

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590147

研究課題名（和文）多環芳香族炭化水素類の塩素置換体による健康影響リスク評価に関する研究

研究課題名（英文）Study on health risk assessment of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons

研究代表者

西村 哲治（NISHIMURA TETSUJI）

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・部長

研究者番号：20156110

研究成果の概要（和文）：

純度が、6位に塩素が置換した一塩素置換体は96.7%、6位に塩素が置換した一臭素置換体は97.2%、6,11-位と6,13-位に塩素が置換した二塩素置換体は94.6%のB[a]Pの塩素置換体及び臭素置換体の標準物質を作製した。

これらのハロゲン置換体の、細胞に対する毒性、変異を起こす活性は弱かった。しかし、神経発達に影響を及ぼす可能性を示唆する結果が見られた。存在量は極めて少なかった。

研究成果の概要（英文）：

The standards of chlorinated and bromated benzo[a]pyrenes were produced by chemical modification. After purification, the purities of these compounds were 94.6% of mono-chlorinated B[a]P replaced on 6 position, 97.2% of mono-bromated B[a]P replaced on 6 position, 94.6% of di-chlorinated B[a]P mixtures replaced 6,11- and 6,13-positions. These halogenated B[a]Ps showed weak toxicities on the cells and mutagenicities under the condition of metabolic activation. However, there were results of indicating the possibility of adverse effects on the nerve development process. The abundance was very little.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：多環芳香族炭化水素・B[a]P・塩素置換体・遺伝毒性・Ah受容体・発生期

## 1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、水道水に対して、水系感染症の発生や拡大が起こらないように一定の塩素が残留するように措置されている。しかし、塩素が存在する条件下では、あらゆる

有機化学物質は、酸化作用や、塩素付加、塩素置換の反応を受けることが予想され、トリハロメタン類等の消毒副生成物と称される有害化学物質が、塩素を添加することにより非意図的に生成することもわかってきた。し

たがって、浄水工程で塩素に接触する機会を持つ条件下にある水道水では、これまで把握できていない反応生成物質が生じていることが考えられる。

化石燃料の燃焼や種々の工業生産活動等で発生した多環芳香族炭化水素類が環境中に放出されて、最終的に水系に流入することが推測されている。この多環芳香族炭化水素類が、消毒処理の工程で塩素と接触することにより塩素反応生成物が生じる可能性が示唆されている。従って、浄水処理では、溶存態の多環芳香族炭化水素が消毒のための塩素処理により塩素反応生成物が生じていることが推測される。多環芳香族炭化水素は Ah 受容体と親和性が認められることより、それらの塩素化合物はダイオキシン様の生理作用を示すことが考えられ、その生物影響を明らかにすることは重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、多環芳香族炭化水素の中で最も存在量が多く、毒性も高いといわれているベンゾ[a]ピレン（以下、B[a]P と省略）が消毒のための塩素処理により生じる塩素反応生成物のヒトおよび生態系に対する影響を明確にし、生態系に対する環境負荷の削減、ヒトの健康影響リスクの削減の対策の一助とすることを目的とする。現時点では市販品や抽出等の操作により入手することが困難な多環芳香族炭化水素類の一塩素置換体および二塩素置換体に焦点をあてて、高純度の精製標品を合成する。この精製標品を用い、有害指標として変異原活性を微生物や培養細胞により評価する。一方、個体発生・成長で最も重要な期間である発生期・胎児期に対する影響を明確にするため、正常な分化進行におよぼす影響を申請者が確立した *in vitro* 分化誘導系を用いて検討する。特に、発生期・胎児期の Ah 受容体の生理作用が明らかになっていない現状を考慮し、分化誘導系における遺伝子解析を通じて、検討を行う。

さらに、環境水中や飲料水中に存在する多環芳香族炭化水素類塩素置換体の実態を調査し、曝露量評価を行う。

## 3. 研究の方法

B[a]P の塩素及び臭素置換体の精製標品を用い、NMR により標品の塩素もしくは臭素元素が置換している正確な位置の決定を行った。

塩基置換型（マウスサルモネラ菌 TA100 株）および塩基脱離型（マウスサルモネラ菌 TA98 株）の株を用いた Ames 試験を実施し、変異原活性の評価を行った。また、細胞を用いた染色体異常試験を行った。

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞及びマウス胎性

幹細胞を用いて、哺乳動物細胞に対する致死作用、増殖に対する影響を調べた。

我々が確立したマウス胎性幹細胞の分化誘導系を用い、分化誘導過程や分化後の細胞毒性を検討した。マウス幹細胞の分化誘導系を利用して、分化の進行段階にしたがって特異的に転写発現がおこる遺伝子と発現量が増減する指標遺伝子を対象として、正常な分化進行におよぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

WHO 飲料水水質ガイドラインで、飲料水を介して経口摂取することに関してヒトへの健康影響を考慮しなければならない水環境中に存在する多環芳香族炭化水素類として取りあげられているフルオランテン、ベンゾ [b] フルオランテン、ベンゾ [k] フルオランテン、B[a]P、ベンゾ [g, h, i] ペリレン、インデノ [1, 2, 3-cd] ピレンの6物質について、塩素と反応することにより塩素置換体に変化することを、固相抽出-ガスクロマトグラフィー/質量分析法により明らかとした。ベンゾ[a]ピレンとベンゾ[k]フルオランテンは、一塩素置換体と二塩素置換体が生成し、その他4物質については一塩素置換体のみが検出された。

これらの結果から、多環芳香族炭化水素の中で最も存在量が多く、毒性も高いといわれている B[a]P の塩素反応生成物に焦点を当て、ヒトと生態系に対する影響について検討を進めることとした。また、臭素が存在する可能性を考慮し、臭素置換体も合わせて検討することとした。

しかし、現在、B[a]P の塩素置換体及び臭素置換体の標準物質を市販品として入手することはできない。そこで、Dewhurst と Kichen が報告している方法 (F. Dewhurst and D. A. Kichen: Synthesis and properties of 6-substituted benzo[a]pyrene derivatives, J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1, 710-712 (1972)) にしたがって、B[a]P の塩素置換体及び臭素置換体を化学修飾し、分取液体クロマトグラフィー/質量分析計により分離精製した。

溶媒再結晶法により抽出・濃縮・精製した標品は、NMR により一塩素置換体は 96.7%、一臭素置換体は 97.2%、二塩素置換体は 94.6% の純度であることを確認した。検討した結果、含有する不純物は再結晶に用いた溶媒であると推定された。一塩素置換体は 6 位に塩素が置換しており、一臭素置換体も 6 位に塩素が置換していることが NMR による解析で明らかとした。しかし、二塩素置換体は 6, 11-位と 6, 13-位に塩素が置換した混合物として回収され、両物質を分離精製することはできなかった。

本化学修飾方法は、他の多環芳香族炭化水

素類のハロゲン置換体の作製に適用できる可能性が認められ、本合成法の導入確立は今後の研究の推進に大きく寄与できると考えられた。

B[a]P一塩素置換体、二塩素置換体及び臭素置換体の3種の精製標品とB[a]Pによる10 $\mu$ Mを最高濃度とした24時間曝露による結果では、マウス胎性幹細胞及びHepG2細胞に対して有意な細胞毒性を示さなかった。しかし、溶存性B[a]Pを塩素処理した後、固相抽出した標品を用いたHepG2細胞に対する5日間の曝露においては、低濃度において有意な細胞毒性が認められた。ガスクロマトグラフィー/質量分析法におけるクロマトグラフでは、B[a]P一塩素置換体及び二塩素置換体が主要生成物として検出されており、その他のピークはほとんど検出されなかった。これらの結果は、溶存性B[a]Pの塩素処理により、B[a]P一塩素置換体及び二塩素置換体以外のごく微量の細胞毒性物質が生成することが示唆され、今後の検討が必要である。

微生物を用いた変異原性試験 (Ames 試験) では、3物質とも、代謝活性を行わない場合にはほとんど変異原性を示さなかった。ラット酵素誘導肝ホモジネートによる代謝活性化を行った場合には、塩基置換型の変異 (TA100 株) とフレームシフト型 (TA98 株) において、弱い変異原性を示した。3物質の中では、臭素置換体が最も強い変異原性を示した。しかし、代謝活性化を行ったB[a]Pに比べ、強い変異原性は示さなかった。培養細胞を用いた染色体異常の発生頻度を調べた結果、代謝活性化を必要とした条件のみで弱い染色体異常の誘導活性を示した。

これらの精製標品を用い、マウス ES 細胞の神経系分化過程への影響を調べた。B[a]P-Cl と B[a]P-Br を約70%以上の生存率を示したそれぞれ21.2 $\mu$ Mと22.4 $\mu$ Mの濃度で曝露を行った結果、細胞および神経系分化に対して形態的に曝露の影響がないことを光学顕微鏡下で確認した。両物質を神経系分化誘導過程で曝露した結果、外胚葉の神経細胞特異的発現遺伝子マーカーとして選択したNestin、Musashi、NSE 遺伝子の発現パターンが、抑制される傾向がみられた。特に、B[a]P-Cl は、分化誘導開始後10日から14日までの神経マーカーの mRNA 発現をB[a]PおよびB[a]P-Br と比べてより強く抑制する傾向が認められた。また、B[a]P-Cl は、10日からAhR、CYP1A1、CYP1B1、MAPK (ERK2) 遺伝子の mRNA 発現誘導を、B[a]P およびB[a]P-Br と比べて発現抑制が認められた。これらの結果から、B[a]P-Cl は、B[a]P やB[a]P-Br よりも強く、神経系分化過程で特異的に発現する遺伝子や AhR シグナルや MAPK シグナル伝達経路関連遺伝子の発現に影響を与え、神経発達に影響を及ぼす可能性が示唆

された。

浄水で塩素置換体の存在は、高さの低いピークは認められることもあるが、定量下限値未満である結果が得られている。水道水の塩素消毒の際や、下水処理水の放流の際に細菌汚染を防ぐために塩素消毒を行う際に、存在するB[a]Pが塩素に暴露されて塩素もしくは臭素置換体が生成し、健康に対するリスクが生じる恐れが想定されたが、本研究の結果からは大きなリスクがあることは示唆されなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計6件)

- 1) Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Sugimoto, N.: Toxicity of chlorinated benzo[a]pyrene, 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagenesis (2009.08.21) Firenze, Italy.
- 2) 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 小濱とも子, 杉本直樹, 西村哲治: マウス ES 細胞の神経系分化課程の評価試験系の確立と同過程における多環芳香族炭素類の影響評価, 第46回全国衛生化学技術協議会年会 (2009.11.13) 盛岡
- 3) 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 小濱とも子, 田原麻衣子, 杉本直樹: ベンゾ [a] ピレンハロゲン置換体の変異原性と細胞毒性, 日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11.26) 静岡
- 4) 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 西村哲治: 浄水工程を想定した生活関連化学物質の処理性評価, 第47回全国衛生化学技術協議会 (2010.11.12) 神戸
- 5) 杉本直樹, 田原麻衣子, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 合田幸広, 西村哲治: qNMRに基づく有機化合物の微量分析の検討, 第47回全国衛生化学技術協議会 (2010.11.12) 神戸
- 6) Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Kobayashi, N., Tahara, M., Obama, T., Hirose, A., Sugimoto, N.: Generation and toxicities of halogenated benzo[a]pyrene, The 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2011.8.23) Brussels, Belgium

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：  
○取得状況（計0件）  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 哲治 (Nishimura Tetsuji)

研究者番号：20156110

### (2) 研究分担者

なし。

### (3) 連携研究者

杉本 直樹 (Sugimoto Naoki)

研究者番号：50300918

清水久美子 (Shimizu Kumiko)

研究者番号：なし