

課題名 5-1305 母児POPs曝露量の質問票及び遺伝要因からの推定に関する研究

課題代表者名 森 千里 (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25～27年度

累計予算額 105,361千円(うち平成27年度:32,908千円)  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード ポリ塩化ビフェニル(PCB)、全ゲノム関連解析(GWAS)、質問票、  
曝露量推定モデル、寄与因子評価

#### 研究体制

- (1) エコチル調査における母親・胎児PCB曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児のPOPs曝露量推定方法の開発に関する研究(千葉大学)

### 研究概要

#### 1. はじめに(研究背景等)

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(Dioxins)、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。そのため、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<sup>1)</sup>。

近年、ヒト胎児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(*P*、*P'*-DDE; Dichlorodipenyldichloroethylene)あるいはヘキサクロロシクロヘキサン(HCHS; hexachlorocyclohexanes)やヘキサクロロベンゼン(HCB; hexachlorobenzene)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<sup>2),3),4),5),6),7)</sup>。特にGovartsらの報告によれば、ヨーロッパの出生コホート調査結果の解析により胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少との間に関連性が示唆されている<sup>7)</sup>。近年の出生体重減少、小児アレルギーや精神神経発達異常の増加などを懸念し、原因解明および対策を目的として欧米およびアジア各国で小児コホート調査が行われているが、それらの調査でもPOPsによる影響究明が最優先の課題となっている。本国でも、2011年に開始した環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」により、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へ及ぼす影響を究明する取り組みが始まり、我々も全国の15ユニットのひとつとして、千葉県内の調査に参画している。

本研究では、母親の質問票から母児のPOPs曝露量の推測を試みるものである。この背景には、各国で実施されている、あるいは準備されているコホート調査の結果を連結して国際的に評価することに大きな期待が寄せられているが、いずれの国でも大規模コホート研究を進める上でのコストが課題とされ、最少のコストで最大の成果を得る手法の開発が必要である。また、今回、われわれが試みる「母親の質問票から母児のPOPs曝露量を推測する」事が可能となり、欧米等の出生コホート調査での質問票と比較検討できればデータの統合解析への道が開かれる。さらに血中PCB濃度に関与する遺伝子群が同定できれば、血中PCB濃度に関与するパスウェイの同定につながり、健康影響調査結果、化学物質曝露状況などの環境要因に加えて遺伝要因との相互作用の解明など、国際的な研究として格段に発展させることが期待できる。

本研究により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濃度の関係がわかれば、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。

#### 2. 研究開発目的

環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」では、「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与えているのではないか？」という中心仮説を明らかにしようとしているが、化学物質曝露調査には膨大なコストをかけず成果を上げる方法が求められる。本研究は母親の質問票から母児POPs曝露量の推定モデルを構築する。さらにPOPs蓄積量の遺伝的要因による違いを調べ、遺伝要因からのPOPs高曝露群検出方法の開発を行う。母親の質問票や遺伝要因から母児POPs曝露量推定が可能となればエコチル調査の成功に大きく貢献できる。我々の先行研究の結果によれば、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であり、パックドカラムを用いた測定では、低予算かつ1mlの血中から総PCBが測

定できる。しかも、母親の血中総PCB濃度がわかると、母親のPCB以外のPOPs濃度と同時に、胎児のPOPs濃度も把握できる。

そこで、本研究では妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度と出産時の臍帯中PCB濃度(GCMS法)を測定し、質問票の年齢、食事、出産回数等の回答から母児PCB曝露量推定決定に対する寄与因子の評価を行い、血中PCB推定モデルを構築することを目的とした(「1 & 2) 母体血中総PCB濃度と3) 臍帯中PCB濃度)。なお、母体血中総PCB濃度の分析には、209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法(「1」)と、主要異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法(「2」)を用い、それぞれの結果について検討する。また、全ゲノム関連解析(GWAS: Genome-wide association study)による母親の血中PCB濃度に関与する遺伝子を同定するため、得られたサンプルから分析した(「4) 母親のPCB濃度に関与する遺伝子座位の探索」)。

### 3. 研究開発の方法

#### (1) エコチル調査における母親・胎児PCB曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児のPOPs曝露量推定方法の開発に関する研究

本研究では、妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度についてパックドカラム簡易法をエスアールエル株式会社、簡易型母体血中総PCB濃度を千葉大学予防医学センター(ISO/IEC17025試験所認定:2015年10月21日)、臍帯中PCB濃度を島津テクノロジー株式会社それぞれ分析依頼した。

##### 1) パックドカラム簡易法による母体血中総PCB濃度

###### a 対象者

1490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。

##### 2) 簡易型母体血中総PCB濃度

###### a 対象者

313名の妊娠前期の母体血中PCB濃度について簡易型血中PCB濃度測定法を用い測定した。

##### 3) 臍帯中PCB濃度

###### a 対象者

145名の妊娠出産時の臍帯中PCB濃度についてGCMS法を用い測定した。

##### 4) 母親のPCB濃度に関与する遺伝子座位の探索

###### a 対象者

妊娠中の血中PCB濃度が得られている160名を対象とした。

### 4. 結果及び考察

#### (1) エコチル調査における母親・胎児PCB曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児のPOPs曝露量推定方法の開発に関する研究:

##### 1) パックドカラム簡易法による母体血中総PCB濃度

本研究で測定した対象者1490名の母体血中のPCB濃度の平均は $0.28 \pm 0.16$  ng/g-wetであった。また、対象者の中で最大値は1.5 ng/g-wet、最小値は検出限界未満の0.10 ng/g-wetであった。本研究結果のPCB濃度は、母体血中PCB類濃度範囲が0.22-5.70 ng/g-wet(報告書内記載量; 220~5700 pg/g-wetを換算)であったとする報告<sup>8)</sup>と比べれば、多少低い範囲にあると解釈できる。しかしながら、これらの濃度範囲の差が何に起因するかについては現段階では分からないため、結果を記すに留める。また、本研究を通して、検出限界未満の結果を示す参加者は見られたものの、多くの測定対象者の生体試料からPCBが検出されたことは、これまでの先行研究と同様の結果といえよう<sup>9)</sup>。

次に、対象者の年齢、BMIと出産回数とPCB濃度との関係について、それぞれ表(1)-1から表(1)-3に示す。年齢、BMIおよび出産回数について、参加者から得た質問票による回答から得た。

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(1)-1に示す。なお、本データでは出産年齢情報を欠落する5名を除外した(N=1485)。20歳未満(N=13)および25歳未満(N=129)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、濃度が高まる傾向が伺えた。この傾向は、我々の先行研究結果による加齢とともにPCB濃度の蓄積量も増加する傾向(結果)を示唆するといえよう<sup>9)</sup>。

表(1)-1 出産年齢区分によるPCB濃度(N=1485)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
20歳未満	13	0.16	0.07
25歳未満	129	0.181767	0.111874
30歳未満	454	0.237445	0.113626
35歳未満	511	0.295245	0.152741
40歳未満	327	0.340795	0.182084
45歳未満	50	0.439	0.257874
45歳以上	1	0.37	NA

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(1)-2に示す。なお、本データでは質問票への回答によるBMI情報を欠損する72名を除外した(N=1418)。

表(1)-2 BMIとPCB濃度(N=1418)

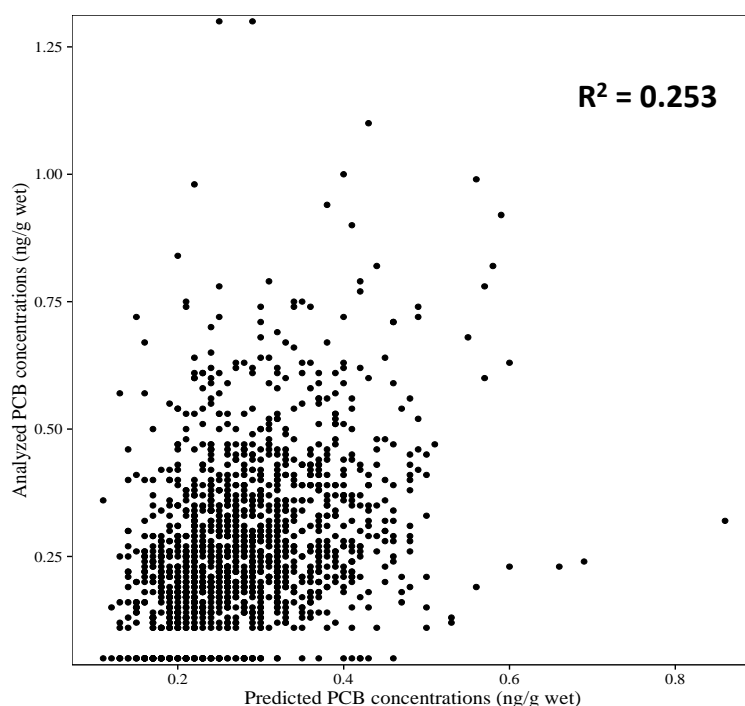
	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
BMI >25	164	0.29	0.17
BMI <25	1254	0.28	0.16

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>25およびBMI<25両群ともにPCB濃度が近似し、明らかな違い認められなかった。現段階において、BMIとPCBの関係については、明確な知見を得られなかったが、前記する加齢にともなうPCB蓄積量の漸増傾向による関与因子を探るためには、BMIだけではなく食生活に関連する何らかの指標を用い追究する必要があると考える。

さらに、出産回数とPCB濃度との関係について、初産および経産により区分した平均値および標準偏差を表(1)-3に示す。なお、本データでは質問票への回答による出産回数情報を欠損する36名を除外した(N=1454)。表から明らかたとおり、初産のPCB濃度が経産婦のPCB濃度と比べ多少高い傾向が認められた。

表(1)-3 出産回数とPCB濃度(N=1454)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
初産	546	0.32	0.14
経産(2回以上)	908	0.26	0.18



図(1)-1 PCBs予測濃度と実測値の相関解析結果

食習慣、年齢、出産回数から、母体血中のPCBs濃度の予測モデル構築を試みる。本研究では、エコチル調査で実施されているFood Frequency Questionnaire (FFQ: 食事摂取頻度調査票)の結果を食習慣のパラメータとした。データ解析にはベイズ線形回帰モデルを用い、決定係数R<sup>2</sup>および、Widely-applicable information creationにより変数選択を行い、モデルの精度を最適化した。解析の結果を図(1)-1に示す。本図から、R<sup>2</sup> = 0.2533で、PCBs濃度を予測できることが明らかになった。

## 2)簡易型母体血中総PCB濃度

本研究で測定した対象者313名の母体血中のPCB濃度の平均は0.35 ng/g-wetであった。また、対象者の中で最大値は2.00 ng/g-wet、最小値は0.04 ng/g-wetであった。本研究を通して、多くの測定対象者の生体試料からPCBが検出されたことは、これまでの先行研究と同様の結果といえよう<sup>9)</sup>。

次に、対象者の年齢と出産回数とPCB濃度との関係について、それぞれ表(1)-4および表(1)-5示す。年齢および出産回数について、参加者から得た質問票による回答から得た。

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、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(1)-4に示す。

20歳未満(N= 1)および25歳未満(N= 22)の対象者数は他の年齢群と比べ少ないものの、年齢の増加に伴いPCB濃度が微増とはいえ、濃度が高まる傾向が伺えた。この傾向は、我々の先行研究結果による加齢とともにPCB濃度の蓄積量も増加する傾向(結果)を示唆するといえよう<sup>9)</sup>。

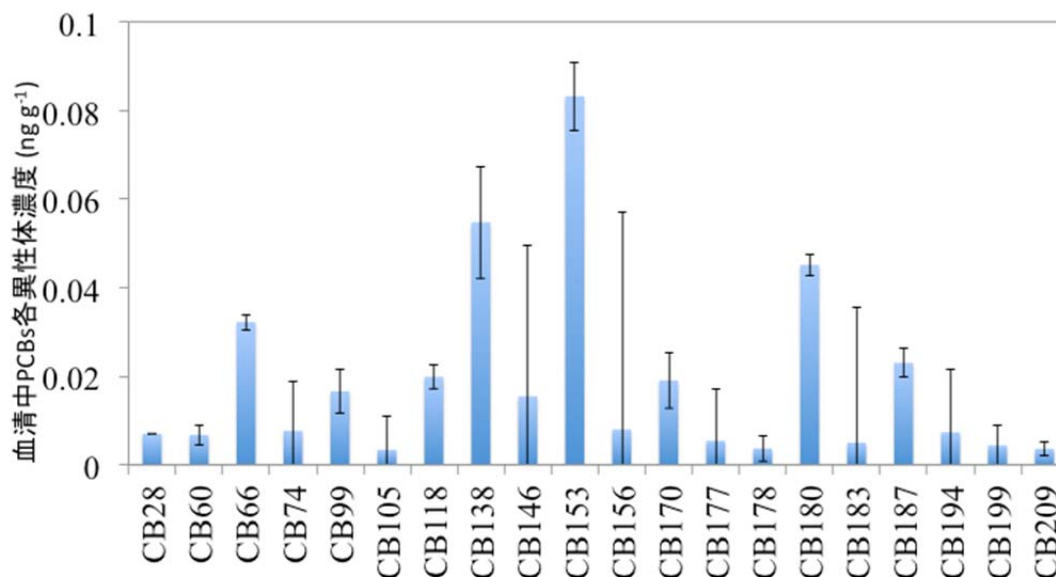
表(1)-4 年齢区分によるPCB濃度(N=313)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
20歳未満	1	0.12	NA
25歳未満	22	0.28	0.12
30歳未満	68	0.32	0.17
35歳未満	136	0.35	0.22
40歳未満	75	0.41	0.29
45歳未満	11	0.42	0.17

さらに、出産回数とPCB濃度との関係について、初産および経産により区分した平均値および標準偏差を表(1)-5に示す。なお、本データでは質問票への回答による出産回数情報を欠損する7名を除外した(N=306)。表から明らかとなお、初産のPCB濃度が経産婦のPCB濃度と比べ有意に高い傾向が認められた。

表(1)-5 出産回数とPCB濃度(N=306)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
初産	186	0.42	0.17
経産(2回以上)	120	0.32	0.29

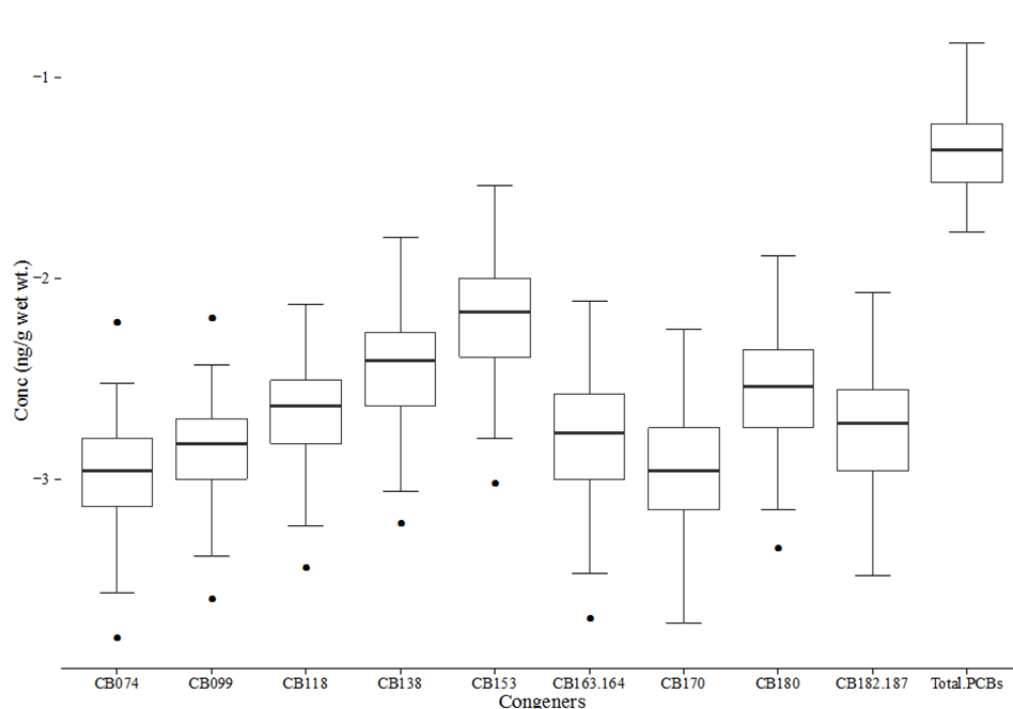


図(1)-2 母体血中PCBの異性体組成

続けて、図(1)-2に母体血中PCBの異性体組成を図示する。本図から、血中におけるPCBsの異性体組成はCB153が最も高い割合を占め、続けてCB138, CB180などの異性体が高濃度であることが明らかとなった。このような傾向は既存の日本人を対象とした研究でも報告されており、本研究においてもこの傾向が保持されていることが明らかになった。

### 3) 臍帯中総PCB濃度

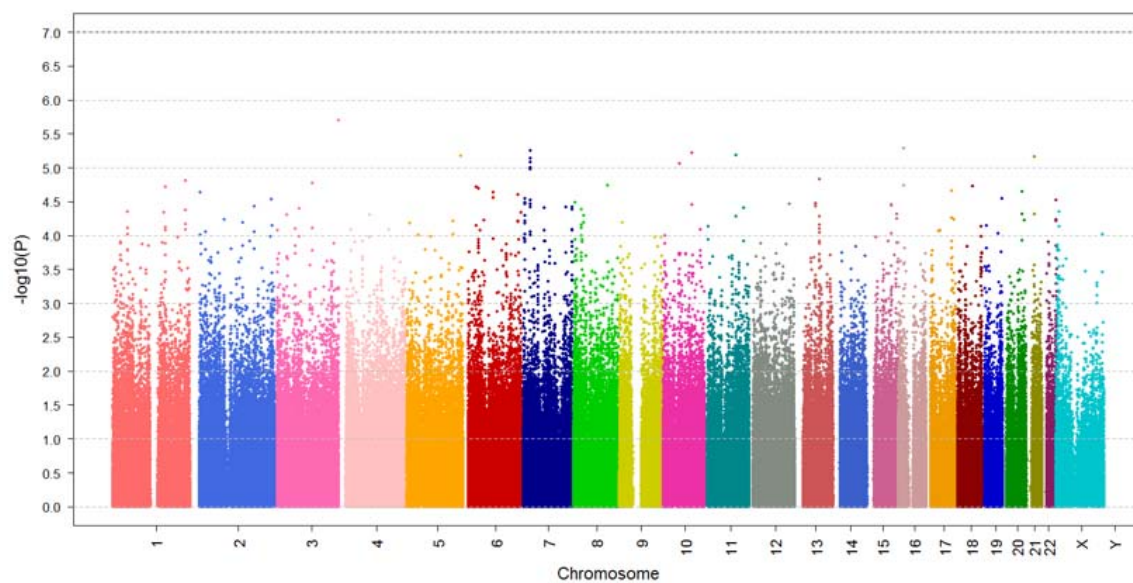
臍帯中の総PCB濃度の平均は $0.047 \pm 0.021$  ng/g-wetであった。また、対象者の中で最大値は0.150 ng/g-wet、最小値は検出限界未満の0.016 pg/g-wetであった。臍帯中総PCB濃度測定対象者のなかには、同族体・異性体によって検出限界値未満を示したデータも見られたが、臍帯中の総PCB濃度は、全参加者から得られた。主要異性体の濃度はCB153、138、180、118、182/187、163/164、99、170、74 (平均:  $0.075 \pm 0.0045$ 、 $0.0041 \pm 0.0025$ 、 $0.0034 \pm 0.0021$ 、 $0.0024 \pm 0.0013$ 、 $0.0021 \pm 0.0013$ 、 $0.0019 \pm 0.0012$ 、 $0.0017 \pm 0.0010$ 、 $0.0013 \pm 0.0009$ 、 $0.0013 \pm 0.0009$  ng g<sup>-1</sup> wet wt.) の順だった。PCB153、138、180、118が高い割合を示す傾向は既存研究<sup>10)</sup>における臍帯血中のPCBs組成と同様の傾向を示した。図(1)-3に結果を示す。



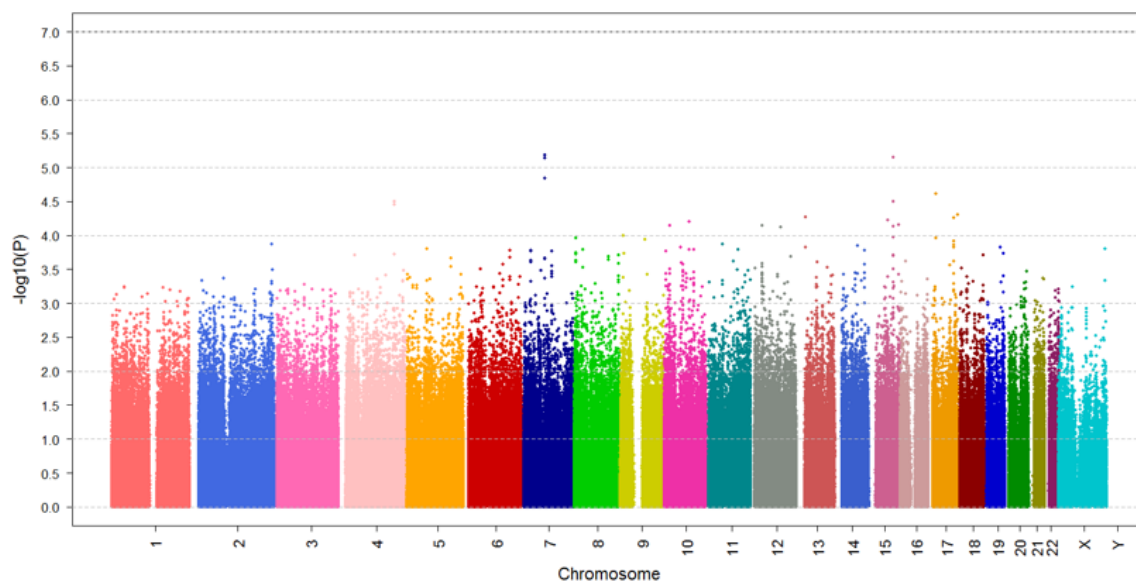
図(1)-3 臍帯血中の総PCBs及び主要異性体の分布

### 4) 母親のPCB濃度に関する遺伝子座位の探索

本研究で母親の唾液試料から抽出したゲノムDNA量は、平均で $85.3 \mu\text{g}$ であったが、その範囲は $1 \sim 390 \mu\text{g}$ と大きなばらつきが見られた。DNA収量が低い(DNA濃度が低い)、あるいはゲノムDNAの分解が進んでしまっているものが一部見られたが、それらを除き、GWAS解析のために全ゲノム遺伝子タイピングを実施した128例については、call rate(正しく遺伝子タイピングができた割合)が平均で0.998と解析に十分なクオリティであった。GWASのデータ解析にはPLINK ver.1.09を使用し、上記3条件を満たす、1,122,527のSNPsを解析対象とした。共変量として年齢、出産回数、BMIを用い、測定された妊娠中の血中PCB濃度を量的形質として回帰分析をおこない、各SNPのP値を計算した。解析データをManhattan plotにより図(1)-4(解析1)と図(1)-5(解析2)に示す。

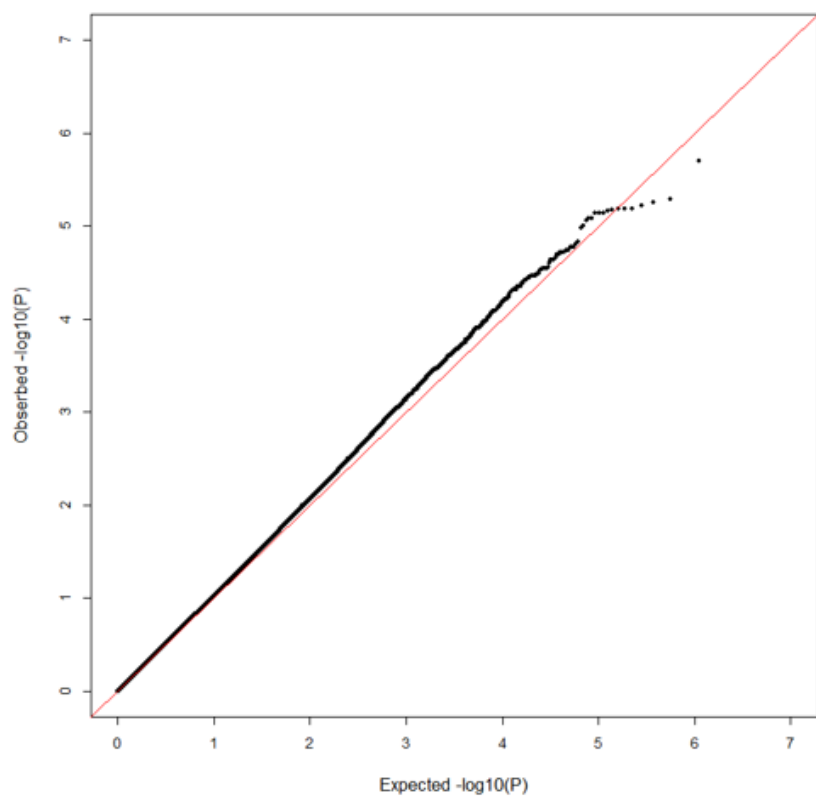


図(1)-4 GWAS重回帰分析－Manhattanプロット(解析1)

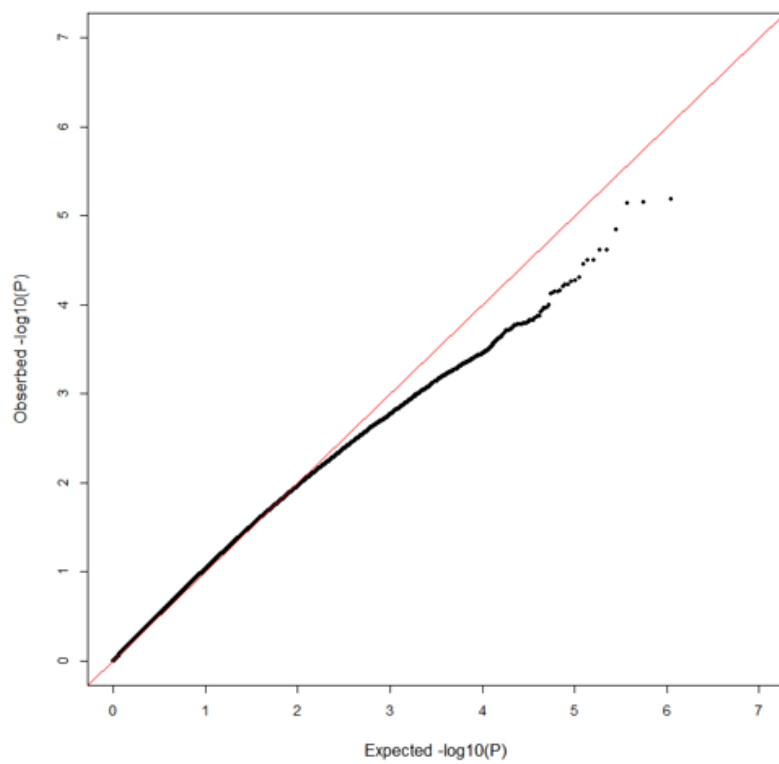


図(1)-5 GWASロジスティック回帰分析－Manhattanプロット(解析2)

Manhattan plotはGWASの結果を示すために通常使用されるものであり、横軸に染色体上の位置、縦軸に $-\log_{10}(P)$ をとり、各SNVについてプロットしたものである。GWAS解析において、一般的な有意水準は $5 \times 10^{-8}$ とされているが、本研究の結果では最も有意性を示すSNPでも $10^{-6}$ に届かない事がわかった。



図(1)-6 GWAS重回帰分析Q-Qプロット(解析1)



図(1)-7 GWASロジスティック回帰分析 Q-Qプロット(解析2)



図(1)-6と図(1)-7に解析1と解析2のQ-Qプロットを図示した。このプロットでは各SNVsが期待値どおりであれば直線上に載ると考えて良く、もし、血中PCB値に有意に関与するSNVがあれば、直線から上部に離れる事になる。両図ともほぼ直線上にプロットされており、P値が有意水準に近づくにつれ上に偏位する傾向はみられていない。

以上の結果によりPCB濃度に関与する遺伝子群において、単独で強い影響を及ぼす遺伝子は存在せず、relative riskが2に満たない弱い影響をもつ遺伝子群により遺伝要因が形成されている可能性が高いと判断できる。この判断が正しいとすると、関与する遺伝子を明らかにするには、できるだけ正確なPCB摂取量を推定できる集団で最低、数千サンプルを使った解析が必要である事になる。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

環境由来で曝露するPCBは、蓄積性が高く半減期の長い化学物質であり、体内でホルモン作用を示すことから、さまざまなヒトへの影響が懸念されている。近年の報告では、ヨーロッパの出生コホート調査結果の解析により胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少との間に関連性が示唆されている<sup>7)</sup>。そのため、欧米アジア各国で小児コホートが行われ、それらの調査でもPCBを含むPOPsによる影響究明が最優先で取り組まれている。

本研究では、妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度と出産時の臍帯PCB濃度を測定し、質問票の年齢、食事、出産回数等の回答から母児PCB曝露量推定決定に対する寄与因子の評価を行った。

研究初年度(平成25年度)および中間年度(平成26年度)の研究遂行により、第一に1) 209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法による母体血中総PCB濃度の検証によって、母体血中のPCB濃度(n=1490名)の平均は $0.28 \pm 0.16 \text{ ng/g-wet}$ であることと、2) 出産年齢の増加に伴いPCB濃度が微増とはいえ高まる傾向を示す結果が得られた。この結果から、PCB濃度推定には、① FFQと年齢、出産回数や、② 女性の経産歴・年齢、③ 食べ物では魚介類・卵の摂取量が重要な要因となることが明らかとなった。また、研究最終年度に行った主要な異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法での母体血中のPCB濃度(n=313名)は、 $0.35 \pm 0.23 \text{ ng/g-wet}$ という結果を導き、パックドカラム簡易法と近似する知見が得られた。これより、簡易型血中PCB濃度測定法をパックドカラム簡易法と比較すると、同程度の簡易さであるにもかかわらず、より高感度かつPCB個別異性体の測定が可能であるという利点が見られ、今後のコホート調査での分析に有益であるといえよう。

次に3) 臍帯中の総PCB濃度の検証によって、臍帯中の総PCB濃度(n=135名)の平均は $0.047 \pm 0.0021 \text{ ng/g-wet}$ であった。また、本研究の執行により得られたデータ(妊娠前期・臍帯)と本研究経費以外で得たデータ(出産時)との組合せが揃う114名の結果から、妊娠前期と出産時の母体血中総PCB濃度および、出産時の母体血と臍帯の総PCB濃度との間に相関する傾向がみられた。

一方、血中PCB濃度に関与する遺伝子群において、単独で強い影響を及ぼす遺伝子は本研究で見いだされなかった。

これらの研究成果は、すぐには結論を導くものではないが、測定を継続することで、母体中に蓄積するPCB濃度と胎児移行のPCB濃度に関するデータの信用性を高めるとともに、質問票による調査内容との寄与を追究することは、母児POPs曝露量の質問票(遺伝因子を含む)からの推定を導く可能性が見いだされる。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

「特に記載すべき事項はない。」

#### <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、農薬類であるP,P'-DDE; DichlorodiphenyldichloroethyleneあるいはHCHs(hexachlorocyclohexanes)やHCB(hexachlorobenzene)といった有機塩素系の残留性有機汚染物質(POPs;persistent organic pollutants)が残留する報告がある<sup>2),3),4),5),6),7)</sup>。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。すなわち、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。また前記する通り、209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法と主要な異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法との結果が近似する点からして、大規模な調査対象からなるコホート調査については、体内に蓄積する化学物質の総量に加え主要な異性体の動向を把握することも重要となり、簡易型血中PCB濃度測定法の汎用が期待される。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

#### <論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

### (2) 主な口頭発表(学会等)

1) C. Mori, A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, M. Watanabe, Y. Matsuno, H. Nakaoka and E. Todaka : 環境ホルモン学会第17回研究発表会、2014

“New approach of human maternal-fetal exposure assessment of persistent organic pollutants (POPs)”

2) C. Mori, K. Sakurai, H. Miyaso, A. Eguchi : 環境ホルモン学会 第18回研究発表会、2015

“Chiba study of Mothers and Children’s Health (C-MACH) : Cohort Study with omics analyses”

3) C. Mori, A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, M. Watanabe, Y. Matsuno, H. Nakaoka, E. Todaka : Endocrine disruptors effects on wildlife and human health, International workshop 2016, Paris, France, 2016

“Development of exposure assessment and preventive intervention of blood PCB level using Japanese birth cohort data”

## 7. 研究者略歴

課題代表者: 森 千里

旭川医科大学医学部卒業、医学博士、現在 千葉大学予防医学センター センター長

研究分担者

1) 羽田 明

熊本大学医学部卒業、医学博士、現在 千葉大学大学院医学研究院 教授

2) 戸高恵美子

千葉大学大学院医学研究院 博士課程修了、医学博士、現在: 千葉大学予防医学センター 教授

3) 花里真道

千葉大学大学院工学研究科 博士課程修了、工学博士、現在: 千葉大学予防医学センター 准教授

4) 松野義晴

千葉大学大学院医学研究院 博士課程修了、医学博士、現在: 千葉大学予防医学センター 准教授

5) 中岡宏子

千葉大学大学院医学研究院 博士課程修了、医学博士、現在: 千葉大学予防医学センター 助教

**5-1305 母児POPs曝露量の質問票及び遺伝要因からの推定に関する研究****(1) エコチル調査における母親・胎児PCB曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児のPOPs曝露量推定方法の開発に関する研究**

千葉大学

予防医学センター 森 千里 (研究代表者)

羽田 明

戸高恵美子

花里真道

松野義晴

中岡宏子

平成25(開始年度)~27年度累計予算額：105,361千円 (うち平成27年度：32,908千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]**

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、半減期は数年から数十年ときわめて長い。本研究では、母親の質問票から母児のPOPs曝露量の推測を試みるものである。本研究により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濃度の関係がわかれば、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。特に、本研究では妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度を測定し、質問票の年齢、食事、出産回数等の回答から母児PCB曝露量推定決定に対する寄与因子の評価を行い、血中PCB推定モデルを構築することを目的とした。なお、母体血中総PCB濃度の分析には、209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法と、主要異性体を分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法を用い、それぞれの結果について検討した。

第一に、パックドカラム簡易法により、母体血中のPCB濃度 (n=1490名) の平均は $0.28 \pm 0.16$  ng/g-wetであることと、2) 出産年齢の増加に伴いPCB濃度が微増とはいえ高まる傾向を示す結果が得られた。また、PCB濃度推定には、1) FFQと年齢、出産回数や、2) 女性の経産歴・年齢、3) 食べ物では魚介類・卵の摂取量が重要な要因となることが明らかとなった、また、主要な異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法での母体血中のPCB濃度 (n=313名) は $0.35 \pm 0.23$  ng/g-wetという結果を導き、パックドカラム簡易法と近似する知見が得られた。簡易型血中PCB濃度測定法による測定の結果、既存手法における測定と同様に、CB153が血中で最も高い割合を占め、続けてCB138、180が検出される傾向が確認された。一方、血中PCB濃度に関与する遺伝子座位の探索を行ったが、本研究の手法では強い関与のある遺伝子座位を検出できなかった。結論として、簡易型血中PCB濃度測定法をパックドカラム簡易法と比較すると、同程度の簡易さであるにもかかわらず、より高感度かつPCB個別異性体の測定が可能であるという利点が見られ、今後のコホート調査での分析に有益であるといえよう。

## [キーワード]

ポリ塩化ビフェニル（PCB）、全ゲノム関連解析（GWAS）、質問票、曝露量推定モデル、寄与因子評価

### 1. はじめに

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（Dioxins）、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。そのため、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<sup>1)</sup>。

近年、ヒト胎児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（P,P'-DDE；Dichlorodiphenyldichloroethylene）あるいはヘキサクロロシクロヘキサン（HCHS；hexachlorocyclohexanes）やヘキサクロロベンゼン（HCB；hexachlorobenzene）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<sup>2),3),4),5),6),7)</sup>。特にGovartsらの報告によれば、ヨーロッパの出生コホート調査結果の解析により胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少との間に関連性が示唆されている<sup>7)</sup>。近年の出生体重減少、小児アレルギーや精神神経発達異常の増加などを懸念し、原因解明および対策を目的として欧米およびアジア各国で小児コホート調査が行われているが、それらの調査でもPOPsによる影響究明が最優先の課題となっている。本国でも、2011年に開始した環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」により、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へ及ぼす影響を究明する取り組みが始まり、我々も全国の15ユニットのひとつとして、千葉県内の調査に参画している。

本研究では、母親の質問票から母児のPOPs曝露量の推測を試みるものである。この背景には、各国で実施されている、あるいは準備されているコホート調査の結果を連結して国際的に評価することに大きな期待が寄せられているが、いずれの国でも大規模コホート研究を進める上でのコストが課題とされ、最少のコストで最大の成果を得る手法の開発が必要である。また、今回、われわれが試みる「母親の質問票から母児のPOPs曝露量を推測する」事が可能となり、欧米等の出生コホート調査での質問票と比較検討できればデータの統合解析への道が開かれる。さらに血中PCB濃度に関与する遺伝子群が同定できれば、血中PCB濃度に関与するパスウェイの同定につながり、健康影響調査結果、化学物質曝露状況などの環境要因に加えて遺伝要因との相互作用の解明など、国際的な研究として格段に発展させることが期待できる。

本研究により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濃度の関係がわかれば、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。

## 2. 研究開発目的

環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」では、「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与えているのではないか？」という中心仮説を明らかにしようとしているが、化学物質曝露調査には膨大なコストをかけず成果を上げる方法が求められる。本研究は母親の質問票から母児POPs曝露量の推定モデルを構築する。さらにPOPs蓄積量の遺伝的要因による違いを調べ、遺伝要因からのPOPs高曝露群検出方法の開発を行う。母親の質問票や遺伝要因から母児POPs曝露量推定が可能となればエコチル調査の成功に大きく貢献できる。我々の先行研究の結果によれば、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であり、パックドカラムを用いた測定では、低予算かつ1mlの血中から総PCBが測定できる。しかも、母親の血中総PCB濃度がわかると、母親のPCB以外のPOPs濃度と同時に、胎児のPOPs濃度も把握できる。

そこで、本研究では妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度と出産時の臍帯中PCB濃度（GCMS法）を測定し、質問票の年齢、食事、出産回数等の回答から母児PCB曝露量推定決定に対する寄与因子の評価を行い、血中PCB推定モデルを構築することを目的とした（「1 & 2）母体血中総PCB濃度と3）臍帯中PCB濃度）。なお、母体血中総PCB濃度の分析には、209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法（「1）」と、主要異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法（「2）」を用い、それぞれの結果について検討する。すなわち、パックドカラム簡易法により、1490検体（平成25年度800+平成26年度690）からなる妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度を分析し、年齢、BMI、出産回数と食生活習慣に対するPCB濃度について検討した。簡易型血中PCB濃度測定法は、313検体（平成27年度）のPCB濃度分析結果について、これまでの報告と照らし合わせ、さらに本測定法と高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-HRMS）による測定値との相関についても検証した。特に、簡易型血中PCB濃度測定法の確立により、本研究背景に記す「化学物質曝露調査には膨大なコストをかけず成果を上げる方法」を叶えるとともに、本法のさらなる利点である主な異性体の濃度動向についても把握できることにつながる可能性を持つ。新規測定手法による313検体血清の測定の結果、既存手法における測定と同様に、CB153が血中で最も高い割合を占め、続けてCB138、180が検出される傾向が確認された。

また、全ゲノム関連解析（GWAS：Genome-wide association study）による母親の血中PCB濃度に関与する遺伝子を同定するため、160検体（平成25年度124+平成26年度36）のサンプルから分析した（「4）母親のPCB濃度に関与する遺伝子座位の探索」）。

### 3. 研究開発方法

#### (1) エコチル調査における母親・胎児 PCB 曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児の POPs 曝露量推定方法の開発に関する研究：

本研究では、妊婦の妊娠中の血中総 PCB 濃度についてパックドカラム簡易法をエスアールエル株式会社、簡易型母体血中総 PCB 濃度を千葉大学予防医学センター（ISO/IEC17025 試験所認定：2015 年 10 月 21 日）、臍帯中 PCB 濃度を島津テクノリサーチ株式会社にそれぞれ分析依頼した。

#### 1) パックドカラム簡易法による母体血中総 PCB 濃度

##### a 対象者

エコチル調査に参加した妊婦のうち、千葉ユニットセンターでリクルートされた 1490 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。参加者の特性を表(1)-1 に示す。なお、本研究に用いた血液試料は、エコチル全体調査に提供された試料のうち、生化学分析を終えた血液（血清）の返却試料を用いた。

表(1)-1 参加者特性 (N=1490)

	平均	標準偏差	最大	最小
登録時年齢（歳）	30.96	4.97	46	16
身長（cm）	158.16	9.06	181	140
体重（kg）	53.52	5.33	106	36
BMI	21.38	3.32	41.14	14.06

##### b ヒト血中総 PCBs 濃度の測定条件

総 PCBs 濃度の測定条件を以下に記す。

血清試料 1 g 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。

##### i 試料

ヒト血清：冷凍状態で受領し、測定までの間、冷凍（-20℃）にて保存した。

##### ii 標準物質および試薬

表(1)-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
1	カネクロール KC-300	_____	ジールサイエンス
2	カネクロール KC-400	_____	ジールサイエンス
3	カネクロール KC-500	_____	ジールサイエンス
4	カネクロール KC-600	_____	ジールサイエンス

5	2,2',4,4',5,6'ヘキサブ`ロモビ`フェニル (IUPAC#154)	_____	WELLINGTON
6	n-ヘキサン	ダ`イキソ類分析用	和光純薬
7	水酸化カリウム	特級	関東化学
8	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
9	蒸留水	HPLC 用	関東化学
10	無水硫酸ナトリウム	残留農薬試験用・PCB 試験用	関東化学
11	フロリジル	_____	ジ`エルサイエンス
12	Silicone OV-1(2%) 3.0m×2.6mm	_____	ジ`エルサイエンス

## iii 分析機器

- ① ガスクロマトグラフ：GC-17A、島津製作所
- ② 電子捕獲型検出器（ECD）：ECD-17、島津製作所
- ③ オートインジェクター：AOC-20I、島津製作所

## iv 分析条件

- ① カラム：Packed Column 3.0m×2.6mmI.D.  
silicone OV-1(2%) Chromosorb W 80/100 AW-DMCS、ジ`エルサイエンス
- ② カラム温度：210℃
- ③ 注入量：5μL
- ④ 注入口温度：250℃
- ⑤ 検出器温度：310℃
- ⑥ キャリアガス：高純度窒素ガス

## v 濃度算出方法

PCB 標準溶液は、10 ng/mL カネクロール混合溶液（KC300：KC400：KC500：KC600 = 1：1：1：1）1 mL に内標として 2,2',4,4',5,6'ヘキサブ`ロモビ`フェニル（IUPAC #154）1 ng を添加したものをを使用した。また、試料にも測定前に内標 1 ng を添加した。

PCB 標準溶液をパックドカラム（OV-1）で分析して得られるピークのうち、DDE 以降に検出される主たる 8 本のピーク（ピーク番号：15、16、18、19、20、21、22、23 の 8 本のピーク）と内標とのピーク高さ比と各ピークの CB<sub>0</sub>(%)より、試料中の総 PCB 濃度を計算式にて算出した。

## 2) 簡易型母体血中総 PCB 濃度

### a 対象者

エコチル調査に参加した妊婦のうち、千葉ユニットセンターでリクルートされた 313 名の妊娠前期の母体血中 PCB 濃度について簡易型血中 PCB 濃度測定法を用い測定した。参加者の特性を表(1)-3 に示す。なお、本研究に用いた血液試料は、エコチル全体調査に提供された試料のうち、生化学分析を終えた血液（血清）の返却試料を用いた。

表(1)-3 参加者特性 (N=313)

	平均	標準偏差	最大	最小
登録時年齢（歳）	31.65	4.66	43	17
身長（cm）	158.65	5.64	175	140
体重（kg）	53.77	5.30	95	35

### b ヒト血中総 PCBs 濃度の測定条件

総 PCBs 濃度の測定条件を以下に記す。血清試料 0.5 g をけん化して有機溶媒に抽出し、硫酸シリカゲルカラムにて精製した後、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）にて測定した。

#### i 試料

ヒト血清：冷凍状態で受領し、測定までの間、冷凍（-20℃）にて保存した。

#### ii 標準物質および試薬

表(1)-4 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
PCB11		WELLINGTON
PCB28		WELLINGTON
PCB60		WELLINGTON
PCB66		WELLINGTON
PCB74		WELLINGTON
PCB87		WELLINGTON
PCB99		WELLINGTON
PCB105		WELLINGTON
PCB118		WELLINGTON
PCB126		WELLINGTON
PCB138		WELLINGTON
PCB146		WELLINGTON
PCB153		WELLINGTON



PCB156		WELLINGTON
PCB170		WELLINGTON
PCB177		WELLINGTON
PCB178		WELLINGTON
PCB180		WELLINGTON
PCB183		WELLINGTON
PCB187		WELLINGTON
PCB194		WELLINGTON
PCB199		WELLINGTON
PCB201		WELLINGTON
PCB206		WELLINGTON
PCB209		WELLINGTON
PCB30		WELLINGTON
PCB55		WELLINGTON
PCB207		WELLINGTON
PBB154		Accustandrd
n-ヘキサン	ダイキシン類分析用	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

## iii 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

## iv 分析条件

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

## v 濃度算出方法

## ① 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。

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

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。

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

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

## ② 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) 臍帯中 PCB 濃度

#### a 対象者

本学の追加調査に同意を得た 145 名の妊娠出産時の臍帯中 PCB 濃度について GCMS 法を用い測定した。参加者の特性を表(1)-5 および表(1)-6 に示す。

表(1)-5 参加者特性 (N=135)

	平均	標準偏差	最大	最小
登録時年齢 (歳)	29.73	4.83	41	19
身長 (cm)	157.82	9.15	172	145
体重 (kg)	54.31	5.11	87	38
BMI	21.76	3.27	33.65	16.38

表(1)-6 参加者特性 (N=10)

	平均	標準偏差	最大	最小
登録時年齢 (歳)	29.00	4.52	37	22
身長 (cm)	160.10	4.75	167	151
体重 (kg)	55.25	8.48	70	45

#### b ヒト臍帯中 PCBs 濃度の測定条件

総 PCBs 濃度の測定条件を以下に記す。臍帯試料 5g 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ィー質量分析計 (GC-MS) を用いて SIM(Selected Ion Monitoring)法により分析を行った。

##### i 試料

ヒト臍帯：冷凍状態で受領し、測定までの間、冷凍 (-20℃) にて保存した。

##### ii 分析条件

分析機器名 Waters/MICROMASS 社製 ガスクロマトグラフィー質量分析計

AutoSpec Ultima または NTS GC 部 Agilent Technologies HP-6890

GC 部 操作条件

分離カラム HT8-PCB(SGE) fused silica capillary column 60m×0.25mm(id)

カラム温度 120℃ → 180℃ → 260℃ → 300℃

(0min) (20℃/min) (0min) (2℃/min) (0min) (5℃/min) (4min)

オンカラム注入

表(1)-7 MS 部 操作条件

MS 部 操作条件	
イオン化方法	EI
イオン化電圧	35V
イオン化電流	500μA
加速電圧	8 k V
インターフェース温度	300 ° C
イオン源温度	300 ° C
分解能	10,000 以上

## 設定質量数

	$M^+$	$(M+2)^+$	$(M+4)^+$	$(M+6)^+$
MCBs	188.0393	190.0363		
DiCBs	222.0003	223.9975		
TrCBs	255.9613	257.9585		
TeCBs	289.9224	291.9195		
PeCBs		325.8805	327.8776	
HxCBs		359.8415	361.8386	
HpCBs		393.8025	395.7996	
OCBs		427.7636	429.7606	
NCBs		461.7246	463.7217	
DeCB			497.6827	499.6798
$^{13}\text{C}_{12}$ -MCB	200.0795	202.0766		
$^{13}\text{C}_{12}$ -DiCBs	234.0406	236.0376		
$^{13}\text{C}_{12}$ -TrCBs	268.0016	269.9987		
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeCBs	301.9626	303.9597		
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCBs		337.9207	339.9178	
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB s		371.8817	373.8788	
$^{13}\text{C}_{12}$ -HpCB s		405.8428	407.8398	
$^{13}\text{C}_{12}$ -OCBs		439.8038	441.8008	
$^{13}\text{C}_{12}$ -NCB		473.7648	475.7619	
$^{13}\text{C}_{12}$ -DeCB			509.7229	511.7199

## iii 同定及び定量

PCBs のイオン強度の強い  $M^+$ 、 $(M+2)^+$ 、 $(M+4)^+$ 、 $(M+6)^+$  のイオンの内、塩化物ごとに測定対象物質と  $^{13}\text{C}_{12}$ -内標準について各々2つをモニターし、PCB 全異性体 (209 種) 混合溶液から判断し、すべての PCBs 異性体の溶出する位置に相当するピークで、各2つのイオンの面積比率が標準品とほぼ同じで、同位体存在比から推定されるイオン強度比に対して $\pm 15\%$ 以内のものを PCBs として同定した。同定した PCBs を内標準物質の添加量を基準に相対感度を用いて、内標準法により S/N 3 以上のピークについてピーク面積で定量した。

定量した PCB 異性体濃度を塩素数ごとに足し合わせたものを同族体濃度 (MCBs ~ DeCBs) とし、同族体濃度を足し合わせたものを PCBs の合計濃度 (Total PCBs) とした。それぞれの計算過程では数字の丸めを行わず、報告結果において数値の丸めを行っている。そのため報告結果において、表示上の数値が一致しないことがある。同定、定量に用いた標準物質 (Wellington Laboratories 製; 関東化学株式会社調製品) を表(1)-8 に示す。

表(1)-8 同定、定量に用いた標準品

標準物質		内標準物質	
IUPAC No.		IUPAC No.	
# 1	2-MCB	# 3	$^{13}\text{C}_{12}$ -4-MCB
# 3	4-MCB		
# 10	2,6-DiCB	# 9	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,5-DiCB(シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 4	2,2'-DiCB	# 8**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,4'-DiCB
# 8**	2,4'-DiCB		
# 11	3,3'-DiCB		
# 12	3,4-DiCB		
# 15	4,4'-DiCB		
# 19	2,2',6-TrCB	# 19	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',6-TrCB(シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 18	2,2',5-TrCB		
# 31	2,4',5-TrCB	# 31	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,4',5-TrCB
# 28**	2,4,4'-TrCB	# 28**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,4,4'-TrCB
# 33	2',3,4-TrCB		
# 38	3,4,5-TrCB		
# 35	3,3',4-TrCB		
# 37	3,4,4'-TrCB		
# 54	2,2',6,6'-TeCB	# 52**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',5,5'-TeCB
# 52**	2,2',5,5'-TeCB		
# 49	2,2',4,5'-TeCB		
# 44	2,2',3,5'-TeCB		
# 57	2,3,3',5'-TeCB		
# 74	2,4,4',5'-TeCB	# 70	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4',5'-TeCB (シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 70	2,3',4',5'-TeCB	# 79	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,5'-TeCB(サンフ <sup>®</sup> リンク <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)*
# 66	2,3',4,4'-TeCB		
# 79	3,3',4,5'-TeCB	# 81	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,4,4',5'-TeCB★
# 78	3,3',4,5'-TeCB	# 77	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4'-TeCB★
# 81	3,4,4',5'-TeCB★		
# 77	3,3',4,4'-TeCB★		
# 104	2,2',4,6,6'-PeCB	# 101**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,5,5'-PeCB
# 95	2,2',3,5',6'-PeCB		
# 101**	2,2',4,5,5'-PeCB	# 111	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',5,5'-PeCB (シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 99	2,2',4,4',5'-PeCB	# 105	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4'-PeCB★★
# 87	2,2',3,4,5'-PeCB	# 114	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,4',5'-PeCB★★
# 110	2,3,3',4',6'-PeCB	# 118**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5'-PeCB★★
# 105	2,3,3',4,4'-PeCB★★	# 123	$^{13}\text{C}_{12}$ -2',3,4,4',5'-PeCB★★
# 114	2,3,4,4',5'-PeCB★★	# 126	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5'-PeCB★
# 118**	2,3',4,4',5'-PeCB★★		
# 123	2',3,4,4',5'-PeCB★★	# 153**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4',5,5'-HxCB
# 126	3,3',4,4',5'-PeCB★	# 138**	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',3,4,4',5'-HxCB (シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 155	2,2',4,4',6,6'-HxCB		
# 149	2,2',3,4',5',6'-HxCB	# 156	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5'-HxCB★★
# 153**	2,2',4,4',5,5'-HxCB	# 157	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5'-HxCB★★
# 138**	2,2',3,4,4',5'-HxCB	# 167	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5,5'-HxCB★★
# 162	2,3,3',4',5,5'-HxCB	# 169	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5,5'-HxCB★
# 156	2,3,3',4,4',5'-HxCB★★		
# 157	2,3,3',4,4',5'-HxCB★★	# 178	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',3,3',5,5',6'-HpCB (シリジ <sup>®</sup> ス <sup>®</sup> イク)
# 167	2,3',4,4',5,5'-HxCB★★		
# 169	3,3',4,4',5,5'-HxCB★		
# 188	2,2',3,4',5,6,6'-HpCB		

# 187**	2,2',3,4',5,5',6-HpCB		
# 174**	2,2',3,3',4,5,6'-HpCB		
# 180**	2,2',3,4,4',5,5'-HpCB★★★	# 180**	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,4,4',5,5'-HpCB★★★
# 170	2,2',3,3',4,4',5-HpCB★★★	# 170	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5-HpCB★★★
# 189	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB★★	# 189	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB★★
# 202	2,2',3,3',5,5',6,6'-OCB		
# 200	2,2',3,3',4,5,6,6'-OCB		
# 203	2,2',3,4,4',5,5',6-OCB		
# 195	2,2',3,3',4,4',5,6-OCB		
# 194	2,2',3,3',4,4',5,5'-OCB	# 194	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5,5'-OCB
# 205	2,3,3',4,4',5,5',6-OCB	# 205	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,3',4,4',5,5',6-OCB (シリジンスパイク)
# 208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NCB		
# 206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-NCB	# 206	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5,5',6-NCB
# 209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DeCB	# 209	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DeCB

(★: non-ortho-PCBs   ★★: mono-ortho-PCBs   ★★★: di-ortho-PCBs    \*\*:major-PCBs)

\* <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-3,3',4,5'-TeCB (#79)は、ガス・大気採取時のサンプリングスパイクとして使用するため、GC-MS 用の標準溶液に含まれているが、今回の分析では、サンプリングスパイクは不要なので、<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-3,3',4,5'-TeCB (#79)を試料に添加していない。

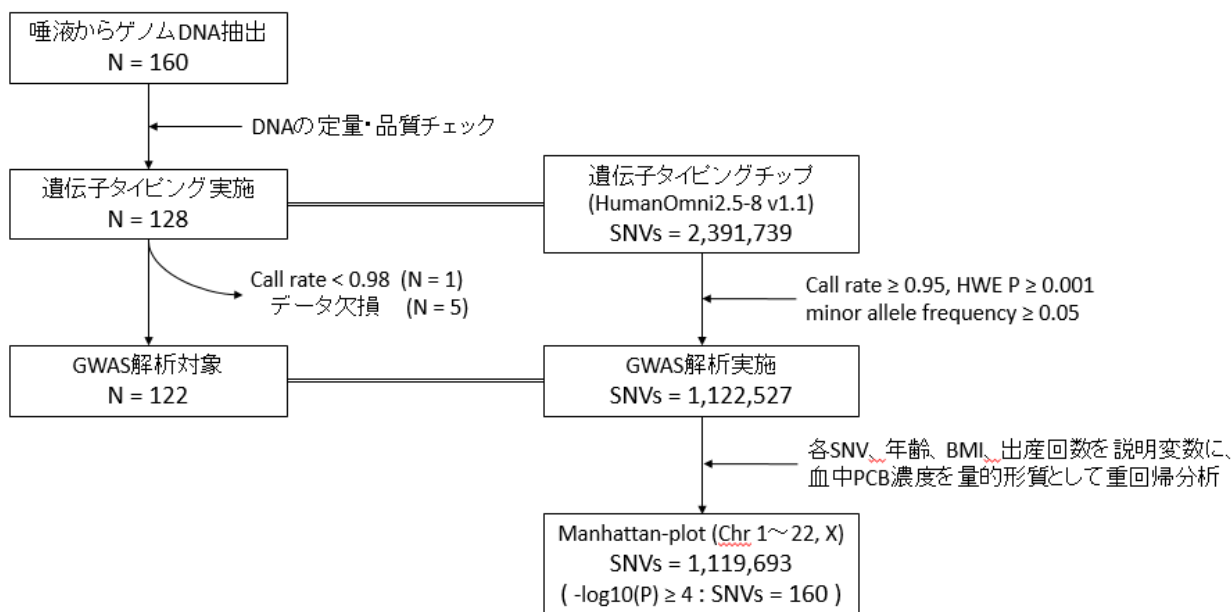
#### 4) 母親の PCB 濃度に関与する遺伝子座位の探索

##### a 対象者

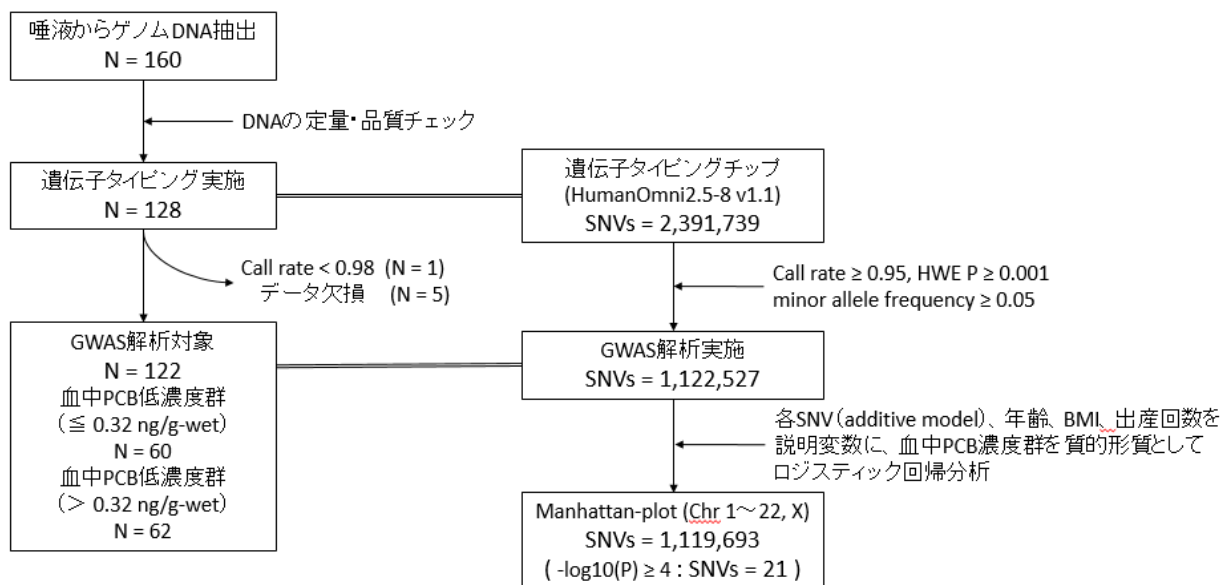
エコチル参加者で追加調査に同意を得た母親のうち、妊娠中の血中 PCB 濃度が得られている 160 名を対象とした。GWAS 解析のフローと各段階でのデータ数を図(1)-1 に示し、順を追って説明を記載する。

##### i 試料

DNA 抽出の生体試料として母親の唾液 2ml を使用した。唾液採取には DNA Genotek 社 Oragene・DNA (OG-500)を用いた。採取した唾液溶液から Qiagen 社 Genra Puregene DNA Purification Kit を使用し、ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA 濃度の測定には、二本鎖 DNA を正確に定量できる Lifetechnologies 社 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit を用いた。GWAS 解析では DNA の質と量が大きく結果に影響するため、前者を電気泳動により、高分子量が保たれている事で、後者を二本鎖 DNA の測定で確認し、遺伝子タイピング対象とした。本研究では DNA 抽出の生体試料として母親の唾液を使用した。血液などからの抽出と異なり、抽出した DNA の量と質における個体差は大きい。図(1)-1 のフローに示すように DNA 抽出後、上記の定量と質の評価をおこない、両面からの GWAS を目的とした遺伝子タイピング解析への利用可能性により、順位付けを行った。また、GWAS を目的とした遺伝子タイピング数はキットの構成上、8 の倍数で行うことが無駄を省く上で必要であるため、最終的にリストの上位から 128 検体の遺伝子タイピングを実施した。その結果、下位グループから、安定したタイピングデータが得られなかったもの 1 検体、調整因子の年齢、出産回数、BMI に関するデータが欠損していた 5 検体を除いた、合計 122 検体の遺伝子タイピングデータを用いて GWAS を実施した (図(1)-1)。GWAS 解析は、測定された妊娠中の血中 PCB 濃度を量的形質として重回帰分析をおこなった場合に引き続き、PCB 値の中央値で高値群と低置群に分け、両者を質的形質としてロジスティック回帰分析をおこなった。前者の解析フローを図(1)-1 に、後者を図(1)-2 に記載した。



図(1)-1 GWAS解析のフロー①

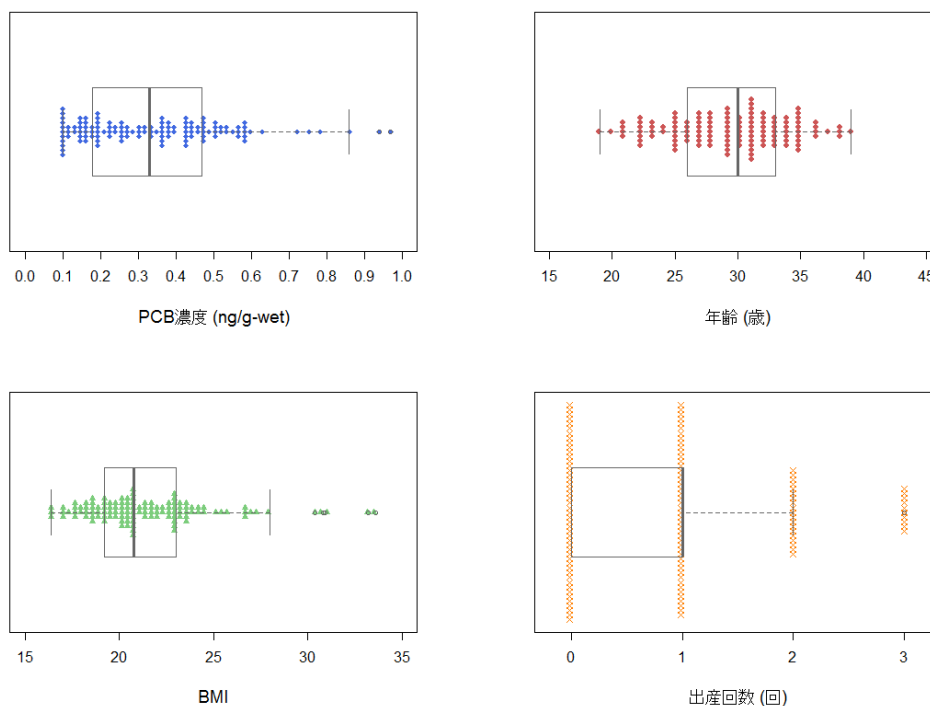


図(1)-2 GWAS解析のフロー②

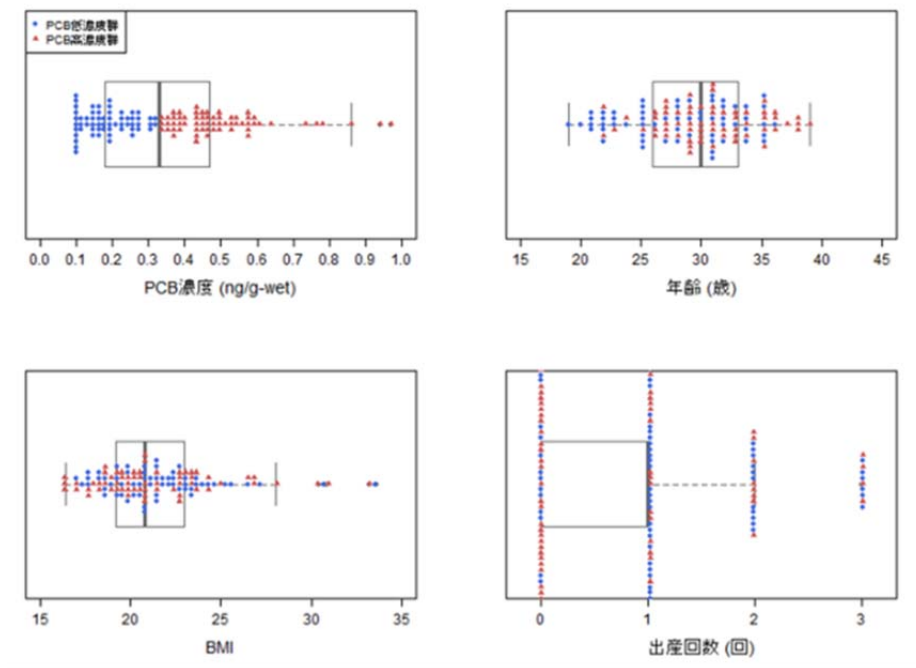


## ii GWAS 解析

遺伝子タイピングには、全ゲノムを網羅する約 240 万個(2,391,739 個)の SNVs (Single Nucleotide Variants)がタイピングできる Illumina 社の遺伝子タイピングアレイ HumanOmni2.5-8 v1.1 DNA Analysis Kit を用いた。この DNA チップは、主に欧米人のデータを考慮して作成してあるため、日本人では存在しない SNVs も多くスポットされている。通常、生データを以下の 3 つの指標で評価し、合格したデータを実際の GWAS 解析に使用する。一つ目は、タイピングデータの安定性から 95%以上の確率で明確なデータが得られるもの(Call rate $\geq$ 0.95 と記載)、二つ目はハーディー・ワインバーグ平衡から大きくかい離しないもの (HWE  $p \geq 0.001$ )、三つ目はマイナーアレル頻度が 5%以上あること(MAF $\geq$ 0.05)である。その結果、実際に解析対象となった SNVs は 1,122,527 個であった(図(1)-1)。タイピングデータは Illumina 社のマイクロアレイスキャナー iScan システムを使用した。解析は 2 種類の方法で実施した (解析 1 および解析 2)。解析 1 は測定された妊娠中の血中 PCB 濃度を量的形質として、コンピュータプログラム PLINK ver.1.09 を用いて関連解析を行った。関連解析には線形回帰モデルを使用し、共変量として年齢、出産回数、BMI を用いた。すなわち、年齢、出産回数、BMI の影響を調整した上で、PCB 濃度に関与する SNVs の有無を検討したことになる。各調整因子の分布を図(1)-3 に示す。解析 2 では、PCB データの中央値で高値群と低値群の 2 群間に分け、両群を質的形質としてロジスティック回帰分析をおこなった。図(1)-4 に PCB 低濃度群を青いドットで、高濃度群を赤いドットで示した。両群の年齢、BMI 値、出産回数の分布も示した。



図(1)-3 GWAS 解析対象サンプル (N=122) の  
血中PCB濃度、年齢、BMI、出産回数の分布 (解析 1)



図(1)-4 GWAS 解析対象サンプル (N=122) の血中 PCB 濃度、年齢、BMI、出産回数の分布  
(解析 2 : PCB 低濃度群 (青)、PCB 高濃度群 (赤) )

#### 4. 結果及び考察

(1) エコチル調査における母親・胎児PCB曝露量測定と母親の質問票からの母親及び胎児のPOPs曝露量推定方法の開発に関する研究：

##### 1) パックドカラム簡易法による母体血中総PCB濃度

パックドカラム簡易法によるエコチル調査に参加する妊婦1490名の妊娠前期の母体血中PCB濃度の結果を表(1)-9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)-9 母体血中総PCB濃度 (N=1490)

	平均値	標準偏差	最大	最小
PCB濃度(ng/g-wet)	0.28	0.16	1.5	0.1

表から明らかなおお、本研究で測定した対象者1490名の母体血中のPCB濃度の平均は0.28 ± 0.16 ng/g-wetであった。また、対象者の中で最大値は1.5 ng/g-wet、最小値は検出限界未満の0.10 ng/g-wetであった。本研究結果のPCB濃度量は、母体血中PCB類濃度範囲が0.22-5.70 ng/g-wet（報告書内記載量；220～5700 pg/g-wetを換算）であったとする報告<sup>8)</sup>と比べれば、多少低い範囲にあると解釈できる。しかしながら、これらの濃度範囲の差が何に起因するかについては現段階では分からないため、結果を記すに留める。また、本研究を通して、検出限界未満の結果を示す参加者は見られたものの、多くの測定対象者の生体試料からPCBが検出されたことは、これまでの先行研究と同様の結果といえよう<sup>9)</sup>。

次に、対象者の年齢、BMIと出産回数とPCB濃度との関係について、それぞれ表(1)-10から表(1)-12に示す。年齢、BMIおよび出産回数について、参加者から得た質問票による回答から得た。

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(1)-10に示す。なお、本データでは出産年齢情報を欠落する5名を除外した（N=1485）。

20歳未満（N=13）および25歳未満（N=129）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、濃度が高まる傾向が伺えた。この傾向は、我々の先行研究結果による加齢とともにPCB濃度の蓄積量も増加する傾向（結果）を示唆するといえよう（図(1)-5も参照されたい）<sup>9)</sup>。

表(1)-10 出産年齢区分によるPCB濃度 (N=1485)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
20歳未満	13	0.16	0.07
25歳未満	129	0.181767	0.111874
30歳未満	454	0.237445	0.113626
35歳未満	511	0.295245	0.152741
40歳未満	327	0.340795	0.182084
45歳未満	50	0.439	0.257874
45歳以上	1	0.37	NA

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(1)-11 に示す。なお、本データでは質問票への回答による BMI 情報を欠損する 72 名を除外した (N=1418)。

表(1)-11 BMIとPCB濃度 (N=1418)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
BMI >25	164	0.29	0.17
BMI <25	1254	0.28	0.16

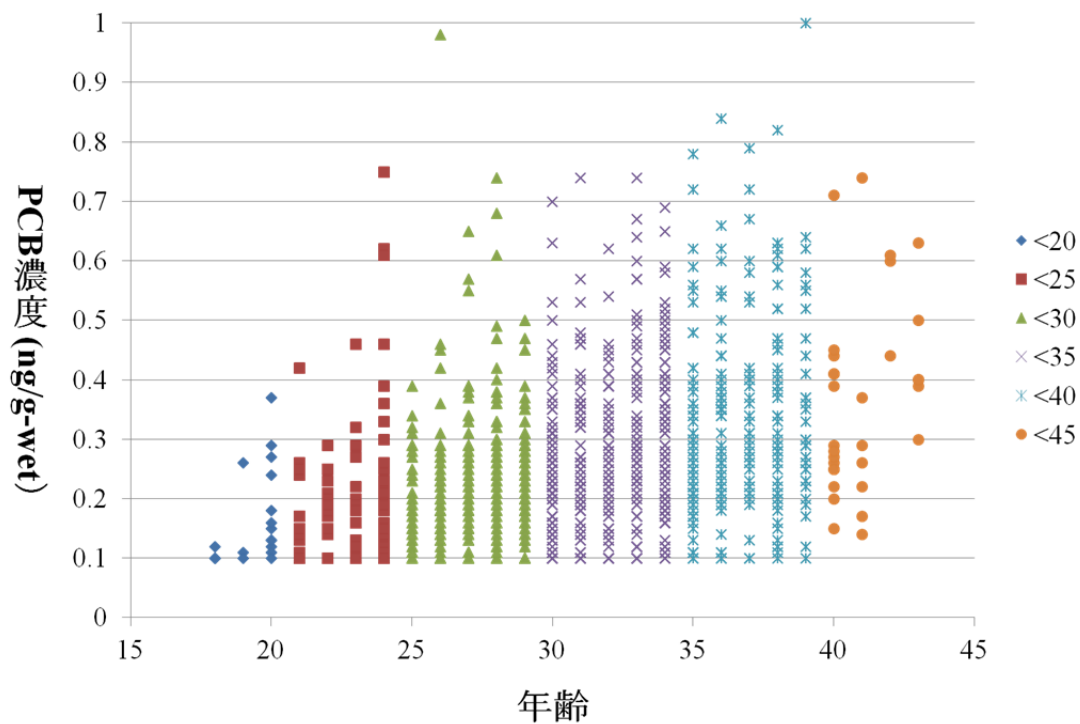
BMIについては、肥満傾向の一般的な尺度となるBMI25を用い大別した。その結果、BMI>25およびBMI<25両群ともにPCB濃度が近似し、明らかな違い認められなかった。現段階において、BMIとPCBの関係については、明確な知見を得られなかったが、前記する加齢にともなうPCB蓄積量の漸増傾向による関与因子を探るためには、BMIだけではなく食生活に関連する何らかの指標を用い追究する必要があると考える。

さらに、出産回数とPCB濃度との関係について、初産および経産により区分した平均値および標準偏差を表(1)-12に示す。なお、本データでは質問票への回答による出産回数情報を欠損する36名を除外した (N=1454)。表から明らかなどおり、初産のPCB濃度が経産婦のPCB濃度と比べ多少高い傾向が認められた。

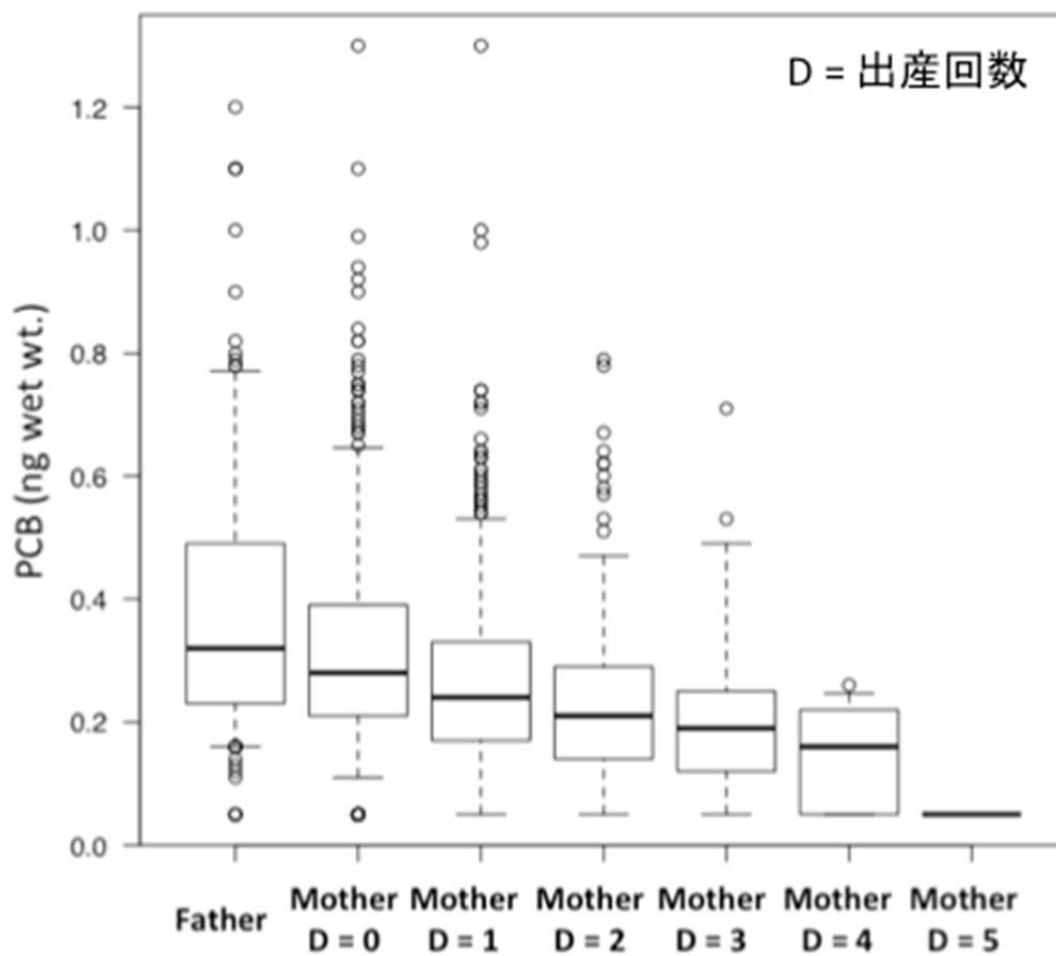
表(1)-12 出産回数とPCB濃度 (N=1454)

	対象者数	PCB濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
初産	546	0.32	0.14
経産 (2回以上)	908	0.26	0.18

図(1)-5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、本研究参加者の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、濃度が高まる傾向が見てとれる。なお、1 ng/g-wetより大きな値を記録した参加者のデータは、年齢とPCB濃度分布傾向を識別するため、本図から除外した。



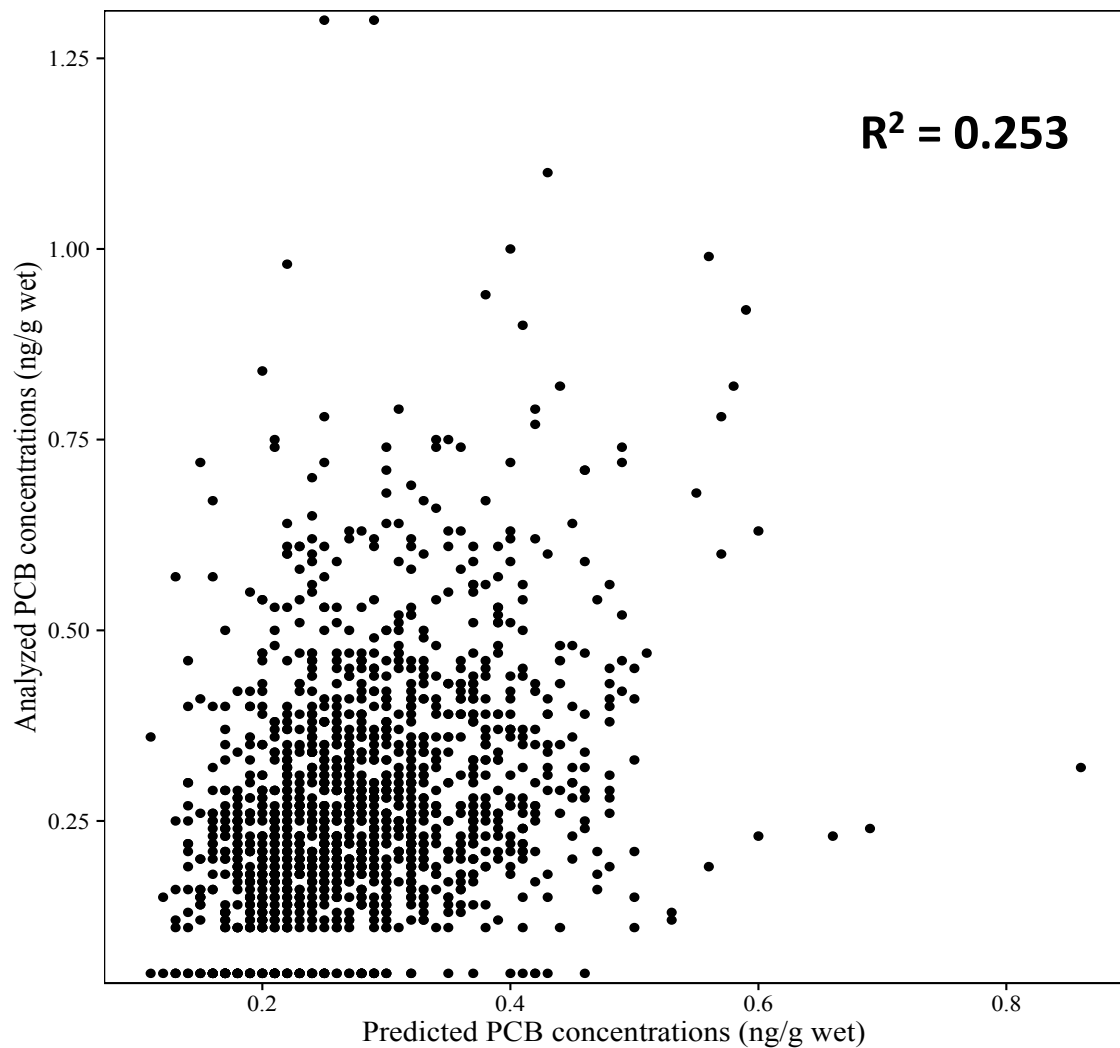
図(1)-5 年齢と母体血中総PCB濃度の関係



図(1)-6 出産回数と母体血中総PCB濃度の関係

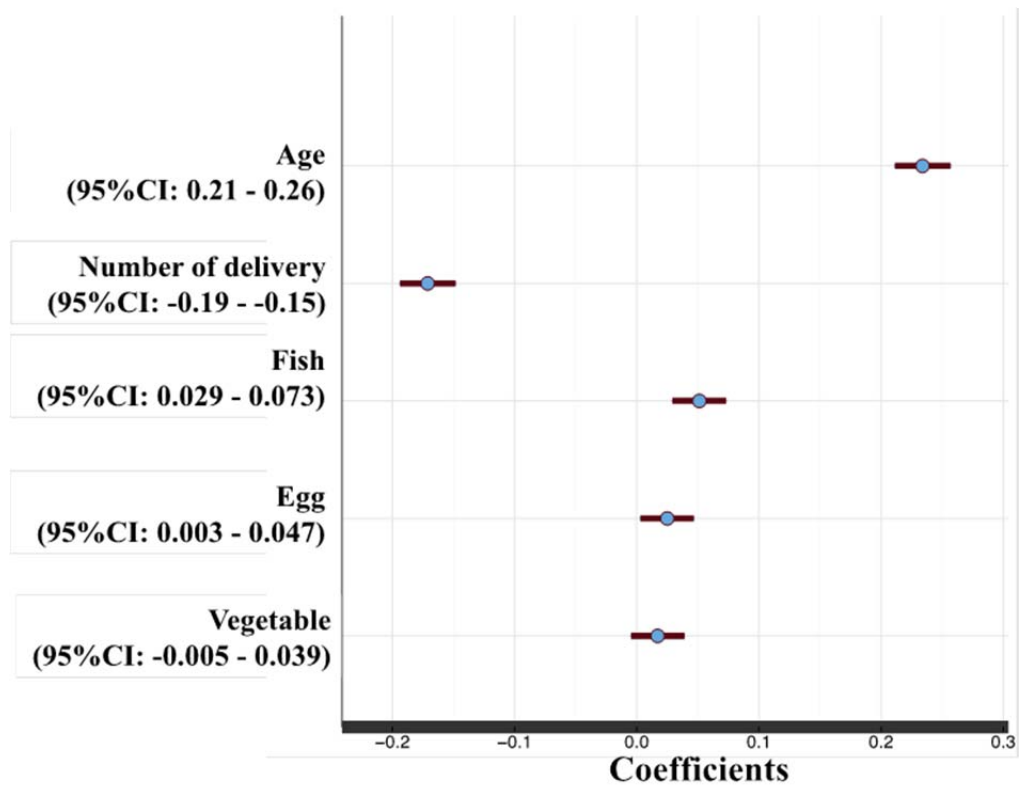
図(1)-6に出産回数と母体血中総PCB濃度の関係を図示する。本図から明らかなように、出産回数の増回に伴い母体血清中のPCBs濃度は低減傾向が認められた。また、母体血清中PCBs濃度は全体的に父親に比べ低い傾向が認められた。本結果より、出生・授乳等にもなう母体血清中PCBs濃度の低減が千葉ユニットセンターにおける参加者においても明らかとなった。

食習慣、年齢、出産回数から、母体血中のPCBs濃度の予測モデル構築を試みる。本研究では、エコチル調査で実施されているFood Frequency Questionnaire (FFQ: 食事摂取頻度調査票) の結果を食習慣のパラメータとした。データ解析にはベイズ線形回帰モデルを用い、決定係数 $R^2$ および、Widely-applicable information creationにより変数選択を行い、モデルの精度を最適化した。解析の結果を図(1)-7に示す。本図から、 $R^2 = 0.2533$ で、PCBs濃度を予測できることが明らかになった。



図(1)-7 PCBs予測濃度と実測値の相関解析結果





図(1)-8 PCBs曝露量との関連要因解析結果

また、予測に関わるパラメータとして、年齢および魚・卵の消費量とPCBs濃度に正の、出産回数とPCBs濃度に負の相関が認められた (図(1)-8)。

諸外国においても魚介類の摂取はPCBsの主な曝露源として知られている<sup>10-12)</sup>。さらに、マーケットバスケット法を用いた先行研究において、日本人における食事由来のPCBs曝露経路は主に魚介類であり、続けて肉・卵類であることが報告されている<sup>13)</sup>。本研究では先行研究を、血中PCBs濃度とアンケート調査の関係解析から裏付ける結果が得られた。

## 2) 簡易型母体血中総 PCB 濃度

簡易型 PCB 測定によるエコチル調査に参加する妊婦の妊娠前期の母体血中 PCB 濃度の結果を表(1)-13 に示す。

表(1)-13 母体血中総 PCB 濃度 (N=313)

	平均値	標準偏差	最大	最小
PCB 濃度 (ng/g-wet)	0.35	0.23	2.00	0.04

表から明らかとなお、本研究で測定した対象者 313 名の母体血中の PCB 濃度の平均は 0.35 ng/g-wet であった。また、対象者の中で最大値は 2.00 ng/g-wet、最小値は 0.04 ng/g-wet であった。本研究結果の PCB 濃度量は、母体血中 PCB 類濃度範囲が 0.22-5.70 ng/g-wet (報告書内記載量; 220~5700 pg/g-wet を換算) であったとする報告<sup>8)</sup>と比べれば、多少低い範囲にあると解釈できる。しかしながら、これらの濃度範囲の差が何に起因するかについては現段階では分からないため、結果を記すに留める。また、本研究を通して、多くの測定対象者の生体試料から PCB が検出されたことは、これまでの先行研究と同様の結果といえよう<sup>9)</sup>。

次に、対象者の年齢と出産回数と PCB 濃度との関係について、それぞれ表(1)-14 および表(1)-15 に示す。年齢および出産回数について、参加者から得た質問票による回答から得た。

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、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(1)-14 に示す。20 歳未満 (N=1) および 25 歳未満 (N=22) の対象者数は他の年齢群と比べ少ないものの、年齢の増加に伴い PCB 濃度が微増とはいえ、濃度が高まる傾向が伺えた。この傾向は、我々の先行研究結果による加齢とともに PCB 濃度の蓄積量も増加する傾向 (結果) を示唆するといえよう (図(1)-9 も参照されたい)<sup>9)</sup>。

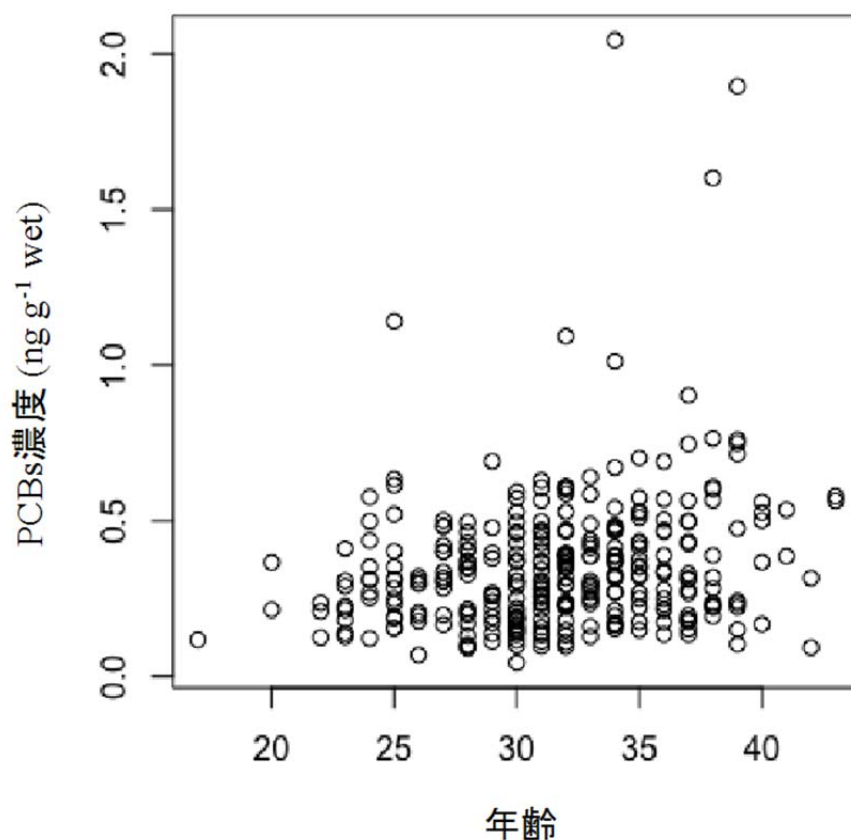
表(1)-14 年齢区分による PCB 濃度 (N=313)

	対象者数	PCB 濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
20 歳未満	1	0.12	NA
25 歳未満	22	0.28	0.12
30 歳未満	68	0.32	0.17
35 歳未満	136	0.35	0.22
40 歳未満	75	0.41	0.29
45 歳未満	11	0.42	0.17

さらに、出産回数と PCB 濃度との関係について、初産および経産により区分した平均値および標準偏差を表(1)-15 に示す。なお、本データでは質問票への回答による出産回数情報を欠損する7名を除外した (N=306)。表から明らかなおとおり、初産の PCB 濃度が経産婦の PCB 濃度と比べ有意に高い傾向が認められた。

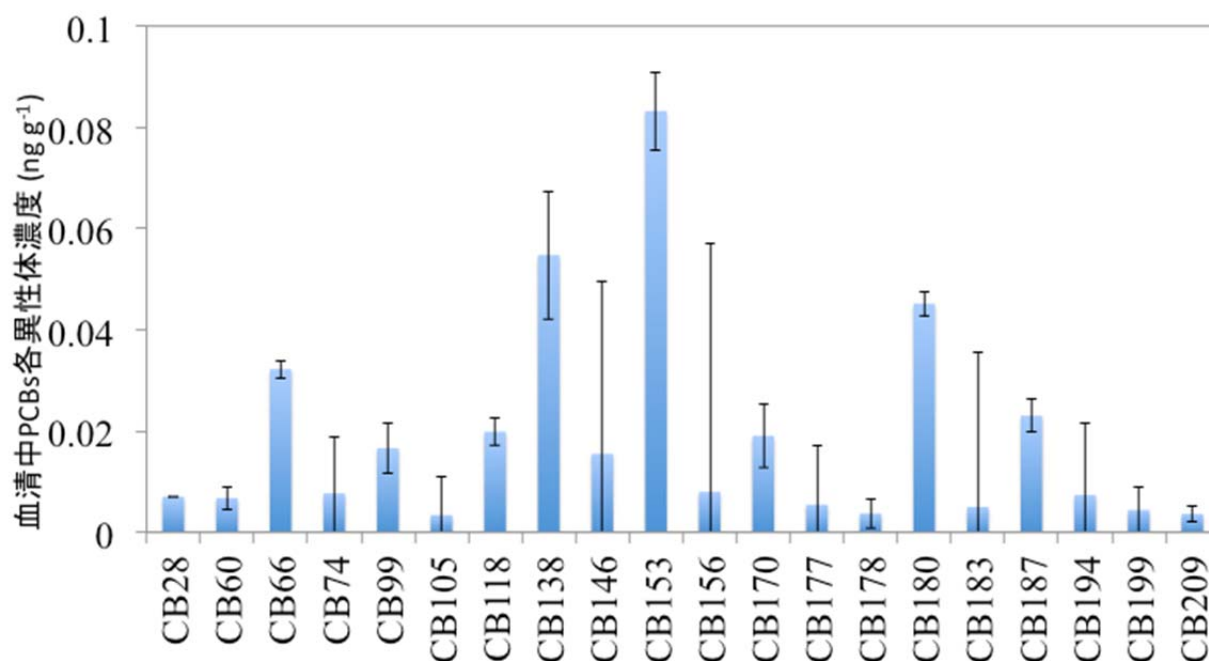
表(1)-15 出産回数と PCB 濃度 (N=306)

	対象者数	PCB 濃度 (ng/g-wet)	標準偏差
初産	186	0.42	0.17
経産 (2 回以上)	120	0.32	0.29



図(1)-9 年齢と母体血中総 PCB 濃度の関係

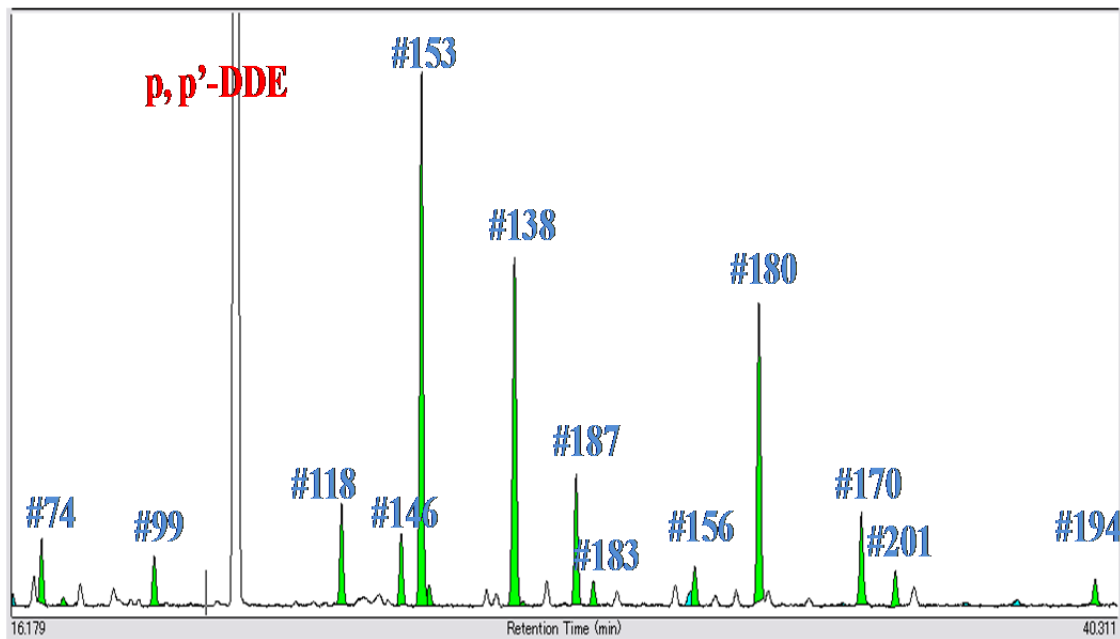
図(1)-9 に出産年齢と母体血中総 PCB 濃度の関係を図示する。本図から、本研究参加者の PCB 濃度範囲と、出産年齢による濃度分布が明らかとなるが、先の結果に記したように出産年齢の増加に伴い PCB 濃度が微増とはいえ、濃度が高まる傾向が見てとれる。



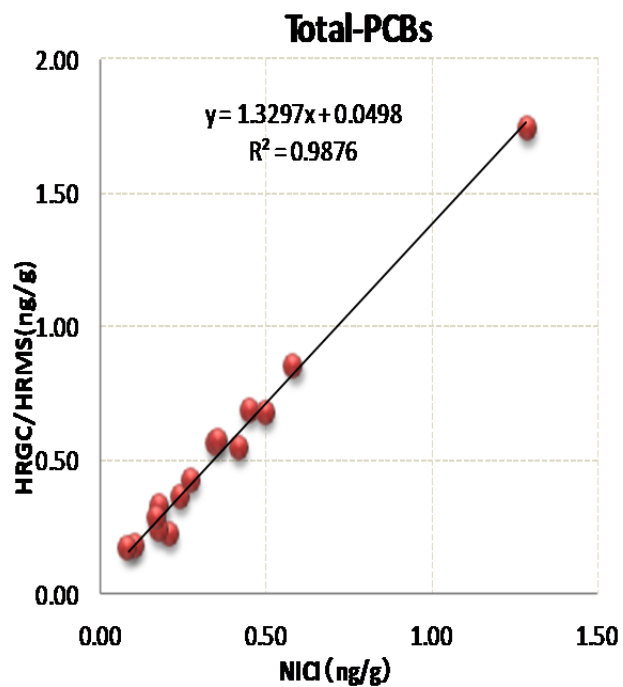
図(1)-10 母体血中 PCB の異性体組成

続けて、図(1)-10 に母体血中 PCB の異性体組成を図示する。本図から、血中における PCBs の異性体組成は CB153 が最も高い割合を占め、続けて CB138、180 などの異性体が高濃度であることが明らかとなった。このような傾向は既存の日本人を対象とした研究でも報告されており、本研究においてもこの傾向が保持されていることが明らかになった。

本節の最後に、新たに確立した PCBs 分析法について示す。本手法はパックドカラム簡易法と比較すると、同程度の簡易さであるにもかかわらず、より高感度かつ PCB 個別異性体の測定が可能であるという利点がある (図(1)-11)。本手法の定量性・精度は、より高精度な手法である高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-HRMS) における測定値 (図(1)-12) および、米国立標準技術研究所 (NIST) の提供する認証血清試料 (SRM1957) を用いたラボ内試験 (表(1)-16) を用いて確認を行い、いずれにおいても良好な結果を示したことを付記する (投稿中)。



図(1)-11 血清サンプルにおける塩素イオン(m/z 35) のマスククロマトグラム



図(1)-12 高分解能 GC-MS (GC-HRMS) と本分析手法の測定値比較結果

表(1)-16 SRM1957 認証値との比較結果

	GC-NICI-MS 定量値 (pg g <sup>-1</sup> wet wt)	SRM1957 認証値 (pg g <sup>-1</sup> wet wt)
CB74	7.2 ± 2.6	13.8 ± 0.1
CB99	< MDL	11.6 ± 0.6
CB118	14 ± 2.1	18.9 ± 1.2
CB138	37 ± 1.7	36.9 ± 9.0
CB153	51 ± 2.8	58.2 ± 0.9
CB156	7.6 ± 2.8	8.2 ± 0.6
CB170	15 ± 1.6	16.2 ± 2.0
CB180	45 ± 3.4	46
CB187	10 ± 1.4	15.5 ± 0.5

### 3) 臍帯中総PCB濃度

本研究での臍帯中PCBの濃度測定は、同族体および異性体に関する精密分析も行っているが、本報告では総PCB濃度および主要異性体濃度結果についてのみ記載する。

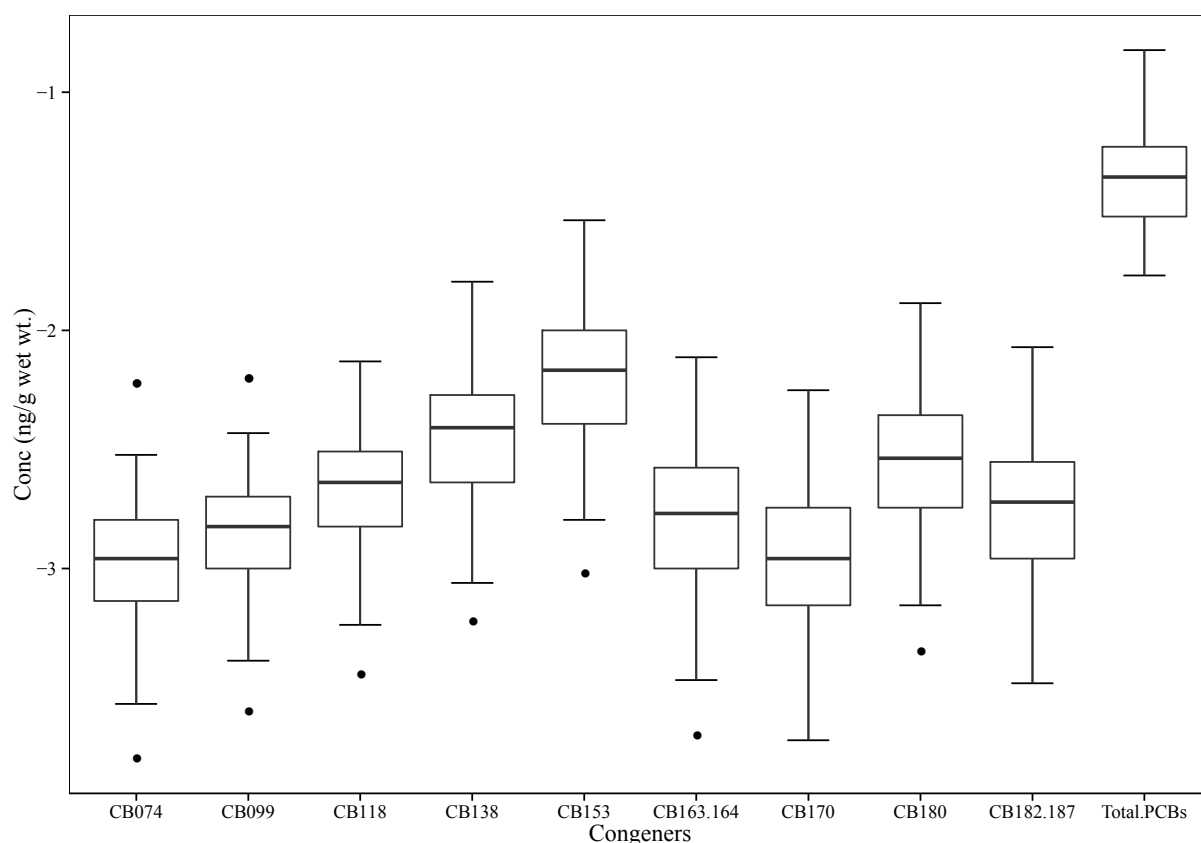
本学の追加調査に同意を得た135名の妊娠出産時の臍帯中PCB濃度結果を表(1)-17および図(1)-13に示す。

表(1)-17 臍帯中総PCB濃度 (ng/g-wet: N=135)

	平均値	標準偏差	最小	最大
CB74	0.0013	0.0008	0.0002	0.0060
CB99	0.0017	0.0010	0.0003	0.0063
CB118	0.0024	0.0013	0.0004	0.0074
CB138	0.0041	0.0025	0.0006	0.016
CB153	0.0075	0.0045	0.0010	0.029
CB163/164	0.0019	0.0012	0.0002	0.0077
CB170	0.0013	0.0009	0.0002	0.0056
CB180	0.0034	0.0021	0.0005	0.013
CB182/187	0.0021	0.0013	0.0003	0.0085
総PCBs	0.047	0.021	0.016	0.150

表から明らかなおおりに、本研究で測定した対象者135名の臍帯中の総PCB濃度の平均は $0.047 \pm 0.021$  ng/g-wetであった。また、対象者の中で最大値は $0.150$  ng/g-wet、最小値は検出限界未満の $0.016$  pg/g-wetであった。臍帯中総PCB濃度測定対象者のなかには、同族体・異性体によって検出限界値未満を示したデータも見られたが、臍帯中の総PCB濃度は、全参加者から得られた。

主要異性体の濃度はCB153、138、180、118、182/187、163/164、99、170、74 (平均:  $0.075 \pm 0.0045$ 、 $0.0041 \pm 0.0025$ 、 $0.0034 \pm 0.0021$ 、 $0.0024 \pm 0.0013$ 、 $0.0021 \pm 0.0013$ 、 $0.0019 \pm 0.0012$ 、 $0.0017 \pm 0.0010$ 、 $0.0013 \pm 0.0009$ 、 $0.0013 \pm 0.0009$  ng g<sup>-1</sup> wet wt.) の順だった。PCB153、138、180、118が高い割合を示す傾向は既存研究<sup>10)</sup>における臍帯血中のPCBs組成と同様の傾向を示した。



図(1)-13 臍帯血中の総PCBs及び主要異性体の分布

参考までに、母体血（妊娠前期と出産時）および臍帯のPCB濃度の関係を表(1)-18に示す。本研究の執行により得られたデータ（妊娠前期・臍帯）と本研究経費以外で得たデータ（出産時）との組合せが揃う114名の結果をまとめたものである。

表(1)-18 母体血（妊娠前期と出産時）および臍帯のPCB濃度の相関（参考データ）

	妊娠前期_母体血	出産時_母体血	出産時_臍帯
妊娠前期_母体血	1	0.8032	0.5421
P_value		<.0001	<.0001
参加者数	114	114	114
出産時_母体血	0.8032	1	0.5977
P_value	<.0001		<.0001
参加者数	114	114	114
出産時_臍帯	0.5421	0.5977	1
P_value	<.0001	<.0001	
参加者数	114	114	114

これらのデータは、本県内の一つの協力病院で出産する方々から得られたデータを連結したのもので、対象とした病院の所在が同一エリアであるため、ここでは傾向を記すに留める。妊娠前期と出産時の母体血中の総PCB濃度および、出産時の母体血と臍帯の総PCB濃度との間に相関する傾向がみられた。



なお、最終年度に行った臍帯中 PCB の濃度測定結果を表(1)-19 に示す。

表(1)-19 臍帯中総 PCB 濃度 (N=10)

	平均値	標準偏差	最大	最小
PCB 濃度(ng/g-wet)	0.043	0.022	0.140	0.016

前節において得られた臍帯 PCB 濃度範囲 ( $0.047 \pm 0.021$  ng/g-wet) と比べても同程度の  $0.043 \pm 0.022$  ng/g-wet の範囲にあり、同族体・異性体によって検出限界値未満を示したデータも見られたが、臍帯中の総 PCB 濃度は、全参加者から得られた。

#### 4) 母親の PCB 濃度に関与する遺伝子座位の探索

本研究で母親の唾液試料から抽出したゲノム DNA 量は、平均で 85.3  $\mu\text{g}$  であったが、その範囲は 1~390  $\mu\text{g}$  と大きなばらつきが見られた。DNA 収量が低い (DNA 濃度が低い)、あるいはゲノム DNA の分解が進んでしまっているものが一部見られたが、それらを除き、GWAS 解析のために全ゲノム遺伝子タイピングを実施した 128 例については、call rate (正しく遺伝子タイピングができた割合) が平均で 0.998 と解析に十分なクオリティであった。

GWAS のデータ解析には PLINK ver.1.09 を使用し、上記 3 条件を満たす、1,122,527 の SNPs を解析対象とした。共変量として年齢、出産回数、BMI を用い、測定された妊娠中の血中 PCB 濃度を量的形質として回帰分析をおこない、各 SNP の P 値を計算した。表(1)-20 に解析 1 の結果、 $-\log_{10}(P)$  が 4 以上の 160 SNVs を p 値順に記載した。

表(1)-20 解析 1 における  $-\log_{10}(P)$  が 4 以上の 160 SNVs のリスト

SNP ID	Chromosome	postion	Minor allele (tested)	Regression coefficient (Beta)	Coefficient t-statistic	P value	$-\log_{10}(P)$
kgp1927942	3	197779183	A	0.1006	5.003	2.01E-06	5.70
kgp7810243	16	17057339	A	0.1292	4.781	5.12E-06	5.29
rs7788668	7	22980638	A	0.1543	4.762	5.54E-06	5.26
rs10509615	10	92791516	A	0.2151	4.74	6.08E-06	5.22
rs11020261	11	93045561	G	0.1653	4.724	6.50E-06	5.19
kgp5401701	11	93056075	A	0.1653	4.724	6.50E-06	5.19
kgp2242062	11	93066879	G	0.1653	4.724	6.50E-06	5.19
rs11739264	5	174601205	A	0.1401	4.715	6.74E-06	5.17
kgp2044298	21	23962827	A	0.1658	4.709	6.91E-06	5.16
rs2286707	7	23028610	A	0.1511	4.698	7.23E-06	5.14
kgp10007776	7	22984967	G	0.1366	4.696	7.27E-06	5.14
kgp25813	7	22973853	G	0.1366	4.696	7.27E-06	5.14
rs17147527	7	23024795	G	0.1351	4.661	8.39E-06	5.08
kgp3941425	7	22985010	C	0.1351	4.661	8.39E-06	5.08
rs10508945	10	53250879	G	0.218	4.649	8.82E-06	5.05
rs10224604	7	22988381	G	0.1043	4.618	1.00E-05	5.00
kgp12198395	7	22925467	A	0.1358	4.603	1.06E-05	4.97
kgp8928005	13	70596638	G	0.1084	4.519	1.50E-05	4.82
kgp6059156	1	235188306	A	0.08953	4.508	1.57E-05	4.80
kgp1238123	3	112091526	G	0.1038	4.486	1.71E-05	4.77
rs7641311	3	112091696	A	0.1038	4.486	1.71E-05	4.77
rs1879512	3	112093900	A	0.1038	4.486	1.71E-05	4.77
rs12548341	8	110821596	G	0.1004	4.472	1.83E-05	4.74
kgp1357413	16	17035048	G	0.1366	4.467	1.85E-05	4.73
kgp16140207	18	47023639	A	0.1774	4.459	1.90E-05	4.72
kgp4746022	6	24819019	A	0.1437	4.458	1.91E-05	4.72
kgp10640563	1	170128903	A	0.1041	4.457	1.92E-05	4.72
rs471569	1	170103379	G	0.1041	4.457	1.92E-05	4.72
rs7775228	6	32658079	G	0.1005	4.443	2.03E-05	4.69
rs3129713	6	32657255	A	0.1005	4.443	2.03E-05	4.69

rs7215998	17	69074425	A	0.08874	4.42	2.22E-05	4.65
rs11696747	20	48128119	G	0.1236	4.419	2.23E-05	4.65
rs512778	6	79345146	G	0.09575	4.415	2.31E-05	4.64
kgp10706681	2	2677265	G	0.09629	4.41	2.31E-05	4.64
rs3829839	2	2678138	A	0.09629	4.41	2.31E-05	4.64
kgp555671	6	158969311	A	0.1144	4.388	2.52E-05	4.60
kgp1983250	6	79348656	A	0.09197	4.36	2.82E-05	4.55
rs6509966	19	56382152	A	0.1798	4.355	2.87E-05	4.54
kgp2021186	7	6734141	C	-0.1061	-4.354	2.88E-05	4.54
rs9639027	7	6746738	G	-0.1061	-4.354	2.88E-05	4.54
rs7798471	7	6744957	G	-0.1061	-4.354	2.88E-05	4.54
rs3801033	7	6734103	A	-0.1061	-4.354	2.88E-05	4.54
kgp10670730	2	230938135	A	0.1535	4.351	2.92E-05	4.53
kgp9301595	2	230941145	A	0.1535	4.351	2.92E-05	4.53
kgp7630532	22	48156449	G	-0.09906	-4.34	3.04E-05	4.52
kgp7064275	7	22931153	A	0.1459	4.34	3.05E-05	4.52
kgp453731	8	4240580	A	0.1305	4.325	3.22E-05	4.49
rs6964079	7	6706631	A	-0.1109	-4.322	3.27E-05	4.49
kgp6621837	13	58203524	C	-0.1157	-4.313	3.38E-05	4.47
rs2807640	13	58202109	A	-0.1157	-4.313	3.38E-05	4.47
rs1374482	13	58156310	A	-0.111	-4.312	3.40E-05	4.47
kgp5441005	7	6748594	G	-0.1052	-4.311	3.41E-05	4.47
kgp4596760	7	6746736	G	-0.1052	-4.311	3.41E-05	4.47
kgp1821563	7	6747267	A	-0.1052	-4.311	3.41E-05	4.47
rs1001026	7	22932736	A	0.1293	4.308	3.45E-05	4.46
rs7301283	12	116142039	A	0.1583	4.308	3.45E-05	4.46
rs17536636	10	92782367	C	0.187	4.305	3.49E-05	4.46
rs11072794	15	79006582	A	-0.08805	-4.299	3.57E-05	4.45
rs899997	15	79019578	C	-0.08809	-4.299	3.59E-05	4.44
rs11072793	15	79006442	G	-0.08725	-4.293	3.65E-05	4.44
kgp6754918	2	177301375	G	0.09149	4.287	3.74E-05	4.43
kgp11701396	13	58176546	G	-0.1104	-4.286	3.76E-05	4.42
kgp3699668	7	23098548	G	0.1474	4.284	3.78E-05	4.42
rs3807147	7	138440260	A	0.1789	4.28	3.84E-05	4.42
rs3793239	7	158917999	C	0.09947	4.28	3.84E-05	4.42
kgp8957881	11	117974541	A	0.097	4.276	3.90E-05	4.41
kgp375182	7	68715427	G	-0.08547	-4.274	3.93E-05	4.41
kgp2503162	3	71339279	G	0.155	4.271	3.98E-05	4.40
rs7811473	7	158947104	G	0.09431	4.264	4.09E-05	4.39
kgp4043717	8	24202760	G	-0.08607	-4.261	4.16E-05	4.38
kgp36684	1	235190411	C	0.08365	4.257	4.21E-05	4.38
kgp22808633	23	10131019	G	-0.1711	-4.241	4.47E-05	4.35
kgp22806426	23	10136702	A	-0.1711	-4.241	4.47E-05	4.35
kgp22735212	23	10143721	A	-0.1711	-4.241	4.47E-05	4.35
rs2239937	23	10125402	G	-0.1711	-4.241	4.47E-05	4.35
rs7535312	1	47288951	A	0.09344	4.239	4.51E-05	4.35
rs3766194	1	47285150	A	0.09344	4.239	4.51E-05	4.35
kgp11417113	1	165192480	G	-0.1118	-4.233	4.61E-05	4.34
rs9455952	6	168499925	G	0.1054	4.232	4.63E-05	4.33

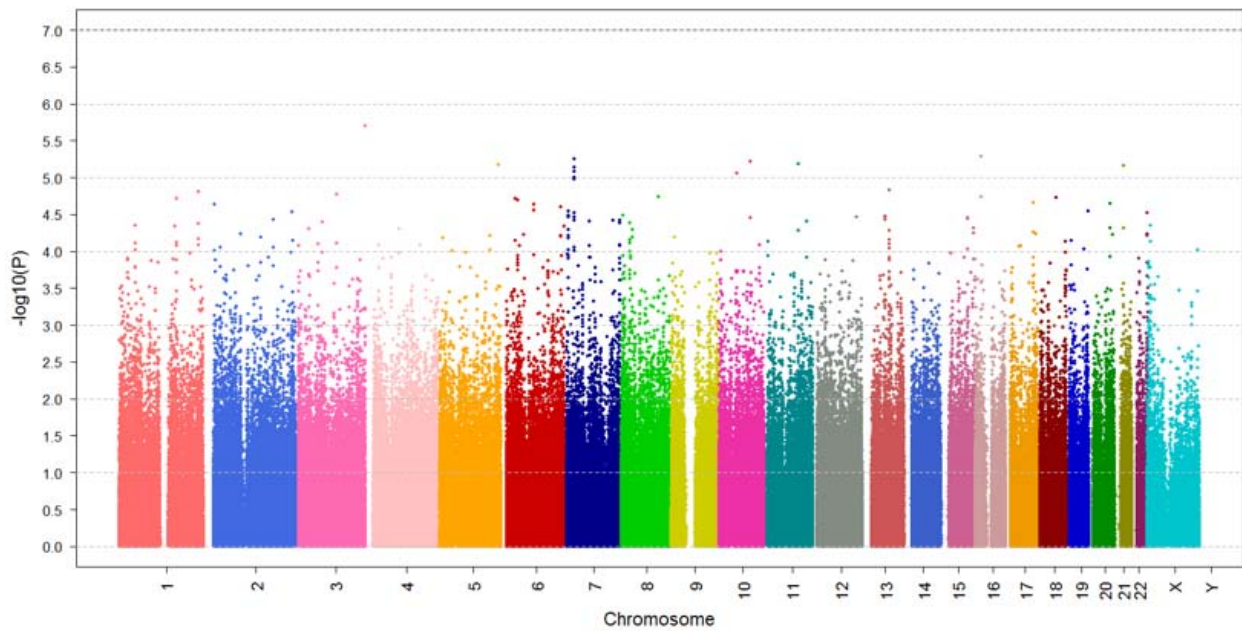
rs7267020	20	48116682	A	0.1186	4.224	4.78E-05	4.32
rs6095547	20	48118822	A	0.1186	4.224	4.78E-05	4.32
rs6095546	20	48116955	A	0.1186	4.224	4.78E-05	4.32
kgp4017136	21	23962518	A	0.1579	4.224	4.78E-05	4.32
kgp3580394	21	23984025	A	0.1579	4.224	4.78E-05	4.32
rs2827633	21	23975186	C	0.1579	4.224	4.78E-05	4.32
rs1918387	21	23964463	G	0.1579	4.224	4.78E-05	4.32
kgp9785376	15	95838225	G	0.1281	4.22	4.85E-05	4.31
rs9842095	3	30887626	A	-0.08852	-4.217	4.90E-05	4.31
rs6531940	4	76741116	A	0.1748	4.212	4.99E-05	4.30
kgp6792506	7	6750112	A	-0.1063	-4.208	5.10E-05	4.29
kgp4666642	8	32574124	A	0.1108	4.204	5.15E-05	4.29
kgp9814270	11	93084553	A	0.1617	4.202	5.20E-05	4.28
kgp5913856	13	70608467	A	0.1021	4.2	5.23E-05	4.28
kgp2808973	17	69072712	A	0.08428	4.185	5.54E-05	4.26
kgp19859473	15	95834127	G	0.1321	4.183	5.58E-05	4.25
kgp14953541	2	79304731	G	0.1521	4.175	5.77E-05	4.24
rs132215	22	48154014	G	-0.09581	-4.174	5.79E-05	4.24
kgp11069368	17	76345310	G	0.09682	4.173	5.80E-05	4.24
rs235193	20	57544274	A	0.08457	4.166	5.96E-05	4.22
rs3799688	6	49804908	G	0.1489	4.166	5.99E-05	4.22
rs5767985	22	48175939	G	-0.1039	-4.161	6.08E-05	4.22
kgp7767581	6	158977380	A	0.1094	4.16	6.09E-05	4.22
kgp2476569	6	158970844	G	0.1094	4.16	6.09E-05	4.22
kgp2023569	6	158970890	G	0.1094	4.16	6.09E-05	4.22
rs6944332	7	6758018	A	-0.09675	-4.157	6.17E-05	4.21
kgp22660126	5	148507463	A	0.1755	4.156	6.20E-05	4.21
rs7746250	6	158976559	C	0.1098	4.156	6.22E-05	4.21
kgp14932630	2	140844159	A	0.2008	4.151	6.42E-05	4.19
rs7856948	9	8900641	A	-0.1408	-4.146	6.43E-05	4.19
rs2919390	8	32526955	A	0.1089	4.144	6.47E-05	4.19
kgp13368347	7	6723843	A	-0.1101	-4.138	6.62E-05	4.18
rs10951991	7	6721661	A	-0.1101	-4.138	6.62E-05	4.18
kgp9074259	5	9437068	A	0.08965	4.136	6.69E-05	4.17
rs34360045	1	235190683	G	0.08131	4.134	6.73E-05	4.17
kgp15166852	1	235183334	A	0.08425	4.133	6.77E-05	4.17
rs7004152	8	24151305	G	-0.08632	-4.128	6.90E-05	4.16
rs9599533	13	70598508	A	0.1005	4.127	6.90E-05	4.16
rs10411676	19	7273991	G	0.1348	4.12	7.10E-05	4.15
kgp10433068	6	24804776	A	0.1279	4.117	7.18E-05	4.14
rs6431302	2	235704447	G	0.09803	4.116	7.21E-05	4.14
kgp6221255	11	2464728	A	0.109	4.113	7.29E-05	4.14
rs16985991	23	10165009	A	-0.1706	-4.113	7.30E-05	4.14
rs9966745	18	75228219	A	0.08807	4.109	7.40E-05	4.13
rs575119	1	170112399	G	0.09665	4.105	7.56E-05	4.12
rs9867544	3	112079277	G	-0.08729	-4.098	7.73E-05	4.11
kgp9143615	8	24195051	G	-0.08199	-4.097	7.75E-05	4.11
rs2297809	1	47282772	A	0.09034	4.097	7.76E-05	4.11
rs9542159	13	70587445	A	0.0993	4.093	7.86E-05	4.10

kgp5593004	13	70551029	A	0.1036	4.089	7.99E-05	4.10
rs4679485	3	59405125	A	-0.08589	-4.087	8.03E-05	4.10
kgp1084784	10	121298412	A	0.1638	4.084	8.13E-05	4.09
kgp571668	10	121306466	G	0.1638	4.084	8.13E-05	4.09
kgp7727591	4	16863708	A	-0.1172	-4.083	8.17E-05	4.09
kgp7368832	4	16872910	A	-0.1172	-4.083	8.17E-05	4.09
kgp3022020	4	16871830	C	-0.1172	-4.083	8.17E-05	4.09
kgp3556014	1	235182187	G	0.0823	4.082	8.19E-05	4.09
kgp7533315	7	158942937	A	0.08908	4.084	8.20E-05	4.09
rs6535218	4	138370960	C	0.1455	4.081	8.26E-05	4.08
kgp2665913	6	38126499	G	0.09859	4.078	8.33E-05	4.08
rs7802012	7	68722152	A	-0.08466	-4.078	8.33E-05	4.08
rs319779	17	31501913	G	-0.08736	-4.076	8.38E-05	4.08
kgp7025521	3	1708055	A	0.108	4.074	8.46E-05	4.07
kgp1103004	7	158820933	A	0.09914	4.073	8.47E-05	4.07
rs10919299	1	170067296	G	0.08697	4.074	8.49E-05	4.07
kgp6659666	17	26242752	A	0.1126	4.072	8.51E-05	4.07
kgp4744845	7	22923397	G	0.1216	4.064	8.78E-05	4.06
rs7604433	2	177260099	G	0.1031	4.062	8.85E-05	4.05
kgp533237	2	20810659	G	0.08256	4.058	8.96E-05	4.05
kgp5359988	13	70493253	G	0.09001	4.053	9.13E-05	4.04
rs9599523	13	70488978	A	0.09001	4.053	9.13E-05	4.04
kgp7521259	15	78987686	G	-0.08521	-4.05	9.23E-05	4.03
rs2189613	19	43285368	A	-0.1208	-4.047	9.36E-05	4.03
kgp22077270	5	148520866	C	0.1763	4.044	9.45E-05	4.02
rs12142787	1	47266590	A	0.08973	4.039	9.64E-05	4.02
rs3766208	1	47268526	A	0.08973	4.039	9.64E-05	4.02
rs11094486	23	150240785	A	-0.12	-4.038	9.65E-05	4.02
kgp1657599	7	6713936	A	-0.1055	-4.037	9.69E-05	4.01
kgp1841777	5	35989739	A	-0.08164	-4.036	9.75E-05	4.01
kgp14830657	2	2673383	A	0.0966	4.041	9.76E-05	4.01
kgp8177828	7	23102329	C	0.1417	4.031	9.93E-05	4.00

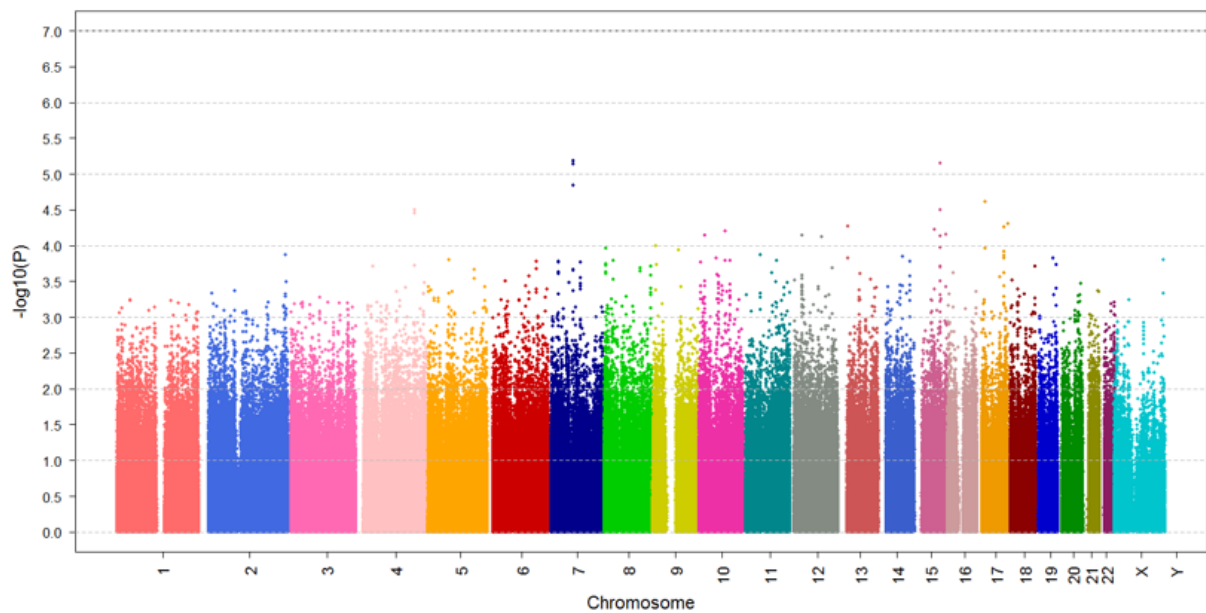
表(1)-21 解析 2 における $-\log_{10}(P)$ が 4 以上の 21 SNVs のリスト

SNP ID	Chromosome	postion	minor allele (tested)	odds ratio	Coefficient t-statistic	P value	$-\log_{10}(P)$
kgp375182	7	68715427	G	0.1918	-4.506	6.61E-06	5.18
kgp7521259	15	78987686	G	0.199	-4.492	7.07E-06	5.15
rs7802012	7	68722152	A	0.1825	-4.483	7.35E-06	5.13
rs10250140	7	68718752	G	0.1974	-4.337	1.44E-05	4.84
rs8080267	17	10154348	A	0.1701	-4.219	2.45E-05	4.61
kgp6294578	17	10155277	A	0.1701	-4.219	2.45E-05	4.61
rs17032316	4	155886241	A	0.2075	-4.163	3.13E-05	4.50
rs3825806	15	78985342	A	0.2032	-4.158	3.21E-05	4.49
kgp7321933	4	155901931	A	4.739	4.137	3.52E-05	4.45
rs4789846	17	80225545	A	0.1876	-4.06	4.91E-05	4.31
kgp1041492	13	21689729	A	5.082	4.041	5.32E-05	4.27
kgp10675237	17	69073319	C	0.2355	-4.03	5.57E-05	4.25
rs4483799	15	59723265	C	0.2243	-4.014	5.98E-05	4.22
rs4410020	15	59723253	A	0.2243	-4.014	5.98E-05	4.22
rs16937003	10	80938499	A	6.675	4.003	6.26E-05	4.20
kgp19859473	15	95834127	G	13.56	3.977	6.97E-05	4.16
kgp11186677	10	19494807	G	4.861	3.973	7.09E-05	4.15
rs11047223	12	24192707	C	0.1946	-3.972	7.13E-05	4.15
kgp2655986	15	78987225	A	0.1957	-3.965	7.35E-05	4.13
rs1796209	12	83304031	G	5.315	3.96	7.51E-05	4.12
rs7856948	9	8900641	A	0.1037	-3.891	9.99E-05	4.00

解析データを Manhattan plot により図(1)-14（解析 1）と図(1)-15（解析 2）に図示した。

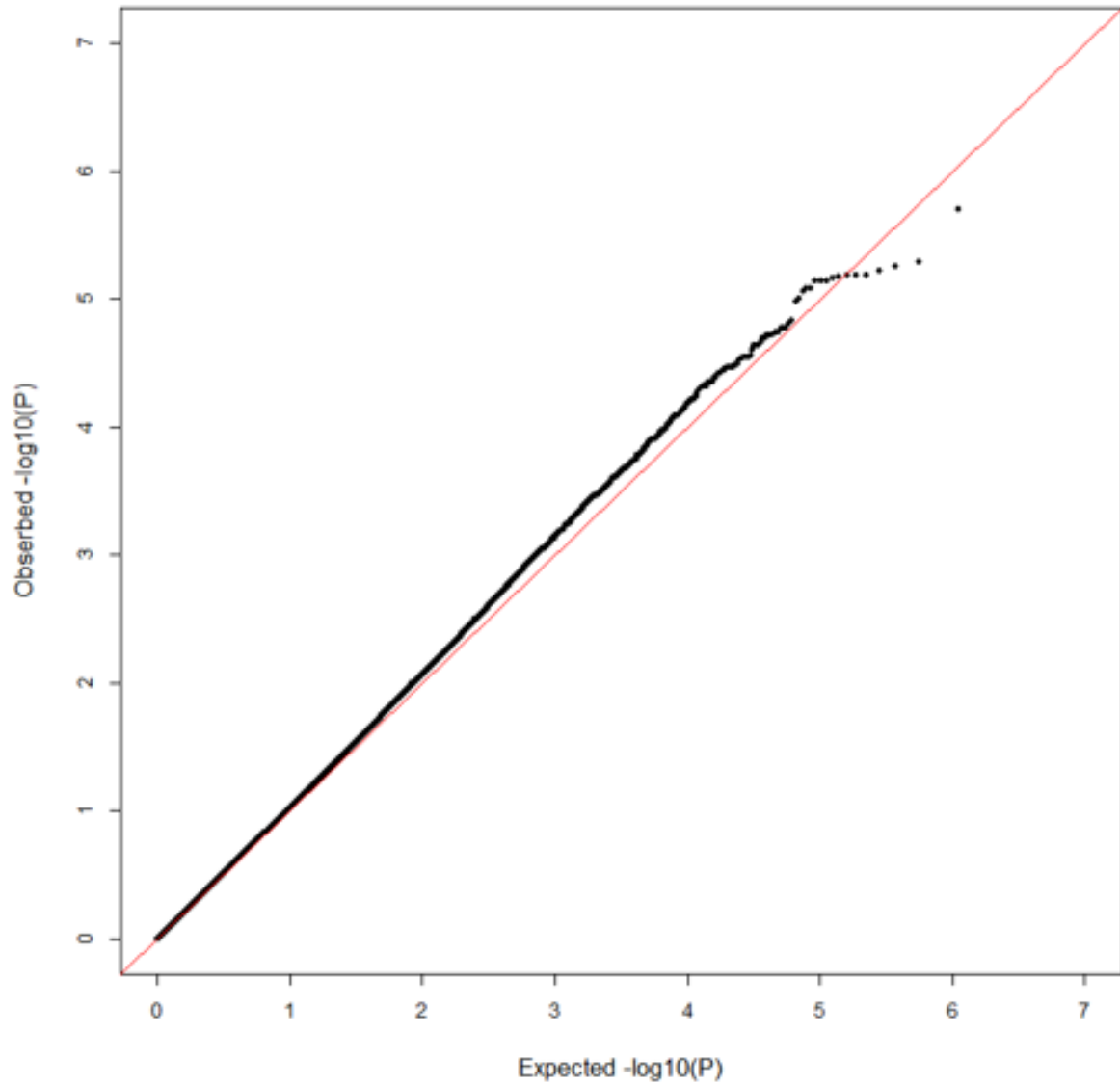


図(1)-14 GWAS 重回帰分析－Manhattan プロット（解析 1）



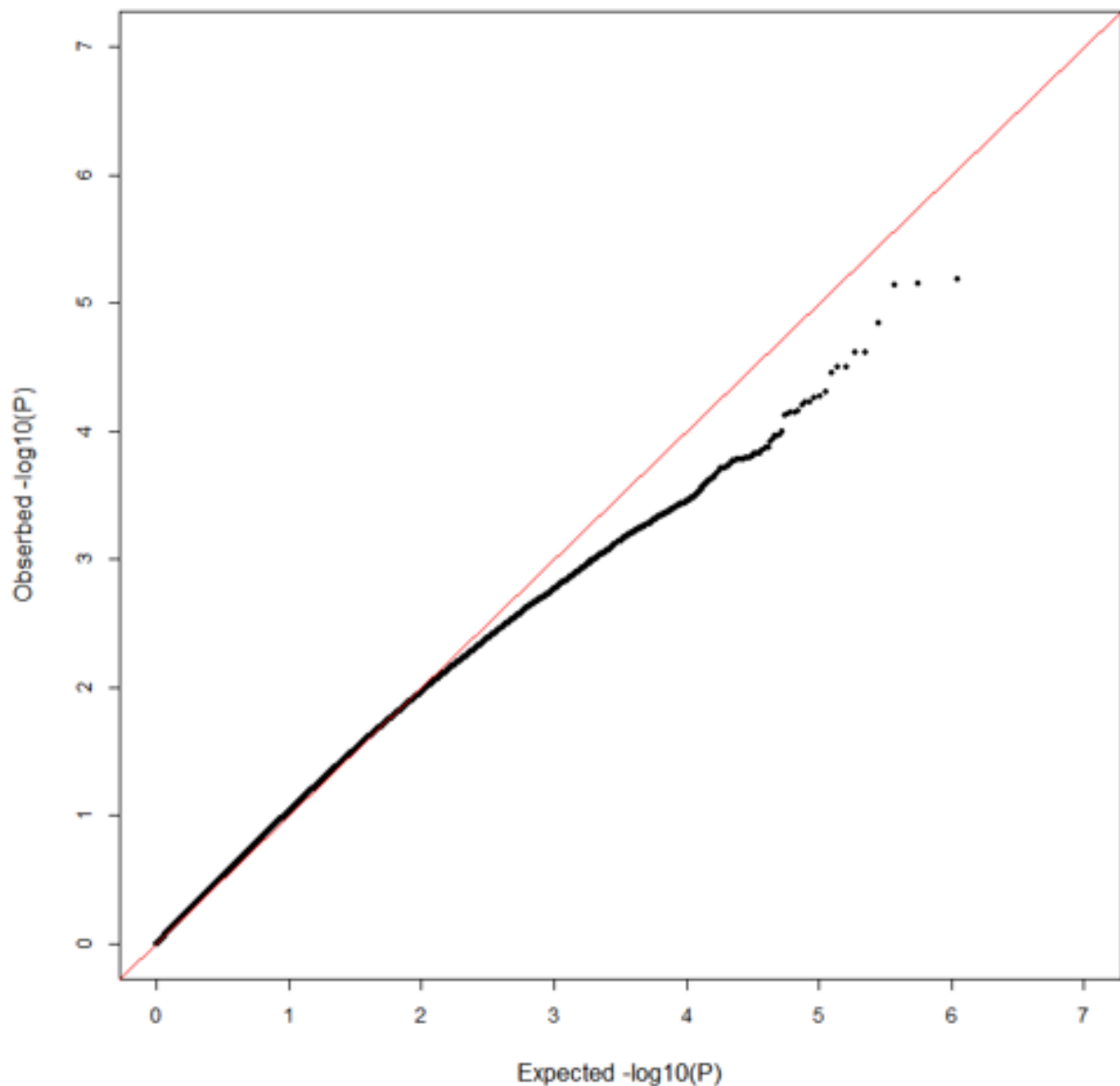
図(1)-15 GWAS ロジスティック回帰分析－Manhattan プロット（解析 2）

Manhattan plotはGWASの結果を示すために通常使用されるものであり、横軸に染色体上の位置、縦軸に $-\log_{10}(P)$ をとり、各SNVについてプロットしたものである。GWAS解析において、一般的な有意水準は $5 \times 10^{-8}$ とされているが、本研究の結果では最も有意性を示すSNPでも $10^{-6}$ に届かない事がわかった。



図(1)-16 GWAS重回帰分析 Q-Qプロット (解析1)





図(1)-17 GWAS ロジスティック回帰分析 Q-Q プロット (解析 2)

図(1)-16 と図(1)-17 に解析 1 と解析 2 の Q-Q プロットを図示した。このプロットでは各 SNVs が期待値どおりであれば直線上に載ると考えて良く、もし、血中 PCB 値に有意に関与する SNV があれば、直線から上部に離れる事になる。両図ともほぼ直線上にプロットされており、P 値が有意水準に近づくにつれ上に偏位する傾向はみられていない。

以上の結果により PCB 濃度に関与する遺伝子群において、単独で強い影響を及ぼす遺伝子は存在せず、relative risk が 2 に満たない弱い影響をもつ遺伝子群により遺伝要因が形成されている可能性が高いと判断できる。この判断が正しいとすると、関与する遺伝子を明らかにするには、できるだけ正確な PCB 摂取量を推定できる集団で最低、数千サンプルを使った解析が必要である事になる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

環境由来で曝露するPCBは、蓄積性が高く半減期の長い化学物質であり、体内でホルモン用作用を示すことから、さまざまなヒトへの影響が懸念されている。近年の報告では、ヨーロッパの出生コホート調査結果の解析により胎児期PCB曝露と最近の出生体重減少との間に関連性が示唆されている<sup>7)</sup>。そのため、欧米アジア各国で小児コホートが行われ、それらの調査でもPCBを含むPOPsによる影響究明が最優先で取り組まれている。

本研究では、妊婦の妊娠中の血中総PCB濃度と出産時の臍帯PCB濃度を測定し、質問票の年齢、食事、出産回数等の回答から母児PCB曝露量推定決定に対する寄与因子の評価を行った。

研究初年度（平成25年度）および中間年度（平成26年度）の研究遂行により、第一に1) 209の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法による母体血中総PCB濃度の検証によって、母体血中のPCB濃度（n=1490名）の平均は $0.28 \pm 0.16 \text{ ng/g-wet}$ であることと、2) 出産年齢の増加に伴いPCB濃度が微増とはいえ高まる傾向を示す結果が得られた。この結果から、PCB濃度推定には、① FFQと年齢、出産回数や、② 女性の経産歴・年齢、③ 食べ物では魚介類・卵の摂取量が重要な要因となることが明らかとなった。また、研究最終年度に行った主要な異性体について分析可能な簡易型血中PCB濃度測定法での母体血中のPCB濃度（n=313名）は、 $0.35 \pm 0.23 \text{ ng/g-wet}$ という結果を導き、パックドカラム簡易法と近似する知見が得られた。これより、簡易型血中PCB濃度測定法をパックドカラム簡易法と比較すると、同程度の簡易さであるにもかかわらず、より高感度かつPCB個別異性体の測定が可能であるという利点を得られ、今後のコホート調査での分析に有益であるといえよう。

次に3) 臍帯中の総PCB濃度の検証によって、臍帯中の総PCB濃度（n=135名）の平均は $0.047 \pm 0.0021 \text{ ng/g-wet}$ であった。また、本研究の執行により得られたデータ（妊娠前期・臍帯）と本研究経費以外で得たデータ（出産時）との組合せが揃う114名の結果から、妊娠前期と出産時の母体血中総PCB濃度および、出産時の母体血と臍帯の総PCB濃度との間に相関する傾向がみられた。

一方、血中PCB濃度に関与する遺伝子群において、単独で強い影響を及ぼす遺伝子は本研究で見いだされなかった。

これらの研究成果は、すぐには結論を導くものではないが、測定を継続することで、母体中に蓄積するPCB濃度と胎児移行のPCB濃度に関するデータの信用性を高めるとともに、質問票による調査内容との寄与を追究することは、母児POPs曝露量の質問票（遺伝因子を含む）からの推定を導く可能性が見いだされる。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

「特に記載すべき事項はない。」

### <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、農薬類である *P,P'*-DDE ; Dichlorodiphenyldichloroethylene あるいは HCHs (hexachlorocyclohexanes) や HCB (hexachlorobenzene) といった有機塩素系の残留性有機汚染物質 (POPs ; persistent organic pollutants) が残留する報告がある<sup>2),3),4),5),6),7)</sup>。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。すなわち、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 濃度の関係を導き出すことができれば、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。また前記する通り、209 の異性体の総量を分析するパックドカラム簡易法と主要な異性体について分析可能な簡易型血中 PCB 濃度測定法との結果が近似する点からして、大規模な調査対象からなるコホート調査については、体内に蓄積する化学物質の総量に加え主要な異性体の動向を把握することも重要となり、簡易型血中 PCB 濃度測定法の汎用が期待される。

## 6. 国際共同研究等の状況

2015年12月12日に、スウェーデン：ウプサラクリニカル・リサーチセンターに所属する生物統計学者のエリック・ランパ博士を招き、ニシンと有害物質のカクテル-PCBとダイオキシン汚染（スウェーデンからの報告；Herrings and Toxic Cocktails : a Swedish Perspective on PCB and Dioxin Exposure）と題して特別講演を開催した。同博士は、PCBなど環境中に長期間残留する化学物質の人体影響を統計的な手法で解析し、本公演ではスウェーデン人の人体汚染に関する知見を参加者に講演した。（この講演は本研究課題の成果発表会での企画であり、本研究課題の成果と関連する内容について意見交換され、特にPCB測定については、各国の測定結果を適宜対比できるプロトコルの確立を目指す我々の考えに異論ない回答を得た。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

#### <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) C. Mori, A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, M. Watanabe, Y. Matsuno, H. Nakaoka and E. Todaka : 環境ホルモン学会第17回研究発表会、2014

“New approach of human maternal-fetal exposure assessment of persistent organic pollutants (POPs)”

2) C. Mori, K. Sakurai, H. Miyaso, A. Eguchi : 環境ホルモン学会 第18回研究発表会、2015

“Chiba study of Mothers and Children’s Health (C-MACH) : Cohort Study with omics analyses”

3) C. Mori, A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, M. Watanabe, Y. Matsuno, H. Nakaoka, E. Todaka : Endocrine disruptors effects on wildlife and human health, International workshop 2016, Paris, France, 2016

“Development of exposure assessment and preventive intervention of blood PCB level using Japanese birth cohort data”

参考：参考ポスター発表

1) M. Hanazato, N. Suzuki, C. Koga, M. Otake, M. Watanabe, E. Todaka, M. Yamamoto, H. Nakaoka and C. Mori : 環境ホルモン学会第16回研究発表会、2013

Relationship between seafood intake, residential area and blood PCB level among pregnant women in Chiba Prefecture, Japan

2) M. Hanazato, M. Watanabe, E. Todaka, Y. Matsuno, H. Nakaoka, C. Mori : 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD 2013, Singapore, 2013

Relationship between blood Polychlorinated Biphenyl level and distance towards the nearest fishing port: A Birth Cohort Study

3) E. Todaka, M. Watanabe, Y. Matsuno, M. Hanazato, H. Nakaoka and C. Mori :

Environment and Health - Bridging South, North, East and West - Basel, Switzerland, 2013

Relationship between food intake & geographic information from questionnaire and blood PCB level in birth cohort study

- 4) C. Mori, M. Otake, A. Eguchi, M. Hanazato, N Suzuki, Y. Matsuno, H. Nakaoka, E. Todaka : pptoxIV Environmental Stressors in Disease and Implications for Human Health, Boston, MA, USA, 2014  
“An attempt of development of PCBs exposure assessment using food frequency questionnaire in birth cohorts in Japan”
- 5) M. Hanazato, A. Eguchi, E. Todaka, Y. Matsuno, H. Nakaoka, C. Koga, C. Mori : 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Madrid, Spain, 2014  
“DO PCBs, OCPS, AND DIOXIN-LIKE COMPOUNDS WITH HIGH MOLECULAR WEIGHT DECREASE HUMAN MATERNAL-FETAL PLACENTAL TRANSFER RATES?”
- 6) A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, Y. Matsuno, H. Nakaoka, E. Todaka, C. Mori : 51st Congress of the European Societies of Toxicology Bridging Sciences for Safety, Euro tox 2015, Porto, Portugal, 2015  
“Estimation of maternal blood PCB level using Food Frequency Questionnaire in Japanese national birth cohort”
- 7) C. Mori, A. Eguchi, M. Otake, M. Hanazato, N. Suzuki, M. Watanabe, Y. Matsuno, H. Nakaoka, Todaka : DOHaD (Developmental origins of health and disease) 9th World Congress, Cape Town, South Africa, 2015  
“Preventive intervention to reduce human exposure of PCBs/Dioxins.”
- 8) M. Hanazato, M. Otake, A. Eguchi, N. Suzuki, C. Koga, Y. Matsuno, H. Nakaoka, E. Todaka and C. Mori : DOHaD (Developmental origins of health and disease) 9th World Congress, Cape Town, South Africa, 2015  
“Relationship between maternal blood PCB level and distance towards the nearest fishing port in Japanese national birth cohort, 9th world congress”
- 9) 江口哲史、大竹正枝、花里真道、鈴木規道、松野義晴、中岡宏子、戸高恵美子、森 千里 : 環境ホルモン学会第 18 回研究発表会、2015  
「食事摂取頻度調査およびアンケート調査結果を用いた血清中 PCB 濃度の推定」

### (3) 出願特許

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) 「次世代の健康のために、いまできること」  
 ~母体血中化学物質測定・食事調査の必要性と今後の展望~  
 (2014年3月16日、東京田町キャンパス・イノベーションセンター国際会議室、市民50名)
- 2) 環境と子どもの健康 (市民講座：千葉大学予防医学センター主催)  
 (2015年3月15日、東京田町キャンパス・イノベーションセンター国際会議室、市民40名)
- 3) 環境と子どもの健康 (市民講座：千葉大学予防医学センター主催)  
 (2015年12月12日、東京都中央区八重洲あすか会議室、市民80名)
- 4) 母児における化学物質の曝露調査に関して (市民講座：千葉大学予防医学センター主催)  
 (2016年3月27日、東京田町キャンパス・イノベーションセンター国際会議室、市民40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

特に記載すべき事項はない。

### 8. 引用文献

- 1) Mori C (2004) : High-risk group and high-risk life stage : Key issues in adverse effects of environmental agents on human health. *Reprod. Med. Biol.*,3 : 51-58.
- 2) Mori C, Komiyama M, Adachi T, Sakurai K, Nishimura D, Takashima K, Todaka E (2002) : Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed long-term effects of multiple chemicals including endocrine disruptors in human fetuses. *Environ Heal Perspect Toxicogenom* 111(1T):7-13.
- 3) Fukata H, Omori M, Osada H, Todaka E, Mori C (2005): Necessity to measure PCBs and organochlorine pesticide concentrations in human umbilical cords for fetal exposure assessment. *Environ Heal Perspect* 113:297-303.
- 4) Dirtu AC, Cernat R, Dragan D, Mocanu R, Grieken RV, Neels H, Covaci A (2006): Organohalogenated pollutants in human serum from Iassy, Romania and their relation with age and gender. *Environ Int* 32:797-803.
- 5) Mori C, Todaka E (2011) : Environmental contaminants and children' s health sustainable health science for future generations. Maruzen Planet Co Ltd. Tokyo. <http://cpms.chiba-u.jp/>. Accessed 23 March 2014.

- 6) Amodio E, Turci R, Massenti MF, Di Gaudio F, Minoia C, Vitale F, Firenze A, Calamusa G (2012) : Serum concentrations of persistent organic pollutants (POPs) in the inhabitants of a Sicilian city. *Chemosphere* 89:970-974.
- 7) Govarts E, Nieuwenhuijsen M, Schoeters G, Ballester F, Bloemen K, de Boer M et al (2012) : Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): a meta-analysis within 12 European birth cohorts. *Environ Heal Perspect* 120:162-170.
- 8) 財団法人 日本公衆衛生協会 (2005) ヒト臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況の継続的調査 平成11年度より平成16年度総括報告書.
- 9) Mori C and Todaka E (2011) Environmental contaminants and children's health Sustainable health science for future generations. MARUZEN PLANET Co.,Ltd. (ISBN: 978-4-86345-077-6)
- 10) Caspersen I.H, Knutsen H.K, Brantsaeter A.L, Haugen M, Alexander J, Meltzer H.M, Kvalem H.E. (2013): Dietary exposure to dioxins and PCBs in a large cohort of pregnant women: results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Environ Int.* 59:398-407.
- 11) Kvalem H.E, Knutsen H.K, Thomsen C, Haugen M, Stigum H, Brantsaeter A.L, Froshaug M, Lohmann N, Papke O, Becher G, Alexander J, Meltzer H.M (2009) : Role of dietary patterns for dioxin and PCB exposure. *Mol Nutr Food Res.* 53:1438-1451.
- 12) Sjodin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Bjork J, Bergman A (2000): Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ Health Perspect.* 108:1035-1041.
- 13) Sasamoto T, Ushio F, Kikutani N, Saitoh Y, Yamaki Y, Hashimoto T, Horii S, Nakagawa J, Ibe A. (2006): Estimation of 1999-2004 dietary daily intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs by a total diet study in metropolitan Tokyo, Japan. *Chemosphere.* 64:634-641.

## **A Study on the Estimation of Mother-Fetal Exposure of POPs by Questionnaires and Genetic Factors**

Principal Investigator: Chisato MORI

Institution: Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University  
1-8-1 Inohana, Chuou-ku, Chiba-City, Chiba 260-8670, JAPAN  
Tel: 81-43-226-2017 / Fax: 81-43-226-2018  
E-mails: cmori@faculty.chiba-u.jp

[Abstract]

Keywords: Polychlorinated biphenyls (PCBs), Genome-Wide Association Study (GWAS), Questionnaire analysis, Exposure pathways, Estimation of exposure amount

It is well known that persistent compounds like polychlorinated biphenyls (PCBs) get accumulated in the human body. These compounds have a long half-life and pose a toxicological risk to human development. It has been reported that the diet is the major source of exposure to PCBs. If population groups having a high exposure to PCBs can be identified using a food frequency questionnaire (FFQ) without performing a chemical analysis, saving time and expenditure is possible. Herein, we determined the relation between FFQ responses and blood PCB contamination levels in mothers. PCB analysis was performed using gas chromatography (GC) combined with an electron capture detector (ECD) for rapid screening and GC combined with negative-ion chemical ionization-mass spectrometry (NICI-MS) for a detailed analysis of congener profiles in the human serum.

The expected and actual blood PCB levels in mothers ( $n = 1,490$ ) were determined using rapid screening. Based on the stepwise forward selection results of Bayesian regression models, it was observed that the blood PCB level (mean:  $0.28 \pm 0.16$  ng/g-wet) positively correlated with age and intake of fish and eggs and negatively correlated with the number of deliveries. These results are consistent with the results from a Japanese total-diet study on the accumulation of dioxins from food intake. These findings indicate that an estimation of daily intake is useful in predicting PCB accumulation in mothers.

The blood PCB level using GC–NICI-MS was comparable to the values obtained from GC-ECD analysis ( $n = 313$ , mean:  $0.35 \pm 0.23$  ng/g-wet). Moreover, the analytical values of the PCBs in the samples analyzed by GC–NICI-MS were comparable to the values reported from other methods. This indicates that GC–NICI-MS is suitable for analyzing tetra- to hepta-chlorinated PCBs in serum samples. CB-153, CB-138, and CB-180 are the major contributors to the total accumulated PCB concentration. These PCB profiles in



serum samples were comparable with previous results from Japanese studies.

Our genetic analysis did not identify any genes that show a strong correlation with blood PCB concentration.

As the analytical method using GC–NICI-MS has a higher sensitivity and selectivity compared to GC-ECD, it can serve as a suitable method for the rapid screening analysis in large-scale cohort studies.