

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790420

研究課題名 (和文)

難分解性フッ素化合物 n-EtFOSE の胎児期、幼若期吸入曝露影響の解明

研究課題名 (英文)

The study of in utero 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

研究成果の概要 (和文)：

n-EtFOSE (n-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) は、疫学研究によるヒトへの影響、動物実験による生体への影響が数々報告されている PFOS (perfluorooctane sulfonate) の原材料にもかかわらず、n-EtFOSE への曝露影響評価は不十分である。そのため本研究は n-EtFOSE の胎児期曝露による影響を評価することを目的とした。研究の結果、n-EtFOSE 曝露によって胎盤形成・機能が影響を受け、体重低下などの胎児発育低下を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The influences of exposure to PFOS (perfluorooctane sulfonate) are reported by epidemiological studies and animal studies. Though n-EtFOSE (n-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) is one of the materials for PFOS synthesis, it is not well known about its influences. We conducted the *in utero* n-EtFOSE exposure study. We showed that *in utero* exposure to N-EtFOSE causes the effects to the development and functions of placenta resulted in the fetal growth delay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：次世代影響、内分泌攪乱物質、環境、衛生

1. 研究開始当初の背景

フッ素化合物である PFOS (perfluorooctane sulfonate) は、テフロ

ン加工製品など多くの製品に使用されてきたが、その難分解性や高残留性から、環境に与える影響が懸念されている。そのため、

2002年にアメリカ 3M 社では、その使用を全面禁止した。また、2006年には、欧州議会環境委員会においても、PFOS 使用禁止案を採択した。こうした規制の進んでいる欧米に比べ、日本では PFOS に対する評価、規制が遅れている。このため、日本において、PFOS が生体へ及ぼす影響を研究、評価することは重要な課題である。

PFOS による影響を調べた疫学研究により、妊婦の PFOS への曝露が児の出生体重に影響を与えることが、2007年に相次いで、アメリカとデンマークから報告された (Apelberg et al., *Environ. Sci. Technol.* 2007; Midasch et al., *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2007)。また、日本においても同様に、妊婦の PFOS への曝露がと児の出生体重に負の関連があることが報告されている (Washino et al., *Environ. Health Perspect.* 2009)。

妊娠ラットならびに妊娠マウスを用いた PFOS の長期経口曝露実験においては、出生率の低下、出生した仔の低チロキシン症、体重減少が引き起こされることが報告されている。また、出生した仔では、通常の子と比較して、少なくとも離乳期までに発育遅延 (低体重、眼の開きの遅れなど) がみられることも明らかとなっている (Lau et al., *Toxicol. Sci.* 2003; Thibodeaux et al., *Toxicol. Sci.* 2003)。

n-EtFOSE (n-ethylperfluorooctane sulfonate amide ethanol) は、PFOS の原材料として使用されており、室内空気においても検出されている。n-EtFOSE の生体への影響を調べた研究として、*in vitro* 実験によ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が報告されている (Xu et al., *Chem. Res. Toxicol.* 2004; Luebker et al., *Toxicology* 2002; Strakov et al., *Toxicol. Sci.* 2002)。その中で、Xu らの報告では、生体内で n-EtFOSE が PFOS へと変化する可能性を指摘している。

このように n-EtFOSE は、疫学研究によるヒトへの影響、動物実験による生体への影響が数々報告されている PFOS の原材料にもかかわらず、n-EtFOSE への曝露影響評価は不十分である。そのため、胎児期、幼若期における n-EtFOSE の吸入曝露の解明は n-EtFOSE 曝露影響の総合的評価へとつながり、ヒトへの外挿を行う際の有用な基礎知見を提供することが可能となるため非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究は、難分解性有機フッ素化合物である PFOS の製造過程に使用されている n-EtFOSE の胎児期、幼若期曝露影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 試薬

n-EtFOSE はアメリカ 3M 社より譲りうけた。

3-2. 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同等となるように振り分けた。各ラットは温度 (22 ± 2°C)、湿度 (40-50%)、光 (12 時間明室/12 時間 暗室) が一定の条件下において飼育した。

3-3. 曝露実験

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 (各条件それぞれ 5 匹ずつ) において、有機フッ素化合物 n-EtFOSE の経口曝露を実施した。曝露濃度は、Case らの研究 (Case et al., 2001) を参考にし、予備実験による検討を行ったうえで決定した。n-EtFOSE は Tween80 に溶解することにより各濃度に調整した。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 3 日目から 20 日目まで、各妊娠ラットの摂餌量、接水量を測定した。妊娠 20 日目に、各妊娠ラットより肺、肝臓、腎臓、子宮の各臓器を取り出し、臓器重量を測定した。また、各妊娠ラットより胎盤ならびに胎仔を取り出し、胎盤重量ならびに胎仔の体重を測定した。その後、各胎仔より肺、肝臓、腎臓の各臓器を取り出し、その重量を測定した。胎盤、肺、肝臓、腎臓は重量を測定した後、液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。

3-4. マイクロアレイ

-80°C で凍結保存していた各胎仔の胎盤より、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 量を調整した。

各曝露群の total RNA 500 ng を用いて、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い行った。ラベル化を行った後、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 Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) を用い添付のプロトコールに従い行った。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。画像の取り込みならびに数値化は 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。各曝露群について3回ずつ実験を行い、データの解析に使用した。データの解析には、GeneSpringGX10 (Agilent) を使用した。

3-5. 定量的 RT-PCR

胎盤 total RNA より High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems) を用いて、添付のプロトコールに従い、胎盤 cDNA を調製した。定量的 RT-PCR は、SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems) を用い、StepOnePlus Real Time PCR System を使用して、添付のプロトコールに従い、それぞれの条件において3回ずつ行った。標準物質には β -actin を使用した。各遺伝子に用いたプライマーは表 1 に示した。

表 1 定量的 RT-PCR に用いたプライマー

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Beta-actin	ttaacacccccagccatgt	cagaggcatcacaggacaacac
Col18a1	cgggctggcctactctt	acttcgaacagcagcgaagaag
Cspg4	gcagcatctggctatgga	cttgcttctctgagatctctt
Hand2	cgagtgcacccccaacgt	aggcgcagagctctgatttg
Mmp2	ttgctggtggccattct	gctcgtacacggcatcaa
Sod3	cgagcagaacacctcaa	tcaggccccgaactcatg
Tf1	gaaggcagcccgggttag	gtcacctttccaaaataaactctct

4. 研究成果

4-1. 吸入曝露条件の検討

吸入曝露装置における n-EtFOSE 濃度が低濃度 (目標値 ; 5 mg/m³)、高濃度 (目標値 ; 20 mg/m³) にて安定した条件となるよう検討を行った。しかし、入手可能な n-EtFOSE の量が吸入曝露実験を実施するには不足していることから実現には至らなかった。

4-2. 曝露実験

各曝露群における母ラットの体重増加量は図 1 のようになった。10 mg/g/day 曝露群では、0 mg/g/day 曝露群ならびに 1 mg/g/day 曝露群と比較して、妊娠期間を通じて体重増加量が減少していた (図 1)。特に、妊娠 10 日目、15 日目においては、10 mg/g/day 曝露群の体重増加量が他の 2 群に比べて有意に減少していた (表 2)。また、10 mg/g/day 曝露群では、他の 2 群と比較して摂餌量が有意に減少していた。母ラットにおける肺、肝臓、

表 2 妊娠中の体重増加

	0 mg/g/day (n = 5)	1 mg/g/day (n = 5)	10 mg/g/day (n = 5)	p-value
Weight gain (GD 5) (g)	8.0±3.3	7.9±1.5	4.4±3.1	0.102
Weight gain (GD 10) (g)	22.0±6.7 ^a	19.8±3.2	12.2±5.0 ^a	0.028*
Weight gain (GD 15) (g)	37.4±8.6 ^a	35.7±6.8 ^b	22.7± 6.9 ^{a,b}	0.018*
Weight gain (GD 20) (g)	74.5± 12.5	69.0±17.1	53.6± 10.6	0.081

*; $p < 0.05$ (by one-way ANOVA)

a, b; Significant difference in each other by Tukey test.

腎臓、子宮の各臓器重量には有意な変化は

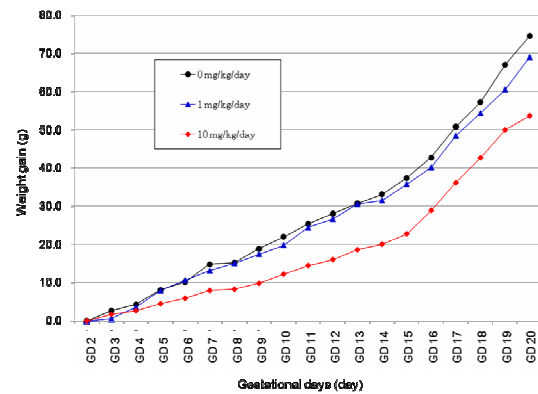


図 1 妊娠中の体重増加

10 mg/g/day 曝露群では、0 mg/g/day 曝露群ならびに 1 mg/g/day 曝露群と比較して、妊娠期間を通じて体重増加量が減少していた。

みとめられなかった。

妊娠 20 日目に母より取り出した雄胎仔において、10 mg/g/day 曝露群では、1 mg/g/day 曝露群に比べ、有意に体重が低かった。また、10 mg/g/day 曝露群の雄胎仔の相対胎盤重量 (胎盤重量/体重) は、0 mg/g/day 曝露群ならびに 1 mg/g/day 曝露群に比べて有意に増加していた。雄胎仔の相対肺重量、相対肝重量および相対腎重量は、各群間で有意な差はみとめられなかった (表 3)。一方、雌胎仔では、雄胎仔で有意な差がみられた体重ならびに相対胎盤重量について、それぞれ雄胎仔と同様の傾向がみられたが、有意ではなかった。しかし、10 mg/g/day 曝露群の雌胎仔の相対肺重量は、0 mg/g/day 曝露群に比べ有意に低かった。相対肝重量および相対腎重量については、雌胎仔においても各群間で有意な差は

表3 雄胎仔の体重・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
体重 (g)	3.46 ± 0.23	3.51 ± 0.32 ^b	3.27 ± 0.27 ^b	0.037*
相対肺重量	0.027 ±0.006	0.029 ±0.004	0.030 ±0.005	0.331
相対肝重量	0.066 ±0.011	0.070 ±0.010	0.069 ±0.014	0.436
相対腎重量	0.007 ±0.003	0.006 ±0.002	0.006 ±0.002	0.819
相対胎盤重量	0.124 ±0.014 ^a	0.117 ±0.009 ^b	0.134 ±0.014 ^{ab}	0.002*

*; $p < 0.05$ (by one-way ANOVA)

^{a, b}; Significant difference in each other by Tukey test.

表4 雌胎仔の体重・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
体重 (g)	3.25 ± 0.24	3.16 ± 0.23	3.11 ± 0.24	0.104
相対肺重量	0.025 ±0.007 ^a	0.028 ±0.006	0.031 ±0.008 ^a	0.010*
相対肝重量	0.067 ±0.013	0.073 ±0.012	0.071 ±0.008	0.211
相対腎重量	0.006 ±0.002	0.006 ±0.002	0.006 ±0.002	0.860
相対胎盤重量	0.135 ±0.016	0.139 ±0.016	0.146 ±0.021	0.081

*; $p < 0.05$ (by one-way ANOVA)

^a; Significant difference in each other by Tukey test.

みとめられなかった (表4)。

4-3. マイクロアレイ

マイクロアレイを行った結果、0 mg/kg/day 曝露群と 10 mg/kg/day 曝露群との間に有意に2倍以上の発現量変化がみられた遺伝子は487個 ($p < 0.01$)であった。胎盤の機能・形成に関与すると考えられる遺伝子として *Col18a1*, *Cspg4*, *Hand2*, *Mmp2*, *Sod3*, *Tf1* などが明らかになった。

4-4. 定量的 RT-PCR

マイクロアレイ法によって n-EtFOSE 曝露による雄胎仔の胎盤において発現量変化のみられた遺伝子の中から、胎盤の形成に関与すると考えられる *Col18a1*, *Cspg4*, *Hand2*, *Mmp2*, *Sod3*, *Tf1* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法により調べた。その結果、1 mg/kg/day, 10 mg/kg/day の各曝露群の *Col18a1* ならびに *Tf1* 遺伝子発現量は、0 mg/kg/day 曝露群に比べて 2-3 倍に有意に上

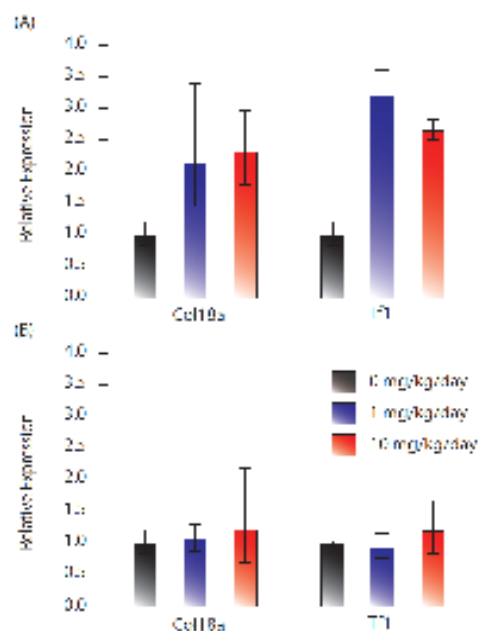


図2 胎盤における Col18a1, Tf1 発現量

(A) 雄胎仔、(B) 雌胎仔の胎盤における Col18a1, Tf1 の β -actin に対する相対発現量をそれぞれ定量的 RT-PCR 法により

昇していた (図2 (A))。雌胎仔の胎盤では、これらの遺伝子の発現量に変化はみとめられなかった。これらの遺伝子は、血管形成や低酸素症に関与すると考えられていることから、N-EtFOSE 曝露により胎盤形成・機能への影響を受けることによって、体重低下などの胎児発育低下を引き起こしていることが示唆された。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権] 計0件)

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