

アルミニウムの精神・神経疾患、新生児発育に  
対する新たなリスク評価指標の開発に向けた取  
り組み

入野康宏：神戸大学 医学研究科

1

**Evaluation of aluminum toxicity  
to neuronal development and  
estimation of aluminum exposure  
in population in Japan**

Yasuhiro Irino, Kobe University

2

# アルミニウム



- アルミニウムの幅広い利用
- 高濃度アルミニウムの神経毒性
- アルミニウムとアルツハイマー病発症の間の疫学的関連性
- 食品、医薬品、およびベーキングパウダーなどの食品添加物に含有

3

# Aluminum



Widespread use of aluminum

Neurotoxicity of high levels of aluminum

Epidemiological relationship between aluminum and the incidence of Alzheimer's disease

Inclusion in food, medicines, and food additives such as baking powder

4

## アルミニウムのリスク評価

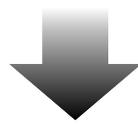
アルミニウムは；

- 食品添加物に含まれている
- 調理器具や容器に広く利用されている



アルミニウムは；

日常生活の中で摂取される機会が多い



アルミニウムのリスク評価

5

## Risk assessment of aluminum

**Aluminum is**

Included in food additives

Widely used for cookware, containers



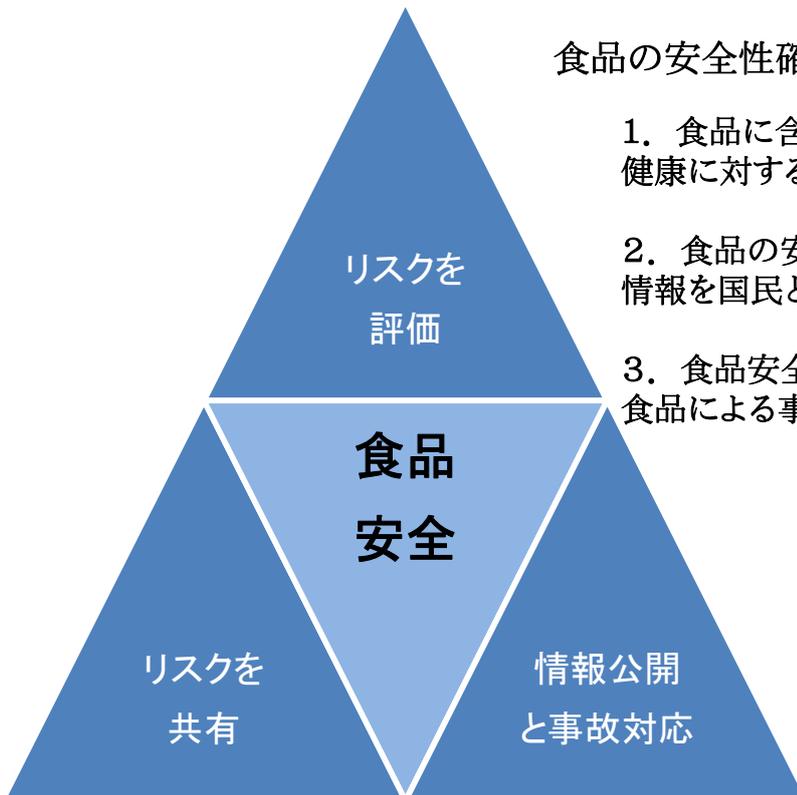
Aluminum is frequently ingested in a daily life



**Risk assessment of aluminum**

6

# 食品安全委員会の役割

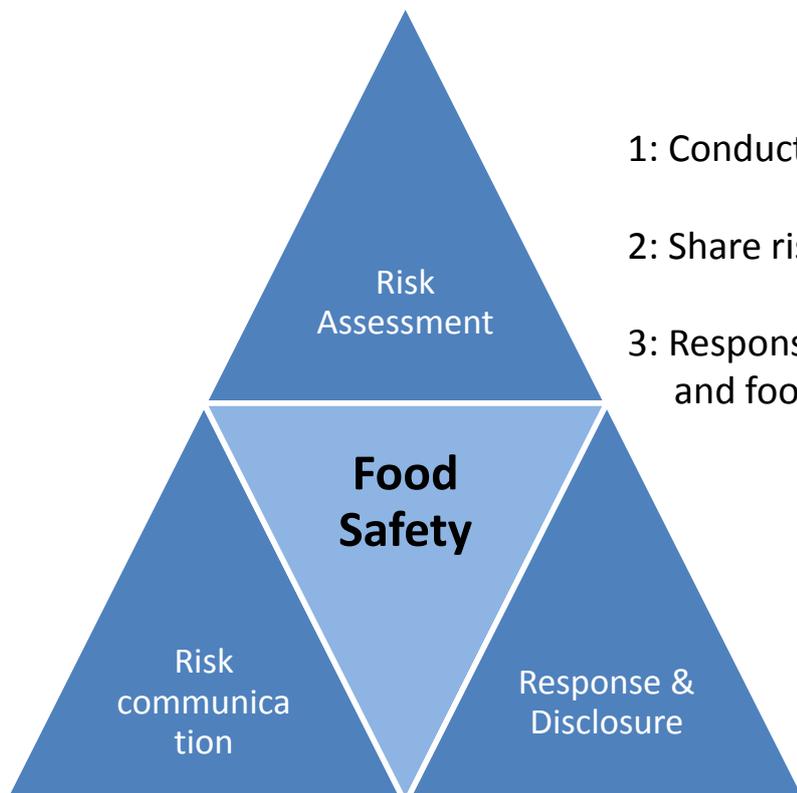


食品の安全性確保のために：

1. 食品に含まれる可能性のある有害物質の健康に対する影響についてリスク評価を行う
2. 食品の安全性やリスク評価についての情報を国民と共有する
3. 食品安全にかかわる緊急事態や、食品による事故に対処する

7

# Mission of Food Safety Commission



- 1: Conduct risk assessment
- 2: Share risk information on food
- 3: Response to emergency and food-induced accidents

8

## リスク評価に向けた研究

1. リスク評価の実施
2. 食品のリスク情報の共有
3. 緊急事態および食品事故への対応

食品安全委員会は、リスク評価の推進と発展のための  
研究を支援している

9

## Research for risk assessment

- 1: Conduct risk assessment
- 2: Share risk information on food
- 3: Response to emergency situations  
and food-induced accidents

**Food Safety Commission has been supporting  
researches to promote and advance risk assessment**

10

## 本研究の目的

### 臨床研究：血中アルミニウムの測定

- アルミニウムの高感度測定方法の確立
- 日本におけるヒト血液中アルミニウムの測定分析

### 動物実験：網羅的行動テストによる行動解析

アルミニウム暴露マウスにおける神経毒性のリスク評価のための新しい指標を探索

11

## Objective of this study

### Clinical study: measurement of aluminum in blood

Establish a methodology for aluminum measurement  
Analyze aluminum in blood of population in Japan

### Animal study: comprehensive behavior analysis

Explore new indicators of neurotoxicity in Aluminum-treated mice

12

## 血中アルミニウム測定法の問題点



- アルミニウムの血中濃度は低い
- 測定試料の調製が煩雑である
- 入手できる血液が微量である

13

## Difficulties for analyzing aluminum in blood



- Low concentration of aluminum in blood
- Complicated sample preparation
- Small sample volume

14

## ICP-MS（高周波誘導結合プラズマ質量分析計）

### 特徴



測定限界が十分に低い高感度分析法

マトリックス効果及び分子イオンによる干渉を克服できる

微量サンプルを処理できる

未知の試料の広範囲にわたる濃度を測定するための十分な直線性

大量の測定に耐える堅牢性（けんろうせい）

15

## ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

Sufficiently low detection limits



Ability to overcome matrix related interferences

Ability to cope with small sample volumes

Reliable linearity to measure in a wide concentration range

Robustness for high sample throughput

16

## 血中アルミニウムの測定

### 方法

ヒト血清



0.7 mM アンモニア, 0.01 mM EDTA, 0.07% TritonX100, 1.5% 1-ブタノール, を含むアルカリ性溶液で前処理をし、内部標準物質として 20 ppb ロジウム(Rh) を加える



ICP-MS を用いて分析

17

## Quantification of Aluminum in blood

### Method

human serum



pretreat with a solution composed of 0.7 mM Ammonia, 0.01 mM EDTA, 0.07% TritonX100, 1.5% 1-butanol, and add 20 ppb Rh (rhodium) as internal standard



Analysis with ICP-MS

18

## 血中アルミニウムの測定

**測定条件** 装置: Agilent 7700x ICP-MS

ICP-MS分析パラメータ	
Rf 出力(W)	1550
キャリアガス(L/min)	1.05
スプレーチャンバ温度(°C)	2
ガス流量(mL/min)	4.5
ガスモード	He
質量あたりの積分時間(s)	3.0

19

## Quantification of Aluminum in blood

**Condition** Device: Agilent 7700x ICP-MS

ICP-MS parameters used in this study	
Rf Power (W)	1550
Carrier gas (L/min)	1.05
Spray chamber temp (°C)	2
Gas flow (mL/min)	4.5
Gas mode used	He
Integration time per mass (s)	3.0

20

# ICP-MS (高周波誘導結合プラズマ質量分析計)

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026												
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122																	boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180						
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305																	aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948						
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80												
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [98]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	paladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29												
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04	actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]												

\* Lanthanide series

\*\* Actinide series

lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04
actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]

monitoring  $m/z$ : 27 for aluminum, 103 for rhodium

21

# ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026												
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122																	boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180						
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305																	aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948						
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80												
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [98]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	paladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29												
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04	actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]												

\* Lanthanide series

\*\* Actinide series

lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04
actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]

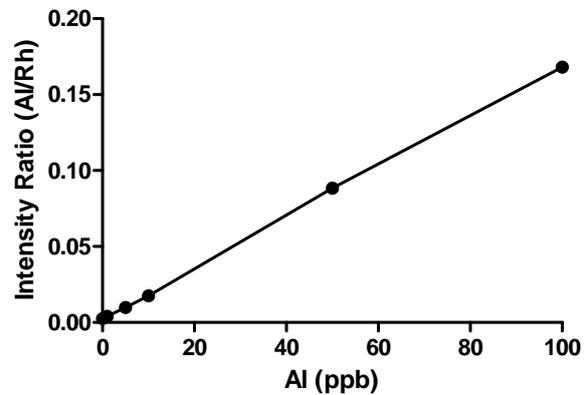
monitoring  $m/z$ : 27 for aluminum, 103 for rhodium

22

# 血中アルミニウムの定量測定

## 検出限界と定量測定可能な濃度域

検出限界: 1 ppb  
濃度域: 1 ppb – 100 ppb



## 定量精度の検証

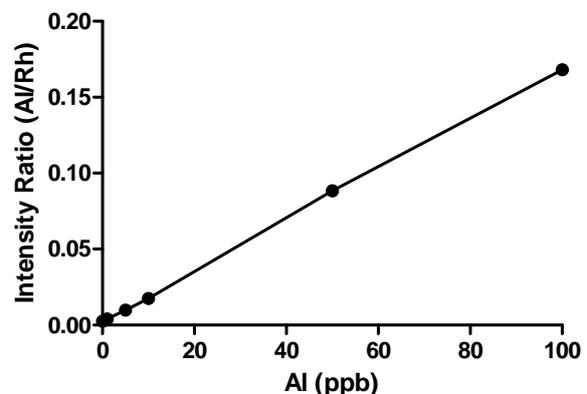
保証付き標準物質(CRM)  
定量値の許容範囲: 92-116 ppb  
我々の測定で得られた定量値: 111.45 ppb

23

# Quantification of Aluminum in blood

## Detection limit and Quantifiable range

Detection limit: 1 ppb  
Range: 1 ppb – 100 ppb



## Accuracy check

Certified Reference Material (CRM)  
Acceptable range: 92-116 ppb  
Acquired value in our analysis: 111.45 ppb

24

## 被験者情報

被験者情報	
被験者総数	51人
男性	29人
女性	22人
被験者の年齢分布	
平均	13.1歳
中間年齢	13歳
年齢域	1-27歳
0-10	(n.) 18 (M:10, F:8)
11-20	(n.) 25 (M:13, F:12)
over 21	(n.) 8 (M:6, F:2)

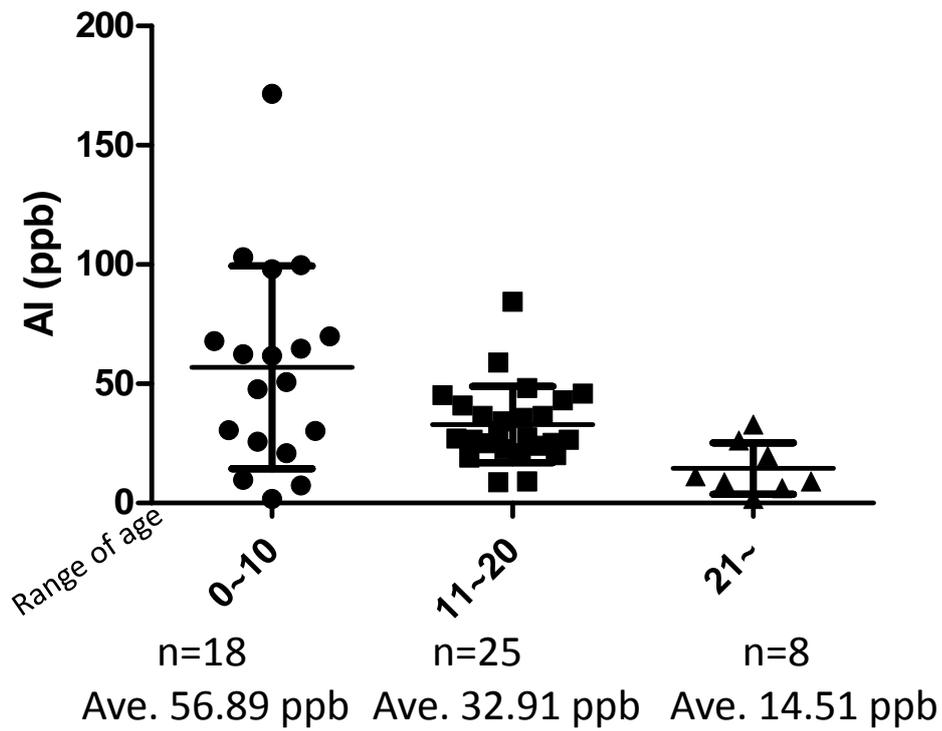
25

## Subject information

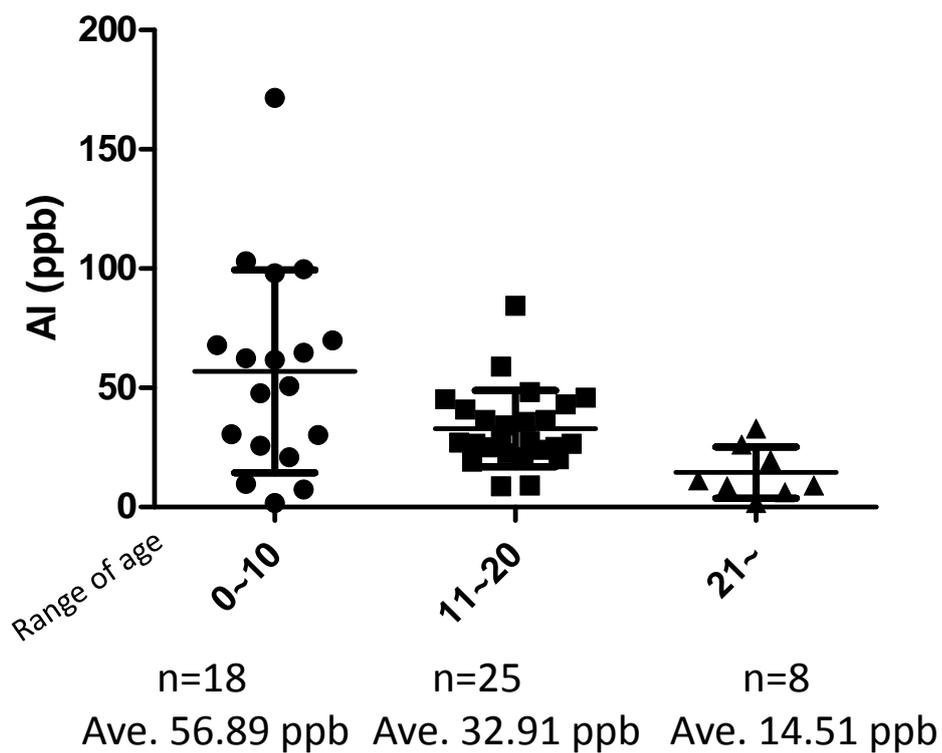
Subject information	
<b>Number of subjects</b>	51
Male	29
Female	22
Age (years) of subjects	
Mean	13.1
Median	13
Range	1-27
0-10	(n.) 18 (M:10, F:8)
11-20	(n.) 25 (M:13, F:12)
over 21	(n.) 8 (M:6, F:2)

26

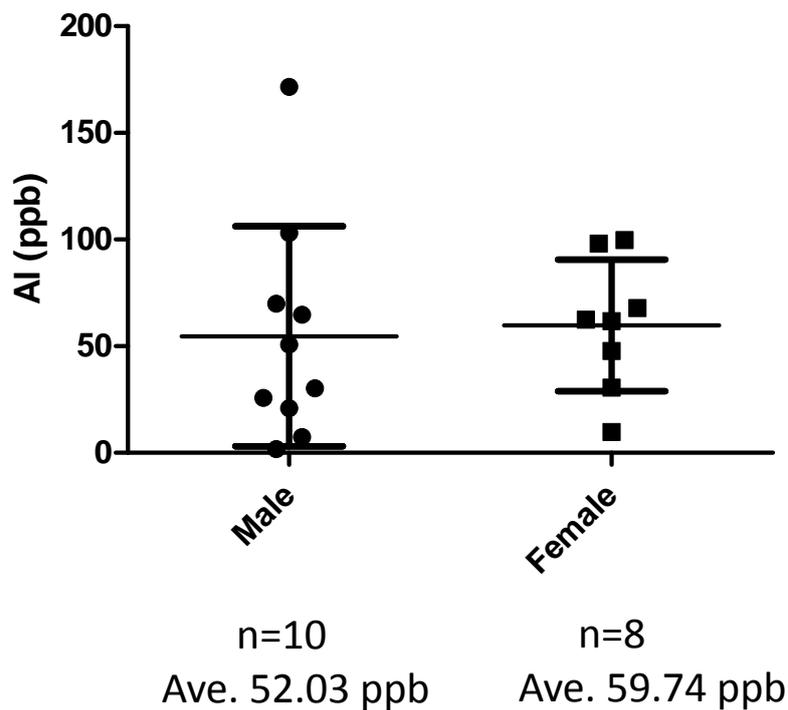
# 日本における年齢域別の血中アルミニウム濃度



# Aluminum in blood in population of different ages in Japan

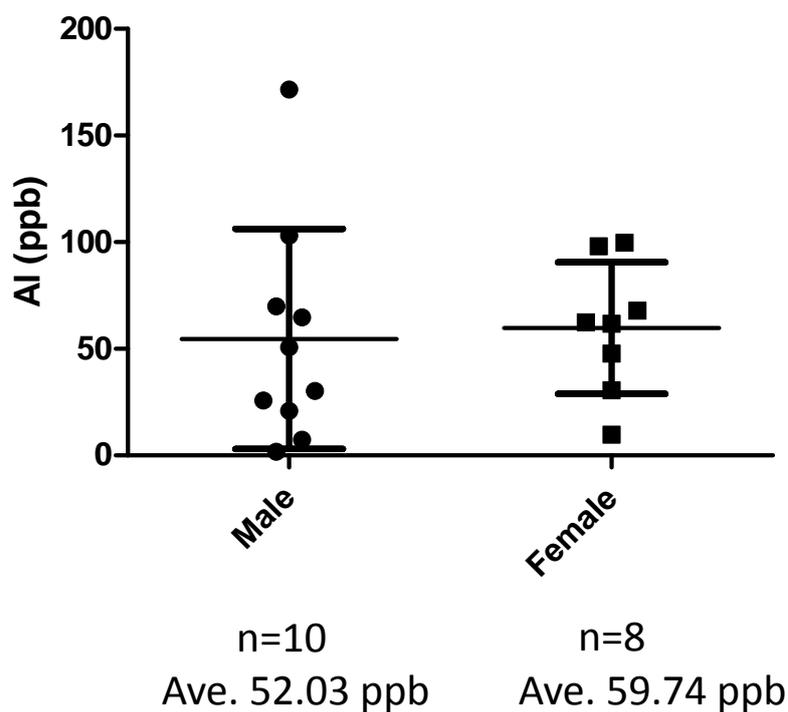


# 0~10歳の年齢層における血中アルミニウム濃度



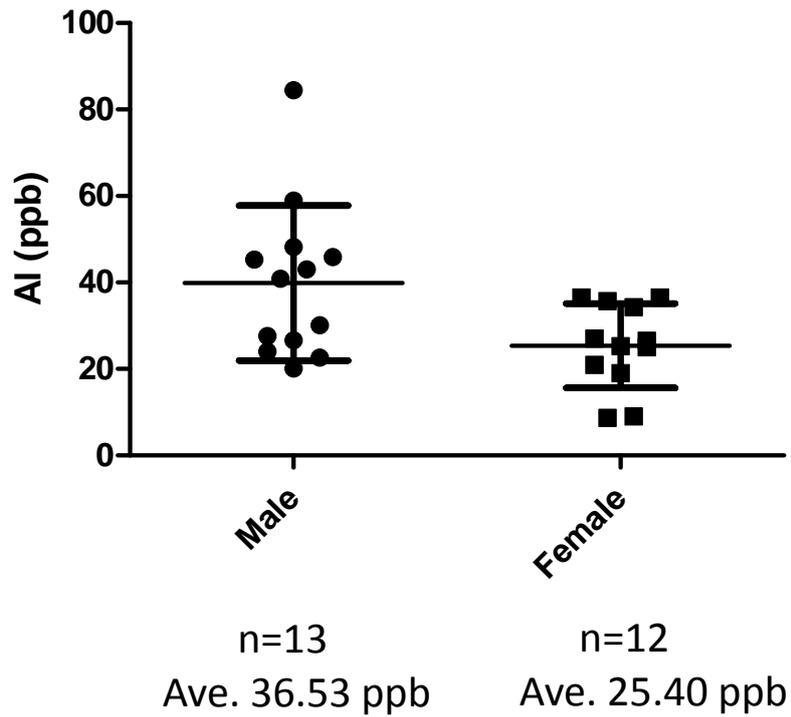
29

# Aluminum in blood in population of age 0-10 in Japan

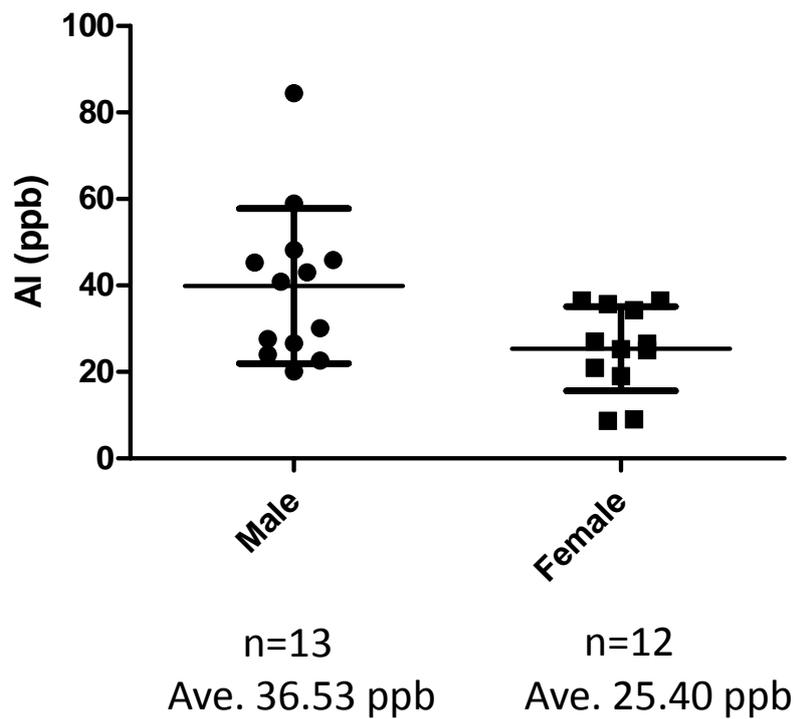


30

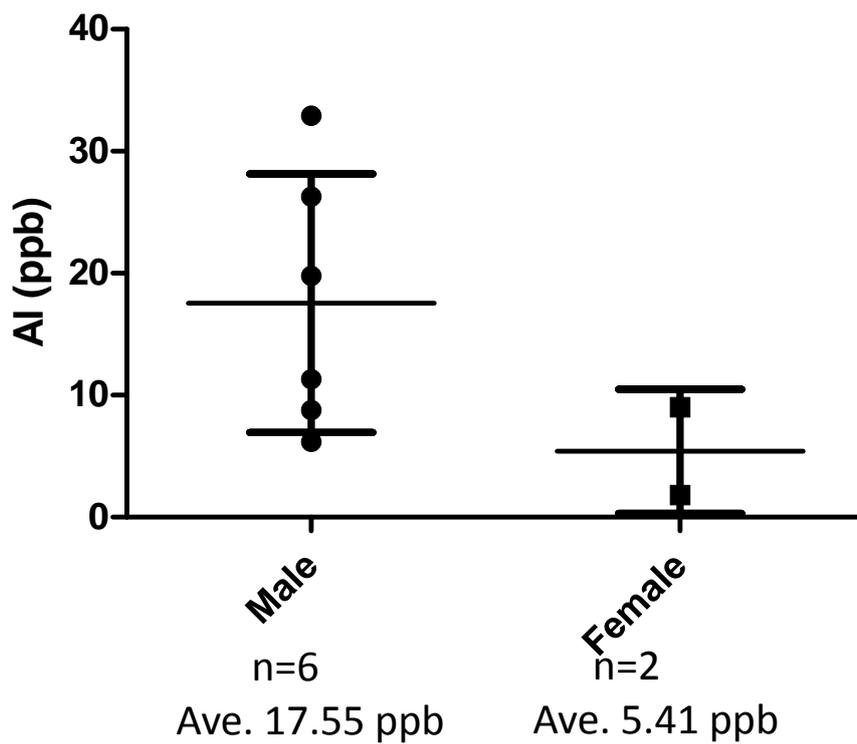
# 11～20歳の年齢層における血中アルミニウム濃度



# Aluminum in blood in population of age 11-20 in Japan

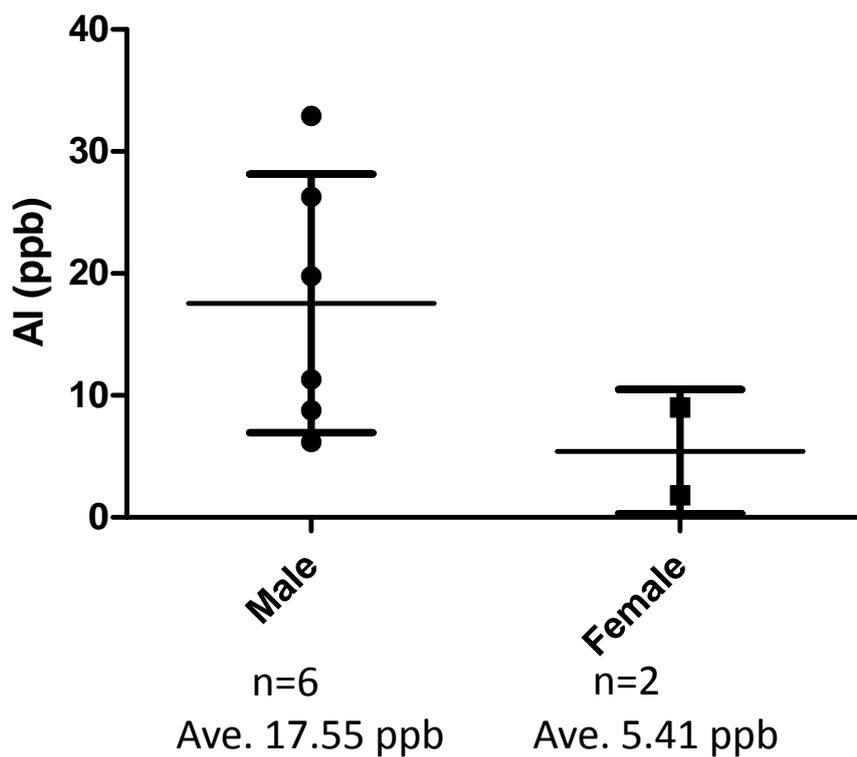


## 21歳以上の年齢層における血中アルミニウム濃度



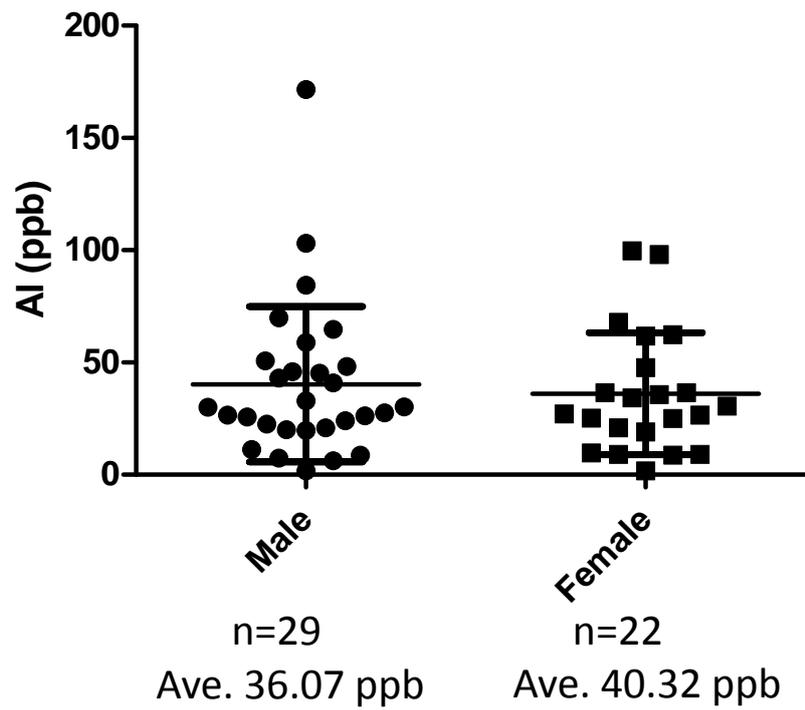
33

## Aluminum in blood in population of age over 21 in Japan



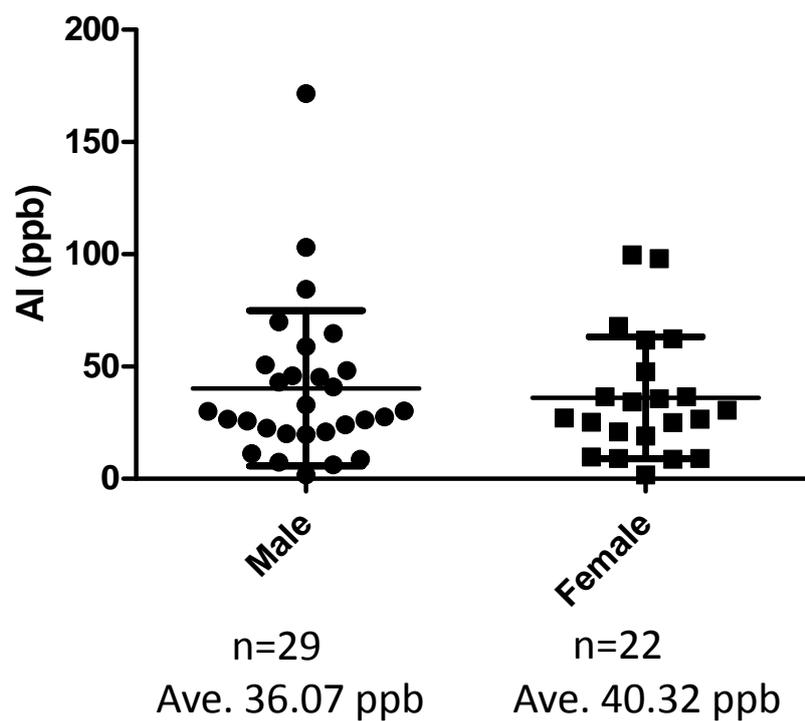
34

# 日本の総年齢層における血中アルミニウム濃度



35

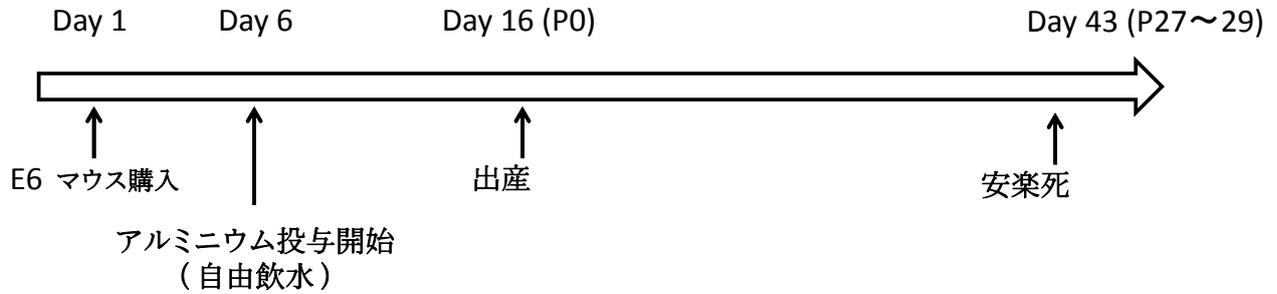
# Aluminum in blood in Japan (whole range of age)



36

# アルミニウム負荷実験

## 妊娠マウスに対するアルミニウム負荷実験

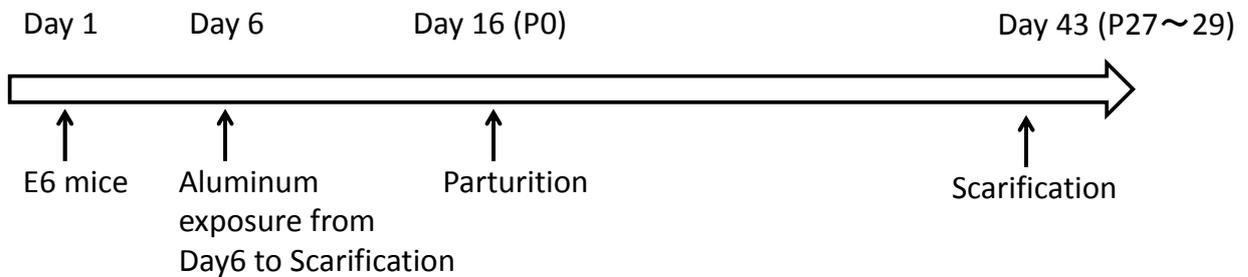


アルミニウム投与実験のタイムライン

37

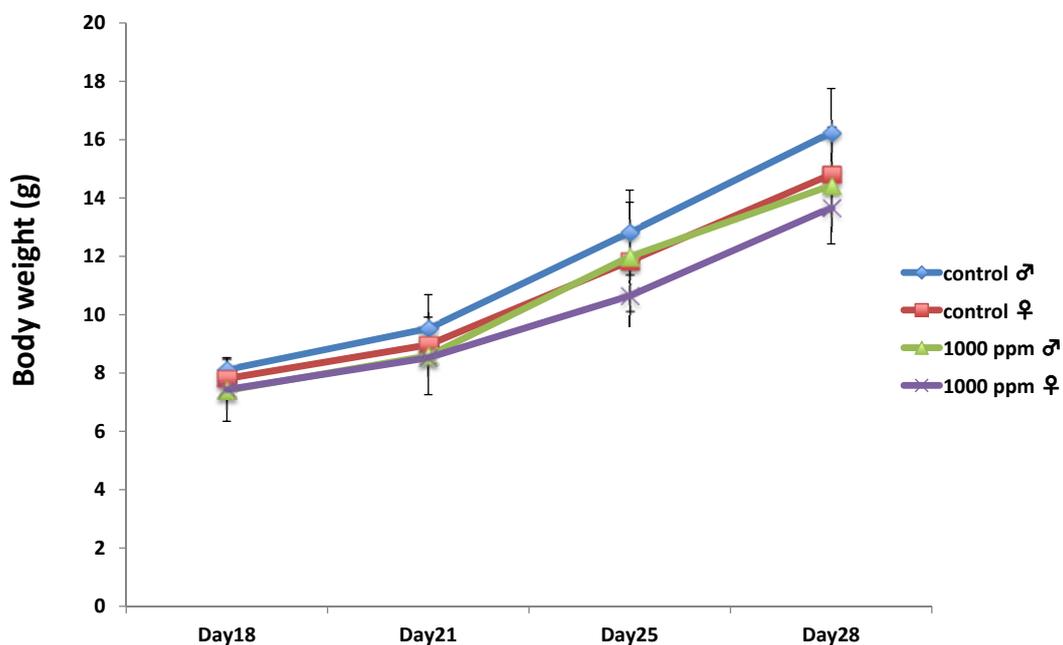
# Aluminum exposure experiments

## Exposure of pregnant mice to aluminum



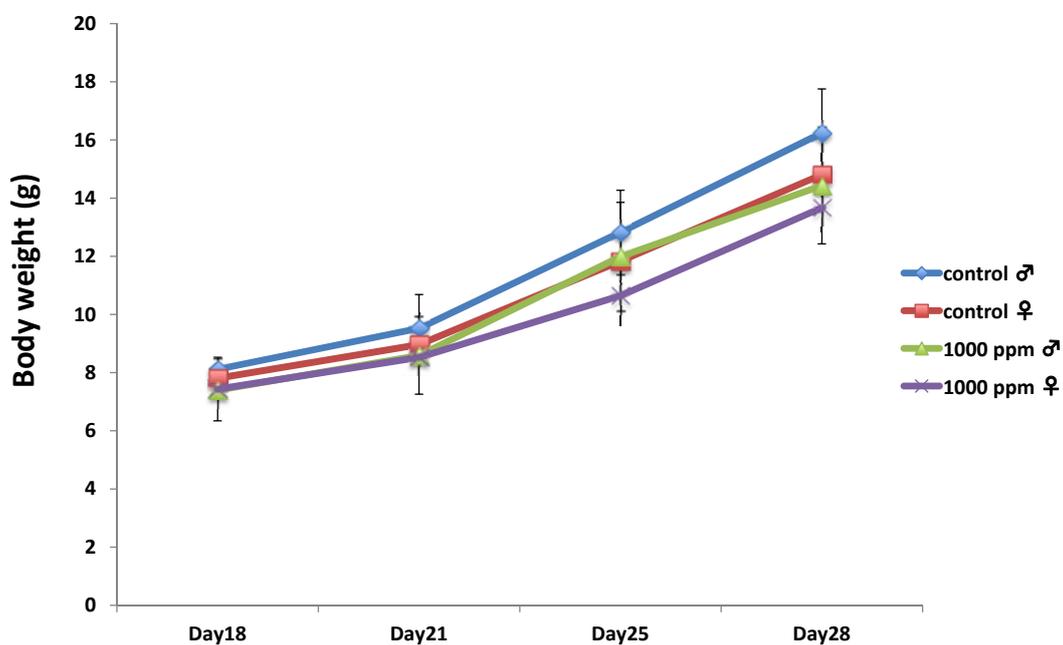
38

## アルミニウム負荷時の体重推移



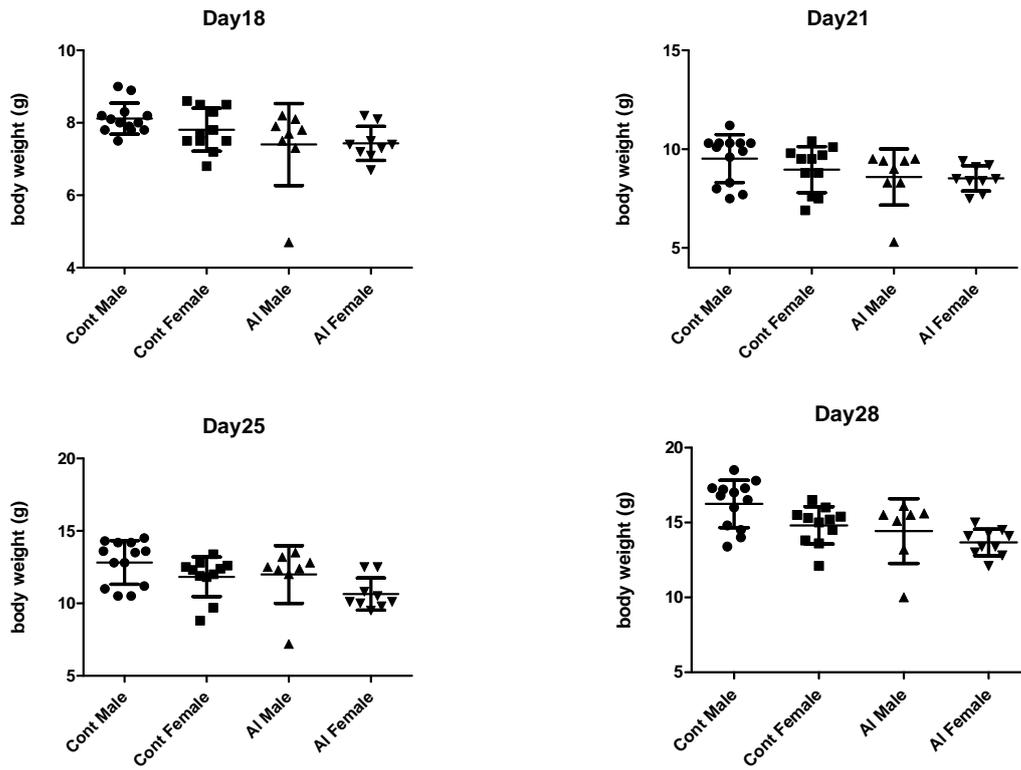
39

## Effect of in-utero exposure to aluminum on postnatal increase of body weight



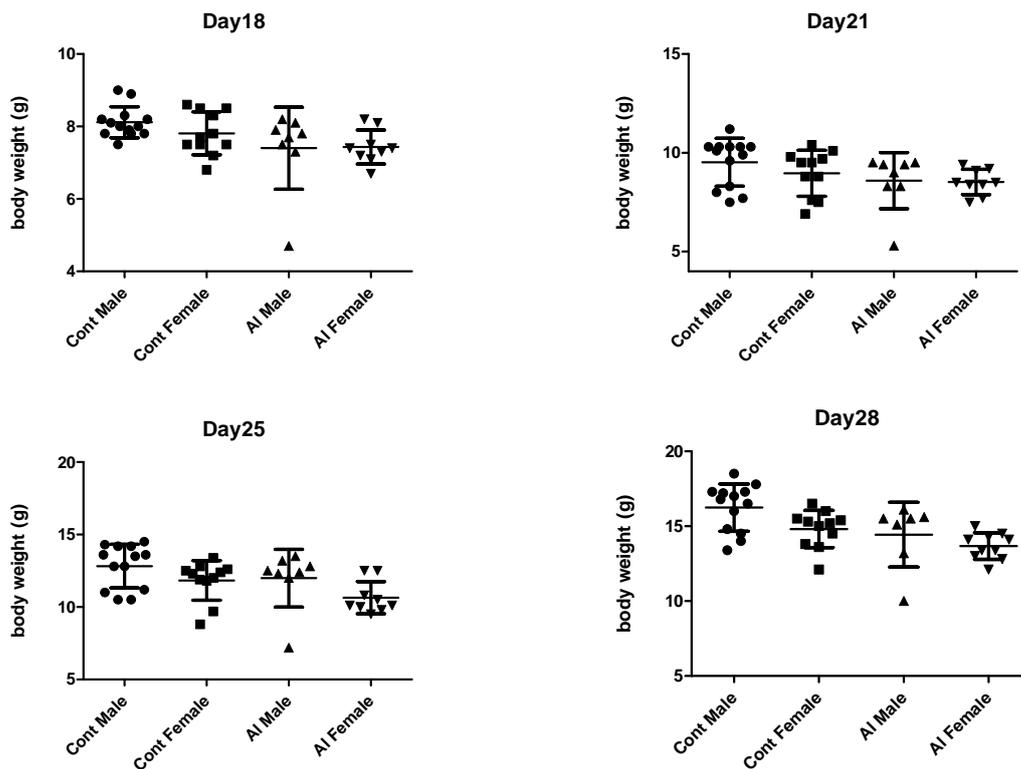
40

# アルミニウム負荷時の体重推移



41

# Effect of in-utero exposure to aluminum on postnatal body weight of males and females



42

# 網羅的行動解析

C57BL/6J

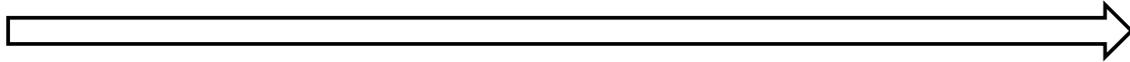


雌マウス (n=19) 陰性対象群  
雌マウス (n=19) アルミニウム負荷群

75 ppmの Al を自由飲水で投与

4 週

10 週



行動解析実施

43

# Comprehensive behavior analysis

C57BL/6J

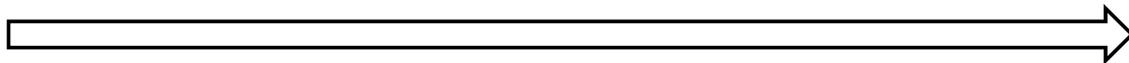


female (n=19) Negative control  
female (n=19) Aluminum exposure

75 ppm Al in drink water

4 weeks

10 weeks



behavior analysis

44

## 網羅的行動解析結果

テスト名	評価内容	結果
一般的健康状態	体重・筋力・体温・握力の測定	アルミの影響なし
明暗選択テスト	不安様行動評価	アルミの影響なし
オープンフィールドテスト	活動性や情動性の評価	アルミの影響なし
高架式十字迷路テスト	不安様行動評価	アルミの影響なし
ホットプレートテスト	痛覚感受性の評価	アルミの影響なし

45

## Results of comprehensive behavior analysis

Tests	Meanings	Results
General health, neurological screening	General health	No effect of Aluminum
Light/dark transition test	Anxiety	No effect of Aluminum
Open field test	Exploratory activity, affectivity	No effect of Aluminum
Elevated plus test	Anxiety	No effect of Aluminum
Hot plate test	Pain sensitivity	No effect of Aluminum

46

## 網羅的行動解析結果

テスト名	評価項目	結果
社会的行動テスト	新規環境下社会的行動の評価	アルミの影響なし
ローターロッドテスト	運動能力評価	アルミの影響なし
プレパルス抑制テスト	感覚運動ゲーティング・注意力の評価	アルミ暴露でプレパルス抑制の低下傾向あり
ポーソルト強制水泳テスト	うつ様行動の評価	アルミ暴露でストレス場面下でのパニック用症状が現れている可能性あり
T字型迷路テスト	作業記憶能力の評価	アルミの影響なし
Y字型迷路テスト	作業記憶能力の評価	アルミの影響なし

47

## Results of comprehensive behavior analysis

Tests	Meanings	Results
Social interaction	Social behavior	No effect of Aluminum
Rota-rod test	Motor coordination	No effect of Aluminum
Prepulse inhibition test	Sensorimotor gating	Reduced tendency in Al-treated mice
Porsolt forced swim test	Behavioral despair	Reduced tendency of immobility in Al-treated mice
T-maze spontaneous alternation test	spatial learning, alternation behavior	No effect of Aluminum
Y-maze test	alternation behavior	No effect of Aluminum

48

## 結 論

1. 高感度の血中アルミニウム定量測定法を確立した。
2. 日本の0～10歳の年齢層で血中アルミニウム濃度が高い傾向が測定された。しかし、腎臓病を患っている患者検体を測定したので、健常人での分析が必要である。
3. 網羅的行動テストで、アルミニウム摂取の影響が観察された。

49

## Conclusion

1. We established highly sensitive analytical system for quantification of aluminum in blood.
2. Population of the age 0 – 10 showed tendency of high aluminum in blood. Further analysis of aluminum in blood from healthy volunteers are needed.
3. We observed some effects of aluminum ingestion with comprehensive behavior analysis.

50

# 謝 辞

本研究は、以下の方々との共同プロジェクトのもとに行われました。

吉田 優、M.D., Ph.D., 神戸大学大学院医学研究科

馬場健史、Ph.D., 大阪大学大学院工学研究科

宮川 剛、Ph.D., 藤田保健衛生大学システム医科学研究部門

本研究プロジェクトは、下記の委託研究として実施しました。

委託研究名：

食品安全委員会・委託研究「食品健康影響評価技術研究」

課題番号1106：食品中のアルミニウムの神経発達系への影響など、  
新生児発育に対するリスク評価研究

51

## Acknowledgements

Masaru Yoshida, M.D. Ph. D, Kobe University

Takeshi Bamba, Ph. D, Osaka University

Tsuyoshi Miyakawa, Ph. D, Fujita Health University

This research project is entrusted by the Food Safety Commission Japan in a consignment agreement for food safety risk assessments on neurodevelopmental toxicity of aluminum.

52