

氏名(本(国)籍)	河本光祐(北海道)
主指導教員名	岩手大学 教授 津田修治
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第328号
学位授与年月日	平成23年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	難分解性有機フッ素化合物PFOS及びPFOAの毒性学的研究
審査委員	主査 岩手大学 教授 古濱和久 副査 帯広畜産大学 教授 石井利明 副査 岩手大学 教授 津田修治 副査 東京農工大学 教授 下田実 副査 岐阜大学 教授 海野年弘

論文の内容の要旨

PFOS (perfluorooctane sulfonate) と PFOA (perfluorooctanoic acid) は海面活性作用を持つ難分解性の過フッ素化合物であり、環境中において非常に高い安定性を示し、地球規模での環境汚染が報告されている。これらは動物実験や疫学調査などによって様々な毒性作用を引き起こすことが報告されているが、神経行動毒性や遺伝毒性に関する報告は極めて少ない。そこで本研究では PFOS および PFOA の神経行動毒性や遺伝毒性を明らかにするとともに、環境生物に対する影響について検討する目的で、環境生物であるゾウリムシおよびメダカとともに典型的な実験動物であるラットあるいはマウスを用いて以下の検討を行った。

1. PFOS のゾウリムシにおける神経行動毒性

ゾウリムシに PFOS と PFOA を曝露したところ、PFOA は遊泳行動に影響を与えなかったが、PFOS は後退遊泳という異常な遊泳行動を引き起こした。ゾウリムシは細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加によって後退遊泳を行うことが知られているため、PFOS の影響として細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加や細胞内 Ca^{2+} の有用性を高めることが考えられた。そこで、細胞内 Ca^{2+} の有用性に対する PFOS の影響について、Triton 細胞モデルを用いて検討した。本モデルは細胞膜としての性質を破壊しながらも遊泳行動に必要な繊毛の収縮要素を維持したものであり、その遊泳行動は外液の Ca^{2+} 濃度によって制御される。PFOS は、Triton 細胞モデルで遊泳行動と外液 Ca^{2+} 濃度との関係に影響を与えず、細胞内 Ca^{2+} の有用性に影響を及ぼさないことが示された。また 10 種の界面活性剤の膜障害作用と遊泳行動に対する影響を比較検討した結果、膜障害作用と遊泳行動に対する影響には関連性が見られず、PFOS による後退遊泳は膜障害作用に

よる非特異的な Ca^{2+} 流入が原因ではないということが示唆された。電気生理学的検討において、PFOS は野生株のゾウリムシと電位依存性 Ca チャネル (VGCC) を持たない突然変異株の両者に 3 相性の電位変化を引き起こした。また PFOS によって後退遊泳を示す野生株では活動電位が見られたが、変異株では活動電位や後退遊泳は見られなかった。さらに、PFOS は voltage-clamp 条件下での内向き Ca 電流に影響を与えず、VGCC を直接活性化してはいることが示された。ゾウリムシにおける 3 相性の膜電位変化は局在性をもった刺激受容チャネルの活性化によってもたらされる事が知られている。したがって PFOS による後退遊泳は VGCC を直接活性化することによるものではなく、刺激受容チャネルからの Ca^{2+} 流入による脱分極が繊毛上の VGCC を二次的に活性化し、 Ca^{2+} 流入を引き起こすことが原因であると示唆された。

2. PFOS のメダカにおける神経行動毒性

PFOS および PFOA をメダカに 96 時間曝露し、その行動に対する影響を検討した。PFOS では旋回遊泳、後退遊泳、鼻あげなど、様々な遊泳行動の変化が観察された。一方、PFOA では遊泳行動の変化はほとんど見られず、唯一見られた平衡異常も半数致死濃度付近でのみ見られており、死亡時の非特異的症状であると推察された。

3. PFOS のラットにおける神経行動毒性

予研究において、PFOS の単回経口投与により、超音波刺激による強直性痙攣がラットで認められているが、PFOA では認められなかった。PFOS は難分解性で蓄積性も有することから、より低濃度かつ長期間の曝露でこのような毒性が引き起こされるかを明らかにすることは重要な課題である。そのため本研究では、0, 2, 8, 32 および 128 ppm の PFOS を雄性 Wistar 系ラットに 13 週間混餌投与した。投与期間中、一般行動に変化は見られず、32 ppm 以下の群では超音波刺激に対しても行動の変化が見られなかった。しかし 128 ppm の群では、第 6 週終了時に 6 匹中 5 匹のラットが超音波刺激によって強直性痙攣を引き起こし、この時点での総 PFOS 投与量は 338 mg/kg であった。PFOS 単回経口投与の検討では 250 mg/kg 以上の PFOS 投与後に同様の痙攣が見られており、本研究の投与量はこれと近い値であった。また、13 週間混餌投与における総投与量に対する組織中の PFOS 濃度の割合は、単回経口投与における割合と極めて類似した値を示した。これらの結果は、強直性痙攣を引き起こす脳の PFOS 濃度が、投与形態に関わらず同程度であることを示唆していた。なお、脳の病理組織学検討では、大脳および小脳の神経細胞やグリア細胞に変化は見られなかった。脳の神経細胞において Ca チャネルからの Ca^{2+} 流入を引き起こす NMDA が、痙攣誘発作用を有することが知られている。前述のように PFOS がゾウリムシで Ca 流入を引き起こすことが明らかとなっており、ラットの神経細胞における Ca^{2+} 動態の変化が PFOS による強直性痙攣と深く関わっている可能性が考えられた。

4. PFOA のゾウリムシ、メダカおよびマウスにおける遺伝毒性

DNA 損傷は Comet assay によって検討した。その結果、PFOS の曝露によりゾウリムシの DNA 損傷に変化は見られなかったが、PFOA の曝露によりゾウリムシおよびメダカの鰓と肝臓で DNA 損傷の有意な増加が認められた。また、120 mg/kg の PFOA を雄性 ICR マウスに 3 日間連続経口投与すると、肝臓で DNA 損傷の増加が認められた。これらの結果から PFOA は原生物、魚類、哺乳動物と広範な生物に対し DNA 損傷を引き起こすことが明らかとなった。活性酸素種 (ROS) および酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の測定をゾウリムシとメダカで行った結果、両者で PFOA による ROS の増加が見られたが、8-OH-dG には変化は見られなかった。また、ゾウリムシに抗酸化剤である glutathione (GSH) と PFOA を同時に曝露したところ、PFOA による ROS の増加は GSH 存在下で完全に抑制されたが、DNA 損傷は消失しなかった。従って ROS の増加が PFOA による DNA

損傷の主たる原因ではなく、これとは別の機序が存在することが示唆された。

以上本研究により PFOS と PFOA は構造的に極めて類似していながら、それぞれ神経行動毒性と遺伝毒性という異なる毒性を有することが明らかとなった。また、PFOS および PFOA の影響は環境生物であるゾウリムシやメダカにも及ぶことが明らかとなり、生態系への影響が懸念された。

審 査 結 果 の 要 旨

PFOS (perfluorooctane sulfonate) と PFOA (perfluorooctanoic acid) は界面活性作用を持つ難分解性過フッ素化合物の代表である。本研究では神経行動毒性と遺伝毒性を検討した。

1. ゾウリムシの遊泳行動

PFOA と PFOS のうち後者のみがゾウリムシを後退遊泳させた。PFOS はゾウリムシの Triton モデルにおいて遊泳行動と外液 Ca^{2+} 濃度との関係に影響を与えなかった。種々の界面活性剤の赤血球膜障害作用とゾウリムシの行動に対する作用には関連性がなかった。PFOS は野生株のゾウリムシと電位依存性 Ca チャネルを持たない突然変異株の両者に化学受容体刺激時に見られる電位変化を引き起こしたが、活動電位は PFOS にのみ認められた。PFOS は voltage-clamp 時の内向き Ca 電流に影響を与えなかった。したがって、PFOS による後退遊泳は刺激受容チャネルによる脱分極が繊毛上の電位依存性 Ca チャネルを活性化し、Ca 流入を引き起こすことが原因であると示唆された。

2. メダカの神経行動毒性

PFOS はメダカに旋回遊泳、後退遊泳、鼻あげなどの遊泳行動の変化を引き起こしたが、PFOA では死亡時の非特異的症状以外の変化はほとんど見られなかった。

3. ラットの神経行動毒性

申請者の関与した以前の実験において、PFOS 250 mg/kg以上の単回経口投与後の超音波刺激によってラットに強直性痙攣が認められたがPFOAでは認められなかった。本研究ではPFOSをラットに13週間混餌投与中に超音波刺激を行ったところ、総投与量 338 mg/kgで強直性痙攣を引き起こした。また、13週投与後の総投与量に対する脳内のPFOS濃度比は単回経口投与時と近い値を示した。よって脳におけるPFOSの蓄積性が示された。なお脳に病理組織学的変化は見られなかった。

4. ゾウリムシ、メダカおよびマウスにおける遺伝毒性

DNA 損傷は Comet assay によって検討した。その結果 PFOS はゾウリムシの DNA を損傷しなかったが、PFOA はゾウリムシ、メダカの鰓と肝臓およびマウスの肝臓の DNA を損傷した。ゾウリムシとメダカで PFOA による活性酸素種の増加が見られたが、8-hydroxydeoxyguanosine は変化しなかった。またゾウリムシにおける活性酸素種の増加はグルタチオンで完全に抑制されたが、DNA 損傷は消失しなかった。したがって活性酸素種の増加が PFOA による DNA 損傷の主たる原因ではないことが示唆された。

本研究により PFOS と PFOA は構造的に類似していながら、それぞれ神経行動毒性と遺伝毒性という異なる毒性を有することが明らかとなった。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) of swimming behavior and membrane potential of *paramecium caudatum*
著 者 名 : Kawamoto, K., Nishikawa, Y., Oami, K., Jin, Y., Sato, I., Saito, N. and Tsuda, S.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 33(2):155-161, 2008

- 2) 題 目 : Perfluorooctanoic acid (PFOA) but not perfluorooctane sulfonate (PFOS) showed DNA damage in comet assay on *Paramecium caudatum*
著 者 名 : Kawamoto, K., Oashi, T., Oami, K., Liu, W., Jin, Y., Saito, N., Sato, I. and Tsuda, S.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 35(6):835-841, 2010

- 3) 題 目 : Ultrasonic-induced tonic convulsion in rats after subchronic exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS)
著 者 名 : Kawamoto, K., Sato, I., Tsuda, S., Yoshida, M., Yaegashi, K., Saito, N., Liu, W. and Jin, Y.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 36(1):2011 in press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Neurotoxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats and mice after single oral exposure
著 者 名 : Sato, I., Kawamoto, K., Nishikawa, Y., Tsuda, S., Yoshida, M., Yaegashi, K., Saito, N., Liu, W. and Jin, Y.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 34(5):569-574, 2009

- 2) 題 目 : Air purifiers that diffuse reactive oxygen species potentially cause DNA damage in the lung
著 者 名 : Kawamoto, K., Sato, I., Yoshida, M. and Tsuda, S.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 35(6):929-933, 2010