

## (2) ハプロタイプブロック

次に、Haploview を用いて、全サンプル並びに各サンプル群ごとに ESR2 遺伝子におけるハプロタイプブロックの推定を行い、さらにサンプル群によるハプロタイプ分布の比較を行った。

ハプロタイプブロックの作成は、Gabriel らの基準に従って行った (Gabriel et al., 2002)。まず、ある 2 つの SNP 間の連鎖不平衡係数  $D'$  の 95% 信頼区間を求め、その上限が 0.98 より大きく下限が 0.7 より大きい場合には「strong LD (強い連鎖不平衡あり)」とし、上限が 0.9 より小さい場合には「strong evidence for historical recombination (組換えあり)」とし、どちらにも入らない場合には「inconclusive (不確定)」と判定した。そして、inconclusive 以外 (informative) で 95% が strong LD であった場合にブロックを形成した。但し、MAF が 0.02 未満の SNP は除外した。また、SNP 間の相関係数や LOD score 等に基づき、タグ SNP の選定を行った。

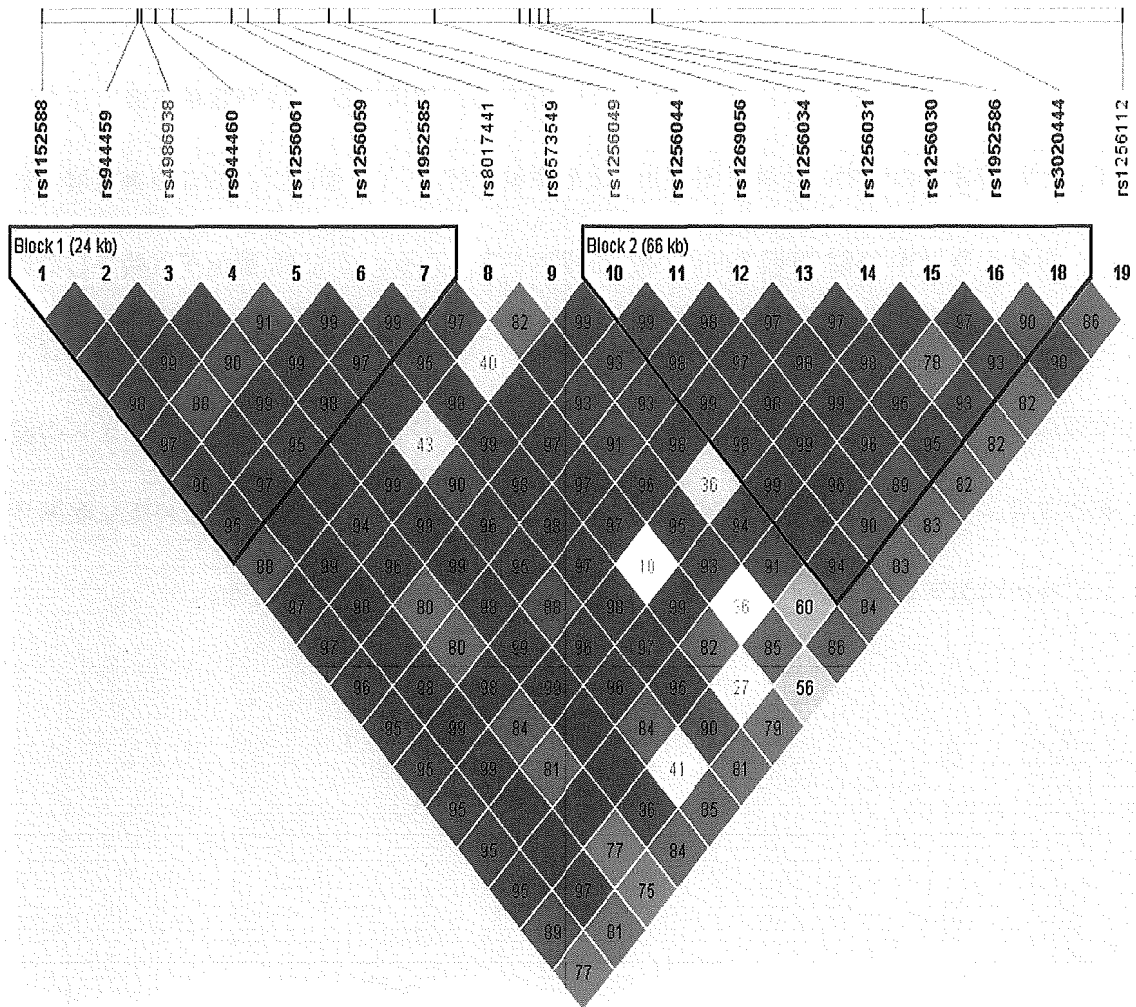
全サンプルについての結果を solid spine によって示したのが図 1 である。それによれば、ESR2 遺伝子の中で、No. 1 から No. 7 まで (24kb)、No. 10 から No. 18 まで (66kb) の 2 つのブロックが存在することが分かる。また、前者のブロックでは SNP1、2、3、4、5、6 が、後者では SNP10、11、14、18 がタグ SNP として認められる。

各サンプル群についても同様に行い、それらをまとめたものが図 2 である。基本的なハプロタイプブロックのパターンは SNP No. 8、No. 9 のところで大きく 2 つ分かれるものであったが、地域 A、地域 B、地域 C、地域 D、地域 F はさらに小さく 3 つに分かれるようであった。イタイイタイ病患者の群では、サンプル数が少なく、ブロックは見出せなかったが、Cd 腎症患者の群では他の健常者の群とは多少異なるパターンを示した。但し、

Cd 腎症患者群とイタイイタイ病患者群を合わせた場合には他の群と似たパターンとなるので、これもサンプル数の問題であるかもしれない。今後はやはり両患者群のサンプル数を増やす必要があると考えられる。

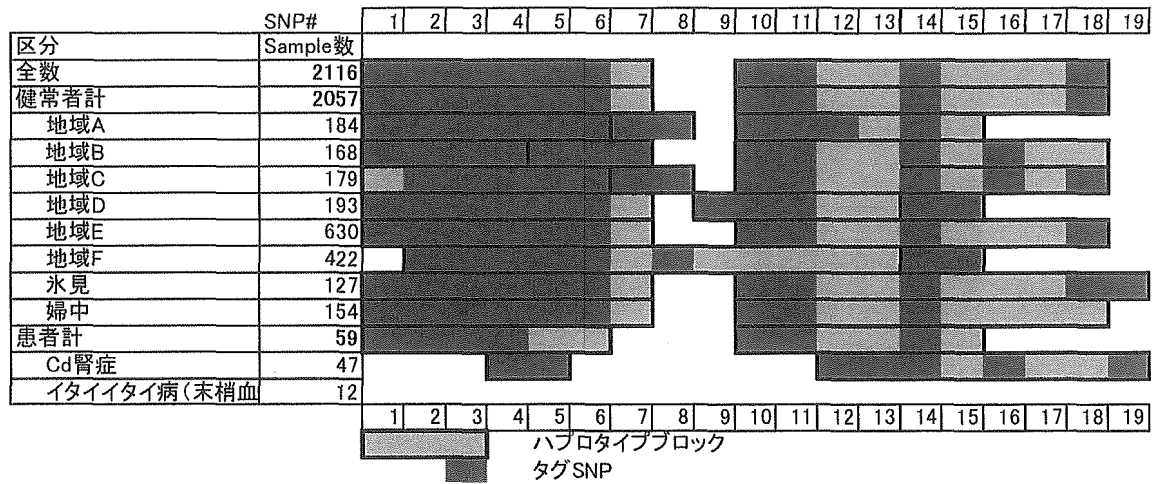
従って、本来であれば、これらのタグ SNP を中心に健常者群、Cd 腎症患者群、イタイイタイ病患者群の間での症例対照研究による比較を行い、Cd 暴露による骨障害発展に対して影響を及ぼす ESR2 遺伝子内の SNP を解明する（あるいは ESR2 遺伝子は関与しないことを示す）必要があるが、これは症例の解析可能なサンプル数が増えるまで待たなくてはならない。現在、病理標本から抽出した DNA からの PCR をもっと小さいサイズの産物となるようなプライマーを設定し直して行っているところであり、解析可能な症例サンプルが増加することが予測され、その結果を待って、再度解析を行う。

図 1. 全サンプルについての ESR2 遺伝子におけるハプロタイプブロック。



※それぞれの四角形内には  $D'$  の 100 倍の数値が記入されている（空欄は  $D' = 100$ ）。2 つの SNP が「strong LD」である場合には最も濃い赤色で示されている。三角形の両脚がすべて「strong LD」となっている部分がハプロタイプブロックであり、黒の太字で囲ってある。また、No. 17 は除外してある。

図2. 各サンプル群についての ESR2 遺伝子におけるハプロタイプブロックとそれらの比較。



#### 4. まとめと今後の予定

種々の程度の Cd 暴露を受けた集団、Cd 腎症患者、イタイイタイ病患者から抽出した DNA において、ESR2 遺伝子の 19 種類の SNP について解析を行ったところ、そのうち 18 種類の SNP について良好な結果が得られた。それに基づき、ハプロタイプの解析を行ったところ、2つのハプロタイプブロックが認められた（サンプル群によっては3つ）。

今後は、イタイイタイ病患者の病理標本からの DNA の SNP 解析をやり直してサンプル数を増やし、その上で症例対照研究を行い、Cd 暴露による骨障害発展に対して影響を及ぼす ESR2 遺伝子内の SNP を解明する計画である。

## 文献

Bannai M, Higuchi K, Akesaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, Tokunaga K. Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem.* 2004 Apr 15;327 (2) :215-21.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2) :263-5.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002 Jun 21;296 (5576) :2225-9.

Ichikawa S, Koller DL, Peacock M, Johnson ML, Lai D, Hui SL, Johnston CC, Foroud TM, Econs MJ. Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Nov;90 (11) :5921-7.

Inoue T, Nabeshima K, Kataoka H, Kono M. Feasibility of archival non-buffered

formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. *Pathol Int.* 1996 Dec;46(12):997-1004.

Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F. Dietary exposure to cadmium at close to the current provisional tolerable weekly intake does not affect renal function among female Japanese farmers. *Environ Res.* 2004 May;95(1):20-31.

Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F. Environmental exposure to cadmium at a level insufficient to induce renal tubular dysfunction does not affect bone density among female Japanese farmers. *Environ Res.* 2005 Jan;97(1):83-92.

Nishio H, Hayashi C, Lee MJ, Ayaki H, Yamamoto R, Ninomiya R, Koizumi N, Sumino K. Itai-itai disease is not associated with polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene. *Arch Toxicol.* 1999 Nov;73(8-9):496-8.

Sadewa HA, Miyabe Y, Nishio H, Hayashi C, Sutomo R, Lee MJ, Ayaki H, Koizumi N, Sumino K. No relationship exists between itai-itai disease and TA repeat polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene. *Arch Toxicol.* 2002 Aug;76(8):467-9.

## 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

分担研究者：中井 里史（横浜国立大学）

研究協力者：林 邦彦（群馬大学）

### 要旨

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った。なお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。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。

### A. はじめに

コーデックス委員会（国際食品規格委員会）において食品中カドミウム（以下、Cd とする）の基準値が検討されてきているが、我が国での現状を検討・報告すべく、昨年度まで国民栄養調査データ等を利用し、モンテカルロ・シミュレーションを用いた Cd 曝露量推定を行ってきた<sup>1)</sup>。しかし、健康影響に関する検討を行うためには、曝露量だけでなく、体内負荷量に関する知見も必要となってくると考える。そのため、本研究では、これまで行ってきた体内曝露量推定のためのモンテカルロ・シミュレーションの手法および結果を応用し、体内負荷量を推定することを目的とした。

### B. 方法

#### 1) 資料

本研究で使用する資料は昨年度まで検討に用いた資料と同じであるが<sup>1)</sup>、概要を再掲する



と以下の通りとなる。

食品摂取量については厚生労働省が実施している国民栄養調査のうち平成7年から平成12年までの6年間のデータベースをプールしたものを、食品群別に摂取者割合並びに摂取量分布に関するデータを得た。国民栄養調査は、身体状況調査、栄養摂取状況調査および食生活状況調査からなっているが、本研究ではそのうち、栄養摂取状況調査結果データを用いた。栄養摂取状況調査は当初は世帯単位の調査であったが、その後の検討によって平成7年以後は個人単位での調査が導入され、性・年齢階級別の摂取量に関するデータが得られるようになった。栄養摂取状況調査の方法は、留め置きによる秤量記録法であり、摂取した食品と重量を記録してもらい、それらをもとに、食品成分表を用いて摂取エネルギーおよび摂取栄養素量を算出する。用いられている食品成分表も時代とともに異なっており、昭和63年以降平成12年までは、970食品を基本とした食品成分表が用いられていたが、平成13年以降は1800以上の食品を基本とした食品成分表が用いられている。本研究では平成7年から平成12年までの国民栄養調査データを用いた。なおこれまでの検討も含む本研究においては、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。

また、輸入分の大豆および小麦のCd濃度として米国产濃度データを用いた<sup>3)</sup>。食品流通関連データについては大豆および小麦の国内産と海外産の消費割合を、食料需給表から用いた<sup>4)</sup>。

## 2) 推計方法

推計モデルの構造を概略的に示したものを図1に示した。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。このモデルは、年齢や性別によって変化する生理学的パラメータ、食物経路によるカドミウム摂取、代謝によるカドミウムの排出、カドミウムの糞排出から構成されている。

生物体内からのカドミウム類の排泄は、血流による体内への分布よりかなり遅い。また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できる。そこで本モデルにおいては生体をシングルコンパートメントモデルとして表現した。

モデルは体重と腎組織体積、食物の消費、糞排泄といった性別や年齢に依存したパラメ

一夕の変化を反映する構造になっている。カドミウム類は食物を通じて摂取され、吸収後に腎へ即座に分配され、腎での代謝と同等に糞中へ排出されるものと仮定した。

カドミウムはほとんどが腎と肝に蓄積されるが、今回は全て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。

なお、生体内及び糞中のカドミウム濃度モデルに対しては、以下の点を仮定した。

- ・ カドミウムは食物を経由して腸管から入る。
- ・ 腸管においてカドミウムは糞中と腸管との間で一定の分配比のもとに分配する。
- ・ 分配は糞が排出される前に全てのコンパートメントで定常状態に達する。
- ・ 生体内のカドミウムは、どの時点においても腎中のカドミウム濃度と腎体積で表すことができる。

#### ・ モデルの構造

本研究で用いたモデルは、物質収支式に基づくものであり、モデルの構造および式は以下のようなものである。

生体内のカドミウム濃度の時間当たり変化量は、食物経由のカドミウム摂取速度、糞排泄速度、及び代謝排出速度の和に等しい。

$$\frac{d(y \cdot V)}{dt} = \left( \frac{dM_N}{dt} \right) - \left( \frac{dN_{Fa}}{dt} \right) - \left( \frac{dN_m}{dt} \right) \quad \dots (1)$$

$y$  : 腎中カドミウム濃度

$V$  : 腎臓体積

$\frac{d(y \cdot V)}{dt}$  : 一定時間当たりの体内負荷量の変動

$\left( \frac{dM_N}{dt} \right)$  : 一定時間当たりの曝露量

$\left( \frac{dN_{Fa}}{dt} \right)$  : 一定時間当たりの糞からの排出量

$\left( \frac{dN_m}{dt} \right)$  : 一定時間当たりの体内での代謝量

### ★ 摂取

摂取速度  $\left(\frac{dM_N}{dt}\right)$  は単位時間あたりに傾向摂取されるカドミウム量で、食品中カドミウム

濃度  $y_{MN}$  と単位時間摂取量  $\frac{dF}{dt}$  で与えられる

$$\left(\frac{dM_N}{dt}\right) = y_{MN} \times \frac{dF}{dt} \quad \dots (2)$$

(単位時間あたりに摂取されるカドミウム量)

$$= (\text{食品中カドミウム濃度}) \times (\text{時間あたりに摂取する食品の量})$$

### ★ 排出

摂取量、体内濃度と糞中濃度の割合、分配比などを考慮に入れて計算を行う（体内濃度≠糞中濃度である）。糞中と腎臓中のカドミウム濃度は糞排泄される前に定常状態に達すると仮定することから、腸管において生体内から単位時間あたりに排出される非代謝のカドミウム量はどの時点でも変わらないとして計算できる。

$$\left(\frac{dN_{Fa}}{dt}\right) = (y \times f_{(fecal-tissue)}) \times \left(\frac{dF_a}{dt}\right) \quad \dots (4)$$

(腸管から非代謝で排出されるカドミウム量) =

$$(\text{腎中カドミウム濃度}) \times (\text{糞中カドミウム濃度/体内カドミウム分配費}) \times (\text{一定時間辺りの糞からの排出量})$$

### ★ 代謝

カドミウムが腎における代謝を受けるという仮定のもと、本モデルにおいても腎における代謝過程を組み込んだ。このモデルでは酵素によるカドミウムの代謝は全て人で起こると仮定し、単位人表面積当たりの代謝量は年齢やその他のパラメータによらず生涯一定であると仮定した。代謝は一次速度仮定で仮定される。全ての組織および器官において平衡状態を仮定していることから、単位時間当たりのカドミウムの代謝量はその体内の資質当たり濃度に比例する。比例定数を代謝クリアランスとして定義する。一般には、代謝クリアランス=体内からの消失速度と考えてよい。

$$\left(\frac{dN_m}{dt}\right) = Cl \times y \quad \dots (5)$$

(単位時間当たりに腎で代謝されるカドミウム量) =

$$(\text{代謝クリアランス}) \times (\text{腎中カドミウム濃度})$$

Cl はカドミウムの代謝酵素の量に対して一次線形であり、体内の腎臓体積と代謝排出の見かけ上の一次速度定数  $K_{el}$  との積に等しく代謝排出の半減期  $t_{1/2}$  に反比例する。

$$Cl = V \times K_{el} = V \times \left( \frac{\ln 2}{t_{m1/2}} \right) \dots (6)$$

Cd 体内負荷量推計および推計に関わる要因についての検討は Crystal Ball 2000 日本語版 ((株) 構造計画研究所) を用いてモンテカルロ・シミュレーション法により行った。式 (2) の摂取量は前年度の報告書での曝露量を用いた。求めた摂取量の値を式 (1) に代入し、差分的な計算を繰り返すことによって体内負荷量を推定した。

### 3) 負荷量推定の手順

式 (6) より代謝クリアランス求め、そのクリアランスと前月までの負荷量を元に式 (5) を用いて代謝量を求めた。式 (4) における「非代謝による排出量」は曝露量に 1 から吸収率を引いた値を掛けた値とした。しかし、20 歳未満については、不確実性の大きさなどから、曝露量推定はおこなわれていない。そのため本検討では、20 歳未満は Cd 曝露量無しとして計算を行っている。

これらの値を式 (1) に代入し、単位期間当たりにおける体内負荷量の増加分を算出した。ここでは単位期間を一ヶ月とし、差分的に計算を繰り返して 30 歳から 80 歳まで、10 歳ごとの負荷量を算出した。なお文献値を参照し、本研究では体内半減期を 40 年、体内吸収率を 37%<sup>11)12)</sup>と仮定して計算を行った。

### 4) 試算シナリオ

今年度の検討においては、これまでに行ってきた曝露量評価の場合と同じシナリオで体内負荷量を推定した (表 2)。各シナリオにおいては、基準値を超える濃度の Cd を含有する食品を流通させないということを前提としている。その際、コーデックス基準値原案の上の値は基準値原案の 2 倍、下の値は基準値原案の 1/2 に設定し、以下のようなシナリオに基づき試算を行った。

- シナリオ1：コーデックス基準値原案
- シナリオ2：全品目コーデックス基準値原案の下の値
- シナリオ3：全品目コーデックス基準値原案の上の値
- シナリオ4：コーデックス基準値原案（ただし精米は 0.2mg/kg）
- シナリオ5：コーデックス基準値原案（ただし精米は 0.3mg/kg）
- シナリオ6：コーデックス基準値原案（ただし精米は 0.5mg/kg）

なお、「米、小麦以外の穀類」、「大豆以外の豆類」及び「豆科野菜」は基準値（0.1mg/kg）が既に採択されているため、上下の値は設定しない。各シナリオに従った Cd 濃度の設定にあたっては、シミュレーション実行時に対数正規分布に従う乱数のうち、設定した基準値を超えるものは除外することによって推計を行った。中央値に固定した品目についてはこれらの数値を超える試料を除外した場合の中央値を算出した。

なお米の搗精工程における Cd 含有量の変化データを見ると、玄米から精米への濃度変化はわずかであったので<sup>8)</sup>、両者の Cd 濃度は同等と見なした。以下では、玄米と精米を区別せずに米と表現している。また、小麦粉の製粉工程における Cd 濃度については減少がみとめられたので<sup>8)</sup>、小麦粉として 1 等粉から末粉までの平均値を用いて、玄麦の Cd 濃度の 0.65 倍とした。

以上のような仮定シナリオに基づき、体重 1kg 当たり 1 週間の摂取量と Cd 濃度を利用して、試行回数 10 万回、ハイパーキュービック法により曝露量を推計し、その値を式（1）に当てはめることで、年齢ごとのカドミウムの体内負荷量を推計した。

### C. 結果

結果を表 3 に示した。ここでは 30 歳から 80 歳まで 10 歳ごとにそれぞれの年代における体内負荷量分布を示している。80 歳の時点における中央値を比較すると、もっとも値が低かったのはシナリオ 2 で 179.0mg、もっとも高かったのはシナリオ 3 の 191.8mg であった。95 パータイル値に関しては、最も低かったのは中央値と同様、シナリオ 2 の 398.3mg、最も高いのはシナリオ 3 の 470.1mg であった。

コーデックス基準値原案から米の基準値のみを変化させた場合（シナリオ 4、5、6）を、コーデックス基準値原案であるシナリオ 1 と比較したところ、分布等の違いはわずかであった。

図 3 にシナリオ別の各年齢における Cd 摂取量推計値の分布を示した。いずれも左右対称ではなく高濃度側に裾をひいた分布となっており、分布の形状はシナリオ間で大きな違い

は認められなかった。

#### D. 考察

今年度はモンテカルロ・シミュレーションを用いた Cd 体内負荷量推定を行った。コーデックス委員会で議論されている食品中、特にわが国の曝露評価で問題となる精米中の Cd 濃度規制値が若干変動したとしても、国民栄養調査に基づく検討では Cd 体内負荷量分布には大きな影響はないことが示された。しかし本検討は、平成 12 年までの国民栄養調査に基づく検討であることや、方法でも述べたように未成年時の摂取量をゼロとおいてあることから過小評価になっていることなどから、まだまだ検討すべき点は多い。また個々人の食習慣には銘柄指向などをも含む嗜好性も存在することから、種々の集団データ、また様々なシナリオにおける検討なども必要となってくる。従って、本研究は今後健康影響等の評価を行うための、方法論的な検討のひとつとして位置づけられると考えている。

結果についてであるが、表 3 における体内負荷量の変化の様子を見ると年齢と共にほぼ直線的に増加していることが分かる。この原因として、物質収支のモデル式 (1) において、代謝の占める割合が小さいことが挙げられる。モデル式 (1) において半減期が寄与している項は代謝のみであるが、摂取量と比較して代謝される量は  $10^3$  倍ほど小さい。一般に、体内半減期が長くなるとクリアランスが悪くなり、代謝能は下がる。また、カドミウムの体内濃度は年齢との相関が確認されている<sup>10)</sup> ことから、負荷量の直線的な増加は不自然ではない。

いずれにせよ、今後リスク評価を行っていくためには、得られた結果をより確かなものとするためにシナリオ等の検討を進めるとともに、健康影響との関係も併せて検討していくことが、リスクコミュニケーションの観点からも必要となってくると考える。

#### E. 結論

体内負荷量を推計するためのシミュレーション法を検討し、曝露量推計と同じシナリオのもとで負荷量推定を行った。シナリオによって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。しかし今後は、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い、健康影響に関する検討を行う必要がある。

F. 図表

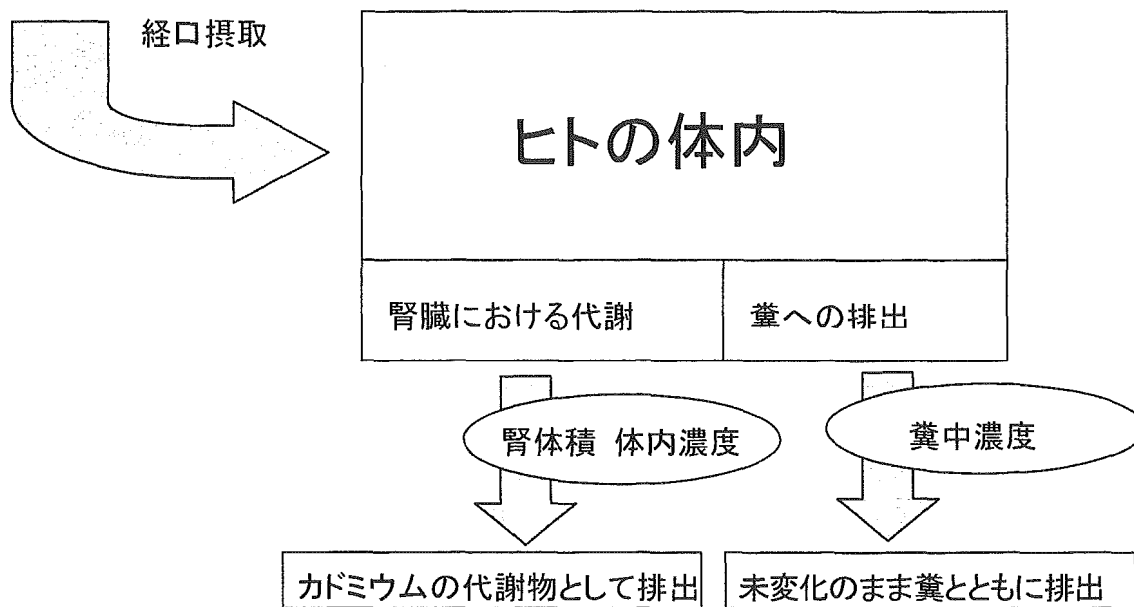


図1.推計モデルの概略

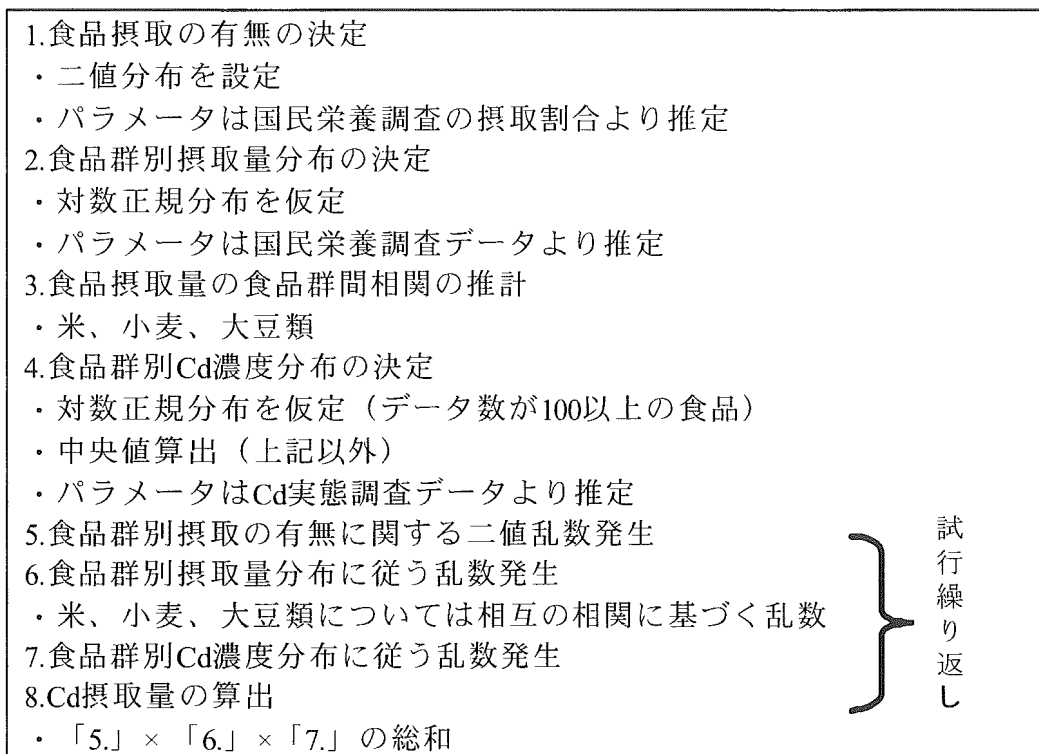


図2. モンテカルロ・シミュレーション手順（試行回数 10 万回、乱数サンプリング法：ハイパーキュービック）



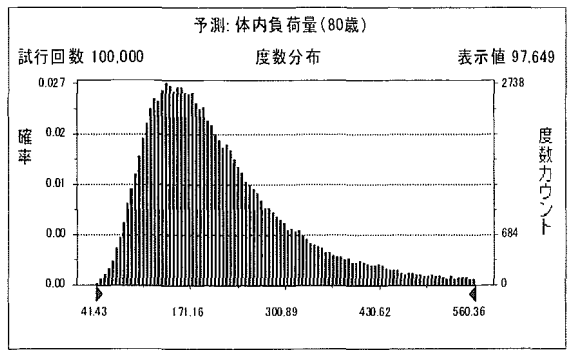
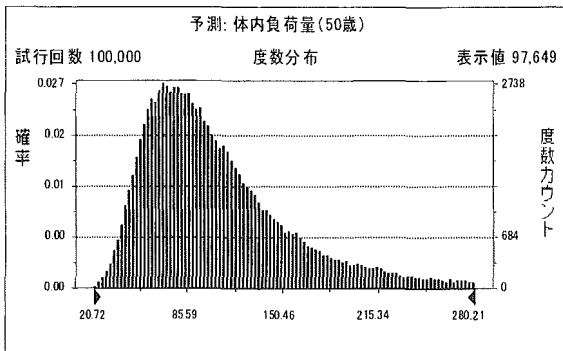
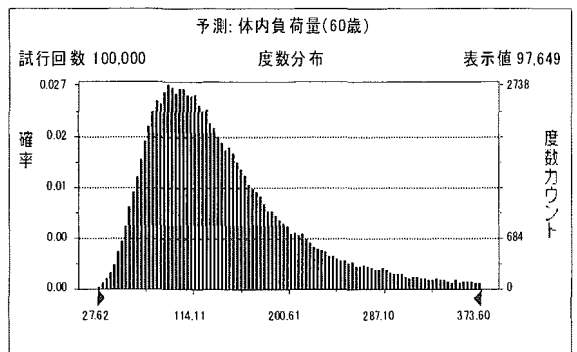
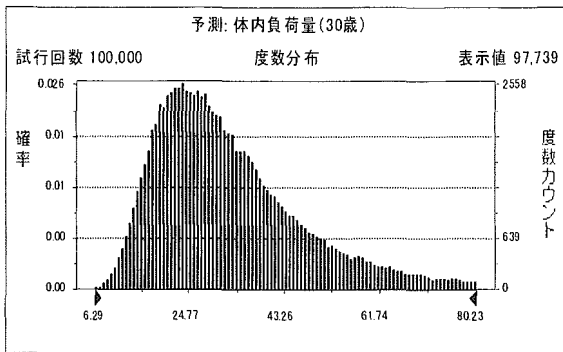
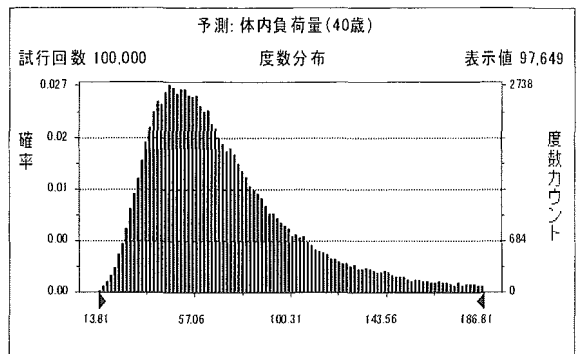
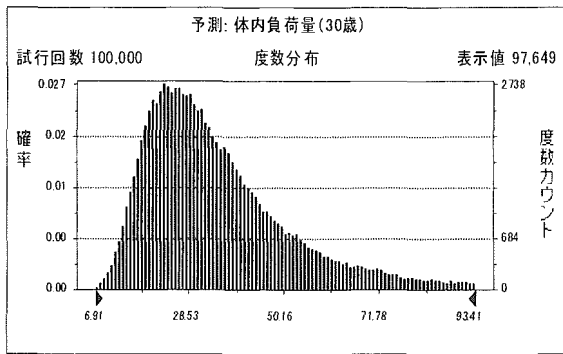


図3. シナリオ別 Cd 摂取量推計値の分布 (シナリオ1)

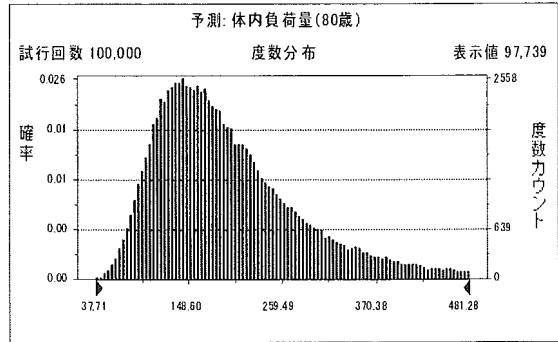
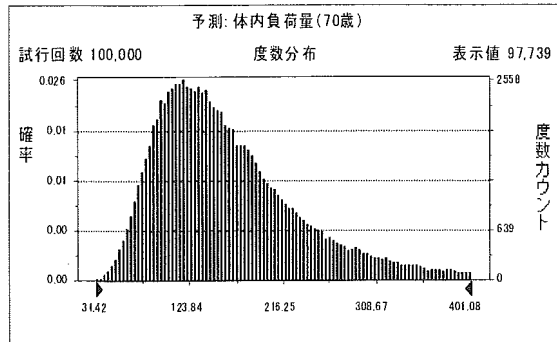
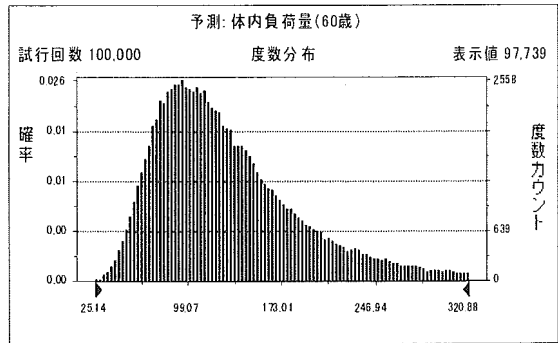
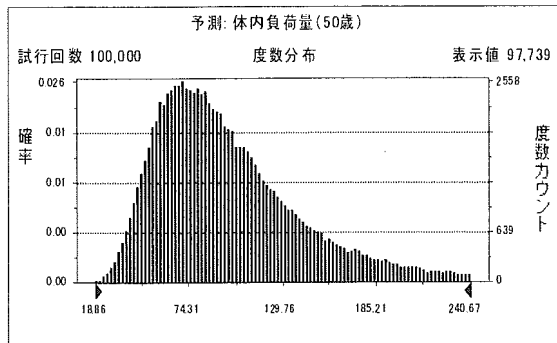
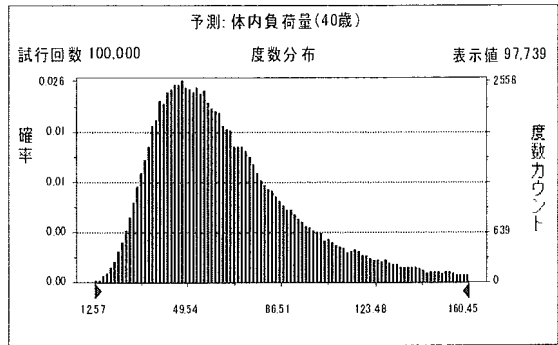
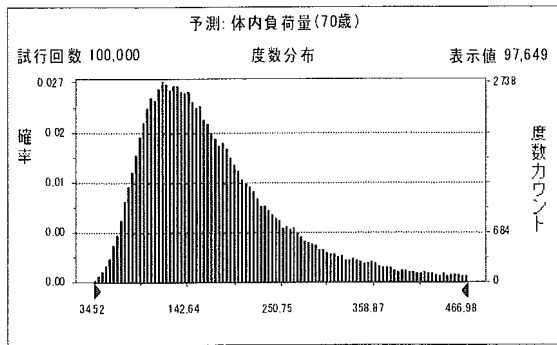


図3. シナリオ別 Cd 摂取量推計値の分布 (シナリオ2)

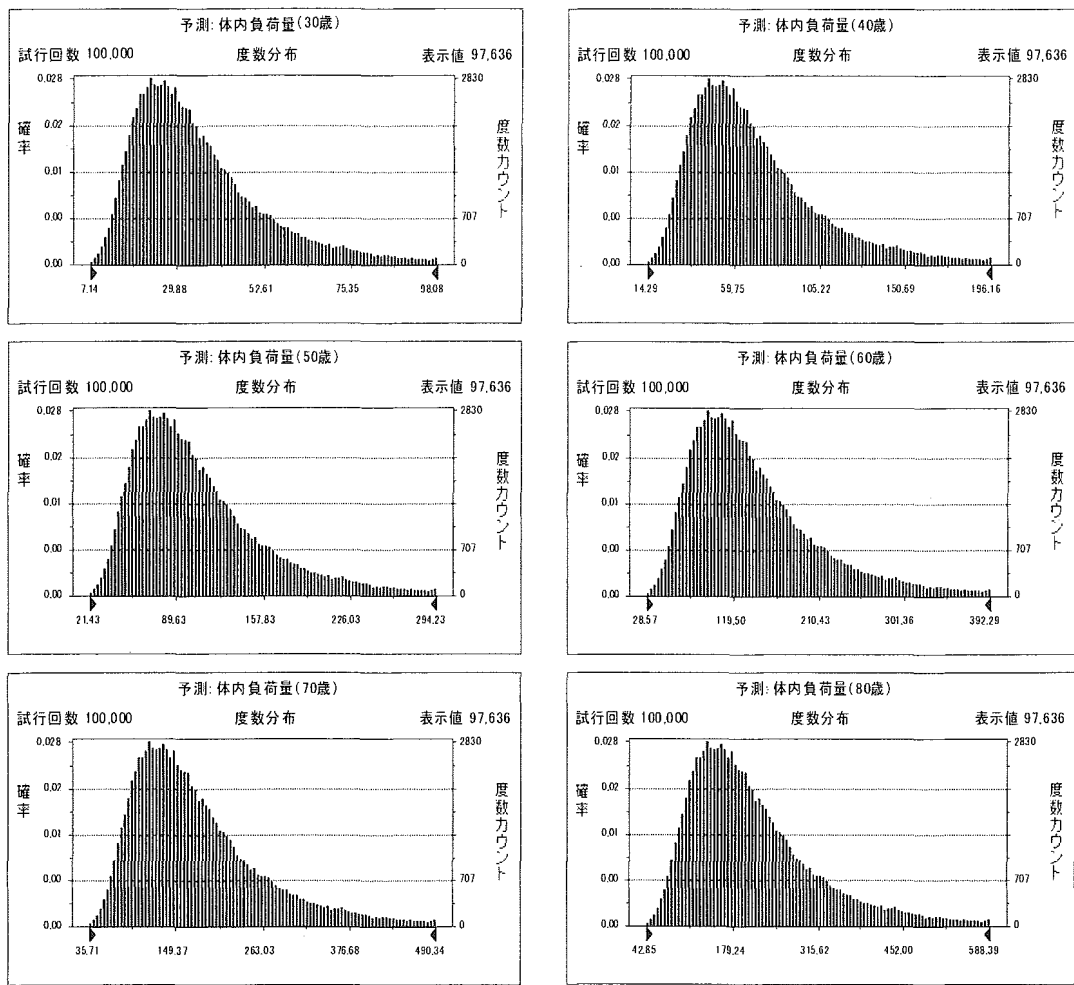


図3. シナリオ別 Cd 摂取量推計値の分布 (シナリオ3)

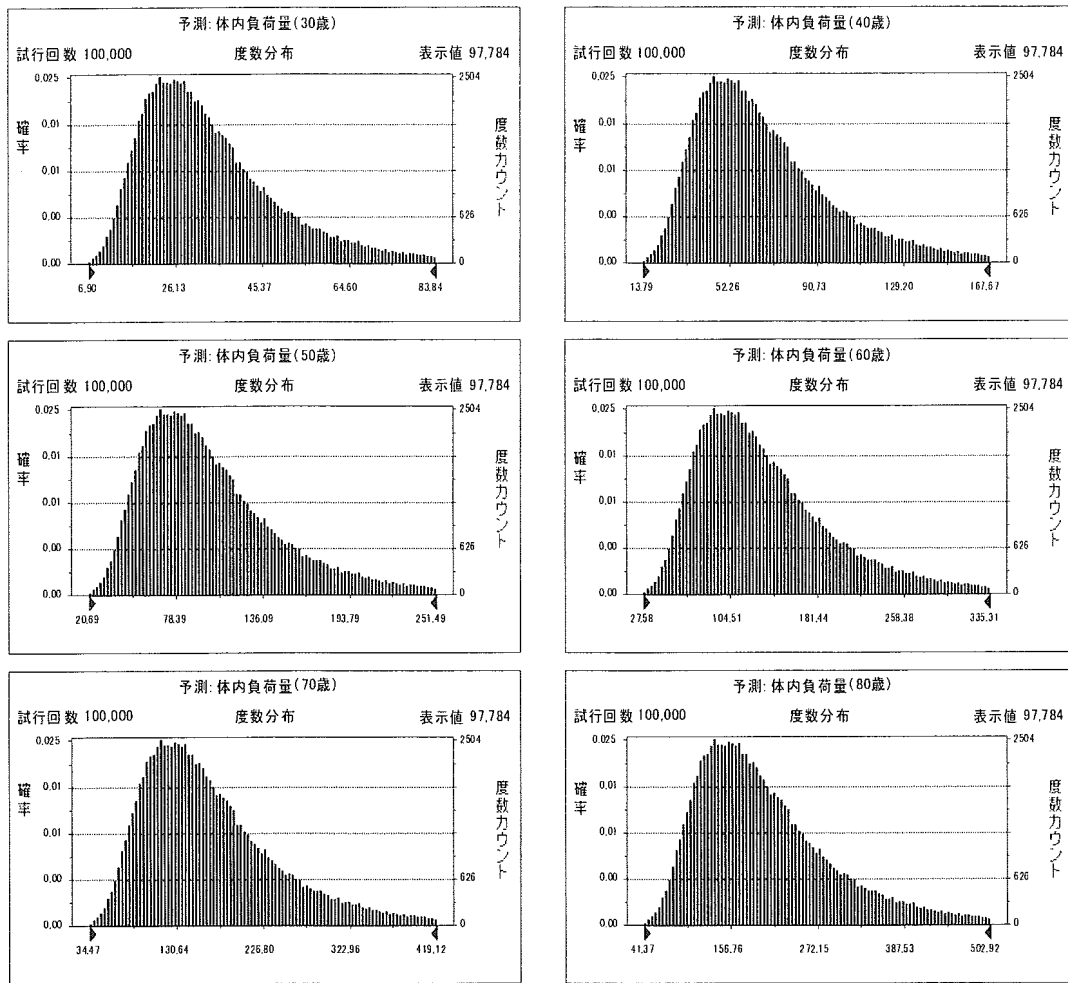


図3. シナリオ別 Cd 摂取量推計値の分布 (シナリオ4)