

特別な配慮が求められるが、Drury氏によれば、水道会社は、水質事故時に特別な配慮を要する契約者（sensitive customer）として、食品産業、人工透析施設を有する医療機関や在宅透析患者等のリストを平時に作成し、非常時の緊急連絡体制を整えている。これは、主に、水質基準超過の広報不足が原因で生じた不利益について訴訟等により水道会社が経済的補償を求められる懸念があるためである。一般家庭に対しては、水道会社は顧客との契約の中で、DNU、DND、BWAのいずれかの勧告が出されている間は一日当たり幾らかの料金を払い戻す契約をあらかじめ結んでいる。

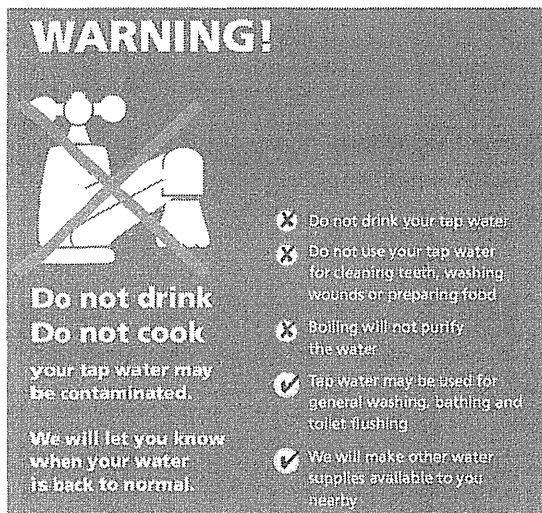


図1 水質異常を周知するリーフレットの例⁴⁾

3.3 水質基準超過により勧告が出された事例の紹介

(1) Gloucestershire大洪水⁵⁾ (2007年7月)

勧告はDND（飲用・調理に不可）だったが、実質的にDNU（トイレ洗浄以外に不可）に近かった事例として、2007年7月、Gloucestershire郡TewkesburyのMythe浄水場が、Severn川の洪水で施設被害を受けた事例がある。降雨の初期段階で洪水特別警報が発令され、河川水位が一定値を越

えた時点で近隣浄水場からの送水系統に切り替えたことにより、およそ2万人が影響を免れたものの、高濁水が配水系統に混入し、約14万世帯（35万人）に、15日間にわたって影響が及んだ。発災直後に多くの家で断水を生じたが、これは浄水処理場が浸水し運転停止を余儀なくされたためであった。その後、他の浄水場からの送水やMythe浄水場の運転再開により対応可能な給水区から順次給水再開に至り、そのタイミングでDND勧告が出された。

最初に一部地域でDND勧告とともに飲用不適の給水を再開したのは、被災5日後であった。また、すべての給水区で給水を再開して以降、2日でDNDからBWA（煮沸勧告）に切り替え、さらに全域給水再開後1週間で安全宣言「Safe to Drink」を発表した。

被災の初期段階で、Mythe浄水場の非常時対応マニュアルに則り、影響の大きい大口契約者、すなわち、病院、養護施設、刑務所、工場などに個別に連絡をとり、代替水源の準備状況を確認した。それらの多くは施設内に貯水施設を有していたため、給水車で定期的に補給すれば対応できることを確認した。また、自宅で人工透析をしている患者など特別な配慮を要する個人契約者にも個別に連絡をとり、状況を確認した。

可動式の小型貯水タンク（Bowser）を各地に設置し、定期的に給水車が給水した（図2）。ピーク時には1,400のBowserを1,100箇所に設置し、さらにホットラインを開設して利用者からの質問や苦情に対応した。貯水タンクによる給水は「Safe to Drink」宣言が出るまで継続されたが、タンク水の需要量はDND勧告のもと給水再開した時点で著しく減少した。これは、ト

イレ洗浄用水を管路から給水することで応急給水の負担は大幅に軽減することを示す。また、貯水タンクと併せてボトル水の配布も行われた。洪水で道路や多くの施設も冠水したため、代替給水は困難を極め、ボトル水の輸送と配布を軍隊が支援した(図3)。



図2 Bowser外観⁵⁾



図3 ボトル水輸送拠点の様子⁵⁾

洪水が管路内に混入した懸念があったことから、給水開始時の水質についてリスク評価が重要となった。およそ1,500のサンプルを水質検査に供し、およそ23,000の測定データを得て、水質上の問題がほとんどないことを確認してから安全宣言がなされた。また、浄水場での運転再開時には、浄水場での塩素注入率と追塩素施設での注入率も上げて対応した。その際、国および自治体の保健行政機関が医学的見地から助言を行った。

本事故事例は、対応マニュアルに沿った浄水場の適切な対応、特に、迅速かつ的確な情報提供が功を奏しており、また、DND勧告のもと管路給水を再開した時点で応急給水の負担が大幅に低減したことが注目に値する。また、給水再開時の水質に

対する懸念を水道事業体だけで払拭しようとせず、保健行政機関と連携した点が重要である。

(2) Camelford市Lowermoor浄水場⁶⁾ (1988年7月)

上記のGloucestershire大洪水は、用途制限勧告がうまく機能した事例であるが、基準超過の原因が自然災害であったことから、利用者の理解を得やすかったとも考えられる。そこで、人為的な水源汚染による給水停止や利用制限の事例として、1988年のCamelford市における水質事故^{6,7)}を紹介する。本件は、適切な情報提供がなされず、制限勧告なしに給水を維持したために、長年にわたる裁判にいたった不幸な事例であり、失策から学ぶきっかけとしたい。

事故は、1988年7月6日、凝集剤の硫酸アルミニウム20トンを輸送トラック運転手が配水池に誤って投入したことに端を発する⁶⁾。基準値の3,000倍を越す620mg/LものAlを含む水道水が給水され、居住者2万人と非居住者1万人に影響した。事態を悪化させたのは、水道事業者が事態を軽視し、味がおかしいとの利用者からの問い合わせには健康上全く問題ないと回答したことにある。事故発生から約1週間後には、全利用者に「利用も飲用も安全」とする誤報を送付したものの、事故発生16日後にアルミニウム基準超過の事実を認めて公表した。その後の調査で、実際には、水道事業者は事故後2日で薬品の誤投入を疑い、6日後には事実を確認していたものの、事故16日後まで事実を公表せず、誤投入した運転手に口止めまでしていたことが発覚した。当時イギリスでは水道民営化の渦中にあったため、事業者が評価低下や契約打ちりを恐れて事故を隠蔽しようとした、との見方が濃厚である。以降、水道水中のアルミニウムとアルツハイマー症の関係に関する議論を交えながら^{7, 8)}、事態はセンセーショナルに報道された。事業者は事態を把握しながら給水停止や異常周知の措置を怠ったとして大規模な裁判に発展し、事業者は罰金と住民補償に莫大な支払いを余儀なくされた。

Drury氏によれば、イギリスではこの事故をきっかけに、安全対策、事故対応、顧客対応の実態を点検し改善するよう全浄水場に周知され、薬品搬入記録をとる、薬品搬入には必ず浄水場職員が立ち会う、全施設に鍵を設けて鍵保管者を限定する、アラームや監視カメラを設置するなど、現在の浄水場では常識的に行われている安全管

理が徹底されるに至った。また、平時の安全性向上のための対策として、オンラインモニタリング設備の導入、利用者からの問い合わせや不満への迅速で誠実な対応、などが強化された。当該地区には、事故水を飲んで健康被害を受けたと主張する住民が未だに多数おり、事故の影響は深刻かつ長期にわたっている。事故対応の不備がいかに大きな問題を生むかを示す事例である。

(3) アイルランドLimerick市⁹⁾

(2014年8月)

イギリスではないが、隣国アイルランドで基準値超過の事例⁹⁾がある。水道事業者が、給水区内約300家庭に対し、水道水を飲用、調理、飲料の希釈、製氷、粉ミルクの調整に使用しないよう通知、すなわちDND（飲用・調理に使用不可）勧告を発表したものである。入浴、シャワー、洗濯には使用可能という点も同時に周知し、可動式の給水装置、給水車、ボトル水での代替給水を開始した。

水質基準を超過したのは、水道管から溶出した鉛であった。欧州の鉛基準は2013年に10 $\mu\text{g/L}$ に強化されたが、該当給水区内での検出濃度は最高約100 $\mu\text{g/L}$ であった。1960年以前に建設された家庭への引き込み管に鉛管が使われていた。当該事業者は最近設立された会社で、それ以前に当該地区に給水していた事業者は給水栓での鉛濃度を調査していなかったために、新会社が事業を引継いだ2014年になって問題が発覚した。鉛管をすべて取り換えるには最短でも12カ月以上かかると判断した新事業者が、DND勧告を出して代替給水に踏み切った。同時に、2015年1月から鉛管取り換え工事を開始し、問題の抜本解決を目指すとして

いる⁹⁾。工事完了までおよそ18ヶ月間、住民は代替給水での生活を余儀なくされる。それに対する不満や同情は報道されているが、新事業者に対する批判的な論調は見られず、同社の迅速な対応と情報公開が評価されている。

4. まとめ

本稿では、イギリスの水道水質基準超過に対する考え方と法的枠組みを整理し、さらにイギリスおよびアイルランドにおける水質事故の例を紹介した。イギリスでは、基準超過項目や超過の程度（濃度や超過予測期間など）に応じて、BWA（飲用・調理には煮沸）、DND（飲用・調理に使用不可）、DNU（トイレ洗浄以外の用途に使用

不可）のいずれかの勧告を発令し、基準超過時でも給水を継続する。Drury氏によれば、勧告の呼称や運用に多少の相違はあっても、水質事故時に給水を継続する基本方針はヨーロッパ各国に共通とのことである。また、過去の水質事故例からは、事故発生そのものよりも事故発生後の対応がその後の事態を大きく左右することが示された。利用制限の考え方や法的枠組みのあり方、勧告の周知方法、特別な配慮を要する水利用者の概念など、日本の水道行政を考えるうえで重要な示唆が得られた。

Acknowledgement

The author would like to give sincere thanks to Mr. David Drury, a former Deputy Chief Inspector of the Drinking Water Inspectorate (DWI) for England and Wales, for the great support.

参考文献

- 1) The Drinking Water Inspectorate Website. <http://www.dwi.gov.uk>
- 2) Statutory Instruments (2000) No. 3184. WATER, ENGLAND AND WALES, The Water Supply (Water Quality) Regulations 2000, Regulations as amended by S.I. 2001/2885, S.I. 2002/2469, S.I.2005/2035, S.I. 2007/2734 and S.I. 2010/991. Applying from 20 April 2010.
- 3) Drinking Water Inspectorate (2012) Guidance on the implementation of the water supply (water quality) regulations 2000 (as amended) in England, Version 1.1. [http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS\(WQ\)-regs-england2010.pdf](http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-of-practice/WS(WQ)-regs-england2010.pdf)
- 4) Drinking Water Inspectorate (2009) Drinking Water Safety, Guidance to health and water professionals. ISBN 978-1-905852-40-6. http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/information-letters/2009/09_2009Annex.pdf
- 5) Severn Trent Water (2007) Gloucestershire 2007: The impact of the July floods on the water infrastructure and customer service, Final report. http://www.stwater.co.uk/upload/pdf/The_Final_Gloucester_2007_Report.pdf
- 6) The Guardian 電子版, 1999年6月9日記事. Still thirsting for justice. <http://www.theguardian.com/society/1999/jun/09/guardiansocietysupplement14>
- 7) BBC News 電子版, 2012年3月14日記事. Camelford water poisoning: 'Authority gambled with lives'. <http://www.bbc.com/news/uk-england-cornwall-17367243>
- 8) Paul Altmann, John Cunningham, Usha Dhanesha, Margaret Ballard, James Thompson, and Frank Marsh (1999) Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. BMJ 319: 807-811. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.319.7213.807>
- 9) The Journal. ie 電子版, 2014年8月20日記事. Limerick residents facing 18 months without drinking water in their taps. <http://jrnl.ie/1628983>

化学物質の毒性評価に基づいた水質基準値の設定

広 瀬 明 彦

水環境学会誌 第 39 卷 (A) 第 2 号 (2016)

pp. 59~63 別刷

公益社団法人 日本水環境学会

化学物質の毒性評価に基づいた水質基準値の設定*

広瀬 明彦

1. はじめに

水道法第4条に基づく水質基準は、昭和33年に制定されて以来、昭和35年、41年、53年および平成4年とその他の科学的知見の集積に基づき、全項目について一括の改正が行われてきたが、平成15年の水道水質基準改定後は項目毎の逐次改正方式に改められることとなった¹⁾。世界保健機関（WHO）においても、飲料水水質ガイドラインの第3版²⁾では、今後は“Rolling Revision”（逐次改正方式）によることとし、従来のような一定期間を経た上で改正作業に着手するのではなく最新の科学的知見に従い常に見直しが行われる方式に切り替えられている。一方、わが国では平成15年の改定後の同年7月に食品安全委員会が設置され、健康影響に係る基準項目としての化学物質については、食品安全委員会において毒性評価が行われ、健康影響評価値に相当する耐容一日摂取量（TDI）に基づいて基準値が改定されることとなった。このような改訂方式を巡る状況の変化は、健康項目の基準値設定における毒性評価も一定期間において全部の化学物質を一括して行う方式から、改定が必要な個別の化学物質ごとに、最新の毒性知見と最新のリスク評価手法に基づいて、より詳細な評価が行われることとなった。そこで、本稿では毒性評価に基づいた水質基準値の設定過程に関する理解を深めるために、健康影響評価値の算定根拠となるTDIの導出と基準値の算定方法について最新のリスク評価手法と共に解説することを目的とする。

2. 健康影響評価値を求めるための毒性評価法

一般的に化学物質をヒトが摂取した場合の有害性の評価は、医薬品申請に必要な試験を除いては、ヒトに直接投与して安全性を確かめることができないため、実験動物を用いた毒性試験や、疫学研究および毒性発現機序に関する研究等に基づいて、ヒトでの安全摂取量あるいは毒性の種類を推定することによって行われている。一方

で、ヒ素やカドミウムなどの毒性の強いことが古くから知られている金属類については、疫学データが充実しておりヒトにおける知見を基にTDIが設定されている。しかし、疫学データを用いた場合でも、後述するように種差に基づく不確実性を考慮する必要がなくなるのみで、個人差に関する不確実性やNOAELの推定などの基本的な推定作業は共通して必要な作業となっている。こうした推定作業に基づく不確実性を認識しつつ、ヒトに対するTDIを科学的に判定することが求められている。

リスクアセスメントにおいてTDIを求めるための標準的な手順としての有害性評価（Hazard Assessment）は、さらに有害性確認（Hazard Identification）と用量反応評価（Dose-response Assessment）という2つの手順から成り立っているとされる^{3,4)}が、実際には2つの手順は互いに関連し合っている。以下にそれぞれの手順における構成要素を解説する。

2.1 有害性確認

有害性の確認においては、まず毒性情報を収集することが必要であるが、その収集先としては、PubMed等の学術雑誌を対象としたデータベースや公開毒性情報データベース等を網羅的に検索できるTOXNET（Toxicological Data Network：<http://toxnet.nlm.nih.gov/>）から検索することが基本である。また、国際的に関心の高い有害化学物質評価機関で評価された物質については、INCHEM（<http://www.inchem.org/>）から、WHOやFAOなどから公開されている評価文書を入手することが可能である。これらの毒性情報を基に、各種の動物を用いた毒性試験や疫学研究の結果などの情報を基に、評価対象化学物質の毒性の種類、質を明らかにし、一般毒性、生殖・発生毒性、免疫毒性、発がん性等についての毒性の程度や無毒性量（NOAEL：No Observed Adverse Effect Level）あるいは最小毒性量（LOAEL：Lowest Observed Adverse Effect Level）を求める。さらに詳細な情報が得られる場合は、毒性の発現機序に関しての確認を行うと共に、動物試験によって得られた毒性については外挿性に関しても検討する。また、毒性に関するデータがない場合でも、対象とする化学物質の構造の中に、ある種の毒性発現に共通した特異的構造を有する場合は、同様の毒性発現が疑われると考えられ、このような構造活性相関的知見も評価の際に考慮する必要がある。

次に、得られた毒性情報からヒトの健康影響を評価するのに最も適した情報を選択する必要がある。その際には、まず、不確実要因を少なくするためにヒトにおける知見や疫学データのうちTDIの設定に適用可能な知見の有無を検討し、適用可能なデータがある場合は最も感受性の高い指標におけるヒトでのNOAELあるいはLOAELを推定する。先に述べたように、有害影響のよく知られ



Akihiko Hirose

医学博士

昭和59年	富山医科薬科大学薬学部 卒業
平成2年	東北大学大学院医学研究科 博士課程修了
同年	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 研究員
8年	同研究所 総合評価研究室 主任研究官
20年	同研究所 総合評価研究室長
27年	同研究所 安全性予測評価部長

* Establishment of Drinking Water Standards Based on the Toxicity Evaluation of Chemicals

ている金属化合物の場合には、ヒトにおける曝露データが比較的揃っており、疫学研究による知見がTDIを算出するための定量的な評価において適用可能場合が多い。しかし、正確な評価を行うためには、飲酒や喫煙、ときには経済状態も含めた生活習慣の違い、遺伝的な多型による感受性の違いなどの交絡因子を考慮しなければならない。また、曝露情報が食品や飲料水などの曝露媒体の汚染濃度のみである場合には、未測定他経路からの曝露量を考慮しないと、総摂取量に依存する毒性影響の用量依存性を評価することが困難となる。血中濃度や尿中濃度などのように、直接あるいは間接的に曝露レベルを評価できる指標であれば、このような欠点を補うことは可能であるが、評価に使用できる研究データは限られたものになる。

一方、TDIの設定に有用な疫学データがない場合には、実験動物を用いた毒性試験などのデータを用いることとなる。基本的には最も感受性の高い毒性指標を選択し、NOAELあるいはLOAELを設定する。その際に注意する点としては、動物を用いた実験結果には、実験動物に特異的と考えられる毒性が最も感受性の高い毒性として報告されている場合も有り、得られた毒性データのヒトへの外挿性に関しても考慮する必要がある。すなわち、得られた毒性の発現機序が実験動物としてよく使用されるげっ歯類に特異的であるか、ヒトでも起きる可能性のある機序であるかどうかについて検討することが重要である。

また、評価する対象化学物質の発がん性に関する評価も重要な評価項目であり、ヒトに対しての発がん性評価に関してのIARC (International Agency for Research on Cancer) における評価結果は重要な知見である。IARCでは、データの信頼性に基づいてヒトでの発がん性の可能性を5段階に分類している。その他にも、欧州連合(EU)および米国環境保護庁(US EPA)などで類似した評価が行われている。ただし、これらの評価結果は定性的なものであり、後述する用量反応評価においては、評価された発がん性が遺伝子障害性に基づくものであるかどうか重要となってくるので、発がん性のメカニズムに関する情報を取得することが重要である。

また、発がん性メカニズムに限らず各種毒性の作用機序の推定には、一般的な毒性試験研究以外の情報として分子生物学的アプローチを用いた知見や、ゲノミクスやプロテオミクスなどのオミクスデータ解析に基づく情報が有用であると思われる。しかし、現段階では定性的な証拠の補強として利用できるものの、後述する定量的な用量反応評価への適用については、今後の課題である。

2.2 用量反応評価

健康影響評価値を算出するためのTDIの設定は、リスクアセスメントにおける用量反応評価の手法に従い、有害性確認で得られたNOAELなどの定量的なデータを基に、ヒトへの外挿性を推測するために実験的証拠や毒性メカニズムに関する情報を基に設定された不確実係数を適用する手法を用いて求めることができる。ただし、遺伝子障害性に基づいた発がん性影響とそれ以外の毒性影響とで健康影響評価値の算出方法は異なる。後者の場合は、ヒトが摂取したときに有害影響が生じないと推定される量としての閾値が設定できると考えられるためTDI

が設定できる。なお、同様の摂取基準値として許容1日摂取量(ADI: Acceptable Daily Intake)という用語も使われるが、ADIは残留農薬および食品添加物などヒトが摂取することが前提とされている物質に対して使用される用語で、TDIは本来ヒトが曝露されることを許容されていない環境汚染物質等に対して用いられることが慣例となっているのみで、両者の用量反応評価における意義は同じであると考えてよい。一方、前者の場合は、遺伝子を直接障害することによって誘発される発がん性には、反応性がなくなる閾値が存在せず、曝露量が0にならない限りはその誘発率は0にならないという原則に立っておりTDIを設定することができない。この場合、現状のほとんどの公的評価機関では、閾値がない毒性の定量評価指標値として 10^{-4} から 10^{-6} リスクに相当する実質安全量(VSD: Virtually Safe Dose)や単位曝露量あたりのリスクとしてのユニットリスク等を算出してリスク管理に用いている。

2.2.1 閾値のある毒性のTDIの算出

基本的な手法は、動物実験または疫学研究から得られたNOAELを不確実係数(UF: Uncertainty Factor)で割ってTDIを求めるものである。この評価に用いられる不確実係数には、以下に示すように5種類の不確実性を適用することを基本としており、有害性確認で得られた毒性発現メカニズムに関する知見などを活用して適切な数値が設定される。なお、本稿ではWHOの飲料水ガイドライン⁵⁾および平成15年の水道水質基準改定時の水質管理専門委員会報告¹⁾に記載された化学物質の水質基準の考え方に記載された手法を基本として解説するが、これらの不確実係数の詳細な適用手法やユニットリスク算出方法などは評価機関によって異なるので、同じ化学物質に対する同じ毒性実験に基づいたTDI等の摂取基準評価が行われても、評価機関によって最終的な評価値は異なることになる。

- ・種間差に対する不確実係数,
- ・個人差に対する不確実係数,
- ・短期の毒性試験を用いてNOAELを求めた場合の不確実係数,
- ・NOAELによらず最小毒性量(LOAEL)を用いた場合の不確実係数,
- ・NOAELの根拠となった毒性が重篤な場合の不確実係数,

各々の不確実係数はその適用が必要な場合に1-10の値をとることが基本とされているが、特殊な理由が説明できない場合はデフォルト値として10を適用することが通例である。因みに、農薬や食品添加物については、申請データとして、慢性毒性試験も含めた十分な試験データが揃っていることがほとんどであり、このような場合は種差と個体差の要素のみを考慮した不確実係数10が適用されることが多い。しかし、環境汚染物質としての化学物質の場合には、十分な試験データが揃っている化学物質は多くなく、ケースバイケースで様々な不確実係数が組み合わされて適用されているのが実情である。最終的にTDIを算定する際には、各要素をそれぞれ吟味して設定した係数をすべて掛け合わせた値を、総合不確実係数としてTDIを算出する。なお、総合UFが10,000を超える場合は不確実性が大きすぎることから、通常TDI

を算出しない。また WHO の飲料水水質ガイドラインなどでは、1,000 を越える不確実係数を適用した TDI は、暫定的な TDI としている。

種差に関する不確実係数には一律に 10 を用いる手法の他に、体表面積による修正法、カロリー需要 (Caloric Demand) に基づいた尺度補正法などが知られている。一方、個人差として適用する不確実係数は、どの評価機関でも通常 10 が用いられている。疫学研究から導かれた NOAEL に対しては、種差に関する不確実係数は適用しないものの、調査対象が高感受性集団である場合を除いて 10 が適用されている。ところで、近年 IPCS (International Program on Chemical Safety) では、この種差と個人差に関する不確実係数については、それぞれが動力学的および動態学的パラメータに分割でき、化学物質特異的調整係数 (Chemical Specific Adjustment Factor : CSAF) という係数で置き換える手法が公表されている⁶⁾。(図 1) 食品安全委員会の評価ではまだ適用されていないものの、WHO 飲料水ガイドラインのホウ素の評価ではこの考え方が導入されている。この法では、種差の不確実係数 10 は AK_{UF} (種差の動力学的に関する不確実係数) : 4.0 と AD_{UF} (種差の動態学的に関する不確実係数) : 2.5 に分割でき、それぞれの係数は、*in vitro* 実験データあるいは PBPK モデル (Physiologically Based Pharmacokinetic Model) による計算データで求められる補正係数に置き換えることにより科学的に妥当な TDI を算出しようという手法である。同様の手法は、個体差の不確実係数についても適用でき、この場合の動力学的および動態学的パラメータの分割率は各々 3.16 と等分に分割される。WHO 飲料水ガイドラインにおけるホウ素の評価において、個人差の動態学的パラメータの係数 [3.16] は妊娠の女性の GFR データの平均値 $\pm 2\sigma$ を標準的な変動幅として算定した [1.8] に置き換えられた結果、個人差に関する不確実係数は 6 ($\approx 1.8 \times 3.16$) とされ、総合不確実係数 60 (種差 10 \times 個体差 6) が NOAEL に適用されて TDI が算出された。

短期の毒性試験を用いて NOAEL を求めた場合の不確実係数については、多くの場合で 3 ヶ月間程度の曝露試

験結果を対して最大値の 10 が通常用いられている。しかし、化学物質の体内からの消失が早い場合や、慢性曝露で重篤化しないと考えられるような影響に関して適用されない場合もある。欧州の化学物質登録に関する REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals) 規制や医薬品の不純物に関する評価では、曝露期間に応じた変数 (2~5) が定義されているが、WHO および食品安全委員会の評価では用いられていない。

NOAEL の代わりに LOAEL を用いた場合の不確実係数についても、最大値の 10 が通常適用されている。LOAEL 設定の根拠となった影響指標の毒性学的意義や毒性試験の用量反応を評価して副実係数を 3 とする評価も行われてきたが、近年はベンチマークドース法⁷⁾ (図 2) がとくに欧州の評価機関において積極的に用いられるようになってきており、NOAEL が得られない場合には、ベンチマークドースが TDI 算出の出発点 (POD : Point of Departure) として NOAEL の代わりに使用されるようになってきている。

毒性の重篤性に関しては、発現した毒性影響に回復性がなく、影響が重大であることを考慮して発がん性、神経毒性、母毒性を伴わない催奇形性などの影響に対して、最大 10 の追加の不確実係数を適用している。例えば、食品安全委員会のトリクロロ酢酸の発がん性を指標として TDI の評価では、マウスの 2 年間の飲水投与試験で認められた腫瘍誘発を根拠として NOAEL に発がん性を考慮した不確実係数が適用されているほか、トルエンの評価においても病理組織学的な変化をとまなう神経毒性を根拠に 3 の不確実係数が適用されている。

2.2.2 ベンチマークドース法^{7, 8)}

動物実験あるいは疫学データを統計学的に尤もフィッティングさせた数理モデルにおいて、その研究の解析結果として統計学的に有意な影響を検出できるベンチマーク反応レベル (BMR : Benchmark Response) の用量に対する 95% 信頼限界の用量下限値をベンチマークドース (BMDL : Benchmark Dose Lower Confidence Level) として算出する手法である (図 2)。BMR は実験に用いた動物数、疫学データはサンプル数などに依存することになるが、通常発生毒性試験で 5%、一般毒試験では 10% の反応率が用いられていることが多い。BMDL は NOAEL が得られなかった場合に TDI 等を設定する際の NOAEL の代替値として用いることが可能であるほか、

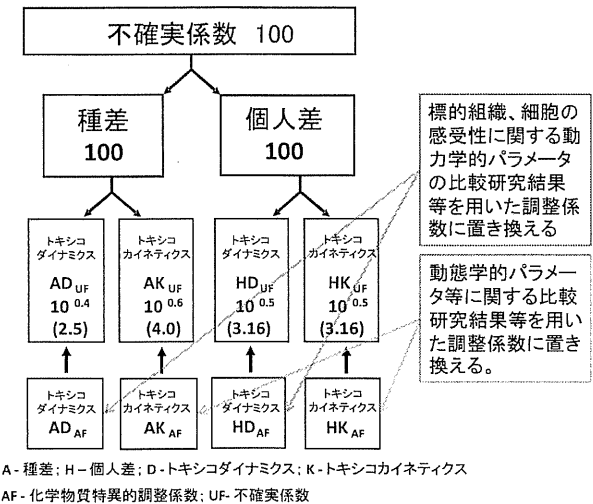


図 1 種差および個体差に関する不確実係数 (UF) の分割と化学物質特異的調整係数 (CSAF) による置き換え

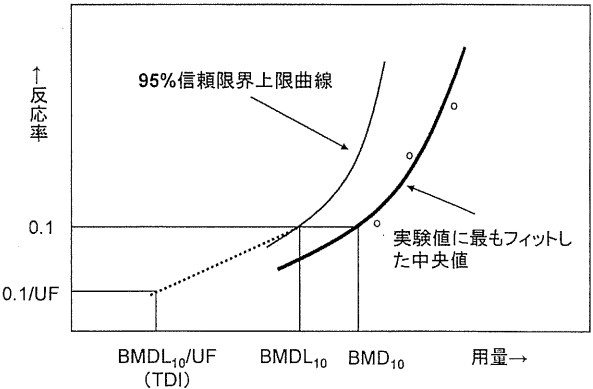


図 2 ベンチマークドース (Benchmark Dose) 法

近年はNOAELが得られている場合でも、用量反応性を統計的に解析した結果としてBMDLをTDIの算定根拠として採用する傾向がある。また、このベンチマークドース法は、後述する遺伝毒性発がん性化学物質の閾値のない毒性の定量的評価手法として、VSDやMOEを求めるためやPODの設定手段としても使用されている。BMDの計算に使用するために一般に公開されているツールとしては、US EPAで開発されているBMDS、オランダの公衆衛生環境保護研究所（RIVM：National Institute for Public Health and the Environment in the Netherlands）で開発されているPROASTというソフトウェアが知られている。因みに、各ソフトウェアを用いたBMDLの算出手法については、食品安全委員会の委託研究事業の研究成果として、国立医薬品食品衛生研究所の安全性予測評価部のホームページ（<http://dra4.nihs.go.jp/bmd>）で詳細に紹介している。

2.2.3 閾値がないと考えられる場合の評価

国内外の規制当局による遺伝子に直接作用して誘発される化学物質の発がん性評価は、その発がんメカニズムからの演繹学的推論により曝露量が0（ゼロ）にならない限り発がんの可能性も0にはならないと言う原則に従って行われている。このため以前は定量的な評価が行われず、その摂取量は合理的に到達可能で最も低くなければならないというALARA（As Low As Reasonably Achievable）の原則に従った管理が行われてきた。しかし、現実的には管理するための基準を設定せざるを得ず、生涯の発がんリスクが10万人から100万人に1人だけ増加するリスクレベルを実質的に安全な量（VSD）として規制値に採用している。そのため遺伝毒性による発がん物質については、数理モデル等を用いた定量的な評価が必要となった。適用可能な数理モデルとしては、プロビット、ロジック、ワイブル、マルチステージなど様々なモデルが知られているが、多くのケースで低用量域での直線性を想定した線形マルチステージモデル（LMSモデル：Linearized Multi-stage Model）が用いられてきた。平成15年の水道水質基準改定およびWHO飲料水水質ガイドラインの第3版あたりまでの評価では、このLMSモデルが主流であったが、現在は2005年にUS EPAで公表された発がん性評価ガイドライン⁹⁾や、同年のJECFAの専門家会議¹⁰⁾において遺伝毒性発がん性化学物質の評価に用いられて以来、ベンチマークドース法を使用するのがほぼ国際的な標準となっている。ベンチマークドース法を用いた低用量外挿手法は、各数理モデルのモデル式から計算される低用量域におけるリスク値がモデルの種類によって大きく異なることを避けるため、動物実験の検出下限値にあたる10%発がんリスクに相当するベンチマークドース（BMDL₁₀）から曝露量0に向かった直線外挿を行うことによって行われる（図3）。この手法は、選択するモデルによるVSDの変動を小さくし、評価機関による計算結果の違いを少なくする可能性があるが、生物学的なモデルとしては最も保守的なVSDを算出することを意味している。このベンチマークドース法にて10⁻⁵あるいは10⁻⁶リスクのVSDを求める場合はBMDL₁₀からの直線外挿により、直線の傾き（スロープファクター）は（10⁻¹/BMDL₁₀）（mg kg⁻¹ day⁻¹）となる。例えばリスク10⁻⁵リスクにおけるVSDは、BMDL₁₀を10⁴

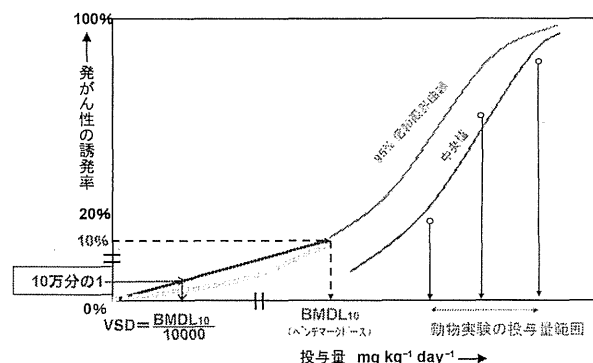


図3 閾値がないと考えられる場合のVSDの求め方

で除することで算出される。因みに、JECFAやEFSAでは直線外挿によるVSD相当のリスク計算を行っておらず、BMDL₁₀と推定曝露量との比で算出されるMOE（Margin of Exposure）という数値を評価の指標として採用している。しかし、リスク評価の結果としての懸念濃度を判断するMOEの値としては10⁴を用いており、10⁻⁵リスクにおけるVSDと推定曝露量を比較していることと数値上の比較評価としては同じ意味をなしている。

3. 毒性評価に基づいた水質基準値の設定

水質基準値の基となる健康影響評価値は、上記の手順によって求められたTDI（わが国においては食品安全委員会の設定したTDI）を基に、日本人の標準的な体重50 kgの人が1日あたり2 Lの水を摂取するとした場合の水の濃度として算出する。その際に、飲料水以外からの化学物質の総摂取量に対する飲料水経路の曝露寄与率を考慮して、水質基準のためにTDIの一部を割り当てる割当率（Allocation）を適用する。したがって、第2席でも示されているように健康影響評価値は以下の式で算出される。

$$\text{健康影響評価値} = \text{TDI (mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}\text{)} \times \text{割当率 (\%)} \times 50 \text{ kg} / 2 \text{ L}$$

一方、遺伝毒性発がん物質の健康影響評価値は、10⁻⁵リスクに相当する曝露量：VSDから同様に算出されるが、モデル推定による不確実性が大きいことを理由として割当率は適用されないため、健康影響評価値は以下の式で計算される。

$$\text{健康影響評価値} = \text{VSD (10}^{-5} \text{リスク) (mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}\text{)} \times 50 \text{ kg} / 2 \text{ L}$$

最終的に水質基準は、水道において維持されることが必要であることに鑑み、基準値の設定に当たっては、水処理技術および検査技術についても考慮される。具体的には、健康影響評価値が水道として実用可能な分析技術によって定量可能なレベルでない場合には、評価値に代えて一定の技術的手法によりその確保を図る方法（定量下限を評価値とすることを含む）や、現時点においては健康影響評価値を達成する水処理技術が存在しない場合には、BAT（Best Available Technology、利用可能な最善の技術）の考え方を取り入れて既存の処理技術で得ら

れる最小の値を基準値する方法が検討される。

4. おわりに

以上のように、遺伝毒性発がん物質とそれ以外の化学物質では、毒性評価の手順も含めると健康影響評価値の設定手法が大きく異なることが示される。このことは、遺伝子障害性に有無の判断が評価値の設定に大きく左右することも意味している。この際の毒性評価の閾値の有無の判定に直接関わる遺伝子障害性の判断は、単に遺伝毒性試験の結果が陽性であることだけに依存するわけではなく、そのメカニズムや動物種による代謝の違い、発がん性試験で認められた発がん率の用量依存性、投与経路による発がん感受性の違いなどの毒性情報を総合的に評価して、発がんのメカニズムがその一次反応として遺伝子への直接障害に基づくものであるとして判断する必要がある。たとえ、発がん性が明らかな物質でも、プロモーション作用や高用量曝露での細胞・組織障害からの修復過程を繰り返すことによって引き起こされる発がん性は閾値があるとの判断により TDI が設定されている。また、近年では、遺伝毒性試験として陽性を示す物質であっても、活性酸素の生成や染色体の構造異常を一次反応として誘発される二次的な遺伝子障害性は、間接的な反応であるとして閾値が設定できると考えられている。しかし、実際に多くの化学物質の評価において発がん性の閾値の有無を判断するための十分な知見が得られることは少ない。このようにに明らかに閾値が設定できる証拠がないときには、閾値の有る場合とない場合の両方のケースを想定して、両ケースにおける健康影響評価値を算出し、行政的には安全側に立った評価としてより低い評価値を採用する手法がとられている。現に食品安全委員会における清涼飲料水に関する物質の評価において臭素酸やジクロロ酢酸などの発がん性を示す物質については TDI とユニットリスクの両方が示されており、厚生省では、その両者から算出される健康影響評価値のうち低い方を健康影響評価値として採用する手順をとっている。

なお、一般的に 10^{-5} リスクの相当する VSD に基づいた健康影響評価値の方が TDI からもとめた健康影響評価値より低くなる傾向ではあるが、上記に示したように VSD を用いた場合には割当率が適用されていないので、もし発がん性以外のエンドポイントからもとめた TDI が 10^{-5} リスクの相当する VSD に近い値として評価された場合は、TDI 方から求めた健康影響評価値の方が低い値をとる可能性は十分にあり得る。また、割当率も健康影響評価値の算定に大きな影響をもたらすことが上記の式からも判断できる。日本の水道水質基準の設定において、曝露評価に関する情報がない場合はデフォルト値として 10%，消毒副生成物についてはデフォルト値として 20% が使用されているが、飲料水以外の曝露情報が得られる場合は、より適切な割当率を設定することが可能でありいくつかの適用事例については第 2 席で詳細に述べられ

ている。このような水質基準設定における割当率に関する問題は、不確実性の高さを理由にしているとはいえ遺伝子障害性の有無に依存して割り当て率の適用の対応が分かれているという問題と合わせて、将来的には適切な運用法を確立することが必要ではないかと考えられる。

さらに、現在、水質基準値のために設定されている健康影響評価値は、生涯曝露に基づく TDI が基になっているが、水質事故等にもなう一時的な水質管理指標値としての適用が困難な場合も想定される。また、水質基準が設定されていない化学物質の事故的な汚染に対応するための指標値の設定の必要性も指摘されている。US EPA では、Drinking Water Health Advisory (HA) Program において、突発的な流出や汚染が起きた際の公衆の健康を守るために公共用水システムの管理者を支援するため情報として、水質基準値の設定されていない多種類の化学物質に対して特定の曝露期間についての健康影響指標値を設定し公表している。わが国においてもこのような健康影響指標値の設定が今後の課題であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は厚生労働科学研究「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」(H25-健危一般-007) (研究代表者 松井佳彦) により行われた。

参考文献

- 1) 厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会, 2003. 水質基準の見直し等について (平成 15 年 4 月). URL: <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/s0428-4b.html> (2015 年 12 月時点).
- 2) WHO, 2008. Guidelines for drinking-water quality third edition incorporating first and second addenda Volume 1. WHO, Geneva.
- 3) 広瀬明彦, 2009. 4 章リスクアセスメント・リスクマネジメント. 日本トキシコロジー学会教育委員会編, 新版トキシコロジー. 朝倉書店, 東京.
- 4) NRC (Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, National Research Council), 1994. Science and Judgment in Risk Assessment. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- 5) WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality, fourth edition. WHO, Geneva.
- 6) WHO, 2005. Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability, guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf (2015 年 12 月時点).
- 7) Crump K., 1984. A new method for determining allowable daily intakes. Fund. Appl. Toxicol. 4, 854-871.
- 8) WHO, 2009. Principles for modeling dose-response for the risk assessment of chemicals. Environmental Health Criteria 239, 1-137.
- 9) US EPA, 2005. Notice of Availability of the Document Entitled Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Fed. Regist. 70, 17765-17817.
- 10) JECFA, 2006. Evaluation of certain food contaminants (Sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series 930.

Original Article

Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats: perfluorohexadecanoic acid and perfluorotetradecanoic acid

Mutsuko Hirata-Koizumi¹, Sakiko Fujii², Kato Hina¹, Mariko Matsumoto¹, Mika Takahashi¹,
Atsushi Ono¹ and Akihiko Hirose¹

¹Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

²Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., 363-24 Sin-ei, Kiyota-ku, Sapporo,
Hokkaido 004-0839, Japan

(Received August 27, 2015; Accepted September 2, 2015)

ABSTRACT — Perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) are global environmental contaminants that are the cause of concern due to their possible effects on wildlife and human health. Since few studies have investigated the toxicity of long-chain PFCAs, we have performed combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests. We previously examined perfluoroundecanoic acid (C11), perfluorododecanoic acid (C12), and perfluorooctadecanoic acid (C18). We here-in reported our results for perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA; C14) and perfluorohexadecanoic acid (PFHxDA; C16). Male and female rats were administered PFTeDA at 1, 3 or 10 mg/kg/day or PFHxDA at 4, 20 or 100 mg/kg/day by gavage, and each female was then mated with a male in the same dose group after 14 days. Males were dosed for a total of 42 days and females were dosed throughout the gestation period until day 5 after parturition. PFTeDA and PFHxDA caused hepatocyte hypertrophy and/or fatty changes in the liver at the middle and high doses. PFTeDA also induced follicular cell hypertrophy in the thyroid at the middle and high doses. The only reproductive/developmental effect observed was an inhibited postnatal body weight gain in pups in the 10 mg/kg/day PFTeDA group. Based on these results, the NOAELs for the repeated dose and reproductive/developmental toxicity were concluded to be 1 and 3 mg/kg/day for PFTeDA and 4 and 100 mg/kg/day for PFHxDA, respectively. Our current and previous results indicate that the toxicity of PFCAs decreases with increases in the carbon chain length from 12 to 18.

Key words: Perfluoroalkyl carboxylic acids, Perfluorotetradecanoic acid, Perfluorohexadecanoic acid, Repeated dose toxicity, Reproductive and developmental toxicity, Rat

INTRODUCTION

A large number of chemicals are industrially produced and used without appropriate evaluations of their potential hazards to human health. The toxicity of these chemicals is continuously assessed in Japan by safety programmes for existing chemicals. These programmes have recently targeted perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) with carbon chain lengths of 11 to 18.

PFCAs are global environmental contaminants that are the cause of concern due to their possible effects on human health (Hekster *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2007; Post *et al.*, 2012). Although extensive toxicological research

has been performed, especially on perfluorooctanoic acid (PFOA), which has a carbon chain length of 8, few studies have examined the toxicity of PFCAs with a carbon chain length of 11 and higher. Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests (combined studies) have been conducted by Japanese safety programmes for existing chemicals in order to obtain initial toxicological information on such long-chain PFCAs.

We have reported our findings in combined studies on perfluoroundecanoic acid (PFUnA, C11), perfluorododecanoic acid (PFDoA, C12) and perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA, C18) (Hirata-Koizumi *et al.*, 2012; Kato

Correspondence: Akihiko Hirose (E-mail: hirose@nihs.go.jp)

et al., in press; Takahashi *et al.*, 2014). We showed that the main toxic target of these long-chain PFCAs was the liver, but they also affected reproduction/development at the higher doses. Based on these findings, the NOAELs were concluded to be 0.1 mg/kg/day for PFUnA (C11) and PFDoA (C12) and 40 mg/kg/day for PFOcDA (C18). The value of NOAEL for repeated dose toxicity of PFOcDA (C18) was much higher than those of PFUnA (C11) and PFDoA (C12). The present study described the results obtained from combined studies on perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA, C14, CAS No. 376-06-7) and perfluorohexadecanoic acid (PFHxDA, C16, CAS No. 67905-19-5), whose carbon lengths are in between previously reported substances. In this paper, we discuss the toxicity of PFCAs in terms of their carbon chain length.

MATERIALS AND METHODS

Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests were performed on PFTeDA and PFHxDA at the Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd. (Sapporo, Japan), according to the OECD guidelines for testing chemicals No. 422 under good laboratory practice (GLP) standards.

Chemicals and treatment

PFTeDA (lot No. 3728, purity: 96.5%) and PFHxDA (lot No. 1262, purity: 95.3%) were obtained from Exflur Research Corporation (Round Rock, TX, USA). They were suspended in a 0.5% water solution of carboxymethylcellulose sodium, and administered by gavage. The homogeneity of test substances in the dosing solution and their stability until they were administered was confirmed before the start of the study. A separate control group was used for each chemical evaluation, and the control rats received vehicle only. The daily volume administered was 10 mL/kg, which was calculated based on the latest body weight. Dose levels were determined to be 1, 3, and 10 mg/kg/day for PFTeDA and 4, 20, and 100 mg/kg/day for PFHxDA based on the results of 14-day dose finding studies.

Animals and housing conditions

Eight-week-old male and female Crl:CD(SD) rats were purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc. (Yokohama, Japan). This species and strain was selected because its reproductive performance is stable and sufficient historical data was available on this strain at the laboratory.

Following quarantine and acclimation periods, the ani-

mals were subjected to oral administration of PFTeDA or PFHxDA at 10 weeks of age. They were housed individually, except for the mating and lactation periods, in bracket-type metallic cages with a wire-mesh floor, and maintained in an air-conditioned room with controlled temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 20\%$). Light was provided on a 12-hr light/dark cycle (light: 8:00-20:00). All animals were fed *ad libitum* with a standard rat diet (CRF-1; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) and tap water. Pregnant females were reared using wood chips as bedding from day 17 of gestation to day 4 after delivery.

The present study protocols were approved by the Ethical Committee for animal experiments in the Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., and performed in accordance with the standard operational procedure contained in the Institutional Ethical Code for Animal Experiments. The use and care of animals complied with the Act on Welfare and Management of Animals (Japanese Animal Welfare Law, Act No. 105 of October 1, 1973. As amended up to Act No. 50 of June 2, 2006), Standards Relating to the Care, Management of Laboratory Animals and, Relief of Pain (Announcement No. 88 of Ministry of the Environment, Japan, dated April 28, 2006) and Guidelines for Animal Experimentation (Japanese Association for Laboratory Animal Science, dated May 22, 1987).

Study design

Male rats (12 animals/dose) were administered PFTeDA or PFHxDA for 14 days and then cohabited with females. This administration of PFTeDA or PFHxDA was continued during and after the mating period, and seven males in the control and high dose groups and all of animals in the low and middle dose groups were euthanized after a 42-day administration (main group). The remaining rats were maintained without the administration of PFTeDA or PFHxDA for 14 days after a 42-day administration and then euthanized for examination (recovery group).

Female rats were assigned to the main group or recovery group before PFTeDA and PFHxDA were administered. The number of females was 12 per dose in the main group, and PFTeDA or PFHxDA was administered for 14 days before mating, and continued throughout the mating, gestation, and lactation periods up to 5 days after parturition. In the recovery group, 5 females/dose (vehicle control and high dose only) were administered for 42 days without mating and euthanized after the 14-day recovery period.

Repeated dose toxicity evaluation

All animals were observed twice daily for general appearance and behavior. Detailed clinical observations, including evaluations in the home cage, during handling and outside the home cage in an open field, were also conducted using a standardized scoring system once a week. Body weight and food consumption was measured at regular intervals (at least once a week).

Males and females in the recovery group were subjected to urinalysis and functional observations in the sixth week of the administration period and second week of the recovery period. Functional observations were also performed for females in the main group on day 4 of lactation. The parameters examined were as follows:

- Functional observations: sensory reactivity to visual, tactile, auditory, pain, and proprioceptive stimuli, mid-air righting reflex, forelimb and hindlimb grip strength, and spontaneous motor activity
- Urinalysis: pH, protein, glucose, ketone body, urobilinogen, bilirubin, occult blood, color, urine volume, and specific gravity

The effects of the administration of PFTeDA and PFHxDA on hematology, blood biochemistry, organ weight, and histopathology were examined on the day after the final administration in the main group and after the completion of the recovery period in the recovery group. Serum thyroid-related hormone levels were also analyzed in the study on PFHxDA because changes were observed in thyroid weight.

The surviving rats were anesthetized deeply after 16- to 22-hr of starvation, and blood samples were collected from the abdominal aorta. The animals were then euthanized by exsanguination, and the organs and tissues of the entire body were examined macroscopically. The major organs were isolated and weighed, and organ weight per body weight (relative weight) was calculated. The eyeball and Harderian gland were fixed and preserved with Davidson's fixative solution. The testis and epididymis were fixed with Bouin's solution and preserved in 70% ethanol. The other organs were stored in 10% neutral-buffered formalin. All preserved organs in the control and high dose groups were sectioned, stained with hematoxylin-eosin, and examined under a light microscope. If treatment-related histopathological changes were found, the same tissues were examined in the low and middle dose groups. The parameters and organs examined were as follows:

- Hematology: red blood cell count, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, reticulocyte count, plate-

let count, white blood cell count, differential count of white blood cells, prothrombin time (PT), and activated partial thromboplastin time (APTT)

- Blood biochemistry: total protein, albumin, albumin/globulin ratio, protein fraction ratio, glucose, total cholesterol, triglyceride, total bilirubin, urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltranspeptidase, calcium, inorganic phosphorus (IP), sodium (Na), potassium, and chlorine (Cl)
- Hormonal analysis (only in the study on PFHxDA): triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), and thyroid-stimulating hormone (TSH)
- Organ weight: the brain, pituitary gland, thyroid, heart, liver, spleen, kidney, adrenal gland, thymus, testis, epididymis, prostate gland, seminal vesicle, and ovary
- Histopathology: the brain, spinal cord, pituitary gland, thymus, thyroid, adrenal gland, spleen, heart, esophagus, stomach, liver, pancreas, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, trachea, lung, kidney, bladder, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle, ovary, uterus, eyeball, Harderian gland, mammary gland, femur, mesenteric and mandibular lymph nodes, sciatic nerve, and grossly abnormal tissues

Reproductive/developmental toxicity evaluation

The estrous cyclicity was evaluated daily by vaginal lavage sampling from the first day of the administration period until evidence of copulation was detected in the main group and until the necropsy day in the recovery group. Females having repeated 4-6 day estrous cycles were judged to have normal estrous cycles.

During the mating period, males and females randomly selected from the same dose group were cohabited on a 1:1 basis until successful copulation occurred for a maximum of 14 days. The presence of sperm in the vaginal smear and/or a vaginal plug was considered to be evidence of successful mating. The day of successful mating was designated as day 0 of gestation. Successfully cohabited females were allowed to spontaneously deliver and nurse their pups until the end of the study. They were checked at least three times daily on days 21-25 of gestation, and the day on which dams held their pups under the abdomen in the nest by 9:00 was designated as day 0 of lactation or postnatal day (PND) 0. Gestational length was recorded, and the following indices were computed for each dose group.

$$\text{Copulation index (\%)} = \frac{\text{Number of animals with successful copulation}}{\text{Number of animals cohabited}} \times 100$$

$$\text{Fertility index (\%)} = \frac{\text{Number of pregnant females}}{\text{Number of pairs with successful copulation}} \times 100$$

$$\text{Gestation index (\%)} = \frac{\text{Number of females with live pups}}{\text{Number of pregnant females}} \times 100$$

All live and dead pups born were counted, and live pups were sexed and examined grossly on PND 0. They were observed daily for general appearance and behavior, and the body weight of live pups was recorded on PNDs 0, 1, and 4. On PND 4, the pups were euthanized and subjected to a gross external and internal observation. At necropsy of maternal animals, the numbers of corpora lutea in the ovary and implantation sites in the uterus were recorded.

Statistical analysis

Parametric data were evaluated by Bartlett's test for the homogeneity of variances. The neonatal sex ratio and body weights of male and female pups were analyzed using the litter as the experimental unit. When homogeneity was recognized, a one-way analysis of variance was applied. If a significant difference was found, Dunnett's test was used for pairwise comparisons between the control and individual treatment groups. Data without homo-

geneity were subjected to the Kruskal-Wallis test, and if significant differences were detected, the Mann-Whitney U test was used to compare PFTeDA- or PFHxDA-treated groups with the correspondent control group.

The results of the detailed clinical and functional observations, qualitative parameters of urinalysis, specific gravity of urine, and histopathological findings with multiple grades were evaluated for the trend in each group by the Kruskal-Wallis test. When significant differences were found, data were compared between the control and each dosage group using the Mann-Whitney U test. The incidence of females with normal estrous cycles, copulation, fertility, and gestation indices, and histopathological findings with a single grade were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test.

RESULTS

Perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA; C14)

Repeated dose toxicity

No treatment-related abnormalities were observed in general appearance or behavior throughout the administration and recovery periods. In the 10 mg/kg/day group, the body weights of male rats were significantly lower than those in the control group on days 7 and 14 of the recovery period (Fig. 1). Although similar results were observed in the female recovery group, significant differences were not observed from the control. Body weights in the female main group were significantly lower on day 4 of the lactation period at 3 mg/kg/day and during the lactation period at 10 mg/kg/day. A significant decrease in food consumption was only found in females given

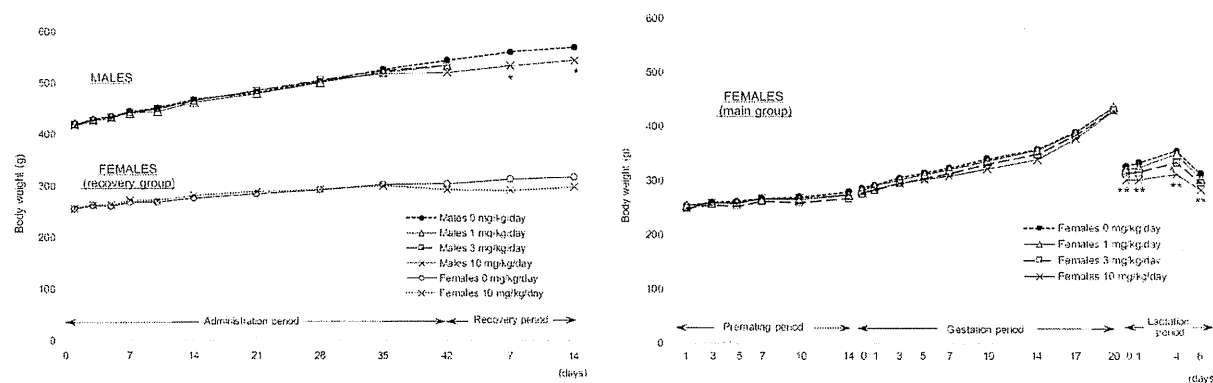


Fig. 1. Body weight changes in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test for PFTeDA in rats. *: Significantly different from the control, $P \leq 0.05$. **: Significantly different from the control, $P \leq 0.01$.

Toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids

10 mg PFTeDA/kg/day in the main group on days 5 and 10 of gestation and on day 4 of lactation (data not shown).

At the end of the administration period, the hindlimb grip strength of male rats decreased in a dose-dependent manner, and a significant difference from the control was found in the 3 and 10 mg/kg/day groups (Fig. 2). No significant changes were observed in grip strength in males of the recovery group or in females. Furthermore, no significant differences were observed in urinalysis parameters between the PFTeDA-treated and control groups, either at the end of the administration period or at the end of the recovery period (data not shown).

In the main group, the only significant effect observed on hematology was a shortening in APTT in males given 10 mg PFTeDA/kg/day (Table 1). Blood biochemical examinations showed significant decreases in total protein in males and the β -globulin fraction in both sexes at 10 mg/kg/day (Table 1). Significant increases were also observed in ALP and BUN in males and Cl in females in the 10 mg/kg/day group. Absolute and relative liver weights were significantly increased at 3 and 10 mg/kg/day in males (Table 1). A significant increase in the relative liver weight was also found in females at 10 mg/kg/day. In males, the absolute weight of the pituitary gland was significantly decreased at 3 and 10 mg/kg/day and the relative weight was also significantly decreased at 3 mg/kg/day. The absolute weight of the seminal vesicle was significantly decreased at all doses.

Histopathologically, centrilobular hepatocyte hypertrophy was observed in males at 3 and 10 mg/kg/day and

in females at 10 mg/kg/day (Table 2). Microgranulomas were noted in the liver of both sexes in all groups containing the control; however, the extent of these was significantly higher in females given 10 mg PFTeDA/kg/day. Focal necrosis was detected in the liver of one female given 10 mg PFTeDA/kg/day. Follicular cell hypertrophy was observed in the thyroids of males at 3 and 10 mg/kg/day. In females, the incidences of decreases in extramedullary hematopoiesis in the spleen and cortex atrophy in the thymus were significantly increased at 10 mg/kg/day. No treatment-related changes were detected in histopathology in other organs, including the pituitary gland and seminal vesicle.

In the recovery group, the hemoglobin concentration and hematocrit value were significantly decreased, and PT was significantly shortened in females in the 10 mg/kg/day group (Table 1). Significant increases were also observed in ALP and IP and decreases in triglyceride levels in males, as well as a significant decrease in total cholesterol and increase in BUN in females in the 10 mg/kg/day group. In this group, the absolute and/or relative liver weights were significantly increased, and histopathologically, centrilobular hypertrophy of hepatocytes, diffuse hypertrophy of hepatocytes or diffuse fatty change was found in the liver (Table 2). Hypertrophy of follicular cells was observed in the thyroids of two males in the 10 mg/kg/day group.

Reproductive/developmental toxicity

Reproductive/developmental results are summarized in Table 3. No significant changes were found in reproduc-

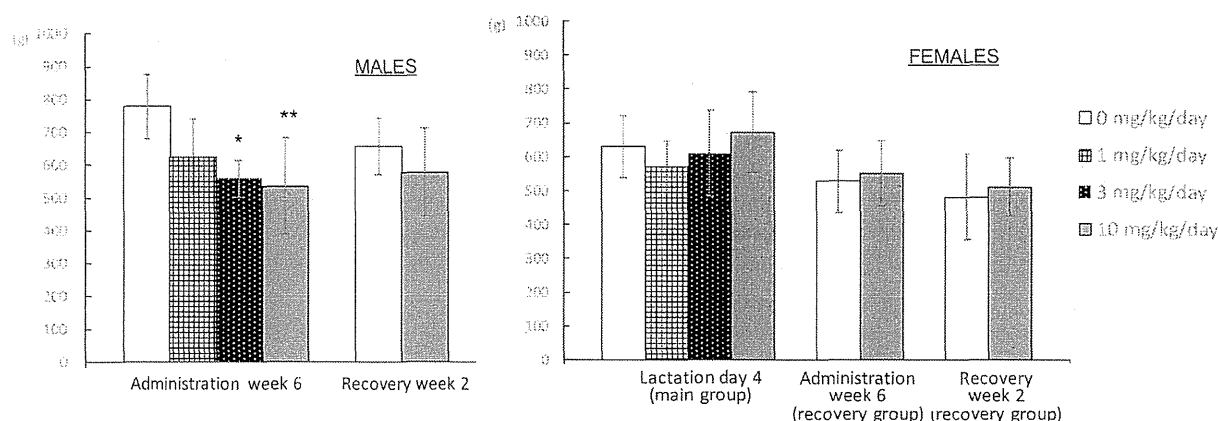


Fig. 2. The hindlimb grip strength of male and female rats in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test for PFTeDA. *: Significantly different from the control, $P \leq 0.05$. **: Significantly different from the control, $P \leq 0.01$.

Table 1. Significant changes in hematological and blood biochemical parameters and organ weights in rats given PFTeDA.

Dose (mg/kg/day)	At the end of the administration period (Main group)				At the end of the recovery period (Recovery group)	
	0	1	3	10	0	10
MALES						
<i>Hematology</i>						
Hemoglobin (g/dL)	15.78 ± 0.61	16.00 ± 0.85	15.90 ± 0.55	15.98 ± 0.77	16.42 ± 0.38	15.88 ± 0.61
Hematocrit (%)	44.86 ± 2.02	45.26 ± 2.10	44.80 ± 1.81	45.16 ± 2.38	46.16 ± 1.04	45.50 ± 1.99
PT (sec)	21.56 ± 6.33	22.46 ± 0.78	22.74 ± 2.34	21.78 ± 4.27	20.10 ± 3.33	21.14 ± 1.62
APTT (sec)	27.42 ± 3.61	28.18 ± 1.36	26.42 ± 1.97	23.62 ± 1.28*	25.78 ± 2.34	24.68 ± 3.86
<i>Blood biochemistry</i>						
Total protein (g/dL)	5.74 ± 0.19	5.66 ± 0.21	5.78 ± 0.30	5.26 ± 0.11**	5.80 ± 0.12	5.52 ± 0.34
β-Globulin fraction of protein (%)	17.12 ± 0.91	16.14 ± 0.80	16.24 ± 0.57	15.68 ± 0.99*	16.40 ± 0.72	16.36 ± 0.51
ALP (IU/L)	363.2 ± 81.5	352.6 ± 113.1	355.0 ± 51.8	520.8 ± 75.6*	334.2 ± 51.7	470.4 ± 67.3**
Triglyceride (mg/dL)	36.0 ± 9.4	50.4 ± 22.1	46.4 ± 17.1	21.8 ± 6.3	59.2 ± 14.2	31.8 ± 8.9**
Total cholesterol (mg/dL)	60.0 ± 9.9	53.8 ± 6.0	44.0 ± 11.2	50.8 ± 14.7	63.8 ± 18.9	50.6 ± 10.7
BUN (mg/dL)	14.26 ± 1.43	14.02 ± 1.47	16.00 ± 1.71	19.88 ± 1.99**	14.82 ± 1.04	16.20 ± 2.11
Cl (mEq/L)	106.8 ± 1.3	107.4 ± 1.8	107.0 ± 0.7	108.4 ± 2.3	105.4 ± 1.1	106.6 ± 1.1
IP (mg/dL)	6.36 ± 0.47	6.04 ± 0.50	6.42 ± 0.60	6.98 ± 0.44	6.20 ± 0.33	6.68 ± 0.29*
<i>Organ weight</i>						
Liver (g)	11.95 ± 1.53	12.09 ± 0.73	14.52 ± 1.82*	15.21 ± 0.53**	13.09 ± 0.95	16.41 ± 0.48**
(%)	2.41 ± 0.11	2.49 ± 0.12	2.87 ± 0.23**	3.25 ± 0.07**	2.43 ± 0.15	3.18 ± 0.16**
Pituitary gland (mg)	13.20 ± 0.74	13.06 ± 1.17	11.18 ± 0.87*	11.48 ± 1.07*	13.10 ± 2.46	13.70 ± 1.04
(10 ⁻³ %)	2.69 ± 0.28	2.69 ± 0.26	2.22 ± 0.21*	2.46 ± 0.28	2.43 ± 0.44	2.65 ± 0.21
Seminal vesicle (g)	2.53 ± 0.51	2.00 ± 0.19*	2.01 ± 0.29*	1.91 ± 0.15*	2.18 ± 0.12	2.14 ± 0.42
(%)	0.512 ± 0.102	0.412 ± 0.035	0.402 ± 0.077	0.408 ± 0.023	0.402 ± 0.029	0.414 ± 0.074
FEMALES						
<i>Hematology</i>						
Hemoglobin (g/dL)	15.14 ± 0.40	14.68 ± 0.70	15.02 ± 0.87	15.50 ± 0.60	15.68 ± 0.62	14.46 ± 0.68*
Hematocrit (%)	43.94 ± 2.17	43.24 ± 2.58	44.26 ± 2.83	44.94 ± 1.48	44.34 ± 1.67	40.90 ± 1.95*
PT (sec)	18.78 ± 0.93	17.60 ± 1.04	17.76 ± 0.47	17.52 ± 1.32	17.26 ± 0.50	16.12 ± 0.87*
APTT (sec)	19.00 ± 0.46	19.54 ± 0.52	19.88 ± 0.60	19.44 ± 0.75	18.28 ± 1.30	19.48 ± 1.03
<i>Blood biochemistry</i>						
Total protein (g/dL)	6.30 ± 0.22	6.52 ± 0.25	6.40 ± 0.23	6.12 ± 0.44	6.46 ± 0.32	6.30 ± 0.28
β-Globulin fraction of protein (%)	18.32 ± 0.54	17.32 ± 1.15	17.56 ± 0.98	15.90 ± 0.92**	14.86 ± 0.98	14.54 ± 0.48
ALP (IU/L)	196.8 ± 54.0	174.0 ± 33.7	177.8 ± 51.3	236.0 ± 32.1	177.6 ± 51.8	234.2 ± 72.9
Triglyceride (mg/dL)	49.6 ± 29.2	43.0 ± 10.9	47.6 ± 13.9	29.2 ± 18.0	15.8 ± 7.7	18.8 ± 16.5
Total cholesterol (mg/dL)	68.8 ± 12.2	63.0 ± 14.5	57.2 ± 10.9	51.2 ± 15.4	75.8 ± 11.6	56.6 ± 10.6*
BUN (mg/dL)	25.58 ± 2.73	24.08 ± 2.27	23.80 ± 3.17	30.44 ± 4.18	15.00 ± 1.60	20.24 ± 4.60*
Cl (mEq/L)	102.6 ± 2.3	103.8 ± 0.8	105.0 ± 1.6	105.8 ± 0.8*	108.4 ± 2.2	107.4 ± 1.1
IP (mg/dL)	9.08 ± 0.91	8.86 ± 0.79	8.20 ± 0.45	8.30 ± 0.60	4.70 ± 0.85	5.64 ± 0.61
<i>Organ weight</i>						
Liver (g)	10.14 ± 0.75	10.96 ± 1.13	10.17 ± 0.19	10.44 ± 0.89	7.18 ± 0.69	7.90 ± 1.07
(%)	3.33 ± 0.17	3.49 ± 0.21	3.42 ± 0.16	3.70 ± 0.29*	2.40 ± 0.27	2.83 ± 0.27*
Pituitary gland (mg)	16.26 ± 2.43	17.44 ± 1.80	16.54 ± 0.93	15.82 ± 2.99	16.32 ± 2.29	18.06 ± 3.75
(10 ⁻³ %)	5.37 ± 0.97	5.58 ± 0.62	5.56 ± 0.24	5.67 ± 1.37	5.44 ± 0.63	6.42 ± 1.04

Data are shown as the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control group at $P \leq 0.05$.**: Significantly different from the control group at $P \leq 0.01$.

Toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids

Table 2. Histopathological findings in the combined repeated dose toxicity study with reproduction/developmental toxicity screening test for PFTeDA in rats.

Dose (mg/kg/day)		At the end of the administration period (Main group)				At the end of the recovery period (Recovery group)	
		0	1	3	10	0	10
MALES							
Number of examined animals		7	12	12	7	5	5
Liver							
- Centrilobular hypertrophy of hepatocytes	+	0	0	6	0	0	2
	++	0	0	2	7	0	3
]]]
				*	**		**
- Microgranuloma	+	4	10	6	1	3	4
- Diffuse fatty change	+	0	0	0	0	0	2
Thyroid							
- Hypertrophy of follicular cells	+	0	0	4	4	0	2
FEMALES							
Number of examined animals		12	12	12	12	5	5
Liver							
- Centrilobular hypertrophy of hepatocytes	+	0	0	0	9**	0	2
- Diffuse hypertrophy of hepatocytes	+	0	0	0	0	0	2
]]
					**		
- Microgranuloma	+	6	9	8	3	4	1
	++	0	0	0	7	0	3
- Focal necrosis	+	0	0	0	1	0	0
Spleen							
- Decrease in extramedullary hematopoiesis	+	2	0	2	8*	0	0
Thymus							
- Cortex atrophy	+	1	2	1	8**	0	0

Values represent the number of animals with findings.

+: Slight change, ++: moderate change

*: Significantly different from the control group at $P \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control group at $P \leq 0.01$.

Brackets in the data columns mean that statistical analysis was performed for a total number of animals with findings in consideration of grades.

tive parameters, including estrous cyclicity, the copulation index, fertility index, gestation index or gestation length. No significant differences were observed in the number of corpora lutea, implantation sites, delivered pups, or live pups on PNDs 0 and 4, or in the sex ratio of live pups between the PFTeDA-treated and control groups. In the 10 mg/kg/day group, the body weights of male and female pups were significantly lower on PNDs 1 and 4. There were no abnormalities in the general appearance or necropsy findings of neonates.

Perfluorohexadecanoic acid (PFHxDA: C16)

Repeated dose toxicity

No treatment-related clinical signs of toxicity were observed throughout the study. The body weights of males in the 100 mg/kg/day group were significantly lower than those of the control on days 35 and 42 of the administration period (Fig. 3). Such effects on body weight were

not detected in the females. Food consumption was significantly reduced on day 14 of the recovery period in males given 100 mg PFHxDA/kg/day, on days 5-14 of the gestation period, and on day 4 of the lactation period in females given 100 mg PFHxDA/kg/day in the main group (data not shown).

A functional observation at the end of the administration period revealed no significant changes in any of the PFHxDA-treated groups, but a significant decrease in hindlimb grip strength at the end of recovery period in both sexes given 100 mg PFHxDA/kg/day (Fig. 4). No significant difference was seen in any urinalysis parameters between the control and PFHxDA-treated groups either at the end of the administration period or at the end of the recovery period (data not shown).

At the end of the administration period, no significant differences were observed in any hematological parameters between the control and PFHxDA-treated groups

Table 3. Reproductive/developmental findings in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental screening test for PFTeDA in rats.

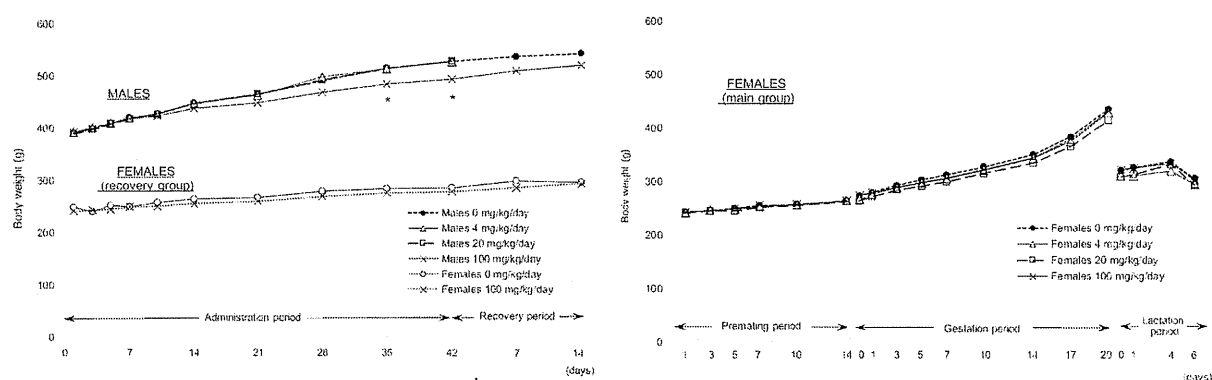
Dose (mg/kg/day)	0	1	3	10
Incidence of females with normal estrous cycle ^a (%)	91.7	91.7	91.7	100
Estrous cycle length ^{a, b} (days)	4.06 ± 0.21	4.00 ± 0.00	3.98 ± 0.17	4.06 ± 0.20
Number of cohabited pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)				
Males	91.7	91.7	100	100
Females	100	100	100	100
Fertility index (%)	100	100	91.7	100
Gestation index (%)	100	100	100	100
Gestation length ^b (days)	22.3 ± 0.7	22.3 ± 0.5	22.2 ± 0.4	22.0 ± 0.0
Number of pregnant females	12	12	11	12
Number of corpora lutea ^b	16.7 ± 1.9	16.4 ± 1.8	16.1 ± 1.6	17.0 ± 2.2
Number of implantation sites ^b	16.0 ± 1.7	16.2 ± 1.6	15.9 ± 1.8	16.4 ± 2.0
Number of pups delivered ^b	14.5 ± 3.8	15.3 ± 2.0	15.3 ± 2.1	15.8 ± 1.8
Sex ratio of pups (male pups / all pups) ^b	0.470 ± 0.113	0.532 ± 0.101	0.481 ± 0.132	0.547 ± 0.116
Number of live pups ^b				
on PND 0	14.5 ± 3.8	15.3 ± 2.0	15.2 ± 2.0	15.8 ± 1.8
on PND 4	14.1 ± 3.6	15.0 ± 1.9	15.1 ± 1.8	15.2 ± 1.3
Body weight of male pups ^b (g)				
on PND 0	6.58 ± 0.93	6.62 ± 0.76	6.43 ± 0.41	6.01 ± 0.34
on PND 1	7.32 ± 1.14	7.19 ± 0.89	6.97 ± 0.52	6.31 ± 0.46**
on PND 4	10.66 ± 2.03	10.53 ± 1.31	9.93 ± 0.76	8.77 ± 0.85**
Body weight of female pups ^b (g)				
on PND 0	6.29 ± 0.81	6.28 ± 0.68	6.05 ± 0.34	5.78 ± 0.36
on PND 1	6.99 ± 1.03	6.83 ± 0.78	6.53 ± 0.49	6.05 ± 0.45**
on PND 4	10.18 ± 1.72	9.98 ± 1.21	9.35 ± 0.68	8.41 ± 0.85**

a: Data of the main group are shown. No significant changes in estrous cycle normality were found in the recovery group, either.

b: Data are shown as the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control group at $P \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control group at $P \leq 0.01$.

**Fig. 3.** Body weight changes in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test for PFHxDA in rats. *: Significantly different from the control, $P \leq 0.05$.

Toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids

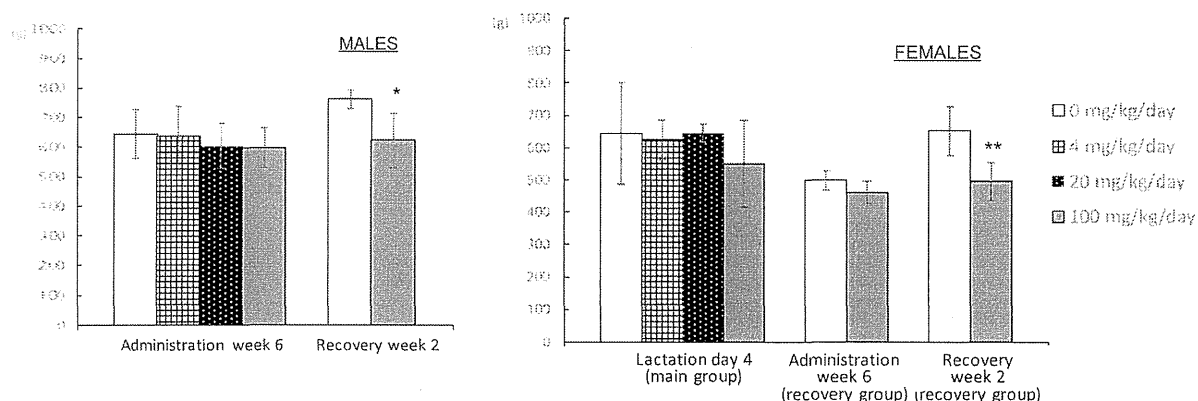


Fig. 4. The hindlimb grip strength of male and female rats in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test for PFHxDA. *: Significantly different from the control, $P \leq 0.05$. **: Significantly different from the control, $P \leq 0.01$.

(data not shown). Serum Cl levels were significantly increased at 100 mg/kg/day in males and at 20 and 100 mg/kg/day in females (Table 4). A significant decrease in serum total bilirubin levels and significant increases in BUN and serum Na levels were also detected in females given 100 mg PFHxDA/kg/day. In males, the absolute and relative liver weights were significantly increased in the 100 mg/kg/day group (Table 4). The relative thyroid weight was significantly increased at 20 and 100 mg/kg/day, with a significant increase also being observed in the absolute weight at 20 mg/kg/day in males. The analysis of serum thyroid-related hormones revealed significantly decreased T_3 in females in all PFHxDA-treated groups. The histopathological examination revealed the centrilobular hypertrophy of hepatocytes in males at 20 mg/kg/day and in both sexes at 100 mg/kg/day (Table 5). Centrilobular fatty changes were also observed in males at 20 and 100 mg/kg/day. No treatment-related histopathological changes were detected in other organs including the thyroid.

A significant decrease was noted in serum total bilirubin levels in both sexes as well as a significant increase in serum Cl level in females in the 100 mg/kg/day group after the 14-day recovery period (Table 4). Serum T_4 levels were significantly decreased in males in the 100 mg/kg/day group. Absolute and relative liver weights in males still remained higher, and in addition, significant decreases were found in absolute and relative adrenal weights in the 100 mg/kg/day group. Histopathologically, the centrilobular hypertrophy of hepatocytes was observed in both sexes as well as centrilobular fatty changes in one male in the 100 mg/kg/day group (Table 5).

Reproductive/developmental toxicity

PFHxDA did not significantly affect any reproductive/developmental parameters (Table 6). Although the body weights of male and female pups on PND 4 were slightly lower in the 100 mg/kg/day group, no significant difference was observed from those in the control group. There were no abnormalities in the general appearance or necropsy findings of neonates.

DISCUSSION

The present study was performed to obtain initial information on the repeated dose and reproductive/developmental toxicity of PFTeDA (C14) and PFHxDA (C16). The results obtained demonstrated that the main toxic target of these compounds was the liver, which was similar to PFUnA (C11), PFDoA (C12), and PFOcDA (C18), which we had examined previously (Hirata-Koizumi *et al.*, 2012; Kato *et al.*, in press; Takahashi *et al.*, 2014).

The hepatic effects of PFCAs in rodents have been attributed, at least partly, to the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) (Lau *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2012). PPAR α is a nuclear receptor that plays an important role in regulating fatty acid metabolism in tissues such as the liver, kidney, heart, and intestinal mucosa (Corton *et al.*, 2000). In the present study, the blood biochemical examination did not reveal any clear effects on lipid metabolism; however, PFTeDA (C14) and PFHxDA (C16) decreased serum total cholesterol in the 14-day dose finding study performed at higher doses. Although the PPAR α agonist activities of PFTeDA and PFHxDA are unknown, PFDoA (C12), which is very similar in

Table 4. Significant changes in blood biochemical parameters, serum thyroid-related hormone levels and organ weights in rats given PFHxDA.

Dose (mg/kg/day)	At the end of the administration period (Main group)				At the end of the recovery period (Recovery group)	
	0	4	20	100	0	100
MALES						
<i>Blood biochemistry</i>						
Total bilirubin (mg/dL)	0.062 ± 0.008	0.056 ± 0.011	0.058 ± 0.015	0.064 ± 0.011	0.064 ± 0.013	0.044 ± 0.005*
BUN (mg/dL)	14.54 ± 0.88	14.52 ± 1.54	14.98 ± 1.60	17.52 ± 2.81	16.16 ± 1.18	15.12 ± 1.31
Na (mEq/L)	144.2 ± 1.6	144.4 ± 1.7	144.4 ± 1.1	145.4 ± 0.9	144.2 ± 1.5	144.4 ± 0.5
Cl (mEq/L)	106.8 ± 1.3	108.2 ± 2.3	107.4 ± 0.9	109.6 ± 1.5*	106.2 ± 1.1	108.0 ± 1.4
<i>Hormonal analysis</i>						
T ₃ (ng/mL)	0.450 ± 0.070	0.466 ± 0.076	0.390 ± 0.060	0.436 ± 0.119	0.474 ± 0.123	0.452 ± 0.061
T ₄ (ng/mL)	69.71 ± 14.91	74.73 ± 10.93	80.05 ± 8.65	71.38 ± 3.83	117.50 ± 15.00	89.25 ± 11.87*
TSH (ng/mL)	3.732 ± 1.491	6.586 ± 2.712	7.064 ± 5.351	9.682 ± 6.029	13.314 ± 5.530	13.564 ± 3.229
<i>Organ weight</i>						
Liver (g)	12.15 ± 1.27	11.81 ± 0.55	12.12 ± 0.85	14.50 ± 0.61**	12.38 ± 1.40	14.62 ± 1.35*
(%)	2.50 ± 0.04	2.45 ± 0.10	2.49 ± 0.15	3.26 ± 0.07**	2.40 ± 0.17	2.97 ± 0.33**
Thyroid (mg)	18.94 ± 1.6	20.58 ± 1.53	24.26 ± 4.28*	22.16 ± 3.26	21.90 ± 3.98	22.40 ± 4.10
(10 ⁻³ %)	3.94 ± 0.58	4.27 ± 0.34	4.98 ± 0.78*	4.98 ± 0.67*	4.26 ± 0.82	4.54 ± 0.84
Adrenal (mg)	70.0 ± 2.1	58.4 ± 11.9	62.4 ± 9.9	57.8 ± 8.4	70.4 ± 3.8	55.2 ± 6.1**
(10 ⁻³ %)	14.52 ± 1.43	12.09 ± 2.41	12.91 ± 2.56	13.03 ± 2.03	13.69 ± 0.72	11.17 ± 1.14**
FEMALES						
<i>Blood biochemistry</i>						
Total bilirubin (mg/dL)	0.080 ± 0.007	0.076 ± 0.005	0.072 ± 0.013	0.060 ± 0.000**	0.084 ± 0.015	0.054 ± 0.011**
BUN (mg/dL)	25.78 ± 2.35	27.82 ± 2.05	28.22 ± 4.41	31.18 ± 1.55*	16.66 ± 1.08	15.50 ± 1.09
Na (mEq/L)	140.8 ± 0.8	142.2 ± 0.8	142.6 ± 1.5	142.8 ± 1.3*	144.6 ± 1.1	145.0 ± 0.7
Cl (mEq/L)	104.0 ± 0.7	105.0 ± 0.7	106.2 ± 1.3*	106.8 ± 1.6**	108.8 ± 0.8	109.8 ± 0.4*
<i>Hormonal analysis</i>						
T ₃ (ng/mL)	0.734 ± 0.023	0.606 ± 0.036**	0.626 ± 0.068**	0.532 ± 0.040**	0.784 ± 0.143	0.684 ± 0.032
T ₄ (ng/mL)	65.48 ± 9.30	65.56 ± 15.86	61.86 ± 7.57	66.36 ± 14.85	46.26 ± 16.70	58.48 ± 7.11
TSH (ng/mL)	4.478 ± 1.454	5.434 ± 5.130	4.408 ± 2.329	8.338 ± 4.661	3.758 ± 0.859	28.772 ± 54.988
<i>Organ weight</i>						
Liver (g)	10.17 ± 0.48	9.70 ± 0.61	10.00 ± 0.81	10.53 ± 0.75	6.95 ± 0.37	7.48 ± 1.00
(%)	3.39 ± 0.12	3.27 ± 0.21	3.35 ± 0.15	3.55 ± 0.20	2.49 ± 0.11	2.71 ± 0.28
Thyroid (mg)	19.28 ± 3.06	15.78 ± 2.95	16.96 ± 3.42	18.04 ± 1.99	18.42 ± 1.97	16.88 ± 3.46
(10 ⁻³ %)	6.40 ± 0.78	5.30 ± 0.86	5.71 ± 1.27	6.07 ± 0.55	6.60 ± 0.79	6.09 ± 1.01
Adrenal (mg)	76.4 ± 5.8	79.6 ± 6.0	79.4 ± 7.9	75.4 ± 7.9	67.0 ± 3.5	74.2 ± 12.4
(10 ⁻³ %)	25.44 ± 1.68	26.80 ± 2.00	26.59 ± 2.12	25.43 ± 2.77	23.98 ± 1.11	26.95 ± 4.70

Data are shown as the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control group at $P \leq 0.05$.**: Significantly different from the control group at $P \leq 0.01$.

structure, was recently reported to activate mouse PPAR α in transiently transfected COS-1 cells (Wolf *et al.*, 2012) and induce the mRNA levels of the important PPAR α target genes, acyl CoA oxidase and CYP4A1, in the rat liver (Zhang *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009). These findings indicated that PFTeDA and PFHxDA may activate PPAR α , which may in turn affect the liver. Regarding the mechanism underlying the hepatotoxicity of PFCAs, many studies have examined PFOA (C8) and showed

that PFOA could elicit changes in the liver not only via PPAR α activation, but also through PPAR α -independent mechanisms (Peters and Gonzalez, 2011). The involvement of other transcription factors such as the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor has been implied. Further research is needed to clarify the mechanism involved in the hepatotoxicity of PFCAs including PFTeDA and PFHxDA.

PFTeDA (C14) induced follicular cell hypertrophy in