

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20825

研究課題名(和文)胎児期OH-PCB曝露による代謝経路と次世代への性ホルモン攪乱作用の解明

研究課題名(英文)To detect the affects of maternal exposure of OH-PCBs during pregnancy on metabolic pathway and disruption of reproductive hormones

研究代表者

川野 佐智子(伊藤佐智子)(Sachiko, ITOH)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号：90580936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：出生前向きコホートをを用いて母体血中水酸化PCB(OH-PCB)濃度が臍帯血中性ホルモン濃度に与える影響について検討した。重回帰分析を行った結果、男児においては4-OH-CB146+3-OH-CB153濃度が高いとSex hormone binding globulin(SHBG)濃度が有意に低かった。女児では、4-OH-CB187濃度が高いとプロゲステロン濃度が有意に低かった。各OH-PCB濃度を四分位にして検討をした結果、男児において4-OH-CB146+3-OH-CB153濃度が最も低い群と3番目に低い群ではSHBGが有意に低くなっており、濃度依存性がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：Evidence on the toxicity of hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) for reproductive hormones is limited. In addition, there was no statistical difference between any of the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) related to metabolic pathway and OH-PCB concentrations in maternal blood during pregnancy. We aimed to investigate the effects of environmental prenatal exposure to OH-PCBs and reproductive hormone levels in cord blood, taking into account the maternal SNPs into account. 169 mother-infant pairs registered to Sapporo cohort, the Hokkaido Study, were included in this analysis. In multiple linear regression models, significant inverse associations were found between maternal 4-OH-CB146+3-OH-CB153 and boy's sex hormone binding globulin (SHBG) in dose-response manner. Maternal 4-OH-CB187 level was associated with decreased girl's progesterone. There was no significant difference of OH-PCB levels or effect on hormones between each type of SNPs.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：OH-PCB 性ホルモン 胎児期曝露 出生コホート 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

PCBは毒性が発見されたのち、すでに国内では1972年に製造が中止され、2004年にストックホルム条約でその使用と廃棄が禁止されたが、PCBを含む製品は現在も使用され、安定性と長期にわたる蓄積性のため、環境中や生体から検出され続けている(Schechter et al. 2003)。これまでPCB胎児期曝露が生後の神経発達を妨げるという報告があり(Grandjean and Landrigan 2006; Jacobson and Jacobson 1996)、成人よりも環境物質に脆弱とされる胎児への影響検討が注目されてきた。

PCBの一部は生体内でCytochrome450による酸化を受けた後、大部分がOH-PCBへ代謝され速やかに体外へ排出されるとされてきたが、近年OH-PCBはPCB同様生体内や環境中に蓄積することが報告されている(Letcher et al. 2000)。そのため、これまでPCBの健康影響とされてきたものが本来はOH-PCBの影響である可能性がある。

PCBの胎児期曝露と生後の性ホルモン濃度の関連を検討した疫学研究では、PCB曝露濃度が高くなると児のテストステロン、エストラジオール濃度が有意に低くなる報告がある(Cao et al. 2008; Grandjean et al. 2012)。胎児期の性ホルモンは性の分化や性器形成に重要な役割を果たしており、特に男児における尿道下裂や停留精巣は胎児の男性ホルモン産生時期に開始することから、これらの発生には胎児期の性ホルモン濃度が関わっているとされる。また、横断研究ではPCBの血中濃度が高いと精子の質の低下がみられたり(Toft et al. 2006)、月経周期の長期化や月経量減少との関連がみられることから(Buck Louis et al. 2011)、胎児期曝露による性ホルモン値攪乱の影響が長期に渡り生殖機能へ弊害をもたらす可能性が考えられる。一方PCB代謝物であるOH-PCBについては、In vitroにてOH-PCBがエストロゲン転移酵素の阻害やエストロゲン受容体に結合することで、エストロゲン・抗エストロゲン作用を有し、ホルモン攪乱作用を起こすことが報告されており(Arulmozhiraja et al. 2005; Kester et al. 2000)、生殖作用への影響が懸念されるが、これまでOH-PCB胎児期曝露による児の性ホルモンへの影響を検討した疫学研究はない。さらに、報告されてきたPCBの影響は、体内で代謝生成されたOH-PCBによる影響とも考えられる。過去の母体血中、臍帯血中それぞれのPCB、OH-PCB濃度を測定した報告では Σ OH-PCB/ Σ PCB比が母体血中より臍帯血中が高かった(Kawashiro et al. 2008; Park et al. 2008)。これはPCBよりOH-PCBがTransthyretin(TTR)など胎盤透過性の高い結合タンパクと強い結合力を有することから(Brouwer et al. 1998)容易に臍帯血中へ移行するためと考えられ、胎児にはより強い影響を与える可能性が示唆される。また、「北海道スタディ」の妊婦256名の体内OH-PCB濃度を異性体ごとに測定したところ、血中

Σ OH-PCB/ Σ PCB濃度比は先行研究の妊婦血中比(0.19 (Soechitram et al. 2004)、0.18 (Kawashiro et al. 2008))と比較して低い値(0.08)を示したことから、申請者らのコホート内妊婦における体内PCB代謝能力が低い、またはOH-PCB体外排泄能力が高い可能性が考えられるため、個人別の生体内代謝環境による血中濃度差について検討の必要がある。このように性分化や器官形成に重要で、最も脆弱な時期である胎児期のOH-PCB曝露による児の性ホルモン値攪乱作用については研究が不足しており十分な結果が得られていないため、わが国における早急な検討と予防対策が急務である。

2. 研究の目的

本研究は国内最大規模の出生前向きコホートを用いて

- ・代謝に関与する遺伝子多型SNPsと体内PCB・OH-PCB濃度との関連を検討すること、
- ・OH-PCBが児の出生時性ホルモン値攪乱へ与える影響の解明を代謝関連SNPsを考慮しながら行い、OH-PCBの胎児期曝露がおよぼす次世代への健康影響評価によって効果的な環境リスク対策と予防対策への道を切り拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

2003年から前向き出生コホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道研究」を実施中であり、そのうち2003年～2005年に札幌市内同一産科医院にて参加登録を行った妊婦514名の小規模コホート参加者のうち、妊娠中母体血中OH-PCB濃度と出生時の児臍帯血が揃う169組の母児を対象とした。

妊婦とその配偶者の既往歴、教育歴、世帯収入、喫煙状況などの対象者の属性は妊娠中期から後期に実施した自記式調査票、児の性別、出生時体重、出産経歴などの出生時所見は医療診療録から得た。母体血中OH-PCB濃度は福岡県保健環境研究所で測定し、LC/MS/MSで母体血中OH-PCB濃度を測定し、4-OH-CB107、4-OH-CB146+3-OH-CB153、4-OH-CB172、4-OH-CB187の各異性体について分析した。

性ホルモンは、臍帯血で295名の性ホルモンであるエストラジオール(E)、総テストステロン(T)、プロゲステロン(P)、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、アンドロステネジオン(A-dione)をLC-MS/MS法、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、およびプロラクチン(PRL)を免疫放射定量測定(IRMA)法、Inhibin BをELISA法で測定した。また、INSL3をEIA法で測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。

SNPs解析については、母体血よりAhR、CYP1A1、CYP1B1、GSTM、GSTTの解析を

行った。

母体血中各 OH-PCB 異性体濃度および Σ OH-PCB 濃度と各性ホルモン値の関連については多変量解析を行った。多変量解析の独立変数は、母体血中 Σ OH-PCB、4-OH-CB146+3-OH-CB153、4-OH-CB187 濃度とした。なお、 Σ OH-PCB 濃度、性ホルモン値は対数変換(\log_e)して解析に用いた。従属変数は、母児各性ホルモン値とし、母親の出産時年齢、出産回数、魚摂取量、世帯年収、妊娠中の喫煙に加え、児の在胎週数で調整して重回帰分析を行った。また同様の解析を各 SNPs の多型ごとに層別化して行った。重回帰分析で $p < 0.10$ の結果については、濃度依存性を検討するため、OH-PCB 濃度を四分位に変換し、各性ホルモン濃度 (\log_e) の Least square means (LSM) を求めた。調整変数は重回帰分析と同様の要因で行った。統計解析には SAS 社 JMP12 を使い、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターの倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

参加した 169 組の母児のうち、男児が 78 名、女児が 91 名であった。

OH-PCB 各異性体のうち、母体血中濃度は 4-OH-CB187 が最も高く (中央値: 19.83 pg/g wet weight (ww))、次に

4-OH-CB146+3-OH-CB153 であった (中央値: 19.15 pg/g ww)、異性体の濃度合計 Σ OH-PCB は中央値が 30.41 pg/g ww であった。4-OH-CB107、4-OH-CB172 濃度は全対象者の 50%未滿が検出下限値以下であったため、その後の解析からは除外した。

OH-PCB の母体血中濃度測定と代謝関連遺伝子多型 (SNPs) の解析と評価では、SNPs (AhR、CYP1A1、CYP1B1、GSTM、GSTT) で層別化した集団間での 4-OH-CB 146 + 3-OH-CB 153、4-OH-CB 187 および Σ OH-PCB 母体血中濃度差を検討したところ、遺伝子多型による有意な濃度差はみられなかった。

OH-PCB の母体血中濃度が臍帯血中性ホルモン値へ与える影響について重回帰分析を行った結果、男児において母体血中 4-OH-CB 146 + 3-OH-CB 153 濃度 (\log_e) が高いほど、SHBG (\log_e) が低かった ($\beta = -0.154$, $p = 0.007$) (Table 1)。女児においては 4-OH-CB187 濃度 (\log_e) が高いほど、P (\log_e) が低かった ($\beta = -0.109$, $p = 0.016$) (Table 2)。各 SNPs で層別化した解析を実施したところ、SNPs による差はみとめられなかった。

Table 1. Linear regression models of maternal 4-OH-CB146+3-OH-CB153 levels and reproductive hormone levels among boys (n=78).

	Beta	95% CI	p-value
--	------	--------	---------

SHBG (nmol/L)	-0.154	0.263, -0.045	0.007
---------------	---------------	----------------------	--------------

Table 2. Linear regression models of maternal 4-OH-CB187 levels and reproductive hormone levels among girls (n=91).

	Beta	95% CI	p-value
Progesterone (ng/mL)	-0.109	-0.197, -0.021	0.016

OH-PCB 濃度を四分位にした検討では、男児において、4-OH-CB146+3-OH-CB153 濃度が最も低い群と 3 番目に低い群では SHBG が有意に低くなっており (p for trend=0.015)、濃度依存性がみとめられた (Figure 1)。

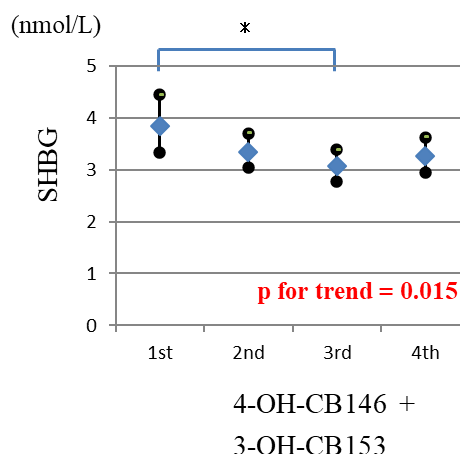


Figure 1. Least square means of SHBG in cord blood among male infants, according to maternal serum 4-OH-CB146+3-OH-CB153 concentration quartiles.

胎児期の OH-PCB 曝露が、出生時の性ホルモンへ与える影響については、これまでヒトでの報告はなく、本研究が世界で初めての報告となる。

本研究では男児において母体血中 4-OH-CB 146 + 3-OH-CB 153 濃度が高いほど、SHBG が低い結果であった。OH-PCB の親化合物である PCB と性ホルモン濃度を検討したフランスの報告では、胎児期の PCB 曝露濃度が高いと臍帯血中 SHBG が高いという結果であった (Warembourg et al. 2016)。OH-PCB は PCB よりタンパク質や性ホルモンレセプターへの結合能力が高いと報告されていることから、先行研究での PCB 曝露による影響は、OH-PCB による影響であることが考えられた。また、SHBG は E2、T の輸送タンパクであり、この SHBG 濃度が影響されることは、E2、T の濃度へも影響する可能性が考えられた。一方、女児では、4-OH-CB187 濃度が高いほど、P が低かった。OH-PCB の親物質である PCB に関する報告では、PCB126、PCB153 は

steroidogenic genes (STAR, HSD3B, CYP19A1) へ影響することが報告されており (Sechman et al. 2016)、OH-PCB もステロイドホルモン合成系に關する酵素の働きを阻害・または促進することで、P4 濃度へ影響することが示唆された。

本研究では、一般生活環境レベルでの妊娠中 OH-PCB 曝露による影響について異物代謝関連 SNPs に着目したが、SNPs による有意な血中濃度差はみられなかった。SNPs によって体内の PCB から OH-PCB への代謝能力の差、さらに生成された OH-PCB 体外排泄能力の差により、体内 OH-PCB 濃度差がある可能性も考えられたが、これまでヒトにおける PCB、OH-PCB の代謝経路は明らかになっておらず、個々人の生体内代謝環境による血中濃度差についての疫学研究はないため、今後も SNPs の追加解析に加え、複数の SNPs 組み合わせによる層別化を行い、検討の必要がある。また、高塩基の PCB は水酸化されにくく、低塩基の PCB は水酸化されやすいことから、総 PCB 濃度が高値であっても総 OH-PCB 濃度は PCB の異性体の種類によることが多い。よって、PCB および OH-PCB 異性体ごとの検討が今後も必要と考えられる。

< 引用文献 >

- Arulmozhiraja S, Shiraishi F, Okumura T, Iida M, Takigami H, Edmonds JS, et al. 2005. Structural requirements for the interaction of 91 hydroxylated polychlorinated biphenyls with estrogen and thyroid hormone receptors. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 84:49-62.
- Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, et al. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: Mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and industrial health* 14:59-84.
- Buck Louis GM, Rios LI, McLain A, Cooney MA, Kostyniak PJ, Sundaram R. 2011. Persistent organochlorine pollutants and menstrual cycle characteristics. *Chemosphere* 85:1742-1748.
- Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, Wittsiepe J, Lemm F, Furst P, et al. 2008. Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: Results from the Duisburg cohort study. *International journal of hygiene and environmental health* 211:30-39.
- Grandjean P, Landrigan PJ. 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368:2167-2178.
- Grandjean P, Gronlund C, Kjaer IM, Jensen TK, Sorensen N, Andersson AM, et al. 2012. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reproductive toxicology* 34:498-503.
- Jacobson JL, Jacobson SW. 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *The New England journal of medicine* 335:783-789.
- Kawashiro Y, Fukata H, Omori-Inoue M, Kubonoya K, Jotaki T, Takigami H, et al. 2008. Perinatal exposure to brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in Japan. *Endocrine journal* 55:1071-1084.
- Kester MH, Bulduk S, Tibboel D, Meinel W, Glatt H, Falany CN, et al. 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: A novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141:1897-1900.
- Letcher RJ, Klasson-Wehler E, Bergman A. 2000. Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *The Handbook of Environmental Chemistry: Anthropogenic Compounds* 3K:315-359.

Park JS, Bergman A, Linderholm L, Athanasiadou M, Kocan A, Petrik J, et al. 2008. Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern slovakia. *Chemosphere* 70:1676-1684.

Schechter A, Pavuk M, Papke O, Ryan JJ. 2003. Dioxin, dibenzofuran, and coplanar pcb levels in laotian blood and milk from agent orange-sprayed and nonsprayed areas, 2001. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 66:2067-2075.

Sechman A, Batoryna M, Antos PA, Hrabia A. 2016. Effects of pcb 126 and pcb 153 on secretion of steroid hormones and mrna expression of steroidogenic genes (star, hsd3b, cyp19a1) and estrogen receptors (eralpha, erbeta) in prehierarchical chicken ovarian follicles. *Toxicology letters* 264:29-37.

Soechitram SD, Athanasiadou M, Hovander L, Bergman Å, Sauer PJJ. 2004. Fetal exposure to pcbs and their hydroxylated metabolites in a dutch cohort. *Environmental health perspectives* 112:1208-1212.

Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Shvets M, Giwercman A, Lindh CH, et al. 2006. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 17:450-458.

Warembourg C, Debost-Legrand A, Bonvallot N, Massart C, Garlantezec R, Monfort C, et al. 2016. Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels. *Human reproduction* 31:190-198.

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

T. Mitsui, A. Araki, H. Goudarzi, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K., Cho K. Moriya, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura
Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *American Journal of Human Biology* in press 査読有

T. Baba, S. Ito, M. Yuasa, E. Yoshioka, C. Miyashita, A. Araki, S. Sasaki, S. Kobayashi, J. Kajiwara, T. Hori, S. Kato, R. Kishi
Association of prenatal exposure to PCDD/Fs and PCBs with maternal and infant thyroid hormones: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Science of the Total Environment* 615, 1239-1246, 2018 査読有

M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, S. Itoh, J. Yamamoto, T. Matsumura, T. Mitsui, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, H. Minakami, N. Shinohara, R. Kishi
Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environment and Children's Health*.1, S3-S9, 2017 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学環境健康科学教育研究センター

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/>

環境と健康ひろば

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hiroba/>

環境と子どもに関する北海道研究・北海道スタディー

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hokkaidostudy/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 佐智子 (ITO, Sachiko)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号：9 0 5 8 0 9 3 6