

# 学位論文

臍帯を用いた胎児期 PCBs 曝露と発達障害  
及び新生児甲状腺機能の関連調査

平成 17 年 12 月博士(環境学)申請

東京大学 大学院新領域創成科学研究科  
環境学専攻

大竹 貴光

## 目 次

第 1 章 はじめに	・・・1
1. 研究概要	・・・2
2. PCBについて	・・・4
2-1. PCB の規制	・・・4
2-1-1. 化審法	・・・4
2-1-2. POPs 条約	・・・4
2-2. PCB の用途	・・・5
2-3. 日本におけるPCB の生産	・・・6
2-4. PCB の構造と物理化学的性質	・・・7
2-5. PCB の生物学的半減期	・・・7
2-6. 日本国内における環境中 PCB 濃度	・・・8
2-7. PCB の毒性影響	・・・9
2-7-1. 動物実験	・・・9
2-7-1-1. 短期曝露の影響	・・・9
2-7-1-2. 催奇形性	・・・10
2-7-1-3. 発ガン性	・・・10
2-7-1-4. 生殖影響と胎児毒性	・・・10
2-7-2. ヒトでの影響	・・・11
3. 胎児期化学物質曝露の指標媒体	・・・12
3-1. 胎盤	・・・12
3-1-1. 胎盤の形態	・・・12
3-1-2. 臍帯循環	・・・12
3-1-3. 胎盤における物質交換	・・・12
3-2. 臍帯	・・・13
3-2-1. 臍帯の構成	・・・13
3-2-2. 妊娠時期と臍帯	・・・13
3-2-3. 物質輸送と臍帯	・・・14
3-2-4. 保存臍帯	・・・14
4. 発達障害と甲状腺ホルモンの関係	・・・16
5. 略語の定義	・・・16

第2章 保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討	・・・18
1. 背景	・・・19
1-1. 前向きコホート研究と後ろ向き調査（症例対照研究）	・・・19
1-1-1. 前向きコホート研究	・・・19
1-1-2. 後ろ向き調査（症例対照研究）	・・・20
1-2. 曝露指標媒体	・・・21
1-2-1. 血液（臍帯血）	・・・21
1-2-2. 胎盤	・・・22
1-2-3. 臍帯	・・・22
1-2-3-1. 新鮮臍帯	・・・22
1-2-3-2. 保存臍帯	・・・23
2. 目的	・・・24
3. 方法	・・・24
3-1. 保存臍帯を胎児期曝露評価指標として用いるための検討	・・・24
3-2. 対象とサンプル	・・・25
3-3. 保存臍帯中 PCBs 分析	・・・25
3-3-1. 試薬	・・・25
3-3-2. 標準物質	・・・25
3-3-2-1. $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs 内標準物質	・・・25
3-3-2-2. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定量用標準物質	・・・26
3-3-2-3. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定性用標準物質	・・・27
3-3-3. 実験器具	・・・27
3-3-4. 前処理方法	・・・27
3-3-5. 測定機器と条件	・・・28
3-4. 倫理審査	・・・28
4. 結果と考察	・・・31
4-1. 保存臍帯中 PCBs の分析方法の評価	・・・31
4-2. 保存臍帯を胎児期 PCBs 曝露指標として用いるための検討	・・・31
4-2-1. 保存臍帯中 PCBs の検出確認	・・・31
4-2-2. 保存臍帯中 PCBs の濃度傾向	・・・33
4-2-3. 保存臍帯と母乳・脂肪組織サンプル中 PCBs 濃度の比較	・・・35
4-2-4. 臍帯保管中の汚染について	・・・36
5. まとめ	・・・38

### 第3章 発達障害に対する保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の適用 ……39

1. 背景	…40
1-1. PCBs 曝露と発達に関する既往の研究例	…40
1-1-1. 動物実験	…40
1-1-2. 疫学調査	…41
2. 目的	…51
3. 方法	…51
3-1. 対象とサンプル	…51
3-2. 保存臍帯中 PCBs 分析	…52
3-3. データ解析	…52
3-4. 倫理審査	…53
4. 結果と考察	…53
4-1. 同胞間での後ろ向き調査 (total PCBs)	…53
4-2. 同胞間での後ろ向き調査 (PCB 異性体別)	…54
4-3. 全対象者での後ろ向き調査	…56
5. まとめ	…58

### 第4章 新鮮臍帯を用いた胎児期 PCBs・水酸化体 PCBs 曝露と 新生児甲状腺機能の関連調査 ……59

1. 背景	…60
1-1. 水酸化体 PCBs (OH-PCBs) について	…60
1-1-1. OH-PCBs の生成過程 (PCBs の代謝経路)	…60
1-1-2. OH-PCBs の物理化学的特性	…62
1-1-3. OH-PCB の生物学的半減期	…62
1-1-4. 人体からの OH-PCBs 検出例	…63
1-1-5. OH-PCBs の毒性	…63
1-2. 甲状腺ホルモンについて	…64
1-2-1. 甲状腺ホルモン	…64
1-2-2. 甲状腺ホルモンの輸送と代謝	…64
1-2-3. 甲状腺ホルモンの分泌調節	…65
1-2-4. 甲状腺ホルモンと神経疾患	…65
1-3. 新生児マススクリーニング	…65
1-4. PCBs・OH-PCBs と甲状腺ホルモンレベルに関する既往の研究	…66
1-4-1. 動物実験, <i>in vitro</i> の研究	…66



1-4-2. ヒトを対象とした調査	・・・68
2. 目的	・・・73
3. 方法	・・・73
3-1. 対象者	・・・73
3-2. 新鮮臍帯中 PCBs・OH-PCBs の分析	・・・73
3-2-1. 試薬	・・・74
3-2-2. 標準物質	・・・74
3-2-2-1. $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs 内標準物質	・・・74
3-2-2-2. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定量用標準物質	・・・74
3-2-2-3. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定性用標準物質	・・・75
3-2-2-4. $^{13}\text{C}_{12}$ -水酸化体 PCBs 内標準物質	・・・75
3-2-2-5. $^{12}\text{C}_{12}$ -水酸化体 PCBs 定性・定量用標準物質	・・・76
3-2-3. 実験器具	・・・76
3-2-4. 新鮮臍帯サンプリング方法	・・・76
3-2-5. 前処理方法	・・・76
3-2-6. 測定機器と条件	・・・79
3-3. fT4, TSH 測定	・・・82
3-3-1. サンプリング方法	・・・82
3-3-2. fT4 測定	・・・82
3-3-2-1. fT4 測定キットの構成	・・・82
3-3-2-2. 実験器具	・・・82
3-3-2-3. 測定方法	・・・82
3-3-3. TSH 測定	・・・83
3-3-3-1. TSH 測定キットの構成	・・・83
3-3-3-2. 実験器具	・・・83
3-3-3-3. 測定方法	・・・84
3-4. 妊婦のアンケート調査	・・・84
3-5. データ解析	・・・84
3-6. 倫理審査	・・・85
4. 結果と考察	・・・85
4-1. 新鮮臍帯中 PCBs・OH-PCBs の分析方法の評価	・・・85
4-1-1. 新鮮臍帯中 PCBs の分析方法の評価	・・・85
4-1-2. 新鮮臍帯中 OH-PCBs の分析方法の評価	・・・86
4-2. fT4, TSH 測定の日内変動・日間変動の評価	・・・86
4-3. 新鮮臍帯中 PCBs, OH-PCBs と新生児血中 fT4, TSH 濃度測定結果	・・・90
4-4. 新鮮臍帯中 PCBs と OH-PCBs の相関	・・・92

4-5. 新鮮臍帯中 total OH-PCBs 濃度に対する OH-PCB 異性体濃度の比	・・・93
4-6. 新鮮臍帯の塩素数分布	・・・94
4-7. 新鮮臍帯中 total PCBs, total OH-PCBs と fT4, TSH レベルの関係	・・・95
4-7-1. 新鮮臍帯中 total PCBs と fT4, TSH レベルの関係	・・・98
4-7-2. 新鮮臍帯中 total OH-PCBs と fT4, TSH レベルの関係	・・・98
4-8. 新鮮臍帯中・異性体ごとの PCBs, OH-PCBs と fT4, TSH レベルの関係	・・・103
4-8-1. 新鮮臍帯中の PCB 異性体と fT4, TSH レベルの関係	・・・104
4-8-2. 新鮮臍帯中の OH-PCB 異性体と fT4, TSH レベルの関係	・・・105
5. まとめ	・・・118
 第 5 章 要約・結言と今後の展望	 ・・・119
1. 本研究の要約	・・・120
2. 結言	・・・120
3. 今後の展望	・・・121
 参考文献	 ・・・122
1. 英語文献	・・・123
2. 日本語文献	・・・138
 謝辞	 ・・・142
 Appendix	 ・・・143
Appendix A 健常者の保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度（第 2 章より）	・・・144
Appendix B 全自閉症患者・健常な同胞の保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 （第 3 章より）	・・・147
Appendix C 新鮮臍帯採取の方法（第 4 章より）	・・・151
Appendix D 各対象者の新鮮臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度（第 4 章より）	・・・156
Appendix E 各変数と新生児血中 fT4, TSH の関連（第 4 章より）	・・・163

## List of Tables

### 第 1 章

Table 1-1 POPs 条約の対象 12 物質リスト	・・・5
Table 1-2 PCB の用途	・・・6
Table 1-3 PCBs の物理化学的性質	・・・8
Table 1-4 日本国内・一般環境中 PCBs 濃度	・・・9
Table 1-5 日本国内・野生生物中 PCBs 濃度	・・・9
Table 1-6 本論文中的略語の定義	・・・17

### 第 2 章

Table 2-1 前向きコホート調査と後ろ向き調査の特徴比較	・・・20
Table 2-2 胎児期曝露指標媒体の比較	・・・23
Table 2-3 HRGC/HRMS の測定条件（保存臍帯中 PCBs）	・・・30
Table 2-4 CARP-1 の分析結果と認証値との比較	・・・31
Table 2-5 対象者の特性と保存臍帯中 total PCBs 濃度	・・・33

### 第 3 章

Table 3-1 動物実験による PCB 曝露（異性体）と神経系への影響に関する既往の研究	・・・45
Table 3-2 動物実験による PCBs 曝露（混合物）と神経系への影響に関する既往の研究	・・・46
Table 3-3 PCBs 曝露と発達障害に関するコホート研究例	・・・47
Table 3-4 同胞間比較対象者の兄弟構成	・・・52
Table 3-5 自閉症と健常な同胞および同胞のいない自閉症対象者に関する情報	・・・52
Table 3-6 保存臍帯中 total PCBs 濃度の平均値・標準偏差 (SD)・中央値・最小値・最大値	・・・54
Table 3-7 同胞間の保存臍帯中 PCB 異性体濃度の平均値・標準偏差 (SD)・中央値・最小値・最大値	・・・55
Table 3-8 全自閉症対象者の特性と保存臍帯中 total PCBs 濃度	・・・57

### 第 4 章

Table 4-1 OH-PCB 代謝物と親 PCB の関係	・・・61
Table 4-2 新生児マススクリーニングの対象疾患	・・・66
Table 4-3 動物実験による PCB 異性体曝露と甲状腺ホルモンレベルの関連	・・・70
Table 4-4 動物実験による PCB 混合物曝露と甲状腺ホルモンレベルの関連	・・・71

Table 4-5 ヒトを対象とした PCBs 曝露と甲状腺ホルモンレベルに 関する既往の研究	・・・72
Table 4-6 HRGC/HRMS の測定条件 (新鮮臍帯中 PCBs)	・・・80
Table 4-7 HRGC/HRMS の測定条件 (新鮮臍帯中 OH-PCBs)	・・・81
Table 4-8 CARP-2 の分析結果と参照値・認証値との比較	・・・88
Table 4-9 ELISA 法による fT4 測定の日内変動・日間変動	・・・89
Table 4-10 ELISA 法による TSH 測定の日内変動・日間変動	・・・89
Table 4-11 新鮮臍帯中 PCBs, OH-PCBs 濃度の 平均値・SD・中央値・最小値・最大値	・・・90
Table 4-12 新生児血中 fT4, TSH 濃度の平均値・SD・中央値・ 最小値・最大値	・・・90
Table 4-13 対象者の特性に関するアンケート等による調査結果	・・・96
Table 4-14 新鮮臍帯中 PCBs, OH-PCBs 濃度と新生児血中 fT4, TSH レベルの関連 ～スピアマンの順位相関分析とピアソンの積率相関分析による相関係数	・・・99
Table 4-15 新鮮臍帯中 PCBs, OH-PCBs 濃度と新生児血中 fT4, TSH レベルの関連 ～重回帰分析による標準回帰係数	・・・99
Table 4-16 新鮮臍帯中 PCB, OH-PCB 異性体濃度と新生児血中 fT4, TSH レベルの関連 ～スピアマンの順位相関分析とピアソンの積率相関分析による相関係数	・・・106
Table 4-17 新鮮臍帯中 PCB, OH-PCB 異性体濃度と新生児血中 fT4, TSH レベルの関連 ～重回帰分析による標準回帰係数	・・・107
Appendix	
Table A-1 保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (サンプル No. 1～10)	・・・145
Table A-2 保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (サンプル No. 11～20)	・・・146
Table B-1 全自閉症患者・健常な同胞の保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (サンプル No. 21～30)	・・・148
Table B-2 全自閉症患者・健常な同胞の保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (サンプル No. 31～40)	・・・149
Table B-3 全自閉症患者・健常な同胞の保存臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (サンプル No. 41～44)	・・・150

Table D-1 新鮮臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (脂肪重量あたり、サンプル No. 1～10)	・・・157
Table D-2 新鮮臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (脂肪重量あたり、サンプル No. 11～19)	・・・158
Table D-3 新鮮臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (湿重量あたり、サンプル No. 1～10)	・・・159
Table D-4 新鮮臍帯中 PCBs・塩素数ごとの濃度 (湿重量あたり、サンプル No. 11～19)	・・・160
Table D-5 新鮮臍帯中 OH-PCBs・異性体ごとの濃度 (湿重量あたり、サンプル No. 1～10)	・・・161
Table D-6 新鮮臍帯中 OH-PCBs・異性体ごとの濃度 (湿重量あたり、サンプル No. 11～19)	・・・162

## List of Figures

### 第 1 章

Fig. 1-1 日本における PCB 生産量の推移 ……6

Fig. 1-2 PCB の構造 ……7

### 第 2 章

Fig. 2-1 保存臍帯中 PCBs 分析フローチャート ……28

Fig. 2-2 出生年による保存臍帯中 total PCBs 濃度の傾向 ……32

Fig. 2-3 健常者の保存臍帯中 total PCBs 濃度のヒストグラム ……32

Fig. 2-4 保存臍帯中 PCBs 濃度と日本国内の PCB 製品生産量の  
時系列トレンド比較 ……34

Fig. 2-5 保存臍帯中 PCBs の塩素数分布 ……34

Fig. 2-6 保存臍帯と母乳中 total PCBs 濃度のレベル・傾向比較 ……35

Fig. 2-7 1927 年生まれの対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布 ……37

Fig. 2-8 1930 年生まれの対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布 ……37

Fig. 2-9 1927, 1930 年生まれ以外の対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布 ……37

### 第 3 章

Fig. 3-1 自閉症患者と健常者の保存臍帯中 total PCB 濃度 ……54

Fig. 3-2 自閉症の有無と保存臍帯中 PCB 濃度の関連解析（同胞間）で  
対象とした PCB 異性体 ……55

Fig. 3-3 全自閉症対象者の保存臍帯中 total PCBs 濃度のヒストグラム ……56

Fig. 3-4 全自閉症対象者の年齢のヒストグラム ……56

### 第 4 章

Fig. 4-1 PCBs の代謝経路 ……61

Fig. 4-2 本研究の分析対象 OH-PCBs（6 種）の構造 ……62

Fig. 4-3 T4 の構造 ……64

Fig. 4-4 T3 の構造 ……64

Fig. 4-5 新鮮臍帯中 PCBs, OH-PCBs 分析フローチャート ……79

Fig. 4-6 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度（wet base）のヒストグラム ……91

Fig. 4-7 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度（fat base）のヒストグラム ……91

Fig. 4-8 新鮮臍帯中 total OH-PCBs 濃度のヒストグラム ……91

Fig. 4-9 新生児血中 fT4 濃度のヒストグラム ……92

Fig. 4-10 新生児血中 TSH 濃度のヒストグラム ……92

Fig. 4-11 新鮮臍帯中 PCB (5~7Cl)と OH-PCBs 濃度の相関	...93
Fig. 4-12 新鮮臍帯中 total PCBs と OH-PCBs 濃度の相関	...93
Fig. 4-13 新鮮臍帯中 OH-PCB 異性体と total OH-PCBs の濃度比	...94
Fig. 4-14 新鮮臍帯中 PCBs の塩素数分布	...95
Fig. 4-15 出生体重のヒストグラム	...97
Fig. 4-16 在胎週数のヒストグラム	...97
Fig. 4-17 妊婦の BMI のヒストグラム	...97
Fig. 4-18 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度 (wet base)と新生児血中 fT4 の相関図	...100
Fig. 4-19 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度 (wet base)と新生児血中 TSH の相関図	...100
Fig. 4-20 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度 (fat base)と新生児血中 fT4 の相関図	...101
Fig. 4-21 新鮮臍帯中 total PCBs 濃度 (fat base)と新生児血中 TSH の相関図	...101
Fig. 4-22 新鮮臍帯中 total OH-PCBs 濃度と新生児血中 fT4 の相関図	...102
Fig. 4-23 新鮮臍帯中 total OH-PCBs 濃度と新生児血中 TSH の相関図	...102
Fig. 4-24 fT4, TSH レベルとの関連解析を行なった対象 PCB, OH-PCB 異性体 (6 種)	...103
Fig. 4-25 新鮮臍帯中 CB118 濃度 (wet base)と新生児血中 fT4 の相関図	...108
Fig. 4-26 新鮮臍帯中 CB118 濃度 (wet base)と新生児血中 TSH の相関図	...108
Fig. 4-27 新鮮臍帯中 CB118 濃度 (fat base)と新生児血中 fT4 の相関図	...109
Fig. 4-28 新鮮臍帯中 CB118 濃度 (fat base)と新生児血中 TSH の相関図	...109
Fig. 4-29 新鮮臍帯中 CB138 濃度 (wet base)と新生児血中 fT4 の相関図	...110
Fig. 4-30 新鮮臍帯中 CB138 濃度 (wet base)と新生児血中 TSH の相関図	...110
Fig. 4-31 新鮮臍帯中 CB138 濃度 (fat base)と新生児血中 fT4 の相関図	...111
Fig. 4-32 新鮮臍帯中 CB138 濃度 (fat base)と新生児血中 TSH の相関図	...111
Fig. 4-33 新鮮臍帯中 CB153 濃度 (wet base)と新生児血中 fT4 の相関図	...112
Fig. 4-34 新鮮臍帯中 CB153 濃度 (wet base)と新生児血中 TSH の相関図	...112
Fig. 4-35 新鮮臍帯中 CB153 濃度 (fat base)と新生児血中 fT4 の相関図	...113
Fig. 4-36 新鮮臍帯中 CB153 濃度 (fat base)と新生児血中 TSH の相関図	...113
Fig. 4-37 新鮮臍帯中 CB180 濃度 (wet base)と新生児血中 fT4 の相関図	...114
Fig. 4-38 新鮮臍帯中 CB180 濃度 (wet base)と新生児血中 TSH の相関図	...114
Fig. 4-39 新鮮臍帯中 CB180 濃度 (fat base)と新生児血中 fT4 の相関図	...115
Fig. 4-40 新鮮臍帯中 CB180 濃度 (fat base)と新生児血中 TSH の相関図	...115
Fig. 4-41 新鮮臍帯中 OH-CB107 濃度と新生児血中 fT4 の相関図	...116
Fig. 4-42 新鮮臍帯中 OH-CB107 濃度と新生児血中 TSH の相関図	...116
Fig. 4-43 新鮮臍帯中 OH-CB187 濃度と新生児血中 fT4 の相関図	...117
Fig. 4-44 新鮮臍帯中 OH-CB187 濃度と新生児血中 TSH の相関図	...117

## Appendix

Fig. E-1 出生体重と新生児血中 fT4 の関連	・・・164
Fig. E-2 出生体重と新生児血中 TSH の関連	・・・164
Fig. E-3 子供の性別と新生児血中 fT4 の関連	・・・164
Fig. E-4 子供の性別と新生児血中 TSH の関連	・・・165
Fig. E-5 在胎週数と新生児血中 fT4 の関連	・・・165
Fig. E-6 在胎週数と新生児血中 TSH の関連	・・・165
Fig. E-7 妊婦の BMI と新生児血中 fT4 の関連	・・・166
Fig. E-8 妊婦の BMI と新生児血中 TSH の関連	・・・166
Fig. E-9 妊婦の喫煙と新生児血中 fT4 の関連	・・・166
Fig. E-10 妊婦の喫煙と新生児血中 TSH の関連	・・・167



# 第 1 章

はじめに

# 第1章 はじめに

## 1. 研究概要

近年、ADHD（注意欠陥多動症候群）や LD（学習障害）、高機能自閉症といった、発達障害に対する社会的な関心が高まっている。これらの発達障害は、キレやすい子供や、社会に適応できない子供の増加、学力低下の問題と密接に関係している。2002 年の文部科学省の、「通常の学級に在籍する特別な教育的支援を必要とする児童生徒に関する全国実態調査」によると、LD に見られる学習面の特徴を顕著に示す子供が 4.5 %、ADHD や高機能自閉症に見られる行動面の困難を顕著に示す子供が 2.9 %、どちらかの特徴を示す子供は全体で 6.3 %であった。特殊教育を受けている児童が約 16 万人で 1.5 %という現状や、1980 年代から大きな教育問題化している不登校児でも約 14 万～15 万人と言われていることを考え合わせると、この約 6 %という数字の意味が大変大きいということが分かる（文部科学省, 2002; 上野, 2003）。

以上のように、社会的問題となっている発達障害の原因を解明することは優先課題となっている。原因には、遺伝的要因、環境的要因、身体的要因が複雑に関連していると推測され、現在盛んに研究されているが、はっきりとした病因はいまだに不明である。こういった、様々な病因が挙げられる中で、原因の 1 つとして、化学物質の関与が示唆されるようになってきており（Colborn, 2004; London and Etzel, 2000; Schettler, 2001）、発達障害の病因として、化学物質の寄与を調査することが急務となっている。そこで本研究では、化学物質曝露が、発達障害の発症に関連しているか否かを調査することを目標として、新たな調査方法の確立や発達障害の発症メカニズム解明などに関し、研究を行なうこととした。

本研究は、①保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討と発達障害への適用、②新鮮臍帯を用いた胎児期 PCBs、水酸化体 PCBs 曝露と新生児甲状腺機能の関連調査、の 2 つのテーマから構成される。

### ①保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討と発達障害への適用（第 2, 3 章）

米国五大湖周辺での疫学調査により、母親の汚染魚摂食による PCBs や有機塩素系農薬類などへの胎児期化学物質曝露が小児の知的発達に及ぼす悪影響が示され、他の疫学調査や動物実験でも、PCBs の胎児期曝露による小児の行動異常、記憶力の低下など、神経系への悪影響が明らかにされている（Jacobson et al., 1985; Grandjean et al., 2001; Koopman-Esseboom et al., 1996）。小児の発達への影響は、胎児期に曝露し、一見正常に出生した後、ある程度の期間が経ってから見出されると言われている（Bernald et al., 2001）。従って、こうした発達障害が化学物質の胎児期曝露によるものかどうかを調査するためには、

健康影響が現れた時点で時間をさかのぼり、胎児期の曝露量を推定、評価する必要がある。出生時に得られる臍帯血や新鮮臍帯は、出生児の胎児期の化学物質曝露指標媒体としてよく用いられてきた。これらの曝露媒体を用いた場合、出生時の化学物質曝露評価はできるが、成長して発達障害が現れた時点で、過去にさかのぼって出生時の曝露を調査することは不可能であることから、これまでは出生時に得られる新鮮臍帯、臍帯血を用いた前向きコホート調査を行なう以外に、胎児期化学物質曝露と発達障害の関連を調査する手段はなかった。しかし、この前向き調査では、追跡する調査集団が大規模になること、長期にわたり追跡しなければならないことから、化学物質の胎児期曝露による健康影響を調査するのに、かなりの時間や費用がかかってしまうという欠点がある。そこで本研究では、日本で一般的に習慣として保存されている臍帯を、胎児期の曝露量を表す指標媒体として使用することの妥当性と、それを使った後ろ向き調査法の確立の検討を行なうことを目的とする。また、この方法を実際の発達障害の調査に適用することも目的とする。

#### ②新鮮臍帯を用いた胎児期 PCBs・水酸化体 PCBs 曝露と新生児甲状腺機能の関連調査（第4章）

PCBs による発達障害は甲状腺機能の変調と関連している可能性がある（Morse et al., 1996; Ness et al., 1993; Longnecker et al., 2000）。そこで本研究では、曝露指標媒体に新鮮臍帯を用いて、ヒトを対象に、胎児期 PCBs、OH-PCBs 曝露と、新生児期の甲状腺ホルモンレベルとの関連を調査し、PCBs、OH-PCBs による発達障害への影響メカニズムを解明するための情報を得ることを目的とする。

以上、本研究での目的をまとめると、「保存臍帯を用い、PCBs の胎児期曝露と発達障害の関連を調査するための方法の確立の検討を行ない、それを発達障害の調査に適用すること（①）、および曝露指標媒体に新鮮臍帯を用い、胎児期 PCBs、OH-PCBs 曝露による新生児甲状腺機能への影響に関する調査を行ない、発達障害の影響メカニズム解明のための情報を得ること（②）」となる。

①では、胎児期 PCBs 曝露と発達障害との関連について調査することができるが、なぜその影響が現れるのかについては知ることができない。これを知るためには②が必要であり、胎児期 PCBs、OH-PCBs 曝露と新生児甲状腺ホルモンレベルの関係を調査することで、PCBs、OH-PCBs による発達障害の影響メカニズムを解明するための情報を得ることができる。したがって、①、②の調査は、胎児期化学物質曝露と発達障害の関連を調査する上で、両方とも重要となる。

## 2. PCB について

ポリ塩化ビフェニル (Polychlorinated Biphenyl: PCB)は、国内では 1954 年から製造が開始され (磯野, 1975; 日本化学会, 1980)、絶縁性、不燃性などの特性によりトランス、コンデンサといった電気機器をはじめ幅広い用途に使用されていたが、1968 年にはカネミ油症事件が発生するなど、その毒性が社会問題化し、日本国内では 1972 年以降その製造は行われていない (環境省, 2005b)。

本章では、PCBs の基本的な情報について、以下にまとめた。PCBs の代謝については第 4 章、PCBs 曝露と発達障害、甲状腺ホルモンレベルとの関連を示す既往の研究については、それぞれ第 3, 4 章で述べる。

### 2-1. PCB の規制

#### 2-1-1. 化審法 (環境省, 2005a)

化学物質審査規制法 (化審法)は、難分解性の性状を有し、かつ人の健康を損なうおそれがある化学物質による環境の汚染を防止するため、PCB による環境汚染問題を契機として、昭和 48 年 (1973 年)に制定された。

新規の化学物質の事前審査制度を設けるとともに、PCB と同様、難分解であり高蓄積性を有し、かつ長期毒性を有する化学物質を特定化学物質 (現在の第一種特定化学物質)に指定し、製造、輸入について許可制をとるとともに使用に係る規制を行なうこととされた。その後、難分解性及び長期毒性を有するにもかかわらず蓄積性を有さない物質についても、環境中での残留の状況によっては規制の必要性が生じたことから、昭和 61 年 (1986 年)に改正され、指定化学物質及び第二種特定化学物質の制度が導入された。さらに、平成 15 年 (2003 年)の改正により、動植物への影響に着目した審査・規制制度や環境中への放出可能性を考慮した審査制度が新たに導入され、平成 16 年 4 月に施行された。

PCB 等 15 物質は、難分解性、高蓄積性及び人、または高次捕食動物への長期毒性を有する化学物質として、政令で第一種特定化学物質に指定されている。

#### 2-1-2. POPs条約

残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants: POPs)は、残留性、生物濃縮性、揮散移動性、毒性の 4 特性を持つ有機汚染物質のことである。残留性とは、物理学的、生物学的、化学的分解が困難であること、生物濃縮性とは、POPs の脂溶性が高いために、生物蓄積性や生物濃縮性を持つこと、揮散移動性とは POPs が半揮発性であることが多いために大気経由の長距離移動が起ること、毒性とは、ヒトの健康や環境に対して有害性がある

ことを意味する(酒井, 1998)。代表的なPOPsには、有機塩素系農薬類、多環芳香族系炭化水素類 (PAHs)、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs)が挙げられる。

現在、日本国内ではPOPsの製造、使用を禁止しているが、POPsの中には、意図せずに生成するものもある。また、海外では現在でもPOPsを使用している国や、環境汚染について十分な対策を取っていない国もある。そこで、POPs対策としては、2001年5月にスウェーデンのストックホルムで、環境中での残留性が高いPCBなど12物質の削減や廃絶などに向けた「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs条約)」が採択されている。Table 1-1 に、POPs条約の対象となっている12物質のリストを示す(環境省, 2004a)。

Table 1-1 POPs 条約の対象 12 物質リスト

物質名	
アルドリン (Aldrin)	クロルデン (Chlordane)
エンドリン (Endrin)	ポリ塩化ビフェニル (PCB)
ヘプタクロル (Heptachlor)	トキサフェン (Toxaphene)
ヘキサクロロベンゼン (HCB)	マイレックス (Mirex)
ディルドリン (Dieldrin)	ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (PCDDs)
DDT	ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs)

これらPOPsは揮散移動性があることから、これまでにPOPsを製造、使用したことがない地域でもPOPsによる汚染が見られ、このように世界各地に広がったPOPsに曝露することにより、特に食物連鎖上位の鳥やアザラシ、クジラ、イルカなどの野生動物や、ヒトにおいて、免疫系や生殖系への影響、催奇形性などが示されることが分かっている(環境省, 2004a; Tanabe et al., 1994)。

POPs曝露による健康影響のうち、本研究では、特に近年注目されている胎児期PCBs曝露による神経系、甲状腺系への影響に着目した。これらの関連については、最近になって *in vitro* や動物実験、ヒトでの調査が行なわれるようになってきたが、ヒトに対しては、まだ十分なデータはないと言える。

## 2-2. PCB の用途

PCB は、その安定な性質を利用して、電気機器用の絶縁油、各種工業における過熱ならびに冷却用の熱媒体および感圧複写紙など、以下の Table 1-2 に示すような用途に使用されていた。1961～1971 年の間の用途別使用状況は、電器関係 66 %、熱媒体 17 %、感圧紙(ノーカーボン紙)12 %、その他開放系用途 5 %となっている。現在は、新たな製造は禁止されている(環境省, 2005b; 青笹, 2003; 日本化学会, 1980)。

Table 1-2 PCB の用途（環境省, 2005b より抜粋）

用途大別	製品例・使用場所	
絶縁油	トランス用	ビル、鉄道車両（地下鉄、新幹線）、船舶等のトランスなど
	コンデンサ用	蛍光灯、水銀灯の安定器、洗濯機等家電用、蓄電用コンデンサなど
熱媒体	（冷却と加熱）	各種化学工業・食品工業・合成樹脂工業などの諸工業における加熱と冷却、船舶の燃料油予熱など
潤滑油		高温用潤滑油、真空ポンプ油、切削油、極圧添加材など
可塑剤	絶縁用	電線の被覆、絶縁テープなど
	難燃用	ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ゴムなどに混合
	その他	接着剤、ニス、ワックス、アスファルトに混合
塗料、印刷インキ		難燃性塗料、耐薬品性塗料、耐水性塗料、印刷インキなど
感圧複写紙		ノーカーボン紙（溶媒）、電子式複写紙など
その他		紙などのコーティング、自動車のシーラントなど

## 2-3. 日本における PCB の生産（磯野, 1975; 日本化学会, 1980）

日本における PCB の生産は、主に鐘淵化学（当時）により 1954 年から開始され、Kanechlor の商標で市販されていた。Kanechlor には、200, 300, 400, 500, 600 などの銘柄があり、この順に塩素数が増える。世界最大のメーカーであるアメリカ合衆国モンサント社の製品は、Aroclor の名称で市販されていた。

日本における PCB の総生産量（1954～1972 年）は約 6 万 t であり、約 96 % が鐘淵化学、残り約 4 % が三菱モンサント（当時）で生産されていた。国内の PCB 生産量の推移を、Fig. 1-1 に示す。

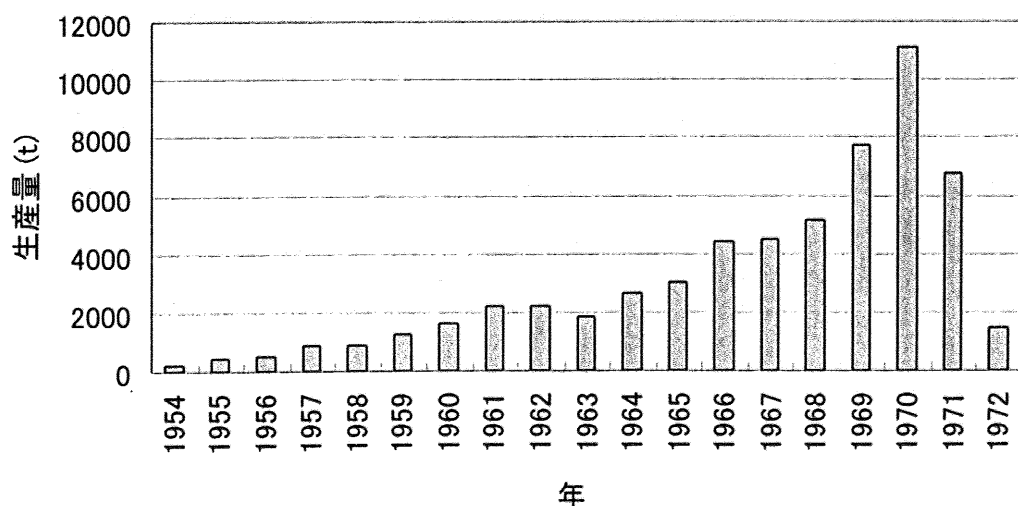


Fig. 1-1 日本における PCB 生産量の推移

## 2-4. PCB の構造と物理化学的性質

PCB は、ビフェニル骨格に 1～10 個の塩素が置換した有機塩素化合物で、209 の異性体を有している。構造を、Fig. 1-2 に示す。

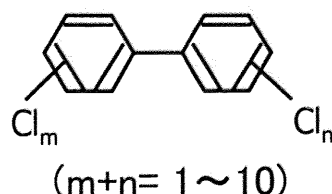


Fig. 1-2 PCB の構造

PCBs の物理化学的性質は、異性体や塩素数によって異なる。Li ら (2003) は、1～8 塩素化合物の PCBs のうち、構造的な特徴 (対称性、塩素の結合位置など) や、環境、ヒト生体サンプルなどでよく分析されている代表的な異性体を選択し、環境中の挙動を考察するときに必要となる、水溶解性 ( $S_w$ )、オクタノール-水分配係数 ( $K_{ow}$ )、蒸気圧 (P)、ヘンリーの法則の定数 (H)、オクタノール-空気分配係数 ( $K_{oa}$ )、オクタノール溶解性 ( $S_o$ ) について、いくつかの文献からデータを調査し、数学的に計算することによって、1 つの数値としてまとめている。Table 1-3 に、それを示す。

## 2-5. PCB の生物学的半減期

PCB は生体内残留性が高く、化学的に安定なため、多くの PCB が分解されずに生体中に蓄積している (鯉淵, 2005)。生体内に吸収された PCB は、脂溶性が高く生物学的にもかなり安定なため、代謝されない限りは肝並びに脂肪などの組織に蓄積し、体外へ排泄されにくい。PCB の化学構造、すなわち置換された塩素数の違い、または塩素数が同じでも置換位置の違いにより、生体外への排泄に顕著な差が見られる。

日本で使用されていた Kanechlor については、Kanechlor 300 の生物学的半減期が 5.1 年、Kanechlor 300/500 が 15 年以上であることが示されている (Hara, 1985)。また生物学的半減期は、ヒト血液中や脂肪中で異性体によって異なり、数年から 20 年以上の異性体もあることが分かっている (Shirai and Kissel, 1996)。さらに動物種によっても、その排泄能は大きく異なることが報告されている (小栗ら, 2000)。

Table 1-3 PCBs の物理化学的性質 (at 25 °C, Li et al., 2003)

PCB 異性体	塩素数	$S_w$ (mol/m <sup>3</sup> )	log $K_{ow}$	log P (Pa)	H (Pa·m <sup>3</sup> /mol)	log $K_{oa}$	$S_o$ (mol/m <sup>3</sup> )
CB3	1	$1.71 \times 10^{-2}$	4.49	-0.33	1.56	6.82	1350
CB8	2	$7.06 \times 10^{-3}$	5.09	-0.91	1.42	7.40	1301
CB15	2	$5.00 \times 10^{-3}$	5.35	-1.23	1.15	7.65	1590
CB28	3	$1.01 \times 10^{-3}$	5.55	-1.63	1.52	7.93	768
CB29	3	$1.86 \times 10^{-3}$	5.74	-1.35	1.51	7.80	692
CB31	3	$8.53 \times 10^{-4}$	5.79	-1.62	1.57	7.93	902
CB52	4	$6.82 \times 10^{-4}$	6.00	-1.97	1.45	8.22	735
CB61	4	$3.63 \times 10^{-4}$	6.17	-2.14	1.31	8.64	862
CB101	5	$9.57 \times 10^{-5}$	6.15	-2.62	1.50	8.90	534
CB105	5	$1.11 \times 10^{-4}$	6.61	-3.06	1.53	10.0	1410
CB118	5	$8.88 \times 10^{-5}$	6.49	-3.05	1.51	9.80	918
CB138	6	$2.08 \times 10^{-5}$	7.00	-3.27	1.60	9.76	1031
CB153	6	$3.77 \times 10^{-5}$	6.71	-3.28	1.40	9.52	675
CB155	6	$3.93 \times 10^{-5}$	7.36	-2.48	1.88	8.89	1948
CB180	7	$8.01 \times 10^{-6}$	7.29	-3.88	0.77	10.1	633
CB194	8	$8.82 \times 10^{-6}$	7.67	-4.69	0.83	11.3	1331

CB3: 4-MonoCB, CB8: 2,4'-DiCB, CB15: 4,4'-DiCB, CB28: 2,4,4'-TriCB, CB29: 2,4,5-TriCB,  
 CB31: 2,5,4'-TriCB, CB52: 2,5,2',5'-TetraCB, CB61: 2,3,4,5-TetraCB,  
 CB101: 2,4,5,2',5'-PentaCB, CB105: 2,3,4,3',4'-PentaCB, CB118: 2,4,5,3',4'-PentaCB,  
 CB138: 2,3,4,2',4',5'-HexaCB, CB153: 2,4,5,2',4',5'-HexaCB, CB155: 2,2',4,4',6,6'-HexaCB,  
 CB180: 2,3,4,5,2',4',5'-HeptaCB, CB194: 2,3,4,5,2',3',4',5'-OctaCB

## 2-6. 日本国内における環境中 PCB 濃度

日本全国での調査における、一般環境中及び野生生物中 PCBs 濃度を、それぞれ Table 1-4, 1-5 に示す。



Table 1-4 日本国内・一般環境中 PCBs 濃度

環境媒体	total PCBs 濃度 (2002 年度調査)
大気	16～880 pg/m <sup>3</sup> (環境省, 2004b)
水質	N.D.～0.045 μg/L (環境省, 2003) 60～11000 pg/L (環境省, 2004b)
底質	1.2～430 μg/kg-dry (環境省, 2003) 39～630000 pg/g-dry (環境省, 2004b)
土壌 (1998 年度調査)	N.D.～825 μg/kg-dry (環境省, 2003)

Table 1-5 日本国内・野生生物中 PCBs 濃度

野生生物種	Total PCBs 濃度 (2002 年度調査)
魚類	1.5～550 ng/g-wet (環境省, 2004b)
両生類 (トノサマガエル、トウキョウダルマガエル)	N.D.～1.0 μg/kg-wet (環境省, 2003)
貝類	0.2～160 ng/g-wet (環境省, 2004b)
鳥類	4.8～22 ng/g-wet (環境省, 2004b) 13～2700 ng/g-wet (環境省, 2003)
哺乳類 (スナメリ、タヌキ、ニホンザル)	0.11～30000 μg/kg-wet

このように、日本国内で PCBs の製造、開放系での使用が禁止された現在でも、PCBs が一般環境や野生生物中から、場合によっては高濃度で検出されていることが分かる。

## 2-7. PCB の毒性影響

PCBs 曝露による毒性については、動物実験などにより、曝露することによって多くの影響が見られることが示されている。いくつかの例を、以下に述べる。

### 2-7-1. 動物実験

#### 2-7-1-1. 短期曝露の影響

ラットにおいて、PCBs の製品である Aroclor 1242 を経口曝露 (100 mg/kg body weight, 2 日ごとに 3 週間)させたところ、体重減少、胸腺萎縮、色素涙、脱水症、運動失調などの中枢神経系機能低下が見られた。肝臓、腎臓での脂肪変化も見られた (Bruckner et al., 1973)。

#### 2-7-1-2. 催奇形性

妊娠マウスに、Kanechlor 500 の 1～5 mg/mouse (40～200 mg/kg body weight に相当)を、妊娠 6～15 日目まで、皮下注射により曝露させた。その結果、3 mg/ mouse の投与量で、母マウスの死亡率が増加した。出生した仔では、皮膚損傷、脱毛症、肝臓の腫れが見られた (Watanabe and Sugahara, 1981)。また、妊娠ラットに、PCB 異性体である CB77 の 3～10 mg/kg-body weight を妊娠 6～18 日の間に経口曝露させたところ、仔の成長の遅れが見られた (Wardell et al., 1982)。

#### 2-7-1-3. 発ガン性

マウスに Kanechlor 300, 400, 500 の、0, 5, 12.5, 25 mg/kg body weight を 32 週間、経口曝露させたところ、Kanechlor 500 の 25 mg/kg body weight で、オスのマウスに肝細胞ガン、メスのマウスに肝臓肥大が見られた (長崎ら, 1974)。また、オスラットに Aroclor 1260 の 0, 50, 100 mg/kg diet を 120 日間、経口曝露させたところ、曝露群で肝細胞ガンが見られた (Rao and Banerji, 1988)。

#### 2-7-1-4. 生殖影響と胎児毒性

Aroclor 1254 を経口曝露 (10 mg/kg body weight, 少なくとも一ヶ月間、毎日投与)させたメスラットにおいて、性的受容性の減少、交尾時期の遅延、妊娠中の膣からの出血、出産した仔の大きさの減少、出産時期の遅延といった影響を示した。ここで出産したメスの仔 (胎児期および授乳により PCBs 曝露されている)と、対照のオスを交尾させて生まれた仔では、体重増加が少ない、死亡率が高い、発情周期の遅延などの影響が見られた (Brezner et al., 1984)。

妊娠したメスのサルに対して、Aroclor 1248 の 0, 2.5 mg/ kg diet を経口曝露させたところ、この親から生まれた 4～6 歳の仔において、注意欠陥、記憶力の低下が見られた。この結果から、PCB 出生前曝露が長期間の認知機能低下につながる可能性のあることが示された (Levin et al., 1988)。

これらの動物実験から、PCBs 曝露により、様々な影響が引き起こされることが分かる。特に、感受性の高い胎児期に PCBs を曝露することにより、出生後の仔に様々な影響が見られているため、ヒトにおいても、胎児期 PCBs 曝露と健康影響の関連調査を行なうことが必要であろう。

## 2-7-2. ヒトでの影響

1968年に、PCBとその関連化合物（PCDFなど）が混入したライスオイルを摂取することにより、九州北部を中心に発症したカネミ油症では、座瘡状発疹、色素沈着、眼脂など、種々の異常が報告されている（Masuda, 2003）。油症の妊婦から生まれた新生児は、全身の皮膚が黒く、俗に黒い赤ちゃんと呼ばれた。死産児の黒い赤ちゃんを解剖した例の結果は、皮膚が黒いのはメラニン色素の沈着によるもので、皮脂腺の角化が著しく、成人の皮膚と本質的には類似の所見であった。すなわち、PCBなどが胎盤を通じて胎児に移行したための胎児性油症である（日本化学会, 1980）。

油症のホルモン影響については、発生当初に女性患者において月経周期の乱れ、月経血の量的、質的变化などが高い確率で認められることが報告されている（楠田, 1971）。甲状腺機能については、油症発生16年後の、1984年度福岡県油症一斉検診において慢性的影響が検討され、油症患者では対象者に比べトリヨードサイロニン（T3）およびサイロキシニン（T4）の上昇が認められることが報告されている（村井ら, 1985）。そして、油症28年後の1996年度福岡県油症一斉検診では、甲状腺機能異常と血中PCB濃度の間に相関は見られなかったが、甲状腺自己抗体については、PCB低濃度群に比べ高濃度群において、抗サイログロブリン抗体の出現が高頻度に認められた（辻ら, 1997）。

油症発生以来、30年以上経過し、血中PCBs濃度は低下し、種々の亜急性中毒症状は軽快している。しかし重症例においては、全身倦怠感、四肢のしびれ感などの症状が持続し、体内のPCBs濃度は現在でも高いことが分かっている（飯田ら, 1981）。

油症患者においては、PCBsなどの曝露により様々な影響が見られているが、その中でも上記のような、ホルモンレベルへの影響が示唆されている。PCBs曝露とホルモンレベル変動の関連については、油症のような大量曝露の場合だけでなく、特に近年言われているような低レベル曝露による影響について、ヒトを対象とした調査が必要であると考えられる。

### 3. 胎児期化学物質曝露の指標媒体

ここでは、胎児期化学物質曝露の指標媒体として用いられるヒトの胎盤、臍帯について基本的な構成、働きなどについて述べる。曝露指標媒体としての胎盤、臍帯の比較については、第2章で記述する。

#### 3-1. 胎盤（武谷・前原, 2004）

胎盤は、胎児に酸素や栄養を供給し、老廃物を排除するほか、種々のホルモンを分泌する内分泌器官としても重要である。形態的あるいは機能的に、妊娠15週頃には完成する。

##### 3-1-1. 胎盤の形態

妊娠末期の完成された胎盤は約500gの重量で、通常、中央に近く臍帯が付着している。胎盤は動物によりその形態に差があり、ヒト胎盤は絨毛間腔に浮遊したような状態にあり、血絨毛胎盤と言われる。

##### 3-1-2. 臍帯循環

胎児胎盤血管は数本に分かれ、放射状に羊膜の下を走り、最終的には2本の臍動脈と1本の臍静脈となり臍帯に入る。本章3-2で詳細を述べるが、臍帯は血管の周囲をWharton's jellyが取り囲み、血管を保護している。臍静脈は胎児の静脈管となり大静脈に流入する。また、臍動脈は左右の内腸骨動脈から分岐する。

##### 3-1-3. 胎盤における物質交換

胎盤完成後の胎児と母体の物質交換は、羊水を介して行なわれるごく一部を除くと、ほとんどが胎盤を介して行なわれる。この物質交換により、胎児は酸素をはじめとして生命の維持と成長に必須な物質を母体から吸収し、二酸化炭素（炭酸ガス）などの不要な物質を排出する。多くの物質は単純拡散や促進拡散により交換されるが、一部の物質は能動輸送により吸収または排出される。

胎盤のエネルギー源であるブドウ糖の胎盤通過性は、きわめて良好で、血中濃度は母児間に直線性の相関がある。母体から供給されたブドウ糖の一部は、胎盤でグリコーゲンに合成される。脂質は糖類に比べ、胎盤通過性は悪い。逆にアミノ酸は、ほとんどが胎児側の方が母体より高く、胎盤で能動輸送が行なわれている。

分子量の大きいタンパク質には胎盤通過性はないが、免疫グロブリンのうち、IgGは例外

的に通過性がある。このことは、ウイルスなどに対する抗体を胎児に与えるメリットである。

臨床的には、薬剤の胎盤通過性が問題となる。原則的には、分子量の小さいものはほとんど胎盤通過性があると考えてよく、母体に薬剤を投与する場合には十分な注意が必要である。

また、化学物質の中でも胎盤を通過する物質が、いくつか示されている。その中の 1 つに、本研究で対象としている PCBs が含まれており (Jacobson and Jacobson, 1988; Huisman et al., 1995a; Lanting et al., 1998; Soechitram et al., 2004)、胎盤通過後、臍帯を通過して胎児に到達するため (Soechitram ら (2004) は、胎児に OH-PCBs で約 50 %、PCBs で約 30 % 移行していることを示した)、本研究では胎児期 PCBs 曝露評価の指標として、臍帯に着目した。

### 3-2. 臍帯

#### 3-2-1. 臍帯の構成

臍帯は、水分を約 90% 含有し、Wharton's jelly の中に 2 本の動脈、1 本の静脈が走行している。Wharton's jelly は、臍帯に特徴的な構造物であり、筋線維芽細胞、膠原線維、基質 (ヒアルロン酸を主とする) の 3 者より構成される。Wharton's jelly は臍帯に弾性を与え、臍帯が圧迫や伸展を受けても、中の血管がつぶれないように作動している。Wharton's jelly 中の細胞は、線維芽細胞と筋細胞両者の性質を併せ持ち、臍帯血管の外膜としても機能している (松原, 1998; Sloper et al., 1979)。

臍帯長は妊娠週数とともに長くなるが、妊娠 28 週目以降は、その伸長は頭打ちとなる。妊娠 20 週で平均 32 cm, 40 週で平均 60 cm と報告されている。過短臍帯 (32 cm 以下) の児では、正常長臍帯の児と比べ、その後の IQ (知能指数) が低値であることが報告されている。これは、たまたま臍帯が短くて血流が悪くなり低酸素血症がらみで低 IQ になった例と、もともとの中枢神経系異常のために、臍帯伸長のための子宮内での胎児運動が制限され、臍帯が短くなった例があり得る (松原, 1998; Naeye, 1985)。過長臍帯 (75~80 cm 程度) では、臍帯下垂や脱出、真結節、巻絡が多く、これらに起因する胎児仮死が問題となる。

#### 3-2-2. 妊娠時期と臍帯 (宇津, 1998)

##### ・妊娠初期の臍帯

発生初期の臍帯部分は付着茎と呼ばれる小さい構造物であり、妊娠 6 週の終わりと妊娠 7 週の初め頃には、胎芽の頭臀長と同じくらいの長さで臍帯が観察できるようになる。この時期、臍帯の内部に血管構造も認識でき、1~2 回のねじれも観察できる。臍帯の発育は、臍帯動脈と臍帯静脈の血管発育速度が違うために、臍帯血管自身が螺旋状にねじれながら、徐々に長く、太くなっていくものと考えられている。大きな胎動が発現しないこの時期から、

妊娠8週末頃までの臍帯は、臍帯血管の螺旋状発育によるねじれだけで、臍帯の先端の胎芽部分も含めて、受動的に緩やかに回旋しながら発育していると考えられている。

妊娠9週以降、胎児の能動的な胎動が出現し始めるようになってからは、臍帯自身の螺旋状発育に加え、活発な胎動によって臍帯は引き伸ばされ、捻転回数が増減され始めると考えられる。この時期から妊娠14週目頃までの臍帯は、胎児の頭臀長とほぼ同じくらいの長さであり、3～6回前後の捻転を確認できる。

#### ・妊娠中期の臍帯

大きな胎動が活発になる妊娠15～26週頃の妊娠中期になると、臍帯の長さや捻転回数はそれぞれの胎児で大きな変動が認められるようになる。子宮の内腔、つまり羊水腔の広さとその形、胎児の大きさや個々の活動性の違いなどによって、この時期に臍帯はさらに引き伸ばされ、長くなったり捻転回数が大きく変動したりする。

#### ・妊娠後期の臍帯

妊娠後期になると大きな胎動は少なくなるので、臍帯の長さや捻転回数は臍帯自身の発育による変化が主で、大きな変動は現れない。ただし、妊娠28週頃以降、胎児-胎盤循環血液量の増加に伴って臍帯血管は拡張され、臍帯は全体に太くなる。また分娩時になると、断続的な子宮内圧の上昇に伴って臍帯血管の血液量は変化し、臍帯はさらに太くなる。

### 3-2-3. 物質輸送と臍帯

胎盤、臍帯は母体と胎児間に存在し、妊娠維持や胎児発育に必要な物質を産生する器官であり、栄養素の輸送器官でもある。臍帯は、胎児と母体を結ぶ供給系と排泄系の、2方向の物質の流れを持つ。

母体側に高濃度に存在するグルコースは、胎児へ促進拡散で輸送され、遊離脂肪酸、コレステロールは飲作用によって母体から胎児へ供給される。胎児側に高濃度に存在するアミノ酸、水溶性ビタミン、乳酸、P, Ca, Feなどは、すべて能動輸送によって母体から胎児へ供給されている。このように、臍帯は母児間の物質輸送に非常に重要である（森山, 1998）。

### 3-2-4. 保存臍帯

本章3-2-1～3-2-3では、出生時に得られる臍帯（新鮮臍帯）について述べたが、日本ではこの臍帯を保存する習慣があり、保存中に新鮮臍帯に含まれる約90%の水分（Sloper et al., 1979）が蒸発し、乾燥状態の臍帯（保存臍帯）となる。

臍帯は、「大病をして、九死に一生を得るか得ないかというような危険にさらされたときに、削って飲む」ために、保存するようになったと言われている（根岸, 1986）。日本以外では、

ペルーのインカ族、バイエルンのライン地方、ベルリンなどで臍帯を保存する習慣があり、人間の運命は、その臍の緒あるいは後産に結びついていると信じられている（根岸, 1986）。

#### 4. 発達障害と甲状腺ホルモンの関係

甲状腺ホルモンは、正常な脳の発達に必須であり、行動や認知機能にも影響を及ぼす。甲状腺機能低下症や、甲状腺機能亢進症、甲状腺ホルモン不応症（GRTH）のような甲状腺ホルモンレベルの異常は、注意欠陥多動症候群（ADHD）や精神遅滞、他の認知機能、発達障害の症状と関連することが示唆されている（Builee and Hatherill, 2004）。また甲状腺ホルモンは、聴力、運動機能の発達にも重要な役割を果たす。Goldey ら（1995a）は、妊娠ラットに Aroclor (PCB mixture) を経口投与したところ、生まれた仔の甲状腺機能低下症に付随して聴力障害を誘発したことを示した。さらに、この実験において、運動障害も誘発された。プロピルチオウラシル曝露させたラットの実験においては、血漿中甲状腺ホルモンレベルの低下が起こり、これに伴い、運動活動の遅延、多動性障害などが見られている（Brosvic et al., 2002）。

ヒトの調査では、Haddow ら（1999）が、妊婦から血液を採取し、出産した子供の知能発達と、母親の血中甲状腺ホルモン減少に関連があることを明らかにした。妊娠約 10 週目で胎児の甲状腺は甲状腺ホルモンを生産するが、この研究により、母から胎児へ移行する甲状腺ホルモンも脳の発達に重要であることが分かり、妊娠中の甲状腺ホルモン濃度の違いが、子供の知能に対し重大な影響を与えうることが示された（Colborn et al., 2004）。前向きコホート研究においては、Stein and Weiss（2003）が注意欠陥多動症候群（ADHD）患者を対象に、甲状腺ホルモンレベルとの関連を調査した。結果、対象者の甲状腺ホルモンレベルは通常レベルの範囲内であった。しかし、その中でも低レベル甲状腺ホルモンの対象者で、inattentive タイプの ADHD が多く、高レベルの対象者で ADHD ではないが、気分障害、広汎性発達障害(PDD)などの対象者が多かった。

このように、甲状腺ホルモンレベルの変動が発達障害の発症要因になっている可能性が示唆されており、特にデータが少ないヒトに対して、発達障害、甲状腺ホルモンに関する研究を行なうことが重要と考えられている。

#### 5. 略語の定義

本論文中に記載する主な用語の定義を、Table 1-6 のように定める。



Table 1-6 本論文中の略語の定義

略語	用語	略語	用語
POPs	残留性有機汚染物質	PCBs	ポリ塩化ビフェニル
OH-PCBs	水酸化体 PCBs	MonoCB	モノクロロビフェニル
DiCB	ジクロロビフェニル	TriCB	トリクロロビフェニル
TetraCB	テトラクロロビフェニル	PentaCB	ペンタクロロビフェニル
HexaCB	ヘキサクロロビフェニル	HeptaCB	ヘプタクロロビフェニル
OctaCB	オクタクロロビフェニル	NonaCB	ノナクロロビフェニル
DecaCB	デカクロロビフェニル	PFK	パーフルオロケロセン
TT4	総サイロキシシン	TT3	総トリヨードサイロニン
fT4	遊離サイロキシシン	fT3	遊離トリヨードサイロニン
TSH	甲状腺刺激ホルモン	TRH	甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン
TTR	トランスサイレチン（プレアルブミン）	TBG	サイロキシシン結合グロブリン
CRM	認証標準物質	ELISA 法	酵素免疫測定法
HRGC/HRMS	高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計	SIM	選択イオン検出法
IUPAC	国際純正及び応用化学連合	NRCC	カナダ国立研究機構
ADHD	注意欠陥多動症候群	LD	学習障害
GRTH	甲状腺ホルモン不応症	RTM	リアルタイムモニタリング
LTM	ロングタイムモニタリング	TEQ	毒性等量

# 第 2 章

## 保存臍帯を用いた 後ろ向き調査法の 確立の検討

## 第2章 保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討

### 1. 背景

米国五大湖周辺での疫学調査により、母親の汚染魚摂食によるPCBsや有機塩素系農薬類などへの胎児期化学物質曝露が小児の知的発達に及ぼす悪影響が示され、他の疫学調査や動物実験でも、PCBsの胎児期曝露による小児の行動異常、記憶力の低下など、神経系への悪影響が明らかにされている（Jacobson et al., 1985; Grandjean et al., 2001; Koopman-Esseboom et al., 1996）。小児の発達への影響は、胎児期に化学物質を曝露し、一見正常に出生した後、ある程度の期間が経ってから症状が見出されるようになることが多い。したがって、発達障害が化学物質の胎児期曝露によるものかどうかを検討するためには、健康影響が現れた時点で時間をさかのぼり、胎児期の曝露量を推定、評価する必要がある。

出生時に得られる新鮮臍帯、臍帯血は、胎児期の化学物質曝露指標媒体としてよく用いられてきた。これらの曝露媒体を用いた場合、出生時の化学物質曝露評価はできるが、成長して発達障害が現れた時点で、過去にさかのぼって出生時の曝露を調査することは不可能であることから、これまでは出生時に得られる新鮮臍帯、臍帯血を用いた前向きコホート調査を行なう以外に、胎児期化学物質曝露と発達障害の関連を調査する手段はなかった。しかし、この前向き調査では、追跡する調査集団が大規模になること、長期にわたり追跡しなければならないことから、化学物質の胎児期曝露による健康影響を調査するのに、かなりの時間や費用がかかってしまうという欠点がある。

そこで本章では、胎児期化学物質曝露と発達障害の関連を、スクリーニング的に調査することができる、保存臍帯を用いた後ろ向き調査法を確立するための検討を行なった。ここでは、保存臍帯が胎児期曝露の評価指標として使用可能かどうかの評価を中心に検討した。

#### 1-1. 前向きコホート研究と後ろ向き調査（症例対照研究）

##### 1-1-1. 前向きコホート研究（日本疫学会, 2002）

何らかの共通特性（同じ職業、同じ住所地、同一の曝露要因など）を持った集団を追跡し、その集団からどのような疾病、死亡が起こるかを観察し、要因（例えば化学物質曝露）と疾病（例えば発達障害）との関連を明らかにしようとする研究である。したがって前向きコホート研究は、疾病の要因と考えられている情報に基づいて、調査集団を設定し、その後の疾病や死亡の起こり方が、要因の有無や、その曝露の程度によってどのように異なるかを観察する方法である。

前向きコホート研究の長所として、以下のものが挙げられる。

- ・集団の死亡率や罹患率を、直接測定できる。
  - ・曝露要因の影響を、単一疾病だけでなく、複数の疾病に対して同時に観察できる。
- 一方、短所としては、以下のものが挙げられる。
- ・設定する調査集団を大規模にしなければならない。また、長期にわたり追跡しなければならないため、調査期間と費用が膨大になる。特に、測定しようとする健康事象がまれな場合、さらに観察集団、期間を大きくする必要がある。
- これらの特徴から、前向きコホート研究は、あらかじめ設定された病因仮説をしっかりと検証する場合に、適した方法であると言える。

#### 1-1-2. 後ろ向き調査（症例対照研究）（日本疫学会, 2002）

病因論的に同一と考えられる病態を着目疾患に選び、その診断基準や適格条件、除外条件などを定める。それらの基準や条件を満たし、着目疾患に罹患した者を症例と呼び、罹患していない者を対照と呼ぶ。対照については、他疾患の患者を含むか否か、性・年齢などの項目で各症例と対応させるかなど、系統誤差（バイアス）や交絡因子の可能性を念頭におき、適格条件を決める。

後ろ向き調査の長所として、以下のものが挙げられる。

- ・前向きコホート調査と比べ、設定する対象者数は少なくできる。
- ・前向きコホート調査と比べ、調査期間は短く、早く結果が得られる。

短所として、以下のものが挙げられる。

- ・バイアスが大きくなるため、前向きコホート調査に比べると、正確性で劣る。バイアスには、一般的には、選択バイアス（症例、対照の選択、曝露者、非曝露者の選択など）、情報バイアス（曝露情報など）が考えられる。

以上から、後ろ向き調査は、病因仮説をスクリーニング的に検証する場合に、適した方法であると言える。

前向きコホート調査と後ろ向き調査の長所、短所を、Table 2-1 にまとめた。

Table 2-1 前向きコホート調査と後ろ向き調査の特徴比較（日本疫学会, 2002）

項目	前向きコホート	後ろ向き調査
対象集団の特定に必要な情報	曝露情報	罹患情報
低頻度疾患への適用性	適用できない	適用できる
研究期間	長い	短い
対象者数	多い	少ない
結果の信頼性	大きい	やや小さい

本研究のように、「胎児期化学物質曝露が発達障害の要因として関連しているか否か」に

ついて、早く、スクリーニング的に結果を示したい場合は、1-1-2 の後ろ向き調査（症例対照研究）が適していると考えられる。しかし、これまでは過去にさかのぼって胎児期化学物質曝露を調査するための曝露評価指標がなかったため、発達障害と胎児期化学物質の関連を見るための後ろ向き調査は行なわれてこなかった。この曝露指標媒体として、本研究では保存臍帯に注目した。

## 1-2. 曝露指標媒体

ヒトの化学物質の曝露指標媒体としては、目的により様々な種類の媒体が用いられている。媒体を選択する場合には、リアルタイムモニタリング（RTM）、または長期モニタリング（LTM）の、どちらを行ないたいのかを考慮することが必要である。RTM, LTM の概念はすでに確立されており、RTM は化学物質の短期的な変化を確認するため、LTM は長期にわたる変化を追跡するために行なわれる（The Science of the Total Environment, 1993）。例えば、血液、母乳、唾液、尿、頭髮などはRTMに、臍帯、胎盤、脂肪組織、肝臓、歯、骨などはLTMに使われる。

さて、発達段階である胎児期に受ける化学物質曝露により、様々な健康影響が引き起こされる可能性が示唆されている（Colborn, 2004; Jacobson et al., 1985）。そのため、胎児期の化学物質曝露と健康影響の関連を調査する場合に、胎児期曝露の評価指標が重要となる。上記した中では、RTM, LTM の目的に合わせ、胎児期化学物質の曝露指標媒体として、一般的に血液（臍帯血）、胎盤、（新鮮）臍帯が多く使われているため、以下にこの 3 種の曝露指標について述べる。

### 1-2-1. 血液（臍帯血）

臍帯の 2 本の動脈、1 本の静脈中を流れている血液が、臍帯血である。通常の場合、臍帯は胎盤の中央部分につながっており、胎児からの臍帯血は、栄養と老廃物の交換のために、臍帯中の動脈を通して胎盤に行き届く。また、臍静脈を通じ、胎盤から胎児へと臍帯血が流れている（Iyengar and Rapp, 2001）。

臍帯血は、非侵襲的に得られ、胎児期 PCBs 曝露の指標媒体として、数多くの研究で使用されている（Jacobson et al., 1985; Grandjean et al., 2001; Stewart et al., 2003; Patandin et al., 1999）。しかしサンプリングの際、臍帯をクランプした後、すぐに臍帯血の凝固が始まるので、サンプリングはいそがなければならない、出産作業を妨げてしまう可能性が考えられる。また、胎児期の曝露を総合的に調査したい場合（蓄積曝露の調査）、臍帯血では長期のモニタリングをすることはできず、不向きであると考えられる。さらに PCBs に対しては、臍帯と比べると検出率が劣り、胎児期 PCBs 曝露を過小評価している可能性があるというデータもある（Fukata et al., 2005）。

### 1-2-2. 胎盤

胎盤は、母体と胎児の間で酸素や栄養を供給し、胎児を成長させる役割を持っている。また満期産の場合、付着している臍帯と膜を除くと、胎盤の平均重量は約 500 g であり、水分 85 %, タンパク質 12 %, 脂肪 0.11 %, 灰分 1 % などから構成される (Iyenger and Rapp, 2001)。

既往の研究により、化学物質によっては胎盤を通過し、胎児が化学物質に曝露することが分かってきた。また、胎盤サンプルは非侵襲的に得られることもあり、胎児期曝露の指標媒体として使用されている (Iyenger and Rapp, 2001)。

しかし、胎盤を使って胎児期の化学物質曝露を評価したとき、胎盤を通過せずに胎盤に蓄積された化学物質も、胎児の曝露として評価してしまう可能性があり、場合によっては胎児期化学物質曝露を過大評価するおそれがあるという欠点が考えられる。

### 1-2-3. 臍帯

胎児期曝露の指標媒体として、臍帯血、胎盤について述べたが、これらの欠点をクリアしているのが、新鮮臍帯である。新鮮臍帯は、非侵襲的にサンプルが得られ、妊娠第 2 期 (15 週) あたりに形成されるため (Grandjean et al., 2005)、これ以降に蓄積された化学物質を知ることができ、胎児期曝露の長期モニタリングに向いている。また、胎盤を曝露指標媒体として用いた場合とは異なり、胎盤を通過した化学物質を評価できるため、臍帯は正確な胎児期化学物質曝露の指標になると考えられる。

本研究での対象物質である PCBs に対しては、胎児期の曝露指標としての適用可能性が検討され、新鮮臍帯が優れた媒体であることが既往の研究によって示されている (Grandjean et al., 2001; Fukata et al., 2005)。以下に、新鮮臍帯、保存臍帯について述べる。

#### 1-2-3-1. 新鮮臍帯

これまで、既往の研究により、胎児期曝露指標として新鮮臍帯 (Storr-Hansen, 1996; Burse et al., 2000; Grandjean et al., 2001)、臍帯血 (Jacobson et al., 1990; Jacobson and Jacobson, 1996)、胎盤 (Iyengar and Rapp, 2001) などが用いられてきた。このうち、よく用いられている臍帯血と同様に、PCBs に対して、新鮮臍帯が優れた胎児期曝露指標媒体であることが示されている。

Grandjean ら (2001) は、出生時に得られた 50 人の臍帯血と新鮮臍帯を使って、それぞれの PCB 濃度に相関があるか否かを検討した結果、良い相関が得られ、新鮮臍帯の曝露指標媒体としての有用性を示した ( $r = 0.90$  for wet weight,  $r = 0.87$  after lipid adjustment)。また、Fukata ら (2005) は、胎児期曝露を評価するために、新鮮臍帯、臍帯血、母体血サンプル中の PCBs、有機塩素系農薬類の分析を行なった。その結果、5~7 塩素化物の PCBs 濃度で、

新鮮臍帯-母体血 ( $r = 0.64$ )、新鮮臍帯-臍帯血 ( $r = 0.75$ )の間に関連が見られた。また PCBs、有機塩素系農薬類とも、臍帯血よりも検出率が高いことから、新鮮臍帯の方が優れた曝露指標であることが結論された。

#### 1-2-3-2. 保存臍帯

保存臍帯は、新鮮臍帯に含まれる約 90 %の水分 (Sloper et al., 1979)が蒸発し、乾燥状態になったものである。これまで、本研究で対象としている保存臍帯中の PCBs を分析した例はないが、メチル水銀を分析した既往の研究には原田ら (1977)、Akagi ら (1998)の例がある。

原田ら (1977)は、水俣地区で生まれた 97 人分の保存臍帯中のメチル水銀を分析した結果、1954～1964 年に生まれた対象者の保存臍帯中メチル水銀がもっとも高く、水俣病の原因とされるメチル水銀を副生したアセトアルデヒド製造のピーク時期と一致したこと、また、保存臍帯中メチル水銀濃度は、水俣病、精神遅滞の患者で高い値であったことを示した。Akagi ら (1998)は、水俣病 24 人、精神遅滞 11 人、脳性麻痺 7 人、他疾患 2 人、健常者 132 人の、いずれも水俣地区で得られた合計 176 人分の保存臍帯中メチル水銀分析を行なった。その結果、1950～1965 年に生まれた対象者の保存臍帯中メチル水銀濃度がもっとも高かった。これも、原田ら (1977)と同様、アセトアルデヒド製造のピーク時期と一致していた。また、水俣病、精神遅滞患者 (水俣地区)の保存臍帯中メチル水銀濃度が、健常者と比較して有意に高かった (それぞれ  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.002$ )。

胎児期曝露指標媒体に使用されている臍帯血、胎盤、(新鮮)臍帯について、それぞれの特徴を Table 2-2 にまとめた。

Table 2-2 胎児期曝露指標媒体の比較

項目	(新鮮)臍帯	臍帯血	胎盤
侵襲性	なし	なし	なし
RTM or LTM	LTM	RTM	LTM
胎児の化学物質曝露評価	正確	過小評価	過大評価の可能性あり
PCBs 検出率	高い	やや低い	不明

以上から、保存臍帯は、新鮮臍帯と同様に胎児期の化学物質曝露を表し、比較的入手しやすいことから、後ろ向き調査を行なう上で最適な曝露指標媒体であると考えられる。しかし、これまでに保存臍帯中の PCBs が分析された例はないため、本章では、PCBs の胎児期曝露指標媒体として保存臍帯が使えるかどうかを確認し、PCBs について保存臍帯を用いた後ろ向き調査法確立のための検討を行なった。

## 2. 目的

本章では、保存臍帯が胎児期曝露の評価指標として使用可能かどうかの評価を中心に、保存臍帯を使った後ろ向き調査法の確立の検討を行なうことを目的とする。

## 3. 方法

### 3-1. 保存臍帯を胎児期曝露評価指標として用いるための検討

保存臍帯を、胎児期 PCBs 曝露指標として用いるために、本章では下記 4 点について検討を行なった。

#### ①保存臍帯中 PCBs の検出確認 (Otake et al., 2004):

これまで、保存臍帯中の PCBs を分析した研究例は存在しない。保存臍帯は、最小重量で約 0.1g とサンプル量が少ないために、ここでは PCBs が検出可能か否かを確認した。

#### ②保存臍帯中 PCBs の濃度傾向 (Otake et al., 2004):

保存臍帯中の PCBs 濃度が、大気、水などの一般環境中濃度を反映しているか否かの確認を行なった。本章では、1920, 1930, 1960, 1970, 1980 年代生まれの大人 18 人、1998, 2001 年生まれの子供 2 人、合計 20 人の健常者から提供された各年代の保存臍帯を用い、出生年別の保存臍帯中 PCBs 濃度傾向を評価し、この結果と、日本国内での PCB 製品生産量の傾向及び既往の研究における一般環境中の PCBs 濃度傾向との比較を行なった。

#### ③保存臍帯と母乳・脂肪組織サンプル中 PCBs 濃度の比較:

PCBs の曝露評価指標として確立され、既往の研究においてよく使われている母乳、脂肪組織と、本研究での保存臍帯中 PCBs 濃度のレベル、傾向を各年代で比較することにより、保存臍帯の曝露指標としての評価を行なった。

#### ④PCBs による汚染確認:

保存臍帯は、クリーンルームなどではなく、一般家庭で通常の状態では保管されているものがサンプルとなるため、大気などに存在する PCBs によって汚染されている可能性が考えられる。そのため、本章では、日本国内で PCBs が生産・使用される以前に出生した対象者(1954 年以前に出生した 1927, 1930 年生まれの対象者)の保存臍帯を分析し、PCBs が検出されるか否かを確認した。



### 3-2. 対象とサンプル

本研究での目的、方法などについて説明し、口頭でのインフォームドコンセントが得られた1920, 1930, 1960, 1970, 1980 年代生まれの大人 18 人、1998, 2001 年生まれの子供 2 人（子供については、親の同意を得た）、合計 20 人（いずれも健常者）の保存臍帯を用いた。

また、本研究での保存臍帯中 PCBs 分析方法の妥当性確認のために、認証標準物質 (CRM) の CARP-1 (National Research Council Canada)を用いた。

### 3-3. 保存臍帯中 PCBs 分析

PCBs 全異性体 (209 種)を対象とし、分析を行なった。

#### 3-3-1. 試薬

アセトン（関東化学、ダイオキシン類分析用）

トルエン（和光純薬、ダイオキシン類分析用）

ヘキサン（関東化学、ダイオキシン類分析用）

シリカゲル（関東化学、シリカゲル 60、400°C4hr 加熱処理して使用）

無水硫酸ナトリウム（関東化学、残留農薬試験用、450°C4hr 加熱処理して使用）

硝酸銀（和光純薬、特級）

硫酸（関東化学、UGR）

水酸化カリウム（和光純薬、特級）

#### 3-3-2. 標準物質（カッコ内は IUPAC No）

##### 3-3-2-1. $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs 内標準物質

・クリーンアップスパイク（Wellington 製）

2-MonoCB (CB3)、2,4'-DiCB (CB8)、4,4'-DiCB (CB15)、

2,4,4'-TriCB (CB28)、2,4',5-TriCB (CB31)、3,4,4'-TriCB (CB37)、

2,2',5,5'-TetraCB (CB52)、3,3',4,4'-TetraCB (CB77)、

3,4,4',5-TetraCB (CB81)、2,2',3,5',6-PentaCB (CB95)、

2,2',4,5,5'-PentaCB (CB101)、2,3,3',4,4'-PentaCB (CB105)、

2,3,4,4',5-PentaCB (CB114)、2,3',4,4',5-PentaCB (CB118)、

2',3,4,4',5-PentaCB (CB123)、3,3',4,4',5-PentaCB (CB126)、

2,2',4,4',5,5'-HexaCB (CB153)、2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB156)、

2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB157)、2,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB167)、

3,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB169)、2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (CB170)、

2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (CB180)、2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (CB189)、  
2,2',3,3',4,4',5,5'-OctaCB (CB194)、2,2',3,3',5,5',6,6'-OctaCB (CB202)、  
2,2',3,3',4,4',5,5',6-NonaCB (CB206)、2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB (CB209)  
各 25 pg/ $\mu$ L

・シリンジスパイク (Wellington 製)

2,3',4',5-TetraCB (CB70)、2,3,3',5,5'-PentaCB (CB111)  
2,2',3,4,4',5'-HexaCB (CB138)、2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (CB178)  
各 10 pg/ $\mu$ L

3-3-2-2.  $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定量用標準物質 (Wellington 製)

2-MonoCB (CB1)、4-MonoCB (CB3)、2,2'-DiCB (CB4)、  
2,4'-DiCB (CB8)、2,6-DiCB (CB10)、4,4'-DiCB (CB15)、  
2,2',5-TriCB (CB18)、2,2',6-TriCB (CB19)、  
2,4,4'-TriCB (CB28)、2',3,4-TriCB (CB33)、  
2,3,4'-TriCB (CB22)、3,4,4'-TriCB (CB37)、  
2,2',6,6'-TetraCB (CB54)、2,2',5,5'-TetraCB (CB52)、  
2,2',4,5'-TetraCB (CB49)、2,2',3,5'-TetraCB (CB44)、  
2,4,4',5-TetraCB (CB74)、2,3',4',5-TetraCB (CB70)、  
3,4,4',5-TetraCB (CB81)、3,3',4,4'-TetraCB (CB77)、  
2,2',4,6,6'-PentaCB (CB104)、2,2',3,5',6-PentaCB (CB95)、  
2,2',4,5,5'-PentaCB (CB101)、2,2',4,4',5-PentaCB (CB99)、  
2,3',4,4',6-PentaCB (CB119)、2,2',3,4,5'-PentaCB (CB87)、  
2,3,3',4',6-PentaCB (CB110)、2',3,4,4',5-PentaCB (CB123)、  
2,3',4,4',5-PentaCB (CB118)、2,3,4,4',5-PentaCB (CB114)、  
2,3,3',4,4'-PentaCB (CB105)、3,3',4,4',5-PentaCB (CB126)、  
2,2',4,4',6,6'-HexaCB (CB155)、2,2',3,5,5',6-HexaCB (CB151)、  
2,2',3,4',5',6-HexaCB (CB149)、2,2',4,4',5,5'-HexaCB (CB153)、  
2,3',4,4',5',6-HexaCB (CB168)、2,2',3,4,4',5'-HexaCB (CB138)、  
2,3,3',4,4',6-HexaCB (CB158)、2,2',3,3',4,4'-HexaCB (CB128)、  
2,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB167)、2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB156)、  
2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB157)、3,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB169)、  
2,2',3,4',5,6,6'-HeptaCB (CB188)、2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (CB178)、  
2,2',3,4',5,5',6-HeptaCB (CB187)、2,2',3,4,4',5',6-HeptaCB (CB183)、  
2,2',3,3',4',5,6-HeptaCB (CB177)、2,2',3,3',4,4',6-HeptaCB (CB171)、

2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (CB180)、2,3,3',4,4',5',6-HeptaCB (CB191)、  
2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (CB170)、2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (CB189)、  
2,2',3,3',5,5',6,6'-OctaCB (CB202)、2,2',3,3',4,5,5',6'-OctaCB (CB201)、  
2,2',3,3',4,5,6,6'-OctaCB (CB199)、2,2',3,3',4,4',5,5'-OctaCB (CB194)、  
2,3,3',4,4',5,5',6-OctaCB (CB205)、2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NonaCB (CB208)、  
2,2',3,3',4,4',5,5',6-NonaCB (CB206)、2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB (CB209)

### 3-3-2-3. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定性用標準物質

PCBs 209 全異性体 Mixture

### 3-3-3. 実験器具

磁器製乳鉢、磁器製乳棒、円筒ろ紙 (WHATMAN)、丸底フラスコ (100 mL)、ソックスレー抽出器 (高さ 21 cm)、冷却管 (高さ 28 cm)、クロマト管、カラムヘッド (300 mL)、漏斗、トラップ球、三角フラスコ (200 mL, 500 mL)、ナシ型フラスコ (10 mL)、マイクロピペット (BLAND 製、20-200  $\mu\text{L}$ )、マイクロシリンジ (50  $\mu\text{L}$ )、パスツールピペット

### 3-3-4. 前処理方法

PCBs は脂溶性であるため、既往の研究において、多くは fat base で濃度を出している。しかし、保存臍帯については臍帯に含有される脂肪量が少ない (新鮮臍帯中脂肪含有量の中央値は 0.18 %; Burse et al., 2000) ことに加えて、サンプル量も非常に少ないことから、脂肪重量測定は不可能であったため、本研究における保存臍帯中 PCBs 濃度は dry weight base とした。以下、PCBs 分析のための保存臍帯の前処理方法について示す。

①保存臍帯サンプルを、アセトンで数回すすぎ洗いを行なった後にハサミ、乳鉢を用いて粉碎し、粉状にした。

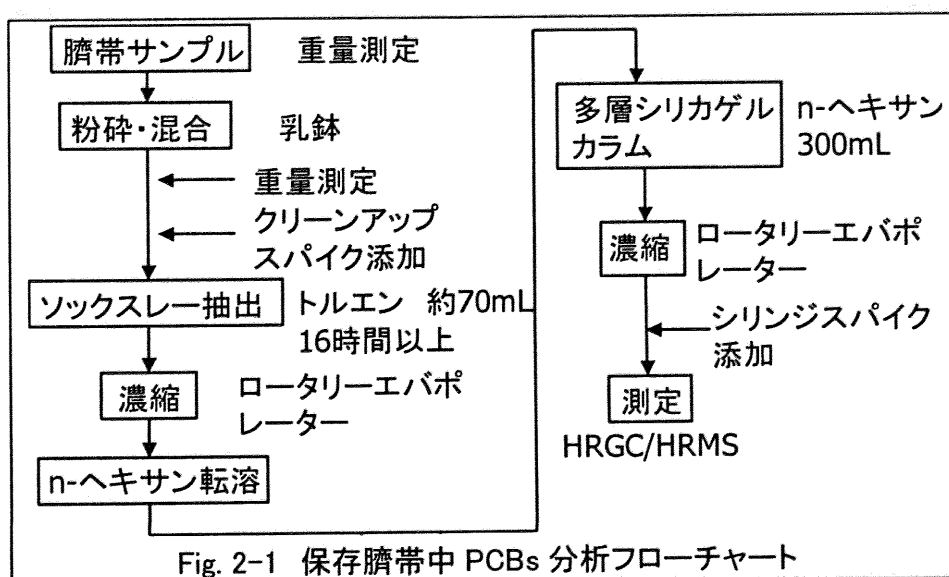
②①のサンプルの重量測定後、円筒ろ紙にサンプルを入れ、クリーンアップスパイク 10  $\mu\text{L}$  を添加した後にソックスレー抽出 (温度はトルエンの沸点: 111  $^{\circ}\text{C}$  以上)を行なった。ソックスレー抽出は、トルエン溶媒により 16 時間以上行なった。

③②の抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮、ヘキサン転溶した。続いて、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー精製を行なうために、ヘキサン 200 mL で洗浄した。多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル 0.5 g、2 %水酸化カリウムシリカゲル 2 g、シリカゲル

0.5 g、50 %硫酸シリカゲル 7 g、シリカゲル 0.5 g、10 %硝酸銀シリカゲル 2 g、無水硫酸ナトリウム 1 cm を順次ヘキサンで湿式充填した。サンプルを、洗浄後の多層シリカゲルクロマトグラフィーに供し、ヘキサン 300 mL で流し展開溶出させた。

④③で得られた溶出液を、ロータリーエバポレーター、乾燥空気で濃縮した。濃縮後サンプルに、シリンジスパイク 30  $\mu$ L を添加し、測定用サンプルとした。

以上の前処理方法のフローを、Fig. 2-1 に示す。



### 3-3-5. 測定機器と条件

#### ・測定機器

HRGC/HRMS: Hewlett Packard (HP)6890 ガスクロマトグラフ 及び Micromass AutoSpec-Ultima 高分解能マスペクトロメーター

GC 用キャピラリーカラムには、SGE international の HT8-PCB (長さ:60 m, 内径: 0.25 mm, 厚さ: 0.25  $\mu$ m)を使用した。

#### ・測定条件

Table 2-3 に記載した。

### 3-4. 倫理審査

保存臍帯に関する本研究計画全体は、東京大学医学系研究科・医学部の倫理審査において承認を受けている。

研究の対象とする個人の人権擁護として、

- ・データ解析においては ID 番号、PCBs 分析用検体には検体番号を用い、被験者のイニシャルなど、個人名を示唆するようなラベリングは行なわない。
  - ・被験者の個人データは一切公開しない。
  - ・研究成果の公開にあたっては、被験者のプライバシーが明らかにされるような情報は一切公開しない。
- などの対策を講じた。

Table 2-3 HRGC/HRMS の測定条件（保存臍帯中 PCBs）

---

ガスクロマトグラフ（6890 series GC system, Agilent社製）

---

試料注入口温度: 300 °C

試料注入方法: スプリットレス

試料注入量: 1.5  $\mu$ l

カラム恒温槽温度:

120 °C(1 min)→(20 °C/min)→210 °C(0min)→(2.0 °C/min)→250 °C→(10 °C/min)  
→330 °C(hold)

分離カラム: 溶融シリカキャピラリーカラム, HT8-PCB (SGE 社製)

---

質量分析計（AutoSpec-Ultima, Micromass）

---

測定方法: SIM

イオン源温度: 300 °C

トラップカレント: 500  $\mu$ A

エレクトロンエネルギー: 25~45 eV

分解能: 10,000以上

加速電圧: 約8,000 V

質量数補正: ロックマス方式（PFK使用）

測定質量数:

	Native		<sup>13</sup> C
Mono CBs	188.0393, 190.0363	<sup>13</sup> C-Mono CBs	200.0795, 202.0766
Di CBs	222.0003, 223.9974	<sup>13</sup> C-Di CBs	234.0406, 236.0376
Tri CBs	255.9613, 257.9584	<sup>13</sup> C-Tri CBs	268.0016, 269.9986
Tetra CBs	289.9224, 291.9194	<sup>13</sup> C-Tetra CBs	301.9626, 303.9597
Penta CBs	325.8804, 327.8775	<sup>13</sup> C-Penta CBs	337.9207, 339.9177
Hexa CBs	359.8415, 361.8385	<sup>13</sup> C-Hexa CBs	371.8817, 373.8788
Hepta CBs	393.8025, 395.7995	<sup>13</sup> C-Hepta CBs	405.8428, 407.8398
Octa CBs	427.7635, 429.7606	<sup>13</sup> C-Octa CBs	439.8038, 441.8008
Nona CBs	461.7245, 463.7216	<sup>13</sup> C-Nona CBs	473.7648, 475.7619
Deca CB	393.8025, 395.7995	<sup>13</sup> C-Deca CB	405.8428, 407.8398

---

## 4. 結果と考察

### 4-1. 保存臍帯中 PCBs の分析方法の評価 (Otake et al., 2004)

本章において使用した CRM の CARP-1 は、工場排水の近くで生息していた鯉 (*Cyprinus carpio*) の全部位を用いて、National Research Council Canada (NRCC) により作成された。Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の 2 種、polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) の 7 種、PCB の 9 種に対して認証値が付与されており、本研究で対象としている PCB では、4~7 塩素化物の認証値が示されている (Table 2-4)。

この CRM を用いて、本研究で用いた分析方法の評価を行なった。CARP-1 の認証値と分析結果を Table 2-4 に示す。表中の認証値は平均値±不確かさで、分析値は平均値±標準偏差で表している。測定条件が同一でないため、一部 PCB 異性体の分離状況が異なっているものの、本実験での結果はすべて認証値の範囲内であることが示された。これより、本研究での分析方法 (Fig. 2-1) は、真度および精度に優れていることが確認できた。

Table 2-4 CARP-1 の分析結果と認証値との比較

PCBs (IUPAC No.)	認証値 (ng/g)	分析値 (ng/g)
52	124±32	108±4 (#52+#69)
101/90	124±37	125±5 (#89+#101+#90)
105	54±24	50±2
118	132±60	134±4
138/163/164	102±23	93±2
153	83±32	94±3
170/190	22±8	21±1
180	46±14	46±1
187/182	36±16	33±2

(n= 3)

### 4-2. 保存臍帯を胎児期 PCBs 曝露指標として用いるための検討

#### 4-2-1. 保存臍帯中 PCBs の検出確認 (Otake et al., 2004)

これまで、保存臍帯中の PCBs を分析した例はなく、また、本研究で得られた保存臍帯の最低重量は約 0.1 g と非常に少ないため、保存臍帯サンプルから PCBs が検出されるか否かを確認することが必要であった。本研究で保存臍帯中 PCBs を分析した結果、Fig. 2-2 に見られるように、検出可能であることが分かった。したがって、本検討により、0.1 g 以上の保存臍帯サンプルがあれば、PCBs が検出可能であることが示された。

保存臍帯からPCBsの検出が確認された、これら対象者のtotal PCBs濃度のヒストグラムをFig. 2-3に示す。また、対象者の特性（性別、出生年）と保存臍帯中total PCBs濃度の関係についてはTable 2-5に、対象者別の塩素数ごとの保存臍帯中PCBs濃度についてはAppendix Aに示した。

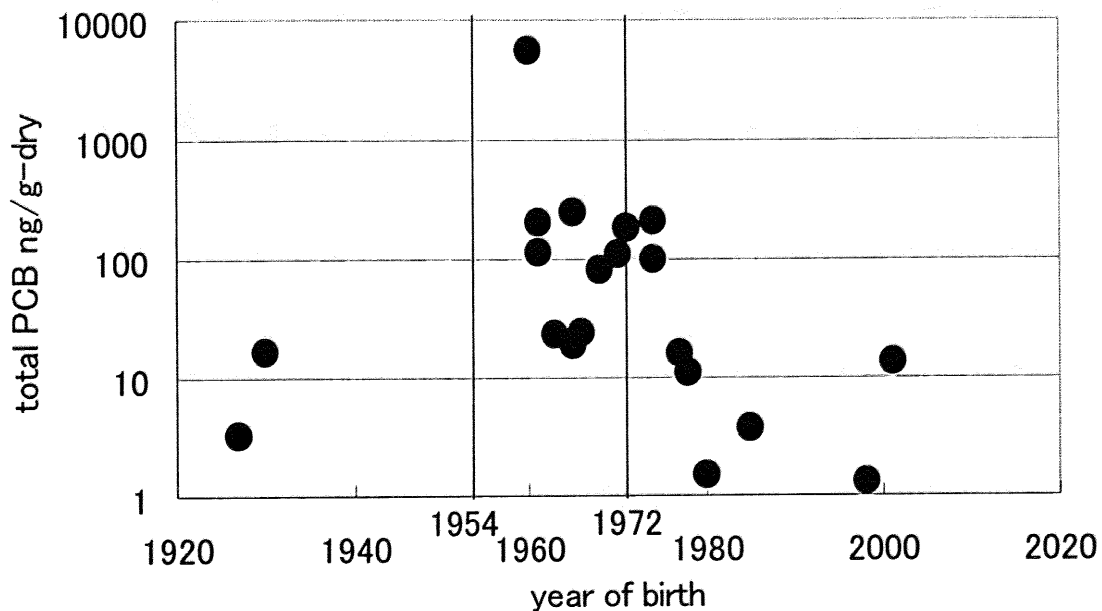


Fig. 2-2 出生年による保存臍帯中total PCBs濃度の傾向 (n=20)  
(1954～1972年は、日本国内でPCBsが生産・使用されていた期間)

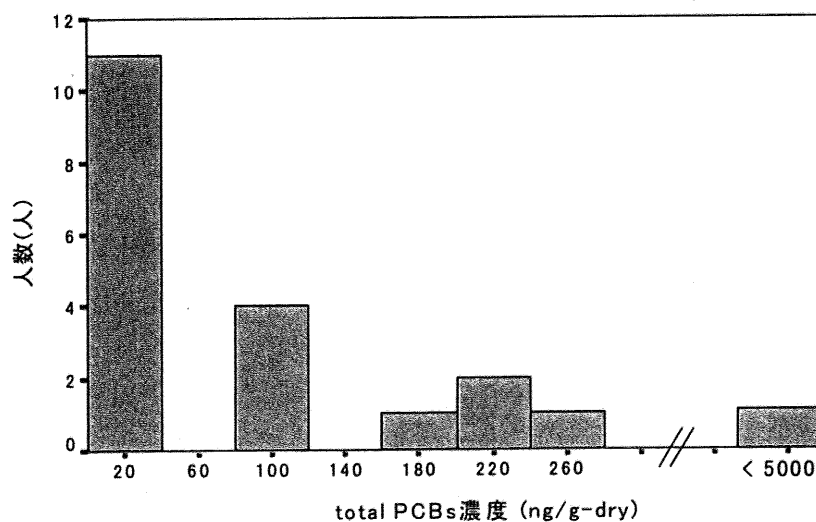


Fig. 2-3 健常者の保存臍帯中total PCBs濃度のヒストグラム (n=20)



Table 2-5 対象者の特性と保存臍帯中 total PCBs 濃度 (n= 20)

対象者の特性	N (人)	total PCBs (ng/g-dry)
<u>性別</u>		
男	9	73
女	11	590
<u>出生年</u>		
< 1950	2	11
1950-1970	9	730
> 1970	9	61

(total PCBs は平均値)

## 4-2-2. 保存臍帯中 PCBs の濃度傾向 (Otake et al., 2004)

保存臍帯中の化学物質分析の例としては、メチル水銀の例がある (原田ら, 1977; Akagi et al., 1998)。これらメチル水銀の研究では、保存臍帯中メチル水銀濃度の高い時期が、水俣病の原因とされるメチル水銀を副生したアセトアルデヒド製造のピーク時期と一致していた。したがって、メチル水銀の場合は、保存臍帯中濃度が一般環境中濃度を反映し、曝露指標媒体として使用できると考えられている。しかし、保存臍帯中の PCBs については分析例がなく、曝露指標媒体として使用できるか、本研究で確認することが必要であった。

ここでは、本章で対象とした、各年代の健常対象者の保存臍帯中 PCBs 濃度と、日本国内での PCB 製品生産量の傾向、及び既往の研究データから得られた一般環境中 PCBs 濃度の傾向を比較することにより、保存臍帯中 PCBs が環境中濃度を反映しているか否かを確認した。保存臍帯の分析により得られた、各対象者の PCBs 濃度の傾向を年代別に整理した結果を Fig. 2-2 に、保存臍帯中 PCBs 濃度と日本国内での PCB 製品生産量の傾向の比較図を Fig. 2-4 に示す。

Fig. 2-2, 2-4, Table 2-5 より、PCBs が日本国内で生産、開放系で使用されていた 1954～1972 年の間に出生した対象者の保存臍帯中 PCBs 濃度が、特に高い傾向にあることが分かった。さらに既往の研究データから、大気や水などの一般環境中 PCBs 濃度の傾向 (久保田ら, 2002; Jones, et al., 1995; Bignert et al., 1998; Lead et al., 1997)と同様に、近年になるにつれて、保存臍帯中 PCBs 濃度が低くなる傾向があることが分かった。

また、保存臍帯中 PCBs の塩素数分布を Fig. 2-5 に示す。各対象者において、塩素数分布の傾向は出生年によって大きくは変わらず、ほぼ同じであった。さらに、保存臍帯中 PCBs の異性体分布については、各対象者で主に CB28, 31, 44, 70, 110, 118 などの異性体が検出されており、この傾向も出生年によって大きくは変わらず、ほぼ同じであった。

このように、保存臍帯中 PCBs 濃度は、国内で PCBs 製品が生産、開放系で使用されていた時期で高い傾向があるだけでなく、一般環境中の PCBs 濃度の時系列トレンドと類似してい

ることを示すことができ、保存臍帯が環境からの PCBs 曝露を反映している可能性が示唆された。

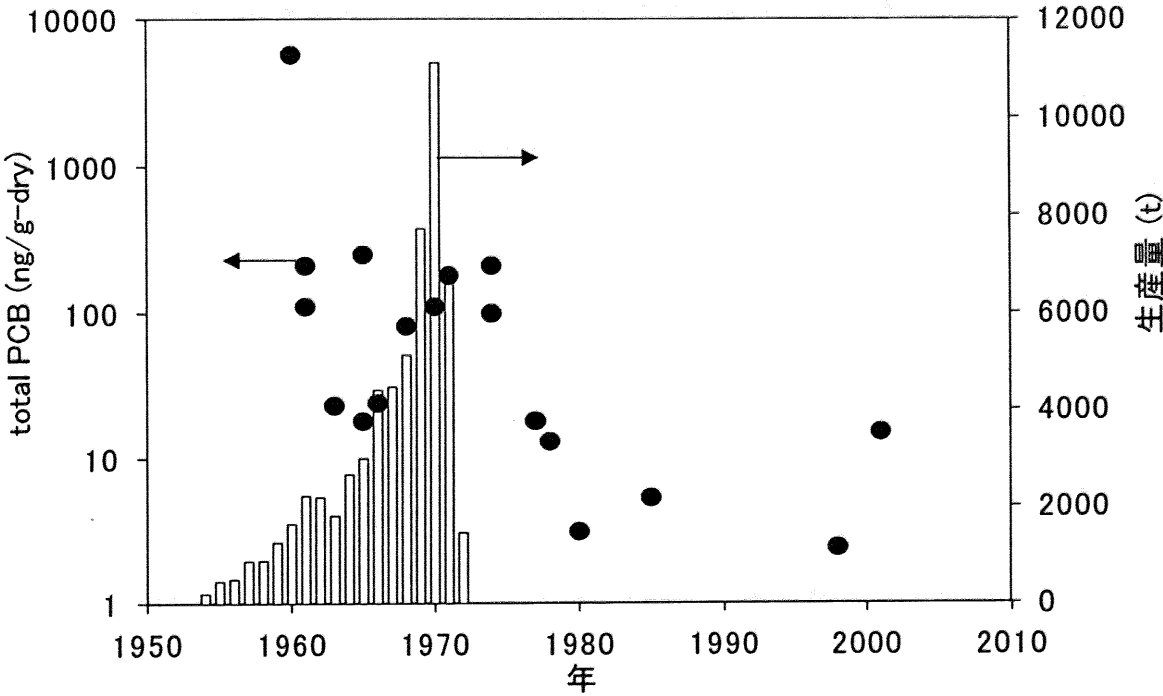


Fig. 2-4 保存臍帯中 PCBs 濃度と日本国内の PCB 製品生産量の時系列トレンド比較  
(●: 保存臍帯中 total PCBs 濃度 (y 左軸; n= 18)、□: 日本国内 PCB 製品生産量  
(y 右軸; 1954～1972 年の期間に生産; 磯野, 1975; 日本化学会, 1980))

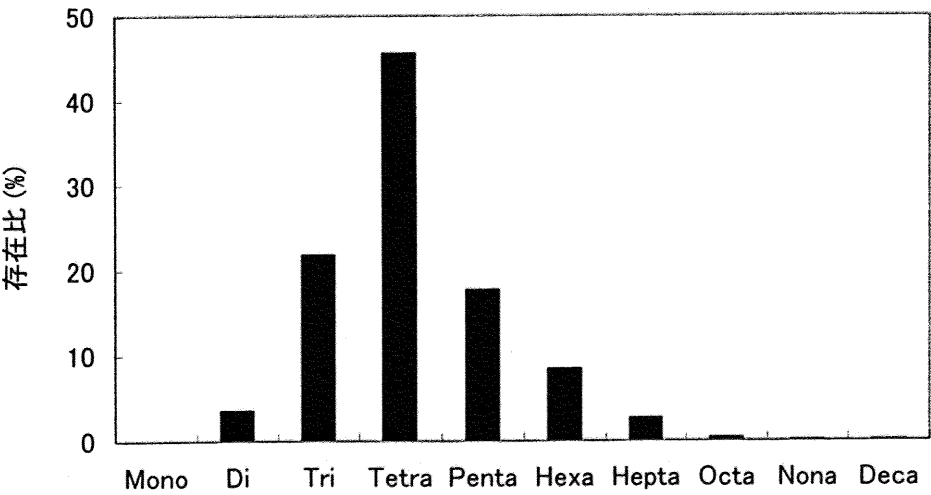


Fig. 2-5 保存臍帯中 PCBs の塩素数分布 (n= 20)

#### 4-2-3. 保存臍帯と母乳・脂肪組織サンプル中 PCBs 濃度の比較

既往の研究において、母乳中や脂肪組織中の PCBs 分析がよく行なわれている。Konishi ら (2001) は、日本 (大阪府) において、1972~1998 年まで母乳中の PCBs を含む有機塩素系化学物質の長期モニタリング調査を行ない、その結果、1974 年にサンプリングした対象者の母乳中 total PCBs 濃度がもっとも高く ( $n=59$ ; 平均値 =  $1.5 \mu\text{g/g-fat}$ ,  $0.6\sim 4.8 \mu\text{g/g-fat}$ )、近年になるにつれ濃度は減少傾向にあることを示した。この、濃度データの詳細が示されている Konishi ら (2001) の母乳中 total PCBs 濃度レベル・傾向と、本研究における保存臍帯中 total PCBs 濃度レベル・傾向の比較を Fig. 2-6 に示す。Fig. 2-6 では、Konishi ら (2001) のデータに合わせ、保存臍帯中 total PCBs 濃度も 1972~1998 年の対象者のデータを使用した。また、保存臍帯中の脂肪含有量を全対象者一定の 0.18 % (この値は、既往の研究での 316 人の新鮮臍帯中における脂肪含有量の中央値であり、濃度幅は 0.01 %~1.43 %であった; Burse et al., 2000) と仮定して、dry-weight base から fat base への濃度変換を行なった。

Fig. 2-6 より、保存臍帯中 total PCBs 濃度レベルが、母乳中 total PCBs 濃度レベルよりも全体的に高くなっているものの、濃度傾向はほぼ一致することが分かった。

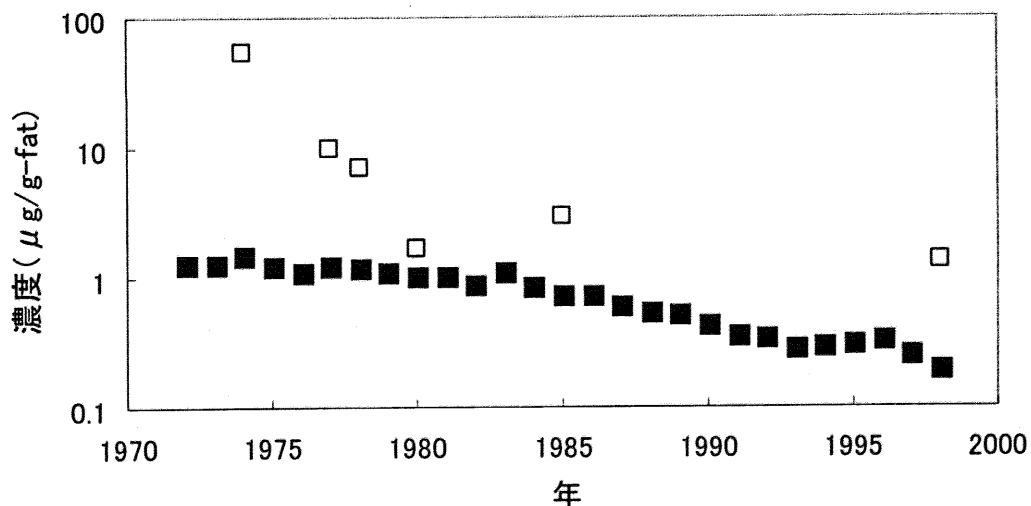


Fig. 2-6 保存臍帯と母乳中 total PCBs 濃度のレベル・傾向比較

(□: 保存臍帯中 total PCBs 濃度 ( $n=6$ ), ■: 母乳中 total PCBs 濃度 (Konishi et al., 2001)、母乳中 total PCBs 濃度の各点は、平均値を示す)

また、Loganathan ら (1993) は、日本 (東京都、広島県、愛媛県) で 1928~1985 年の間に死亡した、ヒトの脂肪組織中の total PCBs を含む有機塩素系化学物質の濃度傾向を解析し、total PCBs については、1960~1980 年頃に死亡した対象者で濃度が高い傾向にあったことを報告している (データが図のみで示されているため、詳細は不明であるが、濃度は数  $\mu\text{g/g-fat}$  のレベルである)。ここでも保存臍帯中 total PCBs 濃度は、脂肪組織中の濃度傾向と

類似していた。

以上より、既往の研究で分析されている母乳、脂肪組織中 PCBs 濃度と本研究での保存臍帯中 PCBs 濃度の時系列トレンドを比較すると、類似していることが分かった。よって、PCBs の曝露指標媒体としてよく用いられている母乳、脂肪組織と同様に、保存臍帯が曝露指標媒体として使用できる可能性を示唆できたと考えられる。

#### 4-2-4. 臍帯保管中の汚染について

保存臍帯は一般家庭で保管されているため、保存中に環境中（主に大気中など）の PCBs を吸着することで汚染される可能性があり、その場合の保存臍帯中 PCBs 濃度は胎児期曝露以外の、保存期間中の大気からの汚染による PCBs も反映することになる。それを確認するために、日本国内で PCBs が生産・使用される以前に出生した対象者（1954 年以前に出生）の保存臍帯の分析を行なった。その結果、Fig. 2-2 に見られるように、1954 年以前に生まれた対象者である 2 名（1927, 1930 年生まれ）の保存臍帯からも PCBs が検出され、保存臍帯は胎児期 PCBs 曝露だけでなく、保存期間中の環境中からの PCBs 汚染も反映することが分かった。したがって、保存臍帯を胎児期曝露指標媒体として後ろ向き調査に用いるためには、こうした保存期間中の汚染も考慮し、使用条件を制限することが必要となる。

そこで本研究では、同胞間で保存臍帯中 PCBs 濃度を比較することで、保存臍帯を後ろ向き調査に使用できると考えた。日本の習慣から、保存臍帯は親によって保管されることが多く、結果的に兄弟姉妹の臍帯は同じ場所に保管されることになる。保存臍帯が同じような状態、環境で保管されていれば、保存期間中の汚染も同程度だと考えられるため、同胞間であれば、保存期間中の汚染によるバイアスを最小限にできる。

また、1927, 1930 年生まれの対象者の、保存臍帯中 PCBs の塩素数分布を解析したが、他の年代に出生した対象者の平均的な塩素数分布と比較したとき、ほぼ同じ傾向となり、3~5 塩素化物が多く検出されていた（Fig. 2-7~2-9）。保存臍帯中 PCBs の異性体分布では、主に CB28, 31, 44, 70, 110, 118 などの異性体が検出されており、この傾向も 1927, 1930 年生まれの対象者和其他の年代に出生した対象者で比較したとき、ほぼ同じ傾向であった。よって保存臍帯中 PCBs の保存中の汚染には、特徴的な塩素数、異性体分布は見られないことが分かった。

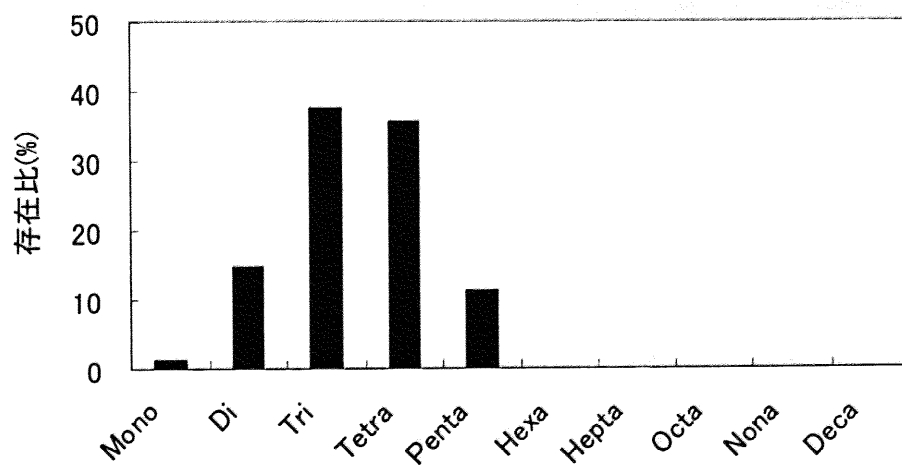


Fig. 2-7 1927 年生まれの対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布

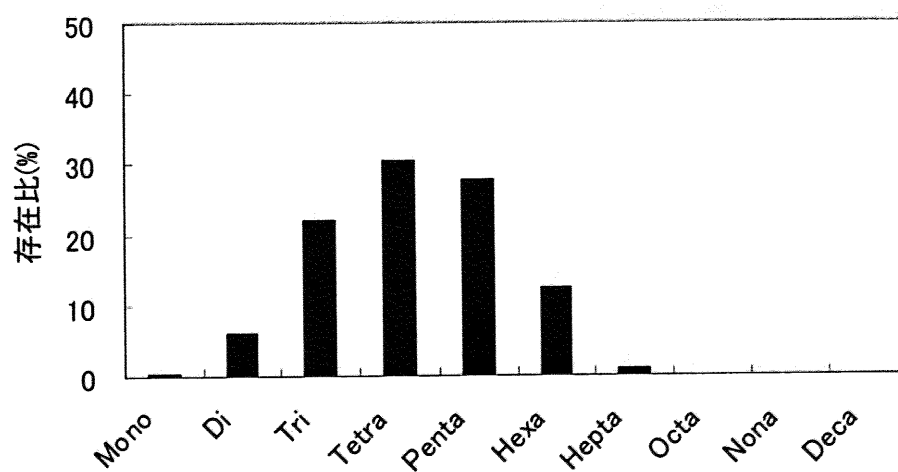


Fig. 2-8 1930 年生まれの対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布

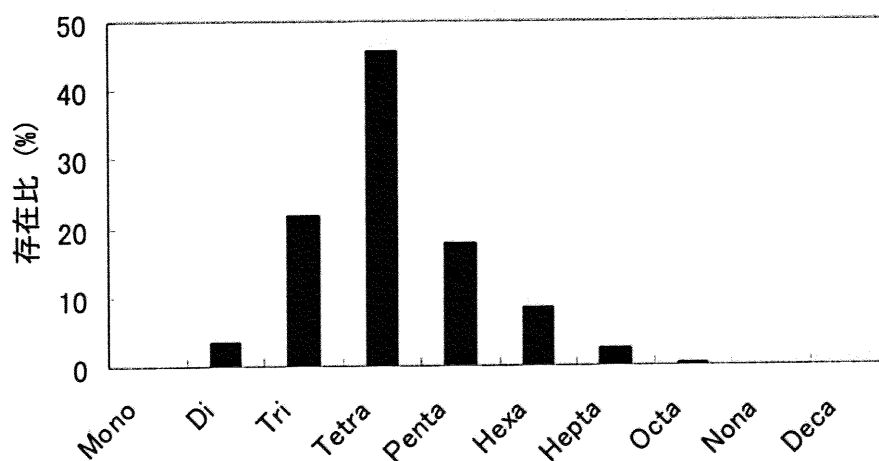


Fig. 2-9 1927, 1930 年生まれ以外の対象者の保存臍帯中 PCBs 塩素数分布 (n= 18)

## 5. まとめ

本章では、PCBsの胎児期曝露指標媒体として、保存臍帯が使用できるか否かの検討を行った。これまで保存臍帯中 PCBs の分析を行なった例はなかったため、検出が可能かどうかを確認し、非常に少ないサンプル量（約 0.1 g）でも、保存臍帯から PCBs が検出可能であることを示した。さらに保存臍帯中 PCBs の濃度傾向は、日本国内における PCB 製品生産量や一般環境中 PCBs 濃度の時系列トレンドと類似していただけでなく、これまで PCBs の曝露指標媒体として用いられてきた母乳、脂肪組織中 PCBs 濃度の時系列トレンドとも類似しており、保存臍帯が曝露指標媒体として使用できる可能性が示唆された。しかし、保存臍帯が保存期間中に環境中の PCBs に汚染されていることも分かったことから、後ろ向き調査に保存臍帯を使うためには、使用条件を制限することが必要となった。その条件として、PCBs を対象物質としたときは、症例の健常な同胞を対照とする方法（同胞間比較）であれば、調査を行なうことが可能であると考えた。

本章では、保存臍帯が PCBs の曝露評価指標として有用である可能性を示し、保存期間中の汚染の問題はあるものの、この対策として同胞間比較を行なうことにより、後ろ向き調査に用いることができる可能性を指摘した。

# 第 3 章

発達障害に対する  
保存臍帯を用いた  
後ろ向き調査法の適用

### 第3章 発達障害に対する保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の適用

#### 1. 背景

近年、ADHD（注意欠陥多動症候群）や LD（学習障害）、自閉症といった、発達障害に対する社会的な関心が高まっており、様々な研究がされているが、はっきりとした病因はいまだに不明である。こうした中で、原因の 1 つとして化学物質の関与が示唆されるようになり、発達障害の病因として、化学物質の関連を調査することが急務となっている。

##### 1-1. PCBs 曝露と発達に関する既往の研究例

本研究で着目している胎児期 PCBs 曝露を中心とした、PCBs 曝露と発達への影響（発達の遅れや発達障害）に関する動物実験、疫学調査（前向きコホート研究）の既往の研究例について、以下に述べる。

##### 1-1-1. 動物実験

Aroclor 1254 を曝露したラットの仔で、通常より早い時点で開眼現象が誘発されるようになった（Schantz et al., 1997; Goldey et al., 1995a, 1995b）。また、Zoeller ら（2000）によると、妊娠中、授乳期を通じて 1 mg/kg/day 以上の Aroclor 1254 に曝露されたラットから生まれた仔において、生後 15 日で RC3/neurogranin mRNA が増大した。このとき、ミエリン塩基性タンパク質 mRNA は通常のレベルであったが、1 mg/kg/day より少ない曝露の場合は、ミエリン塩基性タンパク質 mRNA は、対照に比べて減少していた。RC3/neurogranin は長期増強、学習/記憶プロセスに関係している（Miyakawa et al., 2001）。別の動物実験においては、Aroclor 1254, CB126 の胎児期、新生仔期曝露が、聴力低下を引き起こすことも示されている（Herr et al, 2001; Crofton and Rice, 1999; Goldey et al., 1995a, 1995b）。

運動機能と化学物質曝露の関係では、CB126, CB153 を曝露させたラットの仔で、活動パターンへの影響が示された（Holene et al., 1998）。CB47, CB77 に曝露された大人のオスラットでは、多動性障害が見られ、胎児期に CB95 を曝露されたラットでは、成長後に自発運動の低下を示した（Schantz et al., 1997）。出生 10 日後に CB28, CB52, CB77, CB126 に曝露されたマウスにおいては、どの異性体に対しても、曝露された直後は自発運動の低下を示したが、時間の経過とともに異常な馴化反応が見られるようになった（Eriksson and Fredriksson, 1996）。

このように、数々の動物実験により PCBs 曝露と発達への影響との関連が示されている。これらを含めた関連の研究について、Table 3-1, 3-2 にまとめた。



## 1-1-2. 疫学調査

胎児期、新生児期 PCBs 曝露と、発達の遅れや発達障害のような発達への影響との関連調査では、オランダ、ニューヨーク州、ドイツ、フェロー諸島、台湾、ミシガン州などで、コホート研究が行なわれている。それぞれの研究について、以下に述べる。

①オランダコホート (Huisman et al., 1995; Koopman-Esseboom et al., 1996; Patandin et al., 1999; Vreugdenhil et al., 2002)

1990～1992 年の間の、妊婦 418 名を対象として調査が行なわれた。対象のうち、約半数はロッテルダムの工業地帯、半数はフローニンゲンの農村地域に住んでおり、さらに、それぞれの地域で母乳、人工乳のどちらで育児をしたかで対象者を分類した。

曝露指標媒体には、妊娠最終月の母体血、臍帯血、母乳育児の集団には、母乳を用いた。母体血、臍帯血は、CB118, CB138, CB153, CB180 の 4 種の PCBs を、母乳は 17 種のダイオキシン、フランと 6 種の Co-PCBs (合計、ダイオキシン類 23 種)、20 種のオルト位が置換されている PCBs を対象物質とした。神経発達は、3, 7, 18, 42, 84 ヶ月の時点で、神経学的な検査 (0.5, 18, 42 ヶ月)、the Bayley Scales of Infant Development (3, 7, 18 ヶ月)、the Kaufman Assessment Battery for Children (42 ヶ月)、the Reynell Language Development Scales (42 ヶ月)、the McCarthy Scales of Children's Abilities (84 ヶ月)、Pre-School Activity Inventory (84 ヶ月)によって評価した。

0.5 ヶ月時での神経学的な検査 (姿勢緊張や反射神経など)の結果、母体血、臍帯血中 PCB 異性体、PCBs 濃度とスコアとの関連は見られず、母乳中 PCBs、ダイオキシン類濃度とスコアには負の関連が見られた。18 ヶ月時では、臍帯血、母体血中 PCBs 濃度と運動機能スコアとの間に負の関連が見られ、42 ヶ月時では、各曝露指標媒体の PCBs やダイオキシン類濃度と運動機能スコアには、関連が見られなかった。

3 ヶ月時の the Bayley Scales of Infant Development の結果、母体血中 PCBs 濃度、母乳中ダイオキシン類 TEQ 濃度と精神運動発達スコアに負の関連が見られた。

7 ヶ月時では、母乳中ダイオキシン類 TEQ 濃度と精神運動発達スコアに負の関連が見られたが、18 ヶ月時では PCBs、ダイオキシン類の胎児期、出生後曝露とスコアに関連は見られなかった。また各時期において、このテストの精神発達スコアと胎児期、出生後 PCBs、ダイオキシン類曝露との関連は見られなかった。

42 ヶ月時では、知的機能を検査する the Kaufman Assessment Battery for Children、言語理解を検査する the Reynell Language Development Scales のスコアと、臍帯血、母体血中 PCBs 濃度が、負の関連を示した。また、これらのスコアは、人工乳の方が母乳で育児された対象よりも、有意に高くなった。

84 ヶ月時では、臍帯血中 PCBs 曝露と、the McCarthy Scales of Children's Abilities の認

知機能、記憶機能などのスコアとの間に関連は見られなかった。また、人工乳、母乳育児の違いも、スコアに影響しなかった。しかし臍帯血中 PCBs 濃度が、遊び行動を評価する、Pre-School Activity Inventory のスコアと関連があることを示し、PCBs 濃度の増加とともに、男っぽい遊びが男児で減少し、女児で増加する傾向にあることが示唆された。

②ニューヨーク州（オスウィーゴ）コホート（Stewart et al., 2000; Darvill et al., 2000; Stewart et al., 2003）

オスウィーゴは、スポーツフィッシングのメッカであるオンタリオ湖の沿岸に位置し、ここに住む妊婦が多くの魚を摂取することが分かっているため、胎児期曝露による健康影響の調査をする場所として選ばれた。1991～1994 年の間の妊婦を対象とし、母親、子供の 309 ペアについて調査した。

曝露指標媒体には、臍帯血、胎盤、対象者によっては母乳を用い、PCB 異性体 68 種を対象物質とした。神経発達は、出生時に the Brazelton Neonatal Assessment Scale、6, 12 ヶ月時に the Fagan Test of Infant Intelligence、36, 54 ヶ月時に the McCarthy Scales of Children's Abilities によって評価した。

出生時の the Brazelton Neonatal Assessment Scale（反射神経や運動行動などのテスト）のスコアと 7～9 塩素化物の PCB で汚染された魚摂取との関連を調査し、魚摂取とスコアの間に負の関連が見られた。

6, 12 ヶ月時では、情報処理能力、記憶能力などをテストする the Fagan Test of Infant Intelligence を用い、6, 12 ヶ月時とも、臍帯血中 PCBs 濃度とスコアに負の関連が見られた。高塩素化物 PCBs（7～9 塩素化物）濃度の場合は、6 ヶ月で関連が見られたものの、12 ヶ月ではその関連は見られなかった。

36, 54 ヶ月では、認知発達を調べる McCarthy Scales of Children's Abilities を用い、36 ヶ月では臍帯血中 PCBs とスコアの間に負の関連が見られたが、54 ヶ月ではその関連は見られなかった。

③ドイツコホート（Winneke et al., 1998; Walkowiak et al., 2001）

1993 年に産婦人科を受診した妊婦と、新生児の 171 ペアを対象とした。曝露指標媒体には臍帯血と母乳を用い、PCB の 3 種の異性体（CB138, 153, 180）を対象物質とした。神経発達は、7, 18, 30, 42 ヶ月時に the Bayley Scales of Infant Development、7, 18, 30 ヶ月時に the Kaufman Assessment Battery for Children を用いて評価を行なった。

the Bayley Scales of Infant Development では 7, 30 ヶ月の時点で、the Kaufman Assessment Battery for Children では 42 ヶ月の時点で、母乳中 PCBs 濃度と精神発達スコアに負の関連が見られた。

④フェロー諸島コホート (Grandjean et al., 2001)

1986～1987 年の間の、1022 人の妊婦を対象として調査を行なった。曝露指標媒体としては、臍帯血、妊婦の頭髮、子供の血液 (12 ヶ月、7 歳) を用いた。対象物質は、臍帯血、頭髮、子供血液中の水銀であり、PCB についても 443 人の対象者の臍帯血中 PCBs (CB138, 153, 180) を分析した。

PCBs については臍帯血中 PCBs 濃度と、7 歳の時点で行なわれた言語発達を見るための Boston Naming Test のスコアとの間に、負の関連が見られた。さらに、臍帯血中 PCBs 濃度と、聴力低下にも関連が見られた。

⑤台湾コホート (Chen et al., 1992)

1979 年、日本で起きたカネミ油症と同様に (第 1 章 2-7-2 参照)、台湾でも油症事件 (Yu-Cheng) が起き、製造プロセスで PCBs に汚染されたライスオイルを摂取することにより、様々な健康被害がもたらされた。このライスオイルを摂取した人の中には、妊婦も含まれており、胎児期 PCBs 曝露と神経発達との関連が調査されている。

対象は、1978-1985 年の間に生まれ、Yu-Cheng で PCBs 曝露された 118 人の子供と、その対照者とした。曝露指標には、出生時に母体血、臍帯血、母乳が得られなかったため、油症後の調査時にサンプリングした子供の血液を用い、PCBs の分析を行なった。

調査の結果、子供の血中 PCBs 濃度と、認知機能テスト (Chinese versions of the Stanford-Binet test, the Wechsler Intelligence Scale for Children) のスコアの関連において、PCBs 曝露した子供で認知発達の低下が見られた。さらに、曝露の 7 年後でもその影響が続いて見られていた。

⑥ミシガン州コホート (Jacobson and Jacobson, 1988; Jacobson et al., 1985; Jacobson et al., 1990; Jacobson et al., 1992; Jacobson and Jacobson, 1996; Jacobson and Jacobson, 2003)

PCBs で汚染されているミシガン湖の魚を摂取していた妊婦を対象に、1980～1981 年の間に、ミシガンの 4 つの産婦人科で出産した 8000 人以上に関して、調査が行なわれた。

曝露指標媒体には、臍帯血、母体血、母乳を用い、PCBs を対象物質とした。神経発達は、出生時に the Brazelton Neonatal Assessment Scale、5 ヶ月時に the Bayley Scales of Infant Development、7 ヶ月時に the Fagan Test of Infant Intelligence、4 歳時に the McCarthy Scales of Children's Abilities、11 歳時に WISC-R を用いて評価した。

出生時の the Brazelton Neonatal Assessment Scale による評価では、母親の魚摂取量が反射神経などのスコアと負の関連を示したが、臍帯血中 PCBs 濃度とスコアとの関連は見られなかった。

5 ヶ月時の the Bayley Scales of Infant Development による評価では、母親の魚摂取量、臍帯血中 PCBs 濃度とも、スコアとの関連は見られなかった。

7 ヶ月時の the Fagan Test of Infant Intelligence による評価では、母親の魚摂取量、臍帯血

中 PCBs 濃度とも、刺激反応のスコアと負の関連が見られた。

4 歳時の the McCarthy Scales of Children's Abilities による評価では、言語能力と記憶機能の項目で、臍帯血中 PCBs 濃度、母乳中 PCBs 濃度と、スコアに負の関連が見られた。

11 歳時の WISC-R による評価では、フルスケール IQ、言語 IQ の低下と胎児期 PCBs 曝露に関連が見られた。さらに、記憶力低下、注意欠陥、衝動的な行動、集中力、聴覚記憶能力の低下と胎児期 PCBs 曝露の関連も見られた。出生後 PCBs 曝露は、どのテストのスコアとも関連は見られなかった。

以上の前向きコホート調査について、Table 3-3 にまとめた。

本章 1-1-1, 1-1-2 で示した既往の動物実験、疫学調査（前向きコホート）の研究から、PCBs 曝露（特に感受性の高い胎児期 PCBs 曝露）と発達への影響との関連が多く示唆されていることが分かる。この結果を受け、本研究でも胎児期 PCBs 曝露と発達への影響（特に自閉症、ADHD などの、発達障害との関連を示唆している油症の研究例（本章 1-1-2 の⑤: 台湾コホート））との関連に着目した。

本章では発達障害の一例として、胎児期 PCBs 曝露によって引き起こされる可能性が示唆されている行動などの発達への影響と関連がある自閉症を取り上げ、第 2 章で検討した保存臍帯を用いた後ろ向き調査法を適用し、この方法が発達障害の調査に有効かどうかを確認した。

Table 3-1 動物実験による PCB 曝露（異性体）と神経系への影響に関する既往の研究

PCB and species Individual PCB congeners	曝露の日	影響	参考文献
CB28, マウス	10 PND	自発運動 ↓	Eriksson and Fredriksson, 1996
CB47, ラット	7-18 GD	自発運動 ↑	Hany et al., 1999
	7-18 GD	開眼遅延	Wang et al., 2002
CB77, ラット	7-18 GD	自発運動 ↑	Hany et al., 1999
	10-16 GD	空間学習 ↑	Seo et al., 1995; Schantz et al., 1996
CB77, マウス	10 PND	自発運動 ↓、馴化反応 ↓	Eriksson 1988; Eriksson et al., 1991
CB95, ラット	10-16 GD	自発運動 ↓	Schantz et al., 1997
CB126, ラット	Premating to 21PP	聴力低下 ↓	Crofton and Rice, 1999
	10-16 GD	空間学習 ↑	Seo et al., 1995; Schantz et al., 1996
CB153, ラット	3-13 PP	活動パターンへの影響 (ADHD の動物モデル)	Holene et al., 1998

(GD: Gestational Day, PND: Postnatal Day (exposure of offspring), PP: Postpartum (exposure of dams), ↑: 上昇, ↓: 低下)

Table 3-2 動物実験による PCBs 曝露（混合物）と神経系への影響に関する既往の研究

PCB and species PCB mixtures	曝露の日	影響	参考文献
Aroclor 1254, ラット	6 GD-21 PP	開眼促進、自発運動↓、聴力障害	Goldey et al., 1995a, b
	6 GD-21 PP	RC3/neurogranin mRNA ↑、 ミエリン塩基性タンパク質 ↓	Zoeller et al., 2000
	6 GD-21 PP	聴力低下 ↓	Crofton et al., 2000
Clophen A30, ラット	Premating to 21 GD	学習障害	Lilienthal and Winneke, 1991
	Premating to 21 PP	自発運動 ↑	Lilienthal et al., 1990

(GD: Gestational Day, PND: Postnatal Day (exposure of offspring), PP: Postpartum (exposure of dams), ↑: 上昇, ↓: 低下)

Table 3-3 PCBs 曝露と発達障害に関するコホート研究例

テスト	年齢	結果	曝露指標媒体	参考文献
<u>オランダ</u>				
神経学的検査	0.5ヶ月	↓	母乳 PCBs	Huisman et al., 1995
Bayley				Koopman-Esseboom et al., 1996
精神発達	3ヶ月	-		
精神運動	3ヶ月	↓	母体血 PCBs	
精神発達	7ヶ月	-		
精神運動	7ヶ月	↓	母乳ダイオキシン (TEQ)	
精神発達	18ヶ月	-		
精神運動	18ヶ月	-		
Kaufman				Patandin et al., 1999
認知機能	42ヶ月	↓	臍帯血 PCBs、母体血 PCBs	
同時処理機能	42ヶ月	↓	臍帯血 PCBs、母体血 PCBs	
系列化能力	42ヶ月	↓	臍帯血 PCBs、母体血 PCBs	
Reynell 言語発達	42ヶ月	↓	臍帯血 PCBs、母体血 PCBs	
Pre-School				Vreugdenhil et al., 2002
活動	84ヶ月	↓	臍帯血 PCBs	

(Bayley: the Bayley Scales of Infant Development, Kaufman: the Kaufman Assessment Battery for Children, Pre-School: Pre-School Activity Inventory -: 関連なし, ↓ 低下)

Table 3-3 PCBs 曝露と発達障害に関するコホート研究例（続き）

テスト	年齢	結果	曝露指標媒体	参考文献
<u>オスウィーゴ</u>				
<i>Brazelton</i>				Stewart et al., 2000
自律神経	出生時	↓	魚摂取（7～9Cl PCBs）	
馴化反応	出生時	↓	魚摂取（7～9Cl PCBs）	
<i>Fagan</i>				Darvill et al., 2000
fixation 時間	6 ヶ月	↓	臍帯血 PCBs, 7-9Cl PCBs	
fixation 時間	12 ヶ月	↓	臍帯血 PCBs	
<i>McCarthy</i>				Stewart et al., 2003
認知機能	36 ヶ月	↓	臍帯血 PCBs	
認知機能	54 ヶ月	-	臍帯血 PCBs	

（*Brazelton*: the Brazelton Neonatal Assessment Scale, *Fagan*: the Fagan Test of Infant Intelligence, *McCarthy*: McCarthy Scales of Children's Abilities, -: 関連なし, ↓低下）



Table 3-3 PCBs 曝露と発達障害に関するコホート研究例（続き）

テスト	年齢	結果	曝露指標媒体	参考文献
<u>ドイツ</u>				
<i>Bayley</i>				Winneke et al., 1998; Walkowiak et al., 2001
精神発達	7 ヶ月	↓	母乳 PCBs	
精神発達	18 ヶ月	-		
精神発達	30 ヶ月	↓	母乳 PCBs	
<i>Kaufman</i>				Walkowiak et al., 2001
精神発達	42 ヶ月	↓	母乳 PCBs	
<u>フェロー諸島</u>				
<i>Boston</i>				Grandjean et al., 2001
言語発達		↓	臍帯血 PCBs	
<i>聴力検査</i>				Grandjean et al., 2001
聴力		↓	臍帯血 PCBs	
<u>台湾</u>				
<i>Stanford-Binet</i>				Chen et al., 1992
認知発達		↓	子供血 PCBs	

(*Bayley*. the Bayley Scales of Infant Development, *Kaufman*. the Kaufman Assessment Battery for Children, *Boston*. Boston Naming Test, *Stanford-Binet*. Chinese versions of the Stanford-Binet test, the Wechsler Intelligence Scale for Children, -: 関連なし, ↓低下)

Table 3-3 PCBs 曝露と発達障害に関するコホート研究例（続き）

テスト	年齢	結果	曝露指標媒体	参考文献
<u>ミシガン</u>				
<i>Bayley</i>	5 ヶ月	-		Jacobson and Jacobson, 1988
<i>Fagan</i>				Jacobson et al., 1985
fixation 時間	7 ヶ月	↓	臍帯血 PCBs	
<i>McCarthy</i>				Jacobson et al., 1990; Jacobson et al., 1992
言語能力	4 歳	↓	臍帯血 PCBs、母乳 PCBs	
記憶機能	4 歳	↓	臍帯血 PCBs、母乳 PCBs	
<i>WISC-R</i>				Jacobson and Jacobson, 1996; Jacobson and Jacobson, 2003
フルスケール IQ	11 歳	↓	出生前 PCBs 曝露	
言語 IQ	11 歳	↓	出生前 PCBs 曝露	
記憶能力	11 歳	↓	出生前 PCBs 曝露	
注意欠陥	11 歳	↑	出生前 PCBs 曝露	
衝動行動	11 歳	↑	出生前 PCBs 曝露	

(*Bayley*: the Bayley Scales of Infant Development, *Fagan*: the Fagan Test of Infant Intelligence, *McCarthy*: McCarthy Scales of Children's Abilities, -: 関連なし, ↓ 低下, ↑ 上昇)

## 2. 目的

本章では、発達障害の一例として自閉症を取り上げ、胎児期 PCBs 曝露が発達障害発症に関連があるか否かを調査するために、第 2 章で検討した「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」を適用することを目的とする。

## 3. 方法

### 3-1. 対象とサンプル

東京大学病院の精神科の担当医師が、本研究での目的、方法などについて説明し、書面でのインフォームドコンセントが得られた 1967～2000 年生まれの自閉症患者 17 人と、その対照者（健常者）7 人の保存臍帯を用いた。この対象者の中には、5 組の同胞（4 人兄弟 1 組、双子 1 組、2 人兄弟 3 組）が含まれている。

同胞間比較の条件での、後ろ向き調査の集団は、自閉症患者: 男 4 人 (80 %)・女 1 人 (20 %)、対照者（健常者）: 男 3 人 (43 %)・女 4 人 (57 %) で構成され、2005 年時点での平均年齢は、自閉症患者= 18.4 歳・対照者（健常者）= 21.3 歳であった。また、同胞のいない自閉症対象者の集団は、男 8 人 (67 %)・女 4 人 (33 %) で構成され、2005 年時点での平均年齢は 18.6 歳であり、同胞のいる自閉症対象者と同胞のいない自閉症対象者の集団は、男 12 人 (71 %)・女 5 人 (29 %) で構成され、2005 年時点での平均年齢は 18.5 歳であった。

この同胞間比較の対象者の兄弟構成と、これに同胞のいない自閉症対象者を含めた、全自閉症対象者の性別、年齢の情報について、それぞれ Table 3-4, 3-5 に示す。

自閉症の診断は、東京大学病院精神科の医師により、“American Psychiatric Association’s DSM-IV”に基づいて行なわれた。

Table 3-4 同胞間比較対象者の兄弟構成

兄弟構成	出生年
①4 人兄弟	自閉症: 1972 健常兄弟: 1970, 1971, 1974
②2 人兄弟	自閉症: 1977 健常兄弟: 1979
③2 人兄弟	自閉症: 1994 健常兄弟: 1996
④2 人兄弟 (双子)	自閉症: 1996 健常兄弟: 1996
⑤2 人兄弟	自閉症: 1994 健常兄弟: 2000

Table 3-5 自閉症と健常な同胞および同胞のいない自閉症対象者に関する情報

対象者	n (人)	男女構成比	平均年齢 (2005 年時点: 歳)
自閉症(同胞あり)	5	男: 80 %, 女: 20 %	18.4
健常な同胞	7	男: 43 %, 女: 57 %	21.3
自閉症(同胞なし)	12	男: 67 %, 女: 33 %	18.6
自閉症(同胞あり+なし)	17	男: 71 %, 女: 29 %	18.5

### 3-2. 保存臍帯中 PCBs 分析

本研究では、PCBs 全異性体(209 種)を対象とし、分析を行なった。

試薬、標準物質、実験器具、前処理方法、測定機器と条件など、保存臍帯中 PCBs の分析については、第 2 章の 3-3 と同様に行なった。

### 3-3. データ解析

統計解析は、SPSS Version 12.0 J を用いて行なった。

保存臍帯中の PCBs 濃度については、Kolmogorov-Smirnov 検定により正規性の検定を行ない、必要に応じて対数変換をして統計解析を行なった。

同胞間の後ろ向き調査において、自閉症患者と健常者の保存臍帯中 total PCBs 濃度の差の検定は、Wilcoxon の符号付き順位検定によって行なった。また、この解析に同胞のいない自閉症患者のデータを合わせた全自閉症患者と、全健常者 (健常な同胞 7 人と第 2 章の 20 人)を対象とし、対数変換した PCBs 濃度を従属変数、対象者の性別、年齢、自閉症の有無を説明変数として重回帰分析 (ステップワイズ法)を行なった。性別、自閉症の有無には、ダミ

一変数として 0, 1 を用いた。また、ステップワイズのための F 値確率は、投入= 0.05、除去= 0.10 とした。

### 3-4. 倫理審査

保存臍帯に関する本研究計画全体は、東京大学医学系研究科・医学部の倫理審査において承認を受けている。

研究の対象とする個人の人権擁護として、

- ・データ解析においては ID 番号、PCBs 分析用検体には検体番号を用い、被験者のイニシャルなど、個人名を示唆するようなラベリングは行なわない。

- ・被験者の個人データは一切公開しない。

- ・研究成果の公開にあたっては、被験者のプライバシーが明らかにされるような情報は一切公開しない。

などの対策を講じた。

## 4. 結果と考察

### 4-1. 同胞間での後ろ向き調査 (total PCBs)

自閉症患者と、その対照である同胞健常者の保存臍帯を用いて、自閉症の有無が、保存臍帯中 PCBs 濃度に関連しているか否かの調査を行なった。この後ろ向き調査の集団は同胞 5 組であり、自閉症患者: 男 4 人 (80 %)・女 1 人 (20 %)、対照者 (健常者): 男 3 人 (43 %)・女 4 人 (57 %) で構成され、2005 年時点での平均年齢は、自閉症患者= 18.4 歳・対照者 (健常者)= 21.3 歳であった。

同胞間の後ろ向き調査における、自閉症患者と対照者 (健常者) の保存臍帯中 total PCBs 濃度の平均値、標準偏差 (SD)、中央値、最小値、最大値を Table 3-6 に示した。また、同胞間の後ろ向き調査に用いた自閉症患者、対照者 (同胞健常者) の対象者別、塩素数ごとの保存臍帯中 PCBs 濃度については、Appendix B に示した。Fig. 3-1 には、全自閉症患者と健常者の total PCBs 濃度データを示し、同胞健常者以外の健常者 (第 2 章の 20 人) の保存臍帯中 total PCBs 濃度については、その傾向を曲線で表した。

Table 3-6 保存臍帯中 total PCBs 濃度の平均値・標準偏差 (SD)・中央値・最小値・  
最大値

自閉症/対照		平均値±SD (ng/g)	中央値 (ng/g)	最小値 (ng/g)	最大値 (ng/g)	統計解析
同胞あり	自閉症 (n= 5)	55±99	8.0	0.49	200	Wilcoxon の符号 付き順位検定
	対照 (n= 7)	160±190	93	0.39	450	
同胞あり+なし	自閉症 (n= 17)	51±82	13	0.49	250	—

Wilcoxon の符号付き順位検定:  $p>0.05$

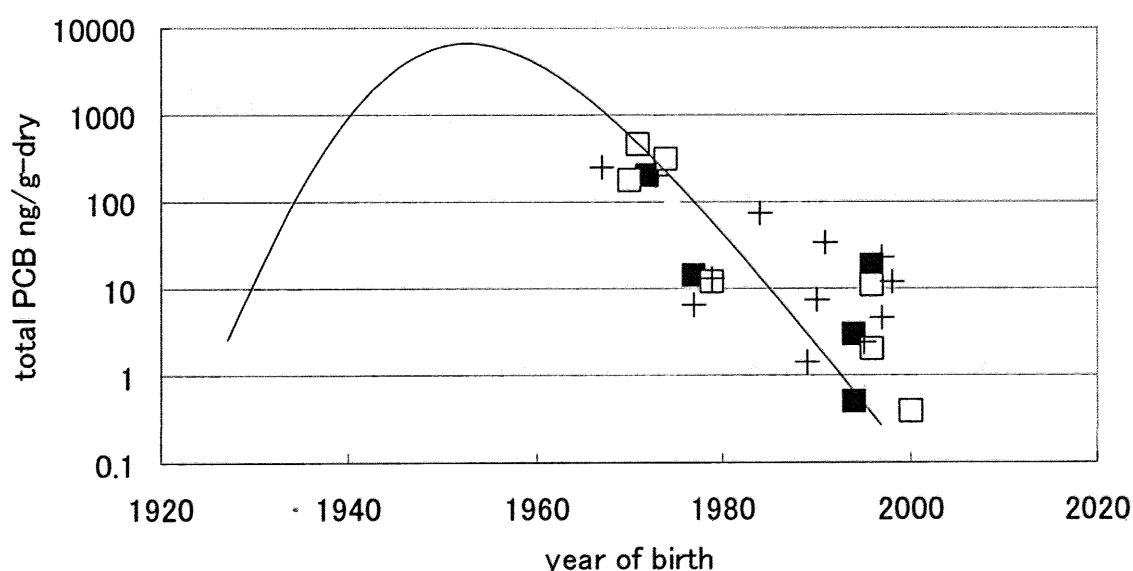


Fig. 3-1 自閉症患者と健常者の保存臍帯中 total PCB 濃度  
(同胞間比較: 自閉症患者 (■; n= 5)-健常者 (□; n= 7)、  
同胞なし: 自閉症患者 (+; n= 12)、健常者 (曲線; Fig. 2-2 の対象者, n= 20))

同胞間比較の解析の結果、自閉症患者と健常な同胞の保存臍帯中 total PCBs 濃度には、  
有意差はなかった (Wilcoxon の符号付き順位検定:  $p>0.05$ )。これより、自閉症の有無と、保  
存臍帯中 total PCBs 濃度には関連があるとは言えないことが分かった。

#### 4-2. 同胞間での後ろ向き調査 (PCB 異性体別)

本章 1-1-1, 1-1-2 で示したように、既往の研究において (Holene et al., 1998; Patandin et  
al., 1999)、いくつかの PCB 異性体曝露によって引き起こされる、自閉症などに関連がある発  
達への影響が示唆されている。そこで、この中から保存臍帯で検出された異性体を選択し、  
本章 4-1 と同様に、自閉症の有無が保存臍帯中 PCB 異性体濃度に関連しているか否かの

同胞間での解析を行なった。ここで対象とした PCB 異性体は、CB118, CB138, CB153, CB180 である。これらの異性体の構造を、Fig. 3-2 に示す。

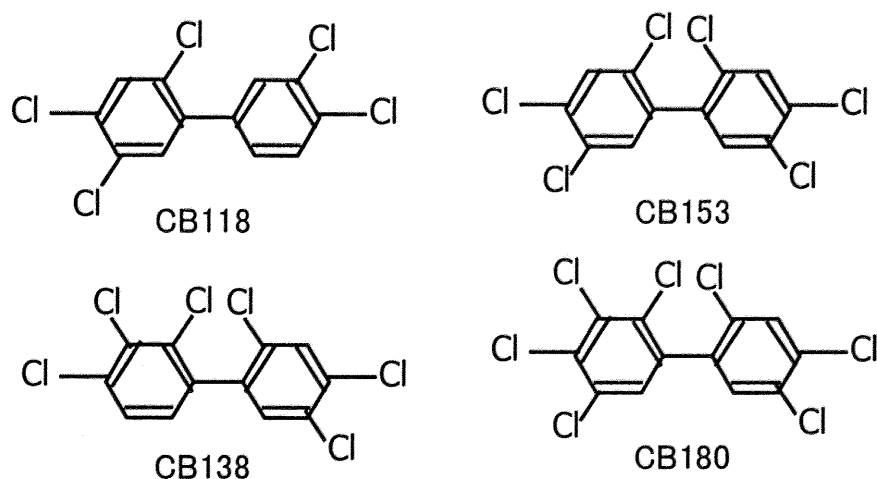


Fig. 3-2 自閉症の有無と保存臍帯中 PCB 濃度の関連解析（同胞間）で対象とした PCB 異性体

自閉症患者と対照者（健常な同胞）の保存臍帯中 PCB 異性体濃度の平均値、標準偏差 (SD)、中央値、最小値、最大値を Table 3-7 に示した。

同胞間比較の解析の結果、自閉症患者と健常な同胞の保存臍帯中 PCB 濃度には、対象としたどの異性体でも有意差はなかった (Wilcoxon の符号付き順位検定:  $p>0.05$ )。これより、4-1 における total PCBs の結果と同様、自閉症の有無と保存臍帯中 PCB 異性体（4 種）濃度には、関連があるとは言えないことが分かった。

Table 3-7 同胞間の保存臍帯中 PCB 異性体濃度の平均値・標準偏差 (SD)・中央値・最小値・最大値

PCB 異性体	自閉症/対照	平均 $\pm$ SD (ng/g-dry)	中央値 (ng/g-dry)	最小値 (ng/g-dry)	最大値 (ng/g-dry)
CB118	自閉症 (n= 5)	0.20 $\pm$ 0.26	0.11	0.028	0.66
	同胞対照 (n= 7)	0.41 $\pm$ 0.48	0.13	0.028	1.3
CB138	自閉症 (n= 5)	0.16 $\pm$ 0.16	0.073	0.011	0.39
	同胞対照 (n= 7)	0.23 $\pm$ 0.24	0.13	0.027	0.71
CB153	自閉症 (n= 5)	0.22 $\pm$ 0.18	0.14	0.053	0.42
	同胞対照 (n= 7)	0.27 $\pm$ 0.23	0.21	0.041	0.72
CB180	自閉症 (n= 5)	0.15 $\pm$ 0.17	0.067	0.024	0.43
	同胞対照 (n= 7)	0.12 $\pm$ 0.08	0.12	0.028	0.24

(Wilcoxon の符号付き順位検定:  $p>0.05$ )

#### 4-3. 全対象者での後ろ向き調査

本章で解析を行なった自閉症の全対象者の保存臍帯中 total PCBs 濃度、年齢のヒストグラムを、Fig. 3-3, 3-4 に示す。また、全自閉症対象者（同胞あり+なし）における、性別、年齢のカテゴリーごとの保存臍帯中 total PCBs 濃度を Table 3-8 に、全自閉症対象者の塩素数ごとの保存臍帯中 PCBs 濃度を Appendix B に示した。

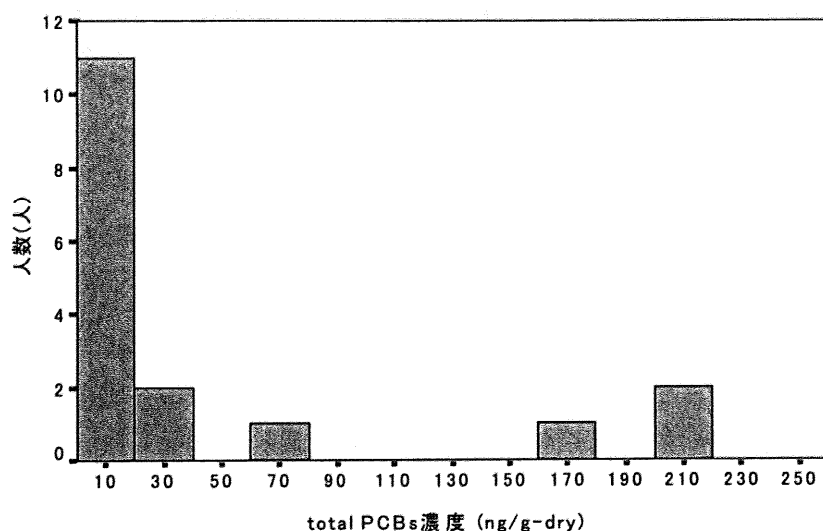


Fig. 3-3 全自閉症対象者の保存臍帯中 total PCBs 濃度のヒストグラム (n= 17)

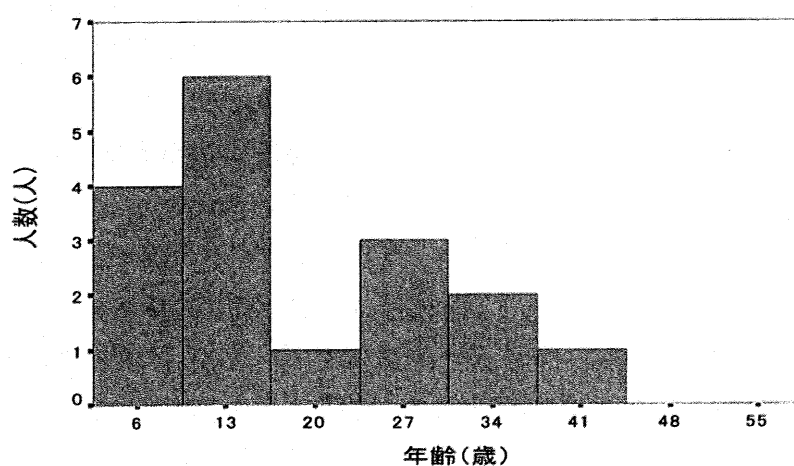


Fig. 3-4 全自閉症対象者の年齢のヒストグラム (n= 17)



Table 3-8 全自閉症対象者の特性と保存臍帯中 total PCBs 濃度 (n= 17)

対象者の特性	N (人)	total PCBs (ng/g-dry)
<u>性別</u>		
男	12	48
女	5	41
<u>出生年</u>		
1960-1980	6	100
> 1980	11	17

(total PCBs は平均値)

全対象者での後ろ向き調査については、4-1 で示した同胞間比較のデータに、同胞のいない対象者（自閉症患者: 12 人、対照者: 14 人）を加え、自閉症の有無と保存臍帯中 total PCBs 濃度との関連について、解析を行なった。同胞のいない対象者の集団は、自閉症患者: 男 8 人・女 4 人、対照者（健常者）: 男 5 人・女 9 人で構成され、2005 年時点での平均年齢は、自閉症患者= 18.6 歳・対照者（健常者）= 28.0 歳であった。ここで、自閉症患者のうち一番先に生まれた対象者の出生年（1967 年）を考慮し、この対象者と出生年を一致させるため、対照者（健常者）は 1965 年以降に生まれた対象者を第 2 章の Fig. 2-2 から選択した。

ここでは、保存臍帯中 total PCBs 濃度に、自閉症の有無が影響しているかどうかを解析するため、重回帰分析（ステップワイズ法）を行なった。従属変数として、対数変換した保存臍帯中 total PCBs 濃度、説明変数として年齢（2005 年時点）、性別（男: 0, 女: 1）、自閉症の有無（自閉症なし: 0, 自閉症あり: 1）を用いた。この重回帰分析を、全自閉症患者（同胞あり、なしを含む 17 人）と対照者（同胞あり、なしを含む 21 人）に適用した結果、自閉症の有無は保存臍帯中 total PCBs 濃度の有意な説明変数として選択されず、年齢（出生年）のみが選択された ( $R^2 = 0.486$ ,  $p < 0.001$ )。さらに、自閉症患者の出生年を考慮せず、全対照者（健常者,  $n = 27$ ）を対象にして同様の重回帰分析を行なった結果、やはり自閉症の有無は保存臍帯中 total PCBs 濃度の有意な説明変数として選択されず、年齢（出生年）と性別が選択された。ここで性別が選択された理由は、保存臍帯中から極端に高い total PCBs 濃度 (5700 ng/g-dry) が検出された対象者を加えて解析したためである。なお、この対象者のみを除いて解析を行なったところ、性別は選択されなかった。

以上より、保存臍帯中 total PCBs 濃度には、自閉症の有無ではなく年齢（出生年）が影響していること、つまり、出生年が強い要因となっていることが分かった。

## 5. まとめ

第 2 章において検討した、「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」を用いて、保存臍帯中の PCBs 濃度が、発達障害の一例として取り上げた自閉症の有無に関連しているか否かの調査を行なった。その結果、自閉症の有無と、保存臍帯中 total PCBs 濃度には、関連があるとは言えないことが分かった。さらに、PCB の異性体ごと（4 種）の解析でも、自閉症の有無と保存臍帯中 PCB 異性体濃度には、関連があるとは言えないことが分かった。

本研究では、上記のように、自閉症の有無と保存臍帯中 PCBs 濃度には関連があるとは言えないことが分かった。自閉症発症に、胎児期 PCBs 曝露が関連しているか否かについては、サンプルサイズの観点から本研究で結論することはできない。今後、これまで疫学分野で一般的に行なわれてきた症例対照研究におけるサンプルサイズを考慮し、保存臍帯を用いた後ろ向き調査法を用いて、50 組程度の同胞間比較による調査をすることで、自閉症発症と胎児期 PCBs 曝露の関連について結論を出すことが可能であると考ええる。

本章では、第 2 章で検討した「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」が、発達障害（自閉症）の調査に適用できる可能性があることを示すことができた。この「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」は、自閉症に限らず、胎児期化学物質曝露が発症要因として疑われる様々な発達障害などの疾患に対しても、適用可能であると考ええる。上述のように、本研究における様々な解析の結果、発達障害の一例として取り上げた自閉症に関しては、その症状の有無と保存臍帯中 PCBs 濃度に関連は見出されなかったものの、今後の展望として、胎児期の化学物質曝露が発症要因として疑われている自閉症以外の疾患（例えば ADHD など）を取り上げ、保存臍帯中化学物質濃度との関連が見られるようなデータを得ることで、「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」が有用な方法であることを、より確実に示すことができると考える。

# 第 4 章

新鮮臍帯を用いた胎児期  
PCBs・水酸化体 PCBs 曝露  
と新生児甲状腺機能の  
関連調査

## 第4章 新鮮臍帯を用いた胎児期 PCBs・水酸化体 PCBs 曝露と

### 新生児甲状腺機能の関連調査

#### 1. 背景

発達障害と発生段階に起きる甲状腺ホルモンの欠乏や過剰が関連している可能性があり、また PCBs、水酸化体 PCBs (OH-PCBs) 曝露による甲状腺ホルモンへの影響が動物実験などで示されている。したがって、甲状腺機能への影響を通じた発達障害と、PCBs、OH-PCBs 曝露との関連を仮定することができるが、ヒトを対象にした調査はほとんど行なわれていないため、新鮮臍帯を使って、胎児期 PCBs、OH-PCBs 曝露と新生児の甲状腺機能との関連調査を行なった。

##### 1-1. 水酸化体 PCBs (OH-PCBs) について

##### 1-1-1. OH-PCBs の生成過程 (PCBs の代謝経路)

PCBs の代謝産物として、チトクロム P-450 により生じたアレノオキサイドを中間体とし、これがさらに代謝を受けた水酸化体代謝物および含硫代謝物 (例えば PCB メチルスルホン) が知られている (小栗ら, 2000, Fig. 4-1)。水酸化代謝物では、主要なものは一水酸化体であるが、これ以外にも二水酸化体が見つけられている。また、微量ではあるが親化合物から塩素原子が一個離脱し、さらに一水酸化された代謝物も報告されている。

OH-PCBs は、PCBs 同様、母親から胎児に多くの量移行していることや (Meerts et al., 2002; Meerts et al., 2004; Soechitram et al., 2004)、動物実験などによって甲状腺への影響なども報告されていることから (Meerts et al., 2002; Meerts et al., 2004; Kimura-Kuroda et al., 2005)、本研究では PCBs だけでなく、OH-PCBs も考慮して調査を行なった。

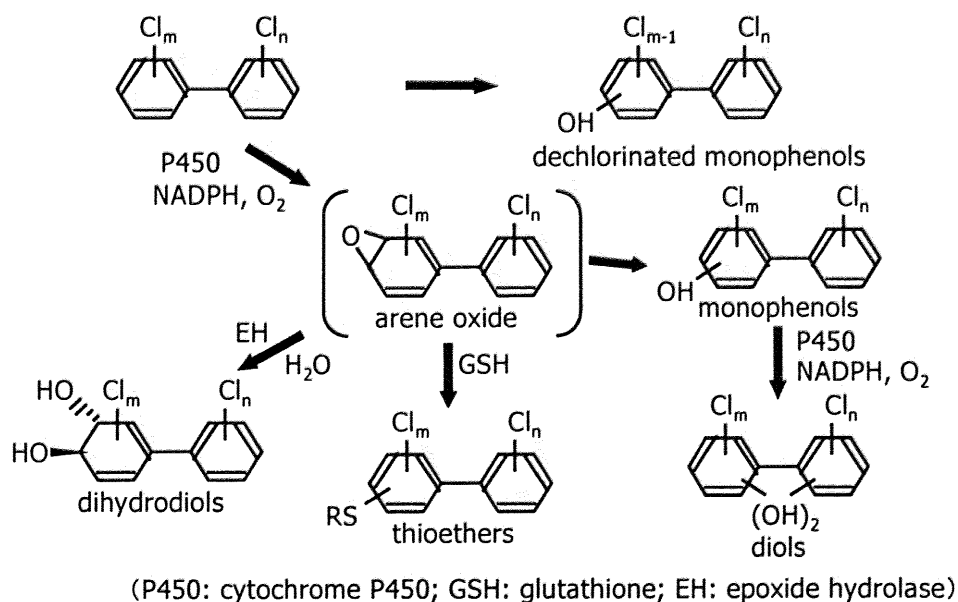


Fig. 4-1 PCBs の代謝経路（小栗ら, 2000 より抜粋）

本研究で分析対象とした OH-PCB の異性体と、その代謝前の PCB（親 PCB）の対応を、Table 4-1 に示した（Fängström et al., 2002; Soechitram et al., 2004）。また、これら OH-PCBs の構造を、Fig. 4-2 に示した。

Table 4-1 OH-PCB 代謝物と親 PCB の関係

OH-PCB 代謝物	親 PCB
4OH-CB107	CB118
	CB105
3OH-CB153	CB153
	CB146
4OH-CB146	CB138
	CB146
	CB153
3OH-CB138	CB138
4OH-CB187	CB183
	CB187
4OH-CB172	CB170
	CB180

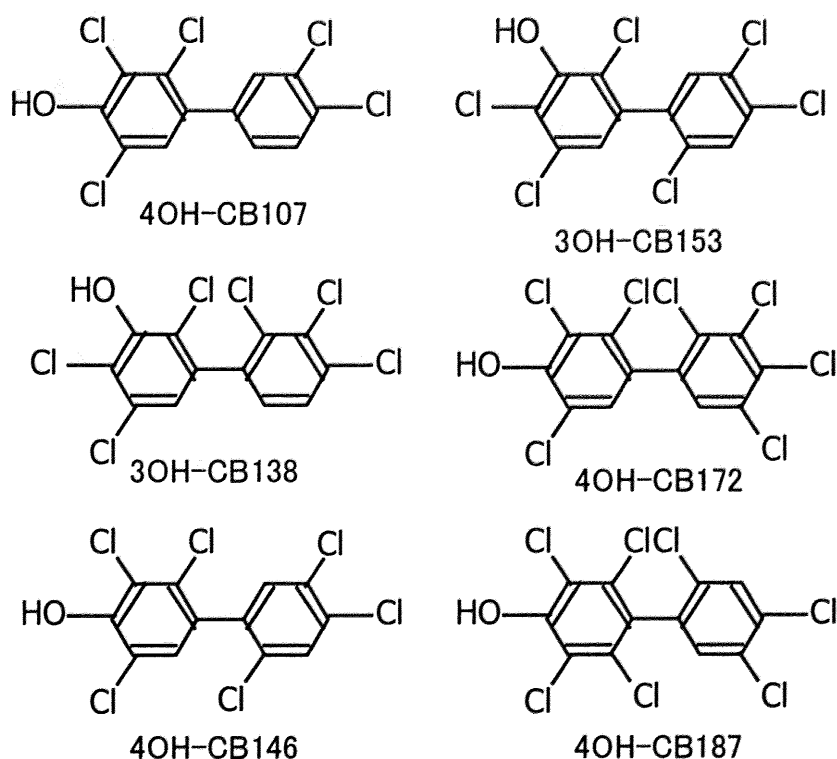


Fig. 4-2 本研究の分析対象 OH-PCBs (6 種) の構造

### 1-1-2. OH-PCBs の物理化学的特性

OH-PCBs に関しては、現在のところ、物理化学的特性はほとんど報告されていない。

OH-PCBs は、ほとんどが弱酸であり、いくつかの異性体に関しては pKa が報告されている。pKa は構造によって異なり、6.8 から、場合によっては 10 以上の異性体がある (Ebner and Braselton, 1987; Letcher et al., 2000)。揮発性はほとんどない (Letcher et al., 2000)。

### 1-1-3. OH-PCBs の生物学的半減期

哺乳類、鳥など、生物の血中における OH-PCB の半減期は、その構造に依存して変わる。Malmberg ら (2004) は、ヒト血中で多く検出される 4-OH-CB107, 4-OH-CB187 の半減期について、ラットの実験で得られたデータと計算により求めた。その結果、生物学的な半減期は、4-OH-CB107 で 3.8 日、4-OH-CB187 で 15 日となった。また、Sinjari ら (1998) はマウスの実験から、4-OH-3,5,3',4'-TetraCB, 4OH-3,5,2',3',4'-PentaCB の半減期を求めた。4-OH-3,5,3',4'-TetraCB では、血漿中で 13.3 時間、肝臓で 69.3 時間、脂肪組織で 53.3 時間であり、4OH-3,5,2',3',4'-PentaCB では、血漿中で 13.3 時間、肝臓で 17.3 時間、脂肪組織で 57.8 時間の半減期であった。

これらのデータから、OH-PCBs の半減期は、数年から 20 年以上と言われる PCBs (詳細は、第 1 章 2-5 を参照) に比較して、非常に短いことが分かる。

#### 1-1-4. 人体からの OH-PCBs 検出例

OH-PCBs については、これまでに鳥類やアザラシ、北極グマ、魚など、野生生物の血液中からの検出例が報告されている (Sandala et al., 2004; Bergman et al., 1994; Berger et al., 2004; Li, H. et al., 2003; Campbell et al., 2003)。近年、ヒトでも血液を中心に OH-PCBs の検出例が増えてきた。

Sandau ら (2000, 2002) は、魚摂取量の多いイヌイット族の血中 PCBs, OH-PCBs を分析し、total PCBs を 1.19-65.9 ng/g whole blood wet weight, total OH-PCBs (5 種) を 0.117-11.6 ng/g whole blood wet weight の濃度レベルで検出した。これは、ケベック州南部の調査と比較すると、約 1~70 倍の濃度であった。また、もっとも多く検出された OH-PCB の異性体は、OH-CB109 であった。同様に Fängström ら (2002) は、魚摂取量が多いフェロー諸島の妊婦を対象に血中 PCBs, OH-PCBs を分析し、total PCBs (18 種) で 150-22000 ng/g fat, total OH-PCBs (5 種) で 19-1800 ng/g fat の濃度レベルであり、OH-PCB の異性体では OH-CB187 がもっとも多く検出されたことを示した。Soechitram ら (2004) は、オランダの妊婦を対象に、母体血、臍帯血中 PCBs (6 種)、OH-PCBs (6 種) を分析し、母体血中 PCBs が 2-293 ng/g fat, OH-PCBs が未検出 (N.D.)-0.62 ng/g fresh weight の濃度レベルであり、臍帯血中 PCBs が 1-277 ng/g fat, OH-PCBs が N.D.-0.47 ng/g fresh weight の濃度レベルであることを示した。

日本人を対象とした調査では、青柳ら (2004) が、健常者の血清中 OH-PCBs 濃度の調査を行ない、total OH-PCBs (14 種) を 0.011-0.64 ng/g serum (平均= 0.22 ng/g serum) の濃度レベルで検出した。榎本ら (2004) も同様に、健常者を対象に血中 OH-PCBs の分析を行ない、total OH-PCBs (3 種) を 1.27 ng/g fat の濃度レベルで検出した。これら日本人と、上記した魚摂取量の多いイヌイット族 (Sandau et al., 2000; Sandau et al., 2002) や、フェロー諸島 (Fängström et al., 2002) の妊婦の血中 total OH-PCBs 濃度レベルを比較すると、これらの研究で対象とした日本人の濃度レベル (青柳ら, 2004; 榎本ら, 2004) の方が低いことが分かった。

血液以外のヒト生体試料では、高菅ら (2004) が、日本人の髄液中 PCBs, OH-PCBs の濃度調査を行なっている。その結果、脳髄液中では、OH-CB187 の濃度レベルがもっとも高かった (4.0~25 pg/g wet wt)。一方、脳髄液中 PCB 濃度レベルは極めて低く、ブランクと同程度であった。

#### 1-1-5. OH-PCBs の毒性 (Letcher et al., 2000)

OH-PCB は、親 PCB よりも細胞毒性が強いと言われ、ミトコンドリア呼吸や内膜の透過性に影響を及ぼすことが示されており (Stadnicki and Allen, 1979; Yamamoto and Yoshimura, 1973)、これらの影響の有無や強さは、OH-PCB の構造や pKa に依存する (Ebner and

Braselton, 1987)。また、CB77 や CB105 の水酸化代謝物によるアリール炭化水素受容体 (AhR)への弱い結合や、Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)の弱い誘導能も示されている (Sinjari et al., 1998; Klasson-Wehler et al., 1990)。二水酸化体 PCBs はキノンに酸化され、高分子とのアダクトを形成する可能性も示唆されている (Amaro et al., 1996)。

以上の他、OH-PCB の毒性に関しては、本研究で着目している甲状腺ホルモンへの影響に関する研究が非常に多く行なわれている。これについては、本章 1-4 で述べる。

## 1-2. 甲状腺ホルモンについて

### 1-2-1. 甲状腺ホルモン

甲状腺ホルモン (3, 5, 3'-triiodothyronine; T3, thyroxine; T4)は、多数の濾胞から成り立つ甲状腺で合成、分泌され、生体の発育を促し、代謝の調節をする。胎生中期から出生数年間の中樞神経系の発達と、それ以降の機能維持にも重要である。特に周産期における脳の機能的成熟には必要不可欠で、ヒト先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症)は出生後早期に甲状腺ホルモン補充を開始しない限り、不可逆的な脳発達障害を残す (貴邑・根来, 1999; 鯉淵ら, 2004)。ここで、T4, T3 の構造を Fig. 4-3, 4-4 に示す。

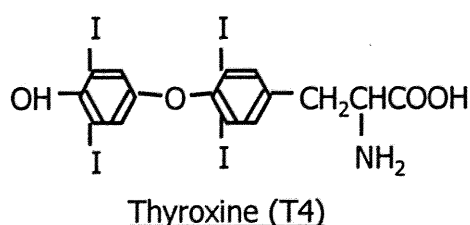


Fig. 4-3 T4 の構造

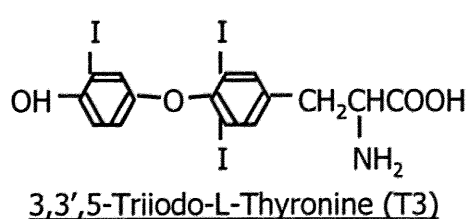


Fig. 4-4 T3 の構造

### 1-2-2. 甲状腺ホルモンの輸送と代謝

T4, T3 は、ヒト血中では、サイロキシン結合グロブリン (TBG)、トランスサイレチン (TTR)、サイロキシン結合プレアルブミン (TBPA)の 3 種の血漿タンパク質に結合しており、げっ歯類の血中では、T4 は輸送タンパク質である TTR と結合している (Brower and van den Berg, 1986)。ヒトにおいては、サイロキシン結合グロブリン (TBG)が主要な輸送タンパク質であり、血中では、T4 は 3 つの輸送タンパク質である TBG に 68 %, TBPA に 20 %, TTR に 11 %結合している (Schreiber et al., 1995)。この 3 つのタンパク質のうち、TTR は脳への T4 の主要な輸送タンパク質であることが分かっている (Schreiber et al., 1995)。また血中 T4 のうち、これらの輸送タンパク質と結合していない遊離 T4 (fT4)は 0.03 %であり、生理的にはこの fT4 に活性がある (Paul, 2001)。

甲状腺より分泌された T4 の代謝は、主として脱ヨードによって進行する。すなわち、T4 の



5' 位 (Fig. 4-3) の脱ヨードによって T3 (Fig. 4-4) が産生され、5 位の脱ヨードによって rT3 が産生される。成人では、血中 T4 の 1/3 は肝臓、腎臓その他で T3 に変換され、45 % は rT3 (3,3',5'-T3) に転換される。従って、末梢で多量の T3, rT3 が生成されることになる (稲田, 1982; 貴邑・根来, 1999)。このような T4 からの T3, rT3 への転換が T4 代謝の第一段階であり、T3 は T4 に比べて作用効果が大きく、一方 rT3 は生物学的に不活性に近いホルモンである。T4 → T3 は T4 の活性化経路、T4 → rT3 は T4 の不活性化経路と考えられている。T3 はさらに 3,3' - diiodothyronine (3,3' -T2) へ、rT3 は 3,3' -T2 および 3',5' -T2 に転換される (稲田, 1982)。

### 1-2-3. 甲状腺ホルモンの分泌調節

視床下部ホルモンである TRH (甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン) は、下垂体前葉を刺激して TSH の合成、分泌を促進する。TSH は甲状腺を刺激して、甲状腺ホルモンの合成、分泌を促進する。通常、甲状腺ホルモン分泌は、TSH と T3, T4 によるネガティブフィードバック機構によって維持されている (貴邑・根来, 1999)。

甲状腺ホルモンの哺乳動物における調節作用を考える際に、2 つの系 (甲状腺 → 下垂体・視床下部系と、甲状腺 → 末梢標的器官系) があると考えられている。第 1 の系は、甲状腺機能の恒常性維持のために、甲状腺ホルモンが血中のシグナルとなって下垂体と視床下部に対して情報入力を行ない、TSH の分泌調節に関与している、上述したネガティブフィードバック作用を行なう系である。第 2 の系は、多くの標的器官に対する代謝促進と器官固有の機能に対する許容作用である (鈴木, 1983)。

### 1-2-4. 甲状腺ホルモンと神経疾患

甲状腺機能低下症における種々の神経症状については、古くからよく知られている。すなわち、一般的神経活動の低下、たとえば記憶力減退、聴力障害、また精神活動における自発性の低下などがあげられる。実験的には、成長・発育時の中枢神経系の構築にとって、甲状腺ホルモンが必須であることが知られている (鈴木, 1983)。

### 1-3. 新生児マススクリーニング

日本国内において、今から約 30 年前に開始された「新生児マススクリーニング」は、知能障害の原因となる先天性代謝異常の検査を、生まれたすべての新生児を対象に行ない、障害を予防する目的で実施されている。疾患は、先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) など、全 6 種類を対象としており、これらの情報を Table 4-2 にまとめた (成瀬・山口, 2004)。

Table 4-2 新生児マススクリーニングの対象疾患（成瀬・山口, 2004 より抜粋）

疾患名	スクリーニング開始	患者発見率*
フェニルケトン尿症	1977 年度	1/78600
メイプルシロップ尿症 （楓糖尿症）	1977 年度	1/504700
ホモスチン尿症	1977 年度	1/192600
ガラクトース血症	1977 年度	1/35700
先天性甲状腺機能低下症 （クレチン症）	1979 年度	1/3800
先天性副腎過形成症	1988 年度	1/15800

（\*患者発見率は、全国的スクリーニング開始時期から、平成 14 年度末までの結果）

採血は、分娩後 4～6 日の間に産院で行なわれ、このサンプルは都道府県・政令指定都市の指示する検査機関に送られ、検査が行なわれており、先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングは、甲状腺刺激ホルモン（TSH）と、場合によっては  $fT_4$  を測定することにより実施されている（鈴木ら, 1991）。現在、日本で生まれる新生児のほぼ 100 %がスクリーニングを受けている。

#### 1-4. PCBs・OH-PCBs と甲状腺ホルモンレベルに関する既往の研究

PCBs, OH-PCBs の（胎児期）曝露と、 $T_4$ , TSH レベルの変動に関して、動物実験、*in vitro* 実験、ヒトでの調査など、多くの研究が行なわれているので、以下に示す。

##### 1-4-1. 動物実験, *in vitro* の研究

PCBs, OH-PCBs が  $T_4$ , TSH レベルに影響を与えるメカニズムは明確には分かっていないが、現在のところ動物実験により、主に以下の 3 つが考えられている。

##### ① 甲状腺への直接的な影響

Collins ら（1980）は、PCB mixture (Aroclor 1254) の 50, 500 ppm を経口曝露させた妊娠ラットから生まれた仔において、甲状腺濾胞上皮細胞に損傷が見られ、血清中  $T_4$  レベルが有意に低下していることを示した ( $p < 0.001$ )。van den Berg ら（1988）は、マーモセットモンキーに CB77 (0.1, 1, 3 mg/kg) を経口曝露させたところ、1 mg/kg 及び 3 mg/kg のグループで甲状腺濾胞上皮細胞の過形成が見られ、血清中  $T_4$  レベルが有意に低下し、3 mg/kg のグループで TSH レベルが有意に増加したことを示した ( $p < 0.05$ )。

## ②グルクロン酸抱合による T4 の排泄

PCBs 曝露により肝ミクロゾーム酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT) が誘導されるため、T4 のグルクロン酸抱合が促進され、排泄が増大することにより T4 レベルが減少する、というメカニズムである。

Morse ら (1993) の実験において、T4 に対するグルクロン酸抱合活性の増大は、CB169 (0, 0.2, 0.6, 1.8 mg/kg body weight), CB77 (0.6 mg/kg body weight) を妊娠 Wistar ラットに経口曝露させたときに見られ、このとき仔の血漿中 T4 レベルは有意に低下したことが示された ( $p < 0.05$ )。さらに Morse ら (1996) は、同様の実験を PCB mixture (Aroclor 1254, 0, 5, 25 mg/kg body weight) で行なったところ、T4 では同様の結果を得たが、血漿中 TSH レベルに関しては、変動は見られなかった。オスの Wistar ラットを用いた Beetsstra ら (1991) の実験では、CB77 を腹腔内投与 (50 mg/kg) したとき、UDP-GT 活性の増大と血清中 T4 レベルの有意な減少が見られた ( $p < 0.001$ )。Kato ら (2004) は、オスの Wistar, Gunn ラットに PCB mixture (Kanechlor-500, 100 mg/kg) と、CB101 (112 mg/kg) を腹腔内投与したとき、血清中 T4 レベルの有意な減少を確認した ( $p < 0.01$ )。このとき、TSH レベルには影響が見られなかった。また同時に、Wistar ラットでは UDP-GT 活性の上昇が見られたが、Gunn ラットでは見られなかった。ここで、Gunn ラットの T4 レベルの減少には、ラット血清から検出された OH-PCBs の TTR への結合による影響が関与し、Wistar ラットでは UDP-GT 活性の増大、OH-PCB による TTR への結合の両方が T4 レベルの減少に影響していたと考えられている。別の実験では、オスの Sprague-Dawley ラットに PCB mixture (Aroclor 1254, 250 ppm) などの UDP-GT 誘導物質を経口曝露させたとき、血清中 T4 レベルの有意な低下と UDP-GT 活性との相関、及び TSH レベルの有意な上昇が確認された ( $p < 0.05$ , Barter et al., 1994)。

## ③甲状腺ホルモン輸送タンパク質への結合

本章 1-2-2 で述べた 3 種のタンパク質のうち、TTR は脳への T4 の主要な輸送タンパク質であり、肝臓と脳内で合成される唯一の T4 輸送タンパク質である (Schreiber et al., 1995)。また、TTR は胎児への T4 の輸送にも関係していることが示されている (Meerts et al., 2002)。この TTR に対し、PCBs や OH-PCBs は、T4 との構造類似性から結合親和性が高いことが示されている。すなわち、PCBs, OH-PCBs が T4 の代わりに TTR に結合してしまい、血中 T4 レベルを下げるという現象が考えられている。

Brouwer ら (1990) は、*in vitro* (binding assay) で CB77 と、その代謝物の TTR 親和性を試験し、CB77 の水酸化代謝物の TTR 親和性 >>> CB77 の TTR 親和性であることを示した。Darnerud ら (1996) は、妊娠マウスに CB77 を経口曝露 (1 or 10 mg/kg body wt) した実験で、仔の血漿中に 4OH-3,3',4',5-tetraCB (CB77 の代謝物) が、母ラットの 4~9 倍検出され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、この OH-PCB が仔の血漿中 TTR に結合していることを確認した。さらに、この研究で、仔の T4 レベルの有意な減少を確認した ( $p < 0.001$ )。Lans ら (1993) は、CB105 とその水酸化代謝物などを用いて binding assay (*in vitro*) を行なった結果、

CB105ではなく、その代謝物の OH-PCB で TTR との相互作用を示すことを確認した。さらに、OH-PCB の中でも、OH 基がメタ、パラ位にある異性体の方が、オルト位に OH 基がある異性体よりも、TTR に対して高い結合親和性があることを示した。また、PCB の binding assay (*in vitro*)で、オルト位のみには置換基がある異性体では TTR 結合親和性は大きくなかったものの、T4 より親和性が大きい異性体 (CB80, CB127, CB169, CB110, CB111, CB138, CB162) があることも示されている (Chauhan et al., 2000)。

以上、これらのいくつかを含めた関連の研究について、Table 4-3, 4-4 にまとめた。また、その他の PCBs, OH-PCBs による甲状腺への影響を調べた研究について、④にまとめた。

#### ④その他の研究

Shiraishi ら (2003)は、酵母 Two-hybrid 法を用いて OH-PCBs (15 種)の甲状腺ホルモン活性の評価を行なった結果、最大で 2',4,5',6-TetraCB-2-ol が T4 活性の 5 %を示すことが分かった。また Iwasaki ら (2002)は、レポーター転写アッセイ法を用いて甲状腺ホルモン受容体機能への作用を検討したところ、PCBs (Aroclor 1254), OH-PCB (4OH-2',3,3',4',5'-PentaCB, 4OH-2',3,3',5,5',6'-HexaCB)が、低濃度レベル (100 pM)で、T3 が誘導した転写を抑制することを示した。Kimura-Kuroda ら (2005)は、マウス小脳培養系を用い、神経細胞であるプルキンエ細胞においては T4 が樹状突起の伸長に必須であることを確認したが、T4 と OH-PCBs (4OH-2',3,3',4,5'-PentaCB, 4OH-2',3,3',4',5,5'-HexaCB)を一緒に系に添加したとき、または OH-PCBs のみのとき、樹状突起の伸長には異常が見られることを示した。さらに、甲状腺ホルモン無添加条件の小脳培養系において、4OH-CB187, 4' OH-CB165 に樹状突起伸長促進効果があることも示されており (木村-黒田ら, 2005)、OH-PCB による神経細胞への様々な影響が示唆されていることが分かる。

以上から、多くの動物実験や *in vitro* の実験により、PCBs, OH-PCBs による甲状腺への影響が示されていることが分かった。

#### 1-4-2. ヒトを対象とした調査

PCB 混入ライスオイル摂取により発生したカネミ油症 (1968 年)の患者を対象に、油症発生 16 年後の 1984 年に行なわれた甲状腺機能検査において、対照者に比べて T4 レベルの有意な上昇 ( $p<0.001$ )、有意ではないが TSH レベルの低下が見られた (小栗ら, 2000)。また五大湖においては、成人の男女を対象に、魚摂取量、PCBs 曝露 (分析対象: 89 種)と甲状腺ホルモンの関係の調査が行なわれ、血清中 PCBs レベルと魚摂取が、T4 レベルの低下に有意な関連があることが分かった ( $p<0.05$ )。また、TSH とは関連が見られなかった (Persky et al., 2001)。Longnecker ら (2000)は、1978~1982 年に出生した North Carolina の子供達への PCBs 曝露 (分析対象: 36 種)の評価を、母体血、母乳を指標に用いて行ない、T4, T3, TSH レベルとの関連を調査した。その結果、有意ではないが、PCBs 濃度上昇に伴い若干の

TSHレベルの上昇を確認した。Ribas-Fitóら（2005）は、Spain の Flix において臍帯血中有機塩素系化合物と新生児血漿中 TSHレベルの関連を調査し、有意ではないが、TSHレベルの上昇と CB118, CB138 濃度増加の関連を示唆した（ $p>0.05$ ）。Koopman-Esseboomら（1994）は、Rotterdam の母と胎児ペアを対象に、母体血、母乳、臍帯血中のダイオキシン類、PCBs 濃度と T4, TSHレベルの関連を調査し、ダイオキシン類、PCBs 濃度の上昇と、T4レベルの減少、TSHレベルの上昇に有意な関連が見られることを示唆した（ $p<0.05$ ）。

以上から、ヒトを対象とした調査においても、調査によって影響パターンが異なるものの、PCBs 曝露による甲状腺ホルモンレベル変動への影響が示唆されているものがあることが分かった。ヒトを対象とした OH-PCBs に関する調査は、これまで行なわれていないため、データはない。また、これらを含めた関連の研究について、Table 4-5 にまとめた。

このような動物実験、ヒトでの調査などの既往の研究結果から、本研究では胎児期 PCBs, OH-PCBs 曝露による甲状腺ホルモンへの影響に着目した。そこで本章では、胎児期曝露評価の指標媒体に新鮮臍帯を用いて、データがほとんど存在しないヒトを対象として、胎児期 PCBs, OH-PCBs 曝露と新生児甲状腺機能に関する調査を行なうこととした。

Table 4-3 動物実験による PCB 異性体曝露と甲状腺ホルモンレベルの関連

PCB and species Individual PCB congeners	曝露の日	影響	参考文献
CB77, ラット	13 GD	仔 T4 ↓, 母 T4 ↓	Morse et al., 1995
	7-18 GD	仔 T4 ↓, TSH →, 母 T4 ↓, TSH →	Roth-Härer et al., 2001
	成獣・オスに腹腔内	T4 ↓	Beestra et al., 1991
CB77, マウス	13 GD	仔 T4 ↓	Darnerud et al., 1996
CB77, サル	成獣・メスに 18 or 23 週間	T4 ↓, TSH ↑	van den Berg et al., 1988
CB95, ラット	21-22 PND	T4 ↓, TSH →	Khan et al., 2002
CB101, ラット	21-22 PND	T4 ↓, TSH →	Khan et al., 2002
	成獣・オスに腹腔内	T4 ↓, TSH →	Kato et al., 2004
CB118, ラット	10-16 GD	仔 T4 ↓	Ness et al., 1993
CB126, ラット	成獣・オスに腹腔内	T4 ↓, TSH →	Desaulniers et al., 1999
CB153, ラット	10-16 GD	仔 T4 ↓	Ness et al., 1993
	成獣・オスに腹腔内	T4 ↑, TSH →	Desaulniers et al., 1999
CB169, ラット	1 GD	仔 T4 ↓, 母 T4 ↓	Morse et al., 1993

(GD: Gestational Day, PND: Postnatal Day (exposure of offspring), PP: Postpartum (exposure of dams), n.s.: not significant,

↑: 上昇, ↓: 減少, →: 変動なし)

Table 4-4 動物実験による PCB 混合物曝露と甲状腺ホルモンレベルの関連

PCB and species	曝露の日	影響	参考文献
PCB mixtures			
Aroclor 1254, ラット	10-16 GD	仔 T4 ↓, TSH →, 母 T4 ↓	Morse et al., 1996
	6 GD-21 PP	仔 T4 ↓, TSH ↑ (n.s.)	Goldey et al., 1995a
	6 GD-21 PP	仔 T4 ↓	Zoeller et al., 2005
	1 GD-21 PP	仔 T4 ↓	Collins and Capen, 1980
	成獣・オスに 21 日間	T4 ↓, TSH ↑	Barter and Klaassen, 1994
	成獣・オスに 19 週間	T4 ↓, TSH ↑	Vansell et al., 2004
	成獣・オスに腹腔内	T4 ↓, TSH ↑	Venkataraman et al., 2004
Kanechlor 500, ラット	成獣・オスに腹腔内	T4 ↓, TSH →	Kato et al., 2004

(GD: Gestational Day, PND: Postnatal Day (exposure of offspring), PP: Postpartum (exposure of dams), n.s.: not significant,

↑: 上昇, ↓: 減少, →: 変動なし)

Table 4-5 ヒトを対象とした PCBs 曝露と甲状腺ホルモンレベルに関する既往の研究

バイオマーカー	曝露指標	対象人数	ホルモン					参考文献
			TT3	fT3	TT4	fT4	TSH	
CB118, CB138, CB153, CB180,	母体血、臍帯血	78	→	—	→	→	↑	Koopman-Esseboom et al., 1994
17PCDD/Fs, 3 coplanar PCBs, 23 nonplanar PCBs	母乳		→	—	↓	→	↑	
CB118, CB138, CB153, CB180, HCB, p,p'-DDE, $\beta$ -HCH,	臍帯血	70	—	—	—	—	↑ (n.s.) (CB118, CB138)	Ribas-Fitó et al., 2005
PCBs (36 種)	母体血、母乳	160	—	—	→	→	↑ (n.s.)	Longnecker et al., 2000
PCBs (7 種)	子供・血液	320	—	↓	—	→	↑ (CB118)	Osius et al., 1999
DDE, PCBs (89 種)	大人・血液	230	↓	—	↓	↓	→	Persky et al., 2001
PCBs (14 種), 有機塩素系農薬 (11 種), Hg	母体血、臍帯血	149	↓	—	—	→	↑ (CB180)	Takser et al., 2005

(n.s.: not significant, ↑: 上昇, ↓: 減少, →: 変動なし, —: 未調査)



## 2. 目的

本章では、曝露指標媒体に新鮮臍帯を用いて、ヒトを対象に胎児期 PCBs、OH-PCBs 曝露レベルと、新生児期の甲状腺ホルモンレベルとの関連調査を行ない、PCBs、OH-PCBs による発達障害への影響メカニズムを解明するための情報を得ることを目的とする。

## 3. 方法

本調査は、①新鮮臍帯中 PCBs、OH-PCBs の分析、②新生児血中  $ft4$ 、TSH レベルの測定、③妊婦のアンケート調査、④ ①②③に基づくデータ解析から成る。

調査は、東京都内の協力病院の産婦人科を受診した妊産婦を対象とした。受診時に、担当医師が本研究での目的、方法などについて説明した後、調査協力の同意が得られた場合には同意書の作成を行なった。その後、臍帯の採取（産婦人科医師による）、妊婦に対する自記式質問紙票を用いたアンケート調査、新生児からの甲状腺ホルモン測定用の採血（小児科医師による）を行なった。

### 3-1. 対象者

東京都内の産婦人科を受診し、インフォームドコンセントが得られた妊産婦を対象とし、①臍帯の提供、②新生児からの採血、③アンケートの記入を依頼した。39 人の妊産婦に依頼し、①から③まで、すべて揃っている対象者は 17 名、①と②が揃っている対象者は 17 名、①のみの対象者は 19 名であった。なお、新生児は 1 名を除いて健常な状態で出産され（1 名は低出生体重児: 2360 g）、妊婦には甲状腺機能低下症などの対象者はいなかった。

### 3-2. 新鮮臍帯中 PCBs・OH-PCBs の分析

本研究では、PCBs は全異性体（209 種）、OH-PCBs は 6 種を対象とし、分析を行なった。新鮮臍帯中 PCBs の塩素数分布は、4～7 塩素化物が支配的であったため（詳細は後述）、OH-PCBs に関しては 4～7 塩素化物の主な 6 種の異性体を選択し、分析を行なった。ここで、6 種の OH-PCBs とは、4OH-CB107, 3OH-CB153, 4OH-CB146, 3OH-CB138, 4OH-CB187, 4OH-CB172 のことである。また、本研究での新鮮臍帯中 PCBs 分析方法の妥当性を、認証標準物質（CRM）の CARP-2（National Research Council Canada）を用いて確認した。

### 3-2-1. 試薬

アセトン（和光純薬株式会社、試薬一級を蒸留精製）

ジクロロメタン（和光純薬工業株式会社、試薬一級を蒸留精製）

ヘキサン（和光純薬工業株式会社、試薬一級を蒸留精製）

濃硫酸（和光純薬工業株式会社、試薬特級）

塩酸（和光純薬工業株式会社、試薬特級）

イソプロパノール（和光純薬工業株式会社、試薬特級）

シリカゲル（和光純薬工業株式会社、ワコーゲル S-1）

アルミナ（和光純薬工業株式会社、ICN Alumina B Super I、活性アルミナ）

N-メチル-N-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン（ナカライテスク株式会社、ジアゾメタン合成用）

ジエチルエーテル（関東化学株式会社、残留農薬・PCB 試験用、ジアゾメタン合成用）

### 3-2-2. 標準物質（カッコ内は IUPAC No）

#### 3-2-2-1. $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs 内標準物質

・クリーンアップスパイク（Cambridge Isotope Laboratories 製）

2-MonoCB (CB3)、4,4'-DiCB (CB15)、2,4,4'-TriCB (CB28)、

2,2',5,5'-TetraCB (CB52)、2,3',4,4',5-PentaCB (CB118)、

2,2',4,4',5,5'-HexaCB (CB153)、2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (CB180)、

2,2',3,3',4,4',5,5'-OctaCB (CB194)、2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NonaCB (CB208)、

2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB (CB209) 各 10 pg/ $\mu\text{L}$

・シリンジスパイク（Cambridge Isotope Laboratories 製）

2,2',3,4,4',5'-HexaCB (CB138) 10 pg/ $\mu\text{L}$

#### 3-2-2-2. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定量用標準物質（Wellington 製）

2-MonoCB (CB1)、4-MonoCB (CB3)、2,6/2,2'-DiCB (CB10/4)、

2,4'-DiCB (CB8)、4,4'-DiCB (CB15)、2,2',6-TriCB (CB19)、

2,2',5-TriCB (CB18)、2,4,4'-TriCB (CB28)、2',3,4-TriCB (CB33)、

2,3,4'-TriCB (CB22)、3,4,4'-TriCB (CB37)、2,2',6,6'-TetraCB (CB54)、

2,2',5,5'-TetraCB (CB52)、2,2',4,5'-TetraCB (CB49)、

2,2',3,5'-TetraCB (CB44)、2,4,4',5-TetraCB (CB74)、

2,3',4',5-TetraCB (CB70)、3,4,4',5-TetraCB (CB81)、  
 3,3',4,4'-TetraCB (CB77)、2,2',4,6,6'-PentaCB (CB104)、  
 2,2',3,5',6-PentaCB (CB95)、2,2',4,5,5'-PentaCB (CB101)、  
 2,2',4,4',5-PentaCB (CB99)、2,3',4,4',6-PentaCB (CB119)、  
 2,2',3,4,5'-PentaCB (CB87)、2,3,3',4',6-PentaCB (CB110)、  
 2',3,4,4',5-PentaCB (CB123)、2,3',4,4',5-PentaCB (CB118)、  
 2,3,4,4',5-PentaCB (CB114)、2,3,3',4,4'-PentaCB (CB105)、  
 3,3',4,4',5-PentaCB (CB126)、2,2',4,4',6,6'-HexaCB (CB155)、  
 2,2',3,5,5',6-HexaCB (CB151)、2,2',3,4',5',6-HexaCB (CB149)、  
 2,2',4,4',5,5'-HexaCB (CB153)、2,3',4,4',5',6-HexaCB (CB168)、  
 2,2',3,4,4',5'-HexaCB (CB138)、2,3,3',4,4',6-HexaCB (CB158)、  
 2,2',3,3',4,4'-HexaCB (CB128)、2,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB167)、  
 2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB156)、2,3,3',4,4',5-HexaCB (CB157)、  
 3,3',4,4',5,5'-HexaCB (CB169)、2,2',3,4',5,6,6'-HeptaCB (CB188)、  
 2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (CB178)、2,2',3,4',5,5',6-HeptaCB (CB187)、  
 2,2',3,4,4',5',6-HeptaCB (CB183)、2,2',3,3',4',5,6-HeptaCB (CB177)、  
 2,2',3,3',4,4',6-HeptaCB (CB171)、2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (CB180)、  
 2,3,3',4,4',5',6-HeptaCB (CB191)、2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (CB170)、  
 2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (CB189)、2,2',3,3',5,5',6,6'-OctaCB (CB202)、  
 2,2',3,3',4,5,5',6'-OctaCB (CB201)、2,2',3,3',4,5,6,6'-OctaCB (CB199)、  
 2,2',3,3',4,4',5,5'-OctaCB (CB194)、2,3,3',4,4',5,5',6-OctaCB (CB205)、  
 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NonaCB (CB208)、2,2',3,3',4,4',5,5',6-NonaCB (CB206)、  
 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB (CB209)

### 3-2-2-3. $^{12}\text{C}_{12}$ -PCBs 定性用標準物質

PCBs 209 全異性体 Mixture

### 3-2-2-4. $^{13}\text{C}_{12}$ -水酸化体 PCBs 内標準物質

・クリーンアップスパイク (Cambridge Isotope Laboratories 製)

4OH-3,3',4',5,5',6'-HexaCB (4OH-CB159) 10 pg/ $\mu\text{L}$

・シリンジスパイク (Cambridge Isotope Laboratories 製)

2,2',3,4,4',5'-HexaCB (CB138) 10 pg/ $\mu\text{L}$

### 3-2-2-5. $^{12}\text{C}_{12}$ -水酸化体 PCBs 定性・定量用標準物質 (Wellington 製)

4OH-2,3,3',4',5-PentaCB (4OH-CB107)、  
3OH-2,2',3',4,4',5-HexaCB (3OH-CB138)、  
4OH-2,2',3,4',5,5',6-HeptaCB (4OH-CB187)、  
4OH-2,3,3',4',5,6'-HexaCB (4OH-CB146)、  
4OH-2,2',3,3',4',5,5'-HeptaCB (4OH-CB172)、  
4OH-3,3',4',5,5',6'-HexaCB (4OH-CB159)

### 3-2-3. 実験器具

ハサミ、ホモジナイザー、遠心管、分液漏斗 (200 mL)、ナシ型フラスコ (300 mL)、微量濃縮管 (5 mL)、クロマト管、漏斗、ビーカー (50 mL)、カラムヘッド、トラップ球、マイクロピペット (20-200  $\mu\text{L}$ )、パスツールピペット、メスシリンダー (100 mL, 250 mL)、ナス型フラスコ

### 3-2-4. 新鮮臍帯サンプリング方法

新鮮臍帯のサンプリングは、環境省のプロトコール (環境省, 2002a; 詳細は Appendix C 参照) に沿って、協力病院の産婦人科医師によって行なわれた。新鮮臍帯は、分娩時に胎児側より 5~10 cm の部分をクランプし、極力長く (20 cm 以上) 採取した。臍帯血については、新鮮臍帯から最大限除去した。採取した新鮮臍帯は、洗浄し、かつ 450  $^{\circ}\text{C}$  で加熱したガラス製容器に封入し、密栓した。この新鮮臍帯サンプルは、分析を行なうまで -20  $^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### 3-2-5. 前処理方法

本測定においては、臍帯サンプル中の脂肪重量も併せて測定する必要があるため、1 本の臍帯を PCBs, OH-PCBs 同時分析用と脂肪用とに分けて、それぞれの測定を行なった。

#### ・脂肪重量測定用サンプル前処理

脂肪抽出は、ジクロロメタン/ヘキサン (50: 50 % v/v) によって行なった (Drouillard et al., 2004)。

①臍帯サンプルの重量測定後、ハサミを用いて細切れにし、ジクロロメタン/ヘキサン (50: 50 % v/v) 約 20 mL を加え、ホモジナイザーによって十分にホモジナイズした。これを 5 分間

振とう後、1 時間放置した。

②①のサンプルを、遠心分離機によって 3000 rpm × 5 分遠心後、ナシ型フラスコに抽出液を移した。

③臍帯サンプルに再びジクロロメタン/ヘキサン (50: 50 % v/v) 約 20 mL を加え振とうしたものを、遠心分離機によって 3000 rpm × 5 分遠心後、ナシ型フラスコに抽出液を移した。この抽出操作を 2 回繰り返した。

④抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、あらかじめ重量を測定しておいた秤量瓶に可能な限り、損失がないように移した後、溶媒を揮発させた。

⑤秤量瓶の重量を測定し、前後の重量差から臍帯サンプル中の脂肪重量を求めた。

#### ・PCBs, OH-PCBs 測定用サンプル前処理

①臍帯サンプル (約 5~20 g) の重量測定後、ハサミを用いて細切れにし、イソプロパノール 約 10 mL を加え、ホモジナイザーによって十分にホモジナイズした。ここに塩酸約 2 mL を添加し、5 分間振とう後、1 時間放置した。

②①に、ジクロロメタン/ヘキサン (50: 50 % v/v) 約 20 mL を加え振とうしたものを、遠心分離機によって 3000 rpm × 5 分遠心後、分液漏斗にヘキサン層を移した。この抽出操作を 3 回繰り返した。

③②の抽出液に PCBs 用, OH-PCBs 用のクリーンアップスパイクの各 50  $\mu$ L を添加した。

④抽出液に濃硫酸を約 10 mL 加えて振とうして一時間静置し、その後、硫酸層のみを除去した。この操作を数回行ない、硫酸層の着色が少し薄くなったところで、振とうを振とう機で約 30 分行なうようにした。この操作を、硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返した。

⑤硫酸処理後のサンプルを、無水硫酸ナトリウムにより脱水し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

⑥濃縮後サンプルを、5 % 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、PCBs 画分と OH-PCBs 画分に分画を行なった。5 % 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、無水硫酸ナトリウム 1 cm、5 % 含水シリカゲル 3 g を順次ヘキサンで湿式充填し、ヘキサン 60 mL で洗

浄してから分画に用いた。濃縮サンプルを、洗浄後の 5 %含水シリカゲルクロマトグラフィーに供し、ヘキサン 60 mL で流し PCBs 画分を、ジクロロメタン/ヘキサン (25: 75 % v/v) 100 mL で流し OH-PCBs 画分を展開溶出させた。

⑦⑥の両画分のサンプルを、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

⑧アルミナカラムクロマトグラフィーによって、PCBs 画分のクリーンアップを行なった。アルミナカラムクロマトグラフィーは、無水硫酸ナトリウム 1 cm、アルミナ 9 g、無水硫酸ナトリウム 1 cm を順次ヘキサンで湿式充填した。濃縮サンプルをアルミナカラムクロマトグラフィーに供し、前捨て操作としてヘキサン 60 mL を流下させた。次に、ジクロロメタン/ヘキサン (50: 50 % v/v) 100 mL で流し PCBs を展開溶出させた。

⑨N-メチル-N-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン、ジエチルエーテル、水酸化ナトリウムにより合成したジアゾメタン (\*下記参照)で、OH-PCBs の誘導体化 (メチル化)を行なった。誘導体化は、ジアゾメタンを濃縮サンプル液に加え、十分に攪拌して反応させ、1 時間放置することによって行なった。誘導体化後、サンプルをヘキサン転溶し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

⑩44 %硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、OH-PCBs 画分のクリーンアップを行なった。44 %硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、無水硫酸ナトリウム 1 cm、44 %硫酸シリカゲル 2 g を順次、乾式充填し、ヘキサン 60 mL で洗浄した。⑨の濃縮サンプルを、洗浄後の 44 %硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン 20 mL で流し OH-PCBs を展開溶出させた。

⑪⑧、⑩のサンプルをロータリーエバポレーターで濃縮後、ヘキサンで微量濃縮管に洗い込み、シリンジスパイク 50  $\mu$ L とデカン 20  $\mu$ L を添加した。これを窒素気流下で約 50  $\mu$ L に最終濃縮し、測定用サンプルとした。

以上、PCBs, OH-PCBs 測定用サンプルの前処理方法のフローを、Fig. 4-5 に示す。

#### \*ジアゾメタン合成法

①N-メチル-N-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン 132 mg と、熱の発生を防ぐための 0.5 mL の水を、ジアゾメタン発生器の内管に入れ、スクリュキャップをしめた。

②ジアゾメタン発生器の外管に 3 mL のジエチルエーテルを入れ、内管を外管にセットして、