

令和元年6月24日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05254

研究課題名(和文) 小児における無機ヒ素毒性のセレンによる修飾：テロメア長を用いた検討

研究課題名(英文) Modification of inorganic arsenic toxicity in children by selenium : taking telomere length as the endpoint

研究代表者

渡辺 知保 (Watanabe, Chiho)

国立研究開発法人国立環境研究所・その他部局等・理事長

研究者番号：70220902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジア・東アジア地域では、地下水のヒ素による汚染が報告されており、地域によっては深刻な健康被害が生じている。本研究では、周産期のヒ素への曝露がテロメア長に与える影響について検討した。ミャンマでヒ素汚染が報告された地域に居住する母子400組の参加を得て、母親の尿中ヒ素、カドミウム、鉛のレベルを測定するとともに、臍帯血からDNAを抽出し、テロメアの相対的な長さ(TL)を測定した結果、ヒ素とカドミウムはそれぞれTLとは負の有意な相関を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期の金属類への曝露が新生児のテロメア長(TL)と関係があることを示した初の報告である。成人期におけるTLは多くの慢性疾患のリスクを増加することが示されているが、成人期のTLの個人差は、新生児期にすでに固定されていることが示唆されており、その意味で、新生児期のTLに影響を与える要因を知ることは重要である。今回の結果はヒ素では中等度の曝露レベルで、またカドミウムでは腎障害に至らないような濃度レベルでの影響であり、各金属の毒性学においても今後、検討に値するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Arsenic contamination of groundwater has been reported for various Southeast and South Asian countries; in a couple of regions, serious health problem is already apparent. In the current study, we recruited approx. 400 mother-newborn pairs and examined their arsenic (as well as cadmium and lead) exposure and its potential effects on the telomere length (TL). As the result, urinary concentrations of arsenic and cadmium negatively correlated with cord blood TL. Since TL is associated with the risk of various chronic diseases (like CHD), and newborn TL is a major determinant of adult TL (i.e., TL is reported to have a tracking nature), this relationship will be worth to further follow up. As far as we know, this is the first report that showed perinatal exposure to metals affects TL.

研究分野：環境保健学，人類生態学

キーワード：ヒ素 カドミウム セレニウム テロメア テロメア長

小児における無機ヒ素毒性のセレンによる修飾：テロメア長を用いた検討

1. 研究開始当初の背景

地下水のヒ素汚染はグローバル・ヘルスの重要課題の一つであり、実験的研究とともに実際の汚染地に居住する集団を対象とする研究が進められてきた。ヒ素による地下水汚染とは、ほとんどの場合、無機ヒ素による汚染を意味する。その健康影響としては、曝露量が大きい場合、皮膚を筆頭に、腎・膀胱など多くの組織にがんを生ずることが知られている他、末梢循環への影響、神経系ならびにその発達への影響の他、糖尿病のリスクを上げることなどが知られ、影響のスペクトルは広い。胎児を含む小児への影響については疫学的調査が増え、知見が積み重なっている。

研究代表者は、南アジアのヒ素汚染地、また、非汚染地を含む東南アジアにおいて、その健康影響などについて調査を行い、ヒ素毒性における性差、BMI による影響、Se の栄養状態による修飾などを報告し、(胎児期を含む)小児期～思春期の集団への影響についても検討を行ってきた。バングラデシュの調査では、出生時における免疫グロブリン A への影響 (Ser et al., 2015)、学齢期における認知機能への影響 (Nahar et al., 2014)、思春期におけるテロメア長への影響 (Fillman et al., 2016)などを論文として発表してきた。

テロメアは染色体末端で配列が反復する構造で、細胞が分裂を繰り返す度に不可逆的に短くなり、一定長にまで短くなると細胞死が誘導される。テロメアの短縮は、肥満・喫煙あるいは重金属などの環境汚染物質への曝露によって加速されることが知られており、加齢、冠動脈疾患、糖尿病、多くの悪性腫瘍のリスクを増大させることが知られている。このことを利用して、TL を加齢や疾患リスクのマーカーとして商業利用するサービスも現れている。近年の研究により、成人における TL の個人差は、出生時の差によるところが大きいことが報告されており、その意味で新生児期の TL は生涯を通じての TL に大きな影響を及ぼす。新生児期の TL の決定要因を調べた研究はまだ少ないが、親の年齢・体格に加え、胎児期における PM_{2.5} への曝露などの影響が報告されており、環境汚染が TL に及ぼす影響を検討することには、将来的な疾患リスクを考える上で意義がある。研究開始の時点で、環境中の重金属への曝露が新生児の TL に与える影響について調べた報告はなかった。

現代における有害物質への曝露は、先進国においては、曝露が軽度(ただちに重篤な疾患を生ずることはない)で、かつ、他の微量な有害物質にも曝露されていることがほとんどである。一方、途上国では低栄養状態が共存することが多い。このような場合、着目している有害物質の毒性を評価する際には、交絡する様々な要因についても注意を払う必要がある。研究代表者は、こうした要因の中で、様々な有害物質と毒性の上で相互作用を示すセレンウム (Se) の持つ役割に着目し、特に水銀 (Watanabe 2002; Nakamura et al., 2014; Ser et al., 2017)ならびにヒ素毒性 (Yoshida et al., 2015)への交絡因子という観点から多くの論文を発表してきた。ヒ素については、Se の栄養状態がヒ素代謝に与える影響がある閾値を持って全く方向を変えるということを報告した。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、本研究では東南アジア・南アジアのヒ素汚染地域に居住する集団において、妊娠中の母親のヒ素への曝露が、新生児あるいは乳児に及ぼす影響について、TL を指標として調べることにした。対象地域としては、近年になって地下水のヒ素汚染が報告されたミャンマ、バングラデシュを選んだ。また、これも上記の通り、ヒ素の TL への影響をセレンが修飾するかわいについても調べることにした。過去の実績から、これらの調査地域ではヒ素とともに、低レベルであるが Cd や Pb による汚染が見られる場合があったので、これらの金属についても同時に定量することにした。対象予定地域にはバングラデシュも含まれていたが、研究期間の開始後間もない時期に現地の治安状況が悪化したため、同国での調査は断念し、これを代替する内容を実施した。

また先進国での状況把握のため、日本人女性を対象として、金属曝露と TL との関連について調べるとともに、関連する測定方法の改良についても検討した。

3. 研究の方法

(1) ミャンマ調査

初年度、日本ならびにミャンマで調査に関する倫理審査を申請し、研究計画の承認を得た後に研究を開始した。なお、(2)・(3)も同様に倫理審査(相手国がある場合は相手国機関による審査も実施)を経て研究を実施した。

ミャンマについては、カウンターパートとの調整を行ったのち、まず、ひ素汚染の報告されている南部エヤワディ地方の2つの市域(township)を対象として予備調査を実施、現地の複数の病院を訪問すると同時に、汚染地域の農村部集落を視察し、状況の確認と調査実施の合意を得た。予備調査の結果を受けて、本調査を実施した。すなわち、地域の病院を妊婦検診に訪れ、参加に同意した妊娠後期にある400名を対象として、聞き取り調査によって、社会経済的状况、出生歴などの情報を得た。同じ対象者グループから、出産時に尿(母体)・臍帯血試料を提供してもらい冷凍保存して分析に供した。収集した生体試料については、コリジョン・セルのついた ICP-MSを用いた微量元素分析によりターゲットのAsならびに頻繁に汚染が見出されるCd、Pbを定量した。TLは白血球から抽出したDNAを解析し、特定のシングルコピー遺伝子に対する相対長として測定した。また、ひ素毒性のメカニズムの一つとされる酸化ストレス指標(尿中8-OHdG)を解析した。以上の結果を元に、Asならびに微量元素への曝露の程度とテロメア長との関連を、交絡要因を考慮した上で統計的に解析した。

(2) バングラデシュ代替調査

バングラデシュの情勢が不安定となったため、代替として以下の調査・分析を実施した。すなわち、ひ素の局所的な汚染が報告されたインドネシア国パレンバン、ムシ川中流域において人と作物(米だけではなく畑の産物も)の予備調査を実施した。バングラデシュと同じ南アジアに属するネパールのひ素汚染地域で、すでに思春期におけるひ素ならびにカドミウムの曝露とTLとの関連について報告(Fillman et al., 2016)を行ったネパール低地で得られた生体試料の分析、バングラデシュにおいて過去に収集した生体試料(尿)(Ser et al., 2015)について、金属曝露の測定と結果解析を行った。現地調査の方法、生体試料の化学・生化学的分析の方法は(1)と同様である。

(3) 日本人女性を対象とする微量元素濃度とテロメア長との関連の検討

TLへの影響が、金属によっては軽微な曝露でも観察されることを踏まえ、一般に曝露程度の低いと考えられる日本人(女性)を対象として採取した尿試料について、尿中Cd、As、Se等微量元素濃度をICP-MSで測定するとともに、全血から抽出したDNAのTLと尿中微量元素濃度との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) ミャンマ調査

ミャンマーのひ素汚染地域で母-新生児のペア400組あまりから収集した生体試料を分析した結果、母親の尿試料中As濃度の中央値は73.9 $\mu\text{g/g}$ クレアチニン(いわゆる随時尿であるために補正をしている、以下Creと省略)であった。同様にCd、Pbについては0.9、1.8 $\mu\text{g/gCre}$ であった。このうち、AsとCd濃度は、臍帯血のTLと有意な負の相関を示すことを見出した。この関係は、主要な交絡要因を考慮したモデルにおいても認められた(論文#3)。尿中8-OHdG濃度の定量によって酸化ストレス状態を評価したところ、Asへの曝露と酸化ストレス指標との間には有意な相関が見出され、これまでの先行研究と矛盾しない結果であった(論文#2)。聞き取り調査・出産時の記録を用い、出産アウトカムと金属への曝露との関連を検討した結果、母体尿中Cd曝露レベルが相対的に高い群で、在胎週数、早産、低体重出生のリスクが有意に上がることが示された(論文#4)。Cdと出生体重との関連についてはこれまでも報告が散見されており、本地域においても同様のリスクが存在することが見出された。As・Seについてはこうした影響は認められなかった。

ミャンマーにおけるひ素汚染は比較的最近になって報告が行われており、実際の汚染レベルも明確にはなっていなかったが、バングラデシュやネパール低地などと比較すると、比較的低いレベルであった。本調査で最も注目すべき知見は、母体を介した金属類(Cd・As)への曝露が、新生児のTLを短縮する有意な効果を認めた点で、母親の妊娠期における金属類への曝露が出生児のTLに影響するという報告はこれまで(2018年時点)になく、その意義および機序についてさらに検討すべきであるとの示唆が得られた(論文#3)。成人については、AsがTLを相対的に長くする効果があるという報告もあり、必ずしも明確な結果は得られていない。As毒性の所見としては、比較的低いレベルで影響が見られていること、また、冒頭に述べた通り、TLの短縮化が非可逆的で、かつ長期に渡って「効果」が残る(tracking)影響であることはAs毒性を考慮の上で留意すべきである。

本研究の大きな目的であったSe(中央値として22.6 $\mu\text{g/gCre}$)による修飾は、統計的には明らかでなかった。理由としては、まずAsの曝露レベルがバングラデシュ・ネパールなどの汚染地域に比較して低いことが考えられる。Asとの相互作用については、Asのレベルが一定の

レベル（尿中濃度として $150 \mu\text{g/gCre}$ 程度）を超えた時点から，尿中 As と Se のレベルの相関が大きく変化することを見出しており（Yoshida et al., 2015），このレベルは今回の As レベルよりは高い．Se の応答についての（仮想的な）‘閾値’の存在はメチル水銀との相互作用を調べた調査においても示唆されており（Ser et al., 2017），今後検討すべき点であるとも言える．ただし，今回の対象者においても酸化ストレス指標は As 曝露と相関する形で上昇していたので，何らかの抗酸化応答が起こっていた可能性はあり，それが Se による修飾作用として検出されるものではなかったということになる．

Cd は出生体重・TL のいずれにも有意な影響を及ぼしたことになる．ここでの尿中 Cd のレベルは，従来毒性学で問題となってきた閾値レベル（ $3\text{--}4 \mu\text{g/gCre}$ ）よりかなり低い点には注意が必要であろう．通常，慢性の Cd 毒性として問題となるのは腎機能の障害であり，尿中の Cd 排泄は腎皮質における Cd の蓄積量を反映するとされる．腎障害が生じないレベルで，新生児に影響が検出されるという点は，Cd 毒性に新たな視点をつけ加える可能性を示している．げっ歯類を用いた古典的実験では，母体に投与した Cd は胎盤にトラップされることが知られており，胎盤通過性が大きい物質ではないとされる．種差があるものの観察された現象が胎盤毒性（Cd による胎盤機能の障害を介した胎児側の障害）を反映している可能性もあることから，胎児側の曝露の定量的な評価が必要であろう．低用量の Cd が新生児～小児期に影響を及ぼす報告は，国内外で散見されるようになってきており，動物実験でも数は少ないが，研究代表者を含め（Ishitobi et al., 2005, 2007），胎児影響が報告されている．本課題としては副次的な所見ではあるが，さらなる影響実態の把握と影響メカニズム解明に向けた努力が必要であろう．

（2）バングラデシュ代替調査

バングラデシュのヒ素汚染地域の母親-乳児のペア 108 組から得た試料について周産期の As 曝露と出生後の成長との関連を検討し，生後 6 ヶ月までの頭周囲とに負の相関があること，特に早期（3 ヶ月まで）で関連が強いことを見出した（論文 #1）．

日本人女子大学生 73 名を対象にして，血液 TL 長と尿中 Cd（平均 $0.31 \mu\text{g/g}$ クレアチニン）等元素濃度と，8OHdG の排泄濃度との関連を解析した結果，これらバイオマーカーと TL 長の間には有意な関連が見いだせなかった．尿中濃度が曝露マーカーとして知られるモリブデン、コバルト、クロムについても検討したが，いずれも有意な関連はなかった．

ネパール低地住民の成人男女（112 名，平均年齢 41 歳）においては，尿中カドミウム（CdU）および As の濃度と唾液テロメア長との間には相関を見い出せなかった（未発表データ）．同地域の思春期の対象者においては尿中 Cd との間にも負の相関（Fillman et al., 2016）を認めており，これが若齢でのみ見出される関連である可能性が示唆された．

ネパール低地の対象地域は，（1）のミャンマーの対象地域と比較して As の曝露レベルは高い．ミャンマーの結果と合わせて考えると，より早い時期（新生児～思春期）では，これら金属類の曝露の影響が見出されるのに対し，成人期の曝露との相関が弱かったという結果である．さらに多くの検証を重ねる必要があるが，考えられる一つの説明は（冒頭にも述べられている通り）複数の先行研究で示唆されているように，TL の個人差は人生の早い時期に決まり，集団内での相対的な順位が固定される（相対的には，成人期には外的要因の影響を受けにくい）というものだろう．今後，TL についての縦断的な調査が行われて，この点が解明されることを期待したい．

（3）日本人女性を対象とする微量元素濃度とテロメア長との関連の検討

ミャンマーにおいて，かなり低いレベルの Cd 曝露と TL 長との関連が得られたことを考慮し，さらに検討を行うこととした．尿中 Cd 濃度を曝露のバイオマーカーとして利用するにあたり，尿中 Cd 濃度を ICP 質量分析法によって精確に定量するための検討を行った．尿中に共存するモリブデンの酸化物からのスペクトル干渉を数学的に補正する方法で，簡便にかつ精確な定量値を得ることができ，疫学研究への適用可能な方法として確立した．

TL 長に影響する因子についての基礎的情報を得る目的で，日本人女子大学生（平均 20 歳）73 名から採取した全血から DNA を抽出し，テロメア長をリアルタイム PCR 法によって測定した．測定結果をシングルコピー遺伝子長との比として表すと，平均と標準偏差は 1.34 ± 0.45 で，正規分布していた．対象者の生物学的属性や生活習慣、食生活とテロメア長の間の変量の解析を行った結果，根菜類（人参、大根等）の摂取頻度との間に有意な正の関連が見いだされた他は有意な関連はなかった．

日本の対象集団での尿中 Cd レベルは $0.3 \mu\text{g/gCre}$ とミャンマーのレベルよりさらに低かった．今回の検討において TL への影響を認めなかった理由は，曝露レベルの低さであると思われるが，上述のように，対象者が成人に達しようとする年齢であったことも関連するのかもしれない．外的要因が TL に及ぼす影響の年齢依存性についての研究が必要なことはここからも示唆される．

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件：全て査読あり)

1 . Kyi Mar Wai, Ping Han Ser, Sk Akhtar Ahmad, Rabeya Yasmin, Yasunori Ito, Shoko Konishi, 'In-utero arsenic exposure and growth of infants from birth to 6 months of age: a prospective cohort study in rural Bangladesh'. *International Journal of Environmental Health Research* Published online: 29 Mar (2019). <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1597835>

2 . Kyi Mar Wai, Masahiro Umezaki, Satoko Kosaka, Ohn Mar, Mitsutoshi Umemura, Chiho Watanabe. 'Arsenic Exposure through drinking water and oxidative stress status: A cross-sectional study in the Ayeyarwady region, Myanmar'. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2019) <https://doi.org/10/1016/j.jtemb.2019.04.009>

3 .Kyi Mar Wai, Masahiro Umezaki, Satoko Kosaka, Ohn Mar, Mitsutoshi Umemura, Toki Fillman, Chiho Watanabe . 'Impact of prenatal heavy metal exposure on newborn leucocyte telomere length: A birth-cohort study' *Environmental Pollution* 243 , 1414-1421 (2018)

4 . Kyi Mar Wai,, Mar O, Kosaka S, Umemura M, Watanabe C. "Prenatal Heavy Metal Exposure and Adverse Birth Outcomes in Myanmar: A Birth-Cohort Study" in *International Journal of Environmental Research and Public Health*. (2017) 14(11): 1339.

〔学会発表〕(計6件)

1. Kyi Mar Wai. Environmental contamination by heavy metals and its impact on maternal and child health in Myanmar. 23th International Conference of the Society for Human Ecology, July 9, 2018, Lisbon, Portugal.

2. 水野 佑紀, 小西 祥子, 今井 秀樹, 藤森 英治, 児島 伸彦, 吉永 淳. 重金属類曝露とテロメア長との関連 . 第6回メタロミクス研究フォーラム (共同開催: プラズマ分光分析研究会 第104回講演会) , 2018年11月1-2日, 八王子 .

3. 水野 佑紀, 小西 祥子, 今井 秀樹, 藤森 英治, 児島 伸彦, 吉永 淳. カドミウム曝露とテロメア長との関連 . メタルバイオサイエンス研究会 2018 , 2018年11月16-17日, 仙台 .

4. Kyi Mar Wai, Environmental contamination by heavy metals and its impact on maternal and child health in Myanmar. July 7-10, 2018.

5. C. Watanabe: Environmental Health in Human Ecological Perspective: Introduction. 23rd International Conference of the Society for Human Ecology, Lisbon. July 7-10, 2018.

6. Kyi Mar Wai, Ohnmar, Kosaka S, Watanabe C. Prenatal Heavy Metal Exposure and Adverse Birth Outcomes in Myanmar: A Birth-Cohort Study . 49th Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health Conference, August 17-19, 2017, Seoul, Korea. (Poster).

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者：
研究分担者氏名：稲岡 司
ローマ字氏名： INAOKA, Tsukasa
所属研究機関名：佐賀大学
部局名：農学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60176386

研究分担者氏名：吉永 淳
ローマ字氏名：YOSHINAGA, Jun
所属研究機関名：東洋大学
部局名：生命科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70222396

研究分担者氏名：小西 祥子
ローマ字氏名： KONISHI, Shoko
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70451771

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。