

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

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、20年度の調査でAhR活性が認められた天然物濃縮加工食品の各分画物(大豆およびゴマ抽出物含有試料の酢酸エチル分画物、プロポリス抽出物含有試料のヘキサン分画物)の含有成分について精査し、同定した化合物の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。含有成分については、大豆含有試料から2種のイソフラボン類(formononetin、biochanin A)、プロポリス試料から8種の化合物(isorhamnetin、pinobanksin、chrysin、pinocembrin、galangin、tectochrysin、pinostrombin、artepillin C)を新たに単離、同定した。またこれら化合物のうち、tectochrysinは顕著なAhR活性を示した。本結果から、イソフラボン類やフラボン類を含有する食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前処理やデータ解析が必要であることが考察された。

またこれまでの結果から、AhR活性を示す食品成分としてフラボノイドがあげられるため、未検討のフラボノイド類25種についてAhR活性を評価したところ、3',4'-dimethoxy flavone、4',6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetinに強いAhR活性が認められ、特にtamarixetinは2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)より強いAhR活性を示した。一方で、その他のものはAhR活性を殆ど示さなかった。

本研究により明らかになったAhR活性成分の特性をみると、イソフラボンのように過剰摂取により健康影響が懸念されるものもあるが、一方で有効成分として報告されているものであり、ダイオキシンのような蓄積性はないことから健康影響はないものと判断される。

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

芳香族炭化水素レセプター(AhR)は、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の元来の生理的機能については不明な部分が多い。

A. 研究目的

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ン類分析にバイオアッセイを適用する場合、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。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 (ダイオキシン様物質) が同定され、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²⁻⁴⁾。しかし食品中のダイオキ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、プロポリス抽出物などの含有加工食品が高濃度で AhR 活性を示す結果を得た⁶⁾。20 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

して活性が認められた分画物について逆相 HPLC 分析を実施した⁷⁾。今年度は、活性の認められた試料分画物に含まれる成分について精査し、単離、同定した化合物の AhR 活性を評価した。さらにこれまでの研究結果から AhR 活性成分としてフラボノイドがあげられることから、未検討のフラボノイド類 25 種について AhR 活性を測定し、本研究で明らかとなった AhR 活性成分の特性から、迅速測定法への影響および健康影響について考察した。

B. 研究方法

1. 試料

19 年度検討した天然物濃縮加工食品 (サプリメントおよび健康食品) 50 種のうち、AhR 活性が認められた試料の中で 5 種 [プロポリス抽出物含有食品 (PP)、ゴマ加工食品 (SM)、大豆抽出物含有食品 (SB) (A~C)] を選択し、それら分画物を試料として用いた。分画物の調製については、各食品 (1 g) にエタノール/水 (4:1) (30 mL) を加え 10 分間超音波処理し、抽出液を吸引ろ過後、ろ液を濃縮して水 (10 mL) を加え、*n*-ヘキサン、酢酸エチル (各 30 mL) で順次振とう抽出後、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。また水画分を濃縮し水分画物とした。

2. 試薬、試液および機器

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。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。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Diaion HP-20(三菱化学)、MCI GEL CHP20P (75–150 μm) (三菱化学)、Toyopearl HW-40 (fine) (東ソー)、YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシー) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

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 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 を加えて攪拌した。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 H1L6.1c2 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 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%酢酸水溶液および (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

試料 50 種の中で AhR 活性の認められた試料のうち、5 種 [プロポリス抽出物含有食品 (PP)、ゴマ加工食品 (SM)、大豆抽出物含有食品 (SB) (A~C)] の抽出物について、ヘキサン、酢酸エチルおよび水分画物を調製し、得られた各分画物の AhR (ダイオキシン様) 活性をケイラックスアッセイにより測定した。併せて、各分画物の成分分布を確認するため、HPLC による分析を実施した。その結果を図 1 に示す。

PP 抽出物については、ヘキサン分画物において 1~10 mg/mL の濃度領域で TCDD と同等の AhR 活性が認められた。一方、SM および SB 抽出物では、共通して酢酸エチル分画物の 0.1~10 mg/mL の濃度領域で顕著な AhR 活性が認められた。この AhR 活性に寄与する化合物を明らかにする目的で、PP 抽出物ヘキサン分画物の HPLC 検出ピークについて、各種カラムクロマトによる分離精製を行った。その結果、8 種の化合物 (isorhamnetin、pinobanksin、chrysin、pinocembrin、galangin、tectochrysin、pinostrombin、artepillin C) を単離、同定することが出来、これら化合物について AhR 活性を評価した。結果を図 2 に示す。試験した化合物の中で tectochrysin に顕著な AhR 活性が認められ、次いで artemillin C に活性が認められた。AhR 活性を示したヘキサン分画物の HPLC チャートを見ると、tectochrysin、pinostrombin、artepillin C が主成分として検出されており、PP 抽出物の AhR 活性本体は主に tectochrysin によるところが大きいことが示された。

一方、SM および SB 抽出物で AhR 活性が示された酢酸エチル分画物の HPLC 分析結果は、共通して daidzein など既に本アッセイにより AhR 活性成分として明らかになっているイソフラボン類が検出された。さらに、

SM 抽出物からは sesamin、一部の SB 抽出物からは新たにイソフラボン類 2 種 (formononetin、biochanin A) が単離、同定された。それらの AhR 活性を評価したところ、sesamin は活性が認められず、formononetin および biochanin A については弱い AhR 活性が認められた (図 2)。従って、SM および SB 抽出物の AhR 活性本体は daidzein などのイソフラボン類であることが示唆される。

また、これまでの研究成果から食品中の AhR 活性成分としてフラボノイドがあげられるため、さらなる研究データの集積を目的に未検討のフラボノイド類 25 種について AhR 活性を測定した。供試したフラボノイドの化学構造とその結果を図 3 に示す。結果、一部のフラボノイド (3',4'-dimetoxyflavone、4',6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetin) に強い AhR 活性が認められ、特に tamarixetin の活性は TCDD より強く、顕著であった。一方で、その他の試料は AhR 活性が殆ど認められなかった。これまでの結果から、フラボノイドの AhR リガンドとしての構造活性相関を考察すると、配糖体よりアグリコンの活性が強いことはこれまでの傾向と同じであった。フラボン類においては、B 環の官能基数が 2 個以内で、全て水酸基よりもメトキシ基を含む方が活性の強い傾向にあった。A 環については、官能基数は 2 個以内で 3 個になると活性が弱まる傾向にあり、水酸基とメトキシ基での違いは認められなかった。イソフラボン類においては、daidzein と formononetin、biochanin A を比較すると、B 環の 4 位がメトキシ基になることで活性は弱くなる傾向が認められた。

AhR 活性を示した画分に分布した成分の特性をみると、大豆イソフラボン (daidzein、glycitein、genistein など) のように過剰摂取により健康影響が懸念されるものもあるが、一方で有効成分として報告されているもの

であった。これらはダイオキシンのような蓄積性もないことから、健康影響はないものと判断される。一方で最近、AhR 活性の免疫調節への関与が報告されており⁸⁾、食品由来の天然 AhR 活性成分が有効成分であることを考えると、AhR を介して免疫系制御などに有効に作用している可能性が示唆される。

D. 結論

19、20 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 5 品目) の各分画物 (ヘキサン、酢酸エチル、水分画) について AhR 活性を評価し、各活性本体を精査した。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に検出されたフラボン類の tectochrysin に強い AhR 活性が認められ、本化合物による寄与が示唆された。他の試料では酢酸エチル分画物に検出された大豆イソフラボン類による影響が示された。また未検討のフラボノイド 25 種について AhR 活性を検討したところ、一部のフラボノイド (3',4'-dimetoxyflavone、4,6,7-trihydroxyisoflavone、tamarixetin) に強い AhR 活性が認められ、特に tamarixetin の活性は顕著であった。バイオアッセイで特にこれら化合物を含有する食品中のダイオキシシン類を測定する際は、その影響を考慮して測定する必要がある。

またこれら天然 AhR 活性成分の特性をみると、有効成分として報告されているものであり、さらにダイオキシシン様の蓄積性もないことを考え合わせると、これらによる健康影響はないものと判断される。

E. 参考文献

- 1) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシシン対策室：「ダイオキシ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).
- 7) 平成 20 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).
- 8) Quintana, FJ., Basso, AS., Iglesias, AH., Korn, T., Farez, MF., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, HL., Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor, Nature, **453**, 65–71 (2008).

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Yoshida, T.: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods, in preparation.

2. 学会発表

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R., Yoshida, T.: Estimation of aryl hydrocarbon receptor binding activity of health food extracts using *in vitro* reporter gene assay. The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy (2009.9).
- 2) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 半田洋士, 好村守生, 松田りえ子, 吉田隆志: 健康食品素材の AhR 結合活性について. 第 3 回食品薬学シンポジウム(2009. 11).
- 3) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 半田洋士, 好村守生, 松田りえ子, 吉田隆志: 天然物濃縮加工食品の AhR 結合活性と成分分析. 日本薬学会第 130 年会(2010. 3).

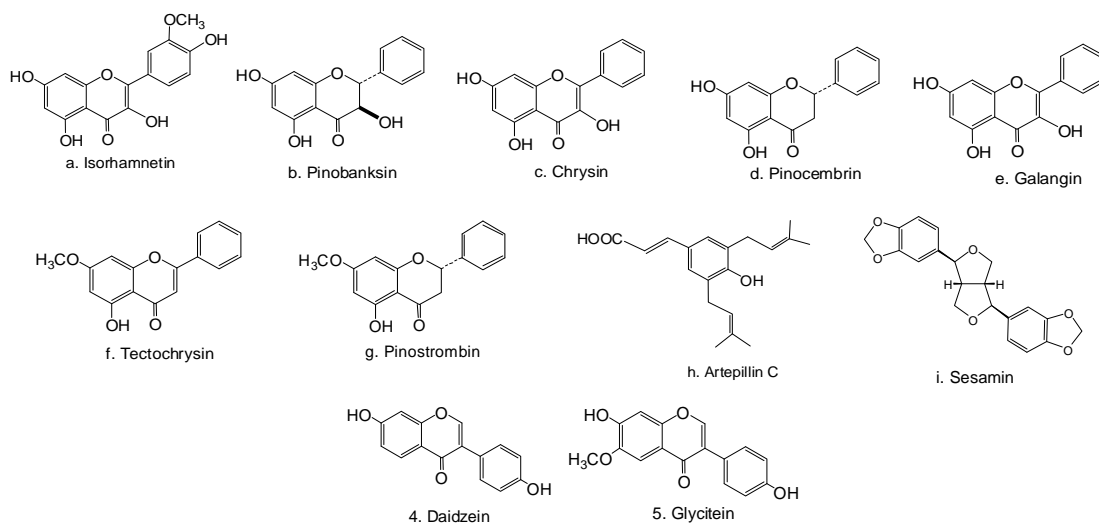
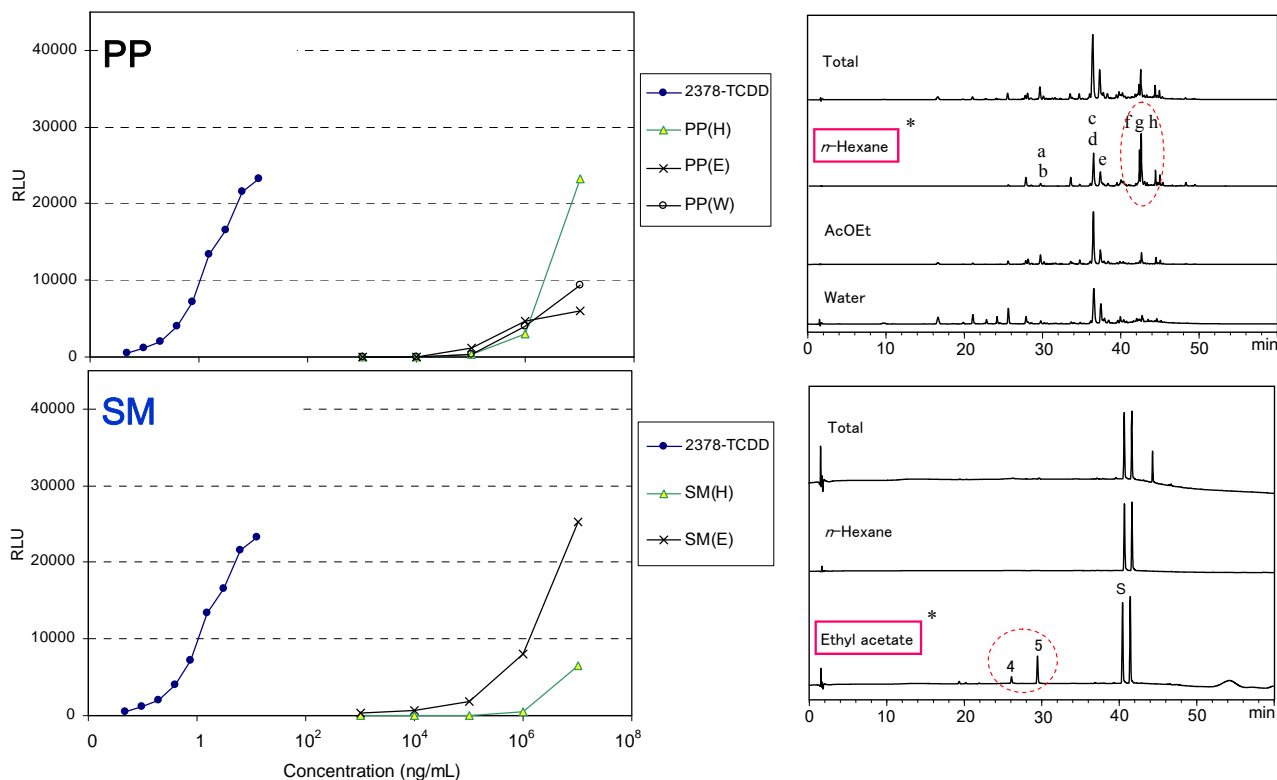


図1a. 試料分画物の AhR 活性(用量-反応曲線)と成分分布(HPLC)および同定した化合物の構造
 PP, プロポリス抽出物含有食品抽出物; SM, ゴマ加工食品抽出物; 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin;
 H, ヘキサン分画物; E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物, *AhR 活性画分
 a, isorhamnetin; b, pinobanksin; c, chrysin; d, pinocembrin; e, galangin; f, tectochrysin; g, pinostrombin; h, artepillin C;
 i, sesamin; 4, daidzein; 5, glycitein
 分析条件, 研究方法参照

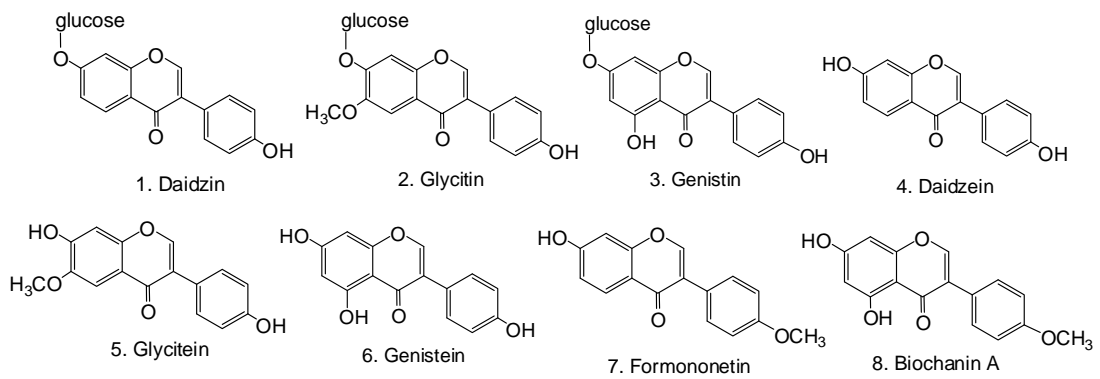
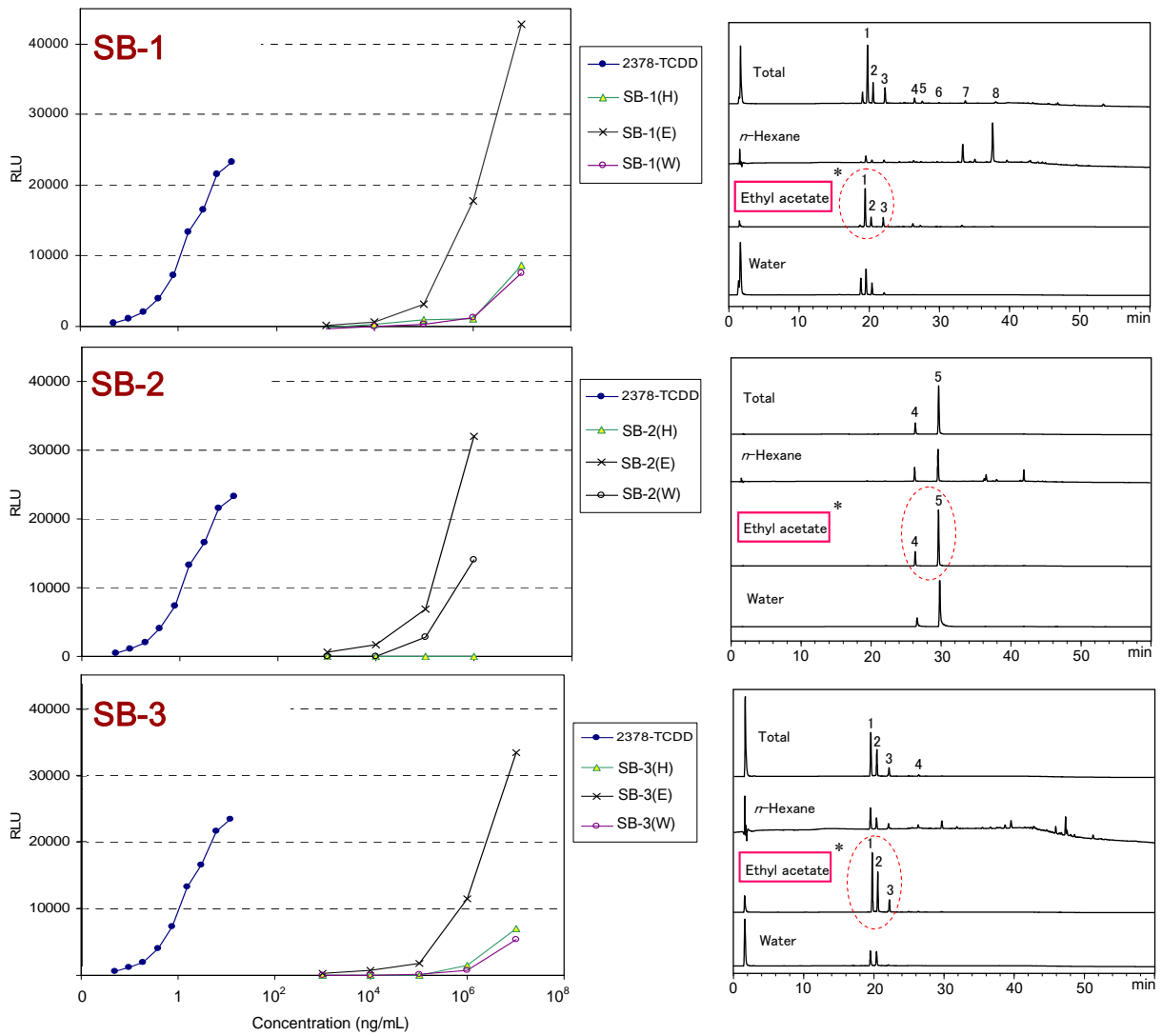


図1b. 試料分画物の AhR 活性(用量-反応曲線)と成分分布(HPLC)および同定した化合物の構造
 SB, 大豆抽出物含有食品, 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; H, ヘキサン分画物; E, 酢酸エチル分画物; W, 水分画物, *AhR 活性画分
 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, daidzein; 5, glycitein; 6, genistein; 7, formononetin; 8, biochanin A
 分析条件, 研究方法参照

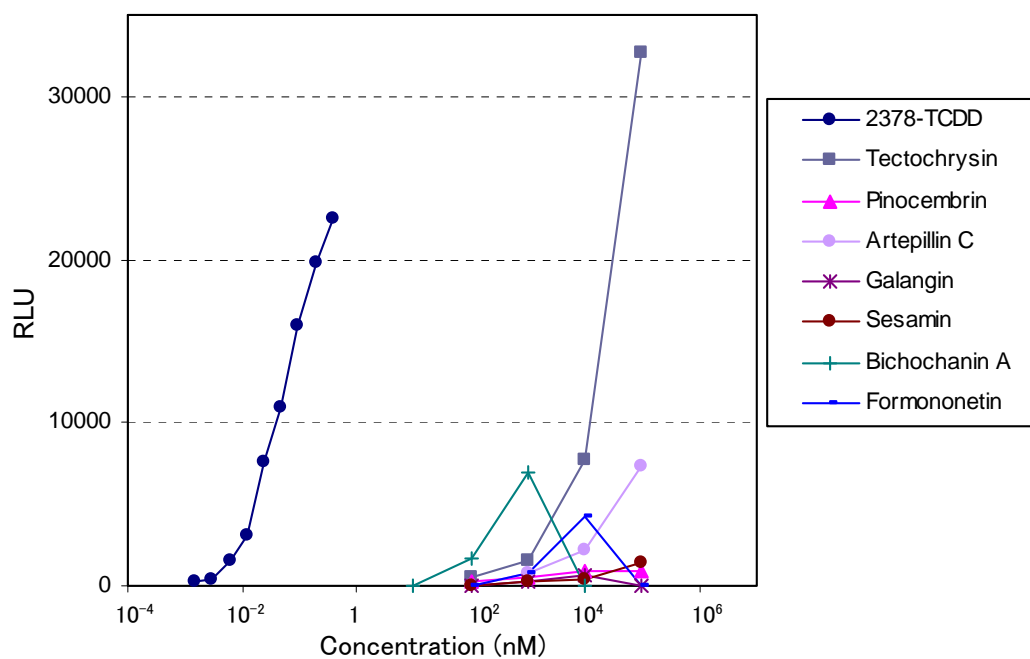


図2. 同定した化合物の AhR 活性(用量-反応曲線)
 2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
 分析条件, 研究方法参照

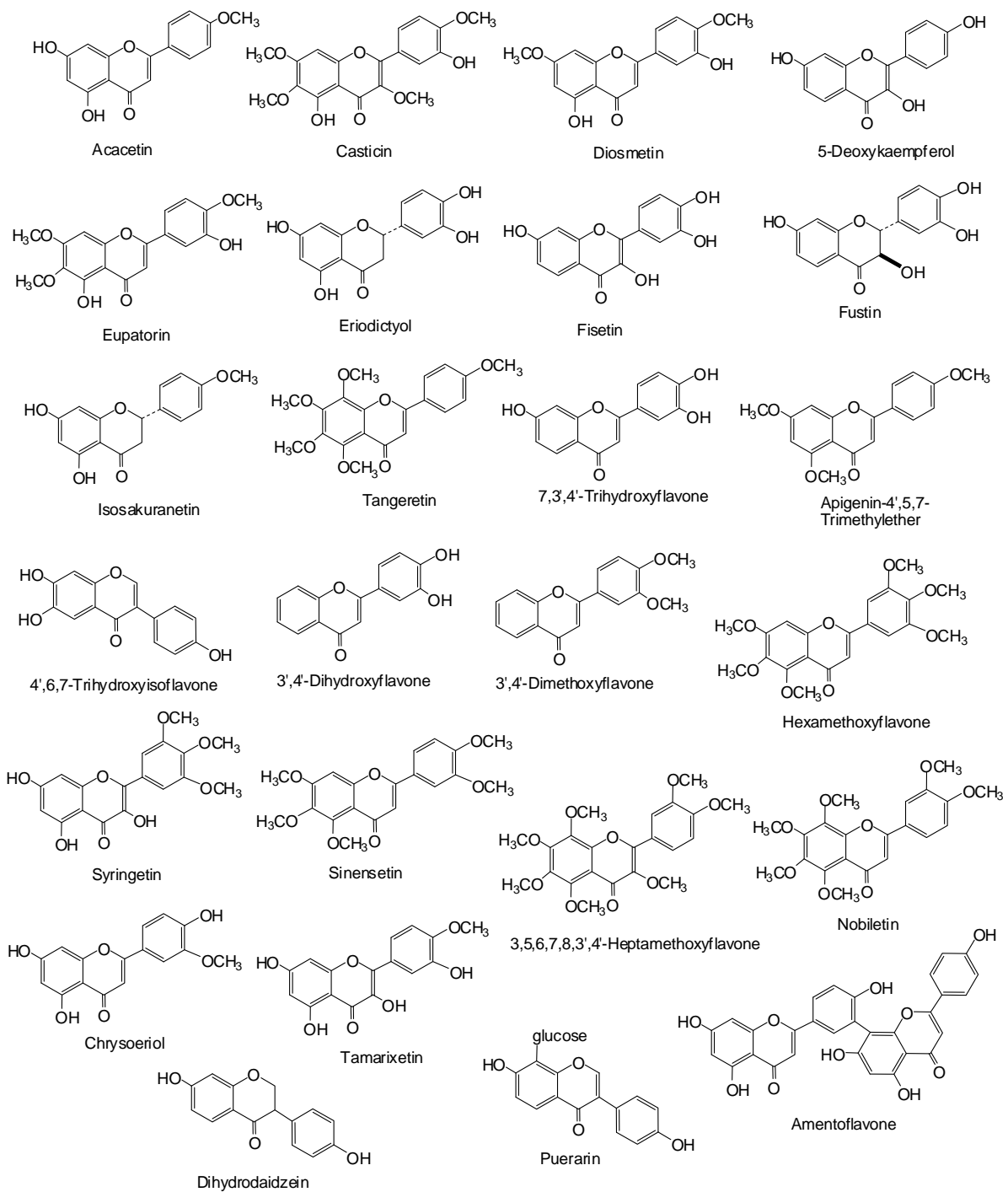


図3a. 供試したフラボノイド 25 種の化学構造

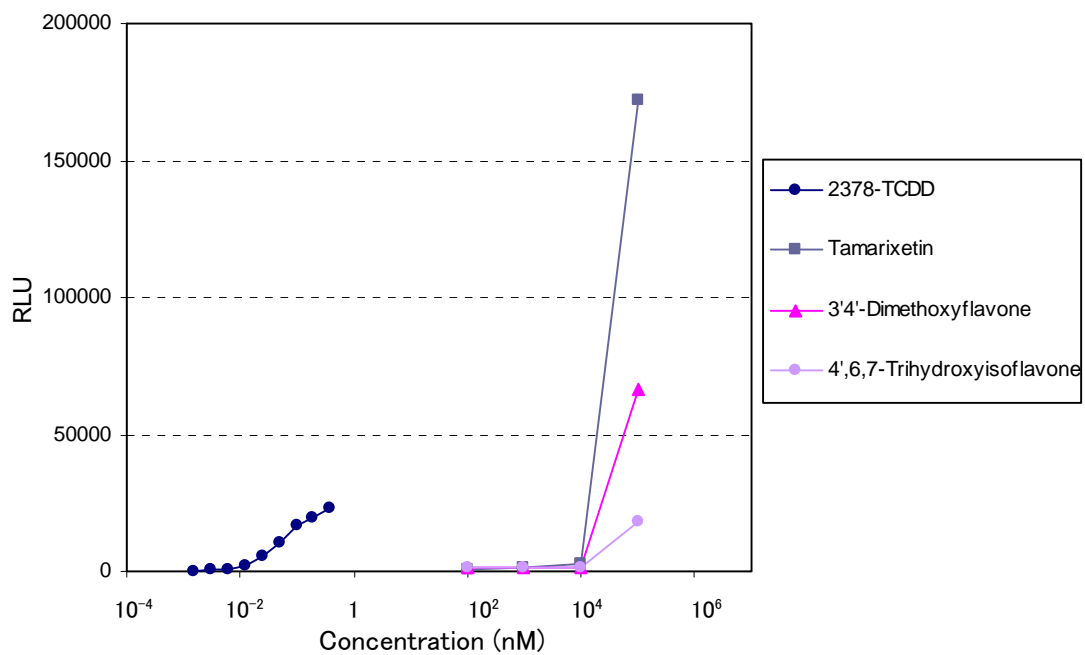


図3b. フラボノイド*の AhR 活性(用量-反応曲線)

*AhR 活性が認められたものを選択

2378-TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

分析条件, 研究方法参照