

## 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。H25 年度の検討において、バイオアッセイ (ケイラックスアッセイ) による評価から明らかとなったアрил炭化水素レセプター (AhR) 相互作用 (DXNs 様活性) 物質について、他のアッセイ (ヒト由来組換え細胞によるレポーター遺伝子アッセイ及び酵母を用いたアッセイ) による評価を行い、ケイラックスアッセイとのデータの比較を行った。その結果、天然食品成分のごく一部の化合物で活性の有無に違いが認められたが、その他については検出感度の違いが認められたものの、活性の有無についてはほぼ同様の傾向が確認された。一方で、評価の明瞭化・簡便化を目的に、緑色蛍光タンパク質を用いたレポーター遺伝子アッセイの本評価への適応について検討したが、これまでのところ、評価できるまでに至らなかった。また H25 年度からの続きとして、多環芳香族炭化水素 (PAHs) 検出の報告がある食品 (かつお節、紅茶) の抽出物について、カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い、各分画物の AhR 活性を測定した。かつお節抽出物については 6 画分に分け、そのうち 4~5 画分が活性を示し、その 2 画分は特に顕著な活性を示した。紅茶抽出物については 8 画分に分け、そのうち 3 画分が活性を示し、特に 1 画分の活性は顕著であった。それら活性に寄与する化合物については引き続き精査中である。一方で、野菜や果物を中心とした食品試料 (39 種類) について抽出物を調製し、酵母を用いたアッセイにより AhR 活性を評価した。その結果、大葉、パセリ、ブロッコリー、もやし等に高濃度領域で活性が認められた。

研究協力者  
松山大学薬学部  
好村守生, 杉脇秀美, 峰 裕美

国立医薬品食品衛生研究所食品部  
堤 智昭, 渡邊敬浩  
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、これらの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には、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が<sup>2)</sup>、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シル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 やその他の植物性食品成分をリガンドとし活性化されることが報告されているが<sup>4)</sup>、その詳細についてはごく一部が明らかにされているのみである。

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が、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。またバイオアッセイを適応するには、その評価で検出する有害物質以外の化合物についても把握する必要がある。

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 及び一部 PAHs 以外の有害物質との相互作用に関する情報が少ない。また一部の食品成分との相互作用について報告があるが、まだ未解明な部分も多い。本研究ではその初期段階として、DXNs 様活性を有する物質の探索及び活性と物質の構造相関の解明を試みる。

H25 年度はデータの乏しい PAHs (ニトロ化体、ハロゲン化体、アミノ化体を含む) 39 種及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及びその代謝物 14 種等について、AhR 活性をバイオアッセイ (ケイラックスアッセイ) により評価した<sup>5)</sup>。今年度は、H25 年度の結果から明らかになった AhR 活性物質を中心に、評価の信頼度を確認する目的で、複数の評価系を使って比較検討を行った。さらに評価の明瞭化・簡便化を目的に、緑色蛍光タンパク質を用いたレポータージーンアッセイによる本評価への試験法の適応についても検討した。また H25 年度からの続きとして、PAHs 検出の報告がある食品

(かつお節, 紅茶) の抽出物について, カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い, 各分画物の AhR 活性を測定した. さらに, 野菜や果物を中心とした食品試料 (39 種類) について抽出物を調製し, 未検討である酵母を用いたアッセイにより AhR 活性を評価した.

## B. 研究方法

### 1. 試料及び試薬

PAHs (ニトロ化, ハロゲン化, アミノ化を含む) : benzo[*c*]fluorene, 1,2-benzanthracene (benzo[*a*]anthracene), chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*j*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene, dibenzo[*a,i*]pyrene, dibenzo[*a,h*]pyrene, 7-nitrobenzo[*a*]anthracene, 6-nitrobenzo[*a*]pyrene, 2-chloronaphthalene, 1,4-dichloronaphthalene, 1-aminonaphthalene, naphthalene (いずれも関東化学製) を用いた.

農薬, アミノ酸, 天然由来成分 : carbendazim, thiabendazole (いずれも関東化学製), tryptamine, evodiamine (いずれも和光純薬工業製), imperatorin, daidzein, tectochrysin (いずれもフナコシ製) 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. その他の試薬は特級又は高速液体クロマトグラフィー用を用いた.

食品試料 (アーモンド, あずき, アスパラガス, えのきたけ, オクラ, カキ, カボチャ, キウイ, キャベツ, くるみ, グレー

プフルーツ, ゴボウ, ゴマ, こまつな, さつまいも, ししとうがらし, ブナシメジ, ショウガ, セロリ, ダイズ, 大葉, タケノコ, トマト, ナス, ニラ, ニンニク, ネギ, ハクサイ, パセリ, ピーマン, ブロッコリー, ミカン, みつば, もやし, ユズ, ラッカセイ, リンゴ, レタス, レモン) についてはいずれも市販のものを用いた (26 年 10 月に入手). かつお節, 紅茶については, H25 年度に抽出したのものを用いた. 各分画物の調製は以下の通りで, 得られた画分を試料として用いた.

かつお節 : かつお節 (10.1 g) を 80% エタノール (50 mL) でホモジナイズ後, ろ過し, ろ液を濃縮して抽出物 (1.6 g) を得た. 抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し, エタノールに不溶な沈殿部を含めて 6 画分 (Fr. 1~6) を得た.

紅茶 : 紅茶 (11.0 g) を 80% エタノール (50 mL) でホモジナイズ後, ろ過し, ろ液を濃縮して抽出物 (787.8 mg) を得た. 抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し, エタノールに不溶な沈殿部を含めて 8 画分 (Fr. 1~8) を得た.

活性評価には, 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, 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. 酵母によるアッセイは, CROMIS AhR (長瀬産業) を使用した.

### 2. 使用機器及び分析条件

マイクロプレートリーダーは Enspire

(Perkin Elmer 社製) 又は Infinite F200 (TECAN 社) を使用した。

逆相 HPLC は, Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件は下記のとおり。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%酢酸及び (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. 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ジーン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。具体的な評価方法を以下に記す。

ケイラックスアッセイ: 化合物及び抽出物を 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 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 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。

ヒト由来組換え細胞によるアッセイ: ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L は, 3 個の生体異物応答配列 XRE を含むヒト CYP1A1 プロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子と融合したプラスミドをヒト肝がん細胞由来 HepG2 に導入した細胞で, 本細胞をアッセイに使用した。主な方法はケイラックスアッセイに準じた。

緑色蛍光タンパク質を用いたレポータージーンアッセイ: ラット肝臓由来の細胞株 (H4 II E 細胞) に 20 個のダイオキシン応答配列 DRE を含む pZsGreen1-1 レポーターベクター (Clontech) を導入した細胞をアッセイに使用した<sup>6)</sup>。主な方法はケイラックスアッセイに準じた。

酵母によるアッセイ: キットのプロトコールに準じて行い, 吸光度を活性値とした。

すべて測定は 2~3 回行い, その平均値をデータとして求めた。

(倫理面への配慮)

本研究では研究用に確立された細胞株を使用しているため、該当する事由はないと考える。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 評価法の比較

PAHs 等, 19 種の化合物 (図 1) 及び食品抽出物 (ウイスキー, 紅茶, かつお節) について, ケイラックスアッセイとヒト由来組換え細胞 (101L 細胞) による方法を比較した。その結果を図 2 に示す (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を陽コントロールとした)。ケイラックスアッセイのマウス由来細胞とヒト由来 101L 細胞では, 感度に差があるものの, ケイラックスの細胞で活性が認められるものは 101L 細胞でも活性があり, ほぼ同じ挙動を示す傾向が確認された。環境汚染物質に対してはマウスの方がヒトより感受性が高い傾向が認められ, 一方, 食品抽出物ではほぼ同等であった。これは環境汚染物質の場合, 単に化合物を取り込み代謝する一方, 食品抽出物は複合物であるため, それ以外の要因も考えられ, その影響と考察されるが, 今後の検討が必要とされる。

また, 一部化合物を用い, 酵母による評価系についても検討した。化合物として, benzo[*b*]fluoranthene, dibenzo[*a,e*]pyrene, 7-nitrobenzo[*a*]anthracene に加え, これまでケイラックスアッセイで活性が認められている天然由来成分 evodiamine, imperatorin, daidzein, tectochrysin について評価した。それらの化学構造と結果を図 3 に示す ( $\beta$ -naphthoflavone を陽コントロールとし

た)。供試した化合物のうち, dibenzo[*a,e*]pyrene はケイラックスアッセイにおいて活性が弱かったもので, 比較のため試験に供した。その他のものはケイラックスアッセイで活性が認められたものである。Dibenzo[*a,e*]pyrene の結果をみると, 高濃度領域で活性はわずかであり, ケイラックスアッセイでの結果と同じ傾向であることが示された。一方, その他大半の化合物については本アッセイにおいても活性が認められた。これまでの検討で, daidzein についてはケイラックスアッセイでは顕著な活性が認められるが, 本アッセイでは活性が認められなかった。Daidzein は大豆イソフラボンの一種で, 植物エストロゲンとして知られている化合物である。酵母と細胞を使用した方法での違いの影響と考察されるが, 単一化合物による評価で細胞のみに活性が認められることは, AhR 以外の要因により活性を示すことが示唆される。さらに, 食品試料 (ウイスキー, 紅茶, かつお節) についても検討した。結果を図 4 に示す。いずれも濃度依存的に活性が認められ, ケイラックスアッセイと同じ傾向の結果が得られ, いずれの評価法においても同じ傾向の結果が得られることが確認できた。

一方で, 食品試料における本評価の明瞭化・簡便化を目的に, 緑色蛍光タンパク質を用いたレポータージーンアッセイによる本評価への適応についても検討したが, 結果的に評価できるまでには至らなかった。今後, 樹立済の GFP 細胞の別の細胞を用いて, 条件検討する予定である。

以上の結果から, 活性の強弱や感度には違いはあるが, いずれのアッセイにおいて

も活性の有無についてはほぼ同じ傾向を示しており、現在のところ、本評価においては感度や既存データが多いケイラックスアッセイにより測定することで対応できることが示された。

## 2. 食品試料分画物の評価

H25年度の結果、活性を示した食品試料（かつお節、紅茶）について、活性成分を解明する目的で、カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。各抽出物をSephadex LH-20に付し、かつお節抽出物については6画分、紅茶抽出物については8画分に分けた。得られた画分をケイラックスアッセイ及び酵母によるアッセイにより評価した。結果を図5に示す。

両試料ともいずれの画分においても活性が認められた。かつお節をみると、ケイラックスアッセイにおいてはFr. 2~5、酵母によるアッセイにおいてはFr. 2~6に顕著な活性が認められた。一方、Fr. 1はいずれも活性が弱く、ほぼ平行な結果が得られた。今後、活性成分について検討する予定である。

紅茶では、ケイラックスアッセイにおいてはFr. 3, 6, 7が活性を示し、特にFr. 3の活性が強かった。酵母によるアッセイにおいてはFr. 1~3に活性がみとめられ、特にFr. 2の活性が強く、両者の活性に違いが認められた。これは、酵母と細胞による違いから、紅茶に共存する成分との相互作用が両者で異なること等が考えられる。共存する成分を確認する目的で、各分画物のHPLCを測定した。その結果を図6に示す。紅茶の各画分にはいくつかのメイン及びマ

イナーピークが観察された。今後、活性の認められた画分について、活性成分の同定を実施する。

## 3. 食品試料における測定

その他の食品について、酵母によるアッセイでの評価は未検討であったため、39種の食品試料について、AhR活性を測定した。その結果を図7に示す。結果として、いずれの試料も弱いながらAhR活性を示すものが多く、特に大葉、ブロッコリー、パセリ、もやし、次いでアズキ、ゴマ、コマツナ、タケノコ等に活性が認められた。ブロッコリーやパセリ等はケイラックスアッセイでも活性を示しており、ほぼ同様の傾向が確認された。

## D. 結論

食品中のAhR相互作用（DXNs様活性）物質について、H25年度に実施したケイラックスアッセイによる方法とは別のアッセイ（ヒト由来組換え細胞によるレポーター遺伝子アッセイ及び酵母を用いたアッセイ）による評価を行い、データの比較を行った。その結果、一部の化合物で活性の有無に違いが認められたが、その他については検出感度の違いが認められるものの、活性の有無についてはほぼ同じ傾向が示された。また、評価の明瞭化・簡便化を目的として緑色蛍光タンパク質を用いたレポーター遺伝子アッセイによる本評価への適応について検討したが、結果的に評価できるまでには至らなかった。また食品（かつお節、紅茶）の抽出物について、カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い、各分画物のAhR

活性を測定した。かつお節抽出物については6画分に分け、そのうち、4~5画分が活性を示し、その2画分は特に顕著な活性を示した。紅茶抽出物については8画分に分け、そのうち3画分が活性を示し、特に1画分の活性は顕著であった。それらに寄与する化合物については引き続き精査中する予定である。また、食品については酵母によるアッセイでの評価は未検討であったため、39種の食品試料について、AhR活性を測定した。その結果、いずれの試料も弱いながらAhR活性を示すものが多く、特に大葉、ブロッコリー、パセリ、もやし、次いでアズキ、ゴマ、コマツナ、タケノコ等に活性が認められ、ケイラックスアッセイの結果とほぼ同様の傾向であることを確認した。

#### 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) 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*, **69**, 3117-3130 (2008).

- 5) 平成 25 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 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.
- 6) Tsutsumi, T., Ishizuka, N., Denison, M.S., Watanabe, T., Matsuda, R.: A new reporter gene assay for dioxins using green fluorescent protein: Increased responsiveness using amplification of the dioxin responsive element, *Organohalogen Compounds*, **71**, 1349-1352 (2009).

#### F. 研究業績

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし



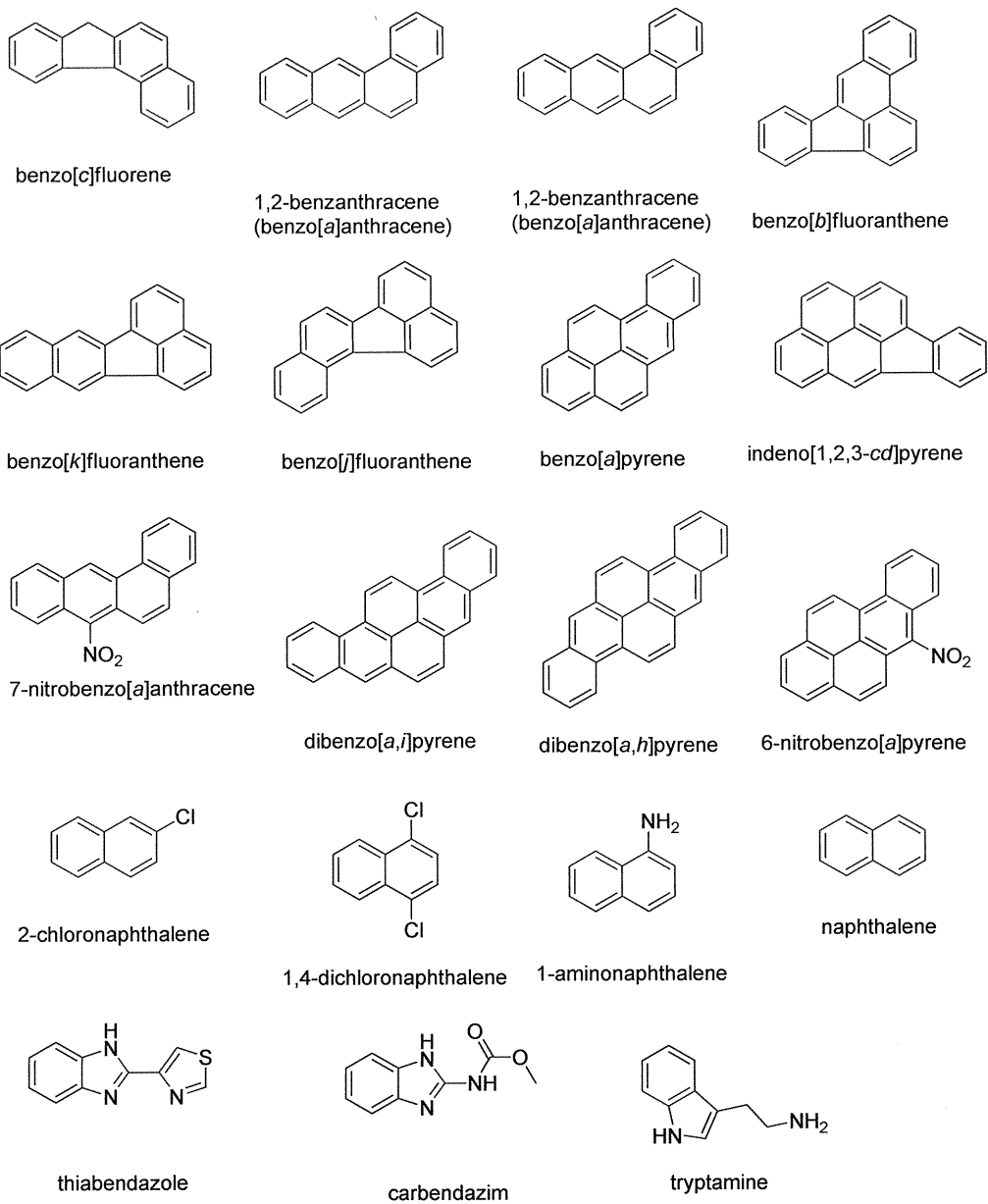


図 1. 供試した化合物の構造

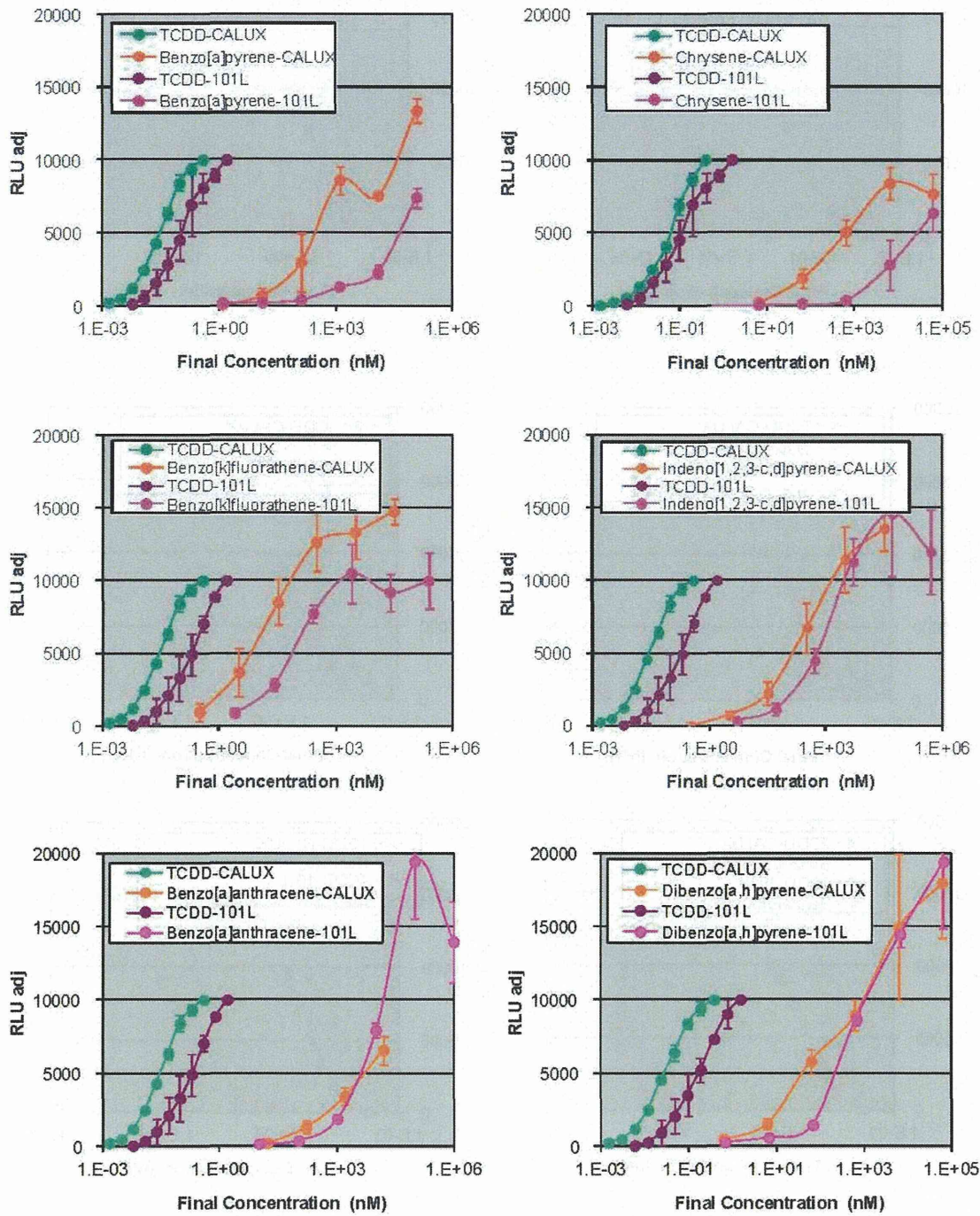


図 2. 評価法の比較 (1)

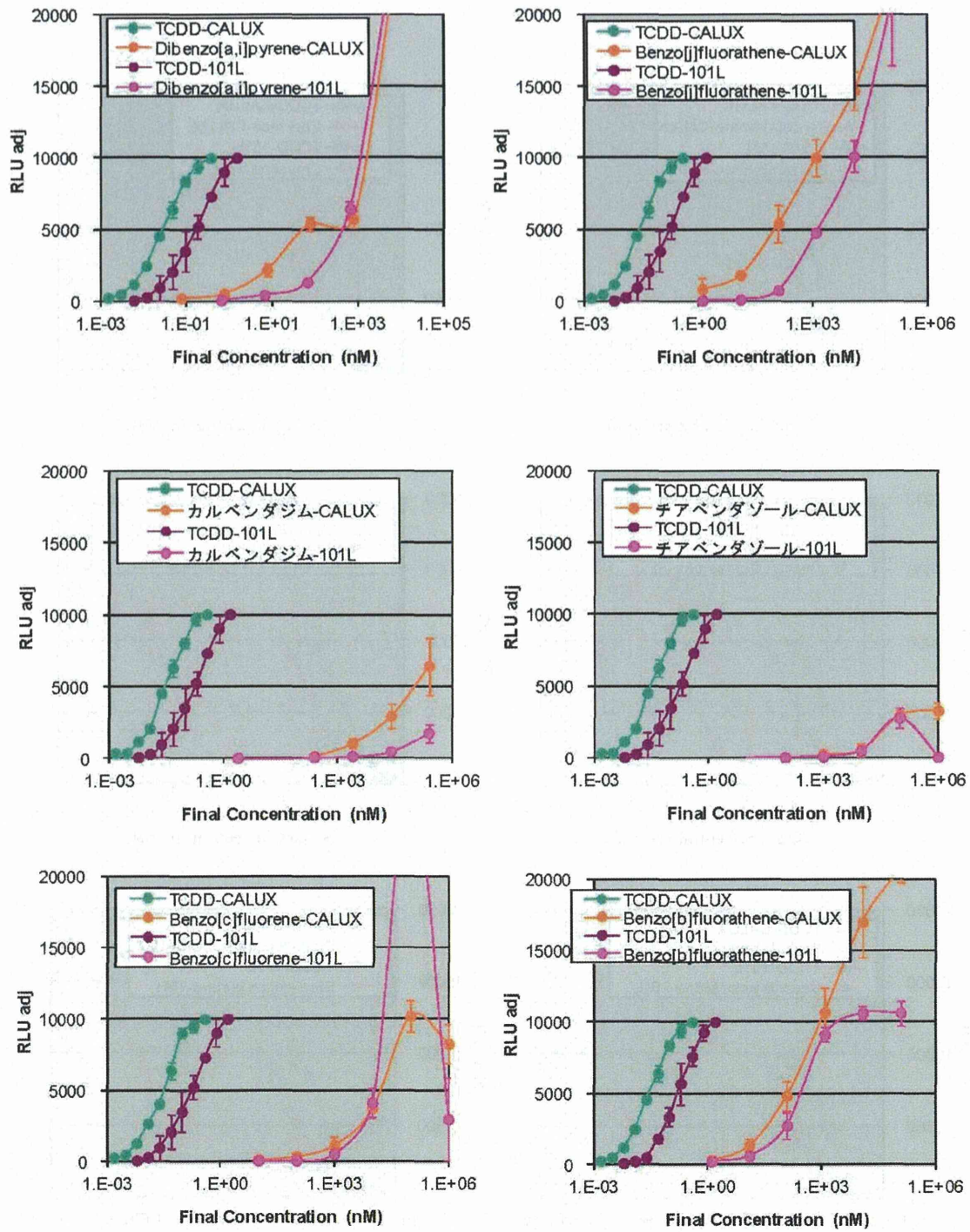


図 2. 評価法の比較 (1) (続き)

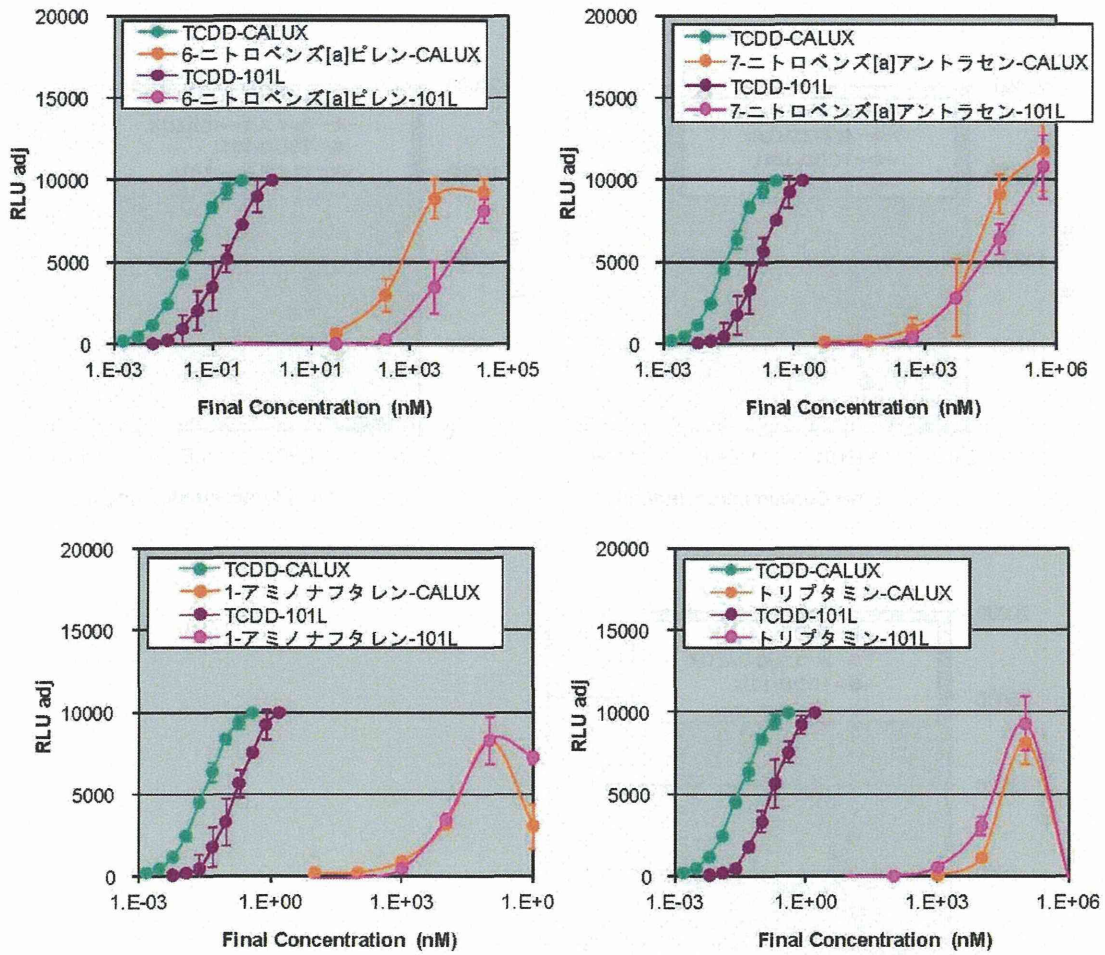


図 2. 評価法の比較 (1) (続き)

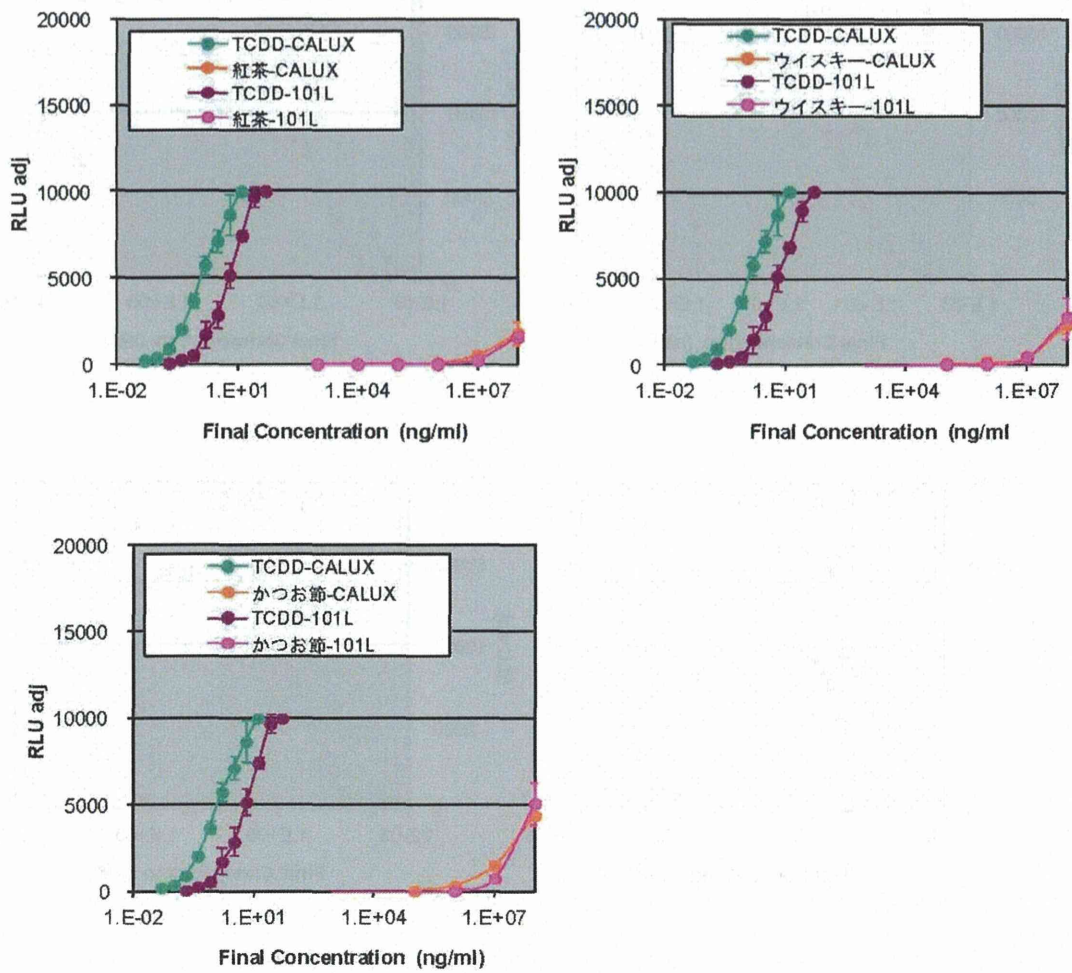
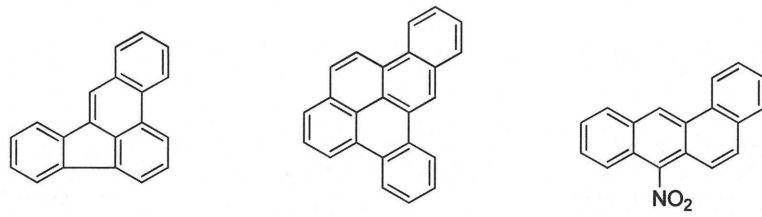
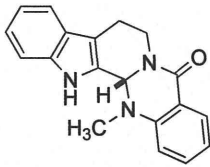


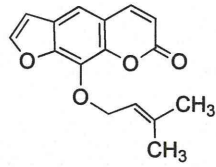
図 2. 評価法の比較 (1) (続き)



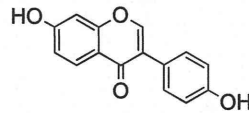
benzo[b]fluoranthene    dibenzo[a,e]pyrene    7-nitrobenzo[a]anthracene



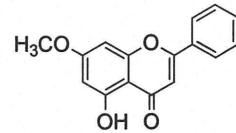
evodiamine



imperatorin



daidzein



tectochrysin

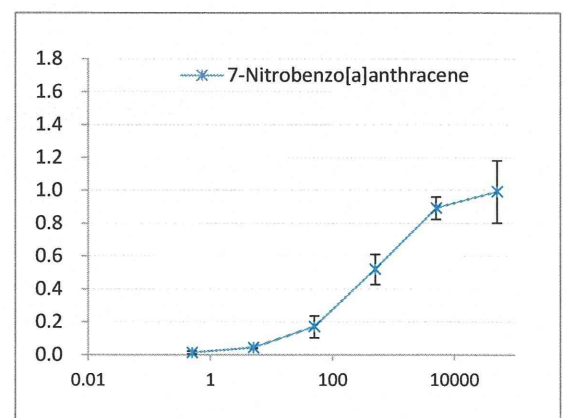
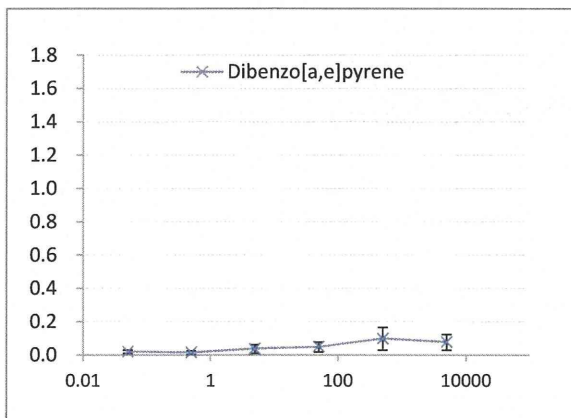
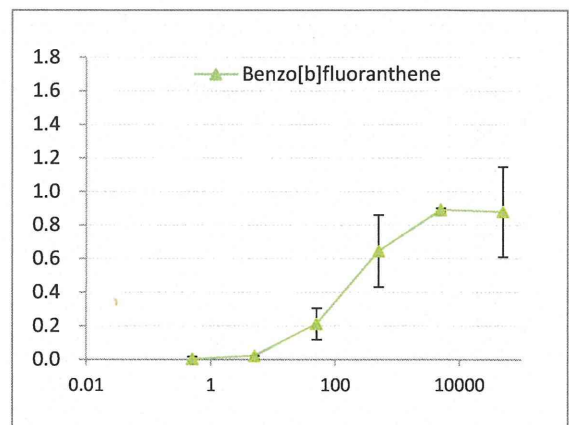
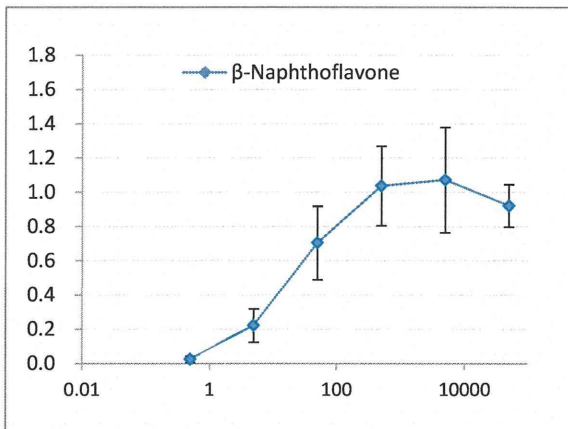


図 3. 評価法の比較 (2)

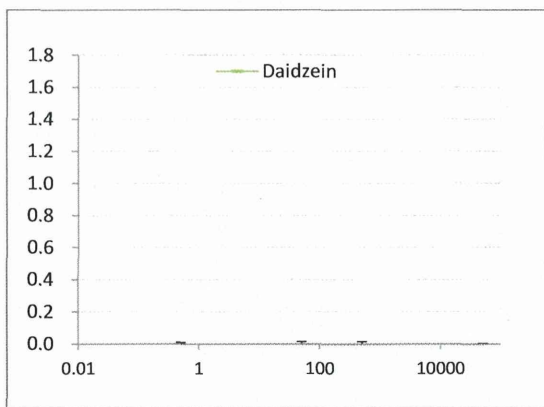
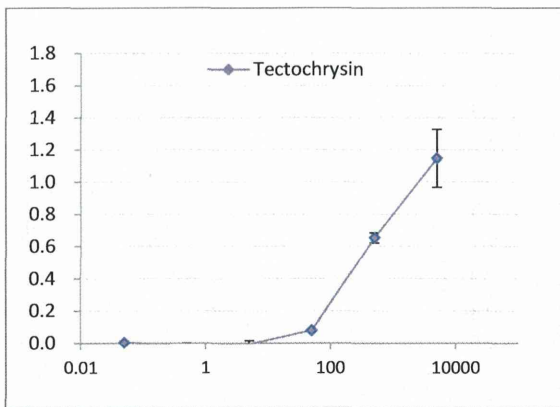
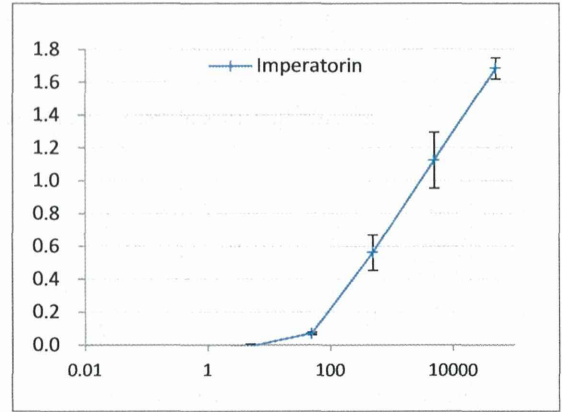
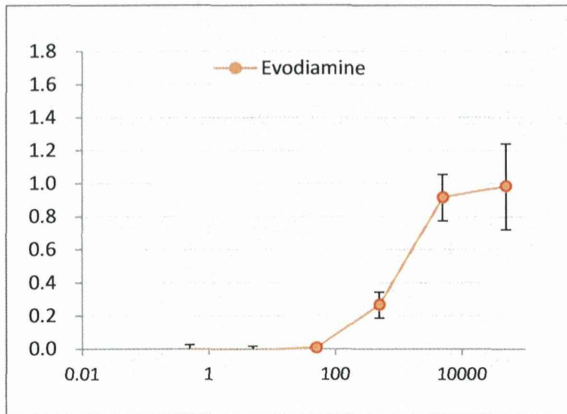


図3. 評価法の比較 (2) (続き)

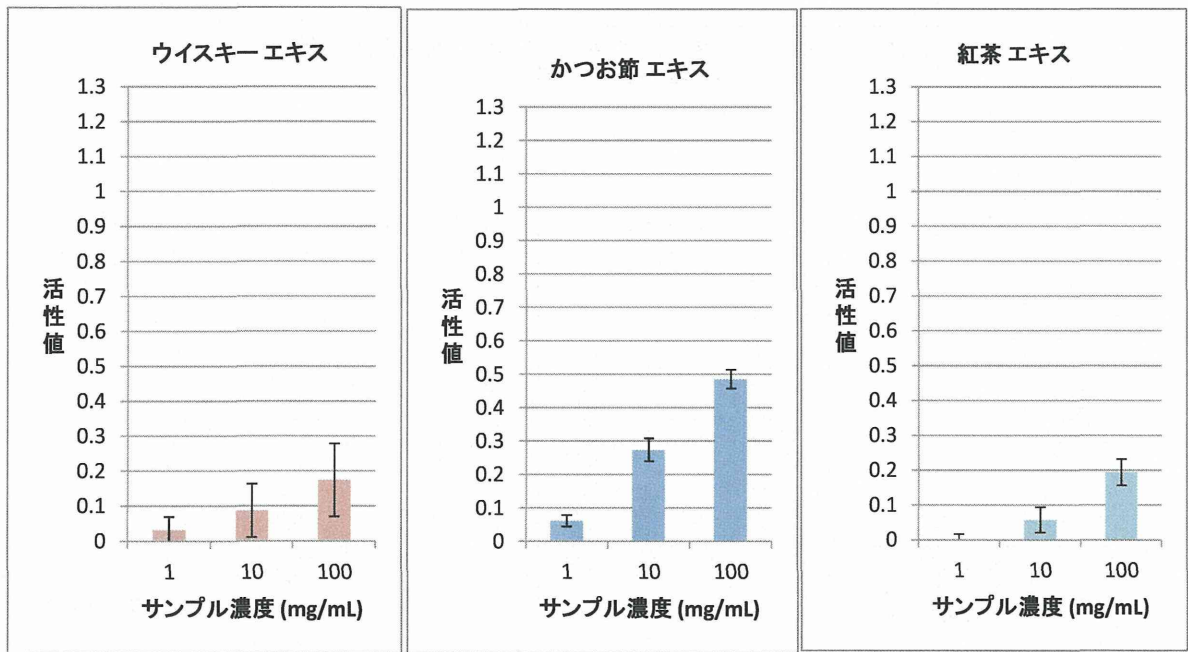
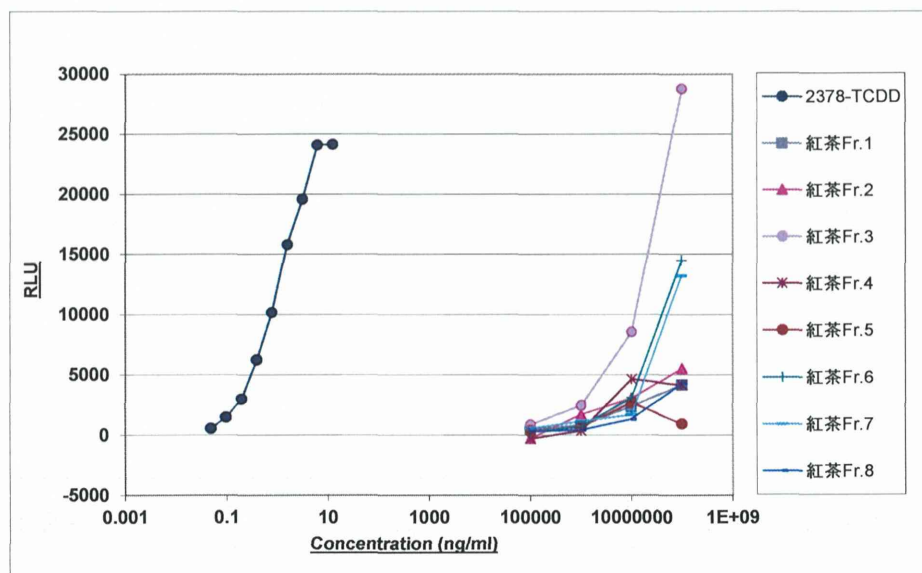


図 4. 評価法の比較 (3)



(a)



(b)

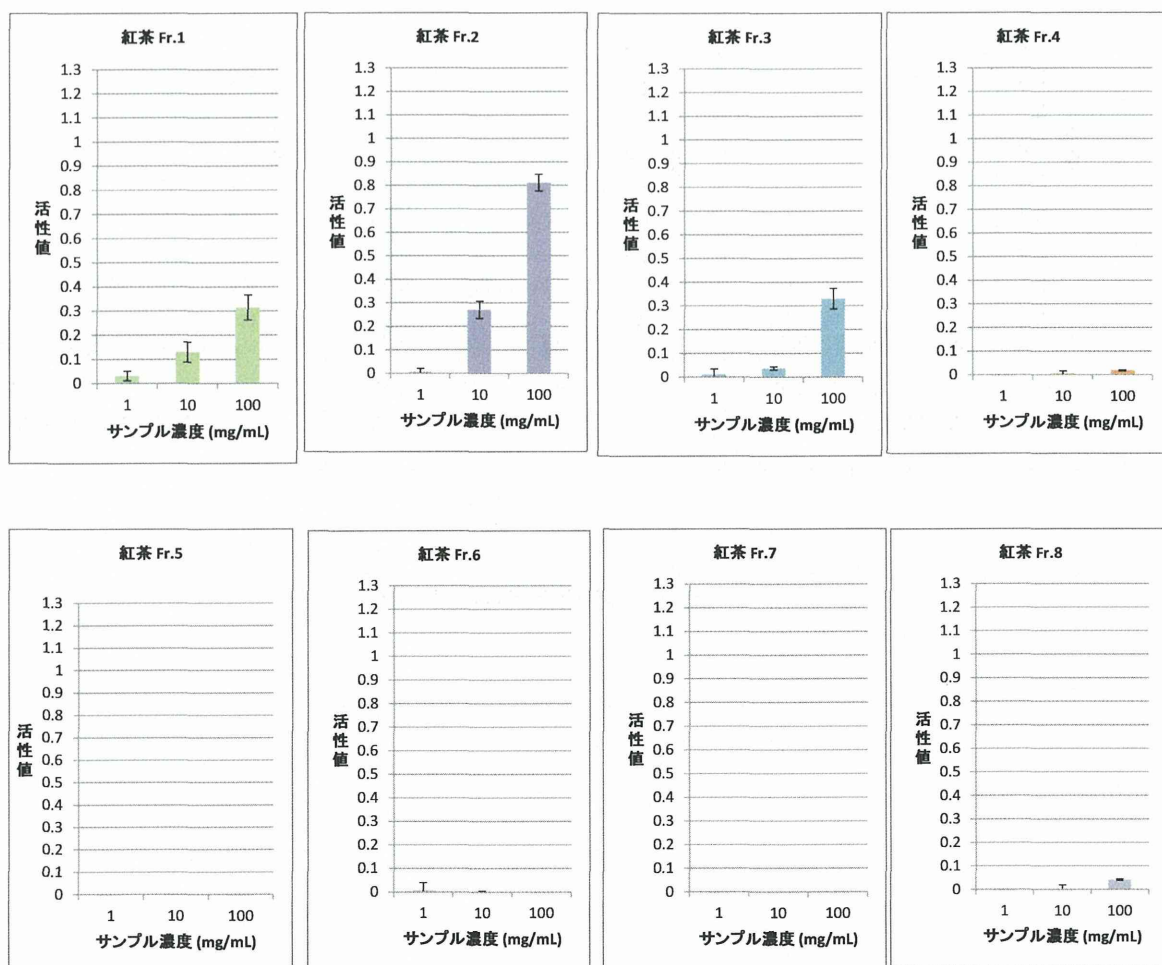
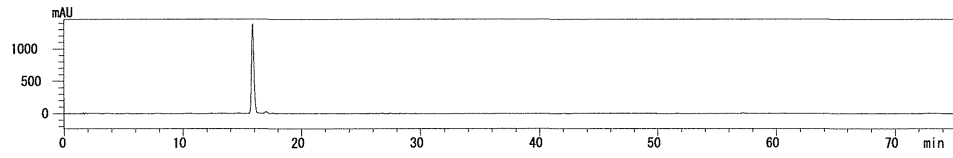


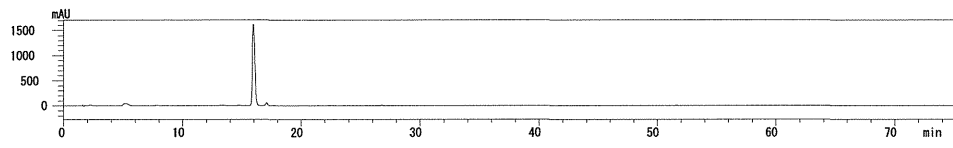
図5. 食品試料分画物の活性 (続き)

[(a) ケイラックスアッセイ, (b) 酵母によるアッセイ]

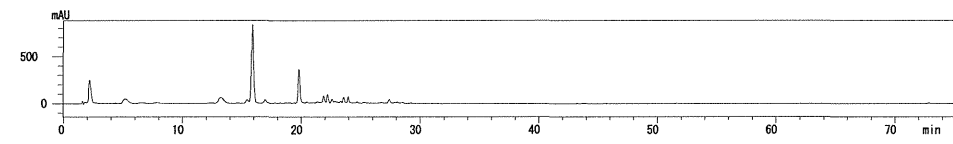
Fr. 1



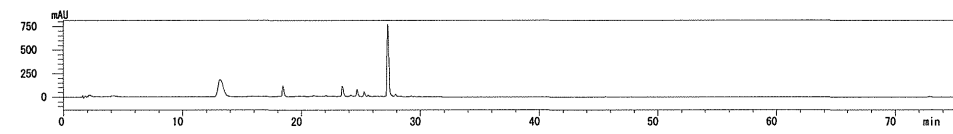
Fr. 2



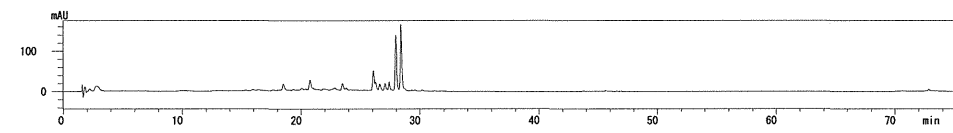
Fr. 3



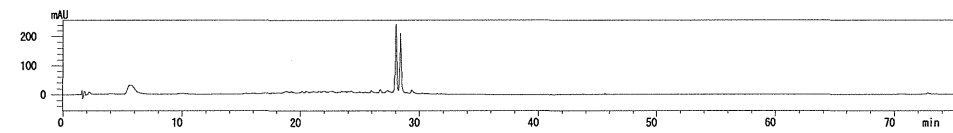
Fr. 4



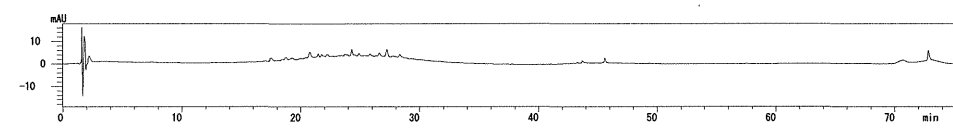
Fr. 5



Fr. 6



Fr. 7



Fr. 8

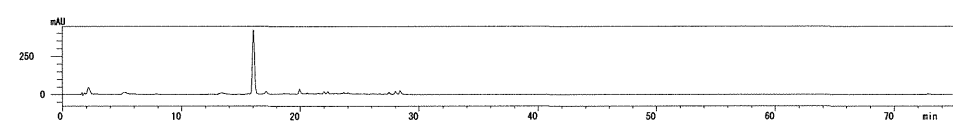


図 6. 紅茶分画物の HPLC クロマトグラム

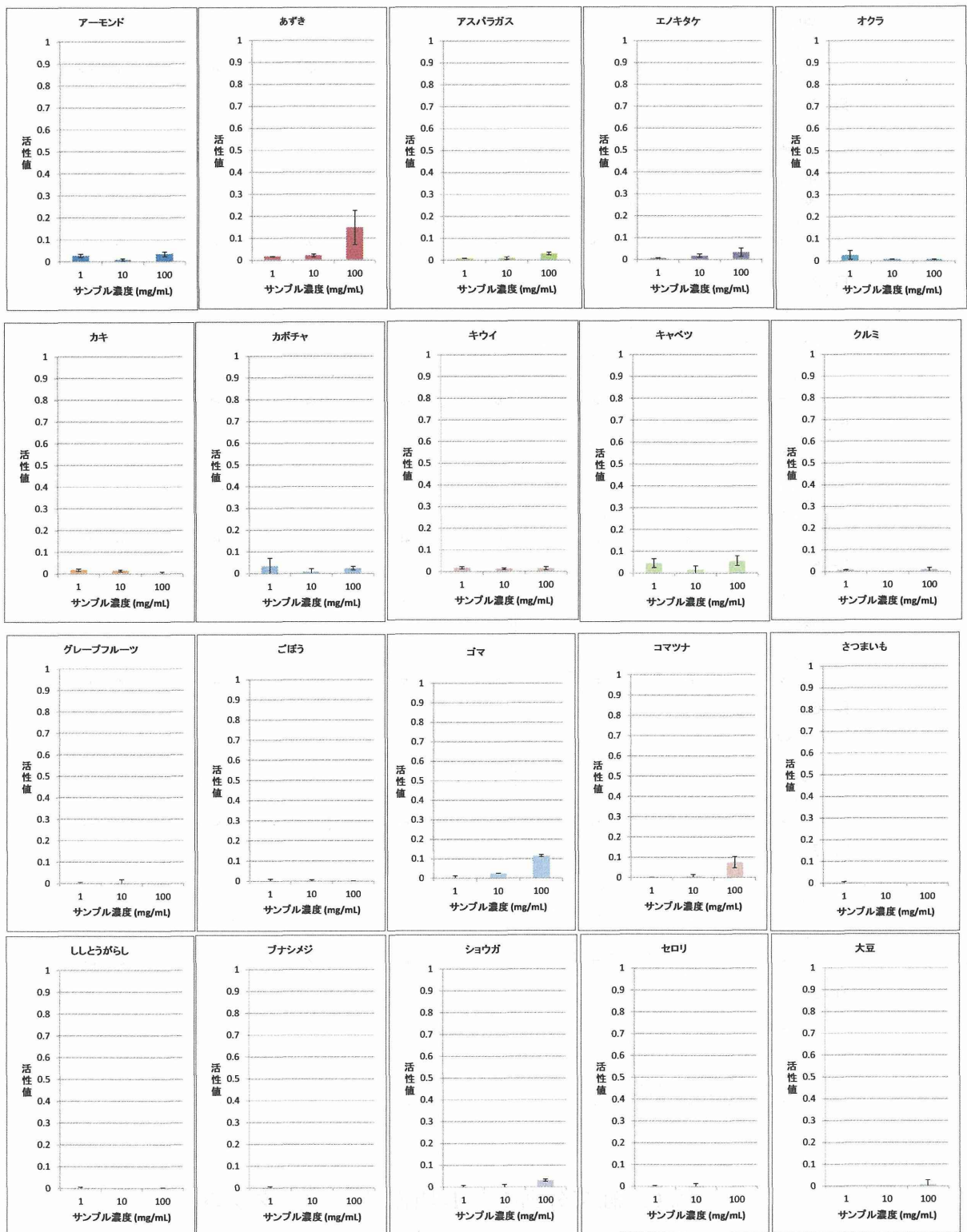


図 7. 食品抽出物の活性評価

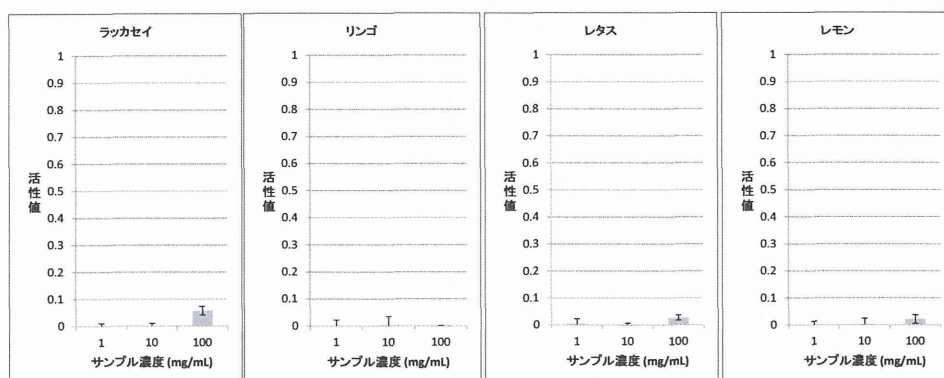
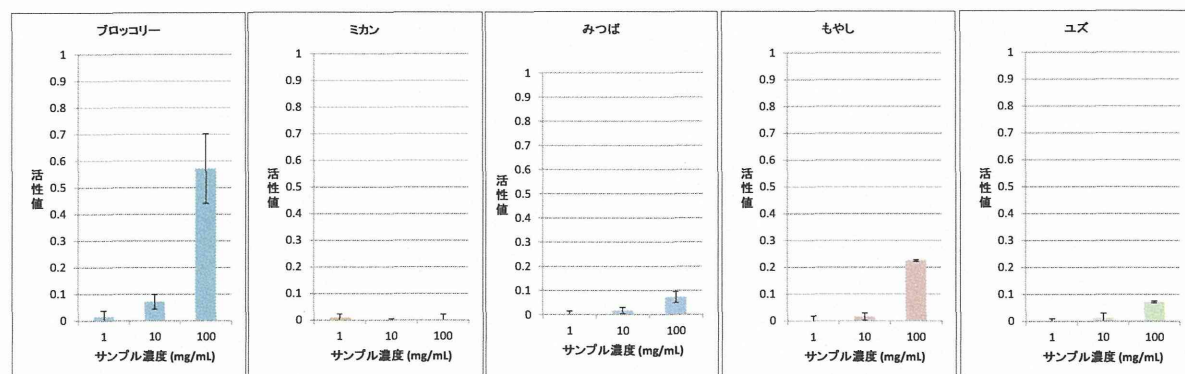
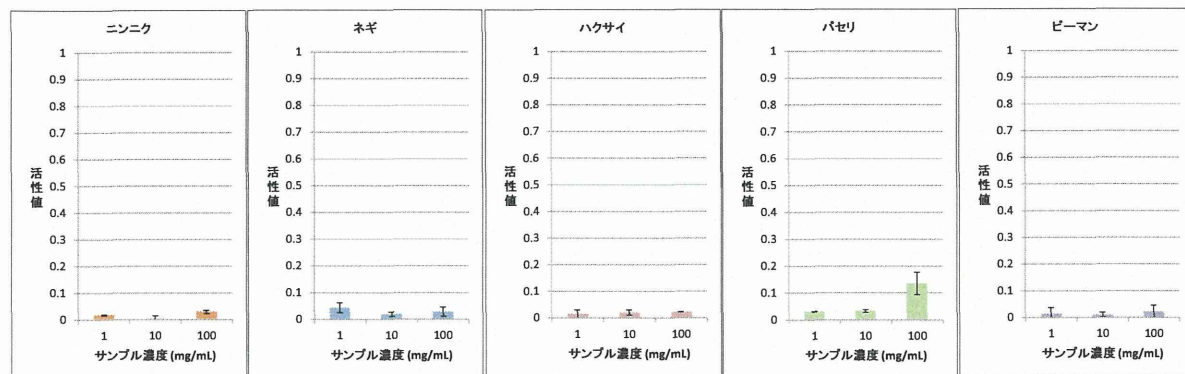
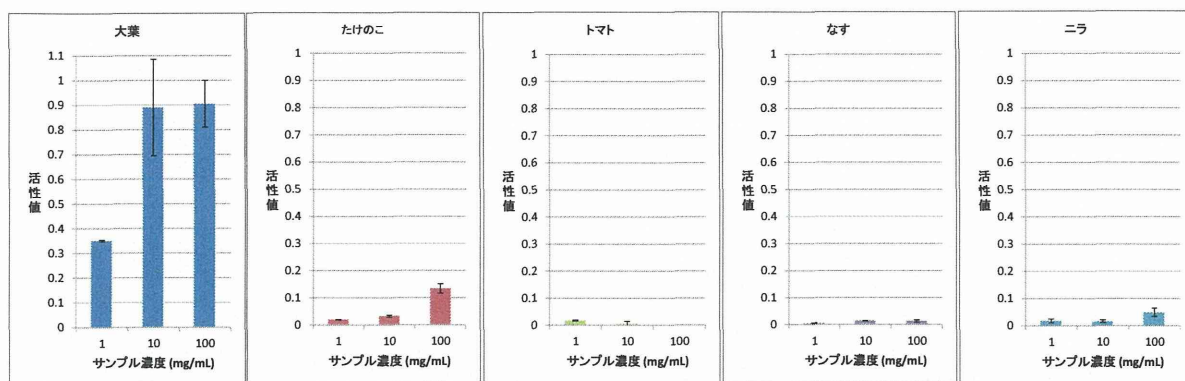


図 7. 食品抽出物の活性評価 (続き)