

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590782

研究課題名(和文) カドミウム曝露を受けた農家におけるメタロチオネイン遺伝子多型に関する疫学研究

研究課題名(英文) Epidemiological study on polymorphisms of metallothionein genes among the farmers exposed to cadmium.

研究代表者

堀口 兵剛 (Horiguchi, Hyogo)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90254002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウム(Cd)曝露により誘導され、その毒性を軽減するメタロチオネイン(MT)という低分子量蛋白質の産生能における個人差の可能性を検討するために、自家産米摂取によりCd経口曝露を受けた秋田県内の農家753人を対象に尿中MT濃度とMT遺伝子多型を調べた。血中・尿中Cd濃度と尿中MT濃度は正の相関関係にあったが、一部でCd曝露レベルが低いにも拘らず、非常に高い尿中MT濃度を示す人がおり、高MT産生者の存在が示唆された。一方、低MT産生者の間からCd曝露による腎尿細管機能障害が発生する傾向が見られた。しかし、2種類のMT遺伝子多型と尿中MT濃度の間には特に有意の関係は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to consider the possibility of individual variations in the producibility of metallothionein (MT), a low molecular weight protein that is induced by cadmium (Cd) exposure and prevents its toxicity, I investigated urinary MT levels and polymorphisms of MT genes among 753 farmers who were orally exposed to Cd through consumption of self-harvested rice in Akita prefecture. Positive correlations were observed between blood or urinary Cd levels and urinary MT levels, but a few farmers showed very high urinary MT levels despite their low levels of Cd exposure, suggesting they would be high producers of MT. On the other hand, low producers of MT had a tendency to develop renal tubular dysfunction due to Cd exposure. However, there were not significant correlations between two kinds of MT polymorphisms and urinary MT levels.

研究分野：衛生学

キーワード：メタロチオネイン カドミウム 遺伝子多型 農家 疫学

## 1. 研究開始当初の背景

メタロチオネイン (MT) は分子量 6,000-7,000 の低分子蛋白質であり、亜鉛やカドミウム (Cd) 等の重金属により肝臓や腎臓でその産生が誘導される。MT はそのアミノ酸残基の 1/3 がシステインで構成されており、重金属との結合能が非常に高い。従って、MT は必須微量元素や毒性重金属の代謝や解毒、さらには種々のストレスに対するラジカル消去作用などの働きをしていると考えられている。

Cd は環境中に広く分布している毒性重金属であり、ヒトは Cd 含有量の高い米などの農産物や海産物などの食品の摂取や喫煙などにより体内に取り込む。Cd は主として腎臓に蓄積し、その量が高度になると腎近位尿細管障害を引き起こすが、これを「カドミウム腎症」という。この状態が長期にわたって継続すると骨軟化症や腎性貧血が続発してくる。これがかつて富山県神通川流域の Cd 汚染地で農家の女性に多発した「イタイタイ病」である。これまでの認定患者数は 200 名近くに上るが、今日では数名の患者のみが生存している。

ところで、神通川流域ほどの重度ではないものの、秋田県にも鉱山由来の Cd 汚染地が存在し、そこでは多数の農家が自家産米摂取によって比較的高いレベルの Cd 経口曝露を受けてきた。代表者はこれらの神通川流域や秋田県の Cd 汚染地において長年地域健康診断による疫学研究を継続して行っており、多くのカドミウム腎症患者やイタイタイ病患者も観察してきた (Horiguchi H, et al., *Environ Res*, 2004 ; Horiguchi H, et al., *Int Arch Occup Environ Health*, 2010)。その結果、興味深いことに、カドミウム腎症の閾値とされている尿中 Cd 濃度 10  $\mu\text{g/g cr}$  をはるかに超える高度の Cd に曝露されていても腎機能には問題がない人が存在することを見出してきた。これは Cd による腎機能障害の発症には個人差があることを示唆するものである。近年、MT には数種類の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) による遺伝子多型があり、それによって同じ Cd 曝露レベルに対しても MT の発現量に差が現れる可能性のあることが報告されている (Miura N, *Ind Health*, 2009)。従って、カドミウム腎症やイタイタイ病の発症に MT の遺伝子多型による MT の産生量の違いが反映していることは十分考えられる。すなわち、「低 MT 産生者」は Cd に対して感受性が高いために、同じ Cd の曝露レベルでも「高 MT 産生者」と比較してカドミウム腎症やイタイタイ病を発症しやすい、という機序が考えられる。

## 2. 研究の目的

秋田県の Cd 汚染地において自家産米の摂

取により Cd 経口曝露を受けた農家を対象として、その尿中 MT 濃度の測定 (つまり MT の産生能力の指標と考える) 及び末梢血から抽出した DNA を用いた MT 遺伝子の SNP タイピングを行い、両者の間の関連を検討する。それにより、MT 産生能に關与する MT 遺伝子多型、すなわち Cd の健康影響作用に対する感受性に關わる遺伝子多型を同定する。

## 3. 研究の方法

検体は、平成 22 年度から 23 年度にかけて秋田県北の農村地域で実施した疫学研究で得られた血液、尿を用いた (全員で 753 名 ; 男 336 名、女 417 名、39-95 歳)。

尿中の MT 濃度は、「Metallothionein ELISA キット」(株式会社フロンティア研究所、北海道石狩市) を用いて測定し、尿中クレアチニン濃度で補正した。

血中・尿中 Cd 濃度の測定は、株式会社 に依頼し、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP/MS) Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。尿中 Cd 濃度は、サンプル中に共存するモリブデンの干渉を避けるためにモリブデンの干渉係数による補正を行うか、あるいは水素ガス導入条件下での測定結果を用いた。また、尿中 Cd 濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。

DNA は 200 $\mu\text{L}$  の末梢血からマッハライ・ナーゲル社の DNA 抽出キットを用いて抽出した。

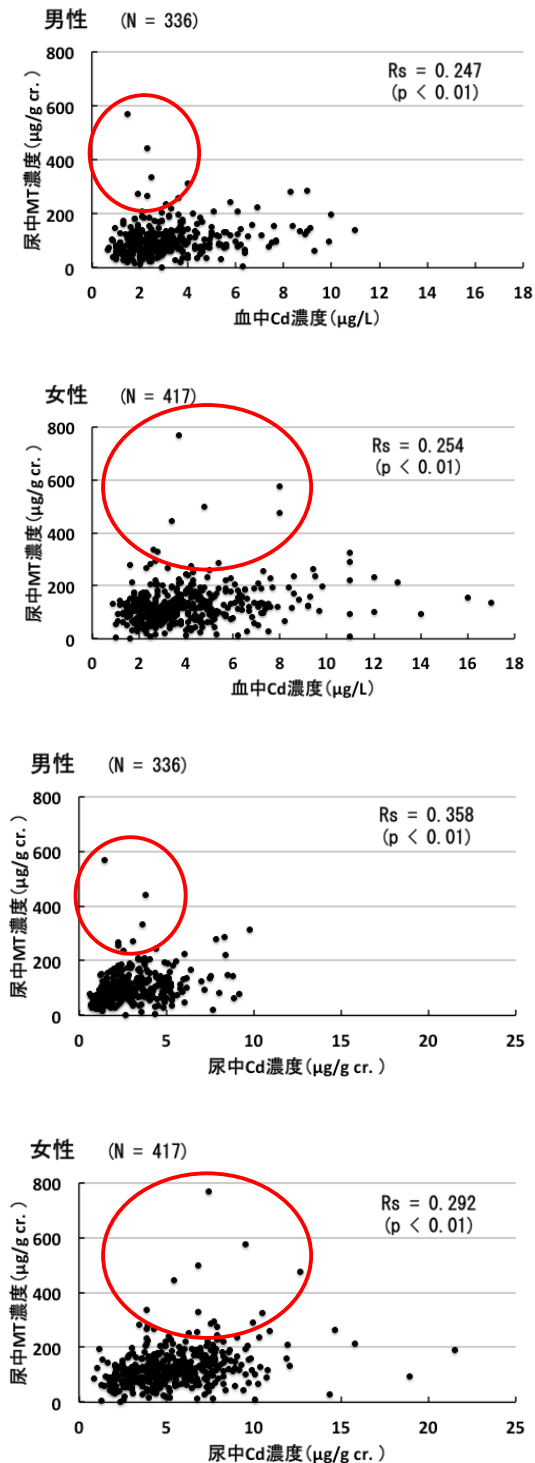
NCBI により MT 遺伝子の SNP を検索したところ、human metallothionein-IA (MT1A) と human metallothionein-IIA (MT2A) にはそれぞれ代表的な SNP が 3 種類ずつあることが判明した。そのうち、MT2A の (rs28366003) という SNP が MT 発現において機能的に重要である可能性が考えられたため (Kita K, et al., *Hum Genet*, 2006)、解析対象とした。それに加え、MT1A においては (rs8052394) という SNP を解析対象として選択した。

MT2A の (rs28366003) に対しては PCR-CTPP (Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers) という解析方法を用いた (EBS 株式会社に解析を依頼)。これは、変異の有無によってそれぞれのアレルに特異的な長さを持つ DNA を同時に合成する PCR 法であり、電気泳動によって出現するバンドを確認することによって遺伝子型が決定される。

MT1A の (rs8052394) に対しては、Taqman プローブ検出によるリアルタイム PCR 法によって解析した。PCR はタカラの TP800 Thermal Cycler Dice Real Time System で実施した。

#### 4. 研究成果

尿中 MT 濃度と血中・尿中 Cd 濃度との関係を散布図で検討したところ、尿中 MT 濃度は男女ともに Cd 曝露レベルに応じて高くなる傾向が見られた。但し、Cd 曝露レベルが高度になると両者の関係は横ばい状態となるため、Cd 曝露に対する MT 産生には上限が存在することが示唆された。また逆に、Cd 曝露レベルがそれ程高くないにも拘らず非常に高い尿中 MT 濃度を示す「高 MT 産生者」が存在することも示唆された（赤丸で囲った集団）。



更に、MT 産生能と腎尿細管機能との関係を観察するために、尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度（同程度の Cd 曝露における MT 産生量、すなわち MT 産生能の指標と考える）と尿中  $\alpha_1$ -ミクログロブリン ( $\alpha 1$  MG) 濃度、尿中  $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2$  MG) 濃度（腎尿細管機能障害の指標）との関係を散布図で観察した。その結果、高度の尿中  $\alpha 1$  MG 濃度、尿中  $\beta 2$  MG 濃度を示す者は尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度の小さい方、すなわち MT 産生能の低い方でのみ存在し、尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度の大きい方、すなわち高 MT 産生者ではそのような者は認められなかった。以上の結果より、Cd 曝露による腎尿細管機能に対する影響には MT 産生能が関与しており、MT 産生能の低い者では高度の Cd 曝露を受けた場合の腎尿細管機能障害の発症リスクが高いことが示唆された。

次いで、MT 遺伝子の SNP の型により尿中 MT のレベルに差を認めるかどうかを確認した。

MT2A 遺伝子の SNP (rs28366003) の解析結果は、以下のとおりであった。

	AA	AG	GG	計
男性	285 (84.8%)	50 (14.9%)	1 (0.0%)	336
女性	355 (84.1%)	60 (14.4%)	2 (0.0%)	417

GG 型が極めて少なかったため、GG 型を除外し、AA 型と AG 型とで比較した。

男性では、AA 型の尿中 MT 濃度は 87.8  $\mu\text{g/g cr.}$ 、AG 型の尿中 MT 濃度は 90.1  $\mu\text{g/g cr.}$  であり、有意の差は見られなかった。女性では、AA 型の尿中 MT 濃度は 107.7  $\mu\text{g/g cr.}$ 、AG 型の尿中 MT 濃度は 116.8  $\mu\text{g/g cr.}$  であり、やはり有意の差は見られなかった。また、年齢や血中・尿中 Cd 濃度は当 MT2A 遺伝子の型の間で差はなかった。

一方、MT1A 遺伝子の SNP (rs8052394) の解析結果は、以下のとおりであった。

	AA	AG	GG	計
男性	213 (65.3%)	105 (32.2%)	8 (0.0%)	326
女性	279 (69.4%)	107 (26.7%)	16 (0.0%)	402

(型不明の結果を除く)

同様に GG 型が極めて少なかったため、GG 型を除外し、AA 型と AG 型とで比較した。

男性では、AA 型の尿中 MT 濃度は 81.1  $\mu\text{g/g cr.}$ 、AG 型の尿中 MT 濃度は 89.4  $\mu\text{g/g cr.}$  であり、有意の差は見られなかった。女性では、AA 型の尿中 MT 濃度は 112.3  $\mu\text{g/g cr.}$ 、AG 型の尿中 MT 濃度は 97.3  $\mu\text{g/g cr.}$  であり、やはり有意の差は見られなかった。また、年齢や血中・尿中 Cd 濃度は当 MT1A

遺伝子の型の間で差はなかった。

以上の結果より、MTの産生能には個人差があり、「高MT産生者」及び「低MT産生者」が多くはないが集団の一部に存在し、特に「低MT産生者」にはCd曝露に対する感受性が高いことが示唆されたが、MTの遺伝子変異の型とMTの産生能との間には特に関連性はないものと考えられた。

当研究は、Cd曝露をうけた比較的大人数の集団においてMT産生能とMTの遺伝子多型との関連を我が国で初めて検討したものであり、有意義なものであったと言える。しかしながら、他のMT遺伝子のSNPの解析も必要であること、尿中MT濃度や尿中Cd濃度は腎尿細管機能障害に影響を受けるために血中MT濃度と血中Cd濃度との関連も観察する必要があること、などが今後の検討課題であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 堀口兵剛: 2015. カドミウム腎症及びイタイタイ病における腎性貧血、腎と透析、(印刷中). 査読無し
2. 堀口兵剛: 2014. カドミウム腎症の診断と社会的対策、腎と透析, 77 (4): 241-246. 査読無し
3. Horiguchi H, Oguma E, Sakamoto T, Murata K, Kayama F. 2014. Suppression of erythropoietin induction by diethylstilbestrol in rats. Arch Toxicol. Jan;88(1):137-44. doi: 10.1007/s00204-013-1095-4. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 堀口兵剛、小熊悦子: マウスにおけるカドミウム曝露による肝臓マクロファージでのG-CSFの発現。平成27年3月27日、第85回日本衛生学会総会、和歌山県和歌山市(日本衛生学雑誌第70巻:S204、2015)
2. 堀口兵剛、小熊悦子、村田勝敬、佐々木敏: カドミウム曝露農家でのメタロチオネイン産生能と腎尿細管障害・酸化ストレスの関係。平成26年5月27日、第84回日本衛生学会総会、岡山県岡山市(日本衛生学雑誌第69巻:S244、2014)
3. Horiguchi H. Significance of urinary metallothionein in Japanese farmers exposed to cadmium through consumption of home-harvested rice. X ISTERH (International Society of Trace

Element Research in Humans) 2013, Shinjuku, Tokyo, 19 November, 2013.(Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 27S1: 10, 2013)

4. 堀口兵剛、小熊悦子、村田勝敬: 秋田県の農家における自家産米摂取によるカドミウム経口曝露とその健康影響。平成25年10月15日、第11回秋田県公衆衛生学会学術大会、秋田県秋田市

5. 堀口兵剛、小熊悦子、村田勝敬、細井陽子、香山不二雄、大久保公美、村上健太郎、佐々木敏、宮本佳代子: 農家女性における体内貯蔵鉄に対する年齢・閉経・カドミウム曝露・腎機能の複合影響。平成25年3月26日、第83回日本衛生学会総会、石川県金沢市(日本衛生学雑誌第68巻:S209、2013)

6. 堀口兵剛: カドミウムの経口曝露を受けた農家で観察された腎尿細管機能障害とメタロチオネインの関与。平成24年12月19日、平成24年度メチル水銀・カドミウム研究ミーティング、東京都江東区(平成24年度メチル水銀・カドミウム研究ミーティング要旨集: 9、2012)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口兵剛 (Hyogo Horiguchi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 90254002

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし