

200501147B 1/2

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 15 年度 - 17 年度 総合研究報告書

主任研究者 小泉 昭夫

平成 18 (2006) 年 4月

1/2 冊

目 次

I. 総合研究報告書

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-----	1
小泉昭夫	

資料 [I] ヒト生体試料バンクの創設

I-1. 過去の保存試料の収集と系統的整備に関する研究	
1) 過去に採取された試料の整備に関する研究(平成15年度)-----	50
渡辺孝男	
2) ヒト生体試料バンクの整備に関する研究(平成16年度)-----	55
吉永侃夫	
3) 試料バンクの現状分析と整備に関する研究(平成17年度)-----	61
小泉昭夫・井上佳代子	
I-2. 新規系統的・継続的試料収集	
1) 新たな試料の採取に関する研究-秋田県での採取-----	67
(平成15-17年度) 村田勝敬・塚田三香子	
2) 新たな試料の採取に関する研究-宮城県での採取-----	76
(平成15年度) 中塚晴夫・(平成16-17年度) 渡辺孝男	
3) 新たな試料の採取に関する研究-関東地方での採取-----	81
(平成15-17年度) 大前和幸	
4) 新たな試料の採取に関する研究-岐阜県での採取-----	85
(平成15-17年度) 竹中勝信	
5) 新たな試料の採取に関する研究-福井県での採取-----	89
(平成15-17年度) 日下幸則	
6) 新たな試料の採取に関する研究-兵庫県での採取-----	93
(平成15-17年度) 和田安彦・清水卓	
7) 新たな試料の採取に関する研究-和歌山県での採取-----	101

- (平成15-17年度) 竹下達也
- 8) 新たな試料の採取に関する研究-高知県での採取----- 108
(平成15-17年度) 甲田茂樹
- 9) 新たな試料の採取に関する研究-山口県での採取----- 111
(平成16-17年度) 廣澤巖夫
- 10) 新たな試料の採取に関する研究-沖縄県での採取----- 115
(平成15-17年度) 等々力英美・鄭奎城
- 11) 新たな試料の採取に関する研究-大阪府での採取----- 119
(平成16年度) 伊達ちぐさ

I-3. バンク試料の運用

- 1) 生体試料バンクの試用に関する研究(平成16年度) -----122
小泉昭夫・吉永侃夫
附 生体試料バンクを活用した日本人体内における
臭素系難燃剤の動態----- 126
東海明宏
- 2) 試料バンクの運用に関する研究(平成17年度) -----134
小泉昭夫・井上佳代子
附 食餌および血液試料のメチル水銀の分析に関する研究----- 141
蜂谷紀之
附 人体試料における臭素系難燃剤、アンチモンの濃度レベル----- 149
東海明宏

資料 [II] ヒト生体試料バンクの倫理的課題の整備

- 1) 日本の現状における諸問題の整理に関する研究-----154
(平成15年度) 小泉昭夫・井上悠輔
- 2) ヒト生体試料バンクの国際的動向に関する研究----- 164
(平成15年度) 小泉昭夫・湯木知史
- 3) 日本人研究者のバンク利用への意識調査に関する研究----- 168
(平成15年度) 小泉昭夫・関野高泰
- 4) 市民参加ワークショップによる生体試料バンクの倫理に関する研究----- 176
(平成16年度) 小泉昭夫・吉永侃夫・井上佳代子

資料 [Ⅲ] ヒト生体試料バンクの有用性の証明

Ⅲ-1. 汚染動向

Ⅲ-1-1. 既存の難分解性化学物質の汚染動向

- 1) 既存の難分解性化学物質の曝露経年変化に関する研究
—PCBsおよびPBDEs (平成15年度) -----180
小泉昭夫・佐藤俊哉
- 2) 食事中および血清中ポリ塩素化ビフェニルの経年的調査
についての研究 (平成16年度) -----186
小泉昭夫・井上純子・原田浩二
- 3) 血清中ポリ塩素化ビフェニルの経年的調査の修飾因子に関する
研究 (平成17年度) ----- 191
小泉昭夫・井上純子・原田浩二
- 4) 母乳中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の分析----- 199
(平成16年度) 小泉昭夫・井上佳代子・
清水卓・河野誠・上原茂樹
- 5) ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) とポリ塩化ビフェニル
(PCB) の授乳中女性の曝露状況と血液から母乳への異性体の
移行の分析に関する研究----- 209
(平成17年度) 小泉昭夫・井上佳代子・竹中勝信・
清水卓・河野誠・上原茂樹
- 6) 食事および血液試料のメチル水銀の分析に関する研究----- 222
(平成15-17年度) 蜂谷紀之
- 7) 試料バンクを用いたリスクコミュニケーションに関する研究--- 245
—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—
(平成16-17年度) 小泉昭夫・井上佳代子
- 8) 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臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs)
ならびにポリ塩素化ビフェニル (PCBs) の分析法の開発----- 250

(平成15-16年度) 藤峰慶徳・平井哲也

- 9) 微量な母乳試料に対するポリ集素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の分析法に関する研究----- 256
(平成16年度) 太田壮一

III-1-2. 新たな難分解性化学物質の汚染動向

- 1) 新たな難分解性化学物質—Perfluorooctane sulfonate および Perfluorooctanoic acid汚染に関する研究----- 263
(平成15-16年度) 小泉昭夫・原田浩二
- 2) 難分解性有機フッ素化合物へのヒト曝露に関する研究----- 274
(平成16-17年度) 小泉昭夫・原田浩二
- 3) PFOS 及び PFOA の分析法開発と大気粉塵の測定に関する研究--- 281
(平成15-17年度) 齋藤憲光
- 4) PFOS・PFOA の処理方法の検討に関する研究----- 296
(平成15-17年度) 藤井滋穂

III-2. 毒性研究

- 1) 難分解性有機フッ素化合物 (PFOS/PFOA) のヒト腎クリアランスに関する研究(平成15-16年度)----- 303
小泉昭夫・原田浩二
- 2) カメを用いた生物濃縮の検討-安威川生態系での観察に関する研究(平成15-16年度)----- 306
小泉昭夫
- 3) 難分解性有機フッ素化合物のカルシウムチャネルへの影響に関する研究-モルモット単離心室筋細胞を用いた研究----- 312
(平成16年度) 小泉昭夫・原田浩二
- 4) 難分解性化学物質 PFOS (Perfluorooctane sulfonate) がラット小脳プルキンエ細胞の活動電位に及ぼす影響に関する研究(平成17年度)----- 319
小泉昭夫・原田浩二

5) 難分解性化学物質PFOS (Perfluorooctane sulfonate)が
Paramecium caudatum の K^+ 誘導性後退泳動時間に及ぼす影響に
関する研究(平成16-17年度)----- 322
小泉昭夫・原田浩二・松原英理子

6) 難分解性化学物質PFOS (Perfluorooctane sulfonate)が
マウスの摂食に与える影響に関する研究(平成17年度)----- 331
小泉昭夫・浅川明弘

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 334

III. 研究成果の刊行物・別刷-----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）
総合研究報告書

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

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授

研究要旨

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进行评估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。また製造規制や使用規制などの施策がヒト曝露低減へ与える影響を正しく評価し、疾病予防への更なる施策の必要性を検討するために、将来にわたり利用可能な試料バンクの創設が求められる。

本研究は、上記背景をもとに、京都大学医学部・大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得て実施した。化学物質リスク評価手法としての試料バンク創設を第一目的とした。1970年代から保存されていた過去の試料の整備に加えて、新たに系統的、継続的な試料収集を行いバンクを創設した。研究者の希望に応じ、試料の運用も行なった。また長期保存ヒト試料の扱いに関する倫理的課題の検討を行なった。試料バンクの有用性を実証するため、指定化学物質として近年重要視されているperfluorooctane sulfonate (PFOS) および類似化合物のperfluorooctanoic acid (PFOA)、および近年汚染の増加が懸念されているpolybrominated diphenyl ethers (PBDEs)、メチル水銀、及び既に規制のなされているpolychlorinated biphenyls (PCBs) をモデル化合物として選定し、実際の曝露評価および今後の曝露動向評価を行った。さらに科学的根拠に基づくリスクコミュニケーションとして、メチル水銀高濃度地域における住民の毛髪中メチル水銀濃度測定と結果説明学習会を行い、低減効果を実証した。

ヒト生体試料バンクの創設：

試料バンク創設において、まず過去の3種類の保存試料を整備した。池田正之（京

都大学名誉教授) および研究分担者の渡辺がそれぞれ管理している、1976年から1997年にかけて実施された全国規模調査による地域住民の個人別の食事、血液(血清、全血)等の生体試料は、食事調査内容の詳細なデータや血液検査結果などの多くの情報を持つ。京都大学医学部附属病院に保存されていた連結不可能匿名化の血清試料は1977年から2002年までの試料であり、属性試料としては性、年齢のみ付随する。主任研究者である小泉がPOP s 研究を目的として集めていた血清、母乳、食事試料も連結不可能匿名化された性、年齢のみ付随する試料である。これら1976年から2002年までに集められ別々に保存されていた全血、血清、母乳、食事試料、及びそれらの属性資料を収集、整備し、その保存状況の確認を行なった。また、長期保存に耐えるように容器、ラベル等を考慮し、試料バンク用にコード化による整理を行った。

本研究開始に伴い、新たに系統的、継続的な試料収集を分担研究者、班友の協力を得て開始し収集した。

平成18年3月現在、全血7,099検体、血清22,535検体、母乳2,704検体、食事3,400検体(表1~表4)が保存されている。保存場所として京都大学大学院医学研究科G棟3階336号室に新たに低温ルームを備えたサンプルルーム(図1、図2)を建設した。試料は書面による同意を得て採取し、連結不可能匿名化で属性をデータベースに保存した。このデータベースはMicrosoft accessを用いて作成し、それぞれの試料の持つ情報ごとに分類され、リレーショナルデータベース(図3~図5)としてデータ保存、検索できるようにした。過去の試料については提供者の血液検査などの情報が付随しており、提供者データ管理機能と試料の持つデータ(採取日、採取場所、食事内容、カロリー、蛋白質量、線維質量、ビタミン・金属などの量など)、および収集されてからのデータ(重量、コレステロール値、トリグリセライド値、測定された化学物質濃度など)などが、同一試料にすべて関連付けられて表示できるようになっている。検索条件も多様であり、採取年、採取地域、提供者の性や年齢など、複数の絞込みも可能であるため、試料の運用に関して検索が容易である。

これら試料の運用を平成16年度に試験的に開始し、平成17年度には2研究機関に提供した。運用はスムーズに行なわれ、有意義な研究結果を得ている。今後も更なるバンク試料利用に向け広報活動を推進していく予定である。

ヒト生体試料バンクに関する倫理的課題の整備:

長期保存ヒト試料の扱いに関する倫理的課題の検討において、平成15年度には、国内外のバンクに関する倫理事項の調査・検討を行ない、日本国内化学物質研究者108名に質問紙表を送付し、その回答をまとめ考え方を整理した。それをもとに平成16年度に約100名の市民の参加を得てワークショップを行ない、研究者、倫理専門家、NPO代表者、一般市民が広く意見を交換した。「過去の試料については連結不可能匿名化で使用する。今後の試料収集においては、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は包括同意ををする。運営の透明化を図り、成果の還元を図る。」という意見に集約された。今後この方

針に沿って運用を進めていきたい。

ヒト生体試料バンクの有用性の証明：

試料バンクの有用性の実証において、PCBs、PBDEs、メチル水銀の過去25年間に
おけるヒト曝露傾向をバンキングされた血清試料と食事試料を用いて明らかにし、
PFOS、PFOAにおいても血清試料を用いて明らかにした。PBDEsにおいては、さらに
次世代に影響を与える母乳試料を用いて現在の曝露レベルを明らかにした。

a) PCBs (polychlorinated biphenyls) :

製造中止の対策による推移の検証として行ったPCBsの測定では、1980年代に幾何
平均522.8ng/day (幾何標準偏差2.5) であった食事からの摂取量は2003年の調査で
幾何平均63.5ng/day (幾何標準偏差3.2) となり急激に減少していた。これにとも
ない、血清中でも1980年代で幾何平均163.0 ng/g lipid (幾何標準偏差1.7) から、
幾何平均86.5ng/g lipid (幾何標準偏差2.0) と減少していた。しかし、年齢層別
に見ると、若年者層での急速な減少に比較して、年齢が上がるほど濃度低下は遅く、
30歳代より高い年齢層では過去の曝露の影響が残っている可能性がある。特に50歳
代では濃度上昇が観察され、異性体別に見たところ、特に高塩素化体(6塩素化体、
7塩素化体)濃度の上昇が顕著であった。この原因探索として、高齢者におけるPCB
高塩素化体の代謝能力低下の可能性があることが、生理的薬物動態モデルを使用し
たシミュレーションによって示唆された。PCBsの製造が中止されているとはいえ、
過去の曝露が高齢者における代謝能力に関連して健康に悪影響をもたらす可能性
があり、今後、高齢者におけるPCBsの健康影響についてさらなる検討が必要である
ことが判明した。

b) PBDEs (polybrominated diphenyl ethers) :

近年世界中で汚染が問題になり、EU (欧州連合) が2006年7月1日以降使用禁止を
決定しているPBDEsは、難燃剤として身近な家庭生活用品に使用されており、曝露
の増加が懸念されている。バンキングされた血清試料を用いた今回の研究でも、
1980年代で全国8地域40人の幾何平均が0.5ng/g lipid (幾何標準偏差3.5)、1995年
で全国8地域40人の幾何平均が1.8ng/g lipid (幾何標準偏差3.7) であったのが、
2005年の全国4地域89人の幾何平均が2.9ng/g lipid (幾何標準偏差1.7) と増加し
ていた。日本でも汚染が進行してきていることが判明した。アメリカ、カナダの汚
染レベルには達していないが、ヨーロッパ諸国並みの汚染が生じていることを明ら
かにした。現在でもなお製造、使用され続けているが、その曝露情報が非常に少な
いdecaBDE (異性体BDE-209) についての検討を2005年の試料を用いて行なった。血
清と母乳を同時に提供して下さった89人 (平均年齢30歳) において、BDE-209は、
82人(92%)から検出された。BDE-209は、血清中においてはその38%を占める優位な
異性体であったが、母乳中においてはわずか8%であった。母乳中においてはBDE-47
(TetraBDE)、BDE-153 (HexaBDE) が主要な異性体であり、それぞれ28%、23%であ

った。この結果から、日本の授乳年齢にある女性がdecaBDEに曝露されていること、および母乳だけの分析結果では、実際の曝露が反映されないことが判明した。今回の結果を用いて、血清中から母乳中への移行は、出産後10週までは下記の式で表される ($r=0.964$, $p<.001$) ことがわかった。Log (分配係数) = $1.225-0.0909 \log(Kow)-0.00105$ (分子量)。今後、decaBDEの曝露状況の動向分析とともに、家庭内での曝露源の同定を行い、曝露低減にむけた取り組みが必要である。

c) メチル水銀：

四方を海で囲まれ海産物の摂取が多いわが国にとって、海産物の化学物質汚染は深刻な問題となる。メチル水銀はまたわが国では化学物質汚染の歴史に残る水俣病を経験したこともあり、メチル水銀の海産物汚染によるヒト曝露の動向は多くの人々の不安の原因になっている。1980年代で全国8地域40人 (平均年齢44.3歳) の幾何平均は、 $10.8 \mu\text{g/L}$ (幾何標準偏差1.7)、1995年の全国8地域40人 (平均年齢52.1歳) の幾何平均は、 $12.5 \mu\text{g/L}$ (幾何標準偏差1.9)、2004年の全国7地域70人 (平均年齢41.5歳) の幾何平均は、 $8.12 \mu\text{g/L}$ (幾何標準偏差1.9) であった。2004年において減少していることが示唆されたが、50歳未満の出産年齢集団 ($n=48$) に限ると、平均年齢34.9歳で、血中メチル水銀およびメチル水銀摂取量推定値の幾何平均はそれぞれ $6.86 \mu\text{g/L}$, $1.28 \mu\text{g/kg-bw/week}$ で、18.8%が2005年に厚生労働省が発表した基準値である妊娠時の暫定的耐容週間摂取量 ($2.0 \mu\text{g/kg-bw/week}$) を超過していた。さらに、1980年代と1995年の測定において、メチル水銀濃度が全国平均を大きく上回った遠洋漁業の町、唐桑町で、平成16年度と17年度において住民とリスクコミュニケーションを行なった。マグロ、カツオを多食する食事内容の聞き取りとアンケートを行ない、住民の毛髪中メチル水銀濃度測定を3回にわたって施行しと結果説明学習会において個別のリスクコミュニケーションを行い、毛髪中メチル水銀濃度が減少した。リスクコミュニケーションで食生活の改善に伴う化学物質曝露を減減できることを実証した。今後リスクコミュニケーションの効果を広範囲に推進していく予定である。

d) PFOS/PFOA (perfluorooctane sulfonate/perfluorooctanoic acid)

新たな環境汚染物質として近年世界中の注目を集めているPFOS/PFOAについては世界をリードする研究成果を公表してきた。

d-1 汚染動向：平成15年度と16年度においてヒト血清中の濃度の経年変化をバンキングされた試料を用いて明らかにした。また現在の曝露レベルを全国で比較し空間的汚染について検討した。その結果、近畿地方在住の人は、PFOS/PFOAともに全国で最も高い汚染レベルであることが明らかになり、その曝露は (秋田県、宮城県、京都府のデータ) 男女ともに1980年代から増加していることが明らかになった。近畿地方在住の人の曝露レベルが高い原因を知るために平成15年度に全国79箇所の河川表層水の汚染レベルを測定しPFOS/PFOAともに近畿地方の河川の汚染が強い

ことが判明した。特にPFOAの近畿地方における汚染は世界最高レベルであることを明らかにした。また、平成15年度に飲料水濃度を測定しPFOS/PFOAともに近畿地方では東北3都市に比較して非常に高い濃度であること、平成17年度には京都府南部の11地点で大気粉塵中濃度を測定し、PFOSは岩手県と同レベルであるが、PFOAは約10倍高い値であることを観測した。大阪府内に発生源があることが確認されており、今後近畿地方での経年的動向を把握するとともに、同様に発生源が存在すると思われる他の地域での動向も把握する必要がある。

これらPCBs、PBDEs、PFOS/PFOAの測定において、貴重なバンクの試料を少量で測定できる方法の開発を研究し、新たな汚染物質であるPFOS/PFOAにおいては、その処理方法の検討を3年間を通じて行い、活性炭で吸着できることを見出した。

d-2 毒性：毒性研究においてはすべて京都大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認の下に、動物愛護に配慮して行われた。

PFOS/PFOA は、撥水剤として開発され消火剤やワックス、防水剤などとして身近に使用されている。化学的に非常に安定で環境中で非常に分解されにくい。そのため平成15年度、生物濃縮を検討するために、世界最高レベルのPFOAの汚染河川として我々が見出した大阪府摂津市安威川において、流域下水処理場の上流、下流に生息するカメを捕獲し、血中PFOS/PFOA濃度を測定した。PFOSにおいては、カメの血中濃度が河川水濃度と比較して極めて高く生物濃縮をうけることが示唆された。しかしPFOAにおいては、血中濃度は河川水濃度と同程度であった。PFOSとPFOAは極めて類似した構造を持つ化学物質であるにもかかわらず、カメの体内においてPFOSとPFOAの濃縮傾向に大きな差が見られた。平成16年度には、いまだ解明されていないPFOS/PFOAの毒性メカニズムの検討をモルモット単離心室筋細胞を用いて行なった。パッチクランプ法で活動電位や電流に与える影響を評価した。PFOSは、その濃度が労働者におけるヒト血清中濃度に匹敵する μM オーダーで活動電位の立ち上がり速度、最大電位、電位持続時間をそれぞれ減少させた。またCa電流に対しては保持電位により増加あるいは減少させるか対照的に作用した。Ca電流の活性化、不活性化電位がそれぞれ過分極側へ移された。PFOAも同様の作用を有していたが、効力は有意に低いことが判明した。次に、平成16年度、17年度において、*Paramecium caudatum*をPFOS/PFOAの毒性スクリーニングに用いることができないか検討すると共に、PFOS/PFOAが、K⁺誘導性後退泳動に及ぼす影響について検討した。*P. caudatum*は繊毛に電位依存性Caチャンネルを持ち、泳ぐ方向、時間からそのチャンネルの動きを知ることができる。本研究によってPFOS/PFOAがK⁺誘導性後退泳動持続時間を延長させることが始めて明らかとなった。その影響の大きさは濃度依存的に増加した。また、炭素鎖長の増加にともなって後退泳動継続時間が延長した。フッ素化数の増加にともなっても後退泳動継続時間がより延長することを確認した。*P. caudatum*の後退泳動は、脱分極刺激により、電位依存性Caチャンネルが開いてCaイオンが繊毛内に流入することによって起こる。したがって我々の得た結果は、PFOS/PFOAがCaチャンネルに影響を及ぼしている可能性を示すもので、上

述のモルモット単離心室筋細胞研究とあわせて、きわめて重要な所見である。また、本研究により PFOS/PFOA の毒性スクリーニングに *P. caudatum* が有用であることが示された。平成 17 年度には、さらに PFOS が、神経細胞に及ぼす影響について検討した。活動電位が PFOS により有意に頻度が減少することがパッチクランプ法により示され、この影響はカルシウムイオンチャネル阻害剤であるカドミウムの存在下でも持続した。このことは PFOS が神経細胞にも作用し、またカルシウムイオンチャネル以外の経路も存在することが示唆するきわめて重要な所見である。一方マウスを用いて PFOS の摂食作用に及ぼす影響も検討した。PFOS は、末梢投与により摂食量を減少させ体重を低下させた。脳室内投与においては、用量依存的に、有意に摂食、胃排出を抑制した。従って PFOS が中枢において摂食行動に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後さらに毒性メカニズムの知見を蓄積し、ヒト健康影響について詳細な検討を行なう予定である。

まとめ

以上、平成 15 年度から 17 年度において、1970 年代からの試料を整備し、ヒト生体試料バンクを京都大学大学院医学研究科内にハード、ソフト両面において創設し、運用を開始した。また PCBs、PBDEs、PFOS/PFOA を少量で測定できる方法を開発し経年変化、空間的变化を検討し、汚染状況の推移を発表した。論文発表はもとより、3 年間を通じて USA の Society of Toxicology の annual meeting で発表することにより、世界中の注目を浴びており、USA の Environmental Protection Agency (EPA) と常時意見交換するようになっている。PBDEs の曝露状況の推移には世界の研究者が注目しているとともに、PFOS/PFOA の曝露状況の推移と毒性メカニズムに関しては、世界中でデータがなく、我々のデータが世界をリードしてきた。Canada の EPA からは、PFOS/PFOA の規制に関しての意見を求められ、我々の研究試料を提供し意見交換した。この PFOS/PFOA の曝露源のひとつと考えられる飲料水からの除去方法も研究した。メチル水銀については高曝露地域において、科学的根拠に基づくリスクコミュニケーションを行い、曝露低減を実証した。

研究期間を通じて、マスコミ各社からも我々の研究に関心が寄せられ、種々の新聞報道がなされた（参考資料1-4）。また試料提供者からの手紙も掲載した（参考資料5）。

主任研究者	小泉昭夫	京都大学大学院医学研究科・教授
分担研究者	大前和幸	慶應大学医学部・教授
	日下幸則	福井大学医学部・教授
	甲田茂樹	前高知大学教授 現産業医学総合研究所研究交流官
	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
	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
	広澤巖夫	関西医療福祉大学・教授
	藤井滋穂	京都大学大学院工学研究科・教授
	村田勝敬	秋田大学医学部・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
	井上佳代子	京都大学大学院医学研究科・講師
	中塚晴夫	宮城大学看護学部・教授
	佐藤俊哉	京都大学大学院医学研究科・教授
	藤峰慶徳	大塚製薬株式会社大塚ライフサイエンス事業部・室長
	吉永侃夫	大阪夕陽丘学園短期大学・教授
	太田壮一	摂南大学薬学部・助教授
	伊達ちぐさ	奈良女子大学・教授
班友	上原茂樹	東北公済病院・部長
	河野誠	河野産婦人科医院・院長
	清水卓	清水産婦人科医院・院長
	塚田三香子	聖霊女子短期大学・教授
研究協力者	井上純子	京都大学大学院医学研究科・教務職員
	原田浩二	京都大学大学院医学研究科・博士課程
	井上悠輔	京都大学大学院医学研究科・博士課程
	湯木知史	京都大学大学院医学研究科・博士課程
	関野高泰	京都大学大学院医学研究科・博士課程
	浅川明弘	京都大学大学院医学研究科・修士課程
	松原英理子	京都大学大学院医学研究科・修士課程
	鄭奎城	琉球大学医学部・助手
	平井哲也	大塚製薬株式会社大塚ライフサイエンス事業部
	東海明宏	産業技術総合研究所化学物質管理研究センター・室長

A. 研究目的

POPs (Persistent organic pollutants) は、化学的に非常に安定であるため環境中で分解されにくい。そのためPOPsによる健康影響は国民の関心事であり、潜在的な不安の原因となっており、環境中の化学物質のリスク評価は急務である。新規にPOPsに指定される化学物質について合理的判断に基づく予見的対策立案が必要であり、施策を要する環境汚染化学物質を遅滞なく速やかに選抜するために、また、規制を受けた化学物質のヒト体内における動向と健康影響を知るため、限られた利用可能試料を有効に提供する必要性がある。厚生行政施策立案によるリスク管理を可能とするために、ヒト試料を利用した化学物質のリスク評価の手法として、試料バンクの創設に関する研究を行なう。研究目的として[Ⅰ]ヒト生体試料バンクの創設(過去の保存試料の収集と系統的整備、新規系統的・継続的試料収集)、[Ⅱ]倫理的課題の整備、[Ⅲ]ヒト曝露の評価と動向予測(ヒト生体試料バンクの有用性の検証)を挙げる。倫理的課題の整備に当たっては、現在施行の倫理的手法、連結不可能匿名化に加えて、共有資源活用のための倫理的諸課題を提起しつつ解決を模索する。これは、ヒト試料を利用した試料バンクを創設するにあたり、社会的理解を得るために必須のものと考えらる。

B. 研究方法

本研究を開始する前に、研究計画書を京都大学大学院医学研究科・医学部・医の倫理委員会に提出し、倫理委員会の検討を経て承認を得た。承認を得た方法に則って研究を遂行する。

[Ⅰ]ヒト生体試料バンクの創設

I-1. 過去の保存試料の収集と系統的整備

池田正之(京都大学名誉教授)および研究分担者の渡辺がそれぞれ管理している、1970年代から1990年代にかけて実施された全国規模調査による地域住民の個人別の食事、血液(血清、全血)等の生体試料を対象とし、試料を収集し、その保存状況の確認と試料バンク用にコード化による整理を行う。また、各試料についての属性情報を整理し、連結不可能匿名化した電子情報として管理する。(これらの試料は「健康と食生活調査に関する調査」として、陰膳実測法による食事調査と肘静脈からの採血による一般血液・生化学検査、尿検査、血圧測定、身体計測実施の際に得られたものである。調査対象者は、事前に趣旨説明会を開催し賛同された方である。採血検査結果、尿検査結果は個人別に返却されている。)属性情報として、1)居住地、2)調査時期、3)姓、4)年齢、5)喫煙の有無、6)飲酒の有無、7)身長、8)体重、9)体脂肪(皮下脂肪厚等)、10)一般血液検査結果、11)生化学検査結果、12)食事調査内容(食事量、献立内容、栄養摂取量等)について入力する。食事、血清、全血試料は-20℃で凍結保存する。

京都大学医学部附属病院に保存されていた連結不可能匿名化の血清試料は1977年から2002年までの試料であり、属性試料としては性、年齢のみが提供された。この試料も同様に保存状況の確認とコード化による整理を行い、電子情報として管理する。

本研究の主任研究者である小泉がPOPs研究を目的として集めていた血清、母

乳、食事試料も同様に連結不可能匿名化され、保存状況の確認とコード化による整理を行い、電子情報として管理する。

これら 3 ルートから収集された血液試料は、比較的 POPs 測定において問題の少ないと考えられるポリプロピレン系の容器に移し変え、重量を測定して保存する(ガラス製品は有機物の湧出がなく安定であるが凍結融解に耐える物理的強度、機械的強度に不安がある)。未知の汚染・湧出に対してはブランク用容器を同一条件で保存する。

全試料において共通したコード番号の付け方、コード番号が長期保存で消えてしまわないようメンディングテープの使用を徹底する。

I-2. 新規系統的・継続的試料収集

平成 15 年度の本研究の開始に伴い、新規試料を系統的・継続的に収集する。

新規試料の収集に当たって、倫理面の配慮に特に留意した。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事項に沿って実施することはいうに及ばず、各研究機関の倫理委員会で再承認を得た分担研究者も多かった。研究参加同意書は、書面にて提出していただき各研究機関に保存され、属性として性、年齢、居住地、職業が連結不可能匿名化された試料に附属し、ヒト生体試料バンク事務局に送付され、電子情報として保存する。

全国の収集分担研究者が何処でも入手可能な容器として、血清用には 2ml ファルコンクライオジェニックバイアルを、母乳にはファルコン 50ml 遠心管を指定した。食事試料は NIKKO 製 (J-ボトル) の 1L のポリプロピレン製の広口ビンを使用することとし、試料をバン

クに送付するときには、サンコー24L コンテナに収納することを徹底する。

試料収集は分担研究者にお願いした。秋田県での採取(村田勝敬 秋田大学医学部・教授)、宮城県での採取(中塚晴夫 宮城大学看護学部・教授 および渡辺孝男 宮城教育大学・教授)、関東地方での採取(大前和幸 慶應大学医学部・教授)、岐阜県での採取(竹中勝信 高山赤十字病院・部長)、福井での採取(日下幸則 福井大学医学部・教授)、兵庫県での採取(和田安彦 兵庫医科大学・助教授)、和歌山県での採取(竹下達也 和歌山県立医科大学・教授)、高知県での採取(甲田茂樹 高知大学医学部・教授)、沖縄県での採取(等々力英美 琉球大学医学部・助教授)を予定し、全国 9 地域から血清、母乳、食事を収集する。また、班友である河野誠(河野産婦人科医院・院長)が北海道の母乳試料を、上原茂樹(東北公済病院・部長)が宮城県の母乳試料を、清水卓(清水産婦人科医院・院長)が兵庫県の母乳試料を、塚田三香子(聖霊女子短期大学・教授)が秋田県の陰膳を収集した。平成 16 年度、17 年度においては、15 年度の地域に加えて、廣澤巖夫(関西医療福祉大学・教授)が山口県の血液、母乳、食事試料を収集した。また、平成 16 年度には臨時的に主任研究者の小泉昭夫が京都府、島根県の母乳試料を収集し、伊達ちぐさ(奈良女子大学・教授)が大阪府の血液試料と陰膳を収集した。さらに平成 17 年度には、全国 4 地域(北海道、宮城県、岐阜県、兵庫県)から血清試料と母乳試料を同一人から採取した。

平成 15 年度における血液試料は血清のみであったが、平成 16 年度、17 年度においては、血清試料に加えて全血試

料も収集した。すべて重量を測定し保存した。

難分解性汚染物質は脂質量で補正する必要があるため、血清試料はコレステロール値とトリグリセライド値を測定し、電子情報として保存する。

[II]倫理的課題の整備

ヒト生体試料が提供され保存された後、当初の目的を越えて広範囲の課題や地域で利用されたり、担当者の代替わりなどが想定されるため、長期保存のヒト試料の管理における倫理的枠組みの検討を行なう。

平成15年度には、日本の現状における諸問題を整理し、動向を把握する。また、国際的動向を把握する。さらに質問紙表を用いて日本人研究者の意識調査を行なう。平成16年度には、前年度の結果をもとに、研究者、倫理専門家、NPO代表者、市民の参加を得てワークショップを行ない、一般市民と広く意見を交換する。研究者と試料提供者の双方の納得できる倫理基盤を整備する。

[III]ヒト生体試料バンクの有用性の証明

製造中止の対策による推移の検証として PCBs (polychlorinated biphenyls) の測定、近年世界中で汚染が問題になり、EU (欧州連合) が 2006 年 7 月 1 日以降使用禁止を決定している PBDEs

(polybrominated diphenyl ethers) の日本における曝露状況の推移と現状把握、海産物多食国である日本において多くの国民の不安の原因となっているメチル水銀のヒト曝露の動向、新たな環境汚染物質として近年世界中の注目を集め、製造会社 3M がその製造を中止した

PFOS (perfluorooctane sulfonate) およびその類縁物質

PFOA (perfluorooctanoic acid) の動向及び毒性研究を行うことにより、ヒト生体試料バンクの有用性を証明する。

a) PCBs (polychlorinated biphenyls) :

1980年代 (1977年から1981年) および1995年 (1991年から1997年) に日本全国8地域で採取されヒト生体試料バンクに保存された試料を用いて過去の動向を把握する。1980年代および1995年の測定にはともに北海道、宮城県、群馬県、石川県、島根県、愛媛県、鹿児島県、沖縄県からそれぞれ無作為に選定された5試料、計40試料である。両年代において、試料提供者は同一人ではないが、それぞれの年代においては、食事試料、血液試料は同一人のものを測定する。現代の曝露レベルの測定には、新規に採取された試料を用いる。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8地域において採取された試料から各10試料、計80試料を無作為に選定する。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、沖縄県からの試料から女性のみ各10試料、計90試料を無作為に選定する。これらを用いて製造中止後のPCBsの食事中濃度の経年変化、ヒト血清中濃度の経年変化を把握する。

生理的薬物動態モデルを使用したシミュレーションによって、属性による曝露修飾の評価を行う。

b) PBDEs (polybrominated diphenyl ethers) :

PBDEsは、pentaBDE、octaBDE、decaBDEが世界的に流通しており、近年汚染が非

常に問題になっている。EU（欧州連合）が2006年7月1日以降使用禁止を決定しており、日本においてもpentaBDEはメーカー自主規制で使用されなくなっている。しかし大量に生産されているアメリカ産業界においては全く規制がなく、世界中で曝露の増加が懸念されている。

日本における曝露動向を調べた研究はこれまでなく、ヒト血清中濃度の推移を調べる。全国8地域（北海道、宮城県、群馬県、石川県、島根県、愛媛県、鹿児島県、沖縄県）における1980年代（1977年から1981年）と1995年（1991年から1997年）のそれぞれ無作為に抽出した40人の血清試料を用いる。2005年に全国4地域（北海道、宮城県、岐阜県、兵庫県）の協力者89人から同時に採取した血清試料と母乳試料の89人分の血清試料を用いて、1980年代、1995年と2005年の曝露経年動向を検討する。

次世代への曝露レベルを知るために2004年に全国11地域（北海道、秋田県、宮城県、東京都、岐阜県、福井県、和歌山県、兵庫県、高知県、山口県、沖縄県）の分担研究者と班友によって新規採取された生体バンク母乳試料から5人ずつを無作為に抽出し、および主任研究者が2004年に臨時に採取した島根県20人と京都府30人の母乳試料の濃度を測定する。

現在でもなお製造、使用され続けているが、その曝露情報が非常に少ないdecaBDE（異性体BDE-209）の曝露レベルを知り、血清試料と母乳試料の相互変換の可能性を知るために、2005年に全国4地域（北海道、宮城県、岐阜県、兵庫県）89人から血清試料と母乳試料を同時に採取し、BDE-209を含む13異性体の濃度を測定する。同時に QSAR analysis を

用いて、血清中から母乳中へ化学物質の移行の決定因子を同定する。この因子を用いて相互変換のモデル式を構築する。

c) メチル水銀：

全国8地域（北海道、宮城県、群馬県、石川県、島根県、愛媛県、鹿児島県、沖縄県）における1980年代（1977年から1981年）と1995年（1991年から1997年）のそれぞれ無作為に抽出した40人の血清試料を用いて、メチル水銀の血液中濃度の動向を把握する。さらに2004年に全国7地域（秋田県、宮城県、岐阜県、和歌山県、兵庫県、高知県、沖縄県）の分担研究者により新規に採取された血液から無作為に10人ずつ抽出し70人の現在の曝露濃度を測定する。また、50歳未満の出産年齢集団における曝露状況を、2005年に厚生労働省が発表した基準値である妊娠時の暫定的耐容週間摂取量（ $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}\text{-bw}/\text{week}$ ）に照らし合わせる。さらに、メチル水銀濃度が全国平均を大きく上回る遠洋漁業の町、唐桑町で、平成16年度と17年度において住民とリスクコミュニケーションを行なった後、マグロ、カツオを多食する食事内容に対して介入を行い、住民の毛髪中メチル水銀濃度測定と個別面談を3回にわたって施行しリスクコミュニケーションの効果を評価する。

d) PFOS/PFOA (perfluorooctane sulfonate/perfluorooctanoic acid)

d-1 汚染動向：平成15年度と16年度において、生体試料バンクに保存された過去のヒト血清試料（秋田県1991年76人、1995年40人、宮城県1977年23人、京都府1983年20人、1987年20人、1991年20人、1995年20人、1999年20人）および主任研

究者である小泉がPOP s 研究を目的として集めていた血清試料（秋田県2003年111人、宮城県2003年55人、京都府2003年54人）のPFOS/PFOA濃度を測定し、秋田県、宮城県、京都府における経年変化を明らかにする。また現在の曝露レベルを全国で比較し空間的汚染について検討するために、2003年から2004年にかけて分担研究者によって採取された全国9地域の血清試料から無作為に男女それぞれ10人ずつを抽出してPFOS/PFOA濃度を測定する。

平成15年度には、日本全国79箇所の河川表層水を採取し汚染レベルを把握する。また、近畿地方（京都府、大阪府、兵庫県、各地域5箇所）と東北地方（秋田県、宮城県、岩手県、各地域5箇所）の飲料水を採取し、汚染レベルを測定し比較する。さらに17年度においては、京都府南部の11地点（宇治、大山崎、木津、久御山、城陽、田辺、八幡、国道1号、国道24号、国道171号、福知山）において大気粉塵中のPFOS/PFOA濃度を測定し、岩手県で採取した大気粉塵中濃度と比較する。

上記PCBs、PBDEs、PFOS/PFOAの測定において、貴重なバンクの試料を少量で測定できる方法の開発を研究する。また、新たな汚染物質であるPFOS/PFOAにおいては、その処理方法の検討を行なう。

d-2 毒性

①ヒト腎クリアランスに関する研究：PFOS/PFOAの血清中濃度には男女差があることがわかっており、その原因の一つとしてラットで認められる腎排泄の違いがヒトでも認められるか検討する。20歳代男女5名ずつ、70歳代男女5名ずつのボランティアから血清および尿試料の

提供を受け尿中クリアランスを測定する。

以下の動物を用いた研究はすべて京都大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認の下に、動物愛護に配慮して行う。

②カメを用いた生物濃縮の検討：PFOS/PFOAは、環境中に蓄積していくことが知られており、多くの野生生物の体内で検出されている。そのため生物濃縮を検討する必要がある。食物連鎖の最高位にあるカメを用いる。平成15年度、河川表層水の汚染レベル測定において、世界最高レベルのPFOAの汚染河川であることが判明した大阪府摂津市安威川において、汚染源と考えられた流域下水処理場の上流、下流5地点に生息するカメを捕獲し、血中PFOS/PFOA濃度を測定する。捕獲したカメの甲羅の年輪を数えて年齢を推定し、心臓から1.5ml採血し、その後捕獲地点に返す。カメの捕獲と同時に同地点の河川水を採取し、カメ血清中と河川水のPFOS/PFOA濃度の比較から生物濃縮を検討する。

③イオンチャネルへの影響に関する研究：平成16年度は、モルモット単離心室筋細胞を用いてパッチクランプ法でPFOS/PFOAのカルシウムチャネルへの影響による活動電位や電流に与える影響を評価する。17年度においては、ラット小脳プルキンエ細胞を用いてPFOSが神経細胞に及ぼす影響をパッチクランプ法にて検討する。④*Paramecium caudatum*を用いた検討：平成16年度、17年度において、*Paramecium caudatum*をPFOS/PFOAの毒性スクリーニングに用いることができないか検討すると共に、PFOS/PFOAが、K⁺誘導性後退泳動に及ぼす影響について検討する。P.

caudatum は繊毛に電位依存性カルシウムチャンネルを持ち、泳ぐ方向、時間からそのチャンネルの動きを知ることができる。PFOS/PFOA が *Paramecium caudatum* の後退泳動持続時間に及ぼす影響、その影響の大きさ、また PFOS/PFOA の類似化学物質である他のフッ素化合物、およびカルシウムイオンチャンネル阻害剤存在下においても同様の観察を行なう。その結果からは PFOS/PFOA の毒性メカニズムを考察する。

⑤マウスの摂食作用に及ぼす影響の検討：雄性 ddy マウスの腹腔内に PFOS を連日 20 日間反復投与し、摂食量、体重に与える影響について検討する。また脳室内（第3脳室）投与系を用い、絶食下において PFOS を急性投与し、投与後の摂食量を測定する。さらに PFOS を脳室内に急性投与し、投与 2 時間後における胃排出能を測定する。

C. 研究結果

[I] ヒト生体試料バンクの創設

試料の収集と整備、保存：

ヒト生体試料バンクの創設において平成18年3月現在、全血7,099検体（表1）、血清22,535検体（表2）、母乳2,704検体（表3）、食事3,380検体（表4）が連結不可能匿名化され保存されている。保存場所は京都大学大学院医学研究科G棟3階336号室サンプルルーム（図1、図2参照）であり、この部屋には-20℃に設定された部屋と4℃に設定された部屋が備え付けられている。これら保存試料のうち、厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）（平成15年度～17年度）により系統的に収集された試料数は、全血3,322検体、血清6,220検体、母乳2,614検体、食事947検体である。これ

ら試料の提供者の平均年齢を表5に示す。

これらの試料の整備は次のように行なった。まず過去の3種類の保存試料を整備した。池田正之（京都大学名誉教授）および研究分担者の渡辺がそれぞれ管理している、1976年から1997年にかけて実施された全国規模調査による地域住民の個人別の食事、血液（血清、全血）等の生体試料は、食事調査内容の詳細なデータや血液検査結果などの多くの情報を持つ。京都大学医学部附属病院に保存されていた連結不可能匿名化の血清試料は1977年から2002年までの試料であり、属性試料としては性、年齢のみ付随する。主任研究者である小泉がPOP s 研究を目的として集めていた血清、母乳、食事試料も連結不可能匿名化された性、年齢のみ付随する試料である。これら1976年から2002年までに集められ別々に保存されていた全血、血清、母乳、食事試料、及びそれらの属性資料を収集、整備し、その保存状況の確認を行なった。また、長期保存に耐えるようにポリプロピレンやポリエチレン容器に移し替え、重量を測定し、メンディングテープを用いてラベル等を張り、試料バンク用にコード化による整理を行った。同時に蒸留水を同じ容器に入れ、それぞれ3本ずつ、容器のブランクとして保存した。

本研究開始に伴い、新たに系統的、継続的な試料収集を分担研究者、班友の協力を得て収集した。これらの試料は分担研究者が収集時点で、先の申し合わせどおり、血清用には2mlファルコンライオジェニックバイアルを、母乳にはファルコン50ml遠心管を、食事試料はNIKKO製（J-ボトル）の1Lのポリプロピレン製の広口ビンを使用しており、メンディングテープを用いてラベル等を張ってあ

り、試料の重量測定と、血清コレステロール値、トリグリセライド値を測定してサンプルルームに保存した。試料は書面による同意を得て採取されており、連結不可能匿名化で属性をデータベースに保存した。

試料を管理するためのデータベースは Microsoft access を用いて委託開発し、それぞれの試料の持つ情報ごとに分類され、リレーショナルデータベース（図3～図5）としてデータ保存、検索できるようにした。過去の試料については提供者の血液検査などの情報が付随しており、提供者データ管理機能と試料の持つデータ（採取日、採取場所、食事内容、カロリー、蛋白質量、線維質量、ビタミン・金属などの量など）、および収集されてからのデータ（重量、コレステロール値、トリグリセライド値、測定された化学物質濃度など）などが、同一試料にすべて関連付けられて表示できるようになっている。検索条件も多様であり、採取年、採取地域、提供者の性や年齢など、複数の絞り込みも可能であるため、試料の運用に関して検索が容易である。

バンク試料の運用：

バンク試料の運用を平成16年度に試験的に開始し、平成17年度には2研究機関に提供した。2年間にわたって全血150検体、血清410検体、母乳50検体、食事390検体を提供した。提供先は独立行政法人産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター東海明宏博士と国立水俣病総合研究センター国際・総合研究部社会科学室蜂谷紀之博士である。

提供に当たっては、バンク運営委員会を開催し、提出された使用申請書に対し

検討を行ない、受理された。平成16年度は東海明宏博士のPBDEs（polybrominated diphenyl ethers）の時間的、空間的動向調査に対して血液試料、母乳資料、食事資料を提供した。食事と血液は1980年代、1990年代を中心に北海道、宮城県、群馬県、富山県、島根県、愛媛県、鹿児島県、沖縄県の試料を、母乳は1980年代、1990年代の秋田県の試料と、2003年の秋田県、宮城県、福井県、京都府、兵庫県、島根県、高知県、沖縄県の試料を提供した。さらに定点観測的に京都で採取された血液を1983年から2000年まで提供した。血液については、10検体ごとに等量ずつ、母乳は5または4検体を等量ずつプーリングした。食事は検体によって1日摂取量が異なるため、それぞれの検体の1日量を比例配分した。平成17年度は、蜂谷博士にはメチル水銀濃度測定のための血液試料を秋田県、宮城県、岐阜県、和歌山県、兵庫県、高知県、沖縄県の試料からそれぞれ10検体ずつ、東海博士には、臭素系難燃剤のうち、デカブロモジフェニルエーテル、エチレンビスペンタブロモフェニル（デカブロモジフェニルエーテルの代替品）、ヘキサブロモシクロドデカン（HBCD）ならびにアンチモンのリスク評価のための食事試料および血液試料を提供した。提供した試料は1980年代、1990年代及び2000年代の全国の食事30検体、血液120検体である。試料数に限りがあるので有効利用するために、臭素系難燃剤ならびにアンチモンの測定では、血液、食事は10検体をプールして1検体とした。地域、年代、性別を反映した代表性のある試料を提供できた。運用はとどこおりなく遂行され、使用された研究においてそれぞれ重要な知見が得られている。詳細につ