

200501027A

厚生労働科学研究費補助預金

食品の安心・安全確保推進研究事業

研究課題名：カドミウムを含む食品の安全性に関する研究

課題番号：H16-食品-004

研究報告書

平成17年度

研究代表者 香山不二雄

自治医科大学 地域医療学センター 環境医学部門

## 研究組織

研究代表者：香山不二雄 自治医科大学 地域医療学センター 環境医学部門 教授

分担研究者：堀口兵剛 自治医科大学 地域医療学センター 環境医学部門 助教授

宇野 秀之 自治医科大学 地域医療学センター 環境医学部門 助手

佐々木 敏 (独) 国立健康栄養研究所健康増進・人間栄養学研究系 リーダ

中井 里史 横浜国立大学大学院環境情報研究院 環境疫学 教授

池田 正之 財) 京都工場保健会 理事・産業医学研究所長

## 目次

平成17年度研究総括	香山不二雄	-----	1
Cd曝露を受けた集団並びにCd腎症患者、イタイイタイ病患者における ESR2遺伝子のSNP解析	堀口兵剛、香山不二雄	-----	4
モンテカルロ・シミュレーションによる日本人の カドミウム体内負荷量推計	中井 里史	-----	25
尿中各種金属濃度と尿細管機能障害指標の関連に関する研究	池田 正之	-----	51

## 平成17年度研究総括

研究代表者: : 香山不二雄

### 研究目的

1. 骨粗鬆症と関連のある遺伝子の SNPs について、全国8カ所の被験者約 2,000 名について解析を行い、骨密度の低下とカドミウムの影響の有無について解析を進める。さらに、イタイイタイ病患者およびカドミウム腎症患者でも同様に、骨粗鬆症と関連のある遺伝子の SNPs について解析を行い、個人の遺伝的素因と骨密度の低下に、カドミウムがどのような影響を与えているか解析する。
2. これまで、国民栄養調査結果などをもとに、モンテカルロ・シミュレーションを利用した日本人のカドミウム曝露量を推計してきた。しかし、健康影響を考慮する場合は、曝露量のみならず、負荷量も検討する必要がある。そのため、シングルコンパートメントモデルを利用し、またこれまで検討してきた推計曝露量推計をもとに、体内負荷量に関する推計シミュレーションを行う。
3. カドミウム以外の Mg、Ca、Zn、Mn、Ni、Co、Cu などの尿中各種金属濃度が尿中  $\alpha$  1-MG、 $\beta$  2-MG 濃度に影響を及ぼすか否かについて検討する。

### 研究方法

1. 全国 8 カ所の被験者の中から骨粗鬆症に関連性のある遺伝子多型について遺伝子解析の同意が得られている被験者の血液から抽出した DNA を用い、Sequence Specific Primer-Single Molecule Fluorescence Detection (SSP-SMFD)法を用いて、ER2の19SNPsについて解析を行った。また、これまで富山大学医学部病理学教室に保管されていたイタイイタイ病患者およびカドミウム腎症患者の DNA について、同様に ER2の19SNPsについて解析を行った。
2. 食品摂取量は、国民栄養調査のうち平成7年から平成12年までの6年間の結果を利用し、栄養摂取状況調査結果データを用いた。20歳以上の成人男女のうち妊娠している者を除いた約5万3千名のデータを体重1kg当たり1週間の摂取量に換算して検討対象とした。食品中の Cd 濃度については、農林水産省による農作物等に含まれるカドミウムの実態調査<sup>2)</sup>の各データを用いた。

本研究では、カドミウムに汚染された食物の摂取に由来するヒトの生涯にわたるカドミウム類の体内負荷量をシミュレーションするためのモデルを構築した。カドミウム類の排

出半減期が数十年単位あることから、カドミウムは問題の量が排出される前に体内器官と組織との間で平衡に達しているものと推測し、シングルコンパートメントモデルとして表現した。今回は全てのカドミウムが腎に蓄積されるという仮定を行った。よって本研究では、腎中濃度が体内負荷量に相当するとして検討を行うこととした。そして、腎の比重を1とし、また腎重量と体重が比例関係にあると仮定して年齢別の腎重量を推定した。

3. 2000—2004年に全国11箇所のCd非曝露地区在住成人女性より提供を受け凍結保存している約13,000の尿検体の中から1,000検体を一定の条件で選定して、ICPにて上記金属濃度を測定した。

## 結果と考察

1. 全被験者の中で遺伝子解析の同意の得られた血液サンプルは、約2,000検体について骨粗鬆症に関連のある遺伝子を解析した。その中でも骨密度の維持にエストロゲンが非常に重要な要因であり、さらに骨梁に多く存在するエストロゲン・レセプター $\beta$ の19SNPsについて解析を行い、17のSNPsについては測定が終了した。現在、解析途中であるが、九州、近畿、北関東、南東北、北東北、北陸で17のSNPsの頻度に大きな差はないことが明らかとなった。また、6つSNPsと6つSNPsとの2つの大きなハプロタイプ・ブロックが存在することが明らかとなった。さらに、骨密度および生活習慣などの解析を進めている。

2. ここでは腎中濃度を体内負荷量として取り上げた。曝露量推計と同じシナリオで実施したシミュレーションにおいては若干の違いが認められていたものの、平均値ベースで考える限り、各年齢層での体内負荷量には、全般的には大きな違いは認められなかった。

3.  $\alpha$ 1-MG・ $\beta$ 2-MG(対数)を従属変数、年齢(真数)および8金属(対数)を独立変数として重回帰分析を行ったところ、クレアチニン補正の有無にかかわらず、Cuは $\alpha$ 1-MG・ $\beta$ 2-MGの最も強い決定因子であり、Cdは $\alpha$ 1-MGに対しては2位又は3位を占めたが、 $\beta$ 2-MGに対しては4から9位の影響力しか示さなかった。

## 結論

1. エストロゲン・レセプター $\beta$ の既知の17SNPsを解析した結果、現在の地域差はほとんどなく、17のSNPsは2つの大きなハプロタイプの群に分けられることが明らかとなった。さらに、骨密度との関係を精査する。

2. 各年齢層での体内負荷量には、全般的には大きな違いは認められなかった。今後は、20歳未満の曝露量に対する仮定などをはじめ、シナリオの選定、およびシミュレーションを実施する元となるデータに対する検討を行う必要がある。

3. カドミウムの曝露の低い集団検診で集められた尿中 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MGとも、Cuが最も強い決定要因であり、カドミウムはむしろ弱い影響しか示さなかった。

## Cd 曝露を受けた集団並びに Cd 腎症患者、イタイイタイ病患者における ESR2 遺伝子の SNP 解析

研究代表者：香山不二雄	自治医科大学
研究協力者：堀口兵剛	同上
小熊悦子	同上
宇野 秀之	同上
佐々木 敏	国立健康・栄養研究所

### 1. 背景と目的

カドミウム (Cd) は人体に蓄積すると腎機能障害、骨軟化症、貧血等を引き起こす毒性重金属である。富山県神通川流域は Cd の高濃度汚染地域であり、この地域の住民は Cd に汚染された水や農作物の摂取を通して高度の Cd 曝露を受けてきており、そのために多数の慢性 Cd 中毒の患者が多発した。ところで、慢性 Cd 中毒による骨軟化症は大きく分けて次の二段階を経て発症すると考えられている。初期の慢性 Cd 中毒では腎臓の近位尿細管の再吸収機能障害によるカルシウムやリン等のミネラルや低分子量蛋白質の尿中への過剰排泄を特徴とするファンコニ症候群といわれる状態であり (Cd 腎症)、この状態が重症化・継続すると骨のカルシウムやリンが減少し、骨軟化症や骨粗鬆症が発症してくる (イタイイタイ病)。ところが、同程度の腎機能障害の Cd 腎症患者でも骨症状を伴うイタイイタイ病まで進展する者とそうでない者が認められているため、イタイイタイ病の発症には何らかの個人的素因が関与してことが推測される。

一方で、Cd は一般環境中にも低濃度ながら広く存在しているため、今日ではその低濃度曝露によるヒトへの健康影響も危惧されている。近年の動物実験の研究や欧州での疫学調

査の中には、Cd には上記のような間接的な骨軟化症惹起作用だけでなく、骨に対する直接的な障害作用もあり、したがって腎機能障害を起こさない程度の低濃度の Cd 暴露によっても骨密度の低下は起こり得る、という報告もある。また、一般に骨代謝には加齢、加重、栄養、運動、等の環境要因に加えて、性、民族、遺伝等の宿主要因も重要な役割を演じており、実際に vitamin D receptor (VDR)、estrogen receptor (ER)、collagen type 1 $\alpha$ 1 (COL1A1) 等の遺伝子の多型が骨密度と関連する、との報告が多数なされている。しかしながら、環境要因としての低濃度 Cd 暴露と上記のような遺伝子多型がどのように関連し合っ

て骨密度に影響を及ぼしているかについては、いまだまったく調べられていない。

イタイイタイ病患者において、ER1 遺伝子の多型の分布との関連が調べられているが、それは PvuII と XbaI の RFLP 並びに TA repeat のみである (Nishio et al., 1999; Sadewa et al., 2002)。また、骨粗鬆症と VDR、ER、COL1A1 等の遺伝子多型との関連については多数の研究報告がされているが、そのほとんどがやはり極少数の RFLP との関連を見たものにすぎない。しかし、ポストゲノムの時代に入った今日では、ヒトの遺伝子多型は急速な勢いで見出されており、その数は NCBI dbSNP Build 126 によれば検証済の single nucleotide polymorphism (SNP) だけでも 600 万を超えている。従って、上記のようなほんのわずかの遺伝子多型と疾患との関連を見ただけの研究は今日ではほとんど意味をなさなくなっている。

この研究では、骨代謝に関連する遺伝子の中でも新たに estrogen receptor 2 (ESR2) に着目し、種々の程度の Cd 暴露を受けた農家女性についての疫学調査である Japanese Multi-centered Environmental Toxicants Study (JMETS) (Horiguchi et al., 2004; Horiguchi et al., 2005) で集められた末梢血、富山県 Cd 汚染地域における Cd 腎症並び

にイタイイタイ病患者からの末梢血、さらには過去に亡くなったイタイイタイ病患者のパラフィン包埋病理標本などから抽出した DNA サンプルを用いて、今までに調べられていないものを含む 19 種類の ER2 の SNP のタイピングを行い、Cd 暴露の骨代謝に対する影響、特に慢性 Cd 腎症状からのイタイイタイ病の発症における遺伝的要因の関与について明らかにすることを試みた。

## 2. 対象と方法

### (1) 被験者並びに DNA 抽出

2001年から2004年にかけて、我々が実施してきた農家女性を対象にした疫学調査地域8カ所の中には、自家産米を食することにより様々なCd曝露を受けている6地域（地域B, C, D, E, Fと富山県婦中町）と、自家産米のCd濃度の低い2地域（地域Aと氷見）とがあり、調査参加者の総数は2,080人である（JMETS）。この中から、遺伝子解析に関するインフォームドコンセントの得られた受診者の末梢血を採取した（表1）。また、富山県神通川流域に居住するCd腎症並びにイタイイタイ病患者からも、1997年に同様に末梢血を採取した（表1）。採取した末梢血はEDTAあるいはヘパリンを添加し、DNA抽出を行うまで-80℃のディープフリーザー内で冷凍保存した。JMETSで採取した末梢血からのDNA抽出は、ヘパリン添加サンプルからも抽出可能なAmpdirect（島津製作所）を、Cd腎症並びにイタイイタイ病患者の末梢血からは、EDTA添加のサンプルのみであったので、セパジーン（三光純薬）を用いて行った。

富山大学医学部第一病理学講座に保存してある剖検を受けたイタイイタイ病患者の肝臓のパラフィン包埋病理標本88検体から5μmの厚さの切片を2枚切り出し、DNA抽出に使用した（表1）。まず、パラフィン切片をキシレン1mlで脱パラフィンの後に無水エタノール1mlで洗浄し、得られた組織片をproteinase Kで溶解した後にQIAamp DNA Mini KIT（キアゲン社）を用いてDNA抽出、精製を行った。抽出したDNAのクオリティーチェックは、ミトコンドリアDNAのプライマー並びにAGT遺伝子のプライマーを用いたPCRによって行った（それぞれのPCR産物は138bp、165bp）。その結果、ミトコンドリアDNAはほぼ全サンプルで良好な増幅が見られたが、AGT遺伝子DNAについては88検体中33検体

のみに良好な増幅が見られた。つまり、他の 55 検体は DNA の低分子化を起こしていると考えられた。

表 1. 研究対象者とその ER2 遺伝子 SNP のタイピング結果

サンプルの種類		検体数	Typing 結果		備考
			可	不可	
JMETS 受診者					
	地域 A	185	184	1	
	氷見市	127	127	0	
	地域 B	185	171*	14	*3 検体は 4SNP 以下の typing
	地域 C	194	193	1	
	地域 D	180	179・	1	・2 検体は 18SNP の typing
	地域 E	630	630 †	0	† 3 検体は 18SNP の typing
	地域 F	425	422	3	
	婦中町	154	154	0	
	小計	2,080	2,060	20	
Cd 腎症患者		49	47	2	
イタイイタイ病患者					
	抹消血	12	12	0	
	病理病本	88	75 ‡	13	‡ 1SNP でも typing できたもの含む
	小計	100	87	13	
合計		2,229	2,194	35	

※Typing 不可とは、抽出 DNA 量が基準以下でタイピングは不可能であったか、あるいは行っても 1SNP もタイピングできなかったことを示す。

## (2) タイピングする SNP の選択

この研究開始の時点での NCBI では ER2 遺伝子のプロモーターからコーディング領域下流までの領域での SNP は 190 種類公開されていたが、これをすべてタイピングすることは不可能かつ無意味と考え、この中からタイピングする SNP を次のように選択した。まず、International HapMap Project では7つの集団で ER2 遺伝子 SNP のハプロタイプブロックが決定されていたが、このうち Japanese (JPT) と Chinese (CHN) の集団でタグ SNP となっていた7種類の SNP を選び出した。さらに、最近発表された骨粗鬆症と ER2 遺伝子多型との関連についての論文で解析されていた12種類の SNP を追加し (Ichikawa et al., 2005)、計 19 種類をタイピング対象とした (表2)。

表2. タイピングを行った ER2 遺伝子の SNP (NCBI)

No	dbSNP rs#	Region	dbSNP allele	Hetero-zygosity	tagSNP
1	rs1152588	3' Flanking	G/C		
2	rs944459	DownStream	C/T	0.195	JPT
3	rs4986938	Exon9	A/G	0.399	
4	rs944460	Intron8	C/G	0.213	
5	rs1256061	Intron7	A/C	0.487	JPT、CHN
6	rs1256059	Intron7	C/T	0.401	CHN
7	rs1952585	Intron7	C/T	0.386	
8	rs8017441	Intron7	A/G	0.332	JPT、CHN
9	rs6573549	Intron6	C/T	0.447	JPT、CHN
10	rs1256049	Exon6	A/G	0.237	JPT、CHN
11	rs1256044	Intron4	C/T	0.404	
12	rs1269056	Intron3	A/G	0.403	
13	rs1256034	Intron3	A/G	N. D.	
14	rs1256031	Intron3	C/T	0.475	
15	rs1256030	Intron2	C/T	0.461	JPT、CHN
16	rs1952586	Intron1	A/G	0.240	
17	rs1887994	Intron1	G/T	0.079	
18	rs3020444	Promoter	A/G		
19	rs1256112	Promoter	T/C		

(3) SNP のタイピング

SNP のタイピングは、SSP-SMFD (Sequence Specific Primer - Single Molecule Fluorescence Detection) 法で行った (Bannai et al., 2004)。SSP とは、検出したいゲノム DNA の塩基配列に相補的なプライマーのことであるが、SNP の場合は2種類の相補的なプライマーを用いて PCR を行うことになり、その増幅産物の種類の組み合わせによって型判定を行うことができる (SSP-PCR)。そして、蛍光ラベルしたプライマーを用い、高感度、高速の蛍光検出が可能な1分子蛍光検出法 (SMFD) によって増幅産物の検出を

行った。

具体的には、まず調整した検体DNAを鋳型として SNP を挟む 300-400bp 程度の増幅産物が得られる 1 次プライマーを用いて通常の PCR を行い、次いで得られた増幅産物をアレル特異的なプライマーを用いて SSP-PCR を行い、その反応液を SMFD により測定した。SNP の型判定は、SMFD 測定値 (K 2 %) の統計解析により、アレル A, B ホモ個体を区別する閾値を SNP 毎に設定して行った。閾値範囲は以下のように分類した。

アレル A ホモ個体 : アレル A ホモ用プライマーによる K 2 % が  $X_1$  % 以上かつアレル B  
ホモ用プライマーによる K 2 % が  $Y_1$  % 以下

アレル B ホモ個体 : アレル B ホモ用プライマーによる K 2 % が  $Y_1$  % 以上アレル A ホモ  
用プライマーによる K 2 % が  $X_1$  % 以下

ヘテロ個体 : アレル A, B ホモ用プライマーによる K 2 % がそれぞれ  $X_1, Y_1$  % 以上

(注)  $X_1, Y_1$  は統計解析の結果得られる K 2 % の閾値

なお、1stPCR 用プライマー設計、SSP-PCR 用プライマー設計、SSP-SMFD は、すべて株式会社ノバスジーンに委託して行った。

#### (4) ハプロタイプ解析

SNP タイピング結果については、ハプロタイプ解析ソフトウェア Haploview を用い、各種アレルに関する統計計算、ハプロタイプブロックの推定、等を行った (Barrett et al., 2005)。

### 3. 結果と考察

#### (1) SNP のタイピング結果

JMETS の受診者 2,080 人のうちの 20 サンプルと Cd 腎症患者 49 人のうちの 2 サンプルは、抽出 DNA 量が基準以下であったためにタイピングは実施しなかった (表 1)。また、地域 B では 3 検体で 4SNP のタイピングしかできず、地域 D, E ではそれぞれ 2 検体、3 検体で 1SNP のタイピングができなかった (表 1)。

イタイタイ病患者 88 人の病理標本から抽出した DNA は、13 サンプルについては 1 SNP もタイピングできず、残りの 75 サンプルについても最大でも 7SNP しかタイピングできなかった。これは、サンプル中の DNA 濃度が低だけでなく断片化していたと考えられ、設定したプライマーによる PCR 産物は 300-400bp と大きなものであったことが理由であると考えられる。一般に、ホルマリン固定によって組織中の DNA は低分子化するため、そのような DNA サンプルを PCR で増幅するにはできるだけ短い産物となるようなプライマーを設定する必要があると言われている (Inoue et al., 1996)。

しかし、これではイタイタイ病患者のサンプル数が少なく、Cd 腎症患者との比較は極めて難しい。クオリティーチェックの際に使用した PCR のプライマーのサイズは 165bp と短く、増幅は 88 サンプル中 33 サンプルで可能であったので、もっと短い増幅産物となるようなプライマーを設定してやり直す必要があると思われる。

すべてのサンプルのジェノタイピング結果を、1SNP でもタイピングできた場合 (2194 サンプル) と、半数 (10SNP) 以上タイピングできた場合 (2116 サンプル) との 2 とおりでまとめたのが表 3 と 4 である。いずれの場合でも、No. 17 の rs1887994 は今回の対象サンプルでは多型が見出されなかった (試薬開発段階で使用したアフリカ人サンプルでは

多型が見つかった)。NCBI で公表されている HapMap Project の Japanese 集団でのタイプング結果でも多型は見つかっていない。また、他の 18SNP は、Hapview の SNP 採用基準である  $HWpval \geq 0.001$ 、 $\%Geno \geq 75\%$ 、 $MAF \geq 0.001$  にすべて適合していた。従って、以降の解析では No. 17 を除外して行った。

表 3. 1SNP でもタイピングできたサンプルにおけるタイピング結果 (2194 サンプル)

No	dbSNP#	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	Rating
1	rs1152588	1	0.457	0.476	0.066	96.5	0.391	
2	rs944459	11184	0.320	0.331	0.132	96.6	0.210	
3	rs4986938	11642	0.250	0.255	0.339	96.7	0.150	
4	rs944460	13282	0.393	0.411	0.045	96.8	0.289	
5	rs1256061	15419	0.492	0.493	0.936	97.0	0.441	
6	rs1256059	22243	0.454	0.479	0.019	96.8	0.396	
7	rs1952585	24181	0.216	0.228	0.022	97.8	0.131	
8	rs8017441	27620	0.108	0.114	0.042	96.8	0.061	
9	rs6573549	33475	0.364	0.368	0.619	96.6	0.243	
10	rs1256049	35877	0.396	0.413	0.064	96.9	0.291	
11	rs1256044	45853	0.462	0.483	0.042	98.1	0.408	
12	rs1269056	55716	0.458	0.483	0.021	96.7	0.407	
13	rs1256034	56951	0.385	0.415	0.001	97.0	0.294	
14	rs1256031	58005	0.479	0.499	0.072	97.4	0.480	
15	rs1256030	58996	0.457	0.481	0.019	96.6	0.404	
16	rs1952586	71245	0.154	0.155	0.704	96.6	0.085	
17	rs1887994	72437	0.000	0.000	1.000	96.7	0.000	多型なし
18	rs3020444	102839	0.313	0.324	0.130	97.4	0.203	
19	rs1256112	126137	0.449	0.460	0.287	96.5	0.359	

表 4. 10SNP 以上タイピングできたサンプルにおけるタイピング結果 (2116 サンプル)

No	dbSNP#	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	Rating
1	rs1152588	1	0.458	0.477	0.075	99.9	0.391	
2	rs944459	11184	0.320	0.330	0.172	100.0	0.210	
3	rs4986938	11642	0.250	0.255	0.399	100.0	0.150	
4	rs944460	13282	0.393	0.411	0.050	100.0	0.289	
5	rs1256061	15419	0.495	0.493	0.916	100.0	0.441	
6	rs1256059	22243	0.456	0.479	0.027	100.0	0.396	
7	rs1952585	24181	0.219	0.229	0.069	100.0	0.131	
8	rs8017441	27620	0.108	0.111	0.379	100.0	0.061	
9	rs6573549	33475	0.364	0.368	0.656	100.0	0.243	
10	rs1256049	35877	0.397	0.413	0.087	100.0	0.291	
11	rs1256044	45853	0.461	0.483	0.039	100.0	0.408	
12	rs1269056	55716	0.459	0.483	0.024	100.0	0.407	
13	rs1256034	56951	0.387	0.415	0.002	100.0	0.294	
14	rs1256031	58005	0.482	0.499	0.118	100.0	0.480	
15	rs1256030	58996	0.457	0.482	0.023	100.0	0.404	
16	rs1952586	71245	0.154	0.155	0.886	100.0	0.085	
17	rs1887994	72437	0.000	0.000	1.000	100.0	0.000	多型なし
18	rs3020444	102839	0.315	0.324	0.220	100.0	0.203	
19	rs1256112	126137	0.449	0.460	0.298	100.0	0.359	

ここで、各列の意味は下記の通り。

dbSNP# : NCBI dbSNP の ID

Position : SNP の相対位置 (単位は塩基数)

ObsHET : 観測されたヘテロ接合度

PredHET : ヘテロ接合度の期待値 =  $2 * \text{MAF} * (1 - \text{MAF})$

HWpval : Hardy-Weinberg 平衡の p-値

小さいものは連鎖不平衡が生じている確率が高い。

(偶然生じる確率が p-値)

%Geno : タイピングできたサンプルの比率

MAF : マイナーアリの比率