

炭素鎖長の異なるペルフルオロカルボン酸の  
生体影響に関する系統的研究  
—脂肪酸代謝および脳機能への影響について—

川畑 公平

## 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. Kawabata K, Tamaki S, Kokubo E, Kobayashi Y, Shinohara T, Sakai A, Kawai H, Mitsumoto A, Kawashima Y, Kudo N. (2017) Disposition of perfluorododecanoic acid in male rats after an oral administration. *Fundam. Toxicol. Sci.* 4 (4), 179-186.
2. Kawabata K, Matsuzaki H, Nukui S, Okazaki M, Sakai A, Kawashima Y, Kudo N. (2017) Perfluorododecanoic acid induces cognitive deficit in adult rats. *Toxicol. Sci.* 157 (2), 421-428.
3. Kawabata K, Karahashi M, Sakamoto T, Tsuji Y, Yamazaki T, Okazaki M, Mitsumoto A, Kudo N, Kawashima Y. (2016) Fatty acid  $\beta$ -oxidation plays a key role in regulating *cis*-palmitoleic acid levels in the liver. *Biol. Pharm. Bull.* 39 (12), 1995-2008.

# 目次

略語	i
総論の部	
緒言	1
第1章 PFOAの肝臓モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) 代謝に対する影響	
ークロフィブリン酸との比較ー	4
第1節 PPAR $\alpha$ アゴニスト作用の比較	5
第2節 MUFA 合成系への影響の比較	8
第3節 肝 18:1 $n-9$ 量への影響の比較	10
第4節 肝 18:1 $n-9$ 代謝に差異が生じるメカニズムの検証	12
第5節 小括	17
第2章 炭素鎖長の異なる PFCA の肝臓トリアシルグリセロール代謝に対する影響	
第1節 一般評価	20
第2節 炭素鎖長が異なる PFCA の肝 TAG 蓄積作用	22
第3節 肝臓における PFCA の蓄積	24
第4節 PFCA による TAG 蓄積作用の比較	25
第5節 肝臓における TAG 代謝関連遺伝子の発現評価	27
第6節 小括	31

第3章 炭素鎖長の異なる PFCA の生体内分布および脳機能に対する影響	33
第1節 PFDoA の組織分布	33
第2節 PFDoA の血清中濃度および組織中濃度の半減期	35
第3節 PFDoA の肝臓に対する作用	37
第4節 行動薬理試験による PFCA の脳機能への影響評価	38
第5節 小括	43
第4章 肝臓中の MUFA 組成に偏りが生じるメカニズム	45
第1節 PFOA は肝臓における MUFA 組成の偏りを拡大させる	46
第2節 MUFA 組成の偏りが生じるメカニズムを解明するための戦略	48
第3節 無脂肪食群とクロフィブリン酸群における肝 MUFA 合成の亢進は無視しうる	49
第4節 無脂肪食群とクロフィブリン酸群における肝脂肪酸組成の大きな違い	52
第5節 肝臓における 16:1 $n$ -7 の優先的な分解	54
第6節 $\beta$ 酸化における MUFA の選択性に影響する可能性を有するその他の因子	58
第7節 小括	63
総括	66
謝辞	68
実験の部	69
引用文献	91

本論文で使用した略語を以下に示す。

ABCA : ATP-binding cassette subfamily A

ACC : acetyl-CoA carboxylase

ACLY : ATP-citrate lyase

ACSL : long-chain acyl-CoA synthetase

ACOT : acyl-CoA thioesterase

ACOX : acyl-CoA oxidase

ALT : alanine transaminase

AMPK : AMP-activated protein kinase

Apo A I : apolipoprotein A I

Apo CIII : apolipoprotein CIII

AST : aspartate transaminase

ATGL : adipose triglyceride lipase

CE : cholesterol ester

CHOP : C/EBP homologous protein

CHREBP : carbohydrate response element-binding protein

CGI : comparative gene identification

CPT : carnitine palmitoyltransferase

CREB : cAMP responsive element binding protein

CYP : cytochrome P450

DAG : diacylglycerol

DGAT : acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ELOVL : fatty acid elongase

FABP : fatty acid binding protein

FABPpm : plasma membrane-associated fatty acid binding protein

FAS : fatty acid synthase

FADS : fatty acid desaturase

FAT/CD36 : Fatty acid translocase

FATP : fatty acid transport protein

FGF : fibroblast growth factor

FOX : forkhead box protein

G6Pase : glucose-6-phosphatase

G6PD : glucose-6-phosphate dehydrogenase

GK : glucokinase

GLS : glycogen synthase

GLUT2 : glucose transporter type 2

GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransferase

GRP : glucose-regulated protein

HPLC :high performance liquid chromatography

HNF : hepatocyte nuclear factor

IRS : insulin receptor substrate

LCAD : long-chain acyl-CoA dehydrogenase

LPL : lipoprotein lipase

LPK : L-type pyruvate kinase

LXR : liver X receptor

MCAD : medium-chain acyl-CoA oxidase

MCDC : malonyl-CoA decarboxylase

ME : malic enzyme

MTP : microsomal triglyceride transfer protein

MUFA : monounsaturated fatty acid

NADH : nicotinamide adenine dinucleotide reduced

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced

Pair-fed : pair-feeding

PCE : palmitoyl-CoA chain elongase

PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

PFCA : perfluorocarboxylic acid

PFDA : perfluorodecanoic acid

PFD<sub>o</sub>A : perfluorododecanoic acid

PFOA : perfluorooctanoic acid

PGC1 $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator

PL : phospholipid

POCE : palmitoleoyl-CoA chain elongase

PPAR $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$

PPAR $\delta$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$

SCD : stearoyl-CoA desaturase

SREBP : sterol regulatory element-binding protein

STAT : signal transducer and activator of transcription

TAG : triacylglycerol

TLC : thin-layer chromatography

UCP : uncoupling protein

UV : ultraviolet

VLCAD : very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

XBP : X-box binding protein

脂肪酸は炭素数、2重結合数および2重結合の位置で表し、以下の略語とする。

- 16:0、 palmitic acid (パルミチン酸)
- 16:1 $n$ -7、 palmitoleic acid (パルミトオレイン酸)
- 18:0、 stearic acid (ステアリン酸)
- 18:1 $n$ -7、 *cis*-vaccenic acid (シスバクセン酸)
- 18:1 $n$ -9、 oleic acid (オレイン酸)
- 18:2 $n$ -6、 linoleic acid (リノール酸)
- 18:3 $n$ -3、  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -リノレン酸)
- 20:3 $n$ -9、 5, 8, 11-eicosatrienoic acid ( $\gamma$ -リノレン酸)
- 20:3 $n$ -6、 8, 11, 14-eicosatrienoic acid (5, 8, 11-エイコサトリエン酸)
- 20:4 $n$ -6、 arachidonic acid (8, 11, 14-エイコサトリエン酸)
- 20:5 $n$ -3、 eicosapentaenoic acid (アラキドン酸)
- 22:5 $n$ -3、 docosapentaenoic acid (ドコサペンタエン酸)
- 22:6 $n$ -3、 docosahexaenoic acid (ドコサヘキサエン酸)



## 総論の部

### 諸言

ペルフルオロアルキル化合物とは、アルキル基の水素原子を全てフッ素原子に置換した化合物の総称であり、代表的な化合物としてペルフルオロアルキル酸、ペルフルオロテロマーアルコール、ペルフルオロアルキルポリマーなどが知られている。ペルフルオロアルキル化合物において、フッ素原子の原子半径が小さくて電気陰性度が大きいいため、炭素－フッ素結合は炭素と水素や他のハロゲン原子との結合に比べて安定であること、炭素－フッ素結合の分極率は炭素と他のハロゲン原子に比べると低いこと、フッ素化合物の分子間力が小さいことなどから、化学的安定性、絶縁性、潤滑性および撥水・撥油性など他の化合物にはみられないユニークな性質を示す。このような性質を利用してペルフルオロアルキル化合物はコーティング剤、防汚剤、絶縁体および撥水・撥油剤など様々な用途で身の回りの多くの製品に用いられてきた [8, 79]。ペルフルオロ化合物の一種であるペルフルオロアルキル酸には、硫酸基、カルボキシル基またはリン酸基を有するものが知られている。これらのうち、硫酸基を有するペルフルオロスルホン酸およびカルボキシル基を有するペルフルオロカルボン酸 (PFCA) は使用量が多く、2004 年におけるペルフルオロスルホン酸の生産量はおよそ 3,500 トン、過去 60 年間における PFCA の生産量は 1 年あたり 150-350 トンであると報告されている [53, 93]。環境中に見出されるペルフルオロアルキル酸は工業的に生産されて排出されるものに加え、種々のペルフルオロ化合物の環境中における最終分解物の寄与が考えられている [72, 92, 93]。

PFCA には炭素鎖長の異なる分子種が多数存在する。炭素鎖長 8-10 の化合物が工業的に多用され、中でも炭素数 8 のペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の使用量が最も多い [79]。PFCA は酸、アルカリ、光分解に対して安定で微生物などによる代謝もうけず、環境中においてほとんど分解されないため、PFOA による環境汚染が深刻な問題となっている [54]。河川、海、湖沼、土壌および大気などに加え、飲料水、食物などからの PFCA の検出事例も多数報告されている [12, 30, 42, 54, 97]。PFOA は環境中から検出されるばかりでなく、鳥類、魚類、哺乳類などの野生動物やヒトにまで及んでいる [12, 30, 54]。実験動物

に比べると、ヒトにおける PFOA 血中濃度の半減期は 4.4 年と極めて長期にわたることが明らかになるに至り、ヒトの健康への影響が強く懸念されるようになった [70]。こうした背景から欧米では PFOA の環境排出量を削減する動きが強まっており、日本においても PFOA は「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」における第二種監視化学物質に指定され、規制の対象となっている。PFOA の生体影響に関しては、げっ歯類に対して肝肥大、ペルオキシソーム増殖、食欲低下および胎児期暴露による出生児の発育遅延などを引き起こすことが知られている [2, 25, 32, 36, 71, 90]。ヒトについても、高濃度暴露集団や一般人を対象とした疫学調査が実施され、甲状腺機能不全や精巣がんのリスクと体内に存在する PFOA 量との間に相関があることを示唆する結果が報告されている [1, 69, 76]。

PFCA の生体影響の評価は、排出量の多い PFOA を中心に展開されており、PFOA に関する文献が多い。また、PFCA は炭素鎖長が長い程、生体蓄積性が高い傾向が示されているため [67]、PFOA の代替品としてより炭素鎖長の短い PFCA が使用されるようになり、これらの毒性評価も多く報告されるようになった [55]。ところが環境中を見渡すと炭素鎖長の長いペルフルオロノナン酸 (PFNA)、ペルフルオロデカン酸 (PFDA)、ペルフルオロウンデカン酸、ペルフルオロドデカン酸 (PFDoA) 等が検出されている [29, 78, 86, 97]。このような長鎖 PFCA が野生動物体内から検出される理由には、工業的に生産される PFCA の副生成物として製品に混入していることに加え、生体内での蓄積性が高い可能性が考えられる。一般に PFCA の炭素鎖長が長くなると毒性が強くなる [71]。例えば、ラットにおける LD<sub>50</sub> 値は PFOA 189 (175-208) mg/kg、PFDA 41 (34-47) mg/kg である。これは従来の知見では生体への蓄積性の差異によって説明されてきた [71]。

PFCA の生体に対する作用は多岐にわたる。PFCA はペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) を活性化することが報告されている [65, 83]。PPAR $\alpha$  は脂質代謝の制御に重要な役割を担う核内受容体である [74]。生体内における脂質のホメオスタシスは、脂質の合成、分解、貯蔵および輸送のバランスにより維持され、脂質代謝の中心的な役割を果たす臓器である肝臓に加え、血液や脂肪組織等の様々な組織によって調節されている。PFOA は脂質代謝に大きな変動を与えることが報告されている [41, 51, 89]。肝リン脂質の増加や脂質代謝酵素の誘導、血清脂質の低下などは PPAR  $\alpha$  を介する作用であると考えら

れるものも多い [41, 44, 45, 49, 89]。また、肝臓中に脂肪蓄積を惹起する作用も報告されている [43]。しかしながら、炭素鎖長の異なる PFCA を系統的に比較した研究はない。このような背景から、本研究では、1) モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) の代謝に対する影響に焦点を当て、既知の PPAR  $\alpha$  活性化剤であるクロフィブリン酸との比較を行い、共通点および相違点を明らかにすることを試みた。さらに、2) 炭素鎖長の異なる PFCA について、MUFA 代謝を中心とした脂質代謝への影響を比較し、生体残留性では説明できない相違点があることを見出した。この過程において、炭素鎖長の長い PFDoA は、従来の PFCA には知られていなかった脳移行性があることを新たに見出したので、脳機能に対する影響を評価し、脳内残留性に相関して学習機能の低下が生じることを見出した。また、MUFA 代謝への影響を研究する過程において、MUFA には PFOA で増加するものとしめないものがあることを見出し、生体内の MUFA レベルの調節機構について詳細な検討を行った。

以上の研究を通じて、炭素鎖長の異なる PFCA は組織残留性に依存して生体作用を示すばかりでなく、各々の PFCA に特徴的な作用を有することを明らかにした。

## 第1章 PFOAの肝臓モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) 代謝に対する影響

### —クロフィブリン酸との比較—

炭素数8のPFOAはPFCAの中で最も使用量が多く、また、河川や土壌など環境中や野生生物から検出されるPFCAの中で最も濃度が高い [12, 30, 42, 54, 97]。PFOAは実験動物において、肝毒性、免疫毒性および発達毒性などの生体毒性を引き起こすことが知られており [2, 15, 16, 20, 60, 67, 84]、特に肝毒性に関してはよく調べられており、高用量のPFOA投与によりALTやASTなどの肝障害マーカーの増加、脂肪の蓄積および炎症細胞の浸潤などが引き起こされることが報告されている [28, 84, 99]。

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )は生体内におけるエネルギー代謝調節、特に脂肪分解調節に関与し [74]、内因性リガンドとして遊離脂肪酸やエイコサノイド、外因性リガンドとしてフィブレート系薬物やPFCAが知られている。リガンドと結合したのちに標的遺伝子の転写を調節し、種々の生体反応を制御すると考えられている。フィブレートの一種であるクロフィブリン酸は、ラット肝において脂肪酸の分解に関連する酵素の遺伝子発現量を増加させるばかりでなく、モノ不飽和脂肪酸 (MUFA)の合成を亢進させること、18:1 $n-9$ 量を増加させることが報告されている [39, 48, 59, 98]。PFOAもクロフィブリン酸と同様にPPAR $\alpha$ アゴニストであり、ラット肝ペルオキシソーム増殖作用を示す [32, 90]。また、ラット肝臓においてSCDを誘導しホスファチジルコリンの18:1 $n-9$ 量を増加させることが報告されている [41, 89]。しかし、一方でクロフィブリン酸が肝TAGを減少させるのに対し [38]、PFOAには肝TAGを増加させるという報告もある [43]。そこで本研究では、PFOAのラット肝MUFA代謝に対する影響について、クロフィブリン酸と詳細に比較を行い、その相違点を明らかにすることを目的とした。

## 第1節 PPAR $\alpha$ アゴニスト作用の比較

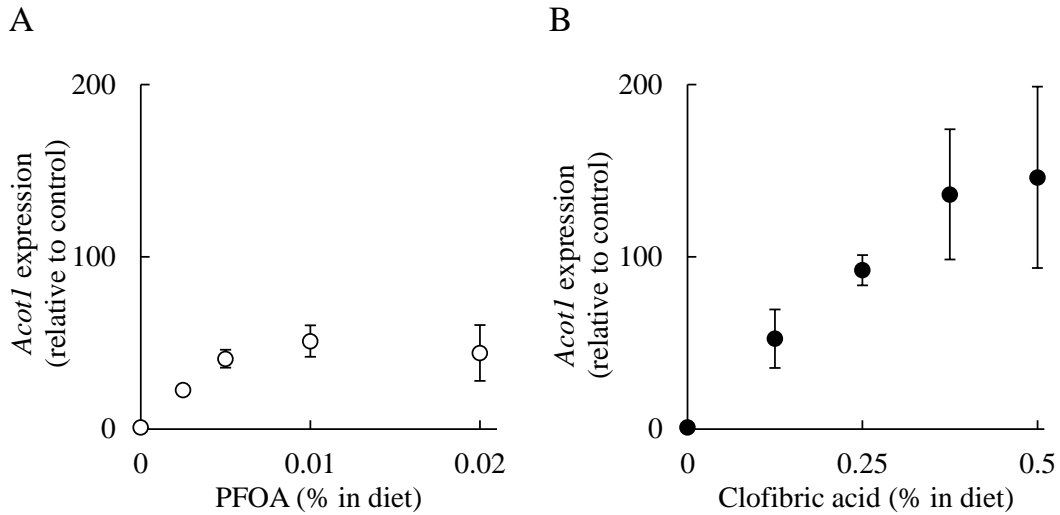
PFOA とクロフィブリン酸の影響を比較するにあたり、ラットに対して毒性を示さないか確かめるために体重および組織重量を測定し、Table 1-1 に示した。体重および相対脂肪組織重量に大きな差異は認められなかったが、両者で相対肝重量の用量依存的な増加が認められた。

PFOA とクロフィブリン酸の PPAR $\alpha$  アゴニスト作用を比較するために、代表的な PPAR $\alpha$  標的遺伝子である *Acot1* の発現量を比較した。PFOA もしくはクロフィブリン酸投与ラットの肝臓における *Acot1* の発現量を Fig. 1-1 に示した。両者ともに用量依存的な *Acot1* 発現量の増加が認められた。しかし、PFOA とクロフィブリン酸の投与量が異なるため、一概には両者の誘導作用を比較することができない。そこで、PFOA および肝臓中濃度を測定し、両者の肝臓中濃度と *Acot1* の発現量との間の相関を調べ、Fig. 1-2 に示した。肝臓中濃度と *Acot1* の発現量との間にはそれぞれ良好な相関が認められ、その傾きを比較した結果、クロフィブリン酸の *Acot1* 誘導作用を 1 としたときに PFOA の誘導作用は 0.35 であった。このことから、PFOA の方がクロフィブリン酸よりも PPAR $\alpha$  アゴニスト作用が小さいことが明らかとなった。

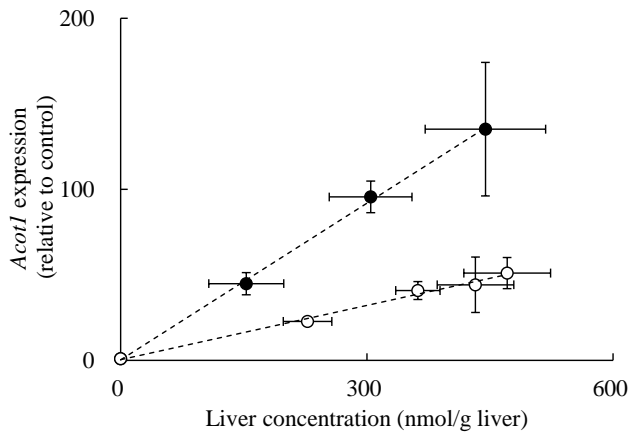
**Table 1-1.** Body Weight and Tissue Weight of PFOA-Treated or Clofibric Acid-Treated Rats.

A. PFOA-Treated Rats											
		Control		PFOA (% in diet)							
				0.0025		0.005		0.01		0.02	
Body weight (g)		344.69	± 8.15 <sup>ab</sup>	356.57	± 9.09 <sup>a</sup>	358.98	± 10.49 <sup>a</sup>	335.04	± 18.28 <sup>b</sup>	333.48	± 12.84 <sup>b</sup>
Tissue weight (g)											
Liver		12.72	± 0.72 <sup>a</sup>	15.64	± 0.65 <sup>b</sup>	18.27	± 1.14 <sup>bc</sup>	18.16	± 2.37 <sup>c</sup>	18.64	± 2.06 <sup>c</sup>
Epididymal fat		3.45	± 0.52	3.35	± 0.40	3.40	± 0.53	2.98	± 0.41	2.85	± 0.58
Mesentric fat		2.56	± 0.40 <sup>a</sup>	2.55	± 0.47 <sup>a</sup>	2.36	± 0.43 <sup>ab</sup>	1.77	± 0.20 <sup>b</sup>	1.76	± 0.33 <sup>b</sup>
Relative tissue weight (% of body weight)											
Liver		3.69	± 0.17 <sup>a</sup>	4.39	± 0.14 <sup>b</sup>	5.09	± 0.19 <sup>c</sup>	5.41	± 0.54 <sup>c</sup>	5.58	± 0.43 <sup>c</sup>
Epididymal fat		1.00	± 0.14	0.94	± 0.10	0.95	± 0.13	0.89	± 0.13	0.85	± 0.17
Mesentric fat		0.74	± 0.11 <sup>a</sup>	0.71	± 0.13 <sup>a</sup>	0.66	± 0.11 <sup>ab</sup>	0.53	± 0.06 <sup>b</sup>	0.53	± 0.10 <sup>ab</sup>
B. Clofibric Acid-Treated Rats											
		Control		Clofibric acid (% in diet)							
				0.125		0.25		0.375		0.5	
Body weight (g)		344.69	± 8.15 <sup>a</sup>	309.47	± 20.07 <sup>b</sup>	311.15	± 14.42 <sup>b</sup>	310.32	± 13.45 <sup>b</sup>	301.59	± 20.52 <sup>b</sup>
Tissue weight (g)											
Liver		12.72	± 0.72 <sup>a</sup>	13.37	± 1.44 <sup>a</sup>	16.94	± 0.74 <sup>b</sup>	17.27	± 0.93 <sup>b</sup>	18.08	± 2.73 <sup>b</sup>
Epididymal fat		3.45	± 0.52 <sup>a</sup>	3.06	± 0.33 <sup>ab</sup>	2.70	± 0.31 <sup>bc</sup>	2.71	± 0.41 <sup>bc</sup>	2.36	± 0.17 <sup>c</sup>
Mesentric fat		2.56	± 0.40 <sup>a</sup>	2.13	± 0.37 <sup>ab</sup>	1.65	± 0.40 <sup>ab</sup>	1.20	± 0.31 <sup>b</sup>	1.14	± 0.46 <sup>b</sup>
Relative tissue weight (% of body weight)											
Liver		3.69	± 0.17 <sup>a</sup>	4.32	± 0.34 <sup>b</sup>	5.45	± 0.14 <sup>c</sup>	5.57	± 0.20 <sup>c</sup>	5.97	± 0.55 <sup>c</sup>
Epididymal fat		1.00	± 0.14 <sup>a</sup>	0.99	± 0.13 <sup>ab</sup>	0.87	± 0.13 <sup>ab</sup>	0.88	± 0.14 <sup>ab</sup>	0.79	± 0.07 <sup>b</sup>
Mesentric fat		0.74	± 0.11 <sup>a</sup>	0.64	± 0.08 <sup>ab</sup>	0.50	± 0.11 <sup>ab</sup>	0.39	± 0.10 <sup>b</sup>	0.37	± 0.14 <sup>b</sup>

Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. (n = 4-6). <sup>a-c</sup>Significant difference without a common superscript ( $P < 0.05$ ). In the absence of superscript, the means are not statistically significant.



**Fig. 1-1.** ACOT1 mRNA Levels in the Liver of PFOA-Treated or Clofibric Acid-Treated Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5% (w/w) for 7 days. (A) PFOA-treated rats and (B) clofibric acid-treated rats. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid.



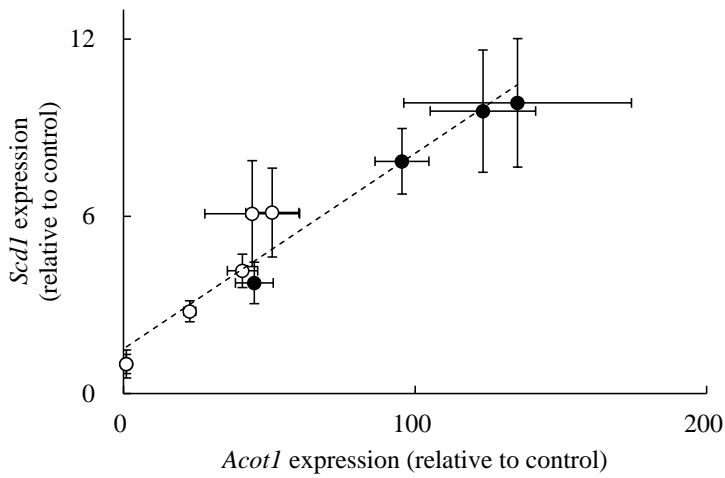
**Fig. 1-2.** Relationship between Concentrations of PFOA or Clofibric Acid and Levels of mRNA Encoding ACOT1 in the Livers of Rats. Data from Fig. 1-2 were utilized. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid. Relationship between hepatic concentrations of PFOA and hepatic levels of mRNA encoding ACOT1,  $y = 0.1055x + 0.4619$  ( $r^2 = 0.9926$ ). Relationship between hepatic concentrations of PFOA and hepatic levels of mRNA encoding ACOT1,  $y = 0.3053x + 0.3031$  ( $r^2 = 0.9990$ ).

## 第2節 MUFA 合成系への影響の比較

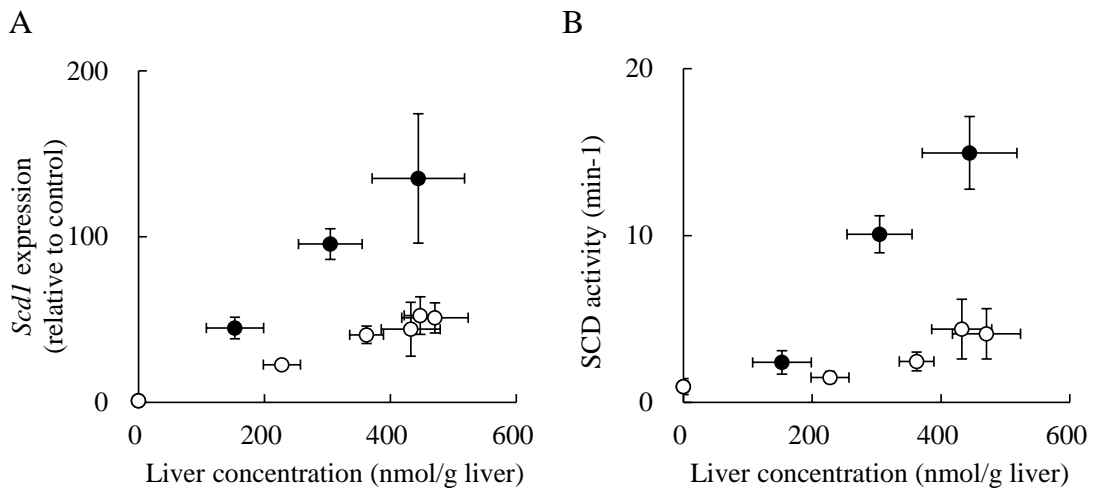
次に、PFOA とクロフィブリン酸の MUFA 合成系への影響を比較した。MUFA 合成系の律速酵素である SCD は PPAR $\alpha$  により活性化されることが知られているが、他にも多くの影響因子が存在する。そこで、SCD が PPAR $\alpha$  以外の因子で活性化されていないかを明らかにするために、SCD1 の遺伝子発現量と ACOT1 の遺伝子発現量の相関を調べ、Fig. 1-3 に示した。PFOA およびクロフィブリン酸投与ラット肝における *Acot1* の発現量と *Scd1* の発現量との間に良好な相関が認められた ( $r^2 = 0.9368$ )。このことから、PFOA およびクロフィブリン酸投与ラット肝において、*Scd1* の発現量は PPAR $\alpha$  アゴニスト作用にのみ応じて増加することが明らかとなり、PPAR $\alpha$  アゴニスト作用が大きいほど、SCD 誘導作用が大きいことが予想される。

そこで、PFOA とクロフィブリン酸の SCD への影響を遺伝子レベルおよび活性レベルで比較した結果を Fig. 1-4 に示した。PFOA およびクロフィブリン酸の肝臓中濃度が高くなるにつれて *Scd1* の発現量が増加し、活性レベルでも同様の結果が認められた。しかし、PPAR $\alpha$  アゴニスト作用と同様に、PFOA の方がクロフィブリン酸に比べて SCD の誘導作用が小さいことが明らかとなった。





**Fig. 1-3.** Relationship between ACOT1 mRNA Levels and SCD1 mRNA Levels in the Liver of Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid. Relationship between ACOT1 mRNA levels and SCD1 mRNA levels,  $y = 0.1055x + 0.4619$  ( $r^2 = 0.9926$ ). Association with hepatic clofibric acid concentrations and hepatic mRNA encoding ACOT1 levels,  $y = 0.0662x + 1.5119$  ( $r^2 = 0.9368$ )

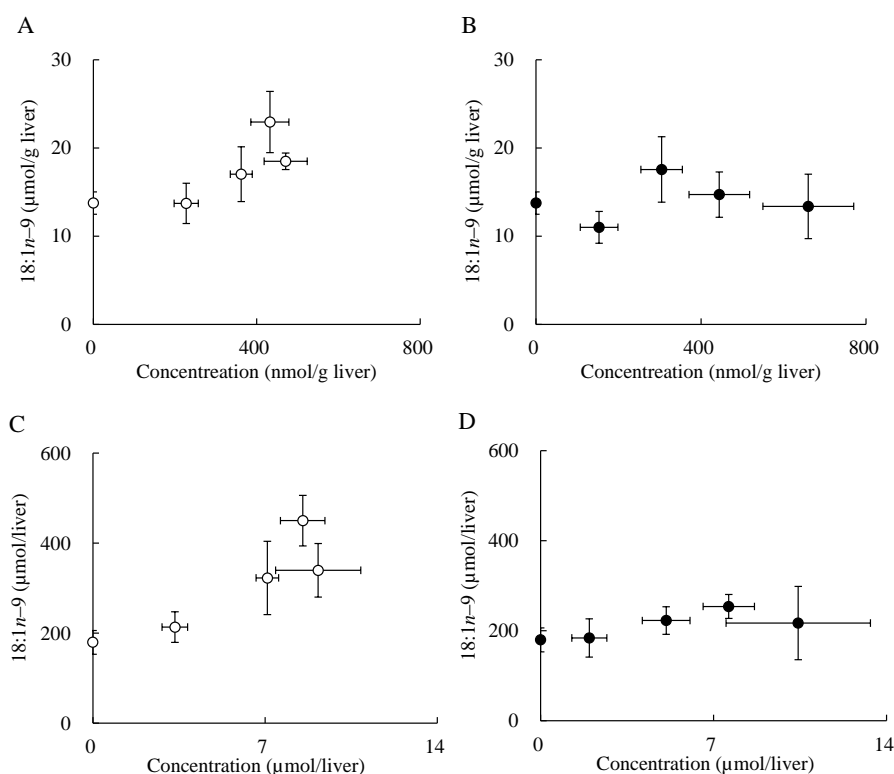


**Fig. 1-4.** Relationship between Concentrations of PFOA or Clofibric Acid and SCD1 mRNA Levels (A) or SCD Activity (B) in the Liver of Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25 or 0.375% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid.

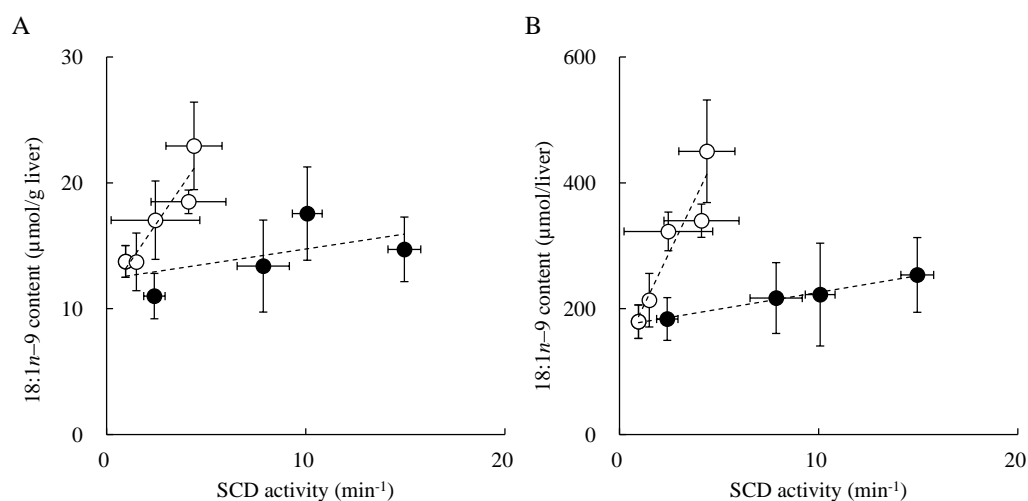
### 第3節 肝 18:1*n*-9 量への影響の比較

PFOA とクロフィブリン酸の SCD 誘導作用に差異が認められたため、肝臓における MUFA 量、特に 18:1*n*-9 量にも違いがあることが考えられる。そこで、肝臓における 18:1*n*-9 量を測定し、PFOA およびクロフィブリン酸の肝臓中濃度との相関を Fig. 1-5 に示した。PFOA の肝臓中濃度が高くなるにつれて 18:1*n*-9 量の増加が認められたが、クロフィブリン酸に関しては、肝臓中濃度が高くなっても 18:1*n*-9 量に変化は認められなかった。このことは、SCD の誘導作用から予想される結果と異なる。

そこで、PFOA およびクロフィブリン酸の投与ラット肝における SCD 活性と 18:1*n*-9 量との間の相関を調べ、Fig. 1-6 に示した。SCD 活性の亢進にともなう 18:1*n*-9 量の増加が認められたが、PFOA 群とクロフィブリン酸群の相関を比較すると、SCD 活性の増加にともなう 18:1*n*-9 量の増加作用は PFOA の方が大きかった。肝臓あたりの 18:1*n*-9 量を縦軸にとった相関の傾きは、クロフィブリン酸が 5.32 であったのに対し、PFOA は 10 倍以上大きい 65.72 であった。従来、肝臓における 18:1*n*-9 量は SCD をはじめとする MUFA 合成系により制御されると考えられていたが、SCD の誘導作用が小さい PFOA の方が 18:1*n*-9 量をより増加させることが明らかになったため、18:1*n*-9 量の調節に寄与する他の因子が存在することが考えられる。



**Fig. 1-5.** Relationship Between Concentrations of PFOA or Clofibric Acid and Levels of 18:1*n*-9 in the Livers of Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5% (w/w) for 7 days. Concentration of PFOA vs 18:1*n*-9 levels per gram liver (A) or 18:1*n*-9 levels per liver (C). Concentration of Clofibric acid vs 18:1*n*-9 levels per gram liver (B) or 18:1*n*-9 levels per liver (D). Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid.



**Fig. 1-6.** Relationship between SCD activity and Levels of 18:1*n*-9 in the Liver of PFOA-Treated Rats and Clofibric Acid-Treated Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.125, 0.25, 0.375 or 0.5% (w/w) for 7 days. (A) SCD activity vs 18:1*n*-9 levels per gram liver. (B) SCD activity vs 18:1*n*-9 levels per liver. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\circ$ , PFOA;  $\bullet$ , Clofibric acid. Relationship between SCD activity in the liver and levels of 18:1*n*-9 content ( $\mu\text{mol/g liver}$ ) of PFOA-treated rats,  $y = 2.3110x + 10.9918$  ( $r^2 = 0.8591$ ). Relationship between SCD activity in the liver and levels of 18:1*n*-9 content ( $\mu\text{mol/g liver}$ ) of clofibric acid-treated rats  $y = 0.2386x + 12.3540$  ( $r^2 = 0.3309$ ). Relationship between SCD activity in the liver and levels of 18:1*n*-9 content ( $\mu\text{mol/liver}$ ) of PFOA-treated rats,  $y = 65.7224x + 125.0071$  ( $r^2 = 0.8729$ ). Relationship between SCD activity in the liver and levels of 18:1*n*-9 content ( $\mu\text{mol/liver}$ ) of clofibric acid-treated rats,  $y = 5.3208x + 172.6878$  ( $r^2 = 0.9923$ ).

#### 第4節 肝 18:1n-9 代謝に差異が生じるメカニズムの検証

これまでの結果より、PFOA はクロフィブリン酸よりも SCD 誘導作用が小さいが、両者は肝 18:1n-9 量を同程度増加させることが明らかとなった。18:1n-9 の代謝の中で、合成以外の要因に対して両者が異なる影響を及ぼしていることが考えられる。PFOA とクロフィブリン酸の 18:1n-9 代謝への影響の差異を明らかにするために、代謝関連遺伝子の発現を網羅的に解析することにした。PFOA とクロフィブリン酸はともに PPAR  $\alpha$  応答遺伝子である *Acot1* と *Scd1* の発現量を用量依存的に増加させ、また両者には良好な相関が認められたため、*Acot1* の発現量で補正することで両者の比較が可能であると言える。したがって、PFOA 群とクロフィブリン酸群それぞれ 2 つの投与量を選択し、肝遺伝子発現量を比較した結果を Table 1-2 に示した。両者の遺伝子発現への影響には類似した点と異なる点が認められた (Table 1-2)。影響の差異を明確にするために、PFOA とクロフィブリン酸の遺伝子発現への影響をスコアで表し、スコアの差を色で表した結果を Table 1-3 に、さらにその結果を 18:1n-9 の代謝経路へと当てはめた結果を Fig. 1-7 に示した。代謝経路の中で TAG 合成関連遺伝子に関して赤色が濃い、すなわち PFOA 群の方が遺伝子発現量が高く、TAG 分解関連遺伝子に関してはあまり変化がない傾向が認められた。

**Table 1-2.** Effects of PFOA and Clofibrilic Acid on Gene Expression in the Liver of Rats

	Control	PFOA (% in diet)		Clofibrilic acid (% in diet)	
		0.005	0.01	0.25	0.5
(relative to control)					
Lipogenesis					
<i>Fas</i>	1.00 ± 0.21 <sup>x</sup>	0.95 ± 0.31	0.83 ± 0.33	1.46 ± 0.41 <sup>xy</sup>	1.71 ± 0.44 <sup>y</sup>
<i>Acc1</i>	1.00 ± 0.23 <sup>ax</sup>	1.28 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.45 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.13 <sup>y</sup>	1.42 ± 0.15 <sup>y</sup>
<i>G6pd</i>	1.00 ± 0.24 <sup>x</sup>	0.97 ± 0.25	1.38 ± 0.33	1.54 ± 0.31 <sup>y</sup>	1.56 ± 0.41 <sup>y</sup>
<i>Acly</i>	1.00 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.54 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.31	0.99 ± 0.29
<i>Me1</i>	1.00 ± 0.23 <sup>ax</sup>	4.69 ± 0.70 <sup>b</sup>	11.33 ± 3.32 <sup>c</sup>	12.85 ± 2.52 <sup>y</sup>	13.49 ± 4.67 <sup>y</sup>
<i>Gpat1</i>	1.00 ± 0.23 <sup>x</sup>	1.04 ± 0.22	1.18 ± 0.35	0.85 ± 0.15 <sup>xy</sup>	0.69 ± 0.22 <sup>y</sup>
<i>Gpat4</i>	1.00 ± 0.25 <sup>ax</sup>	1.64 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.47 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.30 <sup>x</sup>	0.59 ± 0.21 <sup>y</sup>
<i>Dgat1</i>	1.00 ± 0.12 <sup>ax</sup>	1.92 ± 0.20 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.78 <sup>c</sup>	2.19 ± 0.27 <sup>y</sup>	2.15 ± 0.53 <sup>y</sup>
<i>Dgat2</i>	1.00 ± 0.19 <sup>x</sup>	0.76 ± 0.23	0.92 ± 0.23	0.70 ± 0.14 <sup>y</sup>	0.30 ± 0.11 <sup>z</sup>
<i>Lipin1</i>	1.00 ± 0.45 <sup>ax</sup>	1.03 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.65 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.77 <sup>y</sup>	2.60 ± 0.90 <sup>y</sup>
<i>Lipin2</i>	1.00 ± 0.24 <sup>ax</sup>	1.40 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.36 <sup>y</sup>	1.68 ± 0.32 <sup>y</sup>
<i>Lipin3</i>	1.00 ± 0.15 <sup>ax</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.30 <sup>y</sup>	1.02 ± 0.28 <sup>x</sup>
Fatty acid modification					
<i>Scd1</i>	1.00 ± 0.48 <sup>ax</sup>	4.15 ± 0.57 <sup>b</sup>	6.13 ± 1.50 <sup>c</sup>	7.74 ± 1.01 <sup>y</sup>	9.73 ± 2.45 <sup>y</sup>
<i>Fads1</i>	1.00 ± 0.21 <sup>ax</sup>	1.60 ± 0.46 <sup>ab</sup>	2.11 ± 0.66 <sup>b</sup>	1.94 ± 0.58 <sup>y</sup>	1.64 ± 0.54 <sup>xy</sup>
<i>Fads2</i>	1.00 ± 0.24 <sup>ax</sup>	3.35 ± 0.64 <sup>b</sup>	4.36 ± 1.20 <sup>b</sup>	4.56 ± 0.77 <sup>y</sup>	3.75 ± 0.53 <sup>y</sup>
<i>Elovl5</i>	1.00 ± 0.32	0.99 ± 0.40	1.16 ± 0.35	1.16 ± 0.22	0.70 ± 0.13
Fatty acid trafficking					
<i>Fat/Cd36</i>	1.00 ± 0.36 <sup>ax</sup>	4.54 ± 0.42 <sup>b</sup>	6.30 ± 1.05 <sup>c</sup>	11.27 ± 2.04 <sup>y</sup>	12.19 ± 3.03 <sup>y</sup>
<i>Fatp2</i>	1.00 ± 0.23 <sup>ax</sup>	2.15 ± 0.63 <sup>b</sup>	3.63 ± 0.42 <sup>c</sup>	3.17 ± 0.75 <sup>y</sup>	3.96 ± 0.93 <sup>y</sup>
<i>Fatp4</i>	1.00 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.61 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.13	1.07 ± 0.21
<i>Fatp5</i>	1.00 ± 0.27	1.04 ± 0.43	1.02 ± 0.32	0.62 ± 0.25	0.54 ± 0.31
<i>Fabppm</i>	1.00 ± 0.20 <sup>ax</sup>	1.68 ± 0.46 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.36 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.71 <sup>y</sup>	1.90 ± 0.60 <sup>y</sup>
<i>Fabp1</i>	1.00 ± 0.12 <sup>ax</sup>	1.86 ± 0.63 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.52 <sup>b</sup>	4.17 ± 1.06 <sup>y</sup>	3.95 ± 1.13 <sup>y</sup>
<i>Acs11</i>	1.00 ± 0.17 <sup>ax</sup>	2.07 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.62 ± 0.48 <sup>b</sup>	2.37 ± 0.49 <sup>y</sup>	1.89 ± 0.54 <sup>y</sup>
<i>Acs13</i>	1.00 ± 0.28 <sup>ax</sup>	3.42 ± 0.55 <sup>b</sup>	4.94 ± 0.74 <sup>c</sup>	5.28 ± 1.56 <sup>y</sup>	5.01 ± 1.57 <sup>y</sup>
<i>Acs15</i>	1.00 ± 0.23 <sup>ax</sup>	0.96 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.24 <sup>xy</sup>	0.53 ± 0.25 <sup>y</sup>
Lipolysis					
<i>Atgl</i>	1.00 ± 0.16 <sup>ax</sup>	2.65 ± 0.68 <sup>b</sup>	3.91 ± 0.90 <sup>c</sup>	4.39 ± 1.72 <sup>y</sup>	5.36 ± 2.09 <sup>y</sup>
<i>Cgi-58</i>	1.00 ± 0.31 <sup>ax</sup>	1.49 ± 0.35 <sup>ab</sup>	1.73 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.44 <sup>xy</sup>	1.84 ± 0.61 <sup>y</sup>
<i>Cpt1a</i>	1.00 ± 0.30 <sup>ax</sup>	2.15 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.98 ± 0.75 <sup>b</sup>	2.98 ± 0.92 <sup>y</sup>	2.61 ± 0.71 <sup>y</sup>
<i>Mcad</i>	1.00 ± 0.21 <sup>ax</sup>	2.59 ± 0.70 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.76 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.64 <sup>y</sup>	2.78 ± 0.75 <sup>y</sup>
<i>Lcad</i>	1.00 ± 0.24 <sup>ax</sup>	3.03 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.84 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.57 <sup>y</sup>	2.73 ± 0.63 <sup>y</sup>
<i>Vlca</i>	1.00 ± 0.08 <sup>ax</sup>	2.47 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.02 ± 0.47 <sup>c</sup>	2.99 ± 0.47 <sup>y</sup>	2.67 ± 0.44 <sup>y</sup>
<i>Acox1</i>	1.00 ± 0.33 <sup>ax</sup>	11.30 ± 3.04 <sup>b</sup>	15.13 ± 2.65 <sup>c</sup>	18.35 ± 5.26 <sup>y</sup>	22.55 ± 6.94 <sup>y</sup>
<i>Ucp2</i>	1.00 ± 0.31 <sup>ax</sup>	2.01 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.91 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.33 <sup>y</sup>	1.85 ± 0.24 <sup>y</sup>
<i>Mcdc</i>	1.00 ± 0.09 <sup>ax</sup>	2.70 ± 0.32 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.40 <sup>b</sup>	3.16 ± 0.57 <sup>y</sup>	2.88 ± 0.53 <sup>y</sup>
<i>Pgc1a</i>	1.00 ± 0.37 <sup>ax</sup>	1.40 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.50 ± 1.27 <sup>b</sup>	3.52 ± 0.82 <sup>y</sup>	4.90 ± 1.21 <sup>z</sup>

(continued)

**Table 1-2** (continued)

Lipoprotein metabolism						
<i>Apo-C III</i>	1.00 ± 0.19 <sup>ax</sup>	0.70 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>y</sup>	0.23 ± 0.09 <sup>y</sup>	
<i>Mtp</i>	1.00 ± 0.26 <sup>ax</sup>	1.74 ± 0.22 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.73 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.38 <sup>y</sup>	1.60 ± 0.36 <sup>y</sup>	
<i>Lpl</i>	1.00 ± 0.26 <sup>ax</sup>	2.06 ± 0.89 <sup>ab</sup>	2.73 ± 0.81 <sup>b</sup>	3.10 ± 1.08 <sup>y</sup>	5.25 ± 1.63 <sup>z</sup>	
<i>Apo-A I</i>	1.00 ± 0.22 <sup>ax</sup>	0.50 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.17 <sup>y</sup>	0.24 ± 0.13 <sup>z</sup>	
<i>Abca1</i>	1.00 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.17	1.26 ± 0.27	
Nuclear transcription factor						
<i>Srebp-1c</i>	1.00 ± 0.32 <sup>x</sup>	1.37 ± 0.40	1.22 ± 0.45	1.70 ± 0.35 <sup>y</sup>	2.19 ± 0.42 <sup>y</sup>	
<i>Chrebp</i>	1.00 ± 0.22 <sup>ax</sup>	1.54 ± 0.42 <sup>ab</sup>	2.02 ± 0.49 <sup>b</sup>	2.08 ± 0.50 <sup>y</sup>	2.42 ± 0.53 <sup>y</sup>	
<i>Ppar α</i>	1.00 ± 0.22 <sup>ax</sup>	1.58 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.43 <sup>c</sup>	1.83 ± 0.42 <sup>y</sup>	2.24 ± 0.58 <sup>y</sup>	
<i>Ppar δ</i>	1.00 ± 0.19	1.11 ± 0.18	1.15 ± 0.26	0.97 ± 0.13	0.77 ± 0.18	
<i>Creb3l3</i>	1.00 ± 0.28 <sup>xy</sup>	0.85 ± 0.23	0.87 ± 0.20	0.82 ± 0.15 <sup>x</sup>	1.30 ± 0.32 <sup>y</sup>	
<i>Foxo1</i>	1.00 ± 0.34 <sup>ax</sup>	2.20 ± 0.43 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.58 <sup>b</sup>	1.65 ± 0.20 <sup>y</sup>	1.82 ± 0.29 <sup>y</sup>	
<i>Ampk</i>	1.00 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.26	1.01 ± 0.29	
<i>Lxra</i>	1.00 ± 0.24 <sup>ax</sup>	1.39 ± 0.24 <sup>ab</sup>	1.54 ± 0.36 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.45 <sup>xy</sup>	1.72 ± 0.47 <sup>y</sup>	
<i>Hnf4a</i>	1.00 ± 0.20 <sup>ax</sup>	2.74 ± 0.57 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.81 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.59 <sup>y</sup>	2.75 ± 0.51 <sup>y</sup>	
<i>Stat1</i>	1.00 ± 0.15	0.82 ± 0.03	0.90 ± 0.24	0.87 ± 0.21	1.09 ± 0.19	
ER stress						
<i>Grp78</i>	1.00 ± 0.24	0.88 ± 0.11	1.19 ± 0.30	1.00 ± 0.31	0.90 ± 0.14	
<i>Chop</i>	1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.14 ± 0.99 <sup>b</sup>	1.01 ± 0.19	0.89 ± 0.18	
<i>Xbp1</i>	1.00 ± 0.22	0.83 ± 0.23	0.77 ± 0.22	1.34 ± 0.30	0.98 ± 0.40	
Glucose metabolism						
<i>Gk</i>	1.00 ± 0.33 <sup>ax</sup>	0.75 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.44 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.10 <sup>y</sup>	0.23 ± 0.12 <sup>y</sup>	
<i>Lpk</i>	1.00 ± 0.32 <sup>x</sup>	1.63 ± 0.57	1.65 ± 0.47	0.33 ± 0.11 <sup>y</sup>	0.30 ± 0.12 <sup>y</sup>	
<i>G6pase</i>	1.00 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.13	0.96 ± 0.21	
<i>Pepck</i>	1.00 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.40 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.56 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.22	0.90 ± 0.42	
<i>Gls</i>	1.00 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.23	0.68 ± 0.14	
<i>Glut2</i>	1.00 ± 0.30 <sup>ax</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.25 <sup>y</sup>	0.50 ± 0.24 <sup>y</sup>	
<i>Irs1</i>	1.00 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.33 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.39	0.87 ± 0.29	
<i>Irs2</i>	1.00 ± 0.26 <sup>ax</sup>	2.18 ± 0.77 <sup>b</sup>	2.56 ± 0.82 <sup>b</sup>	2.47 ± 0.65 <sup>y</sup>	3.04 ± 0.77 <sup>y</sup>	
Others						
<i>Acot1</i>	1.00 ± 0.18 <sup>ax</sup>	40.80 ± 5.20 <sup>b</sup>	51.05 ± 9.12 <sup>c</sup>	92.21 ± 8.82 <sup>y</sup>	125.31 ± 15.16 <sup>z</sup>	
<i>Cyp4a10</i>	1.00 ± 0.06 <sup>ax</sup>	14.78 ± 1.12 <sup>b</sup>	18.01 ± 4.13 <sup>b</sup>	24.96 ± 4.47 <sup>y</sup>	33.11 ± 8.90 <sup>y</sup>	
<i>Cyp7a1</i>	1.00 ± 0.27	0.69 ± 0.35	0.84 ± 0.38	1.26 ± 0.25	0.96 ± 0.29	
<i>Fgf21</i>	1.00 ± 0.31 <sup>ax</sup>	2.24 ± 0.75 <sup>a</sup>	35.08 ± 6.69 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.46 <sup>x</sup>	2.37 ± 0.43 <sup>y</sup>	

Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.005 or 0.01% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibrac acid at 0.25 or 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. (n = 4-6). <sup>a-c</sup>Significant difference without a common superscript ( $P < 0.05$ ). <sup>x-y</sup>Significant difference without a common superscript ( $P < 0.05$ ). In the absence of superscript, the means are not statistically significant.

**Table 1-3.** Difference of the Effects on Hepatic Gene Expression of 18:1n-9 Metabolism between PFOA and Clofibril Acid-Treated Rats.

A. Lipogenesis

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Fas</i>	0	+1	-1	
<i>Acc1</i>	+1	0	+1	
<i>G6pd</i>	0	0	0	
<i>Aclv</i>	+1	0	+1	
<i>Me1</i>	+1	+1	0	
<i>Gpat1</i>	0	0	0	
<i>Gpat4</i>	+1	-1	+2	
<i>Dgat1</i>	+1	+1	0	
<i>Dgat2</i>	0	-1	+1	
<i>Lipin1</i>	+1	+1	0	
<i>Lipin2</i>	+1	+1	0	
<i>Lipin3</i>	0	0	0	

B. Fatty acid modification

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Scd1</i>	+1	+1	0	
<i>Fads1</i>	+1	+1	0	
<i>Fads2</i>	+1	+1	0	
<i>Elovl5</i>	0	0	0	

C. Fatty acid trafficking

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Fat/Cd36</i>	+1	+1	0	
<i>Fatp2</i>	+1	+1	0	
<i>Fatp4</i>	+1	0	+1	
<i>Fatp5</i>	0	-1	+1	
<i>Fabppm</i>	+1	+1	0	
<i>Fabp1</i>	+1	+1	0	
<i>Acs11</i>	+1	+1	0	
<i>Acs13</i>	+1	+1	0	
<i>Acs15</i>	+1	-1	+2	

D. Lipolysis

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Atgl</i>	+1	+1	0	
<i>Cgi-58</i>	+1	+1	0	
<i>Cpt1a</i>	+1	+1	0	
<i>Mcad</i>	+1	+1	0	
<i>Lcad</i>	+1	+1	0	
<i>Vlcad</i>	+1	+1	0	
<i>Acox1</i>	+1	+1	0	
<i>Ucp2</i>	+1	+1	0	
<i>Mcdc</i>	+1	+1	0	
<i>Pgc1a</i>	+1	+1	0	

E. Lipoprotein metabolism

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Apo-C III</i>	-1	-1	0	
<i>Mtp</i>	+1	+1	0	
<i>Lpl</i>	+1	+1	0	
<i>Apo-A I</i>	-1	-1	0	
<i>Abca1</i>	-1	0	-1	

F. Glucose metabolism

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Gk</i>	+1	-1	+2	
<i>Lpk</i>	+1	-1	+2	
<i>G6pase</i>	-1	0	-1	
<i>Penck</i>	+1	0	+1	
<i>Gls</i>	-1	-1	0	
<i>Glut2</i>	-1	-1	0	
<i>Irs1</i>	0	0	0	
<i>Irs2</i>	+1	+1	0	

G. Nuclear transcription factor

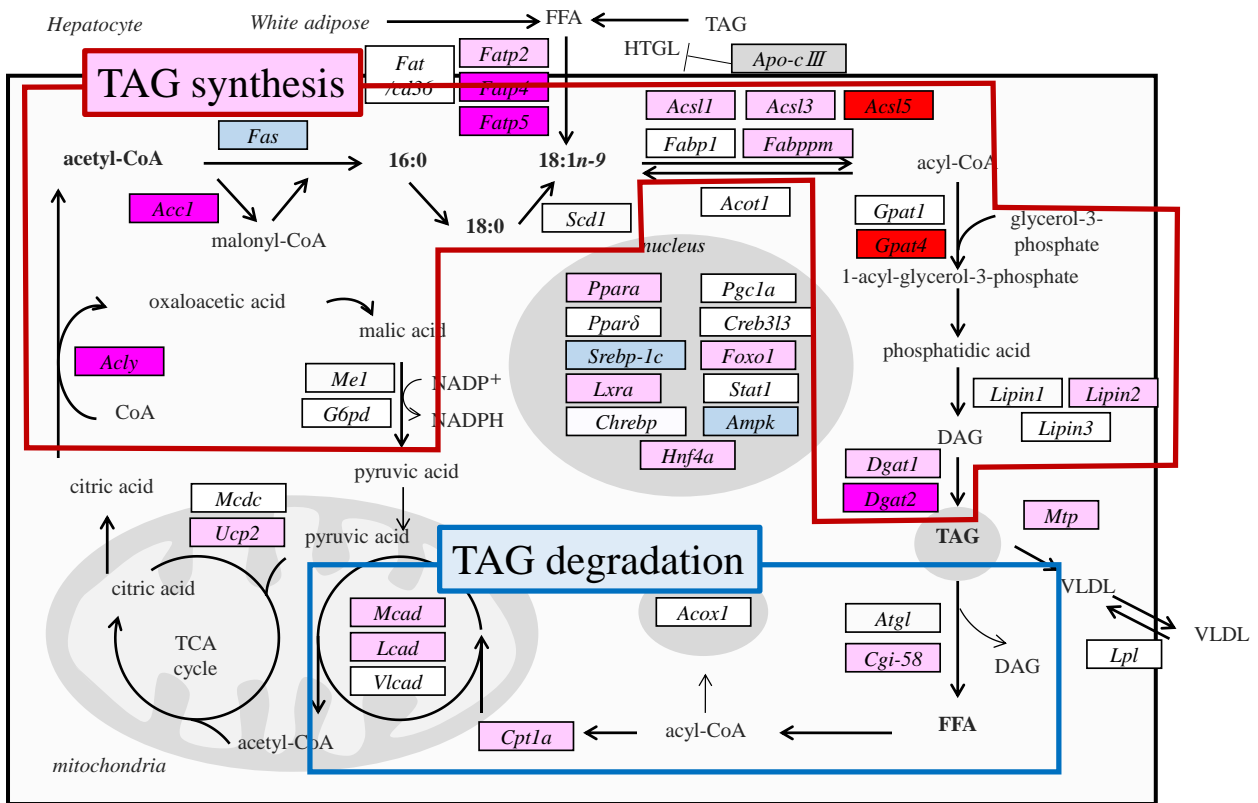
Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Srebp-1c</i>	0	+1	-1	
<i>Chrebp</i>	+1	+1	0	
<i>Ppara</i>	+1	+1	0	
<i>Pparδ</i>	0	0	0	
<i>Creb313</i>	0	0	0	
<i>Foxo1</i>	+1	+1	0	
<i>Ampk</i>	-1	0	-1	
<i>Lxra</i>	+1	+1	0	
<i>Hnf4a</i>	+1	+1	0	
<i>Stat1</i>	0	0	0	

H. ER stress

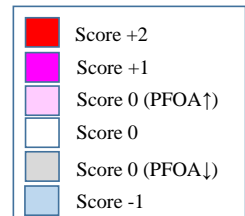
Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Grp78</i>	0	0	0	
<i>Chop</i>	+1	0	+1	
<i>Xbp1</i>	0	0	0	

I. Others

Gene	PFOA	Clof	Score	Color
<i>Acot1</i>	+1	+1	0	
<i>Cyp4a10</i>	+1	+1	0	
<i>Cyp7a1</i>	0	0	0	
<i>Fgf21</i>	+1	+1	0	



**Fig. 1-7.** Difference of the Effect on 18:1n-9 Metabolism between PFOA and Clofibrac Acid-Treated rats.





## 第5節 小活

PFOA の生体作用に関する従来の見解は毒性評価に焦点を当てたものが多く、肝臓における脂肪酸代謝に関しては報告が少ない。一方で、PFOA は脂肪酸代謝において重要な枠割を担う PPAR $\alpha$  を活性化させることが知られており、脂肪酸代謝に対して影響を及ぼすことが予想される。PFOA と同じく PPAR $\alpha$  のアゴニスト作用をもつクロフィブリン酸は、肝臓において脂肪酸代謝に影響することが知られており、MUFA 合成系を亢進することが知られている [39, 40, 48, 56, 59, 62, 98]。クロフィブリン酸は MUFA 合成の律速酵素である SCD を活性化することで 18:1 $n$ -9 量を増加させるが、PFOA には同様の作用があるのかは不明である。そこで、同じく PPAR $\alpha$  アゴニストであるクロフィブリン酸を比較対象とし、PFOA が MUFA 代謝においてクロフィブリン酸とどのように異なっているかを明らかにすることで、MUFA 代謝に対する PFOA の影響の解明を試みた

PFOA とクロフィブリン酸はともに、*Acot1* 発現量、SCD の遺伝子発現量および活性を上昇させたが、PFOA の方が誘導作用は小さかった (Fig. 1-2, 1-4)。PFOA の SCD 誘導作用が小さいため、18:1 $n$ -9 量の増加作用も小さいことが予想されたが、肝臓における 18:1 $n$ -9 量の増加作用は PFOA の方が大きかった (Fig. 1-5)。SCD 活性の亢進にともなう 18:1 $n$ -9 量の増加作用に関しても PFOA の方が大きかったことから (Fig. 1-6)、PFOA 投与ラット肝では、SCD をはじめとする MUFA 合成系以外の要素が 18:1 $n$ -9 量の調節に関与していることが考えられる。肝臓における脂肪酸量の調節因子としては、脂肪酸合成、脂肪酸分解、脂肪酸の脂質への分配、脂肪酸の肝外への分泌および肝外からの流入があげられる。これらの因子の中で、クロフィブリン酸と PFOA による調節に相違が生じている場合、‘PFOA の方が SCD の誘導作用が小さいにも関わらず、18:1 $n$ -9 量の増加作用が大きい’という矛盾を説明できることが予想される。PFOA 群とクロフィブリン酸群において、18:1 $n$ -9 代謝関連遺伝子の発現を網羅的に解析した結果を評価したところ、PFOA は TAG 合成関連遺伝子の発現を上昇させることが明らかとなった。すなわち、PFOA はクロフィブリン酸と比較して 18:1 $n$ -9 の合成能は低いものの、18:1 $n$ -9 を TAG へと取り込んで貯蔵する作用が強いため、結果として 18:1 $n$ -9 量に差異は生じなかった可能性が示唆された。

## 第2章 炭素鎖長の異なる PFCA の肝臓トリアシルグリセロール代謝に対する影響

第1章において、PFOAはPPAR $\alpha$ アゴニスト作用を有し、ラット肝においてMUFA合成系とTAG合成系をともに亢進することによって、18:1*n*-9をTAGに貯蔵するため、脂肪酸の $\beta$ 酸化が亢進するにもかかわらず18:1*n*-9含量が増加することを示唆した。一方、クロフィブリン酸はPFOAと同様にPPAR $\alpha$ を活性化し、MUFA合成および脂肪酸 $\beta$ 酸化を促進するもののTAG合成促進作用をもたないため、18:1*n*-9含量が減少するものと考えられた。PFCAは炭素鎖長が長いほど生体への残留性が高くなる傾向があることから、炭素鎖長の異なるPFCAでその毒性が異なる原因は主として残留性に起因するものであり、質的には同じであるものと考えられてきた。PFOAよりも炭素鎖長の長いペルフルオロノナン酸(PFNA)やPFDAに肝TAG蓄積作用が報告されているものの[46]、異なる炭素鎖長のPFCAを系統的に比較した報告はない。そこで本章では、PFOAよりも炭素鎖長の長いPFDAおよびPFDoAに着目し、PFOAと比較することとした。予備的に各々のPFCAを0.01%の割合で飼料に添加し、肝臓の肝総脂質中の脂肪酸量を検討した(Table 2-1)。MUFAに注目すると、対照群と比べてPFOA群では18:1*n*-9含量の増加が認められ、また、PFDA群およびPFDoA群ではPFOA群よりも著しい増加が認められた。この結果は、PFCAでも炭素鎖長が異なると肝脂質に対する影響が異なることを示唆している。実際、肝TAG蓄積作用は炭素鎖長の長いPFCAにおいて報告が多い[46]。しかしながら、それが肝蓄積性の違い、すなわち量に起因するのか、それとも質的な違いによるものなのかは明らかになっていない。そこで本章では、PFOA、PFDAおよびPFDoAの肝TAG代謝に対する影響を系統的に比較することを目的とした。

**Table 2-1.** Effects of PFOA, PFDA and PFDoA on Fatty Acid Profile of Hepatic Lipids

Fatty acids	Control	PFOA	PFDA	PFDoA
	(mol %)			
16:0	27.65 ± 3.40	26.67 ± 3.08	28.97 ± 2.60	28.33 ± 2.53
16:1 $n$ -7	1.81 ± 0.56 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.52 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.25 <sup>ab</sup>
18:0	16.50 ± 2.13 <sup>ab</sup>	17.80 ± 0.71 <sup>a</sup>	13.42 ± 0.79 <sup>b</sup>	12.98 ± 3.37 <sup>b</sup>
18:1 $n$ -7	4.04 ± 0.63 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.69 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.47 <sup>b</sup>
18:1 $n$ -9	10.23 ± 1.61 <sup>a</sup>	14.69 ± 1.80 <sup>b</sup>	19.17 ± 2.10 <sup>c</sup>	16.21 ± 3.46 <sup>bc</sup>
18:2 $n$ -6	21.39 ± 1.19 <sup>a</sup>	13.24 ± 0.78 <sup>b</sup>	16.46 ± 1.35 <sup>c</sup>	19.73 ± 2.55 <sup>a</sup>
18:3 $n$ -3	0.39 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.33 ± 0.10 <sup>ac</sup>
20:3 $n$ -9	0.11 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.23 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>b</sup>
20:3 $n$ -6	0.68 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.35 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.39 <sup>b</sup>
20:4 $n$ -6	13.08 ± 3.19 <sup>ab</sup>	17.76 ± 1.65 <sup>a</sup>	11.33 ± 1.07 <sup>b</sup>	11.84 ± 4.27 <sup>b</sup>
20:5 $n$ -3	0.66 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.14 <sup>ab</sup>
22:5 $n$ -3	0.90 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.68 ± 0.12 <sup>ab</sup>
22:6 $n$ -3	2.56 ± 0.48 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.31 <sup>ab</sup>	1.73 ± 0.12 <sup>b</sup>	2.47 ± 0.26 <sup>ab</sup>
Total ( $\mu$ mol/g liver)	123.97 ± 14.24	135.32 ± 17.39	133.41 ± 16.36	128.86 ± 17.99

Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.01% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (N = 4-6). Means in the same row without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 第1節 一般評価

PFOA、PFDA および PFDoA を異なる割合で試料に添加して1週間自由摂食させ、その影響を比較した。高用量の PFDA (0.01%および0.02%) および PFDoA (0.02%) 群において、摂食量の低下、体重の減少が認められた (Table 2-2)。いずれの PFCA にも用量依存的な肝肥大作用が認められ、その作用は PFOA で最も強く、PFDA と PFDoA の作用は同程度の強さであった (Table 2-2)。一方、精巣周囲脂肪組織に関しては高用量 (0.02%) の PFDA 群のみで相対重量比の増加が認められた。

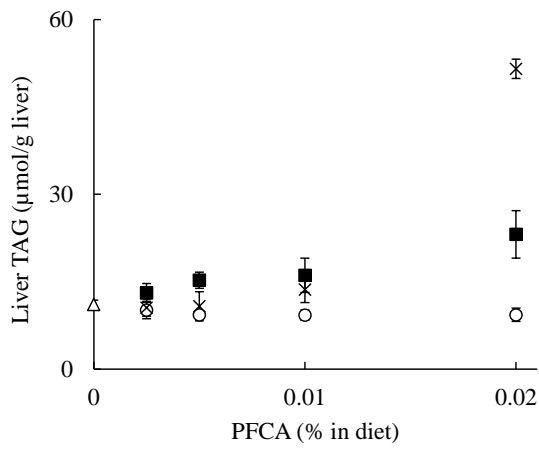
**Table 2-2.** Body weight, Food Intake and Tissue Weight of PFCA-Treated Rats

	PFCA (% in diet)				
	0	0.0025	0.005	0.01	0.02
Body weight (g)					
PFOA	342.72 ± 8.94 <sup>ab</sup>	356.60 ± 9.10 <sup>ac</sup>	359.00 ± 10.50 <sup>a</sup>	328.15 ± 19.71 <sup>b</sup>	333.50 ± 12.80 <sup>bc</sup>
PFDA	342.72 ± 8.94 <sup>a</sup>	347.13 ± 7.62 <sup>a</sup>	332.08 ± 8.97 <sup>a</sup>	309.60 ± 3.80 <sup>b</sup>	248.13 ± 9.87 <sup>c</sup>
PFDoA	342.72 ± 8.94 <sup>a</sup>	342.55 ± 11.53 <sup>a</sup>	343.72 ± 9.20 <sup>a</sup>	344.68 ± 5.69 <sup>a</sup>	303.63 ± 9.37 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)					
PFOA	24.70 ± 1.11	ND	ND	22.62 ± 1.08	ND
PFDA	24.70 ± 1.11 <sup>a</sup>	23.15 ± 0.48 <sup>a</sup>	21.60 ± 0.44 <sup>a</sup>	19.81 ± 1.16 <sup>a</sup>	11.89 ± 2.62 <sup>b</sup>
PFDoA	24.70 ± 1.11 <sup>a</sup>	20.90 ± 1.07 <sup>bc</sup>	21.23 ± 0.29 <sup>bc</sup>	22.86 ± 1.61 <sup>ac</sup>	18.09 ± 1.33 <sup>b</sup>
Liver weight (% of body weight)					
PFOA	3.65 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.39 ± 0.14 <sup>b</sup>	5.09 ± 0.19 <sup>c</sup>	5.46 ± 0.58 <sup>c</sup>	5.58 ± 0.43 <sup>c</sup>
PFDA	3.65 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.23 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.66 ± 0.26 <sup>c</sup>	4.61 ± 0.25 <sup>bc</sup>	4.22 ± 0.19 <sup>b</sup>
PFDoA	3.65 ± 0.17 <sup>ab</sup>	3.57 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.22 <sup>ab</sup>	4.04 ± 0.11 <sup>ab</sup>	4.06 ± 0.32 <sup>b</sup>
Epididymal fat weight (%)					
PFOA	1.12 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.93 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.85 ± 0.17 <sup>b</sup>
PFDA	1.12 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.25 <sup>b</sup>
PFDoA	1.12 ± 0.14	1.03 ± 0.03	1.11 ± 0.06	1.02 ± 0.13	1.06 ± 0.18

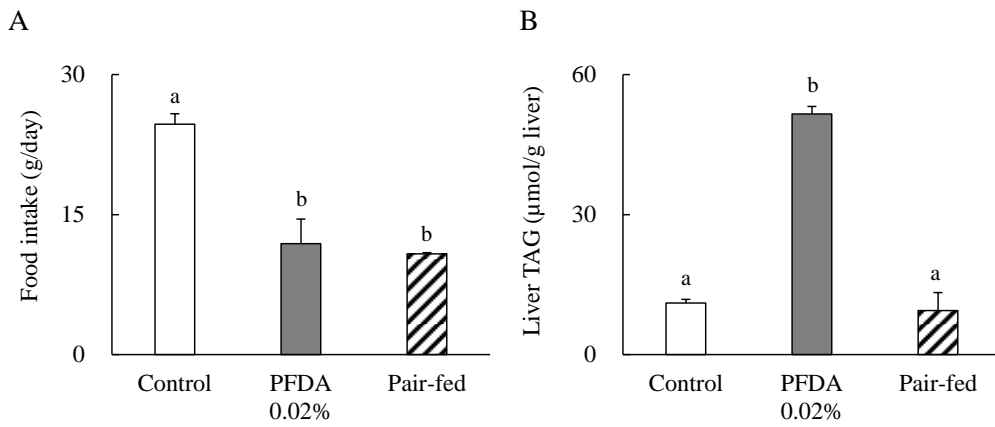
Rats were fed a standar diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. ND, not determined. Values represent the mean ± S.D. (n = 4-6). Means without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 第2節 炭素鎖長が異なる PFCA の肝 TAG 蓄積作用

PFOA、PFDA および PFDoA の肝 TAG 含量への影響を Fig. 2-1 に示した。PFOA は肝 TAG 含量にほとんど影響をおよぼさなかったが、0.02%の PFDA および PFDoA は肝 TAG 含量を顕著に増加させた (Fig. 2-1)。さらに、PFDA と PFDoA を比較すると、肝 TAG 蓄積作用は PFDA の方がはるかに大きいことが認められた。高用量 (0.01%および 0.02%) の PFDA には摂食量の低下作用が認められたため (Table 2-2)、摂食量の低下が肝 TAG 含量の増加を惹起している可能性が考えられる。そこで、摂食量を PFDA 0.02%群とそろえた pair-fed 群について肝 TAG 含量を調べたところ、対照群と同程度であった (Fig. 2-2)。したがって、PFDA による肝 TAG 蓄積は摂食量の低下に起因するものではなく、PFDA 自身の影響であることが明らかとなった。



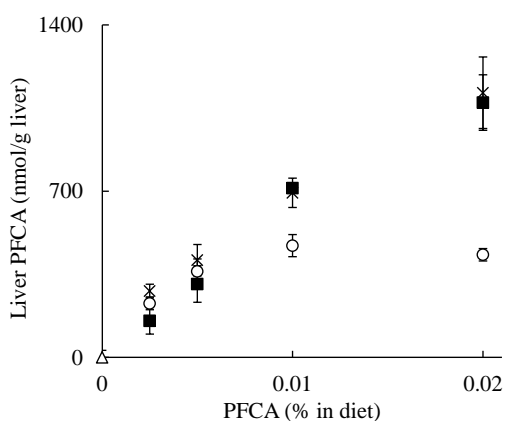
**Fig. 2-1.** Hepatic TAG Content in PFCA-Treated Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\Delta$ , Control;  $\circ$ , PFOA;  $\times$ , PFDA;  $\blacksquare$ , PFDoA.



**Fig. 2-2.** Effects of Food Intake on Hepatic TAG Content in Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFDA at 0.02 (w/w) for 7 day, or standard diet which volume were adjusted to PFDA treated rats for 7 day. (A) Food intake (g/day) of control rats, PFDA-treated rats or Pair-feeding rats for PFDA-treated rats. (B) Hepatic TAG content of control rats, PFDA-treated rats or Pair-feeding rats for PFDA-treated rats. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n =4- 6). <sup>a, b</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ )

### 第3節 肝臓における PFCA の蓄積

PFOA 群、PFDA 群および PFDoA 群の肝臓中における PFCA 量を Fig. 2-3 に示した。いずれの群でも用量依存的な PFCA の蓄積が認められた。PFOA 群に関しては 0.01%以上の群において蓄積量の飽和が認められた。PFOA 群とは異なり、PFDA 群および PFDoA 群では 0.02%まで、用量依存的に PFCA が蓄積していた。PFDA と PFDoA を比べると有意な差は認められなかった。

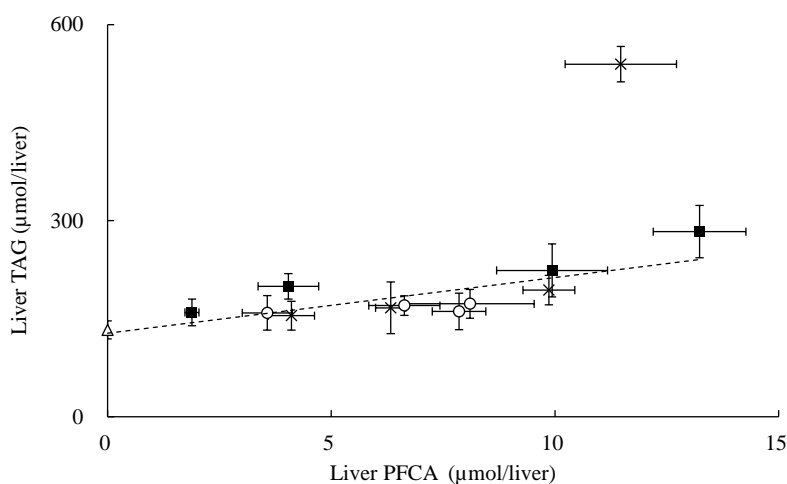


**Fig. 2-3.** Hepatic PFCA Concentration in PFCA-Treated Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\triangle$ , Control;  $\circ$ , PFOA;  $\times$ , PFDA;  $\blacksquare$ , PFDoA.

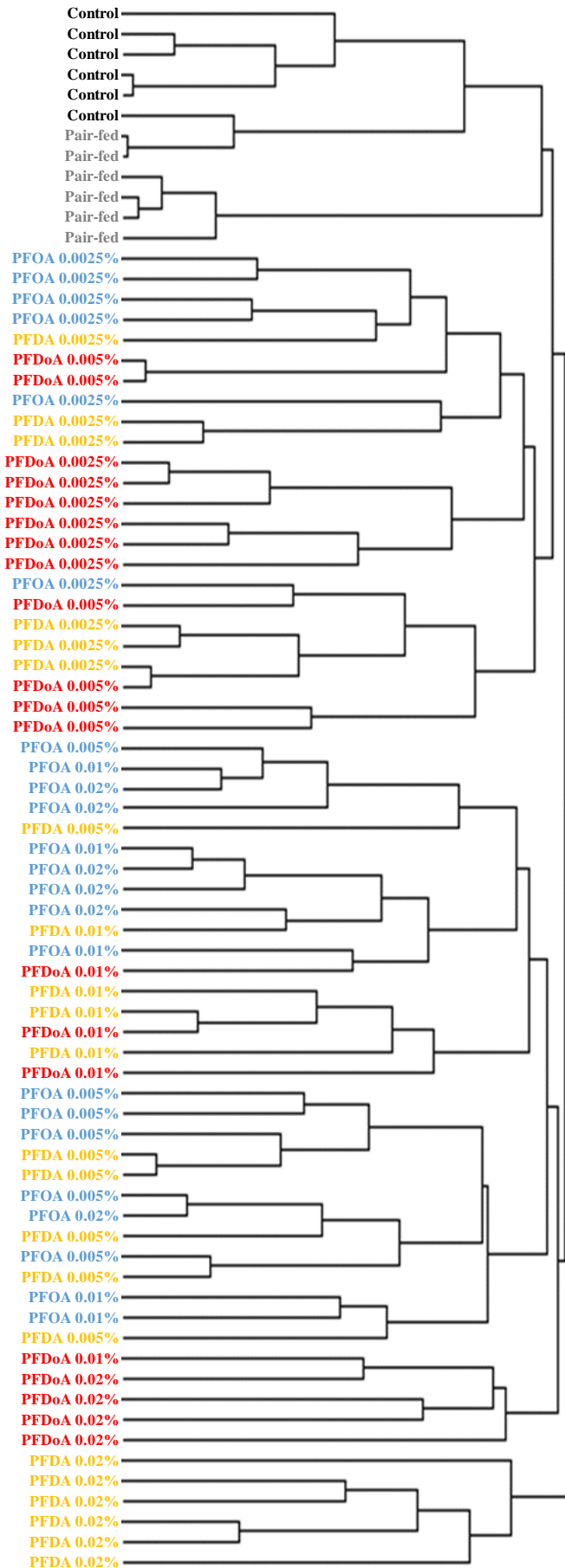


#### 第4節 PFCA による TAG 蓄積作用の比較

PFDA 群および PFDoA 群では、用量依存的に肝 TAG 量の増加、さらに肝 PFCA 蓄積量の増加が認められたので (Fig. 2-2、2-3)、肝 TAG 含量と肝 PFCA 量の相関を調べた (Fig. 2-4)。PFDA 0.02%群を除く PFOA 群、PFDA 群および PFDoA 群に関しては、肝 PFCA 量と肝 TAG 含量との間に良好な相関関係が認められた (Fig. 2-4)。そこで、PFDA と PFOA および PFDoA の性質の違いを明確にするために、肝 TAG 量と肝 PFCA 量を要因にしてクラスター解析を行った (Fig. 2-5)。PFDA 0.02%群のクラスターは残りのすべての群と異なるクラスターに属していることが明らかとなった (Fig. 2-5)。



**Fig. 2-4.** Relationship Between Concentrations of PFCA and Contents of TAG in the Liver of Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\triangle$ , Control;  $\circ$ , PFOA;  $\times$ , PFDA;  $\blacksquare$ , PFDoA. Relationship between hepatic concentrations of PFCA and hepatic contents of TAG except for PFDA 0.02% group,  $y = 8.5344x + 127.7596$  ( $r^2 = 0.6495$ ).



**Fig. 2-5.** Results of Cluster Analysis. Dendrograms of hierarchical clustering of hepatic contents of TAG and PFCA were calculated on the basis of the data from Fig. 2-4.

## 第5節 肝臓における TAG 代謝関連遺伝子の発現評価

肝臓における TAG の代謝経路図を Fig. 2-6 に示した。PFCA の炭素鎖長が異なると、TAG 代謝に対して異なる影響を与えることが示唆されたため、PFOA、PFDA および PFDoA 群の肝臓中における TAG 代謝関連遺伝子の発現量を調べ、その結果を Table 2-3 に示した。*Fas*, *Gpat1* および *Gpat4* の発現量はいずれの PFCA 投与群においても変化は認められなかった。一方、*Dgat2* の発現量はいずれの PFCA 投与群においても用量依存的に減少した。他の遺伝子 (*Acc1*, *Acly*, *Dgat1*, *Cpt1a*, *Atgl*, *Mtp* および *Fat/Cd36*) の発現量は用量依存的に増加した。PFCA の炭素鎖長の違いが遺伝子発現量に及ぼす影響の差を明確にするために、個々の遺伝子の mRNA 発現量を要因として、クラスター解析を行った。*Fas*, *Acc1*, *Acly*, *Gpat1*, *Gpat4*, *Dgat2*, *Cpt1a*, *Atgl*, *Mtp* および *Fat/Cd36* については大きく異なるクラスターを見出すことはできなかった。*Dgat1* について解析したところ、PFDA 0.02%群のクラスターは残りの群と異なるクラスターに属していることが明らかとなった (Fig. 2-7)。そこで、*Dgat1* の遺伝子発現量と肝 TAG 量との相関を調べたところ、良好な相関が認められた (Fig. 2-8)。

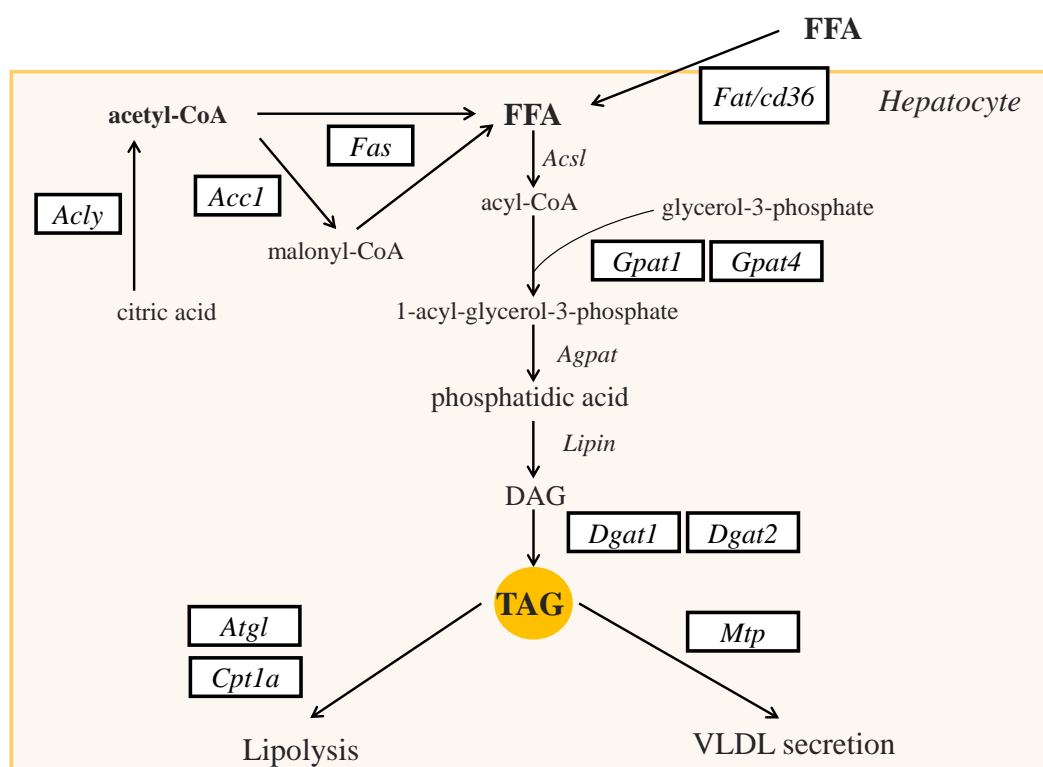


Fig. 2-6. mRNA Encoding Enzyme and Protein Associated with TAG Metabolism in Hepatocyte.

**Table 2-3.** Effects of PFOA, PFDA and PFDoA on Gene Expression in the Liver of PFCA-Treated Rats

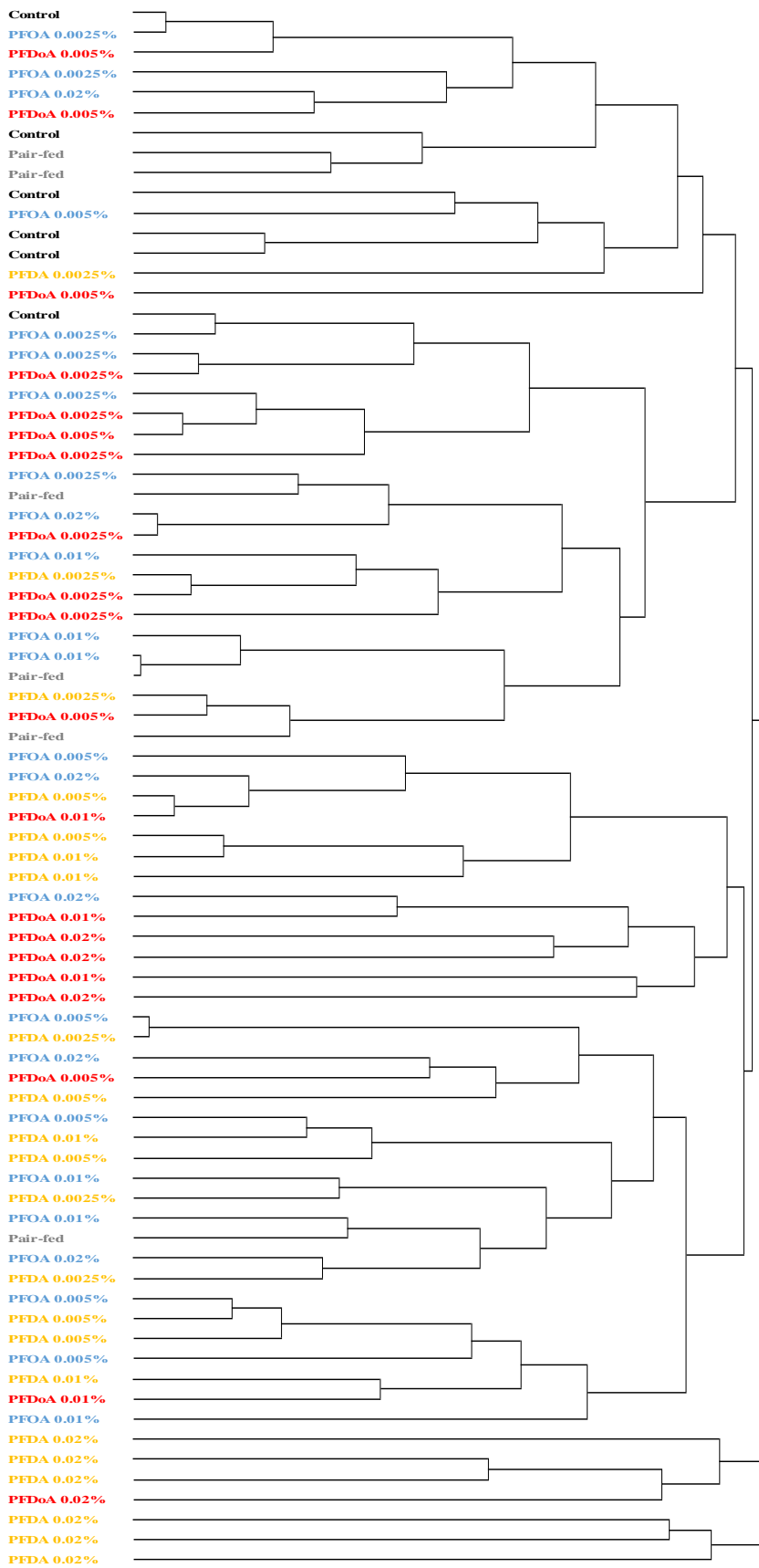
	PFCA (% in diet)				
	0	0.0025	0.005	0.01	0.02
	(relative to control)				
<b>Lipogenesis</b>					
<i>Fas</i>					
PFOA	1.00 ± 0.29	0.81 ± 0.23	0.95 ± 0.31	0.83 ± 0.33	1.19 ± 0.36
PFDA	1.00 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.35 <sup>ab</sup>	0.67 ± 0.21 <sup>ab</sup>	0.54 ± 0.20 <sup>ab</sup>	0.24 ± 0.15 <sup>b</sup>
PFDoA	1.00 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.82 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.14 <sup>b</sup>
<i>Acc1</i>					
PFOA	1.00 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.20 <sup>ac</sup>	1.91 ± 0.45 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.34 <sup>bc</sup>
PFDA	1.00 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.59 <sup>b</sup>
PFDoA	1.00 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.22 ± 0.64 <sup>b</sup>
<i>Acly</i>					
PFOA	1.00 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.34 <sup>ac</sup>	2.16 ± 0.54 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.38 <sup>bc</sup>
PFDA	1.00 ± 0.39	0.92 ± 0.31	1.08 ± 0.42	1.41 ± 0.18	0.93 ± 0.33
PFDoA	1.00 ± 0.39 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.24 ± 0.56 <sup>b</sup>
<i>Dgat1</i>					
PFOA	1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.08 <sup>ac</sup>	1.92 ± 0.20 <sup>bc</sup>	2.70 ± 0.78 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.52 <sup>a</sup>
PFDA	1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.18 <sup>a</sup>	5.78 ± 1.66 <sup>b</sup>
PFDoA	1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.41 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.95 ± 0.54 <sup>b</sup>
<i>Dgat2</i>					
PFOA	1.00 ± 0.22	0.67 ± 0.17	0.76 ± 0.23	0.92 ± 0.23	0.65 ± 0.17
PFDA	1.00 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.10 <sup>b</sup>
PFDoA	1.00 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.08 <sup>b</sup>
<i>Gpat1</i>					
PFOA	1.00 ± 0.36	0.68 ± 0.20	1.04 ± 0.22	1.18 ± 0.35	0.87 ± 0.25
PFDA	1.00 ± 0.36	0.64 ± 0.16	0.56 ± 0.15	0.59 ± 0.06	0.94 ± 0.31
PFDoA	1.00 ± 0.36	0.86 ± 0.36	0.66 ± 0.16	0.81 ± 0.19	0.93 ± 0.45
<i>Gpat4</i>					
PFOA	1.00 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.47 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.41 <sup>a</sup>
PFDA	1.00 ± 0.29	1.30 ± 0.29	1.22 ± 0.29	1.12 ± 0.32	1.48 ± 0.39
PFDoA	1.00 ± 0.29	1.16 ± 0.21	0.94 ± 0.18	1.43 ± 0.32	1.32 ± 0.45
<b>Lipolysis</b>					
<i>Cpt1a</i>					
PFOA	1.00 ± 0.43 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.57 <sup>b</sup>	2.15 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.98 ± 0.75 <sup>b</sup>	3.12 ± 0.67 <sup>b</sup>
PFDA	1.00 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.95 ± 1.41 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.94 <sup>b</sup>	3.95 ± 0.41 <sup>b</sup>	7.01 ± 1.36 <sup>c</sup>
PFDoA	1.00 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.90 ± 1.46 <sup>b</sup>	5.58 ± 1.66 <sup>b</sup>	6.61 ± 1.57 <sup>b</sup>	6.54 ± 1.86 <sup>b</sup>

(continued)

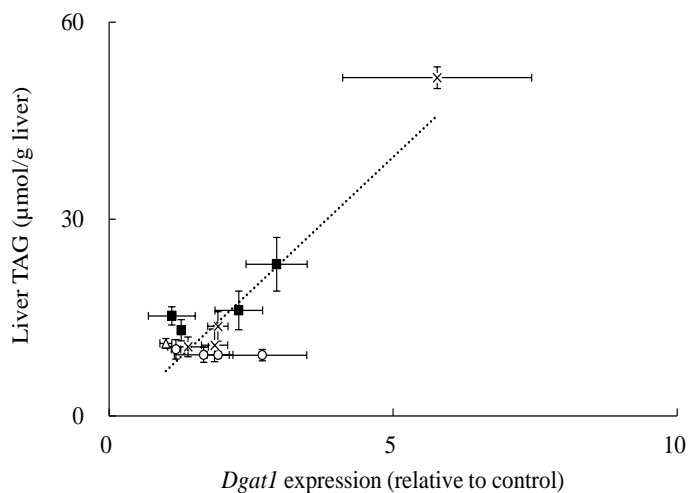
**Table 2-3 (continued)**

<i>Atgl</i>															
PFOA	1.00	±	0.15 <sup>a</sup>	2.07	±	0.62 <sup>ac</sup>	2.65	±	0.68 <sup>bc</sup>	3.91	±	0.90 <sup>b</sup>	3.66	±	1.07 <sup>b</sup>
PFDA	1.00	±	0.15 <sup>a</sup>	3.85	±	1.26 <sup>b</sup>	5.59	±	2.00 <sup>bc</sup>	5.43	±	0.82 <sup>bc</sup>	7.88	±	1.49 <sup>c</sup>
PFD <sub>o</sub> A	1.00	±	0.15 <sup>a</sup>	3.13	±	1.29 <sup>a</sup>	3.19	±	0.61 <sup>a</sup>	8.41	±	2.35 <sup>b</sup>	8.22	±	1.31 <sup>b</sup>
VLDL secretion															
<i>Mtp</i>															
PFOA	1.00	±	0.18 <sup>a</sup>	1.62	±	0.17 <sup>ac</sup>	1.74	±	0.22 <sup>bc</sup>	2.38	±	0.73 <sup>b</sup>	2.03	±	0.22 <sup>bc</sup>
PFDA	1.00	±	0.18 <sup>a</sup>	2.48	±	0.54 <sup>b</sup>	2.05	±	0.47 <sup>b</sup>	2.22	±	0.51 <sup>b</sup>	5.47	±	0.90 <sup>c</sup>
PFD <sub>o</sub> A	1.00	±	0.18 <sup>a</sup>	1.53	±	0.25 <sup>ab</sup>	1.81	±	0.38 <sup>bc</sup>	2.30	±	0.27 <sup>c</sup>	2.14	±	0.37 <sup>bc</sup>
Fatty acid trafficking															
<i>Fat/Cd36</i>															
PFOA	1.00	±	0.24 <sup>a</sup>	3.23	±	0.74 <sup>b</sup>	4.54	±	0.42 <sup>b</sup>	6.30	±	1.05 <sup>c</sup>	6.68	±	1.50 <sup>c</sup>
PFDA	1.00	±	0.24 <sup>a</sup>	3.90	±	1.12 <sup>b</sup>	3.32	±	0.87 <sup>b</sup>	3.78	±	0.63 <sup>b</sup>	8.49	±	1.81 <sup>c</sup>
PFD <sub>o</sub> A	1.00	±	0.24 <sup>a</sup>	2.12	±	0.63 <sup>ab</sup>	3.25	±	1.11 <sup>bc</sup>	6.19	±	1.44 <sup>d</sup>	4.98	±	0.84 <sup>cd</sup>

Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFD<sub>o</sub>A at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. (n = 4-6). Means without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2-7.** Results of Cluster Analysis. Dendrograms of hierarchical clustering of Expression of mRNA Encoding DGAT1 were calculated on the basis of the data from Table 2-3.



**Fig. 2-8.** Relationship between Expression of mRNA Encoding DGAT1 and Contents of TAG in the Liver of Rats. Rats were fed a standard diet for 7 days or a diet admixed with PFOA, PFDA or PFDoA at 0.0025, 0.005, 0.01 or 0.02% (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6).  $\triangle$ , Control;  $\circ$ , PFOA;  $\times$ , PFDA;  $\blacksquare$ , PFDoA. Relationship between hepatic concentrations of PFCA and hepatic contents of TAG,  $y = 8.1524x - 1.3116$  ( $r^2 = 0.8073$ ).

## 第6節 小活

PFOAは種々の生体作用を引き起こすことが知られており [1, 2, 20, 25, 32, 36, 47, 69, 71, 76, 90]、その作用の強さはPFCAの炭素鎖長によって変化することも知られている [46, 67]。PFOAはPPAR $\alpha$ を活性化してMUFA合成系を亢進し、18:1n-9量を増加させることを第1章において明らかにしたが、18:1n-9量の増加作用に対して、PFCAの炭素鎖長の違いが影響を及ぼすことも考えられる。肝総脂質中の脂肪酸分析を行った結果、PFDAおよびPFDoAは肝臓においてPFOAよりも強く18:1n-9量を増加させることが明らかとなった (Table 2-1)。18:1n-9は脂質の中でも主にTAGに取り込まれているため、PFDAおよびPFDoAによる18:1n-9量の増加は、肝臓におけるTAG含量の増加に起因する可能性もあると考え、この点を検討した。

PFOA、PFDAおよびPFDoAの肝TAG蓄積作用を比較したところ、高用量のPFDAにおいて肝TAG量の著しい増加が認められた (Fig. 2-1)。肝臓中のPFCAの蓄積性を調べたところ、いずれのPFCAでも用量依存的な肝臓中濃度の増加が認められたため (Fig. 2-2)、PFOAよりもPFDAおよびPFDoAの方が肝臓への蓄積性が高いことが明らかとなった。肝PFCA量と肝TAG含量の相関関係の解析およびクラスター解析の結果から、高用量のPFDAがPFOA、PFDoAおよび低用量のPFDAとは異なる性質を持つことが示された (Fig. 2-4, 2-5)。

PFOAおよびPFDoAと比べて、高用量のPFDAは肝TAG蓄積作用が著しく大きい、肝臓においてTAG量を調節する因子としては1) TAG合成系、2) TAG分解系、3) TAG分泌系 の3つがあげられる。

TAG 合成の亢進、TAG 分解の抑制もしくは TAG 分泌の抑制、この 3 つのいずれかの作用を PFDA が増強していることが考えられる。そこで、TAG 合成系、TAG 分解系および TAG 分泌系の関連遺伝子の発現量を調べたところ、TAG 合成に関与する *Dgat1* の遺伝子発現量の PFCA 用量依存的な増加が認められた (Table 2-3)。特に PFDA 0.02% 群の *Dgat1* 遺伝子発現量は他の群における発現量よりも高く、クラスター解析の結果より、他の群と異なることが示された (Fig. 2-7)。さらに、肝 TAG 量と *Dgat1* の遺伝子発現量の相関を調べた結果、良好な相関が認められたことから (Fig. 2-8)、PFDA は肝 TAG 合成系を亢進することで肝 TAG 量を増加させる作用が大きいことが示された。一方、TAG 分解系および TAG 分泌系の関連遺伝子の発現量は、いずれの PFCA 投与群においても発現抑制は認められなかったことから、TAG 分解系および TAG 分泌系の抑制は肝 TAG 量の増加の原因としては考えられない。

従来、PFCA の生体作用の強さは残留性の強さに起因すると考えられてきた [52]。しかし、PFDA と PFDoA の肝臓中の量はほぼ同程度であるのに対し、肝 TAG 蓄積作用は PFDA の方が大きく、肝 TAG 合成系の亢進作用も PFDA が大きい。本章で示した結果は、PFCA の生体作用の強さは残留性だけではなく、個々の PFCA の生体作用の強さにも起因することが明らかとなった。



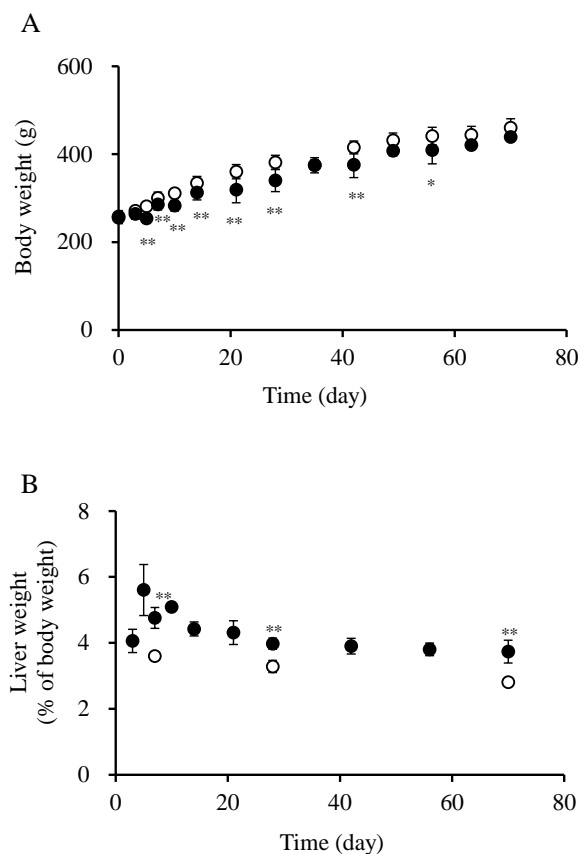
### 第3章 炭素鎖長の異なる PFCA の生体内分布および脳機能に対する影響

第2章において、PFDA および PFDoA は PFOA とは異なり肝臓中に高濃度に蓄積することを明らかにした。一般的な傾向として、PFCA の炭素鎖長が長くなるにつれて血中濃度半減期が長くなるとされているが、これらの報告はニジマスやミミズを用いたものであり [63, 82]、哺乳類では炭素数 10 以下の PFCA に限られており、炭素数 12 の PFDoA の組織分布および血中濃度半減期に関する報告はない。そこで本章では、まず、PFDoA 50 mg/kg を経口より単回投与し、組織分布および血中濃度半減期を評価した。さらに、PFDoA が他の PFCA と比べて脳へと移行しやすいことが明らかとなったため、PFDoA の脳機能に対する影響を評価した。

#### 第1節 PFDoA の組織分布

PFDoA 投与後における体重および肝重量比の経時変化を Fig. 3-1 に示した。Control 群と比べて PFDoA 投与群では体重増加量の有意な減少および肝重量比の有意な増加が認められた。次に PFDoA 投与 5 日後における、血清及び各組織中の PFDoA の濃度を Table 3-1 に示した。組織中の PFDoA 濃度と血清中濃度の比は組織への分布のしやすさの指標となる。肝臓の値は 7.925 と他の組織に比べて顕著な高値を示したことから、PFDoA は肝臓への移行性が高いことが示された。肝臓に比べると小さいものの、検討した他の組織へも移行しやすいことが明らかとなった。

PFDoA の組織移行性をこれまでに報告されている PFOA [50] および PFDA [101] と比較するために、肝臓、腎臓、脳、肺、脂肪組織の血清との濃度比を Table 3-2 に示した。どの組織をみても PFOA および PFDA と比べて、PFDoA は血清中濃度比が高いことが明らかとなった。特に、PFOA および PFDA では移行性がほとんど認められなかった脳および脂肪組織において、PFDoA の移行が認められた。



**Fig. 3-1.** Changes in Body Weight and Liver Weight After an Oral Administration of PFDoA. Rats were received an oral gavage of PFDoA at a dose of 50 mg/kg. (A) Body weight and (B) liver weight was monitored up to 70 days after dosing. Values represent means  $\pm$  SD for 4-5 animals for each point. \* Difference compared with control ( $P < 0.05$ ). \*\* Difference compared with control ( $P < 0.01$ ).  $\circ$ , Control;  $\bullet$ , PFDoA.

**Table 3-1** PFDoA Concentrations in Various Tissues in the Rats 5 Days After an Oral Dose of PFDoA.

	Tissue weight (g)	Tissue weight (% body weight)	PFDoA conc. ( $\mu\text{g/g}$ or mL)	Ratio to serum	PFDoA (% dose)
Serum	7.71 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	-- $\pm$ --	33.30 $\pm$ 2.77	1.000	2.06 $\pm$ 0.17
Liver	14.23 $\pm$ 1.99	5.61 $\pm$ 0.78	263.94 $\pm$ 32.94	7.925	29.63 $\pm$ 5.47
Kidney	2.64 $\pm$ 0.21	1.04 $\pm$ 0.08	55.92 $\pm$ 9.43	1.679	1.16 $\pm$ 0.17
Lung	2.00 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.79 $\pm$ 0.05	39.79 $\pm$ 4.75 <sup>c</sup>	1.166	0.63 $\pm$ 0.09
Heart	0.86 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.03	17.37 $\pm$ 2.54	0.522	0.12 $\pm$ 0.01
Spleen	0.44 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.02	43.96 $\pm$ 4.51	1.320	0.15 $\pm$ 0.02
Brain	1.92 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.02	33.85 $\pm$ 3.40	1.016	0.51 $\pm$ 0.04
Testis	2.51 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.06	19.51 $\pm$ 1.12	0.587	0.39 $\pm$ 0.04
Adipose tissue					
epididymal	2.25 $\pm$ 0.30	0.89 $\pm$ 0.12	9.52 $\pm$ 1.19	0.286	0.17 $\pm$ 0.03
mesenteric	1.22 $\pm$ 0.23	0.48 $\pm$ 0.08	20.98 $\pm$ 4.26	0.630	0.20 $\pm$ 0.01
subcutaneous	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	8.80 $\pm$ 0.62	0.264	-- $\pm$ --

<sup>a</sup>, Serum volume was calculated as 3.1% of body weight.

<sup>b</sup>, Tissue weight is higher than correct values due to perfusion.

<sup>c</sup>, Tissue concentration was underestimated due to swollen during perfusion.

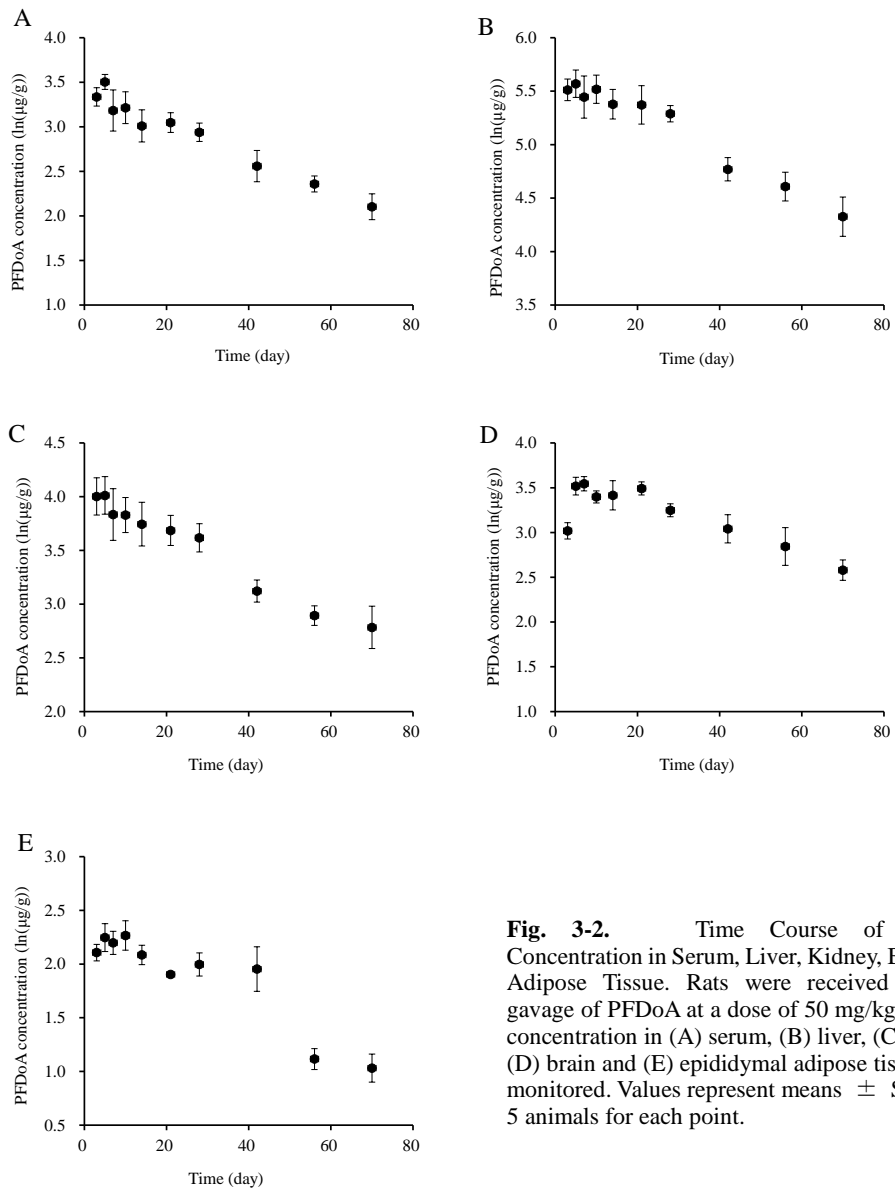
**Table 3-2.** Tissues Distribution of PFCA

Tissues	PFOA <sup>a)</sup>	PFDA <sup>b)</sup>	PFDoA
	(Ratio to serum)		
Liver	1.52	3.72	8.81
Kidney	1.38	0.15	1.86
Brain	0.02	0.00	0.83
Lung	0.31	0.05	2.84
Epididymal fat	0.06	0.02	0.29

Rats were received an oral administration of PFDoA at a dose of 50 mg/kg body weight. Blood samples and tissues were collected 3 days after dosing. Values represent mean  $\pm$  S.D. (n = 4-5). a) [50], b) [101]

## 第2節 PFDoA の血清中濃度および組織中濃度の半減期

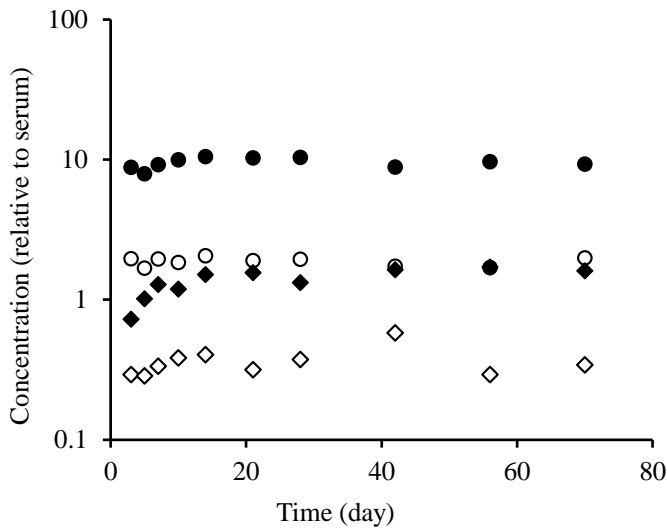
主要組織における PFDoA の組織中濃度の推移を Fig. 3-2 に示した。各組織における PFDoA 濃度の経時的な減少が認められた。Fig. 3-2 の結果をもとに算出した半減期、最高組織中濃度および到達時間を Table 3-3 に示した。肝臓における最高組織中濃度が最も高値を示したが、いずれの組織においても PFDoA の半減期は同程度であった。主要組織における PFDoA の血清中濃度に対する比の経時変化を Fig. 3-3 に示した。肝臓および腎臓に関しては、血清中濃度に対する比は一定値を示したのに対し、脳および精巣周囲脂肪では、血清中濃度に対する比は次第に上昇した後に一定値を示した。



**Fig. 3-2.** Time Course of PFDoA Concentration in Serum, Liver, Kidney, Brain and Adipose Tissue. Rats were received an oral gavage of PFDoA at a dose of 50 mg/kg. PFDoA concentration in (A) serum, (B) liver, (C) kidney, (D) brain and (E) epididymal adipose tissue were monitored. Values represent means  $\pm$  SD for 4-5 animals for each point.

**Table 3-3** Toxicokinetic Parameters for PFDoA.

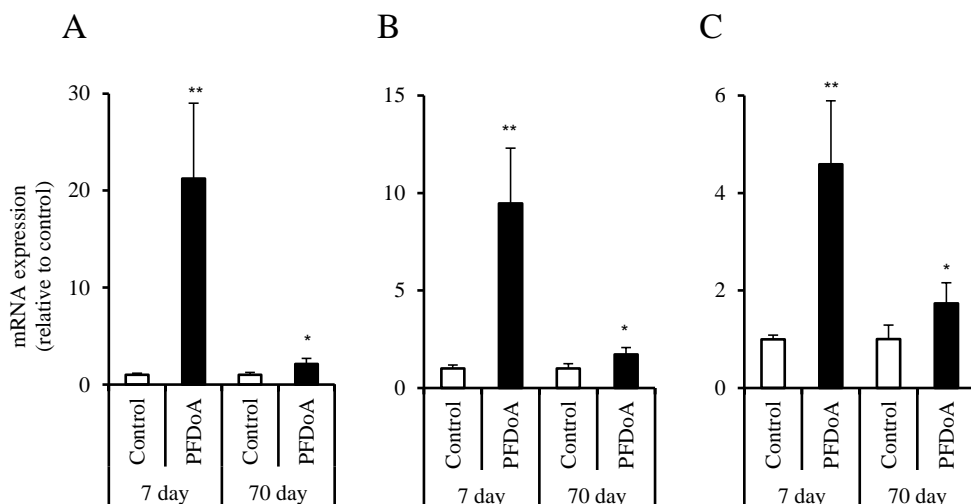
Tissue	Half-life (day)	<i>C</i> <sub>max</sub> (µg/g or mL)	<i>T</i> <sub>max</sub> (day)
Serum	55.3	54.24 ± 4.50	5
Liver	49.3	429.86 ± 53.65	5
Kidney	52.4	91.07 ± 15.36	5
Brain	57.1	56.56 ± 4.49	7
Adipose tissue (epididymal)	49.8	15.81 ± 2.15	10



**Fig. 3-3.** Time Course of PFDoA Concentration Relative to Serum in Various Tissues. Rats were received an oral gavage of PFDoA at a dose of 50 mg/kg. PFDoA concentrations relative to serum was calculated by dividing the mean concentration of tissue by the mean concentration of serum. Values represent means for 4-5 animals for each point. ●, liver, ○, kidney; ◆, brain, ◇, epifad.

### 第3節 PFDoA の肝臓に対する作用

PFDoA 投与 7 日後および 70 日後における PPAR $\alpha$  応答遺伝子 (*Acot1*, *Cyp4a10*, *Acox1*) の発現量を Fig. 3-4 に示した。いずれの応答遺伝子の発現量も PFDoA 群で上昇した。単回投与 70 日後にも  $\mu\text{g/g}$  liver の PFDoA が残留し、有意な PPAR $\alpha$  の活性化が認められた。投与 9 日後における血清中の ALT および AST 値は、対照群において  $23.01 \pm 3.64$ 、 $8.58 \pm 2.19$  karmen unit であったのに対し、PFDoA 群では  $26.31 \pm 3.98$ 、 $10.32 \pm 3.31$  karmen unit であり、肝障害は生じていないと考えられた。



**Fig. 3-4.** Expression of PPAR  $\alpha$ -Target Genes in the Liver of PFDoA-Administered Rats. Rats were received an oral gavage of PFDoA at a dose of 50 mg/kg. mRNA levels for (A) *Acot1*, (B) *Cyp4a10* and (C) *Acox1* were determined at 7 and 70 days after administration. Values represent means  $\pm$  SD for 4-5 animals for each point. \* Difference compared with control ( $P < 0.05$ ). \*\* Difference compared with control ( $P < 0.01$ ).

#### 第4節 行動薬理試験による PFCA の脳機能への影響評価

PFDoA は PFOA および PFDA とは異なり、脳に移行して蓄積することが明らかとなった。脳は化学物質に対する影響を受けやすく [14, 37, 58]、PFDoA が脳機能に対して何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。脳機能に対する影響の評価には、特定の蛋白質発現や細胞の機能を評価する生化学的評価法と被験動物の挙動や運動量を評価する機能学的評価法がある。本研究では、PFCA の脳機能への影響を比較するにあたり、より包括的に影響評価を行うために、行動薬理試験を行うこととした。

行動薬理試験は PFCA 投与 6-9 日目に実施した。PFCA を投与したラットの投与 10 日目の体重、組織重量および PFCA の生体内濃度を Table 3-4 に示した。体重は control 群と比較して PFDA 群で顕著に少なく、PFDoA 群でも若干少なかった。また、どの PFCA を投与した場合にも肝肥大が認められた。血清中の濃度は PFOA および PFDA の方が PFDoA より高く、肝臓中の濃度は PFOA よりも PFDA および PFDoA の方が高かった。PFDoA の脳内濃度は血清中濃度よりも高かった。一方、PFDA の脳内濃度は  $4.7 \mu\text{g/g brain}$  と低く、PFOA は検出限界 ( $0.2 \mu\text{g/g brain}$ ) 以下であった。

PFCA の脳機能への影響を比較するために、まず、新奇物体探索試験を実施した (Fig. 3-5)。新奇物体探索試験は低いモチベーション状態における学習能力を評価する試験法である。試験は、information

phaseにおいて同じ物体 A、A'にラットを接触させた。このとき、PFOA、PFDA、PFDoA いずれの投与群も対照群と同様に 2 つの物体を同程度に探索した (Fig. 3-5A)。24 時間後に物体 A'を B (新奇物体) に置換して探索させた (test phase)。Fig. 3-5B に示すように、対照群では B の物体への探索時間が長くなった。これを discrimination index として Fig. 3-5D に示した。Test phase において、PFOA 群および PFDA 群では B への接触時間が長かったが、PFDoA 群では A と B への接触時間が同程度であった (Fig. 3-5B)。Discrimination index の値を比較したところ、control 群と比べて PFOA 群には差がないのに対し、PFDA 群では若干低下し、また、PFDoA 群では顕著な低下が認められた (Fig. 3-5D)。Test phase において、A と B への接触時間の合計は、いずれの投与群でも差はなかった (Fig. 3-5C)。PFDoA に大きな影響が認められたので、さらなる試験による評価を実施した。

ラットの不安状態を評価するために高架式十字迷路試験を実施した (Fig. 3-6)。不安状態の指標であるオープンアームでの滞在時間が PFDoA 群で有意に増加しており、PFDoA が抗不安作用を示すことが示唆された。一方、Y 字迷路試験、オープンフィールド試験および強制水泳試験では PFDoA による影響は認められなかった (Table 3-5)。

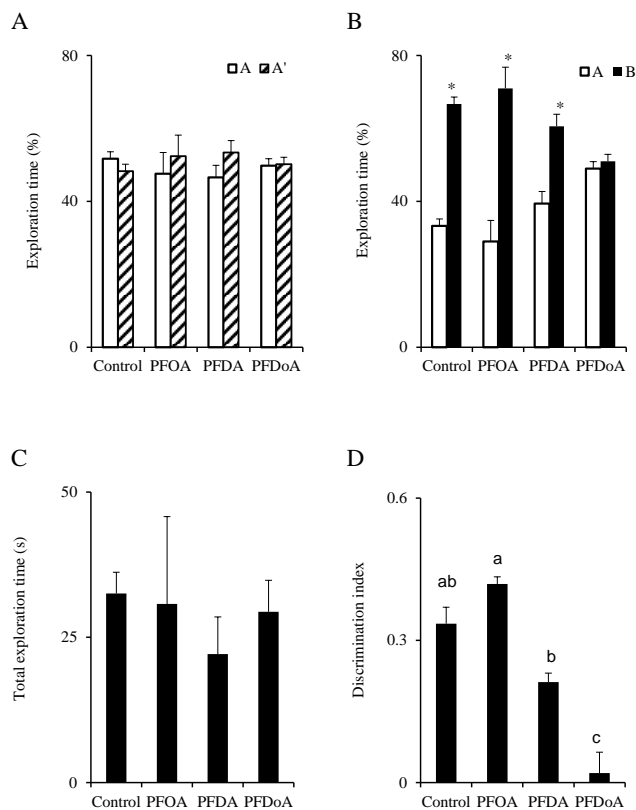
PFDoA の影響を最も鋭敏に検出した新奇物体探索試験にて、PFDoA の影響をさらに詳細に評価した。PFDoA の用量依存性を検討したところ、投与量が 20 mg/kg を超えると discrimination index の低下が認められた (Fig. 3-7B)。このとき、既知物体 A と新奇物体 B への接触時間の合計には影響は認められなかった (Fig. 3-7A)。PFDoA の投与量に比例して、血清および脳における PFDoA 濃度の上昇が認められたので (Fig. 3-7C)、PFDoA の脳内濃度と discrimination index の相関を調べたところ、脳内濃度が 20  $\mu$ g/g brain を超えると discrimination index が低下することが明らかとなった (Fig. 3-7D)。次に、新奇物体探索試験における PFDoA の学習能力低下作用の持続性を検討した結果を Fig. 3-8 に示した。PFDoA 投与 30 日後においても、学習能力の低下が認められた (Fig. 3-8B)。A と B への接触時間の合計には差が認められなかった (Fig. 3-8A)。投与 31 日後における血清および脳の脳内濃度を測定したところ、投与 10 日目における濃度のおよそ 70%であった (Fig. 3-8D)。

PFDoA の脳内分布を Table 3-6 に示した。脳内における主要部位中の PFDoA 濃度を測定したが、部位での差異は認められなかった。このことから、PFDoA は脳内に一様に分布することが明らかとなった。

**Table 3-4.** Body Weight, Tissue Weight and PFCA Concentrations After an Oral Administration of PFCA.

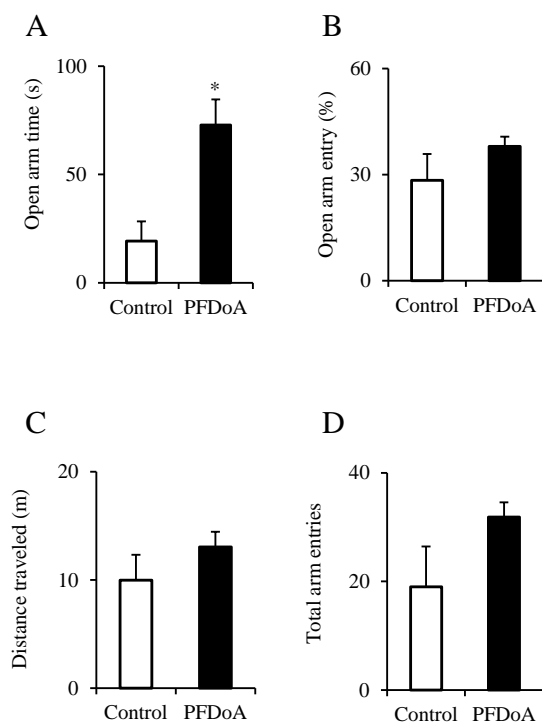
		Vehicle	PFOA	PFDA	PFDoA
<b>Body weight</b>					
Initial	(g)	261.1 ± 2.6	254.8 ± 1.2	259.9 ± 1.9	258.0 ± 2.9
Final	(g)	294.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	288.6 ± 0.9 <sup>ab</sup>	239.3 ± 4.4 <sup>c</sup>	276.4 ± 3.8 <sup>b</sup>
Weight gain	(g)	32.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	33.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	-20.6 ± 4.1 <sup>b</sup>	18.4 ± 3.3 <sup>c</sup>
<b>Tissue weight</b>					
Liver	(g)	11.22 ± 0.26 <sup>a</sup>	17.13 ± 0.87 <sup>b</sup>	15.65 ± 0.69 <sup>b</sup>	15.47 ± 0.60 <sup>b</sup>
	(% of body weight)	3.82 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.30 <sup>bc</sup>	6.52 ± 0.21 <sup>c</sup>	5.58 ± 0.17 <sup>b</sup>
Brain	(g)	1.96 ± 0.02	1.92 ± 0.02	1.92 ± 0.01	1.94 ± 0.02
	(% of body weight)	0.67 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.70 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>PFCA concentration</b>					
Serum	(µg/mL)	-	33.3 ± 4.4 <sup>a</sup>	43.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	24.4 ± 1.0 <sup>c</sup>
Liver	(µg/g tissue)	-	58.7 ± 8.1 <sup>a</sup>	287.7 ± 11.4 <sup>b</sup>	247.7 ± 9.8 <sup>c</sup>
Brain	(µg/g tissue)	-	ND <sup>a</sup>	4.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	44.4 ± 2.0 <sup>b</sup>
Brain/serum		-	0.000 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.109 ± 0.008 <sup>a</sup>	1.821 ± 0.059 <sup>b</sup>
Liver/serum		-	1.774 ± 0.124 <sup>a</sup>	6.726 ± 0.301 <sup>b</sup>	10.32 ± 0.545 <sup>c</sup>

Rats were received an oral gavage of PFOA, PFDA or PFDoA at a dose of 50 mg/kg, or vehicle alone. Blood and tissues were collected on day 10 after dosing. Values represent the mean ± SEM (control, 12; PFOA, 4; PFDA, 7; PFDoA, 7). (-), not determined; ND, less than detection limit (0.8 µg/g). <sup>a, b, c</sup> Means without a common superscript are a significantly different ( $P < 0.05$ ). In the absence of superscript, the means are not statistically significant.



**Fig. 3-5.** Effects of PFOA, PFDA, and PFDoA on the Novel Object Recognition Test. Rats received an oral gavage of PFOA, PFDA, or PFDoA at a dose of 50 mg/kg, and the test was performed on days 6-7. A, Exploration time of object A and object A' in the information phase. B, Exploration time of object A and object B in the test phase. C, Total exploration time in the test phase. D, Discrimination index. Values represent means ± SEM (control, 12; PFOA, 4; PFDA, 7; PFDoA, 7). \* Difference compared with object A ( $P < 0.05$ ). <sup>a-c</sup>, Significant difference without a common superscript ( $P < 0.05$ ).



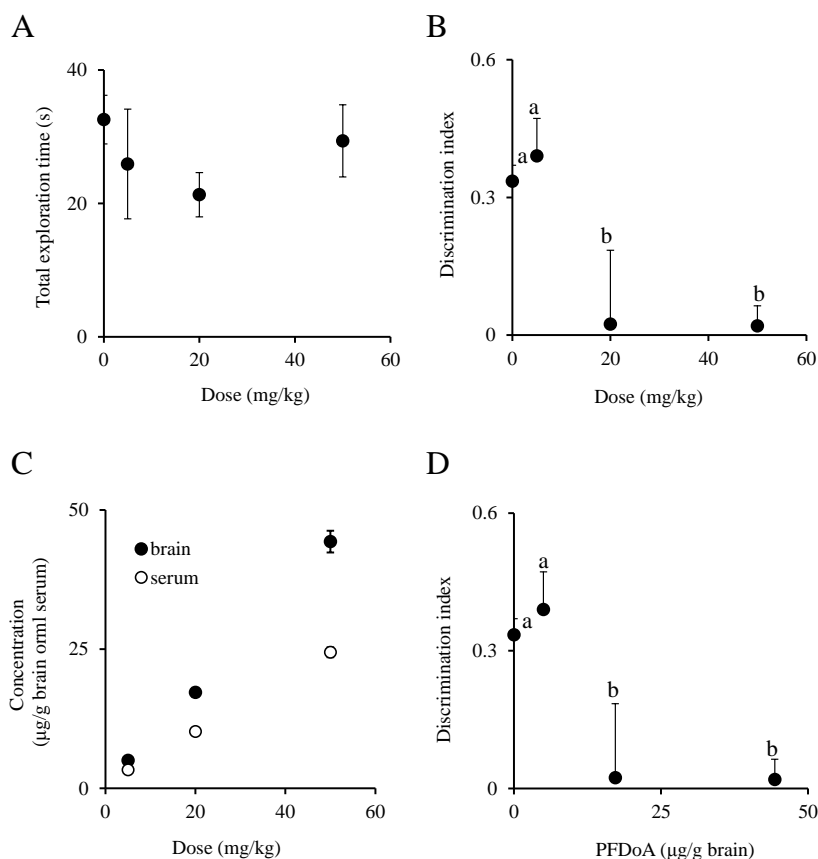


**Fig. 3-6.** Effects of PFDoA on the Elevated-Plus Maze Test. Rats were received an oral gavage of PFDoA at a dose of 50 mg/kg, and the test was performed on Day 7. A, Time spent in open arms. B, Percentage of open arm entries to total arm entries. C, Distance traveled in overall maze. Values represent means  $\pm$  SEM (Control, 6; PFDoA, 8). \* Difference compared with control ( $P < 0.05$ ).

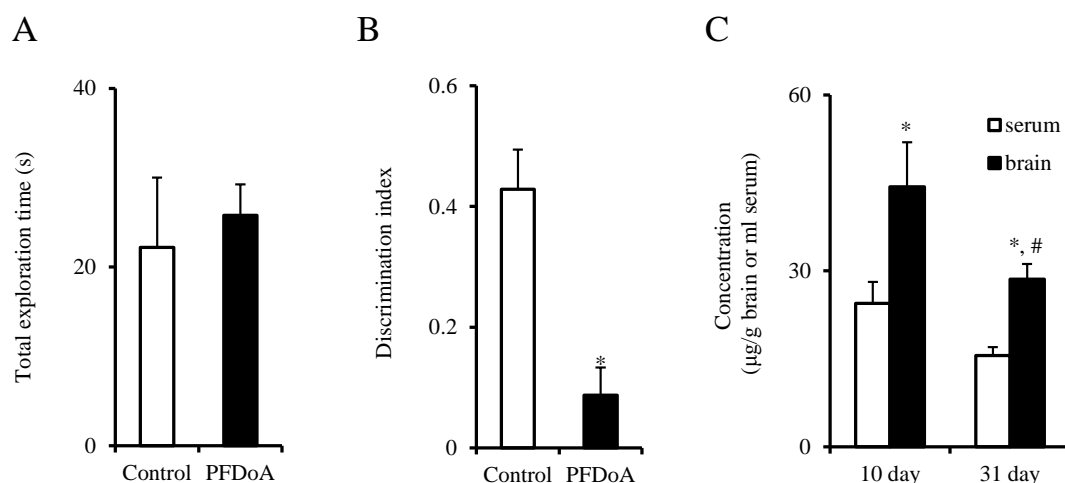
**Table 3-5.** Effects of PFDoA on Y-maze Test, Open Field Test and Forced Swim Test

	Control	PFDoA	<i>P</i> value
<b>Y-maze test</b>			
Alternations (%)	65.5 $\pm$ 5.6	75.7 $\pm$ 5.1	0.194
Total arm entries	16.4 $\pm$ 1.6	14.0 $\pm$ 2.0	0.362
<b>Open-field test</b>			
Distance traveled (m)	20.3 $\pm$ 2.3	16.5 $\pm$ 1.5	0.189
Number of crossings	399.1 $\pm$ 32.1	322.2 $\pm$ 36.4	0.131
Time spent in center region (%)	1.67 $\pm$ 0.23	1.44 $\pm$ 0.31	0.566
<b>Forced swim test</b>			
Immobility time (s)	165.9 $\pm$ 21.9	156.8 $\pm$ 11.6	0.718

Rats received an oral dose of PFDoA at a dose of 50 mg/kg. Y-maze test ( $n=8$ ), open-field test ( $n=10$ ) and forced swim test ( $n=8$ ) were performed on Day 8, Day 6 and Day 8-9, respectively. Difference was not significant.



**Fig. 3-7.** Dose Dependency of the Effect of PFD0A on Novel Object Recognition Test. Rats were received an oral gavage of PFD0A at a doses of 5, 20 and 50 mg/kg and he test was performed on Day 6-7. A, Total exploration time in test phase. B, Relationship between dose and discrimination index. C, PFD0A concentrations in the serum and the brain on day 10. D, Relationship between PFD0A concentration in the brain and discrimination index. Values represent means  $\pm$  SEM (Control, 12; 5 mg/kg, 5; 20 mg/kg, 5; 50 mg/kg, 7). \* Difference compared with control ( $P < 0.05$ ). <sup>a-b</sup>, Significant difference without a common superscript ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3-8.** Effect of PFD0A on the Novel Object Recognition Test on Day 30. Rats were received an oral gavage of PFD0A at a doses of 50 mg/kg, and the test was performed on Days 29-30. A, Total exploration time in test phase. B, Discrimination index. C, PFD0A concentrations in the serum and the brain on day 10 and 31. Values represent means  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \* Difference compared with control ( $P < 0.05$ ). # Difference compared with thw value on Day 10 ( $P < 0.05$ ).

**Table 3-6.** Distribution of PFDoA within the Brain.

Section	PFDoA concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
Cortex	58.51 $\pm$ 3.28
cerebellum	60.55 $\pm$ 1.47
medulla oblongata/bridge	68.06 $\pm$ 4.02
mesencephalon	65.2 $\pm$ 4.88
hippocampus	60.01 $\pm$ 1.43
hypothalamus	69.89 $\pm$ 2.13
corpus striatum	65.63 $\pm$ 1.07

Rats were fed on a diet admixed with PFDoA at 0.05% (w/w) for 7 days. On day 8, brain was obtained from the rat which had been perfused with ice-cold saline. Values in each section were not significantly different ( $P>0.05$ ).

## 第 5 節 小活

第 2 章の結果より、PFOA と比べると PFDA および PFDoA の方が肝臓への蓄積性が高いことを明らかにした。このことは、PFCA の炭素鎖長が異なると生体に対する蓄積性が異なるという従来報告と一致する [55, 67, 69]。PFCA の生体蓄積性に関する従来報告では、PFCA の炭素鎖長が長くなると、血中半減期が長くなることが明らかになっており、雄性ラットの血漿における PFOA および PFDA の半減期はそれぞれ 5.6 日および 39.9 日である [67]。本章の結果より、ラットの血清における PFDoA の半減期は 55.3 日と算出されたため (Table 3-2)、PFDoA の生体蓄積性は PFOA および PFDA よりも高いことが明らかとなった。

PFDoA は生体内において肝臓への移行性が高く、肝臓の血清中濃度に対する比も他の組織と比較して高かった (Table 3-1)。PFDoA の組織分布を PFOA および PFDA と比較すると、PFDoA は各組織への移行性が高く、特に脂肪組織および脳に高濃度の PFDoA が検出された (Table 3-3)。これは PFOA や PFDA にはみられない特徴といえる。炭素鎖長の異なる PFCA で組織移行性が異なる原因としては、アルブミン等のタンパク質との親和性の違い、脂溶性の違いといった性質の違いがあげられる。PFCA の炭素鎖長が長くなるほど BSA との親和性が高くなること [52]、脂溶性の指標である分配係数の値が高くなること [5] より、これらの性質の違いが組織移行性の違いに寄与していると考えられる。しかし、脂肪組織よりも脳への移行性が高いことが認められたため、アルブミンとの結合率や脂溶性だけで移行性の違

いを説明することができない。その点に関しては、さらなる研究が必要である。従来、PFCA は主にタンパク質に富む組織である肝臓、血清、腎臓に分布すると考えられてきたが、PFDoA は全く異なる分布を示すことが明らかとなった。

PFDoA はPFOA およびPFDA とは異なり、脳への移行が認められた。このことは、PFCA の毒性としてはほとんど考慮されてこなかった中枢への影響を示唆するものである。実際、本研究においては学習能力の低下がPFCA の脳内濃度に依存するという新たな知見を得た。また、脳内にPFDoA がとどまっている限り、学習能力低下が持続することも示した。PFCA の神経毒性に関する報告はあるが、いずれの報告もラットの胎仔期もしくは乳児期においてPFCA が神経毒性を示すということに焦点を当てており [11, 21, 22, 35, 72, 81, 91]、従来の知見では、PFCA は成体ラットに対しては神経毒性を示さなかった [10, 23]。すなわち、成体ラットに対してPFCA が神経毒性を及ぼすという知見は本研究が初めてである。

以上の結果より、PFDoA はPFOA やPFDA とは全く異なる動態を示すことによって、特に脳への高い移行性のために学習能力低下を引き起こすという結論を得た。

## 第4章 肝臓中の MUFA 組成に偏りが生じるメカニズム

第1章でも示したように、肝臓において MUFA は 16:0 から合成される (Fig. 4-1)。18:1 $n$ -9 は 16:0 が炭素鎖伸長酵素 PCE により鎖伸長された後に、SCD によって 9 位が不飽和化されることで合成される。また、SCD は 16:0 の 9 位を不飽和化して 16:1 $n$ -7 とし、続いて PCE または炭素鎖伸長酵素 POCE による鎖伸長によって 18:1 $n$ -7 が合成される。16:0 および 18:0 に対する SCD の基質特異性はほぼ同程度であることが明らかになっているので[18, 34, 57]、肝臓における 18:1 $n$ -9 の含量は 16:1 $n$ -7 と 18:1 $n$ -7 の合計とほぼ同程度であるものと予想される。本研究においてラット肝総脂質における脂肪酸組成を調べたところ、18:1 $n$ -9 の割合が 10.35% であるのに対し、16:1 $n$ -7 と 18:1 $n$ -7 の割合はそれぞれ 1.84% と 4.01% であり、 $n$ -7 系の MUFA を合計しても 5.85% にしかならず、SCD の基質特異性から予想される値の半分しかない。本章では、肝臓中の MUFA 組成が  $n$ -9 系に偏っていることに着目し、そのメカニズムを探ることを目的とした。

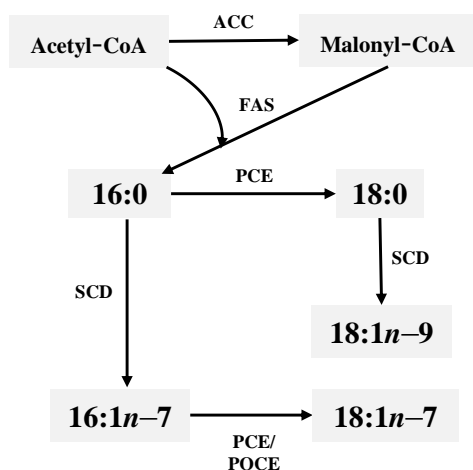


Fig. 4-1. Pathway of MUFA Synthesis.

## 第1節 PFOAは肝臓におけるMUFA組成の偏りを拡大させる

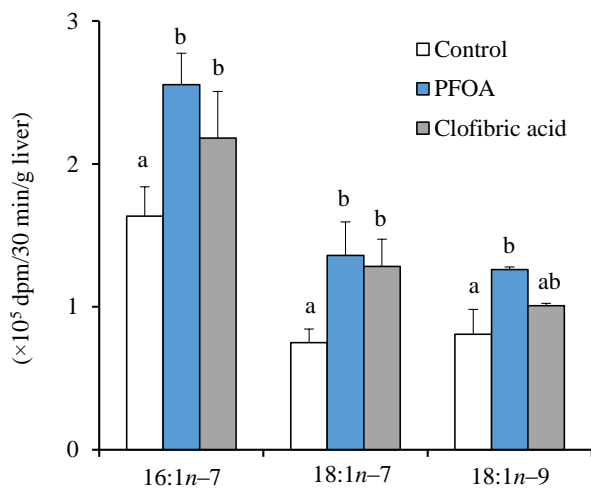
正常ラットの肝臓においてMUFAの割合は $n-9$ 系が $n-7$ 系の2倍と大きく偏っていることは既に述べた。第1章において、PFOAを投与するとSCDの遺伝子発現量および活性が著しく上昇し、 $18:1n-9$ の割合が増えることを示した。これらの結果から、PFOAを投与すると $18:1n-9$ 、 $16:1n-7$ および $18:1n-7$ がいずれも増加することが予想される。PFOA投与により $18:1n-9$ は顕著に増加したのに対し、 $16:1n-7$ は変化がなく、 $18:1n-7$ はむしろ減少した (Table 4-1)。すなわち、PFOA投与により $n-9$ 系へのMUFAの偏りはいっそう拡大した ( $n-9$ 系、; 14.69% ;  $n-7$ 系、 4.18%)。これらの結果より、MUFA組成の偏りが生じる原因は、肝臓における3種類のMUFAの存在割合はSCD、PCEおよびPOCEによって調節されているとする、従来の考え方では説明できないものであり、MUFA組成の調節に他の‘player’が存在することを強く示唆するものである。

生体構成成分の存在量は、主に合成と分解のバランスによって決定されていると考えられている。そこで、MUFAの分解系に着目して、肝臓における $16:1n-7$ 、 $18:1n-7$ および $18:1n-9$ の分解速度の比較に関する過去の知見を調査したが、納得できる報告は見当たらなかった。そこで、肝スライスを用いて *ex vivo* でこれら3種類のMUFAの $\beta$ 酸化速度を比較した。Fig. 4-2に示すように、対照群において3種のMUFAを比べたところ $16:1n-7$ は $18:1n-7$ および $18:1n-9$ と比べて分解されやすいことが明らかとなった。また、PFOA投与によって、これら3種類のMUFAの $\beta$ 酸化速度は相対的な大きさをほぼ保ったまま上昇することが明らかとなった。この結果は、肝臓におけるMUFA含量の調節に脂肪酸の $\beta$ 酸化系が強く関与する可能性を示唆するものである。そこで、MUFAレベルの調節をさらに詳しく調べることにした。クロフィブリン酸はPFOAと同様にPPAR $\alpha$ アゴニストとして知られている。クロフィブリン酸投与ラットにおいてMUFA組成およびMUFAの $\beta$ 酸化活性への影響を調べたところ、ほぼ同程度の変化が認められた (Table 4-1、Fig. 4-2)。後述するように、本章ではMUFA組成に偏りが生じるメカニズムを解析するツールとしてPFOAに替えてクロフィブリン酸を用いることとした。

**Table 4-1.** Fatty Acid Profiles of Hepatic Lipid.

	Control	PFOA (mol%)	Clofibric acid
16:0	28.01 ± 3.66	26.67 ± 3.08	28.01 ± 1.84
16:1 $n-7$	1.84 ± 0.62	1.52 ± 0.27	1.73 ± 0.34
18:0	16.13 ± 2.16	17.80 ± 0.71	17.75 ± 1.08
18:1 $n-7$	4.01 ± 0.70 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.19 <sup>b</sup>
18:1 $n-9$	10.35 ± 1.76 <sup>a</sup>	14.69 ± 1.80 <sup>b</sup>	16.41 ± 1.30 <sup>b</sup>
18:2 $n-6$	21.48 ± 1.31 <sup>a</sup>	13.24 ± 0.78 <sup>b</sup>	10.04 ± 0.54 <sup>c</sup>
18:3 $n-3$	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.05 <sup>b</sup>
20:3 $n-9$	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.08 <sup>b</sup>
20:3 $n-6$	0.67 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.95 ± 0.22 <sup>c</sup>
20:4 $n-6$	12.68 ± 3.39 <sup>a</sup>	17.76 ± 1.65 <sup>b</sup>	15.63 ± 1.26 <sup>ab</sup>
20:5 $n-3$	0.68 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.37 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.20 <sup>b</sup>
22:5 $n-3$	0.99 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>b</sup>
22:6 $n-3$	2.66 ± 0.48	2.17 ± 0.31	2.74 ± 0.36
Total (μmol/g liver)	125.36 ± 15.46	135.32 ± 17.39	115.35 ± 8.88

Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.01% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. (n = 4-6). <sup>a-c</sup>, Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-2.** Oxidation *Ex Vivo* of MUFAs in Liver Slices. Rats were fed a standard diet for 7 days, a diet admixed with PFOA at 0.01% (w/w) for 7 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Liver slices were incubated with [<sup>14</sup>C]16:1 $n-7$ , [<sup>14</sup>C]18:1 $n-7$ , or [<sup>14</sup>C]18:1 $n-9$ . [<sup>14</sup>C]-Labeled acid-soluble products were extracted and the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced was trapped. The rate of fatty acid oxidation is presented as the sum of acid-soluble oxidation products and CO<sub>2</sub>. Values represent the mean ± S.D. <sup>a-c</sup>, Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 第2節 MUFA 組成の偏りが生じるメカニズムを解明するための戦略

本章では、肝臓における MUFA 組成、特に 18:1 $n$ -9 含量に比べて 16:1 $n$ -7 含量が低く保たれているメカニズムをより詳細に解析することを目的とした。本章の研究目的を達成するために研究のデザインで次のような工夫をした。

- ① 肝臓における SCD 活性は高く、脂肪酸  $\beta$  酸化活性は正常または低く、食餌由来の脂肪酸が肝臓の脂肪酸組成に影響しないモデルラットを用いる。
  - ② ①のモデルラットの肝 SCD 活性と同程度の SCD 活性を PFOA 投与によって標準食摂取ラットでつくり出す。
  - ③ 対照群、①および②のラットについて、MUFA 合成、脂肪酸組成および MUFA 分解速度を比較する。
- ①の生理状態は、ラットに無脂肪食を摂取させることで実現できた。一方、PFOA を食餌に 0.03% 加えて、肝の SCD の誘導を試みたが、無脂肪食摂取ラットの SCD に匹敵する高さの SCD の誘導状態を実現することはできなかった。さらに、PFOA 0.03% 投与では、毒性発現の徴候を認めた。そこで本章では、第1章で示したように、PFOA と同じく PPAR $\alpha$  アゴニストであり、かつ毒性が低いクロフィブリン酸を PFOA の代わりに解析のためのツールとして用いることとした。本研究では、クロフィブリン酸投与を‘薬理的マニピュレーション’、無脂肪食摂取を‘栄養学的マニピュレーション’として用いた。この2つのマニピュレーションの共通点は肝臓において MUFA 合成系を亢進することである。相違点は、無脂肪食摂取では飼料由来の外因性脂肪酸の影響を排除できること、クロフィブリン酸投与は脂肪酸分解を亢進するが、無脂肪食摂取では  $\beta$  酸化系を亢進しないことである。対照群を含め、これら3群を詳細に比較し、肝臓における 16:1 $n$ -7 含量の調節における脂肪酸分解系の関与を明らかにすることとした。対照群、無脂肪食群およびクロフィブリン酸群の体重、肝と脂肪組織の相対重量を Table 4-2 に示した。体重に大きな差異は認められなかったが、クロフィブリン酸群では相対肝重量の増加、無脂肪食群では相対脂肪組織重量の増加が認められた。



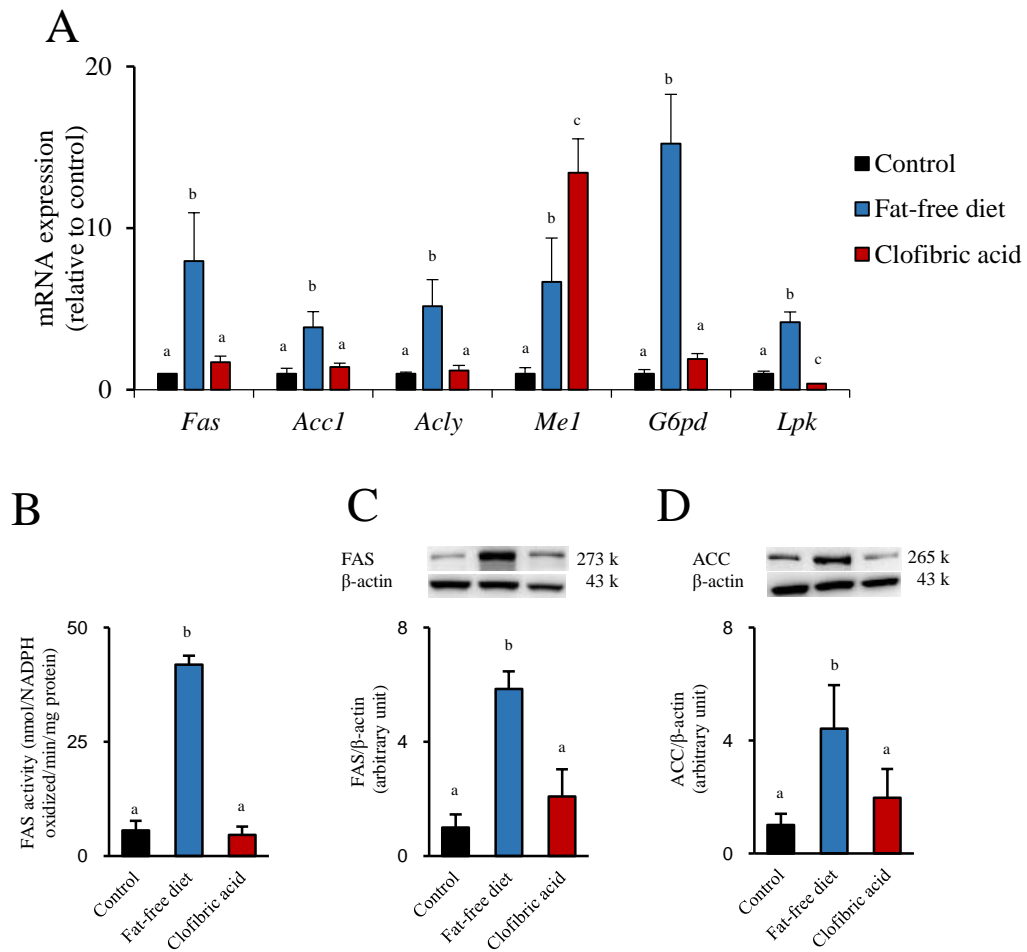
**Table 4-2.** Body Weights and Organ Weights of Experimental Rats

	Control	Fat-free diet	Clofibric acid
Body weight (g)	326.05 ± 21.76 <sup>a</sup>	346.96 ± 27.04 <sup>b</sup>	305.14 ± 19.70 <sup>a</sup>
Liver weight (% of body weight)	3.62 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.29 <sup>a</sup>	6.05 ± 0.48 <sup>b</sup>
Epididymal fat weight (% of body weight)	0.88 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>a</sup>

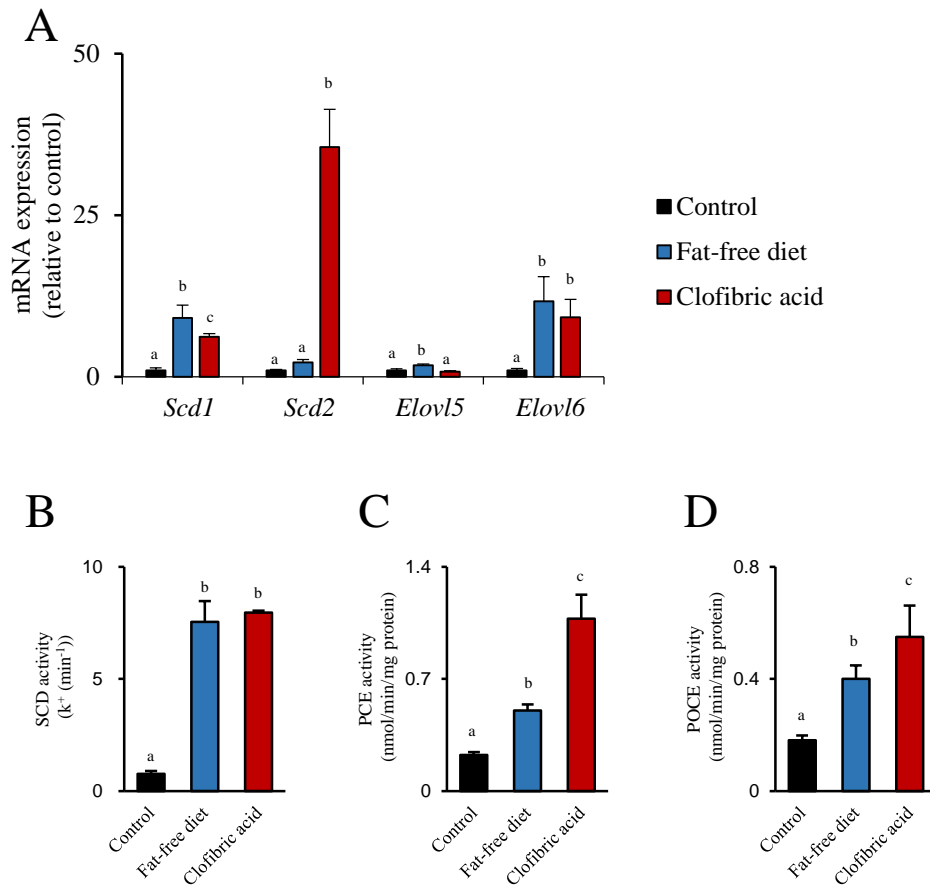
Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. Means in the same row without a common superscript (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 第3節 無脂肪食群とクロフィブリン酸群における肝 MUFA 合成の亢進の差は無視し得る

無脂肪食群およびクロフィブリン酸群において、肝 MUFA 組成変化をもたらす原因となる分子機構に関する知見を得るために、脂肪酸の *de novo* 合成に関与する酵素である fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)、ATP-citrate lyase (ACLY)、malic enzyme 1 (ME1)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および L-type pyruvate kinase (LPK) の遺伝子の発現量を測定した (Fig. 4-3A)。これらの発現量は無脂肪食群で有意に上昇した。一方、*Fas*、*Acc1*、*Acly* および *G6pd* の発現量はクロフィブリン酸群においては変化せず、*Me1* の発現量は上昇したものの、*Lpk* の発現量は低下した。無脂肪食群では FAS 活性、FAS タンパク質発現量および ACC タンパク質発現量が上昇したのに対し、クロフィブリン酸群では影響が認められなかった (Fig. 4-3B-D)。次に、MUFA 合成に関わる SCD、PCE、POCE について、遺伝子発現量および酵素活性を測定した (Fig. 4-4)。*Scd1*、*Scd2* および *Elovl6* の発現量は無脂肪食群およびクロフィブリン酸群で上昇し、*Elovl5* の発現量は無脂肪食群でのみわずかながら上昇した (Fig. 4-4A)。これらの遺伝子の発現上昇が機能変化に寄与しているかどうかを確認するために酵素活性を調べた。SCD 活性は無脂肪食群およびクロフィブリン酸群で著しく亢進し、薬理的マニピュレーションによる SCD 活性の上昇は、栄養学的マニピュレーションによるものと概ね同程度であった。PCE 活性および POCE 活性も両群で亢進が認められた (Figs. 4-4B-D)。



**Fig. 4-3.** mRNA, Activity, and Protein Levels of Enzymes Related to *De Novo* Fatty Acid Synthesis in the Liver. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. (A) mRNAs encoding FAS, ACC1, ACYL, ME1, G6PD, and LPK. (B) FAS activity in the hepatic cytosol. (C) FAS protein in the liver; visible bands represent FAS and  $\beta$ -actin as indicated. (D) ACC protein in the liver; visible bands represent ACC and  $\beta$ -actin as indicated. Regarding (C) and (D), immunoblotting was performed on liver extracts (15  $\mu$ g of protein each). Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5–6). <sup>a, b, c</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-4.** mRNA, Activity, and Protein Levels of Enzymes Related to MUFA Synthesis in the Liver. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibrinic acid at 0.5% (w/w) for 7 days. (A) mRNA encoding SCD1, SCD2, ELOVL5, and ELOVL6. (B) SCD activity in hepatic microsomes. (C) PCE activity in hepatic microsomes. (E) POCE activity in hepatic microsomes. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5–6). <sup>a, b, c</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

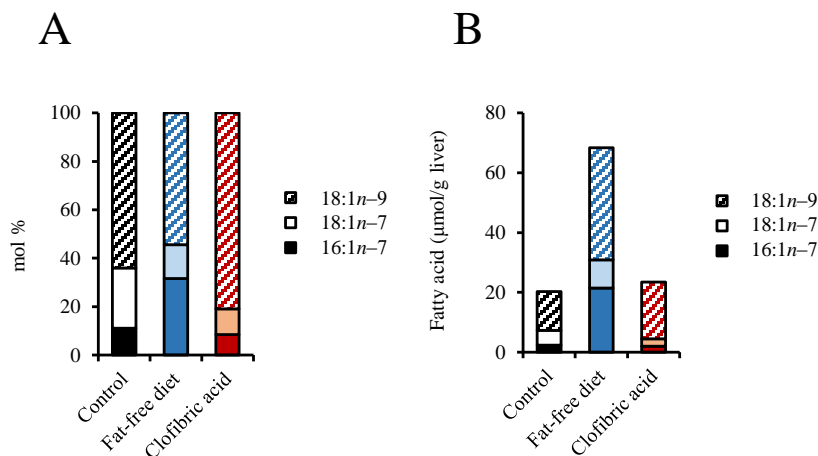
#### 第4節 無脂肪食群とクロフィブリン酸群における肝脂肪酸組成の大きな違い

肝臓における総脂質の脂肪酸組成を Table 4-3 に示した。対照群では 16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 の割合はそれぞれ 1.84、4.01 および 10.35%であった。3種類の MUFA の合計を 100%としたとき、16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 の割合はそれぞれ 11.2、24.9 および 63.9%であった (Fig. 4-5A)。無脂肪食摂取によって総脂肪酸中の MUFA の割合が増加した。16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 含量はそれぞれ対照群の 9.25、1.88 および 2.90 倍に増加し (Table 4-3、Fig. 4-5B)、3種類の MUFA の合計を 100%としたとき、16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 の割合はそれぞれ 31.6、14.0 および 54.4%であった (Fig. 4-5A)。クロフィブリン酸群では総脂肪酸に占める 18:1*n*-9 の割合および含量が増加し、それぞれ対照群の 1.59 および 1.47 倍に増加したが、無脂肪食群の場合とは異なり、16:1*n*-7 に関しては変化が認められず、また 18:1*n*-7 の割合および含量は減少した (Table 4-3、Fig. 4-5B)。クロフィブリン酸群では、3種類の MUFA の合計を 100%としたとき、16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 の割合はそれぞれ 9.5、11.9 および 78.6%であった (Fig. 4-5A)。

**Table 4-3.** Fatty Acid Profiles of Hepatic Lipids

Fatty acids	Control	Fat-free diet	Clofibrinic acid
	(mol %)		
16:0	28.01 ± 3.66 <sup>a</sup>	39.49 ± 2.24 <sup>b</sup>	28.01 ± 1.84 <sup>a</sup>
16:1 $n$ -7	1.84 ± 0.62 <sup>a</sup>	12.28 ± 0.82 <sup>b</sup>	1.73 ± 0.34 <sup>a</sup>
18:0	16.13 ± 2.16 <sup>a</sup>	9.98 ± 1.61 <sup>b</sup>	17.75 ± 1.08 <sup>a</sup>
18:1 $n$ -7	4.01 ± 0.70 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.94 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.19 <sup>c</sup>
18:1 $n$ -9	10.35 ± 1.76 <sup>a</sup>	21.35 ± 3.75 <sup>b</sup>	16.41 ± 1.30 <sup>c</sup>
18:2 $n$ -6	21.48 ± 1.31 <sup>a</sup>	2.41 ± 0.56 <sup>b</sup>	10.04 ± 0.54 <sup>c</sup>
18:3 $n$ -3	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.05 <sup>b</sup>
20:3 $n$ -9	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.08 <sup>b</sup>
20:3 $n$ -6	0.67 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.22 <sup>b</sup>
20:4 $n$ -6	12.68 ± 3.39 <sup>a</sup>	5.54 ± 1.58 <sup>b</sup>	15.63 ± 1.26 <sup>a</sup>
20:5 $n$ -3	0.68 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.20 <sup>a</sup>
22:5 $n$ -3	0.99 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>c</sup>
22:6 $n$ -3	2.66 ± 0.48 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.49 <sup>b</sup>	2.74 ± 0.36 <sup>a</sup>
Total (μmol/g liver)	125.4 ± 15.5 <sup>a</sup>	175.3 ± 11.9 <sup>b</sup>	115.4 ± 8.9 <sup>a</sup>
Total (μmol/liver)	1495 ± 188 <sup>a</sup>	2320 ± 331 <sup>b</sup>	2216 ± 117 <sup>b</sup>

Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibrinic acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Means in the same row without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-5.** Changes in Proportions within MUFAs and Contents of 16:1 $n$ -7, 18:1 $n$ -7, and 18:1 $n$ -9 in Hepatic Lipids by Fat-Free Diet Feeding and the Clofibrinic Acid Treatment. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibrinic acid at 0.5% (w/w) for 7 days before being killed. (A) Proportions (mol%) within MUFAs (proportions of 16:1 $n$ -7, 18:1 $n$ -7, and 18:1 $n$ -9 in the sum of these three fatty acids); cumulative chart bars were calculated on the basis of data in Table 4-3. (B) Contents (μmol/g liver) of 16:1 $n$ -7, 18:1 $n$ -7 and 18:1 $n$ -9; cumulative chart bars were calculated on the basis of data in Table 4-3.

## 第5節 肝臓における 16:1n-7 の優先的な分解

16:1n-7、18:1n-7 および 18:1n-9 について、肝ホモジネートを用いて  $\beta$  酸化速度を *in vitro* で比較した。*In vitro* におけるミトコンドリアの  $\beta$  酸化速度は、16:1n-7 > 18:1n-7  $\approx$  18:1n-9 の順であった。16:1n-7 の  $\beta$  酸化速度を 1 とすると 18:1n-7 および 18:1n-9 はそれぞれ 0.45、0.62 であった (Table 4-4)。クロフィブリン酸投与によりミトコンドリアにおける 16:1n-7 の  $\beta$  酸化速度は顕著に上昇したのに対し、無脂肪食摂取による有意な変化は認められなかった (Table 4-4)。ミトコンドリアにおける 18:1n-7 および 18:1n-9 の  $\beta$  酸化活性もクロフィブリン酸投与によって 16:1n-7 を基質とした場合と同程度の上昇が認められた。一方、無脂肪食摂取によっていずれの MUFA に対する  $\beta$  酸化速度にも有意な変化は認められなかった (Table 4-4)。結果として、無脂肪食群およびクロフィブリン酸群における 16:1n-7、18:1n-7 および 18:1n-9 の  $\beta$  酸化速度の相対比は、対照群とほぼ同じであった。次に、脂肪酸の  $\beta$  酸化に関わる酵素について検討した。ミトコンドリアにおける脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1a) は、mRNA 発現量 (Fig. 4-6A)、タンパク質発現量 (Fig. 4-6B) ともにクロフィブリン酸投与によって顕著に増加していた。クロフィブリン酸は、また、ミトコンドリアの  $\beta$  酸化の初発酵素である、medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)、long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD)、very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) の mRNA 発現量も増加させた。さらに、脂肪酸酸化酵素遺伝子の転写調節に係わる lipin1 と peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) の mRNA も増加していた。一方、無脂肪食群では CPT1a 遺伝子の発現量が高いにもかかわらず、CPT1a タンパク質量に変化は認められなかった (Fig. 4-6A、B)。MCAD、LCAD、VLCAD 遺伝子の発現量は無脂肪食摂取により変化しなかった (Fig. 4-6A)。次に、ペルオキシソームの  $\beta$  酸化系について検討を加えた。ペルオキシソームの  $\beta$  酸化の初発酵素である acyl-CoA oxidase (ACOX1) の mRNA は、クロフィブリン酸投与によって顕著に増加した (Fig. 4-7)。ペルオキシソームの  $\beta$  酸化における 16:1n-7、18:1n-7 および 18:1n-9 の基質選択性に関する情報はほとんどない。そこで、この3種類の MUFA の coenzyme A エステルを基質としてペルオキシソームの  $\beta$  酸化活性を比較したところ、活性の強さは 16:1n-7 CoA  $\gg$  18:1n-7 CoA  $\approx$  18:1n-9 CoA であった (Table 4-5)。16:1n-7 CoA を 1 としたときの相対活性は、18:1n-7 と 18:1n-9 に対してそれぞれ、0.66 および 0.64 であった (Table 4-5)。3種類の MUFA に対するペルオキシソーム  $\beta$  酸化の基質特異性は、無脂肪食群とクロフィブリン酸群においてもほぼ同じであった。ペルオキシソームの  $\beta$  酸化活性は、いずれの MUFA に対してもクロフィブリン酸投与によ

って著しく上昇した。*In vitro*におけるミトコンドリアとペルオキシソームの2種類の $\beta$ 酸化活性の結果から、16:1*n*-7は18:1*n*-7や18:1*n*-9よりも速やかに分解されることが示唆された。

$\beta$ 酸化活性に対するMUFAの基質選択性および薬理的、栄養学的マニピュレーションによる影響について肝ホモジネートを用いた*in vitro*の測定結果を確認するために、肝スライスを用いて*ex vivo*における $\beta$ 酸化速度を調べた。対照群において3種のMUFAの脂肪酸 $\beta$ 酸化速度は、16:1*n*-7 > 18:1*n*-7  $\approx$  18:1*n*-9であった (Table 4-6)。3種のMUFAの相対値は、16:1*n*-7を1とすると18:1*n*-7および18:1*n*-9を基質とした場合に、それぞれ0.46、0.50であった。対照群において、*ex vivo*における結果は、肝ホモジネートを用いた*in vitro*での結果とよく一致していた。*Ex vivo*における16:1*n*-7の $\beta$ 酸化速度は、無脂肪食群およびクロフィブリン酸群のいずれにおいても対照群と同様に、18:1*n*-7や18:1*n*-9のほぼ2倍を示した。無脂肪食群において、16:1*n*-7、18:1*n*-7、18:1*n*-9の $\beta$ 酸化活性はいずれも対照群より低かった。一方、クロフィブリン酸群では、16:1*n*-7と18:1*n*-7の $\beta$ 酸化速度が対照群に比べ有意に高かった。クロフィブリン酸群における16:1*n*-7、18:1*n*-7、18:1*n*-9の $\beta$ 酸化速度は、無脂肪食群と比べると、それぞれ、4.54倍、4.57倍、5.94倍高かった。

**Table 4-4.** Mitochondrial  $\beta$ -Oxidation *In Vitro* of MUFAs in Liver Homogenates

Fatty acids	Control	Fat-free diet	Clofibric acid
	(nmol/min/g liver)		
16:1 $n$ -7	301 $\pm$ 62 <sup>ax</sup> (100.0 $\pm$ 20.6)	249 $\pm$ 37 <sup>ax</sup> (82.7 $\pm$ 12.3)	831 $\pm$ 36 <sup>bx</sup> (276.1 $\pm$ 12.0)
18:1 $n$ -7	135 $\pm$ 29 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 21.5)	132 $\pm$ 24 <sup>ay</sup> (97.8 $\pm$ 17.8)	348 $\pm$ 58 <sup>by</sup> (257.8 $\pm$ 43.0)
18:1 $n$ -9	187 $\pm$ 35 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 18.7)	164 $\pm$ 12 <sup>ay</sup> (87.7 $\pm$ 6.4)	439 $\pm$ 8 <sup>bz</sup> (234.8 $\pm$ 4.3)

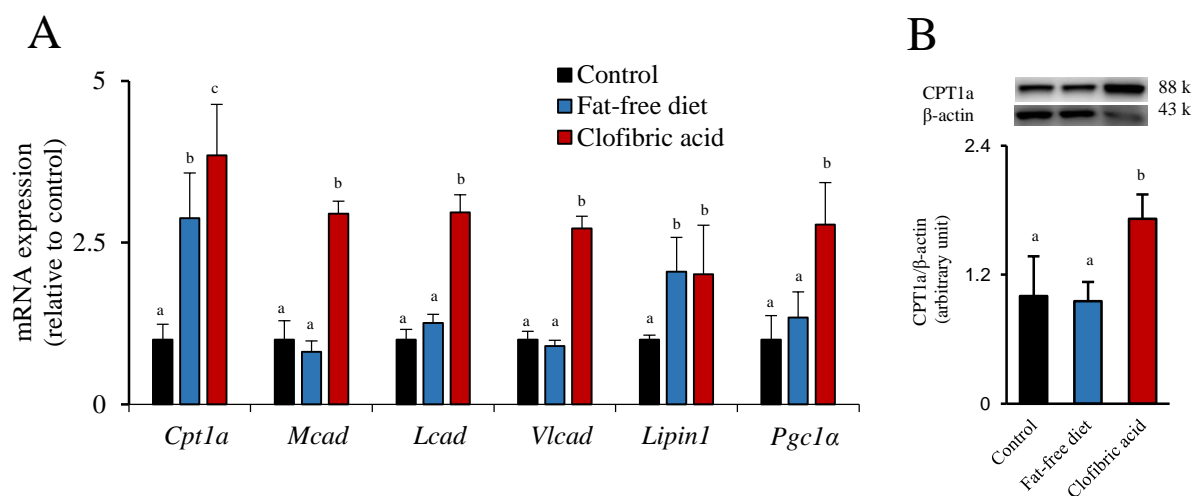
Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. The mitochondrial oxidation of 16:1 $n$ -7, 18:1 $n$ -7, and 18:1 $n$ -9 in liver homogenates was estimated *in vitro*. Liver homogenates were incubated with [<sup>14</sup>C]16:1 $n$ -7, [<sup>14</sup>C]18:1 $n$ -7, or [<sup>14</sup>C]18:1 $n$ -9 in the presence and absence of KCN; [<sup>14</sup>C]-labeled acid-soluble products were extracted and the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced was trapped; the cyanide-sensitive part of oxidation was taken as mitochondrial oxidation. The rate of fatty acid oxidation is presented as the sum of acid-soluble oxidation products and CO<sub>2</sub>. Values in parentheses represent a percentage of the control. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). Means in the same row without a common superscript (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ). Means in the same column without a common superscript (x, y, z) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table 4-5.** Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation *In Vitro* of MUFAs in Liver Homogenates

Fatty acids	Control	Fat-free diet	Clofibric acid
	(nmol/min/mg protein)		
16:1 $n$ -7	5.89 $\pm$ 0.46 <sup>ax</sup> (100.0 $\pm$ 7.8)	4.25 $\pm$ 0.52 <sup>ax</sup> (72.2 $\pm$ 8.8)	96.63 $\pm$ 8.66 <sup>bx</sup> (1640.6 $\pm$ 147.0)
18:1 $n$ -7	3.86 $\pm$ 0.37 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 9.6)	2.55 $\pm$ 0.04 <sup>by</sup> (66.1 $\pm$ 1.0)	54.91 $\pm$ 0.83 <sup>cy</sup> (1422.5 $\pm$ 21.5)
18:1 $n$ -9	3.75 $\pm$ 0.10 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 2.7)	2.61 $\pm$ 0.01 <sup>ay</sup> (69.4 $\pm$ 0.3)	55.41 $\pm$ 1.51 <sup>by</sup> (1477.6 $\pm$ 40.3)

Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. The peroxisomal oxidation of *cis*-palmitoleoyl-CoA, *cis*-vaccenoyl-CoA, and oleoyl-CoA in liver homogenates was estimated *in vitro* as the NAD<sup>+</sup> reduction rate. Values in parentheses represent a percentage of the control. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). Means in the same row without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.05$ ). Means in the same column without a common superscript (x, y) are significantly different ( $p < 0.05$ ).



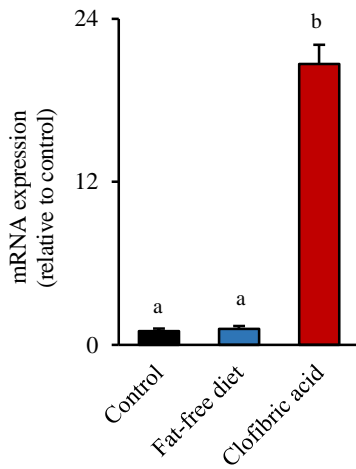


**Fig. 4-6.** Expression of Genes Encoding Enzymes Related to Mitochondrial  $\beta$ -Oxidation and of the CPT1a Protein. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5 % (w/w) for 7 days. (A) mRNA encoding CPT1a, MCAD, LCAD, VLCAD, lipin1, and PGC1 $\alpha$ . (B) CPT1a protein; visible bands represent CPT1a and  $\beta$ -actin as indicated. Immunoblotting was carried out on liver extracts (15  $\mu$ g of protein each). Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 6–10). <sup>a, b, c</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ). In the absence of a superscript, the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

**Table 4-6.** Oxidation *Ex Vivo* of MUFAs in Liver Slices

Fatty acids	Control	Fat-free diet	Clofibric acid
		( $\times 10^5$ dpm/30 min/g liver)	
16:1n-7	1.63 $\pm$ 0.20 <sup>ax</sup> (100.0 $\pm$ 12.3)	0.48 $\pm$ 0.12 <sup>bx</sup> (29.4 $\pm$ 7.4)	2.18 $\pm$ 0.33 <sup>cx</sup> (133.8 $\pm$ 20.2)
18:1n-7	0.75 $\pm$ 0.10 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 13.3)	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>by</sup> (37.3 $\pm$ 5.3)	1.28 $\pm$ 0.19 <sup>cy</sup> (170.7 $\pm$ 25.3)
18:1n-9	0.81 $\pm$ 0.17 <sup>ay</sup> (100.0 $\pm$ 21.0)	0.17 $\pm$ 0.07 <sup>by</sup> (21.0 $\pm$ 8.6)	1.01 $\pm$ 0.02 <sup>ay</sup> (124.7 $\pm$ 2.5)

Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Liver slices were incubated with [ $^{14}$ C]16:1n-7, [ $^{14}$ C]18:1n-7, or [ $^{14}$ C]18:1n-9. [ $^{14}$ C]-Labeled acid-soluble products were extracted and the  $^{14}$ CO $_2$  produced was trapped. The rate of fatty acid oxidation is presented as the sum of acid-soluble oxidation products and CO $_2$ . Values in parentheses represent a percentage of the control. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4–6). Means in the same row without a common superscript (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.05$ ). Means in the same column without a common superscript (x, y) are significantly different ( $p < 0.05$ ).



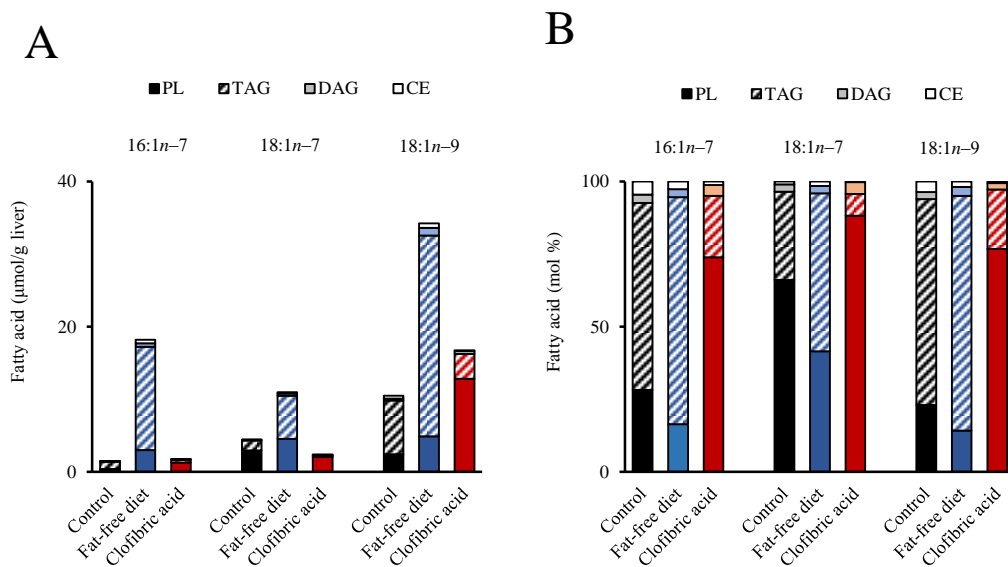
**Fig. 4-7.** Expression of mRNA Encoding ACOX1 in the Liver. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5 % (w/w) for 7 days. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5-6). <sup>a, b</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 第 6 節 $\beta$ 酸化における MUFA の選択性に影響する可能性を有するその他の因子

3 種類の MUFA の肝脂質クラスへの分布を調べ、Table 4-7 に示した。Table 4-7 の結果をもとにして、Fig. 4-8A には 3 種の MUFA の量を脂質クラス別に示し、また、Fig. 4-8B には、3 種の MUFA それぞれの脂質クラスへの分布割合を示した。対照ラットの肝臓において、ほとんどの 16:1*n*-7 は TAG (64.3%、0.98  $\mu\text{mol/g liver}$ ) とリン脂質 (PL、28.2%、0.43  $\mu\text{mol/g liver}$ ) に分布していた。同様に 18:1*n*-9 も主として TAG (70.9%、7.44  $\mu\text{mol/g liver}$ ) と PL (23.0%、2.42  $\mu\text{mol/g liver}$ ) に分布していた。16:1*n*-7 や 18:1*n*-9 と異なり、18:1*n*-7 は主として PL に分布し (66.0%、2.95  $\mu\text{mol/g liver}$ )、TAG への分布の割合は少なかった (30.5%、1.36  $\mu\text{mol/g liver}$ )。無脂肪食を摂取すると、3 種類の MUFA 量はいずれも増加した (Fig. 4-5B)。このとき、16:1*n*-7 は主として TAG (78.2%、14.23  $\mu\text{mol/g liver}$ ) と PL (16.4%、2.99  $\mu\text{mol/g liver}$ ) に分布していた (Table 4-7、Fig. 4-8)。同様に 18:1*n*-9 も主として TAG (80.7%、27.64  $\mu\text{mol/g liver}$ ) と PL (14.3%、4.89  $\mu\text{mol/g liver}$ ) に分布していた (Table 4-7、Fig. 4-8)。一方、クロフィブリン酸を投与すると、肝臓の 18:1*n*-9 量が対照群に比べて増加するのに対し、16:1*n*-7 と 18:1*n*-7 の量は減少した (Fig. 4-5)。クロフィブリン酸投与により 18:1*n*-9 の PL への分布量が増加するのに対して (76.7%、12.84  $\mu\text{mol/g liver}$ )、TAG への分布量は減少した (20.5%、3.43  $\mu\text{mol/g liver}$ )。

このように、16:1*n*-7、18:1*n*-7、18:1*n*-9 は脂質クラスへの分布が異なること、無脂肪食群およびクロフィブリン酸群を対照群と比べると脂質クラスへの振り分けすなわち‘チャネリング’が MUFA 量の調節

に影響する可能性が考えられる。実際、脂肪酸のグリセロ脂質へのエステル化のプロセスは、脂肪酸の分解とも密接に関わっているものと考えられている。そこで、脂肪酸のチャネリングに関与する酵素の遺伝子について検討を加えた。Acyl-CoA synthetase (ACSL)は、脂肪酸を coenzyme A とのチオエステルに変換する酵素であり、肝臓に主として発現している *Acs11*、*Acs13*、*Acs15* の発現量変動を調べた (Fig. 4-9A)。また、グリセロ脂質合成に関与する glycerol-phosphate acyltransferase (GPAT)、DAG に脂肪酸を導入する diacylglycerol acyltransferase (DGAT)の遺伝子である *Gpat1*、*Dgat1*、*Dgat2* の発現量を調べた (Fig. 4-9A)。無脂肪食により *Acs15*、*Gpat1*、*Dgat2* の発現量が増加した。*Acs15* は、FAS と ACC によって合成された 16:0 を 16:0-CoA に変換することによって、SCD や PCE に基質を供給する役割を担っている可能性が考えられる。一方、クロフィブリン酸投与により *Acs11*、*Acs13*、TAG を加水分解する酵素である adipose triglyceride lipase (ATGL) の遺伝子 *Atgl* の発現量が増加していた。これらの ACSL と GPAT のアイソフォームは脂肪酸を異なる代謝経路に導入するチャネリングに関与すると考えられているので、無脂肪食群とクロフィブリン酸群で異なるアイソフォームの発現が変化することが、脂質分子への振り分けに関与しているかもしれない。また、クロフィブリン酸群においては ATGL 遺伝子およびタンパク質の発現量が増加し、活性が上昇していることから (Fig. 4-9B)、いったん TAG に取り込まれた脂肪酸が加水分解され  $\beta$  酸化に使用されている可能性も考えられる。



**Fig. 4-8.** Distribution of 16:1n-7, 18:1n-7, and 18:1n-9 among PL, TAG, DAG, and CE in the Liver. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5 % (w/w) for 7 days. (A) Contents of the three MUFAs in PL, TAG, DAG, and CE. (B) Proportions (mol%) among PL, TAG, DAG, and CE.

**Table 4-7.** Fatty Acid Profiles of Hepatic Major Lipid Classes

Lipid classes	Fatty acids	Control	Fat-free diet	Clofibrac acid
			(μmol/g liver)	
PL				
	16:0	13.36 ± 0.68 <sup>x</sup>	13.43 ± 1.01 <sup>x</sup>	27.04 ± 3.32 <sup>y</sup>
	16:1 <sub>n-7</sub>	0.43 ± 0.08 <sup>x</sup>	2.99 ± 0.41 <sup>y</sup>	1.30 ± 0.22 <sup>z</sup>
	18:0	18.44 ± 2.21	18.71 ± 2.49	19.13 ± 2.20
	18:1 <sub>n-7</sub>	2.95 ± 0.51 <sup>x</sup>	4.55 ± 0.64 <sup>y</sup>	2.08 ± 0.08 <sup>z</sup>
	18:1 <sub>n-9</sub>	2.42 ± 0.04 <sup>x</sup>	4.89 ± 0.58 <sup>y</sup>	12.84 ± 1.28 <sup>z</sup>
	18:2 <sub>n-6</sub>	12.55 ± 0.63 <sup>x</sup>	4.29 ± 0.23 <sup>y</sup>	9.23 ± 1.16 <sup>z</sup>
	18:3 <sub>n-3</sub>	0.12 ± 0.08 <sup>x</sup>	0.03 ± 0.03 <sup>y</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>y</sup>
	20:3 <sub>n-9</sub>	0.03 ± 0.02 <sup>x</sup>	2.37 ± 0.55 <sup>y</sup>	1.09 ± 0.25 <sup>z</sup>
	20:3 <sub>n-6</sub>	0.88 ± 0.09 <sup>x</sup>	1.22 ± 0.14 <sup>x</sup>	2.91 ± 0.76 <sup>y</sup>
	20:4 <sub>n-6</sub>	18.60 ± 1.74	14.26 ± 0.63	17.08 ± 4.21
	20:5 <sub>n-3</sub>	0.63 ± 0.06 <sup>x</sup>	0.21 ± 0.08 <sup>y</sup>	0.71 ± 0.26 <sup>x</sup>
	22:5 <sub>n-3</sub>	0.71 ± 0.04 <sup>x</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>y</sup>	0.37 ± 0.14 <sup>z</sup>
	22:6 <sub>n-3</sub>	3.35 ± 0.38 <sup>x</sup>	5.80 ± 0.43 <sup>y</sup>	2.88 ± 1.09 <sup>x</sup>
	Total	74.47 ± 2.96 <sup>x</sup>	72.84 ± 3.57 <sup>x</sup>	96.69 ± 7.25 <sup>y</sup>
TAG				
	16:0	10.04 ± 1.74 <sup>x</sup>	47.07 ± 5.25 <sup>y</sup>	2.57 ± 0.71 <sup>z</sup>
	16:1 <sub>n-7</sub>	0.98 ± 0.18 <sup>x</sup>	14.23 ± 0.72 <sup>y</sup>	0.37 ± 0.15 <sup>x</sup>
	18:0	0.54 ± 0.15 <sup>x</sup>	1.89 ± 0.23 <sup>y</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>z</sup>
	18:1 <sub>n-7</sub>	1.36 ± 0.23 <sup>x</sup>	5.96 ± 0.56 <sup>y</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>z</sup>
	18:1 <sub>n-9</sub>	7.44 ± 1.11 <sup>x</sup>	27.64 ± 2.29 <sup>y</sup>	3.43 ± 1.12 <sup>z</sup>
	18:2 <sub>n-6</sub>	9.59 ± 1.90 <sup>x</sup>	0.56 ± 0.21 <sup>y</sup>	0.71 ± 0.19 <sup>y</sup>
	18:3 <sub>n-3</sub>	0.33 ± 0.07 <sup>x</sup>	0.04 ± 0.04 <sup>y</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>y</sup>
	20:3 <sub>n-9</sub>	0.01 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.06 ± 0.03 <sup>y</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>x</sup>
	20:3 <sub>n-6</sub>	0.14 ± 0.04 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>y</sup>
	20:4 <sub>n-6</sub>	0.58 ± 0.16 <sup>x</sup>	0.21 ± 0.15 <sup>y</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>y</sup>
	20:5 <sub>n-3</sub>	0.36 ± 0.11 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>y</sup>
	22:5 <sub>n-3</sub>	0.85 ± 0.24 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	ND <sup>y</sup>
	22:6 <sub>n-3</sub>	1.73 ± 0.43 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>y</sup>
	Total	33.94 ± 5.59 <sup>x</sup>	97.67 ± 7.12 <sup>y</sup>	7.69 ± 2.24 <sup>z</sup>

(continued)

**Table 4-7** (continued)

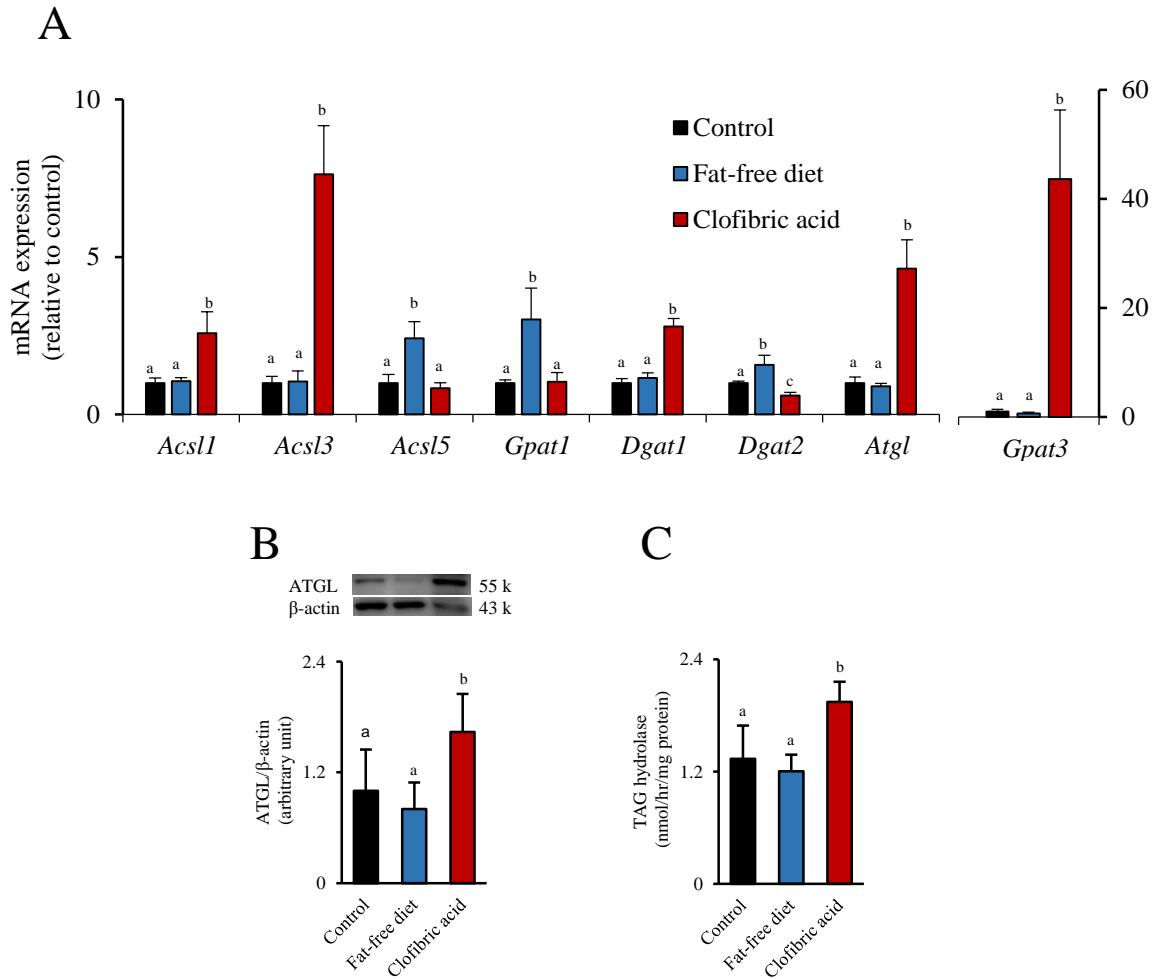
## DAG

16:0	0.69 ± 0.04 <sup>x</sup>	2.09 ± 0.38 <sup>y</sup>	0.54 ± 0.01 <sup>x</sup>
16:1 <sub>n-7</sub>	0.04 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.50 ± 0.09 <sup>y</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>x</sup>
18:0	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.07	0.21 ± 0.03
18:1 <sub>n-7</sub>	0.11 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.28 ± 0.06 <sup>y</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>x</sup>
18:1 <sub>n-9</sub>	0.26 ± 0.05 <sup>x</sup>	1.07 ± 0.19 <sup>y</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>x</sup>
18:2 <sub>n-6</sub>	0.62 ± 0.08 <sup>x</sup>	0.17 ± 0.07 <sup>y</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>z</sup>
18:3 <sub>n-3</sub>	0.01 ± 0.00 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	ND <sup>y</sup>
20:3 <sub>n-9</sub>	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01
20:3 <sub>n-6</sub>	0.02 ± 0.00 <sup>x</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>y</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>z</sup>
20:4 <sub>n-6</sub>	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.01
20:5 <sub>n-3</sub>	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	ND
22:5 <sub>n-3</sub>	0.02 ± 0.00 <sup>x</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>
22:6 <sub>n-3</sub>	0.02 ± 0.00 <sup>xy</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>y</sup>
Total	2.14 ± 0.24 <sup>x</sup>	4.56 ± 0.64 <sup>y</sup>	1.86 ± 0.11 <sup>x</sup>

## CE

16:0	0.89 ± 0.22 <sup>x</sup>	1.08 ± 0.14 <sup>x</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>y</sup>
16:1 <sub>n-7</sub>	0.07 ± 0.03 <sup>x</sup>	0.49 ± 0.10 <sup>y</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>x</sup>
18:0	0.42 ± 0.12 <sup>xy</sup>	0.51 ± 0.17 <sup>x</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>y</sup>
18:1 <sub>n-7</sub>	0.05 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.17 ± 0.04 <sup>y</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>z</sup>
18:1 <sub>n-9</sub>	0.38 ± 0.06 <sup>x</sup>	0.64 ± 0.10 <sup>y</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>z</sup>
18:2 <sub>n-6</sub>	0.33 ± 0.05 <sup>x</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>y</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>z</sup>
18:3 <sub>n-3</sub>	0.01 ± 0.00 <sup>x</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>y</sup>	ND <sup>y</sup>
20:3 <sub>n-9</sub>	0.03 ± 0.01 <sup>x</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>y</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>x</sup>
20:3 <sub>n-6</sub>	ND	ND	ND
20:4 <sub>n-6</sub>	0.13 ± 0.03 <sup>x</sup>	0.17 ± 0.07 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>
20:5 <sub>n-3</sub>	0.01 ± 0.00 <sup>x</sup>	ND <sup>y</sup>	ND <sup>y</sup>
22:5 <sub>n-3</sub>	ND	ND	ND
22:6 <sub>n-3</sub>	ND	ND	ND
Total	2.32 ± 0.37 <sup>x</sup>	3.21 ± 0.21 <sup>y</sup>	0.80 ± 0.12 <sup>z</sup>

Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibrac acid at 0.5% (w/w) for 7 days. Lipids were extracted from the liver and separated by TLC. Methyl esters of fatty acids were measured by gas-liquid chromatography. Values represent the mean ± S.D. ( $n = 5$ ). Means in the same column without a common superscript (x, y, z) are significantly different ( $p < 0.05$ ). In the absence of a superscript, the means are not significantly different ( $p > 0.05$ ). ND : less than 5 nmol/g liver.



**Fig. 4-9.** Expression of Genes Encoding Enzymes Related to the Channeling of Fatty Acids towards Glycerolipid Synthesis Pathways and that of ATGL in the Liver. Rats were fed a standard diet for 28 days, a fat-free diet for 28 days, or a diet admixed with clofibric acid at 0.5 % (w/w) for 7 days. (A) mRNA encoding of ACSL1, ACSL3, ACSL5, GPAT1, GPAT3, DGAT1, DGAT2 and ATGL. (B) ATGL protein; visible bands represent ATGL and  $\beta$ -actin as indicated. Immunoblotting was carried out on liver extracts (15  $\mu$ g of protein each). (C) ATGL activities were estimated as [ $^{14}$ C]triolein hydrolysis in the cytoplasmic fraction of the liver. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5–6). <sup>a,b</sup> Means without a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 第7節 小括

従来、肝臓の MUFA の組成は炭素鎖伸長と不飽和化によって調節され、中でも不飽和化が主要な役割を果たすと考えられてきた [27]。肝ミクロソームや肝臓から精製した SCD を用いて 18:0-CoA と 16:0-CoA に対する活性を比較した従来の研究から、16:0-CoA に対する活性は 18:0-CoA に対する活性の 46～86% であることが示されている [18, 34, 57]。しかしながら、実際の肝臓の MUFA 組成を見ると、16:1n-7 は 18:1n-9 よりもはるかに少ない。ところが、従来の報告からはこのような矛盾が生じる理由を合理的に説明することはできなかった。MUFA 合成活性と実際の MUFA 含有量との間の矛盾を説明するために、本研究では脂肪酸  $\beta$  酸化が MUFA 組成の調節に関与するという仮説を立てた。本章において、16:1n-7 がミトコンドリアとペルオキシソームの両方において 18:1n-7 および 18:1n-9 よりも速やかに  $\beta$  酸化を受けることが明らかとなったことから、16:1n-7 が少ないことが説明できる (Fig. 4-10A)。16:1n-7 の量と  $\beta$  酸化の関連性に関して更なる知見を得るために、ラットに対して栄養学的マニピュレーション (無脂肪食摂取) および薬理的マニピュレーション (クロフィブリン酸投与) の 2 種類のマニピュレーションを行った。両者とも MUFA 合成系、特に SCD を同程度に誘導した。一方、脂肪酸の分解はクロフィブリン酸投与により亢進するが、無脂肪食群では亢進しない。したがって、両者を比較することによって  $\beta$  酸化の役割を明確にできる。また、肝 MUFA 組成は飼料にから摂取する脂肪酸によって大きく左右される。実際、げっ歯類用の標準飼料 (CE-2、日本クレア) には 18:1n-9 が 19.7% (w/w) 含まれるのに対し、16:1n-7 および 18:1n-7 はそれぞれ 2.0 および 2.2% しか含まれていない。飼料から MUFA を摂取することが肝臓の MUFA 組成に影響する可能性を排除するためには、無脂肪食が適している。栄養学的マニピュレーションによって、肝臓では MUFA の *de novo* 合成に関わる酵素遺伝子の誘導、MUFA 合成に関与する酵素遺伝子の誘導および活性の上昇が認められた。一方、脂肪酸分解に係わる遺伝子には変化が認められず、また、*ex vivo* において脂肪酸分解は抑制されていた。これらの現象は、肝臓において 3 種類の MUFA がすべて増加することをよく説明できる (Fig. 4-10B)。さらに、薬理的マニピュレーションによって、MUFA 合成の亢進が亢進しているにもかかわらず、16:1n-7 および 18:1n-7 には増加は認められなかった。一方、脂肪酸の  $\beta$  酸化に関与する酵素の遺伝子が誘導されるとともに、脂肪酸の  $\beta$  酸化活性が亢進していた。3 種類の MUFA を比較すると、クロフィブリン酸投与群においても 16:1n-7 は 18:1n-7 や 18:1n-9 に比べて約 2 倍の速度で分解されることが、*in vitro* および *ex vivo* の実験によって示された。クロフィブリン酸投与によって、MUFA 合成が亢進する一方、分解も亢進し、中でも 16:1n-

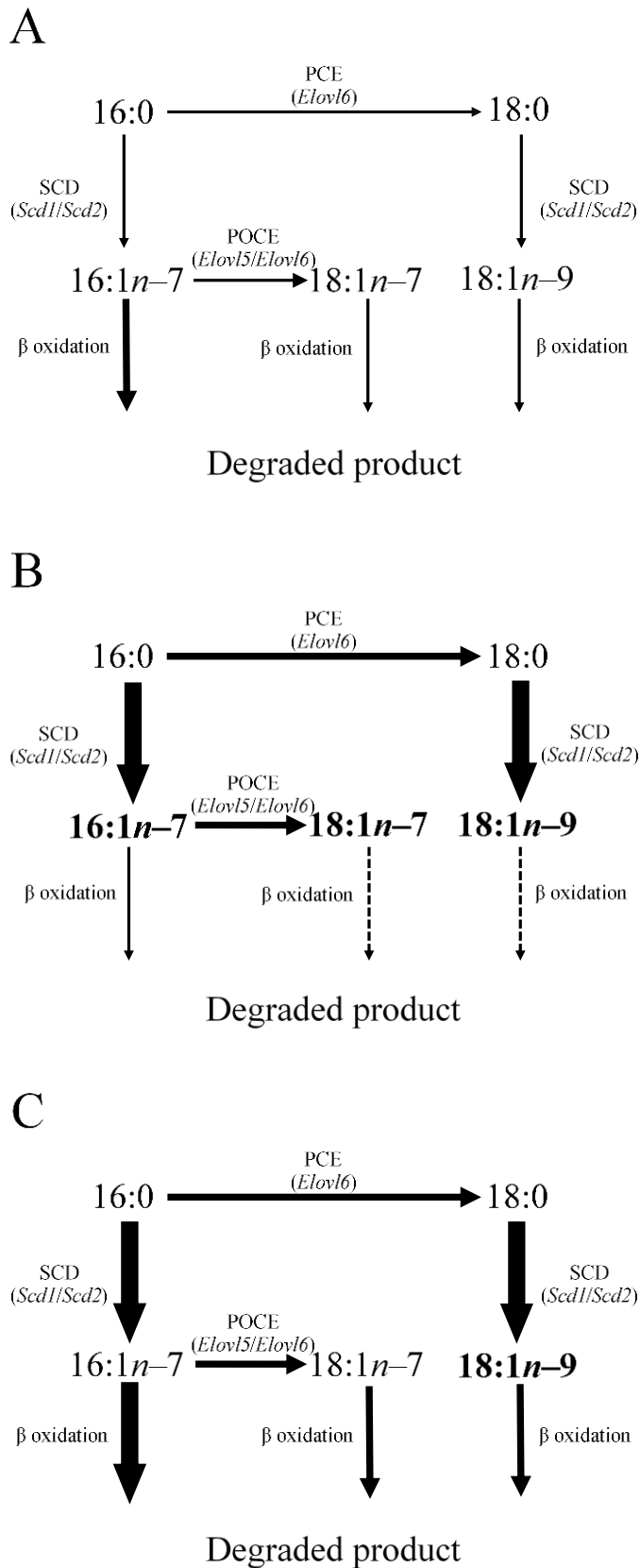
7 が速やかに分解されることが MUFA 組成に反映され、18:1*n*-9 のみに増加が認められるという結果になったものと考えられる (Fig. 4-10C)。

本研究では、MUFA の組成がその合成ばかりでなく分解によって調節を受け、結果として 16:1*n*-7 が低く保たれることを示した。さらに、脂肪酸が TAG や PL などの脂質分子にエステル化される、あるいは β 酸化を受けると異なる経路に導入する振り分けも MUFA 組成を調節する因子である可能性が示唆された。2 種類のマニピュレーションにおいて、振り分けに関与する因子が異なる挙動を示すことが明らかとなったが、MUFA 組成の決定に対する役割の詳細を明らかにするためには、更なる研究が必要である。

近年、3 種類の MUFA がそれぞれ特徴的な生理機能をもつこと、病態と関連があることなどが報告されている [4, 31, 87, 88, 94]、中でも、16:1*n*-7 はリポカインとして糖代謝において重要な役割を果たすことが報告されている [7, 9, 13, 17, 26, 64, 96]。本章の結果より、16:1*n*-7 は生体内において、その含量を低く保たれていることを明らかにしたが、その生理的な意義に関しては十分に明らかにすることはできていない。脂肪酸の分解によって生理活性をもつ 16:1*n*-7 の含量を低く保つことで、その作用の抑制を介したエネルギー代謝調節が行われていることも考えられる。

本章で、クロフィブリン酸を利用することによって明らかにした、16:1*n*-7 含量を肝臓で低く保つ機構は、同じく PPARα アゴニストである PFOA に関してもあてはまると考えられる。すなわち、PFOA 投与ラットの肝臓で 16:1*n*-7 含量が低く保たれている要因は、PFOA によって亢進した脂肪酸分解系が 16:1*n*-7 を優先的に分解することによるものである。これらのことから、PFOA が肝臓の 16:1*n*-7 含量を変動させないことを介して、糖代謝、さらにエネルギー代謝の調節に干渉する可能性が考えられる。





**Fig. 4-10.** Proposed Model for the Metabolic Regulation of the MUFA Profile in the Liver. (A) In the livers of control rats, the proportion of 16:1 $n-7$  was maintained at low levels due to 1) the higher rate of oxidation of 16:1 $n-7$  than those of 18:1 $n-9$  and 18:1 $n-7$  and 2) the conversion of 16:1 $n-7$  to 18:1 $n-7$  by elongation. (B) Upon the feeding of a fat-free diet to rats, the formation of 16:1 $n-7$ , 18:1 $n-7$ , and 18:1 $n-9$  is increased by 1) up-regulated FAS, SCD, PCE, and POCE and 2) the unchanged or rather suppressed oxidation of 16:1 $n-7$ , 18:1 $n-7$ , and 18:1 $n-9$ . (C) The treatment of rats with clofibrate increases the proportion and mass of 18:1 $n-9$  by up-regulated PCE and SCD; 16:1 $n-7$  also appears to be generated by the induced SCD, whereas enhanced fatty acid oxidation degrades 16:1 $n-7$  more extensively than 18:1 $n-9$ . The process of the incorporation of 16:1 $n-7$ , 18:1 $n-7$ , and 18:1 $n-9$  into complex lipids, in particular TAG, may also influence the MUFA profile in the liver.

## 総括

本研究での検討により、各章で以下の諸点が明らかとなった。

### 第 1 章

- ・ラットの肝臓において、PFOA の PPAR $\alpha$  アゴニスト作用および SCD 誘導作用はクロフィブリン酸と比べて弱いことを明らかにした。
- ・ラットの肝臓において、PFOA の 18:1*n*-9 含量の増加作用はクロフィブリン酸と比べて大きいことを明らかにした。
- ・PFOA はクロフィブリン酸に比べて TAG 合成系を亢進させるため、肝 TAG 量が増加し、結果として 18:1*n*-9 含量に差異が生じることを明らかにした。

### 第 2 章

- ・PFOA は肝 TAG 含量にほとんど影響しないが、PFDA および PFD $\omega$ A は肝 TAG 含量を増加させ、その作用は高用量の PFDA で顕著であることを明らかにした。
- ・PFOA、PFDA および PFD $\omega$ A の肝臓中濃度は用量依存的に増加するが、PFOA に比べると PFDA および PFD $\omega$ A の方がより高濃度に蓄積し、かつ両者の蓄積性は同程度であることを明らかにした。
- ・PFDA は PFOA および PFD $\omega$ A と比べて TAG 合成系を亢進し、肝 TAG 量を増加させる作用が大きいことを明らかにした。

### 第 3 章

- ・PFOA および PFDA とは異なり、PFD $\omega$ A は脳および脂肪組織へと移行することを明らかにした。また、主要組織における PFD $\omega$ A 濃度の半減期は概ね同程度であることが認められた。
- ・PFD $\omega$ A は脳内濃度に依存して学習能力の低下を引き起こすことを明らかにした。

### 第 4 章

- ・肝臓の MUFA 組成は一般的には SCD によって決定されると考えられているが、16:1*n*-7 は 18:1*n*-9

および 18:1 $n$ -7 と比較して分解されやすいため、肝臓における 16:1 $n$ -7 の含量が低く保たれていることを明らかにした。

- PFOA は肝臓における MUFA 合成系を亢進するが、同時に脂肪酸分解も亢進するために、16:1 $n$ -7 の含量が低く保たれていることを明らかにした。

本研究では、炭素鎖長の異なる PFOA、PFDA および PFD $\alpha$ A の生体作用と体内分布を比較し、これらの 3 種類の PFCA には特徴的な違いが存在することを明らかにし、さらに、PFCA の生体作用は残留性だけでなく、個々の PFCA の作用の強さに起因することを明らかにした。炭素水素結合で構成される直鎖の飽和脂肪酸では、炭素数が 2 個もしくは 4 個異なることで、その生体作用において本研究で 3 種類の PFCA で認められたような著しい差異を生じるという報告はない。わずかな炭素鎖長の違いが体内動態および生体作用に顕著な違いを生むという点で、PFCA は非常に特徴的な化学物質群である。本研究は、炭素鎖長の異なる PFCA の質的な違いを明らかにしており、PFCA の生体影響を考える上で基礎的な情報として意義のあるものだと考える。

## 謝辞

本研究を学位論文としてまとめる場を与えてくださり、また、研究テーマの設定から結論に至るまで終始一貫して丁寧な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衛生化学講座 工藤なをみ教授に心より感謝と敬意の意を申し上げます。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただき、研究テーマの設定から結論に至るまで終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬学科 川嶋洋一教授に心より感謝と敬意の意を申し上げます。

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主査 城西大学大学院薬学研究科生理学講座 加園恵三教授ならびに副査 城西大学大学院薬学研究科食品機能学講座 真野博教授、城西大学大学院薬学研究科有機薬化学講座 山ノ井孝教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、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薬剤作用解析学講座 小林大介教授ならびに城西大学大学院薬学研究科生体防御学講座 日比野康英教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、種々のご助言、ご尽力を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座 岡崎真理教授、松崎広和助手ならびに城西大学大学院薬学研究科医薬品化学講座 坂本武史教授に心より感謝致します。

本研究の遂行に多大なるご尽力を賜りました城西国際大学薬学部 光本篤史教授ならびに城西大学薬学部毒性学研究室 山崎研助教 (現城西国際大学薬学部 准教授) に感謝します。

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教室の歴代の卒業生ならびに終始ご協力いただいた城西大学薬学部衛生化学教室の皆様に感謝致します。

なお、本研究は、ここに記しきれない多くの方々のご支援を得て成立していることを記し、深く感謝致します。

最後に、これまでの研究生活を温かく見守ってくださった家族に心より感謝致します。

## 実験の部

### 第1章 試薬

[1-<sup>14</sup>C] パルミトイル CoA (60 Ci/mol) は Moravek Biochemicals (米国) から入手した。[2-<sup>14</sup>C] マロニル CoA (55 Ci/mol)、[1-<sup>14</sup>C] 16:0 (56 Ci/mol)、[1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 (55 Ci/mol) および [1-<sup>14</sup>C] 酢酸 (55 Ci/mol) は American Radiolabeled Chemicals Inc. (米国) から入手した。[カルボキシル-<sup>14</sup>C] トリオレイン (108.8 mCi/mmol) は Perkin Elmer (米国) から入手後、TLC にて精製したものを使用した。ステアロイル CoA、パルミトイル CoA、パルミトオレオイル CoA、マロニル CoA、牛血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA、essentially fatty acid free)、ハイアミンヒドロキシド、ベザフィブラート、クロフィブリン酸、アプロチニン、ベスタチン、アンチパイン、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine、PC (卵黄由来))、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol、PI (大豆由来))、トリオレイン、BrMDMC は Sigma-Aldrich Japan から購入した。抗 ATGL マウスモノクローナル IgG 抗体、抗  $\beta$ -Actin マウスモノクローナル IgG 抗体および抗マウス IgG HRP 結合抗体は Santa Cruz Biotechnology (米国) から購入した。抗 CPT1A マウスモノクローナル IgG 抗体、抗 ACC ウサギモノクローナル IgG 抗体、抗 FAS ウサギモノクローナル IgG 抗体は Abcam (イギリス) から購入した。抗マウス IgG HRP 結合抗体は Cell signaling Technology (米国) から購入した。Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) はオリエンタル酵母から購入した。トリトン X-100、ロイペプチンおよびペプスタチンはナカライテスクより購入した。ノナデカノイン酸、コレステリルヘプタデカノアートおよびトリヘプタデカノインは Nu-Chek-Prep Inc. (米国)、ヘプタデカン酸メチルは東京化成工業から購入した。ベザフィブリン酸およびクロフィブリン酸は再結晶して使用した。その他の試薬は和光純薬工業の特級を使用した。

### 第2章 実験動物

日本エスエルシー社から購入した雄性 Wistar ST ラットを馴化飼育後、正常な個体を使用した。すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従うとともに、本研究計画の

動物実験委員会による審査結果に基づいた学長承認を得て「城西大学動物実験規定」に従って実施した。

## 第1節 動物の飼育

### (1) Wistar ST ラットの飼育

Wistar ST ラットは8週齢または10週齢で実験に供した。ラットには固形飼料(CE-2、日本クレア社)および水を自由摂取させた。

### (2) フィブラート、PFCA 混餌投与

クロフィブリン酸は0.0625%、0.125%、0.25%、0.375%、および0.5% (w/w)、PFCAは0.0025%、0.005%、0.01%および0.02% (w/w)の割合でCE-2粉末飼料に混合し、Wistar ST ラットに7日間水と共に自由摂取させた。すべてのラットは10週齢で実験に供した。

### (3) PFCA 経口投与

PFCA (50 mg/kg body weight/2 mL corn oil) を、Wistar ST ラットにゾンデを用いて胃内に単回投与した。ラットにはCE-2および水を自由摂取させ、投与5日後より実験に供した。PFDoAの体内動態を検証する際は、投与3日後より実験に供した。第3章においてPFDoAの投与量をふって実験を行った際には、PFDoAの投与量を5、20もしくは50 mg/kg body weight/2 mL corn oil とふって投与した。

### (4) 無脂肪食摂食

油成分を抜いたOYC改変AIN-93G粉末飼料(オリエンタル酵母)を28日間、Wistar ST ラットに水と共に自由摂取させた。すべてのラットは10週齢で実験に供した。

**Table** Nutrient composition of CE-2 diet

	%
Moisture	8.9
Crude protein	24.9
Crude fat	4.6
Crude fiber	4.1
Crude ash	6.6
Nitrogen-free extract *1	51.0
Total	100.0

\*1, consisting of carbohydrates, sugars, starches, and a major portion of materials classed as hemicellulose in feeds. Values of nutrients are provided in the catalog of CLEA Japan Inc. (2009).

**Table** Nutrient composition of fat-free diet

	%
Corn starch	46.75
$\alpha$ -starch	13.2
Sucrose	10.0
Cellulose	5.0
Casein	20.0
Vitamin mix (AIN93)	1.0
Mineral mix (AIN93G)	3.5
L-cystein	0.3
Choline bitartrate	0.25
Total	100.0

**Table** Fatty acid composition of CE-2 diet

	mol %
16:0	23.23
16:1 $n-7$	1.95
17:0	0.22
18:0	2.41
18:1 $n-7$	19.70
18:1 $n-9$	2.17
18:2 $n-6$	42.07
18:3 $n-3$	3.59
20:3 $n-9$	0.04
20:3 $n-6$	0.00
20:4 $n-6$	0.16
20:5 $n-3$	2.86
22:5 $n-3$	0.26
22:6 $n-3$	1.34
Total	100.00

## 第2節 血液の採取と臓器の摘出

エーテル麻酔下、ラットの下大静脈から血液を採取し、速やかに肝臓および精巣周囲脂肪を摘出した。血液は4℃で凝固させたあと、900 x g で15分間遠心分離して血清を得た。肝臓は生理食塩水で洗浄後、重量を測定し、小片に切り分け液体窒素下で凍結させ、-80℃で保存した。一部を使用して肝臓スライスを作製した（後述）。残りの肝臓は生理食塩水で還流し脱血した後、ミクロソーム調製に用いた（後述）。

PFCA の組織中濃度を測定する場合は、血液を採取後に心臓より生理食塩水を全身に循環させて組織を脱血した。その後、速やかに肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、脳、睾丸および脂肪組織（精巣周囲脂肪、腸周囲脂肪、皮下脂肪）を摘出した。組織重量を測定後に-30℃で保存した。

## 第3章 試料の調製

### 第1節 肝スライスの作製

解剖で得られた肝臓の一部を Krumdieck Tissue Slicer (Albama Research and Development、米国) を用いて、直系8 mm、厚さ約400 μm のスライスを作製した。

### 第2節 肝ミクロソームの調製

肝臓の重量に対して4倍量の10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートを4℃、18,000 x g で20分間遠心し (KUBOTA 7780 II ローター: RA40)、得られた上清を再び同様の条件で遠心した。この上清を0℃、105,000 x g で1時間遠心した (Hitachi CP80WX ローター: RP50T)。得られた沈殿を10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液に懸濁し、再び同様の条件で遠心した。得られた沈殿を10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液に再懸濁し (約50 mg protein/mL)、液体窒素にて凍結後、-80℃で保存した。



ミクロソーム中のタンパク質量は Lowry らの方法に従い測定した [61]。標準物質として BSA を用いた。

### 第3節 組織ホモジネートの調製

脂肪酸分析用のホモジネートは、肝臓の小片に重量に対して 19 倍量の 10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いて調製し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。PFCA 分析用のホモジネートは、肝臓の小片に重量に対して 9 倍量の 10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いて調製し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 第4節 サイトゾルの調製

TAG 加水分解活性の測定にあたり、Wu および Soni らの方法に従って、肝臓からのサイトゾルの調製を行った [85, 95]。 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した凍結肝臓を  $0^{\circ}\text{C}$  で解凍し、4 倍量のホモジナイズ緩衝液 (0.5 M ショ糖、1 mM EDTA、20 mM Tris-塩酸 (pH 7.4)、1 mM ジチオエリトリール、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンチパイン、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチン) を加え Dounce ホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1,000 x g で 10 分間遠心した。0.25 M、1.5 M ショ糖およびホモジネートの上清 (0.5 M ショ糖) を用いて不連続密度勾配をつくり、 $4^{\circ}\text{C}$ 、100,000 x g で 3 時間遠心した (CS100GXL スウィングローター : S55S-1106、Hitachi)。分取した 0.5 M ショ糖溶液をサイトゾル画分とした。タンパク質量は標準物質として BSA を用いて BCA 法に従い測定した。

FAS 活性の測定にあたり、上記とは異なる方法で肝臓のサイトゾル調整を行った。肝臓の 1.5 倍量のリン酸-重炭酸バッファー (pH 8.0) を加えてホモジナイズし、20,000 x g で 10 分間遠心した。上清をさらに 105,000 x g で 60 分間遠心し、その上清をサイトゾル画分とした。

## 第4章 脂質の分析

### 第1節 肝ホモジネートからの脂質の抽出

肝臓ホモジネートから、Bligh-Dyer 法で脂質を抽出した [6]。解凍した 5% 肝ホモジネート 1.6 mL に、抗酸化剤として 0.02% ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液を 50  $\mu$ L 加えた。この際、ガスクロマトグラフィー分析に用いる試料には内部標準物質としてコレステリルヘプタデカノアート、トリヘプタデカノインを加えた。メタノール 4 mL、クロロホルム 2 mL を加えて振とうした。その後、0.1 M 塩酸とクロロホルムを各 2 mL ずつ加えて、2 層に分離し、600 x g で 5 分間遠心後、クロロホルム層を分取した。水層を 2.4 mL のクロロホルムで再抽出して先のクロロホルム層を合わせ、得られたクロロホルム層にクロロホルム/メタノール/0.1 M 塩酸 (3:48:47, v/v) を 3.2 mL 加えて 3 分間振とうした後、遠心した。上層を取り除いた下層に窒素气流を吹き付け、溶媒を留去した後、クロロホルム/メタノール (1:1, v/v) 1 mL に溶かして総脂質とし、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 第2節 脂質の分離

総脂質から一部を分取し、シリカゲル G プレート (No.5721, Merck, ドイツ) 上にスポットし、n-ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80:30:1, v/v) で展開することにより TAG、DAG、PL、CE および FFA に分離した。プレートを乾燥させた後、0.001% プリムリン溶液 (アセトン/水 (4:1, v/v)) を噴霧し、UV (265 nm) 照射により各スポットを検出した。シリカゲルプレートから各スポットをかきとり、0.02% ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液 50  $\mu$ L およびクロロホルム/メタノール/0.1 M 塩酸 (4:4:1, v/v) を加えた。 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩放置後、遠心によりシリカゲルを分離し、0.1 M 塩酸 3 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上清を取り除いた。シリカゲルからの抽出の際、DAG、FFA、PL には内部標準物質としてヘプタデカン酸メチルを加えた。

### 第3節 けん化

肝臓の総脂質、DAG および CE の脂質溶液の溶媒を留去し、10% 水酸化カリウム/90% メタノール溶液を 1 mL 加えて、80 °C で 1 時間反応させた。反応液を室温に戻し、水 4 mL およびヘキサン 4 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を取り除いた。6 M 塩酸を 1 mL 加えて溶液を酸性にし、ヘキサンを 4 mL 加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。下層を 4 mL のヘキサンで再度抽出して、これらのヘキサン抽出液を合わせ、窒素気流を吹き付けて溶媒を留去した。

### 第4節 脂肪酸のメチル化

#### (1) ナトリウムメトキシドを用いた脂肪酸のメチル化

TAG および PL に 0.5 N ナトリウムメトキシド 1 mL を加えて 50 °C で 10 分間反応させた。空冷後、酢酸 100  $\mu$ L を加えて、酸性溶液とした後、水 4 mL およびヘキサン 4 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心してヘキサン層を分取した。水層をヘキサンで再度抽出してこれらを合わせた。

#### (2) 塩化水素メタノールを用いた脂肪酸のメチル化

肝臓の総脂質、CE および DAG をけん化して得た脂肪酸、FFA に 5% 塩化水素メタノール溶液 0.5 mL を加えて 100 °C で 2 時間反応させた。空冷後、水 2 mL およびヘキサン 3 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心してヘキサン層を分取した。水層をヘキサンで再度抽出してこれらを合わせた。なお、総脂質および CE はメチル化の前にノナデカノイン酸を内部標準物質として加えた。

### 第5節 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析

ガスクロマトグラフィーには、GC-2014 (島津製作所) を用いた。分離にはキャピラリーカラム SUPELCOWAX10 (内径 0.53 mm x 30 m、膜厚 1.0  $\mu$ m、SUPELCO、米国) を、検出器には水素炎イオン化検出器を使用した。キャリアーガスとしてヘリウムを用いた。試料注入部および検出器の温度は 255 °C、カラム温度は 230 °C とした。また、18:1n-7 と 18:1n-9 の分離には、キャピラリーカラム SLB-

IL100 (内径 0.32 mm x 30 m、膜厚 0.26  $\mu\text{m}$ 、Sigma-Aldrich Japan) を用い、試料注入部および検出器の温度は 220  $^{\circ}\text{C}$ 、カラム温度は 120  $^{\circ}\text{C}$  とした。標準物質の保持時間との比較によって各ピークを同定し、内部標準物質であるノナデカノイン酸またはヘプタデカン酸のメチルエステルと試料中の脂肪酸メチルエステルのピーク面積比から各脂肪酸を定量した [33]。

## 第 6 節 TAG の定量

TLC により分離後、抽出した TAG の一部の溶媒を、窒素気流を吹き付け留去した。クロロホルム 10  $\mu\text{L}$  および 10% トリトン X-100 / イソプロパノール溶液 90  $\mu\text{L}$  を添加し、攪拌後トリグリセライド E-テストワコーを用いて定量した。検量線はトリオレインで作製した。

## 第 5 章 脂肪酸分解速度の測定

### 第 1 節 スライスを用いた *ex vivo* 脂肪酸分解速度の測定

Friedman らおよび中川の方法を参考にして測定した [19, 100]。1 位を  $^{14}\text{C}$  で標識した 16:1*n*-7、18:1*n*-7 および 18:1*n*-9 と、それぞれの脂肪酸の放射標識していないものを加え、溶媒を留去した。1 assay あたりエタノールを 20  $\mu\text{L}$  加えて溶解させた後、6% BSA 水溶液 0.2 mL を加えて基質溶液とした。[1- $^{14}\text{C}$ ] 16:1*n*-7、18:1*n*-7 もしくは 18:1*n*-9 の基質溶液 (0.25 mM、0.30 mCi)、0.6% BSA および 1% エタノールを含む KRB 緩衝液 2 mL をガラスバイアルに入れ、肝スライス 2 枚を加え、気相を 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  に置換し、密閉した。37  $^{\circ}\text{C}$  で振とうさせインキュベートし、30 分後に 0.6 M 過塩素酸溶液 1 mL を注入して反応を停止させた。バイアル内にセットしたカップにハイアミンヒドロキシド 0.2 mL を注入し、室温で 45 分間振とうさせ、生成した  $^{14}\text{CO}_2$  をハイアミンヒドロキシドに吸着させた。このハイアミンヒドロキシドを回収し、液体シンチレーター (Eco Lite、MPbiomedicals、米国) を 8 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。反応終了後、反応液と肝スライスを回収し、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートを 800 x g で 10 分間遠心して上清を分取した。上清に 5 M KOH を添加して中和し、さらに 3 M 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 0.7 mL を加えて

pH を 4 とした。これに石油エーテル 5 mL を加えて 5 回抽出し、未代謝の基質を除いた。得られた水層の一部を分取し、液体シンチレーター (1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン (2:1、v/v)) 8 mL を加えて液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。30 分間での CO<sub>2</sub> および酸可溶性代謝物の生成量を求め、脂質分解速度として算出した。

## 第 2 節 ホモジネートを用いた *in vitro* 脂肪酸分解速度の測定 (ミトコンドリアによる脂肪酸分解)

Mannaert らの方法を参考にして測定した [62]。1 位を <sup>14</sup>C で標識した 16:1*n*-7、18:1*n*-7 もしくは 18:1*n*-9 と、それぞれの脂肪酸の放射標識していないものを加え、溶媒を留去した。1 assay あたり 4 mM NaOH 100 μL と 7.2% BSA 溶液 200 μL を加えて基質溶液とした。[1-<sup>14</sup>C] 16:1*n*-7、18:1*n*-7 もしくは 18:1*n*-9 の基質溶液 (0.4 mM、0.3 μCi)、補酵素を含む KHB 緩衝液 2.0 mL をガラスバイアルに入れ、実験当日の朝に調製した 5% ホモジネート 0.5 mL を加え、気相を 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> に置換し、密閉した。37 °C で振とうさせインキュベートし、3 分後に 0.6 M 過塩素酸溶液 1 mL を注入して反応を停止させた。バイアル内にセットしたカップにハイアミンヒドロキシド 0.2 mL を注入し、室温で 45 分間振とうさせ、生成した <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> をハイアミンヒドロキシドに吸着させた。このハイアミンヒドロキシドを回収し、液体シンチレーターを 8 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。反応終了後、反応液を 800 x g で 10 分間遠心して上清を分取した。上清に 5 M KOH を添加して中和し、さらに 3 M 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 0.7 mL を加えて pH を 4 とした。これに石油エーテル 5 mL を加えて 5 回抽出し、未代謝の基質を除いた。得られた水層の一部を分取し、液体シンチレーター (1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン (2:1、v/v)) 8 mL を加えて液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。30 分間での CO<sub>2</sub> および酸可溶性代謝物の生成量を求め、脂肪酸分解速度として算出した。

## 第 3 節 ホモジネートを用いた *in vitro* 脂肪酸分解速度の測定 (ペルオキシソームによる脂肪酸分解)

Lazarow と de Duve の方法を参考にして測定した [56]。ペルオキシソームによる脂肪酸分解依存的な NAD<sup>+</sup> の還元速度を測定し、ペルオキシソームによる脂肪酸分解速度として評価した。20% 肝ホモジ

ネートに 16:1*n*-7、18:1*n*-7 もしくは 18:1*n*-9 のコエンザイム A エステル、NAD<sup>+</sup> および KCN を加えて反応溶液を調製し、37 °C にてインキュベーションした。340 nm における吸光度の増加速度を測定し、脂肪酸分解速度として算出した。

## 第 6 章 酵素活性の測定

### 第 1 節 SCD 活性の測定

Oshino らの方法に従って測定した [73]。SCD 活性は NADH により還元されたミクロソーム中のシトクロム b5 がステアロイル CoA 存在下で再酸化される速度を測定することにより求めた。シトクロム b5 の酸化速度は 424 nm と 409 nm の差の吸光度変化を記録することにより求めた。反応系は酵素源としてミクロソームタンパク質 1.2 mg および 0.1 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を石英セルにとり、最終容量 3 mL とした。30°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADH 2 nmol を加え、島津分光光度計 UV-300 で記録を開始した。ミクロソームに含まれるシトクロム b5 の還元反応が完全に終了した後、20 nmol のステアロイル CoA を加え、2 nmol NADH を添加して再びシトクロム b5 の吸光度変化を記録した。還元型シトクロム b5 の酸化の速度定数をステアロイル CoA 存在下 ( $\kappa$ ) と非存在下 ( $\kappa^-$ ) においてそれぞれ求め、SCD の反応速度定数 ( $\kappa^+$ ) は、 $\kappa^+ = \kappa - \kappa^-$  により算出した。

### 第 2 節 Elongase 活性の測定

Kawashima と Kozuka の方法に従って測定した [40]。反応溶液は終濃度で 200  $\mu$ M [2-<sup>14</sup>C] マロニル CoA (20 nCi)、2 mM NADH、2 mM NADPH、1 mM シアン化カリウム、0.1 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、ミクロソーム 200 または 250  $\mu$ g タンパク質を含み、最終容量を 0.5 mL とした。PCE 活性には 30  $\mu$ M パルミトイル-CoA を、POCE 活性には 30  $\mu$ M パルミトオレオイル CoA を基質として用いた。反応液を 37 °C で 4 分間インキュベートした後、10% 水酸化カリウム / 90% メタノール溶液 1 mL の添加により反応を停止させた。80 °C で 30 分間加温後、反応液を室温に戻し、6 M 塩酸を 1 mL 加えて溶液を酸性にした。水 1 mL およびヘキサン 2 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。この操作を 3

回繰り返し、得られたヘキサン抽出液に水 4 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。溶媒を留去し、液体シンチレーター (1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン (2:1、v/v)) 8 mL を加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

### 第 3 節 TAG 加水分解活性

Wu らの方法を一部改変して、TAG 加水分解活性を測定した [95]。基質は、[カルボキシル-<sup>14</sup>C] トリオイレイン 2.96 mg (3  $\mu$ Ci) (終放射活性 0.9  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)、および PC/PI (3:1、w/w) 300  $\mu$ g を混合し、窒素気流を吹き付けた後、減圧下で溶媒を留去した。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 1.5 mL を加え、超音波発生装置 (Astrason ultrasonic processor XL2020; Misonix Inc.、米国) で超音波処理を行った。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 20% (w/v) defatted BSA 0.5 mL を加え、弱く攪拌した [引用文献]。反応は、基質溶液 100  $\mu$ L、サイトゾル画分 50  $\mu$ L、緩衝液 (20 mM リン酸カリウム、1 mM EDTA、1 mM ジチオエリトリトールおよび 0.02% (w/v) defatted BSA、pH 7.0) 50  $\mu$ L を混合し、37 °C で 60 分間行った。コントロールとしてサイトゾル画分を加えない反応も同時に行った。クロロホルム/メタノール (1:2、v/v) を 6 mL 加え、反応を停止した。キャリアとして、18:1*n*-9 (56.4  $\mu$ g/エタノール溶液) および DAG (124.2  $\mu$ g/エタノール溶液) を加え、総脂質の抽出を行った。総脂質の一部を分取し、液体シンチレーターにて放射活性を測定した。また、残りの総脂質から一部を分取し、TLC で分離した DAG、CE および FFA についても同様に放射活性を測定した。

### 第 4 節 FAS 活性の測定

Nepokroeff らの方法に従って測定した [66]。FAS 依存的な NADPH の酸化速度を測定し、FAS 活性とした。Acetyl-CoA、malonyl-CoA および NADPH を含む基質溶液にサイトゾルを加えて 30 °C でインキュベーションした。340 nm における吸光度の減少速度を測定し、FAS 活性として算出した。

## 第7章 フィブリン酸の定量

### 第1節 クロフィブリン酸の抽出

Abeらが報告した方法を一部改変して、フィブリン酸の抽出を行った [3]。試験管にメタノール-水溶液 (90:10、v/v) に溶解した内部標準物質 (ベザフィブリン酸 2 nmol) を加え、窒素気流下で溶媒を留去した。肝臓のホモジネート (10 mg 相当) に水を加えて 0.5 mL とし、さらに 0.5 M 塩酸 1 mL を加えて攪拌した。n-ヘキサン/酢酸エチル (85:15、v/v) 3 mL を加え、よく振とうした。3,000 rpm、10 分間遠心後、有機層を分取し、水層を再度抽出した。得られた有機層を合わせ 0.1 M リン酸水素二ナトリウム 2 mL を加え振とうし、遠心後、有機層を除去した。残りの水層に 0.5 M 塩酸 2 mL を加えて酸性にし、攪拌した後、n-ヘキサン/酢酸エチル (85:15、v/v) 3 mL を加え、振とうした。遠心後、有機層を分取し、水層を再度抽出した。合わせた有機層に窒素気流を吹き付け、溶媒を留去した。

### 第2節 クロフィブリン酸の BrMDMC による誘導体化

抽出したクロフィブリン酸に、真空乾燥した炭酸カリウム 1 mg、アセトニトリルに溶解した 18-crown-6-エーテル 62.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 、アセトンに溶解した BrMDMC 250  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  を加え、攪拌後遮光し、70  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間加温した。反応終了後、アセトニトリル/アセトン (1:1、v/v) を 200  $\mu\text{L}$  加えて攪拌し、綿栓ろ過後、Millex®-LH フィルター (Merck Millipore、ドイツ) でろ過し、HPLC による分析に用いた。

### 第3節 HPLC による BrMDMC 誘導体化クロフィブリン酸の定量

HPLC による分析には、ポンプ : LC-20AT、デカッサー : DGU-20A3、システムコントローラー : SCL 10Avp、蛍光検出器 : RF-10AXL、クロマトパック積分機 : RF-10A (すべて島津製作所) を用いた。分離カラムは YMC-Pack Pro C18 (100 x 4.6 mm、粒子径 : S-3  $\mu\text{m}$ 、細孔径 : 12 nm、YMC CO.) を使用し、カラム温度を 40  $^{\circ}\text{C}$  とした。移動相はアセトニトリル/水 (43:57、v/v) を用い、流速は 1 mL/min とした。検出は励起波長 340 nm、蛍光波長 425 nm で行った。得られた試料は HPLC に注入する前にろ過し、ろ液 10  $\mu\text{L}$  を分析試料とした。BrMDMC 誘導体化クロフィブリン酸が溶出された後、カラムをメタノール



(1.5 mL/min) で 30 分間洗浄した。

## 第 8 章 PFCA の定量

Ohya らの方法に従って PFCA の抽出及び定量を行った [68]。

### 第 1 節 生体飼料からの PFCA の抽出

血清もしくは組織ホモジネート (10%, w/v) に精製水を加えて全量を 1.5 mL とし、これに内部標準物質を 2 nmol 加えた (PFOA の内部標準物質は炭素数 6 のペルフルオロヘキサン酸、PFDA の内部標準物質は PFOA、PFDoA の内部標準物質は PFDA)。さらに 1 M 炭酸ナトリウム溶液 (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、よく攪拌後に超音波処理を 10 分間行った。これに n-ヘキサン/酢酸エチル (1:1, v/v) を 4 mL 加え、3 分間振とう後に 10 分間静置し、もう一度 3 分間振とうした。800 x g で 5 分間遠心し、上層を別の試験管に移した。下層に再度 n-ヘキサン/酢酸エチル (1:1, v/v) を 4 mL 加え、振とう後に遠心して上層をとる操作を 2 回繰り返す、上層を先のものと同様に合わせた。

### 第 2 節 PFCA の蛍光誘導体

抽出した PFCA 溶液に窒素を吹き込んで溶媒を留去した。これに BrAcMC 溶液 (2 mg/mL acetone) を 1 mL 加え、攪拌後に 70 °C 水浴で 25 分間反応させた。反応終了後に直ちに冷却し、-30 °C で保存した。

### 第 3 節 HPLC による BrAcMC 誘導体化 PFCA の定量

HPLC による分析には、ポンプ : LC-20AT、デカッサー : DGU-20A3、システムコントローラー : SCL 10Avp、蛍光検出器 : RF-10AXL、クロマトパック積分機 : RF-10A (すべて島津製作所) を用いた。分離カラムは YMC-Pack Pro C18 (PFOA および PFDA は 50 x 4.6 mm、PFDoA は 150 x 4.6 mm、粒子径 : S-3 μm、細孔径 : 12 nm、YMC CO.) を使用し、カラム温度を 40 °C とした。移動相はアセトニトリル/水

(PFOA および PFDA は 140:60、PFDoA は 350:100、v/v) を用い、流速は 0.8 mL/min とした。検出は励起波長 366 nm、蛍光波長 420 nm で行った。得られた試料は HPLC に注入する前にろ過し、ろ液 10  $\mu$ L を分析試料とした。

## 第 9 章 mRNA の定量

-80°C で凍結保存してあった肝臓の小片に Quiazol (Quiagen、ドイツ) を加え、ポリトロンで粉碎後、RNeasy Mini kit (Quiagen、ドイツ) を用いて総 RNA を抽出した。総 RNA 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なった。逆転写反応は RNA PCR kit (AMV) ver2.1 (タカラバイオ) を用いた。RNA PCR 緩衝液、5 mM 塩化マグネシウム、1 mM dNTP mix、2 U/ $\mu$ L RNase inhibitor、2.5 ng/ $\mu$ L random 9mer、0.05 U/ $\mu$ L AMV 逆転写酵素および 0.5  $\mu$ g の総 RNA を入れ、最終容量が 10  $\mu$ L になるように RNase-free 水を加えた。30°C で 10 分、42°C で 30 分、99°C で 5 分、6°C で 99 分間反応させた。精製した complementary DNA (cDNA) は使用するまで -30°C で保存した。mRNA の定量にはリアルタイム PCR 法を用いた。反応は SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用い、Table に示した各プライマーセットの最終濃度が 200 nM になるように調製した。PCR と溶解曲線の作成は、Step one plus Real-Time PCR System (Applied biosystems、米国) を用いて行なった。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 50 サイクル反応させた。増殖後は、融解曲線を作成し、単一生成物であることを確認した。各遺伝子の発現量は comparative Ct 法を用いて解析した。

## 第 10 章 Western blotting

Ried らの方法に従って行った [80]。RIPA lysis 緩衝液 (25 mM Tris-塩酸、150 mM 塩化ナトリウム、1% NP40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、pH 7.6) にタンパク質分解酵素阻害剤 (アプロチニン 2  $\mu$ g/mL、ベスタチン 13.8  $\mu$ g/mL、ロイペプチン 10  $\mu$ g/mL、ペプスタチン 5  $\mu$ g/mL、AEBSF 250  $\mu$ g/mL) を加え、ホモジナイズ緩衝液とした。-80°C で保存していた凍結肝臓にホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロン RT 2100 ホモジナイザー (Kinematica、スイス) を用いてホモジナイズ後、氷上で 30 分静置させた。10,000 x g、4°C で 10 分間遠心後、得られた上清を再度遠心し、上清を分取した。この上

清中のタンパク質量は、標準物質として BSA を用いて、BCA 法に従い測定した。タンパク質量を測定した後に PBS で希釈して 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  とした。タンパク質を含む上清を、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、2% SDS、6% (v/v) グリセロール、0.02% ブロモフェノシルブルーを含む 0.063 M Tris-塩酸 (pH 6.8) に溶解してタンパク質濃度が 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の溶液を 500  $\mu\text{L}$  調製し、98°C のヒーティングブロックで 5 分間加熱し、泳動サンプルとした。ACC と FAS のタンパク発現を検討する際は 7.5%、ATGL と CPT1 のタンパク発現を検討する際は 10% のポリアクリルアミドゲルを使用した。サンプルのアプライ量は 15  $\mu\text{g}$  protein/well とした。サンプルをアプライ後に泳動を開始し、20 mA 定電流で泳動した。セミドライブロッキング装置 (Bio Rad Inc.、米国) を使用し、PVDF 膜 (GE Healthcare、英国) に転写した。PVDF 膜はブロッキング緩衝液 (5% スキムミルクおよび 1% BSA を含む TBS-T (0.1% Tween 20、25 mM Tris-塩酸、150 mM 塩化ナトリウム、2.6 mM 塩化カリウム、pH 7.6)) に浸して 1 晩 4 °C にてブロッキングを行った。ブロッキング後に PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、ブロッキング緩衝液で希釈した 1 次抗体溶液に PVDF 膜を浸して、浸透させながら室温にて反応させた。反応条件は以下のとおりである。FAS : 抗 FAS ウサギモノクローナル IgG 抗体 1000 倍希釈溶液、1 時間 ; ACC : 抗 ACC ウサギモノクローナル IgG 抗体 2000 倍希釈溶液、1 時間 ; ATGL : 抗 ATGL マウスモノクローナル IgG 抗体 600 倍希釈溶液、2 時間 ; CPT1A : 抗 CPT1A マウスモノクローナル IgG 抗体 1000 倍希釈溶液、1 時間 ;  $\beta$ -Actin : 抗  $\beta$ -Actin マウスモノクローナル IgG 抗体 1000 倍希釈溶液、1 時間。1 次抗体と反応させた後、TBS-T で 3 回洗浄した後、ブロッキング緩衝液で希釈した 2 次抗体溶液に PVDF 膜を浸して、浸透させながら室温にて反応させた。反応条件は以下のとおりである。FAS、ACC : 抗ウサギ IgG-HRP 結合抗体 2000 倍希釈溶液、1 時間 ; ATGL、CPT1A、 $\beta$ -Actin : 抗マウス IgG-HRP 抗体 2000 倍希釈溶液、1 時間。2 次抗体と反応させた後、TBS-T で 3 回洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare、英国) と反応させ、LAS-1000 (GE Healthcare、英国) を用いてタンパク質の検出を行った。

## 第 11 章 行動薬理試験

下記の表に従って行動薬理試験を実施した。

Test	Estimation	Test day
Novel Object Recognition test	recognition memory	6-7 (29-30)
Y-maze test		8
Open Field test	locomotor activity	6
Elevated-Plus Maze test	anxiety	7
Forced Swim test	depression	8-9

### 第 1 節 オープンフィールド試験

ラットの運動量および不安様症状を評価するためにオープンフィールド試験を実施した [24]。ラットを装置 (70 cm×70 cm×40 cm) に置き、様々な行動を経時的に観察し、運動量、区画横切り回数、区画別滞留時間を測定した。装置の中央付近への滞在時間が長いほど不安を感じていないと判断し、評価を行った。

### 第 2 節 高架式十字迷路試験

ラットの運動量および不安様症状を評価するために高架式十字迷路試験を実施した [24]。壁のない open arm と高さ 40 cm の壁をもつ enclosed arm からなる十字状の装置にラットを置き、移動軌跡を経時的に観察、各 arm への進入回数、滞在時間を測定した。オープンアームへの進入回数および滞在時間が長いほど不安を感じていないと判断し、評価を行った。

### 第 3 節 強制水泳試験

ラットのうつ様症状を評価するために強制水泳試験を実施した [75]。水深 25 cm になるように水を入れたアクリル製の円筒にラットを入れ、無動時間 (水中で動かない、もしくは沈まないように後肢のみを動かしている時間) を測定した。無動時間が長いほどうつ様症状を示していると判断し、評価を行っ

た。

#### 第4節 新奇物体探索試験

ラットの学習能力を評価するために新奇物体探索試験を実施した [24]。30 cm × 25 cm × 18 cm の大きさのケージにて試験を行った。1 日目に 2 つの同じ物体 A および A' を設置したケージ内でラットを 5 分間探索させた (information phase)。24 時間後には既知物体 A' を新奇物体 B に置換して 5 分間探索を行わせ、2 つの物体への接触時間を測定した (test phase)。Test phase における A と B への接触時間から discrimination index を算出し、学習能力の指標とした。すなわち、discrimination index の値が小さいほど学習能力が低下していると判断した。

$$\text{Discrimination index} = \frac{(\text{新奇物体 B への接触時間} - \text{既知物体 A への接触時間})}{\text{新奇物体 B への接触時間}}$$

#### 第5節 Y字迷路試験

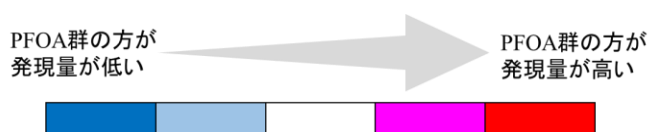
ラットの学習能力を評価するために Y 字迷路試験を実施した [24]。高さ 20 cm の壁をもつ Y 字型の 3 本のアームの中央部にラットを置き、自由探索させ、各アームへの進入回数及び連続して 3 つの異なったアームを選択したことを以って正解とする自発的交替行動率を評価した。自発的交替行動率が低いほど学習能力が低下していると判断した。

$$\text{自発的交替行動率} = \frac{\text{自発的交替行動回数}}{(\text{総進入回数} - 1)} \times 100$$

## 第 12 章 第 1 章における PFOA とクロフィブリン酸の遺伝子発現量への影響の差の評価

第 1 章において PFOA とクロフィブリン酸の 18:1n-9 代謝関連遺伝子発現への影響の差を明確にするために、遺伝子発現量への影響をスコア化し、スコアの差を色で区別することにした。スコアの算出法は下記のとおりである。

Clof のスコア	PFOA のスコア	スコアの差 (PFOA-Clof)	色
変化なし 0	変化なし 0	0	白色
	発現上昇 +1	+1	うすいピンク色
	発現低下 -1	-1	水色
発現上昇 +1	変化なし 0	-1	水色
	発現上昇 +1	* 1	うすいピンク色
	発現低下 -1	-2	水色
発現低下 -1	変化なし 0	+1	うすいピンク色
	発現上昇 +1	+2	赤色
	発現低下 -1	* 2	赤色



スコアの差が 0 となるケースは PFOA 群と Clof 群が遺伝子発現に対して同様の影響を及ぼす場合であり、両群で遺伝子発現量が増加しない場合、遺伝子発現量が増加する場合もしくは遺伝子発現量が減少する場合の 3 通りのケースが考えられる。それぞれのケースに対して、評価法を以下のとおりに定めた。

### i) 両群で遺伝子発現量が増加しない場合

スコアの差を色で区別する際に白色とした。

### ii) 両群で遺伝子発現量が増加する場合 (\*1 の場合)

両群における標的遺伝子の発現量を *Acot1* の発現量で除した後に 50 を乗じた値を比較した。PFOA 群におけるその値がクロフィブリン酸群よりも 2 倍以上高い場合はうすいピンク色、それ未満の場合は白色とした。

iii) 両群で遺伝子発現量は低下する場合

両群における標的遺伝子の発現量に *Acot1* の発現量を乗じた後に 50 で除した値を比較した。PFOA 群におけるその値がクロフィブリン酸群よりも 1/2 以下の場合は灰色、それ以上の場合は白色とした。

## 第 13 章 統計処理

2 群間の比較は、F 検定による分散分析の後、Student の t 検定を用いて行った。3 群以上の比較は、分散分析 (ANOVA) によって、有意性が認められた場合、Sheffé の多重比較検定を用いて行なった。危険率 5%未満を有意とした。

**Table** Sequences of primers used for real-time PCR

Gene	Primer ( 5'–3' )	Accession No.
FAS	F: CGCCGACCAGTATAAACCCA R: GTTGTAATCGGCACCCAAGTC	M76767
ACC1	F: AACGCCTTCACACCACCTTG R: AGTCGCAGAAGCAGCCCAT	J03808
ACLY	F: AAAGTGTATCGCCAGGCAGT R: GTAACGCAGCACGTGATCCAT	J05210
ME1	F: ACAATACAGTTTGGCATTCCG R: AGGATTCGCTCTCCATCAGTCA	NM_012600
SCD1	F: TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCA R: TTCCCATTCCTTCACTCTGA	J02585
Elovl6	F: AGAACACGTAGCGACTCCGAA R: CAAACGCGTAAGCCAGAAT	AB071986
Elovl5	F: ACCACCATGCCACTATGCTCA R: GGACGTGGATGAAGCTGTTG	AB071985
Fads1	F: TACAGGCAACCTGCAACGTTT R: GGTGCCACCTTGTGGTAGTTGT	NM_053445
Fads2	F: GCCACTTAAAGGGTGCCTCC R: TGCAGGCTCTTTATGTCGGG	BC081776
DGAT1	F: CCGTGGTATCCTGAATTGGT R: GCGCTTCTCAATCTGAAAT	NM_053437
DGAT2	F: ATCTTCTCTGTCACCTGGCT R: ACCTTTCTTGGGCGTGTTCC	NM_001012345
Lipin1	F: AGGGAGGGAGATGGTGGTTT R: CTCTCCGGTATTGTGGCCCTT	NM_001012111
Lipin2	F: ACCCTGTTCCAGCCCATCAG R: GGTGCTGGCTTCTTTTGTGA	NM_001108236
Lipin3	F: ATCCTGAGTTCTCGTTGGTC R: GATCTCAAAGTGTCCACGCC	NM_001014184
GPAT1	F: AGACACAGGCAGGGAATCCAC R: AATTCCCGGAGAAGCCCAG	AF021348
GPAT4	F: TTGGAGTCCTGGAATTTGCTGA R: GGCTAATCCCTGTGAATGCCA	NM_001047849
FAT/CD36	F: CGAAGGCTTGAATCCTACCG R: TGTGACCTGCAGTCGTTT	NM_031561
FATP2	F: TTCAACAGTGGCGATCTCCTG R: ACCGGAAGGTGTCTCCAAC	NM_031736
FATP4	F: CCTGGTGTACTATGGATTCCGC R: GCTGAAAACCTTCTTCCGGATCA	NM_001100706
FATP5	F: TTGCGAACGTACGGCAAGTAG R: AAGGCGGTCTCGGAAGTAGAAG	NM_024143
FABPpm	F: TCTGCCAATCCTATGCCAA R: CACCCTTTTGGCTTCTTC	NM_013177
FABP1	F: CGGCAAGTACCAAGTGCAGAG R: CTGACACCCCTTGATGTCCT	BC086947
ACSL1	F: TCAGAGCAGTTCATCGGCATC R: GTCGGTTCCAAGCGTGTGATA	NM_012820
ACSL3	F: GGTGGCCAAAATGTGACAATG R: AAAGTCTCCAATATCGCCAGT	NM_057107
ACSL5	F: CAAACATGGCTGCTTTCTCA R: ACCCTGGACAAGCCTCTCAA	NM_053607
Acot1	F: ACTACGACGACCTCCCAAGA R: TGGCCACGCAGGTAGTTCA	NM_031315.1



CPT1a	F: AAGGCAGCGTTCTTCGTGA R: GTCAAAGCATCTTCCATGC	NM_031559
MCAD	F: CTTTGCCTCTATTGCGAAGGC R: TCCGAAAATCTGCACAGCATC	J02791
LCAD	F: TGTATTGGTGCCATAGCCATGA R: CCCAGACCTTTTGGCATTGT	L11276
VLCAD	F: ACAGCTTTCGTAGTGGAACGGA R: CTGGCACCTTGACTCCATCAA	D30647
ATGL	F: TCACCAACACCAGCATCCAA R: TCCATCTCGGTAGCCCTGTTT	NM_001108509
CGI-58	F: TGCATAGATGGCAACTCTGGC R: ATACACATAATGCCCTGCCCC	NM_212524
PGC1 $\alpha$	F: CGATGACCCTCCTCACAC R: TTGGCTTGAGCATGTTGCG	NM_031347
Acox1	F: TTCGTGCAGCCAGATTGGTAG R: CGGCTTTGTCTTGAATCTTGG	NM_017340
MCDC	F: CGGGAAATGAACGGAGTGCTAA R: CAGCCTCACAATCGCTGATCTT	NM_053477.1
UCP2	F: CAAGACCATTGCACGAGAGGA R: CAGTTGACAATGGCATTTCGG	NM_019354.2
apoCIII	F: GACAATCGCTTCAAATCCCT R: CGGCTCAAGAGTTGGTGTG	NM_012501
MTP	F: ACGTGGTATTCCCGCCTCA R: CGTCAAAGCATTTCGTTCTCG	BC012686
LPL	F: AGCGCTCCATCCATCTCTTCAT R: TCAGGCAGAGCCCTTTCTCAA	NM_012598.2
apoA I	F: GGCACCGAGCTTCACAAAAA R: TGATCGCTGTAGAGCCCAAAC	NM_012738.1
ABCA1	F: AGATGCCCTACCCCTGTTATGT R: GCCTCCTTCTCATAACAATGC	NM_178095.2
LPK	F: TGTGTACCACCGCCAGTTGTT R: AGCACTGAAGGAAGCCTCCA	M17685
PEPCK	F: TGCCTGGATGAAGTTTGATG R: GCCCGGAGCAACTCCAAAAA	NM_198780
G6Pase	F: CAGCCTCTCAAAAACCTGG R: GAGCGACTTGCGGAGTTCTC	L37333
GK	F: TGTCACCGACTGCGACATTG R: GCATGCGATTTATGACCCCA	M25807
GLS	F: AATCTCCATGCCACATAACAAGG R: CATACTCCAGCAATGAAAAG	AF346902.1
GLUT2	F: CACACCAGCACATACGACACC R: ACTGCAAAGCTGGACACAGA	NM_012879
IRS-1	F: TACATCCCAGGTGCTACCAT R: CCAGCCGAGTGAGTTCTCTT	NM_012969
IRS-2	F: TGCTACAGCTCTTTGCCCCG R: TTCCAAAATCCGACCCACAG	NM_001168633
SREBP-1c	F: GGAGCCATGGATTGCACATT R: AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	AF286469
ChREBP	F: AATAGAGGAGCTCAATGCT R: CCCAGAACTTCCAGTTGTGC	AB074517
PPAR $\alpha$	F: AATGCCCTCGAACTGGATGAC R: CACAATCCCCTCCTGCAACTT	NM_013196
PPAR $\delta$	F: TGAGTTCTTGCGCAGTATCCG R: GATGGCGGCAATGAAAAGG	NM_013141.2
CREB3L3	F: AACCCCTAAGCCCAACCATAGAA	NM_001012115.1

FOXO1	R: CTCTCTCCAAGAGGACGACAGA F: TCCTCGAACCAGCTCAAACG R: GAATGCACATCCCCATCCC	NM_001191846.2
AMPK	F: TCTGGAGCTGTGGTGTTATCCT R: AGTGGCAATAGAACGGTTGAGA	NM_023991.1
LXR $\alpha$	F: CCACAGCTCAGCCCAGAA R: GCGTGACTCGAAGTCGGT	NM_031627
HNF4 $\alpha$	F: CATCTTCTTTGACCCAGATGCC R: CATACTGCCGGTCGTTGATGT	NM_022180.1
STAT1	F: GTACAGCCGCTTTTCTTTGGAG R: CATCTGTACGGGATCTTCTTGGA	AF205604
GRP78	F: CCACCAGGATGCAGACATTG R: AGGGCCTCCACTTCCATAGAG	
CHOP	F: CTCTGCCTTTTCGCCTTTGAG R: ATAGGTGCCCCAATTTTCATC	
XBP1	F: ACACGCTTGGGGATGAATG R: CCATGGGAAGATGTTCTGGG	
CYP4A10	F: GAGGAACTGCATTGGGAAAC R: GTGGGATCTGGCAGTAGCTCA	NM_153307
CYP7A1	F: GAATTGCCGTGTTGGTGAG R: AGGTACGGAATCAACCCGTTTC	NM_012942
FGF21	F: TCTCTACACAGATGACGACCA R: CTTTGAGCTCCAGGAGACTTT	NM_1307752.1
$\beta$ -Actin	F: TGCAGAAGGAGATTACTGCC R: CGCAGCTCAGTAACAGTCC	V01217

---

## 引用文献

1. Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts. In : U.S. Environmental Protection Agency (2002).
2. Abbott BD, Wolf CJ, Schmid JE, Das KP, Zehr RD, Helfant L, Nakayama S, Lindstrom AB, Strynar MJ, Lau C (2007) Perfluorooctanoic acid induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha. *Toxicol Sci* 98: 571-581.
3. Abe S, Ono K, Mogi M, Hayashi T (1998) High-performance liquid chromatographic method for the determination of fenofibric acid and reduced fenofibric acid in human blood, plasma and urine. *Yakugaku Zasshi* 118: 447-455.
4. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H (2010) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem* 285: 22027-22035.
5. Bhatarai B, Gramatica P (2011) Prediction of aqueous solubility, vapor pressure and critical micelle concentration for aquatic partitioning of perfluorinated chemicals. *Environ Sci Technol* 45: 8120-8128.
6. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
7. Bolsoni-Lopes A, Festuccia WT, Chimin P, Farias TS, Torres-Leal FL, Cruz MM, Andrade PB, Hiribara SM, Lima FB, Alonso-Vale MI (2014) Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. *Lipids Health Dis* 13: 199
8. Buck RC, Franklin J, Berger U, Conder JM, Cousins IT, de Voogt P, Jensen AA, Kannan K, Mabury SA, van Leeuwen SPJ (2011) Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr Environ Assess Manag* 7: 513-541.
9. Burns TA, Kadegowda AK, Duckett SK, Pratt SL, Jenkins TC (2012) Palmitoleic (16:1 *cis*-9) and *cis*-vaccenic (18:1 *cis*-11) acid alter lipogenesis in bovine adipocyte cultures. *Lipids* 47: 1143-1153.
10. Butenhoff JL, Chang SC, Ehresman DJ, York RG (2009a) Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol* 27: 331-341.

11. Butenhoff JL, Ehresman DJ, Chang SC, Parker GA, Stump DG (2009b) Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K+PFOS) in rats: developmental neurotoxicity. *Reprod Toxicol* 27: 319-330.
12. Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Tully JS, Needham LL (2007) Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u.s. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES). *Environ Sci Technol* 41: 2237-2242.
13. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134: 933-944.
14. Che Y, Cui YH, Tan H, Andrezza AC, Young LT, Wang JF. Abstinence from repeated amphetamine treatment induces depressive-like behaviors and oxidative damage in rat brain. *Psychopharmacol* 227: 605-614.
15. Cui L, Zhou QF, Liao CY, Fu JJ, Jiang GB (2009) Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis. *Arch Environ Contam Toxicol* 56: 338-349.
16. DeWitt JC, Copeland CB, Strynar MJ, Luebke RW (2008) Perfluorooctanoic acid-induced immunomodulation in adult C57BL/6J or C57BL/6N female mice. *Environ Health Perspect* 116: 644-650.
17. Djousse L, Matthan NR, Lichtenstein AH, Gaziano JM (2012) Red blood cell membrane concentration of *cis*-palmitoleic acid and *cis*-vaccenic acid and risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 110: 539-544.
18. Enoch HG, Catala A, Strittmatter P (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 251: 5095-5103.
19. Friedman MI, Harris RB, Ji H, Ramirez I, Tordoff MG (1999) Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol* 276: R1046-R1053.
20. Fuentes S, Colomina MT, Rodriguez J, Vicens P, Domingo JL (2006) Interactions in developmental toxicology: Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and stress in pregnant mice. *Toxicol Lett.* 164: 81-89.
21. Fuentes S, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL (2007a) Influence of maternal restraint stress on the long-lasting effects induced by prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) in mice. *Toxicol Lett*

171: 162-170.

22. Fuentes S, Colomina MT, Vicens P, Franco-Pons N, Domingo JL (2007b) Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicol Sci* 98: 589-598.
23. Fuentes S, Vicens P, Colomina MT, Domingo JL (2007c) Behavioral effects in adult mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicology* 242: 123-129.
24. Galeano S, Martino Adami PV, Do Carmo S, Blanco E, Morelli L (2014) Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci* 8: 321.
25. George ME, Andersen ME (1986) Toxic effects of nonadecafluoro-n-decanoic acid in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 85: 169-180.
26. Gong J, Campos H, McGarvey S, WU z, Goldberg R, Baylin A (2011) Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr* 93: 186-191 (2011)
27. Guillou H, Zadraves D, Martin PG, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49: 186-199.
28. Haugom B, Spydevold O (1992) The mechanism underlying the hypolipidemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctanesulphonic acid (PFOSA) and clofibrac acid. *Biochim Biophys Acta* 1128: 65-72.
29. Higgins CP, Field JA, Criddle CS, Luthy RG (2005) Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ Sci Technol* 39: 3946-3956.
30. Houde M, Bujas TA, Small J, Wells RS, Fair PA, Bossart GD, Solomon KR, Muir DC (2006) Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environ Sci Technol* 40: 4138-4144.
31. Igal RA (2010) Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 31: 1509-1515.
32. Ikeda T, Aiba K, Fukuda K, Tanaka M (1985) The induction of peroxisome proliferation in rat liver by perfluorinated fatty acids, metabolically inert derivatives of fatty acids. *J Biochem* 98: 475-482.

33. Imai K, Koyama M, Kudo N, Shirahata A, Kawashima Y (1999) Increase in hepatic content of oleic acid induced by dehydroepiandrosteron in the rat. *Biochem Pharmacol* 58: 925-933.
34. Jeffcoat R, Brawn PR, Safford R, James AT (1977) Properties of rat liver microsomal stearyl-coenzyme A desaturase. *Biochem J* 161: 431-437.
35. Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P (2008) Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology* 29: 110-116.
36. Just WW, Gorgas K, Hartl FU, Heinemann P, Salzer M, Schimassek (1989) Biochemical effects and zonal heterogeneity of peroxisome proliferation induced by perfluorocarboxylic acids in rat liver. *Hepatology* 9: 522-540.
37. Kamei H, Nagai T, Nakano H, Togan Y, Takayanagi M, Takahashi K, Kobayashi K, Yoshida S, Maeda K, Takuma K, Nabeshima T, Yamada K (2006) *Biol Psychiatry* 59: 75-84.
38. Karahashi M, Hoshina M, Yamazaki T, Sakamoto T, Mitsumoto A, Kawashima Y, Kudo N (2013) Fibrates reduce triacylglycerol content by up-regulating adipose triglyceride lipase in the liver of rats. *J Pharmacol Sci* 123: 356-370.
39. Kawashima Y, Kozuka H (1982) Increased activity of stearyl-CoA desaturation in liver from rat fed clofibric acid. *Biochim Biophys Acta* 713: 622-628.
40. Kawashima Y, Kozuka H (1985) Regulation of palmitoyl-CoA chain elongation and linoleoyl-CoA chain elongation in rat liver microsomes and the differential effects of peroxisome proliferators, insulin and thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 834: 118-123.
41. Kawashima Y, Uy-Yu N, Kozuka H (1989) Sex-related difference 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.
42. Kim SK, Kanna K (2007) Perfluorinated acids in air, rain, snow, surface runoff, and lakes: relative importance of pathways to contamination of urban lakes. *Environ Sci Technol* 41: 421-428.
43. Kudo N, Kawashima Y (1997) Fish oil-feeding prevents perfluorooctanoic acid-induced fatty liver in mice. *Toxicol Appl Pharm* 145: 285-293.
44. Kudo N, Mizuguchi H, Kawashima Y (1999) Alterations by perfluorooctanoic acid of glycerolipid

metabolism in rat liver. *Chemico-Biol Interact* 118: 69-83.

45. Kudo N, Bandai N, Suzuki E, Katakura M, Kawashima Y (2000) Induction by perfluorinated fatty acids with different carbon chain length of perxisomal  $\beta$ -oxidation in the liver. *Chemico-Biol Interact* 124: 119-132.
46. Kudo N, Kawashima Y (2003a) Induction of triglyceride accumulation in the liver of rats by perfluorinated fatty acids with different carbon chain lengths: comparison with induction of peroxisomal beta-oxidation. *Biol Pharm Bull* 26: 47-51.
47. Kudo N, Kawashima Y (2003b) Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J Toxicol Sci* 28: 49-57.
48. Kudo N, Toyama T, Mitshumoto A, Kawashima Y (2003) Regulation by carbohydrate and clofibric acid of palmitoyl-CoA chain elongation in the liver of rats. *Lipids* 38: 531-537.
49. Kudo N, Suzuki-Nakajima E, Mitsumoto A, Kawashima Y (2006) Response 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.
50. Kudo N, Sakai A, Mitsumoto A, Hibino Y, Tsuda T, Kawashima Y (2007) Tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. *Biok Pharm Bull* 30: 1535-1540.
51. Kudo N, Yamazaki T, Sakamoto T, Sunaga K, Tsuda T, Mitsumoto A, Kawashima Y (2011) Effects of perfluorinated fatty acids with different carbon chain length on fatty acid profiles of hepatic lipids in mice. *Biol Pharm Bull* 34: 856-864.
52. Kudo N (2015) Metabolism and pharmacokinetics. *Toxicological Effects of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances* (DeWitt J. C., Ed.) : 151-175.
53. Lau C, Butenhoff JL, Rogers JM (2004) The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 231-241.
54. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 99: 366-394.
55. Lau C (2015) Perfluorinated Compounds: An Overview. *Toxicological Effects of Perfluoroalkyl and*

Polyfluoroalkyl Substances (DeWitt J. C., Ed.) : 1-21.

56. Lazarow PB, De Duve C (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisome; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 73: 2043-2046.
57. Lee CJ, Sprecher H (1971) An in vitro study of the effects of dietary alteration and fasting on the desaturation of palmitic, stearic eicosa-8, 11-dienoic and eicosa-8, 11, 14-trienoic acids. *Biochim Biophys Acta* 248: 180-185.
58. Lin Z, Dodd CA, Filipov NM (2013) Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicol Teratol* 39: 26-35.
59. Lipsky NG, Pedersen PL (1982) Perturbation by clofibrate of mitochondrial levels in animal cells. Implications for a model of mitochondrial genesis. *J Biol Chem* 257: 1473-1481.
60. Loveless SE, Hoban D, Sykes G, Frame SR, Everds NE (2008) Evaluation of the immune system in rats and mice administered linear ammonium perfluorooctanoate. *Toxicol Sci* 105: 86-96.
61. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
62. Mannerts GP, Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ (1979) Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J Biol Chem* 254: 4585-4595.
63. Martin JW, Mabury SA, Solomon KR, Muir DC (2003b) Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 22: 189-195.
64. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligli GS (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr* 92: 1350-1358.
65. Nakamura T, Ito Y, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Kono Y, Naito H, Hayashi Y, Li Y, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima T (2009) Microgram-order ammonium perfluorooctanoate may activate mouse peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , but not human PPAR $\alpha$ . *Toxicology* 265: 27-33.
66. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW (1975) Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol* 35: 37-44.
67. Ohmori K, Kudo N, Katayama K, Kawashima Y (2003) Comparison of the toxicokinetics between



- perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* 184: 135-140.
68. Ohya T, Kudo N, Suzuki E, Kawashima Y (1998) Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 720: 1-7.
  69. Olsen GW, Burris JM, Burlew MM, Mandel JH (2003) Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J Occup Environ Med* 45: 260-270.
  70. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR (2007) Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluoroheptanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115: 1298-1305.
  71. Olson CT, Andersen ME (1983) The acute toxicity of perfluorooctanoic and perfluorodecanoic acids in male rats and effects on tissue fatty acids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70: 362-372.
  72. Onishchenko N, Fischer C, Wan Ibrahim C, Negri WN, Spulber S, Cottica D, Ceccatelli S (2011) Prenatal exposure to PFOS or PFOA alters motor function in mice in a sex-related manner. *Neurotox Res* 19: 452-461.
  73. Oshino N, Imai Y, Sato R (1971) A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturase by rat liver microsomes. *J Biochem* 69: 155-167.
  74. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B (2015) Molecular mechanism of PPAR  $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatology* 62: 720-733.
  75. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47: 32-44.
  76. Preliminary risk assessment of the developmental toxicity associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts. In : U.S. Environmental Protection Agency.
  77. Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH (2006) Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 40: 32-44.
  78. Quinete N, Wu Q, Zhang T, Yun SH, Moreira I, Kannan K (2009) Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish, and dolphins from southeastern Brazil. *Chemosphere* 77: 863-869.

79. Renner R (2001) Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environ Sci Technol* 35: 154a-160a.
80. Reid NB, Ables GP, Otlivanchik OA, Schoiswohl G, Zechner R, Blaner WS, Goldberg IJ, Schwabe RF, Chua SC Jr, Huang LS (2008) Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 283: 13087-13099.
81. Ribes D, Fuentes S, Torrente M, Colomina MT, Domingo JL (2010) Combined effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and maternal restraint stress on hypothalamus adrenal axis (HPA) function in the offspring of mice. *Toxicol Appl Pharm* 243: 13-18.
82. Rich CD, Blaine AC, Hundal L, Higgins CP (2015) Bioaccumulation of perfluoroalkyl acids by earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated soils. *Environ Sci Technol* 49: 881-888.
83. Rosen MB, Lee JS, Ren H, Vallanat B, Liu J, Waalkes MP, Abbott BD, Lau C, Corton C (2008) Toxicogenomic dissection of the perfluorooctanoic acid transcript profile in mouse liver: Evidence for the involvement of nuclear receptors PPAR $\alpha$  and CAR. *Toxicol Sci* 103: 46-56.
84. Son HY, Kim SH, Shin HI, Bae HI, Yang JH (2008) Perfluorooctanoic acid-induced hepatic toxicity following 21-day oral exposure in mice. *Arch Toxicol* 82: 239-246.
85. Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacino JS (2009) Coatomer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* 122: 1834-1841.
86. Senthilkumar K, Ohi E, Sajwan K, Takasuga T, Kannan K (2007) Perfluorinated compounds in river water, river sediment, market fish, and wildlife samples from Japan. *Bull Environ Contam Toxicol* 79: 427-431.
87. Shaw B, Lambert S, Wong MH, Ralston JC, Stryjecki C, Mutch DM (2013) Individual saturated and monounsaturated fatty acids trigger distinct transcriptional networks in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 6: 1-15.
88. Spector AA, Yoerk MA (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26: 1015-1035.
89. Uy-Yu N, Kawashima Y, Kozuka H (1990) Comparative studies on sex-related difference in biochemical response of livers to perfluorooctanoic acid between rats and mice. *Biochem Pharmacol* 39: 1492-1495.
90. Van Refelghem MJ, Mattie DR, Bruner RH, Andersen ME (1987) Pathological and hepatic ultrastructural

effects of a single dose of perfluoro-n-decanoic acid in the rat, hamster, mouse, and guinea pig. *Fundam Appl Toxicol* 9: 522-540.

91. Viberg H, Lee I, Eriksson P (2013) Adult dose-dependent behavioral and cognitive disturbances after a single neonatal PFHxS dose. *Toxicology* 304: 185-191.
92. Wang Z, Cousins IT, Scheringer M, Hungerbuhler K (2013) Fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), perfluoroalkane sulfonic acids (PFSAs) and their potential precursors. *Environ Int* 60: 242-248.
93. Wang Z, Cousins IT, Scheringer M, Buck RC, Hungerbuhler K (2014a) Global emission inventories for C4-C14 perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951-2030, Part I : production and emissions from quantifiable sources. *Environ Int* 69: 166-176.
94. Watt MJ, Hoy AJ, Muoio DM, Coleman RA (2012) Distinct roles of specific fatty acids in cellular processes: implications for interpreting and reporting experiments. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1-E3.
95. Wu JW, Wang SP, Alvarez F, Casavant S, Gauthier N, Abed L, Soni KG, Yang G, Mitchell GA (2011) Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* 54: 122-132.
96. Wu Y, Li R, Hildebrand DF (2012) Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. *Pror Lipid Res* 51: 340-349.
97. Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Petrick G, Gamo T (2005) A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar Pollut Bull* 51: 658-668.
98. Yamazaki T, Okada H, Sakamoto T, Sunaga K, Tsuda T, Mitshumato A, Kudo N, Kawashima Y (2012) Differential induction of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2 gene by fibrates in the liver of rats. *Biol Pharm Bull* 35: 116-120.
99. Yang B, Zou W, Hu Z, Liu F, Zhou L, Yang S, Kuang H, Wu L, Wei J, Wang J, Zou T, Zhang D (2014) Involvement of oxidative stress and inflammation in liver injury caused by perfluorooctanoic acid exposure in mice. *BioMed Res Int* 2014: 409837.
100. Nakagawa K, Kudo N, Kawashima Y. unpublished data.
101. Yanase M, Kudo N, Kawashima Y. unpublished data.