

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09040

研究課題名(和文)血清中有機フッ素化合物濃度と乳がんリスクの関連：日本人女性における症例対照研究

研究課題名(英文) Association between serum concentrations of perfluoroalkyl substances and breast cancer risk: a case-control study among Japanese women

研究代表者

伊藤 弘明 (Itoh, Hiroaki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30502257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん症例・対照401ペアにおける有機フッ素化合物(PFASs)の異性体別の血清中濃度を四分位等でカテゴリー化して独立変数とし、乳がん罹患の有無を従属変数として多変数調整オッズ比を算出したところ、19種類のPFASsの血清中濃度と乳がんリスクの間に有意な負の関連を認めた。分岐鎖のあるペルフルオロトリデカン酸(PFTrDA)では血清中濃度が中程の群において乳がんリスクの有意な増加を認めた一方、分岐鎖のないPFTrDAでは有意な負の関連を認めた。また、対照群における横断研究を別途行い、重回帰分析により18種類のPFASsの血清中濃度と末梢血白血球DNAメチル化レベルの間に有意な正の関連を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、欧米とは乳がん罹患率や体内ホルモン環境、生活習慣の異なる日本人女性における疫学研究であり、またPFASsの影響を異性体別に評価している点で特色がある。既存の研究が評価していない新しい物質を含む多数のPFASsと乳がんリスクの関連を日本人において明らかにした他、PFASsと白血球DNAメチル化レベルとの関連を解析している点にも特色がある。本研究はPFASsの発がん性および対策の要否を検討する上で参照可能な科学的知見を社会に提供した。ヒトにおけるエビデンスのため種差による不確実性がなく、有用性・貢献度が高い。

研究成果の概要(英文)： Serum concentrations of perfluoroalkyl substances (PFASs) in 401 breast cancer cases and 401 matched controls were measured and then categorized into quartiles or tertiles to calculate multivariable-adjusted odds ratios and 95% confidence intervals of breast cancer according to serum levels of PFASs. We found significant inverse associations between the serum levels of 19 PFASs and the risk of breast cancer. Among postmenopausal women, whereas serum level of the linear isomer of perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) was inversely associated with breast cancer risk, a medium degree of exposure to the branched isomer of PFTrDA was associated with increased risk of breast cancer. In a cross-sectional study using the control group, multivariable linear regression analyses showed significant positive associations between the serum levels of 18 PFASs and genome-wide methylation levels of peripheral blood leukocyte DNA.

研究分野：環境疫学、衛生学

キーワード：フッ素化アルキル化合物 PFOS PFOA 異性体 DNAメチル化 エピゲノム 環境疫学 残留性有機汚染物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ここ数十年で乳がんの年齢調整罹患率は著しく増加してきた(死亡率も増加)。乳がん発生の原因はその既知のリスク要因だけでは半分程度しか説明できないとされている。乳がんのリスク要因の解明が求められているが、乳がん発生への関与が疑われているものの1つに、環境汚染物質への曝露がある。

国際がん研究機関はポリ塩素化ビフェニル(PCB)やジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)を発がん性分類グループ1および2Aに格上げしたが、このような有機塩素化合物<sup>1,2</sup>のみならず、近年は有機フッ素化合物(perfluoroalkyl substances, PFASs)の健康影響が懸念されている。PFASsは泡消火剤や撥水剤、フライパン等の表面コーティング剤、化粧品、自動車、半導体、食品包装などの幅広い用途に使われてきた化学物質群である。特にペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)とペルフルオロオクタノ酸(PFOA)が注目されている。ヒトはこれらに食事等の経路から曝露されており、日本人の血中からも検出されている。近年PFASsの発がんへの関与が疑われるようになってきた。これまでPFASsへの曝露と乳がんリスクの関連を評価する疫学研究がグリーンランドやデンマークにおいて行われており<sup>3,4</sup>、これらの研究ではPFASsの曝露評価は主に血清中濃度の測定によって行われている。前立腺がんリスクとの関連を検討した研究もある<sup>5</sup>。しかし、世界的にもまだデータが乏しく、日本ではPFASsへの曝露がヒトのがん罹患に及ぼす影響を検討した研究はこれまでにない。欧米とアジア、日本では乳がん罹患率や体内ホルモン環境、生活習慣、曝露されているPFASsの種類や量が異なるため、日本人を対象とした疫学研究が必要である。また、既存の研究においては乳がんリスクとの関連を評価されたPFASsが限られている他、PFASsが異性体別に分析されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、日本人女性を対象とした症例対照研究を行い、一般生活環境におけるPFASsの血清中濃度と乳がん罹患リスクの関連について明らかにすることを目的とした。PFASsの分析は異性体別とした。

### 3. 研究の方法

本研究は各所属機関で倫理委員会の承認を得て実施した。長野県内の4病院を2001~2005年に受診した乳がん症例405名と年齢・居住地域でマッチングした対照405名のうち401ペア(症例・対照計802検体)の血清50 µLに分岐鎖のないPFASsの安定同位元素標識体(MPFAC-MXA, Wellington Laboratories, Guelph, ON, Canada)を添加して前処理後、誘導體化(ヨードニウム塩を用いたin-portアリアル化)およびガスクロマトグラフィー負化学イオン化質量分析法によりPFASsを異性体別に分析した(分析方法は文献<sup>6</sup>とほぼ同様)。分岐鎖のあるPFASsの内部標準としてはアルキル鎖が似ている分岐鎖のないPFASsの安定同位元素標識体を用いた。分析者は各検体が症例・対照のどちらのものか知らずに、またマッチングした症例・対照のペアの検体は同じバッチにて分析し、分析のバッチ間変動の影響が入らないようにした。Jamesら<sup>7</sup>の提案した方法に従い、定量下限値未満の値には、定量下限値以上であった検体の割合に定量下限値を乗じた値を代入した。対照群の血清中各PFASs濃度の四分位点に基づき対象者を群分けし、最低濃度群を基準群としてダミー変数を作成して独立変数とし、乳がん罹患の有無を従属変数として条件付きロジスティック回帰分析を行い、多変数調整オッズ比と95%信頼区間を算出した。また、傾向性の検定のP値を算出した。なお、分岐鎖のないペルフルオロヘプタンスルホン酸(PFHpS)および分岐鎖のあるペルフルオロトリデカン酸(PFTrDA)は検出頻度が十分高くなく、四分位、三分位で分けられなかったため、定量下限値未満と以上の二群に分け、さらに定量下限値以上の群を75パーセンタイル値(第3四分位点)で二群に分け、三値変数を作成し、ダミー変数化して解析に用いた。マッチング変数(年齢、居住地域)以外では、body mass index、身長、閉経状態・閉経年齢、初産年齢、乳がん家族歴、喫煙習慣、身体活動、初経年齢、出産回数、授乳期間、アルコール摂取量、イソフラボン摂取量を潜在的な交絡要因として考慮しロジスティック回帰分析で調整した。また、感度解析として魚介類摂取量、野菜摂取量、採血年、血清中PCB総濃度(四分位)を追加で調整した。共変量のうち半定量的食物摂取頻度調査票の回答から計算した変数については残差法でエネルギー調整した値を用いた(以下も同様)。連続型の共変量については二乗したものも同時に投入した(以下も同様)。閉経状態によるサブグループ解析、多項ロジスティック回帰分析による乳がんサブタイプを考慮した解析も行った(これらの解析ではPFASs濃度は三分位でカテゴリー化した)。また、感度解析として、多重代入法による欠測値補完を行った上で同様の解析を実施して結果を比較した。また、別途サブテーマとして対照群における横断研究を行い、血清中PFASs濃度(四分位)と末梢白血球のゲノム全体のメチル化レベルとの間の関連を重回帰分析で検討した。この際、Luminometric methylation assay(LUMA)で測定されるのはメチル化されていない割合のため、それを1から引いたもの(メチル化された割合)を従属変数として用いた。またこの際、年齢、body mass index、アルコール摂取量、喫煙習慣、葉酸摂取量、教育歴、採血年、出産回数、血清中 $o,p'$ -DDT濃度(四分位)を潜在的な交絡要因として調整して解析した。統計学的検定は両側検定、有意水準は5%とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 主な成果

血清中有機フッ素化合物を一斉分析して比較的高頻度で検出された 20 種類の PFASs を統計解析の対象とした。この中にはペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)、PFHpS、PFOS、PFOA、ペルフルオロノナン酸 (PFNA)、ペルフルオロデカン酸 (PFDA)、ペルフルオロウンデカン酸 (PFUnDA)、ペルフルオロドデカン酸 (PFDoDA)、PFTTrDA が含まれており、分岐鎖のない異性体に加えて (PFHxS と PFHpS 以外は) 分岐鎖のある異性体も含まれている。いずれの物質においても血清中濃度は症例群よりも対照群の方が有意に高かった。なお、分岐鎖のないペルフルオロテトラデカン酸、ペルフルオロヘプタン酸、ペルフルオロペンタンスルホン酸、ペルフルオロデカンスルホン酸、ペルフルオロペンタデカン酸、ペルフルオロノナン酸、ペルフルオロ-4-エチルシクロヘキサンスルホン酸、分岐鎖のある PFOS のうち 2m-PFOS、3,5-ペルフルオロジメチル-PFOS、4,5-ペルフルオロジメチル-PFOS、分岐鎖のある PFHxS のうち 1m-PFHxS、2m-PFHxS、3m-PFHxS、4m-PFHxS は検出頻度が低かったため個別に乳がん罹患リスクとの関連を解析しなかった。また、ペルフルオロブタンスルホン酸、ペルフルオロドデカンスルホン酸、ペルフルオロヘキサノ酸、分岐鎖のあるペルフルオロテトラデカン酸、ペルフルオロヘキサデカン酸、9-クロロヘキサデカフルオロ-3-オキサノナン-1-スルホン酸、11-クロロエイコサフルオロ-3-オキサウンデカン-1-スルホン酸、分岐鎖のある PFOA のうち 2m-PFOA、3m-PFOA、5m-PFOA は全検体で定量下限値未満の濃度であったため統計解析に使用しなかった。

多変数調整オッズ比では、分岐鎖のある PFDoDA を除く 19 種類の PFASs の血清中濃度と乳がんリスクの間に有意な負の関連を認めた (感度解析として多重代入法による欠測値補完を行った上で同様の解析を実施したところ、20 種類の PFASs において乳がんリスクとの間に有意な負の関連を認めた)。また、ホルモン受容体を考慮した解析 (多項ロジスティック回帰分析) では、分岐鎖のない PFOA において乳がんサブタイプによる関連の有意な違いを認めた ( $P = 0.043$ )。

閉経後女性においては、分岐鎖のない PFTTrDA の血清中濃度と乳がんリスクとの間に負の関連を認めた一方、分岐鎖のある PFTTrDA では血清中濃度が中程の群において乳がんリスクの有意な増加を認めた。このように、示性式が同じ化合物でも分岐鎖の有無により関連が異なることから、PFASs の疫学研究において異性体別の分析が必要であることが示唆された。

また、18 種類の PFASs の血清中濃度と末梢血白血球 DNA メチル化レベルの間に有意な正の関連を認めた。血清中 PFAS 濃度の四分位カテゴリー 1 つ分上昇ごとに白血球 DNA メチル化レベルが 0.36 ~ 0.70% 増加していた。

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

カニクイザルへの低用量投与実験<sup>8</sup>および閉経前・周閉経期・閉経後のヒト女性を対象とした観察的疫学研究<sup>9,10</sup>において PFOS への曝露と血清中または唾液中のエストラジオール濃度の間に負の関連があることが一貫して報告されている。また、PFOS、PFOA、PFNA に関してはインスリン様成長因子の血清中濃度との間に負の関連が報告されている<sup>11</sup>。これらは本研究で観察された PFASs と乳がんの関連の向きと整合的である。PFASs と乳がんに関する欧米における疫学研究<sup>4,12-14</sup>は PFHxS、PFOS、PFOA、PFUnDA において乳がんリスクとの間に負の関連を報告している。関連なしの報告もある。また、グリーンランドにおける小規模な症例対照研究<sup>15</sup>では、複数の PFASs で正の関連を報告している (この研究では PFOS が高曝露であった他、研究対象者の遺伝的な性質の違いが原因の 1 つとして指摘されている<sup>12</sup>)。本研究において PFNA と PFDA で認めた乳がんリスクとの有意な関連は既存の研究にない新しい知見である。また、本研究は PFHpS、PFTTrDA と乳がんリスクの関連を報告した世界初の研究である。

PFASs 曝露と末梢血白血球 DNA メチル化レベルとの関連は、PFHxS、PFOS、PFOA、PFNA のみ既存の研究で検討された例がある。既存の研究とはアッセイ法が異なるため結果を比較する際には注意が必要だが、参考までに比較すると、PFOS に関しては一貫して正の関連が報告されており<sup>16-19</sup>、本研究の結果と一致している。PFHxS、PFOA、PFNA と末梢血白血球 DNA メチル化レベルの間の関連に関しては正の関連を報告した例はまだなく、本研究が世界初の報告である。また、PFHpS、PFDA、PFUnDA、PFDoDA、PFTTrDA と末梢血白血球 DNA メチル化レベルの関連を検討した既存の研究はなく、本研究が世界初の報告である。なお、末梢血白血球 DNA メチル化レベルと乳がん罹患リスクの間には負の関連が報告されており<sup>20</sup>、本研究で観察された PFASs と乳がんの関連の向きと整合的である。

PFHxS、PFOS、PFOA は血中からの消失半減期が数年と長く<sup>21,22</sup>、1~2 年間隔で反復測定した場合に PFOS、PFOA、PFHxS、PFNA、PFDA の血中濃度の級内相関係数がそれぞれ 0.91、0.90、0.94、0.87、0.82 と高いことが報告されており<sup>23</sup>、一回の採血でも血清中 PFAS 濃度は長期の曝露状況を反映し曝露指標としての信頼性が高いと考えられる。

本研究は、PFASs の影響が異性体によって異なる可能性を考え、異性体別にアウトカムとの関連を評価している点で特色がある。既存の研究が評価していない新しい物質を含む多数の PFASs と乳がんリスクの関連を日本人において明らかにした他、ホルモン受容体を考慮した解析、また血清中 PFAS 濃度と白血球 DNA メチル化レベルとの関連を解析してメカニズムに迫っている点にも特色がある。

## (3) 今後の展望

研究成果の論文化を進める。また、本研究課題を国際的に発展させた研究を JSPS 科研費 基盤研究 (C) (一般) 20K10512 『有機フッ素化合物と乳がんリスクに関する疫学研究：国際比較と統

合解析』にて推進する。

#### 引用文献

1. Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S. Serum organochlorines and breast cancer risk in Japanese women: a case-control study. *Cancer Causes and Control* 2009;20(5):567-80.
2. Itoh H, Iwasaki M, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Yoshida T, Yokoyama K, Tsugane S. Association between serum organochlorines and global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women: a cross-sectional study. *Science of the Total Environment* 2014;490:603-609.
3. Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Bossi R, Ayotte P, Asmund G, Kruger T, Ghisari M, Mulvad G, Kern P, Nzulumiki P, Dewailly E. Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. *Environmental Health* 2011;10:88.
4. Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Fredslund SO, Bossi R, Olsen J. Breast cancer risk after exposure to perfluorinated compounds in Danish women: a case-control study nested in the Danish National Birth Cohort. *Cancer Causes and Control* 2014;25(11):1439-48.
5. Hardell E, Karrman A, van Bavel B, Bao J, Carlberg M, Hardell L. Case-control study on perfluorinated alkyl acids (PFAAs) and the risk of prostate cancer. *Environment International* 2014;63:35-9.
6. Harada KH, Fujii Y, Zhu J, Zheng B, Cao Y, Hitomi T. Analysis of perfluorooctane sulfonate isomers and other perfluorinated alkyl acids in serum by in-port arylation gas chromatography negative chemical ionization-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology Letters* 2020;7:259-265.
7. James RA, Hertz-Picciotto I, Willman E, Keller JA, Judith Charles M. Determinants of serum polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides measured in women from the Child Health and Development Study cohort, 1963-1967. *Environmental Health Perspectives* 2002;110(7):617-624.
8. Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Olsen GW, Case MT, Butenhoff JL. Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences* 2002;68(1):249-64.
9. Barrett ES, Chen C, Thurston SW, Haug LS, Sabaredzovic A, Fjeldheim FN, Frydenberg H, Lipson SF, Ellison PT, Thune I. Perfluoroalkyl substances and ovarian hormone concentrations in naturally cycling women. *Fertility and Sterility* 2015;103(5):1261-70.e3.
10. Knox SS, Jackson T, Javins B, Frisbee SJ, Shankar A, Ducatman AM. Implications of early menopause in women exposed to perfluorocarbons. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011;96(6):1747-1753.
11. Lopez-Espinosa M-J, Mondal D, Armstrong BG, Eskenazi B, Fletcher T. Perfluoroalkyl substances, sex hormones, and insulin-like growth factor-1 at 6-9 years of age: A cross-sectional analysis within the C8 health project. *Environmental Health Perspectives* 2016;124(8):1269-1275.
12. Hurley S, Goldberg D, Wang M, Park JS, Petreas M, Bernstein L, Anton-Culver H, Nelson DO, Reynolds P. Breast cancer risk and serum levels of per- and polyfluoroalkyl substances: a case-control study nested in the California Teachers Study. *Environmental Health* 2018;17(1):83.
13. Barry V, Winquist A, Steenland K. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposures and incident cancers among adults living near a chemical plant. *Environmental Health Perspectives* 2013;121(11-12):1313-8.
14. Cohn BA, La Merrill MA, Krigbaum NY, Wang M, Park JS, Petreas M, Yeh G, Hovey RC, Zimmermann L, Cirillo PM. In utero exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and subsequent breast cancer. *Reproductive Toxicology* 2019.
15. Wielsoe M, Kern P, Bonefeld-Jørgensen EC. Serum levels of environmental pollutants is a risk factor for breast cancer in Inuit: a case control study. *Environmental Health* 2017;16(1):56.
16. Watkins DJ, Wellenius GA, Butler RA, Bartell SM, Fletcher T, Kelsey KT. Associations between serum perfluoroalkyl acids and LINE-1 DNA methylation. *Environment*

International 2014;63:71-6.

17. Kingsley SL, Kelsey KT, Butler R, Chen A, Eliot MN, Romano ME, Houseman A, Koestler DC, Lanphear BP, Yolton K, Braun JM. Maternal serum PFOA concentration and DNA methylation in cord blood: A pilot study. *Environmental Research* 2017;158:174-178.
18. Miura R, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Kobayashi S, Wang S-L, Chen C-H, Miyake K, Ishizuka M, Iwasaki Y, Ito YM, Kubota T, Kishi R. An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: The Hokkaido study. *Environment International* 2018;115:21-28.
19. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh S, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Ikeno T, Kishi R. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The Hokkaido Study. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 2017;27(3):251-259.
20. Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S, Yoshida T. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women. *British Journal of Cancer* 2014;110:2765.
21. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental Health Perspectives* 2007;115(9):1298-305.
22. Li Y, Fletcher T, Mucs D, Scott K, Lindh CH, Tallving P, Jakobsson K. Half-lives of PFOS, PFHxS and PFOA after end of exposure to contaminated drinking water. *Occupational and Environmental Medicine* 2018;75(1):46-51.
23. Sun Q, Zong G, Valvi D, Nielsen F, Coull B, Grandjean P. Plasma concentrations of perfluoroalkyl substances and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation among U.S. women. *Environmental Health Perspectives* 2018;126(3):037001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 伊藤弘明, 原田浩二, 岩崎 基, 横山和仁, 春日好雄, 津金昌一郎
2. 発表標題 血清中有機フッ素化合物濃度と乳がんリスクの関連：日本人女性における症例対照研究
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	岩崎 基  (Iwasaki Motoki)  (60392338)	国立研究開発法人国立がん研究センター・社会と健康研究センター・部長   (82606)	
連携研究者	横山 和仁  (Yokoyama Kazuhito)  (00158370)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	