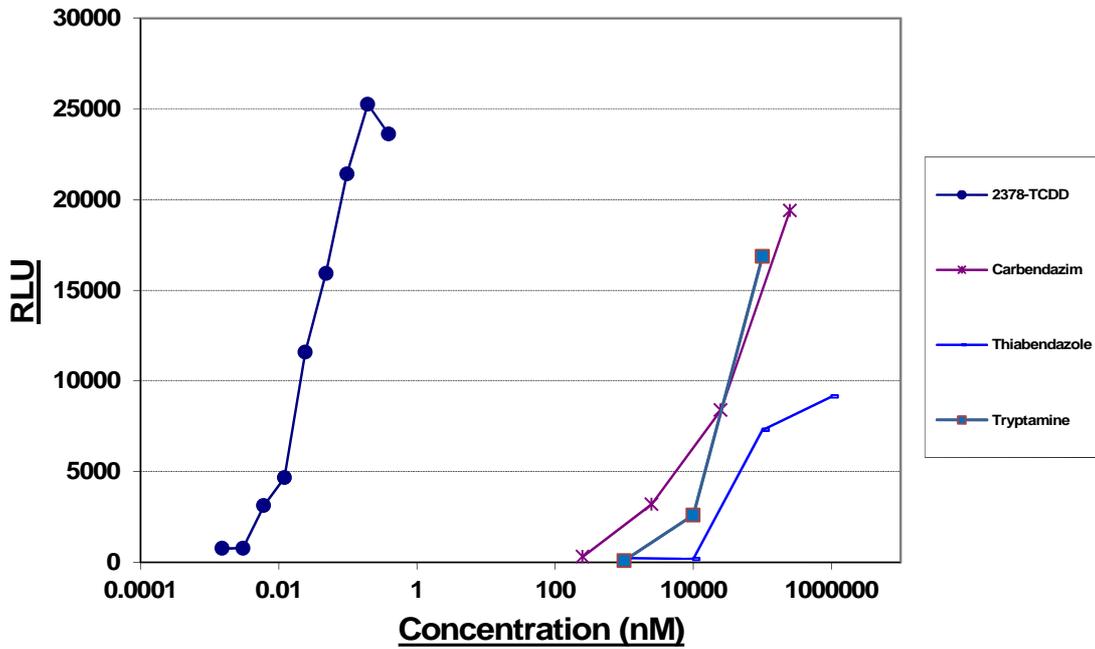
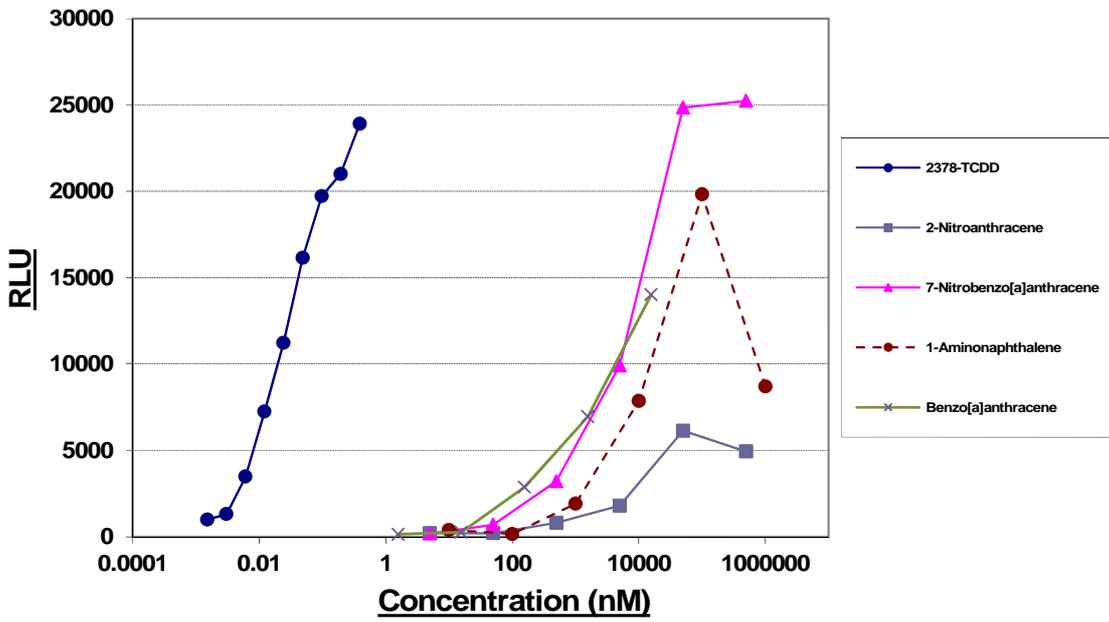


図 2 ( 続き )

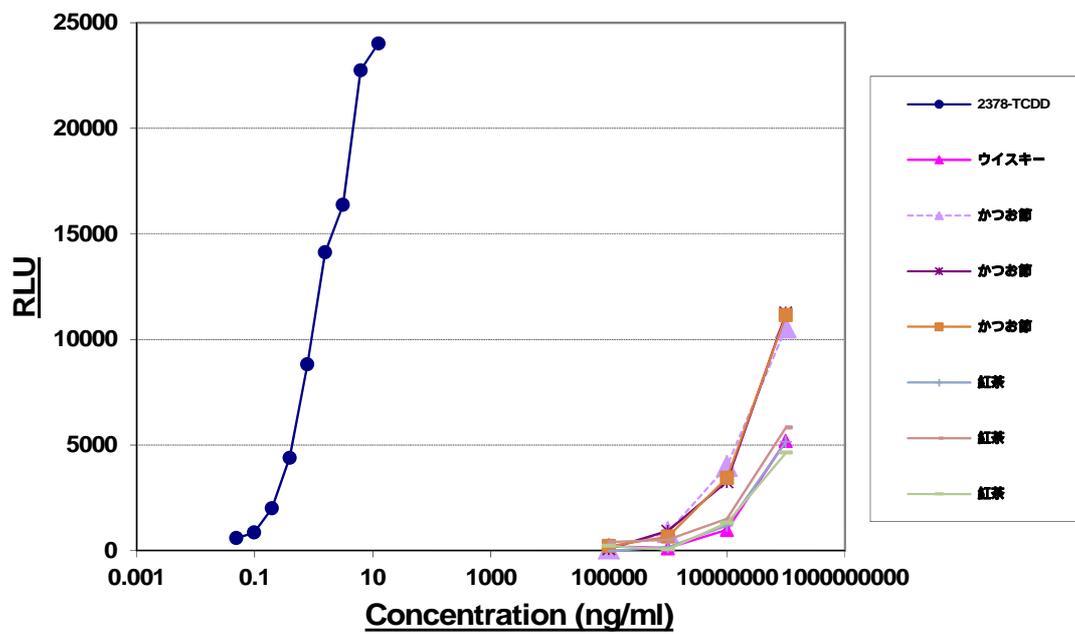


図 2 ( 続き )