

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

有機フッ素化合物の発がん性評価と評価スキームの確立に関する研究

分担研究項目：肝発がん物質短期検出スキームによる検討  
非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法による検討

研究分担者 鈴木 周五 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 教授

### 研究要旨

本研究は、有機フッ素化合物の肝発がん性について、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて検討する。令和6年度は、陽性対照物質である Perfluorooctanoic acid (PFOA) とともに合計6物質について、OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。採取した肝組織から RNA を抽出、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて、それぞれの物質の発がん性検出を行った。結果、PFOA 及び Undecafluoro-2-methyl-3-oxahexanoic acid (GenX) は陽性と示され、他の物質については陰性であった。陽性と示された物質は、酵素誘導及び PPAR $\alpha$  を介した肝発がん機序が関与する結果が得られた。以上の結果から、化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られた RNA を用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測法により、PFOA 及び GenX は肝発がん性を有する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

有機フッ素化合物である PFAS (Per- and Poly-fluoroalkyl substances：パー及びポリフルオロアルキル物質) は幅広い用途で使用され、環境中での難分解性及び生体内蓄積性が問題となっている。近年、国内複数地域の浄水施設の水道水から基準値を超える濃度の Perfluorooctanoic acid (PFOA) と Perfluorooctane sulfonate (PFOS) が検出され、ばく露による有害性、特に発がんの健康影響が懸念される。特に PFOA や PFOS は国際がん研究機関 (IARC) によりグループ1と2Bに分類され、実験的にラットの肝臓を主体に発がん性報告があり、有機フッ素化合物の発がん性検証は喫緊の課題である。一方、有機フッ素化合物は1万種類以上存在し、これら全てを発がん性試験で検討することは莫大な費用や時間等を必要とし極めて困難である。従って有機フッ素化合物の発がん性を短期間、高精度かつ効率的に評価できる試験スキームの確立が求められる。

我々はこれまで既知発がん物質の大半が肝臓を標的にすることに着目し、遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質を短期かつ高精度に検出できるスキームを確立した。本研究ではそのスキームを活用し、有機フッ素化合物の発がん性検証とともに、新たに有機フッ素化合物特異的な評価スキーム開発を行う。

令和6年は、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせで開発した「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を用いて、種々の有機フッ素化合物の肝発がん性を検証した。

### B. 研究方法

OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類にお

ける28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後に屠殺剖検を行い、肝臓を採取した。肝臓から RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出・精製し、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Rat Transcriptome Array 2.0) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。

得られた遺伝子発現変化のうち、既報論文 (Kanki M et al., J Toxicol Sci, 2016) で報告した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル (基盤モデル) で、特異性及び感受性について検証した。この検出法は、感度77%、特異度100%、正答率95%と精度の高い検出法である。具体的には、GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を使用して、非遺伝毒性肝発がん物質うち、細胞傷害 (TAA、MP) や酵素誘導 (PB、HCB)、PPAR $\alpha$  アゴニスト (CFB、WY) に属する2種の化学物質から統計的に有意な発現変動を示し共通する遺伝子を選出し、組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出 (サポートベクターマシンの数理学的アルゴリズムによるモデル) により作成したモデルを用いて特異性及び感受性について検証した。

また、細胞傷害 (TAA、MP) や酵素誘導 (PB、HCB)、PPAR $\alpha$  アゴニスト (CFB、WY) に属する2種の化学物質において、高用量及び中間用量を投与した群と対照群との発現差が Welch T 値で5以上となる遺伝子を選んだ後に各2種の化学物質で共通する遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質の高用量投与群において、対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が1.5倍以下となる遺伝子を選出した。その結果、細胞傷害4遺伝子、酵素誘導2遺伝子、PPAR $\alpha$  アゴニスト18遺伝子が

選出された。それぞれの遺伝子を用いて各発がん機序に対し陽性となる予測モデルを作成し、いずれかで陽性と判定された物質を陽性と判定する新たな予測モデルを構築した（機序別統合モデル）。

令和6年度は、Perfluorooctanoic acid (PFOA) 10 mg/kg、Undecafluoro-2-methyl-3-oxahexanoic acid (GenX; HFPO-DA)、Hexafluoroglutaryl chloride (HxFGC)、2,2-Difluoroethyl trifluoromethanesulfonate (DFEMS)、Perfluorohexanoic acid (PFHxA)については100 mg/kg、3-Perfluorohexyl-1,2-epoxypropane (PFHEP)、Perfluoro(2-methylpentane) (PFMP) 300 mg/kgで強制胃内投与を行った。なお実験は2回に分けて行った。

（倫理面への配慮）

大阪公立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

### C. 研究結果

1回目の実験において、DFEMS投与群が最終屠殺時に2匹となったため、2回目にやり直して実験を行った。

PFOA投与群において、対照群に比べ体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には有意な体重減少を認めた（表1）。また、PFOA及びGenX投与群においては肝臓の絶対及び相対重量いずれも対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。

表1. 体重及び肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
			Absolute (g)	Relative (%)		
Control	6	378.8 ± 24.8	14.2 ± 2.0	3.7 ± 0.4	21.7 ± 2.5	42.9 ± 11.0
PFOA	6	307.5 ± 19.7 ***	17.7 ± 2.3*	5.7 ± 0.4***	18.7 ± 1.5	33.4 ± 4.2
GenX	4	359.8 ± 18.3	23.0 ± 0.5***	6.4 ± 0.4***	22.3 ± 3.1	41.5 ± 9.2
HxFGC	3	371.8 ± 7.0	13.8 ± 1.7	3.7 ± 0.4	21.3 ± 1.6	43.6 ± 9.1
DFEMS	2	373.0 ± 26.2	15.9 ± 1.8	4.3 ± 0.2	22.2 ± 4.0	42.0 ± 9.8

\*, \*\*, \*\*\*: P < 0.05 and 0.001 vs Control, respectively

2回目の2日目までにPFHxA投与群において、3匹死亡したため、100から50 mg/kgへ投与量を半減した。また、PFMP投与群において開始2週間後に2匹まで生存数が低下したため、屠殺剖検して中断した。他の群については4週間投与後に、屠殺剖検した。

PFHEP投与群において、対照群に比べ体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には有意な体重減少を認めた（表2）。また、DFEMS投与群及びPFHEP投与群においては肝臓の絶対及び相対重量いずれも対照群に比べ有意な増加を認めた（表2）。

表2. 体重及び肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
			Absolute (g)	Relative (%)		
Control	6	422.4 ± 21.3	15.8 ± 1.6	3.7 ± 0.2	24.7 ± 1.3	44.2 ± 2.1
DFEMS	5	423.1 ± 28.0	18.7 ± 2.3*	4.4 ± 0.3*	24.6 ± 2.1	44.5 ± 9.7
PFHEP	5	362.5 ± 25.3 **	20.6 ± 1.2***	5.7 ± 0.4***	21.2 ± 2.0**	56.3 ± 7.4**
PFHxA	3	412.9 ± 4.8	15.2 ± 0.6	3.7 ± 0.1	25.0 ± 2.5	39.2 ± 4.0

\*, \*\*, \*\*\*: P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

肝臓の組織学的検討した結果、1回目の実験において、PFOA投与群及びGenX投与群においてZone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在し、散在性に肝細胞の単細胞壊死を認めた（図1）。また、DFEMS投与群においては、Zone 1での肝細胞の変性・壊死が目立っていた（図1）。一方、

HxFGC投与群では、投与群との差がはっきりしなかった（図1）。

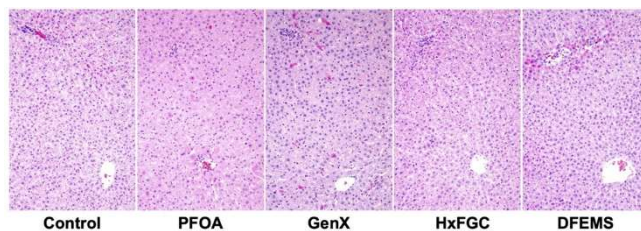


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

2回目の実験においても、DFEMS投与群においては、Zone 1での肝細胞の変性・壊死が目立っていた（図2）。また、PFHEP投与群及びPFMP投与群においてZone 3での肝細胞腫大が存在し、PFHEP投与群ではさらに好酸性顆粒状変性が認められた（図2）。一方、PFHxA投与群では、投与群との差がはっきりしなかった（図2）。

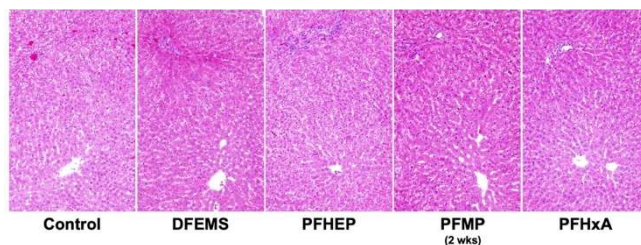


図2. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均1.9 ± 0.7 µgのtotal RNAを回収し、質もA260/A280が平均2.13 ± 0.02と良い状態だった。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の基盤モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果、PFOA及びGenXは基盤モデルで陽性と示され、HxFGC、DFEMS、PFHEP及びPFHxAは陰性と示された。また、機序別統合モデルにおいても同様の結果が得られた。特に、PFOA及びGenXは、PPARαだけでなく、酵素誘導のモデルにおいても陽性を示した。

表3. 非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの結果

物質	基盤モデル	機序別統合モデル		
		細胞障害	酵素誘導	PPARα
PFOA	+	-	+	+
GenX	+	-	+	+
HxFGC	-	-	-	-
DFEMS	-	-	-	-
PFHEP	-	-	-	-
PFHxA	-	-	-	-

PFOAについては、PPARα誘導による発がん性で報告されているため、その遺伝子発現変化を検討したところ、PPARαの下流に位置すると報告がある遺伝子Cyp4a1（ヒトCYP4A11；マウスCyp4a10）及びAcox1の発現上昇を確認した。また、同様の発現上昇をGenXにおいても認めた。

### D. 考察

今回、本検出法を用いたところ、発がん物質として同定できたPFOA及びGenXは、強い肝組織像の変化が存在した。特にPFOAについては、発がん性試験によりラットでの肝発がん性が報告されており、本モデルにおいても陽性を確認出来たことは本モデルの有効性確認に重要な結果と考える。加えて、PPAR $\alpha$ で誘導される遺伝子の発現上昇を確認し、同経路の活性化が肝発がんに寄与する事を裏付ける結果が得られた。また、GenXは、PFOAと同様の遺伝子発現変化やモデルによる結果が得られたことから、PFOAと同じ機序での肝発がん性が推察される。加えて、PFOA及びGenXは酵素誘導型の肝発がん機序を有する可能性を示した。

なお、本研究で用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法は、現時点では国際的な評価を受けていないものの、OECDテストガイドライン化を目指して開発・検討を進めており、今後の発展的活用が期待される。

一方、DFEMSやPFHEPについては、肝組織像変化に関わらず、今回の結果では陰性と示された。DFEMSについては、超短期遺伝毒性肝発がん物質検出法で陽性と示されており、遺伝毒性による肝発がん機序が主体である可能性がある。HxFGCやPFHxAについては、肝組織像変化も乏しく、検出モデルも陰性であることから、肝発がん性が乏しいと推察される。

## E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる非遺伝毒性肝発がん物質予測モデルにより、PFOA及びGenXが肝発がん性を示す可能性を認めた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. J Occup Health. 2025; 67: uiaf005.
2. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 161-5.
3. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 147-54.
4. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the

urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 59-67.

5. Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. Toxicol Sci. 2024; 202: 210-219.
6. Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. Arch Toxicol. 2024; 98: 2711-2730.
7. Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. Arch Toxicol. 2024; 98: 2065-2084.

### 2. 学会発表

1. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオンアルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 広島、第97回日本産業衛生学会、2024年5月22-25日
2. 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、ワチラアルンウオンアルパマス、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 山形、第20回日本病理学会カンファレンス、2024年7月26-27日
3. Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 福岡、第51回日本毒理学学会学術年会、2024年7月3-5日
4. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝及び毒性の評価. 鳥取、第37回発癌病理研究会、2024年8月20-22日
5. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露によるF1マウスにおける肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する. 愛知、2024年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、2024年8月29-31日
6. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁

- 恵、アルパマス ワチラルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとしてPRDX3の検討. 福岡、第83回日本
8. Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期及び授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  9. Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Giuyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  10. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、梯アンナ、鰐淵英機. *o*-Toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変に対するNADPH酸化酵素阻害剤 apocynin の抑制効果. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  11. 野浦郁恵、鈴木周五、梯アンナ、井上健、鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌の新規バイオマーカー候補の検討. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  12. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  13. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
  14. 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の *in vitro* 投与量設定法の開発. 東京、第51回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2024年12月20日11月8-9日
  15. 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるF1ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 徳島、第29回ヒ素シンポジウム、2024年12月7-8日
  16. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露によるF1マウス肝発がん機序におけるDNAメチル化異常の関与. 徳島、第29回ヒ素シンポジウム、2024年12月7-8日
  17. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna akehashi, Arpamas
- 癌学会学術総会、2024年9月19-21日
7. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwon achiraarunwong, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  18. 野浦郁恵、鈴木周五、井上健、梯アンナ、鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌における brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1) の役割. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  19. Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas achiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in fl rats following maternal exposure from pre-mating to lactation. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  20. Arpamas achiraarunwong, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna akehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  21. 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Arpamas achiraarunwong、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしてのPRDX3の解析及び発がん機序解明. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  22. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas achiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna akehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in rats. 三島、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2025年1月30-31日
  23. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) のヒト肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 大津、2024年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、2025年2月12-13日
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得  
特になし。
  2. 実用新案登録  
特になし。
  3. その他  
特になし