Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費　終了研究成果報告書

血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析
(5-1652)

平成28年度～平成30年度

英文課題名

※英文タイトルは、環境省の承認を得ている表現とすること。

（英文パンフレット等http://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/english/gaiyou/pdf/2017_pamphlet_eng.pdf）

<研究代表機関>
国立大学法人千葉大学予防医学センター

2019年５月

目次

I. 成果の概要 ・・・・・・・・ 1○
１．はじめに（研究背景等）
２．研究開発目的
３．研究開発の方法
４．結果及び考察
５．本研究により得られた主な成果
６．研究成果の主な発表状況
７．研究者略歴

Ⅱ．成果の詳細: 血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析・・・・・・・ 10○
要旨
１．はじめに
２．研究開発目的
３．研究開発方法
４．結果及び考察
５．本研究により得られた成果
６．国際共同研究等の状況
７．研究成果の発表状況
８．引用文献

Ⅲ．英文Abstract ・・・・・・・ 30○

I. 成果の概要

課題名　　5-1652　血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

課題代表者名 森　千里 （国立大学法人　千葉大学予防医学センター　センター長）

研究実施期間　平成28～30年度
累計予算額　　114,764千円
（うち平成28年度：38,903千円、平成29年度：38,903千円、平成30年度：36,958千円）
累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 迅速簡易分析法、残留性有機汚染物質 (POPs)、ポリ塩化ビフェニル (PCBs)、有機塩素系農薬 (OCPs)、臭素系難燃剤 (BFRs)、自動分析、ガスクロマトグラフ-質量分析計、出生コホート、曝露起源推定、食事調査、曝露影響解析

研究体制
（1）血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析 （千葉大学予防医学センター）

氏名	専門/学位	所属機関名／部署／役職
森　千里	環境医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/センター長
戸高　恵美子	予防医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/教授
櫻井　健一	内分泌代謝学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
花里　真道	予防医学・博士（工学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
中岡　宏子	予防医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
鈴木　規道	予防医学・博士（工学）	千葉大学/予防医学センター/特任准教授
大竹　正枝	栄養学・博士（農学）	千葉大学/予防医学センター/特任助教
江口　哲史	環境分析化学・博士（理学）	千葉大学/予防医学センター/助教

1. はじめに（研究背景等）

近年、胎児期における化学物質の曝露による身体・精神発達への影響が社会的な問題となっており、我が国でも大規模出生コホート調査（環境省事業「子供の環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」）による、小児への化学物質曝露影響およびその曝露経路の解明が急務とされている。既存手法において、コホート調査で対象とされている血中のポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyls : PCBs)、有機塩素系農薬 (organochlorine pesticides: OCPs) や臭素系難燃剤 (brominated flame retardants: BFRs) などの残留性有機汚染物質 (persistent organic pollutants: POPs)の分析には5ml以上の血液が必要であったが、子供を対象とした疫学調査では、測定に十分な量の血液サンプルを採取することは侵襲性の問題から困難である。また、必要試料量だけでなく、測定前処理、機器分析に必要な時間、資材などのコストの問題から、充分な検体数を確保することは困難である。このため、迅速・低コスト・簡便な分析法を開発し、コホートより得た少量の検体からさまざまな化学物質の測定を、低コスト・迅速に行う手法の開発が必要である。

POPsの曝露によるリスクについてはこれまでも様々な研究が報告されており、中でも胎児への影響として、Govartsらは、ヨーロッパの出生コホート調査結果から、胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少関連性について報告している。さらに、化学物質曝露に伴う小児アレルギー発症・神経発達へのリスクなども先行研究があり、これら、化学物質曝露が原因と推察される小児アレルギーや精神神経発達異常の増加について対策を行うためにも、汚染物質の曝露起源解明は重要な課題である。また、疫学調査において母子の血清・臍帯血清中POPs濃度を分析し、質問票との関係を解析することで各化合物の曝露経路について調査し、介入を行うことで化学物質の曝露量を低減できる可能性を示すことは出産可能年齢の世代への曝露削減対策を講じる上で重要な課題である。さらに、血清試料の採取と比較し、比較的サンプリングが容易な母親の食生活や生活習慣、年齢、出産回数などの質問票をもちいて母児体内におけるPOPs濃度を推測し、化学物質の曝露量やその起源を検討することで、調査票を用いた曝露推定を、省コストで実施できる可能性がある。

2. 研究開発目的

本研究の目的は従来の血清中PCBs分析手法の高度化することで、大規模な出生コホート調査に適用可能な、少量のサンプルから迅速・安価にPCBsを含んだ残留性有機汚染物質 (POPs) の分析法を確立することである。本研究で検討する手法は、侵襲性の問題から十分な量の血清試料を採取できない場合にも対応できるよう、0.5ml以下の試料からPOPsを一斉分析することを目的とした。また、抽出・遠心・精製・濃縮など、煩雑な作業が必要な前処理工程を自動化すること、低コスト・迅速・簡便化のため、検出器であるガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) については、汎用的な四重極型の機器を利用して分析法を確立すること、一台の機器で、一日あたり40-50検体程度の検体を処理できることの3点を目的とした。

また、出生コホートから得られた試料を分析し、POPsの曝露源を特定することについても本研究の目的とした。測定データとアンケート、簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）の関係を解析し、曝露に関係する因子の特定を試みる。血清・臍帯血清中POPs量とアンケートの関係解析により、POPsの曝露経路・曝露の低減につながる生活習慣について考察し、母体・胎児への化学物質曝露量を低減するための手法について検討する。これらの結果は将来の環境政策において問題となる特定の物質群を絞り込んで対応することが可能になるほか、出産可能年齢の世代への曝露削減対策が可能になると考える。申請者らは先行研究で、父母POPs曝露濃度と食事調査票・アンケートとの関係を解析してきたが、本申請では臍帯血を測定対象に含めることで、子供のPOPs曝露量を算出し、父母の生活習慣との関係を解析し、曝露経路の推定を試みる。

３．研究開発の方法

（1）血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

1) 手作業によるPOPs迅速一斉分析法の確立

はじめに手分析による、PCBs, OCPs, PBDEsなど、主要POPsを一斉に分析するための手法を確立する。ここでは汎用分析機器であるガスクロマトグラフ- 陰イオン化学イオン化法質量分析計（GC-NICI-MS: GC: Agilent 7890B, MS: JMS-Q1050GC）を用い、ハロゲン特異的な高感度分析を実現する。分析には0.5mlの血清試料を用い、水酸化カリウム/メタノールによる鹸化、水洗の後、内部標準試料を加えて3mlのヘキサンで2回抽出した。抽出液は44%硫酸シリカゲルカラムによる精製の後、内部標準物質を添加、濃縮し、GC-NICI-MSにより測定した。分離カラムにはDB-5MSUI (30m×0.25mm I.D. Df=0.25μm)を使用した。カラムオーブンの昇温条件は130℃（1分）→40℃/分→160℃→4℃/分→265℃→40℃/分→320℃（2.62分）(合計45分)とし、試料は2μl注入した。

検出下限値の設定には20fg μl^{-1}に調整したウシ胎児血清試料を、測定値の精度管理にはアメリカ標準技術研究所 (NIST) が発行する、標準血清試料 (Standard Reference Material: SRM) 1957を利用した。いずれも7回の繰り返し測定から測定値の分散を算出し、検出下限値の設定及び測定値の認証範囲と比較した。

2) インテリジェントオートサンプラーを用いた自動分析法の確立

手分析による一斉分析法の確立後、自動前処理によるPOPs一斉分析法の検討を試みた。試料の自動分析にはGC-NICI-MS (GC: Agilent 7890B, MS: JMS-Q1500GC）にインテリジェントオートサンプラー(PAL RTC)を追加し、液液抽出・固相抽出カラムを利用したInstrument Top Sample Preparation (ITSP) 法により、試料の前処理、測定の自動化について検討した (図1-1)。試料0.3mlをガラスバイアルに分取・秤量し、内部標準物質添加の後、ギ酸添加によりタンパク質を分解し、ヘキサン/メタノールを用いて対象化合物を抽出した。抽出に伴う振盪・遠心分離などの工程はすべてオートサンプラーに設置した振盪・遠心分離モジュールで実行した。抽出液はオートサンプラー上で小型固相抽出カートリッジ (Mini-SPE)を用いて精製し、溶出液に内部標準物質を添加、ヘッドスペースモジュールにより窒素を吹き付けて濃縮し、分析試料とした。分離カラムにはDB-5MSUI (20m×0.18mm I.D. Df=0.18μm) を使用した。カラムオーブンの昇温条件は130℃（1分）→30℃/分→180℃→3℃/分→220℃ （1分）→4℃/分→240℃→8℃/分→280℃→40℃/分→320℃（3分）(合計30分)とし、試料は1μl注入した。

手分析と同様に、検出下限値の設定には20fg μl^{-1}に調整したウシ胎児血清試料を、測定値の精度管理にはアメリカ標準技術研究所 (NIST) が発行する、標準血清試料 SRM 1957を利用した。いずれも7回の繰り返し測定から測定値の分散を算出し、検出下限値の設定及び測定値の認証範囲と比較した。

図1-1.　自動分析システム

3) 試料の測定・アンケート、食事調査票との関係解析による曝露起源解析

曝露調査としては、千葉大学予防医学センターが主催する出生コホート調査である「胎児期に始まる子どもの健康と発達に関する調査」(C-MACH) において採取した母体血清・臍帯血中のPOPs濃度を測定し、アンケートおよび、簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）との関係を解析することで、母子のPOPs曝露経路特定を試みた。調査は千葉市の2病院で出生した児とその母親を対象とした。母子194組から血清・臍帯血清の採取およびアンケート調査、BDHQに回答いただき、それぞれの血清中PCBs濃度と質問表データとの関係を解析した。試料は2014年2月から2015年7月にかけて採取し、母体血清は妊娠32週目前後に採取したもの、臍帯血清は出生時に採取したものを分析に供した。アンケート調査では年齢、BMI、出産経験、喫煙習慣、学歴、喫煙習慣をBDHQデータからは、食品の摂取頻度および栄養素の摂取量を算出し、解析に用いた。化学物質の測定には、本研究で開発した手分析による手法を用いて測定を行った。データの解析にはフリーのデータ解析言語であるRを利用した。データの解析にはこれまで重回帰分析による分析が主であったが、主成分分析によるデータの要約および、多重共線性の影響を受けにくい主成分回帰分析、正則化付き線形回帰分析を用いた。これらの分析・解析より食習慣および栄養摂取量と母体血清中・臍帯血清中のPCBs濃度の関係を解析し、PCBs濃度を反映する因子や、PCBs濃度と負の関係を持つ食品・栄養素の特定を試みた。また、食品の調理によるPCBs濃度の変動についても合わせて解析を試みた。本調査は千葉大学の生命倫理審査委員会の審査を受けて実施した(ID: 759)。

4. 結果及び考察

（1）血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

1) 手作業によるPOPs迅速一斉分析法の確立

はじめに手分析によるまずPCBs 12異性体, OCPs 28種, PBDEs 7異性体について、20-500 fg μl^{-1}の5点検量線を作成、各点について内部標準物質との面積比（Native/surrogate比）を算出し、その直線性について検討した。

PCBs 12異性体, OCPs 28種, PBDEs 7異性体における検量線の直線性は$R^2 > 0.995$であり、十分な直線性を示した。続いて、20fg μl^{-1}に調整したウシ胎児血清試料の繰り返し測定により、各物質の機器検出下限値を算出した。PCBs各異性体, OCPs各物質, PBDEs各異性体における機器検出下限値は、それぞれ0.7-5.5, 1.1-9.3, 4.7-12 fgであり、良好な感度を示した。この値はこれまで使用されてきた高分解能GC-MSに匹敵する値であった。さらに、PCBsの異性体について、高分解能GC-MSとの測定値を比較した。高分解能GC-MS, GC-NICI/MSの測定値を比較したところ、既存手法である高分解能GC-MSよりも値が低くなる傾向が認められたが、いずれの異性体においても2つの測定値はほぼ直線上にのっていることから、曝露傾向のスクリーニングにおいては十分に利用可能であることが示唆された (図1-2)。

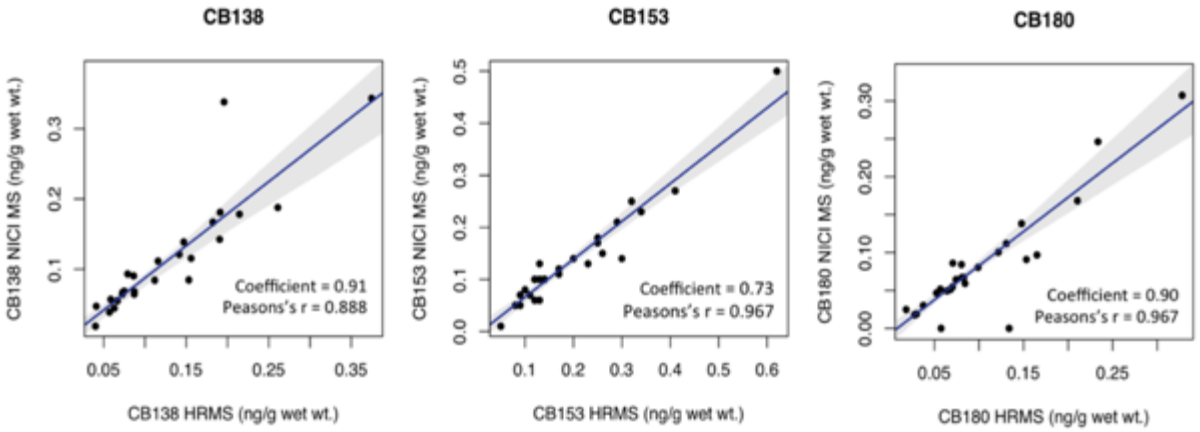

図1-2.　GC-NICI/MSおよびGC-HRMSにおける主要PCBs異性体の測定値比較

ウシ胎児血清およびNIST標準血清試料SRM 1957測定により、メソッド検出下限値の算出および認証値と測定値の比較を行った。前処理後における各サロゲートの添加回収率は97.2-112 % (変動係数: 5.3%–8.5%) であり、良好な結果を得た。また、本手法による分析値は一部の異性体を除きNIST標準認証物質における認証値とほぼ一致した良好な測定値を得た。また、本手法におけるメソッド検出下限値は、既存研究における高分解能GC-MSを用いた分析法と比べ、同等、あるいは若干高い範囲に収まっていた。

これらの結果より、本分析手法は血清中に残留するPCBs, OCPs, PBDEsをはじめとするPOPsの迅速スクリーニング分析に有用であると考える。また、高分解能GC-MSなど既存分析法においては、一回の測定において測定可能な質量範囲が限られているため、PCBs, OCPs, PBDEsを一回のインジェクションで網羅的に測定することができなかったが、本分析手法ではこれらを一回のインジェクションで測定可能であるため、スループットを大幅に高めることができた。しかしながら、本手法は前処理などにおいて煩雑な操作が必要であり、1日あたりの分析可能検体数は20-30検体程度にとどまった。このため、研究では本手法をより発展させ、前処理の自動化及び分析時間の短縮についてさらなる検討を試みた。

2) インテリジェントオートサンプラーを用いた自動分析法の確立

続いて自動分析のため、インテリジェントオートサンプラーを用いた自動前処理条件の検討及び、前処理に利用する小型固相抽出カートリッジ (Mini-SPE) によるPOPs前処理条件の検討を行った。PCBs 12 異性体, *p, p'*-DDE, BDE47における検量線の直線性は$R^2 > 0.997$であり、十分な直線性を示した。また、ウシ胎児血清に 20fg の各化合物を添加し、メソッド検出下限値 (MDL) を算出したところ、PCBs 12 異性体, *p, p'*-DDE, BDE47のMDLは それぞれ0.9-16, 15, 16 pg g^{-1} wet wt.であり、概ね良好な結果を示した。前処理後における内部標準物質の添加回収率は75-93 % (CV: 3.1%– 3.6%) であり、良好な結果を得た。また、NIST 標準認証物質における認証値と本手法における測定値を比較したところ、PCBの主要異性体であるCB153, 138については良好な測定値を得た。また、一部の異性体ついては認証値と外れる傾向があったが、*p, p'*-DDE, BDE47についても認証値の範囲内であった。本分析法は一検体あたりの所要時間は30分程度であり、一日あたりの分析可能検体数は、一台の機器あたり40-50検体程度となる。これにより本手法は当初の目標である、汎用機器の利用、前処理の自動化、目標検体数の3点を達成できた。また、本手法は既存手法に比べ人的なコストだけでなく有機溶媒の使用量・ろ材のコスト面でも優れており、より安価・簡便なシステムを確立できたと言える (図1-3)。

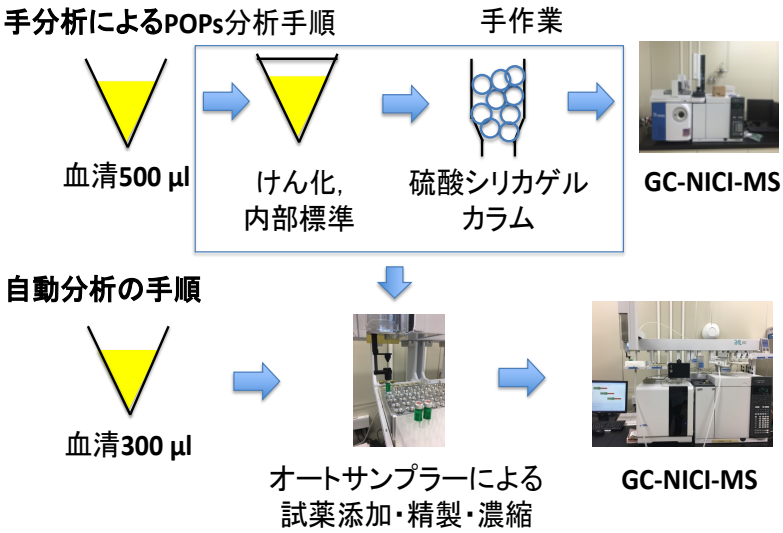

図1-3. 自動分析システムと手分析の比較

3) 試料の測定・食事調査票との関係解析による曝露起源解析・出生アウトカム・低分子代謝物との関係解析

最後に母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度解析および食習慣との関係解析解析の結果を示す。本研究対象者における母体血清・臍帯血清中総PCBs濃度の中央値はそれぞれ370, 100 pg g^{-1} wet wtであり、主要なPCBsの組成はいずれもPCB153 > 138 > 180 > その他異性体の順であった 。本研究で対象とした母子血清中のPCBs濃度は過去の欧米・日本の母子を対象とした調査と比較し、同程度もしくはやや低い傾向が見られた (母体血清: アメリカ: 41 ng g^{-1} lipid wt, 日本: 69 ng g^{-1} lipid wt, ベルギー: 1900 pg g^{-1} wet wt) (臍帯血: 日本: 130 pg g^{-1} wet wt ベルギー: 470 pg g^{-1} wet wt)。また、母体血清・臍帯血清中*p, p'*-DDE濃度の中央値はそれぞれ390, 110 pg g^{-1} wet wtであり、総PCB濃度とほぼ同程度であった。一方、臭素系難燃剤であるBDE47はほとんどの検体で検出下限値を下回った。PCBs各異性体間には強い正の相関関係が認められた (図1-4)。このため、曝露源推定には化学物質を代表し、総PCB濃度を指標として解析を試みた。また、母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度には、妊娠後期と出生時に7週間程度の時間差があるにもかかわらず有意な正の相関関係が認められ、母体血清中のPOPs濃度が児臍帯血清中POPs濃度に強く関係することが示唆された。

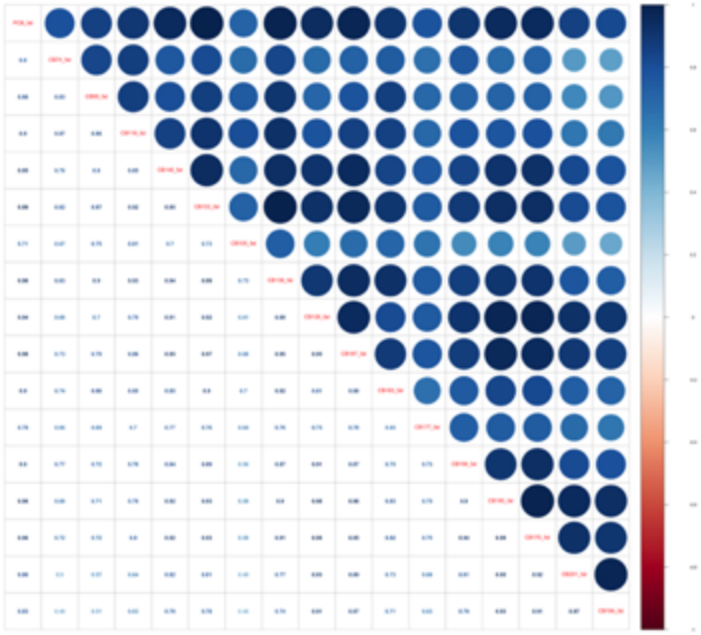

図1-4. 臍帯血清中におけるPCBs異性体濃度の相関関係

2病院のうち1病院をサブコホートとして食事調査について主成分分析・階層クラスタリングによる解析を試みたところ (n = 93)、母親の食事パターンは魚・野菜摂取型、日本食型、菓子・麺類型の3種に分類できた (図1-5)。それぞれの群におけるTotal PCB濃度の平均値は660, 370, 400 pg g^{-1} wet wtであり、魚介類からのPCBs曝露が予想される魚・野菜摂取型の群で最も高値を示した。

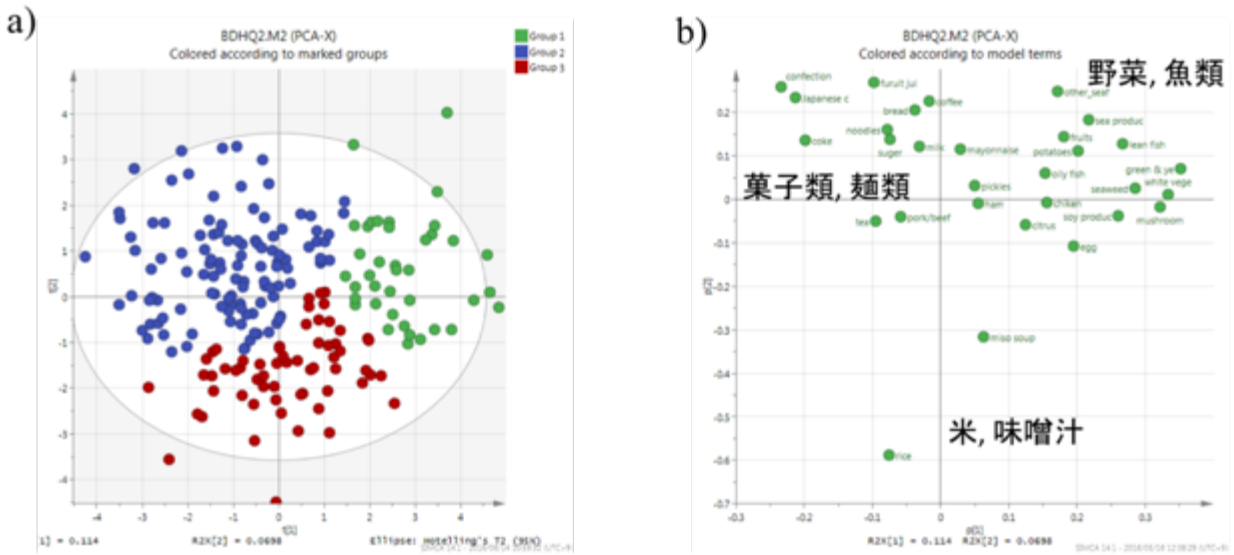

図1-5. 主成分分析・階層クラスタリングによる食事パターンの分類 (a: スコアプロット, b: ローディングプロット) (緑: 魚・野菜摂取型, 青: 菓子・麺類型, 赤: 日本食型)

続いて、各主成分と血清中・臍帯血清中PCBs濃度との関係を主成分回帰分析により解析を試みた。解析の結果、母体血清・臍帯血清いずれにおいても、主成分1-3がPCBs濃度と正の相関関係を示した。各主成分について精査したところ、主成分1では魚介類、野菜、2では魚介類、3では肉、乳製品の消費量がPCBと正の関係を示した。また、負の関係を示した因子に着目すると、主成分1では菓子・麺類、2, 3では野菜・果物類の消費量が負の関係を示した。主成分1の結果は階層クラスタリングの結果同様であり、食習慣を反映した結果である。また、主成分2においても魚介類はPCBsと正の関係を示すことから、曝露の要因としてより確からしいと考えられる。主成分3で正の要因として抽出された肉・卵類も、曝露源となることがマーケットバスケット調査による先行研究で報告されており、食事調査アンケート票を用いて同様の結果が示された。一方、主成分2, 3においては野菜・果物類がPCBs濃度に負の影響を与えうる因子として抽出された。これらの食品群は食物繊維を含んでいることから、PCBsを始めとするPOPsが濃縮されている脂分の吸収を抑え、曝露レベルを低減する可能性がある。また、PCBs濃度と摂取栄養素間においても正則化付き線形回帰分析を用いて解析を試みたところ、食物繊維の摂取量と母体血清・臍帯血清いずれにおいても負の関係が認められたことからも、繊維類の摂取によるPCBs曝露量低減の可能性が示唆された。

また、調理による曝露量低減の可能性について解析を試みた。魚介類では生食の場合、PCBs濃度との回帰係数は0.004であったが、焼き・蒸しの調理により回帰係数が-0.0003, 0.0003と一桁低減した。この結果より、刺し身など生で食すだけではなく、調理によって油分を落とすことで、POPsの曝露量を低減できる可能性が示唆された。
最後にPCBs曝露量と関連する出生アウトカムの探索および、生体内低分子代謝物とPCBs曝露量の関係について解析した。この結果、児の出生体重及び頭囲とPCBs曝露量の間には負の傾向が認められた。また、PCBs曝露量下位25%の群と上位25%の群の臍帯血清中メタボローム組成を比較したところ、アミノ酸・脂質の生合成・代謝に関連するパスウェイの変動が示唆された。この結果より、PCBs曝露が出生体重の低下を招く可能性が示唆された。

５．本研究により得られた主な成果

（１）科学的意義

本研究により、GC-NICI/MSを用いたPCBs, OCPs, PBDEsのスクリーニング分析が可能であることが示唆された。また、本手法はスクリーニング分析にも関わらず、NIST発行の標準認証物質測定においても多くの異性体、化合物において良好な結果が得られたことから、測定の精度についても担保ができたと考える。既存手法ではこれらの化学物質は複数回に分けて測定を行っていたため、一度の測定でこれらを網羅的に測定可能な本手法により、貴重な試料量の節約や、測定時間の短縮によるスループット向上が見込まれる。

PCBs, OCPs, PBDEsについて自動分析法を検討し、当初の目標であった1日40検体の自動分析が可能な自動分析手法を確立できた。既存研究において食物をについて新たな知見を提供することは今後測定対象物質をより広げる上で重要な結果である。また、分析の精度について確認したところ、ほとんどすべての物質で標準認証試料の示す認証範囲内に測定値が収まっており、良好な結果が得られた。更に、本分析法はろ材・有機溶媒のコストが少なく、かつ高感度であることから大規模な出生コホート調査におけるスクリーニング分析に有用であると考える。

最後に母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度解析および食習慣との関係解析解析の結果を示す。本研究により得られた母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度は欧米・日本における母体血清・臍帯血清中PCBs濃度に比べ同等、もしくは低い値を示したが、異性体組成についてはほぼ同様の傾向が得られた。また、母体血清・臍帯血清中PCBs濃度の相関解析より、採取時期のずれがあったとしても臍帯血清中PCB濃

度が母体の影響を強く受けることは重要な結果である。解析の結果から、本研究で検出されたPCBs異性体の曝露源はいずれも共通していることが示唆された。食習慣との解析により、それらが食事、特に、魚の摂取量と強く関係していることが示唆された一方で、繊維類を摂取することでPCBsの取り込みを低減できる可能性が示唆された。また、調理により油を落とすことで、体内に取り込まれるPOPs量を低減できる可能性が示唆された。これらの結果から、主なPOPsの曝露源である食事について、主なルートから低減の可能性までを示すことができた。
また、一部の出生アウトカムとPCBs曝露の間に関係が認められた点について、曝露濃度は低下しているものの未だにPCB曝露が児に影響している可能性が示唆された。更に、曝露に関連する生体内パスウェイについても考察が深まり、毒性学的な知見についても得ることができた点は意義深いと考える。

（2）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

また、POPs曝露量とアンケート・食事調査票との関係解析による、食事由来の曝露及び調理による濃度低減の可能性についてはWHOの会議において報告した。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

既に国内でのPCBの製造等は禁止されているが、我々の体内には環境中に存在するPCBが自然に体内に取り込まれているのも事実である。特に、ヒト胎児には、ダイオキシン類やPCB、OCPs, PBDEsといった人体内に残留性有機汚染物質（POPs；persistent organic pollutants）が残留する報告がある。これらのヒトの生体試料に含まれるPCBに関する報告は多々みられるが、千名を超す集団を対象とする調査では、精密法による測定費用が高額なため、世界各国での取り組みの足並みがそろわないのも事実である。

このため、本研究で得られたハイスループットかつ安価なスクリーニング分析法を用いることで、測定コストを下げるとともにスクリーニング調査として測定可能な検体数を増やすことが出来る可能性がある。また、本研究の遂行により得られた測定結果から、母親の食生活や生活習慣、年齢、出産回数などと母児体内のPOPs濃度の関係を導きだすことができれば、将来の環境政策において問題となる特定の物質群を絞り込んで対応することが可能となるほか、出産可能年齢の世代への曝露削減対策が可能になると考える。

６．研究成果の主な発表状況

（1）主な誌上発表

＜査読付き論文＞

1) Eguchi, A., Enomoto, T., Suzuki, N., Okuno, M., & Mori, C. (2017). Development of simple analytical methods of polychlorinated biphenyls in human serum by gas chromatography negative ion chemical ionization quadrupole mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, *29*(4), 503-506.

2) Jin, W., Otake, M., Eguchi, A., Sakurai, K., Nakaoka, H., Watanabe, M., Todaka, E & Mori, C. (2017). Dietary Habits and Cooking Methods Could Reduce Avoidable Exposure to PCBs in Maternal and Cord Sera. *Scientific reports*, *7*(1), 17357.

3) Eguchi, A., Sakurai, K., Watanabe, M., & Mori, C. (2017). Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: a pilot birth cohort study in Chiba, Japan. *Environment international*, *102*, 157-164.

4) Eguchi, A., Yanase, K., Yamamoto, M., Sakurai, K., Watanabe, M., Todaka, E., & Mori, C. (2019). The relationship of maternal PCB, toxic, and essential trace element exposure levels with birth weight and head circumference in Chiba, Japan. Environmental Science and Pollution Research, *in press*

（2）主な口頭発表（学会等）

1) Akifumi Eguchi, Kenichi Sakurai, Midori Yamamoto, Masahiro Watanabe, Emiko Todaka, Chisato Mori. "Relationship between residue levels of PCBs, p, p'-DDE, PBDEs and trace elements in maternal and umbilical cord serum from Chiba, Japan", Conference of the International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter 2018, (2018), Taipei, Taiwan

2) Chisato Mori, Akifumi Eguchi, Shino Nishizawa-Jotaki, Hiromi Tanabe, Masahiro Watanabe, Emiko Todaka, Kenichi Sakurai. "Epigenetic indicators of effect of fetal PCB exposure on DNA methylation status in human umbilical cord", Conference of the International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter 2018, (2018) Taipei, Taiwan

3) 江口 哲史, 榎本 剛司, 三上 紗弥香, 森 千里, "Mini SPEカートリッジを用いた血清中PCBs分析法の検討" 第27回環境化学討論会, (2018), 那覇市

4) 江口哲史, 榎本剛司, 森千里. "ガスクロマトグラフ-陰イオン化学イオン化法質量分析法による血清中残留性有機汚染物質 (POPs) の分析法検討", 日本質量分析学会第65回質量分析総合討論会, (2017) つくば市

5) 江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邉 応宏, 森千里 "メタボローム解析による母体血清および臍帯血清中PCBs曝露マーカーの探索", 環境ホルモン学会第19回研究発表会, (2016) つくば市

6) 江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邉 応宏, 森千里 "メタボローム解析による血清中PCBs曝露マーカーの探索", 第22回日本環境毒性学会研究発表会, (2016) 松山市

7. 研究者略歴

※記載する研究者の範囲は、課題代表者のほか、サブテーマ代表者等の主要なメンバー数名のみとし、経歴について簡潔に記載すること。

研究代表者: 森 千里、旭川医科大学卒業。医学博士、現在 千葉大学予防医学センター センター長

II. 成果の詳細

Ⅱ－１　血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

課題代表者名 森　千里 （国立大学法人 千葉大学予防医学センター　センター長）

研究実施期間　平成28～30年度
累計予算額　　114,764千円
（うち平成28年度：38,903千円、平成29年度：38,903千円、平成30年度：36,958千円）
累計予算額は、間接経費を含む。

研究体制

氏名	専門/学位	所属機関名／部署／役職
森　千里	環境医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/センター長
戸高　恵美子	予防医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/教授
櫻井　健一	内分泌代謝学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
花里　真道	予防医学・博士（工学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
中岡　宏子	予防医学・博士（医学）	千葉大学/予防医学センター/准教授
鈴木　規道	予防医学・博士（工学）	千葉大学/予防医学センター/特任准教授
大竹　正枝	栄養学・博士（農学）	千葉大学/予防医学センター/特任助教
江口　哲史	環境分析化学・博士（理学）	千葉大学/予防医学センター/助教

［キーワード］
迅速簡易分析法、残留性有機汚染物質 (POPs)、ポリ塩化ビフェニル (PCBs)、有機塩素系農薬 (OCPs)、臭素系難燃剤 (BFRs)、自動分析、ガスクロマトグラフ-質量分析計、出生コホート、曝露起源推定、食事調査、曝露影響解析

要旨

本研究では大規模出生コホートに適用可能な少量・多検体の血清試料中における残留性有機汚染物質(POPs) の分析法を確立することが目的である。申請者らはインテリジェントオートサンプラーによる自動前処理手法と、広く利用されている分析機器である四重極型質量分析計を組み合わせ、一日あたり40-50検体の自動分析が可能となる分析法を確立した。

また、独自で行っているコホート調査に化学分析を適用し、化学物質の曝露起源についての解析を試みた。研究の結果、食事に由来する化学物質の曝露ルートが推察されたほか、食事の組み合わせや調理法により、曝露を低減できる可能性が示唆された。

1. はじめに（研究背景等）

近年、胎児期における化学物質の曝露による身体・精神発達への影響が社会的な問題となっており、我が国でも大規模出生コホート調査（環境省事業「子供の環境と健康に関する全国調査（エコチル調査)」）による、小児への化学物質曝露影響およびその曝露経路の解明が急務とされている。既存手法において、コホート調査で対象とされている血中のポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyls : PCBs)、有機塩素系農薬 (organochlorine pesticides: OCPs) や臭素系難燃剤 (brominated flame retardants: BFRs) などの残留性有機汚染物質 (persistent organic pollutants: POPs)の分析には5ml以上の血液が必要であったが、子供を対象とした疫学調査では、測定に十分な量の血液サンプルを採取することは侵襲性の問題から困難である。また、必要試料量だけでなく、測定前処理、機器分析に必要な時間、資材などのコストの問題から、充分な検体数を確保することは困難である。このため、迅速・低コスト・簡便な分析法を開発し、コホートより得た少量の検体からさまざまな化学物質の測定を、低コスト・迅速に行う手法の開発が必要である。

POPsの曝露によるリスクについてはこれまでも様々な研究が報告されており、中でも胎児への影響として、Govartsらは、ヨーロッパの出生コホート調査結果から、胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少関連性について報告している[1]。さらに、化学物質曝露に伴う小児アレルギー発症・神経発達へのリスクなども先行研究があり、これら、化学物質曝露が原因と推察される小児アレルギーや精神神経発達異常の増加について対策を行うためにも、汚染物質の曝露起源解明は重要な課題である[2]。また、疫学調査において母子の血清・臍帯血清中POPs濃度を分析し、質問票との関係を解析することで各化合物の曝露経路について調査し、介入を行うことで化学物質の曝露量を低減できる可能性を示すことは出産可能年齢の世代への曝露削減対策を講じる上で重要な課題である。さらに、血清試料の採取と比較し、比較的サンプリングが容易な母親の食生活や生活習慣、年齢、出産回数などの質問票をもちいて母児体内におけるPOPs濃度を推測し、化学物質の曝露量やその起源を検討することで、調査票を用いた曝露推定を、省コストで実施できる可能性がある。

2. 研究開発目的

本研究の目的は従来の血清中PCBs分析手法の高度化することで、大規模な出生コホート調査に適用可能な、少量のサンプルから迅速・安価にPCBsを含んだ残留性有機汚染物質 (POPs) の分析法を確立することである。本研究で検討する手法は、侵襲性の問題から十分な量の血清試料を採取できない場合にも対応できるよう、0.5ml以下の試料からPOPsを一斉分析することを目的とした。また、抽出・遠心・精製・濃縮など、煩雑な作業が必要な前処理工程を自動化すること、低コスト・迅速・簡便化のため、検出器であるガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) については、汎用的な四重極型の機器を利用して分析法を確立すること、一台の機器で、一日あたり40-50検体程度の検体を処理できることの3点を目的とした。

また、出生コホートから得られた試料を分析し、POPsの曝露源を特定することについても本研究の目的とした。測定データとアンケート、簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）の関係を解析し、曝露に

関係する因子の特定を試みる[3]。血清・臍帯血清中POPs量とアンケートの関係解析により、POPsの曝露経路・曝露の低減につながる生活習慣について考察し、母体・胎児への化学物質曝露量を低減するための手法について検討する。これらの結果は将来の環境政策において問題となる特定の物質群を絞り込んで対応することが可能になるほか、出産可能年齢の世代への曝露削減対策が可能になると考える。申請者らは先行研究で、父母POPs曝露濃度と食事調査票・アンケートとの関係を解析してきたが、本申請では臍帯血を測定対象に含めることで、子供のPOPs曝露量を算出し、父母の生活習慣との関係を解析し、曝露経路の推定を試みる。

３．研究開発の方法

（1）血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

1) 手作業によるPOPs迅速一斉分析法の確立

ａ 試料

ヒト血清：冷凍状態で受領し、測定までの間、冷凍（-80℃）にて保存した。

米国立標準技術 血清標準認証物質 (SRM1957): 乾燥状態で購入し測定まで保管した。使用時に超純水10.7mlを添加し、安定後測定試料として使用した。また「胎児期に始まる子どもの健康と発達に関する調査」(C-MACH)に参加する妊婦のうち、本学の調査に同意を得た26名の妊娠32週目における母体血清中PCB濃度についてGC-NICI-MS法を用い測定した。参加者の特性は ”(1)-3 母体血清・臍帯血清中PCB濃度定量と食事由来の曝露起源推定” と共通のため省略する。

ｂ 標準物質および試薬

表2-1. 総PCBs濃度分析のために使用した標準物質と試薬

試 薬 名	規格	ﾒｰｶｰ名
PCB28		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB60		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB66		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB74		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB87		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB99		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB105		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB118		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB126		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB138		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB146		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB153		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB156		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB170		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES

PCB177		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB178		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB180		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB183		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB187		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB194		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB199		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB201		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB206		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB209		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PBDE mix (EO-5278 METHOD 1614 NATIVE PAR)		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
OCP mix (ES-5467　EXPANDED POPS PESTICIDES PAR SOLUTION)		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB30		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB55		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB207		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PBB154		Wellington Laboratories
n-ヘキサン	ﾀﾞｲｵｷｼﾝ類分析用	和光純薬
水酸化カリウム	特級	関東化学
エタノール	5000倍濃縮検定品: 残留農薬試験用・PCB試験用	関東化学
無水硫酸ナトリウム	残留農薬試験用・PCB試験用	関東化学
硫酸シリカゲルカラム		日本電子
DB-5MSUI 30m×0.25mm I.D. Df=0.25μm		Agilent

c　分析機器

① ガスクロマトグラフ：Agilent 7890B、Agilent
② 質量分析計 (MS)：JMS-Q1050GC、日本電子
③ オートインジェクター：Agilent 7693A、Agilent

d　分析条件

手技分析

① カラム：DB-5MSUI 30m×0.25mm I.D. Df=0.25μm Agilent
② カラム温度：130℃（1分）→40℃/分→160℃→4℃/分→265℃→40℃/分→320℃（2.62分）
③ 注入量：2μL
④ 注入口温度：280℃
⑤ 検出器温度：280℃
⑥ キャリアガス：高純度ヘリウムガス
⑦ 試薬ガス: メタン

e 濃度算出方法

i 相対感度の算出

RRFcsは、(1)式によって濃度ごとに求めたものを平均する。

$$RRFcs = \frac{Qcs}{Qs} \times \frac{As}{Acs} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

RRFcs：測定対象物質のクリーンアップスパイク内標準物質との相対感度
Qcs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量(pg)
Qs：標準液中の測定対象物質の量(pg)
As：標準液中の測定対象物質のピーク面積
Acs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積

同様に、クリーンアップスパイクの対応するシリンジスパイクに対する相対感度を(2)式によって算出する。

$$RRFrs = \frac{Qrs}{Qcs} \times \frac{Acs}{Ars} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

RRFrs：クリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質との相対感度
Qrs：標準液中のシリンジスパイク内標準物質の量(pg)
Qcs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量(pg)
Acs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積
Ars：標準液中のシリンジスパイク内標準物質のピーク面積

ii 定量値の算出

抽出液全量中の異性体の量は、それに対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量を基準にして内標準法により求める。

Qi：抽出液全量中の異性体の量(pg)
Ai：クロマトグラム上の異性体のピーク面積
Acsi：対応するクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積
Qcsi：対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量 (pg)
RRFcs：対応するクリーンアップスパイク内標準物質との相対感度

2) インテリジェントオートサンプラーを用いた自動分析法の確立

ヒト血清：冷凍状態で受領し、測定までの間、冷凍（-80℃）にて保存した。

米国立標準技術 血清標準認証物質 (SRM1957): 乾燥状態で購入し測定まで保管した。使用時に超純水10.7mlを添加し、安定後測定試料として使用した。

b 標準物質および試薬

表2-2. 総PCBs濃度分析のために使用した標準物質と試薬

試　薬　名	規格	ﾒｰｶｰ名
PCB28		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB60		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB66		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB74		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB87		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB99		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB105		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB118		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB126		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB138		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB146		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB153		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB156		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB170		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB177		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB178		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB180		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB183		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB187		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB194		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB199		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB201		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB206		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB209		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PBDE mix (EO-5278 METHOD 1614 NATIVE PAR)		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
OCP mix (ES-5467　EXPANDED POPS PESTICIDES PAR SOLUTION)		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB30		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB55		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PCB207		CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES
PBB154		Wellington Laboratories
n-ヘキサン	ﾀﾞｲｵｷｼﾝ類分析用	和光純薬

ギ酸		関東化学
エタノール	5000倍濃縮検定品: 残留農薬試験用・PCB試験用	関東化学
無水硫酸ナトリウム	残留農薬試験用・PCB試験用	関東化学
45mg ITSP QuEChERS Blend for GC		ITSP Solutions
DB-5MSUI 20m×0.18mm I.D. Df=0.18μm		Agilent

c 分析機器

i ガスクロマトグラフ：Agilent 7890B、Agilent

ii 質量分析計 (MS)：JMS-Q1500GC、日本電子

iii オートインジェクター： PAL RTCオートサンプラー、CTC ANALYTICS AG

d 分析条件

i カラム：DB-5MSUI 20m×0.18mm I.D. Df=0.18μm Agilent

ii カラム温度：130℃（1分）→40℃/分→160℃→4℃/分→265℃→40℃/分→320℃（15分）

iii 注入量：2μL

iv 注入口温度：280℃

v 検出器温度：280℃

vi キャリアガス：高純度ヘリウムガス

vii 試薬ガス: メタン

viii 検討時標準物質注入量: 各1 ng

e 濃度算出方法

i 相対感度の算出

RRFcsは、(1)式によって濃度ごとに求めたものを平均する。

$$RRFcs = \frac{Qcs}{Qs} \times \frac{As}{Acs} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

RRFcs：測定対象物質のクリーンアップスパイク内標準物質との相対感度

Qcs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量(pg)

Qs：標準液中の測定対象物質の量(pg)

As：標準液中の測定対象物質のピーク面積

Acs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積

同様に、クリーンアップスパイクの対応するシリンジスパイクに対する相対感度を(2)式によって算出する。

$$RRFrs = \frac{Qrs}{Qcs} \times \frac{Acs}{Ars} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

RRFrs：クリーンアップスパイク内標準物質のシリンジスパイク内標準物質との相対感度
Qrs：標準液中のシリンジスパイク内標準物質の量(pg)
Qcs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質の量(pg)
Acs：標準液中のクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積
Ars：標準液中のシリンジスパイク内標準物質のピーク面積

ⅱ 定量値の算出
抽出液全量中の異性体の量は、それに対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量を基準にして内標準法により求める。

$$Qi = \frac{Ai}{Acsi} \times \frac{Qcsi}{RRFcs}$$

Qi：抽出液全量中の異性体の量(pg)
Ai：クロマトグラム上の異性体のピーク面積
Acsi：対応するクリーンアップスパイク内標準物質のピーク面積
Qcsi：対応するクリーンアップスパイク内標準物質の添加量 (pg)
RRFcs：対応するクリーンアップスパイク内標準物質との相対感度

3) 試料の測定・アンケート、食事調査票との関係解析による曝露起源解析

曝露調査としては、千葉大学予防医学センターが主催する出生コホート調査である千葉出生こども調査において採取した母体血清・臍帯血中のPOPs濃度を測定し、アンケートおよび、簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）との関係を解析することで、母子のPOPs曝露経路特定を試みた。調査は千葉市の2病院で出生した児とその母親を対象とした。母子194組から血清・臍帯血清の採取およびアンケート調査、BDHQに回答いただき、それぞれの血清中PCBs濃度と質問表データとの関係を解析した。試料は2014年2月から2015年7月にかけて採取し、母体血清は妊娠32週目前後に採取したもの、臍帯血清は出生時に採取したものを分析に供した。アンケート調査では年齢、BMI、出産経験、喫煙習慣、学歴、喫煙習慣をBDHQデータからは、食品の摂取頻度および栄養素の摂取量を算出し、解析に用いた。化学物質の測定には、本研究で開発した手分析による手法を用いて測定を行った。データの解析にはフリーのデータ解析言語であるRを利用した。データの解析にはこれまで重回帰分析による分析が主であったが、主成分分析によるデータの要約および、多重共線性の影響を受けにくい主成分回帰分析、正則化付き線形回帰分析を用いた。これらの分析・解析より食習慣および栄養摂取量と母体血清中・臍帯血清中のPCBs濃度の関係を解析し、PCBs濃度を反映する因子や、PCBs濃度と負の関係を持つ食品・栄養素の特定を試みた。また、食品の調理によるPCBs濃度の変動についても合わせて解析を試みた。本調査は千葉大学の生命倫理審査委員会の審査を受けて実施した(ID: 759)。

表2-3. 研究対象者ステータス

	n	割合 (%)
参加者数	194	
母親年齢		
<25	12	6.19
25–29	29	14.59
30–34	86	44.33
≥35	67	34.54
母親BMI		
<18.5	35	18.04
18.5–24.9	146	75.26
≥25	13	6.7
出産経験		
0	78	40.21
>1	116	59.79
喫煙経験		
喫煙	2	1.03
過去に喫煙	34	17.53
喫煙経験無し	157	80.93
欠測	1	0.52
学歴		
中学校	5	2.58
高校	33	17.01
専門学校・短大	78	40.21
大学・大学院	77	39.69
欠測	1	0.52

・対象者

BDHQを用いた食事調査に参加した母親の参加者ステータスは表2-3の通りである。

4. 結果及び考察

（1）血中POPsの迅速一斉分析法を用いたヒトへの曝露起源解析

1) 手作業によるPOPs迅速一斉分析法の確立

はじめに手分析によるまずPCBs 12異性体, OCPs 28種, PBDEs 7異性体について、20-500 fg μl^{-1}の5点検量線を作成、各点について内部標準物質との面積比（Native/surrogate比）を算出し、その直線性について検討した。

PCBs 12異性体, OCPs 28種, PBDEs 7異性体における検量線の直線性は$R^2 > 0.995$であり、十分な直線

性を示した(図2-1: 一部化合物抜粋)。続いて、20fg μl^{-1}に調整したウシ胎児血清試料の繰り返し測定により、各物質の機器検出下限値を算出した。PCBs各異性体, OCPs各物質, PBDEs各異性体における機器検出下限値は、それぞれ 0.7-5.5, 1.1-9.3, 4.7-12 fgであり、良好な感度を示した。この値はこれまで使用されてきた高分解能GC-MSに匹敵する値であった。さらに、PCBsの異性体について、高分解能GC-MSとの測定値を比較した。前処理後における各サロゲートの添加回収率は97.2-112 % (変動係数: 5.3%–8.5%) であり、良好な結果を得た。Passing-bablok回帰分析により高分解能GC-MS, GC-NICI/MSの測定値を比較したところ、CB153において本分析手法は高分解能GC-MSよりも値が低くなる傾向が認められたが、いずれの異性体においても2つの測定値はほぼ直線上にのっていることから、曝露傾向のスクリーニングにおいては十分に利用可能であることが示唆された (図2-2)。

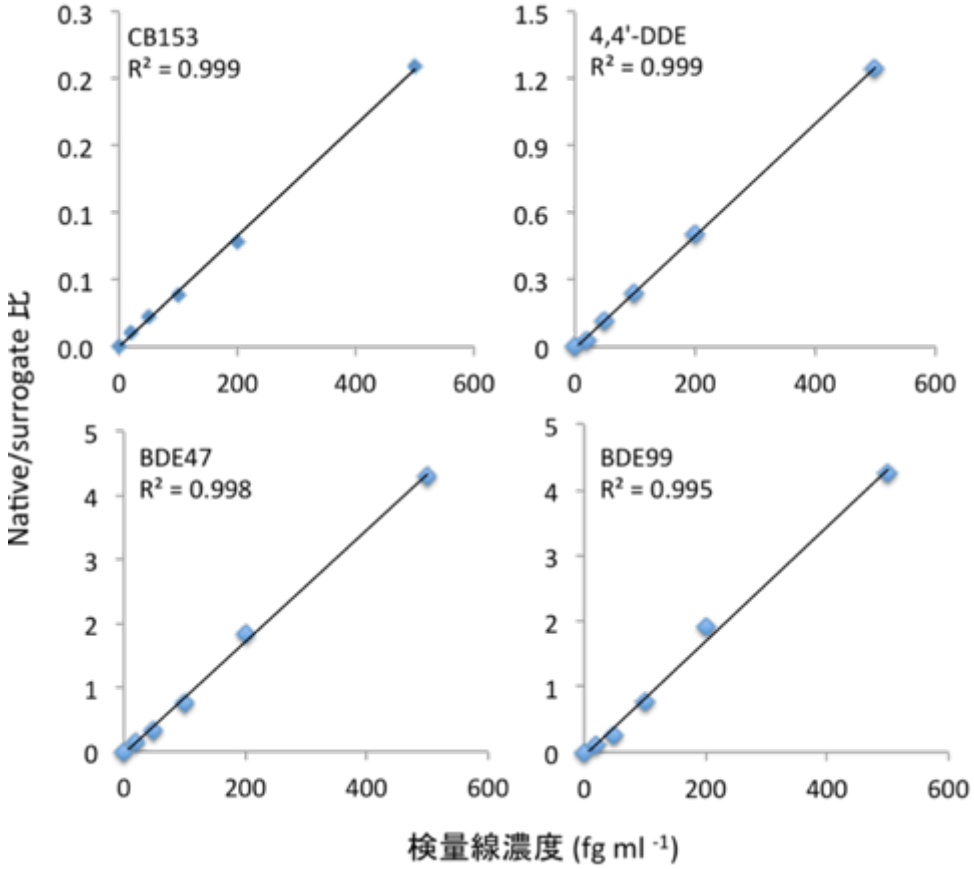

図2-1.　GC-NICI/MS測定における主要POPsの20-500 fg μl^{-1}範囲の5点検量線

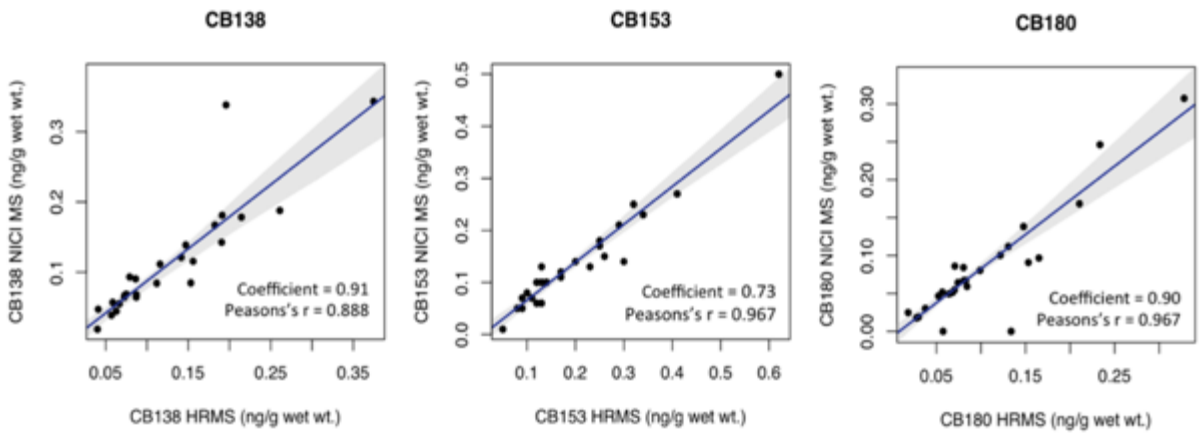

図2-2.　GC-NICI/MSおよびGC-HRMSにおける主要PCBs異性体の測定値比較

表2-4.　GC-NICI/MSにおけるNIST標準認証血清試料の測定値・認証値および各化合物のメソッド検出下限値

	GC-NICI/MS (pg g^{-1} wet wt)	Certified values (pg g^{-1} wet wt)	MDL (pg g^{-1} wet wt)
CB66	< MDL	NA	2.7
CB74	7.2 ± 2.6	13.8 ±0.1	1.9
CB99	< MDL	11.6 ±0.6	20
CB105	< MDL	NA	3.6
CB118	14 ± 2.1	18.9 ±1.2	7.9
CB138	37 ± 1.7	36.9 ±9.0	3.2
CB153	51 ± 2.8	58.2 ±0.9	2.6
CB156	7.6 ± 2.8	8.2 ± 0.6	3.9
CB170	15 ± 1.6	16.2 ±2.0	3.7
CB178	< MDL	NA	4.4
CB180	45 ± 3.4	46	2.7
CB187	10 ± 1.4	15.5 ±0.5	2.2
BDE28	21 ± 1.4	20.0 ± 2.4	2.9
BDE47	270 ± 14	298 ± 7.8	7.2
BDE99	76 ± 3.8	74.5 ± 0.9	4.3
BDE100	50 ± 2.7	46.0 ± 2.5	3.0
BDE153	61 ± 3.2	54.6 ± 2.1	9.3
p, p'-DDE	960 ± 26	921 ± 76	12

最後に、ウシ胎児血清およびNIST標準血清試料SRM 1957測定により、メソッド検出下限値の算出および認証値と測定値の比較を行った (表2-4)。表2-4に示した通り、PCBs, PBDEs, *p, p'*-DDEについてはいずれも良好なメソッド検出下限値を得たほか、一部の異性体を除きNIST標準認証物質における認証値と比較し、良好な測定値を得た。

これらの結果より、本分析手法は血清中に残留するPCBs, OCPs, PBDEsをはじめとするPOPsの迅速スクリーニング分析に有用であると考える。また、高分解能GC-MSなど既存分析法においては、一回の測定において測定可能な質量範囲が限られているため、PCBs, OCPs, PBDEsを一回のインジェクションで網羅的に測定することができなかったが、本分析手法ではこれらを一回のインジェクションで測定可能であるため、スループットを大幅に高めることができた。しかしながら、本手法は前処理などにおいて煩雑な操作が必要であり、1日あたりの分析可能検体数は20-30検体程度にとどまった。このため、研究では本手法をより発展させ、前処理の自動化及び分析時間の短縮についてさらなる検討を試みた。

2) インテリジェントオートサンプラーを用いた自動分析法の確立

続いて自動分析のため、インテリジェントオートサンプラーを用いた自動前処理条件の検討及び、前処理に利用する小型固相抽出カートリッジ (Mini-SPE) によるPOPs前処理条件の検討を行った。本研究では食品中POPsの測定において使用実績のある、ITSP社製45-UMPCX-Tカートリッジを分析に利用した (45mg ITSP QuEChERS Blend for GC)。前処理条件は既報を改良し、図2-3に示した。インテリジェントオートサンプラーを用いた本条件における1検体あたりの前処理時間はGC-MSの昇温条件と同じ30分であり、待ち時間なしで分析をシーケンシャルに進めることができる条件が確立できた。

はじめに測定機器における検量線を作成したところ、PCBs 12 異性体, *p, p'*-DDE, BDE47における検量線の直線性は$R^2 > 0.997$であり、十分な直線性を示した。また、ウシ胎児血清に 20fg の各化合物を添加し、メソッド検出下限値 (MDL) を算出したところ、PCBs 12 異性体, *p, p'*-DDE, BDE47のMDLは それぞれ0.9-16, 15, 16 pg g^{-1} wet wt.であり、ダイオキシンなどの分析に広く用いられている高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計とほぼ同等であり、概ね良好な結果を示した。内部標準物質の添加回収率は75-93 % (CV: 3.1%– 3.6%) であり、良好な結果を得た。

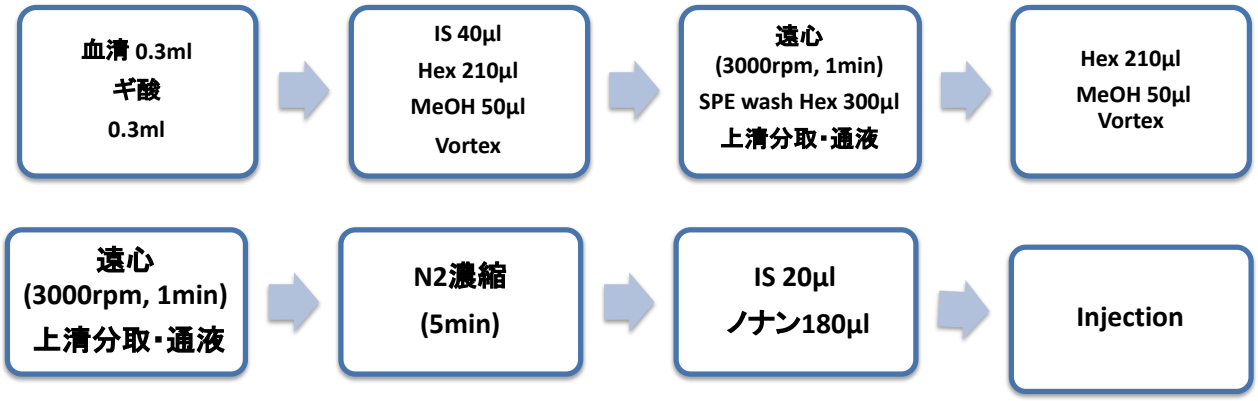

図2-3. インテリジェントオートサンプラーによる前処理のフロー

また、NIST 標準認証物質における認証値と本手法における測定値を比較したところ、PCBの主要異性体であるCB153, 138については良好な測定値を得た。また、一部の異性体ついては認証値と外れる傾向があったが、*p, p'*-DDE, BDE47についても認証値の範囲内であった (図2-4)。

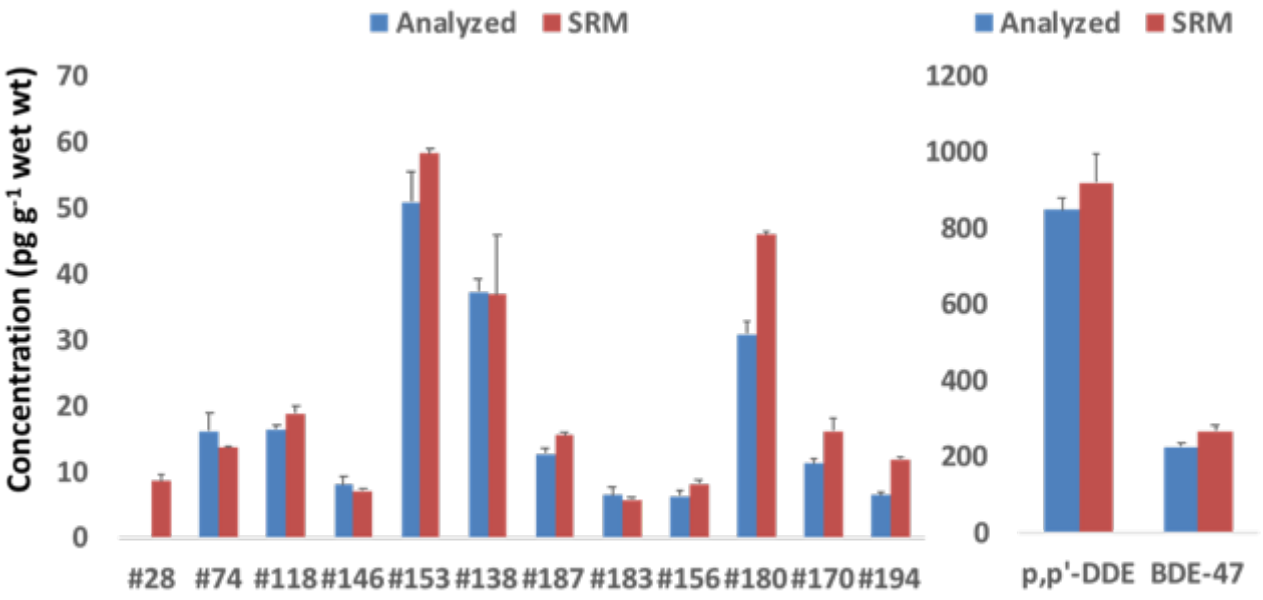

図2-4.　SRM1957測定時における認証値と測定値の比較 (n=7)

本分析法における一検体あたりの所要時間は30分程度であり、一日あたりの分析可能検体数は、一台の機器あたり40-50検体程度となる。これにより本手法は当初の目標である、汎用機器の利用、前処理の自動化、目標検体数の3点を達成できた。また、本手法は既存手法に比べ人的なコストだけでなく有機溶媒の使用量・ろ材のコスト面でも優れており、より安価・簡便なシステムを確立できたと言える (図2-5)。

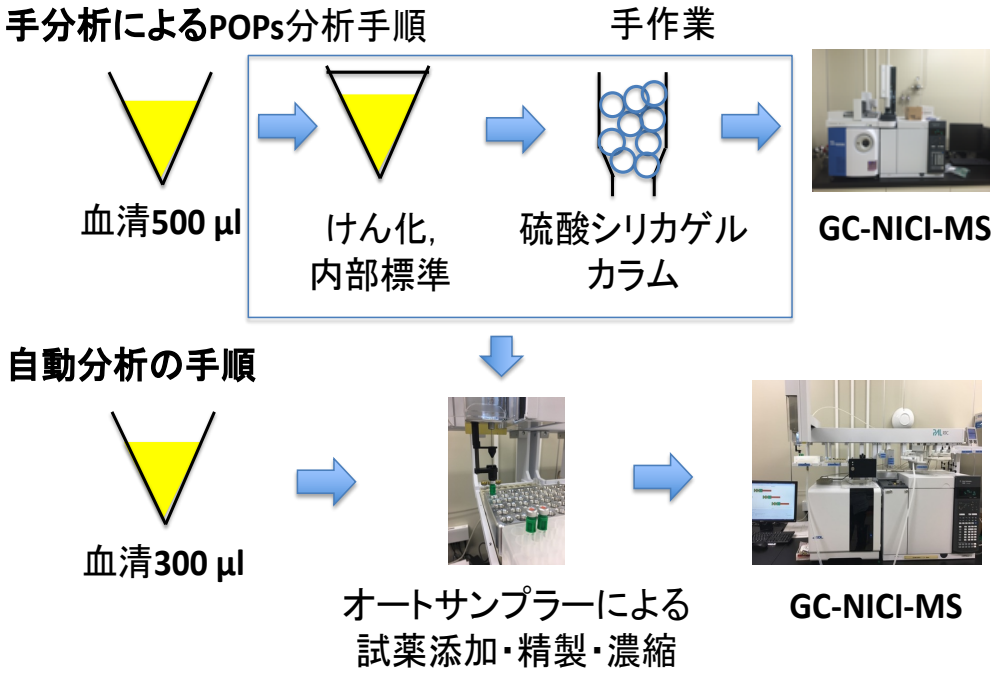

図2-5.　手分析・自動分析比較の概念図

3) 試料の測定・アンケート、食事調査票との関係解析による曝露起源解析

最後に母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度解析および食習慣との関係解析解析の結果を示す。本研究対象者における母体血清・臍帯血清中総PCBs濃度の中央値はそれぞれ370, 100 pg g^{-1} wet wtであり、主要なPCBsの組成はいずれもPCB153 > 138 > 180 > その他異性体の順であった (図2-6)。

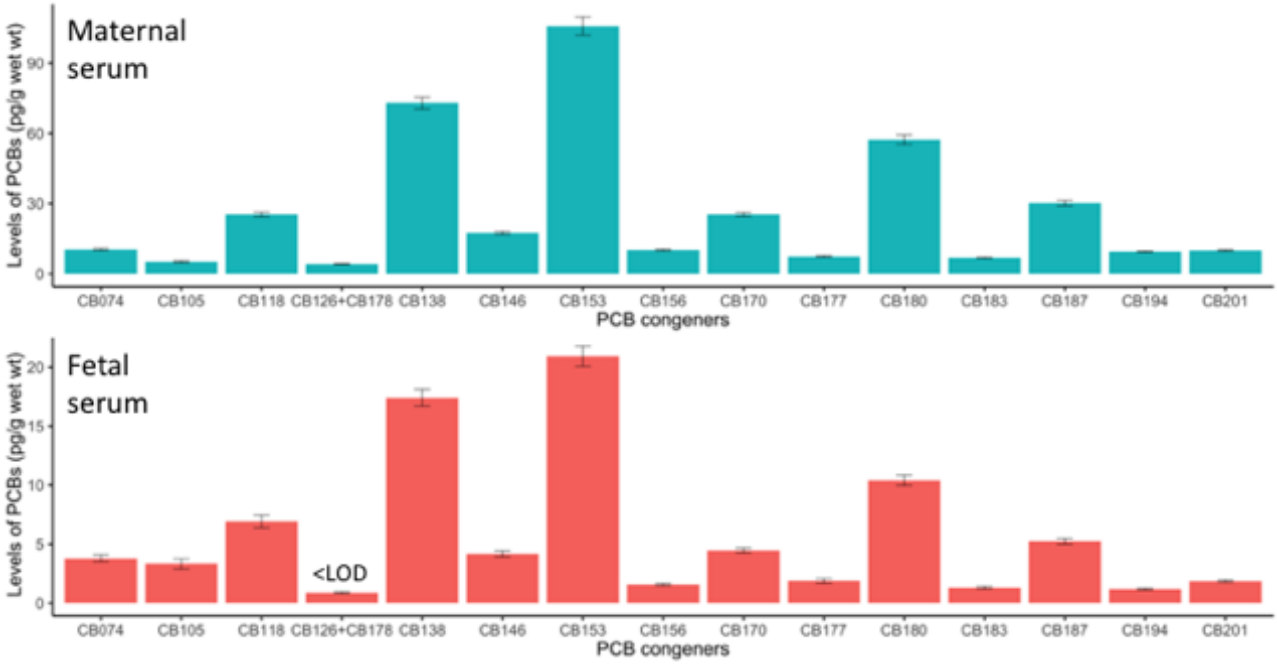

図2-6.　母体血清・臍帯血清中におけるPCBs各異性体濃度の比較

本研究で対象とした母子血清中のPCBs濃度は過去の欧米・日本の母子を対象とした調査と比較し、同程度もしくはやや低い傾向が見られた (母体血清: アメリカ: 41 ng g^{-1} lipid wt, 日本: 69 ng g^{-1} lipid wt, ベルギー: 1900 pg g^{-1} wet wt) (臍帯血: 日本: 130 pg g^{-1} wet wt ベルギー: 470 pg g^{-1} wet wt) [4-7]。また、母体血清・臍帯血清中*p, p'*-DDE濃度の中央値はそれぞれ390, 110 pg g^{-1} wet wtであり、総PCB濃度とほぼ同程度であった。一方、臭素系難燃剤であるBDE47はほとんどの検体で検出下限値を下回った。PCBs各異性体間には強い正の相関関係が認められた (図 2-7: Spearman R = 0.43-0.99)。このため、曝露源推定には化学物質を代表し、総PCB濃度を指標として解析を試みた。また、母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度には、妊娠後期と出生時に7週間程度の時間差があるにもかかわらず有意な正の相関関係が認められ、母体血清中のPOPs濃度が児臍帯血清中POPs濃度に強く関係することが示唆された。

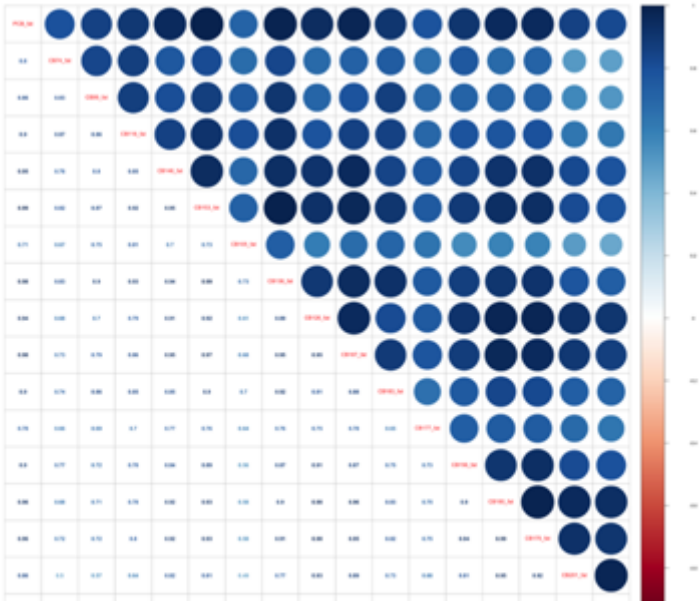

図2-7.　臍帯血清中におけるPCBs各異性体濃度の相関関

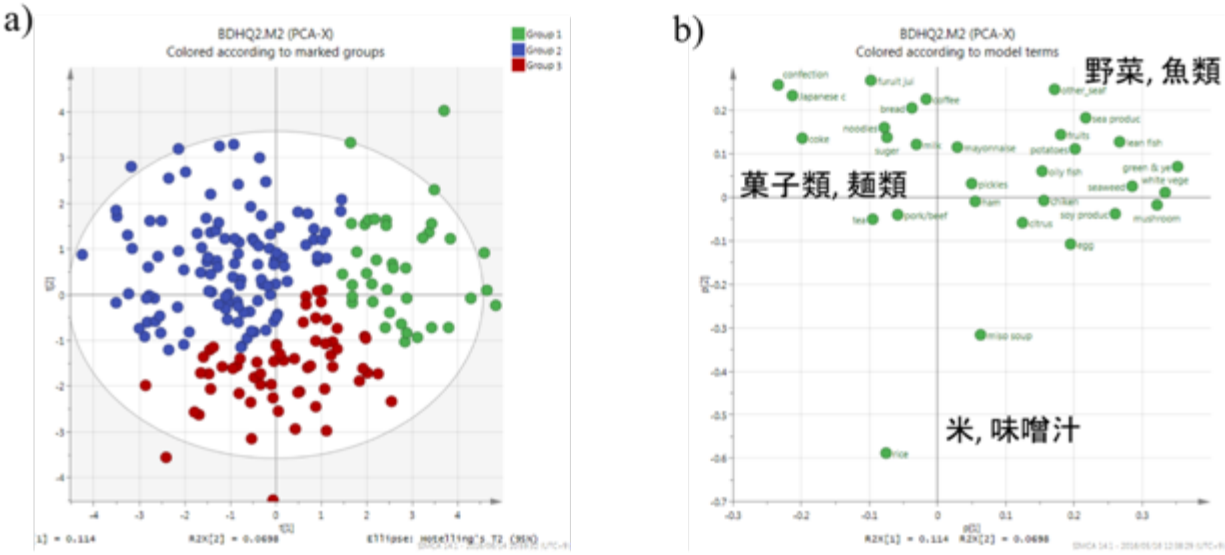

図 2-8. 主成分分析・階層クラスタリングによる食事パターンの分類 (a: スコアプロット, b: ローディングプロット) (緑: 魚・野菜摂取型, 青: 菓子・麺類型, 赤: 日本食型)

2病院のうち1病院をサブコホートとして食事調査について主成分分析・階層クラスタリングによる解析を試みたところ (n = 93)、母親の食事パターンは魚・野菜摂取型、日本食型、菓子・麺類型の3種に分類できた (図2-8)。それぞれの群におけるTotal PCB濃度の平均値は660, 370,400 pg g^{-1} wet wtであり、魚介類からのPCBs曝露が予想される魚・野菜摂取型の群で最も高値を示した。

続いて、各主成分と血清中・臍帯血清中PCBs濃度との関係を主成分回帰分析により解析を試みた。解析の結果、母体血清・臍帯血清いずれにおいても、主成分1-3がPCBs濃度と正の相関関係を示した。各主成分について精査したところ、主成分1では魚介類、野菜、2では魚介類、3では肉、乳製品の消費量がPCBと正の関係を示した。また、負の関係を示した因子に着目すると、主成分1では菓子・麺類、2, 3では野菜・果物類の消費量が負の関係を示した。主成分1の結果は階層クラスタリングの結果同様であり、食習慣を反映した結果である。また、主成分2においても魚介類はPCBsと正の関係を示すことから、曝露の要因としてより確からしいと考えられる。主成分3で正の要因として抽出された肉・卵類も、曝露源となることがマーケット

表2-5 母体・臍帯血清中PCB濃度と栄養素の関係解析

	Maternal Blood	Cord Blood
(Intercept)	-0.1307	-0.0986
Mother's Age	0.0130	0.0014
Mother's BMI	0.0111	0.0033
Parity	-0.1336	-0.0337
Carbohydrate	0.0002	0.0009
Magnesium	> -0.0000	-0.0006
Iron	-	0.0004
Zinc	-	-0.0187
Copper	-	-0.0005
Manganese	-0.0630	-0.0175
Vitamin D	-	0.0035
Alpha Tocopherol	0.0454	0.0488
VitaminB1	0.0842	0.0835
VitamineB2	-	-0.1413
Niacin	-	-0.0022
VitaminB6	-	0.1210
VitaminB12	-	-0.0052
Folic Acid	-	0.0006
Pantothenic Acid	-0.0392	0.0328
Vitamin C	-	-0.0010
Saturated Fatty Acid	-0.0126	-
Monounsaturated Fatty Acid	-	-0.0077
Polyunsaturated Fatty Acid	-	-0.0014
Cholesterol	-	0.0002
Total Dietary Fibre	-0.0132	-0.0176
Salt Equivalent	-	0.0046

表2-6 母体・臍帯血清中PCB濃度と調理法の関係解析

	Maternal Blood	Cord Blood
(Intercept)	-0.1373	0.0867
Mother's Age	0.0155	0.0006
Mother's BMI	0.0093	0.0014
Parity	-0.1445	-0.0297
Fish		
Raw	0.0038	0.0010
Grilling	-0.0003	-
Stew	0.0003	< 0.0000
Deep Frying	0.0015	-
Other than fish		
Grilling (Meat)	-0.0037	-0.0004
Pan Frying (Hamburger Meat)	0.0014	0.0001
Deep Frying	-0.0010	-
Sautéed	0.0007	-
Stew	0.0004	< 0.0000

バスケット調査による先行研究で報告されており[8-9]、食事調査アンケート票を用いて同様の結果が示された。一方、主成分2, 3においては野菜・果物類がPCBs濃度に負の影響を与えうる因子として抽出された。これらの食品群は食物繊維を含んでいることから、PCBsを始めとするPOPsが濃縮されている脂分の吸収を抑え、曝露レベルを低減する可能性がある。また、PCBs濃度と摂取栄養素間においても正則化付き線形回帰分析を用いて解析を試みたところ、食物繊維の摂取量と母体血清・臍帯血清いずれにおいても負の関係が認められたことからも、繊維類の摂取によるPCBs曝露量低減の可能性が示唆された(表2-5)。

続いて調理による曝露量低減の可能性について解析を試みた。魚介類では生食の場合、PCBs濃度との回帰係数は0.004であったが、焼き・蒸しの調理により回帰係数が-0.0003, 0.0003と一桁低減した (表2-6)。この結果より、刺し身など生で食すだけではなく、調理によって油分を落とすことで、POPsの曝露量を低減できる可能性が示唆された。

最後に1つの病院からの参加者をサブコホートとして、PCBs曝露量と関連する出生アウトカムの探索および、生体内低分子代謝物とPCBs曝露量の関係について解析した。臍帯血清中PCBs濃度と、児の出生体重及び頭囲とPCBs曝露量の間には負の傾向が認められた (表2-7)。

表2-7: 頭囲、出生体重と臍帯血清中PCBs濃度との関係解析 (n = 62)

頭囲	Mean	SD	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
(Intercept)	0.13	0.20	−0.27	0.0038	0.13	0.27	0.53
Age (year)	0.075	0.14	−0.21	−0.021	0.077	0.17	0.36
Difference of weight (kg)	0.039	0.13	−0.22	−0.05	0.039	0.13	0.30
BMI (kg/m^2)	0.26	0.12	0.018	0.18	0.26	0.34	0.51
Gestational age (week)	0.12	0.13	−0.13	0.035	0.12	0.20	0.37
PCB lipid basis (ng g^{-1} lipid wt)	−0.28	0.14	−0.56	−0.37	−0.28	−0.18	0.0059
Mn (ng g^{-1})	−0.30	0.14	−0.58	−0.39	−0.30	−0.21	−0.040
Cd (ng g^{-1})	−0.01	0.15	−0.29	−0.10	−0.007	0.089	0.28
Se (ng g^{-1})	0.12	0.15	−0.17	0.025	0.12	0.22	0.41
Hg (ng g^{-1})	0.026	0.14	−0.25	−0.07	0.028	0.12	0.30
Gender	−0.23	0.27	−0.75	−0.40	−0.23	−0.053	0.30

出生体重	Mean	SD	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
(Intercept)	−0.074	0.17	−0.41	−0.19	−0.074	0.036	0.27
Age (year)	0.18	0.13	−0.085	0.10	0.18	0.27	0.43
Difference of weight (kg)	0.0045	0.12	−0.24	−0.078	0.0039	0.088	0.25
BMI (kg/m^2)	0.22	0.11	0.012	0.15	0.22	0.30	0.44
Gestational age (week)	0.50	0.12	0.27	0.43	0.51	0.58	0.74
PCB lipid basis (ng g^{-1} lipid wt)	−0.22	0.13	−0.48	−0.31	−0.22	−0.13	0.034
Mn (ng g^{-1})	−0.030	0.12	−0.27	−0.11	−0.031	0.053	0.21
Cd (ng g^{-1})	−0.039	0.13	−0.30	−0.13	−0.039	0.052	0.22
Se (ng g^{-1})	−0.073	0.13	−0.33	−0.16	−0.075	0.012	0.19
Hg (ng g^{-1})	0.046	0.13	−0.21	−0.043	0.045	0.13	0.30
Gender	0.13	0.24	−0.36	−0.024	0.13	0.29	0.59

また、PCBs曝露量下位25%の群と上位25%の群の臍帯血清中メタボローム組成を比較したところ、母体血清・臍帯血清それぞれにおいて複数のメタボロームの変動が認められた。母体血清において変動していたメタボロームはアミノ酸代謝やグルタチオン代謝に、臍帯血清ではアミノ酸・脂質の生合成・代謝に関連するパスウェイの変動に関連していた (表2-8)。母体血清においては異物代謝に関連しているグルタミン代謝の変動が認められ、化学物質の曝露による異物代謝系の変動が、疫学調査においても示唆されたことは意義深い。また。臍帯血清においては脂質代謝など、エネルギー代謝に関連するパスウェイの変動が示唆されたことから、PCBs曝露がエネルギー代謝系を経由して出生体重の低下を招く可能性が示唆された。

表2-8 PCBs曝露を反映したメタボロームに関連する生体内パスウェイ

Annotation	*p*-value	FDR correction
Maternal serum		
Pyrimidine metabolism	1.03E-03	1.80E-02
Purine metabolism	3.64E-03	3.28E-02
Glutathione metabolism	7.63E-03	5.15E-02
Cysteine and methionine metabolism	1.58E-02	8.53E-02
Cord serum		
Phenylalanine metabolism	5.32E-03	3.40E-02
Glycine, serine and threonine metabolism	6.00E-03	3.40E-02
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1.38E-02	4.51E-02
Arginine and proline metabolism	1.59E-02	4.51E-02

5. 本研究により得られた主な成果

(1)科学的意義

初年度の研究により、GC-NICI/MSを用いたPCBs, OCPs, PBDEsのスクリーニング分析が可能であることが示唆された。また、本手法はスクリーニング分析にも関わらず、NIST発行の標準認証物質測定に

おいても多くの異性体、化合物において良好な結果が得られたことから、測定の精度についても担保ができたと考える。既存手法ではこれらの化学物質は複数回に分けて測定を行っていたため、一度の測定でこれらを網羅的に測定可能な本手法により、貴重な試料量の節約や、測定時間の短縮によるスループット向上が見込まれる。

手動分析手法の確立後、PCBs, OCPs, PBDEsについて自動分析法を検討し、当初の目標であった1日40検体の自動分析が可能な自動分析手法を確立できた。既存研究において食物をについて新たな知見を提供することは今後測定対象物質をより広げる上で重要な結果である。また、分析の精度について確認したところ、ほとんどすべての物質で標準認証試料の示す認証範囲内に測定値が収まっており、良好な結果が得られた。更に、本分析法はろ材・有機溶媒のコストが少なく、かつ高感度であることから大規模な出生コホート調査におけるスクリーニング分析に有用であると考える。

最後に母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度解析および食習慣との関係解析解析の結果を示す。本研究により得られた母体血清・臍帯血清中のPCBs濃度は欧米・日本における母体血清・臍帯血清中PCBs濃度に比べ同等、もしくは低い値を示したが、異性体組成についてはほぼ同様の傾向が得られた。また、母体血清・臍帯血清中PCBs濃度の相関解析より、採取時期のずれがあったとしても臍帯血清中PCB濃度が母体の影響を強く受けることは重要な結果である。解析の結果から、本研究で検出されたPCBs異性体の曝露源はいずれも共通していることが示唆された。食習慣との解析により、それらが食事、特に、魚の摂取量と強く関係していることが示唆された一方で、繊維類を摂取することでPCBsの取り込みを低減できる可能性が示唆された。また、調理により油を落とすことで、体内に取り込まれるPOPs量を低減できる可能性が示唆された。これらの結果から、主なPOPsの曝露源である食事について、主なルートから低減の可能性までを示すことができた。
また、一部の出生アウトカムとPCBs曝露の間に関係が認められた点について、曝露濃度は低下しているものの未だにPCB曝露が児に影響している可能性が示唆された。更に、曝露に関連する生体内パスウェイについても考察が深まり、毒性学的な知見についても得ることができた点は意義深いと考える。

（2）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

また、POPs曝露量とアンケート・食事調査票との関係解析による、食事由来の曝露及び調理による濃度低減の可能性についてWHOの会議において報告した。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

既に国内でのPCBの製造等は禁止されているが、我々の体内には環境中に存在するPCBが自然に体内に取り込まれているのも事実である。特に、ヒト胎児には、ダイオキシン類やPCB、OCPs, PBDEsといった人体内に残留性有機汚染物質（POPs；persistent organic pollutants）が残留する報告がある。これらのヒトの生体試料に含まれるPCBに関する報告は多々みられるが、千名を超す集団を対象とする調査では、精密法による測定費用が高額なため、世界各国での取り組みの足並みがそろわないのも事実である。

このため、本研究で得られたハイスループットかつ安価なスクリーニング分析法を用いることで、測定コストを下げるとともにスクリーニング調査として測定可能な検体数を増やすことが出来る可能性がある。また、本研究の遂行により得られた測定結果から、母親の食生活や生活習慣、年齢、出産回数などと母児体内のPOPs濃度の関係を導きだすことができれば、将来の環境政策において問題となる特定の物質群を絞り込んで対応することが可能となるほか、出産可能年齢の世代への曝露削減対策が可能になると考える。

６．国際共同研究等の状況

出生コホートを用いた日本・台湾におけるPCBs曝露量・組成の比較というタイトルで、国立台湾大学公衆衛生大学院のChang-Chuan Chan教授から試料を受領・分析し、2国間におけるPCBs曝露量とその組成について比較研究を進めている。現在化学分析は終了し、解析の後国際学会および国際誌への投稿を目指す。

７．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

1) Eguchi, A., Enomoto, T., Suzuki, N., Okuno, M., & Mori, C. (2017). Development of simple analytical methods of polychlorinated biphenyls in human serum by gas chromatography negative ion chemical ionization quadrupole mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, *29*(4), 503-506.

2) Jin, W., Otake, M., Eguchi, A., Sakurai, K., Nakaoka, H., Watanabe, M., Todaka, E & Mori, C. (2017). Dietary Habits and Cooking Methods Could Reduce Avoidable Exposure to PCBs in Maternal and Cord Sera. *Scientific reports*, *7*(1), 17357.

3) Eguchi, A., Sakurai, K., Watanabe, M., & Mori, C. (2017). Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: a pilot birth cohort study in Chiba, Japan. *Environment international*, *102*, 157-164.

4) Eguchi, A., Yanase, K., Yamamoto, M., Sakurai, K., Watanabe, M., Todaka, E., & Mori, C. (2019). The relationship of maternal PCB, toxic, and essential trace element exposure levels with birth weight and head circumference in Chiba, Japan. Environmental Science and Pollution Research, *in press*

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない

（２）口頭発表（学会等）

1) Akifumi Eguchi, Kenichi Sakurai, Midori Yamamoto, Masahiro Watanabe, Emiko Todaka, Chisato Mori. “Relationship between residue levels of PCBs, p, p’-DDE, PBDEs and trace elements in maternal and umbilical cord serum from Chiba, Japan”, Conference of the International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter 2018, (2018), Taipei, Taiwan

2) Chisato Mori, Akifumi Eguchi, Shino Nishizawa-Jotaki, Hiromi Tanabe, Masahiro Watanabe, Emiko Todaka, Kenichi Sakurai. “Epigenetic indicators of effect of fetal PCB exposure on DNA methylation status in human umbilical cord”, Conference of the International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science-Asia Chapter 2018, (2018) Taipei, Taiwan

3) 江口 哲史, 榎本 剛司, 三上 紗弥香, 森 千里, “Mini SPEカートリッジを用いた血清中PCBs分析法の検討” 第27回環境化学討論会, (2018), 那覇市

4) 江口哲史, 榎本剛司, 森千里. “ガスクロマトグラフ-陰イオン化学イオン化法質量分析法による血清中残留性有機汚染物質 (POPs) の分析法検討”, 日本質量分析学会第65回質量分析総合討論会, (2017) つくば市

5) 江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邉 応宏, 森千里 “メタボローム解析による母体血清および臍帯血清中PCBs曝露マーカーの探索”, 環境ホルモン学会第19回研究発表会, (2016) つくば市

6) 江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邉 応宏, 森千里 “メタボローム解析による血清中PCBs曝露マーカーの探索”, 第22回日本環境毒性学会研究発表会, (2016) 松山市

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

1) 第26回 千葉大学予防医学センター市民講座

出生コホート調査における化学物質測定の現状（29年3月4日、キャンパス・イノベーションセンター東京、観客10名）

2) 第29回 千葉大学予防医学センター市民講座

出生コホート調査における化学物質測定の現状（30年3月3日、千葉大学西千葉キャンパス松韻会館、観客10名）

3) 第32回 千葉大学予防医学センター市民講座

子どもの健康と化学物質について（31年3月2日、千葉大学西千葉キャンパス松韻会館、観客15名）

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

Chisato Mori, The word and the concept of “Environmental Preventive Medicine” is important for medical students, Second Meeting on Avoidable Early Life Environmental Exposures, WHO Headquarters Salle D, Geneva, Switzerland; 27, 28 November, 2017, Lunchtime Seminar: Children’s Environmental Health VI

Chisato Mori, Recent new findings of environmental health effects on children from Japanese birth cohorts, WHO Headquarters Salle D, Geneva, Switzerland; 19th April, 2018

８．引用文献

1. Govarts, E.; Nieuwenhuijsen, M.; Schoeters, G.; Ballester, F.; Bloemen, K.; de Boer, M.; Chevrier, C.; Eggesbo, M.; Guxens, M.; Kramer, U.; Legler, J.; Martinez, D.; Palkovicova, L.; Patelarou, E.; Ranft, U.; Rautio, A.; Petersen, M. S.; Slama, R.; Stigum, H.; Toft, G.; Trnovec, T.; Vandentorren, S.; Weihe, P.; Kuperus, N. W.;

Wilhelm, M.; Wittsiepe, J.; Bonde, J. P.; Obelix; Enrieco, Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect* **2012,** *120* (2), 162-70.

2. Safe, S. H., Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* **1994,** *24* (2), 87-149.

3. Kobayashi, S.; Murakami, K.; Sasaki, S.; Okubo, H.; Hirota, N.; Notsu, A.; Fukui, M.; Date, C., Comparison of relative validity of food group intakes estimated by comprehensive and brief-type self-administered diet history questionnaires against 16 d dietary records in Japanese adults. *Public Health Nutr* **2011,** *14* (7), 1200-1211.

4. Covaci, A.; Jorens, P.; Jacquemyn, Y.; Schepens, R., Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *Science of the Total Environment* **2002,** *298* (1-3), 45-53.

5. Fukata, H.; Omori, M.; Osada, H.; Todaka, E.; Mori, C., Necessity to measure PCBs and organochlorine pesticide concentrations in human umbilical cords for fetal exposure assessment. *Environ Health Perspect* **2005,** *113* (3), 297-303.

6. Axelrad, D. A.; Goodman, S.; Woodruff, T. J., PCB body burdens in US women of childbearing age 2001-2002: An evaluation of alternate summary metrics of NHANES data. *Environ Res* **2009,** *109* (4), 368-78.

7. Hisada, A.; Shimodaira, K.; Okai, T.; Watanabe, K.; Takemori, H.; Takasuga, T.; Koyama, M.; Watanabe, N.; Suzuki, E.; Shirakawa, M.; Noda, Y.; Komine, Y.; Ariki, N.; Kato, N.; Yoshinaga, J., Associations between levels of hydroxylated PCBs and PCBs in serum of pregnant women and blood thyroid hormone levels and body size of neonates. *Int J Hyg Environ Health* **2014,** *217* (4-5), 546-553.

8. Sasamoto, T.; Ushio, F.; Kikutani, N.; Saitoh, Y.; Yamaki, Y.; Hashimoto, T.; Horii, S.; Nakagawa, J.; Ibe, A., Estimation of 1999-2004 dietary daily intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs by a total diet study in metropolitan Tokyo, Japan. *Chemosphere* **2006,** *64* (4), 634-41.

9. Tsukino, H.; Hanaoka, T.; Sasaki, H.; Motoyama, H.; Hiroshima, M.; Tanaka, T.; Kabuto, M.; Turner, W.; Patterson, D. G., Jr.; Needham, L.; Tsugane, S., Fish intake and serum levels of organochlorines among Japanese women. *Sci Total Environ* **2006,** *359* (1-3), 90-100.

III. 英文Abstract

Investigation of an analytical method for persistent organic pollutants (POPs) in serum samples using intelligent autosampler with gas chromatography - mass spectrometry for large-scale cohort studies: determination of exposure route of POPs in pregnant women and fetal participants

Principal Investigator: Chisato Mori
Institution: Chiba University
1-33 Inage-ku Yayoi-cho, Chiba, 263-8522, JAPAN
Tel: +81-43-290-3896
E-mail: cmori@faculty.chiba-u.jp

[Abstract]

Key Words: Persistent Organic Pollutants, Automated Sample Preparation, GC-MS, Birth Cohort

Despite being banned, polychlorinated biphenyls (PCBs) persist widely in humans because of their lipophilic properties, low water solubility, and bioaccumulation in fatty tissues. They affect the human endocrine system; hence, continuous biomonitoring of PCBs in humans is being undertaken in various studies. For biomonitoring of PCBs in large-scale cohort studies, highly sensitive and high throughput analytical methods are required. In this study, we developed an automated pretreatment method for the quantification of PCBs in human serum samples using intelligent autosampler and mini-solid phase extraction (Mini-SPE) cartridge with gas chromatography (GC)–negative ion chemical ionization mass spectrometry (NICI-MS). The recovery rates of the surrogate PCB congeners of Mini-SPE cartridges were 55%–101% and the analytical values were almost comparable with those of the certified serum samples from the National Institute of Standards and Technology (NIST: SRM1957). These results indicate that this method might be suitable for rapid screening analysis.

In our cohort study, in which we used a new analytical method for the quantification of POPs, information on dietary habits was obtained from a brief questionnaire that included questions about food items and cooking methods. The median concentrations of total PCBs in the maternal and cord sera were 370 and 100 pg g^{-1} wet weight, respectively. The dominant PCB congeners in maternal and cord sera were CB153, CB138, and CB180, contributing most significantly to the total PCB concentration. Among the various lifestyle factors investigated in our study, fish consumption appeared to be the dominant exposure route of PCBs. Contrarily, the analyses of food items and nutrients suggested that food items rich in dietary fiber, and grilling and deep frying of food could reduce avoidable exposure to PCBs in mothers and fetuses.

We also analyzed the relationships between metabolome profiles and PCB levels. The candidate biomarkers and metabolites included in composite models were related to glutathione and amino acid metabolism in maternal serum and amino acid metabolism and ubiquinone and terpenoid-quinone biosynthesis in cord serum, indicating disruption of metabolic pathways due to PCB exposure in pregnant women and fetuses. In this study, biomarkers and pathways directly related to fetal birth weight were not found; however, these results showed that metabolome

analysis might be useful to explore potential biomarkers for and related biological pathways affected by PCB exposure.