

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460814

研究課題名(和文)性及び甲状腺ホルモンを指標としたTBBPAとその代謝物による乳幼児の健康影響評価

研究課題名(英文) Assessment of the Effect of health for infants by TBBPA and their metabolites as an indicator of the steroid hormones

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：臭素化難燃剤テトラブロモビスフェノールA (TBBPA)による乳幼児食品汚染実態の解明並びに内分泌攪乱作用のモニタリング法の構築に成功した。乳幼児食品として乳幼児用食材及び母乳を用いてTBBPAの汚染実態を調査したところ、食材よりも母乳でTBBPAが高濃度であった。その母乳にはTBBPAの代謝物と推定されるトリブロモビスフェノールAが検出され、代謝物モニタリングの重要性を指摘した。また、血中ステロイドホルモン(17種；アンドロゲン4種、エストロゲン3種、プロゲステロン3種及びその代謝物7種)をモニタリングすることで、生体の微弱なシグナルを高感度に確認することを可能とした。

研究成果の概要(英文)：I succeeded in elucidation of TBBPA contamination level in infant food, and in variation of monitoring method of the sex steroid hormones using GC/MS. I investigated the contamination level of foods and breast milk for infants, TBBPA level in breast milk was higher than that of infant foods. Interestingly, the breast milk was detected to metabolites as tribromobisphenol A. From these results, I pointed out importance of monitoring to metabolites such as debrominated TBBPA. Moreover, I enabled to confirm for monitoring method of sex steroid hormones (four kinds of androgens, three kinds of estrogens, three kinds of progestins and metabolites).

研究分野：環境毒性学

キーワード：Flame retardant TBBPA Sex hormone

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類等に代表される環境汚染物質の急性かつ大量曝露による毒性影響については、過去から多くの研究者によって報告されている。事実、動物実験や過去の汚染事故による健康影響では、免疫、生殖、代謝、甲状腺及び中枢神経等の様々な生体への健康影響が報告されている。しかし、一般の生活環境中で食品等から、人体に微量に摂取された環境汚染物質によるヒトの内分泌、免疫等の高次機能への毒性影響に関して未だ不明な点が多い。近年、臭素系難燃剤による生体毒性影響が、世界的に注目されており、事実、ポリプロモジフェニルフェニルエーテル (PBDEs)、ヘキサプロモビフェニル (HxBB) やヘキサプロモシクロドデカン (HBCD) はストックホルム条約で残留性有機汚染物質 (POPs) として規制された。これら POPs と物理化学的な特性が比較的類似しているテトラプロモビスフェノール A (TBBPA) は、我が国の臭素系難燃剤の年間需要量 50,000 トンの中、約 30% の 15,000 トンを占めているにもかかわらず、強い毒性を示さない安全な難燃剤として、現在でも繁用されている。しかし、安全と謳われている一方で、近年の興味深い知見としては、A) 低用量のビスフェノール A (BPA) が、ヒト神経細胞の塩素輸送体遺伝子 (*Kcc2*) を抑制することを観察し、本物質が中枢神経系の初期発達に影響を与える可能性があること (Yeo M. *et al*, *Pro Natl Acad Sci*, 2013) 並びに B) 5 μ M の TBBPA を曝露させたヒト NK 細胞では、その機能低下が観察されており、その結果、生体内で腫瘍細胞の増殖やウイルス感染のリスクを増大させる可能性があること (Kibakaya E.C. *et al*, *Immunotoxicology*, 2009) 等が報告されている。すなわち、両報告は、BPA では神経攪乱が、一方 TBBPA では免疫攪乱が生体内で起こり得ることを示唆している。しかも、上記の BPA の報告等を受けて、2012 年に米国 (FDA) は哺乳瓶への BPA の使用を禁止した。加えて、応募者は、TBBPA の最終の脱臭素化体は BPA であることを考慮した時に、TBBPA とその脱臭素化体による健康影響に深い懸念を感じると共に、これら「生体恒常性攪乱」の影響を最も受けやすい時期は、生体防御機構が脆弱かつ分化が活発な胎児～乳児期であると推察した。それ故に、TBBPA とその代謝物による乳幼児への「真」の健康影響の解明が急務であると考察した。

2. 研究の目的

生体防御機構が脆弱な乳幼児に着目し、第 1 の目的として、母乳や離乳食中の TBBPA や代謝物による汚染実態を解明し、1 日摂取量の推定を行うこと。第 2 に性ホルモン定量を基礎とした TBBPA による毒性評価の他、脱臭素化体等の代謝物による生殖や内分泌系への毒性影響について検討することを目

的とした。

3. 研究の方法

(1) TBBPA の脱臭素化体の合成; BPA にトリプロモピリジニウムで臭素化し、モノ～トリプロモ (Mo-TriBBPA) を HPLC により単離、精製を行う。

(2) 極少量の血液中の性ホルモン、その代謝物の高感度迅速型リアルタイム式分析法の構築

マウスの血中ホルモンのモニタリングが必要であることから、試料の減量化 (血液 100 μ l 以下) 迅速化、高感度化を目指し、GC-HRMS による ppt(10^{-12} g/g) オーダーの超微量分析法の構築を行う。

(3) 乳幼児用食品 (母乳及び離乳食調理用食品) の汚染実態解明

乳幼児用食品の分類に従って実施する。この時、母乳は母親 (18 人) の出産後 1 週間の母乳 18 検体、離乳食調理用食品は、日本食品標準成分表に従い、18 群の食品の中、日本人の摂取量が多い食品を選定し、野菜類、肉類、芋類の汚染実態を明らかにする。

(4) TBBPA 曝露マウスにおける体内動態に関する検討

実験動物 (C57BL/6 マウス、6 週齢、雌・雄) を用いて、各臓器・血液中の TBBPA 及びその代謝物 (脱臭素化体、抱合体) を定量する。別に糞及び尿を採取し、排泄率についても検討する。具体的には、マウスへの TBBPA 最終投与から 1、6、12、24、48、72 時間後に心採血後、灌流脱血し、各臓器及び排泄物を採取し、分析に供する。抱合体については、グルクロニターゼ及びスルファターゼを単独処理あるいは両酵素の同時処理により遊離型に加水分解した上で分析する。

4. 研究成果

(1) 合成した臭素化 BPA のうち、3,5-DiBBPA について、 1 H-NMR により同定後、硫酸ジエチルでエチル誘導体化し、GC-MS で解析した。 1 H-NMR と GC-MS のクロマトグラムとマススペクトルの結果より、合成した 3,5-DiBBPA には他の臭素化 BPA や不純物がほとんど含まれておらず、極めて純度が高い (98% 以上) ことが確認できた。同様に、他の合成した臭素化 BPA についても 1 H-NMR と GC-MS により同定を行った結果、標準品として用いることができることが明らかとなった。

(2) 従来では ELISA 法等による数種の性ホルモンのみの測定であったものが、現在では、血中の性ホルモン (10 種) 及びその代謝物 (7 種) の計 17 種の性ホルモンの定量を可能とした。詳細には、血液 100 μ l を用いた精製、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ジシ

ラザン・ピリジンによる誘導体化による前処理を行った。引き続き、本研究室現有のGC-HRMS (JEOL 製 JMS-700) を駆使し、タイムグルーピング法を導入し、フェムトグラム (10^{-15} g) オーダーの超高感度定量法を確立した。

(3) 乳幼児用食品は離乳食調理用食品 (野菜類 (カボチャ、トマト、パプリカ)、肉類 (鶏、豚、牛)、芋類 (ジャガイモ)) を対象とし、TBBPA 及び BPA 濃度を測定した。その結果、粉ミルク 4 製品からは両化合物とも検出され、その濃度は TBBPA が 3.3~3.8 ng/g、BPA が 3.5~11 ng/g であった。一方、離乳食調理用食品として野菜類 (カボチャ、トマト、パプリカ)、芋類 (ジャガイモ)、肉類 (鶏、豚、牛) を使用した。すべての野菜類と芋類の TBBPA 及び BPA はいずれも 1 ng/g (湿重量) 以下であった。肉類は TBBPA が 2.2~3.9 ng/g、BPA が 2.9~4.1 ng/g であったが、鶏、豚、牛による相違はほとんどなかった。

次に、18 名から採取した母乳中の TBBPA と脱臭素化体の濃度を示している。全ての母乳から TBBPA が検出され、その濃度は母乳脂質 1g あたり、0.14~8.8 ng/g であり、平均濃度は、2.1 ng/g であった。一方、BPA の平均濃度は 38 ng/g であり、TBBPA と比較すると平均で約 18 倍の高濃度で含まれていた (data not shown)。一方、脱臭素化体について解析したところ、ほとんどの母乳中にトリプロモビスフェノール A (TriBBPA) が検出されており、その濃度は TriBBPA の方が TBBPA よりも高濃度であったことから、従来の TBBPA による汚染実態の解析結果は、ビスフェノール系化合物の、一部のみを検出しているに過ぎなかったことが判明した。

(4) TBBPA 曝露マウスにおける TBBPA 及びその代謝物等の体内動態においては、投与 24 時間後の排泄及び体内分布を確認したところ、24 時間後には全投与量の約 40% が未変化体として糞及び尿中に排泄されていた。今回、TBBPA 検出された未変化体のほとんどが糞中に排泄されていることが明らかになった。また、未変化体の各臓器 (肝臓、心臓、脂肪組織、脳など) への分布を調査したところ、投与量に対する分布率は極めて低いものの、その分布率は肝臓 > 腸管 > 心臓 > 脾臓 > 腎臓 > 腸管膜脂肪 > 褐色脂肪の順であった。この結果より、TBBPA が脂肪組織のような高脂質含有組織への蓄積はほとんどなく、速やかに排泄されることを明らかにした。さらに、尿中の主な代謝物として TBBPA のグルクロン酸抱合体が検出されるとともに、肝臓や腎臓では脱プロム化体も検出された。

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 3 件)

(1) Akiyama, E., Kakutani, H., Nakao, T., Motomura, Y., Takano, Y., Sorakubo, R., Mizuno, A., Aozasa, O., Tachibana, K., Doi, T., Ohta, S. Facilitation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by debrominated tetrabromobisphenol A compounds detected in Japanese breast milk., *Environ. Res.*, 140, 2015, 157-164, DOI; 10.1016/j.envres.2015.03.035

(2) Nakao, T., Akiyama, E., Kakutani, H., Mizuno, A., Aozasa, O., Akai, Y., Ohta, S., Detection of tribromobisphenol A as debrominated compounds of tetrabromobisphenol A in breast milk collected in Japan., *J. Environ Chem.*, 査読有, 25, 2014, 69-77, DOI; 10.5985/jec.25.69

(3) Nakao, T., Akiyama, E., Kakutani, H., Mizuno, A., Aozasa, O., Akai, Y., Ohta, S., Levels of tetrabromobisphenol A, tribromobisphenol A, dibromobisphenol A, monobromobisphenol A, and bisphenol A in Japanese breast milk., *Chem. Res. Toxicol.*, 査読有, 28, 2014, 722-728, DOI; 10.1021/tx500495j

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 中尾晃幸, 臭素系難燃剤 TeBBPA 投与マウスの体内動態解析、第 25 回日本環境化学討論会、2016.6.8、新潟県 (新潟コンベンションセンター)

(2) 中尾晃幸, 糖・脂質代謝制御受容体活性化能を有する環境・食品中の健康有害物質の探索、第 25 回日本環境化学討論会、2016.6.8、新潟県 (新潟コンベンションセンター)

(3) 中尾晃幸, 臭素系難燃剤 TBBPA によるエピジェネティックな変化を介した脂肪細胞分化亢進作用、第 25 回日本環境化学討論会、2016.6.9、新潟県 (新潟コンベンションセンター)

(4) 中尾晃幸, ヒト間葉系幹細胞の分化攪乱能を指標とした健康有害物質の毒性評価、第 25 回日本環境化学討論会、2016.6.9、新潟県 (新潟コンベンションセンター)

(5) 中尾晃幸, 健康有害物質を曝露させたマウスが示す内分泌攪乱影響、第 25 回日本環境化学討論会、2016.6.9、新潟県 (新潟コンベンションセンター)

(6) 中尾晃幸, テトラプロモビスフェノール A を投与した C57BL/6 マウスの代謝、排泄およびその仔への母乳を介した移行に関する

る検討、第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016.10.15、大阪府（大阪薬科大学）

(7) Nakao, T.、Contamination levels of polybrominated bisphenol A compounds in human breast milk、第 36 回 残留性有機汚染物質国際会議、2016.8、イタリア（フィレンツェ）

(8) Nakao, T.、Facilitation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by debrominated tetrabromobisphenol A compounds detected in Japanese breast milk、第 36 回 残留性有機汚染物質国際会議、2016.8、イタリア（フィレンツェ）

(9) 中尾晃幸、臭素系難燃剤テトラプロモビスフェノール A 投与マウスが示す体内分布特性と代謝物の解析、第 24 回日本環境化学討論会、2015.6.24、北海道（札幌コンベンションセンター）

(10) 中尾晃幸、健康有害物質 TCDD と TBBPA の曝露により観察される間葉系幹細胞の分化攪乱影響、第 24 回日本環境化学討論会、2015.6.24、北海道（札幌コンベンションセンター）

(11) 中尾晃幸、臭素化難燃剤 TeBBPA のマウス体内動態とその母乳移行について、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015.10.17、大阪府（大阪大谷大学）

(12) 中尾晃幸、健康有害物質による間葉系幹細胞の脂肪・骨芽細胞分化攪乱作用、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015.10.17、大阪府（大阪大谷大学）

(13) 中尾晃幸、乳幼児食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明とその健康影響評価（第 4 報）、第 23 回日本環境化学討論会、2014.5.25、京都府（京都大学）

(14) 中尾晃幸、マウス前駆脂肪細胞およびヒト間葉系幹細胞におけるテトラプロモビスフェノール A 刺激による分化制御、第 23 回日本環境化学討論会、2014.5.25、京都府（京都大学）

(15) 中尾晃幸、ダイオキシン類及び臭素系難燃剤が有する脂肪・骨分化攪乱作用、第 23 回日本環境化学討論会、2014.5.25、京都府（京都大学）

(16) 中尾晃幸、リアルタイム式性ホルモンモニタリング手法による内分泌攪乱作用機構の究明、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(17) 中尾晃幸、難燃剤 TeBBPA とその脱臭

素化体が有する乳幼児への健康影響について、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(18) 中尾晃幸、母乳汚染物質テトラプロモビスフェノール A による脂肪細胞の分化攪乱作用、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(19) 中尾晃幸、脂肪細胞分化を指標とした健康有害物質による肥満の増悪化に関する検討、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(20) 中尾晃幸、ヒト間葉系幹細胞を用いた環境汚染物質 TBBPA と TCDD の骨芽細胞分化攪乱、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(21) 中尾晃幸、プラスチック工業製品中に含まれる難燃剤によるマウス脂肪細胞分化への影響評価、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、京都府（京都薬科大学）

(22) 中尾晃幸、臭素系難燃剤テトラプロモビスフェノール A による間葉系幹細胞の分化攪乱作用、第 17 回環境ホルモン学会、2014.12.10、東京都（東京大学）

(23) 中尾晃幸、TeBBPA による脂肪細胞分化とエピジェネティック変化、第 17 回環境ホルモン学会、2014.12.10、東京都（東京大学）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.setsunan.ac.jp/~p-shokuh/shokuhin/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 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