

3月23日 14:45-16:15

Symposium Session:

SETAC-SOT Session: Environmental Risk Assessment of PFAS

Abstract No.1268

Current Knowledge on Human Health Effects of Per and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS), and Tools for Moving Forward (現在のPFASによる人の健康影響、評価方法)

Dr. Carla Ng, Civil and Environmental Engineering, Environmental and Occupational Health, University of Pittsburgh,

Slide 1-4

PFASによる汚染は広がっている。人、ペット、水道水からもPFASは検出されているが、PFASのほとんどについて情報がまったく不足しているため、検出された濃度が健康にどのような影響があるのか、予想することができない。

人への健康影響についてわかっていることは何か、NIHのDr. Sue FentonらとPFASの影響についてレビューしたところ、衝撃的だったのは、PFASの健康影響が非常に広範なことである。人を対象とした研究と動物実験の結果から、PFAS暴露は免疫機能を低下させるという明確な科学的証拠がある。そして一般に科学者は、このPFAS独特の免疫毒性がPFASの人への毒性に含まれるべきであることに同意している。しばしば、PFASによる免疫システムへの影響は非常に低濃度でも起こりうる。

Slide 5, 6

PFASが人の甲状腺ホルモンと親和的に作用してその働きを変化させ、甲状腺の自己免疫機能に影響を与えうることは知られている。さらに、動物実験の結果と人のデータ解析により、PFASが肝臓の代謝機能を乱し、脂肪蓄積を引き起こし初期脂肪肝と関連していることがわかってきた。もっと懸念されるのは、動物実験の結果から、このような肝臓のダメージは比較的低い濃度でも起こりうることで、最近市場に出てきたPFASの代替品である短鎖のPFAS、GenXでも起こりうることであり、代替品だから「より安全」ということにはならない

のである。また、PFAS は慢性的な腎臓病や腎臓癌の原因になりうるという証拠も増えている。動物実験では、PFOA とその代替品である GenX への慢性的な暴露は肝臓、すい臓、腎臓の癌の原因となる可能性がある。

#### Slide 7

人の健康影響について、すでに分かっていること：

もう一つの重要な PFAS の要素は、受精、妊娠、小児の発達に有害な影響がある、ということである。次世代への影響には、乳腺発達の遅れ、ワクチンに対する反応の低下、低出生体重、肥満、思春期の早期化、流産の増加、精子数の減少、精子の動きの劣化、妊娠中の高血圧、子癇前症の増加（血流増加による）などがある。このような影響を持つ原因は、PFAS がキーとなる生物学的なバリアーを透過するからである。胎盤や脳血管バリアーも含まれる。左の図は、代表的な短鎖の PFAS である PFHxA(C6)が、母体血から AF (amniotic fluid = 羊水) へと移行していることを示している。

#### Slide 8

わかっていないこと

PFAS の健康影響については、わかっていることは少なく、明らかになっていることはほとんどない。

図は、Yeung & Mabury の 2016 年の論文から参照している。この論文では、中国とドイツの人の血中 PFAS が分析されている。この図は中国の都市のデータである。右端の黒い色の部分が、PFAS だが特定されていない種類である。現在、新しい PFAS 類（例えば GenX など）が生産されているが、それらによる健康影響は、これまでに報告されている影響と同様なのだろうか。今起こっている暴露による健康影響はどのように評価できるのか。また、限られた資源を広範な PFAS 汚染にどのように注力すべきなのか。

#### Slide 9

PFAS の人への毒性を評価する戦略

データの種類：

- 疫学調査のデータ

- 暴露濃度の高い集団（職業暴露、暴露濃度の高い地域など）
- 国による生体モニタリング（NHANES など）
- 動物モデル（in vivo）
- In vitro assay（動物を使わなくて済むし、ハイスループットに使える）
- コンピューターモデル（"in silico"）

主な課題：

- 疫学調査は、調整ができない実験なので暴露と結果の因果関係がつかめない
  - 複数の物質への暴露が同時に起こっている
  - どの程度の濃度で暴露されているかがわからない
  - 高濃度に暴露されている集団がさまざまである
  - 一方で、疫学調査は、現実に行っている暴露状況（集団や物質、濃度）を推測できるというメリットがある
- 動物実験の課題は、PFAS の種類によって Toxicokinetics（薬物動態＝生体内での吸収、代謝、代謝物の組織への分布、体外への排出）と Toxicodynamics（物質と標的部位との相互作用、毒性影響をもたらす一連の反応）が様々に異なるので、どの動物でも良い、というわけではない。PFAS の種類ごとに、適した動物を使わなければならない、という点である。
- In vitro では、多くのデータが得られるが、それがどういう意味があるのかを評価しなければならない。効果的な In vitro-In vivo extrapolation（IVIVE= In vitro データの vivo への外挿）が必要である。ペトリ皿で得たデータを、生物にどうあてはめられるか、である。
- コンピューターモデルは、最近急速にアプローチ方法が洗練されてきている。しかしそれらの新しいアプローチも正しく評価されなければならない。そのため、実際の実験データなしに、コンピューターだけで毒性を評価することはできないのである。

## Slide 10

In Vitro と In Silico のアプローチは PFAS の挙動と影響を理解するのに役立つ

生物を、最も重要なカギとなる反応を特定するため、組織、細胞、分子レベルまで分解する必要がある。毒性影響、生体内の薬物動態を知る上で鍵となる組織、

細胞、分子を見るシステムが欲しい。そして、その分子レベルの動きを生物全体への影響として把握したい。

#### Slide 11

私の研究室では、**In Vitro** と **In Silico** のアプローチモデルを使って、**PFAS** がどのように細胞に入り、出ていくのか、細胞の内側、外側でどう蓄積していくかを見た。そして **PFAS** が細胞の内外でどのようにたんぱく質と反応するのか、膜透過性を調べた。これは、どの **PFAS** がどの程度の濃度、速さで、どの組織の細胞の細胞膜を通過して蓄積するのか、しないのかを知るうえで非常に重要である。

#### Slide 12

そのようなアプローチを成功させるためには何が必要か。

まずは動物の全体を対象に **PBPK/PBTK** (生理学的薬物毒物動態学) モデルを使う。動物を構成する組織それぞれを対象に、**PFAS** がどのように細胞から組織へ移動し、蓄積していくのかを予想する。この方法は **PFAS** が細胞レベルでどう移動し蓄積するのかを予想するのに役立つが、そのためには膨大な量のデータ (生理学的、化学的に特化したデータ) のパラメーター化が必要である。そこで、オスのラットと **PFOA** を使ってデモンストレーション的なモデルを使って明らかにした。ラットについては生理学的なデータが数多くあり、**PFOA** については化学的なデータが豊富にあるからである。

#### Slide 13

そのようなパラメーター化されたデータがあれば、異なる濃度、異なる暴露経路による **In vivo** の行動を再現することが可能である。ただし、このデータはほとんどの **PFAS** と他の生物には使えない。ではどうすればよいのか。

#### Slide 14-17

以前考えられていたよりも、多くの **PFAS** に関するデータが利用できることがわかってきた。**OECD** の 2018 年のデータセットより、**PFAS** 以外の物質のデータソースから、マシンラーニングによって **PFAS** の生物活性を分類することが

可能である。このような分類から、より問題のある **PFAS** を特定することが可能になるかもしれない。

#### Slide 18

**PFAS** の動態と効果をパラメーター化するためのシミュレーション

**Molecular Dynamics (MD)**法 (分子動力学法 = 原子、分子の物理的な動きのコンピュータシミュレーション手法) : タンパク質と **PFAS** の相互作用をコンピュータでスクリーニングする

フレームワークは、まず興味のあるたんぱく質の構造を見つけ、**PFAS** 類の中から興味のあるものを選んでそれらを分子的にくっつけ、それを **MD** 法で **free energy of binding** を計算する。その結果、これらの分子の結合の強さがわかる。ここでは、肝臓の脂肪酸結合たんぱく質 (**L-FABP**) を例にしている。**PFAS** が **L-FABP** のようなカギとなる対象細胞と、より速やかに、より強く結合するとすれば、肝臓の中にこれらの化合物は蓄積し、血中アルブミンが毒物動態の主要な **driver** なので、これらの相互作用を予想することで、**PBTK** モデルのパラメータ化と、どの **PFAS** がより強く影響するかのスクリーニングに役立つ。

#### Slide 19

**MD** スクリーニングの結果、**PFAS** の種類によって結合の力が異なることがわかった。このような **MD** 法を使うことで、分子レベルで実際どのような反応、強い結合、弱い結合など、水素結合反応が起こり、**PFAS** がどのような作用を起こしているのかを予測することが可能になる。従来取り上げられてきた **PFAS**、そして最近問題になってきた新しい **PFAS** 類についても、どのような反応が、なぜ起こるのかを予測することができる。

#### Slide 20

このモデルを使って、さらに複雑な **transporter activity** を予測する。**Transporter** について知ることは非常に重要である。なぜなら組織の中でどのように広がり、排出に至るのか、その動態を知ることになるからである。さらに、**PFAS** が体内に入るか防ぐかを左右する (よく知られているのは **blood-brain barrier** (脳血液関門) であるが) についても、**transporter** がカギとなるからである。これまでに **C6** の **PFAS** が肝臓や脳から高濃度に検出された報告や、**C4** の **PFAS** が腎臓や

肺から高濃度に検出された報告などがある。現在、PFASの長鎖から短鎖への代替が進んでいるが、短鎖のPFASなら安全と言えるのだろうか。脳血液関門や母体から胎児への移行する、しないは何が関係しているのか。実験でも、*in silico*でも難しい課題である。

#### Slide 21

PFASについてのケーススタディ：脳内のPFAS: P-glycoprotein (P-gp=P糖たんぱく質=細胞膜上に存在して細胞毒性を有する化合物などの細胞外排出を行う)との反応

P-gpはBBB(脳血液関門)において鍵となるefflux transporter(排出トランスポーター)の一つである。化合物が脳内に入る時、P-gpがそれを血液側に押し戻す働きをする。In vitroの研究では、PFOAとPFOSはP-gpの働きを抑えるということが示唆されたので、さらに詳しく、また他のPFASについてはどうかも見てみた。

#### Slide 22

トランスポーターモデルにおける課題

トランスポーターの構造はたんぱく質のデータベースの中で過小評価されている。たんぱく質のデータベースは私たちがこのMDに使う3D構造の主なデータソースである。また、「基質結合プロテイン」、「膜透過部」、「ヌクレオチド結合部(NBDs)」などは、トランスポーターが構造のconformation change(立体配座変化)をしながら役割を果たす過程の「スナップショット」である。そのため、トランスポーターの活動を説明するためには、これらの構造の変化について説明できなければいけない。

#### Slide 23

私たちが特に興味を持っているトランスポーターであるP-gpについては、たんぱく質のデータベースに二つの種の構造が利用できる。一つは人のP-gpでOutward-facing conformation、もう一つはマウスのP-gpでInward-facing

conformation である。つまり、二つの種、二つの異なる conformation (立体構造) が利用できる。

#### Slide 24-26

そこで、以下の構造を見ることにした

1. PFAS: C4-C15 PFCAs、C4-C10 PFSAAs、ADONA、GenX (Ammonium perfluoro-2-methyl-3-oxahexanoate)、Nafion by-product 2 (NBP2)、F-53B
2. 既知の inhibitors (抑制作用のあるもの) : verapamil (1<sup>st</sup>-generation)、dexverapamil (2<sup>nd</sup>-generation)、zosuquidar (ゾスクィダー) (3<sup>rd</sup>-generation)
3. P-gp の既知の substrates (基質) : P-gp によって脳血液関門 (blood brain barrier) から排出された化学物質、digoxin, cortisol

#### Slide 27

相互反応について実施した最初の調査 : Docking simulations

- Binding affinity (結合親和性)
  - たくさんの化合物について、複数の docking simulation を行い、平均的な結合親和性を予想した。
- その後、hybrid study を行った。いくつかの docking simulation と cluster 分析を合わせてみた。machine learning (マシンラーニング) と分子 docking を一緒にしてみた。P-gp とこれらの化合物との結合部位を予測するためである。

#### Slide 28

結合親和性の研究結果

他のたんぱく質同様、デルタ G で親和性は示されている。人の P-gp、マウスの P-gp である。X 軸の下に行くほど親和性が強い。長鎖であるほど親和性が高い。青色が長鎖の PFCAs、ピンク色が PFSAAs、緑色が代替品、紫色が既知の inhibitor、黄色が substrate (基質) である。紫色の二つの (上部の) バーは、第一、第二世代の inhibitor で、下の紫のバーは第三世代の inhibitor であるが、最も強い親和性を示し、非常に低い濃度で非常に強く P-gp を抑制する。この強さは、もっと長鎖の PFCAs に近い。これらは、どこに結合するのだろうか。

## Slide 29

結合部位を第一、第二、第三世代の inhibitor で比較する

Verapamil が第一世代、Dexverapamil が第二世代、Zosuquidar が第三世代である。人でもマウスでも、第一、第二世代は P-gp のどこにでも結合する。これは、たくさんのシミュレーションを編集した結果である。特にどの部位が結合しやすい、ということではなく、どこにでも結合する。一方、第三世代は特定の部位に結合する。薬物の開発の際、**specificity**（特異性）が改良されていることがわかる。これを、**PFAS** で見てみるとどうだろうか。

## Slide 30

結合部位のクラスター分析結果

上が人の P-gp、下がマウスの P-gp、PFOS と PFOA について見ている。赤で示すのが第三世代 Inhibitor の Zosuquidar、青で示すのが PFOS/PFOA である。人の P-gp では、PFOS/PFOA と Zosuquidar の結合部位が重なっている部分があるが、完全にではない。一方、マウスの P-gp で見ると、結合部位はほとんど同じである。これは、**inward-facing conformation** では似たような抑制メカニズムが働くかもしれない、ということを示唆している。

## Slide 31

鎖の長さが同じような、従来の **PFAS** と、新しい **PFAS** で比較してみた。左が人、右がマウスで、それぞれ左側が従来型の **PFAS**、右側が新しい **PFAS** である。いずれも、結合部位の集合体が非常に近い。

## Slide 32

結論

**P-gp** の抑制は、**ATP** 加水分解を邪魔することにより結合部位をブロックすることにより引き起こされる

従来型の **PFAS**、**PFCA**s や **PFSA**s、そして新規の **PFAS**、フッ素化エーテルは潜在的に **P-gp** を抑制する。

集合体の結合部位の分析の結果、**PFOA** と **PFOS** による抑制メカニズムは少なくとも人の **outward-facing conformation** では **unique**（独特）である。



しかしもちろん、この結果は二つの種、二つの **conformation** についてしか見ていないので、限界がある。

### Slide 33

理解を深めるための次の段階：ドッキングから **molecular dynamics (MD)**へ

ドッキングは計算コストが低くて済むが、たんぱく質を塊として扱うので制限がある。MD 法により **inward** から **outward-facing conformation** へとモデル変換が可能になる。まず人のたんぱく質で一つの **conformation** を見て、その後他の **conformation** を見ることができる。しかし、これは計算コストが高い。そのため、優先順位をつけて広くスクリーニングして対象を絞り、もっと限られたセットで MD 法で見たい。既知の **inhibitor** (抑制作用のあるもの)、**substrates** (基質)、他のトランスポーター、他の組織を見ることでもっと多くのことがわかるようになるだろう。

### Slide 34

現在の毒性学の知識を改良することが急務である。

研究が多くなされてきた **PFAS** 類については、知識が増えるにつれ、検出される濃度は下がっていく。2020年5月にアメリカの12州が飲料水中の **PFAS** 濃度のガイドラインを設定した。このうち9州は **PFOA** について、EPAの推奨値である **70ng/L** よりもさらに低い濃度に設定した。また、他の10州は **PFOA** 以外の **PFAS** についてもガイドラインを設定した。そのため、州や自治体や施設が前進するためには情報が必要である。また、私たちも優先順位をつけるのに役立つ。

### Slide 35-36

**PFAS** 類は難分解性のため、製造から廃棄、リサイクルの過程で人への暴露が続く。そのため、一つ一つの物質の暴露というよりも多くの種類の **PFAS** 類とその副生成物にヒトは暴露している。

人の健康を守るための優先事項：

- まず最も重要なことは、現在起こっている、潜在的に有害な **PFAS** 暴露を減らし排除することである。使用が必須の分野以外では排除していく、ということが有効である。
- 現在必須と思われている物質の使用も、より持続可能で（分解しやすく）リスクの少ない物質へと代替していくことが重要である。ただし、本当にその代替品がよりリスクが低いかどうかは、メカニズムを明らかにしていかなければならない。
- そのためには、すべての **PFAS** についての有害性についての知識を増やすことが必要である。その目的は：
  - 汚染地域の除染に優先順位をつけること、暴露を減らすための優先順位をつけること、
  - **PFAS** の構造と活性についての関係についての知識を増やすこと。それがわかれば、より持続可能な化学物質を作ることが可能になる。今よりも悪い代替品を作ってはならないからである。