

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
分担研究報告書

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

(4) 食品中ダイオキシン類のリスク低減に関する研究

—植物性食品成分のダイオキシン類毒性バイオアッセイ系への影響—

分担研究者 天倉吉章 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中ダイオキシン類のリスク低減化に寄与する情報を得るため、植物性食品成分のダイオキシン類毒性バイオアッセイ系への影響を検討した。評価には、ダイオキシン類の毒性発現に関与するアрил炭化水素レセプター(AhR)を介したメカニズムに基づくバイオアッセイ法、ケイラックスアッセイ(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)を利用し、入手出来た95種の植物性食品成分について検討した。その結果、大部分の化合物は作用を示さなかったが、大豆イソフラボンの他、一部のフラボノイド、スチルベン骨格を有するresveratrolなど、いわゆる植物エストロゲンといわれるものの一部に、高濃度でアッセイ系の活性化が認められた。今回のデータはあくまでも予備的なものであるが、現段階でいえることは、一部食品の過度の摂取を避けたバランスのとれた食事が重要で、ダイオキシンのリスク低減化においても大切であるといえる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

堤 智昭

株式会社日吉

中村昌文

岡山大学薬学部

吉田隆志

割を果たしていたのかもしれない。しかし、食品成分と AhR との相互作用に関する詳細な検討はほとんど見られない。一方、一般生活レベルでのダイオキシンのヒトへの摂取は、その大半が通常食する食品を媒体とするため、そのリスクを考察する上での情報として、食品成分の AhR への影響については検討が必要とされる。さらにその本質を明確にすることで、食品の利点を追求でき、ダイオキシンのリスク低減化を指向した研究が期待される。

そこで本研究では、植物性食品成分の AhR との相互作用について、AhR を介した毒性発現メカニズムに基づくダイオキシン類バイオアッセイ法であるケイラックスアッセイ(ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用し、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レポータージーンアッセイ)を用いて検討を行った。

A. 研究目的

アрил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へ関与することが指摘されている。近年、そのメカニズムに関する研究が数多く行われ、様々な知見が得られているが、このレセプターに関しては未解明な部分も多く、依然、オーファンレセプターの一つにあげられている。リガンドとなるダイオキシンなどは、近年、人類が生み出した産物であるため、AhR は元来、食物などの外来性天然物による誘導現象の受容体として何らかの役

B. 研究方法

1. 試料

入手可能な様々なタイプの植物性食品成分 95

種(フラボノイド類、タンニン類、サポニン類、テルペン類など)を試料とした。Procyanidin B2、C1は *Theobroma cacao* 由来、procyanidin B4は *Cowania mexicana* 由来、brevifolincarboxylic acidは *Phyllanthus flexuosus* 由来、geraniinは *Geranium thunbergii* 由来、agrimoniinは *Agrimonia japonica* 由来、oenothein Bは *Eugenia uniflora* 由来、gemin A、pedunculagin、tellimagrandin Iは *Geum japonicum* 由来、pentagalloylglucose、rugosin Dは *Loropetalum chinensis* 由来、sanguin H-6は *Rubus parvifolius* 由来のものを用いた。Naringin 4'-O- α -glucoseは食品添加物、酵素処理ナリンジン由来のものを用いた(純度はすべて90%以上であることをHPLCで確認した)。他の試料は、フナコシ(株)、和光純薬工業(株)、東京化成(株)、シグマ アルドリッチ、ナカハラ科学(株)から購入した。試料の化学構造を図1に示す。

2. 試薬、試液及び装置

ジメチルスルホキシド(DMSO)(生化学用)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD、98%)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。ルミノメーターはAnthos社製Lucy 1 microplate luminometerを使用した。

3. 評価方法

評価はケイラックスアッセイにより行った。試料溶液(コントロールはDMSO)は終濃度0.01~100,000 nMの範囲で8段階にDMSOで希釈して調製した(TCDDは終濃度0.0015~0.39 nMの範囲で9段階に希釈)。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°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。試料濃度-ルシフェラーゼ活性の反応曲線より、TCDDの最高値を100としたときの25%活性値(EC₂₅値: 1.3×10^2 nM)を誘導する濃度をEC_{TCDD25}とし、試料の活性度を表した。またTCDDのEC₂₅値を1.0として換算した値を誘導等価係数(IEF)とし、その度合いを評価した。試験はすべて3回ずつ行い、その平均値で示した。

C. 研究結果

ケイラックスアッセイの結果、一部の成分において $10^3 \sim 10^5$ nMレベルの高濃度でルシフェラーゼ活性を認めたが、ほとんどの化合物は 10^5 nMレベルにおいても活性を示さなかった。図2にケイラックスアッセイによる用量反応曲線、表1にEC_{TCDD25}値及びIEF値で示した各試料のダイオキシン類バイオアッセイ系活性を示す。活性を認めたほとんどはフラボノイド類であった。最も活性が高かったものは、daidzein、glycitein、genistein(それぞれ、EC_{TCDD25}値: 3.0×10^3 、 4.2×10^3 、 2.4×10^3 nM、IEF値: 4.3×10^6 、 3.1×10^6 、 5.4×10^6)といったイソフラボン類で、これらの配糖体化(daidzin、glycitin、genistin)は活性が弱くなる傾向が認められた(それぞれ、EC_{TCDD25}値: 1.2×10^4 、 2.0×10^4 、 4.2×10^3 nM、IEF値: 1.1×10^6 、 6.5×10^7 、 3.1×10^6)。フラバン、フラボン類においては、naringenin、hesperetinがイソフラボンよりは弱い活性を認め(それぞれ、EC_{TCDD25}値: 5.3×10^4 、 3.8×10^4 、IEF値: 2.5×10^7 、 3.4×10^7)、これらも配糖体化により活性が低減した。フラボン、フラボノール類では全体的に高濃度で若干の活性を示したが、baicalein、baicalin(それぞれ、EC_{TCDD25}値: 2.8×10^3 、 3.2×10^3 、IEF値: 4.6×10^6 、 4.1×10^6)以外はEC_{TCDD25}レベル以下であった。フラボノイド類以外では、スチルベン骨格を有するresveratrol(EC_{TCDD25}値: 7.3×10^3 、IEF値: 1.8×10^6)、アントラキノン構造を有するalizarin(EC_{TCDD25}値: 3.1×10^3 、IEF値: 4.2×10^6)にイソフラボン類に匹敵するアッ

セイ系活性化能が認められた。

D. 考察

結果から、植物性食品成分の構造とダイオキシン類バイオアッセイ系活性化能の相関を概略すると、

①フラボノイド類:イソフラボン類>>フラボノール類 (B 環に水酸基のないもの)>フラバノン類 (3-ol 以外)>その他のフラボノール、フラボン類、フラバノン類の順で活性能を示した。

②その他:トランススチルベン骨格を有する resveratrol に活性が認められた。アントラキノン構造を有する alizarin に活性が認められたが、その一部がアシル化された化合物では活性が認められなかった。

③水酸基の影響: AhR リガンドとして疎水性、平面性のものが多く知られている。今回も水酸基の多いタンニン類など、親水性の高いものは活性が認められず、平面構造に近いものでも活性は乏しかった。しかしイソフラボン類では水酸基の影響は少なく、活性は水酸基とその構造特性の両方に依存するところが大きいことが考えられる。供試した化合物の構造的相違からみると、フラバン構造のものでは、C 環 3 位の水酸基が活性に影響を及ぼすことが示唆された。

④分子サイズ、構造平面性の影響:図 3 に活性化化合物の最小化エネルギー構造を示す。(a) が TCDD の分子モデルであるが、活性を示した化合物の安定構造はすべて平面構造で、TCDD に近い分子サイズを有しており、それらの非平面化及び配糖体化による分子の増大化は活性を低減させた。

活性の認められたすべての化合物はいわゆる植物エストロゲンとして知られているものである。しかし植物エストロゲンに分類される coumestrol、 β -sitosterol など、活性を示さないものもあり、このことはエストロゲン作用のメカニズムの多様性を示唆した。また大豆イソフラボン類は食品の第三次機能成分として知られており、今回の結果から AhR は beneficial regulator として何らかの作用をしている可能性も示唆されたが、これについては今後さらなる検討を必要とする。

大豆イソフラボンなどの一部食品成分に、非現実的な高濃度でアッセイ系の活性化(ダイオキシン様作用)が認められた。しかしその一方で、それらは低濃度で、ダイオキシンによるバイオアッセイ系の活性化に対して弱い抑制効果も示されており、AhR 自体が毒性発現のみでなく、食品を介して毒性を制御している可能性も示唆された。今後、これら食品成分をプローブとしたさらなる機能解明が必要とされる。これまでの結果は、あくまでも予備的で途上なものであるが、現段階でいえることは一部食品の過度の摂取は控えるべきで、バランスのとれた食事がダイオキシンのリスク低減化においても大切であることが考察された。

E. 結論

今回、大豆イソフラボンなどに高濃度で、ダイオキシン類毒性バイオアッセイ系の活性化が認められた。一方、低濃度では逆に弱い抑制作用が示されており、この結果はあくまでも予備的なものであるが、現段階でいえることは一部食品の過度の摂取を控えたバランスのとれた食生活が重要で、ダイオキシンのリスク軽減化も期待できる。

今後、これまでのデータを基に、ダイオキシンによる毒性バイオアッセイ系活性化に対する植物性食品成分の影響、及びその活性化抑制作用が示されているほうれんそう、こまつななどに含まれる活性化抑制因子を明らかにし、ダイオキシンの毒性低減化を指向した食品の役割について予備的検証を行う。

F. 参考文献

- ・ Akiyama, T., Yamada, M., Yamada, T., Maitani, T., Naringin glycosides alpha-glucosylated on ring B found in the natural food additive, enzymatically modified naringin, Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 2246-2249 (2000).
- ・ Denison, M., Brouwer, A., Clark, G., U.S. Patent 5,854,010 (1998).
- ・ Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., Yoshida, T., Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant

effects, *Phytochemistry*, **59**, 749-758 (2002).

・ Informational Brochure of Dioxins (2001), Office of Dioxins Control, Administration Division, Environmental Management Bureau, Ministry of the Environment, Japan.

・ Landers, J.P., Bunce, N.J., The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity, *Biochem. J.*, **276**, 273-287 (1991).

・ Miura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakano, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y., Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor, *Genes to Cells*, **2**, 645-654 (1997).

・ Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Hydrolyzable tannins and related polyphenols, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **66**, 1-102 (1995).

・ Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models, *Pharmacol. Rev.*, **46**, 483-549 (1994).

・ Poland, A., Knutson, J.C., 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554 (1982).

・ Safe, S.H., Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371-399 (1986).

・ Whitlock, J.P.Jr., Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin action, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 251-277 (1990).

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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).

2. 学会発表

1) 天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文, 北川宏子, 藤野潤子, 佐々木久美子, 豊田正武, 吉田隆志, 米谷民雄: 植物性食品成分のアリル炭化水素レセプター活性化に関する検討, フォーラム 2002 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2002. 10).

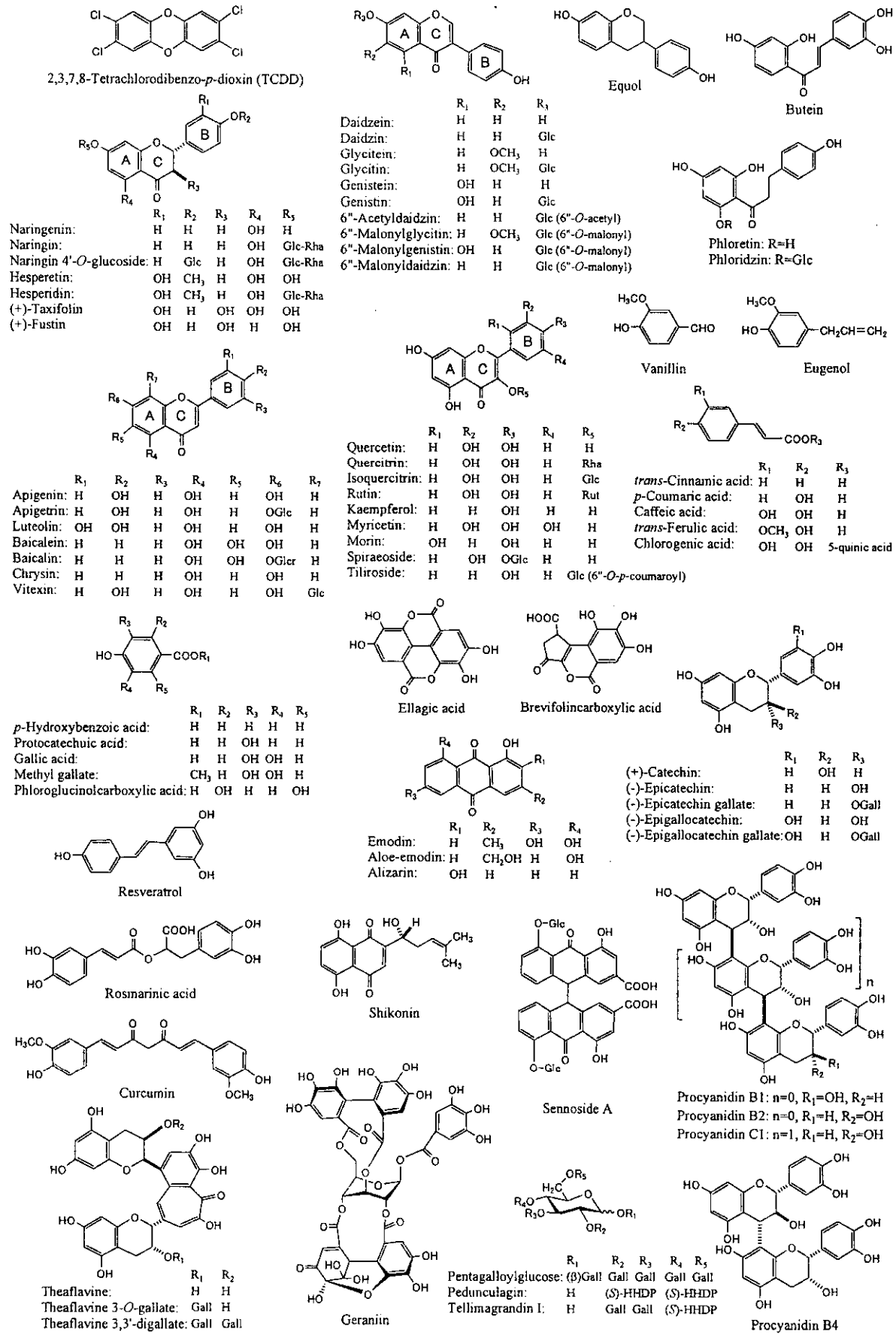


図 1. 試料の化学構造

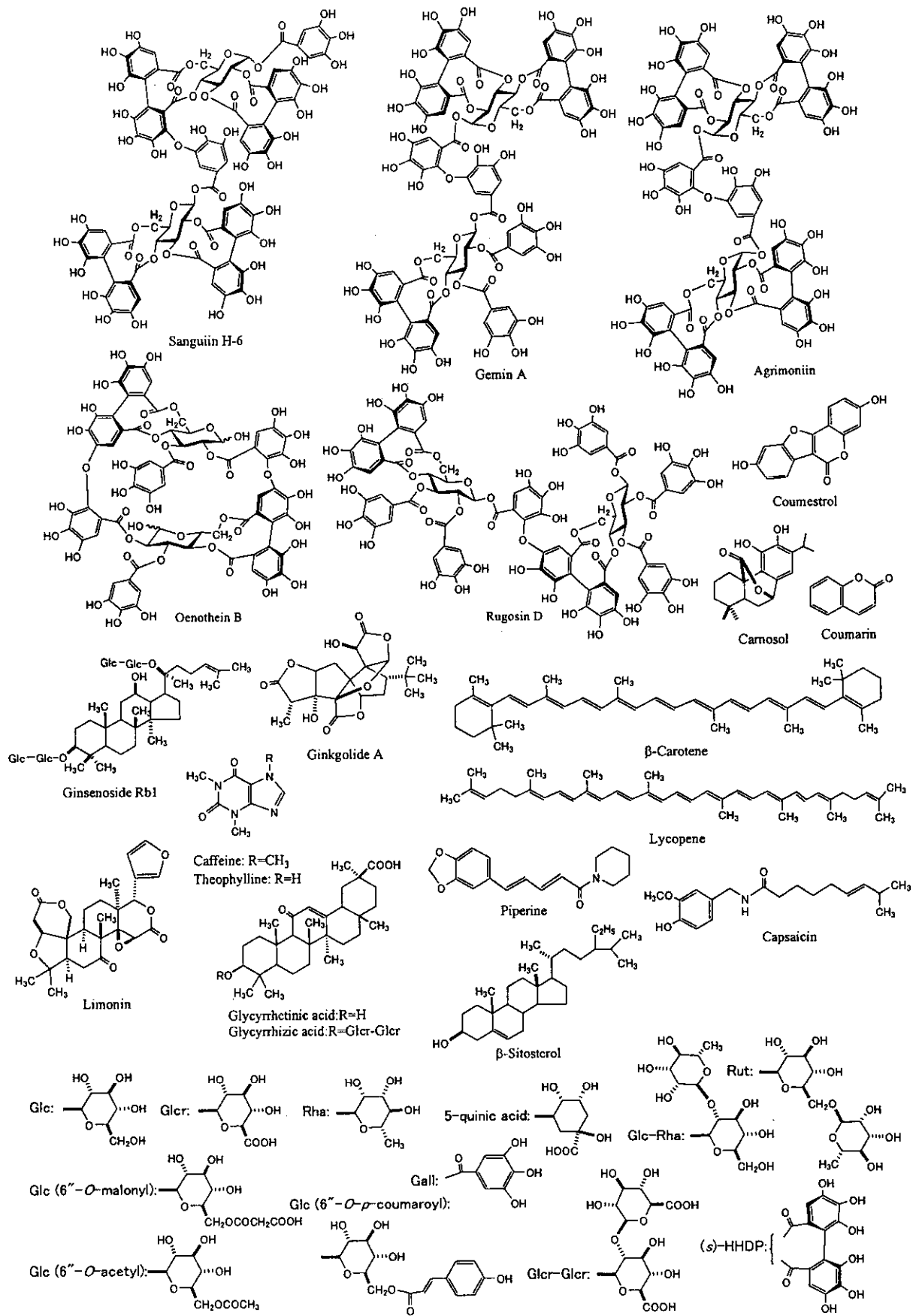


図1 試料の化学構造 (続き)

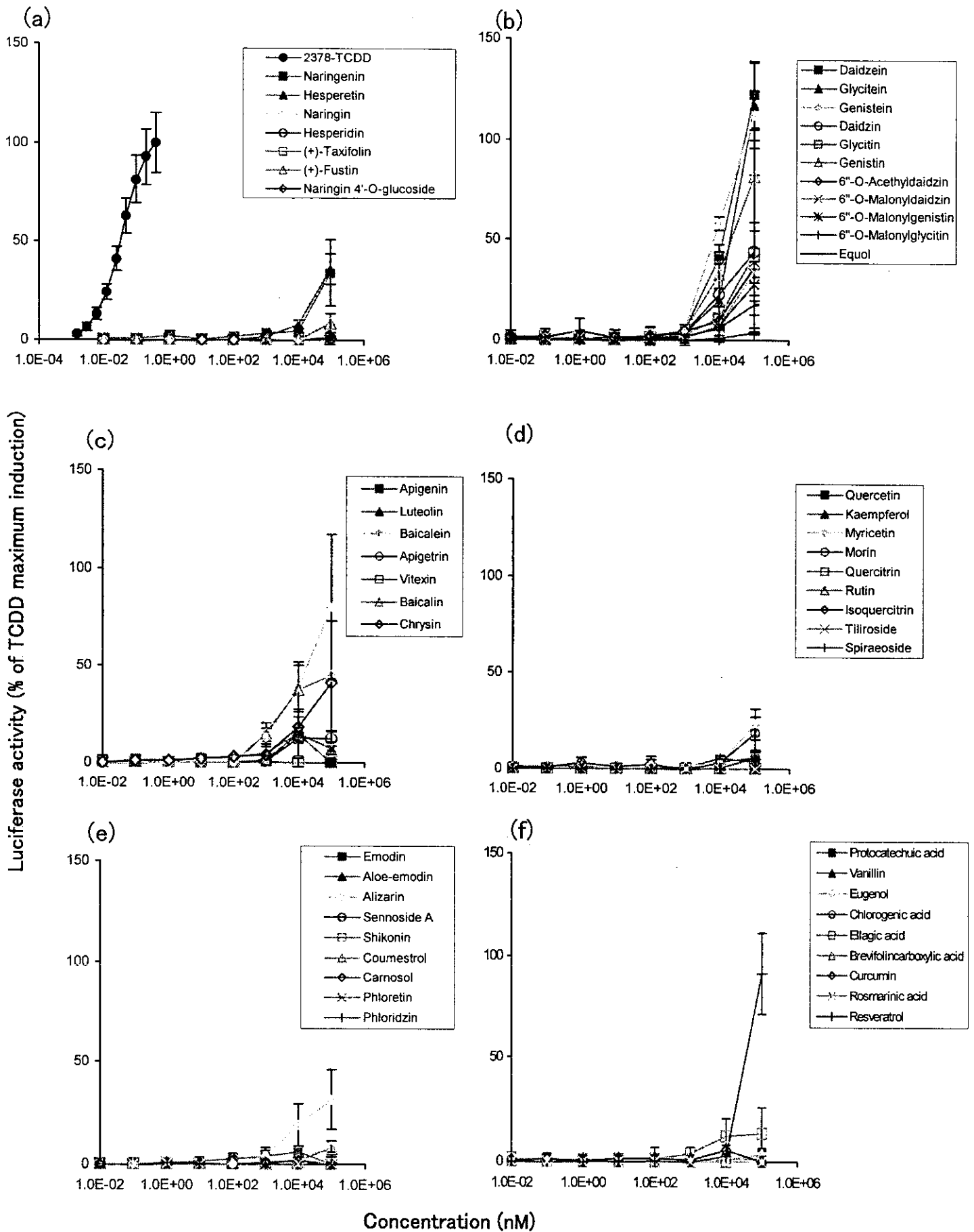


図 2. ケイラックスアッセイによる用量反応曲線 (一部)

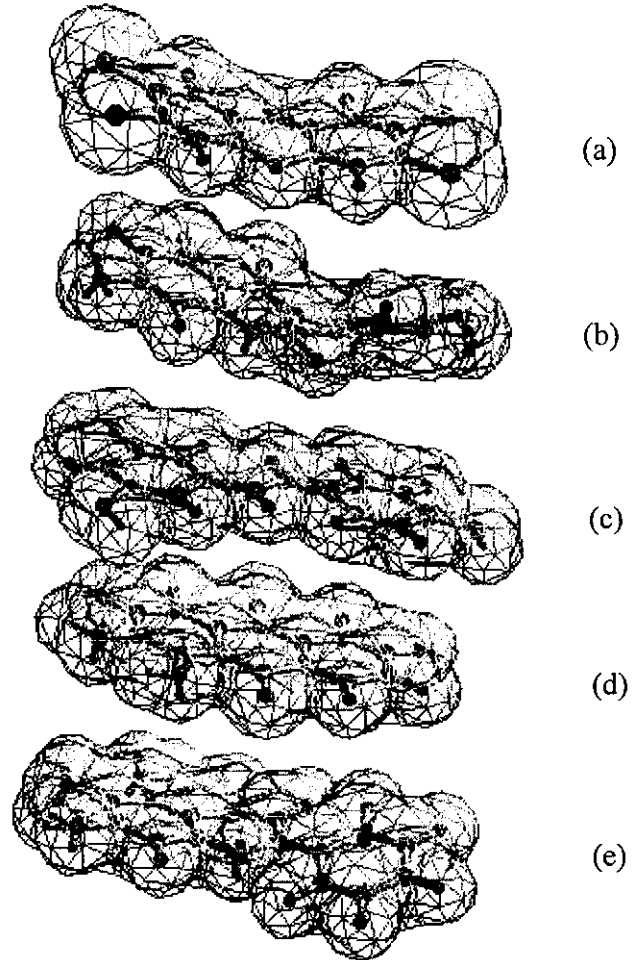


図3. バイオアッセイ系活性化化合物の分子モデル
(MM2計算により求めた最小化エネルギー構造)
(a) TCDD, (b) Daidzein, (c) Resveratrol, (d) Alizarin, (e) Baicalein

表 1. 各試料のダイオキシン類バイオアッセイ系活性化能

	EC _{TCDD25} ^{a)} (nM)	IEF ^{b)}		EC _{TCDD25} (nM)	IEF
2,3,7,8-TCDD	1.3 × 10 ⁻²	1.0	Vanillin	nc	nc
<i>Isoflavones</i>			Eugenol	nc	nc
Daidzein	3.0 × 10 ³	4.3 × 10 ⁻⁶	Chlorogenic acid	nc	nc
Glycitein	4.2 × 10 ³	3.1 × 10 ⁻⁶	Ellagic acid	nc	nc
Genistein	2.4 × 10 ³	5.4 × 10 ⁻⁶	Brevifolincarboxylic acid	nc	nc
Daidzin	1.2 × 10 ⁴	1.1 × 10 ⁻⁶	Curcumin	nc	nc
Glycitin	2.0 × 10 ⁴	6.5 × 10 ⁻⁷	Rosmarinic acid	nc	nc
Genistin	4.2 × 10 ³	3.1 × 10 ⁻⁶	Resveratrol	7.3 × 10 ³	1.8 × 10 ⁻⁶
6"-Acetyldaidzin	3.2 × 10 ⁴	4.1 × 10 ⁻⁷	<i>Anthraquinones and naphthoquinones</i>		
6"-Malonyldaidzin	4.8 × 10 ⁴	2.7 × 10 ⁻⁷	Emodin	nc	nc
6"-Malonylgenistin	9.8 × 10 ⁴	1.3 × 10 ⁻⁷	Aloe-emodin	nc	nc
6"-Malonylglycitin	nc ^{c)}	nc	Alizarin	3.1 × 10 ³	4.2 × 10 ⁻⁶
Equol	nc	nc	Senoside A	nc	nc
<i>Flavanones</i>			Shikonin	nc	nc
Naringenin	5.3 × 10 ⁴	2.5 × 10 ⁻⁷	<i>Condensed tannins</i>		
Hesperetin	3.8 × 10 ⁴	3.4 × 10 ⁻⁷	(+)-Catechin	nc	nc
Naringin	nc	nc	(-)-Epicatechin	nc	nc
Hesperidin	nc	nc	(-)-Epigallocatechin	nc	nc
(+)-Taxifolin	nc	nc	(-)-Epicatechin gallate	nc	nc
(+)-Fustin	nc	nc	(-)-Epigallocatechin gallate	nc	nc
Naringin 4'-O-glucoside	nc	nc	Procyanidin B1	nc	nc
<i>Flavones</i>			Procyanidin B2	nc	nc
Apigenin	nc	nc	Procyanidin B4	nc	nc
Luteolin	nc	nc	Procyanidin C1	nc	nc
Baicalein	2.8 × 10 ³	4.6 × 10 ⁻⁶	Theaflavin	nc	nc
Apigetrin	nc	nc	Theaflavin 3-O-gallate	nc	nc
Vitexin	nc	nc	Theaflavin 3,3'-di-O-gallate	nc	nc
Baicalin	3.2 × 10 ³	4.1 × 10 ⁻⁶	<i>Hydrolyzable tannins</i>		
Chrysin	1.4 × 10 ⁴	9.3 × 10 ⁻⁷	Pentagalloylglucose	nc	nc
<i>Flavonols</i>			Pedunculagin	nc	nc
Quercetin	nc	nc	Tellimagrandin I	nc	nc
Kaempferol	nc	nc	Geraniin	nc	nc
Myricetin	nc	nc	Agrimoniin	nc	nc
Morin	nc	nc	Gemin A	nc	nc
Quercitrin	nc	nc	Rugosin D	nc	nc
Rutin	nc	nc	Sanguin H-6	nc	nc
Isoquercitrin	nc	nc	Oenothien B	nc	nc
Tiliroside	nc	nc	<i>Others</i>		
Spiraeoside	nc	nc	Coumestrol	nc	nc
<i>Chalcones</i>			Carnosol	nc	nc
Butein	nc	nc	Glycyrrhetic acid	nc	nc
Phloretin	nc	nc	Glycyrrhizic acid	nc	nc
Phloridzin	nc	nc	Ginsenoside Rb1	nc	nc
<i>Phenolcarboxylic acid and related compounds</i>			Coumarin	nc	nc
p-Hydroxybenzoic acid	nc	nc	Caffeine	nc	nc
Caffeic acid	nc	nc	Theophylline	nc	nc
trans-Ferulic acid	nc	nc	Capsaicin	nc	nc
trans-Cinnamic acid	nc	nc	Piperine	nc	nc
p-Coumaric acid	nc	nc	β-Sitosterol	nc	nc
Gallic acid	nc	nc	Ginkgolide A	nc	nc
Methyl gallate	nc	nc	Lycopene	nc	nc
Phloroglucinolcarboxylic acid	nc	nc	Limonin	nc	nc
Protocatechuic acid	nc	nc	β-Carotene	nc	nc

各試料 3 回測定.

a) TCDD の最高値を 100 とした時の 25%ルシフェラーゼ活性度と等しい各試料の濃度.

b) TCDD の EC₂₅ 値に対する各試料の EC_{TCDD25} 値 (1.3 × 10⁻²/EC_{TCDD25}).

c) Not calculated; EC_{TCDD25} レベルのルシフェラーゼ活性が認められなかった.