

を示し、PFOA は $0.6\mu\text{m}$ と $4\mu\text{m}$ 付近にピークを持つ 2 山型を示した。福知山では、PFOS, PFOA とともに $0.6\mu\text{m}$ と $4\mu\text{m}$ 付近にピークを持つ 2 山型を示した。PFOS 及び PFOA の総濃度は、R171 では PFOS が $6.4\text{pg}/\text{m}^3$ で PFOA が $319\text{pg}/\text{m}^3$ 、福知山では PFOS が $2.2\text{pg}/\text{m}^3$ で PFOA が $15\text{pg}/\text{m}^3$ であった。R171 と福知山を比較した場合、特に R171 での PFOA 濃度が著しく高いという結果であった。

大気浮遊粉塵を粒度別に見た場合に健康影響が大きいとされる、粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の PFOS 及び PFOA 濃度の割合は、R171 では PFOS が 39% で PFOA が 28%、福知山では PFOS が 42% で PFOA が 34% であった。PFOA 濃度が特に高い R171 では、粒径 $4\mu\text{m}$ 付近で PFOS や PFOA 濃度が増加する傾向が見られた。このことは、発生源から排出された揮発性の高いフッ化ヘキサフルオロエチレンが、粒径 $4\mu\text{m}$ 付近の粗大粉塵の粒子に付着し、浮遊過程で PFOS, PFOA が生成される可能性が示唆された。

4. 南部地域における大気浮遊粉塵中の PFOS, PFOA 濃度

京都府南部の 10 地点で捕集した試料で、大気浮遊粉塵中の PFOS 及び PFOA を測定した。その結果を、図 6 に示した。大気吸引濃度で見た場合、PFOS は最低値が大山崎の $0.8\text{pg}/\text{m}^3$ で、最高値が宇治の $6.5\text{pg}/\text{m}^3$ であった。

これに対して PFOA は、最低値が田辺の $16.5\text{pg}/\text{m}^3$ で、最高値が国道 1 号線の $60.7\text{pg}/\text{m}^3$ であった。PFOS と PFOA を比較した場合、いずれの地点でも PFOS に比べて PFOA の濃度が約 10 倍高いという結果であった。

D. 考察

高速溶媒抽出装置で抽出し、固層カートリッジで濃縮後、LC/MS で大気浮遊粉塵中の PFOS 及び PFOA 分析法を開

発した。繰り返しの添加回収実験の結果は、個別に採取した試料で行ったにもかかわらず、PFOS と PFOA の回収率が 97.5% と 87.5% であり、変動係数も良好であった。本法は、抽出溶媒の使用量を低減し、人為的操作を最小限にしたために、分析誤差が少なく、操作も簡便でルーチン分析法に適している。

京都府の R171 と福知山の 2 箇所、大気浮遊粉塵中 PFOS と PFOA の年間変動及び粒度別濃度を調査した。その結果、これらの化合物は年間を通じて検出され、大気経路でも汚染が拡散していることが証明された。粒径が $2.5\mu\text{m}$ 以下の割合は、PFOS が約 40%、PFOA が約 30% と高い寄与率であることが判明した。これまでの分析例の中で、岩手県の大気浮遊粉塵中 PFOS と PFOA の濃度の幾何平均値は、PFOS が $1.2\text{pg}/\text{m}^3$ ($0.6\text{--}2.4\text{pg}/\text{m}^3$)、PFOA が $3.9\text{pg}/\text{m}^3$ ($3.2\text{--}5.2\text{pg}/\text{m}^3$) であったことが報告されている。

文献

- 1) K. J. Hansen, L. A. Clemen, M. E. Ellefson, H. O. Johnson : Compound-specific, Quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices, *Environ. Sci. Technol.* 35, 766-770 (2001)
- 2) J. P. Giesy, K. Kannan : Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife, *Environ. Sci. Technol.* 35, 1339-1342 (2001)
- 3) K. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J. F. Gorzelany, K. J. Hansen, P. D. Jones, E. Helle, M. Nyman, J. P. Giesy : Accumulation of

- perfluorooctane sulfonate in marine mammals, *Environ. Sci. Technol.* 35, 1593-1598 (2001)
- 4) N. Saito, K. Sasaki, K. Nakatome, K. Harada, T. Yoshinaga, A. Koizumi : Perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 45, 149 (2003)
- 5) C. Sottani, C. Minoia : Quantitative determination of perfluorooctanoic acid ammonium salt in human serum by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 650-654 (2002)
- 6) K. Kannan, J. W. Choi, N. Iseki, K. Senthilkumar, D. H. Kim, J. P. Giesy : Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea, *Chemosphere*, 49, 225231, (2002)
- 7) N. Saito, K. Harada, K. Inoue, K. Sasaki, T. Yoshinaga, A. Koizumi : Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan, *J. Occup. Health*, 46, 49-59 (2004)
- 8) Sasaki K, Harada K, Saito N, Tsutsui T, Nakanishi S, Tsuzuki H, Koizumi A (2003) Impact of airborne perfluorooctane sulfonate on the human body burden and the ecological system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 408-413
- 9) K. Harada, S. Nakanishi, N. Saito, T. Tsutsui, A. Koizumi : Airborn perfluorooctanoate may be a substantial source contamination in Kyoto area, Japan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74, 64-69 (2005)
- 10) 環境省環境保健部環境安全課編：化学物質と環境 平成 15 年度化学物質分析法開発調査報告書, 37-50 (2004)
- 11) K. Harada, N. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, S. Kamiyama, A. Koizumi : The influence of time, sex, and geographic factors of levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years, *J. Occup. Health*, 46, 141-147 (2004)
- 12) Harada K, Saito N, Sasaki K, Inoue K, Koizumi K, (2003) : Perfluorooctane sulfonate contamination of drinking water in the Tama River, Japan: Estimated effects on resident serum levels., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 31-36.

E. 結論

今回調査した、京都府南部の10地点の調査結果では、PFOSは岩手県と同じ濃度レベルであるが、PFOAは約10倍高い値で観測された。要因の解明を行うと共に、汚染防止に向けた検討が必要である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

齋藤憲光、佐々木和明、八重樫香 有

機フッ素系化合物による環境汚染と
その分析法 日本分析化学会 ぶん
せき 2005;6:299-307

2. 学会発表・その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 高速溶媒抽出条件

Instrument	:	DIONEX ASE-200	
Cell size	:	33	mL
Oven temperature	:	100	°C
Pressure	:	1,500	psi (=10.5MPa)
Static time	:	10	min
Flush volume	:	80	% of extraction cell volume
Solvent	:	methanol 100% solution	
Nitrogen purge	:	150	psi (=1MPa) for 120sec.
Extraction cycle	:	twice	

表2. LC/MSの分析条件

HPLC		MS	
Instrument	: Agilent 1100	Instrument	: Agilent 1100MSD SL
Column	: Zorbax XDB C-18(2.1x150mm)	Ionization	: ESI
Mobile phase ¹⁾	: A : CH ₃ CN B : 10mM CH ₃ COONH ₄ /H ₂ O 35 % A-(linear gradient 2 % A/min)-45 % A	Nebulizer	: N ₂ (50 psi)
Flow rate	: 0.2 mL/min.	Drying gas	: N ₂ (10.0L/min, 350°C)
Oven temp	: 40°C	Polarity	: Negative
Injection volume	: 10.0 μL	Fragmentor	: 100V(PFOA), 200V(PFOS)
		Vcap	: 4000V
		SIM(m/z)	: Q ₁ :499, Q ₂ :500, Q ₃ :99 (PFOS); Q ₁ :413, Q ₂ :369 (PFOA)

1) gradient: the proportion of A was 35% for the first 5 min; then increased to 45 % ;
then 45% A was maintained till 20 min.

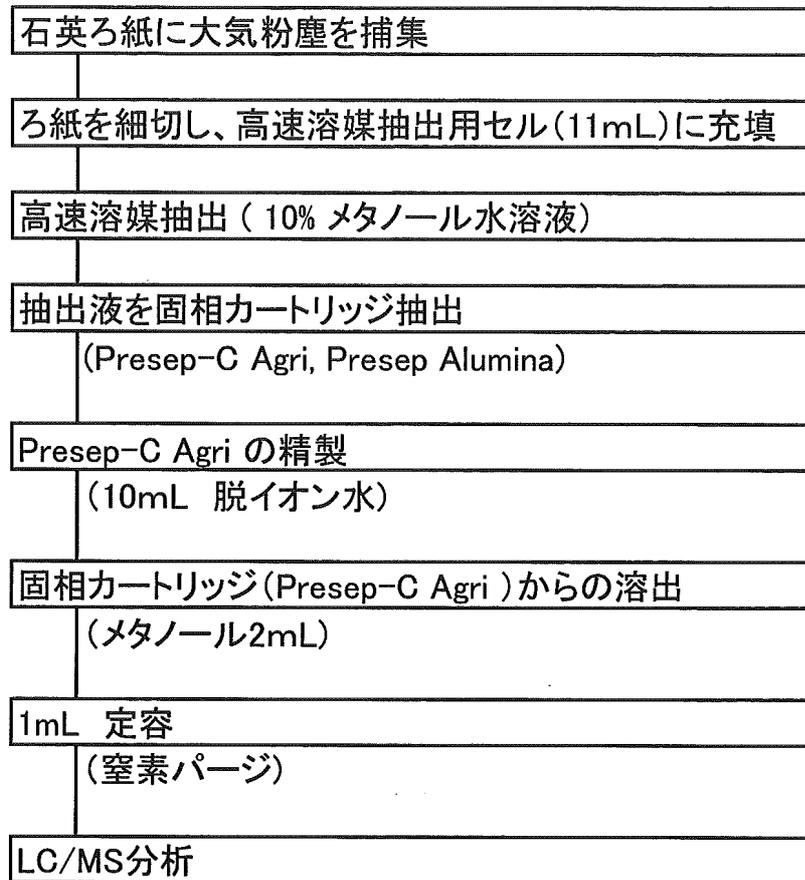


図1. 大気浮遊粉塵の分析操作フロー

R1-----国道 1 号線
 R24-----国道 24 号線
 R171---国道 171 号線

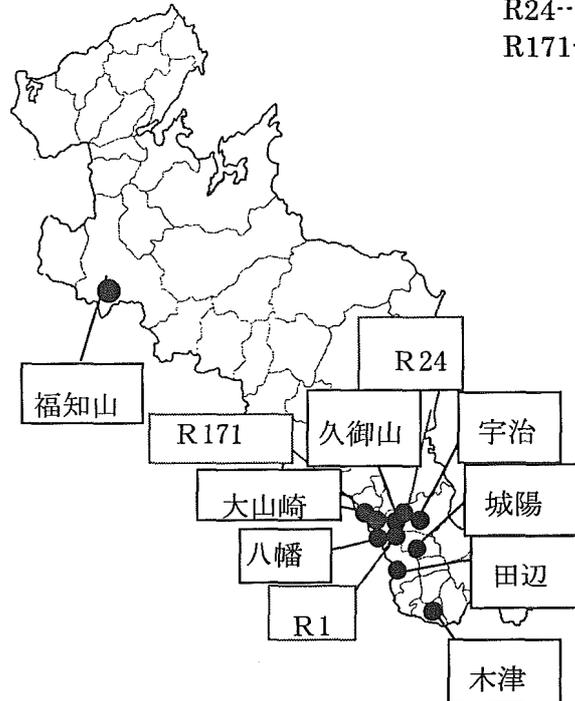


図2 京都府における大気浮遊粉塵のサンプリング地点

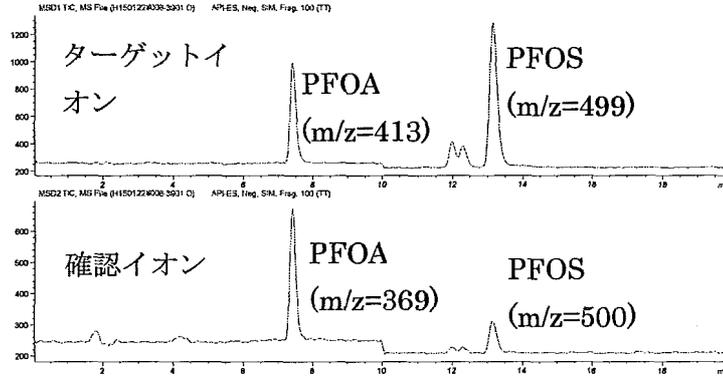


図3 PFOS PFOA LC/MS クロマトグラム

表 3. 石英ろ紙^{a)}に添加した PFOA 及び PFOS の回収結果

	PFOA ^{b)}		PFOS ^{b)}	
	Found (ng)	Recovery (%) ^{c)}	Found (ng)	Recovery (%) ^{c)}
	9.16	92	10.7	107
	9.36	94	9.34	93
	8.46	85	10.0	100
	8.68	87	8.90	89
	8.08	81	9.82	98
Mean	8.748	87.5	9.755	97.5
S. D. (n-1)	0.519	5.192	0.679	6.788
CV (%)	5.9	5.9	7.0	7.0

a) 石英ろ紙: ADVANTEC QR-100

b) PFOA 及び PFOS は各 10ng を添加

c) Recovery (%) = (Found) x100/10

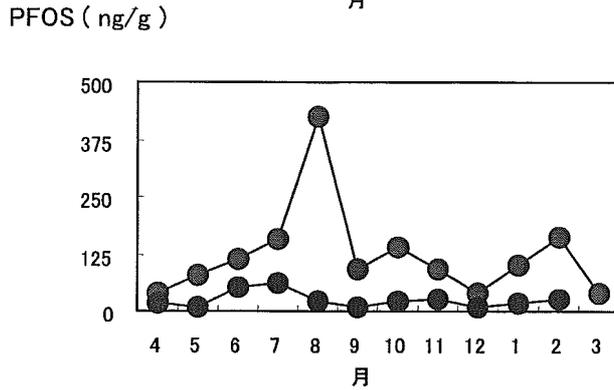
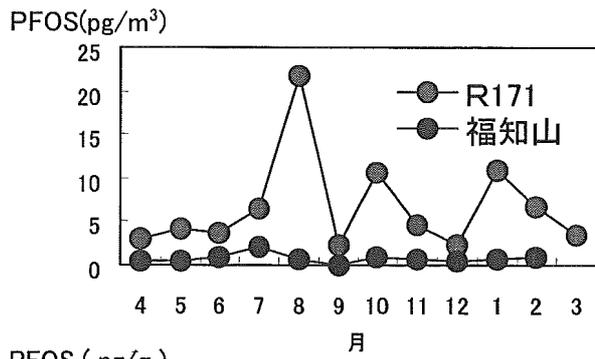


図4 PFOSの年間変動

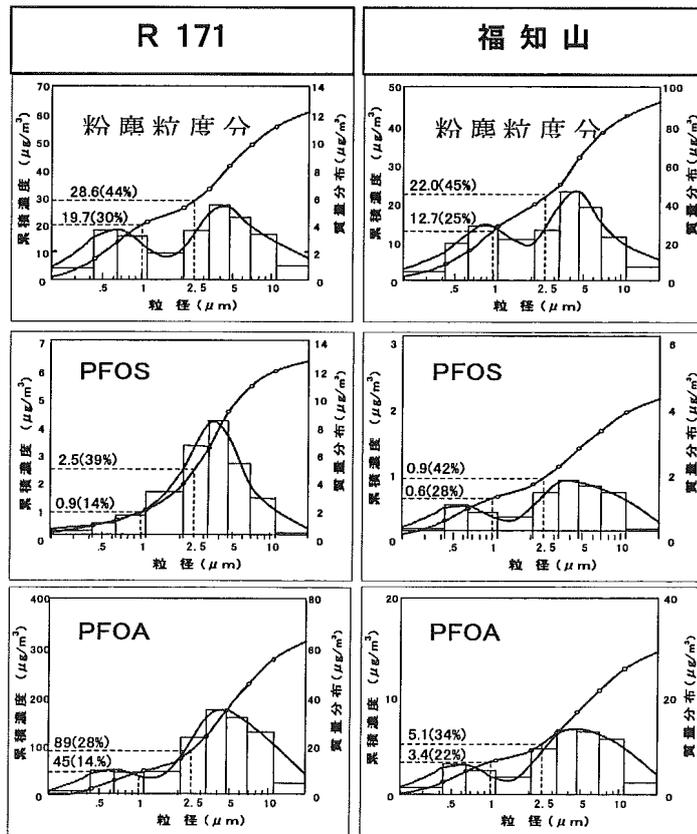


図5 大気浮遊粉塵の粒度分布及び粒度別PFOS・PFOA濃度

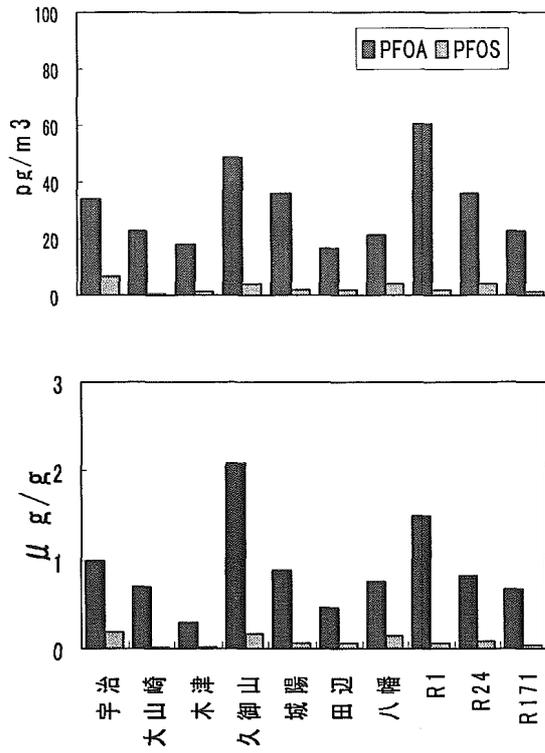


図6 地点別濃度

(上段:大気吸引濃度、下段:粉塵重量濃度)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

PFOS・PFOA の処理方法の検討

分担研究者 藤井 滋穂

京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 教授

研究要旨

本研究では、特性の異なる粒状活性炭による PFOS、PFOA の吸着除去特性を検討した。また、PFOS、PFOA の吸着に及ぼす溶存性有機物質（DOM）の影響を回分式実験により検討した。その結果、活性炭 F400 が Wako に比べてやや高い吸着性を示したが、活性炭の種類による差は、PFOS、PFOA ともにあまり大きくなく、DOM 共存下では活性炭による吸着効率が低下し、その影響は特に PFOS で顕著に現れたことなどが分かった。

A. 研究目的

本研究では、3種類の粒状活性炭による PFOS、PFOA の吸着特性を検討すると共に、PFOS、PFOA の活性炭吸着処理に及ぼす溶存性有機物質（DOM）の影響を回分式実験により検討することを主目的とした。

B. 実験の方法

実験に使用した粒状活性炭の概要を表 1 に示す。粒径はほぼ同じものを選択し、原材料は、木炭、木の実の殻、軟炭の 3 種類を使用した。これら活性炭は、不順物や細かな粒子を取り除くために超純水で洗浄された。その後、活性炭への初期吸着物質を取り除くため、24 時間超純水に浸した。そして、2 日間 105℃で乾燥させ、孔内の空気を抜くために実験の直前に 30 分間吸引脱気した。

PFOS ($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{SO}_3^-$, Wako 508-53921, perfluorooctane sulfonic acid potassium salt, 98%)、PFOA ($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6\text{COO}^-$, Wako163-09542,

perfluorooctanoic Acid, 95%) を、それぞれ超純水に溶かした。PFOS については 4 日間攪拌し溶解させたものを標準原液とし、液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS/MS、TSQ7000、ThermoQuest 社、トリプルステージ四重極型 MS/MS システム）の LC/MS モードで測定した。

PFOS、PFOA の測定条件を表 2 に示す。LC/MS のイオン化条件設定では、100 $\mu\text{g/L}$ の標準液を用いて、ESI Negative Ion 法により次の条件で測定した。移動相には、10mM 酢酸アンモニウムとメタノールを用いた。その他、キャピラリーチューブ温度、イオンソース電圧等の最適値を検討した。

100 $\mu\text{g/L}$ の PFOS、PFOA のクロマトグラムを図 1 に示す。リテンションタイムは、PFOS が約 6.7 分、PFOA が約 4.3 分であった。PFOS、PFOA の検量線を図 2 に示す。両物質とも 1 $\mu\text{g/L}$ ~ 100 $\mu\text{g/L}$ で線形を得た。

C. 活性炭による吸着回分実験

最初に対象物質溶液 (10 mL)、活性炭懸濁液+精製水 (合わせて 10 mL)、リン酸緩衝液 (0.061MKH₂PO₄、0.031MK₂HPO₄) (10 mL) 合計 30 mL を 60 mL 容量の PP 容器に入れ、恒温振とう器 (EYELA UNI Thermo shaker NTS-1300s) により、25°C、pH7.0、振とう速度 120 rpm の条件で実験を開始した。実験装置概要を図 3 に示す。PP 容器は各 Run で 5~16 本用意した。振とう開始後、一定間隔ごとにサンプルを採取し、ろ過後、活性炭乾燥重量、ろ液の PFOS、PFOA 濃度を HPLC/MS (UMA、TSQ7000) で測定した。

実験条件を表 3 に示す。Run1~4 は基本的な吸着実験を、Run5~8 は吸着平衡定数を得るための実験を、Run9~12 は吸着速度を求めるための実験である。

初期濃度約 1000 μg/L の PFOS、PFOA に関する Run1~2 の結果を図 4 に示す。PFOS、PFOA とも短時間で活性炭に吸着した。活性炭 2g/L 添加後 4 時間で PFOS で 93%、PFOA で 99% が吸着された。Run5~8 の 25°C における吸着等温線を図 5 に示す。活性炭 F400 が Wako に比べてやや高い吸着性を示したが、活性炭の種類による差は、PFOS、PFOA ともにあまり大きくなかった。

初期濃度 1000 μg/L、活性炭の添加量を約 0.2g/L とした場合の経時変化 (Run9-11) を図 6 に示す。PFOS の吸着速度が PFOA より速く活性炭による吸着量も PFOS の方が高かった。

D. 活性炭吸着に及ぼす共存物質の影響

実験条件を表 4 に示す。活性炭は F400 を選択し、有機物質としては、Wako のフミン酸を使用した。PFOS、PFOA の分析では固相抽出法 (Precep-C Agri) を用い、DOM 濃度は、溶存有機

炭素濃度 (DOC) として測定した。pH は 1mM リン酸緩衝液にて 7.3 とした。

初期濃度約 1 μg/L の PFOS、PFOA 溶液に、活性炭 (F400) 1g/L と Wako のフミン酸 8.7mg/L、16.8mg/L を添加した時の吸着特性の経時変化を図 7 に示す。PFOS、PFOA ともに 21 日後には 99.8% が吸着されたが、吸着速度に違いが見られた。PFOS の場合、8 時間後の除去率がフミン酸 16.8mg/L の系で 64.2% であるのに対して、フミン酸 8.7mg/L の系では、93.0% と高かった。その傾向は時間を経ても継続し、3 日後には 88.4% と 99.3% であった。一方で、PFOA の場合、8 時間後の除去率がフミン酸 16.8mg/L の系で 54.9%、フミン酸 8.7mg/L の系では 63.4% と差が小さかった。以上の結果から、DOM の存在は活性炭による PFOS、PFOA の処理効率に影響を及ぼすことが推測され、その影響は PFOS で顕著であることが示された。

E. 結論

本研究では、PFOS、PFOA の活性炭吸着処理に及ぼす活性炭の種類の影響および共存有機物質の影響を回分式実験により検討した。その結果、1) 活性炭 F400 が Wako に比べてやや高い吸着性を示したが、活性炭の種類による差は、PFOS、PFOA ともにあまり大きくなかったこと、2) DOM 共存下では活性炭による吸着効率が低下し、その影響は特に PFOS で顕著に現れたことが分かった。上水での PFOS、PFOA リスクを低減する際には、水中の DOM の存在を考慮した、最適な処理対策を検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

QIU Y, FUJII S, TANAKA S, LIEN NPH, KOIZUMI A. Removal Characteristics of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctane Acid by Granular Activated Carbon Adsorption. *Environmental Engineering*. 2005;14:89-97.

2. 学会発表・その他

1) Yong QIU, Shigeo FUJII, Shuhei TANAKA, Nguyen Pham Hong LIEN and Akio KOIZUMI, Removal Characteristics of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctane Acid by Granular Activated Carbon Adsorption, Proceedings of 14th KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, vol.14, p.89-97, 2005年6月, Cheju, Korea
 2) Nguyen Pham Hong Lien, Shigeo FUJII, Shuhei TANAKA, Hiroaki TANAKA, Ryoji NAGAO and Binaya R. Shivakoti, PFOS and PFOA contamination of surface water in the Yodo River Basin, 日本水環境学会シンポジウム講演集, vol.8, pp.65-66, 2005年9月, 龍谷大学
 3) Shuhei TANAKA, Shigeo FUJII, Yong QIU, NGUYEN Pham Hong Lien and Binaya R. SHIVAKOTI, Study on Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid Contamination in the Yodo River Basin and its Proposed Measures,

Proceedings of The 9th-10th Joint Seminar of JSPS-MOE Core University Program on Urban Environment, vol.9,10, p.61-67, 2005年10月, Kunming, China

4) Yong QIU, Shigeo FUJII, Shuhei TANAKA and Akio KOIZUMI, Multi-component adsorption of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctane acid and humic substances by granular activated carbon, 日本水環境学会関西支部研究発表会講演集, vol.5, p.38-39, 2005年11月, 京都

5) Pham Hong Lien NGUYEN, Shigeo FUJII, Shuhei TANAKA, Munehiro NOZOE, Wanpen WIROJANAGUD and Ann ANTON, PFOS and PFOA contamination surveys of surface waters in South-Asian countries, 日本水環境学会関西支部研究発表会講演集, vol.5, p.20-21, 2005年11月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 実験で使用した活性炭の概要

名称	粒径(mm)	原材料	販売元
1 Wako	0.50~2.00	木炭	Wako Pure Chemical Industries Ltd.
2 W10-35	0.43~1.70	木の実の殻	Mitsubishi Chemical Corporation
3 F400	0.43~1.70	軟炭	

表2 測定条件一覧

HP LC	システム		Ultra Microprotein Analyzer	
	カラム	種類	Agilent Zorbax XDB C-18	
		径(mm)	2.1	
		長さ(mm)	150	
		温度(°C)	室温	
	流量(μL/min)		100	
	インジェクション量(μL)		20	
	移動相	種類	A: 10mMCH ₃ COONH ₄	B: CH ₃ CN
	グラジエント*	0-1分	50	50
		1→7分	50→0	50→100
MS	マススペクトル		TSQ7000	
	イオンソース		ESI	
	モード		SIM	
	乾燥ガス温度(°C)		175	
	極性モード		Negative	
	イオンソース電圧(V)		-4200	
	リテンションタイム(min)		PFOS 約6.7分, PFOA 約4.3分*	
	m/z		PFOS 499, PFOA 413	

表3 実験条件

	対象物質	初期濃度 (mg/L)	活性炭	粒径 (mm)	容量 (mL)	活性炭添加濃度 (g/L)	サンプリング時間(hour)
Run1	PFOS	1	Wako	0.5~2.0	20	0.4, 1.5, 5, 32	4, 10, 24, 48
Run2	PFOA					0.4, 2.0, 5, 32	
Run3	PFOS					0.1, 0.5, 5, 7	
Run4	PFOA					0.2, 0.6, 2, 6	
Run5	PFOS	1, 50	F400	0.4~1.7	40	0.1, 0.3, 1, 2.6	7
Run6	PFOA		7				
Run7	PFOS		W1030				7
Run8	PFOA		0.1, 0.2, 1, 2.5				7
Run9	PFOS	1	F400	0.4~1.7	500	0.2	0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 3, 5.5, 9
Run10	PFOA						1.5, 2, 3, 5.5, 9
Run11	PFOS,PFOA						0.5, 2, 3, 5, 9
Run12	PFOS						0.1

表4 実験条件

	初期濃度			サンプリング時間 日
	PFOS,PFOA μg/L	DOM mg/L	GAC g/L	
Run13	1	8.7	1	0.3, 1.7, 3.3, 5.8, 9, 21
Run14		16.8		0.3, 1.7, 3.3, 5.8, 9, 21

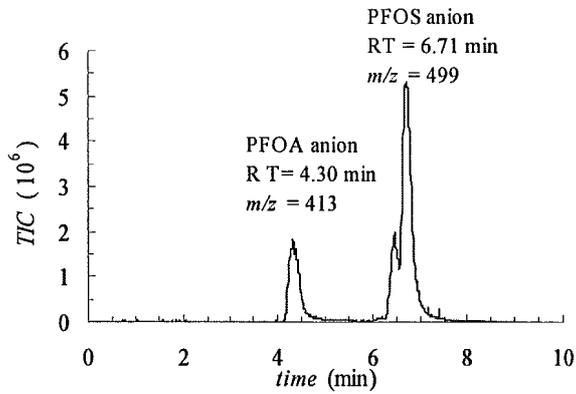


図1 PFOS、PFOA(100 μg/L)のクロマトグラム(HPLC/MC使用)

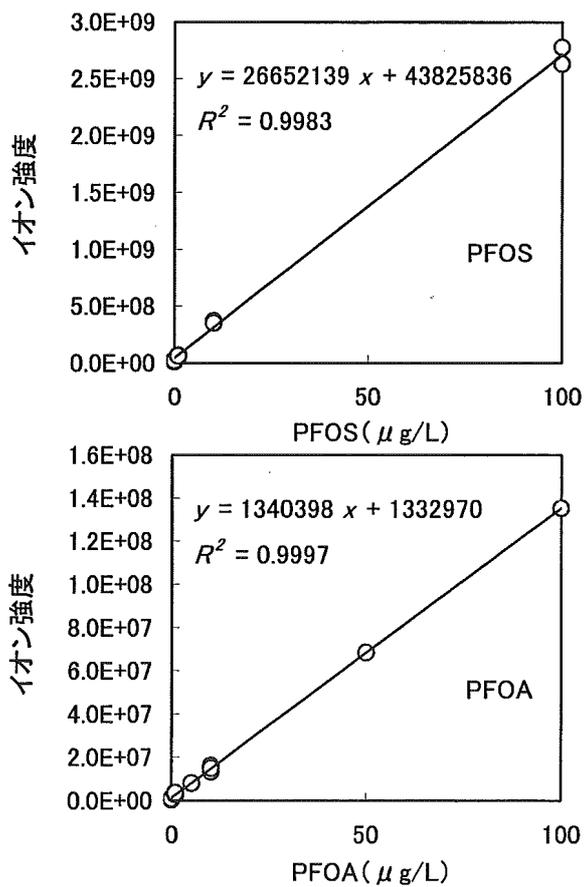


図2 PFOS、PFOAの検量線(HPLC/MC使用)

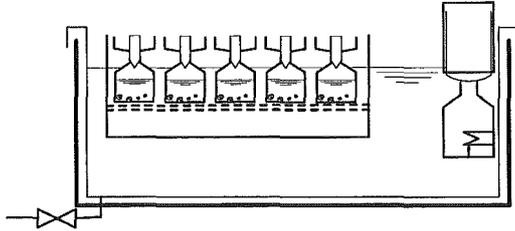


図3 吸着回分実験の概要

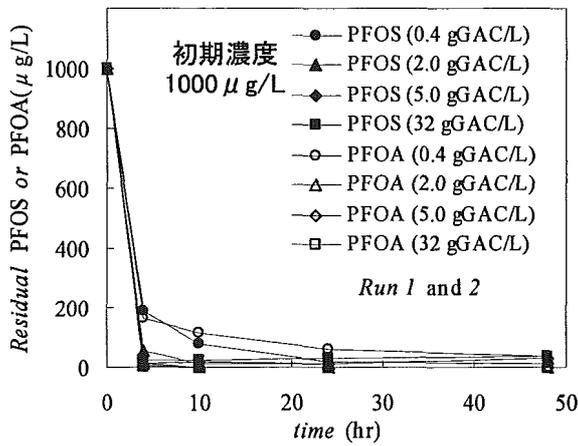


図4 活性炭添加後のPFOS、PFOA濃度の経時変化(HPLC/MS使用)

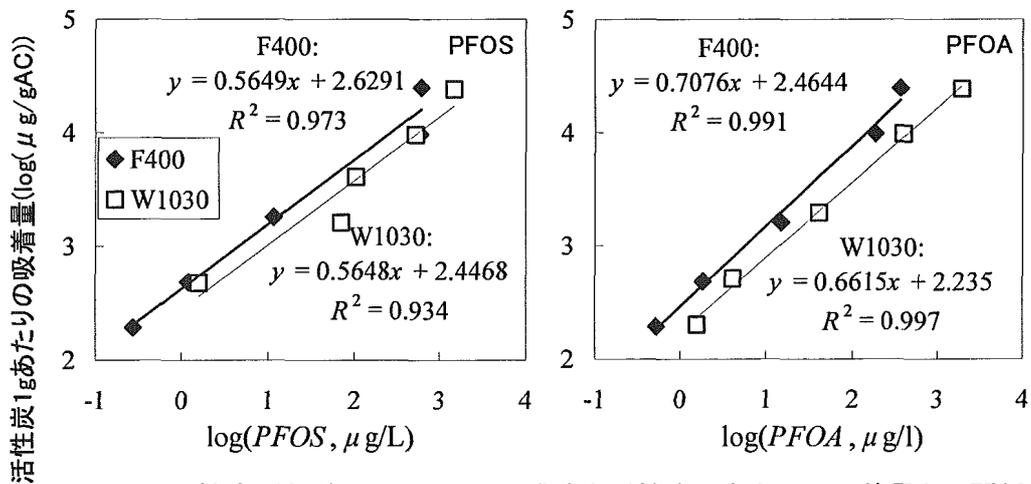


図5 活性炭添加後のPFOS,PFOA濃度と活性炭1gあたりの吸着量との関係

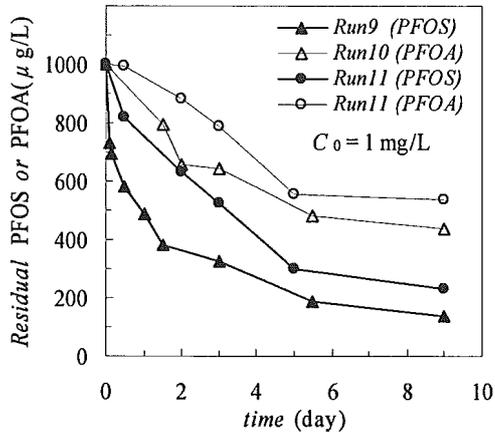


図6 初期濃度1000 µg/L、活性炭の添加量を約0.2g/Lとした場合のPFOS、PFOA濃度の経時変化

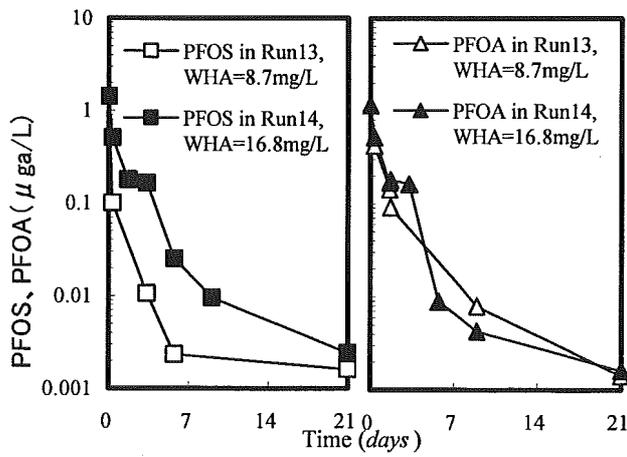


図7 初期濃度1 µg/L、活性炭の添加量を約1g/L、DOM添加時のPFOS、PFOA濃度の経時変化

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

難分解性化学物質 PFOS (Perfluorooctane sulfonate) が
ラット小脳プルキンエ細胞の活動電位に及ぼす影響に関する研究

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授
研究協力者 原田浩二 京都大学大学院博士課程

研究要旨

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) はその構造から、化学的に安定で、環境中で分解されにくい。近年、野生生物体内での蓄積が報告され注目を集めており、またストックホルム条約の新規難分解性汚染物質 (POPs) としての検討が開始されている。米国をはじめ、日本でもヒト血清中から検出されており、その健康影響について懸念されている。PFOS が心室筋 Ca イオンチャンネルに作用することが知られており、本研究では、PFOS が、神経細胞に及ぼす影響について検討した。活動電位は PFOS により有意に頻度が減少することがパッチクランプ法により示され、この影響はカルシウムイオンチャンネル阻害剤であるカドミウムの存在下でも持続した。本研究によって PFOS が神経細胞にも作用し、またカルシウムイオンチャンネル以外の経路も存在することが示唆され、きわめて重要な所見である。

A. 研究背景・目的

近年、注目されている難分解性化学物質のひとつに Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) がある。この物質はその構造から自然界や生体内で代謝されにくい性質を持つ。PFOS は野生生物の血液や肝臓などから検出されているほか、ヒトの血液中にもその存在が確認されている (Giesy and Kannan 2001; Harada et al. 2004)。有害性についての研究も進みつつあり、それらの点で新規 POPs の候補の一つとして挙げられている。しかし、その毒性メカニズムについては未知な部分が多い。我々は PFOS および PFOA がモルモット心室筋単離細胞を用いたパッチクランプ法により、カルシウムイオンチャンネルの電流とその

動態を変化させることを明らかにした (Harada et al. 2005)。その作用メカニズムは細胞膜の電荷状態の変化を伴うものと推測されており、心室筋のほかの器官にも作用することが予想された。イオンチャンネルが重要な役割を持つ器官は数多くあるが、その影響の重要性の観点から、中枢神経への影響について明らかにする必要があると考えられた。本研究においてはパッチクランプ法を用いることで、PFOS がラットの脳プルキンエニューロンの電気活動に及ぼす影響について検討を行った。

B. 研究方法

本研究では、ラット胎仔小脳を単離培養 2 週間目の細胞を使用した。電極

内液はカリウムグルコン酸溶液、外液は人工脳脊髄液とした。チャンバー温度は35°Cに保った。電流固定法で活動電位を計測した。

C. 研究結果

Whole cell current patch clampのもとで、PFOSが活動電位に及ぼす影響を評価した。PFOS(10、100 microM)は濃度依存的に静止膜電位を過分極側にシフトさせた(それぞれコントロールと比較して5、7 mV;いずれも $p < 0.05$)。またPFOS(30 microM)は0.2 nAの電流注入し、400m secにおける活動電位発火頻度を減少させた(コントロール(3.7)と比較しての5.1; $p < 0.05$)。心室筋における研究ではカルシウム電流に対する影響が示されていたため、カルシウムイオンチャンネル阻害剤(Cd 100 microM)の共存下でPFOSの作用に影響するかを評価した。PFOSの作用は100 microM カドミウムの下でも観察された。

D. 考察

以上からPFOSがラット小脳プルキンエニューロンの活動電位に影響を与えることが示され、これによる毒性作用が引き起こされる可能性が示唆された。PFOSはまたカルシウムチャンネル以外のイオンチャンネルにも作用していると考えられた。特定のイオンチャンネル蛋白への作用よりも、細胞膜の電荷への影響を介していることから、電位依存性イオンチャンネル全般への影響を示唆する所見と考えられた。この点はParameciumに対するスクリーニングの結果、多くのフッ素系両親媒性物質がイオンチャンネル関連行動を攪乱したことからも支持される(Matsubara et al. 2006)。今回は

活動電位への作用が明らかにされたが、個別のイオンチャンネル電流の解析を行う必要性があり、特に今回の細胞への影響に関わるイオンチャンネルを同定すること、個体に及ぼす影響との関連の検討が次の課題と考えられる。またPFOAの影響も検討する必要があると考えられる。

E. 結語

本研究ではPFOSが培養ラット小脳プルキンエ細胞に電気生理学的影響として、活動電位頻度の減少を引き起こすことが示された。この影響はカルシウムイオンチャンネル阻害剤とは独立して起こることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

学会発表・その他

2006年3月 Society of Toxicology 45th Annual Meeting March 5-9, 2006, San Diego Convention Center in San Diego. Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on action potential in rat cerebellar purkinje neuron.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

- Giesy JP, Kannan K. 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol* 35(7):1339-1342.
- Harada K, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Watanabe T, Sasaki S, et al. 2004. The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years. *J Occup Health* 46(2):141-147.
- Harada K, Xu F, Ono K, Iijima T, Koizumi A. 2005. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca(2+) currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329(2):487-494.
- Matsubara E, Harada K, Inoue K, Koizumi A. 2006. Effects of perfluorinated amphiphiles on backward swimming in *Paramecium caudatum*. *Biochem Biophys Res Commun* 339(2):554-561.

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

難分解性化学物質 Perfluorooctane sulfonate (PFOS) が
Paramecium caudatum の K⁺誘導性後退泳動時間に及ぼす影響に関する研究

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授
研究協力者 原田浩二 京都大学大学院博士課程
研究協力者 松原英理子 京都大学大学院修士課程

研究要旨

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) 及び、Perfluorooctanic acid (PFOA) はその構造から、非常に安定で、環境中で分解されにくい。近年、野生生物体内での蓄積が報告されるようになり注目を集めている。人においても血清中から検出されており、その影響について懸念されている。しかし、その毒性については未知なところが多い。本研究では、*Paramecium caudatum* を PFOS・PFOA の毒性スクリーニングに用いることができないか検討すると共に、PFOS・PFOA が、K⁺誘導性後退泳動に及ぼす影響について検討した。*P. caudatum* は繊毛に電位依存性 Ca チャンネルを持ち、泳ぐ方向、時間からそのチャンネルの動きを知ることができる。本研究によって PFOS・PFOA が K⁺誘導性後退泳動継続時間を延長させることが始めて明らかとなった。この結果は、PFOS・PFOA が Ca チャンネルに影響を及ぼしている可能性を示すもので、きわめて重要な所見である。また、本研究により PFOS・PFOA の毒性スクリーニングに *P. caudatum* が有用であることが示された。

A. 研究背景・目的

近年、注目されている難分解性化学物質のひとつに Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) がある。これはその構造から自然界や生体内で代謝されにくい性質を持つ。PFOS は野生生物の血液や肝臓などから検出されているほか、ヒトの血液中にもその存在が確認されている(1)。しかし、その毒性については未知な部分が多い。*P. caudatum* の行動はその細胞膜の電氣的制御によって決定されている。*P. caudatum* を K⁺の豊富な溶液に入れると、後退泳動が観察されることが知られており、膜の興奮性を調べる方法として使用されている。さらに、この

後退泳動は、Ca²⁺コンダクタンスの上昇によることが報告されている(2)。PFOS は界面活性化作用を持つことから、細胞膜が毒性ターゲット候補として考えられる。本研究においては *P. caudatum* を用いることで、PFOS・PFOA が細胞膜に及ぼす影響についてスクリーニングすることができないか、K⁺誘導性後退泳動継続時間を指標に検討した。

B. 研究方法

本研究では、培養 4 日目の *Paramecium caudatum* (KNZ82) を使用した。*P. caudatum* はバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) を接種した、

0.5% WGP (Wheat Grass Powder) 抽出液に stigmasterol (0.5mg/litter) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.5g/litter) を添加した培養液で培養・飼育した。

P. caudatum を "reference" 液 (KCl, 1mM; CaCl_2 , 1mM; Tris-HCl buffer, 1mM; pH7.2) に 30 分漬けた後、"K⁺-rich" 液 (KCl, 20mM; CaCl_2 , 1mM; Tris-HCl buffer, 1mM; pH7.2) に入れると、K⁺誘導性の後退泳動が観察される (3)。本研究は、PFOS、およびその関連物質 PFOA が *P. caudatum* の K⁺誘導性後退泳動継続時間に影響を及ぼすかについて観察した。*P. caudatum* の後退泳動は、脱分極性の刺激を受容すると、電位依存性 Ca チャネルから繊毛細胞内に Ca^{2+} が流入することにより、繊毛の打ち方が逆転することに起因する (2, 4) ことが知られている。さらに、界面活性剤である、Nonafluoro-1-*l*-butane sulfonate potassium salt (PFBS), Perfluorononanoic acid (PFNA), nonadecafluorodecanoic acid (PFDA), 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-Tetrahydro-perfluorooctane sulfonate sodium salt (THPFOS), dodecafluorosuberic acid (PFODa), hexadecafluorosebacic acid (PFDDa), sodium *n*-caprylate (OA), 1-octanesulfonic acid sodium salt (OS), 1-decanesulfonic acid sodium salt (DeS), sodium laurate (DoDA), 1-dodecanesulfonic acid sodium salt (DoDS), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Lauric acid sodium salt, Dodecyl trimethyl amine ammonium (DDTMA), [(heptadecafluoro-1-octanesulfonamide)propyl]trimethyl ammonium iodide (FOSAPrTMA), Polyoxyethylene sorbitan monouralate (TW-20) についても、同

様に検討した。使用した試薬の構造式を図 8 に示す。培養 4 日目 (log 期後半から stationary 期前半) の

P. caudatum を "reference" 液に 30 分漬けた後、"K⁺-rich" 液 (コントロール群)、PFOS を含む "K⁺-rich" 液 (PFOS 群)、PFOA を含む "K⁺-rich" 液 (PFOA 群)、PFNA を含む "K⁺-rich" 液 (PFNA 群)、PFDA を含む "K⁺-rich" 液 (PFDA 群)、THPFOS を含む "K⁺-rich" 液 (THPFOS 群)、PFODa を含む "K⁺-rich" 液 (PFODa 群)、PFDDa を含む "K⁺-rich" 液 (PFDDa 群)、OA を含む "K⁺-rich" 液 (OA 群)、OS を含む "K⁺-rich" 液 (OS 群)、DeS を含む "K⁺-rich" 液 (DeS 群)、DoDA を含む "K⁺-rich" 液 (DoDA 群)、DoDS を含む "K⁺-rich" 液 (DoDS 群)、SDS を含む "K⁺-rich" 液 (SDS 群)、DDTMA を含む "K⁺-rich" 液 (DDTMA 群)、FOSAPrTMA を含む "K⁺-rich" 液 (FOSAPrTMA 群)、TW-20 を含む "K⁺-rich" 液 (TW-20 群) に入れ、それぞれにおいて後退泳動継続時間を実体顕微鏡下で測定し記録した。さらに、*P. caudatum* 後退泳動は Ca チャネルと大きく関わっていることが知られることから、Ca チャネル拮抗剤である Cd (250 μM) 及びニフェジピン (500 μM) を用いて、PFOS との相互作用を検討した。測定した結果は、コントロール群と比較するとともに、濃度-反応性の有無を調べた。統計処理には、統計ソフト JMP を用いた。ANOVA 検定で $p < 0.05$ であった群について Dunnett's test または Williams' test により検討した。

C. 研究結果

PFOS 群において、*P. caudatum* の後退泳動継続時間 (mean \pm S.D. sec) はコントロール群 (25.5 \pm 1.6 sec) と比較して有意に延長した (5 μM ; 59.5 \pm 7.5, 19.0 μM ; 162.4 \pm 64.3, 47.5 μM

M; 366.6 ± 72.4)。さらに、後退泳動時間延長は濃度依存的であった。また、高濃度の PFOS (100 μM) を含む "K⁺-rich" 液では、後退泳動中に死亡してしまっただ。PFOA 群においても、コントロール群と比較して後退泳動継続時間が延長 (115.0 μM; 87.2 ± 28.6) し、濃度-反応性も認められた。しかし、同濃度の PFOS を含む "K⁺-rich" 液と比較すると、その影響は小さく、これら 2 つの物質には違いが認められた。陰イオン性界面活性剤である、SDS 群 (10.0 μM; 131.5 ± 37.6, 35.0 μM; 371.2 ± 69.3)、DoDA 群 (100.0 μM; 60.5 ± 24.8)、また炭素鎖長が PFOS と異なる PFBS 群 (100.0 μM; 27.0 ± 3.85)、PFOA と異なる PFNA 群 (50.0 μM; 87.0 ± 8.67)、PFDA 群 (50 μM; 158.2 ± 10.26) においてもコントロール群と比較して後退泳動時間の延長が認められた。その影響は、いずれも炭素鎖長の増加にともない後退泳動を延長させた (図 1)。

さらに炭素鎖がフッ素化していない物質である OA 群、OS 群、DeS 群、DoDS 群においては DeS 群、DoDS 群で有意に後退泳動を延長させた (図 2)。そして炭素鎖長は同じであるが分子中のフッ素数が異なる OA 群、THPFOS 群、PFOS 群で比較したところフッ素数が多い群ほど後退泳動を延長させた (図 3)。また、有意に後退泳動継続時間が延長した PFOS 群に Cd²⁺ (250 μM) またはニフェジピン (500 μM) を加えると、後退泳動時間は短縮した (118.3 ± 30.9) (図 4)。

陽イオン性界面活性剤である DDTMA 群、FOSAPrTMA 群においては、これまでの物質とは対照的に、コントロール群と比較して後退泳動時間を有意に短縮した (DDTMA 0.5 μM; 17.7 ± 3.7, FOSAPrTMA 10 μM; 11.2 ± 3.9) (図 5

A, B)。中性界面活性剤 TW-20 群では後退泳動に有意な差は認められなかった (図 5 C)。また分子の両端がカルボキシル基である PFOdA 群及び PFDdA 群においては後退泳動の延長は見られずコントロール群に対して有意な差は認められなかった (図 6)。

最後に各物質の臨界ミセル濃度 (CMC: critical micelle concentration) と陰イオン性界面活性剤による後退泳動継続時間との関係を表すと逆相関的な関係をとった (図 7)。

D. 考察

本研究において PFOS・PFOA が *P. caudatum* の後退泳動時間を延長させることが分かった。さらに、その影響の大きさは濃度依存的に増加した。まず PFOS と PFOA は類似した構造を持つ物質であるが、*P. caudatum* 後退泳動時間に及ぼす影響が異なったのは、その親水部構造の違いが原因ではないかと考えられる。PFOS・PFOA と同様、陰イオン性界面活性剤である DoDA 群・DoDS 群は *P. caudatum* 後退泳動を延長した点では一致するがその効果は DoDS > DoDA であった。この物質はきわめて類似した構造を持っているが、親水部が異なる。

PFOS と PFBS、PFOA と PFNA または PFDA のように炭素鎖長が異なり親水部と炭素鎖のフッ素化の有無に関わらない群同士を比較すると炭素鎖長の増加にともなって後退泳動継続時間が延長した。フッ素化数が異なる OS 群、THPFOS 群、PFOS 群を比較するとフッ素化数の増加にともなって後退泳動継続時間がより延長したことが確認できた。

P. caudatum の後退泳動は、脱分極刺激により、電位依存性 Ca チャネルが開いて Ca イオンが繊毛内に流入するこ