

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00637

研究課題名(和文) 残留性有機フッ素化合物の生物濃縮特性の解明と予測手法の構築

研究課題名(英文) Development of a prediction method of bioconcentration for perfluoroalkyl acids

研究代表者

小林 淳 (Kobayashi, Jun)

熊本県立大学・環境共生学部・准教授

研究者番号：00414368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生物濃縮の予測精度が低いペルフルオロアルキル酸化合物(PFAAs)を対象に、魚類への生物濃縮実験、タンパク結合実験、肝S9代謝実験、ドッキングシミュレーションを通して高精度な生物濃縮予測手法を開発することを目的とした。実験の結果、ニジマスにおけるPFAAsの生物濃縮係数や体内半減期を明らかにした。またタンパク結合実験とドッキングシミュレーションの結果から、なぜPFAAsが生物濃縮しやすいのかを明らかにし、タンパク結合定数を変数として用いることで多数のPFAAsのBCFを精度高く予測できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生物濃縮の予測精度が低いペルフルオロアルキル酸化合物(PFAAs)を対象に、暴露実験、生化学実験、シミュレーションを行い、なぜPFAAsは濃縮しやすいのか、またどのような変数を用いると高精度に予測ができるかについて検討した。その結果、PFAAsは構造類似物質の脂肪酸等と比べてタンパクと強く結合し、また肝臓で代謝されないため体内に残留しやすいことが示された。さらに、タンパク結合定数を変数として用いることで多数のPFAAsの生物濃縮係数を高い精度で予測できることを示した。本研究の結果は、野生生物に対するPFAAsの暴露評価やリスク評価の精緻化に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a highly accurate bioconcentration prediction method for perfluoroalkyl acids (PFAAs). Bioconcentration experiments for rainbow trout, protein binding experiments, liver S9 metabolism experiments, and docking simulations were conducted. As the results of these experiments, bioconcentration factors (BCFs) and kinetic parameters such as half-lives of PFAAs were obtained. In addition, we clarified the reason why PFAA easily bioconcentrate by the protein binding experiments and the docking simulations. Further, our results indicated that BCFs of PFAAs can be predicted by using protein binding constants as variables.

研究分野：環境リスク制御・評価

キーワード：生物濃縮 ペルフルオロアルキル酸 魚類 タンパク結合

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質による地球規模の汚染は国境を越えて拡散し、水棲生物に蓄積するなど一國に留まらない問題を引き起こすため、それらの環境動態と生物濃縮の予測精度の向上は環境保全・生態リスク管理のために極めて重要である。これまで有害物質としてポリ塩化ビフェニル (PCB) のような疎水性物質が注目を集めてきたが、近年、残留性の有機フッ素系化合物、特にペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) を含むペルフルオロアルキル酸化合物 (PFAAs) など両親媒性・イオン性物質の生物濃縮や生態影響が世界各地で報告されている。イオン性物質の生物濃縮プロセスは疎水性物質と大きく異なるため、既存手法による生物濃縮の予測精度は十分ではなく、予測精度の向上は大きな課題である。予測精度の低い理由として、モデルパラメータである取り込み・排泄・代謝に関する速度定数の報告値が限られていること、両親媒性物質には予測因子として一般的に用いられるオクタノール/水分配係数が適用できないこと、が挙げられる。これらの課題を解決し、PFAAs の予測精度を向上させることが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、ペルフルオロアルキル酸化合物 (PFAAs) を対象として生物濃縮性の予測手法の構築を目的とする。本研究では、魚類への生物濃縮実験、タンパク結合実験、肝 S9 代謝実験に加え、タンパクとのドッキングシミュレーションを取り入れることで、多くの PFAAs に対応する生物濃縮性の予測手法を提案する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生物濃縮実験

生物濃縮試験において代表的な試験魚の 1 種であるニジマスを対象に PFAAs の生物濃縮実験を実施した。ニジマス幼魚 (約 50 g) を養殖業者より購入し、2 週間馴化後に実験を開始した。水温は 14°C とし、給餌は毎日体重の 1% を朝夕 2 回行った。暴露期間は 24 日 (0、3、7、14、28 日目に採取)、排泄期間は 12 日 (6、12 日目に採取) として流水式で実験を行った。

#### (2) タンパク結合実験

タンパク結合実験は限外ろ過法により行った。ヒト、ラット、ウシの血清アルブミンを購入し、これらを対象として各 PFAA と結合実験を実施した。限外濾過した遊離態 PFAAs 濃度を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で測定し、結合定数を求めた。

#### (3) ドッキングシミュレーション

対象タンパク質はウシ血清アルブミン (BSA: 4F5S)、ヒト血清アルブミン (HSA: 4E99)、ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク (hLFABP: 3STM)、ラット肝臓型脂肪酸結合タンパク (rFABP: 1LFO) の計 4 種とした。これらの分子構造はタンパク質構造データベース (PDB) より入手した。ドッキングシミュレーションソフトには Molecular Operating Environment (MOE、富士通九州システムズ) を用いた。

#### (4) 代謝実験

これまで魚類を対象とした肝代謝実験には統一された実験方法がなく、文献によって魚種や実験条件が異なっていた。このような背景から 2018 年に経済協力開発機構 (OECD) よりニジマスの肝 S9 を用いた試験ガイドラインが刊行された。本実験では OECD の試験ガイドライン Test No. 319B (2018) に従い、ニジマスの肝 S9 を用いて実験を行った。未成熟のニジマスを購入し、2 週間馴化後、肝臓を採取、脱血し、遠心分離によって S9 画分を得た。実験により得られた代謝速度  $V_M$  をもとに肝 S9 における固有クリアランス  $CL_{INT, IN VITRO}$ 、肝固有クリアランス  $CL_{INT, IN VIVO}$  を求めた。また、肝クリアランス ( $C_{LH}$ ) を well-stirred model に基づいて求め、 $C_{LH}$  から代謝速度定数 ( $k_M$ ) を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 生物濃縮実験

ニジマスの定常状態における生物濃縮係数 (BCF) は 11 (PFHxA) ~ 820 (PFDODA) の範囲であり、BCF はアルキル基の炭素数 12 の範囲までは炭素鎖長の増加とともに上昇した。また、ニジマスの酸素消費速度および取り込み速度定数  $k_1$  から求めた PFOS の呼吸器官経由の同化効率は 0.1% 以下であり、ニジマス成魚 (約 1 kg) の報告値 (Consoer et al., 2016) よりやや低い値であった。イオン性化学物質の鰓経由の体内移行は低いと考えられており、本研究においても同様の結果であった。体内半減期は 82 日と見積もられ、既報 (Consoer et al., 2016) と同程度であった。

#### (2) タンパク結合実験

ペルフルオロカルボン酸 PFCAs 3 種 (PFOA、PFOA、PFOS)、ペルフルオロスルホン酸 PFSAAs 2 種 (PFOS、PFOS) の  $K_A$  の実測値は  $0.8 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  の範囲であった。HSA と BSA の  $K_A$  は両方で概ね類似した値を示した。また、PFCAs、PFSAAs とともに炭素鎖長が増すにつれて、 $K_A$  が高くなる傾向が観察された。すなわち、炭素鎖長の長いペルフルオロアルキル酸化合物のほうが

タンパク結合しやすいことが示された。

### (3) ドッキングシミュレーション

まず、ドッキングシミュレーションにより推定した  $K_A$  が、タンパク結合実験で求めた  $K_A$  と相関関係があるか否かを検討した。その結果、両者には強い相関関係があることが認められ、ドッキングシミュレーションで推定した  $K_A$  が信頼できることを確認した。

つぎに、PFAAs はなぜ高い生物濃縮性を持つのかを明らかにするために、構造類似物質であるアルキルスルホン酸、飽和脂肪酸、またペルフルオロアルキル化合物で官能基にリン酸基をもつ PFPAs の  $K_A$  を比較した (図 1)。いずれの物質においても  $K_A$  はアルブミン (HSA、BSA) よりも脂肪酸結合タンパク (hLFABP、rLFABP) において高い値を示した。そして、BCF と同様に  $K_A$  においても炭素鎖長が長くなるにつれて数値が上昇する傾向が見られた。また、アルブミンにおいては、官能基にカルボキシ基をもつ PFCAs (炭素鎖 C4–18) と飽和脂肪酸の  $K_A$  はほぼ同じ値を示したが、脂肪酸結合タンパクにおいては PFCAs の  $K_A$  が飽和脂肪酸よりも高い値を示した。この結果は脂肪酸結合タンパクが、脂肪酸よりも PFAAs と強く結合することを示唆しており、生体内で PFAAs が肝臓で高濃度に蓄積する要因のひとつになっていると考えられた。

$K_A$  が生物濃縮の予測に有効であるか検討するために、モデルケースとして魚類 (ゼブラフィッシュ、Chen et al., 2016) の BCF とアルブミン、脂肪酸結合タンパクの  $K_A$  との関係性を調べた (図 2)。

いずれのタンパクの  $K_A$  も PFSAs・PFCAs の BCF と強い相関がみられた。構造類似物質の PFPAs は、アルブミン (HSA) においては PFSAs、PFCAs と傾きが大きく異なったが、脂肪酸結合タンパク (hLFABP) においては 3 物質群ともに類似した傾きを示した。以上のように、 $K_A$  を変数とすることで PFAAs の生物濃縮を予測可能であることが示された。

### (4) 代謝実験

ピレン、ノニルフェノール、トリクロサンでは代謝により濃度低下が観察されたが、PFOA、カフェインの  $k_M$  は  $0 \text{ day}^{-1}$  であり、ニジマスでは代謝されなかった。PFOA は既報においても代謝がみられておらず、ペルフルオロアルキル化合物は肝代謝を受け難い物質であることが示唆された。カフェインについては薬物代謝酵素である CYP1A2 をニジマスが有していないことが原因として考えられる。本研究のデータおよび既報値を収集して解析し、 $\log K_{OW}$  に基づく  $k_M$  の予測式を構築した。

BCF の予測式に  $k_M$  を加えて計算した結果、非イオン性物質に対する本研究の BCF 予測精度は米国環境保護庁 (US EPA) の予測手法 (BCFBAF) と近い結果であった (図 3)。しかし、イオン性物質に対しては両手法とも BCF の予測精度は低く、 $\log K_{OW}$  を変数とした予測では難しいことが改めて示された。イオン性物質については、 $K_A$  等も考慮した新たな予測手法の開発が必要である。

#### < 引用文献 >

Consoer, D.M., Hoffman, A.D., Fitzsimmons, P.N., Kosian, P.A., Nichols, J.W., 2016. Toxicokinetics of perfluorooctane sulfonate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ Toxicol Chem. 35, 717–727.

Chen, F., Gong, Z., Kelly, B., 2016. Bioavailability and bioconcentration potential of perfluoroalkyl-phosphinic and -phosphonic acids in zebrafish (*Danio rerio*): Comparison to perfluorocarboxylates and perfluorosulfonates, Science of The Total Environment 568, 33–41.

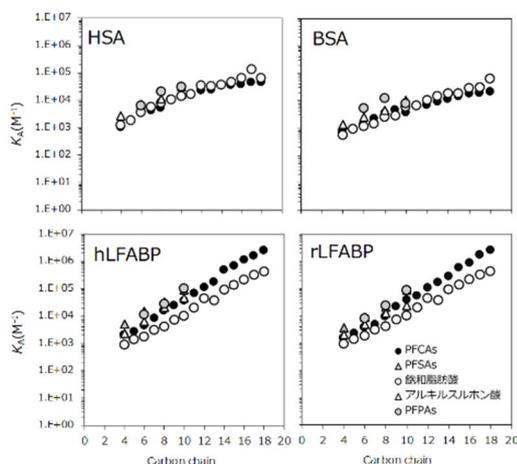


図 1 PFAA および構造類似物質の炭素鎖と解離定数 ( $K_A$ ) の関係

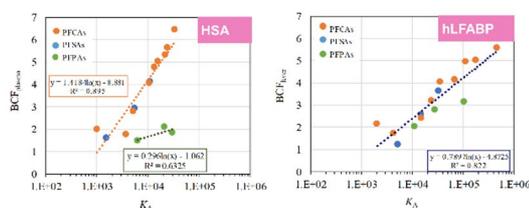


図 2 ニジマスにおける生物濃縮係数 BCF とタンパク結合定数  $K_A$  との関係

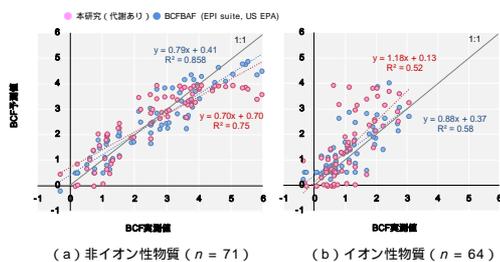


図 3  $\log$  BCF の予測精度に関する本研究と既存手法の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Emi Morokuma, Takeo Sakurai, Jun Kobayashi
2. 発表標題 Comparison of protein binding constants for perfluorinated compounds by in vitro and in silico approach
3. 学会等名 The 11th Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryosuke Nakamura, Kento Ikeda, Takeo Sakurai, Jun Kobayashi
2. 発表標題 Comparison of metabolic rates for harmful chemicals in S9 of rainbow trout
3. 学会等名 The 11th Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村亮輔, 櫻井健郎, 小林淳
2. 発表標題 魚類の生物濃縮係数における肝代謝の影響の評価
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諸熊恵美、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 イオン性化合物の血漿タンパク結合に関する種間比較：有機フッ素化合物を例に
3. 学会等名 第 27 回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村亮輔、池田健登、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 ニジマス肝S9による有害化学物質の代謝速度に関する検討
3. 学会等名 第 27 回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----