

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310021

研究課題名(和文) ヒト胎児の化学物質複合曝露による次世代健康影響の母体血・臍帯を用いた評価法の開発

研究課題名(英文) Use of maternal blood and the umbilical cord for the assessment of fetal exposure to multiple chemicals: implications for future generations

研究代表者

森 千里 (MORI, Chisato)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90174375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、419名の妊娠前期の母親から提供された血液に含まれる化学物質であるポリ塩化ビフェニル(PCB)濃度から、胎児への複合曝露への評価を開発することを主眼とする。419名の妊婦の年齢は $30.36 \pm 5.30$ 歳であった。対象者の母体血中のPCB濃度の平均は $0.26 \pm 0.13$  ng/g-wetであった。年齢とPCB濃度との関係については、20・25・30・35・40・45歳未満および45歳以上の7つに区分し検討した結果、出産年齢の増加に伴いPCB濃度が増加する傾向が伺えた。また、初産および経産(2回以上)を区分し比較したところ初産と経産婦のPCB濃度に大きな違いは認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to assess the levels of polychlorinated biphenyl (PCB) in the maternal blood (serum PCB) to ascertain fetal exposure to multiple chemicals. We studied 419 mothers in early pregnancy, with mean age being  $30.36 \pm 5.30$  years. The mean level of PCB in maternal blood was  $0.26 \pm 0.13$  ng/g-wet. The PCB levels correlated with increasing age of the mother. However, we were unable to clearly differentiate the PCB levels between nulliparous and multiparas.

研究分野：環境医学

キーワード：環境影響評価 科学物質 次世代影響 複合曝露

## 1. 研究開始当初の背景

環境由来で曝露する蓄積性の高い化学物質は一度体内に入ると排泄されにくく、半減期は農薬類で数年、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル (PCB ; polychlorinated biphenyl) などは同族体にもよるが、数年から数十年ときわめて長い。加えて、体内でホルモン様作用を示すなど、さまざまなヒトへの影響が懸念されている。特に、胎児・乳幼児は化学物質曝露に関してハイリスクライフステージと考えられる。母親のお腹の中の胎児は、妊娠期間中、多数の化学物質に複合的に曝露されており、昨今、それによる次世代への健康影響に関する関心が高まっている。しかし、現時点では、胎児の化学物質への複合曝露による健康影響を評価する方法は確立されていない。化学物質のヒト健康影響評価を進めていく上では、曝露量、曝露時期 (胎児期・乳幼児期等)、個体の感受性等が重要な因子であり、我々の研究グループは、これまで 1) 日本人の胎児における化学物質の複合曝露状況、2) ヒト、特に化学物質等に感受性が高い胎児の曝露評価のため臍帯を用いた曝露調査、3) エピジェネティック変異を中心とする環境化学物質の生体影響に関する研究、4) 曝露量が高かった場合の低減法の開発に取り組んできた。特に、2008 年からこれまでに幅広い年齢の成人の PCB 曝露について 1000 件以上データを収集・解析し、基礎データを保有し、血中 PCB 濃度は年齢とともに上昇し、経産婦は男性や未経産婦よりも低くなり、経産婦は胎盤・母乳経路で PCB を胎児・乳幼児へ移行していることを報告してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、化学物質の胎児への複合曝露状況を反映する曝露量アセスメント・システムと、臍帯のエピゲノミクス (網羅的なエピジェネティクス解析) を用いた個々の胎児の化学物質の感受性評価システムを開発し、さらに、この二つのシステムを基盤にして現状の化学物質曝露による胎児・次世代の健康に対する高リスク群を母体血や臍帯を用いて検出する次世代健康影響評価法の開発に向けた研究を行うことを目指すものである。特に、ヒトへの曝露状況については、ダイオキシン類や PCB、農薬類である P、P'-ジクロロジフェニルあるいはヘキサクロロシクロヘキサンやヘキサクロロベンゼンといった人体内に蓄積する有機塩素系の残留性有機汚染物質 (POPs ; persistent organic pollutants) を対象に報告されているが、POPs の中で最も濃度が高く全ての人から検出されるのは PCB を対象とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 化学物質曝露量 (PCB 濃度) の測定

419 名の妊娠前期の母体血中 PCB 濃度についてパックドカラム簡易法を用い測定した。総 PCBs 濃度の測定には、血清試料 1g をけん化して有機溶媒に抽出し、フロリジルにて精製した後、ガスクロマトグラフ (GC/ECD) にて測定した。

なお、研究参加者 419 名の特性は、年齢  $30.36 \pm 5.30$  歳、身長  $158.37 \pm 9.45$ cm、体重  $54.20 \pm 5.37$ kg、BMI (Body Mass Index)  $21.57 \pm 3.43$  であった。

### (2) 臍帯のエピゲノミクス (網羅的なエピジェネティクス解析)

本研究への参加に同意した 5 名の母親について、出産後の各々の臍帯を 4 つに分け (A、B、C、D とする) 4 の生理食塩水中で保管した。産後 6 時間、24 時間、48 時間、72 時間の時点で、各々 A、B、C、D の臍帯を再度生理食塩水で洗浄した上で、液体窒素において凍結、 $-80$  において保存された。

各臍帯サンプルからゲノム DNA 抽出を行い、quality check を行った。pyro-sequence によって、*Igf2-H19* 遺伝子近傍の CpG island のメチル化レベルが評価された。

## 4. 研究成果

### (1) 化学物質曝露量 (PCB 濃度) の測定

妊婦 419 名の妊娠前期の母体血中 PCB 濃度の結果を表 1 に示す。測定対象者のなかには、検出限界値となる 0.10 未満のものが見られたが、本報告では検出限界未満のものデータについては、検出限界 0.10 をデータとして換算した。

表 1. 母体血中総 PCB 濃度 (N=419)

	平均値	標準偏差	最大	最小
PCB 濃度 (ng/g-wet)	0.26	0.13	0.74	0.10

表から明らかなおとおり、本研究で測定した対象者 419 名の母体血中の PCB 濃度の平均は  $0.26 \pm 0.13$  ng/g-wet であった。また、対象者の中で最大値は  $0.74$  ng/g-wet、最小値は検出限界未満の  $0.10$  ng/g-wet であった。

次に、年齢と PCB 濃度との関係については、20 歳未満、25 歳未満、30 歳未満、35 歳未満、40 歳未満、45 歳未満および 45 歳以上の 7 つに区分し検討し、その平均値および標準偏差を表 2 に示す。20 歳未満および 25 歳未満の対象者数は他の出産年齢群と比べ少ないものの、出産年齢の増加に伴い PCB 濃度が微増とはいえ、濃度が増加する傾向が伺えた。

表 2 . 出産年齢区分の PCB 濃度 (N=416)

年齢	対象者数	PCB 濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
<20	6	0.12	0.04
<25	59	0.19	0.11
<30	108	0.22	0.10
<35	148	0.28	0.13
<40	83	0.32	0.14
<45	12	0.42	0.12

次に BMI と PCB 濃度との関係について、BMI25 未満、BMI25 超に大別した平均値および標準偏差を表 3 に示す。

表 3. BMI と PCB 濃度 (N=405)

BMI	対象者数	PCB 濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
>25	60	0.26	0.13
<25	345	0.26	0.13

BMI については、肥満傾向の一般的な尺度となる BMI25 を用い大別した。その結果、BMI の >25 および <25 両群ともに PCB 濃度が近似し、明らかな違いを認められなかった。

さらに、出産回数と PCB 濃度との関係について、初産および経産 (2 回以上) により区分した平均値および標準偏差を表 4 に示す。表から明らかとなり、初産と経産婦の PCB 濃度について、大きな違いは得られなかった。

表 4. 出産回数と PCB 濃度 (N=412)

	対象者数	PCB 濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
初産	121	0.27	0.13
経産	291	0.26	0.13

図 1 に出産年齢と母体血中総 PCB 濃度の関係を図示する。本図から、PCB 濃度範囲と、出産年齢による濃度分布が明らかとなるが、先の結果に記したように出産年齢の増加に伴い PCB 濃度が微増とはいえず、濃度が増加する傾向が見てとれる。

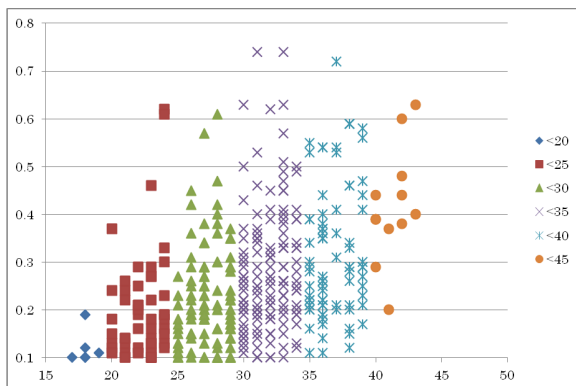


図 1. 年齢と母体血中総 PCB 濃度の関係

## (2) ヒト臍帯におけるエピゲノム解析

ヒト臍帯でのエピゲノム解析を進めるにあたり、解析に適した臍帯のサンプリング方法、分娩からの経過許容時間、および保存状態の決定が試みられた。我々は、本課題において、エピゲノムスの一例として、DNA メチル化解析を行うための条件検討を行った (図 2 参照)。分娩後臍帯を、生理食塩水中に 4 で置き、6hr、24hr、48hr、72hr、96hr 後において、液体窒素によって凍結した。これらのサンプル群で、ゲノム DNA の脱メチル化を含むサンプルの劣化の有無を検討した。解析は pyro-sequence によって、*Igf2-H19* のインプリント部位のメチル化レベルについて行われた (図 3 参照)。

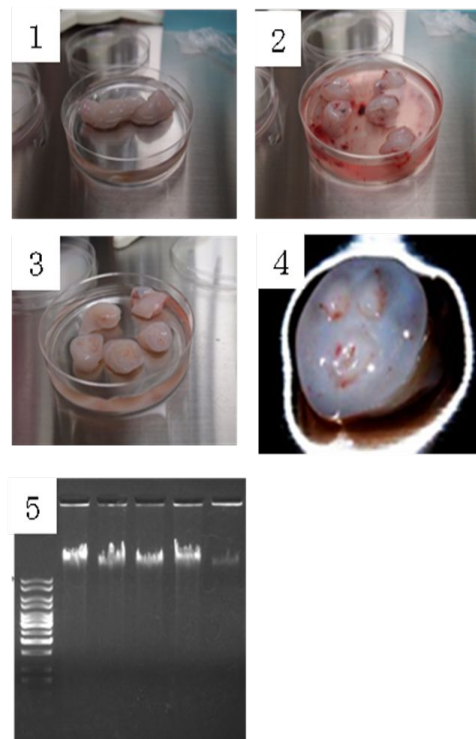


図 2. 臍帯からのゲノム DNA 抽出  
1~4 のように臍帯を処理し、ゲノム DNA 抽出を行う。5 は抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動像を示す。

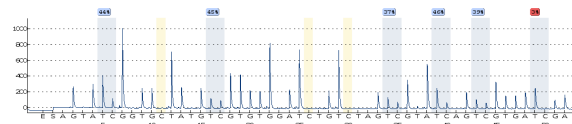


図 3 . 臍帯組織ゲノム DNA の pyro-sequence データ

解析の結果、分娩後 96hr までは、評価されたゲノム DNA の部位において、メチル化の劣化は確認されなかった。このことにより、ヒト臍帯のゲノム DNA メチル化状態を評価

するためのサンプリングの条件の一端、および基礎的な知見が明らかとなった。

#### 謝辞・補足説明

本研究で PCB 濃度を測定した母体血血清試料および一部のデータは環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査」のものを使用した。なお、本研究成果は研究代表者ら自らのものであり、環境省の見解ではない。

また、臍帯試料については研究代表者らが独自に行う子ども調査（胎児期に始まる子どもの健康と発達に関する調査）によるものである。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

M. Hanazato, A. Eguchi, E. Todaka, Y. Matsuno, H. Nakaoka, C. Koga, C. Mori : Do PCBs, OCPs, and dioxin-like compounds with high molecular weight decrease human maternal-fetal placental transfer rates? : 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Madrid, Spain, Aug. 31-Sep. 5, 2014.

A. Eguchi, M. Hanazato, N. Suzuki, Y. Matsuno, C. Mori : Correlations between maternal-fetal transfer rates and physico-chemical properties of PCBs, OCPs, PBDEs, and dioxin-like compounds : 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Madrid, Spain, Aug. 31-Sep. 5, 2014.

M. Hanazato, M. Watanabe, E. Todaka, Y. Matsuno, H. Nakaoka, C. Mori : Relationship between blood Polychlorinated Biphenyl level and distance towards the nearest fishing port ; A Birth Cohort Study : 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD 2013, Singapore, Nov. 17-20, 2013.

M. Hanazato, N. Suzuki, C. Koga, M. Otake, M. Watanabe, E. Todaka, M. Yamamoto, H. Nakaoka and C. Mori : Relationship between seafood intake, residential area and blood PCB level among pregnant women in Chiba Prefecture, Tokyo, Japan :

環境ホルモン学会第16回研究発表会「東京大学山上会館(東京都・文京区)」2013年12月12日-13日.

E. Todaka, M. Watanabe, Y. Matsuno and C. Mori :

Possibility of high-exposure group sampling regarding PCB and POPs from questionnaire in birth cohort study : 52nd Society of Toxicology, San Antonio, Texas, USA, Mar. 10-14, 2013.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 千里 (MORI, Chisato)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号 : 9 0 1 7 4 3 7 5

##### (2) 研究分担者

小宮山 政敏 (KOMIYAMA, Masatoshi)

千葉大学・大学院看護学研究科・教授

研究者番号 : 7 0 1 7 5 3 3 9

戸高 恵美子 (TODAKA, Emiko)

千葉大学・予防医学センター・教授

研究者番号 : 3 0 3 3 4 2 1 2

花里 真道 (HANAZATO, Masamichi)

千葉大学・予防医学センター・准教授

研究者番号 : 0 0 6 0 8 6 5 6

松野 義晴 (MATSUNO, Yoshiharu)

千葉大学・予防医学センター・准教授

研究者番号 : 0 0 3 7 6 3 7 8

中岡 宏子 (NAKAOKA, Hiroko)

千葉大学・予防医学センター・助教

研究者番号 : 6 0 5 8 8 6 4 8