

果、母親毛髪総水銀と運動クラスター、マグロ／カジキ類摂取量と方位クラスター、白身魚と慣れ現象クラスターとの間に危険率5%で有意な相関関係が認められ、青身魚摂取量と原始反射クラスターとの間に危険率10%で関連性が示唆された。

D. 考察

母親毛髪総水銀とNBAS運動クラスターの間

に負の相関関係が見いだされたことは、胎児期メチル水銀曝露の結果として、児の発達の若干の遅延が起きていることを示唆する結果と考えられた。北欧フェロー諸島で行われている大規模な出生コホートでは、PCBおよびメチル水銀による曝露により認知行動面の発達の遅れが確認されているものの、その毛髪水銀濃度は概ね8-12 ppmより高いレベルと報告されている。今回の検討では対象者の毛髪総水銀値は平均で

ORIENTATION cluster

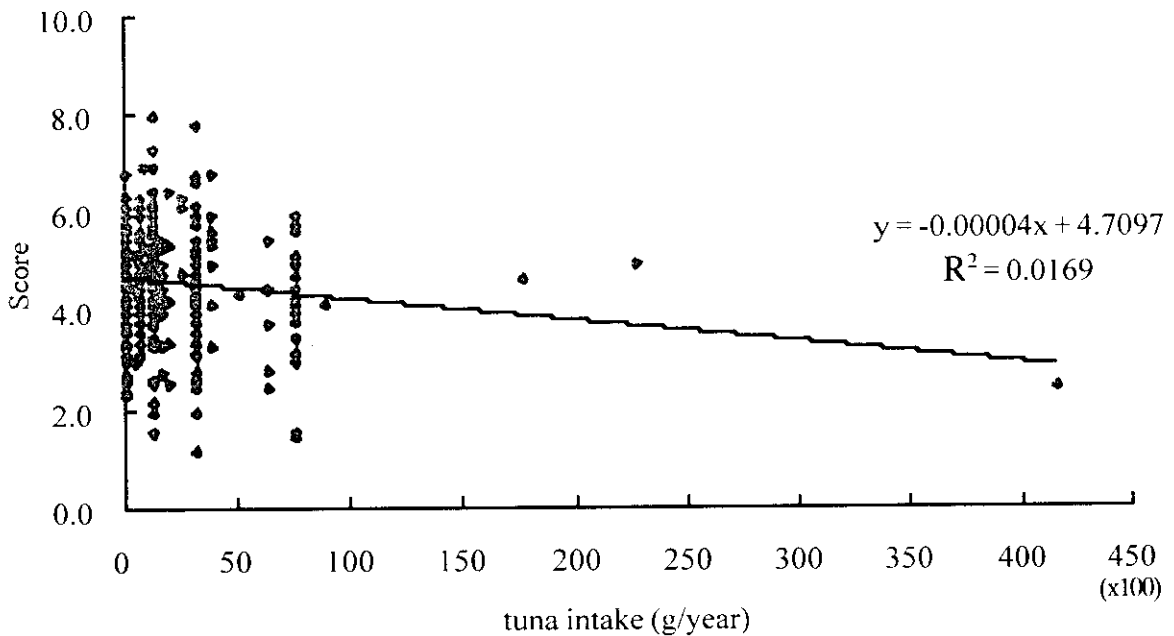


Fig. 7. Association between maternal tuna intake and the score of orientation cluster in NBAS.

REFLEX cluster

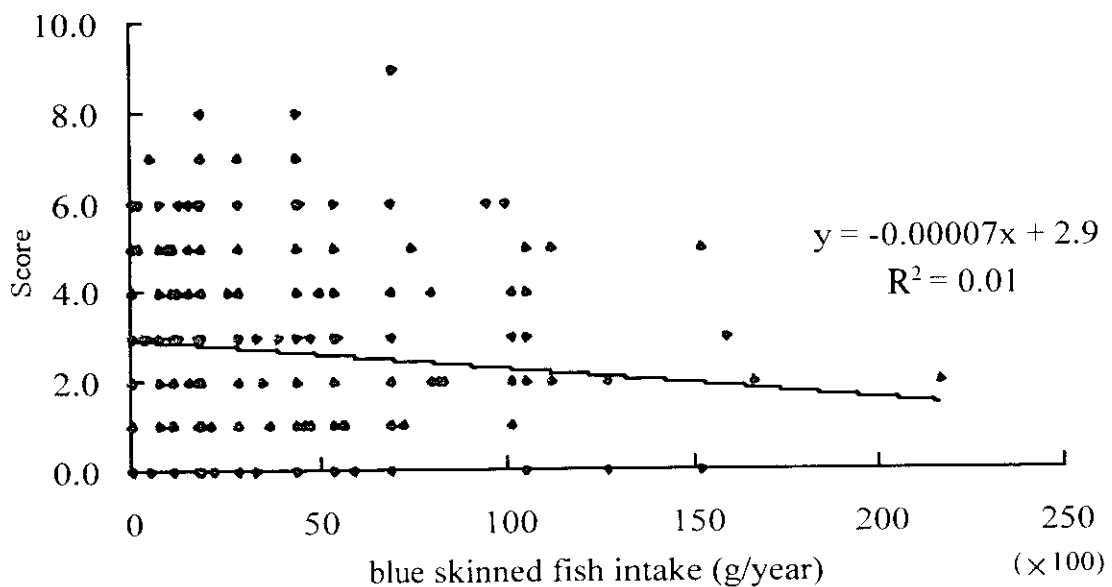


Fig. 5. Association between blue skinned fish intake and the score of reflexes in NBAS.

2.25 ppm、最大でも6.16 ppmであり、北欧の疫学研究で観察されたレベルよりもかなり低い。今回の解析結果はまだ予備的な段階であり、今後は全対象者にて解析を進める予定であるが、その際に以下の点に留意して作業を進めるべきと考えられた。

まず第一に、母親毛髪総水銀と運動クラスターの関連性は有意であるものの、その回帰直線の傾きは極めて小さく、統計学的な有意性と、実際的な健康影響の大きさに関して、十分な検討が必要と考えられる。第二に、今回の有意性は統計学的な偶然、すなわちchance findingである可能性は否定できない。実際に、毛髪総水銀と運動クラスターが有意に相関するならば、メチル水銀の主要な摂取源となっているマグロ/カジキ類の摂取も運動クラスターとの相関が見いだされてもいいと予想されるものの、マグロ/カジキ類の摂取は別のクラスターとのみ相関した。質問紙法によるマグロ/カジキ類の摂取量推定の精度上の問題もあり結論は出しにくいものの、今後の検討課題と考えられた。第三に、フェロー諸島で調査を行っているGrandjeanらの私信によると、メチル水銀の毒性は、(論文として未発表であるものの)指標によっては6-8 ppmからも見られる場合があるという。今回の我々のデータでは最大毛髪水銀量は6.16 ppmであったが、生後3日目のNBASはメチル水銀の影響をより鋭敏に検出する方法であるかもしれない。最後に、生後3日目の運動クラスターの低下は、発達の遅れを必ずしも意味するのではないかもしれない。例えば、魚を多食する場合、魚由来の不飽和脂肪酸などの栄養素の影響として、在胎週数の割に体重が増加しないことが報告されており、これは栄養学的な影響と推測されている。児の発達は最終的には成長後での評価をもって行うべきであり、成長過程における細かな差を過大評価すべきではないかも知れない。この意味では、児の成長を長く観察し結論を導くべきと考えられる。以上の視点は、マグロ/カジキ類摂取と方位クラスター、自身魚摂取量と慣れ現象クラスターとの関連性を解釈する上でも共通の課題であろう。

一方、青身魚摂取量が増加すると児の原始反

射で異常となる割合が減少した事実は、従来から言われているように青身魚の栄養学的な利点を支持しているように思われる。原始反射は新生児が基本的な生命活動を維持するために必須の、生まれながらに備わっている反射であり、その欠如や過剰な反応はマイナスと考えられる。今回の分析結果では危険率10%であり統計学的な有意性はまだ検証されていないものの、魚摂取の利点を暗示する結果と推測された。

D. 結論

予備検討ながら、メチル水銀による胎児期曝露と生後3日目のNBASの結果を解析した。その結果、出産時に採取した母親毛髪総水銀濃度がNBAS運動クラスターと負に相関し、胎児期における低濃度メチル水銀曝露が児の発達に影響しうることが示唆された。同様に、魚摂取摂取量もNBASのいくつかのクラスターと負に相関し、魚摂取量が新生児の発達と関連することが示された。その一方で、青身魚摂取量が増加すると新生児の原始反射で異常となる割合が減少する傾向が示された。以上の結果は、魚摂取がそこに含まれる化学物質摂取を介して児の発達に負に影響すると共に、栄養学的には児の発達に寄与するという、両面性を示すものと考察された。今回の検討はいまだサンプル数288の予備的な解析であり、今後は例数を増やすと共に、生後7および18ヶ月における発達をも考慮に入れた検討が必要であろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, Hosokawa T, Takeo S, Nakamura T, Saito Y, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202:227-237(2004).

Suzuki K, Nakai K, Oka T, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and chemicals on neurobehavioral development in Japanese children: III. maternal smoking confounds neonatal

neurobehavioral status. *Organohalogen Compounds* 65:218-221(2003).

2. 学会発表

Suzuki K, Nakai K, Oka T, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and chemicals on neurobehavioral development in Japanese children: III. maternal smoking confounds neonatal neurobehavioral status. In: 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants. Boston, U.S.A., 2003年8月24-29日.

Satoh H, Nakai K, Oka T, Suzuki K, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Nakamura T, Takahashi H. Cohort study on the neurobehavioral effects of perinatal exposure to halogenated organic environmental pollutants and heavy metals in Japanese children: Protocol and preliminary results on the neonatal behavioral assessment scale. In: International Invitational Conference on Child Development and the Environment. Victoria, Mahe, Republic of Seychelles, 2003年11月3-6日.

鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 岡 知子, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: ブラゼルトン新生児行動評価法について. In: 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム. 神奈川県葉山町, 2003年6月13-14日.

仲井 邦彦, 鈴木 恵太, 岡 知子, 中村 朋之, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: 調査プロトコール. In: 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム. 神奈川県

葉山町, 2003年6月13-14日.

鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 岡 知子, 細川 徹, 黒川 修行, 亀尾 聡美, 菅原 典夫, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 妊娠期間中の母親の喫煙が新生児へ及ぼす影響—ブラゼルトン新生児行動評価を用いて—. In: 第39回宮城県公衆衛生学会学術総会. 仙台, 2003年7月4日.

岡 知子, 鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 黒川 修行, 亀尾 聡美, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 環境由来化学物質による周産期曝露の健康影響に関するコホート 第三報—新生児行動評価の結果より—. In: 第52回東北公衆衛生学会. 秋田, 2003年7月25日.

鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 岡 知子, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 環境由来化学物質の周産期曝露が児の発達に及ぼす影響に関するコホート調査: 甲状腺ホルモンと新生児の神経行動学的発達の指標との関連について. In: 環境ホルモン学会(日本内分泌攪乱化学物質学会)第6回研究発表会. 仙台, 2003年12月2-3日.

鈴木 恵太, 岡 知子, 仲井 邦彦, 岡村 州博, 細川 徹, 中村 朋之, 堺 武男, 亀尾 聡美, 佐藤 洋. 重金属ならびに内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: プロトコールと途中経過. In: 第74回日本衛生学会. 東京, 2004年3月25-27日.

仲井 邦彦, 岡 知子, 鈴木 恵太, 岡村 州博, 坂本 峰至, 安武 章, 村田 勝敬, 亀尾 聡美, 佐藤 洋. 妊婦を対象とした毛髪総水銀濃度の調査. In: 第74回日本衛生学会. 東京, 2004年3月25-27日.

F. 知的所有権の取得状況

なし

生後30ヶ月および42ヶ月時における追跡調査の方法について

分担研究者 細川 徹（東北大学教育学研究科 発達障害学 教授）
村田勝敬（秋田大学 医学部 環境保健学分野 教授）

研究要旨

PCBやメチル水銀といった化学物質の周産期曝露により出生児の発達に遅れや偏りが生じることが危惧されており、その影響を調べる目的で前向きコホート研究を実施している。本報告では、児の成長の追跡調査に関して、生後30ヶ月時および生後42ヶ月時における調査方法を報告した。生後30ヶ月時調査では郵送法による母親への質問紙調査とし、子どもの行動と情緒に関する質問紙であるChild Behavior Checklist/2-3歳用（CBCL/2-3）、社会経済的状況および育児環境に関する質問紙、さらに現在の健康状態や喫煙（現在および妊娠期間中の喫煙）などに関する項目を加えた質問紙を実施することとした。生後42ヶ月時調査では知能検査を実施することとし、Kaufman Assessment Battery for Children（K-ABC）を採用することとした。また加えて生理学的検査を実施する予定であり、現在検査法の選定作業を進めている。

研究協力者

鈴木恵太

（東北大学医学系研究科 環境保健医学分野）

A. 研究目的

周産期におけるPCB、メチル水銀といった環境由来化学物質曝露が児の発達に及ぼす影響を調べる目的で前向きコホート研究を実施している。本研究の中心課題は、周産期の化学物質曝露の推定と、その影響を広く評価するために児の発達を多角的に測定していくことである。すでに生後18ヶ月までの調査方法については詳細を報告済みである。本報告では2004年4月から実施となる生後30ヶ月時における調査方法を報告すると共に、42ヶ月時における調査項目について現時点で決定したものを報告する。

B. 研究方法

生後30ヶ月時調査

調査は母親への質問紙調査とし、郵送法とした。調査で使用する質問紙はa) 家族構成、喫煙状況などを聞く質問紙（参考資料1）、b) CBCL/2-3、c) 社会経済的状況（Socioeconomic status、

SES)/ 育児環境調査（The Evaluation of Environmental Stimulation, EES）の3つから構成される。

CBCLは子どもの情緒と行動の問題に関する質問紙である。Achenbach (1992) らによって開発され、欧米では広く精神保健の臨床や研究で使用されており行動評価法としての実績も高い。このうち今回使用するCBCDL/2-3は2-3歳児を対象としており、現在から過去2ヶ月間の子どもの状態について主たる養育者（多くの場合母親）が評価を行う。質問紙は99問の選択問題（「当てはまらない」「ややまたは時々あてはまる」「よくあてはまる」の3件法）と1問の自由記述からなる。日本語版は中田ら (1999) によって作成されており、2つの上位尺度（外向-内向尺度）と8つの下位尺度（反抗、攻撃、引きこもり、分離不安、不安神経、睡眠・食事、注意集中、発達）から構成される構成得点および

Achenbach TM. 1992. Manual for the Child Behavior Checklist 2-3 and 1992 Profile. Burlington, VT, University of Vermont, Department of Psychiatry.

中田洋二郎、上林靖子、福井知美、藤井浩子、北道子、岡田愛香、森岡由起子. 1999. 幼児の行動チェックリスト(CBCL/2-3)の日本語版作成に関する研究. 小児の精神と神経 39 (4) : 305-316

総得点により分析される。

SES/EESは前回報告書にて報告しているため詳細を省略する。

なお、特に喫煙に関しては、喫煙が児の発達における重要な交絡要因であることを考慮し、現在の母親の喫煙状況および家族の喫煙状況を聞くとともに、母親自身の妊娠期間中の喫煙状況についても確認のために再度質問紙に設問を設けた。

生後42ヶ月時調査

知能検査を実施することとし、K-ABC (Kaufman Assessment Battery for Children)を計画した。K-ABCはKaufman A & Kaufman Nによって1983年に作られた知能検査法である(日本語版は松原ら, 1993)。2~12歳を対象として、幼児・児童の知能と習得度を個別に測定し、知能の特性を継時処理-同時処理のモデルから明らかにすることを目的としている。検査は認知処理過程尺度と習得度尺度からなり、認知処理過程尺度は継時処理尺度と同時処理尺度からなる。これら4つの総合尺度の結果は標準得点(平均100, 標準偏差15)で表される。認知処理過程尺度の標準得点は継時処理尺度と同時処理尺度を総合したもので知能の発達水準を示す。またK-ABCでは知能と習得度を別々に測定することを目的としていることから認知処理過程尺度と習得度尺度を総合する得点は存在しない。

調査は、東北大学医学系研究科に設置された内コラボスペースにて、母親および児と検査者が机に対面して行われる。所要時間は30分程度と思われる。

C. 研究結果および考察

生後30ヶ月時調査について

日本語版CBCL/2-3では構成尺度は2つの上位尺度と8つの下位尺度からなるが、これに対し原本は2つの上位尺度(日本版と同じ)と6つの下位尺度(Aggressive behavior, Destructive behavior, Withdrawn, Anxious/Depressed, Sleep problem, Somatic problem)からなり、日本版の「発達」に相当する尺度はない。他の尺度についても完全な1対1対応ではなく複数の尺度から混成されたものとなっている(例えば、「攻撃」尺

度は原本の Aggressive behavior と Destructive behavior から構成されている)。このため日本版と原本との純粋な意味での比較は難しい。しかしながら、これら質問紙には文化的な背景が大きく作用すること、また構成尺度が内容的にはほぼ同一の概念を示していることを考えれば、十分な比較検討が行えるものと思われる。

先行研究を概観すると、化学物質曝露との関連を見出せなかったという報告が多い(Table 1)。しかしながらそれらでは年齢の高い時期に実施しているものがほとんどであり、CBCL/4-18歳版が使用されている(CBCL/4-18は2-3歳版とは質問項目などで異なる点がある)。年齢の増加とともに他の環境要因の影響を強く受けることになる。本調査では生後30ヶ月という年齢の低い時期に実施するため、先行研究と比べて環境要因の影響がそれほど強くないと考えられる。Tillら(2001)は有機溶剤曝露との関連を検討した中でCBCL/2-3を使用しており、曝露とスコアの低下との関連を見出している。このように年齢の低い時期に実施することにより、より直接的に化学物質曝露との関連をより検討できるものと考えられる。

喫煙に関する項目では、現在の母親および家族の状況に加えて、母親の妊娠期間中の喫煙状況に関する項目を加えた。これは出産後4日目に一度聞いているが、妊娠期間中の嗜好品摂取に関しては、出産直後より生後数年経た後の回答の方がより正確に当時の状況を反映するという報告(Enhartら, 1988)があることを考慮して付け加えた。たばこが胎児および新生児の成長に様々な影響を与えることはすでに知られていることであり、また妊娠中は産科において何らかの形で禁煙指導が行われる。そのような中で、出産直後の母親は妊娠期間中の喫煙について正直に答えにくい状況にあるのかもしれない。産後数年を経て、児の成長も落ち着いてきている段階になり当時を冷静に振り返ることができる状況になることが考えられる。

-
- Till C, Koren G, Rovet JF. 2001. Prenatal exposure to organic solvents and child neurobehavioral performance. *Neurotoxicol Teratol.* May-Jun;23(3):235-45.
- Enhart CB, Morrow-Tlucak M, Sokol RJ, Martier S. 1988. Underreporting of alcohol use in pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res.* 12: 506 - 511.

生後42ヶ月調査

K-ABCは日本でも標準化され、知能検査法として広く一般的に用いられている。検査実施に関する講習会も多く行われており(K-ABCアセスメント研究会主催)、検査プロトコール習得時の困難さは比較的少ないと思われる(検査者候補を講習会に派遣する予定である)。結果の分析も専門の解析ソフトが市販されており、比較的簡便に解析が可能と考えられる。

先行研究では、オランダおよびドイツでのPCB疫学において、本研究と同時期にK-ABCが使用され、周産期PCB曝露とスコア低下との関連が報告されている。ミシガンコホートやセイシェルでのメチル水銀疫学ではMcCarthy

Scale of Children Abilitiesが使用されているが、この検査は日本語版が市販されていない。日本での使いやすさ、疫学での検出力を考慮して、K-ABCを実施することとした。

また生後7ヶ月時調査において実施しているFagan Test for Infant Intelligence (FTII)とK-ABCとの相関を検討していく。FTIIは乳幼児の持つ新奇好性の特徴を利用した視覚認知検査であるが、のち(3歳程度)の知能(IQ)と高い相関を持つと言われている(Fagan and McGrath, 1981)。従来、乳幼児を対象とした測定信頼性は低く(測定誤差が大きい)、さらに十分に確立され定評のある発達検査(例えばBSID)でも後のIQに関する予測妥当性は月例が低いほど(1歳未満

Table 1. 先行研究でCBCLが用いられた場合の結果

Study	Exposure	Administration	Result	Reference
Seychelles	MeHg	5.5 y	No related	Myers et al. 2000.
Faroe	MeHg	7 y	No related	Grandjean et al. 1997.
Taiwan	PCB	10 - 14 y	No related	Lai et al. 2002.
Tronto	有機溶剤	4.6 ± 1.17 y	Related	Till et al, 2001.
Yugoslavia	Lead	4 - 5 y	Related	Wasserman et al, 1996.

Myers GJ, et al. 2000. Environ Res. 84:12-9.; Grandjean P, et al. 1997. Neurotoxicol Teratol. 19:417-28.; Lai TJ, et al. 2002. Arch Gen Psychiatry. ;59:1061-6.; Wasserman GA, et al, 2001. Neurotoxicol Teratol. 2001. 23:13-21.

Table-2. 主な先行研究で採用された検査手法とK-ABC使用状況

Study	Measurement	Administration (month)	Exposure	Result	Reference
Seychelles	McCarthy	66	MeHg	No related	Palumbo DR, et al. 2000.
Faroe	WISC-R	84	MeHg	Related	Grandjean P, 1997.
Michigan	McCarthy	48	PCBs	Related	Jacobson JL, et al. 1990.
North Carolina	McCarthy	36, 48, 60	PCBs	No related	Gladden BC, et al. 1991.
Oswego	McCarthy	38, 54	PCBs	Related	Stewart PW, et al. 2003.
Dutch	K-ABC	42	PCBs	Related	Patandin S, et al. 1999.
German	K-ABC	42	PCBs	Related	Walkowiak J, et al. 2001.

*McCarthy: McCarthy Scale of Children's Abilities.

Palumbo DR, et al. 2001. Environ Res. 84:81-8.; Jacobson JL, et al. 1990. J Pediatr. 116:38-45.; Gladden BC, et al. 1991. J Pediatr. 119: 58-63.; Stewart PW, et al. 2003. Neurotoxicol Teratol. 25:11-22.; Patandin S, et al. 1999. J Pediatr. 134:33-41.; Walkowiak J, et al. 2001. Lancet. 358:1602-7.

Fagan JF, McGrath SK. 1981. Infant recognition memory and later intelligence. Intelligence. 5:121 - 130.

では特に)低いとされる (Dilalla, et al. 1990; Fagan et al. 1986; Rose and Feldman, 1995). すなわち, ある時点で発達に遅れが見られたとしても, それが可逆的であれば最終評価測度にはなり得ない. このような中でFTIIは注目されており, その予測妥当性を検証する意味で, IQとの相関を検討することは非常に重要と考えられる. さらにこれは心理学領域においても非常に重要な問題でもある. 知的機能の連続性に関する検討は, 知能検査の創始者である Binet (1904) が失敗して以来, 未解決の問題のままとなっている. 特に日本ではこの種の研究は稀である. これはPiaget (1969) の発達段階説の影響が大きく単純な連続性に懐疑的であることも指摘できるが, よく計画された研究でなければ当該問題に取り組むこと自体が難しいためである. 2~3歳で測定される知能はすでに環境の影響を強く受けており, 種々の交絡要因を統制しなければ初期のいかなる指標も正確な予測には結びつかない. 本研究は, 医学, 教育など多領域からなる研究チームにより運営され, 母親 IQ や社会経済的状況など様々な交絡要因を測定しており, また対象者も 600組を越していることから, 当該問題を検討するのに十分な成果が期待される.

K-ABCの実施時間は30分程度と予想されるが, 若干の時間の余裕があることから, 検査項目を付け加えることを計画している. PCBやメチル水銀が中枢神経系に作用することを考えると, また3歳半では言語による指示が可能であることから, 平衡感覚やタッピング, リトミックなどの生理学的検査が適当と思われる. これについては現在選定作業を進めている段階である.

- Dilalla LF, Thompson LA, Plomin R, Phillips K, Fagan JF, Haith MM, Cyphers LH, and Fulker DW. 1990. Infant predictors of preschool and adult IQ: A study of infant twins and their parents. *Developmental psychology*. 26:759 - 769.
- Fagan JF, Singer LT, Montie JE, and Shepherd PA. 1986. Selective screening device for the early detection of normal or delayed cognitive development in infants at risk for later mental retardation. *Pediatrics*. 78:1021 - 1026.
- Rose SA, and Feldman JE. 1995. Prediction of IQ and specific cognitive abilities at 11 years from infancy measures. *Developmental psychology*. 33:22 - 31.
- Gladden BC, Rogan WJ. 1991. Effects of perinatal polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene on later development. *J Pediatr*. Jul;119(1 (Pt 1)):58-63.

D. 結論

生後30ヶ月と生後42ヶ月時における追跡調査で実施する項目を決定した. 生後30ヶ月時調査では, 郵送法による母親への質問紙調査とし, 実施項目を健康状態や喫煙状況(現在および妊娠期間中)に関する項目, CBCL/2-3, およびSES/EESの3種類とした. 生後42ヶ月時における追跡調査は知能検査とし K-ABCを実施することとした. さらに何らかの生理学的検査を加えて実施することとし, 現在は検査法を選定中である.

E. 研究発表

1. 論文発表

- Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, Hosokawa T, Takeo S, Nakamura T, Saito Y, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202:227-237(2004).
- Suzuki K, Nakai K, Oka T, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and chemicals on neurobehavioral development in Japanese children: III. maternal smoking confounds neonatal neurobehavioral status. *Organohalogen Compounds* 65:218-221(2003).
- Iwasaki Y, Sakamoto M, Nakai K, Oka T, Dakeishi M, Iwata T, Satoh H, Murata K. Estimation of daily mercury intake from seafood in Japanese women: Akita cross-sectional study. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 200:67-73(2003).
- Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen PJ, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *Journal of Pediatrics*. 144:177-83 (2004).
- Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Iwasaki Y, Dakeishi M, Iwata T, Terui S. Neurodevelopmental effects of methylmercury in Japanese children: a cross-sectional study in Akita. In: NIMD FORUM 2003, in press (2004).
- Murata K, Sakai T, Morita Y, Iwata T, Dakeishi M. Critical dose of lead affecting delta-aminolevulinic acid levels. *Journal of Occupational Health*. 45:209-14 (2003).

Nakaya N, Tsubono Y, Hosokawa T, Nishino Y, Ohkubo T, Hozawa A, Shibuya D, Fukudo S, Fukao A, Tsuji I, Hisamichi S. Personality and the risk of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 95:799-805, 2003
村田勝敬. “キンメダイ勧告”の背景. *医学のあゆみ* 208: 641-642 (2004).
村田勝敬, 嶽石美和子, 佐藤 洋. メチル水銀基準摂取量のゆくえ. *公衆衛生* 67:531-533 (2003).
村田勝敬. 鯨と環境保健. *秋田県公衆衛生学雑誌* 1: 47-49 (2003).

2. 学会発表

Suzuki K, Nakai K, Oka T, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Satoh H. Effects of perinatal exposure to environmentally persistent organic pollutants and chemicals on neurobehavioral development in Japanese children: III. maternal smoking confounds neonatal neurobehavioral status. In: 23rd International Symposium on Halogenated Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants. Boston, U.S.A., 2003年8月24-29日.

Satoh H, Nakai K, Oka T, Suzuki K, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Nakamura T, Takahashi H. Cohort study on the neurobehavioral effects of perinatal exposure to halogenated organic environmental pollutants and heavy metals in Japanese children: Protocol and preliminary results on the neonatal behavioral assessment scale. In: International Invitational Conference on Child Development and the Environment. Victoria, Mahe, Republic of Seychelles, 2003年11月3-6日.

Murata K. A cross-sectional study in Japan. In: NIMD Forum 2003. Niigata, 2003年11月20日.

鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 岡 知子, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: プラゼルトン新生児行動評価法について. In: 内分泌攪乱化学物質特別シンポジ

ウム. 神奈川県葉山町, 2003年6月13-14日.
仲井 邦彦, 鈴木 恵太, 岡 知子, 中村 朋之, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: 調査プロトコール. In: 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム. 神奈川県葉山町, 2003年6月13-14日.

鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 岡 知子, 細川 徹, 黒川 修行, 亀尾 聡美, 菅原 典夫, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 妊娠期間中の母親の喫煙が新生児へ及ぼす影響—ブラゼルトン新生児行動評価を用いて—. In: 第39回宮城県公衆衛生学会学術総会. 仙台, 2003年7月4日.

岡 知子, 鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 黒川 修行, 亀尾 聡美, 細川 徹, 岡村 州博, 堺 武男, 佐藤 洋. 環境由来化学物質による周産期曝露の健康影響に関するコホート 第三報—新生児行動評価の結果より—. In: 第52回東北公衆衛生学会. 秋田, 2003年7月25日.

鈴木 恵太, 岡 知子, 仲井 邦彦, 岡村 州博, 細川 徹, 中村 朋之, 堺 武男, 亀尾 聡美, 佐藤 洋. 重金属ならびに内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: プロトコールと途中経過. In: 第74回日本衛生学会. 東京, 2004年3月25-27日.

仲井 邦彦, 岡 知子, 鈴木 恵太, 岡村 州博, 坂本 峰至, 安武 章, 村田 勝敬, 亀尾 聡美, 佐藤 洋. 妊婦を対象とした毛髪総水銀濃度の調査. In: 第74回日本衛生学会. 東京, 2004年3月25-27日.

岡 知子, 鈴木 恵太, 仲井 邦彦, 村田 勝敬, 坂本 峰至, 菅原 典夫, 亀尾 聡美, 佐藤 洋. 重金属ならびに内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が出生後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究: 母親の魚摂取調査による水銀曝露評価. In: 第74回日本衛生学会. 東京, 2004年3月25-27日.

F. 知的所有権の取得状況

なし

本調査は、食事や環境由来の化学物質が、赤ちゃん（お子さま）の認知や行動の発達に何らかの影響を及ぼすかどうかを科学的に解明することを目的として行われます。

お母さまにお願いしたいアンケートは2種類あり、1つが「普段の育児や環境」に関する内容、もう1つが「お子さまの普段の行動」に関する内容です。アンケート用紙の指示に従って回答下さい。回答に要する時間はおよそ30分です。どの質問にも正解や良い答えはありませんので率直にお答え下さい。また答えたくない質問、答えにくい質問については飛ばしていただいて結構です。

お名前 _____

日付 _____ 年 _____ 月 _____ 日

お子さまのお名前 _____

■まず始めに、ご自身とご家庭のご様子をお聞きします

1. 授乳期間について、

母乳栄養が主だった期間をお聞きします。
授乳を止めた時期をお聞きします。

生後 カ月まで
生後 カ月で止めた

2. 同居のご家族をお教えてください。

祖父、祖母、ご主人、お子さんの兄姉、その他 ()
合計 人家族

3. 最終学歴をお尋ねします。○をつけてください。

ご主人 中学校、高校、高専、専門学校、短大、大学、大学院、その他 ()
ご自身 中学校、高校、高専、専門学校、短大、大学、大学院、その他 ()

4. 職業と、差し障りがなければ収入をお尋ねします。

ご主人 会社員、公務員、自営業、パート、専業主夫、その他 ()
職種 () 役職 ()
100万以下、100-300万、300-600万、600-900万、900-1200万、1200-3000万、3000万以上

ご自身 会社員、公務員、自営業、パート、専業主婦、その他 ()
職種 () 役職 ()
100万以下、100-300万、300-600万、600-900万、900-1200万、1200-3000万、3000万以上
(お勤めの場合) 産後 カ月から復帰(就職)した。

5. 喫煙についてお聞きします。

現在、ご自身は喫煙されていますか？

a) いいえ b) はい → 一日 本を 年間喫煙している

妊娠期間中は喫煙されていましたか？

a) いいえ b) 妊娠を契機に中止した c) はい → 一日 本を喫煙していた

ご自身を含め同居家族の中で喫煙する方はおられますか？

a) いない 人 → その場合は → a) 子供の前では喫煙しない(完全分煙)
b) いる 人 → その場合は → b) 少しは分煙している
c) 分煙はしていない

6. お母さまの現在の健康状態についてお聞きします。

a) 健康である b) 通院している(病名) ()
c) 通院していないが具合が悪い(症状など) ()

7. お子さまの健康状態はいかがですか？

a) 健康である b) 通院している(病名) ()
c) 通院していないが具合が悪い(症状など) ()

■お子さまの「普段の行動」についてお聞きします。

現在より過去2ヶ月間におけるお子さまの行動についてお答え下さい。その項目が、確かにまたはしばしばそうであるときは、

選択肢は「あてはまらない」、「ややまたはときどきあてはまる」、「よくあてはまる」の3つです。各質問について最もよく当てはまるもの（または近いもの）を○で囲んで下さい。どうしても答えたくない質問や答えにくい質問については飛ばしていただいて結構です。

0：あてはまらない

1：ややまたはときどきあてはまる

2：よくあてはまる

1	痛みがある（医学的原因がないときに）	0	1	2
2	年齢に比べて行動が幼すぎる	0	1	2
3	新しいことをやってみるのをこわがる	0	1	2
4	ほかの人と目を合わせようとしない	0	1	2
5	集中できない、長い時間注意が持続しない	0	1	2
6	静かに座ってられない、落ちつきがない	0	1	2
7	ものがいつものところがないと気がすまない	0	1	2
8	待ってられない、何でもすぐに欲しがる	0	1	2
9	食べもの以外のものをかむ	0	1	2
10	大人にまとわりつく、または頼りにしすぎる	0	1	2
11	いつも手助けを求める	0	1	2
12	便秘がちである、お通じがない	0	1	2
13	よく泣く	0	1	2
14	動物をいじめる	0	1	2
15	反抗的である	0	1	2
16	要求がすぐになえられないと気がすまない	0	1	2
17	自分のもちものを破壊する	0	1	2
18	家族のものやほかの子どものものを破壊する	0	1	2
19	病気でないときに下痢をしたり、ゆるい便をする	0	1	2
20	言うことをきかない	0	1	2
21	少しでもいつもの通りにやらないと機嫌が悪くなる	0	1	2
22	一人では寝たがらない	0	1	2
23	ひとが話しかけるととき答えない	0	1	2
24	ちゃんと食べていない	0	1	2
25	子どもたちとうまくやれない	0	1	2
26	遊び方を知らない、小さな大人のようにふるまう	0	1	2
27	やってはいけないことをしたあとで悪と思わないようである	0	1	2
28	家の外に出たがらない	0	1	2
29	欲求不満になりやすい	0	1	2
30	うらやましがったり、やきもちを焼いたりする	0	1	2
31	飲食物でないものをたべたりする	0	1	2
32	特定の動物、場面、または場所を怖がる	0	1	2

0 : あてはまらない

1 : ややまたはときどきあてはまる

2 : よくあてはまる

33	感情がきずつきやすい	0	1	2
34	けがをしやすい、事故にあいやすい	0	1	2
35	けんかが多い	0	1	2
36	なんでもとりちらかしてしまう	0	1	2
37	親と別々になると非常に気が動転する	0	1	2
38	寝つきがわるい	0	1	2
39	頭痛がある（医学的原因がないときに）	0	1	2
40	他人をたたく	0	1	2
41	息をとめる	0	1	2
42	そのつもりはないのに動物や人にけがをさせてしまう	0	1	2
43	たいした理由がないのにふさいでいて元気がない	0	1	2
44	怒りっぽい	0	1	2
45	吐き気がある、気分が悪い（医学的原因がないときに）	0	1	2
46	神経質な身体の動きがある、ぴくぴくした動きがある	0	1	2
47	神経質で興奮しやすい、あるいは緊張している	0	1	2
48	悪夢をみる	0	1	2
49	食べすぎる	0	1	2
50	非常に疲れる	0	1	2
51	太りすぎている	0	1	2
52	排便を痛がる	0	1	2
53	ほかの人に暴力をふるう	0	1	2
54	鼻をほじったり、皮膚または身体他の部分をむしる	0	1	2
55	性器いじりをしすぎる	0	1	2
56	動作がぎこちなく、不器用である	0	1	2
57	医学的原因がない目の問題	0	1	2
58	しかったり罰を与えてもまた同じことをする	0	1	2
59	次から次へとすることが変わる	0	1	2
60	発疹または他の皮膚の問題がある（医学的原因がないときに）	0	1	2
61	食べるのを拒否する	0	1	2
62	活動的な遊びをするのを拒否する	0	1	2
63	繰り返し頭や身体をゆする	0	1	2
64	夜ねどこにつくのをいやがる	0	1	2
65	トイレトレーニングをいやがる	0	1	2
66	よくきいきいごえをあげる	0	1	2
67	ひとが愛情を示しても反応しないようである	0	1	2
68	人の目を気にする、あるいはすぐはずかしがる	0	1	2
69	自分勝手、あういは分けあおうとしない	0	1	2

0 : あてはまらない

1 : ややまたはときどきあてはまる

2 : よくあてはまる

70	感情がきずつきやすい……………	0	1	2
71	まわりのもにほとんど関心を示さない……………	0	1	2
72	けがをすることを怖がらない……………	0	1	2
73	はずかしがりや、または臆病である……………	0	1	2
74	昼または夜、ほかの子どもと比べて睡眠時間が短い……………	0	1	2
75	大便を塗りたくったり、あるいは手でもてあそぶ……………	0	1	2
76	しゃべりかたに問題がある……………	0	1	2
77	宙をみつめている、または何かに気をとられているようにみる	0	1	2
78	腹痛、胃けいれんがある（医学的原因がないときに）……………	0	1	2
79	不必要なものをためこむ……………	0	1	2
80	奇妙な行動……………	0	1	2
81	頑固、むっつりや、あるいは怒りっぽい……………	0	1	2
82	気分や感情が急にかわる……………	0	1	2
83	よくすねる……………	0	1	2
84	眠っているときに、しゃべったり叫んだりする……………	0	1	2
85	かんしゃくをおこす、おこりっぽい……………	0	1	2
86	あまりにきちんとして、清潔でないと気がすまない……………	0	1	2
87	ひどく怖がる、または不安がりすぎる……………	0	1	2
88	協力的でない……………	0	1	2
89	活発でない、動作がのろい、元気がない……………	0	1	2
90	たのしそうでない、悲しそうである、あるいは沈んでいる……………	0	1	2
91	ふだんより声大きい……………	0	1	2
92	はじめての人や場面に気が動転する……………	0	1	2
93	嘔吐する、もどす（医学的原因がないとき）……………	0	1	2
94	夜、しばしば目がさめる……………	0	1	2
95	家をはなれてふらふら歩きまわる……………	0	1	2
96	いつもかまってもらいたがる……………	0	1	2
97	ぐずぐず泣く……………	0	1	2
98	自分のからにこもって、人とかかわらない……………	0	1	2
99	心配性である……………	0	1	2

●お子さまの家での様子や環境についてお聞きします。

選択肢のあるものは、最も近い項目の数字をまるで囲み、() 内には数字や文字を記入して下さい。

1. お子さんと一緒に遊ぶ機会はどのくらいありますか。	(1) めったにない (3) 週に3～4回	(2) 週に1～2回位 (4) ほぼ毎日
2. お子さんは遊んでいる時いつも親から見える範囲にいますか。	(1) ほとんどない (3) ほとんどいる	(2) 半分はいる (4) いつもいる
3. いつ頃お子さんに話しかけを始めましたか。	(1) 特にしていない (3) () ヶ月より	(2) 妊娠中から (4) 子どもが理解できるようになったとき
4. お子さんが眠る時にお話をしたり、子守歌を歌ってあげますか。	(1) めったにない (3) 週に3～4回	(2) 週に1～2回位 (4) ほぼ毎日
5. おうちの人とはどのくらいお子さんに本を読んであげたり、絵を見せてやったりしていますか。	(1) めったにない (3) 週に3～4回	(2) 週に1～2回位 (4) ほぼ毎日
6. お子さんは歌、童謡などを知っていますか。 *はいであれば、どこで覚えましたか(複数回答可)	(1) いいえ (1) 保育園 (3) 母親や父親から (5) その他() から	(2) はい (2) 兄や姉から (4) テレビから
7. お父さん(または父親代わりの方)は育児に協力的ですか。 *はいであれば、どのくらいの頻度で協力してくれますか。	(1) いいえ (1) 1ヶ月に1回位 (3) 週に3～4回	(2) はい (2) 週に1～2回位 (4) ほぼ毎日
8. お子さんが両親と一緒に食卓を囲んで食べるのは何回くらいですか。	(1) めったにない (3) 週に3～4回位	(2) 週に1～2回位 (4) ほぼ毎日
9. お子さんには兄弟がいますか。	(1) いない	(2) いる
10. お子さんが道路の方に歩き出したとき、あなたはいつもどうしますか。(複数回答可)	(1) 声をかけてもどるよういう (2) 駆けて行って手を引いてひきもどす (3) その他()	
11. 一日に平均何回くらいお子さんを抱き上げますか。	(1) ほとんどない (3) 3～4回位	(2) 1～2回位 (4) 5回以上
12. お子さんについてはだいたいどの様に感じていますか。(複数回答可)	(1) いつも微笑み機嫌が良い (2) ひとりでいたがる (3) 親が相手になってやると喜ぶ (4) 思うようにならないと怒る (5) しばしば泣く (6) その他()	
13. 先週は何回くらいお子さんをたたいたりしましたか。	(1) たたかない (3) 3～4回位	(2) 1～2回位 (4) 5回以上
14. お子さんがわざわざ牛乳をこぼしたらどうしますか。(複数回答可)	(1) 子どもをたたく (3) 何等かの方法で悪いことをわからせる内容() (4) 別の方法でこぼさないように考える (5) その他()	(2) 口でしかる ()
15. お子さんは毎日どのくらい子ども用の椅子に腰掛けたり、ベビーサークルを使ったりしていますか。	(1) まったくない (3) 1～2時間位	(2) 1時間未満 (4) 3時間以上
16. 遊びなど、つい手を出してしまう方ですか。	(1) いいえ (3) その他()	(2) はい ()

17.お子さんに時々自分で遊ばせているものはどれですか。(複数回答可)	(1) 朝食や昼食で食べる物の一部 (2) 食料品店で気に入った食べ物 (3) 子どもの着たい服 (4) その他 () (5) 特にない
18.お子さんの本は、何冊くらいありますか。	(1) ほとんどない (2) 1～2冊位 (3) 3～4冊位 (4) 5冊以上
19.お子さんは一日どのくらいテレビを見ますか。	(1) ほとんど見ない (2) 1～2時間位 (3) 3～4時間位 (4) 5時間以上
20.お子さんがいつでも使える状態にあるおもちゃをチェックしてください。(複数回答可)	(1) 三輪車、車、スクーター (2) 絵本 (3) ボール (4) 粘土 (5) はさみ (6) 積み木、ブロック (7) 棒さし (8) パズル (9) クレヨン、絵の具 (10) レコード、カセット、CD、ビデオ (11) おもちゃまたは本物の楽器 (12) 五十音を使ったおもちゃ (13) 数字を使ったおもちゃ (14) 人形 (15) ままごと (16) ミニカー・電車 (17) その他 ()
21.お子さんに音楽などを聞かせますか。	(1) めったにない (2) 週に1～2回位 (3) 週に3～4回位 (4) ほぼ毎日
22.おもちゃ以外でお子さんの遊びに使わせているものは次のどれですか。(複数回答可)	(1) 水 (2) 砂 (3) 食べ物 (4) だろ (5) がらくた (6) フィンガーペイント(指絵具) (7) その他 () (8) これらのどれも使わせていない
23.お子さんを食料品店・スーパーなどへ連れていきますか。	(1) めったにない (2) 週に1～2回位 (3) 週に3～4回位 (4) ほぼ毎日
24.公園など散歩によく連れて行きますか。	(1) めったにない (2) 週に1～2回位 (3) 週に3～4回位 (4) ほぼ毎日
25.お子さんは動物園、レストラン、ドライブなどに外出する機会がありますか。	(1) めったに行かない (2) 1か月に1回位 (3) 2週に1回位 (4) 1週に1回位
26.お子さんを連れてしばしば祖父母、親戚、友人宅などへ出かけますか。	(1) めったに行かない (2) 1か月に1回位 (3) 2週に1回位 (4) 1週に1回位
27.近隣に同じ年頃の子供がいますか。	(1) いいえ (2) はい (3) その他 ()
28.お子さんと同じくらいの年齢の子供をもつ友人や親戚と付き合っていますか。	(1) めったにつきあわない (2) 1か月に1回位 (3) 2週に1回位 (4) 1週に1回位
29.お子さんを連れてしばしばお子さんの友人宅などへ出かけますか。	(1) めったに行かない (2) 1か月に1回位 (3) 2週に1回位 (4) 1週に1回位
30.家族ぐるみで付き合っている家族がありますか。	(1) いない (2) いる
31.お子さんの発達をチェックするため等で定期的に保健センターなどに連れて行きますか。	(1) 行かない (2) 年に1～2回位 (3) 年に3～4回位 (4) 年に5回以上
32.あなたは自分用の本が何冊ありますか。	(1) ほとんどない (2) 1～9冊位 (3) 10～19冊位 (4) 20冊以上
* その本をどこに置いていますか。	(1) 箱に入れておく (2) 本棚にたてておく (3) その他見える場所に置いてある (4) その他 ()

33. お子さんはおもちゃをしまうおもちゃ箱や特別な場所がありますか。 (1) ない (2) ある (3) その他 ()
34. お家に何か植物がありますか。 (1) いいえ (2) はい (3) その他 ()
35. お宅は片づいているほうですか。 (1) それほどきれいではない (2) まあまあ片付いている (3) いつもきちんと片付いている (4) その他 ()
36. 子どもを世話する人が2人以上いますか。 (1) いいえ (2) はい：子どもが () か月の頃より
- * 2人以上いる場合どのくらいお互いに子どもに関して話し合い(連絡等)をしていますか。 (1) ない (2) 1か月に () 回位
37. 近くに育児について相談をする人がいますか。 (1) いない (2) いる (3) その他 ()
38. 夫婦でお子さんの話をする時間はとれますか。 (1) ほとんどとれない (2) 週1～2回位 (3) 週に3～4回位 (4) 毎日
39. 育児について、祖父母等親戚と意見が合いますか。 (1) いいえ (2) はい
* いいえの場合、どの様な点ですか。 ()
40. 母親学級を受けたことがありますか。 (1) いいえ (2) はい
41. お子さまが小さかった時、ミルクを抱いて飲ませましたか。 (1) いいえ (2) はい (3) その他 ()
42. お子さまが小さかった時、話しかけながら授乳しましたか。 (1) いいえ (2) はい (3) その他 ()
43. お子さんが新しいおもちゃを手にした時、あなたはいつもどうしますか。(複数回答可) (1) 子どもと一緒にそれをいじってみる (2) 子どもにそれをいじらせる (3) 特別な時のためにそれをとっておく
44. 見えるところにお子さんの写真を飾っていますか。 (1) いいえ (2) はい (3) その他 ()

その他にお子さまのことやお母さまご自身のことで、お困りのことがありましたら記入して下さい。

◆◆ご協力ありがとうございました◆◆

レポータージーンアッセイによる臍帯血中ダイオキシン類分析の検討

分担研究者 齋藤善則（宮城県保健環境センター 環境化学部 部長）

仲井邦彦（東北大学医学系研究科 環境保健医学分野 助教授）

研究要旨

残留性有機汚染物質（POPs）の周産期曝露影響について、かねてダイオキシン類の寄与が危惧されてきたものの、ダイオキシン類曝露に起因した明確な健康影響は未だ明確ではない。オランダで行われた出生コホートにて、母乳中ダイオキシン類と児の発達との関連性が解析されているものの、相関は確認されていない。ただし、POPs曝露に関しては、経母乳曝露より経胎盤曝露の影響が大きいことが示されており、実際にオランダのコホートでも臍帯血PCBsは児の発達と関連するものの、母乳中PCBsは相関が観察されていない。すなわちダイオキシン類の影響評価には、この出生前曝露影響を解析することが必要であり、臍帯血を用いた分析が望ましい。本コホートではダイオキシン類の胎児期曝露のリスク評価を一つの目的としており、本分担研究では臍帯血によるダイオキシン類分析について検討を行った。臍帯血は採取可能な試料の量が限られていること、ダイオキシン類濃度が成人末梢血中濃度よりもかなり低いと予想されること、疫学調査では多数検体の分析が必要であり、分析コストや分析に必要な時間も重要なポイントになること、などの条件がある。レポータージーンアッセイの手法を応用したCALUX™ Assay（CALUX）によるダイオキシン類分析を実施しその有用性などについて検討を行った。その結果、臍帯血の試料量を10 mLと限定して分析を実施した場合、定量限界以下となる検体がおよそ40%程度を占め、試料として最低でも30 mL程度は必要であることが示された。CALUXの検出力改善の試みが期待されると共に、疫学試料のうち十分量の臍帯血が確保された検体での分析実施が現実的と考えられた。

研究協力者

中村朋之（宮城県保健環境センター）

性を解析され、相関が見られないことが報告されている。ただし、並行して実施されたPCBsの評価でも、母乳中PCBsと児の発達に関連性は見られないものの、臍帯血PCBsは児の発達と高い相関を示すことが確認されている。すなわち、POPs曝露に関しては経母乳曝露より経胎盤曝露の影響が大きいことを示すものであり、ダイオキシン類の健康影響評価には、この出生前曝露影響を解析することが必須であると考えられる。本コホートの目的の一つは、このダイオキシン類の胎児期曝露のリスク評価である。このため本分担研究では臍帯血を用いたダイオキシン類分析について検討を行ってきた。臍帯血でのダイオキシン類分析では、ダイオキ

A. 研究目的

環境残留性有機汚染物質（POPs）の周産期曝露影響について、PCBsの健康影響に関しては若干の知見が蓄積され、高塩素化PCBsなどの胎児期曝露によって発達遅延などが惹起されることが示唆されている。一方、ダイオキシン類はその毒性の強さから健康影響が危惧されてきたものの、周産期曝露の影響に関しては未だに明確な科学的データは示されていない。例えば、過去にオランダで行われた出生コホートにて、母乳中ダイオキシン類と児の発達との関連

シン類濃度が母体血中濃度よりも低いこと、しかし臍帯血採取量は限られており、多くの場合で30 mL程度の臍帯血採取が限度であり、並行して甲状腺ホルモンやPCBs化学分析を実施する場合、ダイオキシン類分析は10 mL程度で実施する必要があること。さらに、疫学調査では多数検体の分析が必要であり、分析コストもかなり重要なポイントになること、などの条件があげられる。このためGC/MSによる化学分析ではなく、レポータージーンアッセイの手法を応用したCALUX™ Assay (CALUX) によるダイオキシン類分析について検討を行った。なお、GC/MSとCALUXの方法論上の比較は考察で述べるが、両者の測定値の間に高い相関が見られることは、環境標準試料を用いた検討であるものの、平成14年度の分担研究報告書で述べたとおりである。

B. 研究方法

コホート調査で同意を得て採取した臍帯血のうち、比較的多量の試料が得られた検体より余剰分を小分けし、N=10にて株式会社日吉（近江八幡市）に委託してCALUXを実施した。CALUXにおける工程は、総脂肪抽出液を酸性シリカゲルカラム+活性炭シリカゲルカラムにて処理し、まずトルエン/酢酸エチル/ヘキサンでCo-PCBs画分（以後、PCB画分と表示）を溶出させ、ついでトルエンにてダイオキシン画分（同じくDXN画分）を溶出させ、それぞれについて培養細胞を用いてAh受容体の活性化をルシフェラーゼタンパク質の発現量から測定するものである。レポータージーンアッセイ全体の概念図をFig. 1.に、分析のプロトコールをFig. 2.に示した。DXN画分とPCB画分で得られたシグナルの和を計算し、ダイオキシン類の毒性として表現される。標準直線は高純度の2,3,7,8-TCDDを用いて計算されており、CALUX-TEQと表示される。なお、臍帯血からはダイオキシン類に加えPCBs全異性体分析を実施する計画であり、この2つの分析で必要となる総脂肪重量の分析を共有するため、試料からまず総脂肪を抽出、その後にCALUXとPCBs分析に分画する計画である。このため、総脂肪の抽出までは国土環境株式会社（静岡県）にて

実施した。

C. 結果

CALUXの10件分の測定結果をTable. 1に示す。CALUXにおける「定量下限値」は溶媒であるDMSOにより得られるシグナル (RLU) のSD (n=4) の2.5倍の数値を検量線の式に代入し、計算されるTCDD濃度と定義されている。今回の分析における定量下限値は0.4 pgTEQ/mL (培地濃度) である。ただし、実際には定量下限値以下でも数値が出るため、その場合は斜字で示した。ダイオキシン画分では10検体中4検体で、Co-PCBs画分では7検体で、それぞれ定量下限以下となった。

D. 考察

現在、ダイオキシン類としてTable 2に示した化学種の分析が行われているが、ダイオキシン類の毒性を表現する際には、2,3,7,8-TCDDによる毒性を1とし、その他の異性体の毒性を相対的に表す毒性係数を考慮し、最終的に毒性当量 (TEQ) が用いられる。このため、ダイオキシン類として定義される全ての化学種をGC/MSで化学分析し、その濃度に毒性係数を掛け、その和が毒性当量と定義される。一方、CALUXではFig. 2.に示したように、試料から抽出された化学物質を混合物として細胞に与え、Ah受容体の活性化の度合いから毒性の総量を推定する方法である。プロトコールでは、抽出過程でダイオキシン類をPCDDsとPCDFsの画分とCo-PCBsの画分に分け、別個に分析を行って和を取る方法となっている。GC/MSの利点は、各化学種の濃度に基づく計算であり、どの化学種が主要な汚染化学物質であるのかを明確にすることができる。ただし、毒性係数の科学的な根拠やその数値に関して曖昧な点も多く、生体応答という観点からは未解決な点も少なくない。さらに、通常では比較的少量の検体が必要であり、分析に要する装置、人員、技術、コストの負担が多い。分析コストの増大は大規模疫学調査では致命的な点でもある。一方、CALUXではAh受容体の活性化に基づく分析原理であり、毒性のより生物学的な表現が可能と期待される。抽出工程における精製原理にも関連する

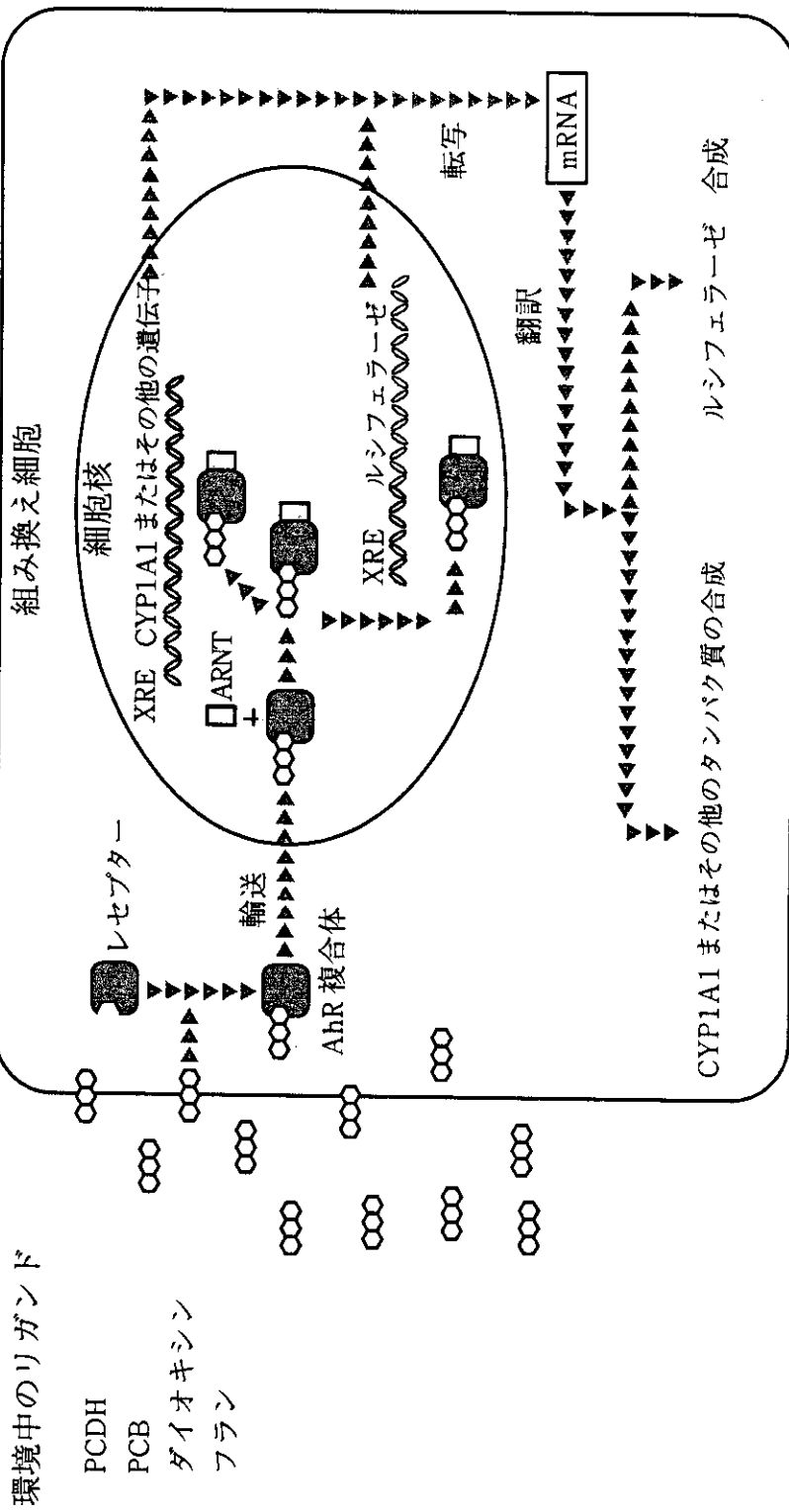


Fig. 1. レポーターアッセイの一つである CALUX の測定原理. 株式会社日吉作成の資料より改変.

が、ダイオキシン様活性、すなわち Ah 受容体との親和性を有する全ての化学物質に対しても有効である。分析系も簡便であり、コストも安い。ただし、CALUX の測定値が高い場合でも、いずれの化学種の寄与が高いかは情報が得られない。このような欠点を補うためには、CALUX での分析をまず実施し、その後に CALUX で高い値が観察された場合に、改めて GC/MS 分析を実施するなどの精密分析が必要であろう。この意味で CALUX はスクリーニングに適した分析とも考えられる。なお、TEQ 分析で定められた TEF と、その化学物質を CALUX で分析した場合の相対的な毒性係数を Table 2 に示した。概ね一致するものの、いくつかの化学種で解離が

観察される。

本分担研究では、この CALUX を用いて、臍帯血 10 件の分析を試験的に実施した。分娩に際して安定的に採取可能な臍帯血量は概ね 30 mL である。その中から全血で PCBs 全異性体分析を実施 (10 mL 程度) し、さらに血漿中の甲状腺ホルモン、セレン、重金属類の分析を実施 (全血で 7-10 mL に相当する血漿) するとなると、ダイオキシン類分析に使用できる試料量は概ね 10 mL となる。今回の検討に際して、臍帯血 10 mL でのダイオキシン類分析の実施を一つの目安とした。その結果、10 検体のうち 4 検体で検出感度以下となり、統計学的な解析の上で大きな支障となることが危惧された。対策として、

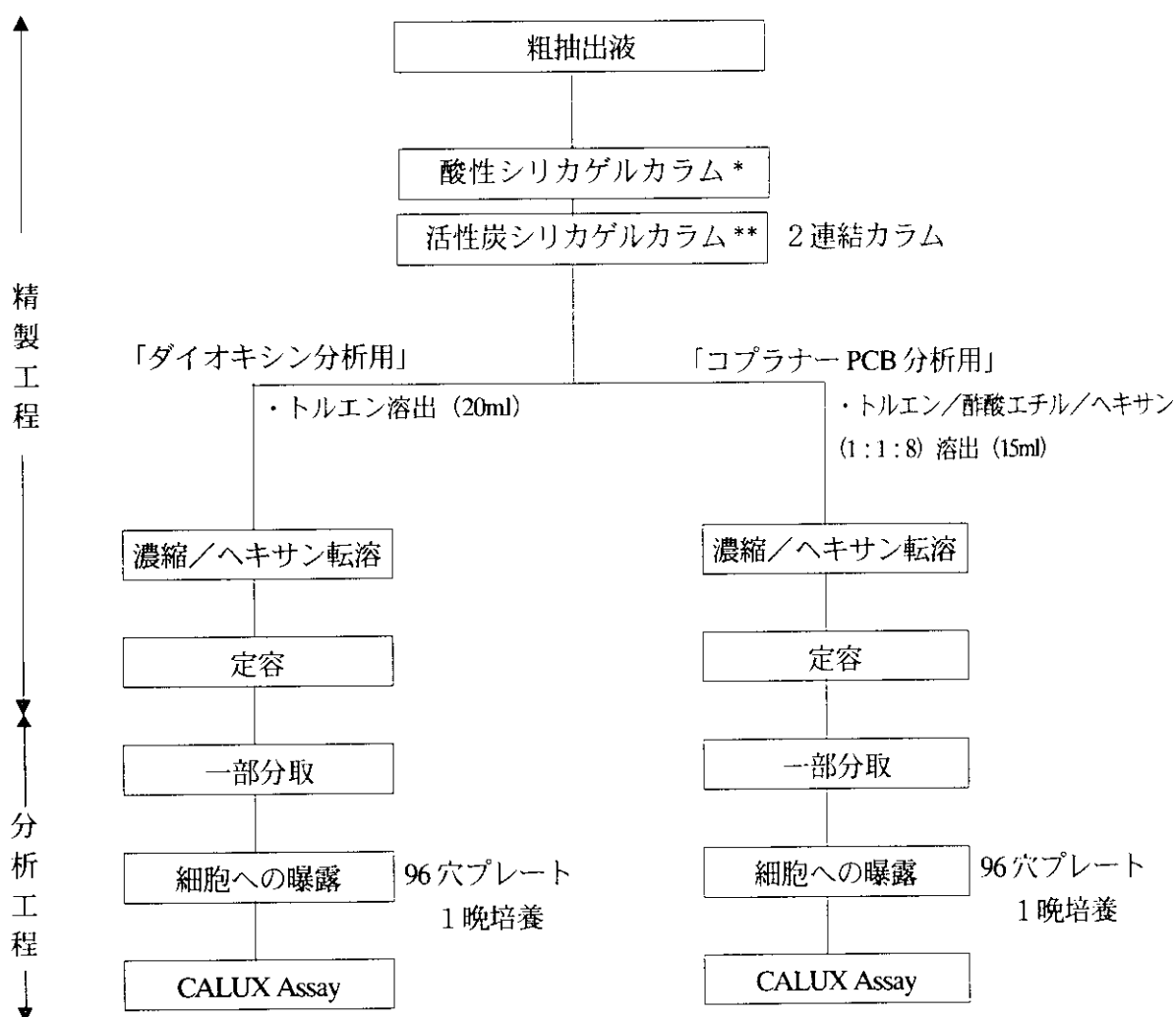


Fig. 1. CALUX における操作工程. * 酸性シリカゲルカラム: グラスウール、3.4 g 硫酸ナトリウム、7.14 g 硫酸シリカ. 洗浄: ヘキサン (50 ml). ** 活性炭シリカゲルカラム: 0.51 g 硫酸ナトリウム、0.30 g 1%XCARB、1.02 g 硫酸ナトリウム. 洗浄: アセトン洗浄 (5 ml)、トルエン洗浄 (20 ml)、ヘキサン洗浄 (10 ml). この 2 つのカラムを連結し試料を添加し、酸性シリカゲルカラム除去後に洗浄、溶出を行う。

a) DXN画分とPCB画分を分けずに分析する、b) 使用する臍帯血量を増加する、もしくはc) CALUXの検出力の改善を目指す、ことなどが考えられた。a)については、活性炭シリカゲルカラムでの分離に際して全ての有機塩素系化学物質をトルエンにより溶出することで、Co-PCBsとダイオキシン類を1つの画分として得ることが可能である。実際の生体内中ではPCDDsやPCDFsはCo-PCBsと混在する形で存在しており、あえて両者を分離して測る必要性は明確ではない。分割せずに分析することで、行程を簡略化し、さらに検出限界以下となるケースを減らすことが可能である。実際に、今回の分析ではDXN画分とPCB画分を分画せずに測定を実施した場合、検出感度と設定された0.4を越えるケースは10件中9件となるものと予想された。ただし、Co-PCBsの量が多い場合等では、DXN画分のTEQとPCB画分のTEQの和は、分画せずに分析した場合よりも高くなる場合もあるとされ、TEFの小さなCo-PCBs分子がTEFの大きな分子のAh受容体への結合を疎外する可能性も指摘されている。この点は生体内でも実際に起こりうる現象とも考えられるため、一概にCALUXの欠点とも言えないものの、議論の余地があるところである。次にb)について、臍帯血の採取量は実際はまちまちであ

Table 1. 臍帯血中 CALUX 測定結果

Sample / 分画	培地濃度 pgTEQ/mL	臍帯血濃度		
		pgTEQ/g-wet	pgTEQ/g-fat	Total TEQ (pgTEQ/g-fat)
1 DXN 分画	0.52	0.02	8.37	9.97
PCB 分画	0.10	0.004	1.60	
2 DXN 分画	0.22	0.01	3.69	7.76
PCB 分画	0.24	0.01	4.07	
3 DXN 分画	0.71	0.03	8.01	9.14
PCB 分画	0.10	0.00	1.13	
4 DXN 分画	0.24	0.01	3.62	5.41
PCB 分画	0.12	0.01	1.79	
5 DXN 分画	0.30	0.01	3.21	4.27
PCB 分画	0.10	0.004	1.06	
6 DXN 分画	0.10	0.004	1.19	2.38
PCB 分画	0.10	0.004	1.19	
7 DXN 分画	0.79	0.03	14.59	22.46
PCB 分画	0.42	0.02	7.87	
8 DXN 分画	0.42	0.02	5.61	10.39
PCB 分画	0.36	0.01	4.79	
9 DXN 分画	0.72	0.03	10.90	17.21
PCB 分画	0.42	0.02	6.31	
10 DXN 分画	0.65	0.03	10.69	20.84
PCB 分画	0.62	0.03	10.15	

2,3,7,8-TCDDを標準品として検量線を得て計算するため、単位はCALUX-TEQとなる。分析は2回の測定値の平均値を示した。定量下限値は0.4 pgTEQ/mL(培地濃度)であり、定量下限値以下でも数値が出るため、その場合は斜字で示した。定量下限値は溶媒であるDMSOにより得られるRLUのSD(n=4)の2.5倍の数値を検量線の式に代入し、計算されるTCDD濃度と定義されている。