

## 研究組織

研究代表者：香山不二雄 自治医科大学医学部環境予防医学講座

研究分担者：吉田貴彦 旭川医科大学健康科学講座

研究分担者：野原恵子 独立行政法人国立環境研究所 環境健康研究センター  
分子毒性機構研究室

研究協力者：Zafar Fatmi アガカーン大学医学部地域医療学教室

研究協力者：三瀬 名丹 自治医科大学医学部環境予防医学講座  
大津 真弓 自治医科大学医学部環境予防医学講座  
水野 敦子 自治医科大学医学部薬理学講座  
池上 昭彦 自治医科大学医学部環境予防医学講座  
水谷悠紀子 自治医科大学医学部環境予防医学講座  
東本 明子 自治医科大学医学部環境予防医学講座  
米田 昌美 自治医科大学医学部環境予防医学講座

## < 概要 >

自治医科大学医学部環境予防医学講座

香山不二雄

### 1. 研究目的

我が国の平均的な鉛及びヒ素の曝露量は低い。しかし、上水道に残存する鉛管や地域限定的に土壤中鉛の高い地域がある。また、ホンダワラ科の海藻の多食者や井戸水および米からのヒ素経口曝露の高い事例が散見される。鉛及びヒ素曝露は胎児、小児がハイリスク集団であり、現時点での生体負荷量とその曝露源を確認し、健康影響および生体影響の可能性の有無について調査することを目的とする。

【貢献】血中鉛濃度  $10\mu\text{g}/\text{dL}$  以下では小児のIQの低下との相関は明らかでないが、出生前後に低濃度の鉛曝露が小児のIQの低下が危惧され、JECFA、EFSAなどで耐容摂取量の再評価が予定されている。胎児期および幼児期の無機ヒ素曝露の影響評価のためのバイオマーカーの検索が喫緊の課題である。さらに、食生活や曝露経路およびヒ素の化学型分布が欧米とは大きく異なるため、我が国の曝露実態と影響評価が必要である。

### 2. 研究方法

【調査地域の条件】国内で鉛、ヒ素の曝露の高い可能性のある地域で、調査の実施可能性から、旭川市を選んだ。すなわち 有鉛ガソリン使用時に大気の停滞や沈降が多い盆地であり、その盆地内で農業が営まれ、その卵、野菜類など農業産品を食している集団が居る。ヒ素の高い可能性のある温泉水の流れている田圃がある。胎児期曝露の評価のために臍帯血が集めてきた環境省エコチル調査の経験がある。以前の3歳児の血中鉛調査で神奈川県より旭川市の方が高かった。大雪山系の火山性土壌である。家屋の気密性が高く、室内で過ごす時間が長く、室内ダスト吸入および経口摂取による鉛曝露の影響が高い可能性がある。また、農村地帯が広がる対照地区として、エコチル調査パイロット調査を実施している自治医大のある栃木県下野市を選んだ。さらに、これまで共同研究をしているアガカーン大学医学部地域医療学講座 Zafar Fatmi 准教授との調査地域(カラチ市及びインダス川流域のシンド州 Khairpur)を、鉛曝露及びヒ素曝露の陽性対照群として、臍帯血を含む生体試料を用いることとした。因みに、パキスタンでは有鉛ガソリンや化粧品として硫化鉛を多く含むスルマがまだ使用されているため、鉛曝露は高い。

【実施計画】調査地域で妊婦をリクルートし、出生児及びその兄弟姉妹(18-60月齢)を被験者とする。25~27年度に旭川市では吉田貴彦が、下野市では香山不二雄が、パキスタンのカラチ市および Khairpur では Zafar Fatmi が、それぞれ50家族の被験者を募る。リクルートした妊婦の家庭で、妊娠後期の時期に、朝1番の井戸水または上水道中の鉛濃度を測定する。また、掃除機に汎用ゴミパックを取り付け1ヶ月のゴミ

を収集し、ハウスダスト中の鉛および総ヒ素濃度を測定する。兄弟姉妹の陰膳3日分をプールして収集する。生体負荷量としては、妊婦の尿および臍帯血清中、化学型別ヒ素、3価、5価のヒ素、MMA, DMA, TMA, アルセノベタイン、アルセノコリン等および臍帯全血中の鉛を、外部測定機関にて測定する。その兄弟姉妹(18-60月齢)の血中鉛、ヒ素濃度を測定する。また、早朝一番の水道水または井戸水を収集し、pHも測定しておく。陰膳および飲水からの鉛およびヒ素の曝露量を算出する。健康影響に関しては、井戸水からのヒ素曝露の高いパキスタン・シンド州 Khairpur での収集する生体試料との差を解析する。平成 25、26 年度に、それぞれ旭川市、下野市、カラチ市、シンド州 Khairpur での一部試料を利用して、野原により解析遺伝子の候補を検索し、平成 27 年度に影響のバイオマーカーと推定される遺伝子発現及びエピジェネティック変異の解析を実施する。

### 3. 進捗状況及び見込まれる研究結果(達成度)

平成 25 年度は、日本学術振興会論博プログラムにて4月に来日した Dr. Zafar Fatmi と自治医大、旭川医科大学のスタッフとミーティングを開き、それぞれの調査地域の特徴と調査の実施可能性について討論し、当初の調査研究計画通りの調査研究が実施出来るように、研究計画の細部を調整した。8月に2週間に亘り香山がパキスタン・カラチ市およびインダス川流域の農村地帯に赴いて、パイロット調査として、陰膳サンプルを収集し、サンプル処理にさらに必要な機器や、試料の運搬について検討した。また、サンプル送付に関して、実際にシュミレーションした。また、パキスタンおよび日本国内で収集したパイロット調査の陰膳サンプル、飲料水を用いて、外部測定機関にて ICP-MS によるヒ素濃度、鉛濃度を測定し、摂取量を評価した。遺伝子解析を含む疫学調査倫理審査を、自治医大で申請し、旭川医科大学、国立環境研究所では迅速審査で、アガカーン大学では別途、倫理審査を受け、受理された。その後、自治医科大学で妊婦のリクルートを始めて、週1名程度の同意を得て、被験者の陰膳を採取し、出産を待つ段階である。

下野市近郊、旭川市近郊での調査計画とパキスタンでも実施可能な調査計画とをすりあわせることに、前半の半年を用い、それに基づいて倫理審査を受け、調査が開始されたところである。産科、小児科の協力も万全で順調に調査は進みつつある。旭川ではエコチル調査のリクルートが終了後、平成 26 年 4 月以降にリクルートを開始する予定である。パキスタンのリクルートは平成 26 年 6 月から開始する予定である。

# 鉛及びヒ素などの食品汚染物質の実態調査ならびにその健康影響に関する研究

( 課題番号 : H25-食品-一般-006 )

自治医科大学 医学部 環境予防医学講座

香山不二雄

1. 背景 国際比較では、我が国の平均的な鉛及びヒ素の曝露量は低い。しかし、上水道に敷設された鉛管が残存することや、土壤中鉛濃度の高い地域の問題がある。また、日本はヒジキなどのホンダワラ科海藻中の高い無機ヒ素を摂取している状況や、井戸水及び米中の無機ヒ素の高い報告例がある。鉛及びヒ素は胎盤を通過するため、また鉛の消化管吸収率が小児期に特に高いため、胎児及び小児が当該物質曝露による健康影響のハイリスク集団である。

10 µg/dL 以下の血中鉛濃度と小児のIQ低下との相関は、これまでの調査では明らかにされていない。しかし、出生前後の低濃度鉛曝露により将来、小児のIQが低下することが危惧され、FAO/WHO 合同食品添加物専門会議(JECFA)、European Food Safety Authority (EFSA) などで耐容摂取量の再評価が予定されている。我が国の内閣府食品安全委員会でも、鉛及びヒ素の耐容摂取量に関する審議が予定されており、再評価と新たな耐容摂取量の設定ために、評価に資する疫学調査が必要である。

胎児期及び幼児期における低濃度の鉛及び無機ヒ素曝露の影響評価の可能なバイオマーカーの検索が喫緊の課題である。さらに、食生活や当該物質の曝露経路及びヒ素の化学型分布が欧米とは大きく異なるため、我が国の曝露実態調査とその影響評価とが必要である。

当研究計画では、当該物質の曝露の高いパキスタンの生体試料を用いて、各組織における遺伝子やマイクロRNA(miRNA)の発現制御に関わるDNAメチル化などのエピジェネティック変異パターンの解析および発現解析を行い、鉛及びヒ素曝露がエピゲノムと遺伝子発現に与える影響について調べる。また、日本における低濃度曝露群でも同様のエピジェネティック変異が起こるか否かを確認することにより、鉛及びヒ素の耐容摂取量を低減させるべきかどうか、判断する知見となり得る。

## 2. 目的

- 1) 母親(妊婦)、胎児及び小児の鉛及びヒ素曝露を把握する目的で、飲料水・陰膳を収集し、鉛及びヒ素濃度を測定し、経口曝露量を評価する。また、室内のハウスダスト中鉛濃度を測定し、経気道曝露量も算定する。
- 2) また、毛髪、爪、臍帯血、末梢血中、尿中の鉛及びヒ素濃度を測定することにより、当該物質への生体負荷量を求める。
- 3) 調査地域は、国内では、鉛及びヒ素曝露が高い可能性のある旭川市近郊、及び低いと想定される下野市近郊とする。パキスタンでは、鉛曝露の高いカラチ市、及びヒ素曝露が高いインダス川流域 Khairpur 近郊とする。

- 4) 鉛及びヒ素の異なる曝露レベルの集団の臍帯血、胎盤、及び小児末梢血の遺伝子発現及びエピジェネティック変異について解析し、当該物質曝露との相関を検討する。

### 3. 研究方法

#### 1) 対象地域及び対象者

- ・ 低濃度の鉛及びヒ素曝露でも健康影響が危惧される胎児、小児を調査対象とする。母親（妊婦）血液中当該物質を測定することで、胎内曝露量を検討し、臍帯血で出生時の児の曝露量を評価する。また、小児血液中当該物質濃度で曝露量を評価する。
- ・ 3歳児の血中鉛濃度が神奈川県に比べ旭川市で高いことを旭川医科大学吉田貴彦らは報告しており、日本国内は高濃度暴露群として旭川市近郊と対照群として研究責任者の所属がある下野市近郊を調査地域とした。
- ・ インダス川流域（パキスタン）では地下水中ヒ素濃度が高く、飲料水及び食品からのヒ素曝露が高いことが想定される。
- ・ パキスタンの女性は新生児期から硫化鉛を含むスルマ（化粧品）をアイシャドーの様に使用しており、スルマの使用による意図しない新生児の経口摂取の可能性がある。また、パキスタン・カラチ市内では、依然、一部の自動車では鉛ガソリンが使用されているので、鉛曝露の高い環境である。
- ・ 下野市近郊の被験者は、胎児の他に18～48月齢の小児がいる妊婦であり、かつ自治医科大学附属病院産科、木村クリニック、樹レディースクリニック、和田マタニティクリニックのいずれかを受診し出産する予定である妊婦とする。ただし、本人に同意がとれる20歳以上の妊娠女性に限る。
- ・ 旭川市近郊では、旭川医科大学の共同研究者が、エコチル調査のリクルートが終わる平成26年3月までは小児科医院で、それ以降は小児科、産科医院、附属病院産科にて、同様の条件でリクルートを行う。
- ・ パキスタンでは、アガカーン大学医学部地域医療学の共同研究者により、カラチ市内およびシンド州 Khairpur 近郊の産科施設で、同様の条件の妊婦をリクルートする。

（添付書類1計画書参照）

#### 2) リクルートと現地調査

【リクルート方式】栃木県下野市近郊に住む自治医科大学附属病院産科、木村クリニック、樹レディースクリニック、和田マタニティクリニックのいずれかを受診し、同施設で出産予定の妊婦であり、すでに18-48月齢の小児をもつ母親を調査対象者とし、母親（妊婦）、出生児、小児（兄弟）の1名を被験者とする。共同で調査する旭川医科大学では、旭川市近郊の産科医院および小児科で、同様の条件の妊婦をリクルートする。パキスタンでは、アガカーン大学の共同研究者が、カラチ市内およびシンド州 Khairpur の産科施設でリクルートする。3年間の調査期間中に旭川市近郊、下野市近

郊、カラチ市、Khairpur 近郊でそれぞれ 50 組の家族の被験者、200 組 600 名を被験者とする。因みに、環境省エコチル調査の対象者は除外する。

(添付文書 2 ; リクルート用ポスター)

(添付書類 3 ; ポンチ絵、添付文書 4 ; 説明文書、添付文書 5 ; 同意書、添付文書 6 ; 同意撤回書)

3)【曝露評価】鉛及びヒ素の曝露量評価は、研究者が妊婦の家庭訪問をして、飲料水、3 日間の陰膳、掃除機によるハウスダストの収集などの実施方法を説明する。井戸水または上水道中の鉛及びヒ素濃度、ハウスダスト中の鉛、母親および小児の 3 日間陰膳食品中の鉛およびヒ素濃度を調べ、当該物質への経口曝露量を求め、国際基準との比較を行う。また、掃除機により収集されたハウスダスト中の鉛濃度を測定し、経口曝露の一部や経気道暴露として評価する。また、気中鉛濃度の高いパキスタンでは、地上 50cm で、ローボリューム・エアサンプラーを用いて 24 時間室内大気中吸入性粉じんを収集して、小児の吸入曝露量として評価する。

4)【生体負荷量評価】とちぎ子ども医療センターにて、医師による母親、小児(兄妹)から 5ml の採血及び 20ml の採尿を実施する。母親および児の毛髪 100 本を頭皮に近いところで切断し採取し、母親および児の爪少量を採取する。また、出産時に臍帯血を採取する。妊婦と児との毛髪、爪、血液、尿、臍帯血中鉛及びヒ素濃度を測定して、生体負荷量を調べる。

遺伝子のエピジェネティック変異に影響を与える生体内葉酸レベルを、母親および児の血中葉酸濃度、臍帯血中葉酸濃度を測ることにより評価する。

5)【生活習慣調査】母親の既往歴、喫煙やアルコール摂取、食習慣、家庭環境や妊娠経過などに関する生活習慣および小児の生活習慣に関して、質問票および調査票を用いて調査する。

(添付資料 7 ; 登録時質問票)

6)【健康影響】鉛及びヒ素への曝露が発達中の胎児・小児に与える影響のバイオマーカーとして、これまでに発現変化の報告例がある遺伝子やマイクロ RNA(miRNA)に加え、新生児期の神経発達、呼吸器発達に関わる遺伝子や発がんに関わる遺伝子などについて、その発現を制御する DNA メチル化などのエピジェネティック変異の解析を実施し、日本国内の低曝露群とパキスタンの高曝露群の比較を行う。さらに詳細なエピジェネティック変異の解析が必要な場合は、匿名化された代表的な試料を用いて、マイクロアレイや大規模シーケンズなどを利用したゲノムワイドなエピゲノム解析を外部分析機関にて行う。また、発がん関連遺伝子群の変異とヒ素及び鉛曝露との関連性を検討するために、臍帯血 DNA、胎盤 DNA および母体末梢血 DNA を用いて、母子間での遺伝子多型やエピジェネティック変異を解析する。ヒ素、鉛への曝露によって発現制御領域に遺伝子多型やエピジェネティック変異が生じている遺伝子や miRNA が発見された場合、代表的なサンプルを用いて RT-PCR、real time PCR、マイクロアレイなどによる遺伝子発現解析を行い、遺伝子多型の出現やエピジェネティック変異が遺伝子発現に与える影響について検討する。

7)【アレルギー検査】 小児の血清中特異的 IgE (食物アレルギー; 卵白、牛乳、小麦、米など。室内アレルギー; ハウスダスト、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニなど。屋外アレルギー; スギ花粉(シラカバ花粉)、ブタクサなど)について調べて、鉛およびヒ素曝露等の環境要因と関連性を検討する。

8) 試料中重金属濃度の測定

地域	種類	量	予定検体数	測定項目
下野市 旭川市 カラチ市 Khairpur 近郊	陰膳 (妊婦+児)	3日間	各地域で 100 検体  全地域では 400 検体	ヒ素、鉛

地域	種類	量	予定検体数(各地域)	測定項目
下野市 旭川市 カラチ市 Khairpur 近郊	母親頭髪	100本	50検体	ヒ素、鉛
	母親爪	少量	50検体	ヒ素、鉛
	母親尿	20 ml	50検体	ヒ素、鉛
	兄弟頭髪	100本	50検体	ヒ素、鉛
	兄弟爪	少量	50検体	ヒ素、鉛
	兄弟尿	20 ml	50検体	ヒ素、鉛
	飲料水	20 ml	50検体	ヒ素、鉛
	ハウスダスト	14日間	50検体	鉛

9) 遺伝子解析試料の種類、量、予定人数

地域	種類	量	予定人数	測定項目
下野市	母親末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	臍帯血	20 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	兄弟末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛,
	胎盤	20 g	50検体	DNA, RNA 解析
旭川市	母親末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	臍帯血	20 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	兄弟末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛,
	胎盤	20 g	50検体	DNA, RNA 解析
パキスタン・カラチ市	母親末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	臍帯血	20 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	兄弟末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛,
	胎盤	20 g	50検体	DNA, RNA 解析
パキスタン・	母親末梢血	5 ml	50名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛

Khairpur 近郊	臍帯血	20 ml	50 名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛
	兄姉末梢血	5 ml	50 名	DNA, RNA 解析, 葉酸, ヒ素, 鉛,
	胎盤	20 g	50 検体	DNA, RNA 解析

#### 10) 精神運動発達調査

小児（兄姉）の精神身体発達の評価指標として、国内およびパキスタンでは、Bayley-III 発達検査を実施して、曝露レベルとの関連性を検討する。

（添付文書 8 ; Bayley-III 発達調査モニター児募集案内）

#### 11) 被験者への謝礼

調査協力への謝礼はない。しかし、母と小児の陰膳収集費用の補償として、2 万円（食事 1,000 円/1 食×9 食/3 日+おやつ 1,000 円/3 日として、一人分が 1 万円）を支払う。調査結果の報告することを、研究に協力して頂くためのインセンティブとする。すなわち、陰膳中、生体試料中、ハウスダスト中の鉛及びヒ素濃度、臍帯血中葉酸濃度、小児の血清中特異的 IgE 抗体価を調べ、簡単な解説を付けて郵送で報告する。また、新版 K 式発達検査を受けた場合は、検査結果を報告し、発達に問題があった場合は、自治医大とちぎ子ども医療センター外来に紹介する。

#### 12) 個人情報の保護の方法

試料等は、本学の個人情報管理者に依頼して連結可能匿名化したうえで、研究に使用する。データは、研究責任者が環境予防医学においてそれぞれパスワードを設定したファイルに記録し、CD に保存して、鍵の掛かるキャビネットに保管する。同意書も同様に鍵の掛かるキャビネットに保管する。匿名化された DNA 等の試料は、フリーザーに施錠して保管する。

#### 13) 遺伝情報の開示に関する考え方

遺伝情報の解析結果は、個人が特定されないように学術論文に開示する。個人の遺伝子解析結果は開示しない。しかし、鉛及びヒ素の異なる曝露レベル集団として、あるいは地域ごとの集団として、ヒ素および鉛の胎児期曝露と遺伝子のエピゲノム変異との関係を解析した結果を、提供者に分かり易く解説したニュースレターを郵送して報告する。

また、遺伝子解析結果以外の個人の調査結果の報告することを、研究に協力して頂くためのインセンティブとする。すなわち、報告を希望する被験者に、それぞれの陰膳中、生体試料中、ハウスダスト中の鉛及びヒ素濃度、臍帯血中葉酸濃度、小児の血清中特異的 IgE 抗体価を調べ、簡単な解説を付けて郵送で報告する。また、Bayley-III 発達検査を受けた場合は、検査結果を報告し、発達に問題があった場合は、自治医大とちぎ子ども医療センター外来に紹介する。

#### 14) 遺伝情報の安全管理の方法

環境予防医学教室の常時施設されている疫学資料保存室を兼ねるサーバー室内のサーバーに、遺伝情報は保存し、解析の折りには、本学の個人情報管理者が連結可能匿名化したファイルのみを各自のコンピュータに複写して使用する。学内ネットワークシステムへの接続は、ソフトウェア・アップグレードなどの時に限り、極力ネットワークに繋がずに運用する。遺伝情報の安全管理は、遺伝情報の安全管理措置を定める手順の策定、事故等への対処法、研究者への遺伝情報の取り扱いに関する教育・指導方法、入退室管理の実施、盗難等の防止策等は大学の規程に則って行う。

#### 15) 倫理審査委員会の承認

- 研究計画書の遺伝子解析倫理審査
- 自治医科大学 平成 26 年 1 月 17 日承認 (第遺 13-38 号)
- 旭川医科大学 平成 26 年 1 月 27 日承認 (1660)
- 国立環境研究所 平成 26 年 2 月 26 日承認 (2013-9R)
- アガカーン大学 平成 26 年 3 月 17 日承認 (2196-chs-erc-14)

## 4. 結果

### 実施調査

#### ● 予備調査

Dr. Fatmi と研究打合わせ (平成 25 年 4 月 16 日間) 下野、旭川

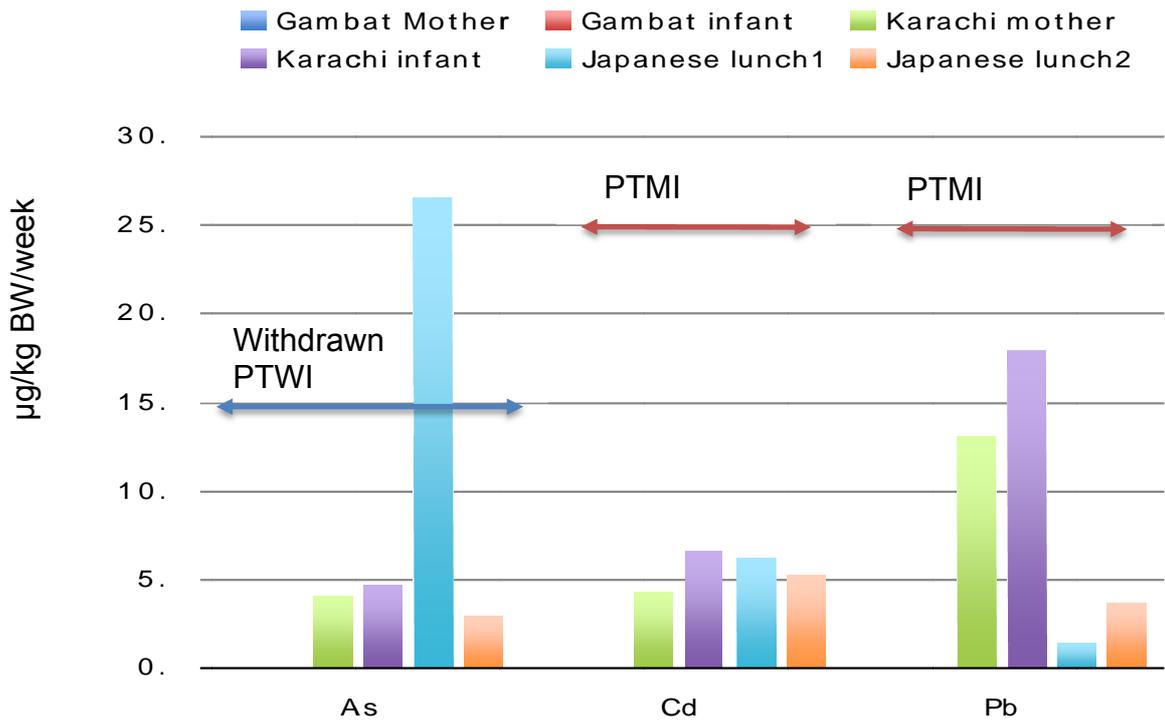
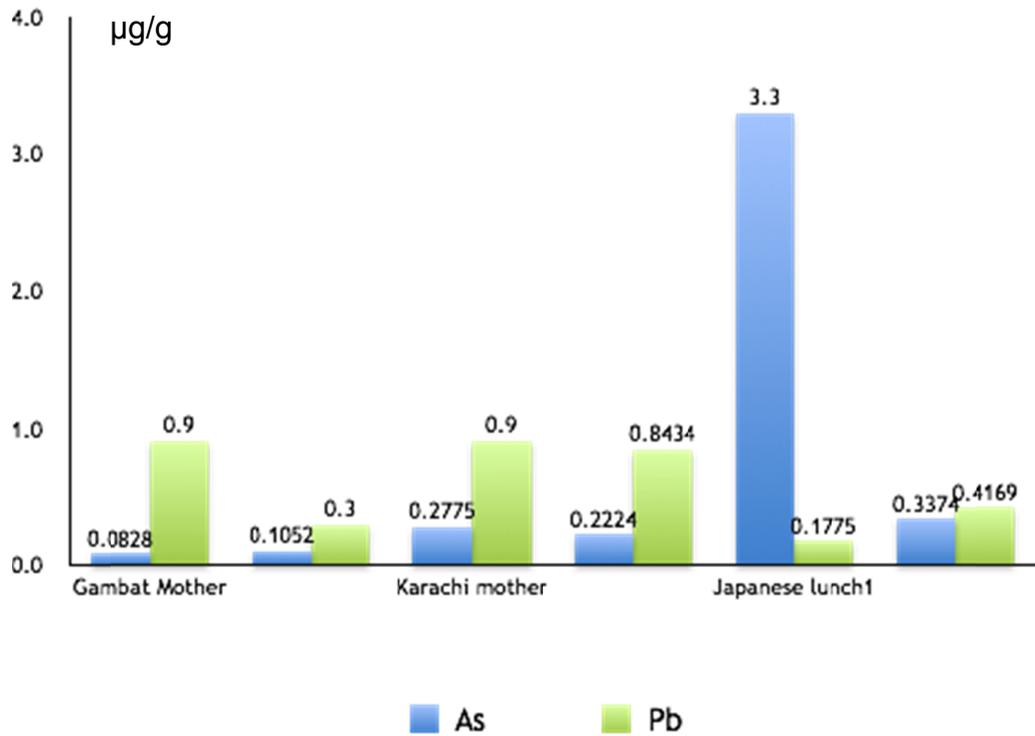
パキスタン現地予備調査 (平成 25 年 8 月 14 日間) カラチ、ガンバット

パキスタンにて打ち合わせ (平成 26 年 1 月 4 日) カラチ

#### ● 予備調査陰膳試料測定

- ◇ カラチ市
- ◇ Khairpur 地域
- ◇ 下野市
- ◇ ブランク、容器用出試験

### 陰膳中ヒ素および鉛濃度測定結果



下野の陰膳には海苔が含まれ有機ヒ素濃度を検出している。今回の予備調査ではヒ素は高くなかった。しかし、鉛はパキスタンの鉛摂取量が高い傾向を示していた。

- 現時点でのリクルート数
- 被験者家族登録数（下野市）全部で7家族、
  - 1名が出産済
  - 他は妊娠中期
  - 陰膳収集 3家族収集済
  - 採血、発達調査 0名

今後の予測は、下野市では1週に1家族のペースで登録が進んでいる。  
 旭川ではエコチル調査のリクルートが3月に終了したので、成26年6月以降にリクルートを開始する予定である。パキスタンのリクルートは平成26年6月から開始する予定であり、出生率の高さから1年以内に目標リクルート数に到達する予定である。

## 5. 謝辞

本研究は、自治医科大学産婦人科学、同小児科学、研究支援課、木村クリニック、和田マタニティクリニック、旭川医科大学産婦人科学の教員、スタッフの皆様のご協力の下に実施することが出来ました。皆様のご協力に深く感謝いたします。

## 6. 研究発表

### 1) 論文発表

この調査に関しては特になし。

### 2) 学会発表

この調査に関しては特になし。

## 7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

無し

## 8. 健康危険情報

無し