

6ヶ月	7ヶ月	8ヶ月
65.3 秒間 2 個の積み木を持ってられる(75) 66. 意図的にベルを鳴らす 67. 取っ手でコップを持ち上げる 70. なじみのある 2 つの言葉を聞き分ける 69. 本の絵をみる(73) 73. 本のページをめくる 72. 箱の中身を探す 68. 身振りで要求を伝えようとする(身振りの記録) 71. 母音と子音の組み合わせを繰り返す (発声の記録 報告)		82. 紐で輪をつるす 75.3 つの積み木を持とうとする 74. カップの中に積み木を一個入れる 74. カップの中に積み木を一個入れる 81. 言語要求に応答する 80. 箱の蓋を開ける 77. 車を押す 79. ベグボードの穴を指でいじる 76. 表現的におしゃべりする 78. 4 つ以上の母音と子音の組み合わせを発声する
42. 座位になろうと試みる 47. 一人で座位になる 45. 立位への引き起こし 43. 歩行前の方法(はいはい)で前進する (ベル・ガラガラ) 48. スプーンや積み木を正中位で合わせる(56) 44. しばらくの間、体重を支えられる(46,53) 46. 立位にて体重を移動させる(53)	50. 座っていて体をひねる(トライアル 1・2) 51. 座位からははいはいの姿勢になる(ベル) 49. 錠剤を掴むため部分的な拇指対立を利用 53. 歩こうとする(60)	52. ひとりで立位になる(つかまり立ち) 59. 立ち上がる 57. 棒をつかむのに部分的な拇指対立を用いる 56. 錠剤を掴むために指先を使う 58. 鉛筆を持ち手のところで持つ 54. 家具を使って横に伝い歩きをする 60. 支えられて歩く 55. 座位になる

ダイオキシン類による胎児期曝露の評価方法に関する検討 — 高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法とバイオアッセイ法による比較 —

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

ダイオキシン類曝露の評価のための分析手段として、一般的に用いられている高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法（HR-GC/MS法）とレポータージーンアッセイ法に基づくCALUX™ Assay法（CALUX法）との比較検討を行った。その結果得られたTEQ値はCALUX法が概して高い結果となったが、両者の相関は $R^2 = 0.99$ と良好な結果であった。HR-GC/MSによる各種同族体および異性体分布から、2,3,7,8置換異性体が他の異性体と比較して有意に高値で得られる試料についてCALUXによる値は近似したものになった。またCALUX法において、ダイオキシン類による生体曝露を考慮にいれ、試料溶液についてPCDDs/DFs, Co-PCBs 画分との分画操作の有無によるダイオキシン類毒性当量（TCDD toxicity-equivalent quantity, TEQ）値の比較を併せて行い、両者間の比率を検討したが、Co-PCBs 含量が比較的多い試料についてやや高値になる傾向が認められたが、大きな相違はなかった。このことから2,3,7,8置換異性体を中心としたプロファイルの得られる生体および生物試料に関して多検体分析処理を行った場合、迅速な結果取得を考慮すると、CALUX法は疫学研究において有効な手段であると考えられた。汚染状況を詳細に把握し調査研究する場合は依然としてHR-GC/MSによる分析が必要であるが、化学分析およびバイオアッセイ両者の有する特徴を活用した機動的な研究が今後望まれることもあわせて確認された。

研究協力者

中村朋之 宮城県保健環境センター
鈴木 滋 宮城県保健環境センター
高橋正弘 宮城県保健環境センター

A. 研究目的

ダイオキシン類の測定に関しては高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法（HR-GC/MS法）が公定法として採用されており、222種類におよぶPCDDs, PCDFs およびコプラナーPCBs（Co-PCBs）の異性体を分離定量し、TEFを掛け合せてTEQを算出する方法が一般的に採用されている。しかしこの方法では、分析装置の検出限界から試料量を多くしなければならず、本厚生科学研究において実施を予定している血液や母乳等の生体試料分析の場合、採取量の増加をやむなくされ被験者の負担が大きい。また工

程が非常に複雑かつ煩雑であるため、分析時間が長期間におよび結果を得るまでに時間がかかる、分析技術の高度さ故にコストが高い等種々の問題がある。今回こうした問題点に対応するため、簡易分析法の一つであるレポータージーンアッセイ法を用いたCALUX™ Assay（CALUX）法を採用しHR-GC/MS法との比較検討を実施した。CALUX法は比較的感度が高く、簡便な前処理で測定でき、分析時間の短縮により多検体を効率よく処理が可能といった利点があり、疫学研究上でも重要なツールとして近年発表されている（Organohalogen Compounds 54: 48）。併せて本法がバイオアッセイによる方法であることから生体内における曝露評価も考慮に入れ、一般的なダイオキシン類の分析法で採用されているPCDDs/DFs 分画とCo-PCBs 分画を個別に測定した場合と、共存した状態による

測定の場合とで、ダイオキシン類毒性当量 (TCDD toxicity-equivalent quantity, TEQ) 値が単純に和算になるか検討し、今後の研究を進めていく上での知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

スキームについては図1に示した。試料の分析に関しては市販および独立行政法人国立環境研究所より供与された環境標準試料を用い、①を宮城県保健環境センターが分析を担当し、それ以外を株式会社日吉が担当した。

HR-GC/MSによる分析は、環境省より提示されている土壌並びに底質調査測定マニュアルに準拠して行い、CALUX法については日吉においてすでに確立されている一連のメソッドに従って実施した。以下、各方法の詳細について述べる。

HR-GC/MSによる分析

試料の抽出

環境標準試料約17.5 gを正確に秤量し、シリカ繊維製円筒ろ紙に詰め、トルエンにて約20時間ソックスレー抽出を行った。抽出液はロータリーエバポレーターにより濃縮し、粗抽出液としてトルエンにて25 mlにメスアップした。

内標準物質の添加

粗抽出液から一定量分取後、表1-1、1-2に示した¹³Cでラベル化した26種類の内部標準試薬

をクリーンアップスパイクとして添加した。

精製

全ての試料において、ダイオキシン類を測定するために硫酸処理、硝酸銀シリカゲル+シリカゲルカラム、アルミナカラムの順に従い、必要な精製を行った。

濃硫酸処理

はじめに粗抽出液から分取した試料を分液ロート中のヘキサンに移す。続いて約10 mlの濃硫酸を加え振とうした後、ヘキサン層と硫酸層が分離したことを確認し、濃硫酸層を捨て新たに濃硫酸を加えるといった操作を硫酸層の着色が認められなくなるまで繰り返した。硫酸層を廃棄した後、ヘキサン洗浄水を約50 ml加え、振とう水洗した。この操作を水層のpHが中性付近になるまで繰り返し、最終的に水層を捨てた後、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムにて脱水した。得られたヘキサン溶液についてはロータリーエバポレーターにより約1 mlまで濃縮した。

硝酸銀シリカおよびシリカゲルカラムクリーンアップ

内径1 cm、長さ40 cmのクロマト管に130℃で3時間活性化したシリカゲル (Siliagel 60, Merck) 3.0 gに10% (w/w) 硝酸銀シリカゲル (WAKO) 3.0 gをおよび無水硫酸ナトリウム約1 gをそれぞれ積層したカラムを作成した。カ

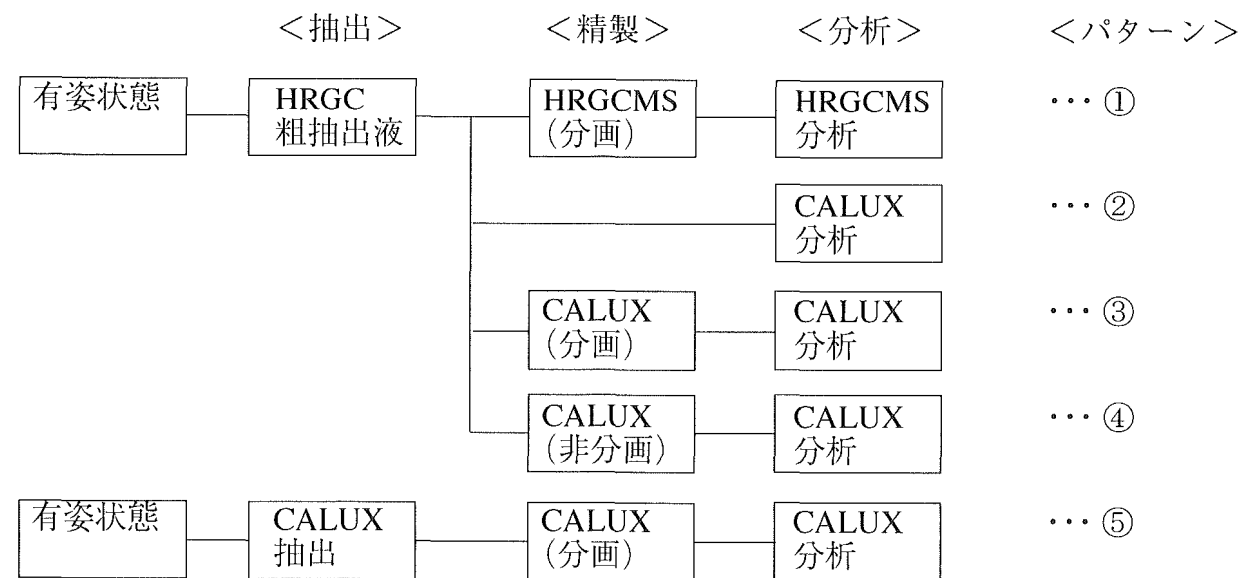


図1 分析スキーム

ラム内をヘキサンにて洗浄後、カラム上端から試料をアプライし、更に容器内壁を少量のヘキサンにて洗い込みながら添加した。その後ヘキサン160 mlを展開溶媒とし、展開液を受器に回収した。回収したヘキサン溶液はロータリーエバポレーターにより約1 mlまで濃縮した。

アルミナカラムクリーンアップ

内径1 cm、長さ40 cmのクロマト管に塩基性アルミナ（Alumina B - Super I for Dioxin Analysis, 活性度I, ICN）10 gを充填し、カラ

ム内をヘキサンにて洗浄後、カラム上端から試料をアプライし、更に容器内壁を少量のヘキサンにて洗い込みながら添加した。始めにヘキサン100 mlを展開し、炭化水素系化合物を溶出させ、次に受器を替え、5% (v/v) ジクロロメタン/ヘキサン100 mlを展開溶媒とし、Co-PCBs画分を回収した。この後再度受器を替え60% (v/v) ジクロロメタン/ヘキサン160 mlにてPCDDs/DFs画分を溶出、回収した。回収した溶液はロータリーエバポレーターにより約1 mlまで濃縮し、容器壁内をヘキサンで洗い込みなが

表 1-1 試料に添加した内部標準物質（PCDDs/DFs）

異性体名	種別	添加量 (pg)	異性体名	種別	添加量 (pg)
[¹³ C ₁₂] 2,3,7,8-TeCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 2,3,7,8-TeCDF	C.S	500
[¹³ C ₁₂] 1,2,3,7,8-PeCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 1,2,3,7,8-PeCDF	Sy.S	500
[¹³ C ₁₂] 1,2,3,4,7,8-HxCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 2,3,4,7,8-PeCDF	C.S	500
[¹³ C ₁₂] 1,2,3,6,7,8-HxCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 1,2,3,4,7,8-HxCDF	C.S	500
[¹³ C ₁₂] 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 1,2,3,6,7,8-HxCDF	C.S	500
[¹³ C ₁₂] OCDD	C.S	500	[¹³ C ₁₂] 1,2,3,7,8,9-HxCDF	Sy.S	500
			[¹³ C ₁₂] 2,3,4,6,7,8-HxCDF	C.S	500
			[¹³ C ₁₂] 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	C.S	500
			[¹³ C ₁₂] 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	C.S	500
			[¹³ C ₁₂] OCDF	C.S	500

註) C.S: クリーンアップスパイク Sy.S: シリンジスパイク

表 1-2 試料に添加した内部標準物質（Co-PCBs）

	異性体名	種別	添加量 (pg)
	2,3',4',5-TeCB (#70)	Sy.S	500
non-ortho	3,4,4',5-TeCB (#81)	C.S	500
	3,3',4,4'-TeCB (#77)	C.S	500
	3,3',4,4',5-PeCB (#126)	C.S	500
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	C.S	500
mono-ortho	2',3,4,4',5-PeCB (#123)	C.S	500
	2,3',4,4',5-PeCB (#118)	C.S	500
	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	C.S	500
	2,3,4,4',5-PeCB (#114)	C.S	500
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	C.S	500
	2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	C.S	500
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	C.S	500
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	C.S	500

註) C.S: クリーンアップスパイク Sy.S: シリンジスパイク

ら、スピッツ管（共栓付遠沈管）に移し、窒素気流下で溶媒を静かに濃縮し、ほぼ乾固させた。これにシリジスパイク-ノナン溶液50 μ lを加え溶解させ、これを検液とした。

測定

HR-GC/MSを用い、PCDDs, PCDFs, Co-PCBsを測定した。装置はCP-Sil 88 for Dioxins（長さ

60 m, 内径0.25 mm, 膜厚0.1 μ m, クロムパック）あるいはDB-5MS（長さ60 m, 内径0.25 mm, 膜厚0.1 μ m, J&W）を装着したGC2000/MAT95XL（サーモクエスト）を用いた。これにオートサンプラーより2 μ lの検液を注入した。

測定は高分解能（ $m/\Delta m > 10,000$ ）SIM法にて行い、定量は安定同位体による内部標準試薬

表 2-1 環境標準試料濃度（PCDDs/DFs）

単位 pg/g

化合物名	海底質	河川 低質	湖沼 底質 1	湖沼 底質 2	湖沼 底質 1	土壌 1	土壌 2	土壌 3	土壌 4	土壌 5
2378-TeCDD	1.5	0.5	0.3	250	270	2.1	0.9	3.0	<0.1	390
TeCDDs	2800	120	250	430	470	70	100	440	<0.1	390
12378-PeCDD	7.3	4.0	1.8	22	28	24	4.8	19	<0.1	850
PeCDDs	510	79	57	280	300	120	110	450	<0.1	850
123478-HxCDD	12	4.7	2.7	21	26	28	6.4	20	0.3	850
123678-HxCDD	62	9.7	5.0	81	91	64	15	44	0.4	860
123789-HxCDD	22	7.3	5.4	41	47	65	13	33	0.4	880
HxCDDs	380	130	120	660	760	530	190	590	4.3	2600
1234678-HpCDD	2200	95	130	590	700	1000	100	290	19	1200
HpCDDs	3400	190	390	1100	1300	1900	210	580	39	1200
OCDD	26000	640	1800	3500	4000	26000	570	1500	720	2600
Total PCDDs	33000	1200	2600	6000	6800	29000	1200	3600	760	7700
2378-TeCDF	15	12	1.5	40	68	2.6	7.3	24	<0.1	360
TeCDFs	260	150	42	660	980	83	160	690	0.2	360
12378-PeCDF	15	15	2.9	100	110	7.3	12	48	<0.1	750
23478-PeCDF	11	12	2.2	67	81	8.1	11	43	<0.1	730
PeCDFs	180	170	39	820	940	140	170	660	1.1	1500
123478-HxCDF	42	21	5.2	590	700	27	15	56	<0.2	800
123678-HxCDF	20	18	4.8	120	150	17	17	59	<0.2	880
123789-HxCDF	1.2	1.6	0.4	3.0	4.1	1.0	1.0	3.5	<0.2	780
234678-HxCDF	19	30	5.5	41	54	21	23	85	<0.2	870
HxCDFs	630	200	53	1600	1900	330	170	610	1.3	3300
1234678-HpCDF	530	100	29	2200	2800	290	68	250	0.9	1200
1234789-HpCDF	66	18	3.7	150	170	42	8.6	31	0.2	1200
HpCDFs	2300	190	64	3000	3600	940	110	410	2.6	2400
OCDF	2600	130	41	5900	6900	1600	56	190	2.2	2000
Total PCDFs	6000	840	240	12000	14000	3100	670	2600	7.4	9600
Total PCDDs/DFs	39000	2000	2800	18000	21000	32000	1800	6100	770	17000

を用いた相対検量線法で行った。PCDDs/DFsについては4～8塩素化体を測定し、Co-PCBsは4～7塩素化体の測定を実施した。各異性体についてはSIMクロマト上でS/N比が3以上のピークを内標準法にて定量した。カラムウィンドウ確認用溶液およびフライアッシュ抽出液の測定により得られた保持時間と、一致しモニターイオン ($m/z = M+$, $(M+2)+$ または $(M+2)+$, $(M+4)+$) の強度比が標準試料の測定で得られたものと±30%の範囲内で一致したものを定量対象物質とみなした。測定に用いた検量線用標準試薬は、市販 (Wellington) のものを使用した。

CALUX による分析

試料の抽出

環境標準試料約 3.5 g を予め有機溶媒 (アセトン-トルエン-ヘキサン) にて洗浄したバイアル瓶に秤量し、メタノール含有トルエンを加えた。バイアル瓶を約1分間振とう、10分間超音波抽出を行い、静置後、上澄み液をプレウォッシュしたセライト/硫酸ナトリウムカラムにアプライした。次にトルエンを加え、同様の操作を行なった。この操作を計3回繰り返す、カラムをトルエンにて洗浄後に約40 mlの粗抽出液を得た。この粗抽出液にノナン 20 μ l 添加し、遠心エバポレーターにより乾固寸前まで濃

縮した。

精製

今回は PCDDs/DFs 分画と Co-PCBs 分画に分離しアッセイ系を行う方法に加え、非分画にてアッセイ系を行う方法とにわけて行った。精製には33% (w/w) 硫酸シリカゲルカラムとカーボン系カラム (XDS社製) を連結したものを使用した。始めに濃縮した試料にヘキサンを入れ、洗いこみながらプレウォッシュした硫酸カラムにアプライし、容器に超音波をかけながら内壁を洗いこみ添加した後ヘキサン 10 ml を展開し、色素類や多環芳香族類を硫酸カラム内に吸着、分解させながら、下部のカーボン系カラムにダイオキシン類を吸着させた。この後に硫酸カラムを取り除き、カーボン系カラムにヘキサン 10 ml にて、その他夾雑物の溶出除去を行った。次に受器を替え、1:1:8 (v/v) トルエン/酢酸エチル/ヘキサン 15 ml を展開溶媒とし、Co-PCBs 画分を回収した。この後、再度受器を替えトルエン 20 ml にて PCDDs/DFs 画分を溶出、回収した。回収した溶液はそれぞれ遠心エバポレーターにより濃縮し、ヘキサン 4 ml で再溶解させた。非分画による方法では、分画と同様の操作で Co-PCB 画分および PCDDs/DFs 画分を分けずに回収した。

表 2-2 環境標準試料中濃度 (Co-PCBs)

化合物名	海底質	河川 低質	湖沼 底質 1	湖沼 底質 2	湖沼 底質 1	単位 pg/g				
						土壌 1	土壌 2	土壌 3	土壌 4	土壌 5
3,4,4',5-TCB (#81)	31	21	2.1	540	410	1.8	5.8	28	0.0	0.0
3,3',4,4'-TCB (#77)	1500	690	73	6500	6700	18	76	240	0.5	0.6
3,3',4,4',5-PnCB (#126)	64	65	4.3	240	250	11	32	120	0.3	0.4
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	3.3	4.7	0.7	13	16	3.8	8.5	33	0.0	0.0
2,3,4,4',5-PnCB (#123)	150	250	4.6	1100	670	3.5	14	47	6.2	5.8
2,3',4,4',5-PnCB (#118)	9600	11000	160	45000	32000	74	410	1200	12	14
2,3,4,4',5-PnCB (#114)	210	280	5.8	1100	740	1.3	5.8	21	0.0	0.0
2,3,3',4,4'-PnCB (#105)	4000	4400	95	18000	14000	41	160	520	4.2	5.5
2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	390	650	5.9	1500	1300	11	45	130	5.2	4.3
2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	870	1700	19	3700	2400	17	87	240	7.4	7.1
2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	210	400	4.8	890	700	9.5	32	96	1.2	1.5
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	72	92	2.7	480	350	5.8	21	59	3.6	4.4
Total Co-PCBs	17000	20000	370	79000	60000	200	890	2800	41	43

測定

PCDDs/DFs 画分および Co-PCBs 画分、さらに PCDDs/DFs と Co-PCBs 混合液の一部（最大で 1 ml）を 4 μ l の DMSO 入った試験管に分取し、遠心エバポレーターで濃縮した。また、検量線として、2,3,7,8-TCDD/DMSO 溶液（250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9, 0.9, 0.5 ppt）の標準液 4 μ l を試験管に分取し、検体と同様の操作を行なった。濃縮後、それぞれの試験管に培地（8%FBS, 1%Penicillin / Streptomycin in RPMI1640）を 400 μ l 加え、ボルテックスで 1 分間攪拌後、14～24 時間培養した 96 穴プレートに CO₂ インキュベーター（5%CO₂, 37℃）から取り出し、前培養液を取り除き、検体又は標準液を含む培地を 2 ウェルに 190 μ l ずつ添加した。一連の試料を全て加えた後、CO₂ インキュベーターにて 20～24 時間培養した。その後、CO₂ インキュベーターから 96 穴プレートを取り出し、培地を取り除き、PBS で洗浄・除去し、倒立顕微鏡で細胞生存の確認を行った。バックグランドを貼り、Lysis Buffer 30 μ l で細胞を溶解させ、プレートシェーカーで 1 分間攪拌後、96 穴プレートを暗室で 15 分間静置させ、ルミノメーター（Lucy1- 吸収波長 300-700 nm, Anthos）でルシフェリン 50 μ l を加え、発光量を測定し、反応停止液（0.06M NaOH 50 μ l/well）を加え一連の操作を完了させた。測定に用いた検量線用標準液は、市販（AccuStandard 社製）のものを調製して使用した。

C. 研究結果

HR-GC/MS から得られた PCDDs/DFs の

2,3,7,8 置換異性体および各同族体濃度を表 2-1 に、Co-PCBs 濃度を表 2-2 に示した。また、CALUX および HR-GC/MS の TEQ 値による分析結果の一覧表を表 3 に示した。

D. 考察

HR-GC/MS と CALUX による TEQ 値の比較
分析方法による比較

HR-GC/MS 分析に基づく既存のマニュアルによる方法と、CALUX 法と呼ばれる一連の方法との分析手法に関わる部分において比較を行った。比較対象は表 3 中の①と⑤である。両者の相関を図 2 に示したが、相関係数は $R^2 = 0.99$ と良好な相関が得られた。個別の分析値を比較すると CALUX 法が全ての試料において高値に算出されたが、2,3,7,8 置換異性体が各同族体中で高比率で存在する場合、CALUX 法の高値に計測される傾向が弱くなる状況が観察された。

測定方法による比較

同一の抽出並びに精製を行った HR-GC/MS（表 3 ①）および CALUX（同 ②）について得られた TEQ 値を比較すると、PCDDs/DFs に関しては後者の方が概して高い結果となり、Co-PCBs では前者が高い結果となった。そこで表 4 に示した CALUX 分析時に得られる特異的な CALUX-TEF（Organohalogen Compounds 53: 211）を HR-GC/MS で得られた分析値に掛け合せた結果と WHO-TEF（1998）により得られた TEQ 値の比を表 5 に示した。この結果から僅かに TEQ 値の上昇が見られたものの、依然として両者間の差は大きく Ah レセプターに結合する

表 3 各分析工程毎の TEQ 値の比較

試料名	海底質					河川底質					湖沼底質 1					湖沼底質 2					湖沼底質 3				
	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
PCDDs/DFs	65	308	300	-	356	24	132	119	-	107	8.2	24	28	-	24	435	939	839	-	717	496	1375	1118	-	857
Co-PCBs	8.6	2.4	3.9	-	3.5	9.4	1.8	2.4	-	2.2	0.5	7.0	0.6	-	0.5	34	3.2	30	-	31	33	26	173	-	332
Total TEQ	74	310	304	396	359	33	134	121	155	109	8.7	31	29	40	25	468	942	870	951	749	529	1401	1291	1619	1190

試料名	土壌 1					土壌 2					土壌 3					土壌 4					土壌 5				
	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
PCDDs/DFs	69	271	270	-	168	23	120	116	-	75	84	332	330	-	213	0.4	2.4	2.2	-	2.1	2300	4955	4769	-	4275
Co-PCBs	1.2	1.3	1.0	-	0.8	3.4	1.3	1.7	-	1.1	13	3.7	4.3	-	2.8	0.03	<0.5	<0.5	-	<0.5	0.05	0.5	0.7	-	0.3
Total TEQ	70	272	271	292	169	27	121	118	114	76	97	336	335	346	216	0.41	2.4	2.2	2.4	2.1	2300	4956	4770	3795	4275

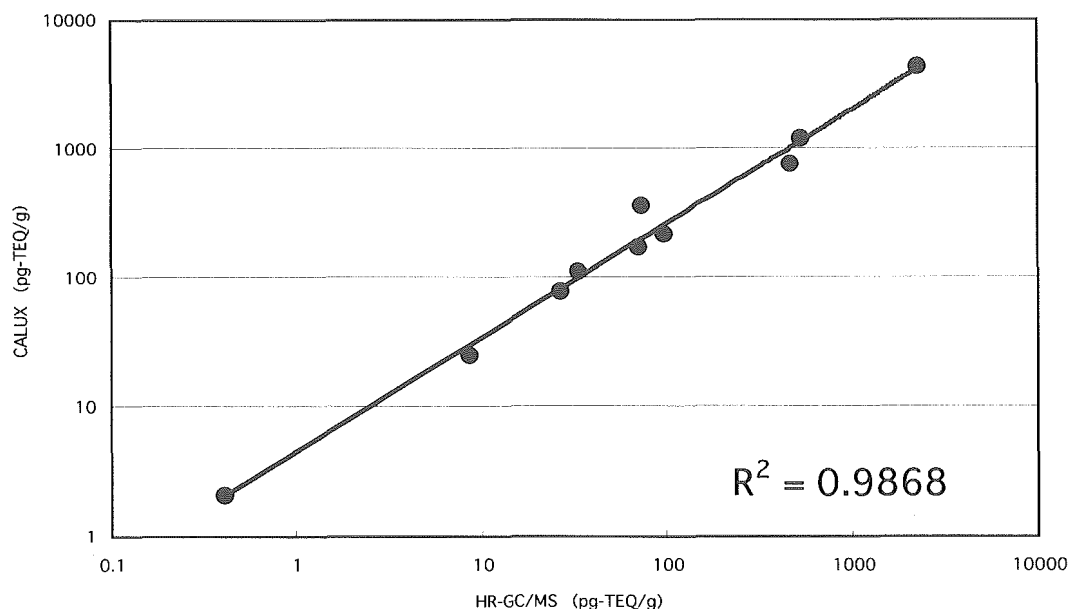


図2 HR-GC/MS と CALUX の分析結果の相関

表4 WHO-TEF と CALUX-TEF の比較

異性体名	WHO-TEF	CALUX -TEF	異性体名 (IUPAC No.)	WHO-TEF	CALUX -TEF
2,3,7,8-TeCDD	1	1	3,4,4',5-TeCB (#81)	0.0001	0.0045
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0.73	3,3',4,4'-TeCB (#77)	0.0001	0.0014
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.075	3,3',4,4',5-PeCB (#126)	0.1	0.038
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.098	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	0.01	0.0011
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.061			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.031	2',3,4,4',5-PeCB (#123)	0.0001	—
OCDD	0.0001	0.00034	2,3',4,4',5-PeCB (#118)	0.0001	—
			2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	0.0001	—
2,3,7,8-TeCDF	0.1	0.067	2,3,4,4',5-PeCB (#114)	0.0005	0.00014
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.14	2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	0.00001	—
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.58	2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	0.0005	0.00014
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.13	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	0.0005	—
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.14	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	0.0001	—
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.11			
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.31			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.024			
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.044			
OCDF	0.0001	0.0016			

表5 WHO-TEF と CALUX-TEF 適用時の TEQ 値比較

試料名	海底質			河川底質			湖沼底質 1			湖沼底質 2			湖沼底質 3		
	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率
PCDDs/DFs	65	136	2.1	24	36	1.5	8.2	13	1.6	435	528	1.2	496	609	1.2
Co-PCBs	8.6	4.8	0.6	9.4	3.8	0.4	0.49	0.28	0.6	34	21	0.6	33	21	0.6
Total TEQ	74	141	1.9	33	40	1.2	8.7	13	1.5	468	549	1.2	529	630	1.2

試料名	土壌 1			土壌 2			土壌 3			土壌 4			土壌 5		
	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率	WHO	CALUX	比率
PCDDs/DFs	69	102	1.5	23	33	1.4	84	117	1.4	0.38	1.0	2.5	2300	2470	1.1
Co-PCBs	1.2	0.46	0.4	3.4	1.4	0.4	13	5.1	0.4	0.033	0.013	0.4	0.046	0.017	0.4
Total TEQ	70	102	1.5	27	34	1.3	97	122	1.3	0.41	2.4	5.8	2300	2470	1.1

註) 比率 = (CALUX TEQ / WHO-TEF)

PCDDs/DFsは、2,3,7,8置換異性体以外にも存在することが示唆された。そこで同族対比率において各同族体間における比率の変化によりCALUX法で得られた分析値がどのような影響を受けるか考察するため、HR-GC/MSにより得られた分析値を基に各種試料においてPCDDs/DFs同族体分布、同時に同族体によるTEQ値寄与率を比較した。この結果、7,8塩素化体のいわゆる高塩素化体ダイオキシンが高比率で含有されている試料についてTEQ値が高値になる傾向が認められた。また塩素化ダイオキシン類の他にPCDDs/DFsフラクションには臭素化体であるPBDDs/DFsも存在していることから、この要因も無視できないファクターになっているものと推測された。

分画試験の有無によるTEQ値の比較

一般にHR-GC/MSにてダイオキシン類を分析する場合、PCDDs/DFsとCo-PCBsを分画して測定が行われている。CALUXについても同様に分画されて分析されることが多く、その全てが自然界に存在している形態、即ち両者が共存した状態での測定報告例は数が少ない。そのため実際のダイオキシン類による曝露影響につ

いて、多量のCo-PCBsが共存した場合、強毒性であるが絶対量の少ないPCDDs/DFs（特に4塩素化体から6塩素化体まで）の活性を見かけ上阻害する可能性が考えられる。特に環境汚染の把握ではなく、生体影響の評価を目的とした研究においては、ダイオキシン類とCo-PCBの共存に伴う生物活性の修飾に関しては、重要なポイントとなる。そこで本研究では、両者を分画して個別に測定した場合と、共存した状態による測定の場合とで、TEQの計算が単純に和算になるか検討した。この結果については、表3の③および④から示されるように、各試料において分画した際の値を1として、非分画時の比を取ると0.80～1.4の範囲におさまり、必ずしも単純な和にはならないことが示されたものの、大きな相違には至らなかった。この原因について考察すると、傾向としては、比較的Co-PCBsの多い底質試料では平均が1.3となり土壌の1.0と比較して若干高くなると思われた。しかしながら、絶対量としてかなりのCo-PCBが存在しているを考慮すると、多量のCo-PCBsが共存してもPCDDs/DFsのAhレセプター結合能には大きな影響を与えないことを示唆する実験データとも考えられよう。さらに、非分画試験に関し

Isomer profiles of PCDDs and PCDFs in Lake Sediment 3

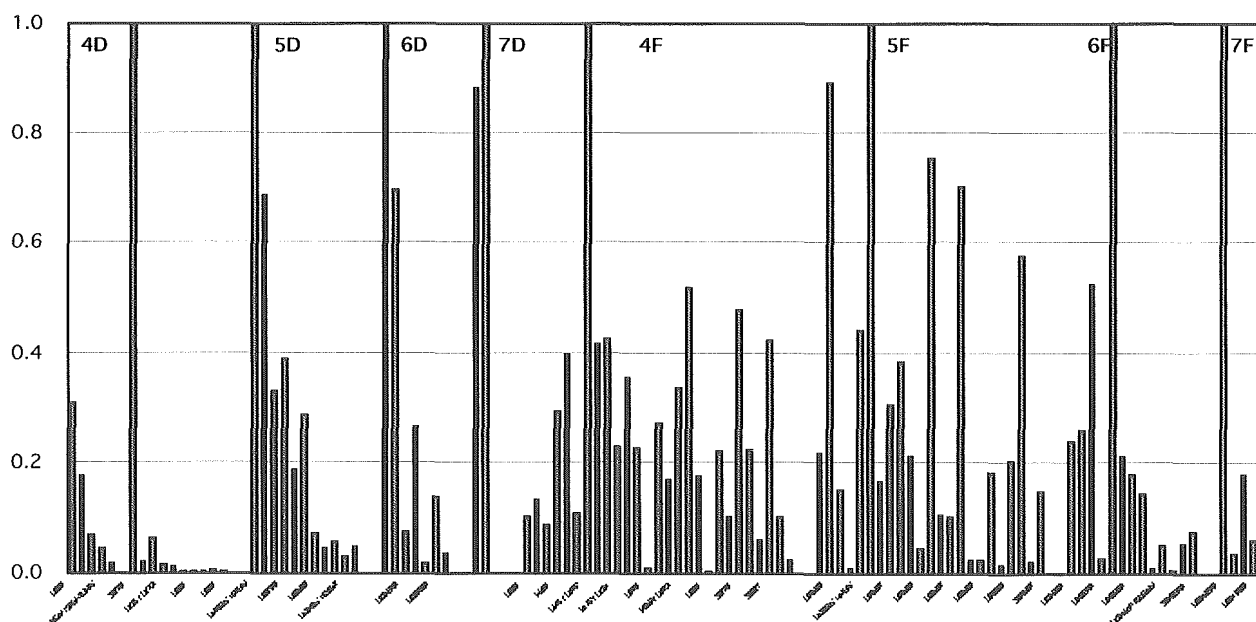


図3 異性体パターン。代表例として、海底質及び湖沼底質3の定量値から得られた異性体プロフィールを示す。図は各同族体毎に最大濃度の異性体を1として正規化した。図に示したように底質試料といった同一媒体においても汚染状況によって全く異なるパターンを示すことから、CALUX法により定量されるTEQ値は各試料の持つPCDDs/DFs分布特徴を反映しているものと推測される。

でも精製工程時に硫酸シリカゲルカラムを実施している。そのために、Ahレセプターと結合能のある多環芳香族炭化水素はかなり排除されていると考えられるため、PCDDs/DFs, Co-PCBs以外にAhレセプターに結合する物質が存在する可能性も示唆された。生体内ではダイオキシン類とCo-PCBは常に共存することを考慮すれば、分画または非分画での分析結果の一致性の意義について、今後とも詳細な資料を収集し、その意味を明らかにすることが必要と考えられた。

E. 結論

ダイオキシン類による胎児期曝露の評価方法における分析手段として、HR-GC/MS法とCALUX法との比較検討を行い、更にCALUX法においてはダイオキシン類による生体曝露が常に絶対量としては圧倒的に多いCo-PCBとの共存下で起きること考慮にいれ、PCDDs/DFs, Co-PCBs画分との分画操作の有無によるTEQ値の比較を併せて実施した。この結果TEQ値はCALUX法が概して高値の結果となったが、両者の相関は $R^2 = 0.99$ と良好な結果を示し、

2,3,7,8置換異性体が他異性体と比較して有意に高値で存在する場合、HR-GC/MSによる結果と近似する傾向にあった。また分画操作の有無によるTEQ値については、ある程度妥当な範囲に入っており、極端な相違は認められなかった。以上の結果から、生体および生物試料に関して多検体分析を必要とする疫学研究では、CALUX法は有効な手段であると考えられた。また汚染状況について詳細な調査研究が必要な場合、HR-GC/MSに頼らざる部分は残るものの、化学分析およびバイオアッセイ両者が有する特徴を活かした研究が今後望まれることもあわせて確認した。

F. 研究発表

Nakai K, Okamura K, Kumamoto K, Hosokawa T, Sakai T, Nakamura T, Sukeno N, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and heavy metals on neurobehavioral development in Japanese children: an interim report. Organohalogen Compounds 53: 180-181, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし

疫学研究のためのプロトコル再評価とマニュアルの作成

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

周産期における化学物質曝露の健康影響を評価する疫学調査を開始しているが、その過程で疫学実践上のいくつかの新たな課題が提起された。多岐に渡る問題が示されたが、主に告知、対象児の除外基準、外部評価、などが重要と考えられた。必要に応じて研究班にて議論し対策を検討するとともに、研究上の具体的な方法の再評価を行い、作業マニュアルともいえるべき調査プロトコルを作成した。疫学研究の正否は、研究側のレベルのみではなく、対象者との信頼関係や医療機関などとの連携が重要と考えられ、本報告書にて整理することとした。

A. 研究目的

ダイオキシンやPCBなどによる周産期における化学物質曝露の健康影響を評価するため、前向きコホートを進めている。その過程で疫学実践上でいくつかの新たな課題が提起された。内容的には告知や研究側と対象者との信頼関係に関わる課題など多岐に渡っている。それらの問題点を整理し、必要に応じて研究班にて論議し、対策を検討することとした。また、その結果を要員に徹底し教育訓練を行うため、作業マニュアルともいえるべきものの必要性が示唆された。本章では、疫学作業上の主要な新たな問題点を述べるとともに、作業マニュアルとして調査プロトコルの作成を目指した。

B. 研究方法

疫学調査の対象者数は登録者で200組を越え、順調に進行している。しかしながら、対象者からいくつかの要望が出されている。重要な課題として、告知の問題が提起されており、その再検討が必要と考えられた。また、早期産として生まれた児の扱いをどのようにするか、検討が必要となった。重要な内容を含む課題については、詳細に検討すると共に、一般化できる問題点については総括し教訓化した。主な課題は以下の通りである。

- ・告知—血中または母乳中化学物資の告知に関する要望
- ・成果の開示—研究成果を開示するための方法に関する要望
- ・告知—心理検査結果の告知の要望
- ・出産時の除外基準に関する再評価—特に体重に関する検討
- ・研究方法の客観性に関する課題—調査プロトコルの作成と開示

以上の課題について個別に検討した。このうち、調査プロトコルは要員の教育訓練にも必須と考え、さらに必要に応じて開示することを想定し、既存のマニュアルに加筆した。

C. 研究結果と考察

告知と開示

告知に関して、血中もしくは母乳中ダイオキシン濃度を対象者に返す上で、いわゆる安全基準というものが存在しないため、適切な説明やコメントを付すことが出来ない。数値のみを返すことはいたずらに対象者の不安を煽ることにもつながると危惧された。従って、調査開始に先立って原則として告知は行わないことを基本方針とし、倫理委員会でもその点を確認した。対象者には、告知しないことを明示し、要員には「告知を前提とした登録は決して行わない」

ことを徹底した。しかしながら、出産時や追跡時での会話によって、対象者の多くが告知を強く望んでおり、その要望に対して「告知しないことを前提にしている」ことを盾に無視することは倫理的に問題ではなかろうかと思われた。さらに、疫学研究では研究側と対象者側との信頼関係によって、長期間の研究を維持することが必要であり、信頼関係の構築のためにも、なんらかの告知が必要と考えられた。

化学物質濃度の数値を告知することについて、1つの方策は数値の告知を希望するかどうかを確認し、希望者には小児科医などの立ち会いのもとに説明し伝える方法であろう。希望者にはさらに医療機関における受診の道を確保しておくことも重要と考えられる。この方法は化学物質に関していたずらに不安を煽ることは回避できる具体案と考えられるものの、希望者の数が多い場合には対応が出来ない。希望者の割合を事前に調査するなどの検討が必須と考えられた。

一方、個別データの告知を希望しない場合、研究成果を一般向けに咀嚼し、平均値とその研究成果の要約を付してレポートとして返す方法が最も適切と考えられた。対象者の中からは、ホームページにて開示することも要望が出ており、電子的なデータによる開示も必要と考えられた。大切な点は、早急に開示方法を決定し、対象者に事前に開示方法に関する考えを伝えることと考えられた。

なお、心理検査結果の告知に関しても開示を要望する母親が圧倒的であった。心理検査は母親同席で実施しており、その試験に際して、お子さんがクリアした試験の原理や意味について、可能な限り即答で詳しく説明することとし、終了後に両親よりの質問を受ける時間を設定すると共に、評価の講評を葉書で返す方式を採用した。この発達試験については新版K式発達検査は国内ですでに標準化されており、修正月齢から見て極端に発達が遅れているケースを見出すような事例も想定される。そのような場合は、小児科専門医やカウンセラーの配置を含む対応が必要と考えられた。そのような体制はまだ未確立であり早急に検討すべき課題と考えられた。

出生児の除外基準について

出生児の除外基準に関して、多くのPCB疫学は在胎日数による基準を適用し、通常は妊娠37週から42週を対象とするものが圧倒的である。本研究では、産科医の判断もあり、妊娠36週から42週までを対象とした。一方、出生児の体重による除外基準を設定している研究は多くはないが、本研究では出生時の体重が2500 g未満の場合、除外した。すなわち、1) 妊娠37週以降で生まれた場合は、体重2400 gまで対象とする、2) 妊娠36週での出産の場合は、体重が2500 g以上の場合のみ対象とする、という2段階方式である。

PCB疫学では今のところ、低体重が惹起されることは否定されている。その一方で、魚を多食する場合は在胎期間が延長することが示されており (Grandjean P. et al. *Int Epidemiol Assoc* 30:1271, 2001)、日本のように魚を多食する民族では妊娠期間と体重について、系統的なデータ収集が必須と思われた。しかしながら、体重2500 gで機械的に切ると、満期産ながら体重が低い児が除外されるケースが時々散見され、在胎週数をより重視する除外基準の設定が必要となったためである。なお、統計解析上は解析過程で体重や妊娠週数での除外をかけることは容易である。

調査プロトコール

作業マニュアルともいえるべき調査プロトコールを成文化した。その意図は、要員の教育訓練にてもちいることに加え、外部より研究方法の開示を打診された場合に、公開する文章の準備のためである。欧米の研究では、研究実態や内容の査察も行われる時代であり、そのような外部評価にも対応可能な研究体制を確立することが、疫学研究では特に重要と考えられたためでもある。非公式なプロトコールは研究開始時から存在したが、開示に耐えるものではなく、また、今回は精度管理に関わる部分についても加筆し、例えば化学物質濃度のデータにアクセス可能な者が追跡検査の試験官を兼ねることを禁止するなど、明文化した。プロトコールは不断に改良される運命にあるが、現時点におけるプロトコールを参考資料として添付した。

その他

追跡調査の心理検査バッテリーについて、当初の研究計画では遠状寺式検査など国内の試験法の導入を想定した計画書を提出した。しかしながら、他の分担研究で述べられてる通り、海外研究では共通の検査バッテリーともいふべき試験法が採用されており、本研究でのその導入を最大限に目指した。詳細は別章で述べられているとおりである。そのため、添付したプロトコールでも明らかなように、心理検査法を変更した。

D. 結論

疫学調査を実際に進める上で問題となった、様々な個別課題について検討し、対策法を考えた。告知に関する問題は多くが未だ未解決のままであるが、今後も継続して検討すべきことの中心問題であることが改めて確認された。また作業マニュアルともいふべき調査プロトコールを作成した。

E. 研究発表

Nakai K, Okamura K, Kumamoto K, Hosokawa T, Sakai T, Nakamura T, Sueno N, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and heavy metals on neurobehavioral develop-

ment in Japanese children: an interim report. *Organohalogen Compounds* 53: 180-181, 2001.

Satoh H, Nakai K, Kim C-Y, Watanabe C. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury. In methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan. Takizawa Y, Osame M. eds. Japan Public Health Association, Tokyo pp94-98, 2001.

Nakai K, Kim C-Y, Liu Z-M, Satoh H. Effects of low dose methylmercury exposure for the lifetime in experimental mice: an interim report. In: Takizawa Y. ed. US-Japan workshop on human health effects of low dose methylmercury exposure. Minamata: National Institute for Minamata Disease, 2001; 1-11.

Satoh H, Nakai K, Kameo S, Kim C-Y, Liu Z-M. Effects of long-term and low-dose methylmercury exposure in the experimental mice. In: Takizawa Y. ed. NIMC Forum 2001-Mercury Research: Today and Tomorrow-. Minamata: National Institute for Minamata Disease, 2001; 106-111.

仲井邦彦, 佐藤洋. 内分泌攪乱物質の健康影響に関する疫学研究から一週産期曝露の影響を中心として. *最新医学* 57: 229-235, 2002.

Nakai K, Satoh H. Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies. *Tohoku J Exp Med.* 196:89-98, 2002.

G. 知的所有権の取得状況

なし

1. 研究体制

1.1. 倫理問題と倫理委員会への申請

東北大学医学部倫理委員会に申請し承認を得る。3年毎に継続申請を行う。

調査結果について、個人データの開示は原則行わず、集団の平均値の結果を匿名化して開示する。調査過程で病的な、もしくは明らかに健康を障害すると判断された場合には、個別に対処し、必要なら介入する（血中鉛が異常に高く、鉛水道管などが疑われた場合など）。

調査途中における対象者からの自発的な脱退申し出に対し、理由を問わず機械的に脱退を受け付ける。その際に、個人データ全ての末梢を要求する権利の行使を認める。

以上のインフォームド・コンセント実施のため、事前説明と行ったのちに医師等による最終確認を行う。

1.2. 要員配置計画と教育プログラム

調査現場に以下の作業に従事する要員を配置し、定期的に教育訓練と現場視察を事務局で具体化して実施する。倫理問題については、特に注意を払って教育を行う。

業務として、対象者への事前説明、出産後説明（以上、看護婦経験者が最適）、新生児行動評価（心理検査担当者）、出産ご説明や毛髪採取、食事調査（事務作業）に加え、HOME調査（保健婦が最適）が想定される。

1.3. 班構成と事務局体制

研究組織は厚生科学研究で構成し、その下に疫学作業を実際的に進めるチームを事務局として設置し、作業を担う。必要に応じて、県環境センター、保健所、医師会、などの外部組織との連携を構築し、研究ネットワークを充実させる。

1.4. データ管理とデータベース

氏名と住所を有するデータは事務局でのみ管理し、ファイルメーカーにてデータベースを構築する。原則、ネットワークから外して設置する。事務局や班員に開示する際はIDで管理し、適及可能な匿名化とする。データベースへのアクセス権を厳密に規定する。

化学物質曝露量を把握できる立場の人間は、原則として心理検査に直接関与させない。

2. 出産までの疫学調査の実施

2.1. 事前説明時の除外基準

除外対象として、体外受精、奇形、多胎、母親の聴覚または視覚障害、精神分裂病、てんかんなどの精神疾患、遺伝病、ウイルス性肝炎、HIV感染、甲状腺機能亢進症および低下症、白血病、糖尿病（妊娠性糖尿病は除外しない）、高度のステロイド剤服用などとし、境界線上のケースではその都度判断する。第1子がダウンなどの疾患の場合、第2子で羊水検査で正常と確定されるまで説明を保留する。外国人（日本語を主言語としない家庭の場合）、未成年（事前説明日当日において）、臍帯血バンク登録者などは除外する。一方、子宮内膜症、子宮筋腫、習慣性流産、人工授精、妊娠中毒症（重度は主治医と相談）、アトピー性皮膚炎、喘息、自己免疫疾患、通常の不妊治療、プレドニンや小児用バファリン服用などは除外しない。カルテを事前に見て事前説明の有無を決めるため、前日にカルテチェックを行う。除外対象を15%、応諾率50%程度を見込む。

2.2. 対象者への事前説明とインフォームド・コンセント

妊娠20週前後で事前説明を行い、同意確認の最終判断を形式的には主治医より実施する。カウンターサインは主治医よりの取得を原則とするが、状況として本人の同意が確実な場合は当方の疫学関係者によるカウンターサインでも承諾書を受け付けるシステムとして倫理委員会に申請する（外来が混み合う場合に、主治医のカウンターサインを取ることが困難なケースが少なくないため）。

調査結果の個人データは原則として非開示であることを、インフォームド・コンセントの際に明確にする。

2.3. 母体血採取

妊娠27週頃の後期採血時に合わせて母体血30 mLを採取する。ヘパリン採血とし、PCB汚染否定済みのロット管理された真空採血管を使用。

2.4. 出産時の除外基準

妊娠期間37-42週を対象とするが、安全を見て36週のゼロ日から対象とする。PCB疫学では体重で除外するstudyは稀であるが、2500 gを切る場合は注意を要することが多い。暫定的には、妊娠37週未満で2500 g未満は除外し、37週以降の場合は体重2400 g以上を対象とする。なお、PCBによる胎児期曝露によって低体重となるとも指摘されたが、その後の疫学で否定されている。一方、魚多食で在胎期間が延長する。

口蓋裂など明白は先天奇形は母親の感情を考慮して除外する。心奇形は原則として対象とし、重度の場合（将来の手術が約束された場合など）は除外する。

黄疸に伴う光線療法については原則として対象外としない。

その他、予後に影響がないと判断されるケースについては新生児行動評価を省略することがあっても、対象として継続する。

最終的には、主治医の判断や母親・家族の感情を尊重して作業を進める。

2.5. 臍帯血、胎盤、臍帯採取

臍帯血採取は、児が切り離され、胎盤が娩出する前。ガス分圧測定用臍帯血を採取した直後に注射器を使わずに採取する（注射器は基本的にダイオキシシンに汚染されている）。術者は各病院の助産婦、産科医師に委託する。凝固や分娩事故で採取できない場合は、欠損とする。臍帯血採取の欠損を穴埋めするため、臍帯及び胎盤の化学物質濃度から臍帯血中濃度を推定する式の算定を行う。

臍帯血採取は揮発性有機化合物を排除したガラス瓶に採取する（ケミカルチャンバー内にて350度前後で加熱した容器を使用する。手配は専門業者に委託する）。抗凝固剤としてヘパリンを使用し、ロット管理する。採取から12時間以内に遠心処理し、全血、血漿、赤血球に分けて冷凍する。血液の凍結保存は50 mL容量のガラス製遠心管にて行う。

臍帯、胎盤はダイオキシシン-freeメチルアルコールにて3回洗浄済みのプラケースにて冷凍保管する。

2.6. 食事調査

半定量式食事摂取頻度調査によって、「過去1年間の平均的な摂取状況」を聞き取り調査する。妊娠によって嗜好が大きく変わったことも考えられるので、その有無についても簡単に聞き取る。

2.7. 新生児検査

ブラゼルトン新生児行動評価(NBAS)を生後3日目に実施する。児の状態によっては検査実施不可能となる場合もあるが、PCB曝露で敏感に関連するとされる、漸減反応、原始反射などについては可能な限り測定する。

心理検査官の養成をセンターを決めて実施し、検査官間の一致を定期的に検証する。

光線療法実施時には生後3日目でのNBAS実施が困難であることが多く、また何らかの理由で新生児が入院した場合もこの項目を省略する。追跡自体は、そののちの認知行動面の発達に影響があると想定されない限り、除外しない。

2.8. 毛髪採取

出産後に後頭部より採取し保管する。脱色、染色、パーマの有無とその実施時期を聞き取り記録する。本数は20本程度とする。毛髪採取は母親によっては抵抗が大きく、インフォームド・コンセント時の重要事項の1つとする。

2.9. 退院前説明

住所、連絡先（特に母乳採取用の瓶の送り先）、出生地、学歴（両親）、飲酒歴、喫煙歴（妊娠中の両親）などに関する一般的項目について聞き取ると共に、退院後の調査の進行について説明する。

以上の一連の調査協力に対し、謝金5000円を支払う（母乳収集までを含むと見なす）。

2.10. 母乳収集

生後30日頃にダイオキシンfreeのは乳瓶を送付し、50 mLの母乳を収集する。搾乳器や別の容器の使用を禁止する。宅配便にてやりとりし、1往復のコストは1400円程度。冷凍保管は血液に準ずる。

2.11. カルテ情報の転載

新生児カルテより新生児の体位データ、Apgar score、Silverman's Retraction Score、分娩時間、分娩時の医療行為、蘇生の有無、母親合併症について転載する。母親カルテより、飲酒や喫煙習慣の有無などについて記載がある場合は、メモとして記録する[本人の自己申告の内容と食い違う場合、自己申告の内容を優先させる]。同じく合併症などを転載すると共に、超音波検査に基づく胎児成長を記録する。

3. 出産後の追跡調査

3.1. 育児環境調査

生後半年、または／および1年半の時期にアンケート法により育児環境を調査する。

3.2. SES調査

アンケート形式による社会経済的要因の調査を実施する。Hollingshead Four Factor Measures of Socio-Economic Statusの採用を検討する。学歴、職業、収入などに立ち入ることになるので、なんらかの面接時が望ましい。

3.3. 母親IQ検査

Raven's Coloured Progressive Matricesによる母親IQ検査を行う。言語を用いず推理能力を評価。所要10-15分。国内では45歳以上で標準化が行われている。

3.4. 発達・知能検査の追跡調査－7ヶ月頃

項目として、Bayley Scales of Infant Development (BSID、この時期の検査では言語は用いない)、新版K式発達検査、およびFagan Test for Infant Intelligence (FTII)を用いる。FTIIは発達試験ではなく、新奇好性を利用した認知試験であり、将来の知能を予測しうるともされている。

発達試験については、検査官の養成を見越して準備することが望ましい。またこの時期は月齢の小さな差が大きな意味を持つため、修正月齢を用い、毎月定期的の実施する必要がある。

発達検査への参加者には、交通費実費および謝金5000円を支払う。以後の検査も同様とする。

3.5. 発達・知能検査の追跡調査－1歳半頃

新版K式発達検査およびBSIDによる追跡検査を行う。ただしこの月齢では言語による試験が入り、翻訳の妥当性、著作権で問題点が残る。

3.6. 発達・知能検査の追跡調査－2歳以降

2歳半から知能試験が可能であり、Kaufman Assessment Battery for Children (K-ABC)を採用する。発達検査はBSIDを日本語化し採用する。実施に際しては、月齢で数ヶ月程度の差を許容し、年間で数回の実施時期を設けて集中的に行う。

その後の知能試験ではWPPSIやWISC-IIIなどを行うと共に、認知行動面のいくつかの測定を行う。また誘発脳波による他覚的検査を実施する。その他の検査についてはあらためて検討する。

4. 化学分析〔詳細な分析法は候補方法を示すのみで、まだ最終決定には到っていない〕

4.1. 毛髪総水銀

総水銀として毛髪水銀を分析する。毛髪を3cm間隔で切り揃え、過去3ヶ月毎の曝露量を推定する。

4.2. PCB

臍帯血、母乳、母体血、胎盤、臍帯（この順は優先順位を示す）の総PCBおよびその高度塩素化PCB量を化学分析する。1検体5万円程度であり、1000検体で5000万円。分析費の確保を目指し、検体を保管する。全検体の化学分析ではなく、ハイリスクおよびローリスク集団のみの分析も考慮すべきかもしれない。

4.3. ダイオキシン類（TEQ算出）

臍帯血、母乳、（母体血、胎盤、臍帯）のダイオキシン毒性当量（TEQ）の算出を目指す。化学分析は1検体20-30万円であり、レポータージーンアッセイによる総TEQ値の分析を目指す（1検体10万円）。分析費の確保を目指し、検体を保管する。

4.4. 魚介類摂取量からの化学物質摂取量推定に基づく代替指標

魚介類摂取量自体が良好な代替指標になるものと思われる。

次に、調査地区にて定期的に魚介類をバスケット法で収集し、メチル水銀等（総水銀でもいいのか？）を分析し、魚介類摂取量と積算、毛髪総水銀との相関を解析する。

PCB、ダイオキシン類について、魚介類の独自分析は費用的に困難であるので、国内で開示されているデータからデータベースを作成し、その平均値と魚介類摂取量からPCB・ダイオキシン類摂取量を推定する。このような代替指標をPCB等の化学分析が終了するまで活用する。

4.5. ビスフェノール、農薬、その他の有機化学物質の分析

母乳、臍帯血、（母体血、胎盤、臍帯）のビスフェノールの化学分析を目指す。特に母乳中ビスフェノールは濃度も高く危惧されている。この他に、農薬類（BHCやDDEなど）や可塑剤などの分析も考慮すべきかもしれない。

農薬については、各地区で特徴的な使用歴史があり、その基礎資料を収集する。

4.6. 重金属（鉛、有機錫、など）

臍帯血、母乳、母体血試料中の重金属類としてPb、有機錫の分析を行う。その他に分析を検討する重金属類として、Cdなどを考慮する。多元素同時分析が可能なICP-MSか、フレイムレス原子吸光などの方法が考えられる。

4.7. 必須元素（セレンなど）

生体防御に関わる各種要素を分析する。その候補として、セレンなどの微量元素に加え、同時に分析が可能なら亜鉛、銅などの必須微量元素の解析を検討する。さらに、脂質成分、特にw3系脂肪酸の分析を目指す。また、ビタミン類や葉酸などの解析も考慮すべきであろう。

4.8. 生体成分の分析

甲状腺刺激ホルモン(TSH)、甲状腺ホルモン（遊離または総T4/T3）を臍帯血で分析する。PCBの胎児期曝露では甲状腺機能攪乱がその作業仮説であり、また血中CdとTSHは正相関するとされている。

4.9. 生物試料の処理と保管について

採取後に速やかに処理すべき測定項目は、甲状腺ホルモン系、w3系脂肪酸、ビタミン類である。このため、母体血については採取後速やかに冷蔵し、概ね3時間以内で遠心処理し凍結する。

臍帯血は採取後12時間以内に処理し、採取からの経過時間を記録する。

臍帯、胎盤も臍帯血と同様とする。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nakai K. et al.	Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury.	Takizawa Y. Osame M.	Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan.	JPHA	Tokyo	2001	94-98
Nakai K. et al.	Effects of low dose methylmercury exposure for the lifetime in experimental mice: an interim report.	Takizawa Y.	US-Japan workshop on human health effects of low dose methylmercury exposure.	NIMD	Minamata	2001	1-11
Satoh H. et al.	Effects of long-term and low-dose methylmercury exposure in the experimental mice.	Takizawa Y.	NIMC Forum 2001-Mercury Research: Today and Tomorrow-	NIMD	Minamata	2001	106-111

JPHA: Japan Public Health Association

NIMD: National Institute of Minamata Disease

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
Nakai K. et al.	Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and heavy metals on neurobehavioral development in Japanese children: an interim report.	Organohalogen Compounds	53	180-181	2001
Nakai K. and Satoh H.	Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies.	Tohoku J Exp Med	196	89-98	2002
仲井邦彦 佐藤洋	内分泌攪乱物質の健康影響に関する疫学研究から一週産期曝露の影響を中心として	最新医学	57	229-235	2002