

生活環境中の化学物質と
赤ちゃんの成長に関する追跡調査
～赤ちゃんの成長の追跡調査～



東北大学大学院医学系研究科
環境保健医学分野

調査に関するご質問・お問い合わせ

東北大学大学院医学系研究科

環境保健医学分野

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1

TEL : 022-717-8102 (または8105)

FAX : 022-717-8106

Eメール : tasc@ehs.med.tohoku.ac.jp
本日の説明は () が行いました。

これからの調査の流れ

ご出産おめでとうございます

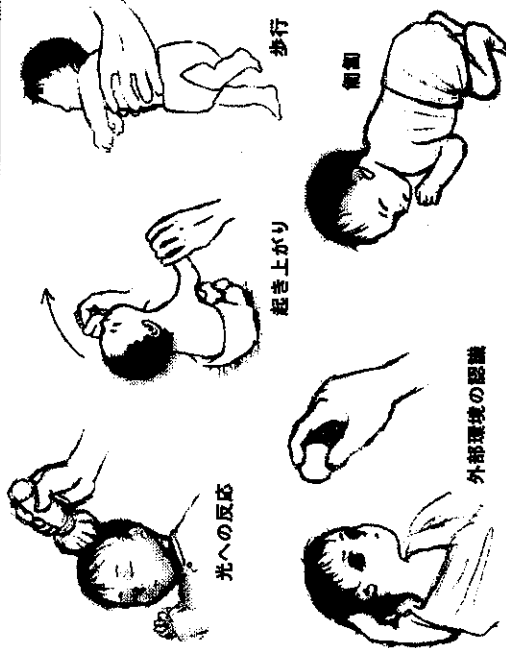
- 生後2日目頃
今後の予定についてご説明します。
毛髪をひとつまみ頂きます。
食生活のアンケートをお願いします。
- 生後3日目頃
ブラゼルトン新生児行動評価により
赤ちゃんの様子を観察します。
- 生後6日目 退院後の予定についてご説明します。

退院

- 生後30日目頃
母乳を50ccほどお分け下さい。
宅急便にて哺乳びんをお送りします。
同封の「送り状」にて料金受取人払いで
返送下さい。
- ・1歳6カ月児健康診査や3歳児健康診査の頃に
同じような行動評価をお願いします。
 - ・半年後や1年後に育児に関する簡単なアンケートを
お送りします。また、だいぶ先のお話になりますが、
乳歯が抜けたらお分け下さい。
 - ・その他にもお願いすることがありますが
改めてご連絡致します。

新生児行動評価について

- 生後3・4日のお子様を対象に行動検査を行います。例えば・・・
- ・刺激への適応：音や光、触覚などに反応する能力を調べます。
 - ・原始反射：生まれながらに起立や匍匐などの原始的な能力を持っていることを見たいきます。
 - ・外部環境の認識：人の顔やガラガラを使って、赤ちゃんが外部へ注意を払い、認識することを調べます。
 - ・覚醒レベルをどれだけ上げられるかを観察します。そのために例えば、泣くことも赤ちゃんの能力の一つと考え、泣き始めたらそのまま少しの間あやしません。そのことも評価の一環としてご理解下さい。
- 赤ちゃんには個人差があります。この評価は優劣を決定するものではなく、個人差や特徴を見るものです。評価後に担当者が簡単にお子様の特徴をお話しますので、今後の育児に活かしていただければと思います。生まれればかりの赤ちゃんにも様々な能力が備わっています。生後3～4日で既に色々なことが出来るのだというところと一緒にご覧になって下さい。



(新生児行動評価の項目の一部)

周産期における環境由来化学物質による健康影響の疫学研究

分担研究者 堺 武男（東北大学医学部附属病院周産母子センター 助教授）

研究要旨

生活環境由来の化学物質が母体から経胎盤または経母乳に胎児と新生児に移行し、何らかの健康影響が起りうるかを検証するための前向きコホート研究が開始された。本年度は疫学調査開始の年度にあたり、母体へのインフォームド・コンセント、登録者の条件設定、出産までの経過観察、出産時における臍帯血等の採取法、ならびに母児退院までの追跡調査に加え、出生後30日頃の母乳収集を行うための研究システム構築を行い、その評価と再構成を行った。本院での検討では、説明を行った母親のおよそ40%の同意が得られ、順調に調査が開始されたものと判断された。

A. 研究目的

子供の心理行動面の障害が様々な形で問題となっており、学習不能、注意欠陥多動障害などが話題となっている。その多くの場合、単に人間関係や環境に起因する心因的なもののみならず、中枢神経系の微細な欠損の可能性が示唆されている。発生は遺伝子に起因する遺伝疾患のみならず胎内環境により左右され、栄養や薬物による健康影響も明らかにされてきた。また環境汚染物質では我が国で胎児性水俣病が発見され、環境由来の化学物質が母体で濃縮蓄積され、それが胎児に移行し中枢神経系を冒しうる事が判明した。このような胎児期に児の脳の正常な発生や発達を冒しうる化学物質としてメチル水銀や鉛などが知られているが、有機塩素系化合物であるダイオキシン類やPCBにもそのような作用が危惧されている。例えば、PCB曝露によって甲状腺機能がかく乱され、中枢神経系の発生に必須な甲状腺ホルモンが欠乏し、知能低下を引き起こす可能性が指摘されている。実際、出生時に甲状腺ホルモンが低値を示すクレチン様の症状を示す児が増加しているとも言われている。このような背景のもと、胎内における児の脳をとりまく化学的な環境を把握し、子供の脳に影響を及ぼしうるかを検証する疫学研究が開始された。本分担研究では、周産

母子センターの立場から疫学立ち上げに参加し、生後の児の発達を経過観察する作業を分担した。

B. 研究方法

周産期における研究

胎内における化学物質環境を推定するため、産科外来で妊娠28週に母体血を確保するとともに、分娩時に臍帯血を収集し、臍帯、胎盤から組織を採取し冷凍保管した。臍帯血は化学物質等の分析ならびに血漿を分離し内因性の様々な指標算出の材料とした。出産2日後に母親後頭部より毛髪を収集し、総水銀の材料とした。出生後の児への曝露をモニタリングするため、生後30日頃に、小児外来または郵送により母乳を50 mL程度収集した。新生児の心理行動を計測するため、生後3または4日目にブラゼルトン新生児行動評価（Neonatal Behavioral Assessment Scale, NBAS）を実施した。その詳細な方法論の確立は、東北大学大学院教育学研究科の細川分担研究員の元で行われたが、母子センターではその検査者の養成と実施の具体化を担当した。

また、出生児の何らかの病的異常が示唆される場合は、通常の診断を通して判断し、疫学研究の対象として適格かを判断した。

成長過程における研究

胎児期に受けた何らかの障害は、出生直後ではなく児の成長過程で明確になると考えられ、児の成長を経過観察する方法論について、同じく細川分担研究員と共同で予備的な検討を行った。

C. 研究結果

2000年12月よりインフォームド・コンセントを妊娠15週齢以上の妊婦に対して開始し、すでに対象者の分娩が開始されている。臍帯血採取法に関しては、臍帯血バンクにおける様々な経験から、1) 新生児が臍帯から切り離された段階で採取する方法、2) 胎盤が排出された後に胎盤をつり下げて胎盤血を回収する方法、に大別される。本年度の検討では、ダイオキシン分析を目指すためより大量の臍帯血採取を試み、吊り下げ法による採取を実施した。この方法の利点は、重力差を用いてより多くの血液を回収できるばかりでなく、注射器を用いずに直接ガラス瓶に回収できる点であるが、反面、分娩室スタッフ以外に要員を配置する必要があり、24時間体制で待機させた。その結果、安定的に30-60 mLの臍帯血採取が可能であった。臍帯動静脈は収縮しやすい臓器である。排出胎盤では従って児との間の臍帯切断面よりの血液回収は困難であり、臍帯中央部に切開を入れ回収する方法とした。なお、胎盤と臍帯はそれぞれ分離し、金属分析用に臍帯基部と胎盤中央部分より微少な組織を採取し保存した。残りの胎盤は縦に分割し別個に保管し、臍帯も保管した。分娩後の毛髪収集も順調であり、毛髪の脱色（ブリーチ）、カラーリング、パーマなどで金属含量が変動するため、毛髪の取り扱い状況も聞き取った。母乳については退院後の生後30日頃における収集のため母親の協力がどこまで得られるか危惧されたものの、数名の母親から母乳が十分出ないという理由で辞退があったのみで、回収率は100%、採乳できた率も良好で95%で推移した。

2000年2月の段階で対象者の出産は25例であり、そのうち1例について出生児の先天奇形が疑われ、精査の結果リンパ管奇形と推定された。NICUに入院し加療することとなり、調査

対象から除外した。

NBAS実施に際して、出産二日目に検査者またはNBASに精通したものを派遣し母親に事前説明し、翌日に新生児行動評価を行うこととした。本研究に先立ち、別の産科医院の協力を得てNBASの訓練を実施してきたが、その際に母親からいくつか疑問または苦情が出された。主な点は、新生児を裸にして試験することの妥当性、新生児に起きあがりなどの身体検査を課すことの妥当性、Moro反射など生体防御に関わる検査の侵襲度、などであった。検査法の安全性に関してはすでに十分保証されていると考えられるものの、母親の不安を取り除く必要があると考えられた。そこで、本調査ではNBAS実施前日にそのような質問が集中する部分についてあらかじめ説明を行い、了解を得て実施した。また検査後に簡単なコメントを返すこととした。今のところ母親からは好意的に迎えられると考えられた。

NBASは検査者の主観的な判断に基づく検査法であり、検査者内または検査者間の基準の変動や差異が心配される。NBASマニュアル（稚山監訳、ブラゼルトン新生児行動評価、医歯薬出版）によれば、NBASの信頼性はスコアリング結果が他の検査者の評価と90%以上一致することとされている。現在までに3名の検査者が参加しているが、46項目の検査項目のうち、95%以上で合意が得られ、信頼性については概ね妥当と予想された。なお、新生児行動評価を行う際に、結果の告知を希望する場合には母親同席でNBASを実施し、その結果も母親に検査者から返すシステムとした。その際に本検査で明らかに異常と思われる児がいる場合には主治医に連絡するシステムとなっているが、今のところそのような事例はない。

D. 考察

本分担研究では臍帯血採取とNBAS実施に際して母子周産センター小児科の立場から疫学研究立ち上げに協力し、2001年1月から出産が開始されたこともあり、臍帯血採取とNBAS実施の観点から参加した。調査は開始されたばかりであり、NBASが主観的検査であることを考慮し、継続して検査結果の信頼性を高める努力を

払いつつ、疫学研究に必要な例数の確保を目指したい。

当初の計画通り、新生児行動評価に次いで、出生後1年半程度で再び心理行動面の発達を追跡調査する予定である。胎児期に受けた影響がいつの時期に最も顕著に現れるかについては二つの可能性がある。一つには、胎児期脳は環境刺激に敏感である反面、可塑性が働き幼児期後期には影響がかき消され、現象的には何も観察されない可能性がある。例えば、早産児は乳児期の発達では遅れていても、幼児期には追いついていくことがよく知られている。他方、もう一つの可能性として発達の過程で小さな困難が拡大していくケースが考えられ、胎児期や周産期における脳のダメージが新生児期や乳児早期には臨床症状として明確ではないものの、成長に伴い情緒面などで次第に顕在化し、それがさらに悪循環を引き起こせば発達過程に重要な影響を及ぼすこととなる。例えば、脳性麻痺は乳児期にはいると症状が顕在化するし、自閉症や多動性障害でも次第に情緒面の症状が顕在化する。ブラゼルトン新生児行動評価は、この脳性麻痺のような障害を新生児期に予見することを

意図して開発されたものであることを補足したい。いずれにしても、このような障害においては運動面を含め多様な症状を呈すると考えられ、全ての発達を一つの検査で網羅的に行うのは到底不可能であろう。低年齢では主に発達スクリーニング的な検査を実施し、ついで知能検査的な評価法の応用が妥当と思われ、追跡調査で用いる方法論の開発を今後継続したい。

E. 結論

2000年12月より東北大学附属病院における疫学研究が開始となり、分娩室における臍帯血等の採取と新生児の健診、ならびにブラゼルトン新生児行動評価の実施に関して指導的に関与した。調査研究は順調に推移しており、フィールド拡大を含め今後の調査を推進する上で基本的な研究体制が確立できたものと考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

胎児脳の発達に影響しうる環境由来化学物質に関する疫学研究 —文献的考察および生体試料採取と保存のプロトコールについて—

分担研究者 助野 典義（宮城県保健環境センター 副所長）

研究要旨

生活環境由来の化学物質と児の脳の発達を関連づける疫学研究の開始に際して、これまでに報告されている海外疫学研究を参考にしつつ、生体試料から何を分析すべきか、また試料をどのように収集し保管すべきか、についてを検討した。その結果を踏まえ、妊娠28週における母体血、分娩時臍帯血、生後30日後の母乳、分娩後の母親毛髪、児の脱落乳歯、ならびに組織として臍帯と胎盤を収集することとなった。血液および母乳試料については、総PCB分析と甲状腺機能攪乱作用を有しうるPCB化学種の分析を想定し、さらに可能ならダイオキシン類毒性等量の算出を目指すこととし、そのための柔軟な試料採取と保存に関わるプロトコールを完成させた。

A. 研究目的

本研究は、生活環境由来の化学物質による胎児期または新生児期曝露が脳にどのような影響を及ぼしうるかを検証することを意図した疫学調査である。胎児期または新生児期に受けた脳のダメージが明確となるのは児が成長した後である可能性が高く、従ってその関連性を明らかにするには児の胎児期を起点とした前向き追跡研究が必須となる。このため周産期に得られる母体血や臍帯血といった生体試料を採取し長期保存することが求められるが、疫学研究であるため標本数を確保することが必須であり、また対象者への侵襲も妥当な範囲内とすることが条件となり、様々な制約を受ける。なお、本疫学研究では、初年度における実績を考慮し、年間の目標標本数を500程度と設定された。そこで本分担研究では、疫学研究開始に先立ち、いかなる化学物質をどの生体試料で分析すべきか、現時点では予測できない測定項目や新しい分析法の出現を考慮して、どのように試料を保管すべきか、検討を加えた。その際に、あらためて海外における疫学研究を文献的に考察を加えるとともに、化学物質が脳に影響しうる経路に関してもある程度の作業仮説を立て、試料収集法

の妥当性について考察を加えた。

B. 研究方法

海外疫学研究の文献的考察

内分泌攪乱物質に関する海外の疫学研究として、五大湖における2件の疫学研究、オランダのコホート研究、ノースカロライナのPCB疫学研究を参考に、対象とする化学物質の解析とその算出法について比較し検討した。

生体試料の採取と保管

産科および周産母子センターとの協議を経て、採取可能な生体試料は母体血、臍帯血、臍帯、胎盤、母乳と決まった。児の血液採取は侵襲が大きく疫学研究に適さないと考え断念した。以上の生体試料に関して、さらにプロトコールを具体化すべく、どのような化学分析を行うのか、またそのためにはいかなる保管法が最適か検討し、疫学研究を実施する上でのプロトコールの策定を行った。

C. 研究結果

海外疫学研究の文献的考察
オンタリオ湖新生児疫学研究

米国五大湖における環境汚染は深刻であり、オンタリオ湖で捕獲された魚を習慣的に食べた妊婦 152 人とそうでない対照群 141 人から生まれた新生児を対象とした疫学研究が報告されている (Neurotoxicol Teratol 22:21, 2000)。曝露指標として、魚摂取量および化学物質の臍帯血中濃度が用いられ、本疫学研究と同様に新生児の心理行動指標にはブラゼルトン新生児行動評価が用いられている。化学分析項目は、臍帯血の“PCBs (69種類)、Hexachorobenzene (HCB)、mirex (農薬)、lead dichlordiphenyldichloroethane (DDE)”であった。PCBはさらに塩素結合数から3つに分類され、オンタリオ湖の魚の汚染状況から塩素数の高いPCBに対して特に配慮された実験計画となっている。PCB表示は ng/g fatであった。母乳も採取し解析されているが、臍帯血の結果がより明確であったとのことで、母乳の詳細な結果を示されていない。行動解析の間に有意な関連性が見いだされた化学物質は、総PCBとPCB (塩素数分類でC17-C19)であり、HCB、mirex、DDEとの間に相関はなかった。化学分析法については入手困難な文献が引用されており不明である。

ミシガン湖コホートによる児童知能検査

ミシガン湖における疫学研究では1980年代から追跡が開始されており、ミシガン湖の魚を食べる習慣を有する母親が登録され、その子供の212名について11歳の段階で行われた知能検査の結果が報告されている (N Engl J Med 335:783, 1996)。胎児期曝露を推定するために採取された生体試料は、臍帯血、分娩後の母体血、出産後半月から4.5ヶ月以内の母乳、児の4または11歳における末梢血である。測定対象の化学物質は、母体血液試料がPCBのみであり、児の血液ではさらに7種の農薬と鉛を分析し、児の毛髪の水銀含量を解析している。PCB分析法はガスクロ分析により血清総PCBの算出を行っており、標準物質としてAroclors1016と1260の混合物を使用している。PCB表示は ng/g fatであった。ただし、当時の分析技術の制約と思われるが、臍帯血の70%、母体血の22%からはPCBは検出されなかったと記載されている。知能試験法は改訂版Wechsler知能検査法な

どである。その結果、臍帯血または母乳PCBともに知能検査と相関し、胎児期曝露により知能低下が証明され、特に記憶や注意集中力への関連性が高かったと報告されている。

オランダコホート一児の心理行動検査

オランダで418人の新生児を対象としたコホート研究が進行中であり、これまでに生後10及び21日後 (Early Hum Develop 41:111, 1995)、18ヶ月 (Early Hum Develop 43:165, 1995)、並びに42ヶ月 (Early Hum Develop 50:283, 1998)における心理行動または知能検査の結果が報告されている。生体試料は、妊娠満期1ヶ月前の母体血、分娩後の臍帯血、および出産後2週、6週、および3ヶ月後の母乳である。血漿が材料の場合、非プラナーPCBであるIUPAC#118、#138、#153、および#180のみを対象に、ガスクロ+ECD検出器により分析が行われている。母乳の場合は、17種のPCDDs/PCDFs、3つのコプラナーPCB、23種の非プラナーPCBである。分析法はPCDD類をガスクロ+高分解Mass spectrumにより、非プラナーPCBはガスクロ+ECD検出器による。その結果、新生児期では母乳中PCBやPCDDs/PCDFsと神経学的な評価が相関し、42ヶ月では母体血PCBが知能検査と相関し、一方母乳中PCBとの相関は見られず、全体として胎児期曝露の影響が強調されていた。化学物質の表現法は、ng/g fatまたはmg/Lであった。

ノースカロライナPCBコホート研究

1980年代に実施されたPCBに関するコホート研究で収集された試料の再評価がごく最近になって行われた (Epidemiology 11:249, 2000)。目的は後述するように、PCBによる甲状腺機能攪乱作用を評価するためのものであり、臍帯血血清中PCB濃度と甲状腺ホルモンの関連性を解析している。心理検査は再評価の対象にはなっていない。PCBも総PCBとして解析され、表現はmg/kg lipidであった。結果は、甲状腺ホルモン濃度とPCB濃度は相関せず、甲状腺機能攪乱作用については否定的な見解が述べられていた。

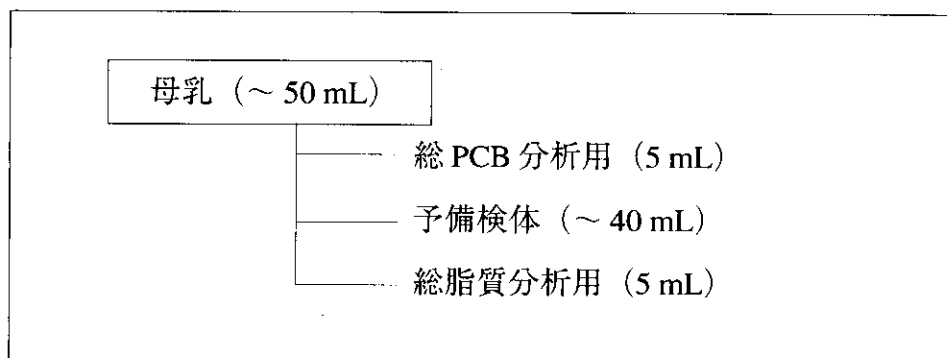
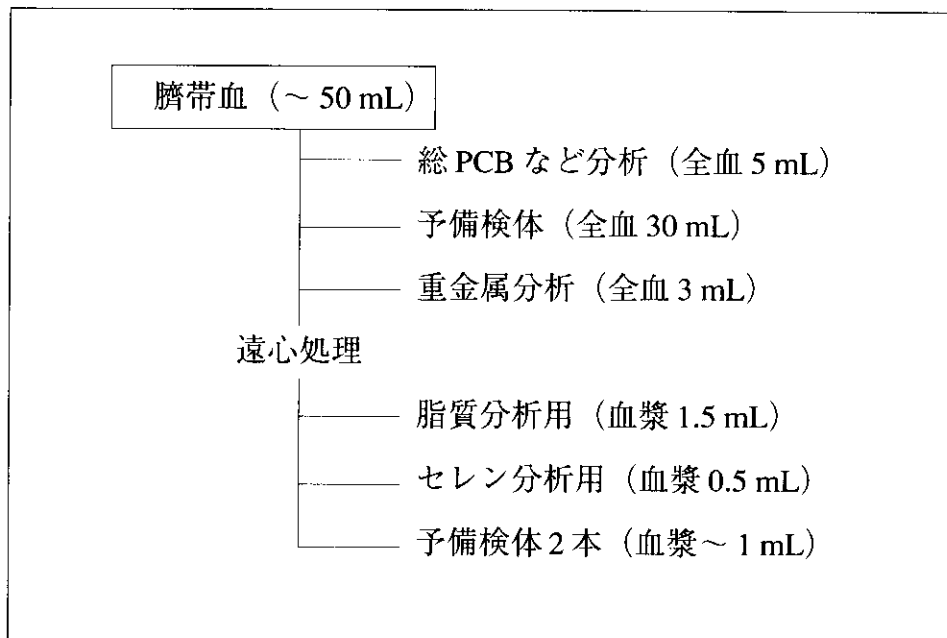
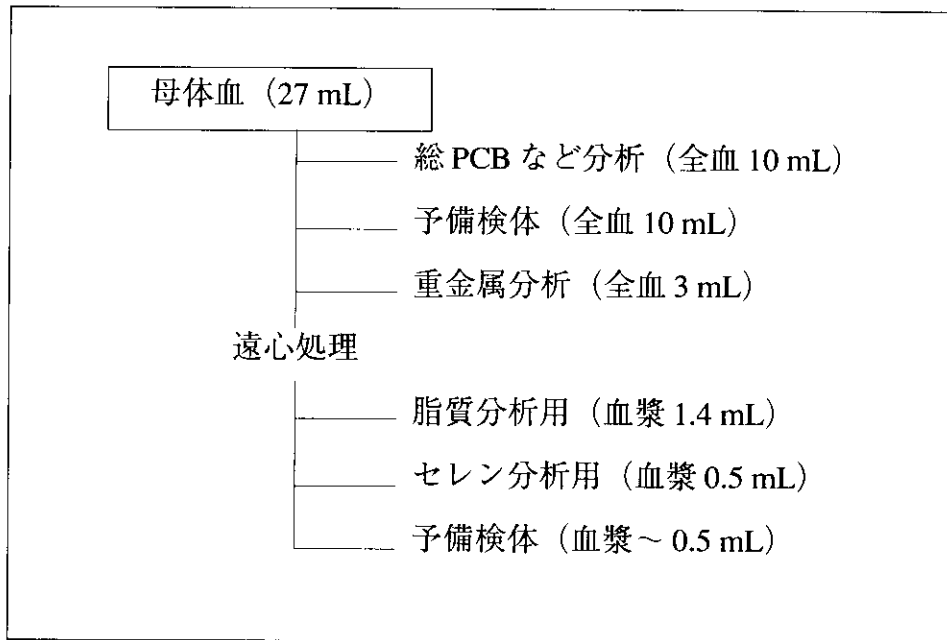


図 1. 母体血、臍帯血、および母乳の処理方法

生体試料の採取と保管

文献学的な調査を行った後に、本疫学における試料採取と保存方法についてプロトコールを作成した。その概要は図1に示した。その背景と理由については、考察において述べた。

D. 考察

海外における疫学研究を概観するに、母体血、臍帯血、母乳という材料の違いが見られるものの、胎児期曝露と児の心理行動面の関連性が強く示唆された。ダイオキシン類は主に魚の摂取を介して取り込まれることから、世界的にも魚を多食する日本人における化学物質汚染と児への健康影響の実態解明が急務であることがあらためて示唆された。

そのような研究の中で、母体血液材料を用いてダイオキシン分析を行っている研究は皆無であった。その理由として、母体血ダイオキシン濃度は極めて少なく、検体量としても血液では30-50 mLもの量が必要であること、また測定コストが高く、疫学研究には適さないためと予想された。例外として、今回の文献学的考察でセブソのダイオキシン汚染事故の文献は対象外としたが、セブソにおける疫学研究ではダイオキシンそのものが末梢血で分析されている。米国国立研究所で分析されたとされるが、検体量は

10 mL程度ときわめて少なく、どのような分析法を用いたのか、その信頼性についても不明な点が多く、少なくない疑義が出されている。一方、総PCBまたは代表的なPCBを用いてPCB曝露を推定する方法はよく用いられていた。PCB、特に非プラナーPCBは濃度も高く、分析が容易である。血液材料としては5 mL程度で分析可能であり、妊娠女性から採血する上でも侵襲性は少ない。次にこのような化学物質の濃度表現であるが、総脂質当たりで表現するケースが多く、なかには血中濃度として示すケースが見られた。総脂質算出の問題としては、脂質分析のみで10 mLの血液が必要であり、疫学研究ではマイナス要因となろう。以上の点をふまえ、本疫学研究における血液試料の処理を以下のように決定した。まず血液によるダイオキシン類のガスクロ化学分析は不可能と判断し、産科との協議の上で母体への侵襲が容認できる採血量として27 mLと設定した。ただし、今後の測定技術の進歩、特に分子生物学の技術を応用した新しい分析法の確立を期待して、ダイオキシン類の分析が可能な試料の取り扱いを行った。すなわち、血液採取に当たり可能な限り汚染を回避するため、全ての器具についてアセトン洗浄および400度加熱による有機塩素系化合物の気化操作を行い、清浄な器具のみを使用し

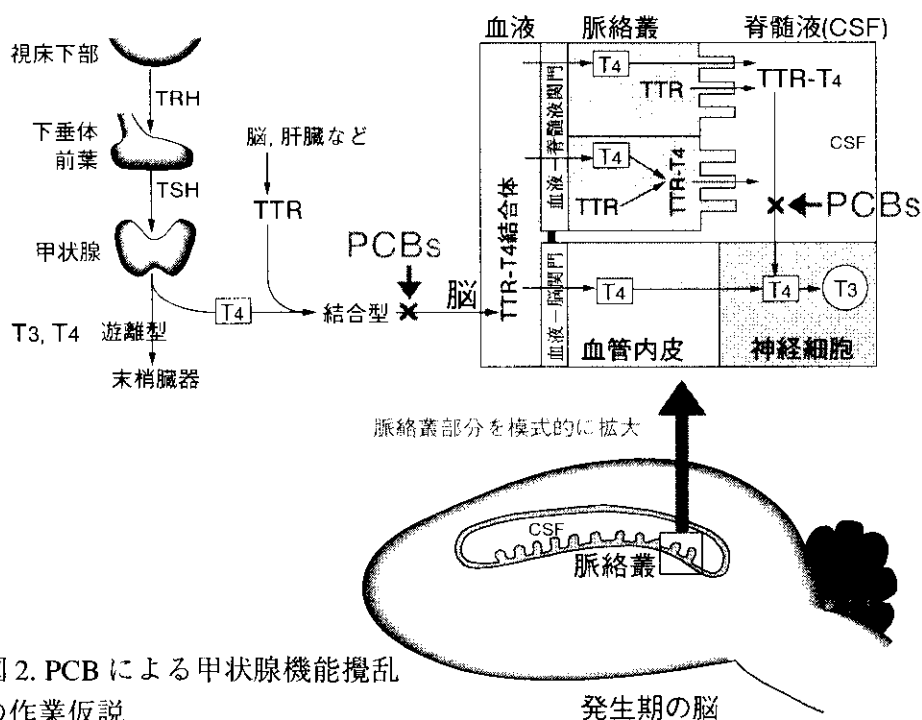


図2. PCBによる甲状腺機能攪乱の作業仮説

た。最終的に、母体血 30 mL のうち、20 mL を 10 mL ずつ 2 本に分注し冷凍保管した。残りの 10 mL については、5 mL を重金属分析用として、残りの 5 mL から血漿を分離して保管した。血漿からは総コレステロール、中性脂質、総リン脂質を分析することとし、ダイオキシン類の表現の際に、総脂質に替わりうる指標としての利用を検討した。またセレンは血漿材料を用いて分析することとした。母体血の採取タイミングであるが、文献考察からは、分娩後または分娩直前などでの採取が行われている。しかしながら、胎児脳の発達を考慮するならば、より以前の母体血でも有用な情報が得られることが期待される。さらに対象者への針刺しを最小限に抑えるには、産科外来における定期検査に重ねることが合理的と考えられた。そこで、妊娠 28 週における定期検査の際に同時に採取することとした。

次に臍帯血であるが、量的には 30-60 mL の

表 1 主な PCB 毒性係数と TTR 親和性

T4 親和性を 1 とし、PCB と TTR 親和性の相対値を示す。

化合物	TTR 親和性	毒性係数
Thyroxine(T4)	1	—
T3	0.08	—
PCDD/PCDF		
2,3,7,8-TCDD	none?	1
2,3,7,8-TCDF	none?	0.5
Co-PCB		
IUPAC#77	<0.001	0.0001
IUPAC#126	<0.001	0.1
IUPAC#169	1.15	0.01
IUPAC#105	<0.001	0.0001
IUPAC#118	<0.001	0.0001
IUPAC#156	<0.001	0.001
非プラナー PCB		
IUPAC#38	1.9	対象外
IUPAC#80	7.1	対象外
IUPAC#127	8.2	対象外
IUPAC#110	2.6	対象外
IUPAC#111	2.7	対象外
非プラナー PCB 代謝物		
OH-IUPAC#14	3.9	対象外
di-OH-IUPAC#80	5.6	対象外

Ref. Toxicol Applied Pharmacol 162:10, 2000, Environm health Perspec 107:273, 1999, など

採取が可能であった。従って、場合によってはガスクロによるダイオキシン定量分析が可能と期待され、5 mL を 2 本、化学分析と重金属分析用に小分けし、残りを採取用瓶に残してそのまま凍結した。採取瓶はアセトン洗浄と加熱処理による清浄化を行った専用容器を用意した。血漿については、母体血の通り処理し、さらに血漿から甲状腺ホルモンなどを分析する可能性を考慮し、血漿を多めに保管した。

母乳については、脂肪含量が多く総脂質は 5 mL で分析可能である。濃度も総脂質当たりで表現することとし、5 mL を 2 本、脂質用と総 PCB 用に小分けし、残りを気密性の高いほ乳瓶のまま凍結した。ほ乳瓶の清浄化も臍帯血採取用試料瓶と同様の処理を行った。母乳採取のタイミングとしては、なるべく出産時期に近く、また母親が比較的母乳を提供しやすい時期を考慮し、出産後 30 日頃とした。母乳中ダイオキシン濃度に関しては、埼玉県による比較的大集団を対象とした疫学研究が存在し(埼玉県健康福祉部 平成 11 年度母乳中のダイオキシン類濃度調査報告書)、採取時期を 20 から 40 日で比較しても安定した結果が得られることが示されており、妥当な時期と考えられた。

胎児期曝露により児の脳の発生や発達に影響を及ぼしうる化学物質として、メチル水銀や鉛などの重金属が知られているが、新たに前述の通り内分泌攪乱物質、特にダイオキシンや PCB による作用が疑われている。その作用機序は明確ではないが、PCB による作用については 1 つの可能性として甲状腺機能攪乱が示唆されている。すなわち、PCB のいくつかの異性体が甲状腺ホルモンである thyroxine (T4) と類似の構造を有し、そのような PCB が血中に取り込まれると T4 運搬タンパク質である transthyretin(TTR) に結合、本来のリガンドである T4 の運搬を妨げるといえるものである。脳の正常な発達には T4 が必須であるが、T4 が血液-脳関門を通過するには TTR との結合が前提と想定され、甲状腺における T4 生産が正常でも結果的に脳への供給が阻害される。この結果として児の脳の発達が障害されることになる。以上の仮説を図 2 に示すが、この病態では血中 T4 は正常であるが、脳などでの甲状腺ホルモンの利用で欠乏が

関知されるために甲状腺刺激ホルモンのフィードバック系が働き、TSHが増加する。実際に、産科臨床では児のTSHが増加しクレチン症様の兆候を示す児の頻度が増加しているという。この仮説で重要な点は、TTRと親和性の高いPCB化学種に関する情報である。in vitroでその親和性を解析した文献が出されており、その結果を表1に示すが、コプラナーPCBやダイオキシン類にTTRとの親和性はなく、逆に非プラナーPCBにそのような高親和性の化学種が認められる。特に、TTRの本来のリガンドであるT4よりも親和性が高いPCBが存在することはきわめて驚きである。さらに、表1に示されているように、PCBのOH代謝物にもそのような活性が示唆されている。OH代謝物の化学種は極めて多様であり、化学分析を想定すると大きな困難が予想される。いずれにしても、このようなPCBは現在の所ほとんど注目されておらず、民間分析機関においても、我々環境センターでも今のところモニタリングの実施は行っていない。結局、ダイオキシン類の毒性表現であるTEQを算出してもこのような甲状腺機能攪乱を予見することは理論的に不可能であり、総PCBまたはできればそのような特異的な

PCBを化学分析する新たな戦略の必要性が強く示唆された。従って、本研究では採取された血液または母乳について、全てを総PCBやダイオキシン分析に回すのではなく、現時点で予測し得ない分析にも対応できるよう、試料採取と保管に可能な限りの配慮を行った。

E. 結論

本疫学研究で使用する生体試料の採取と保存法に関して、海外における疫学研究事例を参考にしつつプロトコルを検討した。その際に、通常の総PCBやTEQ計算、さらに農薬類の分析に加え、非プラナーPCBによる甲状腺機能攪乱作用の可能性、さらには現在活発に開発が進められている分子生物学を応用した新しい測定技術にも対応できるよう、柔軟な試料保管法の確立を行った。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

生体試料中の重金属分析に関する予備検討

分担研究者 仲井 邦彦（東北大学 大学院 医学系研究科 環境保健医学 助教授）

研究要旨

胎児期曝露によって児の中樞神経系の正常な発生、発達を障害しうる化学物質として、内分泌攪乱化学物質に加え、メチル水銀、鉛などが知られる。本分担研究では、重金属および栄養元素の解析を担当するが、本年度はその分析の予備検討を実施した。生体試料として、サンプル量が少ないのは母体血であり、また測定対象元素の中で血中濃度が低いものはカドミウムと想定された。そこでカドミウムを中心にプラズマイオン源質量分析装置（ICP-MS）による多元素同時定量解析の方法を検討し、重金属分析に最低で1 mLの全血が必要であることを確認した。

A. 研究目的

胎児期における曝露により、児の中樞神経系の正常な発生や発達を障害し児に行動奇形を引き起こす化学物質として、メチル水銀や鉛が知られる。最近では、内分泌攪乱化学物質の一部にも同様な作用があるのではないかと危惧され、本研究班の疫学研究が開始された。研究班全体としては、内分泌攪乱化学物質を含め、重金属を含む多様な化学物質を対象とした研究計画が立案されているが、本分担研究では重金属および栄養元素に関する解析を担当した。本年度は研究立ち上げ年度に当たり、分析法に関して予備的な試行を実施し、ICP-MSによる多元素同時分析における血液材料の最小必要量の確認などを行い、疫学研究のプロトコール作成における基礎資料とした。

B. 研究方法

予備検討を目的とし、健康な成人6名より末梢血をヘパリン採血し、後頭部より毛髪を採取した。血液中重金属の測定は、全血0.2から0.5 mLを高純度硝酸を用いてマイクロウェーブ（Milestone社、MLS-1200MEGA）灰化し、ICP-MS（PERKIN-ELMER ELAN5000）を用いて標準添加法により測定した。タフテナーバイアルはジーエルサイエンス社製の7 mLバイアルを使用した。血漿中セレンの測定は、硝酸：過塩

素酸（2：1）混合物により灰化し、Watkinson法により蛍光分光光度計を用いて解析した。総水銀の分析は、硫酸：硝酸：過塩素酸（4：1：1）にて試験管法で灰化後に、水銀還元気化法による原子吸光分析により定量した。標準試料にはNIST1577b（bovine liver）、IAEA MA-A-2（fresh fish）を用いた。

C. 研究結果

予備検討で採取した6名の全血金属元素、毛髪総水銀を表1に示した。セレンはこの表では全血における値を載せた。図1にICP-MSの分析例を示した。同時再現性、日差再現性ともに変動計数で5%以内に入り、信頼性は良好であった。全血中カドミウム、鉛ともに妥当な値が検出され、濃度が低いカドミウムでも十分な検出感度を得られた。

D. 考察

ICP-MSは比較的微量のサンプルで複数の元素を同時に測定できる利点がある。しかしながら、検出精度という点ではまだまだ問題があり、ある程度の試料を必要とした。今回、血液試料から解析した元素は、鉛、カドミウム、セレン、マンガン、銅、などであった。このうちカドミウム濃度が最も低く、ICP-MS解析に先

立つ灰化法について若干の検討を行い、安定的に分析結果を出すための灰化量として、全血で0.5 mLと決定した。従って、再検査を考慮して重金属分析に最低でも1 mLを確保する検体保管のプロトコールとした。灰化法については、従来の試験管を用いる方法と比較して、少量試料でも対応でき、外部からの汚染や試料の揮発を防ぐという点において優れているものの、1回の灰化処理に16検体しか処理できず、1日に処理可能な検体数は60程度に制限された。

行動奇形を起こし得る重金属として、メチル水銀や鉛が知られる。メチル水銀に関して、北海の離島で行われたコホート研究により、母親毛髪総水銀が10 ppm程度でも、その児の成長後の心理行動の成績が低下することが報告された (Neurotoxicol Teratol 19:417, 1997)。実際、国内に毛髪総水銀が10 ppmを越える妊婦は全妊婦の1-3%程度と予測され、さらに最近、米国は妊娠可能な女性や児童に対して、総水銀摂取抑制のため食物連鎖で上位の魚の摂取を避けるよう勧告を行った。毛髪中総水銀が高い母親を特定し、その食事調査との関連などを今後解析する必要がある。

一方、鉛も同様に周産期曝露により児の知能低下を引き起こすことが知られている。例えば、米国では全児童の9%が鉛により何らかの影響を受けていると推定され、母親血中鉛で見た場合に閾値がないとする報告もあるが、8-10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ が閾値となる可能性がある。表1に示す通り、健常の成人で血中鉛は $2.1 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{dL}$ (Mean \pm SD)であり、閾値との幅はそれほど大き

くはない。我が国における鉛の汚染源は主に老朽化水道管と予測される。近年、鉛の健康影響による疫学研究は極めて少ない。その背景には、鉛中毒がもともと貧血から注目され、その閾値は行動奇形の閾値よりも遙かに高く、鉛中毒はすでに解決済みの環境問題と考えられている風潮があるかもしれない。しかしながら、周産期曝露に関する我が国の基礎データは少なく、本疫学研究で妊婦における鉛の曝露状況の把握を試みる予定である。

カドミウムは直接に行動奇形を引き起こすと

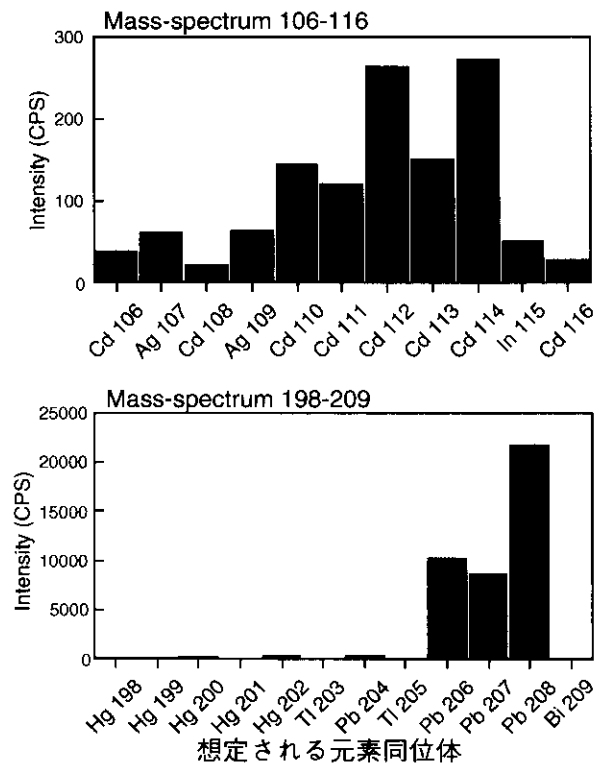


図1. ICP-MS測定例 (MZ別の信号強度)

表1. 健康成人における全血中重金属、および毛髪中総水銀

	全血試料 (ppb)						毛髪 (ppm)
	Cd	Pb	Cu	Zn	Mn	Se	Hg
#1	1.25	21.8	695.1	4970	12.4	228.4	6.7
#2	2.98	38.3	637.1	5671	10.6	175.9	3.5
#3	2.69	26.5	737.7	6011	7.1	178.3	2.7
#4	1.54	19.8	675.2	5044	15.3	219.1	1.2
#5	2.9	14.2	575.5	6778	19.3	180.0	2.5
#6	1.99	9.0	694.9	5052	12.9	191.5	1.5
Mean	2.23	21.6	690.3	5588	12.9	195.5	3.0
SD	0.74	10.2	65.3	716.9	4.1	22.7	1.8

いうデータは出されていない。しかしながら、ドイツで行われた小学2年生を対象とした疫学調査で甲状腺ホルモンと関連する血中化学物質が検索され、作業仮説としてはPCBと甲状腺ホルモンの関連性が疑われていたものの、PCBを含め鉛や水銀も関連せず、唯一血中カドミウムが関連したという(Environ. Health Perspective 107:843, 1999)。カドミウムの標的臓器の1つは甲状腺であり、PCBとの複合曝露による影響を強く危惧させる結果であった。胎児期におけるカドミウム曝露に関するモニタリングの研究は必ずしも多くはない。本調査では母体血、臍帯血のみならず、臍帯や胎盤を保存している。モニタリングにそのような組織の利用を含め、カドミウム曝露に関する基礎データを収集することも念頭に置き、本疫学研究への参加の準備が整った。

E. 結論

本疫学研究における分担研究として、血液、組織、毛髪中の重金属、栄養元素の解析の準備を行った。血液試料ではカドミウム濃度が低く、カドミウム分析を考慮した試料採取と保存方法を検討し、重金属用に血液1 mLの確保を行うプロトコールを策定した。重金属の低濃度曝露の健康影響に関しては、基礎データが必ずしも豊富な訳ではなく、人体曝露の実体解明を念頭におきつつ、本疫学研究への参加の準備を整えた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Satoh H.	Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds.	Ind Health	38	153-164	2000.

V. 研究成果の刊行物・別刷

20000763

以降 P75－86は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

厚生科学研究研究費補助金 生活安全総合研究事業

生活環境中の化学物質が胎児脳と出生後の発達に及ぼす影響の疫学研究
(H12-生活-003)

平成12年度 総括・分担研究報告書 (平成13年3月)

発行責任者 主任研究者 佐藤 洋

発 行 仙台市青葉区星陵町2-1

東北大学大学院医学系研究科

社会医学講座環境保健医学分野

Tel 022-717-8105

Fax 022-717-8106