

[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

平成29～令和元年度 環境研究総合推進費

サブテーマ 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

仲井邦彦、有馬隆博、藤原幾磨、龍田 希（東北大学）

サブテーマ 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

和泉孝志、大日方英、大嶋紀安、ハレツキス ロマナス（群馬大学）

サブテーマ 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

中山祥嗣、岩井美幸（国立環境研）

本研究の目的

サブテーマ 1 小児の重金属曝露メカニズム解明

- A) 家庭環境調査による重金属の曝露源・曝露経路の解明（140件）
- B) メチル水銀に関する認知度調査（300件）

サブテーマ 2 網羅的一斉分析による化学物質曝露の包括的解析

- 有機リン系農薬代謝物および関連バイオマーカーの網羅的解析
- 鉛曝露と関連する尿中バイオマーカーの網羅的解析

サブテーマ 3 小児化学物質曝露の数理モデル提案

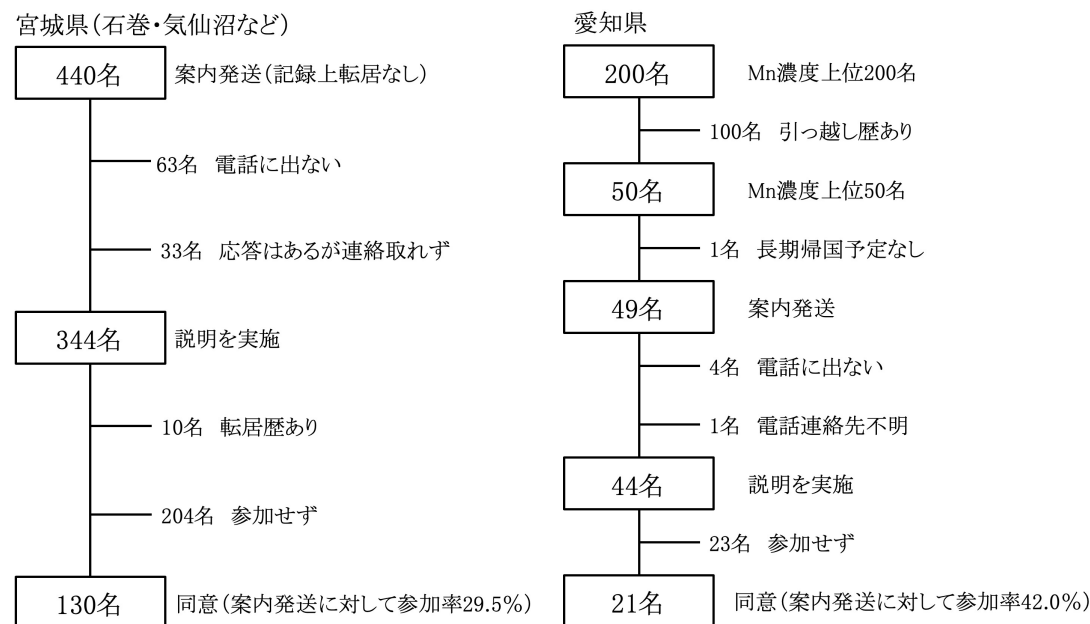
- 重金属類の曝露モデルの確立と摂取量の推定
- 曝露関連バイオマーカーに関するモデル提案

サブテーマ1：家庭環境調査の実施と試料の採取方法

✓ 家庭環境調査を151名の協力をえて実施した。同意率は30.8%であった。

✓ 家庭環境調査にて以下の試料を収集した。

- ・末梢血採血
- ・尿（2年目より）
- ・食事（3日分、陰膳）
- ・水道水（浄水やウオーターサーバーも収集）
- ・ハウスダスト
- ・屋内空気（7日間、浮遊粒子状物質）
- ・庭土
- ・屋内蒸気水銀（1日間連続）



試料

採取で参考としたガイドラインなど

食事（陰膳）

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（庭土）

底質調査方法（平成24年8月）

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

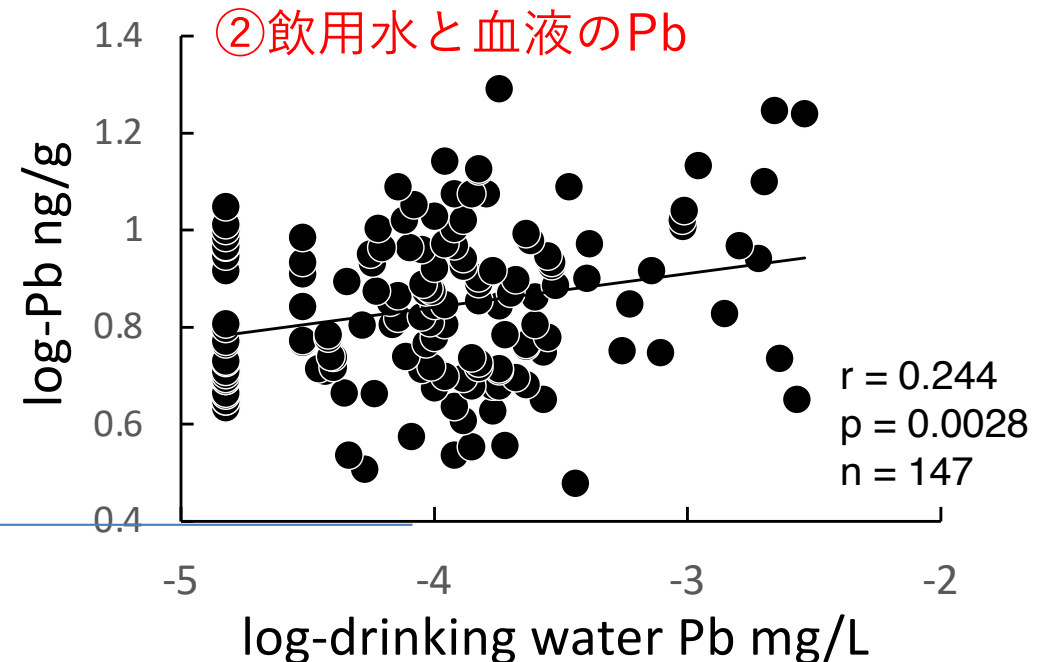
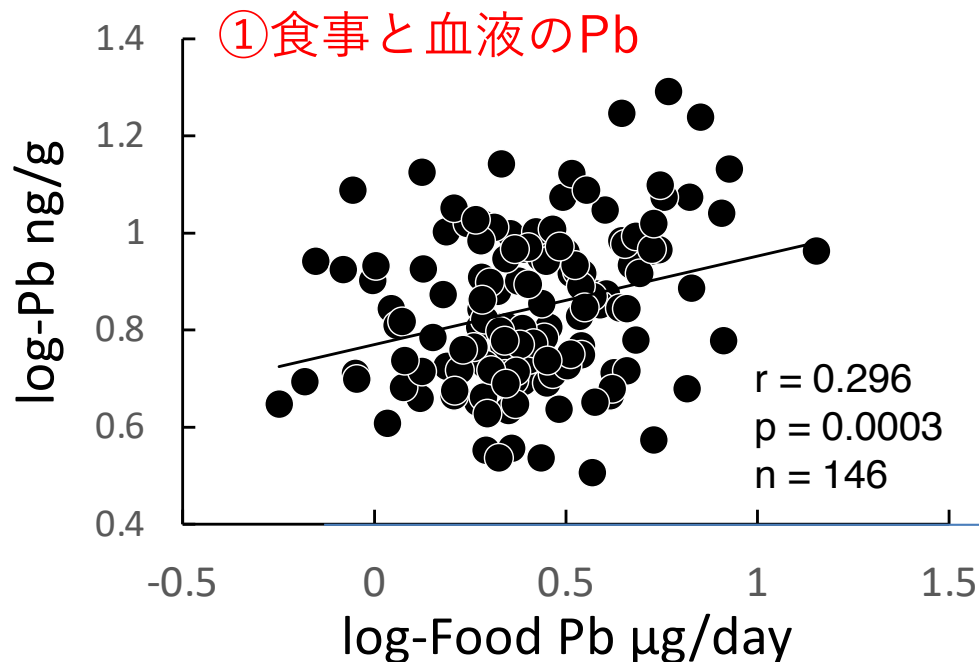


SIBATA ミニポンプMP-Σ300NII
を2台設置し、1週間・24時間の
間欠採取（5分吸引・30分休止）、
1.5 L/min吸引により4320Lを吸引

血中金属濃度と環境試料との相関

	Pb	Cd	Mn	Se	Hg
尿	0.507	0.544	0.088	0.401	0.702
食事（陰膳）	① 0.296	0.053	0.092	0.051	0.204
調理水	0.230	0.120	-0.350	-0.060	-
飲用水	② 0.244	0.056	-0.123	-0.132	-
空気（浮遊粒子状物質）	0.077	0.028	-0.112	0.094	-0.086
ハウスダスト	0.079	0.045	-0.025	0.023	0.086
土壌（庭土）	0.045	0.149	-0.149	0.168	0.122

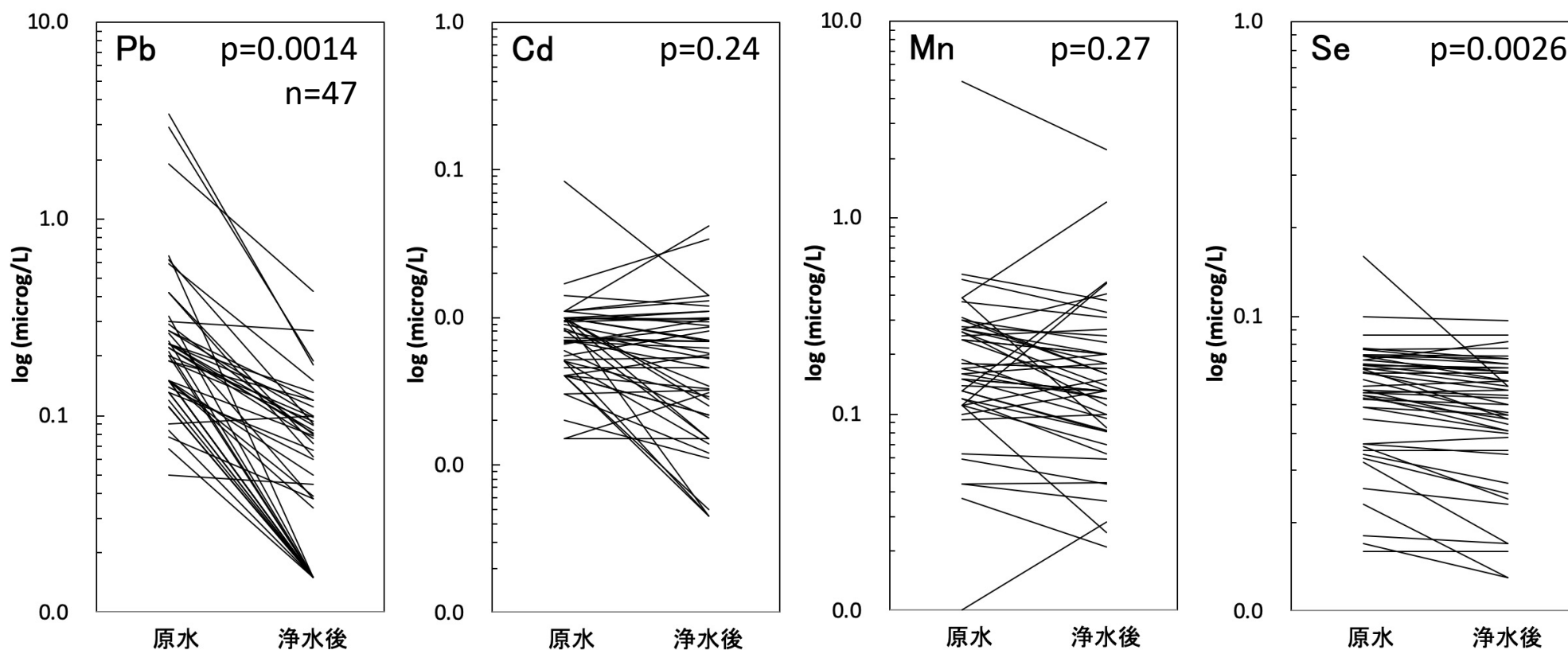
n=81~148、上水中に水銀はいずれの検体でも検出下限値未満であった。



→ 以後の曝露モデルでの検証はサブテーマ3と連携で実施した。

浄水器装着による重金属除去の効果

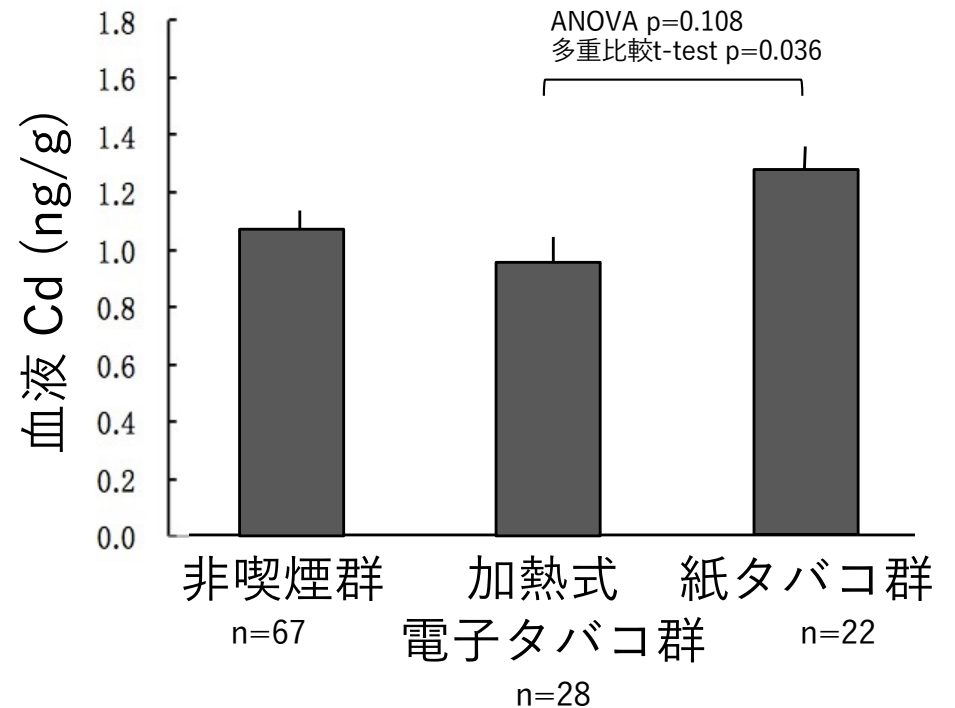
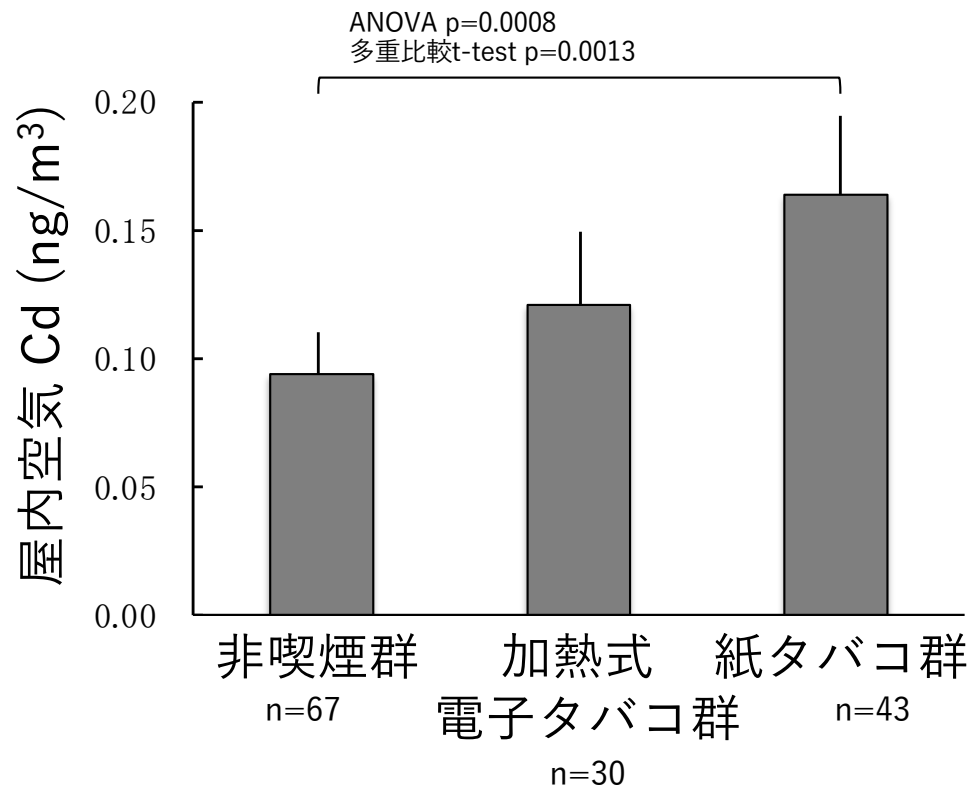
- ✓ 水道水に浄水器を利用していた47件について、原水と浄水後の元素濃度を比較し、Pb除去の効果が観察された。
- ✓ Se除去能も確認されたが、CdおよびMnの除去能は観察されなかった。



浄水器の銘柄・型番についてわかる範囲で聞き取っているが、装着履歴などは聞いていない（除去能が飽和している可能性は否定できない）。

喫煙とCd曝露

- ✓ 喫煙の主流煙および副流煙にCdが含まれていることが知られている。家族内に喫煙者または加熱式電子タバコ利用者がいるかで解析を実施した。
- ✓ 屋内空気（浮遊粒子状物質）のCdは、紙巻きタバコ喫煙者がいる家庭で増加した。
- ✓ 血中Cd濃度との関連性について、自身が喫煙の場合は除外し比較した。紙巻きタバコ喫煙群に比較し、加熱式電子タバコ群で低くなった。



家庭内の喫煙者の有無による分類

加熱式電子タバコ利用者と紙巻きタバコ喫煙者が共存の場合、紙巻きタバコ群とした。完全分煙は非曝露群とした。

課題B メチル水銀に関する認知度の調査

背景 曝露源と曝露経路は明らかと考えられ、厚生労働省からも「妊婦への魚介類の摂取と水銀に関する注意事項」が発表されている。

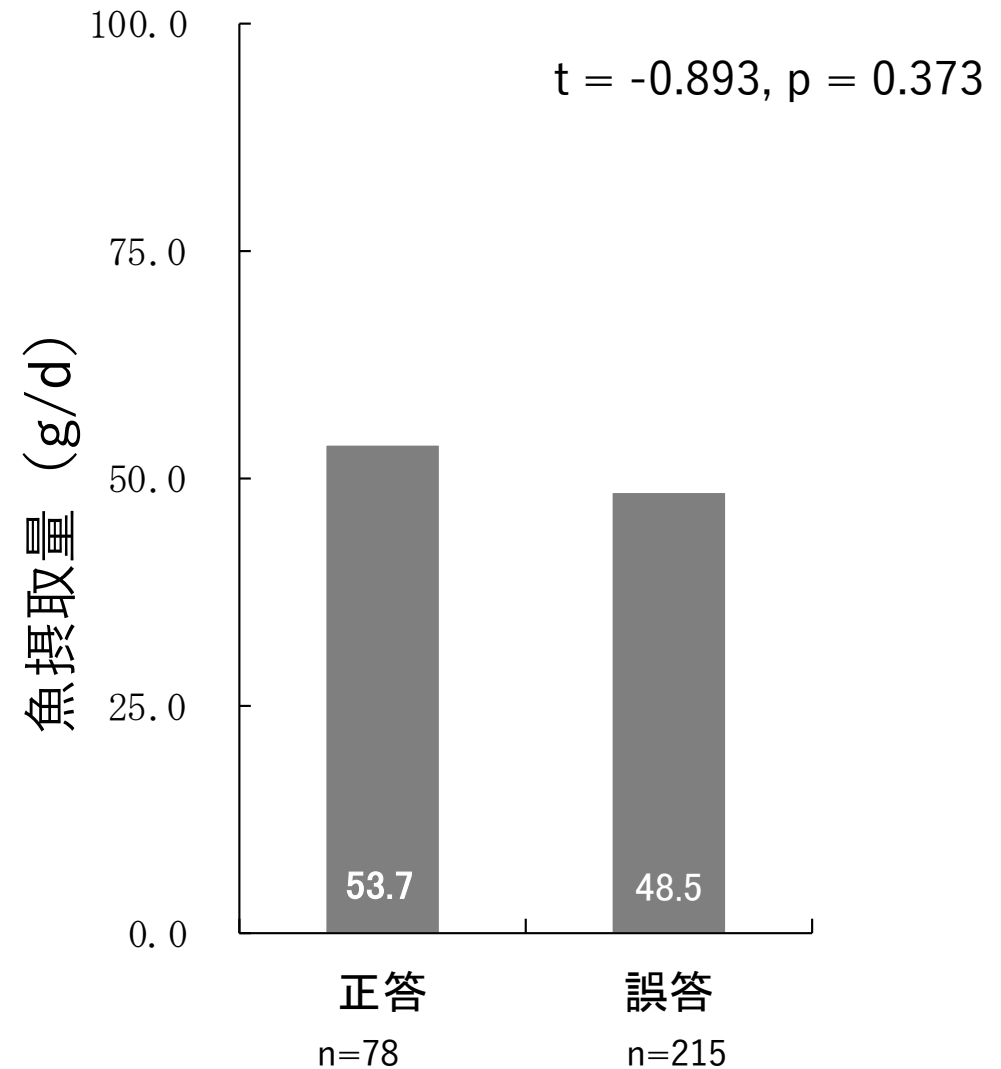
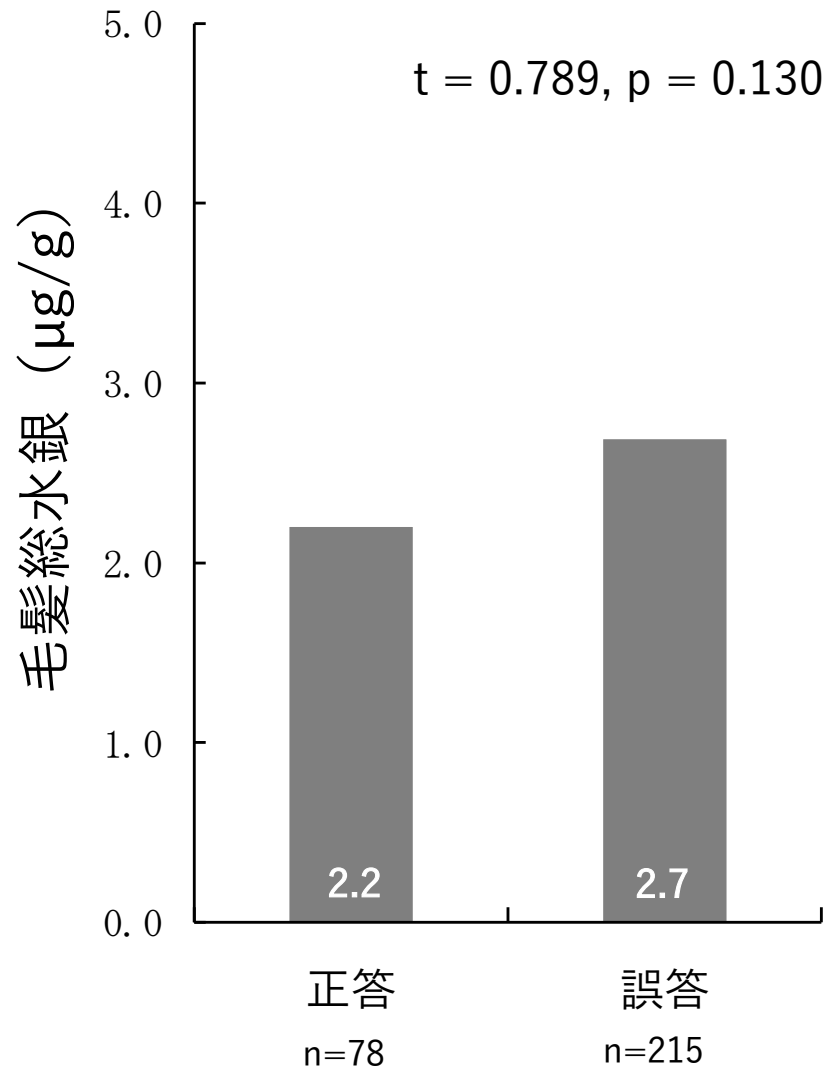
目的 Hgレベルが高い要因として、メチル水銀に関する知識が活用されていないと考えられ、曝露源や厚生労働省の注意事項に関する認知度の調査を行った。

方法 質問票調査と毛髪水銀値の測定を294名で実施した。

1. 食事歴法質問票（BDHQ）
2. 魚介類の種類に関する独自調査票（準備済み）
3. メチル水銀を含む重金属に関する認知度調査（準備済み）
4. 以下の要因を調整：年齢、教育歴、自身の出生順位、出産歴、居住地、喫煙・飲酒習慣、収入、毛髪水銀濃度など

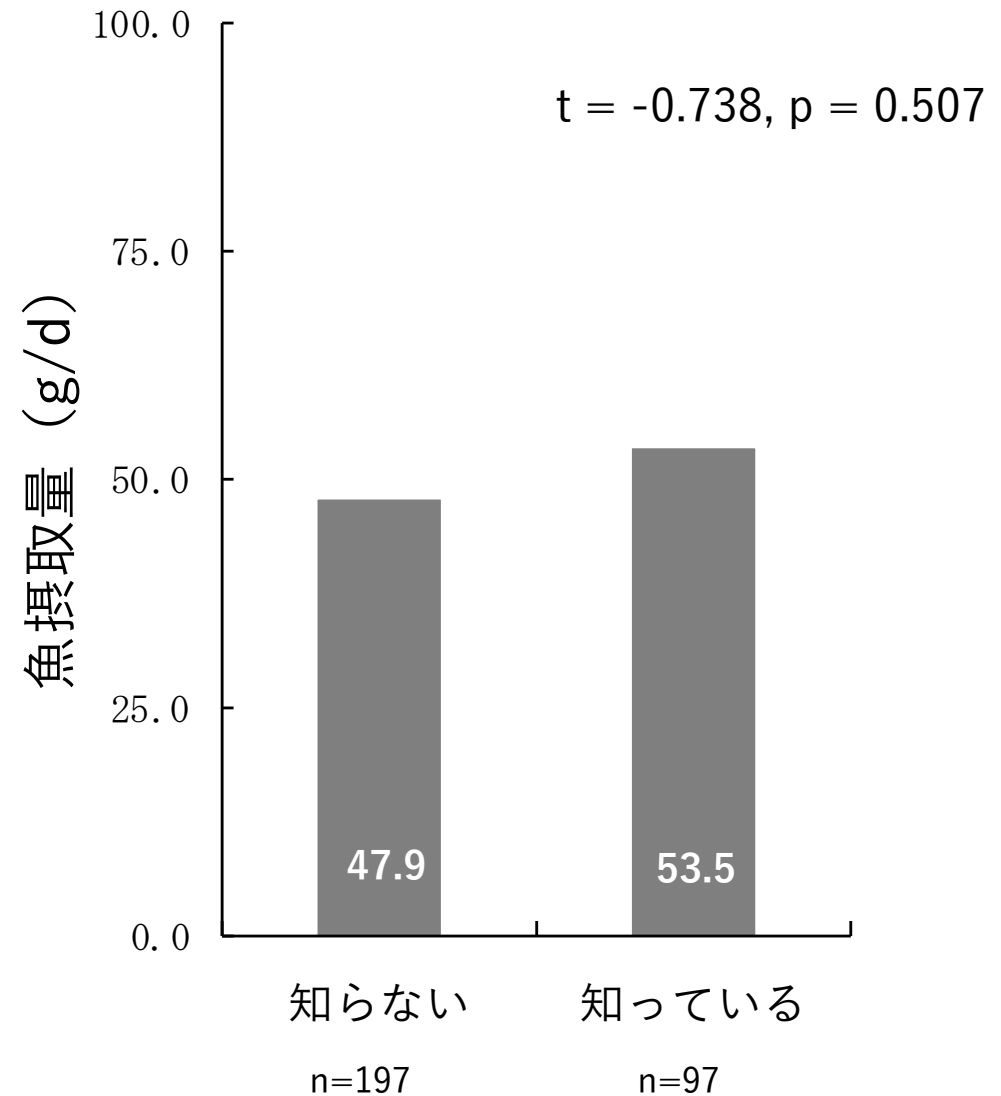
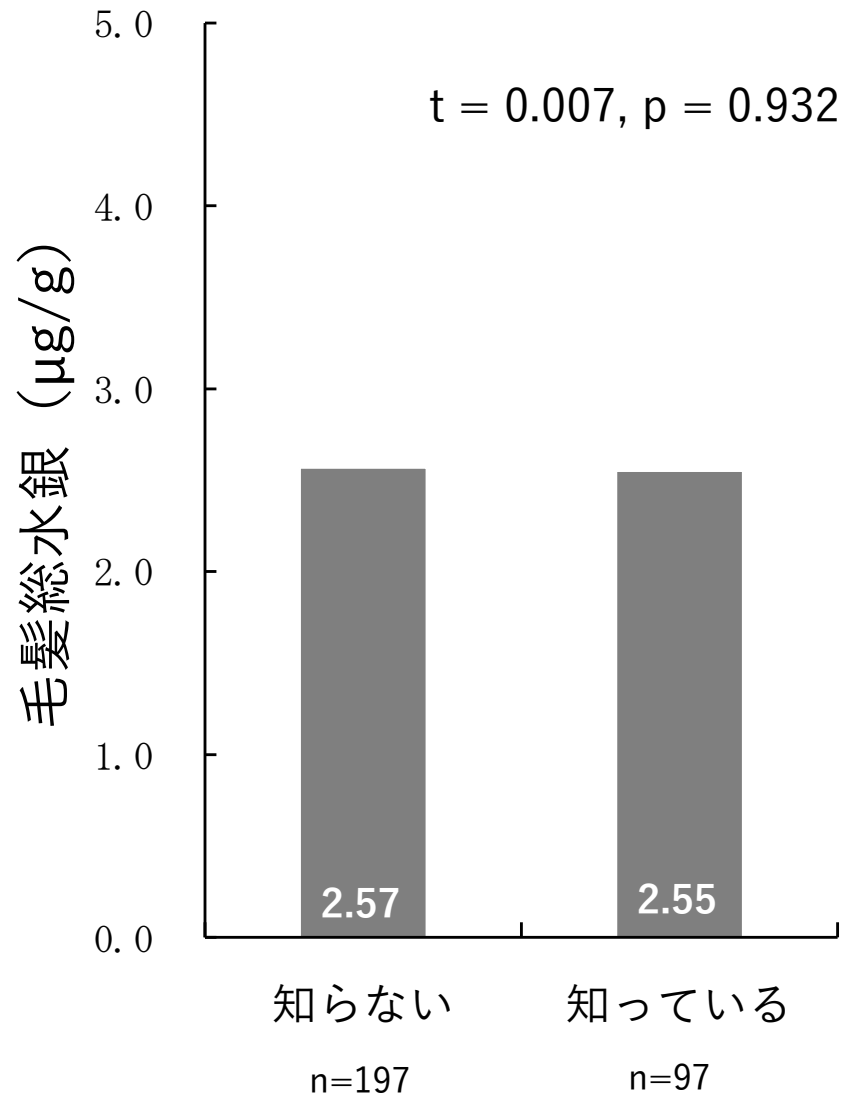
質問：メチル水銀はどのようなものから体内に取り込むと思いますか。

全体の正答率：26.6% (n=293)



質問：厚生労働省の注意事項が公表されていますが、ご存知ですか？

全体の認知率：33.0%



研究の目的

- 小児の化学物質曝露の包括的解析を目指す。
- 複数の化学物質による複合曝露やその生体代謝物全体に及ぼす影響も想定されるため、質量分析による網羅的一斉分析による曝露評価法の開発を行う。
- 曝露メカニズム解明への展開を通じて、リスク管理モデルの構築に繋げる。

研究の全体概要

- 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・解析手法を確立した。
- 生体成分および食品由来の成分に関するデータベースの構築を行うとともに、外来化学物質による曝露の包括的なプロファイリングを目指した。
- 有機リン系農薬代謝物レベルが既知の妊婦尿の網羅的解析を行い、解析手法の評価、農薬曝露が生体代謝物全体に及ぼす影響を解析した。
- 重金属濃度既知の妊婦尿の網羅的解析を行い、曝露経路の推定、複合曝露の有無、曝露が生体代謝物全体に及ぼす影響について解析を試みた。
- さらに、メガデータ解析ツールを用いた探索的解析を進めた。

網羅的分析手法の確立

GC/MSによる尿中代謝物網羅的一斉分析 前処理法の開発

ウレアーゼ処理による尿素除去及び複数の溶媒による抽出を組み合わせることで、検出ピーク数や同定化合物数が増加した。

前処理無し

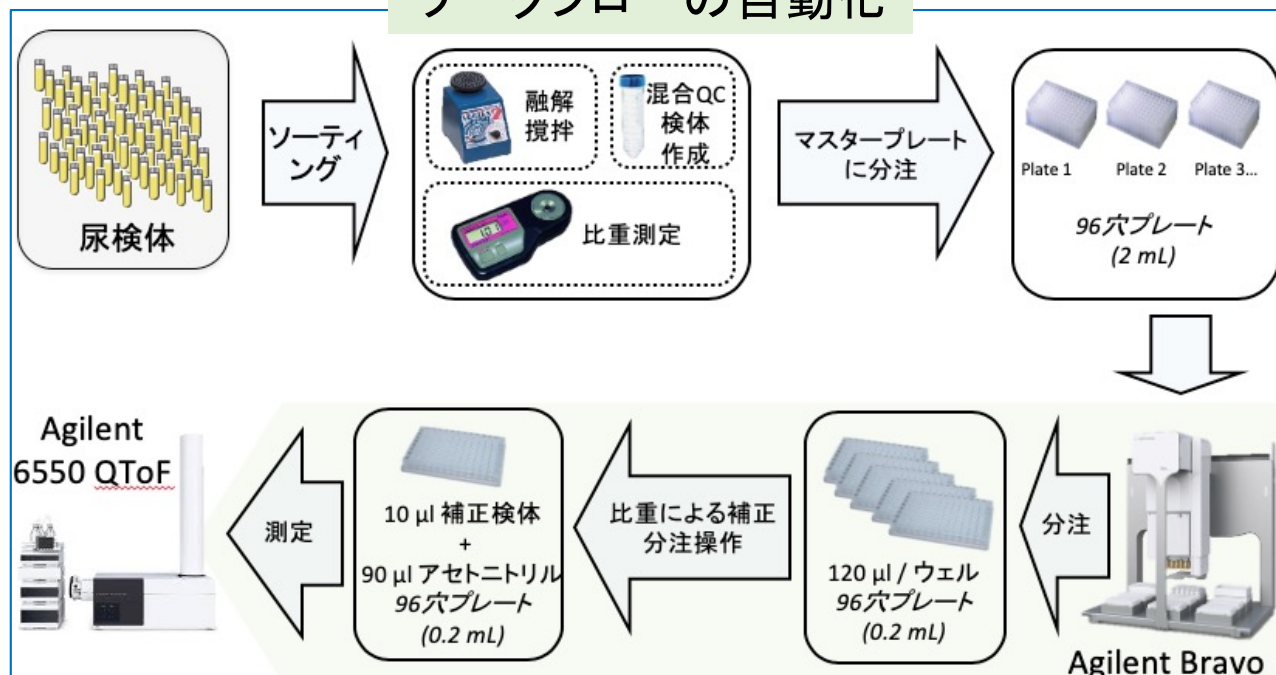
123代謝物
4,253ピーク

前処理 + 溶媒分画抽出

350代謝物
17,588ピーク

LC/MSによる尿中代謝物網羅的一斉分析

ワークフローの自動化



解析手法の確立

ノンターゲットプロファイリング
従来法 + ZIC-HILIC negative mode

データプロセス(m/z , RT)
ProteoWizard, MS-DIAL, CorrDec

QC解析
(m/z , RT, fragments)

代謝物同定・連鎖解析

データベースの整備

インハウスデータベースの
整備

発表論文

Chaleckis R, et al. Clinical Metabolomics, Methods Mol Biol, 1730: 45–58, 2018

Chaleckis R, et al. Curr Opin Biotechnol. 55:44–50, 2018

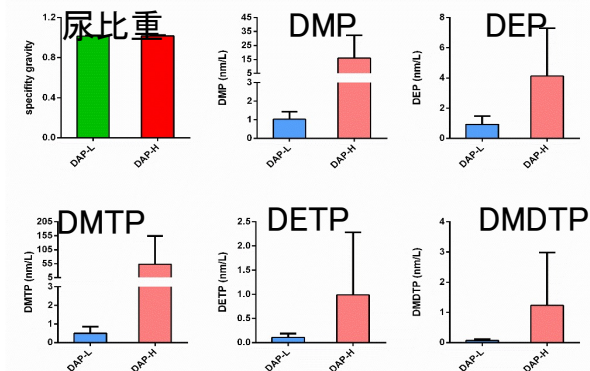
Chaleckis R, et al. Yeast Systems Biology. Methods Mol Biol. 2049: 233–245, 2019

Zhang P, et al. Metabolites. Jun 6;9(6), 2019

Tada I, et al. Metabolites. Oct 26;9(11), 2019

有機リン系農薬代謝物(DAP)濃度が既知の妊婦尿

有機リン系農薬代謝物レベルが既知の妊婦尿200検体から、DAP類(DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP)の濃度を、尿比重による標準化とモル濃度換算を行い、**高DAP群(DAP-H)**と**低DAP群(DAP-L)**を選定した。(各群 30検体)



GC/MSによる網羅的一斉分析の結果、食品由来の4つの候補物質が選定された

高DAP群で増加していた4個の候補物質

トレイトール: 糖アルコール

キシロースが体内で代謝されて生じる。リンゴなどの果実の摂取でも尿中の濃度が上昇する。

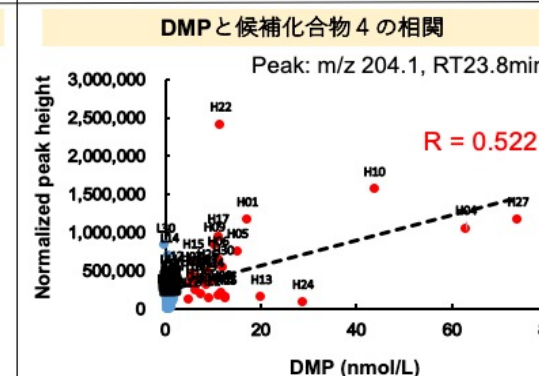
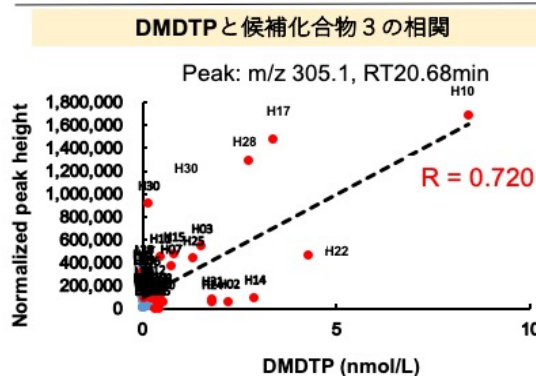
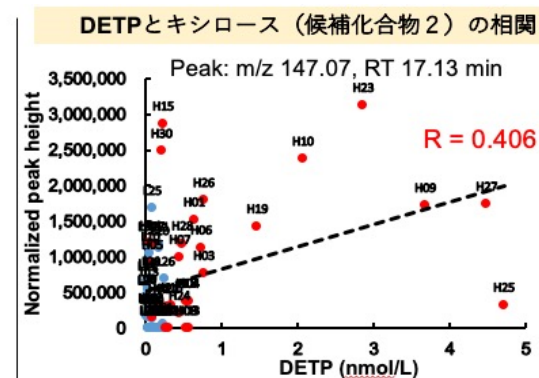
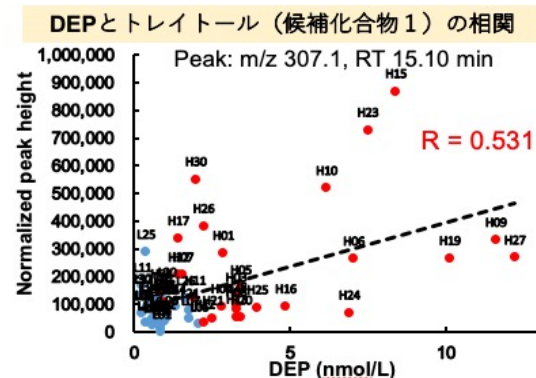
キシロース: 五炭糖

キシラン(細胞壁成分)を構成するものとして植物に広く存在する。

未同定の糖酸: グルクロン酸、ガラクトuron酸、グルコン酸等。果物の皮に含まれる。

未同定の七炭糖: D-アルトロ-ヘプツロース等; ニンジン、アプリコット、りんご、トマトなど様々な果物や野菜に含まれている。

4つの候補物質のピークは個別のDAPと相関を示した



- ✓ 野菜や果物などの食品由来と考えられた。
- ✓ 農薬曝露のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

✓ 曝露経路の探索に有用である可能性がある。 12

LC/MSによるDAP濃度が既知の妊婦尿の網羅的一斉分析の結果

高DAP群で増加していた6個の食品由来の化学物質

プロリンベタイン: 柑橘類を食べた後増加する代謝物、グリシンベタインの類似物

4-ヒドロキシスタキドリン: プロリン及びその代謝物を含む食物(柑橘類)を食べた後に増加する

(R)C(S)S-アリイン: ニンニク等に含まれるスルホキシド

4-アセトアミドブタン酸: キャベツ、唐辛子、カサバ、ベリー類等に含まれる

2-メチル-4-プロピル-1,3-オキサチアン: パッションフルーツ等に含まれる

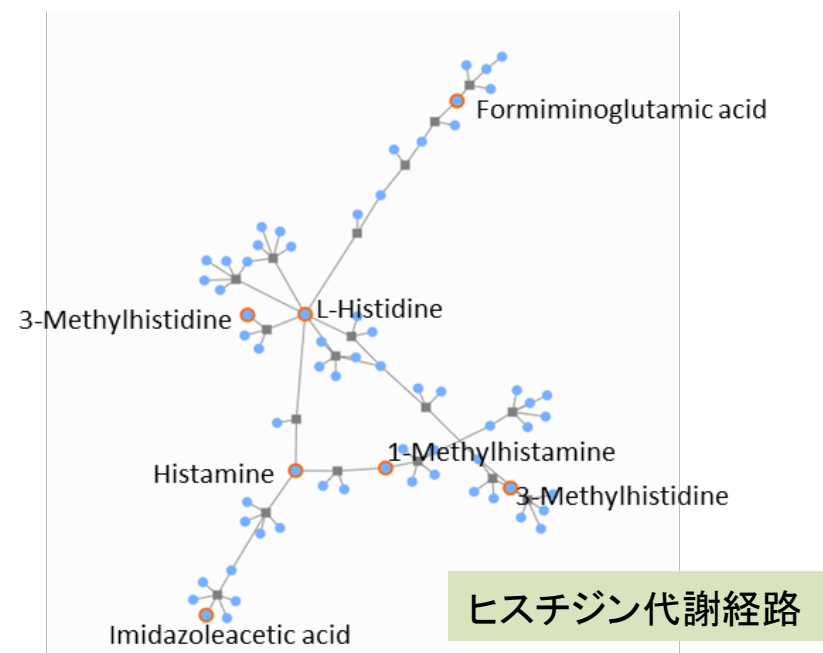
ベノテルピン: リンドウ科植物由来のアルカロイド

- ✓ 野菜や果物などの食品由来と考えられた。
- ✓ 農薬曝露のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

MS-DIALを用いた補正とパスウェイ解析

高DAP群では、以下の7個のヒスチジン代謝経路の代謝物がいずれも低DAP群より増加していた。

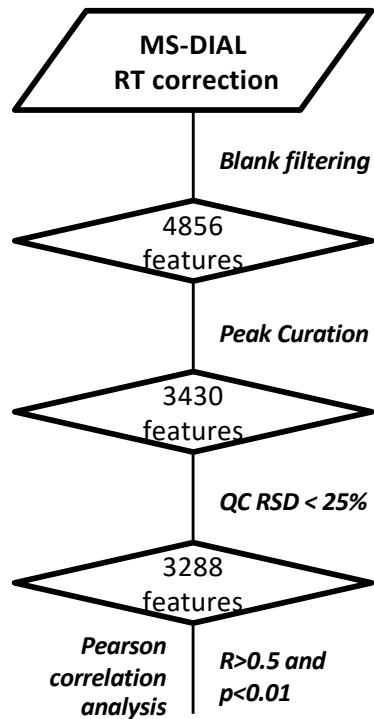
L-ヒスチジン、3-メチルヒスチジン、ヒスタミン、1-メチルヒスタミン、L-ヒスチジノール、1-イミダゾール酢酸、ホルムイミノグルタミン酸



- ✓ ヒスチジンは必須アミノ酸である。
- ✓ 次の2つの可能性が考えられた。
 1. 高DAP群ではヒスチジン多く含む食事を摂った。
 2. 農薬曝露がヒスチジン代謝に影響を与えた。

LC/MSによる重金属濃度既知の女性尿の網羅的解析

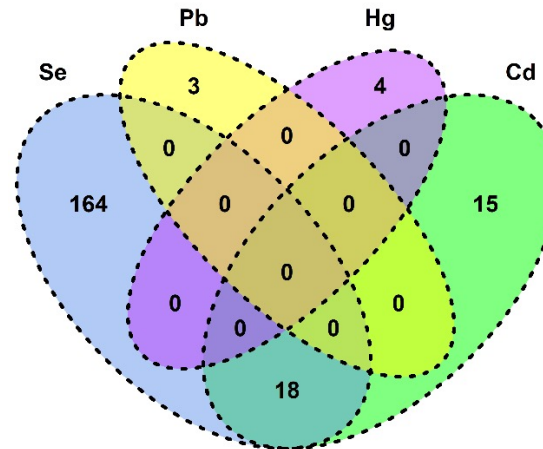
データ解析のワークフロー



204 features

MS-DIALを用いて得られた4856個の精密質量ピークから、最終的に3288個の精密質量ピークを選定した。重金属濃度との相関がある204個の精密質量ピークが見出された。

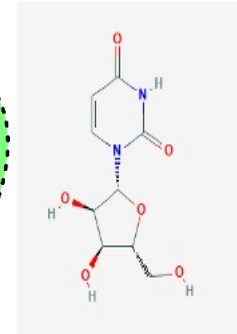
204個の精密質量ピークと重金属との関連



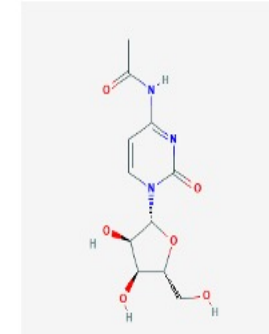
Se濃度とCd濃度の両方に相関する18個の精密質量ピークが見出された。

尿中RNA代謝物

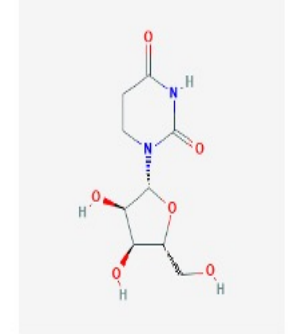
uridine



N4-Acetylcytidine

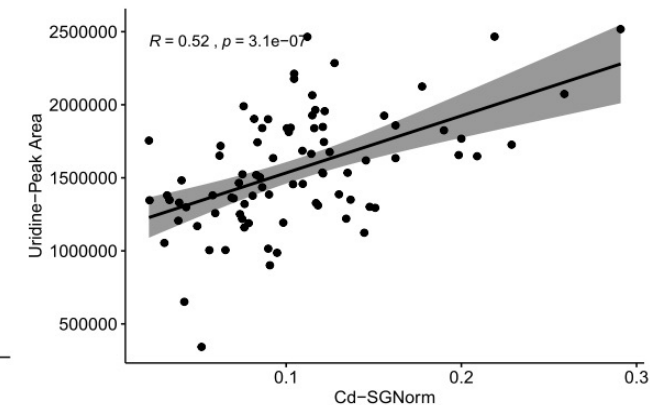
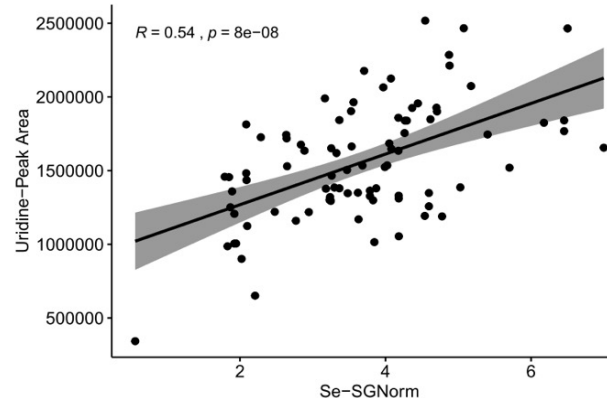


5,6-Dihydrouridine



18個の精密質量ピークのうち、3個はウリジン、N4-アセチルシチジン、5,6-ジヒドロウリジンと同定された。**tRNA分解物**と考えられる。

ウリジンのピーク面積と尿中Se及びCd濃度との相関



- ✓ N4-アセチルシチジンと5,6-ジヒドロウリジンはトランスファーRNA(tRNA)の中にのみ存在する。
- ✓ 従って、今回発見された3個のRNA分解物は**tRNA分解物**と考えられる。
- ✓ 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。
- ✓ メカニズムは不明である。重金属曝露との関連も今後の検討課題である。

サブテーマ3 小児リスク管理モデルの提案

水銀、鉛、カドミウム、マンガンを対象とし、曝露モデル、動態モデルを用いて小児リスク管理モデルの提案を目指す

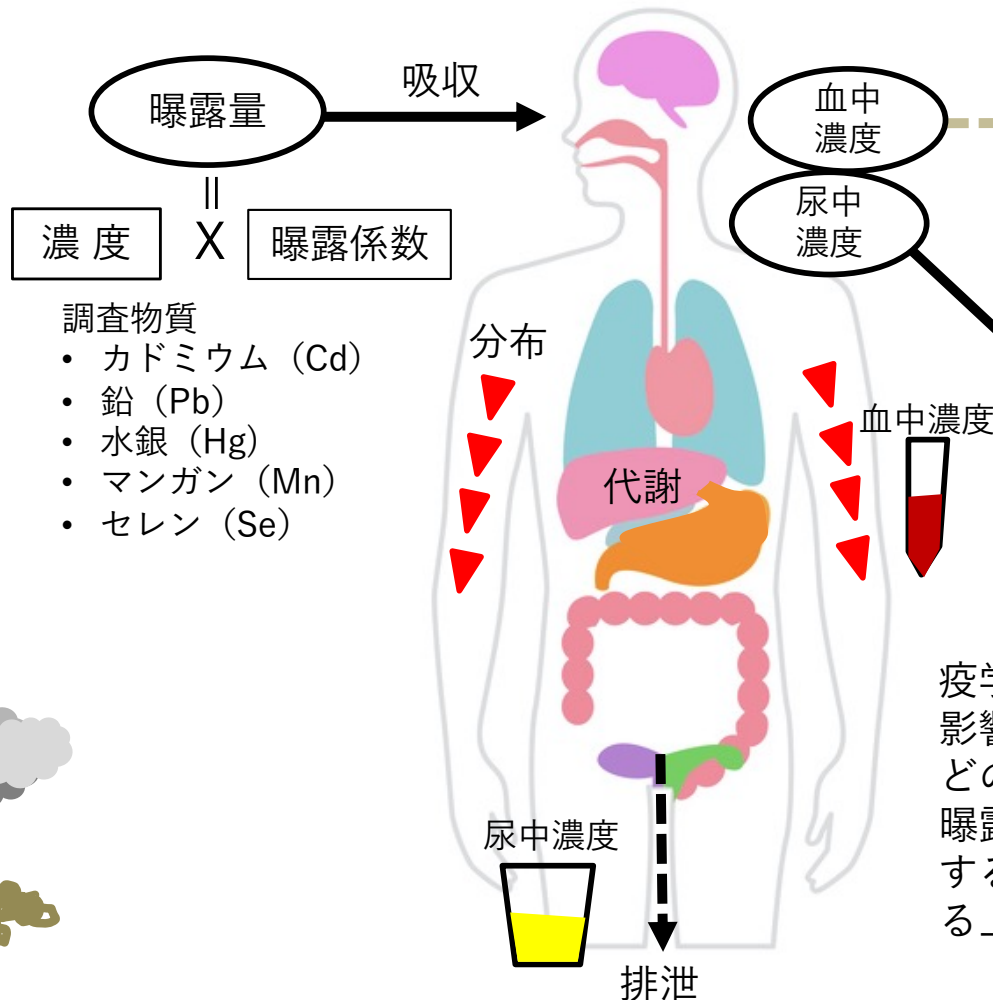
曝露モデル

曝露源は？
曝露レベルは？



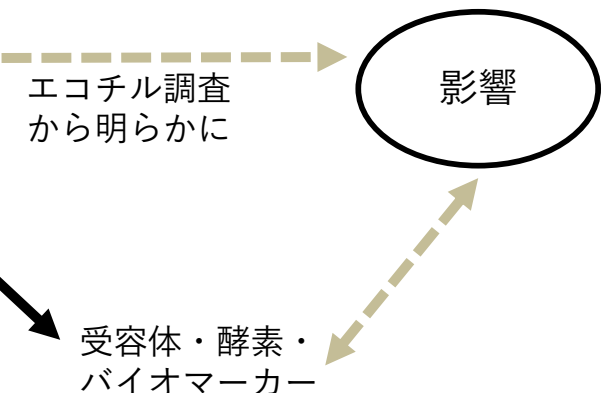
体内動態モデル

体内動態は？曝露モデルとの関係は？
体内濃度の関係は？将来予測は可能？



動態力学モデル

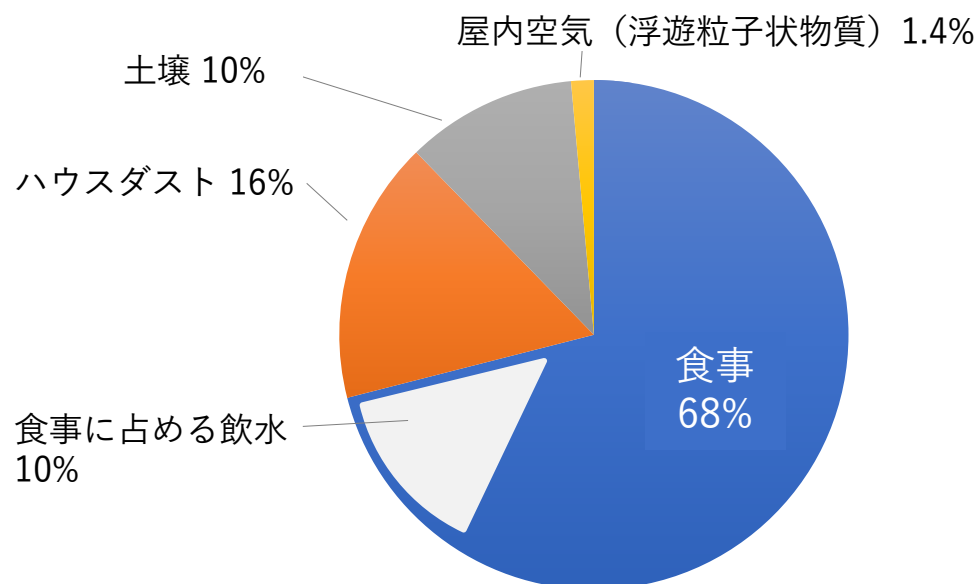
疫学調査（エコチル調査等）から得られる影響モデル



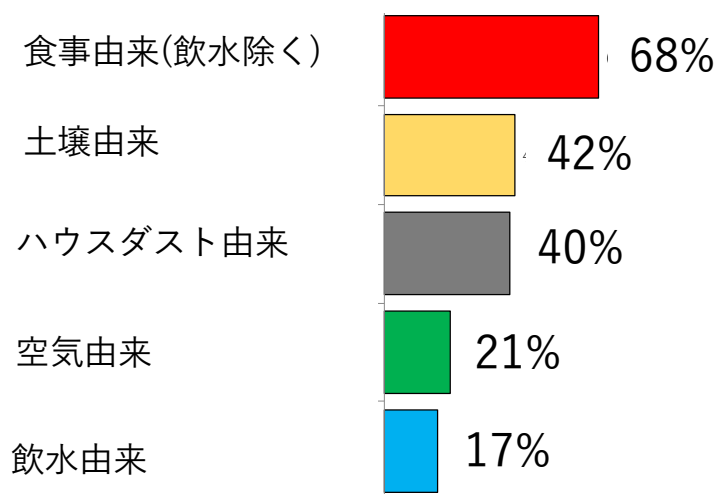
疫学調査などから、化学物質の健康影響との関連がみられた場合に、どのような対策をすれば体内濃度や曝露レベルを低減できるか明らかにすることは、小児のリスク管理をする上で重要な知見となる。

曝露モデル

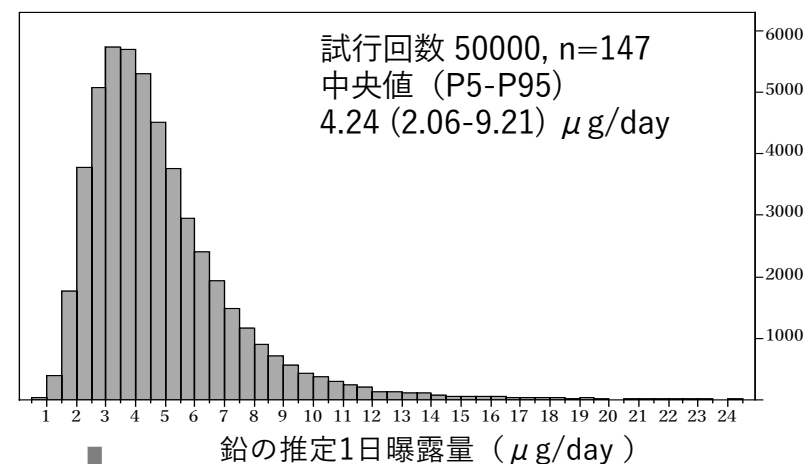
推定曝露量に占める各媒体の割合(中央値)



感度解析

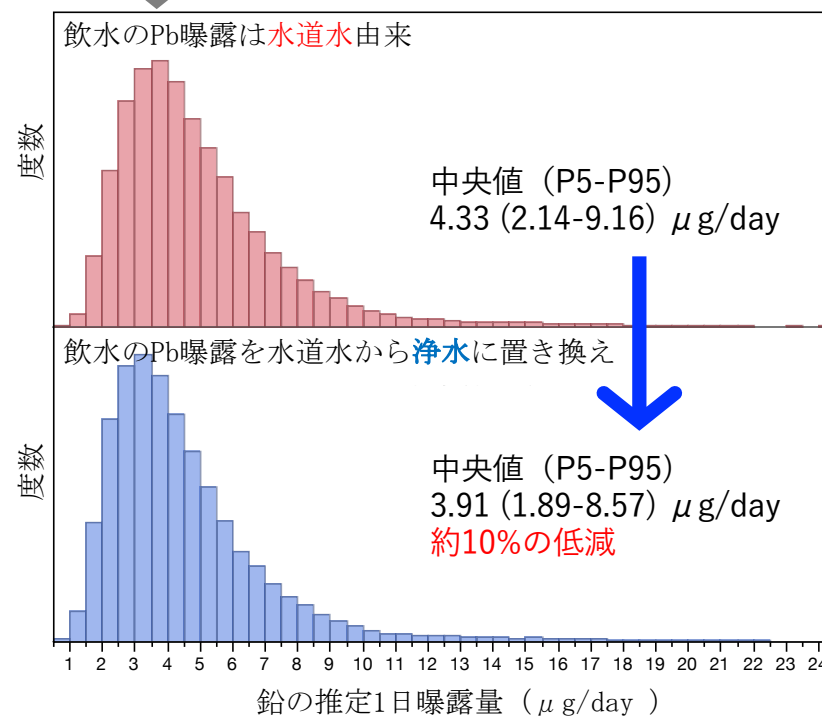


Pb摂取量のモンテカルロシミュレーション



飲水を原水から浄水に置き換えた場合

水道原水を飲水としている対象者(n=65)で試行

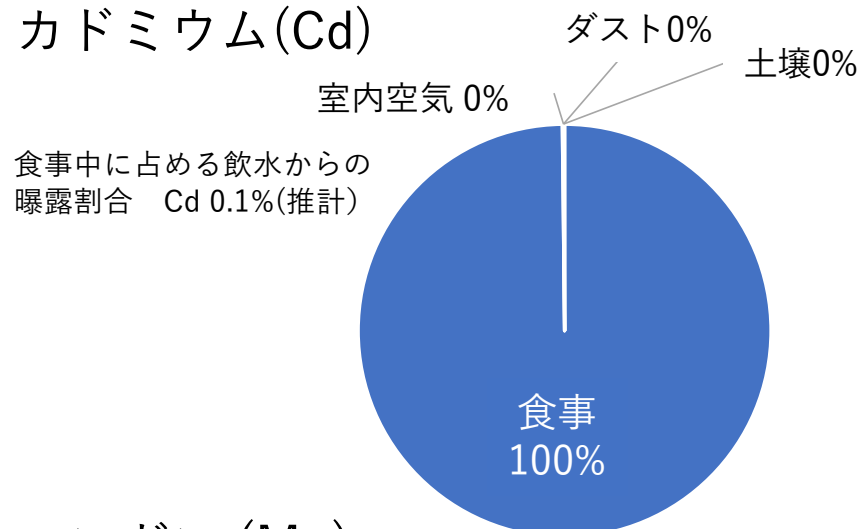


曝露モデルは次式により算出し、各媒体ごとの曝露量を推定曝露量で除して算出

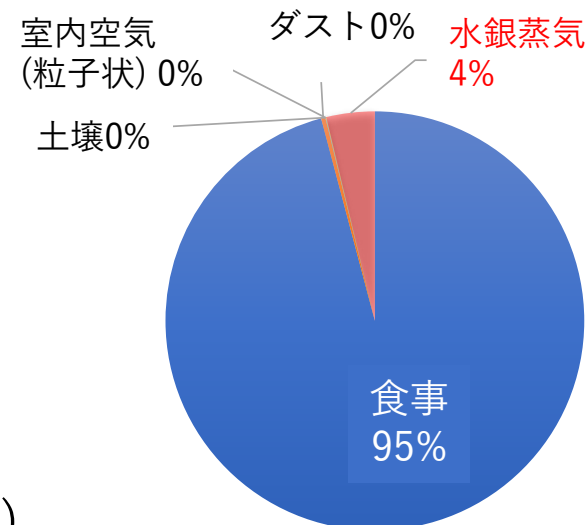
$$\text{推定曝露量(EDI)} = (C_f \times K_f) + (C_a \times K_a) + (C_d \times K_d) + (C_s \times K_s)$$

f: 食事 (飲水を含む)、a: 室内空気、d: ハウスダスト、s: 土壌

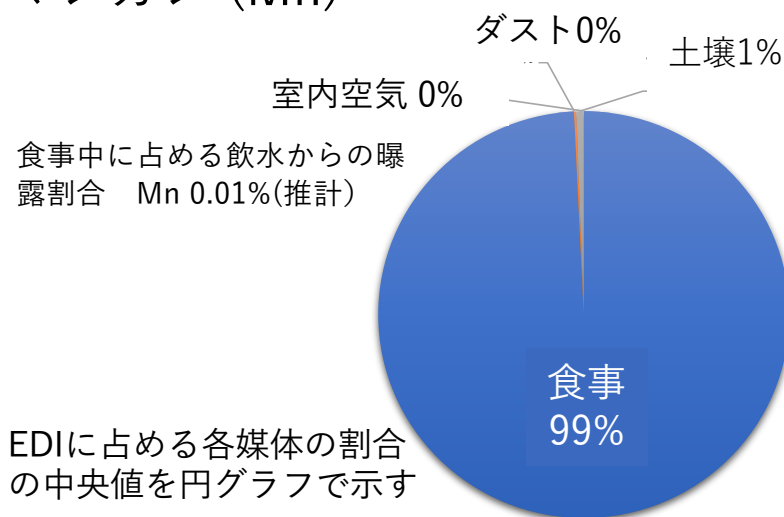
カドミウム (Cd)



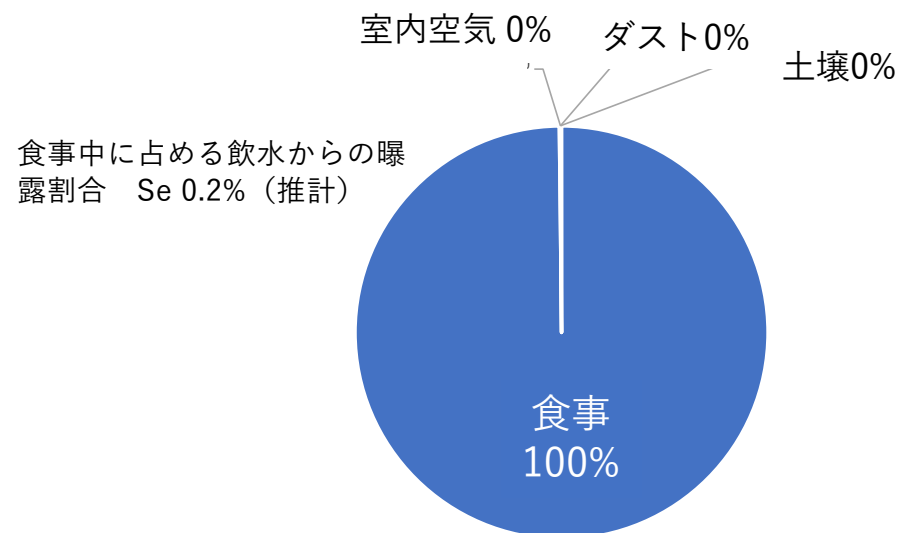
水銀 (Hg)



マンガン (Mn)



セレン (Se)



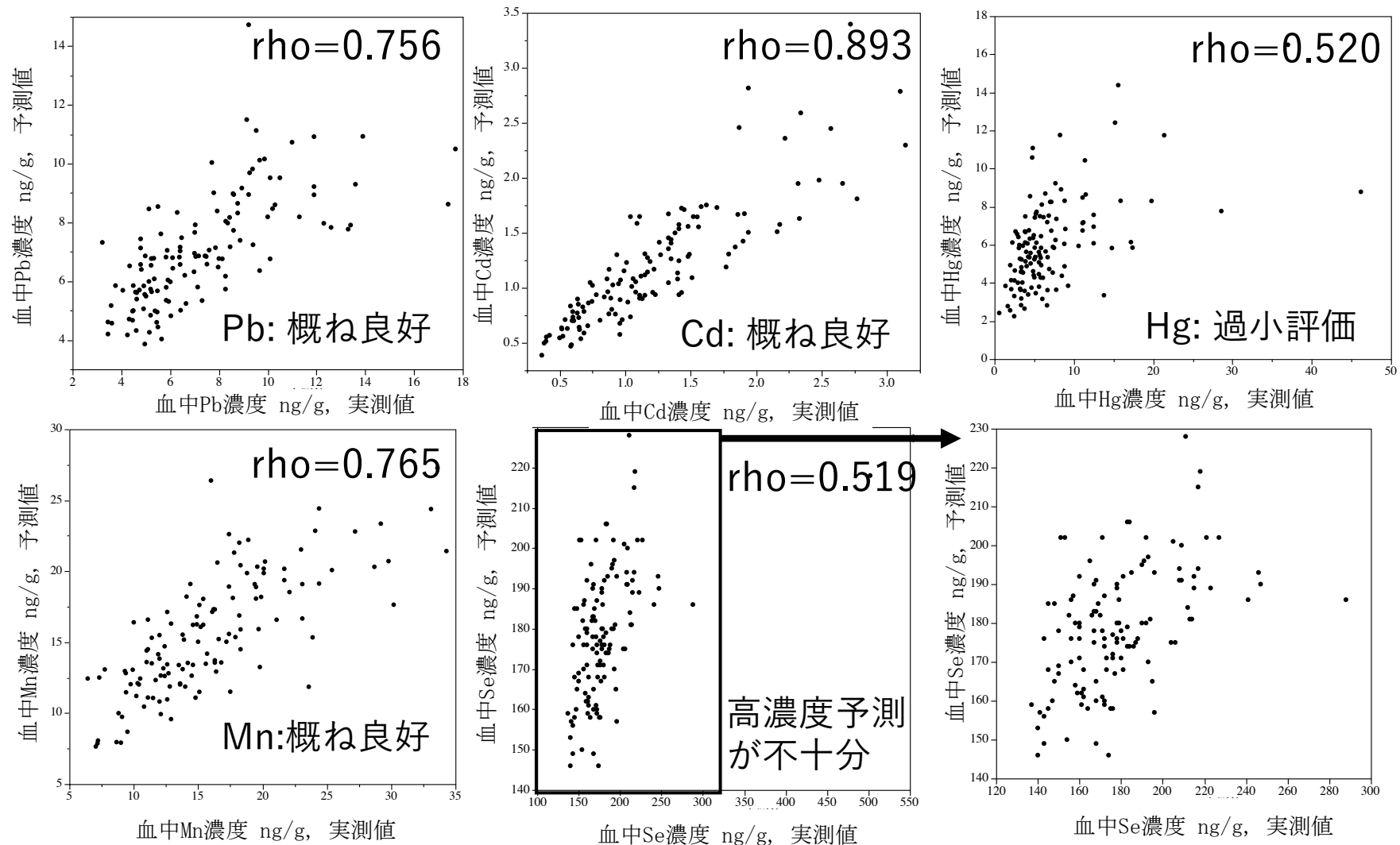
発表論文: C. Ma, M. Iwai-Shimada, N. Tatsuta, K. Nakai, T. Isobe, M. Takagi, Y. Nishihama, S.F. Nakayama: Int. J. Environ. Res. Public Health, 17 (7), 2231(2020)

どの元素も食事からの曝露が大きい
水銀は、食事以外に水銀蒸気の寄与

血中金属濃度予測モデル

妊娠中末期の血中金属類濃度、現在の血中金属類濃度（妊娠から5－6年後）、環境調査データ、生活習慣、社会経済的要因の情報をもとに、現在の血中金属類濃度に対する予測因子を探索し、血中濃度予測モデルを構築した。算出された血中金属類濃度の予測値（Y）と血中金属濃度の実測値(x)をプロットした。

- ✓ 本モデルにより、5－6年後の血中金属類濃度を概ね予測できる可能性が示唆された。
- ✓ 特にカドミウムについては、環境調査データを用いなくとも予測出来るモデルが構築された。



各金属間のスピアマンの相関係数（rho）を示す

研究全体のまとめと課題（１）

サブテーマ1

A) 家庭環境調査による重金属曝露の評価

- 家庭訪問調査を151件で実施し、環境試料及ば血液と尿の元素分析を実施した。
- 血液中濃度と関連性が確認されたのは、Pbの食事と水道水だった。曝露モデルの構築をサブテーマ3へ引き継いだ。
- 水道水中のPb濃度は、浄水器の利用で減少した。
- 紙巻きタバコの喫煙または受動喫煙でCd曝露が示唆された。
- 限界点：ハウスダストの曝露を正確に評価するには擬似胃酸による抽出の検討が必要と考えられた。

B) メチル水銀の有害性に関する認知度調査

- メチル水銀の曝露源および厚生労働省から出されている注意事項の認知度は、それぞれ26.6%および33.0%と低いことが確認された。
- 認知度と毛髪水銀量、魚摂取量およびメチル水銀摂取量は関連がなく、リスク情報の適切な提供が必要と考えられた。

研究全体のまとめと課題（2）

サブテーマ2

有機リン系農薬代謝物と関連マーカーの網羅的解析

- 有機リン系農薬代謝物であるDAPの定量を試みたが、尿中マトリックスの混在かでは十分な感度が確保できず、高濃度曝露群の定性的判定に止まった。
- 一方で、高DAP群に特徴的なバイオマーカーが得られ、いずれも食品由来成分であり、曝露経路の解析に有用と考えられた。
- さらに、必須アミノ酸であるヒスチジン代謝の亢進を示唆するバイオマーカーが増加しており、農薬曝露との関連性が示唆された。
- メタボロミクスデータをサブテーマ3に提供し、機械学習によるバイオマーカー探索に協力した。

金属曝露と関連するバイオマーカーの網羅的解析

- 重金属濃度既知の女性尿の解析から、金属曝露と関連する204個の精密質量ピークを見出した。
- 特に、CdおよびSeの尿中濃度と高い関連性を有する複数の新規バイオマーカーを特定した。RNA代謝の亢進を示す指標であり、動物実験などでの検証が期待された。

研究全体のまとめと課題（3）

サブテーマ 3

- 重金属などの曝露モデルを構築した。（サブテーマ1と連携）
 - ✓ Cd、Hg、Mn、Seのほとんどは食事由来と考えられた。
 - ✓ Pbでは食事の寄与が多いものの、土壌、ハウスダスト、飲水も寄与することが示された。
 - ✓ 限界点：曝露係数は日本人で得られた数値ではなく改善の余地がある。
- 体内動態等の各種モデル：HgのPKモデルを構築した。将来の血中金属類や小児血中POPs濃度の予測モデルを構築した。
- 農薬代謝物のメタボロミクスデータの画像認識処理の機械学習により、有機リン系農薬の高曝露群に特徴的な精密質量ピークを発見し、同定を試みている。（サブテーマ3と連携）

	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
鉛	◎	－	△	○	1と連携
カドミウム	◎	△	－	◎	
水銀	◎	◎	○	△	
マンガン	◎	△	－	○	
セレン	◎	△	－	△	
マンガン	◎	△	－	○	
POPs (DDTs)	NA	NA	NA	◎	
有機リン系農薬	NA	特徴的な精密質量ピークを発見	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