

## 7) 鉛及びヒ素濃度測定

- 鉛及びヒ素の濃度測定は、下記の3施設において所定の方法に従い、機器分析を実施する。

施設名	対象試料	元素	装置
日本食品分析センター	陰膳	鉛 総ヒ素 無機ヒ素	ICP-MS または HPLC-ICP-MS
栃木県産業技術センター	ハウスダスト	鉛	EDXRF
国立環境研究所	飲料水 血液	鉛 総ヒ素	ICP-MS

## 8) 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ス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。
- 発がん関連遺伝子群の変異と鉛及びヒ素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。
- 鉛及びヒ素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。

- ・ 被験者家族の 12～42 月齢の小児の精神運動発達調査として、Bayley Scales of Toddler and Infant development, 3rd Edition (Bayely-III 発達検査) を実施し、鉛やヒ素への曝露の影響を評価する。

#### 9) 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。

#### > 【添付文書 5】 質問票

#### 10) 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、鉛及びヒ素曝露等の環境要因と関連性を検討する。

#### 11) 精神運動発達調査

- ・ 小児(兄弟)の精神身体発達の評価指標として、日本およびパキスタンでは、Bayley 乳幼児発達調査第三版 (以下 Bayley-III) を実施して、曝露レベルとの関連性を検討する。

#### 12) 被験者への謝礼

- ・ 調査協力への謝礼は、母と小児の陰膳収集費用の補償および交通費として、2 万円を支払う。
- ・ 調査結果の報告をすることを、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。
- ・ Bayley-III を受けた場合は、郵送で検査結果を報告し、発達に問題があった場合は、電話で報告するとともに、自治医大とちぎ子ども医療センター外来に紹介する。

### 13) 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。

### 14) 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。
- ・ 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、鉛及びヒ素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は、提供者に分かり易く解説したニュースレターを郵送することで報告する。

### 15) 遺伝情報の安全管理の方法

- ・ 環境予防医学教室の常時施錠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、遺伝情報は保存する。解析を行う際には、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。

16) 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)
- > 【添付文書 6】 アガカーン大学倫理審査申請書
- > 【添付文書 7】 アガカーン大学との契約書

#### 4. 平成 25 年度 結果と考察

##### 4. 1. 予備調査

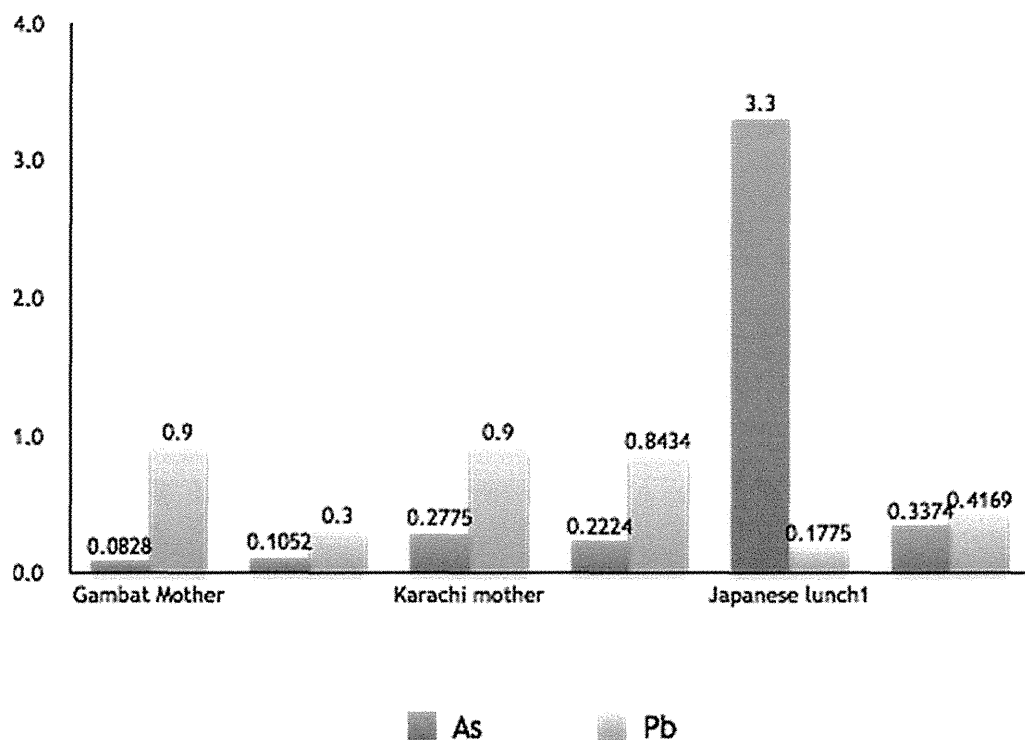
以下の日程にて、打合せおよび予備調査を実施した。

1. パキスタンにて Dr. Fatmi と研究打合せ  
(平成 25 年 4 月、16 日間) 下野、旭川
2. 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
3. パキスタンにて Dr. Fatmi と研究打合せ  
(平成 26 年 1 月、4 日間) カラチ

また、予備調査の陰膳試料は以下のものを検討した。

1. ブランク (容器用出試験)
2. カラチ市
3. Khairpur 地域
4. 下野市

陰膳中の鉛およびヒ素濃度測定の結果、下野の陰膳には海苔が含まれており、パキスタンより高い総ヒ素濃度を検出した。パキスタンは、鉛摂取量が高い傾向が見られた。



#### 4. 2. 本調査

<現時点でのリクルート数>

- 登録数 7 家族
- 陰膳収集 3 家族
- 採血 0 名
- 発達調査 0 名
- 出産数 1 名

下野では、1 週間に 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平成 26 年 3 月に終了したので、平成 26 年 6 月以降にリクルートを開始する予定である。

パキスタンでは、平成 26 年 6 月からリクルートを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. 平成 26 年度 結果と考察

### 5. 1. 本調査

#### <リクルート数>

- 登録数 134 家族（下野 61、旭川 6、カラチ 46、Khairpur 21）
- 陰膳収集 41 家族（下野 40、旭川 1）
- 採血 31 名
- 発達調査 0 名
- 出産数 20 名

#### <測定>

食品中の鉛およびヒ素濃度の測定を行い、飲料水を除く陰膳からの週間摂取量を算出した。

表 陰膳からの鉛およびヒ素の週間摂取量（飲料水除く）

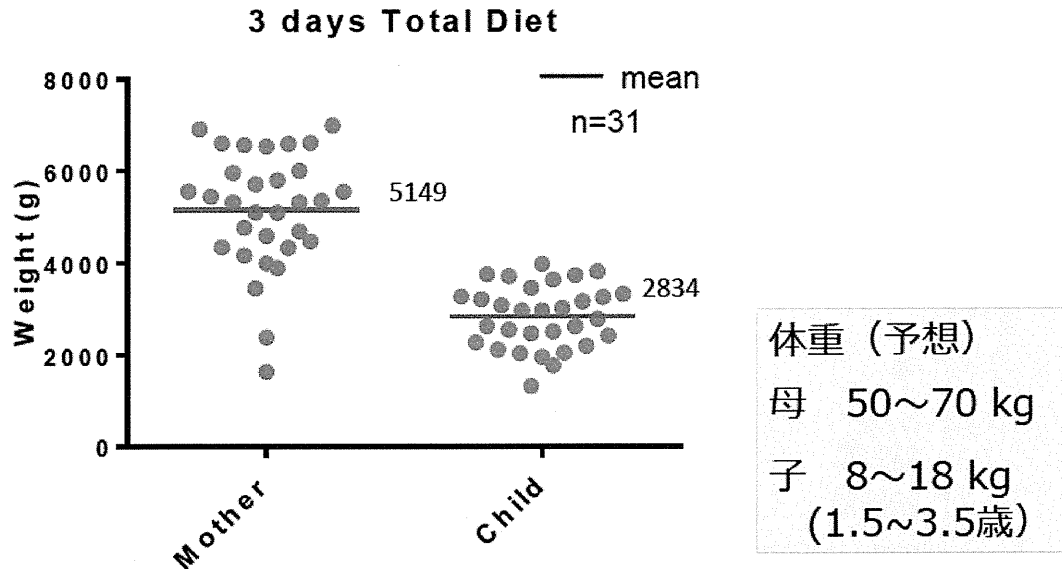
	人数	鉛 μg/kgBW/Week	総ヒ素 μg/kgBW/Week	無機ヒ素 μg/kgBW/Week
日本：母	31	1.8±0.8	4.7±3.6	0.89±0.61
日本：子	31	4.2±1.4	20.0±13.0	4.0±1.5
パキスタン：母	9	16.3±9.1	1.4±0.7	0.74±0.43
パキスタン：子	9	29.9±18.8	4.5±2.0	2.7±1.3

食品中の鉛含有量は、パキスタンの試料で日本の約 10～20 倍の高値であった。食品中の総ヒ素は、日本で高く、海藻類が食事に含まれると高い傾向が認められた。食品からの無機ヒ素摂取量は、母親で最高 112 μg/3 日、子で 45 μg/3 日であった。今後、飲料水中の鉛および総ヒ素濃度（国立環境研究所で分析中）と体重データから、陰膳からの摂取量を換算する。

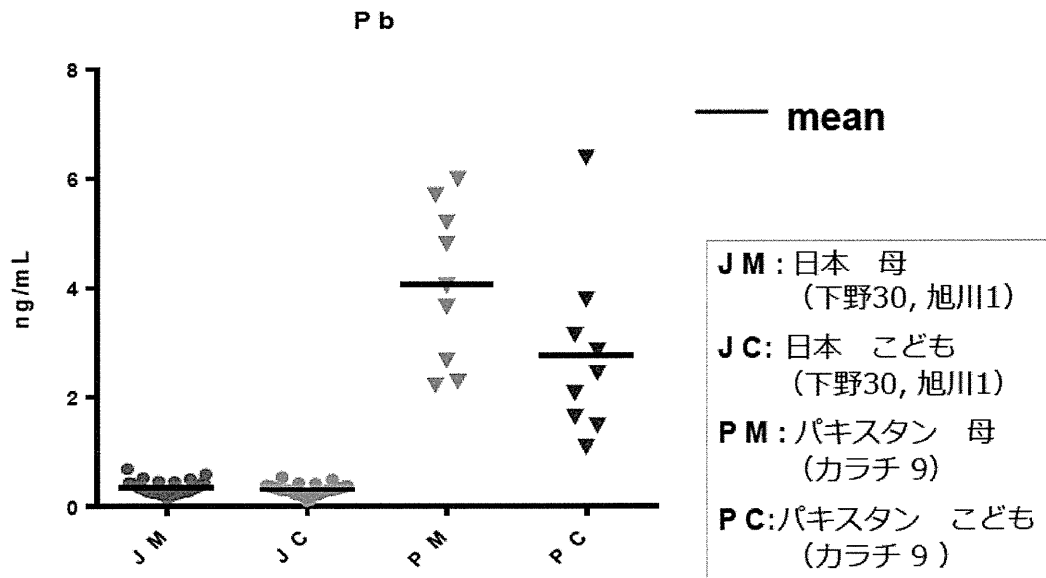
また、母子の末梢血、臍帯血、爪、毛髪中の鉛および総ヒ素濃度を測定予定である。

さらに、鉛に関しては、鉛同位体比分析による鉛曝露源の解析を進めている。試験方法は、US EPA (2012) の「Standard Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil」を参考に、擬似消化液による可給態鉛の溶出を行い、これを国立環境研究所にてマルチコレクター型誘導結合プラズマ質量分析計(MC-ICPMS)を用いて分析を行っている。

日本における母と子の陰膳3日分の重量（飲み水を含まず）

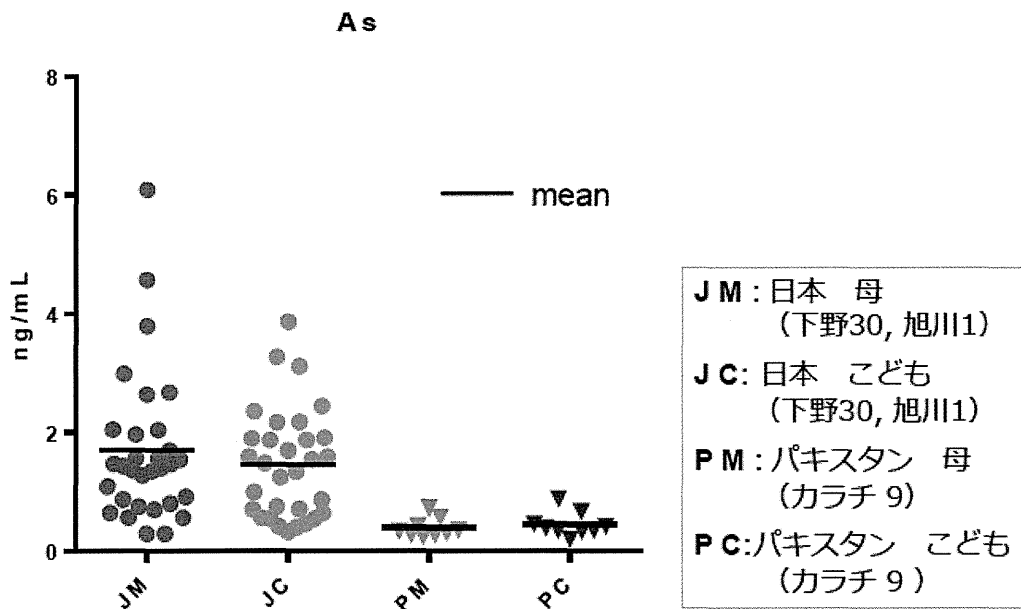


陰膳（食事・飲料）試料中の鉛濃度（測定値・速報）

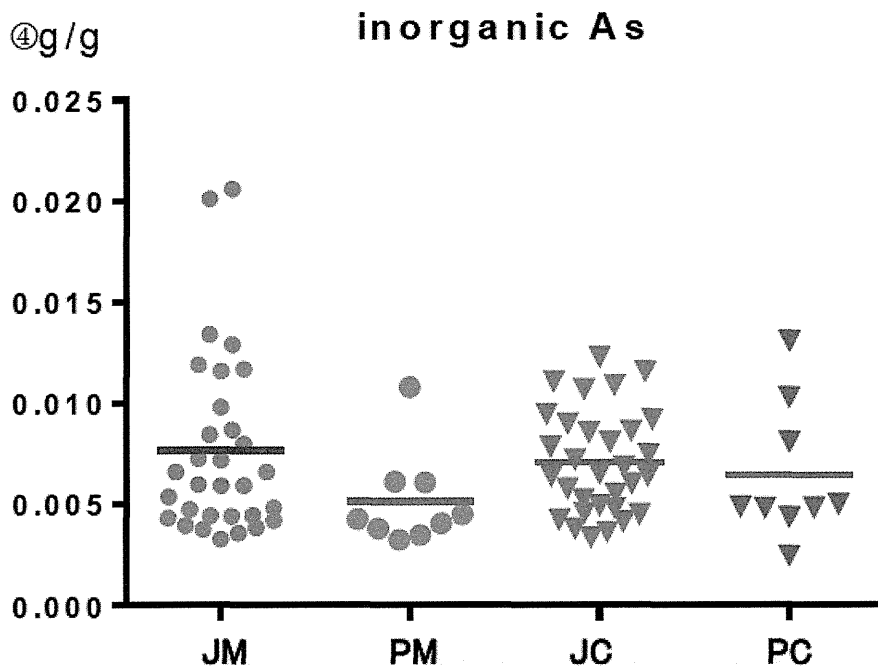




陰膳（食事・飲料）試料中の総ヒ素濃度（測定値・速報）



陰膳（食事・飲料）試料中の無機ヒ素量（測定値・速報）



## 6. 平成 27 年度 結果と考察

### 6. 1. 試料回収および分析

本調査において、日本の下野／旭川とパキスタンのカラチ／ガンバットの各地域より回収した試料の種類と数を表 1 に、これらのうち分析済みの試料の種類と数を表 2 に示した。

表 1 本調査において回収した試料の種類と数

	日本			パキスタン		
	下野	旭川	計	カラチ	ガンバット	計
母親末梢血	89	16	105	100	74	174
臍帯血	81	13	94	100	72	172
小児末梢血	89	17	106	52	40	92
胎盤	85	16	101	103	61	164
母親頭髪	未回収			103	81	184
母親爪	87	16	103	75	64	139
母親尿	87	17	104	7	9	16
小児爪	87	17	104	64	42	106
小児尿	86	14	100	未回収		
母親陰膳	87	15	102	65	47	112
小児陰膳	88	17	105	65	47	112
飲料水	65	25	90	66	44	110
ハウスダスト	88	17	105	62	0	62
吸入性粉じん	未回収			66	14	80

表 2 分析済み試料の種類と数

	日本			パキスタン		
	下野	旭川	計	カラチ	ガンバット	計
母親末梢血	89	16	105	66	41	107
臍帯血	66	0	66	61	39	100
小児末梢血	89	17	106	52	42	94
胎盤	分析中			分析中		
母親頭髮	未回収			分析中		
母親爪	分析中			分析中		
母親尿	分析中			分析中		
小児爪	分析中			分析中		
小児尿	分析中			未回収		
母親陰膳	87	15	102	65	47	112
小児陰膳	88	17	105	65	47	112
飲料水	65	25	90	66	44	110
ハウスダスト	87	17	104	分析中		
吸入性粉じん	未回収			分析中		

なお、分析済みのデータ一覧は、添付文書に付した。

- > 【添付文書 8】 食品
- > 【添付文書 9】 飲料水
- > 【添付文書 10】 陰膳
- > 【添付文書 11】 ハウスダスト
- > 【添付文書 12】 血液

## 6. 2. 鉛曝露について

日本（下野および旭川）の母親および小児の陰膳とハウスダストからの鉛の摂取量を、下野と旭川を合わせた日本を表 3 に、下野を表 4 に、旭川を表 5 にそれぞれ示した。

表 3 日本の母親および小児の陰膳とハウスダストからの鉛の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	102	0.98	1.88	102	0.89	0.30	7.97
	House-dust	84	0.17	1.72	104	0.13	0.00	0.87
Child	Diet	105	2.70	1.83	105	2.66	0.28	13.64
	House-dust	104	0.70	2.78	104	0.83	0.02	3.82

Mother：母親、Child：小児、Diet：陰膳、House-dust：ハウスダスト、  
N(GM)：データ数（幾何平均値）、GM：幾何平均値、GSD：幾何標準偏差値、  
N(M)：データ数（中央値）、Median：中央値、Range：最小最大範囲

表 4 下野の母親および小児の陰膳とハウスダストからの鉛の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	87	1.01	1.87	87	0.94	0.32	7.97
	House-dust	82	0.17	1.73	87	0.16	0.00	0.87
Child	Diet	88	2.71	1.86	88	2.67	0.28	13.64
	House-dust	87	0.74	2.56	87	0.85	0.02	3.13

表 5 旭川の母親および小児の陰膳とハウスダストからの鉛の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	15	0.83	1.92	15	0.75	0.30	3.47
	House-dust	2	0.13	1.05	17	0.00	0.00	0.14
Child	Diet	17	2.61	1.72	17	2.57	0.97	8.56
	House-dust	17	0.54	3.96	17	0.79	0.02	3.82

日本における陰膳からの鉛摂取量(幾何平均値)は、母親で 0.98  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ 、小児で 2.70  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$  であった。陰膳からの鉛摂取量は下野と旭川でほぼ同じレベルであり、両地域共に母親に比較して小児の方が多かった。

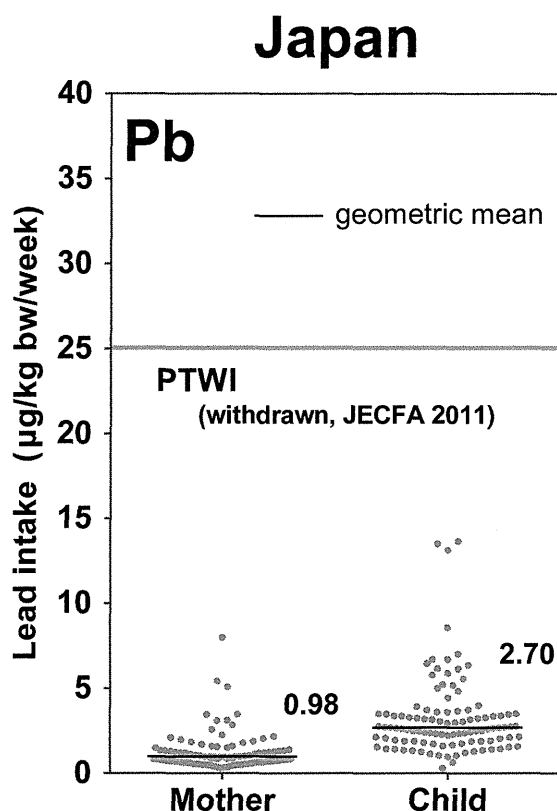


図1 日本の母親および小児の陰膳からの鉛摂取量  
鉛旧耐用摂取量 (PTWI) 25  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$  [JECFA, 2011]

日本の母親および小児の陰膳からの鉛摂取量を分散図(図1)に示した。2011年にJECFAにより撤回された鉛の旧耐用摂取量(PTWI) 25  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ と比較した結果、母親と小児共に旧PTWIよりも低いことが明らかになった。

また、陰膳以外にハウスダストによる鉛曝露も考えられるため、ハウスダストからの鉛摂取量を、米国環境保護庁のハウスダスト摂取量の報告値「成人 30 mg/日」と「小児 60 mg/日」をもとに算出した。ハウスダストからの推定鉛摂取量(幾何平均値)は、母親で 0.17  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ 、小児で 0.70  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ であった。ハウスダストからの鉛摂取量も、陰膳と同様に下野と旭川でほぼ同じレベルであり、両地域共に母親に比較して小児の方が多かった。

パキスタン（カラチおよびガンバット）の母親および小児の陰膳からの鉛の摂取量を、カラチとガンバットを合わせたパキスタンを表 6 に、カラチを表 7 に、ガンバットを表 8 にそれぞれ示した。なお、ハウスダストからの鉛摂取量については、現在分析中である。

表 6 パキスタンの母親および小児の陰膳からの鉛の摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	103	8.12	1.91	103	8.01	2.01	44.34
Child	Diet	102	18.29	2.19	102	17.14	1.76	171.93

表 7 カラチの母親および小児の陰膳からの鉛の摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	63	8.21	1.79	63	8.05	2.61	32.57
Child	Diet	62	15.35	2.13	62	14.66	1.76	111.77

表 8 ガンバットの母親および小児の陰膳からの鉛の摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N (GM)	GM	GSD	N (M)	Median	Range	
Mother	Diet	40	7.99	2.10	40	7.54	2.01	44.34
Child	Diet	40	23.99	2.13	40	20.83	7.59	171.93

パキスタンにおける陰膳からの鉛摂取量（幾何平均値）は、母親で  $8.12 \mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ 、小児で  $18.29 \mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$  であった。パキスタンにおける陰膳からの鉛摂取量は、カラチとガンバットでほぼ同じレベルであり、両地域共に母親に比較して小児の方が多かった。母親に比較して小児の方が多いのは、日本の場合と同様の傾向である。

# Pakistan

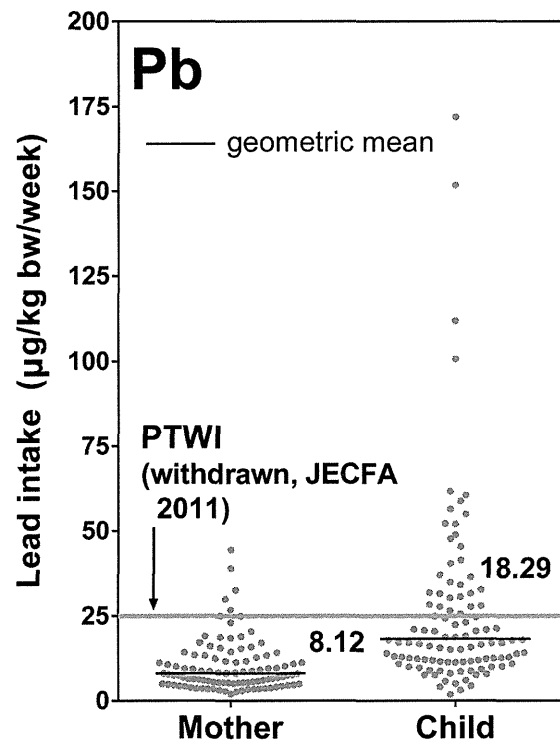


図2 パキスタンの母親および小児の陰膳からの鉛摂取量  
鉛旧 PTWI 25  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$  [JECFA, 2011]

パキスタンの母親および小児の陰膳からの鉛摂取量を分散図(図2)に示した。鉛の旧 PTWI と比較した結果、PTWI を超える母親が約 5%、小児では約 30%に認められた。本結果より、パキスタンにおける食品の鉛汚染が大きな問題であることが明らかとなった。

次に、日本およびパキスタンの陰膳およびハウスダストからの鉛摂取量を図3に示した。母親の陰膳からの鉛摂取量は、パキスタンが8.12  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ と、日本の0.98  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ に比べて約8倍多い量であった。また、小児の陰膳からの鉛摂取量は、パキスタンが18.29  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ と、日本2.70  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ に比べてこちらも約7倍多い量であった。

さらに、ハウスダストからの鉛摂取量は、陰膳からの摂取量と比較して、母親で14%、小児で21%にあたり、小児の鉛曝露に対するハウスダストの寄与率が高いことが示された。なお、パキスタンのハウスダストの測定がまだ完了していないが、同様の傾向であると推定している。

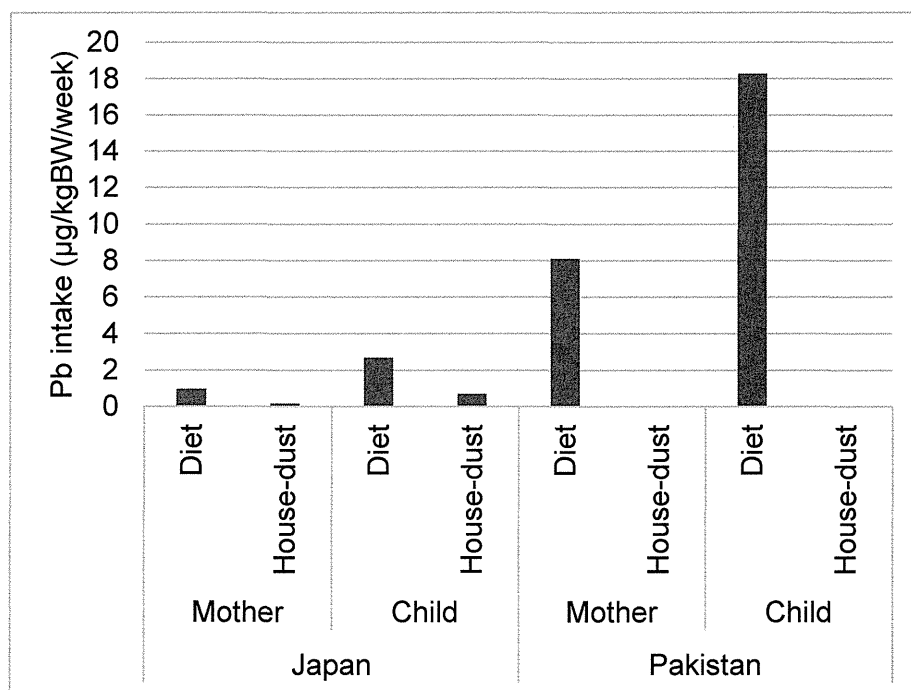


図3 日本およびパキスタンの陰膳およびハウスダストからの鉛摂取量

Pb intake : 鉛摂取量、Diet : 陰膳、House-dust : ハウスダスト、

Mother : 母親ハウスダスト、Child : 小児、

Japan : 日本、Pakistan : パキスタン

注) パキスタンのハウスダストは分析中



日本とパキスタンの母親末梢血、臍帯血および小児末梢血の血中鉛濃度を表9と図4に示した。

日本の母親末梢血、臍帯血、小児末梢血の血中鉛濃度（幾何平均値）は、それぞれ0.67  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、0.81  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、1.19  $\mu\text{g}/\text{dL}$  と他国での調査報告の値と比較して、非常に低い範囲内であった。

一方、パキスタンの母親末梢血、臍帯血、小児末梢血の血中鉛濃度（幾何平均値）は、それぞれ8.87  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、7.01  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、15.28  $\mu\text{g}/\text{dL}$  と日本と比較して非常に高い値であった。

表9 日本とパキスタンの血中鉛濃度 ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )

		N	GM	Median
Japan	Mother	105	0.67	0.64
	Cord	66	0.81	0.73
	Child	106	1.19	1.19
Pakistan	Mother	107	8.87	9.83
	Cord	100	7.01	8.79
	Child	94	15.28	15.93

Japan：日本、Pakistan：パキスタン、  
 Mother：母親末梢血、Cord：臍帯血、Child：小児末梢血、  
 N：データ数、GM：幾何平均値、Median：中央値

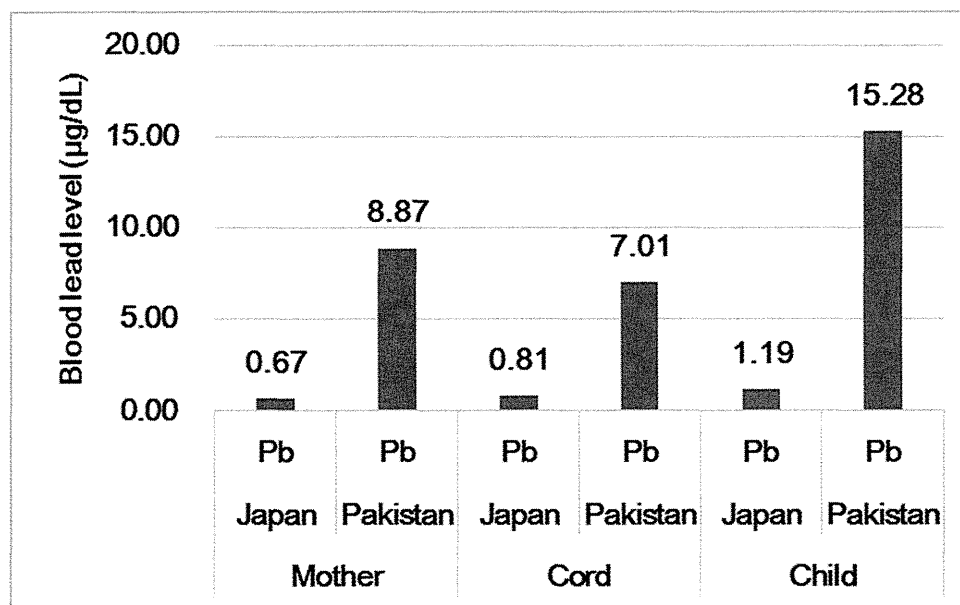


図4 日本とパキスタンの血中鉛濃度

パキスタンの母親末梢血、臍帯血および小児末梢血の血中鉛濃度を、カラチとガンバットに分けて表 10 と図 5 に示した。

表 10 カラチとガンバットの血中鉛濃度 ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )

		N	GM	Median
Karachi	Mother	66	14.52	14.79
	Cord	61	12.52	12.69
	Child	52	20.17	20.11
Gambat	Mother	41	4.01	3.90
	Cord	39	2.83	2.96
	Child	42	10.84	10.52

Karachi : カラチ、Gambat : ガンバット

パキスタンの血中鉛濃度は、カラチの場合に非常に高く、その幾何平均値は、母親で  $14.52 \mu\text{g}/\text{dL}$ 、臍帯血で  $12.52 \mu\text{g}/\text{dL}$ 、小児で  $20.17 \mu\text{g}/\text{dL}$  であった。また、ガンバットの場合でも、母親で  $4.01 \mu\text{g}/\text{dL}$ 、臍帯血で  $2.83 \mu\text{g}/\text{dL}$ 、小児で  $10.84 \mu\text{g}/\text{dL}$  とカラチよりは低いが、日本に比較すると高い値であった。

これまでの Surveillance for Elevated Blood Lead Levels Among Children United States, 1997-2001 (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5210a1.htm>) によると、血中鉛濃度が  $10 \mu\text{g}/\text{dL}$  以下でも、小児の神経行動発達に異常が見られることが報告されており、カラチの小児血中鉛濃度は、その幾何平均値で約 2 倍、最大では約  $50 \mu\text{g}/\text{dL}$  と約 5 倍の血中鉛濃度であった。このため、健康障害に危惧すべきレベルであることが示唆された。

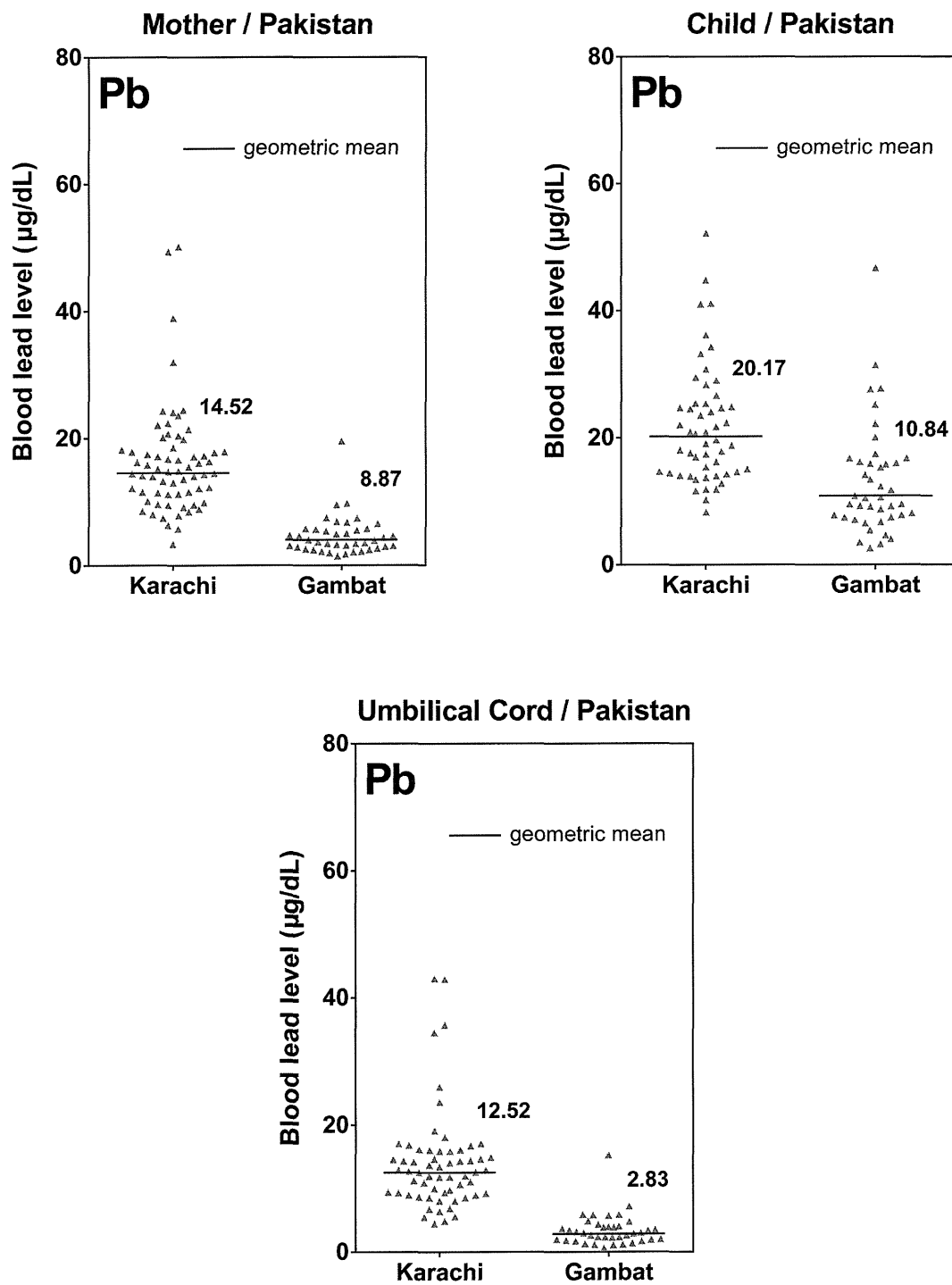


図5 カラチとガンバットの血中鉛濃度  
 上左：母親末梢血、上右：小児末梢血、下：臍帯血

### 6. 3. ヒ素曝露について

日本（下野および旭川）の母親および小児の陰膳からの総ヒ素および無機ヒ素の摂取量を、下野と旭川を合わせた日本を表 11 に、下野を表 12 に、旭川を表 13 にそれぞれ示した。

表 11 日本の母親および小児の陰膳からの総ヒ素および無機ヒ素の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N	GM	GSD	Median	Range	
Mother	tAs	102	6.15	2.16	6.4	1.03	73.8
	iAs	102	1.45	1.77	1.38	0.47	6.75
Child	tAs	105	16.68	1.86	17.17	3.68	57.39
	iAs	105	4.28	1.6	4.11	1.54	20.42

Mother：母親、Child：小児、tAs：総ヒ素、iAs：無機ヒ素、  
N：データ数、GM：幾何平均値、GSD：幾何標準偏差値、  
Median：中央値、Range：最小最大範囲

表 12 下野の母親および小児の陰膳からの総ヒ素および無機ヒ素の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N	GM	GSD	Median	Range	
Mother	tAs	87	5.96	2.13	6.60	1.03	45.23
	iAs	87	1.49	1.76	1.49	0.47	6.75
Child	tAs	88	16.23	1.89	17.08	3.68	57.39
	iAs	88	4.38	1.60	4.30	1.54	20.42

表 13 旭川の母親および小児の陰膳からの総ヒ素および無機ヒ素の  
摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{week}$ )

		N	GM	GSD	Median	Range	
Mother	tAs	15	7.41	2.35	6.36	1.58	73.80
	iAs	15	1.23	1.82	1.10	0.63	4.93
Child	tAs	17	19.25	1.69	18.60	10.26	57.12
	iAs	17	3.79	1.59	3.71	1.75	7.56