

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

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
(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

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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。高濃度で AhR 活性が見込まれる試料として、濃縮物が中心の加工食品であるサプリメントや健康食品を取り上げ、50 種類の市販品について、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、主に大豆、ゴマ、プロポリスを原料とする試料の一部が、高濃度で 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) と同等の AhR 活性を示した。今回、一部の試料が高濃度ではあるが、食品成分に由来すると考えられる AhR 活性を示したことから、特に活性を示した食品原料中のダイオキシン類濃度を本バイオアッセイにより測定する際は、測定結果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

A. 研究目的

芳香族炭化水素レセプター(AhR)は、哺乳動物などの細胞、組織内に存在する受容体型転写因子で、ダイオキシンなど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 の元来の機能については不明な部分も多い。それゆえ、AhR は依然、オーファンレセプターの一つにあげられている。食品

中には微量で検出される汚染物質としてのダイオキシン類の他に、天然 AhR アゴニスト(ダイオキシン様物質)の存在が示唆されており、ダイオキシンと比較してかなり高濃度で、AhR 結合活性(ダイオキシン様活性)を示すことが明らかになっている¹⁾⁻³⁾。それらの健康影響について懸念されるが、その実態については殆ど明らかにされておらず、さらなる検討が必要とされる。

一方で、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。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）。錠剤は粉碎機により粉末にし、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 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 を加えて攪拌後、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℃, 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〕、イチヨ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様活性を示した。

特に顕著にダイオキシシ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、それらを含む原料由来の大豆抽出物含有食品が主にダイオキシシ様活性を認めた。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

表 1. 供試した食品試料の概要

No.	名称	形状	No.	名称	形状
1	ガルシニア抽出物含有食品	錠剤	36	茶類（シソ葉）	茶
2	マカエキスを含有食品	カプセル	37	茶類（柿葉）	茶
3	ウコンエキスを含有食品	カプセル S	38	茶類（ヨモギ）	茶
4	調製ローヤルゼリー	カプセル	39	茶類（ルイボス）	茶
5	ギムネマ抽出物含有食品	錠剤	40	茶類（ビワ葉）	茶
6	ヘマトコッカス藻色素含有食品	カプセル S	41	プロポリスエキスを含有食品	カプセル S
7	ビタミン類含有食品	カプセル S	42	タマネギエキスを含有食品	錠剤
8	イソフラボン含有食品	カプセル S	43	アミノ酸，ビタミン，ミネラル加工食品	錠剤
9	大豆抽出物含有食品	カプセル	44	野菜加工食品	錠剤
10	β -カロテン含有加工食品	錠剤	45	ギムネマシルベスタエキスを含有食品	錠剤
11	カシスエキスを含有加工食品	錠剤	46	大豆イソフラボン加工食品	錠剤
12	植物性ステロイド含有食品	カプセル S	47	ウコン加工食品	錠剤
13	コエンザイム Q10 含有食品	カプセル S	48	アガリクス茸加工食品	錠剤
14	ルテイン含有食品	カプセル S	49	キダチアロエ加工食品	錠剤
15	アスタキサンチン含有食品	カプセル S	50	ウラジロガシ加工食品	錠剤
16	大豆イソフラボン含有食品	錠剤			
17	大豆抽出物含有食品	錠剤			
18	ノコギリヤシエキスを加工食品	カプセル S			
19	野菜加工食品	錠剤			
20	ビルベリーエキスを含有食品	カプセル S			
21	魚油加工食品	カプセル S			
22	キトサン加工食品	錠剤			
23	ルテイン含有食品	カプセル S			
24	ウコンエキスを含有食品	錠剤			
25	ビタミン C 含有食品	錠剤			
26	大豆若葉加工食品	粉末			
27	大豆イソフラボン含有食品	錠剤			
28	魚油加工食品	カプセル S			
29	イチョウ葉エキスを含有食品	錠剤			
30	ゴマ加工食品	カプセル S			
31	大麦若葉加工食品	粉末			
32	茶類（エキナセア）	茶			
33	茶類（杜仲）	茶			
34	茶類（甜茶）	茶			
35	茶類（グアバ）	茶			

表 2. 供試した食品試料の AhR (ダイオキシン様) 活性能 (抜粋)

試料 No.	TCDD (ng/mL)	抽出物濃度 ^{a)} (mg/mL)
8	0.5	5.6
	1.0	11.1
9	0.5	28.0
	1.0	— ^{b)}
16	0.5	1.8
	1.0	3.5
17	0.5	16.5
	1.0	40.3
27	0.5	19.0
	1.0	58.9
30	0.5	7.6
	1.0	16.6
36	0.5	54.5
	1.0	—
40	0.5	56.6
	1.0	—
41	0.5	2.3
	1.0	6.1
46	0.5	1.4
	1.0	3.4

各 3 回測定

^{a)} TCDD 各濃度 (0.5, 1.0 ng/mL) の AhR 活性度に対する各抽出物濃度 (mg/mL)

^{b)} >100 mg/mL

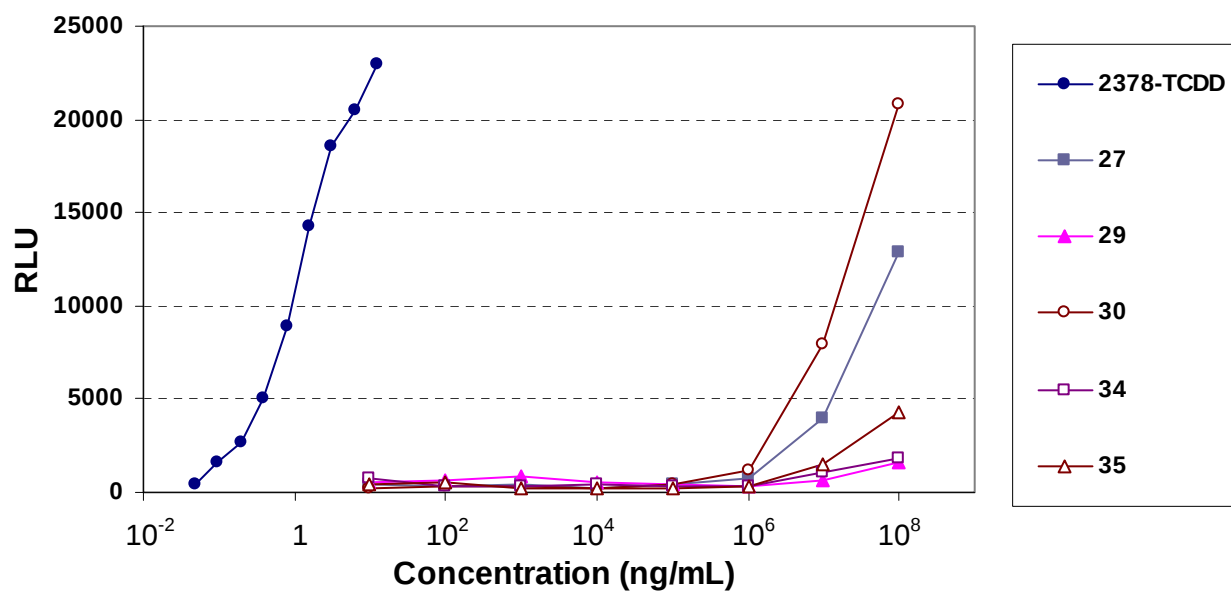
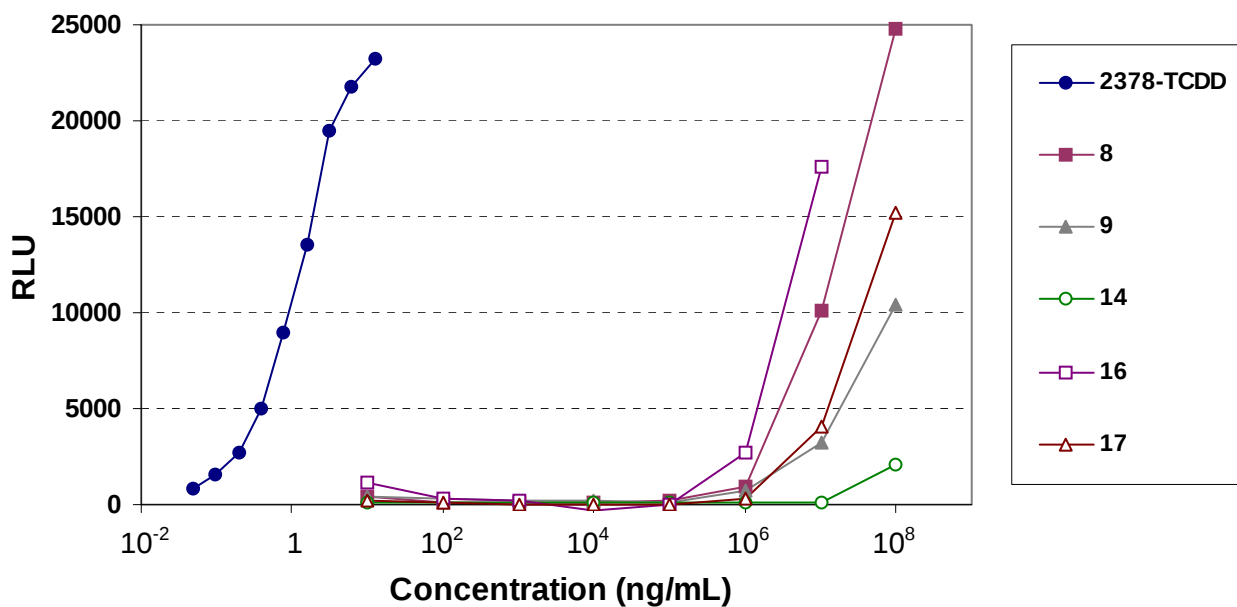


図1(a). ダイオキシンと食品試料の AhR(ダイオキシン様)活性〔用量-反応曲線〕
 ケイラックスアッセイにより評価
 2378-TCDD:2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 番号:試料 No.

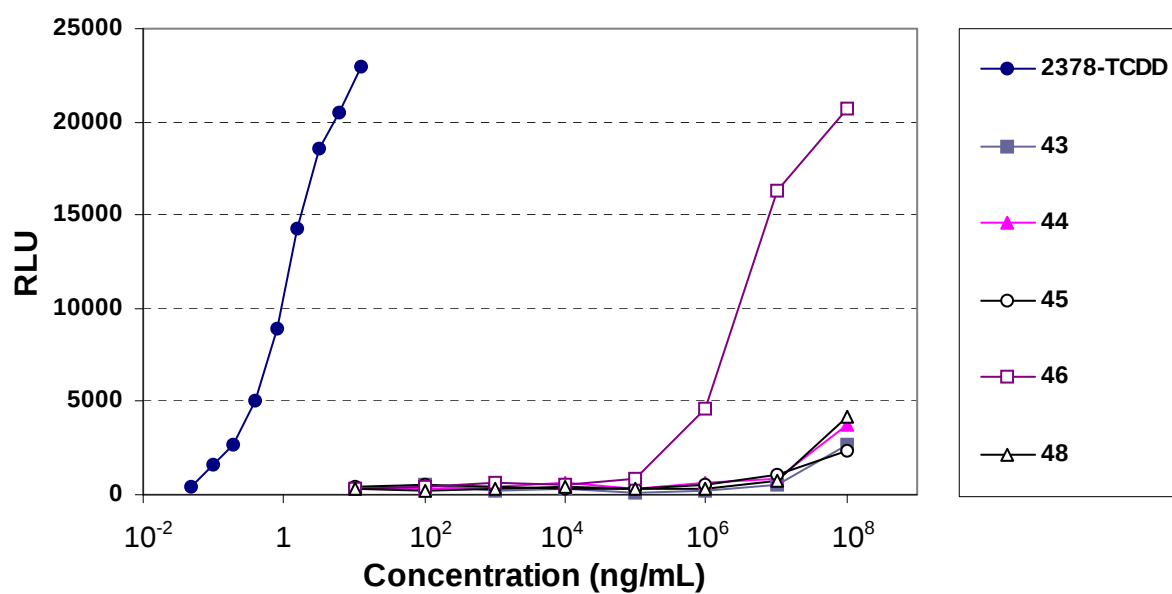
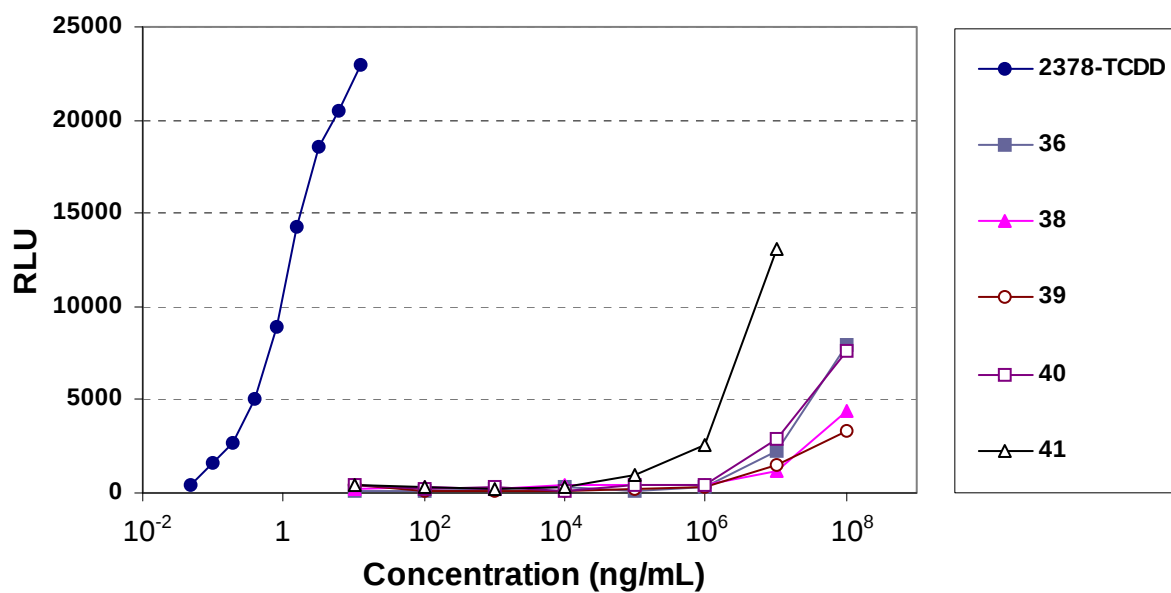


図1(b). ダイオキシンと食品試料の AhR(ダイオキシン様)活性〔用量-反応曲線〕
 ケイラックスアッセイにより評価
 2378-TCDD:2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 番号:試料 No.