

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：病理学的解析

研究分担者 藤岡 正喜 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 特任講師

研究要旨

本研究は、有機フッ素化合物ばく露による毒性影響について、毒性病理学的解析を行う。令和6年度は「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」および「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」で用いられた動物に次いで検討した。その結果、「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」では19物質のうち16物質において肝臓への毒性影響を認め、単回投与による毒性影響の主体は肝臓であることが確認された。また、3物質で腎臓への毒性影響が存在した。加えて、一部のPFASについて投与濃度依存性の毒性影響を確認できた。「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」では、6物質のうち肝臓で4物質が、腎臓で1物質が、重量の増加とともに、病理組織学的にも毒性影響を確認した。一方、血液・生化学検査による解析では、上記の毒性影響を認めた臓器に関連するGOTやGPT、CREやBUNなどの有意な上昇が全例でみられず、低い感受性を示した。また、肝組織での毒性影響所見や領域が異なることは、PFASによる毒性機序が異なることを示し、発がん機序や遺伝子発現変動が異なる可能性を示した。加えて、「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」で毒性の認められた臓器は、「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」においても検出できた。以上の結果から、PFASによる毒性は肝臓が主体ながら一部は腎臓にも存在し、その影響を検討するためには毒性病理学的解析が重要な役割を果たすことが示された。

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年度は「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」および「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」で得られた検体を用いて、一般状態および病理組織学的解析を実施し、PFASのばく露による影響について検討を行った。

B. 研究方法

[材料と方法]

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」および「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」で得られた検体を用いて、以降に記す検討を行った。

[臓器重量、血液学的・血液生化学的検査および病理組織学的解析]

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」において、試験期間終了後、麻酔下にて安楽殺を行い、肝臓、腎臓および脾臓を採取し、臓器重量を測定した。また「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」において、試験期間終了後、麻酔下にて腹部大動脈より採血後に安楽殺を行い、肝臓、腎臓、脾臓、大脳、小脳、肺、心臓、舌、膵臓、胸腺、前胃、腺胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、前立腺、精囊、精巣、精巣上体、下垂体、副腎および甲状腺を採取した。また、剖検時に得られた肝臓、腎臓および脾臓については臓器重量を測定した。さらに、剖検時に採取した全血および血清を用いて血液学的・血液生化学的検査を行った。

得られた組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定を行い、切り出し・パラフィン包埋したのちに病理組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した上で鏡検をおこなった。

[統計学的解析]

臓器重量の有意差検定について、F検定による等分散検定を行った。等分散の場合はStudent's t-test検定を行い、不等分散の場合はWelch t-test法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定について、Fisherの直接確率検定を

行った。

(倫理面の配慮)

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

[体重・臓器重量]

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」における試験開始前と剖検直前の体重変化を Table 1 に、臓器の絶対重量および相対重量を Table 2 に示す。対照群と比較して、PFOA 330 mg/kg 投与群、DFEMS 300 mg/kg 投与群、GenX (HFPO-DA)、PFPMs、PFBA 投与群で有意な体重の増加抑制がみられた。また、対照群と比較して、絶対肝重量の有意な減少が PFOA 330 mg/kg 投与群、DFEMS 100, 300 mg/kg 投与群、GenX (HFPO-DA)、PFOS、PFPMs、PFBA、HFBC、PFPeA 投与群でみられた。一方、PFMP 投与群においては、有意な増加が確認された。また相対肝重量の有意な減少が、DFEMS 100, 300 mg/kg 投与群、PFPMs、PFBA、PFHxA、4-CBTF、PFPeA 投与群でみられた。絶対腎臓重量の有意な増加が、PFHEP、2, 2-BPF、PFHC、2, 5-BDF、PFHxA、4-CBTF 投与群でみられた。また、有意な減少が PFOA 330 mg/kg 投与群、PFOS、PFPeA、PFHpA 投与群でみられた。相対腎臓重量の有意な増加が、PFOA 330 mg/kg 投与群、DFEMS 300 mg/kg 投与群、GenX (HFPO-DA)、PFHEP、2, 2-BPF、2, 5-BDF、PFBA、PFHxA、4-CBTF、HFBC、PFPO 投与群でみられた。絶対脾臓重量の有意な減少が PFOA 110, 330 mg/kg 投与群、DFEMS 300 mg/kg 投与群、PFBA、4-CBTF 投与群でみられた。

「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における剖検時における各群の重量および臓器の絶対重量および相対重量を Table 3 および 4 に示す。対照群と比較して、体重増加の有意な抑制が PFOA、DFEMS 投与群でみられた。絶対および相対肝重量の有意な増加が PFOA、GenX (HFPO-DA)、PFHEP、DFEMS 投与群でみられた。絶対腎重量の有意な増加が DFEMS 投与群で、相対腎重量の有意な増加が、PFOA、DFEMS 投与群でみられた。また、絶対脾重量の有意な減少が、PFOA 投与群でみられた。

[血液学的・血液生化学的検査]

「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における血液学的検査を Table 5 に、血液生化学的検査を Table 6 に示す。

血液学的検査の結果、対照群と比較して、白血球(WBC)の有意な増加が PFOA、GenX (HFPO-DA)、DFEMS 投与群でみられた。また、赤血球(RBC)、ヘモグロビン(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)の有意な減少が PFOA、GenX(HFPO-DA)、DFEMS 投与群でみられた。加えて、GenX(HFPO-DA)投与群ではRDWCV(%), RDWSD(fL), PDW(%)の有意な減少がみられた。

血液生化学的検査の結果、対照群と比較して、LDH、GOTの有意な増加が PFOA および GenX(HFPO-DA)投与群でみられた。総タンパク(TP)の有意な減少が PFMP 投与群でみられた。アルブミン(ALB)の有意な減少が PFHEP、PFMP 投与群でみられた。グルコース(GLU)の有

意な減少が PFOA 投与群でみられた。総コレステロール(TCHO)の有意な減少が、PFOA、PFMP 投与群でみられた。GPTの有意な増加が GenX(HFPO-DA)投与群でみられた。Caの有意な減少が、PFOA 投与群でみられた。クレアチニン(CRE)の有意な減少が、DFEMS、PFHEP、PFMP 投与群でみられた。BUNの有意な増加が、PFOA 投与群でみられた。グロブリン(GLOB)の有意な減少が、PFOA、GenX(HFPO-DA)投与群でみられた。ALB/GLOB比の有意な減少が、PFOA、GenX(HFPO-DA)投与群でみられた。BUN/CRE比の有意な増加が、DFEMS 投与群でみられた。

[病理組織学的解析]

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」における病理組織学的解析の結果を Table 7 に示す。対照群と比較して、肝臓の single cell necrosis の有意な増加が PFOA 35, 110, 330 mg/kg 投与群、DFEMS 100, 300 mg/kg 投与群、GenX(HFPO-DA)、PFHEP、PFPMs、HxFGC、2, 2-BPF、PFHC、2, 5-BDF、PFMP、PFBA、PFHxA、4-CBTF、PFBS、HFBC、PFPeA 投与群でみられた。また肝臓の Focal necrosis の増加が DFEMS 100, 300 mg/kg 投与群、HxFGC、PFBA 投与群でみられた。腎臓の尿細管壊死の有意な増加が PFHEP、2, 2-BPF、2, 5-BDF 投与群でみられた。また腎臓における蛋白円柱の形成の増加が 2, 2-BPF および 2, 5-BDF 投与群でみられた。

「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における病理組織学的解析の結果を Table 8 に示す。対照群と比較して、肝臓の Single cell necrosis の有意な増加が、PFOA、GenX(HFPO-DA)、DFEMS、PFHEP 投与群でみられた。また、GenX(HFPO-DA)投与群では、グリソン鞘周囲の肝細胞の変性・壊死を主体に focal necrosis を、HxFGC 投与群では、極わずかながら focal necrosis がみられた。一方、PFOA、GenX(HFPO-DA)、DFEMS 投与群で、小葉中心性肝細胞肥大がみられた。腎臓については、PFHEP 投与群で近位尿細管の好酸性変性と拡張とともに、一部のラットでは再生尿細管が存在した。一方、糸球体領域については、いずれの群にも著変がみられなかった。肺については、一部に誤嚥性肺炎や肺炎像が散見されたが、投与群特異的な変化は乏しく、強制胃内投与後の誤嚥関連の炎症所見と推察された。その他の臓器については、一部で炎症細胞浸潤像が見られるものの散発的で、投与物質に起因すると考えられる変化はみられなかった。

D. 考察

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」において、投与前後で体重増加が有意に減少したPFASが存在し、同投与群では臓器の絶対重量も低下しており、その毒性による摂餌困難による影響が推察された。また、病理組織解析の結果、今回検討した19物質のうち16物質で肝臓に single cell necrosisが存在し、単回投与による主な影響を受ける臓器として肝臓であることが確認された。一方、PFHEP、2, 2-BPFおよび2, 5-BDFでは腎臓で尿細管壊死を認め、一部のPFASについては腎障害を引き起こすことが確認された。以上の結果から、PFASによる急性毒性が出現する主な臓器として肝臓および一部で腎臓であることが確認された。

「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」においては、28日間投与により一部のPFASでは肝臓や腎臓の重量増加を認め、組織学的にも変性や壊死など臓器への障害が確認され、「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」と同様に、肝臓や腎臓が主たる毒性影響を受ける臓器である可能性が確認できた。血液・生化学検査において、GOTやGPTの上昇を認めるPFASは、上記の肝臓に影響を与えた物質の一部であり、今回の条件下では鋭敏なマーカーにはならなかった。腎臓についても、PFHEPでCREやBUNの上昇は確認されず、血液・生化学検査による検出が困難であった。その他、肺組織を主体に炎症細胞浸潤像を各群において孤発性にみられたものの、PFAS投与特異的な所見として有意差が認められる病変は乏しかったことから、「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」で得られた結果と同様に、PFASによる毒性が出現する主な臓器として肝臓および一部で腎臓であることが確認された。

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」および「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」いずれも行ったPFASについて検討した結果、28日間投与で病理組織学的に肝臓への毒性影響を確認するとともに肝重量の増加が見られた物質は、単回投与では肝重量の有意な抑制が存在し、肝重量を基にした毒性指標が存在する可能性を示した。一方、単回投与での病理組織学的解析では、大半のPFASで肝毒性影響が検出され、28日間投与よりも非特異的な毒性影響が存在する可能性を示した。今後も臓器重量や病理組織学的解析を主体に、投与期間による毒性影響の相違を検討したい。

E. 結論

1日および28日間のPFAS投与による影響について検討した結果、毒性が出現する主な臓器として肝臓および一部で腎臓であることが確認された。特に28日間投与により、臓器重量の増加と病理組織所見が認められることから、その毒性影響が理解しやすく、肝臓では影響領域が異なる物質が存在し、その毒性機序が異なることを反映していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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、アルパマス ワチラアルンウオン、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回日本毒性学会学術年会、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および毒性の評価. 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 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、妊娠期およ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
 8. Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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方法の*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
 13. 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
 14. 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
 15. 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwon Arpamas、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3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
 16. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwon, 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
 17. Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwon, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 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
 18. Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, 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
 19. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, 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
 20. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、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)のヒト化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**
(予定を含む。)
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。

Table 1. 「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」における体重変化

Chemical	Dose (mg/kgB.W.)	No. of animals	Initial B.W. (Mean±SD)	Final B.W. (Mean±SD)	Ratio (Initial/Final)	
MC	0	27/27	204.0 ± 27.0	225.0 ± 27.7	+10%	
PFOA	low	35	6/6	171.9 ± 5.2	187.4 ± 6.8	+9.0%
	middle	110	6/6	171.6 ± 8.2	185.3 ± 6.5	+8.0%
	high	330	6/6	170.7 ± 7.2	157.6 ± 8.6 ***	-7.7%
DFEMS	low	30	6/6	171.6 ± 6.8	188.4 ± 9.2	+9.8%
	middle	100	6/6	170.7 ± 9.9	186.4 ± 9.7	+9.2%
	high	300	6/6	170.3 ± 7.5	174.5 ± 11.3 ***	+2.5%
GenX	HFPO-DA	580	6/6	217.9 ± 9.1	198.6 ± 15.7 **	-8.9%
	PFOS	50	6/6	171.3 ± 6.3	191.8 ± 8.2	+12.0%
	PFHEP	2000	5/6	217.7 ± 9.2	226.6 ± 11.0	+4.1%
	PFPMs	2000	4/6	218.4 ± 6.7	212.2 ± 6.3 *	-2.8%
	HxFGC	300	6/6	221.6 ± 11.2	227.3 ± 15.1	+2.6%
	2,2-BPF	300	3/3	236.9 ± 4.1	225.0 ± 15.8	-5.0%
	PFHC	300	6/6	233.6 ± 13.5	234.4 ± 20.4	+0.3%
	2,5-BDF	300	6/6	227.0 ± 13.3	220.7 ± 7.6	-2.7%
	PFMP	2000	6/6	227.3 ± 11.4	247.4 ± 10.1	+8.8%
	PFBA	300	6/6	227.4 ± 13.7	194.4 ± 36.5 **	-14.5%
	PFHxA	300	6/6	233.2 ± 8.1	229.1 ± 17.5	-1.8%
	4-CBTF	2000	6/6	227.8 ± 13.0	223.9 ± 11.8	-1.7%
	PFBS	140	6/6	203.5 ± 36.9	245.5 ± 20.1	+20.6%
	HFBC	300	6/6	181.9 ± 14.3	182.9 ± 21.7	+0.5%
	PFPeA	300	6/6	182.2 ± 15.1	187.4 ± 14.6	+2.9%
	PFHpA	300	6/6	182.3 ± 16.9	186.6 ± 31.0	+2.4%
	PFPo	300	6/6	199.2 ± 18.9	207.4 ± 11.3	+4.1%

*: p < 0.05 ** : p < 0.01 *** : p < 0.001

Table 2. 「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」における臓器重量

Chemical	Dose (mg/kgB.W.)	No. of animals	Liver weight		Kidney weight		Spleen weight		
			Absolute (Mean±SD)	Relative (Mean±SD)	Absolute (Mean±SD)	Relative (Mean±SD)	Absolute (Mean±SD)	Relative (Mean±SD)	
MC	0	27/27	11.7 ± 1.8	5.2 ± 0.3	1.94 ± 0.23	0.86 ± 0.05	0.59 ± 0.10	0.26 ± 0.03	
PFOA	low	35	6/6	9.8 ± 0.9	5.2 ± 0.3	1.69 ± 0.12	0.90 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.26 ± 0.03
	middle	110	6/6	9.6 ± 0.5	5.2 ± 0.2	1.71 ± 0.11	0.92 ± 0.04	0.44 ± 0.07 *	0.24 ± 0.04
	high	330	6/6	7.8 ± 0.2 ***	4.9 ± 0.2	1.57 ± 0.13 **	0.99 ± 0.07 ***	0.36 ± 0.07 ***	0.23 ± 0.04
DFEMS	low	30	6/6	9.4 ± 1.3	5.0 ± 0.4	1.68 ± 0.14	0.89 ± 0.05	0.49 ± 0.04	0.26 ± 0.02
	middle	100	6/6	8.3 ± 0.5 **	4.4 ± 0.2 **	1.70 ± 0.17	0.91 ± 0.06	0.54 ± 0.10	0.29 ± 0.06
	high	300	6/6	8.2 ± 1.3 **	4.7 ± 0.5 *	1.70 ± 0.15	0.98 ± 0.04 **	0.49 ± 0.05 *	0.28 ± 0.02
GenX	HFPO-DA	580	6/6	10.3 ± 0.6 **	5.2 ± 0.3	2.03 ± 0.10	1.03 ± 0.07 **	0.50 ± 0.10	0.25 ± 0.05
	PFOS	50	6/6	10.0 ± 0.4 ***	5.2 ± 0.1	1.68 ± 0.13 **	0.88 ± 0.06	0.50 ± 0.12	0.26 ± 0.06
	PFHEP	2000	5/6	11.0 ± 0.8	4.9 ± 0.3	2.32 ± 0.07 ***	1.03 ± 0.07 **	0.49 ± 0.11	0.22 ± 0.04
	PFPMs	2000	4/6	9.6 ± 0.4 ***	4.5 ± 0.1 ***	1.94 ± 0.10	0.92 ± 0.05	0.58 ± 0.13	0.27 ± 0.06
	HxFGC	300	6/6	10.9 ± 1.7	4.8 ± 0.5	1.99 ± 0.15	0.88 ± 0.06	0.58 ± 0.17	0.25 ± 0.05
	2,2-BPF	300	3/3	10.2 ± 2.3	4.5 ± 0.7	2.69 ± 0.10 ***	1.20 ± 0.08 *	0.53 ± 0.15	0.24 ± 0.05
	PFHC	300	6/6	12.4 ± 1.1	5.3 ± 0.2	2.18 ± 0.14 **	0.93 ± 0.08	0.57 ± 0.08	0.24 ± 0.02
	2,5-BDF	300	6/6	10.6 ± 1.3	4.8 ± 0.6	2.09 ± 0.11 *	0.95 ± 0.07 *	0.55 ± 0.10	0.25 ± 0.05
	PFMP	2000	6/6	12.8 ± 0.8 *	5.2 ± 0.4	2.13 ± 0.19	0.86 ± 0.06	0.64 ± 0.07	0.26 ± 0.03
	PFBA	300	6/6	9.1 ± 1.5 **	4.7 ± 0.2 **	1.87 ± 0.32	0.97 ± 0.04 ***	0.45 ± 0.11 *	0.23 ± 0.04
	PFHxA	300	6/6	10.8 ± 1.2	4.7 ± 0.2 **	2.16 ± 0.18 *	0.95 ± 0.07 *	0.60 ± 0.18	0.26 ± 0.07
	4-CBTF	2000	6/6	10.9 ± 0.9	4.9 ± 0.3 *	2.15 ± 0.14 *	0.96 ± 0.05 **	0.49 ± 0.09 *	0.22 ± 0.04
	PFBS	140	6/6	13.2 ± 1.8	5.3 ± 0.5	2.23 ± 0.31	0.90 ± 0.06	0.66 ± 0.15	0.27 ± 0.06
	HFBC	300	6/6	9.4 ± 1.3 **	5.1 ± 0.1	1.79 ± 0.26	0.98 ± 0.07 **	0.47 ± 0.12	0.26 ± 0.04
	PFPeA	300	6/6	9.0 ± 1.0 ***	4.8 ± 0.3 *	1.69 ± 0.20 *	0.90 ± 0.05	0.47 ± 0.12	0.25 ± 0.04
	PFHpA	300	6/6	10.5 ± 2.4	5.6 ± 0.5	1.77 ± 0.10 *	0.97 ± 0.13	0.45 ± 0.14	0.24 ± 0.05
	PFPo	300	6/6	11.2 ± 1.0	5.4 ± 0.3	1.96 ± 0.19	0.94 ± 0.05 *	0.52 ± 0.09	0.25 ± 0.03

*: p < 0.05 ** : p < 0.01 *** : p < 0.001

Table 3. 「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法（1回目）」における臓器重量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Kidneys		Spleen	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	6	378.8 ± 24.8	14.2 ± 2.0	3.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	0.7 ± 0.0	0.87 ± 0.16	0.23 ± 0.04
PFOA	6	307.5 ± 19.7 ***	17.7 ± 2.3*	5.7 ± 0.4***	2.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1**	0.58 ± 0.09**	0.19 ± 0.02
GenX	4	359.8 ± 18.3	23.0 ± 0.5***	6.4 ± 0.4***	3.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.71 ± 0.04	0.20 ± 0.02
HxFGC	3	371.8 ± 7.0	13.8 ± 1.7	3.7 ± 0.4	2.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.70 ± 0.20	0.19 ± 0.05
DFEMS	2	373.0 ± 26.2	15.9 ± 1.8	4.3 ± 0.2	2.8 ± 0.3	0.8 ± 0.0	0.81 ± 0.01	0.22 ± 0.02

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

Table 4. 「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法（2回目）」における臓器重量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Kidneys		Spleen	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	6	422.4 ± 21.3	15.8 ± 1.6	3.7 ± 0.2	3.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	0.76 ± 0.10	0.18 ± 0.03
DFEMS	4	423.1 ± 28.0	18.7 ± 2.3*	4.4 ± 0.3*	3.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	0.81 ± 0.12	0.19 ± 0.02
PFHEP	5	362.5 ± 25.3 **	20.6 ± 1.2***	5.7 ± 0.4***	4.2 ± 0.5***	1.2 ± 0.2***	0.75 ± 0.14	0.21 ± 0.03
PFHxA	3	412.9 ± 4.8	15.2 ± 0.6	3.7 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.8 ± 0.0	0.78 ± 0.10	0.19 ± 0.03

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

Table 5. 「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における血液学的検査

Treatment	Control		PFOA		GenX (HFPO-DA)		HxFGC		DFEMS		DFEMS		PFHEP		PFMP	
	0		30		100		100		100		300		100		100 → 50	
	12/12		6/6		4/6		3/6		2/6		5/6		4/6		3/6	
WBC (10 ² /uL)	65.5 ± 9.6	83.3 ± 7.6 **	88.3 ± 6.5 **	70.7 ± 7.6	110.0 ± 9.0 **	66.0 ± 8.32	67.3 ± 2.7	70.3 ± 12.8								
RBC (10 ⁴ /uL)	718.1 ± 23.4	688.2 ± 50.2 *	605.3 ± 27.6 ****	678.3 ± 38.3	742.0 ± 41.0	638.6 ± 52.58 *	692.3 ± 21.5	680.3 ± 27.1								
HGB (g/dL)	14.8 ± 0.4	13.0 ± 0.8 ***	12.9 ± 0.4 ****	14.3 ± 0.6	14.8 ± 0.5	13.0 ± 0.84 **	14.2 ± 0.3	14.0 ± 0.5								
HCT (%)	40.8 ± 1.0	36.1 ± 2.1 ***	35.8 ± 1.0 ****	39.4 ± 1.2	40.8 ± 1.3	35.7 ± 2.22 **	39.1 ± 0.9	38.6 ± 1.4								
MCV (fL)	66.8 ± 1.2	54.9 ± 1.5	59.3 ± 1.9	68.1 ± 1.5	65.0 ± 1.4	56.0 ± 1.88	56.5 ± 0.6	56.8 ± 1.6								
MCH (pg)	20.7 ± 0.5	19.8 ± 0.8	21.3 ± 0.6	21.0 ± 0.5	20.0 ± 0.4	20.4 ± 0.54	20.5 ± 0.2	20.5 ± 0.4								
MCHC (g/dL)	36.3 ± 0.6	36.0 ± 0.5	35.9 ± 0.2	36.2 ± 0.4	36.3 ± 0.1	36.4 ± 0.50	36.3 ± 0.3	36.1 ± 0.4								
PLT (10 ⁴ /uL)	111.4 ± 11.1	101.0 ± 16.1	128.0 ± 16.1	118.5 ± 16.2	122.0 ± 7.0	104.1 ± 9.02	119.3 ± 14.6	102.1 ± 8.3								
RDWCV (%)	12.1 ± 0.4	12.8 ± 0.6	13.3 ± 0.3 **	12.1 ± 0.4	12.7 ± 0.0	12.7 ± 0.61	12.4 ± 0.2	12.3 ± 0.3								
RDWSD (fL)	27.5 ± 1.2	28.2 ± 1.8	31.6 ± 1.3 **	28.2 ± 1.7	27.9 ± 0.7	28.5 ± 1.92	28.0 ± 0.4	28.0 ± 1.3								
PCT (%)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.05	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0								
MPV (fL)	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.0	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.0	5.4 ± 0.10	5.6 ± 0.1	5.4 ± 0.1								
PDW (%)	14.8 ± 0.5	15.5 ± 0.5	15.7 ± 0.3 **	15.0 ± 0.0	14.8 ± 0.2	14.7 ± 0.19	14.8 ± 0.2	14.7 ± 0.4								

*: p < 0.05 ** : p < 0.01 ***: p < 0.001 ****: p < 0.0001

Table 6. 「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における血液生化学的検査

Treatment	Control		PFOA		GenX (HFPO-DA)		HxFGC		DFEMS		DFEMS		PFHEP		PFMP	
	0		30		100		100		100		300		100		100 → 50	
	12/12		6/6		4/6		3/6		2/6		5/6		4/6		3/6	
LDH (U/L)	118.18 ± 30.8	213.7 ± 43.8 ***	174.0 ± 43.5 *	98.7 ± 11.1	88.0 ± 12.0	128.4 ± 49.2	228.3 ± 141.5	128.3 ± 49.8								
GOT (U/L)	63.5 ± 5.6	95.5 ± 10.6 ****	75.0 ± 4.6 *	63.0 ± 9.0	56.0 ± 6.0	57.0 ± 6.9	61.5 ± 5.7	64.3 ± 4.2								
TP (g/dL)	5.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.9 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.1 ± 0.1 *								
ALB (g/dL)	3.5 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2 *	2.8 ± 0.1 *								
ALP (U/L)	534.3 ± 20.5	472.3 ± 111.2	682.5 ± 96.3	389.3 ± 118.6	504.5 ± 88.5	457.0 ± 66.6	390.8 ± 77.2	511.3 ± 55.2								
GLU (mg/dL)	150.8 ± 27.4	60.8 ± 18.7 *	88.3 ± 25.6	108.3 ± 52.2	122.0 ± 35.0	190.4 ± 25.9	210.3 ± 17.3	241.3 ± 7.6								
TBIL (mg/dL)	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0								
IP (mg/dL)	9.8 ± 1.6	12.7 ± 1.0	12.7 ± 1.3	12.1 ± 1.5	12.7 ± 1.7	8.2 ± 0.6	8.1 ± 0.8	8.8 ± 0.1								
TCHO (mg/dL)	62.8 ± 9.1	52.3 ± 2.8 *	61.3 ± 11.6	58.0 ± 1.4	64.5 ± 2.5	56.4 ± 6.3	69.0 ± 8.4	43.0 ± 3.7 **								
GGT (U/L)	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.4 ± 1.7	1.5 ± 0.6	2.3 ± 0.5								
GPT (U/L)	38.7 ± 9.1	44.2 ± 3.4	48.8 ± 3.7 *	32.7 ± 3.7	40.0 ± 4.0	33.4 ± 3.6	35.8 ± 6.5	42.7 ± 3.7								
Ca (mg/dL)	9.2 ± 0.5	8.8 ± 0.2 *	9.1 ± 0.1	9.0 ± 0.0	9.7 ± 0.4	9.4 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.5 ± 0.0								
CRE (mg/dL)	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0 **	0.2 ± 0.0 **	0.2 ± 0.0 **								
BUN (mg/dL)	20.5 ± 2.0	25.3 ± 2.4 ***	23.1 ± 1.7	20.8 ± 0.5	19.9 ± 0.6	21.9 ± 4.1	20.8 ± 2.5	18.8 ± 1.2								
GLOB (g/dL)	2.2 ± 0.3	1.8 ± 0.1 *	1.6 ± 0.2 *	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.0								
ALB/GLOB	1.7 ± 0.4	2.2 ± 0.3 *	2.5 ± 0.4 **	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1								
BUN/CRE	66.6 ± 13.6	81.1 ± 10.2	69.0 ± 3.7	69.2 ± 7.2	61.3 ± 2.8	88.8 ± 11.5 *	86.3 ± 11.6	79.3 ± 5.7								

*: p < 0.05 ** : p < 0.01 ***: p < 0.001 ****: p < 0.0001

Table 7. 「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」における病理組織学的解析

Chemical Dose (mg/kgB.W.)	MC 0	PFOA			DFEMS			GenX HFPO-DA 580	PFOS 50
		low 35	middle 110	high 330	low 30	middle 100	high 300		
No. of animals	27/27	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Liver									
Single cell necrosis	0	6*	6*	6*	0	6*	6*	6*	0
Focal necrosis	0	0	0	1	0	4*	6*	0	0
Kidney									
Necrosis, tubule	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cast	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyst	0	0	0	0	0	2	0	0	0

Chemical Dose (mg/kgB.W.)	MC 0	PFHEP 2000	PFPMs 2000	HxFGC 300	2,2-BPF 300	PFHC 300	2,5-BDF 300	PFMP 2000	PFBA 300	PFHxA 300	4-CBTF 2000	PFBS 140	HFBC 300	PFPeA 300	PFHpA 300	PFPO 300
No. of animals	27/27	5/6	4/6	6/6	3/3	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Liver																
Single cell necrosis	0	3*	3*	2*	3*	5*	5*	2*	6*	6*	5*	3*	5*	4*	1	0
Focal necrosis	0	0	0	2*	0	0	0	0	2*	0	1	0	0	0	0	0
Kidney																
Necrosis, tubule	0	4*	0	0	3*	0	2*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cast	0	0	0	0	3*	0	3*	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cyst	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

*: p < 0.05 (vs. MC group)

Table 8. 「非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」における病理組織学的解析

Treatment	Control	PFOA	GenX (HFPO-DA)	HxFGC	DFEMS	PFHEP	PFMP
Dose (mg/kg)	0	30	100	100	300	100	100
No. of animal	12	6	4	3	5	4	3
Liver							
Single cell necrosis	0	6*	4*	1	4*	0	0
Focal necrosis	0	0	4*	3*	1	0	2
Hypertrophy, centrilobular	0	6*	4*	0	5*	0	0
Kidney							
Tubular regeneration	0	0	0	0	0	2	0
Tubular dilatation	0	0	0	0	0	5*	0
Cyst	1	0	0	0	0	0	1
Lung							
Thrombus	0	0	1	0	0	0	0
Prostate							
Inflammation, interstitium	0	0	0	0	1	2	0
Thyroid							
Inflammation, interstitium	0	0	0	0	0	2	0
Epididymis							
Sperm granuloma	0	0	0	1	0	0	0

*: p < 0.05 (vs. Control)