

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。本研究ではこれらの人工・天然の臭素系化合物を対象に、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Caco-2細胞を用いた消化管膜透過性の検討、旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析とデータ解析を行った。

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。さらに市販されている乳幼児食品と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と精製を行った。

2) Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験

臭素系化合物の消化管吸収機構を明らかにするために、Caco-2細胞（小腸上皮細胞モデル細胞）を用いて消化管膜透過性のスクリーニングを行った。

3) 新規臭素系難燃剤の微量分析法の検討と分析

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) をターゲットとし、GC-MSを使用し分析法の検討と化学計測を行った。得られたデータから1日の総摂取量を計算した。検出限界以下の場合には数値を零とした。

4) 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。得られたデータから1日の総摂取量を計算した。検出限界以下の場合には数値を零とした。

(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/D. 考察

1) 乳幼児食品の収集と前処理

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（47日食）の収集を行った。乳幼児の年齢は7ヶ月から2歳0ヶ月であり、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。1日食分の平均重量は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、母乳（30件）と一般に広く流通している市販乳幼児食品（15種類）と粉ミルク（4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。陰膳試料の平均脂肪含有量は陰膳試料で1.3%（湿重量）であった。

2) Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験

平成29年度に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のCaco-2細胞（小腸上皮細胞モデル細胞）における細胞内取り込み機構の評価を行い（29年度業績 Kimura et al., *Toxicol. Lett.*, 2017）、ハロゲン系化合物でのアッセイ系を確立した。平成30年度は臭素系化合物での検討を行った。新規難燃剤のTBPHとTBBを対象とし、旧難燃剤（PBDE）のCaco-2細胞での透過性試験の先行研究（*Environ. Res.* 154 93-100 2017）を参考に検討した。新規難燃剤は20ng/mlになるようにHBSS（Hanks' balanced salt solution）を用いて調製を行った。また完全に溶解されていることを確認するために、溶液をGC-MSで測定し、濃度の確認を行った。Caco-2細胞を多孔性フィルター上で21日間培養し、コンフルエントに達したCaco-2細胞のapical側から新規難燃剤を含むHBSSでインキュベートした。1、2、4、8時間後に、basolateral側のHBSSを採取し、GC-MSで測定を行った。その結果、TBPHとTBBは何れの時間においてもapical側からbasolateral側への透過は認められなかった。この結果から新規難燃剤の分解や代謝などが無いと仮定すると、TBPHとTBBの消化管吸収にはapical membraneに発現している

P-glycoprotein や breast cancer resistance protein (BCRP) などの efflux transporters が関与している可能性が考えられる。このことから、バイオアベイラビリティは低いと予想されるが、細胞実験の限界として細胞膜表面あるいはトランスウェルへの結合や吸着の影響も考えられ、慎重な検討が必要である。

3) 新規臭素系難燃剤の検討と分析

新規臭素系難燃剤はTBB, TBPH, BTBPE, DBDPEをターゲットとしてGC-MS分析を行った。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内部標準を添加し、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、15mlのDCM/n-hexane (12:88, v/v,もしくは50:50, v/v)で目的化合物を流出させた。エバポレーターで再濃縮し、ヘキサン0.1mlで溶解、分析用試料とした。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。その結果、すべての分析検体（離乳食陰膳、母乳、市販乳幼児食品、粉ミルク）においてTBB, TBPH, BTBPE, DBDPEはすべて検出限界以下(<10 ng/g-lipid weight)であった。

4) 旧臭素系難燃剤、天然由来臭素系

物質の分析

旧臭素系難燃剤と天然由来臭素系物質の分析については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方法 (Fujii et al., 2014 *Environ.Int.*) を用いて、2008-2010年に日本国内で収集した母乳の旧臭素系難燃剤のヘキサブロモシクロドデカンを分析したところ、すべての検体で検出が確認された (論文発表1 Fujii et al., 2018)。今回収集した母乳での分析を行ったところ、旧臭素系難燃剤BDE209は多くの検体で検出限界以下 (離乳食陰膳は検出率6% (47件中3件)、母乳は27% (30件中8件)、市販乳幼児食品40% (15件中6件)、粉ミルク0% (4件中検出なし) (検出限界10ng/g-lipid weight) であった。一方で検出感度の高い旧臭素系難燃剤のBDE47や天然由来臭素系化合物である2'-MeO-BDE68、6-MeO-BDE47については粉ミルクを除くほぼすべての検体で検出が確認された (検出限界0.2-1ng/g-lipid weight)。また、6-MeO-BDE47については魚介類の摂取量と正の相関がみられた ($\rho=0.6$, $p<0.05$)。

天然由来の臭素系化合物は鯨類に多く蓄積 (一例として北海道のシャチには2'-MeO-BDE68は327ng/g-lipid weight、6-MeO-BDE47は2690ng/g-lipid) しており (論文発表2 Fujii et al., 2018, 論文発表3 Fujii et al., 2018, 学会発表1)、食物連鎖上位の海洋哺乳類や大型魚類 (マグロ等) が曝露源である可能性が示唆された。さらに、天然由来臭素系化合物の一部は食用海藻に検出され、これらについては海藻が発生源である可能性が示唆された (学会発表2)

E. 結論

平成30年度は1)については予定件数の乳幼児関連試料 (陰膳・母乳・市販食品・粉ミルク) の収集と分析前処理を追試し、2)についてはCaco-2細胞を用いた透過性スクリーニングを実施、3)、4)についてGC-MSを用いた新規難燃剤、旧難燃剤、天然由来臭素系化合物の分析とデータ解析を行った。得られた結果から離乳食を通じた乳幼児の臭素系化合物の摂取量はBDE47は0.47ng/day、BDE209は3.9ng/day、6-MeO-BDE47は7.6ng/dayであった。米国有害物質疾病登録局はBDE209の中期毒性の最小リスクレベル値を0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と設定している。本研究の対象乳幼児の体重は6.4-12.1kgであり、本研究で得られたBDE209摂取量は最小リスクレベル値を下回る結果になった。一方で、天然由来の臭素系化合物の毒性はいまだ不明確であり、今後のさらなる検討が求められる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Fujii, Y.; Kato, Y.; 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
2. 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
3. Fujii Y, Kato Y, Kozai M, Matsuishi T, Harada KH, Koizumi A, et al. Different profiles of naturally produced and anthropogenic organohalogens in the livers of cetaceans from the Sea of Japan and the North Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;136:230-42.
- (2) 学会発表
1. 日本分析化学会 第 67 年会, 2018.9, 仙台, 藤井 由希子、加藤 善久、木村 治、遠藤 哲也、原口 浩一. 北海道に棲息する海洋哺乳類におけるハロゲン化ビピロール類および長鎖ペルフルオロカルボン酸の濃度とその組織別蓄積傾向.
2. Dioxin2018, 2018.8, Krakow, Poland, Haraguchi K, Fujii Y, Ohta C, Koga N, Kimura O, Endo T, Kato Y: Human exposure to brominated phenoxy phenols: seaweeds as source of hydroxylated and methoxylated PBDEs in Asia-Pacific.
- 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