

定した。

B. 研究方法

1) サンプル収集

PAPsを始めとした有機フッ素化合物の関連物質が成分表示されている製品を収集し、分析試料とした (Table1)。2007-2012に日本で販売されている化粧品15サンプル、日焼け止め9サンプルを入手した。化粧品原料としてPAPsで表面加工(総重量の5%)がされているマイカとタルクを入手した。

2) 抽出・測定

調査対象物質は、perfluoroheptanoic acid (PFHxA; 炭素鎖6、C6)、perfluorohexanoic acid (PFHpA, C7)、PFOA (C8)、perfluorononanoic acid (PFNA; C9)、perfluorodecanoic acid (PFDA; C10)、perfluoroundecanoic acid (PFUnDA; C11)、perfluorododecanoic acid (PFDoDA; C12)、perfluorotridecanoic acid (PFTrDA; C13)、および perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA; C14)の9化合物とした。サンプルは1-200mgを分注し分析用試料とした。分注後、¹³C標識のPFOA、PFNA、PFDA、PFUnDA、PFDoDA内部標準、*t*-ブチルメチルエーテル (MTBE)1ml、0.5Mテトラブチルアンモニウム溶液 (TBA) 0.3ml、0.5M炭酸ナトリウム緩衝液0.6mlを加えた。チューブローターにて24時間回転混和させた後、遠心分離を行い、上清を量りとった。さらにMTBEを1ml追加し、24時間回転、遠心分離、上清を取る操作を繰り返した (計2回の抽出)。この溶液を高純度窒素気流で乾固し、1 ng¹¹H-PFUnDAを加えた臭化ベンジルアセトン溶液を添加

し、ベンジルエステル誘導体化した。分析は誘導体化後24時間以内に行った。

GC/MS (Agilent 6890GC/5973MSD, Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan)を用いて測定した。DB-5MS(全長30m、内径0.25mm、膜厚1 μ m)のカラムで分離し、Single ion monitoringを使用し、化学イオン化陰イオンモードで分析した。試薬ガスにはメタンを用いイオン源温度は150 $^{\circ}$ Cとした。昇温条件は70 $^{\circ}$ Cで2分保持後、100 $^{\circ}$ Cまで20 $^{\circ}$ C/min、280 $^{\circ}$ Cまで30 $^{\circ}$ C/minで昇温した。Table 2に示すイオンを測定した。

3) 検出限界、ブランク値、回収率

装置の検出限界(IDL)はシグナル/ノイズ比=3にて設定を行った。操作ブランクにはMilli-Q waterを使用した (計9)。ブランク値が検出された場合はサンプルの値からブランク値を引いたうえで、ブランク値の2倍の値をMethod detection limit (MDL)として扱った (Table2)。回収率は100pgの各標準物質を抽出前のサンプルに添加し、抽出後に添加した¹¹H-PFUnDAと比較することで確認した。

C/D. 結果・考察

本研究では、消費者段階のパーソナルケア製品中のPFCAの検出に成功した。リカバリーは77-81%であった (Table2)。PFCAレベルはTable3に示す。化粧品15製品中13、日焼け止め9製品中8でPFCAが検出された。PAPsの表示のある製品からは全てPFCAが検出された。総PFCA (炭素鎖6-14)の濃度は化粧品で最大5.9 μ g/g、日焼け止めで最大19 μ g/gであった (Table 3)。これは今まで

に報告され consumer products に含まれる PFCAs のレベルを大きく上回っており (Washburn et al., 2005)、この高濃度の PFCAs が含まれたパーソナルケア製品は人への直接曝露の原因、もしくはハウスダストや下水の汚染原因となる可能性がある。

化粧品原料の PAPs 表面加工マイカは $35.0 \mu\text{g/g}$ 、タルクは $2.5 \mu\text{g/g}$ と高濃度の PFCAs をそれぞれ含んでいた (Table 4)。PFCAs が PAPs を含んだ化粧品原料中にも高濃度見られたことから、工業用 PAPs が PFCAs のソースであると推測される。

E. 結論

本研究は化粧品・日焼け止の PFCAs 濃度を測定した初の報告である。それら製品中の PFCAs は ppm レベルであり、従来の消費者製品類の濃度よりもはるかに高濃度であった。PFCAs は PAPs を含んだ化粧品原料中にも高濃度見られたことから、工業用 PAPs が PFCAs のソースであると推測される。今後は肌への塗布による体内への吸収、さらには下水・ハウスダスト等への影響を評価する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

第83回日本衛生学会学術総会
(2013年3月24-26日 金沢)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

D'eon, J.C., Mabury, S.A., 2007. Production of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) from the biotransformation of polyfluoroalkyl phosphate surfactants (PAPS): Exploring routes of human contamination. *Environmental Science & Technology* 41, 4799-4805.

D'eon, J.C., Mabury, S.A., 2011. Exploring Indirect Sources of Human Exposure to Perfluoroalkyl Carboxylates (PFCAs): Evaluating Uptake, Elimination, and Biotransformation of Polyfluoroalkyl Phosphate Esters (PAPS) in the Rat. *Environmental Health Perspectives* 119, 344-350.

Daito Kasei Kogyo., 1993. Water and Oil repellent Pigments and their Manufacturing. Examined Patent Publication of Japan (Kokoku) No.5-3456. 15 December 1993.

Washburn, S.T., Bingman, T.S., Braithwaite, S.K., Buck, R.C., Buxton, L.W., Clewell, H.J., Haroun, L.A., Kester, J.E., Rickard, R.W., Shipp, A.M., 2005. Exposure assessment and risk characterization for perfluorooctanoate in selected consumer articles. *Environmental Science & Technology* 39, 3904-3910.

Table 1

a. Characteristics of personal care product samples purchased in Japan

Sample No.	Type of PCP	specific features	application body site	Fluorinated ingredients (ingredients listed in the labels on each product)	Sampling	Country of origin	Manufacturing company
					Year		
cosmetics							
1	manicure	-	nail	PAPs ^c	2009	Japan	A
2	manicure	-	nail	PAPs ^c	2009	Japan	B
3	foundation	-	face	PAPs ^c	2009	France	C
4	lip rouge	-	lip	PAPs ^c	2009	Japan	D
5	manicure (base coat)	-	nail	PAPs ^c	2009	Japan	A
6	powder fundation	-	face	PAPs ^c	2011	Japan	E
7	powder fundation	-	face	PAPs ^c	2011	France	F
8	powder fundation	-	face	PAPs ^c , Polyfluorooctylmethyl trimethoxysilane	2011	Japan	G
9	powder fundation	-	face	PAPs ^c , Perfluorooctyl triethoxysilane	2011	Japan	B
10	liquid foundation	-	face	PAPs ^c , Perfluoroalkyl ethoxydimethicone	2011	Japan	E
11	liquid makeup base	-	face	PAPs ^c , Perfluoroalkyl ethoxydimethicone	2011	Japan	E
12	foundation	-	face	Polyfluoroalkyl silylated mica	2009	Korea	H
13	foundation	-	face	Polyfluorooctyl trimethoxysilane	2009	Japan	A
14	lip rouge	-	lip	Stearyl methacrylate/perfluorooctylethyl methacrylate copolymer	2009	Japan	E
15	powder fundation	-	face	Grapeseed fatty acid perfluorononyl octyldodecyl glycol	2011	The United States	I
sunscreen							
1-1 ^b	skin milk	waterproofness	face and body	PAPs ^c	2007	Japan	J
1-2 ^b	skin milk	waterproofness	face and body	PAPs ^c	2009	Japan	J
1-3 ^b	skin milk	waterproofness	face and body	PAPs ^c	2011	Japan	J
1-4 ^b	skin milk	waterproofness	face and body	PAPs ^c	2011	Japan	J
2	skin milk	waterproofness	face and body	PAPs ^c	2011	Japan	J
3	skin milk	-	face	PAPs ^c	2011	Japan	J
7 ^a	skin milk7	-	face and body	-	2011	Japan	H
4	powder foundation	waterproofness	face	PAPs ^c	2011	Japan	B
5	liquid foundation	waterproofness	face	PAPs ^c , PEG-8 trifluoropropyl dimethicone copolymer	2011	Japan	B
6	foundation	-	face	Polyperfluoroethoxymethoxy difluoroethyl PEG phosphate	2011	Japan	J
Control samples (does not list any fluorinated ingredients in their labels) ^a							
1	Cosmetic (manicure)	-	nail	-	2009	Japan	A
2	Sunscreen (skin milk)	-	face and body	-	2011	Japan	J

^a The cosmetic and sunscreen samples that did not list any fluorinated ingredients in their labels were used as control samples.

^b Sunscreen No. 1, No. 2, No. 3 and No. 4 are the same product with different lot numbers.

^c PAPs; polyfluoroalkyl phosphate esters

b. Compounding agents of PCPs

Sample No	Component	Composition (Weight %)	Sampling	Country of origin
			Year	
compounding agents				
1	Mica treated with PAPs ^c	mica: 95 (%) , PAPs ^c :5 (%)	2012	Japan
2	Talc treated with PAPs ^c	talc: 95 (%) , PAPs ^c :5 (%)	2012	Japan

^c PAPs; polyfluoroalkyl phosphate esters

Table 2

Recoveries and method detection limits for PFCAs analysis of personal care products

Compound (carbon atoms)	Quantification ions (confirmation ions) m/z	Instrument detection limit ^a (pg)	Recovery of Internal standards ^b % (SD%) (n=9)	Procedural blank (SD) (pg, n=9)	Method detection limit (ng g ⁻¹) ^c (for 1mg samples)
PFHxA (C6)	313 (294)	0.004	81(8.0) ^b	19(15.6)	39
PFHpA (C7)	363 (344)	0.004	n.d.	40(6.8)	79
PFOA (C8)	413 (394)	0.003	79(7.9) ^b	26(10.5)	51
PFNA (C9)	463 (444)	0.003	77(8.5) ^b	11(3.2)	22
PFDA (C10)	513 (494)	0.004	78(8.8) ^b	13(4.1)	26
PFUnDA (C11)	563 (544)	0.004	77(7.8) ^b	9(2.0)	18
PFDoDA (C12)	613 (594)	0.005	77(8.2) ^b	10(4.8)	20
PFTTrDA (C13)	663 (644)	0.005	n.d.	3(2.4)	6
PFTeDA (C14)	713 (694)	0.007	n.d.	<0.7	0.7

SD: relative standard deviation

^a 1 µL injection^b ¹³C₂-labeled PFHxA, ¹³C₄-labeled PFOA, ¹³C₅-labeled PFNA, ¹³C₂-labeled PFDA, ¹³C₂-labeled PFUnDA and ¹³C₂-labeled PFDoDA^c The method detection limit is defined as the concentration that produces a signal three times that of the blank. The mean blank signal was subtracted from the calculated sample concentration. No blank response was observed for PFTeDA and its method detection limit was calculated from the instrument detection limit. The sample size was approximately 1 to 200 mg, and this varied according to sample concentration.

Table 3
Levels of PFCAs in personal care products

Sample No		Compound (carbon atoms), Concentration (ng g ⁻¹)									ΣPFCAs ^c
		PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDaDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)	
(In a concentration order)											
cosmetics											
8	powder foundation	1,100	170	1,700	240	1,000	150	940	67	590	5,900
10	liquid foundation	2,100	290	1,400	230	610	110	260	34	84	5,100
3	foundation	410	140	1,400	250	880	130	430	56	210	3,900
6	powder foundation	800	200	1,100	380	650	180	360	71	140	3,900
9	powder foundation	910	150	390	110	320	66	160	27	59	2,200
1	manicure	140	43	910	140	450	62	230	16	44	2,000
12	foundation	170	140	430	330	270	150	140	55	62	1,700
2	manicure	21	<14	200	40	110	19	55	7.4	12	460
7	powder foundation	109	24	91	22	73	14	43	8	18.2	400
13	foundation	360	24	6.9	<0.6	2.8	0.4	0.7	<0.2	<0.02	400
11	liquid makeup base	54	12	43	3.2	12	1.9	5.7	0.9	1.8	130
5	manicure (base coat)	4.0	<1.9	15	2.2	6.7	0.9	3.0	0.4	1.5	34
4	lip rouge	<0.8	<1.7	3.3	0.6	2.2	0.5	2.0	0.2	0.7	11
14	lip rouge	<3.3	<6.8	<4.4	<1.9	<2.2	<1.5	<1.7	<0.5	<0.06	<MDL ^e
15	powder foundation	<1.1	<2.3	<1.5	<0.6	<0.7	<0.5	<0.6	<0.2	<0.02	<MDL ^e
sunscreen											
1-1 ^b	skin milk	6,500	960	5,700	660	2,900	330	1,400	140	600	19,000
2	skin milk	3,300	500	1,700	330	1,100	200	630	100	300	8,100
1-4 ^b	skin milk	2,900	450	1,500	290	940	180	560	85	260	7,100
1-2 ^b	skin milk	2,700	390	1,400	270	970	170	580	85	280	6,800
1-3 ^b	skin milk	1,300	200	670	130	430	76	240	36	110	3,100
4	powder foundation	350	59	270	73	210	47	160	28	76	1,300
5	liquid foundation	170	48	370	170	160	75	77	28	28	1,100
3	skin milk	3.2	<2.1	2.8	<0.6	1.2	<0.5	<0.5	<0.2	<0.02	9.1
6	foundation	<1.4	<2.8	<1.8	<0.8	<0.9	<0.6	<0.7	<0.2	<0.02	<MDL ^e
Control samples (does not list any fluorinated ingredients in their labels)^a											
1	Cosmetics (manicure)	<0.4	<0.7	<0.5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.1	<0.01	<MDL ^e
2	sunscreen (skin milk)	<0.2	<0.4	<0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.03	<0.003	<MDL ^e

Each sample was quantified once

a. The cosmetic and sunscreen samples that did not list any fluorinated ingredients in their labels were used as control samples.

b. Sunscreen No. 1.1, No. 1.2, No. 1.3 and No. 1.4 are the same product with different lot numbers.

c. Concentrations lower than the method detection limit (MDL) were given a value of half of the MDL for the calculation.

d. Compositions of even and odd numbered PFCAs are expressed as (C6+C8+C10+C12+C14)/ΣPFCAs and (C7+C9+C11+C13)/ΣPFCAs, respectively.

e. MDL: method detection limit

Table 4
Levels of PFCAs in compounding agents of PCPs

Sample No	Component	Composition (Wt %)	Compound (carbon atoms), Concentration (ng g ⁻¹)										ΣPFCAs ^c
			PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFOxDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)		
compounding agents													
1	Mica treated with PAPs ^a	Mica: 95.0, PAPs ^a :5.0	8,400	3,100	6,000	3,200	5,700	2,300	3,800	1,100	1,900	35,000	
2	Talc treated with PAPs ^a	Talc: 95.0, PAPs ^a :5.0	500	130	350	190	600	140	350	62	150	2500	

Each sample was quantified once
a. PAPs: polyfluoroalkyl phosphate esters

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

マウスを用いた母乳中PFCA分泌割合の検討

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学医学研究科環境衛生学分野
研究協力者 藤井 由希子 京都大学医学研究科環境衛生学分野

研究要旨

有機フッ素カルボン酸(PFCAs)は環境中に検出される汚染物質である。ヒトにおいても血清を始め母乳中からも炭素鎖が異なる PFCA 類の検出が確認されているが、血清から母乳への移行係数についての検討はされていない。本研究では PFOA(C8)を含む炭素鎖 5 から 13 (C5-C13)の PFCA 類に注目しマウスを用いて母乳中への分泌を評価した。投与 24 時間後のマウスの血清中と母乳中の PFCAs の移行係数 (母乳中 PFCAs/血清中 PFCAs) は C7 が 1.56 最も高く、C8 から C13 までは 0.22 から 0.54 の幅に収まった。(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35 C13:0.54)。このように炭素鎖長で大きく異なり、短鎖 PFCAs (C7)と中長鎖 PFCAs(C8-C13)の間には血中からの分泌において大きな差があることが確認された。

A. 研究目的

有機フッ素カルボン酸(PFCA 類)は環境中に検出される汚染物質である。近年、主たる汚染物質である PFOA(炭素鎖 8, C8)以外の炭素鎖長の異なる類縁物質 (炭素鎖 9~14, C9~C14)の血清中増加が東アジア地域において見られている(Harada et al., 2011)。

PFOA 曝露が乳児の発達に与える影響について近年多くの研究がなされてきた。その中で、乳児の曝露経路として母乳を介する経路が注目されている。しかし、母体血中から母乳への移行の動態について十分な知見がない。我々の報告では、母乳中からも炭素鎖が異なる PFCA 類(C8-C13)を

検出しており(Fujii et al., 2012)、異なる炭素長の有機フッ素カルボン酸の母体から母乳への移行を評価する必要がある。しかしながら、比較的先行研究が豊富な PFOA(C8)を除き、PFCAs の母乳中への移行割合は現在まで明らかにされていない。

本研究の目的は、マウスを用いて、化学物質の母乳中への移行動態を評価する手法を開発することである。

B. 研究方法

本研究計画は京都大学動物実験委員会承認されている。

出産14-9日後の野生型FBV/Nマウスの雌(n=4)にPFCAs(C5-C14)各3.17nmol/gを尾静脈注射投与した。マ

ウス用搾乳機の詳細は写真1に示す。24時間後に麻酔下で搾乳を行った。一匹のマウスから約10分の作業で約1-2mlの母乳を採取し(写真2)、直後に血清を回収した。検体に対してイオンペア抽出、誘導体化後ガスクロマトグラフィー・質量分析法により各PFCAs濃度を測定した。

C. 研究結果

結果はTable1に示す。マウス血清中PFCAsはC8をピークに短鎖(C7)もしくは長鎖(C9-C13)ほど低い濃度になった(nmolg/ml-serum; C7:1.43, C8:15.56, C9:13.71, C10:3.82, C11:3.47, C12:1.22, C13:0.68)。母乳中PFCAsも同様の傾向を示した(nmolg/ml-milk; C7:2.16, C8:5.58, C9:4.73, C10:0.79, C11:0.66, C12:0.39, C13:0.30)。母乳中へのPFCAs分泌割合(母乳/血清)はC7が1.56最も高く、C8からC13までは0.22から0.54の幅に収まった。(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35, C13:0.54)。

D. 考察

投与24時間後のマウスの血清中と母乳中のPFCAsの関係(母乳中PFCAs/血清中PFCAs)はC7(1.56)とC8-C13(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35, C13:0.54)と両者の間で大きく異なり、短鎖PFCAs(C7)と中長鎖PFCAs(C8-C13)の間には血中からの分泌において大きな差があることが確認された。

またPFOA(C8)のみについて母乳中分泌の検討を行った先行研究(Fenton et al., 2009)では、分泌割合は37%であり、今回の36%に近い数値となっており、本研究の妥当性が検証さ

れた。

E. 結論

本研究ではマウスの搾乳に成功し、母乳中PFCAs分泌割合の検討を行った。結果として投与24時間後の母乳中PFCAs/血清中PFCAsは短鎖PFCAs(C7: 156%)と中長鎖PFCAs(C8-C13(54-22%))と両者の間で大きく異なることが確認された。今後は投与されたPFCAsの他の臓器への分配を含めた評価が必要とされる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

Harada, K.H., Hitomi, T., Niisoe, T., Takanaka, K., Kamiyama, S., Watanabe, T., Moon, C.S., Yang, H.R., Hung, N.N., Koizumi, A., 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int* 37, 1183-1189.

- Fujii Y, Yan J, Harada KH, Hitomi T, Yang H, Wang P, Koizumi A. 2012. Levels and profiles of long-chain perfluorinated carboxylic acids in human breast milk and infant formulas in East Asia. *Chemosphere* 86, 315-321.
- Fenton SE, Reiner JL, Nakayama SF, Delinsky AD, Stanko JP, Hines EP, White SS, Lindstrom AB, Strynar MJ, Petropoulou SS. 2009. Analysis of PFOA in dosed CD-1 mice. Part 2. Disposition of PFOA in tissues and fluids from pregnant and lactating mice and their pups. *Reprod Toxicol.* 27:365-72

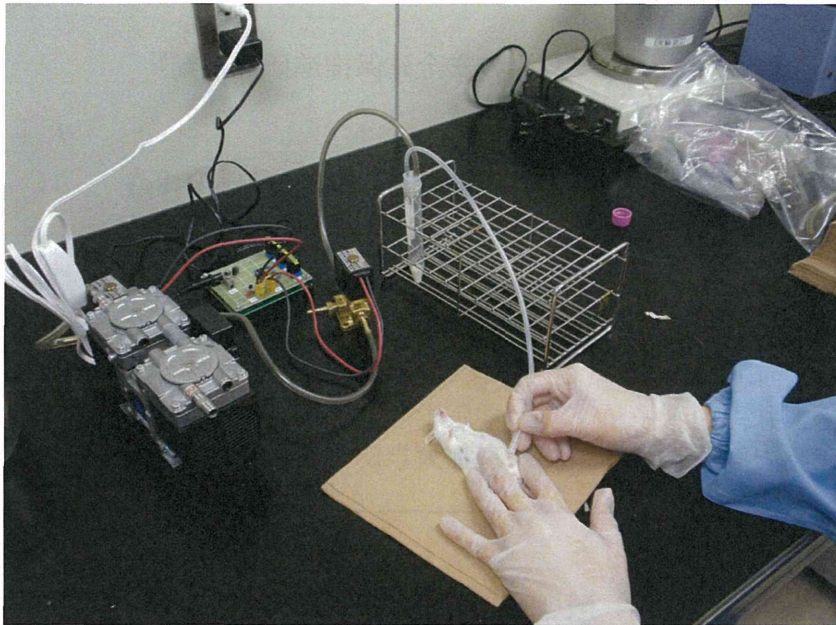


写真 1. マウス搾乳機

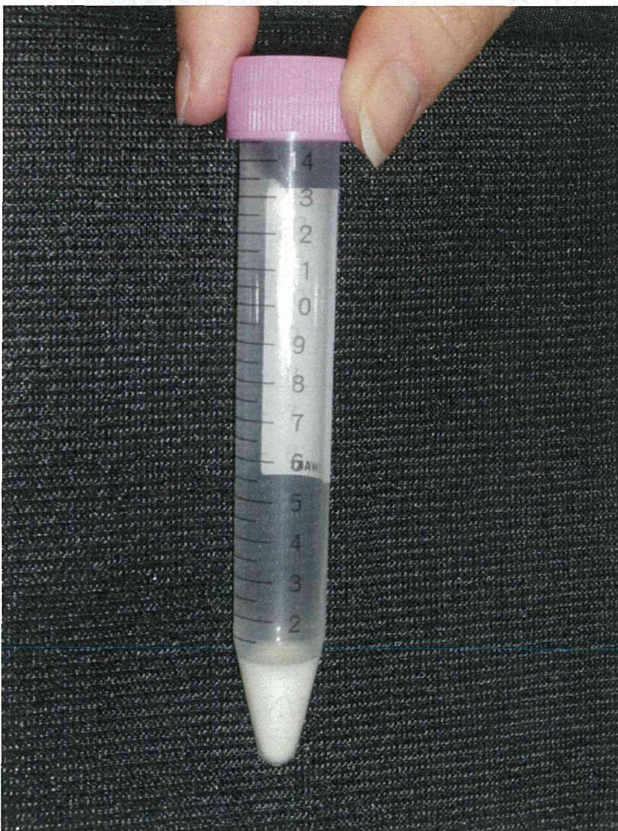


写真 2. 採取されたマウス母乳

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

炭素鎖の異なる有機フッ素カルボン酸における体内動態の相違
；マウスを用いた体内動態実験とヒトサンプルの分析

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学医学研究科環境衛生学分野
研究協力者 藤井 由希子 京都大学医学研究科環境衛生学分野
研究協力者 新添 多聞 京都大学防災研究所

研究要旨

ペルフルオロアルキルカルボン酸 (Perfluoroalkyl carboxylates; PFCAs) は多数の炭素鎖の異なる同族体をもつ残留性有機汚染物質である。PFCAsの鎖長とその毒性は密接な関連があるとされることから、これらの体内動態のデータはPFCAsの毒性の把握において重要な情報となるとされる。本研究ではPFCAsの体内動態についてマウスを用いた動物実験と、ヒト試料での検討を行った。本研究で得られた知見は以下のとおりである。(1) マウスを用いた動物実験によると短鎖PFCAs(C5 to C7)は急速に尿中に排泄されるが長鎖PFCAs(C8 to C14)は肝臓に蓄積され、胆汁を通して糞中に比較的ゆっくりとしたペースで排泄される (2)ヒトとマウスの共通事項としてPFCAsの尿中クリアランスは鎖長が長くなるにつれ低下する。一方、糞中クリアランスは増加する。その結果総クリアランスはマウスでC10, ヒトでC9が最も低くなる。低クリアランスの物質についてのより詳細な評価が今後の課題となる。

A. 研究目的

ペルフルオロアルキルカルボン酸 (Perfluoroalkyl carboxylates; PFCAs)は多数の炭素鎖の異なる同族体をもつ残留性有機汚染物質である。PFCAsの鎖長とその毒性は密接な関連があるとされることから、これらの体内動態のデータはPFCAsの毒性の把握において重要な情報となるとされる。本研究では幅広い鎖長のPFCAs(炭素鎖5から14まで)を対象にマウスとヒトでの体内動態の評価を行った。

B. 研究方法

1) マウスを用いたPFCAs体内動態試験

動物実験の概要はTable1に示す。野生型マウスFVB/NJcl (WT)を雌雄ともに日本クレア株式会社(Tokyo, Japan)から購入し、京都大学医学研究科附属動物実験施設にて飼育した。実験計画は京都大学動物実験委員会により承認された。8週齢の雄(n=18)、雄(n=18)を、PFCAs投与開始の24時間前に代謝ケージへ搬入した。PFCAs

は尾静脈内注射 (i.v.) で $0.31 \mu\text{mol/kg-b.w.}$ 、経口投与 (p.o.) で $3.13 \mu\text{mol/kg-b.w.}$ を単回急速投与した。投与したマウスを代謝ケージに戻し、観察を継続した。投与した時間を0時間とし、1, 3, 6, 12, 24時間後に血液を採取した。静脈投与マウスについては追加して投与0.5時間後に血液を採取した。投与24時間後に尿・糞・血液・臓器類 (肝臓・腎臓・脂肪組織・脳) を回収した。

2) ヒト試料の概要

京都大学医の倫理委員会の承認を得て、5名の胆管ドレナージを実施した患者から血液、胆汁の提供を受けた。また、別の健常人男性5名、女性5名より尿および血液の提供をうけた。ヒト試料の概要はTable2に示す。

3) PFCAs分析

PFCAsの定量はイオンペア抽出、誘導体化ガスクロマトグラフィ質量分析法で行った。各試料 (固形試料はホモジナイズ後) に ^{13}C 標識のPFHxA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA内部標準、*t*-ブチルメチルエーテル (MTBE) 1ml、0.5Mテトラブチルアンモニウム溶液 (TBA) 0.3ml、0.5M炭酸ナトリウム緩衝液0.6mlを加えた。チューブローターにて24時間回転混和させた後、遠心分離を行い、上清を量りとった。さらにMTBEを1ml追加し、24時間回転、遠心分離、上清を取る操作を繰り返した (計2回の抽出)。この溶液を高純度窒素気流で乾固した。誘導体化効率を確認するために $1 \text{ ng } ^{11}\text{H-perfluoroundecanoic acid}$ と $1 \text{ ng } ^{13}\text{C}_{12}\text{-labeled CB111}$ 0.1 M を加えた臭化ベンジルアセトン溶液を添加し、ベンジルエステル誘導体化し

た。分析は誘導体化後24時間以内に行った。GC/MS (Agilent 6890GC/5973MSD, Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。DB-5MS (全長30m、内径0.25mm、膜厚 $1\mu\text{m}$) のカラムで分離した。試薬ガスにはメタンを用いイオン源温度は 150°C とした。昇温条件は 70°C で2分保持後、 100°C まで $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 、 280°C まで $30^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温した。Table 3に示すイオンを測定した。

4) 動態解析

動態解析はTwo compartment model に基づき行い、パラメータの推定は、最小二乗法により推定した。

C/D. 研究結果・考察

1) 血中濃度の推移

血清中PFCAs濃度の推移は2-コンパートメントモデルを用いて評価を行った。Table4にパラメータを示し、Fig1にグラフ化した。C5, C6は投与後1時間時点ですべて検出限界以下であった。Fig1に示すとおり、C7は投与24時後までにすべて排出されている。その他PFCAs (C8からC14) までは初期の分配は6時間後までにはほぼ終了していることが確認された。

2) PFCAsの臓器への分配と排泄

血液を含む各臓器へのPFCAsの分配はTable5とTable6に示す。静脈投与と経口投与の双方において、目立った性差は確認されなかった。C5-C7の短鎖PFCAsはほぼ全量が尿中に排泄されていた (i.v. 66 to 101%, p.o. 46 to 72%)。一方、C8-C14の長鎖PFCAsは肝臓に蓄積されていた (i.v. 30 to 80%, p.o. 27 to 90%)。次に静脈投与時の尿中クリアランス・糞中クリアランスに

注目をした(Table7a)。尿中クリアランス(Renal clearances:CLr)は長鎖ほど小さい値になった(mL/day/kg-mice-b.w., C8;13, C9;3.6, C10;1.0, C11;0.5, C12;0.5, C13;0.6, C14;0.6)。一方、糞中クリアランス(fecal clearances: CLf)は長鎖ほど大きい値になった(>C8)(mL/day/kg-mice-b.w., C9;1.4, C10;1.8, C11;3.1, C12;5.1, C13;9.0, C14;14)。長鎖PFCAsが肝臓に多く蓄積されることと胆汁中に検出されることを鑑みると、PFCAsは腸管循環のなかで再吸収されなかった分が糞中に排泄されていると考えられる。尿中クリアランスと、糞中クリアランスを合計したマウスの総クリアランスではC10付近でもっとも低くなる(Fig2a)。

短鎖PFCAsは腎排泄により速やかに尿中へ移行し、長鎖PFCAsは肝臓への蓄積を経て、比較的ゆっくりとしたペースで糞中より排泄される。一般的に知られている通り、低分子量の水溶性物質は腎排泄され、高分子量の脂溶性物質は肝排泄されといわれており、PFCAsの排泄の違いは、物理化学的性質によっておこると推測される。

3) ヒトとマウスのPFCAs排泄の違い

ヒトのPFCAs尿中クリアランスと胆汁中排泄をTable7bに示す。C5,C6はヒト血清中では検出されなかったため、クリアランスの計算は出来な。尿中クリアランスは鎖長が長くなるにつれて低下する傾向を示した(mL/day/kg-human-b.w.: C7,0.67; C8,0.044; C9,0.038; C10,0.015; C11,0.0051; C12,0.0047; C13,0.0058)。一方、胆汁中排泄は鎖長が長くなるにつれ増加した。(>C8) (mL/day/kg-human-b.w.,

C9;1.2, C10;2.5, C11;3.0, C12;3.3, C13;3.6, C14;11)。胆汁中PFCAsの約90パーセントが腸管循環で再吸収され、約10%が再吸収されず糞中に排泄されると仮定すると、総クリアランスはC8,C9,C10でもっとも低い値となる(Fig2b)。

ヒトとマウスのクリアランスの違いは興味深い結果を示した。まず、総排泄はヒトはマウスの10から45分の一の値であった。さらに最もクリアランスが低い鎖長はマウスではC9-C11で最少となり、ヒトではC-8,C9,C10で最少となり、炭素鎖一つの違いがあった(Fig3)。種差によるこのような違いの理由は、尿中クリアランス、腸管循環による排泄の影響が大きく、種差の原因として腎と肝臓での分泌過程の関与が重要である。

E. 結論

本研究ではPFCAsの体内動態についてマウスを用いた動物実験と、ヒト試料での検討を行った。その結果、

C5-C14の有機フッ素カルボン酸の体内動態は、経路に関わらず2コンパートメントモデルでよく記載できることを証明できた。本研究で、強調すべき点は、鎖長による生物的残留性の違いを種差を含めて検討を行ったことである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。(1)マウスを用いた動物実験によると短鎖PFCAs(C5 to C7)は急速に尿中に排泄されるが長鎖PFCAs(C8 to C14)は肝臓に蓄積され、胆汁を通して糞中に比較的ゆっくりとしたペースで排泄される(2)ヒトとマウスの共通事項としてPFCAsの尿中クリアランスは鎖長が長くなるにつれ低下する。一方、糞中クリアランスは増加する。その結果総クリアラン

スはマウスでC9,C10,C11で最少となり ヒトでは、C8,C9,C10が最も低くなる。低クリアランスの、血中および臓器中の担体タンパクや分泌機構など生理的説明についてのより詳細な評価が今後の課題となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

近畿産業衛生学会

2011年11月5日 奈良

日本衛生学会

2012年3月24-26日 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

なし

Table1. Study profile of PFCAs animal study

administration methods	dosage amount (nmol/g-mice-k.g.)	Sex (N)	Serum sampling	Urine and Feces sampling	Tissue Sampling (Liver, Kidney, Brain, Adipose tissue)
intravenous (i.v.)	0.31	Male (9), Female(9)	Time course (0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24hr after dosing)	24 hr after dosing	24 hr after dosing
oral (p.o.)	3.13	Male (9), Female(9)	Time course (0, 1, 3, 6, 12, 24hr after dosing)	24 hr after dosing	24 hr after dosing

Table 2
Demographic status of participants

No	sex	Age (yrs)	Disease	Treatment
Bile-serum pair				
1	female	68	carci noma of the head of the pancreas	endoscopic nasobiliary drainag
2	male	74	chol edochol i t h i asi s	percutaneous transhepatic biliary drainage
3	female	90	chol edochol i t h i asi s	endoscopic nasobiliary drainag
4	male	75	chol ecvst ol i t h i asi s	percutaneous transhepatic gallbladder drainage
5	male	81	chol edochol i t h i asi s	endoscopic nasobiliary drainag
Urine-serum pair				
1	male	23	healthy volunteer	-
2	male	21	healthy volunteer	-
3	male	22	healthy volunteer	-
4	male	21	healthy volunteer	-
5	male	21	healthy volunteer	-
6	female	22	healthy volunteer	-
7	female	22	healthy volunteer	-
8	female	21	healthy volunteer	-
9	female	22	healthy volunteer	-
10	female	28	healthy volunteer	-

Table 3

Target ions and method detection limits

		Human samples				
			Serum	Bile	Urine	
Compound (carbon atoms)	Quantification ions (confirmation ions) m/z	Instrument detection limit ^a (pg)	Method detection limit (pg mL ⁻¹) ^c	Method detection limit (ng mL ⁻¹) ^c	Method detection limit (ng L ⁻¹) ^c	
PFPeA	(C5)	263 (244)	0.005	-	-	-
PFHxA	(C6)	313 (294)	0.004	-	-	-
PFHpA	(C7)	363 (344)	0.004	30	0.8	6.4
PFOA	(C8)	413 (394)	0.003	215	0.8	3.5
PFNA	(C9)	463 (444)	0.003	107	0.4	1.3
PFDA	(C10)	513 (494)	0.004	49	0.3	0.8
PFUnDA	(C11)	563 (544)	0.004	36	0.3	0.5
PFDODA	(C12)	613 (594)	0.005	20	0.1	0.3
PFTTrDA	(C13)	663 (644)	0.005	17	0.1	0.8
PFTeDA	(C14)	713 (694)	0.007	11	0.1	0.2

SD: relative standard deviation

^a 1µL injection

^c The method detection limit is defined as the concentration that produces a signal three times that of the blank. The mean blank signal was subtracted from the calculated sample concentration. No blank response was observed for PFTeDA and its method detection limit was calculated from instrument detection limit. Sample volume was approximately 0.5 to 30 mL samples, which varied according to sample concentration.

Table4. Parameter estimates of serum PFCAs levels based on 2-compartment model

$$\text{serum concentration} = a_1 \cdot \exp(-\lambda_1 \cdot t) + a_2 \cdot \exp(-\lambda_2 \cdot t)$$

a. Intravenous injection (i.v. dose: 0.313 nmol/g-mice-b.w.)

	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDaDA (C12)	PFTTrDA (C13)	
	Male							
	a	a	a	a	a	a	a	
a_1 (nmol/g-b.w.)	0.79(0.26) B	0.20(0.11) A	0.19(0.10) A	0.36(0.20) A	0.26(0.10) A	0.23(0.11) A	0.24(0.12) A	
λ_1 (/h)	1.59(0.50) E	0.026(0.019) A	0.18(0.11) AB	1.20(0.37) DE	0.82(0.25) CD	0.75(0.33) C	0.62(0.32) BC	
a_2 (nmol/g-b.w.)	3.8(0.86) E	1.6(0.37) D	1.3(0.41) CD	0.99(0.24) BC	0.72(0.15) AB	0.38(0.12) A	0.36(0.11) A	
λ_2 (/h)	0.20(0.10) B	0.00014(0.0001) A	0.000046(0.00004) A	0.00013(0.0001) A	0.000052(0.00004) A	0.00035(0.0002) A	0.00058(0.0003) A	
AUC ^b ((nmol/ml)•24h)	22(8.4) D	42(9.9) E	33(10) CE	24(6.0) BC	18(3.7) AB	9.5(3.1) A	9.2(3.1) A	
	Female							
	a	a	a	a	a	a	a	
a_1 (nmol/g-b.w.)	0.87(0.2) B	0.50(0.3) A	0.59(0.3) BA	0.36(0.2) A	0.32(0.2) A	0.47(0.2) A	0.44(0.2) A	
λ_1 (/h)	1.4(0.6) C	0.034(0.02) A	0.032(0.02) A	0.11(0.07) A	0.61(0.2) AB	1.5(0.7) C	1.0(0.5) BC	
a_2 (nmol/g-b.w.)	3.5(1.1) D	1.7(0.5) B	1.6(0.4) BC	1.3(0.3) BC	0.90(0.3) AB	0.48(0.1) A	0.36(0.1) A	
λ_2 (/h)	0.18(0.08) B	0.00021(0.0001) A	0.00042(0.0003) A	0.00046(0.0003) A	0.00043(0.0003) A	0.00023(0.0002) A	0.00027(0.0002) A	
AUC ^b ((nmol/ml)•24h)	24(14) BC	49(12) D	47(11) D	33(8) C	22(6.9) BC	12(3.3) AB	9.3(2.6) A	

b. Peroral administration (p.o. dose: 3.13 nmol/g-mice-b.w.)

	PFHpA (C7)		PFOA (C8)		PFNA (C9)		PFDA (C10)		PFUnDA (C11)		PFDoDA (C12)		PFTTrDA (C13)	
	Male		a		a		a		a		a		a	
a ₁ (nmol/g-b.w.)	-19(2)	AB	-20(2)	A	-19(3)	AB	-18(4)	AB	-15(4)	BC	-11(4)	CD	-8.6(3)	DE
λ ₁ (/h)	0.78(0.3)	B	0.30(0.08)	A	0.28(0.08)	A	0.25(0.07)	A	0.18(0.06)	A	0.16(0.06)	A	0.18(0.07)	A
a ₂ (nmol/g-b.w.)	29(6)	E	23(4)	DE	20(4)	CD	19(4)	CD	16(4)	BC	11(4)	AB	8.6(3)	A
λ ₂ (/h)	0.18(0.06)	B	0.014(0.004)	A	0.014(0.004)	A	0.021(0.01)	A	0.033(0.01)	A	0.041(0.01)	A	0.042(0.01)	A
AUC ^b ((nmol/ml)•24h)	141(51)	BC	409(76)	E	335(63)	D	277(44)	D	170(30)	C	90(21)	AB	69(21)	A
	Female		a		a		a		a		a		a	
a ₁ (nmol/g-b.w.)	-15(1)	A	-12(5)	AB	-16(5)	A	-14(4)	A	-8.4(3)	BC	-4.4(0.9)	CD	-3.7(0.5)	CD
λ ₁ (/h)	0.22(0.1)	AB	0.24(0.1)	AB	0.20(0.1)	A	0.18(0.1)	A	0.17(0.1)	A	0.18(0.1)	A	0.30(0.1)	B
a ₂ (nmol/g-b.w.)	38(6)	D	24(3)	C	27(3)	C	22(3)	C	14(4)	B	6.4(1)	A	4.2(0.9)	A
λ ₂ (/h)	0.14(0.05)	B	0.0041(0.0004)	A	0.0022(0.001)	A	0.0070(0.002)	A	0.0081(0.003)	A	0.0058(0.002)	A	0.0021(0.0002)	A
AUC ^b ((nmol/ml)•24h)	215(156)	BC	492(64)	DE	535(63)	E	414(61)	D	248(78)	C	117(27)	AB	84(23)	A

c. Ratio of AUC (oral average AUC / i.v.average AUC ratio)^b

	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTTrDA
Male	6.3	9.7	10.1	11.4	9.6	9.4	7.5
Female	9.1	9.9	11.3	12.4	11.2	9.8	9.1

Values are mean (SD).

a. Values with different letters differ significantly (p<0.05, Tukey–Kramer HSD test). For example, the letters A and B indicate that the corresponding values differ.

b. AUC; Area under the curve

Table5. Distribution and excretion of PFCAs 24hours after Intravenous administration (i.v. dose: 0.313 nmol/g-mice-b.w.)

		PFPeA (C5)	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male (N=9)											
Average body weight of mice (SD)	g-mice.b.w.	25.9 (1.5)									
Average of administrated dose (SD)	nmol	8.2 (0.5)									
		100%									
Blood ^a (SD)	nmol	<0.034	<0.034	<0.034	2.6(0.50)	2.2(0.41)	1.6(0.26)	1.1(0.19)	0.62(0.13)	0.50(0.14)	0.47(0.18)
		-	-	-	32.3%	27.2%	19.6%	13.7%	7.5%	6.1%	5.7%
Liver (SD)	nmol	<0.033	<0.033	0.10(0.20)	3.9(0.42)	5.6(0.91)	6.6(1.3)	6.4(1.4)	5.5(1.3)	6.0(1.4)	5.3(1.5)
		-	-	1.3%	47.4%	68.5%	79.9%	78.4%	66.6%	72.8%	64.2%
Kidney (SD)	nmol	<0.0071	<0.0071	0.018(0.039)	0.11(0.020)	0.092(0.016)	0.094(0.013)	0.10(0.019)	0.094(0.019)	0.16(0.032)	0.21(0.031)
		-	-	0.2%	1.3%	1.1%	1.1%	1.2%	1.2%	1.9%	2.6%
Brain (SD)	nmol	<0.0064	<0.0064	<0.0064	0.0084(0.0029)	0.010(0.0070)	0.019(0.0076)	0.027(0.0087)	0.024(0.0072)	0.031(0.0087)	0.031(0.0078)
		-	-	-	0.1%	0.1%	0.2%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%
Adipose tissue (SD)	nmol	<0.012	<0.012	0.0083(0.011)	0.13(0.20)	0.045(0.030)	0.043(0.032)	0.053(0.036)	0.051(0.038)	0.088(0.059)	0.12(0.078)
		-	-	0.1%	1.5%	0.6%	0.5%	0.7%	0.6%	1.1%	1.5%
Urine (SD)	nmol	6.92(5.14)	8.31(5.05)	8.1(4.2)	0.61(0.41)	0.11(0.14)	0.021(0.027)	0.0083(0.0073)	0.0039(0.0042)	0.0041(0.0037)	0.0034(0.0033)
		84.4%	101.3%	99.0%	7.4%	1.3%	0.3%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
Feces (SD)	nmol	0.45(0.47)	0.38(0.44)	0.26(0.44)	0.052(0.038)	0.038(0.017)	0.039(0.017)	0.047(0.019)	0.043(0.018)	0.064(0.027)	0.094(0.048)
		5.4%	4.7%	3.2%	0.6%	0.5%	0.5%	0.6%	0.5%	0.8%	1.1%
Total ^b (SD)	nmol	7.4(1.8)	8.7(1.9)	8.5(2.1)	7.4(0.8)	8.1(1.1)	8.4(1.4)	7.8(1.5)	6.3(1.4)	6.8(1.4)	6.2(1.5)
	Total recovery ^b	90%	106%	104%	91%	99%	102%	95%	77%	83%	76%

Female (N=9)

Average body weight of mice (SD)		g-mice.b.w.		20.1 (1.2)								
Average of administrated dose (SD)		nmol		6.4 (0.4)								
				100%								
Blood ^a (SD)	nmol	<0.023	<0.023	<0.023	2.0(0.84)	2.1(0.77)	1.5(0.54)	0.93(0.34)	0.48(0.22)	0.36(0.21)	0.27(0.26)	
		-	-	-	31.5%	32.2%	22.7%	14.6%	7.5%	5.7%	4.2%	
Liver (SD)	nmol	<0.027	<0.027	0.031(0.059)	1.9(0.28)	2.9(0.44)	3.4(0.53)	3.4(0.52)	3.0(0.46)	3.5(0.51)	3.0(0.40)	
		-	-	0.5%	30.2%	45.8%	53.3%	53.3%	46.9%	54.6%	47.1%	
Kidney (SD)	nmol	<0.0048	<0.0048	<0.0048	0.087(0.013)	0.10(0.012)	0.10(0.017)	0.11(0.020)	0.10(0.018)	0.14(0.025)	0.16(0.028)	
		-	-	-	1.4%	1.6%	1.6%	1.7%	1.6%	2.2%	2.5%	
Brain (SD)	nmol	<0.0064	<0.0064	<0.0064	0.0076(0.0017)	0.012(0.0034)	0.023(0.0065)	0.033(0.0085)	0.028(0.0073)	0.035(0.0097)	0.031(0.0099)	
		-	-	-	0.1%	0.2%	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	
Adipose tissue (SD)	nmol	<0.011	<0.011	0.0051(0.0089)	0.057(0.021)	0.073(0.050)	0.083(0.070)	0.094(0.082)	0.092(0.070)	0.15(0.085)	0.19(0.10)	
		-	-	0.1%	0.9%	1.1%	1.3%	1.5%	1.4%	2.3%	2.9%	
Urine (SD)	nmol	5.1(1.9)	5.1(1.7)	4.2(2.3)	0.41(0.25)	0.14(0.078)	0.027(0.012)	0.0073(0.0024)	0.0042(0.0029)	0.0037(0.0020)	0.0033(0.0026)	
		80.4%	79.0%	66.1%	6.4%	2.2%	0.4%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	
Feces (SD)	nmol	0.96(0.99)	1.0(0.85)	0.84(0.85)	0.084(0.065)	0.060(0.028)	0.052(0.026)	0.057(0.028)	0.044(0.023)	0.053(0.025)	0.065(0.037)	
		15.0%	15.6%	13.1%	1.3%	0.9%	0.8%	0.9%	0.7%	0.8%	1.0%	
Total ^b (SD)	nmol	6.2(1.7)	6.1(1.8)	5.3(2.4)	4.1(0.5)	4.4(0.5)	4.6(0.6)	4.3(0.5)	3.7(0.5)	4.3(0.5)	3.8(0.5)	
	Total recovery ^b	96%	95%	80%	72%	84%	80%	73%	59%	66%	58%	

Values are mean (SD). Lower values in parentheses are the mean percentages.

a, calculated by assuming 56 ml/kg-mice body weight for male and 65 for female (Richers et al., 1972)

b, Total of Blood, Liver, Kidney, Brain, Adipose tissue, Urine and Feces.