

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410195

研究課題名(和文)医薬品類由来の高毒性化したハロゲン化有機物がもたらす生物相汚染の究明

研究課題名(英文)Studies on pollution in ecological biota caused by halogenated organic compounds originating from pharmaceuticals

研究代表者

寺崎 正紀(TERASAKI, Masanori)

岩手大学・人文社会科学部・准教授

研究者番号：10363904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：国内外で使用実績のあるパラベン5物質、塩素化パラベン10物質、代謝分解物3物質の計18物質について、下水処理場の放流河川に生息する魚類とケージを使って河川水に7日間曝露した貝類を分析した。

その結果、魚類から塩素化パラベン3物質とパラベン1物質、下水放流口そばで曝露した貝類から塩素化パラベン8物質とパラベン3物質を検出した。塩素化パラベンは低次栄養段階では蓄積性が高いことを示すと同時に、生物相汚染の下水処理場の寄与を確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the levels of exposure to chlorinated parabens originating from pharmaceuticals in the aquatic biota (Medaka, Trichoptera, and *Sinotaia quadrata historica*) were analyzed.

In the river biota investigated, 3 chlorinated and 1 non-chlorinated parabens were identified in Medaka and Trichoptera. In exposure testing of caged *S. historica* near the outfall of the sewage treatment plant, 8 chlorinated and 3 non-chlorinated parabens were identified. This suggests that the sewage treatment plant is the predominant route for the accumulation of chlorinated parabens in biota.

研究分野：環境化学、化学物質影響科学

キーワード：生物蓄積 塩素化パラベン 代謝物

1. 研究開始当初の背景

医薬・化粧品等に含まれる防腐剤パラベンが、新たな水質汚染物質として明らかになっている。パラベンは水道水中や下水消毒過程において、容易に塩素化パラベンへ変換される。下水処理水やその放流河川では国内・国外問わず、塩素化パラベンの検出が相次いでいる。生成した塩素化パラベンは疎水性が高まることや水生生物への急性強毒の強毒性化、また、新たな毒性として芳香族炭化水素受容体 (AhR) への結合能が高まることも示されている。

2. 研究の目的

有機ハロゲン化合物の多くは、生物蓄積性が懸念されているが、塩素化パラベンに関しては、生物試料の分析法は確立されておらず、蓄積状況も不明である。そこで、はじめにパラベンとその塩素化体およびその主要代謝物について、水生生物中濃度を計測するため固相抽出-GC-MSによる分析法確立を目指した。続いて下水放流河川に生息する魚類の分析を試みるとともに、汚染物質を取り込みやすい貝類を用いて生物蓄積性に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 添加回収実験による分析法の検討

国内外で使用実績のあるパラベン5物質とそれらの塩素化体10物質、加水分解物3物質の計18物質を対象とした。魚肉 (*Oncorhynchus keta*) をホモジナイズ後、18物質およびサロゲート (プロピルパラベン-d₄) を添加した。Freezing-lipid filtration法 (-24℃) により脂質を除去後、Silica固定相にて clean-up した抽出物をガスクロマトグラフ-質量分析計で定量した (Fig. 1)。なお、試験に用いた魚肉試料の脂質割合は 1.8±0.12% (n=5) であった。

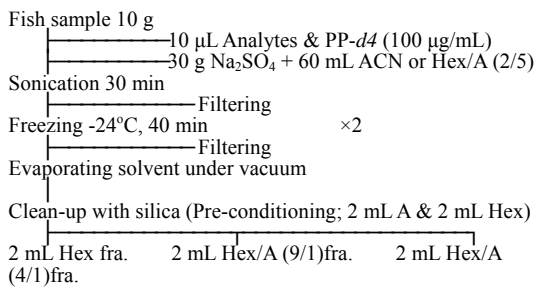


Fig 1. Extraction procedure for parabens and chlorinated parabens in fish tissue samples. ACN; acetonitrile, Hex; hexane, A; acetone.

(2) 塩素化プロピルパラベンの代謝物

機器分析により 3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシ安息香酸と推測される物質の合成を試みた (Scheme 1)。テトラヒドロフラン中、トリフェニルホスフィンおよびアゾジカルボン酸ジエチル存在

下、3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシ安息香酸とプロピレングリコールを室温にて反応させた。生成物は分取薄層クロマトグラフィー上でクロロホルム/メタノール (85/15, v/v) で展開させた4番目の画分を回収、濃縮した。

(3) 水生生物試料の分析

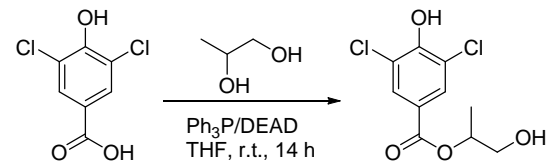
下水処理場 (処理人口 35 万人) 放流域の河川から捕獲したメダカ (n=39) およびトビケラ (*Trichoptera*, n=3) の塩素化パラベン濃度を計測した。また、同河川の放流口そば、0.1 km 上流、2 km 下流の3地点でケージ法によるヒメタニシ (*Sinotia quadrata histrica*, n=10) の曝露実験を実施した。7日間河川水に曝露したヒメタニシ中の塩素化パラベンについて、濃度計測に取り組んだ。さらに、実験室において二塩素化メチルパラベン水溶液 (濃度 0.95 µg/mL) 中で曝露したヒメタニシ (n=10) についても、7日間後に塩素化パラベン濃度を計測した。なお、下水処理場放流口は 1 km 下流で北上川と合流する地点に位置する。

4. 研究成果

(1) 固相抽出/GC-MSによる分析法検討

パラベンおよび塩素化パラベン15物質について、サロゲートで補正した添加回収率が 66%~128%、再現性も相対標準偏差が 15%以内となり、良好であった (n=5)。S/N=10とした定量下限値は 0.10~5.1 ng/g wet weight となった。

(2) 代謝物の合成



Scheme 1

生成物のスペクトルデータを以下に示す。Yield 51%. Purity (GC) 97% ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (3H, d, J=6.5 Hz), 3.77–3.85 (2H, m), 5.22–5.29 (1H, m, J=6.0 Hz), 8.00 (2H, s). HR-EI-MS (M⁺): 263.9955 (Calcd for C₁₀H₁₀O₄³⁵Cl₂: 263.9956), 265.9928 (Calcd for C₁₀H₁₀O₄³⁵Cl³⁷Cl: 265.9927), 267.9904 (Calcd for C₁₀H₁₀O₄³⁷Cl₂: 267.9897).

GC-MSによる代謝物および合成標品の保持時間とマススペクトルは一致したため、代謝物の同定に成功した。肝 S9 フラクションによる塩素化パラベンから当該物質への代謝変換率は、同定した代謝物6物質中2番目に高い32%であった。当該物質の毒性に関して、YCM3 酵母レポーター遺伝子アッセイを実施したところ、ヒト芳香族炭化水素受容体への結合活性は認められなかった。これは活性物質である塩素化プロピルパラベンと比較して、エステル側鎖の嵩高い官能基の導入によ

り芳香環との干渉が大きくなり、分子の平面性が低下したことによると考えられる。

(3) 生物試料の分析

河川の生物試料から、塩素化体 3 物質、非塩素化体 1 物質を検出し、濃度レベルは最大で 0.62 ng/g wet weight であった (Fig. 2)。

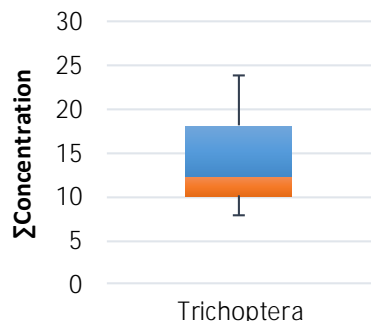


Fig. 2 Box and whisker plots of total parabens concentrations (ng/g wet weigh) in *Trichoptera*. Box stretch between the 25th and the 75th percentiles.

ケージ法により河川水に 7 日間曝露したヒメタニシから、塩素化パラベン 8 物質および非塩素化パラベン 3 物質を検出した (Table 1)。濃度レベルは最大で 12 ng/g wet weight であった。また検出物質の総濃度は 29 ng/g wet weight となった。下水放流口の上流域で曝露したヒメタニシからは、塩素化パラベン 4 物質および非塩素化パラベン 1 物質を検出し、濃度レベルは最大で 1.1 ng/g wet weight であった。総濃度は 5.4 ng/g wet weight で、この値は放流口そばの総濃度と比較して約 1/5 の値であった。さらに、ケージ曝露の期間中に計測した塩素化パラベンの河川水中の濃度は、ヒメタニシ中の蓄積濃度との相関が認められた ($R^2 = 0.33 \sim 0.77$)。これらの結果はヒメタニシから検出した塩素化パラベンの発生源として、下水処理場の寄与が大きいことを示している。

一方、下水処理場の下流 2 km でケージ曝露したヒメタニシからは、塩素化パラベン 6

Table 1 Concentration (ng/g wet weight) of parabens and chlorinated parabens in *S. histrica* samples ($n = 10$) caged at 0.1 to 2 km upstream and downstream from the sewage treatment plant.

	Upstream	STP outfall	Downstream
MP	0.73	0.43	0.49
CIMP	nd	0.39	0.52
HBA	nd	12	nd
C12MP	0.59	0.62	0.48
ClHBA	nd	7.3	nd
BP	nd	2.1	nd
C1PP	nd	0.44	nd
C12EP	0.15	0.15	0.12
C12HBA	1.1	3.1	1.1
C1BP	nd	0.26	0.18
C12PP	2.8	2.4	4.5
Σ	5.4	29	7.3

nd: not detected.

物質および非塩素化パラベン 1 物質を検出した。下流では総濃度は放流口そばの 1/4 にまで低下した。これは水量の多い北上川と合流するため、希釈されたと考えられる。しかしながら、検出した塩素化パラベンの種類は放流口そばで曝露した試料とほぼ同数である。このため、塩素化パラベンによる低濃度の水圏蓄積が下流域で進行している可能性が高いと考えられる。

室内実験における曝露実験では、7 日間曝露後のすべてのヒメタニシ試料から二塩素化メチルパラベンを検出した。しかしながら、曝露水中の二塩素化メチルパラベン濃度を考慮しても、物質収支 (マスバランス) が一致しなかった。このため、二塩素化メチルパラベンの一部は、抱合体や代謝分解物へと変換が進んだと考えられる。

以上の結果から、本研究の知見は河川における塩素化パラベンの生物蓄積性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

M Terasaki, T Wada, Satoshi Nagashima, Masakazu Makino, Hiro Yasukawa. In vitro transformation of chlorinated parabens by the liver S9 fraction: Kinetics, metabolite identification, and AhR agonist activity. Chem Pharm Bull (2016) 64 650-654.

M Terasaki, M Yasuda, M Makino, K Shimoi. Aryl hydrocarbon receptor potency of chlorinated parabens in the aquatic environment. Environ Sci Water Res Technol (2015) 1 375-382.

[学会発表] (計 5 件)

笹木 晃平, 寺崎 正紀. 臭素化パラベンのエストロゲン活性の評価. 第 50 回日本水環境学会年会. 2017 年 3 月 16 日. 熊本
K Sasaki, M Terasaki. Estrogenic activity of parabens and their brominated derivatives. SETAC North America 36th Annual Meeting. 2016 年 11 月 10 日. Orlando, USA

寺崎 正紀. 東北地方で問題になっている有害化学物質. 第 19 回日本水環境学会シンポジウム. 2016 年 9 月 13 日. 秋田

T Wada, M Terasaki. Synthesis and endocrine-disruption potential of biotransformation products of chlorinated parabens. SETAC North America 36th Annual Meeting. 2015 年 11 月 5 日. Salt Lake City, USA

寺崎 正紀. 魚類中の防腐剤パラベンおよびその塩素化体の分析法に関する検討. 第 49 回日本水環境学会年会. 2015 年 3 月 16 日. 金沢

〔その他〕

ホームページ等

<http://envchem.hss.iwate-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

寺崎 正紀 (TERASAKI MASANORI)

岩手大学・人文社会科学部・准教授

研究者番号：10363904