

ラットにおけるペルフルオロオクタン酸の尿中排泄機構の解析



甲第27号

衛生化学講座

片倉 賢紀

ラットにおけるペルフルオロオクタン酸の尿中排泄機構の解析

衛生化学講座

片倉 賢紀

# 目 次

略号	i
総論の部	
緒言	1
第1章 PFOA のラットに対する作用の性差	3
第1節 ペルオキシソーム $\beta$ 酸化活性に対する PFOA の作用	3
第2節 PFOA 腎クリアランスにおける性差と性ホルモンの影響	6
第3節 PFOA 腎クリアランスに対するマンニトール定速静注の効果	10
第4節 PFOA 腎クリアランスに対するプロベネシドの効果	14
第5節 考察	17
第2章 腎皮質切片を用いた PFOA の取り込みの解析	20
第1節 PFOA の取り込みの特性	20
第2節 腎皮質切片への PFOA の取り込みに対する性ホルモンの影響	22
第3節 考察	24
第3章 腎臓における各種輸送担体 mRNA 発現量の性ホルモンによる変動	25
第1節 各種輸送担体 mRNA 発現量の性ホルモンによる変動	25
第2節 考察	40
第4章 MRP2 欠損ラットおよび低リン食を用いた PFOA 腎クリアランスの測定	41
第1節 Eisai hyperbilirubemia rat (EHBR) における PFOA 腎クリアランスの変化	41
第2節 低リン食による PFOA 腎クリアランスの変化	46
第3節 考察	49

第5章	アフリカツメガエル卵母細胞強制発現系を用いた PFOA 輸送担体の検索	50
第1節	oatp1 による PFOA の輸送	50
第2節	NPT2 による PFOA の輸送	52
第3節	OAT3 による PFOA の輸送	52
第4節	考察	53
第6章	OAT3 タンパク質の発現	54
第1節	OAT3 タンパク質発現に対する性ホルモンの効果	54
第2節	考察	60
総括		62
謝辞		64
実験の部		
第1章の実験		65
第2章の実験		71
第3章の実験		73
第4章の実験		76
第5章の実験		77
第6章の実験		81
引用文献		88

## 略号

本論文中に使用した略号について以下に記載する。

AUC: area under the blood concentration - time curve  
BSA: bovine serum albumin  
cDNA: complementary DNA  
CLr: renal clearance  
CL<sub>tot</sub>: total clearance  
cMOAT: canalicular multispecific organic anion transporter  
C<sub>p</sub>: plasma concentration  
cRNA: capped RNA  
E<sub>2</sub>: estradiol  
E<sub>2</sub> 17β - G: estradiol 17β - glucuronide  
EDTA: ethylenediaminetetra acetic acid  
EHBR: eisai hyperbilirubiuria rat  
GAPDH: glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase  
GFR: glomerular filtration rate  
HPLC: high performance liquid chromatography  
Da: dalton  
NPT: sodium dependent phosphate transporter  
MBS: modified Barth's medium  
mRNA: messenger ribonucleic acid  
MRP: multidrug resistance associated protein  
OAT: organic anion transporter  
OAT - K: kidney - specific organic anion transporter  
oatp: organic anion transporting polypeptide  
ORX: orchidectomy  
OVX: ovariectomy  
PAH: *p* - aminohippuric acid  
PCR: polymerase chain reaction  
PFCA: perfluorocarboxylic acid

PFOA: perfluorooctanoic acid

RT - PCR: reverse transcription coupled polymerase chain reaction

SDR: Sprague - Dawley rat

SDS: sodium dodesyl sulfate

T: testosterone

$T_{1/2}$ : biological half life

TBS: tris buffered saline

TCA: taurocholic acid

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

Vd: volume of distribution

## 総論の部

## 緒 言

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は、オクタン酸の炭素に結合した水素がすべてフッ素に置換された化合物であり、特殊な物理化学的性質をもち、界面活性剤や乳化剤として、あるいは他のフルオロ化合物合成の原料として使用されている [12]。PFOA は極めて安定な化合物であり、生体内あるいは環境中で全く分解されない [70]。

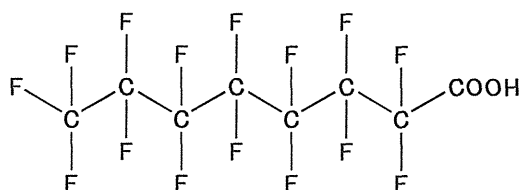


Fig. Chemical structure of PFOA

最近の研究から、北米やヨーロッパに生息する野生生物 (鳥類、水棲哺乳類や魚類など) から PFOA やペルフルオロオクタンスルホン酸が検出されており、PFOA による環境汚染が広がっていることが明らかとなってきた [14、23、24]。ヒトにおいては、1980 年代にフルオロ化合物製造工場労働者の血液中から高濃度の PFOA が検出されたと報告され、その後の研究によって一般人の血液中からも微量の PFOA が検出されることが明らかとなった [1、2、67]。工場退職者の追跡調査からヒトにおける PFOA の半減期は 1.50 - 13.49 年と推察されている [2]。このように PFOA は、環境中や動物そしてヒト体内に長期間にわたり残存する懸念が高まってきた。米国の環境保護局は、2000 年からペルフルオロ化合物の規制をはじめ、我が国においては、2002 年 12 月に化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (いわゆる、化審法) の指定化学物質に指定された。このような流れをうけて PFOA の主要製造元である米国の 3M 社は 2003 年に自主的に PFOA の製造を中止した。しかしながら、現在も PFOA は一部の企業により製造されており、また、環境中もしくは生体内で代謝されて PFOA を生じるペルフルオロ化合物も使用されていること



から、環境中における PFOA は今後も増加すると予測されている。

一般人が PFOA の暴露を受ける経路は十分に解明されていないが、食物連鎖による生物濃縮や、工業製品からの直接暴露などが考えられている。PFOA のヒト健康に対する影響については工場労働者を対象とした疫学調査から甲状腺機能の低下のリスクや膵臓、精巣あるいは前立腺などを含む男性生殖器系のガンにより死亡するリスクなどが上昇することなどが指摘されている [1、2、52]。PFOA は、今後、長期間環境を汚染し続けることが予測されるため、この化合物の体外への排泄の機構を解明することは、生体内に残存した PFOA の排泄を促進させる解毒法の開発につながると考えられる。

ラットを用いたこれまでの研究から、PFOA の生体作用には顕著な性差があることが判明している [28、29、30]。生体作用における性差には、体外への排泄過程が関係している可能性が高い。そこで本研究ではラットにおいて PFOA の排泄に性差が生じる機構を検討し、この結果をもとに PFOA の腎臓からの排泄機構の解析を行った。以下に本研究の結果と考察を述べる。

## 第 1 章 PFOA のラットに対する作用の性差 [36, 37, 38]

ペルフルオロカルボン酸 (PFCA) のラットに対する作用の代表的なものにペルオキシソーム増殖作用がある [22]。PFOA を投与すると雄性ラットに対しては肝臓のペルオキシソームβ酸化酵素を誘導するが、雌性ラットにはほとんど誘導作用を示さないことが報告されている [29]。PFOA が動物体内で全く代謝されないことから、PFOA の作用の性差はこの化合物の体内動態が雌雄ラットで異なることによる可能性が考えられる。これまで PFOA を簡便に定量する方法がなかったため、PFOA の体内動態について詳しく研究した報告がほとんどなかった。近年、HPLC - 蛍光検出器を用いた高感度で簡便な定量法が開発された [51]。本章では、PFOA の生体作用に性差が生じる機構を調べるために、肝臓のペルオキシソームβ酸化酵素の誘導を指標として PFOA の用量と作用の関係を調べるとともに、PFOA の動態解析を行った。

### 第 1 節 ペルオキシソームβ酸化活性に対する PFOA の作用

ラットに PFOA を 1 日 1 回 5 日間投与した場合の肝臓ペルオキシソームβ酸化活性を Fig. 1 - 1A に示した。雄性ラットにおいて PFOA は投与量依存的にペルオキシソームβ酸化活性の上昇を引き起こした。一方、雌性ラットでは 20 mg/kg 体重を投与した場合でもペルオキシソームβ酸化活性の上昇は認められなかった。図には示していないが、投与量を 130 mg/kg 体重まで増加させても雌性ラットでは同酵素活性の上昇はほとんど認められなかった。この時の PFOA の肝残存量を Fig. 1 - 1B に示した。雄性ラットでは、投与量の増加にともない肝残存量が増大し、投与量 10 mg/kg 体重以上では、40 μg/g 肝臓でほぼ一定の値を示した。しかし、雌性ラットでは、投与量 20 mg/kg 体重の場合でも PFOA の肝残存量は非常に低く検出限界 (1 μg/g 肝臓) 以下だった。したがって雌性ラットにおいてペルオキシソームβ酸化活性が誘導されないのは、誘導に必要とされる量の PFOA が肝臓に残存していないためと考えられる。

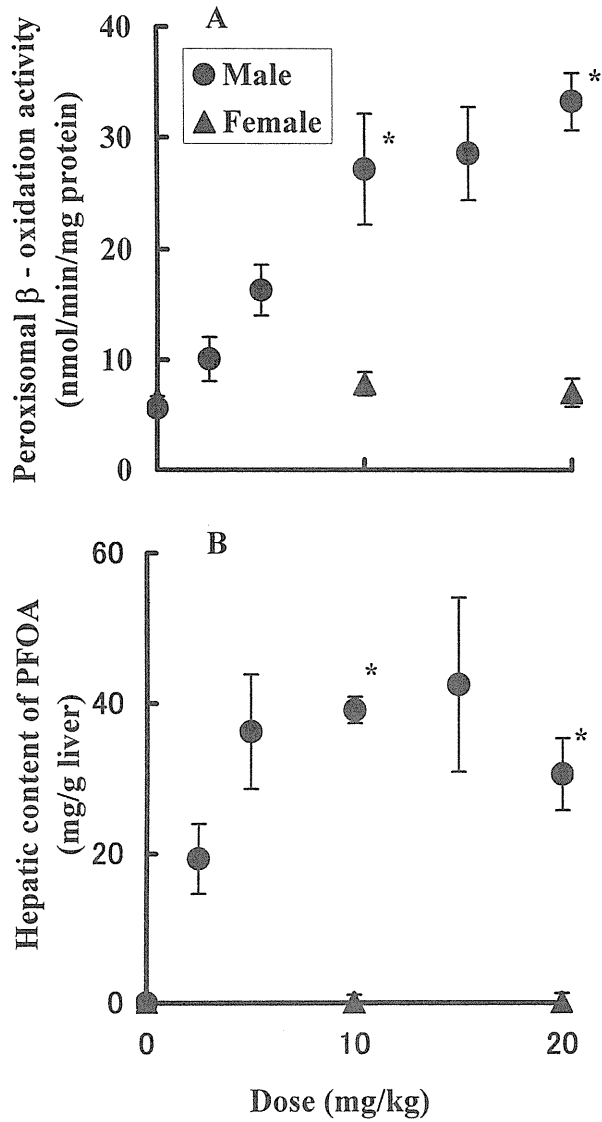


Fig. 1 - 1 Dose - dependency of the induction of hepatic activity of peroxisomal  $\beta$  - oxidation (A) and accumulation of PFOA (B). Male (●) and female (▲) rats were administered with PFOA at indicated doses once a day for 5 days. Values are means  $\pm$  S.D. for four rats. \*, Differences are statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

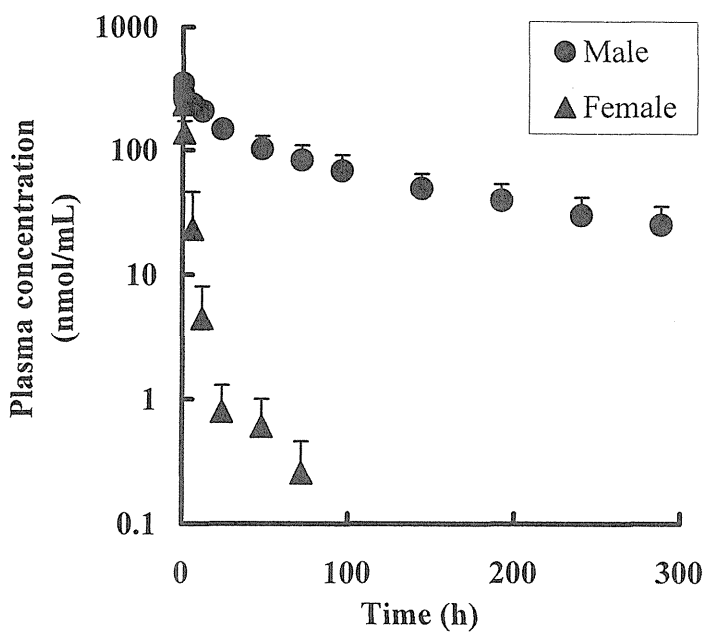


Fig. 1 - 2 Plasma concentration - time profiles of PFOA. Male (●) and female (▲) rats were intravenously injected with PFOA at a dose of 48.63  $\mu\text{mol/kg}$  of body weight. Values are means  $\pm$  S.D. for three or four rats.

上述した結果より雌雄ラットでは PFOA の体内動態が大きく異なっているものと予想される。そこで、血中からの PFOA の消失を雌雄両性ラットで比較した。PFOA (48.63  $\mu\text{mol/kg}$  体重) を静脈内に単回投与し、血漿中の PFOA の濃度変化を経時的に調べた (Fig. 1 - 2)。血液中からの PFOA の消失には明らかに性差があり、雄性ラットに比べると雌性ラットははるかに消失が速かった。また、雌雄ラットとも血漿中の消失が 2 相性を示していたので、この結果を 2 - コンパートモデルにあてはめ、非線形解析ソフト MULTI を用いて動態パラメーターを算出した (Table 1 - 1)。PFOA の全身クリアランス ( $\text{CL}_{\text{tot}}$ ) は雄ラットに比べ雌性ラットで 44 倍高かった。また、雌性ラットの生物学的半減期 ( $T_{1/2}$ ) は、雄性ラットの 1/70 であった。分布容積 (Vd) にも性差が認められたが、 $\text{CL}_{\text{tot}}$  の差を説明できるほど大きなものではなかった。したがって、 $\text{CL}_{\text{tot}}$  にみられる性差は、PFOA の組織親和性が異なるために生じるのではないと考えられる。

Table 1 - 1 Toxicokinetic parameters of PFOA in rats

	Male	Female
$\text{CL}_{\text{tot}}$ (mL/min/kg b.w.)	0.035 $\pm$ 0.010	1.551 $\pm$ 0.559 *
$T_{1/2}$ (day)	5.68 $\pm$ 0.99	0.08 $\pm$ 0.03 *
Vd (mL/kg b.w.)	345.6 $\pm$ 57.3	211.2 $\pm$ 28.2 *

$\text{CL}_{\text{tot}}$ , total clearance of PFOA;  $T_{1/2}$ , half life of PFOA; Vd, volume of distribution; b.w., body weight. Values are means  $\pm$  S.D. for three to four rats. \* Differences are statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

## 第 2 節 PFOA 腎クリアランスにおける性差と性ホルモンの影響

PFOA は生体内で全く代謝を受けないことが知られている [2、69]。したがって PFOA の  $T_{1/2}$  における性差は PFOA の排泄速度の差を反映しているもの

と考えられる。また、PFOA の主要な排泄経路が尿であることが Vanden Heuvel らによって示されている [70]。そこで、PFOA の尿中からの消失の性差を評価するために、PFOA の腎クリアランス (CLr) を非定型的方法により求めた。CLr は、ラットに PFOA (48.63  $\mu\text{mol/kg}$  体重) を静脈内に単回投与し、経時的に 5 時間採尿および採血を行い、CLr を求めた。Fig. 1 - 3 に示したように、CLr にも顕著な性差がみられ、雌性ラットは雄性ラットに比べて約 13 倍高い値を示した。次に、PFOA の CLr に対する性ホルモンの影響について検討した。雄性ラットを去勢 (ORX) すると、PFOA の CLr は約 4 倍上昇した。また、雄性ラットにエストラジオールを投与 ( $E_2$ ) した場合にも CLr は約 2.5 倍上昇した。次に去勢した雄性ラットにテストステロンを投与すると (ORX+T)、CLr は、雄性ラットを去勢した (ORX) ラットに比べ約 1/13 に低下し、コントロールの雄性ラットよりも低い値を示した。また、雌性ラットにテストステロンを投与した時 (T) にも CLr は低下した。雌性ラットから卵巣を摘出した場合 (OVX)、PFOA の CLr は、コントロールの雌性ラットと差がなかった。一方、卵巣切除後にエストラジオールを投与すると (OVX+ $E_2$ )、CLr は大きく低下した。

CLr 測定時の 15、300 分後の血中濃度 ( $C_{p15\text{min}}$ 、 $C_{p300\text{min}}$ )、血中濃度 - 時間曲線下面積 (Area under the plasma concentration - time curve、 $AUC_{0-300\text{min}}$ ) および 300 分間の尿中排泄率を Table 1 - 2 にまとめた。コントロールの雄性ラットと雌性ラットを比較すると  $C_{p15\text{min}}$ 、 $C_{p300\text{min}}$  および  $AUC_{0-300\text{min}}$  に有意な差は認められなかった。雄ラットの 4 群 (normal、 $E_2$ 、ORX および ORX+T) で比較すると、 $C_{p15\text{min}}$  は、コントロールの雄性ラットと比較して、去勢した雄性ラット (ORX) および去勢後にテストステロンを投与したラット (ORX+T) で高かった。 $C_{p300\text{min}}$  は、去勢した雄性ラット (ORX) および雄性ラットにエストラジオールを投与 ( $E_2$ ) すると有意に低下し、去勢後にテストステロンを投与 (ORX+T) すると有意に高くなった。 $AUC_{0-300\text{min}}$  は去勢後にテストステロンを投与したラット (ORX+T) でやや高く、雄性ラットにエストラジオールを投与 ( $E_2$ ) するとやや低下した。雌性ラットの 4 群 (normal、T、OVX

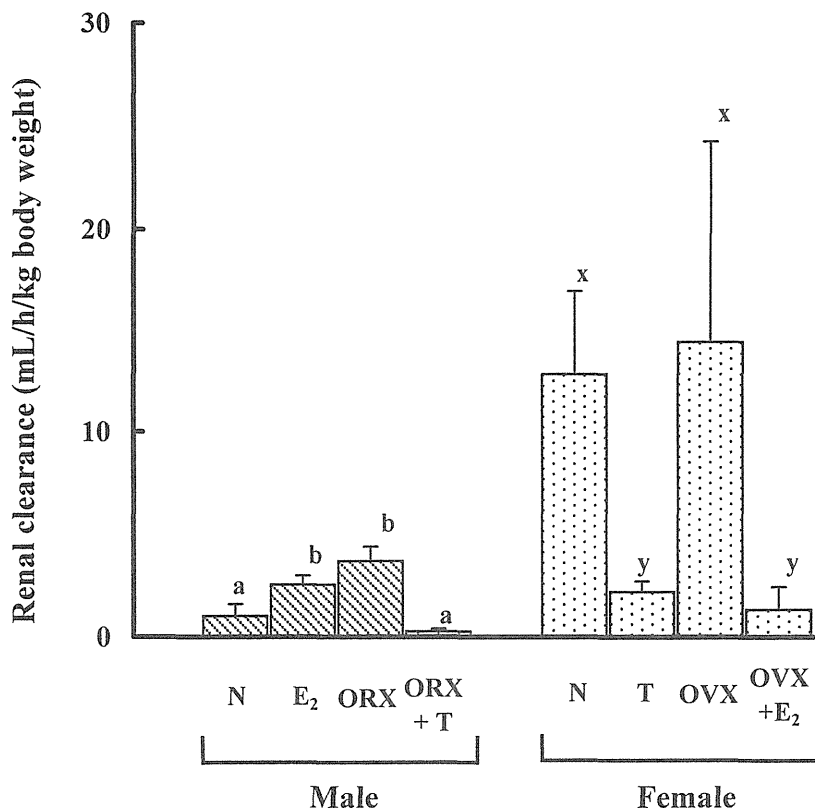


Fig. 1 - 3 Renal clearance of PFOA in the rats under different hormonal states. Values are means  $\pm$  S.D. for three or four rats. N, normal male or female rats; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).

Table 1 - 2 Effects of sex hormones on PFOA kinetics

## (A) Male rats

	Normal	E <sub>2</sub>	ORX	ORX+T
Cp <sub>15min</sub> (nmol/mL)	298.51 ± 22.30 <sup>a</sup>	286.27 ± 31.41 <sup>a</sup>	334.46 ± 15.58 <sup>a,b</sup>	370.21 ± 28.27 <sup>a</sup>
Cp <sub>300min</sub> (nmol/mL)	232.66 ± 12.27 <sup>a</sup>	202.18 ± 16.22 <sup>c</sup>	218.22 ± 20.33 <sup>a,c</sup>	260.93 ± 6.97 <sup>b</sup>
AUC <sub>0-300 min</sub> (μmol·min/mL)	71.92 ± 3.39 <sup>a</sup>	62.01 ± 5.46 <sup>a</sup>	68.36 ± 0.75 <sup>a</sup>	74.81 ± 1.65 <sup>a,b</sup>
Urinary excretion (% of dose)	2.45 ± 1.39 <sup>a</sup>	4.34 ± 1.98 <sup>a,c</sup>	8.77 ± 1.46 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.32 <sup>a</sup>

## (B) Female rats

	Normal	T	OVX	OVX+E <sub>2</sub>
Cp <sub>15 min</sub> (nmol/mL)	336.37 ± 61.44 <sup>x</sup>	329.69 ± 32.29 <sup>x</sup>	295.19 ± 2.83 <sup>x</sup>	316.94 ± 72.60 <sup>x</sup>
Cp <sub>300 min</sub> (nmol/mL)	185.30 ± 31.89 <sup>x</sup>	221.16 ± 21.89 <sup>x</sup>	162.39 ± 47.99 <sup>x</sup>	165.76 ± 60.23 <sup>x</sup>
AUC <sub>0-300 min</sub> (μmol·min/mL)	66.62 ± 12.97 <sup>x</sup>	69.67 ± 5.59 <sup>x</sup>	55.82 ± 7.71 <sup>x</sup>	54.30 ± 14.16 <sup>x</sup>
Urinary excretion (% of dose)	28.14 ± 4.39 <sup>x</sup>	5.21 ± 0.92 <sup>y</sup>	25.94 ± 15.03 <sup>x</sup>	3.04 ± 2.75 <sup>y</sup>

ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone; Cp<sub>15 min</sub>, plasma concentration of PFOA at 15 min after PFOA administration; Cp<sub>300 min</sub>, plasma concentration of PFOA at 300 min after PFOA administration; AUC<sub>0-300 min</sub>, area under the plasma concentration time curve (0 – 300 min). <sup>a-c</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).



および OVX+E<sub>2</sub>) で比較すると、AUC<sub>0-300 min</sub>、Cp<sub>15min</sub> および Cp<sub>300min</sub> に有意な差はなかった。これらの結果より、PFOA の CL<sub>r</sub> は、雌雄ラットともにテストステロンにより抑制されることが明らかとなった。一方、エストラジオールは雌雄両性のラットに対し、異なる影響を示した。すなわち、雄性ラットでは促進的に作用しているのに対して、卵巢を摘出したラット (OVX) には抑制的に作用していた。

### 第 3 節 PFOA 腎クリアランスに対するマンニトール定速静注の効果

予備的な実験で PFOA の血漿蛋白結合率 95% 以上であった。また蛋白結合率には性差がないことが報告されている [13]。ラットの平均糸球体ろ過速度 (GFR) が 240 - 360 mL/h/kg 体重であることから血漿蛋白結合率を 95% とすると血中遊離型分率 (fp) から求めた遊離型 PFOA の糸球体ろ過速度 (fp · GFR) は 12 - 18 mL/h/kg 体重である。この値と CL<sub>r</sub> の値を比較すると、ほとんどの性ホルモン状態のラットで CL<sub>r</sub> < fp · GFR である。このことから PFOA は尿細管管腔から再吸収されることが考えられる。そこで本節では、PFOA の尿細管管腔からの再吸収の有無を検討した。

マンニトール液を流速 0.1 mL/min で静注すると開始 2 時間後には尿量が安定し、注入速度とほぼ同じ尿排出速度 (0.1 mL/min) となった。Fig. 1 - 4 に PFOA 静注後の尿中排泄率に対するマンニトール液静注の影響を示した。PFOA の尿中排泄率は、マンニトール液の注入により雌雄ラットとも約 2 倍上昇した。尿流速の増加により PFOA の排泄が高まったことから、PFOA は、雌雄ラットとも腎尿細管で再吸収されるものと考えられる。PFOA の尿中排泄の性差が尿細管からの再吸収過程によるものかどうかを検討するために、さまざまな性ホルモン状態でマンニトール静注下での PFOA の CL<sub>r</sub> を求めた (Table 1 - 3、Fig.1 - 5)。Table 1 - 3 に示したようにマンニトール存在下では非存在下における PFOA の CL<sub>r</sub> 比がいずれの性ホルモン状態でも有意に上昇することからこれら全てのホルモン状態において PFOA は再吸収されるものと

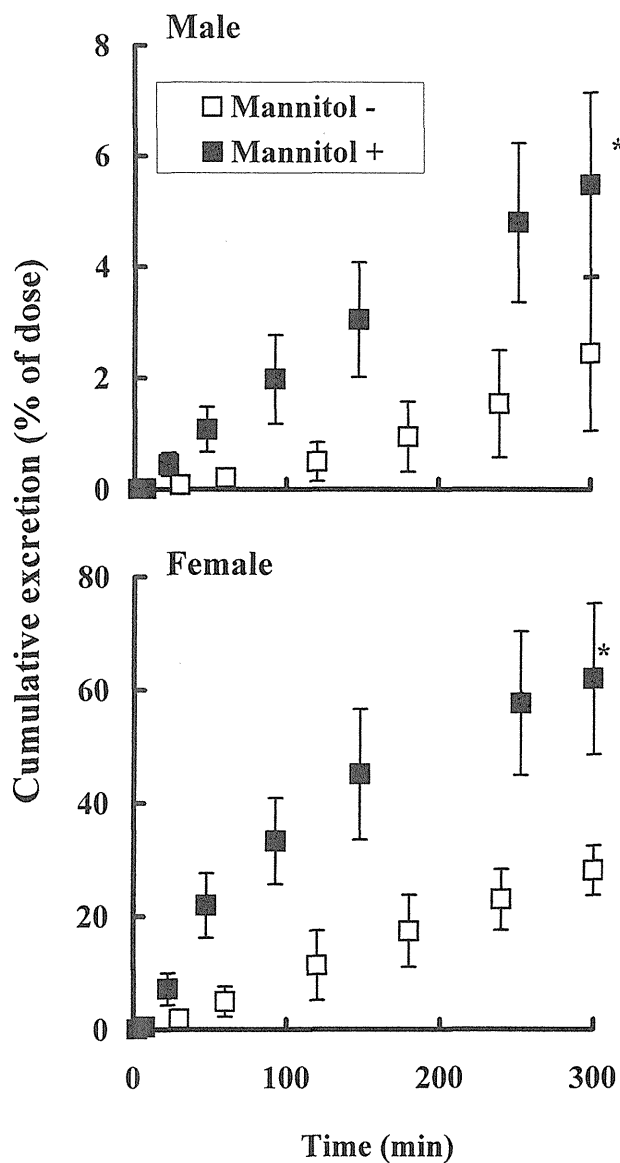


Fig. 1 - 4 Effect of mannitol infusion on cumulative excretion of PFOA. Values are means  $\pm$  SD for three to six rats. \*, Differences are statistically significant from the value without mannitol infusion ( $P < 0.05$ ).

Table 1 - 3 Effects of sex hormones on PFOA kinetics with mannitol infusion

(A) Male rats

	Normal	E <sub>2</sub>	ORX	ORX+T
Cp <sub>5 min</sub> (nmol/mL)	308.15 ± 40.54 <sup>a</sup>	315.35 ± 14.25 <sup>a</sup>	352.52 ± 15.71 <sup>a</sup>	380.39 ± 48.44 <sup>a</sup>
Cp <sub>300min</sub> (nmol/mL)	215.50 ± 49.60 <sup>a</sup>	132.71 ± 13.33 <sup>b</sup>	127.17 ± 34.40 <sup>a</sup>	246.80 ± 22.84 <sup>a</sup>
AUC <sub>0-300 min</sub> (μmol·min/mL)	66.76 ± 16.47 <sup>a</sup>	48.13 ± 6.34 <sup>a</sup>	53.39 ± 5.57 <sup>a</sup>	75.77 ± 6.50 <sup>a</sup>
Urinary excretion (% of dose)	4.92 ± 1.62 <sup>a</sup>	21.62 ± 8.48 <sup>b</sup>	48.72 ± 11.93 <sup>c</sup>	1.82 ± 0.09 <sup>a</sup>
Increase upon mannitol infusion	1.89 ± 0.89 <sup>a</sup>	5.21 ± 2.27 <sup>b</sup>	7.32 ± 2.22 <sup>a</sup>	2.56 ± 0.13 <sup>b</sup>

(B) Female rats

	Normal	T	OVX	OVX+E <sub>2</sub>
Cp <sub>5 min</sub> (nmol/mL)	356.39 ± 43.77 <sup>x</sup>	365.86 ± 28.14 <sup>x</sup>	244.57 ± 9.80 <sup>y</sup>	332.09 ± 37.31 <sup>x</sup>
Cp <sub>300min</sub> (nmol/mL)	69.66 ± 37.93 <sup>x</sup>	193.06 ± 17.20 <sup>x</sup>	22.03 ± 3.87 <sup>y</sup>	121.17 ± 9.87 <sup>x</sup>
AUC <sub>0-300 min</sub> (μmol·min/mL)	34.92 ± 6.28 <sup>x</sup>	66.04 ± 4.25 <sup>y</sup>	18.83 ± 0.52 <sup>z</sup>	47.26 ± 3.09 <sup>x,y</sup>
Urinary excretion (% of dose)	50.46 ± 6.64 <sup>x</sup>	13.84 ± 2.84 <sup>y</sup>	69.76 ± 3.66 <sup>x</sup>	36.70 ± 9.65 <sup>x,z</sup>
Increase upon mannitol infusion	4.24 ± 2.18 <sup>x</sup>	3.24 ± 0.61 <sup>x</sup>	7.48 ± 0.43 <sup>x</sup>	4.78 ± 2.90 <sup>x</sup>

ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone; Cp<sub>15 min</sub>, plasma concentration of PFOA at 15 min after PFOA administration; Cp<sub>300 min</sub>, plasma concentration of PFOA at 300 min after PFOA administration; AUC<sub>0-300 min</sub>, area under the plasma concentration time curve (0 – 300 min). Values are means ± S.D. for three to six rats. <sup>a-c</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x-z</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).

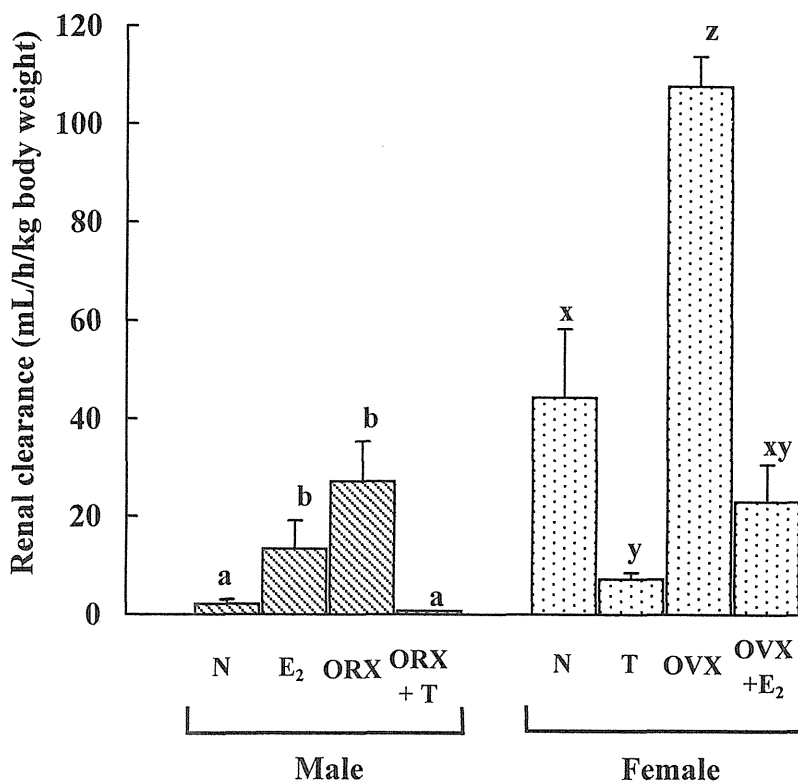


Fig. 1 - 5 Renal clearance of PFOA with mannitol infusion in the rat under different hormonal states. Values are means  $\pm$  S.D. for three or four rats. N, normal male or female rats; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups in male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups in female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).

考えられる。マンニトール存在下における PFOA の CLr は、マンニトール非存在下と同様に性ホルモンにより変動した (Fig. 1 - 5)。CLr 値は雄性ラットより雌性ラットで約 25 倍高かった。去勢した雄性ラット (ORX) の CLr 値はコントロールの雄性ラットより 13 倍高く、コントロールの雌性ラットの値に近くなった。エストラジオールを投与した雄性ラット (E<sub>2</sub>) では、雄性ラットに比べ、約 7 倍 CLr の上昇がみられた。去勢した雄性ラット (ORX) および雌性ラットにテストステロンを投与 (T) すると、CLr はそれぞれ 0.703、7.170 mL/h/kg 体重とテストステロン投与により低下した。雌性ラットの卵巣を切除 (OVX) すると、CLr は約 2 倍上昇した。卵巣を切除後にエストラジオールを投与 (OVX+E<sub>2</sub>) すると CLr は雌のコントロールの約 1/2 にまで低下した。これらの結果から、マンニトール共存下でも雌雄ラットとも PFOA の CLr は、テストステロンにより抑制されることが明らかとなった。一方、PFOA の CLr に対するエストラジオールの効果は雌雄ラットで異なり、雄性ラットでは増加が、雌性ラットでは減少がみられた。Table 1 - 3 に示したように、Cp<sub>15min</sub> に差はみられなかった。また、Cp<sub>300min</sub> および AUC<sub>0-300 min</sub> には性差が認められたが、これは雌性ラットにおいて PFOA の尿中への排泄が進み、血漿濃度が低下したためと考えられる。また、Cp<sub>15min</sub> にはさまざまなホルモン状態のラットでほとんど差がみられなかったことから、CLr の性ホルモンによる変動は、PFOA の分布ではなく、腎臓からの排泄機構に差があることによるものと考えられる。

#### 第 4 節 PFOA 腎クリアランスに対するプロベネシドの効果

本研究で検討している性ホルモン状態のうち CLr の大きな雌性ラットおよび卵巣を摘出したラット (OVX) では、PFOA が尿細管からの分泌により尿中へ排泄されている可能性が考えられる。PFOA は有機酸であることから有機酸輸送担体を介して輸送され、排泄されている可能性が考えられる。そこで、有機酸輸送担体を幅広く阻害することが知られているプロベネシドの PFOA

の CLr に対する影響を検討した。Table 1 - 4 に示したように雄性ラット、去勢した雄ラット (ORX)、雌性ラットおよび卵巣切除ラット (OVX) の全てにおいて、プロベネシドにより PFOA の CLr の低下が認められた。PFOA の CLr は、プロベネシド存在下では、性ホルモンにより影響を受けなかった。このことから、PFOA は尿細管管腔に分泌を受けており、この分泌過程が性ホルモンにより CLr の変動が起こる主な過程であると考えられる。プロベネシド定速静注下での PFOA の体内動態の変化についてまとめた (Table 1 - 5)。プロベネシド共存下では  $C_{p300min}$  の有意な上昇が認められた。300 分後の肝臓と腎臓に残存する PFOA を定量し血中濃度との比を算出して比較したところ、肝臓/血漿中 PFOA 濃度比 ( $C_{Liver}/C_{p300min}$ ) はプロベネシド存在下でほとんど変化がなかったが、腎臓/血漿中 PFOA 濃度比 ( $C_{Kidney}/C_{p300min}$ ) はプロベネシド存在下で大きく低下した。このことは、プロベネシドが PFOA の腎臓への取り込みを阻害することを示している。

Table 1 - 4 Effects of probenecid on renal clearance of PFOA

Probenecid	Male		Female	
	Normal	ORX	Normal	OVX
	(mL/h/kg body weight)			
—	2.11 ± 0.93	27.11 ± 8.24	44.42 ± 13.94	107.93 ± 6.16
+	0.64 ± 0.21*	0.82 ± 0.32*	1.02 ± 0.60*	0.70 ± 0.31*
Inhibition (%)	66.6	96.9	97.6	99.4

ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat. Values are means ± S.D. for three to six rats. \*, Differences are statistically significant from the value without probenecid infusion ( $P < 0.05$ ).

Table 1 - 5 Effects of probenecid on tissue distribution of PFOA in OVX rats.

Probenecid	$C_{p300min}$ (nmol/mL)	$C_{Liver}/C_{p300min}$	$C_{kidney}/C_{p300min}$
—	162.38 ± 47.99	0.75 ± 0.29	1.58 ± 0.63
+	226.34 ± 37.94 *	0.69 ± 0.10	0.09 ± 0.04*

OVX, ovariectomized female rat. Values are means ± S.D. for three to six rats.

\*, Differences are statistically significant from the value without probenecid infusion ( $P < 0.05$ ).

## 第 5 節 考 察

本章における検討から、PFOA の生体作用に性差が生じる原因が一部明らかとなった。PFOA を連続投与すると、ラット肝臓のペルオキシソームβ酸化酵素活性の誘導作用は雄性ラットでは顕著であるのに対し、雌性ラットでは全く作用がみられなかった。肝臓に残存している PFOA を定量したところ、雄性ラットでは肝臓に多く残存していたのに対して、雌性ラットでの残存量は検出限界以下であった。このような PFOA の肝臓残存量に性差が生じる原因は PFOA の全身クリアランスの違いを反映したものであり、雌雄両性のラット間で 44 倍もの差が認められた。このことから PFOA の生体作用は消失過程で性差が生じているものと考えられる。PFOA は生体内で体謝を全く受けないこと、また、主排泄経路は尿中であり胆汁中への排泄は少ないことが明らかにされている [37、50、70]。PFOA の CLr を測定し、種々の性ホルモン状態のラットで比較したところ、雌雄ラットで 10 倍以上の差が認められた。このことから、尿中からの PFOA の排泄過程が PFOA の生体内残存量を決定する重要な因子であると考えられる。しかし、尿中排泄率が性ホルモン状態により変化しているにもかかわらず、CLr 測定時の血中濃度 ( $C_{p15min}$ 、 $C_{p300min}$  および AUC) については、性ホルモン状態の違いによる変動はほとんど認められない。このことから、PFOA の血液中からの消失には尿中排泄だけでなく、PFOA の体内分布も関与しているものと考えられる。したがって、PFOA の分布の変動もまた、PFOA の生体内残存量を決定する因子の 1 つであると考えられる。PFOA の尿中排泄は性ホルモンにより調節されていることが明らかとなった。雌雄両性のラットにおいて、テストステロンは PFOA の尿中排泄に対し抑制的に作用した。一方、エストラジオールは、PFOA の尿中排泄に対し、正常な雄性ラットには促進的に作用したにもかかわらず、卵巣を切除したラット (OVX) に対しては抑制的に作用した。このように、エストラジオールの影響が性ホルモン状態により大きく異なるのは、PFOA の体内分布が異なることと関係があるのかもしれない。しかし、その詳細は、現在のところ、明らかではない。

一般的に腎臓における栄養素や薬物・毒物の挙動は、①血中遊離型物質の



糸球体からのろ過、②尿細管での分泌、③尿細管からの再吸収の 3 つの行程を経る。多くのミネラルは、糸球体でろ過され、尿細管で各種輸送担体により再吸収される。この機構は内分泌系と密接に共役していて血中の各種ミネラルバランスの恒常性に重要な役割を果たしている。グルコースやアミノ酸などの生体に必須な有機化合物は、糸球体からろ過されるとすぐに  $\text{Na}^+$  と共役した輸送担体を介して近位尿細管からほぼ 100% 再吸収される。物質によっては複雑な行程を経て尿中へ排泄されるものもある。尿酸は、糸球体でろ過された後近位尿細管ですぐに担体により 99% が再吸収されるが、その後再度分泌され尿細管管腔へ排出後、再び再吸収を受ける。このいずれの行程にも輸送担体の関与が証明されている。PFOA がどのような行程を経て尿中へ排出されるかについてこれまでほとんど研究されていない。本章の実験結果から PFOA が腎尿細管で再吸収を受ける可能性が考えられる。

再吸収は単純拡散あるいは能動輸送によって起こる。単純拡散の場合は、濃度勾配、pH、pKa、脂溶性などの因子によって決まる。この単純拡散により再吸収される酸性および塩基性薬物が知られている。しかし、PFOA は pKa が約 2.5 と報告されており [2]、生体内ではほとんどがイオン型で存在しているものと考えられるので、pH - 分配仮説に従った受動的輸送により再吸収される可能性は低い。一方、セファレキシシンなどのアミノ基とカルボキシル基を持つ両性イオン型アミノβラクタム系抗生剤は、小腸の場合と同様にジペプチド輸送系を介して再吸収され、また、エストラジオール 17βグルクロニド ( $\text{E}_217\beta - \text{G}$ ) は、腎尿細管管腔に発現している organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) により再吸収されることが報告されている [11、27、64]。これらのことから、PFOA は尿細管管腔に発現する輸送担体により再吸収を受ける可能性が高いと考えられる。再吸収過程での性ホルモンの関与については、本章で示したようにマンニトールを静注した実験系では、尿細管での再吸収を完全には阻害することができないため、明確な結論は得られていないが、マンニトール共存によるクリアランスの上昇率が性ホルモン状態により異なることから、この再吸収過程にも性ホルモンによる調節があるものと考えられる。また、本章に示した検討結果から PFOA が尿細管で分泌されるこ

とが明らかとなった。プロベネシド共存下で腎尿管上皮細胞への PFOA の取り込みが低下していたことから、PFOA の CLr の性差が尿管分泌過程に起因するものなのか、再吸収過程に由来するものなのか、それとも両方の過程が関与しているのかについては、現段階で明確に結論付けることはできない。

本章における検討で判明した PFOA の腎臓での挙動は次の 3 点に要約できる。①PFOA は糸球体からはほとんどろ過されず尿管分泌によって主に管腔内に排出される。②管腔内に排出された PFOA は一部再吸収を受け、残りが尿中へ排出される。③血液中から腎臓への取り込みにはプロベネシドにより阻害される能動輸送担体が関与している。分泌または再吸収が性ホルモンによる影響を受けるために PFOA の尿中排泄に性差が生じるものと考えられる。

## 第2章 腎皮質切片を用いた PFOA の取り込みの解析

第1章において PFOA が尿細管から分泌されることが示された。また、PFOA の血液中から腎臓への取り込み過程にプロベネシドにより阻害される有機酸輸送担体が関与していることが明らかとなった。尿細管における分泌過程は、尿細管上皮細胞を介した経細胞輸送であるので、血液中から尿細管管腔への物質の輸送は、血管側膜 (側底膜) と管腔側膜 (刷子縁膜) の2種類の膜輸送を介して行われている。これらの膜にはそれぞれ特異的な輸送担体が発現している [10]。PFOA はどのような輸送担体により輸送されているのであろうか? この点についてはこれまで全く研究が行われていない。本章では、腎皮質切片による PFOA の取り込みを測定することにより、血管側膜を介した血液中から尿細管上皮細胞への輸送を評価した。

### 第1節 PFOA の取り込みの特性

ラット腎皮質より厚さ 50  $\mu\text{m}$ 、重量約 60 mg の切片を作製し、 $[^{14}\text{C}]$ PFOA を含む基質液中でインキュベートし、一定時間に取り込まれた基質の量を測定した。測定は、25 $^{\circ}\text{C}$ と 0 $^{\circ}\text{C}$ で行い、0 $^{\circ}\text{C}$ における取り込みを非特異的な取り込みとした。マンニトールは細胞膜を全く透過しないので、腎皮質切片への取り込みを測定する時に基質の細胞間隙や血管への移行量を評価するのに用いられている。本研究において、25 $^{\circ}\text{C}$ におけるマンニトールの取り込み比 (切片中の濃度/基質液中の濃度) はほぼ 0.4 で一定であった。これは報告された値と一致していた [19]。本研究の 0 $^{\circ}\text{C}$ での各 PFOA 濃度の取り込み比 (切片中の濃度/基質液中の濃度) も 0.4 であった。この値は、マンニトールの取り込み比と一致している。したがって、0 $^{\circ}\text{C}$ における PFOA の腎皮質切片への取り込みは、25 $^{\circ}\text{C}$ におけるマンニトールの取り込みと同様に、PFOA の細胞間隙や血管への移行量を評価していると考え、25 $^{\circ}\text{C}$ における取り込み値から 0 $^{\circ}\text{C}$ における取り込み値を差し引いた値を特異的な取り込みとした。

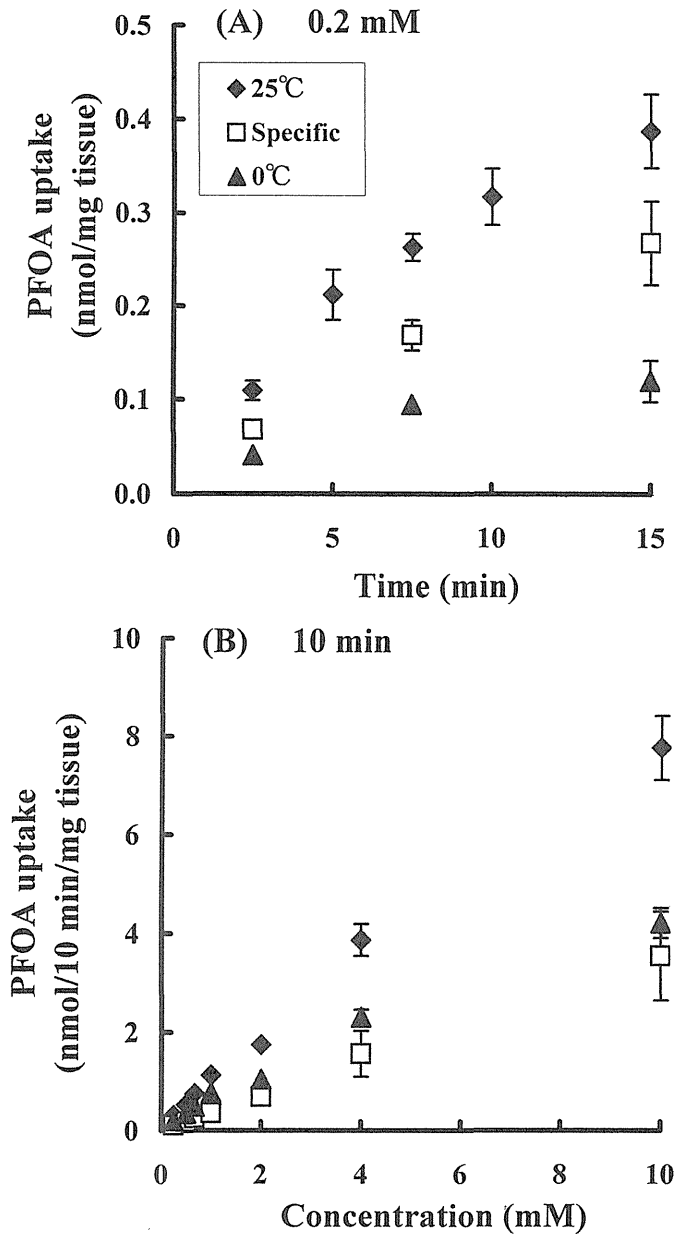


Fig. 2 - 1 PFOA uptake by renal cortical slices of rat kidney. Time course (A) and concentration dependency (B) of PFOA uptake in renal cortical slices are determined at 0°C and 25°C. Values are means  $\pm$  S.D. for four experiments.

まず、PFOA 濃度を 0.2 mM とした場合における PFOA 取り込みの時間依存性について検討した (Fig. 2 - 1A)。腎皮質切片への PFOA の取り込みは時間依存的に増加したが、10 分を超えると速度が低下する傾向が認められた。この結果から、腎皮質切片による PFOA の取り込み測定時間を 10 分に設定した。次に、PFOA の取り込みにおける濃度依存性を 0.2 - 10 mM の範囲で調べた (Fig. 2 - 1B)。10 分間での PFOA の取り込みは濃度依存性を示し、また、特異的な取り込みには、飽和がみられた。PFOA の濃度を 10 mM よりも高い濃度にするると、PFOA の結晶が析出したため、高濃度における検討はできなかった。この結果から Eadie - Hofstee plot を行ったが、Y 切片が負の値になったため、 $K_m$  および  $V_{max}$  を求めることができなかった。しかし、腎皮質切片への PFOA の取り込みには時間依存性および温度依存性が認められたことから、PFOA の腎皮質切片への取り込みには、輸送担体が関与していると考えられる。

## 第 2 節 腎皮質切片による PFOA の取り込みに対する性ホルモンの影響

第 1 章では、ラットにおいて PFOA の CLr が性ホルモン状態によって大きく変動することが示された。そこで次に、このような変動が血液中から尿細管上皮細胞への取り込み過程で生じている可能性を調べるために、性ホルモンによって腎皮質切片への PFOA の取り込み速度が変化するかどうかについて検討した。第 1 章と同様の性ホルモン状態のラットから腎皮質切片を作製し、PFOA の取り込み速度を測定した。PFOA の濃度は、CLr 測定時の初期血中濃度に近い 0.25 mM と 0.5 mM に設定し、取り込み時間は 5 分間とした。結果を Fig. 2 - 2 に示した。雌雄ラット、雄性ラットにエストラジオールを投与したラット ( $E_2$ )、去勢した雄性ラット (ORX)、去勢した雄性ラットにテストステロンを投与したラット (ORX+T) および卵巣を摘出したラット (OVX) について腎皮質切片への PFOA の取り込みを比較したところいずれの濃度においても有意な差は認められなかった。これらの結果は、PFOA の血液中から腎尿細管上皮細胞への取り込み速度は、性ホルモンによって大きく変動しな

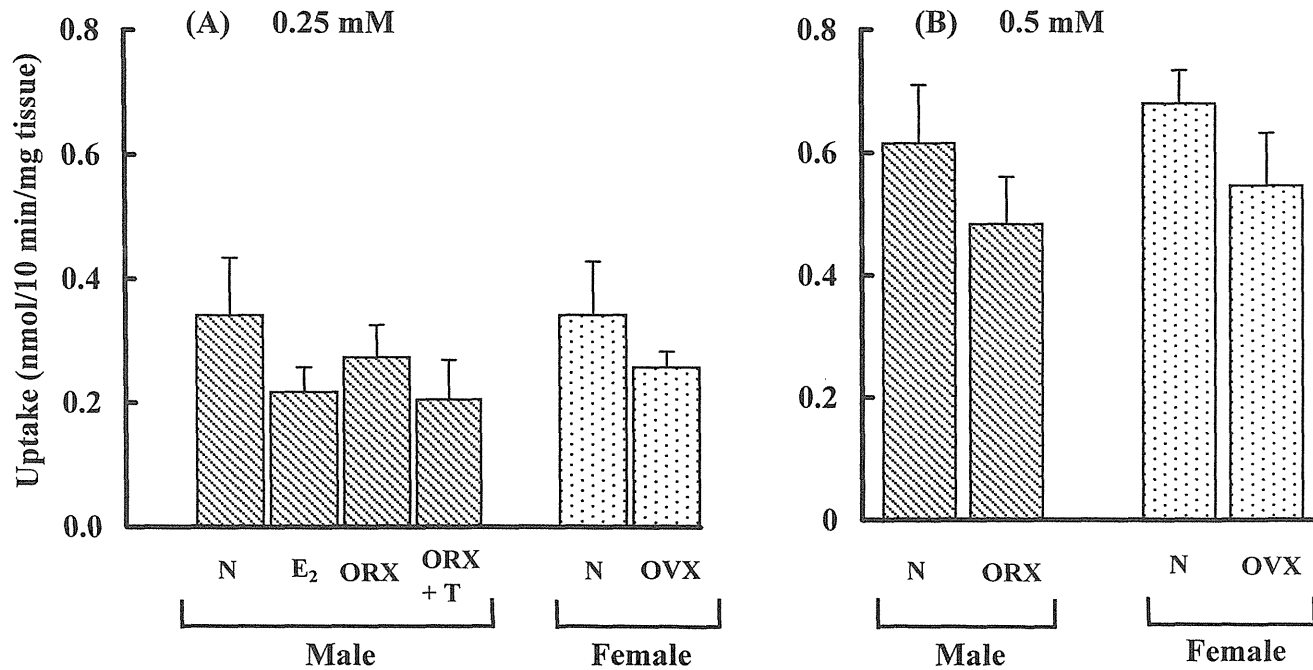


Fig. 2 - 2 Uptake of PFOA by renal cortical slice prepared from the rat under different hormonal states. Values represent temperature-dependent uptake. Values are means  $\pm$  S.D. for three rats. N, normal male or female rats; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Differences among six or four experimental groups are not statistically significant.

いことを示している。したがって、PFOA の CLr の性差は、PFOA の腎臓への取り込み過程で生じるものではないと考えられる。

### 第3節 考 察

腎皮質切片を作成する際に尿細管はふさがれると考えられている。したがって、腎皮質切片による PFOA の取り込みを測定する実験系は、血管から腎尿細管上皮細胞内へ PFOA の取り込みが評価できる系であると考えられている。本章では、PFOA が尿細管分泌される最初の過程となる血液中から腎尿細管上皮細胞へと取り込まれる過程において担体輸送が関与し、これが性ホルモンによって調節されているかどうかを調べるために腎皮質切片を用いて検討した。

腎皮質切片への PFOA の取り込みは、温度依存的、濃度依存的および時間依存的であった。このことから PFOA は、濃度勾配に従って単純拡散するのではなく、担体を介して輸送されるものと考えられる。種々の性ホルモン状態のラットから作製した腎皮質切片への PFOA の取り込み速度に大きな差は認められなかった。この結果は、PFOA の腎尿細管上皮細胞への取り込みには性差がないことを示しているものと考えられる。しかしながら、本章の結果では 0°C における PFOA の輸送量が大きい (Fig. 2 - 1)。このことから腎皮質切片への PFOA の非特異的な吸着が多いことが示唆される。これは PFOA が長い疎水基をもつためかもしれない。したがって腎皮質切片への取り込み実験は選択的な PFOA の輸送を十分に評価できていない可能性もある。

本章における検討の結果から、CLr における性差は尿細管上皮細胞から尿細管管腔への輸送過程あるいは、尿細管管腔からの再吸収の過程で生じるものであると推定される。

### 第3章 腎臓における各種輸送担体 mRNA 発現量の性ホルモンによる変動<sup>[38]</sup>

腎臓は、さまざまな生体内物質や生体外物質を体外へ排出するとともに、生体にとって必要な物質の再吸収を行う役割を担っている。これらの過程には多数の輸送担体が関与している。近年、腎臓の輸送担体が分子生物学的手法を用いてクローニングされ、その一次構造が明らかにされるとともに、性状の解析が行われている [17]。第1章では PFOA の腎尿細管における輸送には何らかの輸送担体が関与しており、これらの担体はプロベネシドで阻害されること、テストステロンにより抑制されることを明らかにした。本章では PFOA の腎臓における輸送に、既知の有機酸輸送担体が関与しているという作業仮説を立て、ラット腎臓におけるこれらの有機酸輸送担体の発現量が性ホルモン状態によって影響されるかどうかについて検討した。

#### 第1節 各種輸送担体 mRNA 発現量の性ホルモンによる変動

本章では、organic anion transporter family の3種 (OAT1、2、3)、organic anion transporting polypeptide family の3種 (oatp1、2、OAT - K)、sodium - dependent phosphate transporter family の2種 (NPT1、2) と multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) の計9種の輸送担体について mRNA の発現量を調べた。これら9種の輸送担体のラット腎尿細管上皮細胞における発現部位と、輸送の方向性および駆動力を示した (Fig. 3 - 1)。

Fig. 3 - 2 から Fig. 3 - 10 には様々な性ホルモン状態におけるこれら輸送担体の腎臓における mRNA 発現量を示した。なお、mRNA の発現量は、glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量との相対値とし、さらに雄性ラットの値を1として表した。

多くの輸送担体 mRNA の発現量は性ホルモンにより変動した (Fig. 3 - 2 - 3 - 10)。これらの結果を Table 3 - 1 にまとめた。



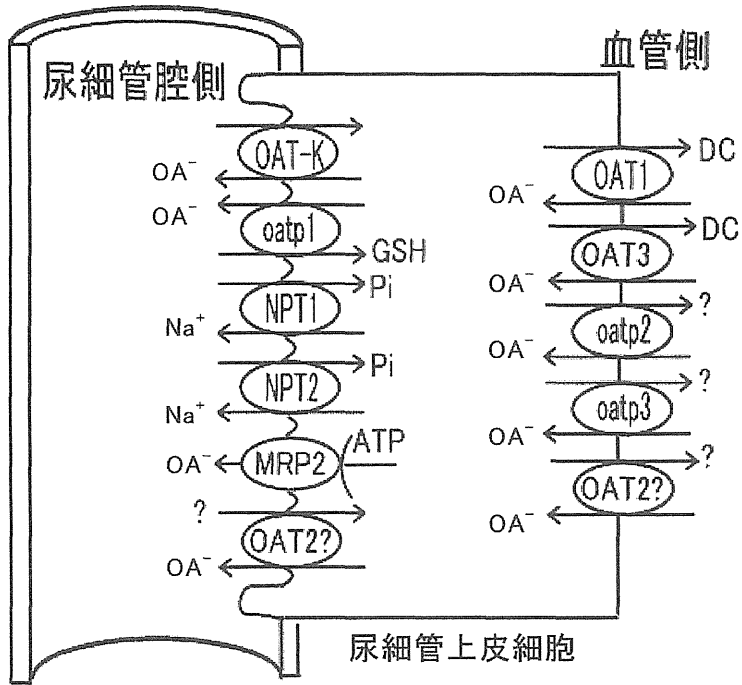


Fig. 3 - 1 Localization of various organic anion transporters in renal epithelial cells in the rat. OA<sup>-</sup>, organic anion; GSH, glutathion; Pi, phosphate ion; ATP, adenosine triphosphate; DC, dicarboxylic acid.

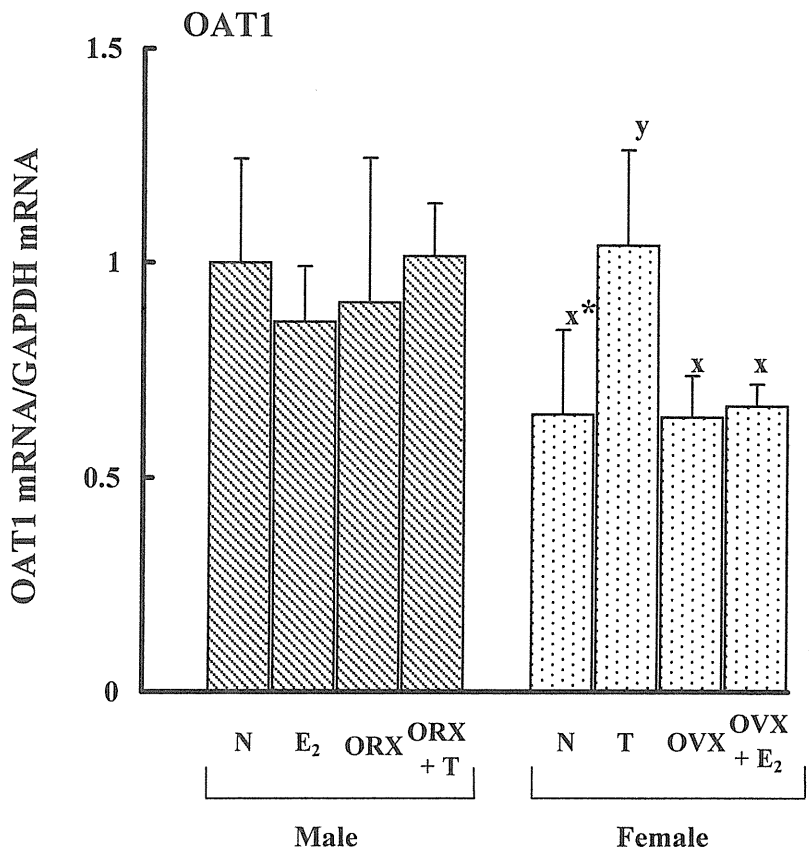


Fig. 3 - 2 Renal levels of OAT1 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).\*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

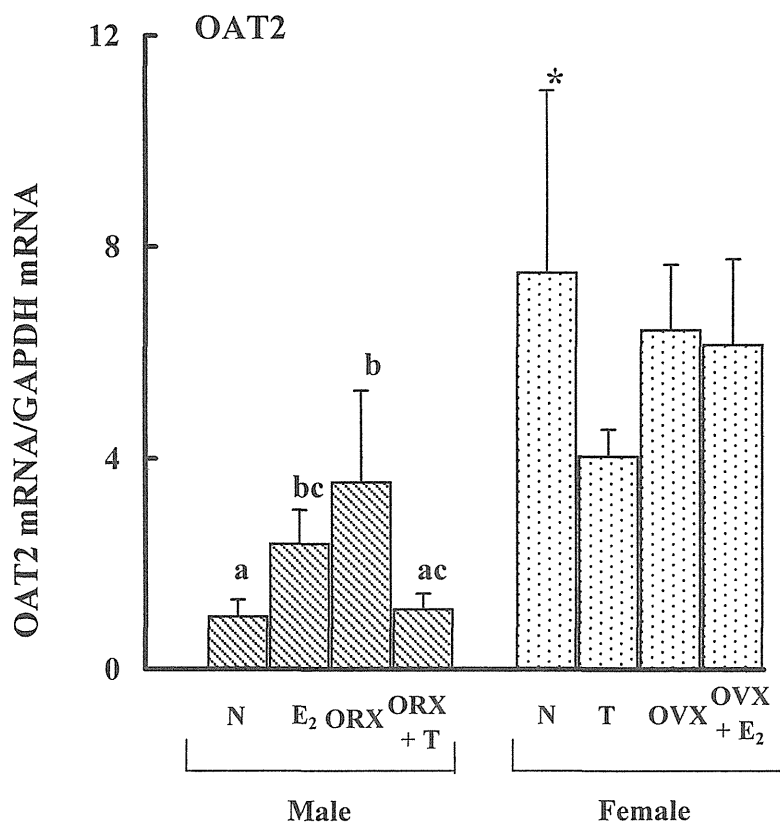


Fig. 3 - 3 Renal levels of OAT2 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a-c</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).\*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

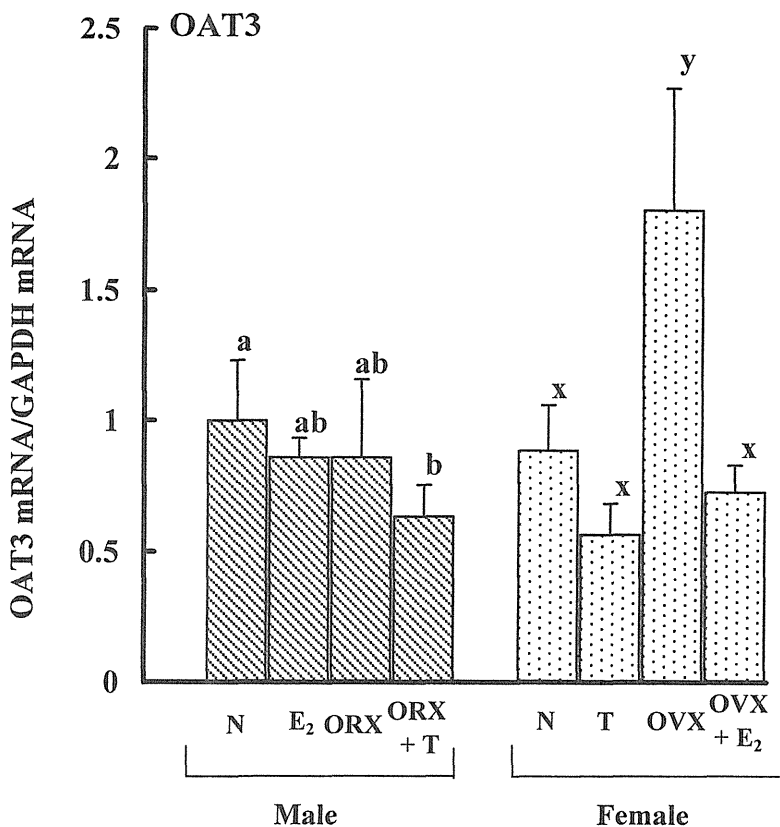


Fig. 3 - 4 Renal levels of OAT3 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). \*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

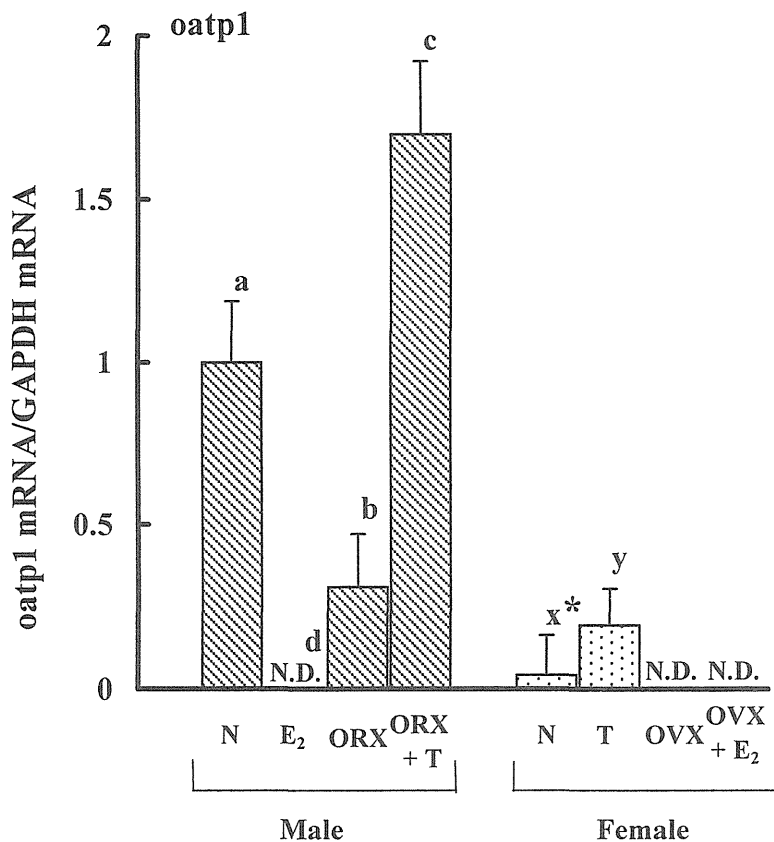


Fig. 3 - 5 Renal levels of oatp1 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone; N.D., not detected. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a-d</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). \*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

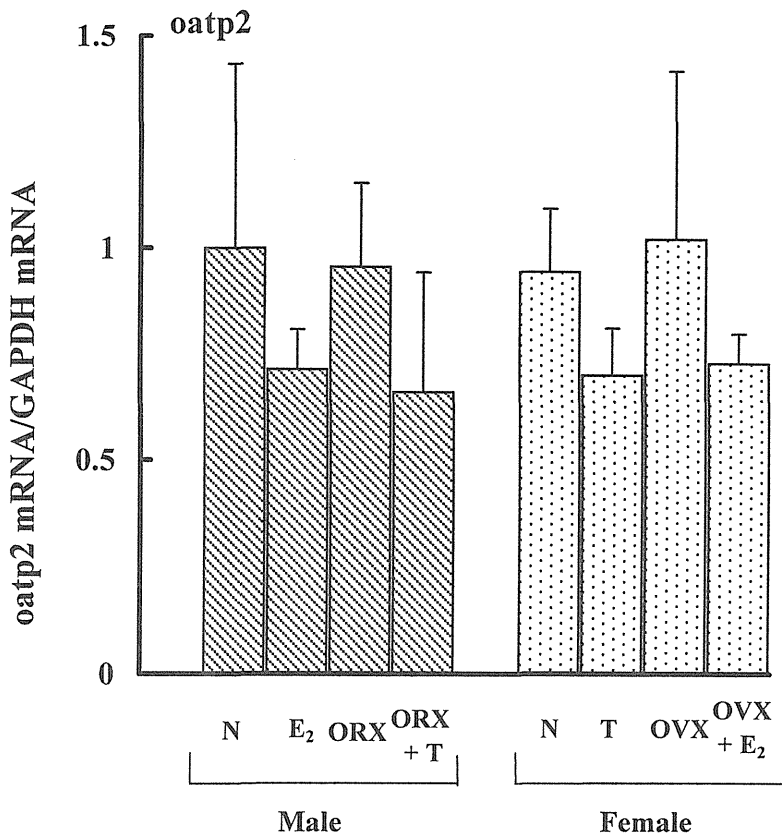


Fig. 3 - 6 Renal levels of *oatp2* mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means  $\pm$  S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. Differences among all experimental groups are not statistically significant.

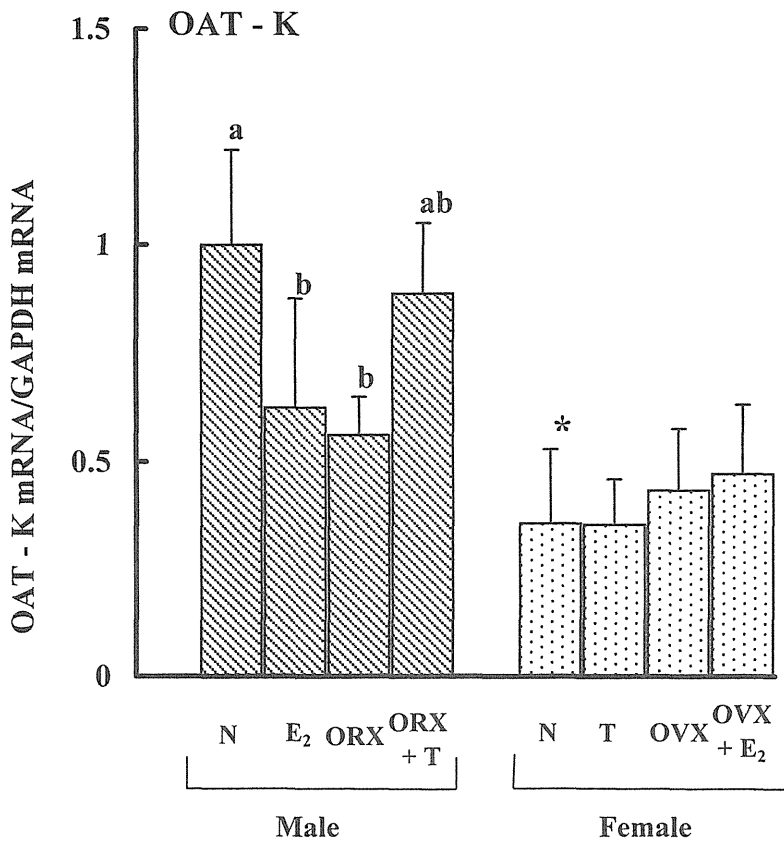


Fig. 3 - 7 Renal levels of OAT - K mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means  $\pm$  S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). \*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

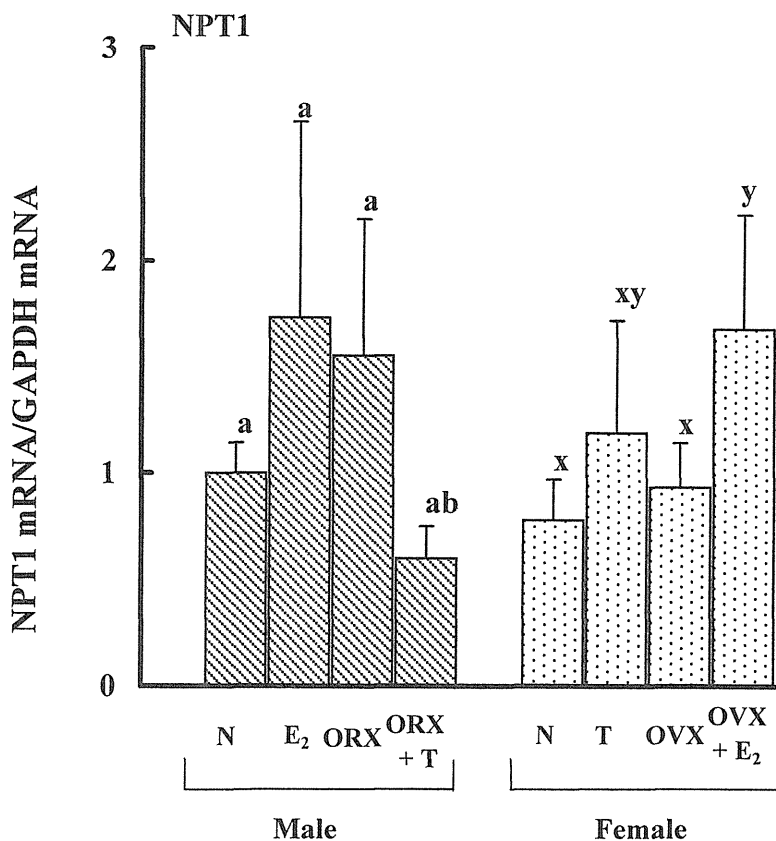


Fig. 3 - 8 Renal levels of NPT1 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ).



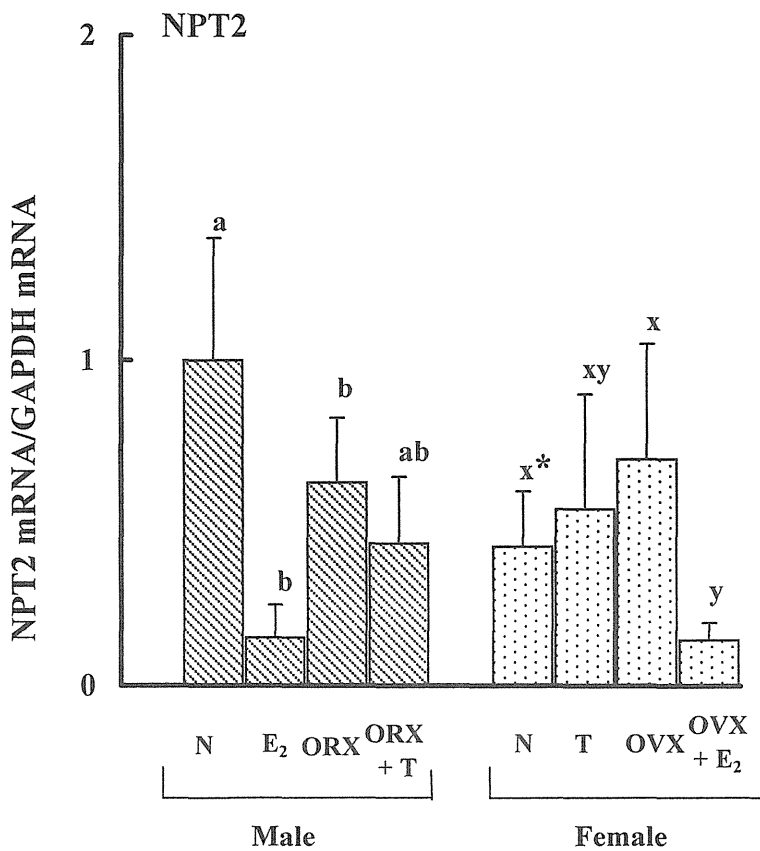


Fig. 3 - 9 Renal levels of NPT2 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means  $\pm$  S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. <sup>a,b</sup>, Differences among four experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among four experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.05$ ). \*, Difference is statistically significant between male and female rats ( $P < 0.05$ ).

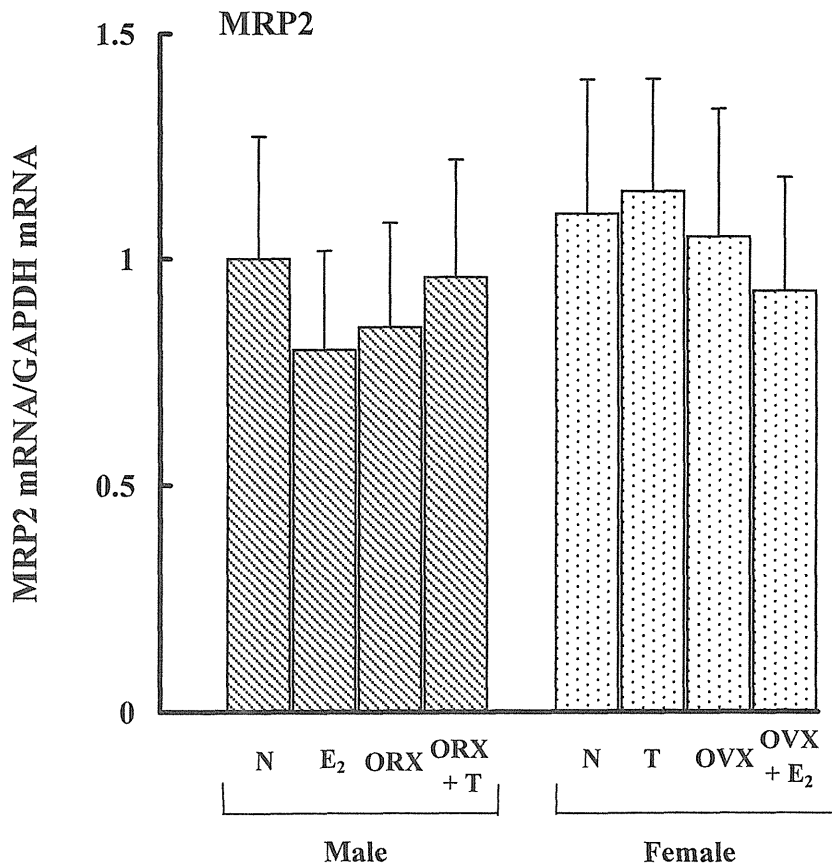


Fig. 3 - 10 Renal levels of MRP2 mRNA in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for 3 - 6 rats. Data represent the value relative to that of male rats. Differences among all experimental groups are not statistically significant.

Table 3 - 1 Summary of steady state mRNA levels of organic anion transporters in the kidney of rats under various hormonal states.

	OAT1	OAT2	OAT3	oatp1	oatp2	OAT-K	NPT1	NPT2	MRP2
<b>Male</b>									
Normal	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E <sub>2</sub>	0.86	2.38	0.86	N.D.	0.72	0.56	1.73	0.15	0.80
ORX	0.91	3.56	0.86	0.31	0.96	0.89	1.55	0.62	0.85
ORX+T	1.02	1.14	0.64	1.70	0.66	0.62	0.60	0.44	0.96
<b>Female</b>									
Normal	0.65	7.52	0.89	0.04	0.95	0.36	0.78	0.43	1.10
T	1.04	4.05	0.57	0.19	0.70	0.4	1.19	0.54	0.79
OVX	0.64	6.43	1.81	N.D.	1.02	0.47	0.94	0.69	1.05
OVX+E <sub>2</sub>	0.67	6.15	0.73	N.D.	0.73	0.36	1.68	0.14	0.93

Values are means for 3 - 8 rats. Data are from Fig. 3 - 2 - Fig. 3 - 10. N.D., not detected; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone.

性ホルモンにより mRNA 発現量が大きく変動したのは、OAT2、oatp1、OAT-K および NPT2 であった。

OAT2 は、腎臓での発現部位がラットの系統により異なり、血管側に発現しているという報告と、尿細管管腔側に発現しているとする報告がある [7、31、34]。OAT2 はパラアミノ馬尿酸 (PAH)、サリチル酸、エストロン 3-硫酸などを基質としていることが明らかにされているが、現在のところ駆動力は判明していない [31、47、59]。雌性ラットの OAT2 mRNA の発現量は、雄性ラットに比べ約 8 倍高かった。この発現量は雄性ラットを去勢すると (ORX) 増加し、去勢した雄性ラットにテストステロンを投与すると (ORX+T)、雄性ラットと同程度まで低下した。雌性ラットにテストステロンを投与した場合にも (T)、OAT2 の mRNA 発現量はやや低下した。卵巣切除した雌性ラット (OVX) および卵巣切除後にエストラジオールを投与 (OVX+E<sub>2</sub>) しても、正常の雌性ラットと大きな差はなかった。

oatp1 は、尿細管管腔側に発現しており、有機酸をグルタチオン (GSH) と

の交換輸送により輸送する [4、20、60]。oatp1 の mRNA は、雌性ラットの腎臓からはほとんど検出されなかった。去勢した雄性ラット (ORX) では mRNA の発現量が 70% 低下し、去勢した雄性ラットにテストステロンを投与すると (ORX+T)、雄性ラットの 1.7 倍まで増加した。雌性ラットにテストステロンを投与すると (T)、mRNA の発現量が增大し、雄性ラットの 1/5 程度となった。卵巣切除した雌性ラット (OVX) および卵巣切除後にエストラジオールを投与 (OVX+E<sub>2</sub>) しても、雌性ラットと同様に検出されなかった。雄性ラットにエストラジオールを投与した場合 (E<sub>2</sub>)、mRNA の発現量は大きく低下し、検出されなかった。これらの結果の一部は以前に報告された結果と一致していた [42]。

OAT - K は kidney - specific organic anion transporter の略称であり、cDNA 配列が極めて近い (99%) 2 種類 (OAT - K1 と OAT - K2) が報告されている (スプライシングバリエーションを入れると合計 14 種類があると報告されている) [44、55、71]。両者は遺伝子の相同性が非常に高いため、RT - PCR 法による mRNA の定量において別々に測定することが困難であった。本章ではこの 2 つをまとめて OAT - K として定量した。OAT - K は、腎臓に特異的に発現しているメトトレキサートを輸送する輸送担体としてクローニングされ、尿細管管腔に発現する両方向性の輸送担体である [45、65]。腎臓での OAT - K mRNA の発現量は、雌性ラットより雄性ラットで mRNA の発現量が高く、雄性ラットにエストラジオールを投与したとき (E<sub>2</sub>) および去勢した雄性ラット (ORX) で mRNA の発現量が低下した。このように oatp1 と類似の変化を示したが、oatp1 とは異なり雌性ラット群での性ホルモン状態の変動による発現量の変化は認められなかった。

NPT family は最近有機酸を輸送することが明らかにされた輸送担体である [68]。腎臓に発現している NPT ファミリーは、NPT1 と NPT2 がおり両者とも尿細管管腔側に発現しており、糸球体でろ過されたリン酸イオンの再吸収を行っている [40、43、48]。NPT2 は腎臓でリン酸イオンの再吸収を主に行っており、NPT1 の機能を検索する中で PAH などの有機酸化合物を輸送することが確認され、有機酸化合物の排泄担体として位置付けられたものである。

NPT1 の mRNA は各性ホルモン状態で大きな変動は示さなかったが、エストラジオールにより発現量が増大する傾向を示した。一方、NPT2 に関しては、エストラジオールによって mRNA の発現が抑制された。この結果は以前報告された膜ベシクルを用いたリン酸イオンの輸送実験の結果と一致する [3、9]。

OAT3 の mRNA の発現量は、卵巣を切除した雌性ラット (OVX) でのみ発現量の増加が認められ、他の性ホルモン状態では変動しなかった。OAT3 は、腎臓の血管側に発現しており、ジカルボン酸を駆動力として PAH、エストロン 3 - 硫酸などのほか、カチオン輸送体の基質になるシメチジンを輸送する他の有機酸輸送体ではみられない性質を有している輸送担体である [8、34、39、62]。

OAT1 は、血管側に発現が確認されており、OAT3 と同様にジカルボン酸との交換輸送系である [34、58、61、66]。この輸送体は PAH、メチル水銀のアセチル抱合体、メトトレキサートなどを輸送することが報告されている [33、54、69]。OAT1 は OAT2 と逆に雄性ラットにおいて雌性ラットより多く発現している。この輸送体 mRNA の発現量は、雌性ラットにテストステロンを投与することによって (T) 増大し、逆に、雄性ラットにエストラジオールを投与すると ( $E_2$ ) 減少した。

oatp2 は腎臓の血管側に発現しているが、発現量は低く、性ホルモンによる顕著な変動は認められなかった。

本章で検討した輸送担体のうち唯一、一次性能動輸送担体である MRP2 (canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT) は、管腔側に発現し腎臓の細胞内から管腔内へ基質を輸送する [53、56、57]。内因性物質のグルクロン酸抱合体 ( $E_2$  17 $\beta$  - G、抱合型ビリルビン) やメトトレキサートなどを輸送する [35]。MRP2 の mRNA 発現量は各性ホルモン状態で大きな差を示さなかった。

次に、雌雄両性のラット 8 群で有意な差が認められた輸送担体について、さまざまな性ホルモン状態における各輸送担体の mRNA の発現量とマンニトール非存在下での PFOA の CLr との相関性を調べ、Table 3 - 2 に示した。

Table 3 - 2 Relationships between CLr of PFOA and mRNA levels of various organic anion transporters in rat kidney

	OAT1	OAT2	OAT3	oatp1	OAT-K	NPT2
<i>r</i>	- 0.730	0.751	0.734	- 0.629	- 0.563	- 0.132
<i>P</i>	0.040	0.032	0.577	0.095	0.147	0.755

*r*, coefficient of correlation; *P*, critical rate.

PFOA CLr との相関性が有意に高かったものは、OAT1 および OAT2 であった。oatp1 mRNA の発現量は、雌性ラットでの発現量が非常に低く雄性ラットにエストラジオールを投与したラット (E<sub>2</sub>)、卵巣を摘出したラット (OVX) および卵巣摘出後にエストラジオールを投与したラット (OVX+E<sub>2</sub>) で検出できなかった。このため、有意な相関は認められなかったが、本研究で mRNA の発現が検出できなかったホルモン状態を除いて相関性を分析すると PFOA CLr と oatp1 mRNA の発現量の相関係数 (*r*) は、- 0.915 で、危険率 (*P*) は 0.0293 となり有意な相関関係が得られた。このように、いくつかの輸送担体で PFOA CLr との相関が認められたことから、これらの輸送担体が PFOA の腎臓からの排泄に関与しているものと考えられる。これら輸送担体の PFOA の腎臓からの排泄に対する相対的な寄与率とその輸送の方向性を調べるために、PFOA CLr といくつかの輸送担体との多重相関を調べ、PFOA の排出に関与している輸送体の予測を試みた。多重相関は、変数減少法により行い、多重共線性を考慮して輸送体同士の発現の変動に相関性のあるものは、どちらか片方のみを計算に用いた。計算の結果、説明変数として OAT2 と OAT3 が残り、重回帰式が  $Y = 1.2672 \times (\text{OAT2}) + 7.7338 \times (\text{OAT3}) - 7.4094$  ( $R^2 = 0.8194$ ,  $P = 0.0139$ ) となった。多重相関の相関性は単一輸送体との比較を行った場合より高くなった。この結果は、PFOA の輸送に OAT2 と OAT3 の両者が関与していることを示唆している。

## 第2節 考 察

第1章の結果から、PFOAの腎臓からの排泄にはいくつかの輸送担体が関与し、プロベネシドにより阻害され、テストステロンにより調節される性質をもつものと考えられる。そこで、本章では、PFOAの腎臓からの排泄に関与する輸送担体を同定するための手掛かりを得るため、既にクローニングされている輸送担体の中から候補をしぼり、これらのラット腎臓における mRNA の発現量を測定した。本章の結果を学術論文として発表した直後に、2つの研究グループから同様の結果が報告された [5、6、32]。

本章の結果より、性ホルモン状態によって、いくつかの輸送担体 mRNA の発現量が変動することが明らかとなったので、PFOAのCLrと個々の輸送担体 mRNA 発現量の変動に相関性があるかどうか検討したところ、OAT1 および OAT2 は有意な相関性を示し、また、条件付きで *oatp1* も有意な相関性を示した。したがって、PFOAの輸送にはいくつかの輸送担体が関与していると考えられる。変数減少法を用いた多重相関分析によると、OAT2とOAT3がPFOAの輸送に関与しているという結果となった。したがって、OAT1、OAT2、OAT3 および *oatp1* が PFOA の輸送担体の候補としてうかび上がった。本章における検討では必ずしも全ての PFOA 輸送担体を選び出せるわけではないので、他の輸送担体が PFOA を輸送する可能性も視野に入れて検討を行う必要がある。

## 第 4 章 MRP2 欠損ラットおよび低リン食を与えたラットを用いた PFOA 腎クリアランスの測定

第 1 - 3 章に示した結果は、PFOA の血液中から腎臓尿細管細胞への取り込み過程、尿細管からの再吸収過程には何らかの輸送担体が関与していることを示唆するものである。尿細管分泌の過程においては、これら 2 つの過程に加えて尿細管上皮細胞から尿細管管腔側に物質を輸送する輸送過程が考えられる。尿細管上皮細胞から尿細管管腔への排出を簡便に評価する実験系は現段階ではない。個々の輸送担体の *in vivo* における役割を明らかにする方法としては、これらの輸送担体のトランスジェニックマウスにおける PFOA の体内動態の変化を観察することが考えられる。しかし、PFOA の腎臓からの排泄には種差がありラットとマウスで大きく異なることが平成 13 年度の住谷の修士論文研究から明らかになっている [73]。さらに、ラットとマウスでは発現している輸送体分子に種差があることも報告されている [17]。したがって、ラットにおける PFOA の輸送担体の検索にトランスジェニックマウスを用いることはあまり良い方法とはいえない。次に、RNA interference による遺伝子発現を抑制する方法が考えられる。この方法はラットにも適用可能であり特異的な遺伝子のみを抑制することができる。しかしながら、輸送担体など配列の相同性が高い複数の遺伝子から特異的な遺伝子を区別することや、*in vivo* での臓器へのターゲティングの難しさなどの問題を含んでいる。そこで、本章では、輸送担体が欠損あるいは変動していることが報告されているラットを用いて、PFOA の動態の変化について検証する。

### 第 1 節 Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) における PFOA 腎クリアランスの変化

高ビリルビン尿症ラット、Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) と名付けられたラットは、研究の結果から ATP 依存性のトランスポーター、cMOAT (MRP2) をコードする遺伝子の 2564 番目の塩基 G が A に置き換わり、ストップコード



ンとなることにより MRP2 が機能的に欠損していることが明らかになっている [18]。EHBR は、腎臓の尿細管管腔に発現している MRP2 も欠損している。本節では、雌雄 EHBR の PFOA の CLr をマンニトール存在下で調べた。EHBR は Sprague - Dawley (SD) より出現した変異体であるため、比較対照として SD ラット (SDR) を用いた。

Table 4 - 1 に示したように、雌雄ラットとも SDR と比較して EHBR の方の体重が重かった。また、体重に対する肝臓の重量比は EHBR の方が高い傾向にあり、雌性ラットでは有意差が認められた。SDR と EHBR 間の体重に対する腎臓の重量比には、雌雄ラットに有意な差は認められなかった。

Table 4 - 1 Body weight, liver weight and kidney weight of SDR and EHBR

		Body weight (g)	Liver/body weight (× 100)	Kidney/body weight (× 100)
<b>SDR</b>	<b>Male</b>	273.05 ± 3.06	3.81 ± 0.69	0.88 ± 0.06
	<b>Female</b>	200.05 ± 10.64*	3.06 ± 0.09	0.87 ± 0.08
<b>EHBR</b>	<b>Male</b>	329.48 ± 8.12*#	4.51 ± 0.13	0.92 ± 0.08
	<b>Female</b>	243.08 ± 8.17*#	3.97 ± 0.11#	0.94 ± 0.04

SDR, Sprague - Dawley rat; EHBR, Eisai hyperbilirubinuria rat. Values are means ± S.D. for three or four rats. \*, Differences from the value of male rats are statistically significant ( $P < 0.05$ ). #, Differences from the value of SDR are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 - 1A に EHBR と SDR に PFOA (48.63  $\mu\text{mol/kg}$  体重) を静脈内に単回投与した時の血漿中の PFOA 濃度 (A) と累積尿中排泄量の経時変化 (B) を示した。PFOA 静脈内投与後の血漿中濃度の変化には、EHBR と SDR との間に大きな差はなかった。EHBR にも血漿中濃度変化および尿中排泄に性差が認められた。経時的な尿中排泄率にも EHBR と SDR の間に大きな差は認められなかった。Table 4 - 2 には、PFOA の CLr、投与 300 分後における肝臓および腎臓中の PFOA の濃度、肝臓および腎臓と血漿中 PFOA との濃度比を示した。

PFOA の CLr には、SDR、EHBR ともに性差が認められ、SDR では雄性ラットより雌性ラットで約 10 倍高く、EHBR では雄性ラットより雌性ラットで約 15 倍高かった。SDR と EHBR との間の差は雌雄ラットともに認められなかった。肝残存量、腎残存量についても同様であった。腎臓/血中濃度比は、SDR では雌性ラットで約 2 倍高いが、EHBR では雌雄ラットに有意な差は認められなかった。また、肝臓/血中濃度比は、SDR では雌雄ラットに有意な差は認められなかったが、EHBR では雌性ラットで雄性ラットの約 1/2 であった。これらのことは、1) SDR では、腎臓の取り込みが雌性ラットで高いが、肝臓の取り込みには雌雄ラットで差がないこと、また、2) EHBR では、肝臓の取り込みは、雄性ラットの方が高いが腎臓への取り込みには雌雄ラットで有意な差はないことを示している。すなわち、EHBR と SDR では、両者とも PFOA の尿中排泄には同様な性差が認められているが、腎臓や肝臓への分布様式が異なることが示された。MRP2 が PFOA の尿細管管腔への排泄に関与している可能性は低いですが、MRP2 欠損により変化した要因 (輸送担体の発現量の変化、血漿ビリルビン抱合体の増加など) によって PFOA の動態が異なっていると考えられる。

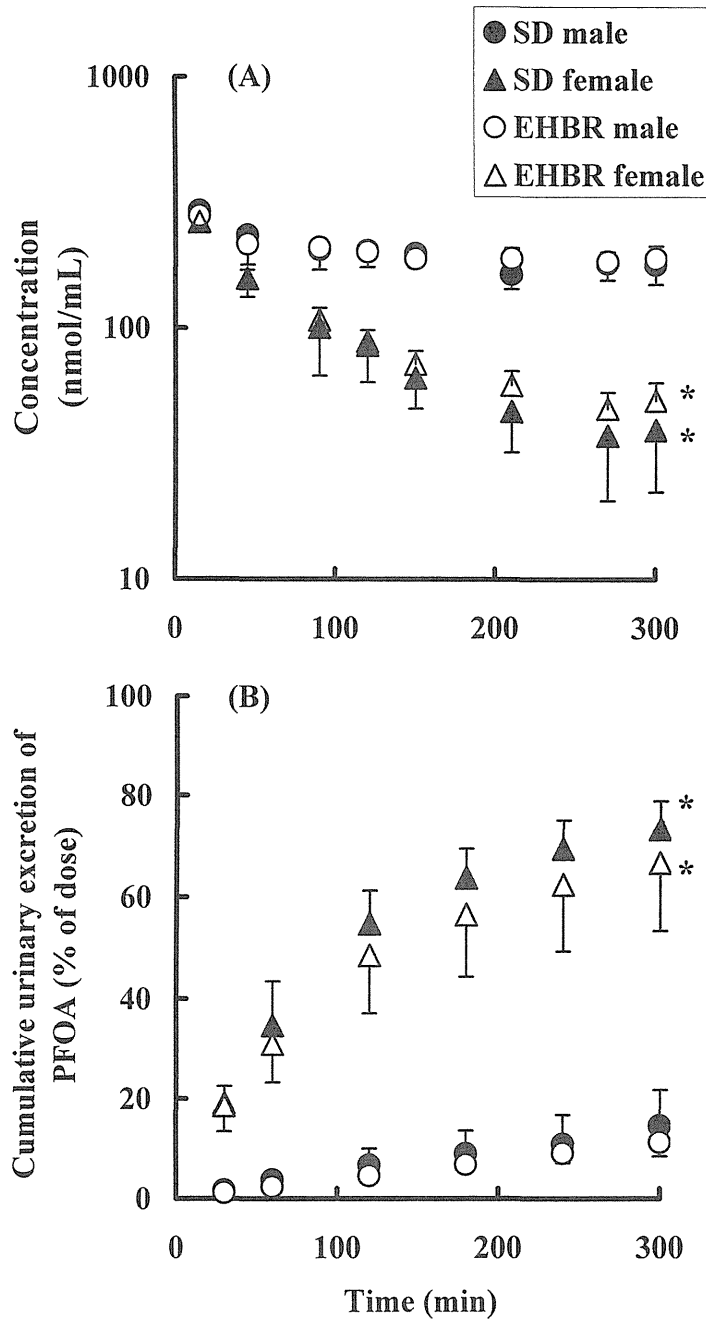


Fig. 4 - 1 Plasma concentration - time profile (A) and cumulative excretion-time profile (B) of PFOA after a intravenous injection in SDR and EHBR. Values are means  $\pm$  S.D. for four rats. Differences between SDR and EHBR are not statistically significant. \*, Differences from the value of male rats are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

Table 4 - 2 PFOA kinetics in the SDR and EHBR

	SDR		EHBR	
	Male	Female	Male	Female
CLr (mL/h/kg b.w.)	8.130±4.851	85.01±21.96*	5.485±1.910	83.83±16.69*
C <sub>Liver 300 min</sub> (nmol/g liver)	229.63±55.26	47.05±15.25*	213.48±22.28	29.74± 9.83*
C <sub>Kidney 300 min</sub> (nmol/g kidney)	94.21±18.21	41.29±17.89*	112.82±26.55	45.31±13.18*
C <sub>Liver</sub> /C <sub>p</sub>	1.264±0.395	1.241±0.151	1.123±0.046	0.565±0.095* <sup>#</sup>
C <sub>Kidney</sub> /C <sub>p</sub>	0.517±0.124	1.050±0.020*	0.609±0.208	0.865±0.104

CLr, renal clearance of PFOA; C<sub>Liver 300 min</sub>, hepatic concentration of PFOA at 300 min; C<sub>Kidney 300 min</sub>, renal concentration of PFOA; C<sub>Liver</sub>/C<sub>p</sub>, concentration ratio of liver to plasma at 300 min; C<sub>Kidney</sub>/C<sub>p</sub>, concentration ratio of kidney to plasma at 300 min; SDR, Sprague - Dawley rat; EHBR, Eisai hyperbilirubinuria rat. Values are means ± S.D. for three or four rats. \*, Differences from the value of male rats are statistically significant ( $P < 0.05$ ). #, Differences from the value of SDR are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

## 第2節 低リン食による PFOA 腎クリアランスの変化

腎臓におけるリン酸イオンの再吸収は、小腸からの吸収と並んで生体内のリン酸イオンのホメオスタシスに重要な役割を果たしている。腎臓におけるリン酸イオンの再吸収はほとんど NPT2 により行われている [40、43、48]。腎臓におけるリン酸イオンの再吸収は、食餌性リン酸イオンの摂取量、酸/塩基代謝、甲状腺ホルモンや副腎皮質ホルモンの血漿濃度などにより制御されることが知られている。最近の研究から、これらの変動が尿細管上皮細胞管腔側膜への NPT2 タンパク質の移行過程と、腎臓の NPT2 mRNA 発現量の変動により起こることが明らかになった [16、46、49]。第3章の結果から性ホルモンにより変動することが示されたので、PFOA の再吸収に NPT2 が関与しているかどうかを検討した。

低リン食飼育した雄性ラットでは PFOA を静脈内に単回投与した後の血漿中濃度変化には低リン食飼育による影響は認められなかったのに対し、雌性ラットでは低リン食飼育により上昇が認められた (Fig. 4 - 2)。同様に PFOA の尿中排泄も雄性ラットでは低リン食飼育による変化は認められなかったのに対し、雌性ラットでは有意に低下した。その結果、雌性ラットでのみ低リン食飼育により PFOA の CLr が有意に低下した。また、雌雄ラットとも低リン食飼育により肝臓への PFOA の取り込みに変化はなかったが、腎臓への取り込みが有意に低下していた (Table 4 - 3)。

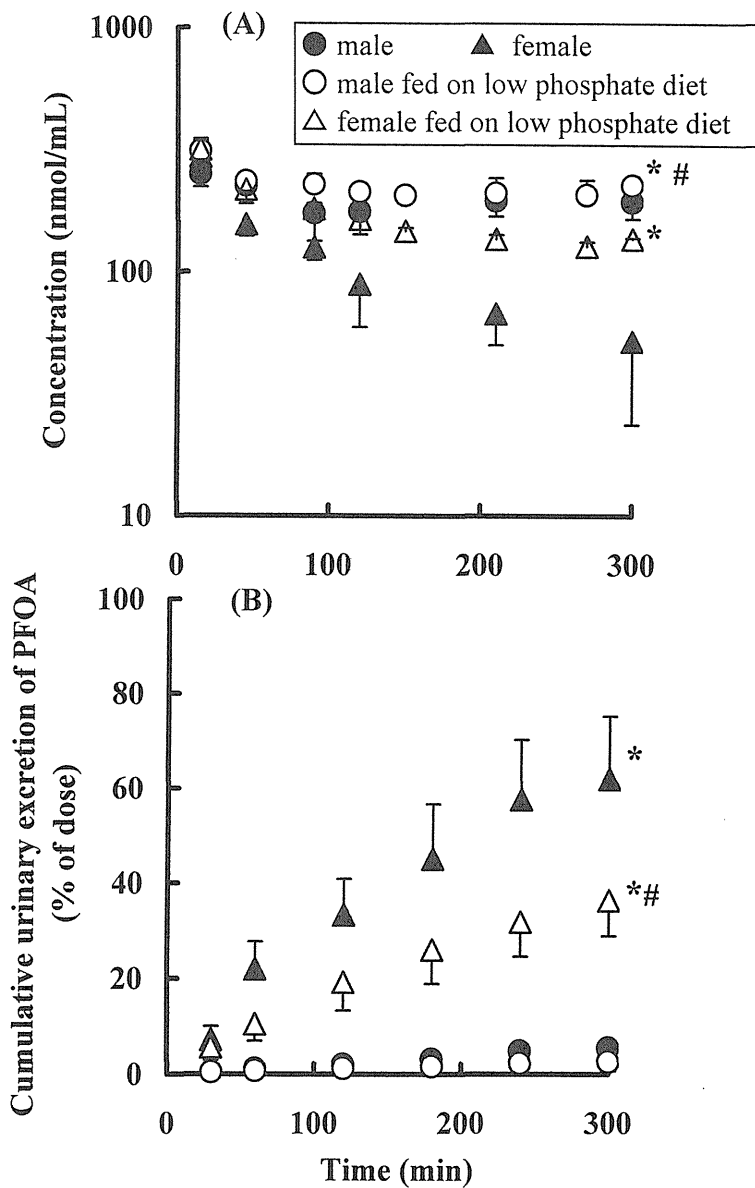


Fig. 4 - 2 Plasma concentration - time profile (A) and cumulative excretion-time profile (B) of PFOA after an intravenous injection. Rats fed on low phosphate diet (0.02% phosphorus) for 7 days. Values are means  $\pm$  S.D. for four rats.

\*, Differences from the value of male rats are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

#, Differences from rats fed a normal diet are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

Table 4 - 3 PFOA kinetics in the rat fed on low phosphate diet

	Normal diet		Low phosphate diet	
	Male	Female	Male	Female
CLr (mL/h/kg b.w.)	1.99 ± 1.24	47.48 ± 14.02*	1.14 ± 0.78	22.36 ± 4.44*#
C <sub>p 15 min</sub> (nmol/mL)	308.28 ± 33.66	356.39 ± 35.74	314.10 ± 37.75	318.42 ± 25.80
C <sub>p 300 min</sub> (nmol/mL)	236.06 ± 4.64	185.30 ± 31.89*	229.15 ± 19.22	137.72 ± 1.42*#
AUC <sub>0-300 min</sub> (μmol·min/mL)	65.86 ± 13.32	33.72 ± 6.56*	63.46 ± 6.23	47.49 ± 1.56*#
C <sub>Liver</sub> /C <sub>p</sub>	1.17 ± 0.08	0.81 ± 0.36	0.79 ± 0.20	0.62 ± 0.03
C <sub>Kidney</sub> /C <sub>p</sub>	0.93 ± 0.14	1.40 ± 0.34	0.46 ± 0.12 <sup>#</sup>	0.65 ± 0.09 <sup>#</sup>

CLr, renal clearance of PFOA; C<sub>15min</sub>, plasma concentration of PFOA at 15 min, C<sub>300 min</sub>, plasma concentration of PFOA at 300 min; AUC<sub>0-300 min</sub>, area under the plasma concentration time curve (0 - 300 min); C<sub>Liver</sub>/C<sub>p</sub>, concentration ratio of liver to plasma at 300 min; C<sub>Kidney</sub>/C<sub>p</sub>, concentration ratio of kidney to plasma at 300 min. Rats fed on low phosphate diet (0.02% phosphorus) for 7 days. Values are means ± S.D. for three or four rats.

\*, Differences from the value of male rats are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

#, Differences from rats fed a normal diet are statistically significant ( $P < 0.05$ ).

### 第3節 考 察

EHBR ラットでは PFOA の CLr に大きな変動がなかったことから PFOA の尿中排泄に MRP2 はほとんど関与していないことが明らかとなった。また、低リン食飼育によって雌性ラットの CLr が低下することが明らかとなった。さらに低リン食飼育が NPT2 の発現を上昇させること [46] から、NPT2 が PFOA の尿中排泄に関与しているものと考えられる。本章の実験で低リン食飼育した雌性ラットで尿中排泄率の低下が認められたことと第3章で示したエストラジオールにより mRNA の発現量が低下するという結果からから考えて、NPT2 は、PFOA を尿細管管腔へ排出する可能性が高い。

本章での検討により、遺伝的あるいは後天的要因で、PFOA の体内動態に変化が生じることがあらためて認識され、これらの変化の原因が腎臓のみならず、肝臓にもあることが示唆された。この事実は環境化学物質である PFOA のヒトへの蓄積性が生理的な条件によって大きく異なってくる可能性を示唆するものであり、PFOA の汚染の進展に伴い、PFOA の危険性を予測するための情報としても非常に有用であろう。本章で示した EHBR での実験のように PFOA の CLr は変化しないものの PFOA の体内動態に変化が起こり、PFOA の毒性の発現に違いが生じる可能性もある。ヒトにおける PFOA の毒性発現を予測するためには、今後さまざまな病態モデル動物を用いた PFOA の動態解析が必要である。



## 第 5 章 アフリカツメガエル卵母細胞強制発現系を用いた PFOA 輸送担体の検索 <sup>[26]</sup>

第 1 章から第 4 章に示した結果から、いくつかの輸送担体が PFOA の腎臓からの排泄に関与していることが示唆された。しかし、これらの輸送体が実際に PFOA を輸送するかどうかについては情報が無い。そこで本章では輸送体遺伝子を細胞に強制的に発現させて PFOA を輸送するかどうかを調べることを試みた。本章では、形質膜タンパク質を非常に効率よく形質膜に発現させることができるアフリカツメガエル卵母細胞を用い、同細胞に輸送担体を発現させ、PFOA の取り込みの上昇が起こるかどうかを検討した。

### 第 1 節 oatp1 による PFOA の輸送

oatp1 は、腎臓の尿細管管腔側に発現している輸送担体で両方向に基質を輸送することが知られている (Fig. 3 - 1)。第 3 章において oatp1 の mRNA 発現量と PFOA の CLr は部分的に相関が認められた。また、最近 oatp1 は腎尿細管において E<sub>2</sub>17β - G の再吸収に関与していることが報告された [11、27]。これらのことから、PFOA が oatp1 により輸送されることが予測される。

本章の研究では、oatp1 の cRNA を *in vitro* で合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し、3 日後に TCA および PFOA の取り込みを測定した。TCA は oatp1 により輸送されることが明らかになっている物質であり、本実験のポジティブコントロールとして用いた。TCA のアフリカツメガエル卵母細胞への取り込み量は、oatp1 cRNA 注入群で水注入群の約 9 倍であった。また、PFOA の取り込みは水注入群に比べて 1.5 倍高かった (Fig. 5 - 1)。このことから oatp1 が PFOA を輸送することが明らかとなった。

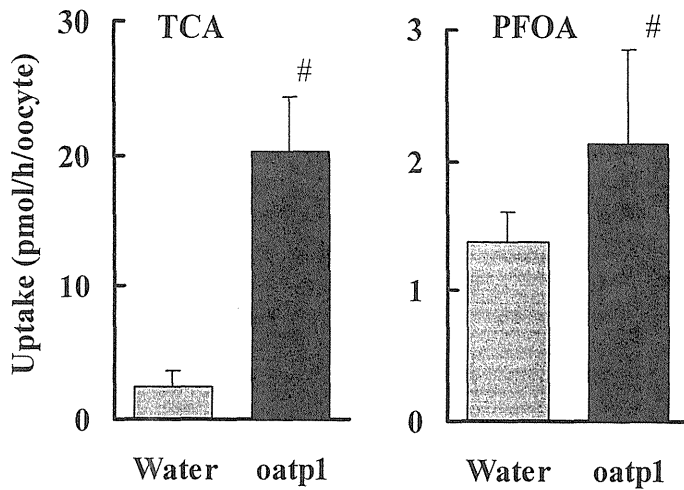


Fig. 5 - 1 PFOA uptake by oatp1 - expressed oocytes. Values are means  $\pm$  S.D. for ten oocytes. #, Statistically significant difference from the value of water - injected oocytes ( $P < 0.01$ ).

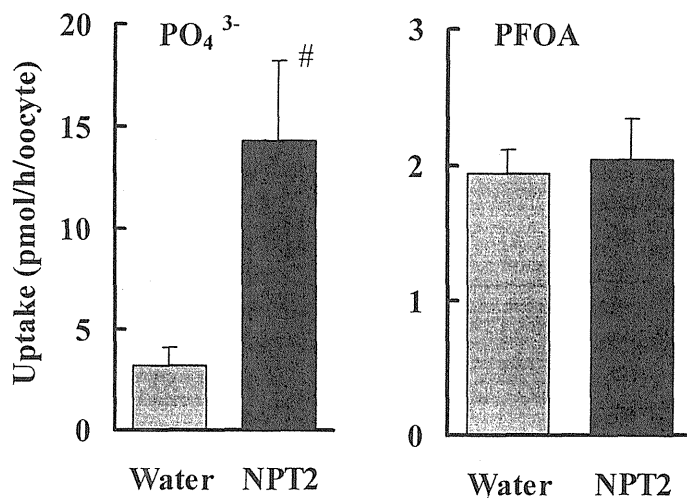


Fig. 5 - 2 PFOA uptake by NPT2 - expressed oocytes. Values are means  $\pm$  S.D. for ten oocytes. #, Statistically significant difference from the value of water - injected oocytes ( $P < 0.01$ ).

## 第2節 NPT2 による PFOA の輸送

NPT2 は、腎臓の尿細管管腔に発現しており、糸球体でろ過されたリン酸イオンの再吸収を行っている (Fig. 3 - 1)。第3章において示したように NPT2 mRNA の発現量がエストラジオールにより抑制されること、および、第4章において示したように低リン食飼育により雌性ラットで PFOA の CLr が低下したことから、卵巣を切除したラット (OVX) における PFOA の腎尿細管への排出に関与している可能性が考えられる。そこで、NPT2 が PFOA を輸送するかどうかをアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討した。生理的な基質である正リン酸は NPT2 cRNA 注入群で水注入に対して有意に輸送が増加したが、PFOA の輸送には両者に変化は認められなかった (Fig. 5 - 2)。したがって、NPT2 は PFOA の輸送を仲介しないものと考えられる。

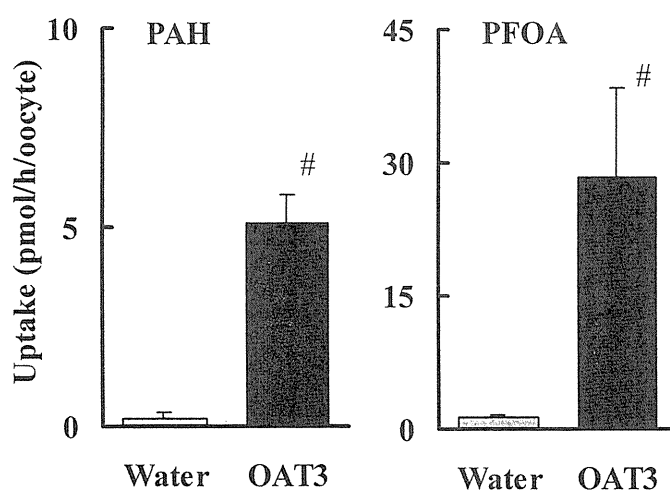


Fig. 5 - 3 PFOA uptake by OAT3 - expressed oocytes. Values are means  $\pm$  S.D. for ten oocytes. #, Statistically significant difference from the value of water - injected oocytes ( $P < 0.01$ ).

## 第3節 OAT3 による PFOA の輸送

OAT3 は腎臓の血管側に発現しており本研究で用いた種々の性ホルモン状

態の中では卵巣を切除したラット (OVX) でのみ、その mRNA およびタンパク質の発現が上昇する輸送担体である。OAT3 が卵巣を切除したラット (OVX) での PFOA CLr の上昇していることと関係があると考え、この発現系で検証することとした。OAT3 の基質となることが報告されている PAH をポジティブコントロールとして用いたところ PAH のアフリカツメガエル卵母細胞への取り込みは、OAT3 cRNA 注入群において水注入群の約 22 倍の値を示した。また、PFOA の取り込みも水注入群と比較して約 22 倍高かった (Fig. 5-3)。このことから OAT3 は、PFOA を輸送することが明らかとなった。

#### 第 4 節 考 察

本章の研究から *oatp1* および OAT3 が PFOA を輸送する輸送担体として同定された。これらは PFOA を輸送する輸送担体の存在を直接証明したはじめての例である。*oatp1* については、コントロールの雄性ラット、去勢した雄性ラット (ORX)、去勢した雄性ラットにテストステロンを投与したラット (ORX+T) およびテストステロンを投与した雌性ラット (T) の 4 群において、腎臓での mRNA の発現量と PFOA の CLr との間に負の相関が認められることから、腎尿細管からの再吸収に関与しているものと考えられる。一方、OAT3 は、第 3 章で示されたように、卵巣を切除したラット (OVX) でのみ mRNA の発現が上昇する輸送担体である。本研究で示した卵巣を切除したラット (OVX) での PFOA CLr の上昇は OAT3 の発現量の増加によるものである可能性が考えられる。しかしながら、一方で、腎皮質切片を用いての PFOA の取り込みを評価したところ卵巣を切除したラット (OVX) では上昇が認められないことを第 2 章で示し、これらは、腎尿細管の血管側に発現している OAT3 が PFOA の輸送を行っていると考えると矛盾する結果である。その原因の 1 つとして、OAT3 以外の輸送担体が血管側からの PFOA の取り込みに OAT3 よりも優位に関与している可能性が考えられる。また、OAT2 については PFOA を輸送しないという予備的な結果を得ているものの更に検討を加える必要がある。

## 第 6 章 OAT3 タンパク質の発現 [25]

第 5 章の実験から OAT3 が PFOA を輸送する輸送担体の 1 つであることが明らかとなった。OAT3 mRNA の発現量は必ずしもタンパク質の発現量を反映するものではない可能性がある。さらに、輸送担体は、膜タンパク質であるため、翻訳されたタンパク質の膜への移行過程で複雑な翻訳後修飾を受けることが多い。本節では、異なる性ホルモン状態のラット腎臓から粗膜画分を調製し、OAT3 のウエスタンブロッティングを行い、腎臓における OAT3 タンパク質の発現量を定量し、mRNA の発現量が膜画分におけるタンパク質の発現量に反映するのかどうかを検討した。

### 第 1 節 OAT3 タンパク質発現に対する性ホルモンの効果

本研究で用いた抗体では、主に 69 kDa と 100 kDa のバンドが認められた、また、62 kDa 付近にもバンドが認められた (Fig. 6 - 1)。Hasegawa らは、OAT3 のウエスタンブロッティングを行った際、54 kDa と 65 kDa の 2 本のバンドを検出している [15]。また、Ji らは、同様の実験で 72 kDa 単一のバンドを得ている [21]。GeneBank に登録されているアミノ酸配列をもとに算出した OAT3 の分子量は 59 kDa である。本章で得られたバンドのサイズが他の報告より大きいと、サンプルバッファーに 2 -メルカプトエタノール以外にジチオトレイトールの添加、サンプルの尿素による可溶化を試みたが、バンドを一本に収束させることはできなかった。

69 kDa と 100 kDa の 2 つのバンドについて定量性を検討した。タンパク量 1.7 - 30  $\mu$ g の範囲で両バンドともタンパク量にほぼ比例してバンドが濃くなったものの、完全な直線性は得られなかった (Fig. 6 - 2A、B)。2 つのバンドの相対値は実験ごとにばらつきがあるため、両バンドとも OAT3 であると考え、両バンドを足し合わせて OAT3 の発現量としたところ良好な直線関係が得られた (Fig. 6 - 2C)。種々の性ホルモン状態のラットから調製した粗膜画分についてウエスタンブロッティングを行い、この検量線にあてはめて OAT3

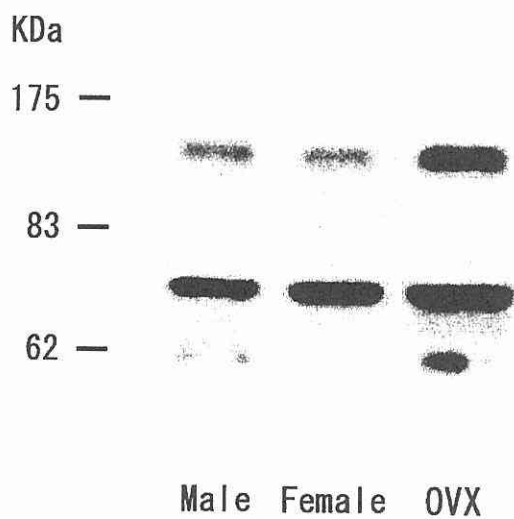


Fig. 6 - 1 Westren blot analysis of OAT3 in crude plasma membrane fraction of kidney in rats. Two bands (100 kDa and 69 kDa) are detected. OVX, ovariectomized rat.

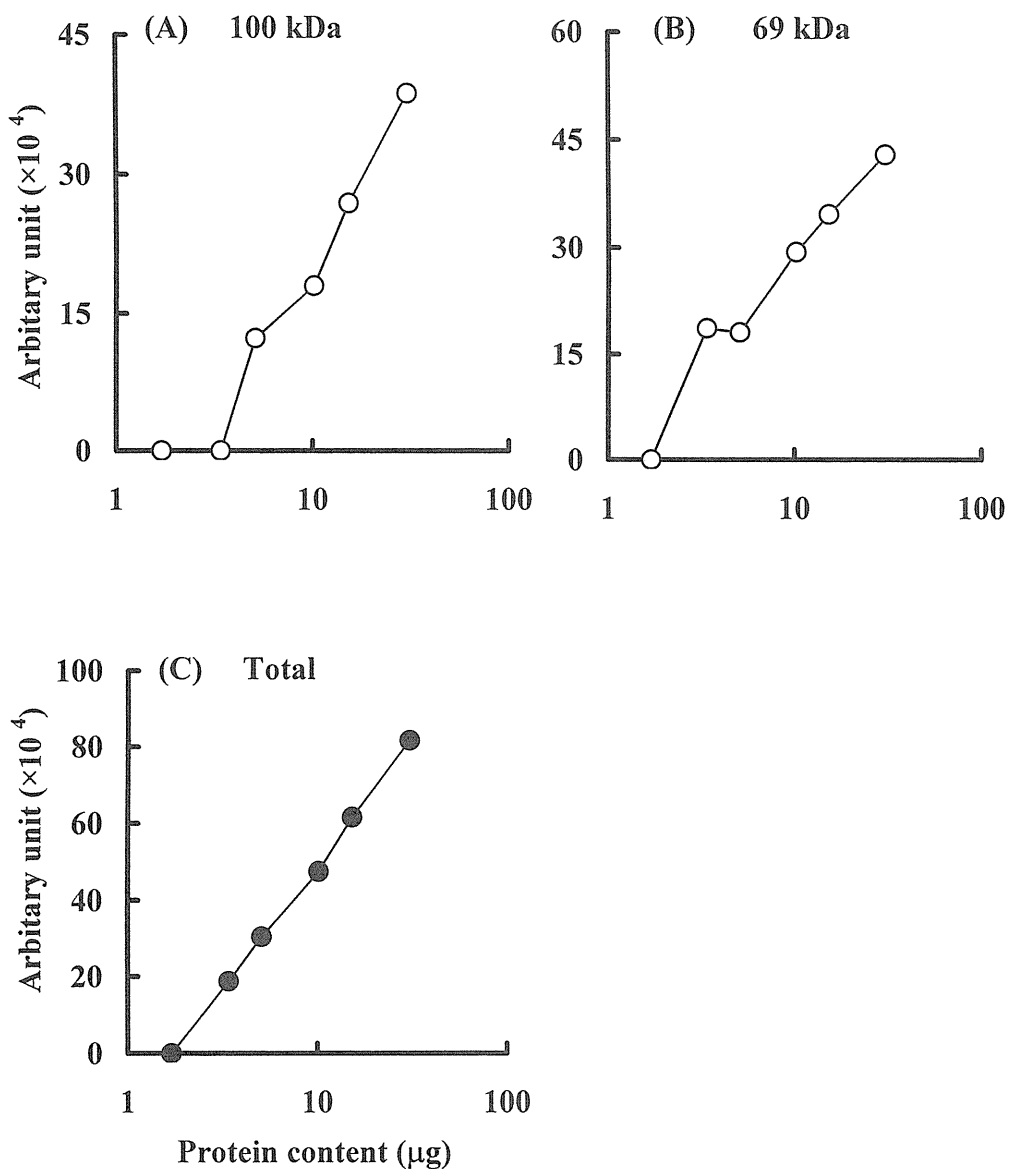


Fig. 6 - 2 Standard curve of quantification of OAT3 protein. Standard curve is obtained using different amounts of protein (1.7 - 30  $\mu\text{g}$ ) based on the chemiluminescence. 100 kDa band (A) 69 kDa band (B) and sum of 100 kDa and 69 kDa bands (C).

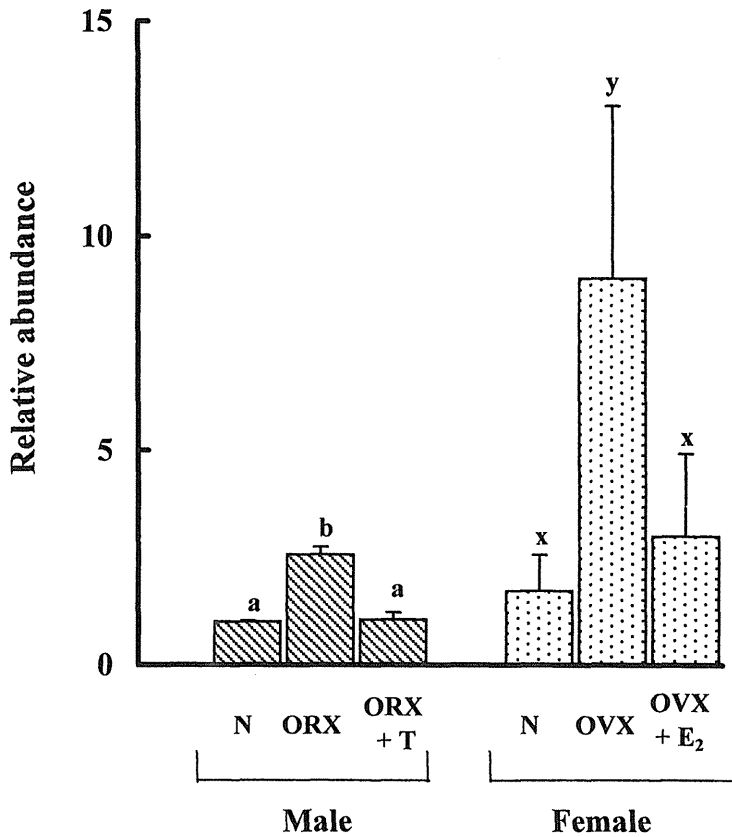


Fig. 6 - 3 Renal levels of OAT3 protein in rats under different hormonal states. N, normal male or female rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized female rat; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol; T, treatment with testosterone. Values are means ± S.D. for three rats. <sup>a,b</sup>, Differences among three experimental groups of male rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.001$ ). <sup>x,y</sup>, Differences among three experimental groups of female rats are statistically significant without a common superscript ( $P < 0.001$ ).





Fig. 6 - 4 Confocal laser scanning microphotographs of the renal cortex of ovariectomized rat (OVX). Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ ; Magnification  $\times 400$ .

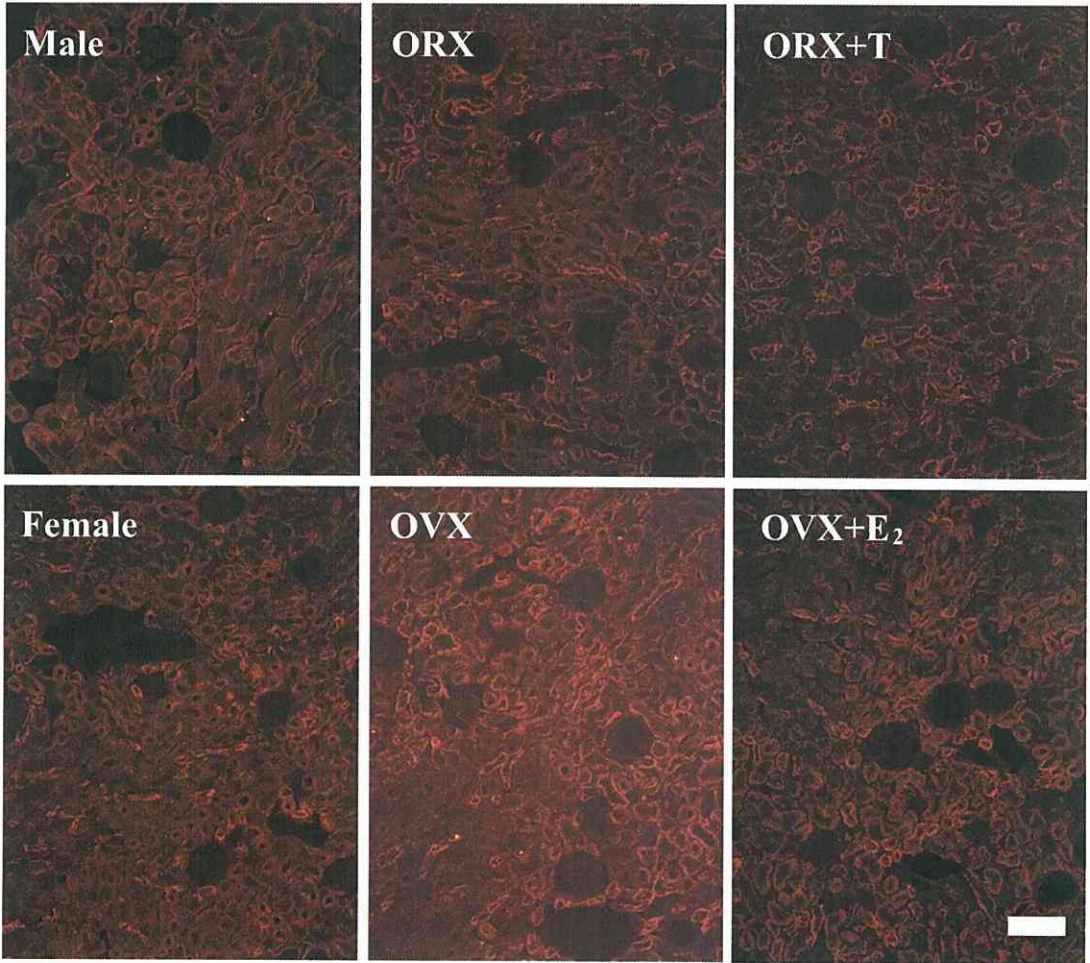


Fig. 6-5 Immunofluorescence localization of OAT3 in the cortex of rat kidney. ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized rat; T, treatment with testosterone; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ ; Magnification  $\times 100$ .

タンパク質の定量を行った (Fig. 6 - 3)。粗膜画分中の OAT3 の量は、雌雄両性のラットの間大きな差はなかった。雄性ラットの 3 群 (normal、ORX および ORX+T) で比較すると去勢した雄性ラット (ORX) が他の 2 群より優位に高かった。雌性ラットの 3 群 (normal、OVX および OVX+E<sub>2</sub>) で比較すると卵巣を摘出したラット (OVX) において対照群の雌性ラットより約 4 倍高い値を示した。雌雄両性のラット 6 群で比較すると卵巣を摘出したラット (OVX) でのみ有意に高かった。この結果は、OAT3 mRNA を定量した結果とほぼ一致していた。種々の性ホルモン状態のラットにおいて OAT3 タンパク質と mRNA には有意な相関が認められた ( $r^2 = 0.703, P = 0.037$ )。したがって、OAT3 mRNA 発現量は粗膜画分中の OAT3 タンパク質の発現量を反映したものであるといえる。次に、OAT3 タンパク質が腎臓のどの膜に発現しているのかを調べるため、同じ抗体を用いて、免疫組織染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡により倍率 400 倍で組織の染色度を観察したところ、皮質、髄質外層の尿細管の血管側でよく染色されていた (Fig. 6 - 4)。一方、髄質内層の尿細管はそれ程染色されなかった。次に、種々の性ホルモン状態のラットから作製した腎切片を用いて染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し比較した (Fig. 6 - 5)。OAT3 の蛍光強度は、卵巣を摘出したラット (OVX) で顕著に増大していたが、その他の性ホルモン状態のラットでは雌雄の正常ラットと大きな差は認められなかった。この結果は、先の mRNA およびウエスタンブロッティングの結果と一致していた。

## 第 2 節 考 察

第 5 章における検討によって OAT3 が PFOA を輸送することが明らかとなった。しかし、第 2 章の腎皮質切片への PFOA の取り込みの結果は、PFOA の取り込みが種々の性ホルモン状態でほとんど変動しないことを示しており、この 2 つの実験結果の間には矛盾がある。そこで、OAT3 タンパク質の発現量が実際に mRNA の発現量を反映しているのかどうかを検討した。本章での検討の結果、OAT3 タンパク質は分子量 69 kDa および 100 kDa の 2 つが検出さ

れた。2-メルカプトエタノールやジチオトレイトールにより分子量が変化しないことから、この2つの分子量のタンパク質が検出される理由は2量体形成によるものではなくOAT3タンパク質が糖鎖などの修飾を受けたものであると考えられるが、明確な解答は得られていない。本章の実験では2つの分子量のタンパク質ともにOAT3であるとし、OAT3タンパク質の定量を行った。本章の実験の結果、OAT3 mRNAの発現量はタンパク質の発現量を反映しており、卵巣を摘出したラット(OVX)でのみ膜画分での発現の上昇が認められた。OAT3タンパク質が卵巣を摘出したラット(OVX)でのみ高発現しているにも関わらず卵巣を摘出したラット(OVX)においてPFOAの腎皮質切片への取り込みがほとんど変化していない(第2章)ことや、PFOAのCLrが卵巣を摘出したラット(OVX)でもあまり変動しないという事実を考え合わせるとラットの腎臓には血管側からのPFOAの取り込みにOAT3以外にもPFOAを輸送する担体が発現している可能性が考えられる。

## 総 括

本研究は PFOA の生体作用に著しい性差が生じる原因を調べることから開始した。すなわち、PFOA のラット肝臓のペルオキシソーム増殖作用は雄性ラットにおいて顕著であるのに対し、雌性ラットでは全くみられない。この性差は肝臓での PFOA の残存量の差によるものであることをつきとめた。次に、PFOA の生物学的半減期に大きな性差があり、これが雌雄両性のラットにおける CLr の差によるものであることを明らかにした。さらに、PFOA の尿中からの排泄機構には性ホルモンによって調節される輸送担体が関与するという作業仮説を立て、これを以下の方法で検証した。

- ① 様々な性ホルモン状態における PFOA の CLr の評価を行い、調節に関わる性ホルモンが主にテストステロンであることを明らかにした。
- ② PFOA が尿細管上皮細胞を経て輸送される過程のうち、血液中から尿細管上皮細胞への取り込み過程と尿細管管腔から尿細管上皮細胞への再吸収過程が輸送担体によるものであることを示した。
- ③ 様々な性ホルモン状態において、PFOA の CLr と種々の有機酸輸送体の mRNA 発現量の変動とを比較し、PFOA を輸送する輸送担体として OAT1、OAT2、OAT3 および oatp1 を候補として絞り込んだ。
- ④ 病態あるいは生理状態を変化させた動物モデルの解析から NPT2 が PFOA 輸送体の候補となった。
- ⑤ アフリカツメガエル卵母細胞を用いた輸送実験から、oatp1 と OAT3 が PFOA を輸送することが明らかとなった。
- ⑥ アフリカツメガエル卵母細胞を用いた輸送実験から、NPT2 は PFOA を輸送しないことが明らかとなった。
- ⑦ OAT3 タンパク質は尿細管の血管側に発現しており、卵巣を切除した雌性ラットにおいてタンパク質の発現量が増加していることが明らかとなった。

以上の結果から、PFOA の腎臓からの排出機構の一部が解明された。PFOA

は血漿タンパク結合率が高く糸球体ろ過をほとんど受けない。PFOA は血液中から腎尿細管上皮細胞側底膜に発現している OAT3 により尿細管上皮細胞に取り込まれ、何らかの機構で尿細管腔に排出された後、管腔に発現する *oatp1* により再吸収を受ける。この再吸収過程が CLr に性差が生じる原因の 1 つと考えられる。再吸収を受けなかった PFOA は尿中に排出される。一方、PFOA の血液中から腎尿細管上皮細胞への取り込みには OAT3 以外の輸送担体も関与している可能性も示された。また、雌性ラットでは *oatp1* がほとんど発現していないにもかかわらずマンニトール存在下で CLr が上昇することから再吸収には *oatp1* 以外の輸送体も関与している可能性が考えられる (Fig.)。これら疑問点の解明には、今後、更に研究を進展させる必要がある。

これまで、PFOA の尿中排泄機構を分子レベルで解明した例はない。本研究の成果は PFOA のヒトにおける残留性の予測や排泄促進法を開発する上で極めて有益な情報となるであろう。

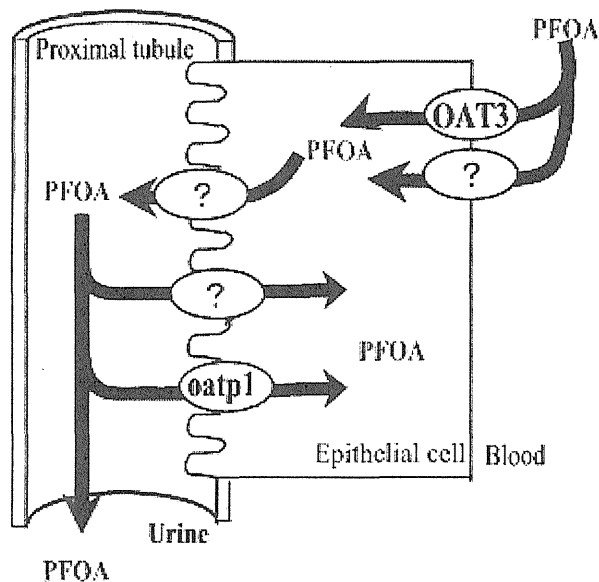


Fig. Proposed mechanism for urinary excretion of PFOA

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学 大学院 薬学研究科 川嶋洋一 教授に衷心より感謝致します。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただきました城西大学 大学院 薬学研究科 工藤なをみ 講師に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始ご指導ならびにご助言を賜りました（財）放射線影響研究所・疫学部 江口英孝 博士、城西大学 大学院 薬学研究科 日比野康英 教授、津田整 教授、岡崎真理 講師、光本篤史 講師、臼井達洋 助手に深謝の意を表します。

実験に際し、本研究の基礎となる研究を行われた城西大学 薬学部 衛生化学講座の歴代の院生ならびに終始ご協力いただいた城西大学 衛生化学講座の諸氏に感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました副査 城西大学 大学院 薬学研究科 荻原政彦 教授、駒田富佐夫 助教授に深く感謝致します。

## 実験の部



## 実験の部

### 第 1 章の実験

#### 1. 試薬

PFOA、ウレタンおよび無脂肪酸ウシ血清アルブミン (BSA、Essentially Fatty acid free) は Sigma - Aldrich Inc. (MO、USA) から購入した。ヘパリン注射液は武田薬品工業から購入した。ネンブタール注射液は大日本製薬株式会社から購入した。プロピオン酸テストステロン、安息香酸エストラジオール、プロベネシドおよび *d* - マンニトールは和光純薬から購入した。その他の試薬はすべて特級を使用した。

#### 2. 動物

##### 1) 飼育

Wistar ラットおよび Wistar ST ラットは SLC から購入した。動物は入荷後 1 週間馴化飼育し、正常な個体のみを実験に使用した。動物は自由に飲水、摂食 (CE - 2、日本クレア) させた。動物実験の取り扱いは、城西大学生命科学センター動物実験規範に従って行った。

##### 2) PFOA 投与

PFOA 0、2.5、5、10、15 および 20 mg をプロピレングリコール:水 (1:1、v/v) に溶解し、5 週齢の Wistar ラットに体重 1 kg 当り 1 mL の割合で、1 日 1 回 5 日間腹腔内に投与した。最終投与から 24 時間後に肝臓を摘出し、生理食塩液で灌流後、9 倍量のスクロース緩衝液 (0.25 M スクロース、1 mM EDTA、10 mM Tris - HCl、pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーを用いホモジネートを調製した。ホモジネートは、β酸化活性測定用には - 80°C で、PFOA 定量用には - 30°C で、それぞれ実験まで保存した。

##### 3) 外科的処置

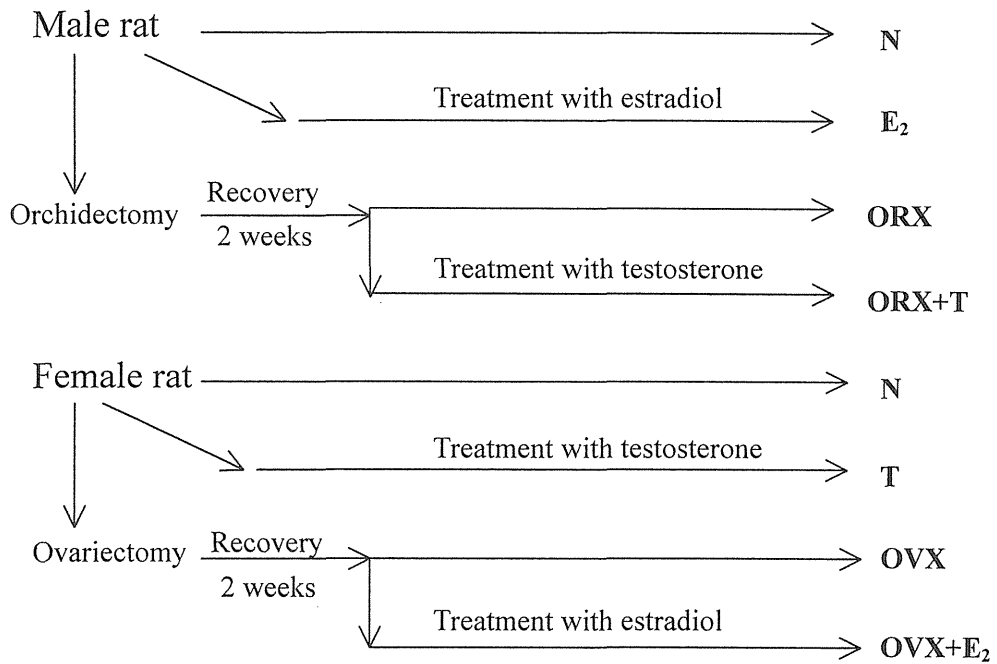
###### 精巢の摘出 (ORX)

6 週齢の Wistar ST 雄性ラットをネンブタール

注射液 (36 mg/kg 体重、50 mg/mL) で麻酔し、背位固定後、正中線に沿って陰囊中心部の皮膚を約 10 mm 切開した。切開部からはさみとピンセットを用いて右精巣を露出させ、精巣頭部にある精巣動、静脈を包む脂肪組織を 2 ヶ所結紮し、2 本の糸の間で切断し、精巣を摘出した。左側の精巣も同様に摘出した。左右の精巣を摘出後、切開した皮膚を縫合し、ヨードチンキで消毒後、皮下にペニシリン G カリウム (200 U/rat、200,000 U/バイアル、明治製菓株式会社) を投与した。手術後ラットは、プラスチックケージに収容して個々に飼育し、2 週間回復させた後実験に用いた。

卵巣の摘出 (OVX) 6 週齢の Wistar ST 雌性ラットをネンブタール注射液 (36 mg/kg 体重) で麻酔し、背位固定後、バリカンで第 10 肋骨の下側を中心に左右の毛を刈り、塩化ベンザルコニウム液 (0.1%) で消毒後、腸骨稜と左側の第 10 肋骨の左端を結ぶ線の中心部分の皮膚を縦に切開した。内皮も同じ大きさに切開し、腹腔内に見える脂肪の塊をピンセットでゆっくり引き出し、脂肪塊の中にある赤紫色、桑実状の卵巣の存在を確認した。結紮糸 (硬質 5 号) で輪をつくり、子宮の一部とともに卵巣周囲の脂肪ごと結紮した。結紮糸部分の直下から卵巣を切除した。切除後、腹腔内に子宮を戻し、内皮および外皮を縫合した。右側の卵巣も同様に摘出した。縫合部をヨードチンキで消毒後、皮下にペニシリン G カリウム (200 U/rat) を投与した。手術後ラットは、プラスチックケージに収容して個々に飼育し、2 週間回復させた後実験に用いた。

性ホルモン投与 8 週齢の Wistar ST 雄性ラットに安息香酸エストラジオール (0.2 mg/kg 体重/mL corn oil) を 1 日 1 回 7 日間皮下投与した ( $E_2$ )。8 週齢の Wistar ST 雌性ラットにプロピオン酸テストステロン (10 mg/kg 体重/mL corn oil) を 1 日 1 回 10 日間皮下投与した (T)。手術からおおよそ 2 週間後に、一部の精巣を摘出したラットにはプロピオン酸テストステロン (10 mg/kg 体重/mL corn oil) を 1 日 1 回 5 日間皮下投与した (ORX+T)。また、一部の卵巣を摘出したラットには安息香酸エストラジオール (0.2 mg/kg 体重/mL corn oil) を 1 日 1 回 7 日間皮下投与した (OVX+ $E_2$ )。本実験で行ったホルモン処理について scheme 1 にまとめた。



Scheme 1 Experimental design for different hormonal states. N, normal rat; ORX, orchidectomized male rat; OVX, ovariectomized rat; T, treatment with testosterone; E<sub>2</sub>, treatment with estradiol.

#### 4) タンパク定量 [41]

ホモジネート中のタンパク量は、Lowry らの方法により測定した。標準物質として牛血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA) を用いた。

#### 5) ペルオキシソームβ酸化活性の測定

肝ホモジネートを酵素源として、シアン存在下でのβ酸化活性を測定し、ペルオキシソームβ酸化活性とした。β酸化活性は、パルミトイル CoA を基質とし、反応過程で  $\text{NAD}^+$  が還元されて生成する NADH を 340 nm の吸光度を測定することにより行った。反応系は、1 mM シアン化カリウム、0.1% (w/v) Triton X - 100、0.1 mM CoA、0.2 mM  $\text{NAD}^+$ 、12 mM ジチオトレイトール、0.15 mg/mL BSA (essentially fatty acid free)、0.03 mM パルミトイル CoA、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) およびホモジネート (タンパク質として約 30  $\mu\text{g}$ ) を含み、最終容量 1 mL とした。反応液を 37°C で 2 分間予備加温し、パルミトイル CoA の添加によって反応を開始し、340 nm の吸光度の増加を測定した。吸光度の測定には UV - 300 (島津製作所) を用いた。NADPH の分子吸光係数を  $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とし、4) で定量したタンパク量から比活性を算出し、nmol/min/mg protein で示した。

#### 6) 腎クリアランスの測定

マンニトール非存在下      ラットにウレタン溶液 (0.9 g/3.6 mL/0.9% NaCl 溶液/kg 体重) を腹腔内に注射し、麻酔を施した。右大腿部および下腹部を切開し大腿静脈および膀胱にカニューレ (SP 45) を挿入し固定後、切開部を縫合した。手術後、ラットをボールマニケージ (夏目製作所) に収容した。手術から 1 時間後 PFOA (48.63  $\mu\text{mol/mL/kg}$  体重) をカニューレより急速静脈内投与した。PFOA 投与後 30、60、120、180、240 および 300 分後に採尿を、15、45、90、120、150、210、270 および 300 分後に採血を行った。試料中の PFOA は以下に示す方法で定量した。PFOA 投与後 5 時間までの AUC を求め、尿中への排泄量を AUC で除して腎クリアランスとした。

マンニトール存在下      ラットをウレタン (0.9 g/3.6 mL/0.9% NaCl 溶液/kg 体重) で麻酔した後、大腿部を切開し大腿静脈よりカニューレ (SP 45) を挿入し固定後、切開部を縫合した。手術後、ラットをボールマンケージに収容し、カニューレより 10% (w/v) *d*-マンニトール/0.9% (w/v) 塩化ナトリウム溶液を 0.1 mL/min の流速で持続的に注入した。注入開始から 2 時間後に PFOA (48.63  $\mu$ mol/mL/kg 体重) をカニューレより急速静脈内投与し、直ちに点滴を再開した。PFOA 投与後、2.5、7.5、22.5、47.5、92.5、147.5、252.5 および 300 分後に採尿を、5、15、35、70、120、200 および 300 分後に採血を行った。試料中の PFOA は以下に示す方法で定量した。PFOA 投与後 5 時間までの AUC を求め、尿中への排泄量を AUC で除して腎クリアランスとした。

プロベネシド共存下      上記と同様の手術を行い、10% (w/v) *d*-マンニトール/0.9% (w/v) 塩化ナトリウム溶液の注入を開始してから 1.5 時間後にプロベネシド (15 mg/kg/mL 0.9% NaCl) を急速静注した。その後、注入液を 0.15% (w/v) プロベネシド/10% (w/v) *d*-マンニトール/0.9% (w/v) 塩化ナトリウム溶液に交換し 0.1 mL/min の流速で実験終了まで持続的に注入した。マンニトール溶液の注入開始から 2 時間後に PFOA (48.63  $\mu$ mol/mL/kg 体重) をカニューレより急速静脈内投与し、上記と同様の実験を行った。

## 7) PFOA の定量

ブロムアセチルメトキシクマリンの合成方法      2-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド 2 g をよく乾燥させたナスフラスコにとり、無水メタノール 20 mL を加え、マントルヒーターで温めて溶かした。これに 3-オキシブタン酸エチル 2.4 mL を加えて軽く振り混ぜ、ピペリジンを 8 滴加えた。沸騰石を入れ、ジムロートに接続し 150°C で 5 分間還流させた。室温で冷却後、生成した結晶を濾取後、少量のエタノールで洗い、デシケーター中で乾燥させた。この結晶 2 g を三角フラスコにとりジクロロメタン 100 mL に溶かし、テトラブチルアンモニウムブロマイド 8.8 g

を加え溶かした。遮光しながらスターラーで1時間攪拌後、室温で一晩放置した。生成した結晶を濾取後、デシケーターで乾燥させた。この結晶1 gを三角フラスコにとり、酢酸エチル100 mLを加え、加温式スターラーで沸騰するまで温めた。沸騰後から50 mLのベンゼンを少しずつ結晶が完全に溶けるまで加えた。結晶の析出を防ぐためにろ過装置を加温しておき、速やかにろ過した。濾液放冷後、氷冷した。再び室温に戻し析出した結晶を濾取後、デシケーターで乾燥させ、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

生体試料からの PFOA の抽出 尿試料 0.2 - 1.0 mL、血漿試料 50  $\mu\text{L}$  または、臓器ホモジネート 0.5 - 1.0 mL をネジ付試験管にとり、精製水を加えて容積を 1.0 mL とした。この試験管に内部標準物質としてペルフルオロヘキサン酸 5 nmol をマイクロシリンジで加えた。さらに、精製水 0.5 mL、1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) および 0.5 M テトラブチルアンモニウム溶液 (pH 10.0) を各 1.0 mL 加えた。よく攪拌後、10 分間超音波処理した。これにヘキサン：酢酸エチル (1 : 1, v/v) を 4 mL 加え、16 分間振とうした。800 $\times$ g で 5 分間遠心し、上層を別のネジ付試験管に移した。下層に再びヘキサン：酢酸エチル (1 : 1, v/v) を 4 mL 加え、同様の操作を 2 回繰り返す、上層を先のものと同合わせた。

PFOA の誘導体化 PFOA の抽出液の溶媒を窒素エバポレーターで留去した。さらに、ベンゼン 0.5 mL を加え再び窒素エバポレーターで溶媒を完全に留去した。残渣にブROMアセチルメトキシクマリン溶液 (2 mg/mL 脱水アセトン) 3 mL を加え、よく攪拌後  $70^{\circ}\text{C}$  水浴で 25 分反応させた。反応終了後直ちに氷冷し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

HPLC による PFOA の分離、定量 高速液体クロマトグラフ (HPLC) は LC10AS および LC6A (島津製作所) を用いた。分離用カラムは Wakosil II 3C18 (4.6 $\times$ 50 mm) および YMC pack C18 (4.6 $\times$ 50 mm) を使い、カラム温度は  $40^{\circ}\text{C}$  に設定した。移動相にはアセトニトリル：水 (140 : 60, v/v) を流速 0.8 mL/min で用いた。検出には蛍光検出器 (RF - 10A XL、島津製作所) を使い、励起波長を 366 nm、蛍光波長を 420 nm とした。試料は注入前に綿栓ろ過し、マイクロシリンジで 20  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入した。

得られたクロマトグラムは、JASCO - BORWIN (日本分光) にて波形処理した。

検量線の作成          メタノールに溶解した PFOA を 0.5 - 50 nmol ネジ付き試験管にとり、内部標準物質としてペルフルオロヘキサン酸メタノール溶液 5 nmol と精製水 500  $\mu$ L を加えた。生体試料と同様の方法で PFOA の抽出および誘導体化を行い、HPLC で分離し定量した。内部標準物質との面積比から PFOA の検量線を作成した。分析試料中の PFOA の量はこの検量線から求めた。

### 3. 統計処理

2 群の比較は Student's *t* - test を用いて行った。3 群以上の比較には、一元配置分散分析を行った。有意差のあるものについてはさらに、Shèffe の多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。

## 第 2 章の実験

### 1. 試薬

[1 -  $^{14}$ C]ペルフルオロオクタン酸 (55 mCi/mmol) は BlyChem Ltd. (Bellingham, UK) に合成を委託した。その他の試薬はすべて特級を使用した。

### 2. 腎皮質切片を用いた PFOA の取り込み速度の測定

#### 1) 腎皮質切片の作製

ラットをジエチルエーテルで麻酔し、腹部を正中線に沿って切開後腹部上行静脈より採血後、左右両腎臓を摘出した。腎臓は生理食塩水で洗浄し、脂肪および被膜を除いた腎臓をメスで 4 等分した。腎臓 1 片を Krumdieck tissue slicer (Alabama Research and Development, AL, USA) を用いて厚さ 50  $\mu$ m の切片 (40 - 90 mg) にした。1 片の腎臓から 2 枚の腎皮質切片を得た。切片は実験まで酸素ガスを通気した uptake buffer 中に、4°C で保存した。

## 2) 腎皮質切片への取り込み実験 [19]

Uptake bufferの組成 Uptake bufferは最終濃度として、120 mM NaCl、16.2 mM KCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を含み pH7.5 となるように調製した。Uptake bufferには [<sup>14</sup>C]PFOA および PFOA を所定の濃度になるように溶解させ、基質液とした。

取り込み実験 酸素ガスを通気した uptake bufferのみを 3 mL 入れたバイアルに腎切片を一枚ずつ入れふたをして 25°Cの水浴に浸し、ゆっくり振盪し (25 min<sup>-1</sup>)、5 分間予備加温した。別途、基質液を 3 mL 加えたバイアルを準備し、あらかじめ加温しておいた。Uptake buffer 中の切片を基質液の入ったバイアルに移し入れ、反応開始時刻とした。続いて、酸素ガスを 5 秒間注入し、ふたを閉め、25°Cの水浴に浸しゆっくり振盪した。一定時間 (2.5、5、7.5、10 または 15 分) 後基質液中から切片をピンセットで取り出し、あらかじめ氷冷しておいた 1% BSA (essentially fatty acid free) を含む uptake buffer を 3 mL 入れたバイアルに入れ、攪拌後この溶液を除いた。腎切片には新たに氷冷した 1% BSA (essentially fatty acid free) を含む uptake buffer を 3 mL 入れ、攪拌後溶液を除いた。腎切片を取り出し、水分を濾紙で丁寧に吸い、重量を測定した。腎切片をシンチレーションバイアルにいれ、5% (w/w) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液 1 mL を加えふたをして約 16 時間振盪した (100 min<sup>-1</sup>)。腎切片が溶解したことを確認しシンチレーター (トルエン : Triton X - 100、1 : 1、v/v) 8 mL を加えよく攪拌し、約 16 時間放置後に、液体シンチレーションカウンター (アロカ社) で放射活性を測定した。別途、基質液の放射活性を測定し、切片に取り込まれた PFOA の量を算出した。取り込みは nmol/mg tissue または、nmol/10 min/ mg tissue で表した。

## 3. 統計処理

2 群の比較は Student's *t* - test を用いて行った。3 群以上の比較には、一元配置分散分析を行った。有意差のあるものについてはさらに、Shèffe の



多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。

### 第 3 章の実験

#### 1. 試薬

RNeasy Maxi kit および QuantiTect™ SYBER Green PCR kit は Qiagen (Germany) から購入した。Oligotex - dT30 〈Super〉 および RNA PCR kit (AMV) はタカラバイオ株式会社から購入した。PCR プライマー各種は Amersham bioscience corp. (NJ, USA) または、シグマジェノシスジャパン株式会社に合成を依頼した。フェノールは核酸抽出用のものを和光純薬株式会社から購入した。電気泳動用のアクリルアミド、ビス (*N,N'*-メチル-ビス-アクリルアミド)、過硫酸アンモニウム、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンは Bio - Rad Laboratories (CA, USA) から購入した。その他の試薬はすべて特級を使用した。

#### 2. 腎臓からの mRNA の調製法

##### 1) 腎組織からの total RNA の調製

種々のホルモン状態のラットから腎臓を摘出し、外科用メスで 4 等分後、プラスチックバイアルに入れ、液体窒素で凍結し - 80°C で保存した。腎組織から RNeasy Maxi kit を用い、total RNA を抽出した。Total RNA 溶液定量は抽出液の吸光度を波長 260 nm で測定することにより行った ( $1 A_{260nm} = 40 \mu\text{g/mL RNA}$ )。この溶液の total RNA をエタノール沈殿させ、RNA 濃度が 1 mg/mL 以上になるように適量の RNase - free 水に溶解した。この溶液の RNA 濃度は、上式のように 260 nm の吸光度から算出した。

##### 2) Total RNA からの mRNA の精製

1) で得られた溶液 1 mL に対し 1 mL の割合で Oligotex - dT30 〈Super〉を加えよく攪拌し、65°C の水浴で 5 分間反応させ、さらに 3 分間氷冷した。この反応液に、加えた Oligotex - dT30 〈Super〉の 0.05 倍量の 5 M 塩化ナトリウム溶液を加え、37°C で 10 分間加温した。15,000 rpm で 3 分間遠心

し、上清を注意深く除いた。沈殿に始めに加えた Oligotex - dT30 (Super) と同量の 10 mM Tris/1 mM EDTA 溶液、pH 7.5 を加え、沈殿をよく懸濁した。これを 65°C の水浴で 5 分間反応させ、その後 3 分間氷冷した。15,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を別のチューブに移した。沈殿にもう一度同量の 10 mM Tris/1 mM EDTA 溶液、pH 7.5 を入れ、先と同様の操作を繰り返した。得られた上清はまとめて、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い mRNA 濃度が 0.5 mg/mL 以上になるように RNase - free 水に溶解した。この溶液の吸光度を分光光度計で測定し、mRNA 量を定量した。調製した溶液は使用まで - 80°C で保存した。

### 3) フェノール/クロロホルム抽出/エタノール沈殿

RNA 溶液に等量のフェノール：クロロホルム (1 : 1, v/v) を加えよく攪拌した。10,000 rpm で 15 秒遠心し、上清を別のチューブに移し、等量のクロロホルムを加え攪拌した。これを 10,000 rpm で 15 秒遠心し、上清を別のチューブに移した。この溶液にエタノールを 2.5 倍量加え、よく攪拌して、- 80°C で 1 - 2 時間放置した。4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を静かに除いた。得られた沈殿に氷冷した 70% エタノールを加え、再び同条件で遠心した。上清を除き、室温で 10 分放置して残存するエタノールを揮発させて除いた後、RNase - free 水に溶解した。

## 3. RT - PCR 法による各種輸送担体 mRNA の定量

### 1) 逆転写反応

逆転写反応は RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (タカラバイオ株式会社) を用いた。逆転写反応系には最終濃度で 5 mM MgCl<sub>2</sub>、1×RNA PCR buffer、1 mM dNTP mix、20 U RNase Inhibitor、0.125 μM oligo dT アダプタープライマーを 0.5 mL の PCR チューブに加えた。さらに、1 U AMV 逆転写酵素および 1 μg mRNA を入れ、最終容量が 20 μL になるように RNase - free 水を加えた。PCR チューブをサーマルサイクラー (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, CA, USA) にセットし、42°C で 30 分、99°C で

5 分、5°Cで 5 分間それぞれ反応させた。生成した complementary DNA (cDNA) は使用するまで - 30°Cで保存した。

## 2) Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA PCR kit (AMV) を用いた方法 PCR 反応系には最終濃度で、0.1  $\mu\text{M}$  プライマー (Table 7 - 1)、40 mM KCl、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  および 0.8 mM dNTPs を加え、1.25 U *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup>、さらに上記 1) の逆転写反応生成物 4  $\mu\text{L}$  を加え、RNase - free 水を加えて最終容量を 50  $\mu\text{L}$  とした。PCR チューブをサーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9700) にセットし、Table 7 - 2 に示すプログラムを用いて増幅させた。反応後、反応液の一部を分子量マーカーとともに 1.5% アガロースゲル電気泳動にかけた。分離後、ゲルをエチジウムブロミドで染色した。PCR 生成物のサイズをマーカーと比較して確認した。目的の分子量のバンドをゲルから精製し (GENECLEANIII kit, Bio101, CA, USA)、DNA シークエンサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) によりシークエンスを調べ、正しい位置で増幅されていることを確認した。目的のバンドの蛍光強度をゲルイメージングシステム (Epi - Light UV2000, Aisin Cosmos) と Luminous Imager を用いて数値化した。PCR に使用した雄性ラットの mRNA 量が 125 ng から 2  $\mu\text{g}$  の範囲では、測定サイクル数 $\pm$ 1 サイクルの範囲で定量的に増幅されていることを確認した。結果はすべて雄性ラットの値を 1 とした時の相対比で示した。

リアルタイム PCR 法による mRNA の定量 本法には QuantiTect<sup>TM</sup> SYBER Green PCR kit (Qiagen) を用いた。PCR プレートに 2 $\times$ PCR master mix を 12.5  $\mu\text{L}$ 、0.16  $\mu\text{M}$  輸送担体または GAPDH のプライマー (Table 7 - 1)、1) の逆転写反応生成物の 10 倍希釈液 5  $\mu\text{L}$  を入れ、最終容量が 25  $\mu\text{L}$  になるように RNase - free 水を加えた。プレートにキャップをし、PCR プレートをサーマルサイクラー (iCycler, Bio - Rad Laboratories) にセットし、Table 7 - 2 に示すプログラムを用いて増幅させた。増幅後、融解曲線を作製し単一の生成物であることを確認した。また、PCR 増幅産物のシークエ

ンスを DNA シークエンサーを用いて調べ、目的産物であることを確認した。NPT1、NPT2、MRP2 および GAPDH については、mRNA が 2.5 ng から 50 ng の範囲で定量的に増幅することを確認した。すべての実験において、蛍光強度が 500 に達する時のサイクル数（スレシホールドサイクル）を求めた。各輸送担体の mRNA 発現量は、GAPDH のスレシホールドサイクルから各トランスポーターのスレシホールドサイクルを差し引き、この値で 2 を累乗させることにより求めた。結果は、雄性ラットの値を 1 とした時の相対比で示した。

#### 4. 統計処理

2 群の比較は Student's *t* - test を用いて行った。3 群以上の比較には、一元配置分散分析を行った。有意差のあるものについてはさらに、Shèffe の多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。

多重回帰分析は、マイクロソフト社の EXCEL を用いた。説明変数の選択方法は変数減少法を用いた。変数選択の統計的基準として *F* 値を用いた。*F* 値は次式を用いて求めた。

$$F = \{(\text{偏回帰係数}) / (\text{偏回帰係数の誤差})\}^2 = (t \text{ 値})^2$$

*F* 値が 2 以上ならば有効な変数、2 未満ならば不要な変数として変数の選択を行った [72]。

## 第 4 章の実験

### 1. 試薬

低リン食は、AIN - 93M 中の無機リン酸濃度 0.6% を 0.02% に変更させた飼料をオリエンタル酵母工業株式会社より入手した。その他の試薬はすべて特級を使用した。

### 2. 動物

#### 1) 飼育

Wistar ST ラット、Sprague - Dawley ラット、Eisai hyperbilirubiuria ラット (EHBR) は SLC から購入した。動物は入荷後 1 週間馴化飼育し正常な個体

のみを実験に使用した。動物は自由に飲水、摂食 (CE - 2) させた。低リン食の実験では、動物入荷から 1 週間馴化飼育の後、餌料を低リン食に変え、1 週間自由に摂食させた。動物実験の取り扱い、城西大学生命科学センター動物実験規範に従った。

## 2) 腎クリアランスの測定

第 1 章実験の部 2 - 6) に示した方法でサンプルを採取し、第 1 章実験の部 2 - 7) に示した方法で PFOA の分離定量を行った。

## 3. 統計処理

2 群の比較は Student's *t* - test を用いて行った。

## 第 5 章の実験

### 1. 試薬

*Pyrobest*<sup>®</sup> DNA polymerase はタカラバイオ株式会社から購入した。各種プライマーは Amersham bioscience corp. または、シグマジェノシスジャパン株式会社に合成を依頼した。*p* - [glycyl 1 - <sup>14</sup>C]PAH (40 Ci/mmol) および [taurine 2 - <sup>3</sup>H]TCA (50 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals Inc. (MO、USA) から、[<sup>32</sup>P]正リン酸 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (2.9 Ci/mol) は PerkinElmer Life Sciences Inc. (MA、USA) から購入した。

### 2. capped RNA (cRNA) の合成

#### 1) 各輸送担体の全長 cDNA のクローニング

第 2 章の実験 2 - 3) に示す方法で得られたラット腎 cDNA をテンプレートとして Table 7 - 1 に示したクローニング用各種プライマーセットを用いて PCR を行った。0.5 mL の PCR チューブに 1×*Pyrobest*<sup>®</sup> buffer II、TaKaRa *Pyrobest*<sup>®</sup> DNA polymerase 1.25 U、プライマー 20 pmol および逆転写生成物 5.0 μL を加え、最終容量が 50 μL になるように RNase - free 水を加えた。PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、Table 7 - 2 に示したプロ

グラムを用いて増幅した。反応終了後 PCR 生成物を 1% アガロースゲル電気泳動にかけ、目的の分子量のゲルを切り出し、GENCLEANIII Kit を用いて cDNA を精製した。精製した PCR 生成物を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs Inc., MA, USA) によりリン酸化した (37°C、5 時間)。反応溶液をフェノール/クロロホルム処理して酵素を除き、エタノール沈殿後、適量の 10 mM Tris/1 mM EDTA 溶液、pH 7.5 に溶解した。

## 2) 各輸送担体の全長 cDNA のプラスミドベクターへの導入

プラスミドベクター (pBluescript KS II(+), Stratagene, CA, USA) を制限酵素 (*EcoRV*、*Sma I*) で平滑末端に切断した後、アルカリホスファターゼ (タカラバイオ株式会社) で脱リン酸化を行った。反応終了後、生成物をフェノール/クロロホルム処理して酵素を除き、エタノール沈殿後、適量の 10 mM Tris/1 mM EDTA 溶液、pH 7.5 に溶解した。リン酸化した PCR 生成物と平滑末端に切断し脱リン酸化したベクターを質量比が 2 : 1 になるように混合し、DNA リガーゼ (LigaFast DNA Ligation kit, Promega, WI, USA) を用いて 30 分室温で反応させた。

## 3) 形質転換 (エレクトロポレーション)

大腸菌 (DH<sub>5α</sub> コンピテントセル) 懸濁液に 2) の反応溶液 1 μL を混合し、エレクトロポレーションキュベット (Bio - Rad Laboratories) にあわ立たないように入れた。3 分間氷冷後、エレクトロポレーション装置 (MicroPulser、Bio - Rad Laboratories) にセットし、1.8 KeV の電流を 4.4 ミリ秒流した。エレクトロポレーション後、懸濁液を SOC 培地 (2% Bactotryptone、0.5% Bacto yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MgSO<sub>4</sub>、20 mM glucose) に入れ 37°C で 1 時間振盪培養した。SOC 大腸菌培養液にイソプロピルチオ - β - ガラクトシダーゼ (0.1 mg) と 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - ガラクトピラノシド (2.5 μmol) を混合した。この混合液 20 - 100 μL を L - Broth 寒天培地 (1.2% Agar purified、1% Bactotryptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5% NaCl) に均

一に蒔き、37°Cで約 16 時間培養した。白色のコロニーをピックアップし、L-Broth 液体培地で約 16 時間培養した。培養液から菌体を回収し、市販のキット (Flexi prep™、Amersham Biosciences Corp.) を用いてプラスミドを回収した。回収したプラスミド中の目的 cDNA については、電気泳動、制限酵素処理およびシーケンスを行い目的の cDNA であることを確認した。

#### 4) cRNA の合成

3) で得られたプラスミドの目的配列の C 末端側を制限酵素で切断して平滑末端とし、T7 RNA polymerase (RiboMAX RNA production system、Promega) と Ribo m<sup>7</sup>G cap analog を混合し 37°C で 4 時間反応させた。鋳型 DNA の除去のため反応液に RQ1 RNase - free DNase (Promega) を添加し、さらに 30 分反応させた。この反応液に等量のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1、v/v) を加え 1 分間攪拌後 13,000 rpm で 2 分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、等量のクロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1、v/v) を加え 1 分間攪拌後 13,000 rpm で 2 分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、3 M 酢酸カリウム溶液とイソプロパノールを遠心上清の体積の 0.1 倍および等量それぞれ加え、10 分間放置した。13,000 rpm で 10 分間遠心後上清を注意深く除き、沈殿を風乾後、キット付属の nuclease - free water に溶解した。この溶液の 260 nm における吸光度を測定し、 $1 A_{260nm} = 40 \mu\text{g/mL RNA}$  から RNA 濃度を算出した。調製した溶液は使用まで - 80°C で保存した。

### 3. アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験

#### 1) アフリカツメガエル卵母細胞の調製 [63]

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵巣をコパセティックから入手した。これを Modified Barth's Medium (MBS、88 mM NaCl、1 mM KCl、0.82 mM MgSO<sub>4</sub>、0.4 mM CaCl<sub>2</sub>、0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM HEPES/Tris、pH7.5) で 5 回洗浄した。ピンセットを用いて卵を裂き、アフ

リカツメガエル卵母細胞が 10 - 20 個の塊なるようにはさみで切断した。切断した塊約 10 個を 20 mL バイアルに入れ、コラゲナーゼ溶液 (Type I、Invitrogen Corp., CA, USA、2 mg/mL MBS) 2 mL を加え、ふたをして 20°C で軽く振盪した。1 時間後、コラゲナーゼ溶液を交換しさらに 1 時間振盪を行った。コラゲナーゼ溶液を除き、BSA 溶液 (1 mg/mL BSA/MBS) で 5 回、続いて MBS で 5 回洗浄した。洗浄後のアフリカツメガエル卵母細胞を実体顕微鏡で観察し、ステージ IV - V の卵母細胞を選別し、バイアルに入れて MBS を加え、18°C で約 16 時間保存した。次に、phosphate medium (1 mg BSA/mL 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 6.5) をバイアルに入れ 20°C で 1 時間、軽く振盪した。phosphate medium を除き、BSA 溶液で 5 回、続いて MBS で 5 回洗った。アフリカツメガエル卵母細胞を MBS 中 18°C で 16 時間保存し、マイクロインジェクションを行った。

## 2) マイクロインジェクション

マイクロピペット作成器 (PN - 3、株式会社 成茂科学器械研究所) を使用してガラス管 (3 1/2 Drummond replacement tubes、Drummond Scientific Company、PA、USA) からマイクロキャピラリーを作製した。マイクロキャピラリーの先端を直径 20 μm になるようにマイクロフォジ (株式会社 成茂科学器械研究所) で確認しながら加工した。加工したマイクロキャピラリーをジエチルピロカルボネートで処理した精製水で洗浄し滅菌缶に保存した。加工したマイクロキャピラリーに後ろからミネラルオイルを充填し、マイクロマニピュレーター (Nanoject II、Drummond Scientific Company) にセットし、キャピラリー内の空気を除いた。次に直径 3 cm ディッシュの底に濾紙を敷き、MBS で湿らせ、約 30 個のアフリカツメガエル卵母細胞をのせ、実体顕微鏡にセットした。2 - 5 μL の水または cRNA 溶液をキャピラリーの先端から充填した。実体顕微鏡下、アフリカツメガエル卵母細胞に 30 nL づつインジェクションした。アフリカツメガエル卵母細胞を、静かにバイアルへ移し MBS を入れ、18°C で 3 日間保存した後、取り込み実験に用いた。この間、MBS は毎日交換した。



### 3) アフリカツメガエル卵母細胞への化学物質取り込み実験

取り込み実験      Uptake buffer として ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, pH7.4) を用いた。基質として、10 μM *p*-[glycyl 1 - <sup>14</sup>C]PAH, 10 μM [taurine 2 - <sup>3</sup>H]TCA, 100 μM [<sup>32</sup>P]PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> および 10 μM [1 - <sup>14</sup>C]PFOA のいずれかを uptake buffer に溶解して用いた。正常なアフリカツメガエル卵母細胞を実体顕微鏡下で選別し、あらかじめ ND96 を 200 μL 入れた 2 mL ラウンドチューブに 10 個ずつ入れ、反応開始まで 19°C で保存した。25°C で 5 分間予備加温後、ND96 をピペットで除き、基質液を 200 μL 入れ反応を開始した。25°C のヒーティングブロック上で 1 時間反応させ、この間 7 分毎に軽く振盪した。氷冷した ND96 800 μL を加え反応を停止させた。ND96 を丁寧にピペットで除き、氷冷した ND96 1 mL で 4 回洗浄した。アフリカツメガエル卵母細胞を 1 個ずつ液シンバイアルに移し、10% (w/v) SDS 水溶液 500 μL を加えバイアルにふたをして、振盪式恒温槽で 37°C、1 時間振盪し溶解させた (100 min<sup>-1</sup>)。バイアルにシンチレーター (トルエン : Triton X - 100, 1:1) 8 mL を加え、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。測定結果からアフリカツメガエル卵母細胞への取り込み量を算出した。

### 4. 統計処理

2 群 (水注入群と各輸送担体 cRNA 注入群) の比較は Student's *t*-test を用いて行った。

## 第 6 章の実験

### 1. 試薬

ウサギ抗ラット OAT3 ポリクローナル抗体はトランスジェニック購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体は Amersham Biosciences Corp. から購入した。ブロッキング剤 (ブロックエース) は大

日本製薬から購入した。その他の試薬はすべて特級を使用した。

## 2. ウェスタンブロッティング

### 1) ラットの腎臓からの粗膜画分の調製 [34]

ラットをジエチルエーテルで麻酔し、腎臓を摘出した。秤量し、7倍量のスクロース緩衝液 (0.25 M スクロース、10 mM Tris - HCl、1 mM EDTA、pH 7.4、1  $\mu$ g/mL ロイペプチン、1  $\mu$ g/mL ペプスタチン A、0.1 mM フェニルメチルスルホニル=フルオリド、0.08  $\mu$ g/mL *N* <sup>$\alpha$</sup> -トシル-L-リジリル-クロロメチルケトン、5  $\mu$ g/mL アプロチニン、0.1 mM ベンズアミジン) を加え、ポッター型ホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートの一部をマイクロチューブに分け取り、-80°Cで保存した。残りのホモジネートを2 mLのラウンドチューブに分注し500 $\times$ g 4°Cで5分間遠心した。上清を新しいチューブに移し6,000 $\times$ gで5分間遠心した。上清とfluffy (粗膜画分) 層を別のチューブに移し懸濁した。6,000 $\times$ gで再度5分間遠心した。上清とfluffyを別のチューブに移して懸濁し、16,000 $\times$ gで5分間遠心した。fluffy層を別のチューブに移しスクロース緩衝液1.5 mLに懸濁後、16,000 $\times$ gで15分間遠心した。fluffy層を別のチューブに移し適量のスクロース緩衝液に懸濁した。懸濁液をマイクロチューブに入れ液体窒素で凍結し、使用まで-80°Cに保存した。

### 2) 電気泳動および転写

粗膜画分サンプルに最終濃度3%になるように10% (w/v) SDS水溶液を加え十分に攪拌した。この一部に63 mM Tris - HCl、pH6.8、2% (w/v) SDS、6% (v/v) グリセロール、0.002% (w/v) プロモフェノールブルー、42 mM ジチオトレイトールとなるようにそれぞれの試薬を添加した。この混合液を沸騰水浴中で5分間加熱した。放冷後、一定量を12% ポリアクリルアミドゲルに導入し電気泳動を行った (20 mA、4 - 5 時間)。SDSで可溶化したサンプルは、bicinchoninic acid法によりタンパク定量を行った。泳動終了後、ゲルはメタノール処理したポリビニリデンジフルオリド膜とともに、

Towbin buffer (25 mM Tris、192 mM グリシン、20% メタノール) に浸し 30 分間平衡化させた。転写装置 (Mini trans - blot cell、Bio - Rad laboratories) にセットし、4°C で 40 mA、16 時間通電した。

### 3) 抗体との反応

転写後メンブレンを取り出し、ブロッキング液 (5% (w/v) スキムミルクを含む Tris 緩衝液 (TBS、0.3 M NaCl、40 mM Tris - HCl、pH 7.0)) に浸し、室温で 2 時間振盪した。TBS で 5 分間 3 回洗浄後、ウサギ抗ラット OAT3 ポリクローナル抗体をブロッキング液で 333 倍希釈した溶液と反応させた。室温で 1 時間振盪後、0.1% (v/v) Tween 20 を含む TBS で 5 分間 3 回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体をブロッキング液で 1000 倍希釈した溶液と反応させた。室温で 1 時間振盪後、0.1% (v/v) Tween 20 を含む TBS で 5 分間 3 回洗浄した。

### 4) 検出および数値化

ポリビニリデンジフルオライド膜を、検出試薬 (ECL plus western blotting detection reagent、Amersham Biosciences Corp.) と室温で 5 分間反応させた。ポリビニリデンジフルオライド膜上の化学発光をルミノイメージアナライザー (LAS - 100plus、フジフィルム) で検出し、バンドごとの化学発光の強度を Image gage (フジフィルム) で数値化した。雄性ラットから調製した腎粗膜画分のタンパクを用いて異なる量のタンパク質と化学発光強度をプロットし、検量線を作製した。各試料から得られた化学発光強度を検量線にあてはめ、得られた値をコントロールの雄性ラットの値との比で表した。

### 5) タンパク定量 (Bicinchoninic acid 法)

試料中のタンパク量を bicinchoninic acid 法により定量した。発色試薬は Pierce (IL、USA) から購入した。標準物質として、BSA を用いた。

### 3. 組織染色

#### 1) 腎臓の固定

ラットの腹腔内にネンブタール注射液 (50 mg/mL) を 50 mg/kg 体重の割合で投与し、また、尾静脈からヘパリンナトリウム注射液 (清水製薬株式会社、40 U/mL/kg 体重) を投与した。腹部大動脈にカニューレ (SP 45) を挿入して、カニューレから固定液 (4% (w/v) パラホルムアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液) を流速 10 mL/min で流した。30 分後に腎臓を摘出し、固定液に浸した。4°C で 6 時間放置した。次に、固定液を捨て、25% (w/v) スクロース液に浸し、約 16 時間放置した。25% (w/v) スクロース液を交換し、6 時間放置した後、切片の作製に用いた。

#### 2) 組織切片の作製

組織切片の作製には、大型滑走式マイクロトーム (ROM - 670e、大和光機工業株式会社) を用いた。固定した腎臓をメスで 4 等分し、あらかじめマイクロトームの標本ブロックに凍結組織用包埋剤 (Tissue - Tek、OCT compound、サクラサイエンティフィックジャパン株式会社) を適量載せ、その上に腎臓 1/4 個を切断面が平らになるように載せた。炭酸ガスで急速冷凍し、30 ミクロンの厚さの切片を作製した。作製した切片は、一時的に氷冷した 0.01 M リン酸緩衝液中で保存し、スライドガラス (マイクロスライドガラス、スーパーフロースト、松浪硝子工業株式会社) にのせた。比較したい切片は同じスライドガラス上にのせ、以後の操作がすべて同一条件となるようにした。

#### 3) 染色

風乾した切片をのせたスライドガラスを染色バットに入れ、0.01 M PBS に 15 分間浸した。次に染色バットを 5% (v/v) Triton X - 100 を含む 0.01 M リン酸緩衝液に 30 分間入れた。0.01 M リン酸緩衝液に 15 分間漬けた後、液をよく除いてから乾燥させた。スライドガラスに 4% (w/v) ブロックエースおよび 10% (v/v) ヤギ血清を含む 0.01 M リン酸緩衝液をのせ 1 時間

室温で放置しブロッキングを行った。ブロッキング液を除きウサギ抗ラット OAT3 ポリクローナル抗体 20 倍希釈溶液をのせ、4℃で一晩放置反応させた。一次抗体溶液を除き、0.5% (v/v) Triton X - 100 を含む 0.01 M リン酸緩衝液で洗浄し、Cy 3 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed Laboratories Inc., CA, USA) 150 倍希釈溶液をのせ、遮光して室温で 1.5 時間反応させた。0.5% (v/v) Triton X - 100 を含む 0.01 M リン酸緩衝液で 30 分間洗浄し、グルセロール：リン酸緩衝液 (8：2、v/v) で封入した。

#### 4) 顕微鏡観察

蛍光顕微鏡観察には、BX51W1 (オリンパス社) を用い、Cy 3 の蛍光を 520 - 550 nm で励起させ、580 nm で検出した。画像は Luminavision (三谷商事株式会社) でデジタル化した。

共焦点蛍光顕微鏡観察には、MRC - 600 レーザーシャープシステム (Bio - Rad laboratories) を用い、Cy 3 の蛍光をクリプトン (568 nm) レーザーにて励起させた。画像は、1.0  $\mu\text{m}$  ごとにスキャンを行い、5 枚重ねた像を 1 枚の画像とした。

#### 4. 統計処理

2 群の比較は Student's *t* - test を用いて行った。3 群以上の比較には、一元配置分散分析を行い、有意差のあるものについてはさらに、Shèffe の多重比較を行い、2 群間の有意差を検定した。

Table 7 - 1 Primer sequence used for experiments

Transporter	GenBank accession number	Purpose	Primer	Sequence (5'-3')
OAT1 (Slc22a6)	AB004559	RT-PCR	Forward	ACAAGCAAGGACAACCCGAA
			Reverse	AGACATAGCCAATCAAGGTGCC
OAT2 (Slc22a7)	L27651	RT-PCR	Forward	GCAGCCTCCATCAACTACATCA
			Reverse	GCGCACAAGGAAGTAGACCATA
OAT3 (Slc22a8)	AB017446	RT-PCR	Forward	TGGAGGACCTGTGATTGGAGAA
			Reverse	ATAGAACCAGCCAGCGTATGGA
		Cloning	Forward	CATCCACCTCCAGTCCAAC
			Reverse	TCCAGAAGGGTACTGCTTGG
oatp1 (Slc21a1)	L19031	RT-PCR	Forward	CATGAGTGTACTTCTCTCTTGG
			Reverse	ATTCTGCTGGGTCTTGCGTTGG
		Cloning	Forward	CAGAAGAACACCATGGAAG
			Reverse	TCTCCCCAGGGAAATCTTA
oatp2 (Slc21a5)	U95011	RT-PCR	Forward	GCCTAAGTATCTGGAACAGCAA
			Reverse	CAGCGAGTATATGAAACAGCCA
OAT-K (Slc21a4)	AB012662	RT-PCR	Forward	TCGCATTCTGCCTATCCTTGTC
			Reverse	GCCTTTATTACACAGCCCCAGG
NPT1 (Slc17a1)	U28504	RT-PCR	Forward	CTCAGCGAGTGTGCCTGAAC
			Reverse	GATCACAGATGAAGCCGATC
NPT2 (Slc17)	L13257	RT-PCR	Forward	CAGCCTTGCAAACACCACCA
			Reverse	ATGCGGATGGGCAGACGTGT
		Cloning	Forward	TCAAGGACTCATTGTGGGTG
			Reverse	GGGCTCTGTAAAAATCCCGT
MRP2 (ABCC2)	X96393	RT-PCR	Forward	TCACGGCTTCCTTTCTGAGT
			Reverse	CTTCTCCAGGACGAGAACG
GAPDH	M17701	RT-PCR	Forward	GACCCCTTCATTGACCTCAACTACA
			Reverse	TGATGGCATGGACTGTGGTCATGAG

Table 7 - 2 PCR conditions

Transporter	Purpose	PCR conditions			
		Denature	Annealing	Extension	Cycles
OAT1	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	19
OAT2	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	23
OAT3	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	21
	Cloning	98°, 10 s	68°, 30 s	72°, 2 min	40
oatp1	Quantification (Real time)	94°, 15 s	62°, 30 s	72°, 30 s	50
	Cloning	98°, 10 s	53°, 30 s	72°, 4 min	40
oatp2	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	31
OAT-K	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	21
NPT1	Quantification (Real time)	94°, 15 s	56°, 30 s	72°, 30 s	50
NPT2	Quantification (Real time)	94°, 15 s	60°, 30 s	72°, 30 s	50
	Cloning	98°, 10 s	65°, 30 s	72°, 2 min	30
MRP2	Quantification (Real time)	94°, 15 s	56°, 30 s	72°, 30 s	50
GAPDH	Quantification	94°, 1 min	63°, 30 s	72°, 30 s	17
	Quantification (Real time)	94°, 10 s	56°, 30 s	72°, 30 s	50

## 引用文献

- (1) Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts. In : U. S. Environmental Protection Agency (2002).
- (2) Preliminary risk assessment of the developmental toxicity associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts. In : U. S. Environmental Protection Agency (2003).
- (3) Beers, K.W., Thompson, M.A., Chini, E.N., and Dousa, T.P.  $\beta$ -Estradiol inhibits  $\text{Na}^+$ - $\text{P}_i$  cotransport across renal brush border membranes from ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 442-5 (1996).
- (4) Bergwerk, A.J., Shi, X., Ford, A.C., Kanai, N., Jacquemin, E., Burk, R.D., Bai, S., Novikoff, P.M., Stieger, B., Meier, P.J., Schuster, V.L., and Wolkoff, A.W. Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* **271**, G231-8 (1996).
- (5) Buist, S.C., Cherrington, N.J., Choudhuri, S., Hartley, D.P., and Klaassen, C.D. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 145-51 (2002).
- (6) Buist, S.C., Cherrington, N.J., and Klaassen, C.D. Endocrine regulation of rat organic anion transporters. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 559-64 (2003).
- (7) Burckhardt, B.C., and Burckhardt, G. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146**, 95-158 (2003).
- (8) Deguchi, T., Ohtsuki, S., Otagiri, M., Takanaga, H., Asaba, H., Mori, S., and Terasaki, T. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int.* **61**, 1760-8 (2002).
- (9) Dick, I.M., and Prince, R.L. The effect of estrogen on renal phosphorus handling in the rat. *Am. J. Nephrol.* **21**, 323-30 (2001).
- (10) Dresser, M.J., Leabman, M.K., and Giacomini, K.M. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* **90**, 397-421 (2001).



- (11) Gotoh, Y., Kato, Y., Stieger, B., Meier, P.J., and Sugiyama, Y. Gender difference in the *oatp1*-mediated tubular reabsorption of estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide in rats. *Am. J. Physiol.* **282**, E1245-54 (2002).
- (12) Guethner, R.A., and Vietor, M.L. Surface active materials from perfluorocarboxylic acid. *Ind. Eng. Chem. Proc. Res. Dev.* **1**, 165-167 (1962).
- (13) Han, X., Snow, T.A., Kemper, R.A., and Jepson, G.W. Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 775-81 (2003).
- (14) Hansen, K.J., Johnson, H.O., Eldridge, J.S., Butenhoff, J.L., and Dick, L.A. Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1681-5 (2002).
- (15) Hasegawa, M., Kusuhara, H., Endou, H., and Sugiyama, Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 1087-97 (2003).
- (16) Hernando, N., Karim-Jimenez, Z., Biber, J., and Murer, H. Molecular determinants for apical expression and regulatory membrane retrieval of the type IIa Na/Pi cotransporter. *Kidney Int.* **60**, 431-5 (2001).
- (17) Inui, K.I., Masuda, S., and Saito, H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.* **58**, 944-58 (2000).
- (18) Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume, K., Shimizu, T., and Sugiyama, Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* **272**, G16-22 (1997).
- (19) Ito, T., Yano, I., Masuda, S., Hashimoto, Y., and Inui, K. Distribution characteristics of levofloxacin and grepafloxacin in rat kidney. *Pharm. Res.* **16**, 534-9 (1999).
- (20) Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. Expression cloning of a rat liver Na<sup>+</sup>-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 133-7 (1994).
- (21) Ji, L., Masuda, S., Saito, H., and Inui, K. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int.* **62**, 514-24 (2002).

- (22) Just, W.W., Gorgas, K., Hartl, F.U., Heinemann, P., Salzer, M., and Schimassek, H. Biochemical effects and zonal heterogeneity of peroxisome proliferation induced by perfluorocarboxylic acids in rat liver. *Hepatology* **9**, 570-81 (1989).
- (23) Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S., and Giesy, J.P. Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3210-6 (2002).
- (24) Kannan, K., Newsted, J., Halbrook, R.S., and Giesy, J.P. Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in mink and river otters from the United States. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2566-71 (2002).
- (25) Katakura, M., Kudo, N., Okazaki, M., Hibino, Y., and Kawashima, Y. Sex hormone regulation of rat organic anion transporter 3 (rOAT3) expression in rat kidney. *J. Health Sci.* **49**, 233-238 (2003).
- (26) Katakura, M., Kudo, N., Tsuda, T., Mitsumoto, A., Hibino, Y., and Kawashima, Y. Rat organic anion transporting polypeptide 1 mediates renal reabsorption of perfluorooctanoic acid. *Toxicological Sciences*, (submitted).
- (27) Kato, Y., Kuge, K., Kusuhara, H., Meier, P.J., and Sugiyama, Y. Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 483-9 (2002).
- (28) Kawashima, Y., Uy-Yu, N., and Kozuka, H. Sex-related differences in the enhancing effects of perfluoro-octanoic acid on stearyl-CoA desaturase and its influence on the acyl composition of phospholipid in rat liver. Comparison with clofibric acid and tiadenol. *Biochem. J.* **263**, 897-904 (1989).
- (29) Kawashima, Y., Uy-Yu, N., and Kozuka, H. Sex-related difference in the inductions by perfluoro-octanoic acid of peroxisomal  $\beta$ -oxidation, microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase and cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochem. J.* **261**, 595-600 (1989).
- (30) Kawashima, Y., Matsunaga, T., Uy-Yu, N., and Kozuka, H. Induction by perfluorooctanoic acid of microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase in rat kidney. Sex-related difference. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1921-6 (1991).

- (31) Khamdang, S., Takeda, M., Babu, E., Noshiro, R., Onozato, M.L., Tojo, A., Enomoto, A., Huang, X.L., Narikawa, S., Anzai, N., Piyachaturawat, P., and Endou, H. Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* **465**, 1-7 (2003).
- (32) Kobayashi, Y., Hirokawa, N., Ohshiro, N., Sekine, T., Sasaki, T., Tokuyama, S., Endou, H., and Yamamoto, T. Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 482-7 (2002).
- (33) Koh, A.S., Simmons-Willis, T.A., Pritchard, J.B., Grassl, S.M., and Ballatori, N. Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1. *Mol. Pharmacol.* **62**, 921-6 (2002).
- (34) Kojima, R., Sekine, T., Kawachi, M., Cha, S.H., Suzuki, Y., and Endou, H. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 848-57 (2002).
- (35) Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., and Keppler, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 377-94 (1999).
- (36) Kudo, N., Bandai, N., Suzuki, E., Katakura, M., and Kawashima, Y. Induction by perfluorinated fatty acids with different carbon chain length of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in the liver of rats. *Chem. Biol. Interact.* **124**, 119-32 (2000).
- (37) Kudo, N., Suzuki, E., Katakura, M., Ohmori, K., Noshiro, R., and Kawashima, Y. Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chem. Biol. Interact.* **134**, 203-16 (2001).
- (38) Kudo, N., Katakura, M., Sato, Y., and Kawashima, Y. Sex hormone-regulated renal transport of perfluorooctanoic acid. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 301-16 (2002).

- (39) Kusuhara, H., Sekine, T., Utsunomiya-Tate, N., Tsuda, M., Kojima, R., Cha, S.H., Sugiyama, Y., Kanai, Y., and Endou, H. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 13675-80 (1999).
- (40) Li, H., and Xie, Z. Molecular cloning of two rat Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> cotransporters: evidence for differential tissue expression of transcripts. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 451-60 (1995).
- (41) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75 (1951).
- (42) Lu, R., Kanai, N., Bao, Y., Wolkoff, A.W., and Schuster, V.L. Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone. *Am. J. Physiol.* **270**, F332-7 (1996).
- (43) Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., and Murer, H. Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5979-83 (1993).
- (44) Masuda, S., Ibaramoto, K., Takeuchi, A., Saito, H., Hashimoto, Y., and Inui, K.I. Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. *Mol. Pharmacol.* **55**, 743-52 (1999).
- (45) Masuda, S., Takeuchi, A., Saito, H., Hashimoto, Y., and Inui, K. Functional analysis of rat renal organic anion transporter OAT-K1: bidirectional methotrexate transport in apical membrane. *FEBS Lett.* **459**, 128-32 (1999).
- (46) Miyamoto, K.I., and Itho, M. Transcriptional regulation of the NPT2 gene by dietary phosphate. *Kidney Int.* **60**, 412-5 (2001).
- (47) Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H., and Sugiyama, Y. Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 1179-84 (2001).
- (48) Murer, H., Hernando, N., Forster, I., and Biber, J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol. Rev.* **80**, 1373-409 (2000).
- (49) Murer, H., Hernando, N., Forster, I., and Biber, J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 531-42 (2003).

- (50) Ohmori, K., Kudo, N., Katayama, K., and Kawashima, Y. Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* **184**, 135-40 (2003).
- (51) Ohya, T., Kudo, N., Suzuki, E., and Kawashima, Y. Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **720**, 1-7 (1998).
- (52) Olsen, G.W., Burriss, J.M., Burlew, M.M., and Mandel, J.H. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 260-70 (2003).
- (53) Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., Bakker, C.T., Otter, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Borst, P., and Oude Elferink, R.P. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-8 (1996).
- (54) Pombrio, J.M., Giangreco, A., Li, L., Wempe, M.F., Anders, M.W., Sweet, D.H., Pritchard, J.B., and Ballatori, N. Mercapturic acids (N-acetylcysteine S-conjugates) as endogenous substrates for the renal organic anion transporter-1. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1091-9 (2001).
- (55) Saito, H., Masuda, S., and Inui, K. Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney. *J. Biol. Chem.* **271**, 20719-25 (1996).
- (56) Schaub, T.P., Kartenbeck, J., Konig, J., Vogel, O., Witzgall, R., Kriz, W., and Keppler, D. Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1213-21 (1997).
- (57) Schaub, T.P., Kartenbeck, J., Konig, J., Spring, H., Dorsam, J., Staehler, G., Storkel, S., Thon, W.F., and Keppler, D. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1159-69 (1999).
- (58) Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., and Endou, H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* **272**, 18526-9 (1997).

- (59) Sekine, T., Cha, S.H., Tsuda, M., Apiwattanakul, N., Nakajima, N., Kanai, Y., and Endou, H. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett.* **429**, 179-82 (1998).
- (60) Shitara, Y., Sugiyama, D., Kusuhara, H., Kato, Y., Abe, T., Meier, P.J., Itoh, T., and Sugiyama, Y. Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl (slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport. *Pharm. Res.* **19**, 147-53 (2002).
- (61) Sweet, D.H., Wolff, N.A., and Pritchard, J.B. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **272**, 30088-95 (1997).
- (62) Sweet, D.H., Chan, L.M., Walden, R., Yang, X.P., Miller, D.S., and Pritchard, J.B. Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na<sup>+</sup> gradient. *Am. J. Physiol.* **284**, F763-9 (2003).
- (63) Sylvia, Y.M.Y., Carol E. Cass, and James D. Young. The *Xenopus* oocyte expression system for the cDNA cloning and characterization of plasma membrane transport protein. In *Membrane Transport* (S. A. Baldwin, Eds.), pp. 47-76. Oxford University Press, New York. (2000).
- (64) Takahashi, K., Nakamura, N., Terada, T., Okano, T., Futami, T., Saito, H., and Inui, K.I. Interaction of beta-lactam antibiotics with H<sup>+</sup>/peptide cotransporters in rat renal brush-border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1037-42 (1998).
- (65) Takeuchi, A., Masuda, S., Saito, H., Abe, T., and Inui, K. Multispecific substrate recognition of kidney-specific organic anion transporters OAT-K1 and OAT-K2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 261-7 (2001).
- (66) Tojo, A., Sekine, T., Nakajima, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., Kimura, K., and Endou, H. Immunohistochemical localization of multispecific renal organic anion transporter 1 in rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 464-71 (1999).
- (67) Ubel, F.A., Sorenson, S.D., and Roach, D.E. Health status of plant workers exposed to fluorochemicals-a preliminary report. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **41**, 584-9 (1980).

- (68) Uchino, H., Tamai, I., Yamashita, K., Minemoto, Y., Sai, Y., Yabuuchi, H., Miyamoto, K., Takeda, E., and Tsuji, A. *p*-Aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 254-9 (2000).
- (69) Uwai, Y., Okuda, M., Takami, K., Hashimoto, Y., and Inui, K. Functional characterization of the rat multispecific organic anion transporter OAT1 mediating basolateral uptake of anionic drugs in the kidney. *FEBS Lett.* **438**, 321-4 (1998).
- (70) Vanden Heuvel, J.P., Kuslikis, B.I., Van Rafelghem, M.J., and Peterson, R.E. Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *J. Biochem. Toxicol.* **6**, 83-92 (1991).
- (71) Wolff, M.W., and Su, T.Z. Cloning and tissue-specific expression of spliced variants of the rat organic anion transporter (rOAT-K). *DNA Seq.* **13**, 15-25 (2002).
- (72) 内田治、EXCELによる多変量解析、東京図書 (2000).
- (73) 住谷文須紗、城西大学大学院薬学研究科、修士論文 (1999).

