別添３

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

食品を介したPFAS経口曝露に伴う毒性影響のバイオマーカー探索に関する研究（24KA3001）

研究代表者　畝山　瑞穂　国立医薬品食品衛生研究所病理部・研究員

研究要旨

ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）の健康影響についての懸念が国内外で高まっている。PFASには化学構造特性の異なる多様な物質が含まれるが、毒性の実態についてはごく一部の化合物で検索されているのみであり、全体像については明らかになっていない。そこで本研究では、毒性影響が不明であるPFASについてその詳細な生体影響を明らかにするとともに、化学構造グループごとの生体影響の異同を検証し、様々なPFASによる毒性影響の検出に有用なバイオマーカーを創出することを目的とした。

令和7年度は前年度に引き続き、毒性データが不明あるいは不十分であったPerfluorobutanesulfonic acid（PFBS、スルホン酸類）、2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-1-butanol（3:1FTOH、n:1フルオロテロマー類）、Perfluoro-2-butyltetrahydrofuran（FC-75、アルキルエーテル類）の3化合物について雄性Crl:CD(SD)ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験の実施および解析を行った。

PFBSについて血清濃度解析を実施したところ、血清PFBS濃度は用量依存的に増加した一方、肝臓における遺伝子発現等との有意な相関は認められなかった。3:1FTOHについて0、100、300、1000 mg/kg/dayの用量で28日間反復経口投与毒性試験を実施したところ、1000 mg/kg/day群において一過性の歩様異常、肝機能および腎機能への影響が認められ、本試験における無毒性量は300 mg/kg/day と推測された。また、同群の肝臓においてPFBSと同様に*Cyp2b2*の発現上昇が認められた。FC-75について0、40、200、1000 mg/kg/dayの用量で28日間反復経口投与毒性試験を実施したところ、体重、摂餌量、血液学的検査結果および臓器重量に投与による影響は認められなかった。

次年度はFC-75の生体影響解析を継続するとともに、網羅的遺伝子発現解析によるバイオマーカー候補の抽出を実施する。加えて、他グループのPFASについても公開データベースや*in silico*解析を活用して毒性情報を収集し、バイオマーカー候補の汎用性、あるいはグループ特異性を検証する。

Ａ．研究目的

ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）は撥水・撥油性、熱・化学的安定性等の様々な物性を示し、幅広い用途で使用されてきた。難分解性、高蓄積性、長距離移動性の指摘を受け、国際条約および各国の法令に基づき代表的な物質（ペルフルオロオクタン酸：PFOA、ペルフルオロオクタンスルホン酸：PFOS等）について多くの国で製造・輸入等が原則禁止されているが、その性状のため環境中に微量ながら広く残留している。近年、飲料水や食物を介したPFAS曝露によるヒトへの健康影響が懸念されており、種々の病態とPFAS血中濃度との関連が指摘されている。しかし、PFASの摂取量と健康影響との関連は不明な点が多く、PFASによる健康影響を検出あるいは予測可能なバイオマーカーも同定されていない。また、PFASには異なる化学構造特性を有する多様な化合物が含まれるが、毒性の実態についてはごく一部の化合物で検索されているのみであり、全体像については明らかになっていない。PFASの中には現在規制対象外であり、今後の対応について検討中の化合物も多く存在することから、各化学構造グループに共通した、あるいは特異的な生体影響の有無を検証することは、PFASによる健康リスク管理において重要である。

そこで本研究では、毒性影響が不明であるPFASについてその詳細な生体影響を明らかにするとともに、化学構造グループごとの生体影響の異同を検証し、様々なPFASによる毒性影響の検出に有用なバイオマーカーを創出することを目的とした。

Ｂ．研究方法

評価対象物質はOECDによるPFASの化学構造分類[OECD. Fact Cards 2022]に基づき、代表的な化合物が気体であるもの、本邦で入手困難なもの、比較的不安定であり他のグループに変換されるもの、およびポリマー類を除いた7グループ（カルボン酸類・スルホン酸類・アルキルエーテルカルボン酸類・アルキルエーテル類・n:2フルオロテロマー類・n:1フルオロテロマー類・側鎖型フッ素系芳香化合物類）を選出した。各グループについて、代表化合物として構造が比較的単純であるものを1種類ずつ選抜した。

令和7年度は前年度に引き続き、毒性データが不明あるいは不十分であった2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-1-butanol（3:1FTOH、n:1フルオロテロマー類）、Perfluoro-2-butyltetrahydrofuran

(FC-75、アルキルエーテル類)、Perfluorobutanesulfonic acid (PFBS、スルホン酸類)の3化合物について詳細な評価を行った。投与動物として広くPFAS投与試験に供されており、多くのPFASにおいて雌よりも高感受性を示すCrl:CD(SD)雄ラット（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）を使用した。

1. ラットにおけるPFBSの血清中濃度分析

令和6年度に実施したラットを用いたPFBSの28日間反復経口投与毒性試験で得られた血清について、株式会社島津テクノリサーチに依頼しLC-MS/MS MRM法を用いたPFBSの濃度分析を実施した。分析は0、0.8、4、20、および100 mg/kg/day群の各群3匹について実施した。同動物群の血清生化学検査結果および相対遺伝子発現量について、血清PFBS濃度に対するピアソンの積率相関係数（r）を算出した。

2. ラットを用いた3:1FTOHの28日間反復経口投与毒性試験

これまでに経口投与による毒性試験の実施報告がない3:1FTOHについて反復投与による生体影響を評価するため、令和6年度に実施した用量設定試験結果に基づきCrl:CD(SD)雄ラットを用いて28日間反復経口投与毒性試験を実施した。

6週齢の雄性Crl:CD(SD)ラット各群5匹にコーン油に溶解した3:1FTOH（東京化成工業株式会社、純度99.8%）を0、100、300または1000 mg/kg/dayの用量で1日1回28日間強制経口投与した。実験期間中は一般状態を毎日観察するとともに、体重および摂餌量を週1回測定した。投与終了後、麻酔下にて採血し、血液学的および血清生化学検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、下垂体、心臓、胸腺、肺、甲状腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢に関しては重量の測定を行った。摘出した全身諸器官・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。肝臓の一部は剖検時に-80℃で保存し、RNeasy Mini Kit（株式会社QIAGEN）を用いてRNAを抽出後、TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific Inc.)による遺伝子発現解析に供した。また、0および1000 mg/kg/day群の各群1匹のホルマリン固定肝臓組織について、株式会社花市電子顕微鏡技術研究所に依頼し電子顕微鏡解析を実施した。

3. ラットを用いたFC-75の28日間反復経口投与毒性試験

これまでに毒性試験の報告がないFC-75について、生体影響を評価するため反復経口投与毒性試験を実施した。試験に用いたFC-75懸濁液は乳化コネクター(φ5μm、エス・ピー・ジーテクノ株式会社)による膜乳化法を用いて調製した。

28日間反復経口投与毒性試験に先立ち、6週齢の雄性Crl:CD(SD)ラット各群5匹に2% Tween80水溶液に懸濁したFC-75（東京化成工業株式会社、異性体混合物（試験適合））を0、250、500または1000 mg/kg/dayの用量で1日1回7日間強制経口投与したところ、250 mg/kg/day以上の群で血中総コレステロールの有意な上昇を認めた。この結果を受け、28日間反復経口投与毒性試験の用量を0、40、200または1000 mg/kg/dayに設定した。6週齢の雄性Crl:CD(SD)ラット各群5匹に、FC-75を上記の用量で1日1回28日間強制経口投与した。実験期間中は一般状態を毎日観察するとともに、体重および摂餌量を週1回測定した。投与終了後、麻酔下にて採血し、血液学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、下垂体、心臓、胸腺、肺、甲状腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢に関しては重量の測定を行った。摘出した全身諸器官・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。また、剖検時に肝臓の一部を-80℃で保存した。

（倫理面への配慮）

動物実験の際には、平成26年5月に公布された「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律105号）に基づき制定された、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成25年環境省告示第84号）の精神を遵守し、使用頭数の削減および苦痛の軽減のため充分な準備を行った上で実施した。また、国立医薬品食品衛生研究所の定める「動物実験の適正な実施に関する規程」に即して実験を計画し、同所動物実験委員会の承諾を得て実験を行った。

Ｃ．研究結果

1. ラットにおけるPFBSの血清中濃度分析

0.8 mg/kg/day以上の群において、血中PFBS濃度は用量の増加に伴い、有意な増加傾向を示した（p=0.0322）（Figure 1）。対照群の血中PFBS濃度は検出限界以下（<25 ng/ml）であった。一方、個体別の血中PFBS濃度と*Cyp2b1*および*Cyp2b2*発現量を含む各種検査結果との間に有意な相関は認められなかった（Figure 2、PFBS vs *Cyp2b1*: r=0.435、p=0.105、PFBS vs *Cyp2b2*: r=0.301、p=0.276）。以上の内容を加えたラットを用いたPFBSの28日間反復経口投与毒性試験結果について、第52回日本毒性学会学術年会にて報告した。

2. ラットを用いた3:1FTOHの28日間反復経口投与毒性試験

投与期間中、1000 mg/kg/day群の複数個体において投与直後に一過性の歩様異常が認められ、いずれも24時間以内に消失した（Table 1）。全ての群で体重、摂餌量および血液学的検査結果に有意な変動は認められなかった（Figure 3, Table 2）。血清

生化学検査および臓器重量測定において、1000 mg/kg/day群でアルブミン、A/G比、尿素窒素、肝臓および腎臓相対重量の有意な高値、総コレステロールおよび中性脂肪の有意な低値が認められた（Tables 3,4）。病理組織学的検査の結果、1000 mg/kg/day群の肝臓において小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞好酸性顆粒状変化が認められた（Figure 4, Table 5）。腎臓や神経系を含むその他の臓器に投与と関連した所見は認められなかった。遺伝子発現解析の結果、1000 mg/kg/day群の肝臓において核内受容体CARの標的遺伝子である*Cyp2b2*の発現が有意に上昇し、同じく核内受容体CARの標的遺伝子である*Cyp2b1*、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体α（PPARα）の標的遺伝子である*Acox1*および*Cyp4a1*の発現も上昇傾向を示した（Table 6）。電子顕微鏡解析の結果、1000 mg/kg/day群の肝細胞においてペルオキシソームの増生を認めた（Figure 5）。以上の結果について、第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会にて報告した。

3. ラットを用いたFC-75の28日間反復経口投与毒性試験

全てのFC-75投与群で、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査結果および臓器重量において投与と関連した所見は認められなかった（Figure 6、Tables 7,8）。また、肝臓および腎臓の病理組織学的検査において投与に関連した変化は認められなかった（Figure 7）。血清生化学的検査、他臓器の病理組織学的検査および遺伝子発現解析を現在実施中である。

D．考察

PFBSの血清中濃度分析の結果、血清PFBS濃度は用量の増加に伴い有意な増加傾向を示し、本試験条件下において用量依存的な全身曝露が成立していることが確認された。前年度の研究では、肝臓における*Cyp2b1*および*Cyp2b2*発現がPFBS曝露を反映するマーカー候補であることが示唆された。一方、今回の検討では、*Cyp2b1*および*Cyp2b2*発現量が血清PFBS濃度と定量的に対応することは確認できなかった。従って、これら遺伝子発現はPFBS曝露に伴う生体影響の指標となる可能性はあるものの、PFBS曝露量を定量的に推定するマーカーとして利用することは困難である可能性が考えられた。

3:1FTOHの28日間反復経口投与毒性試験の結果、1000 mg/kg群において歩様異常および肝臓・腎臓への影響が認められ、いずれも3:1 FTOH投与に関連する毒性影響と考えられた。ラットにおいて3:1 FTOHの2000 ppm/6hrの吸入曝露により昏睡を呈したという報告[3M company, 2009]がある。本試験においても投与直後から一過性の歩様異常が認められたことから、高用量の3:1 FTOHは中枢神経系に対して一過性の影響を及ぼす可能性が示唆された。肝臓において、脂質関連パラメーターの低下を伴う肝細胞肥大および好酸性顆粒状変化に加え、ペルオキシソームの増生ならびにPPARα標的遺伝子発現の上昇傾向を認めたことから、3:1 FTOHの肝臓に対する影響にはPPARα活性化の関与が示唆された。また、高用量群において*Cyp2b2*の発現上昇も認められ、3:1 FTOHの曝露マーカーとなる可能性が示唆された。腎臓に関連する変化として相対重量の増加を伴う血清尿素窒素の高値が認められたことから、腎機能への影響が示唆された。一方で病理組織学検査では腎臓に有意な所見は認められず、標的細胞や毒性機序については不明であった。以上の結果から、本試験における3:1 FTOHの無毒性量は300 mg/kg/dayと推定された。

FC-75の28日間反復経口投与毒性試験において、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査結果および臓器重量に投与と関連する変化は認められなかった。今後、血清生化学的検査、肝・腎以外の病理組織学的検査および遺伝子発現解析を行い、同化合物による生体影響を評価する予定である。

E．結論

令和7年度の研究により、3:1FTOHはラットに対して歩様異常、肝機能および腎機能への影響が確認され、3:1FTOHの28日間反復経口投与毒性試験における無毒性量は300 mg/kg/dayと推定された。また、3:1 FTOHの肝臓に対する影響にはPPARα活性化の関与が示唆された。加えて、前年度の結果と併せて*Cyp2b2*が3:1FTOHおよびPFBSに共通する曝露マーカーとなる可能性が示唆された。

次年度は引き続きFC-75の試験結果解析を実施するほか、これまで検討した3物質について網羅的遺伝子発現解析を実施し、更なるバイオマーカー候補遺伝子を抽出する。加えて、他グループのPFASについても28日間反復経口投与毒性試験の実施や、公開データベースおよび*in silico*解析を活用して毒性情報を収集し、バイオマーカー候補の汎用性、あるいはグループ特異性を検証する。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 畝山瑞穂，赤根弘敏，森川朋美，豊田武士：Crl:CD(SD) ラットにおけるPerfluorobutanesulfonic acidの生体影響解析.第52回日本毒性学会学術年会(2025年7月)
2. 畝山瑞穂，赤根弘敏，森川朋美，高須伸二，小

川久美子, 豊田武士：免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の開発. 第 11 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（2025年9月）

3. 畝山瑞穂, 高須伸二, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 豊田武士：免疫染色結果に基づく決定木分析によるラット肝発がん物質の早期検出法の検討. 第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
4. 畝山瑞穂, 高須伸二, 赤根弘敏, 森川朋美, 豊田武士：雄性Crl:CD（SD）ラットを用いた2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanolの28日間反復経口投与毒性試験. 第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会（2026年3月）
5. 水田保子, 赤木純一, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 六鹿元雄, 磯貴子, 松本真理子, 小川久美子, 豊田武士:ラットを用いた4-(ベンジルオキシ)フェノールの13週間反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第31回総会・学術大会（2025年6月）
6. 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 青山博昭, 小川久美子, 豊田武士：ラット28日間反復投与毒性試験における病理組織学的及び免疫組織化学的解析によるTSH産生阻害剤の検出および機序推定. 第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
7. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子：異なる結晶子径の二酸化チタン粒子の90日間反復経口投与によるラット小腸パイエル板における免疫毒性影響の検討. 第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
8. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子：反復経口投与によりラット小腸パイエル板に取り込まれた二酸化チタンによる免疫毒性影響の検討. 第32回日本免疫毒性学会学術年会（2025年9月）
9. 赤根弘敏, 松下幸平, 畝山瑞穂, 森川朋美, 高須伸二, 小川久美子, 豊田武士：病理組織学的及び免疫組織化学的解析を用いたVA-K-14のラットにおける抗甲状腺作用機序の評価. 第84回日本癌学会学術総会（2025年9月）
10. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子：ラットを用いたさまざまな結晶子径の二酸化チタンの反復経口投与毒性の検討. 第8回医薬品毒性機序研究会（2025年12月）
11. 赤根弘敏, 高須伸二, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 青山博昭, 小川久美子, 豊田武士：免疫組織化学的解析を用いたヨウ素取込み及び脱ヨウ素酵素阻害剤のラットにおける抗甲状腺作用の評価. 第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
12. 高須伸二, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 豊田武士:フラン誘発肝傷害の早期に生じる肝漿膜下領域における変化の経時的解析. 第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2026年1月)

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

該当なし

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし

Table 1. General condition of male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

		Week			
Groups	Findings	1	2	3	4
	Cumulative total no. of animals per week	35	35	35	35
0 mg/kg	-	-	-	-	-
100 mg/kg	-	-	-	-	-
300 mg/kg	-	-	-	-	-
1000 mg/kg	Abnormal gait	31	19	16	5

Values are total number of occurrences in each week.
-; No abnormalities detected.

Table 2. Hematological data for male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

		Control	3:1 FTOH		
			100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
RBC	(10^6/uL)	7.61 ± 0.12	7.63 ± 0.21	7.48 ± 0.22	7.55 ± 0.30
HGB	(g/dL)	14.4 ± 0.2	14.5 ± 0.4	14.4 ± 0.4	14.4 ± 0.3
HCT	(%)	42.6 ± 0.9	42.9 ± 1.1	42.6 ± 1.4	42.6 ± 1.1
MCV	(fL)	56.0 ± 1.6	56.3 ± 1.6	57.0 ± 2.4	56.5 ± 0.9
MCH	(pg)	19.0 ± 0.5	19.1 ± 0.5	19.2 ± 0.6	19.1 ± 0.3
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 0.5	33.8 ± 0.5	33.7 ± 0.5	33.8 ± 0.3
RET	(10^3/uL)	298.1 ± 38.0	317.1 ± 40.8	303.3 ± 18.2	289.5 ± 23.8
	(%)	3.9 ± 0.5	4.2 ± 0.6	4.1 ± 0.3	3.8 ± 0.2
WBC	(10^3/uL)	7.13 ± 2.28	7.64 ± 1.64	5.83 ± 1.22	7.16 ± 1.43
NEUT	(10^3/uL)	0.98 ± 0.44	1.06 ± 0.25	0.80 ± 0.08	1.29 ± 0.28
	(%)	13.4 ± 5.1	13.9 ± 1.5	14.4 ± 4.1	18.1 ± 1.6
LYMPH	(10^3/uL)	5.76 ± 1.95	6.29 ± 1.26	4.76 ± 1.22	5.49 ± 1.10
	(%)	81.1 ± 7.3	82.6 ± 1.4	81.0 ± 4.3	76.7 ± 1.5
MONO	(10^3/uL)	0.32 ± 0.18	0.20 ± 0.15	0.19 ± 0.10	0.27 ± 0.08
	(%)	4.50 ± 2.39	2.42 ± 1.33	3.22 ± 1.45	3.72 ± 0.51
EO	(10^3/uL)	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.23 ± 0.32
	(%)	0.88 ± 0.29	0.92 ± 0.16	1.04 ± 0.46	1.32 ± 0.45
BASO	(10^3/uL)	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	(%)	0.12 ± 0.16	0.18 ± 0.11	0.34 ± 0.24	0.18 ± 0.08
PLT	(10^3/uL)	935 ± 99	938 ± 41	875 ± 125	988 ± 72

Values are means ± SDs.

Table 3. Serum biochemical data for male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

		Control	3:1 FTOH		
			100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
TP	(g/dL)	5.94 ± 0.15	5.86 ± 0.13	5.78 ± 0.25	5.92 ± 0.33
ALB	(g/dL)	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.7 ± 0.3*
A/G		2.7 ± 0.4	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.4	3.8 ± 0.6**
BUN	(mg/dL)	10.4 ± 1.9	9.7 ± 1.2	9.8 ± 1.6	13.8 ± 2.5*
CRE	(mg/dL)	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
AST	(IU/L)	118.2 ± 27.5	121.6 ± 31.2	113.6 ± 18.1	128.4 ± 15.7
ALT	(IU/L)	32.0 ± 1.2	34.0 ± 5.3	35.2 ± 3.9	38.4 ± 5.2
ALP(IFCC)	(IU/L)	210.4 ± 33.4	204.8 ± 34.4	166.2 ± 39.1	229.8 ± 40.4
r-GT	(IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO	(mg/dL)	68.6 ± 16.9	60.4 ± 8.6	65.4 ± 17.8	46.2 ± 5.9*
TG	(mg/dL)	81.2 ± 30.1	54.8 ± 11.5	66.6 ± 31.6	43.0 ± 11.0*
T-BIL	(mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01**
GLU	(mg/dL)	98.4 ± 11.8	97.6 ± 9.7	101.4 ± 6.1	110.4 ± 20.4
Na	(mEq/L)	142.6 ± 1.1	143.8 ± 1.3	143.6 ± 1.3	142.2 ± 0.4
K	(mEq/L)	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.1 ± 0.1
Cl	(mEq/L)	101.6 ± 1.3	103.0 ± 1.4	102.8 ± 2.2	101.6 ± 0.9
Ca	(mg/dL)	10.4 ± 0.3	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.5	10.2 ± 0.4
IP	(mg/dL)	7.9 ± 0.3	7.8 ± 0.4	7.7 ± 0.4	8.1 ± 1.0

Values are means ± SDs.
*, **; $P < 0.05$ and < 0.01 vs. Control by Dunnett's test, respectively.

Table 4. Organ weight data for male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

		Control	3:1 FTOH		
			100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Body weight	(g)	364.6 ± 20.5	367.1 ± 17.6	371.1 ± 27.5	352.8 ± 40.5
Brain	(g)	1.98 ± 0.07	2.00 ± 0.03	2.00 ± 0.08	1.93 ± 0.08
	(%)	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.07
Pituitary	(g)	0.015 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002
	(%)	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000
Heart	(g)	1.28 ± 0.06	1.28 ± 0.16	1.25 ± 0.10	1.20 ± 0.16
	(%)	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02
Thyroid	(g)	0.023 ± 0.002	0.024 ± 0.005	0.021 ± 0.003	0.021 ± 0.004
	(%)	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Thymus	(g)	0.56 ± 0.12	0.59 ± 0.11	0.70 ± 0.11	0.61 ± 0.18
	(%)	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.05
Lung	(g)	1.25 ± 0.07	1.27 ± 0.10	1.25 ± 0.11	1.18 ± 0.08
	(%)	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02
Spleen	(g)	0.68 ± 0.08	0.70 ± 0.09	0.70 ± 0.12	0.62 ± 0.09
	(%)	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.01
Liver	(g)	10.5 ± 0.6	10.4 ± 0.9	11.9 ± 1.9	12.8 ± 2.4
	(%)	2.87 ± 0.14	2.82 ± 0.15	3.18 ± 0.30	3.62 ± 0.42**
Kidney	(g)	2.61 ± 0.30	2.57 ± 0.18	2.74 ± 0.21	2.74 ± 0.19
	(%)	0.71 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.78 ± 0.04*
Adrenal	(g)	0.044 ± 0.007	0.045 ± 0.002	0.043 ± 0.003	0.048 ± 0.004
	(%)	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.014 ± 0.001
Testis	(g)	3.05 ± 0.33	3.21 ± 0.29	3.00 ± 0.36	3.12 ± 0.24
	(%)	0.84 ± 0.10	0.88 ± 0.12	0.82 ± 0.14	0.89 ± 0.09
Epididymis	(g)	0.83 ± 0.12	0.89 ± 0.04	0.83 ± 0.15	0.80 ± 0.04
	(%)	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.03
Prostate	(g)	0.83 ± 0.11	0.82 ± 0.11	0.83 ± 0.12	0.81 ± 0.14
	(%)	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03
Seminal vesicle	(g)	1.05 ± 0.14	1.03 ± 0.11	0.98 ± 0.13	0.93 ± 0.19
	(%)	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03

Values are means ± SDs.

*, **; $P < 0.05$ and < 0.01 vs. Control by Dunnett's test, respectively.

Table 5. Histopathological findings for male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

	Findings	Control	3:1 FTOH		
			100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±)	0	0	0	5**
	Cytoplasmic alteration, eosinophilic (±)	0	0	0	5**

±; minimal.
**; $P < 0.01$ vs. Control by Fisher's exact test.

Table 6. Relative expression levels (fold changes) of *Cyp2b1*, *Cyp2b2*, *Acox1*, *Cyp4a1*, *Cyp1a1* and *Gpx2* in the liver of male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

	Control	3:1 FTOH		
		100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Acox1	1.05 ± 0.33	0.83 ± 0.72	0.99 ± 0.80	3.06 ± 2.44
Cyp4a1	1.05 ± 0.32	0.82 ± 0.80	1.77 ± 2.03	4.59 ± 2.62
Cyp2b1	1.07 ± 0.39	1.77 ± 1.88	2.09 ± 1.62	6.84 ± 3.79
Cyp2b2	1.29 ± 0.93	1.16 ± 1.48	2.31 ± 2.49	4.86 ± 1.77*
Cyp1a1	ND	ND	ND	ND
Gpx2	1.18 ± 0.57	1.83 ± 1.67	1.03 ± 0.63	3.90± 6.78

Values are means ± SDs.
ND; not detected.
*; P < 0.05 vs. Control by Dunnett's test.

Table 7. Hematological data for male SD rats treated with FC-75 for 28 days.

		Control	FC-75		
			40 mg/kg	200 mg/kg	1000 mg/kg
RBC	(10^6/uL)	7.50 ± 0.20	7.71 ± 0.11	7.62 ± 0.25	7.61 ± 0.26
HGB	(g/dL)	14.2 ± 0.4	14.9 ± 0.2**	14.4 ± 0.4	14.6 ± 0.2
HCT	(%)	42.0 ± 1.2	44.6 ± 0.4**	42.6 ± 1.3	43.9 ± 0.8*
MCV	(fL)	56.0 ± 1.5	57.9 ± 0.9	55.9 ± 1.5	57.7 ± 2.2
MCH	(pg)	18.9 ± 0.4	19.3 ± 0.3	18.8 ± 0.6	19.3 ± 0.8
MCHC	(g/dL)	33.8 ± 0.2	33.3 ± 0.5	33.7 ± 0.4	33.4 ± 0.5
RET	(10^3/uL)	301.5 ± 52.1	320.5 ± 19.7	276.2 ± 20.4	330.0 ± 40.2
	(%)	4.0 ± 0.7	4.2 ± 0.2	3.6 ± 0.3	4.4 ± 0.7
WBC	(10^3/uL)	6.11 ± 1.93	6.12 ± 1.66	5.36 ± 1.30	6.17 ± 2.57
NEUT	(10^3/uL)	0.90 ± 0.41	0.66 ± 0.34	0.72 ± 0.15	0.90 ± 0.46
	(%)	14.9 ± 4.6	10.8 ± 4.7	14.1 ± 4.9	15.1 ± 6.4
LYMPH	(10^3/uL)	4.89 ± 1.60	5.23 ± 1.58	4.33 ± 1.24	5.00 ± 2.30
	(%)	79.7 ± 4.7	85.2 ± 5.0	80.0 ± 5.5	80.3 ± 6.6
MONO	(10^3/uL)	0.24 ± 0.07	0.17 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.18 ± 0.09
	(%)	4.04 ± 0.89	2.84 ± 1.15	3.92 ± 1.47	3.02 ± 1.04
EO	(10^3/uL)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02
	(%)	1.06 ± 0.35	0.90 ± 0.21	1.60 ± 0.98	1.40 ± 0.73
BASO	(10^3/uL)	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	(%)	0.30 ± 0.20	0.22 ± 0.11	0.34 ± 0.28	0.18 ± 0.13
PLT	(10^3/uL)	983 ± 98	891 ± 74	939 ± 107	894 ± 60

Values are means ± SDs.
*, **; $P < 0.05$ and < 0.01 vs. Control by Dunnett's test, respectively.

Table 8. Organ weight data for male SD rats treated with FC-75 for 28 days.

		Control	FC-75		
			40 mg/kg	200 mg/kg	1000 mg/kg
Body weight	(g)	378.9 ± 39.2	384.2 ± 24.0	368.0 ± 27.7	391.3 ± 20.3
Brain	(g)	2.03 ± 0.13	1.95 ± 0.08	1.96 ± 0.10	2.03 ± 0.09
	(%)	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.52 ± 0.02
Pituitary	(g)	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001
	(%)	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000
Heart	(g)	1.27 ± 0.22	1.27 ± 0.10	1.24 ± 0.07	1.25 ± 0.09
	(%)	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Thyroid	(g)	0.027 ± 0.005	0.022 ± 0.005	0.019 ± 0.005*	0.024 ± 0.001
	(%)	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001**	0.006 ± 0.000
Thymus	(g)	0.72 ± 0.05	0.55 ± 0.08	0.59 ± 0.15	0.63 ± 0.17
	(%)	0.19 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.04
Lung	(g)	1.27 ± 0.19	1.28 ± 0.19	1.25 ± 0.08	1.29 ± 0.07
	(%)	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02
Spleen	(g)	0.65 ± 0.13	0.69 ± 0.09	0.63 ± 0.08	0.69 ± 0.11
	(%)	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Liver	(g)	10.7 ± 1.2	11.4 ± 1.5	10.3 ± 1.1	11.1 ± 0.2
	(%)	2.83 ± 0.10	2.96 ± 0.24	2.79 ± 0.16	2.84 ± 0.12
Kidney	(g)	2.72 ± 0.33	2.75 ± 0.17	2.70 ± 0.43	2.94 ± 0.11
	(%)	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.04	0.73 ± 0.07	0.75 ± 0.03
Adrenal	(g)	0.043 ± 0.009	0.049 ± 0.008	0.047 ± 0.004	0.046 ± 0.008
	(%)	0.011 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Testis	(g)	2.78 ± 0.27	3.13 ± 0.23	2.91 ± 0.35	3.17 ± 0.29
	(%)	0.74 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.79 ± 0.10	0.81 ± 0.04
Epididymis	(g)	0.77 ± 0.16	0.85 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.84 ± 0.05
	(%)	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Prostate	(g)	0.80 ± 0.14	0.85 ± 0.21	0.81 ± 0.10	0.91 ± 0.17
	(%)	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.04
Seminal vesicle	(g)	0.93 ± 0.15	0.93 ± 0.13	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.05
	(%)	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.01

Values are means ± SDs.

*, **; $P < 0.05$ and < 0.01 vs. Control by Dunnett's test, respectively.

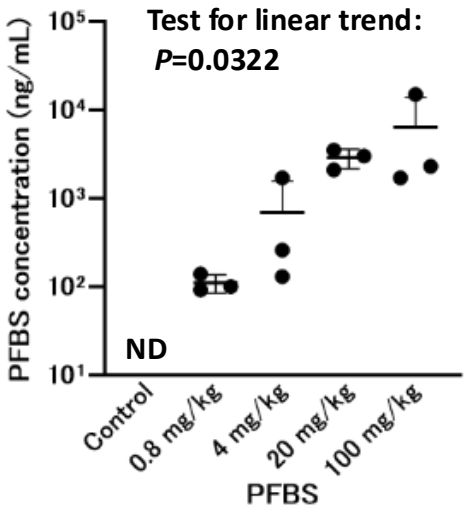


Figure 1. Serum PFBS concentration for male SD rats treated with PFBS. One-way ANOVA was used for the linear trend test.
ND; not detected.

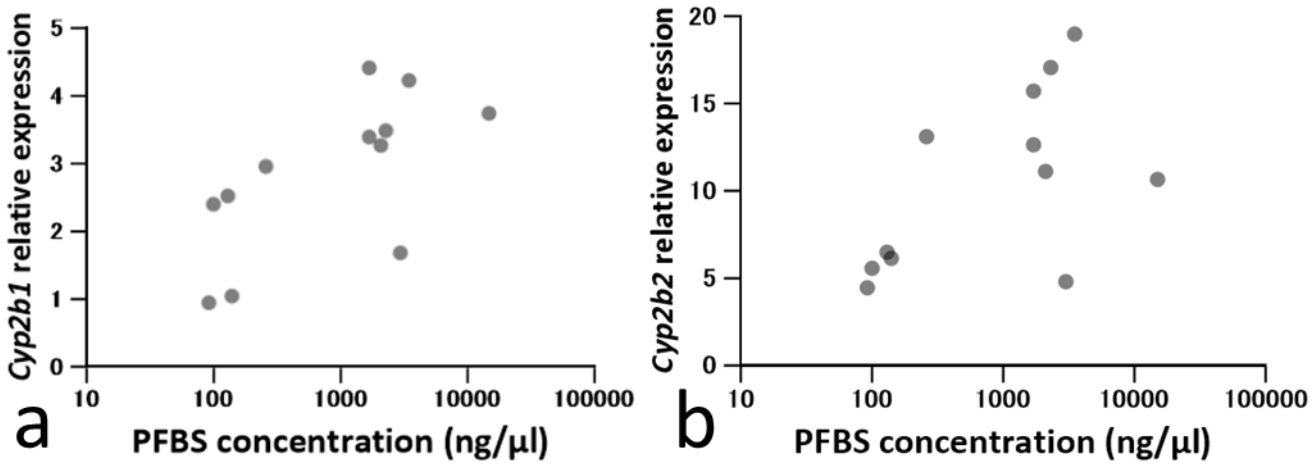


Figure 2. Scatter plots of Serum PFBS concentration compared to relative expression levels (fold changes) of *Cyp2b1* (a) and *Cyp2b2* (b).

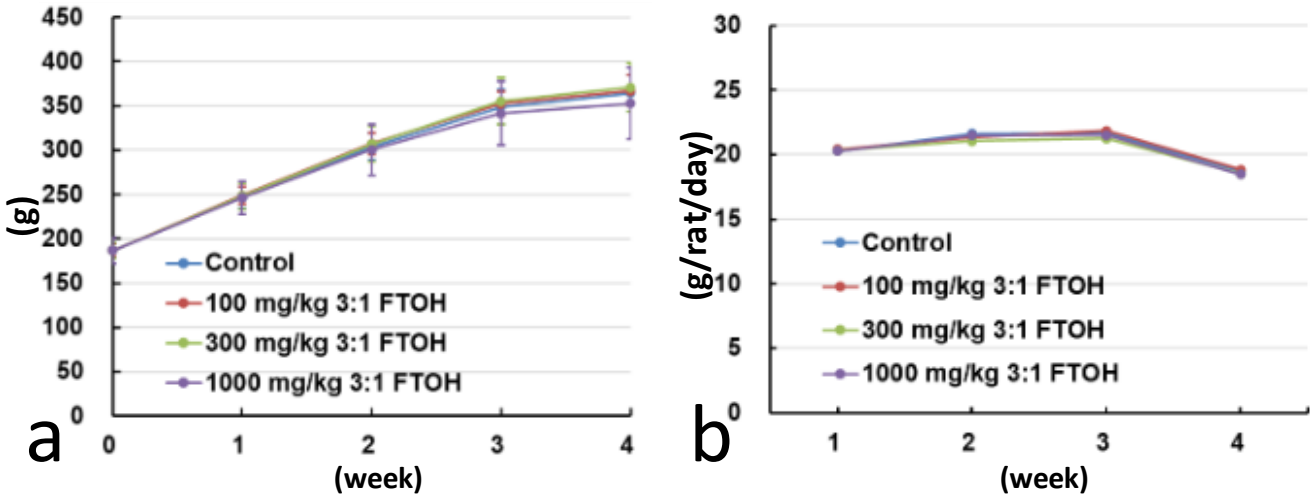


Figure 3. Mean body weight (a) and food intake (b) for male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days.

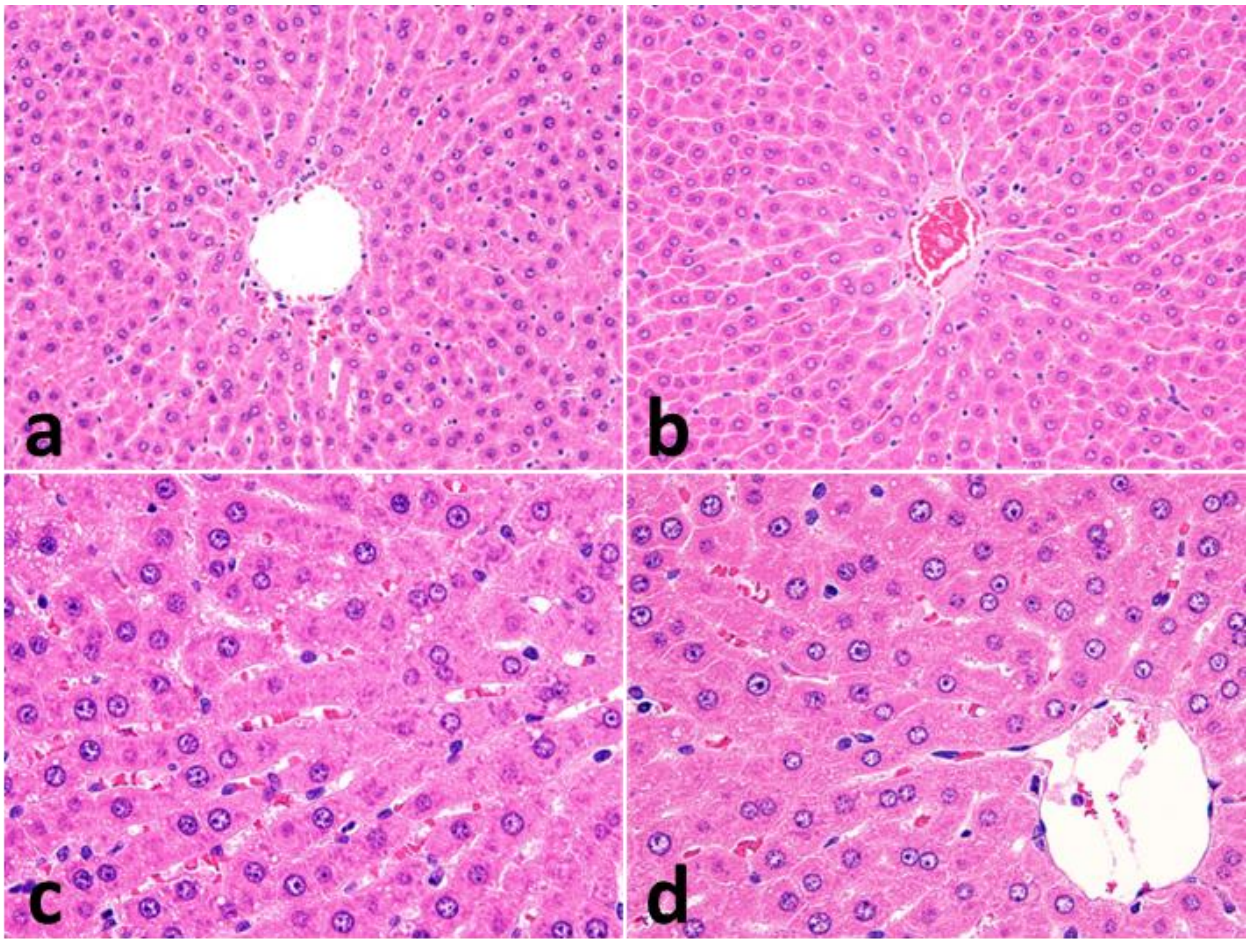


Figure 4. Histopathology of male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days. Hematoxylin and eosin staining. Livers in the control (a, c) and 1000 mg/kg/day group (b, d).

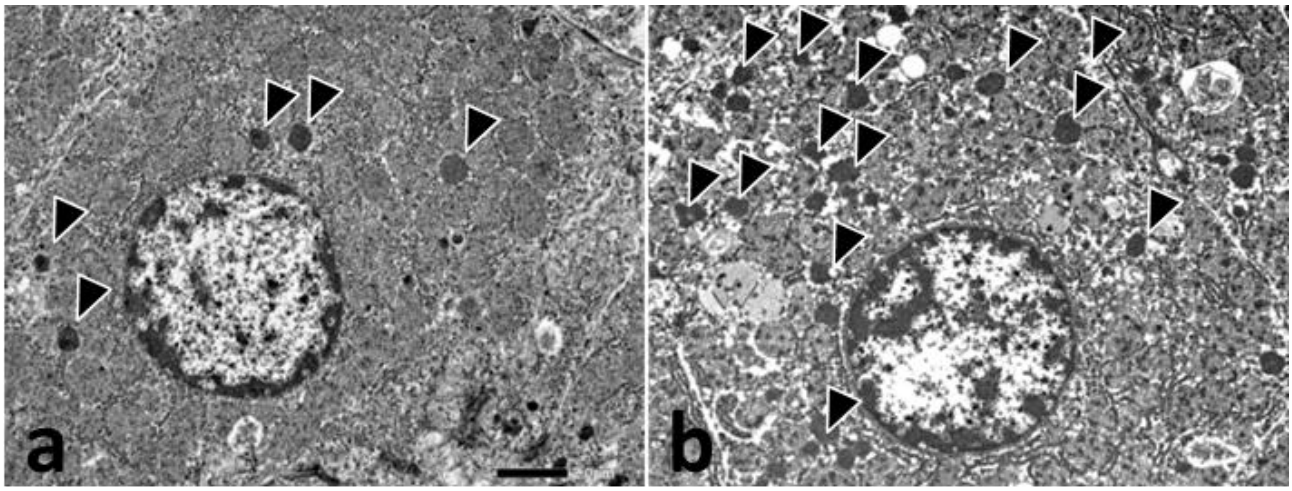


Figure 5. Transmission electron microscopy of male SD rats treated with 3:1FTOH for 28 days. Hepatocytes containing peroxisomes (arrowhead) in the control (a) and 1000 mg/kg/day group (b). Scale bar = 2 μm.

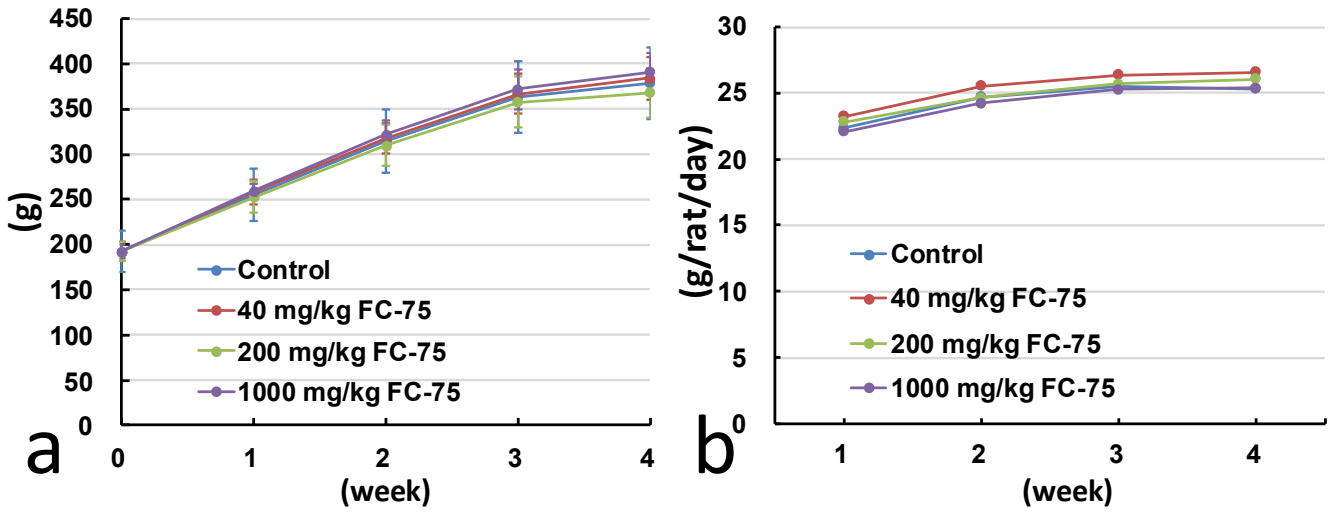


Figure 6. Mean body weight (a) and food intake (b) for male SD rats treated with FC-75 for 28 days.

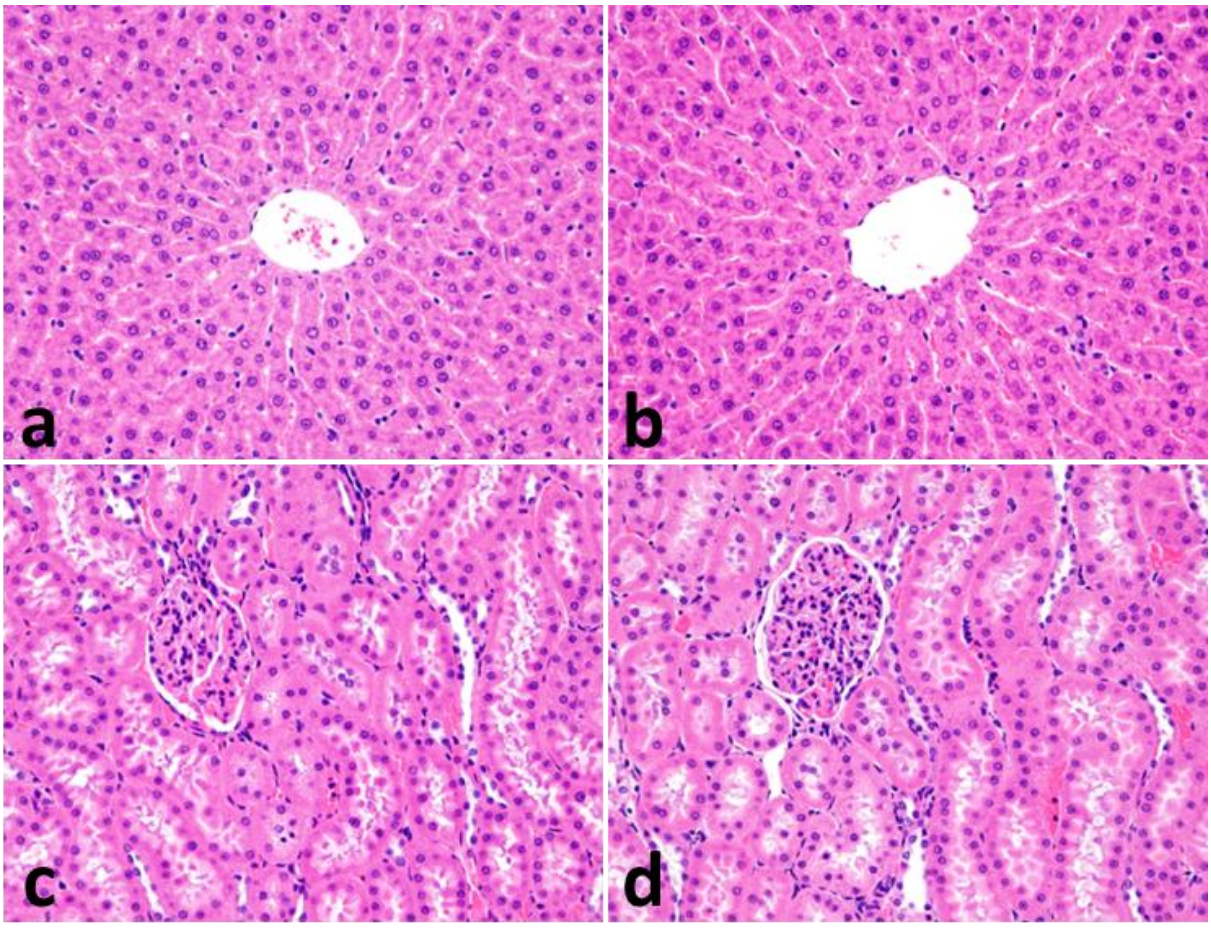


Figure 7. Histopathology of male SD rats treated with FC-75 for 28 days. Hematoxylin and eosin staining.
(a and b) Livers in the control (a) and 1000 mg/kg/day group (b). (c and d) Kidneys in the control (c) and 1000 mg/kg/day group (d).