



# Studies on suppression of the dioxin toxicity by food factors

Fukuda, Itsuko

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Date of Publication)

2015-05-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3280

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003280>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 191 】

氏 名・(本 籍) 福田 伊津子 ( 富山県 )  
博士の専攻分野の名称 博士(学術)  
学 位 記 番 号 博い第527号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Studies on Suppression of the Dioxin Toxicity by Food  
Factors  
(食品成分によるダイオキシン毒性の抑制に関する研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 芦 田 均  
教 授 金 沢 和 樹  
教 授 坂 本 博  
教 授 佐 々 木 満

本論文は以下の8章から構成されている。

環境汚染物質であるダイオキシン類は、ヒトへの汚染が危惧されるため、大きな社会問題となっている。ダイオキシン類は主に食事とともに我々の体内に侵入するため、薬品による防御は難しく、日常摂取している食品に含まれる成分によりダイオキシン類の毒性発現を軽減することが望ましい。ダイオキシン類は、実験動物においては体重減少、発がん促進、免疫抑制、催奇形性を、ヒトにおいては塩素ざ瘡、発がんリスクの増加、神経発達の遅延といったさまざまな毒性を引き起こすことが知られている。これらのダイオキシン毒性は、主にアリアル炭化水素受容体(AhR)を介して引き起こされる。すなわち、ダイオキシン類が細胞質内の AhR に結合してこれを活性化させると、活性化した AhR は核内へ移行して転写因子として働く。その結果、DNA 上のダイオキシン応答配列(DRE)と特異的に結合し、その下流にあるシトクローム P4501A1 (CYP1A1)などのさまざまなタンパク質の発現を促進する。AhRの活性化は、ダイオキシン毒性発現の初発段階であるため、AhRの活性化を抑制できれば毒性の発現を回避できると考えられる。

AhRは、疎水性で $14 \times 12 \times 5 \text{ \AA}$ の大きさの化合物を受容する事が知られている。フラボノイドがこれに似た性質を持ち、植物性食品に多く含まれる事に着目し、第2章では、さまざまなフラボノイド類の抑制効果をラット肝臓の細胞質画分を用いた無細胞系において評価した。すなわち、AhRを含むラット肝臓の細胞質画分に2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラジオキシン(TCDD)を添加し、活性化したAhRを $^{32}\text{P}$ 標識したDREオリゴヌクレオチドプローブを用いたゲルシフト法により検出した。この実験系に予め34種の天然フラボノイド類をTCDDの添加前に処理することで、その抑制効果を調べた。その結果、フラボノイド類の抑制効果はサブクラスに特異的で、フラボン類=フラボノール類>フラバノン類>カテキン類>>イソフラボン類の順に効果が強いことが分かった。特にフラボン類、フラボノール類は我々の体内で存在し得る濃度で抑制効果を発揮した事から、我々の体内においてもAhRの活性化を抑制することでダイオキシン毒性の発現を回避する可能性があると考えた。

ダイオキシン類による毒性発現はAhRの活性化を介することから、ダイオキシンリスクを評価するためにAhRの活性化をより迅速かつ簡便、高感度に測定できることが望ましい。そこで第3章では、サウスウェスタンケミストリーと多検体処理能に優れたサンドイッチELISAとを組み合わせた新たなダイオキシン類の測定方法(SW-ELISA法)を構築した。ラット肝臓の細胞質画分を用いて活性化したAhRを測定したところ、SW-ELISA法におけるTCDDの検出範囲は $2 \text{ pM} \sim 10 \text{ nM}$  ( $0.026 \sim 129 \text{ pg/assay}$ )であり、培養細胞を用いた既報の高感度検出系とほぼ同程度の感度を有することが分かった。SW-ELISA法を用いて12種のジオキシン類と6種のジベンゾフラン類がTCDDの半影響レベルを誘導する濃度を決定したところ、世界保健機関が定めた毒性等価係数(TEF)と有意な相関性が得られた( $r=0.754$ )。さ

らに、SW-ELISA法を用いてフラボノイド類によるAhRの活性化抑制効果を評価することも可能であった。9種のフラボノイドのアンタゴニスト効果をSW-ELISA法とゲルシフト法とで評価した結果、有意な相関性が得られた( $r=0.935$ )。このことから、構築したSW-ELISA法はアゴニストとアンタゴニスト両方の活性の測定に適用できることが分かった。

これまでの報告から、植物性食品にはAhRの活性化を抑制する成分が多く含まれており、未だ抑制効果が見出されていない新規成分が存在する可能性が高いと考えられた。そこで、第4章では、植物性食品の代表として緑茶に着目し、これに含まれる新規な有効成分の単離・同定を試みた。その結果、緑茶葉中からルテイン、クロロフィルaとbとを単離・同定し、 $0.1 \text{ nM}$  TCDDに対する $\text{IC}_{50}$ 値を決定したところ、それぞれ、 $3.2$ 、 $5.0$ と $5.9 \text{ }\mu\text{M}$ であった。これらの新規なアンタゴニストは、ほとんどの植物に存在する事から、植物性食品の摂取はダイオキシン毒性の発現抑制に有効であると考えられた。

また、第5章では、紅茶葉に含まれる有効成分として4種のテアフラビンを同定し、これらの $\text{IC}_{50}$ 値を決定したところ、 $1 \text{ nM}$  TCDDに対して $0.7 \sim 4.5 \text{ }\mu\text{M}$ であり、フラボンやフラボノール類と同等の効果を示した。テアフラビン類は、カテキン類が酸化、重合することにより生成されるもので、紅茶のみならず緑茶中にも含まれている。したがって、茶はさまざまな種類のアンタゴニストを多く含むことから、ダイオキシン毒性発現の軽減に有効な食品の一つであると考えた。

これまでの研究は、無細胞系ならびに細胞系での試験からアンタゴニストの効果を評価していたが、第6章では、緑茶および紅茶を自由摂取させたラットにAhRの活性化を誘導する3-メチルコラズレン(MC)を投与し、茶の飲用がおよぼす影響を検討した。その結果、緑茶および紅茶の摂取は、肝臓においてMCが誘導するAhRの活性化と核内への移行を阻止し、CYP1A1の発現量ならびにその酵素活性を反映する7-エトキシレゾルフィン-O-デエチラーゼ活性を有意に抑制した。また、緑茶を摂取させたラット肝臓より調製した細胞質画分を用いて*ex vivo*の試験を行ったところ、TCDDが誘導するAhRの活性化を抑制した。さらに、血清中からカテキンならびにテアフラビンを検出し、これらが茶中から吸収されて体内濃度が上昇していたことが判った。以上のことから、有効成分が肝細胞に取り込まれて効果を発揮していることと、カテキンやテアフラビン類が食事性アンタゴニストである可能性が強く示唆された。

第7章では、(-)-エピガロカテキンガレート(EGCg)を始めとするフラボノイド類がAhR活性化を抑制するとき、AhRと結合するか否かを無細胞系において検討した。その結果、ケンフェロール、ケルセチン、ガランジンは $^3\text{H}$ 標識したMCとAhRとの特異的な結合を濃度依存的に阻害した。また、EGCgとラット肝臓細胞質画分に含まれるAhRとの相互作用を表面プラズモン共鳴シグナルとして検出したところ、EGCgの濃度依存的に相互作用が強

(氏名：福田 伊津子 NO. 3 )

くなった。このことから、フラボノイド類は AhR と結合し、競合的アンタゴニストとして働くことが分かった。したがって、食事性アンタゴニストは、アゴニストが AhR と結合することを阻害することによって AhR の活性化を抑制する事が示唆された。

以上のことから、フラボン、フラボノール、カテキン、ルテイン、クロロフィル、テアフラビンなどの植物性色素が食事性アンタゴニストとして働くことがわかった。しかしながら、これら食事性アンタゴニストは代謝されやすく、ダイオキシン類と比べると体内残留時間ははるかに短い。したがって、さまざまな植物性食品を継続的に摂取し、食事性アンタゴニストの体内濃度を上昇させることで、ダイオキシン毒性の発現を軽減できると考えた。

氏名	福田 伊津子		
論文題目	Studies on Suppression of the Dioxin Toxicity by Food Factors (食品成分によるダイオキシン毒性の抑制に関する研究)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	芦田 均
	副査	教授	金沢 和樹
	副査	教授	坂本 博
	副査	教授	佐々木 満
要 旨			
<p>ダイオキシン類は環境汚染物質であり、環境リスク管理の観点から国内外で社会問題となっている。ダイオキシン類の環境中での所在調査や発生制御に関する研究、毒性の発現機構に関する研究は多くあるが、毒性抑制に関する研究はほとんどない。ダイオキシン類のヒトへの主たる暴露経路が汚染食品によるため、食の安全性確保の観点からの研究が望まれている。ダイオキシン毒性は多岐にわたるが、毒性発現の初発段階は細胞質に存在するアリール炭化水素受容体(別名、ダイオキシン受容体)の形質転換に依存している。福田伊津子は、この形質転換がダイオキシン毒性の指標と考えられることに着目し、食品あるいはその成分による形質転換抑制を明確にすることでダイオキシン毒性の抑制を目指すという研究戦略を構築している。本論文は、この戦略に基づいて研究を実施し、アリール炭化水素受容体の形質転換を抑制するいくつかの食品成分を見出して、それを含む植物性食品が実験動物レベルでも抑制効果を示すことを検証し、その作用機構を明らかにしたものである。</p> <p>第一章は序論であり、ダイオキシン類の種類や発生源に関する概要を記載し、生物への影響について毒性とその発現に関わる生化学的な変化について整理している。次いで、食品成分によるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制という本研究の戦略について論述し、その戦略に基づく研究の必要性を述べている。また、研究を遂行するために必要なアリール炭化水素受容体の形質転換を定量的に評価することができる新規な評価系の構築についてもふれている。</p> <p>第二章は、植物性食品広範に含まれているフラボノイドがアリール炭化水素受容体のリガンド結合部位の大きさに匹敵することに注目し、それによるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制効果について検討している。すなわち、2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(TCDD)が誘導するアリール炭化水素受容体の形質転換に対して、34種の天然フラボノイド類の抑制効果をラット肝臓の細胞質成分を用いた無細胞系においてゲルシフト法で評価している。フラボノイドが予め反応系に存在すると TCDD による形質転換を抑制することを明らかにし、フラボノイドの抑制効果がそのサブクラスに特異的であることも示している。すなわち、フラボンとフラボノールの抑制効果が強く、フラバノンとカテキンの効果は弱く、イソフラボンは効果を示さなかった。さらに、フラボンとフラボノールとはこれまでに報告されている生体内濃度で抑制効果を発揮したことから、これらは体内においてもアリール炭化水素受容体の形質転換を抑制することでダイオキシン毒性を回避する可能性があることと論じている。本章の成果は、FEBS Letters 誌に公表されている。</p> <p>第三章は、ダイオキシンリスクを評価するために、アリール炭化水素受容体の形質転換を迅速かつ簡便、高感度に定量できる新規測定法の構築を行っている。この新規測定法は、サウスウエスタンケミストリーとサンドイッチ ELISA との組み合わせによるものであり、TCDD の検出範囲は 2 pM-10 nM (0.026-129 pg/assay)であった。本法は無細胞系であるにもかかわらず、既報の培養細胞にレポーター遺伝子を組み込んだ高感度測定法と遜色のない検出感度を有していた。本法を用いてアリール炭化水素受容体のアゴニストとして 12 種のジオキシンと 6 種のジベンゾフランの交差反応性を検討したところ、世界保健機関(WHO)が定めた毒性等価係数と有意な相関性が得られ、さらに、9種のフラボノイドのアンタゴニスト効果を検討したところ、それらの抑制効果はゲルシフト法との間で高い相関性が得られた。これらのことから、構築した新規測定法は、アリール炭化水素受容体のアゴニストとアンタゴニストとを検索することができ、これらの作用について定量的な解析ができることを明らかにしている。本章の成果は、Journal of Immunological Methods 誌に掲載されている。</p> <p>第四章は、上記で得られた結果を踏まえ、身近な食品素材である緑茶に着目して、それに含まれる新規抑制成分の単離・同定を行っている。緑茶葉中から、ルテイン、クロロフィル a と b とをアリール炭化水</p>			

氏名 福田 伊津子

素受容体の新規アンタゴニストとして単離・同定した。これらの0.1 nM TCDDに対する半阻害濃度は、それぞれ3.2、5.0と5.9  $\mu\text{M}$ であった。また、これら3つの化合物を含むアンタゴニストの緑茶葉中での存在量とそれぞれの抑制効果とについても示している。本章の成果は、Journal of Agricultural and Food Chemistry 誌に掲載されるとともに、Science News 誌にトピックスとして取り上げられ、高い評価を得ている。

第五章は、前章の内容を受けて緑茶とは製造工程の異なる紅茶葉中に含まれるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制成分について検討している。その結果、カテキンが酸化、重合することにより生成し、紅茶特有の色素である4種のテアフラビンに強い抑制効果があることを明らかにしている。単離・同定した4種のテアフラビンの1 nM TCDDに対する半阻害濃度は0.7-4.5  $\mu\text{M}$ であることから、その効果はカテキンよりも強く、フラボンやフラボノールに匹敵することを論じている。また、興味深いことにテアフラビンはTCDDによるアリール炭化水素受容体の形質転換誘導前に有効であるばかりか、同時添加や誘導後の添加でも抑制効果を示し、他のフラボノイドとは異なる特性を有することも明らかにしている。本章の成果は、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 誌に掲載が決定している。

第六章は、動物実験による茶の有効性の証明である。すなわち第四章と第五章とでそれぞれ緑茶と紅茶とからアリール炭化水素受容体の形質転換抑制成分を単離・同定しているが、実際に茶の飲用により形質転換が抑制されているか否かを知ることは、食品によるダイオキシン毒性の軽減を証明するために重要である。ラットにヒトが飲用する濃度の緑茶および紅茶を飲水として8日間自由摂取させ、TCDDと同様にアリール炭化水素受容体を形質転換させることが知られている3-メチルコランズレンをアンタゴニストとして腹腔内投与することで茶の効果を検証している。その結果、緑茶および紅茶を摂取させたラット血清中から、カテキンとテアフラビンとが検出され、これらが体内に取り込まれていることを確認している。この条件下で、緑茶および紅茶は、肝臓において3-メチルコランズレンが誘導するアリール炭化水素受容体の形質転換を抑制し、その抑制作用が細胞質にあるアリール炭化水素受容体の核内移行の阻害であることを明らかにしている。また、形質転換したアリール炭化水素受容体が転写因子として発現誘導するシトクローム P4501A1 タンパク質の発現、ならびにその酵素活性を反映する7-エトキシレゾルフィン-O-デエチラーゼ活性が抑制されていることも示している。さらに、緑茶を摂取させたラット肝臓より調製した細胞質画分にTCDDを作用させたところ、アリール炭化水素受容体の形質転換が抑制されることも明らかにしている。これらの結果に基づいて、茶葉中のアンタゴニストは体内に取り込まれ、肝臓内で抑制効果を発揮しているのであろうと結論している。

第七章は、植物性食品に含まれるアリール炭化水素受容体のアンタゴニストの作用機構について解析している。すなわち、(-)-エピガロカテキンガレートを始めとするフラボノイドがアリール炭化水素受容体と結合してその抑制効果を発揮するか否かを複数の手法で検討している。まず、確立された手法であるヒドロキシシアバタイトを用いた結合試験により、ケンフェロール、ケルセチン、ガランジンが<sup>3</sup>H標識した3-メチルコランズレンとアリール炭化水素受容体との特異的な結合を濃度依存的に阻害することを明らかにしている。また、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて2種類の実験系を構築して、これを用いて(-)-エピガロカテキンガレートとラット肝細胞質画分に含まれるアリール炭化水素受容体との相互作用を解析し、(-)-エピガロカテキンガレートの濃度依存的に相互作用が強くなることを明らかにしている。これらのことから、フラボノイドはアリール炭化水素受容体と結合して、競合的アンタゴニストとして作用すると結論している。アンタゴニストと受容体との結合に関しては知られているが、天然アンタゴニストでの報告はほとんどなく、詳細なアプローチについては本研究が最初である。

第八章では、以上の結果をまとめるとともに考察し、植物性食品に含まれる色素成分であるフラボン、フラボノール、カテキン、ルテイン、クロロフィル、テアフラビンなどがアリール炭化水素受容体のアンタゴニストとして作用し、ダイオキシン類による受容体の形質転換の抑制に有効であることを論じている。また、これらのアンタゴニストは代謝・排泄されやすく、ダイオキシン類と比べると体内残留時間ははるかに短いことから、アンタゴニストを含むさまざまな植物性食品を継続的に摂取してアンタゴニストの体内濃度を上昇させるという、食生活の工夫を行うことで、ダイオキシン毒性を抑制できる可能性が高いと結論している。

本研究は、食品成分によるダイオキシン毒性の抑制について、アリール炭化水素受容体の形質転換を指標として、植物性食品からのアンタゴニストの探索、動物試験によるその有効性の証明と作用機構解明について研究したものであり、食の安全性確保の観点からダイオキシン毒性の防衛について重要な知見を得たものとして価値ある成果の集積であると認める。よって学位申請者の福田伊津子は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。