

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 濃度が低い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 集団でのタイピ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	PredHE T	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	rs9444459	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	rs9444460	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	:	マイナーアレルの比率

(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。

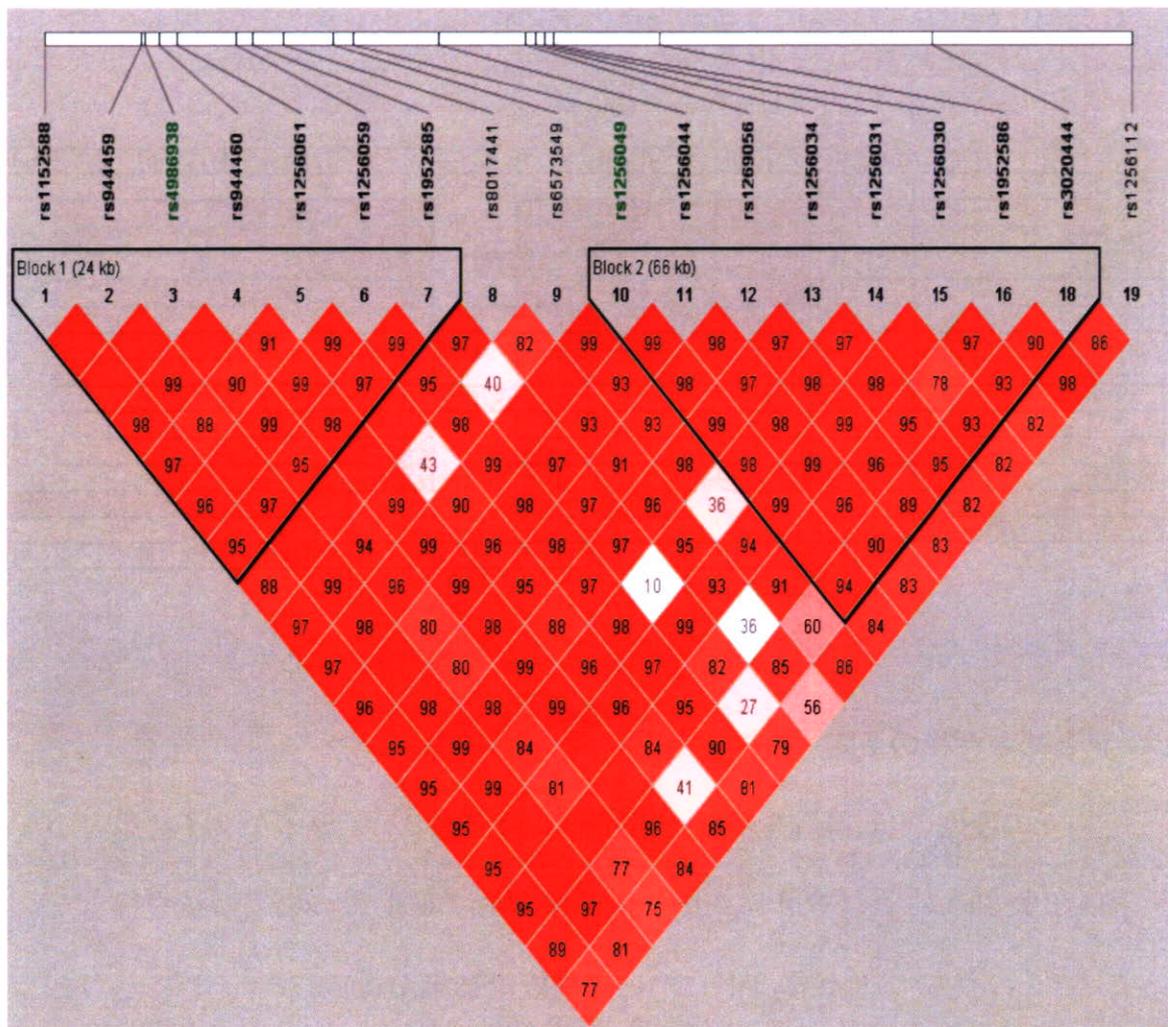
全サンプルについての結果を solid spine によって示したのが図 1 である。それによれば、ESR2 遺伝子の中で、No. 1 から No. 7 まで (24kb)、No. 10 から No. 18 まで (66kb) の 2 つのブロックが存在することが分かる。また、前者のブロックでは SNP1、2、3、4、5、6 が、後者では SNP10、11、14、18 がタグ SNP として認められる。

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。

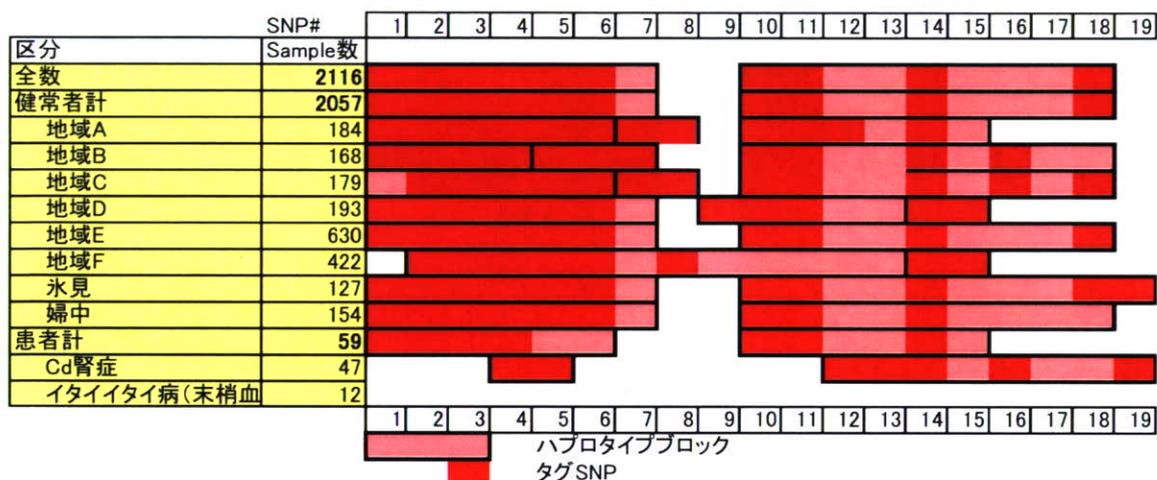
従って、本来であれば、これらのタグ SNP を中心に健常者群、Cd 腎症患者群、イタイイタイ病患者群の間での症例対照研究による比較を行い、Cd 暴露による骨障害発展に対して影響を及ぼす ESR2 遺伝子内の SNP を解明する（あるいは ESR2 遺伝子は関与しないことを示す）必要があるが、これは症例の解析可能なサンプル数が増えるまで待たなくてはならない。現在、病理標本から抽出した DNA からの PCR をもっと小さいサイズの産物となるようなプライマーを設定し直して行っているところであり、解析可能な症例サンプルが増加することが予測され、その結果を待って、再度解析を行う。

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。

参考文献

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曝露量推計

分担研究者：中井 里史（横浜国立大学）

要旨

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、精米等の基準値を変化させた際の日本人のカドミウム曝露量を推計してきた。その内容は、(1) 平成15年度に実施された日本人のカドミウム曝露量推計の方法に基づき、新たにコーデックス委員会から要請されたシナリオに基づく曝露量推計シミュレーション、(2) カドミウム曝露量が高いと推測される一地域で実施されたトータルダイエツ研究のデータを使用した曝露量推計、(3) 基準値設定は撤廃されたが当初案として提出されていた大豆の基準を変化させた場合の曝露量推計である。また曝露量推計をもとに、シングルコンパートメントモデルを利用し、体内負荷量に関する推計シミュレーションを行ってきた。

結果については、(1) コーデックス基準値原案から米の基準値を変化させた場合の結果を、コーデックス基準値原案による結果と比較したところ、分布の違いはわずかであった。(2) 地域データにシミュレーションを適用した結果については、年齢階級別に実施したシミュレーションにおいては実測データと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、全般的には個別データに基づく集計と大きな違いは認められなかった。(3) 大豆のカドミウム基準を設けた場合と、設けなかった場合と比較したところ、大豆からのカドミウム曝露量および全食品からの曝露量ともに、ほとんど差は認められなかった。また、負荷量に関しては、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。

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た。昨年度我が国での現状を検討・報告すべく、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曝露量推定を行い、コーデックス委員会に報告してきた¹⁾。このシミュレーションデータなどをも利用して2006年7月末のコーデックス委員会総会においては、精米のCd基準が0.4mg/kg（0.4ppm）としてステップ8で最終採択され、一応の決着をみた。この間に

は、コーデックス委員会からの新たな提言などもあり、摂取量評価のさらなる参考資料とするべく、新しいシナリオに基づくわが国での食品からの Cd 曝露量推定を行う必要にも迫られた。なお、曝露量推定は主に、精米の基準値に関するものであるが、大豆のように当初案として提出されたが最終的には基準案が撤廃されてきたものもある。わが国では味噌や豆腐など大豆の食品、摂取方法は多岐にわたり、大豆摂取による Cd 曝露を懸念する声もあることから、精米だけではなく、大豆の基準値をも考慮したシミュレーションを実施した。

また国民全体の Cd 曝露量の状況を調べるだけでなく、Cd への高曝露集団と考えられる集団が、実際どの程度の曝露を受けているかを調べることも、リスクマネジメントの観点からは重要となる。しかし、十分な量、また十分信頼できる地域集団のデータを集めることは必ずしも容易ではない。そのため、ある Cd 高曝露地域で実施されたトータルダイエツトスタディデータに国民栄養調査で実施したモンテカルロ・シミュレーションを適用し、摂取量調査や濃度測定などの個別データからの Cd 曝露量算出結果とシミュレーション結果を比較することでモンテカルロ・シミュレーションの有効性を調べるとともに、その地域における Cd 曝露量の分布を推計・検討した。

さらには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、体内負荷量推定に関する検討も行った。

なお、Cd 基準値に関しては、平成 16 年度当初では検討段階であったものが、平成 18 年度までに確定したものがある。しかし、本研究はコーデックス委員会での検討途中段階で実施したものも含まれている。いくつかのシナリオは途中段階のまま検討を行っていることを申し添えておきたい。

B. 方法

1. 曝露量に関するシミュレーション

1) 資料

本研究で使用する資料や推計方法の基本はこれまでと同じであるが¹⁾、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のを用い、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までの国民栄養調査データを用いた。なお、以下の解析には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用いた。

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²⁾の各データを用いた。

また、輸入分の大豆および小麦のCd濃度として米国産濃度データを用いた³⁾。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⁴⁾。

一地域でのトータルダイエツト研究データを用いたシミュレーションに関しては、香山らによって実施されたCd曝露量調査で、もっともCd曝露が高い地域で実施されたトータルダイエツトスタディのデータを用いて検討を行った⁵⁾。調査の概要は以下の通りである。

厚生労働省が実施しているトータルダイエツトスタディに基づいて、13群の食品群から代表的な食品群と、Cd含有量が高く、食品摂取量が多く、Cd曝露の寄与が高いと考えられる94品目、一品目につき最低3～19サンプル、合計530サンプルを採取した。食品サンプルの前処理は、トータルダイエツトスタディに準じて、可食部のみを取り出し、サンプルとした。なお、これらのデータによるCd曝露量平均値は1.06 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{日}$ (7.40 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{週}$) と計算され、この値は全体の58.2パーセンタイル値に相当する。

2) 推計方法

推計手順の概要を図1に示した。国民栄養調査を用いた場合、まず、食品摂取量として目的のためには長期平均摂取量を求める必要があるが、今回の解析では1日調査である国民栄養調査のデータをそのまま用いた。食品摂取量には各食品(群)間で相関がみ

とめられるので、推計にあっては米類、小麦類、大豆類の3食品間の相関を考慮した。具体的には順位相関として、それぞれ米-小麦:-0.32、米-大豆: 0.22、小麦-大豆:-0.1を仮定した。

一方、農水産物中のCd濃度は約130品目について得られている。しかしながら、この農水産物品目と国民栄養調査データベースに含まれる約千種類の食品とは必ずしも1対1に対応していない。そのため、国民栄養調査の食品とCd濃度測定データがある農水産物と1対1の対応がついていないものについては関連する農水産物のCd濃度をプールして用いた。その対応関係を表1に示した。

さらに、加工食品では複数の農水産品から作られているものもある。そのため、各食品に含まれる農水産物品の種類と量を示す係数(以下では、変換係数と呼ぶ)を求めなければならない。この変換係数については吉池⁶⁾が残留農薬の曝露量試算のために示した値を用いた。なお、これに示されていない魚介類についてはすべて変換係数を1とし、すなわち水産物はそのまま食品として摂取すると仮定した。食品群別摂取量を算出する際にはこの変換係数をかけた上で積算した。

Cd摂取量分布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。約90種類の食品群別(表1)の摂取量分布とそれらの食品群に農水産物中のCd濃度分布を掛け合わせることによって行った。実際には、摂取の有無、摂取量(摂取者のみ)およびCd濃度について、それぞれの分布に従う乱数を発生させ、それを掛け合わせてCd摂取量を算出する操作を繰り返すことによって、Cd摂取量分布を推計した(図2)。摂取の有無については0と1の二値分布を仮定し、国民栄養調査データにおいて食品群毎に摂取量がゼロでない者の割合を二値分布において1となる期待値とした。摂取量およびCd濃度の理論分布としては原則として対数正規分布を仮定した。各分布の性状は国民栄養調査およびカドミウムの実態調査から得られたそれぞれの平均値並びに標準偏差から推計したパラメータによって決定した。ただし、Cd濃度については定量下限(LOQ)を越える分析試料数が100以上の食品群についてのみ対数正規分布を仮定し、定量下限(LOQ)を越える分析試料数が100未満のその他の食品群については中央値を固定値として用いた⁷⁾。Cd濃度がLOQ以下の場合の取り扱いについてはGEMS/Foodのレポート⁸⁾に従って、LOQ以下の割合が60%以下のものは $LOQ*0.5$ を、それ以上の場合はLOQ値を代入する方法によった。

一地域でのトータルダイエット研究データからの推計方法等は、国民栄養調査に基づく方法と同じであるが、以下のような条件を加味して検討を行った。

- ・ 食品摂取量には、対数正規分布を仮定した（平均値等は食品摂取量調査の結果を用いた）。
- ・ 体重は、調査対象となった 20 歳以上の 965 人（うち 2 名は体重のデータ無し）のデータを利用して、正規分布を仮定した。
- ・ Cd 濃度分析試料数が 5 以上の食品について分布（対数正規分布）を仮定し、試料数が 5 未満の場合は平均濃度のみを使用した。
- ・ 食品摂取量間には、絶対値 0.4 以上の順位相関を考慮した。
- ・ Cd 濃度および食品摂取量の最大値、最小値はトータルダイエットスタディの結果を反映し、その値を超えるものは存在しないと仮定した。

負荷量推定

推計モデルの構造を概略的に示したものを図 3 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ータ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 $\left(\frac{dM_N}{dt} \right)$ は単位時間当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

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

$$\begin{aligned} & \text{(単位時間あたりに摂取されるカドミウム量)} \\ & = \text{(食品中カドミウム濃度)} \times \text{(時間あたりに摂取する食品の量)} \end{aligned}$$

★ 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。

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

$$\begin{aligned} \text{(腸管から非代謝で排出されるカドミウム量)} = \\ \text{(腎中カドミウム濃度)} \times \text{(糞中カドミウム濃度/体内カドミウム分配費)} \times \text{(一定時間辺りの糞からの排出量)} \end{aligned}$$

★ 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。

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

$$\begin{aligned} \text{(単位時間あたりに腎で代謝されるカドミウム量)} = \\ \text{(代謝クリアランス)} \times \text{(腎中カドミウム濃度)} \end{aligned}$$

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曝露量推計と同様に Crystal Ball 2000 日本語版を用いて行った。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。負荷量推定の手順は、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%^{9,10)} と仮定して計算を行った。

C. 試算シナリオ

シミュレーション実施に際して、これまで行ってきた試算シナリオは以下の通りである。

平成 16 年度 (国民栄養調査に基づく) および体内負荷量推定 (表 2)

シナリオ 1 : コーデックス基準値原案 (当時)

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)

平成 16 年度 (特定地域)

シナリオ 7 : Cd 濃度の上限値は特には定めない、すなわち Cd 濃度の規制を行わず