

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750148

研究課題名(和文) 防腐剤に起因するハロゲン化芳香族類の水圏生態系蓄積と生体内運命の解明

研究課題名(英文) Accumulation and metabolic fate of halogenated aromatic compounds originating from p
reservatives

研究代表者

寺崎 正紀 (TERASAKI, MASANORI)

静岡県立大学・付置研究所・助教

研究者番号：10363904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：防腐剤パラベンの塩素化体について、化学的な視点から代謝反応の解明と水圏生物への長期的な影響評価に取り組んだ。ラット肝S9を使った代謝系で、反応速度の解析からパラベンは塩素化に伴い、分解性が著しく低下することを明らかにした。塩素化パラベンの代謝物として3つの新規化合物を発見するとともに、合成法を確立した。このうち側鎖に水酸基をもつ化合物は、AhR活性を有することが判明した。

ニセネコゼミジンコ(C.dubia)を使ったパラベン類12物質の慢性毒性試験では、化合物の疎水性が高いほど、致死率の上昇、産仔数の低下、初産日までの日数短縮が観測され、繁殖能に影響を及ぼす結果となった。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to examine the metabolic reaction and chronic effect of chlorinated parabens from a chemical perspective. The kinetic analysis indicated that chlorination of the paraben reduced its degradation rate to approximately 1/30 of that observed in the metabolic reaction with rat liver S9. We identified three novel metabolites of the chlorinated paraben and developed a practical route to their syntheses. Two metabolites, which contained a hydroxyl group, also exhibited aryl hydrocarbon receptor-mediated activity in the yeast assay.

The chronic toxicity of the 12 chlorinated and nonchlorinated parabens was investigated using a 7-day Ceriodaphnia dubia test. The mortality and inhibition of reproduction tended to increase with increasing hydrophobicity and decreased with the degree of chlorination of the parabens.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：微量環境物質評価 塩素化パラベン 代謝反応 代謝物 標品合成 内分泌かく乱作用 水生生物 繁殖毒性

1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシ安息香酸エステル(パラベン)は、医薬品、パーソナルケア製品、食品などの防腐剤・保存料として広く使われている。その塩素化副生成物である塩素化パラベンが、製品中への使用頻度が高い側鎖メチル体およびプロピル体を中心に下水処理水の放流河川やプール水中で存在を確認してきた。塩素化パラベンの毒性に関しては、内分泌かく乱毒性の一つであるエストロゲン受容体活性が示されている。また塩素化にともない水生生物(甲殻類)への急性毒性が高まることが判明している。

2. 研究の目的

塩素化パラベンの曝露後における生物への影響を、化学的な視点から予見するため、ラット肝 S9 を用いた塩素化パラベンの代謝反応を実施した。はじめに S9 による塩素化パラベンの分解挙動を追跡するため、本試験系の反応速度を解析した。続いて、機器分析により分解生成物の同定を試みた。ここではパラベンと内分泌かく乱作用、特に、エストロゲン受容体活性および芳香族炭素受容体活性を想定し、フェノール骨格を有する化合物に着目した。これらスペクトル解析に基づき、構造決定に成功した化合物の合成に取り組むとともに、合成標品を用いた反応生成物の定量と各種受容体活性の評価も実施した。また、防腐剤関連物質の長期的な水圏への影響を探るため甲殻類に対する慢性毒性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 塩素化パラベンの代謝反応

水環境中から検出事例がある二塩素化プロピルパラベン(CI2PP)をモデル物質とした。ラット肝 S9 は市販品を使用した。反応速度を比較するため、プロピルパラベン(PP)も同様の反応を実施した。生成物の同定・定量は酢酸エチルにより抽出、トリメチルシリル(TMS)誘導化後、GC-MSにより分析した。

(2) 反応生成物の標品合成

マススペクトル(MS)解析に基づき、3つの代謝生成物について標品合成を検討した。分子構造はNMR(CDC₃)および高分解能TOF-MS(M⁺-H)により確認した。

(3) 内分泌かく乱作用の評価

エストロゲン活性(ER)は酵母two-hybridアッセイにより、芳香族炭化水素受容体活性(AhR)は酵母レポーターゼーンアッセイにより評価した。

(4) 慢性毒性

ニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)を用いて、カナダ環境省ガイドライン(2007)に準じて、7日間慢性毒性試験(致死数、産仔数、初産日までの期間)を実施した。得られたデータは、主成分分析(PCA)およびクラスター分析に基づく多変量法により毒性プロファイルを解析した。

(5) 初期環境リスク評価

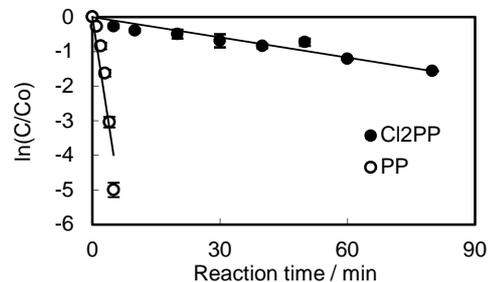
環境中予想濃度(PEC)/予想無影響濃度(PNEC)に基づくリスク評価を実施した。なお、PECは既報データの最高値、PNECはNOECまたはEC50から決定し、アセスメント係数は1000と設定した。

4. 研究成果

(1) 代謝反応

CI2PPの初期濃度(C₀)を0.14 mMとし、縦軸をln(C/C₀)、横軸を反応時間とするCI2PPとPPの経時変化をプロットしたとき、r²値はそれぞれ0.915、0.864となった(Fig. 1)。反応が一次式と近似できたことから、肝S9によるCI2PPおよびPPに対する代謝反応は一次の分解反応であることを明らかにした。分解速度定数(k)はそれぞれ0.024、0.82と計算でき、半減期(t_{1/2})はそれぞれ28分、0.82分と見積もることができた。これらの結果から、パラベンの塩素化にともない、その代謝速度は34倍低下することが判明した。

Fig. 1. Time-course plots of (C/C₀) for



propyl paraben (PP) and its chlorinated derivative (CI2PP) in the presence of the liver S9.

(2) 反応生成物の同定と標品合成

酢酸エチルによる溶媒抽出物のTMS誘導化後のGC-MS分析では、一または二塩素化化合物に見られる同位体パターンを示す5つの化合物を明らかにした(Fig. 2)。

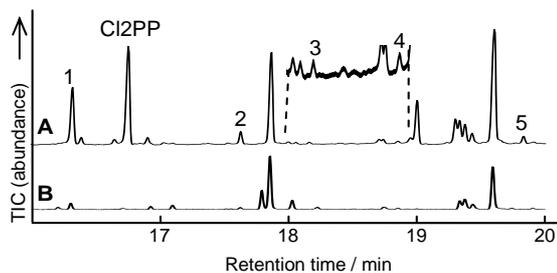
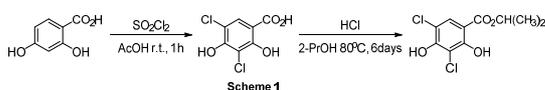


Fig. 2. GC-MS total ion chromatograms (TIC) of the extractive of CI2PP with liver S9 treatment for 120 min (A) and the blank (without CI2PP) (B). Peak numbers represent chlorinated compounds.

ピーク1は市販標品によりCI2PPの水解物である二塩素化ヒドロキシ安息香酸、ピーク2はMSフラグメントパターンからCI2PPの1つの塩素原子が水酸基に置換した化合物と同定した。

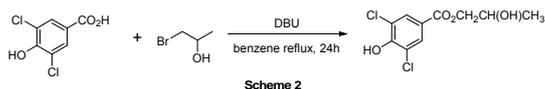
ピーク 3 ~ 5 の MS を解析したところ、Cl2PP に 1 つの水酸基が置換した化合物に相当する M⁺ (m/z = 408) を観測した。そこで別途合成した Cl2OHIPP、Cl2PP2OH、Cl2PP3OH の保持時間および MS を測定したところ、各ピークとそれぞれ一致した。以下に合成標品の詳細を記す。

Cl2OHIPP は 2,4-ジヒドロキシ安息香酸を出発物質に、塩化スルフィリル/酢酸による塩素化、続く酸触媒下 2-プロパノール中での還流により、2 段階で合成した。分取 HPLC にて精製した化合物 (全収率 7.4%) のスペクトルデータを示す。¹H-NMR: 1.39 (d 6H, J = 6.3 Hz), 5.24-5.32 (sept, 1H, J = 1.3 Hz), 7.78 (s, 1H). MS: 262.9872 (calcd. for

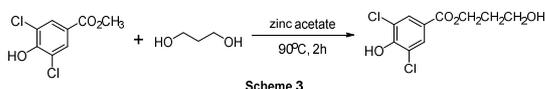


C₁₀H₉O₄³⁵Cl₂: 262.9870), 264.9844 (calcd. for C₁₀H₉O₄³⁵Cl³⁷Cl: 264.9840), 266.9818 (calcd. for C₁₀H₉O₄³⁷Cl₂: 266.9820).

Cl2PP2OH は窒素気流下ベンゼン溶媒中 DBU 触媒を用いたエステル化により、二塩素化ヒドロキシ安息香酸と 1-プロモ-2-プロパノールの還流によって合成した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー上でトルエン/酢酸エチル (6/4, v/v) で展開して得られた最初の画分に含まれる化合物 (収率 68%) のスペクトルデータを示す。¹H-NMR: 1.26 (d 3H, J = 5.5 Hz), 4.12-4.30 (m, 3H), 7.94 (s, 2H). MS: 262.9842, 264.9841, 266.9812.



Cl2PP3OH は酢酸亜鉛を用いたエステル交換により、二塩素化メチルパラベンと 1,3-プロパンジオールの加熱 (90 °C) によって合成した。生成物を hexane/AcOEt から再結晶して得た化合物 (収率 57%) のスペクトルデータを示す。¹H-NMR: 2.00 (t, 2H, J = 3.3 Hz), 3.72-3.77 (q, 2H, J = 6.0 Hz), 4.45-4.48 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 7.94 (s, 2H). MS: 262.9879, 264.9849, 266.9810.



初期濃度 0.1 mM の Cl2PP に対する反応時間と各代謝物濃度の経時変化を Fig. 3 に示す。いずれの生成物も反応 120 min までに時間とともに濃度が増加した。塩素化パラベンの水解物である Cl2HBA が代謝物として最も多く生成し、その濃度は 0.025 mM であった。続いて、Cl2PP2OH (0.0072 mM)、Cl2PP3OH (0.0039 mM)、Cl2OHIPP (0.00072 mM) の順となった。本試験系の物質収支に関して、ここで示した代謝物は Cl2PP 初期濃度の 37% に相当する。

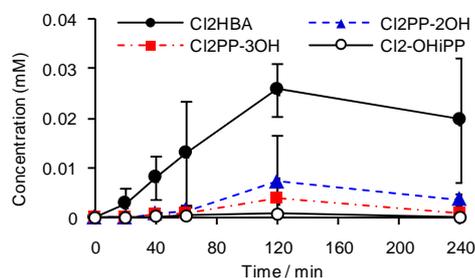


Fig. 3. Concentrations of the identified compounds in the metabolic reaction.

(3) 代謝物の内分泌かく乱作用

ER アゴニスト活性はいずれの代謝物からも認められなかったが、AhR アゴニスト活性については、側鎖が水酸化された 2 物質 (Cl2PP2OH および Cl2PP3OH) について、陽性対照物質である β-ナフトフラボンの 10⁻⁴ 程度の活性を有することが判明した (Table 1)。

Table 1. ER and AhR activities (EC50, nM) of the metabolites in the yeast assays.

Cmpd.	ER assay		AhR assay	
	EC50; nM	RA ^c	EC10; nM	RA ^c
Cl2HBA	not active		not active	
Cl2OHIPP	not active		not active	
Cl2PP2OH	not active		10000±8200	0.00014
Cl2PP3OH	not active		13000±1400	0.00011
E2 ^a	0.21±0.046	1.0	not active	
BNF ^b			1.4±0.78	1.0

^a Positive control for the ER assay. ^b Positive control for the AhR assay. ^c Relative activity for E2 or BNF.

(4) パラベンおよび塩素化パラベンの *C. dubia* 慢性毒性と分類

水圏での検出事例や毒性の強さを考慮して、12 物質について実施した。化合物の疎水性の増加とともに、致死率増加、産仔数低下、初産日までの期間短縮が見られた。一例として産仔数と分配係数との関係を Fig. 4 に示す。各エンドポイントの EC50 値を決定したところ、致死数が 0.30-3.1 mg/L、産仔数が 0.047-12 mg/L、初産日数が 1.3-6.3 mg/L となり、産仔数が最も低濃度で影響が表れることが判明した。この産仔数について、無影響濃度 (NOEC) および最低影響濃度 (LOEC) をプロビット法で算出した結果、それぞれ 0.04-10 mg/L と 1.2-19 mg/L になった。メチルパラベン (MP)、ベンジルパラベン (BnP)、二塩素化ベンジルパラベン (Cl2BnP) の各化合物は、NOEC よりも低い暴露濃度においてもコントロールと比較して有意な減少が認められた。プロピルパラベン (PP) とイソプロピルパラベン (iPP) およびそれらの塩素化体は、濃度依存性のない毒性応答を示したことから、NOEC と LOEC を決定できなかった。

本研究で得られた慢性毒性値および既報の *D. magna* 急性毒性と ER 活性のデータを使って、主成分分析を実施した結果、6 成分に分別できた。このうち 3 成分の固有値が 0.3 を超え、これら PC1 ~ PC3 の寄与率は、総計

で 98%であった。これらの結果から、毒性プロファイルの違いによりパラベン類は以下の4つに分類できる (Fig. 5)。

クラスター 1 : *C. dubia* 慢性毒性と ER 活性の寄与が非常に大きい化合物 (ClBnP)

クラスター 2 : *C. dubia* 慢性毒性と ER 活性の寄与が大きい化合物 (BnP)

クラスター 3 : *C. dubia* 慢性毒性と ER 活性の寄与が中程度の化合物 (ClPP、PP、iPP)

クラスター 4 - i : *C. dubia* 慢性毒性と ER 活性の寄与が小さい化合物 (Cl2BnP、ClPP)

クラスター 4 - ii : *C. dubia* 慢性毒性と *D. magna* 急性毒性の両方が寄与する化合物 (Cl2iPP、Cl2MP、MP、ClMP、Cl2PP)

このことからプロピル、イソプロおよびベンジルパラベンとメチルパラベンとは生態毒性の作用機構が異なる可能性がある。疎水性の高いパラベンが示す慢性毒性や ER 活性は塩素化により減少するが、疎水性の小さいパラベンが示す急性・慢性毒性は塩素化されても変化せず、その毒性を維持する傾向がつかめた。

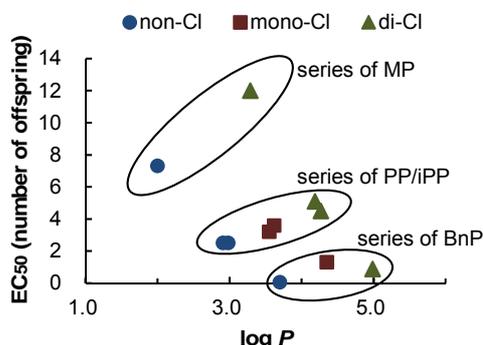


Fig. 4. Plots of EC50 values of reproduction toxicity (number of offspring) versus the logarithm of the octanol-water partition coefficients ($\log P$) in the parabens.

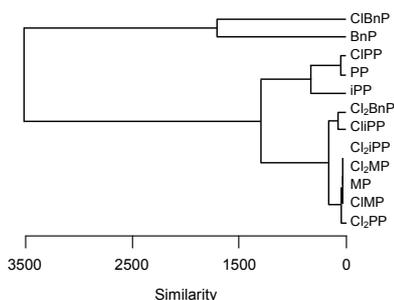


Fig. 5. Dendrogram of the cluster analysis of 12 compounds on the basis of toxicity units to acute (*Daphnia magna*) and chronic (*Ceriodaphnia dubia*) toxicity tests and yeast estrogen assay involving the medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor α .

(5) PEC/PNEC によるパラベン類の生態系へのリスク評価

パラベン類 12 物質の PEC/PNEC 値を Table 2 に示す。PEC/PNEC 値は 0.0012 ~ 0.2 となり、MP が最も高い値を示した。環境への影響

が懸念される「1」を超える化合物はなかったが、継続して調査・観測が必要な「0.1」を超える化合物があり、蓄積性や他の生物種に関する毒性についても調査の必要性が認められた。

Table 2. PEC/PNEC values for parabens and chlorinated parabens

Cmpd.	PEC (ng/L)	PNEC ^a (mg/L)	PEC/PNEC
MP	262 ^a	0.0013	0.20
Cl ₂ MP	12 ^b	0.010	0.0012
PP	231 ^a	0.0025	0.092
CIPP	9.7 ^c	0.0020	0.0049
Cl ₂ PP	28 ^c	0.0023	0.012
iPP	46 ^d	0.0025	0.018
BnP	2.3 ^d	0.000040	0.058

^a Kusk et al., 2011.

^b González-Mariño et al., 2001.

^c Terasaki et al., 2012.

^d Yamamoto et al., 2011.

^e Value by dividing NOEC or EC50 by an assessment factor of 1000.

以上、塩素化パラベンの代謝過程に関して、肝 S9 による分解速度、代謝生成物の同定、標品合成法を確立するとともに長期的な影響についての毒性化学的な知見を得た。

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1件)

M Terasaki, R Abe, M Makino, N Tatarazako. Chronic toxicity of parabens and their chlorinated by-products in *Ceriodaphnia dubia*, Environmental Toxicology, peer-reviewed journal, in press. DOI 10.1002/tox.21944

[学会発表](計6件)

和田 武・寺崎 正紀・牧野 正和. ラット肝 S9 を用いた塩素化パラベンの代謝反応について. 第 22 回環境化学討論会. 2013 年 8 月 2 日. 東京

寺崎 正紀・牧野 正和. 塩素化パラベンの AhR 結合能と水環境への影響評価. 第 22 回環境化学討論会. 2013 年 8 月 2 日. 東京

木村 健一・寺崎 正紀・牧野 正和. 臭素化パラベンの標準品合成の検討. 環境科学学会 2013 年会. 2013 年 9 月 3 日. 静岡

M Terasaki・M Makino. Chlorinated parabens in the water environments and their AhR potency, Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 34th Annual Meeting. 2013 年 11 月 18 日. Nashville, Tennessee, USA

寺崎 正紀・保田 倫子・牧野 正和・下位 香代子. レポータージーンアッセイと EROD アッセイを用いた塩素化パラベンによる AhR 活性化. 第 16 回環境ホルモン学

会研究発表会. 2013 年 12 月 12 日. 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺崎 正紀 (TERASAKI MASANORI)

静岡県立大学・環境科学研究所・助教

研究者番号：1 0 3 6 3 9 0 4