

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：DNA 付加体の網羅的解析及び変異シグネチャー解析

研究分担者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学薬学部 教授

研究要旨

有機フッ素化合物である PFAS (Per-and Polyfluoroalkyl 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パーフルオロオクタン酸 (PFOA) とパーフルオロオクタンスルホン酸 (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。我々は先行研究で、DNA 付加体を指標とした化学物質の肝臓に対する発がん性/遺伝毒性を予測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/遺伝毒性の検証とともに、新たに有機フッ素化合物特異的な評価スキーム開発および、変異シグネチャー解析による発がん/毒性発現機序の解明について検討する予定である。今年度は、DNA 付加体の網羅的解析を実施する準備に加え、松本分担研究者からの構造活性相関による情報を基に、DNA のアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のあるいくつかの PFAS について、アルキル化 DNA の修復酵素 (MGMT) 欠損株 (*Salmonella typhimurium* YG7108) を用いた Ames 試験により、変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOA は代謝活性化系存在/非存在下で、用量の上限を 10 mg/plate まで上昇させて変異原性試験を実施したが、いずれの菌株及び条件下においても復帰変異コロニー数の増加は認められず、本条件下での Ames 試験における変異原性は陰性であると判定した。PFPMs では、代謝活性化系非存在下において TA1535 では変異原性を示さなかったが、YG7108 では用量依存的かつ、溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が観察されたことから、変異原性は陽性であると判定した。YG7108 は MGMT が欠損しているため、*O*-methyl-dG などの DNA 付加体の修復ができず、アルキル化剤に対して高感受性となる菌株である。したがって、PFPMs では *O*-methyl-dG 様の DNA 付加体を形成し、変異原性を誘発しているものと推測された。一方、その変異原活性の強度を陽性対照の *N*-Methyl-*N*-nitrosourea (MNU) と比較してみたところ、その強度は弱いものと推測された。

A. 研究目的

有機フッ素化合物である PFAS (Per-and Polyfluoroalkyl 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パーフルオロオクタン酸 (PFOA) とパーフルオロオクタンスルホン酸 (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簡便に予測できる試験スキームの確立が求められる。

我々は先行研究で、DNA 付加体を指標とした化学物質の肝臓に対する発がん性/遺伝毒性を予測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/遺伝毒性の検証とともに、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。また、変異シグネチャー解析による発がん/毒性発現機序の解明も試みる。

B. 研究方法

今年度は、DNA 付加体の網羅的解析を実施する準備に加え、松本分担研究者からの構造活性相関による情報を基に、DNA のアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のあるいくつかの PFAS について、アルキル化 DNA の修復酵素欠損株 (*Salmonella typhimurium* YG7108) を用いた Ames 試験により、変異誘発能の確認を実施中である。

【DNA付加体の網羅的解析】

雄性SDラット (各群それぞれ6匹) にPFAS 19 物質を単回経口投与した。PFASの試験用量は、LD50が判明している物質にはLD50の1/3用量を投与した。LD50が不明な物質に対してはOECD TG 423に基づき最大耐量を推定し、最大耐量 (2000 mg/kg または300 mg/kg) で試験を実施した。投与後24時間後に肝臓を摘出し、DNAを抽出し、DNaseI、ヌクレアーゼP1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化し、HPLC-高分解能精密質量分析機器によるDNAアダクトーム解析を実施する準備を行なった。

【アルキル化DNAの修復酵素欠損株 (YG7108) を用いた Ames試験】

DNAのアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のあるPFASを表1に示す。

表1. DNAのアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のあるPFAS

試験物質番号 (検体番号)	1回目検封の実験番号	品番	メーカー	試験物質名	略称	CAS, NO
#02	24AC-1 G2	SIA-171468-25G	Sigma-AL	Perfluorooctanoic acid	PFOA	335-67-1
#06	24AC-1 G6	IQ-0013	Combi-Blocks	2,2,3,3,3-Pentafluoropropyl trifluoromethanesulfonate	PFPMs	6401-00-9
#08	24AC-1 G8	QA-9756	Combi-Blocks	2,2-Difluoroethyl trifluoromethanesulfonate	DFEMS	74427-22-8
#11	24AC-2 G4	QN-2419	Combi-Blocks	2,5-Bis(trifluoromethyl)-3,5-dioxadecafluorooctanoyl fluoride	2,5-BDF	2641-34-1

OECDテストガイドラインでは、Ames試験を実施する際の使用化学物質上限値 (5 mg/plateもしくは5 μ L/plate) を参考に、生育阻害が観察されない適当な用量 (溶媒対照を含む5用量) で実施した。試験菌株はアルキル化DNAの修復酵素 (MGMT) 欠損株 (YG7108) とその野生型 (TA1535) を用い、構造活性相関情報に従い、代謝活性化系の存在下または非存在下で実施した。独立した試験を少なくとも2回実施し、それら結果の平均値で変異原活性の判定を行った。

(倫理面の配慮)

該当なし

C. 研究結果

【DNA付加体の網羅的解析】

今年度使用した化学物質は表2に示す。現在までに、これらPFASを単回経口投与したSDラット肝臓 (N=114) についてフェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。いずれのサンプルからも100 μ g以上のDNAが抽出できており、以降のDNAアダクトーム解析を実施するのに十分な量である。酵素によるDNAの消化とフィルターによるLC-MS分析の前処理も終了しており、LC-HRAMの感度チェックなどが完了出来次第にこれらサンプルの分析を開始する予定である。

表2. 化学物質リスト

本研究で使用した有機フッ素化合物

被検物質名	略称	投与量 (mg/kg)	毒性判定 (鏡先生)	IARC	アラート
Perfluorooctanoic acid	PFOA	330	陽性	Group 1	非遺伝毒性発がん物質
Undecafluoro-2-methyl-3-oxahexanoic acid	GenX (HFPO-DA)	580	陰性	-	その他の構造アラート
Heptafluorobutryl chloride	HFBC	300	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
3-Perfluorohexyl-1,2-epoxypropane	PFHEP	2000	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
2,2,3,3,3-Pentafluoropropyl trifluoromethanesulfonate	PFPMs	2000	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
Hexafluoroglutaric chloride	HxFGC	300	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
2,2-Difluoroethyl trifluoromethanesulfonate	DFEMS	300	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
2,2-Bis(trifluoromethyl)propanoyl fluoride	2,2-BPF	300	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
Perfluoroheptanoyl chloride	PFHC	300	陰性	-	遺伝毒性発がん物質
2,5-Bis(trifluoromethyl)-3,5-dioxadecafluorooctanoyl fluoride	2,5-BDF	300	陽性	-	遺伝毒性発がん物質
Perfluoro(2-methylpentane)	PFMP	300	陰性	-	その他の構造アラート
Heptafluorobutyric Acid	PFBA	300	陰性	-	その他の構造アラート
Perfluoropentanoic acid	PFPeA	300	陰性	-	その他の構造アラート
Perfluorohexanoic acid	PFHxA	300	陰性	-	非遺伝毒性発がん物質
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	300	陰性	-	非遺伝毒性発がん物質
4-Chlorobenzotrifluoride	4-CBTF	2000	陰性	Group 2B	なし
Nonafluorobutanesulphonic acid	PFBS	140	陰性	-	その他の構造アラート
Potassium perfluoro-1-octanesulfonate	PFOS-K	50	陰性	Group 2A	なし
2,2,3,3,3-Pentafluoropropan-1-ol	PFPO	300	陰性	-	その他の構造アラート

【アルキル化DNAの修復酵素欠損株 (YG7108) を用いた Ames試験】

PFOA, PFPMs, DFEMS, 2,5-BDFのうち、これまでにPFOA, PFPMsの試験を実施した。その結果を図1および2に示す。

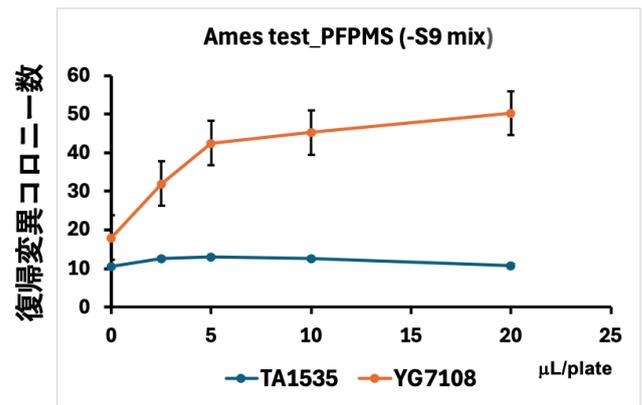


図1. 代謝活性化系非存在下でのPFPMSの変異原性

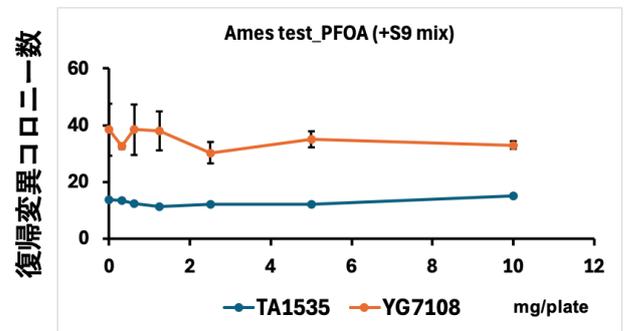
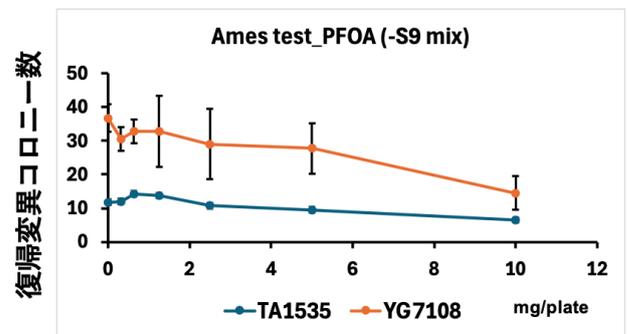


図2. 代謝活性化系存在/非存在下でのPFOAの変異原性

PFPMsでは、代謝活性化系非存在下においてTA1535では変異原性を示さなかったが、YG7108では用量依存性的かつ、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数が観察されたことから、変異原性は陽性であると判定した。

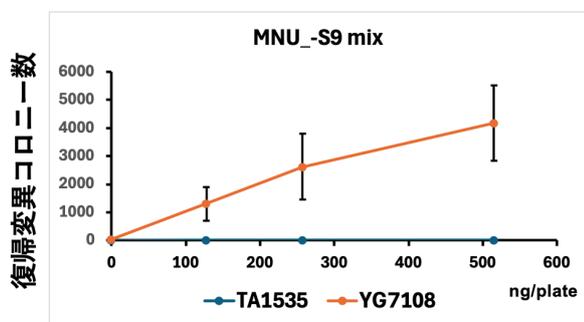
一方、PFOAに関しては構造活性相関情報に従い代謝活性化系存在/非存在下で、用量の上限を10 mg/plateまで上昇させて変異原性試験を実施したが、いずれの菌株及び条件下においても復帰変異コロニー数の増加は認められず、本条件下でのAmes試験における変異原性は陰性であると判定した。現在、DFEMS, 2,5-BDFの変異原性試験については同様に検討中である。

D. 考察

現在までに、PFASを単回経口投与したSDラット肝臓

について DNA を抽出し、いずれのサンプルからも DNA アダクトーム解析を実施するのに十分な量の DNA が抽出できており、LC-HRAM の感度チェックなどが完了出来次第にこれらサンプルの分析を開始する予定である。

一方、多くの PFAS はその変異原性に関する情報が不十分である。松本分担研究者からの構造活性相関による情報によると、DNA のアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のある PFAS がいくつか存在することだったので、アルキル化 DNA の修復酵素 (MGMT) 欠損株 (*Salmonella typhimurium* YG7108) を用いた Ames 試験により、PFOA、PFPMs の変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOA は代謝活性化系存在/非存在下で、用量の上限を 10 mg/plate まで上昇させて変異原性試験を実施したが、いずれの菌株及び条件下においても復帰変異コロニー数の増加は認められず、Ames 試験における変異原性は陰性であると判定した。PFPMs では、代謝活性化系非存在下において TA1535 では変異原性を示さなかったが、YG7108 では用量依存的かつ、溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が観察されたことから、変異原性は陽性であると判定した。YG7108 は MGMT が欠損しているため、*O*-methyl-dG などの DNA 付加体の修復ができず、アルキル化剤に対して高感受性となる菌株である。したがって、PFPMs では *O*-methyl-dG 様の DNA 付加体を形成し、変異原性を誘発しているものと推測された。一方、その変異原活性の強度を陽性対照の *N*-Methyl-*N*-nitrosourea (MNU) と比較してみた。図 3 には MNU の TA1535/YG7108 に対する変異原性試験結果を示す。



MNU 1mgあたりの復帰変異コロニー数: 81,184

図3. MNUのTA1535/YG7108に対する変異原性試験結果

その結果、MNUの1 mgあたりの復帰変異コロニー数は81,184であるのに対して、PFPMsの1 mgあたりの復帰変異コロニー数を計算すると21.2であった。このことから、PFPMsはYG7108を用いたAmes試験では陽性となるが、その変異原活性の強度は弱いものと推測された。

E. 結論

PFAS を単回経口投与したSDラット肝臓についてDNAを抽出し、アダクトーム解析を実施する準備を行った。

一方、多くのPFASはその変異原性に関する情報が不十分である。松本分担研究者からの構造活性相関による情報によると、DNAのアルキル化を介して変異原性を誘発する可能性のあるPFASがいくつか存在することのこ

とだったので、アルキル化DNAの修復酵素(MGMT)欠損株(*Salmonella typhimurium* YG7108)を用いたAmes試験により、PFOA、PFPMsの変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOAは代謝活性化系存在/非存在下で、用量の上限を10 mg/plateまで上昇させて変異原性試験を実施したが、いずれの菌株及び条件下においても復帰変異コロニー数の増加は認められず、本条件下でのAmes試験における変異原性は陰性であると判定した。PFPMsでは、代謝活性化系非存在下においてTA1535では変異原性を示さなかったが、YG7108では用量依存的かつ、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数が観察されたことから、変異原性は陽性であると判定した。YG7108はMGMTが欠損しているため、*O*-methyl-dGなどのDNA付加体の修復ができず、アルキル化剤に対して高感受性となる菌株である。したがって、PFPMsでは*O*-methyl-dG様のDNA付加体を形成し、変異原性を誘発しているものと推測された。一方、その変異原活性の強度を陽性対照の*N*-Methyl-*N*-nitrosourea(MNU)と比較してみたところ、その強度は弱いものと推測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara K, Totsuka Y. Whole Genome Sequencing Analysis of Model Organisms Elucidates the Association Between Environmental Factors and Human Cancer Development. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 11191.
- Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Totsuka Y. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024; 899: 503821.
- Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Totsuka Y. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 2024; 49: 425-34.

2. 学会発表

- 戸塚ゆかり. DNA付加体研究の過去・現在・未来. 東京、令和6年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム、2024年6月1日
- Yukari Totsuka. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 札幌、第42回札幌国際がんシンポジウム、2024年6月6-8日
- Yukari Totsuka. Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens. 京都、

The 8th JCA-AACR Special Joint Conference、2024年6月28-30日

4. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、煙山紀子、加藤護. Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products. 福岡、第83回日本癌学会学術総会、2024年9月19-21日
5. 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明. 東京、アンチエイジング研究シンポジウム、2024年10月25-26日
6. 戸塚ゆ加里. 環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索. Web開催、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024秋季ネットシンポジウム、2024年11月9日
7. 戸塚ゆ加里. DNA付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明. 福岡、第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27-29日
8. 戸塚ゆ加里. オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発. 岡山、第85回MMS秋の定例会、2024年12月6日
9. 戸塚ゆ加里、石ケ守里加子、牛山明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子. 加熱タバコ製品の吸入暴露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性. 岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
10. 戸塚ゆ加里、永井桃子、加藤護. 次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する. 岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
11. 石ケ守里加子、柳澤萌、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストナノマテリアルの毒性評価. 岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
12. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚ゆ加里. N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析. 岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
13. 渡部浩平、三好規之、戸塚ゆ加里. 二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析. 岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
14. 戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性評価. 福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
15. 宮崎飛翔、藤岡正喜、鰐淵英機、美谷島克宏、石ケ守里加子、加藤孝一、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規毒性試験法の開発. 福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
16. 渡部浩平、下村航平、安藤彩花、佐藤玲香、鈴木千咲、武内まどか、三好規之、小林琢磨、戸塚ゆ加里、加藤孝一、中嶋順一. 二環芳香族アミンにおける遺伝毒性評価. 福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
17. 本橋実奈、高村岳樹、佐々彰、加藤孝一、中嶋順一、戸塚ゆ加里. アルコール発がんにおけるドライバードラクトの探索と変異誘発メカニズムの解明. 福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
18. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri ZAVADIL、渡部浩平、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバードラクト探索. 福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日

G. 知的所有権の取得状況

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