

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。また、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、19 種類の PFAS を対象に、DNA のアダクトーム解析を実施し、得られたデータによる主成分判別分析 (PCA-DA) を実施したところ、遺伝毒性および発がん性の有無によりクラスタリングされることがわかった。また、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 について、アルキル化 DNA の修復酵素 (MGMT) 欠損株 (YG7108) を用いた Ames 試験により、PFOA、PFPMs、DFEMS の変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOA は本条件下における変異原性は陰性であると判定した。一方、PFPMs および DFEMS 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 では変異原性は陽性であると判定した。

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

① DNA 付加体の網羅的解析

課題 1 で実施した PFAS 19 物質を単回経口投与で得られた肝臓から 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した。

得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを A: 肝発がん物質短期検出スキームもしくは、Ames 試験で陽性と判定されたもの (赤で表示)、B: 肝発がん物質短期検出スキーム陰性かつ QSAR で遺伝毒性アラートが立たなかったもの (青で表

示)、C: 肝発がん物質短期検出スキーム陰性だが、遺伝毒性発がん物質のアラートが立っているもの(黄色で表示)の3つに分類し、主成分判別分析(PCA-DA)により解析した。

② アルキル化DNAの修復酵素欠損株を用いたAmes試験

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4つのPFAS(PFOA、PFPMs、DFEMS、2,5-BDF)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した。

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

① DNA付加体の網羅的解析

各PFASを投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。PCA-DA解析を行なったところ、A、B、C(分類内訳は方法を参照)の3つのグループに綺麗に分離されることがわかった。

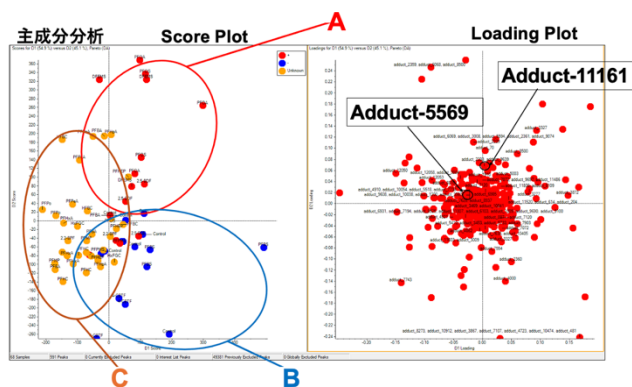


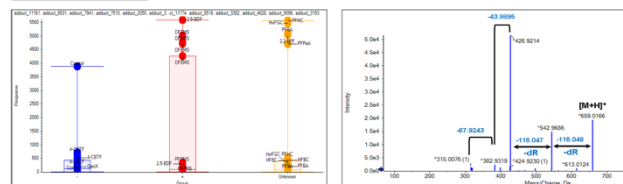
図1. LC-HRAM アダクトームによるPCA-DA解析

Loading Plotから、AとBのクラスターへの寄与が大きい付加体をスクリーニングしたところ、Adduct-5569およびAdduct-11161の2つを見出した。これら付加体のMS/MSフラグメント解析結果および各グループにおける存在量を図2に示す。

MS/MSフラグメントパターンからAdduct-11161はデオキシリボース(dR)に相当するm/z116.047の喪失が2分子分観測されていることから、DNA-DNAの架橋であることが推測された。また、Adduct-5569はフラグ

メントイオンピークに1分子のdR喪失に加え、グアニン塩基に相当するm/z152.058が観測され、dG付加体であることが推測された。

Adduct-11161



Adduct-5569

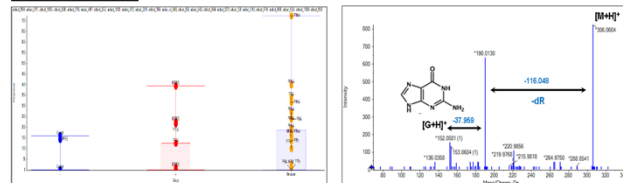


図2. MS/MSフラグメント解析結果と各グループにおける存在量

② アルキル化DNA修復酵素欠損株を用いたAmes試験

PFOA、PFPMsおよびDFEMSの変異原性試験を実施した結果、両化合物とも、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(図3)。さらに、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。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では4.7, DFEMSでは29.1であった。このことから、PFPMsおよびDFEMS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。

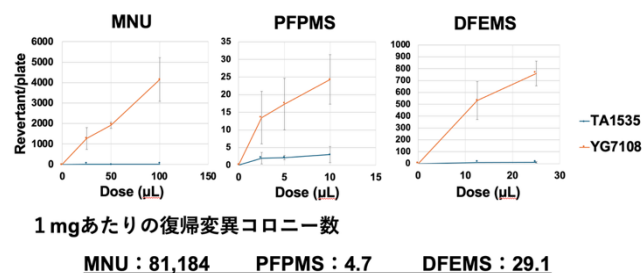


図3. 代謝活性化系非存在下でのPFPMsおよびDFEMSの変異原性

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、2,5-BDFの変異原性試験について同様に検討中である。

D. 考察

①DNA 付加体の網羅的解析

各 PFAS を投与したラット肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なったところ、A、B、C の 3 つのグループに綺麗に分離されることがわかった。このうち、C に分類した PFAS のうち、A と近いところにプロットされるものが観察され、これらの PFAS は肝発がん物質短期検出スキーム陰性と判定されたが、遺伝毒性や肝臓に対する毒性影響を示す可能性があるのではないかと考えている。現在、肝発がん物質短期検出スキームで追加解析された検体および PFAS の長期投与による発がん性予測試験から採取された検体についても同様にアダクトーム解析を実施している。

②アルキル化 DNA 修復酵素欠損株を用いた Ames 試験

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とのことだったので、アルキル化 DNA の修復酵素 (MGMT) 欠損株 (YG7108) を用いた Ames 試験により、PFOA、PFPMs、DFEMS の変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOA は本条件下における変異原性は陰性であると判定した。一方、PFPMs および DFEMS 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ことから、これら PFAS は DNA のアルキル化様の付加体を介して遺伝毒性を示すことが示唆された。MNU と同様の反応機構であるのであれば、赤丸で囲った部分が DNA に付加する可能性が考えられた (図 4)。

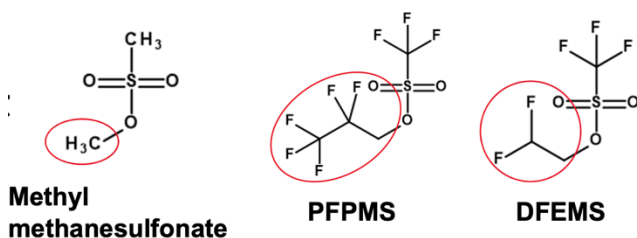


図 4. PFPMs と DFEMS の構造から予測される官能基

一方、PFOA 及び PFPMs について、遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出法による評価では、それぞれ陽性及び陰性の結果が得られたのに対し、MGMT 欠損株 YG7108 を用いた Ames 試験では、逆にそれぞれ陰性及び陽性という異なる結果が得られた。このような *in vitro* 及び *in vivo* 試験結果の乖離については、使用菌株の特性やアルキル化 DNA 修復酵素の発現状況を含む複数の要因を考慮する必要がある。今後は、より多様な PFAS を対象とした体系的かつ包括的な比較検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

19 種類の PFAS を対象に、DNA のアダクトーム解析を行なったところ、A: 肝発がん物質短期検出スキームも

しくは、Ames 試験で 陽性と判定されたもの (赤で表示)、B: 肝発がん物質短期検出スキーム陰性かつ QSAR で遺伝毒性アラートが立たなかったもの (青で表示)、C: 肝発がん物質短期検出スキーム陰性だが、遺伝毒性発がん物質のアラートが立っているもの (黄色で表示) の 3 つのグループに綺麗に分離されることがわかった。このうち、C に分類した PFAS のうち、A と近いところにプロットされるものが観察され、これらの PFAS は肝発がん物質短期検出スキーム陰性と判定されたが、遺伝毒性や肝臓に対する毒性影響を示す可能性があるのではないかと考えている。また、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 について、アルキル化 DNA の修復酵素 (MGMT) 欠損株 (YG7108) を用いた Ames 試験により、PFOA、PFPMs、DFEMS の変異誘発能の確認を実施した。その結果、PFOA は本条件下における変異原性は陰性であると判定した。一方、PFPMs および DFEMS 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 では変異原性は陽性であると判定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y. Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells. Genes & Environ., 2025 in press.
2. Betsuyaku Y, Motohashi M, Sassa ., Takamura-Enya T, Totsuka Y. Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde. Biomolecules, 2025; 15(6): 878.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里. 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発. 沖縄、第52回日本毒性学会学術年会、2025年7月2-4日
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水 洋志. *In vitro* 薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性. 沖縄第52回日本毒性学会学術年会、2025年7月2-4日
3. 宮崎飛翔、石ヶ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、加藤孝一、美谷島克宏、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発. 千葉、第38回発癌病理研究会、2025年8月20-22日
4. Yukari Totsuka, Momoko Nagai, Asmaa Elzawahari, Rikako Ishigamori, Shinya Hasegawa, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers. ニューヨーク、EMGS2025、2025年9月6-10日
5. 戸塚ゆ加里. 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析. 名古屋、第32回日本がん予防学会総会、2025年9月12, 13日
6. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚ゆ加里. 有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価. 名

古屋、第32回日本がん予防学会総会、2025年9月12,13日

7. Yukari Totsuka. Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling. 金沢、第84回日本癌学会総会、2025年9月25-27日
8. 石ケ守里加子、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの遺伝毒性評価. 金沢、第84回日本癌学会総会、2025年9月25-27日
9. 長谷川晋也、吉田健一、垣内伸之、渡部光一、川口駿、小川誠司、戸塚ゆ加里. 加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム. 金沢、第84回日本癌学会総会、2025年9月25-27日
10. Yukari Totsuka. Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling. ソウル、2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, 2025年10月22-24日
11. 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とメカニズムの解明. 大阪、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2025年10月24-25日
12. 戸塚ゆ加里. Screening for genotoxic compounds and study of carcinogenic mechanisms using next-generation sequencing (NGS) and adductome analysis. 静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22-23日
13. 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、加藤孝一、美谷島克宏、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発. 静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22-23日
14. 石ケ守里加子、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ドマテリアルの包括的毒性評価. 静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22-23日
15. 長谷川晋也、石ケ守里加子、鈴木周五、大野麻理奈、吉田健一、垣内伸之、渡部光一、川口駿、小川誠司、

戸塚ゆ加里. ヒト胎児腎細胞株を用いた Error-corrected NGS による化学物質の変異シグネチャー解析. 静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22-23日

16. 戸塚ゆ加里. オルガノイド技術を用いた環境化学物質影響評価. 東京、日本学術会議主催学術フォーラム、2025年12月18日
17. 戸塚ゆ加里. ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発. 大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
18. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志. ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性. 大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
19. 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、吉田健一、大野麻理奈、小川誠司、垣内伸之、川口駿、渡部光一、中馬新一郎、加藤孝一、美谷島克宏、樋口裕一郎、上原正太郎、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発. 大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
20. 長谷川 也、石ケ守里加子、高橋賢吾、遠藤瑞葵、戸塚ゆ加里. ヒト胎児腎細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価. 大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
21. 今井正彦、小川心音、川西なつき、中山瑞穂、大島正伸、戸塚ゆ加里. 大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築. 大阪、日本薬学会第146年会、2026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