

課題番号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

千葉大学予防医学センター

森 千里

子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）とは

➤ **中心仮説**・・・**胎児期から小児期にかけての化学物質曝露が**
子どもの健康に大きな影響をあたえているのではないか？

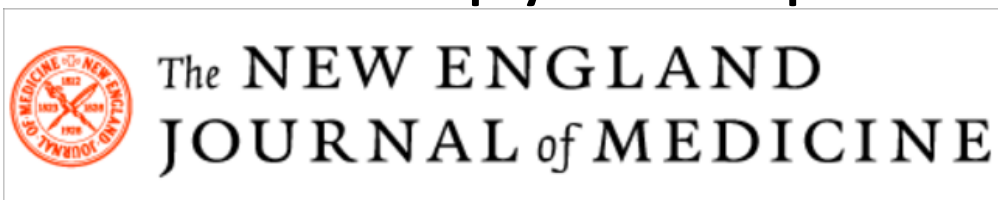
- **調査方法** ・・・出生コホート研究
- **調査規模** ・・・全国で約10万人
- **調査機関** ・・・16年間 リクルート3年、追跡13年
- **総 額** ・・・約900億円（平成22年度31億円）
- **期待される成果**
 - ① 小児の健康に影響を与える環境要因の解明
 - ② 小児の脆弱性を考慮したリスク管理体制の構築
 - ③ 次世代の子供が健やかに育つ環境の実現
 - ④ 国際競争と国益

大規模コホート調査に対応したPOPs迅速一斉分析法の必要性

(Persistent Organic Pollutants : 残留性有機汚染物質)

THE LANCET

Environmental exposure to **polychlorinated biphenyls** and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood



Intellectual Impairment in Children Exposed to **Polychlorinated Biphenyls** in Utero

IQ下がる→平均知能が下がることでさまざまな損失が



日本でも環境要因が子供の成長に与える影響の解明を目的とした**大規模疫学調査**がスタート
100,000組の親子を対象とした出生コホート

PCBs以外のPOPsの影響についての懸念

POPs曝露が健康に悪影響をおよぼすのか？ 最近は難燃剤等も懸念
どのような媒体を介して体内に取り込まれるのか？

胎児小児期における化学物質曝露による影響が社会的問題

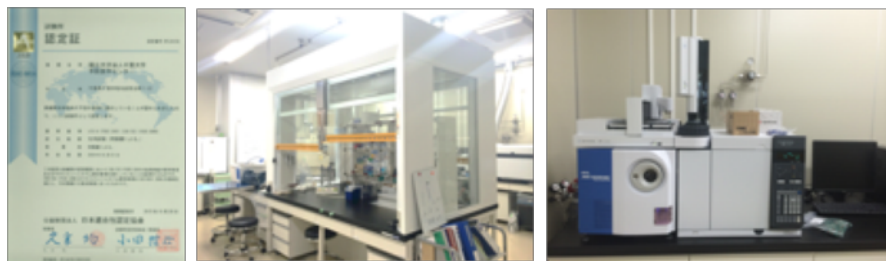
大規模出生コホート調査 環境省事業（エコチル調査）
侵襲性がある採血での十分な血清の確保（小児、臍帯血等）が難しい

1. 新たな測定分析法の確立

大規模コホート調査に対応するため
より安価、より迅速、より少量サンプル

事前準備として

血中PCB分析を安価、迅速、少量で確立
国際規格 ISO17025試験所認定



血中POPsの迅速一斉分析法の確立

2. ヒトへの曝露起源解明

エコチル調査により得られたアンケートより **個人・地域構造要因**を得る

- ・ 食事摂取頻度調査票（FFQ）
- ・ 年齢、出産回数、地域要因 等



母子血中POPs測定結果との解析

事前準備として

FFQからのPCBs摂取量予測モデルを構築

POPs曝露量・曝露起源の推定を高度化

行政ニーズへの適合性

エコチル調査での**化学物質調査測定予算(削減)への貢献**

POPs曝露起源(難燃剤、有機塩素系農薬含む)の解明と曝露削減対策への貢献

大規模コホート調査に対応したPOPs迅速一斉分析法の必要性

(Persistent Organic Pollutants : 残留性有機汚染物質)

PCBs、農薬、難燃剤、様々なPOPsが存在

現 状

検体量: 小児採血、臍帯血では**極少量での測定が必須**
採血の侵襲性が高いため十分な血清の確保が難しい

時間コスト: 分析の前処理工程が煩雑
大量の検体測定が困難

測定コスト: 分析 1検体あたり数万～数十万円
予算に限りがあるため全数測定が困難



安価・迅速・少量サンプルに対応した一斉分析法が必要

研究目的

➤ 少量血清試料中POPsの測定法確立

大規模コホート調査に対応するため
より**安価**、より**迅速**、より**少量サンプル**での測定法の確立

➤ ヒトへの曝露起源解明

エコチル調査：アンケート
年齢、出産回数、地理要因や食事摂取頻度調査票
(FFQ) との関係解析
最新の統計手法を用いた**母子のPOPs曝露起源特定**

➤ エコチル調査でのPOPsの胎児曝露（経胎盤曝露）と 新生児・乳児曝露（母乳経由曝露）状況の解明

研究体制

1. 研究体制：ちばエコチルユニットセンター

研究代表者： 森 千里 （千葉大学医学研究院：研究全般）

研究分担者： 予防医学センター

戸高 恵美子（医学） 櫻井 健一（医学、医師）

花里 真道（工学） 中岡 宏子（医学）

鈴木 規道（工学） 大竹 正枝（農学）

江口 哲史（理学）

2. 研究期間：平成28-30年度の3年間

平成28-29年度： POPs迅速一斉分析法確立

平成29-30年度： ヒトへの曝露起源解明

研究計画

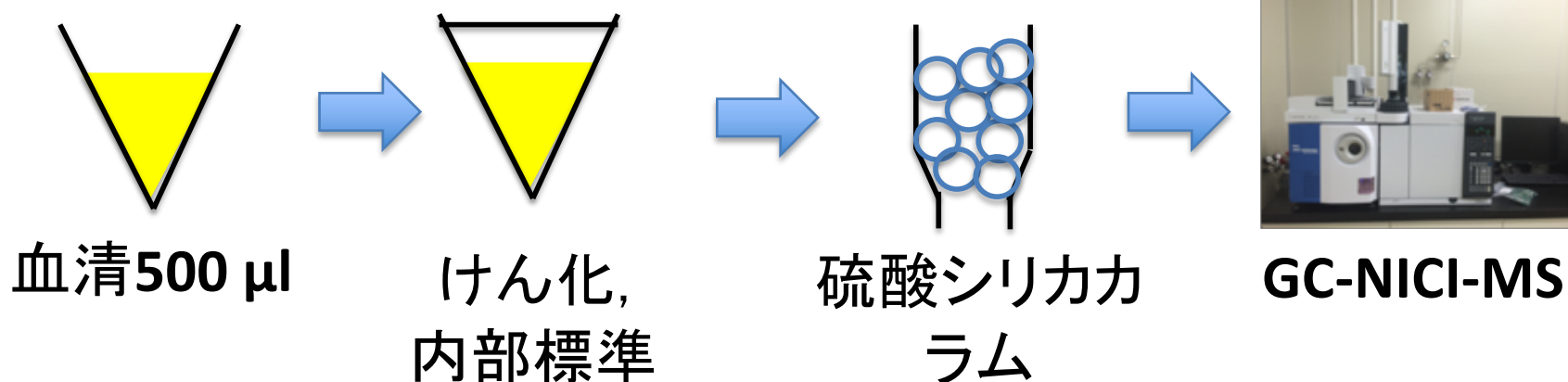
	平成28年度	平成29年度	平成30年度
分析法確立	POPs一斉分析条件 検討 既存手法による血 清中PCBs分析	POPs一斉分析法確立 測定精度の確認（試 験所間比較・標準試 料分析） 上記手法による測定 の開始	分析法精度の継続 的なモニタリング ISO17025のアップ デート 新規手法による POPs測定の継続
曝露起源 モデリング	既存研究データ の再検討 母親へのPCBs曝 露経路の解析	新規手法により得 られたデータの解 析開始 母親・胎児POPs暴 露に関するプライ マリ解析	母子のPOPs曝露経 路詳細解析

進捗状況

- ISO/IEC 17025（国際試験所認定）の取得に用いた分析法の論文化
- 自動化の検討
- 千葉出生コホートを対象としたPCBs測定に関する研究の紹介（食習慣との関係）

出生コホート調査に対応したPCB分析システムの確立

PCBs分析手順: ISO/IEC 17025 (千葉大学) 準拠



Eguchi, A., Enomoto, T., Suzuki, N., Okuno, M., Mori, C. (2017).. Acta Chromatographica

GC/NICI-MS method (JMS-Q1050GC : JEOL)

カラム: HP5-MSUI (30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm film).

インジェクタ: 280° C, pulsed splitless mode.

カラムオーブン 130° C for 1 min, heated to 180° C at a rate of 20° C min⁻¹, heated to 260° C at a rate of 2° C min⁻¹, heated to 300° C at a rate of 5° C min⁻¹, and maintained at 300° C for 4 min.

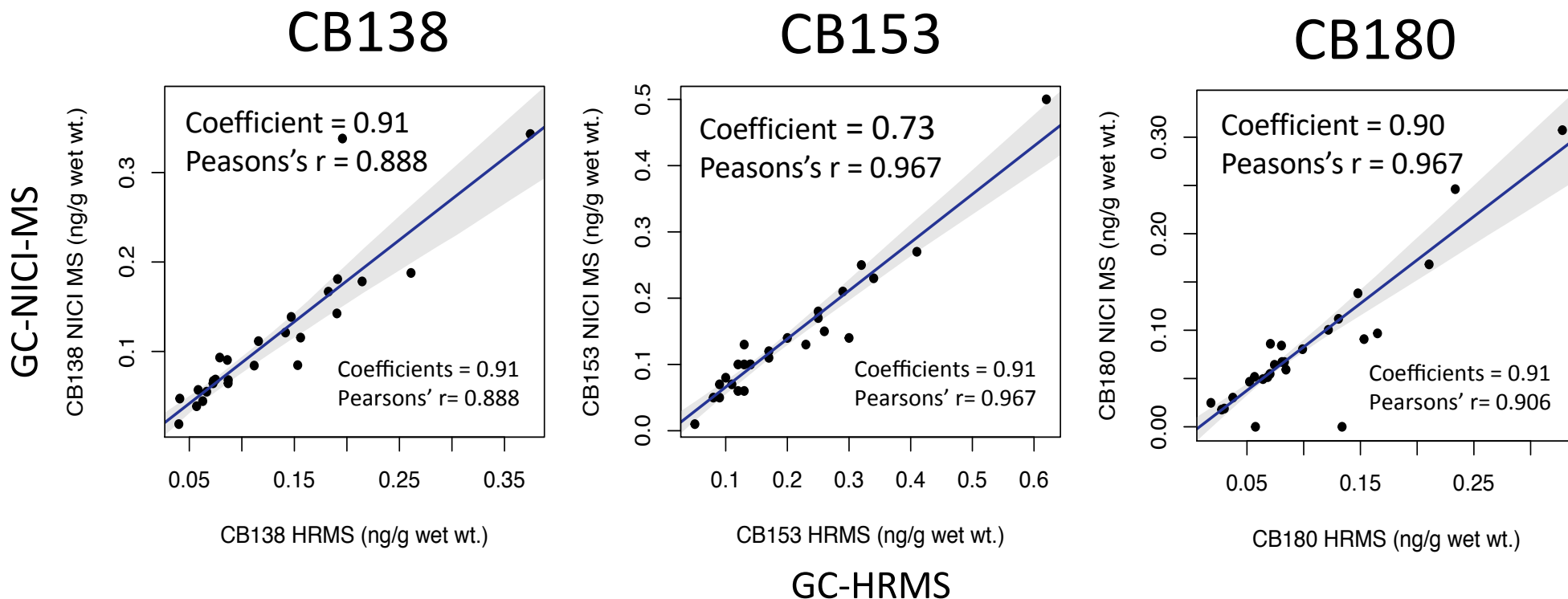
キャリアガス: Helium at a column flow rate of 1.3 mL/min (constant flow rate)

反応ガス: Methane

選択イオン: m/z = 35 and 81 (Cl⁻ and Br⁻)

1日20検体程度の前処理が可能

出生コホート調査に対応したPCB分析システムの確立

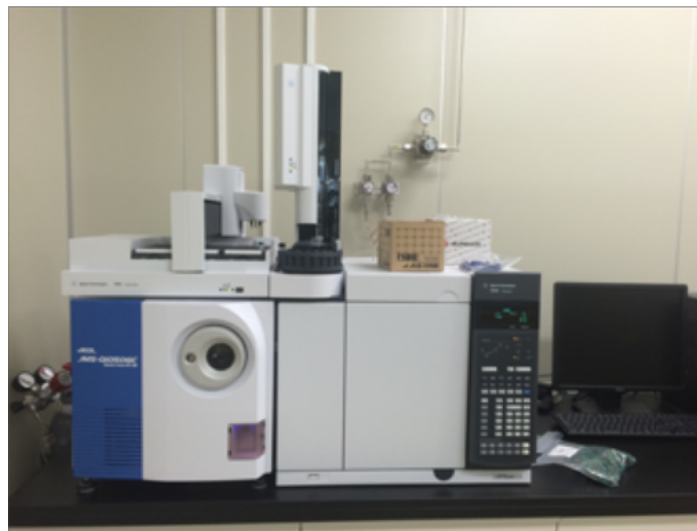
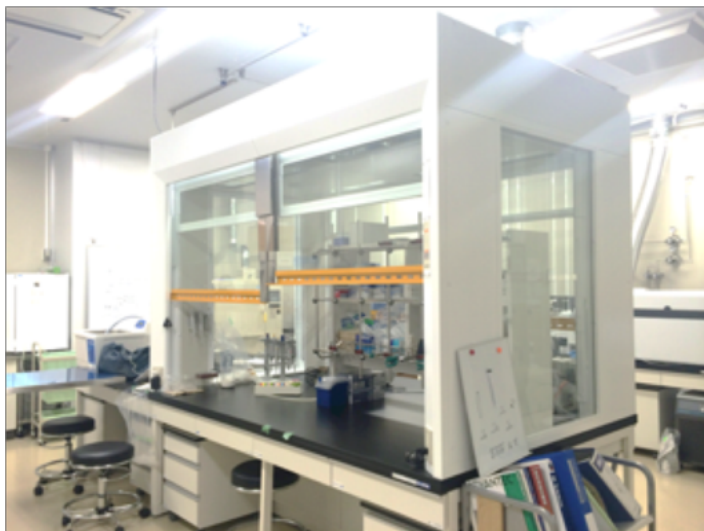


本分析手法における測定値とGC-HRMSによるPCBs
測定値は概ね一致

血中PCB濃度をより少量の試料で、より安価に、より迅速に測定す

る手法を開発

- 測定手法：血中PCB濃度の簡易測定
- **測定コスト**：従来より大幅に削減 **1～2万円/1検体**
- **サンプル量**：5-10 ml → **0.5 ml**
- 時間コスト：1日あたりの分析数が2倍以上



分析手法についての論文が受理

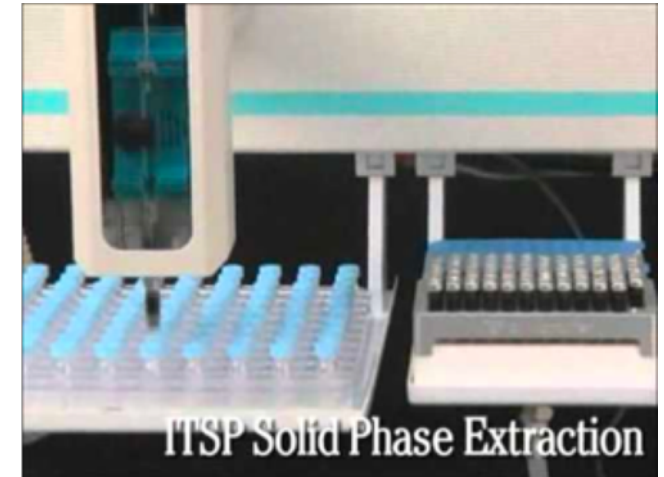
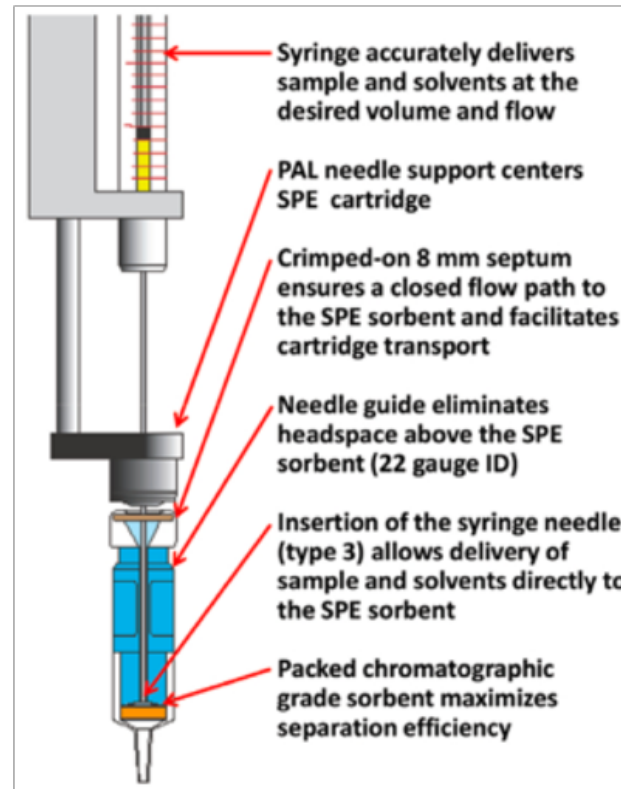
進捗状況

- ISO/IEC 17025（国際試験所認定）の取得に用いた分析法の論文化
- 自動化の検討
- 千葉出生コホートを対象としたPCBs測定に関する研究の紹介（食習慣との関係）

自動化手法 (ITSP: instrument top sample preparation)



JEOL HPより引用



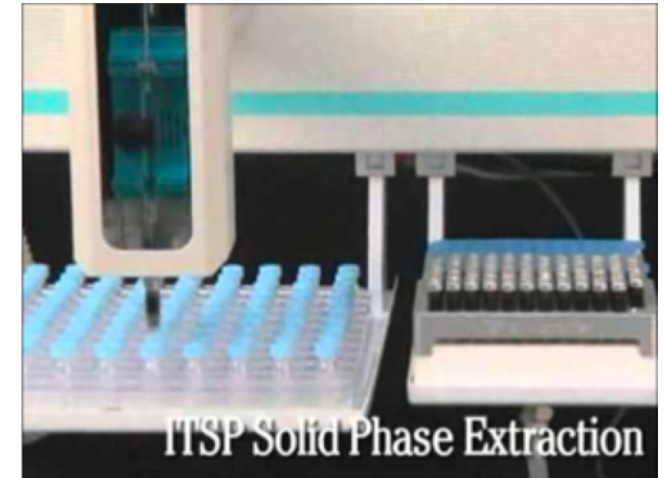
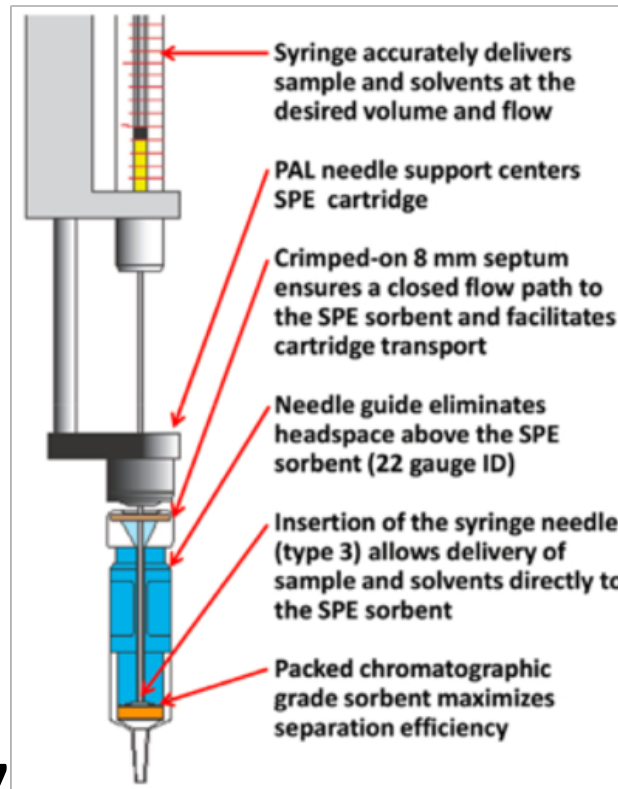
Lehotay, S. J., Han, L., & Sapozhnikova, Y. (2016). Automated mini-column solid-phase extraction cleanup for high-throughput analysis of chemical contaminants in foods by low-pressure gas chromatography—tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 79(17-18), 1113-1130.

食物中の農薬、POPs関連物質の一斉分析に使用
→血清への応用を目指す

自動化手法 (ITSP: instrument top sample preparation)



JEOL HPより引用



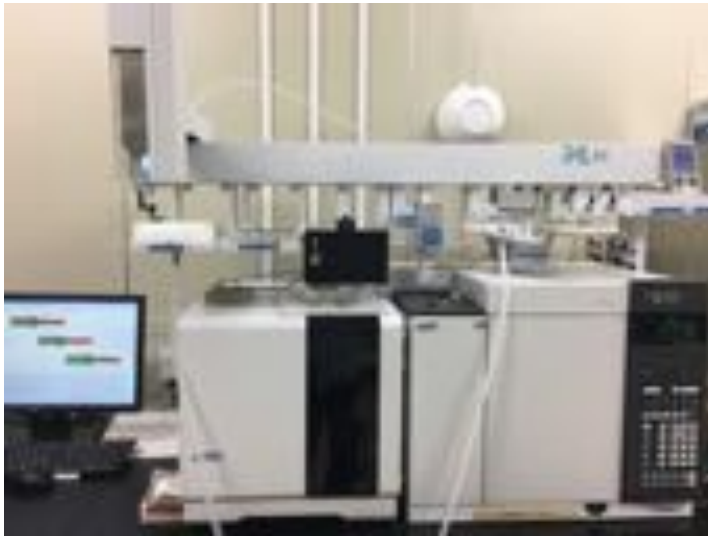
Surrogate: CB30, 55, 207

Syringe spike: PBB154

対象物質: PCB19異性体, *p*, *p'*-DDE, BDE47

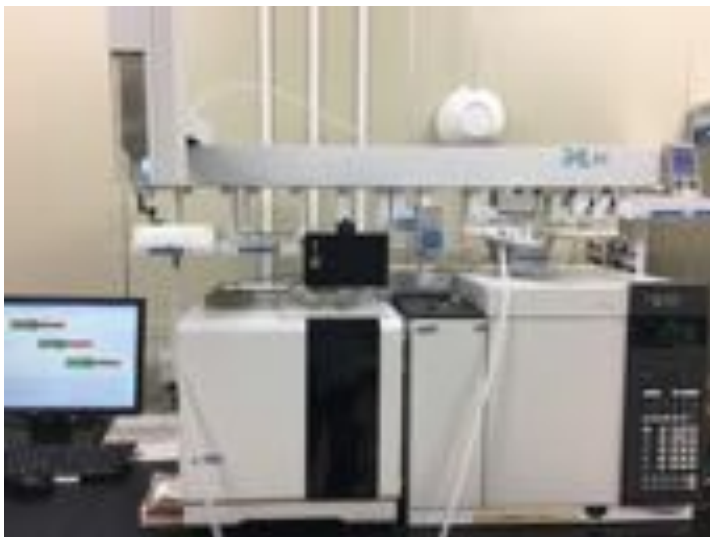
試料: ウシ胎児血清, NIST SRM1957

自動前処理のためのプログラム検討



試料をセットするだけでinjectionまで自動化
添加回収率: 55-102% (ウシ胎児血清: n = 7)
良好な回収率を得た

自動前処理のためのプログラム検討



メソッド検出下限計算 (ウシ胎児血清: n = 7)

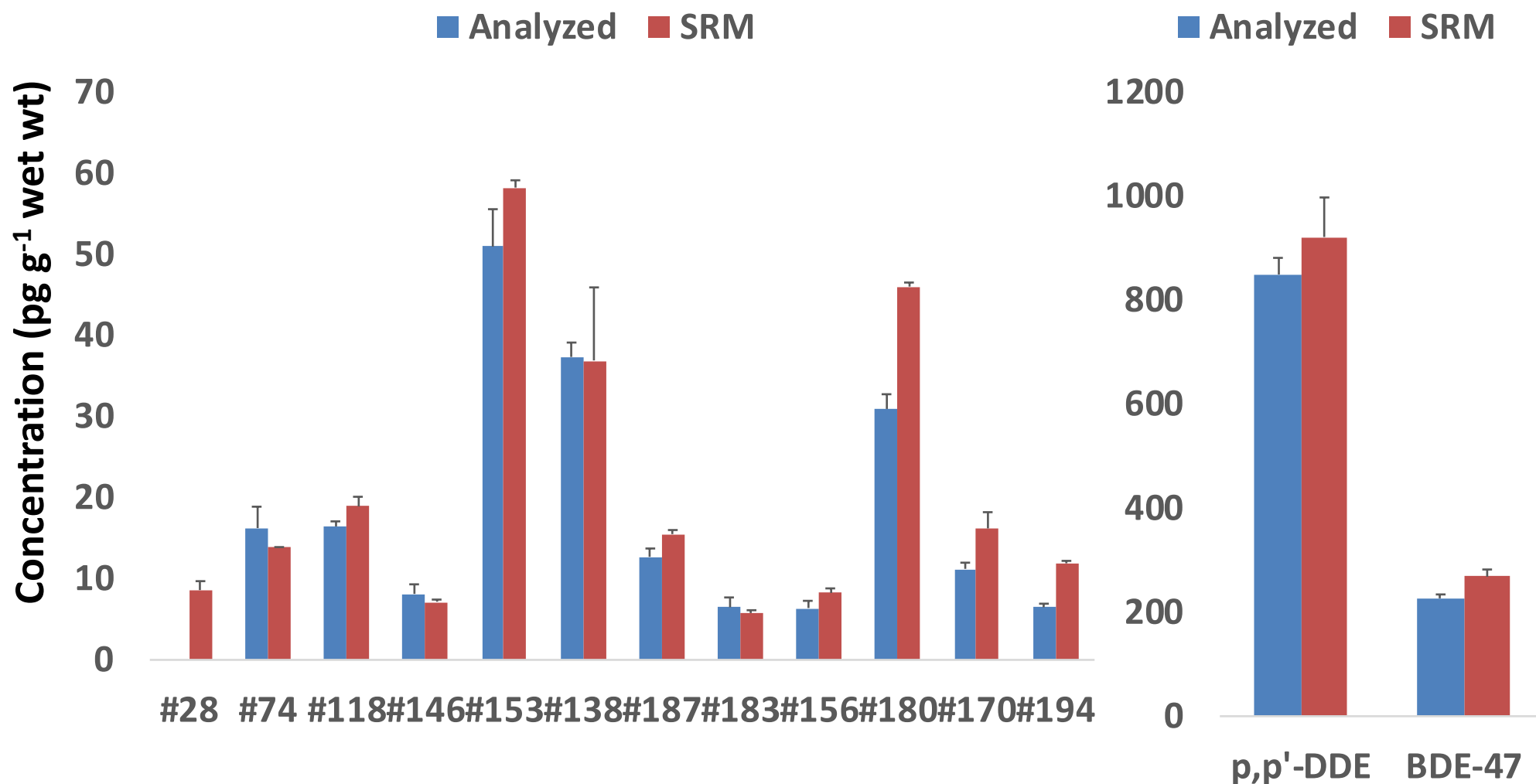
PCBs: 0.53-15 pg g⁻¹ wet wt

p, p'-DDE: 15 pg g⁻¹ wet wt

BDE-47: 16 pg g⁻¹ wet wt

高分解能GC-MSと同等の研究感度を得た

測定値の精度確認 (NIST標準認証試料: SRM1957)



PCBはCB180を除き概ね良好な結果
DDE, BDE47は認証値の20%誤差範囲内
スクリーニング法としては十分な精度 (30min/sample)

測定法まとめ

PCBsについては異性体ごとに測定可能, 論文化

Total PCBs濃度測定についてはISO17025認証を得た

有機塩素系農薬, PBDEsに関しては、現状の測定法に組み込む形では、概ね一斉分析が可能な段階

インテリジェントオートサンプラー + Mini-SPEによる自動化に切り替え, 概ね良好な結果が得られた

低濃度SRMの測定値に問題なし

自動分析による一日40検体測定が可能な条件を確立

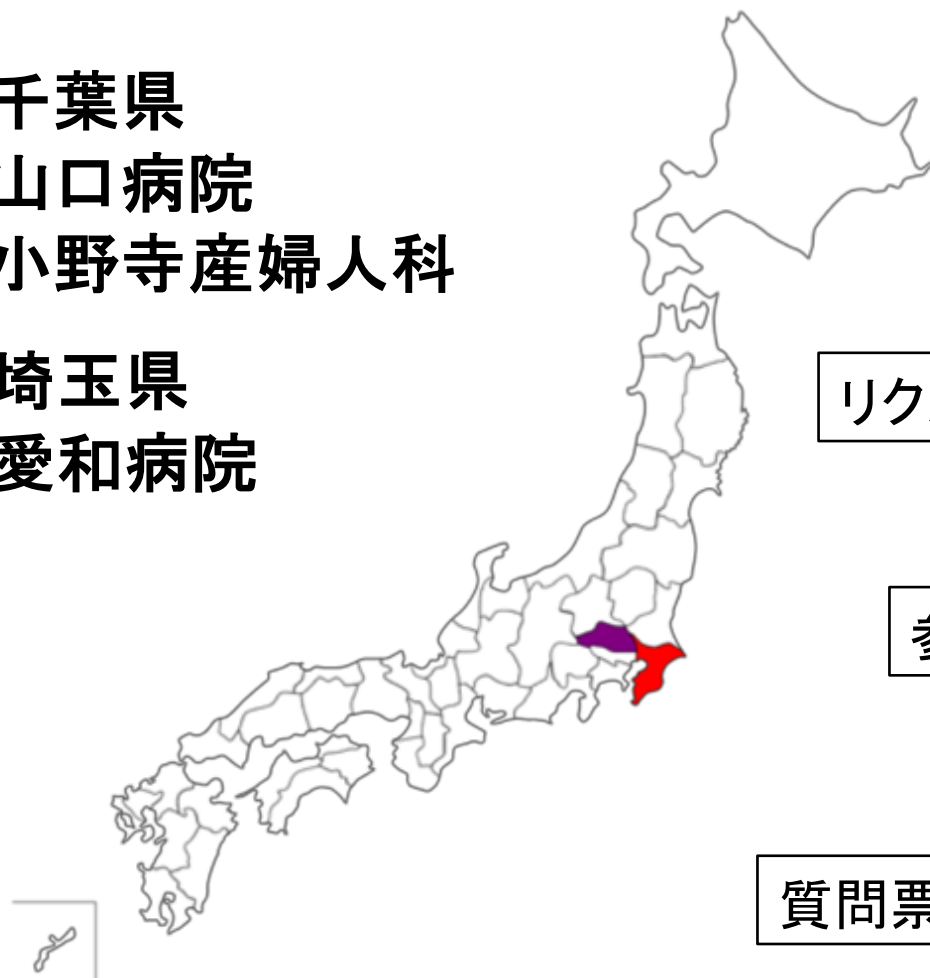
進捗状況

- ISO/IEC 17025（国際試験所認定）の取得に用いた分析法の論文化
- 新規POPsの測定に関する検討
- 千葉出生コホートを対象としたPCBs測定に関する研究の紹介（食習慣との関係）

試料と方法: C-MACHコホート研究参加者

■ 千葉県
山口病院
小野寺産婦人科

■ 埼玉県
愛和病院



質問票
(年齢, 身長, 体重, 出産回数)

妊娠32週の血清試料

リクルート (n = 433)

撤回 (n = 25)

参加 (n = 408)

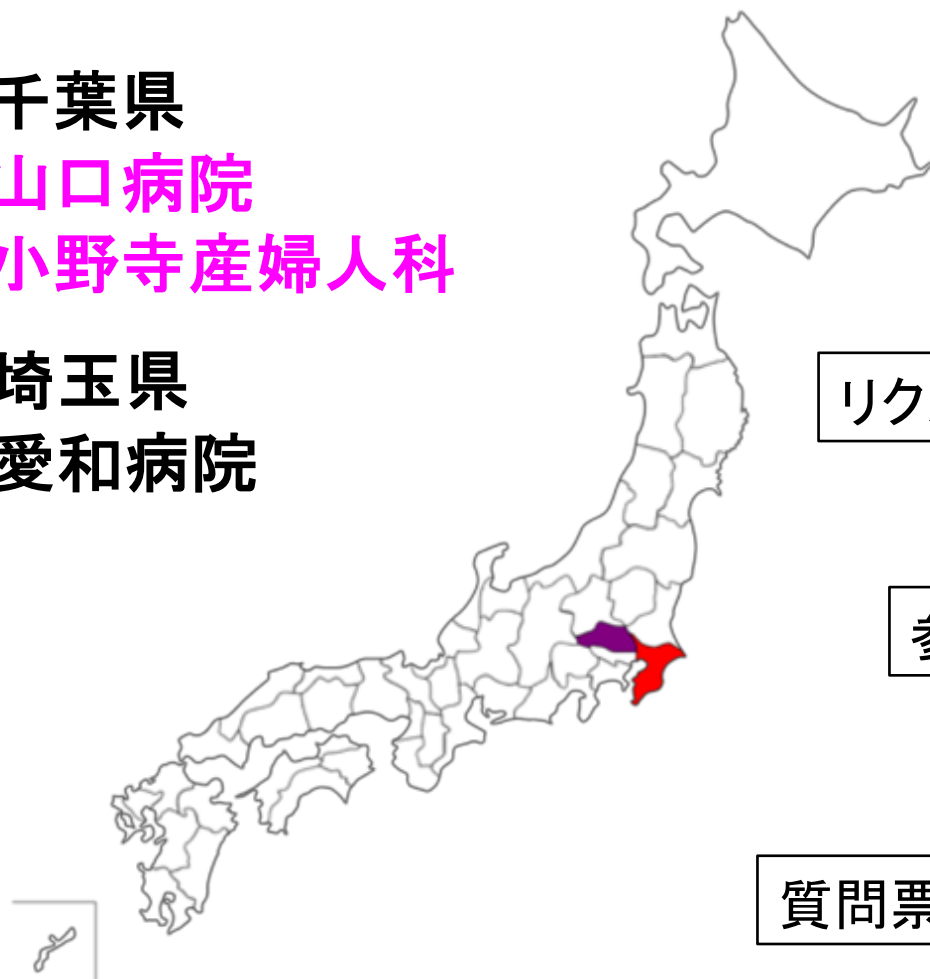
質問票回答なし
n = 32

質問票回答あり (n = 376)

Sakurai, K., Miyaso, H., Eguchi, A., Matsuno, Y., Yamamoto, M., Todaka, E., ... & Fujita, S. (2016). Chiba study of Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses. *BMJ open*, 6(1), e010531.

試料と方法: C-MACHコホート研究参加者

- 千葉県
山口病院
小野寺産婦人科
- 埼玉県
愛和病院



質問票
(年齢, 身長, 体重, 出産回数)

妊娠32週の血清試料

リクルート (n = 433)

撤回 (n = 25)

参加 (n = 408)

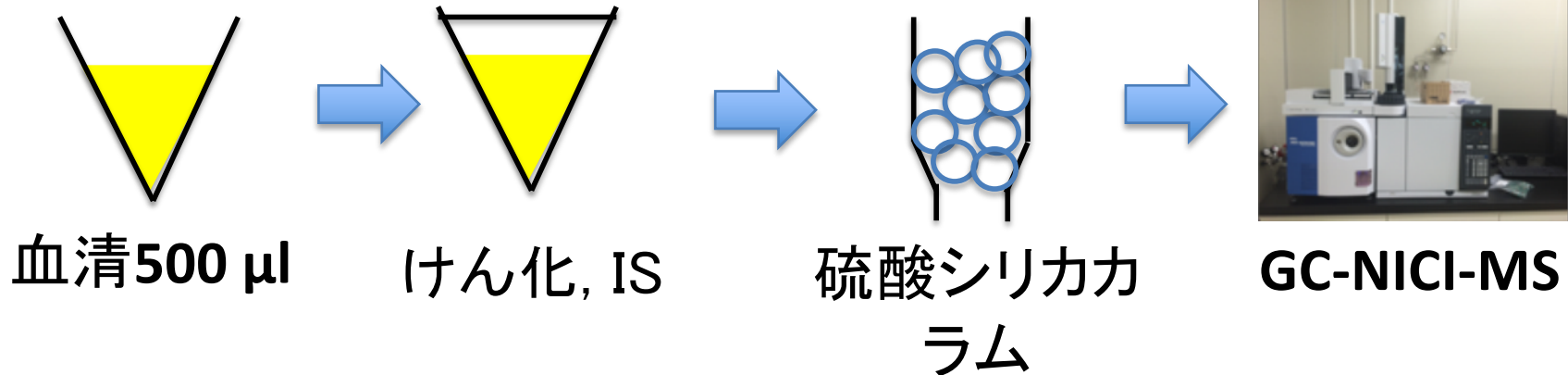
質問票回答なし
n = 32

質問票回答あり (n = 376)

小野寺産婦人科, 山口病院で同意を得られた194組を対象
妊娠後期に採取された血清および臍帯血清を測定

試料と方法: 化学分析・データ解析

PCBs分析: ISO/IEC 17025 (千葉大学) 準拠



Eguchi, A., Enomoto, T., Suzuki, N., Okuno, M., Mori, C. (2016).. Acta Chromatographica, Accepted.

データ解析

PCBs濃度・参加者詳細・食習慣アンケートデータを利用

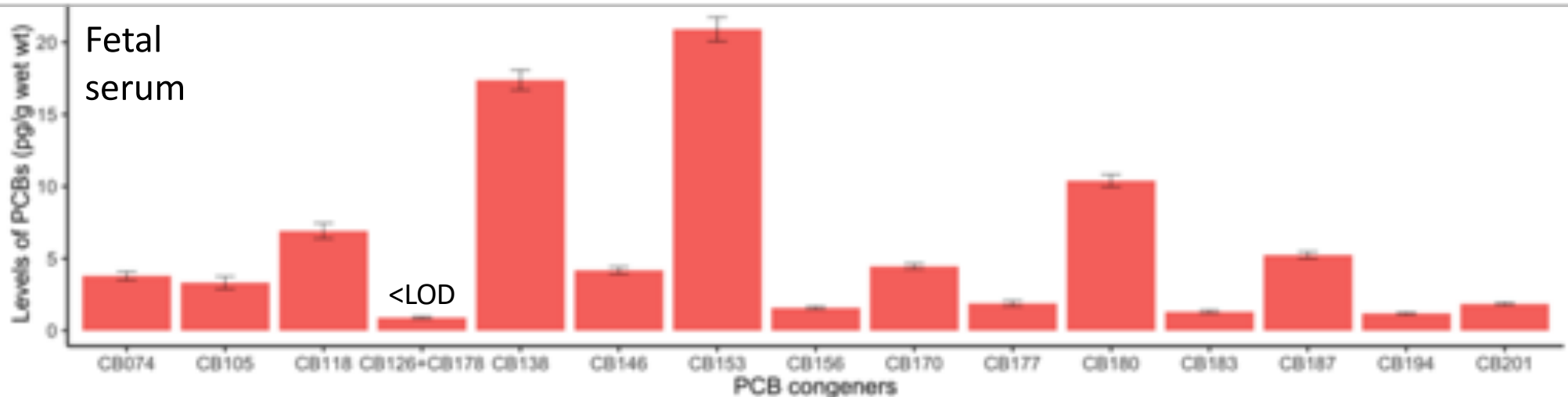
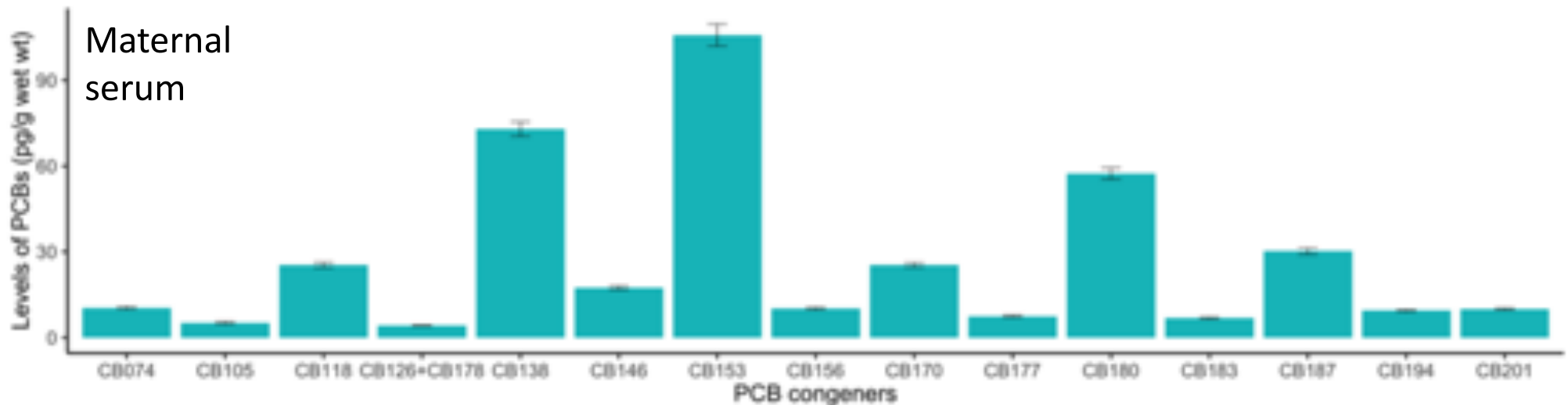
主成分分析

Least absolute shrinkage and selection operator (Lasso) 回帰

により解析

母子における血清中PCBs濃度と曝露起源の解析 曝露低減についての方策

血清中PCBs濃度, 組成

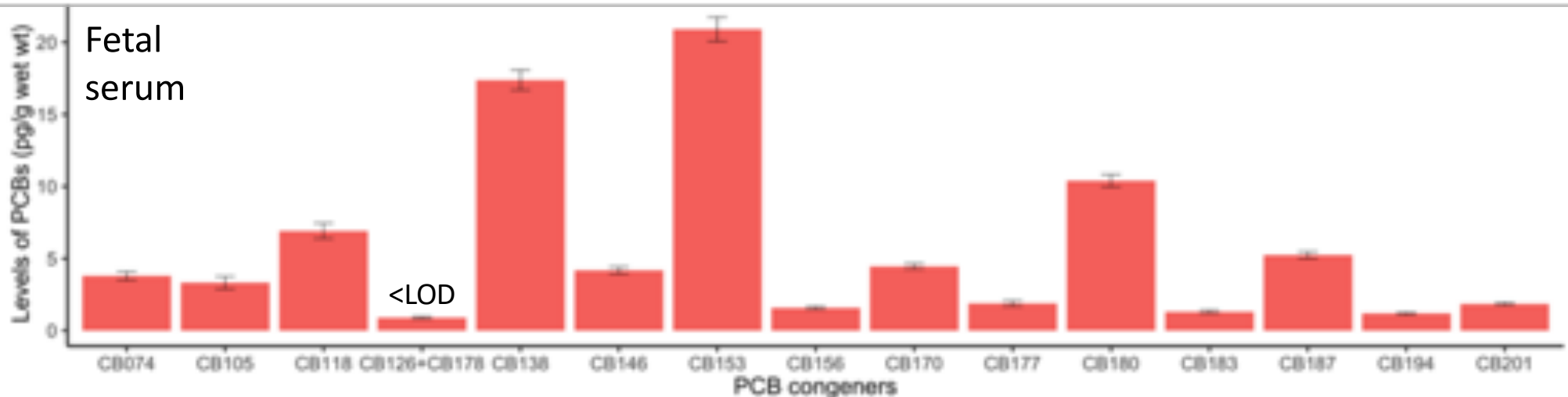
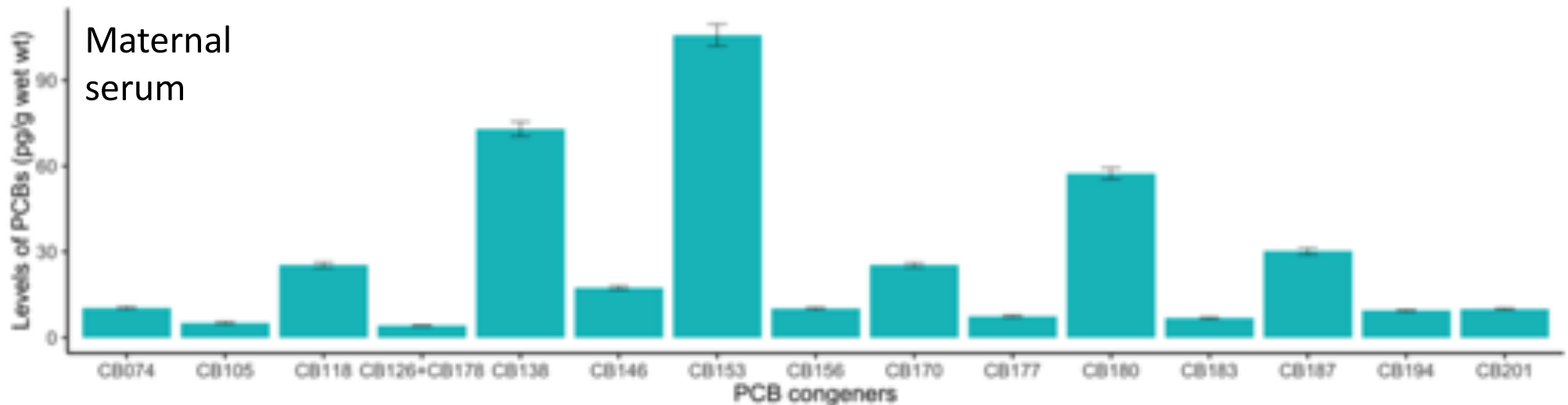


総PCB濃度: 中央値 母体 $430 \text{ pg g}^{-1} \text{ wet wt}$, 臍帯血: $91 \text{ pg g}^{-1} \text{ wet wt}$

過去の日本や欧米の研究に比べ低濃度

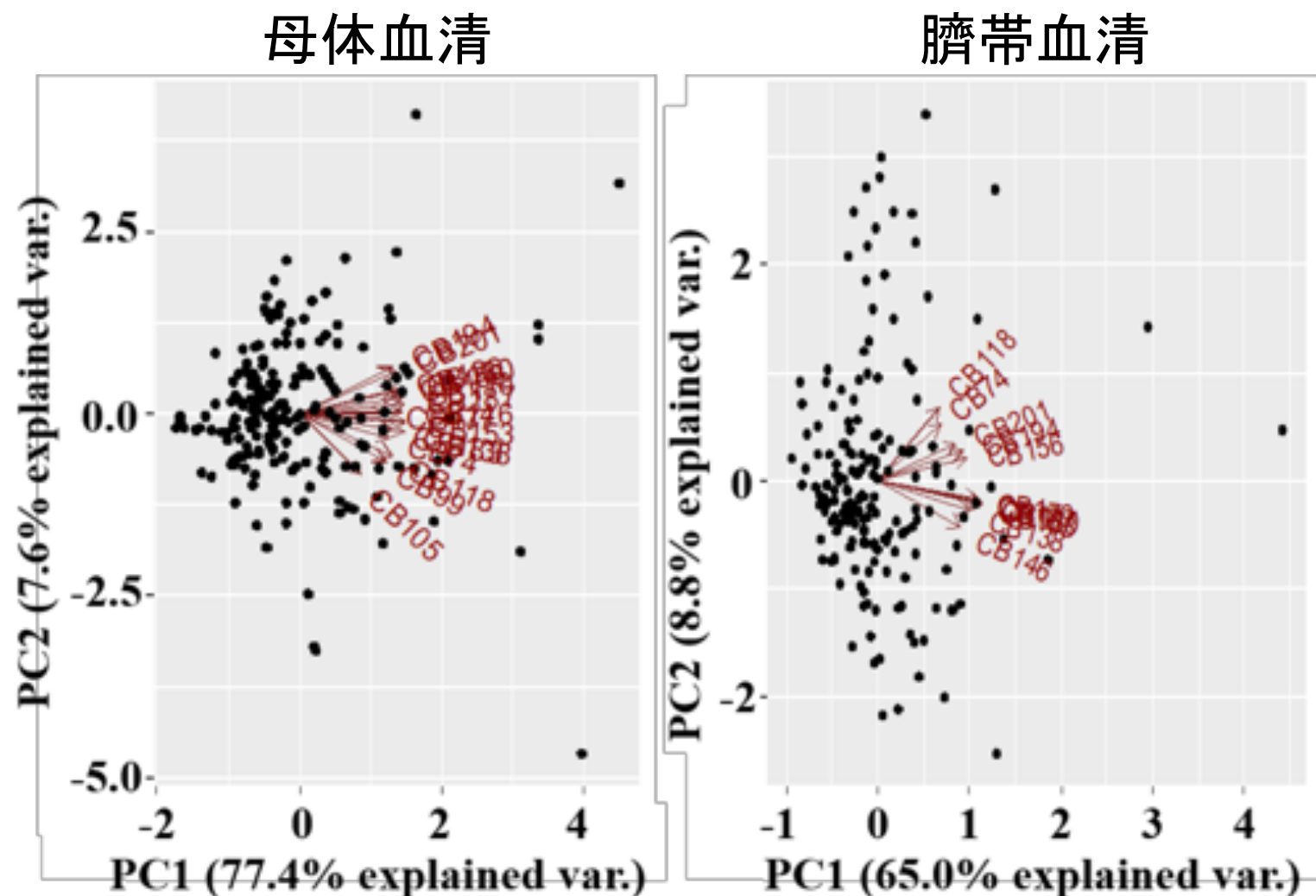
対象者が低年齢であること, 母子間移行を反映?

血清中PCBs濃度, 組成



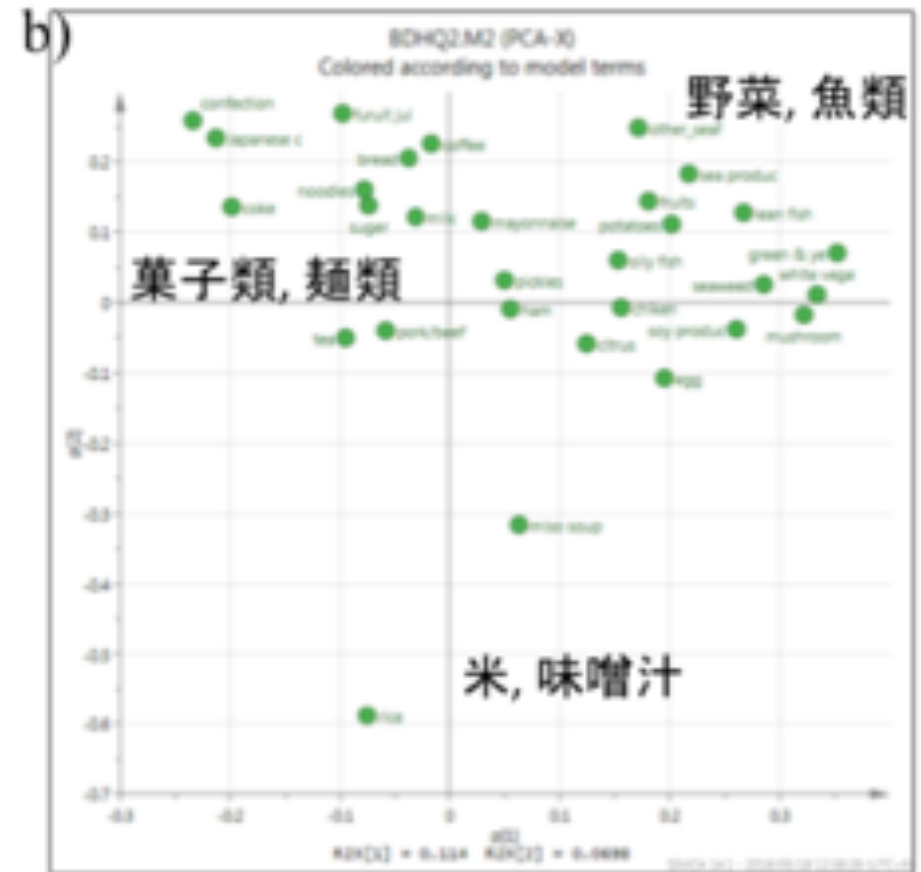
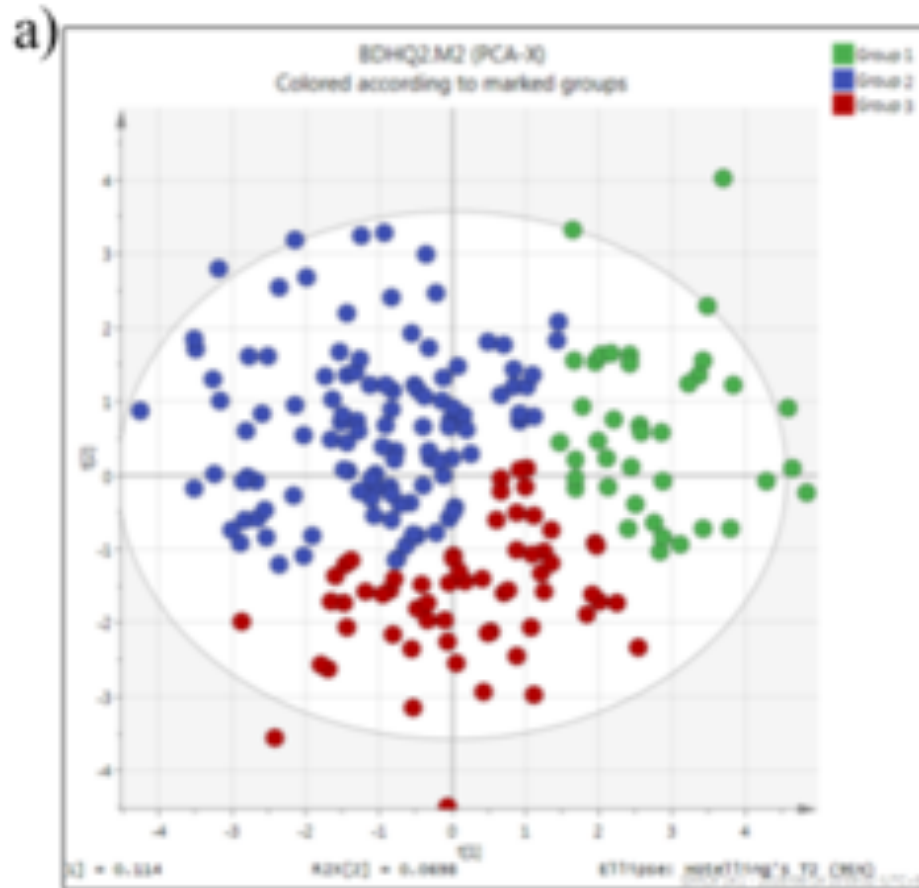
異性体 **CB153 > 138 > 180 > その他**
一般的な日本人の血清中組成 (5-8塩素の寄与大)
魚介類からの曝露

結果と考察: 血清中PCBs濃度, 組成



母子いずれにおいてもPCBsのパターンは第一主成分で説明可能
→複数の曝露源があるとしてもその影響は小さいと予想される

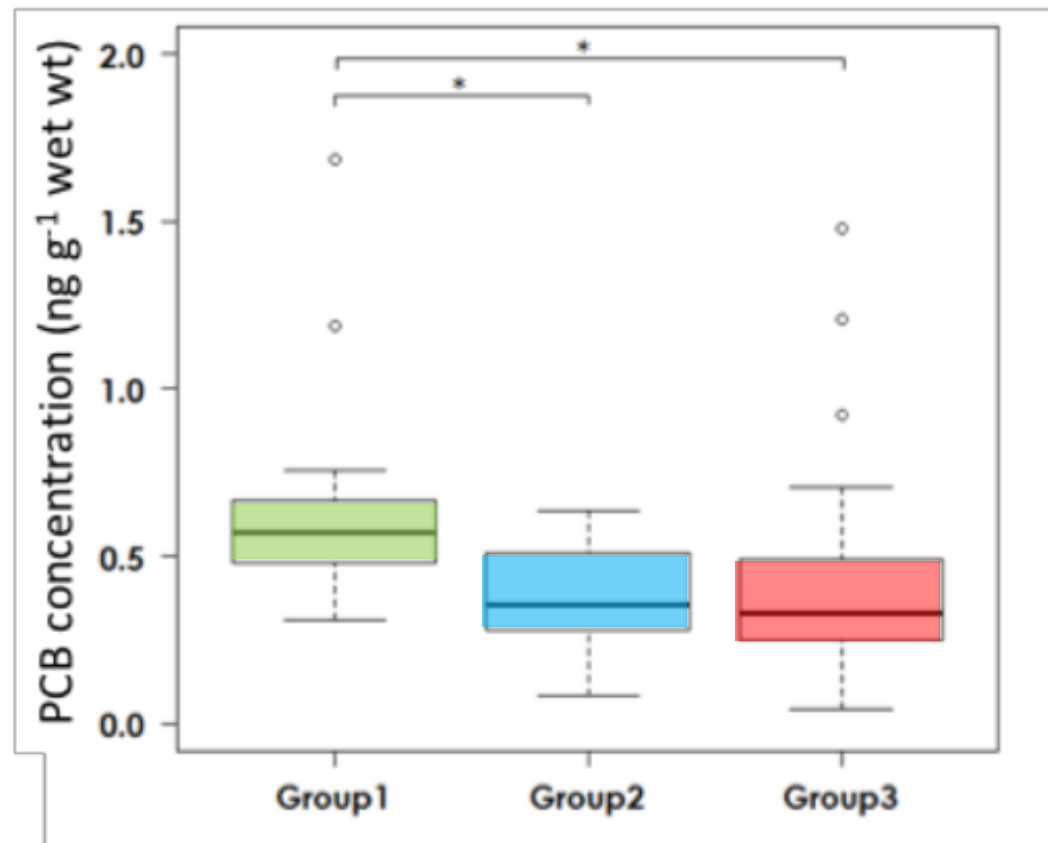
結果と考察: 母体血清中PCBs濃度と食習慣の関係



千葉出生コホートにおける食習慣を主成分分析でまとめた結果を階層クラスタリングした結果、千葉県の妊娠中の女性の食事パターンを3つのグループに分けることができた

緑: 野菜、魚の消費量大, 青: 菓子類の消費量大, 赤: 米、味噌汁の消費量大

母体血清中PCBs濃度と食習慣の関係



野菜、魚の消費量大: 0.659 ng/g wet

菓子類の消費量大: 0.366 ng/g wet

米、味噌汁の消費量が多い日本食: 0.399ng/g wet

魚介類、野菜、キノコを多く摂取する群で最も高値
魚介類からのPCBs摂取を反映？

結果と考察: 血清中PCBs濃度と食習慣の関係

	Maternal Blood	Cord Blood
(Intercept)	0.0398	0.0640
PC1	0.0101	0.0034
PC2	0.0055	0.0025
PC3	0.0026	0.0017
PC4	-	0.0072
PC5	0.0099	0.0024
PC7	0.0028	0.0052
PC8	-	0.0016
PC9	-	-0.0038
PC11	-	-0.0069
PC12	-	-0.0024
PC13	-	0.0077
PC14	-	0.0061
PC15	-0.0113	-0.0057
Parity	-0.1197	-0.0298
Mothers' BMI	0.0092	0.0031
Mothers' Age	0.0121	0.0006

各主成分とPCBs濃度の関係をLasso回帰分析により解析
母子いずれも寄与率の高い主成分1-3がPCBs濃度と正の関係を示した

結果と考察: 血清中PCBs濃度と栄養素の関係

	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

栄養素との関係を解析したところ、繊維質はPCBs濃度と負の関係

結果と考察: 血清中PCBs濃度と調理法の関係

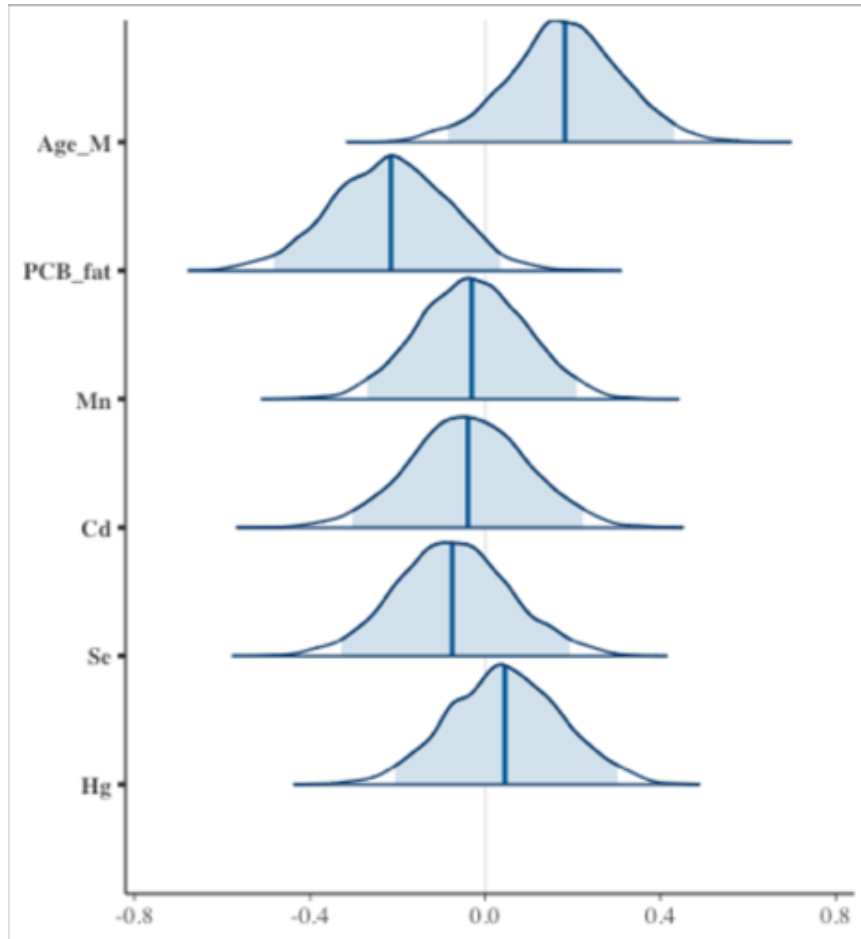
	Maternal Blood	Cord Blood
(Intercept)	-0.1373	0.0867
Mother's Age	0.0155	0.0006
Mother's BMI	0.0093	0.0014
Parity	-0.1445	-0.0297
Fish		
Raw	0.0038	0.0010
Grilling	-0.0003	-
Stew	0.0003	< 0.0000
Deep Frying	0.0015	-
Other than fish		
Grilling (Meat)	-0.0037	-0.0004
Pan Frying (Hamburger Meat)	0.0014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

魚・肉を焼く事で濃度が低減する傾向

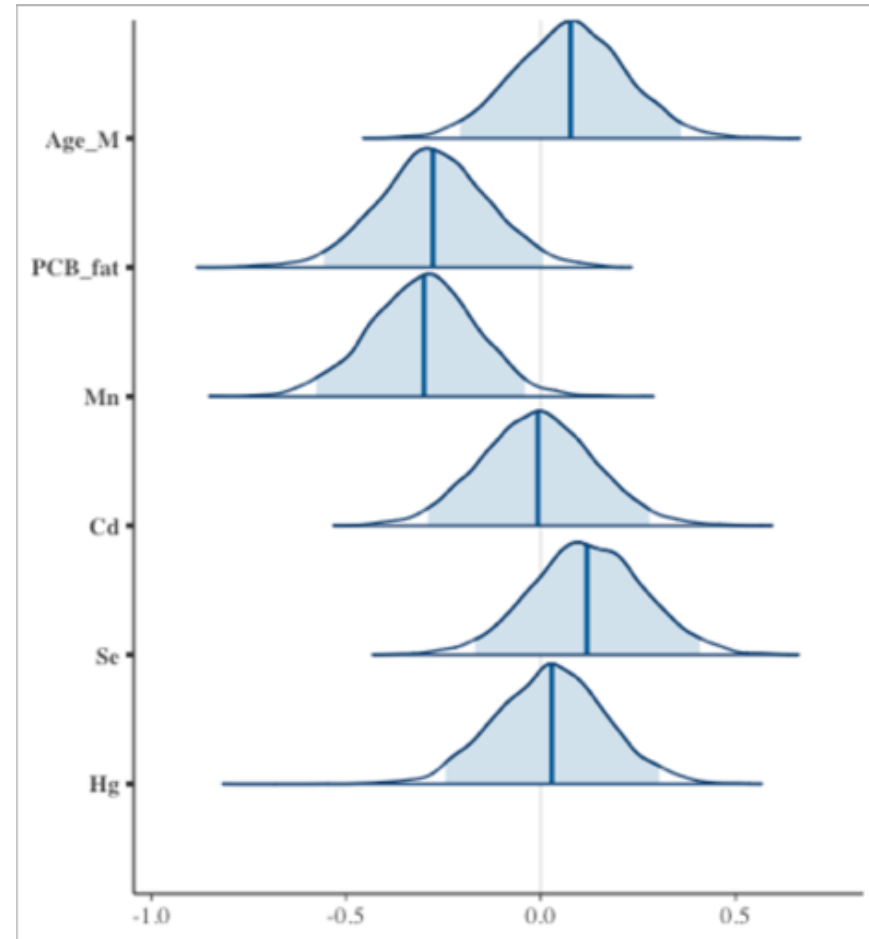
**出生体重・頭囲との関係解析および
出生体重・頭囲低下に関連する要因の考察**

出生体重・頭囲詳細

出生体重



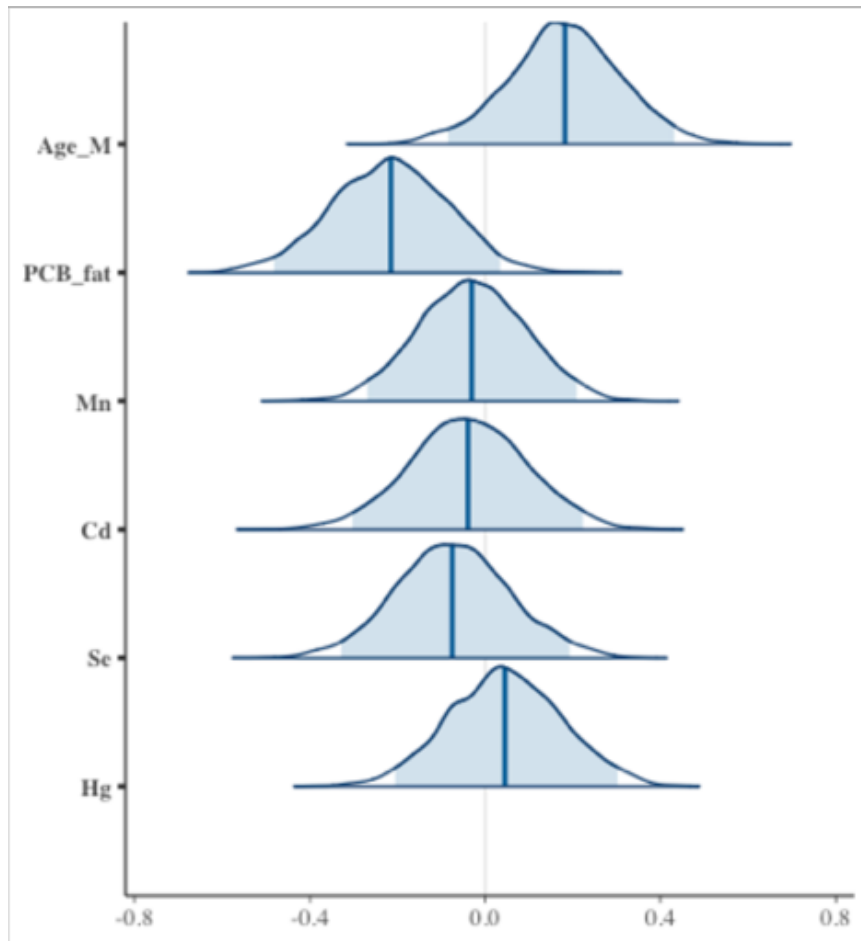
頭囲



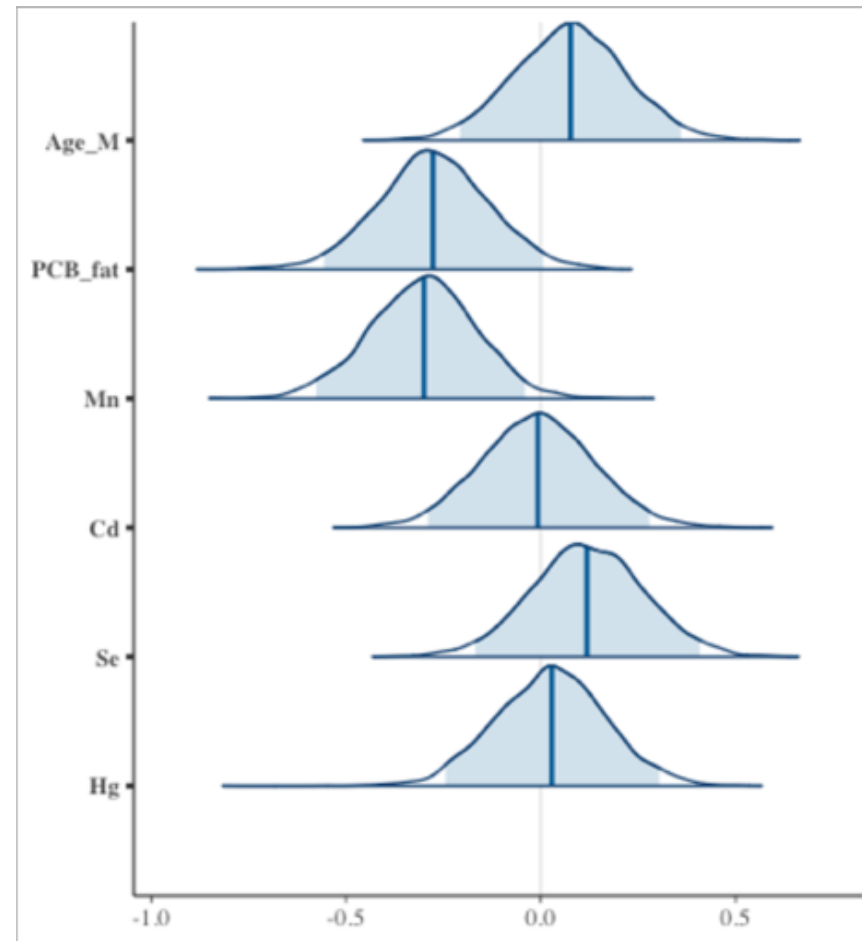
出生体重とPCB濃度に負の傾向
頭囲とPCB, Mn濃度に負の傾向

出生体重・頭囲詳細

出生体重



頭囲



欧州における大規模な疫学調査においてもPCBs濃度と出生体重の負の関係が報告されているが、どのようなメカニズムでこれが起こるのかは明らかではない

PCBs濃度に関連する生体内パスウェイ

Annotation	<i>p</i> -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

母体血清: グルタチオン代謝のように異物代謝に関わるパスウェイに変動

動物実験などでもPCBs曝露によるグルタチオンの低下が報告されており、これを通じた酸化ストレスの影響が懸念

PCBs濃度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

臍帯血清: ユビキノン生合成, フェニルアラニン、グリシン、アルギニン等アミノ酸代謝系の変動

出生体重変動に直接関わるエネルギー代謝系の変動は認められなかったが、上記パスウェイが脂質生合成に関わるという報告も

実試料分析現状まとめ

PCBsについて、千葉コホート調査のサンプルの分析開始
既報と同様の異性体組成、濃度は若干低め

食事調査との関係解析から魚由来のPCBs取り込みが確認

食習慣とPCBs濃度のモデリングおよび、PCBs濃度低下につ
ながる食習慣の提案について解析した論文が受理

曝露を反映するアウトカム・バイオマーカー・パスウェイにつ
いて解析

これまでの論文まとめ

- 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*, 1-4.
- 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.
- Jin, W., Otake, M., Eguchi, A., Sakurai, K., Nakaoka, H., Watanabe, M., ... & Mori, C. (2017). Dietary Habits and Cooking Methods Could Reduce Avoidable Exposure to PCBs in Maternal and Cord Sera. *Scientific reports*, 7(1), 17357.
- Eguchi et al, The relationship of maternal PCB and toxic and essential trace element exposure levels with birth weight and head circumference in Chiba, Japan, Under review

社会への発信（平成29年度）

千葉大予防医学センター市民講座ポスター

第24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実況

平成29年3月4日(土) 13:00-16:00 市民講座 1F 市民講座室

千葉大学予防医学センターは、出生コホート調査の重要性を認識し、市民への啓発活動を行っています。本講座では、出生コホート調査の現状と化学物質測定の実況について、専門家の講演を通じて、市民の健康意識を高め、予防医学の発展に貢献します。

- 13:00 開会
13:05 開会挨拶
13:10 講演1：出生コホート調査の意義
13:20 講演2：出生コホート調査の現状
13:30 講演3：出生コホート調査の未来
13:40 講演4：出生コホート調査の課題
13:50 講演5：出生コホート調査の展望

14:00 講演1：出生コホート調査の意義
14:10 講演2：出生コホート調査の現状
14:20 講演3：出生コホート調査の未来
14:30 講演4：出生コホート調査の課題
14:40 講演5：出生コホート調査の展望

15:00 講演1：出生コホート調査の意義
15:10 講演2：出生コホート調査の現状
15:20 講演3：出生コホート調査の未来
15:30 講演4：出生コホート調査の課題
15:40 講演5：出生コホート調査の展望

16:00 閉会

会場：市民講座室
〒260-8602 千葉大学 市民講座室
〒260-8602 千葉大学 市民講座室

主催：千葉大学予防医学センター
協賛：市民講座室
お問い合わせ：市民講座室
〒260-8602 千葉大学 市民講座室

平成30年度も3月に市民講座を開催予定

全体まとめ

- PCBs分析法についての論文受理
- PCBsに加え、臭素系難燃剤, 有機塩素系農薬の自動一斉分析法を確立
- 曝露は食事からが中心・食べ合わせや加工により曝露量を減らせる可能性を示唆
- PCBs曝露が出生児の体格に関係・曝露により児の代謝が変化？