

平成 10 年度学長所管研究奨励金

## ペルフルオロ脂肪酸の生体作用を決定づける因子に関する研究

研究代表者 薬学部衛生化学教室 教授 川嶋 洋一

共同研究者 同 助手 工藤 なをみ

## はじめに

フッ素系界面活性剤の一種であるペルフルオロ脂肪酸(PFCA)は脂肪酸の炭素結合水素がすべてフッ素に置換した化合物である。PFCAは通常の脂肪酸にはない特殊な性質(表面張力が極めて弱い、化学的に非常に安定)を持ち、これらの性質を利用して撥水・撥油剤、消火剤などに広く利用されている。PFCAの生体への毒性は低いものと考えられており、そのため、現在PFCAの生産、使用に関する基準は設けられていない。その一方、化学工場労働者の血液からPFCAの一種であるペルフルオロオクタン酸(PFOA, C8)が検出され、しかも、半減期が非常に長いといった報告も出されている<sup>1)</sup>。本研究代表者らは、これまでにPFCAの生理作用について研究を重ね、これらの化合物がげっ歯類において肝脂質代謝や薬物代謝に広く影響を与えることを明らかにしてきた<sup>2-4)</sup>。これら一連の研究の過程において、雄と雌で作用が異なるいわゆる性差があることが判明した<sup>3)</sup>。また、炭素鎖長の異なるPFCAはときとして生体作用が大きく異なるという報告もなされた<sup>4)</sup>。以上の背景から本研究では、炭素鎖長の異なるPFCAについてその生体作用の強さを系統的に検討することによって、両者の関係を明らかにし、さらに、生体作用の差がどのような機構で生じるのか、その機構を解明することを目的とした。本研究では、[ ]炭素数8のPFCAであるPFOAにより肝臓におけるリン脂質が蓄積する現象に注目して、その機構の解析を行った<sup>5)</sup>。次に、[ ]PFCAによる肝臓のペルオキシソーム酸化活性の誘導を指標として、PFCAの炭素鎖長と活性誘導能との関係を、肝臓におけるPFCAの蓄積量との関係から論じる<sup>6)</sup>とともに、PFCAの体外への排泄経路および速度について考察を加えた。この結果が他の動物種にも該当するか、すなわち種差があるかどうかを検討するために[ ]マウスを用いて、ラットと同様の検討を行った<sup>7)</sup>。

## 研究の成果

### ペルフルオロオクタン酸(PFOA)によるラット肝グリセロリン脂質代謝の変動

PFOA をラットの飼料に 0.01 0.04% の割合で混入して与えると、肝臓におけるグリセロリン脂質の量が PFOA 量に依存して増加した。0.01%の PFOA を 1 週間与えた場合、ホスファチジルコリン (PtdCho)、ホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn)、ホスファチジルセリン (PtdSer)、ホスファチジルイノシトール (PtdIns) およびトリグリセリド (TG) の増加率はそれぞれ、2.2, 2.4, 2.4, 1.6 および 5.2 倍であった。この原因を調べるために、グリセロリン脂質の合成酵素の活性を検討した。グリセロリン脂質合成の共通の酵素であるグリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (G3PAT) の活性は 70%上昇していた。また、TG を合成する酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) 活性は約 80%上昇した。一方、PtdCho を合成する酵素であるコリンキナーゼ (CK)、CTP:ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ (CT) および CDP コリン:ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (CPT) の活性や PtdEtn の合成酵素であるエタノールアミンキナーゼ (EK) の活性に変化は認められなかった。ホスファチジルエタノールアミン *N*-メチルトランスフェラーゼ CTP:ホスホエタノールアミンシチジリルトランスフェラーゼ (ET) 活性は低下した。ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ活性はやや上昇した。

次に、各リン脂質における脂肪酸組成を検討した。肝臓 1 g あたりで比較すると、PtdCho ではオレイン酸 (18:1) レベルの上昇とアラキドン酸 (20:4) レベルの減少が顕著であった。また、PtdEtn においてはオレイン酸 (18:1) およびアラキドン酸 (20:4) レベルの上昇が顕著であった。PtdCho および PtdEtn について分子種を解析したところ、PtdCho では 16:0-18:1 分子種の割合が約 2 倍に増加し 18:1-20:4、16:0-18:2 分子種の割合が減少した。PtdEtn では 16:0-22:6 分子種が減少し、20:4 を含む分子種が増加した。肝ミクロソーム中のステアロイル-CoA デサチュラーゼおよびオレオイル-CoA:1-アシルグリセロホスホコリンアシルトランスフェラーゼ活性が PFOA により約 3 倍に上昇していたことから、PtdCho における 16:0-18:1 分子種の著しい増加はこれらの酵素活性の上昇によるものと考えられた。

一方、血清中のすべての脂質は PFOA 投与により減少した。主要リン脂質・PtdCho の分子種の組成をみると、18:1 を含む分子種の割合が増加し、18:2 を含む分子種の割合が減少していた。

以上の結果から、PFOA を与えることによる PtdCho の増加は、18:1 をもつ分子種の増加によって 18:2、を含む分子種が相対的に不足したために、分泌が減少することによると考えられた。一方、PtdEtn の増加は PtdEtn を PtdCho に変換する酵素の活性低下と、PtdSer から PtdEtn を合成する酵素の活性上昇によるものと考えられた。また、TG の増加は、DGAT 活性の上昇および、肝臓からのリポ蛋白質分泌の低下によるものと考えられた。

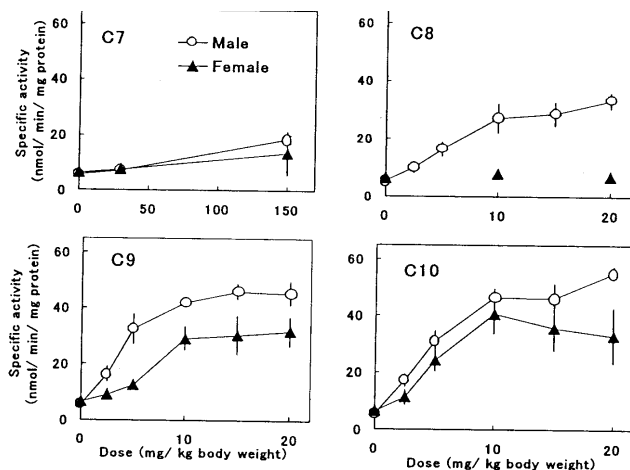
#### 炭素鎖長の異なる種々のPFCA によるラット肝ペルオキシソーム 酸化誘導作用の比較

雌雄ラットにおける肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能を、炭素鎖長 7-10 の PFCA について比較した。PFOA、ペルフルオロノナン酸 (PFNA, C9) およびペルフルオロデカン酸 (PFDA, C10) は用量依存的に肝ペルオキシソーム 酸化活性を誘導した。また、ペルフルオロヘプタン酸 (PFHA, C7) は用量を増加させてもあまり活性の上昇は認められなかった(図 1)。同じ用量で比較すると、炭素鎖長の長い PFCA ほど肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能が強い傾向が認められ、また、PFOA, PFNA の場合に雄の活性が雌を上回っていた。

肝臓における PFCA の残存量を検討したところ、PFOA, PFNA, PFDA は用量依存的な蓄積が観察された。炭素鎖長の長い PFCA ほど肝臓における蓄積量が多かった。雌雄ラットを比較すると、PFOA と PFNA の場合、雄は雌を上回っていた。一方、PFDA の場合には性差は認められなかった。PFCA の肝蓄積量と肝ペルオキシソーム 酸化活性について相関を調べたところ、雌雄、PFCA の炭素鎖長によらず、両者の間には非常に高い正の相関が認められた(図 2)。初代培養肝細胞を用いて、in vitro で PFCA の肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能を比較すると、いずれの PFCA もほぼ同程度の活性誘導能を示した。In vivo では誘導の認められない PFHA にも肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能が認められた。

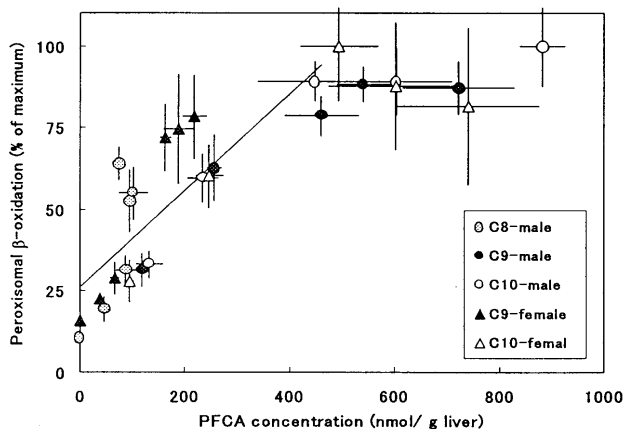
このことは、炭素鎖長の異なる PFCA に、また、雌雄のラット間に肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能の強弱が認められるのは、肝臓における残存量が違うためであることを示している。

図1 Effects of PFCA on the activity of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in male and female rats.



Rats were subcutaneously injected with PFCA once a day for 5 days. Livers were excised 24 h after the final injection, homogenized and used for enzyme assay. Values are means + SD for 4 rats.

図2 Relationship between the activity of peroxisomal  $\beta$ -oxidation and concentrations of PFCA in rat liver.



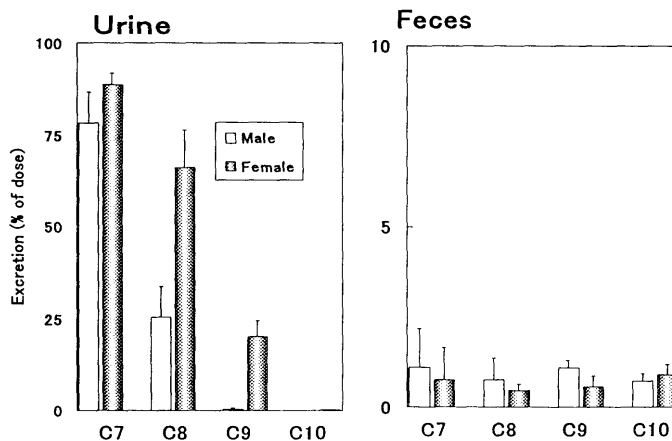
Regression analysis was performed on the mean data from male or female rats at the concentration of PFCA below 500 nmol/g liver. PFCA concentrations versus peroxisomal  $\beta$ -oxidation activity,  $Y=0.122X + 33.5$ ,  $r=0.855$ ,  $P,0.001$ .

PFOA と PFNA の肝臓における残存量に性差が生じる原因を検討した。雄ラットを去勢すると PFCA の肝臓における残存量は著しく減少し、雌の値に近くなった。逆に、去勢した雄ラットにテストステロンを投与すると残存量は増加することから、性ホルモンにより調節されていると考えられた。

PFCA の排泄経路および量について検討を加えた(図 3)。炭素鎖長の短い PFCA ほどよく尿中から排泄されることがわかった。炭素鎖長 10 の PFDA はほとんど尿中から排泄されなかった。また、PFOA と PFNA は雌ラットでの尿中排泄が雄ラットに比べて速かった。一方、糞中への排泄は、いずれの PFCA とも非常に遅かった。したがって、肝臓における PFCA の残存性の差は尿中排泄速度の差によるところが大きいことが判明した。また、尿中への排泄速度が性ホルモンによって調節されていることが明らかとなった。

以上の結果から、PFCA の生体作用、ここでは肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能、が PFCA の炭素鎖長やラットの性によって大きく異なるのは、PFCA の尿中への排泄速度の違いが原因となって、肝臓への蓄積量の違いとなるためであることが明らかとなった。

図3 Excretion of PFCA into urine and feces 24 h after the injection in male and female rats.



Rats were intraperitoneally injected with PFCA (20 mg/ kg body weight). Urine and feces were collected for 24 h. Values are means  $\pm$  SD for 4 rats.

## マウスにおける炭素鎖長の異なるPFCAによる肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能の検討 ラットとの比較

これまでの研究から、ラットにおける PFOA の肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能には性差が認められるのに対して、マウスでは性差がないことが判明している。先の研究から、ラットにおける PFOA の生体作用の性差は肝臓への残存性の差によるものであることが明らかとなった。それでは、マウスには肝残存性に性差がないのであろうか。また、異なる炭素鎖長の PFCA はどのような生体作用の差を示すのであろうか。この点を明らかにするために、マウスにおいて種々の PFCA の肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能を比較検討した。

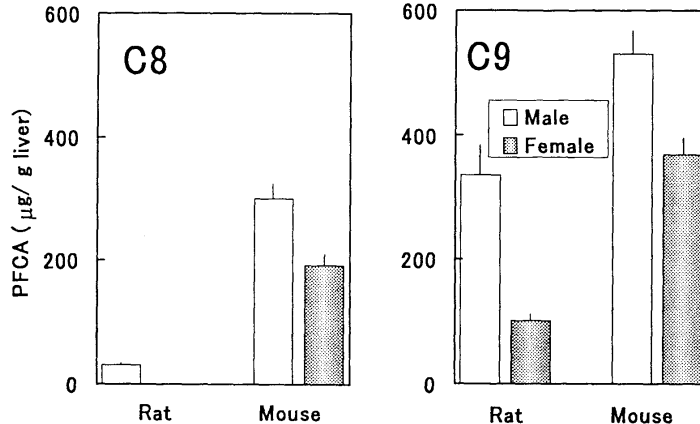
雌雄マウスにおける肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能を、炭素鎖長 6~9 の PFCA について比較した。マウスでも炭素鎖長の長い PFCA ほど肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能が強かった。ラットと異なり、炭素鎖長 6 のペルフルオロヘキサノ酸 (PFHepA) や PFHA でも誘導が認められた。PFCA による肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導は用量に依存していた。しかし、いずれの PFCA でも誘導に性差は認められなかった。肝臓における PFCA の残存量を検討したところ、PFCA の肝残存量は炭素鎖長が長いほど高かった。また、いずれの PFCA でも雄マウスのほうが雌マウスよりも高濃度の蓄積が認められた。ラットと同様に、肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能と肝臓の PFCA 濃度には、PFCA の炭素鎖長や性によらず高い正の相関が認められ、また、PFCA 濃度が 500 nmol/g liver で飽和を示した。マウスでは PFCA の肝残存量に性差が認められるものの、その差はラットほど大きくなかった。

肝臓における PFCA の残存量をラットとマウスで比較した(図 4)。その結果、マウスのほうがラットよりもすべての PFCA の残存性が高いことが判明した。

以上の結果をまとめると、マウスにおいても炭素鎖長の PFCA ほど肝臓への残存性が高いことが明らかとなった。マウス肝臓においても、PFCA の残存性には性差があり、雄の方が雌より高残存性を示すものの、その差はラットほど大きくないために、肝ペルオキシソーム 酸化活性の誘導能には明らかな差が認められない。ラットに比べてマウスではすべての PFCA の残存性が高いために、

炭素鎖長の短い PFCA も生体作用を示す。

図 4 Difference in PFCA accumulation between rats and mice.



Data represent hepatic concentrations of PFCA in rats and mice received daily injection of PFCA at a dose of 20 mg/ kg body weight for 5 days. Values are the means  $\pm$  SD for 4 animals.

## まとめ

PFCA はラット肝においてリン脂質合成酵素活性を変動させることにより、リン脂質の増加とオレイン酸の増加を引き起こすことが判明した。ラット、マウスともに炭素鎖長の長い PFCA ほど尿中から排泄されにくいいため、肝臓に高濃度蓄積し、強い作用を示すこと、ラットよりマウスに高い蓄積性を示すことが明らかとなった。

## 参考文献

- 1) Ubel, F.A., Sorenson, S.D. and Roach, D.E., Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 41, 584-589 (1980).
- 2) Kawashima, Y., Matsunaga, T., Uy-yu, N. and Kozuka, H., Biochem. Pharmacol., 42, 1921-1926 (1996).
- 3) Kawashima, Y., Uy-Yu, N. and Kozuka, H., Biochem. J. 261, 595-600 (1989).
- 4) Sohlenius, A.-K., Andersson, K. and DePierre, J.W., Biochem. J., 285, 779-783 (1992).
- 5) Kudo, N., Mizuguchi, H. and Kawashima, Y., Chemico-Biological Interactions, 118, 69-83 (1999).
- 6) Kudo, N., Bandai, N., Suzuki, E., Katakura, M. and Kawashima, Y., Chemico-Biological Interactions, 124, 119-132 (2000).
- 7) Kudo, N., Suzuki, E., Kohtarō Ohmori and Kawashima, Y., Chemico-Biological Interactions, in press.





# 原著論文要旨