

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310049

研究課題名 (和文) 天然由来脂溶性ハロゲン化合物のヒト残留実態および代謝活性化による影響評価

研究課題名 (英文) Metabolic activation of naturally produced halogenated compounds in human

研究代表者

原口 浩一 (Koichi, Haraguchi)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00258500

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 13,700,000 円

研究成果の概要 (和文) : 日本人血清中には、6-OH-PBDE47など4種のOH-PBDEが検出され、海外での調査結果より1桁以上高濃度であった。海藻にはOH体が、魚介類や鯨類にはMeO体が残留した。食事中にはOH体とMeO体の両方が含まれ、ヒト血清にOH体が、母乳にMeO体が選択的に分布した。MeO体の代謝試験では容易に脱メチル化が起こることがわかった。ORAC法で抗酸化性を調べると、OH-PBDEはtrolox以上の活性を示した。また、その抗菌活性 (MIC) はトリクロサンと同様、グラム陽性菌の発育を阻止した。ヒトに残留するOH-PBDEは海藻OH体の直接摂取またはMeO体の代謝に由来することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Our survey on the serum concentration of OH-PBDEs in Japanese (n=60) resulted in higher concentration of naturally produced 6-OH-BDE47, which was detected at twenties times higher levels than BDE-47. The profiles of OH-PBDEs in dry seafood (Hijiki) were coincident with those in human serum. OH-PBDEs were selectively retained in serum, whereas MeO-PBDEs were present in breast milk. The in vivo and vitro metabolism study of MeO-PBDEs resulted in the O-demethylation in the liver. The antioxidant activities (MIC) of most hydroxylated compounds were higher than that of trolox standard, whereas the activities of methoxylated ones were reduced. The antibacterial activities of these halogenated biphenols were strong against Gram-positive straining, whereas the methylated ones were not. Collectively, Japanese are exposed to naturally produced OH/MeO-PBDEs via diet, of which MeO-PBDEs are demethylated to bioactive OH-PBDEs.

研究分野：環境化学

キーワード：代謝 環境動態 ヒト

1. 研究開始当初の背景

日本および東南アジアの海洋生物は多くの生理活性のある臭素化合物を生産する。そのうち脂溶性の高い臭素化ビフェノール類は食物連鎖によりヒトに曝露されている。申請者らは、フィリピン海藻（共生微生物）から検出される数種の hydroxy-PBDE 類が、抗酸化性などの機能性を示すことに着目してきた。しかしながら、これらの起源はもとより、動物体内での代謝および生理活性の詳細は分かっていなかった。

2. 研究の目的

- (1) 脂溶性の高い天然ハロゲン化ビフェノール (MeO-PBDE および OH-PBDE) , ハロゲン化ビピロール(Q1 および HDBP)が食物連鎖の最上位にある鯨類にどの程度残留しているかの実態調査を行う。また種差、地域差および曝露経路を検証し、その発生源を推定する。
- (2) 日本人 (n=60) 血清および母乳中の OH-PBDE 濃度を定量し、年齢 (20-50 歳) との相関性を調べる。ヒト曝露評価を行うため、食事、血清および母乳中の天然臭素化合物を POPs 濃度と対比しながら、日本人の食事からの摂取量を算出する。
- (3) OH-PBDE の由来を検討するため海藻（芽ひじき）を分析する。
- (4) 代謝活性化：ヒトおよび鯨類に蓄積する MeO-PBDE 関連物質について動物肝ミクロゾームによる in vitro 代謝試験およびマウス体内動態試験を行う。
- (5) 機能性評価：ヒト血清に残留する臭素化ビフェノールとその関連物質の抗酸化活性および抗菌活性を調べ、機能性分子としての有用性を評価する。

3. 研究の方法

- (1) 北海道の日本海側、オホーツク海側および太平洋側海域の 14 種 40 頭の座礁クジ

ラを用いた。(SNH 北海道ストランディングネットワーク)。測定対象物質を天然ハロゲン化ビピロール (Q1, HDBP) およびビフェノール(MeO-PBDE, OH-PBDE) とした。

- (2) 食事およびヒト由来試料：京都大学ヒト試料バンク（小泉教授）に保管してある 2000～2010 年の食事、ヒト血清および母乳を用いた。

- (3) 海藻はフィリピン海藻 (*Sargassum* sp) および日本の市販乾燥ひじき（伊勢志摩産）に含有する臭素化ビフェノール類の組成を GC-MS で定性、定量した。

- (4) in vitro 代謝：雄性のラットおよびモルモット肝ミクロソーム(Ms) は、未処理、phenobarbital、3-methylcholanthrene および dexamethasone 前処理動物から調製した。代謝活性：MeO 体を NADPH 存在下、好氣的に動物肝 Ms とともに 37°C で 20 分間反応した。反応物はトリメチルシリル化後、GC-ECD にて分析した。

- (5) 機能性評価：6-OH-BDE47, diOH-BB80 および 2',6-diOH-BDE68 および tetrabromocatechol とその関連化合物を Marsh らの方法で合成した。抗酸化活性は ORAC 法および DPPH 法により評価した。抗菌活性はグラム陽性菌 (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, and MRSA) およびグラム陰性菌(*E. coli* and *salmonella*)について発育阻止濃度 (MIC $\mu\text{g/mL}$)で評価した。

4. 研究成果

- (1) 鯨類の天然由来臭素化合物

鯨類 17 種 40 頭の肝臓、血液中の天然由来臭素化合物(ハロゲン化ビピロールおよびハロゲン化ビフェノールの残留特性を調べた結果、シャチ肝臓に MeO-PBDE が 100 ng/g wet で検出された。血液中には OH-PBDE が MeO 体の 1/10 レベルで検出された。ヒトの血清レベルで OH/MeO 比が約 20 であることを考慮すると、鯨類の MeO 体の脱メチル化

代謝能は弱いと考えられた。

(2) ヒトの残留実態と起源

日本人(n=60) 血清中の OH-PBDE 濃度を調べた結果、6-OH-PBDE47 (56-525 ng/g wet) が BDE-47 の約 20 倍の濃度で検出され、海外での調査結果より一桁以上高い値であった。また 2'-OH-BDE68 および 2,2'-diOH-BB80 が BDE-47 と同レベルで検出された。これらの濃度は年齢 (20-50 歳) と相関性がなかった。日本人の血液に OH-PBDE 濃度が高い理由の 1 つに海藻食事による曝露が考えられた。

①ヒト由来試料：血液、母乳、食事からのフェノール分画および中性分画を調査し、OH/MeO-PBDE の割合を考察した。その結果、食事（陰膳方式）中には MeO 体と OH 体がほぼ同レベルで検出された。血液には OH 体が、母乳には MeO 体が選択的に存在した。

②海藻：食事に含まれる OH/MeO 体の由来を調べるため、加工食品乾燥ひじきを分析した結果、芽ひじき（葉の部分）に 6-OH-BDE47 が最大 1 µg/g dry wet で検出された。同時に diOH-BB80 および 2'-OH-BDE68 が検出され、ヒト血清のそれと一致した。そのため、ヒト血清 OH-PBDE はひじきなどの海藻の摂取に由来することが示唆された。なお OH 体は特定の産地の芽ひじきで計測されるが MeO 体は含有していなかった。この組成は東南アジア海藻で計測される OH/MeO-PBDE 比とは大きく異なった。なお、日本近海の魚介類には MeO 体のみが残留した。

以上の結果、食事の OH 体は海藻食品、MeO 体は魚介類由来と推定される。

(3) 代謝

① diMeO-BB80 の in vitro 代謝

diMeO-BB80 はラット肝ミクロゾームにより速やかに一脱メチル化されるが、二脱メチル化体は確認できなかった。P450 誘導剤を用いた結果からこの代謝には、ラット P450 分子種の CYP2B が関与することが示唆された。

② Tetrabromoveratrole (TBV) の in vitro 代謝

TBV を NADPH 存在か動物肝ミクロソームで反応させると、容易に一脱メチル化させることが示唆された。PB 誘導性チトクロム P450 (ラット CYP2B1, モルモット CYP2B18) により容易に一脱メチル化させることが示唆された。

③ tetrabromo-2,4-dimethoxybenzene (TDB) の in vitro 代謝

TDB は、主に PB 誘導性チトクロム P450 (CYP2B および CYP3A)により、容易に一脱メチル化され、さらに二脱メチル化されて diOH 体へ代謝されることが示唆された。

④ 2'-MeO-BDE28 および methyl triclosan のマウス in vivo 代謝

体内での MeO-BDE 類の in vivo 代謝を調べるために、合成した 2-MeO-BDE28 および methyl-triclosan をマウスに投与しその組織分布を調べた。その結果、脱メチル化が容易に起こり、血液中に 2-OH-BDE28 および triclosan として検出された。また diOH 体、MeO-OH-体が尿および糞中で検出された。このことからヒト血清 OH 体の一部は MeO 体に由来することが示唆された。

(4) 機能性評価

OH-体の機能性を評価するため同定した数種の OH-PBDE および MeO-PBDE を合成した。

①抗酸化活性：OH-PBDE の抗酸化活性を ORAC 法により評価した結果、ヒト残留性 6-OH-BDE47, 6-OH-BDE28, 2,2'-diOH-BB80 は標準 trolox より強い活性を有した。一方、O-メチル化体の抗酸化能は消失した。乾燥ひじきの抽出液および海綿抽出液も強い活性を示した。DPPH 法では tetrabromocatechol が強い活性を示したが、ほかの OH-PBDE の活性はきわめて弱かった。

②抗菌活性：OH-PBDE とその MeO 体および海綿抽出液のグラム陽性および陰性菌に

対する最小発育抑制濃度 (MIC) を求めた。

6-OH-BDE47, 2,2'-diOH-BB80, 2',6-diOH-BDE68 および TBC については抗菌剤トリクロサン同様、グラム陽性菌の発育阻害を認めた (MIC <16 µg/mL)。グラム陰性菌については 6-OH-BDE47 のみがトリクロサン同様 *E. coli* および *salmonella* の発育を阻害した。こうして一連の天然臭素化ビフェノールは抗酸化作用および抗菌作用の両方を有することが明らかになった。

全体の結果をまとめると、ヒト血清に残留する臭素化ビフェノールは PBDE の代謝物ではなく、海藻食品および魚介類を含む食事起因する。ヒトに取り込まれた MeO 体は体内で脱メチル化されるか、海藻食品 OH 体を直接取り込んで血液残留することが示唆された。OH 体はいずれも抗菌性および抗酸化性などの機能性を有することが分かり、今後、この有害性 (内分泌かく乱性) および有用性 (抗酸化性) の両方を考慮した代謝活性化による影響評価を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- ① Endo, T.; Hayasaka, M.; Ogasawara, H.; Kimura, O.; Kotaki, Y.; Haraguchi, K. Relationships among mercury concentration, and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in the scalp hair of residents from seven countries: effects of marine fish and C4 plants consumption. PLoS ONE 2015, 10, e0128149. doi: 10.1371/journal.pone.0128149 査読有
- ② Ohta, C.; Haraguchi, K.; Kato, Y.; Endo, T.; Kimura, O.; Koga, N. Distribution and excretion of 2,2',3,4',5,5',6- heptachloro-biphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. *Chemosphere* 2015, 118, 5-11. doi: org/10-1016/j-chemosphere2014.05.019 査

読有

- ③ Fujii, Y.; Sakurada, T.; Harada, K. H.; Koizumi, A.; Kimura, O.; Endo, T.; Haraguchi, K. Long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in Pacific cods from coastal areas in northern Japan: A major source of human dietary exposure. *Environmental Pollution* 2015, 199, 35-41. doi: org/10.1016/j.envpol.2015.01.007 査読有
- ④ Kimura, O.; Ohta, C.; Koga, N.; Haraguchi, K.; Kato, Y.; Endo, T. Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem* 2014, 154, 145-150. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.069 査読有
- ⑤ Kimura, O.; Haraguchi, K.; Ohta, C.; Koga, N.; Kato, Y.; Endo, T. Uptake of aristolochic acid 1 into Caco-2 cells by monocarboxylic acid transporters. *Biological and pharmaceutical Bulletin*, 37, 2014, 1475-1479. doi: org/10.1348/bpb.b14-00219 査読有
- ⑥ Fujii, Y.; Harada, K.H.; Hitomi, T.; Kobayashi, H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Temporal trend and age-dependent serum concentration of phenolic organohalogen contaminants in Japanese men during 1989-2010. *Environ. Pollut.*, 2014: 185, 228-233. doi: org/10.1016/j.envpol.2013.11.002 査読有
- ⑦ Fujii, Y.; Nishimura, E.; Kato, Y.; Harada, K.H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Dietary exposure to phenolic and methoxylated organohalogen contaminants in relation to their concentration in breast milk and serum in Japan. *Environ Int.* 2014: 63, 19-25. doi.org/j.envint.2013.10.016 査読有
- ⑧ Endo, T.; Kimura, O.; Sato, R.; Kobayashi, M.; Matsuda, A.; Haraguchi, K. Stable isotope ratios of carbon, nitrogen and oxygen in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the coast of Hokkaido, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 86,

2014, 238-243.

doi: org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.012 査読有

- ⑨ Endo, T.; Hisamichi, Y.; Kimura, O.; Ogasawara, H.; Ohta, C.; Koga, N.; Kato, Y.; Haraguchi, K. Levels of mercury in the muscle and liver of star-spotted dogfish (*Mustelus manazo*) in the northern region of Japan: A comparison with spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Arch Environ. Contam. Toxicol.* **2013**; 64, 467-474.
doi.org/10.1007/s00244-012-9858-0 査読有
- ⑩ Endo, T.; Hayasaka, M.; Hisamichi, Y.; Kimura, O.; Haraguchi, K. Carbon and nitrogen stable isotope ratios and mercury concentration in the scalp hair of residents from Taiji, a whaling town. *Mar. Pollut. Bull.* **2013**; 69, 116-121.
doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.018 査読有
- ⑪ Kato, Y.; Onishi, M.; Haraguchi, K.; Ikushiro, S.; Ohta, C.; Koga, N.; Endo, T.; Yamada, S.; Degawa, M. A possible mechanism for 2,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**; 36, 1594-1601.
doi.org/bpb.b13-00440 査読有

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① Takagi, M.; Koyanagi, Y.; Moriyama, A.; Kawano, T.; Fujii, Y.; Endo, T.; Haraguchi, K. Human exposure to hydroxylated PBDE: seaweeds as dietary source, Society of Toxicology 54th Annual Meeting, San Diego, California, March 22, 2015.
- ② 太田千穂、西村恵理、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太 海洋生物由来の tetrabromo-1,4-dimethoxybenzene(TDB)の動物肝ミクロゾームによる代謝 日本薬学会第 135 年会（神戸）3 月 29 日, 2015
- ③ 太田千穂、西村恵理、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸 海洋

生物由来の tetrabromoveratrole (TBV)の動物肝ミクロゾームによる代謝 日本薬学会第 134 年会（熊本）3 月 27 日～30 日, 2014

- ④ 加治佐彰悟、河村忠彦、原雄一、西村恵理、原口浩一、太田千穂、古賀信幸 二枚貝(*Spondylus* sp.) に検出される臭素化グアヤコールおよびベラトロールの濃縮特性 日本薬学会第 134 年会（熊本）3 月 27～30 日, 2014
- ⑤ 河野龍海、小柳侑一、高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、松原大、原口浩一、Jun Rolex、Marc Romero、小瀧裕一 海藻由来の臭素化ビフェノール類の起源および機能性評価 平成 26 年度日本水産学会秋季大会（福岡）9 月 19～22 日, 2014
- ⑥ 西村恵理、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸 海洋生物由来 2,2'-dimethoxy-BB80 のラットにおける in vivo 代謝、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー（つくば）9 月 19～20 日, 2014
- ⑦ 鷺巣俊也、高田宗佑、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、遠藤哲也 フェノール性臭素化合物 (6-HO-BDE47) のヒト血清残留とその由来 日本薬学会第 133 年会（横浜）3 月, 2013
- ⑧ 西村恵理、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、古賀信幸 海洋生物由来 2,2'-dimethoxy-BB80 のラット肝ミクロゾームによる代謝と抗酸化活性 フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー（福岡）9 月, 2013.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
原口 浩一 (HARAGUCHI Koichi)
第一薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00258500
- (2) 研究分担者
古賀 信幸 (KOGA Nobuyuki)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号：80136514

遠藤 哲也 (ENDO Tetsuya)
北海道医療大学・薬学部・准教授
研究者番号：10133216

(3) 連携研究者

加藤 善久 (KATO Yoshihisa)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号：90161132

太田千穂 (OHTA Chiho)
中村学園大学・栄養科学部・講師
研究者番号：80271435