

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究
(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-2) 食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中のダイオキシン類の簡易測定生物検定法(バイオアッセイ)の信頼性確保に関する基礎的検討を目的に、食品試料の芳香族炭化水素レセプター(AhR)結合活性(ダイオキシン様活性)について実態調査を行った。本年度は、19年度の調査でAhR活性が認められた天然物濃縮加工食品(大豆、ゴマ、プロポリス抽出物を含有する8試料)について、含有AhR活性物質を検討するために、各分画物(ヘキサシ、酢酸エチル、水分画)を調製し、それらのAhR活性をレポータージーンアッセイ(ダイオキシン類とAhRとの結合をルシフェラーゼ活性により検出するバイオアッセイ)により評価した。その結果、プロポリス抽出物含有試料ではヘキサシ分画物、他の試料においては酢酸エチル分画物において、いずれも高濃度領域(1~10 mg/mL)で2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)と同等のAhR活性を示した。これまでの結果から、本アッセイに影響を及ぼす化合物としてイソフラボン類があげられるため、各試料中のイソフラボン類(daidzein, glycitein, genistein, daidzin, glycitin, genistin)の分布をHPLCにより検討した。その結果、いずれの試料においてもイソフラボン類の検出が認められ、これらを含有する特に大豆関連製品について本バイオアッセイを使用する際には、その影響も考慮したデータの慎重な解釈が必要であることが考察された。

研究協力者

松山大学 薬学部

天倉 吉章, 好村 守生, 吉田 隆志

株式会社 日吉

中村 昌文, 半田 洋士

A. 研究目的

芳香族炭化水素レセプター(AhR)は、ダイオキシン等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結合活性)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

オキシシン類分析にバイオアッセイを適用する場合、ダイオキシ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。これまでの検討から、このバイオアッセイにより検出する天然 AhR アゴニスト（ダイオキシシン様物質）が同定され、ダイオキシシンと比較してかなり高濃度で AhR 結合活性（ダイオキシシン様活性）を示すことが明らかとなっている²⁾⁴⁾。

しかし、食品中のダイオキシシン様活性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。

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シン様物質を精査することを目的とする。19年度は試料 50 種を対象に、ダイオキシシン類迅速測定法で食品試料の実績もあるケイラックスアッセイ⁵⁾による AhR 活性の実態調査を行った。その結果、大豆、ゴマ、プロポリス抽出物等の含有加工食品が、高濃度で AhR 活性を示す結果を得た⁶⁾。今年度は、それら活性が認められた試料抽出物について、AhR 活性成分をスクリーニングする目的で分画物を調製し、それらの AhR 活性を評価した。また活性が認められた分画物について、逆相 HPLC 分析を行い、含有物の分布を検討し、その特徴を考察した。

B. 研究方法

1. 試料

19 年度検討した天然物濃縮加工食品（サプリメント及び健康食品）8 種（試料 A~H）を試料とした（表 1）。各試料（1 g）に含水エタノール〔エタノール/水（4:1）〕（30 mL）を加え、10 分間超音波処理による抽出を行った。抽出液を吸引ろ過後、得られたろ液を濃縮し、試料抽出物とした。試料抽出物に水（10 mL）を加え、*n*-ヘキサン、酢酸エチル

（各 30 mL）で順じ振とう抽出後、得られた各溶媒分画物を濃縮し、それぞれヘキサン、酢酸エチル各分画物とした。また水面分を濃縮し、水分画物とした。試料 F（ゴマ加工食品）の水分画物については、供試できる量が得られなかった。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、各試料溶液とした。

2. 試薬、試液及び機器

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。ルミネッセンスマイクロプレートリーダーは BERTHOLD 社製の Centro LB960 を使用した。逆相 HPLC は島津製作所製 Simadzu Prominence システムを使用した。

3. 方法

AhR 活性の評価は、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、以下のように行った¹⁾⁵⁾。試料溶液（コントロールは DMSO）を、5 段階の濃度に DMSO で希釈して調製し、各 4 μ 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 μ L を加えて攪拌した。そのうち 200 μ L を一晩前培養した 96 穴マイクロプレート中のマウス HIL6.1c2 細胞（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 μ 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 μ L を加え、ルミノメーターにより発光量 (RLU) を測定した。

また、逆相 HPLC は以下の条件で測定した。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%)].

C. 研究結果及び考察

表 1 に列挙した試料 8 種類 (A~H について、図 1 のフローに従い、ヘキサン、酢酸エチル及び水分画物を調製した。得られた各分画物について、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。その結果を図 2 (a~c) に示す。プロポリス抽出物含有試料 (G) では、ヘキサン分画物において高濃度領域 (1~10 mg/mL) で TCDD と同等の AhR 活性が認められた。一方、その他の試料 (大豆, ゴマ抽出物含有試料) では、共通して酢酸エチル分画物の高濃度領域 (0.1~10 mg/mL) で顕著な AhR 活性が認められた。

これまでの研究で, daidzein, glycitein 等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ン様活性を示すことを報告している³⁾。そこで, AhR 活性を認めた画分について, 逆相 HPLC による大豆イソフラボン類 6 種 (daidzein, glycitein, genistein, daidzin, glycitin, genistin) の分布について検討した。その結果を図 3 (a~d) に示す。6 試料 (A~E, H) が大豆抽出物含有試料であり, すべての試料において大豆イソフラボン類の検出が認められたが, 製品によりその分布は異なった。6 種のイソフラボ

ン分布の特徴から, 大まかに 3 群 (1 群, 試料 A, D, E, H; 2 群, 試料 B; 3 群, 試料 C) に大別できるが, AhR 活性はいずれも酢酸エチル分画物が強かった。HPLC 結果により, イソフラボン類の分布が確認されたことから, それらによる本アッセイへの影響が示唆される。検出したイソフラボン類 6 種以外のピークも認められることから, それらについては今後, 明らかにする必要がある。また, ゴマ抽出物含有試料 (試料 F) においても, 酢酸エチル分画物の AhR 活性が強かった。その HPLC 結果をみると, daidzin, genistin に相当するピークが観察され, イソフラボン類を含有している可能性が示唆された。今後その確認が必要である。このようにイソフラボン類が本バイオアッセイに影響を及ぼすことが食品レベルでも確認され, 本アッセイを使用する際には, その影響を考慮したデータの解釈が必要であることが考察される。一方, プロポリス抽出物含有試料においては, ヘキサン分画物が最も AhR 活性が強かった。HPLC 結果を見ると, イソフラボン類以外の新たな活性因子の存在が示唆される。今後これら試料中のダイオキシン様活性成分について, 精査する予定である。

D. 結論

19 年度の結果に基づき, AhR 活性を示した天然物濃縮加工食品 (大豆, ゴマ, プロポリス抽出物を含有する 8 品目) について, それら分画物 (ヘキサン, 酢酸エチル, 水分画) を調製し, AhR 活性を評価した。その結果, プロポリス抽出物含有試料ではヘキサン分画物, 他の試料においては酢酸エチル分画物のいずれも高濃度領域 (0.1~10 mg/mL) で, TCDD と同等の AhR 活性を示した。大豆抽出物含有製品については, イソフラボン類の影響が示唆されるため, 逆相 HPLC によるイソフラボン類の分布を検討したところ, いずれの製品においてもそれらの検出が認めら

れた。

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, 532–539 (2003).
- 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, 31–33 (2004).
- 5) 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*, 128, 486–492 (2003).
- 6) 平成 19 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」（分担報告書 2-2 食品試料の芳香族炭化水素レセプター結合活性の調査）。

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) 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).

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章，堤 智昭，中村昌文，好村守生，米谷民雄，吉田隆志：天然物濃縮加工食品の AhR 結合活性について。日本生薬学会第 55 年会（2008. 9）。

表 1. 供試した試料(A~H)の概要

名称	形状
A イソフラボン含有食品	カプセル S
B 大豆抽出物含有食品	カプセル
C 大豆イソフラボン含有食品	錠剤
D 大豆抽出物含有食品	錠剤
E 大豆イソフラボン含有食品	錠剤
F ゴマ加工食品	カプセル S
G プロポリスエキス含有食品	カプセル S
H 大豆イソフラボン加工食品	錠剤

カプセル S, ソフトカプセル

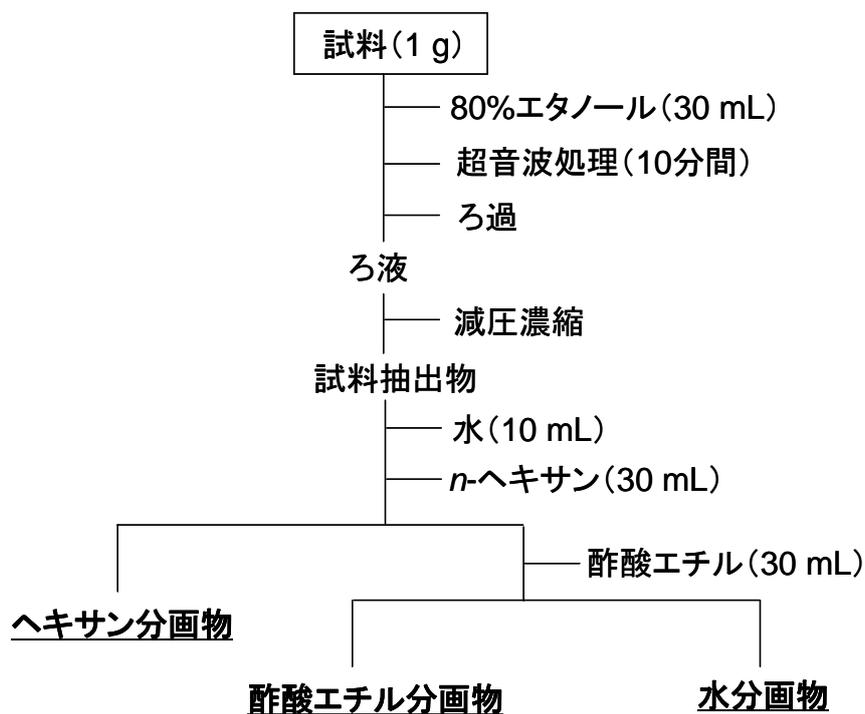


図1. 試料調製(分画物調製)のフローチャート

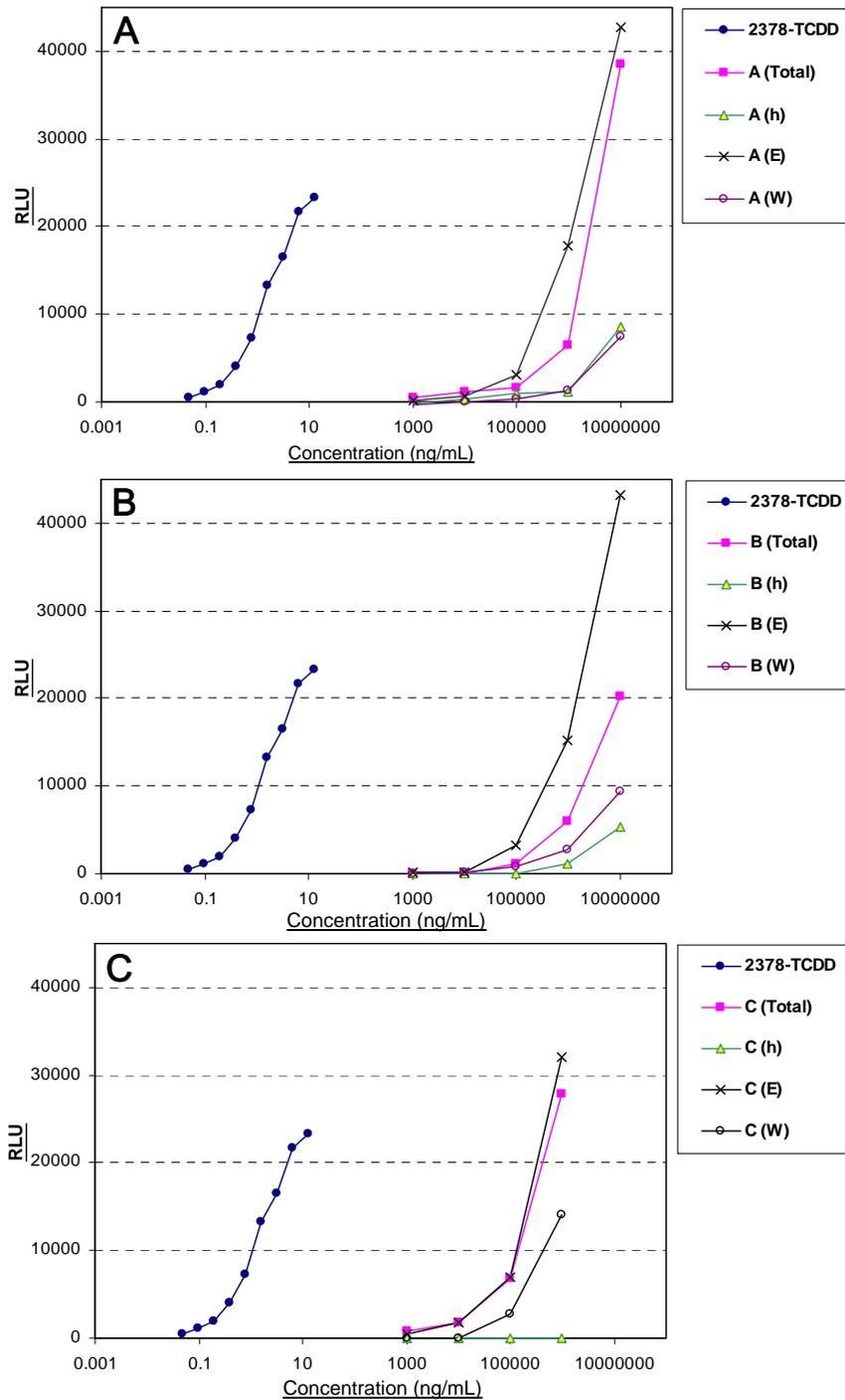


図 2a. ダイオキシンと試料(A~C)分画物の AhR 結合活性(用量-反応曲線)
 ケイラックスアッセイにより評価
 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; Total, 分画前エキス; h, ヘキサン分画物;
 E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物

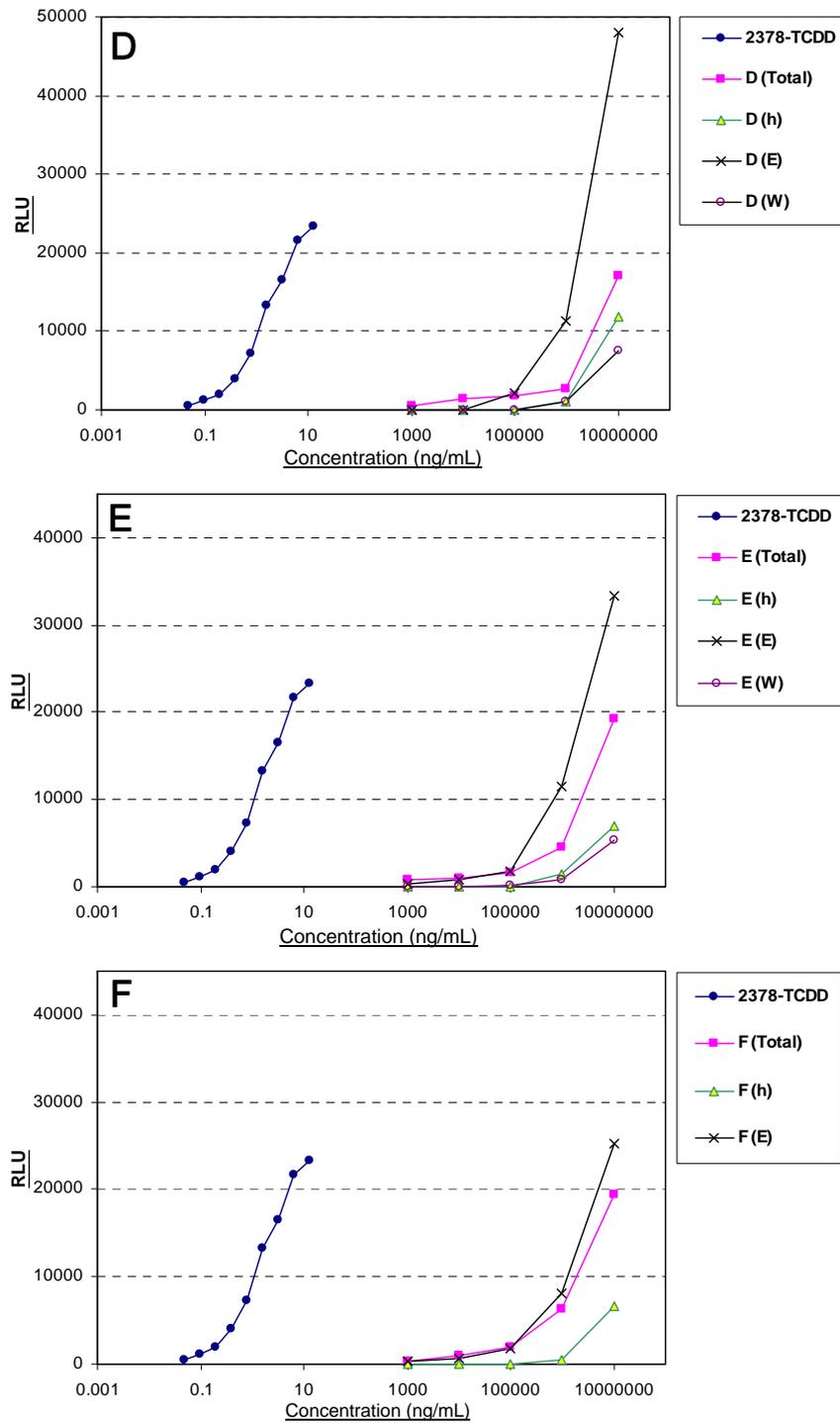


図 2b. ダイオキシンと試料(D~F)分画物の AhR 結合活性(用量-反応曲線)
 ケイラックスアッセイにより評価
 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; Total, 分画前エキス; h, ヘキサン分画物;
 E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物

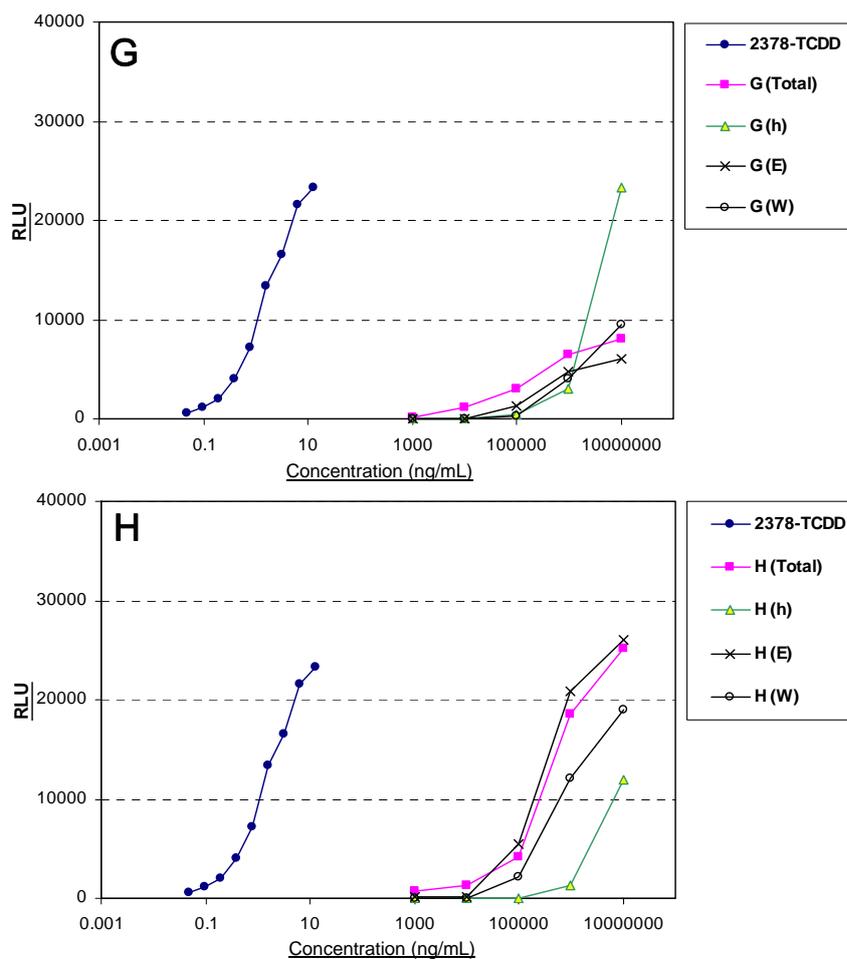


図 2c. ダイオキシンと試料(G, H)分画物の AhR 結合活性(用量-反応曲線)
 ケイラックスアッセイにより評価
 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; Total, 分画前エキス; h, ヘキサン分画物;
 E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物

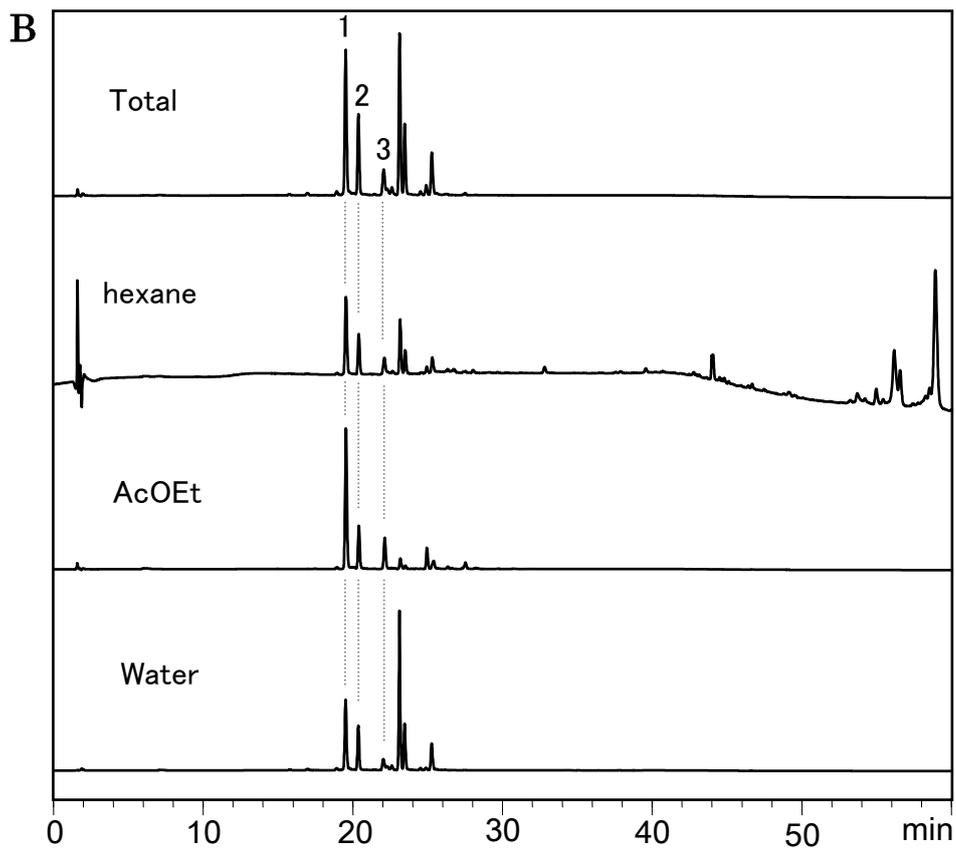
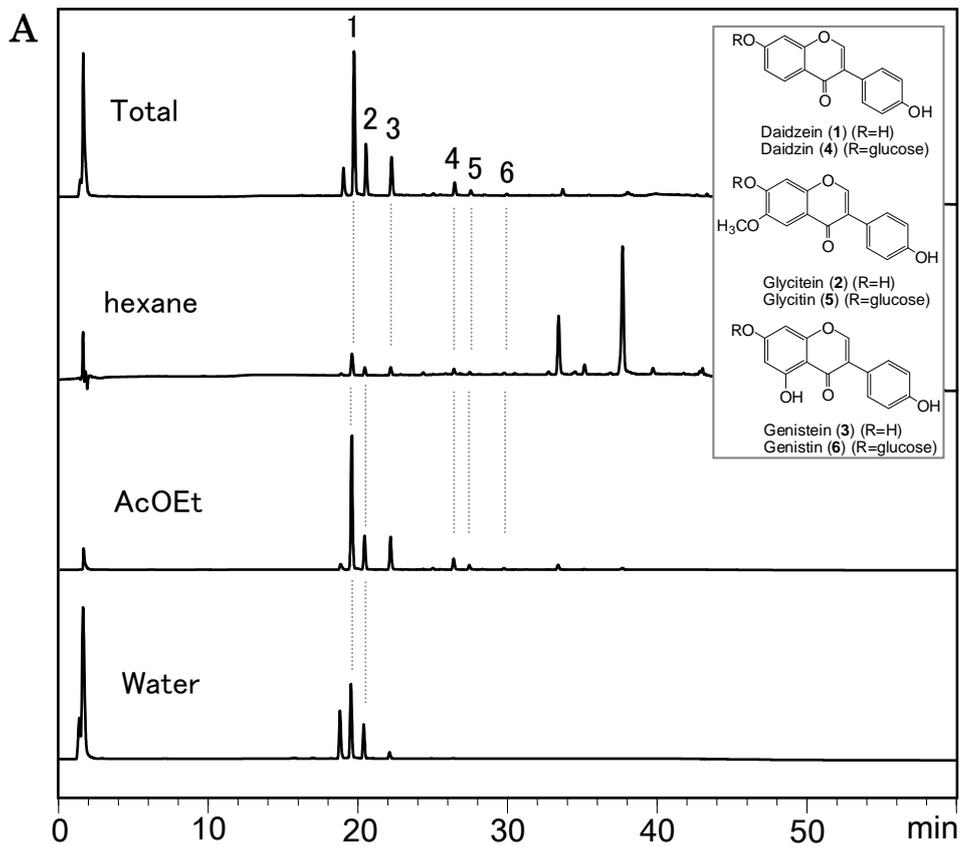


図 3a. 試料(A, B)分画物の HPLC クロマトグラム

Total, 分画前エキス; hexane, ヘキサン分画物; AcOEt, 酢酸エチル分画物; Water, 水分画物
 1, Daidzein; 2, Glycitein; 3, Genistein; 4, Daidzin; 5, Glycitin; 6, Genistin
 分析条件, 研究方法参照

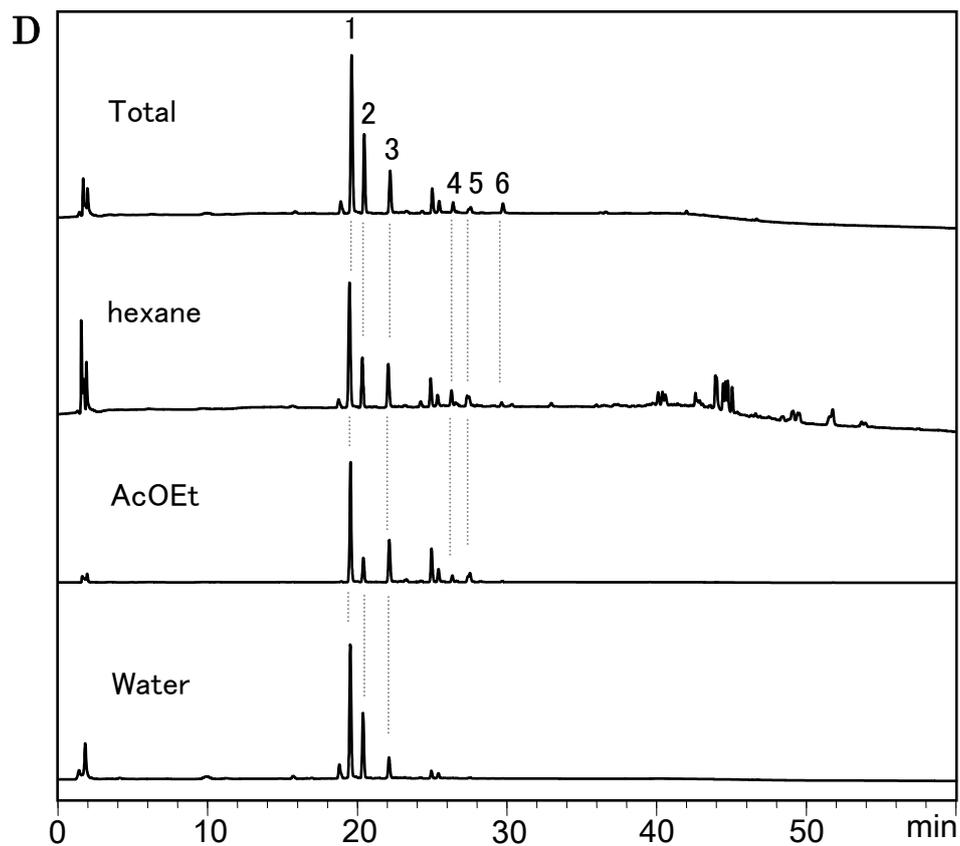
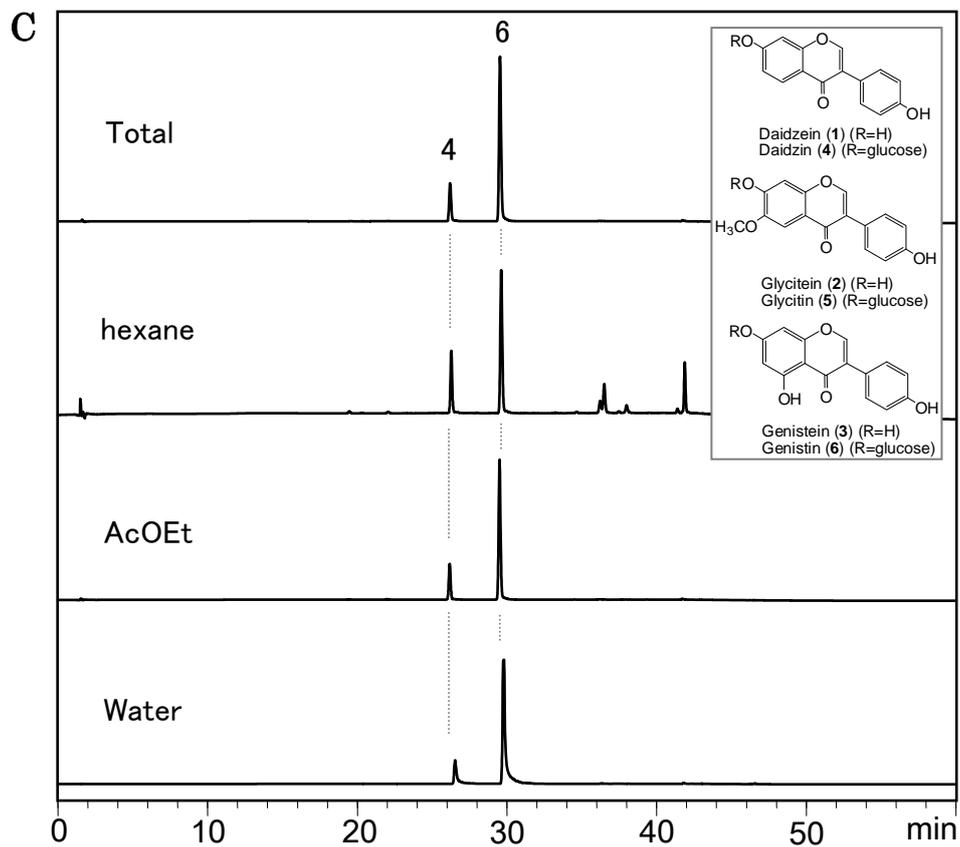


図 3b. 試料(C, D)分画物の HPLC クロマトグラム

Total, 分画前エキス; hexane, ヘキサン分画物; AcOEt, 酢酸エチル分画物; Water, 水分画物
 1, Daidzein; 2, Glycitein; 3, Genistein; 4, Daidzin; 5, Glycitin; 6, Genistin
 分析条件, 研究方法参照

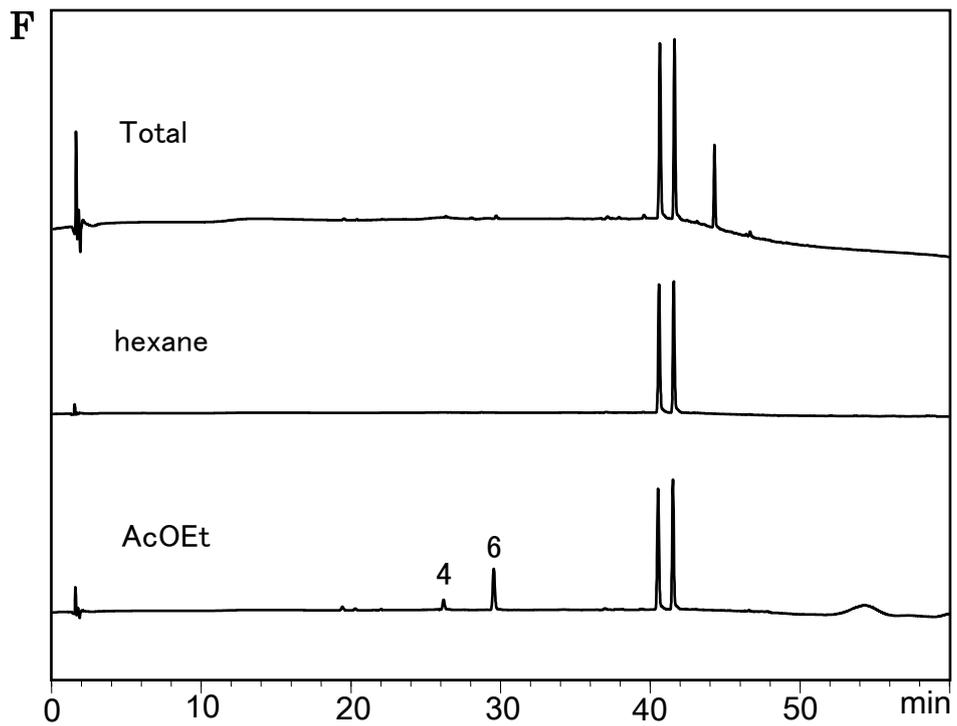
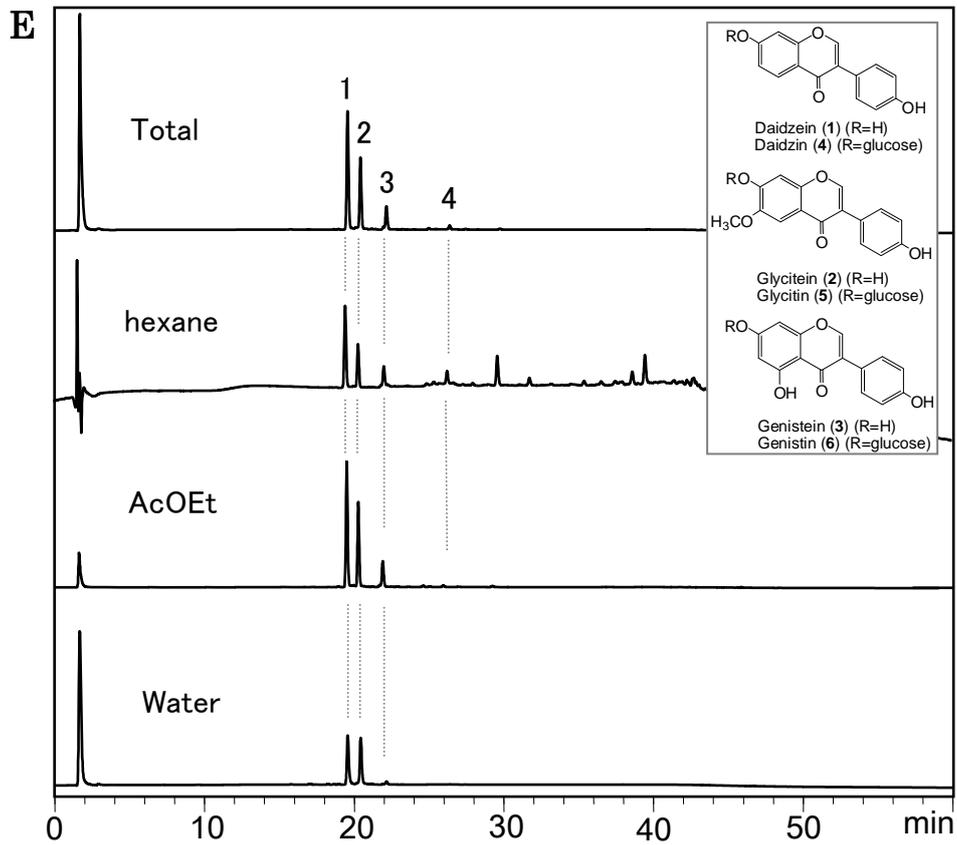


図 3c. 試料 (E, F) 分画物の HPLC クロマトグラム
 Total, 分画前エキス; hexane, ヘキサン分画物; AcOEt, 酢酸エチル分画物; Water, 水分画物
 1, Daidzein; 2, Glycitein; 3, Genistein; 4, Daidzin; 5, Glycitin; 6, Genistin
 分析条件, 研究方法参照

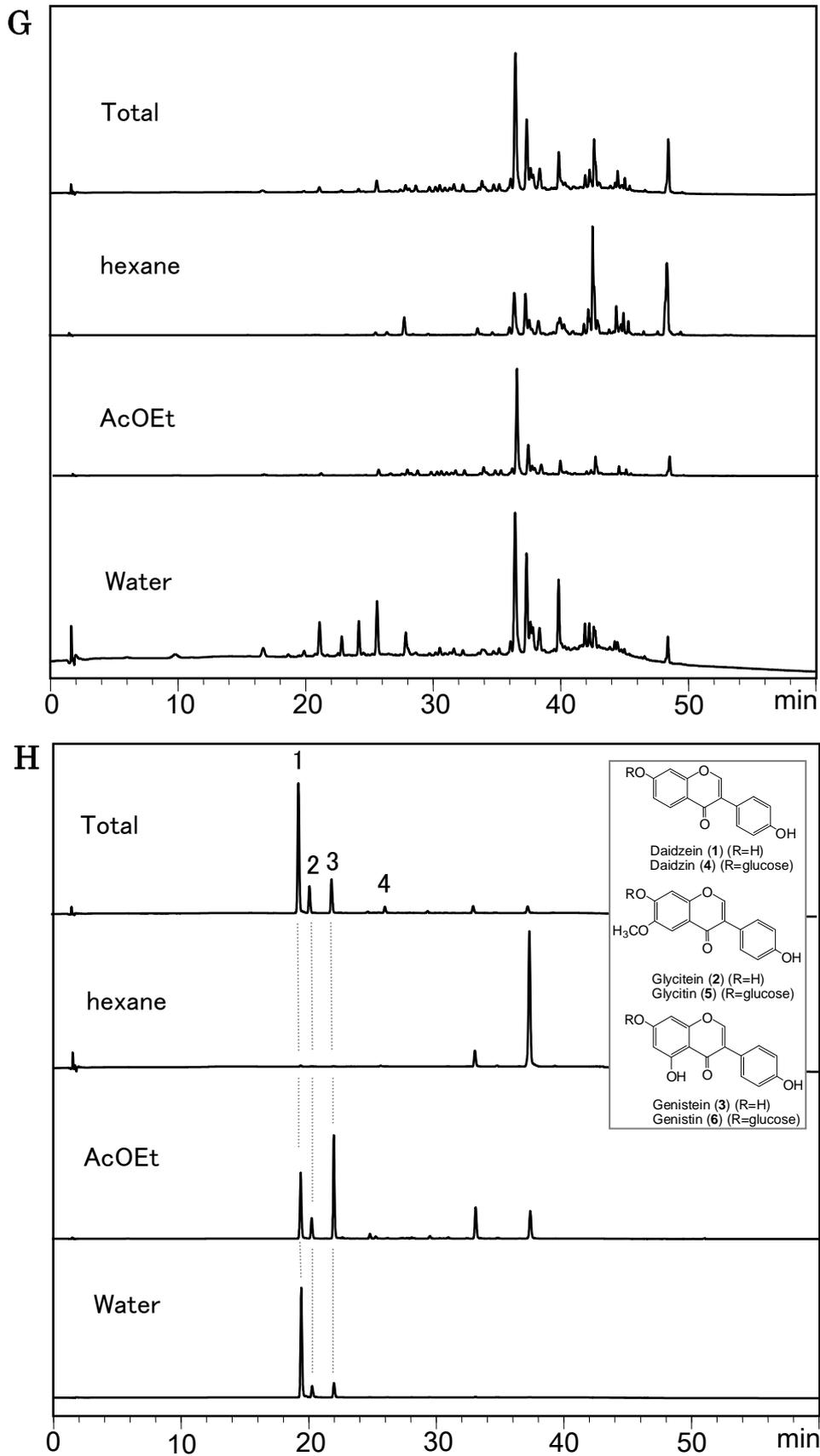


図 3d. 試料(G, H)分画物の HPLC クロマトグラム

Total, 分画前エキス; hexane, ヘキサン分画物; AcOEt, 酢酸エチル分画物; Water, 水分画物
 1, Daidzein; 2, Glycitein; 3, Genistein; 4, Daidzin; 5, Glycitin; 6, Genistin
 分析条件, 研究方法参照