

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18510063

研究課題名（和文） 新規フッ素系界面活性剤は代謝活性化により毒性を発現するか？

研究課題名（英文） Is the metabolic activation involved in the toxicity of perfluorinated chemicals ?

研究代表者

工藤 なをみ (KUDO NAOMI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：10161647

研究成果の概要：撥水・撥油剤などとして利用されている *1H,1H,2H,2H*-perfluorodecanol (8-2FTOH) は、環境中あるいは生体内で分解され、安定な化合物である perfluorooctanoic acid (PFOA) となり、蓄積することが予想されている。本研究では、8-2FTOH の生体内運命と生体内作用について明らかにすることを目的とした。8-2FTOH は生体内ではほとんど未変化体としては存在しないこと、PFOA の生成には酸化過程が関与することを明らかにした。また、生体内で生成した PFOA のみでは、8-2FTOH の生体作用を十分に説明できないことから、一部の中間代謝物にも生体への影響を示すものがあることが推察された。*1H,1H,2H,2H*-perfluorodecanol (8-2 acid) は中間代謝物の1つと考えられるが、PFOA よりも毒性が強いことが示唆された。次に、生体内で生じた微量の PFOA について、その分布を詳細に検討したところ、生成した PFOA 量が少ないほど肝臓に蓄積しやすいこと、肝細胞内では膜画分に分布しやすいことが明らかになった。以上の結果から、8-2FTOH を摂取すると、速やかに代謝され、ごく少量の PFOA が生体内に生じるが、このような場合、肝臓の膜画分に選択的に蓄積するものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	660,000	4,360,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：*1H,1H,2H,2H*-perfluorodecanol、perfluorooctanoic acid、代謝、生体内蓄積、細胞内分布、*2H,2H*-perfluorodecanoic acid、*2H,2H,3H,3H*-perfluorodecanoic acid、生体作用

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

フッ素系界面活性剤は、化学的にきわめて安定で界面活性剤として高いパフォーマンスを示すことから、撥水・撥油剤、難燃剤、消火剤、乳化剤など多様な用途に使用されている。1970年代からヒト血液中に有機フッ素化合物が存在することが指摘されていたが、近年の分析技術の進歩により、地球規模での PFOS や PFOA の汚染が明るみに出てきた。主として検出されるのは、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) とペルフルオロオクタン酸 (PFOA) であり、野生動物ばかりでなく、一般人の血液中からも微量ではあるが有意な蓄積が認められている。これらの化合物自身が使用されていることに加えて、多様なフッ素系界面活性剤の最終代謝産物として両化合物が蓄積しているものと考えられている。特に、アルコール型の化合物は、PFOA や PFOS の代替品として今後、その使用が増えることが予想される。中間代謝物の中には反応性が高く、生体高分子に作用することによって生体障害を示す可能性が考えられる。さらに、生体内で生じた PFOA が体内でどのような挙動を示すかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、代謝性のアルコール型フッ素系界面活性剤に焦点を当て、その安全な利用方法を提案することを目的とする。研究の流れは以下に示すとおりである。① 生体に対する毒性（急性および慢性）について実験動物を用いて明らかにする。② 生体内運命を探る。すなわち吸収、分布、排泄の程度を明らかにする。③ 代謝物を同定する。特に、生体にとって有害な代謝物を明らかにする。④ 工業的に利用される製品から生じる代謝物を同定する。⑤ 代謝物の生体反応性と蓄積性を評価する。⑥ 代謝に関わる酵素の分子種を同定する。⑦ ヒトモデルとして、培養ヒト肝細胞、小腸上皮細胞を用いて、ヒトにおける動態を予測する。⑧ ヒトモデルとしての培養ヒト細胞を用いて、代謝活性化による障害のメカニズムを探る。

以上の研究より、対象としたアルコール型フッ素系界面活性剤がヒトにおいてどのように代謝されて毒性を発揮するか、どの程度の摂取であれば安全といえるかについて、指標を示したい。

3. 研究の方法

(1) ラットにおける 8-2FTOH の生体作用の評価 ラットに 8-2FTOH を 0.1 ~ 1.6% 含む粉末飼料を 14 日間自由に摂取させた。肝

臓を摘出して、ホモジネートを調製し、acyl-CoA oxidase (AOX) 活性を測定した。また、肝臓中の PFOA を TBA とのイオンペア形成により抽出し、蛍光標識ののち HPLC により分離定量した。

(2) ラットにおける 8-2FTOH 代謝経路の検討 ラットに 8-2FTOH 0.8% を含む粉末飼料を 7 日間摂取させ、一部のラットには、CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (1-ABT) 40 mg/kg または、アルコールデヒドロゲナーゼ阻害剤である 4-methylpyrazole (4-MP) 41.5 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。肝臓を採取し、実験(1)と同様に、肝臓の AOX 活性を評価するとともに、PFOA の定量を行った。

(3) マウスにおける 2H,2H-perfluorodecanoic acid(8-2 acid) および 2H,2H,3H,3H-perfluorodecanoic acid (7-3 acid) の影響評価 マウス腹腔内に、8-2 acid または 7-3 acid 0.024 ~ 48 μ mol /kg を 1 日 1 回 7 日間投与した。肝臓を摘出し、total RNA を抽出して、逆転写により cDNA を調製し、real-time PCR 法により mRNA を定量した。また、(1) と同様の方法で、肝臓の AOX 活性と肝臓中の PFOA を定量した。

(4) ラットにおける低用量 PFOA の分布様式の検討 ラットの頸静脈より [14C]PFOA 0.041 ~ 16.56 mg/kg を投与し、2 時間後に血液、組織を採取した。肝臓についてはホモジネートを調製し、遠心により細胞分化くを行った。TBA とのイオンペア形成により PFOA を抽出し、放射活性を測定することにより、PFOA の分布割合を算出した。

4. 研究成果

(1) ラットにおける 8-2FTOH の生体作用の評価 ラットに 8-2FTOH 含有資料を摂取させたところ、1.6% 以下の摂取では、顕著な毒性は認められなかった。肝臓の肥大作用は、PFOA に比べるとはるかに弱かった。肝 AOX 活性を指標として PFOA と 8-2FTOH の作用を比較したところ、肝肥大作用とほぼ同様の結果が得られた。肝 AOX 誘導作用が、管総中に地区生起した PFOA によるものかどうかを検討するために、肝臓中の PFOA 濃度と AOX 活性の相関を検討した。図 1 に示すように 8-2FTOH を摂取した場合にも、PFOA を摂取した場合にも、肝臓中の PFOA 濃度と AOX 活性には強い相関が認められた。しかしながら、両化合物を比較すると、8-2FTOH 摂取の場合は、より低い PFOA 濃度でも AOX 誘導作用が認められることが明

らかとなった。

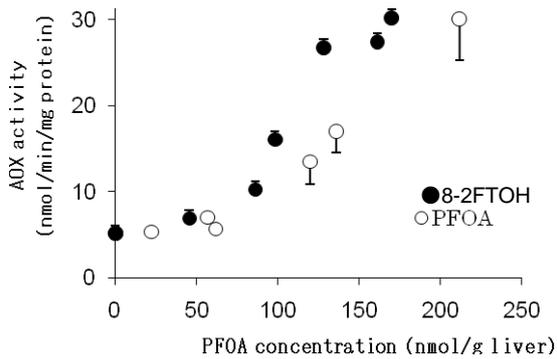


図1 8-2FTOHとPFOAによる肝AOX誘導

(2) ラットにおける8-2FTOH代謝経路の検討 8-2FTOHはアルコールであり、ホルボン酸に代謝されるためには酸化過程が関与するものと考えられる。そこで異物の参加に関与する可能性があるアルコールデヒドロゲナーゼとシトクロムP450が関与するかどうかを検討した。0.8% 8-2FTOHを含む飼料を7日間摂取させ、同期間に阻害剤を投与した。肝臓中のAOX活性は、アルコールデヒドロゲナーゼ阻害剤4-MPおよびシトクロムP450阻害剤1-ABTは、いずれもAOX活性の上昇を抑制した(図2)。このとき、肝臓中に残存するPFOA濃度を測定したところ、いずれの阻害剤投与においても、PFOA濃度の低下が認められた(図3)。以上の結果から、8-2FTOHからPFOAの生成過程にはアルコールデヒドロゲナーゼとシトクロムP450の両者が関与する可能性が示唆された。

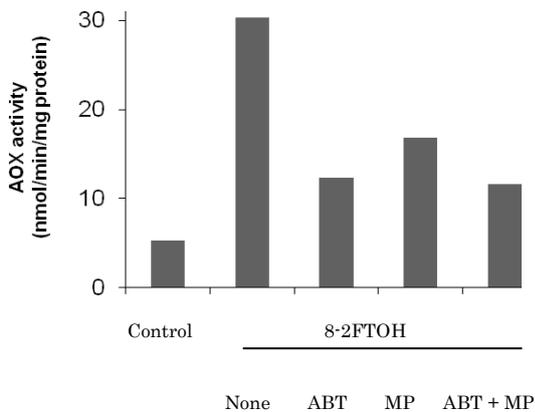


図2 8-2FTOHによる肝AOX誘導に対する阻害剤の影響

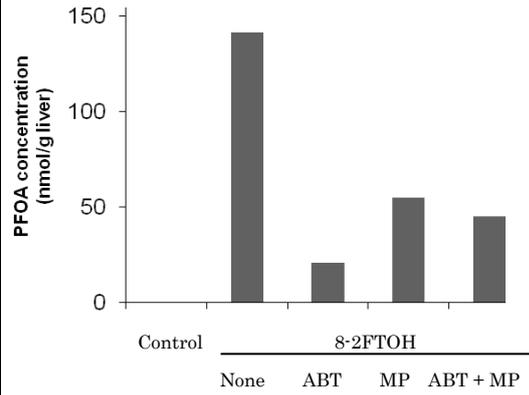


図3 8-2FTOHからPFOA生成に対する阻害剤の影響

(3) マウスにおける2H,2H-perfluorodecanoic acid(8-2 acid)および2H,2H,3H,3H-perfluorodecanoic acid(7-3 acid)の影響評価 ラットにおいて8-2FTOHから生成したPFOAによる肝AOX誘導作用が、PFOAそのものを投与した場合に比べて弱いことから、何らかの代謝中間体にも成体への作用があることが示唆された。また、AOX誘導作用を示す代謝中間体としてカルボン酸類が予想されるので、8-2 acidおよび7-3 acidについて、生体への作用を検討した。マウスの腹腔内にこれらの化合物0.024~48 mg/kg体重を1日1回7日間投与し、観察を行った。同用量のPFOAと比較したところ、8-2 acidおよび7-3 acidでは体重増加抑制作用がPFOAよりも強かった。また、血清中ALTおよびAST活性は、高用量でやや上昇するものの、PFOAよりも弱かった。

次に、肝臓におけるAOX誘導作用を検討した。8-2 acidおよび7-3 acidには、弱いながらも用量依存的なAOX誘導作用が認められた(図4)。その作用は8-2 acidの方が7-3 acidよりも強かった。しかし、PFOAと比較すると、両化合物ともに、その作用は弱いことが明らかとなった。肝臓において、AOXのmRNAレベルは活性の上昇との相関が認められた。また、CYP4A10もmRNAレベルを調べたところ、8-2 acidおよび7-3 acidによって上昇することが明らかとなった。

上記の結果から、8-2 acidおよび7-3 acidは、そのものがペルオキシソーム増殖作用を有するか、あるいは代謝されて生じたPFOAが作用を示す可能性が考えられる。そこで、肝臓におけるPFOAを定量したところ、8-2 acidを投与したマウス肝臓ではごくわずかではあるがPFOAが検出された。一方、7-3 acidを投与したマウスの肝臓からはPFOAはほとんど検出されなかった。以上の結果から、8-2 acidおよび7-3 acidそれ自体、あるいはPFOA以外の代謝物にもペルオキシソ

ーム増殖作用を有する可能性が示唆された。

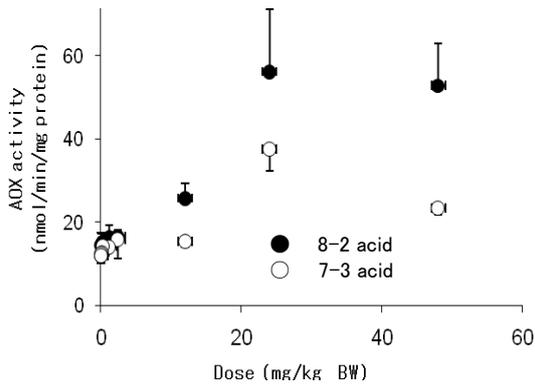


図4 8-2 acid および7-3 acidによる肝 AOX 誘導作用

(4) ラットにおける低用量 PFOA の分布様式の検討 8-2FTOH は、投与後速やかに代謝され体内にはほとんど残留しないものと考えられている。われわれの予備的なデータでも8-2FTOH はほとんど検出されない。したがって、最終代謝産物である PFOA が生体内で生成するのはごくわずかである。わずかな PFOA は大量の PFOA を投与した場合とは異なる生体内挙動を示す可能性がある。そこで、放射標識 PFOA を用いて微量の PFOA の体内挙動を検討した。

PFOA の用量を 16.56 mg/kg および 0.041 mg/kg として両者を比較したところ、低用量では、より肝臓に蓄積することが明らかになった (図5)。

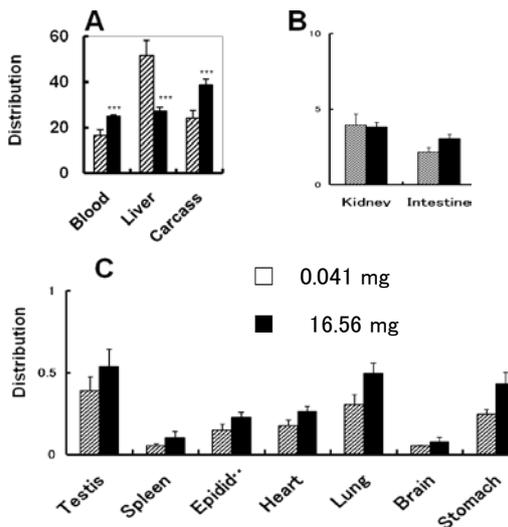


図5 PFOA の体内分布における用量の影響

つぎに、PFOA の用量と変化させて、肝臓中の濃度と肝臓中への分布割合の関係を調べた (図6)。肝臓中の濃度が 1 $\mu\text{mol/g}$ を超えると、分布割合が低下することが示唆された。この結果より、肝臓には親和性が高い蓄積部位が存在し、用量に限界があるために、高濃度の場合には、肝臓特異的な蓄積が認められなくなるものと考えられる。

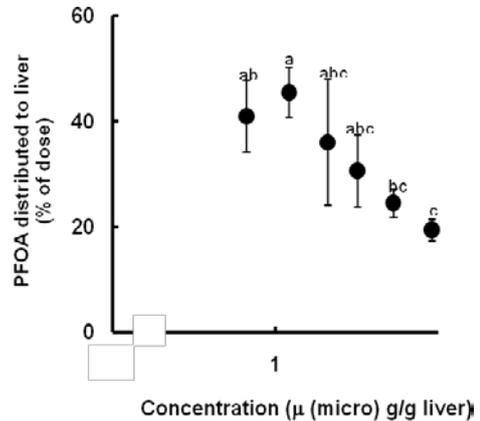


図6 肝臓中の PFOA 濃度と肝臓への PFOA の分布割合の関係

つぎに、肝細胞内で PFOA が特異的に集積する部位を調べるために、PFOA をお東予市羅ラットも肝臓を細胞分画し、各画分における分布割合を調べた。PFOA 16.56 mg/kg を投与した場合には、肝細胞内 PFOA の 40%以上が可溶性画分に分布したのに対し、0.041 mg/kg を投与した場合には、ほとんどが膜画分に分布していた (図7)。

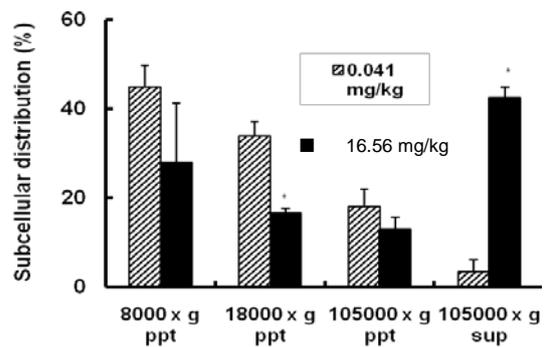


図7 PFOA の肝細胞内分布

さらに、PFOA の投与量を変化させて、肝臓中の濃度と、肝細胞内の可溶性画分への分布割合について検討したところ、肝臓の PFOA 濃度依存的に可溶性画分の分布割合が上

昇することが明らかになった (図 8)。さらに、肝臓中の濃度が高いほど、胆汁中に分泌される PFOA の割合も高くなることが明らかとなった。これらの結果から、肝臓中には、微量の PFOA を選択的に保持する機構があるが、ここが飽和することにより、流動性の高い PFOA として細胞内可溶性画分に保持されるために、胆汁中への排泄や血液との交換が行われやすいのと考えられる。

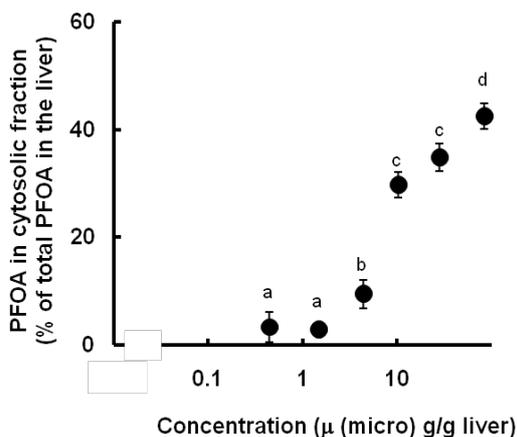


図 8 肝臓可溶性画分の PFOA の分布割合

(5) まとめ 以上 (1) ~ (4) の結果より、8-2FOH は、PFOA そのものに比べると毒性、生体作用は弱いことが示された。下し、酸化により生じる中間代謝物と考えられる 8-2acid や 7-3 acid は PFOA よりも生態影響が強い可能性が示された。しかしながら、8-2FTOH および 8-2acid や 7-3 acid から生じる PFOA はごくわずかであることが判明した。さらに、生体内で生じた微量の PFOA は、大量に投与した場合と異なり、肝臓に選択的に蓄積し、肝細胞内では膜画分に分布することが明らかとなった。今後は、どのような分子が肝選択的な蓄積に関与するかについて明らかにしていきたい。

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 4 件)

- ① □ Iwase, Y., Kudo, N., Toyama, T., Tamura, M., Mitsumoto, A. and Kawashima, Y., Effect of 8-2 fluorotelomer alcohol on oleic acid formation in the liver of rats. Biol. Pharm. Bull., 29:1740-1746 (2006). 査読有
- ② □ Kudo, N., Suzuki-Nakajima, E., Mitsumoto, A. and Kawashima, Y., Responses of the

liver to perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in male and female mice: In relation to induction of hepatomegaly, peroxisomal β -oxidation and microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase., Biol. Pharm. Bull., 29:1952-1957 (2006). 査読有

- ③ □ Katakura, M., Kudo, N., Tsuda, T., Hibino, Y., Mitsumoto A. and Kawashima, Y., Rat organic anion transporter 3 and organic anion transporting polypeptide 1 mediate perfluorooctanoic acid transport J. Health Science, 53:77-83 (2007). 査読有
- ④ □ Kudo, N., Sakai, A., Mitsumoto, A., Hibino, Y., Tsuda, T. and Kawashima, Y., Tissue distribution and subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. Biol. Pharm. Bull., 30:1535-1540 (2007). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 酒井絢子、工藤なをみ、川嶋洋一、微量ペルフルオロオクタン酸の生体内残留性、フォーラム 2006 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (平成 18 年 10 月)
- ② 酒井絢子、工藤なをみ、川嶋洋一、低用量慢性暴露時のペルフルオロオクタン酸の体内分布、日本薬学会第 127 年会 (平成 19 年 3 月)
- ③ 岩瀬由布子、田村雅史、工藤なをみ、川嶋洋一、1H,1H,2H,2H-perfluorodecanol は脂質代謝を変える、日本薬学会第 127 年会 (平成 19 年 3 月)
- ④ 柳原光雄、外山智章、工藤なをみ、川嶋洋一、フッ素系界面活性剤の長期暴露による生体残留性と影響評価、日本薬学会第 127 年会 (平成 19 年 3 月)
- ⑤ 西畑ちづる、工藤なをみ、川嶋洋一、種々のフッ素系界面活性剤の体内動態の解析、日本薬学会第 128 年会 (平成 20 年 3 月)
- ⑥ 畑幸江、工藤なをみ、川嶋洋一、ペルフルオロオクタン酸の肝細胞内分布のホルモンによる調節、日本薬学会第 129 年会 (平成 21 年 3 月)
- ⑦ 鎌苅有華、工藤なをみ、川嶋洋一、2H,2H-perfluorodecanoic acid のマウスに対する影響、日本薬学会第 129 年会 (平成 21 年 3 月)

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 なをみ (KUDO NAOMI)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号：10161647

(2) 研究分担者

岩瀬 由布子 (IWASE YUKO)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号：80406371

(3) 連携研究者