

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

小児特有の化学物質複合曝露メカニズム解明とリスク管理モデルの提案
(5-1752)

平成29年度～令和元年度

Mechanism Elucidation and Risk Management Modeling of Combined Exposure to Chemicals in Children

〈研究代表機関〉
東北大学

〈研究分担機関〉
群馬大学
国立環境研究所

令和2年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	1
2. 研究開発目的	1
3. 研究開発の方法	2
4. 結果及び考察	4
5. 本研究により得られた主な成果	7
6. 研究成果の主な発表状況	8
7. 研究者略歴	9
II. 成果の詳細	
II-1 コホート内ケースコントロールによる小児の重金属曝露メカニズム解明 （東北大学大学院医学系研究科）	10
要旨	
1. はじめに	10
2. 研究開発目的	11
3. 研究開発方法	11
4. 結果及び考察	16
5. 本研究により得られた成果	24
6. 国際共同研究等の状況	25
7. 研究成果の発表状況	25
8. 引用文献	26
II-2 網羅的一斉分析による小児の化学物質曝露の包括的解析 （群馬大学大学院医学系研究科）	28
要旨	
1. はじめに	28
2. 研究開発目的	29
3. 研究開発方法	29
4. 結果及び考察	31
5. 本研究により得られた成果	42
6. 国際共同研究等の状況	43
7. 研究成果の発表状況	43
8. 引用文献	44
II-3 小児化学物質曝露の数理モデル構築とリスク管理モデルの提案 （国立研究開発法人国立環境研究所）	45
要旨	
1. はじめに	46
2. 研究開発目的	46
3. 研究開発方法	46

4. 結果及び考察	47
5. 本研究により得られた成果	59
6. 国際共同研究等の状況	59
7. 研究成果の発表状況	59
8. 引用文献	61
III. 英文Abstract	62

I. 成果の概要

課題名 5-1752 小児特有の化学物質複合曝露メカニズム解明とリスク管理モデルの提案

課題代表者名 仲井 邦彦 (東北大学大学院医学系研究科・発達環境医学分野・教授)

研究実施期間 平成29～令和元年度

研究経費(累計額) 129,063千円

(平成29年度：43,750千円、平成30年度：41,563千円、令和元年度：43,750千円)

本研究のキーワード 家庭環境、重金属、リスク管理、曝露シナリオ、曝露モデル、鉛曝露、網羅的一斉分析

研究体制

(1) コホート内ケースコントロールによる小児の重金属曝露メカニズム解明(東北大学)

(2) 網羅的一斉分析による小児の化学物質曝露の包括的解析(群馬大学)

(3) 小児化学物質曝露の数理モデル構築とリスク管理モデルの提案(国立研究開発法人国立環境研究所)

1. はじめに(研究背景等)

化学物質に対して感受性が高い集団の一つは胎児と乳幼児と考えられ、特に胎児への曝露影響を考慮すると母親の曝露レベルが重要な鍵を握る。鉛(Pb)やカドミウム(Cd)、水銀(Hg、国内で問題となる水銀化合物はメチル水銀)についてみると、公害や産業曝露で問題となるより低いレベルでも胎児期における曝露で様々な健康影響が懸念されることが報告されている。このため日本でも子どもの健康や成長に影響を与える環境要因を明らかにすることを目的として、環境省により「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」が2010年度より開始され、重金属類も中心課題の一つとして取り上げられている。すでに調査参加者の妊娠中期・後期の血液中の重金属類の分析が行われているが、少数ながら安全基準値を超える事例が観察されており、その曝露源や曝露経路に関する環境調査が求められている。さらには、そのような重金属類のリスク管理を考えた場合、全員の曝露レベルを個別に採血し曝露評価を行うのではなく、様々な環境試料中のレベルから数理モデルにより推定する重金属類の管理モデルの構築も求められている。

健康影響が懸念される化学物質として、重金属以外にも残留性有機汚染物質(POPs)や農薬など非常に多様な化学物質が含まれる。その曝露評価を行う場合、個別の化学物質をそれぞれターゲット分析する手法が現在採用されているが、候補物質は非常に多数であり、網羅的一斉分析による曝露評価が期待される。網羅的分析では、メタボロミクスデータを解析することで、曝露指標もしくは影響指標に関わるバイオマーカーを抽出し、曝露シナリオまたは影響シナリオの中で管理モデルを構築する道も開ける可能性を秘めていると期待される。近年の網羅的一斉分析に関わる技術の進歩は著しく、環境科学分野への応用が期待される。

2. 研究開発目的

化学物質曝露に対するハイリスクグループの一つは胎児および乳幼児であり、安全量を超えた曝露の場合、曝露メカニズム解明と曝露低減対策が求められる。このため環境省は「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」を計画し、特に胎児期曝露に着目し妊娠期の母親の曝露評価と子どもを対象とする有害性評価を進めている。このうち重金属類について、PbやHgなどで少数ながら安全基準値を超える高曝露群が実際に観察されている。そこで、本研究のサブテーマ1では、重金属類の曝露メカニズムの解明と、リスク管理モデル提案を目指し、家庭内における重金属の曝露源と曝露経路を明らかにし、曝露メカニズムの解明を目指す。対象者は、エコチル調査などで事前に母体血濃度がわかっている方の協力を目指す。家庭環境試料として、陰膳、上水、屋内空気(浮遊粒子状物質)、ハウスダス

ト、庭土を収集するとともに、調査時の母親の曝露レベルを把握するため末梢血採血を実施し、試料中の元素を誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）により分析を行った。平成30年度よりは尿も収集し同様に分析を行った。調査対象として140件の調査を目指した。次に、水銀については、その曝露源と曝露経路は魚介類とその摂取が重要であることがすでにわかっているものの、未だに高レベルの曝露事例が観察される。このためメチル水銀の有害性および厚生労働省から出されている注意事項に関する認知度について横断調査を計画した。なお、メチル水銀は水俣条約の発効を受けて人の曝露を減らす努力が求められており、リスクコミュニケーションに役立つ情報収集を目指した。この水銀については、さらに、臍帯血/母体血比などに個人差があり、高感受性を示す集団の存在が示唆される。遺伝的素因の関与を仮定し、ゲノムワイド関連解析により重金属の胎児移行なに関与する一塩基多型の探索を300名で計画した。

人体を汚染する化学物質の数は急速に増えている。管理モデルを構築する上で曝露評価や影響評価が鍵となるが、曝露評価でも個々の化学物質を分析する手法には限界がある。さらに、多くの化学物質は安全量に関する知見も乏しい。エコチル調査での有害性評価の進展が期待されるが、その前提となる多様な化学物質の曝露評価に必要なモニタリング手法そのものが未開発である。そこで、サブテーマ2では、この打開策として網羅的一斉分析による包括的モニタリングを提案した。その検証のため、まず最初に、有機リン系農薬代謝物を対象に、機器分析で尿中濃度が既知の検体から、高濃度と低濃度検体各20件を用いて、ターゲット/ノントarget分析を実施し、農薬代謝物および関連するバイオマーカーの包括的解析を試みた。次に、家庭環境調査で得られた母親尿を用いて、重金属曝露と関連するバイオマーカーについても同様な手法で探索的研究を実施し、網羅的分析手法の可能性の検証を試みた。

サブテーマ3では、サブテーマ1および2で得られた成果を活用し、曝露、体内動態に関するモデルを構築し、その検証を目指した。検討対象として、すでに研究グループ内でデータを有している残留性有機汚染物質（POPs）の小児曝露に加え、重点課題として取り組む数理モデルとして、重金属による母親の曝露モデル、体内動態及び血中濃度予測モデル等の構築を目指した。

3. 研究開発の方法

（1）コホート内ケースコントロールによる小児の重金属曝露メカニズム解明

家庭環境調査では、重金属のうちPb、Cd、MnおよびHgを中心に、Seを含めて家庭内環境媒体および血中レベルの曝露評価を実施し、曝露メカニズムの解析を行う。調査目標を140件とし、対象者としてエコチル調査で妊娠中期・後期の母体血の金属濃度（Pb、Cd、MnおよびHg）が高い集団を中心に声かけを実施し、調査参加者数が不足する場合は東北大学が独自に進めている追加調査などの調査参加者にも対象を拡大した。調査内容は、環境試料（陰膳、上水、屋内空気（浮遊粒子状物質）、ハウスダスト、庭土）を収集し、調査参加者の末梢血を含めて元素分析をICP-MSなどで実施し、曝露源と曝露経路の解析を実施した。環境媒体の試料収集と分析について、すでに公開されているガイドラインがあるものはその方法に準拠して実施した水銀はさらに水銀蒸気捕集を行った。上水について、浄水器設置やウォーターサーバーなどを利用している場合は、原水に加え実際に調理または飲用の用途を確認しながらサンプルを収集した。高レベル曝露群（ケース）に対して、他元素の高レベル曝露群を対照（コントロール）とした。

メチル水銀に関する認知度調査では、家庭環境調査の調査参加者に加え、公募により調査参加者を募り、300名を目標に調査を実施した。調査内容は、調査内容は、毛髪採取と質問票調査とした。毛髪採取では、後頭部の根元から30本程度毛髪を採取し、根元から3cmを水銀測定に使用した。質問票調査では、メチル水銀の認知度について、曝露源および厚生労働省から出されている注意事項について質問した。メチル水銀の摂取量を推定するため、過去3ヶ月間の魚種ごとの摂取量と摂取頻度を調査し、メチル水銀の体内負荷量と認知度との関連性についても解析を進めた。

統計解析ソフトには、JMP14.3.0（SAS, Inc）を使用した。本研究を進めるにあたり、研究計画を東北大学医学系研究科倫理委員会に提出し承認を得流とともに、家庭環境調査では書面による同意を得て疫学研究を実施した。

(2) 網羅的一斉分析による小児の化学物質曝露の包括的解析

化学物質の網羅的分析では、食事や生体由来の成分の中に小さなピークとして化学物質が検出されることから、ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)および液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)のワークフロー・解析手法の確立をまず実施した。特に、尿中の尿素は濃度が高く、GC/MSでの測定時に検出に悪影響をもたらす。尿中の尿素をウレアーゼ処理で分解することで、導入する試料量を増やすと同時に高感度化を目指した。このためウレアーゼ処理による尿素除去法の開発、誘導体化の検討、および複数の溶媒による抽出により、試料注入量を増加させ、尿素によるマトリックス効果の減弱を行なって、化学物質のモニタリングに適した分析系の確立を目指した。

有機リン系農薬代謝物の網羅的分析では、サブテーマ1から妊娠中期・後期の母親尿の提供を受け、代謝物であるジアルキルリン酸(DAP)濃度が高い群と低い群をそれぞれ30検体ずつ選出し、分析に使用した。有機リン系農薬は主に肝臓でDAPに代謝されて尿中に排出される。尿中のDAP濃度は有機リン系農薬への曝露を観察する上で良い指標とされている。

さらに、サブテーマ1では平成30年度より家庭環境調査で尿を収集しており、家庭環境調査で得られた出産経験を有する女性尿85検体について、網羅的一斉分析の手法(LC/MS)を用いて、重金属(Pb、Cd、Mn、SeおよびHg)の尿中濃度との関連性について検討を行った。

本研究は「群馬大学 人を対象とする医学系研究倫理審査委員会」による承認を得て進めた。

(3) 小児化学物質曝露の数理モデル構築とリスク管理モデルの提案

金属類の曝露モデルの構築をサブテーマ1と連携し進めた。推定曝露量(EDI: estimated daily intake)の算出にあたって、曝露係数(K)と各媒体の濃度(C)を用いて、以下の式により推定曝露量(EDI, $\mu\text{g/day}$)または体重1kg当たりの推定曝露量($\mu\text{g/kg/day}$)を算出した。曝露係数(K)は、US-EPAのExposure Factors Handbook (2011)に示されたcentral tendency (平均値または中央値)または95パーセンタイル値を用いた(詳細は以下の表3.3.1に示す)。1日食事摂取量については、陰膳食事調査で得られた対象者ごとの値を使用した。

$$\text{推定曝露量(EDI)} = (C_f \times K_f) + (C_a \times K_a) + (C_d \times K_d) + (C_s \times K_s)$$

f: 食事(飲水を含む)、a: 室内空気、d: ハウスダスト、s: 土壌

Hg以外の体内動態について、各種パラメータを取得するため文献検索を実施し、情報収集を行った。一方、Hgの体内動態に関しては、既報論文(Yaginuma-Sakurai et al., 2012)のデータを活用し、母集団薬物動態・薬力学ガイドラインを参考にし、母集団体内動態(PPK)解析を実施した。母集団薬物動態解析にはPhoenix WinNonlin (Cetara社)を使用した。

血中濃度の予測モデルの構築について、3つのアプローチで検討を進めた。1) 東北コホート調査データを活用し、母体血及び臍帯血の金属類濃度との関係について解析するとともに、その変動要因や臍帯血濃度の予測因子について検討を進めた。2) モントリオール大学との国際連携を進め、母体血、母乳あるいは臍帯血濃度から経時的な小児血中POPs濃度を予測するモデル(PBPK model)を活用した。さらに、3) 本研究ではエコチル調査の調査参加者が一部に含まれており、現在の血中金属類濃度と妊娠期中の血中金属類濃度の縦断的解析が可能であり、血中金属類濃度の予測モデルの構築を目指した。

解析に際して、重回帰分析を実行するにあたって、欠測している変数については連鎖方程式を用いた多重補完(MICE; multiple imputation by chained equation)を適用した。シミュレーション解析には、モンテカルロシミュレーション及びブートストラップを用いた。環境試料および食事試料中の金属類濃度の一部は検出下限値未満であり、下限値の半分値を一律に当てはめて解析をしたが、曝露モデル構築に際しては解析から除外した。環境試料および食事試料中の金属類濃度を使用した重回帰分析を実施する際、下限値未満の占める割合が20%以下であれば下限値未満の値を多重補完(MICE)することとし、分布に偏りが発生しないように考慮した。統計解析ソフトには、JMP14.0 (SAS, Inc) またはR (R Core

Team 2019) を使用した。母薬物動態解析にはPhoenix WinNonlin (Cetara Inc) を用いた。

本研究にあたり、国立環境研究所医学研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

4. 結果及び考察

(1) コホート内ケースコントロールによる小児の重金属曝露メカニズム解明

家庭環境調査の調査参加者について、宮城県では、440名の方に案内状を送付し最終的に130名で同意を得た（案内状送付に対する同意率は29.5%）。愛知県では、49名の方に案内状を送付し、最終的に21名で同意を得た（同意率42.0%）。合計151名で調査を進めた。調査参加者として140名を目標としていたが、151名の協力を得て調査を進めた。

重金属類の体内負荷量と密接な指標として全血中の元素濃度が有用と考えられた。そこで、血液中の濃度と環境試料との間で関連性が示された媒体に着目すると、全血中のPbは食事、調理水、および飲料水のPbと関連性が確認された。尿中Pbも同じ傾向であった。一方で、血液中のCdと環境試料中のCdとの間に関連性は確認されなかった。Hgについても、血液中のHgは食事のHgとの間に正の関連性が認められた。血液中のHgはそのほとんどがメチル水銀に由来すると考えられているが、その由来は食事の魚と推測された。なお、屋内空気中の蒸気水銀の濃度は低いながら、全ての検体で検出されたものの、血液中のレベルとの間に関連性は観察されなかった。以上の結果から、Pb曝露には食事および上水由来のPb曝露の寄与が大きいことが示唆された。ただし、以上の解析は単純な相関係数からの検討であり、曝露モデルについてはデータをサブテーマ3に提供し、数理モデルによる解析に委ねた。

なお、Pbの曝露源としての上水について見てみると、1/3ほどの家庭で活性炭などの浄水器装置を水道水蛇口に設置し利用している事例が観察された。そのようなケースで原水中と濾過水の元素濃度を比較すると、PbおよびSeで元素の除去能が確認され、Pb除去に有効と考えられた。仮に、Pbの曝露源の一つが鉛製水道管からの汚染と考えられる場合、浄水器の利用が曝露回避に有用であると考えられた。また、紙巻きタバコには重金属としてCdが含まれており、主流煙のみならず副流煙にCdが含まれていると指摘されている。そこで、家庭内における喫煙者の有無と屋内空気Cdとの関連性について検討を行った。同居家族の喫煙状況を聞き取り、紙巻きタバコ群、加熱式電子タバコ群、および非喫煙群で比較した。その結果、非喫煙群と紙巻きタバコ群の間でCd濃度に有意差が認められ、加熱式電子タバコ群でもCd濃度がやや高い傾向が観察されたものの、他の群との差は認められなかった。従って、屋内での紙巻きタバコの喫煙は、副流煙によりCd汚染を引き起こすことが示唆された。次に、喫煙状況と調査参加者の末梢血Cdとの比較を行ったところ、紙巻きタバコ群に対して、非喫煙群および加熱式電子タバコ群でCd濃度が低下した。血中Cdの曝露経路が受動喫煙によるものなのか、本人喫煙によるものなのかは、さらに解析を行う必要があるものの、喫煙によるCd曝露が強く懸念された。

メチル水銀に関する認知度調査では、家庭環境調査の調査参加者151名に加え、公募で参加が得られた143名を加えた女性合294名で解析を実施した。メチル水銀の曝露源に関する認知度と毛髪総水銀や魚摂取重量との関連性を検討した。メチル水銀はどのようなものから体内に取り込むと思うかを問う項目では、「魚介類」を正しく選んだ割合は26.5%であった。この質問に対する正答群と誤答群で毛髪総水銀の濃度または魚摂取量を比較したところ、統計学的に有意な差異は認められなかった。次に、厚生労働省が妊娠女性を対象に魚摂取の注意事項を公表しており、その認知度を調べた結果、「知っている」と回答した割合は33.0%であった。この認知度の有無で毛髪総水銀または魚摂取量を比較したが、有意な差異は認められなかった。以上の結果から、メチル水銀の曝露源や注意事項を知っている場合でも、メチル水銀の体内負荷量の低減とは結びついていない様子が示された。ただし、曝露レベルが低い場合、魚摂取量を控える必要はない。そこで、魚摂取量からメチル水銀摂取量を推定し、耐容週間取量（TWI）を超えている方（20人、全体の6.8%）に着目したが、厚生労働省の注意勧告を知っていると回答した割合は9名（45%）であり、TWIを超えている人の方が、メチル水銀に関する認知度が高いことが示唆された。この認知度調査の限界として、調査参加者が妊娠をもうしないと決めた場合、曝露回避には結びつかない。また、調査参加者の中で、母親はマグロ類を摂取するが、子どもたちには他の魚介類を提供するなどの工夫をしているケースも見られた。このため子どもの毛髪水銀値をアウトカムとした認知度調査が

さらに必要と考えられた。

(2) 網羅的一斉分析による小児の化学物質曝露の包括的解析

ノンターゲット分析法による網羅的一斉分析において、有機リン系農薬尿中代謝物(DAP)の測定が可能かどうかを、GC/MS及びLC/MSでそれぞれ検討した。GC/MS及びLC/MSについて、それぞれワークフロー・解析手法の確立を行ったのちに、まずDAP類標準品の分析をGC/MSで実施し、いずれのDAPも10 µg/mlまで検量線は良好な直線性を示すことを確認した。しかし、尿中DAPの測定を網羅的一斉分析のプロトコールに従って行くと、ノンターゲット法(スキャンモード)では検出感度の低下が観察され、尿中DMPなどのスキャンモードでの検出下限値は約100 ng/mlとなった(同じサンプルをターゲット法(選択イオンモニタリングモード)で測定すると約10 ng/mlであった)。Q-ToF LC/MSを用いて水溶液中のDAPの測定をノンターゲット分析法により測定すると、DAPの検出下限値は、0.32 ng/ml～8 ng/mlであったが、尿中DAPの検出限界は8 ng/ml～40 ng/mlであり、1 µg/mlまで検量線は良好な直線性が得られた。今回使用した尿中のDAPの測定で用いられた液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)によるDAPの検出下限値は0.1～0.5 ng/mlと報告されており、Q-ToF LC/MSを用いたノンターゲット分析は検出感度が2桁劣っていることが示唆された。以上より、ノンターゲット分析でも高濃度曝露尿においてはDAPの定性的な検出が可能であったが、低濃度曝露もしくは日常レベルのDAPの検出には限界があることが示された。GC/MSによる網羅的一斉分析では、100個以上の化合物が同定され、有機酸、糖及び糖酸、アミノ酸とその誘導体、芳香族、核酸、アルコール類、ビタミン類などであった。尿中には外因性汚染物質より遙かに高濃度の数万を超える化学物質が存在するため、それらのマトリックス効果等により農薬代謝物の検出が不可能となったと考えられる。

GC/MSによるDAP濃度既知の妊婦尿の網羅的解析では、最終的にDAP高値群で有意に増加している4種類の化合物が抽出された。この4つの候補化合物は、データベース中の標準マススペクトル等との類似性検索から、トレイトール(4炭素の4価アルコールで、ジュートやキマメの樹皮、枝、葉に含まれている)、キシロース(5炭糖であり、ヘミセルロースの一つであるキシランの構成成分として植物中に広く存在。ヒトにおいてキシロースは代謝されトレイトールを生じる)、ガラクトuron酸/グルクロン酸/グルコン酸(糖酸類で果物の皮に含まれるペクチンの構成成分)、およびD-アルトロ-ヘプツロース(7炭糖類で、ニンジン、アプリコット、リンゴ、アボカド、トマトなど様々な果物や野菜に多く含まれる)が候補となった。いずれも野菜、果物、植物に含まれており、尿中DAP濃度が高い妊娠女性は、有機リン系農薬が付着/内部移行した野菜や果物を多く摂取した結果、これらの化合物に由来するピークが高く観察されたものと考えられた。これら食品由来の代謝物は外因性汚染物質およびその代謝物より遙かに高濃度であり、検出が容易である。このため曝露シナリオの視点からは、化学物質曝露の新たなバイオマーカーになる可能性があり、また曝露経路の探索にも有用と期待された。なお、今回のGC/MSによる分析では、DAP高値群でアミノ酸代謝や糖代謝などの内因性の代謝物マーカーは抽出されなかった。従って、今回の農薬曝露のレベルでは、GC/MSで検出可能な代謝系へ影響は与えていないことを示す結果と考えられた。

同様に、LC/MSによるDAP濃度既知の妊婦尿の網羅的解析では、最終的にDAP高値群で有意に増加している6種類の化合物が抽出された。高DAP群で増加していたのは、プロリンベタイン、4-ヒドロキシスタドリン、(R)C(S)S-アイリン、4-アセトアミドブタン酸、2-メチル-4-プロピル-1,3-オキサチアン、ベノテルピンであり、4-アセトアミドブタン酸はGABAの代謝物でもあるが、6つともいずれも野菜や果物由来の代謝物として知られているものであった。これらの化合物に関しても、化学物質曝露の新たなバイオマーカーになる可能性がある。次に、MS-DIALというソフトウェアを取り入れて解析を行うと、DAP高値群でヒスチジン代謝経路の様々な代謝物が高値となっていることが示された。ヒスチジンはヒト体内の合成速度が遅く食物から補給しなければならないため、必須アミノ酸の1つである。食材でヒスチジンを多く含んでいるのは、マグロ、カツオ・ブリ・サバ・サンマなどの青魚や鶏胸肉、豚赤身肉などの肉類、チーズやヨーグルトなどの乳製品、大豆やきな粉などの大豆製品であり、農薬曝露との直接の関連性は低いと考えられた。このため有機リン系農薬がヒスチジン代謝を亢進させる可能性も想定されるものの、更なる解析と、動物実験における検証等が必要と考えられた。

サブテーマ1より提供された家庭環境調査で得られた尿85検体をLC/MSによる網羅的一斉分析で解析した。MS-DIALを用いて4856個の精密質量ピークから、マニュアルキュレーションやQCピークとの変動係数比較等により最終的に3288個の精密質量ピークを選定し、重金属濃度とピーク面積との相関を解析したところ、重金属濃度との間に有意な関連性を示す204個の精密質量ピークが見出された。182個の精密質量ピークがSe濃度と相関し、3個がPb濃度と、4個がHg濃度、33個がCd濃度とそれぞれ相関していた。さらに、SeとCdの両方と高度に相関する18個の精密質量ピークが見出され、精密質量ピークの同定を行っているところである。現時点で、ウリジンを含む3個のRNA分解物が同定され、tRNAの分解物と考えられた。RNAの転写亢進やtRNAの分解亢進などのRNA代謝の亢進が起きていることが想定され、重金属曝露との関連性で今後の検討課題と考えられた。

(3) 小児化学物質曝露の数理モデル構築とリスク管理モデルの提案

重金属のうち、Pbについて、各媒体の濃度に欠測のない147名について解析を行った。Pbの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値68%（平均64%）となった。順に、ハウスダスト由来が占める割合は中央値16%（平均19%）、土壌の占める割合は中央値10%（平均13%）、室内空気の占める割合は中央値1.4%（平均3.2%）となった。Pb曝露において食事由来の寄与も大きい一方で、様々な曝露源の寄与が推定された。そこで、モンテカルロシミュレーションにより推定1日曝露量（ $\mu\text{g/day}$ ）を算出したところ、中央値（5%tile-95%tile）4.24（2.06-9.21） $\mu\text{g/day}$ となった。同様に各種媒体の感度解析を実施したところ、食事（飲水を除く）による影響が大きく、土壌、ハウスダスト、空気および飲水の順となった。Cdについては、ほとんどが食事由来となったが、喫煙や受動喫煙の直接吸入による曝露については、本調査では十分評価できていない可能性が示された。MnとSeについては、食事由来の寄与が大きいことが示された。Hgについては、水銀蒸気を含め各媒体の濃度に欠測のない88名での解析となった。Hgの推定曝露量のうち、食事由来の占める割合は中央値95%（平均93%）となり、予想通り食事の寄与が大きいことが再確認された。ただし、次に寄与が大きかったのは水銀蒸気であり、その割合は中央値3.7%（平均5.6%）とであり、水銀蒸気の寄与が予想より大きいことが示唆された。

曝露モデルから算出された推定曝露量に対して、内閣府食品安全委員会の耐容摂取量および日本の食事摂取基準（2020年版）の目安量等との比較を行った。その結果、本調査の調査参加者では耐容摂取量および耐容上限量を超えるケースはないことが算出された。また、Mnはほとんどの調査参加者で目安量以下であり、Seではほとんどの調査参加者が推奨量以上であった。ところで、サブテーマ1よりTWIを超えるメチル水銀の摂取量を示す事例が報告されている。Hgの曝露源として、食事由来のなかで魚摂取量との関連性がすでにわかっているが、今回の曝露モデルではある一時点の陰膳調査により構築されたものであり、陰膳調査で本来の水銀曝露源となる魚摂取が十分に考慮されたかという点に関して今後の課題と考えられた。

食事中に占める水道水（原水・浄水）の推定曝露量および金属類曝露割合について推定したところ、Pbをのぞく元素では水道水を介した曝露は非常に小さいことが示された。一方で、Pbは水道水を介した曝露が他の元素よりも大きいことが明らかとなった。飲水からの鉛の推定曝露量は原水より低く、浄水器などを活用することによりPb曝露が軽減された結果を示していると考えられた。

次に、母体血、母乳あるいは臍帯血濃度から経時的な小児血中POPs濃度を予測するモデル（PBPK model）について、モントリオール大学との国際連携で解析を行った。母乳中DDTs濃度および授乳期間の回答に欠測のない290名について、小児血中DDTs濃度の予測を実施し、3つの期間（0～6か月、6～12か月、12～24か月）の子ども血中DDTs濃度を推定した。その上で、健康指標として小児のBMIとの関連性を検討したところ、女兒で血中p,p'-DDE推定値との間で正の関連性が観察された。この結果は予測モデルの有用性を示唆する結果とも考えられた。POPsの曝露評価では実測には末梢血採血が必要であり、調査参加者の負担が大きい。調査コストや分析コストを含め、予測モデルによる推定の可能性を強く示唆する成果と期待された。

過去の血中金属類濃度から現在の血中金属類濃度に対する予測モデルの構築について検討した。妊娠中期・後期の金属類濃度と今回の調査時の金属類濃度に加え、金属類の推定曝露量、住環境、生活習慣

等の基本属性などのデータから予測式を推定したが、妊娠時採血から本調査の採血まで年数（SD）として平均5.6(1.0)年経過しているにも関わらず、同じ金属間の血中濃度には比較的強い関連がみられた。構築したモデル式から算出された予測値（Y）と現在の実際の血中金属濃度の実測値(x)について、スピアマンの相関係数は、Pb 0.756、Cd 0.893、Mn 0.765、Se 0.519、およびHg 0.520となった。この結果は、ある一時点の血中金属類濃度から5-6年先の血中金属類濃度を予測できることを示すものと考えられた。

サブテーマ2との連携で、尿中有機リン系農薬代謝物のメタボロミクスデータを受け取り、ランダムフォレスト解析（機械学習）を進めた。その結果、曝露の高値群と低値群を区別する精密質量ピークを見出した。当該ピークについては所有するデータベースに該当する化合物がなく、現在構造を同定中であるが、網羅的分析を行うことで新たなバイオマーカーを見出せる可能性が示唆された。多様な化学物質による曝露の影響を取り扱う上で、個別の化学物質の曝露評価を行うことには限界があり、曝露シナリオの中で曝露マーカーとしてメタボロミクスの結果を活用する戦略が考えられる。また、バイオマーカーが影響指標の場合、新たな影響メカニズムへの進展も期待できる。曝露モデルの構築にはまだ情報が不足しているものの、数理モデルの中に網羅的分析で得られるメガデータを取り込むことで、新しい解析アプローチが開拓できるものと期待された。

以上より、サブテーマ3では、サブテーマ1および2で得られた成果を活用し、曝露、体内動態に関するモデルを構築し、その検証を目指した。検討対象として、すでに研究グループ内でデータを有しているPOPsの小児曝露に加え、重点課題として取り組んだ金属元素に関わる曝露モデル、体内動態および血中濃度予測モデル等の構築を目指した。曝露モデルはすべての金属類について構築し、Pbの推定曝露量についてはシミュレーションも実施した。数理モデルにおける変数や定数をさらに改善することで、いずれ金属類やPOPsについて管理モデルを構築できる可能性を明示できたと考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

（1）科学的意義

Pb、CdおよびHgは、小児の環境保健分野において低濃度であっても健康影響が懸念される重金属であり、今回の家庭環境調査により、その曝露源と曝露経路を明らかにできたと考える。公害や職業曝露といった高濃度曝露ではなく、一般生活における低濃度の金属曝露メカニズムに関する知見として貴重なデータであり、特に鉛については、曝露源の多様さと小児に対する影響の閾値が定まっていないため、リスク管理が極めて難しい元素である。今回、数理モデルを検討し曝露モデルの構築に挑戦したことで、どの元素も食事由来の寄与が大きいこと、Pbについてはさらに飲水管理により曝露を軽減できる可能性があることを示すことができたと考ええる。さらに、重金属とPOPsについて、将来の曝露レベルを推定できる可能性についても検討を試みた。現在進行中の疫学調査で化学物質の有害性評価を行う際に、毎回、採血を実施して血中の曝露レベルを測定するのではなく、数理モデルで影響評価を試みる戦略の潜在的な有用性についても示すことができたと考えられた。

（2）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

金属類に関する曝露モデルの試算結果（サブテーマ3）を内閣府食品安全委員会に提供した。特にPbについては、曝露源の多様さと小児に対する影響の閾値が定まっていないため、リスク管理が極めて難しい元素であり、また鉛の推定曝露量や曝露源、血中レベルとの関連性について貴重な基礎的資料になりうるものである。Pbの安全基準値策定の検討が始まっており、環境行政に貢献できたものと考ええる。

<行政が活用することが見込まれる成果>

家庭環境調査で分析対象とした5つの金属元素は、小児の環境保健分野において、低濃度であっても健康影響と密接な元素であり、特にPbについては、曝露源を中心にこれまで十分な知見がなかった重金属である。今回、一般生活環境における低濃度の金属曝露メカニズムを明らかにしたことで、曝露レベル

を数理モデルから推定し、その上での各種媒体の環境基準（土壌基準値等）の策定にも応用が可能になるとともに、内閣府食品安全委員会での安全基準値策定の際にも基礎的な資料として利用できると考えられた。また、Hgについては水俣条約の枠組みの中で、人の曝露低減や有効性評価のためのモニタリングが始まっており、日本におけるHgの曝露メカニズムの解析が国際条約を進めていく上でも貢献できると期待された。

6. 研究成果の主な発表状況

（１）主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) M. IWAI-SHIMADA, S. KAMEO, K. NAKAI, K. YAGINUMA-SAKURAI, N. TATSUTA, N. KUROKAWA, S.F. NAKAYAMA, and H SATOH: Environ. Health Prev. Med., 24 (35) (2019) Exposure profile of mercury, lead, cadmium, arsenic, antimony, copper, selenium and zinc in maternal blood, cord blood and placenta: the Tohoku Study of Child Development in Japan.
- 2) C. MA, M. IWAI-SHIMADA, N. TATSUTA, K. NAKAI, T. ISOBE, M. TAKAGI, Y. NISHIHAMA, and S.F. NAKAYAMA: Int. J. Environ. Res. Public Health, 17 (7), 2231 (2020) Health Risk Assessment and Source Apportionment of Mercury, Lead, Cadmium, Selenium, and Manganese in Japanese Women: An Adjunct Study to the Japan Environment and Children's Study.
- 3) L. PLOUFFE, D. BOSSON-RIEUTORT, L. MADANIYAZI, M. IWAI-SHIMADA, K. NAKAI, N. TATSUTA, S.F. NAKAYAMA, and M.A. VERNER: Environmental Health (2020) Estimated postnatal p,p'-DDT and p,p'-DDE levels and body mass index at 42 months of age in a longitudinal study of Japanese children (in press).

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

（２）主な口頭発表（学会等）

- 1) L. PLOUFFE, M. IWAI-SHIMADA, S.F. NAKAYAMA, K. NAKAI, M.A. VERNER: Society of Toxicology, USA (2018). "Estimating children's postnatal exposure to DDT and DDE using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model."
- 2) 西浜柚季子, 龍田希, 岩井美幸, 磯部友彦, 藤原幾磨, 有馬隆博, 中山祥嗣, 和泉孝志, 仲井邦彦: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「一般家庭における重金属曝露メカニズムの解明-調査プロトコルについて。」
- 3) 岩井美幸, 龍田希, 仲井邦彦, 中山祥嗣: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「妊娠期及び乳児期の化学物質曝露とその低減」
- 4) 仲井邦彦, 龍田希, 岩井美幸, 磯部友彦, 西浜柚季子, 中山祥嗣, 和泉孝志, 大日方英, 大嶋紀安, ハレツキスロマナス: 第28回環境化学討論会(2019) 「家庭環境内における重金属類曝露シナリオの解明-調査方法の検討」
- 5) 仲井邦彦, 龍田希, 岩井美幸, 西浜柚季子, 中山祥嗣: 第78回日本公衆衛生学会総会 (2019) 「家庭環境内における重金属類曝露調査-調査方法および中間報告」
- 6) 岩井美幸, 柳沼梢, MA CHAOCHEN, 龍田希, 仲井邦彦, 中山祥嗣: 第46回日本毒性学会学術年会 (2019) 「暫定耐容摂取レベルのメチル水銀に関する母集団体内動態解析」
- 7) 岩井美幸, MA CHAOCHEN, 龍田希, 仲井邦彦, 磯部友彦, 高木麻衣, 中山祥嗣: 第90回日本衛生学会学術総会 (2020) 「Potential health risks from exposure to 5 elements via multiple pathways among women: evidence from Miyagi prefecture, Japan.」
- 8) M. IWAI-SHIMADA, K. YAGINUMA-SAKURAI, N. TATSUTA, K. NAKAI, S.F. NAKAYAMA: Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting and ToxExpo (2020) "A Population Toxicokinetic

Modelling of Mercury and Methylmercury in Human”

7. 研究者略歴

研究代表者

仲井 邦彦

北海道大学獣医学部卒業、学術博士、現在、東北大学大学院医学系研究科教授

研究分担者

1) 和泉 孝志

東京大学医部卒業、医学博士、群馬大学教授、現在、群馬大学大学院医学系研究科特任教授

2) 中山 祥嗣

岡山大学医学部卒業、博士（医学）、現在、国立研究開発法人国立環境研究所環境リスク・健康研究センター・室長（兼）エコチル調査コアセンター次長

II. 成果の詳細

II-1 コホート内ケースコントロールによる小児の重金属曝露メカニズム解明

東北大学大学院医学系研究科

発達環境医学分野

遺伝情報学分野

環境遺伝医学総合研究センター

仲井 邦彦・龍田 希

有馬 隆博

藤原 幾磨

平成29(開始年度)～令和元年度研究経費(累計額)：65,233千円(研究経費は間接経費を含む)
(平成29年度：20,350千円、平成30年度：19,333千円、令和元年度：25,550千円)

[要旨]

PbやCdなどの重金属について、低レベルでも周産期の曝露では負の健康影響が指摘されているが、低レベルの曝露の場合の汚染源は不明な点が多い。そこで家庭環境内における曝露源と曝露経路を特定し、曝露レベルの軽減に必要な基本情報の収集を目指す家庭環境調査を実施した。家庭環境調査では、食事(陰膳)、水道水、屋内空気(浮遊粒子状物質)、ハウスダストおよび庭土を収集するとともに、末梢血採血を実施し、その金属類の元素の測定を行った。その結果、全血中のPb濃度と関連性が認められたのは、食事、調理水および飲料水のPbであった。上水中のPb濃度は家庭用浄水器を設置することで低減できることも示された。Cdは食事との関連性は認められなかったものの、喫煙もしくは受動喫煙との関連性が示唆された。

一方で、水銀については主要な曝露源と曝露経路は魚とその摂取であることがすでにわかっており、家庭環境調査でも食事由来の曝露が大きいことを再確認した。魚摂取に関連する水銀はそのほとんどがメチル水銀であるが、このメチル水銀の曝露を低減するための注意事項が厚生労働省から出されている。そこでメチル水銀の曝露に関連する食品や、厚生労働省から出されている注意事項に関する認知度について調査(n=294)を行ったが、曝露源を正しく理解している割合は半数以下で、厚生労働省の注意事項を知っている割合は3割程度に過ぎないことが示された。メチル水銀の曝露低減には一般市民の理解度を改善する取り組みが求められていると考えられた。

[キーワード]

重金属曝露、家庭環境、鉛曝露、曝露調査、曝露シナリオ

1. はじめに

重金属類について、比較的高レベルの曝露で様々な健康影響を引き起こすことが知られ、Pbによる産業中毒での貧血や、Cdによる公害病としてイタイイタイ病などが知られている。このような高濃度曝露は国内では過去の事例となりつつあるが、さらに近年、より低レベルの曝露でも健康影響が報告されており、周産期における曝露に限定しても、Pb曝露に関連した出生児の知的発達の遅れ¹⁾や多動²⁾、Cd曝露に関連して早期早産リスクの上昇³⁾などが報告されている。特にPbについては、米国で小児のIQへの影響を指標として血中Pbで $5\mu\text{g/dL}$ という安全基準値が設定されているものの、さらに低い $1\mu\text{g/dL}$ のレベルでも健康影響が懸念されており、米国でもPbの安全値の見直しが進められている。一方で、MnやSeは通常は必須微量元素としてどちらかというと有用な栄養素として捉えられている元素であるが、Mnは一般集団の中でも摂取量が多い集団では負の影響も報告されている⁴⁾。Seは重金属といよりも必須微量元素に分類されメチル水銀曝露に対して保護的に働くと考えられているが、他の重金属曝露に対しても保護的に関わるとの報告がある⁵⁾。MnおよびSeについて、Pb、CdおよびHgと同様に曝露源と曝露経路を把握しておくことが重要と考えられる。

これらの重金属類の曝露レベルについて、エコチル調査より妊娠中期・後期の曝露評価の結果が報告

されているが、少数ながら血中レベルが高い事例が示されている⁶⁾。安全基準値には不確実係数が見込まれており、その値を超えても直ちに健康影響があらわれるわけではないが、曝露の低減が望ましい。そのためには、まず家庭内における重金属類の曝露源と曝露経路を明らかにし、管理モデルの構築に必要な基礎データの集積が必要と考えられた。

一方で、Hgについては、健康影響が問題になる水銀化合物はメチル水銀であり、日本人の主要な曝露源と曝露経路は魚とその摂取であることが示されている。健康影響が問題となる集団も妊娠女性であることがわかっており、耐容摂取量がすでに定められており、厚生労働省から妊娠女性または妊娠を計画している女性を対象に、魚介類の食べ方に関する注意事項が公表されている。その注意事項を守る限り、健康影響が懸念される曝露レベルには到達しないと考えられる。しかしながら、実際には耐容摂取量を超える曝露レベルを示す妊娠女性が存在することが報告されており、曝露の低減が進まない要因を解明することが求められている。

メチル水銀については、さらに水銀の臍帯血/母体血比などで個人差が大きく、メチル水銀の曝露に対して高感受性を示す集団が存在すると予想される。遺伝的要因の関について、ゲノム解析が必要と考えられた。

2. 研究開発目的

胎児および乳幼児は化学物質曝露に対するハイリスクグループの一つであり、化学物質の曝露としては妊娠女性への曝露が重要な課題となる。このため環境省はエコチル調査を進め、特に胎児期曝露に着目し妊娠期の女性の曝露評価と子どもを対象とする有害性評価を目指している。このうち重金属類について、PbやHgなどで少数ながら安全基準値を超える高曝露群が実際に観察されている。そこで、本研究では、重金属類の曝露メカニズムの解明と、リスク管理モデル作成に必要な基礎的な曝露データの収集を目指し、家庭内における重金属の曝露源と曝露経路を明らかにする家庭環境調査を計画した。対象者は、エコチル調査などで事前に母体血濃度がわかっている方の協力を目指した。家庭環境試料として、陰膳、上水、屋内空気（浮遊粒子状物質）、ハウスダスト、庭土を収集するとともに、調査時の母親の曝露レベルを把握するため末梢血採血を実施し、試料中の元素を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により分析を行った。調査目標として140件の調査を目標とし、平成30年度よりは尿も収集し同様に分析を計画した。

次に、水銀については、その曝露源と曝露経路は魚介類とその摂取が重要であることがすでにわかっているものの、未だに高レベルの曝露事例が観察される。このためメチル水銀の有害性および厚生労働省から出されている注意事項に関する認知度について横断調査を計画した。メチル水銀は水俣条約の発効を受けて人の曝露を減らす努力が求められており、リスクコミュニケーションに役立つ情報収集についても検討した。

この水銀については、さらに、臍帯血/母体血比などに個人差があり、メチル水銀の胎児への移行に関連して、高感受性を示す集団の存在が示唆される。遺伝的素因の関与が示唆されることから、ゲノムワイド関連解析により重金属の胎児移行などに関与する一塩基多型の探索を300名で計画した。

3. 研究開発方法

A) 重金属に関する家庭環境調査

調査地域と対象者

重金属類の家庭環境調査については、エコチル調査の調査参加者および東北大学が独自に進めている東北コホート調査（水銀に関する出生コホート調査）に参加している調査参加者を対象に、面談で調査内容を説明し、書面による同意を得て調査を行う計画とした。エコチル調査では、宮城県石巻～気仙沼地区在住の方を対象に、妊娠中期・後期の末梢血のPbもしくはCdの濃度が高い方をまず選択し、本調査の時点で居住地に変更がない方を抽出し調査候補者とした。愛知在住の方の場合は、Mn濃度が高い方を中心に抽出し、同じく調査候補とした。エコチル調査の調査参加者を対象とすることから、事前にエコチル調査コアセンターに研究計画書を提出し、宮城県と愛知県でのみ調査実施の許可を得て調査を進

めた。登録基準および除外基準としては、日本語を読み書きでき、エコチル調査についてはエコチル調査の登録時点から転居歴がないこととしたが、特に除外基準は定めなかった。登録に際しては、調査候補の方に調査目的と内容に関して説明資料をまず郵送し、その後に電話連絡を実施して簡単に説明し、自宅訪問の内諾が得られた方に対して、調査担当者が訪問してあらためて調査内容を説明し、書面による同意を得て登録した。調査3年目では、エコチル調査の調査参加者の中に重金属類の血中濃度が比較的高い対象者が少なくなってきたことから、東北コホート調査の調査参加者の中からランダムに候補者を抽出し、同様に登録を進めた。家庭訪問調査の実施目標数を140件程度とし、目標に到達するまで登録を進めた。当初、対象者選択ではコホート内で各元素の曝露レベルが高い方とその対照として曝露レベルが低い方のペアで登録を計画したものの、転居歴がない方は少なく、さらに同意率も高くはなく、実質的にはPb、CdおよびMnで曝露レベルが高い方を含む横断調査となった。

家庭環境調査に加え、後述の認知度調査を含め、疫学調査を進めるにあたり、東北大学医学系研究科倫理委員会に事前に研究計画書を提出し、承認を得て調査を進めた（2017-1-858、2018-1-521）。

環境調査の方法

- 1** 呼吸することからだに取り込まれる重金属の量を推定します。
お母さまに確認していただきながら、採取は全てスタッフが行います。

< ハウスダストの採取方法 >

普段、よく過ごす部屋の床のホコリを持参する掃除機で吸い取ります。もしくはご自宅の掃除機にたまっているものをご提供ください。



< 庭土の採取方法 >

自宅周りの土の表面を5箇所から、それぞれ5g程度採取します。



< 室内空気の採取方法 >

1度目の訪問時にポンプを設置します。およそ1週間かけて室内の粒子状物質を収集し、2度目の訪問で回収します。



- 2** 飲料水としてからだに取り込まれる重金属の量を推定します。

< 水道水（原水）の採取方法 >

ご家庭毎の採取条件を同じにするため、下記の手順で採取します。流量はおおよそ30Lです。

①流水（5分）



②留置（15分）



③採水（5L）



④浄水フィルター等を使用している場合には、原水と別に採取します。

図3.1.1 家庭環境調査のうちハウスダスト、庭土、屋内空気（浮遊粒子状物質）および上水の採取方法（調査参加者向けの説明資料から抜粋）

家庭環境調査の方法

家庭環境調査では、重金属類の曝露源と曝露経路を明らかにするため、食事（陰膳）、水道水、屋内空気（浮遊粒子状物質）、ハウスダスト、土壌および蒸気水銀のサンプリングを行うとともに、生物学意的モニタリングのため末梢血採血および調査2年目より尿の採取を実施した。

環境媒体の試料収集と分析について、すでに公開されているガイドラインがあるものはその方法に準拠して実施した（表3.1.1.）。

食事は陰膳法により収集した。3日分の陰膳を収集する方法であり、おやつや夜食なども含めて収集を依頼した。陰膳3日分は連続しなくてもいい条件とした。陰膳調査では「カレーなど準備がしやすいメニューが集まる」ことがよくあることから、事前に「普段よく食べるメニュー」を聞き取り、その中から選択するよう依頼した。サプリメントなどを利用している場合は陰膳に含めてもらったが、処方薬は対象外とした（医薬品名の聞き取りは行なったが、重金属類などの元素の濃度などは不明のため、処方薬由来の元素は解析に含めていない）。陰膳は冷蔵宅配便で収集し、最終的に3日分の陰膳試料を混合

しホモジナイズを行ったのちに凍結乾燥を行なって分析試料とした。

食事調査の方法

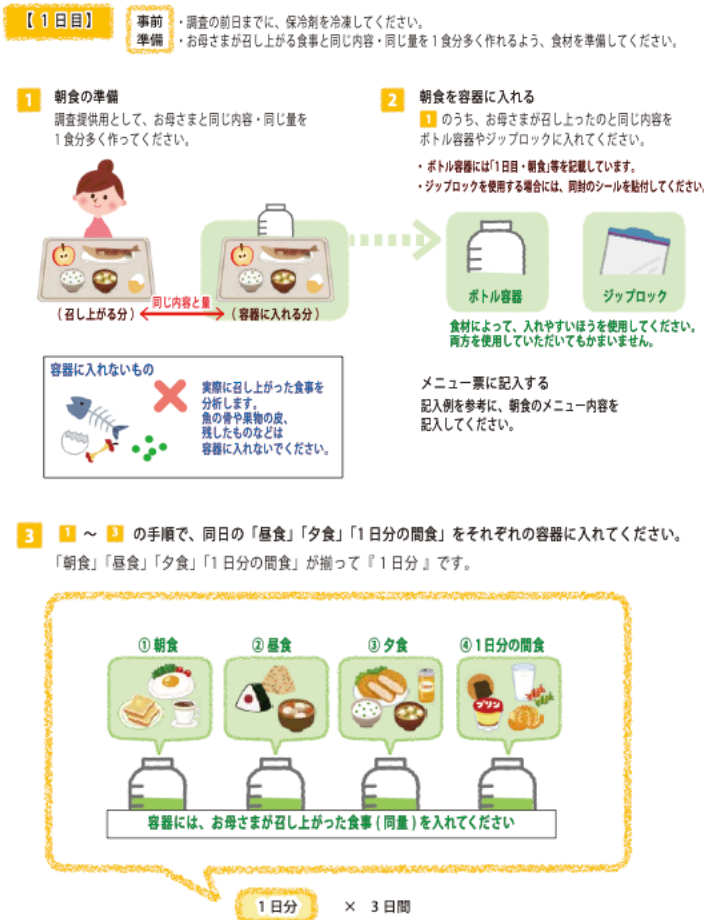


図3. 1. 2 家庭環境調査における陰膳の採取方法（調査参加者向けの説明資料から抜粋）

水道水は15分滞留水試験（上水試験法2011）に準拠し収集した。水道水を5分間放水（約20 L）した後、15分間滞留し、5Lをポリ瓶に採水し、混和後に2 Lを分注し持ち帰った。家庭内に浄水器がある場合、さらに15分間滞留を実施し、ろ過に切り替えて100 mL放水し、同様に5 Lを採水した。家庭内ウォーターサーバーがある場合、またはホームセンターなどのウォーターサーバーを利用している場合は、それぞれ採水を実施し分析に用いた。水道水原水に対して、飲料水または調理用の水を使い分けているかを聞き取り、それぞれ集計に用いた。

表 3. 1. 1. 調査対象の媒体別の調査方法

食事	環境省ばく露モニタリング調査
水道水	上水試験法（2011）
屋内空気（浮遊粒子状物質）	有害大気汚染物質測定方法マニュアル
ハウスダスト	（参考となるガイドラインなどはない）
土壌	底質調査方法（平成24年8月）
屋内空気（蒸気水銀）	有害大気汚染物質測定方法マニュアル、水銀分析マニュアル

屋内空気（浮遊粒子状物質）の収集は有害大気汚染物質マニュアルに準拠し実施した。当初、ローバリュームエアサンプラーにより10～30 L/minで1週間採取を計画したが、騒音が許容範囲を超えていることから設置困難と判断され、エコチル調査の屋内空気サンプリングで用いられたSIBATA ミニポンプ

MP-Σ300NIIを2台設置し採取する方法とした。1週間・24時間の間欠採取(5分吸引・30分休止=1440分)、吸引量1.5 L/min(吸引量2160 L)で、2台設置で4320 Lを吸引した。試料は粉じん捕集用フィルター(PF020、47mm、ADVANTEC)に回収し、ろ紙2枚をマージし元素分析に用いた。

ハウスダストについては参考になるガイドラインがないことから、エコチル調査・詳細調査で採用された掃除機(ダイソン)と紙パックを活用し、各家庭でハウスダストを1 g以上採取した。ハウスダストを紙パックから回収した後、毛髪を目視で除去し、250 μmメッシュの篩に通し分析試料とした。

土壌は底質調査方法(平成24年8月)に準拠し、5ヶ所から各10g程度の土をステンレス製スコップで採取し、それぞれ別の袋に保管して風乾試料を2mmメッシュの篩で処理し、通過試料を同重量ずつ秤取りし混合して分析資料とした。高層階に居住する場合、土壌試料はなしとした。

蒸気水銀については、SIBATA ミニポンプMP-Σ300NIIを1台設置し、24時間連続の吸引とし(吸引量720 L)、金カラム(珪藻土粒子表面に金を焼き付けた捕集材を充てんしたもの)に通気した。

表 3.1.2 環境試料ごとの分析対象

試料の媒体	Pb	Cd	Mn	Se	Hg	MeHg
水道水	レ	レ	レ	レ	X	-
土壌(庭土)	レ	レ	レ	レ	レ	-
屋内空気(浮遊粒子状物質)	レ	レ	レ	レ	レ	-
ハウスダスト	レ	レ	レ	レ	レ	-
食事(陰膳)	レ	レ	レ	レ	レ	レ
屋内空気(蒸気水銀)	-	-	-	-	レ	-
血液(末梢血全血)	レ	レ	レ	レ	レ	-
尿	レ	レ	レ	レ	レ	-

X 水道水中のHgは検出感度以下のため分析せず

化学分析

各環境試料の分析対象の元素を表3.1.2に示した。

化学分析について、血液の元素は全血試料0.2 mLにブタノール、界面活性剤、内標準物質等を含むマトリクス溶液を加えて測定溶液とし、Pb、Cd、Mn、SeおよびHgをICP-MSで測定した。

尿については、Hgを除く元素は尿試料0.4 mLを測定用バイアルに分取し、硝酸0.2 mLを加えて80℃で1時間加熱後、内標準溶液を添加し、ICP-MSを用いて測定を実施した。尿中のHgについては、試料5 mLに純水1 mLを加えて混和した後、硝酸:過塩素酸2 mLおよび硫酸5 mLを加え、200～230℃で30分加熱分解し、純水で50 mLに定容し、塩化スズ(II)溶液を加えて還元帰化水銀測定装置により測定した。

水道水中の元素は試料50 mLに硝酸1 mLを添加し、加熱後に放冷し内標準物質溶液を加え、ICP-MSにより測定した。水道水中のHgは初年度の検討で全て検出感度以下のため、次年度以降の測定は実施しなかった。

食事については、各個人の各日の食事を混和し、ミキサーでホモジナイズし重量を測定した後、3日分の全食合計重量に対する各食重量の割合で分取混合し、そこから適量を分取し凍結乾燥して分析用試料とした。HgとMeHgを除く元素については、凍結乾燥試料1gにふっ化水素酸3 mLおよび硝酸5 mLを添加し、マイクロ波による加熱加圧分解を行った後に、過酸化水素水1 mLを添加し、ホットプレート上で加熱してふっ化水素酸を除去した後、内標準物質溶液を加えて超純水で50 mLに定容し、ICP-MSで測定した。Hgについては、試料0.2 gに純水1 mLを加えた後、尿と同様な方法で分析を実施した。

メチル水銀の分析は環境省水銀分析マニュアルに従って、ジチゾン抽出-ECDガスクロマトグラフィー法により実施した。簡単には、乾燥試料0.2 gに純水0.5 mLを加えて浸潤させ、1N KOH-エタノール溶液10 mLを加えて、100℃で1時間加熱しヘキサン抽出を行なったのちに、0.01%ジチゾン溶液5 mLを加えて3分間振とうし、メチル水銀をジチゾネートとしてトルエン相に抽出した。静置後、水相を吸引除去し、2,500 rpmで3分間遠心分離後、更に水相を吸引除去した。トルエン相に1N NaOH 3 mLを加えて振とうし、静置した後に水相を吸引除去し、更に2,500 rpmで3分間遠心分離した。トルエン相の一定量にアルカリ性硫化ナトリウム溶液2 mLを加えて3分間振とうし、メチル水銀を水相に逆抽出した。1,200 rpmで3分間遠心分離後、トルエン相のみを吸引除去した。更に水相にトルエン2 mLを加えて3分間振とう洗浄し、再

び1,200 rpmで3分間遠心分離後、トルエン相を吸引除去した。これに1N HClを3～5滴添加した後、N₂ガスを3分間通気し溶液中の過剰の硫化物イオンを硫化水素ガスとして追い出した。次いでWalpole緩衝液2 mLを加え、充分混和後、精製0.01%ジチゾン溶液の一定量を加えて振とうし、メチル水銀を抽出した。1,200rpmで3分間遠心分離後、水相を吸引除去し、トルエン相に1N NaOH 3 mLを加えて振とう洗浄した。静置後、水相を吸引除去し、1,200 rpmで3分間遠心分離後、更に水相を吸引除去した。次いで、トルエン相に 1N HClを2滴加え、攪拌して酸性化し、1,200 rpmで3分間遠心分離した。静置後、塩酸相を吸引除去し、測定溶液としてGC-ECDで測定した。

ハウスダストについては、掃除機で収集した試料重量を測定し、受器付250 μ m meshの篩上に広げ、毛髪を手作業で取り除いた後、振幅1cmで5分間振とうした。これを2回繰り返し、250 μ m meshの篩を通過して受器に残ったダスト中から、さらに毛髪あるいは動物毛を取り除いた後に重量を測定し、分析用試料とした（図3.1.3）。Hgを除く元素については、試料0.5～1 gにふっ化水素酸3mLおよび硝酸5m Lを添加し、食事試料と同様な方法でICP-MSで測定した。Hgの分析も食事試料と同様とした。

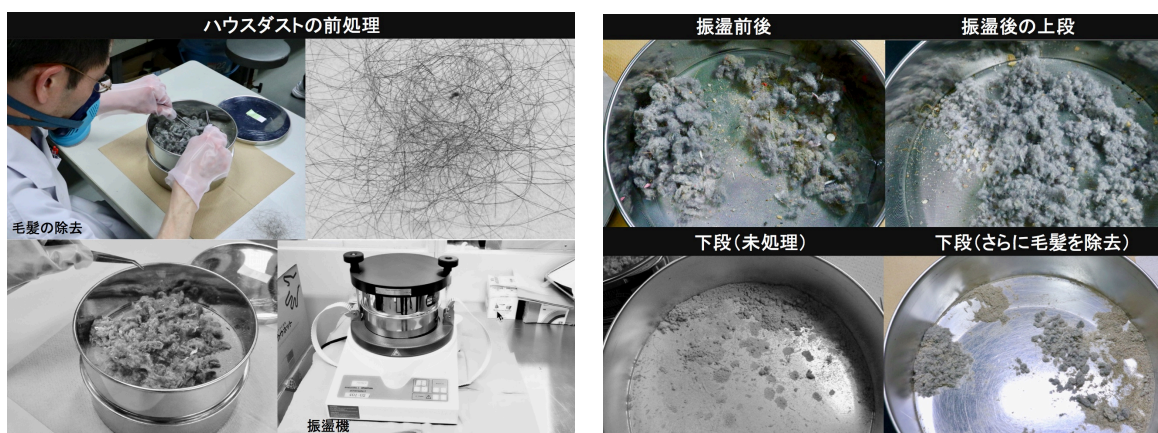


図3.1.3 ハイスダスト用試料の前処理（左）とハウスダストの震盪前～震盪後のさらに毛髪除去を行った検体の様子（右）。毛髪の混入によりHgのコンタミネーションが懸念され、篩の前後で手作業による毛髪片の除去を行った。

屋内空気中の浮遊粒子状物質については、粉じん捕集用フィルターの重量を調査前と調査後でそれぞれ測定し、調査後に差分を計算し捕集した粉じん量とした。Hgを除く元素について、秤量したフィルター試料に、ふっ化水素酸3mLおよび硝酸5mLを添加して、マイクロ波による加熱加圧分解を実施し、食事試料と同様な方法でICP-MSで測定した。粉じん捕集用フィルターが複数ある場合はまとめて分析に供した。Hgの分析も食事試料と同様とした。

土壌については、1検体当たり5地点から採取された試料を風乾し、各地点で2 mm程度より大きな礫を取り除いた後、乳鉢ですりつぶして均質にし、5地点それぞれから等量分取、混合して分析試料とした。Hgを除く元素について、試料0.1～0.2gにフッ化水素酸および硝酸5mLを添加し、マイクロ波による加熱加圧分解を実施し、食事試料と同様な方法でICP-MSで測定した。Hgの分析も食事試料と同様とした。

屋内空気中の蒸気水銀の分析では、ガス状水銀が金アマルガムとして捕集された金カラムを加熱気化装置に接続し、ゼロガスを流しながら加熱精製して、原子吸光分析計に導入して測定した。

測定機器について、主な元素分析はICP-MS（Agilent Technologies社製 7900）を用い、水銀分析では還元気化水銀測定装置（マーキュリー3320A、日本インスツルメンツ社製）（上水）または半自動水銀測定装置（HG-201型、三双製作所社製）（食事、尿、屋内空気、ハウスダスト、土壌）を用いて実施した。メチル水銀はGC-ECD（G-2700、ヤナコテクニカルサイエンス（株）社製）により分析を行った。

化学分析に際し、標準物質として、血液（Serionorm Trace Elements Whole Blood L-1およびL-3）、水道水（NIST SRM1640a）、屋内空気およびハウスダスト（NIES CRM No. 28 都市大気粉塵）、土壌（NIST SRM2702）、食事（NRC DORM-4、Hgは屋内空気およびハウスダスト兼用）を分析し、精度管理を行った。

統計解析ソフトには、JMP14.3.0 (SAS, Inc) を使用した。

B) 水銀に関する認知度調査

調査参加者

家庭環境調査の調査参加者に加え、宮城県内の沿岸部で公募を実施し、同意が得られた20歳台～30歳台の女性を対象として横断調査を実施した。公募の方法は、宮城県内沿岸部の福祉センターや病院にポスターを掲示するとともに、美容室に委託しチラシを配布した。

調査方法

調査内容は、毛髪採取と質問票調査とした。毛髪採取では、後頭部の根元から30本程度毛髪を採取し、根元から3cmを水銀測定に使用した。Hgの測定は、還元気化水銀測定装置により実施した。

質問票調査は、調査時の年齢や普段の飲酒状況に関する基本属性を情報収集した。メチル水銀の認知度についても質問票より調査した。認知度に関する質問は2問あり、1)「メチル水銀は有害な物質であることが知られていますが、どのようなものから体内に取り込むか、正しいと思うもの全てに○をつけてください。」という複数回答の項目であり、2)「厚生労働省から、妊婦さんのメチル水銀の摂取を低減するため、注意事項が公表されています。この注意事項のことをご存知ですか?」という項目から構成された。

魚摂取量を調べるために、対象地域で売られている魚介類を抽出し、過去3ヶ月間の摂取頻度と摂取量に関する調査を実施した。その結果から魚摂取重量 (g/日) を算出した。さらに魚摂取重量からメチル水銀摂取量 (μg/週) を推定した。魚介類の水銀濃度は、厚生労働省の「魚介類に含まれる水銀の調査結果 (まとめ)」にあるメチル水銀値を用いた。メチル水銀の値が欠損の場合には、総水銀の90%以上がメチル水銀であると仮定した。質問票の回答と毛髪の採取は同時期に行った。

C) メチル水銀の感受性に関するゲノム解析

メチル水銀の体内動態に関わるゲノム要因解析を計画していたが、ゲノムの網羅的解析については、分析結果を当初調査参加者本人に返却する方向で予定していたものの、偶然の知見として疾患との関連性が見出された場合の対応が難しく、倫理委員会への手続きが遅れたことなどから、ゲノム解析は行わないこととし、引き続き家庭環境調査に研究を集約させることとなった。

4. 結果及び考察

A) 重金属に関する家庭環境調査

家庭環境調査の調査参加者の概要について、宮城県および愛知県に分けて示した (図4.1.1)。

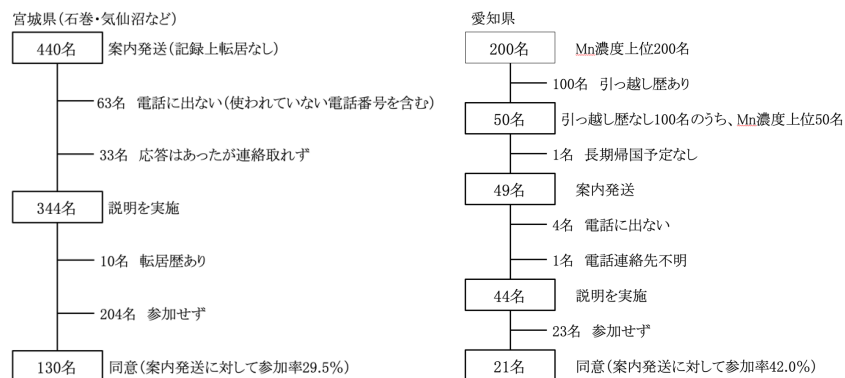


図4.1.1 宮城県または愛知県における調査参加者の登録の状況

宮城県では、440名の方に案内状を送付し、344名に電話にて事前説明を行い、最終的に130名で同意を得た。案内状送付に対する同意率は29.5%であった。愛知県では、49名の方に案内状を送付し、44名の

方に電話にて事前説明を行い、最終的に21名で同意を得た。案内状送付に対する同意率は42.0%であった。調査参加者として140名を目標としており、151名の協力を得て調査を進めた。ただし、血液や陰膳などで試料を全て収集することができない事例もあり、解析ではそれぞれのサンプル数を記載した。

各試料の元素分析の結果を表4.1.1にまとめた（食事は総摂取量を考慮した1日摂取量）。検出率について見てみると、上水中の元素分析で検出下限値以下となる割合が高く、尿中でMnも一部の検体で検出下限値を下回る事例が観察された。検出下限値未満の場合、解析ではその半値を解析に用いた。水道水ではHgがいずれも検出下限値未満であり、測定結果は記載しなかった。この水道水について、浄水器やウォーターサーバーも利用している場合は、それぞれ分析結果を示した。その上で、調理または飲料に用いる水を聞き取り、曝露モデルの解析では、調理に用いる水または飲料用の水としてそれぞれ解析を進めた。

表4.1.1 各試料の各元素の測定結果

Hg	blood (ng/g)	urine (ug/g-cre)	food (μg/day)	tap water (mg/L)	filtered water (mg/L)	water server (mg/L)	air (ng/m ³)	house dust (mg/kg)	soil (mg/kg-dry)
Pb									
n	147	82	147	148	48	16	148	147	146
%>LOD	100%	100%	100%	100%	95.7%	23.8%	61.1%	100%	100%
minimum	3.01	0.21	0.56	0.000035	0.000015	0.000015	0.45	2.4	6.8
1st Quartile	5.20	0.44	1.88	0.000110	0.000015	0.000015	2.20	14.0	15.0
median	6.98	0.58	2.43	0.000170	0.000061	0.000015	3.55	21.0	20.0
mean	7.45	0.70	2.97	0.000380	0.000101	0.000022	8.68	28.1	34.7
3rd quartile	9.22	0.81	3.70	0.000290	0.000100	0.000015	8.43	31.0	26.0
maximum	19.60	5.21	14.23	0.003400	0.001400	0.000058	110.00	160.0	740.0
Cd									
n	147	82	147	148	48	16	148	147	146
%>LOD	100%	100%	100%	96.7%	91.3%	28.6%	56.7%	100%	100%
minimum	0.35	0.28	0.94	0.000001	0.000000	0.000000	0.01	0.03	0.06
1st Quartile	0.75	0.77	7.96	0.000004	0.000002	0.000000	0.03	0.26	0.20
median	1.12	1.07	10.75	0.000007	0.000005	0.000001	0.06	0.42	0.28
mean	1.22	1.26	13.19	0.000008	0.000007	0.000001	0.12	0.91	0.33
3rd quartile	1.48	1.55	15.28	0.000010	0.000010	0.000002	0.20	0.71	0.39
maximum	3.14	5.32	149.68	0.000083	0.000042	0.000002	1.45	29.00	2.30
Mn									
n	147	82	147	148	48	16	148	147	146
%>LOD	100%	45.9%	100%	98.7%	100%	42.9%	30.4%	100%	100%
minimum	6.42	0.02	384	0.000010	0.000021	0.000010	1.5	5	350
1st Quartile	11.70	0.07	1869	0.000103	0.000083	0.000010	2.0	98	560
median	15.00	0.10	2370	0.000170	0.000135	0.000010	3.0	140	710
mean	15.78	0.16	2524	0.000239	0.000226	0.000054	5.2	165	724
3rd quartile	18.60	0.18	3019	0.000270	0.000208	0.000033	4.0	210	830
maximum	34.30	0.69	8168	0.004900	0.002200	0.000510	140.0	640	3900
Se									
n	147	82	147	148	48	16	148	147	146
%>LOD	100%	100%	100%	100%	100%	47.6%	65.5%	100%	100%
minimum	106	18.6	7.43	0.000014	0.000013	0.000002	0.03	0.11	0.05
1st Quartile	160	30.5	40.99	0.000047	0.000036	0.000002	0.10	0.28	0.15
median	176	40.3	50.51	0.000060	0.000052	0.000003	0.17	0.35	0.22
mean	181	43.0	55.21	0.000058	0.000050	0.000005	0.23	0.42	0.24
3rd quartile	194	53.5	67.18	0.000069	0.000067	0.000140	0.27	0.43	0.29
maximum	502	95.9	132.97	0.000290	0.000097	0.000160	3.10	4.80	1.00
Hg									
n	147	82	147				146	147	146
%>LOD	100%	98.8%	100%				46.1%	100%	100%
minimum	0.59	0.20	0.10				0.01	0.01	0.00
1st Quartile	3.83	5.52	0.55				0.02	0.05	0.02
median	5.59	10.13	1.19				0.02	0.08	0.03
mean	7.28	19.02	2.64				0.03	0.39	0.05
3rd quartile	8.49	21.11	2.44				0.04	0.13	0.05
maximum	46.20	165.89	34.54				0.25	18.00	1.50

検出下限値(LOD)未満はその半値を用いて解析を実施した。

毛髪総水銀、屋内水銀蒸気、および食事中的メチル水銀の結果を表4.1.2に示した。食事試料中のメチル水銀については半数程度で検出下限値以下となった。ここに機械的に検出下限値の半値を用いた場合、食事の摂取量が多い場合に現実と乖離するような事例も出たため、検出下限値以上のメチル水銀が検出

された検体では総水銀に対するメチル水銀の割合が80.9%であったことを考慮し、総水銀からメチル水銀の濃度を推定し解析に用いた。この点は、半数程度が検出下限値以下であることから、解析結果の解釈については慎重な取り扱いが必要と考えられた。

表4.1.2 毛髪水銀、屋内空気中の蒸気水銀、および食事中的メチル水銀の測定結果

	hair Hg (ppm)	Hg vapor (ng/m ³)	food MeHg (Hg μ g/day)
n	148	88	147
%>LOD	100%	100%	45.3%
minimum	0.2	1.1	0.10
1st Quartile	1.1	1.9	0.42
median	1.8	2.3	0.62
mean	2.2	3.8	2.28
3rd quartile	2.4	2.7	2.14
maximum	15.0	71.0	30.71

検出下限値(LOD)未満はその半値を用いて解析を実施した。

各試料中の元素同時の相関係数について、血液（表4.1.3）、尿（表4.1.4）、食事（表4.1.5）、上水の原水（表4.1.6）、調理用の水（表4.1.7）、飲料用の水（表4.1.8）、屋内空気（浮遊粒子状物質、表4.1.9）、ハウスダスト（表4.1.10）、および庭土（表4.1.11）について示した。

表4.1.3 血液中の元素間の相関係数

blood ng/g	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	—								
log-Cd	0.278	0.0006	1.000	—						
log-Mn	0.093	0.26	0.102	0.26	1.000	—				
log-Se	0.098	0.24	0.063	0.45	-0.200	0.015	1.000	—		
log-Hg	-0.031	0.71	0.098	0.24	-0.167	0.043	0.609	<0.0001	1.000	—

n=147

表4.1.4 尿中の元素間の相関係数

urine ug/g-cre	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	—								
log-Cd	0.332	0.0023	1.000	—						
log-Mn	0.462	<0.0001	0.374	0.0005	1.000	—				
log-Se	0.306	0.0052	0.234	0.035	0.396	0.0002	1.000	—		
log-Hg	0.418	0.0001	0.408	0.0002	0.512	<0.0001	0.527	<0.0001	1.000	—

n=81-82

表4.1.5 食事中的元素間の相関係数

food μ g/g-wet	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg		log-MeHg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	—										
log-Cd	0.158	0.056	1.000	—								
log-Mn	0.075	0.37	0.487	<0.0001	1.000	—						
log-Se	0.158	0.056	0.270	0.0010	0.310	0.0001	1.000	—				
log-Hg	0.080	0.34	0.058	0.48	0.075	0.37	0.452	<0.0001	1.000	—		
log-MeHg	0.042	0.61	0.011	0.90	0.003	0.97	0.402	<0.0001	0.925	<0.0001	1.000	—

n=147

表4.1.6 上水の原水中の元素間の相関係数

tap water mg/ml	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se	
	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	—						
log-Cd	0.013	0.13	1.000	—				
log-Mn	-0.086	0.30	0.389	<0.0001	1.000	—		
log-Se	0.153	0.064	0.322	<0.0001	0.146	0.078	1.000	—

n=148

表4. 1. 7 調理用の水の元素間の相関係数

cooking water mg/ml	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se	
	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	-						
log-Cd	0.126	0.88	1.000	-				
log-Mn	-0.016	0.85	0.113	0.17	1.000	-		
log-Se	0.280	0.0006	0.249	0.0023	0.085	0.303	1.000	-

n=148

表4. 1. 8 飲料用の水の元素間の相関係数

drinking water mg/ml	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se	
	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	-						
log-Cd	0.395	<0.0001	1.000	-				
log-Mn	0.227	0.0055	0.409	<0.0001	1.000	-		
log-Se	0.336	<0.0001	0.332	<0.0001	0.274	0.0007	1.000	-

n=148

表4. 1. 9 ハウスダストの元素間の相関係数

house dust mg/kg	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	-								
log-Cd	0.462	<0.0001	1.000	-						
log-Mn	0.374	<0.0001	0.306	0.0002	1.000	-				
log-Se	0.312	0.0001	0.466	<0.0001	0.179	0.030	1.000	-		
log-Hg	0.117	0.16	0.185	0.025	-0.003	0.97	0.372	<0.0001	1.000	-

n=147

表4. 1. 10 屋内空気（浮遊粒子状物質）の元素間の相関係数

air ng/m ³	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	-								
log-Cd	0.588	<0.0001	1.000	-						
log-Mn	0.063	0.45	0.234	0.0041	1.000	-				
log-Se	0.229	0.0051	0.356	<0.0001	0.132	0.11	1.000	-		
log-Hg	0.045	0.59	0.085	0.31	0.063	0.45	0.130	0.12	1.000	-

n=147

表4. 1. 11 庭土の元素間の相関係数

soil mg/kg-dry	log-Pb		log-Cd		log-Mn		log-Se		log-Hg	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
log-Pb	1.000	-								
log-Cd	0.438	<0.0001	1.000	-						
log-Mn	0.323	<0.0001	0.389	<0.0001	1.000	-				
log-Se	0.344	<0.0001	0.436	<0.0001	0.460	<0.0001	1.000	-		
log-Hg	0.302	0.0002	0.354	<0.0001	0.205	0.013	0.514	<0.0001	1.000	-

n=147

主な特徴のみを記載すると、生体試料および食事では、HgとSe、PbとCdに間に正の関連性または関連する傾向が観察された。環境中の試料については、原水でCdとMn、CdとSeに間に関連性が確認され、PbとCdの間にも多くの試料で高い関連性が示された。特に、PbとCdはいずれも有害な重金属と考えられるが、多くの試料で正の関連性が観察され、複合曝露の様子が示唆された。

次に、試料間の相関係数について、Pb（表4. 1. 12）、Cd（表4. 1. 13）、Mn（表4. 1. 14）、Se（表4. 1. 15）、およびHg（表4. 1. 16）の結果を示した。この中で、血液中の濃度と環境試料との間で関連性が示されたものは、Pbの血液と食事、調理水、および飲料水であり、尿中Pbも同じ傾向であった。血液中のCdと環境試料中のCdとの間に関連性は確認されなかった。血液中のMnは調理水のMnと負に関連したが、その要因は不明である。血液中のSeは土壌のSeと関連性が認められた。Hgについても、血液中のHgは食事のHgとの間に正の関連性が認められた。血液中のHgはそのほとんどがメチル水銀に由来すると考えられているが、その由来は食事の魚と推測された。なお、屋内空気中の蒸気水銀の濃度は低いながら、全ての

検体で検出されたものの、血液中のHgとの間に関連性は確認されなかった。

表4. 1. 12 各試料中のPbの相関係数

Pb	blood (mg/ml)		urine (ug/g-cre)		food (μ g/day)		cooking water (mg/L)		drinking water (mg/L)		air (ng/m ³)		house dust (mg/kg)		soil (mg/kg-dry)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
blood	1.000	-														
urine	0.507	<0.0001	1.000	-												
food	0.296	0.0003	0.407	0.0001	1.000	-										
cooking water	0.230	0.0052	0.386	0.0003	0.176	0.033	1.000	-								
drinking water	0.244	0.0028	0.395	0.0002	0.238	0.0038	0.726	<0.0001	1.000	-						
air	0.077	0.35	0.117	0.29	0.138	0.095	0.111	0.18	0.150	0.068	1.000	-				
house dust	0.079	0.35	0.145	0.19	0.108	0.20	-0.036	0.67	-0.019	0.82	0.016	0.84	1.000	-		
soil	0.045	0.59	0.048	0.67	-0.050	0.55	0.035	0.67	0.128	0.12	-0.008	0.93	0.310	0.0001	1.000	-

n=81-148

表4. 1. 13 各試料中のCdの相関係数

Cd	blood (mg/ml)		urine (ug/g-cre)		food (μ g/day)		cooking water (mg/L)		drinking water (mg/L)		air (ng/m ³)		house dust (mg/kg)		soil (mg/kg-dry)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
blood	1.000	-														
urine	0.544	<0.0001	1.000	-												
food	0.053	0.53	0.153	0.17	1.000	-										
cooking water	0.120	0.15	-0.055	0.63	-0.043	0.61	1.000	-								
drinking water	0.056	0.50	-0.034	0.76	-0.082	0.32	0.650	<0.0001	1.000	-						
air	0.028	0.74	-0.005	0.96	0.053	0.53	0.077	0.35	0.148	0.074	1.000	-				
house dust	0.045	0.59	0.044	0.69	-0.123	0.14	-0.007	0.93	0.110	0.18	0.053	0.52	1.000	-		
soil	0.149	0.07	0.050	0.66	-0.024	0.77	-0.022	0.79	0.122	0.14	0.242	0.0033	0.189	0.023	1.000	-

n=81-148

表4. 1. 14 各試料中のMnの相関係数

Mn	blood (mg/ml)		urine (ug/g-cre)		food (μ g/day)		cooking water (mg/L)		drinking water (mg/L)		air (ng/m ³)		house dust (mg/kg)		soil (mg/kg-dry)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
blood	1.000	-														
urine	0.088	0.43	1.000	-												
food	0.092	0.27	0.188	0.091	1.000	-										
cooking water	-0.350	<0.0001	0.136	0.22	-0.068	0.41	1.000	-								
drinking water	-0.123	0.14	0.138	0.22	-0.061	0.46	0.654	<0.0001	1.000	-						
air	-0.112	0.18	-0.062	0.58	0.114	0.17	0.101	0.22	0.045	0.58	1.000	-				
house dust	-0.025	0.77	-0.083	0.46	-0.178	0.032	0.115	0.17	0.054	0.52	0.054	0.51	1.000	-		
soil	-0.149	0.073	0.125	0.26	-0.219	0.0082	0.160	0.054	0.189	0.023	0.203	0.014	0.164	0.048	1.000	-

n=81-148

表4. 1. 15 各試料中のSeの相関係数

Se	blood (mg/ml)		urine (ug/g-cre)		food (μ g/day)		cooking water (mg/L)		drinking water (mg/L)		air (ng/m ³)		house dust (mg/kg)		soil (mg/kg-dry)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
blood	1.000	-														
urine	0.401	0.0002	1.000	-												
food	0.051	0.54	0.322	0.0032	1.000	-										
cooking water	-0.060	0.47	-0.045	0.69	-0.201	0.015	1.000	-								
drinking water	-0.132	0.11	-0.239	0.03	-0.235	0.0042	0.490	<0.0001	1.000	-						
air	0.094	0.26	0.159	0.15	0.125	0.13	0.105	0.20	-0.089	0.28	1.000	-				
house dust	0.023	0.78	0.203	0.068	-0.091	0.28	-0.049	0.56	-0.080	0.33	0.257	0.0017	1.000	-		
soil	0.168	0.043	0.172	0.12	-0.154	0.065	-0.005	0.95	-0.070	0.40	0.233	0.0047	0.138	0.099	1.000	-

n=81-148

表4. 1. 16 各試料中のHgの相関係数

Hg	blood (mg/ml)		urine (ug/g-cre)		food (μ g/day)		air (ng/m ³)		house dust (mg/kg)		soil (mg/kg-dry)		vapor (ng/m ³)		food MeHg (μ g/day)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
blood	1.000	-														
urine	0.702	<0.0001	1.000	-												
food	0.204	0.013	0.182	0.10	1.000	-										
air	-0.086	0.30	0.000	1.00	-0.054	0.52	1.000	-								
house dust	0.086	0.30	-0.044	0.70	0.040	0.63	0.077	0.36	1.000	-						
soil	0.122	0.14	0.058	0.61	-0.037	0.66	0.111	0.18	0.207	0.013	1.000	-				
vapor	-0.001	0.99	-0.008	0.94	0.080	0.46	0.169	0.12	0.338	0.0013	0.000	1.00	1.000	-		
food MeHg	0.236	0.0042	0.166	0.14	0.928	<0.0001	0.037	0.66	0.091	0.27	-0.024	0.78	0.075	0.49	1.000	-

n=81-147

サブテーマ1では、家庭環境調査を実施し、環境媒体中の金属類の化学分析を実施した。その結果、人体曝露の指標と考えられる血中濃度と関連性が見出されたのは、PbとHgであり、Pbは食事、調理水および飲料水のPbと高い関連性が示され、Hgは食事との関連性が確認された。その他の媒体に由来する曝露については、データベースをサブテーマ3と共有し、数理モデルを構築し解析を進めることとした。

ところで、Yoshinagaらは、屋内ハウスダスト中の元素分析を実施し、ハウスダスト中の鉛（中央値49.1 mg/kg）の発生源について検討を実施している。Pbは土壌由来の元素との関連性が低く、一方でSnおよびSbとの関連性高かったことから、曝露源としてハンダやプラスチックまたは金属製品が使われているおもちゃや装飾品に由来する可能性を提案している⁷⁾。今回の調査では、Pbによる人体曝露の寄与はハウスダストより食事または飲料水による寄与が大きいと推測された。さらに、無鉛ハンダの普及や家庭内における鉛製品の排除が進行していると期待されるものの、ハウスダスト中のPbの由来についてはさらなる検討が必要と考えられた。

なお、本研究ではハウスダストに含まれる金属類による曝露について、総量を解析した。しかし、元素によっては吸収されにくい化学形態をとることもあり、このため各元素のbioaccessibilityの評価では、模擬胃液などでハウスダストを抽出し、元素総質量に対する抽出された金属の質量の割合を計算する方法が提案されている⁸⁾。今回、模擬胃酸により抽出の検討はまだ行っておらず、本研究の限界と考えられる。試料として残量がある検体があり、模擬胃酸などを用いた抽出を行うなど、追加試験が必要と考えられた。

原水中の元素濃度については、厚生労働省が定めている水質基準値（厚生労働省 平成27年4月1日施行、鉛およびその化合物 $10 \mu\text{g/L}$ 以下、Cdおよびその化合物 $3 \mu\text{g/L}$ 以下、Mn及びその化合物 $50 \mu\text{g/L}$ 以下、水銀およびその化合物 $0.5 \mu\text{g/L}$ 以下、Seおよびその化合物 $10 \mu\text{g/L}$ 以下）をいずれも下回るレベルであり、異常値は観察されなかった。

ただし、Pbの曝露源としての上水について見てみると、1/3ほどの家庭で活性炭などの浄水器装置を水道水蛇口に設置し利用している事例が観察された。そのようなケースで原水中と濾過水の元素濃度を比較すると、PbおよびSeで元素の除去能が確認された（図4.1.2）。装着されていた浄水器ユニットをそのまま使用し採水したため、消耗品であるフィルターの使用期間は不明であるが、Pb除去に有効と考えられた。仮に、Pbによる曝露源の一つが鉛製水道管からの汚染と考えられる場合、浄水器の利用が曝露回避に有用であると考えられた。

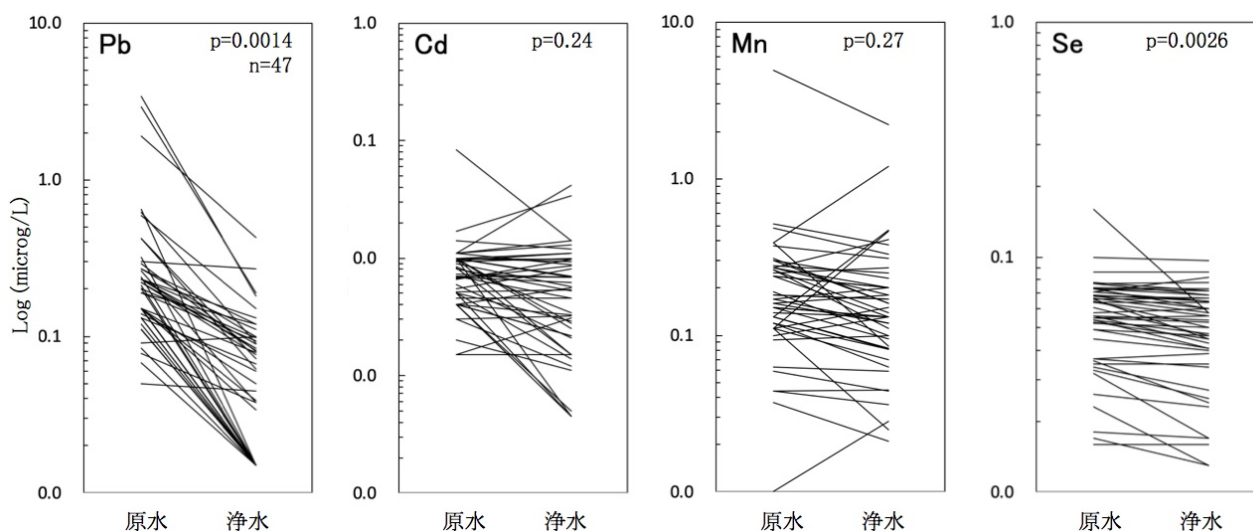


図4.1.2 浄水器装着による元素除去の効果

紙巻きタバコには重金属としてCdが含まれており、主流煙のみならず副流煙によっても人体のCd曝露が起こることが報告されている⁹⁾。そこで、家庭内における喫煙者の有無と屋内空気Cdとの関連性につ

いて検討を行った。同居家族の喫煙状況を聞き取り、紙巻きタバコ群、加熱式電子タバコ群、および非喫煙群と比較した。同居者内に一人でも紙巻きタバコ喫煙者がいる場合は、他のメンバーが加熱式電子タバコ利用者であっても、紙巻きタバコ群とした。同居者内に喫煙者が含まれていても、自宅で完全分煙していると回答した場合は非喫煙群とした。8名は未回答であり除外して解析した。その結果、屋内空気中のCdについて分散分析で有意差が観察され($p=0.0008$)、多重比較(t検定)を行うと非喫煙群と紙巻きタバコ群の間で有意差が認められた($p=0.040$) (統計解析は対数変換後に実施した) (図4.1.3)。加熱式電子タバコ群でもCd濃度がやや高い傾向が観察されたものの、他群との差は認められなかった。一方で、Pb、Mn、SeおよびHgには喫煙状況との間に統計学的に有意な関連性は観察されなかった。以上の結果から、屋内での紙巻きタバコの喫煙は、副流煙にCdが含まれ、屋内空気中のCd汚染を引き起こすことが示唆された。

同様に喫煙状況と調査参加者の末梢血Cdとの比較を行った。紙巻きタバコの本人喫煙で血中Cdが増加するため、自身が喫煙する場合は除外して解析した。分散分析で有意差は認められなかったが($p=0.108$)、多重比較を行うと、紙巻きタバコ群に対して電子タバコ群($p=0.036$)で低くなる現象が観察された(図4.1.4)。血中Cdの曝露経路が受動喫煙によるものなのか、本人の喫煙習慣について尿中コチニンなどを分析することで特定し、さらに解析を行う必要があると考えられた。

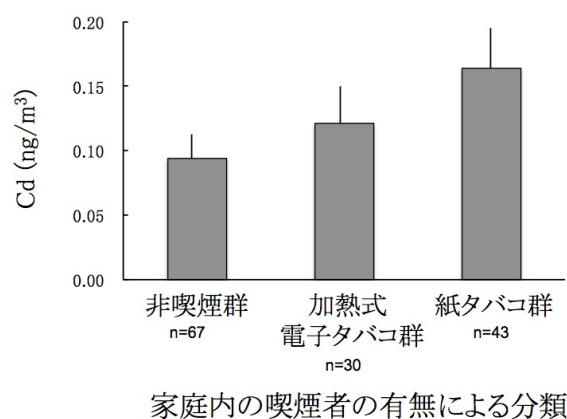


図4.1.3 家庭内の喫煙者の有無と屋内空気Cd濃度との関連性 (平均値およびSDを示す)

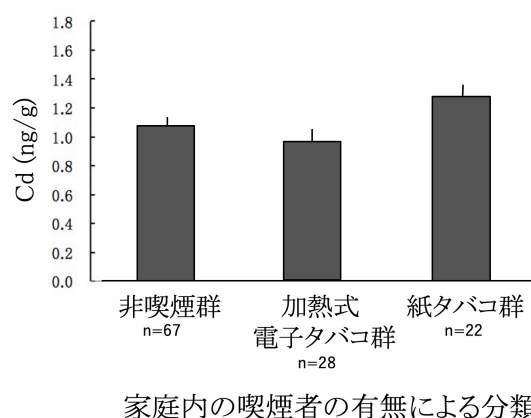


図4.1.4 家庭内の喫煙者の有無と末梢血中Cd濃度との関連性 (平均値およびSDを示す)

B) メチル水銀に関する認知度調査

家庭環境調査の調査参加者151名に加え、公募で参加が得られた143名を加えた、20～30歳代の女性合294名を解析対象とした。飲酒の頻度についてみると、毎日飲む人の割合が8.8%であった。喫煙率は17%であり、飲酒習慣は毎日飲む人の割合が8.8%であった。

本研究の対象者の毛髪総水銀値の中央値は、1.9 (最小値0.13-最大値53.0) $\mu\text{g/g}$ であった (図4.1.5)。パーマをかけている場合に、水銀値が減少すると燃されているが、パーマをかけている場合もヘアカラーをしている場合も統計学的に有意な差異は認められなかった。魚摂取重量の中央値は38.7 g/日 (平均値は49.8 g/日) であった (図4.1.5)。平成29年国民健康・栄養調査結果による魚介類摂取量の30歳～39歳の平均は46.3 g/日であり、ほぼ同じ結果が得られた。魚摂取重量からメチル水銀摂取推定量を算出した結果、中央値は31.5 $\mu\text{g/週}$ であった (図4.1.6)。2005年に食品安全委員会は妊娠女性を対象とするメチル水銀の耐容週間摂取量 (TWI: Hgとして2.0 $\mu\text{g/kg}$ 体重/週) を公表したが、調査参加者の6.7%がTWIを超えることが示された。メチル水銀推定摂取量と毛髪総水銀値の相関はPearsonの相関係数で0.464 ($p<0.001$) であった。

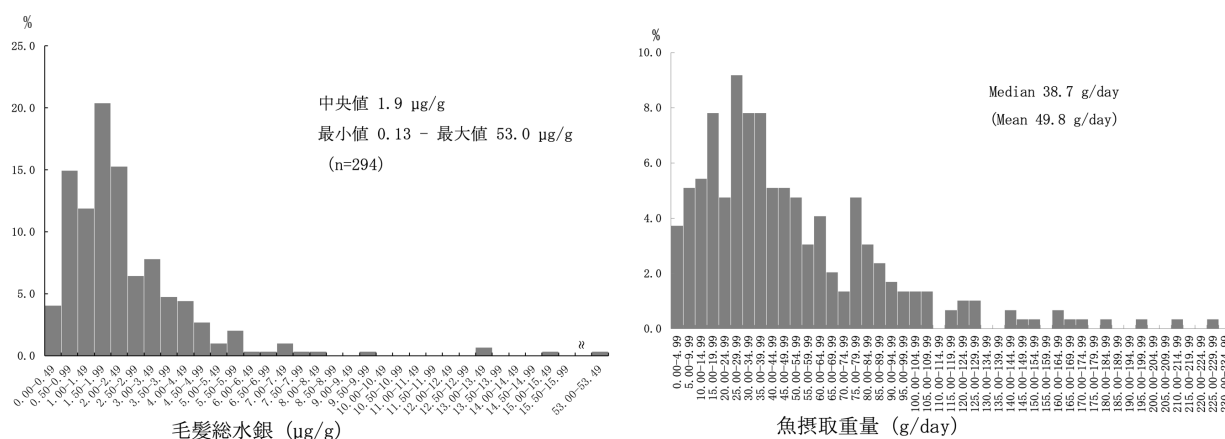


図4.1.5 認知度調査の調査参加者の毛髪水銀および魚摂取量

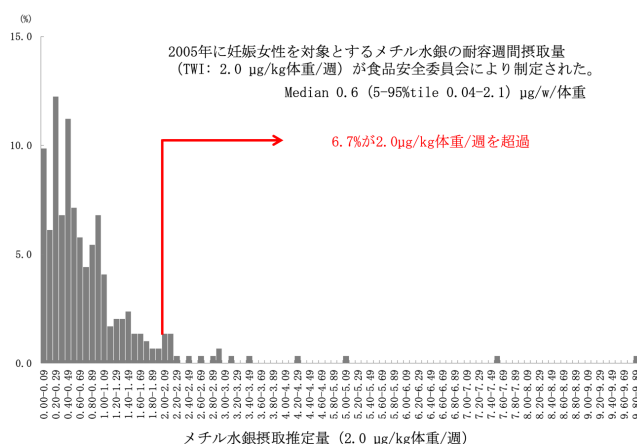


図4.1.6 認知度調査の調査参加者のメチル水銀摂取量の推定値

毛髪総水銀に関連する要因を検討したところ、喫煙習慣では、加熱式電子タバコを使用している人は、紙巻きタバコや喫煙をしていない人に比べて毛髪総水銀値が低いことが示された ($F=4.235$, $p=0.006$)。飲酒習慣については、毎日飲酒をしている人はそうではない人に比べると毛髪総水銀値が高い傾向が観察された ($F=2.175$, $p=0.072$)。学歴が高いと水銀値が高い傾向にあり ($F=2.968$, $p=0.053$)、調査時の年齢、体格、年収と毛髪総水銀値の間には関連性は認められなかった。

メチル水銀の曝露源に関する認知度と毛髪総水銀や魚摂取重量との関連性を検討した ($n=293$)。メチル水銀はどのようなものから体内に取り込むと思うかを問う項目では、「魚介類」を正しく選んだ割合は26.6%であった。この質問に対する正答群と誤答群で毛髪総水銀の濃度を比較したところ、統計学的に有意な差異は認められなかった ($t=0.789$, $p=0.130$) (図4.1.7)。魚摂取重量も同様に差異は認められず ($t=-0.893$, $p=0.373$)、曝露源に関する知識が体内負荷量とは関連していない実態が示された。次に、厚生労働省が妊娠女性を対象に魚摂取の注意事項を公表しており、その認知度を調べた結果、「知

っている」と回答した割合は33.0%であった(n=294)。この認知度の有無で毛髪総水銀($r=0.007$, $p=0.932$)および魚摂取量($t=-0.738$, $p=0.507$)を比較したが、有意な差異は認められなかった(図4.1.8)。この結果から、注意事項を知っている場合でも、メチル水銀の体内負荷量とは結びつかない実態が示された。ただし、曝露レベルが低い場合、魚摂取量を控える必要はない。そこで、毛髪水銀の値がTWIを超えている方(20人、全体の6.8%)に着目したが、厚生労働省の注意勧告を知っていると回答した割合は9名(45%)であり、TWIを超えている人の方が、メチル水銀に関する認知度が高いことが示唆された。

この認知度調査の限界として、調査参加者が妊娠をもうしないと決めた場合、曝露回避には結びつかない。また、調査参加者の中で、母親はマグロ類を摂取するが、子どもたちには他の魚介類を提供するなどの工夫をしているケースも見られた。このため子どもの毛髪水銀値をアウトカムとした認知度調査がさらに必要と考えられた。

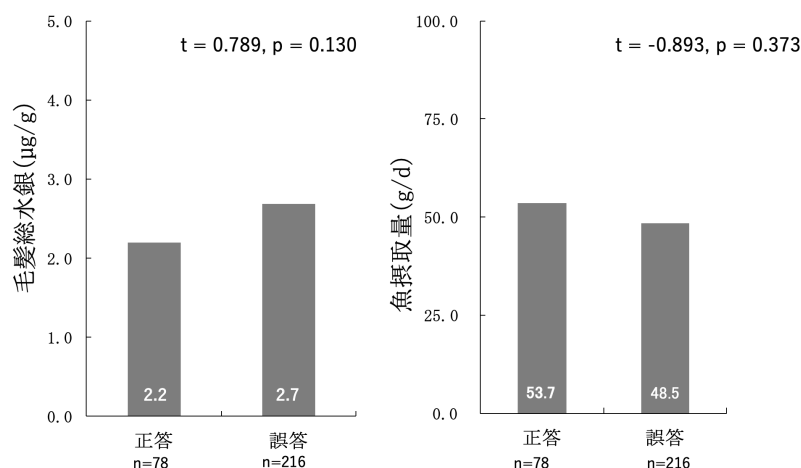


図4.1.7 メチル水銀の曝露源に関する回答と毛髪水銀または魚摂取量の関連性

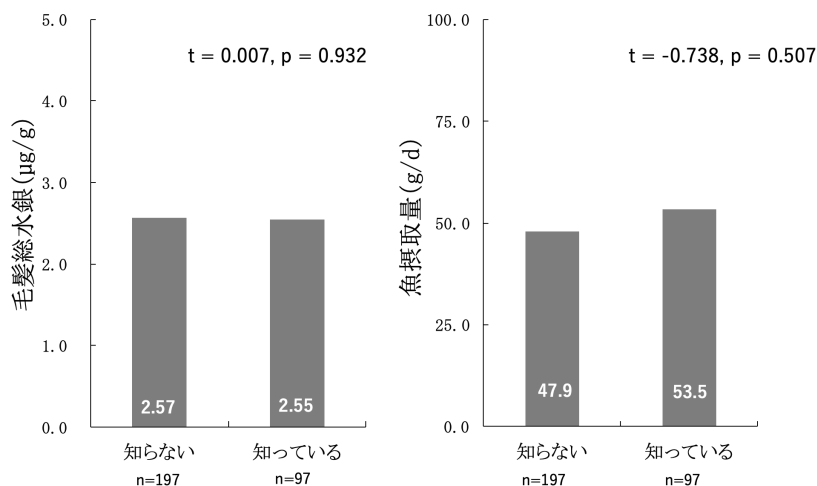


図4.1.8 メチル水銀の摂取に関する注意事項の認知度と毛髪水銀または魚摂取量の関連性

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

家庭環境調査を実施し、食事、上水、屋内空気(浮遊粒子状物質)、ハウスダスト、庭土中のPb、Cd、Mn、SeおよびHgに関するデータを確定した。血液および尿中濃度も分析を終了し、経口摂取量の推定など重金属類に関する管理モデルを構築する上で必要となる基礎的なデータベースを確立した意義があると考えられた。

Cd曝露に関連して、紙巻きタバコの主流煙もしくは副流煙により人体汚染の可能性が示された。タバ

コの有害性として主に重金属以外の化学物質に関心が集まっているが、重金属であるCdの曝露影響についても見直しが必要と考えられた。

（２）環境政策への貢献

Pb曝露の低減を行う上で、食事および水道水による曝露の寄与が大きいことを示し、そのうち水道水については浄水器などを活用することでPbの摂取量を削減できることを示した。家庭内の水質を全てモニタリングし、鉛水道管を交換することも選択肢であるが、とりあえず浄水器を用いた曝露提言が可能であることを示すものであり、すぐに環境政策に応用可能と考えられた。

メチル水銀の曝露について、認知度調査などから、メチル水銀の汚染源や厚生労働省の注意事項に関する知識が、魚摂取量や毛髪水銀と関連しないことが示された。このことは、有害情報などの知識の単純な提供では曝露低減に結びつかないことを示唆しており、リスク情報のリテラシーを見直す必要性があるものと考えられた。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

特に記載すべき事項はない。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) C. MA, M. IWAI-SHIMADA, N. TATSUTA, K. NAKAI, T. ISOBE, M. TAKAGI, Y. NISHIHAMA, and S.F. NAKAYAMA: Int. J. Environ. Res. Public Health, 17 (7), 2231 (2020) Health Risk Assessment and Source Apportionment of Mercury, Lead, Cadmium, Selenium, and Manganese in Japanese Women: An Adjunct Study to the Japan Environment and Children's Study.
- 2) L. PLOUFFE, D. BOSSON-RIEUTORT, L. MADANIYAZI, M. IWAI-SHIMADA, K. NAKAI, N. TATSUTA, S.F. NAKAYAMA, and M.A. VERNER: Environmental Health (2020) Estimated postnatal p,p'-DDT and p,p'-DDE levels and body mass index at 42 months of age in a longitudinal study of Japanese children (in press).

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) L. PLOUFFE, M. IWAI-SHIMADA, S.F. NAKAYAMA, K. NAKAI, M.A. VERNER: Society of Toxicology, USA (2018). "Estimating children's postnatal exposure to DDT and DDE using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model."
- 2) 西浜柚季子, 龍田希, 岩井美幸, 磯部友彦, 藤原幾磨, 有馬隆博, 中山祥嗣, 和泉孝志, 仲井邦彦: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「一般家庭における重金属曝露メカニズムの解明-調査プロトコルについて。」
- 3) 岩井美幸, 龍田希, 仲井邦彦, 中山祥嗣: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「妊娠期及び乳児期の化学物質曝露とその低減」

- 4) 仲井邦彦、龍田希、岩井美幸、磯部友彦、西浜柚季子、中山祥嗣、和泉孝志、大日方英、大嶋紀安、ハレツキスロマナス：第28回環境化学討論会(2019)「家庭環境内における重金属類曝露シナリオの解明-調査方法の検討」
- 5) 仲井邦彦、龍田希、岩井美幸、西浜柚季子、中山祥嗣：第78回日本公衆衛生学会総会（2019）「家庭環境内における重金属類曝露調査-調査方法および中間報告」
- 6) 岩井美幸、柳沼梢、MA CHAOCHEN、龍田希、仲井邦彦、中山祥嗣：第46回日本毒性学会学術年会（2019）「暫定耐容摂取レベルのメチル水銀に関する母集団体内動態解析」
- 7) 岩井美幸、MA CHAOCHEN、龍田希、仲井邦彦、磯部友彦、高木麻衣、中山祥嗣：第90回日本衛生学会学術総会（2020）「Potential health risks from exposure to 5 elements via multiple pathways among women: evidence from Miyagi prefecture, Japan.」
- 8) M. IWAI-SHIMADA, K. YAGINUMA-SAKURAI, N. TATSUTA, K. NAKAI, S.F. NAKAYAMA: Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting and ToxExpo (2020) “A Population Toxicokinetic Modelling of Mercury and Methylmercury in Human”

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

石巻医療圏は本調査の主要な調査地域であり、石巻市が主催する石巻市民食育健康フェスティバルの会場にて、エコチル調査宮城ユニットセンターと連携してブースを設置し、調査目的と調査内容の紹介を行った。第６回石巻市民食育健康フェスティバル(2017/10/1)、第７回(2018/10/14)、第８回(2019/10/6)の３回であり、第８回では水道水と鉛などに関する健康情報について発信した。

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

８．引用文献

- 1) Liu J, Gao D, Chen Y, Jing J, Hu Q, Chen Y. Lead exposure at each stage of pregnancy and neurobehavioral development of neonates. *Neurotoxicology*. 2014;44:1-7.
- 2) Dorea JG. Environmental exposure to low-level lead (Pb) co-occurring with other neurotoxicants in early life and neurodevelopment of children. *Environmental research*. 2019;177:108641.
- 3) Tsuji M, Shibata E, Morokuma S, Tanaka R, Senju A, Araki S, et al. The association between whole blood concentrations of heavy metals in pregnant women and premature births: The Japan Environment and Children's Study (JECS). *Environmental research*. 2018;166:562-9.
- 4) de Water E, Proal E, Wang V, Medina SM, Schnaas L, Tellez-Rojo MM, et al. Prenatal manganese exposure and intrinsic functional connectivity of emotional brain areas in children. *Neurotoxicology*. 2018;64:85-93.
- 5) Sun H, Chen W, Wang D, Jin Y, Chen X, Xu Y. The effects of prenatal exposure to low-level cadmium, lead and selenium on birth outcomes. *Chemosphere*. 2014;108:33-9.
- 6) Nakayama SF, Iwai-Shimada M, Oguri T, Isobe T, Takeuchi A, Kobayashi Y, et al. Blood mercury, lead, cadmium, manganese and selenium levels in pregnant women and their determinants: the Japan Environment and Children's Study (JECS). *Journal of exposure*

- science & environmental epidemiology. 2019;29(5):633-47.
- 7) Yoshinaga J, Yamasaki K, Yonemura A, Ishibashi Y, Kaido T, Mizuno K, et al. Lead and other elements in house dust of Japanese residences--source of lead and health risks due to metal exposure. Environmental pollution. 2014;189:223-8.
- 8) Oguri T, Suzuki G, Matsukami H, Uchida N, Tue NM, Tuyen LH, et al. Exposure assessment of heavy metals in an e-waste processing area in northern Vietnam. The Science of the total environment. 2018;621:1115-23.
- 9) Lee W, Lee S, Roh J, Won JU, Yoon JH. The Association between Involuntary Smoking Exposure with Urine Cotinine Level and Blood Cadmium Level in General Non-Smoking Populations. Journal of Korean medical science. 2017;32(4):568-75.

Ⅱ－２ 網羅的一斉分析による小児の化学物質曝露の包括的解析

群馬大学大学院医学系研究科
群馬大学未来先端研究機構

和泉 孝志・大嶋紀安
大日方英・ハレツキス ロマナス
メイスター イザベル（研究協力者）・ジャン
ペイ（研究協力者）（平成30年度-令和元年度）

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：55,315千円（研究経費は間接経費を含む）
（平成29年度：19,500千円、平成30年度：18,525千円、令和元年度：17,290千円）

〔要旨〕

化学物質の曝露評価に必要なモニタリング手法を開発するために、まず、質量分析を用いた網羅的一斉分析による生体試料中の化学物質の包括的解析手法を確立した。網羅的分析で用いる機器分析で農薬代謝物の評価が可能かどうかを農薬代謝物濃度が既知の検体を用いて検討したところ、定量的な検出感度には至らないものの、高濃度曝露に関する定性的評価は可能であった。確立した包括的解析手法を用いて、サブテーマ1より提供を受けた有機リン系農薬代謝物（ジアルキルリン酸類：DAP）レベルが既知の妊婦尿60検体（高曝露群30検体、低曝露群30検体）の解析を行った結果、農薬代謝物以外の食物由来の代謝物が農薬曝露の指標となる可能性が示唆された。さらに、生体代謝物に及ぼす影響を解析したところ、高曝露群においてアミノ酸経路代謝産物が増加していることが明らかになったが、その機序と意味に関してはさらなる解析と研究が必要である。サブテーマ3に網羅的分析の質量分析データを送り、機械学習による解析を行ったところ、高曝露群と低曝露群を区別する特徴的な精密質量ピークが発見された。当該ピークを構成する化合物は現在同定中であるが、新たなバイオマーカーになる可能性が示唆された。次に、開発した解析手法を用いて、サブテーマ1より提供を受けた家庭環境調査で得られた母親尿85検体の解析を行ったところ、尿中重金属濃度と有意な相関のある200余りの精密質量ピークを見出した。その精密質量ピークから核酸分解物が同定され、低濃度の重金属曝露でも核酸代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。現在、さらなる解析を進めている。

このように質量分析を用いた包括的解析手法によって、曝露に関連する曝露物質以外の化学物質が数多く見出された。それらの化学物質は、食品代謝物、アミノ酸代謝物、核酸代謝物等である。曝露に関連する可能性が高い物質未同定の精密質量ピークも多数見出されている。これらは、化学物質曝露の新たなバイオマーカーになる可能性がある。また、曝露経路の探索、複合汚染の有無、曝露の生体に及ぼす影響などを解明する上で、重要な手がかりを与えてくれることが期待される。

〔キーワード〕

化学物質曝露、質量分析、網羅的一斉分析、バイオマーカー

1. はじめに

化学物質曝露のリスク要因の解明のために、集団調査等で集められたヒトサンプル中の化学物質を解析する手法として、質量分析法は大変有効である。質量分析の技術革新が進み、情報科学の進歩と相まって、1つの生体試料から数千種類の低分子の化学物質を測定できるようになってきた。このような化学物質には、食品由来物質、食品添加物、薬物、汚染物質、生体代謝物といった外因性および内因性の化学物質や曝露源が数多く含まれる。体内環境に存在するほぼ全ての化学物質を網羅的に測定し、その特性を解析することが原理的には可能である。

質量分析による測定には大きく分けて、ターゲット法とノンターゲット法がある。測定対象を定めて測定するターゲット法では、極めて低濃度の化学物質の解析が可能であり、その手法は測定対象を定めずに行うノンターゲット法に比べて確立している。しかし、化学物質の数は増え続けていることに加え、実際の曝露は一種類の化学物質ではなく、複数の化学物質の複合曝露となることから、各物質を個

別にターゲット法だけで分析する手法には限界がある。また、ターゲット化合物以外の予期せぬ変化を見逃してしまう危険もある。さらに、リスク要因の解明には、曝露物質だけでなく内因性の化学物質の代謝に与える影響を考慮する必要がある。このように、リスク管理のためのモニタリングには、曝露物質やその代謝物を測定対象とするターゲット法に加えて、食品由来物質や生体代謝物等も網羅的に測定対象とするノンターゲット法を組み合わせることによって、より包括的な解析が可能となる。ところが、ターゲット法に比べてノンターゲット法には、生体成分やマトリックスの影響を受けやすい、安定性や再現性に課題があり検体間の比較が困難であるなどの測定上の問題や、数万以上にも及ぶピークの質量補正や同定、マススペクトルデータベース整備などの多くの課題がある。

2. 研究開発目的

人体を汚染する化学物質の数は急速に増えている。管理モデルを構築する上で曝露評価や影響評価が鍵となるが、曝露評価でも個々の化学物質を分析する手法には限界がある。さらに、多くの化学物質は安全量に関する知見も乏しい。エコチル調査での有害性評価の進展が期待されるが、その前提となる多様な化学物質の曝露評価に必要なモニタリング手法そのものが未開発である。そこで、サブテーマ2では、この打開策として網羅的一斉分析による包括的モニタリングを提案した。最初に、有機リン系農薬代謝物を対象に、機器分析で尿中濃度が既知の検体から、高濃度と低濃度検体各20件を用いて、ターゲット/ノンターゲット分析を実施し、農薬代謝物および関連するバイオマーカーの包括的解析を計画した。次いで、家庭環境調査で得られた母親尿を用いて、重金属曝露と関連するバイオマーカーについても同様な手法で探索的研究を実施し、網羅的分析手法の可能性を検証した。

3. 研究開発方法

1 化学物質の網羅的一斉分析を実施するための分析ワークフロー・解析手法の確立

1.1 ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)における前処理法の確立

ウレアーゼ処理による尿素除去法の開発、誘導体化の検討、及び複数の溶媒による抽出により、試料注入量を増加させ、尿素によるマトリックス効果を減弱させることで、検出ピーク数や同定化合物数の増加を目指した。

1.2 液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)におけるワークフロー・解析手法の確立

1.2.1 液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)におけるワークフローの自動化

尿検体を比重補正しLC/MSに注入して測定を行うまでのワークフローの自動化を目指した。すなわち、生体試料の分注、混合QC検体の自動作成、比重測定、比重による補正、分注、LC/MSへの注入までの、一連の流れを可能な限り自動化し、ピペッティング操作時等のヒューマンエラーを排除し、再現性のある安定した測定を目指した。

1.2.2 LC/MS/MSにおける親イオンとの相関に基づくデコンボリューション法の開発

液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 (LC/MS/MS) は化学物質の網羅的分析において広く使用されている。不偏かつ再現性のある測定のために、いくつかのデータ独立取得 (DIA) 法が開発されてきた。LC/MS/MSのDIA法の1つである全イオンフラグメンテーション (AIF) では、すべての親イオンは事前選択なしにMS/MSスペクトルにフラグメント化される。したがって、フラグメント混合物はほぼ同時に共溶出される複数の親イオンから生成される。不純なスペクトルからピークを明らかにするには、マススペクトルのデコンボリューション*が重要となる。しかし、保持時間に基づく既存のアルゴリズムでは、AIFのような複雑なスペクトルには不十分である。そこで、AIFにおける化合物同定の精度を向上させるために、新しいデコンボリューションアルゴリズムの開発を目指した。

*デコンボリューション：複数の多価イオンピークが観測されるマススペクトルから目的化合物のピークを分離・抽出してその m/z 値を求める手法

2 包括的分析における有機リン系農薬代謝物（DAP）の測定

包括的分析で用いる機器分析で、尿中の有機リン系農薬代謝物（ジアルキルリン酸類：DAP）（図3.2.1）の評価が可能かを、標準品及び農薬代謝物濃度が既知の尿を用いて評価を行った。

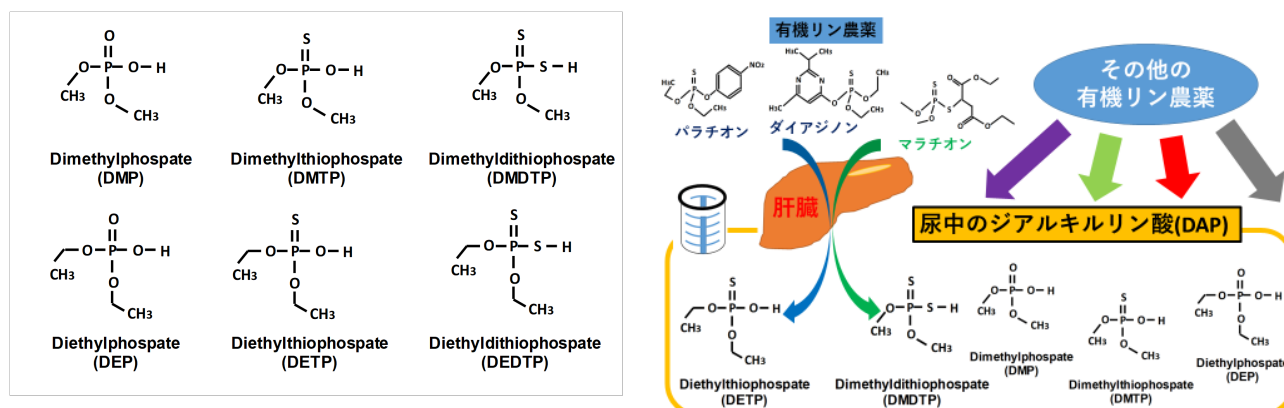


図3.2.1 DAPの分類と生体内における代謝

左図) DAPはジアルキルリン酸(Dialkylphosphate)の総称であり、6種類の代謝物の構造と略語を示す。右図) 有機リン系農薬は主に肝臓でDAPに代謝されて尿中に排出される。尿中のDAP濃度は有機リン系農薬への暴露の良い指標とされる。

3 有機リン系農薬代謝物（DAP）レベルが既知の妊婦尿の網羅的解析

宮城県在住の妊娠中期の母親から採取された200検体の尿を、サブテーマ1から提供された。6種類のDAPの濃度は測定済みである。尿中DAP濃度を比重(SG)によって補正し、総DAP濃度によって、高DAP群(DAP-H, SG補正濃度: 21.8 nmol/L - 619.8 nmol/L、クレアチニン補正濃度: 18.6 µg/g cre - 903.9 µg/g cre)と、低DAP群(DAP-L, SG補正濃度: 0.44 nmol/L - 3.16 nmol/L、クレアチニン補正濃度: 4.96 µg/g cre - 6.00 µg/g cre)各30検体ずつを選出した(図3.2.2)。

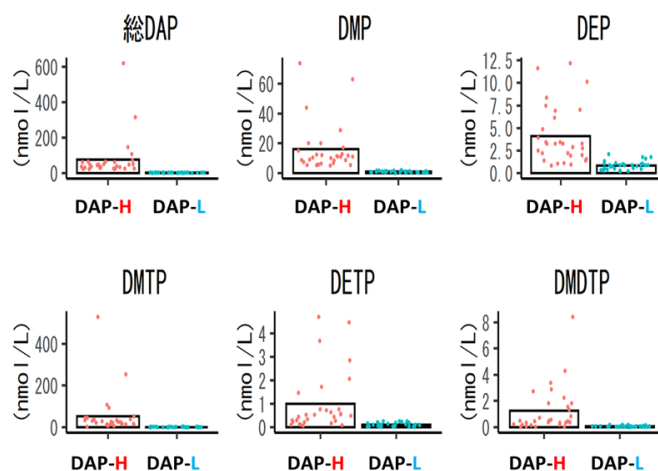


図3.2.2 DAP-H群とDAP-L群におけるDAP濃度

尿中代謝物の網羅的一斉分析に用いた妊婦尿60検体の比重補正したDAP濃度を箱ひげ図で表わす。

DAP-H群及びDAP-L群には30検体ずつが含まれる。DEDTPの濃度は全ての試料で検出限界未満のためグラフを省略した。総DAP濃度はDMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP濃度の合計である。

次に、サブテーマ1から提供をうけた、妊娠期母体尿の基本属性のデータの中から、表3.2.1に示す33個のパラメータを選び、DAP-H群とDAP-L群の比較を行ったところ、血液中EPA（エイコサペンタエン酸：C20:5）濃度及びω-3インデックス（EPAとDHAの量が総脂肪酸量に占める割合）が、DAP-H群においてDAP-

L群よりも有意に増加していた(図3.2.3)。このことは、DAP-H群ではより多く魚を食べることを意味している。

表3.2.1 解析に用いた妊婦の基本属性のパラメータ

Numeric	Norminal
Age at collection	Smoking_12wks
Gestation days at collection	Smoking_24wks
BMI	Smoking_12wks_father
Income ranking	Smoking_24wks_father
Education level	passive smoking
Log_Physical	MT2_High IPAQ
MT2_Real Mets-min/week	
glucose (mg/dl)	
Fishintake(g/day)	
Meat_intake(g/day)	
Sleep time_min	
Sleep depth	
M_AA 20:4n-6%	
M_EPA 20:5n-3%	
M_DHA 22:6n-3%	
M_SFA	
M_MUFA	
M_PUFA	
M_n-6PUFA	
M_n-3PUFA	
M_n-6LCPUFA	
M_n-3LCPUFA	
M_omega-3 index	
M_DHA/ARA	
Cord DHA	
Cord EPA	
Cord AA	

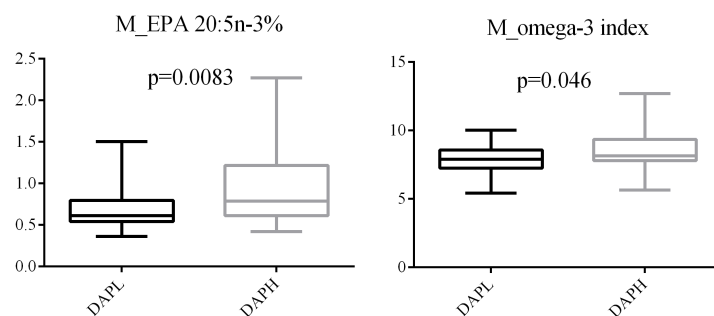


図3.2.3 DAP-H群とDAP-L群における血液中EPA濃度と ω -3インデックス

4 重金属暴露濃度既知の出産経験を有する女性尿の網羅的解析

サブテーマ1より、家庭環境調査で得られた出産経験を有する女性尿85検体の提供を受けた。重金属(Pb、Cd、Mn、SeおよびHg)の尿中濃度が測定されている。網羅的一斉分析の手法(LC/MS)を用いて、重金属暴露の指標となる化学物質の探索、重金属暴露の生体代謝物に及ぼす影響等を解析した。

倫理審査

本研究は「群馬大学 人を対象とする医学系研究倫理審査委員会」による承認を得て行われた。「試験番号：HS2017-293、課題名：内因性代謝物および環境由来化学物質の網羅的一斉分析法の開発と生体試料の分析」

4. 結果及び考察

1 化学物質の網羅的一斉分析を実施するための分析ワークフロー・解析手法の確立

1.1 ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)における前処理法の確立

尿中の尿素は濃度が高く、GC/MSでの測定時に検出に悪影響をもたらす。尿中の尿素をウレアーゼ処理で分解することで、導入する試料量を増やすと同時に高感度化を目指した。予備実験の結果、ウレアーゼ処理の条件を、ウレアーゼ終濃度 5.0×10^{-4} g/ml、反応時間120分、反応温度37℃とすることで、尿素がほぼ完全に分解されることを確認した(図4.2.1)。

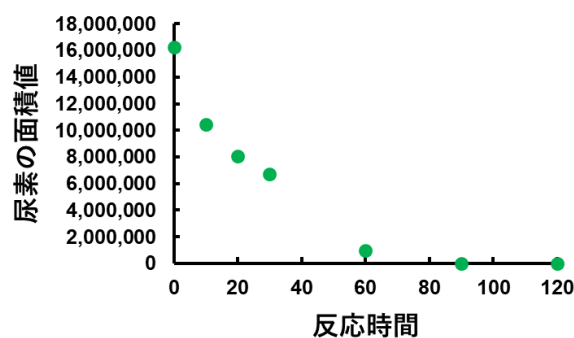


図4.2.1 ウレアーゼ処理の条件検討

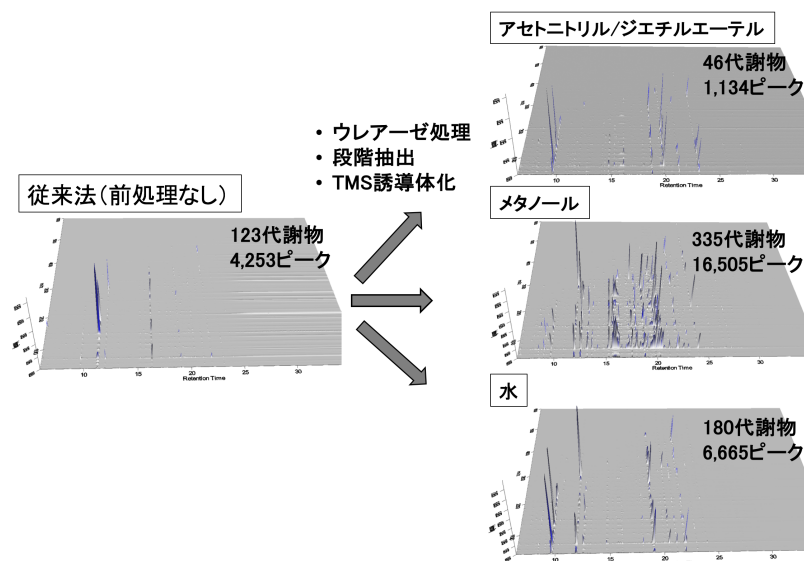


図4.2.2 GC/MS解析の新しいワークフローによる尿中代謝物の同定

ウレアーゼ処理、溶媒段階抽出及びTMS誘導体化の組み合わせによる新しいワークフローを開発した結果、従来法では123個であった尿中代謝物質の同定数が、新しい解析法では各抽出段階の合計で350個（重複を含まず）と飛躍的に増加した（図4.2.2）。

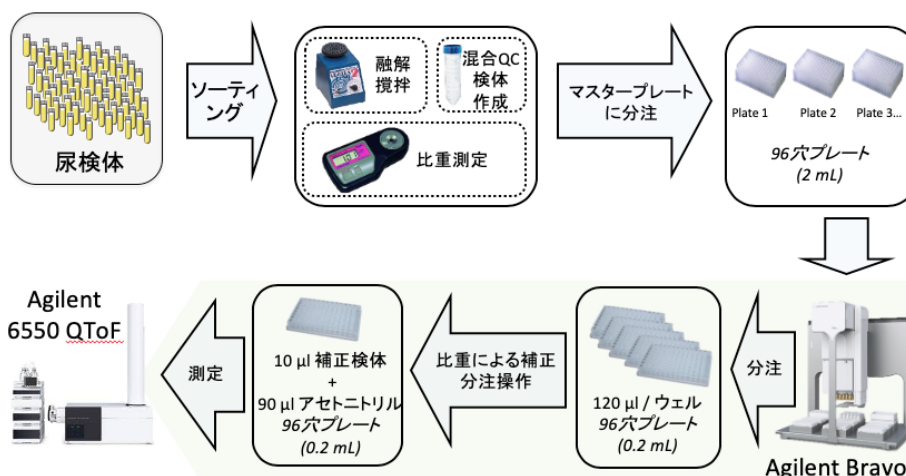


図4.2.3 尿検体網羅的一斉分析のためのワークフローの自動化

1.2. 液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC/MS) におけるワークフロー・解析手法の確立

1.2.1 液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC/MS) におけるワークフローの自動化

生体試料の分注、混合QC検体の自動作成、比重測定、比重による補正、分注、LC/MSへの注入までの、一連の流れを可能な限り自動化した（図4.2.3）。これにより、前処理時間が大幅に短縮され、安定した測定が可能となった。

1.2.2 液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)におけるワークフロー・解析手法の確立

CorrDec法による解析によって、従来のMS2Dec法に比べて良好なデコンボリューションの結果を得た。その実験例を示す（図4.2.4）。

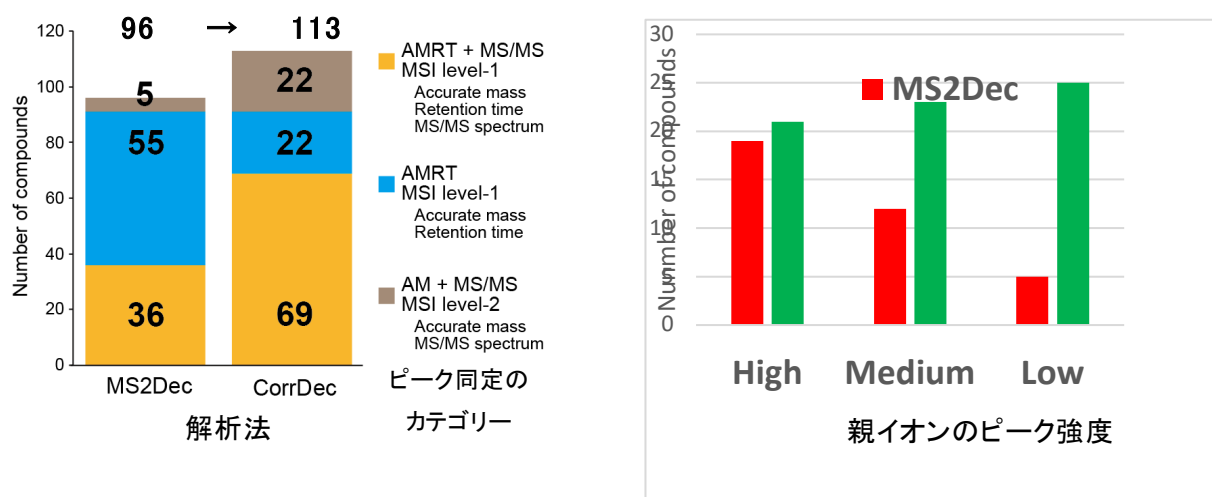


図4.2.4 解析法の違いによる尿サンプルの解析例

左図) 2つの解析法（MS2Dec法及びCorrDec法）の同定ピーク数を示す。カラムの色はピーク同定のカテゴリーを示す。右図) 親イオンのピーク強度別の同定ピーク数を示す。

この解析例では、従来法のMS2Dec法では96個だった同定された代謝物が、新しいCorrDec法では113個と増加した。その内訳を親イオンの強度別にみると、親イオンのピーク強度が低い場合ほど、同定代謝物の増加が顕著であった。

2 包括的分析における有機リン系農薬代謝物（DAP）の測定

ノンターゲット分析法による網羅的一斉分析においても、有機リン系農薬尿中代謝物(DAP)の測定が可能かどうかを、GC/MS及びLC/MSでそれぞれ検討した。

2.1 GC/MSにおける測定

まずDAP類標準品の分析をGC/MSで行ったところ、水溶液中のDAPの測定ではノンターゲット法（スキャンモード）による解析においても、いずれのDAPも10 μ g/mlまで検量線は良好な直線性を示した。しかし、尿中DAPの測定を網羅的一斉分析のプロトコルに従って行くと、ノンターゲット法（スキャンモード）では検出感度が落ち定量性も低下した。例えば、尿中DMP及びDMTPのスキャンモードでの検出下限値はいずれも約100 ng/mlであったが、同じサンプルをターゲット法（選択イオンモニタリングモード）を使って測定すれば、検出下限値はそれぞれ約10 ng/mlとなり、高濃度曝露尿におけるDAPの検出が可能となった。今後、カートリッジ等を利用した前処理法の開発や、測定モードの検討により、検出感度の向上を目指す余地があると考えられた。

2.2 LC/MSにおける測定

Q-ToF LC/MSを用いて水溶液中のDAPの測定をノンターゲット分析法により測定すると、DAPの検出下限値は、0.32 ng/ml～8 ng/mlであったが、尿中DAPの検出限界は8 ng/ml ～ 40 ng/mlであった（表4.2.1）。いずれの場合も1 μ g/mlまで検量線は良好な直線性を示した。

表4.2.1 LC/MSノンターゲット分析によるDAPの検出限界

	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
水溶液中の検出下限値	0.32 ng/ml	8 ng/ml	8 ng/ml	0.32 ng/ml	1.6 ng/ml	1.6 ng/ml
尿中の検出下限値	8 ng/ml	40 ng/ml	40 ng/ml	40 ng/ml	8 ng/ml	8 ng/ml

上山らによる液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)によるによれば、6種類のDAPの検出下限値は0.1～0.5 ng/mlと報告されており¹⁾、今回のQ-ToF LC/MSを用いたノンターゲット分析では検出感度が2桁劣った。GC/MSの場合と同様、高濃度曝露尿においてはノンターゲット分析によってもDAPの定性的な検出が可能であるが、低濃度曝露もしくは日常レベルのDAPの検出には限界がある。DAPの測定に最適化した前処理法や測定法により検出感度向上の余地はあるものの、ノンターゲット分析と同時に低濃度の農薬曝露の定量的分析を行うことは難しいと考えられた。

3 有機リン系農薬代謝物 (DAP) レベルが既知の妊婦尿の網羅的解析

3.1 GC/MSによるDAP濃度既知の妊婦尿の網羅的解析

3.1.1 前処理と分析方法

尿試料ウレアーゼを加え、37℃で2時間反応させた後、遠心後の上澄み液をメタノール抽出した後、オキシム化、トリメチルシリル化して測定用試料とした。60試料全ての尿を等量ずつ混ぜ合わせたQC試料も他の尿試料と同様に前処理を行った。

ガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いた誘導体化後の試料の測定にはGC/MS-TQ8030、およびオートサンプラーAOC-20i (島津製作所)を用いた。GC用のキャピラリーカラムには、DB-5 (カラム長30 m × 内径0.25 mm, 膜厚1.00 μm)を用いた。測定条件は、568化合物のマススペクトルと溶出時間が登録されているSmart Metabolites Data base Release 3.01 (島津製作所)の方法に従った。スキャンする質量イオン比(m/z)の範囲は45～600とした。測定する尿試料の順序はランダム化し、5測定毎にQCサンプルを測定した。

多数の測定結果からのピークの抽出、ピークのアライメントにはProfiling Solution (島津製作所)を用いた。代謝物の同定はGC/MS solution (島津製作所)を用いてマススペクトル情報をデータベース検索することにより行った。代謝物データベースは、Smart Metabolites Release 3.01および、NIST11を用いた。統計解析、グラフの作成は、Excel、およびR (Ver 3.6.0)を用いた。

3.1.2 結果及び考察

14個のQC試料と、60個妊婦尿試料、計74個の測定データをProfiling Solutionを用いて解析した。ピークの高さの閾値を1,000以上に設定し、ピーク認識を行わせた。次に、74個の測定データ間でRTとm/zが一致するピークを同一であると識別させるアライメント処理(Ion m/z tolerance: 500 mDa, Ion RT tolerance: 0.1 min)を行った。アライメントの結果、測定全体で32,589組のピークが抽出された。

次に、QCにおけるピークの高さ10,000以上、ピークの出現頻度80%以上、ピークの高さの%変動係数(%RSD)が30%以下、RTの%変動係数(% tRSD)が30%以下という条件を満たすピークを4,775組抽出した。さらに、DAP-H検体30個とDAP-L検体30個について、いずれかの群において出現頻度が80%以上のピークを抽出し、尿試料を加えないブランクの測定でも出現するピークを除く処理を行うと、2,821組のピークが抽出された。ピークの高さは各検体で抽出された全てのピークの高さの和によって標準化することで、尿の濃縮度を補正した。

最後に、Volcano Plotを行い、DAP-HおよびDAP-Lの2群間で比較してピークの高さの平均の比が2倍以上ありかつ、t検定で $p < 0.05$ の条件を満たすピークの抽出を行った。このようにして、DAP-H群で有意に増加している代謝物に由来すると考えられている73組のピークが見出された (表4.2.2、および図4.2.5)。

表4. 2. 2 ピークの選択

Condition for Selection	Number of Peaks
Ion intensity threshold: 1,000	
Ion m/z tolerance: 500 mDa, Ion RT tolerance: 0.1 min	32,589
Peak threshold in QC: 10,000, Frequency of appearance in QC $\geq 80\%$, % tRSD $\leq 30\%$	4,775
Frequency of appearance in DAP-H or DAP-L $\geq 80\%$	2,821
Standardization of peak height	
Volcano Plot Ratio of peak height of DAP-H and DAP-L ≥ 2 , t-test $p < 0.05$	73

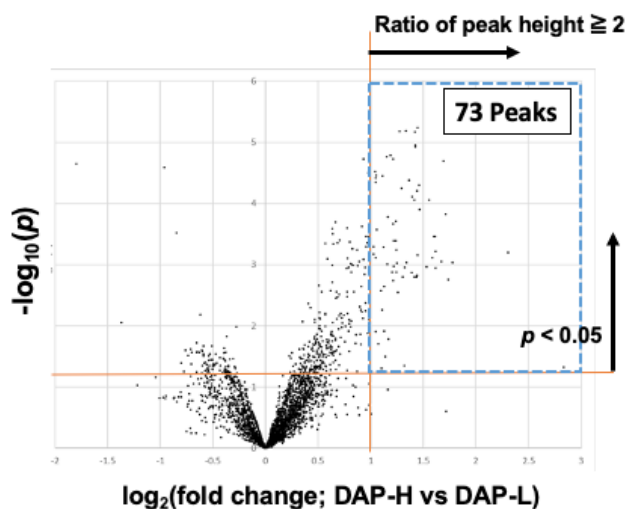


図4. 2. 5 Volcano Plot

2,821個のピークについてDAP-H群とDAP-L群のピーク高の比を計算しVolcano Plotを行った。
DAP-H群においてDAP-L群に比べて2倍以上、有意 ($p < 0.05$) に増加しているピークが73個あった。

GC/MSの測定においては、GCで分離された化合物が質量分析計のイオン源でイオン化される際に複数のフラグメントイオンを生じる。そのため、同じRTに出現するピークは、しばしば同一の化合物に由来する。見出だされた73組のピークは、RTで分類すると、RTが15.10分、17.18分、20.69分、23.82分の4種類の化合物に由来すると考えられた (図4. 2. 6)。

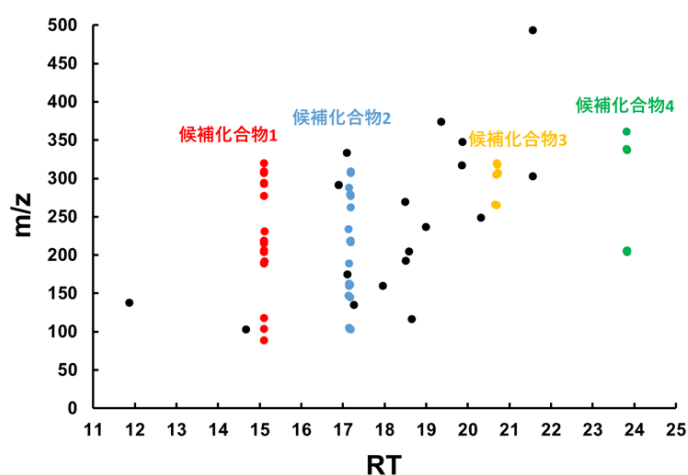


図4. 2. 6 73組のピークのRTとm/z

73組のピークをRTで分類した結果、これらのピークは4つの化合物由来と想定された。
RT 15.10分：21ピーク、RT 17.18分：21ピーク、RT 20.69分：7ピーク、RT 23.82分：6ピーク

この4つの候補化合物について、データベース中の標準マススペクトル等との類似性検索を行った結果、候補化合物1のRTでのマススペクトルはトレイトールとの類似度が93%であった。同じく、候補化合物2ではキシロースとの類似度が90%、候補化合物3ではガラクトツロン酸、グルクロン酸、グルコン酸との類似度がそれぞれ59%、57%、52%であった。候補化合物4では、D-アルトロ-ヘプツロースとの類似度が44%であった。これらのことから、候補化合物1は糖アルコールの1種トレイトール、候補化合物2は五炭糖のキシロースと考えられた。候補化合物3はグルクロン酸等の糖酸、候補化合物4は、D-アルトロ-ヘプツロース等の七炭糖と考えられるが、これらには数多くの同位体が存在するため、同定には至っていない（図4.2.7）。

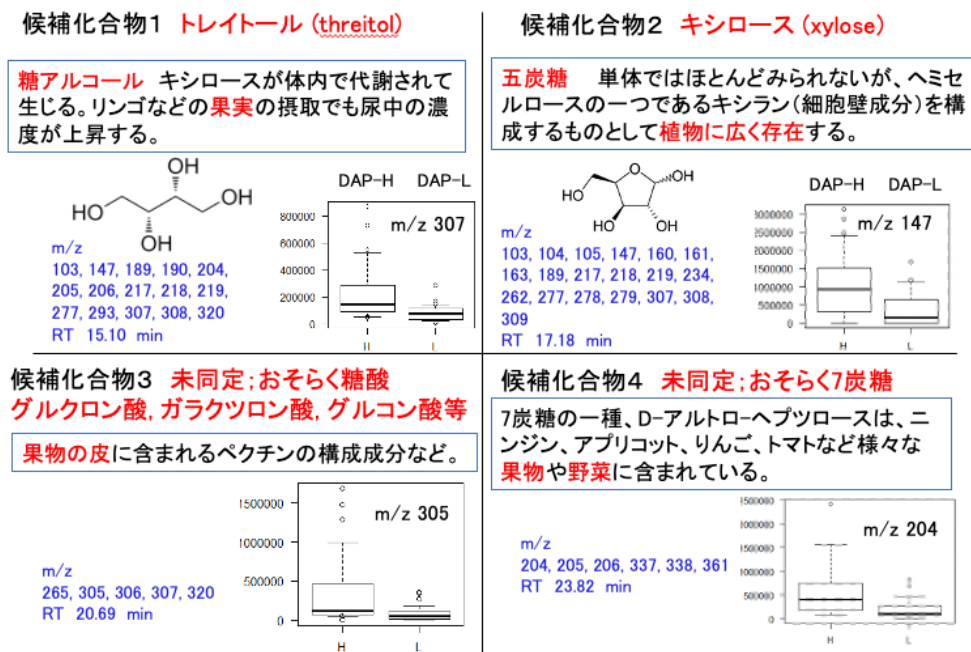


図4.2.7 DAP-H群で2倍以上増加していた4つの候補物質

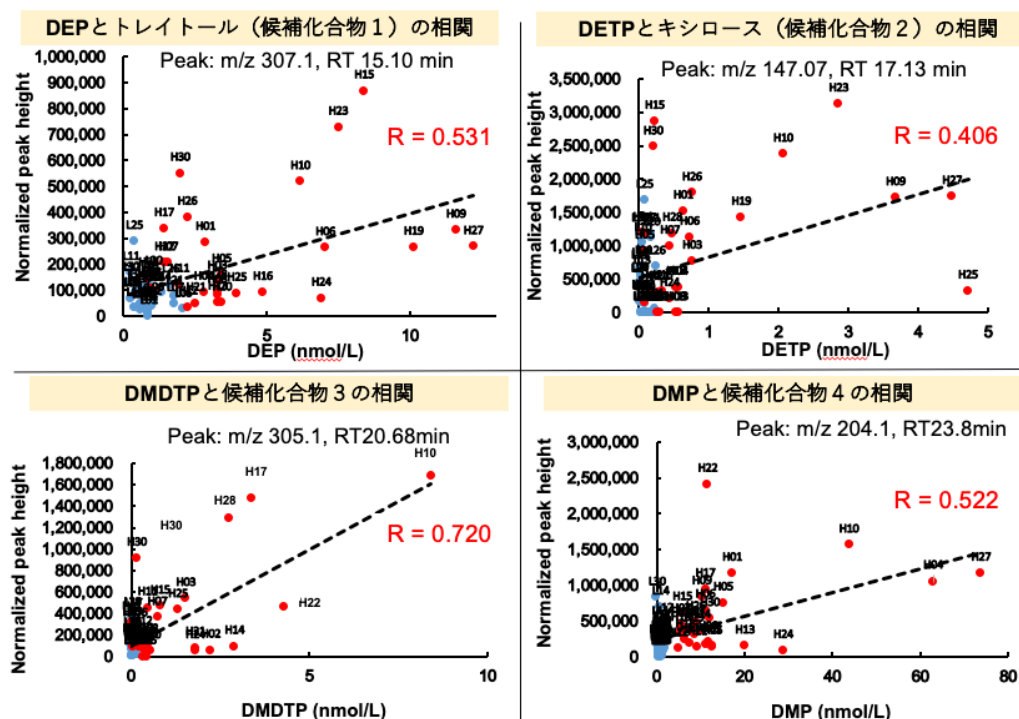


図4.2.8 4種類の候補化合物のピークの高さと各DAP濃度との相関
DAP濃度とピークの高さが高い相関を示した相関図を示す。

4つの候補化合物は、いずれも野菜、果物、植物に含まれている。尿中DAP濃度が高い妊婦は、有機リン系農薬が付着もしくは内部移行した野菜や果物を多く摂取した結果、これらの化合物に由来するピークが高く観察されたものと考えられた。次に、見つかった4種類の化合物由来のピークの高さと、総DAP濃度及び個別のDAP（DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP）濃度との間の相関を解析した。候補化合物1～4はそれぞれのDAP濃度に対して異なる相関関係を示した。例えば、DEP及びDETP濃度は候補化合物1及び2と、DMDTPは候補化合物3と、DMPは候補化合物4と比較的よい相関を示した（図4.2.8）。このことは、摂取した食物の種類によって暴露する農薬が異なることを示している。また、同じ食物であっても、収穫時期や場所によっても農薬が異なる可能性も考えられる。

本研究において、尿中DAP濃度に関連して尿中で増加している4種類の候補化合物を見出した。トレイトールは4炭素の4価アルコールである。ジュートやキマメの樹皮、枝、葉に含まれている。キシロースは5炭糖であり、ヘミセルロースの一つであるキシラン（細胞壁成分）の構成成分として植物中に広く存在する。ヒトにおいてキシロースは代謝されトレイトールを生じ、尿中に排出される。それ故、RT 15.10分に検出されたトレイトールはキシロースが分解されて生じた可能性が考えられる。RT 20.69分の化合物は未同定であるが、グルクロン酸、ガラクトロン酸、グルコン酸に類似したマススペクトルが確認できた。これらの糖酸類は果物の皮に含まれるペクチンの構成成分である。RT 23.82分の化合物も未同定であるが、D-アルトロ-ヘブツロース等の7炭糖類に類似したマススペクトルを示した。7炭糖類は、ニンジン、アブリコット、リンゴ、アボカド、トマトなど様々な果物や野菜に多く含まれている。4種類の候補化合物のピークの高さと各DAPとの関係の解析結果からは、次の様な農薬暴露経路の推定ができる（図4.2.9）。

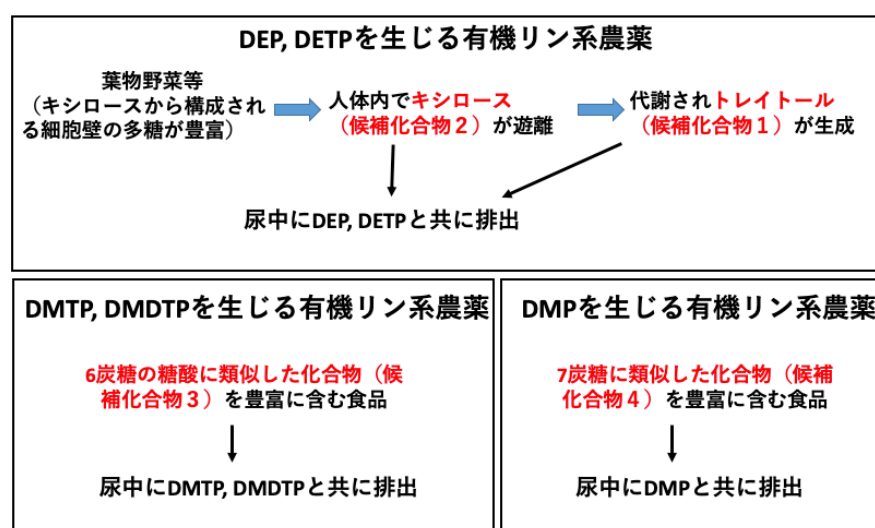


図4.2.9 GC/MSによる網羅的一斉分析による農薬暴露経路の推定

今回のGC/MSによる網羅的一斉分析では、100個以上の化合物が同定された。その内訳は、有機酸、糖及び糖酸、アミノ酸とその誘導体、芳香族、核酸、アルコール類、ビタミン類などである。この中には、農薬そのものやその代謝物は含まれていなかった。一般に、ヒト体内に存在する多くの外因性汚染物質は生体代謝物や食品由来の化学物質と比較して濃度が約1/1,000といわれる。これらはターゲット法によって解析することが望ましいと考えられる。尿中には外因性汚染物質より遙かに高濃度の数万を超える化学物質が存在するため、それらのマトリックス効果等により農薬代謝物の検出が不可能となったと考えられる。また今回のGC/MSによる分析では、農薬暴露がアミノ酸代謝や糖代謝などの内因性の代謝物に及ぼす影響は認められなかった。

GC/MSにより網羅的一斉分析によって高濃度曝露群において高値を示した食品由来の代謝物を検出し、さらにそれらのピークの高さは個別のDAP濃度と相関を示した。食品由来の代謝物は外因性汚染物質及びその代謝物より遙かに高濃度であり、検出が容易である。これらは、化学物質曝露の新たなバイオマ

ーカーになる可能性がある。さらに、曝露経路の探索にも有用である可能性が示唆された。有機リン系農薬暴露と野菜や果物等の摂取との関連を、GC/MSによる網羅的一斉分析によって明らかにした研究は、我々が知る限り初めてである。

3.2 LC/MSによるDAP濃度既知の妊婦尿の網羅的解析

3.2.1 測定方法

LC/MSに導入するまでの試料の調整は、1.2.1で述べた自動化ワークフローを用いて行った。LC/MSによる測定及び分析は、報告している方法に従って行った。標準のプロトコールは、zic-HILICカラムをAgilent 6550 Q-TOF-MS systemに装着し、カラム温度25℃、酸性条件下（0.1% ギ酸）で水→アセトニトリルの15分間のグラジエントをかけて溶出した。測定条件は、マスレンジ 40~1,200 m/z、AIFモード、3つのコリジョン電圧（full scan, 10, and 30 eV）、スキャン速度は6スキャン/秒である。得られたデータはProteoWizard（version 3.0）を用いてmzML フォーマットに変換し、MS-DIAL（version 3.32）を用いてRTおよびMS2スペクトラムを得た。さらに、MS2DecもしくはCorrDecにてデコンボリューションを行い、MS-FINDER（version 3.32）にてアノテーションを行った。なお、ピーク選定やアノテーションに際しては、市販のライブラリー等に必要なライブラリーを追加して作成したインハウスライブラリーを用いて行った。

3.2.2 結果と考察

DAP-H検体30個とDAP-L検体30個について、同定された化学物質全体のプロファイルの比較をOPLS-DAスコアプロットを用いて判別分析を行った。プロファイル全体には大きな差は認められなかった（図4.2.10）。

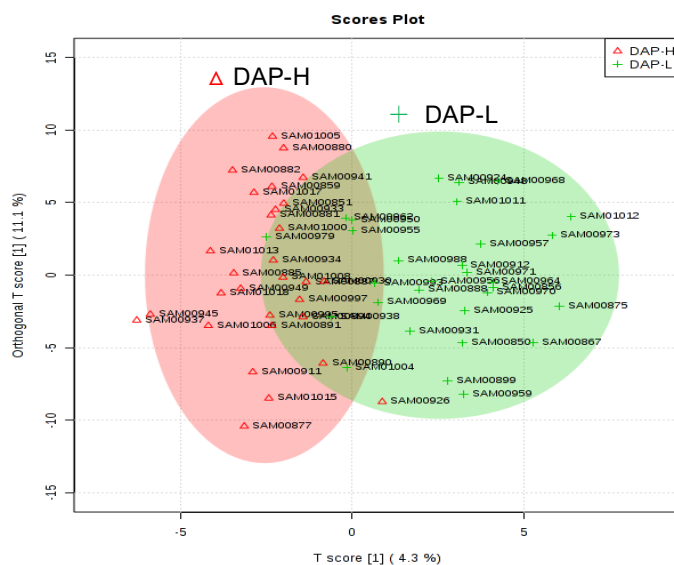


図4.2.10 網羅的一斉分析により同定された化学物質のOPLS-DA スコアプロット

次に、LC/MSで同定された約200個の化学物質についてVolcano plotを用いると、高DAP群で2倍以上増加している6つの化学物質が抽出された（図4.2.11）。

高DAP群で増加していたのは、プロリンベタイン、4-ヒドロキシスタドリン、(R)C(S)S-アイリン、4-アセトアミドブタン酸、2-メチル-4-プロピル-1,3-オキサチアン、ベノテルピンである。このうち4-アセトアミドブタン酸はGABAの代謝物でもあるが、6つともいずれも野菜や果物由来の代謝物として知られているものである（図4.2.12）。プロリンベタインは柑橘類の食後に、4-ヒドロキシスタドリンはプロリン及びその代謝物を含む食物を食べた後に増加することが知られている。アイリンはニンニクに含まれ、4-アセトアミドブタン酸はキャベツや唐辛子等に含まれる。2-メチル-4-プロピル-1,3-オキサチアンはパッションフルーツ等に含まれており、ベノテルピンは植物由来のアルカロイドである。

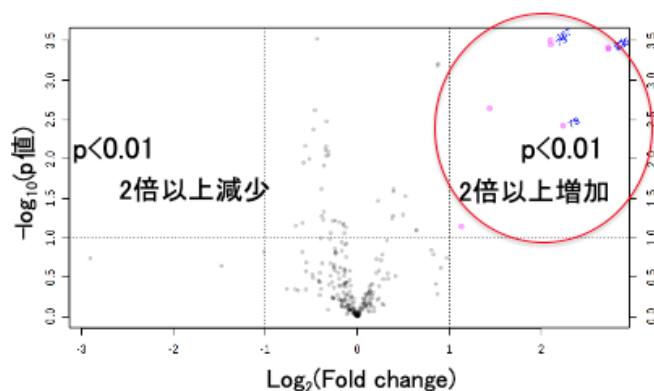


図4.2.11 Volcano plot

LC/MSで同定された112個の化学物質についてVolcano plotを行った。

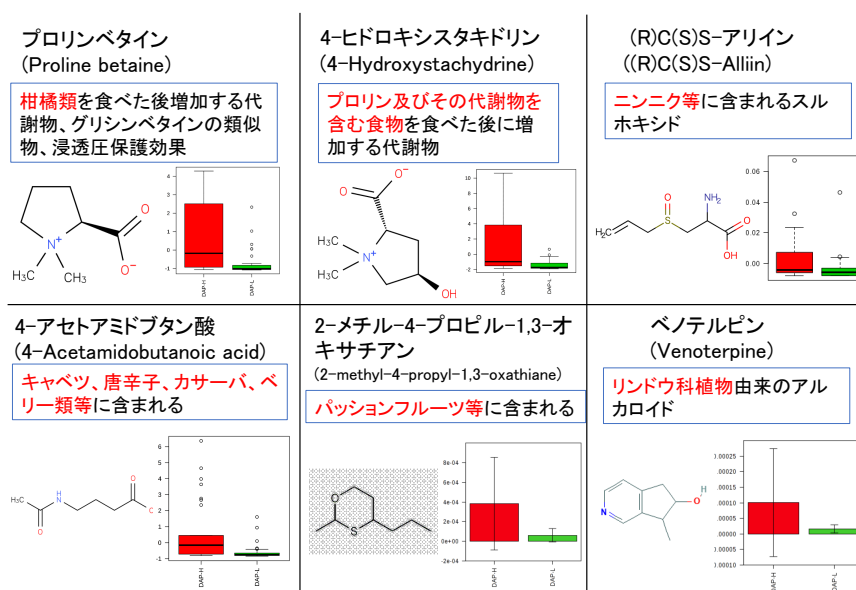


図4.2.12 DAP-H群で増加していた6つの化学物質

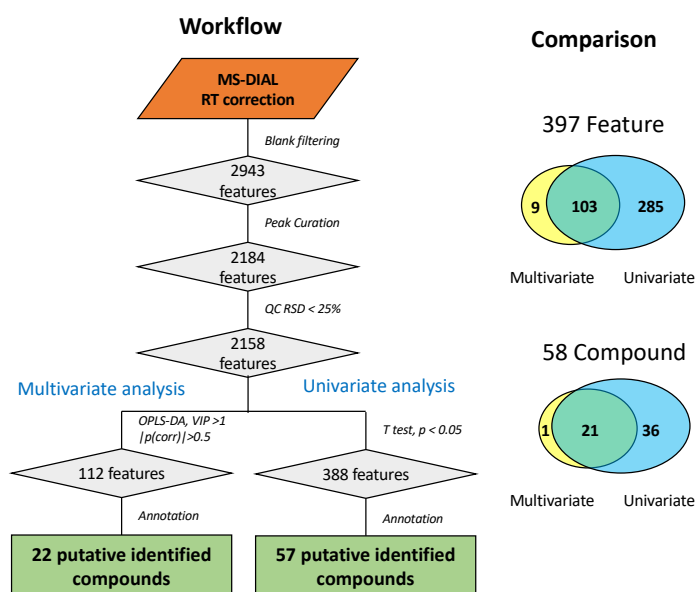


図4.2.13 2つの統計解析のワークフロー、それぞれの解析によって見出されたDAP-H群において増加している精密質量ピークと候補化合物の関係

次に、MS-DIALを用いて溶出時間補正等を行い、ブランクフィルタリングやQC比較等を行って選定した2158個の精密質量ピークを用いて、DAP-H群とDAP-L群との間で多変量解析及び単変量解析を行った。その結果、DAP-H群において有意に増加している精密質量ピークを、多変量解析では112個、単変量解析では388個見出した。さらにその精密質量ピークから、多変量解析では22個、単変量解析では57個の候補化合物を同定した。2つの統計解析のワークフローと、見出された397個の精密質量ピーク及び58個の候補化合物の関係を図4.2.13に示す。

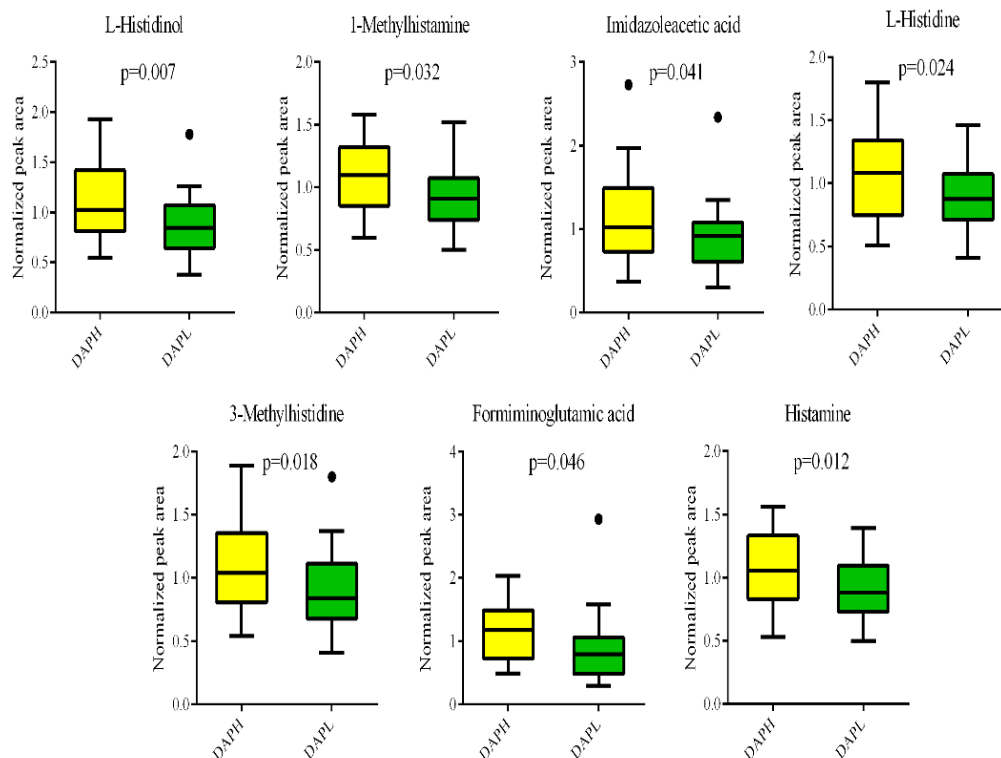


図4.2.14 DAP-H群において増加していたヒスチジン代謝経路の代謝物

次に、候補化合物についてMetaboAnalystを用いてパスウェイ解析した結果、58個のうち7個がヒスチジン代謝経路の代謝物であった。即ち、L-Histidinol, 1-Methylhistamine, Imidazoleacetic acid, L-Histidine, 3-Methylhistidine, Formiminoglutamic acid, Histamineである（図4.2.14）（図4.2.15）。

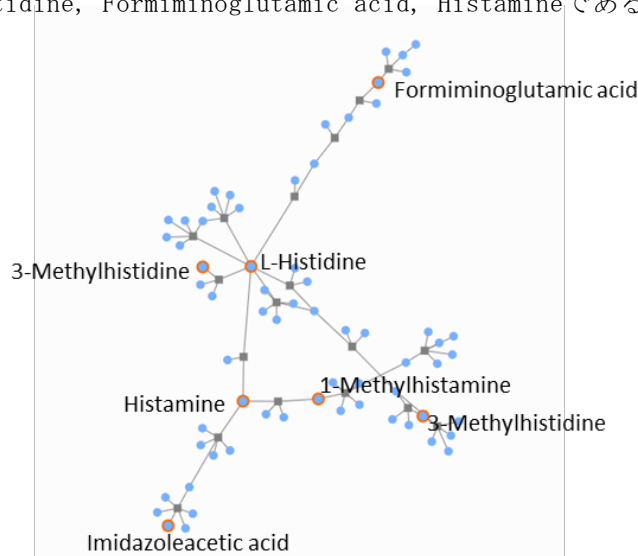


図4.2.15 ヒスチジン代謝経路

DAP-H群において増加していた6個のヒスチジン代謝経路の代謝物が示されている。

3-Methylhistidineは2箇所に示されている。L-Histidinolは示されていない。

このように、DAP-H群において多くのヒスチジン経路の代謝産物が増加していることが明らかになった。ヒスチジンはヒト体内の合成速度が遅く食物から補給しなければならないため、必須アミノ酸の1つである。食材でヒスチジンを多く含んでいるのは、マグロ、カツオ・ブリ・サバ・サンマなどの青魚や鶏胸肉、豚赤身肉などの肉類、チーズやヨーグルトなどの乳製品、大豆やきな粉などの大豆製品である。特に多く含む食材は、青魚である。高DAP群の妊婦は、 ω -3脂肪酸（EPA）の血液中の濃度が高かったこととあわせて考えると、これらのヒスチジン代謝経路の代謝物も青魚由来の可能性がある。もう一つの可能性として、有機リン系農薬がヒスチジン代謝を亢進させる機序が考えられる。化学物質に暴露された生物の体内必須アミノ酸類が増加することが知られている2)。その理由として、暴露により体内に取り込まれた化学物質を解毒、代謝するためのエネルギーを通常より多く必要とするために、体タンパク質を分解しアミノ酸を生成させることで、エネルギー代謝を亢進させる反応ではないかと考えられている。有機リン系農薬が、解糖系やペントースリン酸経路に影響を与えるとの報告もある3)。今回の妊婦の場合、DAP-H群であっても有機リン系農薬曝露の程度は低いと考えられる。このような低い農薬曝露がヒスチジン代謝に影響を与えるかどうかについては、更なる解析と、動物実験における検証が必要と考えられる。

3.3 LC/MSによる重金属濃度既知の出産経験を有する女性尿の網羅的解析

3.3.1 測定方法

サブテーマ1より提供された、家庭環境調査で得られた出産経験を有する女性尿85検体をLC/MSによる網羅的一斉分析で解析した。解析方法は3.2.に従い、HILICカラムを用いて陽イオンモードで測定し解析を行った。

3.3.2 結果及び考察

MS-DIALを用いてブランクフィルタリングを行って得られた4856個の精密質量ピークから、マニュアルキュレーションやQCピークとの変動係数比較等により最終的に3288個の精密質量ピークを選定した。個々の重金属濃度とピーク面積との相関を解析したところ、重金属濃度との相関があり有意に増加($R > 0.5$, $p < 0.01$)している204個の精密質量ピークが見出された(図4.2.16)。

204個中182個の精密質量ピークがSe濃度と相関し、3個がPb濃度と、4個がHg濃度、33個がCd濃度とそれぞれ相関していた。さらに、Se濃度とCd濃度の両方と高度に相関する18個の精密質量ピークが見出された(図4.2.17)。現在、18個の精密質量ピークの同定を行っているところである。

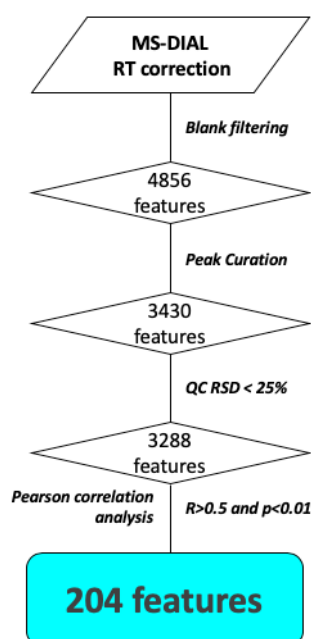


図4.2.16 女性尿85検体の解析結果

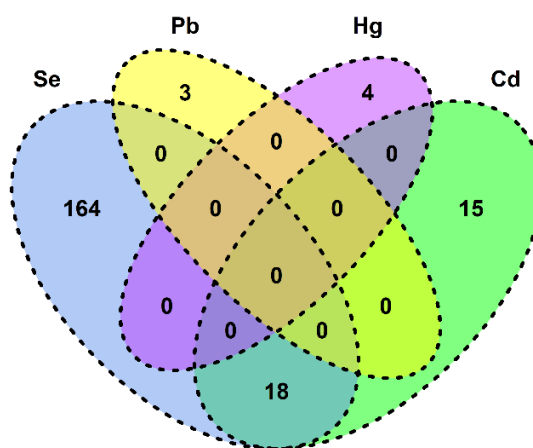


図4.2.17 204個の精密質量ピークのベン図

18個の精密質量ピークから、ウリジン、N4-アセチルシチジン、5,6-ジヒドロウリジンの3つが同定された（図4.2.18）。ウリジンはRNAの構成成分であり、N4-アセチルシチジンはアセチル化されたシチジン（転写後修飾RNA）でtRNAの中に存在しAUGコドンの正確な解読に寄与するとされる。5,6-ジヒドロウリジンも修飾塩基（微量塩基）で、ウリジンの二重結合が単結合になったものであり、tRNAの中にのみ存在する。ウリジンのピーク面積と尿中Se及びCd濃度との相関を図4.2.19に示す。

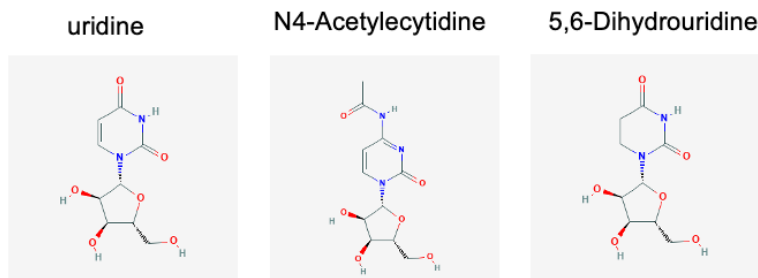


図4.2.18 Se濃度とCd濃度の両方と高度に相関する尿中RNA代謝物

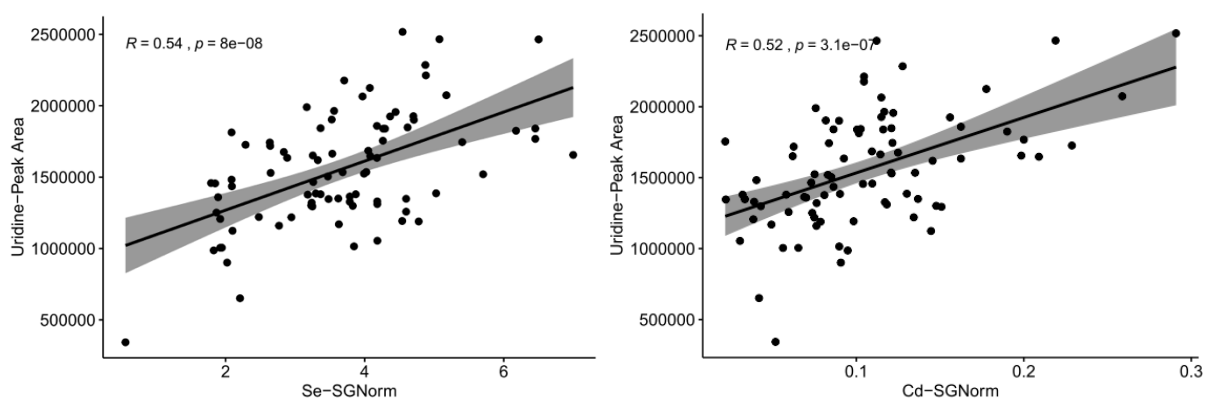


図4.2.19 ウリジンのピーク面積と尿中Se及びCd濃度との相関
ピーク面積、Se濃度、Cd濃度のいずれも比重（SG）を用いて標準化している。

N4-アセチルシチジン及び5,6-ジヒドロウリジンはどちらも修飾されたRNAであり、トランスファーRNA(tRNA)の中にのみ存在するものである。このことから、今回発見されたウリジンを含む3個のRNA分解物はtRNAの分解物と考えられる。その機序として、RNAの転写亢進やtRNAの分解亢進などのRNA代謝の亢進が起こったことが想定されるが、そのメカニズムは不明である。また、比較的低濃度のSeやCdの濃度との関連も今後の検討課題である。

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

化学物質の曝露評価に必要となる、質量分析を用いた網羅的一斉分析による生体試料中の化学物質の包括的解析手法を確立した。確立した手法を用いて、有機リン系農薬代謝物レベルが既知の妊婦尿、および尿中重金属濃度が既知の母親尿の分析を行ったところ、曝露に関連する曝露物質以外の化学物質が数多く見出された。それらの化学物質は、食品代謝物、アミノ酸代謝物、核酸代謝物等である。これらは、化学物質曝露評価に際して新たなバイオマーカーになる可能性がある。また、曝露経路の探索、複合汚染の有無、曝露の生体に及ぼす影響などを解明する上で、重要な手がかりを与えてくれることが期待される。

（2）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

人体を汚染する化学物質の数は急速に増えている。管理モデルを構築する上で曝露評価や影響評価が鍵となるが、個々の化学物質を分析する手法には限界がある。今回サブテーマ2で開発した網羅的一斉分析による包括的モニタリングはこの打開策となる可能性がある。また、今回曝露に関連する曝露物質以外の多くの化学物質が同定された。未同定の精密質量ピークも数多く残されている。これらのバイオマーカーとしての評価は今後の研究に待つ必要があるが、曝露物質そのものよりは遙かに高濃度で生体中に存在しているため検出は容易である。また、曝露による影響評価のバイオマーカーとしての役割も期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

生体試料のエクスポソーム解析及びメタボローム解析を行うにあたり、測定方法及び解析手法の開発をスウェーデンカロリンスカ研究所のグループと共同で行った。この共同研究は、日本学術振興会の二国間交流事業共同研究（期間：平成30年4月～令和3年3月、対応機関：スウェーデンSTINT）の研究課題「環境曝露とアレルギー及び呼吸器疾患発症との関連を解明するためのエクスポソーム解析」と関連した研究開発である。日本側研究代表者は和泉孝志であり、相手国研究代表者はカロリンスカ研究所ウィーロック クレイグ准教授である。ウィーロック准教授らのグループは、質量分析を用いた網羅的解析手法を長年研究しており、ヨーロッパのU-BIOPRED（呼吸器疾患の転帰予測のためのバイオマーカー探索コホート研究）に参加するなど、その研究手法は世界的に高く評価されている⁴⁾。

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない。

（2）口頭発表（学会等）

- 1) 西浜柚季子、龍田希、岩井美幸、磯部友彦、藤原幾磨、有馬隆博、中山祥嗣、和泉孝志、仲井邦彦：第88回日本衛生学会学術総会（2018）：「一般家庭における重金属曝露メカニズムの解明 調査プロトコルについて」
- 2) 仲井邦彦、龍田希、岩井美幸、磯部友彦、西浜柚季子、中山祥嗣、和泉孝志、大日方英、大嶋紀安、ロマナス ハレツキス：第89回日本衛生学会学術総会（2019）「家庭環境内における重金属曝露シナリオの解明－調査方法の確立」
- 3) 仲井邦彦、龍田希、岩井美幸、磯部友彦、西浜柚季子、中山祥嗣、和泉孝志、大日方英、大嶋紀安、ロマナス ハレツキス：第28回環境化学討論会（2019）「家庭環境内における重金属類曝露シナリオの解明－調査方法の検討」

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 上山純: 科学研究費助成事業23689034研究成果報告書 (2014)
- 2) 國師恵美子、宇野誠一、小山次朗: 環境毒性学会誌, 16(1), 1-11 (2013) コイ血漿メタボロミクスによるカーバメート系殺虫剤 BPMC の有害性評価
- 3) K. M. SOMAYYEH and A. MOHAMMAD: Human & Experimental Toxicology, 30(9), 1119-1140 (2011) Toxic Influence of Organophosphate, Carbamate, and Organochlorine Pesticides on Cellular Metabolism of Lipids, Proteins, and Carbohydrates: A Systematic Review.
- 4) R. EMMA, A. T. BANSAL, J. KOLMERT, C. E. WHEELLOCKら32名: U-BIOPRED Study Group: PLoS One, 13(9), (2018) Enhanced Oxidative Stress in Smoking and Ex-Smoking Severe Asthma in the U-BIOPRED Cohort.

Ⅱ－３ 小児化学物質曝露の数理モデル構築とリスク管理モデルの提案

国立研究開発法人 国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター・曝露動態研究室 中山祥嗣・岩井美幸

馬超辰（研究協力者 令和元年度）

Lina Madaniyazi（研究協力者、平成29-30年度）

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：8,515千円（研究経費は間接経費を含む）

（平成29年度：3,900千円、平成30年度：3,705千円、令和元年度：910千円）

〔要旨〕

脆弱な胎児や小児の曝露回避または曝露低減への対策を提案するために、曝露源などの曝露メカニズムや体内動態に関する詳細な解析が急務である。そこでサブテーマ3では、サブテーマ1およびサブテーマ2で得られたデータを活用し、曝露モデル、体内動態を考慮した小児リスク管理に関して提案することを目的とした。なお、既存の疫学調査のデータを活用し、モンテリオール大学と共同して、母乳あるいは臍帯血濃度から小児血中の経時的なPOPs濃度について予測するモデル構築(PBPKモデル)を実施し、本調査のデータ解析に応用する準備を行った。

家庭環境調査のデータを用いて（サブテーマ1と連携）曝露モデルの構築を行った。曝露量の算出では食事摂取量、土壌摂取量、肺換気量およびハウスダスト摂取量の曝露係数と、今回実測した各媒体の濃度を用いて推定曝露量を算出した。その結果、Cd、MnおよびSeの摂取源のほとんどは食事（99%）であり、Hgの曝露源もほとんどは食事（95%）であったものの、水銀蒸気の寄与割合が4%と算出された。Pbの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値68%（平均64%）となった。順に、ハウスダスト由来が占める割合は中央値16%（平均19%）、土壌の占める割合は中央値10%（平均13%）、室内空気の占める割合は中央値1.4%（平均3.2%）であった。Pbの曝露源解析においてはモンテカルロシミュレーションによる解析も実施され、50000回施行したPbの曝露量の推定値は、中央値4.24 $\mu\text{g/day}$ となった。

重金属について、体内動態モデル構築に向け、特にHgについては暫定耐容摂取レベルでの母集団体内動態とシミュレーション解析を実施した。算出された血中半減期は水銀59日、メチル水銀56日となった。モデルの適格性評価のため、ブートストラップにより同モデルを1000回施行した場合もほぼ同様の結果が示された。その他の元素については、シミュレーションを実行するための既存情報が十分ではなく、半減期等の情報を参考とし、長期的な血中金属類濃度の推移が予測したが、妊娠時から本調査までの年数（SD）は平均5.6年（1.0）経過しているにも関わらず、同じ金属間の血中濃度には関連がみられ、5-6年後の血中金属類濃度はある程度予測できる可能性が示唆された。

今回分析を実施した5つの元素は小児環境保健分野において、低濃度でも健康影響が指摘される重要な元素である。今後、エコチル調査において、これら元素と健康影響に関して多数の論文発表がなされると期待され、その際、本調査結果は重要な意義を持つ。特にPbは、曝露源の多様さと小児に対する影響の閾値が定まっていないため、リスク管理が極めて難しい元素である。本調査を通して、どの元素も食事由来の寄与が大きいこと、一部の元素は飲水管理により曝露をさげられること、そしてより長期的に曝露を軽減する取り組みが必要であることが明らかとなった。

さらにサブテーマ2との連携を進め、尿中有機リン系農薬代謝物のメタボロミクスデータのランダムフォレスト解析（機械学習）を進めた。その結果、高値群と低値群を区別する特徴的な精密質量ピークを発見した。当該ピークを構成する化合物は現在同定中であるが、新たなバイオマーカーになる可能性が示唆された。本結果は、曝露マーカーとして、化学物質そのものに加え、メタボロミクスの結果も利用可能なことを示しており、さらに、新たな影響メカニズムへの進展も期待できる成果となった。

〔キーワード〕

鉛、カドミウム、水銀、マンガン、セレン、曝露モデル、体内動態モデル

1. はじめに

化学物質に対して脆弱な胎児や小児は、化学物質曝露による成長や発達への影響が最も懸念される集団である。胎児期や小児期の化学物質曝露による出生後の影響について国内外の疫学調査により数多くの報告がある。日本でも子どもの健康や成長に影響を与える環境要因を明らかにすることを目的として、子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)が、2010年度より実施されている。環境省が主体となって開始したこの調査は、約10万組の母子の協力のもと継続されている。調査参加者の血液(妊娠中期・後期)の金属類分析(Pb、Cd、Mn、Se、Hg)が実施され、本調査開始時点において10万人のうち2万人の分析結果が公表された。その結果、極めて少数ではあるものの、一部の対象者で参照値を超過する曝露事例が観察された。安全量を超えた曝露あるいは何らかの健康影響が判明した曝露があった場合に、その曝露を回避または低減する対策が必要となる。しかしながら、公害レベルの高濃度曝露の曝露源については明らかであるが、公害でないレベルのこれら金属類の曝露源については十分な知見がない。脆弱な胎児や小児の曝露回避または曝露低減を提案するために、曝露源などの曝露メカニズムに関する情報が必須である。そこで本研究では曝露モデル、体内動態を考慮した小児リスク管理の提案を目指した。

2. 研究開発目的

胎児期や小児期の化学物質曝露による出生後の影響について、国内外の疫学調査により数多くの報告がある。これら金属類の低濃度曝露に関する曝露源については十分な知見がないことから、脆弱な胎児や小児の曝露回避または低減への対策を提案するために、曝露源などの曝露メカニズムや体内動態に関する詳細な解析が急務である。そこでサブテーマ3では、サブテーマ1および2で得られた成果を活用し、曝露、体内動態に関するモデルを構築し、その検証を目指した。重点課題として取り組む数理モデルとして、金属類の曝露モデル、体内動態および血中濃度予測モデル等の構築を目指した。血中濃度予測には、母体血から臍帯血金属類濃度を予測するモデル、将来の血中金属類濃度を予測するモデル、小児血中濃度予測モデル(POPsを対象)を構築することを目指し、曝露モデル、体内動態を考慮した小児リスク管理に関して提案することを目的とした。

3. 研究開発方法

3.1. 曝露モデルの構築

金属類(Pb、Cd、Hg、Mn、Se)の曝露モデルの構築を進めた。推定曝露量(EDI: estimated daily intake)の算出にあたって、曝露係数(K)と各媒体の濃度(C)を用いて、以下の式により推定曝露量(EDI, $\mu\text{g/day}$)または体重1kg当たりの推定曝露量($\mu\text{g/kg/day}$)を算出した。曝露係数(K)は、US-EPAのExposure Factors Handbook (2011)¹⁾に示されたcentral tendency(平均値または中央値)または95パーセンタイル値を用いた(詳細は以下の表3.3.1に示す)。1日食事摂取量については、陰膳食事調査で得られた対象者ごとの値をそれぞれ用いた。各媒体の濃度は環境調査のデータを使用した。陰膳食事調査および環境調査はサブテーマ1で実施された。

$$\text{推定曝露量(EDI)} = (C_f \times K_f) + (C_a \times K_a) + (C_d \times K_d) + (C_s \times K_s)$$

f: 食事(飲水を含む)、a: 室内空気、d: ハウスダスト、s: 土壌

表3.3.1 本曝露モデルで使用した曝露係数

曝露係数	Mean/median/central tendency (P50)	95パーセンタイル値 (P95)	引用
食事摂取量	1708 g/day	2688 g/day	本調査データに基づく
肺換気量	16 m ³ /day	21.3 m ³ /day	US-EPA, Exposure Factors Handbook (2011) ¹⁾
土壌摂取量	20 mg/day	200 mg/day	
ハウスダスト摂取量	30 mg/day	100 mg/day	

3.2. 体内動態モデルの構築、シミュレーション

3.2.1. Hg

Hgの体内動態に関して、既報論文(Yaginuma-Sakurai et al., 2012) のデータを活用し、母集団薬物動態・薬力学ガイドラインを参考にし、母集団体内動態 (PPK) 解析を実施した。詳細な体内動態のパラメータを取得するとともに、作成したモデルでシミュレーションを実行した。既報論文ではメチル水銀の耐容週間摂取量に相当する量のマグロ・カジキを14週摂取したのち、その後14週のwash-out期間を設け、1-2週間ごとに採血が実施された (N=27) 。母集団薬物動態解析にはPhoenix WinNonlin (Cetara社) を使用した。

3.2.2. その他の元素

Cd、Pb、Se、Mnの体内動態について、各種パラメータを取得するため文献検索を実施した。文献検索は、NCBI (国立生物科学情報センター) が提供する文献データベースであるPubMedを用いて実施した。対象論文は、2020年3月時点で論文が入手できた文献を対象にし、人を対象とし、金属類の体内動態を解析した論文とした。検索用語は、以下のように設定した。

(cadmium/lead/manganese/selenium[MeSH Terms]) AND ("1970/01/01"[PDAT] : "2020/3/31"[PDAT]) AND ("humans"[MeSH Terms]) AND (English[lang] OR Japanese[lang]) AND ("pharmacokinetics"[MeSH Terms] OR "PK"[MeSH Terms] OR "toxicokinetics"[MeSH Terms] OR "PBPK"[MeSH Terms])

3.3. 血中濃度予測モデルの構築

血中濃度の予測モデルの構築について、3つのアプローチで検討を進めた。1) 東北コホート調査データを活用し、母体血及び臍帯血の金属類濃度との関係について解析するとともに、その変動要因や臍帯血濃度の予測因子について検討を進めた。2) モントリオール大学のVernerらと国際連携を進めた。彼らは、母体血、母乳あるいは臍帯血濃度から経時的な小児血中POPs濃度を予測するモデルを構築 (PBPK model) しており、本研究への応用を念頭に入れ連携を進めた。3) 本調査では調査時に採血を実施していることから、現在の血中金属類濃度と妊娠期間の血中金属類濃度との関係を解析し、血中金属類濃度の予測モデルの構築を目指した。

3.4. データ解析

各種解析データについて、幾何平均、中央値、5-95パーセンタイル値等の記述統計を行った。単変量解析について、スピアマンの順位相関係数またはピアソンの積率相関係数、重回帰分析を行った。重回帰分析を実行するにあたって、欠測している変数については連鎖方程式を用いた多重補完 (MICE; multiple imputation by chained equation) が適用された。シミュレーション解析には、モンテカルロシミュレーション及びブートストラップが実行された。金属類の血中濃度は全ての対象者で検出下限値以上であった。環境試料および食事試料中の金属類濃度の一部は検出下限値未満であった。曝露モデルにおいて、環境調査が実施されていない場合または一部の環境試料に欠測があった場合は解析から除外した。また環境試料および食事試料中の金属類濃度が検出下限値未満であった場合、下限値の半分値を一律に当てはめて解析をした。環境試料および食事試料中の金属類濃度を使用した重回帰分析を実施する際、下限値未満の占める割合が20%以下であれば下限値未満の値を多重補完 (MICE) することとし、分布に偏りが発生しないように考慮した。統計解析ソフトには、JMP14.0 (SAS, Inc) またはR (R Core Team 2019) を使用した。母薬物動態解析にはPhoenix WinNonlin (Cetara Inc) を用いた。本解析にあたり、国立環境研究所医学研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

4. 結果及び考察

4.1. 曝露モデルの構築 (サブテーマ1と連携)

曝露モデルの構築にあたって、2017年度対象者 (宮城県沿岸地域) データを用いて、構築を進めた。その結果、Hg、Cd、SeおよびMnの摂取源のほとんどは食事であった一方、Pbの曝露源は、食事63%、土壌

12%、ハウスダスト17%および空気8%であった（37名）。本成果は国際ジャーナルに発表した。本報告書では、2017年度対象者（宮城県沿岸地域）に加えて2018-2019年度の調査者のデータを追加し、推定曝露量を算出した（151名）。

4. 1. 1. Pb

151名の調査参加者のうち、各媒体の濃度に欠測のない対象者は147名となった。その結果を図4. 3. 1と表4. 3. 1に示した。Pbの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値68%（平均64%、95%信頼区間65-70%）となった。順に、ハウスダスト由来が占める割合は中央値16%（平均19%、14-19%）、土壌の占める割合は中央値10%（平均13%、9-11%）、室内空気の占める割合は中央値1. 4%（平均3. 2%、1. 1-1. 7%）となった。食事由来の寄与も大きい一方で、様々な曝露源の寄与が明らかとなった。そこで、モンテカルロシミュレーションによるPbの推定1日曝露量（ $\mu\text{g/day}$ ）を算出した。シミュレーションを実行する際には、対数正規分布を仮定し、食事（飲水を除く）、飲水、ハウスダスト、土壌および空気の推定曝露量同士の相関関係を考慮し、50000回の施行によりPbの推定1日曝露量を算出した。その結果、モンテカルロシミュレーションによるPbの推定1日曝露量は、中央値(P5-P95) 4. 24 (2. 06-9. 21) $\mu\text{g/day}$ となった(図4. 3. 2)。モンテカルロシミュレーションデータによる各種媒体の感度解析を実施した結果、食事（飲水を除く）が最も影響が大きく、土壌、ハウスダスト、空気および飲水の順となった（飲水は、実際に飲んでいる水であり水道水または浄水した水が含まれる。飲水に関する詳細は1. 6を参照、図4. 3. 3）。

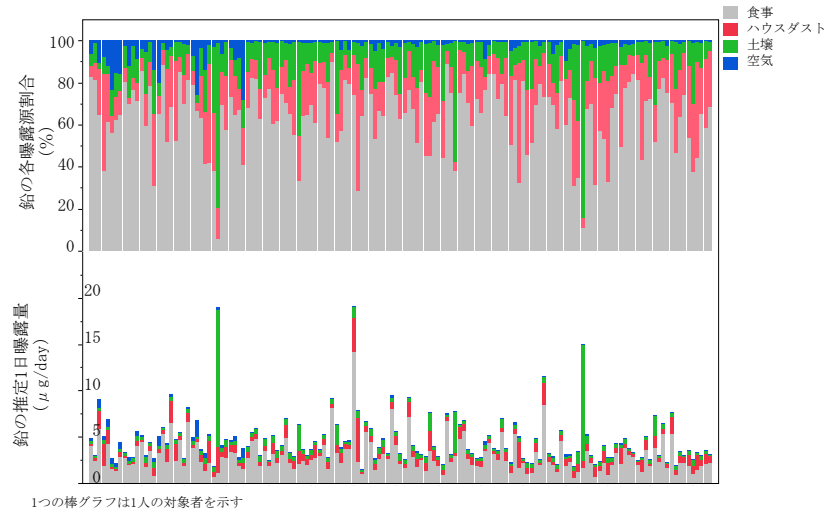


図4. 3. 1 Pbの推定曝露量（ $\mu\text{g/day}$, 下段）と曝露媒体ごとの占める割合（%, 上段）
灰色：食事、赤；ハウスダスト、緑：土壌、青：室内空気（浮遊粒子状物質）

表4. 3. 1 Pbの推定曝露量

Pbの推定曝露量	Unit	N	Median	P5	P95
食事	$\mu\text{g/day}$	147	2. 38	0. 93	6. 61
ハウスダスト	$\mu\text{g/day}$	147	0. 63	0. 23	2. 31
土壌	$\mu\text{g/day}$	147	0. 40	0. 19	1. 70
室内空気（浮遊粒子状物質）	$\mu\text{g/day}$	147	0. 05	0. 02	0. 58
総推定曝露量 (P50の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	147	3. 79	2. 09	9. 21
総推定曝露量 (P95の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	147	11. 31	6. 83	31. 24
体重当たり総推定曝露量 (P50の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	147	0. 07	0. 04	0. 17
体重当たり総推定曝露量 (P95の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	147	0. 20	0. 11	0. 54

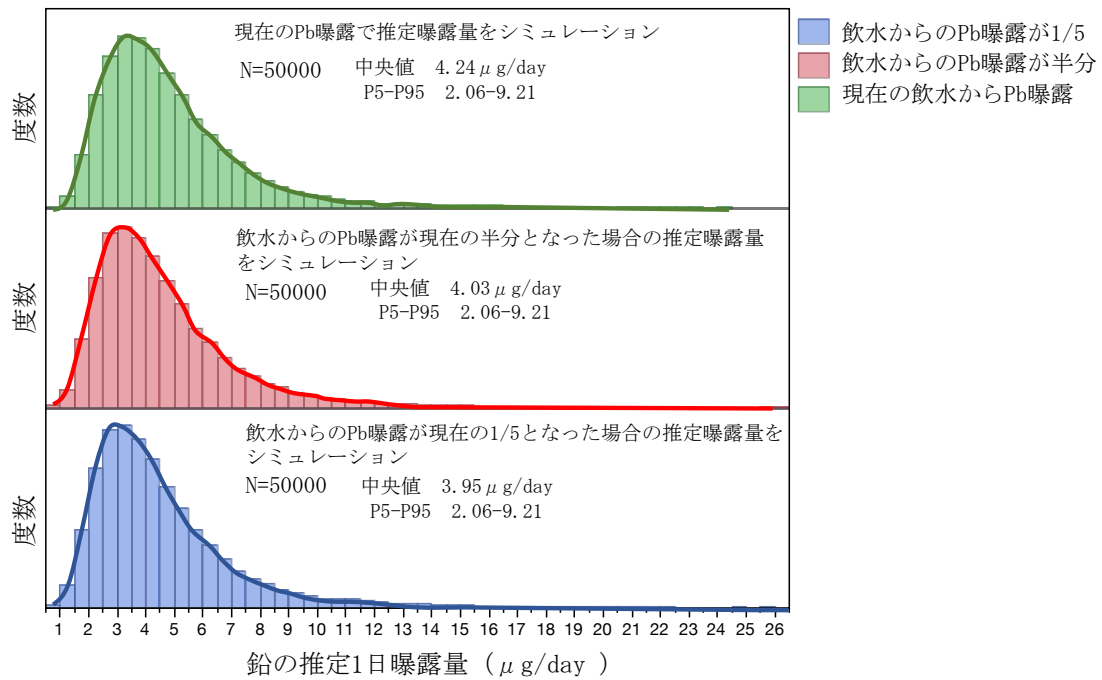


図4.3.2 モンテカルロシミュレーションによるPbの推定1日曝露量 (μ g/day)

食事（飲水を除く）、飲水、ハウスダスト、土壌および空気の推定曝露量同士の相関関係を考慮し、Pbの推定1日曝露量を算出した（N=50000）。飲水からの曝露低下した場合、集団としてどの程度曝露レベルが下がるかシミュレーションを実施（なお、本試算結果は、浄水器を使用している人としていない人の両方が含まれるが、水道水使用者が浄水に切り替えた場合の試算結果は、飲水からの曝露が5分の1に近似していた）。

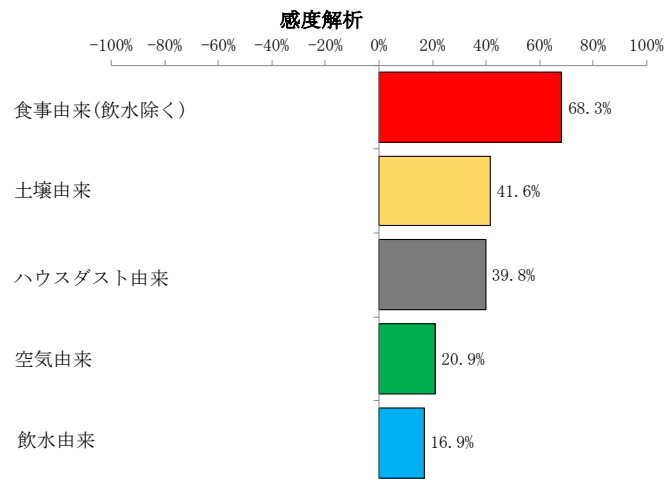


図4.3.3 モンテカルロシミュレーション後のデータを用いたPbの感度解析

感度解析とは、各種パラメータが変動した時に、結果にどの程度の影響を与えるか明らかにする手法であり、食事（飲水を除く）が最も影響が大きく、土壌、ハウスダスト、空気および飲水の順となった（飲水は、実際に飲んでいる水であり水道水または浄水した水が含まれる）。

4.1.2. Cd

151名の調査参加者のうち、各媒体の濃度に欠測のない対象者は147名となった。その結果を図4.3.4と表4.3.2に示した。Cdの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値99.8%（平均99%）となり、ほとんどが食事由来となった。一方で、喫煙や受動喫煙の直接吸入の曝露については、本調査では十分評価できていない可能性がある。

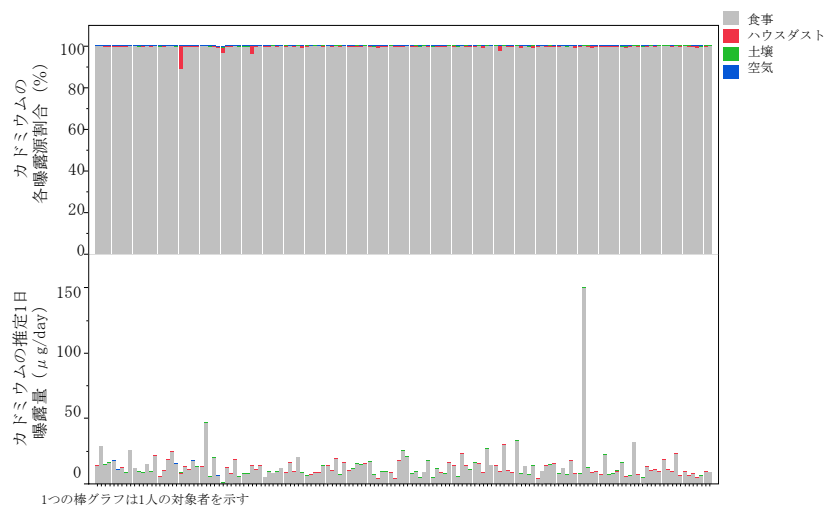


図4.3.4 Cdの推定曝露量（ $\mu\text{g/day}$, 下段）と曝露媒体ごとの占める割合（%, 上段）
灰色：食事、赤；ハウスダスト、緑：土壌、青：室内空気（浮遊粒子状物質）

表4.3.2 Cdの推定曝露量

Cdの推定曝露量	Unit	N	Median	P5	P95
食事	$\mu\text{g/day}$	147	10.2	4.9	26.4
ハウスダスト	$\mu\text{g/day}$	147	0.013	0.004	0.058
土壌	$\mu\text{g/day}$	147	0.006	0.002	0.013
室内空気（浮遊粒子状物質）	$\mu\text{g/day}$	147	0.0010	0.0002	0.0052
総推定曝露量(P50の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	147	10.2	4.9	26.4
総推定曝露量(P95の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	147	17.2	8.8	41.8
体重当たり総推定曝露量(P50の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	147	0.2	0.1	0.5
体重当たり総推定曝露量(P95の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	147	0.31	0.14	0.76

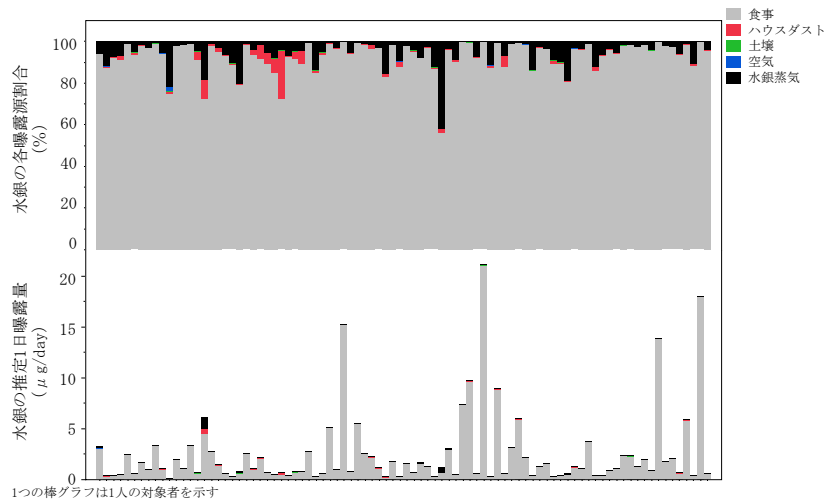


図4.3.5 Hgの推定曝露量（ $\mu\text{g/day}$, 下段）と曝露媒体ごとの占める割合（上段）
灰色：食事、赤；ハウスダスト、緑：土壌、青：室内空気（浮遊粒子状物質）、黒：蒸気水銀

4.1.3. Hg

151名の調査参加者のうち、水銀蒸気を含め各媒体の濃度に欠測のない対象者は88名となった。その結

果を図4.3.5と表4.3.3に示した。Hgの推定曝露量のうち、食事由来の占める割合は中央値95%（平均93%）となり、次に寄与が大きかったのは水銀蒸気であり、その割合は中央値3.7%（平均5.6%）となった。一方で、水銀の曝露ソースとして、食事由来のなかで魚摂取量との関連があるが、本曝露モデルではある一時点の陰膳調査により構築されたものであり、陰膳調査で本来の水銀曝露ソースとなる魚摂取が十分に考慮されたかという点に関して課題が残った。

表4.3.3 Hgの推定曝露量

Hgの推定曝露量	Unit	N	Median	P5	P95
食事	$\mu\text{g/day}$	147	1.17	0.26	12.9
ハウスダスト	$\mu\text{g/day}$	147	0.003	0.001	0.038
土壌	$\mu\text{g/day}$	147	0.001	0.000	0.002
室内空気（浮遊粒子状物質）	$\mu\text{g/day}$	146	0.000	0.000	0.001
水銀蒸気	$\mu\text{g/day}$	89	0.04	0.02	0.14
総推定曝露量(P50の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	88	1.13	0.30	12.0
総推定曝露量(P95の曝露係数)	$\mu\text{g/day}$	88	1.98	0.50	21.2
体重当たり総推定曝露量(P50の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	88	0.02	0.01	0.21
体重当たり総推定曝露量(P95の曝露係数)	$\mu\text{g/kg/day}$	88	0.04	0.01	0.43

4.1.4. Mn

151名の調査参加者のうち、各媒体の濃度に欠測のない対象者は147名となった。その結果を図4.3.6と表4.3.4に示した。Mnの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値99.2%（平均99%）となり、ほとんどが食事由来となった。

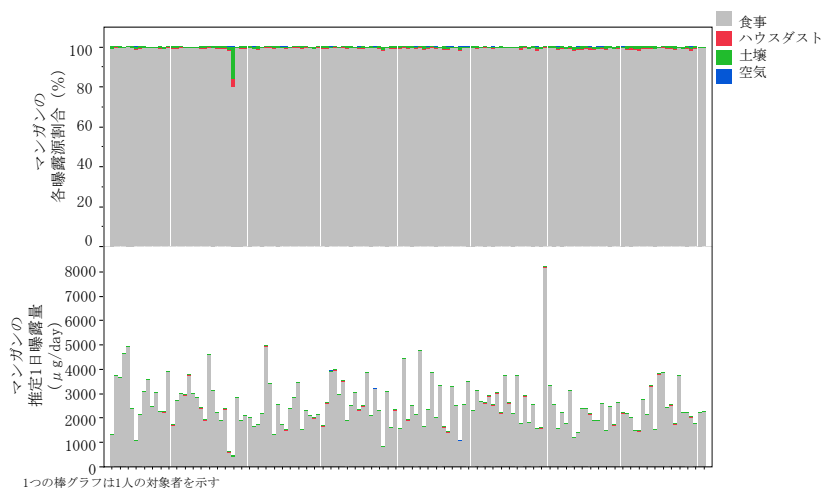


図4.3.6 Mnの推定曝露量（ $\mu\text{g/day}$, 下段）と曝露媒体ごとの占める割合（%, 上段）
灰色：食事、赤；ハウスダスト、緑：土壌、青：室内空気（浮遊粒子状物質）

4.1.5. Se

151名の調査参加者のうち、各媒体の濃度に欠測のない対象者は147名となった。その結果を図4.3.7と表4.3.5に示した。Seの推定曝露量のうち、食事由来が占める割合は中央値99.9%（平均99.9%）となり、ほとんどが食事由来となった。

表4. 3. 4 Mnの推定曝露量

Mnの推定曝露量	Unit	N	Median	P5	P95
食事	μ g/day	147	2349	1311	4239
ハウスダスト	μ g/day	147	4. 20	1. 51	11. 8
土壌	μ g/day	147	14. 2	7. 88	20. 0
室内空気	μ g/day	147	0. 04	0. 02	0. 21
総推定曝露量 (P50の曝露係数)	μ g/day	147	2368	1325	4257
総推定曝露量 (P95の曝露係数)	μ g/day	147	3937	2541	6459
体重当たり総推定曝露量 (P50の曝露係数)	μ g/kg/day	147	42. 8	23. 0	76. 7
体重当たり総推定曝露量 (P95の曝露係数)	μ g/kg/day	147	74. 1	40. 5	129

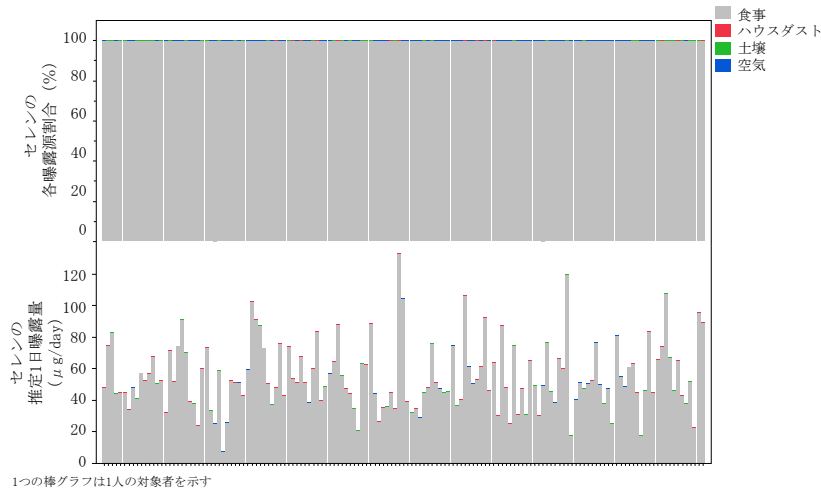


図4. 3. 7 Seの推定曝露量（μ g/day, 下段）と曝露媒体ごとの占める割合（%, 上段）
灰色：食事、赤；ハウスダスト、緑：土壌、青：室内空気（浮遊粒子状物質）

表4. 3. 5 Seの推定曝露量

Seの推定曝露量	Unit	N	Median	P5	P95
食事	μ g/day	147	50. 5	24. 9	94. 0
ハウスダスト	μ g/day	147	0. 011	0. 005	0. 026
土壌	μ g/day	147	0. 004	0. 002	0. 010
室内空気（浮遊粒子状物質）	μ g/day	147	0. 003	0. 001	0. 007
総推定曝露量 (P50の曝露係数)	μ g/day	147	50. 5	24. 9	94. 1
総推定曝露量 (P95の曝露係数)	μ g/day	147	85. 7	41. 3	172. 3
体重当たり総推定曝露量 (P50の曝露係数)	μ g/kg/day	147	0. 97	0. 37	1. 68
体重当たり総推定曝露量 (P95の曝露係数)	μ g/kg/day	147	1. 59	0. 67	3. 08

4. 1. 6. 推定曝露量の各指標との比較

本調査の曝露モデルから算出された推定曝露量と参照値として内閣府食品安全委員会の耐容摂取量および日本の食事摂取基準（2020年版）の目安量等との比較について、表4. 3. 6に示した。その結果、本

調査対象集団において、耐容摂取量および耐容上限量を超える対象者はいなかった。また、Mnの目安量（3.5mg/day）以上を摂取していたのは、推定曝露量の85パーセンタイル値以上の対象者（全体の15%）で、ほとんどの対象者は目安量以下であった。その一方で、Seの推奨量（25 μg/day）以上を摂取した対象者は、推定曝露量の5パーセンタイル値以上の対象者（全体の95%）で、ほとんどの対象者は、推奨量以上であった。

本調査では、食事と飲水が陰膳食事調査の試料として一緒に集められ、まとめて分析がなされた。そのため、食事に含まれる飲水からの各金属類曝露の寄与は、詳細な解析することが困難であった。しかしながら、食事調査票から算出された1日水量のデータを使用し、食事に占める飲水経由の曝露について推定し、計算した（表4.3.7）。原水とは、浄水していない水（主に水道水）を示し、飲水とは実際に飲んでいる水（浄水または水道水）を示す（浄水器等を設置していない場合は原水と同値）。実際には、原水は飲水していない場合もあるため、原水をそのまま飲んだと仮定して推定曝露量を算出した。各水中の金属類濃度に食事調査票より算出された1日水量を乗じて原水または飲水の推定曝露量を算出した。食事中に占める水（原水・飲水）曝露の割合は、次のように計算した。

$$\text{食事中に占める水（原水・飲水）曝露の割合（\%）} = \frac{\text{水（原水・飲水）の金属類濃度} \times \text{1日水量（食事調査票）}}{\text{食事中の金属濃度（実測）} \times \text{食事摂取量（実測）}}$$

食事中に占める水（原水・飲水）の推定曝露量および金属類曝露割合について、表4.3.7に示した。その結果、Mn、Se、Cdの水を介した曝露は、非常に小さい一方で、Pbは水を介した曝露が他の元素よりも大きいことが明らかとなった。また飲水からのPbの推定曝露量は原水より低く、浄水によりPb濃度が低減された結果を示していると考えられた。

表4.3.6 本調査の曝露モデルから算出された推定曝露量と各指標との比較

Unit	N	本研究			食品安全委員会の指標		食事摂取基準（2020年版） 女性30-49歳		
		Median	P95		耐容一日摂取量	耐容週間摂取量	目安量	推奨量	耐容上限量
Pb	μg/day	147	3.79	9.21					
	μg/kg/day	147	0.07	0.17	No data				
Cd	μg/day	147	10.2	26.4					
	μg/kg/day	147	0.2	0.5		7 μg/kg/week			
Hg	μg/day	88	1.13	12.0					
	μg/kg/day	88	0.02	0.21	IHg 0.7 μg/kg/day	MeHg 2.0 μg/kg/week			
Mn	μg/day	147	2368	4257			3.5mg/day		11mg/day
	μg/kg/day	147	42.8	76.7	0.18mg/kg/day				
Se	μg/day	147	50.5	94.1				25 μg/day	350 μg/day
	μg/kg/day	147	0.97	1.68	4.0 μg/kg/day				

曝露係数：食事摂取量は実測値、ハウスダスト、土壌及び室内空気はUS-EPA Exposure Hand bookの中央値・平均値を使用

表4.3.7 原水および飲水を介した1日推定曝露量と食事中に占める曝露量とその割合

	推定曝露量	Median	P5	P95
Pb	原水, $\mu\text{g/day}$	0.25	0.073	2.71
	飲水, $\mu\text{g/day}$	0.18	0.018	1.81
	食事中に占める原水曝露の割合, %	12.2	2.87	75.0
	食事中に占める飲水曝露の割合, %	7.53	0.75	64.52
Cd	原水, $\mu\text{g/day}$	0.01	0.002	0.026
	飲水, $\mu\text{g/day}$	0.008	0.001	0.029
	食事中に占める原水曝露の割合, %	0.09	0.02	0.33
	食事中に占める飲水曝露の割合, %	0.07	0.01	0.34
Mn	原水, $\mu\text{g/day}$	0.29	0.059	0.84
	飲水, $\mu\text{g/day}$	0.25	0.018	0.88
	食事中に占める原水曝露の割合, %	0.01	0.002	0.05
	食事中に占める飲水曝露の割合, %	0.01	0.0004	0.05
Se	原水, $\mu\text{g/day}$	0.09	0.03	0.16
	飲水, $\mu\text{g/day}$	0.085	0.013	0.16
	食事中に占める原水曝露の割合, %	0.16	0.05	0.48
	食事中に占める飲水曝露の割合, %	0.16	0.02	0.48

N=147、原水：浄水していない水（主に水道水）、飲水：実際に飲んでいる水（浄水または水道水）、浄水器を設置していない場合は原水と同値、各水中の金属類濃度に食事調査票より算出された1日水量を乗じて原水または飲水の推定曝露量を算出、食事中に占める飲水曝露源割合は、飲水の推定曝露量を食事の推定曝露量で除して算出。

4.2. 体内動態モデルの構築、シミュレーション

4.2.1. Hg

体内動態モデル構築に向け、特にHgについては既報論文のデータを活用し、暫定耐容摂取レベルでの母集団体内動態とシミュレーション解析を実施した。その結果、算出された血中半減期の中央値は、Hg59日、メチル水銀56日または54日となった（表4.3.8）。モデルの適格性評価のため、ブートストラップにより同モデルを1000回施行した場合もほぼ同様の結果が示された。これらの解析結果は国際学会で発表した。

表4.3.8 Hg及びメチル水銀の母集団体内動態解析結果

	Variable	Unit	Mean	Median	5th	95th
Crude: Log additive model of one compartment model						
Mercury (total)	Cl	L/week	22	21.4	17	32.1
	kel	week ⁻¹	0.082	0.082	0.079	0.085
	t _{1/2}	day	59.2	59.2	57.1	61.4
Methylmercury	Cl	L/week	50.1	48.5	33.9	82
	kel	week ⁻¹	0.087	0.087	0.087	0.087
	t _{1/2}	day	55.8	55.8	55.8	55.8
Subtraction of baseline mercury levels: Additive+Multicative model of one compartment model						
Mercury (total)	Cl	L/week	42	38	20.8	77.3
	kel	week ⁻¹	0.082	0.077	0.048	0.123
	t _{1/2}	day	59.2	63.0	39.4	101.1
Methylmercury	Cl	L/week	45.2	45.2	24.2	88.3
	kel	week ⁻¹	0.09	0.084	0.056	0.143
	t _{1/2}	day	53.9	57.8	33.9	86.6

4.2.2. その他の元素

3の2.2の方法に示す式を用いて検索した結果、Cdは254報の論文が該当したが、そのうち人を対象とし、体内動態を含み、かつ本研究に重要な論文は9報であった。Pbは384報の論文が検索されたが、その

うち人を対象とし、体内動態含む重要な論文2報のみであった。Seは459報の論文が検索されたが、そのうち体内動態含む重要な論文3報であった。Mnは259報論文中で、体内動態含む重要な論文4報であった。Cdは尿による体内動態モデルが主流、Seは血漿での報告（本研究は全血）、Mnは吸入曝露によるものが主であり、本調査データを活用するには十分ではなく、今後の課題となった。

4. 3. 血中金属類濃度の予測モデルの構築

4. 3. 1. 臍帯血金属濃度と母体血金属濃度との関係

既存の調査データ（東北コホート調査）を活用し、臍帯血金属類濃度と母体血金属類濃度との関係について検討した。本調査の対象5元素のうち、Mnについては分析されておらず解析は実施していない。臍帯血金属類濃度と母体血金属類濃度間のスピアマンの順位相関係数(ρ)を図4. 3. 8に示す。その結果、Hg及びメチルHgで強い相関がみられ、Pbについては中程度の相関となった。Seは弱い相関となり、Cdには相関はみられなかった。また、臍帯血金属類濃度と母体血濃度の比をとった結果、中央値でメチルHg1.8倍、Se 1.1倍、Pb0.9倍、Cd0.7倍となった。これらの係数を活用し、母体血金属類濃度から臍帯血金属類濃度を一定程度予測することも可能と考えられた。さらに、目的変数に臍帯血金属類濃度、説明変数に母体血金属濃度、FFQなどの食事調査、基本属性などを投入し、ステップワイズ法により、最小BICとなるように変数を選択し、重回帰分析を実施した（ $N=540$ ）。その結果、臍帯血Hgの予測因子として、母体血中Hg濃度、母体血中Pb濃度及び出産回数との関連が見られた（ $R^2=0.618, P<0.001$ ）。臍帯血Pbの予測因子として、母体血中Pb濃度、母体血中Pb濃度ビタミンB6摂取量および水分摂取量との関連が見られた（ $R^2=0.192, P<0.001$ ）。しかしながら、Pbの決定係数は高いとはいえず、またCdはモデルを構築できなかったことから、エコチル調査のデータを活用したさらなる検討が必要と考えられた。

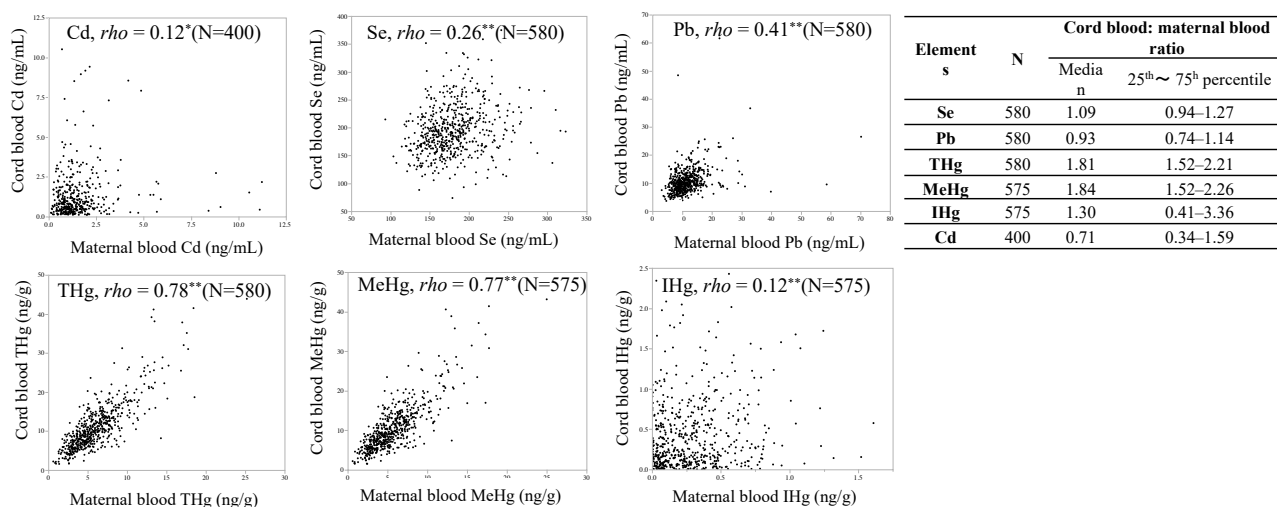


図4. 3. 8 臍帯血金属類濃度と母体血金属類濃度との関係

スピアマンの順位相関係数(ρ)を示す。THg: total mercury, MeHg: Methylmercury, IHg: Inorganic mercury, Se: Selenium. 成果論文より Iwai-Shimada et al. (2019), Environ. Health Prev. Med. 24 (35)

4. 3. 2. 小児血中POPs濃度の予測モデル（モントリオール大学との連携）

サブテーマ1の研究グループが有する既存データ（東北コホート調査）を活用し、母乳中DDTs濃度および授乳期間の回答に欠測のない290名について小児血中DDTs濃度の予測を実施した。p, p'-DDTおよびp, p'-DDE濃度は、生後1か月に収集した母乳で分析し、p, p'-DDTおよびp, p'-DDE濃度は全ての対象者で検出下限値以上であった。モントリオール大学が開発した体内動態モデルを活用して、3つの期間（0～6か月、6～12か月、12～24か月）の子ども血中DDTs濃度を推定した（表4. 3. 9）。この国際共同研究により、ある一時点のp, p'-DDTおよびp, p'-DDE濃度データを活用して、およそ24ヶ月後までの子どもの血中濃度

を予測することができ、分析コストや対象者負担の軽減も含め予測モデルの有用性が示唆された。

表4.3.9 母乳中 p, p' -DDTおよび p, p' -DDE濃度 (ng/g-lipid) から子どもの血中濃度予測 (生後0ヶ月から24ヶ月, N = 290)

Chemical	Min	P25	P50	P75	Max
p, p' -DDT					
Breast milk	1.4	4.4	6.3	8.6	34.5
Child 0-6 months	2.4	7.8	10.9	15.4	62.5
Child 6-12 months	3.0	10.7	14.6	21.7	98.9
Child 12-24 months	2.4	10.2	14.8	21.7	110.6
p, p' -DDE					
Breast milk	24.7	86.7	138.5	194.1	658.3
Child 0-6 months	44.4	156.1	247.4	357.5	1228.1
Child 6-12 months	46.4	216.5	349.3	513.3	1934.9
Child 12-24 months	48.0	222.9	370.3	551.6	2261.4

P:percentile, 成果論文: Environ. Health, 19:49 (2020)

4.3.3. 過去の血中金属類濃度から現在の血中金属濃度を予測するモデルの構築

過去の血中金属類濃度から現在の血中金属類濃度に対する予測モデルの構築を目指した。本調査では妊娠中期・後期の金属類濃度、現在の金属類濃度、金属類の推定曝露量、住環境、生活習慣等の基本属性など様々なデータが集められおり、これらのデータを活用した。妊娠時採血から本調査の採血まで年数 (SD) として平均5.6 (1.0) 年経過しているにも関わらず、同じ金属間の血中濃度には比較的強い関連がみられた。作成した血中濃度予測式を以下に示す。本予測式を構築するにあたり、現在の血中金属類濃度を目的変数とし、各媒体の推定曝露量 ($\mu\text{g/day}$)、各媒体の体重1kg当たり推定曝露量 ($\mu\text{g/kg/day}$)、年齢、調査時体重 (kg)、調査時身長 (cm)、BMI、喫煙習慣、受動喫煙、飲酒習慣、就業状況、毛髪への美容的处理、調査月 (1-12月)、子どもの性別、出産形態、教育歴、世帯収入、食事質問票データ、妊娠中末期の金属類濃度に対して、それぞれ単変量解析を実施した。単変量解析で関連が見られた変数を用いて、現在の金属濃度を予測する式の構築を進めた (N=128)。図4.3.9では、構築したモデル式から算出された血中金属類濃度の予測値 (Y) と現在血中金属濃度の実測値 (x) をプロットした。その結果、各金属間のスピアマンの相関係数は、Pb 0.756、Se 0.519、Mn 0.765、Cd 0.893およびHg 0.520となった。Hgの予測値は、実測値に対して過小評価、Seについて高濃度予測が十分ではなかったものの、一定程度の予測が可能であった。Pb、MnおよびCdについては予測値と実測値は比較的類似しており、特にCdについては、環境調査のデータを使用せずに予測できることから応用性の高いモデルが構築された。以上の結果は、ある一時点の血中金属類濃度から5-6年先の血中金属類濃度を予測できる可能性を示唆するものと考えられた。

予測回帰式 Pb:

$$\log(\text{current blood Pb level}) = a_1 \log(\text{blood Pb level during pregnancy}) + a_2 \text{food intake} (\mu\text{g/kg/day}) + a_3 \text{height (cm)} + a_4 \text{smoke} + a_5 \text{occupation} + a_5 \text{perm} + a_6 \text{month of sampling} + a_6 \text{delivery style} + \text{Intercept}$$

Multiple R-squared: 0.5291, Adjusted R-squared: 0.4304 (P<0.01)

予測回帰式 Cd:

$$\log(\text{current blood Cd level}) = a_1 \log(\text{blood Cd level during pregnancy}) + a_2 \text{age} + a_3 \text{smoke} + a_4 \text{height} + a_5 \text{occupation} + a_6 \text{income} + \text{Intercept}$$

Multiple R-squared: 0.7989, Adjusted R-squared: 0.7836 (P<0.01)

予測回帰式 Hg:

$$\log(\text{current blood Hg level}) = a_1 \log(\text{blood Hg level during pregnancy}) + a_2 \text{food intake} (\mu\text{g/kg/day}) + a_3 \text{age} + a_4 \text{occupation} + \text{Intercept}$$

Multiple R-squared: 0.3334, Adjusted R-squared: 0.306 (P<0.01)

予測回帰式 Mn:

$$\log(\text{current blood Mn level}) = a_1 \log(\text{blood Mn level during pregnancy}) + a_2 \text{food intake} (\mu\text{g/kg/day}) + a_3 \text{age} + a_4 \text{passive smoke} + a_5 \text{alcohol} + a_6 \text{perm} + a_7 \text{month of sampling} + a_8 \text{income} + a_{19} \text{b12} + \text{Intercept}$$

Multiple R-squared: 0.5919, Adjusted R-squared: 0.5017 (P<0.01)

予測回帰式 Se:

$$\log(\text{current blood Se level}) = a_1 \log(\text{blood Se level during pregnancy}) + a_2 \text{soil intake} (\mu\text{g/kg/day}) + a_3 \text{age} + a_4 \text{BMI} + a_5 \text{occupation} + a_6 \text{income} + \text{Intercept}$$

Multiple R-squared: 0.2916, Adjusted R-squared: 0.2311 (P<0.01)

変数名

Current blood:現在の血中金属濃度、Blood level during pregnancy:妊娠中末期血中金属濃度、food intake: 体重1kg当たり推定曝露量(食事由来)、soil intake: 体重1kg当たり推定曝露量(土壌由来)、passive smoke: 受動喫煙、alcohol: 飲酒習慣、perm: 毛髪への美容的処理、month of sampling: 調査月、income: 収入、b12: ビタミンB₁₂摂取量、age: 年齢、BMI: Body mass index、occupation: 職業、height: 身長、 $a_1 \sim a_6$: 各回帰係数

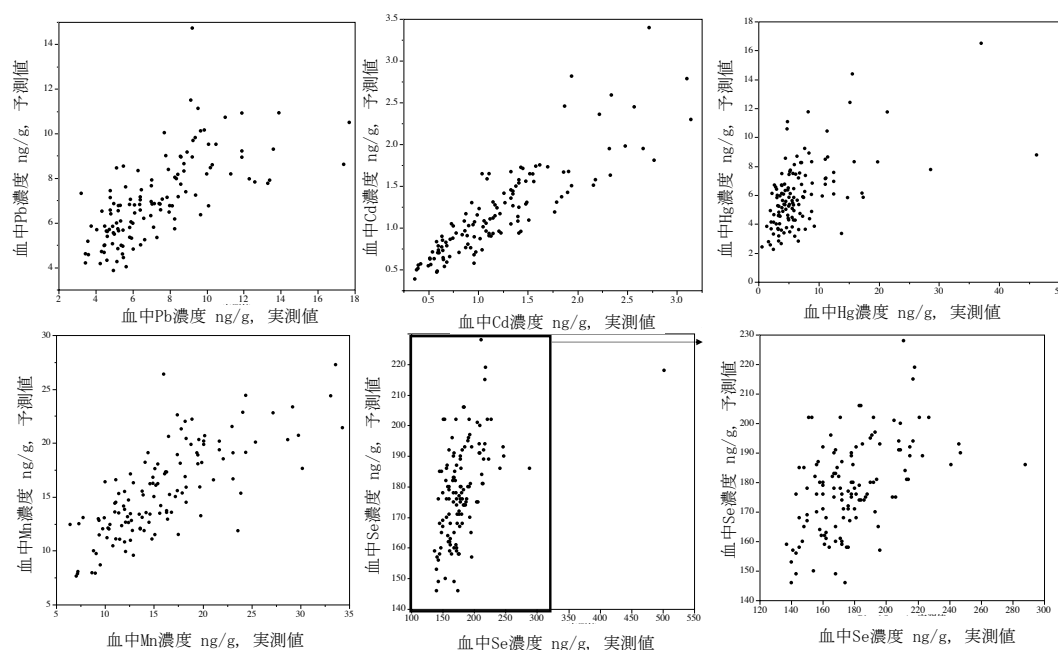


図4.3.9 モデル式から算出された血中金属類濃度の予測値(Y軸)と現在の血中金属濃度実測値(X軸)
縦軸: 構築したモデルから算出された予測値、横軸: 実測値

4.3.4. 目標に対する到達度

サブテーマ3では、サブテーマ1および2で得られた成果を活用し、曝露、体内動態に関するモデルを構築し、その検証を目指した。検討対象として、すでに研究グループ内でデータを有している難分解性有機汚染物質(POPs)の小児曝露に加え、重点課題として取り組む数理モデルとして、重金属による母親の曝露モデル、体内動態及び血中濃度予測モデル等の構築を目指した。目標に対する到達度を表

6.3.1に示した。曝露モデルはすべての金属類について構築し、Pbの推定曝露量についてはシミュレーションも実施した。体内動態についてHgについて独自の体内動態モデルを構築した。血中濃度予測モデルについては、すべての物質で構築を進め、特にCdとDDTsに関して良いモデルが構築された。

表4.3.10 目標への達成度

	曝露モデル	体内動態モデル	臍帯血予測モデル	将来濃度予測モデル	サブテーマ
Pb	◎	—	△	○	1と連携
Cd	◎	△	—	◎	
Hg	◎	◎	○	△	
Mn	◎	△	—	○	
Se	◎	△	—	△	
Mn	◎	△	—	○	
POPs (DDTs)	NA	NA	NA	◎	
有機リン系農薬	NA	特徴的なバイオマーカーの新知見	NA	NA	2と連携

◎：目標に到達、○：概ね目標に到達、△：さらなる研究が必要、—：実施できない又は構築できず、NA：実施せず

4.4. 副次的な成果

4.4.1. 尿中有機リン系農薬代謝物のメタボロミクスデータのランダムフォレスト解析（サブテーマ2との連携）

サブテーマ1で保有する有機リン系農薬代謝物濃度が既知の尿試料を用いて、サブテーマ2へ尿試料の供与が進められ、尿中有機リン系農薬代謝物（DAP）の網羅的解析が測定が行われた。サブテーマ3では、サブテーマ2よりメタボロミクスデータを受領し、ランダムフォレスト解析（機械学習）を行った。その結果、高値群と低値群を区別する精密質量ピークを発見した。当該ピークを構成する化合物は現有のデータベースに該当するものがなく未知の物質であり、現在同定作業を進めているところであるが、有機リン系農薬曝露に関する新たなバイオマーカーになる可能性を秘めていると示唆された。本結果は、曝露マーカーとして、化学物質そのものに加え、メタボロミクスの結果も利用可能なことを示しており、曝露しなりを構築ことに加え、バイオマーカーによっては新たな影響メカニズムへの進展も期待できる知見となった。

表4.3.11 小児血中DDTs濃度と小児BMIとの関連

	Model 1 ^a				Model 2 ^b			
	p, p' -DDT		p, p' -DDE		p, p' -DDT		p, p' -DDE	
	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p
Children's area under the concentration vs. time curve (AUC) (0-6 months)								
All	-0.02 (-0.21, 0.17)	0.847	0.09 (-0.07, 0.25)	0.252	-0.03 (-0.21, 0.16)	0.790	0.09 (-0.07, 0.25)	0.276
Girls ^c	0.15 (-0.10, 0.40)	0.248	0.23 (0.01, 0.45)	0.044	0.13 (-0.12, 0.38)	0.313	0.23 (0.01, 0.46)	0.042
Boys ^c	-0.19 (-0.47, 0.09)	0.174	-0.02 (-0.24, 0.20)	0.870	-0.21 (-0.49, 0.07)	0.138	-0.05 (-0.28, 0.18)	0.668
Children's area under the concentration vs. time curve (AUC) (6-12 months)								
All	0.05 (-0.12, 0.23)	0.547	0.14 (-0.01, 0.29)	0.075	0.06 (-0.11, 0.24)	0.480	0.15 (-0.01, 0.30)	0.060
Girls ^c	0.21 (-0.02, 0.47)	0.069	0.26 (0.06, 0.47)	0.011	0.19 (-0.05, 0.43)	0.113	0.28 (0.06, 0.49)	0.012
Boys ^c	-0.12 (-0.38, 0.14)	0.377	0.02 (-0.21, 0.24)	0.871	-0.10 (-0.37, 0.17)	0.454	0.01 (-0.21, 0.24)	0.904
Children's area under the concentration vs. time curve (AUC) (12-24 months)								
All	0.06 (-0.10, 0.22)	0.474	0.14 (-0.01, 0.28)	0.067	0.09 (-0.08, 0.26)	0.309	0.16 (0.01, 0.32)	0.034
Girls ^c	0.19 (-0.02, 0.39)	0.070	0.24 (0.05, 0.43)	0.012	0.19 (-0.04, 0.42)	0.101	0.27 (0.06, 0.48)	0.010
Boys ^c	-0.09 (-0.34, 0.15)	0.458	0.03 (-0.19, 0.25)	0.810	-0.05 (-0.31, 0.21)	0.688	0.04 (-0.18, 0.27)	0.702

^aAdjusted for pre-pregnancy BMI

^bAdjusted for pre-pregnancy BMI, weight gain during pregnancy, fish intake (g/year), and total breastfeeding duration

^cGirls (n=134); boys (n=156)

4. 4. 2. 母乳中DDTs濃度から推定された小児血中DDTs濃度と小児BMIとの関連（サブテーマ1およびモントリオール大学と国際連携）

既に述べたように、モントリオール大学との連携により、ある1時点の母乳中DDTs濃度から小児血中DDTs濃度の推定を行ったが、その推定された小児血中DDTs濃度と小児BMIとの関連について解析をさらに追加した(表4. 3. 11)。その結果、推定された小児血中 p,p' -DDE濃度と実測した小児BMIの間に女兒で正の関連性が観察された。小児のPOPs体内負荷量を把握するには採血が必須となるが、侵襲性が大きく実施も容易ではない。小児血中POPs濃度の予測モデルの有効性を示唆する結果であるかもしれない、再現性確認を含め、さらなる検証を進める予定である。成果についてはEnviron Health, 19:49 (2020)にて公表済みである。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

今回調査された5つの元素は小児の環境保健分野において、低濃度であっても小児への健康影響が指摘されるなど重要な元素である。公害や職業曝露といった高濃度曝露ではない、一般生活環境における低濃度の金属曝露メカニズムに関して、これまで十分な知見がなかった。今後、エコチル調査において、これら元素と健康影響に関して多数の論文発表がなされると期待されるが、その際、本調査結果は曝露源および曝露経路の推定に加え、管理モデルの構築の上でも重要な意義を持つ。特にPbについては、曝露源の多様さと小児に対する影響の閾値が定まっていなかったため、リスク管理が極めて難しい元素である。本調査を通して、どの元素も食事由来の寄与が大きいこと、一部の元素は飲水管理により曝露を下げられる可能性があること、そしてより長期的に曝露を軽減する取り組みが必要であることが明らかとなった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究成果である曝露モデルの試算結果（サブテーマ3）を内閣府食品安全委員会に提供し、安全基準値策定の検討に貢献した。特にPbについては、曝露源の多様さと小児に対する影響の閾値が定まっていなかったため、リスク管理が極めて難しい元素であり、Pbの推定曝露量や曝露源について本調査結果が参考とされた。

<行政が活用することが見込まれる成果>

今回調査された5つの元素は小児の環境保健分野において、低濃度であっても小児への健康影響が指摘されるなど重要な元素であり、一般生活における低濃度の金属曝露メカニズムに関して、これまで十分な知見がなかった。行政が活用することが見込まれる成果として、一般生活における低濃度の金属曝露メカニズムに関して、ヒトへの健康影響の視点から曝露レベルを把握し、その上での各種媒体の環境基準（土壌基準値等）の策定にいかされる可能性や、内閣府食品安全委員会での安全基準値策定の際にこれら試算結果が活用される可能性、国際的なバイオモニタリング事業、水俣条約への貢献等が考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

体内動態モデル構築に関し、モントリオール大学(Université de Montréal)、Verner Marc-André・Department of Occupational and Environmental Health・カナダとの連携を実施し、本研究で得られた成果に基づいて論文報告をすでに行うなど成果が得られた。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) C. MA, M. IWAI-SHIMADA, N. TATSUTA, K. NAKAI, T. ISOBE, M. TAKAGI, Y. NISHIHAMA, and S.F. NAKAYAMA: Int. J. Environ. Res. Public Health, 17 (7), 2231 (2020) Health Risk Assessment and Source Apportionment of Mercury, Lead, Cadmium, Selenium, and Manganese in Japanese Women: An Adjunct Study to the Japan Environment and Children's Study.
- 2) L. PLOUFFE, D. BOSSON-RIEUTORT, L. MADANIYAZI, M. IWAI-SHIMADA, K. NAKAI, N. TATSUTA, S.F. NAKAYAMA, and M.A. VERNER: Environmental Health (2020) Estimated postnatal p,p' - DDT and p,p' -DDE levels and body mass index at 42 months of age in a longitudinal study of Japanese children (in press).

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) L. PLOUFFE, M. IWAI-SHIMADA, S.F. NAKAYAMA, K. NAKAI, M.A. VERNER: Society of Toxicology, USA (2018). "Estimating children's postnatal exposure to DDT and DDE using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model."
- 2) 西浜柚季子, 龍田希, 岩井美幸, 磯部友彦, 藤原幾磨, 有馬隆博, 中山祥嗣, 和泉孝志, 仲井邦彦: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「一般家庭における重金属曝露メカニズムの解明-調査プロトコルについて。」
- 3) 岩井美幸, 龍田希, 仲井邦彦, 中山祥嗣: 第88回日本衛生学会学術総会 (2018) 「妊娠期及び乳児期の化学物質曝露とその低減」
- 4) 仲井邦彦, 龍田希, 岩井美幸, 磯部友彦, 西浜柚季子, 中山祥嗣, 和泉孝志, 大日方英, 大嶋紀安, ハレツキスロマナス: 第28回環境化学討論会(2019) 「家庭環境内における重金属類曝露シナリオの解明-調査方法の検討」
- 5) 仲井邦彦, 龍田希, 岩井美幸, 西浜柚季子, 中山祥嗣: 第78回日本公衆衛生学会総会 (2019) 「家庭環境内における重金属類曝露調査-調査方法および中間報告」
- 6) 岩井美幸, 柳沼梢, MA CHAOCHEN, 龍田希, 仲井邦彦, 中山祥嗣: 第46回日本毒性学会学術年会 (2019) 「暫定耐容摂取レベルのメチル水銀に関する母集団体内動態解析」
- 7) 岩井美幸, MA CHAOCHEN, 龍田希, 仲井邦彦, 磯部友彦, 高木麻衣, 中山祥嗣: 第90回日本衛生学会学術総会 (2020) 「Potential health risks from exposure to 5 elements via multiple pathways among women: evidence from Miyagi prefecture, Japan.」
- 8) M. IWAI-SHIMADA, K. YAGINUMA-SAKURAI, N. TATSUTA, K. NAKAI, S.F. NAKAYAMA: Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting and ToxExpo (2020) "A Population Toxicokinetic Modelling of Mercury and Methylmercury in Human"

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

2018年に開催された内閣府食品安全委員会主催の一般市民を対象とした講演会にて「水銀等の重金属のばく露状況とその関係性:国内外での研究事例を含めて」という内容にて発表をした（講演者 岩井美幸）。また、国立環境研究所で実施される夏の一般公開の機会を利用して、研究内容について紹介するポスター掲示等を行った。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) US-EPA, Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final Report),
<https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=236252>
- 2) K. YAGUNUMA-SAKURAI, et al., J Toxicol Sci. 2012 Feb;37(1):123-30.

III. 英文Abstract

Mechanism Elucidation and Risk Management Modeling of Combined Exposure to Chemicals in Children

Principal Investigator: Kunihiro NAKAI

Institution: Tohoku University Graduate School of Medicine
 2-1 Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, JAPAN
 Tel: +81-22-717-8950 / Fax: +81-20-4623-5681
 E-mail: nakaik@med.tohoku.ac.jp

Cooperated by: Gunma University Graduate School of Medicine
 National Institute for Environmental Studies

[Abstract]

Key Words: Home environment, Heavy metals, Risk management, Exposure scenario, Exposure model, Lead contamination, Comprehensive simultaneous analysis

Several adverse effects have been reported due to exposures to lower levels of heavy metals during low prenatal or infancy period. To elucidate the exposure mechanisms of heavy metals in home environment and to establish the management model, a home environment study was conducted to clarify the exposure sources and exposure routes of Pb, Cd, Mn, Se, and Hg with the participation of women of childbearing age. As environmental samples, food (duplicate diet), water, air (indoor suspended particulate matters), house dust, and garden soil were collected and subjected to chemical analysis. The results showed that a simple correlation was found between Pb in food and water and blood Pb. Blood Cd was shown to be associated with smoking or second-hand smoke exposure. Then, an exposure model was constructed using the exposure coefficients of intakes for food, water, house dust, and soil and lung ventilation. Most sources of exposure to Cd, Mn, Se, and Hg were considered to be dietary, but Pb was estimated to be dietary 64%, soil 13%, house dust 19%, and air 5%. These findings suggested that all elements contributed greatly from diet, and Pb could be reduced in exposure by drinking water control. Although the source of Hg exposure is considered to be fish intake, it was also shown that the low awareness of the hazard and cautions issued by the government are outside the scope of exposure reduction.

In constructing a management model, an exposure scenario targeting various chemical substances is expected, and, therefore, the potentials of comprehensive simultaneous analysis approaches were examined. First, we examined whether pesticide metabolites can be identified by instrumental determination for comprehensive analysis with urine samples whose concentrations of pesticide metabolites were determined already with specific determination method. The comprehensive analysis was shown to perform qualitative assessments, and also provided additional information related to

exposure scenario such as exposure sources other than various pesticide metabolites. Additional machine learning (random forest) analysis could distinguished the highly-exposed group and the lower-exposed group. Furthermore, the comprehensive analysis was conducted to urine samples whose concentrations of heavy metals were determined, and found multiple markers related to tRNA metabolism in relation to the exposure to heavy metals at lower concentrations. These findings indicated that comprehensive analysis approach is a promising strategy to find new biomarkers that cannot be obtained by conventional approach, suggesting that it may be very useful in constructing exposure scenarios and impact scenarios on human health.