

ペルフルオロオクタン酸の生体蓄積性の解析
—代替化合物設計のための基礎的検討—

甲第38号

酒井 絢子

ペルフルオロオクタン酸の生体蓄積性の解析
—代替化合物設計のための基礎的検討—

酒井 絢子

論文目録

本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、城西大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. *Biochem. Pharm. Bull.*, 30: in press (2007).
2. Comparison of tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid between acute and subchronic exposures in rats. Manuscript in preparation.

目次

略号	i
----	---

総論の部

緒言	1
----	---

第1章 極低用量暴露における PFOA の組織集積性の解明および体内動態

第1節 PFOA の組織分布における用量依存性	4
第2節 PFOA の肝細胞内分布における用量依存性	8
第3節 PFOA の体外排泄速度における用量依存性	9
第4節 少括および考察	10

第2章 低用量 28 日間暴露における PFOA の生体影響および体内分布

第1節 肝臓中における生体影響の用量依存性	14
第2節 主要組織蓄積における用量依存性	21
第3節 肝および腎細胞内分布における用量依存性	23
第4節 少括および考察	25

第3章 急性暴露と 28 日間暴露の生体影響および体内分布の比較

第 1 節	肝臓における生体影響の比較	26
第 2 節	肝細胞内分布の比較	30
第 3 節	少括および考察	33
第 4 章	PFOA 体内濃度の飽和機構の検討	
第 1 節	尿および糞中への排泄過程における用量依存性	34
第 2 節	繰り返し投与ラットにおける PFOA の体内動態	37
第 3 節	肝および腎臓における各種輸送担体 mRNA 発現量の用 量依存性	38
第 4 節	少括および考察	44
第 5 章	PFOA 類縁化合物ペルフルオロヘキサン酸 (PFHA) の生 体影響および体内動態	
第 1 節	PFHA 28 日間暴露における生体影響の検討	46
第 2 節	繰り返し経口投与による PFHA の生体蓄積性	50
第 3 節	PFHA の体外排泄速度の検討	52
第 4 節	少括および考察	54
考察		55
総括		59
実験の部		61

謝辭 ····· 73

引用文献 ····· 74

略号

本論文中に使用した略号について以下に記載する。

- AHase : acyl-CoA hydrolase
- AOX : acyl-CoA oxidase
- AUC : area under the blood concentration-time curve
- BSA : bovine serum albumin
- cDNA : complementary deoxyribonucleic acid
- CL_R : renal clearance
- CL_B : biliary clearance
- C_{Liver} : liver concentration
- C_p : plasma concentration
- EDTA : ethylenediaminetetra acetic acid
- FABP : Fatty acid binding protein
- HPLC : high performance liquid chromatography
- 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
- OCT : organic cation transporter
- PCR : polymerase chain reaction
- PFOA : perfluorooctanoic acid
- PFHA : perfluorohexanoic acid

RT-PCR : reverse transcription coupled polymerase chain reaction

総論の部

総論の部

緒言

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) (Fig.) 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持つ^{1,3, 62)}。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はほとんど分解されない^{4, 5)}。テフロンは焦げ付かない鍋やフライパン等様々な用途に利用されているが、PFOA はテフロン製造プロセスで乳化剤として使用される。また、カーペットや家具、食品容器、皮製品用スプレー、靴、衣類、塗料などに施される、防汚、撥油、および撥水処理剤には *1H, 1H, 2H, 2H*-ペルフルオロデカノール等が使用されている⁶⁾ が、これらは環境中や生体内で分解され PFOA を生じることが示されている^{7, 8)}。また、PFOA は他のフルオロ化合物の製造原料としても使用されている。ペルフルオロ化合物は従来安全な化合物であると考えられてきたため、化学工場からの排気、排水にも含まれており、環境中に拡散しているものと考えられている^{9, 10)}。



Fig. Chemical structure of PFOA

OECD の統計によると、加盟国における年間生産量は 38460 kg (1998 年) である。最近の研究から、世界各地に生息する野生動物^{11, 12, 59)} (鳥類、水棲哺乳類や魚類など) や水中¹³⁻²¹⁾ から PFOA やペルフルオロスルホン酸 (PFOS) が検出されており、これらのペルフルオロ化合物による環境汚染

が広がっていることが明らかとなってきた^{22, 23)}。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有機フッ素が検出されることがはじめて報告された²⁴⁾。その後の調査から有機フッ素化合物が PFOA であるという報告がなされ、生体残留が序々に明らかになってきた^{25, 26)}。PFOA プラント工場の退職者を追跡した調査から、PFOA のヒトにおける半減期が 4.4 年と非常に長いことが明らかになった²⁵⁾。近年の分析技術の進歩により、より微量の分析が可能となったことにより、一般のヒトの血液中および乳汁中からも微量の PFOA が検出されることが明らかになりつつあり、ヒトにおける残留性の高さが指摘されている^{27-31, 60, 61)}。このように環境やヒトを含めた動物がペルフルオロ化合物に広範に汚染されており、しかも長期に亘って残留することが明らかとなったため、ペルフルオロ化合物のリスク管理が改めて問題となっている。PFOA の生体への影響に関しては動物実験の結果から、この化合物が胎児の発育に影響を与えるということが報告されている³²⁻³⁴⁾。また、ヒトの疫学調査の結果から、PFOA に暴露すると甲状腺機能不全や精巣がんのリスクが高まることが示されている^{35, 36)}。このような状況を受けて、PFOA および PFOS の米国における主要製造元である 3M 社は 2002 年までに段階的にこれらの化合物の製造を中止した。また、PFOA や PFOS 以外のペルフルオロ化合物についても、最終代謝産物として PFOA や PFOS となる化合物があることも次第に明らかになってきており、これまでほぼ規制のなかったペルフルオロ化合物が厳しい制限下に置かれる状況になってきている。我が国においても、PFOA による水質汚染が広がり、中でも大阪市とその周辺では高濃度で⁶⁸⁾、住民の血中濃度も高くなっている³¹⁾ことが報告されている。このような状況下において、PFOA に替わる化合物を開発することが急務となっている。では、どのような化合物が望まれるのであろうか？代替化合物として不可欠の条件は生体

残留性が低いことである。また、生体作用が弱いことも最低条件であろう。生体残留性に関する従来の実験動物を用いた研究では、PFOA の生体残留は低く、血漿中の半減期は雄性ラットでは約 7 日、雌性ラットではわずかに 2 時間と報告されてきた³⁷⁾。マウスにおいても約 30 日程度である³⁸⁾。ところが上述したようにヒトの推定半減期は約 4 年と非常に長い。このような差は動物種差あるいは性差に原因があるものと考えられ、したがって動物実験からヒトの長期残留性のメカニズムを探ることは困難であると考えられてきた³⁹⁾。しかし、これまでに報告された研究内容を精査すると、動物実験における PFOA の体内動態研究は高用量暴露における情報に限られており^{4, 39-43)}、ヒトが暴露するような極低用量慢性暴露条件で体内動態を検討した例は全くない。したがって、動物実験で観察される短い半減期は高用量暴露した場合に限られる現象である可能性が考えられる。

本研究では、極低用量では実験動物においても PFOA の生体蓄積性が高いという作業仮説を立てこれを検証することとした。PFOA の生体残留性についてその特徴を明らかにするために低用量、長期暴露条件を設定し、高用量短期暴露の場合との詳細な比較を行い、前述の疑問の解答を得ることを目指した。本研究の結果を利用すると、生体蓄積性が低く安全な代替化合物を分子設計するにあたっての基準を明確にすることが可能になるであろう。また、本研究は、生体に蓄積した PFOA を体外に強制排泄させる、すなわち解毒方法開発に繋がる情報を提供できるものとする。

第 1 章 極低用量暴露における PFOA の組織集積性の解明 および体内動態

PFOA は極めて難代謝性化合物であることから、PFOA の生体内蓄積はこの化合物の体内動態の影響を大きく受けるものと考えられる。まずはじめに、極低用量の PFOA に暴露した場合の体内分布を検討することにした。従来最も感度の高い定量法は LC-MS/MS を用いる方法であるが、検出感度は 10 ppb オーダーである。放射標識 PFOA を用いる場合には sub ppb オーダーの検出が可能となる。化学合成した[1-¹⁴C]PFOA には、不純物として含まれる炭素鎖長の異なるペルフルオロカルボン酸が PFOA と異なる挙動を示す可能性が考えられた。そこで、本章では、放射標識した PFOA を使用するにあたり純度検定を行ったところ、PFOA 以外の不純物が多く混在していることが明らかとなった。そこで、[1-¹⁴C]PFOA を誘導体化した後、HPLC で精製し、不純物のない高純度の[1-¹⁴C]PFOA をほぼ 100%得る方法を開発することに成功した。

第 1 節 PFOA の組織分布における用量依存性

PFOA をラットに 0.1 または 40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重で静脈内に単回投与し、投与 2 時間後の組織分布を調べた(Fig. 1-1)。PFOA を静脈内に単回投与後、血漿中の PFOA の濃度変化を 2-コンパートメントモデルにあてはめて解析したところ、投与初期の 2 時間が分布相であると考えられたため、投与 2 時間で検討を行うことにした。0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 体重を投与した場合、PFOA の大部分は肝臓、血液およびカーカス中で検出された。0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群では投与量の 52%が肝臓に分布したのに対し、40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群で

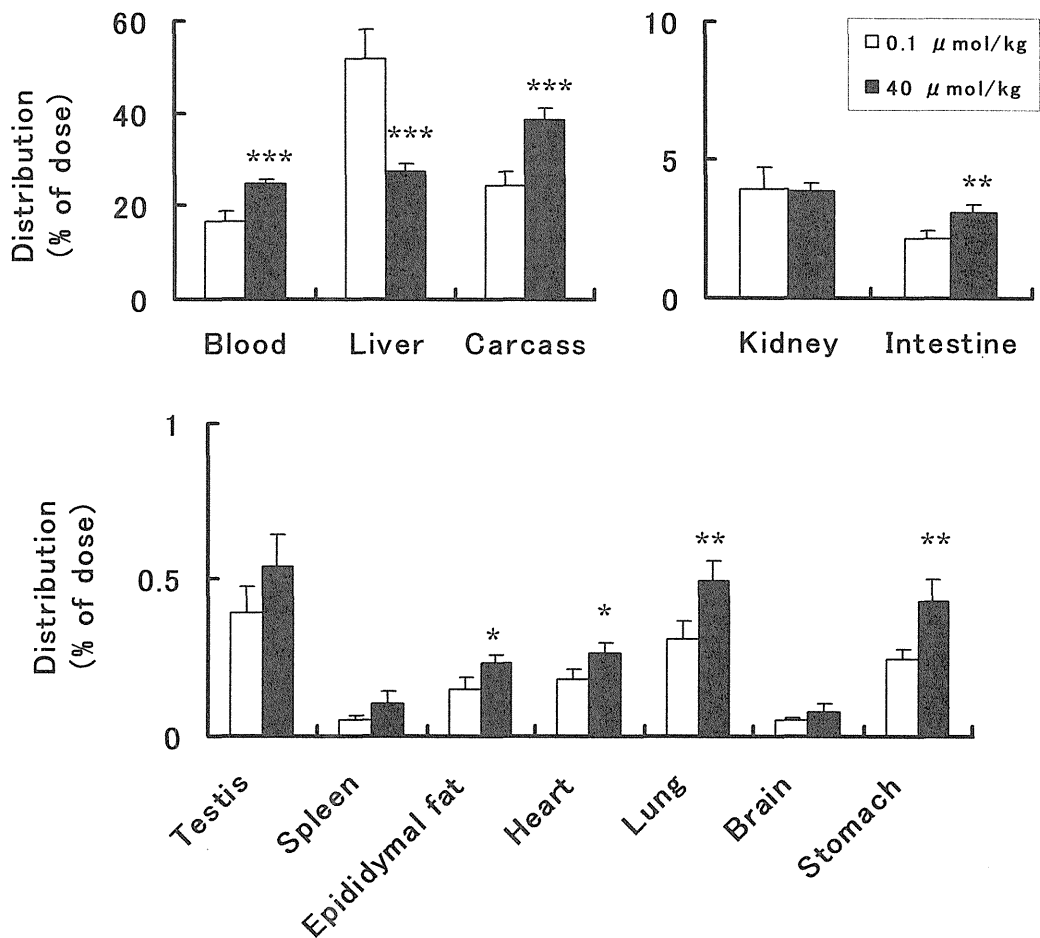


Fig. 1-1 Tissue distribution of [1-¹⁴C] PFOA after an i.v. injection at very low and high doses. Values are mean \pm SD for 4 rats. *, **, ***, Significantly different from the value at 0.1 μ mol/kg body weight at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

は 27%しか肝臓に分布しなかった。対照的に 40 μ mol/kg 体重の投与群では、血液、カーカス、小腸、肺、胃、副睪丸周辺脂肪組織および心臓などの肝臓以外の組織に多く分布していた。肝臓への PFOA の分布率は 0.1~40 μ mol/kg

体重の範囲で投与量を増加させた場合、肝臓中濃度依存的に低下した(Fig. 1-2)。次に、様々な組織中における PFOA の濃度を示した(Table 1-1)。0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重投与群では、血漿中の PFOA 濃度よりも肝臓中の PFOA 濃度は高かった。肝臓/血漿中 PFOA 濃度比は 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重の投与群で 2.22 であり、40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重の投与群と比較して 2.7 倍高い値を示した。血液容量および血漿容量はそれぞれラット体重の 5.8%および 3.1%と仮定して算出した。また、血液中における PFOA のほとんどは血漿中に存在していた。

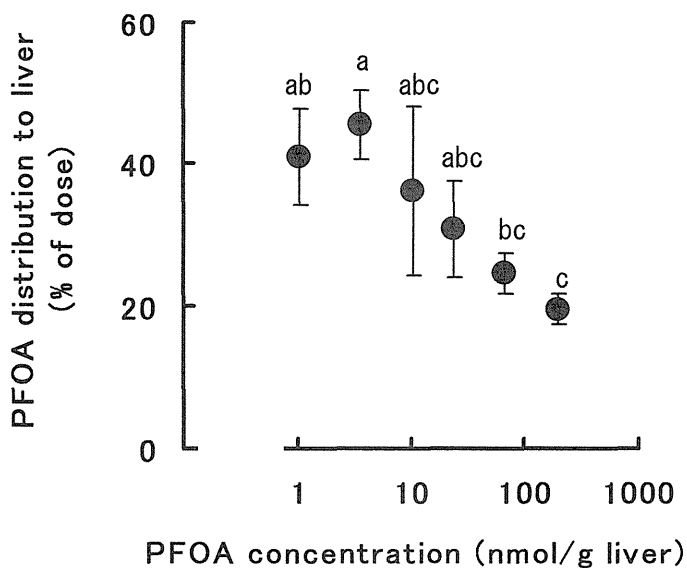


Fig. 1-2 Relationship between PFOA concentration in the liver and percentage of dosed PFOA recovered in the liver at various doses. Values are mean \pm SD for 4 rats. ^{a, b, c}, Differences between 6 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.05$.

Table 1-1 Concentrations of PFOA found in blood, plasma and various tissue in rats after an i.v. injection at very low and high doses.

Tissue	Dose ($\mu\text{mol/kg}$ body weight)	
	0.1	40
	(nmol/g organ)	
Blood	0.320 \pm 0.030	139.22 \pm 6.20
Plasma	0.610 \pm 0.060	254.42 \pm 10.12
Liver	1.350 \pm 0.220 *	211.19 \pm 29.39 #
Kidney	0.650 \pm 0.120	191.99 \pm 26.92 ##
Intestine	0.042 \pm 0.005 *	16.72 \pm 1.78 ###
Testis	0.042 \pm 0.007 *	18.52 \pm 1.72 ###
Spleen	0.036 \pm 0.004 *	19.51 \pm 7.59 ###
Epididymal fat	0.022 \pm 0.005 *	8.28 \pm 1.39 ###
Heart	0.069 \pm 0.008 *	31.41 \pm 4.08 ###
Lung	0.094 \pm 0.010 *	43.39 \pm 5.93 ###
Brain	0.008 \pm 0.001 *	3.33 \pm 1.65 ###
Stomach	0.021 \pm 0.002 *	9.21 \pm 2.48 ###
Carcass	0.073 \pm 0.007 *	34.66 \pm 2.89 ###

Male rats were received an i.v. injection of PFOA at 0.1 or 40 $\mu\text{mol/kg}$ body weight. PFOA concentrations in blood, plasma and tissues were determined 2 h after the injection. Values are means \pm SD for 4 rats. *, Significantly different from the plasma concentration at 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ body weight at * $P < 0.001$. #, ##, ###, Significantly different from the plasma concentration at 40 $\mu\text{mol/kg}$ body weight at # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$.

第2節 PFOAの肝細胞内分布における用量依存性

肝臓はPFOAの主要な蓄積臓器であることから、肝細胞内におけるPFOAの分布を検討した。PFOAの塩形成を避けるため、カチオン性の試薬は0.25 M ショ糖溶液中には一切加えなかった。0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群では、8000 x g 沈殿（未破壊細胞、核およびミトコンドリア含有画分）、18000 x g 沈殿（リソソームおよびペルオキシソーム含有画分）、105000 x g 沈殿（ミクロソーム画分）および105000 x g 上清（可溶性画分）の順に従ってPFOAは分布した。対照的に40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群では可溶性画分に最も多く分布し、その割合は肝臓中のPFOAの43%に達した（Fig. 1-3）。105000 x g 上清画分へのPFOAの分布率は、0.1 ~ 40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の範囲で投与量を増加した場合、肝臓中のPFOA濃度に依存して増加した（Fig. 1-4）。

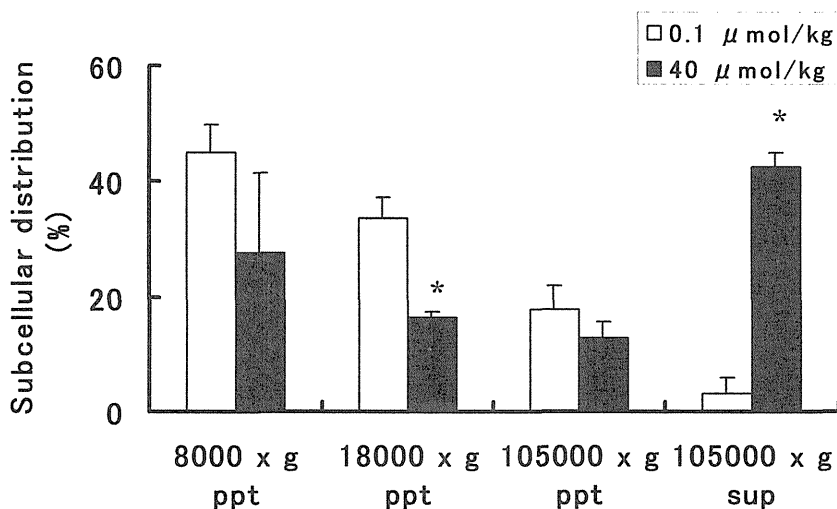


Fig. 1-3 Subcellular distribution of [1-¹⁴C]PFOA in the liver after an i.v. injection. Values are mean \pm SD for 4 rats. *, Significantly different from the value at 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ body weight at $P < 0.001$.

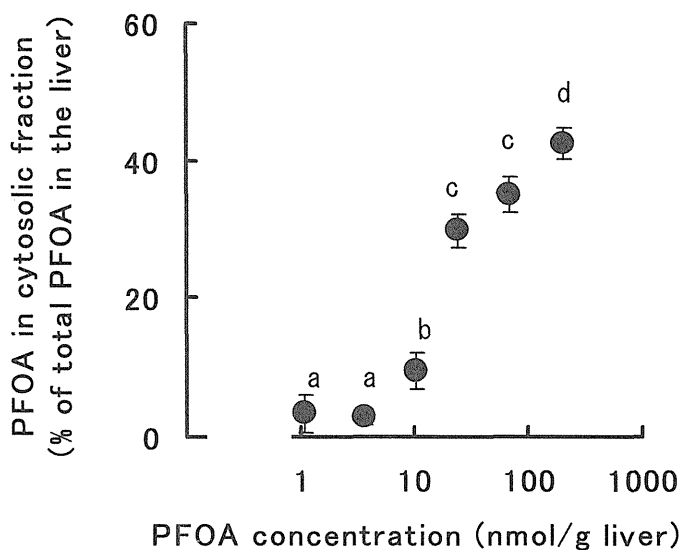


Fig. 1-4 Relationship between the proportion of PFOA distributed to cytosolic fraction and hepatic PFOA concentration. Values are mean \pm SD for 4 rats. ^{a, b, c, d}, Differences between 6 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.05$.

第3節 PFOA の体外排泄速度における用量依存性

極低用量暴露の場合における PFOA の生体蓄積性をさらに検討するために、次に PFOA の体外排泄速度における用量依存性を調べた。PFOA の胆汁クリアランスは、0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群では 0.07 mL/h/kg 体重であった(Fig. 1-5A)。PFOA の投与量を増加した場合、有意な差は認められなかったものの胆汁クリアランスは増加傾向を示した。Fig. 1-2 で示したように肝臓中への PFOA の分布率は肝臓中濃度依存的に低下していたことからわかるように、肝臓/血漿中の PFOA 濃度比も用量依存的な低下が認められた(Fig. 1-5B)。そこで、肝臓中から胆汁中へ排泄される PFOA を評価するために、胆汁/肝臓中の PFOA 総量比を算出し、異なる用量間で比較したとこ

ろ、肝臓中濃度依存的な増加が認められた(Fig. 1-5C)。40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群は 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の投与群と比較して 3.6 倍高い値を示した。一方、PFOA の腎クリアランスは、0.1 ~ 40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の異なる用量間で有意な差は認められなかった(Fig. 1-6A)。腎臓は肝臓とは異なり、腎臓/血漿中 PFOA 濃度比および尿/腎臓中 PFOA 総量比にも異なる用量間での違いは認められなかった(Fig. 1-6B,C)。

第 4 節 小括および考察

高用量暴露の場合に比べると、極低用量の PFOA 暴露群では静脈内投与 2 時間後に PFOA が高い割合で肝臓へ分布することが明らかとなった。投与量が増加し、肝臓中における PFOA 濃度が 3 nmol/g 肝臓 以上になると、対照的に血液およびその他の組織に多く分布するようになった。異なる用量間における肝細胞内での分布は極低用量の PFOA 暴露の場合には、高用量暴露の場合とは著しく異なることが明らかとなった。肝臓中の PFOA 濃度が 3 nmol/g 肝臓 以下ではほとんどの PFOA は膜画分中に見出され、可溶性画分中にはわずか 3% しか存在しなかった。可溶性画分中への PFOA の分布率は肝臓中の PFOA 濃度の増加に伴って増加した。この結果は、PFOA が膜画分、特に 18000 \times g 沈殿画分中の何らかの成分と結合する可能性を示唆している。しかしながら、本実験では分画した沈殿を洗浄することにより PFOA が洗い出されることを避けるため、再度の遠心による洗浄操作を行っていない。したがって各画分は粗く分画したものであり他の画分がある程度混入していることが予想される。そのため、細胞内で PFOA が高親和性に集積しているオルガネラの同定には至らなかった。PFOA の細胞内分布は Han らによっても報告されている⁴⁴⁾。Han らの設定した投与量は 25 mg/kg 体

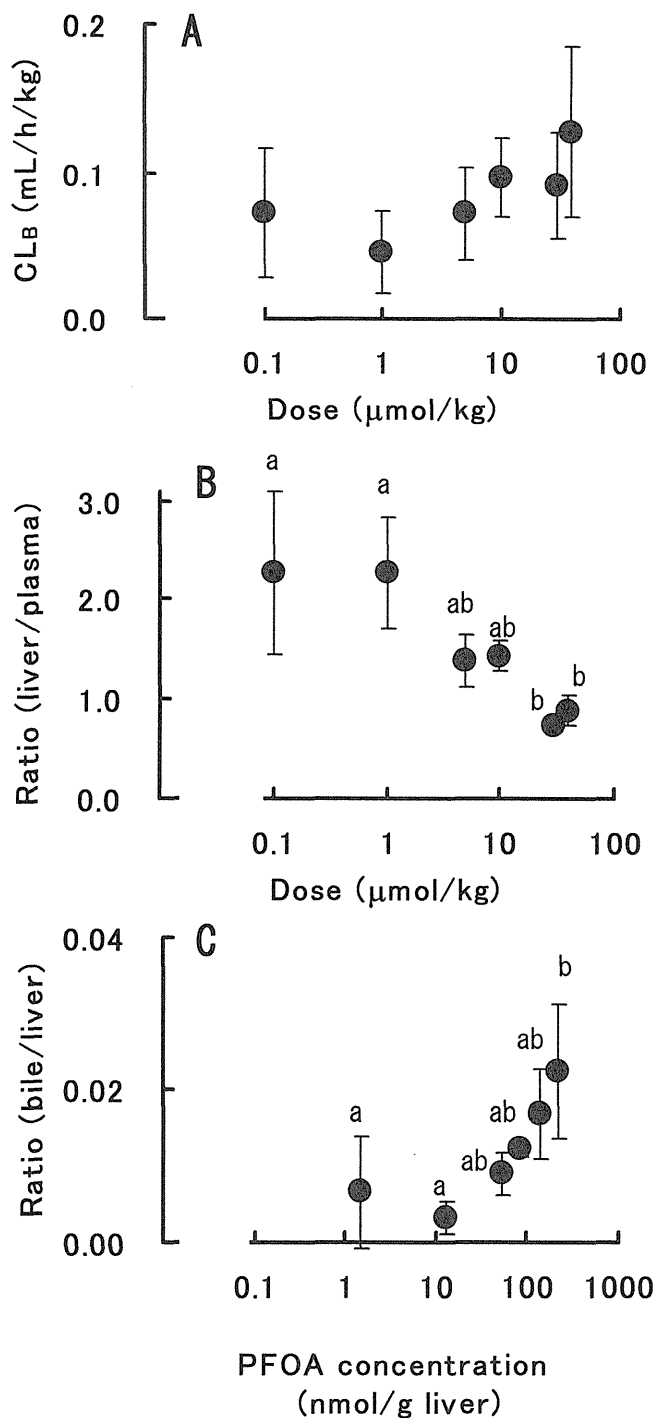


Fig. 1-5 Dose dependency of CL_B of PFOA. A, CL_B of PFOA; B, ratio of hepatic PFOA concentration to plasma PFOA concentration; C, relationship between hepatic PFOA concentration and ratio of the amount of PFOA excreted into bile to the amount of PFOA in the liver. Values are mean \pm SD for 4 rats. ^{a,b}, Differences between 6 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.05$.

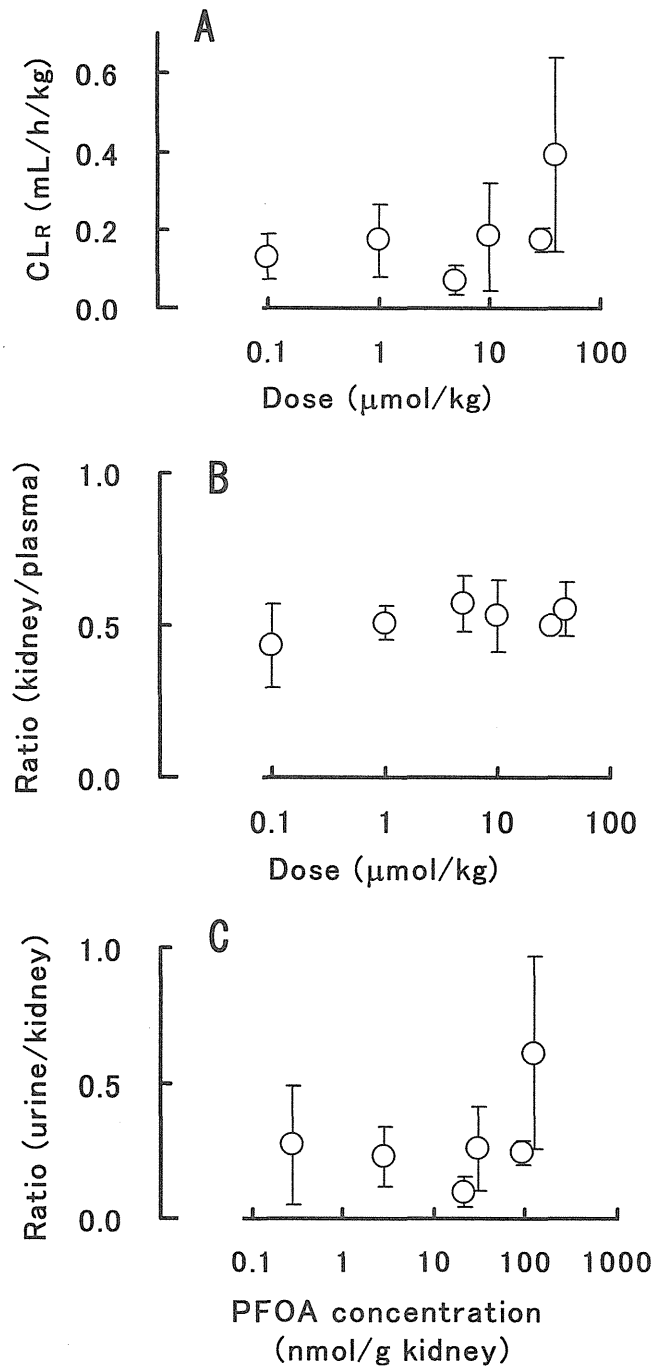


Fig. 1-6 Dose dependency of CL_R of PFOA. A, CL_R of PFOA; B, ratio of renal PFOA concentration to plasma PFOA concentration; C, relationship between renal PFOA concentration and ratio of the amount of PFOA excreted into urine to the amount of PFOA in the kidney. Values are mean \pm SD for 4 rats. Differences between 6 data points are not statistically significant.

重（約 60 $\mu\text{mol/kg}$ 体重）であり、本研究で用いた投与量（40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重）よりも高用量であった。しかしながら、肝可溶性画分中への分布率は本研究結果が 40% だったのに対し、Han らの結果はわずか 25% であった。一方、600 x g 沈殿および 6000 x g 沈殿画分への PFOA の分布率の合計は 50% 以上であった。本研究結果と Han らの研究結果の矛盾点に関する明確な答えは今のところ見つかっていない。肝臓への PFOA の分布率は投与量依存的に低下することから、胆汁クリアランス値には異なる用量間で有意な差は認められなかった。しかしながら、胆汁/肝臓中 PFOA 総量比には投与量依存的な増加が認められた。肝臓中の PFOA 濃度が増加するにつれ、血漿/肝臓中の PFOA 濃度比は増加し、さらに可溶性画分への分布率も増加した。また、肝臓から胆汁中への PFOA 排泄割合も増加した。これら一連の結果は、肝可溶性画分中の PFOA が胆汁中への輸送や血漿中への排出を受けやすいこと。また、PFOA の肝細胞内分布は組織分布の影響を強くうけることを示唆している。対照的に、血漿/腎臓中の PFOA 濃度比および尿/腎臓中の PFOA 総量比のどちらにおいても、異なる腎臓中の PFOA 濃度間で有意な差は認められなかった。本章における検討から、極低用量の PFOA をラットに暴露させた場合、肝臓への選択的な蓄積が認められ、高用量暴露の場合とは異なる組織分布であることが明らかとなった。また、肝細胞内には PFOA の高親和性集積部位が存在し、この部位が飽和した場合に低親和性部位に分布することが考えられる。さらに、極低用量の PFOA を投与した場合、胆汁中への排泄率が低かったことから高親和性集積部位に分布すると細胞内に貯留しやすくなることが推測される。

第2章 低用量28日間暴露におけるPFOAの生体影響および体内分布

第1章での検討結果より、極低用量のPFOAを1回暴露した場合、高用量暴露の場合とは異なる体内動態を示すことが明らかとなった。しかしながら、現実においてヒトは微量のPFOAを長期間に渡って暴露しているものと考えられる。本章では、ラットにPFOA含有飼料を28日間摂食させ、その生体蓄積性および生体作用を検討した。

第1節 肝臓中における生体影響の用量依存性

PFOA 0~200 ppm を含む粉末飼料を28日間与えたラットの体重および肝重量に与える影響を観察した(Fig. 2-1)。PFOAの暴露濃度が高い群では対照群に比べて体重がやや低い傾向があったものの有意な差は認められなかった。肝重量および相対肝重量は対照群と比較して10 ppm以上から濃度依存的な増加が認められた。相対肝重量の最大値は、200 ppmのPFOAを与えた場合で約6.8%であり、これは対照群の約2倍であった。次に、ラット血漿中および肝臓中におけるPFOAの蓄積濃度を測定した(Fig. 2-2)。血漿中および肝臓中ともに、50 ppmまでは用量依存的なPFOA濃度の増加が認められたがそれ以上の用量では増加が認められず、PFOA濃度は頭打ちを示した。PFOAのラットに対する代表的な作用にペルオキシソーム増殖作用がある^{45-49, 63-66}。PFOAはペルオキシソーム β 酸化活性の律速酵素であるアシルCoAオキシダーゼ(AOX)やアシルCoAを脂肪酸とCoAに分解するアシルCoAヒドロラーゼ(AHase)の活性を誘導することが報告されている⁵⁰。そこでまず、PFOA反復暴露ラットにおける肝AOX活性に対する影響を検討

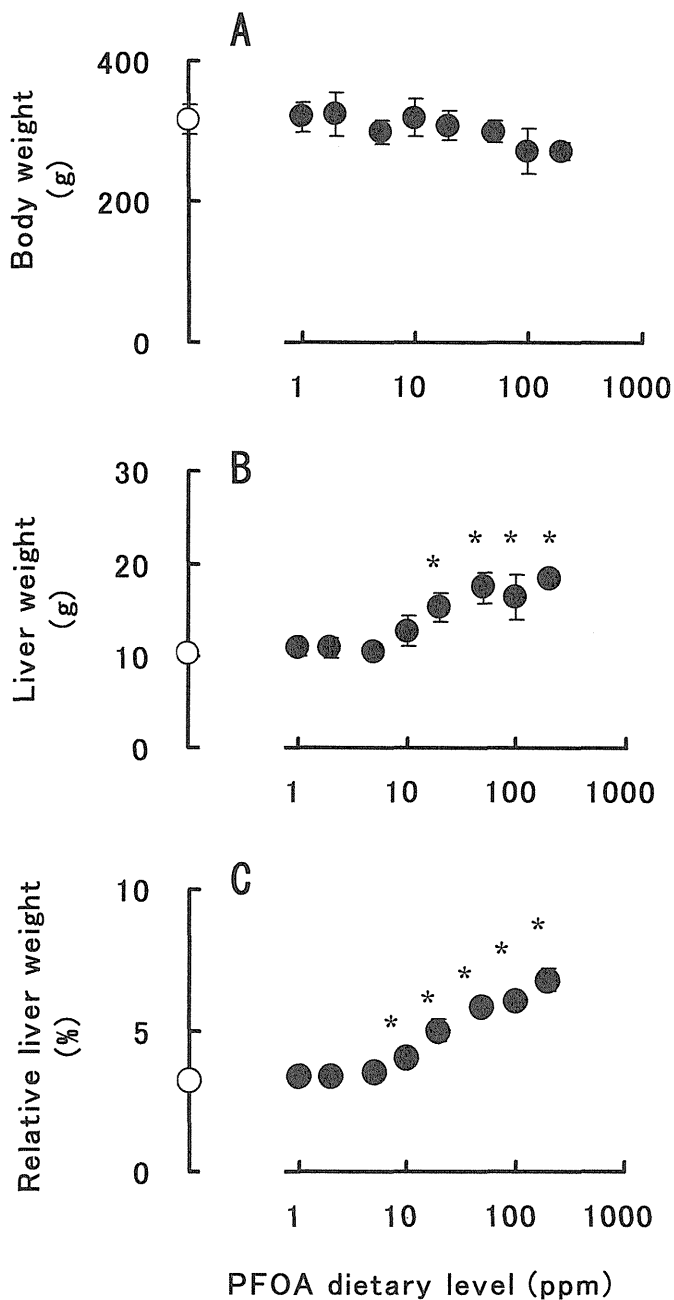


Fig. 2-1 Effects of PFOA on body weight and liver weight of rats fed on a diet containing PFOA at 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 ppm for 28 days. A, body weight; B, liver weight; C, relative liver weight. Values are mean \pm SD for 3 or 4 rats. *, Significantly different from control at $P < 0.05$.

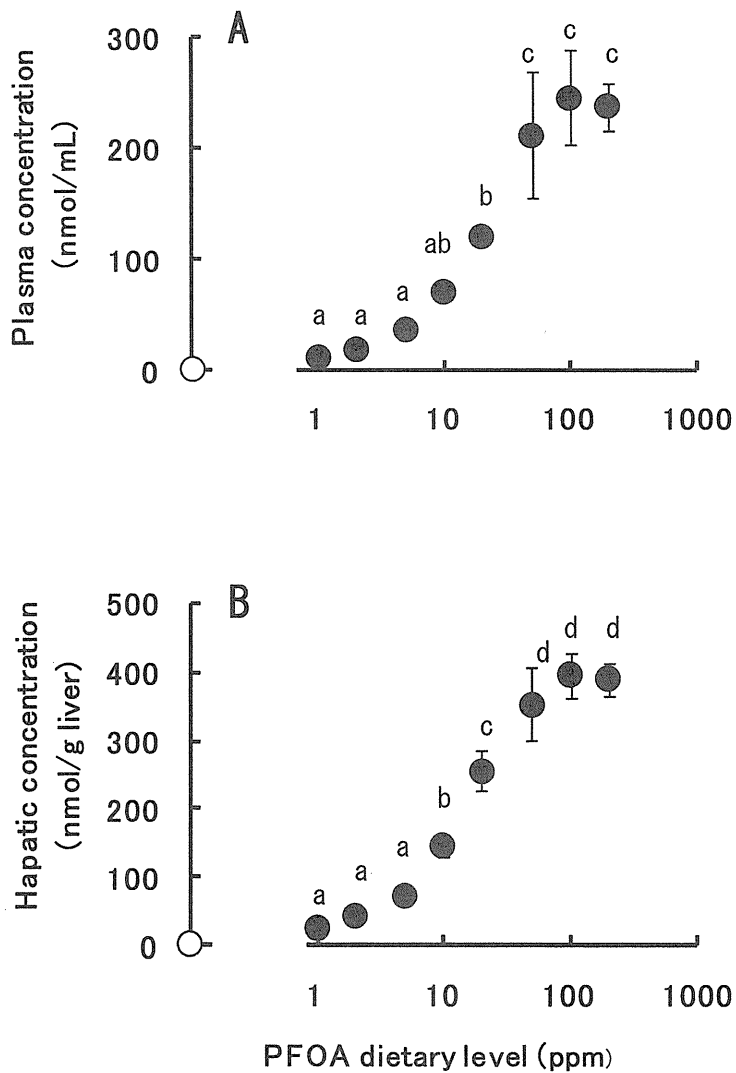


Fig. 2-2 Plasma concentration and hepatic concentration of PFOA of rats fed on a diet containing PFOA at 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 ppm for 28 days. A, plasma concentration; B, hepatic concentration. Values are mean \pm SD for 3 or 4 rats. ^{a, b, c, d}, Differences between 8 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.05$.

した(Fig. 2-3)。肝臓中の AOX 活性は PFOA の用量依存的に増加し、200 ppm 摂取群における活性は対照群の約 6.5 倍となった。PFOA 投与量と肝臓中の PFOA 蓄積濃度の関係および PFOA 投与量と肝 AOX 活性の誘導の関係には類似の傾向が認められた。そこで、肝 AOX 活性と肝臓中の PFOA 蓄積濃度の相関関係を調べたところ、正の相関が認められた ($Y=0.067X+1.866$, $r=0.963$, $P<0.05$.) (Fig. 2-4)。肝臓の PFOA 蓄積濃度は 400 nmol/g liver 付近で頭打ちとなり、AOX 活性は最大で 33 nmol/min/mg protein となった。PFOA の用量依存的な生体影響をさらに検討するために、肝臓における AOX およびアシル CoA ヒドロラーゼの mRNA 発現量を定量したところ用量依存的な増加が認められた(Fig. 2-5A,B)。また、PFOA は in vitro での実験系において肝細胞内可溶性画分の約 5%を占める脂肪酸結合タンパク質 (FABP、分子量 14000)⁵¹⁾ と脂肪酸の蛍光アナログとの結合を競合的に阻害することが報告されている^{52, 53)}。PFOA は脂肪酸であるオクタン酸のアナログであることから PFOA もまた、肝細胞内で FABP に結合する可能性が考えられる。そこで、肝臓における脂肪酸結合タンパク質の mRNA 発現量についても定量をおこなったところ、AOX およびアシル CoA ヒドロラーゼの mRNA 発現量と同様に用量依存的な増加が認められた(Fig. 2-5C)。また、肝 mRNA 発現量と肝臓中の PFOA 蓄積濃度の相関関係を調べたところ、AOX ($0.051X+0.072$, $r=0.969$, $P<0.05$.)、アシル CoA ヒドロラーゼ ($0.034X+0.205$, $r=0.921$, $P<0.05$.)および脂肪酸結合タンパク質 ($0.006X+0.991$, $r=0.955$, $P<0.05$.)のいずれも有意な正の相関関係が認められた (Fig.2-6)。

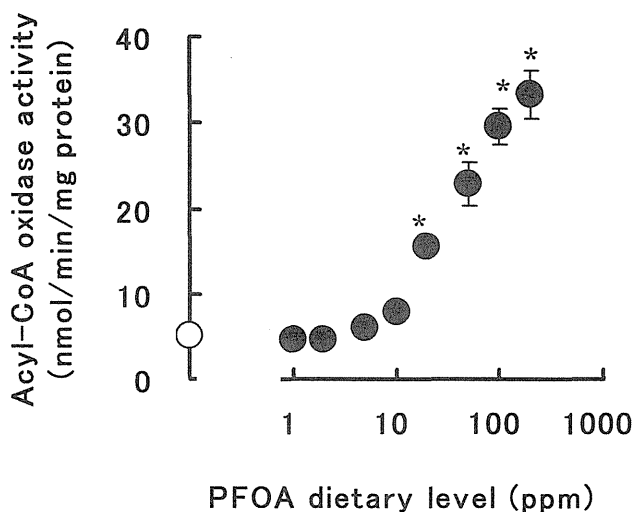


Fig. 2-3 Acyl-CoA oxidase activity in the liver of rats fed on a diet containing PFOA at 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 ppm for 28 days. Values are mean \pm SD for 3 or 4 rats. *, Significantly different from control at $P < 0.001$.

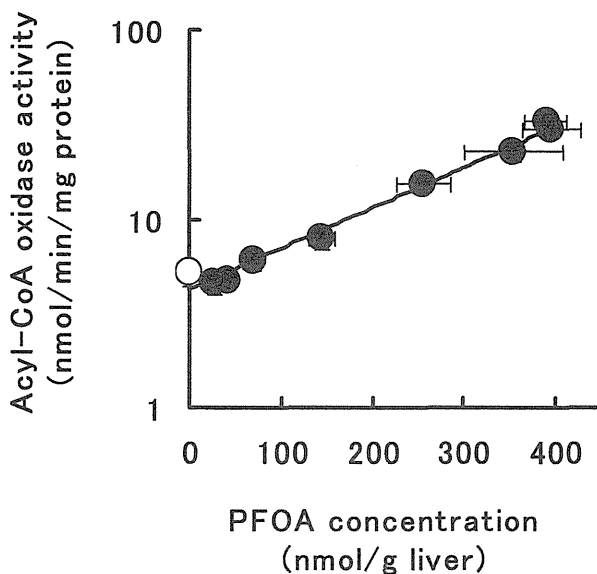


Fig. 2-4 Relationship between the acyl-CoA oxidase activity and PFOA concentration in the liver of rats. Nine sets of data from Fig. 2-2B and Fig. 2-3 were used for the analysis. PFOA concentration versus acyl-CoA oxidase activity, $Y = 0.067X + 1.866$, $r = 0.963$, $P < 0.05$.

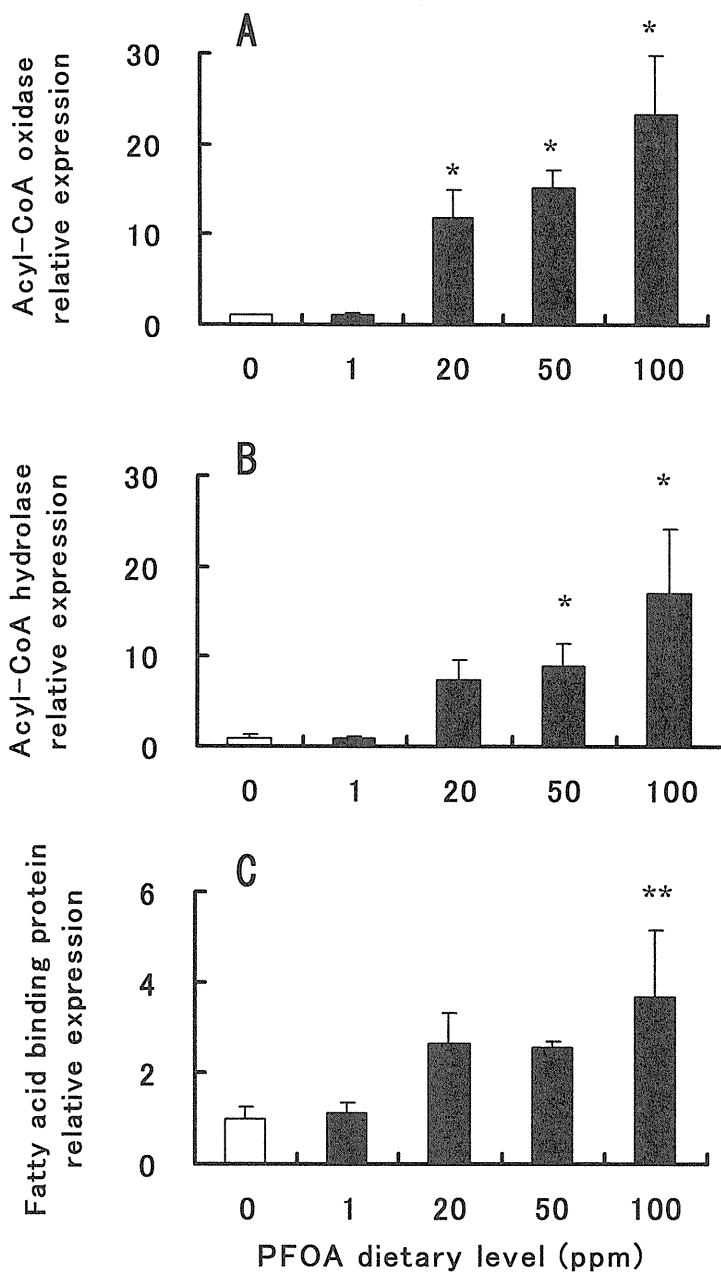


Fig. 2-5 mRNA expression of acyl-CoA oxidase, acyl-CoA hydrolase and fatty acid binding protein in the liver of rats fed on a diet containing PFOA at 0, 1, 20, 50 and 100 ppm for 28 days. A, acyl-CoA oxidase; B, acyl-CoA hydrolase; C, fatty acid binding protein. Values are mean \pm SD for 3 or 4 rats. *, **, Significantly different from control at $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

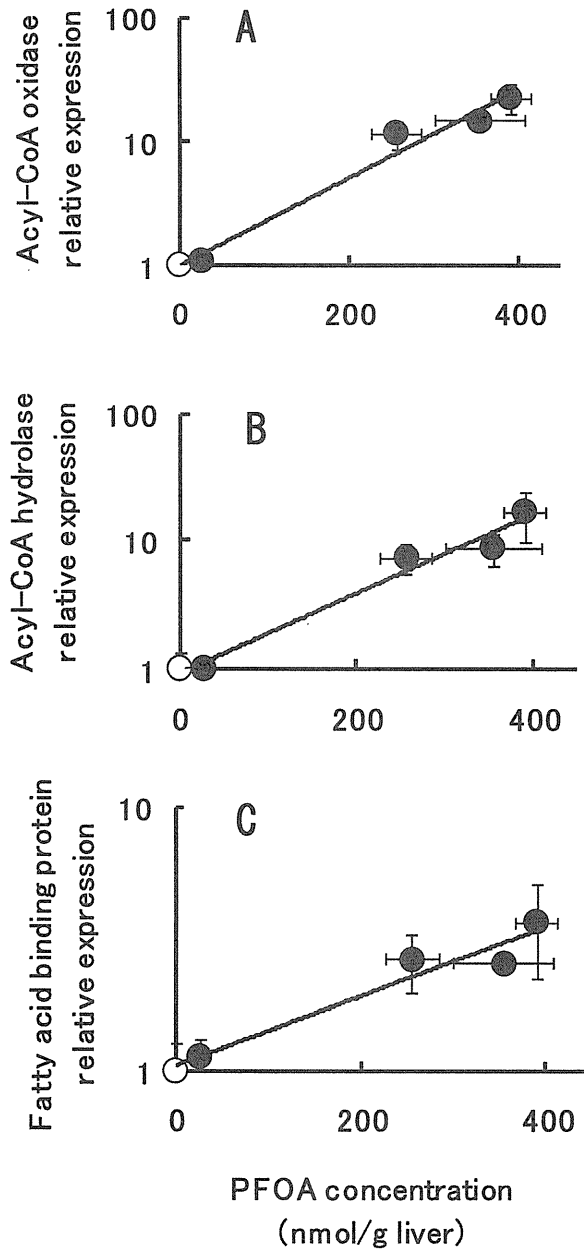


Fig. 2-6 Relationship between the hepatic mRNA expression and PFOA concentration in the liver of rats. Five sets of data from Fig. 2-2B and Fig.2-5 were used for the analysis. A, acyl-CoA oxidase ($Y=0.051X+0.072$, $r=0.969$, $P < 0.05$); B, acyl-CoA hydrolase ($Y=0.034X+0.205$, $r=0.921$, $P < 0.05$); C, fatty acid binding protein ($Y=0.006X+0.9913$, $r=0.955$, $P < 0.05$).

第2節 主要組織蓄積における用量依存性

第1節で、PFOAを反復暴露させたラットの肝臓中では用量依存的な生体作用が認められることを示した。この用量依存的な生体作用は、ラット体内におけるPFOAの累積的な蓄積量を反映するものなのかどうかを確かめるために、PFOAを1 ppm、10 ppm および 50 ppm を含む粉末飼料を与えたラットの血漿中のPFOA濃度変化を経時的に調べた(Fig. 2-7)。1 ppm 暴露の場合には暴露日数の経過とともに血中濃度の増加が28日間にわたって認められるのに対し、50 ppm 暴露の場合には、暴露7日目で血中濃度が飽和に達した。また、10 ppm 暴露では14日目で血中濃度は飽和に達した。次に、

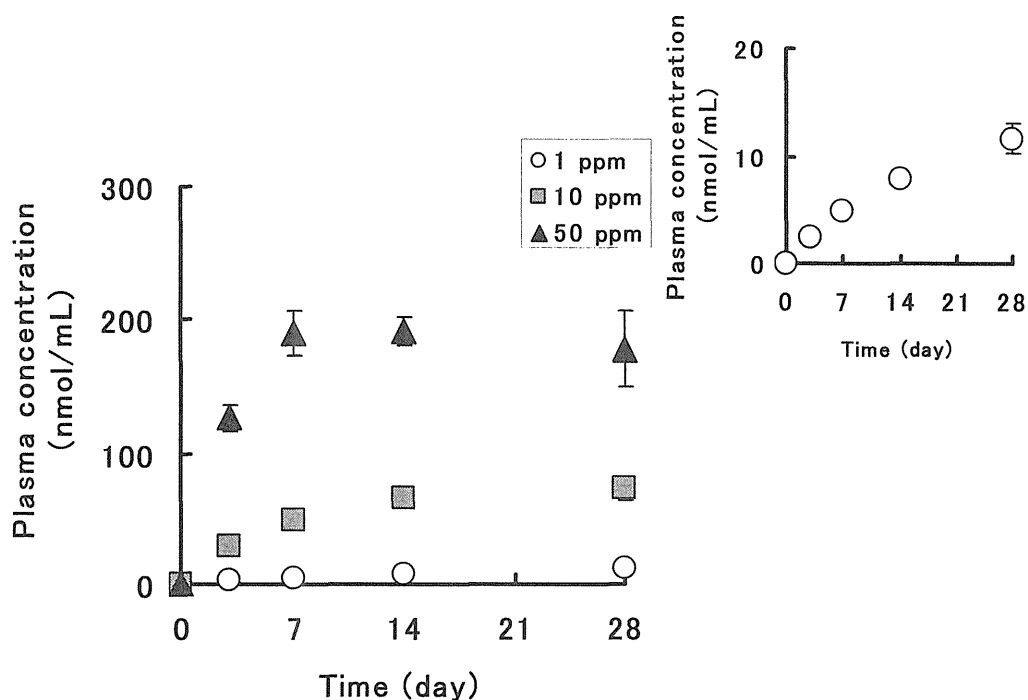


Fig. 2-7 Plasma PFOA concentration profiles of rats fed on a diet containing PFOA at 1, 10 and 50 ppm for 28 days. Values are mean \pm SD for 4 rats.

ラットの主要組織中における PFOA 濃度を測定した (Table 2-1)。1 ppm および 50 ppm の両群ともに血漿中よりも肝臓で PFOA の濃度は高かった。しかし、PFOA の肝臓/血漿中濃度比は 1 ppm 暴露群で 2.33 であり 50 ppm 暴露群と比較して 1.7 倍高い値を示した。一方、PFOA の腎臓/血漿中濃度比は 1 ppm 暴露群で 0.68 であり、有意な差は認められなかったものの 50 ppm 暴露群よりも低い値を示した。その他の組織では、PFOA の異なる用量間において差は認められなかった (Table 2-2)。

Table 2-1 Concentrations of PFOA in plasma and various tissues in rats fed on a diet containing PFOA at 1 or 50 ppm

Tissue	PFOA dietary level (ppm)	
	1	50
	(nmol/g organ)	
Plasma	11.14 ± 1.32	177.96 ± 28.42
Liver	25.61 ± 1.48	236.77 ± 12.95
Kidney	7.82 ± 1.08	177.19 ± 19.54
Testis	0.91 ± 0.27	16.40 ± 3.38
Spleen	n.d.	11.22 ± 0.97
Epididymal fat	n.d.	4.60 ± 0.62
Heart	1.26 ± 0.11	19.46 ± 6.08
Lung	2.16 ± 0.61	30.59 ± 5.37

Male rats were fed on a diet containing PFOA at 1 or 50 ppm for 28 days. Values are means ± SD for 4 rats.

Table 2-2 The ratio of various tissues and plasma concentration of PFOA in rats fed on a diet containing PFOA at 1 or 50 ppm

Tissue	PFOA dietary level (ppm)			
	1		50	
(Tissue/plasma ratio)				
Liver	2.33	± 0.31	1.35	± 0.18*
Kidney	0.68	± 0.10	1.02	± 0.19
Testis	0.08	± 0.02	0.09	± 0.01
Spleen	n.d.		0.06	± 0.01
Epididymal fat	n.d.		0.03	± 0.00
Heart	0.11	± 0.01	0.11	± 0.03
Lung	0.18	± 0.03	0.17	± 0.00

Male rats were fed on a diet containing PFOA at 1 or 50 ppm for 28 days. Values are means ± SD for 4 rats. *, Significantly different from the value at 1 ppm PFOA diet fed group at $P < 0.01$.

第3節 肝および腎細胞内分布における用量依存性

第2節の結果より、PFOAの生体蓄積性は暴露用量により異なることが明らかとなった。また、PFOAの主要蓄積臓器である肝臓と腎臓の組織蓄積性は全く異なるものであった。そこで、次に肝臓および腎臓内の細胞内分布を検討することにした(Fig. 2-8)。1 ppm 暴露群の肝細胞内では、8000 x g 沈殿(未破壊細胞、核およびミトコンドリア含有画分)、18000 x g 沈殿(リソソームおよびペルオキシソーム含有画分)、105000 x g 沈殿(ミクロソーム含有画分)に蓄積した。

ム画分) および 105000 x g 上清 (可溶性画分) の順に従って PFOA は分布した。可溶性画分に分布した PFOA は、肝臓中に存在する PFOA の 17% であった。一方、50 ppm 暴露群の肝細胞内では、肝臓中の PFOA の 55% が可溶性画分に分布した。腎細胞内では肝細胞内で認められたような暴露用量の違いによる分布の違いは認められなかった。細胞内における PFOA の高親和性集積部位の存在は肝細胞に特異的なものである可能性が示唆された。

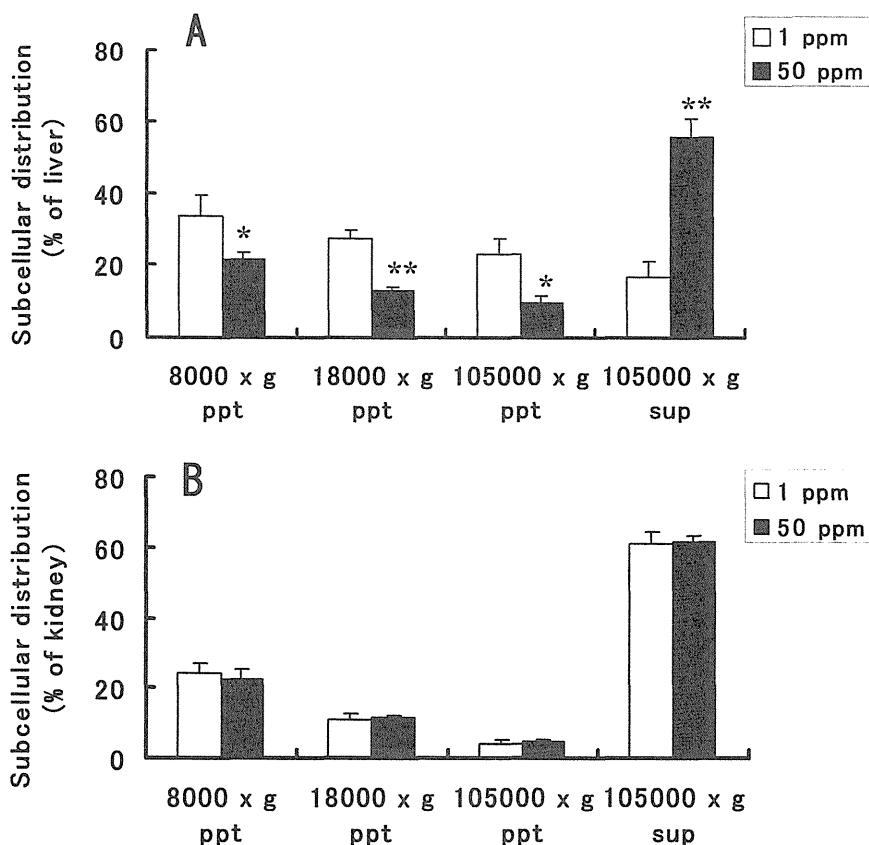


Fig. 2-8 Subcellular distribution of PFOA in the liver and kidney of rats fed on a diet containing PFOA at 1 or 50 ppm for 28 days. A, liver subcellular distribution; B, kidney subcellular distribution. Values are mean \pm SD for 4 rats. *, **, ***, Significantly different from the value at 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ body weight at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

第4節 小括および考察

PFOA を 28 日間反復暴露させた場合、肝臓において用量依存的な生体作用が認められることが明らかとなった。この生体作用は低用量暴露ではラット体内の血漿中および肝臓中の蓄積濃度に依存して増加した。経時的な PFOA の血漿中濃度変化は低用量暴露では直線的に増加するのに対し、暴露量が増加するにつれ飽和するようになることが認められた。PFOA の生体への蓄積性は用量依存的に異なることがあらためて明らかとなった。PFOA は暴露量が低いほど血漿中から肝臓中へ取り込まれやすく、逆に高用量暴露になるほど取込み率が低下するのに対し、その他の臓器では暴露量による蓄積性の違いが認められなかった。さらに、肝臓では暴露量の違いによる細胞内での分布が大きく異なった。したがって、肝細胞内には PFOA の高親和性集積部位が存在し、この部位が飽和した場合に低親和性部位に分布することが反復暴露の場合においても考えられる。一方、腎臓中ではそのような分布の違いは認められなかった。肝臓には、低用量暴露の場合、PFOA が選択的に分布する機構が存在し、低用量で慢性的に暴露させた場合、肝臓へ選択的に蓄積し、高用量暴露の場合とは異なる組織分布であることが明らかとなった。

第3章 急性暴露と28日間暴露の生体影響および体内分布の比較

第1章および第2章での検討より、静脈内単回投与の場合においても、飼料摂取による繰り返し暴露の場合においても、低用量暴露では高用量暴露とは異なる組織分布および肝細胞内分布を示すことが明らかとなった。さらに、肝細胞内にはPFOAの高親和性集積部位が存在し、この部位が飽和した場合に低親和性部位にも分布することが予想された。高親和性集積部位へのPFOA飽和要因を考えた場合、単に暴露用量だけでなく、暴露様式も生体に大きな影響を与えるものと考えられる。そこで本章では、急性暴露と28日間暴露において、肝臓中のPFOAの蓄積濃度を揃えた場合の急性暴露と28日間暴露の生体への影響を比較検討した。PFOAを腹腔内に単回投与し、3日後のラットを急性暴露モデルとし、第2章で示した28日間暴露モデルと比較検討した。

第1節 肝臓における生体影響の比較

暴露様式による生体作用の比較検討は、低用量暴露では、肝臓中のPFOA濃度が約25 nmol/g肝臓に揃うように急性暴露群の投与量を3 $\mu\text{mol/kg}$ 体重に設定し、また、高用量暴露での比較検討は、肝臓中のPFOA濃度が約250 nmol/g肝臓に揃うように急性暴露群の投与量を100 $\mu\text{mol/kg}$ 体重に設定して実験を行った(Fig. 3-1)。肝臓におけるPFOAの生体影響を調べるための指標としてAOX活性を測定した(Fig. 3-2)。肝臓のAOX活性は、低用量の場合には急性暴露と28日間暴露で違いは認められなかった。対照的に、高用量の場合には急性暴露群は28日間暴露群の約2倍であった。PFOAの生

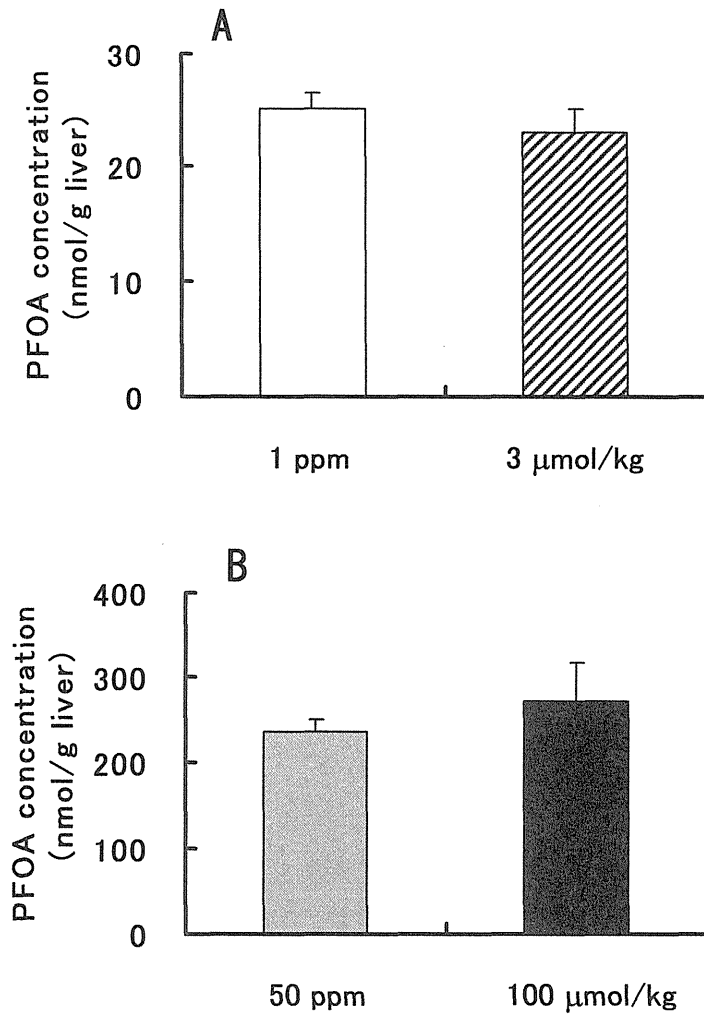


Fig. 3-1 Comparison of the hepatic PFOA concentration between acute and subchronic exposures. A, low dose group; B, high dose group. Values are mean \pm SD for 4 rats. Difference is not statistically significant between two groups.

体影響をさらに検討するために肝臓中における AOX、アシル CoA ヒドロラーゼおよび脂肪酸結合タンパク質の mRNA 発現量を定量した(Fig. 3-3)。AOX の mRNA 発現量は活性での変化と同様に、高用量暴露の場合、急性暴露群は 28 日間暴露群よりも 2 倍高い値を示した。対照的に、低用量暴露の場合は急性暴露群と 28 日間暴露群との間に違いは認められなかった。一方、アシル CoA ヒドロラーゼおよび脂肪酸結合タンパク質に関しては、低用量群および高用量群のどちらの群においても異なる暴露様式間における mRNA 発現量に有意な違いは認められなかった。

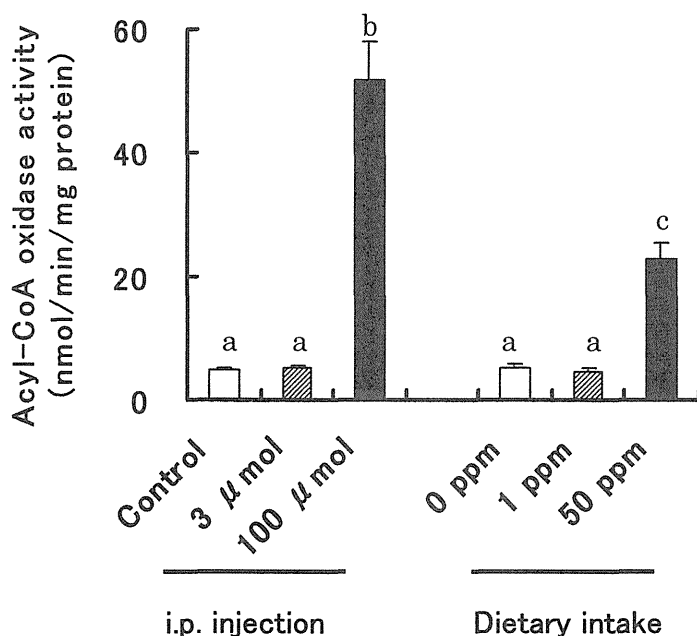


Fig. 3-2 Comparison of the acyl-CoA oxidase activity between acute and subchronic exposures. A, acyl-CoA oxidase; B, acyl-CoA hydrolase; C, fatty acid binding protein. Values are mean \pm SD for 3 - 6 rats. ^{a, b, c}, Differences between 6 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.001$.

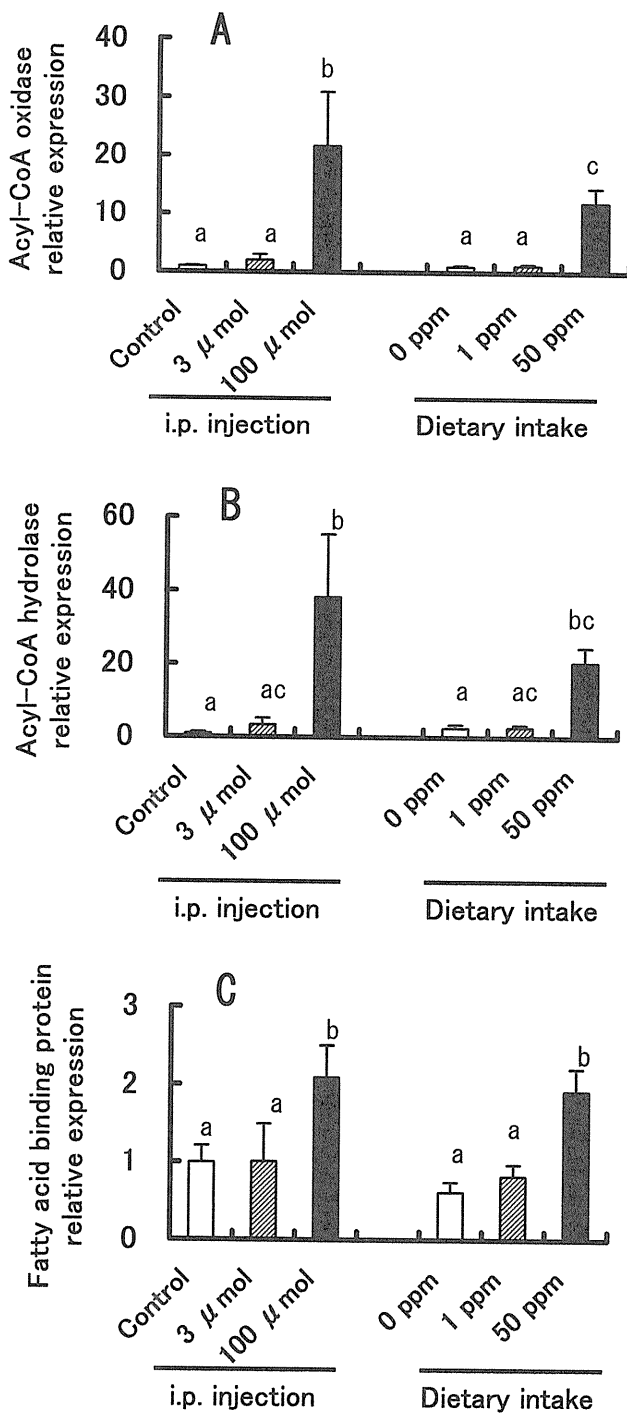


Fig. 3-3 Comparison of the hepatic mRNA expression between acute and subchronic exposures. A, acyl-CoA oxidase; B, acyl-CoA hydrolase; C, fatty acid binding protein. Values are mean \pm SD for 4 or 6 rats. ^{a, b, c}, Differences between 6 data points are statistically significant without a common superscript at $P < 0.05$.

第 2 節 肝細胞内分布の比較

低用量暴露の場合、肝臓中の PFOA 濃度が約 25 nmol/g 肝臓に揃うように腹腔内単回投与の投与量を 3 $\mu\text{mol/kg}$ 体重に設定し、PFOA の肝細胞内分布を比較した(Fig. 3-4)。肝臓/血漿中 PFOA 濃度比は 1 ppm の 28 日間暴露群が 3 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の急性暴露群に比較して約 1.2 倍高い値を示した。また、肝細胞内の 105000 x g 沈殿には 1 ppm の 28 日間暴露群で 23% の PFOA が分布したのに対し、3 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の急性暴露群では 15% の PFOA しか分布しなかった。対照的に、105000 x g 上清には 1 ppm の 28 日間暴露群で 17% の PFOA しか分布しなかったのに対し、3 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の急性暴露群では 25% の PFOA が分布した。また、8000 x g 沈殿および 18000 x g 沈殿画分への PFOA の分布には違いは認められなかった。一方、高用量暴露の場合、肝臓中の PFOA 濃度が約 250 nmol/g 肝臓に揃うように腹腔内単回投与の投与量を 100 $\mu\text{mol/kg}$ 体重に設定し PFOA の肝細胞内分布を比較した(Fig. 3-5)。肝臓/血漿中 PFOA 濃度比は 50 ppm の 28 日間暴露群および 100 $\mu\text{mol/kg}$ 体重の急性暴露群ともに約 1.3 であり違いは認められなかった。さらに、細胞内分布においても両群ともに肝臓中の PFOA の 55% が 105000 x g 上清画分に最も多く分布し、その他の画分への分布率にも違いは認められなかった。

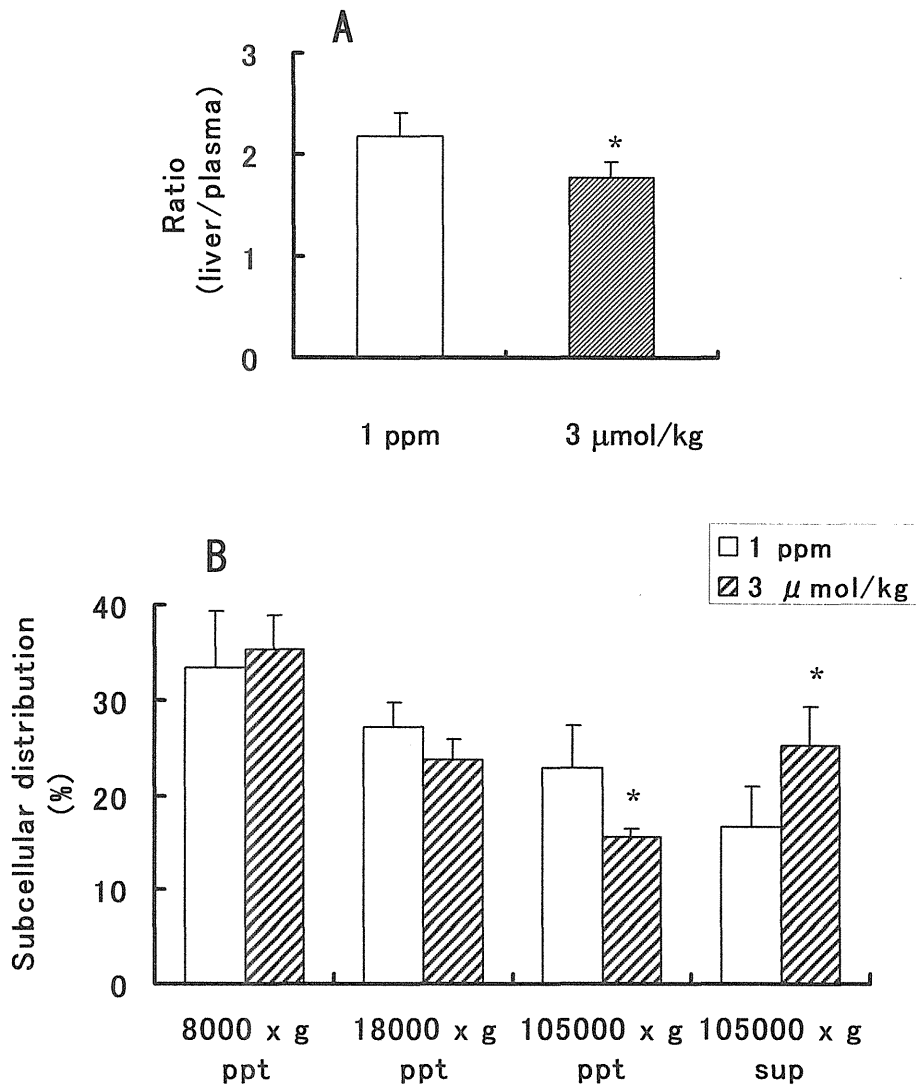


Fig. 3-4 Comparison of the ratio of liver and plasma concentration and subcellular distribution of PFOA between acute and subchronic exposures at low doses. A, ratio of hepatic PFOA concentration to plasma PFOA concentration; B, subcellular distribution. Values are mean \pm SD for 4 rats. *, Significantly different from the value at 1 ppm diet fed group at $P < 0.05$.

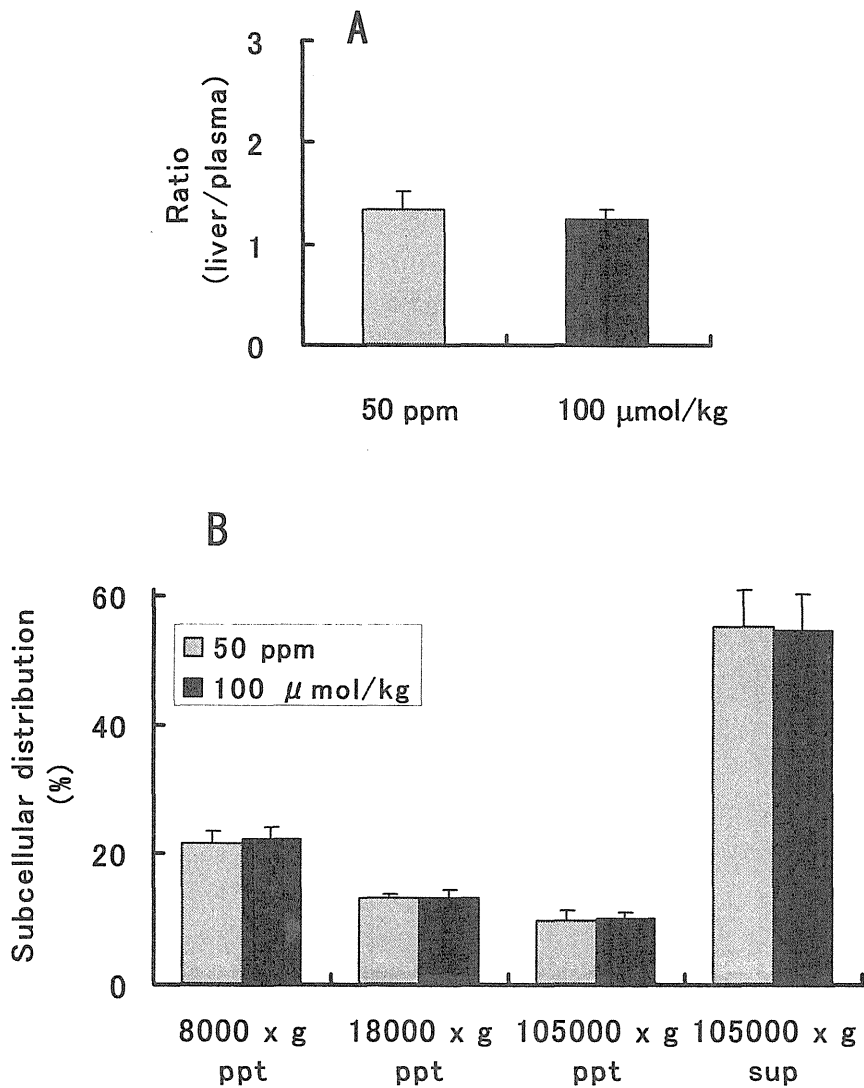


Fig. 3-5 Comparison of the ratio of liver and plasma concentration and subcellular distribution of PFOA between acute and subchronic exposures at high doses. A, ratio of hepatic PFOA concentration to plasma PFOA concentration; B, subcellular distribution of PFOA. Values are mean \pm SD for 4 rats. Difference is not statistically significant between two groups of high doses.

第3節 小括および考察

PFOA の生体蓄積機構および生体作用は単に PFOA の蓄積濃度にもみ依存するのではなく PFOA の暴露様式によっても大きく影響を受けることが明らかとなった。本章での検討結果は肝細胞内における PFOA の高親和性集積部位には一定の飽和濃度が存在する可能性を強く示唆するものであり、低用量暴露における PFOA の生体蓄積性や生体作用は、単に暴露用量や組織蓄積濃度からだけでは正確には評価できない可能性が示唆された。

第 4 章 PFOA 体内濃度の飽和機構の検討

第 2 章での検討より、飼料中の PFOA 濃度が低い食餌を摂取したラットの血漿中 PFOA 濃度は暴露日数の経過に従った増加が認められたのに対し、PFOA の高含有飼料を摂取したラットの血漿中 PFOA 濃度は暴露日数の経過とともに飽和することが認められた。本章では、PFOA の暴露用量の違いによる血漿濃度の飽和現象の有無は、ラット体内からの排泄過程に違いが生じることによるという作業仮説をたて、この仮説を証明することを試みた。

第 1 節 尿および糞中への排泄過程における用量依存性

ラットを個別に代謝ケージに収容し、PFOA を 1 ppm 含む飼料からの暴露量に相当する投与量として 0.06 mg (0.14 μ mol)/kg 体重を、PFOA を 50 ppm 含む飼料からの暴露量に相当する投与量として 3 mg (7.14 μ mol)/kg 体重を 1 日 1 回 14 日間、腹腔内に投与し、血液、糞および尿を採取して PFOA 濃度を測定した。3 mg/kg 体重の投与群では投与日数の経過とともに、血漿中濃度に飽和が認められるようになったのに対し、0.06 mg/kg 体重の投与群では血漿中濃度に飽和は認められなかった(Fig. 4-1)。ラットへの投与経路が腹腔内であったことから、血漿中濃度の飽和の原因が消化管からの PFOA の吸収率が低いことによるものというよりは、むしろ体内からの PFOA の排泄が高いことによるものではないかと考えた。そこで、次に、尿中および糞中への PFOA の排泄率を求めた(Fig. 4-2)。糞中からの PFOA の排泄率は、3 mg/kg 体重の投与群では投与日数に関係なくほぼ毎日 15%程度であったのに対し、0.06 mg/kg 体重の投与群の糞中 PFOA 濃度はすべて検出限界以下(1 nmol/g 糞)であった。一方、尿中からの PFOA の排泄率はどちらの投与

群においても日数の経過とともに増加が認められた。しかし、3 mg/kg 体重の投与群では 0.06 mg/kg 体重の投与群と比較して投与初日から最終日まで常に約 2 倍多く尿中から排泄した。本節での検討では、低用量暴露ラットにおける糞中の PFOA 濃度は定量値限界以下であったため用量依存的な変化に関しては現時点では不明である。しかし、PFOA の主要排泄経路は尿中であり、胆汁中への排泄は少ないことがこれまでにすでに報告されていることから^{4, 41, 57)}、尿中からの PFOA の排泄は糞中からの排泄よりも PFOA の生体内蓄積量を決定する上でより重要な因子であると考えられる。本節における検討から、高用量投与群で認められた血漿中 PFOA 濃度の飽和は尿中排泄率の増加が一因となることが明らかとなった。

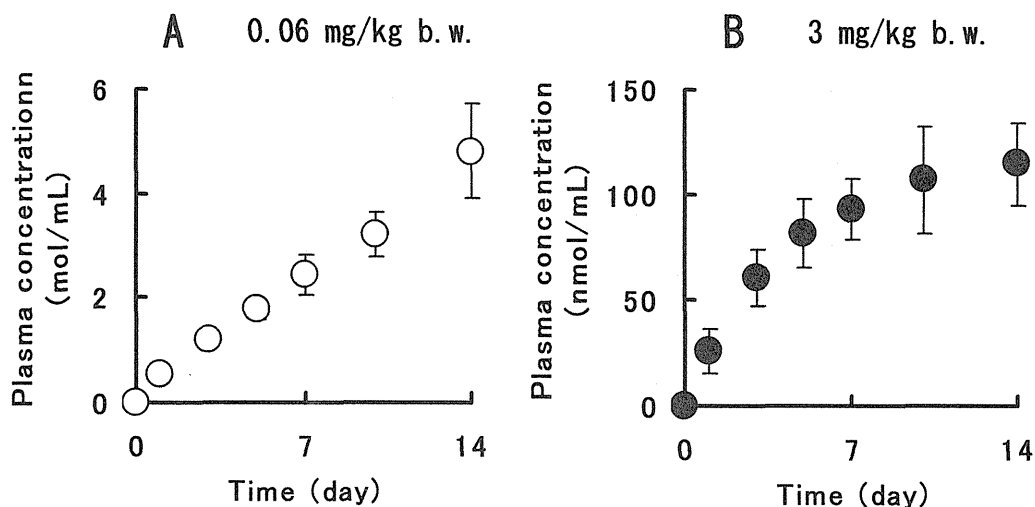


Fig. 4-1 Plasma concentration-time profiles of PFOA after intraperitoneal injection in rats. A, 0.06 mg/kg body weight; B, 3 mg/kg body weight. Male rats were i.p. injected with PFOA (0.06 mg or 3 mg/kg body weight) once a day for 14 days. Values are means \pm SD for 4 rats.

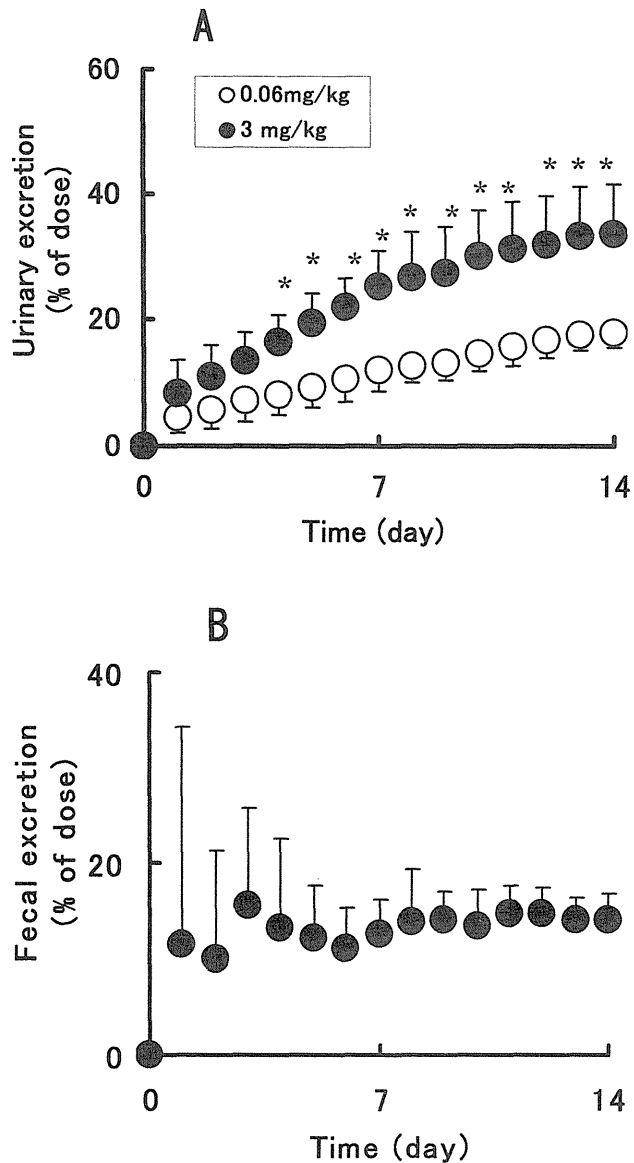


Fig. 4-2 Excretion of PFOA in urine and feces during 24 h after PFOA i.p. injection of PFOA in rats. A, urinary excretion; B, fecal excretion. Male rats were i.p. injected with PFOA (0.06 mg or 3 mg/kg body weight) once a day for 14 days. Urine and feces were collected for 24 h. Values are means \pm SD for 4 rats. *, Significantly different from the value of the group dosed at 0.06 mg/kg body weight at $P < 0.05$.

第2節 繰り返し投与ラットにおける PFOA の体内動態

前節で認められた PFOA の尿中排泄率の増加が PFOA のクリアランスの変化によるものであるかどうかを次に検討した。PFOA 3 mg (7.24 μmol)/kg 体重を 1 日 1 回 9 日間腹腔内に繰り返し投与したラットに大腿静脈内から PFOA 3 mg/kg 体重を単回投与し、経時的に 3 時間まで尿、胆汁および血液を回収し、PFOA 投与後 30 分間での腎クリアランス(CL_R)および胆汁クリアランス(CL_B)を求めた(Fig. 4-3)。腹腔内繰り返し投与群の腎クリアランスは非投与群の腎クリアランスに比較して約 2 倍高い値を示した。一方、胆汁クリアランス値は両群ともに約 0.1 mL/h/kg 体重であり、繰り返し投与による変化は認められなかった。

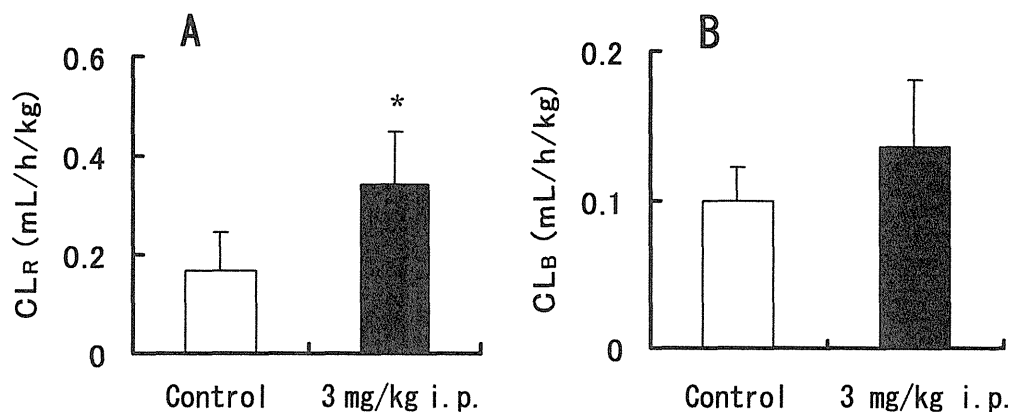


Fig. 4-3 Renal clearance and biliary clearance of PFOA after i.p. injection in rats. A, CL_R of PFOA; B, CL_B of PFOA. Male rats were i.p. injected with PFOA (3 mg/kg body weight) once a day for 9 days. The rats which had been i.p. injected with PFOA and control rats were i.v. injected with PFOA (3 mg/kg body weight). Values are means \pm SD for 4 or 6 rats. *, Significantly different from control at $P < 0.05$.

第3節 肝および腎臓における各種輸送担体 mRNA 発現量の用量依存性

第2節で示したように、PFOAの繰り返し投与によって腎クリアランスが増加することが明らかになった。腎臓に発現する各種輸送担体⁵⁴⁾の中には、PFOAの尿中排泄過程への関与が推察されるものが存在する⁵⁵⁾。本節では、PFOAの主要蓄積臓器である肝臓または腎臓中に発現する organic anion transporter family の3種 (OAT1、2、3)、organic anion transporting polypeptide family の3種 (oatp1、4、OAT-K)、organic cation transporter family の2種 (OCT1、2)、multidrug resistance associated protein の2種 (MRP2、3) の輸送担体について mRNA 発現量を検討した。

肝臓の血管側膜に発現している oatp4 の発現量は、PFOA 投与群では対照群に比較して 1.5 倍高い値を示したものの用量依存的な変動は認められなかった (Fig. 4-4B)。肝臓の血管側膜に発現が確認されている MRP3 は ATP 依存的な一次性能動輸送体で細胞内から細胞外への汲み出しに働く輸送担体である⁵⁶⁾。MRP3 の発現量は PFOA の投与量に依存して増加し、3 mg/kg 体重投与群では対照群に比較して 6.6 倍高い値を示した (Fig. 4-5C)。一方、腎臓中の輸送担体については PFOA の投与による発現量の変動は認められなかった (Fig. 4-6, 4-7, 4-8)。

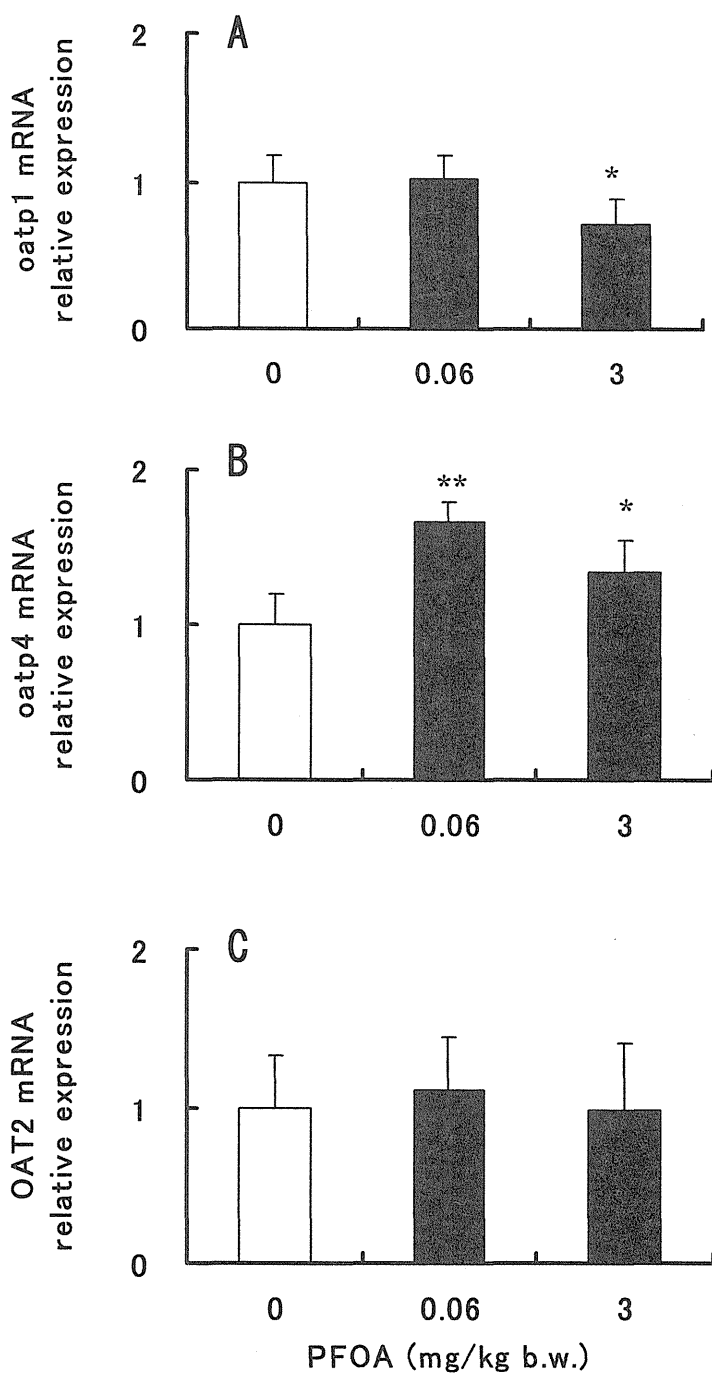


Fig. 4-4 Effects of injection of PFOA on mRNA expression of oatp1, oatp4 and OAT2 in the liver of rats. A, oatp1; B, oatp4; C, OAT2. Values are mean \pm SD for 6 rats. *, **, Significantly different from the control at $*P < 0.05$ and $**P < 0.001$.

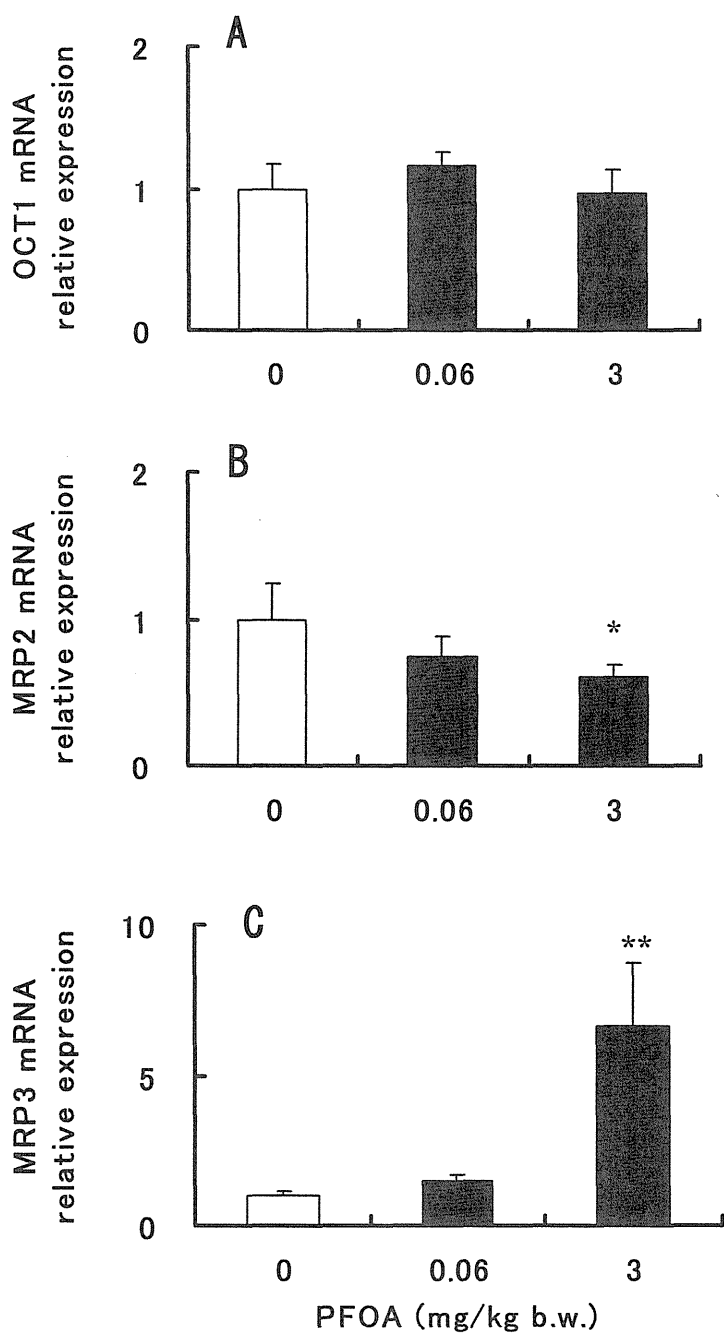


Fig. 4-5 Effects of injection of PFOA on mRNA expression of OCT1, MRP2 and MRP3 in the liver of rats. A, OCT1; B, MRP2; C, MRP3. Values are mean \pm SD for 6 rats. *, **, Significantly different from the control at $*P < 0.01$ and $**P < 0.001$.

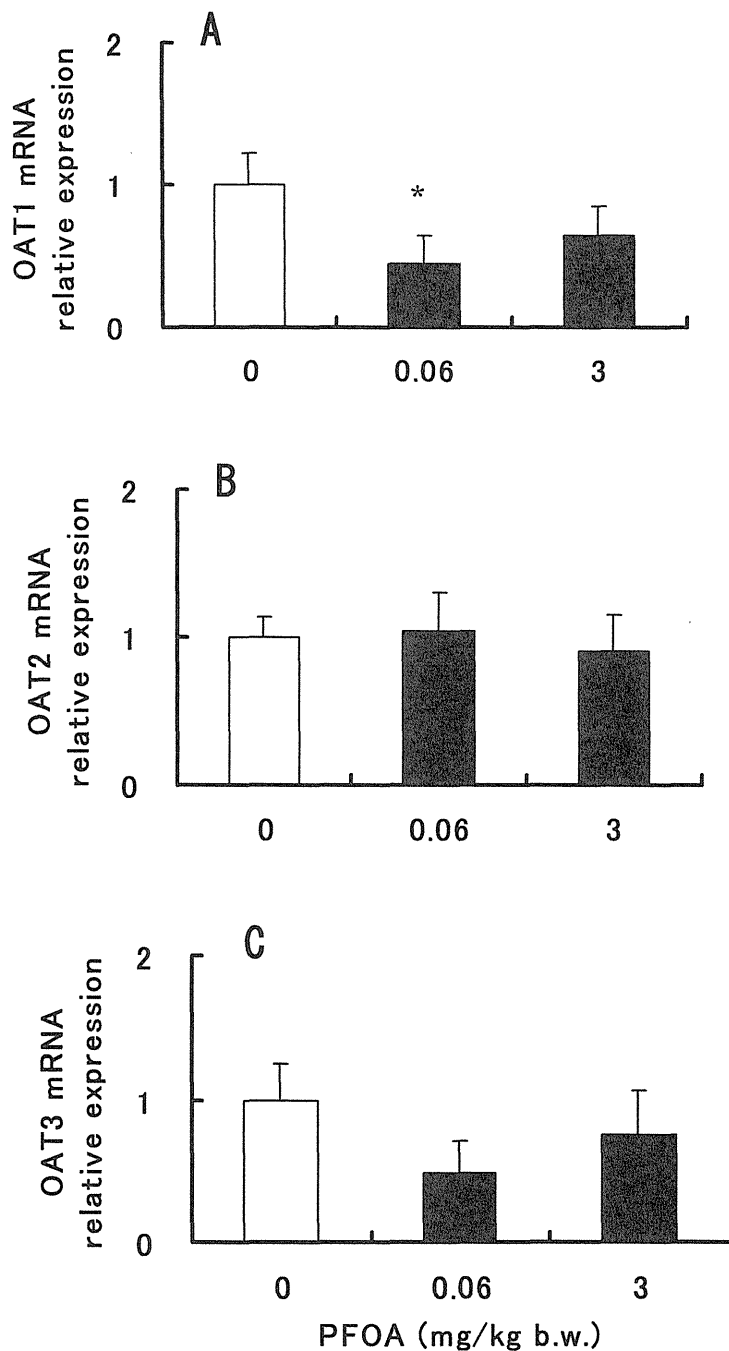


Fig. 4-6 Effects of injection of PFOA on mRNA expression of OAT1, OAT2 and OAT3 in the kidney of rats. A, OAT1; B, OAT2; C, OAT3. Values are mean \pm SD for 6 rats. *, Significantly different from the control at $P < 0.05$.

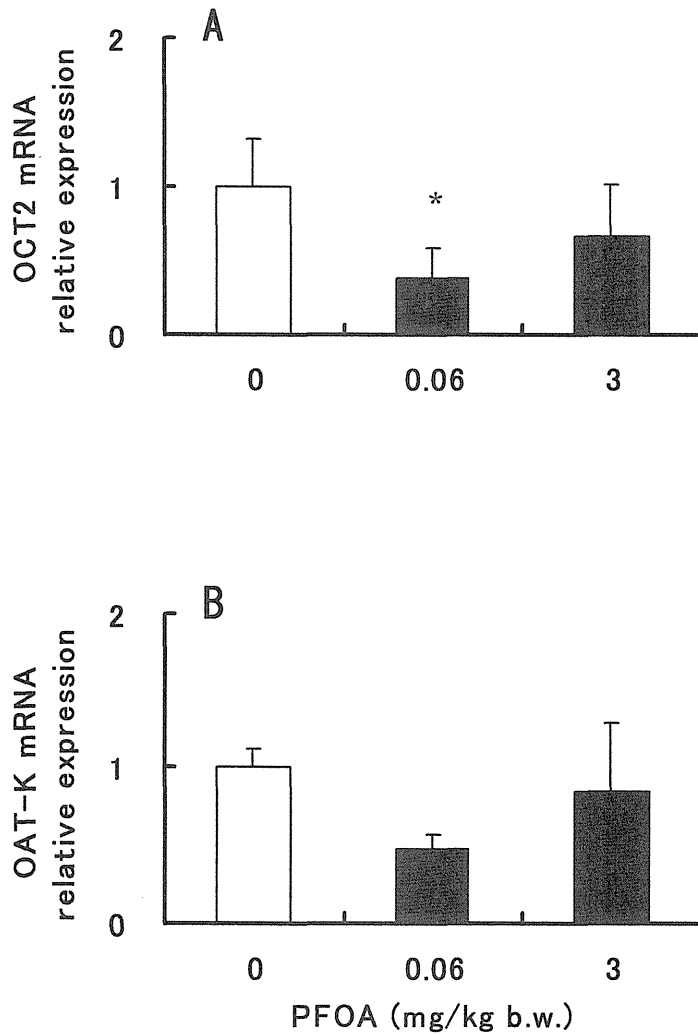


Fig. 4-7 Effects of injection of PFOA on mRNA expression of OCT2 and OAT-K in the kidney of rats. A, OCT2; B, OAT-K. Values are mean \pm SD for 6 rats. *, Significantly different from the control at $P < 0.05$.

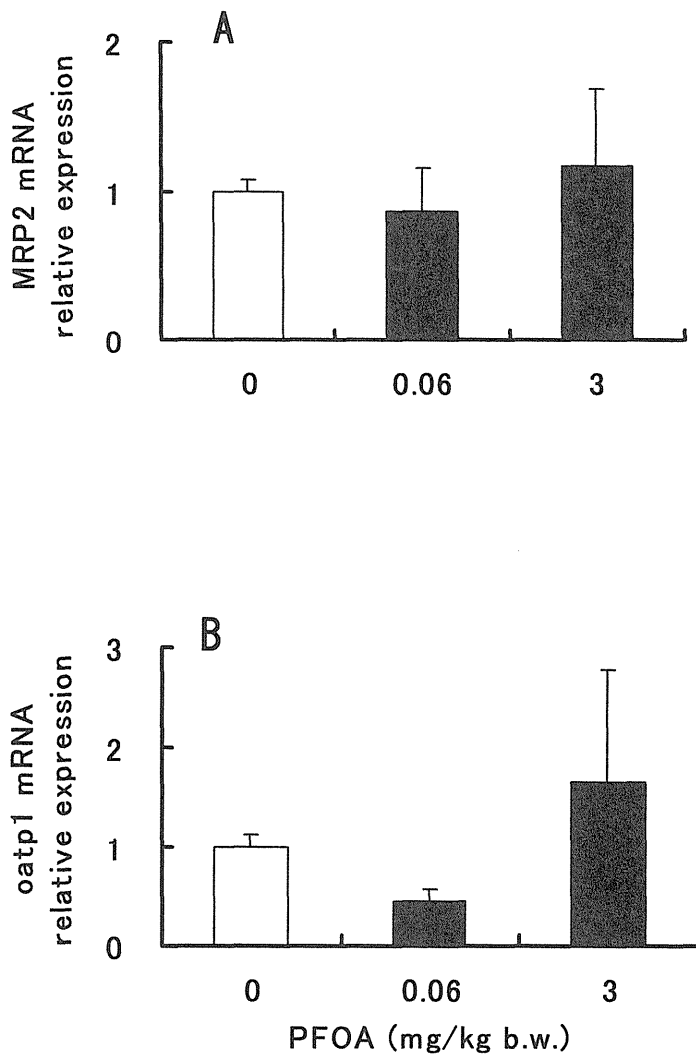


Fig. 4-8 Effects of injection of PFOA on mRNA expression of MRP2 and oatp1 in the kidney of rats. Values are mean \pm SD for 6 rats. Differences among three groups are not statistically significant.

第4節 小括および考察

本章における検討から、異なる PFOA の暴露用量間で認められた生体蓄積性の違いは PFOA の尿中排泄率の違いによるものであることが明らかとなった。本章で検討した輸送担体の中では、唯一 MRP3 の発現量が PFOA 投与により著しく増加した。MRP3 は肝細胞および胆管上皮細胞の血管側膜に局在しており細胞内から細胞外への汲み出しに働く輸送体である⁵⁶⁾。この MRP3 の発現が誘導されたラットでは、肝臓から血管側への PFOA の排出が亢進している可能性が考えられる。高用量暴露群では血管側へ排出された PFOA が増加することにより血流に乗って腎臓中へと取り込まれ、その結果、尿中からの排泄が亢進するものと考えられる。しかし、腎臓中の輸送担体の発現量には、PFOA 投与による変動は認められなかった。本章での検討では、肝臓と腎臓に発現している全ての輸送担体を検討しているわけではないので、他の輸送担体についても PFOA を輸送する可能性を視野に入れて今後検討する必要がある。

第5章 PFOA 類縁化合物ペルフルオロヘキサン酸(PFHA)の生体影響および体内動態

第1章から第4章までの検討結果より、低用量反復暴露は高用量反復暴露とは異なる生体蓄積性、生体作用および体内動態を示すことが明かとなった。PFOA の代替品開発においては生体影響を示さずにまた、低用量反復暴露の条件下でも生体蓄積性を示さないことが条件といえよう。

地球上のあらゆる場所とそこに生息する野生生物から PFOA や PFOS が検出されている。PFOA の代替化合物や代謝されても PFOA を生じない化合物の開発が急がれている。炭素鎖長が PFOA より一つ短いペルフルオロヘプタン酸はペルオキシソーム β 酸化酵素の誘導能が低いことが報告されている⁴¹⁾。また、Ohmori らは PFOA よりも炭素鎖長がひとつ短いペルフルオロヘプタン酸は PFOA に比べて尿中に排泄されやすいことを報告している^{41, 57)}。さらに、炭素鎖長が二つ短いペルフルオロヘキサン酸 (PFHA) は肝臓に蓄積しにくく、生体作用が認められないという報告はマウスにおいて以前にもあった⁵⁸⁾ がこれまでラットにおいて系統的にそれを証明した例はなかった。PFHA が上記の条件を満たす化合物であるならば炭素水素を含むペルフルオロ化合物や最終代謝産物が PFHA となる化合物についても、生体蓄積性が低ければ代替品候補化合物となり得るだろうと考えた。そこで、本章では PFHA は生体から排泄されやすく生体蓄積性が低い化合物であるものと考え、PFHA をモデル化合物として 0, 50, 500 および 1000 ppm の含有粉末飼料を調製してラットに 28 日間反復暴露した場合における生体蓄積性を PFOA 暴露と比較検討することにした。

第1節 PFHA 28日間暴露における生体影響の検討

前章までの検討より、PFOAには用量依存的な生体蓄積性および生体作用が認められた。しかし、PFHAの生体蓄積量と生体作用との関係性についてはまだ情報が極めて乏しい。そこでPFHA 0~1000 ppmを含む粉末飼料を28日間与えたラットの生体蓄積性および生体作用を検討することにした。いずれの暴露群においても、体重、肝重量および相対肝重量は、PFHAを含まない対照群と比較して、有意な差は認められなかった (Fig. 5-1)。次にラットの血漿中および肝臓中のPFHAの蓄積濃度を測定した (Fig. 5-2)。最高暴露用量の1000 ppm摂取群においてもPFHAの血漿中濃度は20 nmol/mL、肝臓中濃度は10 nmol/g 肝臓 であり、PFOAとは異なり、PFHAには血液および肝臓への蓄積性はほとんど認められなかった。生体への影響の指標として肝AOX活性 (Fig. 5-3)、AOX、AHaseおよびFABPのmRNA発現量を測定した (Fig. 5-4)。肝AOX活性、およびmRNA発現量のいずれにおいてもPFHAではPFOAとは異なり用量依存的な誘導は認められず、対照群との間に有意な差は認められなかった。また、PFHA摂取期間中による血漿中の濃度変化を調べたところ、50、500および1000 ppmのいずれの群においても摂取開始1日目が最も高く、摂取から7日目を経過するとむしろ低下傾向を示した (Fig. 5-5)。この結果よりPFHAは反復暴露した場合にも蓄積性認められないことが明らかとなった。

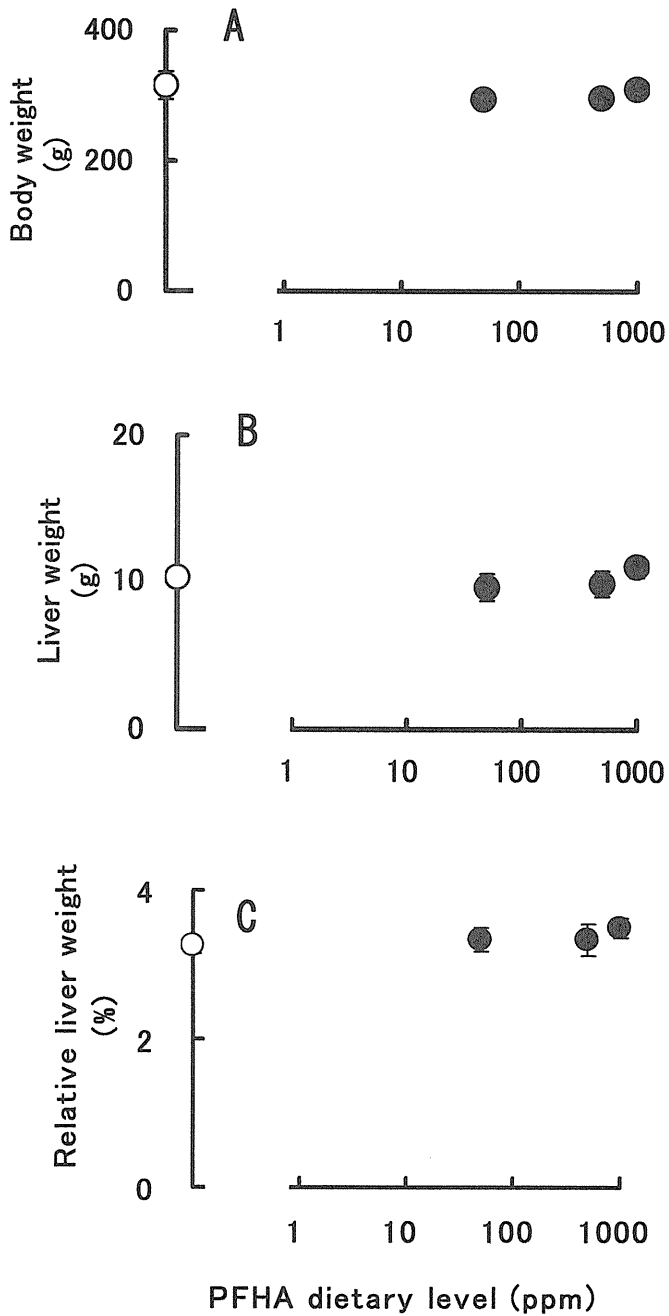


Fig. 5-1 Effects of PFHA on body weight and liver weight of rats fed on a diet containing PFHA at 0, 50, 500 and 1000 ppm for 28 days. A, body weight; B, liver weight; C, relative liver weight. Values are mean \pm SD for 4 rats. Differences among four groups are not statistically significant.

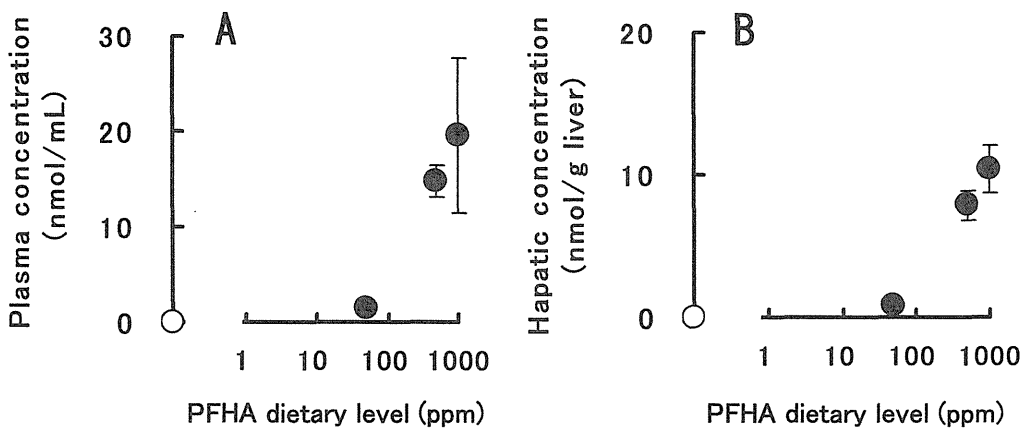


Fig. 5-2 Plasma concentration and hepatic concentration of PFHA of rats fed on a diet containing PFHA at 0, 50, 500 and 1000 ppm for 28 days. A, plasma concentration; B, hepatic concentration. Values are mean \pm SD for 4 rats.

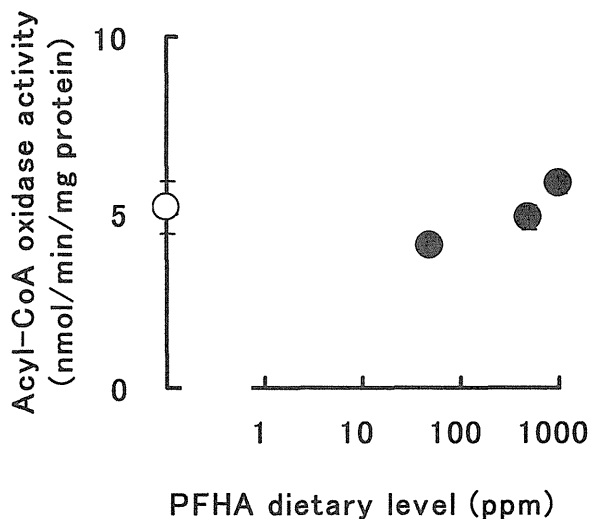


Fig. 5-3 Acyl-CoA oxidase activity of rats fed on a diet containing PFHA at 0, 50, 500 and 1000 ppm for 28 days. Values are mean \pm SD for 4 rats.

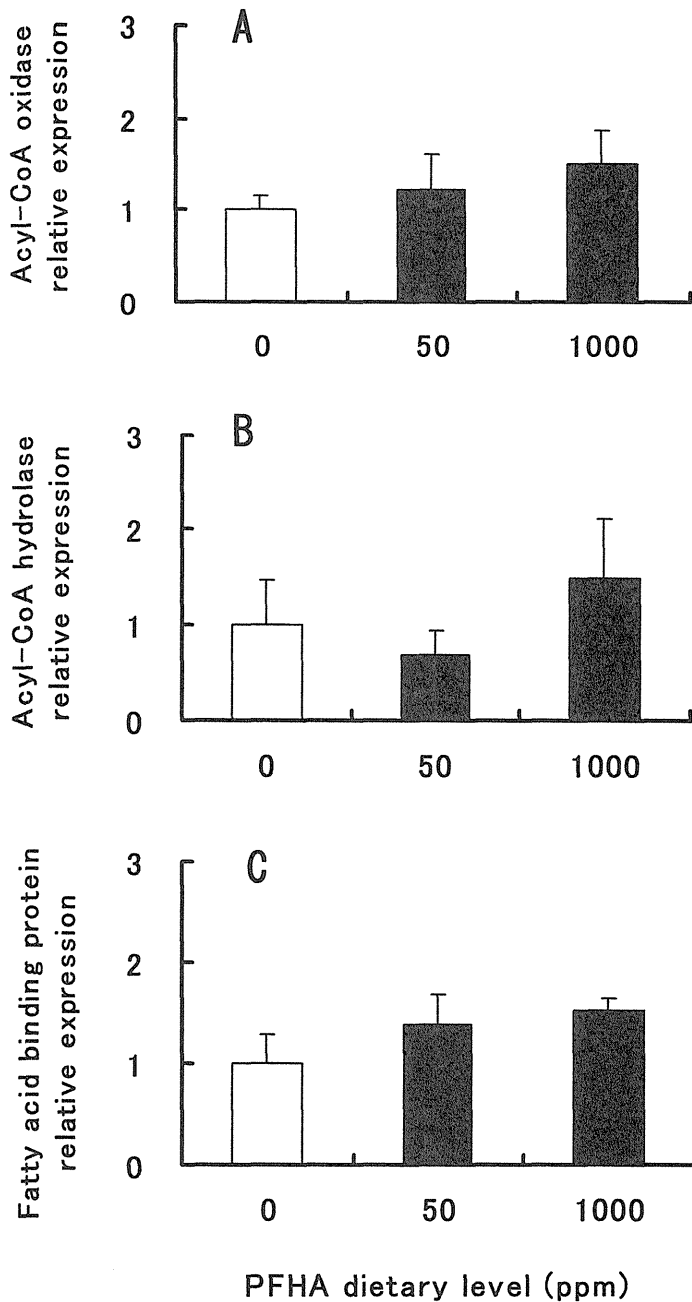


Fig. 5-4 mRNA expression of acyl-CoA oxidase, acyl-CoA hydrolase and fatty acid binding Protein in the liver of rats fed on a diet containing PFHA at 0, 50 and 1000 ppm for 28 days. A, acyl-CoA oxidase; B, acyl-CoA hydrolase; C, fatty acid binding protein. Values are mean \pm SD for 4 rats. Differences among three groups are not statistically significant.

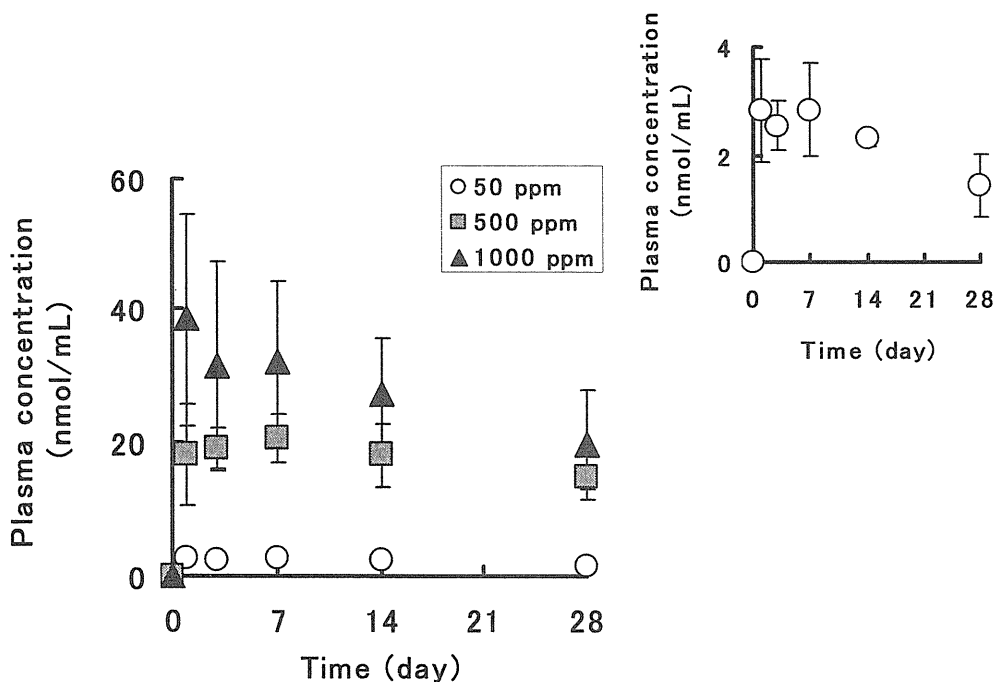


Fig. 5-5 Plasma PFHA concentration profiles of rats fed on a diet containing PFHA at 0, 500, and 1000 ppm for 28 days. Values are mean \pm SD for 4 rats.

第2節 繰り返し経口投与によるPFHAの生体蓄積性

前節においてPFHAを含む飼料摂取による検討から、PFHAには用量依存的な生体蓄積性がないばかりか、暴露日数の経過に伴い血漿中濃度が低下することを示した (Fig. 5-5)。そこで本節では、PFHA暴露後の血漿中濃度変化をさらに短時間で検討することにした。ラットの飼料摂食量による影響を排除するために、PFHAを強制的に経口投与した場合における血漿中濃度変化を検討することにした (Fig. 5-6, 5-7)。PFHA 3 mg (9.55 μ mol) /kg 体重または 60 mg (191.08 μ mol) /kg 体重を、さらに PFOA 0.06 mg (0.14 μ mol)

/kg 体重または 3 mg (7.14 μmol) /kg 体重を、1 日 1 回 7 日間ラットに経口投与した。投与初日および投与 7 日目には経口投与直後から経時的にエーテル麻酔下でラット眼底より採血を行い、血漿中の PFHA および PFOA 濃度を比較した。PFOA には繰り返し投与による蓄積が認められた。特に低用量の場合には時間経過による累積的な蓄積性が認められた。一方、PFHA は、投与後 24 時間までには血漿中からほぼ完全に消失することから、PFHA には、繰り返し投与 7 日目においても累積的な蓄積性が認められなかった。

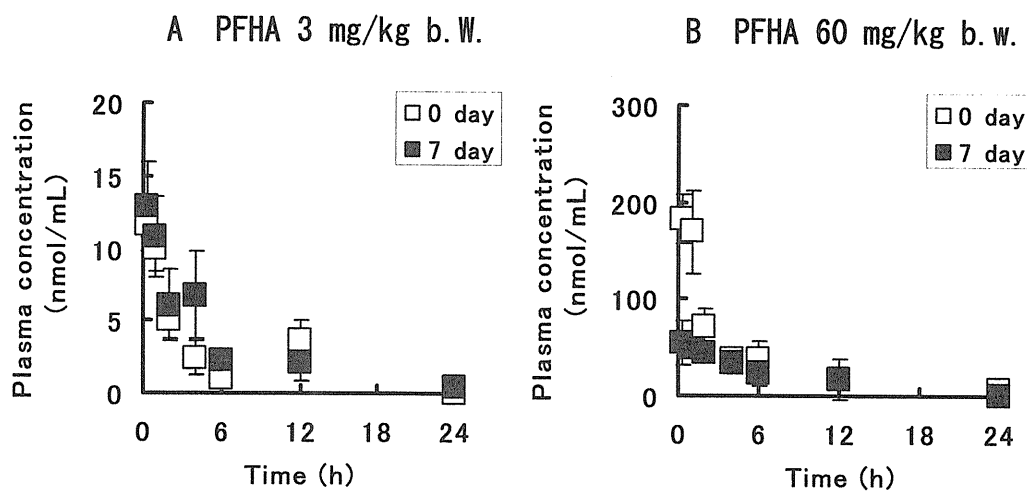


Fig. 5-6 Plasma concentration-time profiles of PFHA after the final oral administration in rats. A, 3 mg/kg body weight; B, 60 mg/kg body weight. Male rats were received oral administration of PFHA (3 mg or 60 mg/kg body weight) once a day for 7 days. Blood samples were collected at each time points from ophthalmic vein of rats. Values are means \pm SD for 4 rats.

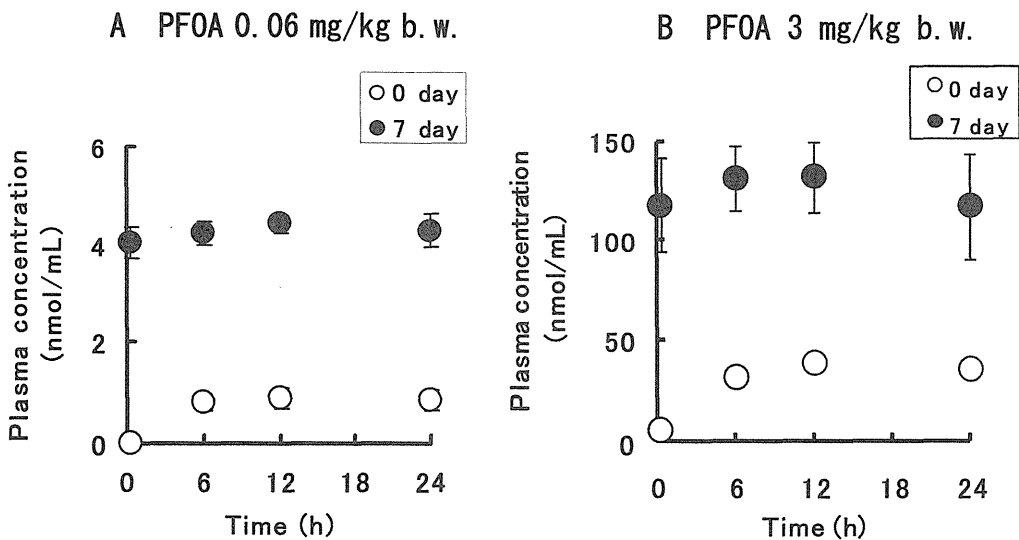


Fig. 5-7 Plasma concentration-time profiles of PFOA after the final oral administration in rats. A, 0.06 mg/kg body weight; B, 3 mg/kg body weight. Male rats were received oral administration of PFOA (0.06 mg or 3 mg/kg body weight) once a day for 7 days. Blood samples were collected at each time points from ophthalmic vein of rats. Values are means \pm SD for 4 rats.

第3節 PFHA の体外排泄速度の検討

PFHA の尿中および胆汁中からの消失速度を評価するために腎および胆汁クリアランスを求めて PFOA と比較した。ラットに PFHA または PFOA を静脈内に単回投与 (48.63 $\mu\text{mol/kg}$ 体重) し、経時的に 5 時間まで尿、胆汁および血液を回収しクリアランスを求めた。クリアランス測定時の 300 分後の血漿中濃度 ($C_{p300 \text{ min}}$)、肝臓中濃度 (C_{Liver})、血中濃度時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve、 $\text{AUC}_{0-300 \text{ min}}$)、腎クリアランス (CL_R) および胆汁クリアランス (CL_B) をまとめた (Table 5-1)。

PFHA の $C_{p300\text{ min}}$ および C_{Liver} は、PFOA の 1/6 および 1/14 の濃度であった。一方、PFHA の CL_R および CL_B は PFOA の 350 倍および 2 倍の値を示した。これらの結果より、PFHA の体外排泄速度は PFOA に比較して非常に速いことが明らかとなった。

Table 5-1 Comparison of the toxicokinetics parameters between PFHA and PFOA in rats

Parameter	PFHA			PFOA		
$C_{p300\text{ min}}$ (nmol/mL)	45.70	±	20.94 **	270.10	±	16.94
C_{Liver} (nmol/g)	14.80	±	6.80 **	211.30	±	67.80
$AUC_{0-300\text{ min}}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}/\text{mL}$)	25.49	±	3.01 **	84.36	±	7.15
CL_R (mL/h/kg b.w.)	85.54	±	25.19 **	0.24	±	0.21
CL_B (mL/h/kg b.w.)	0.21	±	0.06 *	0.11	±	0.02

Male rats were i.v. injected with PFHA or PFOA at 48 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight. Values are means \pm SD for 4 rats. *, **, Significantly different from PFOA toxicokinetics parameter at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

第4節 小括および考察

PFOA の腎クリアランス値が 0.24 mL/h/kg 体重であったのに対して、PFOA よりも炭素鎖長が二つ短い PFHA の腎クリアランス値は 85 mL/h/kg 体重と、PFHA の尿中排泄速度は PFOA に比較して約 350 倍と非常に速いことが示された。また、PFOA は 1 ppm を反復暴露した場合、時間経過による蓄積が認められ、PFOA 暴露から 28 日目のラット血漿中濃度は 11 nmol/mL であった。これに対し、PFHA は 1000 ppm 反復暴露した場合においても時間経過による蓄積がないことよりも、むしろ、時間経過により血漿への蓄積は低下しており、PFHA 暴露から 28 日目のラット血漿中濃度はわずか 20 nmol/mL であった。さらに、PFHA は肝臓中への蓄積性も PFOA に比較して低く、強い生体作用を発現することもなかった。しかし、PFHA (60 mg/kg 体重) の繰り返し経口投与群では、7 日目の投与直後の血漿中濃度は初日の投与直後の血漿中濃度の約 1/3 であった。この傾向は、PFHA 含有粉末飼料による 28 日間反復暴露の実験においても認められた。これらの結果は、PFHA の慢性的な繰り返し暴露は PFHA の排泄を亢進する可能性を示唆している。本章での検討結果より、PFHA は PFOA に比較して生体蓄積性が低く、肝臓中における生体作用にもほとんど影響は認められなかったことから、PFHA が PFOA の代替品候補化合物として備えるべき必要条件を満たすことが明らかとなった。

考 察

本研究では、極低用量の PFOA に暴露した場合、肝臓に優先的に蓄積すること、その際に膜画分に多く分布することを明らかにした。肝臓における PFOA 濃度が 10-20 nmol/g 肝臓を越えると可溶性画分に分布する割合が濃度依存的に大きくなるが、その際には胆汁に排泄される割合もまた大きくなり、肝臓/血漿濃度比が低下する。この結果より、Fig. に示すようなモデルが考えられる。肝臓の膜画分には PFOA に対して親和性の高い部位があり、この部位が飽和すると可溶性画分に増加していき、可溶性画分に存在する PFOA は血液中や胆汁中に移行しやすい。本研究では大まかな細胞分画を行ったため、PFOA が結合しやすいオルガネラを特定するには至っていない。実験結果からは 18000 x g 沈殿に多く分布していることから、リソソームやペルオキシソームである可能性が考えられる。予備的な実験の結果として *in vitro* で PFOA を肝ホモジネートに添加した後、細胞分画を行った場合にも、*in vivo* とほぼ同様の結果が得られることから、輸送タンパク質などが働いて特定部位に集積するのではなく、PFOA 分子とオルガネラ中の分子との間の親和性が高いのではないかと考えている。肝臓とは異なり、腎臓では PFOA 濃度が低い場合にも膜画分への選択的な集積が認められないことから考えて、肝臓に特異的に発現している分子が関与している可能性も考えられる。PFOA が選択的に集積するオルガネラとそこに関与する分子の実体を明らかにすることは、PFOA の生体への影響を考える上で極めて重要であり、今後は特異的な結合分子の検索を進める必要がある。肝臓において PFOA が結合する分子が存在することは Han らによって指摘されているが、その親和性については言及されておらずまた、分子の特定には至っていない^{44, 67)}。次に、同程度の PFOA が肝臓に蓄積した場合でも、繰り返し暴

露により蓄積した方が、より膜面分に分布する割合が高いことがあきらかとなった。前述の仮説に基づくならば、繰り返しの暴露により、結合タンパク質の誘導が起こっている可能性がある。

高用量の PFOA に繰り返し暴露した場合には、逆に生体への蓄積性が低くなることが明らかになった。これまでの報告で実験動物における PFOA の蓄積性が過小評価されてきた原因のひとつであると考えられる。生体への蓄積性が低下する原因が尿中への排泄促進によるものであることが、第 4 章の実験により示された。片倉らは、PFOA は有機アニオントランスポーターを介して尿中に排泄される可能性を示唆した⁵⁵⁾。肝臓から胆汁中への PFOA 移行、血管側膜を介した血液からの PFOA の取り込みおよび流出についてもトランスポーターが関与している可能性も考えられる。この点に関して、本研究においては第 4 章に示したように、肝臓では血管側膜に発現している MRP3 は PFOA の暴露用量依存的な増加が認められた。高用量暴露の場合には、MRP3 の発現が亢進したことにより、肝臓中から血液中への PFOA の流出が促進されている可能性も考えられる。しかしながら、MRP3 が PFOA を輸送するかどうかについてはまだ不明である。腎臓においては、数種類の有機アニオントランスポーターを検討したが、繰り返し暴露により mRNA が増加しているという事実は得られなかった。PFOA の排泄を促進する機構については、今後更なる検討が必要である。

次に、PFHA は、繰り返し暴露しても生体への蓄積性が低いという結果から、PFOA の代替品の候補となりうることが示された。PFHA は界面活性作用の特性などから、PFOA の用途の一部を代替できることが、化成品製造会社により報告されている（データは未発表）。PFHA が蓄積性を示さない理由はその尿中への排泄のされやすさにあるということが第 5 章の結果より明らかとなった。PFHA がいかんにして尿中に排泄されるかは興味深い問題で

ある。PFOA の尿中への排泄には有機アニオントランスポーターが関与することが示唆されているが、PFHA が同様の機構で排泄されるのかについてはまだ知見がない。ペルフルオロカルボン酸類の尿中排泄のメカニズムが明らかになり、輸送に関与するトランスポーター分子の特定ができれば、今後の代替品開発にとって非常に重要な知見となるであろう。また、肝臓に蓄積しない理由についても、今後さらに検討していく必要があるだろう。前述したように、PFOA に関しては高親和性の結合分子が肝臓中に存在することが示唆される。このような分子に対して PFHA がいかなる特性を示すかを調べることで、肝臓に対する蓄積性の低さを裏付けることが出来るかもしれない。

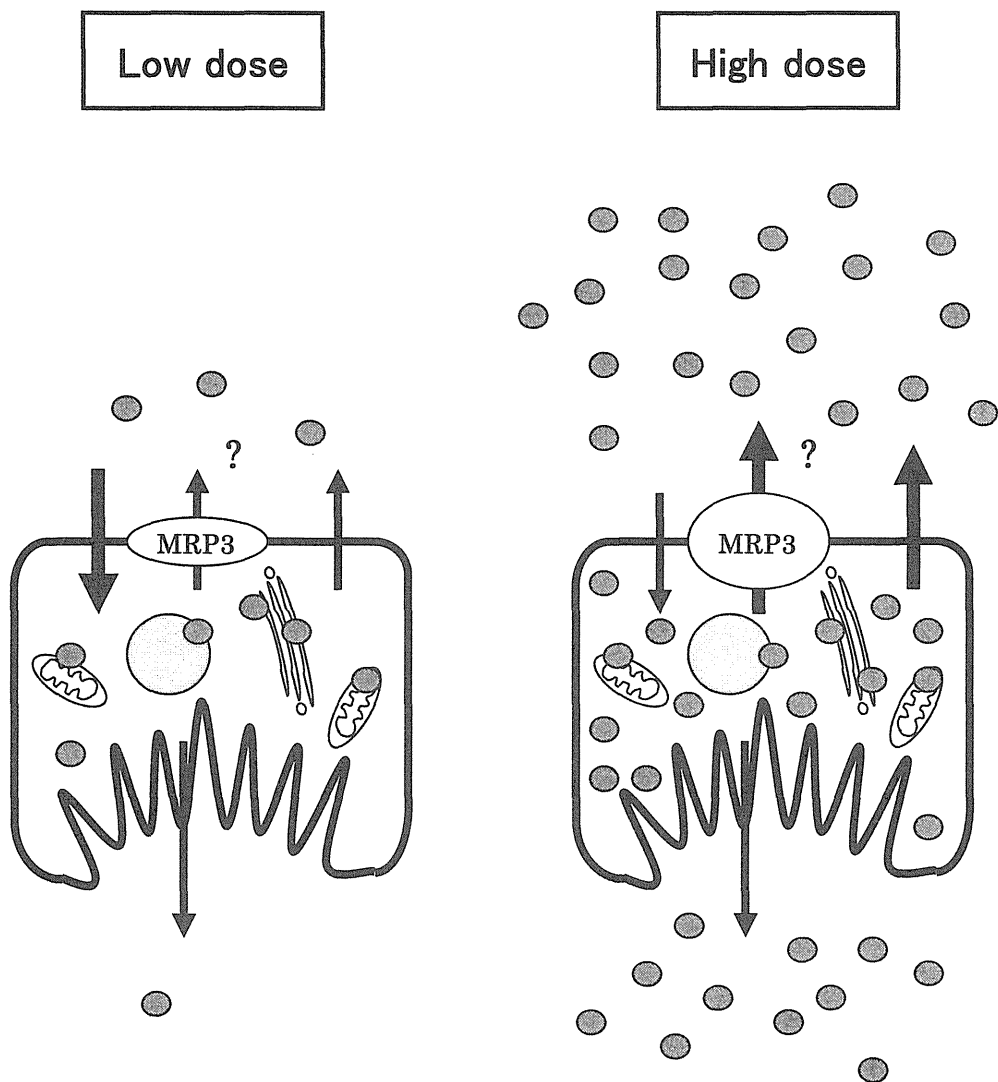


Fig. Putative mechanisms for PFOA accumulation in the liver at low and high dose.

総括

本研究によって以下の諸点が明らかとなった。

1. ラットに PFOA を急性暴露させた場合、低用量ほど肝臓に選択的に蓄積し、その場合における肝細胞内分布は膜画分に特に多く分布し、胆汁中には排泄されにくいことを明らかにした。
2. ラットに PFOA を反復暴露させた場合、低用量ほど肝臓に選択的に蓄積し、肝細胞内では膜画分に多く分布することを明らかにした。また、肝細胞内で認められた用量依存的な分布の変化は腎臓では認められなかった。
3. ラットに PFOA を急性暴露させた場合と反復暴露させた場合に、同程度の肝臓中濃度に揃えて比較すると、低用量の場合には反復暴露させた場合のほうがより肝臓に蓄積しやすく、また、肝細胞内では膜画分に分布することを明らかにした。一方、高用量の場合には急性と反復暴露の間に違いは認められなかった。
4. ラットに PFOA を繰り返し暴露した場合の生体蓄積性について用量依存性を検討したところ、低用量繰り返し暴露の場合とは異なり、高用量を繰り返し暴露した場合には肝臓、血液ともに蓄積性が低下すること、その理由として尿中への排泄が促進されることを明らかにした。
5. PFOA よりも炭素鎖長が 2 個短い PFHA は慢性的に暴露しても生体内にはほとんど蓄積せず生体影響が低いこと、その理由として尿中への排泄が極めて速いために生体に残留しないことを明らかにした。

これまで、PFOA の生体内運命を現実のヒトに近い極低用量暴露モデルを

本研究用いて解析した例はない。本研究では、PFOA の低用量反復暴露は高用量急性暴露とは著しく異なる体内動態を示すことを明らかにし、これまでの実験動物で得られた値からではヒトにおける PFOA の残留性を予測できないことを明確にした。低用量の PFOA を繰り返し暴露した場合、生体内へ取り込まれた PFOA は肝臓に選択的に蓄積し、その原因は膜画分に高い親和性を有する成分が存在するためであると考えられる。肝細胞内における高親和性集積部位への分布の違いが PFOA の体内蓄積性または体外排泄速度にどのような影響を与えるのかに関してはまだ不明な点が多い。今後、PFOA が高親和性に集積するオルガネラを同定し、それに関与する分子を検索して、高親和性の発現するメカニズムを解明していく必要がある。PFOA での研究から、代替化合物設計に関する最低条件を考察し、この考察を基に、PFOA よりも炭素鎖長が二つ短い PFHA を PFOA と比べると、尿中への排泄が非常に速いため、生体蓄積性が極めて低く、肝臓への生体影響も示さないことから、代替化合物としての最低条件を満たすことを示した。

本研究によって得られた情報がヒトにおける PFOA の高蓄積性のメカニズムの解明と代替品候補化合物の分子設計のための基礎データとして利用できるものであると考えている。

実験の部

実験の部

第 1 章 試薬

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は Aldrich Chemical Company, Inc. (U.S.A.) から購入した。ペルフルオロヘキサン酸 (PFHA) は東京化成から購入した。ヘパリン注射液は武田薬品工業から入手した。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。ウレタンはシグマアルドリッチジャパンから購入した。[1-¹⁴C]ペルフルオロオクタン酸 (55 mCi/mmol) は BlyChem Ltd. (Bellingha 社、英国) に合成を委託した。*p*-Bromophenacyl-8 は (Pierce、英国) から購入した。パルミトイル CoA、脂肪酸を除去した牛血清アルブミンは (Sigma Chemical 社、米国) から購入した。トリトン X-100 はナカライテスクから購入した。ブロムアセチルメトキシクマリンは Ohya らの方法に従って合成した⁶⁹⁾。その他の試薬はすべて和光純薬の特級を使用した。

第 2 章 実験動物と飼料

Wistar ST ラットは日本エスエルシー社から購入した。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。動物には水および固形飼料 (CE-2、日本クレア社) を自由に摂取させた。動物実験の取り扱いは、城西大学生命科学研究センター動物実験規範に従って行った。

第 3 章 動物の処理

第 1 節 ペルフルオロ脂肪酸 (PFCA) の投与

1. 1 静脈内投与

[1-¹⁴C] PFOA を 0~40 $\mu\text{mol/kg}$ 体重になるように秤量し、等モルの 1 M NaOH 溶液で中和した後、ラット血清に溶解し、体重 1 kg あたり 1 mL の割合で投与した。

1. 2 経口投与

PFOA を 0.06 または 3 mg/kg 体重、PFHA を 3 または 60 mg/kg 体重になるように秤量し、等モルの 1 M NaOH 溶液で中和した後、生理食塩水に溶解し、体重 1 kg あたり 2 mL の割合で投与した。

1. 3 腹腔内投与

PFOA を 0.06 または 3 mg/kg 体重になるように秤量した後、プロピレングリコール：水 (1 : 1、v/v) に溶解し、体重 1 kg あたり 1 mL の割合で投与した。

1. 4 飼料による投与

粉末飼料 (CE-2、日本クレア社) に PFOA を 0~200 ppm、PFHA を 0~1000 ppm の割合で混合し、粉末飼料給餌器にて 28 日間自由に摂食させた。

第 2 節 臓器の摘出とホモジネートの調製

エーテル麻酔下、下大静脈から血液を採取した後、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、精巣、副睾丸周辺脂肪組織および脳を摘出した。血液を 4°C、900×g

で 15 分間遠心分離して、血清を得た。肝臓の小片 (2g) およびその他の各臓器は 9 倍容の 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズした。また、代謝ケージ収容により採取した糞は、秤重量の 9 倍容の蒸留水を加えてホモジナイズした。

第 3 節 腎および胆汁クリアランスの測定

9 週齢のラットの腹腔にウレタン溶液 (0.9 g/3.6 mL/0.9% NaCl 溶液/kg 体重) を投与し、麻酔を施した。大腿部を切開し大腿静脈よりカニューレ (SP 45) を挿入し、切開部を縫合した。次に、下腹部および上腹部を切開し、膀胱 (SP 45) および胆管 (SP 10) にカニューレを挿入し、切開部を縫合した。手術後、ラットをボールマンケージ (夏目製作所) に収容した。手術から 30 分後に PFOA または PFHA をカニューレから急速静脈内投与した。PFOA 投与後 30、60、120、180、240、300 分後に尿および胆汁を採取し、5、15、45、90、120、150、210、270、300 分後に血液を採取した。PFCA 投与後 5 時間までの AUC を求め、尿中および胆汁中への排泄量を AUC で除して腎クリアランスおよび胆汁クリアランスとした。

また、PFOA (3 mg/mL/kg 体重) を 9 日間腹腔内投与したラットにおいては上記と同様の手術を行い、手術から 10 分後にサンプリングを開始した。サンプリング開始後 30 分、60 分後に尿および胆汁を採取し、0、30、60 分後に血液を採取した。その後 PFOA をカニューレから急速静脈内投与した。PFOA 投与後 30、60、120、180 分後に尿および胆汁採取し、5、15、45、90、120、150、180 分後に血液を採取した。PFOA 投与後 2 時間までの AUC を求め、尿中および胆汁中への排泄量を AUC で除して腎クリアランスおよび胆汁クリアランスとした。

第 4 節 細胞内分布の測定

肝臓の一部および腎臓に 9 倍容の 0.25 M ショ糖溶液を加え、10% ホモジネートを調製した。ホモジネートを 4°C で 8000×g で 15 分間遠心し、上清と沈殿に分離した (9300 rpm、RA-440 ローター、クボタ 6900/6910)。沈殿には臓器重量の 4 倍容のショ糖溶液を加えてホモジナイズし、PFOA の定量に供した。続けて、8000×g 上清を 18000×g で 20 分間遠心し、上清と沈殿に分離した (14000 rpm、RA-440 ローター、クボタ 6900/6910)。沈殿には臓器重量の 2 倍容のショ糖溶液を加えてホモジナイズし、PFOA の定量に供した。18000×g 上清については更に、105000×g で 60 分間遠心し、上清と沈殿に分離した (39000 rpm、RP50T-440 ローター、日立 SCP70H/48000 rpm、S100AT-6 ローター、日立 CS120-GX)。沈殿には臓器重量の 2 倍容のショ糖溶液を加えてホモジナイズし、PFOA の定量に供した。各遠心過程で生じた上清は一部採取し、PFOA の定量に供した。

第 4 章 PFOA および[1-¹⁴C]PFOA の定量

第 1 節 PFOA の定量

1.1 生体試料からの PFOA の抽出

採取した生体試料 (0.05 ~ 1.5 mL) をネジ付き試験管にとり、精製水を加えて全量を 1.5 mL とし、これに内部標準物質としてペルフルオロヘキサン酸 2 nmol を加えた。さらに、1 M 炭酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 10)、0.5 M テトラブチルアンモニウム溶液 (pH 10) を各 1 mL 加え、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、3 分間振とうした後、800×g で 5 分間遠心し、上層を別のネジ付き試験管に、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様にした。

1.2 PFOA の誘導体化⁶⁹⁾

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アセトン溶液 (2 mg/mL) を 1 mL 加え、よく攪拌した後 70°C 水浴で 25 分間反応させた。反応終了後直ちに氷冷し、-30°C で保存した。

1.3 HPLC による PFOA の分離、定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は LC10AS および LC6A (島津製作所) を用いた。分離用カラムは YMC-Pack Pro C18 (4.6×50 mm) を用いた。糞中の PFOA の分析には 4.6×100 mm の長さのカラムを用いた。カラム温度は 40°C に設定した。移動層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 (島津 RF-10AXL) を用い、励起波長を 366 nm、蛍光波長を 420 nm とした。試料は HPLC に注入する前に綿線濾過し、濾液 10 μL を分析試料とした。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。試料分析後にメタノールを流速 1 mL/min で 10 分間カラムを洗浄した。

1.4 検量線の作成

メタノールに溶解した PFOA を 0.1~40 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 2 nmol 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 量はこの検量線から求めた。

第 2 節 [1-¹⁴C]PFOA の定量

2.1 [1-¹⁴C]PFOA の精製

メタノールに溶解した [1-¹⁴C]PFOA を 5 μmol (275 μCi) ネジ付き試験管にとり精製水を加えて 全量を 1.5 mL とした。さらに、1 M 炭酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 10)、0.5 M テトラブチルアンモニウム溶液 (pH 10) を各 1 mL 加え、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、3 分間振とうした後、800 \times g で 5 分間遠心し、上層を別のネジ付き試験管に、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 回繰り返し、上層を先のもものと合わせた。[1-¹⁴C]PFOA の抽出液の溶媒を窒素エバポレーターで留去した。残渣に *p*-Bromophenacyl-8 (0.1 $\mu\text{mol/mL}$) を 50 μL およびアセトニトリル 450 μL を加えて全量を 500 μL とした。よく攪拌した後 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴で 30 分間反応させ、反応終了後直ちに氷冷した。この反応溶液に乾固する直前まで窒素ガスをふきつけアセトニトリルを留去した。残渣にアセトニトリル 50 μL 添加し HPLC にて分離した。HPLC は LC6A (島津製作所) を用いた。分離用カラムは YMC-Pack Pro C18 (4.6 \times 50 mm) を用いた。移動層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。検出には紫外分光光度計検出器 (島津 SPD-6A) を使い、紫外波長を 260 nm とした。得られたクロマトグラムは、Smart Chrom (ケーワイエーテクノロジー社) にて波形処理した。HPLC で分離された PFOA 画分のみ

をメスシリンダーに回収した。これを 1 mL ずつネジ付き試験管に分注し、10% KOH/90% MeOH 溶液 0.5 mL 加えて 80°C ヒーティングブロックで 60 分間加水分解した。放置後、ヘキサン 1 mL 加え、3 分間振とうした後、800 ×g で 5 分間遠心し、上層を除去した。下層に再びヘキサン 1 mL を加え、同様の操作を再度行った。下層に 1 M HCl 0.75 mL 加えて液性を中性にした後、下層に含まれるアセトニトリルを窒素エバポレーターで約 10 分間留去した。下層に 1 M 炭酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 10)、0.5 M テトラブチルアンモニウム溶液 (pH 10) を各 1 mL 加え、よく攪拌後ヘキサン：酢酸エチル (1 : 1、v/v) を 2 mL 加え、3 分間振とうした後、800 ×g で 5 分間遠心し、上層を別のネジ付き試験管に、移した。下層に再びヘキサン：酢酸エチル (1 : 1、v/v) を 2 mL 加え、同様の操作を 2 回繰り返し、上層を先のものと同様のものと合わせた。抽出液の溶媒を窒素エバポレーターで留去した後に残渣に精製水 2 mL、6 M HCl 1 mL 加え、よく攪拌後ヘキサンを 2 mL 加え、3 分間振とうした後、800 ×g で 5 分間遠心し、上層を別のネジ付き試験管に、移した。下層に再びヘキサンを 2 mL 加え、同様の操作を 2 回繰り返し、上層を先のものと同様のものと合わせた。抽出液の溶媒を窒素エバポレーターで留去した後に残渣に精製水 2 mL、6 M HCl 1 mL 加え、よく攪拌後ヘキサンを 2 mL 加え、同様の操作を再度行った。抽出液の溶媒を窒素エバポレーターで完全に留去した後に残渣に MeOH : H₂O (1 : 1、v/v) を 1 mL 加えて -30°C で保存した。

2.2 [1-¹⁴C]PFOA の定量

採取した生体試料をネジ付き試験管にとり、精製水を加えて 全量を 1.5 mL とし、これにキャリアーとして非放射性の PFOA を 5 nmol を加えた。さらに、1 M 炭酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 10)、0.5 M テトラブチルアンモ

ニウム溶液 (pH 10) を各 1 mL 加え、よく攪拌した後、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、3 分間振とうした後、800×g で 5 分間遠心し、上層を液体シンチレーションバイアルに移した。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量合わせた。抽出液の溶媒を 100°C ホットプレート上で加熱して留去した後にトルエンシンチレーター/Triton X-100 (1 : 1、v/v) 8 mL を加えよく攪拌し、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、投与液の放射活性を測定し、生体試料中に取り込まれた PFOA 量を算出した。

第 5 章 アシル CoA オキシダーゼ活性の測定

Small らの方法によって測定した⁷⁰⁾。パルミトイル CoA を基質として、反応により生じた過酸化水素を定量した。過酸化水素を還元型の 2',7'-ジクロロフルオレセインと共にカタラーゼ処理し、その際に生じる酸化型の 2',7'-ジクロロフルオレセインを 502 nm で測定した。反応液は最終濃度で 50 μM 2',7'-ジクロロフルオレセイン、40 U/mL ペルオキシダーゼ、4 mM 3-アミノ-1H-1, 2, 4-アミノトリアゾール、0.2 mg/mL 牛血清アルブミン、0.02% トリトン X-100、0.05 mM パルミトイル CoA、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) および酵素源として肝臓のホモジネート約 35 μg を含み最終容量を 1 mL とした。また、ホモジネート中のタンパク量は、Lowry らの方法に従って測定した。標準物質として牛血清アルブミンを用いた⁷¹⁾。

第 6 章 mRNA の定量

第 1 節 組織からの RNA の調製

液体窒素で凍結し、 -80°C で保存してあったラット肝の小片 (0.1 g) から RNeasy Mini Kit (Qiagen 社、ドイツ) を用いて総 RNA を抽出した。一方、ラット腎組織からは $\mu\text{MACS mRNA Isolation Kit}$ (Miltenyi Biotec 社、ドイツ) を用いて mRNA を精製した。RNA 溶液の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 ($1 A_{260 \text{ nm}} = 40 \mu\text{g/mL RNA}$)。

第 2 節 RT – PCR 法による逆転写反応

逆転写反応は RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (タカラバイオ社) を用いた。肝組織の総 RNA の逆転写反応系には最終濃度で 5 mM MgCl_2 、 $1\times\text{RNA PCR buffer}$ 、1 mM dNTP mix、 $1 \text{ U}/\mu\text{L RNase inhibitor}$ 、 $0.25 \mu\text{M Random 9 mers}$ 、 $0.25 \text{ U}/\mu\text{L AMV}$ 逆転写酵素および 500 ng の総 RNA を入れ、最終用量が $10 \mu\text{L}$ 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 社、米国) にセットし、 30°C で 10 分、 42°C で 30 分、 99°C で 5 分、 5°C で 5 分間反応させた。一方、腎組織の mRNA の逆転写反応系には最終濃度で 5 mM MgCl_2 、 $1\times\text{RNA PCR buffer}$ 、1 mM dNTP mix、 $1 \text{ U}/\mu\text{L RNase inhibitor}$ 、 $0.125 \mu\text{M Oligo dT – Adaptor Primer}$ 、 $0.25 \text{ U}/\mu\text{L AMV}$ 逆転写酵素および 50 ng の mRNA を入れ、最終用量が $10 \mu\text{L}$ 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、 42°C で 30 分、 99°C で 5 分、 5°C で 5 分間反応させた。生成した complementary DNA (cDNA)

は使用するまで -30°C で保存した。

第3節 リアルタイム PCR 法による mRNA の定量

肝組織 AOX、AHase および FABP の mRNA 定量には、QuantiTect SYBER Green PCR Kit (Qiagen 社、ドイツ)を用いた。2×PCR master mix を $12.5\ \mu\text{L}$ 、各プライマーセットおよび標準遺伝子である β -アクチンのプライマー (Table) は最終濃度が $0.6\ \mu\text{M}$ になるように調製した。AOX、アシル CoA 加水分解酵素および脂肪酸結合タンパク質の PCR と融解曲線の作成は iCycler IQ real-time detection system (Bio-Rad 社、米国)を用いて行った。反応は 95°C 、15 分で変性させた後、1 サイクルが 94°C で 30 秒、 57°C で 30 秒、 72°C で 30 秒を 50 サイクル反応させた。一方、肝および腎トランスポーターの mRNA 定量には、SYBYR Premix Ex Taq™ (タカラバイオ社)を用いた。2×PCR master mix を $12.5\ \mu\text{L}$ 、各プライマーセットおよび標準遺伝子である β -アクチンのプライマー (Table) は最終濃度が $0.8\ \mu\text{M}$ になるように調製した。PCR と融解曲線の作成は 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem 社)を用いて行った。反応は 95°C 、10 秒で変性させた後、1 サイクルが 95°C で 5 秒、 60°C で 34 秒を 40 サイクル反応させた。増幅後、融解曲線を作成し単一の生成物であることを確認した。Table に示したすべてのプライマーセットについては mRNA が定量的に増幅することを確認した。各遺伝子の発現量は comparative Ct 法を用いて解析した⁷²⁾。

Table Primer sequence used for experiments

Gene	GenBank		Primer (5'-3')
	ID		
AOX	NM_017340	Forward	TTCGTGCAGCCAGATTGGTAG
		Reverse	CGGCTTTGTCTTGAATCTTGG
AHase	NM_031315	Forward	ACTACGACGACCTCCCCAAGA
		Reverse	TGGCCACGCAGGTAGTTCA
FABP	BC086947	Forward	CGGCAAGTACCAAGTGCAGAG
		Reverse	CTGACACCCCCTTGATGTCCT
oatp1	L19031	Forward	CATGAGTGTACTTCTCTCTTGG
		Reverse	ATTCTGCTGGGTCTTGCGTTGG
oatp4	AJ271682	Forward	AACAAGCCATTTGCTGGCC
		Reverse	CATCCTGCCAGACAAGGTGAA
OAT1	AB004559	Forward	ACAAGCAAGGACAACCCGAA
		Reverse	AGACATAGCCAATCAAGGTGCC
OAT2	L27651	Forward	GCAGCCTCCATCAACTACATCA
		Reverse	GCGCACAAGGAAGTAGACCATA
OAT3	AB017446	Forward	TGGAGGACCTGTGATTGGAGAA
		Reverse	ATAGAACCAGCCAGCGTATGGA
OAT-K	AB012662	Forward	TCGCATTCTGCCTATCCTTGTC
		Reverse	GCCTTTATTACACAGCCCCAGG

GenBank			
Gene	ID		Primer (5'-3')
MRP2	X96393	Forward	TCACGGCTTCCTTTCTGAGT
		Reverse	CTTCTTCCAGGACGAGAACG
MRP3	AF072816	Forward	TGAAGTTCAAAGACTCCCGCA
		Reverse	CCCAAGCGTACAGCTTCAGAA
OCT1	U17013	Forward	ATTGTGCTGCAGATGGTCTGC
		Reverse	TCAGCCTGAACACCATGAAGG
OCT2	D83044	Forward	GGGACTGGTCAGCAAAGCAGGCTGGTT
		Reverse	GCTTGGGTAGAATGGGCATCACCATGGCCT
β -actin	V01217	Forward	TGCAGAAGGAGATTACTGCC
		Reverse	CGCAGCTCAGTAACAGTCC

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。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部毒性学講座 工藤 なをみ 准教授に深謝の意を表します。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただきました外山 智章 博士に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました副査 城西大学大学院薬学研究科従二 和彦 教授ならびに荻原 政彦 教授に謹んで感謝申し上げます。

実験遂行に際してご助言ならびにご協力をいただきました城西大学薬学部衛生化学講座の皆々様に感謝致します。

引用文献

- 1) Guethner, R.A., and Vietor, M.L. Surface active materials from perfluorocarboxylic acid. *Ind. Eng. Chem. Proc. Res. Dev.* **1**, 165-167 (1962).
- 2) Key, B.D., Howell, R.D., and Criddle, C.S. Fluorinated organics in the biosphere. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2445-2454 (1997).
- 3) Ophaug, R.H., and Singer, L. Metabolic handling of perfluorooctanoic acid in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **163**, 19-23 (1981).
- 4) 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).
- 5) Hatfield, S. Screening studies on the aqueous photolytic degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA). 3M Environmental Laboratory. Lab request number E-00-2192. St. Paul, MN. (2001).
- 6) Stock, N.L., Lau, F.K., Ellis, D.A., Martin, J.W., Muir, D.C.G., and Mabry, S.A. Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the North American troposphere. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 991-996 (2004).
- 7) Dinglasan, M.J., Ye, Y., Edwards, E.A., and Mabury, S. Florotelomer alcohol biodegradation yield poly- and perfluorinated acid. *Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 2857-2864 (2004).
- 8) Henderson, W.M., Smith, M.A., Perfluorooctanoic acid and perfluorononanoic acid in fetal and neonatal mice following in utero

- exposure to 8-2 fluorotelomer alcohol. *Toxicol. Sci.* **95**, 452-461 (2007).
- 9) Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., and Muir, D.C., Biological monitoring polyfluoroalkyl substances. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3463-3473 (2006).
 - 10) Harada, K., Nakanishi, S., Sakaki, K., Furuyama, K., Nakayama, S., Saito, N., Yamashita, K., and Koizumi, A. Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in Kyoto area, in Japan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **76**, 306-310 (2006).
 - 11) Kannan, K., Newsted, J., Halbrook, R.S., and Giesy, J.P. Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in milk and liver otters from the United States. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2566-71 (2002).
 - 12) Giesy, J.P., and Kannan, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wild life. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1339-1342 (2001).
 - 13) Hansen, K.J., Jonson, 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**, 1681-1685 (2002).
 - 14) 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 Mediterranean Seas. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3210-3216 (2002).
 - 15) So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Giesy, J.P., Zheng, J., Fang, Z., Im, S.H.,

- and Lam, P.K. Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South, China, and Korea. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4056-4063 (2004).
- 16) Boulanger, B., Vargo, J., Schnoor, J.L., Hornbuckle, K.C., Derection of perfluorooctanoate surfactants in Great Lakes water. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4064-4070 (2004).
- 17) Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., Gamo, T., A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar. Pollut. Bull.* **51**, 658-668 (2005).
- 18) Schaefer, A. Perfluorinated surfactants contaminate German waters. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7108-7109 (2006).
- 19) Skutlarek, D., and Exner, M. Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environ. Sci.. Pollut Res.* **13**, 299-307 (2006).
- 20) Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., and Hanke, G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Nothern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1469-1478 (2007).
- 21) Van de Vijver, K.I., Holbeek, L., Das, K., Blust, R., Joiris, C., and De Coen W. Occurrence of perfluorooctanoate sulfonate and other perfluorinated alkylated substances in harbor porpoises from the Black Sea. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 315-320 (2007).
- 22) Taniyasu, S., Kannan, K., Horii, Y., Hanai, N., and Yamashita, Y. A survey of

- perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 2634-2639 (2003).
- 23) Sinclair, E., Mayack, D.T., Roblee, K., Yamashita, T., and Kannan, K. Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 398-410 (2006).
- 24) 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**, 584-589 (1980).
- 25) Burris, J.W., Lundberg, J.K., Olsen, G., Simpson, C., and Mandel, J. Interim report No.2 Determination of serum half-levels of several fluorochemicals. St. Paul (MN), 3M Company. U.S. EPA public Docket AR-226. (2002).
- 26) Olsen, G.W., Burris, J.M., Burlew, M.M., and Mandel, J.H. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctane-sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examination. *J. Occup. Environ. Med.* **45**, 260-270 (2003).
- 27) Olsen, G.W., Hansen, K.J., Steaveson, L.A., Burris, J.M., and Mandel, J.H. Human donor liver and serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and perfluorochemicals. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 888-891 (2003).
- 28) Yeung, L.W., So, M.K., Jiang, G., Taniyasu, S., Yamashita, N., Song, M., Wu, Y., Li, J., Giesy, J.P., Guruge, K.S., and Lam, P.K. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 715-720 (2006).

- 29) Butenhoff, J.L., Gaylor, D.W., Moore, J.A., Olsen, G.W., Rodricks, J., Mandel, J.H., and Zobel, L.R. Characterization of risk for general population exposure to perfluorooctanoate. *Regul. Tox. Pharmacol.* **39**, 363-380 (2004).
- 30) Ehresman, D.J., Froehlich, J.W., Olsen, G.W., Chang, S.C., and Butenhoff, J.L. Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals. *Environ. Res.* **103**, 176-184 (2007).
- 31) Harada, K., Koizumi, A., Saito, N., Inoue, K., and Yoshinaga, T., Date, C., Fujii, S., Hachiya, N., Hirose, I., and Koda, S. Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human in Japan. *Chemosphere.* **66**, 293-301 (2007).
- 32) Lau, C., Thibodeaux, J.R., Hanson, R.G., Narotsky, M.G., Rogers, J.M., Lindstrom, A.B. and Strynar, M.J. Effects of Perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol. Sci.* **90**, 510-518 (2006).
- 33) Hinderliter, P.M., Han, X., Kennedy, G.L., and Butenhoff, J.L. Age effect on perfluorooctanoate (PFOA) plasma concentration in post-weaning rats following oral gavage with ammonium perfluorooctanoate (APFO). *Toxicology.* **225**, 195-203 (2006).
- 34) White, S.S., Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Villanueva, L., Zehr, R.D., Helfant, L., Strynar, M.J., Lindstrom, A.B., Thibodeaux, J.R., and Wood, C. Gestational PFOA exposure of mice is associated with altered mammary gland development in dams and female offspring. *Toxicol. Sci.* **96**, 133-144 (2007).
- 35) Gilliland, F.D., and Mandel, J.S. Mortality among employees of a

- perfluorooctanoic acid production plant. *J. Occup. Med.* **35**, 950-954 (1993).
- 36) Olsen, G.W., Gilliland, F.D., Burlew M.M., Burris, J.M., Mandel J.S., and Mandel, J.H. An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid. *J. Occup. Environ. Med.* **40**, 614-622 (1998).
- 37) Kudo, N., Katakura, M., and Kawashima, Y. Sex hormone-regulated renal transport of perfluorooctanoic acid. *Chem. Bio. Interact.* **139**, 301-316 (2002).
- 38) 平成 13 年度 住谷文須紗、城西大学大学院薬学研究科、修士論文 (1999).
- 39) Kennedy, G.L. Jr., Butenhoff, J.L., Olsen, G.W., O'Connor, J.C., Seacant, A. M., Perikins, R.G., Biegel, L.B., Murphy, S.R., Farrar, D.G. The toxicology of perfluorooctanoate. *Crit. Rev. Toxicol.* **34**, 351-384 (2004).
- 40) Ylinen, M., Kojo. A., Hanhijarvi, H., and Peura, P. Disposition perfluorooctanoic acid in the rat after single and subchronic administration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 46-53 (1990).
- 41) Ohmori, K., Kudo, N., Katayama, K., and Kawashima, Y. Comparison of toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology.* **184**, 135-140 (2003).
- 42) Ylinen, M., Kojo, A., Hanhijarvi, H., and Peura, P. Disposition of perfluorooctanoic acid in the rat after single and subchronic administration. *Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 46-53 (1990).
- 43) Goecke, C.M., Jarnot, B.M., and Reo, N.V., A comparative toxicological

- investigation of perfluorocarboxylic acids in rats by fluorine-19 NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 512-519 (1992).
- 44) Han, X., Kemper, R.A., and Jepson, G.W. Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney. *Drug. Chem. Toxicol.* **28**, 197-209 (2005).
- 45) Just, W.W., Gorgas, K., Hartl, F.U., Heinemann, P., Salzer, M., and Schimassek, H. Biochemical effects and zonal hepatology of peroxisome proliferation induced by perfluorocarboxylic acids in rat liver. *Hepatology.* **9**, 570-581 (1989).
- 46) Kudo, N., Bandai, N., Suzuki, E., Katakura, M., and Kawashima, Y. Induction by perfluorinated fatty acids with different carbon chain length of peroxisomal β -oxidation in the liver of rats. *Chemico-Biol.Interact.* **124**, 119-132 (2000).
- 47) Borges, T., Robertson, L.W., Peterson, R.E., and Glauert, H.P. Dose related effects perfluorodecanoic acid on growth, food intake and hepatic peroxisomal β -oxidation. *Arch. Toxicol.* **66**, 18-22 (1992).
- 48) Uy-Yu, N., Kawashima, Y., and Kozuka, H. Comparative studies on sex-related difference in biochemical responses of livers to perfluorooctanoic acid between rats and mice. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1492-1495 (1990).
- 49) Takacs, M.L., Abbott, B.D., Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (α , β/δ , γ) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol. Sci.* **95**, 108-117 (2007).
- 50) Kawashima, Y., Uy-Yu, N., and Kozuka, H. Sex-related difference in the

- inductions by perfluoro-octanoic acid of peroxisomal β -oxidation, microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase and cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochem. J.* **261**, 595-600 (1989).
- 51) Owada, Y., Kitanaka, N., and Kondo, H. Fatty acid binding proteins. *Nippon Rinsho.* **62**, suppl. 12, 95-97 (2004).
- 52) Vanden Heuvel, J.P., Strechele, P.F., Nesbit, D.J., and Penterson, R.E., Coordinate induction of acyl-CoA binding protein, fatty acid binding protein and peroxisomal beta-oxidation by peroxisome proliferators *Biochim. Biophys. Acta.* **1177**, 183-190 (1993).
- 53) Luebker, D.J., Hensen, K.J., Bass, N.M., Butenhoff, J.L., and Secant, A.M. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid binding protein. *Toxicology.* **176**, 175-185 (2002).
- 54) 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).
- 55) 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).
- 56) Hirohashi, T., Suzuki, H., and Sugiyama, Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J. Biol. Chem.* **274**, 15181-15185 (1999).
- 57) Kudo, N., Suzuki, E., Katakura, M., Ohmori, K., Noshiro, R., and Kawashima,

- Y. Comparison of elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chem. Biol. Interact.* **134**, 203-216 (2001).
- 58) Kudo, N., Suzuki-Nakajima, E., Mitumoto, A., and Kawashima, Y. Responses of the liver to perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in male and female mice in relation to induction of hepatomegaly, peroxisomal beta-oxidation and microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1952-1957 (2006).
- 59) Kannan, K., Yun, S.H., and Evans, T.J. Chlorinated, brominated, and perfluorinated contaminants in livers of polar bears from Alaska. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9057-9063 (2004).
- 60) Calafat, A.M., Kuklenyik, Z., Caudik, S., Reidy, J.A., and Needham, L.L., Perfluorochemicals in pooled serum samples from United States resident in 2001 and 2002. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2128-2134 (2006).
- 61) Kannan, A., Muller, G., Van, Bavel, B., Harden, F., Toms, L.M., and Lindstrom, G. Levels of 12 perfluorinated chemicals in pooled Australian serum, collected 2002-2003, in relation to age, gender, and region. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3742-3748 (2006).
- 62) Hansen, K.J., Clemen, L.A., Ellefson, M.E., and Johnson, H.O. Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 766-770 (2001).
- 63) Kawashima, Y., Kobayashi, H., Miura, H., and Kozuka, H. Characterization of hepatic responses of rat to administration of perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acids at low levels. *Toxicology.* **99**, 169-178 (1995).

- 64) Permadi, H., Lundgren, B., Anderson, K., and Depierre, J.W. Effects of perfluoro fatty acids on peroxisome proliferation and mitochondrial size in mouse liver: Dose and time factors and effect of chain length. *Xenobiotica*. **23**, 761-770 (1993).
- 65) Sohlenius, A.-K., Andersson, K., and Depierre, J.W. The effects of perfluoro-octanoic acid on hepatic peroxisome proliferation and related parameters show no sex-related differences in mice. *Biochem. J.* **285**, 779-783 (1992).
- 66) Sohlenius, A.-K., Lundgren, B., and Depierre, J.W. Perfluorooctanoic acid has persistent effects on peroxisome proliferation and related parameters in mouse liver. *J. Biochem. Toxicol.* **7**, 205-212 (1992).
- 67) Han, X., Hinderliter, P.M., and Snow, T.A., and Jepson, G.W. Bindng of perfluorooctanoic acid to rat liver-form and kidney-form alpha₂u-globulins. *Drug. Chem. Toxicol.* **27**, 341-360 (2004).
- 68) Saito, N., Harada, K., Inoue, K., Sasaki, K., Yoshinaga, T., and Koizumi, A., Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentration in surface water in Japan. *J. Occup. Health.* **46**, 49-59 (2004).
- 69) 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).
- 70) Small, G.M., Burdett, K., and Connock, M.J. Peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochem. J.* **227**, 205-210 (1985).

- 71) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farry, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1991).
- 72) PE Applied Biosystems. Relative Quantitation of Gene Expression. *User bulletin.* **2**, 1-36 (1997).

