

ルモン合成関連タンパクレベルの低下や乳腺の Areg、HGF α 、ER α 、EGFR、核内増殖抗原 (PCNA) レベルの低下も認められた。これらの影響は C57Bl/6 PPAR α 欠損マウスでは観察されなかった。PFOA を投与した Balb/c 及び C57Bl/6 野生型マウスで観察された乳腺発達や乳腺の関連タンパクへの影響はエストロゲン及びプロゲステロンの投与により消失した。

低用量の PFOA 投与による発達影響を調べるために、CD-1 マウスの妊娠 1 日から 17 日に 0.3~3.0 mg/kg/day の PFOA を強制経口投与した。その結果、すべての投与群の雌児に乳房上皮の発育阻害が認められ、この変化は生後 84 日まで観察された。児の血清及び肝臓中 PFOA は雌では生後 42 日、雄では生後 84 日まで対照群と比較して有意に高かった。さらに低い量の PFOA (0.01~1.0 mg/kg/day) を CD-1 マウスの妊娠 10 から 17 日に強制経口投与した結果、すべての投与群で児の乳房上皮の発育阻害が認められ、1.0 mg/kg 投与群では縦方向への上皮の発育の低下と末梢芽状突起の減少が認められた。

PFOA のエストロゲン及び抗エストロゲン活性を明らかにするために、CD-1 マウスの出生後 18 日から 20 日に PFOA (0.01~1 mg/kg/day) を強制経口投与した結果、0.01 mg/kg 投与群のみで、子宮の絶対及び相対重量の増加が認められ、子宮内膜の浮腫、子宮内膜の粘膜及び腺上皮の肥大、子宮筋層の浮腫/肥大/過形成の発現頻度及び重篤度が増加した。1.0 mg/kg/day 群では、子宮頸部及び膣の粘液化 (mucification) の重篤度が増加したが、エストロゲン曝露によって引き起こされる典型的な変化である、子宮頸部及び膣の扁平上皮過形成や上皮層の角化は引き起こされなかった。エストラジオールを同時投与した群では、PFOA による抗エストロゲン作用は認められなかった。

CD-1 マウスの妊娠 1 から 17 日まで 5 mg/kg/day の PFOA を強制経口投与し、妊娠 14 日から生後 28 日までの胎児/児の PPAR 発現量及び PPAR 関連遺伝子への影響を調べた。PFOA 投与群では、妊娠 14 日から、PPAR、CAR 及び PXR 関連遺伝子の誘導が認められたが、これらの遺伝子発現への影響は、各組織によって異なっており、必ずしも PPAR 発現量と関連していなかった。

10 日齢の雄 NMRI マウスに PFOA (0.58 または 8.70 mg/kg) を単回強制経口投与し、発達神経影響を調べた。2 及び 4 か月齢に自発行動検査を行った結果、馴化作用の減少/消失や自発運動の亢進などの自発行動の変化がみられた。さらに、4 か月齢時にニコチン誘導性行動検査を行った結果、対照群ではニコチンに対する興奮性反応が認められたのに対し、PFOA 投与群では抑制性の反応が見られた。4 か月齢時の高架式十字迷路試験では PFOA 投与による影響は見られなかった。PFOA 投与の 24 時間後には、海馬のカルシウム (Ca)/カルモジュリン (CaM) 依存性タンパクキナーゼ及び成長関連タンパク-43、海馬及び大脳皮質のシナプトフィジン及びタウレベルの増加が認められた。

免疫毒性

雄の CD ラットに 0.3~30 mg/kg/day の PFOA (NH₄ 塩) を 29 日間強制経口投与した結果、10 及び 30 mg/kg 投与群において、体重増加抑制や血清コルチコステロンレベルの増加がみられたが、脾臓及び胸腺の細胞数やヒツジの赤血球 (SRBC) に対する免疫グロブリン (Ig)M 抗体産生反応などの免疫系への影響は認められなかった。同じ方法で投与を行った CD-1 マウス (雄) では、10 及び 30 mg/kg 投与群において、体重低下、顕著な血清コルチコステロン濃度の増加に加え、末梢血中の好中球及び単球数の増加及びリンパ球数の低下が

見られた。同投与群では、IgM 抗体産生量の低下、脾臓及び胸腺の細胞数の減少やリンパ系組織の消失/萎縮なども観察された。

雄の ICR マウスに 2~250 ppm の PFOA (NH₄ 塩)を 21 日間飲水投与した結果、50 及び 250 ppm 投与群では体重が低値を示した。脾臓では、すべての投与群で CD8⁺リンパ球が減少し、50 及び 250 ppm 投与群では CD4⁺リンパ球が増加した。胸腺では、250 ppm 投与群において、CD8⁺リンパ球が増加した。病理組織学検査では、250ppm 投与群の脾臓の白髄にリンパ球過形成の増加が認められた。同投与群の胸腺では皮質及び髄質の厚みの減少が見られたが、リンパ球はより密に配列されていた。50 ppm 以上の投与群では、脾臓において炎症性サイトカイン類の発現量が増加し、脾臓及び胸腺ではがん原遺伝子である c-myc の発現量が増加した。

C57BL/6J マウスの雌に 30 mg/kg/day の PFOA (NH₄ 塩)を 10 日間強制経口投与し、半数例には溶媒のみを、残りの半数例には PFOA をさらに 5 日間投与した。PFOA 投与により、体重、胸腺及び脾臓重量が低値を示したが、投与終了後には回復が見られた。両投与群で、血清中の SRBC-特異的 IgM 抗体力価がおおよそ 20%減少したが、SRBC-特異的 IgG 抗体力価や遅延型過敏性反応への影響は見られなかった。C57BL/6N マウスの雌に 3.75~30 mg/kg/day の PFOA (NH₄ 塩)を 15 日間飲水投与したところ、15 及び 30 mg/kg 投与群で体重増加抑制がみられ、脾臓及び胸腺の相対重量が低下した。すべての投与群で血清中の SRBC-特異的 IgM 抗体力価が低下した。同じ方法で 0.94~7.5 mg/kg/day の PFOA (NH₄ 塩)を投与したところ、3.75 及び 7.5 mg/kg 投与群で脾臓の相対重量が減少し、血清中の SRBC-特異的 IgM 抗体力価が低下した。

雄の C57BL/6 マウスに 10 日間混餌投与し、

免疫系への影響を調べた一連の試験結果を以下に示す。0.02%の PFOA を投与した結果、体重が低値を示し、血中総白血球数、リンパ球及び好中球が減少した。骨髄のマクロファージが顕著に減少したが、脾臓や腹腔ではこのような変化は見られなかった。腹腔内から単離したマクロファージによる TNF- α 及び IL-6 の生成量は軽度増加した。PFOA 投与群では、リポ多糖 (LPS)を投与した後の血清 TNF- α 及び IL-6 レベルや腹腔内及び骨髄マクロファージによる TNF- α 及び IL-6 生成量 (*ex vivo*)は顕著に増加したが、脾臓のマクロファージによる TNF- α 及び IL-6 の生成量 (*ex vivo*)は顕著に減少した。同様の方法で 20 倍低い 0.001%の PFOA を投与したマウスでは、先天性免疫に関するこれらのパラメータの変化は見られなかった。0.001-0.02%の PFOA を投与した試験では、0.02%投与群において、胸腺及び脾臓の相対重量が低下し、胸腺、脾臓及び骨髄の総細胞数の低下、骨髄のミエロイド系細胞および B リンパ系細胞の減少が見られた。骨髄の B リンパ球数の低下は 0.002%投与群でもみられた。骨髄の B リンパ細胞亜集団への影響を調べたところ、特にプロ/プレ B 細胞の減少が顕著であった。投与終了後、PFOA を投与せずに 10 日間維持した回復群では、ミエロイド系細胞の数は回復したものの、相対胸腺重量、相対脾臓重量及び B リンパ系細胞は、未だ低値を示した。0.02%投与群と同量の餌を与えた pair-fed 対照群においても、胸腺や脾臓の萎縮や骨髄の B リンパ系細胞の減少が見られたが、ミエロイド系細胞への影響は見られなかった。

副腎切除マウスもしくは非切除マウス (C57BL/6N、雌)に 3.75~15 mg/kg の PFOA (NH₄ 塩)を 10 日間飲水投与した結果、副腎非切除マウスの 15 mg/kg 投与群で SRBC に特異的な IgM 抗体力価が 15%低下した。副腎切除マウ

スの7.5及び15 mg/kg投与群でもSRBCに特異的なIgM抗体力価の低下(それぞれ11.8%及び18%)が認められた。

雌のSDラットにPFOA(150 mg/kg)、クロフィブラート(PPAR α アゴニスト、100 mg/kg)もしくはロシグリタゾン(PPAR γ アゴニスト、10 mg/kg)を皮下投与し、セルレイン-誘発急性膵臓炎に対する抗炎症作用を調べた。PFOA投与群及びロシグリタゾン投与群では、膵臓の活性化白血球の数が減少した。また、PFOA及びクロフィブラート投与群ではプロスタグランジンE2合成の抑制が認められた。いずれの投与群においても、炎症性浮腫の形成や血清のリパーゼ活性の増加への影響は見られなかった。

マウスに1もしくは5 mg/kgのPFOAを腹腔内投与した結果、血清中のヒスタミン濃度が増加した。雌のBALB/cマウスの耳の背面をPFOA(10もしくは50 mg/kg)に4日間暴露させ、受動皮膚アナフィラキシー反応を引き起こした結果、PFOA投与によるIgE依存性アレルギー反応の増強が認められた。

神経毒性

雄のICRマウス及びWistarラットにPFOA(250-1000 mg/kg)を経口投与した結果、神経毒性症状は観察されなかった。超音波刺激による強直性痙攣も引き起こされなかった。

4) Perfluorononanoic acid (PFNA)

ラットでは、PFNAの血中半減期はPFOAよりも長く、雄では29.6日、雌では2.44日、と明確な性差が認められる。側鎖の長さや性による半減期の違いは尿中排泄速度の違いによるものと考えられている。PFNAは、マウス及びヒトPPAR α に対してPFOAと同等のアゴニスト活性を示し、げっ歯類の肝重量やペルオキシソーム β 酸化への影響は、PFOAよりも強かった。ラットを用いた出生前投与試験では、5 mg/kg/day投与群で児の体重への影響が認め

られており、マウスの免疫系への影響も報告されている。2009年以降、PFNAの体内動態、肝臓及び脂質代謝への影響、生殖発生毒性、及び免疫毒性に関する新たなデータが下記の通り報告された。

SDラット及びCD1マウスに1~10 mg/kgのPFNAを単回強制経口投与した結果、ラットの血清中からのPFNAの消失は概ね線形性を示し、雄の半減期は30.6日、雌の半減期は1.4日であった。一方、マウスの血清中からの排出は非線形で、雄の半減期は34.3~68.9日、雌の半減期は25.8~68.4日であった。PFNAはラットとマウス共に肝臓に蓄積し、その蓄積量は雌より雄の方が多かった。

雄のSDラットに0.2, 1もしくは5 mg/kg/dayのPFNAを14日間強制経口投与したところ、1及び5 mg/kg投与群で血清中のグルコースレベルが増加し、血清中高密度リポタンパク(HDL)の低下(すべての投与群)と低密度リポタンパク(LDL)の増加(5 mg/kg投与群)も認められた。最高用量群の肝臓では、限局性の肝細胞空胞化が観察され、グリコーゲン及び脂質蓄積量の増加と酸化ストレスの指標である過酸化水素及びマロンジアルデヒドの増加が認められた。さらに、5 mg/kg投与群では血清及び肝臓中の炎症性サイトカイン類の増加が認められた。PFNA投与群の肝臓では、グルコース代謝及び脂質代謝に関連する種々の遺伝子発現レベルが変化し、インスリン・シグナル経路に関わるリン酸化タンパクレベルへの影響も認められた。同じ方法でPFNAを投与した別の試験では、肝臓のTGレベルの増加、血清中ALT、LDH及びALPの増加、肝臓のTNF- α 及びIL-1 β レベルの増加が認められたが、これらの影響はクッパー細胞の不活性化(塩化ガドリニウム投与)により阻害された。一方、PFNA投与群で観察されたPPAR α とその標的遺伝子の発現レベ

ルの増加は、クッパー細胞の不活化により増強された。

雄ラット(SD)に1, 3 または 5 mg/kg/day の PFNA を 14 日間強制経口投与した結果、5 mg/kg 投与群で、血清エストラジオール濃度が著しく増加し、血清テストステロン濃度は減少した。精巣の病理組織学検査の結果、5 mg/kg 投与群では、生殖細胞の精細管内脱落やクロマチン凝縮などが観察され、用量依存的なアポトーシスの増加が認められた。透過型電子顕微鏡でセルトリ細胞の構造を観察した結果、空胞化が認められた。精巣では、Fas 及び Bax の mRNA レベルが増加し、Bcl-2 の mRNA レベルが減少した。用量依存的な活性化型カスパーゼ-8 の増加も認められた。さらに、血清中のミュー管抑制因子濃度の増加、インヒビン B 濃度の低下、精巣のウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) タンパクレベルの増加及びトランスフェリンタンパクレベルの低下が認められた。

野生型 129S1/SvImJ マウスと PPAR α 欠損マウスの妊娠 1~18 日に 0.83, 1.1, 1.5 または 2 mg/kg/day の PFNA を強制経口投与したところ、いずれの遺伝型マウスにおいても、母体重、着床数、同腹児数および児の出生時体重への影響は認められなかった。野生型マウスの 2 mg/kg 投与群では、全児損失/死亡率が軽度増加し、1.1 及び 2 mg/kg 投与群では、出生時の生存児数と受乳期間中の生存率が低下した。さらに、2 mg/kg 投与群では眼瞼開裂の遅れが見られ、受乳期間中の体重が低値を示した。PPAR α 欠損マウスでは、これらの発達エンドポイントに影響は見られなかった。野生型マウスではすべての投与群で児 (生後 21 日) の相対肝重量が用量依存的に増加したが、PPAR α 欠損マウスでは最高用量群のみで軽微な相対肝重量の増加が認められた。

雄の SD ラットに 1, 3 または 5 mg/kg/day

の PFNA を 14 日間強制経口投与した結果、胸腺への影響を調べたところ、3 mg/kg 以上の投与群で体重が低値を示し、5 mg/kg 投与群では胸腺の相対重量が低下した。胸腺を病理組織学的に調べたところ、髄質に対する皮質の割合が用量依存的に減少し、皮質のアポトーシスリンパ球および染色性マクロファージ (アポトーシス細胞を貪食するマクロファージ) の増加が観察された。3 mg/kg 以上の投与群で血清中 IL-1 濃度の増加と IL-2 濃度の減少が認められ、さらに、最高用量群では血清中 IL-4 濃度とコルチゾール濃度が増加した。胸腺における PPAR、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ及び NF- κ B シグナル経路に関連した遺伝子発現への影響を調べた結果、PPAR α 、PPAR γ 、p38 キナーゼ及び抗アポトーシス遺伝子 Bcl-2 の mRNA レベルの変化がみられた。c-Jun NH₂ 末端キナーゼ (JNK)、NF- κ B p65 サブユニット及び I κ B α の mRNA レベルは変化しなかった。タンパクレベルを調べたところ、ホスホ-JNK 及びホスホ-p38 の増加が認められたが、ホスホ-I κ B α の変化はみられなかった。脾臓への影響を調べたところ、5 mg/kg 投与群で相対重量が低下し、3 mg/kg 以上の投与群でアポトーシスが増加した。5 mg/kg 投与群の脾臓では、IL-1、IL-6 及び TNF- α 濃度が増加したが、IFN- γ 及び IL-10 濃度は減少した。5 mg/kg 投与群では、脾臓の過酸化水素濃度が増加したが、3 及び 5 mg/kg 投与群では脾臓のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 濃度が減少した。3 及び 5 mg/kg 投与群では、脾臓の PPAR α 及び PPAR γ 発現レベルが増加した。さらに、PFNA 投与群の脾臓では、1 型 TNF 受容体、アポトーシス誘導因子、p-JNK の蛋白レベルの増加と、カスパーゼ 8 及びカスパーゼ 3 の前駆体、切断型カスパーゼ 3、Bcl-2 及び CD3 の蛋白レベルの減少が認められた。

5) Perfluorodecanoic acid (PFDeA)

ラットにおける血中半減期は雄で40日、雌では60日と長く、特に肝臓に蓄積することが報告されている。雄ラットに0.00125~0.01%の用量で1週間混餌投与した試験では、肝臓への影響が明らかになっており、ペルオキシソーム増殖剤反応性指標への影響はPFOAよりも1.5倍程度強かった。一方、マウスPPAR α に対するアゴニスト活性はPFOAより弱く、ヒトPPAR α に対するアゴニスト活性は認められていない。げっ歯類に比較的高用量(20~400 mg/kg)で単回投与した試験では、腎臓、甲状腺、心臓、雄性生殖器系や免疫系などへの影響も観察された。マウスを用いた出生前投与試験では、0.1 mg/kg/day以上の投与群で生存胎児数や生存胎児重量の低下が認められた。2009年以降に報告された新たな研究結果を以下に示す。

雄のC57BL/6マウスにPFDeA(80 mg/kg)を単回腹腔内投与した結果、血清中胆汁酸濃度がおよそ3倍に増加した。PFOA(40 mg/kg)を単回腹腔内投与したマウスではこのような変化は認められなかった。肝臓の取り込みトランスポーターへの影響を調べた結果、PFDeA及びPFOA両投与群で有機アニオン輸送ポリペプチド(Oatp)1a1、1a4及び1b2のmRNAやタンパクレベルが減少し、さらにPFDeA投与群では、タウロコール酸ナトリウム共輸送体ポリペプチド(Ntcp)のmRNA及びタンパク量も減少した。PPAR α 欠損マウスにPFDeA(40 mg/kg)を単回腹腔内投与した結果、野生型マウスと比較してOatp1b2への影響は少なく、野生型マウスで観察されたOatp1a4やNtcpへの影響は認められなかった。PFDeA(80 mg/kg)を単回腹腔内投与したPXR欠損マウスでは、野生型マウスと比較してOatp1a4への影響が少なかった。

雄のC57BL/6マウスにPFOA(40 mg/kg)

またはPFDeA(80 mg/kg)を単回腹腔内投与した結果、肝臓のCyp2B10、3A11及び4A14のmRNA量が増加したが、Cyp1A1/2のmRNA量に変化はみられなかった。Cyp2B及び4Aについてはタンパク量も顕著に増加した。PPAR α 欠損マウス及び野生型マウスにPFDeA(40 mg/kg)を投与し、Cyp2B10及びCyp4A14への影響を比較した結果、Cyp2B10への影響はPPAR α 欠損マウスでより顕著であり、Cyp4A14への影響は野生型マウスの方がやや強かった。CAR欠損マウスにPFDeA(80 mg/kg)を投与した結果、野生型マウスと同様にCyp2B10の増加が認められたが、Cyp2B10への影響は全く観察されなかった。FXR欠損マウスでは、Cyp2B10 mRNA及びタンパク量へのより顕著な影響が観察された。

PFDeA(80 mg/kg bw)をC57BL/6マウス(雄)に単回腹腔内投与したところ、肝臓の排出トランスポーターである多剤耐性関連タンパク(Mrp)3とMrp4のmRNAレベルが増加し、血清中の抱合型ビリルビン及び胆汁酸レベルが増加した。同じ方法でPFOAを投与したマウスでもMrp3及びMrp4 mRNAレベルの増加が認められた。NF-E2関連因子(NF-E2-related factor: Nrf)2欠損マウス及びPPAR α 欠損マウスでは、PFDeA(40もしくは80 mg/kg)投与によるMrp3及びMrp4のmRNA及びタンパクレベルへの影響は、野生型マウスと比較して弱かった。クッパー細胞を不活化したマウス(塩化ガドリニウムで前処理)にPFDeAを投与したところ、未処理マウスで観察された血清/肝臓中TNF- α レベルの増加は認められず、また、未処理マウスで観察されたMrp4 mRNAの増加も抑制された。

10日齢の雄NMRIマウスにPFDeA(0.72もしくは10.8 mg/kg)を単回強制経口投与し、発達神経影響を調べた。2~4ヵ月齢時に自発行動試験、ニコチン誘導性行動試験及び高架

式十字迷路試験を実施した結果、PFDeA 投与による影響は認められなかった。

6) Perfluorododecanoic acid (PFDoA)

PFDoA は、ラットに 14 日間強制経口投与した試験で、肝臓及び精巣に影響を及ぼしたことが報告されている。PFDoA の毒性に関する新たな知見を以下に記す。

雄の SD ラットに 0.02, 0.05, 0.2 または 0.5 mg/kg/day の PFDoA を 110 日間強制経口投与した結果、0.5 mg/kg 投与群の体重が低値を示した結果、血中グルコース及びアルブミンの増加 (すべての投与群)、TG の低下 (0.05 mg/kg 以上)、ALP、クレアチニン、BUN 及び総胆汁酸の増加 (0.2 mg/kg 以上)、総ビリルビンの増加 (0.5 mg/kg) が認められた。肝臓の病理組織学検査の結果、0.05 mg/kg 以上の投与群で脂質滴と広範な細胞システムの崩壊、0.2 mg/kg 以上の投与群で水腫性変性、脂肪変性及び肝細胞の腫脹、0.5 mg/kg 投与群では肝細胞の空胞化と細胞核の巨大化が観察された。肝臓組織及び血清のメタボロミクス及び遺伝子発現解析の結果から、PFDoA は脂肪酸取り込み、脂質生成及び脂肪酸酸化を攪乱することにより肝臓の脂肪変性を引き起こすと考えられた。

PFDoA は、COS-1 細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、マウスの PPAR α を活性化させたが、その作用は PFOA や PFDeA よりも弱かった。ラットの PPAR α と PFDoA との相互作用に関する情報は得られていないが、上述の 110 日間試験では、PPAR α 標的遺伝子である Acox や Cyp4a1 のアップレギュレーションが見られたことから、PFDoA の肝毒性には PPAR α が関与している可能性が考えられる。

雄の SD ラットに PFDoA (0.05~0.5 mg/kg/day) を 110 日間強制経口投与し、腎臓組織のプロテオミクス解析を行った結果、ア

ミノ酸代謝、TCA サイクル、糖新生、解糖、電子伝達及びストレス反応に関連するタンパクの変化が認められた。メタボロミクス解析の結果、ピルビン酸、乳酸、酢酸、コリンや様々なアミノ酸類の増加が認められた。

雄の SD ラットに 0.02~0.5 mg/kg/day の PFDoA を 110 日間強制経口投与した結果、0.5 mg/kg 投与群の体重が低値を示した。0.2 及び 0.5 mg/kg 投与群では、血清テストステロン及びプロゲステロンレベルが顕著に低下し、精巣の病理組織学検査の結果、0.5 mg/kg 投与群では精細管内に脱落細胞が観察された。精巣のステロイド合成関連遺伝子の発現量やタンパク量を調べた結果、StAR 及びコレステロール側鎖切断酵素 (P450scc) レベルの減少が見られ、さらに、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF-1R) 及び IL-1 α の mRNA レベルの低下が認められた。精巣のプロテオミクス解析を実施した結果、ミトコンドリア呼吸、酸化ストレス、精子活性、細胞構造及び細胞内シグナル伝導に関わるタンパク量の変化が認められた。関連する酵素活性を調べた結果、SOD、ミトコンドリア H-ATPase 及びシトクロム c 酸化酵素活性の低下、さらには、脂質過酸化の増加が認められた。

雌の SD ラットに 0.5, 1.5 もしくは 3 mg/kg/day の PFDoA を 28 日間強制経口投与した結果、3.0 mg/kg 投与群の体重が低値を示し、同投与群において血清総コレステロールの増加及び血清エストラジオールの低下がみられた。卵巣の遺伝子発現解析を行った結果、コレステロール輸送及びステロイド合成関連遺伝子 (StAR、P450scc、17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼなど) の発現量の変化がみられ、さらに、黄体ホルモン (LH) 受容体及び ER α 及び β の低下が認められた。性周期、膣開口、血清 LH 及び卵胞刺激ホル

モン (FSH)、子宮及び卵巣の重量・病理に変化は見られなかった。

7) Perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA)

これまでに毒性情報の報告はなかったが、最近、反復投与毒性・生殖毒性併合試験の結果が下記の通り報告された。CD(SD)ラットに 40, 200 もしくは 1000 mg/kg/day の用量で強制経口投与し、14 日後から雌雄を同居させた。雄は交配期間を含めて計 42 日間、雌は、交配、妊娠、授乳期間を通して出産後 5 日まで投与を続けた。その結果、1000 mg/kg 投与群の雌雄に体重増加抑制が見られ、同投与群の雌 1/12 例が妊娠 18 日に瀕死状態となった。200 mg/kg 以上の投与群の雄では、赤血球数、ヘモグロビンレベル及びヘマトクリットの低下が、1000 mg/kg 投与群の雌では、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。病理組織学検査の結果、200 および 1000 mg/kg 投与群の肝臓に、小葉中心性肝細胞肥大や壊死が観察され、さらに 1000 mg/kg 投与群では、膵臓のチモーゲン顆粒の減少が認められた。生殖発生毒性に関しては、1000 mg/kg 投与群において、黄体数、着床数、出産児数、生後 0 及び 4 日の生存児数が低下し、さらに、出生時体重の低下及び出生後の体重増加抑制が認められた。

2.2.2. パーフルオロスルホン酸類

1) Perfluorobutanesulfonic acid (PFBS)

PFBS は、ラットにおいて、消化管から急速に吸収され、主として尿中に排泄される。終末相の血清排出半減期は雄では 4.51 時間、雌では 3.96 時間と算出された。雄雌のカニクイザルの血清排出半減期 (終末相) は、それぞれ 95.2 時間、雌では 83.2 時間と算出されている。ラットを用いた 90 日間反復経口投与試験では、200 mg/kg/day 以上の投与群で血液、胃及び腎臓への影響が認められた。マウス及びヒトの PPAR α に対するアゴニスト活性は PFBA

や PFOA を含むパーフルオロカルボン酸類と比較して著しく弱い。新たな知見として、サル及びラットを用いた体内動態試験とラットの脂質代謝への影響を調べた試験の報告があり、さらに、2006 年に学会報告として発表された二世世代繁殖試験の結果が専門誌で発表された。

カニクイザルに 10 mg/kg の PFBS 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 9.6~24 時間、雌では 5.8~9.5 時間と算出された。同じ方法で SD(CD)ラットに PFBS を投与した結果、雄の血清半減期は 2.1 時間、雌の半減期は 0.64 時間となり、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 70% が尿中に排泄された。

APOE*3-Leiden.CETP マウスに 1003 μ moles/kg diet の PFBS (K 塩, 30 mg/kg bw/day) を含む飼料 (Western 型) を 4-6 週間与えた結果、血漿中の TG レベルが軽度減少し、肝臓の遊離コレステロール及びコレステリルエステル濃度が低下した。血漿中コレステロールレベル、肝臓の TG 含量や性腺周囲の脂肪重量に変化は見られなかった。

SD ラットに 30、100、300 および 1000 mg/kg/day の PFBS (K 塩) を交配前 10 週から妊娠・授乳期間を通して、二世世代に渡って強制経口投与した結果、1000 mg/kg 投与群において F1 雄動物の離乳後の体重増加量が減少した。交配後に雄親動物を剖検した結果、F0 及び F1 世代共に、300 mg/kg 以上の投与群で肝細胞肥大及び腎髄質/乳頭部の尿細管及び導管上皮過形成の発生率の増加が認められた。F0 及び F1 雌親動物では、肝臓の病理変化は認められなかったが、腎臓では尿細管及び導管上皮過形成に加え、巣状乳頭浮腫が観察された (300 mg/kg 以上の投与群)。いずれの世代においても、精子パラメータ、性周期、交

配率、妊娠率等の生殖パラメータに影響は見られず、雌雄の生殖器に病理組織学的変化は観察されなかった。出生児数、児の生存率や体重にも影響は見られなかった。

2) Perfluorohexanesulfonic acid (PFHxS)

これまでにほとんど情報が得られなかった PFHxS の体内動態や毒性に関して下記の通り新知見が入手できた。

SD ラット、CD-1 マウス及びカニクイザルに PFHxS を投与し、体内動態を比較した。1~100 mg/kg の PFHxS (K 塩)を単回経口投与したラットでは、肝臓中濃度は血清中濃度よりも低く、主要な排泄経路は尿中であった。血清及び肝臓中蓄積量(雄>雌)や尿中排泄量(雌>雄)には明確な性差が認められた。ラットに 10 mg/kg の PFHxS (K 塩)を単回静脈内投与した結果から、血清半減期は雄では 29.1 日、雌では 1.64 日と算出された。PFHxS (K 塩, 1 もしくは 20 mg/kg)を単回経口投与したマウスの肝臓中濃度は、ラットと同様に、血清中濃度よりも低く、血清半減期は雄では 28.0-30.5 日、雌では 24.8-26.8 日と算出された。PFHxS (K 塩) 10 mg/kg を単回静脈内投与したサル血清半減期は雄では 141 日、雌では 87 日と長かった。

SD ラットに 0.3、1、3 及び 10 mg/kg/day の PFHxS (K 塩)を強制経口投与した反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (雄: 交配 14 日前から 44 日間投与、雌: 交配前 14 日から分娩後 21 日まで投与)では、雄のみで毒性影響が認められた。3 及び 10 mg/kg 投与群では赤血球数及びヘマトクリット値が低下し、1 mg/kg 以上の投与群ではヘモグロビン濃度が低下した。さらに、0.3、3 及び 10 mg/kg 投与群ではプロトロンビン時間の延長が認められた。血液生化学検査の結果、すべての投与群でコレステロールの低下、最高用量群でアルブミン、血中尿素窒素及び ALP の増加と TG

の低下が認められた。3 及び 10 mg/kg 投与群では、肝細胞肥大及び甲状腺の濾胞上皮細胞肥大/過形成の発現頻度が増加した。精子パラメータ、性周期、妊娠率、着床数、出産児数、児の生存率及び体重等の生殖発生パラメータに影響は見られなかった。

APOE*3-Leiden.CETP マウスに 150 μ moles/kg diet の PFHxS (K 塩, 6 mg/kg bw/day) を含む飼料 (Western 型)を 4-6 週間与えた結果、血漿中 TG、コレステロール、非高密度リポタンパク (non-HDL) -コレステロール、高密度リポタンパク (HDL) -コレステロール及びアポリポタンパク AI 濃度が顕著に低下した。血漿中超低密度リポタンパク (VLDL) が減少し、血中リポプロテインリパーゼ活性の増加を伴う VLDL-TG クリアランスの増加と VLDL-TG 及び VLDL-アポタンパク B 生成量の低下が認められた。さらに、肝臓の TG 含量の増加、性腺周囲の脂肪重量、血漿中遊離脂肪酸及びグリセロールレベルの低下や胆汁酸の糞中排泄量の低下も見られた。肝臓の遺伝子発現解析の結果、様々な脂質代謝関連遺伝子への影響が認められ、リポタンパク質代謝への影響は少なくとも PPAR α 及び PXR を含む複数の核内受容体の活性化によって引き起こされた可能性が示唆された。

3) Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)

PFOS は、ラットにおいて消化管から容易に吸収され、主として尿中に排泄される。血中半減期は、雄ラットでは 179 時間と算出されたのに対し、カニクイザルでは 110~202 日、と顕著な種差が認められた。ラットを用いた 90 日間混餌投与試験では、すべての投与群 (2 mg/kg/day~)で肝臓への影響が報告されている。PFOS はペルオキシソーム増殖作用を示すことが知られているが、サルを用いた試験でも肝臓への影響が観察されたことから、PPAR α 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、出生児数及び児の生存率の低下、内臓奇形、骨格変異、生後発達遅延などがラット (0.4 mg/kg/day~)及びマウス (1.0 mg/kg/day~)で共通して報告されている。新知見として、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ついて下記の報告があった。

体内動態

これまでに、ラット及びカニクイザルを用いた試験の結果を企業データとして入手することができたが、最近、これらの情報にマウスを用いた試験を加えた一連の体内動態試験の結果が下記の通り専門誌で公表されている。

^{14}C でラベルした PFOS (K 塩, 4.2 mg/kg) を SD ラットの雄に単回経口投与した結果、24 時間後に血中濃度が最高値に達し、48 時間後までに投与量の 3.24 %が糞中に、また、2.52 %が尿中に排泄された。同用量の ^{14}C -PFOS (K 塩)を雄の SD ラットに単回静脈内投与した結果、64 日後までに投与量の 12.6%が糞中に排泄され、89 日後までに 30.2%が尿中に排泄された。投与 89 日後には、投与量の 25.2%が肝臓に、2.8%が血漿中に残留していた。雌雄の SD ラットに 2 及び 15 mg/kg の PFOS (K 塩)を単回経口投与した結果、平均血中濃度に明確な性差が見られ (雌>雄)、雄の半減期は 38-41 日、雌では 62-71 日と算出された。CD-1 マウスに 1 もしくは 20 mg/kg の PFOS (K 塩)を単回経口投与し、血清、肝臓、腎臓中の濃度を測定した結果、肝臓の PFOS 濃度が最も高かった。血清排出半減期は、雄では 36-43 日、雌では 30-38 日と算出され、投与後 24 時間の尿中及び糞中排泄量 (投与量の 0.7%未満)に明確な性差は見られなかった。カニクイザルに 2 mg/kg の PFOS (K 塩)を単回静脈内投与した試験では、血清排出半減期は雄で 132 日、雌で 110 日と算出された。雌雄ともに尿中から極低用量の PFOS が

持続的に検出された。

PFOS の体内動態に関するその他の新知見は下記のとおりである。

ヒトが環境経路で暴露されうる量 (0.031 mg/kg/day)もしくはその 750 倍の量の ^{35}S -PFOS (23 mg/kg/day)を雄の C57/BL6 マウスに 1~5 日間混餌投与した結果、放射能の多くは、肝臓、骨 (骨髄)、血液、皮膚及び筋肉中から検出され、特に肝臓、肺、血液、腎臓及び骨 (骨髄)中の濃度は高かった。低用量群では血中から組織中への分配率が時間と共に増加する傾向が見られたのに対し、高用量群では時間に依存した組織中濃度/血中濃度の変化はなく、低用量群よりも血中から組織中への分配率が高かった。

C57Bl/6 マウスの妊娠 16 日に 12.5 mg/kg の ^{35}S -PFOS を単回静脈内投与もしくは強制経口投与し、全身オートラジオグラフィー及び液体シンチレーション計測により、母体、胎児及び児における体内分布を調べた。母動物の肝臓及び肺の ^{35}S -PFOS レベルは血中レベルよりも高く、脳や腎臓の ^{35}S -PFOS レベルは低かった。一方、妊娠 18 日の胎児では、肺、肝臓及び腎臓の ^{35}S -PFOS レベルが高く、母動物の血中レベルの 2~3 倍であった。出生後 1 日の児の肺の ^{35}S -PFOS レベルは、妊娠 18 日の胎児より高かった。胎児/児の脳では ^{35}S -PFOS の分布は不均一で、その濃度は母動物の脳の 4~5 倍高かった。

0.1~1.0 mg/kg/day の PFOS (K 塩)を SD ラットの妊娠 0 日から出産後 20 日まで経口投与した結果、妊娠 20 日の胎児の肝臓の PFOS 濃度は血清濃度のおよそ 0.6~0.8 倍であったが、生後 4 及び 21 日には血清濃度のおよそ 2~4 倍に増加した。出生後 72 日の雄児及び雌児の血清中 PFOS 濃度は生後 21 日のそれぞれおよそ 3%及び 11%まで低下し、肝臓の PFOS 濃度は雌雄ともにおよそ 17%にまで低下した。

妊娠20日の母動物の脳のPFOS濃度は血清濃度のおよそ4~9%であったの対し、妊娠20日の胎児及び出生後4日の児の脳のPFOS濃度は血清濃度のおよそ33%であった。生後21日にはおよそ10%にまで低下した。

その他に、ラットやサルの体内動態モデルに関する検討結果が報告された。サルを用いた体内動態試験データを基に開発した生理学的薬物動態学的モデルを人に外挿し、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PFOS濃度を概ね適切に予測することができた。

反復投与毒性

3M社が実施した慢性毒性/発がん性試験の結果が、2012年に専門誌で公表された。CD(SD)ラットに0.5、2、5、20 ppmのPFOS(K塩、雄: 0.024、0.098、0.242、0.984、1.144 mg/kg/day、雌: 0.029、0.120、0.299、1.251 mg/kg/day)を104週間混餌投与した結果、血液生化学検査では、総コレステロールの低下、グルコースの低下や尿素窒素の増加等が認められた。20 ppm投与群の肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大、空胞化、好酸性顆粒状細胞質及び色素沈着が観察され、2 ppm以上の投与群の雄では好酸性明細胞性変異細胞巣及び嚢胞変性の増加も認められた。20 ppm投与群では肝細胞腺腫が増加し(雄7/60例、雌5/60例)、20 ppm投与群の雌1/60例のみに肝細胞癌が観察された。

その他にも、下記の通り新たな知見が得られた。

雄のSDラットに5及び20 mg/kg/dayのPFOS(K塩)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等が観察された。20 mg/kg投与群では、体重増加抑制が認められ、投与26日までにすべての動物が死亡した。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

ど比較的重篤な変化が観察され、その他にも脾臓や脳に病理組織学的変化が認められた。

SDラットに2、20、50もしくは100 mg/kg dietのPFOS(K塩; 雄: 0.14, 1.33, 3.21, 6.34 mg/kg bw/day, 雌: 0.15, 1.43, 3.73, 7.58 mg/kg bw/day)を28日間混餌投与した結果、50及び100 mg/kg diet投与群で体重増加量が減少した。100 mg/kg diet投与群の雌では、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットが低下した。血液生化学検査の結果、50 mg/kg diet以上の投与群でコレステロールが低下し、さらに100 mg/kg diet投与群ではTG及びグルコースの低下や総ビリルビンの増加、ALT活性の増加等が認められた。20 mg/kg diet以上の投与群では血清T4レベルが低下し、50 mg/kg diet以上の投与群では血清トリヨードサイロニン(T3)レベルが低下した。病理組織学検査では、50及び100 mg/kg diet投与群の雄に肝細胞肥大が観察され、同投与群の雌雄の肝臓では細胞質の均一性が増加した。肝臓ではペルオキシソームACOX(50 mg/kg diet以上の投与群)及びCYP4A22(20 mg/kg diet以上の投与群)の発現量が増加した。肝臓の脂肪酸プロファイルを調べた結果、総一価不飽和脂肪酸レベルの増加、総多価不飽和脂肪酸レベルの低下、リノール酸の増加、長鎖脂肪酸の減少などが認められた。

低用量のPFOS投与による影響を明らかにするために、1.25、5もしくは10 mg/kg/dayのPFOS(K塩)をSDラットに28日間強制経口投与した結果、最高用量群では、雌のみで体重が低下し、雄では血清ASTの増加及びTGの低下が認められた。肝臓の病理組織学的検査の結果、雄では脂質変性(5及び10 mg/kg)、雌では肥大や細胞腫脹(10 mg/kg)が観察された。さらに、肝臓では、アポトーシスの増加、procaspase-3タンパクの減少、CYP4A1mRNA及びタンパク量の増加が認め

られた。実際に環境中から検出される、より低い量の PFOS への曝露により、どのような影響が認められるのか調べた結果が報告されている。成熟 B6C3F1 マウスの雌に 3.31, 16.6, 33.1 もしくは 166 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の PFOS を 28 日間経口投与した結果、最高用量群で子宮の相対重量が低下した。その他の器官重量、血液学/血液生化学検査値に影響は見られず、33.1 及び 166 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の各 1/5 例の脳組織に軽度な多発性小膠細胞症が認められた以外には、病理所見に明確な変化は認められなかった。

PFOS による肝臓影響の持続性/回復性を評価するために、雄の SD ラットに 20 もしくは 100 ppm の PFOS を 7 日間混餌投与し、投与後 84 日間観察を続けた。投与終了翌日には、血漿コレステロール及び TG 濃度が減少した。さらに、肝臓では、DNA 濃度の減少、ミクロソーム CYP450 濃度の増加、ACOX、CYP4A、CYP2B 及び CYP3A 活性の増加、増殖指数の増加、アポトーシス指数の低下、肝細胞空胞化の減少及び小葉中心性肝細胞肥大の増加が観察された。このうち、血漿中コレステロール、CYP450 濃度、アポトーシス指数、CYP3A 活性への影響や肝細胞肥大は回復期間の終了時まで持続した。

雄の C57BL/6 マウスに 0.005% の PFOS [(NH₄)₄ 塩] を投与した結果、血清コレステロールが低下し、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、免疫表現型的に赤血球前駆細胞と考えられる肝細胞が増加したが、その他の IHIC への影響はみられなかった。さらに、肝臓の TNF- α 、IFN- γ 及び IL-4 レベルが低下し、さらに、肝臓のエリスロポエチンレベルの増加もみられた。

APOE*3-Leiden.CETP マウスに 60 $\mu\text{moles}/\text{kg diet}$ の PFOS (K 塩, 3 $\text{mg}/\text{kg bw}/\text{day}$)

を含む飼料 (Western 型) を 4-6 週間与えた結果、PFHxS と同様な脂質代謝への影響が観察された。血漿中 TG、コレステロール、non-HDL-C、HDL-C、VLDL 及びアポリポタンパク AI 濃度が顕著に低下し、VLDL-TG クリアランスの増加と VLDL-TG 及び VLDL-アポリポタンパク B 生成量の低下が認められた。さらに、肝臓の TG 含量の増加、性腺周囲の脂肪重量、血漿中遊離脂肪酸及びグリセロールの低下及び胆汁酸の糞中排泄量の低下も見られ、肝臓の遺伝子発現解析の結果から、リポタンパク質代謝への影響は少なくとも PPAR α 及び PXR を含む複数の核内受容体の活性化によって引き起こされた可能性が示唆された。

PFOS によって引き起こされる肝肥大や肝細胞腺腫発生時の PPAR α 及び CAR/PXR の役割を調べるために、SD ラットの雄に PFOS (K 塩, 1.66 及び 7.90 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)、Wyeth 14,643 (Wy 14,643, 41.79 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) 及び phenobarbital (PB, 4.65 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) を 28 日間混餌投与した。PFOS 投与群では、投与 7 日以降、血清コレステロール及び TG が低値を示したが、Wy 14,643 投与群では同様な変化は投与 7 日のみに認められた。PB 投与群では、投与 1 日に血清 TG の軽度に増加したが、投与 28 日後には軽度な低下がみられ、血清コレステロール濃度に変化は見られなかった。PFOS 及び PB 投与群では肝臓の P450 濃度が増加し、CYP2B 活性、CYP3A 活性、CYP2E1、CYP2B1/2 及び CYP3A1 タンパク量が増した。PFOS 及び Wy 14,643 投与群では肝臓の ACOX 及び CYP4A 活性と CYP4A1 タンパクが増加した。すべての投与群で、肝臓の細胞増殖指数の増加とアポトーシス指数の減少 (PFOS は高用量群のみ) が見られた。

野生型マウス (129S1/SvImJ) 及び PPAR α 欠損マウス (129S4/SvJae)

-*Pparatm1Gonz/J*)に3もしくは10 mg/kg/dayのPFOS (K 塩)を7日間強制経口投与し、肝臓の遺伝子発現解析を行った結果、野生型マウスでは、脂質代謝、ペルオキシソーム生合成、プロテアソーム活性化や炎症反応など、PPAR α 制御機能に関わる様々な遺伝子の変化が認められた。野生型マウス及びPPAR α 欠損マウスで共通して変化した遺伝子は、脂質代謝、炎症及び異物代謝に関わる転写産物からなり、CARにより誘導されるCyp2b10の誘導も認められた。PPAR α 欠損マウスのみで、胆汁やコレステロールの恒常性に関連する重要な遺伝子であるCyp7a1のアップレギュレーションの他、リボソーム生合成、酸化リン酸化及びコレステロール生合成関連遺伝子の変化などが見られた。

SDラットの雄に1.7~15.0 mg/LのPFOSを含む飲料水を91日間与えた結果、すべての投与群で血清総T4レベルが用量依存的に減少したが、血清総T3、遊離T4及びTSH濃度に影響は見られなかった。5.0 mg/L以上の投与群では、肝臓のUGT1A1のmRNAレベルが増加したが、UGT1A6のmRNAレベルに変化は見られなかった。肝臓では、5.0 mg/L投与群において、type 1 deiodinase (DIO1)のmRNAレベルが低下したが、甲状腺ではDIO1 mRNAの用量依存的な増加が認められた。甲状腺のペルオキシダーゼ活性、ヨウ化ナトリウム共輸送体及びTSH受容体のmRNAレベルに影響は見られなかった。

Wistarラットの雌にPFOS (K 塩, 0.2~3.0 mg/kg)、propylthiouracil (PTU, 10 mg/kg)もしくはPTU (10 mg/kg)及びPFOS (K 塩, 3.0 mg/kg)を1日1回5日間強制経口投与した結果、PFOS投与群では、血清総T4及び総T3レベルが減少したが、胆汁中の総T4及びT3レベルに変化は見られなかった。PFOS投与群の肝臓では、OATP2のmRNAレベルが増加し、

MRP2の発現量が増加した。MRP2 mRNA発現量と血清総T4レベルとの間には良い相関性が認められた。血清サイログロブリン及びトランスサイレチンレベルに影響は見られなかった。PFOS投与群とPTU投与群の血清総T3、胆汁中総T4及びT3レベルには有意差が見られたが、PTU投与群とPTU+PFOS投与群の血清及び胆汁中の総T4及び総T3レベルに有意差は認められなかった。

血清中のT4レベルの低下の要因を明らかにするために、3つの試験が行われた。最初に、雌のSDラットに15 mg/kgのPFOS (K 塩)を単回経口投与した結果、2~6時間後に一過性の遊離T4の増加及びTSHの低下がみられた。総T4レベルは投与2時間後から24時間後まで低値を示した。24時間後にはT3及びrT3が減少し、リンゴ酸酵素活性の増加が認められた。2及び6時間後にはUGT1AのmRNAレベルが増加した。次に、雌雄のSDラットに¹²⁵Iで標識したT4を静脈内投与し、2時間後に15 mg/kgのPFOS (K 塩)を単回経口投与した結果、PFOS投与群では、血清及び肝臓中の¹²⁵I活性が減少し、尿中及び糞中の¹²⁵I活性が増加した。最後に、雄のSDラットにPFOS (3mg/kg/day、強制経口投与)、PTU (10 μ g/mL、飲水投与)もしくはPTU及びPFOS (飲水及び強制経口投与)を7日間与えた結果、すべての投与群で血清中T4及びT3レベルが減少し、さらにPTU投与群とPTU/PFOS投与群では血清中TSHが増加した。

生殖発生毒性

ラットやマウスを用いた出生前投与試験では、10 mg/kg/day以上の投与により口蓋裂が引き起こされたことが報告されている。PFOSによる口蓋裂の発生メカニズムを明らかにするために、ICRマウスの妊娠1日から17日にPFOS (9~30 mg/kg)を強制経口投与し、胎児の血清中のPFOS濃度と口蓋裂の発現頻度の関

連性を調べた。13 及び 20 mg/kg 投与群の胎児の血中 PFOS 濃度は投与量に依存して軽度増加した (110.7±13.4 µg/ml 及び 138.6±0.9 µg/ml)のに対し、口蓋裂の発現頻度は、7.3%から 78.3%、と急激に増加した。ICR マウスの妊娠 1 日から 17 日 (20 mg/kg) 及び妊娠 11 から 15 日 (50 mg/kg)に PFOS を強制経口投与したところ、口蓋裂の発現頻度はそれぞれ 89.3%及び 6.1%と大きく異なったものの、下顎の発達は同程度に阻害された。対照群では、妊娠 15 日までに口蓋形成が終了したが、20mg/kg 投与群では口蓋棚の上昇が見られなかった。

PFOS 投与による新生児死亡の要因を明らかにするために、下記の試験が行われた。妊娠 ICR マウス(妊娠 0 日から)に 1、10 もしくは 20 mg/kg/day の PFOS (K 塩)を強制経口投与した結果、20 mg/kg 投与群では母動物の体重増加量が低下した。妊娠 18 日に剖検したところ、20 mg/kg 投与群では生存胎児数が低下し、10 mg/kg 以上の投与群で胎児重量の低下が認められた。1 mg/kg 以上の投与群で、口蓋裂や波状肋骨などの骨格変異や骨化遅延が観察された。さらに、20 mg/kg 投与群では、すべての胎児の頸背部に腫脹が認められ、10 mg/kg 投与群の数例の胎児にも脛背部の腫れが認められた。胎児の肺及び脳の病理組織検査を行った結果、20 mg/kg 投与群で頭蓋内血管の拡張が認められたが、肺の構造に変化は見られなかった。同じ方法で投与を行い自然分娩させたところ、20 mg/kg 投与群ではすべての新生児が不活発で衰弱しており、数時間以内に死亡した。10 mg/kg 投与群では、45%の新生児が 24 時間以内に死亡した。10 mg/kg 以上の投与群の新生児には、脛背部の腫脹が見られ、病理組織学検査では、肺の拡張不全と重篤な頭蓋内血管の拡張が認められた。

SD ラットの妊娠 12-18 日に 5 もしくは

20 mg/kg/day の PFOS を強制経口投与し、妊娠 18.5 日の胎児の肺の遺伝子発現への影響を調べた結果、それぞれの投与群で 21 及び 43 遺伝子のアップレギュレーションが認められた。これらの遺伝子には 5 つの PPAR α 遺伝子 (Acot1, Hmgcs2, Fabp4, Fabp1 及び Myh7)が含まれ、その他の遺伝子は、主として、細胞骨格構造、細胞外マトリックス、輸送及び分泌タンパクに関連するものであった。胎児の肺に明確な病理組織学的変化は見られなかった。

妊娠 SD ラットに 0.1 もしくは 2.0 mg/kg/day の PFOS を強制経口投与 (妊娠 1 から 21 日)した結果、高用量群では児の出生後 3 日までの致死率が増加し、さらに、出生時から生後 21 日までの体重が低値を示した。生後 0 及び 21 日の児の肺を調べた結果、2.0 mg/kg 投与群では、肺泡出血、肺泡間中隔の肥厚、肺硬化巣、炎症性細胞浸潤等の重篤な病理組織学的変化が観察され、アポトーシスの増加と酸化ストレスの誘導が認められた。0.1 mg/kg 投与群においても、酸化ストレスの軽度な増加が認められた。アポトーシス誘発性及び抗アポトーシス因子の mRNA 発現量を調べた結果、Bax 発現量/Bcl-2 発現量比が増加し、Fas 及び Fas-L 発現量も増加した。さらに、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロム c 放出量の増加や caspase-3、-8 及び-9 活性の増加も認められた。

その他にも胎児や児の肝臓、肺、甲状腺、脳や免疫機能への影響を調べた研究の結果が下記の通り報告されている。CD-1 マウスの妊娠 1 から 17 日に 5 もしくは 10 mg/kg の PFOS (K 塩)を強制経口投与した結果、胎児の肝臓ではペルオキシソーム増殖に特徴的な好酸性顆粒が観察されたが、胎児の肺の病理所見には明確な変化は認められなかった。胎児の肝臓及び肺の転写プロファイリングを実施したところ、肝臓では PPAR α の活性化マーカーの

アップレギュレーションが見られ、肺では、Cyp4a14、エノイル CoA ヒドラターゼや脂肪酸結合タンパク 1 など、より限られた遺伝子群の変化が認められた。PFOS の投与により影響を受けた経路及びグループは、胎児の肺及び肝臓の脂肪酸代謝、異物代謝、ペルオキシソーム生合成、コレステロール生合成、胆汁酸生合成、グルコース及びグリコーゲン代謝などであった。PFOA に関して実施した試験の結果と比較したところ、顕著な差は認められなかった。

SD ラットの妊娠 2 から 20 日まで 3 mg/kg の PFOS を強制経口投与し、胎児の肝臓の遺伝子発現解析を行ったところ、225 の転写物の増加及び 220 の低下が見られ、最も大きな変化は細胞質アシル CoA チオエステラーゼの増加 (25 倍) であった。PPAR α の mRNA レベルに変化は見られなかったが、肝臓のペルオキシソーム増殖、脂肪酸活性化、輸送及び酸化経路 (ミトコンドリア及びペルオキシソーム両方) に関連した遺伝子転写物の発現量が増加した。その他に、脂肪酸生合成に関連した遺伝子転写物の増加や胆汁酸合成に必要な Cyp7a1 転写物の減少がみられた。

妊娠 0 から 20 日に 1.0 mg/kg/day の PFOS (K 塩) を経口投与した SD ラットとその胎児の肝臓を用いて、種々の核内受容体、甲状腺ホルモン及び抱合酵素に関連した遺伝子の発現解析を行ったところ、母動物及び胎児共に Cyp2b2 レベルの増加が見られた。同様の方法で妊娠 0 日から出産後 20 日まで投与を続けたところ、出生後 21 日の雄児では、Cyp4A1、ACoA 及び Cyp2b2 の増加と Cyp7A1 の低下が認められた。妊娠 20 日、出生後 4 及び 21 日の母動物及び胎児/児の血清中の TSH レベルに影響はみられず、胎児/児の甲状腺の病理所見及び濾胞の形態計測結果にも有意な変化は見られなかった。妊娠 20 日の胎児の甲状腺を

Ki-67 で免疫組織化学的に染色した結果、PFOS 投与群の雌児の増殖細胞数は対照群と比較して 2.1 倍高かった。

生後 7、14、21、28 もしくは 35 日の KM マウスに 50 mg/kg の PFOS を単回皮下投与し、24 時間後に、脳及び肝臓のマレイン酸ジアルデヒド含量 (MDA)、SOD 活性及び総抗酸化能 (T-AOC) を測定した。生後 7 日及び 21 日に投与した雄の脳の SOD 活性と生後 21 日に投与した雄の脳の T-AOC は低下した。さらに、生後 14 日に投与した雌の肝臓の SOD 活性と生後 7、14 及び 21 日に投与した雄及び投与 21 日に投与した雌の肝臓の T-AOC 活性が低下した。脳及び肝臓の MDA 含量に変化は見られなかった。脳中の PFOS の濃度及び分布率 (0.85~5.04 %) は年齢と共に低下したが、一方で、肝臓中濃度と分布率 (14.84~73.68 %) は年齢と共に増加した。

Wistar ラットの妊娠及び授乳期に 3.2 mg/kg の PFOS (K 塩) を混餌投与し、出産日に PFOS 投与群と対照群の児を交換した。児の総 T3 及びリバーズ T3 (rT3) 濃度に PFOS 暴露による影響は認められなかった。妊娠期のみ PFOS を投与した群では生後 21 及び 35 日の児の T4 レベルは対照群と比較してそれぞれ 20.3 及び 19.4% 低かった。出産後のみに PFOS を投与した群の児でも T4 レベルがそれぞれ 28.6% および 35.9% 減少した。児の肝臓における甲状腺ホルモンの輸送、代謝及び受容体関連遺伝子の発現への影響を調べた結果、生後 0 日には PFOS 投与による影響は見られなかったが、生後 21 日には妊娠期及び授乳期両方に PFOS を投与した群のみで、甲状腺ホルモン結合タンパクであるトランスサイレチンの増加が認められた。

雌の C57BL/6N マウスと雄の C3H/HeJ マウスを交配させ、妊娠 1~17 日に 0.1、1 もしくは 5 mg/kg/day の PFOS (K 塩) を強制経口投

与し、児(B6C3F1)の4及び8週齢時に免疫機能への影響を調べた。その結果、8週齢時にナチュラルキラー細胞活性の低下(1.0 mg/kg以上の投与群)及びSRBC特異的なIgM生成量(5.0 mg/kg投与群)の低下が認められた。脾臓及び胸腺のリンパ球亜集団への影響を調べた結果、4週齢時には、5.0 mg/kg投与群の雌において、脾臓のB220+細胞が低下し、8週齢時には同投与群の雄において、胸腺のCD3+及びCD4+細胞が減少した。

PFOSの神経発達毒性に関する報告を以下に示す。CD(SD)ラットの妊娠0日から出産後20日まで0.1~1.0 mg/kg/dayのPFOS(K塩)を強制経口投与した結果、生後17日の雄児に自発運動量の増加及び馴化機能の低下が見られたが、これらの変化は出生後13、21及び61日には観察されなかった。その他の行動エンドポイント、学習及び記憶能、聴覚驚愕反応や脳の重量に影響は見られなかった

10日齢の雄NMRIマウスにPFOS(K塩、0.75または11.3 mg/kg)を単回強制経口投与し、2及び4か月齢時に自発行動検査を行った結果、馴化作用の減少/消失や自発運動の亢進などがみられた。さらに、4か月齢時にニコチン誘導性行動検査を行った結果、対照群ではニコチンに対する興奮性反応が認められたのに対し、PFOS投与群では抑制性の反応が見られた。4か月齢時の高架式十字迷路試験ではPFOS投与による影響は見られなかった。投与の24時間後には、海馬のCa/CaM依存性タンパクキナーゼ、成長関連タンパク-43及びシナプトフィジンレベル、大脳皮質のシナプトフィジン及びタウの増加が認められた(11.3 mg/kg投与群)。

PFOSの発達神経毒性影響の分子メカニズムを明らかにするために、Wistarラットの妊娠1日から出産後21日まで3.2 mg/kgのPFOS(K塩)を混餌投与し、児には生後35日まで

PFOS(3.2 mg/kg)を含む餌を与え、生後1、7及び35日の大脳皮質の遺伝子発現プロファイルへの影響を調べた。その結果、神経活性リガンド-受容体相互作用、Ca-シグナリング経路、細胞間コミュニケーション、長期増強/抑制、細胞周期、PPARシグナル伝達に関する遺伝子の発現レベルが有意に変化した。神経発達への転写影響は、主として神経内分泌系を攪乱することにより引き起こされることが明らかになった。

妊娠1日から出産後7日に3.2 mg/kg feedのPFOS(K塩)を混餌投与したWistarラットの児の出生後1及び7日の脳のマイクロRNA(miRNA)発現プロファイルを8種のmiRNAアレイを用いて解析した結果、出生後1日には24種、出生後7日には17種のmiRNAに変化が見られ、神経発達及びシナプス伝達に不可欠な、miR-466b、-672及び-297は5倍以上減少した。これらの結果から、変化する可能性があるかと推測された、6種のシナプス関連タンパクへの影響を調べた結果、いずれの蛋白についてもアップレギュレーションは見られず、NGFR、TrkC及びVGLUT2レベルの減少がみられた。

Wistarラットの妊娠0日から出産後35日まで3.2 mg/kg foodのPFOSを混餌投与し、児の海馬のCa依存性シグナル伝達分子の遺伝子発現解析を行った結果、出生後1日には、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体サブタイプ-2B(NR2B)、CaM及びCa²⁺/CaM依存性キナーゼII α (CaMKII α)の発現量が増加し、出生後7日にはCaMKII α 及びcAMP応答配列結合タンパク(CREB)の増加、出生後35日にはNR2Bの減少が認められた。出産した児を対照群の母動物に哺育させたところ、出生後7日にはNR2B及びCaMの減少とCREBの増加がみられ、出生後35日にはNR2Bの減少が見られた。対照群の児をPFOS投与群の母

動物に哺育させたところ、出生後 7 及び 35 日に CaM の減少、出生後 35 日には NRB2 の減少が見られた。

SD ラットの妊娠 0 日から 20 日まで 0.1~2.0 mg/kg/day の PFOS (K 塩) を強制経口投与し、児の海馬を透過型電子顕微鏡で観察した結果、シナプスの超微細構造の変化 (シナプス小胞及びシナプス屈曲の減少及び活性化シナプス領域の短縮) が認められ、シナプス小胞関連タンパクの発現量に影響が見られた。出生後 0 日もしくは 21 日には、すべての投与群で、シナプシン 1、シナプシン 2 及びシナプトフィジンの mRNA レベルが減少した。さらに、出生後 0 日には、0.6 及び 2.0 mg/kg 投与群においてシナプシン 3 の mRNA レベルの減少がみられたが、出生後 21 日にはこの変化は認められなかった。

免疫毒性

成熟 SD ラットに 2、20、50 もしくは 100 mg/kg diet (0.14~7.58 mg/kg bw/day) の PFOS (K 塩) を 28 日間混餌投与した結果、50 mg/kg diet 以上の投与群で体重が低値を示し、胸腺ではアポトーシスが増加した。100 mg/kg diet 投与群の雌では、血清中の IgM 及び IgG_{2c} レベルが増加した。2 及び 20 mg/kg diet 投与群の雄では血清 IgG₁ レベルが低下したが、この変化に用量依存性は見られなかった。マイトゲンに対する脾細胞の増殖反応 (生体外) や T 細胞依存性抗原に対する遅延型過敏反応に影響は見られなかった。

成熟 C57BL/6 マウスの雄に PFOS (K 塩) を 7 日間強制経口投与した結果、20 mg/kg/day 以上の投与群で体重が低下し、血清中コルチコステロンレベルが増加した。同投与群では、胸腺及び脾臓のリンパ球亜集団細胞数が減少し、ナチュラルキラー細胞の活性やマイトゲンに対する B 細胞の増殖反応が低下した。すべての投与群 (5~40 mg/kg/day) で、T 細胞の増殖反応及

び SRBC に対するプラーク形成 (PFC) 反応が低下した。血清中の IgM レベルは用量依存的に低下し、5 mg/kg/day 投与群のみで血清 IgG レベルの顕著な増加が認められた。5 及び 20 mg/kg/day 投与群から脾細胞を単離し、サイトカイン生成量を調べた結果、両投与群で IL-4 の生成量が増加し、さらに、20 mg/kg/day 投与群では IL-2 及び IFN γ 生成量が減少した。

雄の C57BL/6 マウスに 0.001~1% の PFOS [(C₄H₉)₄N 塩] を 10 日間混餌投与した結果、0.05% 以上の投与群では身づくろいの低下や嗜眠が観察され、0.02% 以上の投与群では体重低下、胸腺、脾臓及び脂肪組織の萎縮が観察された。フローサイトメトリー分析 (0.001~0.02% 投与群) の結果、0.02% 投与群では胸腺細胞及び脾臓の B リンパ球の減少が顕著であった。病理組織学検査では胸腺皮質の細胞枯渇が観察された (0.02% 投与群)。0.005% もしくは 0.02% の PFOS [(C₄H₉)₄N 塩] を PPAR α 欠損マウス (129/Sv) に 10 日間混餌投与した結果、胸腺及び脾臓への影響は野生型マウスと比較して軽度であった。

雄の C57BL/6 マウスに PFOA を 10 日間混餌投与した上述の試験では、同じ方法で PFOS [(NH₄)₄ 塩, 0.02%] の投与が行われている。0.02% PFOS 投与群では、PFOA 投与群と同様に、体重低値、血中総白血球数及びリンパ球の減少、骨髄マクロファージの減少、LPS 投与後の腹腔内及び骨髄マクロファージによる TNF- α 及び IL-6 生成量 (*ex vivo*) の増加、脾臓マクロファージによる TNF- α 及び IL-6 の生成量 (*ex vivo*) の減少、骨髄のミエロイド系細胞および B リンパ系細胞の減少、骨髄の B リンパ細胞亜集団の変化 (特にプロ/プレ B 細胞の減少) 等が認められた。

成熟 C57BL/6 マウスの雄に PFOS (K 塩) を 60 日間強制経口投与し免疫系への影響を

調べた一連の試験結果を以下に示す。8.33~2083 µg/kg/day を投与した結果、417 µg/kg 以上の投与群で体重増加抑制がみられ、833 µg/kg 以上の投与群では血清コルチコステロン濃度が増加した。417 µg/kg 以上の投与群では、脾臓及び胸腺の相対重量、細胞数及びすべての T 細胞 CD4/CD8 亜集団が減少し、B 細胞亜集団の減少も見られた。833 µg/kg 以上の投与群では、リンパ球増殖反応及びナチュラルキラー細胞活性が低下し、83.33 µg/kg 以上の投与群では、PFC 反応の低下が見られた。8.3~833.3 µg/kg/day の用量で投与し、脾細胞によるサイトカイン生成量を調べたところ、83.3 µg/kg 以上の投与群では、IL-4 の生成量が用量依存的に増加し、さらに、833.3 µg/kg 投与群では IL-10 の増加及び IL-2 及び IFN- γ が顕著に低下した。投与 54 日目に SRBC を静脈内投与した結果、血清中の SRBC-特異的 IgM レベルは用量依存的に低下し (83.3 µg/kg 以上)、833.3 µg/kg 投与群では SRBC-特異的 IgG、IgG1 及び IgE レベルが増加した。16.7~833.3 µg/kg/day の PFOS (K 塩) を投与した試験では、83.3 µg/kg 以上の投与群で脾細胞及び胸腺細胞の生存性が低下し、アポトーシス及びアポトーシス誘発性タンパク p53 の発現量が用量依存的に増加した。さらに、脾細胞及び胸腺細胞のミトコンドリア膜電位の低下、抗アポトーシス因子である Bcl-xl 発現量の低下、プロカスペーゼ-3 発現量の低下、シトクロム c の増加が認められた。一方で、アポトーシス誘発因子である Bax や抗アポトーシス因子である Bcl-2 の発現量に影響は見られなかった。8.3~2083.3 µg/kg/day の用量で投与した結果、416.7 µg/kg 以上の投与群で脾臓細胞数の低下が見られたが、マクロファージの数に有意な変化は見られなかった。16.7 µg/kg 以上の投与群では腹腔内の総細胞数に対するマクロファージ数の割合が用量依存的

に増加した。生体外で脾臓及び腹腔内マクロファージによるサイトカイン生成能を調べた結果、LPS 投与の有無に関わらず、TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 の生成量の増加が認められた。833.3 µg/kg 以上の投与群では、これらの炎症性サイトカインの血中濃度が増加した。脾臓では、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 に加え、がん原遺伝子である c-myc の発現量の増加も認められた。

血清濃度が 11 µg/ml (職業的に暴露されたヒトのおよそ 8~85 倍) となるように 1.56 µg/g diet の PFOS [(C₂H₅)₄N 塩、およそ 250 µg/kg/day] を雄の B6C3F1 マウスに 28 日間混餌投与した結果、体重増加量が低下し、相対肝重量が増加した。しかし、胸腺及び脾臓の細胞組成、SRBC に対する IgM 抗体産生脾細胞数、SRBC に特異的な IgM 及び IgG 抗体やトリニトロフェニル-LPS に対する IgM 抗体の血清中レベルに影響は見られなかった。

実際にヒトや野生動物から検出される血中濃度で免疫系にどのような影響が見られるのか調べるために、0.166~166 µg/kg/day の PFOS を成熟 B6C3F1 マウスに 28 日間強制経口投与した。その結果、胸腺及び脾臓の重量、細胞数や細胞の生存性、マイトジェンに対するリンパ球増殖反応への影響は見られなかったものの、16.6 µg/kg 以上の投与群の雄では、ナチュラルキラー細胞の活性が増加した。3.31 µg/kg 以上の投与群の雌では、脾臓の CD4-/CD8+ 及び CD4+/CD8-T 細胞の数が軽度に変化したが、同投与群の雄ではすべての亜集団の T 細胞数が明確に変化した。1.66 µg/kg 以上の投与群の雄及び 16.6 µg/kg 以上の投与群の雌では PFC 反応が抑制された。雌マウスに 344 µg/kg の PFOS を 21 日間投与し、LPS に結合させたトリニトロフェニルを投与したところ、血清中の TNP-特異的 IgM 力価の減少が認められた。

成熟 B6C3F1 マウスの雌に 33.1, 99.3 もしくは 9930 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の PFOS を 28 日間経口投与した結果、高用量群では体重増加量が減少し、脾臓の相対重量が低下した。同投与群では、*in vivo* で LPS 刺激した際の腹腔内マクロファージによる IL-6 生成量及び *in vitro* で LPS 刺激した際の TNF- α 生成量が増加した。33.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、血清中 TNF- α 濃度の顕著な低下と血清中 IL-6 濃度の軽度な増加がみられ、93.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、細胞内に IL-6 を発現している脾細胞数が減少したが、これらの変化に用量依存性は見られなかった。細胞内に TNF- α 、IL-10 もしくは IL-1 を発現している脾細胞の数に変化は見られなかった。同じ方法で 3.31~166 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の PFOS を投与した試験では、脾臓の CD19⁺/CD21⁻, CD19⁺/CD21⁺, B220⁺/CD40⁺, CD4⁺/CD154⁻, CD4⁺/CD154⁺ 及び MHC-II+ 細胞数に変化は見られなかった。3.31 および 33.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の脾臓から単離した B 細胞を抗 CD40 抗体もしくは LPS で刺激し、IL-6 の生成量を調べた結果、対照群と比較して有意な増加が認められた。一方、単離した CD4⁺ T 細胞による IL-4、IL-5 及び IL-6 生成量 (*in vitro* で抗 CD3 抗体もしくは phorbol myristate acetate による刺激後) に有意な影響は見られなかった。

雌の B6C3F1 マウスに 5 もしくは 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の PFOS (K 塩) を 21 日間強制経口投与し、インフルエンザ A 型ウイルスの感染に対する抵抗性への影響を調べた。脾臓、胸腺及び肺の PFOS 濃度は用量依存的に増加したが、これらの器官の相対重量に変化は見られなかった。PFOS 投与群では、インフルエンザ A 型ウイルスによる衰弱及び致死率が用量依存的に増加した (有意差は高用量群のみ)。

神経毒性

雄の ICR マウス及び Wistar ラットに PFOS (K

塩, 125-500 mg/kg) を経口投与した結果、神経毒性症状は観察されなかったが、超音波刺激をしたところ、250 mg/kg 以上の PFOS を投与したラット及び 125 mg/kg 以上の PFOS を投与したマウスに強直性痙攣が引き起こされた。脳の PFOS 濃度は他の組織と比較してかなり低かったが、暴露後は時間と共に増加した。脳の病理組織学所見やノルエピネフリン、ドパミン、セロトニン、グリシン、4-アミノブタン酸及びグルタミン酸濃度に変化は見られなかった。

Wistar ラットの雄に 2, 8, 32 もしくは 128 ppm の PFOS (K 塩) を 13 週間混餌投与した結果、神経毒性を示唆する一般状態の変化は観察されなかった。32 ppm 以上の投与群では体重が低下し、相対肝重量が増加した。週に 2 回超音波刺激を与えた結果、投与 6 週目に 128 ppm 投与群の 6 例中 5 例が硬直性痙攣を引き起こした。痙攣は数 10 秒持続し、1 例は翌朝死亡した (7 週目以降は超音波刺激なし)。大脳及び小脳の神経細胞やグリア細胞の病理組織学所見に異常は観察されず、海馬皮質のニューロンや小脳のニューロン及び顆粒細胞の超微細構造にも変化は見られなかった。

中枢神経系への影響について、そのメカニズムを明らかにするために、成熟 SD ラットの雄に 1.7~15.0 mg/L の PFOS (K 塩) を 91 日間飲水投与し、中枢神経系の Ca 依存性シグナル伝達分子への影響を調べた。その結果、大脳皮質 (5.0 及び 15.0 mg/L 投与群) 及び海馬 (すべての投与群) の CaMKII α 及びリン酸化 CREB の発現レベルが増加した。海馬では、転写因子である c-fos の mRNA レベルが増加し (15.0 mg/L 投与群)、大脳皮質 (15.0 mg/L 投与群) 及び海馬 (すべての投与群) で c-jun の増加も認められた。

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

3.1. LC/MS/MS 分析条件の検討

3.1.1 PFCs の分離

前年度の結果から、PFCs の LC 分離用カラムに、逆相系の単体 ODS C18 系を充填したものをを用いる場合には、10mM 酢酸アンモニウム-CH₃CN を移動相とすれば良好な分離が可能であることがわかった。本研究では、分析系内への PFCs 残存量を少なくするために、流路系の内容積が少なく、かつ高理論段数が得られる市販 UHPLC 用の ODS カラム BEH C18 (ウォーターズ製、粒径 1.7 μm、2.1 x 50 mm)を用いることとし、注入量と移動相 10mM 酢酸アンモニウム-CH₃CN のグラジエント条件について検討した。その結果、注入量については、2、5 及び 10 μL で調べたところ、注入量 10 μL では PFPeA や PFHxA のピークが 2 つにわかれる等、良好な分離が行えなかった。注入量 2 及び 5 μL では、全ての PFCs を良好に分離が可能であった。移動相のグラジエント条件については、A 液の組成が 50%以上では、PFPeA が非保持時間に接近することから、初期 A 液の組成は、40%とすることとした。

3.1.2. PFCs の MS/MS 条件

キャピラリー電圧の値を 1~3 kV の間で変化させて対象化合物の親イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類の感度はキャピラリー電圧の値を上げるに従い低下したことから、キャピラリー電圧を約 1 kV に設定した。

コーン電圧の値を 20~100 V の間で変化させて対象化合物の親イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類は 20 V で最高の感度を示した。

コリジョン電圧の値を 10~40 V の間で変化させて対象化合物の娘イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類は 10 V で最高の感度を示した。

以上の結果より、一イオンの当たりの取込時間を 0.018 秒、その他の MS/MS 分析条件は表 1 に示すとおりに設定することとした。

3.1.3. 検出感度

注入量 5 μL における各 PFCs の定量下限値は 1 ng/mL であり、前年度の 0.5ng/mL より若干劣るが、血清中の PFCs の定量には問題ないと考えられる。

3.1.4. PFOcDA の LC/MS/MS 系内への残存量の低減化

高濃度(μg/mL)の PFCs 混合標準溶液を分析した後に、メタノール溶液を分析した結果、いずれの PFCs のピークも認められなかった。また、対照群の雌雄ラット血清から調製した試験溶液中には、PFOcDA は定量下限値未満であった。したがって、本 UHPLC/MS/MS 装置を用いることにより、流路系内の PFCs のメモリーを減らすことができた。

3.2. PFOcDA 投与ラット血清中の直鎖 PFCs 濃度

PFOcDA の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のラット血清試料中の各種 PFCs の濃度を測定した。試験の概要は「2.2.1.パーフルオロカルボン酸類」の「7) Perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA)」に示すとおりである。

雄性ラットの対照群ではいずれの PFCs も検出されなかった。雄性ラットの低用量(40 mg/kg)群では、PFOcDA の濃度は 14ng/mL であった。また、PFOcDA よりも鎖長の短い PFCs については、濃度は PFDA、PFNA > PFUdDA > PFDoA、PFTrDA および PFTeDA > PFOA、PFHpA、PFHxDA の順で高かった。PFPeA および PFHxA は検出されなかった。中用量(200 mg/kg)群では、低用量群よりも各 PFCs (PFPeA、PFHxA を除く)の濃度は 3~4 倍高かったが、各 PFCs の濃度比は同様な結果であった。高用量(1000 mg/kg)群では、各 PFCs (PFPeA、PFHxA を除く)の濃度は最も高く、各 PFCs の濃度比は低および中用量群と同様な結果であった。回復群(1000 mg/kg 投与後に 14 日間回復)の場合には、各 PFCs の血清中濃度は中用量群と同程度まで

に減少していた。

雌性ラットの対照(0mg/kg)群でも PFCs は検出されなかった。雌性ラットの低用量群では、PFOcDA の濃度は 30 ng/mL であった。また、PFOcDA よりも鎖長の短い PFCs については、濃度は PFDA > PFUdDA、PFDoA、PFTrDA および PFTeDA > PFNA > PFHxDA の順で高く、PFPeA、PFHxA、PFHpA および PFOA は検出されなかった。中用量群では、低用量群よりも各 PFCs (PFPeA、PFHxA を除く) の濃度は 3~4 倍高かったが、各 PFCs の濃度比は同様な結果であった。高用量群では、各 PFCs (PFPeA、PFHxA を除く) の濃度は最も高く、各 PFCs の濃度比は低および中用量群と同様な結果であった。回復試験群の場合には、各 PFCs の血清中濃度は低用量群の濃度より低かった。

3.3. PFOcDA 投与ラット血清中の分岐鎖 PFCs 濃度

市販の PFCs を含む製品中には、直鎖 PFCs の他に分岐鎖 PFCs が存在する。また、北極熊等の生態試料からも、分岐鎖 PFCs が検出されている。逆相系 ODS カラムを用いた場合、それら分岐鎖 PFCs の保持時間は、直鎖 PFCs の保持時間より若干短くなることが知られている。

本研究においても、各直鎖 PFCs のすぐ手前に、親イオン>娘イオンが同じ複数のピークが認められた。PFOcDA を投与したラット血清から調製した試験溶液に、直鎖 PFOcDA の標準品を添加した場合、ピーク面積の増加は直鎖 PFOcDA の部分のみであったことから、血清から調製した試験溶液の成分等との相互作用により、ピークが複数に分かれたとは考えにくい。また、サロゲートとして加えている PFOA-¹³C₂ は単一のピークとして分離されていることも、それを示唆する。

分岐鎖の標準品は入手できなかったため、直鎖 PFCs のピーク面積に基づき分岐鎖 PFCs を定量した。雌性ラットについて、分岐鎖 PFCs の

濃度が高く、炭素鎖が短くなるにしたがい、濃度が減少した。また、投与量が増加するにしたがい、各分岐鎖 PFCs の濃度は増加した。雌性ラットでは、雄性ラットの同様な結果であった。回復群の雄性ラットでは、分岐鎖 PFCs の濃度は低用量群の分岐鎖 PFCs よりも、低い値に減少した。また、PFOA よりも短鎖の分岐鎖 PFCs は検出されなかった。雌性ラットの場合も、雄性ラットと同様な結果あったが、PFNA よりも短鎖の分岐鎖 PFCs は検出されなかった。

3.4. PFOcDA の純度

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験で、投与に使用した PFDcDA の純度を調べた。

PFOcDA 標準品 10mg をアセトン 10mL に溶解したのち、その 1mL を正確にとり、メタノールで 100 倍希釈し、1mg/L 溶液を調製し、LC/MS/MS で測定した。PFOcDA の組成比は 99.2% で最も多く、PDHxDA が 0.7%、PFTeDA が 0.1% であった。PFTrDA よりも炭素鎖が短い PFCs は検出されなかった。また、分岐鎖 PFCs は検出されなかった。

D. 考察

1. 複合暴露によるリスク評価手法に関する研究

米国 EPA 及び EFSA で行われた農薬の複合暴露評価手法を調査し整理した。米国 EPA では、農薬の複合リスク評価や共通の毒性メカニズムをもつ農薬のグループ化に関するガイダンスが公表されており、これまでに、5 つの農薬グループについて複合暴露評価が行われている。RPF 法もしくはそれに準じた方法を用いて複合リスクが算出され、いずれの農薬グループについても、現時点では健康影響の懸念はないと結論された。EPA では、有害性評価及び曝露評価、それぞれについてかなり詳細な検討が行われており、特に曝露データの入手が難しい日本では、同レベルの評価を行うことは、困難な可能性が高い。これに対し、