

201234031A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物の汚染実態の解明及びその健康影響評価

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 中尾 晃幸

平成25（2013）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物の汚染実態の解明及びその健康影響評価-----	1
中尾晃幸	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	8

乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物の汚染実態の解明及びその健康影響評価

研究代表者 中尾 晃幸 摂南大学薬学部講師

【研究要旨】 乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態を解明するに当たり、高精度分析法の確立を行った。ブランク管理が非常に困難とされるこれら化合物の分析に対し、洗浄方法や分析法の細部に改良を加え再現性のある高精度分析法の構築に成功した。本分析法を採用し、乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物（主にテトラブロモビスフェノールA；TBBPA及びビスフェノールA；BPA）及びTBBPAの脱ブロム化体であるMoBBPA、DiBBPA、TriBBPAによる汚染実態の解明に着手した。検討した食品は、日本食品標準成分表にある18群の食品群の中で主に離乳食調理用食材として使用される8群（穀類、いも及びでん粉類、豆類、野菜類、果実類、きのこ類、肉類、乳類）を選定した。肉類と乳類以外の食品群のほとんどは1.0 ng/g以下であり汚染レベルは軽度であった。乳類として粉ミルクを調査したところ、TBBPA及びBPAの両化合物が検出され、その濃度はそれぞれ1.3～7.8 ng/g、2.5～5.8 ng/gであった。また、肉類においては、TBBPAが2.2～3.9 ng/g、BPAが2.9～4.1 ng/gであり、牛、豚、鶏の相違はなかった。

健康影響評価を解明するため動物実験にも着手した。TBBPA曝露マウスにおいて、その代謝物や体内動態（分布、排泄）について検討した。経口投与後、24時間で全投与量の約45%が未変化体として排泄され、代謝物（グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体）を含めると66%であった。72時間後には代謝物も含め大半が排泄されることを明らかとした。排泄は速やかに起こる一方で各組織への分布も調べたところ、24時間後では肝臓への分布が最も多く、全投与量の1%であった。次に腸管、心臓、腎臓の順であったが、代謝物も含めるとその分布は変化し、肝臓、腎臓、脾臓となった。興味深いことに、分布率としては低いものの、脳への移行が確認された。さらに、PPARのリガンドとなるTBBPAは、糖・脂質代謝をかく乱する可能性が指摘されることから、試験動物の肝臓における脂質代謝に関与するmRNAのCD36とFSP27の発現が増加していることが判明した。

本研究成果は、乳幼児用食品のビスフェノール系化合物による汚染レベルが解明され、さらに脂質代謝攪乱作用を示す基礎的な知見が得られたことである。

研究分担者氏名：角谷 秀樹
所属研究機関名：摂南大学
職名：助教

A. 研究目的

食品の安全性確保のため、過去より厚生労働省等を中心に多くの食品・食事試料中の有害化学物質による汚染調査が行われ、国民に情報提供がなされてきた。しかし、乳幼児用食品中のBPAやTBBPA等による汚染実態及びその健康影響評価に特化した研究は、現在まで皆無に等しい。BPAの健康影響への知見は、乳幼児の知能の発育障害の他、性周期異常、内分泌や免疫系への毒性影響等の多数の報告が行われている。一方、TBBPAの毒性機構は未だ不明な点が多く、現在までの知見は、TBBPA曝露マウスにおける、総コレステロール値や肝重量の増加、甲状腺ホルモン受容体の活性化、TBBPAを摂取したRSウイルス感染マウスのサイトカインの分泌異常等が観察されている。従って、乳幼児用食品の安全性の確保には、まず、上記化合物の分析法の構築し、

乳幼児が摂取する食品・食事試料の汚染調査、さらには、1日摂取量を基礎とした上記化合物、とりわけTBBPAによる健康影響の検討が急務となる。

本研究の目的は、我々の環境中で大量に使用されているビスフェノール系化合物に焦点を当て、乳幼児食品・食事中の汚染実態と1日摂取量の解明並びに健康影響評価を行うことである。

B. 研究方法

本研究体制は、中尾(代表者)と角谷(分担者)が緊密な連携体制を取りながら、計画を遂行する。期間は2年間とし、分担内容は、まず、両者が協力してBPAやTBBPA等のビスフェノール系化合物の高精度迅速型同時一斉分析法を確立した後、中尾が主に乳幼児用食品中の上記化合物による汚染実態の検討を、角谷が主に細胞や動物を用いて上記化合物の健康影

響に関する検討を行う。

1) 乳幼児食品中の上記化合物による汚染実態の解明(中尾); 表1の①および②の分類の中、①製造会社別市販粉ミルク8品目、及び②離乳食調理用食品の中、9群の食品の汚染実態を解明する。なお、②の検討食品は、日本食品標準成分表に従い、18群の食品の中、日本人の摂取量が多い、野菜類、果実類、肉類、乳類、穀類、芋類、豆類、菓子類、きのこ類の計9群の食品を対象とする。

表1 調査対象となる乳幼児食品の分類

食品の分類	食品及び加工食品の一例
①市販人工乳(粉ミルク)	製造会社別粉ミルク製品(8製品)
②離乳食調理用食品 8群	
野菜類	カボチャ、トマト、パプリカ、ブロッコリー、ニンジン
果実類	バナナ
肉類	鶏肉、牛肉、豚肉
乳類	粉ミルク
穀類	小麦、片栗粉、生米、マカロニ、そうめん、米粥
芋類	ジャガイモ、サトイモ
豆類	アーモンド、きな粉
菓子類	ぼうろ、ビスケット
きのこ類	しいたけ、しめじ

2) TBBPA 曝露マウスにおける TBBPA 及びその代謝物等の体内動態に関する検討(角谷); 実験動物(C57BL/6 マウス)を用いて、各臓器・組織・血液中の TBBPA 代謝物及び BPA を定量する。マウスへの TBBPA の投与から 24 及び 48 時間後に心採血後、灌流脱血し、臓器(肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、膵臓、脂肪、脳)等及び排泄物を採取する。次に、上記分析法を用いて生体試料中の上記化合物を定量する。

3) PPAR γ を介した TBBPA による脂質・糖代謝系への影響(角谷); TBBPA がヒトの PPAR γ 特異的リガンドであることに着目し、PPAR γ を一過的に発現させたヒト肝がん由来(HepG2)細胞と内在性 PPAR γ が発現するマウス線維芽(3T3-L1)細胞を用いたインビトロアッセイ系並びに TBBPA 曝露マウスやその胎仔・新生仔を用いたインビボアッセイ系(図1参照)による、TBBPA の PPAR γ を介した脂質・糖代謝系への恒常性攪乱作用の解明を試みる。細胞やマウスに TBBPA を添加あるいは投与後、細胞や臓器等中で発現する PPAR γ の標的遺伝子(PEPCK(糖新生に関与する酵素)、ANGPTL4(中性脂肪代謝に関与する因子)、L-FABP(肝臓型脂肪酸結合タンパク質)、CD36(脂肪酸輸送に関連)、GLUT4(糖輸送に関連)等)、及び PPAR γ の mRNA 量はリアルタイム PCR 法(厚生労働科学研究費補助金により購入)により、一方タンパク量はウエスタンブロット法により解析する。その他、細胞実験では、アディポネクチンの定量(生化学検査キット)、脂肪取込・分解量(生化学検査キットおよび Oil Red

O 染色)や糖の取込量、分化誘導能等を検討する。

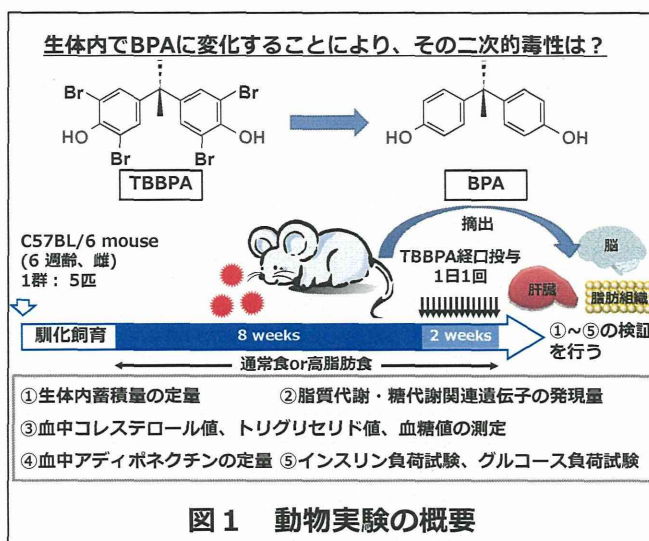


図1 動物実験の概要

(倫理面への配慮)

本研究課題の遂行には、多くの市販食品及び人体(母乳)試料を用いる必要があることから、まず、本研究計画案を薬学部の臨床薬学研究倫理委員会に提出、審議して頂き、本委員会並びに教授会の承認を得る。そして、母乳や離乳食試料等の提供の依頼の際には、従来より協力頂いている産婦人科医師や看護学部教授と一緒に各被験者の方と面談し、研究の趣旨等をよく説明した後、試料提供同意書の提出をお願いすることとしている。またこの時、被験者の年齢、被験乳幼児の経月別の生長度(体重・身長・アレルギーの有無等)、家族構成、食事嗜好、喫煙の有無、生活環境(住居情報、在宅時間、周辺環境等)に関してアンケート調査を実施するため、母乳測定データも含め個人情報等の保護に関しては、十分配慮して取り扱う方針であることを書面、並びに口頭で被験者に伝えるつもりである。さらに、測定データの通知を希望する被験者には、分析データの解析終了後に、その結果を通知すると共に、高濃度汚染が観察された被験者に対しては、無意味な不安を煽ることなく、汚染経路の推定及び体内負荷軽減策等も含め、代表者が懇切丁寧に説明、指導する。一方、市販の乳幼児用食品の汚染実態研究においても、有害化学物質における食品汚染データは、非常にセンシティブな内容(産地、製造者等)が含まれることより、その取扱い方次第では、風評等により生産者、製造者、行政関係者及び消費者に多大な不利益を与える可能性を秘めていることより、無闇に不安を扇動することの無いように、その公表に当たっては、厚生労働省と十分に事前協議する。さらに、本研究計画には、遺伝子の組換えや動物を使用する内容等が含まれていることから、本学部の組換えDNA実験委員会の「組換えDNA委員会規定マニュアル」及び動物委員会の「動物利用規定マニュアル」に従

って、平成23年度4月初旬に、詳細な研究計画を記載した使用申請書類等を両委員会に提出し、上記の両委員会にて審議、承認を得た後に、適正な管理運営の基で、本研究課題を精力的に遂行する。

C. 研究結果

研究結果について、1) 乳幼児食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明、2) TBBPA 曝露マウスにおける TBBPA 及びその代謝物等の体内動態及び3) PPAR γ を介した TBBPA による脂質・糖代謝系への影響の3つのテーマに沿って報告する。

1) の乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明においては、乳幼児用食品は粉ミルク(8検体)、離乳食調理用食品(野菜類(カボチャ、トマト、パプリカ、ブロッコリー、ニンジン)、果実類(バナナ)、肉類(鶏、豚、牛)、乳類(粉ミルク)、穀類(小麦、片栗粉、生米、マカロニ、そうめん、米粥)、芋類(ジャガイモ、サトイモ)、豆類(アーモンド、きな粉)、菓子類(ぼうろ、ビスケット)、きのこ類(しいたけ、しめじ))を対象とし、TBBPA 及び BPA 濃度を測定した。乳類の粉ミルク 8 製品からは両化合物とも検出され、その濃度は TBBPA が 3.3~3.8 ng/g、BPA が 3.5~11 ng/g であった(図2)。一方、離乳食調理用食品として野菜類、きのこ類、果実類(図3)は TBBPA 及び BPA はいずれも 1 ng/g(湿重量)以下であった。次に、肉類(鶏、豚、牛)は TBBPA が 2.2~3.9 ng/g、BPA が 2.9~4.1 ng/g であったが、鶏、豚、牛による相違はほとんどなかった(図4)。

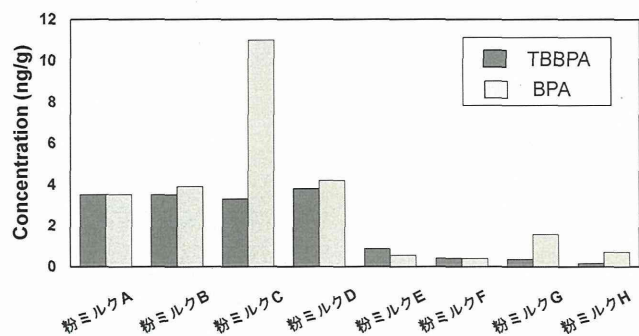


図2 乳類に検出されたTBBPA及びBPAの濃度

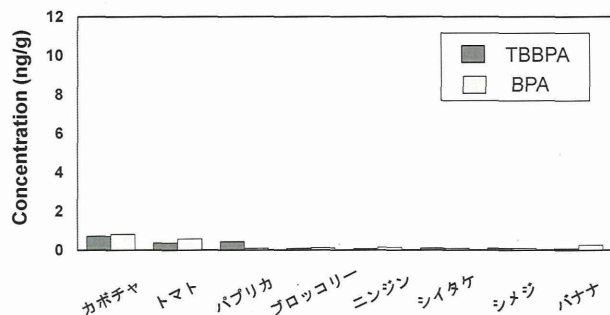


図3 野菜・きのこ・果実類に検出されたTBBPA及びBPAの濃度

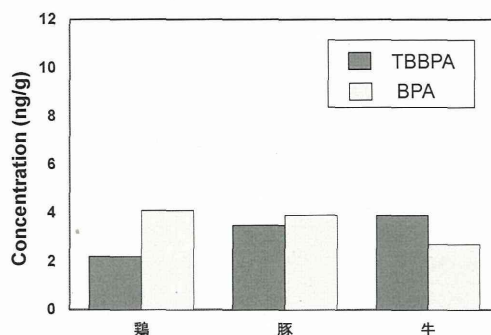


図4 肉類に検出されたTBBPA及びBPAの濃度

芋類、菓子類(図5)および豆類、穀類(図6)についても、いずれも 1 ng/g(湿重量)以下であった。種々の食品の汚染レベルを調べたところ、粉ミルクと肉類で TBBPA と BPA の汚染が明らかとなり、高脂肪含有の食品ではこれらビスフェノール系化合物による汚染が高くなることが判明した。

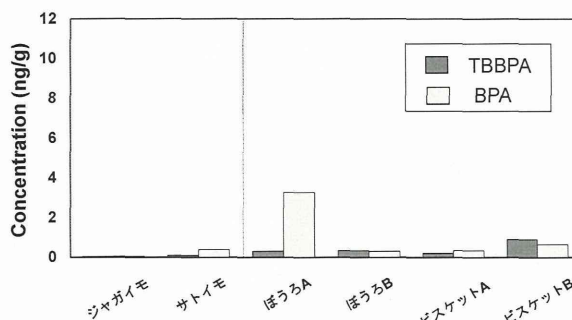


図5 芋・菓子類に検出されたTBBPA及びBPAの濃度

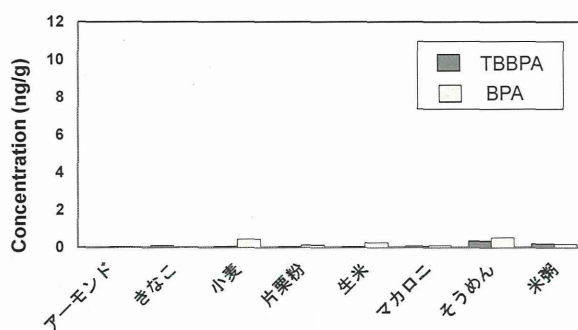


図6 豆・穀類に検出されたTBBPA及びBPAの濃度

2) TBBPA 曝露マウスにおける TBBPA 及びその代謝物等の体内動態においては、投与 24 時間後の排泄及び体内分布を確認したところ、24 時間後には全投与量の約 40%が未変化体として糞及び尿中に排泄されていた。今回、検出された TBBPA 未変化体のほとんどが糞中に排泄されていることが明らかになった。

また、未変化体の各臓器（肝臓、心臓、脂肪組織、脳など）への分布を調査したところ、投与量に対する分布率は極めて低いものの、その分布濃度は肝臓 > 腸管 > 心臓 > 腎臓 > 腸管膜脂肪 > 褐色脂肪 > 脳 > 精巣 > 顎下腺 > 肺 > 脾臓 > 内臓脂肪の順であった（図 7）。

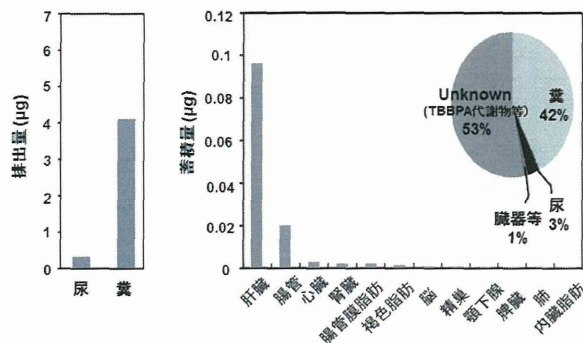


図7 C57BL/6マウスにTBBPA経口投与（10μg, 24時間後）したときの未変化体の糞、尿中排泄率と各臓器蓄積率

次に、TBBPA 代謝物の分布を確認した（図 8）。その結果、糞及び尿中にグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体が検出された。さらに、臓器では肝臓で主にグルクロン酸抱合体、腎臓及び脾臓でグルクロン酸及び硫酸抱合体が検出された。このように臓器中には抱合体の形で主に分布していることが明らかとなった。以上の結果より、TBBPA は未変化体と代謝物を含めると、24 時間で 66%が排泄され、速やかに代謝・排泄を受けることが判明した。

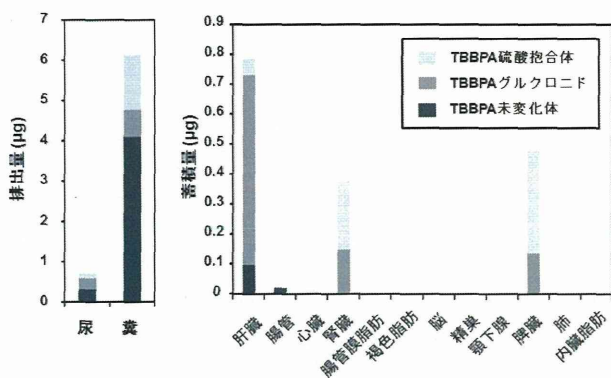


図8 TBBPA経口投与24時間後の糞、尿および各臓器中の未変化体、抱合体(グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体)組成

次に、24、48 時間後の糞・尿中への TBBPA 及びその代謝物の排泄率を確認した（図 9）。上述したように、24 時間後で総投与量の 66%が糞・尿中から排泄されている。その 24 時間後である 48 時間の排泄率を確認したところ、糞及び尿中に全投与量の 97%が排泄されていることが明らかとなった。

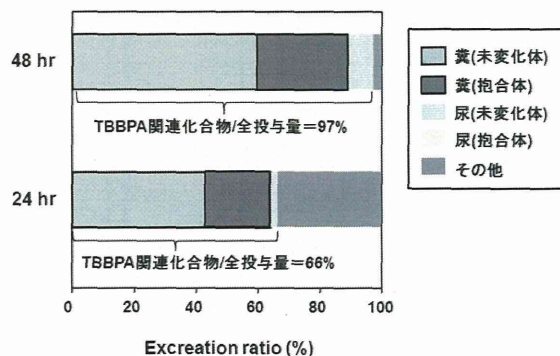


図9 C57BL/6マウスにTBBPA経口投与したときの24及び48時間後の体外排泄率（未変化体・抱合体）

3) PPAR γ を介した TBBPA による脂質・糖代謝系への影響評価を行った。はじめに HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、PPAR サブタイプ (α , β , γ) に対する TBBPA 活性は、PPAR γ 特異的であることが明らかとなった（図 10）。

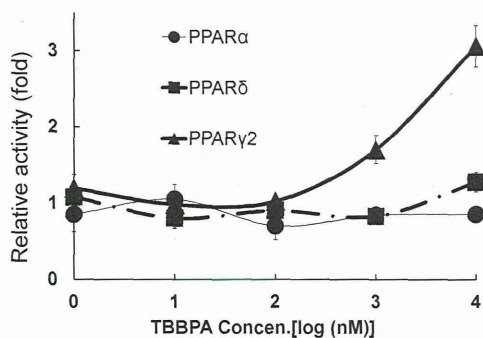


図10 TBBPAのペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)に対する活性スクリーニング

次に、図 11 は TBBPA の代謝物と推定される MoBBPA、DiBBPA、TriBBPA の PPAR γ に対する活性を比較したものである。臭素の置換数が多くなるほど活性が高くなることが判明した。

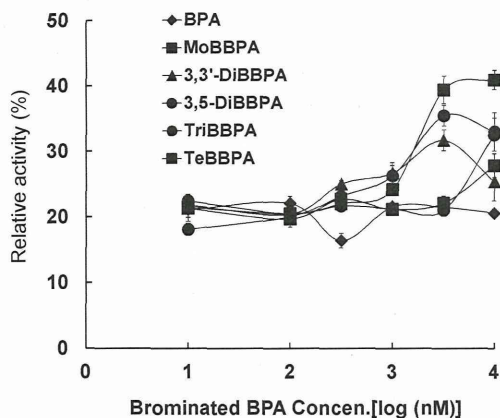


図11 臭素化BPAsのPPAR γ 活性の比較

図 12 は、脂質、糖代謝系への健康影響として、TBBPA 曝露マウスの肝臓中の糖脂質代謝遺伝子の発現解析を行った結果である。TBBPA 濃度依存的に脂肪酸輸送に関連する CD36 及び FSP27 の mRNA 量が上昇した。次に、TBBPA を曝露させた妊娠マウスから出生した雄性仔マウスの影響を調査した。仔マウスに高脂肪食を自由摂取させた時の耐糖能変化は、高脂肪食群では耐糖能悪化が認められたものの、TBBPA 曝露による血糖値に相違が確認されなかった。従って、TBBPA は、PPAR γ を介し、肝臓の脂質代謝を攪乱する可能性が示唆される結果となった。

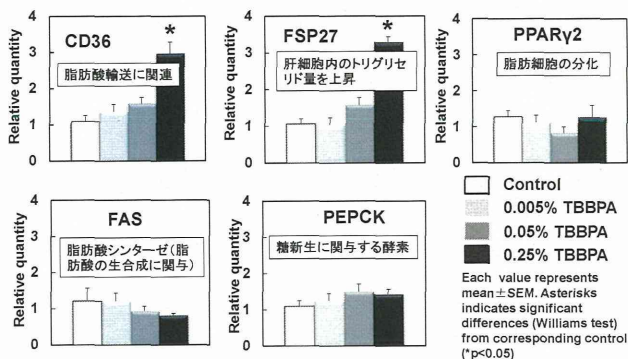


図12 TBBPAの投与によるマウスの肝臓における脂質代謝に関するmRNAの発現変化

D. 考察

1) の乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明では、これまで皆無であった乳幼児用食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態が明らかとなった。粉ミルク (8検体) を分析したところ、TBBPA及びBPAの濃度が、それぞれ3.3~3.8 ng/g及び3.5~11 ng/gであった。TBBPAの濃度は検体毎にほとんど相違がなかった。また、肉類にもビスフェノール系化合物が検出され、TBBPAが2.2~3.9 ng/g、BPAが2.9~4.1 ng/gであったが、鶏、豚、牛による相違はほとんどなかった。その他の食材についても調査したところ、ほとんどの食材で1.0 ng/g以下となり、汚染レベルは極めて低いことが判明した。さらに、食品の包装容器や粉ミルクの缶からの溶出量を予試験的に調べたところ、粉ミルクや食材よりも高濃度に検出される検体が確認されたことから、包装容器等からの汚染の可能性を指摘する結果となった。

2) のTBBPA曝露マウスにおけるTBBPA及びその代謝物等の体内動態では、TBBPA曝露マウスの24時間後の糞及び尿中にTBBPA未変化体が全投与量の45%が排泄されていることが明らかとなり、体内蓄積量が少ないことが判明した。小腸から吸収されたTBBPAは肝臓を経由し、全身に分布すると考えられたが、その分布率は、肝臓、腸管、心臓の順で高いことが判った。続いて、代謝物の分析を行ったところ、糞及び尿中にグルクロン酸抱合及び硫酸抱合体が検出された。このように代謝物を含めると24時間で66%が代謝・排泄されていることが判明し、TBBPAは速やかに体外に排泄されることが明らかとなった。

3) PPAR γ を介したTBBPAによる脂質・糖代謝系への影響評価では、TBBPAはPPAR γ に対し、特異的リガンドとなること、また脱ブロム化体についてもPPAR γ に対し活性を示すことが明らかとなった。さらに、TBBPA曝露マウスの肝臓中の糖脂質代謝遺伝子の発現解析を行った結果、TBBPA濃度依存的に脂肪酸輸送に関連するCD36及びFSP27のmRNA量が上昇した。また、仔マウスに高脂肪食を自由摂取させた時の耐糖能変化は、高脂肪食群では耐糖能悪化が認められたものの、TBBPA曝露による血糖値に相違が確認されなかった。以上の結果より、TBBPAはPPAR γ を介し、肝臓の脂質代謝を攪乱する可能性が示唆される結果となった。

E. 結論

高精度迅速型分析法の構築に成功し、一部の乳幼児用食品の汚染実態が明らかとなった。その汚染レベルは1グラムあたり数ナノグラムであり、比較的低濃度であった。2年間の汚染実態調査という比較的短

期間での調査であったものの、日本食品成分表18群の食品群の中、9群の食品の汚染実態を明らかにし、乳幼児用の食品汚染レベルの基礎的な知見が得られたものと判断した。今後、追跡調査等を行い、より詳細な汚染実態の解明に努めたい。

健康影響評価では、マウスによる動態解析と細胞を用いたレポータージーンアッセイによる評価を中心に行った。TBBPAは速やかに排泄されるものの、一部は全身に分布し、臓器中に検出されることが判明した。興味深いことに、肝臓中で脱ハロゲン化されたTriBBPA、DiBBPAおよびMoBBPAが検出されたことより、これら代謝物による二次的な毒性影響の可能性も示唆される結果となり、今後の課題といえる。レポータージーンアッセイによる評価では、マウス肝臓において脂質代謝に関連する遺伝子の発現が増加したことにより、肝臓の脂質代謝を攪乱する可能性が指摘された。

F. 健康危機情報

今回、分析した乳幼児食品中のビスフェノール系化合物の濃度は、比較的 low、現在のところ健康危機となる情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Contamination levels and health assessment of tetrabromobisphenol A and its related compounds in infant foods, *Chemosphere* 投稿中

2. 学会発表

- 1) ダイオキシン類が有する免疫攪乱作用の検討—70日間連続投与ダイオキシン類による抗原特異的な抗体産生変動—、第21回環境化学討論会、p102、2012
- 2) 脂肪細胞に対するTBBPAが有する恒常性攪乱作用の解明、第21回環境化学討論会、p127、2012
- 3) 乳幼児食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明及びその健康影響評価(第2報)、第21回環境化学討論会、p128、2012
- 4) 幹細胞を用いた環境汚染物質の健康影響評価システムの開発—第1報、第21回環境化学討論会、p203、2012
- 5) Dextran透過を指標としたTCDDとB(a)Pによる生体膜破綻作用、第21回環境化学討論会、p203、2012
- 6) 臭素化ビスフェノールA蓄積性と核内受容体PPAR活性との相関性、第21回環境化学討論会、p204、2012
- 7) 臭素系難燃剤TBBPAによる肝脂質代謝異常に関する検討、第21回環境化学討論会、p204、2012

- 8) TBBPAの妊娠期・授乳期曝露による仔マウスの生体影響、第21回環境化学討論会、p205、2012
- 9) Damaging effect of tight junctions as barrier function in Caco-2 cells indicated by diolxins and their related compounds, 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, p57、2012
- 10) Exposure to tetrabromobisphenol A alters hepatic lipid metabolism in C57BL/6N mice, 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, p57、2012
- 11) Tetrabromobisphenol A regulates mRNA expression involved in adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation, 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, p57、2012
- 12) Contamination levels and health assessment of tetrabromobisphenol A and its related compounds in infant foods, 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, p79、2012
- 13) トランス脂肪酸の健康影響評価—食品に含まれるトランス脂肪酸の定量及びトランス異性体の分離・精製—、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p154、2012
- 14) 生体膜破綻能を指標とした環境汚染物質の毒性影響、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p155、2012
- 15) TCDDの長期連続投与による抗原特異的な抗体産生の推移、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p155、2012
- 16) プラスチック工業製品に含まれる難燃化剤TBPAによる脂肪細胞分化促進作用、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p155、2012
- 17) 性ホルモンモニタリングを基礎とした環境汚染物質による内分泌攪乱作用、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p30、2012
- 18) 高残留性有機環境汚染物質(POPs)による市販食品の汚染実態調査、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p30、2012
- 19) 難燃剤テトラブロモビスフェノールA連続曝露による肝脂質代謝攪乱機構、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p30、2012
- 20) 臭素化ビスフェノールAのファミリー化合物が有する脂肪細胞分化作用、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p30、2012
- 21) POPs投与マウスが示す18種の性ホルモン・代謝物の変動と毒性影響、第15回環境ホルモン学会、p120、2012
- 22) 1~4臭素化ビスフェノールAが有する脂肪細胞分化作用、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p136、2012

- 23) TBBPA連続曝露マウスが示す糖・脂質代謝関連遺伝子の発現変化、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、p137、2012
- 24) ビスフェノール系化合物による乳幼児用食品の汚染実態、日本薬学会第133年会、p88、2013
- 25) 塩素・臭素化ダイオキシン類の薬物代謝酵素誘導能、日本薬学会第133年会、p88、2013
- 26) 性ホルモンモニタリング法によるPOPs曝露マウスの内分泌かく乱作用、日本薬学会第133年会、p89、2013
- 27) 市販食品中のトランス脂肪酸の定量及びトランス異性体の分離・精製方法の検討、日本薬学

会第133年会、p89、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年

