

化学物質の胎児期曝露と自閉症の関連に関する 後ろ向き調査法の検討と適用

大竹 貴光*1、吉永 淳*1、関 好恵*2、松村 徹*2、
渡辺 慶一郎*3、石島 路子*3、加藤 進昌*3

(*1: 東京大学 大学院新領域創成科学研究科、*2: 国土環境株式会社、*3: 東京大学 大学院医学系研究科)

<要 旨>

日本で一般的に習慣として保存されている臍帯（保存臍帯）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して研究を行った。さらに、この方法を発達障害（自閉症）の調査に適用することも目的とした。

検討、調査の結果、保存臍帯が PCBs 胎児期曝露指標媒体として使用できる可能性を示した。また、保存臍帯を PCBs の胎児期曝露評価指標に用いて後ろ向き調査を行なうには、同胞間比較が適していると考えられる。さらに発達障害の一例としての自閉症に、保存臍帯を用いた後ろ向き調査法を適用して解析した結果、自閉症の有無と保存臍帯中 PCBs 濃度には関連が見られなかった。

<キーワード>

保存臍帯、後ろ向き調査、化学物質（PCBs）、胎児期曝露、自閉症

【はじめに】

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^{(1)~(3)}。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。

そこで本研究では、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。

また近年、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(4)~(6)、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。そこで、ここでは上記した「保存臍帯を用いた後ろ向き調査法」を、発達障害の一例として取り上げた自閉症に適用した。

【目的】

1. 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、
2. 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、1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して研究を行った。

【方法】

1. 保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討

1-1. 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、本研究では下記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 (7) :

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 (7) :

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。本研究では、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、本研究では、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。

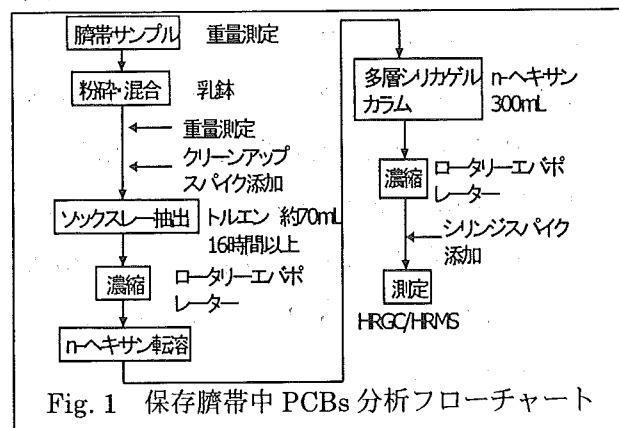
1-2. 対象とサンプル

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。

1-3. 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。前処理方法のフローを、Fig. 1に示す。



1-4. 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。

2. 自閉症に対する保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の適用

2-1. 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年生まれの子供の自閉症患者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。

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。

2-2. 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。前処理方法など、保存臍帯中PCBs

の分析については、前ページ 1-3 と同様に行なった。

2-3. 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、ダミー変数として 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。

2-4. 倫理審査

前ページ 1-4 と同様の対策を講じた。

【結果と考察】

1. 保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の確立の検討

1-1. 保存臍帯中 PCBs の分析方法の評価 (7)

本研究において使用した 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。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。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 (data not shown)。これより、本研究での分析方法 (Fig. 1) は、真度および精度に優れていることが確認できた。

1-2. 保存臍帯を胎児期 PCBs 曝露指標として用いるための検討

1-2-1. 保存臍帯中 PCBs の検出確認 (7)

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 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。

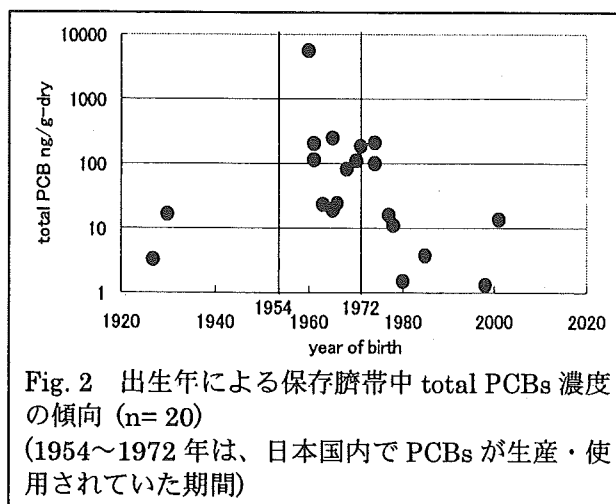


Fig. 2 出生年による保存臍帯中 total PCBs 濃度の傾向 (n=20) (1954~1972 年は、日本国内で PCBs が生産・使用されていた期間)

1-2-2. 保存臍帯中 PCBs の濃度傾向 (7)

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 (8), (9)。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、本研究で対象とした、各年代の健康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 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. 3 に示す。

Fig. 2, 3 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 (10)~(13) 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。

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。

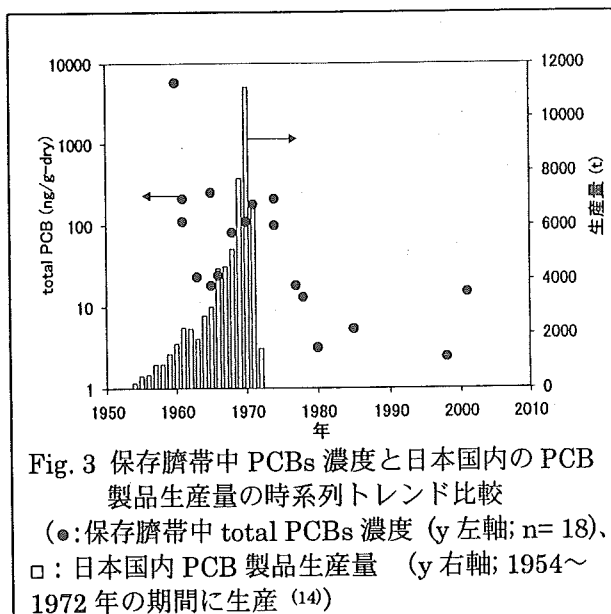


Fig. 3 保存臍帯中 PCBs 濃度と日本国内の PCB 製品生産量の時系列トレンド比較 (●: 保存臍帯中 total PCBs 濃度 (y 左軸; n=18), □: 日本国内 PCB 製品生産量 (y 右軸; 1954~1972 年の間に生産 (14))

1-2-3. 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 (15) 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、近年になるにつれ濃度は減少傾向にあることを示した。これより比較すると、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。また、Loganathan ら (16) 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。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。

1-2-4. 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と考えられる。

2. 自閉症に対する保存臍帯を用いた後ろ向き調査法の適用

2-1. 同胞間での後ろ向き調査⁽¹⁷⁾

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 1 に示した。Fig. 4 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 (Fig. 2 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。

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

Table 1 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: $p>0.05$

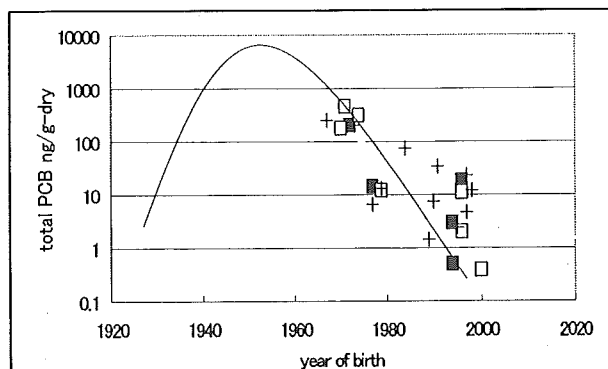


Fig. 4 自閉症患者と健常者の保存臍帯中 total PCB 濃度

(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 (×; Fig. 2 の対象者, n= 20))

言えないことが分かった。

2-2. 全対象者での後ろ向き調査 (17)

全対象者での後ろ向き調査については、前ページ 2-1 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 Fig. 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。

【まとめ】

1. 本研究では、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。

2. 本研究では、1 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ました。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られる。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、調査することも必要であると考えられる。

【謝辞】

本研究のために、貴重な臍帯サンプルをご提供下さいました対象者の方々に、深く感謝致します。

【参考文献】

(1) Jacobson, S. W., Fein, G. G., Jacobson, J. L., Schwartz, P. M. and Dowler, J. K.; *Child Dev*, 1985; 56: 853-860
(2) Grandjean, P., Weihe, P., Burse, V. W., Needham, L. L., Storr-Hansen, E., Heinzow, B., Debes, F., Murata, K., Simonsen, H.,

Ellefsen, P., Budtz-Jørgensen, E., Keiding, N. and White, R. F.; *Neurotoxicol Teratol*, 2001; 23: 305-317

(3) Koopman-Esseboom, C., Weisglas-Kuperus, N., de Ridder, M. A. J., van der Paauw, C. G., Tuinstra, L. G. M. Th. and Sauer, P. J. J.; *Pediatrics*, 1996; 97: 700-706

(4) Colborn, T.; *Environ Health Perspect*, 2004; 112: 944-949

(5) London, E. and Etzel, R. A.; *Environ Health Perspect*, 2000; 108 (Suppl. 3): 401-404

(6) Schettler, T.; *Environ Health Perspect*, 2001; 109 (Suppl. 6): 813-816

(7) Otake, T., Yoshinaga, J., Imai, H., Seki, Y. and Matsumura, T.; *J Environ Monit*, 2004; 6: 128N-131N

(8) 原田正純, 藤野紘, 樺島啓吉; *脳と発達*, 1977; 9: 79-84

(9) Akagi, H., Grandjean, P., Takizawa, Y. and Weihe, P.; *Environ Res*, 1998; 77: 98-103

(10) 久保田彰, 染矢雅之, 渡部真文, 田辺信介; *日本水産学会誌*, 2002; 68: 695-700

(11) Jones, K. C., Duarte-Davidson, R. and Cawse, P. A.; *Environ Sci Technol*, 1995; 29: 272-275

(12) Bignert, A., Olsson, M., Persson, W., Jensen, S., Zakrisson, S., Litzén, K., Eriksson, U., Häggberg, L. and Alsberg, T.; *Environ Pollut*, 1998; 99: 177-198

(13) Lead, W. A., Steinnes, E., Bacon, J. R. and Jones, K. C.; *Sci Total Environ*, 1997; 193: 229-236

(14) 磯野直秀; *化学物質と人間 PCB の過去・現在・未来*, 中央公論社, 1975

(15) Konishi, Y., Kuwabara, K. and Hori, S.;
Arch Environ Contam Toxicol, 2001; 40:
571-578

(16) Loganathan, B. G., Tanabe, S., Hidaka,
Y., Kawano, M., Hidaka, H. and Tatsukawa,
R.; Environ Pollut, 1993; 81: 31-39

(17) Otake, T., Yoshinaga, J., Seki, Y.,
Matsumura, T., Watanabe, K., Ishijima, M.
and Kato, N.; Environ Health Prev Med,
2006; 11: 65-68