

の高分解能 GC/MS による機器分析法と比較し、総合的な一数值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る。それゆえ、食品中のダイオキシン類分析にバイオアッセイを適用させる場合、ダイオキシン様活性を示す食品成分を明確にしておくことが、信頼性の高いデータを確保することに繋がる。しかしながら、食品中のダイオキシン様活性物質は殆ど明らかにされておらず、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も、それら基礎データの情報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重要であると考えられ、AhR の機能解明への応用が期待される。

このような背景に基づき、本研究では食品成分が高濃度に存在する濃縮物加工食品であるサプリメントや健康食品を試料とし、含有する食品中のダイオキシン様物質を精査することを目的に検討を行った。本年度は、それら試料のダイオキシン様活性について実態調査を行った。

B. 研究方法

1. 試料

日本国内で 2007 年に市販されていた加工食品（サプリメント及び健康食品）50 種を試料とした（表 1）。錠剤は粉砕機により粉末にし、カプセルで被包した形状の製品については内容物のみを試験に供した。また茶類は、製品に記載されている煎じ方に従い、得られた煎出液を凍結乾燥させたものを供試した。各試料 100 mg を 0.5~1.0 mL のジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、試料溶液とした。

2. 試薬、試液

DMSO（生化学用）は和光純薬工業社製を用いた。RPMI1640 培地、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、リン酸緩衝生理食塩水、0.25%トリプシン溶液はナカライテスク社製を用いた。牛胎児血清（FBS）は Invitrogen 社製を、Lysis 試薬、ルシフェラーゼアッセイシステムは Promega 社製を用いた。マイクロプレートリーダーは Anthos 社製の Lucy 1 microplate luminometer、Molecular Devices 社製の SpectraMax M2 を使用した。

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¹⁾⁻⁵⁾。ケイラックスアッセイ：試料溶液（コントロールは DMSO）は、8 段階の濃度に 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、CO₂ インキュベーター（37°C、5% CO₂ 濃度）で 20~24 時間培養した。培養後、培地を取り除き、ウェルを洗浄後、顕微鏡下、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

表 1 に列挙した試料 50 種類について、ケイラックスアッセイによる AhR（ダイオキシン様）活性を測定した。その結果、試料の大半は 100 mg/mL の高濃度においてもダイオキシン様活性は認められなかった。一方で、一部試料は高濃度で活性を示した。図 1 にダ

イオキシシキ様活性を示した試料の用量-反応曲線を示す。活性試料の分類をまとめると、大豆抽出物含有食品〔試料 8, 9, 16, 17, 27, 46〕が大半を占め、1 mg/mL の濃度から活性が認められ、10~100 mg/mL においては TCDD と同等のダイオキシシキ様活性を示した。ゴマ加工食品〔試料 30〕、プロポリスエキス含有食品〔試料 41〕においても高濃度で大豆抽出物含有食品と同等のダイオキシシキ様活性が認められた。次いで茶類の一部（シソ葉〔試料 36〕、ビワ葉〔試料 40〕）が高濃度でダイオキシシキ様活性を示した。その他の試料では、ルテイン含有食品〔試料 14〕、イチョウ葉エキス含有食品〔試料 29〕、茶類（甜茶〔試料 34〕、グアバ〔試料 35〕、ヨモギ〔試料 38〕、ルイボス〔試料 39〕）、アミノ酸・ビタミン・ミネラル含有食品〔試料 43〕、野菜加工食品〔試料 44〕、ギムネマシルベスタエキス含有食品〔試料 45〕、アガリクス茸加工食品〔試料 48〕が、高濃度で若干のダイオキシシキ様活性を示した。

特に顕著にダイオキシシキ様活性が認められた試料について、その活性度を TCDD と比較するため、0.5 及び 1.0 ng/mL TCDD が誘導する AhR 活性に相当する試料濃度を算出した。その結果を表 2 に記す。TCDD の約 100 万倍の濃度であるが、大豆抽出物含有食品〔試料 8, 16, 46〕、ゴマ加工食品〔試料 30〕、プロポリスエキス含有食品〔試料 41〕が TCDD と同等のダイオキシシキ様活性を示した。

これまでの研究から、daidzein, glycitein などの大豆イソフラボンや resveratrol といったいわゆる植物エストロゲンと言われるものの一部が、高濃度でダイオキシシキ様活性を示すことを報告している^{1), 2)}。今回の検討においても、それらを含むしている原料由来の大豆抽出物含有食品が主にダイオキシシキ様活性を認めた。またゴマ抽出物には、sesamin などのゴマリグナンの含有が知られており、

これらも植物エストロゲンの一つとしても考えられている。またプロポリスにもフラボノイドなどの含有が考えられるが、それら以外の新たな活性因子の存在も示唆される。今後これら試料中のダイオキシシキ様活性因子について、精査する予定である。

D. 結論

抽出物含有食品を中心に、市販加工食品 50 種を試料とし、ダイオキシシキ類迅速測定法の一つであるケイラックスアッセイにより AhR (ダイオキシシキ様) 活性を評価した。その結果、大豆抽出物、ゴマ抽出物、プロポリス抽出物などの含有加工食品が、高濃度で AhR 活性を示した。

E. 参考文献

- 1) 平成 14 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシシキ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シキ類のリスク低減に関する研究)
- 2) 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**, 532-539 (2003).
- 3) 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**, 31-33 (2004).
- 4) 平成 13 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシシキ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 1-2 ダイオキシシキ類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)

- 5) Tsutumi, 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*, **128**, 486–492 (2003).

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし