

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

POPs のリスク評価にむけてのヒト曝露長期モニタリングのための  
試料バンクの創設に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小泉 昭夫

平成17(2005)年 4月

目次

I. 総括研究報告書

POPs のリスク評価にむけてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンクの創設に関する研究

小泉昭夫 ----- 1

II. 分担研究報告書

1) 試料の収集と系統的整備

課題1—試料バンクの現状分析と整備に関する研究

吉永侃夫・小泉昭夫----- 12

課題2—本プロジェクトでの新たな試料の収集—平成16年度の収集状況

1) 新たな試料の採取に関する研究-秋田県での採取

村田勝敬 ----- 17

2) 新たな試料の採取に関する研究-宮城県での採取およびメチル水銀ハイ  
リスク地域での曝露追跡調査に関する研究

渡辺孝男 ----- 23

3) 新たな試料の採取に関する研究-関東地方での採取

大前和幸 ----- 29

4) 新たな試料の採取に関する研究-岐阜県での採取

竹中勝信 ----- 32

5) 新たな試料の採取に関する研究-福井県での採取

日下幸則----- 35

6) 新たな試料の採取に関する研究-追跡調査が必要な試料の採取

小泉昭夫・吉永侃夫----- 38

7) 新たな試料の採取に関する研究-大阪市での採取

伊達ちぐさ----- 43

8) 新たな試料の採取に関する研究-兵庫県での採取

和田安彦----- 48

9) 新たな試料の採取に関する研究-和歌山県での採取

竹下達也----- 53

10) 新たな試料の採取に関する研究-高知県での採取

甲田茂樹----- 58

11) 新たな試料の採取に関する研究-山口県での採取

廣澤巖夫----- 61

12) 新たな試料の採取に関する研究-沖縄県での採取 等々力英美-----	64
II] 試料バンクのソフトインフラ整備と運用試用	
課題3-試料に関するソフトインフラおよび倫理事項に関する研究 小泉昭夫・吉永侃夫-----	67
課題4-試料バンクの運用試用に関する研究 小泉昭夫・吉永侃夫-----	78
III] 試料バンクの有用性の検証	
課題5-既存の難分解性化学物質の曝露の経年変化	
1) 食事中および血清中ポリ塩素化ジフェニルの経年的調査についての研究 小泉昭夫-----	90
2) 母乳中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)の分析 小泉昭夫-----	96
3) 少量試料を用いたヒト血液試料および食事試料中の残留性有機汚染物質として のポリ塩素化ジフェニル(PCBs)の分析法の開発 藤峰慶徳-----	108
4) 微量な母乳試料に対するポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)の分析法に 関する研究 太田壮一-----	118
5) 食事試料のメチル水銀の分析に関する研究 蜂谷紀之-----	124
課題6-新たな難分解性化学物質-Perfluorooctane sulfonate (PFOS) およびPerfluorooctanoic acid (PFOA)の経年変化、分析法、処理法の開発	
1) 難分解性有機フッ素化合物へのヒト曝露に関する研究 小泉昭夫-----	133
2) PFOS及びPFOAの分析法開発 齋藤憲光-----	141
3) PFOS・PFOAの処理方法の検討 藤井滋穂-----	152
課題7-新たな難分解性化学物質-Perfluorooctane sulfonate (PFOS) およびPerfluorooctanoic acid (PFOA)の新たな毒性	

1) 難分解性有機フッ素化合物のカルシウムチャンネルへの影響に関する研究 小泉昭夫 -----	157
2) 難分解性化学物質 PFOS (Perfluorooctane sulfonate) が <i>Paramecium caudatum</i> の K <sup>+</sup> 誘導性後退泳動時間に及ぼす影響に関する研究 小泉昭夫 -----	164
IV] 試料バンクを用いたリスクコミュニケーションの研究 課題 8 - メチル水銀高摂取地域における現状とリスクコミュニケーション 小泉昭夫 -----	169
III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----	199
IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----	別冊添付

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業研究事業）  
総括研究報告書

POPs のリスク評価にむけてのヒト曝露長期モニタリングのための  
試料バンクの創設に関する研究

総括研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授

現在我々は多くの環境汚染物質に曝露されている。特に環境中において難分解性のため生物濃縮を受ける POPs (Persistent organic pollutants) は、化学的に非常に安定であるため新規化合物が次々と産業界に導入される。POPs による健康影響は多くの国民の関心事であり、不安の原因となっている。そのためこれらの化学物質の有害性同定、用量反応関係、曝露評価のプロセスを通しての迅速なリスク評価、リスク管理が望まれている。対象とする化学物質の環境汚染とヒト曝露との関係を把握することは国民の健康衛生上極めて重要であるが、現実には利用可能なデータは限られており、有害性情報が不確実な中で、施策などの意思決定を行わなければならない。こうした現状において、重点的に施策を行うべき物質の選択には、長期的ヒト曝露傾向の評価が重要であり、過去の生体試料および食物の汚染状況を評価できる食事試料からなる試料バンクが早急に必要であると考えられる。このような状況に対応すべくバンクの創設を行った。本年度は昨年度に引き続き、I.試料の収集と系統的整備、II.試料バンクのソフトインフラ整備と運用試用、III.試料バンクの有用性の検証、IV. 試料バンクを用いたリスクコミュニケーション、を行った。

小泉昭夫	京都大学大学院医学研究科・教授
太田壮一	摂南大学薬学部・助教授
大前和幸	慶応大学医学部・教授
日下幸則	福井大学医学部・教授
甲田茂樹	高知大学医学部・教授
齋藤憲光	岩手県環境保健研究センター・部長
竹下達也	和歌山県立医科大学・教授
伊達ちぐさ	武庫川女子大学生生活環境学部・教授
広澤巖夫	関西医療福祉大学・教授
竹中勝信	高山赤十字病院・部長
等々力英美	琉球大学医学部・助教授
蜂谷紀之	国立水俣病総合研究センター・室長

藤井滋穂	京都大学大学院工学研究科・教授
藤峰慶徳	大塚製薬（株）大塚ライフサイエンス事業部・室長
村田勝敬	秋田大学医学部・教授
吉永侃夫	京都大学大学院医学研究科・助教授
渡辺孝男	宮城教育大学・教授
和田安彦	兵庫医科大学・助教授

## I. 試料の収集と系統的整備

### 課題1—試料バンクの現状分析と整備に関する研究

#### A. 研究目的

試料バンクにおける試料は、多くの研究者によりなされることが予想される。また試料バンクの性質からできるだけ標準化された方法で採取・処理・保存され、採取時の適切なプランクの同時保存が望まれる。本年度の試料バンク整備に関する研究の目的は、これらの過程における標準化に焦点をあて検討した。具体的には

- ① 試料バンク採取の手順の標準化
- ② データファイルの標準化
- ③ 試料処理の標準化
- ④ 試料の品質管理

の4項目を中心に検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) 試料採取の手順の標準化

試料収集分担者および班友が採取した試料は、収集者が同意書を保管し連結不可能匿名化の処理を行い、その後、京都大学に送られることになっている。具体的には、血清、全血と母乳試料は京大内の事務局に、食事試料は京都市内の冷凍倉庫に送られる。

##### 2) データファイルの標準化

試料バンクに納められている試料に関するデータファイルは収集地、採取日、または試料の属性を示すもの、さらにそれらを使って測定された各種の測定値を記載したファイルが存在する（15年度分担研究報告書「試料に関するソフトインフラ整備に関する研究」参照）。さらに新しく採取されたものについても一定の情報がデータとして付加されるはずである。この整備状況について検討した。

##### 3) 試料処理の標準化

本プロジェクト開始以降に各地で採取された試料について、採取・保存の標準化を行ってきた。各施設で

- 1) 試料処理方法の統一
  - 2) 試料保存に関する事項の統一
- の2点がそれぞれの採取者で守られているかどうか検討した。

##### 4) 試料の品質管理

難分解性汚染物質の多くは濃度表現として脂質量で補正された値で報告される。しかし、長期の保存により脂質は過酸化を受け変性するため、長期保存後は正しく脂質濃度は測定できない。本研究ではこの点を検討した。

## C. 研究結果

### 1) 試料採取の手順の標準化

全国で集められた検体は、標準的な手順でほぼ 100%集められてきた。血液は主に健診時に参加をお願いする、食事は協力者を得て収集する、母乳は母乳外来受診者をお願いする、という方法が多かった。すべての試料とも決められ手順と方法で採取され、決められた容器に入れられていた。また適切なブランクも同時に採取されていた。

倫理的手続きは文書による説明と文書による同意書の取得が全試料において実施され、100%匿名化されていた。

### 2) データファイルの標準化

試料群をそれぞれ纏めたデータファイルが作成され、保存中の試料の基本的な数量と属性の管理を行えるようになっていた。これらのデータを相互に関連づけるためにマイクロソフトのアクセスを使ってリレショナルデータベースが構築され、この研究が始まる以前に作成された種々の属性、分析結果を必要な時に参照可能なインターフェースとなっている。

また各施設から送付される試料のデータについてはほぼ 100%決められた情報が付加されていた。

### 3) 試料処理の標準化

食事試料は男女、年齢、朝、昼、夕食のいずれかを想定し、購入後、素材、添加物、カロリー等が貼付されておれば資料として別途ファイルに保存されていた。食品はホモジェネートを行う前にそれぞれの素材を秤量して献

立ファイルに記録されていた。ホモジェネートは同時に採取された飲料とともに素材が判別出来なくなるまでブレンダーで均質化して、全重量が記録されていた。これと同時に食事・飲料の代りに水を用いて同一の処理過程を経たもの、空の容器をブランクとして保存されていた。

血液（血清および全血）試料、母乳試料は、記載した方法でそれぞれ処理して所定の容器に保存されていた。

### 4) 試料の品質管理

血清試料では血清中のコレステロールとトリグリセライドから推定した値との比（推定法/重量法）をもとめた。1990 年以前の試料では  $0.90 \pm 0.10$  ( $n=16$ )、1991 年から 2000 年までに集めた試料では、 $0.94 \pm 0.10$  ( $n=10$ )、2000 年以降では  $1.07 \pm 0.15$  ( $n=10$ ) であり、ほぼ推定値と重量法は一致した。しかし、保存期間と比の関係は：比 =  $1.059 - 0.009 \times$  期間 (年) ( $r = 0.468$ ,  $p = 0.0013$ ) で保存期間が長くなると推定値は小さくなる。一方、全血では、1997 年以前の試料のみの検討であるが、比は  $2.61 \pm 0.60$  ( $n=20$ ) であり、Ht を 40% とするとほぼ 1 に近いが、ばらつきが大きい。

## D. 考察

既存の試料および新規試料ともデータの標準化はなされていた。さらに輸送、採取、処理、ブランク同時採取による品質管理もほぼプロトコールどおりであった。

脂質重量については抽出法による測

定に大量の試料が必要なことから、コレステロールおよびトリグリセライドによる脂質含量の推定は、極めて有効な方法と考えられた。ただし、全血試料については適用に注意が必要である。

## 課題2—本プロジェクトでの新たな試料の収集—平成16年度の収集状況

平成17年3月12日現在のバンクが管理している血液・母乳・食事試料の由来別の概数は、血液が血清および全血を含めて26,351検体、母乳が1,391検体、食事が4,197検体である。平成16年度にはメチル水銀など全血試料が測定に適する場合があることから採取に着手した。

各地域で採取された研究班試料のうち、血液（血清＋全血）、母乳提供者の年齢等の属性は表1に示した。

個別分担研究者の採取した試料については分担報告を参照されたい。

## II. 試料バンクのソフトインフラ整備と運用試用

### 課題3—試料に関連するソフトインフラおよび倫理事項に関する研究

#### A. 研究目的

本研究は、市民との対話を通じたバンクのあり方を考えることを目的とした。

#### B. 研究方法と実行

平成16年10月2日に京都でワークショップを行い倫理問題の検討を行った。

## C. ワークショップの結果

1) 研究者の立場：研究者の立場を代表して中西準子氏（産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター・センター長）は、難分解性化学物質の曝露の経年的変化を知ることの重要性を、アマゾンにおける水銀汚染をケースとして示した。

2) 有識者の意見：米本昌平氏（科学技術文明研究所・所長）は、ヒト生体試料コレクションに対する考え方は大きく変り、再整理されようとしている。欧州型の考え方では、個人情報のうち、とくに保護が必要なセンシティブ情報は、第三者による編集や利用を原則禁止とし、明確な本人の同意があった場合にのみ利用可能とした。

ヒト生体試料バンク一般についても、想定外の研究目的で試用する可能性がある以上、社会の側がこれらの研究の意義を理解した上で信頼している必要があり、そのためにも社会との対話は常に不可欠である。これらの将来を考える上で、私財（この場合はヒト生体試料）を公益目的で預託する慈善財団を、運営のモデルとするのが、一つの道である。要するに、目的、運用方針を明確にして、それに賛同した人が預託をして、将来的にどう使われるかをある程度包括同意をする。運営の透明性と報告書作成の監査が保障されれば、20世紀型の非常に厳格な目的外利用の禁止というのは緩めてもいいし、緩めざるを得ないというのが、



いまのゲノムの現状である。この倫理がヒト生体試料にも適用されるという考え方が一般的になった。

3) 市民の立場：、同世代人を意識した「世間よし」と、未来世代を意識した「孫子よし」を念頭に置いた地域づくりなど地域活動を模索することで、サステイナブルな循環型社会形成を進めようとしてきている。こうした地域の取り組みはボランティア活動であり、試料バンクへの協力にも共通する。試料バンクの成果がよりよい地域社会作りに生かされることが必要でありそのためには、地域への還元は必要である。

また、生体試料バンクの重要性は、認識しているつもりだが、生命倫理、個人のプライバシー、子供を含めた人権について、日本ほど人権に関心を持たない社会はないと考えられる。この生体試料バンクも適正な形で管理されていくのか疑問がある。特に成果還元を念頭に置き、社会体制、研究者の対社会への交流等を整備するのが先決だと市民のサイドから思っている。

#### D. 考察

試料バンクの必要性については研究者・市民の双方が重要性を認識している。しかし、その一方個人情報保護についての懸念と、成果の還元が十分できる状況にあるかについて疑問が寄せられている。特に現在、個人情報保護のため、連結不可能匿名化のもとに試料が集められており、個人への測定結果の還元ができない状況にあ

る。さらに、生体試料バンクは基本的に利用目的が試料提供時に明示されず、包括合意にならざるを得ない状況がある。これについても市民の預託という新たな考えを取り入れた展開が必要と考える。

また、市民の研究者に対する疑念の多くは、市民への継続的な接触により払拭可能であると考えられた。

#### 課題4－試料バンクの運用試用に関する研究

##### A. 研究目的

試料バンクの利用を目指し、試験的に運用を行い公的バンクのありようについて検討した。

##### B. 研究方法

###### ① 利用者への呼びかけ

平成15年度にアンケートを行い、全国の研究者に、利用の希望、その場合の研究テーマ、必要な試料の種別と必要な量について問い合わせた。回答を検討し、利用を呼びかけるべき対象を絞り込んだ。

###### ② 利用者への試料の準備

利用者に希望に添うように試料を準備した。

##### C. 研究結果

###### ① 利用者の選定

昨年実施したアンケートの中で、産業技術総合研究所の利用計画が最も試料利用にふさわしいと運営委員会の審議で決定した。

###### ② 試料の提供

研究目的は産業技術総合研究所による包括的大規模シミュレーションの検証であり、時代の代表性のある試料が求められた。そのため、血液、血清、母乳の pooled sample が用いられた。これらの提供はデータベースを用いて行われた。Pooling の作業は手作業によった。

#### D. 考察

希望通りの試料提供が可能であることが実証できた。多くの研究者が Pooled sample を希望しており、適切な Pooling のために、Computer file 上で管理する必要が確認された。

また、利用者の公募に関しては、アンケートなどを通じての広報活動が必要であることが確認された。

### Ⅲ. 試料バンクの有用性の検証

#### 課題 5 - 既存の難分解性化学物質の曝露の経年変化

##### A. 研究目的

昨年度は 1980 年、1995 年の試料を用いて PCBs、PBDEs、メチル水銀の曝露評価を行った。本年度は研究班試料を用いて現在の曝露状況を明らかにし、動向を明らかにした。

##### B. 研究方法

###### ① PCBs

食事試料は秋田県、宮城県、東京都、岐阜県、和歌山県、兵庫県、高知県、沖縄県の試料から無作為にそれぞれ 10 検体、計 80 検体を選定した。

血清試料は秋田県、宮城県、岐阜県、

福井県、和歌山県、兵庫県、高知県、山口県、沖縄県の試料から女性についてそれぞれ 10 検体、計 90 検体を無作為に選定した。

###### ② PBDEs

北海道、秋田県、宮城県、東京都、岐阜県、福井県、兵庫県、和歌山県、山口県、高知県、沖縄県で採取された母乳試料の中からそれぞれ 5 検体計 55 検体を無作為に選んだ。また京都市内の産科病院母乳外来において採取した母乳の中から無作為に選んだ 30 検体と昨年度の分析結果から汚染の増加が懸念された島根県で採取した母乳 20 検体を測定した。計 105 検体を用い、TriBDE#28、TetraBDE#47、PentaBDE#99、PentaBDE#100、HexaBDE#153、HexaBDE#154 を測定した。検出できなかった試料に関しては検出限界の 1/2 の値を用いて解析を行った。

###### ③ メチル水銀

全国 8 地域で採取した食事 80 検体（各 10 検体）でメチル水銀を測定した。採取地および採取日は、秋田県秋田市（2004 年 2 月）、宮城県仙台市（2004 年 2 月）、東京都（2004 年 2 月）、岐阜県高山市（2004 年 10 月）、兵庫県西宮市（2003 年 12 月～2004 年 3 月）、和歌山県和歌山市（2003 年 12 月～2004 年 1 月）、高知県高知市および南国市（2004 年 1～2 月）、沖縄県（2004 年 2 月～3 月）であった。

（倫理面への配慮）

京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会の承認を得て施行し

た。詳細については各分担研究者の報告に記載されている。

## C. 研究結果

### ① PCBs

食事からの摂取量は 63.5ng/day となり、1980年代に 522.8ng/day であったころから急激に減少してきている。これにともない、血清中でも 1980年代で 163.0 ng/g lipid から、86.5ng/g lipid と減少してきている。1990年代に若年者層で特に減少が見られていたが、これは 2000年代でも見られ、20代、30代、40代、50代でそれぞれ 48.7, 84.8, 108.2, 231.1 ng/g lipid となり、年齢が血清中濃度に強く影響することが明らかになった。

### ② PBDEs

105 検体の PBDEs の範囲は 0.11-22.79 ng/g lipid であり、Geometric mean は 1.36 ng/g lipid (median 1.28 ng/g lipid) であった。測定した異性体 (#28、#47、#99、#100、#153、#154、) のうち、総濃度に対する寄与率の高い異性体は、TetraBDE#47(48%)であった。

### ③ メチル水銀

メチル水銀摂取量は、算術平均で 29.4  $\mu$ g/week (幾何平均: 15.0  $\mu$ g/week) であり対厚労省基準では 17.3%、対 JECFA 基準の 36.8%と非常に低い水準を維持していた。

## D. 考察

### ① PCBs

各国の対策により、食事中および血

中の PCBs 濃度は著しく減少していることが確認された。しかし、高齢者においては依然高い値を保ち、年齢が血清中濃度に強く影響することが明らかになった。

### ② PBDEs

米国、カナダ、英国の報告値よりは低値であったが、スウェーデンに匹敵する値であった。全国で地域差があり、秋田県、北海道、岐阜県で高値であった。年齢による相関は認めなかった。しかし、東海らの報告でもあるようにデカ化合物の濃度は高く異性体毎に見てゆく必要があろう。

前回認められた 1995 年の島根県斐川町の汚染は 2003 年には確認されなかった。生物学的半減期からこの 8 年間に減少してきた可能性が考えられる。

### ③ メチル水銀

過去におけるメチル水銀の食事を介する週あたりの摂取量は、1980年では、算術平均で 120.4  $\mu$ g/week (幾何平均: 48.3  $\mu$ g/week)、1995年では、80.5  $\mu$ g/week (幾何平均で 43.4  $\mu$ g/week) と減少してきたが、今回更なる減少が見られた。この原因として前回は蔭膳方式で試料を採取したのに対して今回は購入方式で食事試料を準備した。試料の質の違いによる可能性がまず考えられる。さらに、比較的高濃度に曝露されてきた集団でも観察されたように(リスクコミュニケーション参照)魚の摂取量が減少していることも一つの原因と考えられる。

課題6－新たな難分解性化学物質－  
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)  
および Perfluorooctanoic acid  
(PFOA) の経年変化

A. 研究目的

試料バンクの形成と平行して、近年汚染が拡大していると考えられている難分解性有機フッ素化合物について、

①試料バンクを活用した長期傾向の把握、②処理技術の開発、を行い、試料バンクによる効果的な環境汚染予防行動を取りうることを実証する。

B. 研究方法

① 長期動向

1983年から2003年にかけての長期傾向を明らかにするため、生体試料バンクから京都における血清試料を4年間隔で5時点について男女10名ずつ計100検体を無作為に抽出した。また地理的分布を明らかにするため、秋田、宮城、岐阜、福井、京都、兵庫、山口、高知、沖縄の9地域で居住歴がある、20代から50代の男女各10名、計180名について、生体試料バンクから血清を無作為に抽出した。

② 処理技術の開発

本研究では、PFOS、PFOAの処理方法として吸着処理に着目し、PFOS、PFOAの基本的吸着特性を低濃度レベルで検討した。

C. 研究結果

① 長期動向

京都における血清中PFOA濃度の経

年的傾向調査で、京都においてもPFOAの指数関数的増加が見られ、80年代初めからの指数関数的に増加し続けていた。

これに対して血清中PFOS濃度の経年変化はPFOAに比べれば緩やかなものであった。血清中PFOA・PFOS濃度の地域間での差では秋田県横手市、宮城県大和町、仙台市が低いグループを、京都、兵庫、高知で高いグループを作っていた。PFOAでは京都、兵庫で突出して高い結果となった。

② 処理技術の開発

低濃度PFOS/PFOAの吸着では、活性炭を約2g/L添加した系では、PFOS、PFOAは振とう開始後4時間以内に効率よく吸着した。

D. 考察

わが国において、PFOSの曝露はほぼ1990年代で飽和に達したが、PFOAについては依然関西を中心に汚染が続いている。関西地域での汚染源として、大気粉塵および飲料水が考えられる。

このような現状から、今後のリスク評価の如何では、関西地域での高濃度汚染に対して、汚染軽減のための対策が必要になる事態も想定される。その場合、活性炭による吸着により処理できることが示された。

課題7－新たな難分解性化学物質－  
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)  
Perfluorooctanoic acid (PFOA) の新  
たな毒性

A. 研究目的

PFOS/PFOA は動物実験で多様な生体影響が知られている。発がん性、発達障害、甲状腺機能障害、神経内分泌機能障害などが知られている。

本研究では、これら PFOS/PFOA の断片的な毒性情報に対して、より生物機能に基づいた毒性の探索を行った。その結果、PFOS の  $Ca^{2+}$  Channel への特異的な毒性が見出された。

## B. 研究方法

①ゾウリムシの後退遊泳を用いた神経行動学の影響のスクリーニング

*Paramecium Caudatum* を、“ $K^+$ -rich”液 ( $KCl$ , 20mM ;  $CaCl_2$ , 1mM ; Tris-HCl buffer, 1mM ; pH7.2) に入れると、 $K^+$ 誘導性の後退泳動が観察される。この後退泳動は、T-type  $Ca^{2+}$  channel を介する、 $Ca^{2+}$ コンダクタンスの活性化によることが報告されている。本研究では後退遊泳の延長について検討した。

②ギニアピッグの単離心筋細胞を用いた Patch Clamp による  $Ca$  チャンネルへの影響の評価

体重 300-400g のモルモットから酵素解離法により心室筋細胞を単離した。L 型カルシウム電流の測定では高  $Ca^{2+}$  ピペット液を用い  $Ca^{2+}$  conductance を検討した。

## C. 研究結果

①ゾウリムシの後退遊泳への影響

PFOS は薬理的濃度 ( $9.5 \mu M$ ) ですでに有意に後退遊泳を延長した。PFOA は同じく延長したが濃度ははるかに

高い ( $115.0 \mu M$  ;  $87.2 \pm 28.6$ )。以上から  $Ca^{2+}$  channel への影響が考えられた。

②ギニアピッグの単離心筋細胞の  $Ca^{2+}$  channel への影響

PFOS は活動電位の立ち上がり速度、最大電位、活動電位持続時間をそれぞれ減少させた。これらの作用は、 $1-3 \cdot M$  で認められた。

## D. 考察

PFOS・PFOA の毒性に関して分子レベルでの機能が不明であったが、今回我々は  $Ca^{2+}$  channel に影響を及ぼすことを見出した。 $Ca^{2+}$  channel は、多くの細胞レベルで細胞機能の発現に重要な意味を持っている。作用濃度が非常に低く、特異的に作用するため、今後、PFOS/PFOA の毒性が  $Ca^{2+}$  channel と関連付けて一元的に理解できる可能性が期待される。

## IV. 試料バンクを用いたリスクコミュニケーションの研究

課題 8 -メチル水銀高摂取地域における現状とリスクコミュニケーション

### A. 研究目的

我々が構築しつつある試料バンクに貯蔵されている 1980 年、1995 年に採取された試料を用いてメチル水銀の曝露指標の長期動向を観察した。その結果、予期せぬことに東北地区のサンプリングサイトである宮城県唐桑町の人々において、メチル水銀の高濃度汚染地域として知られている

Seychelles あるいは Faroe 諸島の住民の濃度に匹敵する曝露があることが示唆された。この結果を踏まえ、地域住民とリスクコミュニケーションを試みた。

住民と計測データは連結不可能化されているため個人情報はなく、地域に情報を帰すしかない。そこで我々は、地域とのリスクコミュニケーションを行った。

## B. 研究方法

前回測定した 1980 年、1995 年の血液濃度、食事からの一日摂取量を、地元行政担当者および首長に報告した。1980 年、1995 年の 2 回の測定結果は、試料数が少ないため限界を有している。従ってこの事情を町の行政に説明した。町とのやり取りの中で産業振興課の担当者は風評被害に対して注意して欲しいとのコメントはあったが、町長以下、現在の曝露レベルを知る必要があるとの結論に至った。そこで、平成 16 年 12 月から 17 年 1 月にかけて町と我々が協力し、住民に協力を御願いし、前回参加した地区の住民を中心に毛髪を用いて住民の曝露評価を行うことにした。

## C. 研究結果

前回調査に比べ大きく曝露は減少しておりその原因として魚摂取の減少があることが判明した。今回の参加者は 128 名（男性 51 名、女性 77 名）であり、毛髪水銀濃度から推定された血中濃度は大きく減少していた。しか

し、一部の住民では依然メチル水銀濃度は高い。さらに同時に施行した魚類の頻度別調査により、魚の摂取頻度が高いほど、また、マグロ・カジキの摂取頻度が高いほど明らかに毛髪水銀濃度も高く、用量反応関係が認められた。

## D. 考察

今回の調査でメチル水銀曝露は、1995 年から見ると減少傾向にはあるが依然高い曝露が存在した。この結果は既に町に報告されており、4 月中にメチル水銀についての勉強会の開催と同時に住民個人個人に結果が報告される。

## V. 結論

1. 大よそ、2.7 万の血液検体、1,400 の母乳検体、4,200 の食事検体からなる試料バンクが構築された。
2. 倫理的検討がなされ、市民の不安の外、今後情報の公開と運営の透明性について注意を払うべきことが示された。
3. はじめてバンクを用いた検討が行われた。予想通りバンクは機能した。多くの研究者、地域による差を消し、時代特性を検討するため Pooled samples を使用することが考えられ、それに対応したデータベースの編成を考える必要がある。
4. 試料バンクの有用性の検証プロジェクトで示されたように、汚染物質への曝露モニタリングを経年的行うことは汚染を早期に知るために極め

て有用であることが示された。

5. 試料バンクの試料測定で時に高濃度曝露地域が見出される可能性があり、その場合には、地域へのリスクコミュニケーションが必要であり、それにより地域住民の協力も得ることができる。

## VI. 健康危険情報

なし

## VII. 研究発表

### 1. 論文発表

Koizumi A, Yoshinaga T, Harada K, Inoue K, Morikawa A, Muroi J, Inoue S, Eslami B, Fujii S, Fujimine Y, Hachiya N, Koda S, Kusaka Y, Murata K, Nakatsuka N, Omae K, Saito N, Shimbo S, Takenaka K, Takeshita T, Todoriki H, Wada Y, Watanabe T, Ikeda M: Assessment of human exposure to polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Japan using archived samples from

the early 1980s and mid 1990s Environ Res. In press (Appeared in Available online 22 January 2005)

### 2. 学会発表

Inoue K, Koizumi A, Yoshinaga T, Harada K, Saito N. Establishment of the public sample bank to monitor a long term trend of human exposure to persistent organic pollutants (POPs). 43 rd Annual meeting of Society of Toxicology, Baltimore, 2004

## VIII. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許の取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1. 平成16年度に採取したサンプルの属性

地域	全血		血清		母乳				
	検体数	平均年齢(才)	男/女	検体数	平均年齢(才)	男/女	検体数	平均年齢(才)	平均重量
北海道							32	27.4	23.7
秋田県							67	29.2	23.6
宮城県	203	46.1	151/42	203	46.1	151/42			
東京都	141	40.1	141/0						
岐阜県	454	48.1	273/181	960	42.4	338/572	24	32.7	43.3
福井県							64	30.5	30.9
京都府							136	31.1	11.0
大阪府	26	61.2	0/26	26	61.2	0/26			
兵庫県									
和歌山県	78	49.0	67/11	123	42.0	67/56	187	29.2	16.1
島根県							64	30.3	17.2
高知県	126	38.6	63/63	125	38.6	63/63	140	28.3	22.5
沖縄県	71	35.7	61/10	71	35.7	61/10	23	30.6	23.0
全体	1099	45.1	756/343	1559	41.2	730/829	737	29.7	19.9

(H17年3月15日現在)

分担協力者厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

生体試料バンクの現状分析と整備に関する研究

分担研究者 吉永 侃夫 京都大学大学院助教授  
分担研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授

研究要旨

平成15年度に創設された生体試料バンクは既収集試料を基盤に新規に収集された試料を積み上げる方式で構成されている。試料バンクは採取、処理、保存に多数の研究者が携わっているため、これらのステップには標準化されたプロトコルが必須である。本研究ではⅠ．試料バンク採取の手順の標準化、Ⅱ．データファイルの標準化、Ⅲ．試料処理の標準化、Ⅳ．試料の品質管理の4項目について検討した。

A. 研究目的

平成15年度に設立した難分解性化学物質長期曝露モニタリングのための試料バンクにおける試料は、時間的、空間的広がりの中で採取、処理、保存、供与、分析のそれぞれのステップで数多くの研究者が関与することが予想される。従って測定結果が人為的な理由で変動することを極力避けなければならない。そのためにはできるだけ標準化された方法で採取・処理・保存されることが不可欠であり、人為的な修飾の有無を検討するためには、試料取扱いの各ステップで適切なバンクの同時保存が望まれる。

本年度の「試料バンク整備に関する研究」の目的を、これらの試料の取扱い過程における標準化に焦点をあて検討した。具体的には

- 1) 試料採取の手順の標準化
  - 2) データファイルの標準化
  - 3) 試料処理の標準化
  - 4) 試料の品質管理
- の4項目を中心に検討した。

B. 研究方法

1) 試料採取の手順の標準化

a. 食事試料

食事試料の採取法は陰膳方式と購入方式が主要な方法であり、本バンク設立以前に採取された日本縦断試料と京大試料は陰膳方式で採取されている。陰膳方式は食品の調理プロセスまでの情報が含まれており優れた方式であるが食事の提供者を確保するのに困難を伴う。最近では外食を利用する人の割合が急増してきており、購入方式の有効性が増してきている。本プロジェクトでは、購入方式を採用しており、採取分担者は、20歳代から50歳代の男女を対象者として依頼し、普段食べる食事を想定して食料品店で調理された食事を春秋2回にわたって購入し、その食材の種類と重量を記録する。

一部の試料については陰膳方式で試料を採取し、その場合にはデータファイルにその旨を記録する。

b. 血液・母乳試料

血液・母乳の採取は医療機関や健診機関を受診した人に、本プロジェクトの目的と概要を文書で説明し、同意を



得ることができた人に対して、「京都大学大学院医学研究科・医学部 医の倫理委員会」の承認を得た書式で作成した同意書に氏名、住所、を記入してもらう。採血、採乳方式は通常の採血・採乳方法を実施していることを確認したうえで、実施した医療機関、健診機関の方式に従い、その時使用した同一の採取器具をブランクとして保存する。

採取分担者は採取地点で試料を匿名化し、記号（S：血清、B：全血、M：母乳－採取者－採取者ごとの通し番号、例 S－小泉－123）をつけて、後述の処理を施す。また、試料の記号、採取地点、採取年月日、性別、年齢、最長居住地、職業を記入した匿名化データファイルを作成する。

採取された試料は同意書を採取分担者の手許に保管し、血清・全血と母乳試料は京都大学内の研究班事務局に、食事試料は京都市内の冷凍倉庫に送られ、データファイルは研究班事務局に送付される。送付された試料についてバンク事務局でデータファイルに記載項目の漏れと、試料との対応、匿名化が為されているかを点検の上、内容物の重量を測定し、データベースに追加する。

本研究ではバンクに送付された試料とデータファイルについて、事務局側で指定した方式で試料収集が行われているか、倫理面について問題がないかを検討した。

## 2) データファイルの標準化

本試料バンクでは試料は食事(F)、全血(B)、血清(S)、母乳(M)別に分類され（F－研究班、B－研究班、S－研究班、M－研究班：データファイル）通し番号を付けられる。これら新規採取の試料については4種の試料のデータファイルが支柱である。既存試料につ

いては試料の収集、または試料の属性を示すもの、さらにそれらを使って測定された各種の詳細な測定値を記載したファイルが存在する（15年度分担研究報告書「試料に関するソフトインフラ整備に関する研究」参照）。これら4種類の研究班データファイルと既存試料のデータファイル（全国縦断試料データファイル、京都試料データファイル、京大試料データファイル）にはこれらの試料を使って測定を行った日時、測定項目と使用量、測定結果が付記される。また、保存中の試料相互の属性の関連等を参照し、管理するためにマイクロソフトのアクセスを使ってリレーショナルデータベースが構築されている。また、研究プロジェクト毎に、バンクから抽出して使用した試料番号と使用量、測定項目、測定結果をまとめたファイルも作成される。これらデータファイル、データベースに新たな移動があった場合にその情報が記載されているかを含めて整備状況について検討した。

## 3) 試料処理の標準化

本バンク創設以降に各地で採取された試料について、採取・保存の標準化を行ってきた。

### a. 試料処理方法の統一

①食事試料は購入の場合にはその食事が20歳代から50歳代のどの年代の、男性または女性の、食事として購入したか、および収集した食品の献立、食材の種類と重量をデータファイルに記入する。食品に貼付されている食材の種類と産地、添加物、重量、カロリー、製造元等の表示シールが存在すればこれをはがし、別の台紙に貼って食事資料としてまとめてバンク事務局に送付する。

食品は食事の際に飲む飲料と混合してホモジナイザーでペースト状と

なるまで均質化して規定の容器に入れる。内容物の重量を測定して記録する。

食事・飲料と同量の蒸留水で同一の処理を行い、それぞれ規定の容器に入れてブランクとしてバンクに送付する。

②血液は今年度から全血と、血清に分けて保存する。

それぞれの機関の方式で採取された血液は2mlをEDTA（凝血防止剤）入のチューブで処理し、それをバンク指定の容器に入れ換える。残りの血液は血清分離管または遠心法で血清を分離しバンク指定の2mlの容器に分注する。

③各機関の採乳法で採取した母乳はバンク指定の容器に移す。

食事、血液、母乳のそれぞれの容器には前述の形式（例：M-小泉-234）のラベルをレーザープリンターでプリントアウトして、適当なサイズに切り取ったものをスプレー糊（3M-555）で容器に貼り付け、その上をメンディングテープ（スコッチ）で覆う。

#### b. 試料保存に関する事項の統一

試料はいずれも-20℃の冷凍保存が原則である。分担者によって採取された試料は冷凍便でバンクに送付コンテナに収納されて冷凍保存されている。全国縦断試料の血液は8mlのポリエチレン容器に入れられ、採取年代と地域毎に通し番号順に試験管立てに納め、それをデータファイルの番号（B-班-○）を付したコンテナに入れて保存している。それ以外の血液試料は2mlのポリエチレン製バイアルに、採取地域、採取年月日毎に採集者の名前とラック通し番号（S-小泉-○）を振った100本入りラックに収納しコンテナに入れて冷凍保存している。

試料採取分担者が試料処理を標準化したプロトコルに従って処理し、保存し、バンクへ送付しているかを検討した。バンク到着以降の処理、保存は共通のプロトコルに従って処理している。

#### 4) 試料の品質管理

難分解性の汚染物質の多くは濃度表現として脂質量で補正された値で報告される。しかし、長期の保存により脂質は過酸化を受け変性するため、長期保存後は正しく脂質濃度を測定できない。

脂質量を測定する方法は有機溶剤で脂質を抽出し、重量法で測定するのが一般的である。この方法は被測定物質をかなり大量に必要とし、食事試料の様に試料量が比較的少量にある場合は適用できるが血液試料の場合には貴重な試料を浪費することになる。そこで、重量法による脂質測定に代え、試料消費量を最小限にするためにコレステロールとトリグリセライドをレフロトロンを用いて酵素的に測定することで総脂質量として換算した。測定値を試料の属性としてデータベースに記載する。

この方法で測定し総脂質として換算した値が標準測定法として認知されている重量法と比較して妥当な値を示すかどうか、また今年度から始めた血清のレフロトロンによる測定に意義があるかどうかを判定する。

#### C. 研究結果

##### 1) 試料採取の手順の標準化：

###### a. 食事試料

収集された食事試料は90%以上がコンビニエンスストアまたはスーパーマーケットを通じた購入方式であった。普段食べる食事として購入した人の年齢、性別が匿名化されたデータ

として付随していた。陰膳方式で採取した食事は、平成15年および16年度を通じて秋田、大阪および和歌山で採取されたものであり、合計146検体であった。

#### b. 血液試料

医療機関や健診機関での採取されたものが大部分であった。今年度開始した全血は血清試料と対になっている。協力機関の業務の都合上、全血の分別が不可能な岐阜の一部では血清のみの試料もあった。

#### c. 母乳試料

母乳試料は20mlを標準としていたが地域によって多少の差があった。母乳外来受診者に残余を指定した容器に入れて頂く方式でおこなっていた。

d. 全国で集められた検体は、血液、食事、母乳試料とも決められ手順と方法で採取されていた。また適切なブランクも同時に採取されていた。

特別な追跡調査で結果を対象者に返す研究（メチル水銀の高摂取地域におけるリスクコミュニケーションを行う研究—結果の返却を希望した地方行政担当者の意見に従い連結可能匿名化とした）以外の、全試料は、連結不可能匿名化されており文書による同意書が採取分担者に管理されていた。

今年度から指定した試料容器に貼付するラベルの作成は大部分の分担者が実行してくれていた。

#### 2) データファイルの標準化

各施設から送付される試料のデータについてはほぼ100%決められた情報が付加されていたが、一部職業欄に空白がみられた。

試料群をそれぞれ纏めたデータファイル（研究班データファイル）が作成され、保存中の試料の基本的な数量と属性の管理を行えるようになってい

た。各測定プロジェクト毎に試料の選択、使用量、処理法、測定結果をまとめたファイルが作成されていた。

これらのデータを相互に関連づけるためにマイクロソフトのアクセスを使ってリレイショナルデータベースが構築され、この研究が始まる以前に作成された種々の属性、分析結果を必要な時に参照可能となっている。

#### 3) 試料処理の標準化

##### a. 食事試料

食事試料は、購入後、素材、添加物、カロリー等の表示シールが貼付されておれば資料として別途ファイルに保存されていた。食品はホモジェネートを行う前にそれぞれの素材を秤量して献立ファイルに記録されていた。ホモジェネートは同時に採取された飲料とともに素材が判断出来なくなるまでブレンダーで均質化して、全重量が記録されていた。

これと同時に食事・飲料の代わりに水を用いて同一の処理過程を経たもの、空の容器をブランクとして保存されていた。

##### b. 血液（血清および全血）・母乳試料

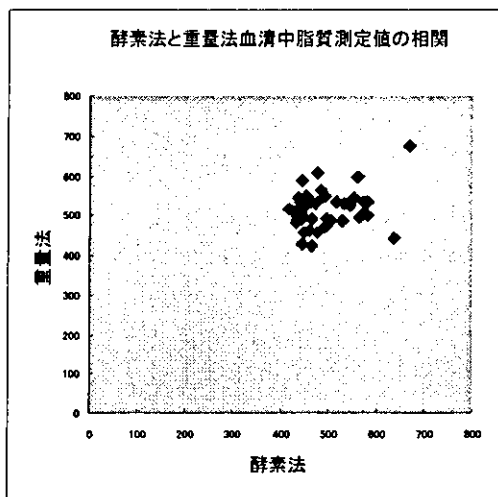
血液（血清および全血）・母乳試料は、記載した方法でそれぞれ処理されており、また所定の容器に保存されていた。

#### 4) 試料の品質管理

2003年以降の血清試料について既に測定値の存在する検体以外（1,742検体）についてレフロトロンを用いてコレステロールとトリグリセライドの値の測定を行い、データベースに記載した。全国縦断試料は採取時に詳細な生化学的検査を行っているのでそのファイルを参照することができた。

レフロトロンを用いた酵素法と重量法による血清試料中の脂質重量の相

関を下図に示した。



また、血清試料では血清中のコレステロールとトリグリセライドから推定した値の比（推定法/重量法）を求めた。1990年以前の試料では  $0.90 \pm 0.10$  ( $n=16$ )、1991年から2000年までに集めた試料では、 $0.94 \pm 0.10$  ( $n=10$ )、2000年以降では  $1.07 \pm 0.15$  ( $n=10$ ) であり、ほぼ推定値と重量法は一致した。しかし、保存期間と比の関係は：比 =  $1.059 - 0.009 \times$  期間 (年) ( $r = 0.468$ ,  $p = 0.0013$ ) で保存期間が長くなると推定値は小さくなる。一方、全血では、1997年以前の試料のみの検討であるが、比は  $2.61 \pm 0.60$  ( $n=20$ ) であり、Htを40%とするとほぼ1に近い。

#### D. 考察

新規採取試料における匿名化は100%なされており、リスクコミュニケーションのために個人への結果の返却を行政から依頼された一地域の連結可能匿名化を除いては、すべての試料が連結不可能匿名化されていた。

既存の試料および新規試料ともデータの標準化はなされている。さらに輸送、採取、処理、ブランク同時採取に

よる品質管理もほぼプロトコルどおりであった。データファイルの一部に職業欄の空白がみられたが、ボランティアとして提供して頂いているので、属性の全欄記入は強制できない。

脂質重量については抽出法による測定が大量の試料が必要なことから、コレステロールおよびトリグリセライドによる脂質含量の推定は、極めて有効な方法と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表・その他

第75回 日本衛生学会総会、2005年3月27-30日

難分解生化学物質を対象とした生体試料バンクの創設に関する研究

吉永侃夫、原田浩二、井上佳代子、森川亜紀子、Eslami Bita、井上純子、湯木知史、研究班グループ、小泉昭夫  
第44回 近畿産業衛生学会、2004年11月6日

難分解生化学物質を対象とした生体試料バンクの創設に関する研究

吉永侃夫、原田浩二、井上佳代子、森川亜紀子、Eslami Bita、井上純子生体バンク研究班グループ、新保慎一郎、池田正之、小泉昭夫

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし