

第2表 ストックホルム条約に関連する動き

1992年 6月	地球サミットのアジェンダ 21 で重要性の指摘
1993年 5月	第17回 UNEP 管理理事会決定によって、世界行動計画の採択のための政府間会合を行うことが決定された。
1997年 2月	第19回 UNEP 管理理事会で条約化の決定
1998年 6月	政府間交渉会議の開始
2000年 12月	第5回政府間交渉会議で条約案について合意
2001年 5月	外交会議（於ストックホルム）で条約の採択
2002年 8月	日本が条約を批准
2004年 5月	50カ国が締結し発効
2005年 5月	第1回締約国会議にて POPs 検討委員会を設置
2009年 5月	第4回締約国会議にて9物質を附属書に追加

第3表 各国が講ずべき対策

[1] 製造、使用の原則禁止及び原則制限 (DDT・PFOS)
[2] 非意図的生成物質の排出の削減
[3] 上記 POPs を含有するストックパイル・廃棄物の適正管理及び処理
[4] これらの対策に関する国内実施計画の策定
[5] その他の措置
・新規 POPs の製造・使用を予防するための措置
・POPs に関する調査研究、モニタリング、情報公開、教育等
・途上国に対する技術・資金援助の実施

1. POPs を巡る動き

POPs をめぐっては 90 年代から国際的な取り組みを模索する動きが現れた。1992 年 6 月の国連環境開発会議でまとめられたアジェンダ

21 第 17 章では海洋及び資源保護に

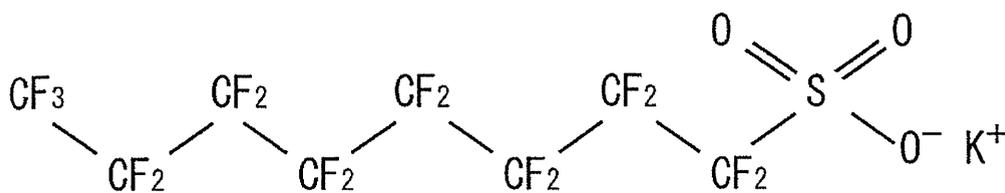
ついて、海洋汚染の 70% は陸上活動に起因していること、また、大きな脅威となっている汚染物質の一つとして合成有機化合物が挙げられている。長距離移動性により越境汚染を生じうるため、一部の国々の取り組みのみでは地球環境汚染の防止には十分でなく、国際的に協調して POPs の廃絶、削減等を行う必要がある。そのため政府間会合の招請が要請され、これを受けて 2000 年にはヨハネスブルクで開かれた「POPs の規制に関する国際会議」において、生物全般に悪影響を与える 12 種類の化学物質を規制する条約案の合意がなされた(表 2)。これを受けて 2001 年 5 月にストックホルムでストックホルム条約が採択された。この条約では、地球環境汚染の防止のため、POPs の製造・使用の禁止又は制限、非意図的生成物質の排出削減、ストックパイル・廃棄物の適正管理及び処理、これらの対策に関する国内実施計画の策定などを定めている(表 3)。

関連する国内法として、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」などにより、当初の 12 POPs 物質が規制されているが、1972 年に生産が禁止された PCB について、大量の未処理のストックパイルが保管されておりその管理や処理について課題が残されている。2001 年 6 月に「ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理に関する特別

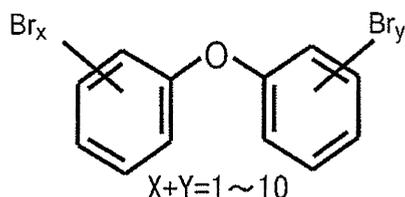
措置法」が制定され、処分計画を策定するようになっている。また、化学物質の規制等に関して「ダイオキシン類対策特別措置法」「特定化学物質排出量管理促進法」等の法律が 1999 年 7 月に成立している。

2. 新たな POPs

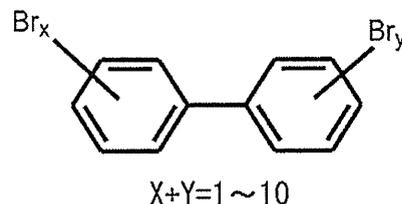
2005 年 5 月の第 1 回締約国会議で、当初条約に含まれていた 12 物質(Dirty dozen)に加えて、対象となる POPs を追加するため POPs 検討委員会が設置された。2009 年の第 4 回締約国会議では新規 9 物質(Nasty nine)の追加が決定された(表 2 および図 1)。当初の 12 物質の多くが農薬であったのに比べて、工業原料が指定されるようになった。また有機塩素化合物以外に有機臭素化合物、有機フッ素化合物と多様なハロゲン化合物が POPs になりうることを示している。ポリプロモジフェニルエーテルなどの各種の臭素系難燃剤などを焼却した場合に発生する臭素化ダイオキシン類についても塩素化ダイオキシン類と同様な毒性が指摘されている(WHO, 1998)。ダイオキシン類対策特別措置法の附則では、臭素化ダイオキシンについて、調査研究の推進、必要な措置を講ずることとされている。



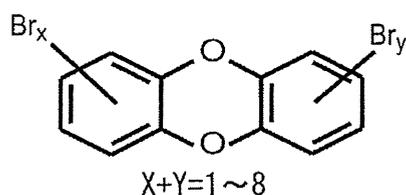
Perfluorooctane sulfonate (PFOS) potassium salt



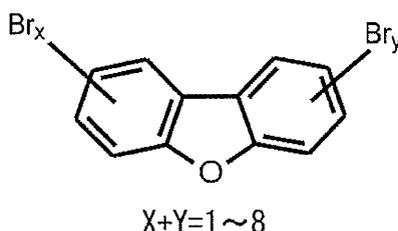
Polybrominated diphenyl ether (PBDEs)



Polybrominated biphenyl (PBBs)



Polybromodibenzo-p-dioxin (PBDDs)



Polybromodibenzofuran (PBDfS)

図1 新たなフッ素系, 臭素系 POPs

第4表 POPs 候補物質

ヘキサブロモシクロドデカン	プラスチック難燃剤
短鎖塩素化パラフィン	プラスチック難燃剤
エンドスルファン	殺虫剤, 防かび剤

現在、難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン、塩ビ樹脂可塑剤、難燃剤である短鎖塩素化パラフィン、農薬であるエンドスルファンが POPs 検討委員会で評価中である(表4)。さらに多環芳香族炭化水素(PAHs)、ペンタクロロフェノール(PCP)なども残留性から論議されている。

本稿では近年特に注目されているペルフルオロオクタンスルホン酸とポリブロモジフェニルエーテルについて記述する。

3. ペルフルオロオクタンスルホン酸

ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS: Perfluorooctane sulfonate)に代表される有機フッ素

化合物が POPs に挙げられる。PFOS の主要な生産者であった 3M 社は 2000 年に、環境中、生体中での蓄積を理由に、2002 年の終わりまでに生産を停止することを発表した。1950 年代からそれまで膨大な利益を上げていた製品を撤収させるほど事態を重く見たものである。PFOS とその塩は完全に炭素鎖上の水素がフッ素化された有機化合物である。疎水部はペルフルオロアルキル基(Rf 基)、親水部はスルホ基からなる界面活性剤である。Rf 基はテトラフルオロエチレンを原料としたテロメライゼーション、またはアルキル基を電解フッ素化することで製造される(図1)。Rf 基において、F は強い電気陰性度を持ち、C-F 結合はきわめて強い結合となり、Rf 基は自然的変化や生物学的代謝を受けないとされており、きわめて壊れにくい物質と考えられている。フッ素系界面活性剤は、メッキ液のミスト防止剤、離型剤、各種塗料・インキの湿潤・浸透・レベリング剤、油火災用の膜形成型泡消火剤、フッ素樹脂の

重合乳化剤、半導体リソグラフィのフォトレジストのような多様な産業用途があった。また重合化合物として紙や衣服の防汚・撥水処理剤にも使われていた。

PFOSとその関連物質は半世紀近く、注意なく使用されてきたが、それは生産量9万6千トンと極めて多いとはいえず(Paul et al., 2009)、また分析技術がなかったため、その環境汚染が表に出なかった。種々の有機フッ素化合物が利用されているなか、それらがヒトの血液中に有機態フッ素化合物が存在されることは知られてきた。難分解性の性質から1997年に有機フッ素化合物への懸念が生じてから(Key et al., 1997)、米国3M社の支援の元でミシガン州立大学のグループにより広汎な野生動物での汚染が証明されるにおよび行政、業界の動きがあわただしくなった。日本においてはPFOSは2002年には化審法指定化学物質と指定された。一方で、3M社はPFOSなどの生産を停止したが、2006年においても、いくつかの国において生産と輸入は続いていた(OECD, 2006)。このためストックホルム条約に附属書Bに指定され、限られた用途(半導体リソグラフィ、メッキ用など)を除いて使用が制限された。

3.1 PFOSの蓄積

PFOSは生物濃縮性試験でブルーギルと鯉の組織中で生物濃縮することが示され、生物濃縮係数はブルーギルで、非可食部について4013、鯉で、肝臓について2100 - 4300とされている。ストックホルム条約では生物濃縮係数5000以上を高濃縮性一つの目安としているが、環境中での広がりを加味して高濃縮性と判断している。PFOSは界面活性剤であるためオクタノール-水分配係数が測定不能である。また水溶性であるPFOSがこれほど蓄積することはこれまでのPOPsとはまったく様相が異なる。これには血漿タンパク質との非共有結合があげられている(Jones et al., 2003)。実際、ヒトにおいて腎クリアランスがきわめて低く(0.015 mL/day/kg)、また腸肝循環によるものと考えられる(Harada et al., 2007)。

ヒト血液中では、労働者、そして一般人口において検出されている。職業被曝について米国とベルギーの3M施設における従業員の自発的な医療

サーベイランスプログラムに基づく横断研究が報告されており、最も高いものは1995年アラバマ州ディケイターの製造従業員で血清中にPFOSが最高で12.83ppmで観察されたと報告している(Olsen et al., 1999)。平均では2000年においてディケイターとベルギーでのプラントでそれぞれ、1.32、0.80ppmであった(Olsen et al., 2003)。一般人口では、米国非ヒスパニックでの中央値は、PFOSは40.2ng/mLと報告されており、日本では20ng/ml前後で比較的低い(Harada et al., 2007)。PFOSがカーペット処理などに用いられていることなどから曝露に違いがあるのではないかと考えられている。また男性の血中濃度が2倍ほど女性より高く、この差は閉経後女性では消失する(Harada et al., 2005)。腎クリアランスに違いはなく、体内動態シミュレーションにより月経血による効果が推定されている。

PFOSは主に食事を介して曝露しており、関西地域における試算では1日あたり83.3ngのうち76.3ngが食事であり、ついで飲料水が4.9ngであった(Harada and Koizumi, 2009)。

3.2 毒性情報

1) 動物実験と疫学研究：

動物実験では、高用量で肝発がん性を有している(Seacat et al., 2002)。発達毒性について、ラット、マウスの胎児の成長を阻害することが報告されている(Lau et al., 2003)。また後ろ向きコホート研究が、フッ素化学工場の従業員を対象に行われている。その結果、膀胱がんの有意な増加が認められている(Alexander et al., 2003)。デンマーク、日本において、母胎中あるいは臍帯血中PFOS濃度と出生体重に負の相関が報告されている(Apelberg et al., 2007)。免疫毒性も検討されており、マウスにPFOSを投与し、IgM抗体産生能を評価した研究では、抗体産生の低下が認められ、LOELはオスで91.5ppbとなり、低濃度でも影響を及ぼしうることが示唆されている(Peden-Adams et al., 2008)。内分泌については横断研究で血漿中PFOS濃度が血中インスリン濃度、HOMA指数と正の相関を示し、グルコース恒常性への影響を示唆した(Lin et al., 2009)。神経内分泌系についてメス成熟ラットでPFOS

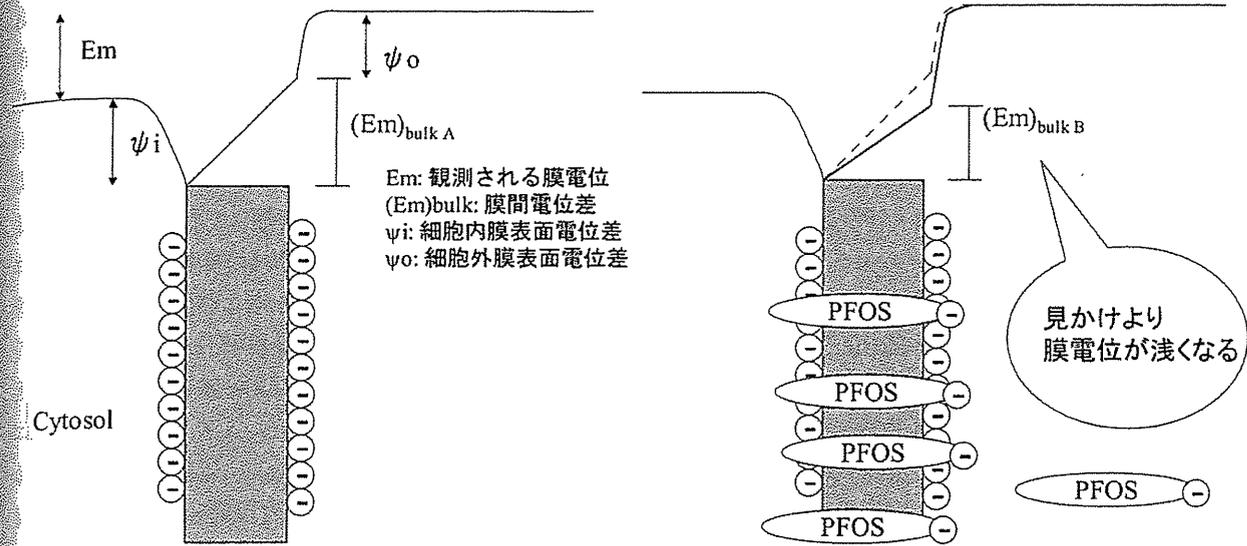


図2 ペルフルオロオクタンスルホン酸の電気生理学的作用メカニズム

を腹腔内投与し、脳内モノアミンの変化、コルチコステロン、レプチンについて評価されている (Austin et al., 2003)。PFOS 曝露は用量依存的に食餌摂取量と体重を減少させ、血清レプチン濃度を減少、血清コルチコステロンの増加、視床下部室傍核のノルエピネフリン濃度の増加を示した。

2) 作用機序を示唆する研究：

PFOS は変異原性を示さず (Oda et al., 2007)、一方ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 PPAR α のリガンドであり β 酸化の亢進による酸化ストレスはげっ歯類における発がん性の一因とされている (Seacat et al., 2002)。ヒトにおいては PPAR α の活性は弱く、フィブラート系薬剤を服用していてもペルオキシゾームの増殖は認められない。カニクイザルでの慢性投与試験でも肝細胞のペルオキシゾームの増殖は一貫しなかった (Seacat et al., 2002)。そのため、ヒトでは当てはまらないとの考えがあるが、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 でも PFOS により活性酸素種が増加することが観察されている (Eriksen et al. 2010)。

PFOS の発達毒性では母獣体重、肝重量に変化はないが、仔相対肝重量の増加、Eye opening の若干の遅延、出生後死亡の増加が見られる (Lau et al., 2003)。しかし PPAR α 欠損マウスでもこれらの影響は見られるため、作用メカニズムは

PPAR α 単一ではないと考えられる (Abbott et al., 2009)。

行動毒性についての動物実験では PFOS が不安行動の増加させると報告されている。脳室内への PFOS 投与実験により視床下部における神経ペプチド Urocortin2 の発現上昇が認められ、CRF2 受容体を介して不安作用、摂食低下をもたらしていると考えられる (Asakawa et al., 2007)。電気生理学的検討により PFOS が -60mV 程度の膜電位下で L 型 Ca^{2+} チャネルの抑制作用を有することが報告された (Harada et al., 2005)。またラット小脳プルキンエ細胞において、活動電位の頻度を低下させる作用を示した (Harada et al., 2006)。作用メカニズムとして、PFOS が陰イオン界面活性剤でもあり、細胞のリン脂質との相互作用が考えられ、この膜作用は、界面活性剤の強さに比例している (図 2)。この作用は神経細胞への影響や、気管上皮細胞の Ca^{2+} 恒常性にも影響を与えることが示されている (Matsubara et al., 2007)。それゆえに膵島 β 細胞に作用し、インスリン分泌に影響を及ぼす可能性も考えられる。

3.3 今後の課題

PFOS の体内動態を含め、毒性感受性に少なからぬ種差があると考えられる。体内半減期がヒトとげっ歯類とで大きく異なり、腎クリアランスの

違いが一つと考えられる。また PPAR α を介した作用についてげっ歯類とヒトでは反応性の違いがあり、ヒトではより耐性であるとされているが、ターゲット分子の解明が望まれる。また今後の PFOS 製造の規制が汚染の低減につながっていくかをモニタリングしていく必要があると考えられる。

4. ポリブロモジフェニルエーテル

ポリブロモジフェニルエーテル (PBDEs: Polybrominated diphenyl ethers) に代表される有機臭素化合物も近年 POPs に挙げられている。経済成長のなか家庭電化製品の増加に伴い、火災事故も増加してきたため、1970 年代には難燃剤の開発が始まり、各種難燃剤が生産され、現在も利用されている。難燃剤に臭素化合物が多いのは、火災の燃焼によるラジカル分子種を臭素原子が受け取り安定化し、樹脂の燃焼を抑制するためである。このうち PBDEs は不純物として臭素化ジベンゾダイオキシンが含まれていたことが懸念された。また燃焼によっても臭素化ジベンゾダイオキシンを発生しうる。

臭素系難燃剤は、電気製品の筐体、基板、繊維製品などに使われている。1995 年には臭素系難燃剤製造業者は自主規制を始めた。PCBs に類似した構造のポリブロモジフェニルや PBDEs 同族体のうち毒性が比較的強いペンタブロモジフェニルエーテルの製造、使用は廃止された。現在ではストックホルム条約の附属書 A に指定された。一方でリスクが低いとされるデカブロモジフェニルエーテルは使用が続いている。

4.1 PBDEs の蓄積

PBDEs は、PCBs のように臭素の置換数、置換位置により 209 の同族体が存在する。臭素置換数によりその性質は大きく異なってくる。コイを用いた生物濃縮性試験ではペンタブロモジフェニルエーテルは 1650 から 11700 の生物濃縮係数を示すが、デカブロモジフェニルエーテル (BDE-209) は 50 以下と濃縮性は少ない。BDE-209 はオクタノール-水分配係数 ($\log K_{ow}$) は 10.1 と極めて高いにもかかわらず、他の POPs のような高濃

縮性を示さない。SD ラットへの投与試験では、経口投与で BDE-209 の吸収率は約 10% と比較的低い (Morck et al., 2003)。また体内での分布も脂肪組織よりも肝臓、血液に多く分布する。排出経路は胆汁が主であり、静脈内投与後の消失半減期は最終相で 51 時間と短い (Sandholm et al., 2003)。また体内で代謝され、9 臭素化ジフェニルエーテル、メトキシ化合物も生成される。難燃剤ゴム製造労働者、電子機器解体作業員での研究では BDE-209 の血清中半減期は 15 日であるが、9 臭素化ジフェニルエーテル、8 臭素化ジフェニルエーテルはそれぞれ 29 日、64 日と臭素化数が少ない方が残留しやすい (Thuresson et al., 2006)。ラットでのペンタブロモジフェニルエーテルの脂肪組織中半減期はオスで 24.9 から 36.8 日と BDE-209 と大きく異なる (von Meyerinck et al., 1990)。

ヒト血液中では、PBDEs 製造労働者、廃棄物解体作業員、そして一般人口において検出されている。職業曝露について中国広東省の廃棄物解体作業員で BDE-209 が 3436 ng/g-lipid で検出されており、これまでの最高値である (Qu et al., 2007)。中国山東省の PBDEs 製造工場付近に住む住民からは 8 同族体の合計で平均 613 ng/g-lipid の血清中 PBDEs が検出され、アジア、欧米各国での既報値より 20 倍以上高い (Jin et al., 2009)。日本 8 地域の成人女性を対象とした調査では、1980 年代では血清中幾何平均濃度は 0.5 ng/g-lipid、1990 年代では 1.8 ng/g-lipid であった (Koizumi et al., 2005)。日本 4 地域の 2005 年における授乳中女性の調査では、血清中幾何平均濃度 2.9 ng/g-lipid と職業曝露集団に比べて十分低い。経年的には増加している (Inoue et al., 2006)。日本人の血液中には PBDEs のうち BDE-209 が占める割合が高く、生物利用能が低いものの日常的に多く曝露していると考えられる。4 臭素化体、6 臭素化体がついで多い。日本 4 地域の 2005 年における授乳中女性の母乳中の PBDEs では 4 臭素化体、6 臭素化体がもっとも多いが、BDE-209 は約 10% であり、血清中でのパターンと大きく異なる (Inoue et al., 2006)。構造活性相関解析の結果、PCBs と PBDEs の母乳、血清分配比の決定因子として水オクタノール分配係数

測値、水素結合受容体数が有意なものとしてあげられている。水溶性が極めて低い化合物では母乳中へ移行しにくいことが示された。

PBDEs は主に食事を介して曝露していると考えられている。全国 8 地域で集められた陰膳食事試料の分析では 1 日摂取量の幾何平均は 1980 年代で 91.4ng、1990 年代で 93.8ng であり、有意な差はなかった(Wada et al., 2005)。近年の増加は PBDEs 含有製品などの増加による室内での曝露が増えている可能性がある。

4.2 毒性情報

1) 動物実験と疫学研究：

ラットの BDE-209 慢性投与試験では 2240mg/kg/day の高用量で肝臓の血栓、変性が観察される(NTP, 1986)。一方で生後 3 日から 19 日までに経口投与で BDE-209 をオスマウスに投与した場合、20.1mg/kg で行動異常が見られた(Viberg et al., 2003)。ペンタプロモジフェニルエーテルの場合は 0.8mg/kg から行動への影響が見られるなど、毒性は高臭素化体より高い(Viberg et al., 2004)。4 臭素化体、5 臭素化の合剤を 4 日間 4 週齢ラットに経口投与し、0.81mg/kg/day で血中甲状腺ホルモン濃度の低下を示し、肝臓中 EROD 活性、PROD 活性、UDPGT 活性の増加を示した(Zhou et al., 2001)。

疫学研究では米国 NHENS2003-2004 のデータを用いた横断研究で血液中 BDE-153 とメタボリック症候群のオッズ比を有意に上昇させ、糖尿病のオッズ比は逆 U 字の関連を示した(Lim et al., 2008)。また五大湖周辺に住む男性での調査では血中 PBDEs 濃度と総 T 4 値、抗サイログロブリン抗体と正の相関を示した(Turyk et al., 2008)。スウェーデンの精巣癌患者 31 名と対照者 22 名の母親の血中 PBDEs 濃度での比較では、低濃度群に比べて高濃度群はオッズ比 2.5 であった(Hardell et al., 2006)。

2) 作用機序を示唆する研究：

ダイオキシン類と化学組成は似ているが、PBDEs はコプラナー構造を取らない。そのためアрил炭化水素受容体 AhR に結合するものの、CYP1A1 の転写誘導はほとんど見られず、弱い

アンタゴニストとして働く(Peters et al., 2006)。商業用の PBDEs は不純物のポリプロモジベンゾフランを含むことから、これが CYP1A1 の誘導をもたらすと考えられる(Wahl et al., 2008)。BDE-47 の 4 日間 3mg/kg/day 投与後、肝臓中構成的アンドロスタン受容体 CAR の発現上昇、トランスサイレチンの発現低下が認められている(Richardson et al., 2008)。代謝の亢進および甲状腺ホルモン輸送体の変化が甲状腺ホルモンレベルを変化させていると考えられる。CAR のほか、BDE-47、BDE-99、BDE-209 によりプレグナン X 受容体 PXR を介して CYP3A11、CYP2B10 の転写誘導を引き起こし、PXR 欠損マウスではこの効果は抑えられた(Pacyniak et al., 2007)。

また PBDEs の代謝産物についても近年注目されている。フェノール構造のため、直接のエストロゲン様作用、甲状腺ホルモン様作用が考えられるためである。CHO-K1 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、BDE-28、BDE-47、BDE-100、水酸化 BDE-17、水酸化 BDE-42 がエストロゲン α 受容体(ER α)アゴニストであるとされる(Kojima et al., 2009)。このうち水酸化 BDE はエストロゲン β 受容体(ER β)にもアゴニストとして働く。ただし活性は弱く、エストラジオールの活性の 100 万分の 1 である。一方、BDE-99、BDE-153、水酸化 BDE-49、メトキシ BDE-49、メトキシ BDE-90 は ER α 、ER β のアンタゴニストになる。多くの PBDEs、水酸化 PBDEs、メトキシ PBDEs はアンドロゲン受容体のアンタゴニストとなり、水酸化 BDE-17 は 10⁻⁸M の低濃度でも作用する。BDE-99、水酸化 BDE-17、メトキシ BDE-49 などはグルココルチコイド受容体の弱いアンタゴニストであった。甲状腺ホルモン受容体では水酸化 BDE-90 のみにアンタゴニスト作用が見られた。また水酸化 BDE-47 により胎盤由来ミクロソームのアロマトラーゼ活性の抑制が μ M レベルで見られた(Canton et al., 2008)。このような内分泌攪乱作用がどのように行動に影響を及ぼしているのかを結びつける必要がある。

4.3 今後の課題

PBDEs は現在、BDE-209 の高臭素化体の利用に限定されているため、直接のリスクは現在高く

ない。しかしながら、体内、環境中でBDE-209が分解して低臭素化ジフェニルエーテルを生成する可能性が指摘されている。生産から廃棄、環境への拡散のライフサイクルの詳細を明らかにすべきであり、またそれには水酸化体、メトキシ体を含めてモニタリングしていく必要があると考えられる。

参考文献

- Abbott, B.D., Wolf, C.J., Das, K.P., Zehr, R.D., Schmid, J.E., Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Lau, C., 2009. Developmental toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) is not dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPAR alpha) in the mouse. *Reprod Toxicol* 27, 258-265.
- Alexander, B.H., Olsen, G.W., Burris, J.M., Mandel, J.H., Mandel, J.S., 2003. Mortality of employees of a perfluorooctanesulphonyl fluoride manufacturing facility. *Occup Environ Med* 60, 722-729.
- Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L., Goldman, L.R., 2007. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Persp* 115, 1670-1676.
- Asakawa, A., Toyoshima, M., Fujimiya, M., Harada, K., Ataka, K., Inoue, K., Koizumi, A., 2007. Perfluorooctane sulfonate influences feeding behavior and gut motility via the hypothalamus. *Int J Mol Med* 19, 733-739.
- Austin, M.E., Kasturi, B.S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P.S., MohanKumar, S.M., 2003. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect* 111, 1485-1489.
- Canton, R.F., Scholten, D.E., Marsh, G., de Jong, P.C., van den Berg, M., 2008. Inhibition of human placental aromatase activity by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). *Toxicol Appl Pharmacol* 227, 68-75.
- Eriksen, K.T., Raaschou-Nielsen, O., Sorensen, M., Roursgaard, M., Loft, S., Moller, P., 2010. Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutat Res*, 39-43.
- Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Yoshinaga, T., Saito, N., Koizumi, A., 2005. Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 99, 253-261.
- Harada, K., Koizumi, A., Saito, N., Inoue, K., Yoshinaga, T., Date, C., Fujii, S., Hachiya, N., Hirosawa, I., Koda, S., Kusaka, Y., Murata, K., Omae, K., Shimbo, S., Takenaka, K., Takeshita, T., Todoriki, H., Wada, Y., Watanabe, T., Ikeda, M., 2007. Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in Japan. *Chemosphere* 66, 293-301.
- Harada, K., Xu, F., Ono, K., Iijima, T., Koizumi, A., 2005. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca²⁺ currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 487-494.
- Harada, K.H., Hashida, S., Kaneko, T., Takenaka, K., Minata, M., Inoue, K., Saito, N., Koizumi, A., 2007. Biliary excretion and cerebrospinal fluid partition of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in humans. *Environ Toxicol Pharmacol* 24, 134-139.
- Harada, K.H., Ishii, T.M., Takatsuka, K., Koizumi, A., Ohmori, H., 2006. Effects of perfluorooctane sulfonate on action potentials and currents in cultured rat cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 240-245.
- Harada, K.H., Koizumi, A., 2009. Environmental and biological monitoring of persistent fluorinated compounds in Japan and their toxicities. *Environ Health Prev Med* 14, 7-19.
- Hardell, L., Bavel, B., Lindstrom, G., Eriksson, M., Carlberg, M., 2006. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int J Androl* 29, 228-234.
- Inoue, K., Harada, K., Takenaka, K., Uehara, S., Kono, M., Shimizu, T., Takasuga, T., Senthilkumar, K., Yamashita, F., Koizumi, A., 2006. Levels and concentration ratios of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in serum and breast milk in Japanese mothers. *Environ Health Perspect* 114, 1179-1185.
- Jin, J., Wang, Y., Yang, C., Hu, J., Liu, W., Cui, J., Tang, X., 2009. Polybrominated diphenyl ethers in the serum and breast milk of the resident population from production area, China. *Environ Int* 35, 1048-1052.
- Jones, P.D., Hu, W., De Coen, W., Newsted, J.L., Giesy, J.P., 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ Toxicol Chem* 22, 2639-2649.
- Key, B., Howell, R., Criddle, C., 1997. Fluorinated organics in the biosphere. *Environmental Science & Technology* 31, 2445-2454.
- Koizumi, A., Yoshinaga, T., Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Muroi, J., Inoue, S., Eslami, B., Fujii, S., Fujimine, Y., Hachiya, N., Koda, S., Kusaka, Y., Murata, K., Nakatsuka, H., Omae, K., Saito, N., Shimbo, S., Takenaka, K., Takeshita, T., Todoriki, H., Wada, Y., Watanabe, T., Ikeda, M., 2005. Assessment of human exposure to polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Japan using archived samples

- from the early 1980s and mid-1990s. *Environ Res* 99, 31-39.
- Uejima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshida, T., Kitamura, S., 2009. Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 117, 1210-1218.
- Paul, C., Thibodeaux, J.R., Hanson, R.G., Rogers, J.M., Grey, B.E., Stanton, M.E., Butenhoff, J.L., Stevenson, L.A., 2003. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II : postnatal evaluation. *Toxicol Sci* 74, 382-392.
- Kim, J.S., Lee, D.H., Jacobs, D.R., Jr., 2008. Association of brominated flame retardants with diabetes and metabolic syndrome in the U.S. population, 2003-2004. *Diabetes Care* 31, 1802-1807.
- Lin, C.Y., Chen, P.C., Lin, Y.C., Lin, L.Y., 2009. Association among serum perfluoroalkyl chemicals, glucose homeostasis, and metabolic syndrome in adolescents and adults. *Diabetes Care* 32, 702-707.
- Watsubara, E., Nakahara, T., Yoshida, H., Kuroiwa, T., Harada, K.H., Inoue, K., Koizumi, A., 2007. Effects of perfluorooctane sulfonate on tracheal ciliary beating frequency in mice. *Toxicology* 236, 190-198.
- Worck, A., Hakk, H., Orn, U., Klasson Wehler, E., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rat : absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab Dispos* 31, 900-907.
- Yoda, Y., Nakayama, S., Harada, K.H., Koizumi, A., 2007. Negative results of umu mutagenicity test of fluorotelomer alcohols and perfluorinated alkyl acids. *Environ Health Prev Med* 12, 217-219.
- OECD, 2006. Results of the 2006 Survey on Production and Use of PFOS, PFAS, PFOA, PFCA, Their Related Substances and Products/Mixtures Containing These Substances. ENV/JM/MONO (2006) 36.
- Olsen, G.W., Burris, J.M., Burlew, M.M., Mandel, J.H., 2003. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J Occup Environ Med* 45, 260-270.
- Olsen, G.W., Burris, J.M., Mandel, J.H., Zobel, L.R., 1999. Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J Occup Environ Med* 41, 799-806.
- Macyniak, E.K., Cheng, X., Cunningham, M.L., Crofton, K., Klaassen, C.D., Guo, G.L., 2007. The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicol Sci* 97, 94-102.
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2009. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ Sci Technol* 43, 386-392.
- Peden-Adams, M.M., Keller, J.M., Eudaly, J.G., Berger, J., Gilkeson, G.S., Keil, D.E., 2008. Suppression of humoral immunity in mice following exposure to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 104, 144-154.
- Peters, A.K., Nijmeijer, S., Gradin, K., Backlund, M., Bergman, A., Poellinger, L., Denison, M.S., Van den Berg, M., 2006. Interactions of polybrominated diphenyl ethers with the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Sci* 92, 133-142.
- Qu, W., Bi, X., Sheng, G., Lu, S., Fu, J., Yuan, J., Li, L., 2007. Exposure to polybrominated diphenyl ethers among workers at an electronic waste dismantling region in Guangdong, China. *Environ Int* 33, 1029-1034.
- Richardson, V.M., Staskal, D.F., Ross, D.G., Diliberto, J.J., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S., 2008. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol Appl Pharmacol* 226, 244-250.
- Sandholm, A., Emanuelsson, B.M., Wehler, E.K., 2003. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica* 33, 1149-1158.
- Seacat, A.M., Thomford, P.J., Butenhoff, J.L., 2002. Terminal observations in Sprague Dawley rats after lifetime dietary exposure to potassium perfluorooctanesulfonate. *Toxicologist* 66, 185.
- Seacat, A.M., Thomford, P.J., Hansen, K.J., Olsen, G.W., Case, M.T., Butenhoff, J.L., 2002. Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 68, 249-264.
- Thuresson, K., Hoglund, P., Hagmar, L., Sjodin, A., Bergman, A., Jakobsson, K., 2006. Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers. *Environ Health Perspect* 114, 176-181.
- Turyk, M.E., Persky, V.W., Imm, P., Knobeloch, L., Chatterton, R., Anderson, H.A., 2008. Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers. *Environ Health Perspect* 116, 1635-1641.
- Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P., 2004. Investigations of strain and/or gender differences in developmental neurotoxic effects of polybrominated diphenyl ethers in mice. *Toxicol Sci* 81, 344-353.
- Viberg, H., Fredriksson, A., Jakobsson, E., Orn, U., Eriksson, P., 2003. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl

- ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Toxicol Sci* 76, 112-120.
- von Meyerinck, L., Hufnagel, B., Schmoldt, A., Benthe, H.F., 1990. Induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 by the pentabromo diphenyl ether Bromkal 70 and half-lives of its components in the adipose tissue. *Toxicology* 61, 259-274.
- Wada, Y., Koizumi, A., Yoshinaga, T., Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Muroi, J., Inoue, S., Eslami, B., Hirosawa, I., Hirosawa, A., Fujii, S., Fujimine, Y., Hachiya, N., Koda, S., Kusaka, Y., Murata, K., Nakatsuka, H., Omae, K., Saito, N., Shimbo, S., Takenaka, K., Takeshita, T., Todoriki, H., Watanabe, T., Ikeda, M., 2005. Secular trends and geographical variations in the dietary intake of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) using archived samples from the early 1980s and mid 1990s in Japan. *J Occup Health* 47, 236-241.
- Wahl, M., Lahni, B., Guenther, R., Kuch, B., Yang, L., Straehle, U., Strack, S., Weiss, C., 2008. A technical mixture of 2,2',4,4'-tetrabromo diphenyl ether (BDE47) and brominated furans triggers aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated gene expression and toxicity. *Chemosphere* 73, 209-215.
- WHO, 1998. Environmental Health Criteria 205 : Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans.
- Zhou, T., Ross, D.G., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol Sci* 61, 76-82.

1. は

「農薬的に防物を予に使用病の診で開発えられ(2007年木及び昆虫、」
「病害虫殺虫剤進又は、その他病害虫(フェロ」ととき、一方、として義され)ペット、介する、物等を請する用語殺虫剤(法上の限る)、公

IV-3 生体試料バンク

京都大学大学院医学研究科研究員

新添多聞

京都大学大学院医学研究科教授

小泉昭夫

1. はじめに

化学物質は絶えず新たな素材が生み出され、製造技術も常に進歩し、新薬の開発やその商品化も進む。今世紀における開発速度には目を見張るものがあるが、それは同時におびただしい種の化学物質が環境中に排出される、あるいは流出するという点でもある。工業目的で広く利用される化学物質はおよそ70000種あるとされているが、そのうち環境中での動態が明らかになっているものはほんのわずかでしかない。環境調査が新種の開発速度に間に合うはずもない以上、迅速に規制していかなければ、野生動物の健康も含めた生態系への影響を最小限に抑えることはできない。

環境生体試料バンク (environmental specimen bank; 以下 ESB) は代表的な環境生体試料をシステムとして長期保存する組織および設備である。ESB に保存された試料は、過去の環境を分析することにより、規制に関する政策評価に利用されてきた。この点で、適切に構成された ESB は過去から現在を記録した試料の有用な資源となりうる。ESB の試料を使えば、研究者は現在の状況を対象としてきた研究を過去に拡張することも出来れば、未来に外挿することも出来る。特定の化学種について、様々なシナリオを仮定することにより、将来の曝露状況を予測することも出来るのである。

この30年の間に、アメリカ、ドイツ、スウェーデン、日本など多くの国で公式の ESB が整備

された。これに対して近年、京都大学ではヒト生体試料バンクを構築した¹⁾。この生体試料バンクの際立った特徴は、1970年代から2008年までのヒト曝露を再現する手段を提供できる点にある。また保存されている試料は日本で採取されたものに留まらず、広くアジア諸国——中国、韓国、タイ、ベトナム、マレーシア、フィリピン——にまで及ぶ。従って、環境汚染における時間的傾向と同時に地理的傾向をつかむ手段も提供できる。

ここではまず京都大学ヒト生体試料バンクについて紹介する。さらに世界の主要な ESB である、日本、アメリカ、ドイツ、スウェーデンの ESB の特徴を比較してそれぞれの ESB の役割を概説する。さらに環境科学における ESB 活用の具体例についても紹介したい。

2. 京都大学ヒト生体試料バンクと世界の主要な環境試料バンク

2010年現在、世界には10を超える数の ESB が存在する (http://www.chem.unep.ch/gmn/05_ESB.htm)。

2.1 京都大学ヒト生体試料バンク (<http://hes.pbh.med.kyoto-u.ac.jp/kuhsb/>)

京都大学ヒト生体試料バンクは2004年に京都大学大学院医学研究科に創設された¹⁾。ここに保存される試料は4つの研究活動により収集されたものである。第1のグループは池田正之らにより1970年代後半から1990年代まで続けられた、日

本における全国規模の重金属モニタリングの一環として収集された²⁻⁶⁾。1980年代初頭には、日本およびアジア諸国において一貫した手法に従った計画的な試料採集が行われた。そこでは参加者から全血、尿、および24時間の陰膳食事試料の提供を受けた。さらに年齢、血圧、過去と現在の病歴、使用薬、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニン、γ-グルタミントランスフェラーゼ、総コレステロール、トリグリセド、高密度リポタンパクコレステロール、尿タンパク、尿中赤血球といった個人情報および生化学データを質問紙と生化学分析により得た⁷⁾。陰膳食事サンプル法では食事試料は調理済みのものであり、その品目を記録しておく、その後48時間以内に研究室に搬送し、処理を行うまで-30℃で保管した。処理方法としては、食料の材料を单品ごとに重さを測定しておいてから、飲み水とともに均一に混ぜ合わせる、均一化した試料全体のうち1リットル(約1kg)を100ml瓶10本に取めて-30℃で保存する。それぞれの地域における鉛およびカドミウム曝露の長期トレンドが詳細に記録されている²⁻⁶⁾。

第2のグループは1980年代に秋田県において収集された試料である。これは母乳、全血、血清試料から成り、秋田県の農業地域に位置する平鹿総合病院から提供を受けた。この試料は本来、殺虫剤に対する農業従事者の曝露状況を調査する目的で収集されたものである⁸⁾。

第3のグループは2004年から2006年にかけて小泉昭夫らによって収集された¹⁾。全血と母乳試料を全国規模で集めたもので、地域は沖縄、高知、兵庫、京都、高山(岐阜県)、福井、東京、宮城、秋田、静内(北海道)である。さらにそれぞれの地域で市場に出回っている朝食、昼食、夕食用弁当を試料として収集している。母乳試料の採取は出産後12週までを対象とした。全血と母乳試料の提供者には研究趣旨に対して文書による同意を得ると同時に、それまでの生活環境、生活習慣に関する質問紙に対する回答を得た。この研究においては、食事試料は朝食、昼食、夕食試料のセットを一日分の試料として均一化処理を行った。また飲料水は第1の研究と同様の手法により各地域で採取した。

第4のグループは2007年および2008年に日本の宮城、高山、京都、中国の北京、韓国のソウル、釜山、ベトナムのハノイにおいて採集した。この研究では全血試料もしくは母乳試料のどちらかを採取する場合はそれぞれの国内医療機関に依頼したが、全血試料と食事試料の両方を採取する場合は上記第3の研究と同じ手法で行った。また、研究趣旨に対する文書による同意を得、生活環境、生活習慣の質問紙への回答と提供する食事試料の詳細な品目表の提出を受けた。母乳試料提供者についてはいずれの国の場合も同じ手続きに則った。即ち試料採取は産後12週までとし、試料提供者からは質問紙への回答を得た。

京都大学ヒト生体試料バンクは1980年代から現在まで収集された試料に基づいたヒト曝露評価が可能となるように構成されている。これまでに収集された生体試料は現在、血液22000検体、食事4500検体、母乳730検体に上る。試料の提供要請を受けた際は、試料バンクの運営委員会がその研究計画を審査する。申請が許可された場合は、要請された生体試料が研究者に対して、送料以外は一切無償で提供されている。

2.2 es-Bank

(<http://www.ehime-u.ac.jp/~emes/esbank/esbank.htm>)

愛媛大学では1965年に環境生体試料の収集を開始した⁹⁾。その当時愛媛大学では、地域の農業従事者により使用されていた殺虫剤による局所的な環境汚染の研究の為の生体試料の収集を目的としていた。試料は愛媛大学職員によって体系的に収集、保存され、これがその後の大規模な試料群に繋がることとなった。愛媛大学沿岸環境科学研究センターの研究者グループによって、これまでに数千にもものぼる試料が世界中から収集された。この世界中から集めた生体試料の大部分が2002年にes-Bankとして引き継がれた。科学におけるes-Bankの特に優れた点であり、他のどのESBにも見られない特徴は、それが全世界的規模に及んでいること、特にアジア太平洋地域の生体試料を数多く保存していることである。

2.3 国立環境研究所環境試料タイムカプセル (<http://www.nies.go.jp/timecapsl/>)

国立環境研究所では1979年にESBを試験的に創設した。環境試料タイムカプセルはその後拡張され、環境生体試料と絶滅危惧種の遺伝資源の収集を始めることとなった。この生体試料バンクの目的は、将来において必要となる、あるいは将来分析することを想定して長期間(50 - 100年間)生体試料を保存することである。ここには二枚貝、魚類、ヒトの母乳の他、大気試料も保存されている。このうち二枚貝試料は膨大かつ広範囲におよび、極めて貴重な環境試料である。特に遺伝多様性の長期変遷や気候変動による種の自然淘汰などの情報源として期待されている。

このESBは国家事業であるため、国立環境研究所の厳しい管理の下で長期保存それ自体が目的となっている。従って、研究者からの検体の提供要請に応えることはできない。また現時点では体系的な試料収集が行われているようには思われない。むしろ将来必要となりうる様々な研究に備えることを目的としているようである。

2.4 米国国立バイオモニタリング試料バンク (National Biomonitoring Specimen Bank)、 海洋環境生体試料バンク(Marine Environmental Specimen Bank ; <http://www.nist.gov/estl/analytical/marineesb.cfm>)

この2つの試料バンクは設計が非常に優れており、またプロトコルも明快である¹⁰⁾。米国には似通った構成を持つ国立のESBが2つ存在する。1つ目の試料バンクがCASPIR (The CDC and ATSDR Specimen Packaging, Inventory and Repository)であり、疫病予防管理センター(Center for Disease Control and Prevention ; CDC)と毒性物質疫病登録機関(Agency for Toxic Substances and Disease Registry ; ATSDR)による公衆衛生活動の一環として様々なヒト生態試料を収集してきた。2つ目の試料バンクは国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology ; NIST)の管理下にあり、2つの独立した施設から成る。即ち、国立バイオモニタリング試料バンクと海洋環境生体試

料バンクである。CASPIRがヒトの健康科学のための生体試料を保存しているのに対して、NISTの試料バンクは環境学のための構成がなされている。

米国のESBはテキサス州の砂漠、ハワイ、アラスカといった多様な環境に生息する動物の試料を継続的に収集している¹¹⁾。試料には絶滅危惧種のものも含まれ、その種類も魚類、哺乳類、鳥類、植物に及ぶ。この試料バンクの構成には食物網による汚染物質の伝播と野生動物の健康状態という観点も考慮されており、環境の維持管理という点で極めて重要な役割を果たしている。また現在、これまで蓄積されてきた試料に対して、最新の、より感度の高い手法による分析を行っている。

2.5 ドイツヒト環境生体試料バンク (Environmental Specimen Bank for human tissues ; ESBHum : <http://www.umweltprobenbank.de/>)

ESBHumはドイツ環境生体試料バンクの一部として創設されたもので、現在から過去に遡っての測定値によるヒト曝露調査を行うことを主眼としている¹²⁾。試料は毎年分析され、無機元素20種(Sb, Th, As, Ba, Cd, Pb, Hg, Ag, Tl, Sn, U, Cu, Ca, Fe, Mg, K, Se, Na, Sr, Zn)、有機化合物5種(ヘキサクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、PCB-138、PCB-153、PCB-180)を測定している。検体は毎年、ミュンスター、ハレ、グライフスヴァルト、ウルムの4都市に居住する20 - 29歳の学生500人から無償により提供を受けている。その際、詳細な個人情報が入検体に添付される。その意味では、ESBHumは健康関連環境調査の目的で企図されたものであると言える。

2.6 スウェーデン自然史博物館生体試料バンク (<http://www.nrm.se/>)

このESBは陸上、陸水、海洋環境における生体中の汚染物質の残留濃度とその影響を調べるために1980年にスウェーデン環境省により着手された¹³⁾。その狙いは様々なテーマに沿った生体試料を収集し、処理、蓄積して供給することにより、環境問題に対する行動指針を更新するうえで

必要な情報を提供することであった。

現在、スウェーデン ESB には 26 万体の有機生物の試料が蓄積され、さらに年間約 8000 - 9000 体の生体試料が収集されている。スウェーデンのモニタリング計画は試料バンクへの集積と分析が密接に繋がっていて、新しい化学物質の時間的傾向や空間的分布および検出手法の研究に年間 3500 検体が消費されている。

ESB に関連する活動として、スウェーデン環境省は 1989 年に海洋の頂点捕食動物の生体調査を計画した。この計画の目的は 3 種のカモメと 1 種のオジロワシの個体数、生殖、発育、健康状態を調査することであった。この研究をサポートするため、スウェーデン ESB はこれらの種の細胞組織と臓器の試料を収集している。また現在はさらに植物、コケ類、堆積物、泥、ヒトの食材の収集も行っている。

3. 環境学における生体試料の活用 ——血中鉛の数値シミュレーションと生体試料による検証

ESB は現代の環境科学や意思決定の基盤として今や不可欠のものとなっており、環境科学に関連する以下のような幅広い分野で中心的役割を果たしてきた。(1) 政府の環境政策決定や規制措置の評価。(2) 動物の健康評価のための資源。(3) 生態系におけるトレンド調査の研究ツール。(4) 新たに問題化した化学種の過去に遡っての検出。(5) 環境における現象の数値モデルの検証。(6) 汚染源の特定。(7) 食の安全評価ツール。(8) 環境変化による遺伝淘汰圧の検証。ここでは筆者らが行

った、血中鉛の数値シミュレーションにおける生体試料の活用例を紹介する。

鉛は、日本、韓国では有鉛ガソリンの禁止や厳しい排出規制などの成果により、大気中濃度はこの 30 年間で大きく減少したが欧州に比べればいまだに高いことが知られている¹⁴⁾。また東アジアの経済成長著しい国では大気中濃度は現在でも非常に高い¹⁵⁾。筆者らはこの 30 年間の東アジアにおける大気中鉛濃度の推移と越境大気汚染を評価するために、鉛の大気輸送モデルの開発を行った¹⁶⁾。東アジアでは大気中鉛濃度の観測は都市部に偏っており、また大気中濃度は風や雨と言った気象条件による変動が大きいいため、モデルの検証には大気中濃度の観測値と比較するだけでは不十分である。

そこで、大気モデルにより計算された大気中濃度を生理的薬物動態モデルに組み込んで血中鉛濃度をシミュレートし、これを京都大学ヒト生体試料バンクの血液試料における実測値と比較した。その際、食事による鉛摂取量は同じく生体試料バンクの食事試料における鉛含有量から、国ごとに時間の関数として推定した値を与えた。使用した血液と陰膳法による食事の試料は表 1 の通りである。すべて職業上の曝露を受けない、非喫煙者の女性から提供されたもののみを用いた。

図 1 は血中鉛濃度の計算値と実測値とを、散布図を用いて比較した結果である。生体試料によれば、日本における血中鉛濃度は、1980 年頃は $20 \mu\text{g L}^{-1}$ から $40 \mu\text{g L}^{-1}$ 程度であった。1990 年代にはこれが $10 \mu\text{g L}^{-1}$ から $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 程度に、2007 年には $15 \mu\text{g L}^{-1}$ 前後へと減少しているのが分かる。韓国では 1990 年代中頃まで $50 \mu\text{g L}^{-1}$

表 1 血中鉛シミュレーションとその検証に用いた、京都大学ヒト生体試料バンクの血液と食事の試料

国	年代	検体数
日本	1979 - 1981	306
	1991 - 1997	534
	2007	60
韓国	1986	40
	1994	181
	2000	38
中国	2007	35
	1993 - 1997	300
	2007	25
ベトナム	2007 - 2009	55

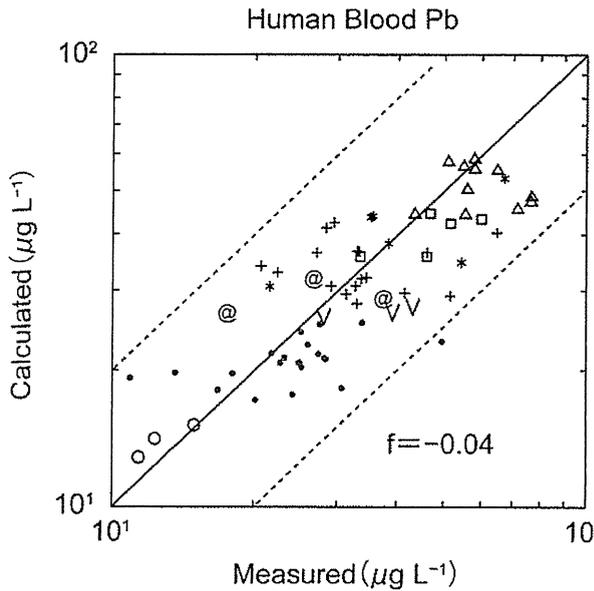


図1

血中鉛濃度($\mu\text{g L}^{-1}$)の数値モデルによる計算値と京都大学ヒト生体試料バンクの試料における実測値との比較。実線は計算値と実測値が一致することを表し、2本の破線は誤差が2倍の範囲にあることを表す。(+)日本1980年頃、(●)日本1990年代中頃、(○)日本2007年、(□)韓国2000年以前、(◎)韓国2000年以後、(△)中国1995年以前、(*)中国1995年以後、(V)ベトナム2000年代。

前後であったのが2000年頃には $30\mu\text{g L}^{-1}$ 程度に、2007年には $18\mu\text{g L}^{-1}$ へと減少している。中国では1995年以前の生体試料によれば、 $50\mu\text{g L}^{-1}$ から $80\mu\text{g L}^{-1}$ 程度であった。1990年代後半や2007年には北京や瀋陽で $40\mu\text{g L}^{-1}$ を下回っているものの、依然として日本、韓国よりも高い水準にある。また南京では1998年に $67\mu\text{g L}^{-1}$ という非常に高い値を記録しており、日本、韓国のような明確な減少傾向は見られない。ベトナムでは生体試料が最近のものしかないとトレンドについては分からないが、現在の血中濃度は、1980年頃の日本、あるいは1990年代中頃の韓国の水準に近い。数値モデルによる計算値は日本、韓国、中国、ベトナムのいずれの年代の実測値とも概ね2倍の誤差の範囲で一致している。また、日本、韓国におけるこの30年間の明確な減少傾向を再現できている。このように、大気モデルと生理的薬物動態モデルを結合した数値モデルを用いて、東アジアにおけるヒトの血中鉛濃度の過去

から現在までの推移が再現できることが、生体試料バンクに保存された試料によって示されている。

4. 将来の展望

血中鉛の例で見たように、生体試料バンクの試料を用いて、化学物質の経年的、空間的、ヒト曝露動向を明らかにすることが可能であり、製造禁止や排出規制に関して国内の政策決定のみならず、多国間協議のための重要な資料を提供することができる。産業界の発展とヒト健康影響が平衡を保ちながら持続可能な社会、環境を維持していくために、多くの研究者に利用されていくとともに、このような環境汚染モニタリングのための生体試料バンクを、研究機関はもとより社会全体で支えていく必要があると考える。

参考文献

1. Koizumi A, Harada KH, Inoue K, Hitomi T, Yang H-R, Moon C-S, Wang P, Hung NN, Watanabe T, Shimbo S, Ikeda M. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environ. Health Prev. Med.* 14, 307-318, 2009.
2. Watanabe T, Koizumi A, Fujita H, Kumai M, Ikeda M. Dietary cadmium intakes of farmers in nonpolluted areas in Japan, and the relation with blood cadmium levels. *Environ. Res.* 37, 33-43, 1985.
3. Watanabe T, Nakatsuka H, Ikeda M. Cadmium and lead contents in rice available in various areas of Asia. *Sci. Total Environ.* 80, 175-184, 1989.
4. Watanabe T, Nakatsuka H, Shimbo S, Iwami O, Imai Y, Moon C-S, Zhang Z-W, Iguchi H, Ikeda M. Reduced cadmium and lead burden in Japan in the past 10 years. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68, 305-314, 1996.
5. Watanabe T, Zhang Z-W, Moon C-S, Shimbo S, Nakatsuka H, Matsuda-Inoguchi N, Higashikawa K, Ikeda M. Cadmium exposure of women in general populations in Japan during 1991-1997 compared with 1977-1981. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73, 26-34, 2000.
6. Ikeda M, Zhang Z-W, Shimbo S, Watanabe T, Nakatsuka H, Moon C-S, Matsuda-Inoguchi N, Higashikawa K. Exposure of women in general populations to lead via food and air in East and Southeast Asia. *Am. J. Ind. Med.* 38, 271-280, 2000.
7. Chiba K, Miyasaka M, Koizumi A, Kumai M, Watanabe T, Ikeda M. Comparison of food constituents in the diet of female agricultural workers

- in Japan with high and low concentrations of high-density lipoprotein in their sera. *J. Epidemiol. Community Health* 39, 259-262, 1985.
8. Sugaya T, Watanabe K, Sasaki S. Levels of organochlorines and polychlorinated biphenyls in human body. *J. Jpn. Assoc. Rural Med.* 33, 140-146, 1984.
 9. Tanabe S. Environmental Specimen Bank in Ehime University (es-Bank) , Japan for global monitoring. *J. Environ. Monit.* 8, 782-790, 2006.
 10. Wise SA, Koster BJ. Considerations in the design of an environmental specimen bank: experiences of the National Biomonitoring Specimen Bank Program. *Environ. Health Perspect.* 103 [Suppl 3] , 61-67, 1995.
 11. Becker PR, Wise SA. The U.S. national biomonitoring specimen bank and the marine environmental specimen bank. *J. Environ. Monit.* 8, 795-799, 2006.
 12. Wiesmüller, GA, Eckard R, Dobler L, Günzel A, Oganowski M, Schröter-Kermani C, Schlüter C, Gies A, Kemper FH. The environmental specimen bank for human tissues as part of the German Environmental Specimen Bank. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 299-305, 2007.
 13. Odsjö T. The environmental specimen bank, Swedish Museum of Natural History —a base for contaminant monitoring and environmental research. *J. Environ. Monit.* 8, 791-794, 2006.
 14. Kim K-H. Airborne lead concentration levels on the Korean peninsula between 1991 and 2004. *Atmos. Environ.* 41, 809-824, 2007.
 15. Okuda T, Katsuno M, Naoi D, Nakao S, Tanaka S, He K, Ma Y, Lei Y, Jia Y. Trends in hazardous trace metal concentrations in aerosols collected in Beijing, China from 2001 to 2006. *Chemosphere* 72, 917-924, 2008.
 16. Niisoe T, Nakamura E, Harada K, Ishikawa H, Hitomi T, Watanabe T, Wang Z, Koizumi A. A global transport model of lead in the atmosphere. *Atmos. Environ.* 44, 1806-1814, 2010.

1.

予
体防
機序
の定
代が
診断
配列
同時
てい
198
2001
にて
造が
ノム
てい
ゲ
ノム
う解
わち
て解
子・タ
(ome
う合成
解析す
たなメ
トラン
体を理

Past, present, and future of environmental specimen banks

Akio Koizumi · Kouji H. Harada · Kayoko Inoue · Toshiaki Hitomi ·
Hye-Ran Yang · Chan-Seok Moon · Peiyu Wang · Nguyen Ngoc Hung ·
Takao Watanabe · Shinichiro Shimbo · Masayuki Ikeda

Received: 4 March 2009 / Accepted: 12 July 2009 / Published online: 15 August 2009
© The Japanese Society for Hygiene 2009

Abstract Environmental specimen banks are an essential part of the infrastructure of environmental sciences. They have various functions: (1) evaluation of governmental environmental policy-making and regulations; (2) a resource for animal health evaluation; (3) research tools to investigate time trends in ecosystems; (4) detection of newly emerging chemicals in the time trends; (5) validations of computer models for environmental phenomena;

(6) source identification of contaminants; (7) a tool for food safety; (8) evaluation of genetic selection pressure due to environmental changes. In this review paper, we present a detailed description of the Kyoto University Human Specimen Bank (history, protocol and questionnaires) and provide brief outlines of other representative environmental specimen banks. We then review two illustrative cases in which environmental specimen banks have unveiled insidious contaminations of polybrominated diphenyl ethers and perfluorooctanoic acids. Finally, we give a perspective of new functions for environmental specimen banks in the next 20 years.

A. Koizumi (✉) · K. H. Harada · K. Inoue · T. Hitomi ·
H.-R. Yang
Department of Health and Environmental Sciences,
Graduate School of Medicine, Kyoto University,
Yoshida Konoe, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan
e-mail: koizumi@pbh.med.kyoto-u.ac.jp

H.-R. Yang
Research Institute of Public Health and Environment,
Seoul Metropolitan Government, Seoul 137-130, Korea

C.-S. Moon
Department of Industrial Health, Catholic University of Pusan,
Busan 609-757, Korea

P. Wang
Department of Health Education, School of Public Health,
Peking University, Beijing 100083, People's Republic of China

N. N. Hung
Department of Science and Technology, Hanoi Medical
University, Hanoi, S.R. Vietnam

T. Watanabe
Miyagi University of Education, Sendai 980-0845, Japan

S. Shimbo
Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University,
Kyoto 605-8501, Japan

M. Ikeda
Kyoto Industrial Health Association, Kyoto 604-8472, Japan

Keywords Environmental specimen banks ·
Food duplicate sample · Human breast milk · Human blood

Introduction

The rapid development of new materials, new production methods, and new pharmaceuticals and commercial products in the 21st century has resulted in the release and/or emission of a myriad of chemicals into the environment. The environmental fates of only a few of the estimated 70,000 chemicals commonly used in industry have been characterized. Since monitoring lags far behind the rate of new development, regulatory decisions should be made as soon as possible to minimize the effects on ecological systems, including wild animal health.

An environmental specimen bank (ESB) is an organization and facility that is engaged in the systematic long-term preservation of representative environmental specimens. Specimens from ESBs have been used for retrospective analysis and evaluation for regulatory decision-making. As such, a well-designed ESB can be a valuable

resource of specimens for real-time and retrospective monitoring. Specimens maintained in ESBs have enabled investigators to extend their current research on present-day situations into the past as well as extrapolate it to the future. They enable future exposure assessments for given chemicals to be made under various scenarios.

In the last 30 years, formal ESBs have been constructed in many countries, including the USA, Germany, Sweden, and Japan. A human specimen bank has also recently been established in Kyoto University (i.e., the Kyoto University Human Specimen Bank) [1]. An important aspect of this specimen bank is that it provides the means to reconstruct human exposures from the 1970s through to 2008. The bank contains human samples collected not only in Japan but also in various Asian countries, including China, Korea, Thailand, Vietnam, Malaysia and the Philippines, and is thus expected to provide a means of monitoring temporal as well as geographic trends in environmental contamination.

The major aim of this review is to introduce the Kyoto University Human Specimen Bank. Features of representative ESBs—in Japan, the USA, Germany and Sweden—are also compared to demonstrate individual functions of the ESBs. Finally, we discuss the future functions of ESBs in the environmental sciences.

Kyoto University Human Specimen Bank and other representative environmental specimen banks throughout the world

As of 2008, there are more than a dozen ESBs in the world, with one also currently under construction in France. Here, we provide a brief description of a number of these as well as their protocols (Table 1).

Kyoto University Human Specimen Bank

The Kyoto University Human Specimen Bank was established in 2004 at the Kyoto University Graduate School of Medicine [1]. The stored samples originate from four research activities. The first group of samples was collected in Japan as part of the nation-wide heavy-metal monitoring projects led by Prof. Ikeda [2–6] during the late 1970s up to the 1990s. Beginning in 1980s, samples were systematically collected in Japan and other Asian countries within the framework of a consistent sampling design in which participants donated blood, urine and duplicate 24-h food samples. Personal information and biochemical data were obtained by questionnaire and biochemical analysis and included data on age, gender, blood pressure, past and present illnesses, medication use, aspartate aminotransferase, alanine, gamma-glutamyl transferase, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, urinary

protein, and red blood cells in urine [8]. In the duplicate food sampling protocol, the foods are cooked and meal menus recorded. The samples are then transferred to the laboratory within 48 h and stored at -30°C until processed. In the processing of food samples, each food composite homogenate is weighed and homogenized together with the drinking water. One-liter (approx. 1 kg) portions of the total homogenate are stored in ten 100-ml bottles at -30°C . Concurrent and long-term trends in Pb and Cd exposures are reported in detail [2–6].

The second group of samples comprises samples collected in Akita prefecture during the 1980s. The samples consist of breast milk, blood, and serum samples donated by the Hiraga General Hospital in the rural area of Akita. These samples were originally collected to monitor farmers' exposure to pesticides [7].

The third group of samples was collected by Prof. Kozumi and his colleagues from 2004 to 2006 [1]. Blood and breast milk samples were collected nationwide in Okinawa, Kochi, Hyogo, Kyoto, Takayama (Gifu), Fukui, Tokyo, Miyagi, Akita, and Shizunai (Hokkaido). In this project, commercially available packed breakfast, lunch, and dinner samples were collected from those sampling sites. Breast milk sampling was conducted until 12 weeks post-partum. Blood and breast milk donors also submitted self-reported questionnaires (Table 2). Within the framework of this study, food samples were homogenized as a set of breakfast, lunch, and dinner samples, and drinking water was collected at the sampling sites in the same manner as in the first study.

The fourth group of samples was collected in 2007 and 2008 in Japan (Miyagi, Takayama, and Kyoto), Beijing in China, Seoul, and Busan in Korea and Hanoi in Vietnam. In this project, blood or breast milk samples were collected domestically. However, blood and meals were sampled in the same way as in the third group of samples mentioned above. The donors of blood and food completed self-reported questionnaires (Table 2) and food record sheets (Table 3). All breast milk donors, irrespective of nationality, followed the same protocol: samples were collected up to 12 weeks post-partum, and donors filled out questionnaires (Table 2).

The total quantities of samples are shown in Table 1. Meta data describing the donor's personal information are shown in Table 1.

The Kyoto University Human Specimen Bank was designed so that human exposure assessments can be made on samples taken from the 1980s to the present. When distribution requests are received, the protocol will be reviewed by the committee of our sample bank. If the request is approved, our sample bank will release the specimens requested to the researcher(s) without any fees other than shipping.

Table 1 Current environmental specimen banks in 2008

Description	Kyoto University Human Specimen bank	es-Bank	Time capsule NIES
Home page	http://hes.pbh.med.kyoto-u.ac.jp/kuhsb/	http://www.ehime-u.ac.jp/~cmes/esbank/esbank.htm	http://www.nies.go.jp/timecaps1/index.htm
Foundation	Founded in 2004 by Department of Health and Environmental Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine	Founded in 2002 by Center for Marine Environmental Studies	Founded in 2004 by National Institute for Environmental Studies
Storage	−30°C	−25°C	−20 to −150°C
Sample description	Human blood and serum sampled with 1-day meals. Those samples have been collected from 1970s to 2008 in Japan, China, Korea, Philippine, Thailand, and Vietnam. While there are some blood samples and meal samples, which have been collected independently, most of the samples have been collected in a food duplicate design Breast milk samples have been collected from 1980s to the present in Japan, China, Korea, and Vietnam Urine samples have been collected in the 2000s in Japan	Wildlife, sea water, soils from various locations of the world	Fishes, shellfishes and marine sediments Airborne particulate matters Human breast milk collected in Tokyo from 2001 to 2007, 30 samples per year
Sample quantity or sampling	Blood or serum: 28,000 Meals: 3,500 days Breast milk: 3,000 Urine: 14,000	This bank has collected the tissues and organs of 1,000 species with 100,000 wild life and environmental samples Details are unknown for human breast milk samples	Bivalves have been collected all over Japan from 2003. They have been collected at eight sites annually and other more than 100 sites Fish and sediments in Tokyo bay collected at 20 sites annually from 2003 Airborne particulate matters from six sites Human breast milk samples, totally about 600 No description on the home page
Meta data	Serum and food samples are accompanied by personal information, including age, sex, occupation, food habit, and meal menu. Breast milk samples were collected with questionnaires between 0 to 12 post-partum weeks		
Design	Human exposure monitoring: Most of blood and meals samples were collected in a food duplicate design (see text)	Global marine monitoring	No specific designs
Functional category of the bank	Retrospective human exposure monitoring for Asian countries	Retrospective ecological monitoring	Long-term storage for future studies
	NBSB	German ESB for human tissues	Swedish ESB
Home page	http://www.nist.gov/public_affairs/gallery/specimen.htm	http://www.umweltprobenbank.de	http://www.nrm.se/
Foundation	Founded in 1979 by National Institute of Standards and Technology and U.S. EPA	Founded in 1981 by University Hospital Munster and Federal Environmental Agency	Founded in 1980 by the Swedish Museum of National History
Storage	−80 to −150°C	−150°C	−30 to −80°C

Table 1 continued

	NBSB	German ESB for human tissues	Swedish ESB
Sample description	Human liver, Human blood serum, Human blood spots, human food specimens Mussels and oysters, fish livers and muscle, fish (whole) Marine sediments, marine mammal tissues, seabird eggs, peregrine falcon eggs and feathers	24-h urine, whole blood and blood plasma have been collected from the beginning. Until 2005, saliva, scalp and pubic hair had been collected. Recently, collection of placenta, umbilical cord blood and amniotic fluid have initiated	Mammals, Birds, Eggs, Wings of birds, Fish, Mosses soil, sludge, breast milk and food products In total approximately 8,000–9,000 specimens have been collected annually and 3,500 specimens have been processed for chemical and biological analysis
Sample quantity or sampling	While relatively small numbers of human samples (8–722), a large numbers of ecological animal samples	125 volunteers aged between 20 and 29 per location and year for 4 sites joined the donation of samples	Mammals: 20,000 Birds: 21,000, eggs: 6,500 Wings of birds: 30,000 Fish: 115,000, mosses: 10,000, sludge: 8,000 Breast milk: 800, food products: 12,000
Meta data	No description on the home page	Sex, age, place of birth, medical data, and personal behavior by a standard self-reported questionnaire	Registered in database together with results made by chemical and biological analysis
Design	Domestic ecosystem monitoring with consideration of trophic levels and wild animal health status	Human body burden monitoring	Nordic ecosystem monitoring of ecological system with consideration of food chain and biological diversities
Functional category of the bank	Whole ecological monitoring in the sea around USA	Real and retrospective monitoring and long-term storage	Real-time and retrospective monitoring and long-term storage

ESB, Environmental Specimen Bank; es-Bank, Ehime University; NIES, National Institute for Environmental Studies, Japan; NBSB, National Biomonitoring Specimen Bank, USA

es-Bank

Ehime University (Matsuyama City, Japan) began collecting environmental specimens in 1965 [9]. At that time, Ehime University focused on collecting specimens for studying local environmental contamination with pesticides that had been used by regional farmers. Samples were systematically collected and stored by the staff of Ehime University, and these samples later became seeds for subsequent collections of samples on larger scales. Thousands of samples from all over the world have been collected by the research group of the center for marine environmental studies over the past three decades. A large portion of these globally collected ecological samples was upgraded to form the es-Bank in 2002. The unique scientific merit of this collection, which cannot be matched by other environmental specimen banks, is its global scope, with a large number of specimens from the Asia–Pacific region (Table 1).

Time capsule ESB (<http://www.nies.go.jp/>)

The National Institute for Environmental Studies (NIES) in Japan started a pilot ESB in 1979. The Environmental Specimen Time Capsule program was extended and has started storing environmental specimens and genetic resources of endangered species (Table 1). The aim of this specimen bank is to store specimens for a long period (50–100 years) to await future needs and analyses. The bank has compiled atmospheric samples as well as samples of bivalves, fish, and human breast milk. The bivalve archives are very comprehensive and very important as environmental samples. Specifically, they are expected to provide information on long-term changes in genetic diversity or the natural selection of these species due to climate change.

This ESB, which is supported nationally, is characterized by long-term storage under the strong initiative of the NIES; as such, it does not allow the distribution of samples

upon request by researchers. At the present time, the time capsule ESB does not seem to have a systematic sampling design; rather, it seems to be aimed at covering a large variety of research needs in the future.

The U.S. National Biomonitoring Specimen Bank and the Marine Environmental Specimen Bank

These two banks are very well designed and have a very clear protocol [10]. There are two national ESBs that have very similar designs. The first sample bank is the CASPIR [The CDC (center for disease control) and ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Specimen Packaging, Inventory and Repository], which has collected various human specimens as part of public health activities by the CDC and ATSDR. The second sample bank is maintained by the National Institute of Standards and Technology (NIST) and consists of two separate facilities: the National Biomonitoring Specimen Bank and the Marine Environmental Specimen Bank. While CASPIR maintains specimens for human health research, the NIST banks are designed for environmental research (Table 1).

The relevant ESB in the USA continuously monitors animals living in diverse environments covering Texas desert areas, Hawaii, and Alaska [11]. Activities also include monitoring endangered species. The collections cover fish, mammals, avian species, and plants. This sample bank was designed to consider the transfer of contamination through the food web and the health status of wild animals and as such, it plays a key role in quality assurance. Stored samples are presently being analyzed using newer and more sensitive analytical methods.

German Environmental Specimen Bank for human tissues (ESBHum: <http://www.umweltprobenbank.de>)

The ESBHum was established as part of the German Environmental Specimen bank, and it focuses on human exposure assessments by real-time and retrospective monitoring [12, 13]. Samples are processed annually to measure 20 inorganic (Sb, Th, As, Ba, Cd, Pb, Hg, Ag, Tl, Sn, U, Cu, Ca, Fe, Mg, K, Se, Na, Sr and Zn) and five organic (hexachlorobenzene, pentachlorophenol, PCB-138, PCB-153 and PCB-180) chemicals. Samples are donated annually by 500 voluntary students aged

Table 2 Self-reported questionnaire

A request to donate your blood or breast milk
-4 country environmental study-

BACKGROUND: At present, it is believed that 300 billion chemicals are registered in the world. Human beings are currently exposed to about 100,000 chemicals in their daily lives. Of those, only a small number of chemicals, that is, about 1,000 chemicals, have been fully risk-assessed, while the remaining majority of chemicals have not been investigated

Some chemicals which once were produced actively because of their usefulness are now banned, because of their hazardous effects on human health as well as the ecosystem. For example, DDT and PCBs were once considered useful chemicals but are now banned because of global environmental contamination. After banning their production, the environment is recovering very slowly. As such, long term monitoring studies of environmental contaminants are needed

AIM of the CURRENT STUDY: Asian countries in the midstream of globalization are now considered passengers in the same environmental boat. To install precautionary measures to effectively prevent environmental contamination in the Asian area, future trend prediction using computer simulation based on cutting edge theories is now considered very promising. However, only a small number of observations have been available to validate such simulation theories. If the computer simulation results are in agreement with reconstructed data, such a simulation theory is believed to be reliable to predict future levels of environmental contamination. We have established the Human Specimen Bank in Kyoto University (The Kyoto University Human Specimen Bank). Stocked samples (diet, breast milk, and blood) have been collected in Japan, Korea and China since the 1970s. Each sample has information about sampling time and geographic location. We are thus planning to reconstruct the past environment from the 1980s onwards using historical human samples in our sample bank

REQUEST to Participants: We have collected human specimens from the late 1970s onwards and stored them in the Human Specimen Bank in Kyoto University. We are going to make full use of these samples to reconstruct the past environment from the 1980s to the present. Although we have stored historical Japanese samples up to 2005 and Korean and Chinese samples up to 2000, we do not have updated samples. Thus we would like to request that you donate 5-ml of blood or ca 30 ml breast milk. These samples will be used to validate computer simulation theories and will be stored for future use in the environmental sciences

We hope you understand our aim and will cooperate with our project

The 4 countries in collaboration for environmental sciences

Director KOIZUMI Akio M.D., Ph.D. (Professor, Kyoto University, Kyoto, Japan)

YANG Hye-Ran Ph.D. (Researcher, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul, Korea)

CHOI Kyung Ho, D.V.M., Ph.D. (Associate Professor, Seoul National University, Seoul, Korea)

WANG Peiyu, M.D., Ph.D. (Deputy Dean, Peking University, Beijing, China)

Nguyen Ngoc Hung, M.D., Ph.D. (Professor, Hanoi Medical University, Hanoi, Vietnam)