

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K23224

研究課題名（和文）環境残留性有機フッ素化合物と糖尿病・代謝疾患リスクに関する疫学研究

研究課題名（英文）Epidemiological Study on Risks from Environmental Persistent Organofluorine Compounds on Diabetes and Metabolic Diseases

研究代表者

原田 真理子 (Harada Sassa, Mariko)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：10553399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではPFASが脂肪酸代謝などとの関連を検討した。また血清中PFASと魚介類摂取の生物学的指標であるn-3系多価不飽和脂肪酸との関連を検討した。PFOA、PFNAなどはパルミトレイン酸、エイコセン酸などのオメガ-9モノ不飽和脂肪酸と関連していた。重回帰分析においても類似の結果が得られた。エイコサペンタエン酸/アラキドン酸比(EPA/AA)は魚介類摂取量を示すバイオマーカーとして知られている。EPA/AAといくつかのPFASは正の相関を示した。年齢、性別を調整し、共分散分析を行ってもEPA/AAと血中PFAS濃度との間に有意な相関が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PFASはその安定性や水や油をはじく性質から、撥水剤・表面処理剤などに使用されてきた。水にも油にも溶けやすい、かつ難分解性で蓄積性が高いことから、環境中に広範囲に存在している。健康影響が懸念されているが、代謝についても影響しうるとされる。PFASによる脂質代謝への影響の一端として、細胞内の受容体PPARαを介することが細胞、動物実験で示されてきたが、ヒトでの観察研究においても関連を示された。その結果は不飽和脂肪酸への代謝が増加しており、メカニズムに合致した。またエイコサペンタエン酸との関連も示されたことは、PFAS摂取の経路として魚介類によるものが一定の寄与があることを示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the relationship between PFAS and fatty acid metabolism. Serum PFAS was also examined with n-3 polyunsaturated fatty acids, a biological indicator of seafood intake. PFOA and PFNA were associated with omega-9 monounsaturated fatty acids such as palmitoleic acid and eicosenoic acid. Similar results were obtained in multiple regression analysis. Eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio (EPA/AA) is a known biomarker of seafood intake; EPA/AA and several PFAS were positively correlated. After adjusting for age and sex, analysis of covariance showed a significant correlation between EPA/AA and blood PFAS concentrations.

研究分野：内科学

キーワード：PFAS 内分泌攪乱物質 脂質代謝異常 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、脂質異常症などは循環器疾患の重要なリスクファクターであり、予防の重要な対象となっている。これらのリスクファクターについて、生活習慣、遺伝的素因の研究が数多くなされているが、環境要因からの研究は限られている。

本研究では、化学環境要因、特に近年、世界的に汚染が広がっている有機フッ素化合物 PFAS の内分泌かく乱化学物質の影響を疫学的に研究した。PFAS はその安定性や水や油をはじく性質から、撥水剤・表面処理剤・乳化剤・消火剤・コーティング剤などを主な用途とする。水にも油にも溶けやすい、かつ難分解性で蓄積性が高いことから、環境水中や野生生物中に広範囲に存在している。残留性のほか、疫学研究で出生体重の低下が示唆されるなど懸念が示されているが、代謝についても影響しうる。多くの PFAS は PPAR のアゴニストとして機能する。この背景には同じく PPAR のアゴニストとである脂肪酸と分子の構造が似ていることがある。PPAR は標的遺伝子にペルオキシソームの脂肪酸酸化酵素群(アシル CoA 合成酵素、二頭酵素、チオラーゼなど)、ミトコンドリアの脂肪酸酸化酵素群(カルニチンパルミトイル転移酵素 I、アシル CoA デヒドロゲナーゼなど)、細胞内脂肪酸輸送に関わるタンパク質群、脂肪酸膜輸送に関わるタンパク質群などを持ち、脂質代謝の制御などをその機能とする (Wang 2006)。ラットにおいてノナデカフルオロ-n-デカン酸 PFDA が脂肪酸組成に影響することを示す研究などもあった。北海道において妊婦の PFC 曝露と胎児の出生時体重の関係性を調べる研究もあった (Kishi 2015)。ペルフルオロオクタンスルホン酸 PFOS、ペルフルオロオクタノ酸 PFOA に関して妊娠中の PFOS 曝露と妊婦血中の多価不飽和脂肪酸濃度とに負の相関が示唆された。

また多価不飽和脂肪酸は食品由来の摂取も多いことから PFAS 曝露との関係でも原因として考慮すべきである。米国 3M 社が製造を 2002 年から中止した後、米国では成人血中 PFOS 濃度が 60%、PFOA 濃度が 25%減少したと報告された(Olsen et al., 2008)。近年ペルフルオロオクタノ酸 PFOA(C8)以外の長鎖 PFCA 類(C9-C13)の血中での増加が認められた(Harada et al., 2011)。長鎖 PFCA の濃度を規定する因子は不明である。

2. 研究の目的

本研究では PFAS が脂肪酸代謝、糖尿病、脂質異常症との関連を検討した。また血清中 PFCA と魚介類摂取の生物学的指標である n-3 系多価不飽和脂肪酸との関連を検討した。

ドック検診などの対象者の血清検体から対象の PFAS 曝露を評価した。PFAS 測定には開発された GC-MS 分析法を利用した。得られた曝露情報から脂肪酸代謝、糖尿病、脂質異常症の関連指標に与える影響について、関連する生活習慣を含めて統計解析を実施した。

3. 研究の方法

ガスクロマトグラフィー質量分析で、曝露要因として有機フッ素化合物を測定すると同時に、脂肪酸組成の同定を行うための分析法を開発した。結合型脂肪酸を遊離させるための酸、アルカリ処理に対して、有機フッ素化合物は安定であり、続いて、ペンタフルオロベンジルプロミドによる誘導体化を使用した。試料 0.5mL に 0.5M テトラブチルアンモニウム塩水溶液(pH10) 0.5mL、サロゲート標準溶液(PFC-MXA, Wellington Laboratories; Docosahexaenoic Acid-d5, Cayman Chemical)を加え、1 mL の methyl t-butyl ether (MTBE)で抽出し、再度 1 mL MTBE で抽出した。有機層を乾固させ、PFCA は 0.1M 臭化ペンタフルオロベンジル/0.1M 18-Crown-6 アセトン溶液、炭酸水素カリウム粉末 1 片、内部標準溶液 11H-PFUnDA を加えて、60 で 60 分間加熱して、ペンタフルオロベンジレステル誘導体とした。Agilent 6890GC/5973MSD inert で、HP-5MS を用いて分離し、化学イオン化(メタンガス、負イオン化モード)で測定した。測定対象の PFAS、脂肪酸類は全て[M-C₇H₂F₅]⁻により定量した。

健康成人男女 130 名の集団において 7 種の PFC の血中濃度と 13 種の脂肪酸の血中濃度との関係性を調べた。年齢・性別・身長・体重・出産回数・各疾患の有無・喫煙習慣・飲酒習慣・血清クレアチニン値・eGFR・体表面積補正 eGFR/1.73・脂肪酸濃度(lauric, myristic, myristoleic, Palmitic, Palmitoleic, Stearic, Oleic, Linoleic, aLA, gLA, C20:0, C20:1, AA)・PFAS 濃度(PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA)を調査した。年齢に関して四分位を参考に 4 グループに区分した。身長と体重をもとに BMI を求め、日本肥満学会の定めた基準をもとに「肥満」「普通体重」「やせ」の 3 グループに区分した。出産回数に関して「0 回」「1,2 回」「3,4 回」の 3 グループに区分した。各疾患に関して、過去にあったと回答した人は「疾患あり」として数えた。eGFR/1.73 に関して、日本腎臓学会の発表した CKD 診断ガイドラインをもとに「ステージ 1」「ステージ 2」「ステージ 3 以上」に区分した。各 PFAS 濃度に関して四分位を参考に上から「Q4」「Q3」「Q2」「Q1」に区分した。重回帰分析では年齢区分・性別・BMI 区分・出産回数区分・高脂血症の有無・喫煙習慣・飲酒習慣・eGFR/1.73 区分を調整した。

PFAS 汚染度が高い東京都多摩地域、沖縄県中部地域などにおいて生活習慣病患者の血中 PFAS 濃度の分析を実施し、臨床的アウトカムの収集を行った。また統計解析を行う上で必要な調整因子について検討を行った。

4. 研究成果

血清検体の分析法のセットアップを行った。この際、強極性のシアノプロピルキャピラリーカラムでは脂肪酸構造異性体を分離して測定でき、今後の検討に活かせることが確認できた。低極性のカラムによる方法で血清検体の分析を実施した。

炭素数7のPFHpAから炭素数13のPFTrDAまでが95%以上の検出率となり、解析に用いた。炭素数7から9、10から13のものは比較的相関関係を有していた(図1)。炭素数8より鎖長の長いPFCAが全PFCAの50%以上を占めており、以前の報告と同様の結果となった(表1)。

表1. 研究参加者の血中PFAS濃度 (pg/mL)

	n	Age (yr)	Concentration (pg mL ⁻¹)								
			PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTrDA	PFTeDA	
Total	131	Mean±SD	63±15	63±30	4626±2449	3020±2202	869±1132	998±602	141±79	191±72	17±113
		Median	67	57	4079	2509	659	895	124	183	ND
Male	37	Mean±SD	60±18	61±37	4102±2629	3022±3025	1024±1968	920±568	131±67	203±101	26±150
		Median	66	52	3305	2229	618	813	115	195	ND
Female	94	Mean±SD	64±14	64±27	4832±2358	3019±1799	808±529	1029±615	144±83	187±57	14±95
		Median	68	60	4571	2695	686	933	126	183	ND

また奇数鎖 C9,C11,C13 が偶数鎖 C10,C12 より高かった。曝露源がそれぞれで共通なものがあると考えられた。

PFAS と血中脂肪酸組成との関連を検討した。PFHpA、はステアリン酸、オレイン酸、リノール酸濃度と正の関連を示した(図2)。またPFOA、PFNAなどはパルミトレイン酸、エイコセン酸などのオメガ-9 モノ不飽和脂肪酸と関連していた。重回帰分析においても類似の結果が得られた。不飽和脂肪酸はPPARαのΔ5, Δ6, Δ9 desaturase 誘導により増加することが動物実験、臨床例で知られており、この関連を部分的に説明するかもしれない。一方、PFTrDAはそれらとは異なり、いくつかの不飽和脂肪酸と負の関連を示した。PFASはカルニチンのアシル化の阻害などの作用も報告されており、PPARα以外の作用も考慮される。この結果について論文執筆を行い、投稿している。

多価不飽和脂肪酸のうち、DHA、EPAは魚介類からの摂取する量が多い。エイコサペンタエン酸/アラキドン酸比(EPA/AA)は魚介類摂取量を示すバイオマーカーとして知られている。

単変量解析では、年齢との相関はC8,C9,C10,C11,C12で有意になった(図3)。EPA/AAとC8,C9,C10,C11,C12は正の相関を示した(図4)。EPA/AAは年齢と相関していたため年齢、性別をさらに調整し、共分散分析を行ってもEPA/AAとC8,C9,C11,C12との間に有意な相関が認められた。PFASのうち特に長鎖PFCAは陰膳食事中で検出され、食事が主要な曝露源であると考えられる(Fujii et al., 2012)。生物濃縮性の高い長鎖PFCAは魚類に比較的蓄積し、食事からの摂取に占める割合が高くなっている可能性がある。PFOSなどのスルホン酸についても解析を実施し、関連を示すPFASを認めた。論文執筆を行い、投稿している。

このほか、脂質異常症、糖尿病との関連についてもデータ収集を行い、統計解析を実施する基盤を構築した。

【参考文献】

Fujii Y, Harada KH, Koizumi A. Analysis of perfluoroalkyl carboxylic acids in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry with electron capture negative ionization. *Environ Sci Technol* 2012;46:11235-42.

Harada KH, Hitomi T, Niisoe T, Takenaka K, Kamiyama S, Watanabe T, Moon CS, Yang HR, Hung NN, Koizumi A. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int* 2011;37:1183-9.

Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, Miyashita C, Itoh S, Araki A, Ikeno T, Iwasaki Y, Nakazawa H. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with

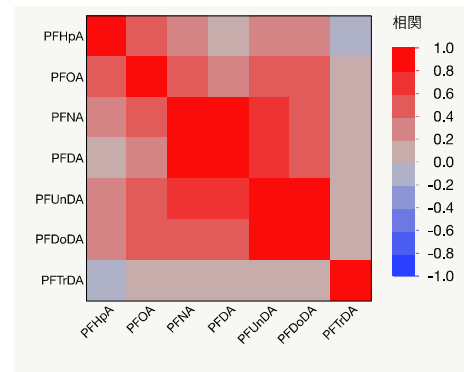


図1. PFAS間の相関

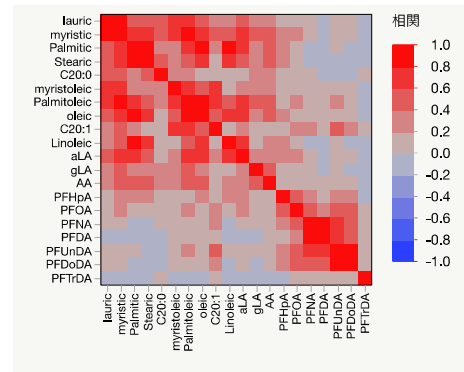


図2. PFASと血中脂肪酸組成との相関

Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study. *Environ Health Perspect.* 2015 Oct;123(10):1038-45.

Olsen GW, Mair DC, Church TR, Ellefson ME, Reagen WK, Boyd TM, Herron RM, Medhdizadehkashi Z, Nobiletti JB, Rios JA, Butenhoff JL, Zobel LR. Decline in perfluorooctanesulfonate and other polyfluoroalkyl chemicals in American Red Cross adult blood donors, 2000-2006. *Environ Sci Technol* 2008;42:4989-95.

Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res.* 2006 Sep;47(9):2028-41.

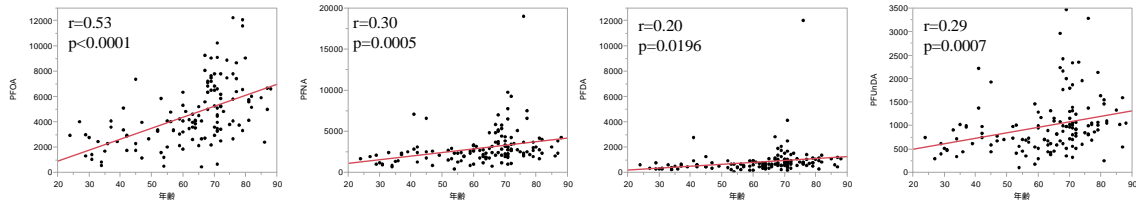


図 3. 血清 PFCAs 濃度と年齢との関連

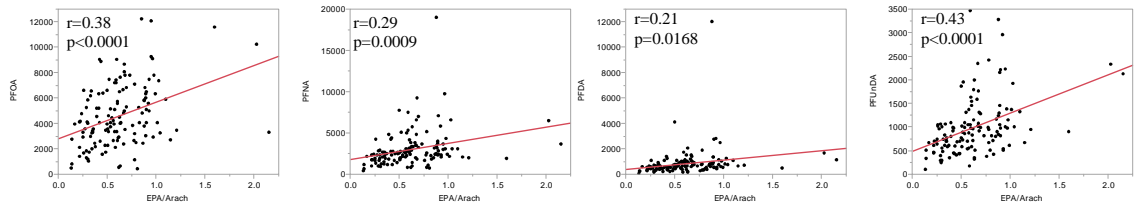


図 4. 血清 PFCAs 濃度とエイコサペンタエン酸/アラキドン酸比の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada Kouji H., Harada Sassa Mariko	4. 巻 65
2. 論文標題 Potential confounders in the association between per- and polyfluoroalkyl substance exposure and diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 1745 ~ 1746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-022-05758-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田浩二、栗岡麟太郎、原田真理子
2. 発表標題 有機フッ素カルボン酸類が血中脂肪酸組成に与える影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------