

称号及び氏名 博士（獣医学） 岩井 宏之

学位授与の日付 平成29年11月30日

論文名 **Toxicity comparison of surface treatment agent APFO and its alternative substance APFHx**
(表面処理剤 APFO とその代替物質 APFHx の毒性比較)

論文審査委員 主査 笹井 和美
副査 小森 雅之
副査 竹内 正吉

論文要旨

諸 言

ペルフルオロオクタン酸（PFOA： $C_7F_{15}COO^-$ ）、その塩および PFOA 関連化合物は、多くの製造業種にわたって幅広い用途および消費者製品に使用されている。1950 年以降 PFOA およびその塩は、フッ素ゴムおよびフライパンの表面をコーティングして、こびりつきにくい作用を与えるフッ素樹脂の製造における重合助剤として最も広く使用されてきた。また、PFOA 関連化合物（側鎖フッ素化ポリマーを含む）は、テキスタイルや紙に撥水撥油性の付加物や消火剤にも用いられている。一方、PFOA および PFOA 関連化合物が環境中に存在することが明らかとなった。環境中に放出された PFOA 関連化合物は、環境および生物において PFOA に分解されるが、PFOA はそれ以上分解されない。PFOA は環境中を長距離に移動することが知られており、水等の経口摂取によりヒト血液中に微量存在している。さらに、臍帯血や母乳にも存在しており、大人よりも乳児のほうがより蓄積していることが明らかとなり、出生前および出生後の成長時の影響が懸念されている。そのため PFOA の工業的な使用を中止する場合、同様の化学的性能をもつ構造的類似物質を代替とする必要から、生体内蓄積性が低いと予想されるペルフルオロヘキサン酸（PFHxA： $C_5F_{11}COO^-$ ）が候補となっているが、PFHxA の毒性評価に関する報告は少ない。

本研究の目的は、PFOA の毒性と PFHxA の毒性を比較検証し、PFHxA の生物学的安全性を明らかにすることである。本研究では、PFOA や PFHxA は酸性度が高いことか

ら、中性であるアンモニウム塩の APFO と APFHx を用いて行った。

第1章 APFO のラットでの反復毒性

APFO を、Crj : CD (SD) 雄性ラットに 14 日間繰り返し経口投与した。APFO の投与量を、国連のグローバルハーモナイズシステム (GHS) から反復毒性の基準となる 50mg/kg/日を最大量と設定し、またサルの反復投与試験において 3mg/kg/日投与群で肝臓に影響があると報告されたことから、0.5 と 5 mg/kg/日投与群を追加した。

5、50mg/kg/日投与群では、肝臓の絶対重量/相対重量の有意な増加および増加傾向を示したが、全投与群において脾臓重量の変化は観察されなかった。5、50mg/kg/日投与群では、肝細胞のミトコンドリアおよびペルオキシソーム特異的酵素の誘導は増加したが、脂質代謝の血液学的パラメーターの低下は見られなかった。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットは有意な減少または減少傾向を示したが、リンパ球サブセットへの影響は認められなかった。マウスで免疫抑制の報告があったが、ラットでは免疫抑制効果は認められなかった。

本試験では、APFO の有害な影響が臓器に認められない最大量、すなわち無毒性量 (NOAEL) は 0.5mg/kg/日であり、GHS の基準量 50mg/kg/日を下回ったため、APFO の毒性は強いと判断した。

第2章 APFHx のラット、マウスでの体内動態

APFO の毒性を、体内蓄積性によるものと考え、まず APFHx の蓄積性を検討した。雄雌のマウスおよびラットに APFHx の単回および 14 日間反復経口投与した後の排出パターンを割を検証した。毒性作用がなく、排出物中の代謝産物を同定できる用量であり、90 日反復試験において PFHxA の NOAEL が 50mg/kg/日という報告があったことから、この量を投与量に設定した。

試験物質としては¹⁴C標識 APFHx を使用した。単回経口投与後、全排泄は急速であり、性別および種にかかわらず、投与後 24 時間で 90%以上が排出された。排出の主な経路は、尿 (投与量の 73.0~90.2%)、次いで糞便 (投与量の 7.0~15.5%) であった。呼気からの排出はごくわずかであった。複数回投与試験では、APFHx の 13 日間反復経口投与後に¹⁴C 標識 APFHx の単回経口投与を行った。この場合も、排出は急速であり、性別や種にかかわらず、投与後 24 時間で、投与量の 90%以上が排出された。排出の主な経路は、尿 (投与量の 77.8~83.4%)、続いて糞便 (投与量の 9.6~12.9%) であった。単回投与のマウスでの半減期は、APFO が 408 時間に対して APFHx は 1 時間であった。

APFHx は、PFOA に比較して蓄積性が低いと判断した。

第3章 APFHx のマウスでの繁殖毒性

PFHxA のラット 90 日反復毒性試験の報告から NOAEL は 50mg/kg/日であることが

示されており、また、24ヶ月の慢性毒性試験を実施した結果、200mg/kg/日投与においても腫瘍の発生は認められていない。これらの結果に加えて第2章で示した APFHx の低い蓄積性から APFHx の一般毒性は低いと考えられる。しかしながら諸言で述べたように胎児や乳児への影響が懸念されることから APFHx の繁殖毒性を検証した。また、PFOA は雄ラットでは高い生物蓄積性を有するが、雌ラットでは体内から急速に消失することからラットの繁殖毒性は低いと推定される。そのため、生物蓄積性の性差がないマウスで、繁殖毒性を評価した。

1群20匹で、妊娠6日目から18日まで経口投与した。投与群を、7、35、100、175、350、500mg/kg/dayとした。エンドポイントとしては、仔の世代(F1)の死亡率、生存率、体重、成長状態、性成熟度、受胎率と分娩率、母獣(F0)の体重、肝臓重量とした。350と500mg/kg/day群では、F0に体重変化が起こり、数匹の死亡が発生し、F1に死産、成長率の低下が認められた。175mg/kg/dayでは、死産数の増加、生後1日目の死亡および体重の減少が認められた。これらの結果から APFHx の繁殖毒性のNOAELは100mg/kg/dayであった。

総括

1. APFO を、雄のラットに2週間経口反復投与すると主に肝臓肥大が認められたが、免疫系には作用しなかった。NOAELは、0.5mg/kg/dayであった。
2. APFHx は、種差や性別に関係なく、速やかに体内から排出されるため、生体蓄積性は低かった。
3. APFHx のマウス繁殖毒性の結果、繁殖毒性のNOAELは100 mg/kg/dayであった。
4. APFHx の化学性能および本研究結果から、APFHx を APFO の代替として使用できることを明らかにした。

審査結果の要旨

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA : $C_7F_{15}COO^-$)、その塩および PFOA 関連化合物は、多くの製造業種にわたって幅広い用途および消費者製品に使用されている。1950 年以降 PFOA およびその塩は、フッ素ゴムおよびフライパンの表面をコーティングして、こびりつきにくい作用を与えるフッ素樹脂の製造における重合助剤として最も広く使用されてきた。また、PFOA 関連化合物 (側鎖フッ素化ポリマーを含む) は、テキスタイルや紙の撥水撥油性の付加物や消火剤にも用いられている。一方、PFOA および PFOA 関連化合物が環境中に存在することが明らかとなった。環境中に放出された PFOA 関連化合物は、環境および生物において PFOA に分解されるが、PFOA はそれ以上分解されない。

PFOA は環境中を長距離に移動することが知られており、水等の経口摂取によりヒト血液中に微量存在している。さらに、臍帯血や母乳にも存在しており、大人よりも乳児のほうがより蓄積していることが明らかとなり、出生前および出生後の成長時の影響が懸念されている。そのため **PFOA** の工業的な使用を中止する場合、同様の化学的性能をもつ構造的類似物質を代替とする必要から、生体内蓄積性が低いと予想されるペルフルオロヘキサン酸 (**PFHxA** : $C_6F_{11}COO^-$) が候補となっているが、**PFHxA** の毒性評価に関する報告は少ない。

本研究の目的は、**PFOA** と **PFHxA** の毒性を比較検証し、**PFHxA** の生物学的安全性を明らかにすることである。本研究では、**PFOA** や **PFHxA** は酸性度が高いことから、中性であるアンモニウム塩である **APFO** と **APFHx** を用いて行った。

第一章では、**APFO** のラットでの反復毒性を検証する目的で、**APFO** を、Crj : CD (SD) 雄性ラットに 14 日間繰り返し経口投与した。**APFO** の投与量を、国連のグローバルハーモナイズシステム (GHS) から反復毒性の基準となる 50mg/kg/日を最大量と設定し、またサル反復投与試験において 3mg/kg/日投与群で肝臓に影響があると報告されたことから、0.5 と 5 mg/kg/日投与群を追加した。

5、50mg/kg/日投与群では、肝臓の絶対重量・相対重量の有意な増加および増加傾向を示したが、全投与群において脾臓重量の変化は観察されなかった。5、50mg/kg/日投与群では、肝細胞のミトコンドリアおよびペルオキシソーム特異的酵素の誘導は増加したが、脂質代謝の血液学的パラメーターの低下は見られなかった。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットは有意な減少または減少傾向を示したが、リンパ球サブセットへの影響は認められなかった。マウスで免疫抑制の報告があったが、ラットでは免疫抑制効果は認められなかった。

本試験では、**APFO** の有害な影響が臓器に認められない最大量、すなわち無毒性量 (NOAEL) は 0.5mg/kg/日であり、GHS の基準量 50mg/kg/日を下回ったため、**APFO** の毒性は強いと判断した。

第 2 章では、**APFHx** のラット、マウスでの体内動態を検証する目的で、**APFO** の毒性を体内蓄積性によるものと考え、まず **APFHx** の蓄積性を検討した。雄雌のマウスおよびラットに **APFHx** の単回および 14 日間反復経口投与した後の排出パターンの割合を検証した。毒性作用がなく、排出物中の代謝産物を同定できる用量であり、90 日反復試験において **PFHxA** の NOAEL が 50mg/kg/日という報告があったことから、この量を投与量に設定した。試験物質としては [^{14}C] 標識 **APFHx** を使用した。

単回経口投与後、全排泄は急速であり、性別および種にかかわらず、投与後 24 時間で 90%以上が排出された。排出の主な経路は、尿 (投与量の 73.0~90.2%)、次いで糞便 (投与量の 7.0~15.5%) であった。呼気からの排出はごくわずかであった。反復投与試験では、**APFHx** の 13 日間経口投与後に [^{14}C] 標識 **APFHx** の単回経口投与を行った。この場合も、排出は急速であり、性別や種にかかわらず、投与後 24 時間で、投与量の 90%以上が排出された。排出の主な経路は、尿 (投与量の 77.8~83.4%)、続いて糞便 (投与量の 9.6~12.9%) であった。単回投与のマウスでの半減期は、**APFO** が 408 時間に対して **APFHx** は 1 時間であった。

APFHx は、**PFOA** に比較して蓄積性が低いと判断した。

第3章では、APFHxのマウスでの繁殖毒性を検証した。PFHxAのラットへの90日反復毒性試験の報告からNOAELは50mg/kg/日であることが示されており、また、24ヶ月の慢性毒性試験を実施した結果、200mg/kg/日投与においても腫瘍の発生は認められていない。これらの結果に加えて第2章で示したAPFHxの低い蓄積性からAPFHxの一般毒性は低いと考えられる。しかしながら緒言で述べたように胎児や乳児への影響が懸念されることからAPFHxの繁殖毒性を検証した。また、PFOAは雄ラットでは高い生物蓄積性を有するが、雌ラットでは体内から急速に消失することからラットの繁殖毒性は低いと推定される。そのため、生物蓄積性の性差がないマウスで、繁殖毒性を評価した。

1群20匹で、妊娠6日目から18日まで経口投与した。投与量を、7、35、100、175、350、500mg/kg/dayとした。エンドポイントとしては、仔の世代(F1)の死亡率、生存率、体重、成長状態、性成熟度、受胎率と分娩率、母獣(F0)の体重、肝臓重量とした。350と500mg/kg/day群では、F0に体重変化が起こり、数匹の死亡が発生し、F1に死産、成長率の低下が認められた。175mg/kg/日では、死産数の増加、生後1日目での死亡および体重の減少が認められた。これらの結果からAPFHxの繁殖毒性のNOAELは100mg/kg/dayであった。

以上のように、APFHxは、種差や性別に関係なく速やかに体内から排出されるため、生体蓄積性が低いことや、マウス繁殖毒性の結果、繁殖毒性のNOAELが100mg/kg/dayであることを示した本研究結果およびAPFHxの化学的性能から、APFHxを毒性の高いAPFOの代替として使用できることを明らかにした。この研究成果は、獣医学・医学の発展、とりわけ実験動物学や毒性学における病態解明に向けた新たな展開に資すると判断する。よって、本論文の審査並びに学力確認の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。