

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
分担研究報告書

飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究  
－寄与率分科会－

研究代表者	松井佳彦	北海道大学大学院工学研究院	教授
研究分担者	浅見真理	国立保健医療科学院	生活環境研究部 上席主任研究官
	伊藤禎彦	京都大学大学院地球環境学堂	地球益学廊 教授
	広瀬明彦	国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室	室長
	平田睦子	国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室	主任研究官
	西村哲治	帝京平成大学	薬学部 教授
研究協力者	大野浩一	国立保健医療科学院	生活環境研究部 上席主任研究官
	国包章一	静岡県立大学環境科学研究所	教授
	柳橋泰生	福岡女子大学	教授

研究要旨：

科学的根拠に基づいた合理的な水道水質基準における評価値を算定する方法を提案するため、化学物質曝露における、水道水の寄与率に関係する最近の知見の収集と寄与率の推定方法に関する研究を実施した。

消毒副生成物のうちクロロホルムとハロ酢酸をとりあげ、水道への割当率および飲用寄与率に関する検討を行った。水道水および食品からの経口摂取による曝露に加え、吸入、経皮という曝露経路についても考慮し曝露評価を実施した。クロロホルムにおいて吸入と経皮曝露における体内吸収率に関する補正を行い、経口経由に換算した補正曝露量分布を算定した。この分布において、95%値＝TDI 12.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  になるように計算した場合、クロロホルム評価値が 122  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2L/day の飲水量を想定した割当率が 38 %と算定された。ハロ酢酸のうち飲用寄与率の確率分布関数が適用できた物質に対し、飲用寄与率の推奨値として、ジクロロ酢酸 40%、トリクロロ酢酸 30%、プロモクロロ酢酸 30%、プロモジクロロ酢酸 60%が計算された。ただし、これらの値はいずれも不確実性が大きく、特に、食品曝露量の変動と地域差、水道水摂取量（2L/日）が大きな影響を与えることがわかった。

2012年度に行った夏期の摂水量調査（n=1278）において、平日1日目の結果として、水道水由来の摂水量は、平均値で夏 1159 mL、冬 1124 mL、95%では夏 2400、冬 2200 mLであった。この値に、炊飯用水など間接的に摂取する水道水量を今後推定し加えると、日本人の夏期と冬期の直接・間接摂水量についての基礎資料となり得る。

2012年5月のホルムアルデヒド水質事故を受けて、水質基準と給水停止に対する住民の意識に関するアンケート調査を行った。その結果、住民は水道水質基準を満たしていない水であっても、数日程度あれば、特に生活用水確保のために断水を望まない傾向が示された。しかし同時に、基準を満たさないことが健康影響に直結するのではという不安や、基準を満たさないこと自体に対する不安があることも示唆された。

A. 研究目的

2011年6月に公表されたWHO飲料水水質ガイドライン第4版において、一部の物質について毒性情報や飲料水寄与率の見直しが行わ

れた。近年の水道水質基準設定においても、水道水寄与率に関する知見は一層重要と考えられることから、化学物質摂取量と水道水の寄与率に関係する最近の知見の収集と寄与率

の推定方法に関する研究を実施した。

今年度は消毒副生成物として、クロロホルムとハロ酢酸の寄与率推定に関する検討を行った。クロロホルムにおいては、経口摂取として水道と食品、またお風呂や調理などによる吸入曝露とお風呂における経皮曝露についての曝露も推定し、モンテカルロ・シミュレーションを行って、曝露量分布を推定し、水道への割当率の妥当性を検討した。

ハロ酢酸においても、曝露経路として飲用、吸入、経皮の3種を想定し、飲用寄与率を推定した。また、一部のハロ酢酸に対して、不確実性に関する考察も行った。

飲料水の寄与率を推定する際に、飲料水の摂取量、調理水の摂取量、その他の水の摂取量、すなわち摂水量により寄与率が変化することから、過去の摂水量について検討を行ったところ、これまで、地域や年齢の代表性を考慮した水道水や飲料の摂水量調査が限られることから、インターネットアンケートにより年代別、男女別、地域別、季節別に摂水量調査を行った。本年度は昨年度の冬期の調査に引き続き夏期の調査を行い、季節の影響などについても考察を加えた。

さらに2012年5月のホルムアルデヒド水質事故を受け、水質基準と給水停止に対する住民の意識に関するアンケート調査を行った。

## B. 研究方法

本年度は以下の内容について研究を実施した。

### 1) クロロホルム摂取量に対する飲料水の影響と水質基準における割当率

水道水中のクロロホルム (TCM) 濃度として水質基準値の 0.06 mg/L、飲水量 2L/day の飲用を仮定し、経口、経皮、吸入の3曝露経路を考慮した TCM 摂取量分布の推計を行った。推計にはモンテカルロ・シミュレーション (試行回数: 10 万回、乱数サンプリング法: ラテンハイパーキューブ法) を用いた。手順の概略として食品からの経口摂取の例を図 1 に示す。

$$\sum_{\text{食品17群}} \left[ C_{\text{food}} \times \text{経口} \right] = \text{曝露量}$$

食品17群 (食品中濃度 [µg/g] (水道水中濃度の関数)) × 経口 (食品摂取量 [g/kg-bw/day]) = 曝露量 [µg/kg-bw/day]

図1 食品からの曝露量推計手順の概略

### 2) ハロ酢酸の飲用寄与率の提示

ハロ酢酸の曝露経路としては、飲用、吸入、経皮の3者を想定した。曝露媒体である水道水、空気、食品中のハロ酢酸濃度を測定し、各経路による曝露量の評価を行った。ついで被験者ごとに飲用寄与率を試算し、その変動を確率分布で表した後、適切と考えられる値を飲用寄与率推奨値として提示した。なお、食品曝露量について新たに調査を行っている。また、水道水摂取量は 2L/日として固定し、現行基準値の設定方法における飲用寄与率の値の正確性を高めることを目的とした。

### 3) 夏期実施のアンケート調査に基づく日本人の摂水量

2012年1~2月に行った冬期調査と同様の形で、インターネット調査 (株式会社日経リサーチによる実施) により平日2日、休日1日の摂水量アンケート調査を実施した。家族による回答などを含め、地域4区分、性別、年齢層6区分より各25~50人前後の回答を得るよう努め、合計1914名から回答を得た。その中から成人男女の回答である1,278人の結果を用いて、摂水量の解析を行った。なお、夏期調査を行うにあたり、可能な限り冬期調査に協力していただいた世帯への協力を依頼した。結果として、アンケート開始時点では8割程度の世帯が再協力する意向を示した。ただし、調査完了時点の、総人数として (世帯数ではなく) の協力率はこの値より低いと推定される。

### 4) 給水停止に対する住民のパーセプションに関するアンケート調査について

2012年8月から9月にかけて、摂水量調査に加えて、断水に対する意識と断水時に困る用途に関するアンケート調査を行った。全国754世帯の代表者より回答を得た。

## C. 研究結果及びD. 考察

### 1) クロロホルム摂取量に対する飲料水の影響と水質基準における割当率

水道水中のクロロホルム濃度として 0.06 mg/L を仮定し、飲水量 2 L/day の飲用、水道水質の影響を受けた調理用水、吸入、経皮経由の総曝露量の分布を求めた。調理用水、吸入、経皮経由の曝露量について、単純に和を取った場合では、中央値は 7.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、95%ile 値は 14.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  となり TDI である 12.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を超えた。しかし、この単純計算では体内吸収率の違いなどが考慮されていないため、体内吸収率に関する補正を行い、経口経由に換算した補正曝露量分布を算定した。

その結果、補正した曝露量分布においては、中央値 4.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、95%値は 6.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  となり TDI の 12.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  より小さい値となった。逆に 95%値 = TDI 12.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  になるように計算した場合、クロロホルム評価値が 122  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2L/day の飲水量を想定した割当率が 38 %と算定された。

ただし、今回の推定には様々な仮定に基づいている。トリハロメタン類の総曝露を含めて今後さらに検討を進める必要がある。

## 2) ハロ酢酸の飲用寄与率の提示

水道水、空気、食品経由のハロ酢酸曝露濃度より、それぞれのハロ酢酸曝露量を求め、被験者 22 人に対する飲用寄与率を求めた。この飲用寄与率の分布よりアンダーソン・ダーリング検定を用いて、最も適合する確率分布関数を採用した。なお、一部のハロ酢酸に対しては、吸入及び経皮曝露量は推定できず、また統計的検討の結果、適合する分布が存在しない物質もあった。これらについては、検討から除外した。

飲用寄与率の確率分布関数が適用できた物

質に対して、累積確率が 0.05 あるいは 0.1 に対応するレベルを求め数字を丸めた結果、飲用寄与率の推奨値として、ジクロロ酢酸 40%、トリクロロ酢酸 30%、ブromokloro酢酸 30%、ブromojikloro酢酸 60%と計算された。

ここで示した飲用寄与率の値には種々の不確実性を含んでおり、今後不確実性の大きな項目について重点的に追加調査を行うことが望ましい。そこで、ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸について、不確実性分析を行った。その結果、食品曝露量の変動と地域差、水道水摂取量 (2L/日からの変更など) が、今回の推奨値に大きな影響を与えることがわかった。

## 3) 夏期実施のアンケート調査に基づく日本人の摂水量

2012 年度に行った夏期の摂水量調査と 2011 年度に行った冬期の結果の概要について、平日 1 日目の結果を表 1 に示す。水道水由来の摂水量は、平均値で夏 1159 mL、冬 1124 mL (中央値で夏 1055, 冬 1020 mL) であり、95%では夏 2400, 冬 2200 mL であった。この値には、水道水の直接飲用および間接飲用としてスープや汁物の摂取量は含まれている。しかし、炊飯用水など調理に使用され、かつ摂取されるであろう部分の間接飲用については、このデータに含まれていない。今後この間接飲用についての推定を行い、表 1 のデータに加算する必要がある。

夏期の摂水量は冬期との比較において、平均値で 103%、95%値でも 109%と大きな違いは得られなかった。ただし、非加熱・加熱水の摂水量で分けて考えると大きな違いが生じている。非加熱水道水は夏には冬と比較して

表 1 夏期 (2012 年 8~9 月実施)と冬期(2012 年 1~2 月実施)の摂水量調査の結果  
(平日 1 日目の調査結果に基づく統計値)

名目	中央値			算術平均			95%値		
	夏 (mL)	冬 (mL)	夏/冬	夏 (mL)	冬 (mL)	夏/冬	夏 (mL)	冬 (mL)	夏/冬
(非加熱)水道水	390	100	390%	542	255	213%	1676	950	176%
(加熱)水道水	300	500	60%	424	606	70%	1500	1500	100%
<b>水道水/小計</b>	<b>870</b>	<b>800</b>	<b>109%</b>	<b>966</b>	<b>860</b>	<b>112%</b>	<b>2170</b>	<b>1800</b>	<b>121%</b>
スープ・汁物	200	200	100%	193	264	73%	500	600	83%
<b>水道水由来/小計</b>	<b>1055</b>	<b>1020</b>	<b>103%</b>	<b>1159</b>	<b>1124</b>	<b>103%</b>	<b>2400</b>	<b>2200</b>	<b>109%</b>
ボトル水	0	0	—	142	77	186%	800	500	160%
市販飲料	540	350	154%	635	437	145%	2500	1200	208%
<b>液体の全摂水量</b>	<b>1798</b>	<b>1530</b>	<b>118%</b>	<b>1936</b>	<b>1638</b>	<b>118%</b>	<b>3570</b>	<b>2900</b>	<b>123%</b>

平均で213%となり、逆に加熱水道水は70%、スープ・汁物も73%となった。すなわち、夏は非加熱水を摂取する量が多く冬は加熱水を摂取する量が多い。ただし、水道水由来の摂水量としてはあまり差がない、ということであった。

また、一般的に考えて、夏の方が汗を多くかくことなどから、夏期に水分摂取量が多くなると推定されたが、水道水由来の摂水量では大きな差が得られなかった。しかし、ボトル水や酒類を含む市販飲料に夏期と冬期の違いが生じており、その結果、液体の全摂水量は平均で夏期が冬期の118%となっていた。

#### 4) 給水停止に対する住民のパーセプションに関するアンケート調査について

断水時に困る用途として、トイレ(78%)、お風呂・シャワー・手洗い(66%)、飲み水(43%)、調理用水(39%)の順で困るという回答が得られた。

住民は水道水質基準を満たしていない水であっても、数日程度あれば、特に生活用水確保のために断水を望まない傾向が示された。しかし同時に、基準を満たさないこと自体に対する不安もあることが調査より示唆された。

水質事故時において、生活用水確保のために、給水停止を回避して飲用制限で対応することも場合によっては有効な方策であると考えられる。水質基準を超えたときの健康影響やリスクについて、事故時ではなく普段から積極的に伝えていくことにより、事故時などにおける住民の不安を低減できる可能性があると推測される。

#### E. 結論

水道水質基準設定のための水道水の寄与率に関する知見の収集と寄与率の推定方法に関する研究を行った。

消毒副生成物のうち、クロロホルムとハロ酢酸の一部に対して、食品と水道水からの経口曝露に加え、経皮と吸入曝露についても考慮に入れて水道水(あるいは飲料水)の寄与率を推定した結果、現行のTDIの20%という水道水への割当よりも推定した寄与率の方

が大きい結果となった。しかし、いずれも多くの不確実性を含んでいるため、これら不確実性を減少するための調査が求められる。

上記の不確実性の中でも大きいと考えられている水道水の摂水量について、調査を行った。これまでは世界的に2L/dayという飲料水量がリスク評価においても飲料水、水道水水質基準値設定においても使用されてきた。本調査における推定値は約1200人からなる成人男女の摂水量分布からなっている。日本のような、先進国かつ欧米と大きく生活スタイルが異なる国において、自国独自の基礎データを持つことには大きな価値があり、今後とも資料の蓄積と整理がなされることが期待される。

水質基準と給水停止に対する住民意識アンケート調査の結果、住民は水道水質基準を満たしていない水であっても、数日程度あれば、特に生活用水確保のために断水を望まない傾向が示された。しかし同時に、基準を満たさないこと自体に対する不安もあることが示唆された。水質基準と給水停止に関する考え方と住民への伝え方に関する整理が今後望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Quan, D., Okashita, R., Yanagibashi, Y., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S., Jinno, H., Exposure to Haloacetic Acids via Typical Components of the Japanese Diet and their Allocations of Drinking Water Ingestion to Total Exposure, *J. Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 2013 (in press).

##### 2. 学会発表

- 1) 大野浩一, 浅見真理, 松井佳彦, 水質汚染事故時の給水停止に対する住民のパーセプションについて, 第47回日本水環境学会年会講演集, 409, 大阪, 2013/3/11-13.
- 2) 大野浩一, 浅見真理, 松井佳彦, 給水停止対策に対する住民のパーセプション—ア

ンケート結果より，日本リスク研究学会第  
25 回年次大会講演論文集，155-158，彦根市，  
2012/11/9-11.

- 3) 木戸淳基，新妻瞬，松井佳彦，権大維，伊  
藤禎彦，大野浩一，松下拓，クロロホルム  
摂取量に対する飲料水の影響と水質基準  
における割当率，第 63 回全国水道研究発  
表会講演要旨集，538-539，松江，  
2012/5/16-18,2012

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含  
む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

分担研究年度終了報告書

水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究

リスク評価に関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 室長
研究分担者	平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 主任研究官
研究協力者	鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター・環境保健部・水質環境研究科 主任研究員
研究協力者	西村 哲治	帝京平成大学・薬学部・薬学科 教授
研究協力者	江馬 眞	独立行政法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門 招聘研究員
研究協力者	小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 主任研究官
研究協力者	高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 研究員
研究協力者	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 研究員

研究要旨

本年度は3つの研究を行った。1) 一昨年度から継続して行っている化学物質の複合暴露によるリスク評価手法に関する研究では、米国 EPA 及び EFSA で行われた農薬の複合リスク評価手法を調査し整理した。米国 EPA では、これまでに、Relative potency factor (RPF)法もしくはそれに準じた方法により、5つの農薬グループの評価が行われており、いずれの農薬グループについても、健康影響の懸念はないと結論された。一方、EFSA では、段階的アプローチを推奨しており、ケーススタディとしてトリアゾール系農薬の複合リスク評価が行われた。最初に Hazard Index 法による評価が行われ、段階的により詳細で複雑な評価が繰り返し行われたが、結果として、この段階的アプローチをルーチンベースで適用するには、特に cumulative assessment group の設定や暴露評価に関して問題点があると結論された。2) 環境を介した暴露によるヒトの健康への影響が懸念されるパーフルオロカルボン酸/スルホン酸類の毒性に関する最新情報を収集・整理した。その結果、2008年以降、特に perfluorooctanoic acid (PFOA)及び perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)の肝毒性、発生毒性や免疫毒性に関する多くの研究成果の報告があった。また、これまでに全く報告がなかった物質に関する試験結果の報告も認められた。しかし、PFOA 及び PFOS 以外の物質については毒性情報が未だ十分とは言えず、特に炭素数が12を超える長鎖のパーフルオロカルボン酸/スルホン酸類については、ほとんど情報は得られなかったことから、さらなる研究が望まれる。3) パーフルオロカルボン酸類の毒性強度が炭素鎖の長さに依存して変化する要因を明らかにすることを目的として、ラットの血清中のパーフルオロ化合物 (PFCs)濃度を測定するための分析法を開発した。平成24年度に開発した分析法を改良することにより、分析系内の PFCs 残存量を少なくすることができた。この方法を用いて、perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA)を投与したラットの保存血清中の PFCs を再分析したところ、平成24年度と同様に PFOcDA 以外の PFCs が検出され、さらに分岐鎖 PFCs も検出された。

## A. 研究目的

本研究は、飲料水中の化学物質の基準値設定及び改定に資するために、食品安全委員会や WHO が新たに健康影響を評価した化学物質や、新たに健康影響が懸念される化学物質の毒性情報を収集し整理すると共に、化学物質の安全性評価手法に関する最新知見の動向調査を行い、得られた知見の基準値設定等への適用の妥当性について検証することを目的としている。

本年度は、以下の3つの研究を行った。(1) 昨年度から継続して行っている化学物質の複合暴露によるリスク評価手法に関する研究では、米国環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency: US EPA) 及び欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) で実際に行われた複合リスク評価の方法を調査し、整理した。(2) 環境を介した暴露によるヒトの健康への影響が懸念されるパーフルオロ化合物類の体内動態及び毒性に関する最新情報を収集・整理した。(3) パーフルオロ化合物のうち、長鎖パーフルオロカルボン酸類に関して、その毒性強度が炭素鎖の長さに依存して変化する要因を明らかにすることを目的として、ラットの血清中有機フッ素化合物の濃度を測定するための分析法を開発すると共に、perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA) を経口投与したラット血清試料中の有機フッ素化合物濃度の測定を試みた。

## B. 研究方法

1. 複合暴露によるリスク評価手法に関する研究：米国環境保護庁 (Environmental Protection Agency: EPA) 及び欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) で実施された複合リスク評価を調査し、主と

して有害性評価手法について整理した。

2. パーフルオロ化合物の体内動態及び毒性に関する情報収集・整理：我々は、平成19～20年度厚生労働科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」において、パーフルオロカルボン酸/スルホン酸類の体内動態及び毒性に関する情報収集・整理を行った。本研究では、2008年以降の最新情報について Toxline や Medline を用いて検索を行い、実験動物を用いた試験/研究に焦点を当て情報収集及び整理を行った。

3. 長鎖パーフルオロカルボン酸の毒性発現の違いに関する研究：

平成24年度に実施した検討結果では、PFOcDA が対照群のラット血清から低投与(40mg/kg)群ラットと同程度の濃度で検出された。その原因として、タンデム型液体クロマトグラフ (LC/MS/MS) 装置に注入した PFOcDA の一部が、LC/MS/MS 装置の分析系内、特に LC 内部に残存するためと考えられた。そこで、今年度の目的は、従来の LC よりも装置流路系の内容積が少なく、かつ高理論段数が得られる超高速液体クロマトグラフ (Ultra High Performance Liquid Chromatograph, UHPLC) を使用することで、PFOcDA の LC/MS/MS 装置流路系内の残存量の低減化を図るとともに、PFOcDA を投与したラット血清中の PFCs の再分析を実施することとした。

### 3.1. 標準物質および試薬

有機フッ素化合物 (PFCs) : 表1に示す炭素数14以下のPFCsの2mg/Lメタノール溶液はウェリントンラボオラトリー社 (PFC-MXA) から購入した。ペルフルオロヘキサデカン酸 (PFHxDA) およびペルフルオロオクタデカン酸 (PFOcDA) は Exflour Research

Corporation が合成したものを使用した。PFHxDA および PFOcDA の各 10mg を採り、アセトンで 10mL とし、各溶液の 1mL をメスフラスコに採り、メタノールで 100 倍に希釈した。

サロゲート溶液: パーフルオロオクタン酸の 2 重水素体 (PFOA-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>、ウェリントンラボラトリー製、MPFOA) 10mg を採り、メタノールで 10mL とした。その溶液 1mL をメスフラスコに採り、メタノールで 1000 倍希釈し、1 μg/mL の溶液を調製した。

0.5M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム (TBAS) 溶液: TBAS の試薬特級 (和光純薬) 17.0g を採り、精製水で 80mL にし、水

酸化ナトリウムで pH10 とした後、全量を 100mL としたもの

0.25M 炭酸ナトリウム: 試薬特級 (和光純薬) 5.3g を採り、精製水で全量を 200mL にしたもの

メチルターシャリーブチルエーテル (MTBE): 水質試験用 (関東化学)

酢酸アンモニウム: 試薬特級 (和光純薬)

精製水: 水道水を純水製造装置 Elix UV5 (ミリオア製) で処理したもの

メタノール: 残留農薬試験用 (和光純薬)

アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフィー用窒素ガス

表 1. 測定対象の有機フッ素化合物 (PFCs)

No PFCs	PFCs	abbreviation	LOQ (ng/mL)	tR (min)	cone (V)	collision (V)	parent ion (m/z)	daughter ion (m/z)
1	perfluoro-n-pentanoic acid	パーフルオロペンタン酸	PFPeA	1.00	1.9	20	10	263 219
2	perfluoro-n-hexanoic acid	パーフルオロヘキサン酸	PFHxA	1.00	2.7	20	10	313 269
3	perfluoro-n-heptanoic acid	パーフルオロヘプタン酸	PFHpA	1.00	3.7	20	10	363 319
4	perfluoro-n-octanoic acid	パーフルオロオクタン酸	PFOA	1.00	4.6	20	10	413 369
5	perfluoro-n-[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-octanoic acid	パーフルオロオクタン酸	PFOA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	1.00	4.6	20	10	415 370
6	perfluoro-n-nonanoic acid	パーフルオロノナン酸	PFNA	1.00	5.5	20	10	463 419
7	perfluoro-n-decanoic acid	パーフルオロデカン酸	PFDA	1.00	6.3	20	10	513 469
8	perfluoro-n-undecanoic acid	パーフルオロウンデカン酸	PFUDA	1.00	7.0	20	10	563 519
9	perfluoro-n-docecanoic acid	パーフルオロドデカン酸	PFDoA	1.00	7.8	20	10	613 569
10	perfluoro-n-tridecanoic acid	パーフルオロトリデカン酸	PFTTrDA	1.00	8.6	20	10	663 619
11	perfluoro-n-tetradecanoic acid	パーフルオロテトラデカン酸	PFTTeDA	1.00	9.3	20	10	713 669
12	perfluoro-n-hexadecanoic acid	パーフルオロヘキサデカン酸	PFHxDA	1.00	10.5	20	10	813 769
13	perfluoro-n-octadecanoic acid	パーフルオロオクタデカン酸	PFOcDA	1.00	11.6	20	10	913 869

LOQ: 定量下限値、tR: 保持時間

### 3.2 器具および装置

共栓ガラス製スピッツ: ガラス製 (容量 10mL、イワキガラス製)

マイクロシリンジ: 10~100 μL 用

遠心分離機: H-3R (国産精工製)

ポリエチレン製サンプル瓶: テフロンを使用して  
いないポリプロピレン製 (キャップ部はポリエチレン製、容量 300 μL、ウォーターズ製)

### 3.3 LC/MS/MS の分析条件

本実験に用いた LC/MS/MS の LC 部は Acquity



SDS（ウォーターズ製）、MS/MS 部は Xevo-TQMS（ウォーターズ製）であった。LC 部の分析条件はつぎのとおりであった。カラム：BEH C18（粒径  $1.7\ \mu\text{m}$ 、 $2.1 \times 50\ \text{mm}$ ）、移動相：A 液 10mM 酢酸アンモニウム- $\text{CH}_3\text{CN}$ （10:90）、B 液 10mM 酢酸アンモニウム。グラジエント分析の条件：A 液 40% で 1 分間保持し、10 分後に A 液 100% になるようにグラジエントをかけ、15 分まで保持し、15.01 分から 20 分まで A 液 40% とした。カラム温度： $40^\circ\text{C}$ 、試料注入量： $5\ \mu\text{L}$ 。MS/MS 部の分析条件はつぎのとおりであった。キャピラリー電圧： $1.5\ \text{kV}$ 、イオン源温度： $120^\circ\text{C}$ 、脱溶媒温度： $350^\circ\text{C}$ 、コーンガス： $0.15\ \text{L/hr}$ 、脱溶媒ガス： $650\ \text{L/hr}$ 、検出器電圧： $650\ \text{V}$ 。その他の分析条件は表 1 に示すとおりであった。

### 3.4 試験溶液の調製

血清  $200\ \mu\text{L}$  を共栓ガラス製スピッツに採り、サロゲート溶液  $1\ \mu\text{g/mL}$  をマイクロシリンジで  $10\ \mu\text{L}$  添加した。ついで、メタノール  $400\ \mu\text{L}$  を加え、攪はん後 5 分間放置し、除タンパクを行った。TBAS (pH10)  $200\ \mu\text{L}$  および  $0.25\ \text{M}$  炭酸ナトリウム  $400\ \mu\text{L}$  を添加し、攪はん後 2 分間放置し、PFCs と TBAS のイオンペアを形成させた。さらに、MTBE 約  $2\ \text{mL}$  を添加し、ミキサーで 1 分間攪はん後、 $10^\circ\text{C}$ 、 $3500\ \text{rpm}$  で 10 分間遠心分離し、MTBE 層を共栓ガラス製スピッツに分取した。再度、MTBE 約  $2\ \text{mL}$  をスピッツに加え、ミキサーで 1 分間攪はん後、 $10^\circ\text{C}$ 、 $3500\ \text{rpm}$  で 10 分間遠心分離し、MTBE 層を分取し、先の MTBE 層と合わせた。MTBE 層を窒素気流下で乾固し、メタノール  $0.2\ \text{mL}$  を加え、十分に攪はんし、これを試験溶液とした。

#### 倫理面への配慮

本研究では、ラットの血清中濃度の測定法を検討しているが、実験動物に対する動物愛護等を配慮して実施した過去の別研究で採取した試料を用いているので、該当しない。

## C. 研究結果

### 1. 混合物への複合暴露によるリスク評価手法に関する研究

#### 1.1. 米国 EPA における複合リスク評価

これまでに 5 つの農薬グループについて複合リスクアセスメントが行われている。評価方法の概要を下記に示す。

- ① 同じ毒性メカニズムで同じ毒性影響を引き起こす化学物質のグループ (CMG) を決定する。
- ② CMG に含まれる各々の物質について登録・提案された使用方法を評価し、起こりうる暴露経路や曝露源を特定する
- ③ CMG から、複合影響にほとんど寄与しない物質や曝露経路や使用方法がマイナーなものに限定された物質を除き、複合リスクの定量的評価に含める物質 (CAG) を決定する。
- ④ 化学物質の毒性強度を比較するための基準となるインデックス物質を選択し、インデックス物質の Point of departure (POD) を決定すると共に、それぞれの物質について Relative Potency Factor (RPF, インデックス物質の毒性強度に対するそれぞれの物質の毒性強度の比) を算出する。RPF は、それぞれの物質の曝露量をインデックス物質相当量に変換するために使われる。
- ⑤ 不確実係数を決定する。EPA では、種差及び個体差に関する不確実係数に加え、乳幼児や小児を保護するための追加の不確実係数 [Food Quality Protection Act (FQPA) 安全係数、デフォルト: 10 倍] を適用している。すべての対象物質の不確実係数が同じ値の場合はその値を target MOE とするが、物質毎に異なる不確実係数が選択された場合は、それぞれの値で RPF を調整する。
- ⑥ 曝露シナリオを決定し、各シナリオについて複合曝露量 (インデックス物質相当量) を

算出する。

- ⑦ 複合暴露量とインデックス物質の POD から Margin of Exposure (MOE)を算出する。
- ⑧ 複合リスク評価の結果と結論を述べると共に、結果の信頼性や評価に関連する不確実性、リスクの要因等を特定する。

各農薬グループの有害性評価手法を以下にまとめた。

#### 有機リン系農薬

中枢神経系及び末梢神経系のアセチルコリンエステラーゼに結合し、リン酸化する有機リン系農薬 50 種 (CMG)から、ヒトが食事、飲料水もしくはその他の暴露経路を介して曝露される可能性のある 30 物質が CAG として選択された。各物質の毒性強度を比較するためのデータとしては、実験動物を用いて血漿、赤血球及び脳のコリンエステラーゼ活性への影響を調べたデータや神経行動及び機能への影響を調べたガイドライン試験のデータがあるが、末梢神経系のアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を調べたデータは少なかった。行動の変化は通常はコリンエステラーゼが阻害される用量よりも高い用量で引き起こされ、様々な行動学的な影響が様々な測定値を用いて評価されているという意味でも適切なエンドポイントではないと判断された。脳のコリンエステラーゼデータに基づいて算出した相対毒性強度の信頼区間は、赤血球中のコリンエステラーゼ活性に基づいた相対毒性強度と比較して狭かった。血中のコリンエステラーゼ活性は、脳のコリンエステラーゼ活性データがない場合に、末梢神経や中枢神経系への影響の適切な代替指標となると考えられているが、有機リン系農薬の共通の毒性メカニズムの直接的な測定値である脳のコリンエステラーゼ活性の方がより適切なエンドポイントであると判断された。

ほとんどの有機リン系農薬に関しては、ラ

ットの感受性に性差は見られなかったものの、3 種の有機リン系農薬については雌ラットの方が感受性が高かったことから、雌ラットの脳のコリンエステラーゼ阻害作用を基に RPF が設定された。なお、有機リン系農薬のコリンエステラーゼ阻害作用は、投与開始後、急速に変化するが、およそ 21~28 日間の暴露後には定常状態となることが知られているため、暴露期間が 21 日以上データが用いられた。

経口投与試験データについては、ベンチマークドース (BMD)アプローチにより、脳のコリンエステラーゼ阻害率 10%に相当する BMD<sub>10</sub> が算出された。脳のコリンエステラーゼ減少の統計学的な検出限界はおよそ 10%であり、有機リン系農薬に関する多くの試験で 10%の阻害作用が確実に検出されている。さらに、脳のコリンエステラーゼ阻害率が 10%未満の場合は有機リン系農薬暴露による臨床症状や行動影響は認められないことから、反応率として 10%が選択された。経皮・吸入曝露に関しては、データが限られていたため、同等の毒性学的反応を示す設定用量である CEL (comparative effect level)が求められた。CEL は最大で 15%の阻害作用を示す用量と定義された。すべての投与経路について質の高い用量反応データが存在している methamidophos をインデックス物質として、BMD<sub>10</sub> および CEL を基に、経口、経皮及び吸入曝露それぞれについて、各物質の RPF が算出された。

多くの有機リン系農薬は環境中でオクソン体に代謝されることが知られており、オクソン体の活性は未変化体よりも高い。食品中からは、dimethoate のオクソン体である omethoate が一貫して検出されたため、omethoate についても RPF が算出された。omethoate 以外のオクソン体の食品中残留量は極めて低かった。これまでの研究で、標準

的な飲料水処理により 10 種の有機リン系農薬から安定したオクソン体が形成されることが確認されている。さらに、食品及び飲料水以外の曝露に関しては、限られたデータではあるものの、3 種の有機リン系農薬の使用によりオクソン体が生成されることが示されている。しかし、飲料水及びその他の暴露経路については、感度分析 (sensitivity analysis) を行った結果、オクソン体の形成はリスクアセスメントの結果に影響を及ぼさないだろうと結論された。

幼若ラットと成熟ラットに反復投与し、脳のコリンエステラーゼ阻害作用を調べた試験の結果を基に、化学物質特定の FQPA 安全係数 (10 物質について 1~6.5) が算出された。データが不十分な物質については、デフォルト値である 10 を FQPA 安全係数として、それぞれの物質の RPF に FQPA 安全係数を乗じることで RPF の調整が行われた。種差及び個体差に関する不確実係数は、デフォルト値の 10 を用いることが適切と判断された。Methamidophos の BMD<sub>10</sub> (経口: 0.08 mg/kg/day, 経皮: 2.12 mg/kg/day, 吸入: 0.39 mg/kg/day) を POD とし、target MOE を 100 としてリスク判定が行われた。

#### N-メチルカルバメート類

アセチルコリンエステラーゼの活性部位にあるセリン残基の水酸基をカルバミル化することによりアセチルコリンエステラーゼを阻害する、N-メチルカルバメート類 10 種が CAG として選択された。その他にもカルバメート系農薬はあるが、共通した特定の経路を通してコリンエステラーゼを阻害する、N-メチルカルバメート類のみが対象とされた。

N-メチルカルバメート類の毒性強度は、有機リン系農薬と同様に、脳のアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を基に決定された。すべての暴露経路について質の高い用量反応データ

及び時間-回復データがある oxamyl をインデックス物質とし、ラットを用いた強制経口投与、経皮投与及び吸入曝露試験における最大阻害時のアセチルコリンエステラーゼ活性について求めた BMD<sub>10</sub> を基に、それぞれの物質の RPF が算出された。一部の経皮曝露データについては、ラットのデータがなかったためウサギのデータが使用された。

3 種の N-メチルカルバメート類については、リスクアセスメントで使用する倫理的及び科学的に容認できる、ヒトを対象とした経口投与試験が行われている。この 3 物質については、ヒトとラットにおける赤血球中のコリンエステラーゼ活性に関する BMD<sub>10</sub> を比較し、種差に関する不確実係数 (2~5) が算出された。ヒトとラットにおける半減期は同等であった。その他の N-メチルカルバメート類については、種差不確実係数としてデフォルト値である 10 を用いることが適切と判断された。有機リン系農薬と同様に、幼若ラット及び成熟ラットの脳のコリンエステラーゼ阻害作用を比較した試験から求めた BMD<sub>10</sub> の比を化学物質特異的な FQPA 安全係数 (1.8~3.5) とし、このような比較試験が行われていない 4 種の N-メチルカルバメート類については、デフォルト値である 10 が FQPA 安全係数として選択された。個体差不確実係数については、いずれの物質についてもデフォルト値 10 を用いることが適切と判断された。それぞれの物質の RPF に種差不確実係数及び FQPA 安全係数を乗じた調整 RPF を用いて複合曝露量 (インデックス物質相当量) を算出し、oxamyl の BMD<sub>10</sub> 95% 信頼区間下限値 (BMDL<sub>10</sub>, 経口: 0.18 mg/kg/day, 経皮: 17.05 mg/kg/day, 吸入: 0.66 mg/kg/day) を POD、target MOE を 10 としてリスク判定が行われた。

#### トリアジン類

構造特性、毒性影響、代謝、体内動態やメカ

ニズムについて weight of evidence 分析を行った結果から、神経内分泌及び内分泌系に関連した生殖・発生影響及び発がん影響に基づき、3種のトリアジン類 (simazine, propazine 及び atrazine)及びそれらの代謝物3種がCMGに選択された。その他のトリアジン類は毒性プロファイルが異なるため除外された。

CMGに選択されたトリアジン類は、視床下部-下垂体-性腺軸に影響を与えることにより、黄体形成ホルモン (LH)サージの減弱、性周期の攪乱、性成熟の遅れや乳腺腫瘍などを引き起こすことが示されており、これらの神経内分泌影響が健康影響を評価するための最も重要なエンドポイントと判断された。Simazine、propazine 及びこれらの塩素化代謝物の内分泌系への影響は atrazine と同等か、もしくは atrazine より弱かったことから、これらの triazine 類の毒性は本質的に atrazine と同等と考えられた。なお、CMG を選択するためのパラメータとして、ラットで観察された乳腺腫瘍が用いられたが、ラットで観察されたようなエストロゲンやプロラクチン濃度の持続的な上昇はヒトでは起こらないだろうと判断され、発がんリスクアセスメントは実施されなかった。CMG に選択されたトリアジン類のうち、propazine については、暴露の可能性がないことから評価の対象から外された。

設定された曝露経路シナリオのうち、飲料水を介した90日間曝露については、ラットを用いた6か月経口投与試験における性周期の変化とLHサージの抑制を基に設定された無毒性量1.8 mg/kg/day、経皮、経口もしくは吸入短期曝露に関しては、ラットの生後23日から53日に経口投与した試験で観察された亀頭包皮分離の遅れを基に設定された無毒性量6.25 mg/kg/dayがPODとして選択され、複合曝露量との比較が行われた。種差及び個体

差に関する不確実係数はいずれもデフォルト値である10が選択された。FQPA安全係数については、すべての発達期の曝露についてその影響が調査されている訳ではないが、思春期の動物と成熟動物を用いた試験データを比較した結果から、有害性に関するFQPA安全係数は3で十分であると考えられた。曝露量としてモニタリングデータを用いる際にはさらにデータ不足に関する不確実性を考慮して追加のFQPA安全係数3が適用され、target MOEを300~1000としてリスク判定が行われた。

#### クロロアセトアニリド類

CMGにはacetochlor、alachlor及びbutachlorが選択された。これらの物質は、鼻上皮に細胞毒性及び再生性細胞増殖を引き起こす活性代謝物を形成し、その結果として鼻甲介腫瘍を引き起こす。さらに、これらの物質は、共通のメカニズム (UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導)によって甲状腺濾胞細胞腫瘍を引き起こすことが知られているが、この変化は最大耐容量より高い用量で引き起こされる変化である。また、ヒトは、ラットと比較して、UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導に伴う甲状腺濾胞細胞腫瘍の形成に対して強い抵抗性を示すことが知られていることから、最も感受性が高く、ヒトでも起こりうる、鼻嗅上皮腫瘍の形成をエンドポイントとして複合リスク評価が行われた。

3種のクロロアセトアニリド類のうち、butachlorは米国では登録されていないことから、曝露の可能性はないと判断され、残りの二物質について複合曝露評価が行われた。ラットにおける鼻嗅上皮の腫瘍形成は、非線形の非遺伝毒性メカニズムによって引き起こされる。Alachlorをインデックス物質として、二物質のNOAEL (acetochlor: 10 mg/kg/day、alachlor: 0.5 mg/kg/day)の比からacetochlorの

RPF は 0.05 となった。

FQPA 安全係数を設定するために、ラットの多世代生殖毒性試験における鼻組織への影響と発がん性試験の結果との比較検討が行われた。その結果、両試験における鼻上皮の過形成及び腫瘍の閾値は同等であり、成熟動物と比較して、発達過程の胎児及び若齢動物の感受性が高いとは考えられないことから、FQPA 安全係数は 1 に設定された。種差及び個体差に関する不確実係数にはそれぞれデフォルト値である 10 が用いられ、alachlor の NOAEL (0.5 mg/kg/day) を POD として算出した MOE が 100 を超えるとき、懸念レベルを超えていると判断された。

#### ピレトリン/ピレスロイド類

ピレトリン/ピレスロイド類は、電位依存性ナトリウム・チャンネル (VGSC) と相互作用することで、神経系の膜興奮性を攪乱し、神経毒性を引き起こす。一般に、I 型と呼ばれる  $\alpha$  シアノ基を欠くピレスロイド類によって引き起こされる神経毒性は、攻撃性、興奮性亢進、微小振戦、全身性の粗大振戦を伴う虚脱、体温上昇、昏睡及び死亡であり、これらの神経行動反応は T (tremor) 症候群と呼ばれる。一方で、 $\alpha$  シアノ基を含む II 型ピレスロイド類によって引き起こされる神経行動は、pawing 及び burrowing、流涎、興奮性亢進、後肢の運動異常、全身性の粗大振戦、舞踏病アテトーシス (choreathetosis, 身のよじり)、昏睡、死亡などで、CS (choreathetosis and salivation) 症候群と呼ばれる。Fenprothrin や esfenvalerate のような数種のピレスロイド類は、T 症候群と CS 症候群が混ざった行動を引き起こすので、混合型 (I/II 型) と考えられている。

米国 EPA では、I 型及び II 型ピレスロイド類すべてを一つの CMG に分類し、スクリーニングレベルでの複合暴露評価が実施された。今後、より正確な複合リスク評価が適

切と判断された際には、I 型及び II 型ピレスロイド類を別グループに分けた評価が行われる可能性がある。

合成ピレスロイド 20 種と天然のピレトリン 1 種から、共通メカニズムに関連したエンドポイントに関する有害性の低い物質もしくは曝露の可能性の低い物質を除き、16 種のピレスロイド類 (ピレトリンを含む) を対象とした複合リスクの定量的評価が行われた。対象とする毒性エンドポイントとしては、現時点では、VGSC への影響を *in vivo* で評価するための方法はなく、また、複合リスク評価で用いるための *in vivo* バイオマーカーもないが、多くの研究により、特にラットで測定された行動反応をピレスロイド毒性の感受性の高い指標として用いることができることが示されている。ピレスロイド類の毒性は急性的で、反復投与による毒性の増強は見られない。一方で、投与時に用いた溶媒と投与容量の違いにより異なる試験結果が得られることが知られており、さらに、行動測定時に用いられるスコアリング方法には研究所間でかなりばらつきがある。これらのことから、同一の研究所で、同一の溶媒を用いて同容量で投与を行ったラットを用いた急性単回投与試験における、ピーク時の行動変化に関する BMD<sub>20</sub> を基に RPF が算出された。最もデータが豊富な permethrin と deltamethrin のうち、より信頼性の高い POD (BMDL<sub>20</sub>: 11 mg/kg) を算出することができた deltamethrin がインデックス物質に選択された。データのばらつきやサンプルサイズを考慮して、有意な変化を検出することが可能な最も保守的な値である 20% が反応率として選択された。なお、ピレトリンについては、データに用量反応性が見られなかったため、モデルに適合することができなかったが、他のピレスロイド類の BMD<sub>20</sub> で認められた影響と同等の影響が 800 mg/kg で認

められたことからこの値を用いて RPF が算出された。Imiprothrin、prallethrin、cyphenothrin 及び d-allethrin についてはいずれも毒性が比較的弱いので、BMD 分析を行わず、試験結果から BMD<sub>20</sub> に相当する適切な値が選択された。

FQPA 安全係数については、6 才未満の小児についてのみ、3 を適応することが適切であると判断された。これは、生理学的薬物動態 (PBPK) モデルにより幼若ラットの脳中濃度が成熟ラットと比較して3倍高いことが予測されたことや *in vitro* の薬力学的データや *in vivo* データが低用量では幼若ラットと成熟ラットの感受性に差がないことを示していることなどをもとに決定された。種差及び個体差に関する不確実係数については適切なデータがないことからデフォルト値である 10 を適用することが適切と判断された。6 歳未満の小児については MOE が 300 を超えるとき、それ以外については MOE が 100 を超えるとき懸念レベルを超えていると判断された。

## 1.2. EFSA における複合リスク評価

EFSA の PPR (Plant Protection Products and their Residues) パネルは、これまでに、食事由来の複合リスク評価に関する既存の方法を評価し、毒性評価及び曝露評価それぞれについて段階的なアプローチを適用すべきであると結論している。この段階的なアプローチを検証するために、トリアゾール系農薬を対象とした複合曝露評価が下記の通り行われた。

急性影響に関しては、共通の毒性メカニズムによって起きると考えられる頭蓋-顔面奇形を引き起こす7種のトリアゾール類を CAG として選択し、慢性評価に関しては、肝毒性をエンドポイントとして、11 種のトリアゾール類 (CAG) について、下記の通り段階的な評価が行われた。

- ① 各物質の急性参照用量もしくは ADI

を用いた Hazard Index (HI) の算出

- ② 共通した影響に関する急性参照用量 /ADI を用いた adjusted HI の算出
- ③ 各物質の NOAEL を基に算出した RPF を用いた複合曝露量の算出及びインデックス物質の急性参照用量/ADI との比較
- ④ 各物質の BMD<sub>5</sub> を基に算出した RPF を用いた複合曝露量の算出及びインデックス物質の急性参照用量/ADI との比較 (急性影響のみ)

曝露評価についても、確定的なものから確率論的なものへ段階的なアプローチが実施されている。

RPF を算出する際には、急性影響については、共通のエンドポイントに関して最もデータがそろっている fluzilazole をインデックス物質とし、一般的に発達影響に関して観察される反応の限界あるいは限界に近い値である 5% を BMR として BMD を算出した。慢性影響については、cyproconazole がインデックス物質として選択されたが、肝毒性に関して報告されている NOAEL が異なるエンドポイントに基づくものであること、さらには、複数の動物種の NOAEL も用いていることから、BMD アプローチは実施されていない。慢性影響についても BMD アプローチを実施するためには、個々の試験レポートを再評価する必要がある。

トリアゾール類に関するケーススタディの結果から、PPR パネルは、段階的なアプローチは食事経由の複合リスク評価を行うために適切な方法であるが、まだルーチンベースで適用することはできないと結論した。解決すべき問題点として、信頼性の高い CAG を設定する際の基準 (欧州レベルで)、複合曝露評価に関する確定的及び確率論的なアプローチが適切な保護水準にあることの確定、曝露評価

の適切な方法に関するさらなるガイダンスの完成が指摘された。

## 2. パーフルオロ化合物の体内動態及び毒性に関する情報収集・整理

### 2.2. 結果

#### 2.2.1. パーフルオロカルボン酸類

##### 1) Perfluorobutanoic acid (PFBA)

PFBA は、ラットにおいて、消化管から速やかに吸収され、主として尿中に排泄される。血中消失速度には明確な性差及び種差があり、血中半減期は次のように算出されている；雄ラット：6.4~9.2時間、雌ラット：1.0~1.8時間、雄マウス：5.2~16時間、雌マウス：2.8~3.1時間、雄カニクイザル：40時間、雌カニクイザル：41時間。

反復投与毒性に関しては、これまでに、28日間及び90日間試験の報告書がweb上で公表されていたが、最近、これらの試験結果が以下の通り専門誌で発表された。SDラットに1.2 mg/kg/day (90日間試験のみ)、6 mg/kg/day、30 mg/kg/day もしくは150 mg/kg/day (28日間試験のみ)のPFBA (NH<sub>4</sub>塩)を強制経口投与した結果、30 mg/kg以上の投与群の雄のみで、血中総コレステロールの低下が見られ、肝細胞肥大及び甲状腺濾胞肥大/過形成の発現頻度や重篤度が増加した。

これらの試験では、血清中の総サイロキシン (T4)濃度及び遊離 T4 濃度の低下が見られたが、血清中の甲状腺刺激ホルモン (TSH)濃度に変化は見られなかった。肝臓では、T4の抱合に関与するUDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UGT)1A1のmRNAレベルが増加した。PFBAは、*in vitro*で血清中のT4結合を競合的に阻害し、さらに、ラットにおいて<sup>125</sup>Iの糞中排泄量を増加させたことが報告されていることから、PFBAによる甲状腺への影響には、遊離T4レベルの増加に伴うT4の組織取り込み、抱合及び排泄の増加が関与し

ていると考えられた。

PFBAは、マウス及びヒトのペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR) $\alpha$ に対して比較的弱いアゴニスト活性を示し、ペルオキシソーム増殖やペルオキシソーム脂肪酸酸化を引き起こすことが報告されている。上述の反復投与毒性試験では、肝臓のアシルCoAオキシダーゼ (ACOX)及びアラキドン酸モノオキシゲナーゼのmRNAレベルが増加しており、観察された肝細胞肥大はPPAR $\alpha$ の活性化によって引き起こされた可能性が考えられる。野生型マウス、PPAR $\alpha$ 欠損マウス及びPPAR $\alpha$ ヒト化マウスにPFBAを投与し、肝臓への影響を比較した結果、野生型マウス及びPPAR $\alpha$ ヒト化マウスでは、肝細胞肥大やPPAR $\alpha$ 標的遺伝子のアップレギュレーションが認められたが、PPAR $\alpha$ 欠損マウスではこれらの変化は認められなかった。また、野生型マウスのみで、炎症性細胞浸潤を伴う肝細胞の巣状壊死が観察された。

生殖発生毒性に関しては、マウスの妊娠期に経口投与した試験が行われており、その結果、すべての投与群 (35 mg/kg/day以上)で眼瞼開裂の軽度な遅れがみられ、より高い用量を投与した群では全胚吸収率の増加、膈開口及び亀頭包皮分裂の遅れが認められた。2009年以降、PFBAの生殖発生毒性に関する新たな知見は得られなかった。

##### 2) Perfluorohexanoic acid (PFHxA)

反復投与毒性及び生殖発生毒性試験の結果が2008年に学会で発表された。最近、これらの情報が専門誌に発表され、さらに、体内動態、急性毒性及び反復投与毒性については新たなデータの報告があった。

#### 体内動態

ラット及びマウスに2または100 mg/kgの<sup>14</sup>C標識PFHxA (Na塩)を単回経口投与した結果、ラットでは速やかな吸収が認められ、雄の血

漿半減期 (1.5~1.7 時間)は雌 (0.5~0.7 時間)よりやや長かった。マウスにおいても吸収は速やかであったが、二相性の排出プロファイルを示したため半減期は算出できなかった。ラット及びマウス共に、主要な排泄経路は尿であったが、ラットでは投与量のほぼ 100%が 12 時間以内に排泄されたのに対し、マウスでは同量の放射能を排泄するのに雌では 24 時間、雄では 48 時間を要した。CD-1 マウスおよび SD ラットに 50 mg/kg/day の  $^{14}\text{C}$  標識 PFHxA (NH<sub>4</sub> 塩)を単回または 14 日間強制経口投与した試験においても、急速な排泄が認められている。主要な排泄経路は尿中であったが、糞中への排泄 (7~16%)も認められた。排泄量や経路に明確な性差や種差はみられなかった。

カニクイザルに 10 mg/kg の PFHxA を単回静脈内投与した試験では、終末相の血清半減期は雄では 2.8~7.8 時間、雌では 1.4~4.4 時間と算出された。同じ方法で PFHxA を投与した SD(CD)ラットの血清半減期は、雄では 1.0 時間、雌では 0.42 時間となり、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC)やクリアランス、分布容積には明確な性差が認められた。雌雄ともに投与後 24 時間以内に投与量のおよそ 80%が尿中に排泄された。SD(CD)ラットに 50~300 mg/kg/day の PFHxA を 26 日間強制経口投与した結果、投与の反復に伴い血中濃度が減少する傾向がみられた。終末相の血清半減期 (雄: 2.2~2.8 時間、雌: 2.3~2.7 時間)に性差は見られなかったが、AUC は雄の方が 1.8~3.8 倍高かった。投与後 24 時間以内に、雄では約 90%、雌では 70~100%が尿中に排泄された。

#### 急性毒性

雌の CD(SD)ラットに PFHxA (Na 塩)を単回強制経口投与した結果、1750 mg/kg 投与群の 1/4 例及び 5000 mg/kg 投与群の全 3 例が死亡したが、550 mg/kg 以下の投与群では死亡はみら

れなかった。全身毒性として、異常歩行、脱水、姿勢の異常、流涎、運動失調や嗜眠などが観察された。

#### 反復投与毒性

CD(SD)ラットに 20、100 または 500 mg/kg/day の PFHxA (Na 塩)を 90 日間強制経口投与した結果、最高用量群の雄の体重増加量が低下した (学会報告の論文化)。血液学検査では、最高用量群の雄雌において、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の低下、網状赤血球数及び血小板数の増加が認められた。病理組織学検査では、100 mg/kg 以上の投与群の雄雌の鼻に嗅上皮変性/萎縮、鼻甲介の癒着、呼吸上皮化生 (respiratory metaplasia)、100 mg/kg 以上の投与群の雄と最高用量群の雌に肝細胞肥大及び甲状腺の濾胞上皮肥大が観察された。

CD(SD)ラットに 10、50、または 200 mg/kg/day の PFHxA を強制経口投与した 90 日間反復投与試験でも、体重増加抑制 (すべての投与群の雄及び 50 mg/kg 以上の投与群の雌)や貧血 (200 mg/kg 投与群の雌雄)が認められた。肝臓では、細胞質内に顆粒状物質を伴う軽度な小葉中心性肝細胞肥大が観察されたが (200 mg/kg 投与群の雄)、鼻や甲状腺の病変はみられなかった。

これらの 90 日間試験では肝臓のペルオキシゾーム  $\beta$  酸化活性の増加がみられた。PFHxA は、マウス及びヒト PPAR $\alpha$  に対して PFBA と同程度のアゴニスト活性を示すことが報告されており、少なくとも肝臓への影響に関しては PPAR $\alpha$  が関与している可能性が考えられる。

#### 生殖発生毒性

CD(SD)ラットに 20、100 または 500 mg/kg/day の PFHxA (Na 塩)を、交配前約 70 日から妊娠・授乳期間を通して、およそ 4 か月間強制経口投与した (学会報告の論文化)。500 mg/kg



投与群では、被毛/皮膚の汚れ等の一般状態の変化、100 及び 500 mg/kg 投与群の雄では体重増加抑制が認められたが、性周期、精子パラメータ、交配率、妊娠率や出産児数等の生殖パラメータへの影響は認められなかった。500 mg/kg 投与群では、出生時及び哺育期間中の児の体重が低値を示したが、生後 0~39 日の体重増加量には影響は見られず、児の生存率や発達指標への影響は認められなかった。

妊娠 6~20 日の CD(SD)ラットに 20、100 または 500 mg/kg/day の PFHxA (Na 塩)を強制経口投与したところ、500 mg/kg 投与群で、母動物の体重増加抑制が認められた (学会報告の論文化)。観察された発達影響は、胎児重量の軽度な減少 (500 mg/kg 投与群)のみであった。

### 3) Perfluorooctanoic acid (PFOA)

ラットでは、消化管から容易に吸収され、代謝されずに、主として尿中に排泄される。PFOA の体外排出速度には、明確な性差及び種差が認められる (血中半減期: 雄ラット: 115~277 時間、雌ラット: 1.9~16.2 時間、ウサギ: 約 4 時間、イヌ: 202~473 時間、カンクイザル: 482~782 時間)。ラットを用いた反復投与毒性試験では、0.6 mg/kg/day という低い用量で肝臓に影響を及ぼすことが報告されており、ラットを用いた発がん性試験では、肝臓、膵臓及び精巣に腫瘍性病変が観察された。PFOA は、ペルオキシソーム増殖作用を示すが、PPAR $\alpha$  欠損型マウスやサルを用いた試験の結果から、PPAR $\alpha$  を介さないメカニズムの関与が示唆されている。生殖発生毒性に関しては、マウスの妊娠期に投与した試験において、分娩遅延、児の生存率の低下、体重増加抑制、骨格変異や骨化遅延の増加等 (3 mg/kg/day 以上の投与群)が報告されている。2008 年以降、体内動態、反復投与毒性、生殖発生毒性、免疫毒性や神経毒性に関する下記

の情報が新たに報告された。

### 体内動態

新規データの報告はなかったものの、ラットやマウスの体内動態データを基にした体内動態モデルの検討が行われた。サルの体内動態データを用いた PBPK モデルの開発も行われた。このモデルを人に外挿し、飲料水がパーフルオロ化合物によって汚染された地域の住民及び米国の一般住民から収集したデータをシミュレーションした結果、ヒトの血清中 PFOA 濃度を概ね適切に予測することができた。

### 反復投与毒性

雄の SD ラットに 5 もしくは 20 mg/kg/day の PFOA を 28 日間強制経口投与した結果、すべての投与群で活動低下や嗜眠が観察され、20 mg/kg 投与群では体重増加抑制が認められた。病理組織学的検査の結果、肝臓では主として肝細胞肥大や細胞質空胞化、肺ではうっ血及び上皮壁の肥厚など比較的篤重な変化が観察され、その他にも脾臓や脳の変化が認められた。

1981 年から 1983 年に 3M 社により実施されたラットを用いた慢性毒性/発がん性試験の結果が、病理ピアレビューを経て、専門誌で公表された。この試験では SD ラットに 30 もしくは 300 ppm の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩, 雄: 1.3 及び 14.2 mg/kg/day; 雌: 1.6 及び 16.1 mg/kg/day) を 2 年間混餌投与した結果、300 ppm 投与群で体重増加抑制が認められた。血液生化学検査では、300 ppm 投与群の雄で、アルブミン、ALT、AST 及び ALP の増加が見られた。300 ppm 投与群では、肝臓の嚢胞様変性、肝細胞肥大及び門脈域単核細胞浸潤の発現頻度が増加した。腫瘍性病変としては、0、30 及び 300 ppm 投与群の 0/50、2/50、7/50 例の精巣にライディッヒ細胞腺腫が観察されたが、肝臓や膵臓腫瘍の増加は認められなかった。

その他に、肝臓への影響に関する研究成果が下記の通り報告された。

雄の ICR マウスに 2~250 ppm の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩)を含む飲料水を 21 日間継続して与えた結果、相対肝重量が用量依存的に増加し、10 ppm 以上の投与群で血清中 ALT 及び AST が増加した。病理組織学検査では、50 ppm 以上の投与群で顕著な巨大肝細胞及び細胞質の好酸性化が観察され、250 ppm 投与群ではさらに多発性凝固及び液化壊死によるびまん性肝障害が観察された。50 ppm 以上の投与群の肝臓では、腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ 及びインターロイキン (IL) - $1\beta$ の発現量が低下し、形質転換増殖因子 (TGF)- $\beta$ の発現量が増加した。

雄の C57BL/6 マウスに 0.002%の PFOA を 10 日間混餌投与した結果、血清コレステロール及びトリグリセリド (TG)が低下し、ALP 活性が増加した。肝臓では、顕著な肝細胞肥大が見られ、細胞質内好酸性顆粒の増加や有糸分裂像も観察された。肝臓の免疫状態を調べたところ、肝臓内免疫細胞 (IHIC)の総数及び表現型の異なる亜集団の数、特に推定赤血球前駆細胞が増加し、さらに、肝臓の TNF- $\alpha$ 、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ 及び IL-4 レベルの低下やエリスロポエチンレベルの増加もみられた。

雄の SD(CD)ラットに PFOA (NH<sub>4</sub> 塩, 17-24 mg/kg/day)もしくは PPAR $\alpha$ アゴニストとして知られる Wy 14,643 (3.1-4.1 mg/kg/day) を 28 日間混餌投与した結果、両投与群で、肝臓肥大、肝細胞過形成、グリコーゲン損失、肝臓のペルオキシソーム  $\beta$  酸化及びミクロソーム CYP4A1 タンパクの増加、血中 TG、コレステロール及び糖の低下が認められた。PFOA 投与群のみで、体重増加抑制がみられ、肝臓の CYP2B1/2 及び CYP3A1 レベルの増加が認められたことから、PFOA の肝毒性には PPAR $\alpha$  のみではなく、構成的アンドロスタン

受容体 (CAR)やプレグナン X 受容体 (PXR) の活性化が関与している可能性が示唆された。

PPAR $\alpha$ 欠損マウス及びヒト化 PPAR $\alpha$ マウスに 0.1 もしくは 0.3 mg/kg の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩) を 2 週間強制経口投与した試験では、野生型マウスで見られたような肝重量の増加や PPAR $\alpha$ 標的遺伝子への影響は認められなかった。しかし、より高用量の PFOA を 4~6 週間強制経口投与した試験では、PPAR $\alpha$ 欠損マウス及びヒト化 PPAR $\alpha$ マウスいずれにおいても肝重量の増加が見られ、PPAR $\alpha$ 欠損マウスでは血清総コレステロールの低下も認められた。肝臓の病理組織学的検査では、それぞれの遺伝型マウスで異なる変化が観察された。野生型マウス及びヒト化 PPAR $\alpha$ マウスでは細胞質の好酸性化を伴う肝細胞肥大が観察された。PPAR $\alpha$ 欠損マウスのみで小葉内の炎症及び大滴性脂肪変性が観察され、ヒト化 PPAR $\alpha$ 及び PPAR $\alpha$ 欠損マウスでは小滴性脂肪変性及び水腫性変性が観察された。PPAR $\alpha$ 欠損マウスの肝臓で観察された最も特徴的な変化は胆管障害であり、野生型マウスよりも顕著な変化が観察されたとの報告もある。野生型及び PPAR $\alpha$ 欠損マウスの血中及び肝臓中 PFOA 濃度に違いは見られなかったが、野生型マウスの胆汁中 PFOA 濃度は、PPAR $\alpha$ 欠損マウスと比較して、顕著に高かった。

PFOA を投与した野生型マウス及び PPAR $\alpha$ 欠損マウスの肝臓の転写プロファイルを比較したところ、それぞれの遺伝型マウスで異なる変化が認められた。野生型マウスのみで変化が見られた遺伝子の多くは、脂質ホメオスタシス、炎症、細胞増殖及びプロテオームの維持に関わるものなど、ペルオキシソーム増殖剤により影響を受ける典型的な遺伝子グループであった。PPAR $\alpha$ 欠損マウスで変化が認められた遺伝子には、主に脂質ホメオスタシス、アミノ酸代謝や異物代謝に関連

する遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の変化は、CARの活性化剤を投与した野生型マウスで認められ、それらの多くはCAR欠損マウスでは認められなかった。

#### 生殖発生毒性

PFOAは、ラットの精巣テストステロンレベルを低下させ、精巣毒性を引き起こすことが知られている。このテストステロン低下作用へのPPAR $\alpha$ の関連性を調べるために、1.0もしくは5.0 mg/kg/dayのPFOA (NH<sub>4</sub>塩)を129/sv野生型マウス、PPAR $\alpha$ 欠損型マウス及びPPAR $\alpha$ ヒト化マウスに6週間経口投与した結果、野生型及びPPAR $\alpha$ ヒト化マウスでは、血漿中テストステロン濃度が低下し、精巣の病理変化や精子の形態異常の増加が観察された。PPAR $\alpha$ 欠損型マウスではこれらの影響は観察されなかった。野生型及びPPAR $\alpha$ ヒト化マウスでは、ステロイド産生急性調節タンパク (StAR)やミクロソームチトクロム P450 (CYP) 17- $\alpha$ ヒドロキシラーゼ/C17-20リアーゼ等のステロイド合成関連因子の発現量及びタンパク量の低下が認められた。

ICRマウスの妊娠0日から17日、もしくは18日まで1、5もしくは10 mg/kg/dayのPFOAを強制経口投与した結果、10 mg/kg投与群では母動物の体重増加量が低下し、すべての投与群で肝臓の病理組織学的変化が観察された。妊娠18日に剖検した結果、5及び10 mg/kg投与群では胎児重量が低値を示し、10 mg/kg投与群の胎児には、胸骨及び指骨の骨化遅延や切歯萌出の遅れが認められた。出生後の評価では、5及び10 mg/kg投与群で、新生児の生存率及び体重が低下した。PFOS投与により引き起こされることが知られている胎児/児の頭蓋内血管拡張は観察されなかった。

発生毒性のメカニズムを明らかにするために、CD-1マウスの妊娠11~16日に2、10

もしくは25 mg/kg/dayのPFOA (NH<sub>4</sub>塩)を強制経口投与し、妊娠16日に帝王切開したところ、すべての投与群で胎盤重量及び胎盤効率(胎児重量/胎盤重量)の低下や吸収胎及び死亡胎児数の増加がみられ、10 mg/kg以上の投与群では生存胎児数や胎児重量の低下も認められた。10及び25 mg/kg投与群の胎盤では、用量依存的な壊死性の変化が観察され、胎盤の発達不全が認められた。さらに、マウス胎盤性ラクトゲン(mPL) -II、プロラクチン様タンパク (mPLP) -E、mPLP-F、Pit-1 $\alpha$ 及び $\beta$ のmRNAレベルが用量依存的に減少し、mPL-II、mPLP-E、mPLP-FのmRNAレベルと胎児重量の間には正の相関性が認められた。

CD-1マウスの妊娠1日から17日に0.01~5 mg/kgのPFOA (NH<sub>4</sub>塩)を強制経口投与した結果、出生後1日には5 mg/kg投与群で、離乳時には3 mg/kg以上の投与群で、児の体重が低値を示した。0.01~0.3 mg/kg投与群では、雌児の20~29日齢時の体重が高値を示し、0.01及び0.1 mg/kg投与群では40週齢時にも同様な影響が見られた。0.01及び0.1 mg/kg投与群では、21~33週齢時の血清中のインスリン及びレプチン濃度の増加が認められた。5 mg/kg投与群では18ヵ月齢時の体重が低値を示し、1及び5 mg/kg投与群では白色脂肪組織重量の低下、1及び3 mg/kg投与群では褐色脂肪組織重量の増加が認められた。離乳時に卵巣を摘出した結果(0.01~1 mg/kg投与群のみ)、体重や脂肪組織重量への影響は認められなかった。

PFOAの発達影響と暴露時期との関連性を調べるために、CD-1マウスの妊娠1~17日、8~17日もしくは12~17日に5 mg/kgのPFOA (NH<sub>4</sub>塩)を強制経口投与した結果、母動物の体重増加量や出産生存児数に影響はみられなかった。いずれの投与群においても出生後1日の児の平均体重は低値を示し、この変化は

離乳時まで継続して観察された。出産 10 日後の母動物の乳腺を調べたところ、妊娠 1~17 日もしくは妊娠 8~17 日に PFOA を投与した群で上皮分化の遅延がみられ、出産後 20 日にはすべての投与群で正常な上皮退縮の遅れや乳タンパク発現量の変化が認められた。生後 10 及び 20 日の雌児の乳腺を調べた結果、すべての投与群において、乳腺上皮の分岐障害や成長障害が認められた。

妊娠 CD-1 マウスの様々な時期に PFOA (NH<sub>4</sub> 塩)を強制経口投与し、雌児の乳腺発達への影響を調べた。妊娠 8 から 17 日に 5 mg/kg/day の用量で投与し、出産後に対照群と PFOA 投与群の授乳動物を交換したところ、妊娠期のみ及び授乳期のみには曝露された両方の群で、出生後 1 日に乳腺発達の遅れが明らかになり、この変化は少なくとも出生後 63 日まで継続して観察された。妊娠 15 から 17 日に投与した群では、妊娠 7 から 17 日に投与した群と同等の影響が観察された。これらの結果は、乳腺の高感受期は、胎児期の後期及び新生児期にあることを示している。

CD-1 マウスの妊娠 1~17 日に 1 もしくは 5 mg/kg/day の PFOA を強制経口投与し、母動物の乳腺や児の乳腺発達への影響、さらには、次世代動物の発達・哺育行動への影響を調べた。妊娠 7 日から試験期間 (F2 児の生後 62 日まで)を通して、5 ppb の PFOA を含む飲料水を与える別の試験群も設けた。その結果、5 mg/kg 投与群において、出生児数、児の生後生存率及び体重の低下が認められた (P0/F1 世代)。出産後 22 日に P0 動物の乳腺を観察した結果、低用量の PFOA を飲水投与した群を含めた、すべての投与群で離乳に伴う乳腺退縮の障害が認められた。F1 児動物では、すべての投与群で乳腺発達の遅れが認められた。F1 親動物では、出産後 10 日に乳腺発達の遅れが認められたが、母乳生成量や哺育行動に

影響は見られず、F2 児の体重にも変化は見られなかった。

21 日齢の Balb/c マウス及び C57BL/6 マウスに 1~10 mg/kg の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩)を 4 週間 (1 日 1 回、5 日/週)強制経口投与し、乳腺発達への影響を調べた。いずれの系のマウスでも高用量群で体重増加抑制がみられ、1 mg/kg 以上の投与群で膈開口の遅れが認められた。Balb/c マウスの 5 及び 10 mg/kg 投与群では乳腺及び子宮の発達障害が観察された。一方、C57BL/6 マウスでは、5 mg/kg 群では乳腺及び子宮の発達促進、10 mg/kg では発達抑制が認められた。

C57BL/6 マウスで観察された乳腺発達亢進のメカニズムを明らかにするために、卵巣摘出マウス (C57BL/6)に 5 mg/kg/day の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩)を 4 週間 (5 日/週)強制経口投与した結果、乳腺発達への影響は認められなかった。同じ方法で卵巣非摘出マウス (C57BL/6)に PFOA を投与した結果、血清中のプロゲステロンレベルが増加し、エストラジオール投与、プロゲステロン投与、エストラジオールとプロゲステロンの同時投与に対する乳腺の反応が増加した。PPAR $\alpha$ 欠損マウス及び野生型マウス (C57BL/6)に、5 mg/kg/day の PFOA を投与したところ、いずれの遺伝型マウスでも乳腺発達が促進され、卵巣のステロイドホルモン合成関連酵素レベル、乳腺の上皮成長因子受容体 (EGFR)、エストロゲン受容体 (ER) $\alpha$ 、アンフィレグリン (Areg, EGFR のリガンド)、肝細胞増殖因子 (HGF)、サイクリン D1 及び増殖性細胞核抗原レベルの増加が認められた。

21 日齢の Balb/c 及び C57BL/6 野生型マウスの雌にそれぞれ 2.5 及び 7.5 mg/kg の PFOA (NH<sub>4</sub> 塩)を 5 日/週、4 週間強制経口投与したところ、乳腺発達が阻害された。さらに、PFOA は、膈開口の遅れもしくは阻害や性周期の欠如を引き起こし、卵巣のステロイドホ