

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07056

研究課題名(和文) 母乳摂取量から推定するベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による乳児へのリスク評価

研究課題名(英文) Estimated intake of benzotriazole UV stabilizers and risk assessment of infants

研究代表者

中尾 晃幸 (Nakao, Teruyuki)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：20288971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BUVA)は、化粧品などに広く使われている。BUVAは肝毒性を持つことが報告されている。一方で、BUVAによる人体汚染やその曝露経路については明らかにされていない。本研究では、母乳を調査することにより、BUVAの汚染実態を解明し、曝露経路の究明を目的とした。

すべての母乳からBUVAが検出され、総濃度は最も高いもので6.57 ng/mLであった。その主成分は、UV320、UV329及びUV9であった。これらの成分は、別途分析した食事と大気中の組成と同様であった。以上、食事と大気中のBUVAが母乳に移行していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BUVA)は、化粧品などに広く使われている。BUVAは肝毒性を持つことが報告されている。一方で、BUVAによる人体汚染やその曝露経路については明らかにされていない。本研究では、母乳を調査と母乳提供者が摂取した食事及び生活環境大気も同時に調査することにより、BUVAの汚染実態を解明し、曝露経路の究明を行った。すべての母乳からBUVAが検出され、平均濃度は42.5 ng/g, lipidであり、その濃度範囲は12.8～159 ng/g, lipidであった。母乳中の主成分は、UV320であることが判明し、主に食事の影響を受けていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Benzotriazole UV stabilizers (BUVA) are widely used as UV light filters and stabilizers in cosmetics, skin creams, and body lotions and as corrosion inhibitors in building materials, automobile components, and automotive antifreeze cooling systems. Some of these BUVA have been reported to possess hepatotoxicity and endocrine disruption. On the other hand, the human contamination level and the contamination route by BUVA are unknown. In this study, I attempted to elucidate the contamination level of human breast milk and to investigate the contamination route. BUVA were detected in all milk samples, with a maximum concentration of 6.57 ng/mL. The main components were UV320, UV329 and UV9. The composition of these chemicals were similar to those of diet and indoor air samples. These results suggest that dietary and atmospheric BUVA are transferred to breast milk.

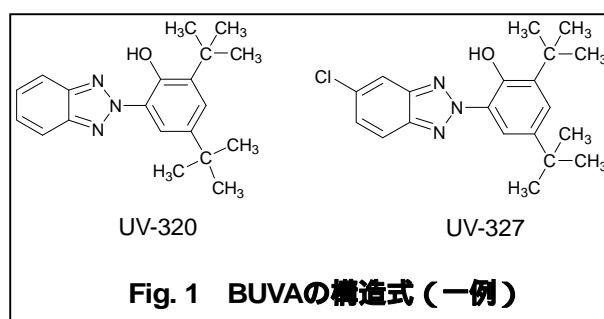
研究分野：衛生薬学

キーワード：ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 母乳 乳児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)において、第一種特定化学物質として規制されている化学物質は、様々な生物化学的な試験により難分解性、高蓄積性及び高毒性であることが判明している。2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-*t*-ブチルフェノール(UV-320、Fig. 1)は、BUVAの1つであり、平成19年度に第一種特定化学物質として指定された。また、BUVAの中で難分解性、高蓄積性を示すが、ヒトへの長期毒性が不明な監視化学物質として、2-(5-クロロ-2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-*t*-ブチルフェノール(UV-327、Fig. 1)及び2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-*t*-ブチル-2-*sec*-ブチルフェノール(UV-350)の2種類が指定されており、これら化学物質の毒性評価が急務である。一方、上記の3種類以外にも極めて類似の化学構造を有する、その他多数のBUVAが存在し、様々な工業製品の添加剤として、現在でも国内外で汎用されている。しかし、それらによるヒトへの健康影響評価や環境・人体汚染実態についての詳細は、未だ解明されていない。



近年、未規制のBUVAの1種である2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチル-6-(2-ブロペニル)フェノール(UV-P)や2-(5-クロロ-2-ベンゾトリアゾリル)-6-*t*-ブチル-*p*-クレゾール(UV-326)が酵母レポーター遺伝子アッセイにより、ヒト芳香族炭化水素受容体(AhR)にアゴニスト活性を示すこと(Nagayoshi *et al*, Environ Sci Technol, 2015) 加えてアンドロゲン受容体(AR)、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR α)及び甲状腺ホルモン受容体(TR α)に対しては抑制作用を示すことが報告された(Fent *et al*, Sci Total Environ, 2014)。すなわち、上記受容体への様々な作用は、薬物代謝、糖・脂質代謝を含む生体恒常性への増悪作用が生体内でも起こる可能性を示唆するものである。また、ステロイドホルモンの原料となるコレステロールが主に肝臓で合成されることを考慮すると、内分泌かく乱作用が肝障害(代謝酵素阻害)に起因することが十分に考えられる。申請者は、化審法により指定された3種のBUVAに加えて、現在も使用されている類似構造を有する9種の未規制のBUVA(UV-P, -PS, -090, -234, -326, -328, -329, -360, -9)が、食事や大気等を経由して人体汚染を引き起こす可能性は高く、BUVAによるヒトへの健康影響に対して深刻な懸念を持つに至った。しかも、ヒトへの毒性発現、とりわけ「生体恒常性」に最も影響を与える時期として、生体防御機構が脆弱かつ分化が活発な胎児～乳児期に特に警戒する必要があると考察した。それ故に、BUVAの乳幼児に特化した健康影響の検討が極めて重要かつ急務であると確信した。

2. 研究の目的

BUVAによるヒト(特に母子)への汚染経路を食事や室内大気試料を用いて明らかにする

こと。 生体に取り込まれた BUVA の母乳への排泄量(蓄積量)を解析すること。上記2つの目的を達成するために、申請者は、これまでに培ってきた GC-HRMS によるダイオキシン類や PCB の微量分析技術を、BUVA の微量分析法に活用して、研究課題の全容解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究試料の採取方法

大気試料：室内大気汚染の評価法として、市販の毛糸を用いた大気簡易評価法が構築されている。それを基に、毛糸を床から 1.5~2 m の位置に 4 日間吊り下げ静置することで、大気捕集を行った。

食事試料と母乳試料：毛糸回収日に母乳を 40 ml 程度採取し、母乳試料とした。採取した母乳は実験前まで-30°Cで保存した。また、母乳採取直前の食事の一部を食事試料とした。

(2) 分析方法

大気試料の分析方法：大気捕集済みの毛糸をトルエン 150 mL を用いて還流抽出し、濃縮したものをサンプルとした。内標準物質 (d-Chrysene) を添加し、シェイカーを用いてアルカリ分解を行った。その後、フロリジル (2 g) を充填したフロリジルカラムクロマトグラフィー(溶出:5%酢酸メチル/n-ヘキサン)により精製を行った。精製液を N₂ により濃縮後、GC-QMS で BUVA の定量を行った。

アルカリ分解は、試料に 1 mol/L 水酸化カリウム 15 mL を添加しシェイカーを用いて 2 時間振とうした。そこに水 30 mL、n-ヘキサン 25 mL を加え 15 分振とうした。下層を取り出し n-ヘキサン 25 mL を加え同様に 15 分振とうした。n-ヘキサン層を集め、水洗、脱水を行い濃縮した。

母乳試料の分析方法：母乳試料 5mL に内標準物質 (d-Chrysene) 飽和シュウ酸ナトリウム 10 mL、エタノール 10 mL、ジエチルエーテル 15 mL、n-ヘキサン 15 mL を添加し、15 分間シェイカーを用いて振とうした。下層を取り出し、ジエチルエーテルと n-ヘキサンを添加して同様に振とうした。その後上層のみを取り出し、水洗、脱水を行ったのち、ろ過を行った。脂質抽出液は N₂ で乾固した後、脂質重量を測定した。続いて、この脂質に 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール 2 mL を添加して超音波破碎した。さらに 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール 13 mL を加えて合計 15 mL としたのち、2 時間シェイカーで振とうして脂質のアルカリ分解を行った。さらに水 30 mL と n-ヘキサン 25 mL を添加して 15 分間振とうした。下層を取り出し、ヘキサン 25 mL を添加して同様に振とうした。その後上層のみを取り出し、水洗、脱水を行ったのち、ろ過を行った。抽出液を濃縮し、Waters 製 HLB カートリッジ (500 mg, 6 cc) を用いて固相抽出を行った。固相抽出液は底質試料と同様のフロリジルカラムクロマトグラフィー (2 g) で精製した。精製液を N₂ により濃縮後、GC-QMS で BUVA の定量を行った。

食事試料の分析方法：食事試料 5 g をアセトン/トルエン (1:1) 50 mL とともに 3 時間還流抽出を行った。ろ過、減圧濃縮し、アセトン/トルエン (1:1) で 4 mL までメスアップ後、1 mL 量り取り、サンプルとした。サンプルを N₂ で乾固した後、1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール 1 mL を添加して超音波破碎した。さらに内標準物質 (d-Chrysene) 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール 14 mL を加えて合計 15 mL としたのち、2 時間シェイカーで振とうして脂質のアルカリ分解を行った。その後、母乳試料と同様に HLB カートリッジとフロリジルカラムクロマトグラフィー (2 g) により精製した。精製液を N₂ により濃縮後、GC-QMS

で BUVA の定量を行った。

4. 研究成果

Fig. 2 及び 3 に食事中に含まれる BUVA の濃度と各化合物の組成比を示した。全ての食事試料から BUVA が検出され、その平均濃度は 3.84 ng/g であり、その濃度範囲は 0.719 ~ 14.2 ng/g であった。それらの組成比を確認すると、ほとんどの食事試料で UV320 が 60% 以上を示すことが明らかとなった。次に、組成比の高かった化合物は UV329、UV326 及び UVPS であった。UV9 はいずれの食事試料からも検出されなかった。

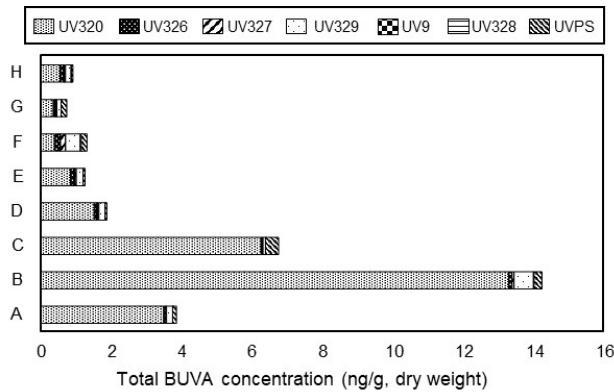


Fig. 2 BUVA contamination levels in food

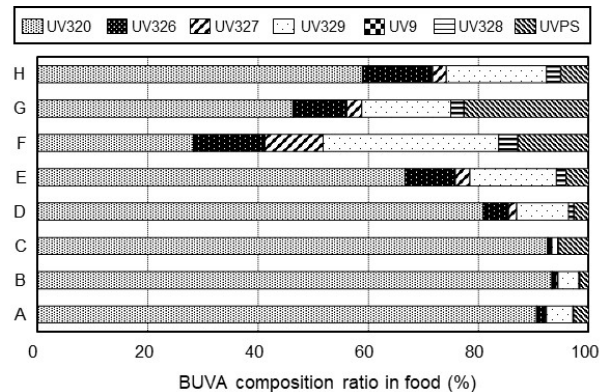


Fig. 3 BUVA composition ratio in food

次に、食事試料提供者の室内大気について、室内大気汚染濃度及び組成解析を行った (Fig. 4 及び 5)。全ての大気試料から BUVA が検出され、その平均濃度は 14.4 ng/sampler であり、その濃度範囲は 1.58 ~ 51.7 ng/sampler であった。それらの組成比を確認すると、ほとんどの大気で UV329 と UV9 が全体の 80% を示すことが判明した。前述した食事試料には未検出であった UV9 が含まれていることより、家電製品や家具等からの揮散によることが考えられた。一方、食事時の主要な構成成分であった UV320 が大気中にはむしろマイナーな成分であることが明らかとなった。

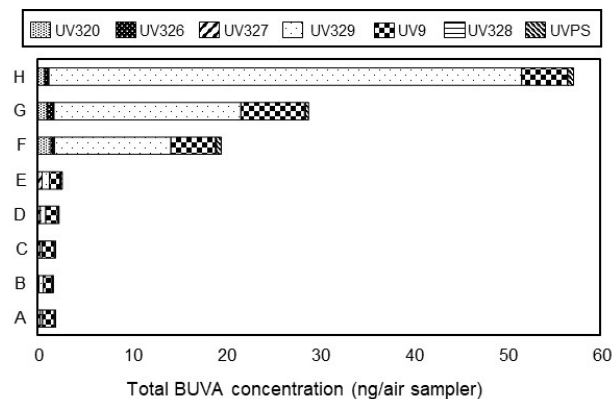


Fig. 4 BUVA contamination levels in indoor air

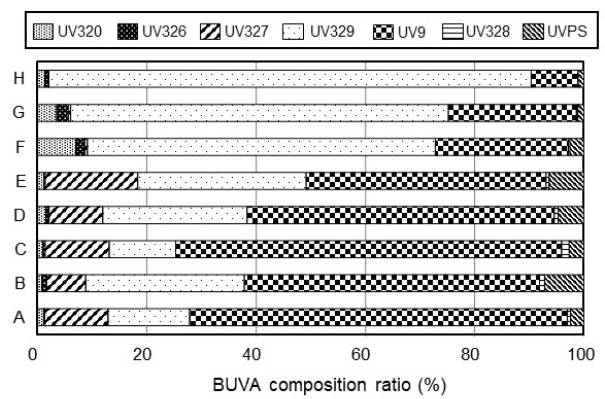


Fig. 5 BUVA composition ratio in indoor air

続いて、大気、食事試料提供者が出産 1 ヶ月後に搾乳した母乳試料について、BUVA 濃度とその組成解析を行った (Fig. 6 及び 7)。全ての母乳試料から BUVA が検出され、その平均

濃度は 42.5 ng/g, lipid であり、その濃度範囲は 12.8 ~ 159 ng/g, lipid であった。それらの組成比を確認すると、Sample G を除き UV320、UV326 及び UV329 の 3 化合物が主成分であった。最も高濃度であった Sample H は特に UV320 の濃度が 81.2 ng/g と高かった。一方、Sample H の提供者が直前にとった食事 Sample H は他者と比較して、特別な汚染が確認されなかった。しかし、室内大気については母乳と同様、他の大気試料と比較すると高濃度であった。主な汚染成分を確認したが、大気中には UV329 が主成分であったことから、矛盾した結果となった。以上の結果より、母乳中に含まれている BUVA の成分は食事試料と比較的類似しているものの、大気試料の影響も受けていることが明らかとなった。

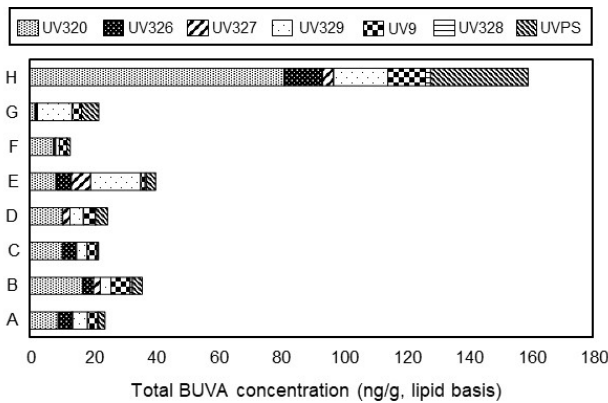


Fig. 6 BUVA contamination levels in breast milk

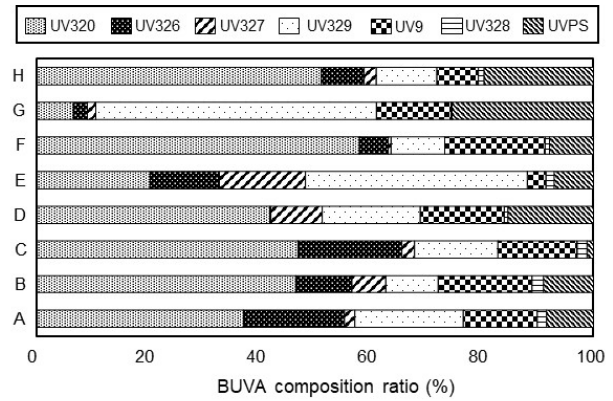


Fig. 7 BUVA composition ratio in breast milk

以上の結果より、大気、母乳及び食事試料中 BUVA を分析した結果、食事及び大気中の BUVA が母乳に移行していること可能性が推察された。食事と母乳に共通して検出された UV320 は移行性が高く、さらに生体蓄積性も大きいことが判明した。食事について解析した結果、肉、魚を含まない食事群では UV320 の割合が 10% 未満であるのに対し、肉、魚を含む群では UV320 が多いもので 90% 以上検出され、組成比に大きな違いが観察された。

以上の結果より、私たちは日常的に BUVA の曝露を受けており、大気及び食事を經由した曝露の可能性が推察された。これらの成果は、生活環境中の化学物質による曝露予防に繋がる。また、ヒトに対する健康影響についてより詳細に検討することが極めて重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 中尾晃幸	4. 巻 30
2. 論文標題 薬毒物代謝酵素と環境汚染物質の代謝活性化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 廃棄物資源循環学会誌	6. 最初と最後の頁 186-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3985/mcwmr.30.186	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24件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 中尾晃幸、青木未奈、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 トランス型脂肪酸摂取マウスにおける脂肪酸分布特性と血中脂質への影響
3. 学会等名 第69回薬学会関西支部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、吉村優花、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 有機リン系難燃剤による母乳汚染およびその汚染経路の究明
3. 学会等名 第69回薬学会関西支部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤が示すマウス肝薬物代謝酵素誘導能の比較
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 中尾晃幸、西條瑞希、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による人体汚染実態とその汚染源の解明
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 杠 智博、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤による肝脂質代謝系攪乱影響に関するin vitro 検討
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 中尾晃幸、宮尾咲衣、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一、泉川孝子、伊東厚子、黒田晴代、茂木真貴子
2. 発表標題 母乳汚染を引き起こすリン酸エステル系難燃剤の汚染経路の解明
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 杠 智博、神田亜矢子、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 有機リン系難燃剤が有する代謝性疾患関連受容体に対する作用の検討
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 角谷秀樹、杠 智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 ダイオキシン類が有する生体バリア破綻作用における芳香族炭化水素受容体の重要性
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 Teruyuki Nakao, Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Souichi Ohta
2. 発表標題 Phosphorus flame retardants (OPFRs) in human breast milk in Japan: Implications for human exposure
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Souichi Ohta, Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Teruyuki Nakao
2. 発表標題 In vitro assessment of lipid metabolism disruption by organophosphorus flame retardants
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 TBBPA facilitated adipocyte differentiation but not osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruyuki Nakao, Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Souichi Ohta, Takako Izumikawa, Atsuko Itou, Haruyo Kuroda, Makiko Mogi
2. 発表標題 Assessment of human exposure to organophosphorus flame retardants (OPFRs) in Japan
3. 学会等名 The 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Souichi Ohta, Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao
2. 発表標題 TCDD facilitates the antigen-specific immunoglobulin production under oral or nasal administration
3. 学会等名 The 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 Investigation of glucose and lipid metabolism disruption by organophosphorus flame retardants in human hepatoma cells
3. 学会等名 The 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon R plays an important role in Caco-2 cells exposed with TCDD
3. 学会等名 The 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸, 角谷秀樹, 杠 智博, 太田壮一
2. 発表標題 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による底質中の分布特性と組成解析
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹, 杠 智博, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 マウス授乳期の経母乳を介したTCDD曝露の有無による仔マウスにおける免疫機能に対する毒性評価
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杠 智博, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤の核内受容体活性化作用
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田壮一角谷秀樹, 杠 智博, 中尾晃幸
2. 発表標題 ヒト間葉系幹細胞の分化に及ぼすTCDDとTBBPAの複合的曝露影響
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾晃幸, 角谷秀樹, 杠 智博, 太田壮一
2. 発表標題 食品に含まれるトランス脂肪酸幾何異性体の分析方法の構築
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹, 杠 智博, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 芳香族炭化水素受容体を介したダイオキシン類による生体バリア破綻特性
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹, 杠 智博, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 チトクロムP450 活性を指標とした健康有害物質の複合曝露影響の評価
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹, 杠 智博, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 皮膚アレルギー増悪化作用を有する紫外線吸収剤の探索
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶 智博, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤によるNAFLD の増悪化への関与
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------