

総括研究報告書

人工・天然由来臭素系化合物の乳幼児摂取量評価

研究代表者 藤井 由希子 第一薬科大学薬学部分析化学分野・講師

研究要旨

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)は火災予防等に広く使われていたが、RoHS指令、ストックホルム条約、業界の自主規制等によりその使用量は減少している（旧臭素系難燃剤群）。一方で上記の代替品として現在使用量が増加しているのがエチルヘキシルテトラブロモ安息香酸エステル（TBB）、ビスエチルヘキシルテトラブロモフタル酸エステル（TBPH）等の新規臭素系難燃剤群である。また、これら人工の臭素系化合物の他に、海洋生態系を発生源とする天然由来の臭素系化合物が存在する。臭素系難燃剤と類似した構造を持つこれらの天然由来臭素系化合物は日本近海の海洋ほ乳類・魚類にも検出され、食用魚類を通じたヒトへの曝露が懸念される。本研究ではこれらの人工・天然の臭素系化合物を対象に、母乳を含む乳幼児食品からの曝露評価を行い、リスク管理の基礎資料とすることを目的とする。本年度は食事、母乳試料の収集と前処理、新規難燃剤群の分析手法の検討、旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析、Caco-2細胞を用いた消化管膜透過性の検討を行った。

A. 研究目的

臭素系難燃剤は高分子有機材料の火災予防に広く使われている。代表的な臭素系難燃剤のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）は、ポリ塩化ビフェニル（PCBs）と似た化学構造を持ち、難分解性で高蓄積性であり、ヒト体内に蓄積後、さまざまな生理活性作用を持つ。これらの物質はRoHS指令、ストックホルム条約、業界の自主規制等によりその使用量は減少し

ている

一方、これらの規制を受けPBDEsの代替品として普及しているのがエチルヘキシルテトラブロモ安息香酸エステル（TBB; 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate）、ビスエチルヘキシルテトラブロモフタル酸エステル（TBPH; bis(2-ethylhexyl) 2,3,4,5-tetrabromophthalat）等の新規難燃剤群である。しかしながら最近、これらの物質が内分泌かく乱作用を

持つという報告がなされている (Saunders et al., *Toxicol lett* 2013., Mankidy et al., *Toxicol lett.* 2014他)。

人工の臭素系有機化合物の他に、海洋生態系を発生源とする天然由来臭素系化合物が存在する (Fujii et al., 2014 *Environmental Int*; Haraguchi et al., 2016 *Environmental Int*)。これらは日本近海の魚類に検出され、食用魚類を通じたヒトへの曝露が懸念される。最近の研究では細胞実験においてエストロゲンシグナルかく乱作用が見いだされ (岡崎ら、第137回日本薬学会年会)、その影響が懸念されている。

本研究ではこれらの臭素系化合物を対象に、母乳を含む乳幼児食品についての旧難燃剤、新規難燃剤、さらに天然由来の臭素系化合物の曝露評価を行い、リスク管理の基礎資料とすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 乳幼児食品の収集と前処理

分析試料の収集を実施した。地域薬局で開催される育児相談会の参加者を対象に福岡県内で2歳までの乳幼児の1日食を陰膳方式で収集を行った。得られた食事試料は各食品群の重量の記録後、1日食ずつホモジナイズを行った。天然由来臭素系化合物は海洋生態系由来であると推測されることから、海産物の摂取状況を中心に、食生活についてのアンケートを行った。さらに市販されている乳幼児食品の購入、母乳・粉ミルクの収集も行った。収集した分析試料は前処理として脂肪分の抽出を行った。

2) 新規臭素系難燃剤の微量分析法の検討

新規臭素系難燃剤はTBB, TBPH 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane (BTBPE), 1,2-bis(pentabromophenyl) ethane (DBDPE) を最初のターゲットとし、第一薬科大学に配備されているGC-MSを使用し分析法の検討を行った。

3) 旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析

収集した分析試料を用いて旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系化合物の化学計測を行った。

4) Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験

臭素系化合物での腸管での吸収を明らかにするために、薬物の消化管膜透過性のスクリーニングに用いられるCaco-2細胞 (小腸上皮細胞モデル細胞) を用いて透過係数を算出する予備実験を行った。

(倫理面での配慮)

分析試料 (母乳・陰膳) の収集は第一薬科大学研究倫理委員会の承認 (No. 17001) を得て実施された。薬局の育児相談会にて説明を行い、文書による同意を得た方を参加者とした。

C. 研究結果

1) 乳幼児食品の収集と前処理

平成29年度は福岡県の地域薬局で開催される育児相談会の参加者を対象に陰膳方式での乳幼児の食事 (46日食)、母乳 (30検体) の収集を行った。乳幼児の年齢は7ヶ月から2歳0ヶ月までであり、平均は1歳2ヶ月であった。得られた陰膳は各食材重量の記録を行い、1日食ずつのホモジネート処理を行った。平均重量は518gであった。

陰膳収集時にはアンケートを行い、試料提供者の基礎的情報（年齢・性別・体重等）と普段の食生活についての情報を得た。また薬局の管理栄養士と協力し、一般に広く流通している乳幼児食品と粉ミルク（8種類）についても収集を行った。

続いて分析の前処理として収集した分析試料の脂肪分の抽出を行った。試料約15 gに1mol/Lの塩酸10ml、エタノール10ml、ヘキサン10mlを加えて、ローテーターで48時間攪拌後、遠心分離により上層を分離した。3回繰り返し抽出した液を濃縮し脂肪含量を測定した。食事試料の脂肪含有量は平均1.3%であった。

2) 新規臭素系難燃剤の微量分析法の検討

新規臭素系難燃剤はAli et al., 2011, *Anal Bioanal Chem* 400, 3073-3083.2011 を参考とし、GC-MSを用いて行った。ターゲットをTBB, TBPH, BTBPE, DBDPEとし、DB-5ms column (15 m × 0.25 mm I.D × 0.1 μm film thickness)を用いて標準品の定性と分離を行った。

検体の精製にはサイズ除去クロマトグラフィーを使用し、食事ホモジネートからの抽出された脂肪分に標準品のTBB, TBPH, BTBPE, DBDPEを添加し、1mlのジクロロメタン：ヘキサン(1:1 v/v)に溶解、Bio-Beads S-X3 column (20 g of gel material; バイオラッド社製)に付した。移動相(ジクロロメタン：ヘキサン(1:1 v/v))を流速4 mL/minで流したところ、17分以降に目的化合物の流出を確認した。

17分以降のGPC溶出液を回収し、エバポレーターで濃縮、ヘキサン(1 mL)溶液とした。その後、さらなる精製の

ためにシリカゲルカラム(0.2 g of Wako gel S-1)に付し、DCM/n-hexane (12:88, v/v,もしくは50:50, v/v)で目的化合物が溶出することを確認した。

3) 旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析

1)で得られた乳幼児食品について旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析を行った。先行研究(Fujii et al., 2014 *Environ Int*)の方法を利用し、サイズ除去クロマトグラフィーで高分子の脂肪類を除去し精製を行った。また鯨類の組織別に天然由来臭素系物質・旧臭素系難燃剤の分析を行い(論文発表1 Fujii et al., 2018)、基礎的な生体内分布についての情報を得るとともに、食品中の曝露源としてターゲットになる可能性が高い海洋生物における参考値を得た。さらに日本人の母乳中に含まれる旧臭素系難燃剤のヘキサブROMシクロドデカンの報告を行った(論文発表2 Fujii et al., 2018)。

4) Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験

平成29年度は臭素系化合物での実験の予備検討として、同じハロゲン系化合物であるフッ素系カルボン酸についてCaco-2細胞(小腸上皮細胞モデル細胞)による消化管膜透過性の評価を行い(論文発表3 Kimura et al., 2017)、アッセイ系を確立した。

D. 考察

平成29年度は乳幼児関連試料(陰膳・母乳・市販食品・粉ミルク)の収集と分析前処理を完了した。また、GC-MSを用いた新規難燃剤分析の予備的検討を行い、一部試料で旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の測定

に着手した（論文発表1 Fujii et al., 2018: 論文発表2 Fujii et al., 2018）。Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験については、確立されたアッセイ系（論文発表3 Kimura et al., 2017）を用いて、平成30年度に透過係数を算出する予定である。これについては予備検討の結果、臭素系化合物は脂溶性が高いことが予想されるため、先行研究を参考にして試験を実施する（Yu et al., 2017, *Environ. Res.* 154 93-100）

E. 結論

平成29年度は分析試料の収集、前処理、新規難燃剤分析の予備的検討、旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の測定に着手した。平成30年度は引き続き、新規・旧臭素系難燃剤・天然由来臭素系の分析と*in vitro*の評価を行い、得られた数値をデータベースとしてまとめ、解析データとする予定である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. **Fujii, Y.**; Kato Y.; Sakamoto K, Matsuishi T, Harada KH, Koizumi A, Kimura O, Endo T, Haraguchi K., Tissue-specific bioaccumulation of long-chain perfluorinated carboxylic acids and halogenated methylbipyrroles in Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) and harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in northern Japan. *The Science of the total environment* 616-617 554-563, 2018
2. **Fujii, Y.**; Kato, Y.; Masuda, N.; Harada, K.H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Contamination trends

and factors affecting the transfer of hexabromocyclododecane diastereomers, tetrabromobisphenol A, and 2,4,6-tribromophenol to breast milk in Japan. *Environ Pollut*, 237, 936-943, 2018

3. Kimura, O., **Fujii, Y.**, Haraguchi, K., Kato, Y., Ohta, C., Koga, N., Endo, T., Uptake of perfluorooctanoic acid by Caco-2 cells: Involvement of organic anion transporting polypeptides. *Toxicology letters* 277, 18-23, 2017
4. Kato, Y.; Fujii, A.; Haraguchi, K.; **Fujii, Y.**; Atobe, K.; Endo, T.; Kimura, O.; Koga, N.; Ohta, C.; Yamada, S.; Degawa, M. Possible mechanism for the polychlorinated biphenyl-induced liver-selective accumulation of thyroxine in rats. *J Toxicol Sci*, 42, 663-669, 2017

(2) 学会発表

1. 津田侑人、中村翼、碓元貴士、府高昌才輝、**藤井由希子**、加藤善久、木村治、遠藤哲也、太田千穂、古賀信幸、原口浩一。食用魚類に含まれる残留性長鎖有機フッ素カルボン酸の分析、日本薬学会第138回年会（金沢）2018年3月
2. 木村 治、**藤井由希子**、原口浩一、加藤善久、太田千穂、古賀信幸、遠藤哲也。Caco-2細胞におけるBSPの取り込みに及ぼすペルフルオロカルボン酸化合物の影響 日本薬学会 第138回年会（金沢）2018年3月
3. **藤井 由希子**、小川 和加野、松原 大、原口浩一。海藻 (*Sargassum fusiforme*) に含有される臭素化ビフェノール(6-OH-BDE47)の抗菌作用 第51回ビブリオシンポジウム 2017年11月
4. Haraguchi K, **Fujii Y**, Kimura O, Endo T, Kato Y, Ohta C, Koga N. Brominated catechols and guaiacols as possible sources of dihydroxylated PBDEs and hydroxylated dioxins in bivalves from Asia-Pacific. *Dioxin*

2017 Vancouver Canada 2017 August
20 to 25 Sheraton Wall Centre

5. Fujii Y, Kato Y, Kimura O, Endo T, Ohta C, Koga N, Harada K, Koizumi A, Haraguchi K. Tissue-specific bioaccumulation of halogenated methylbipyrroles and long-chain perfluorinated carboxylic acids in marine mammals stranded in northern Japan, Dioxin 2017 Vancouver Canada 2017 August 20 to 25 Sheraton Wall Centre
6. Kimura O, Fujii Y, Haraguchi K, Kato Y, Ohta C, Koga N, Endo T. Uptake of perfluorooctanoic acid into human intestinal Caco-2 cells by organic anion transporting polypeptide. Dioxin 2017 Vancouver Canada 2017 August 20 to 25 Sheraton Wall Centre

7. 岡崎 裕之、竹田 修三、藤井 由希子、原口 浩一、渡辺 和人、荒牧 弘範. 環境化学物質による女性ホルモン機能の修飾メカニズム 第44回日本毒性学会学術大会 2017年7月

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし