

平成 29~30 年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）
(※研究全体の期間（初年度及び 2 年目以降）について記載する。)

研究課題名 (研究項目名)	無機ヒ素ばく露評価およびその手法に関する研究 (課題番号: 1704) (2) 健康影響発現のメカニズムの解明 (2) 食品中の微量化学物質・汚染物質のばく露と健康影響に関する研究 (3) 食品中の汚染物質の生物学的モニタリングによるばく露量推定に関する研究
主任研究者	研究者名: 吉永 淳 所属機関: 東洋大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 29 年度～平成 30 年度（2 年間）

2 研究目的

無機ヒ素 (iAs) はヒトにおける発がん物質であり、がん以外にも生殖、発達、内分泌等多くの健康障害に関与している可能性が認識されるようになった。これらは主にアジアや南米等の地下水汚染地域での疫学的知見を基にしたものであるが、そうでない地域においてもヒ素の持つ健康影響について関心が高まってきた。

地下水汚染がない地域では、一般公衆の iAs 摂取源はほぼ 100% 食物である。今後、わが国でも iAs 摂取量と健康影響に関する疫学調査によって、ヒトにおける有害性の同定や量 - 影響（反応）関係に関する知見を蓄積することが必要である。そのためには対象者の iAs 摂取量把握のために、FFQ 等の食物摂取調査や陰膳による実測等を行う必要がある。しかし食品の iAs 含量に関する情報はきわめて限られているために、食物摂取調査から iAs 摂取量を推定することはできない。それは、特定のヒ素化合物のみを分離定量する方法（化学形態分析）が必須であること、食物中の iAs 濃度が低いこと等、分析の困難さによるものと推定される。事実、分析がより容易な総ヒ素については食物中濃度情報が入手できるが、日本人のように多種多様な形態のヒ素を摂取している民族では、総ヒ素情報では役に立たない。陰膳調査はこうした分析上の困難の他、労力・コストがかかりすぎるために疫学調査では現実的でない。

本研究では、日本人の iAs 摂取量・摂取源等について基礎的な情報を得るとともに、今後の疫学研究で活用できる、個人の iAs 摂取量調査手法を提案することを目的とした。簡易的に摂取量を見積もる方法および尿中 iAs 代謝産物濃度に基づき摂取量を見積もる方法の 2 種類を提案する。尿の採取は非侵襲的であるうえに、陰膳採取に比較して容易である。さらに internal dose を評価することができるという特徴があり、疫学研究では望ましいばく露評価手法と考えられている。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
無機ヒ素摂取量調査票の開発	無機ヒ素摂取データの統計的解析	吉永淳（東洋大学）
	マーケットバスケット試料の無機ヒ素分析	吉永淳（東洋大学）成川知弘（産業技術総合研究所）
	無機ヒ素摂取調査票の開発	吉永淳（東洋大学）
尿中無機ヒ素代謝産物濃度に基づく摂取量推定法の開発	陰膳・尿試料の収集と前処理	吉永淳（東洋大学）
	陰膳・尿試料の無機ヒ素・無機ヒ素代謝産物分析	成川知弘（産業技術総合研究所）
	無機ヒ素摂取量—尿中排泄濃度の関連解析	吉永淳（東洋大学）

4 倫理面への配慮について

研究協力者から尿と陰膳を提供してもらうデザインであったので、東洋大学の人を対象とする医学系研究倫理審査委員会で審査を受け、承認を得た（2017-010）。

II 研究内容及び成果等

（1）研究項目名：無機ヒ素摂取量調査票の開発

1) 個別課題名：無機ヒ素摂取データの統計的解析（研究担当者：吉永淳（東洋大学））

iAs に関し、わが国で唯一の大規模摂取量調査である、平成 24、25 年度の食品安全委員会による「陰膳サンプルを用いた化学物質・汚染物質の分析調査」結果を詳細に解析した。この調査結果は、環境省が 2006～2010 年度に全国 319 世帯から 3 日間連続で採取した陰膳 949 試料の無機ヒ素濃度および一日摂取量データを一覧にしたものである。

① 無機ヒ素一日摂取量の算出

同データから計算した日本人の iAs 一日摂取量は、15.3 µg/人/日あるいは 0.260 µg/kg/日であった。体重あたりの一日摂取量は対象者の性別、年齢階級、居住地域等により有意な個人間変動は見られなかった。一方、総ヒ素一日摂取量はこうした要因によって有意な変動を示した。個人内変動（1 世帯の 3 日間のばらつき）は変動係数の中央値が 25% と予想外に小さい変動であった。これは②に示すように、iAs の摂取源が米などの主食であるために、個人内・個人間ともに比較的小さい変動幅であると考えられた。

② 無機ヒ素摂取量に寄与する食品群の特定

同データのうち、iAs 一日摂取量（n=949）を従属変数、陰膳調査の際に得られた各食品群の摂取重量を説明変数とした重回帰分析を行った。その結果、iAs 一日摂取量を有意に説明する変数として「米および米製品」の摂取量が見いだされた（調整済み偏回帰係数 $\beta=0.524$, $p<0.001$ ）。その他「油脂類」「魚介類」「豆類」の摂取量が $\beta=0.06\sim0.08$ ($p<0.05$ あるいは $p<0.01$) のやや弱い有意な関連を示した。この統計解析結果から、米類が iAs

摂取量を決定する強い要因であることが示唆された。

2) 個別課題名: マーケットバスケット試料の無機ヒ素分析 (研究担当者: 吉永淳 (東洋大)・成川知弘 (産総研))

2015年12月に別研究のために静岡市内で行ったマーケットバスケット調査試料(「穀物」「芋類」「糖類および甘味料」「豆類」「種実類」「野菜類」「果物類」「きのこ類」「藻類」「魚介類」「肉類」「卵類」「乳類」「油および脂肪類」「菓子類」「飲料類」「調味料および香辛料類」の計17群)凍結乾燥された各食品群の試料は、10% (w/v)ペプシンを含む 0.07 mol L^{-1} 塩酸溶液を用いて、温度37°Cで2時間振とうし、水溶性ヒ素化合物を抽出し、液体クロマトグラフ ICP 質量分析法 (LC-ICP-MS) により、iAs の定量を行った。

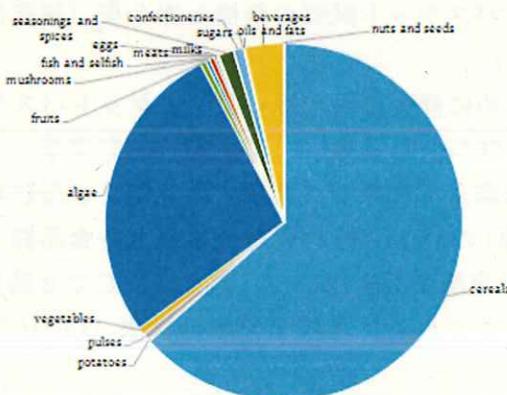
各食品群の抽出液である実試料の定量に先立ち、LC-ICP-MS での高感度化および精確さの検討を行った。試料マトリックスが ICP-MS へ与える負荷を軽減するためのガードカラムの有用性と、分析時の試料導入量および LC 条件について検討した。その結果、ガードカラムの利用は、分析用カラムの劣化と試料マトリックスの抑制に効果的であると思われたが、LC 流路圧を約 40 %増加させ、さらに繰り返し試験における耐久性を大きく向上させるものではなかった。よって、分析用カラムを定期的に交換して定量した方が、LC への負荷が小さく、分析値も安定すると考えられた。また、定量時の試料導入量を $10 \mu\text{L}$ から $50 \mu\text{L}$ に変化させ、導入量依存性を確認した。試料導入を増加する事は、その分得られる感度が増加し、見た目上の検出下限が良くなる、すなわち高感度化される。しかしながら、同時に試料マトリックスを多量に分析用カラムに導入することになるため、実試料では特段の性能向上は認められなかった。また、試料導入時の液相幅が広くなるため、多種多様なピークが存在する実試料では、近傍ピークの分離が悪くなる可能性が高い。よって、感度と精確性を考慮し、 $20 \mu\text{L}$ を標準導入量とした。

また、高感度化と精確さに関しては、イオン交換カラムと逆相カラムにおける条件(分離挙動と溶離液組成など)、ICP-MS における検出での条件検討(セルガス条件など)および干渉物質の影響($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ による多原子分子イオン干渉の影響など)を検討し、最適化をした。さらに、最適化した条件を用い、コメ組成標準物質中無機ヒ素を繰り返し測定して耐久性を検討した。これらの検討の結果、逆相 ODS カラムを用いた LC-ICP-MS において、試料導入量 $20 \mu\text{L}$ 、イオンペア試薬系溶離液、カラムサイズ $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、溶離液流速 0.5 mL min^{-1} 、ヘリウムコリジョンガスによる測定が妥当であった。よって、規格化した条件を基に、食品群試料の測定を行った。

その結果、総ヒ素量としては「藻類」および「魚介類」に多くのヒ素が含まれていることが確認された。しかし、「魚介類」ではそのほとんどは有機ヒ素化合物であり、iAs は全体の 0.5 %にも満たない。一方、「藻類」では、全体の約 8 %が iAs であった。その他の食品群に関しては、ヒ素の含有量自体が微量であり、「穀類」で数百 ppb レベル、その他は数~数十 ppb レベルであった。しかし、iAs に着目した際には、「穀類」「豆類」および「きのこ類」では全体の約 70 %が iAs であった。

LC-ICPMS により得られた各食品群試料の iAs 濃度と、平成 25 年度国民健康栄養調査でえられた東海地方の各食品群別一日摂取量とを掛け合わせて、食品群ごとの iAs 摂

取量及びその和としての一日摂取量を算出した。その結果を図 1 に示す。



Daily inorganic As intake from food categories

図 1. 無機ヒ素摂取量の関するマーケットバスケット調査の結果

一日 iAs 摂取量は 25.4 μg/人/日、最大の寄与をする食品群は「穀類」で 63% (16.1 μg/人/日)、ついで「藻類」(27%) 「豆類」「野菜類」(ともに 0.6%) と、「穀類」と「藻類」で 90% を占め、他はほとんど寄与をしていなかった。米類が最大の寄与をするというのは、上記 (1) ②の陰膳試料の分析結果に基づく統計解析結果とよく合っているが、藻類の寄与は統計解析結果とは異なるものであった。

3) 個別課題名：無機ヒ素摂取調査票の開発（研究担当者：吉永淳（東洋大））

上記 1) 2) の結果を受けて、日本人の一日 iAs 摂取量に大きな寄与をする食品群は穀類および藻類であると考えた。また既往の文献における知見より、穀類の中でも特に米が、藻類の中でも特にひじきが主要な iAs 源であると考えられたので、米類とひじきの摂取量を調べる簡易調査票を開発した。2018 年度 4 月より、陰膳調査対象者にこの調査票案に回答をしてもらい、71 人からの回答を得た。

調査票は、①普通の茶碗によそった「めし」、②小鉢にとった、一人前のひじきの煮物、の写真を提示し、それぞれを a 陰膳調査当日に、b 通常日に 何杯食べた（る）かを聞くものである。a で得られた回答と、白米・玄米およびひじきの平均的な iAs 含有量、および、調理の過程での iAs 含有量の変化を考慮して、各対象者の一日 iAs 摂取量を推定した。ここで白米、玄米の iAs 含有量については、農林水産省の 2003-2005 及び 2012 年度のサーベイランス結果（白米 n=640、玄米 n=1200）を使用することとしたが、同サーベイランスではひじきのデータが少ない (n=71)。そのため、本研究でも別途ひじきを購入し (n=30)、iAs 含量を測定して農水省データに追加した。なお追加したひじき iAs 濃度データは、 $1.81 \pm 1.19 \text{ mg As/g}$ で、農水省のデータ（平均 3.6 mg As/g）と比較すると、約半分の値であった。

調査票から推定した一日 iAs 摂取量と、陰膳試料から実測した一日摂取量との比較を

図 2 に示す。ピアソンの相関係数 $r=0.651$ は高度に有意であった ($p<0.001$) ことから、推定摂取量が実測値を概ねよく反映していることが見て取れたが、回帰直線の傾きは 0.40 と小さく、推定摂取量は実測値の 2.5 倍の高値を示すことがわかった。この結果から、推定に用いたひじきの iAs 含量が過大評価のため、ひじきを食べた対象者の摂取量が過大になり、推定値が実測値を大幅に超過している可能性が示唆されている。

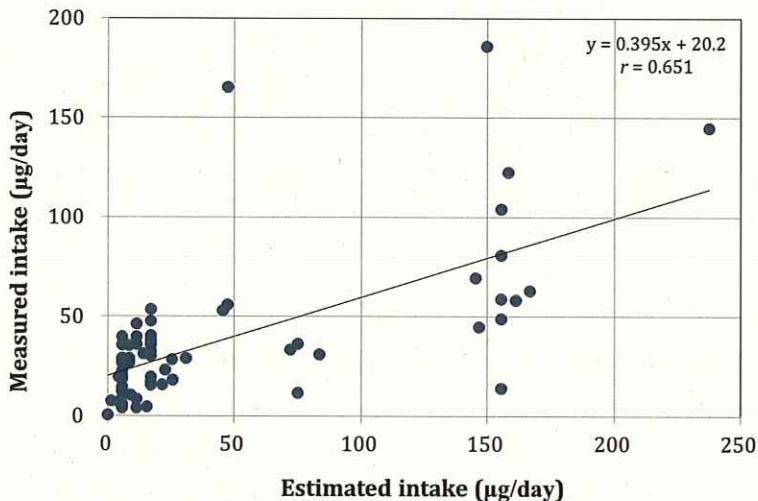


図 2 質問票に基づく無機ヒ素推定一日摂取量と陰膳からの実測摂取量の比較

(2) 研究項目名：尿中無機ヒ素代謝産物濃度に基づく摂取量推定法の開発

- 1) 個別課題名：陰膳・尿試料の収集と前処理（研究担当者：吉永淳（東洋大））
iAs 摂取レベルと排泄レベルとの関連を調べる目的で、2017, 18 年度 2 年間で 150 名の対象者から陰膳と陰膳採取翌朝の早朝尿の提供を受けた。対象者の性別・年齢別の内訳は表 1 のとおりである。

表 1 陰膳及び尿を採取した対象者の性別年齢別内訳

	20 代以下	30-50 代	60 代以上	合計
男性	21	25	19	65
女性	25	33	27	85
合計	46	58	46	150

採取した陰膳は、フードプロセッサによる混合・均一化後、一部 (~100 g) を凍結乾燥し、さらにメノウ乳鉢・乳棒で粉状にすりつぶしたものを保管している。尿は対象者から受領した後、比重を測定し、凍結保存し、順次クレアチニン濃度の測定を行った。これら陰膳、尿は順次研究分担者に送付し、iAs 濃度の測定をした。

- 2) 個別課題名：陰膳・尿試料の無機ヒ素・無機ヒ素代謝産物分析（研究担当者：成川知弘（産総研））

1) で収集・前処理した陰膳及び尿試料のヒ素化学形態分析を、2017年度にバリデーションした LC-ICPMS 法を使用して行った。陰膳中 iAs 濃度に陰膳重量をかけて一日摂取量を算出し、必要に応じて対象者の体重で割って体重 1 kgあたりの摂取量を求めた。尿中の iAs と MMA 濃度を合計して iAs 代謝産物濃度とした。表 2 に 150 名分の記述統計を示す。

表 2 対象者の無機ヒ素一日摂取量と尿中排泄 (n=150)

	単位	平均	標準偏差	中央値
一日摂取量	μg/kg/day	0.501	0.531	0.387
尿中 iAs+MMA 濃度	ng As/mL	6.86	6.17	5.58
〃	ng As/ mg cre	5.21	4.21	4.30

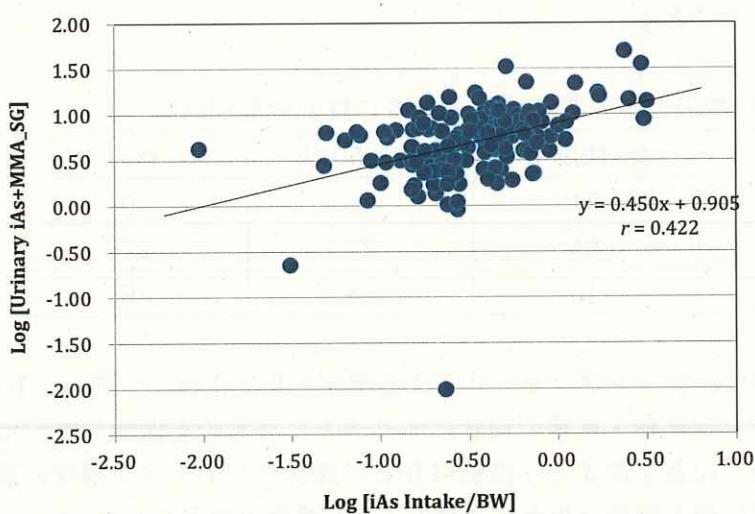
3) 個別課題名：無機ヒ素摂取量—尿中排泄濃度の関連解析（研究担当者：吉永淳（東洋大））

上記 1) 2) によりえられた、150 名の無機ヒ素一日摂取量（陰膳分析より）と尿中無機ヒ素+メチルアルソン酸濃度（比重あるいはクレアチニン補正済み）との関連を解析した。摂取量、尿中濃度とも対数正規分布に近似できたので、両者を対数変換して回帰分析を行った。その結果、比重 (SG) 補正、クレアチニン (cre) 補正、それぞれが

$$\text{Log} [\text{摂取量}] = 0.450 \times \text{Log} [\text{尿中 iAs+MMA}_\text{SG}] + 0.905 \quad (r=0.422)$$

$$\text{Log} [\text{摂取量}] = 0.501 \times \text{Log} [\text{尿中 iAs+MMA}_\text{cre}] + 0.820 \quad (r=0.497)$$

であった。散布図を図示すると、次のようになる。



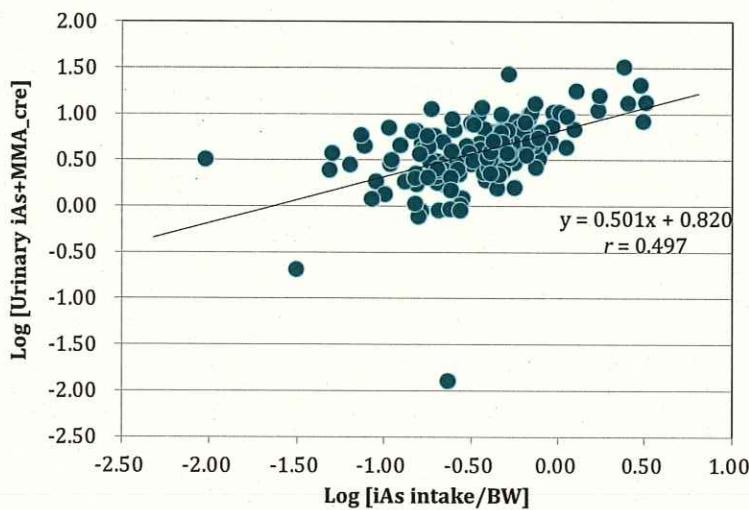


図 3 無機ヒ素一日摂取量と尿中 iAs+MMA 濃度との関連。上、尿中濃度を比重補正；下、尿中濃度をクレアチニン補正。

クレアチニン補正した尿中濃度の方が比重補正したものよりも、摂取量との相関係数は大きかったが、散布図で見ると両者の関係には大きな違いはなかった。また、対象者を男女に分けて解析しても、回帰直線には男女差が見られなかった（共分散分析）。

(3) 研究全体の成果、考察及び結論

iAs の発がんやそのほかの健康影響の量一影響関係を定量的に明らかにし、わが国における iAs 摂取の健康リスクを把握するためには、疫学的な調査が必須である。疫学的に摂取量を評価する方法の一つが陰膳法による摂取量の実測であるが、この方法はコストと時間がかかるために、大規模疫学での曝露評価法としては適切とは言えない。本研究は陰膳法を iAs 曝露評価のゴールドスタンダードとみなし、それよりも簡易な方法である尿中 iAs 関連物質濃度測定あるいは調査票によるコメとひじきの摂取量見積もりに基づく方法を比較して、こうした方法の有用性を評価することとした。

その結果、尿中 iAs+MMA 濃度でも簡易調査票であっても、陰膳からの iAs 摂取量と強い正の相関関係があることが判明し、今後の iAs 疫学調査における曝露評価手法として、どちらも有用であることを示した。尿の場合、相関係数は 0.5 未満、調査票法の場合相関係数は 0.65 と、やや後者の方が係数が大きかった。尿中 iAs 代謝物排泄濃度は、iAs 摂取と採尿のタイミングや、まだあまり知られていない iAs 代謝に係る個人間変動の可能性など、一日摂取量と排泄濃度との関連を修飾する要因があるものと推測される。しかしながら本研究結果は、尿中 iAs (及び代謝産物) 濃度に基づく生物モニタリング結果を、一日摂取量に換算する式を提供できたという点で、今後の曝露評価に有用である。

本研究でも明らかにしたように（図 1）、日本人の iAs 摂取源は、ほぼコメとひじきだけである、という事実から、簡易食事調査票の有用性が期待され、本研究結果はその期待に違わなかったといえる。推定値と実測値の相関係数は 0.65 と高かったものの、回帰直線の傾きが約 0.4 と、大きく 1 と異なったことは、今後の検討を要する。具体的には、調査票による摂取量推定値の算出に使用したコメ及びひじきの iAs 含有量の妥当性

の検討である。ひじきの iAs 濃度として農水省のサーベイランス（2006-2008 年度）では 3.6 mg/kg であったのに対し、本研究で購入した国内産ひじきの iAs 平均値は 1.8 mg As/kg と約半分の値であった。この 10 年間に市販のひじき iAs 含有量が減少傾向にあるのかもしれない。仮に本研究で測定したひじき濃度のみを使用して iAs 一日摂取量を計算しなおすと、回帰直線の傾きは 0.78 まで上昇し、推定値と実測値はよりよく合致する。今後は、より正確に回答しやすい調査票に修正すること、わが国で消費されているひじきの iAs 濃度の現状をより広範に把握することで、調査票による推定値の精度が上昇すると考えられる。

本研究遂行の過程で、日本人の iAs 一日摂取量（陰膳データ、マーケットバスケットデータ）、摂取源、摂取量の集団内変動など、曝露に関する最新の基礎的な情報も入手できた。

III 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

A. Hayashi, F. Sato, T. Imai, J. Yoshinaga (2018) Statistical approach to identify food categories that determine daily intake levels of total and inorganic arsenic, lead and aluminum of Japanese diet. ◎Food Addit. Contam. 35: 1749-1754.

A. Hayashi, F. Sato, T. Imai, J. Yoshinaga (2019) Daily intake of total and inorganic arsenic, lead, and aluminum of the Japanese: Duplicated diet study. ◎J. Food Comp. Anal 77: 77-83.

2 本研究を基にした学会発表の実績

吉永淳、成川知弘：無機ヒ素摂取量推定のための簡易質問票の開発と評価. 第 77 回日本公衆衛生学会、郡山、2018 年 10 月 24-26 日.

成川知弘、吉永淳、小栗朋子：食事中無機ヒ素の摂取量と排泄に関する調査. 第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、広島、2018 年 11 月 15-16 日.

林亜希子、佐藤文夫、今井智子、吉永淳：日本人の無機ヒ素摂取量—環境省陰膳サンプル分析データの解析. 第 24 回ヒ素シンポジウム、熊本、2018 年 11 月 24-25 日.

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 食品安全委員会による日本人の無機ヒ素摂取量データの解析に基づき、無機ヒ素主要摂取源となる食品の特定を行う。	5	当初の目標通り解析を完了した。
(2) マーケットバスケット試料の実測に基づき、食品群ごとの無機ヒ素濃度レベル、主要摂取源となる食品の無機ヒ素濃度を求めて、日本人の食品ごとの無機ヒ素濃度レベルについて基礎的なデータを得る。	5	当初の目標通り分析・解析を完了した。
(3) 上記(1)(2)に基づき明らかになった無機ヒ素主要摂取源の摂取頻度・量を調査するための簡易調査票を開発する。	5	調査票を開発し、71名に記入してもらい、それに基づく無機ヒ素摂取量推定値と陰膳試料の無機ヒ素濃度に基づく摂取量実測値の比較を目標通りに行った。
(4) 150名を目標として、陰膳と尿の採取と、その無機ヒ素・無機ヒ素代謝産物分析を行ない、無機ヒ素一日摂取量—尿中無機ヒ素代謝産物排泄濃度の関連を解析する。	5	2017,18年度併せ150名分について摂取量と尿中排泄の間の相関分析を行った。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	当初目標はすべてクリアした。
(2) 研究成果の有用性	4	簡易調査票に基づく摂取量推定値と陰膳による実測値の相関は良好で、曝露評価に使用できるめどが立った。尿中濃度から摂取量を推定するための回帰式が求まったため、尿分析から摂取量推定が可能になった。ただし当初予測よりも、陰膳から実測した摂取量—尿中排泄間、調査票からの推定値—陰膳から実測した摂取量間の相関が弱く、当初の目標に照らすと、尿分析や調査票から摂取量を高い精度で推定することが困難かもしれない。相関のずれを考察することで新しい知見が得られる可能性がある。
総合コメント		
全体的に当初の目標通り研究は進捗したが、尿や質問票から高い精度で摂取量を推定することが予想よりも困難かもしれないという事実に直面している。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。