

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790676

研究課題名(和文) 包括的評価による有機フッ素化合物 n - EtFOSE の胎児期・幼若期曝露影響の解明

研究課題名(英文) The study of in utero and prepubertal exposure of N-EtFOSE, persistent fluorinated chemical

研究代表者

坂 晋 (BAN, SUSUMU)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：30399828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：N-EtFOSE (N-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) はPFOSの製造過程で使用され、その影響が懸念されている。本研究は、胎児期ならびに幼若期のラットにN-EtFOSE曝露をそれぞれ行い生殖系への影響を包括的に評価した。本研究の結果、N-EtFOSE胎児期曝露によって、胎盤遺伝子の発現量が変化し、その遺伝子群は雌雄胎仔のあいだで異なることが示唆された。また、幼若期曝露によって、雄ではテストステロン合成関連遺伝子の発現量変化や血清テストステロン濃度の低下がみられ、雌では、異常性周期の増加やエストロゲン合成関連遺伝子の発現量変化がみられた。

研究成果の概要(英文)：N-EtFOSE (N-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) is one of the materials for PFOS synthesis, it is not well known about its influences. In this study, we conducted in utero and prepubertal exposures to N-EtFOSE. In utero N-EtFOSE exposure alters the placental gene expressions and the patterns of these gene expressions are different between males and females. Prepubertal exposures to N-EtFOSE resulted in the serum testosterone levels and the altering gene expressions involved in testosterone synthesis in male rats, and increasing rate of abnormal estrus cycles and the altering gene expressions involved in estrogen synthesis in female rats.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒 内分泌かく乱物質 次世代影響 難分解性

1. 研究開始当初の背景

有機フッ素化合物 PFOS (perfluorooctanic sulfonate) は、テフロン加工製品など多くの製品に使用され、日本では、2009年に第1種特定化学物質に指定されるなど、最近になり規制が始まった。しかし、PFOSは難分解性・高蓄積性から製造中止後も環境中に残存し続け、ヒトをはじめとした生体への影響が長期間続くため、その曝露影響が世界的に懸念されている。

疫学研究では、2007年以降、ヒト出生時ならびに男女の生殖系へのPFOS影響に関する報告が相次いでいる。その中には、妊婦のPFOS濃度と児の出生体重との負の関連についての複数の報告 (Apelberg *et al.*, 2007; Midasch *et al.*, 2007; Washino *et al.*, 2009)、妊婦のPFOS濃度が高いと妊娠に至るまでの期間が長いこと、ならびに若い男性 (平均年齢19歳) における高いPFOS濃度と精子数の低下との関連についての報告などがある (Fei *et al.*, 2009; Joensen *et al.*, 2009)。しかし疫学研究でみられるようなPFOSによる生殖系への影響について、研究開始時点でほとんど明らかとなっていなかった。

N-EtFOSE (N-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) はPFOSの製造過程で使用され、室内外において広く検出されるとともに生体内でN-EtFOSEは毒性の高いPFOSへと代謝されることなどから、N-EtFOSE曝露による生体への影響が懸念されている (Xu *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2009)。研究開始時点におけるN-EtFOSE曝露影響の報告として、3編は*in vitro*における肝ミトコンドリアへの影響や脂肪酸結合タンパク質への影響についての報告 (Xu *et al.*, 2004; Luebker *et al.*, 2002; Strakov *et al.*, 2002)、2編はそれぞれ雄ラットへの単回腹腔内投与 (Berthiaume *et al.*, *Toxicol. Lett.* 2002) と胎仔催奇形性に焦点をあてた妊娠ラットへの長期経口投与実験 (Case *et al.*, *Int. J. Toxicol.* 2001) に関する報告である。したがって、研究開始時点において、N-EtFOSEによる幼若期曝露影響や生殖系への影響についての動物実験による報告はなかった。

胎児期・幼若期は、内分泌かく乱化学物質などの化学物質に対して最も脆弱な時期であることから、胎児期・幼若期におけるPFOS前駆体であるN-EtFOSE曝露による生殖系への影響に対する研究・評価は予防医学上危急の課題であり、迅速に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、幼若期にN-EtFOSE曝露をそれぞれ行い生殖可能時期への影響を明らかにする。また、胎児期曝露による出生時への影響も含めて比較することによって、N-EtFOSE胎児期・幼若期曝露による生殖系への影響を包括的に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 胎児期曝露による胎盤遺伝子発現量への影響

① 動物

妊娠1日目のWistar系ラット (株式会社三協ラボ) を購入した。それぞれのラットの体重を測定し、各曝露群における体重が均等となるように3群 (各条件それぞれ5匹ずつ) に振り分けた。温度(22 ± 2°C)、湿度(40-50%)、光(12時間 明室/12時間 暗室)が一定の条件下で、各ラットを飼育した。

② 胎児期N-EtFOSE投与実験

本研究では、妊娠2日目から妊娠19日目まで0, 1, 10 mg/kg/dayの各条件において、有機フッ素化合物N-EtFOSEの経口曝露を実施した。各曝露濃度のN-EtFOSEは2% Tween80に溶解することにより調製し、10 µL/gの条件で投与した。投与期間中、妊娠2日目から20日目まで、各妊娠ラットの体重を測定した。また、妊娠20日目に、各妊娠ラットより胎盤ならびに胎仔を取り出し、胎仔の体重、ならびに胎盤重量を測定し、相対胎盤重量を算出した。その後、各胎仔より肺、肝臓の各臓器を取り出し、その重量を測定した。胎盤は重量を測定した。

③ マイクロアレイ法

各胎仔の胎盤より、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて添付のプロトコールに従い、total RNAを抽出した。各胎仔の胎盤total RNA量が等量となるように、各曝露群の胎盤total RNA量を調製した。

雌雄の対照群と10mg/kg/day群の胎盤total RNA 500 ngを用いて、それぞれCy-3によるラベル化 (1色法) を行った。ラベル化はQuick-Amp Labeling Kit (1カラー) (Agilent) を使用し、添付のプロトコールに従って行った。ラベル化を行ったに、ラット遺伝子と転写産物を載せたガラスアレイ (Whole Rat Genome (4×44K) Oligo Microarray (Agilent)) とハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションにはGeneExpression Hybridization Kit (Agilent) を用い添付のプロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーション後、ガラスアレイをGene Expression Wash Pack(Agilent) を用いて洗浄した。なお、各群について3回ずつマイクロアレイ法による実験を行った。画像の取り込み、数値化および各補正はAgilent G2565CA マイクロアレイスキャナ (Agilent) ならびにFeature Extraction Ver. 9.5 ソフトウェア (Agilent) を用いて行った。上記の方法によって得られたデータについて標準化 (Quantile normalization) した後に対数変換を行った。その後、3回の実験のうち2回以上有効値 (Cut Off 値<20%) を得られたProbe setのうち、対照群と10 mg/kg/day群の間で発現量比が1.5倍以上かつt検定にて、 $P < 0.05$ を示す遺伝子を有意に発現が変動していると判定した。これらの遺伝子について、DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用い

てアノテーション解析を行った。

3-2. 雄幼若期曝露による生殖系への影響

① 動物

雄3週齢の Wistar-imamichi ラット(株式会社三協ラボ)を購入した。それぞれのラットの体重を測定し、各曝露群における体重が均等となるように3群に振り分けた。温度(22±2°C)、湿度(40-50%)、光(12時間 明室/12時間 暗室)が一定の条件下で、各ラットを飼育した。

② 雄幼若期 N-EtFOSE 投与実験

本研究では、3週齢から0, 1, 10 mg/kg/dayの各条件において、N-EtFOSEの経口曝露を5週間にわたって実施した。各曝露濃度のN-EtFOSEは2% Tween80に溶解することによりに調製し、10 µL/gの条件で投与した。曝露期間中、各ラットの体重を測定した。また、曝露35日目に、ラットの心臓から採血をおこなった。また、各臓器を摘出し、その重量を測定し相対重量を算出した。

③ 血中ホルモン量の測定

血清 FSH, LH, テストステロン濃度をELISA法によって測定した。

④ 精巣内テストステロン合成関連遺伝子の発現量の測定

摘出した精巣からRNAを抽出した。抽出したRNAを用いて逆転写反応を行った後、リアルタイムPCR法によって、テストステロン合成関連遺伝子である *Hsd3b*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd17b* の発現量を測定した。

3-3. 雌幼若期曝露による生殖系への影響

① 動物

雌3週齢の Wistar-imamichi ラット(株式会社三協ラボ)を購入した。それぞれのラットの体重を測定し、各曝露群における体重が均等となるように4群に振り分けた。温度(22±2°C)、湿度(40-50%)、光(12時間 明室/12時間 暗室)が一定の条件下で、各ラットを飼育した。

② 雌幼若期 N-EtFOSE 投与実験

本研究では、3週齢から0, 1, 5, 10 mg/kg/dayの各条件において、N-EtFOSEの経口曝露を5週間にわたって実施した。各曝露濃度のN-EtFOSEは2% Tween80に溶解することによりに調製し、10 µL/gの条件で投与した。曝露期間中、各ラットの体重を測定した。また、曝露35日目以降に最初の発情間期の日に、ラットの心臓から採血をおこなった。また、各臓器を摘出し、その重量を測定し相対重量を算出した。

③ 性周期

膣開口後、毎朝各ラットのスメアを採取し、光学顕微鏡による観察を行い、発情前期、発情期、発情後期、発情間期の判定を行った。

④ 卵巣内エストロゲン合成関連遺伝子の発現量の測定

摘出した卵巣からRNAを抽出した。抽出したRNAを用いて逆転写反応を行った後、

リアルタイムPCR法によって、テストステロン合成関連遺伝子である *StAR*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1* の発現量を測定した。

4. 研究成果

4-1. 胎児期曝露による胎盤遺伝子発現量への影響

10 mg/kg/day N-EtFOSEの妊娠期投与によって、0 mg/kg/day群あるいは1 mg/kg/day妊娠ラットよりも体重増加量が有意に低下した($p < 0.05$) (図1)。

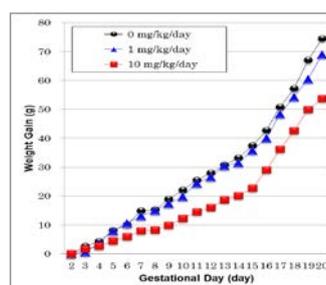


図1 N-EtFOSEによる妊娠期待体重増加量変化

N-EtFOSE 経口投与による雄胎仔体重ならびに臓器重量について調べたところ、10 mg/kg/day N-EtFOSE 投与群では、1 mg/kg/day 投与群と比較して雄胎仔体重の有意な低下($p < 0.05$)、0 mg/kg/day ならびに1 mg/kg/day 投与群と比較して雄胎仔の相対胎盤重量の有意な増加がみられた(それぞれ $p < 0.05$) (表1)。一方、雌胎仔では10 mg/kg/day N-EtFOSE 投与群では、対照群と比較すると有意に相対肺重量が有意に増加していた($p < 0.05$)。また、雌胎仔ではN-EtFOSE 投与によって、雄胎仔のような相対胎盤重量の有意な増加がみられたが有意ではなかった(表2)。

表1 N-EtFOSEによる雄胎仔の出生時体重・相対臓器重量変化

	0 mg/g/day (n = 24)	1 mg/g/day (n = 17)	10 mg/g/day (n = 14)	P-value
出生体重 (g)	3.46 ± 0.23	3.51 ± 0.32 ^b	3.27 ± 0.27 ^b	0.037
相対肺重量 (g/100g)	2.72 ± 0.59	2.90 ± 0.44	3.00 ± 0.50	0.290
相対肝重 (g/100g)	6.57 ± 1.07	7.03 ± 1.02	6.90 ± 1.45	0.440
相対胎盤重量 (g/100g)	12.34 ± 1.43 ^a	11.69 ± 0.88 ^b	13.42 ± 1.41 ^{a,b}	0.002*

*: Significantly different by one-way ANOVA, $p < 0.05$

a, b: Significantly different between the same symbols by Turkey test

表2 N-EtFOSEによる雌胎仔の出生時体重・相対臓器重量変化

	0 mg/g/day (n = 26)	1 mg/g/day (n = 25)	10 mg/g/day (n = 31)	P-value
出生体重 (g)	3.25 ± 0.24	3.16 ± 0.23	3.11 ± 0.24	0.104
相対肺重量 (g/100g)	2.51 ± 0.66 ^a	2.76 ± 0.64	3.10 ± 0.81 ^a	0.010*
相対肝重量 (g/100g)	6.70 ± 1.32	7.24 ± 1.21	7.06 ± 0.83	0.280
相対胎盤重量 (g/100g)	13.46 ± 1.55	13.91 ± 1.64	14.59 ± 2.15	0.069

*: Significantly different by one-way ANOVA, $p < 0.05$

a, b: Significantly different between the same symbols by Turkey test

マイクロアレイ解析を行った結果、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 投与によって、対照群と比べて、雄胎仔胎盤では685遺伝子、雌胎仔胎盤では481遺伝子の発現量に変化した。また、それらのうち、145遺伝子は雌雄胎仔双方の胎盤で発現量に変化していた。また、アノテーション解析を行ったところ、雌雄胎仔の胎盤で共通して発現が変化している遺伝子では、6つのクラスターを構成した。また、雄胎仔の胎盤のみで発現が変化した遺伝子群と雌胎仔の胎盤のみで発現が変化した遺伝子群では、それぞれ59と13のクラスターを構成した。雄胎仔の胎盤のみで発現が変化した遺伝子群で構成されたクラスターとして、「response to organic substance and hormone」、「growth」、「blood vessel development」などが含まれていた。

4-2. 雄幼若期曝露による生殖系への影響

10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、曝露14日(35日齢)以降で有意に体重増加量が低下した($p < 0.05$) (表3)。また、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、0 mg/kg/day 経口曝露群ならびに1 mg/kg/day 経口曝露群に比べて、相対肝臓重量と相対精巣重量が有意に増加した(それぞれ $p < 0.05$) (表4)。

表3 雄幼若期 *N*-EtFOSE 経口曝露による体重増加量の低下

曝露期間 (日齢)	0 mg/g/day (n = 26)	1 mg/g/day (n = 25)	10 mg/g/day (n = 31)	P-value
曝露 1日 (22日齢)	42.9 ± 3.5	42.1 ± 2.5	42.2 ± 2.8	0.908
曝露 7日 (28日齢)	74.5 ± 6.3	75.2 ± 4.5	68.7 ± 4.6	0.13
曝露 14日 (35日齢)	118.6 ± 10.7	118.3 ± 4.7	102.6 ± 8.0	0.039*
曝露 21日 (42日齢)	169.8 ± 16.0	167.7 ± 7.9	143.0 ± 13.5	0.039*
曝露 28日 (49日齢)	221.9 ± 17.5	219.3 ± 7.3	182.2 ± 17.9	0.021*
曝露 35日 (56日齢)	273.7 ± 20.2	274.2 ± 12.3	225.9 ± 23.2	0.026*

*: Significantly different by one-way ANOVA, $p < 0.05$

a., Significantly different between the same symbols by Turkey test

表4 雄幼若期 *N*-EtFOSE 経口曝露による相対臓器重量変化

	0 mg/g/day (n = 6)	1 mg/g/day (n = 5)	10 mg/g/day (n = 5)	P-value
相対肝重量 (g/100g)	3.57 ± 0.24	3.68 ± 0.24	4.35 ± 0.18	0.009*
相対腎重量 (g/100g)	0.91 ± 0.04	0.89 ± 0.05	0.95 ± 0.05	0.281
相対精巣重量 (g/100g)	0.84 ± 0.04	0.86 ± 0.05	1.00 ± 0.07	0.009*

*: Significantly different by one-way ANOVA, $p < 0.05$

a, b: Significantly different between the same symbols by Turkey test

次に、*N*-EtFOSE 経口曝露群による血清ホルモン量の変化を調べたところ、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、0 mg/kg/day 経口曝露群に比べて、血清 FSH 濃度が有意に低下した($p < 0.05$)。また、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、0 mg/kg/day 経口曝露群ならびに1 mg/kg/day 経口曝露群に比べて、血清テストステロン濃度が有意に低下した($p < 0.05$) (図2)。血清 LH 濃度は検出感度以下であったため、測定できなかった。

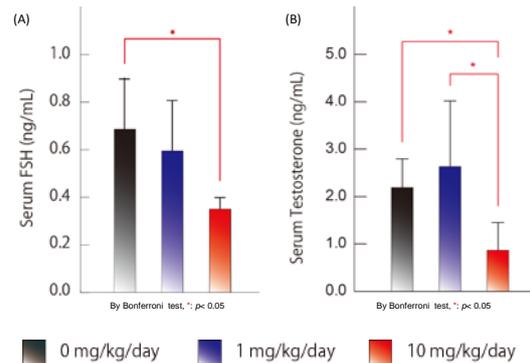


図3 *N*-EtFOSE 経口曝露による血清 FSH 濃度の低下 (A) と

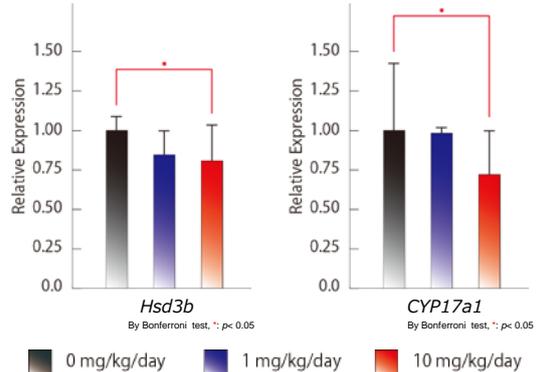


図4 *N*-EtFOSE 経口曝露によるテストステロン合成関連遺伝子の発現量変化

4-3. 雌幼若期曝露による生殖系への影響

10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、体重増加量に低下傾向がみられた。また、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、0 mg/kg/day 経口曝露群に比べて、相対肝臓重量と相対腎重量が有意に増加した(それぞれ $p < 0.05$) (表5)。

次に、*N*-EtFOSE 経口曝露による性周期への影響について調べた。本研究では、性周期が安定している Wistar-imamichi ラットを使用し、1周期4~5日を正常周期と判定し、それ以外の場合を異常性周期と判定した。その結果、10 mg/kg/day *N*-EtFOSE 経口曝露群では、異常性周期の割合が、0 mg/kg/day 経口曝露群に比べて、有意に増加していた($p < 0.05$) (図4)。

N-EtFOSE 経口曝露群によって、血清テストステロン量に変化が見られたことから、卵巣内エストロゲン合成関連遺伝子である *StAR*、*Cyp11a1*、*Cyp17a1*、*Cyp19a1* の発現量変化を調べた。その結果、10 mg/kg/day N-EtFOSE 経口曝露群によって、*Cyp17a1*、*Cyp19a1* の発現量に増加傾向がみられた。

表 5 雌幼若期 N-EtFOSE 経口曝露による相対臓器重量変化

	0 mg/g/day (n = 5)	1 mg/g/day (n = 4)	10 mg/g/day (n = 4)	10 mg/g/day (n = 4)
相対肝重量 (g/100g)	4.99 ± 0.21 ^{a, d}	5.39 ± 0.31 ^b	6.02 ± 0.28 ^{c, d}	7.29 ± 0.68 ^{a, b, c}
相対腎重量 (g/100g)	0.87 ± 0.03 ^{a, d}	0.91 ± 0.05	0.96 ± 0.05	0.97 ± 0.02 ^d

*: Significantly different by one-way ANOVA, p < 0.05

a, b: Significantly different between the same symbols by Turkey test

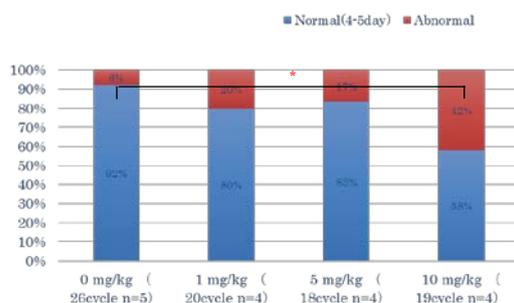


図 4 N-EtFOSE 経口曝露による異常性周期の増加

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 坂 晋、宮下ちひろ、岡田恵美子、小林澄貴、岸 玲子 「有機フッ素化合物 N-EtFOSE の胎児期曝露による雌雄における胎盤遺伝子発現量の変化」(第 82 回日本衛生学会学術総会、2012 年 3 月、京都府京都市)
- ② 坂 晋、宮下ちひろ、岡田恵美子、小林澄貴、岸 玲子 「有機フッ素化合物 N-EtFOSE の胎児期曝露による雌雄における胎盤遺伝子発現量の変化」(第 82 回日本衛生学会学術総会、2012 年 3 月、京都府京都市)
- ③ 坂 晋、横山 聡、松岡 道美、里見佳子、原田 均、井上 純子、大西 志保、川西 正祐 「胎児期における有機フッ素化合物 N-EtFOSE 曝露による胎盤遺伝子発現量変化」(フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月、愛知県名古屋市)
- ④ 坂 晋、松岡 道美、横山 聡、里見佳子、原田 均、井上 純子、大西 志

保、川西 正祐 「有機フッ素化合物 N-EtFOSE 胎児期曝露による雌雄胎仔の胎盤遺伝子発現量変化」(日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月、神奈川県横浜市)

⑤ 松岡 道美、坂 晋、黒田 祐、横山 聡、川西 正祐 「有機フッ素化合物 N-EtFOSE 幼若期曝露による雄生殖系への影響」(日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2013、2013 年 11 月、三重県鈴鹿市)

⑥ 坂 晋、松岡道美、横山 聡、黒田 祐、里見佳子、原田 均、井上純子、大西志保、川西正祐 「雄幼若期ラットにおける有機フッ素化合物 N-EtFOSE 曝露による血清テストステロン濃度変化」(日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月、熊本県熊本市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂 晋 (SUSUMU BAN)

鈴鹿医療科学大学薬学部・助手

研究者番号：30399828