

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03094

研究課題名(和文)生活関連物質から生じるハロゲン化アリアル類の水圏汚染化学とリスク削減に関する研究

研究課題名(英文) Study on the chemistry of water pollution by aryl halides originated from personal care products and their risk reduction

研究代表者

寺崎 正紀 (Terasaki, Masanori)

岩手大学・人文社会科学部・教授

研究者番号：10363904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品やパーソナルケア製品に含まれる化学物質について、水処理工程で生じるハロゲン化体に焦点をあて水圏での挙動と生態系への影響を評価した。結果は防腐剤として知られるパラベンの臭素化体が季節を通じてほぼ検出され、臭素の数およびパラベン側鎖の炭素数の多い物質ほど河川濃度が高いことが判明した。急性毒性や薬物代謝酵素を誘導する活性(AhR活性)も強く、高リスク因子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常的に使われている防腐剤が消毒工程で水に含まれる微量の臭素と反応して臭素化体となり、水環境を汚染していることを世界で初めて明らかにした。特に分子量の大きい防腐剤は臭素化されると、汚染濃度や毒性が相乗的に高くなり、水生生物に対して高リスクであることが判明した。これら高リスクの物質について重点的に環境モニタリングをする必要性を示した。

研究成果の概要(英文)：Parabens are used as preservatives in pharmaceuticals and personal care products. Parabens react with aqueous chlorine, which is used in disinfection processes, leading to the formation of halogenated parabens. This study investigated measuring brominated paraben concentrations in the river and whether brominated parabens have a hazard in the aquatic environment.

The concentration and toxicities (acute toxicities of an aquatic organism and AhR activity) of parabens increased with the length of the hydrocarbonated chain and the number of bromine substituents. These compounds had the highest contributions to the observed toxicities in water samples.

研究分野：環境毒性化学

キーワード：防腐剤 水質汚染 生態毒性 受容体結合活性 ハロゲン化副生成物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有効成分や製品の質の維持、向上が期待される成分は生活関連物質と呼ばれ、医薬品、化粧品、パーソナルケア製品などに添加されている。生活関連物質は日常的に使用されるため絶えず環境中へ放出されていると考えられており、水質への負荷量や生物への有害性に関心もたれている。なかでもヒドロキシ安息香酸エステル類(パラベン)は幅広いpH領域で長期間静菌性を発揮することから防腐剤として多くの製品に添加されている(上限1%w/w)。これまでの研究でパラベンは芳香環上の水素が比較的置換しやすく、水道水中の塩素や生活排水の水処理工程において1または2個の塩素が置換した塩素化パラベンが生成することがわかっている。生成した塩素化パラベンは水生生物への急性・慢性毒性が強くなることや生物へ取り込まれた際の代謝速度が大幅に低下することが判明している。一般的に広く使用されるオキシ酸系消毒剤として次亜塩素酸(HClO)がある。この消毒剤は不純物として次亜臭素酸(HBrO)を数%含むほか、臭化物イオン(Br⁻)を酸化させてHBrOを与える可能性がある。パラベンがHBrOと反応した場合、芳香環の水素が臭素に置換した臭素化パラベンを生成する可能性がある。しかし水環境中での汚染実態や有害性についてはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究ではハロゲン化パラベンとして臭素化パラベンに着目した。臭素化パラベンは標準物質が市販されていないため、最初に標準物質16物質の合成を検討した。次に合成標品を使って、固相抽出とUPLC-MSを組み合わせた水試料の分析法確立と水質汚染状況の把握を目指した。続いて生物への影響として、生殖毒性および薬物代謝酵素の誘導を指標とした毒性を調査した。

3. 研究の方法

(1) 臭素化パラベン標準品の合成

CS₂中の各種アルキルパラベン(1.0g)に臭素(1.3当量)を滴下後、4時間還流した。反応後に水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層は飽和食塩水と硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで溶媒除去後、ヘキサン/酢酸エチルから再結晶して一臭素化アルキル(メチル、エチル、プロピル、iso-プロピル、ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル)パラベンをそれぞれ得た。

密封容器内でCS₂中のアルキルパラベン(500mg)に臭素(4.0当量)を加えて、40℃で1時間反応させた。反応後に水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水と硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで溶媒除去後、ヘキサン/酢酸エチルから再結晶して二臭素化アルキル(メチル、エチル、プロピル、iso-プロピル、ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル)パラベンをそれぞれ得た。

密封容器内で炭酸水素カリウム(0.46g)存在下、DMF中のモノまたはジブプロモ-4-ヒドロキシ安息香酸(1.0g)に臭化ベンジル(1.2g)を滴下後、40℃で3時間反応させた。反応後に炭酸カリウム(0.1g)のメタノール(1mL)溶液と水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層は飽和食塩水と硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーターで濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(250×35mm、展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル=7/3)。目的画分を濃縮後、ヘキサン/酢酸エチルから再結晶して一および二臭素化ベンジルパラベンをそれぞれ得た。

(2) 添加回収実験による分析法の検討

蒸留水(0.5L)に上記(1)で合成した各臭素化パラベン100ngおよびサロゲート(プロピルパラベン-d₄)1μgのアセトニトリル溶液を添加した。酢酸でpH4として、減圧下、予めメタノールおよび水でコンディショニングしたC18カートリッジに流速2mL/minで通水した。N₂通気により乾燥後、ヘキサン、酢酸エチル、メタノールの順に各10mLを用いて溶出させて、3つの画分(ヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分)を得た。各画分にDMSO(50μL)を添加後、エバポレーターで溶媒除去して残留物を少量のアセトニトリルでバイアルへ転溶した。N₂パーージで濃縮し、アセトニトリル/水(80/20, v/v)で500μLへメスアップした(濃縮率=1000倍)。各試料は0.25μmフィルターでろ過後、UPLC-MS/ESI⁺(Shimadzu LCMS2020)に供した。臭素化パラベンの同定は試料ピークの保持時間および定量イオンと確認イオンのピーク面積比と標準品のそれらとの一致によりおこなった。定量は2.0~150μg/Lの範囲で6段階の濃度から作成した検量線により算出した。

(3) 各種毒性試験

エストロゲン受容体(ER)活性: ヒトER^αを導入した酵母two-hybridアッセイを用いた。DMSOに溶かした被験物質を96ウェルマイクロプレートに3列ずつ加えて(n=3)、培地で5段階希釈後、前培養した酵母を添加して18時間培養した。ザイモリエースで処理後、β-ガラクトシダーゼ(β-Gal)をクロロフェノールレッド-β-ガラクトピラノシド(CPRG)により呈色後、吸光度(540と690nm)をプレートリーダーにより測定し、次式から得られるシグモイド関数により定量した。

$$\beta\text{-Gal} = A540 - 1.2 \times A690 \quad \text{Eq.1}$$

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + K_s / X^{\text{slope}}) \quad \text{Eq.2}$$

X=(濃度)、Y=シグモイド関数(β-Galのmaxとmin)から計算した活性値、K_s(定数)とslopeはMicrosoft Excelのソルバー機能から求めた。活性は17β-エストラジオール(E2、アゴニスト活性)および4-ヒドロキシタモキシフェン(4HT、アンタゴニスト活性)に対する相対活性として評価した

芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性: ヒト AhR を導入した酵母レポータージーンアッセイを用いた。実験操作は上記に従った。アゴニスト活性は -ナフトフラボン (BNF) に対する相対活性として評価した。

また HepG2 cells による Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) 試験に関してもあわせて実施した。

4. 研究成果

(1) 標準品の合成

精製した合成物を ¹H-NMR、高分解能 FAB-MS により分析し、目的の構造であることを確認した。これら標準品の純度はいずれも 98%以上 (GC FID) であることを確認した。収率は二臭素化ベンジルパラベンが 9.2%、それ以外の臭素化パラベンは 58%~95%であった。

(2) 分析法の検証

検量線の最も低濃度の試料を蒸留水に添加して繰り返し測定した臭素化パラベンの定量下限値 LOQ(10) は 3.4 ng/L から 8.7 ng/L、回収率は 65%から 122%、再現性 (相対標準偏差) は ±24%の範囲に収まり、環境モニタリングとして問題のない分析法であると判断した。

(3) 河川水中の濃度

2017年から2018年にかけて岩手県盛岡市から宮城県石巻市までの北上川計10地点で増水期(春)と減水期(秋)の年2回測定を実施したところ、対象とした18物質中15物質が調査期間中に1回以上検出され、うち13物質はLOQ以上の濃度であった(表1)。

二臭素化体は検出頻度25%以上、濃度8.1~27 ng/L(中央値)、一臭素化体は一臭素化ベンジルパラベン Br1BnPのみが検出頻度73%、中央値濃度28 ng/Lで定量できた。これら臭素化パラベン(一臭素化メチルパラベン Br1MP、一臭素化プロピルパラベン Br1PP、Br1BnP、二臭素化メチルパラベン Br2MP、二臭素化エチルパラベン Br2EP、二臭素化プロピルパラベン Br2PP、二臭素化ブチルパラベン Br2BP、二臭素化ベンジルパラベン Br2BnP)の河川からの検出は初めての報告である。

総パラベン(一および二臭素化パラベン+非臭素化パラベン)濃度は140 ng/Lで、二臭素化体の占める割合(61%)が非臭素化体(18%)よりも高いことが判明した。臭素化パラベンの河川水中濃度は塩素化パラベンのそれらとほぼ同程度であり、また下水処理水が放流される地点で濃度が高い傾向を示した。水処理工程においてHBrOとHClOの存在比はHClOが多く占めると考えられる。しかし、これらオキシ酸副生成物であるハロゲン化パラベンの存在比はほぼ等しいため、臭素化反応が塩素化反応よりも速いことが示唆された。また非臭素化体は疎水性が小さいため、臭素化体よりもパラベンのエステル部の加水分解速度も速い。このため下水処理工程での除去効率は良好と考えられる。ここで示された非臭素化体の濃度が低い理由の一つとして、除去効率の良さが反映された可能性がある。

定量データと採水時期の関係をみると、水量の多い春で濃度が低く、対照的に水量の少ない秋で濃度が高くなる傾向がみられた(P<0.01)。パラベン類はその用途から夏場に水質汚染が高まるとの報告がある。一方、本研究で調査した河川は春季に融雪による増水が見られる。そのような河川において、臭素化パラベンによる水質汚染は、希釈効果による濃度変動が大きいことが示唆される。

このほか一次分解生成物と考えられるヒドロキシ安息香酸HBA(160 ng/L、検出頻度98%)とその二臭素化体Br2HBA(38 ng/L、検出頻度33%)も検出できた。HBAがより濃度が高い理由として、先に述べた非臭素化体の加水分解性の高さが反映されているかもしれない。一臭素化体BrHBAは期間中どの地点からも未検出であった。

(4) AhR 活性

酵母レポーター試験では対象とした18物質中12物質が活性を示した(表2)。臭素置換数に見られる活性傾向は一臭素化体>二臭素化体>非臭素化体の順となった。またアルキルエステルの疎水性の増加とともに活性は強まるが、芳香環を持つベンジル基はブチル基ほどの活性は示さないことが判明した。BNFに対する相対活性は4.4×10⁻⁴から7.1×10⁻¹の範囲であった。また河川水のAhR活性はすべての地点で検出できた。その強度はBNF換算で120 pMから620 pM(中央値230 pM)で下流ほど高い傾向があることを明らかにした。

表1 調査期間中(2017-2018年)^aの臭素化パラベンの河川水濃度 (ng/L)

物質	頻度 n = 40	平均	中央値	パーセンタイル	
				25%	75%
MP	70%	LOQ ^b			
EP	38%	140 (n = 1)			
PP	45%	24	7.6	4.9	11
BP	48%	25 (n = 1)			
BnP	93%	26	18	16	18
Br1MP	5.0%	19 (n = 1)			
Br1EP	Not detected				
Br1PP	18%	LOQ			
Br1BP	Not detected				
Br1BnP	73%	33	28	26	45
Br2MP	50%	52	24	17	42
Br2EP	25%	11	10	5.2	19
Br2PP	48%	50	8.1	5.9	43
Br2BP	88%	110	17	10	44
Br2BnP	100%	49	27	17	39
計			140		
HBA	98%	270	160	110	690
Br1HBA	Not detected				
Br2HBA	33%	38	38	24	47

^a Date: 15th May 2017, 23rd Nov 2017, 30th Apr 2018, and 19th Nov 2018. ^b Limit of quantitation

EROD 試験は 5 物質が 100 mM の濃度でコントロールと比較して 1.2 倍から 1.8 倍の範囲で有意な増加を示した ($P < 0.05$)。Br1BnP が最も活性が高く、次いで Br2BP、二臭素化 iso ブチルパラベン Br2iBP の順となった。

一臭素化 iso ブチルパラベン Br1iBP、一臭素化 sec ブチルパラベン Br1sBP、Br1BnP、Br2BP は両試験で活性を示したことから CYP1A 依存、すなわち受容体を介した発現を示す活性物質であることを明らかにした。

相対活性と河川水濃度を乗じた BNF 当量で水環境へのリスクを評価した。これによると河川から検出される AhR 活性に対する臭素化パラベンの活性寄与率は最大で 14% であると見積もられる。下水放流域の地点で寄与率が高くなる傾向を示した。また調査した物質の中では Br1BnP と Br2BP が高い寄与を示すことが判明した。

(5) ER 活性

アゴニスト試験では、非臭素化アルキルパラベン 5 物質が 3.7×10^{-5} から 7.1×10^{-4} (E_2 に対する相対活性) の範囲で活性を示す一方、それらの臭素化体はいずれも活性を示さなかった。アンタゴニスト試験では、臭素化パラベン 12 物質が 0.11 から 2.5 (4HT に対する相対活性) の範囲で活性を示した (図 1)。

活性はエステル基の疎水性の増加および臭素置換数の多い物質ほど高まることを明らかにした。ベンジルパラベンはアゴニストおよびアンタゴニスト活性を示すが、臭素化にともなっていずれもの活性も減衰または消失することが判明した。したがって、パラベンの臭素化はエストロゲンアゴニスト活性を弱めるとともにアンタゴニスト活性を高めると判断できる。

表 2 酵母アッセイによる AhR 活性 ($n = 3$)

物質	EC50 (nM)	相対活性 ^a
MP		Not active ^b
EP		Not active ^b
PP		5×10^{-4} b
iPP		Not active ^b
BP		1×10^{-4} b
iBP		4×10^{-4} b
sBP		Not active ^b
BnP		1×10^{-3} b
Br1MP	4100 ± 390	6.8×10^{-4}
Br1EP	3400 ± 740	8.2×10^{-4}
Br1PP	91 ± 21	3.0×10^{-2}
Br1iPP	340 ± 53	8.2×10^{-3}
Br1BP	3.9 ± 1.1	7.1×10^{-1}
Br1iBP	9.6 ± 0.85	2.9×10^{-1}
Br1sBP	38 ± 9.2	7.3×10^{-2}
Br1BnP	9.0 ± 10	3.1×10^{-1}
Br2MP	6300 ± 850	4.4×10^{-4}
Br2EP	2200 ± 52	1.3×10^{-3}
Br2PP	700 ± 86	3.9×10^{-3}
Br2iPP	Not active	
Br2BP	290 ± 41	1.4×10^{-2}
Br2iBP	Not active	
Br2sBP	Not active	
Br2BnP	Not active	
HBA		Not active ^b
Br1HBA	Not active	
Br2HBA	Not active	
BNF	2.8 ± 0.14	1.0

^a Relative activity to BNF. ^b Terasaki et al., 2015.

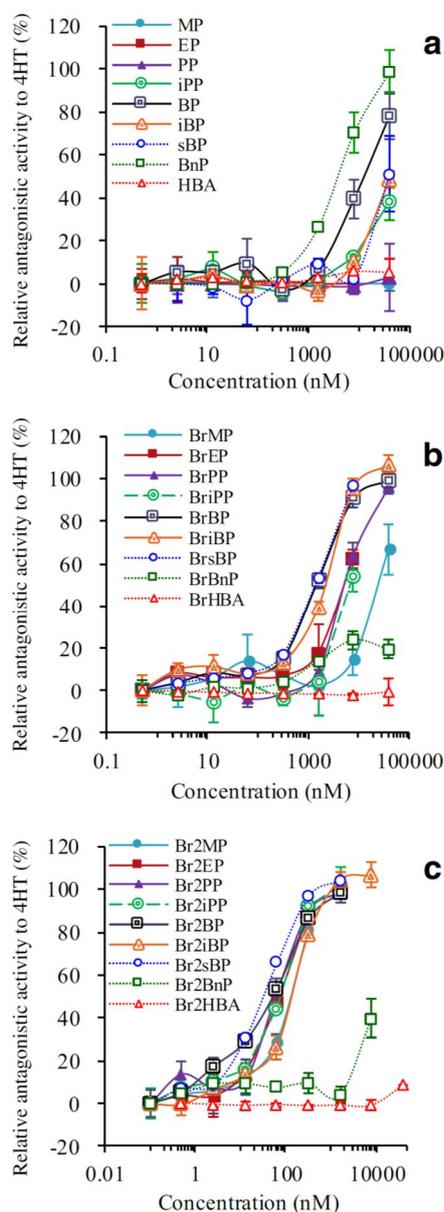


図 1 酵母 two-hybrid アンタゴニスト試験による臭素化パラベンの濃度反応曲線：(a) 非臭素化体、(b) 一臭素化体、(c) 二臭素化体。データは平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gouukon Yoshikazu, Yasuda Michiko T., Yasukawa Hiro, Terasaki Masanori	4. 巻 249
2. 論文標題 Occurrence and AhR activity of brominated parabens in the Kitakami River, North Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2020.126152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Kohei, Terasaki Masanori	4. 巻 25
2. 論文標題 Estrogen agonistic/antagonistic activity of brominated parabens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 21257 ~ 21266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-018-2600-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Gouukon Yoshikazu, Terasaki Masanori
2. 発表標題 AhR activity of brominated disinfection by-products of parabens in the river water
3. 学会等名 Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) North America 40th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 郷右近 嘉一、寺崎 正紀
2. 発表標題 河川水中の臭素化パラベンとAhR活性:北上川における事例
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Sasaki and Masanori Terasaki
2. 発表標題 Effect of bromination on the estrogen agonistic/antagonistic activity of parabens
3. 学会等名 Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) North America 38th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----