

胎児性メチル水銀曝露の小児発達影響と臨界濃度

—セイシェルおよびフェロー諸島の研究を中心に—

村田 勝 敬, 嶽 石 美和子

秋田大学医学部社会環境医学講座環境保健学分野

Neurodevelopmental Effects from Prenatal Exposure to Methylmercury in the Seychellois and Faroes Cohorts and the Critical Concentration: A Review

Katsuyuki MURATA and Miwako DAKEISHI

Division of Environmental Health Sciences, Department of Social Medicine, Akita University School of Medicine, Akita

Abstract A workshop on the Scientific Issues Relevant to Assessment of Health Effects from Exposure to Methylmercury was held in Raleigh, North Carolina, November 18–20, 1998. At that time, most discussions focused on two of the major epidemiologic studies, e.g., Seychelles child development study and Faroese birth cohort study, associating methylmercury exposure with an array of developmental measures in children. These two studies seemed to provide different conclusions on the potential health effects of methylmercury and significant uncertainties remained because of issues related to exposure, neurobehavioral endpoints, confounders and statistics, and design. Since then, each group researching the Seychellois or Faroes cohort has reported some new findings on the risk assessment of methylmercury. This article is intended to present an overview of the above research, as well as benchmark dose calculations. One implication is that neuropsychological measures may depend on social and cultural factors including race and language, and another is that a key to resolve whether the exposure has harmed the fetus appears to lie in neurophysiological measures such as brainstem auditory evoked potentials and electrocardiographic R-R interval variability. In addition, it is likely that the findings published tend to underestimate the neurotoxic effects of developmental methylmercury exposure. In light of the precautionary principle, a conclusion on health effects of low-level dietary exposures to methylmercury needs to be drawn from all available data including the New Zealand study.

Key words: methylmercury (メチル水銀), risk assessment (リスク評価), prenatal exposure (胎児性曝露), benchmark dose (ベンチマークドース), Faroese birth cohort study (フェロー出生コホート研究), Seychelles child development study (セイシェル小児発達研究)

1. はじめに

1998年11月18～20日に、米国 North Carolina 州 Raleigh にあるホテルで “Scientific Issues Relevant to Assessment of Health Effects from Exposure to Methylmercury” のワークショップが Committee on Environment & Natural Resources, Office of Science and Technology Policy および

White House の主催で開催された (1)。このワークショップは、1998年までに発表された小児発達に影響するメチル水銀を扱った主要な疫学的研究を評価・検討し、その物質のリスク評価に一定の合意を得んとすることが目的であった。このため、Iraq, Seychelles, Faroe Islands (Denmark 自治領) および Amazon (Brazil の Amazon 川流域) の比較的大規模集団を対象とした研究が検討された。主催者側はこれらを行った3つの研究グループ (Clarkson 博士を中心とする Iraq および Seychelles 研究グループ, Grandjean 博士を中心とする Faroes 研究グループ, Mergler 博士を中心とする Amazon 研究グループ) に8つの質問を事前に提示し、これに答える形で研究者が発表し、その後専門委員による質疑応答が行われた。各々の研究に対し、①曝露は有機水銀あるいは無機水銀のいずれであ

受付 2004 年 11 月 6 日, 受理 2004 年 11 月 29 日

Reprint requests to: Katsuyuki MURATA

Division of Environmental Health Sciences, Department of Social Medicine, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan

TEL: +81(18)884-6085, FAX +81(18)836-2608

E-mail: winestem@med.akita-u.ac.jp

るか、②その曝露源は何か、魚介類および海洋哺乳類摂食が主要な曝露源と言えるか、あるいはアマルガムや職業性曝露が攪乱していないか、③特異的および鋭敏な健康影響指標 (health endpoint) として何をういたのか、それらの健康影響指標の中で最も特異的かつ鋭敏であるのはどれか、またそれらの検査は文化や行動習慣に影響されるか、④用いられた発達検査は他の研究と比較可能であるか、⑤健康影響指標に正または負に影響する交絡因子は何か、またそれら交絡因子 (セレン、多価不飽和脂肪酸、ポリ塩化ビフェニール PCB、アルコールなど) は研究の解釈に影響するか、⑥集団内あるいは集団間の水銀曝露および対象者属性 (性・年齢、栄養状態など) にどのような多様性があるか、⑦統計的デザイン、研究計画、研究遂行でどのような点が特に強力 (あるいは脆弱) であったか、⑧これら疫学研究の解釈に動物実験はどのように貢献するのか。この3日間のワークショップで議論された Seychelles および Faroe Islands の研究は、両者とも同レベルのメチル水銀曝露であったが、健康影響の評価で相反する結論を示し、不確実さばかりが残った。National Research Council (NRC) はこのワークショップの最終報告書を基に再検討し、“Toxicological Effects of Methylmercury” という本の中で一つの結論を出した (2)。しかしながら、Seychelles と Faroe Islands の研究に対しては幾つかの疑問が投げかけられたままであった。

臨界濃度 (critical concentration) は、ある物質が体内に蓄積し、細胞や臓器に有害な影響 (adverse effect) を現わし始める濃度を示し、毒性学的には“閾値 (threshold) 濃度”とも呼ばれる (2)。臨界濃度は無毒性量 (no-observed-adverse-effect level, NOAEL) や最小毒性量 (lowest-observed-adverse-effect level, LOAEL) として推定され、リスク評価からリスク管理に移行する際にこの値が重要となる。すなわち、ヒトの耐容食事摂取量などを算出する際の基礎的な数値として使用されている (3)。メチル水銀のリスク評価においては、臨界濃度の算出に benchmark dose (BMD) 法がよく用いられ、BMD の 95% 信頼下限値 (benchmark dose level, BMDL) が NOAEL の代用値として使われるが (2)、日本では BMD および BMDL とともにあまり馴染みがないように思われる。

Seychelles child development study (以下、Seychelles 研究) および Faroese birth cohort study (以下、Faroes 研究) はいずれも 1980 年代に開始され、その研究概要はこれまでに幾つか紹介されている (4-8)。本稿は、上述の米国で催されたメチル水銀曝露による小児発達影響に関するワークショップ前に報告された両研究の調査結果 (前者は 5.5 歳児、後者は 7 歳児) とその後の追跡調査結果 (前者は 9 歳児、後者は 14 歳児) を、ワークショップで提起された疑問と関連付けて概説する。併せて、それらの研究で用いられた BMD 法と今後のメチル水銀のリスク評価の在り方について考察する。

2. Seychelles 研究の結果

米国 New York 州 Rochester 大学の研究グループは 1970 年代の Iraq のメチル水銀禍のヒトの健康影響を調査していたが、胎児期のメチル水銀曝露では低濃度でも影響が起りうることから、魚多食集団を世界各地で探していた。調査地として Seychelles が選択された理由は、魚多食集団である、島国で人口移動が少ない、教育水準が高いなどであり、彼らが Seychelles に足を踏み入れたのは 1980 年の初めてであった (7)。公用語は英語、仏語、クレオール語の 3 言語であり、アフリカ系、フランス系、インド系など人種的背景は複雑である。

1989～1990 年の 1 年間に首都ビクトリアのある Mahe Island で生まれた 779 名の母子が登録され、5.5 歳 (66 ヶ月) の調査ではこのうちの 711 名 (脱落率 8.7%) が参加した (9)。曝露指標は妊娠中の平均毛髪水銀濃度 6.8 (範囲 0.5～26.7) $\mu\text{g/g}$ であり (Seychelles で食される 25 種類の魚の総水銀濃度は 0.004～0.75 $\mu\text{g/g}$)、その他 5.5 歳児の毛髪水銀濃度 (平均 6.5, 0.9～25.8 $\mu\text{g/g}$) も使用された。影響指標としては、表 1 に示したように、認知能力、言語の表現と理解能力、読書力と計算能力、視空間能力などの 6 つの検査であった。共変量ないし交絡因子として、子供の出生体重、出生順位、性、授乳歴、聴力、病歴の他、母親年齢、妊娠中の喫煙・飲酒、母親病歴、保護者の知能 (Seychelles の子供の 25% は父親が不明であり、子供と同居している親類縁者や母親が保護者として測定された)、家庭内での使用言語、Hollingshead の社会経済状況指標、HOME score が用いられた。6 つの検査のいずれにおいても、水銀曝露による影響は見られず、むしろ 4 つの検査では出生前あるいは出生後の水銀曝露が高い群で良い成績が得られた。重回帰分析でも Preschool language scale では出生の前後の水銀曝露と有意な関連が見られたが、水銀濃度が高いほど成績が良いことを示す結果であった。

3. Faroese 研究の結果

Iraq, Seychelles, New Zealand などのメチル水銀研究では曝露指標として母親の妊娠時毛髪水銀濃度が使用されていたが、Faroese 研究は毛髪水銀濃度の他に臍帯血中水銀濃度を測定した点で従来の研究と異なっていた (10)。1986～1987 年の 21 ヶ月間に Faroe Islands で出産し登録された母子 1,023 組 (総出産数の 75.1%) の臍帯血中水銀濃度の中央値は 24.2 (0.5～351) $\mu\text{g/l}$ であり、母親の毛髪水銀濃度の中央値は 4.5 (0.2～39.1) $\mu\text{g/g}$ であった (10 $\mu\text{g/g}$ 以上が 130 名)。このうち 250 例 (24.5%) は臍帯血中水銀濃度が 40 $\mu\text{g/l}$ を超えており、また 20 例が 100 $\mu\text{g/l}$ 以上であった。両者の水銀濃度は高い相関 ($r=0.78$) を示すとともに、臍帯血中セレン濃度と有意な正の相関があった。これらは妊娠中の飲酒歴、母親の知能、フェロー人の母親か否か等の要因とも有意な関連を示した。また、

Table 1 Outcome variables used in Seychellois and Faroes Cohorts (9, 11–13)

Variables	Effects of prenatal exposure*
1. Seychelles child development study (66-month-old children)	
McCarthy General Cognitive Index	NS
Preschool Language Scale	favorable
Woodcock-Johnson (W-J) Tests Letter-Word Recognition	favorable
W-J Tests Applied Problems	NS
Bender Gestalt Test	NS (boys), favorable (girls)
Child Behavior Checklist	NS
2. Faroese birth cohort study (7-year-old children)	
Neurobehavioral Evaluation System (NES) Finger Tapping Test	adverse
NES Hand-Eye Coordination Test	NS
Tactual Performance Test	NS
NES Continuous Performance Test	adverse
Wechsler Intelligence Scale for Children—Revised (WISC-R) Digit Spans	NS
WISC-R Similarities	NS
WISC-R Block Designs	NS
Bender Gestalt Test	NS
California Verbal Learning Test (Children)	adverse
Boston Naming Test	adverse
Nonverbal Analogue Profile of Mood States	NS
Pattern-reversal Visual Evoked Potentials	NS
Brainstem Auditory Evoked Potentials	adverse
Postural Sway Test	NS
Coefficient of Variation for Electrocardiographic R-R Interval	NS
Blood Pressure	adverse

* NS represents “not significant”.

臍帯血中水銀およびセレン濃度は月当たりの鯨肉 (pilot whale, 齒鯨類のゴンドウクジラ) あるいは週当たりの魚 (cod fish, タラ) の摂食回数が増すにつれ高くなったが、臍帯血中鉛濃度 (平均 $1.8 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{dl}$) は摂食回数と無関係であった。なお、1,023 名の出生コホートのうち 1 名は追跡中に病死した (以後 1,022 名)。

7 歳児調査は 1993 年および 1994 年の 4～6 月に Faroe Islands および Denmark (Copenhagen および Odense 大学) で行われ、出生コホート 1,022 名のうち 923 名が参加した (脱落率 9.7%)。調査で用いられた検査を表 1 に示す (11)。7 歳児の毛髪水銀濃度 (幾何平均, 25 および 75 パーセントイル) は $0.60 (0.34 \sim 1.24) \mu\text{g}/\text{g}$ であった。主たる解析は、対数変換した水銀濃度 ($\log_{10}[\text{Hg}]$) の他に、幾つかの交絡因子を説明変数とした重回帰分析を使用した。この対数変換の使用は水銀濃度分布が左方偏位しており正規分布近似させるためであるが、一方で水銀濃度が 10 倍高くなれば回帰係数の値だけ影響指標 (目的変数) が増加 (あるいは減少) することを表す。神経生理学的検査では、聴性脳幹誘発電位の V 頂点潜時 (peak latency) のみが臍帯血中水銀濃度と有意な正の関連 (水銀曝露により伝導遅延する) を示した。一方、神経心理および行動学的検査では、Finger tapping (利き手および両手), Boston naming test (ヒント無し, 有り共), California verbal learning test (短時間記憶) および Continuous performance test (反応時間) が臍帯血ないし出産時母親毛髪の水銀濃度と有意に関連することが認められた (すなわち、

記憶, 注意, 言語などの能力がメチル水銀曝露の増加に伴って低下するという関係を示した)。また、臍帯血中水銀濃度 $15 \mu\text{g}/\text{l}$ 未満, $15 \sim 30 \mu\text{g}/\text{l}$, $30 \sim 50 \mu\text{g}/\text{l}$, $50 \mu\text{g}/\text{l}$ 以上の 4 つのサブグループに分け、検査成績の上位 25 パーセントイルに属する子供の割合を検討すると、California verbal learning test および Continuous performance test で有意な量一反応関係が認められた。

1994 年に脳波計が (恐らく連休明けに結露して) 一時的に不具合を生じたため、1993 年に測定された聴性脳幹誘発電位潜時のみを用いて再解析した (12)。中耳炎のない子供 388 名で性・年齢を調整し、臍帯血中水銀濃度, 母親出産時毛髪水銀濃度, 7 歳児毛髪水銀濃度との関係を解析すると、III 頂点潜時および I–III 頂点間潜時 (interpeak latency) は出生時水銀濃度 (前 2 者) とのみ有意な正の関連を示した。これより、メチル水銀の聴覚神経伝導遅延影響は少なくとも 7 歳前後の曝露ではなく、胎児期曝露による影響であろうと推定された。

小児神経内科医によって測定された血圧と日本から来た共同研究者によって測定された心電図 R-R 間隔変動が検討された (13)。7 歳児の収縮期血圧は $100 \pm 8 \text{ mmHg}$ であり、拡張期血圧は $65 \pm 9 \text{ mmHg}$ であったが、血圧に対して出生時体重や胎盤重量は何等影響を及ぼさなかった。しかしながら、臍帯血中水銀濃度 $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{l}$ あるいは母親の出産時毛髪水銀濃度 $0.2 \sim 2 \mu\text{g}/\text{g}$ の子供における水銀曝露と血圧の関係を重回帰分析で検討すると、有意な正の関連が認められた (臍帯血中水銀濃度が 10 倍

増加すると、収縮期血圧で14.6 mmHg、拡張期血圧で13.9 mmHg上昇する)。この結果を基に、NRCの報告書では心血管系影響が低濃度メチル水銀曝露の影響指標として有用かもしれないと述べている(2)。但し、臍帯血中水銀濃度が10 µg/lを超えると、この血圧における量-影響関係は消失した。

Faroe Islands 住民の主要な水銀曝露源は伝統的な食物である鯨肉の摂食であり(1990年代前半に捕獲された鯨の平均水銀濃度は3.3 µg/gであり、このうち約半分がメチル水銀)、その他の水銀曝露源はタラであった(タラの平均水銀濃度は0.07 µg/gであり、大半がメチル水銀)。彼らは鯨肉とともに脂身も摂食することから、後者に多く含まれるPCBsの影響が特に問題となる。GrandjeanらはPCBsの影響を検討するために臍帯血中PCBsの測定を試みたが、臍帯血は必ずしも十分確保できていなかった。そこで、十分な臍帯血の得られた子供50名の血中PCBs濃度とともに、臍帯組織中のPCBs濃度を測定し、相関係数 $r=0.90$ を得た(14)。これより、臍帯組織中PCBs濃度は臍帯血中PCBs濃度を反映すると考え、7歳児の神経心理・行動学的検査成績と併せて検討すると、Continuous performance test, Boston naming test および California verbal learning test がPCBs濃度と有意に関連した。幾つかの交絡因子とともにPCBおよび水銀曝露量を説明変数として重回帰分析で解析すると、PCBはこれら検査成績と有意な関連を示さず、一方水銀はPCBの影響を考慮してもなおContinuous performance test (反応時間)と有意な関連を示した。

4. ワークショップとその後の補足研究

1998年に開催された“Scientific Issues Relevant to Assessment of Health Effects from Exposure to Methylmercury”のワークショップで疑問が付けられた点は、以下の通りである(1)。

- A) 曝露指標として、母親の出産時毛髪水銀濃度と臍帯血中水銀濃度のいずれが適切であるか (Exposure Panel)。
- B) 曝露形態として、Seychellesの住民は毎日2回位魚を摂食しているが、Faroe Islandsでの鯨摂食は月に数回程度の頻度であることから、“spiking effect (鯨摂食後の短期間高濃度曝露影響)”がありうるかもしれない (Exposure Panel)。
- C) Seychellesでは対象集団の血清分析でPCBが検出限界以下であることが示されているが、有機塩素系殺虫剤の曝露はFaroe Islandsよりも高値かもしれない (Exposure Panel)。
- D) Seychelles 研究では臨床評価に基づく神経学的所見の重症度 (standardized measures of global function) を調べる検査が主であり、一方のFaroes研究ではメチル水銀で特異的に障害されやすい脳機能 (domain-

specific effect) を調べる検査が主であった。このため両者の比較は根本的に不可能であり、共通する検査が今後の研究で用いられるべきである (Neurobehavioral Endpoints Panel)。

- E) Seychellesは大小115の島々よりなるが、研究対象は比較的健康状態の良いMahe Island 在住者に限られていたので、その選択バイアスにより曝露影響が過小評価されている可能性がある、また用いられた検査が5.5歳という年齢に相応しくないかもしれない (Confounders & Variables Panel)。
- F) Faroes 研究では、検査に要す時間が長く(個々の子供の拘束時間は4時間)、この長い検査時間がContinuous performance testの結果に影響している可能性がある (Confounders & Variables Panel)。
- G) SeychellesおよびFaroes研究とも多くの交絡因子を用いて調整しており、このため結果が過小評価されている可能性がある (Confounders & Variables Panel)。
- H) 多くの曝露指標、影響指標、交絡因子を用いてたくさんの比較や関連性の検討が行われているので、結果の一部は偶然によることも考えられる。多重有意性検定を行うべきである (Design/Statistics Panel)。

多くのメチル水銀のリスク評価研究で母親の妊娠時毛髪水銀濃度が用いられてきた(9, 15-19)。これは毛髪が非侵襲的に採取でき、また特定の毛髪部位を測定することにより限られた期間の水銀曝露量を推定することができるためである(2)。しかしながら、毛髪-血中濃度比率(現行250:1)の不正確さが叫ばれ(3, 20)、また母親の毛髪水銀濃度がパーマ処理により20~25%低下することが指摘されていることから(21, 22)、胎児期の曝露指標として毛髪水銀濃度が本当に適切かどうか問われている。Grandjeanらは毛髪水銀濃度と臍帯血中水銀濃度の間に $r=0.78$ と高い相関があることを認めながらも“gold standard”は何かと問いかけた(23, 24)。メチル水銀の生物学的半減期を45日と仮定すると(25)、頭皮から8~9cmの毛髪は妊娠初期から35週までの水銀濃度を反映し、一方の臍帯血中水銀濃度は胎児の30~40週の水銀濃度を反映すると考えられる。7歳児の神経心理・行動学的検査成績を臍帯血、出産時の母親毛髪、1歳児の毛髪、7歳児の毛髪および全血の水銀濃度との関係で検討すると、臍帯血中水銀濃度と出産時母親毛髪水銀濃度がContinuous performance test, Wechsler intelligence scale for children (WISC-R), Boston naming test, California verbal learning test と有意な関連を示し、特に前者の方が回帰係数の絶対値が大きいことから、臍帯血中水銀濃度の優位性を強調した。

Faroe Islandsの妊婦3名から得られた毛髪を頭皮より1.5cm毎に切断して水銀濃度を測定すると、その変動係数は25%以上であった(26)。そこで、出産時の母親毛髪の頭皮から2cmまでの水銀濃度と全長毛髪水銀濃度を測定し、両者の値が著しく異なる(すなわち、摂食パター

ンの変動が著しい) 母親から生まれた 7 歳児 (約 10%) を除いて量一影響関係を再解析した。しかしながら、胎児期水銀濃度の変動の少なかった 7 歳児の解析結果は 1997 年に報告された解析結果 (11) と殆ど違いがなかった。したがって、“spiking effect” によって過大評価していることはないだろうと結論づけた。

疫学研究では曝露と影響の因果関係を検討する際に交絡因子を考慮する。しかし、交絡因子を多く用いると、交絡因子と曝露指標 (あるいは影響指標) との内部相関により、量一影響関係がもともと弱い影響指標の評価においては過小評価する恐れがある。Faroës 研究では交絡因子の 1 つとして“居住地” (town/country) を入っていた。この研究では (特に測定バイアスを避けるために) コンピュータ支援検査を多く使用していたので、コンピュータやピアノなどに親しんでいる子供はこの種の検査で良い成績を得るかもしれないと考えられたためであった。一方、小漁村 (country) の住民は大きな町 (town) の住民と比べ鯨肉の摂取量が概して多く、この居住地因子は曝露量と関連する。このため、居住地因子を含んだモデルの臍帯血中水銀濃度と California verbal learning test との関係は回帰係数 β_{B-Hg} が -0.569 ($p=0.077$) であったが、居住地因子を除いたモデルの β_{B-Hg} は -0.673 ($p=0.031$) と有意になった (27)。Seychelles 研究では、さらに多い交絡因子 (共変量) が用いられていることから (1, 9, 19), これらを選択した意義を再検討する必要があるかもしれない。例えば、子供の知能や技能は遺伝的素因や家庭環境の影響を受けやすいのは事実であるが、一方でそれらをあまりに重視すると低濃度メチル水銀曝露の軽微な影響は霧散する恐れがある。

同様の過小評価は測定バイアスの混入によっても起こりうる。Faroës 研究では、原則として全ての紙と鉛筆を用いる検査はフェロー人男性臨床心理士によって行われた。しかしながら、知能検査 (WISC-R) を含む神経心理学的検査は彼および 7 歳児にとっても負担が大きく、このため調査期間の途中に Similarities (類似性) 検査のみ特別に訓練された検査技師に代わるようになった (28)。この結果、臨床心理士が行った 7 歳児 282 名では水銀曝露量と Similarities 得点との間に有意な負の関係 (回帰係数 $\beta=-1.53$, $p=0.043$) を認めたが、検査技師が行った 578 名では $\beta=0.24$ ($p=0.59$) であり、両者を併せた 7 歳児 860 名では有意な関係は見られなかった ($\beta=-0.05$, $p=0.90$)。

11 種の神経心理・行動学的検査が使用された Faroës 研究では、有意な影響指標は 4 つであった。その上、曝露指標には毛髪水銀濃度と臍帯血中水銀濃度の 2 種類が用いられた。このため、冒頭のワークショップでも多重有意性検定の必要性が指摘されていた (1)。Budtz-Jørgensenらはこれらの影響指標、曝露指標 (毛髪および臍帯血中水銀濃度、鯨摂取回数) および PCBs 濃度を含む交絡因子を全て共分散構造分析 (structural equation model) に含めて解析を行い、曝露指標群が PCB などの影響を取り除

いてもなお影響指標群と有意な関係にあることを証明した (29)。この方法により、個別の運動機能および言語能力が臍帯血中水銀濃度や出産時母親毛髪水銀濃度の増加に伴い有意に低下することも示した。

Faroës 研究では視覚誘発電位潜時が測定されたが、メチル水銀との関連は認められなかった (11)。この理由として、鯨脂身摂取により多価不飽和脂肪酸 (エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸など) の摂取量が増え、メチル水銀曝露による視神経影響を修飾したかもしれないと推量された。特に、ドコサヘキサエン酸は胎児や母乳栄養児の知能および視神経発達に必須の成分であることが近年示唆されている。1994 年に出生したコホート 2 の母子 182 組を用いて検討すると、月当たりの鯨脂身摂取回数の増加に伴い臍帯血清中のエイコサペンタエン酸は有意に増加し ($p=0.002$), ドコサヘキサエン酸も増加傾向が見られた (30)。この結果は 7 歳児の臍帯血試料から測定されたものではないので、視覚誘発電位潜時に及ぼすメチル水銀の影響が現れなかった間接的な証拠と言えよう。

5. ワークショップ後の大規模調査研究

Seychelles 研究は 5.5 歳児に続いて 9 歳児調査を行った (19)。参加した母子は 643 名 (脱落率 17.5%) であった。曝露指標として妊娠中の母親毛髪水銀濃度が用いられた。調査は 1997 年 2 月から 1998 年 11 月まで行われたが、Faroës 研究と同じ検査もあった。使われた神経心理学的検査は WISC IQ, California verbal learning test, Boston naming test, W-J tests の Letter-Word recognition と Applied problems, Visual motor integration, Bruninks-Oseretsky test, Haptic discrimination test, Grooved pegboard test, Trail marking test, Finger tapping, Wide range assessment of memory and learning, Continuous performance task, Connor's child behavior checklist, Connor's teacher rating scale など 21 の影響指標である。交絡因子 (共変量) は前回とほぼ同様であるが、9 歳児の毛髪水銀濃度 ($6.1 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$) もこの中に含まれている。これらの検査のうち、母親毛髪水銀濃度と有意な関連のあった影響指標は Grooved pegboard test と Connor's teacher rating scale の 2 つのみであったが、著者らは偶然 (chance) の結果とみなした。Seychelles 研究に関する論文は 1999 年以降に幾つか報告されているが (31-37), 結論は本質的に変わっていない。ただ、結論を変えないまでも、出生時の母親毛髪水銀濃度 $12 \mu\text{g/g}$ 以上で Grooved pegboard 利き手得点に有意な悪影響があることを示唆する非線形関係係を最近の研究報告は提示している (37)。

Faroës 研究は 7 歳児調査で終了する予定であったが、1998 年のワークショップを経て米国 National Institute of Environmental Health Sciences が継続研究に資金援助することが決まり、このため 14 歳児調査を実施することが可能となった。2000 年および 2001 年の 4 ~ 6 月に行わ

れた14歳児調査は、7歳児に観察された現象は再現性があるか、また対象児童の多くはFaroe Islandsの中で生活しており、後天性の水銀曝露を受けていると考えられることから、この曝露による影響の有無を明らかにすることを主要な目的とし、1986～1987年に登録された1,022名のうち883名(脱落率13.7%)が参加して実施された。Faroes研究の神経心理・行動学的検査のうち、既に発表されたのはContinuous performance test(動物影絵版)の成績のみである(38)。7歳と14歳の両方の検査を受けた子供819名を対象としているが、7歳児調査と14歳児調査で検査時間は異なっていた。平均反応時間は14歳(10分間検査)で 492 ± 45 msであり、7歳(4分間検査)の750msよりも早くなっていた。臍帯血中水銀濃度と14歳児の反応時間は有意な関係があり(相関係数 $r=0.09$, $p=0.01$)、7歳児で得られた関係と同様であった。なお、大規模なコホート研究で長期追跡の後に曝露-影響関係を検討すると、統計的に有意であっても相関係数が極端に小さいことがある。例えば、寄与率(r^2)が1%未満であったとして、無意味な結果と片付けてしまうことはありうる。このような判断は研究結果の過小評価に結びつくかもしれない。曝露後の年数が経っているとそれだけ多くの交絡因子の影響を受けるので、得られた関係の生物学的重要性や臨床的意義を慎重に考慮すべきであろう。

Faroes研究の14歳児調査では、聴性脳幹誘発電位、視覚誘発電位、事象関連電位(P300)が測定された(39)。14歳児の聴性脳幹誘発電位のⅢおよびⅤ頂点潜時とⅠ-Ⅲ頂点間潜時は臍帯血中水銀濃度(および出産時母親毛髪水銀濃度)の増加に伴って延長した。そのうえ、Ⅲ-Ⅴ頂点間潜時は14歳児毛髪水銀濃度(幾何平均 $0.96, 0.02 \sim 9.65 \mu\text{g/g}$)と有意な正の関係があった。胎児性水俣病患者ではⅠ-ⅢおよびⅠ-Ⅴ頂点間潜時が有意に延長していた(40)。また、メチル水銀に汚染された食物とともに水銀蒸気に曝露されたEcuadorの子供では、血中水銀濃度が $20 \sim 89 \mu\text{g/l}$ 群の聴性脳幹誘発電位のⅢ-ⅤおよびⅠ-Ⅴ頂点間潜時は $20 \mu\text{g/l}$ 未満群と比べ有意に延長していた(41)。このように、聴神経の末梢側は胎児性(prenatal)メチル水銀曝露によって不可逆的影響を受け、一方聴神経の中枢側(間脳～脳幹部)は後天性(postnatal)曝露により影響を受けることが示唆された(42)。

胎児期の低濃度メチル水銀曝露が血圧上昇と関連することがFaroes研究の7歳児で示されたが(13)、14歳児においても同様の变化が認められるのか、また血圧制御に関連する自律神経機能への影響はどうか検討された(43)。7歳児および14歳児とも、収縮期血圧は(副交感神経機能の低下による)交感神経優位の状態と関連した。14歳児男子の収縮期血圧は $115.5 \pm 8.3 \text{ mmHg}$ であり、拡張期血圧は $63.1 \pm 8.5 \text{ mmHg}$ であった(女子は各々 $113.0 \pm 7.9 \text{ mmHg}$ と $64.1 \pm 7.8 \text{ mmHg}$ であった)。14歳児の血圧と出生時水銀濃度との関係は7歳児のパターンとほぼ同様であったが、統計的に有意でなかった。一方、自律

神経機能の交感神経および副交感神経活動レベルは臍帯血中水銀濃度とのみ有意な負の関係を示した。なお、7歳児および14歳児の毛髪水銀濃度との有意な量-影響関係は認められなかった。

Faroes研究とSeychelles研究における論争は、後者の9歳児調査結果(19)を巡って再燃した。2つの研究で共通に用いられたBoston naming testにおいて、交絡因子を調整した水銀濃度との回帰係数がSeychellesでは -0.012 (95%信頼区間 $-1.0 \sim 0.8$)であり、Faroe Islandsでは -1.18 (95%信頼区間 $-2.0 \sim -0.4$)であったことに注目し、前者のグループは2つの研究で得られた回帰係数の点推定値に有意な差は認められないと主張した(44)。また、Seychellesでは出生後6ヶ月以内に母親から毛髪を集め、妊娠時毛髪水銀濃度を測定しているが、これが曝露誤差(exposure misclassification)を引き起こし、真の影響を過小評価していると述べた。これに対し、後者のグループは統計的手法で帰無仮説を証明することはできないと反駁している(45)。すなわち、Boston naming testで水銀影響が認められるとFaroes研究グループは主張し、一方Seychelles研究グループは認められないと主張しているのである。同様の論争はContinuous performance testでも展開されている。この検査は、Seychellesで用いられた時、ひとりの検査者によって管理されていなかったとGrandjeanらは述べている(46)。いずれにせよ、1998年のワークショップで指摘された多すぎる交絡因子(共変量)とともにそれらが影響(または曝露)指標と高い相関を持つことによって生じうる過小評価、影響指標の選択における思惑、影響(または曝露)指標の測定バイアスなどが2つの研究の間で錯綜し、中立的な比較を困難にしている。

今後の胎児期メチル水銀曝露の影響評価の方向として、Faroe Islandsで測定された神経生理学的検査を用いる研究に注目したい。前述のワークショップで本稿著者の一人がFaroe Islandsの神経生理学的結果を述べたが、当時は全く無視された。しかしながら、聴性脳幹誘発電位(12, 39-42, 47, 48)、心電図R-R間隔変動(43)、視覚誘発電位(47, 48)は客観的、定量的かつ非侵襲的な方法であり、また社会文化的要因や対象者の協調性に非依存であることから、性・年齢のような限られた交絡因子を調整するだけで検討できる(46)。したがって、これらを用いた調査研究の遂行が、SeychellesおよびFaroes研究の論争に終止符を打つ残された方策なのかもしれない。

6. Benchmark dose (BMD) の算出

臨界濃度はNOAELやLOAELとして推定されてきた。前者は非発癌性影響のリスク評価として十分にコントロールされた動物実験から得られ、曝露群に統計的あるいは生物学的に有意な悪影響の増加を生じさせない“最も高い実験的曝露量”と定義され、後者は曝露群に統計的あるいは生物学的に有意な悪影響の増加を生じさせ

る“最も低い実験的曝露量”と定義される(2)。しかしながら、NOAELやLOAELは曝露群と非曝露群の統計的比較(有意差検定)に基づいて算出されるため、近年研究者の間で異議が唱えられている。例えば、Seychelles研究では、711名の対象が出産時の母親毛髪水銀濃度で3 μg/g以下(平均2.0 μg/g)、3~6 μg/g(平均4.5 μg/g)、6~9 μg/g(平均7.4 μg/g)、9~12 μg/g(平均10.3 μg/g)、12~26.7 μg/g(平均15.3 μg/g)の5つのサブグループに分けられ、5.5歳児の発達影響指標が比較された(9)。いずれの群間にも有意差が認められなかったため、米国Agency for Toxic Substances and Disease Registry(ATSDR)は曝露レンジの最も高い群の平均値(15.3 μg/g)をNOAELとみなした(49)。もし、この12~26.7 μg/gのサブグループを、さらに12~15 μg/g、15~26.7 μg/gと分けていたら、ATSDRの定めるNOAELはもっと高い値になっていたかもしれない。CrumpはNOAELとBMD法の違いを以下のように述べている(50)。

① NOAELは、一般的に、ある曝露量を受けた群と非曝露群の反応を比較するが、BMD法は全てのデータを用いて量-反応モデルで推定する。

② サンプル数の少ない研究において、BMD法では小さいBMDLが得られるが、NOAELでは逆に大きい値になりやすい。

③ NOAELは実験で使用された用量のいずれかの値である。つまり、使用された用量をどのように決めたとかという論争がNOAELでは起こりうる

が、多くの疫学的研究では対象集団をある曝露量ごとに分けることは恣意的と解釈される。BMD法ではこの種の問題は生じにくい。

④ BMD法は、NOAELが存在しないようなデータからも算出できる。

Crumpは標準化された実験的2値反応(反応の有無でみる影響指標)を評価するためにBMD法を開発していたが、これを連続量データにまで拡張した(51)。このBMDの算出は、まず曝露量に伴って影響指標が有意に増加(あるいは減少)する関係があることを確認し、非曝露集団の影響指標の異常確率(あるいは異常者割合)を P_0 とする(正規分布近似の場合、 P_0 は通常5%で、この境界がカットオフ値)。曝露集団において、異常確率 P_0 よりさらに $\alpha\%$ の異常増加(benchmark response, BMR)をもたらす曝露量(濃度)をBMDと定義する(図1)。この後、BMDの95%信頼下限値BMDLを算出する。BMRの値として、NRCは5%を推奨している(連続量データでは正規分布上の5%以下または95%以上を異常値と定めることが多く、その異常反応の頻度が2倍になる)(2)。なお、2値反応モデルではBMR=0.1が多く採用されているが(BMD₁₀)、これは $P_0=0$ であることが多いためであろう。以上より、得られるBMDおよびBMDLの特徴は次のようになる(52,53)。

① BMDは生物学的変動(集団データを正規分布近似)と統計的不確実性(95%信頼下限値としてBMDLを算出)の両方を考慮している、② BMDLは

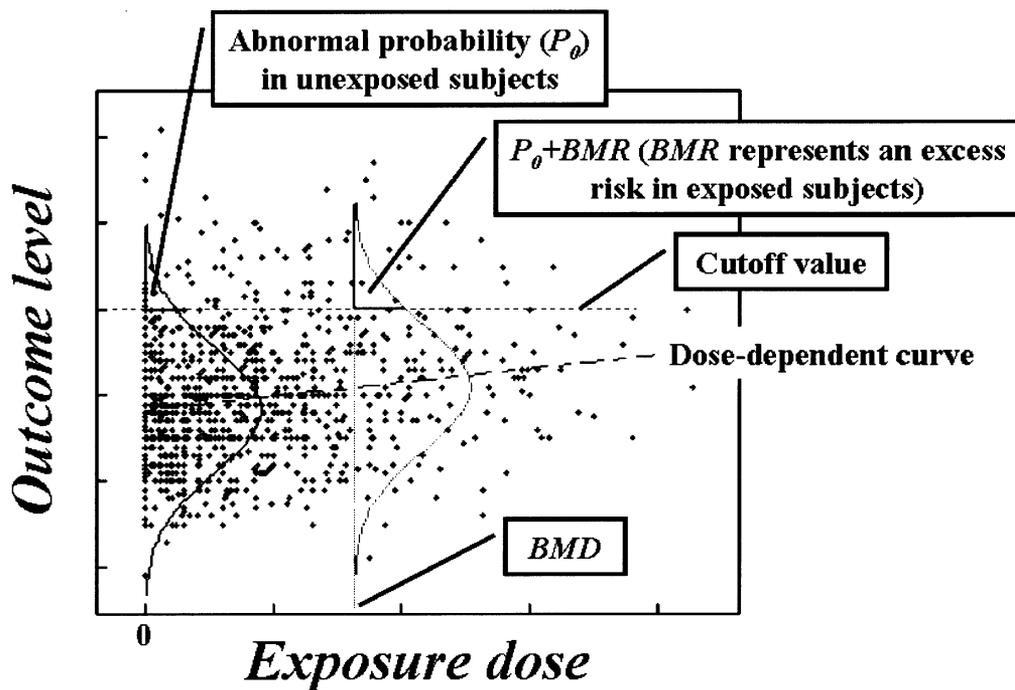


Fig. 1 Hypothetical dose-effect (response) relation illustrating the concepts of the benchmark dose method. The dose-dependent curve indicates that when the exposure dose increases, so does the expected outcome level. The distribution of outcome levels in unexposed subjects is shown at 0 of the x-axis. Outcome levels above the cutoff value are considered abnormal. The risk of an abnormal response in unexposed subjects is P_0 . At the BMD, the distribution has been translated upward and the risk of an abnormal response has increased to $P_0 + BMR$. The BMDL (the statistical 95% lower bound of the BMD) is placed somewhere between zero and the estimated BMD, depending on the amount of information in the study.

BMDの95%信頼下限値であるので、BMDLを算出することで研究の検出力を考慮したことになる(正確性が低ければBMDLは低くなる)、③交絡因子(共変量)を含むBMD計算では、カットオフ値は非曝露集団が全て(交絡因子や共変量の値にかかわらず)同じ異常反応のリスクを持つ値として定義することで、BMDは交絡因子(共変量)に依存しない、④非曝露集団の設定は事実上困難なことが多いので、曝露量の極めて低い集団および高い集団を含む曝露集団全体で解析を行う。

BMDおよびBMDLを算出するモデルは研究者により異なる(52, 54)。CrumpはWeibull関数を当てはめて算出しているが(51)、Faroes研究では線形モデルにベキ関数(power function, d^k)を組み合わせた方法を採用した(53, 55-57)。Mutti & SmargiassiはCox regression modelを用いて有害化学物質のprolactin反応に及ぼす臨界濃度を推定した(58)。米国Environmental Protection AgencyはWeibull関数、多項式モデル、ベキ関数モデルなどを選択できるBMD softwareをweb上で提供しているが(59)、交絡因子の調整ができないので、交絡因子を含まない動物実験のデータ解析に適しているだろう(54, 60, 61)。いずれにせよ、特定の推奨モデルは定まっていないので、最終的にモデルの適合度検定で判断する(52, 54)。しかし、BMD法はもともと低濃度曝露集団における臨界濃度を推定する方法であるので、極端に高濃度の曝露者が混入すると、モデルの適合性に問題が生じる可能性がある(56)。

CoxらはIraqで胎児性水銀曝露を受けた18ヶ月児の歩行遅延の有無と出産時の母親から採取した毛髪水銀濃度をLogitモデルおよびHockey-stickモデルで解析し、推定最小影響水銀濃度は10 $\mu\text{g/g}$ (不確実性の95%レンジは0~13.6 $\mu\text{g/g}$)となると結論した(16)。この値は非曝露集団の有病率を0%と想定した場合であり、有病率が4%であると不確実性の上限値は190 $\mu\text{g/g}$ になるとNRCは述べている(2)。CrumpらはIraqのデータをNOSTASOT法(言語遅延で80 $\mu\text{g/g}$)、NOAEL法(41~250 $\mu\text{g/g}$)、BMD法(119~215 $\mu\text{g/g}$)で再解析し、毛髪水銀濃度で80 $\mu\text{g/g}$ 以下で発達障害が起こるとする根拠はないと論じた(62)。その後、BMD法が盛んに用いられようになり、New Zealand cohortで検討された知能検査(Scholastic and psychological test performance)では、母親の毛髪水銀濃度が86 $\mu\text{g/g}$ と極端に高い子供1名を外れ値として除き、BMDLは7.4~10 $\mu\text{g/g}$ (毛髪水銀濃度)と算出した(63)。影響指標としてMotor speed, Attention, VisuospatialおよびVerbal memory検査を用いて算出したFaroes研究のBMDLは9.4~14 $\mu\text{g/g}$ (毛髪水銀濃度)であった(64)。彼らは、最近、全ての曝露指標、交絡因子、影響指標を入れたBMDLとして6 $\mu\text{g/g}$ を算出している(65)。また、Faroe IslandsおよびMadeiraの7歳児の聴性脳幹誘発電位潜時で算出されたBMDLは7.5~10.5 $\mu\text{g/g}$ であった(55)。ちなみに、日本人とMadeiraの7歳児から算出されたBMDLは7.1~10.5 $\mu\text{g/g}$ であった(42)。Seychelles研究では、有意な量一反応(影響)関係が見られなかつ

たにもかかわらず、BMDL(毛髪水銀濃度で19~30、平均25 $\mu\text{g/g}$)を算出した(66)。これは有意でない一回帰モデルの回帰直線の両側に95%信頼曲線を描くことが理論的に可能であるのと同じ意味であろう。すなわち、疫学は確率論を基本に成り立っているので、その確率論で“ $p < 0.05$ ”を統計的“有意”と定義するならば、この考えを無視する立場と言えよう。

以上より、胎児性曝露による非顕性影響の臨界濃度(BMDL)を上述した報告(55, 63-65)の範囲内で眺めると、出生時の母親毛髪水銀濃度で6~14 $\mu\text{g/g}$ となる。今後、個々の研究の妥当性について吟味する必要がある。

7. おわりに

メチル水銀はヒトに有用な生物学的作用を持たない神経毒性物質である(2, 67, 68)。この物質の高濃度曝露により求心性視野狭窄、小脳性失調、構音障害や聴力障害が発生し、また胎児期の高濃度曝露下で生まれた子供に発育、運動機能、神経機能の発達の遅れや著明な知能障害を起こすことは疑いようのない事実である(2, 67-71)。現在わが国が直面している課題は、魚介類を通して体内に取り込まれる魚多食者のメチル水銀レベルで胎児に神経影響が起こり得るかということである。残念ながら、水俣で用いられた臨床神経学的検査は低濃度メチル水銀の曝露影響の評価法としてはあまりに感度が低く、かつ検査者に依存する(46)。また、神経心理・行動学的検査を用いたSeychelles研究とFaroes研究は前述したように結論が対峙したままである。しかしながら、「水銀濃度の高い鯨肉を食べない欧米人にFaroes研究を一般化することはできない」(72)という発言は環境中毒学の本質を揺るがす論理と考えられる。したがって、この課題に処する方法は、日本人を対象とした進行中の研究結果(42, 73)が出るまで結論を先送りするか、あるいはNew Zealand研究など他の研究者の成果(17, 63, 74-78)を加えた文献資料から予防原則(precautionary principle)に照らして取捨選択し(79)、暫定的結論を導くことであろう。

謝 辞

本稿は、日本衛生学会助成ワークショップ「衛生学における生殖毒性・次世代影響研究の現状と展望」(平成13年度ならびに平成14年度総会時)において口演発表した内容に、今日までの新しい知見を加筆しまとめたものである。「生殖次世代影響研究会」として活動の一環であることを付記する。本稿を書くに当たり、有益なご意見を賜りました東北大学大学院教授佐藤 洋先生に心より感謝申し上げます。なお、本研究には環境省の「メチル水銀の低濃度曝露による健康影響に関する調査研究」研究費、厚生労働科学研究費補助金および科学研究費補助金の一部を使用した。

文 献

- (1) Committee on Environment and Natural Resources, Office of Science and Technology Policy and the White House. Report of the Workshop on "Scientific Issues Relevant to Assessment of Health Effects from Exposure to Methylmercury." Research Triangle Park: National Institute of Environmental Health Sciences, 1999.
- (2) National Research Council. Toxicological Effects of Methylmercury. Washington DC: National Academy Press, 2000.
- (3) 村田勝敬, 仲井邦彦, 佐藤 洋. メチル水銀と健康問題—未来. 環境科学会誌 2004; 17: 191-198.
- (4) 秋葉澄伯, 安藤哲夫. 魚多食集団における有機汚染—セイシェル, ニュージーランド. 公衆衛生 1995; 59: 317-320.
- (5) 荒記俊一, 村田勝敬. 魚多食集団における有機水銀汚染—フェロー諸島. 公衆衛生 1995; 59: 321-324.
- (6) 村田勝敬, 巖石美和子. 胎児性メチル水銀曝露による小児神経発達影響—Faroe 研究を中心に—. 日衛誌 2002; 57: 564-570.
- (7) 岡 知子, 仲井邦彦, 亀尾聡美, 佐藤 洋. セイシェル共和国における水銀と健康の問題. 環境科学会誌 2004; 17: 163-168.
- (8) 村田勝敬, 巖石美和子, 岩田豊人. フェロー諸島における出生コホート研究. 環境科学会誌 2004; 17: 169-180.
- (9) Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Needham L, Choi A, Wang Y, Berlin M, Clarkson TW. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. JAMA 1998; 280: 701-707.
- (10) Grandjean P, Weihe P, Jørgensen PJ, Clarkson T, Cernichiari E, Viderø T. Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium, and lead. Arch Environ Health 1992; 47: 185-195.
- (11) Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. Neurotoxicol Teratol 1997; 19: 417-428.
- (12) Murata K, Weihe P, Araki S, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. Neurotoxicol Teratol 1999; 21: 471-472.
- (13) Sørensen N, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. Epidemiology 1999; 10: 370-375.
- (14) Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, Debes F, Murata K, Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxins. Neurotoxicol Teratol 2001; 23: 305-317.
- (15) Marsh DO, Clarkson TW, Cox C, Myers GJ, Amin-Zaki L, Al-Tikriti S. Fetal methylmercury poisoning: relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. Arch Neurol 1987; 44: 1017-1022.
- (16) Cox C, Clarkson TW, Marsh DO, Amin-Zaki L, Tikriti S, Myers GG. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. Environ Res 1989; 49: 318-332.
- (17) Kjellström T, Kennedy P, Wallis S. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2, interviews and psychological tests at age 6 (Report 3642). Stockholm: National Swedish Environmental Protection Board, 1989.
- (18) Myers GJ, Marsh DO, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Tanner M, Choi A, Cernichiari E, Choisy O, Clarkson TW. Main neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: outcome at six months. Neurotoxicology 1995; 16: 653-664.
- (19) Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. Lancet 2003; 361: 1686-1692.
- (20) Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, Jørgensen PJ, Weihe P, Keiding N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. Environ Res 2004; 95: 385-393.
- (21) Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. Tohoku J Exp Med 2003; 199: 161-169.
- (22) Iwasaki Y, Sakamoto M, Nakai K, Oka T, Dakeishi M, Iwata T, Satoh H, Murata K. Estimation of daily mercury intake from seafood in Japanese women: Akita cross-sectional study. Tohoku J Exp Med 2003; 200: 67-73.
- (23) Grandjean P, Budtz-Jørgensen E, White RF, Jørgensen PJ, Weihe P, Debes F, Keiding N. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in 7-year-old children. Am J Epidemiol 1999; 150: 301-305.
- (24) Grandjean P, Jørgensen PJ, Weihe P. Validity of mercury exposure biomarkers. In: Wilson SH, Suk WA eds. Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives. Boca Raton: CRC Press/Lewis Publishers, 2002; 235-247.
- (25) Smith JC, Farris FF. Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 137: 245-252.
- (26) Grandjean P, White RF, Weihe P, Jørgensen PJ. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. Ambul Pediatr 2003; 3: 18-23.
- (27) Budtz-Jørgensen E, Keiding N, Grandjean P, Weihe P, White RF. Consequences of exposure measurement error for confounder identification in environmental epidemiology. Stat Med 2003; 22: 3089-3100.

- (28) Grandjean P, White RF, Weihe P. Evidence of developmental methylmercury toxicity. In: Abstract of 6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Minamata: National Institute for Minamata Disease, 2001; 233.
- (29) Budtz-Jørgensen E, Keiding N, Grandjean P, Weihe P. Estimation of health effects of prenatal methylmercury exposure using structural equation models. *Environ Health* 2002; 1: 2.
- (30) Grandjean P, Bjerve KS, Weihe P, Steuerwald U. Birth-weight in a fishing community: significance of essential fatty acids and marine food contaminants. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1272-1278.
- (31) Davidson PW, Myers GJ, Shamlaye C, Cox C, Gao P, Axtell C, Morris D, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Choi A, Palumbo D, Clarkson TW. Association between prenatal exposure to methylmercury and developmental outcomes in Seychellois children: effect modification by social and environmental factors. *Neurotoxicology* 1999; 20: 833-841.
- (32) Davidson PW, Palumbo D, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Wilding GE, Clarkson TW. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children from the pilot cohort at 108 months following prenatal exposure to methylmercury from a maternal fish diet. *Environ Res* 2000; 84: 1-11.
- (33) Myers GJ, Davidson PW, Palumbo D, Shamlaye C, Cox C, Cernichiari E, Clarkson TW. Secondary analysis from the Seychelles child development study: the child behavior checklist. *Environ Res* 2000; 84: 12-19.
- (34) Axtell CD, Cox C, Myers GJ, Davidson PW, Choi AL, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Shamlaye CF, Clarkson TW. Association between methylmercury exposure from fish consumption and child development at five and a half years of age in the Seychelles child development study: an evaluation of nonlinear relationships. *Environ Res* 2000; 84: 71-80.
- (35) Palumbo DR, Cox C, Davidson PW, Myers GJ, Choi A, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Clarkson TW. Association between prenatal exposure to methylmercury and cognitive functioning in Seychellois children: a reanalysis of the MaCarthy scales of children's ability from the main cohort study. *Environ Res* 2000; 84: 81-88.
- (36) Huang LS, Cox C, Wilding GE, Myers GJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Clarkson TW. Using measurement error models to assess effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure in the Seychelles child development study. *Environ Res* 2003; 93: 115-122.
- (37) Huang LS, Cox C, Myers GJ, Davidson PW, Cernichiari E, Shamlaye CF, Sloane-Reeves J, Clarkson TW. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles child development study nine-year data using semiparametric additive models. *Environ Res* 2005; 97: 100-108.
- (38) Grandjean P, White RF, Debes F, Weihe P, Letz R. NES2 continuous performance test results obtained by methylmercury-exposed children at ages 7 and 14 years. In: Abstract Book of 8th International Symposium: Neurobehavioral Methods and Effects in Occupational and Environmental Health. Brescia: Institute of Occupational Health and Industrial Hygiene, University of Brescia, 2002 (June 23-26); 136.
- (39) Murata K, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr* 2004; 144: 177-183.
- (40) 浜田陸三, 吉田義弘, 桑野麗雄, 三嶋 功, 井形昭弘. 胎児性有機水銀中毒における聴性脳幹反応の検討. *神経内科* 1982; 16: 283-285.
- (41) Counter SA. Neurophysiological anomalies in brainstem responses of mercury-exposed children of Andean gold miners. *J Occup Environ Med* 2003; 45: 87-95.
- (42) Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Weihe P, Dakeishi M, Iwata T, Liu X-J, Ohno T, Kurosawa T, Kamiya K, Satoh H. Effects of methylmercury on neurodevelopment in Japanese children in relation to the Madeiran study. *Int Arch Occup Environ Health* (in press).
- (43) Grandjean P, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr* 2004; 144: 169-176.
- (44) Keiding N, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure in the Seychelles. *Lancet* 2003; 362: 664-665.
- (45) Myers G, Cox C, Davidson PW, Huang L-S, Clarkson TW. Authors' reply. *Lancet* 2003; 362: 665.
- (46) Grandjean P, Cordier S, Kjellström T, Weihe P, Budtz-Jørgensen E. Health effects and risk assessments. In: Pirrone N, Mahaffey KR eds. *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales*. Mechelen: Kluwer (in press).
- (47) Murata K, Weihe P, Renzoni A, Debes F, Vasconcelos R, Zino F, Araki S, Jørgensen PJ, White RF, Grandjean P. Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 343-348.
- (48) Weihe P, Hansen JC, Murata K, Debes F, Jørgensen P, Steuerwald U, White RF, Grandjean P. Neurobehavioral performance of Inuit children with increased prenatal exposure to methylmercury. *Int J Circumpolar Health* 2002; 61: 41-49.
- (49) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Mercury. US Department of Health and Human Services, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>, 1999.
- (50) Crump K. A new method for determining allowable daily intakes. *Fund Appl Toxicol* 1984; 4: 854-871.
- (51) Crump KS. Calculation of benchmark doses from continuous data. *Risk Anal* 1995; 15: 79-89.
- (52) Crump K. Critical issues in benchmark calculations from continuous data. *Crit Rev Toxicol* 2002; 32: 133-153.
- (53) Budtz-Jørgensen E, Keiding N, Grandjean P. Benchmark dose calculation from epidemiological data. *Biometrics*

- 2001; 57: 698-706.
- (54) Filipsson AF, Sand S, Nilsson J, Victorin K. The benchmark dose method—review of available models, and recommendations for application in health risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 505-542.
- (55) Murata K, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Benchmark dose calculations for methylmercury-associated delays on evoked potential latencies in two cohorts of children. *Risk Anal* 2002; 22: 465-474.
- (56) Murata K, Sakai T, Morita Y, Iwata T, Dakeishi M. Critical dose of lead affecting δ -aminolevulinic acid levels. *J Occup Health* 2003; 45: 209-214.
- (57) Dakeishi M, Iwata T, Ishii N, Murata K. Effects of alcohol consumption on hepatocellular injury in Japanese men. *Tohoku J Exp Med* 2004; 202: 31-39.
- (58) Mutti A, Smargiassi A. Selective vulnerability of dopaminergic systems to industrial chemicals: risk assessment of related neuroendocrine changes. *Toxicol Ind Health* 1998; 14: 311-323.
- (59) National Center for Environmental Assessment. Benchmark Dose Software. US Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/ncea/bmds.htm>, 2004.
- (60) Senoh H, Katagiri T, Arito H, Nishizawa T, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Toxicity due to 2- and 13-wk inhalation exposures of rats and mice to *N, N*-dimethylformamide. *J Occup Health* 2003; 45: 365-375.
- (61) Umeda Y, Matsumoto M, Yamazaki K, Ohnishi M, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats administered vinyl acetate monomer in drinking water. *J Occup Health* 2004; 46: 87-99.
- (62) Crump KS, Viren J, Silvers A, Clewell H III, Gearhart J, Shipp A. Reanalysis of dose-response data from the Iraqi methylmercury poisoning episode. *Risk Anal* 1995; 15: 523-532.
- (63) Crump KS, Kjellström T, Shipp AM, Silvers A, Stewart A. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. *Risk Anal* 1998; 18: 701-713.
- (64) Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, Keiding N, White RF, Weihe P. Benchmark dose calculations of methylmercury-associated neurobehavioural deficits. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 193-199.
- (65) Budtz-Jørgensen E, Keiding N, Grandjean P. Effects of exposure imprecision on estimation of the benchmark dose. *Risk Anal* (in press).
- (66) Crump KS, van Landingham C, Shamlaye C, Cox C, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW. Benchmark concentrations for methylmercury obtained from the Seychelles child development study. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 257-263.
- (67) International Programme on Chemical Safety. Methylmercury (Environmental Health Criteria 101). Geneva: World Health Organisation, 1990.
- (68) United Nations Environmental Programme Chemicals. Global Mercury Assessment. Geneva: UNEP Chemicals, 2002.
- (69) Kurland LT, Faro SN, Siedler H. Minamata disease: the outbreak of neurologic disorder in Minamata, Japan and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurol* 1959; 1: 370-395.
- (70) Tokuomi H, Uchino M, Imamura S, Yamanaga H, Nakanishi R, Ideta T. Minamata disease (organic mercury poisoning): neuroradiologic and electrophysiologic studies. *Neurology* 1982; 32: 1369-1375.
- (71) Igata A. Epidemiology and clinical features of Minamata disease. *Environ Res* 1993; 63: 157-169.
- (72) Tibbetts J. Methylmercury and children's heart function. *Environ Health Perspect* 2004; 112: A870.
- (73) Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, Hosokawa T, Sakai T, Nakamura T, Saito Y, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. The Tohoku study of child development: a cohort study of effects of perinatal exposures to methylmercury and environmentally persistent organic pollutants on neurobehavioral development in Japanese children. *Tohoku J Exp Med* 2004; 202: 227-237.
- (74) McKeown-Eyssen GE, Ruedy J, Neims A. Methyl mercury exposure in northern Quebec. II. Neurologic findings in children. *Am J Epidemiol* 1983; 118: 470-479.
- (75) Marsh DO, Turner MD, Smith JC, Allen P, Richdale N. Fetal methylmercury study in a Peruvian fish-eating population. *Neurotoxicology* 1995; 16: 717-726.
- (76) Grandjean P, White RF, Nielsen A, Cleary D, de Oliveira Santos EC. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 587-591.
- (77) Murata K, Weihe P, Renzoni A, Debes F, Vasconcelos R, Zino F, Araki S, Jørgensen PJ, White RF, Grandjean P. Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 343-348.
- (78) Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, Josse D, White R, Amiel-Tison C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res* 2002; 89: 1-11.
- (79) Grandjean P, Soffritti M, Minardi F, Brazier JV (eds). The precautionary principle: implications for research and prevention in environmental and occupational health. *Eur J Oncol* 2003; Suppl 2: 1-248.