

厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の
人の生殖機能等への影響に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

津 金 昌一郎 国立がんセンター研究所支所

分担研究者

兜 真 徳 独立行政法人国立環境研究所

山 本 正 治 新潟大学医学部

佐々木 寛 東京慈恵会医科大学

平成14（2002）年4月

目次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の人の生殖機能等への影響に関する研究 津金昌一郎	—————	1
---------------------------------------	-------	---

II. 分担研究報告書

1. 分泌かく乱化学物質の人への健康影響に関する疫学的研究 津金昌一郎 （資料）内分泌かく乱化学物質の健康影響 に関する疫学研究の現状	—————	9
2. エストロゲン代謝系への影響評価に関する研究 兜 真徳	—————	15
3. 食事・飲料水由来の内分泌かく乱化学物質の ヒト体脂肪蓄積量 山本 正治	—————	21
4. 子宮内膜症との関連についての症例対照研究 佐々木 寛	—————	27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	31
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	35
-----------------	-------	----

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の人の生殖機能等への影響に関する研究

主任研究者 津金 昌一郎 国立がんセンター研究所支所 臨床疫学研究部長

研究要旨 日常生活環境における内分泌かく乱化学物質(EDC)への暴露が、人の健康影響と関連するか否かを疫学的に検討することを目的として、疫学研究をデザインするための基礎的情報(暴露と健康影響指標)を得ると共に、EDCの健康影響を検証するために子宮内膜症及び乳癌の疫学研究を開始した。暴露情報については、一般地域住民における脂肪組織中の有機塩素系化合物残留量の測定によって有機塩素系化合物21種の存在を確認した。最も濃度が高かったのはTotal-DDTで1ppmを超えていた。次いでTotal-BHCとPCBで約0.5ppm、Total-クロルデンの約0.24ppm、ディルドリン及びヘプタクロルエポキシドの約0.04ppmであった。ヘプタクロル、ケルセン及びマイレックスは概ね0.005ppm以下であった。魚摂取量が多いと予想される3地域の母乳中ダイオキシン類レベルは、平均が8.9~13.1 pg TEQ/g-fat(国際標準TEF)であり、出生順位、魚摂取量および居住地域との関連が示された。また、血清中植物エストロゲン分析、Ahイムノアッセイ法による母乳中ダイオキシン分析の疫学研究への応用可能性に関して検討を行った。文献によるエビデンスの検討では、EDCと内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響に関する疫学研究はきわめて乏しく、乳癌と有機塩素系化合物との関係が否定される以外にはEDCと健康影響との関連について言及できなかった。EDCと子宮内膜症の関連を検証するための症例対照研究では症例収集が終了し、子宮内膜症(Stage II期以上)58例、対照例(Stage I期以下)82例を収集した。また、EDCと乳癌との関連を検証するための症例対照研究を開始し、83ペアを収集した。

分担研究者

兜 真徳・国立環境研究所
・上席研究官
山本正治・新潟大学医学部・医学部長
佐々木寛・東京慈恵会医科大学
産婦人科学教室・助教授

研究官

坪野吉孝・東北大学大学院医学系研究科
社会医学講座公衆衛生学分野
講師
岸 玲子・北海道大学大学院医学研究科社
会医学専攻公衆衛生学教授
岩本晃明・聖マリアンナ医科大学泌尿器科
学教授

研究協力者

花岡知之・国立がんセンター研究所
支所臨床疫学研究部主任

A. 研究目的

日常生活環境における内分泌かく乱

化学物質（EDC）への暴露が、人の健康影響と関連するか否かを疫学的に検討することを目的とする。平成13年度は、

〔1〕疫学研究を実施するための基礎的検討として、(1) 人へのEDC暴露評価と、暴露に寄与する要因について検討するとともに、(2) 横断面研究によってEDC暴露の健康影響およびその指標について検討を行う。さらに(3) 人の健康影響に関するエビデンスについて文献的検討を行う。

また、〔2〕EDCによる健康影響を明らかにするための疫学研究として、(1) 平成11年度に作成したプロトコールにしたがって子宮内膜症の症例対照研究における症例収集を行い、さらに(2) EDCによる健康影響のひとつであることが疑われている乳癌発症へのEDC暴露のリスクを明らかにするために昨年度に作成したプロトコールにしたがって症例対照研究を開始する。

B. 研究方法

1. EDCの人の健康影響に関する疫学研究実施のための基礎的検討

(1-1) 人へのEDC暴露とその要因（暴露源）に関する基礎的検討

(1-1-1) 脂肪組織中の有機塩素系化合物残留量と食事等との関連

地域住民で胃がん又は大腸がんの手術を行った者57名について、手術の際に摘出した臓器の非がん部（大網）を採取した。その脂肪組織中のPCBの残留量を電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフで、DDT、 β -hexachlorocyclohexane（ β -HCH）及びクロルデンの残留量をガスクロマトグラフ質量分析計で測定する。また、自記式調査票によって食事、職業、居住地の環境特性等について調べ、それらの関連を検討する。

（倫理面への配慮）

研究計画について新潟大学医学部倫理委員会の承認を得た（平成12年8月17日）。研究参加者に対して手術前に口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

(1-1-2) EDCの人への暴露評価に関する基礎的検討

(1-1-2-1) 血清中植物エストロゲン量の評価

血清中の植物エストロゲン（daizein、genistein、equol）の液体クロマトグラフ電気化学検出器による高感度分析のためのサンプル処理方法を開発し、分析の妥当性を検討した。さらに1994～1995年に疫学研究のための食物摂取評価に関する妥当性研究に参加した健康ボランティア集団約200名について分析を行い、個人間変動、摂取食品や生活習慣との関連の検討を行う。

（倫理面への配慮）

分析方法の開発時に協力を得た血液サンプル提供者に対しては、口頭で研究の説明を行い、研究参加の同意を得た。健康ボランティア集団については、文書と口頭で研究の説明を行い、研究参加の同意を得ている。

(1-1-2-2) 高感度Ah免疫アッセイ法の基礎的検討

Ah免疫アッセイ法（Kubota, Co.）はAh受容体（AhR）とARNT（Ah Receptor Nuclear Translocator）を用いた2抗体免疫アッセイ法である。25名分の母乳から、多層カラムおよび活性炭カラムにより（PCDDs, +PCDFs）分画とCo-PCBs分画を分離抽出しGC/MS法で、また、多層カラム抽出物をAh免疫アッセイ法で測定し、これら2つの方法による分析結果を比較した。

（倫理面への配慮）

研究計画については国立環境研究所医学倫理委員会の承認を得た。研究参加者

に対して口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

(1-2) 人でのEDC暴露の影響およびその指標に関する検討

魚摂取量が多いと予想される北海道1漁村、沖縄1漁村及び長崎離島の、各7、7、20、計34名について、食品別摂取頻度調査、GC-MS法による母乳中ダイオキシン類量分析を行い、それらの関連について検討し、さらに採取した抹消血や臍帯血を使用し、暴露の影響としてエストロゲン代謝系(CYP類のmRNA発現、尿中エストロン分画あるいは甲状腺ホルモン等)に影響しているかどうかを調べる。

(倫理面への配慮)

研究計画については国立環境研究所医学倫理委員会の承認を得た。研究参加者に対して口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

(1-3) 人の健康影響に関するエビデンスの検討

EDCと、内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響、に関する疫学研究的現状を把握する目的で、文献レビューを行い、これまでの研究結果を整理した。

(倫理面への配慮)

文献レビューのため、倫理的な問題は無い。

2. EDCの健康影響を検証するための疫学研究

(2-1) 子宮内膜症の症例対照研究

平成11年度に作成したプロトコールにしたがって昨年度に引き続き子宮内膜症及び対照例の症例収集を行う。さらに、採取した血清中のPCB類、ダイオキシン類などのEDCの分析を開始する。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本および米国の関連4施設(東京慈恵会医科大学、国立がんセンター、国立環境研究所、米国疾病管理予防センター)の倫理委員会で研究が承認され、かつ日本側の研究機関と米国の間でProject Assuranceが取り交わされた。また全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

(2-2) 乳癌の症例対照研究

乳癌とEDCとの関連を解明するために昨年度に作成したプロトコールにしたがって多施設症例対照研究を行う。生活習慣に関する質問票調査及び血清中のEDCやホルモン、チトクロームP450系酵素など環境化学物質の代謝に関連する遺伝子多型を測定し、乳癌発症とEDCとの関連について検討を行う。症例対照例の収集は400ペアを目標とする。

(倫理面への配慮)

研究計画については国立がんセンター倫理審査委員会に申請し、平成12年12月27日に承認されている。全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

C. 研究結果

1. EDCの人の健康影響に関する疫学研究実施のための基礎的検討

(1-1) 人へのEDC暴露とその要因(暴露源)に関する基礎的検討

(1-1-1) 脂肪組織中の有機塩素系化合物残留量と食事等との関連

PCB、ヘキサクロロベンゼン、 β -BHC、p,p'-DDE、p,p'-DDT、ヘプタクロルエポキシド、trans-及びcis-ノナクロルは全ての試料から検出された。また、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、ケルセン及びマイレックスも多くの検体から検出された。検出された

これら化学物質は全て有機塩素系化合物であった。一方、 γ -BHC、 δ -BHC、アルドリン、エンドリン、 α -及び β -エンドスルファン、エンドスルファンスルフェート、アラクロール、ビクロゾリン、NIP、CNP、ペルメトリン、シペルメトリン及びフェンバレートは全ての試料で検出されなかった。

Total-BHCはそのほとんどが β -BHCで占められ、僅かに α -BHCと γ -BHCが検出されたが、 δ -BHCは検出されなかった。Total-DDTはその約95%がp,p'-DDTの代謝物であるp,p'-DDEで占められていた。Total-クロルデンはその約60%がtrans-ノナクロル、約25%がオキシクロルデン、約10%がcis-ノナクロルで占められ、僅かではあるがtrans-及びcis-のクロルデンも検出された。

検出された物質を平均値で比較すると、最も濃度が高かったのはTotal-DDTで、それは1ppmを超える濃度であった。次いでTotal-BHCとPCBで約0.5ppm、Total-クロルデンの約0.24ppm、ディルドリン及びヘプタクロルエポキシドの約0.04ppmであった。ヘプタクロル、ケルセン及びマイレックスは概ね0.005ppm以下であった。

PCB、ヘキサクロロベンゼン、Total-BHC、Total-DDT及びTotal-クロルデンの間には極めて高い相関が認められた。一方、ディルドリン、ヘプタクロルエポキシド、ケルセン及びマイレックスでは多少有意の相関関係は有るものの相対的には前述化学物質ほどの相関は認めなかった。なお性、年齢、水道水源、居住地、がんの種類別にEDC濃度に差を認めなかった。

(1-1-2) EDCの人への暴露評価に関する基礎検討

(1-1-2-1) 血清中植物エストロゲン量の評価

血清中の植物エストロゲンの液体クロ

マトグラフ電気化学検出器による高感度分析のためのサンプル処理方法を開発し、daizein、genistein、equolについて、良好な回収率(94~106%)、同時再現性(変動係数3.6~5.9%)、日差再現性(変動係数1.0~2.2%)を得た。さらに健常ボランティアについての分析を開始した。

(1-1-2-2) 高感度Ahイムノアッセイ法(Ah-IA)の基礎検討

GC/MSによるダイオキシン類(DXNs)濃度(TEQ)は平均17.2(3.3~45.7)pg TEQ/g-lipid(TEF: WHO1998)であった。Ah-IAの感度は1pg DEQ(2,3,7,8-TCDD相当)/wellであり、DXN類の29の同族体の交差反応係数(CRF)を求め、それぞれのTEF(WHO1998)と比較すると、前者が平均22倍大(但し、下記異常値を含む)であった。また、Ah-IA値は平均27.9(0~107.2)pg DEQ/g-lipidであった。一方、GC/MSによる同族体測定値に、TEFの代わりにCRFを乗じて求めた“AhR-CRF adjusted DXNs”は平均53.1(6.0~151.7)pg/g-lipidとなった。ここで、AhR-CRF adjusted DXNsが100以上を示した異常高値群3例を除いて、TEQ値とAhR-CRF adjusted DXNs値の相関をみると $r=0.991(p<0.001)$ 、また、Ah-IA値との相関は $r=0.612(p<0.01)$ となり、両値はともにTEQのほぼ2倍の値を示した。

(1-2) 人でのEDC暴露の影響およびその指標に関する検討

3地域の母乳中ダイオキシン類レベルは、平均8.9~13.1pg TEQ/g-fat(国際標準TEF)であり、1地域で有意に高値であった。全32名について年齢と総ダイオキシンとの間には有意な相関はなかった。また、出生順位別(第1子、2子、3子以上)の比較では、年齢調整平均値では有意差は見られなかったが、同時に地域を調整すると第1子で有意に高かった。

Coplanar-PCB のみについてみても同様であった。

ダイオキシン類、Coplanar-PCB とともに、魚摂取量が多い群で高く、さらに魚摂取量も肉摂取量も多い群で、両者ともに少ない群より統計的に有意に高かった。また、年齢、出生順位および魚摂取量あるいは肉摂取量を調整しても、地域差は統計的に有意であった。抹消血や臍帯血の採取を行っており、現在なお CYP 類 mRNA 等を測定中である。

(1-3) 人の健康影響に関するエビデンスの検討

EDC と、内分泌関連がんに関するこれまでの研究を総括すると、複数のコホート内症例対照研究の成績から、有機塩素系化合物（PCB や主な有機塩素系農薬）による乳がんリスクの上昇はなさそうであった。複数のコホート研究の成績から、ジエチルスチルベストロールの経口投与による 20～30% 程度の乳がんリスクの上昇が示唆された。その他の EDC と乳がんとの関連やその他の内分泌系の影響を受ける可能性のある部位のがん（子宮体部、卵巣、前立腺、精巣、甲状腺）との関連については、疫学研究的成績はほとんどなかった。複数の断面研究の成績から、PCB の高度曝露者において、甲状腺機能の低下をもたらす可能性が示唆された。尿道下裂、停留精巣との関連については、疫学研究的成績はほとんど存在しなかった。複数のコホート研究の成績から、PCB が小児の神経発達に影響を与えている可能性が示唆されたが、PCB 曝露や神経系発達に対する評価の方法や時期が多様であり、個々の関連に対する再現性は十分とは言えなかった。精子数低下、子宮内膜症との関連については、疫学研究的成績はほとんど存在しなかった。

2. EDC の健康影響を検証するための疫学研究

(2-1) 子宮内膜症の症例対照研究

2000年1月から2002年1月の期間に、不妊症治療を目的として東京慈恵会医科大学産婦人科を受診し、腹腔鏡検査を受けて本調査に登録された20～45歳の未経産婦は166例であった。このうち対象者のクライテリアに一致し、最終的に研究対象者となったのは140例であった。このうち内膜症群は58例、対照群は82例であった。腹腔鏡下の内膜症進行期分類の内訳は内膜症群：Ⅱ期10例、Ⅲ期23例、Ⅳ期25例、対照群：Ⅰ期22例、内膜症なし60例であった。血清中のPCB類、ダイオキシン類などのEDCの分析を行う準備を整え、分析を行う米国疾病管理予防センターと打ち合わせを行った。

(2-2) 乳癌の症例対照研究

プロトコールにしたがって研究を開始し、平成14年3月までに有効症例83例（83ペア）を収集した。さらに継続している。

D. 考察

体脂肪を用いて有機塩素系化合物を中心に31種のEDCを分析した結果から、有機塩素系化合物21種の汚染を確認することができた。これら化学物質の大部分は魚介類からも検出されており、人体汚染の経路は食事に由来するものと推定される。今後、特に検出された有機塩素系化合物残留に寄与する食生活等の要因のさらなる解析と、EDCの曝露状況と健康影響に関する規模の大きい疫学調査の必要性が示唆された。

今年度開発した血清中植物エストロゲン量の分析法は再現性に優れ、諸外国に比較して植物エストロゲン摂取量が高い日本人におけるEDCの疫学研究での内部曝露評価に応用可能であると考えられ

る。

ダイオキシン類の測定は1検体約20万円程度のコストが必要であり、疫学的検討には多大のコストが必要である。今年度の高感度Ahイムノアッセイ法についての基礎的検討結果は、少なくともダイオキシン類の簡易測定法の開発可能性を強く示唆しており、実用化が図れば同時に多数の検体を対象とし、さらにダイオキシン類以外のEDCを加えたより総合的な研究の展開が可能となるものと期待される。

魚摂取量が多いと予想される3地域の母乳中ダイオキシン類レベルの決定因子として出生順位、魚摂取量および居住地域が優位であることが示唆された。観察された中ダイオキシン類レベル範囲内においては、これまでオランダの疫学調査等で示唆されてきた甲状腺ホルモンの低下や、動物実験での急性曝露により上昇することが知られているCYP類などの有意な変動が認められないことが予想されるが、本研究で得られた生体試料についてもなお測定中である。

EDCと、内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響、に関しては、乳癌以外はこれまでの疫学的知見はきわめて乏しく、EDCと人の健康影響との因果関係を適切に判断することは困難と思われた。日本人における疫学研究の必要性が文献調査から示唆された。

子宮内膜症の症例対照研究では症例収集が終了し、まず血清中のPCB類、ダイオキシン類などについて米国疾病管理予防センターにおいて平成14年5月より分析を行う予定である。その他の分析については準備が整い次第開始する。EDCと子宮内膜症との関連についての疫学研究はこれまでほとんどなく、これらの分析結果の検討によって子宮内膜症の発症、

増悪とEDCとの関連が明らかになることが期待される。

乳癌とEDCとの関連を解明するための症例対照研究では、3施設の全入院例について登録が行われ、予定通りに症例が収集されている。EDCに焦点を当てた症例対照研究は、これまで欧米諸国から主にPCBなどの有機塩素系化合物について複数の報告があるが、わが国からの報告はない。日本人の乳癌は、欧米諸国と比較して罹患率が低く、しかし最近増加しているという特徴をもつため、日本人の乳癌に関する検討はEDCと乳癌発症についての関係を解明するうえで有益な情報をもたらすものと考えられる。

E. 結論

わが国におけるEDC暴露状況と暴露源を明かにする目的で、地域住民における脂肪組織中の有機塩素系化合物残留量の測定を行ったところ、有機塩素系化合物21種の存在を確認した。EDC暴露評価法の基礎検討として、血清中植物エストロゲン量の分析法、Ahイムノアッセイ法による母乳中ダイオキシン分析について検討し、疫学研究へ応用可能であるという結果が得られた。魚摂取量が多いと予想される3地域の母乳中ダイオキシン類レベルは、平均が8.9～13.1 pg TEQ/g-fat(国際標準TEF)であり、出生順位、魚摂取量および居住地域との関連が示された。

EDCと、内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響に関する文献レビューでは、乳癌と有機塩素系化合物以外の疫学的知見はきわめて乏しく、いずれの健康影響についてもその関連について言及できないことが明らかになった。

内分泌かく乱作用が疑われている化学

物質が、食品や一般環境中に存在し、人が暴露していることが示されたことから、子宮内膜症と乳癌の疫学研究を開始した。子宮内膜症に関する症例対照研究では症例収集が終了し、乳癌に関する症例対照研究では症例収集が開始されたが、その他の健康影響に関しても考慮していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, Kobayashi M, Arai Y, Uehara M, Adlercreutz H, Watanabe S, Takahashi T, Itoi Y, Iwase Y, Akabane M, Tsugane S. Validity and reproducibility of a self-administered food frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J Nutr* 2001;131:2741-2747.

Hanaoka T, Takahashi Y, Kobayashi M, Sasaki S, Usuda M, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S. Residuals of beta-hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyltrichloroethane, and hexachlorobenzene in serum, and relations with consumption of dietary components in rural residents in Japan. *Science Total Environ* (in press)

Hanaoka T, Yamano Y, Pan G, Hara K, Ichiba M, Zhang J, Zhang S, Liu T, Li L, Takahashi K, Kagawa J, Tsugane S. Cytochrome P450 1B1 mRNA levels in peripheral blood cells and exposure

to polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese coke oven workers. *Science Total Environ* (in press)

Hanaoka T, Nair J, Takahashi Y, Sasaki S, Bartsch H, Tsugane S. Urinary level of 1,N6-ethenodeoxyadenosine, a marker of oxidative stress is associated with w6-polyunsaturated fatty acid intake in postmenopausal Japanese women. *Int J cancer* (in press)

Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. Urinary bisphenol A and plasma hormone levels in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* (in press).

山本正治, 遠藤和男, 中平浩人, 中村和利: 主要臓器癌の疫学研究の現状. 胆道癌. 癌と化学療法 2001;28:155-8.

Yamamoto M, Lang I, Sakai H, Nakadaira H, Nakamura K, Tsuchiya Y, Tsugane S. Endocrine disrupting chemicals in Hungarian canned foods. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2002; 6: 273-5.

Tsuchiya Y, Yamamoto M, Sato T, Kiyohara C, Yoshida K, Ogoshi K, Nakamura K. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 1A1 and risk of gallbladder cancer. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 2002; 21: 609-14.

Ezaki K, Moyoyama H, Sasaki H. Immunohistologic localization of extrone sulfatase in uterine endometrium and adenomyosis. *Obstet Gynecol* 2000;98:815-9.

舞床和洋, 江崎敬, 廣嶋牧子, 大浦訓章, 許山浩司, 佐々木寛, 田中忠夫, 多田聖郎. 卵巣チョコレートのお胞におけるエストロンサルファターゼ発現に関する検討. エンドメトリオーシス研究会会誌 2001;22:193-6.

佐々木寛, 田中忠夫. 卵巣腫瘍の腹腔鏡下手術とその取り扱い. 産婦人科の実際 2001;50:1747-57.

佐々木寛, 小池俊子, 江崎真理子. 最新がん治療と看護: 化学療法と看護ケア: 後編, 卵巣がん・子宮がんに対する化学療法とその限界. がん看護 2001;6:23-5.

2. 学会発表

兜 真徳, ほか. ダイオキシンの生体負荷とバイオマーカーとの関連 (第1報). 日本衛生学会, 福島, 2001年4月.

Kabuto M, Yonemoto Y, Sone H, Imai H, Todoriki H, Kaneko T, Yamamoto R and Yamaguchi T. Correlation between fish intake and dioxins in human milk at the individual level. DIOXIN 2001, Korea, 2001.

Kabuto M, Imai H, Yonemoto J, Sone H, Matsuwaki T, Kobayashi Y, Usuki Y, Hirai T. Trial measurement of dioxins in human milk with a newly developed Ah-immunoassay. Japanese Association of EDCs, Tsukuba, 2001.

中平浩人, 山本正治. 生活環境モニタリングとしての地域がん登録の役割-水質汚染. JACR Monograph, 2001;6:30-34.

酒井美月, 山本正治他. 新潟平野の河川下流域におけるダイオキシン類汚染の変遷. 環境科学会, 山梨, 2001年10月.

佐々木寛. 腹腔鏡下リンパ節郭清術. 堵区別講演および手術実演. 第4回中国内視鏡手術シンポジウム, 中国医科大学第二臨床学院, 2001年7月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当せず

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の人への健康影響に関する疫学的研究

分担研究者 津金 昌一郎 国立がんセンター研究所支所 臨床疫学研究部長

研究要旨 内分泌かく乱化学物質(EDC)と人の健康影響との関連を検証する疫学研究をデザインするための基礎的情報を得るために、EDCの人への暴露評価に関する基礎検討、人の健康影響に関するエビデンスの包括的な検討を行った。また、乳癌とEDCとの関連を検証するための症例対照研究を開始した。暴露評価の基礎検討として、血清中植物エストロゲン分析法について検討し、疫学研究での多検体分析に応用可能な再現性の良い分析方法を開発した。EDCと、内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響に関する疫学研究の文献的検討では、乳癌以外の疫学研究はきわめて少なく、関連が示唆された健康影響についても再現性が十分であるとは言えず、また、研究の対象となった化学物質も限られていた。日本人での疫学研究はほとんど存在しなかった。昨年度に倫理審査を受けたプロトコールにしたがって乳癌の多施設症例対照研究を開始し、平成14年3月までに有効症例83例(83ペア)を収集し、さらに継続している。

研究協力者

花岡知之・国立がんセンター研究所
支所臨床疫学研究部主任研究官

坪野吉孝・東北大学大学院
医学系研究科社会医学講座
公衆衛生学分野講師

岸 玲子・北海道大学大学院
医学研究科社会医学専攻
公衆衛生学教授

岩本晃明・聖マリアンナ医科大学
泌尿器科学教授

A. 研究目的

日常生活環境における内分泌かく乱化学物質(EDC)への暴露が、人の健康影響と関連するか否かを疫学的に検討することを目的とする。平成13年度は、前年度に引き続いて、疫学研究を実施す

るための基礎的情報を得るために、EDCの人への暴露評価に関する基礎検討を行う。また、人の健康影響に関するエビデンスの検討を包括的に行う。

同時に、EDCによる健康影響のひとつであることが疑われている乳がん発症へのEDC暴露のリスクを明かにするために症例対照研究を開始する。

B. 研究方法

1. EDCの人の健康影響に関する疫学研究実施のための基礎的検討

(1) EDCの人への暴露評価に関する基礎検討

血清中の植物エストロゲン(daizein, genistein, equol)の液体クロマトグラフ電気化学検出器による高感度分析のためのサンプル処理方法を開発し、分析の妥当性を検討した。さらに1994~1995年

に疫学研究のための食物摂取評価に関する妥当性研究に参加した健康ボランティア集団約200名について分析を行い、個人間変動、摂取食品や生活習慣との関連の検討を行う。

(倫理面への配慮)

分析方法の開発時に協力を得た血液サンプル提供者に対しては、口頭で研究の説明を行い、研究参加の同意を得た。健康ボランティア集団については、文書と口頭で研究の説明を行い、研究参加の同意を得ている。

(2) EDCの人の健康影響に関するエビデンスの検討 (添付資料参照)

EDCと、人の健康影響に関する疫学研究の現状を把握する目的で、文献レビューを行った。対象にした健康影響は、内分泌関連がん、甲状腺機能、器官形成、小児神経発達、精子数への影響であり、米国立医学図書館の医学文献データベース (PubMed) を用いて、「(”健康影響”) and (Insecticides OR Pesticides OR Chlorinated Hydrocarbons OR PCBs OR Bisphenol OR Phenol OR Phthalate OR Styrene OR Furan OR Organotin OR Diethylstilbestrol OR Ethinyl Estradiol) AND (human)」というキーワードによって検索した文献とそれらの中で引用されている文献などを参照して、これまでの研究結果を整理した。

(倫理面への配慮)

文献レビューのため、倫理的な問題はない。

2. EDCの健康影響を検証するための疫学研究

乳癌とEDCとの関連を解明するために、昨年度に倫理審査を受けたプロトコールにしたがって、多施設症例対照研究を開始した。初発の乳癌で調査期間中に長野県内の3病院 (長野松代総合病院、

長野赤十字病院、長野市民病院) に入院した20歳以上75歳未満の女性入院患者全員を症例、人間ドック受診予定者の女性で上記症例に対して年齢 (±3歳) と居住地域が一致する者のうち最も年齢の近い1名を対照とした。生活習慣に関する質問票調査及び血清中のEDCやホルモン、チトクロームP450系酵素など環境化学物質の代謝に関連する遺伝子多型を分析し、乳癌発症とEDCとの関連について検討を行う。

(倫理面への配慮)

研究計画について国立がんセンター倫理審査委員会に申請し、平成12年12月27日に承認されている。全研究対象者に文書と口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

C. 研究結果

1. EDCの人の健康影響に関する疫学研究実施のための基礎的検討

(1) EDCの人への暴露評価に関する基礎的検討

血清中の植物エストロゲンの液体クロマトグラフ電気化学検出器による高感度分析のためのサンプル処理方法を開発した (図1)。回収率は、daizein, genistein, equolについてそれぞれ101%、106%、94%であった。サンプル血清中の抱合体植物エストロゲンの割合はそれぞれ97%、74%、49%であった。同時再現性は変動係数が3.6~5.9%、日差再現性は変動係数が1.0~2.2%であった。さらに健康ボランティアについての分析を開始した。

(2) EDCの人の健康影響に関するエビデンスの検討

EDCと、内分泌関連がんに関するこれまでの研究を総括すると、複数のコホート内症例対照研究の成績から、有機塩素系化合物 (PCBや主な有機塩素系農薬)

による乳がんリスクの上昇はなさそうであった。複数のコホート研究の成績から、ジエチルスチルベストロールの経口投与による20~30%程度の乳がんリスクの上昇が示唆された。その他のEDCと乳がんとの関連やその他の内分泌系の影響を受ける可能性のある部位のがん（子宮体部、卵巣、前立腺、精巣、甲状腺）との関連については、疫学研究的成績はほとんどなかった。複数の断面研究の成績から、PCBの高度曝露者において、甲状腺機能の低下をもたらす可能性が示唆された。尿道下裂、停留精巣との関連については、疫学研究的成績はほとんど存在しなかった。複数のコホート研究の成績から、PCBが小児の神経発達に影響を与えている可能性が示唆されたが、PCB曝露や神経系発達に対する評価の方法や時期が多様であり、個々の関連に対する再現性は十分とは言えなかった。

精子数低下、子宮内膜症との関連については、疫学研究的成績はほとんど存在しなかった。

2. 乳癌とEDCとの関連を解明するための症例対照研究

プロトコールにしたがって研究を開始し、平成14年3月までに有効症例83例（83ペア）を収集した。さらに継続している。

D. 考察

これまでの報告では日本人の植物エストロゲンの摂取量は、米国白人の約250倍以上、米国人全体の約10倍以上であると報告されている。したがって日本人においてEDCの人の健康影響に関する疫学研究をデザインするには植物エストロゲンの摂取量は無視できない。本研究で開発した分析方法は、簡便かつ再現性良く血清中の植物エストロゲン量を評価で

きるものであり、多検体を扱う疫学研究に応用可能であると考えられる。

EDCと、内分泌関連がんに関しては、有機塩素系化合物による乳がんリスクの上昇は否定的であるが、層別解析（閉経前か閉経後か、遺伝子多型など）で関連が強く出る可能性を示唆する報告もあり、影響を受けやすいサブグループの存在が今後の検討課題である。その他のEDCやその他のがんとの関連については、疫学研究的成績がほとんどなく、関連性については言及できない。甲状腺機能と小児の神経発達への影響については、影響が示唆されるが、再現性が十分とは言えず、より質の高い日本人での疫学研究が望まれる。尿道下裂、停留精巣、精子数低下、子宮内膜症との関連については、疫学研究的成績がほとんどなく、EDCとの関連性については言及できないのが現状である。

乳癌とEDCとの関連を解明するための症例対照研究では、3施設の全入院例について登録が行われ、予定通りに症例が収集されている。EDCに焦点を当てた症例対照研究は、これまで欧米諸国から主にPCBなどの有機塩素系化合物について複数の報告があるが、わが国からの報告はない。日本人の乳癌は、欧米諸国と比較して罹患率が低く、しかし最近増加しているという特徴をもつため、日本人の乳癌に関する検討はEDCと乳癌発症についての関係を解明するうえで有益な情報をもたらすものであると考えられる。

E. 結論

EDCの人への曝露評価に関する基礎検討として、血清中植物エストロゲンの高感度分析のためのサンプル処理方法を開発し、高い再現性が得られた。

EDCの人の健康影響に関する文献的

検討を包括的に行った結果、疫学研究、特に日本人での疫学研究は極めて少なかった。

乳がん発症へのEDC暴露のリスクを明かにするために乳がんの多施設症例対照研究を開始し、症例を収集した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, Kobayashi M, Arai Y, Uehara M, Adlercreutz H, Watanabe S, Takahashi T, Itoi Y, Iwase Y, Akabane M, Tsugane S. Validity and reproducibility of a self-administered food frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J Nutr* 2001;131:2741-2747.

Yamamoto M, Lang I, Sakai H, Nakadaira H, Nakamura K, Tsuchiya Y, Tsugane S. Endocrine disrupting chemicals in Hungarian canned foods. *Environ Health Preven Med*. 2002;273-275

Hanaoka T, Takahashi Y, Kobayashi M, Sasaki S, Usuda M, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S. Residuals of beta-hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyltrichloroethane, and hexachlorobenzene in serum, and relations with consumption of dietary components in rural residents in Japan. *Science Total Environ* (in press).

Hanaoka T, Yamano Y, Pan G, Hara K,

Ichiba M, Zhang J, Zhang S, Liu T, Li L, Takahashi K, Kagawa J, Tsugane S. Cytochrome P450 1B1 mRNA levels in peripheral blood cells and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese coke oven workers. *Science Total Environ* (in press).

Hanaoka T, Nair J, Takahashi Y, Sasaki S, Bartsch H, Tsugane S. Urinary level of 1,N6-ethenodeoxyadenosine, a marker of oxidative stress is associated with w6-polyunsaturated fatty acid intake in postmenopausal Japanese women. *Int J cancer* (in press).

Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. Urinary bisphenol A and plasma hormone levels in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* (in press).

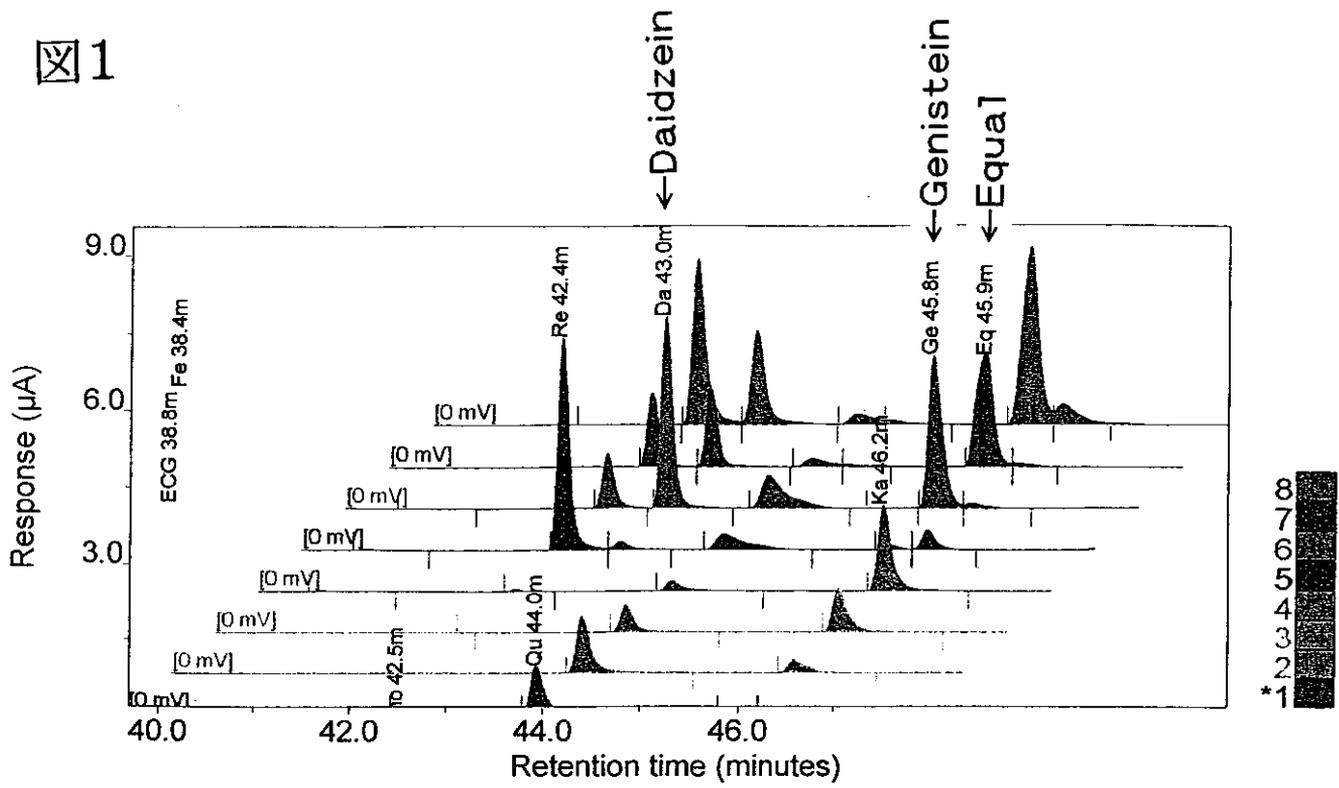
2. 学会発表

なし

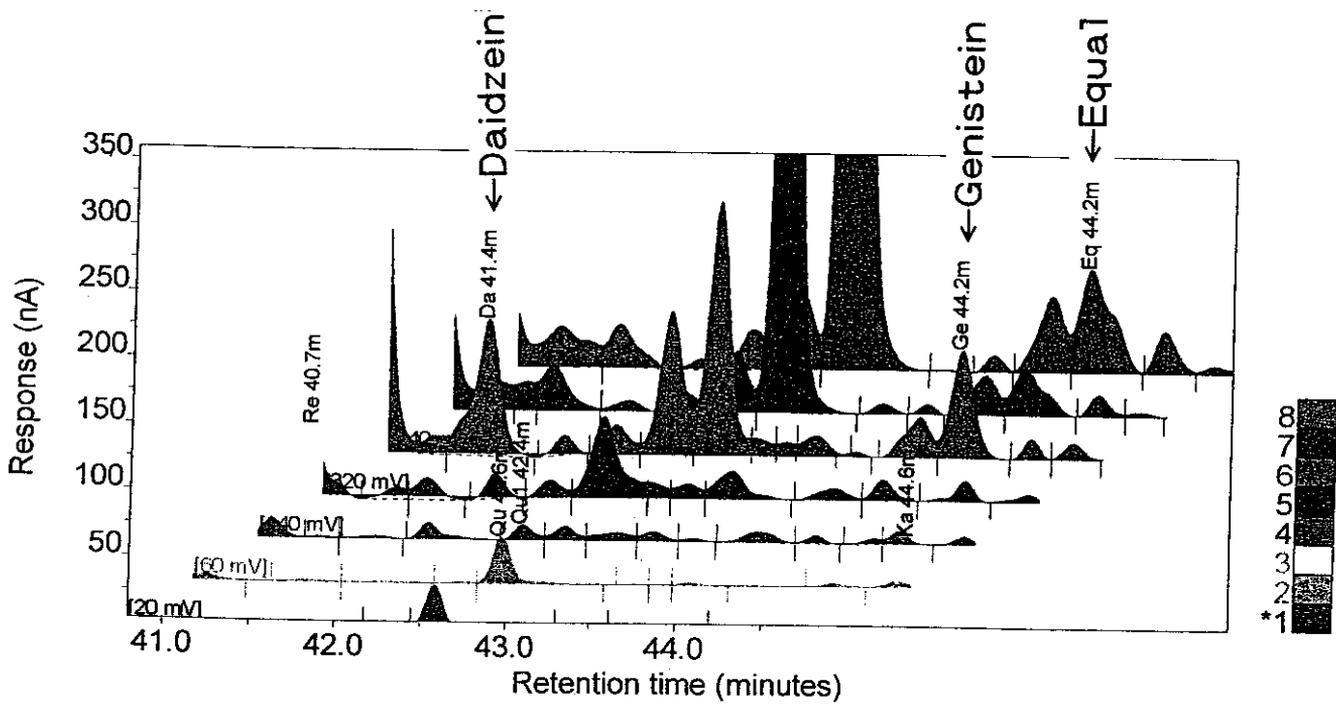
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当せず

☒ 1



Standard



Sample

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

エストロゲン代謝系への影響評価に関する研究

分担研究者 兜 真徳 独立行政法人 国立環境研究所 首席研究官

研究要旨 内分泌かく乱化学物質類によるエストロゲン(E)代謝系への影響評価を目的として、各種内分泌かく乱物質類の母乳、尿中、血中の濃度とリンパ球の CYP 類の mRNA 発現量、E 代謝物である 2 及び 16 α -ヒドロキシ・エストロン、甲状腺ホルモン等との関連につき一連の検討を行っている。平成 11~12 年度には、職業性のダイオキシン (DXN) 高曝露集団において 3 種の CYP 類の遺伝子発現と血中 DXN との関連を検討した結果関連は明らかでなかった一方、東京郊外の焼却炉周辺住民調査においては DXN の高レベル群のみで CYP1a1 の mRNA 発現量が僅かに高く、また甲状腺ホルモンが若干低下する傾向が示唆された (有意ではない)。また、北海道 1 漁港の主婦 7 名では母乳中 DXN は上記 2 集団より低値であったが魚摂取推定量との相関が示唆された。H13 年度は沖縄の 1 漁村と長崎の離島の住民から母乳、血液、尿 (一部では臍帯血) を採取し、上記北海道 7 名を合わせて食品摂取パターンと母乳中 DXN 濃度との関係を中心に解析した。また、ビスフェノール A や植物エストロゲンの測定法および Ah Receptor Assay の測定法について基礎的検討を行った結果、とくに後者の簡易スクリーニングへの実用可能性が示唆されている。

A. 研究目的

本分担では、我が国の一般人口における環境ホルモン曝露がエストロゲン代謝系 (CYP 類の mRNA 発現、尿中エストロン分画あるいは甲状腺ホルモン等) に影響しているかどうかを評価することを目的としてきた。

2 年度目に当たる昨年度には、北海道 1 漁村の産科病院で出産のため入院中の妊婦 46 名に食品別摂取頻度調査を行い、魚・肉・ミルク類の摂取量を推定し、その中の摂取量の多い人と少ない人 7 名から母乳と尿サンプルを採取、所要の諸分析を行った。結果、母乳中 DXN 濃度は、他地域に比較してやや低値であるが、授乳や魚摂取量による変動が示唆された。

本年度は、とくに魚摂取量の多いと予想される集団+についてのデータを収集するため、さらに沖縄の 1 漁村と長崎の離島の集団から約 30 名の分娩後の女子を選出して同様な調査を行った。なお今回は抹消血や臍帯血の採取を行っており、現在なお CYP 類等を測定中である。

本報告では、昨年度の対象者のデータ

を合わせ、3 地域の全対象者について、魚肉摂取量との関係についての解析結果、および長崎離島の母乳サンプルを用いて行った Ah Receptor Assay についての基礎検討結果を報告する。

B. 研究方法

対象者 (損測定値が揃った者) は北海道 1 漁村 (K-city)、沖縄 1 漁村 (T-town) 及び長崎離島 (K-town) の各 7、7、20、計 34 名、年齢は平均 29.3 (20-41) 歳である。出生順位第 1 子が 13、第 2 子が 10、第 3 子が 9 名であった。

魚と肉類の摂取量調査は昨年度報告の通り国立がんセンター方式により、食品摂取量指数は、 $\text{Dietary intake index} = \sum (\text{average meals/day})_i \times (\text{average amount of intake})_i$ の式によって算出した。ただし、Fish meat intake には、salmon, tuna, cod, sea bream, sardine, mackerel, salmon roe, eel, squid, octopus, shrimp, clam, mud snail and fish paste cake を、また、Meat intake には、beef, pork, chicken, ham, sausage and bacon を含む。

地域別の魚摂取量指数と肉摂取量指数の平均値(±S.E)を表1に示す。沖縄では量摂取量とも他地域より多い傾向があるが、有意に多いのは肉摂取量であった。一方、北海道 K-city では魚と肉摂取量とも低い傾向が顕著であった。

表1:魚および肉摂取量指数の地域別平均平均値(±S.E)

	Fish meat intake	Meat intake
長崎 (K-town)	225 (27)	233 (28)
沖縄 (T-town)	260 (31)	303 (36) *
北海道 (K-city)	158 (21)	166 (29)

注) * 北海道 (K-city) より有意 (p<0.05) に高値であった。

母乳中ダイオキシン類は GC-MS 法により Dioxin (13 PCDD + 15 PCDF + 12 Co-PCB isomers) を測定した。

共分散分析などの統計解析には PC-SAS の GLM (General Linear Model) を用いた。

(倫理面への配慮)

研究計画については国立環境研究所医学倫理委員会の承認を得た。研究参加者に対して口頭で研究の説明を行い、文書により研究参加の同意を得た。

C. 研究結果

C.1.3 地域の母乳中 DXN レベルと魚・肉摂取量との関連

K-city, K-town および T-town の母乳中 DXN レベルはそれぞれ平均 8.9 (最低・最高: 3.8-16.4), 7.2 (5.3-10) および 13.1 (2.1-29.7) pg TEQ/g-fat (国際標準 TEF) であり、T-town では有意に高値であった。全 32 名について年齢と総 DXN との間には有意な相関はなかった。また、出生順位別 (第 1 子、2 子、3 子以上) の比較では年齢調整平均値では有意差は見られなかったが、表 2 に示すように、同時に地域を調整すると第 1 子で有意に高いことが知られた。ここで、再度、年齢と出生順位を調整して地域別平均を比較しても、T-town の平均値がその他の地域よ

り有意に高い傾向があった。こうした傾向は Coplanar-PCB のみについても同様であった (表 2)。

表 2: 地域別および出生順位別にみた母乳中の Co-PCB と総 Dioxins の濃度 (pg TEQ /g-fat) の平均値 平均値(±S.E)

出生順位別の平均値		
出生順位	Co-PCB **	Total dioxins **
1	6.02 (0.97)#	13.03 (1.92)#
2	3.12 (1.08)	6.66 (1.95)
3=<	1.08 (1.47)	5.49 (2.65)

注) * は年齢と出生順位を、また ** は年齢と地域を調整した平均値を示す。また、# は p<0.05, ## は p<0.01 で他の地域より統計的に大きいことを示す。

地域別の平均値		
地域	Co-PCB *	Total dioxins*
長崎 (K-town)	5.60 (0.74)#	12.80 (1.34)##
沖縄 (T-town)	2.60 (1.21)	6.01 (2.18)
北海道 (K-city)	2.77 (1.31)	6.73 (2.37)

ここで、さらに魚摂取量と肉摂取量のそれぞれを大小によって 2 群に分け、両者の組み合わせによる 4 群間で母乳中 DXN レベルが異なるかどうかを、年齢と出生順位を調整して検討した。結果は図 1 と 2 に示すように、DXN および Coplanar-PCB とともに魚摂取量が大きい群で大きく決定され、さらに魚摂取量が大きく、かつ肉摂取量が大きい人で、両者ともに小さい群より統計的に有意であった。ただし、魚摂取量の 2 群間の母乳中 DXN の差は、年齢と出生順位のほか、地域を調整してもしなくても有意であったが、肉摂取量ではいずれも有意ではなかった。また、年齢、出生順位および魚摂取量あるいは肉摂取量を調整しても、地域差 (とくに長崎と沖縄の差) は統計

的に有意であった。

以上から、母乳中 DXN レベルの決定因子として出生順位、魚摂取量および居住地域が優位であることが示唆される。魚の摂取量とは独立して地域が有意に寄与している原因として、長崎の対象地域近辺で捕獲され・摂取される魚の DXN 汚染が、沖縄の調査地近辺で捕獲されて食されている魚のそれより高いことを予想させる。

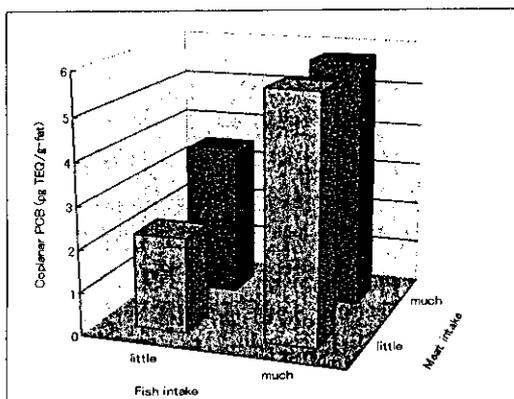


図1:魚摂取量の多少と肉摂取量の多少で分けた4群間での母乳中総DNXレベルの平均値の比較。両者とも多い群は両者とも少ない群より有意高値(P<0.05)。

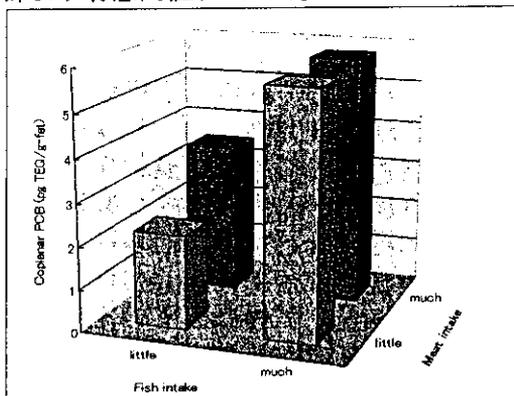


図2:魚摂取量の多少と肉摂取量の多少で分けた4群間での母乳中Co-PCBレベルの平均値の比較。両者とも多い群は両者とも少ない群より有意高値(P<0.05)。

C.2.Ah Receptor Assay についての基礎検討結果

環境ホルモンに係る疫学的リスク評価

を進める目的で、高感度「Ah イムノアッセイ (Ah-IA) 法 (Kubota,Co.)」の基礎的検討を行った。Ah-IA 法は Ah 受容体 (AhR) と ARNT(Ah Receptor Nuclear Trans-locator)を用いた2抗体 IA 法である。25名分の母乳から、多層カラムおよび活性炭カラムにより (P CDDs,+ P CDFs) 分画と Co-PCBs 分画を分離抽出し、それぞれ GC/MS 法で、また、多層カラム抽出物を Ah-IA 法で測定した。GC/MS による DXNs 濃度(TEQ)は平均 17.2 (3.3~45.7) pg TEQ /g-lipid (TEF: WHO1998) であった。Ah-IA の感度は 1 pg DEQ (2,3,7,8- TCDD 相当)/well であり、DXN 類の 29 のコンジエの交差反応係数 (CRF) を求め、それぞれの TEF(WHO1998)と比較すると、前者が平均 22 倍大 (但し、下記異常値を含む) であった。また、Ah-IA 値は平均 27.9 (0~107.2) pg DEQ/g-lipid であった。一方、GC/MS によるコンジエ測定値に、TEF の代わりに CRF を乗じて求めた “AhR-CRF adjusted DXNs” は平均 53.1(6.0 ~151.7)pg/g-lipid となった。ここで、AhR-CRF adjusted DXNs が 100 以上を示した異常高値群 3 例を除いて、TEQ 値と AhR-CRF adjusted DXNs 値の相関をみると $r=0.991(p<0.001)$ 、また、Ah-IA 値との相関は $r=0.612(p<0.01)$ となり (Fig.1)、両値はともに TEQ のほぼ 2 倍の値を示すことが知られた。現在、上記の異常値や Ah-IA 測定値のバラツキの原因と考えられる抽出法やアッセイ条件の最適化など、さらに検討中である。

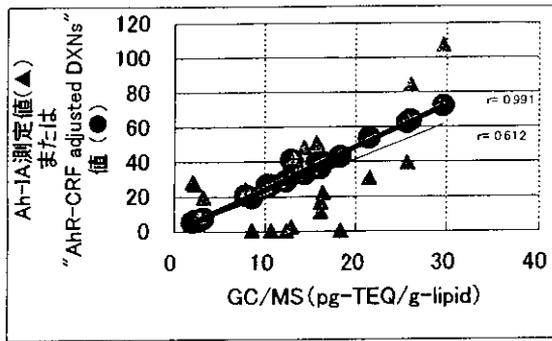


図3 : DXNs (TEQ) と「AhR-CRFで調整した DXNs 濃度」 ($r=0.991, p<0.001$) および Ah-I で測定された値との各相関関係 ($r=0.612; p<0.01$)を示す。

D. 考察

本研究結果から、母乳中 DXN レベルの規定要因として出生順位、魚摂取量および地域が有意に寄与していることが示唆された。他の研究では年齢の寄与も示唆されているが、母乳採取した対象主婦では年齢層が限定されていることも考えられる。魚の DXN 汚染の地域差やそれが地域住民の体負荷量にどのような影響を与えているかについて、さらに検討が必要と思われる。なお、ここで利用した魚摂取量指標はあくまで食品別摂取頻度調査から計算によって求められたものであり、陰膳法などのより直接的な測定も考慮されるべきであろう。

また、昨年度までの検討結果からみて、ここで観察された DXN レベル範囲内においては、これまでオランダの疫学調査等で示唆されてきた甲状腺ホルモンの低下や、動物実験での急性曝露により上昇することが知られている CYP 類などの有意な変動が認められないことが予想されるが、本研究で得られた生体試料についてもなお測定中であり、追解析する予定としており、論文発表の予定である。

一方、本研究ではビスフェノール A やノニルフェノールや農薬の測定も一部試みているが、なお測定法の問題が大きいため十分な検討ができなかった。本調査も最後の段階に至ってようやくビスフ

ェノール A の安定した測定系や植物エストロジェンの測定も可能となってきた。

DXN 測定では1検体約20万程度が必要であり、必要と考えられる疫学的検討には多大のコストが必要である。Ah-Immunoassay を用いた Receptor Assay についての基礎的検討結果は、少なくとも DXN の簡易測定法の開発可能性を強く示唆しており、実用化が図れば同時に多数の検体を対象とし、さらに上記の環境ホルモン類を加えたより総合的な研究の展開が可能となるものと期待している。ちなみに、上記 Receptor Assay は、抽出に係る前処理法を変化させることによって PAH や植物ホルモンあるいは臭素化 DXN などをそれぞれ一括測定する道も開けるものと期待される。

以上の経過を受け、平成14年の新規調査研究計画(厚生科学研究費)として、示唆される胎児期における曝露のリスクを評価するための母子のコホート調査のための研究費申請を行っているところである。なお、同コホート調査が採択されれば以上の調査の対象者や収集保存されている生体試料は同研究においても引き続き利用可能となる。

E. 結論

本研究を通して、近海の魚摂取量の多いと予想された3地域では、出生順位や地域を考慮しても、魚摂取量に相関して母乳中 DXN レベルが上昇する傾向はあるが、全体的なレベルは、他地域(例えば所沢など都市域)に比較して低く、エンドポイントとして検討している甲状腺ホルモンやCYP類の有意な変動を与えている可能性は殆どないことが示唆されている。また、別途検討してきた各種内分泌かく乱化学物質の影響リスク評価のための疫学調査に必要な新たな手法開発を進め、Ah Receptor Assay の可能性などを確認してきた。

現在、こうした経過を受け、さらになお胎児期の高感受性期における脳神経機能などへの影響について社会的不安などを考慮し、新たに母子コホートを対象と