

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651053

研究課題名（和文）特定化学物質PFOSの血液高蓄積機構の解明

研究課題名（英文） Mechanizme analysis of accumulation of PFOS in blood

研究代表者

大嶋雄治（OSHIMA YUJI）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70176874

研究成果の概要（和文）：トラフグに PFOS-を腹腔内投与した結果、血漿中 PFOS 濃度は 1 日目に 728 ng/mL と急激に増加し、14 日目でも 861 ng/mL であった。肝臓と体表粘液は経日的に増加し、14 日目ではそれぞれ 278 ng/g、690 ng/g となった。しかし、筋肉、生殖腺、皮膚ではほとんど増加しなかった。体内に取り込まれた PFOS は、血漿中に蓄積され、一部は肝臓中に蓄積され、徐々に体表粘液中に排出されると考えられた。また、PFOS 曝露トラフグ血漿の硫酸画分(塩濃度 55-80%)で高濃度の PFOS が検出され、結合試験の結果と一致したことから、本画分に PFOS 結合タンパク質が存在することが示された。

研究成果の概要（英文）：Perfluorooctane sulfonate (PFOS) was known to accumulate in blood of fish, bird and mammals. PFOS might bind with unknown substance in blood, however the mechanism is unclear. Thus, we performed to purify a PFOS binding substance from fish blood and confirmed its affinity to PFOS. As results, PFOS binding protein was successfully purified from the plasma of PFOS administered-puffer fish (*Takifugu rubripes*) from the 65-70% ammonium sulfate precipitation. N-terminal analysis strongly suggested that PFOS-binding protein was an apolipoprotein A-I in *T. rubripes*. In accorded this, PFOS was confirmed to bind with the 65-70% ammonium sulfate fraction prepared from non-PFOS treated *T. rubripes*. Those results indicated that PFOS was bind to apolipoprotein A-I. Thus, this may suggest disorder of physiological function because apolipoprotein A-I may play an important role in lipid metabolism in fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：PFOS 結合タンパク質、魚類、血液

## 1. 研究開始当初の背景

ペルフルオロ化合物(PFCs)は、有機フッ素化合物であり、耐熱性、耐薬品性、界面活性等、工業的に優れた化学的性質を持っている。そのため、界面活性剤や調理器具のコーティング剤、消火剤等多方面で利用されてきた。PFCs の 1 種であるペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)も同様に、1950 年代から世界各地で多用途に使用されたが、1990 年頃から日本(40-75 pg/L)、中国(23-9680 pg/L)、東太平洋(54-78 pg/L)、北大西洋(8.6-36 pg/L)等、世界各地の環境水中に広く PFOS の汚染が広がっている検出がされた(Yamashita et al., 2005)。さらに、カジカ(10 ng/g in liver)やアザラシ(30 ng/g in liver)、ホッキョクグマ(1285 ng/g in liver)といった極地の動物にも PFOS の汚染が広がり、さらに、生態ピラミッドの上位にいる動物でより高濃度に検出されることが報告された(Bossi et al., 2005)。PFOS の環境中での残留性や生物への高い蓄積性が問題視された結果、2009 年に残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約が改正され、Persistent Organic Pollutants (POPs)に指定された。日本でも 2009 年、化審法によって第一種特定化学物質に指定された。これにより、現在国内では工業的な生産、および使用が原則禁止されている。

PFOS は難分解性であり、加水分解、光分解、生物分解をせず、また不揮発性であることから、海水中に PFOS が存在し続け、今後も水生生物への汚染は問題となると考えられる。また、これらを通したヒトや野生生物への影響が懸念されている。生体への影響として、ラットやサル等の哺乳類を用いた室内

実験では、コレステロールの減少(Seacat et al., 2002)、発がん作用(Nakayama et al., 2005)、発達毒性(Lau et al., 2004)、免疫毒性(Peden-Adams et al., 2008)、ペルオキシソーム増殖作用(Shipley et al., 2004)等が報告されている。

現在までに、PFOS は野生生物、ヒトにおいて、肝臓だけでなく、血液中にも高濃度に蓄積することが報告されている(ヒト:28.4 ng/mL, Hansen et al., 2001; ハクトウワシ:330 ng/mL, Kannan et al., 2001; 魚類 2-489 ng/mL, Taniyasu et al., 2008)。また、PFOS は血中でタンパク質と結合した状態で存在していると考えられている(Jones et al., 2003)。しかし、生体内での詳細な蓄積機構に関しては未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

よって、本研究では腹腔内投与を行い、PFOS の魚体内動態と PFOS の血液蓄積機構の解明を目的とした。蓄積機構の解明としては、血中結合タンパク質の同定を目指した。水環境中に生息する水生生物への PFOS の汚染、また、生物濃縮によるヒトや野生生物への影響を考慮し、本実験では魚類を対象として実験を行った。

## 3. 研究の方法

実験 1:PFOS 腹腔内投与による体内動態の解明

### PFOS 投与試験

実験は、九州大学水産実験所にて行った。

2012年10月9日、500 L水槽に養殖トラフグ (*T. rubripes*)19個体を2日間馴致させた。馴致期間中、ろ過海水を給水すると共に、十分なエアレーションを行った。2012年10月11日、15個体のトラフグ(平均体重 501±68.1 g、平均尾さ長 24.9±1.42 cm)に 0.5 mg/mL PFOS-カリウム塩 (Strem chemicals, USA) in DMSO—0.9% NaCl を 0.5 mg/kg b.w.の割合で腹腔内投与し、14日間無給餌で飼育を行った。期間中、ろ過海水を給水すると共に十分なエアレーションを行った。排水は活性炭処理を行った。投与前、投与後1、3、7、14日目に各4個体ずつサンプリングした(14日目のみ n=3)。体表粘液をメスによって採取し、次にヘパリン処理したシリンジを用いて肝門脈から採血を行った。その後、肝臓、生殖腺、筋肉、皮膚を採取し、組織をそれぞれ15 mL ポリプロピレンチューブで保存した。血液は4°Cで一晩静置後、1,110 G、4°Cで10分間遠心分離し、血漿と血餅に分離した。得られた血漿と血餅は-30°Cで凍結保存した。また、その他の組織は-80°Cで凍結保存した。

## 実験2：PFOS結合タンパク質の探索

### トラフグ血漿サンプルの準備

養殖トラフグ4個体(平均体重 825 g、平均尾さ長 26.8 cm)からヘパリン処理したシリンジを用いて肝門脈より採血を行った。血液は4°Cで一晩静置後、1,110 G、4°Cで10分間遠心分離し、血漿と血餅に分離した。得られた血漿をプールして10 mLにし、4°C下で硫酸アンモニウムによる血漿中タンパク質の粗分画を行った。分画濃度は、0-20, 20-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-80, 80-100, 100 上清 (%)に設定した。ビーカー内で血漿をスターラーで攪拌しながら、上記の濃度になるように硫酸アンモニウムを徐々に添加し、完全に溶解させた。そのま

ま30分間攪拌した後、血漿を15 mL チューブに移し、27,730 G、4°Cで30分間遠心分離を行い、沈殿を得た。上清はビーカーに戻して、上記の操作を繰り返した。析出した沈殿はPBS 3 mLに再溶解させた。各画分のタンパク質濃度はBCA Protein Assay Kit(PIERCE, USA)を用いて測定し、同時にPFOS濃度の測定も行った。

### 実験 2-1：平衡透析法によるトラフグ血漿のPFOS結合試験

多穴平衡型透析セル(コスモ・バイオ, Japan)にヴィスキングシート(24 Å, 分画分子量約14,000, サンプラテック, Japan)をセットし、中央のセル(A)に各画分の血漿サンプル(0.1 mg/mL)を、両側のセル(B)に PFOS 溶液(0.1 mM)をそれぞれ2 mL 入れ、15°Cで24時間静置した。その後、各溶液を回収し、AとBのPFOS濃度を測定し、濃度比を算出した。各硫酸画分に対し2回繰り返し試験を行った。

### 実験 2-2：PFOS 投与トラフグ血漿の硫酸分画

PFOS 投与試験(投与後14日目)で得られた血漿サンプルをプールして10 mLにし、硫酸アンモニウムによる血漿タンパク質の粗分画を行った。分画濃度は、0-20, 20-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-80, 80-100, 100 上清 (%)に設定した。ビーカー内で血漿をスターラーで攪拌しながら、上記の濃度になるように硫酸アンモニウムを徐々に添加し、完全に溶解させた。そのまま30分間攪拌した後、血漿を27,730 G、4°Cで30分間遠心分離を行い、沈殿を得た。上清はビーカーに戻して、上記の操作を繰り返した。析出した沈殿はPBS 3 mLに再溶解させた。各画分のタンパク質濃度はBCA Protein Assay Kit(PIERCE, USA)を用いて測定し、同時にPFOS濃度の測定も行った。

PFOS 投与 14 日目の血漿を用いた硫酸分画で得られた各硫酸分画の血漿タンパク質に対して sodium dodecylsulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。

#### ゲル電気泳動と N 末端アミノ酸配列解析

ブロッティング装置(AE6675, ATTO, Japan)を用い、セミドライ法によって PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride membranes, 0.2 mm, Sequi-Blot™, Bio-Rad, USA) に目的のバンドを転写した。その後、2 mA/cm<sup>2</sup> で 90 分間通電した。転写したサンプルの N 末端アミノ酸配列解析はプロテインシーケンサー (PPSQ-31A, Shimadzu, Japan) を用いて行った。得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を基に、blast による検索を行った。

## 4. 研究成果

### 実験 1: PFOS 腹腔内投与による体内動態の解明

血漿で最も高濃度の PFOS が検出され、投与 1 日目に 728 ng/mL と増加し、14 日目(861 ng/mL)まで高濃度で検出され続けた(図 1a)。体表粘液は 1 日目に 59.1 ng/g-w.w. が検出され、その後経時的に増加し、14 日目では 690 ng/g-w.w. であった(図 1b)。肝臓ではコントロールに 86.3 ng/g-w.w. の PFOS が検出された。また、経時的に増加傾向が見られ、1 日目は 124 ng/g-w.w.、14 日目では 277 ng/g-w.w. であった。血餅、生殖腺、筋肉、皮膚中では PFOS は検出されたが、全て 14 日目では 100 ng/g-w.w. 以下と低濃度であった。血餅中では 1 日目に 200 ng/mL、14 日目に 84.5 ng/mL であった(図 1d)。生殖腺では 1 日目に 127 ng/g-w.w. であり、14 日目は 112 ng/g-w.w. であった(図 1e)。筋肉では 1 日目に 70.0 ng/g-w.w. であり、14 日目では 85.3 ng/g-w.w. であった(図 1f)。皮膚ではコントロールに 17.0

ng/g-w.w. の PFOS が検出された。1 日目は 19.3 ng/g-w.w. であり、14 日目では 54 ng/g-w.w. であった(図 1g)。

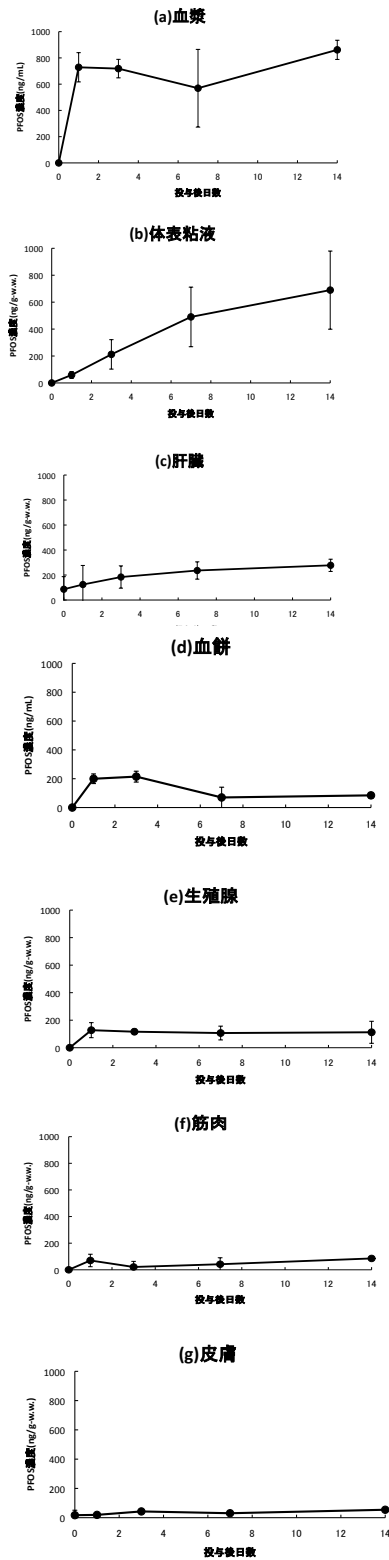


図 1. PFOS 0.5 mg/kg b.w. を投与したトラフグ各組織 (a, 血漿; b, 体表粘液; c, 肝臓; d, 血餅; e,

生殖腺; f,筋肉; g,皮膚)における PFOS 濃度の経時的变化

実験 2-1: 平衡透析法によるトラフグ血漿の PFOS 結合試験

PFOS 無処理トラフグ血漿タンパク質の硫安分画物のタンパク質濃度および PFOS 濃度の結果を図 2 に示す。硫安分画時、全ての画分の PFOS 濃度は検出限界以下(<0.92 ng/mL)であった。平衡透析後、両側のセル B の PFOS 濃度を対する中央のセル A の濃度比を図 3 に示す。硫安濃度 55-70%の画分において PFOS 濃度比は 3 以上であり、60-65%の画分は 4.77 となった。他の画分は 3 以下であった。よって、55-70%の画分のタンパク質に PFOS が結合していた。

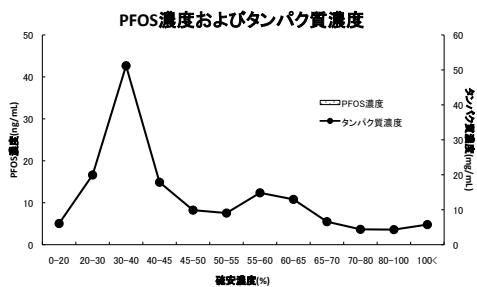


図 2. PFOS 無処理トラフグ血漿の硫安分画物の PFOS 濃度およびタンパク質濃度

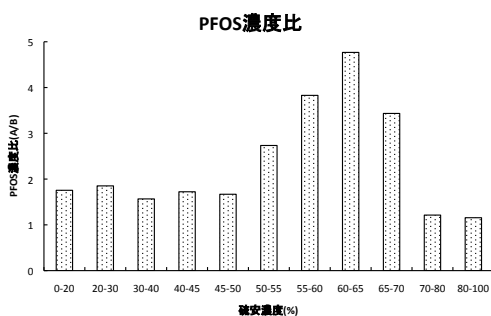


図 3. PFOS 無処理トラフグ血漿の硫安分画物の PFOS 結合試験後の両側のセル B に対する中央のセル A の PFOS 濃度比

実験 2-2: PFOS 投与トラフグ血漿の硫安分画

PFOS 投与 14 日目のトラフグ血漿の硫安分画で得られた各画分のタンパク質濃度および PFOS 濃度の結果を図 4 に示す。PFOS 濃度は硫安濃度 60-80%の画分において顕著なピークが見られた。PFOS が最も高濃度に検出されたのは硫安濃度 65-70%の画分であり、190 ng/mL であった。また、PFOS 曝露後 14 日目のトラフグ血漿タンパク質 1 mg 当たりの PFOS 濃度を算出した結果、65-70%の画分で最大となり、14.0 ng-PFOS/mg-タンパク質であった(図 5)。

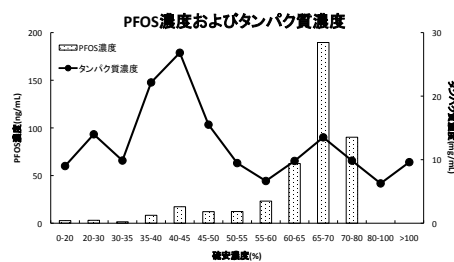


図 4. PFOS 投与 14 日目のトラフグ血漿の硫安分画物の PFOS 濃度およびタンパク質濃度

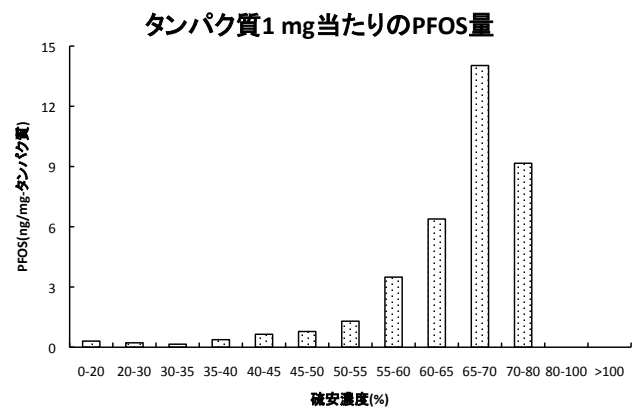


図 5. PFOS 投与 14 日目のトラフグ血漿の硫安分画物のタンパク質 1 mg 当たりの PFOS 量

ゲル電気泳動

SDS-PAGE の結果を図 6 に示す。25 kDa 付近に 2 本のタンパク質のバンド (バンド 1、バンド 2) が確認された。この 2 本のバンドの検出強度に対する PFOS 投与後トラフグ血

漿タンパク質 1 mg 当たりの PFOS 量の結果 (図 5) をプロットし、線形回帰分析を行った。その結果、両者の関係に高い正の相関が見られた ( $P < 0.05$ )。さらにこの 2 本のバンドに対して N 末端アミノ酸配列解析を行った。

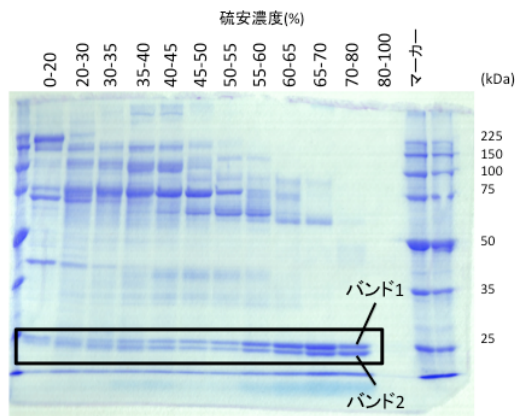


図 6. PFOS 投与 14 日目のトラフグ血漿の硫安分画物の SDS-PAGE

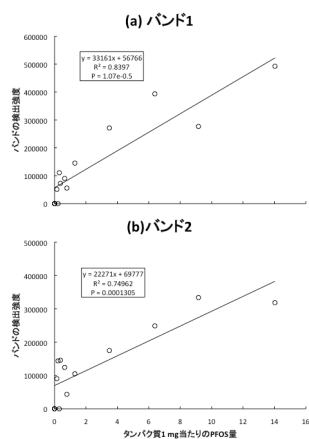


図 7. PFOS 投与 14 日目のトラフグ血漿の硫安分画物の SDS-PAGE のバンドの検出強度 (図 6: バンド 1、バンド 2) とタンパク質 1 mg 当たりの PFOS 量に対する線形回帰分析; (a) バンド 1、(b) バンド 2

### N 末端アミノ酸配列解析

N 末端アミノ酸配列解析の結果、バンド 1 からは”ASLMADPPSELEHFRSALS”、バンド 2 からは”ADPPSELEHFRSALS”の配列が得られた。この配列を BLAST 検索したところ、バンド 1 とバンド 2 共に、

apolipoprotein A-I precursor [*T. rubripes*] (identity: 100%) であると特定された (表 2、3)。

表 2. SDS-PAGE バンド 1 の BLAST 検索結果

Description	Identity	E value	Accession
apolipoprotein A-I precursor [ <i>Taifugu rubripes</i> ]	100% identity in 20 amino acid overlap	3.00E-11	NP_001072100.1
apolipoprotein A-I [ <i>Opiophagus fuscus</i> ]	67% identity in 18 amino acid overlap	0.15	ACF21981.1
apolipoprotein A-I [ <i>Epinephelus coioides</i> ]	71% identity in 17 amino acid overlap	0.19	AEW43727.1
apolipoprotein A-I [ <i>Epinephelus coioides</i> ]	71% identity in 17 amino acid overlap	0.19	ADZ78522.1
apolipoprotein A-I [ <i>Epinephelus coioides</i> ]	71% identity in 17 amino acid overlap	0.22	ACM48181.1
apolipoprotein A-I [ <i>Epinephelus coioides</i> ]	71% identity in 17 amino acid overlap	0.23	AC86071
apolipoprotein A-I [ <i>Epinephelus coioides</i> ]	90% identity in 18 amino acid overlap	0.65	XP_002007982.1
apolipoprotein A-I precursor [ <i>Oncorhynchus mykiss</i> ]	67% identity in 18 amino acid overlap	1.5	NP_001177181
hypothetical protein MELLADRAFT_52833 [ <i>Metapogona larici-populina</i> BRAG31]	90% identity in 10 amino acid overlap	1.5	EGG00884.1
apolipoprotein A-I-2 [ <i>Hemibarbus mylonis</i> ]	67% identity in 15 amino acid overlap	4.9	AC115860.1

表 3. SDS-PAGE バンド 2 の BLAST 検索結果

Description	Identity	E value	Accession
apolipoprotein A-I [ <i>Taifugu rubripes</i> ]	100% identity in 18 amino acid overlap	4.9	YVNS0121.1
apolipoprotein A-I [ <i>Opiophagus fuscus</i> ]	67% identity in 18 amino acid overlap	3.2	YVNS1888.1
apolipoprotein A-I precursor 31.13 [ <i>Hydrophylus sphenocentrus</i> DSM 14536]	67% identity in 18 amino acid overlap	5.1	MG_00019623.1
apolipoprotein A-I-2 [ <i>Buconia</i> (genus name)]	67% identity in 17 amino acid overlap	0.95	MG_001111132.1
CK10282 [ <i>Choreobacter mizutani</i> ]	67% identity in 17 amino acid overlap	0.99	MG_000004852.1
apolipoprotein A-I-1 [ <i>Buconia</i> (genus name)]	67% identity in 17 amino acid overlap	0.99	YVNS0121.1
127 sp-2 [ <i>Hydrophylus sphenocentrus</i> ]	67% identity in 17 amino acid overlap	0.18	YVNS00001.1
apolipoprotein A-I-1 [ <i>Buconia</i> (genus name)]	11.1% identity in 17 amino acid overlap	0.004	MG_001111131.1
apolipoprotein A-I-1 [ <i>Buconia</i> (genus name)]	67% identity in 18 amino acid overlap	0.018	YVNS10492.1
apolipoprotein A-I-2 [ <i>Buconia</i> (genus name)]	100% identity in 15 amino acid overlap	0.00E-13	MG_001015100.1
apolipoprotein A-I-2 [ <i>Hydrophylus sphenocentrus</i> ]	67% identity in 18 amino acid overlap	E value	Accession

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

国際誌に投稿準備中

〔学会発表〕 (計 0 件)

2013 年、日本環境毒性学会、環境ホルモン学会に発表予定。

〔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〕

なし

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋雄治 (農学研究院)

研究者番号: 7 0 1 7 6 8 7 4

(2) 研究分担者

島崎 洋平 (農学研究院)

研究者番号: 4 0 3 6 3 3 2 9