

## 地域Eにおける初回調査から4年後または5年後のコホート調査結果

自治医科大学 地域医療学センター 環境医学 堀口兵剛、香山不二雄

### 研究の目的

#### 1. 研究目的

食品から摂取するカドミウム（以下、Cd）の健康影響を調べるために、自家保有米およびその地域の野菜等を食している農家女性を対象に調査を行う。特に腎機能および骨密度について追跡調査を行う。これまでの約1,900名の被験者の断面調査では明らかな腎機能障害および骨密度への影響は見いだされていないが、今後加齢とともに顕在する可能性もあり、コホートとして調査を継続する必要がある。その結果により国内でも高いCd曝露を受けてきたと考えられる集団に対する対応と国内基準の策定に重要な情報をもたらす。

### 研究方法

#### ● 調査対象地域

平成13年および平成14年に調査した地域Eが4年または5年経過するので、同じ被験者に対して4年後または5年後の健康診断を再行う。今回も同様にJAから前回の被験者に健康診断の勧奨を行っていただき、内容は前回と同様に栄養調査、生活歴、現病歴、疾病罹患率の調査、骨密度調査、腎機能障害について追跡調査を行う。平成18年11月に、JA女性部の協力を得て、栄養および環境汚染物質と骨粗鬆症などの健康影響との関係を調査した。30歳以上の女性における栄養および生活習慣を調査し、腎機能障害、骨粗鬆症などについて検討した後に、それらの総合評価を作成し、それに基づいて生活指導、栄養指導を行った。前回の被験者の再度の参加は気体より少なく、コホートの追跡率が低かったため、平成19年1月に再度繰り返し、個別勧誘をし、健康診断を実施した。

- 栄養調査 佐々木ら (Sasaki et al. 1998, Sasaki et al. 2000a, Sasaki et al. 2000b) により開発され検証された自記式質問票による栄養調査、過去1ヶ月の食事について代表的食品147品目の摂取量と摂取頻度に関する質問で構成されている。米に関しては、日頃使用するお茶碗の大きさを聞き、三食でそれを用いてご飯を何杯食

べるかを聞いた。説明会で記入方法を説明の上、自宅で記入して貰った。記入に要する時間は一般的に 40～60 分間である。健診当日、栄養士が記載状況、内容を本人に確認の上、質問票を回収した。

● 各自持参の米の収集、

Cd 濃度測定のために少量(約 20 g)の白米を健診当日に、健診参加者全員から収集した。

● 質問票による生活習慣調査、運動量、運動習慣を記入して貰い、健診当日に栄養士および保健婦による確認をした後に、質問票を回収した。

● 身体計測、身長、体重、握力(骨密度測定を行う非利き手の握力)

骨密度計測(DEXA 法、非利き手の橈骨尺骨遠位側)を行った。

● 血液・尿検査項目

血中 Pb、Cd、p,p'-DDE、hexachlorbenzen、尿中 Pb、尿中 Cd

貧血指標 血算、血清鉄、フェリチン

糖尿病指標 空腹時血糖、ヘモグロビン A1c

肝機能指標 GOT、GPT、 $\gamma$  GTP

脂質 総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド

腎機能 血中  $\beta$  2-ミクログロブリン、尿中  $\beta$  2-ミクログロブリン、尿中  $\alpha$  1-ミクログロブリン、尿中クレアチニン

骨代謝指標 血中カルシウム、リン、オステオカルシン、骨型 ALP、尿中 NTX、尿中デオキシピリジノリン

性腺刺激ホルモン LH

● Cd の測定法

血液および米の試料には硝酸添加の後にマクロ波加熱装置(MDS-200, CEM)で行い、HP4500 series ICP-MS(Yokokawa Analytical Systems)で定量した。尿試料に関しては、平成 13 年の第 1 回目の調査では、硝酸を加え 24 時間放置後に、フレームレス原子吸光分析計 SIMAA 6000(Perkin Elmer)にて Cd の定量を行った。全てのサンプルには、インジウムおよびタリウムを内部標準として加えて、測定を行った。精度管理は、精度管

理用サンプルを用いて変動をコントロールし、部分的に ICP-MS と原子吸光分析の両方法を用いて確認を行った。一方、平成 18 年度の調査時には、前回尿の測定に用いた原子吸光分析器が老朽化のため、機器更新が行われた。今回、尿の測定は同様の手法を用いるという方針であったため、新規に原子吸光分析器が導入され前回の保存されていた同一サンプルを新しい原子吸光分析器と血液測定に使用した ICP-MS の両方を用いて測定を行い、再現性について検討を行った。

### ●統計解析

年齢は算術平均と標準偏差を求め、地域間の比較で、前年齢層では、ダネットの多重比較により検定し、 $p < 0.05$  を統計学的に有意な差とした。40 歳以上では、two way ANOVA の後に Holm の多重比較により検定した。この解析の過程では、年齢を除いてすべて対数変換した値を用いて解析した。前回調査との比較は、paired t-test を利用した。

### 結果

2001 年および 2002 年調査（初回調査）の保存された尿試料を、古い原子吸光分析器（ASS）で当時測定された結果と、新しい原子吸光分析器（AAS）並びに HP4500 series ICP-MS（Yokokawa Analytical Systems）で測定した結果とを、比較検討した（図 1）。その結果、初回調査時の値と、ICP-MS とのデータの相関がよりよいので、2006 年および 2007 年（平成 18 年度）の調査では、ICP-MS を用いて尿中 Cd 濃度を測定することとした。

平成 18 年度は、地域 E のコホートの追跡調査対象者 725 人に対して、調査勧誘を行った結果、12 月実施の調査では 371 名が再度調査に参加した。さらに 1 月の調査で 163 名のコホート対象者が健康診断を実施することができた。すなわち、追跡率 74% となった。また、新規の調査参加者が 266 人加わった。

この中から、地元産の米摂取歴が 10 年未満の女性 20 名、喫煙者 25 名、関節リュウマチの既往および現病歴ありの 25 名、サルコイドーシス 1 名、尿試料なし 4 名の重複を差し引いて、最終解析対照コホート数は 483 名となった（表 9）。さらに、コホートの追跡結果は、表 10 に示す。平成 13 年時点で、20 歳代 8 名、30 歳代 16 名、40 歳代 69 名、50 歳代 167 名、60 歳代 187 名、70 歳代 36 名であった。

表 11 に、尿中 Cd 濃度を、 $3.0\mu\text{g/g cre}$  未満、 $3.0\mu\text{g/g cre}$  以上  $6\mu\text{g/g cre}$  未満、 $6\mu\text{g/g cre}$  以上との 3 群に分けて検討をしてみた。血中 Cd 濃度は変化しなかったが、尿中 Cd

濃度では、平成 13 年が  $3.0\mu\text{g/g cre}$  未満であったグループでは 5 年後には、尿中 Cd 濃度は統計学的に有意に上昇していた。一方、初回調査で  $6.0\mu\text{g/g cre}$  以上の高濃度群に含まれていた被験者は増加しておらず、むしろ 60 歳代で低下していた。

次に、表 1 2 で、Cd 曝露が高い群で、腎機能の加齢による低下を助長するか確認をした。その結果は体内のカドミウム蓄積量にかかわらず、臨床医学的に問題となるような腎機能の有意な増悪、すなわち  $\alpha 1\text{-MG}$ 、 $\beta 2\text{-MG}$  の上昇は見られなかったが、 $\alpha 1\text{-MG}$  は 70 歳代の尿 Cd  $3.0\text{-}6.0$  の群において統計学的に有意な上昇、また、Cd 曝露の高い高齢者で  $\beta 2\text{-MG}$  も統計学的には有意でないが上昇傾向が見られる。表 1 3 に、血中鉛の変化を示す。特に大きな変化は、40 歳代に見られ、閉経期に末梢血鉛濃度が上昇することが観察された。

この追跡調査の結果、尿中カドミウム濃度が腎機能障害発生の閾値と考えられている  $10\mu\text{g/g cre}$  を超えた被験者の数の集計を表 1 4 に示す。前回または今回の調査で、尿中カドミウム濃度が  $10\mu\text{g/g cre}$  以上であった方は合計で 51 名であった。

## 考察

腎機能障害を起こす尿中 Cd 濃度の「閾値」はそれほど厳密に定まっているわけではなく、おおよその目安であり、研究者により異なる。特に、 $10\mu\text{g/g cre}$  を超える程の高いレベルでは個人内変動も大きくなるため、一度、この値を超えたからと言ってすぐに腎機能障害が進行するという訳ではない。実際に、明らかな腎機能障害のある被験者は見いだされなかった。

従って、これらの 51 名の方に対して緊急に医療上の対策を実施する必要はないが、報告書を送るだけでなく、心理的なケアも含めた個人的対応が必要である。

一方、今回のコホート被験者に明らかな腎機能障害が認められなかったが、かなりの量の体内カドミウム負荷量があり、さらに今後も、カドミウム濃度が流通の基準値以上の自家産米を食べ続ける可能性のある被験者は、将来、腎機能障害が発症してくる可能性は決して否定できない。従って、尿中カドミウム濃度が高い値を示した被験者には、耕作地の土壌管理の徹底、自家産米のカドミウム濃度の定期的測定、自家産米摂取の自粛等の予防対策が必要になると考えられる。

## 結論

米中カドミウム濃度が高い米の見つかる率の高いE地域の5年後のコホート追跡調査では、725名の追跡対象者の中で、534名74%の追跡率であった。解析対象者は、483名で解析をした結果、カドミウム曝露が高い群でも、5年間の加齢による腎機能低下を増悪させていなかった。

しかし、この集団の中に、尿中カドミウム濃度  $10\mu\text{g/g cre}$  以上を、少なくとも一回以上観察された被験者が51名おり、この生体負荷量の高い被験者群の個別のフォローアップが必要である。

図1 測定機器別の尿中カドミウム濃度測定値の相関

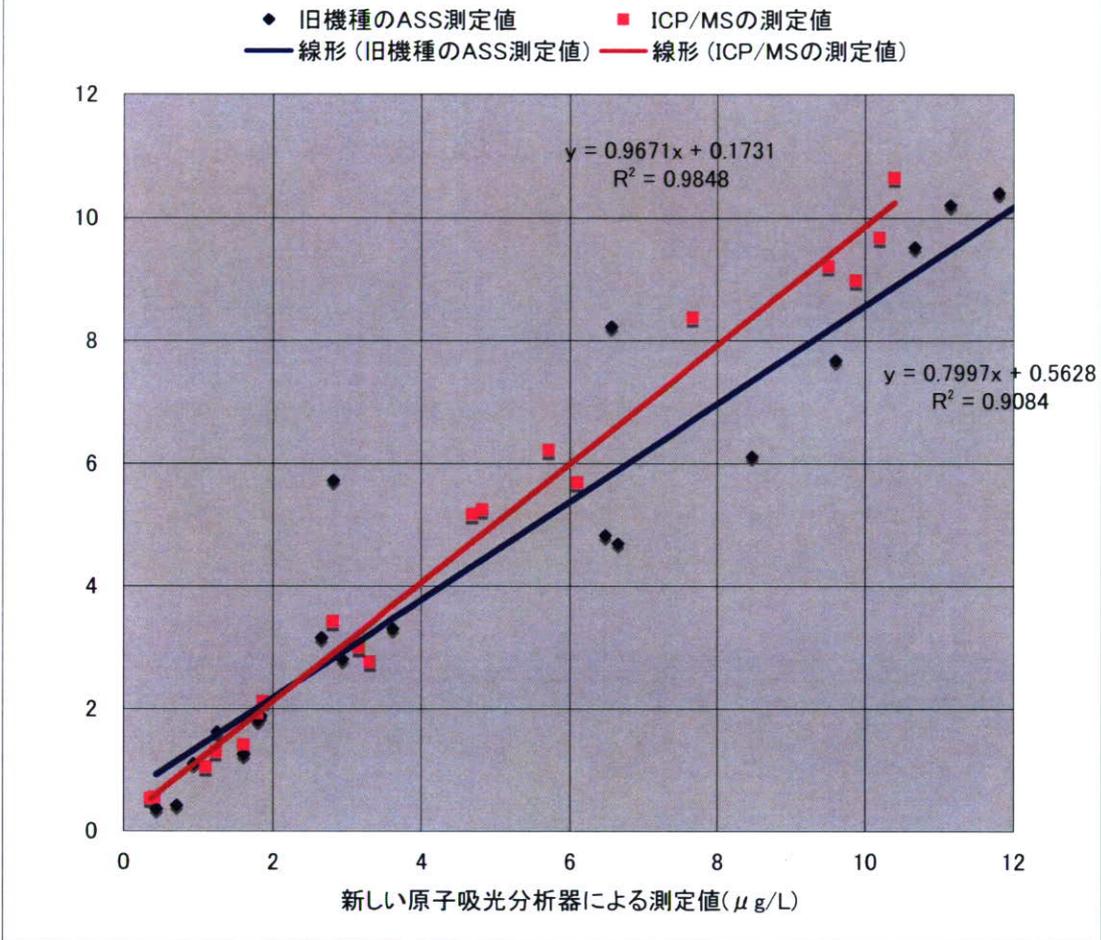


表9

2001-2002年地域E受診者数	725名
2006-2007年地域E追跡調査受診者数	534名
4-5年間の追跡調査数の割合	74%

コホートからの除外者

地元産米摂取歴10年未満*	20名
喫煙者(過去・現在) #	25名
関節リウマチ現病・既往	5名
サルコイドーシス現病	1名
尿サンプル無しç	4名

註1

\* (喫煙者と2名重複、尿サンプル無しと1名重複)

# (米摂取歴と2名重複、尿サンプル無しと1名重複)

ç (米摂取歴と1名重複、喫煙者と1名重複)

註2

コホートからの除外者数合計 = 55名 - 4名 = 51名

最終的な解析対象コホート数 = 534名 - 51名 = 483名

表10

The number of cohort subjects and grouping by urinary Cd and age.

Age classes	Urinary Cd ( $\mu\text{g/g cr.}$ )									
	<3.0		$\geq 3.0, <6.0$		$\geq 6.0$		Total			
	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2006-2007	
All subjects	132	230	121	483						
Number										
Age	$51.9 \pm 12.3$	$56.8 \pm 12.3$	$58.7 \pm 8.7$	$63.5 \pm 8.6$	$60.5 \pm 7.3$	$65.2 \pm 7.2$	$57.3 \pm 10.1$	$62.1 \pm 10.0$		
Maximum age	77	81	78	83	75	79	78	83		
Minimum age	22	27	36	41	42	47	22	27		
20-29 y.o.										
Number	8	0	0	8						
Age	$26.0 \pm 3.1$	$30.9 \pm 2.9$					$26.0 \pm 3.1$	$30.9 \pm 2.9$		
30-39 y.o.										
Number	14	2	0	16						
Age	$34.4 \pm 3.2$	$39.1 \pm 3.1$					$34.6 \pm 3.0$	$39.4 \pm 3.0$		
40-49 y.o.										
Number	25	33	11	69						
Age	$45.3 \pm 2.7$	$50.2 \pm 2.7$	$45.1 \pm 2.8$	$50.0 \pm 2.9$	$46.8 \pm 2.2$	$51.5 \pm 2.1$	$45. \pm 2.7$	$50.3 \pm 2.7$		
50-59 y.o.										
Number	51	76	40	167						
Age	$54.3 \pm 3.2$	$59.1 \pm 3.2$	$54.3 \pm 2.9$	$59.1 \pm 3.0$	$55.0 \pm 2.6$	$59.8 \pm 2.5$	$54.4 \pm 2.9$	$59.3 \pm 3.0$		
60-69 y.o.										
Number	26	101	60	187						
Age	$64.4 \pm 3.2$	$69.5 \pm 3.2$	$64.5 \pm 2.8$	$69.2 \pm 2.9$	$64.8 \pm 2.6$	$69.6 \pm 2.7$	$64.6 \pm 2.8$	$69.4 \pm 2.9$		
70-79 y.o.										
Number	8	18	10	36						
Age	$72.9 \pm 2.6$	$77.4 \pm 2.7$	$72.6 \pm 2.4$	$77.2 \pm 2.6$	$71.6 \pm 1.8$	$76.1 \pm 1.9$	$72.4 \pm 2.3$	$76.9 \pm 2.4$		

Age data are presented as arithmetic mean  $\pm$  arithmetic standard deviation.

表11

The changes of Cd concentration in peripheral blood and urine in cohort subjects.

Age classes	Urinary Cd ( $\mu\text{g/g cr.}$ )									
	<3.0		$\geq 3.0, <6.0$		$\geq 6.0$		Total			
	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007
Peripheral blood Cd ( $\mu\text{g/L}$ )										
All subjects (range)	2.76 (1.60)	2.92 (1.55)	3.50 (1.51)	3.63 (1.44)	5.13 (1.53)	5.23 (1.46)	3.61 (1.63)	3.75 (1.56)*	3.61 (1.63)	3.75 (1.56)*
20-29 y.o.	1.74 (1.53)	1.92 (1.40)	—	—	—	—	1.74 (1.53)	1.92 (1.40)	1.74 (1.53)	1.92 (1.40)
30-39 y.o.	1.72 (1.55)	2.11 (1.29)	—	—	—	—	1.95 (1.70)	2.31 (1.42)	1.95 (1.70)	2.31 (1.42)
40-49 y.o.	3.03 (1.62)	3.26 (1.48)	3.37 (1.55)	3.40 (1.42)	6.44 (1.57)	6.67 (1.22)	3.60 (1.68)	3.73 (1.53)	3.60 (1.68)	3.73 (1.53)
50-59 y.o.	2.87 (1.48)	3.17 (1.52)*	3.17 (1.56)	3.41 (1.45)	4.67 (1.57)	5.00 (1.49)	3.38 (1.59)	3.66 (1.54)*	3.38 (1.59)	3.66 (1.54)*
60-69 y.o.	3.31 (1.49)	3.09 (1.56)	3.70 (1.46)	3.79 (1.43)	5.03 (1.47)	4.98 (1.41)	4.02 (1.51)	4.02 (1.49)	4.02 (1.51)	4.02 (1.49)
70-79 y.o.	3.26 (1.71)	2.67 (1.78)	4.00 (1.46)	4.06 (1.53)	6.57 (1.46)	6.42 (1.67)	4.39 (1.62)	4.20 (1.76)	4.39 (1.62)	4.20 (1.76)
Urinary Cd ( $\mu\text{g/g cr.}$ )										
All subjects (range)	2.09 (1.38)	3.43 (1.61)*	4.31 (1.22)	5.08 (1.37)*	8.10 (1.28)	7.58 (1.37)*	4.14 (1.74)	5.05 (1.59)*	4.14 (1.74)	5.05 (1.59)*
20-29 y.o.	1.81 (1.47)	1.64 (1.67)	—	—	—	—	1.81 (1.47)	1.64 (1.67)	1.81 (1.47)	1.64 (1.67)
30-39 y.o.	2.05 (1.32)	1.74 (1.35)*	—	—	—	—	2.27 (1.48)	1.97 (1.56)	2.27 (1.48)	1.97 (1.56)
40-49 y.o.	2.08 (1.30)	3.47 (1.45)*	4.20 (1.26)	4.25 (1.39)	9.11 (1.35)	9.35 (1.39)	3.68 (1.77)	4.48 (1.61)*	3.68 (1.77)	4.48 (1.61)*
50-59 y.o.	2.20 (1.36)	4.01 (1.44)*	4.35 (1.22)	4.89 (1.35)	7.76 (1.25)	7.32 (1.35)	4.06 (1.69)	5.07 (1.48)*	4.06 (1.69)	5.07 (1.48)*
60-69 y.o.	1.95 (1.50)	4.37 (1.31)*	4.36 (1.20)	5.48 (1.31)*	8.10 (1.28)	7.39 (1.36)*	4.76 (1.67)	5.85 (1.40)*	4.76 (1.67)	5.85 (1.40)*
70-79 y.o.	2.24 (1.30)	3.88 (1.59)*	4.08 (1.21)	5.45 (1.50)*	8.42 (1.34)	8.06 (1.44)	4.37 (1.70)	5.63 (1.61)*	4.37 (1.70)	5.63 (1.61)*

Data are presented as geometric mean (geometric standard deviation).

\* Significantly different from the value of the previous study judged by paired *t* test ( $P < 0.05$ ).

ND, not detected (less than  $0.3 \mu\text{g/L}$ ).

表12

The changes of urinary protein concentrations in peripheral blood and urine in cohort subjects.

Age classes	Urinary Cd ( $\mu\text{g/g cr.}$ )											
	<3.0					$\geq 3.0, < 6.0$					Total	
	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	$\geq 6.0$	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	2001-2002	2006-2007	
Urinary $\alpha 1$ -MG (mg/g cr.)												
All subjects (range)	3.81 (2.09)	3.80 (2.04)	5.01 (1.95)	5.43 (2.03)*	5.38 (2.02)	5.54 (2.05)	5.38 (2.02)	4.77 (2.04)	4.91 (2.06)	(ND-31.29)	(ND-46.69)	
20-29 y.o.	1.92 (1.58)	1.80 (1.35)	—	—	—	—	—	1.92 (1.58)	1.80 (1.35)	—	—	
30-39 y.o.	2.66 (1.59)	3.21 (1.47)	—	—	—	—	—	2.71 (1.54)	3.12 (1.53)	—	—	
40-49 y.o.	2.85 (1.87)	3.01 (1.89)	3.10 (1.74)	3.63 (1.84)	3.72 (1.67)	3.09 (2.07)	3.72 (1.67)	3.00 (1.83)	3.41 (1.83)	—	—	
50-59 y.o.	3.92 (2.07)	4.13 (2.21)	4.84 (1.92)	5.19 (1.84)	5.09 (1.86)	5.53 (2.03)	5.09 (1.86)	4.69 (2.01)	4.82 (1.97)	—	—	
60-69 y.o.	6.31 (2.01)	4.94 (1.86)	5.70 (1.84)	5.96 (2.03)	5.58 (2.14)	6.06 (1.94)	5.58 (2.14)	5.90 (1.89)	5.69 (2.04)	—	—	
70-79 y.o.	5.58 (2.02)	5.55 (2.05)	7.20 (2.22)	8.87 (2.38)*	8.10 (1.91)	6.20 (2.35)	8.10 (1.91)	6.53 (2.18)	7.79 (2.18)	—	—	
Urinary $\beta 2$ -MG ( $\mu\text{g/g cr.}$ )												
All subjects (range)	144.5 (2.05)	138.0 (2.12)	155.9 (2.27)	170.2 (2.54)	194.6 (2.47)	193.6 (2.39)	194.6 (2.47)	161.2 (2.25)	166.2 (2.43)	(ND-3262.6)	(ND-21223.4)	
20-29 y.o.	97.2 (1.35)	87.4 (1.21)	—	—	—	—	—	97.2 (1.35)	87.4 (1.21)	—	—	
30-39 y.o.	105.8 (1.57)	105.6 (2.09)	—	—	—	—	—	98.3 (1.85)	104.9 (2.22)	—	—	
40-49 y.o.	111.7 (1.67)	105.0 (2.19)	101.3 (1.90)	110.8 (2.10)	127.0 (1.85)	138.4 (2.83)	127.0 (1.85)	110.3 (1.97)	111.1 (2.08)	—	—	
50-59 y.o.	153.1 (2.20)	170.2 (2.00)	153.1 (2.16)	155.6 (2.11)	178.7 (2.28)	193.3 (2.21)	178.7 (2.28)	161.9 (2.19)	165.3 (2.11)	—	—	
60-69 y.o.	197.4 (2.22)	140.4 (2.06)*	174.8 (2.13)	186.8 (2.40)	205.5 (2.64)	194.1 (2.35)	205.5 (2.64)	183.8 (2.21)	185.1 (2.44)	—	—	
70-79 y.o.	209.0 (1.88)	201.9 (2.80)	217.4 (3.38)	343.9 (4.91)	315.5 (2.49)	278.1 (2.88)	315.5 (2.49)	230.8 (2.86)	298.3 (3.69)	—	—	

Data are presented as geometric mean (geometric standard deviation).

\* Significantly different from the value of the previous study judged by paired *t* test ( $P < 0.05$ ).

ND, not detected ( $\alpha 1$ -MG, less than 0.9 mg/L;  $\beta 2$ -MG, less than 70  $\mu\text{g/L}$ ).



2001年・2002年健康診断	2006年・2007年健康診断	人数
閾値未満	閾値未満	—
閾値以上	閾値未満	9名
閾値未満	閾値以上	15名
閾値以上	閾値以上	11名
閾値未満	受診なし	—
閾値以上	閾値未満	11名
受診なし	閾値未満	—
受診なし	閾値以上	5名
どちらかの検診で閾値以上の尿中カドミウム濃度の被験者		51名

## 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(平成 17 年)

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coni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	G/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