

労災疾病臨床研究事業費補助金

化学物質特異的IgGのアレルギー診断と  
曝露モニタリングへの有用性に関する調査

平成 26 年度 ～ 28 年度 総合研究報告書

研究代表者 辻 真弓

平成29 年 (2017年) 3 月

# 目 次

I. 総合研究報告	
化学物質特異的IgGのアレルギー診断と曝露モニタリングへの有用性に関する調査	----- 1
辻 真弓	
(資料) 分担研究報告	
1. 一般集団における化学物質抗体分布に関する予備調査～一般住民を対象として～	----- 8
郡山 千早	
2. 日常生活における化学物質曝露が総 IgE 抗体および総 IgG 抗体に及ぼす影響	----- 32
太田 雅規	
3. ドットプロット法を用いた化学物質特異的 IgG 抗体測定の実際-日常生活における化学物質 (ネイル用塗料) 曝露での検討-	----- 50
土屋 卓人	
4. 職場における化学物質特異的抗体保有率に関する研究	----- 88
辻 真弓	
5. 化学物質付加によるヒト血清アルブミン立体構造変化の解析と化学物質曝露状況評価や化学物質アレルギー診断を指向した血液中化学物質特異的 IgG 定量のための新規ペプチド ELISA の構築	----- 154
石原 康宏	
6. 捕捉資料：化学物質概要	----- 214
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 226
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 227

## 化学物質特異的IgGのアレルギー診断と曝露モニタリングへの有用性に関する調査

研究代表者 辻 真弓 産業医科大学 医学部 産業衛生学 准教授

### 研究要旨

本研究は、化学物質（樹脂）取扱い作業者を含む事業所従業員ならびに一般住民を対象に、化学物質特異的 IgG 抗体のアレルギー診断と曝露モニタリングに対する有用性を調査した。対象者は一般住民、大学教職員・学生、化学物質（樹脂）取扱い作業従事者である。解析した化学物質は以下の 12 種類の化学物質である。

ビスフェノール A ジグリシジルエーテル(BADGE)、無水フタル酸(PA)、トルエン-2,4-ジイソシアネート(TDI)、パラフェニレンジアミン(PPD)、ホルムアルデヒド(FA)、グルタルアルデヒド(GA)、アクリルアミド(AA)、エチレンジアミン(ED)、ヘキサメチレンジイソシアネート(HDI)、メタクリル酸メチル(MMA)、無水トリメリット酸(TMA)、メタクリル酸グリシジル(GMA) (大学教職員・学生研究は6種類のみ測定：BADGE、PA、FA、AA、MMA、TMA)

一般住民研究：鹿児島県南九州市住民 191 名のうち 183 名（男性 101 名、女性 82 名）を対象として、化学物質等への血清抗体値の測定を行い、抗体分布と関連する生活・環境要因について検証した。特異的抗体価を測定した 12 種類中最も抗体陽性率が高かった化学物質は PA で、次いで TMA、TDI、GA、HDI であった。それ以外の化学物質については、ほとんどの対象者は、特異的 IgG 抗体陰性の判定であった。喫煙と総 IgE 抗体間に関係が認められたが、特異的 IgG 抗体と有意な相関が認められる生活習慣はなかった。PA の使用範囲は広く、日常生活における環境曝露による可能性について今後の検討が必要である。

大学教職員・学生研究①：一般人を対象として、日常生活における化学物質曝露の有無や曝露経路とアレルギー症状、総 IgG および総 IgE 抗体との関連性を横断研究するとともに、1 カ月後、3 カ月後の経時変化を検証することを目的とした。20 歳以上の 80 名の女性（大学教職員と学生）を対象とし、アレルギー疾患の有無、日常生活や職場・学校での化学物質の曝露の有無や、タバコ、アルコールといった生活習慣における曝露の有無、そして、呼吸器系症状の有無と総 IgE および総 IgG 抗体との関連性を検証した。

その結果、横断研究においては、アレルギー疾患の有無において、総 IgG 抗体はアレルギー疾患がある群がない群に比べ高い傾向にあった。生活習慣では、飲酒習慣や喫煙習慣と総 IgE 抗体に関連を認めた。縦断研究では、総 IgG において、ベースライン、1 ヶ月後、3 ヶ月後の時期に関係なく、アレルギー疾患を持つものの方が有意に高いという結果であった。一方、総 IgE 抗体については、個体内、個体間いずれについても有意な差を認めなかった。以上から、特異的 IgE、IgG 抗体の検証を行う際には、層別化するか、交絡要因を用いた補正が必要であると考えられた。

大学教職員・学生研究②：大学生を対象とした一般住民における化学物質の曝露状況を調査し、特に本研究で対象とした年齢で使用されている頻度が高いネイル用塗料に着目して、その使用状況の調査とドットプロット法を用いた含有感作性塗料成分（化学物質）特異的 IgG 抗体測定（6 種）を行い、使用状況と IgG 抗体測定値の関連性を検討した。ネイル用塗料の「非使用群」（7 名）、「現在使用群」（42 名）、「過去使用群」（32 名）の 3 群間の比較において、血清総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値は統計学的有意差を認めなかった。また 6 種の化学物質に対する特異的 IgG 抗体平均値も 3 群間で統計学的有意差は認めなかった。さらに「現在使用群」の対象者のうち、初回調査後新たにネイル用塗料を塗布しなかった 13 名の、1 ヶ月後、3 ヶ月後での総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値、6 種の化学物質特異的 IgG 抗体平均値を測定したがいずれも統計学的に有意な変化は認めなかった。今回の検討におい

て自宅で行うネイルに使用するレベルの低濃度化学物質曝露と感作性塗料成分（化学物質）特異的 IgG 抗体保有との間に関連性は認められなかった。

**樹脂取り扱い事業所研究：**化学物質（樹脂）取扱い作業者を含む 8 つの事業所を対象に、樹脂取り扱い作業従事者と一般人の化学物質特異的 IgG 抗体値を比較した。またうち 1 事業所に関しては 7 年前の血液と今年度採取した血液を用い IgG 抗体値を比較し、2 事業所に関しては炎症性マーカー mRNA 発現量を測定した。

ウレタン樹脂の原料である TDI や HDI を使用している a 事業所は TDI、TMA、GA 特異的 IgG 抗体値が一般人と比較して高かった。TMA はエポキシ樹脂やウレタン樹脂の硬化剤または改質剤として有用であるため a 事業所で同時に使用されている可能性が高い化学物質である。GA はプラスチックの定着剤に使用される。TDI や HDI といったイソシアネート特異的 IgG 抗体がそれらの曝露の指標になりうるということが報告されているという先行研究も考慮すると、a 事業所対象者の化学物質特異的 IgG 値上昇は職業上の曝露が反映している可能性が高い。c 事業所はポリアミド樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ウレタン樹脂等様々な樹脂を使用している。c 事業所対象者は HDI 特異的 IgG 抗体値  $12.55 \mu\text{g/ml}$  以上の高 HDI-IgG 群の割合が一般人より高くなる傾向が認められる。さらにこの高 HDI-IgG 群ではアレルギー既往有の対象者が既往無の対象者より多く、この傾向は TDI でも同じである。また TDI 特異的 IgE 抗体値が他事業所よりも高く、今後職業性曝露とアレルギーの関係を調査する必要のある事業所だと考えられる。f 事業所は主としてポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂を使用している。f 事業所対象者は一般人と比較して BADGE と ED 特異的 IgG 抗体値が共に高い傾向が認められた。BADGE はエポキシ樹脂の原料として、ED はエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている。エポキシ樹脂は優れた硬化性、接着性、耐食性等を持つため、幅広い用途で使用されている。我々が聞き取りした f 事業所関係者からはエポキシ樹脂の使用があるとは聞き出せていない。しかしながら f 事業所は自動車関連事業所であり、エポキシ樹脂が自動車ボディ電着塗装や接着剤として使用されている可能性がある。

複数の化学物質抗体を測定することで、職業上曝露の有無や曝露源の推定の精度が上昇する。従業員の健康を保持・増進するために、曝露状況の推測・アレルギー発症を予防するためのツールとして化学物質特異的 IgG 抗体値に注目し、複数の化学物質特異的 IgG 抗体値を事業所ごとにオーダーメイドで測定することは有用であると考えられる。

**新規ペプチド ELISA の構築：**本研究では、川本らが報告した化学物質特異的 IgG 抗体を測定するドットプロット法を改良し、多検体を短時間で処理できる ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を構築することを目的とした。候補化学物質として、カルボニル化合物、FA、PA、TDI を選択した。まず、ヒト血清アルブミンと化学物質の付加体の立体構造を詳細に解析し、ヒト血清アルブミンと化学物質との反応について、立体構造変化を引き起こすかという点に焦点を当てて解析した。アミノ基定量の結果、ヒト血清アルブミン中のリシン残基が、化学物質中のカルボニル基と反応することが明らかとなった。ヒト血清アルブミンと化学物質との付加体を用いて ELISA を行なったところ、一般住民や事業所従業員の血清中からヒト血清アルブミン-化学物質を認識する IgG が検出された。この結果は、曝露された化学物質の少なくとも一部はヒト血清アルブミンと反応し、それが抗原となって抗体が産生されたことを支持する。次に正確性を増すために、リシン残基を含むヒト血清アルブミン部分ペプチドを設計し、カルボニル化合物とリシン残基との反応様式を調べたところ、FA はイミンを、PA は 3 級アミンを介してリシン残基を修飾することが明らかとなった。一般住民と樹脂工場労働者の血清検体中の抗 FA-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG および抗 PA-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG 量を、これら化学物質とヒト血清アルブミン部分ペプチドとの付加体を抗原とした ELISA で調べたところ、一般住民と比較して工場労働者の血清中に高い抗体量が認められた。従って、本ペプチド ELISA は、FA や PA の曝露状況評価に用いることができると考えられる。今後は、ここで作製した ELISA がカルボニル化合物の曝露状況評価に用いることができるか、さらに、カルボニル化合物によるアレルギー診断に用いることができるかについて、慎重に調べ、ELISA をさらに改良して、検査或いは診断の場で使用できるより簡便で精度の高い、IgG 検出法の構築を目指す。

## 分担研究者

川本 俊弘	産業医科大学 医学部 産業衛生学
武林 亨	慶応大学 医学部 衛生公衆衛生学
郡山 千早	鹿児島大学 医学部 疫学予防医学
土屋 卓人	産業医科大学 医学部 産業衛生学
太田 雅規	福岡女子大学国際文理学部食・健康学科
石原 康宏	広島大学 大学院総合科学研究科
田中 政幸	公益財団法人 福岡労働衛生研究所
一瀬 豊日	産業医科大学 進路指導部

## A. 研究目的

樹脂(プラスチック)原料は、プラスチック製造業のみならず建設業、塗装業、繊維業など幅広い分野で取り扱われており、樹脂作業者のアレルギー疾患の増加が危惧されている。またネイル用塗料にも樹脂原料が含まれており、ネイル用塗料が原因と思われるアレルギー疾患の発生が報告されている。

樹脂(プラスチック)は様々な化学物質を用いて合成され、どの化学物質が労働者のアレルギーの原因物質か問診や症状のみで決定することは難しい。また、アレルギー診断の診療現場で使用されているパッチテストやプリックテストは、十分な量のアレルゲンを強制的に経皮吸収させるため副作用がおりうるだけでなく、テストにより新たな感作を起こすことがあるとされている。

本研究で使用したドットプロット法(産業医科大学産業衛生学講座で開発)は既存の測定法と比較し、ごく少量の血清で測定可能あり、さらに副作用がないという点で優れている。本研究においてこの測定方法を使用して、化学物質(樹脂)取扱作業者を含む事業所従業員ならびに一般住民を対象に、化学物質特異的 IgG 抗体のアレルギー診断と曝露モニタリングに対する有用性を調査した。

## B. 研究方法

### (1)一般住民を対象とした研究

2014年に鹿児島県南九州市の住民191名(男性:107名、女性84名)を対象として、生活習慣(喫煙・飲酒習慣、嗜好飲料および運動歴など)、職業歴、アレルギー疾患を含むその他の既往歴および日常生活や職場における化学物質などへの曝露状況などについて質問票を用いて尋ねた。さらに身体測定(身長、体重、腹囲)と空腹時採血を行った。

今年度は、一部の対象者(2014年度に調査)の血清を用いて、12種類の化学物質への特異的 IgG 抗体を測定した。解析した化学物質は、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル(Bisphenol A

Diglycidyl Ether: BADGE)、無水フタル酸(Phthalic Anhydride: PA)、トルエン-2,4-ジイソシアネート(2,4-Toluene Diisocyanate: TDI)、パラフェニレンジアミン(para-Phenylenediamine: PPD)、ホルムアルデヒド(Formaldehyde: FA)、グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde: GA)、アクリルアミド(Acrylamide: AA)、エチレンジアミン(Ethylenediamine: ED)、ジイソシアネ酸ヘキサメチレン(Hexamethylene Diisocyanate: HDI)、メタクリル酸メチル(Methyl Methacrylate: MMA)、無水トリメリット酸(Trimellitic Anhydride: TMA)、メタクリル酸グリシジル(Glycidolmethacrylate: GMA)である。

予備実験の結果より、化学物質の濃度条件は、いずれの物質とも基準濃度(0.1M)の10倍濃度(1:10)の条件で行い、positive controlの発光強度により、特異的 IgG 抗体価の半定量を行い、-(陰性)、±、+、++、+++の5段階に区分した。

### (2)大学教職員・学生を対象とした研究①

対象は、F大学およびS大学の教職員、20歳以上の学生80名(男性2名は除いた)のうち、1ヶ月、3ヶ月の経時変化の調査に自主的に参加した38名を対象とし、アレルギー・日常生活についての質問紙調査並びに血液採取をベースライン、1ヶ月後、3ヶ月後の3回行い、化学物質曝露やアレルギー症状と総 IgE、IgG 抗体の経時変化との関連について検証を行った。測定した化学物質特異的抗体は BADGE、PA、FA、AA、MMA、TMA の6種である。

### (3)大学教職員・学生を対象とした研究②

対象は20歳以上の大学生および大学教職員81名(男性2名、女性79名)である。大学教職員・学生を対象とした研究①と質問紙・採血の間隔は同様である。②の対象者には特にネイル用塗料使用歴に関しては詳細な聞き取りを行い81名をネイル用塗料の「非使用群」、「現在使用群」、「過去使用群」の3群に分け検討した。

### (4)樹脂取り扱い作業従事者を対象とした研究

事業所従業員(4社)を対象とし、自記式質問票ならびに生体試料(血液)を収集し、総・特異的 IgE・IgG 抗体を測定した。測定した化学物質特異的抗体は一般住民を対象とした研究と同様の12種類である。今年度はさらにリアルタイムPCR法を用いて炎症性マーカーの mRNA 発現量を測定した。

#### (5) 化学物質特異的 IgG 検出用 ELISA 開発研究

曝露された化学物質の少なくとも一部はヒト血清アルブミンと反応し、それが抗原となって抗体が産生されたことを確認した後、以下のステップで ELISA 開発を行った。

1. リシン含有ヒト血清アルブミン (HSA) 部分配列の設計と合成
2. Lys 含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体の形成
3. 2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) による  $\epsilon$ -アミノ基の定量
4. MALDI-TOF MS 解析によるペプチドの分子量の決定
5. 血液の採取と血清の分離
6. ビオチン標識 IgG の作製
7. Lys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA
8. シス테인含有 HSA 部分配列の設計と合成
9. Cys 含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体の形成
10. Ellman's reagent を用いたペプチド中シス테인残基の定量
11. Cys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA

(倫理面への配慮)

アンケート調査および生体試料の採取は産業医科大学倫理委員会、鹿児島大学医学部倫理委員会、福岡女子大学の承認を得て行われている。また、実施にあたっては、平成 14 年 7 月に発表された厚生労働省と文部科学省の合同委員会による「疫学に関する倫理指針」を遵守して行い、結果に対してはプライバシーに十分に配慮した。

### C. 研究結果

#### (1) 一般住民を対象とした研究

12 種類中最も抗体陽性率 (+以上) が高かった化学物質は PA (89%) で、次いで TMA (39%)、TDI (20%)、GA (14%)、HDI (12%) であった。それ以外の 7 つの化学物質については、ほとんどの対象者は、特異的 IgG 抗体陰性の判定であった。

12 種類すべての化学物質について、特異的 IgG 抗体価の相対係数を検討したところ、相関係数が最も高かったのは TDI と PA (Spearman 相関係数 0.47、Bonferroni 調整後の P 値 < 0.001) との相関であり、次いで TMA と TDI ( $\rho = 0.45$ )、HDI と TDI ( $\rho = 0.45$ )、TMA と PA ( $\rho = 0.43$ )、GA と TDI ( $\rho = 0.43$ )、TMA と HDI ( $\rho = 0.42$ ) であり、いずれも統計学的に有意であった。

日常生活において特異的 IgG 抗体値に影響を及ぼす因子はなかった。一部の化学物質で使用歴

がないにも関わらず抗体陽性を示した。曝露源が職業性である可能性は低く、日常生活における何らかの環境曝露による可能性が考えられる。しかしながら、今回質問票調査で把握した生活習慣や化学物質の使用歴の中で有意に関連する項目はなく、その理由を明らかにすることはできなかった。今後は、曝露歴が明らかな集団における特異的抗体分布と比較することにより、適切なカットオフ値の設定が課題であると考える。

#### (2) 大学教職員・学生を対象とした研究①

横断研究：化学物質ごとの解析を行ったところ、塩素系漂白剤、染料、殺虫剤の使用、受動喫煙の有無で総 IgE、総 IgG 抗体に有意な差を認めなかった。学校内での化学物質の曝露として、有機溶剤やホルムアルデヒド、樹脂といった化学物質に曝露されているとの回答であったが、それらの有無と総 IgE、総 IgG 抗体に有意な差を認めなかった。

縦断研究：ベースライン、1ヶ月後、3ヶ月後のフォローアップができた対象者は 38 名で、平均年齢  $22.7 \pm 3.1$  歳であった。総 IgE 抗体および総 IgG 抗体の経時変化に有意な差を認めなかった。経時変化にはアレルギー疾患の有無で有意な差を認めなかったが、総 IgG 抗体において、ベースライン、1ヶ月後、3ヶ月後の時期に関係なく、アレルギー疾患を持つものの方が有意に高いという結果であった。一方、総 IgE 抗体については、個体内、個体間いずれについても有意な差を認めなかった。受動喫煙の有無で、総 IgE および総 IgG 抗体に有意な差を認めず、経時変化においても 2 群間で有意な差を認めなかった。

#### (3) 大学教職員・学生を対象とした研究②

ネイルを「現在している群 (N=42)」「以前ネイルをしていた群 (N=32)」「全くネイルをしたことがない群 (N=7)」の 3 群間において、総 IgE・総・特異的 IgG 抗体値に有意な差を認めなかった。しかしながら FA、AA、MMA は有意ではないものの「現在使用している群」の特異的 IgG 値が他の 2 群より高かった。また「現在使用している群」の 42 名中、ネイル用塗料の使用頻度別の各化学物質の特異的 IgG 抗体値に関しては、TMA の使用頻度が高くなるに従い IgG 平均値も高くなっていった。

#### (4) 樹脂取り扱い作業従事者を対象とした研究

今回の研究で、一般人と対象者の特異的 IgG 抗体値を比較し、TDI、PA、GA、ED、BADGE、HDI、MMA、TMA 特異的 IgG 抗体値が曝露の指標になりうる可

能性があることを示唆する結果が得られた。

#### ウレタン樹脂を使用

ウレタン樹脂の原料であるTDIやHDIを使用していると考えられる事業所は a, b, c, d 事業所である。このうち a 事業所はTDI 特異的 IgG 抗体値が、c 事業所はHDI 特異的 IgG 抗体値が一般人より高い傾向が認められた。さらに a 事業所はTMA 特異的 IgG 抗体値が同時に有意である点も重要である。TMA はエポキシ樹脂やウレタン樹脂の硬化剤または改質剤として有用であるため a 社で同時に使用されている可能性が高い化学物質である。さらに a 事業所ではGA 特異的 IgG 抗体値も一般人より高い。GA はプラスチックの定着剤に使用されており、関連性が疑われる。

#### エポキシ樹脂を使用

BADGE はエポキシ樹脂の原料として、ED はエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている。エポキシ樹脂を使用している事業所は b, d, e 事業所である。しかしながら b, d, e 事業所ではなく、f 事業所において一般人と比較してBADGE と ED 特異的 IgG 抗体値が共に高い傾向が認められた。エポキシ樹脂は優れた硬化性、接着性、耐食性等を持つため、幅広い用途で使用されている。我々が聞き取りした事業所関係者からはエポキシ樹脂の使用があるとは聞き出せていない。しかしながら f 事業所は自動車関連事業所であり、エポキシ樹脂は自動車ボディ電着塗装や接着剤として使用されている可能性がある。

#### メタクリル樹脂を使用

MMA はメタクリル樹脂（アクリル樹脂）のポリマーである。f 事業所において一般人と比較してMMD 特異的 IgG 抗体値が高い傾向が認められた。メタクリル樹脂は、使用目的の範囲が非常に広く、プラスチックの女王と評される樹脂である。透明性が樹脂中で最も高く、強靱で、加工しやすく、着色もしやすいことから、特に電子機器の光学用途、自動車部品に使用されている。またその特性からコスメ用品、特にネイル製品にも使用されている。目の刺激症状や皮膚刺激性、鼻腔の炎症、喘息といった上気道炎症とメタクリル酸との関係性が報告されている。f 事業所は特にアレルギー既往歴ありのものが対象者の約半数（46%）を占めており、今後MMA 曝露とアレルギー症状の関係を詳細に調査する必要がある。

#### ポリエステル樹脂を使用

PA はポリエステル樹脂、医薬、香料と幅広く使用されている。ポリエステル樹脂を主として使用している事業所は c 事業所であり、c 社はPA 特異的 IgG 抗体が一般人と比較し高い。しかしながら日用品でも使用頻度が高い物質に関しては、

日常生活上の曝露状況を把握しなければ、IgG が職域での曝露であるとは言い難く、今後は職場以外の日常的なルートにおける曝露を検討する必要がある。

#### ●炎症性マーカーとの関係

今回の研究では、a 社と c 社の対象者の酸化ストレスマーカー、炎症に関わるマーカー17 種類の mRNA を測定した。

2社共通の傾向を示した化学物質特異的 IgG 抗体値とマーカーの関係は以下の通りである。

TDI: IL-8b ↑

FA: CXCL3 ↑

PPD: IL-8b ↑

AA: IL-1 β ↑

IL-8 は炎症系のマーカーで、先行研究においてTDI 曝露と関係があることが報告されている。

PPD と IL-8 の関係も報告されている。また AA と IL-1 β との関係も報告されており、我々の研究方法や研究成果と炎症性マーカーの整合性が確認できたと言える。

#### (5)化学物質特異的 IgG 検出用 ELISA 開発研究

接着剤や樹脂原料として広く使用されている一方で感作性を有することが知られているカルボニル化合物、FA と PA を標的とした。カルボニル化合物は、生体アミノ酸の中でもリシン残基と反応することが予測される。そこで、リシン残基を含む HSA 部分ペプチドを設計し、カルボニル化合物とリシン残基との反応様式を調べたところ、FA はイミンを、PA は 3 級アミンを介してリシン残基を修飾することが明らかとなった。一般住民と樹脂工場労働者の血清検体中の抗 FA-HSA 部分ペプチド IgG および抗 PA-HSA 部分ペプチド IgG 量を、これら化学物質と HSA 部分ペプチドとの付加体を抗原とした ELISA で調べたところ、一般住民と比較して工場労働者の血清中に高い抗体量が認められた。従って、本ペプチド ELISA は、FA や PA の曝露状況評価に用いることができると考えられる。また、血清中の抗 FA-HSA 部分ペプチド IgG および抗 PA-HSA 部分ペプチド IgG 抗体価が高い被験者の中には、成人後にアレルギーを発症した被験者が含まれていた。従って、血清中抗 FA-HSA 部分ペプチド IgG 量および抗 PA-HSA 部分ペプチド IgG 量とアレルギーとの関連が示唆されたが、さらに詳細な解析が必要である。

#### D. 考察

一般住民を対象とした研究と大学教職員・学生を対象とした研究で、化学物質特異的抗体に影響

を与える可能性のある日常因子を探索した。性と年齢は解析する際に共変数に入れる必要のある因子といえる。その他喫煙やBMI、アレルギー既往がIgGに影響を与えることもあり注意を要する。

日常で広く使用されている化学物質に関しては曝露経路の推定が複雑であり、職域と同時に日常生活の調査が重要になると考えられる。

複数の化学物質抗体を測定することで、曝露源の推定の精度が上昇する。従業員の健康を保持・増進するために、曝露状況の推測・アレルギー発症を予防するためのツールとして化学物質特異的IgG抗体値に注目し、複数の化学物質特異的IgG抗体値を事業所ごとにオーダーメイドで測定することは有用であると考えられる。その際簡便で精度の高いELISA法による測定が行われることが望ましい。

## E. 結論

ドットブロット法(産業医科大学産業衛生学講座で開発)は既存の測定法と比較し、ごく少量の血清で測定可能あり、さらに副作用がないという点で優れている。本研究においてこの測定方法を使用して、化学物質(樹脂)取扱い作業員を含む事業所従業員ならびに一般住民を対象に、化学物質特異的IgG抗体のアレルギー診断と曝露モニタリングに対する有用性を調査した。複数の化学物質抗体を測定し、事業所内で使用している樹脂に含まれる化学物質が同時に複数陽性である場合、曝露源の推定精度が上昇する。すなわち職域で曝露が生じていると推測されるため、作業場の作業環境管理・作業環境の見直しに役に立てることができる。従って本研究の目的の一つである「化学物質特異的IgG抗体の曝露モニタリングの有用性」は十分確認できたと考えられる。もう一つの目的である「化学物質特異的IgG抗体値とアレルギー診断」に関しては、呼吸器疾患、特に慢性アレルギー疾患等と職域での化学物質曝露の関係性を明らかにするのは困難である。今後さらなる研究が必要である。

一般人並びに樹脂取扱い施設を対象に、一度に複数種類の化学物質特異的IgG抗体値を半定量化した研究は国内外で本研究が初めてであり、その意義は非常に大きい。また今回、国内外で初めて複数の炎症マーカーと複数の化学物質特異的IgG抗体値を測定し、化学物質特異的IgG抗体値と関係があるマーカー候補を提示することができた。さらに現在使用しているドットブロット法を発展させ、ELISAでの化学物質特異的IgG抗体検出キットが創出されれば更なる研究成果が

得られる。今後も各事業所にマッチした、特定化学物質にリストアップされていない化学物質も十分に視野に入れた調査を行うことが必要である。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kawamoto T, Tsuji M, Isse T.  
Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis.  
BMC Public Health. 2015 Sep 21;15:930.  
doi: 10.1186/s12889-015-2302-4.
- (2) Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro Ishihara, Toyohi Isse, Nami Ikeda-Ishihara, Takuto Tuchiya, Toshihiro Kawamoto. A simple method for detection of multiple chemical-specific IgGs in serum based on dot blotting.  
Health, 2016, 8, 1645-1653.

### 2. 学会発表

- (1) 辻 真弓、土屋 卓人、一瀬 豊日、太田 雅規、田中 政幸、川本 俊弘. 感作物質特異的抗体の保有率の検討1. 第88回日本産業衛生学会 大阪 グランフロント大阪 2015年5月
- (2) 川本 俊弘、辻 真弓、土屋 卓人. プラスチック樹脂原料の血清アルブミンへの結合. 第88回日本産業衛生学会 大阪 グランフロント大阪 2015年5月
- (3) 土屋卓人、辻真弓、一瀬豊日、田中政幸、川本俊弘. 感作物質特異的抗体の保有率の検討2 -成人女性での検討-. 第88回日本産業衛生学会大阪 グランフロント大阪 2015年5月
- (4) 土屋卓人、辻真弓、川本俊弘. 成人女性における感作物質特異的抗体の保有率の検討. 第13回日本予防医学会 金沢 2015年6月
- (5) 土屋卓人、辻真弓、川本俊弘. ドットブロット法を用いた感作物質特異的抗体保有率の検討 -成人女性での検討-. 第33回産業医科大学会 北九州 2015年10月

- (6) 辻 真弓、郡山 千早、太田 雅規、田中 政幸、川本 俊弘。職場における化学物質特異的抗体保有率に関する研究。第 74 回日本公衆衛生学会総会 長崎 長崎ブリックホール 2015 年 11 月
- (7) 郡山千早、上床太心、辻真弓、秋葉澄伯。緑茶飲用による血清脂質等への影響。第 74 回日本公衆衛生学会 長崎 長崎ブリックホール 2015 年 11 月
- (8) 郡山千早、上床太心、辻真弓、秋葉澄伯 一般集団における化学物質特異的抗体および総 IgE 分布に関する調査。第 75 回日本公衆衛生学会、大阪 10 月
- (9) 土屋卓人、辻真弓、太田雅規、川本俊弘：ネイル用塗料の使用と含有化学物質特異的抗体保有率との関連性。第 86 回日本衛生学会、旭川、2016 年 5 月
- (10) 土屋卓人、辻真弓、太田雅規、川本俊弘：ネイル液使用と含有化学物質特異的抗体保有率との関連性。第 14 回日本予防医学会、東京、2016 年 6 月
- (11) 辻 真弓、土屋 卓人、川本 俊弘。職場における化学物質特異的抗体保有率に関する研究 第 86 回日本衛生学会総会 2016 年 5 月
- (12) 辻真弓、土屋 卓人、太田雅規、田中政幸、川本俊弘。職場における化学物質特異的抗体保有率に関する研究。第 89 回日本産業衛生学会 2016 年 5 月
- (13) 辻真弓、郡山 千早、田中政幸、川本俊弘。母親の精神的ストレスとアレルギー児の炎症性サイトカインの関係。公衆衛生学会第 75 回日本公衆衛生学会総会 2016 年 10 月
- (14) Kawamoto T, Tsuji M, Tsuchiya T. Detection of Specific Immunoglobulin G Against Plastic Resin in Workers with Dermatitis. International Symposium of Environmental Science 25th Meeting, Henderson, Nevada. 2015. 10. 18-22.
- (15) Tsuji M, T Isse, M Yamamoto, T. Kawamoto. Toluene diisocyanate and formaldehyde specific IgE and IgG antibodies in the urethane resin handling plant. SOT55th Annual Meeting & ToxExpo. New Orleans Ernest N. Morial Convention Center in New Orleans, Louisiana. 2016. 3. 16.
- (16) Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro Ishihara, Isse Toyohi, Takuto Tsuchiya, Nami Ikeda-Ishihara and Toshihiro Kawamoto. Comparing specific IgGs of unexposed and exposed chemical plant workers to plastic resins by a simple method to detect plural chemical specific IgGs in serum. PPTOXV 2016. 11. Kitakyusyu, Japan.
- (17) Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro Ishihara, Takuto Tsuchiya, Nami Ikeda-Ishihara and Toshihiro Kawamoto. Comparing specific IgGs of unexposed and exposed chemical plant workers to plastic resins by a simple method to detect plural chemical specific IgGs in serum. SOT56th Annual Meeting & ToxExpo. 2016. 3. Baltimore, Maryland.
- (18) Takuto Tsuchiya, Mayumi Tsuji, Masanori Ohta and Toshihiro Kawamoto: Relationship between the exposure to nail polish and the production of nail polish-specific antibodies. 5<sup>th</sup> Conference on Prenatal Programming and Toxicity, Kitakyushu, Japan, Nov. 2016

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	特許第 5757519 号
実用新案登録	該当無し
その他	該当無し

## 一般集団における化学物質抗体分布に関する予備調査 ～一般住民を対象として～

分担研究者 郡山 千早 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学 准教授

### 研究要旨

【目的】本調査では、一般住民を対象として、化学物質等への血清抗体価の測定を行い、抗体価の分布と関連する生活・環境要因について明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】2014年に鹿児島県南九州市で疫学調査を行った住民191名のうち183名(男性101名、女性82名)を対象として、12種類の化学物質に対する特異的IgG抗体価をドットプロット法で測定した。解析した化学物質は、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、無水フタル酸(PA)、トルエン-2,4-ジイソシアネート(TDI)、パラフェニレンジアミン(PPD)、ホルムアルデヒド(FA)、グルタルアルデヒド(GA)、アクリルアミド(AA)、エチレンジアミン(ED)、ジイソシアン酸ヘキサメチレン(HDI)、メタクリル酸メチル(MMA)、無水トリメリット酸(TMA)、メタクリル酸グリシジル(GMA)である。陽性コントロールの発光強度との目視比較により、特異的IgG抗体価の半定量を行い、生活習慣および環境要因との関連を調べた。

【結果と考察】12種類中最も抗体陽性率(++以上)が高かった化学物質はPA(69%)で、次いでTMA(19%)、TDI(10%)、HDI(5%)、GA(3%)であった。それ以外の7つの化学物質については、ほとんどの対象者は、特異的IgG抗体陰性の判定であった(±を含む)。PAとTMAの両方に強陽性反応が見られた者は11名(6%)であり、これらの抗体間には有意な相関が認められた(Spearman相関係数0.43、調整後のP値<0.001)。2つ以上の物質への特異的IgG抗体価が高い者について背景を検討したところ、職業は事務職などが多く、特に化学物質を扱う仕事に従事していると思われる者は1名のみであった。

本研究より、一般集団においても無水フタル酸などに対して特異的抗体を有する割合が比較的高いことが確認され、その原因は日常生活における何らかの環境曝露による可能性が考えられた。しかしながら、今回の調査で把握した生活習慣や化学物質の使用歴の中で有意に関連する項目は認められなかった。

### 研究協力者

秋葉 澄伯

上床 太心

Muflihatul Muniroh

Lai Thi Minh Hang

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
疫学・予防医学

2014年に鹿児島県南九州市の住民191名(男性:107名、女性84名)を対象として、生活習慣(喫煙・飲酒習慣、嗜好飲料および運動歴など)、職業歴、アレルギー疾患を含むその他の既往歴および日常生活や職場における化学物質などへの曝露状況などについて質問票を用いて尋ねた。

さらに身体測定(身長、体重、腹囲)と空腹時採血を行った。採血した血液は、12時間以内に血清を分離し、-20℃で保存した。

今年度は、一部の対象者(2014年度に調査)の血清を用いて、12種類の化学物質への特異的IgG抗体を測定した。解析した化学物質は、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(Bisphenol A Diglycidyl Ether: BADGE)、無

### A. 研究目的

一般住民を対象として、化学物質等への曝露状況を質問票を用いて把握するとともに、化学物質等への血清抗体価の測定を行い、抗体価の分布と関連する生活・環境要因について明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

水フタル酸(Phthalic Anhydride: PA)、トルエン-2,4-ジイソシアネート(2,4-Toluene Diisocyanate: TDI)、パラフェニレンジアミン(para-Phenylenediamine: PPD)、ホルムアルデヒド(Formaldehyde: FA)、グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde: GA)、アクリルアミド(Acrylamide: AA)、エチレンジアミン(Ethylenediamine: ED)、ジイソシアネートヘキサメチレン(Hexamethylene Diisocyanate: HDI)、メタクリル酸メチル(Methyl Methacrylate: MMA)、無水トリメリット酸(Trimellitic Anhydride: TMA)、メタクリル酸グリシジル(Glycidolmethacrylate: GMA)である。BADGE と PA はエポキシ樹脂の原料、TDI、PPD、FA および GA はウレタン樹脂の原料である。さらに AA は染料・合成樹脂の原料、ED は塗料・冷却材の防腐剤、HDI はエナメルコーティングなどの外装塗装、MMA および GMA はアクリル樹脂の原料、TMA はエポキシ樹脂硬化剤に使用されている。

各化学物質の特性およびドットプロット法の詳細については、他の分担研究者がすでに報告しているので省略する。予備実験の結果より、化学物質の濃度条件は、いずれの物質とも基準濃度(0.1M)の10倍濃度(1:10)の条件で行い、positive control の発光強度との目視比較により、特異的 IgG 抗体価の半定量を行い、- (陰性)、±、+、++、+++ の5段階に区分した。

さらに血清中の高感度 CRP 値(NanopiaCRP, Sekisui Medical CO., LTD) および活性酸素(ROS)の測定を行った。

血清中の特異的 IgG 抗体価の群間差については、Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。さらに++以上の判定が比較的多かった PA と TDI の結果について、陰性群(-、±、+)と陽性群(++、+++ )に分け、総 IgG、血清高感度 CRP 値および ROS の比較を行った。さらに生活習慣や既往歴との関連について、ロジスティック回帰分析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究計画は、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 疫学研究等倫理委員会、および産業医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、実施にあつたては、厚生労働省と文部科学省の合同委員会による「疫学に関する倫理指針」を遵守して行い、結果に対してはプライバシーに十分に配慮した。

すべての対象者に文書と口頭で説明を行い、書面による同意を得た。

## C. 研究結果

### 対象者の属性

本調査では、鹿児島県南九州市の一般住民を対象として行った。対象となった男性107名、女性84名の性・年齢分布を表1に示す。男性の平均年齢46.4歳(SD=11.2)、女性の平均年齢51.9歳(SD=14.1)で、女性では60歳以上の参加者が多かった(35%)。

対象者の体格(肥満度と腹囲)を表2に示す。肥満度(BMI)が25以上であった者は、男性39名(37%)、女性24名(28%)であり、特に男性において肥満者の割合が高かった。腹囲についても同様で、特定健診におけるメタボリックシンドロームの基準値以上の者が、男性で55名(51%)と半数を占めた。一方、女性では、基準値以上の者の割合は20%であった。

### 生活習慣

喫煙・飲酒習慣の状況を表3に示す。男性では約7割が喫煙経験者であった。飲酒については、「週5日以上」の飲酒習慣がある者が、男性では35%、女性では6%であった。1回あたりの飲酒量をドリンクスコアに換算した分布を示す(表4)。飲酒量が、厚生労働省ガイドラインで推奨されている2ドリンクを超えている者は、男性59名(59%)、女性18名(27%)であり、男性では全体の約3割が4ドリンク以上の飲酒量であった。さらに飲酒頻度が多い者ほど、飲酒量が多い傾向にあり、飲酒量が2ドリンク以上の者の割合は、「週1-4日」の群で51%、「週5日以上」の群で83%であった。

表5に嗜好飲料の摂取状況を示している。緑茶を「あまり飲まない」と回答した者は、男性で27名(25%)、女性で9名(11%)であった。一方、コーヒーを「あまり飲まない」者は、男性で36名(34%)、女性で39名(47%)であった。ジュースなど甘い飲み物については、「ほとんど飲まない」と回答した者が多く、男性で65名(61%)、女性で68名(81%)であった。一方、「1日に2本以上」と回答した者が男性で12名(11%)、女性で2名(2%)いた。

運動習慣については、「1回30分以上の軽く汗をかく運動を週2日以上、1年以上実施している」運動習慣がある者の割合は、男性で27%、女性で15%であった(表6)。

職業の分布を表7に示す。男女ともに事務系

(会社員・公務員を含む)が多く、男性では半数以上を占めていた。

既往歴については、男女ともにアレルギー性疾患(70名)や脂質異常症(71名)が最も多く、次いで高血圧症(38名)の既往がある者が多かった(表8)。

### 化学物質への曝露状況

日常生活および職場における化学物質の使用について質問票で尋ねた結果を示す(図1)。男性では、殺虫剤(25%)や除草剤(23%)への曝露が多かった。一方、女性においては、塩素系漂白剤が65%と最も多く、次いで染料(髪染め)が56%であった。殺虫剤については男性と同じ程度(30%)の曝露状況であった。有機溶剤は男女とも5%程度であり、プラスチック樹脂の使用経験がある男性が1名いた。その他の物質(ホルマリン、クロム、ヒ素、カドミウム、水銀)に関しては使用経験がある者はいなかった。

### 血清抗体価と生活習慣および環境要因との関連

一部の研究対象者(男性29名、女性31名)の血清を用いて、総IgEおよび総IgGの測定を行った。さらにイソシアネートとホルマリンに対する特異的抗体IgEも測定した。男女別の結果を表9および図2に示す。総IgEについては男性において高く、この性差は統計学的に有意であった( $P=0.005$ )。さらに基準値173 IU/mLを超えた者が男性で9名(31%)、女性で4名(13%)であった。総IgGにおいては顕著な性差はなく( $P=0.186$ )、基準値の上限を超えた者はいなかったが、2名の女性が基準値の下限を下回っていた。イソシアネートとホルマリンに対する特異的IgE抗体を測定したが、ほとんどの者が陰性であり、1名のみホルマリンに対する抗体価が高かった(クラス2)。

総IgEおよび総IgGの分布は年齢との関連はなかった。

喫煙の有無別で比較すると、喫煙者で総IgE抗体が高い傾向が見られた(図3)が、男性に限定して比較するとその関連はみられなかった( $P=0.775$ )。飲酒習慣は、総IgEおよび総IgGのいずれとも関連していなかった。既往歴との関連においては、アレルギー性疾患を有する群で総IgEが有意に高かったが、総IgGは関連していなかった(図4)。その他の疾患については、血清抗体価と関連しているものは認め

られなかった。

化学物質への曝露歴と血清抗体価との関連を調べたところ、除草剤の使用経験がある群において総IgEが高い傾向が見られた( $P=0.065$ )。塩素系漂白剤でも同様の傾向がみられたが、統計学的に有意なものではなかった。一方、総IgGの分布については、いずれの化学物質への曝露歴とも有意な関連はみられなかった。女性のみの検討であるが、染料(髪染め)の使用歴はIgE、総IgGのいずれとも関連はみられなかった。

### 化学物質特異的IgG抗体の分布

研究対象者191名中、化学物質特異的抗体の測定が可能であった者は、183名(男性101名、女性82名)であり、12種類の化学物質に対する特異的IgG抗体の測定を行った。

12種類中最も抗体陽性率(++以上)が高かった化学物質はPA(69%)で、次いでTMA(19%)、TDI(10%)、HDI(5%)、GA(3%)であった。それ以外の7つの化学物質については、ほとんどの対象者は、特異的IgG抗体陰性の判定であった(±を含む)。(図5-1、5-2)。

12種すべての化学物質について、特異的IgG抗体価の相対係数を検討したところ、相関係数が最も高かったのはTDIとPA(Spearman相関係数0.47、Bonferroni調整後の $P$ 値 $<0.001$ )との相関であり、次いでTMAとTDI( $\rho=0.45$ )、HDIとTDI( $\rho=0.45$ )、TMAとPA( $\rho=0.43$ )、GAとTDI( $\rho=0.43$ )、TMAとHDI( $\rho=0.42$ )であり、いずれも統計学的に有意であった(表10、図6)。

### 化学物質への曝露との関連

日常生活および職場などにおいて、化学物質(塩素系漂白剤、除草剤、殺虫剤、染料など)の使用について質問票で尋ねた結果との関連を検討したが、有意に関連する特異的IgG抗体はなかった。

### 複数の特異的IgG抗体の保有

2つ以上の特異的IgG抗体が強陽性(+++)であった対象者は、183名中18名(10%)であり、すべて抗PA-IgG抗体が強陽性であった(表11)。抗PA-IgGと抗TMA-IgGが陽性であった者が最も多く、18名中11名(61%)、次いで抗PA-IgGと抗TDI-IgG陽性が9名(50%)であった。職業は、機械製造に携わっている者が1名のみで、その他は事務系職が多かった。

日常生活で使用している化学物質は、塩素系漂白剤が7名と最も多かったが、すべての者に共通して使用しているものはなかった。

### 総 IgG、炎症反応との関連

12 種類の化学物質の中で、++以上の判定が比較的多かった PA (++) と TMA (++) の結果について、総 IgG 抗体、高感度 CRP および活性酸素との関連を検討した。PA 陽性率と総 IgG 抗体との間に関連は認められなかった (図 7-1)。TMA については、陽性群において、総 IgG 抗体がやや高い傾向を示したものの、統計学的に有意なものではなかった (図 7-2)。

血清中の高感度 CRP 値を比較したところ、PA 陽性率および TMA 陽性率との関連は認められなかった (図 8-1、図 8-2)。

血清中の活性酸素についても、PA 陽性率との関連はなかった (図 9-1)。一方、TMA 陰性群と比べて、陽性群では血清中の活性酸素 (ROS) が有意に高かった (図 9-2)。

### 多変量解析結果

ドットプロット法で++以上の判定割合が比較的多かった PA と TMA について、抗体陰性群 (+以下) と陽性群 (++) に分け、生活習慣、血液検査、既往歴および化学物質への曝露状況などどの要因との関連について検討した。共変数として性・年齢を用いたロジスティック回帰分析結果を示す (表 12、表 13)。

抗 PA-IgG 抗体陽性リスクの検討を行ったところ、中性脂肪値が高いほど、抗体陽性リスクが低くなる傾向を認めた。その他の項目において有意な関連を示すものはなかった (表 12)。一方、抗 TMA-IgG 抗体においては、アレルギー性疾患歴の既往がある者において、TMA 陽性リスクが有意に低かった (オッズ比: 0.40、95% 信頼区間: 0.17-0.96) (表 20)。その他の項目において有意な関連を示すものはなかった。

### D. 考察

本研究は、一般住民を対象として、化学物質等への特異的 IgG 抗体の分布を把握し、関連する生活・環境要因について検討することを目的として行った。

今回、特異的抗体価を測定した 12 種類中最も抗体陽性率 (++) が高かった化学物質は PA (69%) で、次いで TMA (19%)、TDI (10%)、HDI (5%)、GA (3%) であった。それ以外の 7

つの化学物質については、ほとんどの対象者は、特異的 IgG 抗体陰性 (+以下) の判定であった (図 5)。

抗体間の相関については、特に TDI と PA との間に有意な相関が認められた (Spearman 相関係数 0.47、調整後の P 値 < 0.001) (表 10)。PA (無水フタル酸) はエポキシ樹脂の原料、TDI (トルエン-2,4-ジイソシアネート) はウレタン樹脂の原料である。特にこの 2 つの物質への特異的 IgG 抗体価が高い 9 名について背景を検討したが、女性が多く、職業も事務職など、特に化学物質を扱う仕事に従事していると思われる者は認めなかった (表 11)。職業については、現在の職業のみしか確認していないが、塗料やプラスチック樹脂などの特定の化学物質の使用歴も尋ねており、それらの使用歴がある者はいなかった。また、日常生活で用いられる塩素系漂白剤、除草剤や染料 (髪染め) の使用の有無との関連も検討したが、いずれも有意に使用頻度が高いという傾向は認めなかった。

PA および TMA に対する抗体陽性リスクについて多変量解析結果を行ったが、有意にこれらの抗体陽性率と関連する生活習慣および環境要因は認められなかった (表 12、13)。

約 7 割の者が++以上の判定で抗 PA-IgG 抗体を有していたため、非特異的反応の可能性を検討するために、総 IgG との関連をみたが、有意な関連は認めず (図 7-1、 $p=0.551$ )、相関傾向も見られなかった ( $p=0.006$ )。この結果は抗 TMA-IgG においても同じであった (図 7-2、 $p=0.166$ )。また血清中の CRP 値については、PA および TMA 抗体価との関連はなかったが、活性酸素は TMA 陽性群において有意に高く (図 9-2)、生体内の炎症反応がある傾向が確認された。これらの結果より、ドットプロット法による抗 PA および TMA 抗体の陽性反応が非特異的反応である可能性は低いと考えられたが、その原因は職業性曝露によるものとは考えにくく、日常生活における何らかの環境曝露による可能性が考えられる。しかしながら、今回質問票調査で把握した生活習慣や化学物質の使用歴の中で有意に関連する項目はなく、その理由を明らかにすることはできなかった。今後は、曝露歴が明らかな集団における特異的抗体分布と比較することにより、適切なカットオフ値の設定が課題であると考えられる。

PA はフタル酸系可塑剤の原料と使用されることが最も多く、健康障害に関しては、吸入曝露により喘息や慢性気管支炎などが報告され

ている。本研究においてもアレルギー疾患既往歴との関連を検討したが、抗 PA-IgG との関連は見られなかった（表 19-3、オッズ比：1.2、95%信頼区間：0.62-2.34）。今後は、臨床診断のみならず呼吸機能検査などの指標を組み合わせた検討が必要であると考ええる。

#### E. 結論

一般集団においても無水フタル酸などに対して特異的抗体を有する割合が比較的高いことが確認され、その原因は日常生活における何らかの環境曝露による可能性が考えられた。しかしながら、今回の調査で把握した生活習慣や化学物質の使用歴の中で有意に関連する項目は認められなかった。

#### 参考文献

- Wernfors M. et al., Phthalic anhydride-induced occupational asthma. Int Arch Allergy Immunol 79, 77-82, 1986.
- Nielsen J. et al., Specific serum antibodies against phthalic anhydride in occupationally exposed subjects. J Allergy Clin Immunol 82, 126-33, 1988.

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

1. 論文発表 該当無し
2. 学会発表

郡山千早、上床太心、辻真弓、秋葉澄伯 緑茶飲用による血清脂質等への影響（第74回日本公衆衛生学会 11月4-6日 長崎）

郡山千早、上床太心、辻真弓、秋葉澄伯 一般集団における化学物質特異的抗体および総IgE分布に関する調査（第75回日本公衆衛生学会 10月26-28日 大阪）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

表1 対象者の性・年齢分布

	男性 (107名)	女性 (84名)
40歳未満*	26 (24%)	17 (20%)
40 - 59歳	75 (70%)	38 (45%)
60歳以上**	6 (6%)	29 (35%)

\* 19歳～39歳、\*\* 60歳～79

表2 対象者の肥満度と腹囲

	男性(107名)	女性(84名)
BMI		
25未満	68 (64%)	60 (71%)
25～	35 (33%)	17 (20%)
30～	4 (4%)	7 (8%)
腹囲		
男性85cm女性 90cm未満	52 (49%)	67 (80%)
男性85cm女性 90cm以上	55 (51%)	17 (20%)

表3 喫煙・飲酒習慣

	男性(107名)	女性(84名)
喫煙経験		
なし	34 (32%)	79 (94%)
あり	73 (68%)*	5 (6%)*
飲酒		
週5日以上	37 (35%)	5 (6%)
週1～4日	34 (32%)	11 (13%)
週1日未満	29 (27%)	42 (50%)
ほとんど飲まない	5 (5%)	26 (31%)
やめた	2 (2%)	0

\* 禁煙者42名(男性38名、女性4)

表4 1回あたりの飲酒量

	男性(100名)	女性(67名)
ドリンクスコア		
1未満	11 (11%)	30 (45%)
1以上2未満	30 (30%)	19 (28%)
2以上4未満	30 (30%)	12 (18%)
4以上	29 (29%)	6 (9%)

1ドリンク＝純アルコール10g

厚生労働省のガイドラインでは1日平均2ドリンク以下を推奨

例 ビール500mL:2ドリンク、ウィスキーダブル:2ドリンク

表5 その他の嗜好飲料の摂取状況

	男性（107名）	女性（84名）
緑茶		
あまり飲まない	27 (25%)	9 (11%)
3杯未満/日	28 (26%)	17 (20%)
3杯以上/日	42 (39%)	42 (50%)
6杯以上/日	10 (9%)	16 (19%)
コーヒー		
あまり飲まない	36 (34%)	39 (47%)
3杯未満/日	54 (50%)	38 (46%)
3杯以上/日	17 (16%)	6 (7%)
ジュース類		
ほとんど飲まない	65 (61%)	68 (81%)
1本/日	30 (28%)	14 (17%)
2本以上/日	12 (11%)	2 (2%)

表6 運動習慣

	男性（107名）	女性（84名）
2回以上/週の運動*を1年以上継続		
している	29 (27%)	13 (15%)
していない	78 (73%)	71 (85%)

\*30分以上の運動

表7 職業分布

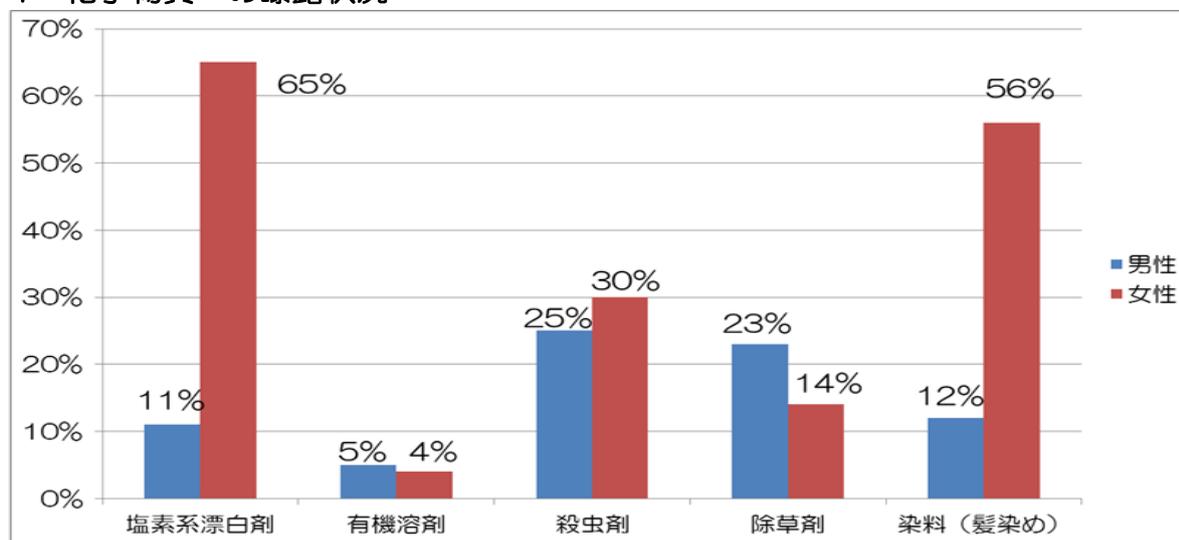
大分類項目	男性	女性
専門的・技術的職業	9 (8%)	7 (8%)
事務（会社員・公務員を含む）	58 (54%)	30 (36%)
販売	1 (1%)	0
サービス	1 (1%)	3 (4%)
保安職業	1 (1%)	0
農林漁業	2 (2%)	6 (7%)
生産工程	6 (6%)	11 (13%)
輸送・機械運転	3 (3%)	0
建設・採掘	0	1 (1%)
運搬・精集	0	2 (2%)
無職	0	19 (23%)
無回答	5 (5%)	6 (7%)

表8 既往歴の分布

疾患名	男性 (107名)	女性 (84名)
アレルギー疾患*	38 (36%)	32 (38%)
高血圧症	23 (21%)	15 (18%)
循環器系疾患	5 (5%)	2 (2%)
高尿酸血症	10 (9%)	1 (1%)
脂質異常症 (服薬あり)	41 (38%) 7 (7%)	30 (36%) 7 (8%)
高血糖 (糖尿病)	16 (15%) 2 (2%)	14 (17%) 4 (5%)

\*アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、接触性皮膚炎、じんましん、食物アレルギー、薬疹・薬剤アレルギー、慢性副鼻腔炎など

図1 化学物質への曝露状況



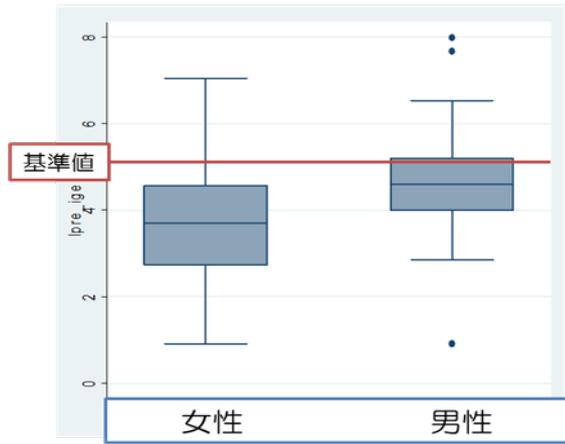
プラスチック樹脂：男性1名、ホルマリン、クロム・ヒ素・カドミウム、水銀：曝露なし

表9 血清抗体価の分布

	男性 (29名)	女性 (31名)
総 IgE: 中央値 (95%CI)	100 (64, 162)	40.5 (24, 62)
基準値 (173 IU/mL以下) を超過 (%)	9 (31%)	4 (13%)
総 IgG: 中央値 (95%CI)	1131 (1021, 1183)	1142 (1101, 1266)
基準値 (870~1700 IU/mL) 外 (%)	0	2 (6%)*
IgEイソシアネート (クラス1以上)	0	0
IgEホルマリン (クラス1以上)	1 (3%)**	0

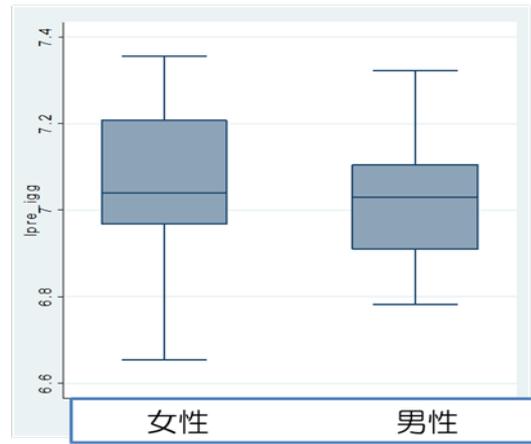
\*\* 42歳男性、地方公務員、喫煙者、除草剤の使用歴あり \* 870 IU/mL未満

図2 血清抗体価の分布・性別



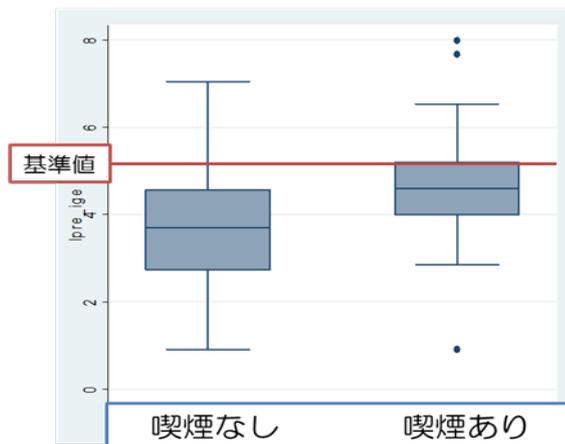
総 IgE P=0.005

\*lgE は対数表示



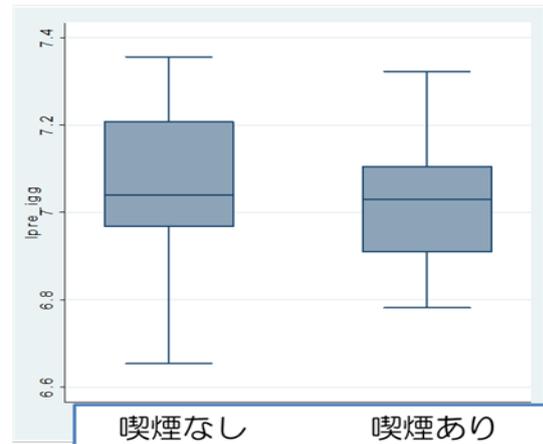
総 IgG P=0.186

図3 血清抗体価の分布・喫煙の有無別



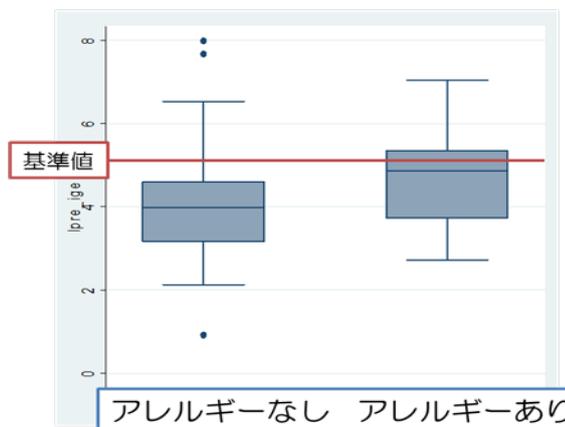
総 IgE P=0.016

\*lgE は対数表示



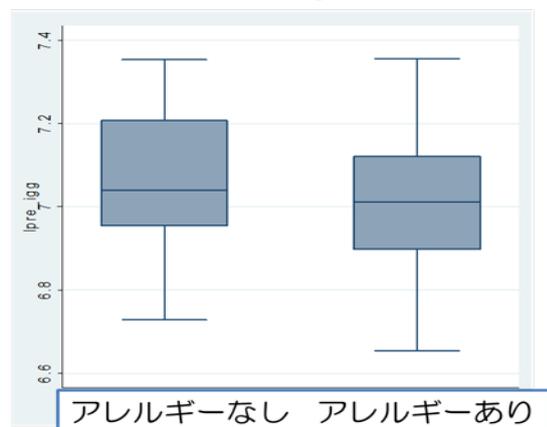
総 IgG P=0.095

図4 血清抗体価の分布・アレルギー疾患の有無別



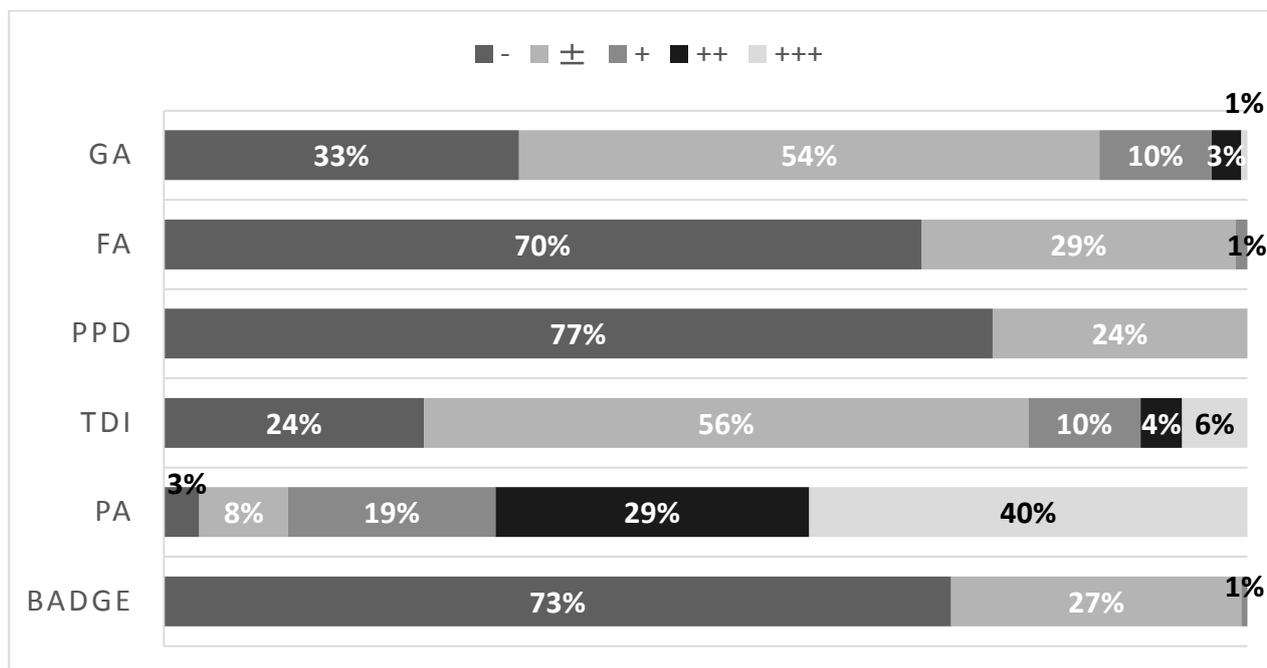
総 IgE P=0.026

\*lgE は対数表示



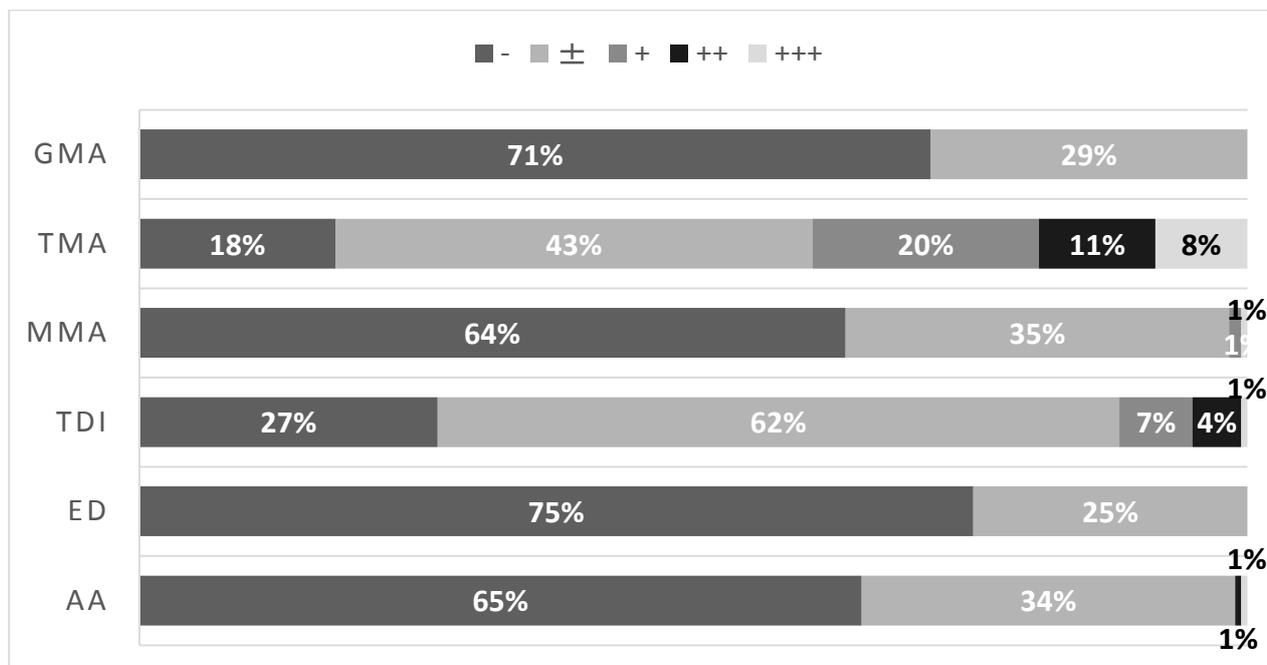
総 IgG P=0.276

図5-1 化学物質特異的 IgG 抗体の分布（183 名測定結果）



- : 陰性、± : <3.125、+ : 3.125-6.25、++ : 6.25-12.5、+++ : 12.5 以上

図5-2 化学物質特異的 IgG 抗体の分布（183 名測定結果）



- : 陰性、± : <3.125、+ : 3.125-6.25、++ : 6.25-12.5、+++ : 12.5 以上

図6 各化学物質特異的 IgG 抗体価の散布図行列 (対数変換値を使用、検出限界以下も含む)

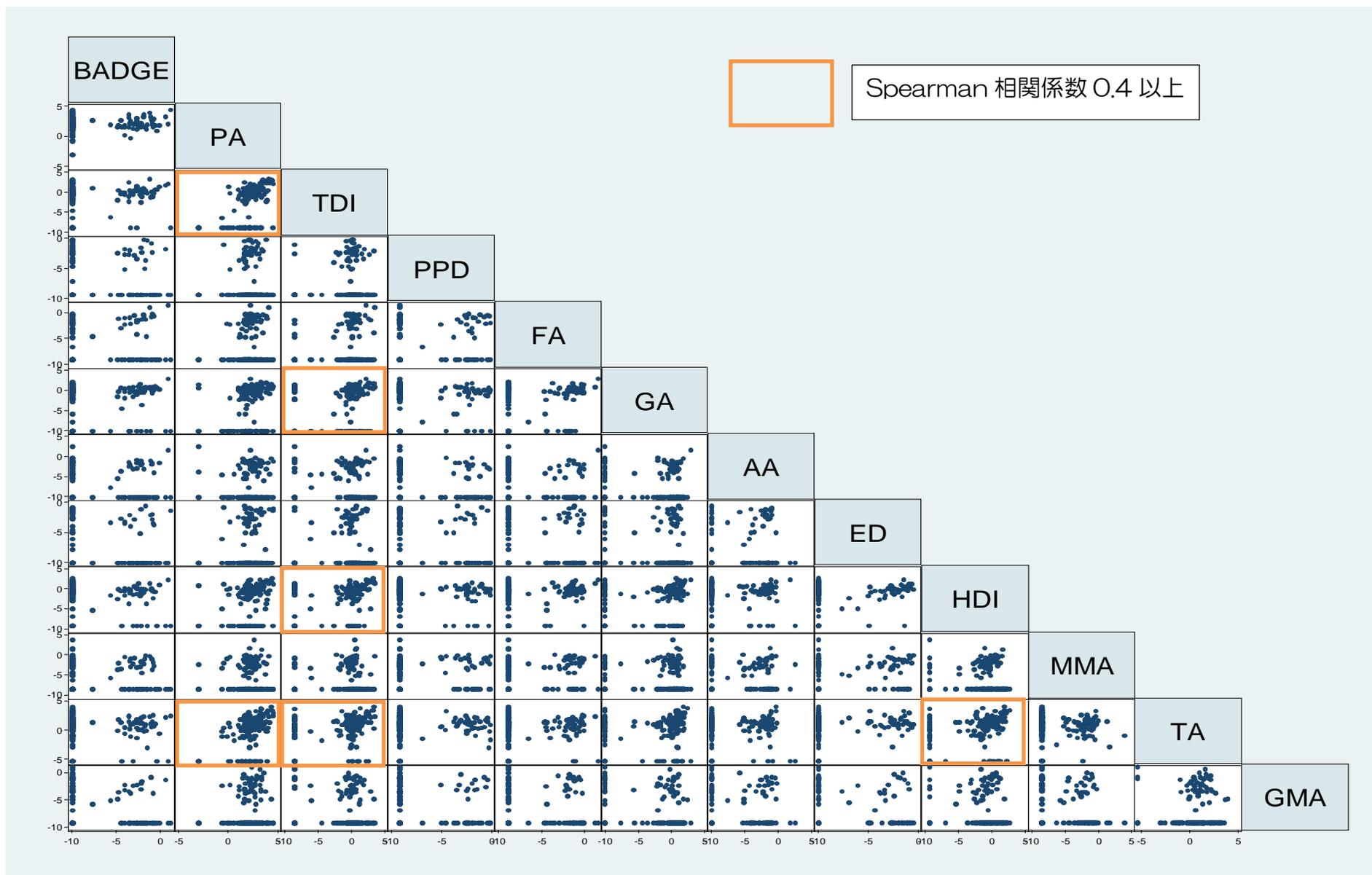


表 10 各 IgG 抗体間の相関 (Spearman 相関係数) 上段: Spearman 相関係数 下段: P 値 (Bonferroni 補正後)

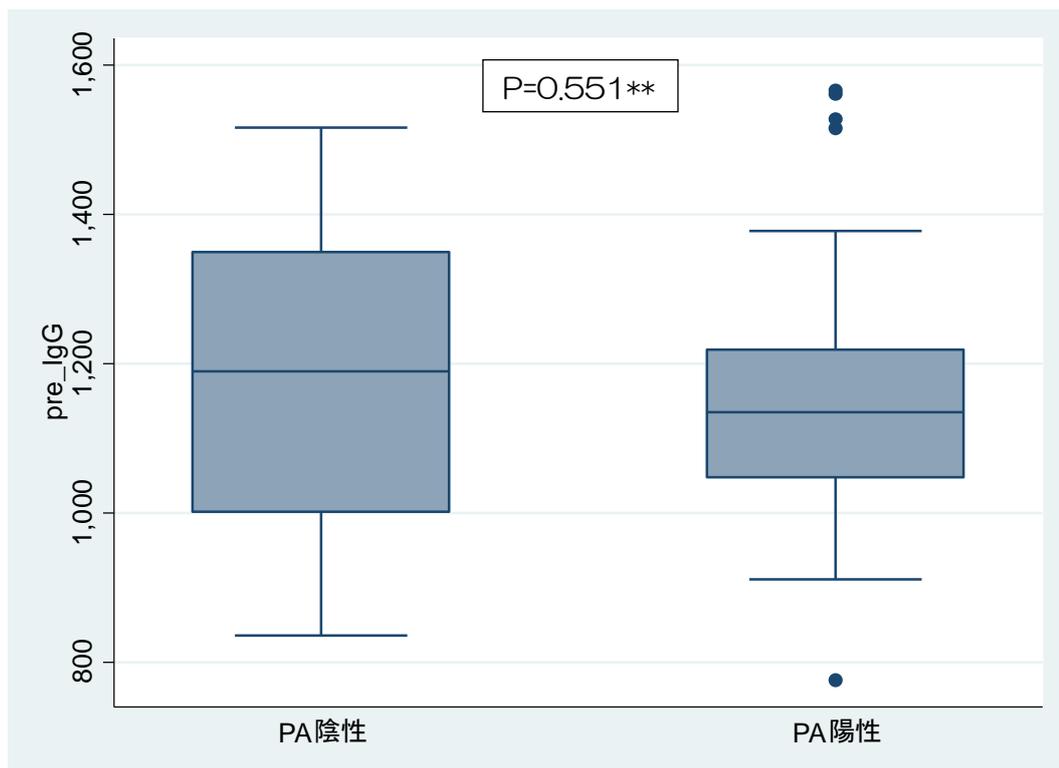
	BADGE	PA	TDI	PPD	FA	GA	AA	ED	HDI	MMA	TMA	GMA
BADGE	1.000											
PA	0.008 1.000	1.000										
TDI	0.203 0.412	<b>0.492</b> <0.001	1.000									
PPD	0.144 1.000	-0.058 1.000	0.086 1.000	1.000								
FA	0.274 0.013	0.087 1.000	0.221 0.188	0.317 0.001	1.000							
GA	0.134 1.000	0.206 0.362	<b>0.429</b> <0.001	0.065 1.000	0.187 0.795	1.000						
AA	0.146 1.000	0.096 1.000	0.159 1.000	0.053 1.000	0.047 1.000	-0.014 1.000	1.000					
ED	0.130 1.000	0.069 1.000	0.063 1.000	0.126 1.000	0.170 1.000	0.078 1.000	0.357 0.001	1.000				
HDI	0.066 1.000	0.330 <0.001	<b>0.453</b> <0.001	0.108 1.000	0.248 0.053	0.324 0.001	0.264 0.022	0.273 0.014	1.000			
MMA	0.143 1.000	-0.071 1.000	0.004 1.000	0.263 0.023	0.319 0.001	0.072 1.000	0.162 1.000	0.384 <0.001	0.184 0.899	1.000		
TMA	0.073 1.000	<b>0.430</b> <0.001	<b>0.454</b> <0.001	0.119 1.000	0.114 1.000	0.275 0.013	0.097 1.000	0.253 0.041	<b>0.423</b> <0.001	0.106 1.000	1.000	
GMA	0.055 1.000	0.097 1.000	0.007 1.000	0.100 1.000	0.096 1.000	-0.142 1.000	0.142 1.000	0.099 1.000	0.078 1.000	0.091 1.000	0.176 1.000	1.000

表 11 2つ以上の特異的 IgG 抗体が強陽性 (+++) を示した対象者

性	年齢	職業	喫煙	除草剤	殺虫剤	塩素系 漂白洗剤	染料 (髪染め)	アレルギー疾患既往歴	陽性 (+++) を示した特異的 IgG 抗体
女性	41 歳	事務職	吸わない	なし	なし	なし	あり	なし	PA, TDI
男性	52 歳	事務職	吸わない	なし	なし	なし	なし	なし	PA, TMA
男性	75 歳	不明	やめた	あり	あり	なし	なし	なし	PA, TMA
男性	54 歳	製造業	吸っている	なし	なし	なし	なし	なし	PA, TDI
女性	56 歳	不明	吸わない	あり	なし	あり	あり	なし	PA, TMA
女性	73 歳	助産師	吸わない	なし	なし	あり	なし	あり	PA, TMA
女性	55 歳	無職	吸わない	なし	あり	あり	あり	なし	PA, TDI, TMA, HDI
男性	56 歳	会社員	やめた	なし	なし	なし	なし	なし	PA, TMA
男性	32 歳	教職員	吸わない	なし	なし	なし	なし	あり	PA, TDI
女性	29 歳	事務職	吸わない	なし	なし	なし	あり	なし	PA, TDI
女性	57 歳	製造業	吸わない	なし	なし	あり	あり	あり	PA, TDI
男性	27 歳	事務職	吸わない	なし	なし	なし	なし	あり	PA, MMA
女性	32 歳	無職	吸わない	なし	なし	あり	なし	あり	PA, TMA
男性	50 歳	JA	やめた	なし	なし	なし	あり	あり	PA, TDI, TMA
女性	62 歳	主婦	吸わない	なし	なし	あり	なし	なし	PA, TDI, TMA
女性	61 歳	パート	吸わない	なし	なし	あり	なし	なし	PA, TDI
男性	35 歳	団体職員	吸っている	なし	なし	なし	なし	なし	PA, TMA
男性	44 歳	機械製造*	吸わない	なし	なし	なし	なし	なし	PA, TMA

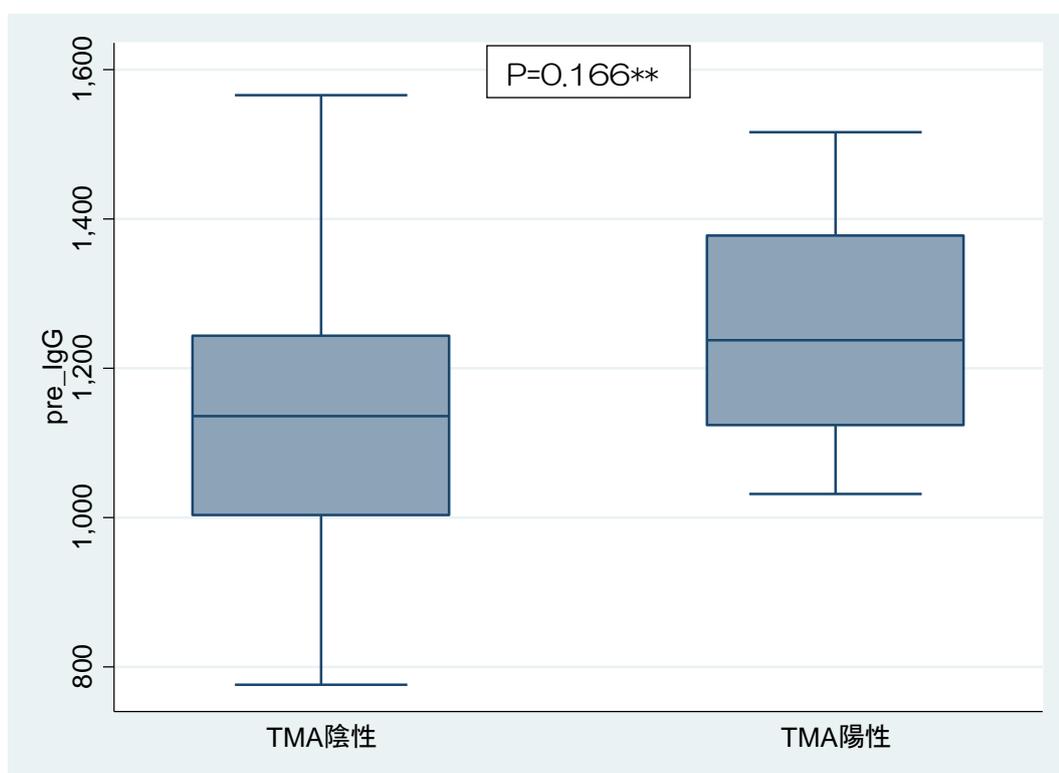
\*有機溶剤を使用

図 7-1 総 IgG 抗体の分布 (PA 陽性群と陰性群との比較)



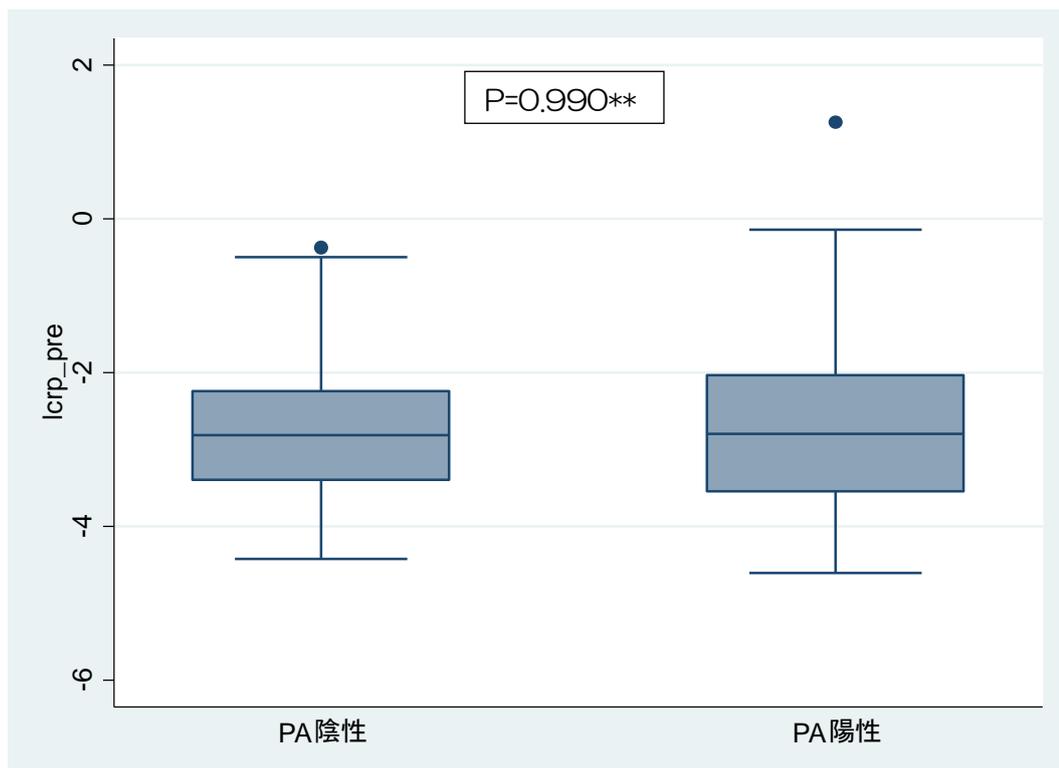
PA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

図 7-2 総 IgG 抗体の分布 (TMA 陽性群と陰性群との比較)



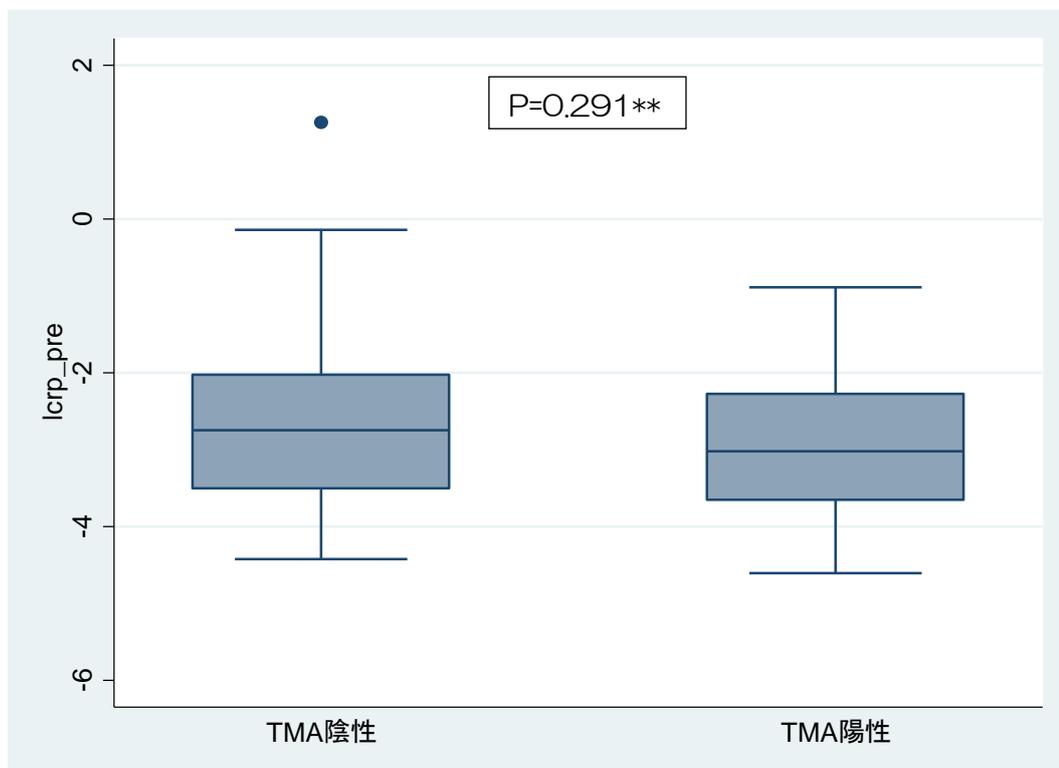
\*TMA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

図 8-1 高感度 CRP 値の分布 (PA 陽性群と陰性群との比較)



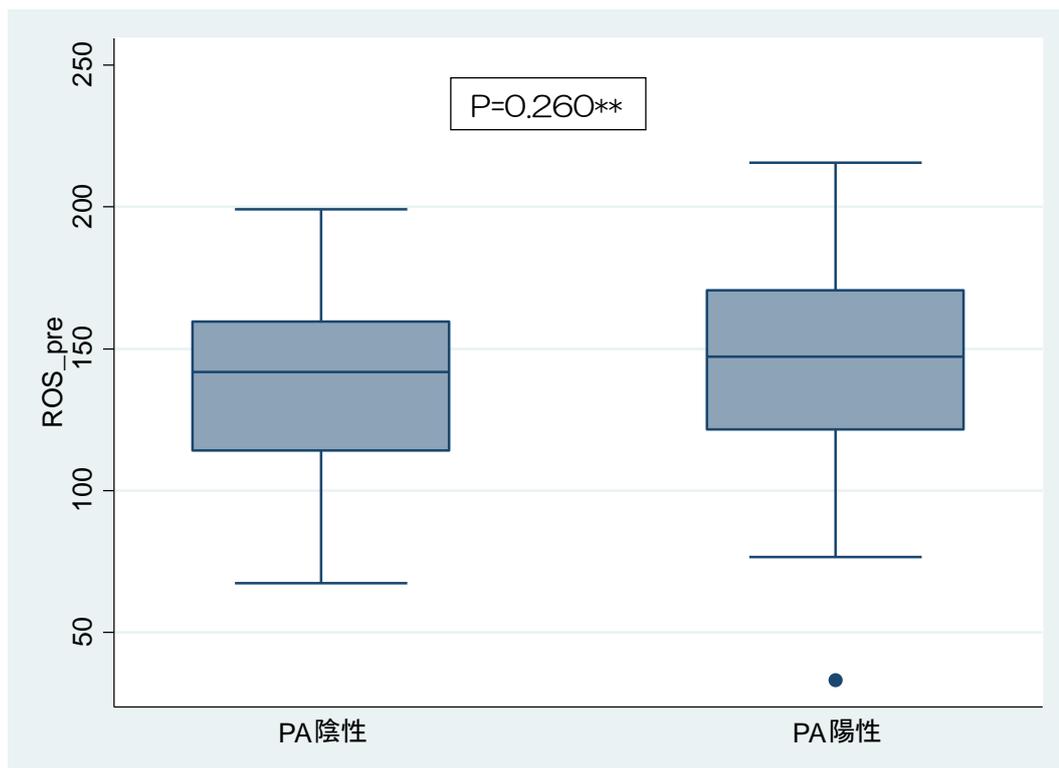
\*PA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

図 8-2 高感度 CRP 値の分布 (TMA 陽性群と陰性群との比較)



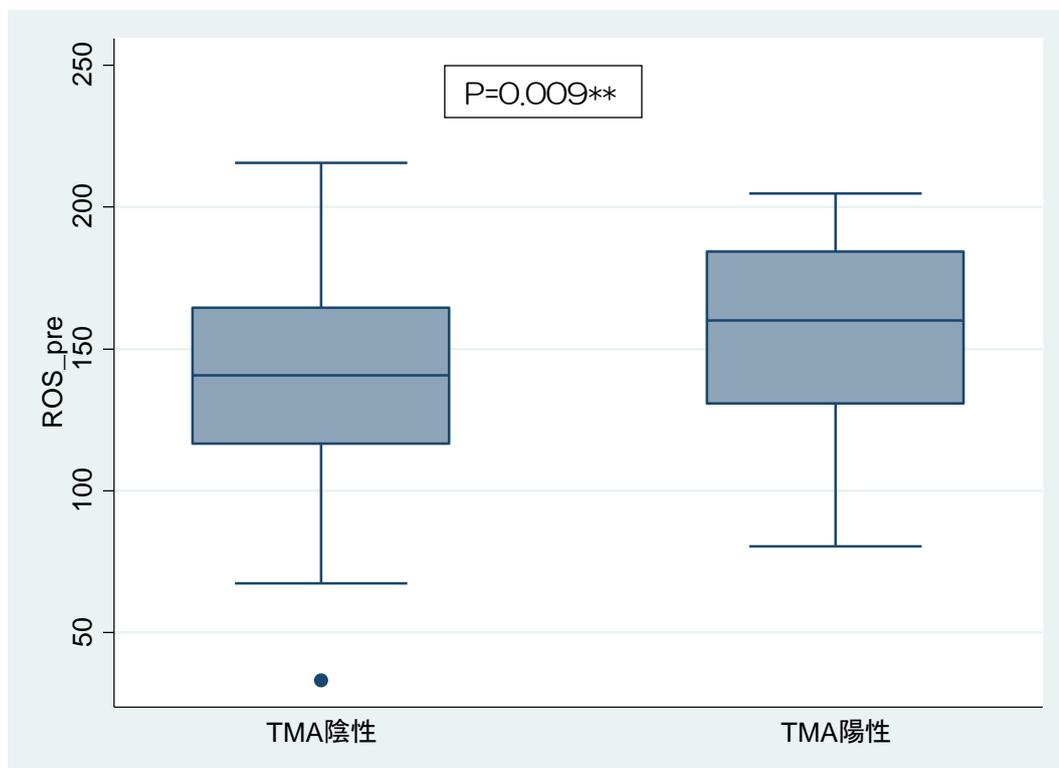
\*TMA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

図 9-1 血清 ROS の分布 (PA 陽性群と陰性群との比較)



\*PA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

図 9-2 血清 ROS の分布 (TMA 陽性群と陰性群との比較)



\*TMA 陽性: ++以上、\*\*Mann-Whitney U test

表 12-1 無水フタル酸 (PA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連

	人数 (%)	PA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
性						
男性	101 (100)	27 (27)	74 (73)	1.38	0.72-2.65	
女性	82 (100)	29 (35)	53 (65)	1.0	(ref)	
肥満度 (BMI)						
25 未満	123 (100)	41 (33)	82 (67)	1.0	(ref)	P for trend = 0.134
25~	60 (100)	15 (25)	45 (75)	1.53	0.76-3.11	
中性脂肪値 (mg/dL)						
150 未満	144 (100)	40 (28)	104 (72)	1.0	(ref)	P for trend = 0.191
150~	20 (100)	6 (30)	14 (70)	0.83	0.29-2.34	
200~	19 (100)	10 (53)	9 (47)	<b>0.32</b>	<b>0.12-0.87</b>	
HDL コレステロール値 (mg/dL)						
40 未満	16 (100)	6 (38)	10 (63)	0.65	0.22-1.93	P for trend = 0.754
40 以上	167 (100)	50 (30)	117 (70)	1.0	(ref)	
LDL コレステロール値 (mg/dL)						
140 未満	145 (100)	42 (29)	103 (71)	1.0	(ref)	P for trend = 0.714
140 以上	38 (100)	14 (37)	24 (63)	0.75	0.35-1.61	
ヘモグロビン A <sub>1c</sub> (%)						
6.2 未満	180 (100)	55 (31)	125 (69)	1.0	(ref)	P for trend = 0.377
6.2 以上	3 (100)	1 (33)	2 (67)	1.01	0.09-11.8	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 12-2 無水フタル酸 (PA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	PA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
<b>喫煙習慣</b>						
吸わない	109 (100)	34 (31)	75 (69)	1.0	(ref)	
やめた	39 (100)	12 (31)	27 (69)	0.73	0.27-1.93	
吸う	35 (100)	10 (29)	25 (71)	0.72	0.25-2.05	
<b>飲酒習慣</b>						
飲まない	32 (100)	10 (31)	22 (69)	1.0	(ref)	P for trend = 0.234
付き合い程度	68 (100)	20 (29)	48 (71)	0.93	0.37-2.38	
1-4 回/週	43 (100)	11 (26)	32 (74)	0.94	0.31-2.82	
5 回以上/週	40 (100)	15 (38)	25 (63)	0.51	0.16-1.55	
<b>ドリンクスコア</b>						
1 未満	39 (100)	13 (33)	26 (67)	1.0	(ref)	P for trend = 0.867
1 以上 2 未満	47 (100)	16 (34)	31 (66)	0.83	0.32-2.14	
2 以上 4 未満	41 (100)	12 (29)	29 (71)	1.01	0.36-2.79	
4 以上	32 (100)	9 (28)	23 (72)	1.01	0.33-3.10	
<b>緑茶摂取量 (1 日あたり)</b>						
3 杯未満	79 (100)	19 (24)	60 (76)	1.0	(ref)	P for trend = 0.214
3 杯以上	104 (100)	37 (36)	67 (64)	0.66	0.33-1.33	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 12-3 無水フタル酸 (PA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	PA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
コーヒー摂取量 (1 日あたり)						
あまり飲まない	72 (100)	20 (28)	52 (72)	1.0	(ref)	P for trend = 0.407
3 杯未満	87 (100)	30 (34)	57 (66)	0.67	0.34-1.35	
3 杯以上	23 (100)	5 (22)	18 (78)	1.25	0.40-3.89	
ジュース等の甘い飲み物						
飲まない	127 (100)	39 (31)	88 (69)	1.0	(ref)	0.818
1 本	42 (100)	13 (31)	29 (69)	0.78	0.35-1.75	
2 本以上	14 (100)	4 (29)	10 (71)	0.81	0.23-2.90	
運動習慣 (週 2 日以上、1 年以上継続)						
あり	41 (100)	14 (34)	27 (66)	1.0	(ref)	
なし	142 (100)	42 (30)	100 (70)	1.24	0.57-2.67	
高コレステロールの指摘						
あり	70 (100)	21 (30)	49 (70)	1.11	0.57-2.15	
なし	113 (100)	35 (31)	78 (69)	1.0	(ref)	
高血糖の指摘						
あり	29 (100)	9 (31)	20 (69)	1.07	0.45-2.56	
なし	154 (100)	47 (31)	107 (69)	1.0	(ref)	
アレルギー性疾患の既往						
あり	68 (100)	19 (28)	49 (72)	1.20	0.62-2.34	
なし	115 (100)	37 (32)	78 (68)	1.0	(ref)	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 12-4 無水フタル酸 (PA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	PA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*
		<6.25	≥6.25		
塩素系漂白剤の使用					
なし	117 (100)	32 (27)	85 (73)	1.0	(ref)
あり	66 (100)	24 (36)	42 (64)	0.82	0.37-1.82
殺虫剤の使用					
なし	133 (100)	40 (30)	93 (70)	1.0	(ref)
あり	49 (100)	15 (31)	34 (69)	1.12	0.54-2.34
除草剤の使用					
なし	147 (100)	44 (30)	103 (70)	1.0	(ref)
あり	35 (100)	11 (31)	24 (69)	1.01	0.44-2.34)
染料の使用					
なし	124 (100)	34 (27)	90 (73)	1.0	(ref)
あり	59 (100)	22 (37)	37 (63)	0.81	0.37-1.76

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 13-1 無水トリメリット酸 (TMA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連

	人数 (%)	TDI 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
性						
男性	99 (100)	87 (83)	17 (17)	0.69	0.32-1.49	
女性	82 (100)	65 (79)	17 (21)	1.0	(ref)	
肥満度 (BMI)						
25 未満	122 (100)	99 (81)	23 (19)	1.0	(ref)	P for trend = 0.701
25~	59 (100)	48 (81)	11 (19)	1.08	0.48-2.43	
中性脂肪値 (mg/dL)						
150 未満	144 (100)	112 (78)	32 (22)	1.0	(ref)	P for trend = 0.057
150~	18 (100)	17 (94)	1 (6)	0.22	0.03-1.73	
200~	19 (100)	18 (95)	1 (5)	0.22	0.03-1.76	
HDL コレステロール値 (mg/dL)						
40 未満	15 (100)	13 (87)	2 (13)	0.70	0.15-3.29	P for trend = 0.685
40 以上	166 (100)	134 (81)	32 (19)	1.0	(ref)	
LDL コレステロール値 (mg/dL)						
140 未満	144 (100)	117 (81)	27 (19)	1.0	(ref)	P for trend = 0.438
140 以上	37 (100)	30 (81)	7 (19)	1.05	0.41-2.70	
ヘモグロビン A <sub>1c</sub> (%)						
6.2 未満	178 (100)	145 (81)	33 (19)	1.0	(ref)	P for trend = 0.885
6.2 以上	3 (100)	2 (67)	1 (33)	1.71	0.14-21.0	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 13-2 無水トリメリット酸 (TMA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	TMA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
<b>喫煙習慣</b>						
吸わない	108 (100)	86 (80)	22 (20)	1.0	(ref)	
やめた	39 (100)	31 (79)	8 (21)	1.21	0.41-3.55	
吸う	34 (100)	30 (88)	4 (12)	0.54	0.15-2.04	
<b>飲酒習慣</b>						
飲まない	32 (100)	25 (78)	7 (22)	1.0	(ref)	P for trend = 0.446
付き合い程度	67 (100)	53 (79)	14 (21)	0.86	0.30-2.47	
1-4 回/週	42 (100)	34 (81)	8 (19)	0.86	0.25-2.93	
5 回以上/週	40 (100)	35 (88)	5 (13)	0.56	0.14-2.23	
<b>ドリンクスコア</b>						
1 未満	38 (100)	29 (76)	9 (24)	1.0	(ref)	P for trend = 0.659
1 以上 2 未満	47 (100)	38 (81)	9 (19)	0.78	0.26-2.34	
2 以上 4 未満	41 (100)	34 (83)	7 (17)	0.68	0.21-2.24	
4 以上	32 (100)	26 (81)	6 (19)	0.78	0.22-2.78	
<b>緑茶摂取量 (1 日あたり)</b>						
3 杯未満	79 (100)	64 (81)	15 (19)	1.0	(ref)	P for trend = 0.457
3 杯以上	102 (100)	83 (81)	19 (19)	1.17	0.51-2.67	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 13-3 無水トリメリット酸 (TMA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	TMA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*	P 値*
		<6.25	≥6.25			
コーヒー摂取量 (1 日あたり)						
あまり飲まない	71 (100)	57 (80)	14 (20)	1.0	(ref)	P for trend = 0.816
3 杯未満	86 (100)	69 (80)	17 (20)	0.98	0.44-2.19	
3 杯以上	23 (100)	20 (87)	3 (13)	0.65	0.17-2.57	
ジュース等の甘い飲み物						
飲まない	127 (100)	101 (80)	26 (20)	1.0	(ref)	
1 本	40 (100)	32 (80)	8 (20)	0.74	0.29-1.94	
2 本以上	14 (100)	14 (100)	0 (0)	-	-	
運動習慣 (週 2 日以上、1 年以上継続)						
あり	41 (100)	33 (80)	8 (20)	1.0	(ref)	
なし	140 (100)	114 (81)	26 (19)	0.77	0.31-1.93	
高コレステロールの指摘						
あり	69 (100)	58 (84)	11 (16)	0.82	0.37-1.85	
なし	112 (100)	89 (79)	23 (21)	1.0	(ref)	
高血糖の指摘						
あり	29 (100)	25 (86)	4 (14)	0.73	0.23-2.31	
なし	152 (100)	122 (80)	30 (20)	1.0	(ref)	
アレルギー性疾患の既往						
あり	68 (100)	60 (88)	8 (12)	<b>0.40</b>	<b>0.17-0.96</b>	
なし	113 (100)	87 (77)	26 (23)	1.0	(ref)	

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

表 13-4 無水トリメリット酸 (TMA) 特異的抗体価の分布と血液検査および生活習慣・環境要因との関連 (続き)

	人数 (%)	TMA 特異的抗体価		オッズ比*	95%信頼区間*
		<6.25	≥6.25		
塩素系漂白剤の使用					
なし	116 (100)	95 (82)	21 (18)	1.0	(ref)
あり	65 (100)	52 (80)	13 (20)	1.18	0.45-3.11
殺虫剤の使用					
なし	131 (100)	108 (82)	23 (18)	1.0	(ref)
あり	49 (100)	38 (78)	11 (22)	1.72	0.73-4.06
除草剤の使用					
なし	145 (100)	118 (81)	27 (19)	1.0	(ref)
あり	35 (100)	28 (80)	7 (20)	1.52	0.56-4.12
染料の使用					
なし	122 (100)	99 (81)	23 (19)	1.0	(ref)
あり	59 (100)	48 (81)	11 (19)	1.12	0.43-2.93

\*性・年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果



## 日常生活における化学物質曝露が 総 IgE 抗体および総 IgG 抗体に及ぼす影響

分担研究者 太田 雅規 福岡女子大学 国際文理学部 食・健康学科  
(公衆衛生学研究室) 教授

### 研究要旨

一般人を対象として、日常生活における化学物質曝露の有無や曝露経路とアレルギー症状、総 IgG および総 IgE 抗体との関連性を横断研究するとともに、1 カ月後、3 カ月後の経時変化を検証することを目的とした。

本分担研究では、20 歳以上の 80 名の女性 (大学教職員と学生) を対象とし、アレルギー疾患の有無、日常生活や職場・学校での化学物質の曝露の有無や、タバコ、アルコールといった生活習慣における曝露の有無、そして、呼吸器系症状の有無と総 IgE および総 IgG 抗体との関連性を検証した。

その結果、横断研究においては、アレルギー疾患の有無において、総 IgG 抗体はアレルギー疾患がある群がない群に比べ高い傾向にあった。また、化学物質曝露については、化学物質曝露がない方がある群よりも総 IgG 抗体が有意に低値であった。生活習慣では、飲酒習慣や喫煙習慣と総 IgE 抗体に関連を認めた。縦断研究では、総 IgG において、ベースライン、1 ヶ月後、3 ヶ月後の時期に関係なく、アレルギー疾患を持つものの方が有意に高いという結果であった。一方、総 IgE については、個体内、個体間いずれについても有意な差を認めなかった。疾患別では、アトピー性皮膚炎がある場合、総 IgE はベースライン調査の夏から 1 ヶ月後、3 ヶ月後にかけて低下する傾向にあり、アトピー性皮膚炎の無い群にはその傾向は認めないという結果であった。化学物質曝露については、総 IgG 抗体は化学物質曝露がある場合、無い群よりも高いが、経時変化には 2 群間に有意な差を認めなかった。

以上から、特異的 IgE、IgG 抗体の検証を行う際には、層別化するか、あるいは補正に加えるなど、交絡要因としての補正が必要であると考えられた。また、アトピー性皮膚炎のある者においては、総 IgE 抗体は季節性的な変化が認められたため、長期に経過をフォローする場合は更に注意が必要であろう。ただし、本結果の解釈には特異的な IgE、IgG 抗体での更なる検証を必要とする。

### 分担研究者

川本 俊弘 産業医科大学 医学部 産業衛生学  
土屋 卓人 産業医科大学 医学部 産業衛生学

### A. 研究目的

エポキシ樹脂、ウレタン樹脂等の樹脂 (プラスチック) の原料は、ここ 30 年増加しており、2011 の年間生産量は 1,159 万トンに上っている。樹脂の生産量の増加は労働現場における使用量の増加と直結しており、樹脂作業者のアレルギー疾患の増加が危惧されている。2008 年にはエポキシ樹脂原料が原因のアレルギー性皮膚炎がエポキシ樹脂作業従事者 8 名 (19 名中) に発症した労

災事例も報告されている。

合成樹脂 (プラスチック) は様々な化学物質を用いて生成されており、どの化学物質が労働者のアレルギーの原因物質 (アレルゲン) か、問診や症状のみで決定することは難しい。また症状の経過を客観的に判定するためのツールも存在していない。特に樹脂原料として常に新規化学物質が開発され、使用現場や労働衛生行政、医療現場はそれに対応できていない状況である。

近年 IgG 抗体が曝露の指標になりうることや抗原への曝露の機会を減少させると特異的 IgG 抗体・IgG/IgE 比の減少がおけると報告がある<sup>1-3)</sup>。今回我々は産業医科大学医学部産業衛生学講座が開発した特異的 IgG・IgE 抗体検出法を用

いて、化学物質曝露とアレルギー症状、抗体との関連について分子疫学研究を行った。

本分担研究においては、上記の分子疫学研究の一環として、一般人を対象とし、日常生活における化学物質曝露の有無や曝露経路とアレルギー症状、IgG および IgE 抗体との関連性について横断研究および1カ月後、3カ月後の縦断研究を行い検証することを目的とした。

なお、本報告では、日常生活における化学物質曝露と総 IgE および総 IgG 抗体との関連を中心に報告する。特異的 IgG 抗体についての検証は分担研究者の土屋の報告書を参照されたい。

## B. 研究方法

### 1. 方法の概要

自記式質問票を用いて、喫煙歴、飲酒歴といった生活習慣の他、化学物質曝露情報として、塩素系漂白剤、殺虫剤、染料（髪染め）、ネイル、有機溶剤、ホルムアルデヒド、樹脂、その他の使用の有無を尋ねた。また、近年、手軽に扱えるようになっている紫外線硬化樹脂であるネイルに着目し、ネイル（ペディキュアを含む）使用に関しては、使用期間等も含め詳細に質問した。

自記式質問票調査と同時に採血を行い、総 IgE、総 IgG 抗体を測定した。得られた結果を用いて、化学物質曝露の有無やアレルギー症状と総 IgG、総 IgE 抗体との関連性を検証した。

### 2. 研究・解析対象者

対象は、F 大学および S 大学の教職員、20 歳以上の学生 82 名とした。なお、横断研究については 82 名中男性 2 名は除外して集計、解析を行った。縦断研究については、1 ヶ月、3 ヶ月の経時変化の調査に自主的に参加した 38 名を対象とした。

学内掲示板等を利用して募集をかけた。対象者には、目的と内容を十分説明し、調査への参加とデータの使用に同意した者全てを対象とした。また、情報はすべて連結可能匿名、ID 化して管理・保存した。

### 3. 研究方法（調査内容等）

#### ①アレルギー・日常生活についての質問紙調査（別添資料参照）

上記対象者に対し、別紙の質問紙調査を行った。また、縦断研究においては、別紙の質問紙調査をベースライン、1 ヶ月後、3 ヶ月後の 3 回行った。なお、ベースラインの調査は 8 月に実施した。

#### ②総・特異的 IgG・IgE 抗体

上記対象者に対し、採血を行い産業医科大学医

学部産業医学講座の開発した手法で特異的 IgG の測定を行い、総 IgG、総 IgE については、外注検査で測定した。本項では、総 IgG および総 IgE の結果について述べる。

#### ③化学物質曝露やアレルギー症状と総 IgG、総 IgE 抗体との関連についての検証

以上の情報をもとに、化学物質曝露やアレルギー症状と総 IgG および総 IgE 抗体との関連について横断的および縦断的に検証を行った。

## 4. 解析

横断研究における解析には、2 群比較には対応のない t 検定、3 群以上の場合は一元配置分散分析を用いた。

縦断研究における解析には、反復測定分散分析を用い生活習慣や化学物質の曝露の有無等による経時変化の違いを検証した。

以上の解析は JMP Pro 12.2.0 を用い、データは平均±標準偏差で表した。

## 5. 倫理面への配慮

本研究は産業医科大学および福岡女子大学の倫理委員会(2015-03)にて承認を得て行われた。本人の自由意志で協力いただき、本研究の意義、目的、方法、不利益および危険性について説明文書を作成し文書および口頭で十分な説明を行い、同意をいただいた者のみを対象とした。

## C. 研究結果

### I. Study 1: 横断研究

#### 1. 対象者の特性（表 I-1）

平均年齢 23.5±6.4 歳、総 IgE 抗体 393.6±825.4 IU/ml、総 IgG 抗体 1248.2±210.3 mg/dl であった。

#### 2. アレルギー疾患と総 IgE、総 IgG 抗体

気管支喘息やアレルギー性鼻炎、花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのアレルギー疾患をもつ者(既往も含む)は 80 名中 52 名であった。アレルギー疾患の内訳を表 I-2 に示す。

表 I-2 に示すとおり、アレルギー性鼻炎が最も多く、次いで花粉症、蕁麻疹、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎の順となっている。今回の対象者では化学物質過敏症は 1 名であった。

次に、アレルギー疾患の有無による総 IgE、総 IgG 抗体の違いについて検証した(表 I-3)。その結果、アレルギー疾患のある群の方がいない群よりも総 IgG 抗体が高い傾向にあった(p=0.053)。しかし、総 IgE 抗体については、有意な差を認めな

かった (p=0.418)。

更に、アレルギー疾患別に総 IgE、総 IgG 抗体の違いを検証したところ(表 I-4)、アトピー性皮膚炎のある群はない群に比べて総 IgE 抗体が高い傾向が見られたが、総 IgG 抗体についてはアレルギー疾患毎ではその有無で有意な差を認めなかった。

### 3. 化学物質曝露と総 IgE、総 IgG 抗体

表 I-5 に化学物質曝露の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の違いを示す。表 I-5 が示すとおり、総 IgG 抗体は基準値内の範囲であるが(870-1800mg/dl)、化学物質曝露のある群の方が、ない群よりも有意に低いという結果であった (p=0.022)。

さらに、化学物質ごとの解析を行ったところ(表 I-6~12)、塩素系漂白剤、染料、殺虫剤の使用の有無で総 IgE、総 IgG 抗体に有意な差を認めなかった。職場や学校内での化学物質の曝露として、有機溶剤やホルムアルデヒド、樹脂といった化学物質に曝露されているとの回答であったが、それらの有無と総 IgE、総 IgG 抗体に有意な差を認めなかった。

また、日常生活での化学物質曝露(塩素系漂白剤、染料、殺虫剤のいずれかの曝露)の有無と職場や学校内での化学物質(有機溶剤、ホルムアルデヒド、樹脂、その他の化学物質)の曝露の有無で、それぞれ総 IgE、総 IgG 抗体を比較したところ、日常生活での化学物質曝露がある群はない群に比べ有意に総 IgG 抗体が低いという結果であった(p = 0.02)。

### 4. ネイルの使用の有無と総 IgE、総 IgG 抗体

表 I-15 にネイルの使用の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の違いを示す。ネイルを「現在している群」「以前ネイルをしていた群」「全くネイルをしたことがない群」の3群間に総 IgE、総 IgG 抗体レベルに有意な差を認めなかった。

また、「現在ネイルをしている群」において、ネイルをつける頻度と総 IgE、総 IgG 抗体を比較したところ、有意な差を認めなかった(図 I-1)。さらに、「以前ネイルをしていた群」において、ネイルをつけていた時期と総 IgE、総 IgG 抗体を比較した場合でも有意な差を認めなかった(図 I-2)。

### 5. 受動喫煙の有無と総 IgE、総 IgG 抗体

表 I-16 に受動喫煙の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の違いを示す。表 I-16 からわかるように、受動喫煙の有無で有意な差を認めなかった。

### 6. 喫煙状況と総 IgE、総 IgG 抗体

「非喫煙」「過去喫煙」「現喫煙」の3群に分け、総 IgE・IgG 抗体を比較した(表 I-17)。その結果、「現喫煙群」は、「非喫煙群」や「過去喫煙群」よりも有意に総 IgE 抗体が高いことが示された。ただし、「過去喫煙群」および「現喫煙群」の人数が少ないため結果の解釈には注意を要する。

### 7. 飲酒状況と総 IgE、総 IgG 抗体

飲酒状況として、「やめた」「飲まない」「飲む」の3群に分け総 IgE、総 IgG 抗体の比較を行った(表 I-18)。その結果、「やめた」群は、「飲まない」群および「飲む」群と比べて有意に総 IgE 抗体が高いことが示された。ただし、喫煙状況と同様に、「やめた」群は N=2 と少ないため結果の解釈には注意を要する。

### 8. 呼吸器症状と総 IgE、総 IgG 抗体

呼吸器症状として、「息切れ」の有無、「咳や痰」の有無についての解析を行った(表 I-19, 20)。その結果、いずれの呼吸器症状においても、それらの有無と総 IgE および総 IgG 抗体に有意な差を認めなかった。

## II. Study 2: 縦断研究

### 1. 対象者の特性(表 II-1)

ベースライン、1ヶ月後、3ヶ月後のフォローアップができた対象者は38名で、平均年齢22.7±3.1歳であった。総 IgE 抗体および総 IgG 抗体の経時変化に有意な差を認めなかった(総 IgE: p = 0.114, 総 IgG: p = 0.468)。

### 2. アレルギー疾患の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化

フォローアップ対象者のアレルギー疾患の内訳を表 II-2 に示す。アレルギー性鼻炎および蕁麻疹を持つものが9人と最も多く、ついで、アトピー性皮膚炎7名、花粉症およびアレルギー性結膜炎が5名であった。

アレルギー疾患の有無が総 IgE、総 IgG の経時変化に及ぼす影響を検証した。表 II-3 および図 II-1 に示すように、経時変化にはアレルギー疾患の有無で有意な差を認めなかったが、総 IgG において、ベースライン、1ヶ月後、3ヶ月後の時期に関係なく、アレルギー疾患を持つものの方が有意に高いという結果であった。一方、総 IgE については、個体内、個体間いずれについても有意な差を認めなかった。

ベースラインでの調査において、各アレルギー疾患の有無別に総 IgE および総 IgG について比較した結果、アトピー性皮膚炎の有無で総 IgE 抗体

レベルが有意に異なり、アトピー性皮膚炎がある群の方が無い群よりも大きい結果を得ている(表 I-4)。そこで、総 IgE 抗体の経時変化についても検証を行った。その結果、表 II-4 および図 II-2 に示すように、総 IgE 抗体について、アトピー性皮膚炎の有無と 3 時点の経時変化に交互作用を認めた。アトピー性皮膚炎がある場合、総 IgE はベースライン調査の夏から 1 ヶ月後、3 ヶ月後の秋にかけて低下する傾向にあり、アトピー性皮膚炎の無い群にはその傾向は認めないという結果であった。

### 3. 化学物質曝露の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化

表 II-5 および図 II-3 に示すように、総 IgG 抗体は化学物質曝露がある場合、無い群よりも高いが、経時変化には 2 群間に有意な差を認めなかった。

### 4. 受動喫煙の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化

表 II-6 に受動喫煙の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化を示す。受動喫煙の有無についての検証では、喫煙者は除外して解析を行った。

受動喫煙の有無で、総 IgE および総 IgG 抗体に有意な差を認めず、経時変化においても 2 群間で有意な差を認めなかった。

### 5. 飲酒習慣の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化

表 II-7 に飲酒習慣の有無と総 IgE および総 IgG 抗体の経時変化を示す。

飲酒をやめた対象者は N=1 のため明確なことは言えないが、総 IgE 抗体レベルが他の飲まない群、飲む群と比較しても高い結果であった。経時変化を見ても、やめた 1 名は低下傾向にあるものの高いレベルを保っていた。

### 6. 呼吸器症状と総 IgE・IgG 抗体の経時変化

呼吸器症状として、「息切れ」の有無、「咳や痰」の有無についての経時変化についての解析を行った(表 II-8, 9)。

その結果、総 IgE、総 IgG 抗体いずれも「息切れ」の有無、「咳や痰」の有無について 2 群間で有意な差を認めず、また、経時変化においても 2 群間に有意な差を認めなかった。

### 7. ネイルの使用の有無と総 IgE、総 IgG 抗体の経時変化

表 II-10 にネイルの使用の有無と特異的 IgE、総 IgG 抗体の経時変化を示す。

表 II-10 から明らかなように、ネイルを現在使用している群と過去にしていたが今はしていない群との間に有意な差を認めず、また、経時変化でも 2 群間に有意な差を認めなかった。

## **D. 考察**

### Study I: 横断研究の結果から

本分担研究では、アレルギー疾患の有無、日常生活や職場・学校での化学物質の曝露の有無や、タバコ、アルコールといった生活習慣における曝露の有無、そして、呼吸器系症状の有無と総 IgE および総 IgG 抗体との関連性を検証した。

アレルギー疾患の有無において、総 IgG 抗体はアレルギー疾患がある群がない群に比べ高い傾向にあった。また、化学物質曝露については、化学物質曝露がない方がある群よりも総 IgG 抗体が低いという結果であった。

アレルギー疾患により総 IgG 抗体やそのサブクラスが増加するとの報告はこれまでもなされている<sup>4,5)</sup>。一方で、化学物質については、動物実験において毒素の摂取で総 IgG 抗体が抑制されたとの報告や<sup>6)</sup>、ヒトにおける樹脂曝露では総 IgG 抗体が高いとの報告もある<sup>7)</sup>。アトピー性皮膚炎で総 IgG 抗体と IgG サブクラスの IgG4 抗体との関連を調べた横断研究では、IgG4 抗体はアトピー性皮膚炎で高値を示すが、7 割以上の症例で総 IgG 抗体は基準値の範囲内に収まっていたと報告している<sup>8)</sup>。今回、アレルギー疾患の有無と化学物質曝露の有無との間に総 IgG 抗体が逆の結果となったが、基準値内の範囲での差であった。今後、特異的 IgG 抗体の測定を行う等、更なる検証が必要がある。

本研究では、生活習慣として飲酒習慣および喫煙習慣に着目し、総 IgE・IgG 抗体についての解析も行った。その結果、受動喫煙の有無では有意な差を認めなかったが、「現喫煙群」は「非喫煙群」や「過去喫煙群」に比べ有意に総 IgE 抗体が高い結果であった。また、飲酒を「やめた群」は、「飲酒する群」や「飲酒しない群」よりも有意に総 IgE 抗体が高い結果であった。

飲酒習慣が総 IgE 抗体に与える影響についてはこれまでも多くの報告があり、Díaz らのレビューによると、慢性的なエタノール摂取それ自体が総 IgE 抗体の増加に関係していることが示唆されており、このことは、アルコールが抗原やアレルゲンとして作用するとも考えられると述べている<sup>9)</sup>。喫煙習慣と総 IgE 抗体についての報告もあり、いくつかの疫学研究で喫煙と総 IgE 抗体との関連性が示されている<sup>10)</sup>。ただし、現喫煙群・過去喫煙群や飲酒をやめた群の人数は非常に

少ないため本分担研究の結果の解釈には注意を要する。

### Study II: 縦断研究の結果から

アレルギー疾患の有無、化学物質の曝露の有無や、タバコ、アルコールといった生活習慣における曝露の有無、そして、呼吸器系症状の有無と総 IgE および総 IgG 抗体の経時変化を検証した。

アレルギー疾患の有無別では、総 IgG 抗体は、時期に関係なくコンスタントにアレルギー疾患がある場合に高くなっていた。ベースラインにてアレルギー疾患がある場合に総 IgG 抗体が有意に高い結果であったが、その傾向が経時変化に関係なく認められた。アレルギー疾患により総 IgG 抗体やそのサブクラスが高くなることは過去にも報告されており<sup>4,5)</sup>、それに合致した結果であった。

また、疾患別では、アトピー性皮膚炎の有無により、総 IgE 抗体の経時変化に有意な差を認めた。アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2016 年版によると、患者の約 80%で総 IgE 抗体が高値であるとされる<sup>11)</sup>。アトピー性皮膚炎の増悪因子として、スギ花粉が挙げられており、春にアトピー性皮膚炎が増加する要因の一つと考えられている<sup>12)</sup>。我が国では春にアトピー性皮膚炎が増悪する例が約 50%存在することも報告されている<sup>13)</sup>。さらに、藤澤らによると、アトピー性皮膚炎の症状の出現に関わる因子として総 IgE 抗体値が上げられている<sup>14)</sup>。今回、ベースラインは 8 月に行っており、春に飛散するスギ花粉の時期を経て総 IgE 抗体が高値となり、その後、1 ヶ月後、3 ヶ月後の経過とともに次第に低下したと考えられる。

横断研究の結果において化学物質曝露の有無で、曝露の無い群の方がある群よりも有意に総 IgG 抗体レベルが高いことを示した。経時変化による検証においても、化学物質曝露の有無で、総 IgG 抗体レベルに有意な差を認め、化学物質の曝露の無い群の方が有意に高かったが、経時変化は 2 群間に有意な差を認めなかった。動物実験における化学物質の曝露で総 IgG 抗体が抑制されるとの報告がなされており<sup>6)</sup>、縦断研究の結果もそれに合致する結果であり、さらに、その差は 3 ヶ月間の経時変化においても有意な差を認めず、コンスタントに化学物質の曝露の無い群で総 IgG 抗体レベルが高いことが示された。

受動喫煙曝露の有無での検証結果では、横断研究での調査と同様に、縦断研究においても総 IgE、総 IgG 抗体、いずれについても 2 群間に有意な差を認めず、経時変化についても有意な差を認めなかった。

本分担研究では、女性が日常的に曝露されている化学物質としてネイルに着目したが、経時変化による解析においても、横断研究の結果と同様に、ネイルの使用の有無で総 IgE および総 IgG 抗体レベルに有意な差を認めなかった。経時変化においてもネイルの使用の有無では非特異的な抗体レベルには影響を及ぼさないことが示唆される。

なお、飲酒習慣の有無の結果では、横断研究において総 IgE 抗体レベルが、飲酒をやめた人に高いことが示されたが、経時変化においても、飲酒をやめた人の総 IgE 抗体レベルは高値を保っていた。ただし、今回の解析では、飲酒をやめたもののうち、経時変化を追えたものは 1 名であったため、本分担研究の結果の解釈には注意を要する。

### E. 結論

アレルギー疾患の有無や化学物質曝露の有無で総 IgE、総 IgG 抗体に差がある可能性が示唆された。生活習慣については、飲酒習慣や喫煙習慣について有意な差を認めた。特異的 IgE、IgG 抗体の検証を行う際には、層別化するか、あるいは補正に加えるなど、交絡要因としての補正が必要であると考えられた。また、アトピー性皮膚炎のある者においては、総 IgE 抗体は季節性的変化が認められたため、長期に経過をフォローする場合は更に注意が必要であろう。ただし、本結果の解釈には特異的な IgE、IgG 抗体での更なる検証を必要とする。

## 参考文献

1. Pronk, et al. Respiratory symptoms, sensitization, and exposure response relationships in spray painters exposed to isocyanates. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 1090-1097.
2. Wisnewski, et al. Biomonitoring Hexamethylene diisocyanate (HDI) exposure based on serum levels of HDI-specific IgG. *Ann Occup Hyg* 2012; 56: 901-910.
3. Erwin, et al. Changes in cat specific IgE and IgG antibodies with decreased cat exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 112: 545-550.
4. Platts-Mills, et al. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357: 752-756.
5. Shakib, et al. Elevated serum IgE and IgG4 in patients with atopic dermatitis. *British J Dermatol* 1977; 97: 59-63.
6. Rasooly, et al. Vomitoxin-induced dysregulation of serum IgA, IgM and IgG reactive with gut bacterial and self antigens. *Food and Chemical Toxicology* 1992; 30: 499-504.
7. Littorin, et al. Exposure biomarkers and risk from gluing and heating of polyurethane: a cross sectional study of respiratory symptoms. *Occup Environ Med* 2000; 57: 396-405.
8. Merrett, et al. Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. *Clin Exp Immunol* 1984;56:645-652.
9. Díaz, et al. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Euro J Clin Nutrition* 2002; 56(supple 3): S50-S53.
10. González-Quintela, et al. Alcohol-induced alterations in serum immunoglobulin e (IgE) levels in human subjects. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: e234-244.
11. 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン作成委員会. アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2016年版. 日本皮膚科学会雑誌 2016;126: 121-155.
12. 大山克巳. アトピー性皮膚炎におけるスギ花粉の意義. 日本皮膚科学会雑誌 1993; 103: 1067-1073.
13. 上原正巳. アトピー性皮膚炎のライフサイクル. 皮膚病診療 1987; 9: 1002-1006.
14. 藤澤重樹ら. データベースADOSによるアトピー性皮膚炎の臨床データの解析. 日本皮膚科学会雑誌 1988; 98: 1211-1217.

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

1. 論文発表 該当無し
2. 学会発表 該当無し
- 3.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

(表)

I. 横断研究の図表

表 I-1 対象者の特性

	ベースライン (N=80)	
	平均	SD
年齢	23.5	± 6.4
総 IgE (IU/ml)	393.6	± 825.4
総 IgG (mg/dl)	1248.2	± 210.3

表 I-2 アレルギー性疾患の内訳

疾病	N
気管支喘息	8
アレルギー性鼻炎	16
花粉症	15
アトピー性皮膚炎	11
アレルギー性結膜炎	12
食物アレルギー	6
薬疹	2
蕁麻疹	14
接触性皮膚炎	5
シックハウス症候群	0
化学物質過敏症	1
その他のアレルギー疾患	8

表 I-3 アレルギー疾患の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=50)		なし (N=30)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	451.9 ±	1001.8	296.5 ±	380.2	0.418
総 IgG (mg/dl)	1283.4 ±	208.2	1189.6 ±	203.8	0.053

表 I-4 アレルギー疾患別の解析結果

疾病	あり			なし		
	N	総 IgE (IU/ml)	総 IgG (mg/dl)	N	総 IgE (IU/ml)	総 IgG (mg/dl)
気管支喘息	8	389.0 ± 370.6	1282.0 ± 202.6	72	394.1 ± 862.9	1244.5 ± 212.2
アレルギー性鼻炎	16	439.3 ± 860.1	1297.0 ± 246.0	64	382.2 ± 823.1	1236.0 ± 200.7
花粉症	15	393.4 ± 680.5	1305.3 ± 180.2	65	393.6 ± 860.0	1235.0 ± 215.8
アトピー性皮膚炎	11	775.7 ± 1635.6 <sup>¶</sup>	1329.5 ± 200.1	69	332.7 ± 608.9	1235.3 ± 210.4
アレルギー性結膜炎	12	712.3 ± 1581.1	1270.2 ± 185.6	68	337.3 ± 609.5	1244.3 ± 215.4
食物アレルギー	6	372.8 ± 272.7	1245.5 ± 227.1	74	395.3 ± 855.7	1248.4 ± 210.5
薬疹	2	60.8 ± 68.2	1286.0 ± 113.1	78	402.1 ± 834.3	1247.2 ± 212.5
蕁麻疹	14	720.2 ± 1496.2	1240.3 ± 176.3	66	324.3 ± 593.7	1249.9 ± 218.0
接触性皮膚炎	5	114.8 ± 101.6	1253.4 ± 112.8	75	412.2 ± 849.2	1247.9 ± 215.7
シックハウス症候群	0			80	393.6 ± 825.4	1248.2 ± 210.3
化学物質過敏症	1	24.2	1214.0	79	398.3 ± 829.6	1248.6 ± 211.6
その他のアレルギー疾患	8	217.2 ± 327.1	1356.9 ± 203.3	72	413.2 ± 862.3	1236.1 ± 208.9

あり vs なし, <sup>¶</sup>: p < 0.1

表 I-5 化学物質曝露の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=56)		なし (N=24)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	420.2 ±	911.0	331.5 ±	591.4	0.663
総 IgG (mg/dl)	1213.1 ±	183.2	1330.1 ±	248.3	0.022

表 I-6 塩素系漂白剤の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=28)		なし (N=52)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	392.2 ±	710.5	394.3 ±	887.8	0.446
総 IgG (mg/dl)	1223.6 ±	145.9	1261.5 ±	238.2	0.975

表 I-7 染料の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=27)		なし (N=53)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	270.3 ±	402.5	456.4 ±	970.6	0.344
総 IgG (mg/dl)	1201.8 ±	137.7	1271.8 ±	236.7	0.264

表 I-8 殺虫剤の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=6)		なし (N=74)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	329.0 ±	293.6	398.8 ±	855.0	0.844
総 IgG (mg/dl)	1188.3 ±	144.3	1253.1 ±	214.7	0.472

表 I-9 有機溶剤の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=20)		なし (N=60)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	490.7	± 1237.8	361.2	± 643.9	0.547
総 IgG (mg/dl)	1262.2	± 223.8	1243.6	± 207.4	0.735

表 I-10 ホルムアルデヒドの使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=5)		なし (N=75)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	85.1	± 101.7	414.2	± 848.5	0.391
総 IgG (mg/dl)	1251.0	± 234.8	1248.0	± 210.3	0.976

表 I-11 樹脂の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=3)		なし (N=77)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	182.1	± 270.4	401.8	± 839.3	0.654
総 IgG (mg/dl)	1310.7	± 103.0	1245.8	± 213.4	0.603

表 I-12 その他の化学物質の使用の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=2)		なし (N=78)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	21.9	± 9.5	403.1	± 833.9	0.522
総 IgG (mg/dl)	1158.5	± 178.9	1250.5	± 211.5	0.545

表 I-13 日常生活での化学物質曝露の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=47)		なし (N=33)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	343.5	± 609.1	465.0	± 1067.6	0.520
総 IgG (mg/dl)	1204.1	± 137.7	1311.0	± 273.9	0.024

表 I-14 職場あるいは学校内での化学物質曝露の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=23)		なし (N=57)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	441.4	± 1158.4	374.3	± 657.8	0.744
総 IgG (mg/dl)	1270.2	± 225.6	1239.3	± 205.2	0.556

表 I-15 ネイルの有無と総 IgE・IgG 抗体

	している (N=42)		以前した (N=33)		全くなし (N=5)		p 値
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	435.9	± 1064.0	352.9	± 433.2	306.7	± 554.8	0.887
総 IgG (mg/dl)	1247.8	± 213.3	1256.2	± 209.4	1199.0	± 229.4	0.854

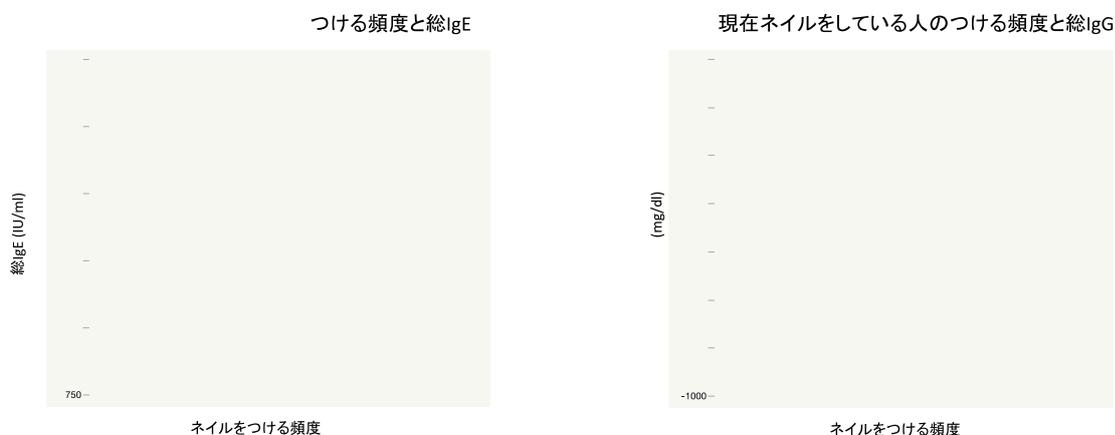


図 I-1 現在ネイルをつけている人の頻度と総 IgE・IgG 抗体との関係



図 I-2 以前ネイルをつけていた人がネイルをつけていた時期と総 IgE・IgG 抗体との関係

表 I-16 受動喫煙の有無と総 IgE・IgG 抗体

	あり (N=30)		なし (N=50)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	574.0 ±	1203.1	285.3 ±	458.0	0.131
総 IgG (mg/dl)	1267.7 ±	226.4	1236.5 ±	201.5	0.524

表 I-17 喫煙状況と総 IgE・IgG 抗体

	非喫煙 (N=76)		過去喫煙 (N=2)		現喫煙 (N=2)		p 値
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	336.8 ±	583.4	25.1 ±	15.8	2921.0 ±	3873.5	<0.0001
総 IgG (mg/dl)	1250.7 ±	213.1	1269.5 ±	149.2	1132.0 ±	196.6	0.730

現喫煙 vs 非喫煙 : p<0.0001, 現喫煙 vs 過去喫煙 : p=0.0004

表 I-18 飲酒状況と総 IgE・IgG 抗体

N	やめた (N=2)		飲まない (N=57)		飲む (N=21)		p 値
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	2930.0 ±	3860.8	280.6 ±	372.0	458.8 ±	935.0	<0.0001
総 IgG (mg/dl)	1241.0 ±	350.7	1254.5 ±	209.1	1232.0 ±	213.7	0.917

やめた vs 飲まない : p<0.0001, やめた vs 飲む : p<0.0001

表 19 呼吸器症状と総 IgE・IgG 抗体:息切れ

	あり (N=32)		なし (N=48)		p 値
	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	406.9 ±	609.9	384.7 ±	948.5	0.907
総 IgG (mg/dl)	1274.3 ±	211.6	1230.9 ±	209.9	0.369

表 20 呼吸器症状と総 IgE・IgG 抗体:咳や痰

	あり (N=4)		なし (N=7)		風邪の時のみ (N=69)		p 値
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
総 IgE (IU/ml)	360.4 ±	317.3	815.8 ±	1266.2	352.7 ±	790.9	0.371
総 IgG (mg/dl)	1165.8 ±	208.4	1276.4 ±	199.9	1250.1 ±	213.2	0.694

## II. 縦断研究の図表

表 II-1. 対象者の特性 (N=38)

	平均	SD	p 値 (個体内 : group x time)*
年齢	22.7	3.1	
総 IgE (IU/ml)			<b>0.114</b>
ベースライン	449.6	1019.7	
1ヶ月後	427.6	910.7	
3ヶ月後	460.3	957.5	
総 IgG (mg/dl)			0.468
ベースライン	1239.2	191.0	
1ヶ月後	1248.7	204.1	
3ヶ月後	1240.3	189.7	

\*反復測定分散分析

表 II-2. アレルギー疾患の内訳

疾病	N
気管支喘息	3
アレルギー性鼻炎	9
花粉症	5
アトピー性皮膚炎	7
アレルギー性結膜炎	5
食物アレルギー	3
薬疹	1
蕁麻疹	9
接触性皮膚炎	3
化学物質過敏症	1
その他のアレルギー疾患	6

表 II-3. アレルギー疾患の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	あり (N=27)		なし (N=11)		P (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)					0.512	0.589
ベースライン	523.1	1192.5	269.3	315.6		
1ヶ月後	496.2	1062.5	259.1	299.6		
3ヶ月後	517.1	1111.2	320.9	389.1		
総 IgG (mg/dl)					<b>0.030</b>	0.117
ベースライン	1285.4	188.1	1125.7	151.8		
1ヶ月後	1294.3	201.3	1136.7	171.2		
3ヶ月後	1277.1	190.9	1150.0	160.8		

\*反復測定分散分析

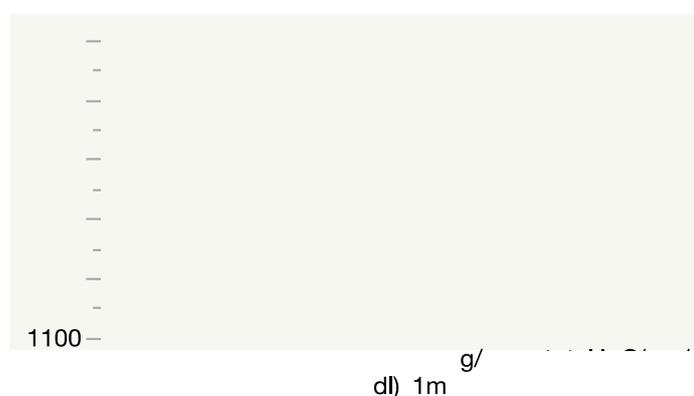


図 II-1. アレルギー疾患の有無と総 IgG 抗体の経時変化

表 II-4. アトピー性皮膚炎の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	なし (N=31)		あり (N=7)		P (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)					0.157	<b>0.036</b>
ベースライン	324.6	586.3	1003.3	2062.8		
1ヶ月後	326.4	582.6	875.6	1769.5		
3ヶ月後	370.3	693.7	858.8	1737.9		
総 IgG (mg/dl)					0.511	0.299
ベースライン	1225.7	182.9	1299.0	229.5		
1ヶ月後	1239.4	201.6	1289.7	226.6		
3ヶ月後	1233.3	188.8	1271.4	205.9		

\*反復測定分散分析

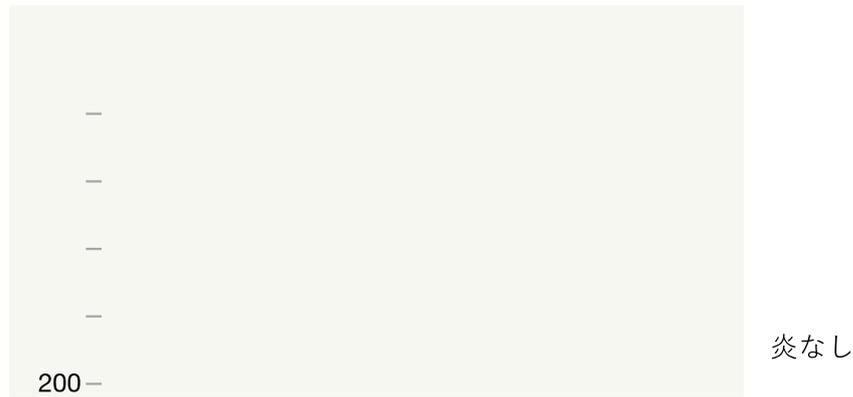


図 II-2. アトピー性皮膚炎の有無と総 IgE 抗体の経時変化

表 II-5. 化学物質曝露の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	なし (N=9)		化学物質あり (N=29)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)					0.837	0.394
ベースライン	470.8	896.4	443.1	1069.7		
1ヶ月後	488.0	918.0	408.8	924.0		
3ヶ月後	555.2	1089.6	430.8	931.9		
総 IgG (mg/dl)					<b>0.050</b>	0.220
ベースライン	1333.4	240.8	1210.0	167.0		
1ヶ月後	1361.4	255.7	1213.7	176.1		
3ヶ月後	1361.8	247.1	1202.6	154.6		

\*反復測定分散分析

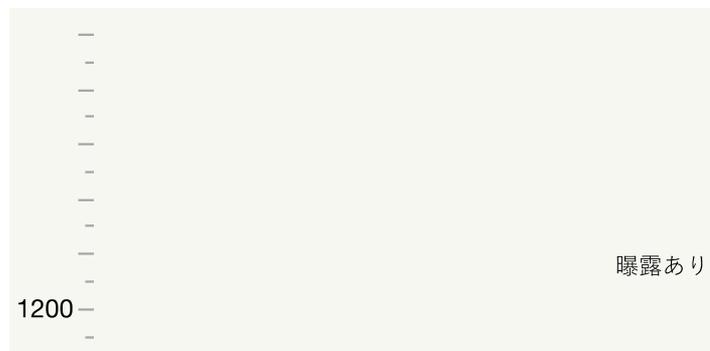


図 II-3. 化学物質曝露の有無と総 IgG 抗体の経時変化

表 II-6. 受動喫煙の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化 (喫煙者は除外して解析)

	受動喫煙あり (N=11)		受動喫煙なし (N=25)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	標準偏差	平均	標準偏差		
総 IgE (IU/ml)					0.230	0.335
ベースライン	363.0	548.4	295.9	558.0		
1ヶ月後	356.7	511.5	296.6	566.5		
3ヶ月後	387.8	604.5	336.1	676.7		
総 IgG (mg/dl)					0.695	0.250
ベースライン	1281.4	171.9	1225.1	199.0		
1ヶ月後	1275.0	184.4	1245.1	214.7		
3ヶ月後	1276.5	174.5	1231.0	198.5		

\*反復測定分散分析

表 II-7. 飲酒習慣の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	やめた (N=1)		飲まない (N=25)		飲む (N=12)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)							<0.0001	<0.0001
ベースライン	5660.0	.	285.6	410.2	357.2	769.4		
1ヶ月後	4870.0	.	282.8	383.5	359.1	788.8		
3ヶ月後	4780.0	.	312.6	460.8	408.0	933.6		
総 IgG (mg/dl)							0.408	0.928
ベースライン	993.0	.	1246.7	215.3	1244.2	126.2		
1ヶ月後	966.0	.	1258.8	227.6	1251.3	140.1		
3ヶ月後	996.0	.	1250.1	211.2	1240.3	134.5		

\*反復測定分散分析

表 II-8. 息切れの有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	息切れあり (N=15)		息切れなし (N=23)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)					0.645	0.191
ベースライン	512.2	780.3	408.8	1164.9		
1ヶ月後	512.9	775.3	371.9	1002.1		
3ヶ月後	583.9	923.9	379.6	990.7		
総 IgG (mg/dl)					0.225	0.995
ベースライン	1287.0	190.4	1208.0	189.0		
1ヶ月後	1295.5	220.3	1218.1	191.5		
3ヶ月後	1288.0	197.5	1209.2	182.1		

\*反復測定分散分析

表 II-9. 咳や痰の有無と総 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	あり (N=3)		なし (N=3)		風邪の時のみ (N=32)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD	平均	SD		
総 IgE (IU/ml)							0.965	0.804
ベースライン	476.7	264.4	280.0	421.8	463.0	1105.5		
1ヶ月後	434.0	238.7	291.3	432.8	439.7	986.0		
3ヶ月後	538.0	384.1	333.0	512.7	464.9	1032.3		
総 IgG (mg/dl)							0.924	0.231
ベースライン	1187.0	249.9	1276.7	340.6	1240.6	177.8		
1ヶ月後	1188.0	269.6	1263.7	272.5	1253.0	199.6		
3ヶ月後	1235.0	238.6	1254.0	245.6	1239.5	188.1		

\*反復測定分散分析

表 II-10. ネイルの有無と非特異的 IgE, 総 IgG 抗体の経時変化

	ネイルしている (N=28)		以前していた (N=10)		p 値 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	SD	平均	SD		
非特異的 IgE (IU/ml)					0.840	0.509
ベースライン	438.7	1149.5	480.4	556.5		
1ヶ月後	410.5	1024.6	475.4	507.0		
3ヶ月後	430.9	1061.4	542.5	615.6		
総 IgG (mg/dl)					0.859	0.617
ベースライン	1239.5	194.2	1238.5	192.0		
1ヶ月後	1253.7	205.8	1234.6	209.4		
3ヶ月後	1245.2	194.5	1226.6	185.0		

\*反復測定分散分析



## ドットブロット法を用いた化学物質特異的 IgG 抗体測定の実際 -日常生活における化学物質 (ネイル用塗料) 曝露での検討-

分担研究者 土屋 卓人 産業医科大学医学部産業衛生学 助教

### 研究要旨

産業現場で使用されている化学物質は年々増加しそれとともに職場での化学物質曝露に伴う様々な健康障害が認められている。特に近年化学物質に起因したアレルギー疾患 (気管支喘息、アレルギー性皮膚炎) の報告が増加し産業衛生分野における大きな課題になっている。しかしそのメカニズムは明らかにされておらず、アレルゲンを同定するのに有用な検査法の確立が求められている。我々の教室ではドットブロット法を用いて対象者の血清中に化学物質特異的 IgG 抗体があるか否かを判定する方法を開発し特許を取得した。今分担研究において、主に大学生を対象とした一般住民における化学物質の曝露状況を調査し、特に本研究で対象とした年齢で使用されている頻度が高いネイル用塗料に着目して、その使用状況の調査とドットブロット法を用いた含有感作性塗料成分 (化学物質) 特異的 IgG 抗体測定 (6 種) を行い、使用状況と IgG 抗体測定値の関連性を検討したところ以下の結果が得られた。ネイル用塗料の「非使用群」(7 名)、「現在使用群」(42 名)、「過去使用群」(32 名) での 3 群間の比較において、血清総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値は統計学的有意差を認めなかった。また 6 種の化学物質に対する特異的 IgG 抗体平均値も 3 群間で統計学的有意差は認めなかった。さらに「現在使用群」の対象者のうち、初回調査後新たにネイル用塗料を塗布しなかった 13 名の、1 ヶ月後、3 ヶ月後での総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値、6 種の化学物質特異的 IgG 抗体平均値を測定したがいずれも統計学的に有意な変化は認めなかった。以上よりドットブロット法を用いた化学物質特異的 IgG 抗体検出は簡便かつ、一度に複数の抗原を測定できる有用な方法であった。今回の検討においてネイル用塗料に着目した日常生活での低濃度化学物質曝露と感作性塗料成分 (化学物質) 特異的 IgG 抗体保有との関連性は認められなかった。

### 分担研究者

川本 俊弘 産業医科大学医学部産業衛生学  
辻 真弓 産業医科大学医学部産業衛生学  
太田 雅規 福岡女子大学国際文理学部食・健康学科  
石原 康宏 広島大学大学院総合科学研究科  
行動科学講座 分子脳科学研究室

一疾患 (気管支喘息、アレルギー性皮膚炎) の報告が増加し産業衛生分野における大きな課題になっている。しかしそのメカニズムは明らかではなく、化学物質に起因するかどうかの診断法も確立されていない。

アレルギー疾患の予防のためには起因抗原の正確な診断が重要である。アレルギーが疑われた場合詳しい問診を基に原因を推測し、特定のための検査を行う。現在有用とされているアレルゲン同定検査には、パッチテストやプリックテスト、抗原吸入誘発テスト、血清特異的 IgE 抗体検査などが有用とされる検査として挙げられ、ガイドラインでも推奨されている。一方これら検査の問題点としてパッチテストやプリックテスト、抗原吸入誘発テストはアナ

### A.研究目的

#### 1. ドットブロット法を用いた化学物質特異的 IgG 検出法

産業現場で使用されている化学物質は年々増加の一途をたどり、それとともに職場での化学物質曝露に伴う様々な健康障害が散見されている。特に近年化学物質に起因したアレルギー

フィラキシーの惹起など副作用の危険性があるため検査できる機関が限られてくること、採血時の侵襲のみですむ radioimmunoassay である RAST (radioallergosorbent test) 法や酵素を使いその発色を測定する ELISA 法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) を用いて行う血清特異的 IgE 抗体検査は有用な検査であるものの商業ベースにおいて測定可能な抗原は限られていること、また化学物質などの低分子物質が抗原の場合特異的 IgE 抗体が検出しにくいとも言われていることから化学物質を同定するためには更なる検査法の確立が求められている。

近年トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネートといったイソシアネート類において、アレルゲンの同定および職業性曝露の指標として血清特異的 IgG 抗体が有用であるとの報告がなされている。そこで我々の教室でも化学物質に対する血清特異的 IgG 抗体に着目し化学物質特異的 IgG 抗体を検出する方法としてドットブロット法を用いて検討した。

ドットブロット法はまず低分子量の化学物質に抗原性を持たせるため、対象化学物質とヒト血清アルブミンを反応させ添加抗原である付加体を作成し、それをメンブレンに Blotting、その後対象者の血清にメンブレンを浸し、対象化学物質に対する特異的 IgG 抗体を保有していれば一次抗体、標識二次抗体反応がおこり発光する (図 1)。この方法を用いて皮膚症状ありの工場労働者となしの労働者の血清を用いて、実際労働現場で使用しているこれら製造物の原料となる化学物質、または製造物そのものを抗原とした特異的 IgG 抗体の検出を行ったところ、皮膚症状ありの労働者群では取扱い製造物の特異的 IgG 抗体の陽性率が皮膚症状なしの群よりも有意に高い結果を示した。この結果からドットブロット法を用いて検出された化学物質特異的 IgG 抗体はアレルギー症状を引き起こす化学物質を同定する有用なマーカーではないかという可能性が示唆された。

## 2. 日常生活での化学物質曝露 (ネイル用塗料の使用) と感作性塗料成分特異的 IgG 抗体保有との関連性についての検討

上記先行研究の結果からドットブロット法を用いた化学物質特異的 IgG 抗体の検出は、化学物質の職業性曝露の指標、そしてアレルゲンの同定に関して有用な検査法である可能性が示唆された。一方で日常生活レベルでの化学

物質曝露との関連性についてはまだ検討されていない。そこで今分担研究では非労働者である一般人を対象に日常生活 (非職業性) での比較的 low 濃度の化学物質曝露と上記のドットブロット法を用いた化学物質特異的 IgG 抗体保有との関連性について検討することとした。日常生活上においても様々な化学物質に曝露されているが、今回は日常生活で汎用されている化粧品、特にネイル用塗料に絞って検討を行った。化学物質美容の一種として爪に様々な装飾を施すネイルアートの中で特に専用の塗料を塗る行為 (手の爪への塗装は「マニキュア」、足の爪への塗装は「ペディキュア」という: 以下まとめて「ネイル」とする) はよく行われており、使用経験のある成人女性は多い。このネイル用塗料には、アクリル樹脂やウレタン樹脂といった樹脂成分を主成分として使用している例が多く、その他可塑剤や染料、香料など様々な成分が含まれているが、近年ネイル用塗料を顧客に塗布する職業 (ネイリスト) や自らネイル用塗料を使用している人においてネイル用塗料が原因と思われる皮膚炎などのアレルギー疾患の発生報告が散見されるようになった。実際ネイル用塗料に含まれている成分にはアレルギーを引き起こす感作性成分が含まれているものが多く、アクリル樹脂の原料であるメタクリル酸やエポキシ樹脂の原料であるビスフェノール A ジグリシジルエーテルは日本産業衛生学会や「化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS)」が定める感作性物質分類において皮膚感作性、あるいは呼吸器感作性ありとされている。比較的曝露の大きい労働現場では 3 管理に則して様々な対応がとられているが、美容行為として日常生活上に行っている人のネイル用塗料に対する曝露の程度やアレルギー発生要因 (塗料中のどの物質がアレルゲンとなっているか) などの詳細は明らかではなく予防対策も限定的である。さらに昨年には、市販されているネイル用塗料より国が化粧品への配合を禁止している成分の一つであるホルムアルデヒドが検出されたことが問題になり、ネイル用塗料による健康障害が注目されている。

今回はこのネイル用塗料使用者はネイル用塗料の感作性成分に対する特異的抗体を有しているのではないかと考えの下、本研究の目的をネイル用塗料の使用 (曝露) 状況と感作性塗料成分 (化学物質) 特異的 IgG 抗体保有との関連性を、ドットブロット法を用いた化学物質

特異的 IgG 抗体測定により明らかにすることとした。

## B. 研究方法

以下ネイル用塗料の使用(曝露)状況と感作性塗料成分(化学物質)特異的 IgG 抗体保有との関連性について検討の方法を述べる。ドットプロット法による化学物質特異的 IgG 抗体測定の概要についてもこの中で述べる。

### 1. 対象者

対象は20歳以上の本学および分担研究者の所属機関である福岡女子大学の学生および教職員で、本研究に同意の得られた81名(男性2名、女性79名)。

### 2. 質問紙調査と生体試料(血清)採取

対象者には自記式による質問票調査と血液採取を行った。質問票は別途示す。質問票では基本属性(身長、体重、既往歴(アレルギー疾患など)、飲酒・喫煙歴など)、ネイル用塗料使用歴(使用期間、頻度、製品名)、その他の化学物質への曝露歴(殺虫剤、除草剤、染料、塩素系漂白剤・殺菌剤、職業性曝露の有無)を尋ねた。採取した血液より血清を分離し、総 IgE 値、総 IgG 値を測定した。81名を質問票調査において「これまでネイルを全く使用したことがない」と回答した群(以下「非使用群」と、「現在ネイルをしている」と回答した群(以下「現在使用群」と「以前はしていたが今はしていない」と回答した群(以下「過去使用群」)に分け、3群間での喫煙歴、既往歴(アレルギー疾患)割合、および総 IgE 値、総 IgG 値を比較した。さらに対象者の血清を用いて、ネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体を測定し3群間で比較した(図2)。

### 3. ドットプロット法による化学物質特異的 IgG 抗体測定

測定用抗原として化学物質と生体内蛋白の付加体を作成した。対象とする化学物質はネイル用塗料に含まれていることがあるビスフェノール A ジグリシジルエーテル(Bisphenol A Diglycidyl ether: BADGE)、無水フタル酸(Phthalic Anhydride: PA)、ホルムアルデヒド(Formaldehyde: FA)、アクリルアミド(Acrylamide: AA)、メタクリル酸メチル(Methyl methacrylate: MMA)、および無水トリメリット酸(Trimellitic Anhydride: TMA)の6種類とした。6種の化学物質の特徴を表1に記す。生体内蛋白はヒト血清アルブミン(Human Serum Albumin: HSA)を用いた。

溶媒はジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide: DMSO)を用い、各化学物質と HSA を混合後遠心にて上清を抽出した。作成条件としてバッファの pH 条件を 10.8 とし、化学物質の濃度条件を「1:1」(=HSA モル濃度: 化学物質モル濃度)、「1:10」、「1:100」および HSA のみ(コントロール)の4濃度とし、化学物質毎に化学物質-HSA 付加体を作成した。

作成した化学物質-HSA 付加体に BTB (Bromothymol Blue) 溶液を混ぜ着色し、ニトロセルロース膜に 1 $\mu$ l ずつ、各濃度で2プロットした(図3)。また Standard として Human IgG を 40.8 $\mu$ g/ml から順に 25 $\mu$ g/ml、12.5 $\mu$ g/ml、6.25 $\mu$ g/ml、3.125 $\mu$ g/ml、0 $\mu$ g/ml とプロットした。プロットを行ったニトロセルロース膜にブロッキング剤を添加した後、一次抗体反応としてヒト血清を用いた。対象者の血清(血清 100 $\mu$ l を Phosphate Buffered Saline with Tween 20 (PBST) 20ml で希釈したもの)にニトロセルロース膜を浸し一次抗体反応を行った。さらに蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体(Goat anti-human IgG)を用いて二次抗体反応を行った。検体ごとに Standard の発行強度より検量線を作成し、化学物質特異的抗体の発行強度を定量化(2プロットの平均値)した。今回判定に用いた濃度は「1:10」とし、class1 (0 $\mu$ g/ml)、class2 (>0 $\mu$ g/ml、3.125 $\mu$ g/ml <、class3 ( $\geq$  3.125 $\mu$ g/ml、<6.25 $\mu$ g/ml)、class4 ( $\geq$  6.25 $\mu$ g/ml、<12.5 $\mu$ g/ml)、class5 ( $\geq$  12.5 $\mu$ g/ml)に class 分類し評価した。

### 4. 縦断調査

ネイル用塗料の曝露の程度と含有化学物質特異的 IgG 抗体値の経時的変化を明らかにするため、「現在使用群」の対象者のうち、初回調査から1ヶ月後、3ヶ月後に同様の質問票調査および採血の実施に同意した人で、さらに初回調査から3ヶ月調査終了後まで新たにネイル用塗料を塗布しなかった13名を縦断調査の対象とし、総 IgE 値、総 IgG 値および血清を用いたネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体値を測定し経時的変化について明らかにした。

#### (倫理面への配慮)

本研究は産業医科大学および福岡女子大学の倫理委員会にて承認を得て行われた。対象者には本人の自由意志で協力いただいた。本研究の意義、目的、方法、不利益および危険性について説明文書を作成し文書および口頭で十分

な説明を行い、同意をいただいた者のみを対象とした。生体試料（血清）は連続可能匿名化した状態で所属講座のフリーザーに保管している。

## C. 研究結果

### 1. 質問票によるネイル用塗料使用歴の結果

81名（男性2名、女性79名）に対し質問票調査を行った。平均年齢は24.1歳であった。ネイル用塗料使用歴（表2）については「これまでネイルを全く使用したことがない」（非使用群）のは7名（8.6%：2名の男性含む）、「現在ネイルをしている」（現在使用群）のは42名（51.9%）、「以前はしていたが今はしていない」（以下「過去使用群」）のが32名（39.5%）で平均年齢は各々37.0歳、22.3歳、23.8歳で非使用群が高かったが統計学的には有意差は認めなかった。各群の喫煙率、アレルギー疾患既往率は表3に記した。

「現在使用群」の42名中、ネイル用塗料の使用頻度が「2週間以内に1回」が6名（14.3%）、「2週間から1か月に1回」が16名（38.1%）、「1か月から3か月に1回」が12名（28.6%）、「3か月から6か月に1回」が8名（19.0%）で「2週間から1か月に1回」が最も多かった。「過去使用群」32名において最も直近で使用してからどのくらい時間が経過しているかについては「1年以上使用していない」が11名（34.4%）、「6か月から1年未満」が5名（15.6%）、「6か月未満」が16名（50.0%）と「6か月未満」が最も多かった。

### 2. 総IgE抗体値、IgG抗体値の比較

「非使用群」、「現在使用群」、「過去使用群」の3群における総IgE抗体、IgG抗体平均値は、「非使用群」で各々250 (IU/ml)、1207 (mg/dl)、「使用群」で436 (IU/ml)、1248 (mg/dl)、「過去使用群」で357 (IU/ml)、1250 (mg/dl)であり、3群間で統計学的有意差は認めなかった（表2）。各群において総IgE抗体値（基準値173IU/ml以下）が基準値を超えている人の割合は「非使用群」で3名（42.9%）、「現在使用群」で17名（40.5%）、「過去使用群」で19名（59.3%）であった。一方総IgG抗体値は全例で基準値（870-1700mg/dl）内を示した。

### 3. 化学物質特異的IgG抗体測定

ネイル塗料に含有されている頻度の高い6種の化学物質（BADGE、PA、FA、AA、MMA、TMA）に対する特異的IgG抗体値を「非使用群」（7名）と「現在使用群」（42名）、および

「過去使用群」（32名）全3群の血清を用いて測定した。前述のように測定用抗原で用いる化学物質-HSA付加体は4条件の各化学物質濃度で作成したが、今報告書で解析に用いた濃度条件は「1:10」とした。「非使用群」におけるIgG抗体平均値はBADGE 0 (μg/ml)、PA 9.23 (μg/ml)、FA 0.07 (μg/ml)、AA 0 (μg/ml)、MMA 0.04 (μg/ml)、TMA 0.73 (μg/ml)で、「現在使用群」におけるIgG抗体平均値はBADGE 0.01 (μg/ml)、PA 12.73 (μg/ml)、FA 0.86 (μg/ml)、AA 0.04 (μg/ml)、MMA 0.13 (μg/ml)、TMA 0.83 (μg/ml)、「過去使用群」におけるIgG抗体平均値はBADGE 0.02 (μg/ml)、PA 16.05 (μg/ml)、FA 0.05 (μg/ml)、AA 0.02 (μg/ml)、MMA 0.10 (μg/ml)、TMA 0.91 (μg/ml)であり、3群間で統計学的に有意差は認めなかったが、FAを除く5物質で「非使用群」が他の2群より低い数値であった（図4）。「現在使用群」と「過去使用群」の2群間においては特に一定の傾向は示さなかった。

3群における特異的IgG抗体値のclass分類別の結果を表4に示す。特異的IgG抗体値が高いclass3以上（3.125μg/ml以上）だった人の割合は「非使用群」ではPA 7人（100%）認めたものの他のBADGE、FA、AA、MMA、TMAはいずれも0人であった。「現在使用群」におけるclass3以上だった人の割合はBADGE 0人（0%）、PA 40人（95.2%）、FA 2人（4.8%）、AA 0人（0%）、MMA 0人（0%）、TMA 4人（9.5%）であり、「過去使用群」におけるclass3以上だった人の割合はBADGE 0人（0%）、PA 32人（100%）、FA 0人（0%）、AA 0人（0%）、MMA 0人（0%）、TMA 2人（6.3%）であった。3群間でのFA、TMAにおけるclass3以上の割合に統計学的有意差は認めなかった。

「現在使用群」の42名中、ネイル用塗料の使用頻度別の各化学物質の特異的IgG抗体値を表5に示す。TMAが、使用頻度が高くなるに従い平均値も高くなっていた。

「過去使用群」32名中、ネイル用塗料の最終使用からの未使用期間別の各化学物質の特異的IgG抗体値を表6に示す。特に一定の傾向は示さなかった。

### 4. 症例供覧

【症例1（図5）】22歳女性。大学生。ネイル用塗料使用経験なし。喫煙歴：なし  
既往歴：アレルギー性結膜炎  
血清抗体値：総IgE抗体値638(IU/ml)、総IgG

抗体値 1589 (mg/dl)。

化学物質特異的 IgG 抗体測定 (class 分類)  
BADGE : class1、PA : class4、FA : class1、  
AA : class1、MMA : class1、TMA : class2

【症例 2 (図 6)】22 歳女性。大学生。ネイル  
用塗料 A を使用。ネイル用塗料 A の含有物質  
は図 6 に表記。使用頻度は 2 週間から 1 か月  
に 1 回。

喫煙歴 : なし

既往歴 : 花粉症

血清抗体値 : 総 IgE 抗体値 638 (IU/ml)、総 IgG  
抗体値 1589 (mg/dl)。

化学物質特異的 IgG 抗体測定 (class 分類)  
BADGE : class1、PA : class5、FA : class2、  
AA : class2、MMA : class2、TMA : class4

5. ネイル用塗料曝露と化学物質特異的 IgG  
抗体値の経時的関連性 (縦断調査)

「現在使用群」の対象者のうち、初回調査か  
ら 3 ヶ月間新たにネイル用塗料を塗布しな  
かった 13 名 (図 7) を対象に、初回調査、初回  
調査 1 ヶ月後、3 ヶ月後の時点における総 IgE  
値、総 IgG 値 (図 8) および血清を用いたネ  
イル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体値 (図  
9) の結果を示す。総 IgE 値、総 IgG 値い  
ずれも初回、1 ヶ月後、3 ヶ月後で統計学的に有意  
な変化は示さなかった。各時点での化学物質特  
異的 IgG 抗体平均値であるが初回→1 ヶ月後  
→3 ヶ月後で各々 BADGE 0.01→0.12→0.05  
( $\mu\text{g/ml}$ )、PA 10.16→8.25→8.73 ( $\mu\text{g/ml}$ )、FA  
0.44→0.68→0.88 ( $\mu\text{g/ml}$ )、AA 0.08→0.001→  
0.02 ( $\mu\text{g/ml}$ )、MMA 0.26→0.02→0.14 ( $\mu\text{g/ml}$ )、  
TMA 0.76→1.09→1.01 ( $\mu\text{g/ml}$ )であり、い  
ずれも初回、1 ヶ月後、3 ヶ月後において統計学的  
に有意な変化は認めなかった。

#### D. 考察

本来ドットプロット法はタンパク質を電気  
泳動などにより分離することなくニトロセル  
ロース膜などに固定し、酵素標識抗体などで  
タンパク質量を特異的に定量することを主な目  
的とした方法であり、我々が今研究でドット  
プロット法を用いた目的である血清中に特異  
的 IgG 抗体である一次抗体があるか否かを検  
出するものとは異なる。また最近 IgE 抗体が  
関与している即時型アレルギーのアレルゲン  
同定法として原因物質や食材に含まれるタン  
パク質を電気泳動で分離しメンブレンに転写  
後患者血清中の IgE 抗体が結合するタンパク  
質バンドを検出するイムノブロッティング法  
(ウェ

スタンブロッティング法)の有用性についても  
報告されている。コンセプトはドットプロット  
法と同様であるが、ドットプロット法での特  
異的 IgG 抗体測定とは電気泳動の有無、およ  
び IgE 抗体と IgG 抗体であることが相違点  
である。イムノブロッティング法はアレルギ  
ー惹起物質内の原因抗原分子同定のために  
タンパク質成分を電気泳動により分離するこ  
とで、どのアレルゲン・コンポーネントに感  
作、反応しているのか明らかにできるのが利  
点であるが、電気泳動の際変性処理を行うた  
めにタンパク質の立体構造が変性し反応性が  
低下する可能性も指摘されている。ドット  
プロット法はタンパク質の変性処理および電  
気泳動を行わずに測定するため測定時間も短  
く、また 1 抗原あたり 1 プロット ( $1\mu\text{l}$ )  
で測定できるため、1 枚のメンブレンで多  
くの抗原を評価することが可能であった。

今分担研究ではドットプロット法を用いて  
の化学物質特異的 IgG 抗体測定を日常生活  
レベルにおける比較的低濃度曝露において行  
った。主に大学生を対象とした一般住民にお  
ける化学物質の曝露状況を調査し、化学物質  
の中でも特にその健康障害が近年注目され  
ていること、また日常生活において使用状況  
が比較的確であることからネイル用塗料に  
着目して、本調査で対象とした年齢で使用  
されている頻度が高いその使用状況 (曝露  
の程度) と含有化学物質特異的 IgG 抗体  
との関連性について検討したが、明らかな  
関連性は認められなかった。測定用抗原に  
使用した対象化学物質を 6 種選定したが、  
ネイル用塗料には皮膜形成剤 (ニトロセル  
ロース、アクリル樹脂、エポキシ樹脂、  
ポリメタクリル酸メチルなど)、揮発性溶  
剤 (酢酸エチル、酢酸ブチルなど)、可塑  
剤 (カンフル、クエン酸エステル、無水フ  
タル酸、無水トリメリット酸など)、助溶  
剤 (イソプロパノール)、ゲル化剤 (有機  
粘土鉱物など)、着色剤 (有機顔料、無機  
顔料)、パール剤 (天然魚鱗箔、合成パール  
剤)、あるいはベース液や仕上げ剤 (トッ  
プコート) など多くの化学物質が含まれて  
いることから選定についてその妥当性の判  
定が難しく、関連性が認められなかった理  
由である可能性も否定できなかったが、今  
結果よりドットプロット法を用いての化学  
物質特異的 IgG 抗体測定は日常生活レ  
ベルの低濃度曝露を対象とするよりも職  
業性などの比較的高濃度曝露での評価に  
有用であることが示唆された。

曝露指標としての特異的IgG抗体の有用性については前述のようにトルエンジイソシアネートやヘキサメチレンジイソシアネートといったイソシアネート類の工場での比較的高濃度である職業性曝露における報告はあるが日常生活レベルでの化学物質曝露での報告はない。今回ネイル用塗料に絞って検討したが、特にネイル用塗料使用による曝露指標については含有成分の代謝物質を測定した報告があるものの、曝露の程度が職業性に比べ低いことから、含有成分自体の代謝物質ではなく、特異的抗体での検出は困難であったと思われる。またネイル用塗料に含まれる化学物質は単体(モノマー)ではなく、いくつかの重合体でできた高分子化合物(ポリマー)として存在することがある。今研究で用いた無水フタル酸(PA)や無水トリメリット酸(TMA)もコポリマーとして存在している。測定用抗原として今回のように単体ではなくより塗料成分に類似した形態での検討も必要であると思われた。

一方で測定用抗原として用いた6種の化学物質のなかで、FA(国内製のネイル用塗料には原則含まれていない)を除く5物質で有意差はないものの「非使用群」が「現在使用群」、「過去使用群」より低い数値であったことから、症例数の増加(特に「非使用群」)など、さらに調査をすすめれば新たな知見が得られる可能性も考えられた。

縦断調査の結果については初回使用後から3ヶ月間新たにネイル用塗料を使用しないで特異的IgG抗体値が低下するかを検討したが、初回、1ヶ月、3ヶ月の有意な変化を認めなかった。縦断調査についての先行研究はないが、少なくとも月単位の期間では特異的IgG抗体値は変動しない、つまりドットプロット法は再現性が比較的高いことが明らかになった。

今結果ではネイル用塗料をターゲットとした感作性塗料成分(化学物質)の低濃度曝露での検討を行い関連性は認められなかったが、症例数の増加や測定用抗原選定の検討、(同一のネイル用塗料を使用するなどの)明確な介入を行う、あるいはその塗料内に含まれた化学物質の特異的IgG抗体を測定する、などの点を考慮した上であらためて検討することで測定対象を低濃度曝露まで拡大できるか否かを判断する必要があると思われた。

## E. 結論

ドットプロット法を用いた化学物質特異的

IgG抗体測定の概略を述べ、日常生活における化学物質曝露とネイル用塗料を対象として検討した。本法は簡便かつ短時間で多くの抗原を評価することが可能で、再現性の高い検査であったが、ネイル用塗料に着目した日常生活での低濃度曝露では化学物質特異的IgG抗体保有との関連性は認められなかった。

## 参考文献

- ・後藤 穠ら. 産業中毒便覧. 東京, 医歯薬出版, 1981, 1630p
- ・産業医の職務 Q&A 編集委員会. 産業医の職務 Q&A 第10版. 東京, 産業医学振興財団, 2014, 538p
- ・中村 晋ら. 職業アレルギー. 大阪, 永井書店, 2011, 279p
- ・中央労働災害防止協会. 労働衛生のしおり. 平成27年度. 東京, 2015, 359p
- ・日本産業衛生学会許容濃度等に関する委員会. 許容濃度等の勧告(2015年度). 産衛誌 57(4), 146-172, 2015
- ・日本皮膚科学会接触皮膚炎診療ガイドライン委員会. 接触皮膚炎診療ガイドライン. 日皮会誌 119(9), 1757-1793, 2009
- ・国際連合(2013)「化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS)改訂5版」  
<[http://www.env.go.jp/chemi/ghs/attach/unec\\_e\\_ghs\\_rev05\\_ja.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/ghs/attach/unec_e_ghs_rev05_ja.pdf)> 2015年3月8日アクセス
- ・安部 正通ら. ビスフェノール A 型エポキシ樹脂による接触皮膚炎の1例. J Environ Dermatol Cutan Allergol, 3(2), 105-110, 2009
- ・Mitsuya K et al. Occupational allergic contact dermatitis due to epoxy resin. Environ Dermatol, 2, 217 - 222, 1995
- ・Akita H et al. Erythema multiforme-like occupational contact dermatitis due to bisphenol A. Contact Dermatitis, 45, 305, 2001
- ・Wernfors M et al. Phthalic Anhydride-Induced Occupational Asthma. Int Arch Allergy Immunol 79, 77-82, 1986
- ・Campo P et al. Work-related sensitization and respiratory symptoms in carpentry apprentices exposed to wood dust and

diisocyanates. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 105(1) 24-30, 2010

・ Diller WF et al. Facts and fallacies involved in the epidemiology of isocyanate asthma. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 23: 551-553, 1988

・西岡和恵. 理・美容師の職業性皮膚炎. *職業・環境アレルギー誌*, 17 (2), 1-9, 2010

・小川真規ら. ホルムアルデヒドへのアレルギーを主症状としたシックハウス症候群の1例. *産衛誌*, 50 : 83-85, 2008

・藤井一恭ら. かぶれとシックハウス症候群. *皮膚アレルギーフロンティア* 2, 227-231, 2004

・西岡和恵ら. グルタルアルデヒドによる職業性接触皮膚炎. *J Environ Dermatol Cutan Allergol*, 7 (4) , 237-239, 2013

・14705 の化学商品. 東京, 化学工業日報社, 2005, 2152p

・化粧品基準 - 厚生労働省<

[http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouho-u-11120000-Iyakushokuhinkyoku/keshouhin-standard.pdf#search=%E5%8C%96%E7%B2%A7%E5%93%81%E5%9F%BA%E6%BA%96'](http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouho-u-11120000-Iyakushokuhinkyoku/keshouhin-standard.pdf#search=%E5%8C%96%E7%B2%A7%E5%93%81%E5%9F%BA%E6%BA%96'>) 2016年2月11日アクセス

・独立行政法人医薬品医療機器総合機構「安全対策業務、情報提供業務、医薬部外品・化粧品、回収情報」<  
<http://www.info.pmda.go.jp/rgo/MainServlet?recallno=2-6538>> 2016年2月13日アクセス

・渡部裕子. ネイルアートによるアレルギー性接触皮膚炎の1例. *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology.* 7; 251-255, 2013

・森山達哉. イムノブロッティング法によるアレルギーの解析方法. *Derma.* 229; 185-190, 2015

・Mendelsohn E et al. Nail polish as a source of exposure to triphenyl phosphite. *Environ Int.* 86, 45-51, 2016

・Minamoto K. Allergic contact dermatitis from two-component acrylic resin in a manicurist and a dental hygienist. *J Occup Health.* 56, 229-34, 2014

・Kwapniewski R et al. Occupational exposure to dibutyl phthalate among manicurists. *J Occup Environ Med.* 50, 705-11, 2008

・Ye YM et al. Biophysical determinants of toluene diisocyanate antigenicity associated with exposure and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 118, 885-91, 2006

・Kawamoto T et al. Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis. *BMC Public Health.* 15, 930, 2015

・Aude S et al. A rare nail polish allergen: phthalic anhydride, trimellitic anhydride and glycols copolymer. *Contact Dermatitis.* 56, 172-173, 2007

## F.健康危険情報

該当無し

## G.研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

土屋卓人、辻真弓、一瀬豊日、田中政幸、川本俊弘：感作物質特異的抗体の保有率の検討 2-成人女性での検討- 第 88 回日本産業衛生学会、大阪、2015 年 5 月

土屋卓人、辻真弓、川本俊弘：成人女性における感作物質特異的抗体の保有率の検討. 第 13 回日本予防医学会、金沢、2015 年 6 月

土屋卓人、辻真弓、川本俊弘：ドットプロット法を用いた感作物質特異的抗体保有率の検討 -成人女性での検討-. 第 33 回産業医科大学会、北九州、2015 年 10 月

土屋卓人、辻真弓、太田雅規、川本俊弘：ネイル用塗料の使用と含有化学物質特異的抗体保有率との関連性. 第 86 回日本衛生学会、旭川、2016 年 5 月

土屋卓人、辻真弓、太田雅規、川本俊弘：ネイル液使用と含有化学物質特異的抗体保有率との関連性. 第 14 回日本予防医学会、東京、2016 年 6 月

Takuto Tsuchiya, Mayumi Tsuji, Masanori Ohta and Toshihiro Kawamoto: Relationship between the exposure to nail polish and the production of nail polish-specific antibodies. 5<sup>th</sup>

Conference on Prenatal Programming and Toxicity,  
Kitakyushu, Japan, Nov. 2016

#### H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

## 図 1. ドットブロット法の概略

### ドットブロット法

タンパク質を電気泳動などにより分離することなくメンブレンに固定し、酵素標識抗体などでタンパク質量を特異的に定量する方法

- ① 化学物質とヒト血清アルブミンを反応させ付加体を作成
- ② メンブレンへの付加体のブロッティング
- ③ 一次抗体反応（ヒト血清）
- ④ 標識二次抗体反応（抗ヒト IgG 抗体）
- ⑤ 撮影

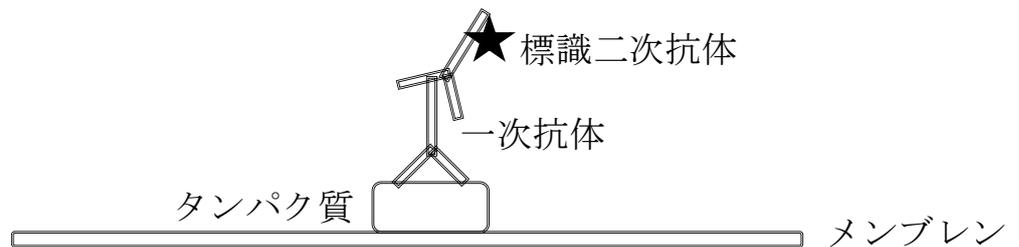


図 2. 対象者の群分け、測定項目

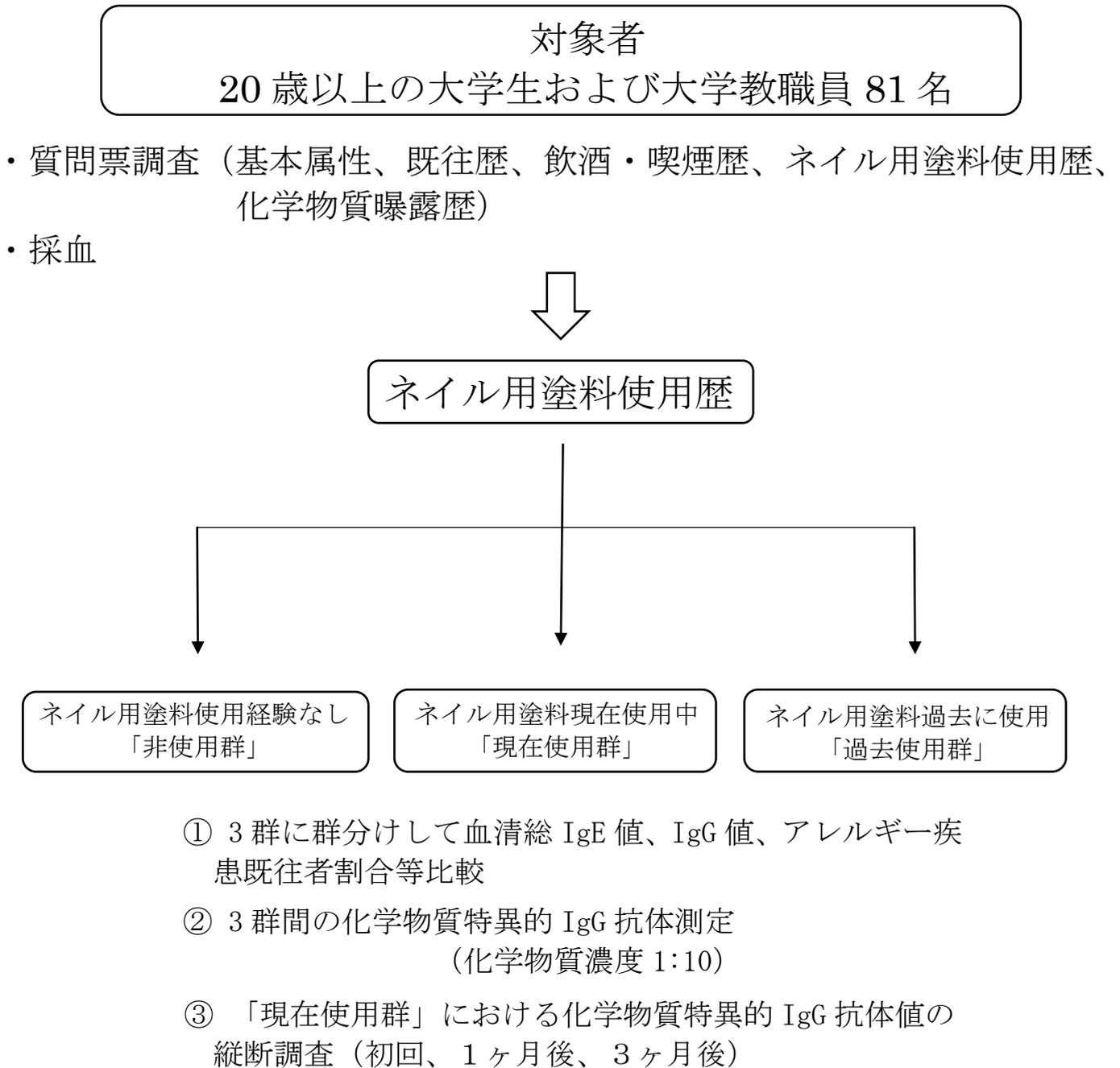


表 1. 測定に用いた対象化学物質

化学物質名	ネイル液での主な用途	GHS 感作性分類区分 (#)	
		呼吸器	皮膚
ビスフェノール A ジグリシジルエーテル Bisphenol A Diglycidyl ether (BADGE)	エポキシ樹脂 (皮膜形成剤)	区分なし	1
無水フタル酸 Phthalic anhydride (PA)	可塑剤	1	1
アクリルアミド Acrylamide (AA)	アクリル樹脂 (皮膜形成剤)	区分なし	1
メタクリル酸メチル Methyl methacrylate (MMA)	アクリル樹脂 (皮膜形成剤)	1	1
無水トリメリット酸 Trimellitic Anhydride (TMA)	可塑剤	1	1
ホルムアルデヒド (*) Formaldehyde (FA)	硬化剤	1	1

\*ホルムアルデヒドは「化粧品基準」(平成 13 年 4 月施行:厚生労働省)にて国内製の全ての化粧品に配合が禁止されている。

#### # GHS 感作性分類区分

区分 1: ヒトに対し当該物質が特異的な呼吸器過敏症や皮膚接触による過敏症を引き起こす証拠がある場合

図 3. メンブレン (ニトロセルロース膜) への化学物質-HSA 付加体の  
のブロッティング

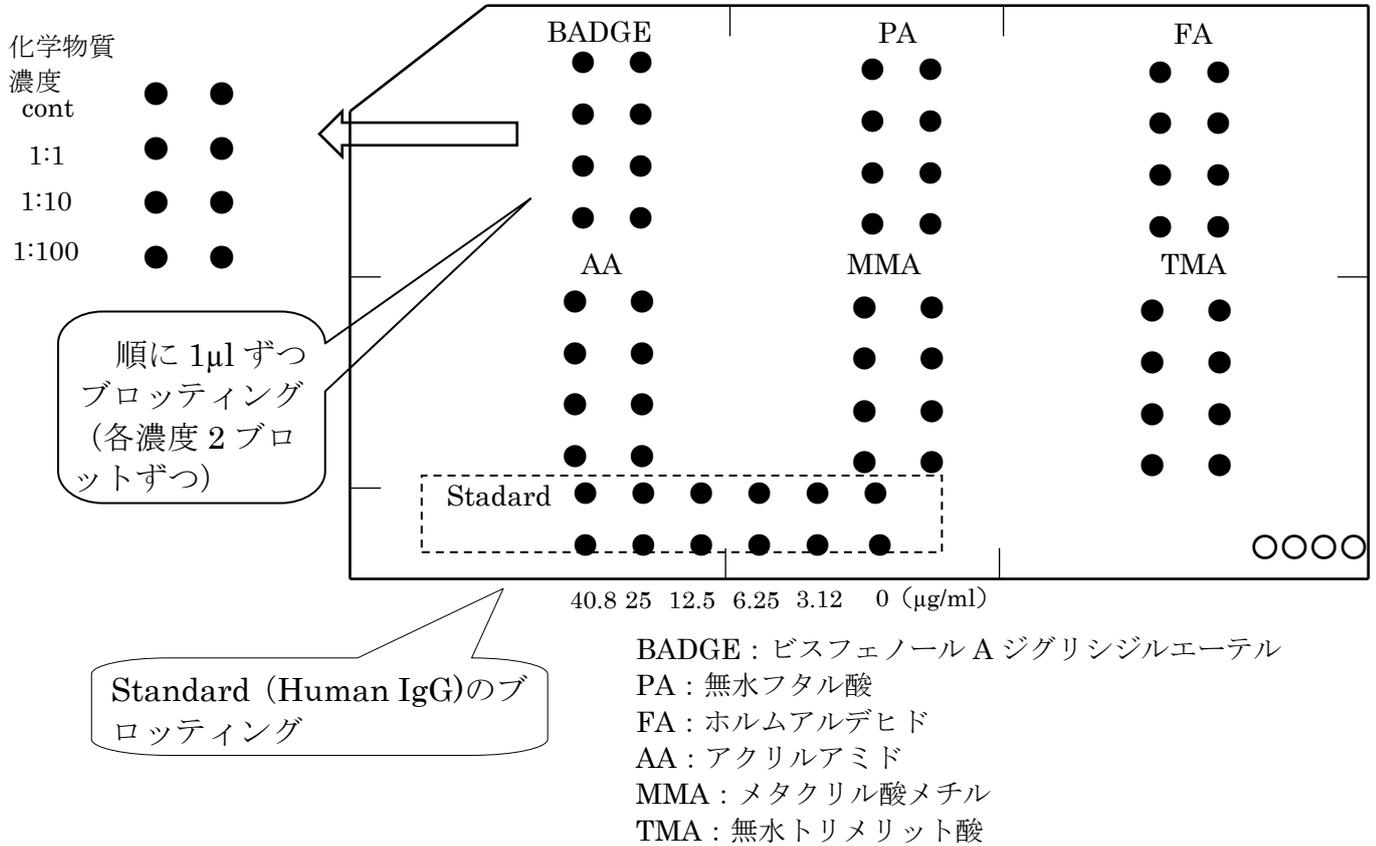


表 2. ネイル用塗料に関する質問紙表結果

全くしたことがない	7名(8.6%)	⇒ 「非使用群」
現在使用している (使用頻度)	42名(51.9%)	⇒ 「現在使用群」
2週間以内に1回	6名	
2週間から1か月に1回	16名	
1か月から3か月に1回	12名	
3か月から6か月に1回	8名	
以前はしていたが今はしていない (最終使用からの未使用期間)	32名(39.5%)	⇒ 「過去使用群」
1年以上	11名	
6か月～1年未満	5名	
6か月未満	16名	
計	81名	

表 3. ネイル用塗料使用歴による群分け

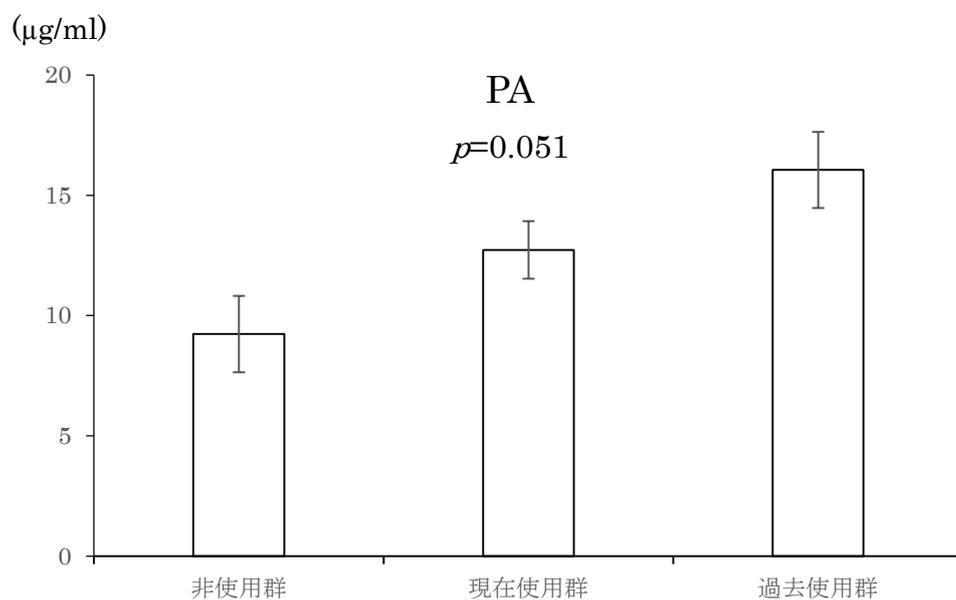
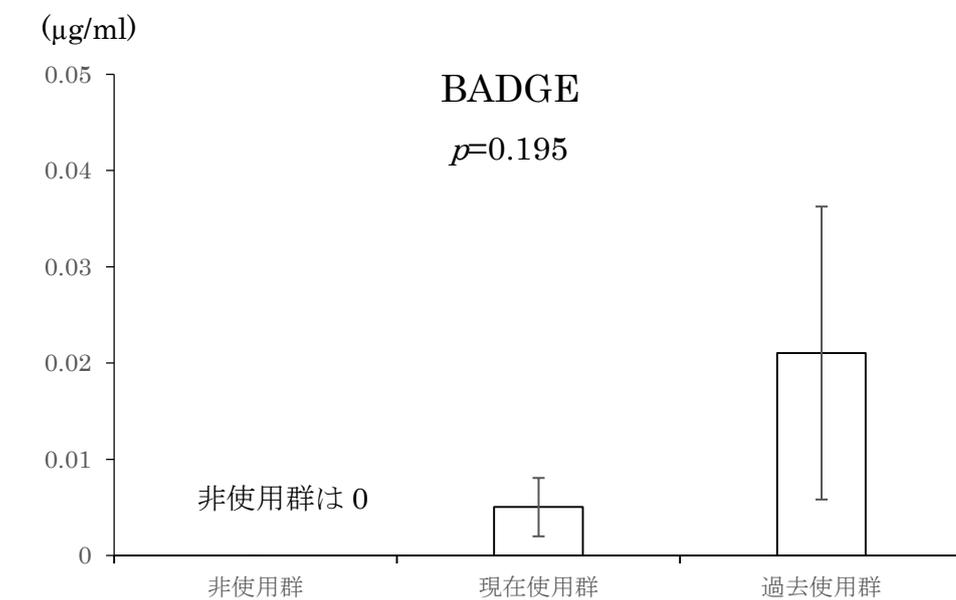
	非使用群	現在使用群	過去使用群	p 値
人数	7名 (男2名、女5名)	42名 (全て女性)	32名 (全て女性)	
平均年齢	37.0±6.0 歳	22.3±0.5 歳	23.8±1.2 歳	0.08*
喫煙経験あり	2名 (28.6%)	4名 (9.5%)	0名 (0%)	0.169#
アレルギー疾患 既往歴あり	6名 (85.7%)	30名 (71.4%)	15名 (50.0%)	0.041#
血清総 IgE 平均値	250±176 IU/ml	436±164 IU/ml	357±78 IU/ml	0.320*
血清総 IgG 平均値	1207±83 mg/dl	1248±32 mg/dl	1250±37 mg/dl	0.734*

Mean±SE

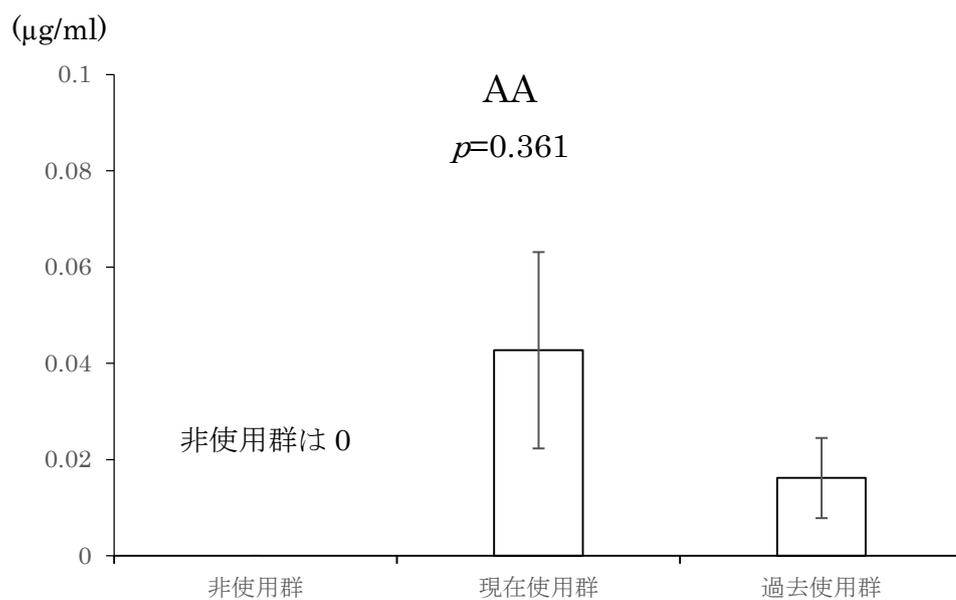
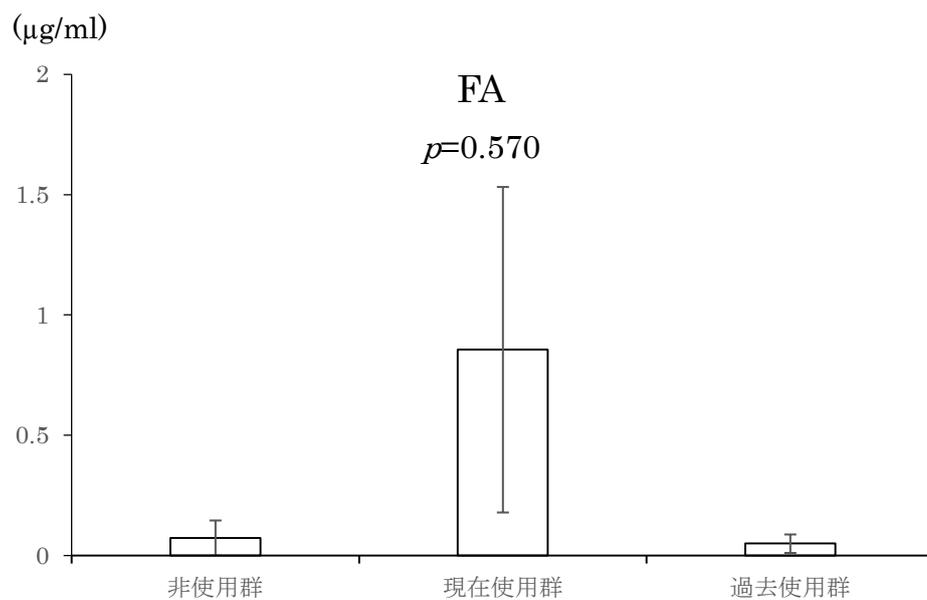
\* : Kruskal-Wallis test

# : カイ二乗検定

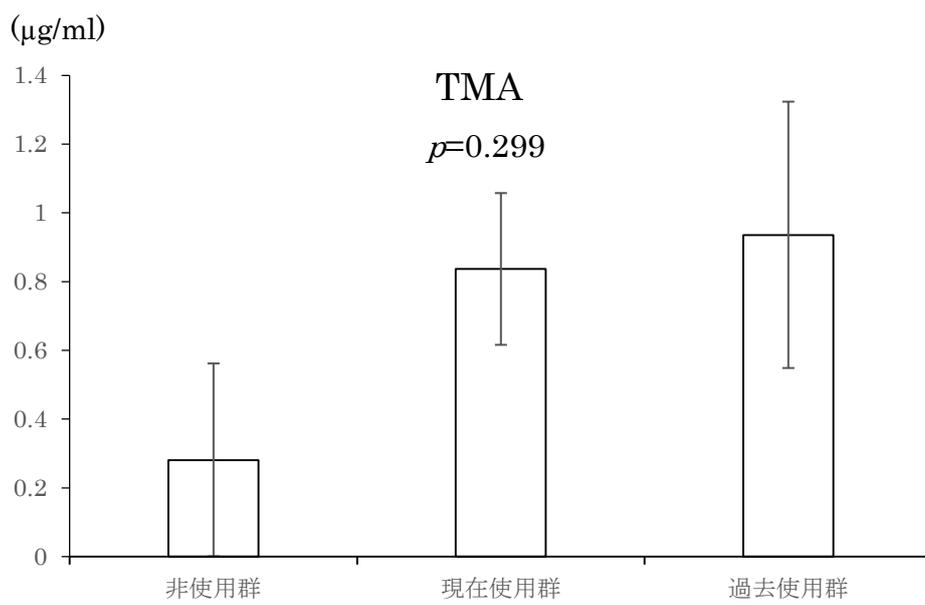
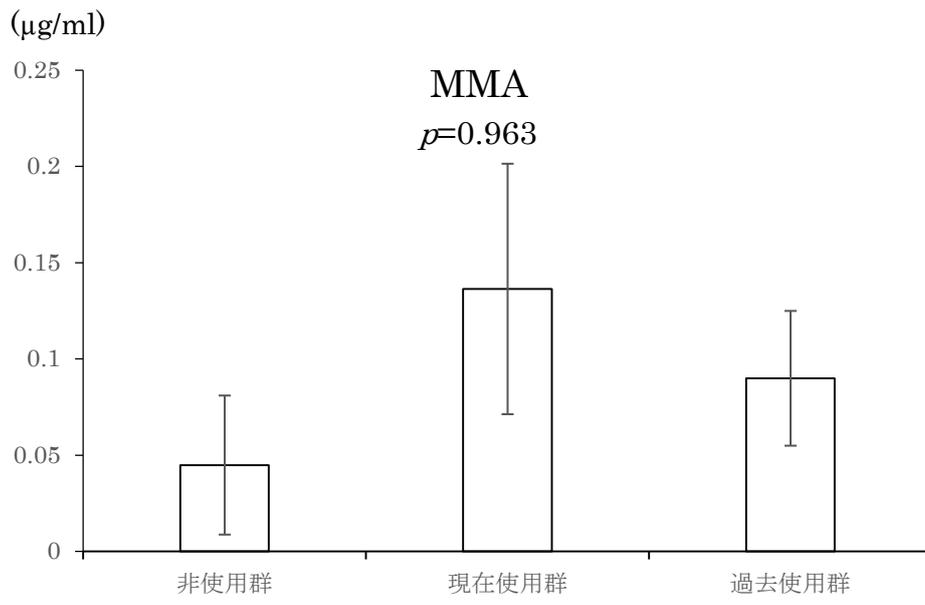
図 4. 化学物質特異的 IgG 抗体平均値 (3 群比較)



Mean  $\pm$  SE  
Mann-Whitney U test



Mean  $\pm$  SE  
Mann-Whitney U test



Mean  $\pm$  SE  
Mann-Whitney U test

表 4. 3 群の化学物質特異的 IgG 抗体測定値の class 分類  
 および class3 以上の割合の検定 (化学物質濃度 1:10)

非使用群 (N=7)

	BADGE	PA	FA	AA	MMA	TMA
class1	7 (100%)	0	6 (85.7%)	7 (100%)	5 (71.4%)	5 (71.4%)
class2	0	0	1 (14.3%)	0	2 (28.6%)	2 (28.6%)
class3	0	1 (14.3%)	0	0	0	0
class4	0	5 (71.4%)	0	0	0	0
class5	0	1 (14.3%)	0	0	0	0
class3 以上	0	7 (100%)	0	0	0	0

名 (%)

現在使用群 (N=42)

	BADGE	PA	FA	AA	MMA	TMA
class1	39 (92.9%)	0	31 (73.8%)	33 (78.6%)	29 (69.0%)	17 (40.5%)
class2	3 (7.1%)	2 (4.8%)	9 (21.4%)	9 (21.4%)	13 (31.0%)	21 (50.0%)
class3	0	7 (16.7%)	1 (2.4%)	0	0	4 (9.5%)
class4	0	14 (33.3%)	0	0	0	0
class5	0	19 (45.2%)	1 (2.4%)	0	0	0
class3 以上	0	40 (95.2%)	2 (4.8%)	0	0	4 (9.5%)

名 (%)

過去使用群 (N=32)

	BADGE	PA	FA	AA	MMA	TMA
class1	26 (81.3%)	0	26 (81.3%)	24 (75.0%)	22 (68.7%)	14 (43.7%)
class2	6 (18.7%)	0	6 (18.7%)	8 (25.0%)	10 (31.3%)	16 (50.0%)
class3	0	1 (3.1%)	0	0	0	2 (6.3%)
class4	0	12 (37.5%)	0	0	0	0
class5	0	19 (59.4%)	0	0	0	0
class3 以上	0	32 (100%)	0	0	0	2 (6.3%)

名 (%)

BADGE : ビスフェノール A ジグリシジルエーテル

PA : 無水フタル酸

FA : ホルムアルデヒド

AA : アクリルアミド

MMA : メタクリル酸メチル

TA : 無水トリメリット酸

class1 (0 $\mu$ g/ml)

class2 (>0 $\mu$ g/ml、3.125 $\mu$ g/ml <)

class3 ( $\geq$ 3.125 $\mu$ g/ml、<6.25 $\mu$ g/ml)

class4 ( $\geq$ 6.25 $\mu$ g/ml、<12.5 $\mu$ g/ml)

class5 ( $\geq$ 12.5 $\mu$ g/ml)

	非使用群	現在使用群	過去使用群	P 値
FA class3 未満	7	40	0	0.386
FA class3 以上	0	2	0	
TMA class3 未満	7	33	30	0.696
TMA class3 以上	0	9	2	

カイ二乗検定

表 5. 現在使用群におけるネイル用塗料使用頻度別化学物質特異的 IgG 抗体平均値 (化学物質濃度 1:10)

使用頻度	BADGE	PA	FA	AA	MMA	TMA
～2 週 (N=6)	0	11.538	0	0.094	0.051	1.217
2～4 週 (N=16)	0.132	12.569	1.883	0.073	0.082	1.116
4～12 週 (N=12)	0	14.449	0.058	0	0.302	0.701
12 週～ (N=8)	0	11.364	0.639	0.075	0.021	0.021

( $\mu\text{g/ml}$ )

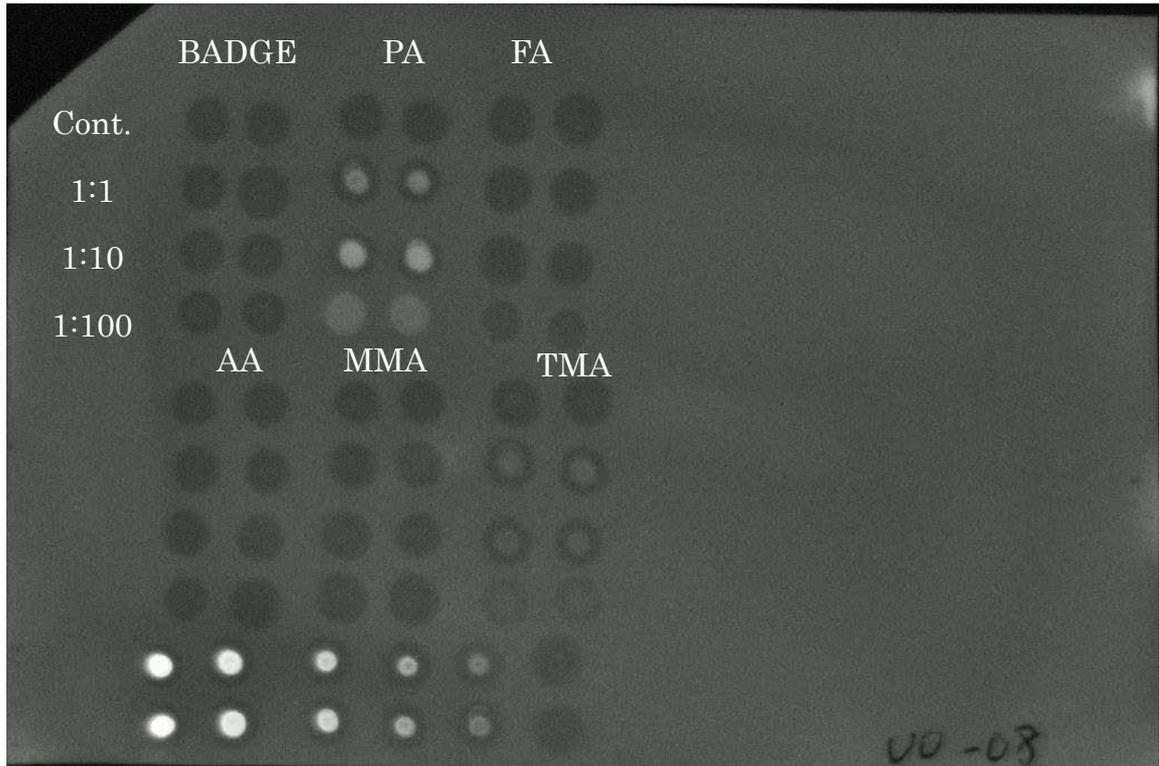
表 6. 過去使用群におけるネイル用塗料最終使用からの未使用期間別化学物質特異的 IgG 抗体平均値 (化学物質濃度 1:10)

未使用期間	BADGE	PA	FA	AA	MMA	TMA
1 年以上 (N=11)	0.017	18.295	0.030	0.020	0.167	1.175
6 ヶ月～1 年 (N=5)	0.002	14.515	0.242	0.037	0.052	0.405
6 ヶ月未満 (N=16)	0.295	14.992	0	0.006	0.062	0.894

( $\mu\text{g/ml}$ )

図 5. 化学物質特異的 IgG 抗体検出法による結果 (症例 1)

【症例 1】 22 歳女性。大学生。ネイル用塗料使用経験なし。  
 喫煙歴：なし 既往歴：アレルギー性結膜炎  
 血清抗体値：総 IgE 抗体値 638(IU/ml)、総 IgG 抗体値 1589 (mg/dl)



Standard 40.8 25 12.5 6.25 3.125 0( $\mu\text{g/ml}$ )  
 Human-IgG

BADGE : ビスフェノール A ジグリシジルエーテル  
 PA : 無水フタル酸  
 FA : ホルムアルデヒド  
 AA : アクリルアミド  
 MMA : メタクリル酸メチル  
 TA : 無水トリメリット酸

Cont : HSA のみ

1:1、1:10、1:100

→HSA モル濃度 : 化学物質モル濃度

化学物質特異的 IgG 抗体測定 (class 分類) BADGE : class1、PA :  
 class4、FA : class1、AA : class1、MMA : class1、TMA : class2

class1 ( $0\mu\text{g/ml}$ )、class2 ( $>0\mu\text{g/ml}$ 、 $3.125\mu\text{g/ml} <$ )、class3 ( $\geq 3.125\mu\text{g/ml}$ 、  
 $<6.25\mu\text{g/ml}$ )、class4 ( $\geq 6.25\mu\text{g/ml}$ 、 $<12.5\mu\text{g/ml}$ )、class5 ( $\geq 12.5\mu\text{g/ml}$ )

図 6. 化学物質特異的 IgG 抗体検出法による結果 (症例 2)

【症例 2】 22 歳女性。大学生。

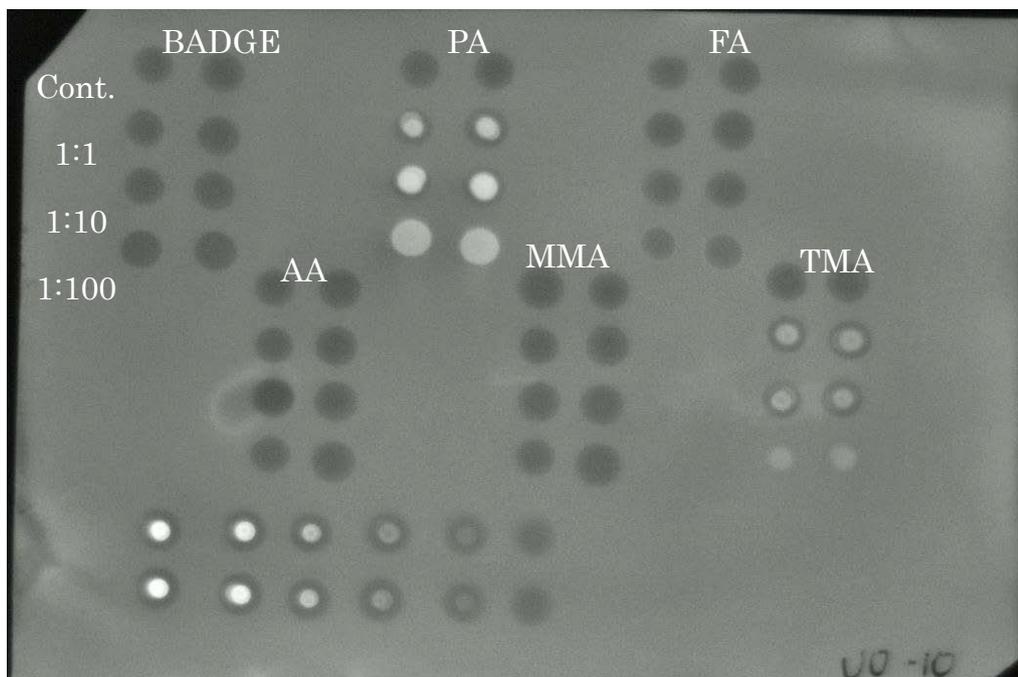
ネイル用塗料 A を使用 (含有成分は下記)。使用頻度は 2 週間から 1 か月に 1 回。

喫煙歴：なし 既往歴：花粉症

血清抗体値：総 IgE 抗体値 638 (IU/ml)、総 IgG 抗体値 1589 (mg/dl)

ネイル用塗料 B の含有成分：

酢酸エチル、酢酸ブチル、ニトロセルロース、トリベンゾイン、イソプロパノール、酢酸プロピル、クエン酸アセチルトリブチル、ステアラルコニウムベントナイト、トリアセチン、ヒドロキシ安息香酸フェニルテトラブチル、PPG-2 ジメチコン、ジメチコン、クエン酸、リンゴ酸、シルク、シリカ、オキシベンゾン-1、ホウケイ酸(Ca/Al)、リン酸、水、PET、(アジピン酸/ネオペンチルグリコール/無水トリメリト酸)コポリマー、合成金雲母、アルミナ、マイカ、酸化チタン、マンガンバイオレット、ホウケイ酸(Ca/Na)、グンジョウ、コンジョウ、カーボンブラック、酸化スズ、カルミン、酸化鉄、ステアラルコニウムヘクトライト、ジ安息香酸トリメチルペンタンジイル、ポリブチレンテレフタレート、変性アルコール、ポリウレタン-11、ブタノール、硫酸 Ba、赤 201、赤 202、黄 4



Standard 40.8 25 12.5 6.25 3.125 0( $\mu\text{g/ml}$ )  
Human-IgG

化学物質特異的 IgG 抗体測定 (class 分類) BADGE : class1、PA : class5、FA : class2、AA : class2、MMA : class2、TMA : class4  
class1 (0 $\mu\text{g/ml}$ )、class2 (>0 $\mu\text{g/ml}$ 、3.125 $\mu\text{g/ml}$  <)、class3 ( $\geq$ 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 、<6.25 $\mu\text{g/ml}$ )、class4 ( $\geq$ 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、<12.5 $\mu\text{g/ml}$ )、class5 ( $\geq$ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ )

図 7. 縦断調査の対象者

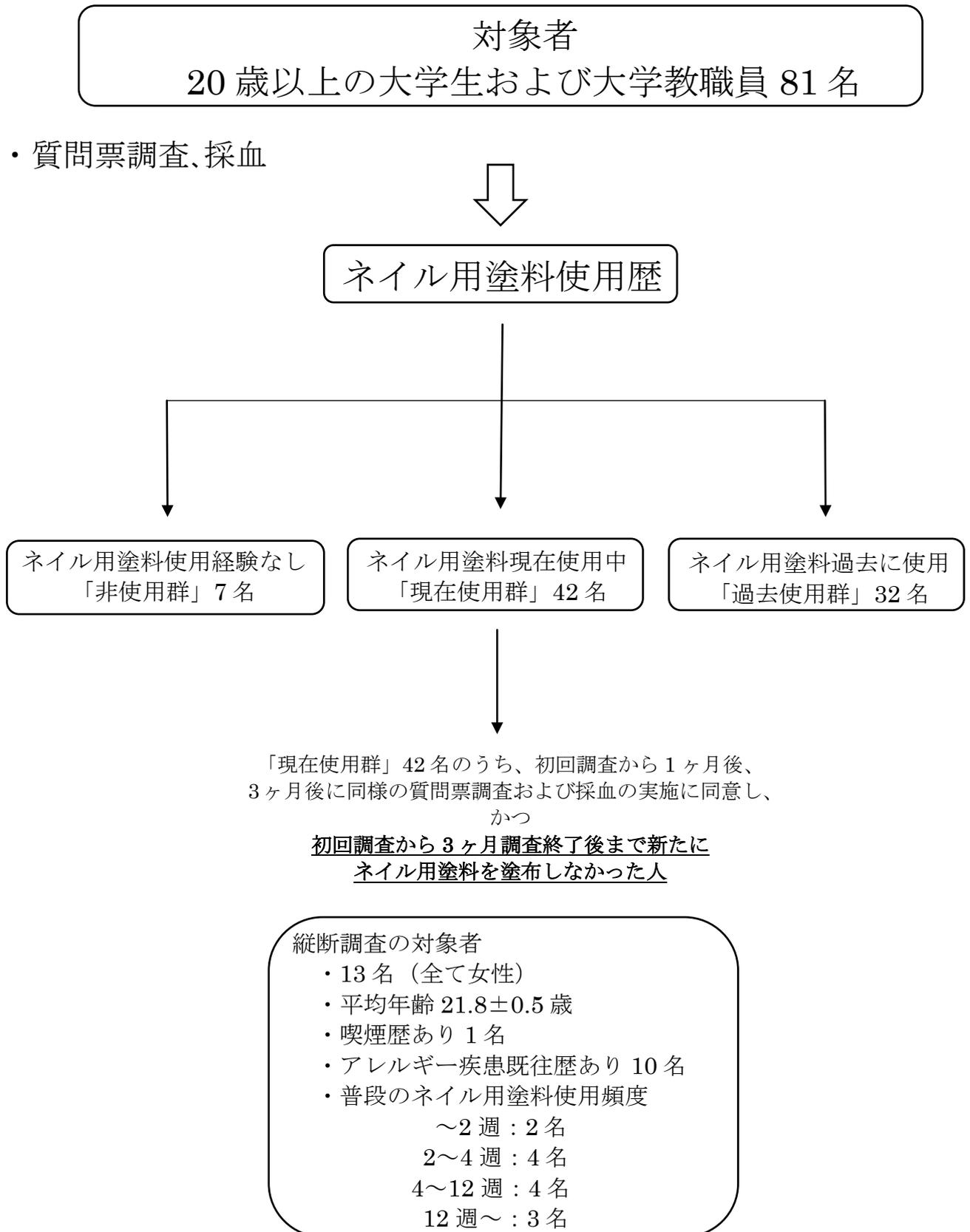
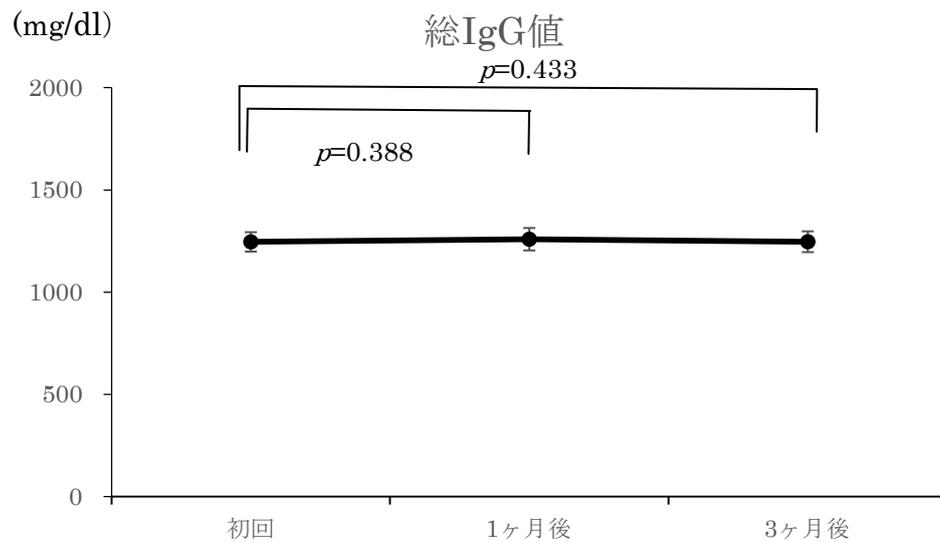
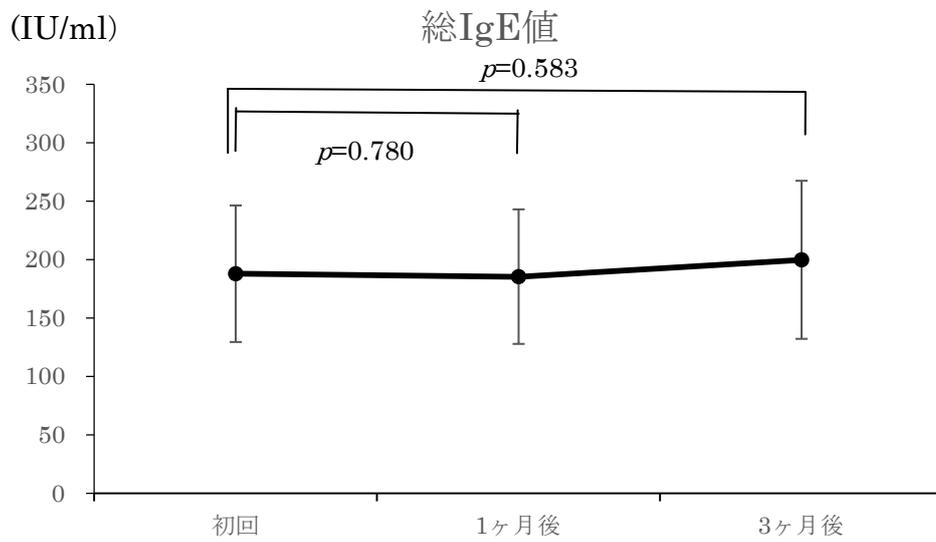
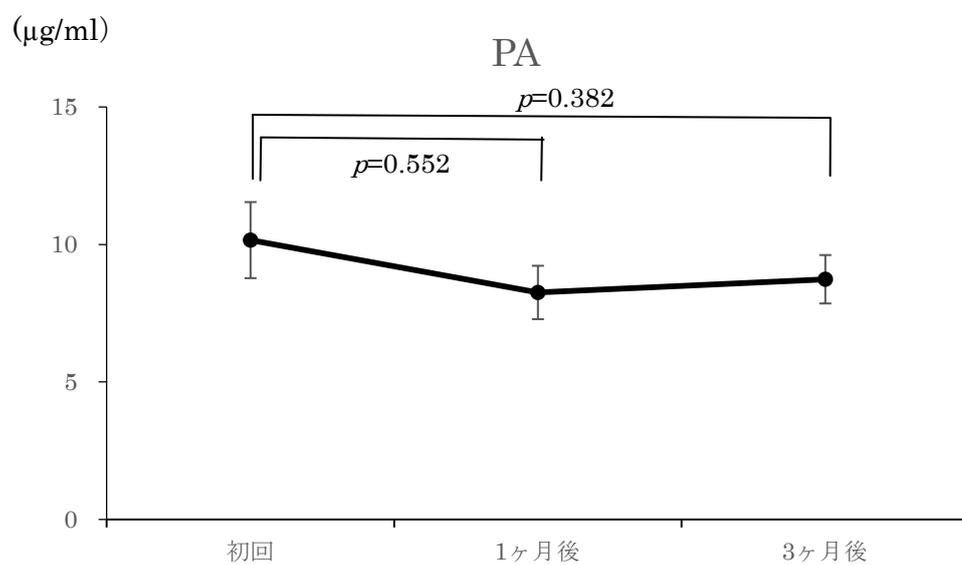
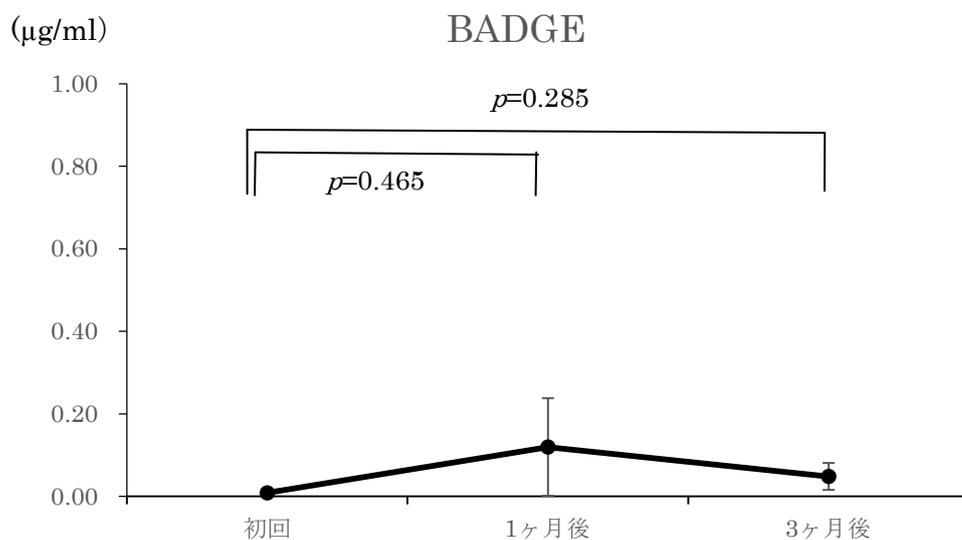


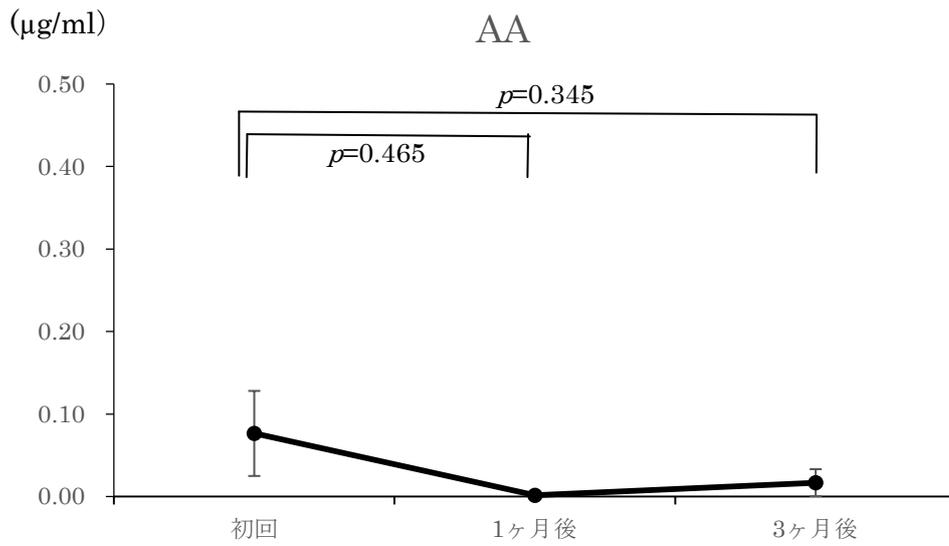
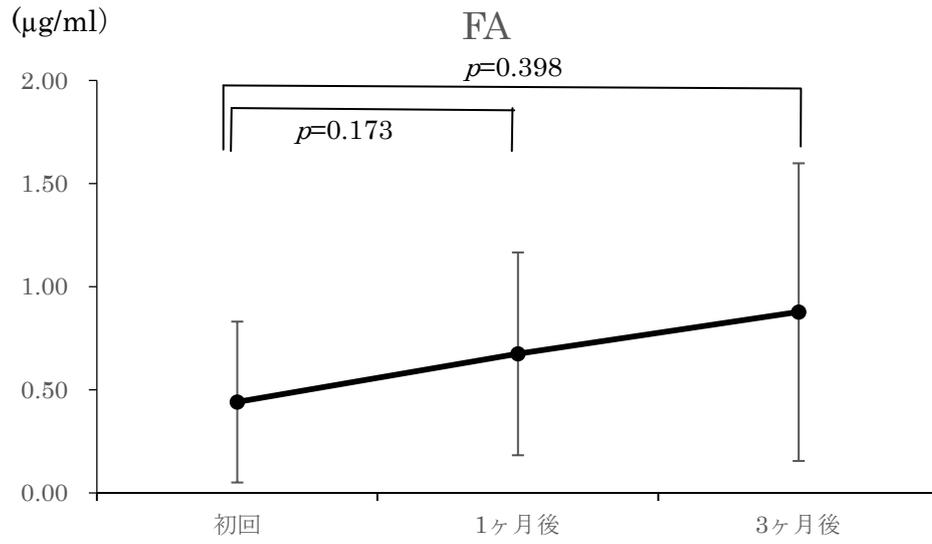
図 8. 血清総 IgE 値、総 IgG 値の経時的変化



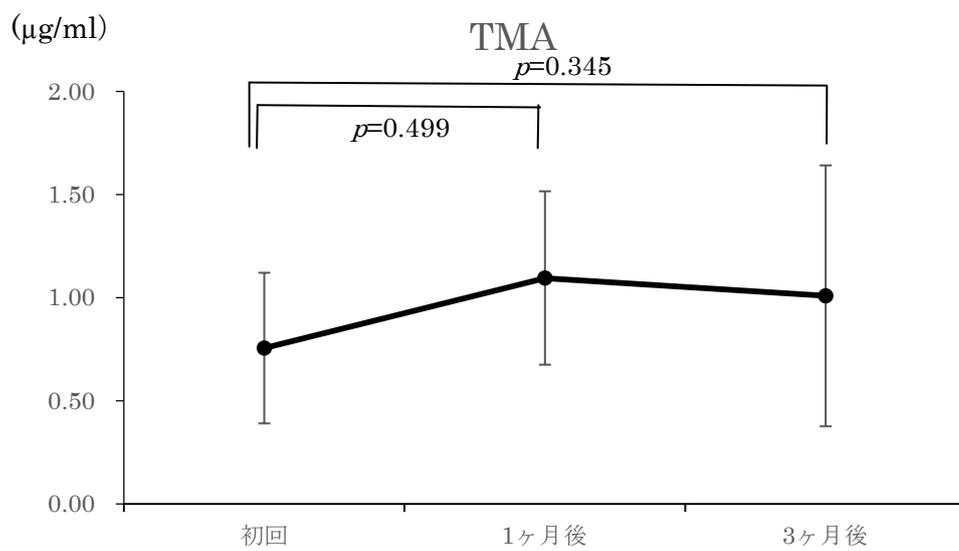
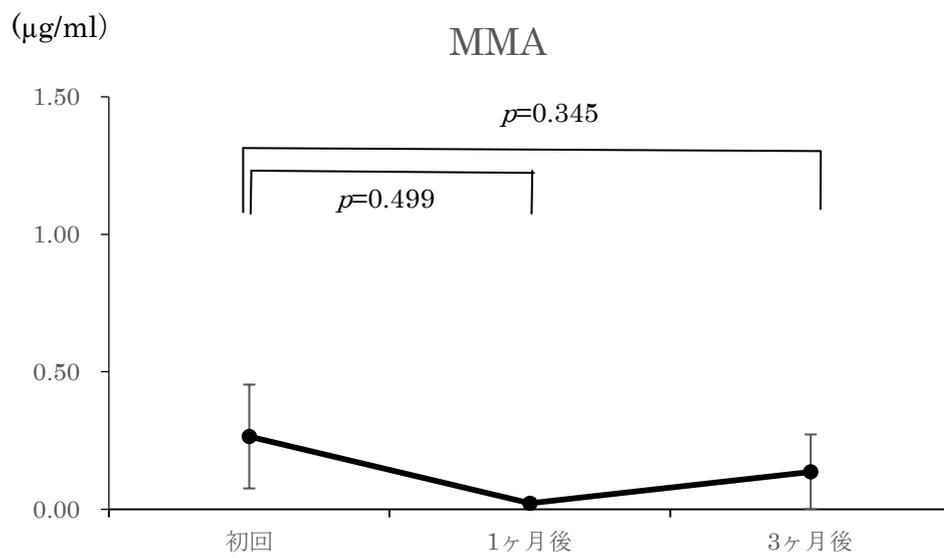
Mean ± SE  
Wilcoxon signed-rank test

図 9. 化学物質特異的 IgG 抗体平均値の経時的変化





Mean  $\pm$  SE  
 Wilcoxon signed-rank test



## 質問票ご記入のお願い

この度は産業医科大学産業衛生学講座・福岡女子大学国際文理学部食・健康学科との共同研究である「ドットプロット法を用いた化学物質特異的IgE、IgG抗体測定と日常生活レベルにおける化学物質曝露およびアレルギー症状との関連性についての研究」へご参加をいただきありがとうございます。

お寄せいただく回答が目的外で使用されることは決してございません。質問票はこの研究が終了した時点で破棄されます。

健康診断問診票と重複する質問項目に関しましてもご回答いただきますようお願い申し上げます。（推測される解答時間は10分です。全部で6ページあります。）

皆様のご理解とご参加を心よりお願い申し上げます。

質問票記入日 平成 年 月 日

お名前 \_\_\_\_\_ ( 歳) (男・女)

所属部署 (学生の場合は「学生」と記載) \_\_\_\_\_

1. 身長と体重を教えてください。

身長 \_\_\_\_\_ cm      体重 \_\_\_\_\_ kg

2. 喫煙についておたずねします。あてはまる項目の口にチェック(シ)をつけ、内にあてはまる数字をご記入ください。

喫煙したことはない。

喫煙したことがある。

吸い始めた年齢は? 歳      吸うのを止めた年齢は? 歳

平均して毎日何本くらい吸っていましたか? 本

喫煙している。

吸い始めた年齢は? 歳

平均して毎日何本くらい吸っていますか? 本

3. あなたが現在、家の中や仕事場、外出先の屋内で、定期的に他の人が吸ったタバコの煙を吸う機会が1週間のうち、どれくらいありますか？（1つだけ□にチェック（し））

ほとんどない 週1日くらい 週2～3日 週4～6日 毎日

3-1.

ピンクの枠にチェックを入れた方のみお答えください。

そのような場合、他の人が吸ったタバコの煙を、あなたが吸う時間は1日のうち、どれくらいですか？（1つだけ□にチェック（し））

1時間未満 1～2時間くらい 3時間以上

4. ご自身の呼吸についておたずねします。

あてはまる回答の□にチェック（し）をつけてください。

4-1. 過去4週間に、どのくらい頻繁に息切れを感じましたか？

まったく感じなかった 数回感じた ときどき感じた  
ほとんどいつも感じた ずっと感じた

4-2. 咳をしたとき、粘液や痰などが出たことが、これまでにありますか？

一度もない たまたま風邪や肺の感染症にかかったときだけ  
1か月のうち数日 1週間のうち、ほとんど毎日  
毎日

4-3. 過去12か月のご自身に最も当てはまる回答を選んでください。

呼吸に問題があるため、以前に比べて活動しなくなった。

まったくそう思わない そう思わない 何とも言えない  
そう思う とてもそう思う

5. 労働時間についておたずねします。(学生は回答せず次の「6」に進んでください。)

5-1. 平均して週に何日働きますか? 日

5-2. 1日の平均労働時間は何時間ですか? 残業時間も含めてお答え下さい。

時間

5-3. 勤続年数は何年ですか?(1年未満の方は1年とご記入下さい。) 年

6. ネイル(ペディキュアを含む)についておたずねします。

あてはまる回答の□にチェック(シ)をつけてください。

6-1. これまでネイルをしたことがありますか?

全くしたことがない →問い7△

以前はしていたが今はしていない →問い6-2△

している →問い6-3△

6-2. 以前していた人にお尋ねします。いつ頃までしていましたか?

1年以上前  6ヶ月から1年未満  6ヶ月未満

6-3. 現在、ネイルをしている人にお尋ねします。つける頻度はどのくらいですか?

また使用中のネイルの製品名をご記入ください。

2週間以内に一回  2週間から1ヶ月に1回  1ヶ月から3ヶ月に1回

3ヶ月から6ヶ月に1回  6ヶ月以上あいている

製品名 \_\_\_\_\_

7. お酒についておたずねします。

一番あてはまる□にチェック(し)をつけてください。

- もともと飲まない  
機会飲酒  
飲み会のときのみ
- 以前は飲んでいたが止めた
- 現在も飲んでいる

「以前は飲んでいたが止めた」方のみ

「以前は飲んでいたが止めた」、  
「現在も飲んでいる」方のみ

7-1. 以前は飲んでいたが止めた人におたずねします。

止めたのは何歳のときですか？   歳

7-2. 以前は飲んでいたが止めた、現在も飲んでいると答えた人におたずねします。

お酒はどれくらいの頻度で飲みますか？(飲みましたか?)。

一番あてはまる□にチェック(し)をつけてください。

- ほとんど飲まなかった  月1~3日  週1~2日  週3~4日  
 週5~6日  毎日飲んでいた

7-3. お酒はどのくらいの量飲みますか？(飲みましたか?)

1日に飲むもっとも普通の組合せを選んで、あてはまる□にチェック(し)してください。

例：ふだんビールを1本飲んだ後に、日本酒を2合飲むなら、ビール「1本」と日本酒の「2合」にチェック(し)。

- ・日本酒1合(180ml)： 0.5合未満  1合  2合  3合  4合  5合以上
- ・焼酎・泡盛： 0.5合未満  1合  2合  3合  4合  5合以上
- ・ビール大ビン1本(633ml)： 0.5本未満  1本  2本  3本  4本以上  
\*中ビンまたは500ml缶を0.8本、小ビンまたは350ml缶を0.6本と換算してください。
- ・ウィスキー シングル(30ml)： 0.5杯未満  1杯  2杯  3杯  4杯以上
- ・ワイン グラス(60ml)： 0.5杯未満  1杯  2杯  3杯  4杯以上

8. 既往歴および現在の健康状態についておたずねします。

下記の病気の中であなたが生まれてから今まで**医師から診断を受けた**病名があれば教えてください。あてはまる病名の**すべての口**に**チェック（シ）**をつけて、**最初に診断を受けた時の年齢**をご記入ください。

	診断を受けたことがある	現在通院中	最初に診断を受けた時の年齢
貧血	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高血圧	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高脂血症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
脳卒中(脳出血・脳梗塞・くも膜下出血)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
心筋梗塞・狭心症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
糖尿病(1型)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
糖尿病(2型)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高尿酸血症(痛風)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
慢性閉塞性肺疾患(COPD)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
気管支喘息	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アレルギー性鼻炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
花粉症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アトピー性皮膚炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アレルギー性結膜炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
食物アレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
薬疹・薬剤アレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
じんましん	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
接触性皮膚炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
シックハウス症候群	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
化学物質過敏症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
その他のアレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
慢性副鼻腔炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
慢性中耳炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
甲状腺疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
腎臓疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
肝臓疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
その他の疾患既往歴(疾患名 )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳

9. 現在までに仕事や趣味・家庭などの日常の環境で以下のものを扱いましたか？

例に従って、当てはまる項目すべての口にチェックをつけてください。

例：

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
例)殺虫剤	<input type="checkbox"/>	2 回	3 分・時間
例)除草剤	<input checked="" type="checkbox"/>	回	分・時間

①主に日常生活上使用する機会が多いもの

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
a. 塩素系漂白剤・殺菌剤 (「混ぜるな危険」の表示のあるもの)	<input type="checkbox"/>		分・時間
b. 染料(髪染め)	<input type="checkbox"/>		分・時間
c. 殺虫剤	<input type="checkbox"/>		分・時間
d. 除草剤	<input type="checkbox"/>		分・時間

②主に職業上使用する機会が多いもの

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
e. 有機溶剤(シンナー、試験・分析・抽出用溶剤、ドライクリーニング用洗剤、染み抜き溶剤、ペイント塗料、除光液(リムーバーなど)	<input type="checkbox"/>		分・時間
f. ホルマリン、ホルムアルデヒド	<input type="checkbox"/>		分・時間
g. クロム、ヒ素、カドミウム	<input type="checkbox"/>		分・時間
h. 水銀	<input type="checkbox"/>		分・時間
i. プラスチック樹脂(フェノール、エポキシ樹脂など)	<input type="checkbox"/>		分・時間
j. その他の化学物質 (名前が分かれば記載ください。)	<input type="checkbox"/>		分・時間
	<input type="checkbox"/>		分・時間
	<input type="checkbox"/>		分・時間

質問は以上です。ご参加ありがとうございました。

ご記入方法にご不明な点がございましたら、本研究スタッフにお尋

ねください



## 質問票ご記入のお願い（1ヶ月後用）or（3ヶ月後用）

この度は産業医科大学産業衛生学講座・福岡女子大学国際文理学部食・健康学科との多施設共同研究である「ドットプロット法を用いた化学物質特異的 IgE、IgG 抗体測定と日常生活レベルにおける化学物質曝露およびアレルギー症状との関連性についての研究」へご参加をいただきありがとうございます。

お寄せいただく回答が目的外で使用されることは決してございません。質問票はこの研究が終了後5年間厳重に保管されます。

健康診断問診票と重複する質問項目に関しましてもご回答いただきますようお願い申し上げます。（推測される解答時間は10分です。全部で6ページあります。）

皆様のご理解とご参加を心よりお願い申し上げます。

質問票記入日 平成 年 月 日

お名前 \_\_\_\_\_ ( 歳) (男・女)

所属部署（学生の場合は「学生」と記載） \_\_\_\_\_

同じ質問票を用いていますので、その後の変化について主にご回答いただきます。下記を参考にご回答ください。

質問1：回答不要

質問2：現在「喫煙している」場合は、本数を回答

質問3：回答してください

質問4：回答してください

質問5：学生以外は回答してください

質問6：回答不要

質問7：回答してください

質問8：前回の調査から変化があれば回答してください

質問9：前回の調査から変化があれば回答してください

スタッフ記入欄

1. 身長と体重を教えてください。→回答不要

身長 \_\_\_\_\_ cm

体重 \_\_\_\_\_ kg

2. 喫煙についておたずねします。あてはまる項目の□にチェック(シ)をつけ、□内にあてはまる数字をご記入ください。→「喫煙している」方のみ回答して下さい

喫煙したことはない。

喫煙したことがある。

吸い始めた年齢は？   歳      吸うのを止めた年齢は？   歳

平均して毎日何本くらい吸っていましたか？    本

喫煙している。

吸い始めた年齢は？   歳

平均して毎日何本くらい吸っていますか？    本

3. あなたが現在、家の中や仕事場、外出先の屋内で、定期的に他の人が吸ったタバコの煙を吸う機会が1週間のうち、どれくらいありますか？（1つだけ□にチェック（し））

→皆さん回答して下さい

ほとんどない 週1日くらい 週2～3日 週4～6日 毎日

3-1.

ピンクの枠にチェックを入れた方のみお答えください。

そのような場合、他の人が吸ったタバコの煙を、あなたが吸う時間は1日のうち、どれくらいですか？（1つだけ□にチェック（し））

1時間未満 1～2時間くらい 3時間以上

4. ご自身の呼吸についておたずねします。

あてはまる回答の□にチェック（し）をつけてください。→皆さん回答して下さい

4-1. 過去4週間に、どのくらい頻繁に息切れを感じましたか？

まったく感じなかった 数回感じた ときどき感じた  
ほとんどいつも感じた ずっと感じた

4-2. 咳をしたとき、粘液や痰などが出たことが、これまでにありますか？

一度もない たまたま風邪や肺の感染症にかかったときだけ  
1か月のうち数日 1週間のうち、ほとんど毎日  
毎日

4-3. 過去12か月のご自身に最も当てはまる回答を選んでください。

呼吸に問題があるため、以前に比べて活動しなくなった。

まったくそう思わない そう思わない 何とも言えない  
そう思う とてもそう思う

5. 労働時間についておたずねします。(学生は回答せず次の「6」に進んでください。)

→学生以外はこの1ヶ月の様子について回答して下さい

5-1. 平均して週に何日働きますか? 日

5-2. 1日の平均労働時間は何時間ですか? 残業時間も含めてお答え下さい。

時間

5-3. 勤続年数は何年ですか?(1年未満の方は1年とご記入下さい。) 年

6. ネイル(ペディキュアを含む)についておたずねします。

あてはまる回答の□にチェック(し)をつけてください。→回答不要

6-1. これまでネイルをしたことがありますか?

全くしたことがない →問い7△

以前はしていたが今はしていない →問い6-2△

している →問い6-3△

6-2. 以前していた人にお尋ねします。いつ頃までしていましたか?

1年以上前  6ヶ月から1年未満  6ヶ月未満

6-3. 現在、ネイルをしている人にお尋ねします。つける頻度はどのくらいですか?

2週間以内に1回  2週間から1ヶ月に1回  1ヶ月から3ヶ月に1回

3ヶ月から6ヶ月に1回  6ヶ月以上あいている

7. お酒についておたずねします。→**皆さん回答して下さい**

一番あてはまる□にチェック(し)をつけてください。

- 
- |                              |                                       |                                   |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| もともと飲まない<br>機会飲酒<br>飲み会のときのみ | <input type="checkbox"/> 以前は飲んでいたが止めた | <input type="checkbox"/> 現在も飲んでいる |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|

「以前は飲んでいたが止めた」方のみ

「以前は飲んでいたが止めた」、  
「現在も飲んでいる」方のみ

7-1. 以前は飲んでいたが止めた人におたずねします。

止めたのは何歳のときですか？   歳

7-2. 以前は飲んでいたが止めた、現在も飲んでいると答えた人におたずねします。

お酒はどれくらいの頻度で飲みますか？(飲みましたか?)。

一番あてはまる□にチェック(し)をつけてください。

- ほとんど飲まなかった  月1~3日  週1~2日  週3~4日  
 週5~6日  毎日飲んでいた

7-3. お酒はどのくらいの量飲みますか？(飲みましたか?)

1日に飲むもっとも普通の組合せを選んで、あてはまる□にチェック(し)してください。

例：ふだんビールを1本飲んだ後に、日本酒を2合飲むなら、ビール「1本」と日本酒の「2合」にチェック(し)。

- ・日本酒1合(180ml)：0.5合未満 1合 2合 3合 4合 5合以上
- ・焼酎・泡盛：0.5合未満 1合 2合 3合 4合 5合以上
- ・ビール大ビン1本(633ml)：0.5本未満 1本 2本 3本 4本以上  
\*中ビンまたは500ml缶を0.8本、小ビンまたは350ml缶を0.6本と換算してください。
- ・ウィスキー シングル(30ml)：0.5杯未満 1杯 2杯 3杯 4杯以上
- ・ワイン グラス(60ml)：0.5杯未満 1杯 2杯 3杯 4杯以上

8. 既往歴および現在の健康状態についておたずねします。

→ 前回の調査の後に病気にかかった場合は回答して下さい

下記の病気の中であなたが生まれてから今まで**医師から診断を受けた**病名があれば教えてください。あてはまる病名の**すべての口**に**チェック（シ）**をつけて、**最初に診断を受けた時の年齢**をご記入ください。

	診断を受けたことがある	現在通院中	最初に診断を受けた時の年齢
貧血	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高血圧	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高脂血症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
脳卒中(脳出血・脳梗塞・くも膜下出血)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
心筋梗塞・狭心症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
糖尿病(1型)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
糖尿病(2型)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
高尿酸血症(痛風)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
慢性閉塞性肺疾患(COPD)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
気管支喘息	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アレルギー性鼻炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
花粉症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アトピー性皮膚炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
アレルギー性結膜炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
食物アレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
薬疹・薬剤アレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
じんましん	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
接触性皮膚炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
シックハウス症候群	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
化学物質過敏症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
その他のアレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
慢性副鼻腔炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
慢性中耳炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
甲状腺疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
腎臓疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
肝臓疾患	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳
			歳
その他の疾患既往歴(疾患名 )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	歳

9. 現在までに仕事や趣味・家庭などの日常の環境で以下のものを扱いましたか？

例に従って、当てはまる項目すべての口にチェックをつけてください。

→ 前回の調査から変化があった場合は回答して下さい

例：

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
例)殺虫剤	<input type="checkbox"/>	2 回	3 分・時間
例)除草剤	<input checked="" type="checkbox"/>	回	分・時間

①主に日常生活上使用する機会が多いもの

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
a. 塩素系漂白剤・殺菌剤 (「混ぜるな危険」の表示のあるもの)	<input type="checkbox"/>		分・時間
b. 染料(髪染め)	<input type="checkbox"/>		分・時間
c. 殺虫剤	<input type="checkbox"/>		分・時間
d. 除草剤	<input type="checkbox"/>		分・時間

②主に職業上使用する機会が多いもの

物質名	いいえ	月に( )回	1回あたりに扱う時間
e. 有機溶剤(シンナー、試験・分析・抽出用溶剤、ドライクリーニング用洗剤、染み抜き溶剤、ペイント塗料、除光液(リムーバーなど)	<input type="checkbox"/>		分・時間
f. ホルマリン、ホルムアルデヒド	<input type="checkbox"/>		分・時間
g. クロム、ヒ素、カドミウム	<input type="checkbox"/>		分・時間
h. 水銀	<input type="checkbox"/>		分・時間
i. プラスチック樹脂(フェノール、エポキシ樹脂など)	<input type="checkbox"/>		分・時間
j. その他の化学物質 (名前が分かれば記載ください。)			
	<input type="checkbox"/>		分・時間
	<input type="checkbox"/>		分・時間

質問は以上です。ご協力ありがとうございました。

ご記入方法にご不明な点がございましたら、本研究スタッフにお尋ねください。



## 職場における化学物質特異的抗体保有率に関する研究

研究代表者 辻 真弓 産業医科大学 医学部 産業衛生学 准教授

### 研究要旨

化学物質(樹脂)取扱い作業を含む8つの事業所を対象に、樹脂取扱い作業従事者と一般人の化学物質特異的 IgG 抗体値を比較した。またうち1事業所に関しては7年前の血液と今年度採取した血液を用い IgG 抗体値を比較し、2事業所に関しては炎症性マーカーの mRNA 発現量を測定した。

ウレタン樹脂の原料である TDI や HDI を使用していると考えられる事業所は a, b, c, d 事業所である。このうち a 事業所は TDI、TMA、GA 特異的 IgG 抗体値が一般人と比較して高い。TMA はエポキシ樹脂やウレタン樹脂の硬化剤または改質剤として有用であるため a 社で同時に使用されている可能性が高い化学物質である。GA はプラスチックの定着剤に使用される。TDI や HDI といったイソシアネート特異的 IgG 抗体がそれらの曝露の指標になりうるということが報告されているという先行研究も考慮すると、a 事業所対象者の化学物質特異的 IgG 値上昇は職業上の曝露が反映している可能性が高い。c 事業所は HDI 特異的 IgG 抗体値 12.55  $\mu$ g/ml 以上の高 HDI-IgG 群の割合が一般人より高くなる傾向が認められる。さらにこの高 HDI-IgG 群ではアレルギー既往有の対象者が既往無の対象者より多く、この傾向は TDI でも同じである。また TDI 特異的 IgE 抗体値が他事業所よりも高い。今回の研究で対象者らは「TDI 系の樹脂は使用していない」と質問表で申告していたにもかかわらず、改めて詳細な職場巡視を行った結果、実際はその化学物質が含有されている原料が使用されていた。よって c 事業所では職場での曝露の影響で IgG 抗体値の上昇やアレルギー罹患が増加している可能性を否定できない。f 事業所において一般人と比較して BADGE と ED 特異的 IgG 抗体値が共に高い傾向が認められた。BADGE はエポキシ樹脂の原料として、ED はエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている。エポキシ樹脂は優れた硬化性、接着性、耐食性等を持つため、幅広い用途で使用されている。我々が聞き取りした f 事業所関係者はエポキシ樹脂の使用があるか把握していなかったが、f 事業所は自動車関連事業所であり、エポキシ樹脂が自動車ボディ電着塗装や接着剤として使用されている可能性がある。

複数の化学物質抗体を測定することで、職業上曝露の有無や曝露源の推定の精度が上昇する。従業員の健康を保持・増進するために、曝露状況の推測・アレルギー発症を予防するためのツールとして化学物質特異的 IgG 抗体値に注目し、複数の化学物質特異的 IgG 抗体値を事業所ごとにオーダーメイドで測定することは有用であると考えられる。

樹脂取扱い施設を対象に、一度に複数種類の化学物質特異的 IgG 抗体値を半定量化した研究は国内外で本研究が初めてであり、その意義は非常に大きい。また今回、国内外で初めて複数の炎症マーカーと複数の化学物質特異的 IgG 抗体値を測定し、化学物質特異的 IgG 抗体値と関係があるマーカー候補を提示することができた。

今後も各事業所にマッチした、特定化学物質にリストアップされていない化学物質も十分に視野に入れた調査を行うことが必要である。

### 研究分担者

川本 俊弘 産業医科大学医学部産業衛生学  
一瀬 豊日 産業医科大学進路指導部  
土屋 卓人 産業医科大学医学部産業衛生学  
武林 亨 慶應義塾大学 医学部  
衛生学公衆衛生学慶応大学  
田中 政幸 公益財団法人 福岡労働衛生研

### 研究所

石原 康宏 広島大学大学院総合科学研究科  
行動科学講座 分子脳科学研究  
室

### A. 研究目的

「化学物質特異的 IgG 抗体のアレルギー診断と

曝露モニタリングへの有用性に関する調査」に関し、化学物質（樹脂）取扱い作業を含む事業所従業員の特異的 IgG 抗体値と一般住民の特異的抗体値を比較し、IgG のアレルギー診断と曝露モニタリングの有用性を調査する。

## B. 研究方法

対象：

事業所従業員を対象とし、抗体値に影響を及ぼすと予想される生活習慣に関するデータ（喫煙、飲酒、アレルギー既往歴、化学物質の取り扱い状況等）ならびに生体試料（血液）を収集した。

生体試料（血液）：

- ・ 総 IgG、総 IgE、特異的 IgE 抗体測定：業者に測定を委託した。
  - 測定方法：蛍光酵素免疫測定法（FEIA）
- ・ 特異的 IgG 抗体測定：産業医科大学産業衛生学講座で開発・特許を取得（2015 年特許第 5757519 号）した方法を用いた。
- ・ 平成 26 年度で報告した a 社に関して、再度特許取得後論文化した方法<sup>1</sup>で計測を行った。新法で解析：事業所 a, b, c, c 新人, g  
旧法で解析：事業所 d, e, f
- ・ 比較対象である南九州一般住民の抗体測定も論文化した方法で計測を行い、さらに人数を増加させて解析を行った。
- ・ 今年度はさらにリアルタイム PCR 法を用いて以下のマーカーの mRNA 発現量を測定した。  
酸化ストレスマーカー：  
GCS, NQO1, SOD1, SOD2, GPx1, Catarase  
炎症に関わるマーカー：  
IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-22, CXCL7, IL-8b, CXCL3, IL17A, CYP1A1, IDO1, IDO2, IL-10

### （倫理面への配慮）

調査内容は産業医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、実施にあたっては、平成 14 年 7 月に発表された「疫学に関する倫理指針」を遵守して行い、結果に対してはプライバシーに十分に配慮した。

## C. 化学物質基本情報

本報告書で使用している略語

TDI：トルエンジイソシアネート

PA：無水フタル酸

FA：ホルムアルデヒド

GA：グルタルアルデヒド

PPD：パラフェニレンジアミン

BADGE：ビスフェノール A ジグリシジルエーテル

AA：アクリルアミド

ED：エチレンジアミン

HDI：ヘキサメチレンジイソシアネート

MMA：メタクリル酸メチル

TMA：無水トリメリット酸

GMA：メタクリル酸グリシジル

## D. 結果

### a 社

#### A 質問票の結果

主として使用する樹脂はウレタン樹脂である。事業所の研究対象者総数は 81 名（男性 77 名、女性 4 名）、対象者の年齢の平均値は 38.6 歳。アレルギー既往歴ありのものは 35%（28 名/81 名）であった。喫煙率は 44%（36 名/81 名）、ほぼ毎日飲酒するものが全体の 57%（39 名/81 名）であった。厚生労働省国民健康・栄養調査（平成 26 年度）では、喫煙習慣のある者の割合は男性で 34.1%、女性で 9.6%である。飲酒習慣のある者の割合は男子で 32.8%、女性で 8.7%である。よって A 社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が多いといえる。（a 社 A 質問票の結果①～⑥）

#### B 採取試料から得られた結果

##### 特異的 IgG 抗体値の一般人・a 社比較

対象者が一般人より高い抗体値を示した物質(OR 3.0 以上)

TDI：対象者は一般人と比較して TDI 特異的 IgG 抗体値 0 より大 3.125  $\mu$ g/ml 未満、3.125 以上 6.25  $\mu$ g/ml 未満、6.25 以上 12.5  $\mu$ g/ml 未満、12.5  $\mu$ g/ml 以上の割合が高くなる傾向が認められた（OR=2.60 P value=0.085, OR=6.99 P value=0.004, OR=10.8 P value=0.002, OR=3.39 P value=0.116）。

PA：対象者は一般人と比較して PA 特異的 IgG 抗体値 6.25 以上 12.5  $\mu$ g/ml 未満、12.5  $\mu$ g/ml 以上の割合がやや高くなる傾向が認められた（OR=2.56 P value=0.445, OR=3.42 P value=0.312）。

GA：対象者は一般人と比較して GA 特異的 IgG 抗体値 3.125 以上 6.25  $\mu$ g/ml 未満、6.25 以上 12.5  $\mu$ g/ml 未満、12.5  $\mu$ g/ml 以上の割合が高くなる傾向が認められた（OR=2.70 P value=0.083, OR=3.97 P value=0.113, OR=4.06 P value=0.345）。

TMA：対象者は一般人と比較して TMA 特異的 IgG 抗体値 0 より大きく 3.125  $\mu$ g/ml 未満、3.125 以上 6.26  $\mu$ g/ml 未満、6.25 以上 12.5  $\mu$ g/ml 未満、12.5  $\mu$ g/ml 以上の割合が高くなる傾向が認められた（OR=3.98 P value=0.041, OR=5.02 P value=0.023, OR=5.23 P value=0.034, OR=3.43 P value=0.137）。

(a 社 B 採取試料から得られた結果 (5))  
尚、オッズ比の値は性、年齢のみを共変数として解析した場合 並びに 性、年齢、喫煙、飲酒習慣を共変数として解析した場合で顕著な差がみられなかった。よって性、年齢を共変数として解析を行った。

## b 社

### A 質問票の結果

使用する樹脂はウレタン樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂等複数の樹脂である。全員が特化物健康診断対象者である。事業所の研究対象者総数は 43 名 (男性 42 名 女性 1 名)、対象者の年齢の平均値は 41.0 歳。アレルギー既往歴ありのものは 12% (5 名/43 名) であった。喫煙率は 56% (24 名/43 名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の 49% (21 名/43 名) であった。よって B 社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が非常に多いといえる。(b 社 A 質問票の結果①～⑥)

### B 採取試料から得られた結果

#### 特異的 IgG 抗体値の一般人・b 社比較

対象者が一般人より高い抗体値を示した物質 (OR 3.0 以上) はなかった。

(b 社 B 採取試料から得られた結果 (5))

## c 社

### A 質問票の結果

主として使用する樹脂はポリアミド樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ウレタン樹脂である。事業所の研究対象者総数は 100 名 (男性 97 名、女性 3 名)、対象者の年齢の平均値は 32.8 歳。アレルギー既往歴ありのものは 61% (61 名/100 名) であった。喫煙率は 57% (57 名/100 名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の 44% (44 名/100 名) であった。よって c 社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が多いといえる。

(c 社 A 質問票の結果①～⑥)

### B 採取試料から得られた結果

#### 特異的 IgG 抗体値の一般人・c 社比較

①対象者が一般人より高い抗体値を示した物質 (OR 3.0 以上)

PA: 対象者は一般人と比較して PA 特異的 IgG 抗体値 0 より大きく 3.125  $\mu$ g/ml 未満、3.125 以上 6.25  $\mu$ g/ml 未満、3.125 以上 6.25  $\mu$ g/ml 未満、6.25 以上 12.5  $\mu$ g/ml 未満、12.5  $\mu$ g/ml 以上の割合の割合が高くなる傾向が認められた (OR=10.8 P value=0.120, OR=7.38 P value=0.151 OR=9.71 P value=0.100, OR=5.70 P value=0.200)。

HDI: 対象者は一般人と比較して HDI 特異的 IgG 抗体値 12.55  $\mu$ g/ml 以上の割合は高くなる傾向が認められた (OR=56.3 P value=0.221)。

(c 社 B 採取試料から得られた結果 (5))

## c 社 (新入社員)

### A 質問票の結果

事業所の研究対象者総数は 38 名 (男性 34 名 女性 4 名)、対象者の年齢の平均値は 19.3 歳。アレルギー既往歴ありのものは 53% (20 名/38 名) であった。喫煙率は 11% (4 名/38 名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の 3% (1 名/38 名) であった。よって c 社新入社員の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が少ないといえる。(c 社補足 A 質問票の結果①～⑥)

### B 採取試料から得られた結果

#### 特異的 IgG 抗体値の一般人・c 社新人の比較

対象者が一般人より高い抗体値を示した物質 (OR 3.0 以上) はなかった。

(c 社 B 採取試料から得られた結果 (5))

## d 社

### A 質問票の結果

使用する樹脂はウレタン樹脂、エポキシ樹脂等複数の樹脂である。全員が特化物健康診断対象者である。事業所の研究対象者総数は 39 名 (すべて男性)、対象者の年齢の平均値は 37.5 歳。アレルギー既往歴ありのものは 8% (3 名/39 名) であった。喫煙率は 28% (11 名/39 名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の 26% (10 名/39 名) であった。よって d 社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が少ないといえる。(d 社 A 質問票の結果①～⑥)

### B 採取試料から得られた結果

#### 特異的 IgG 抗体値の一般人・d 社比較

対象者が一般人より高い抗体値を示した物質 (OR 3.0 以上)

ED: 対象者は一般人と比較して ED 特異的 IgG 抗体値 0 より大きく 3.125  $\mu$ g/ml 未満の割合が高くなる傾向が認められた (OR=4.61 P value=0.194)。(d 社 B 採取試料から得られた結果 (5))

## e 社

### A 質問票の結果

主として使用する樹脂はエポキシ樹脂である。全員が特化物健康診断対象者である。事業所の研究対象者総数は 35 名 (男性 34 名、女性 1 名)、対象者の年齢の平均値は 34.7 歳。アレルギー既

往歴ありのものは63% (22名/39名)であった。喫煙率は46% (16名/35名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の49% (17名/39名)であった。よってC社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が多いといえる。(C社 A質問票の結果①～⑥)

## B 採取試料から得られた結果

### 特異的 IgG 抗体値の一般人・e社比較

PPD: 対象者は一般人と比較して PPD 特異的 IgG 抗体値0より大きく3.125  $\mu$ g/ml未満の割合が低かった (OR=0.20 P value=0.066) が3.125以上6.25  $\mu$ g/ml未満の割合は高くなる傾向が認められた (OR=4.30 P value=0.318)。抗体値0より大きく3.125  $\mu$ g/ml未満と3.125  $\mu$ g/mlの2群比較でORは1以下になるため関係があるとは言えない。

(C社 B採取試料から得られた結果(5))

## f社

### A 質問票の結果

主として使用する樹脂はポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂である。事業所の研究対象者総数は26名(すべて男性)、対象者の年齢の平均値は34.7歳。アレルギー既往歴ありのものは46% (12名/26名)であった。喫煙率は50% (13名/26名)、ほぼ毎日飲酒するものが全体の39% (10名/26名)であった。よってB社の対象者は全国と比較して、喫煙・飲酒習慣者が多いといえる。(D社 A質問票の結果①～⑥)

## B 採取試料から得られた結果

### 特異的 IgG 抗体値の一般人・f社比較

対象者が一般人より高い抗体値を示した物質 (OR 3.0以上)

BADGE: 対象者は一般人と比較して BADGE 特異的 IgG 抗体値0より大きく3.125  $\mu$ g/ml未満の割合が高くなる傾向が認められた (OR=6.88 P value=0.073)。

ED: 対象者は一般人と比較して ED 特異的 IgG 抗体値0より大きく3.125  $\mu$ g/ml未満の割合が高くなる傾向が認められた (OR=4.93 P value=0.247)。

MMA: 対象者は一般人と比較して MMA 特異的 IgG 抗体値0より大きく3.125  $\mu$ g/ml未満の割合が高かった (OR=20.7 P value=0.020)。

## ●mRNA 発現量の検討

今回の研究では、a社とc社の対象者の酸化ストレスマーカー、炎症に関わるマーカー17種類のmRNAを測定した。

2社共通の傾向を示した化学物質特異的 IgG 抗体値とマーカーの関係は以下の通りである。

TDI: IL-8b  $\uparrow$

FA: CXCL3  $\uparrow$

PPD: IL-8b  $\uparrow$

AA: IL-1  $\beta$   $\uparrow$

## ●縦断研究 g社

2007年に使用していた樹脂で接触性皮膚炎を生じた対象者5名、生じていなかった対象者5名を2015年度に再度リクルートした。2007年度時点で接触性皮膚炎の原因物質と推定された樹脂の使用を中止したことにより、症状が消失したことを確認した。また現在も別の樹脂を使用した業務に就いているが、職業性アレルギーを疑う症状は現れていない。

接触性皮膚炎に罹患していた対象者の2007年度と2015年度のBADGE特異的 IgG 抗体値を比較した場合、全員の抗体値が低下していることが確認された。

## E. 考察

今回の研究で、一般人と対象者の特異的 IgG 抗体値を比較し、TDI、PA、GA、ED、BADGE、HDI、MMA、TMA 特異的 IgG 抗体値が曝露の指標になりうる可能性があることを示唆する結果が得られた。

### ウレタン樹脂を使用

ウレタン樹脂の原料であるTDIやHDIを使用していると考えられる事業所はa, b, c, d事業所である。このうちa事業所はTDI特異的 IgG 抗体値が、c事業所はHDI特異的 IgG 抗体値が一般人より高い傾向が認められた。さらにa事業所はTMA特異的 IgG 抗体値が同時に有意である点も重要である。TMAはエポキシ樹脂やウレタン樹脂の硬化剤または改質剤として有用であるためa社で同時に使用されている可能性が高い化学物質である。さらにa事業所ではGA特異的 IgG 抗体値も一般人より高い。GAはプラスチックの定着剤に使用されており、関連性が疑われる。TDIやHDIといったイソシアネート特異的 IgG 抗体がそれらの曝露の指標になりうるということが報告されており<sup>24</sup>、先行研究も考慮すると、a社対象者の化学物質特異的 IgG 値上昇は職業上の曝露が影響している可能性を否定できない。

### エポキシ樹脂を使用

BADGEはエポキシ樹脂の原料として、EDはエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている。エポキシ樹脂を使用している事業所はb, d, e事業所である。しかしながらb, d, e事業所ではなく、f事

業所において一般人と比較して BADGE と ED 特異的 IgG 抗体値が共に高い傾向が認められた点は、曝露因子・曝露経路を推定するうえで注目すべき点である。BADGE は接触性皮膚炎の原因物質として報告されているだけでなく<sup>5,6</sup> 生殖機能への影響の有無<sup>7</sup> が依然として取だたされている化学物質である。ED はヒトを対象とした疫学調査において、呼吸器障害<sup>8</sup> や接触性皮膚炎<sup>9</sup> の原因物質であると報告されている。また、ラットを用いた研究では臓器（肝臓、腎臓、心臓、脾臓等）の重量減少<sup>10</sup> や母動物への毒性用量で発生毒性（胎児の前腕頭動脈の短縮・欠損、体重減少、胸骨非化骨化発現数増加等）<sup>11</sup> が報告されている。エポキシ樹脂は優れた硬化性、接着性、耐食性等を持つため、幅広い用途で使用されている。我々が聞き取りした事業所関係者からはエポキシ樹脂の使用があるとは聞き出せていない。しかしながら f 事業所は自動車関連事業所であり、エポキシ樹脂は自動車ボディ電着塗装や接着剤として使用されている可能性がある。

#### メタクリル樹脂を使用

MMA はメタクリル樹脂（アクリル樹脂）のポリマーである。f 事業所において一般人と比較して MMD 特異的 IgG 抗体値が高い傾向が認められた。メタクリル樹脂は、熱硬化性塗料・接着剤、ラテックス改質剤、イオン交換樹脂、紙、織物加工剤等、その使用目的の範囲が非常に広く、プラスチックの女王と評される樹脂である。透明性が樹脂中で最も高く、強靱で、加工しやすく、着色もしやすいことから、特に電子機器の光学用途、自動車部品に使用されている。またその特性からコスメ用品、特にネイル製品にも使用されている。先行研究の疫学調査では、MMA 取り扱い作業従事者において、重度な症状はみられないが、咳・痰の増加、喉の痒み等がみられたことが報告されている<sup>12</sup>。メタクリル酸と呼吸器に関するレビュー論文では、目の刺激症状や皮膚刺激性、鼻腔の炎症、喘息といった上気道炎症とメタクリル酸との関係性が報告されている<sup>13</sup>。f 事業所は特にアレルギー既往歴ありのものが対象者の約半数（46%）を占めており、今後 MMA 曝露とアレルギー症状の関係を詳細に調査する必要がある。

#### ポリエステル樹脂を使用

PA はポリエステル樹脂、医薬、香料と幅広く使用されている。ポリエステル樹脂を主として使用している事業所は c 事業所であり、c 社は PA 特異的 IgG 抗体が一般人と比較し高い。しかしながら日用品でも使用頻度が高い物質に関しては、日常生活上の曝露状況を把握しなければ、IgG が

職域での曝露であるとは言い難く、今後は職場以外の日常的なルートにおける曝露を検討する必要がある。

#### ●炎症性マーカーとの関係

IL-8 は炎症系のマーカーで、先行研究において TDI 曝露と関係があることが報告されている<sup>14,15</sup>。

PPD と IL-8 の関係も報告されている<sup>16</sup>。また AA と IL-1 $\beta$  との関係も報告されており<sup>17</sup>、我々の研究方法や研究成果と炎症性マーカーの整合性が確認できたと言える。

対象事業所は従業員や企業の規模は様々である。しかしながら主たる使用樹脂は把握できるが、時期によっては複数の樹脂を同時に使用し、さらに含有量が一定に満たない化学物質に関しては使用状況を把握することは一層難しい。特に特定化学物質ではない化学物質は作業従事者ならびに医療スタッフの意識にのぼりにくい。もともとアレルギー疾患を有している従業員は、アレルギー症状の原因物質に関して職業性の因子が関係しているかどうか、意識すらしていないことがほとんどである。複数の化学物質抗体を測定することで、曝露源の推定の精度が確実に上昇する。また特化物以外の化学物質の影響も明らかにできる。従業員の健康を保持・増進するために、曝露状況の推測・アレルギー発症を予防するためのツールとして化学物質特異的 IgG 抗体値に注目し、複数の化学物質特異的 IgG 抗体値を事業所ごとにオーダーメイドで測定する必要があると考える。

樹脂取り扱い施設を対象に、一度に複数種類の化学物質特異的 IgG 抗体値を半定量化した研究は国内外で本研究が初めてであり、その意義は非常に大きい。ま国内外で初めて複数の炎症マーカーと複数の化学物質曝露を職域において測定した点も大変有意義である。今後も特定化学物質にリストアップされていない化学物質も十分に視野に入れた調査を行うことが必要である。

#### E. 結論

事業所において一般人より有意に高い化学物質特異的 IgG 抗体値が複数認められ、さらにこれらの化学物質がこの事業所で使用している樹脂製造過程で使用される化学物質である場合、職場での曝露の可能性が高い。日常に広く使用されている化学物質に関しては曝露経路の推定が複雑であり、職域と同時に日常生活の詳細な調査が重要になると考えられる。

## 参考文献

1. Tsuji M et al. A simple method for detection of multiple chemical-specific IgGs in serum based on dot blotting. Health, 2016, 8, 1645-1653
2. Pronk A et al. Respiratory symptoms, sensitization, and exposure response relationships in spray painters exposed to isocyanates. Am J Respir Crit Care Med. 176:1090-1097, 2007
3. Wisniewski A et al. Biomonitoring Hexamethylene diisocyanate (HDI) exposure based on serum levels of HDI-specific IgG. Ann Occup Hyg. 56:901-910, 2012
4. Pham le D et al. Serum specific IgG response to toluene diisocyanate-tissue transglutaminase conjugate in toluene diisocyanate-induced occupational asthmatics. Ann Allergy Asthma Immunol. 113(1):48-54, 2014.
5. Bangsgaard N et al. Contact allergy to epoxy resin: risk occupations and consequences. Contact Dermatitis. Aug;67(2):73-7, 2012.
6. Breuer K et al. Contact allergy induced by bisphenol A diglycidyl ether leachables from aluminium tubes for pharmaceutical use. Allergy. 70(2):220-6, 2015.
7. Peretz J et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. Environ Health Perspect. 122(8):775-86, 2014.
8. Popa V et al. Bronchial asthma and asthmatic bronchitis determined by simple chemicals. Dis Chest. 56(5):395-402, 1969.
9. Tas J et al. Allergy to aminophylline; report of a case. Acta Allergol. 12(1):39-42, 1958.
10. Yang RS et al. Acute and subchronic toxicity of ethylenediamine in laboratory animals. Fundam Appl Toxicol. 3(6):512-20, 1983.
11. DePass LR et al. Evaluation of the teratogenicity of ethylenediamine dihydrochloride in Fischer 344 rats by conventional and pair-feeding studies. Fundam Appl Toxicol. 9(4):687-97, 1987.
12. Mizunuma K et al. Biological monitoring and possible health effects in workers occupationally exposed to methyl methacrylate. Int Arch Occup Environ Health. 65(4):227-32, 1993.
13. Borak J et al. Methyl methacrylate and respiratory sensitization: a critical review. Crit Rev Toxicol. 41(3):230-68, 2011.
14. Kim JH et al. Serum cytokines markers in toluene diisocyanate-induced asthma. Respir Med. 2011 Jul;105(7):1091-4.
15. Park H et al. Neutrophil activation following TDI bronchial challenges to the airway secretion from subjects with TDI-induced asthma. Clin Exp Allergy. 1999 Oct;29(10):1395-401.
16. Corsini E, et al. Role of PKC- $\beta$  in chemical allergen-induced CD86 expression and IL-8 release in THP-1 cells. Arch Toxicol. 2014 Feb;88(2):415-24.
17. Santhanasabapathy R et al. arnesol quells oxidative stress, reactive gliosis and inflammation during acrylamide-induced neurotoxicity: Behavioral and biochemical evidence. Neuroscience. 2015 Nov 12;308:212-27.

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

H27 年度

Kawamoto T, Tsuji M, Isse T.  
Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis.  
BMC Public Health. 2015 Sep 21;15:930.  
doi: 10.1186/s12889-015-2302-4.

H28 年度

Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro Ishihara, Toyohi Isse, Nami Ikeda-Ishihara, Takuto Tuchiya, Toshihiro Kawamoto. A simple method for detection of multiple chemical-specific IgGs in serum based on dot blotting. Health, 2016, 8, 1645-1653.

## 2. 学会発表

### H27 年度

- (1) 辻 真弓、土屋 卓人、一瀬 豊日、  
太田 雅規、田中 政幸、川本 俊弘 感作  
物質特異的抗体の保有率の検討 1. 第 88 回  
日本産業衛生学会 大阪 グランフロント  
大阪 2015. 5. 15
- (2) 川本 俊弘、辻 真弓、土屋 卓人・プラ  
スチック樹脂原料の血清アルブミンへの結  
合. 第 88 回日本産業衛生学会 大阪 グラ  
ンフロント大阪 2015. 5. 16
- (3) 辻 真弓、郡山 千早、太田 雅規、田中  
政幸、川本 俊弘. 職場における化学物質  
特異的抗体保有率に関する研究. 第 74 回  
日本公衆衛生学会総会 長崎ブリックホー  
ル 2015. 11. 5
- (4) Kawamoto T, Tsuji M, Tsuchiya T.  
Detection of Specific Immunoglobulin G  
Against Plastic Resin in Workers with  
Dermatitis. International Symposium of  
Environmental Science 25th Meeting,  
Henderson, Nevada, Oct. 18-22, 2015
- (5) Tsuji M, T Isse, MYamamoto, T. Kawamoto.  
Toluene diisocyanate and formaldehyde  
specific IgE and IgG antibodies in the  
urethane resin handling plant. SOT55th  
Annual Meeting & ToxExpo. New Orleans  
Ernest N. Morial Convention Center in New  
Orleans, Louisiana. 2016. 3. 16.

### H28 年度

- (1) 辻 真弓、土屋 卓人、川本 俊弘。職場  
における化学物質特異的抗体保有率に関す  
る研究 第 86 回日本衛生学会総会 2016 年  
5 月
- (2) 辻真弓, 土屋 卓人, 太田雅規, 田中政幸,  
川本俊弘。職場における化学物質特異的抗  
体保有率に関する研究. 第 89 回日本産業  
衛生学会 2016 年 5 月
- (3) 辻真弓, 郡山 千早, 田中政幸, 川本俊弘。  
母親の精神的ストレスとアレルギー児の炎  
症性サイトカインの関係。公衆衛生学会第  
75 回日本公衆衛生学会総会 2016 年 10 月
- (4) Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro  
Ishihara, Isse Toyohi, Takuto Tsuchiya,  
Nami Ikeda-Ishihara and Toshihiro  
Kawamoto. Comparing specific IgGs of  
unexposed and exposed chemical plant  
workers to plastic resins by a simple  
method to detect plural chemical

specific IgGs in serum. PPTOXV  
2016. 11. Kitakyusyu, Japan.

- (5) Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro  
Ishihara, Takuto Tsuchiya, Nami  
Ikeda-Ishihara and Toshihiro Kawamoto.  
Comparing specific IgGs of unexposed and  
exposed chemical plant workers to plastic  
resins by a simple method to detect plural  
chemical specific IgGs in serum. SOT56th  
Annual Meeting & ToxExpo. 2016. 3.  
Baltimore, Maryland.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H27 年度

- |           |               |
|-----------|---------------|
| 1. 特許取得   | 特許第 5757519 号 |
| 2. 実用新案登録 | 該当無し          |
| 3. その他    | 該当無し          |

# 1 a 社 自動車用ウレタンパッド製造会社

## A 質問票の結果

① 主たる使用樹脂：ウレタン樹脂

ウレタン樹脂原料：

A 社で確認された使用製品

・コスモネート TM-20 (三井化学)

主な原料 TDI (トルレンジイソシアネート)

・スミジュール 44V (住化バイエル株式会社)

主な原料 MDI (ジフェニルメタンジイソシアネート)

・SBU ポリオール H556 (住化バイエル株式会社)

・4053 Polyol DA (THE DOW CHEMICAL COMPANY)

・離型剤 URH-520 (コニシ株式会社)、有機成分含有シリコーン  
グリコール、グリセリン、ジエタノールアミン 等

② 対象者 81 名 (男性 77 名、女性 4 名)

③ 年齢 mean (S.E.) 38.6 (1.1)

④ アレルギー疾患既往歴 なし 53 名 (65%) あり 28 名 (35%)

⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=81	%
吸わない	18	22
やめた	27	33
吸う	36	44

⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=81	%
飲まない・機会飲酒	29	43
ほぼ毎日飲んでいる	39	57

## B 採取試料(血清)から得られた結果

### (1) 総IgG値、総IgE値

	IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1181 (29)	290 (102)

### (2) アレルギー既往歴別

アレルギー既往歴	総IgG(mg/dl)	総IgE(IU/ml)
	mean (S.E.)	mean (S.E.)
なし (N=53)	1148 (38)	128 (31)
あり (N=28)	1244 (42)	597 (285)

グラフ1

### (3) 特異的IgE値

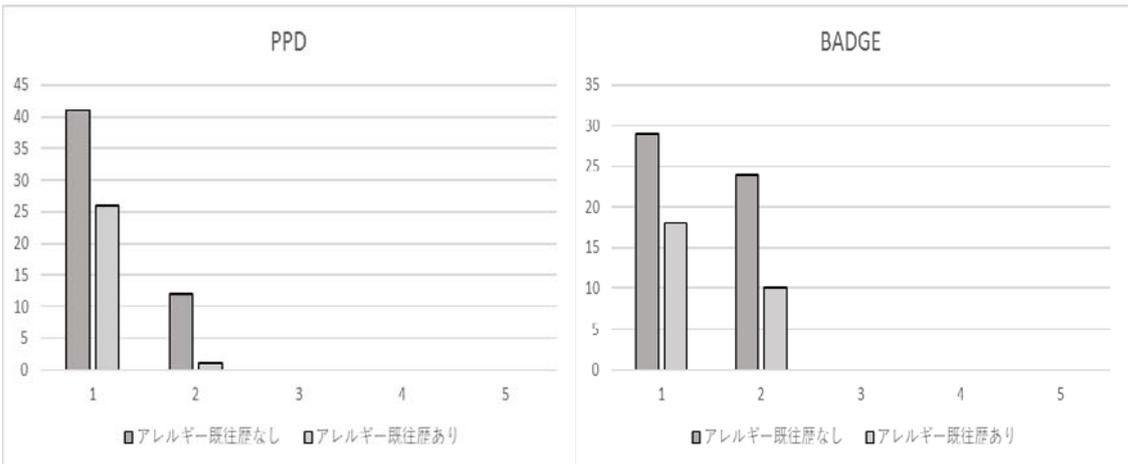
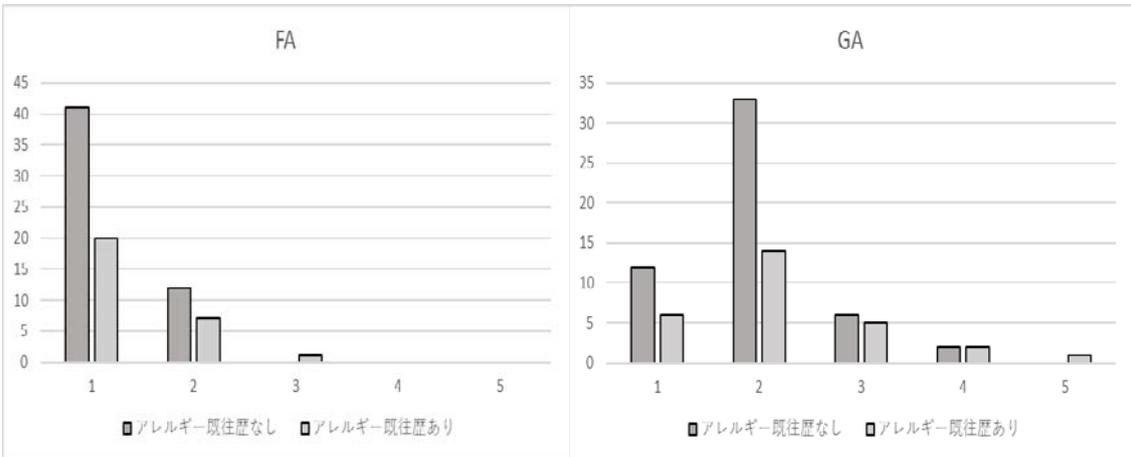
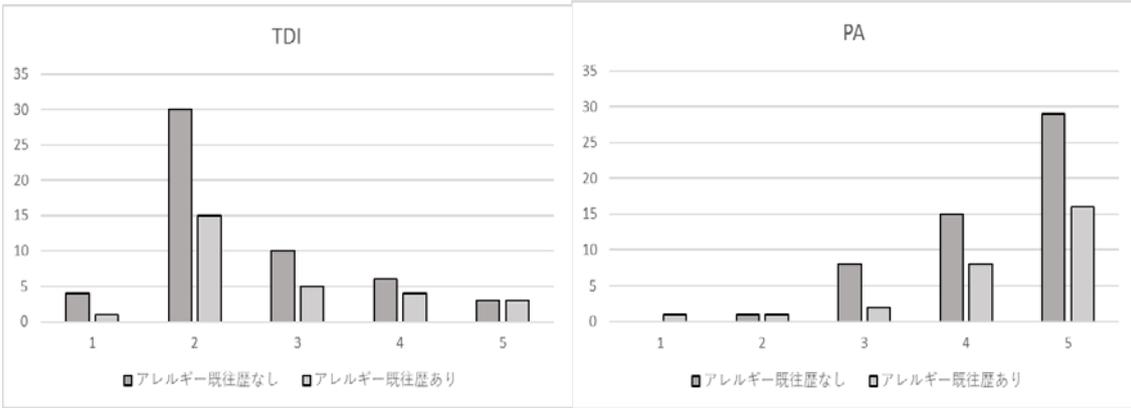
	特異的IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	79	2
FA	81	0
PA	80	1

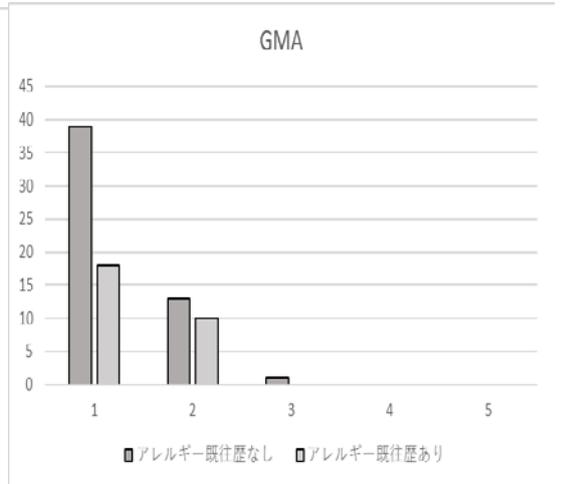
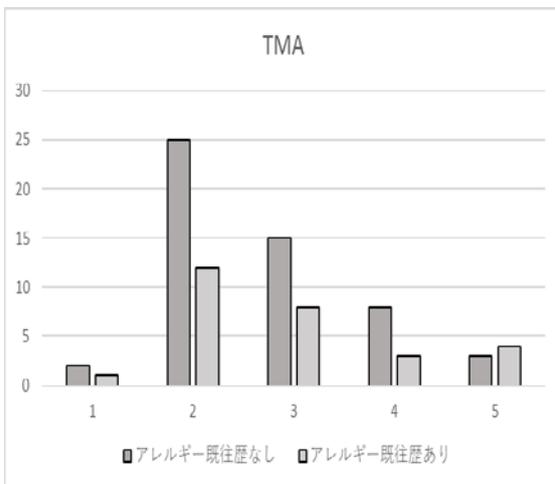
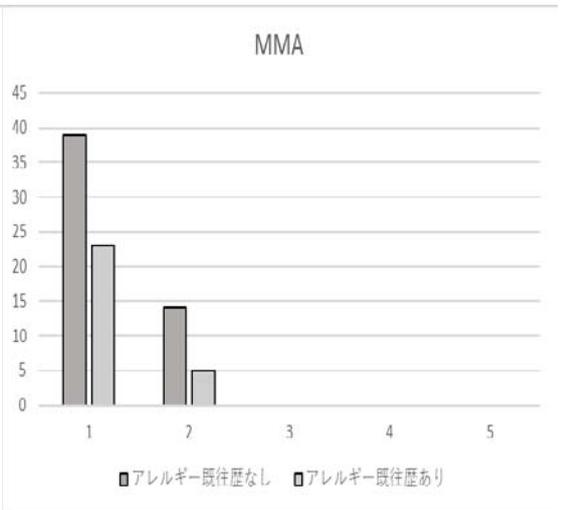
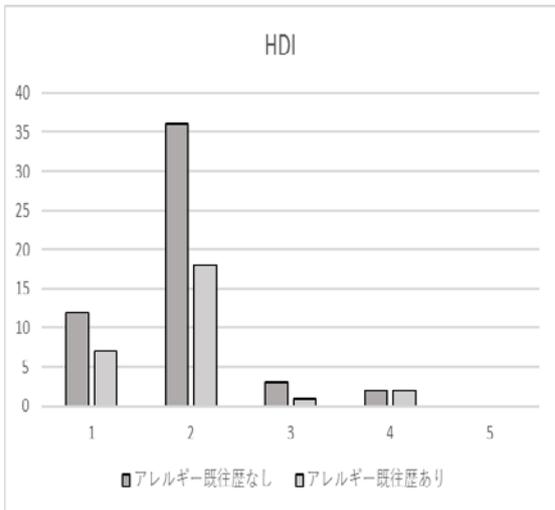
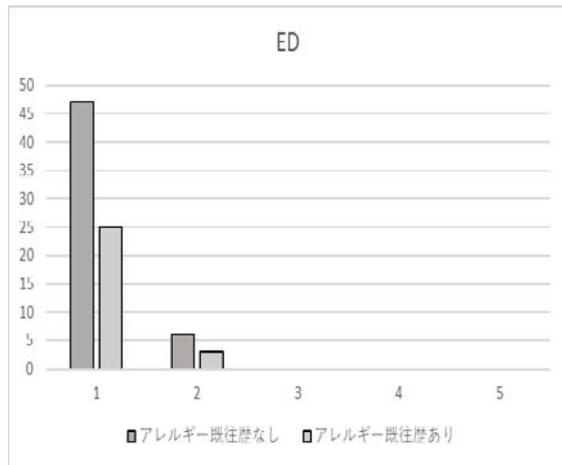
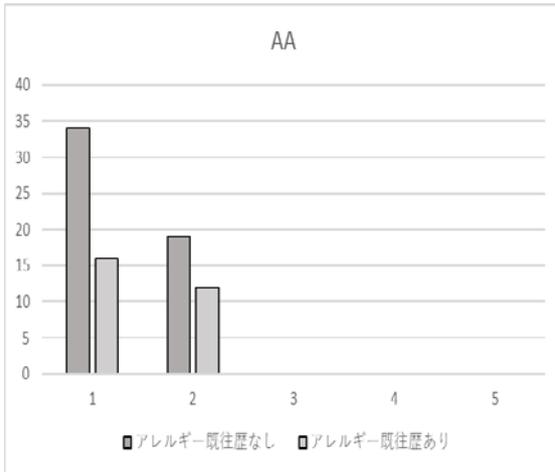
### (4) 特異的IgG値とアレルギー既往歴

\* 特異的IgG値 ( $\mu$ g/ml) のクラス分け基準\*

class1(-):  $0 \mu$ g/ml, class2(±):  $>0, <3.125$ , class3(+):  $\geq 3.125, <6.25$

class4(≡):  $\geq 6.25, <12.5$ , class5(≡):  $\geq 12.5$





(5)特異的 IgG 値の一般人・a 社比較

TDI

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	44	5	1.00	(ref)	
>0, <3.125	102	45	2.60	0.88-7.69	0.085
$\geq$ 3.125, <6.25	19	15	6.99	1.85-26.3	0.004
$\geq$ 6.25, <12.5	7	10	10.8	2.41-48.8	0.002
$\geq$ 12.5	11	6	3.39	0.74-15.5	0.116

PA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	6	1	1.00	(ref)	
>0, <3.125	15	2	1.41	0.08-24.9	0.813
$\geq$ 3.125, <6.25	35	10	1.82	0.15-21.6	0.637
$\geq$ 6.25, <12.5	53	23	2.56	0.23-28.5	0.445
$\geq$ 12.5	74	45	3.42	0.32-37.1	0.312

FA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	128	61	1.00	(ref)	
>0, <3.125	53	19	0.65	0.33-1.30	0.222
$\geq$ 3.125, <6.25	2	1	0.48	0.04-5.74	0.564
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

GA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	61	18	1.00	(ref)	
>0, <3.125	97	47	1.78	0.86-3.69	0.121
$\geq$ 3.125, <6.25	19	11	2.70	0.88-8.32	0.083
$\geq$ 6.25, <12.5	5	4	3.97	0.72-21.9	0.113
$\geq$ 12.5	1	1	4.06	0.22-74.4	0.345

PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	140	67	1.00	(ref)	
>0, <3.125	43	14	0.59	0.28-1.28	0.182
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	133	47	1.00	(ref)	
>0, <3.125	49	34	1.87	0.99-3.51	0.053
$\geq$ 3.125, <6.25	1	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

AA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=183)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	118	50	1.00	(ref)	
>0, <3.125	61	31	0.89	0.47-1.67	0.706
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

ED

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=182)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	137	72	1.00	(ref)	
>0, <3.125	45	9	0.31	0.13-0.73	0.007
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=182)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	49	19	1.00	(ref)	
>0, <3.125	112	54	1.06	0.52-2.19	0.858
$\geq$ 3.125, <6.25	12	4	0.59	0.13-2.74	0.504
$\geq$ 6.25, <12.5	8	4	0.87	0.21-3.65	0.846
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=182)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	116	62	1.00	(ref)	
>0, <3.125	63	19	0.37	0.19-0.75	0.005
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## TMA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=182)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	32	3	1.00	(ref)	
>0, <3.125	78	37	3.98	1.06-15.0	0.041
$\geq$ 3.125, <6.25	37	23	5.02	1.25-20.2	0.023
$\geq$ 6.25, <12.5	19	11	5.23	1.13-24.1	0.034
$\geq$ 12.5	15	7	3.43	0.68-17.4	0.137

## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu$ g/ml)	一般人(N=182)	a 社(N=81)	OR	95%CI	P 値*
0	130	57	1.00	(ref)	
>0, <3.125	52	23	0.79	0.40-1.55	0.493
$\geq$ 3.125, <6.25	0	1	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

## (2) 各種サイトカインと化学物質の関係

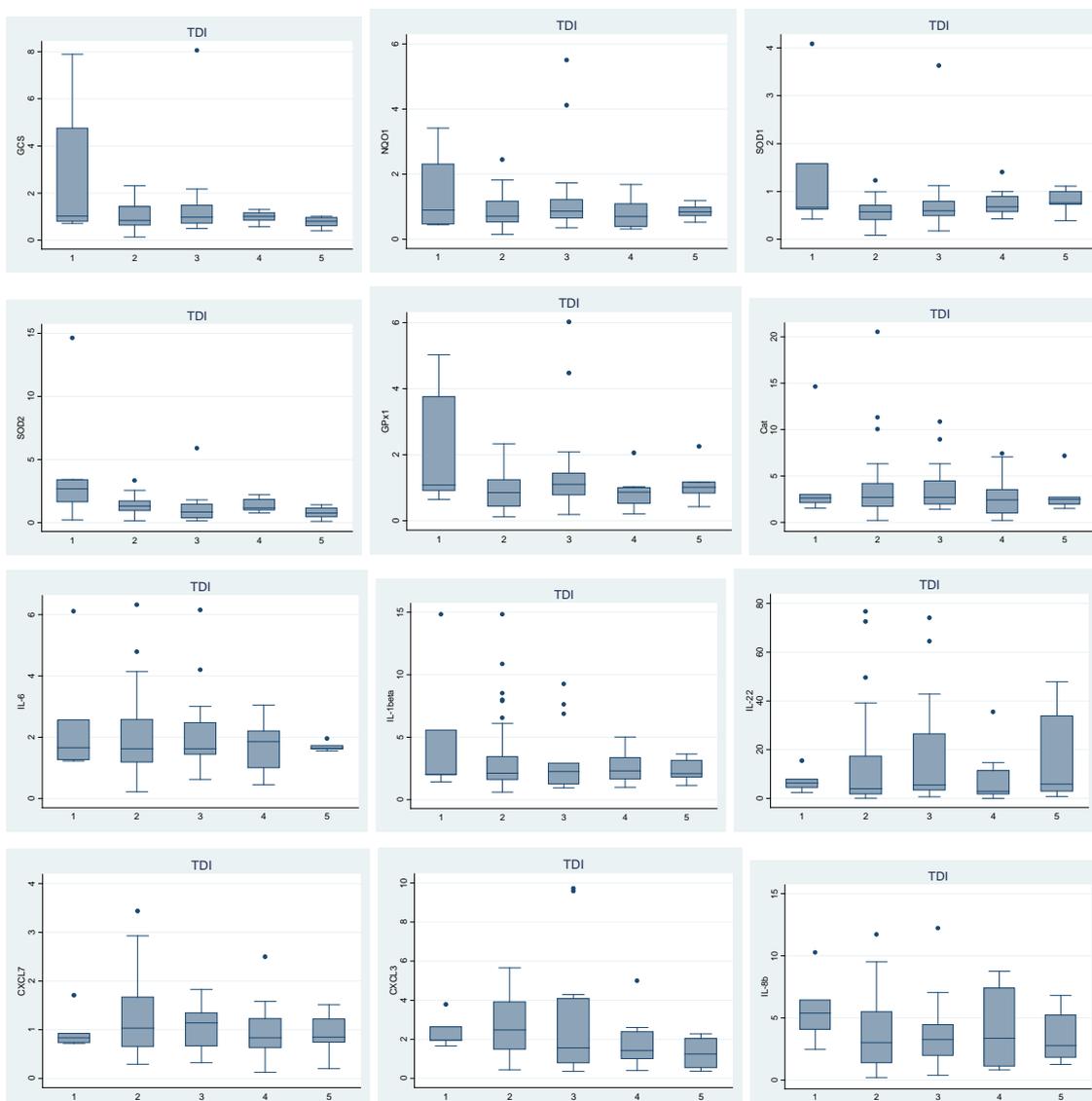
\* 特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ ) のクラス分け基準 \*

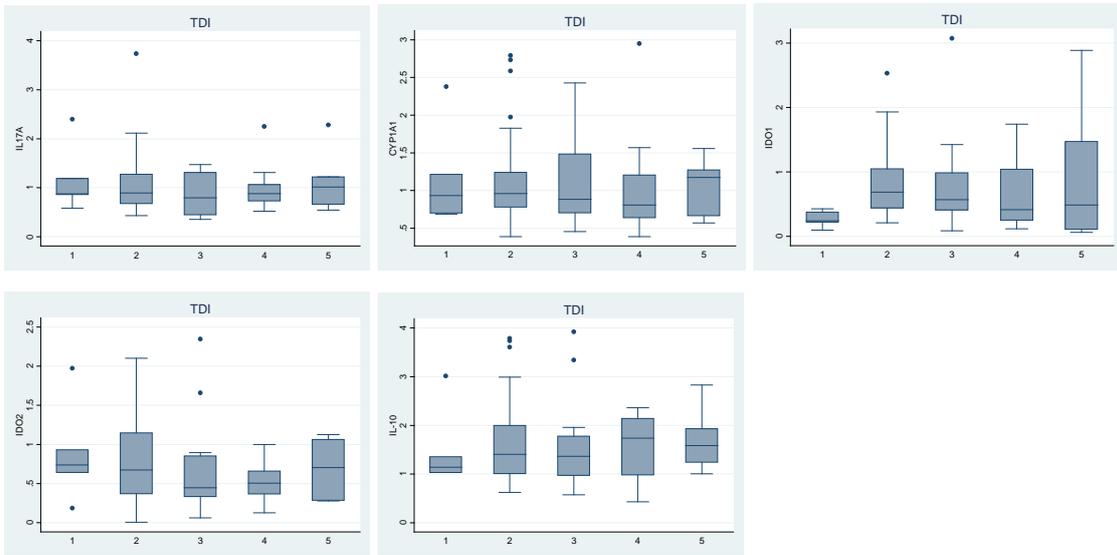
class1(-):  $0 \mu\text{g/ml}$ , class2( $\pm$ ):  $>0, <3.125$ ,  
 class3(+):  $\geq 3.125, <6.25$  class4( $\#$ ):  $\geq 6.25, <12.5$ ,  
 class5( $\#\#$ ):  $\geq 12.5$

\* サイトカインの種類 \*

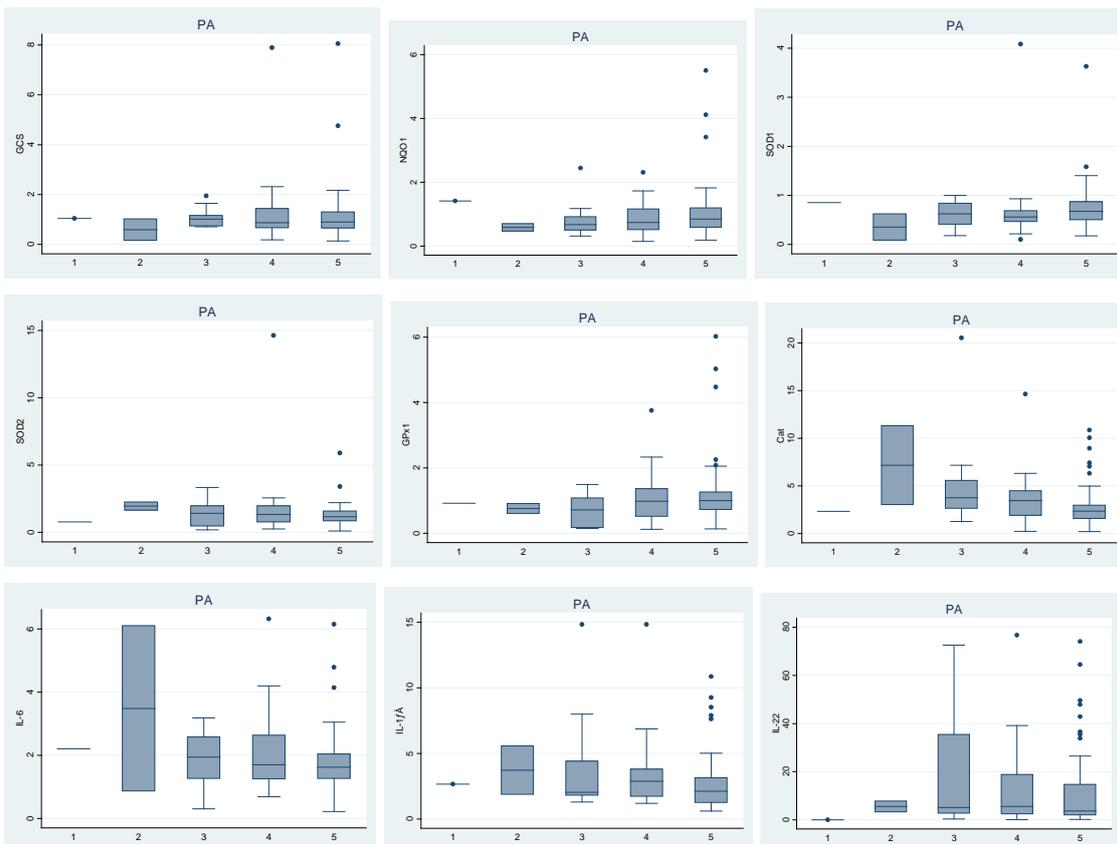
GCS NQ01 SOD1 SOD2 GPx1 Catarase  
 IL-6 IL-1 $\beta$  IL-22 CXCL7 IL-8b CXCL3 IL17A CYP1A1  
 IDO1 IDO2 IL-10

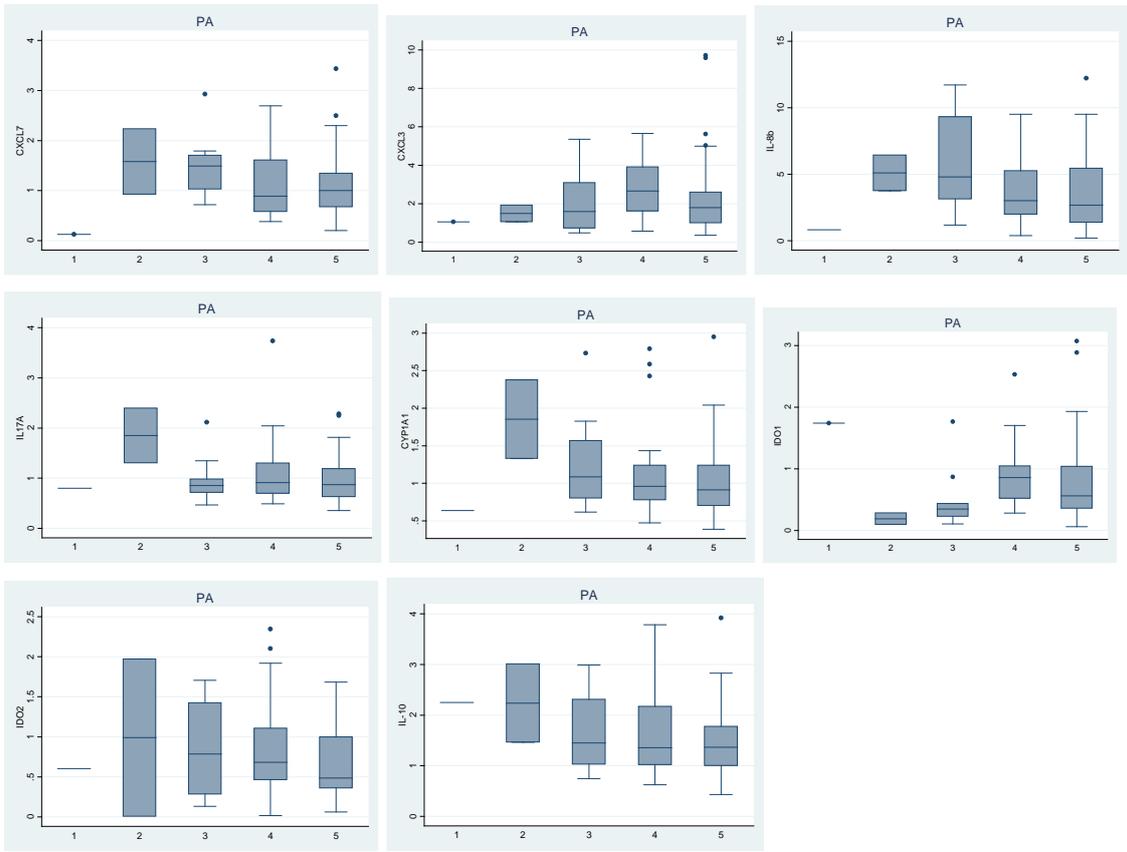
### ① TDI



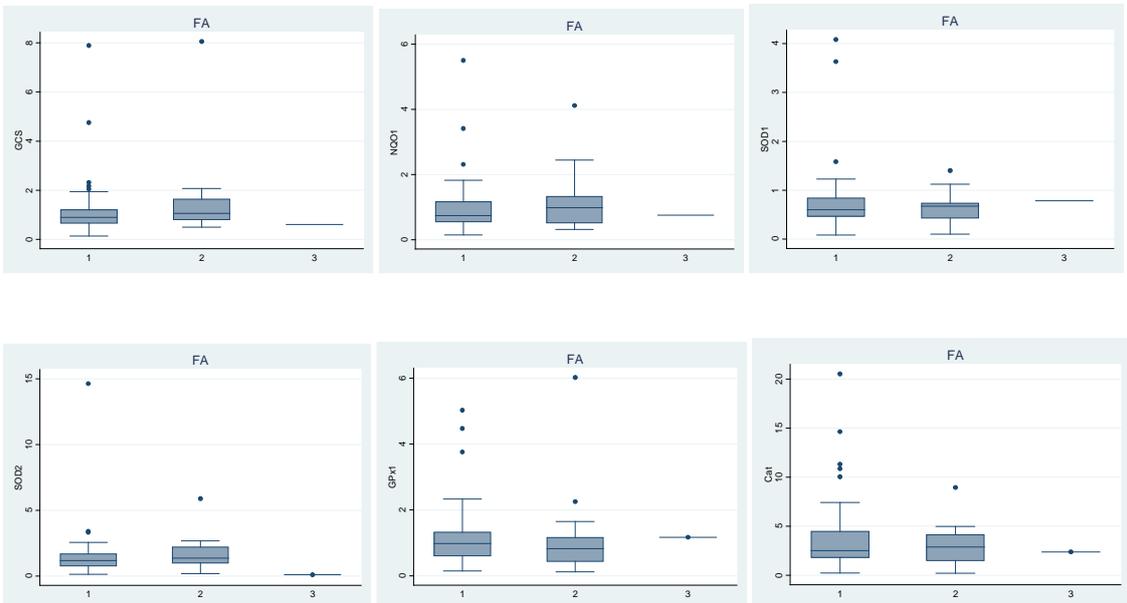


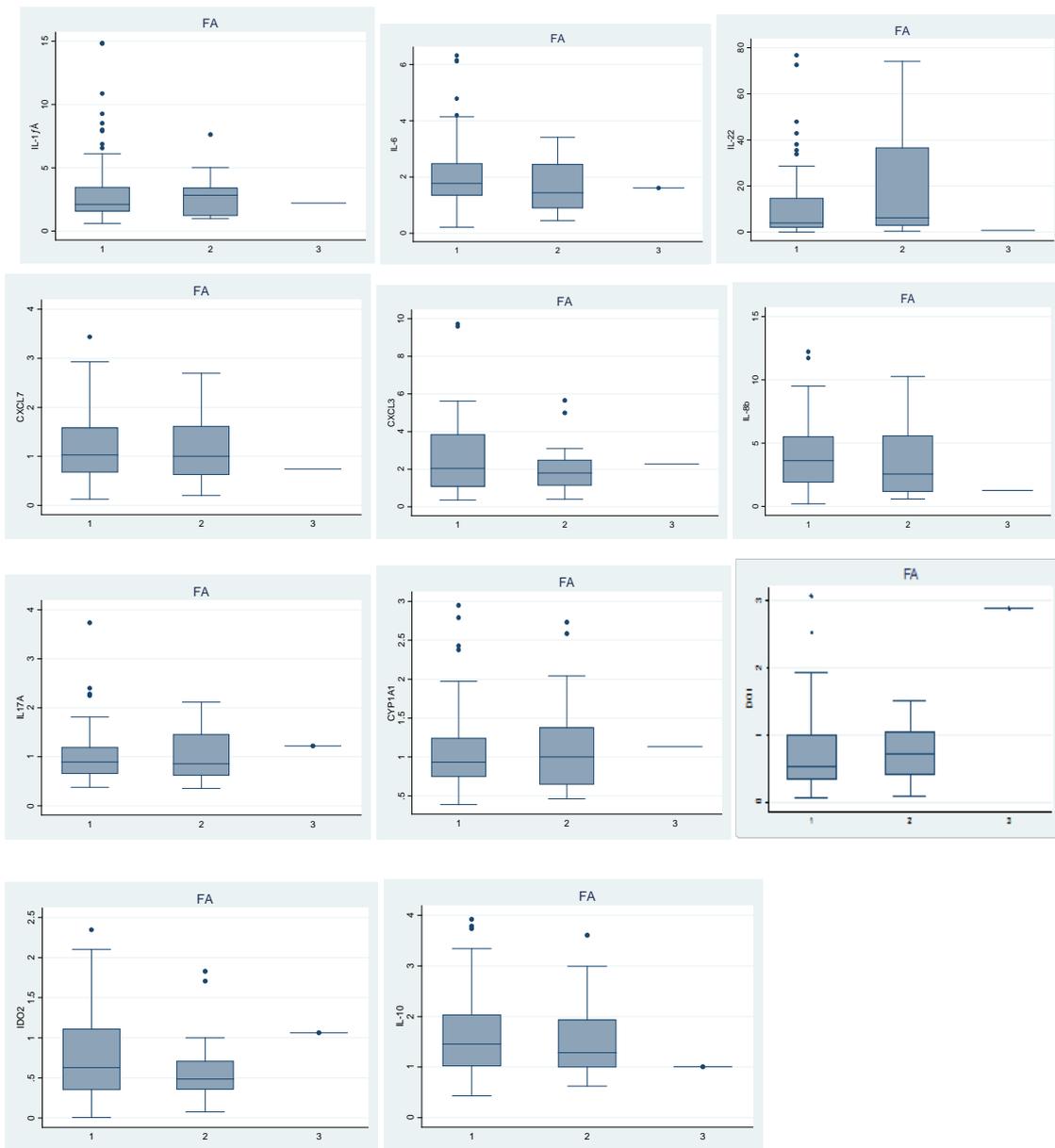
② PA



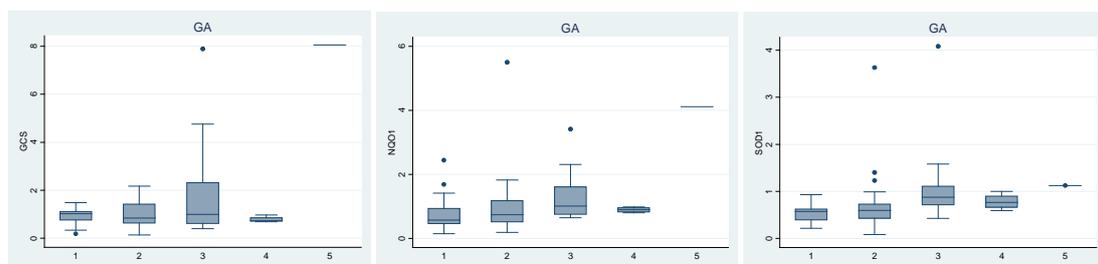


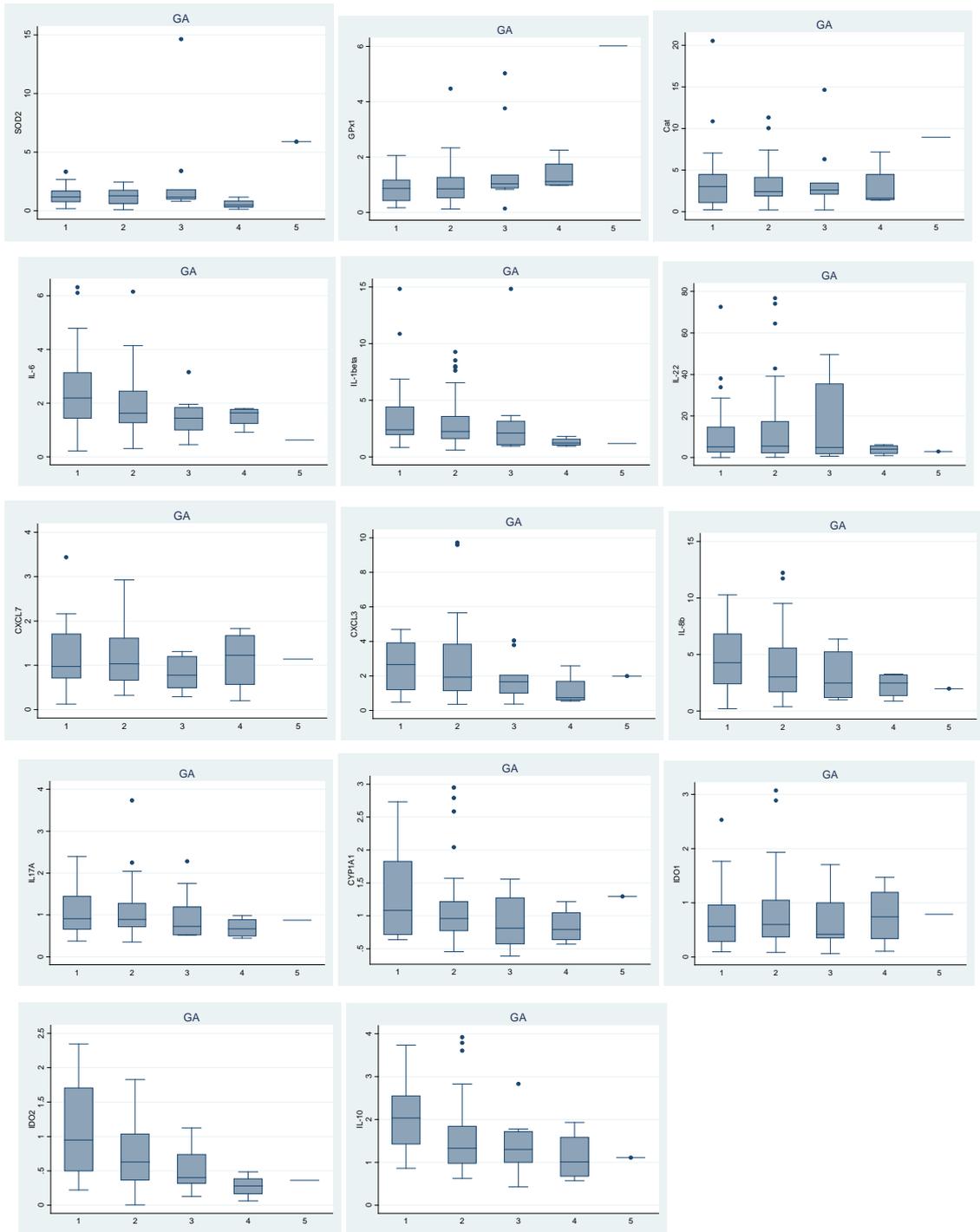
### ③ FA



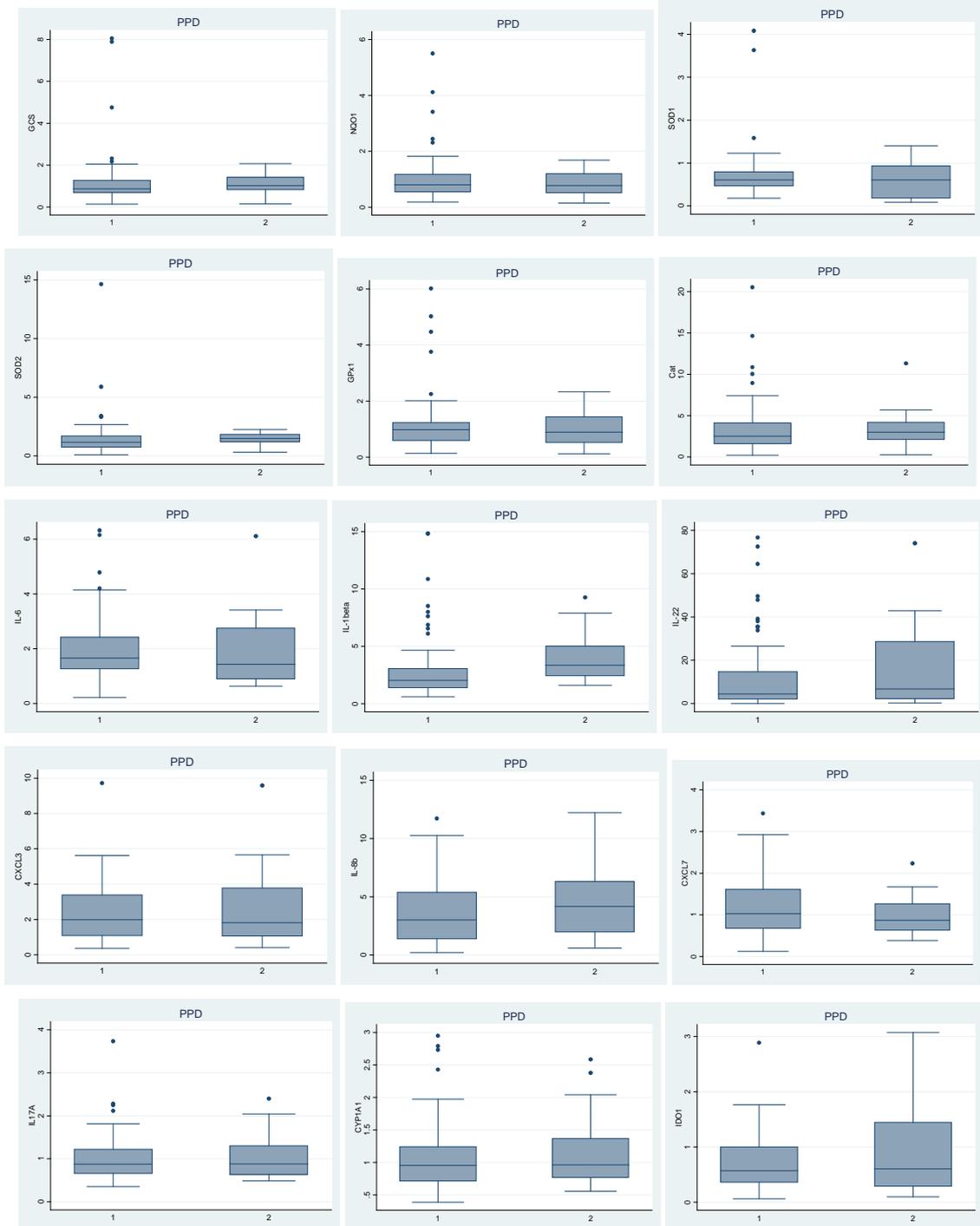


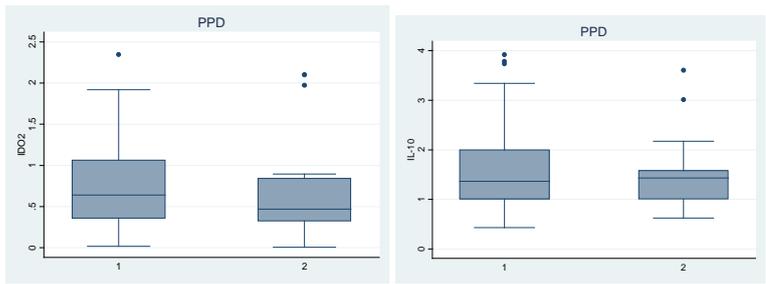
**④GA**



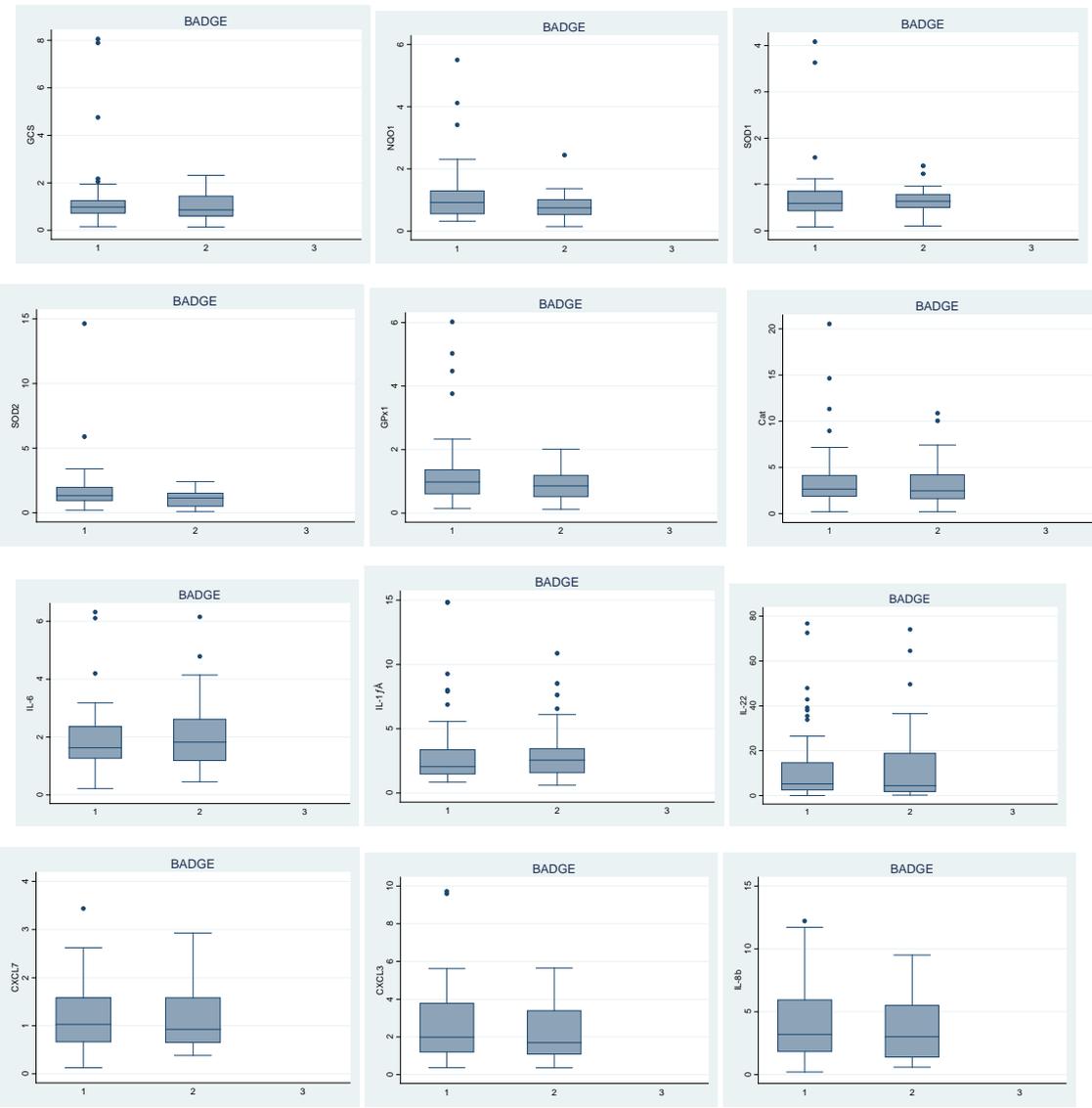


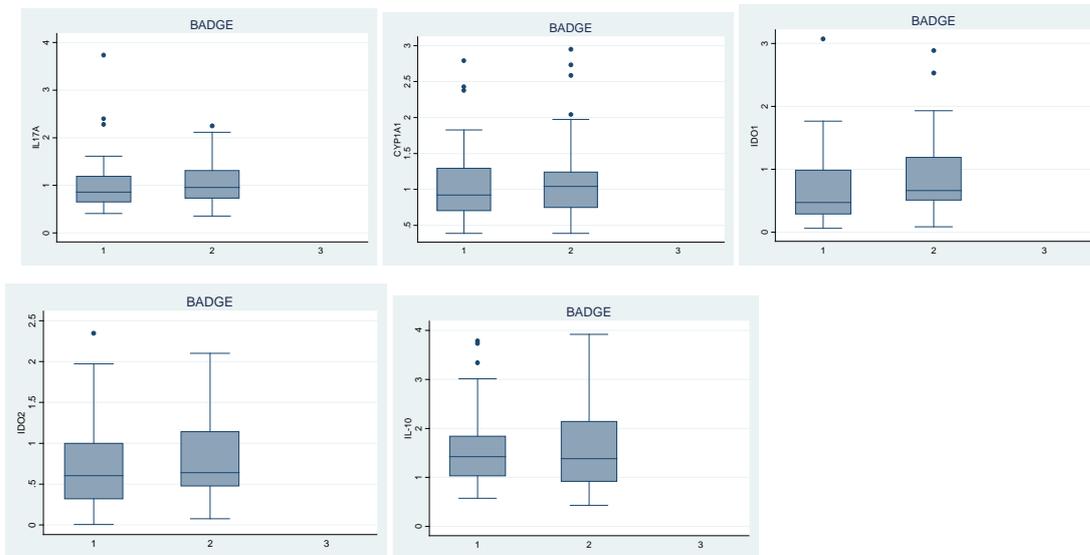
⑤PPD



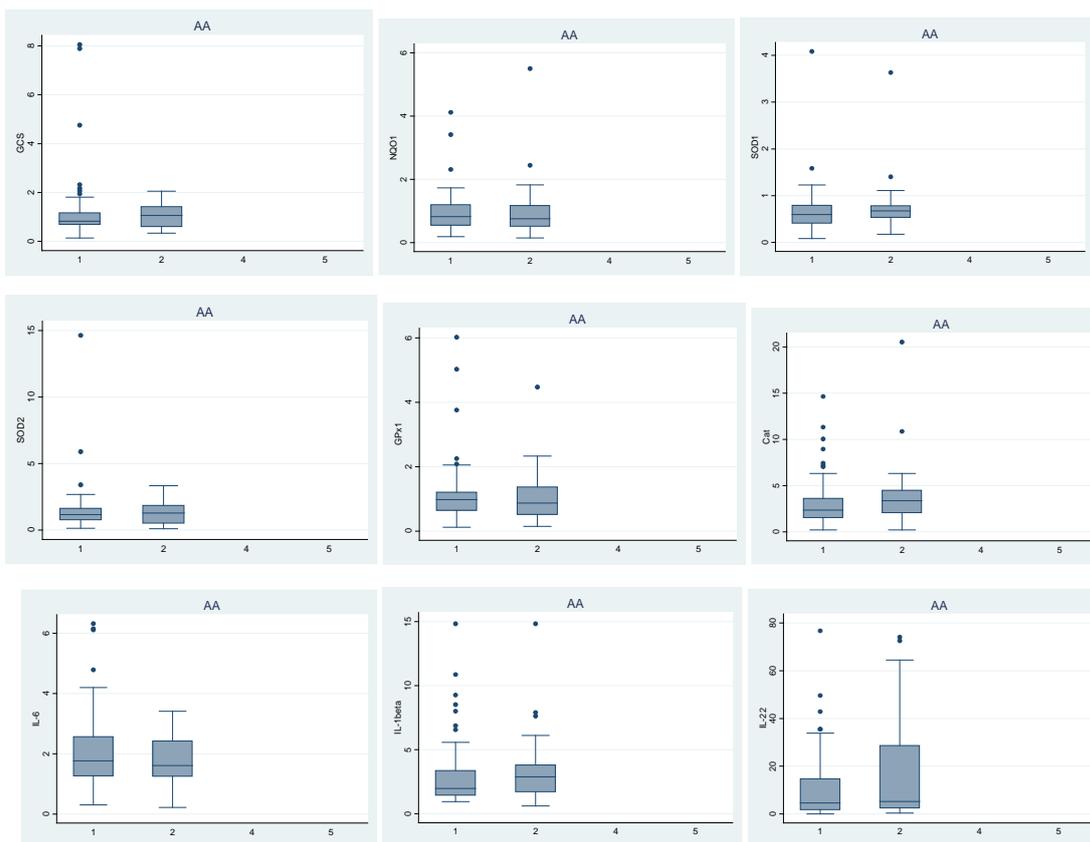


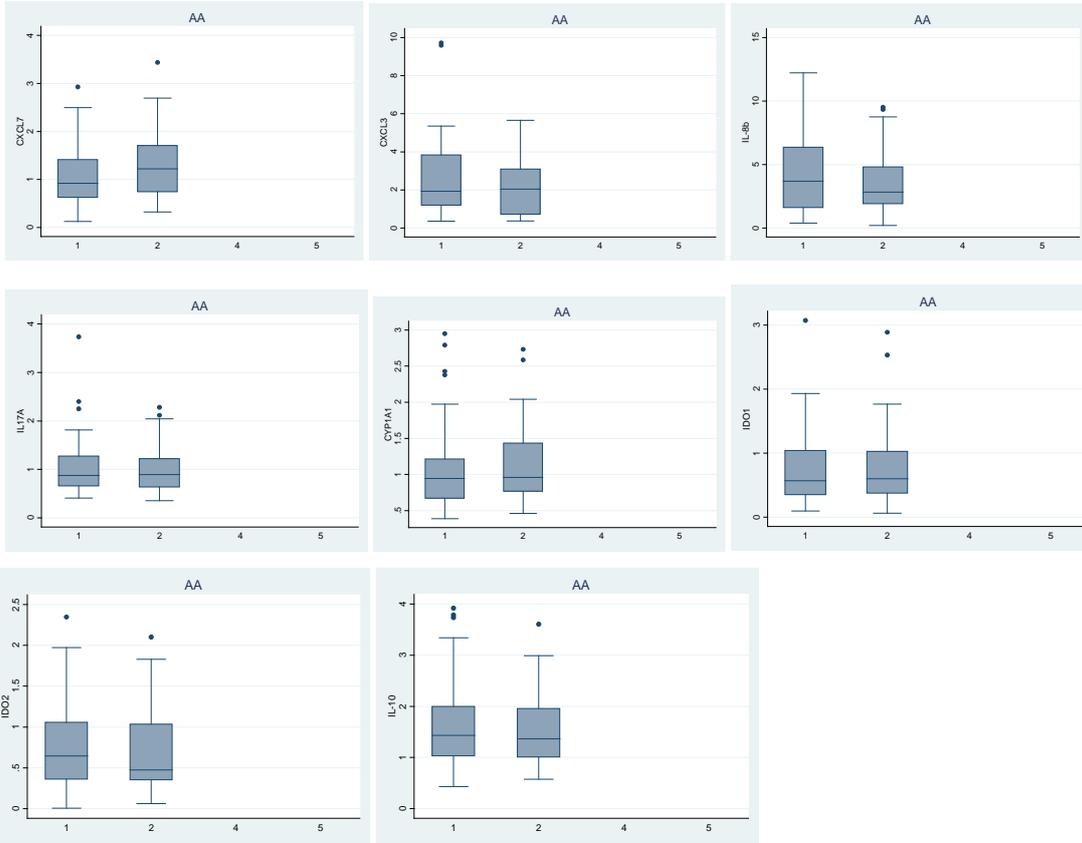
**⑥BADGE**



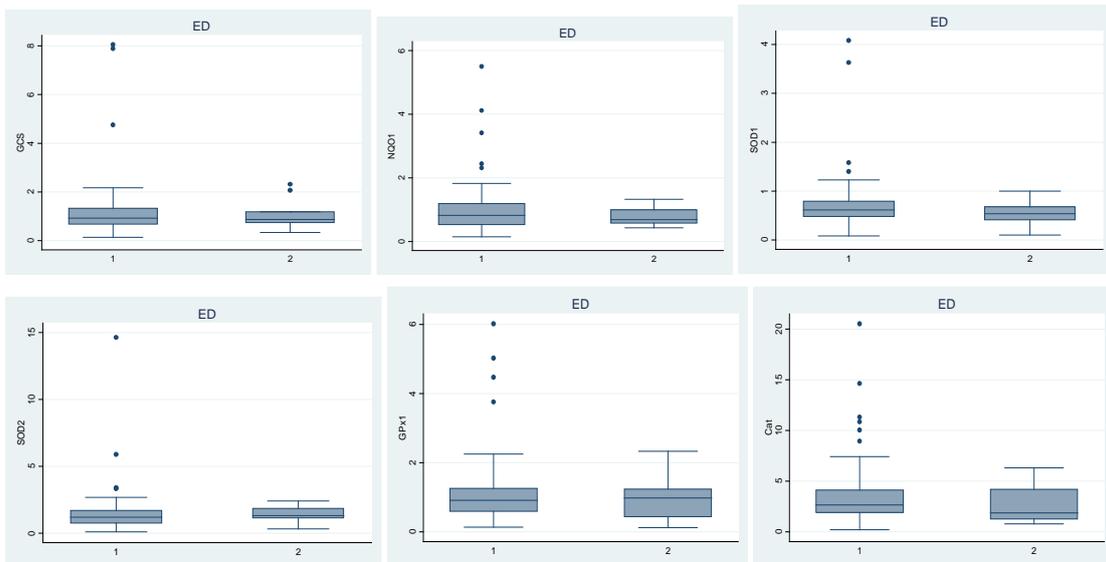


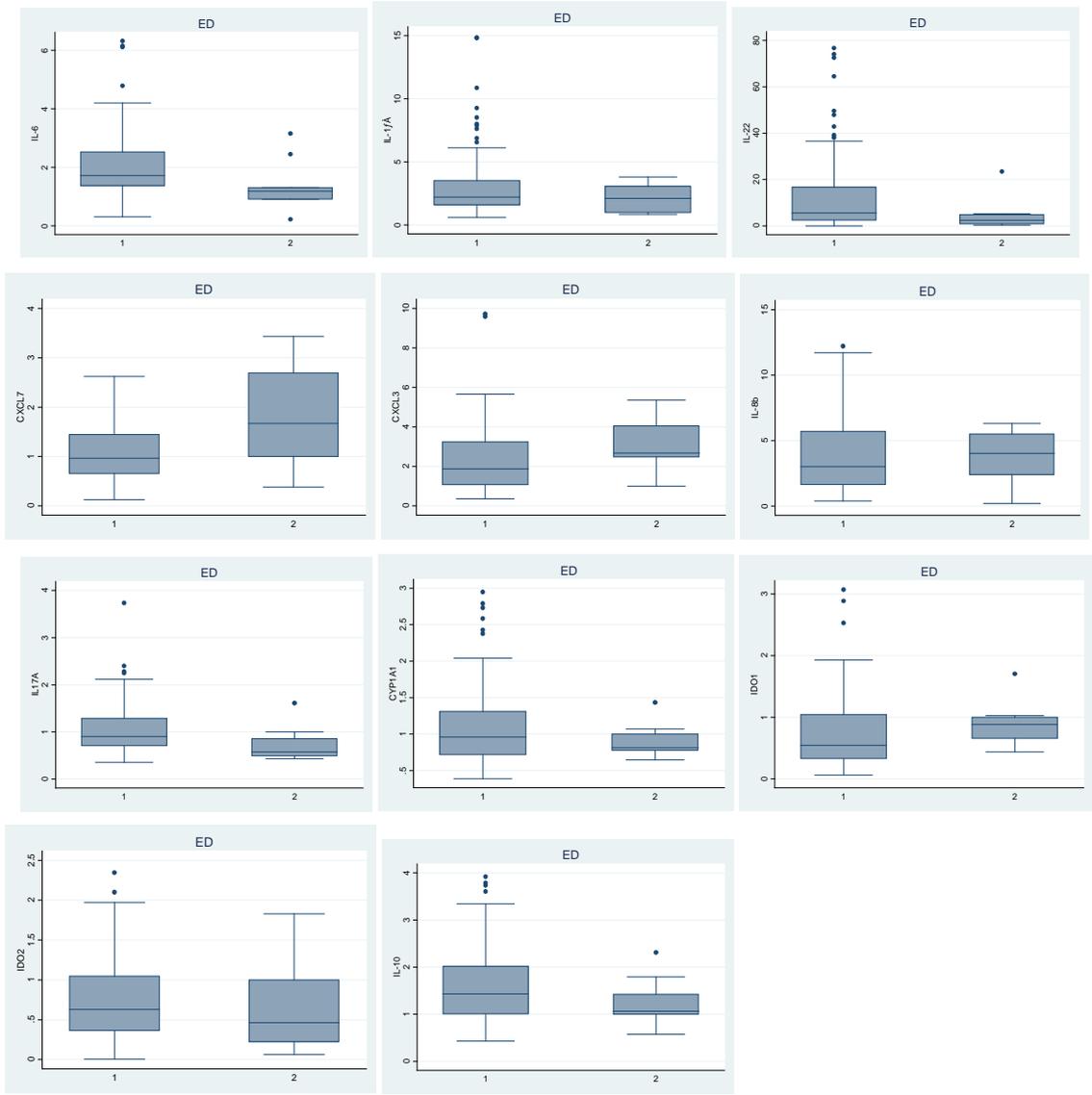
**AA**



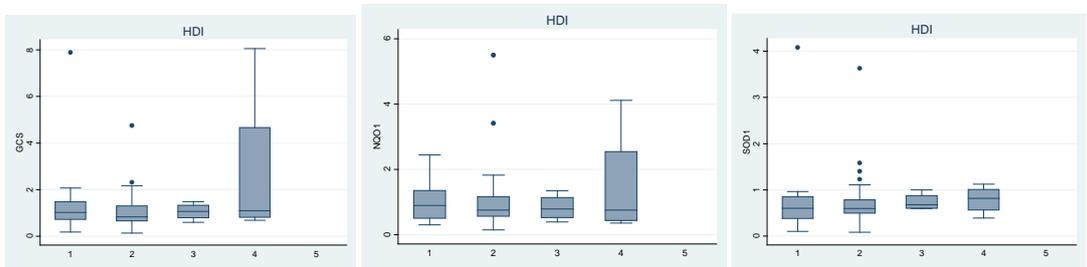


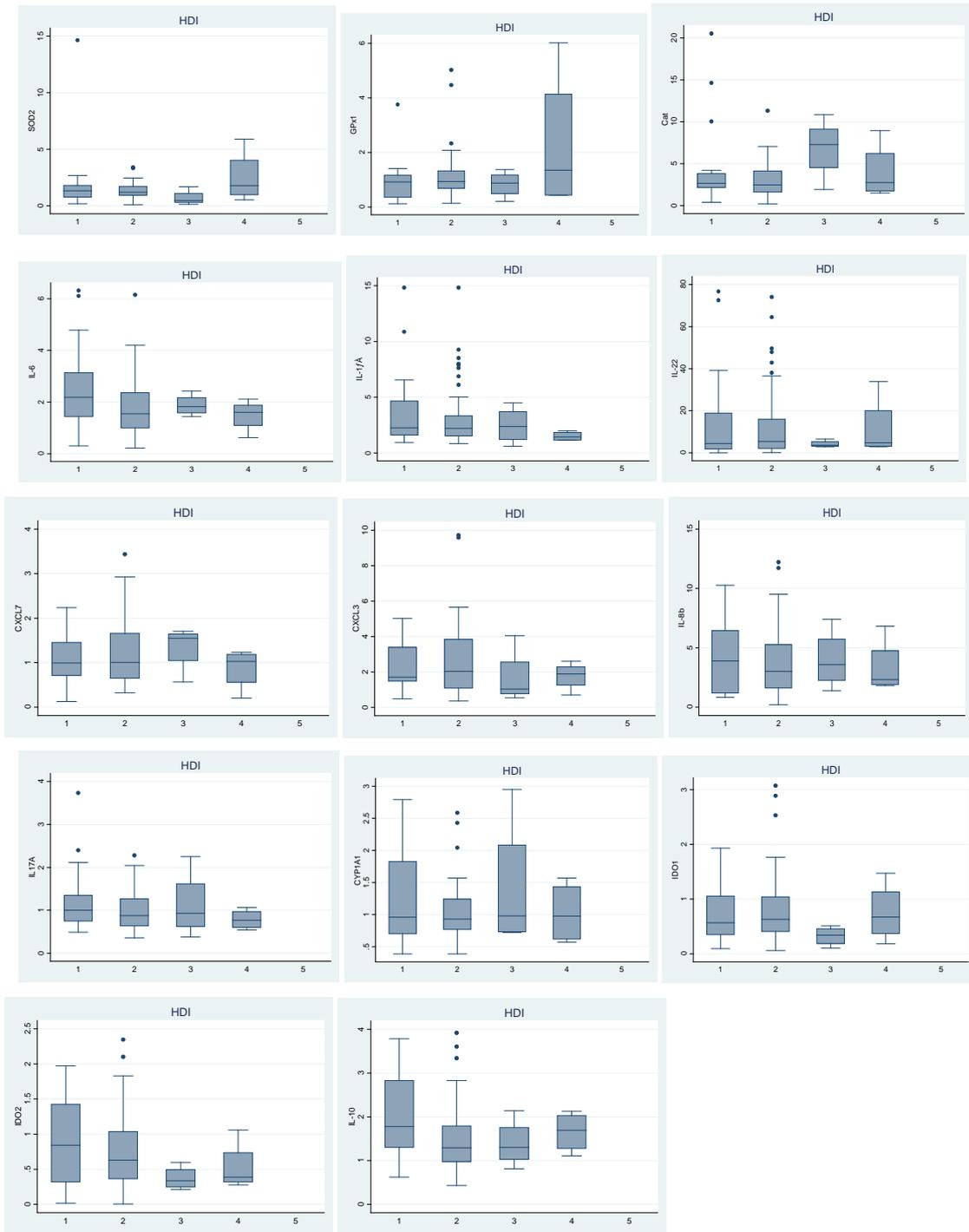
**ED**

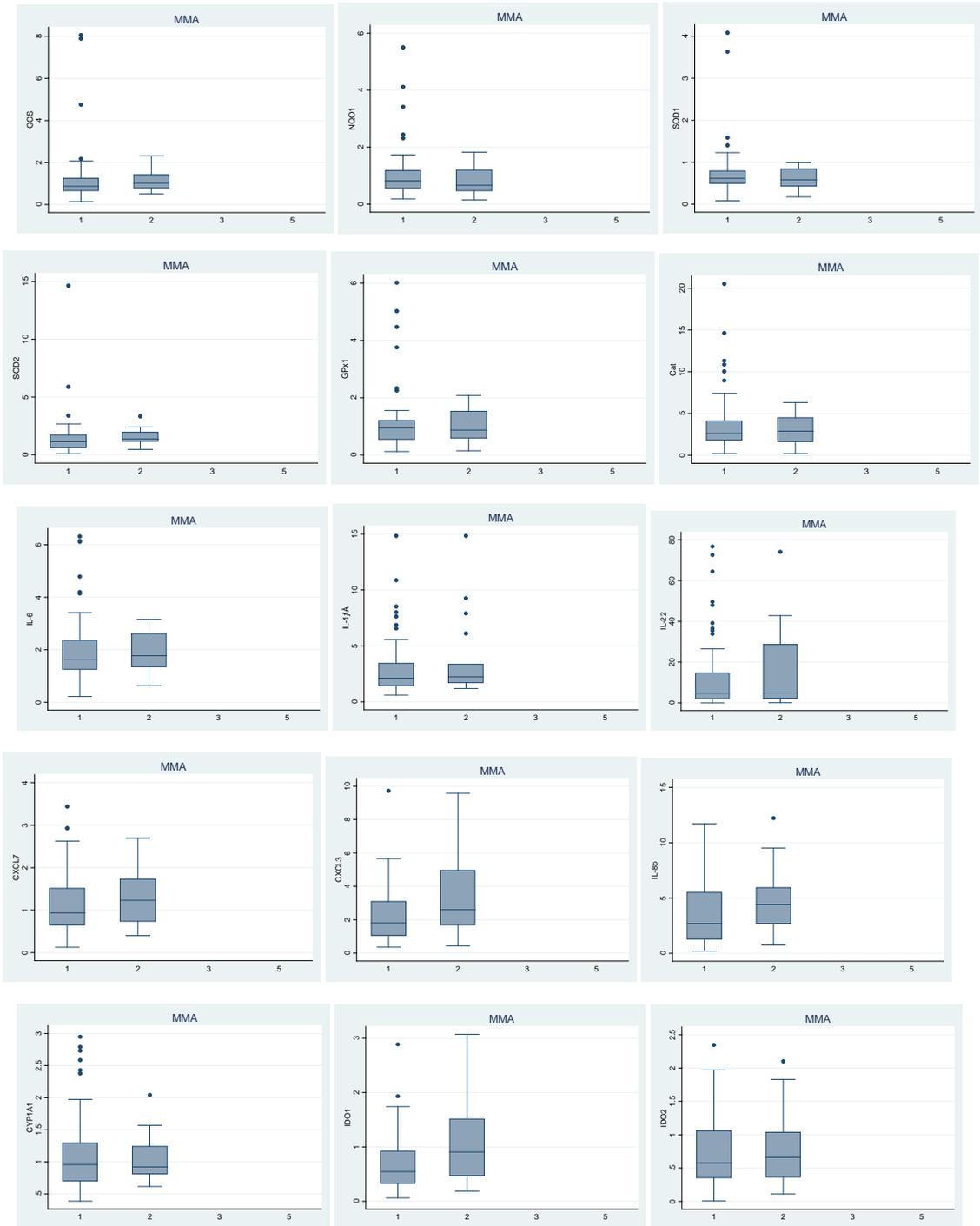


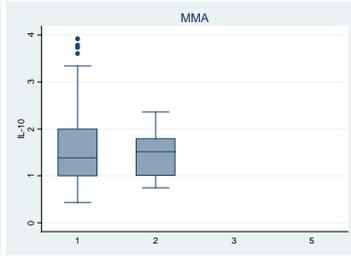
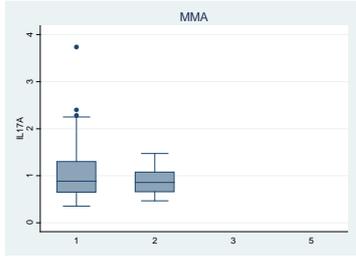


⑨HDI

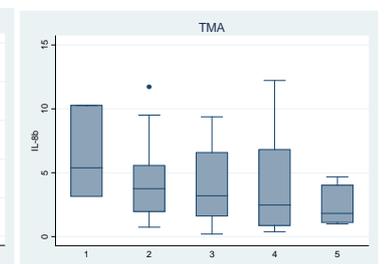
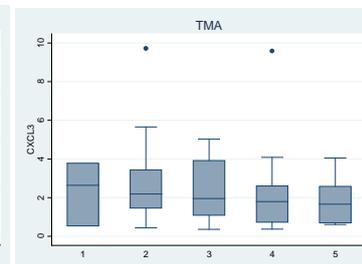
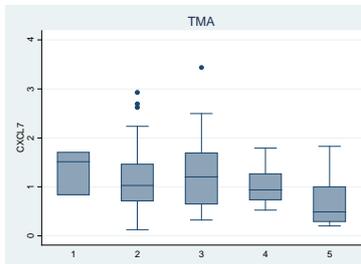
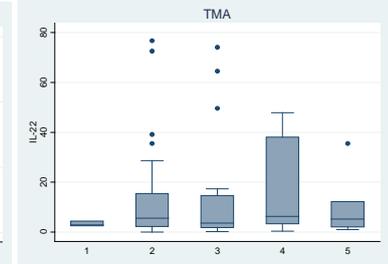
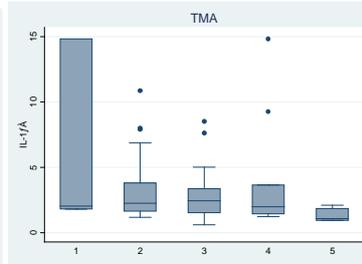
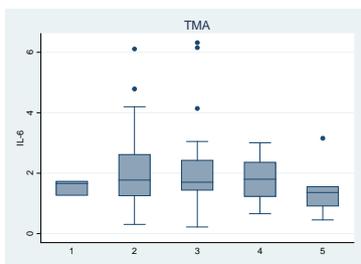
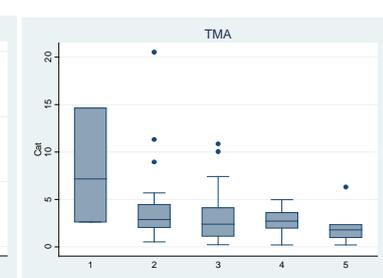
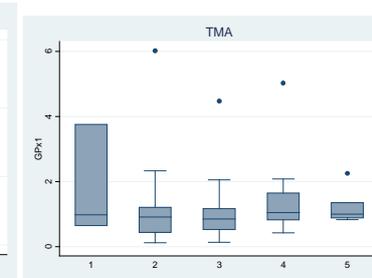
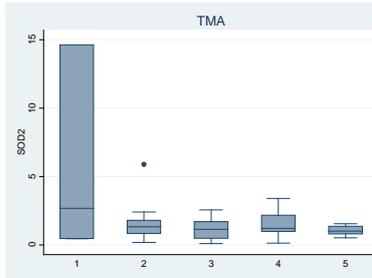
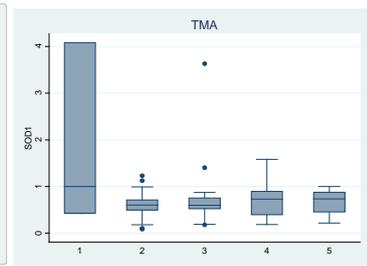
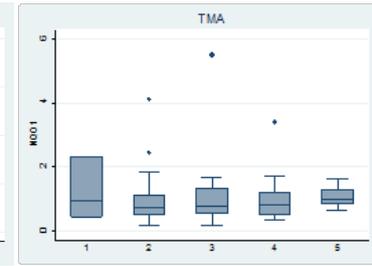
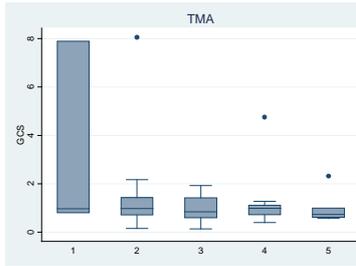


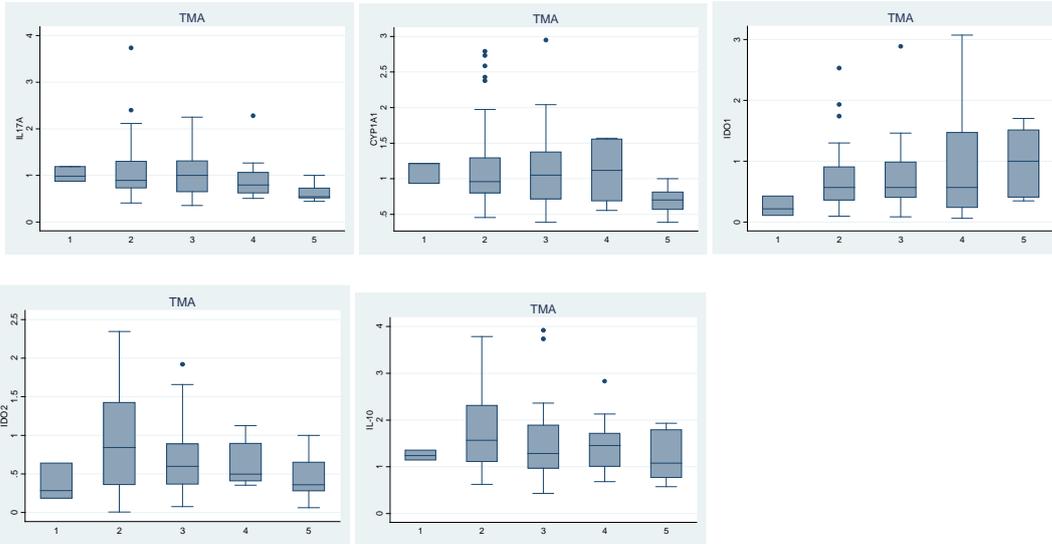




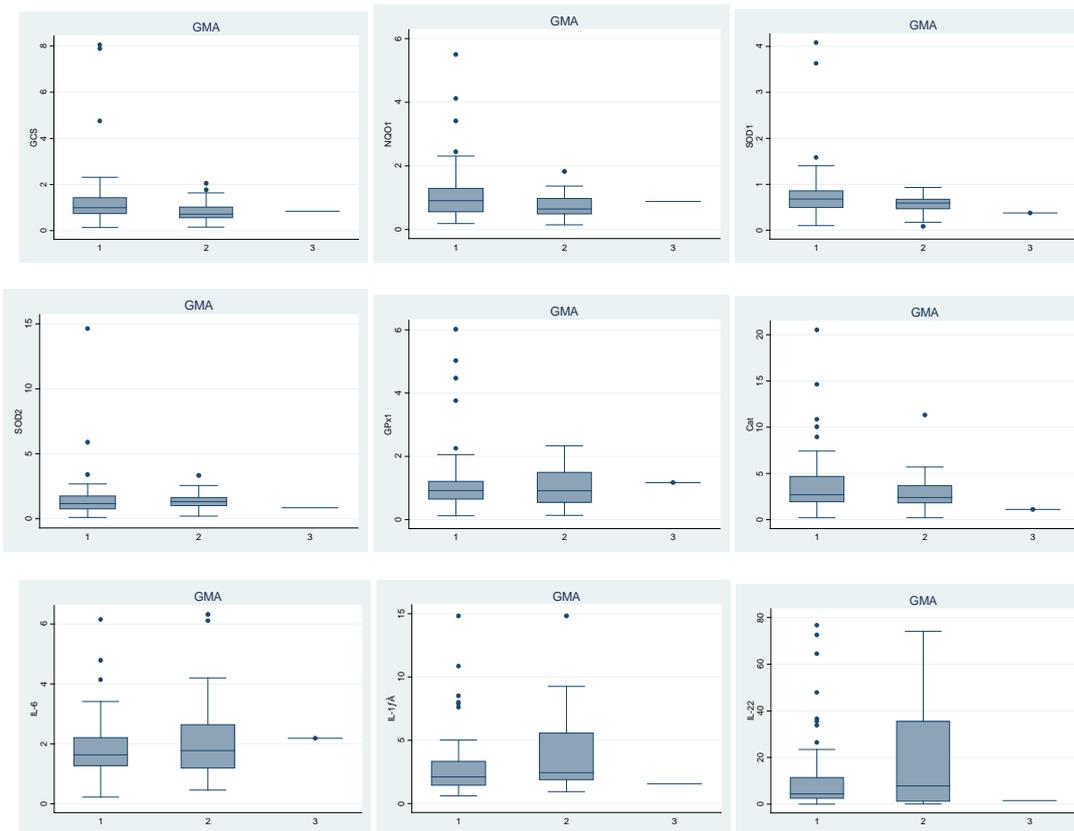


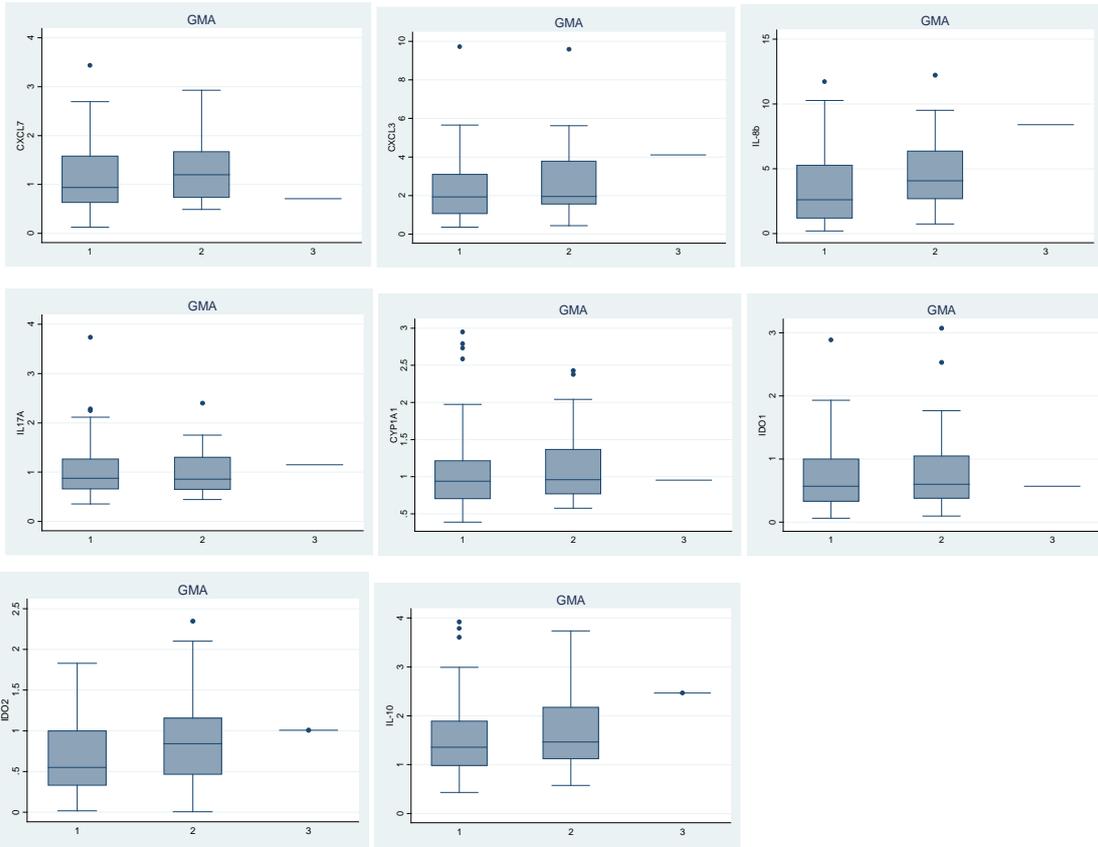
①TMA





**12 GMA**





## 2. b社 車両整備・板金・塗装会社

### A 質問票の結果

- ①主たる使用樹脂： ウレタン樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂等 複数の樹脂
- ② 対象者 43名(男性42名、女性1名)  
\*うち血液採取 35名
- ③ 年齢 mean (S.E.) 41.0 (0.8)
- ④ アレルギー疾患既往歴 なし 38名(88%) あり 5名(12%) (特に咳が出やすい)

#### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=43	%
吸わない	11	25
やめた	8	19
吸う	24	56

#### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=43	%
飲まない・機会飲酒	22	51
ほぼ毎日飲んでいる	21	49

### B 採取試料(血清)から得られた結果

#### (1) 総IgG値、総IgE値

	IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1194 (33)	180 (33)

#### (2) アレルギー既往歴別

アレルギー既往歴	総IgG(mg/dl)	総IgE(IU/ml)
	mean (S.E.)	mean (S.E.)
なし (N=30)	1204 (38)	184 (35)
あり (N=5)	1134 (45)	156 (104)

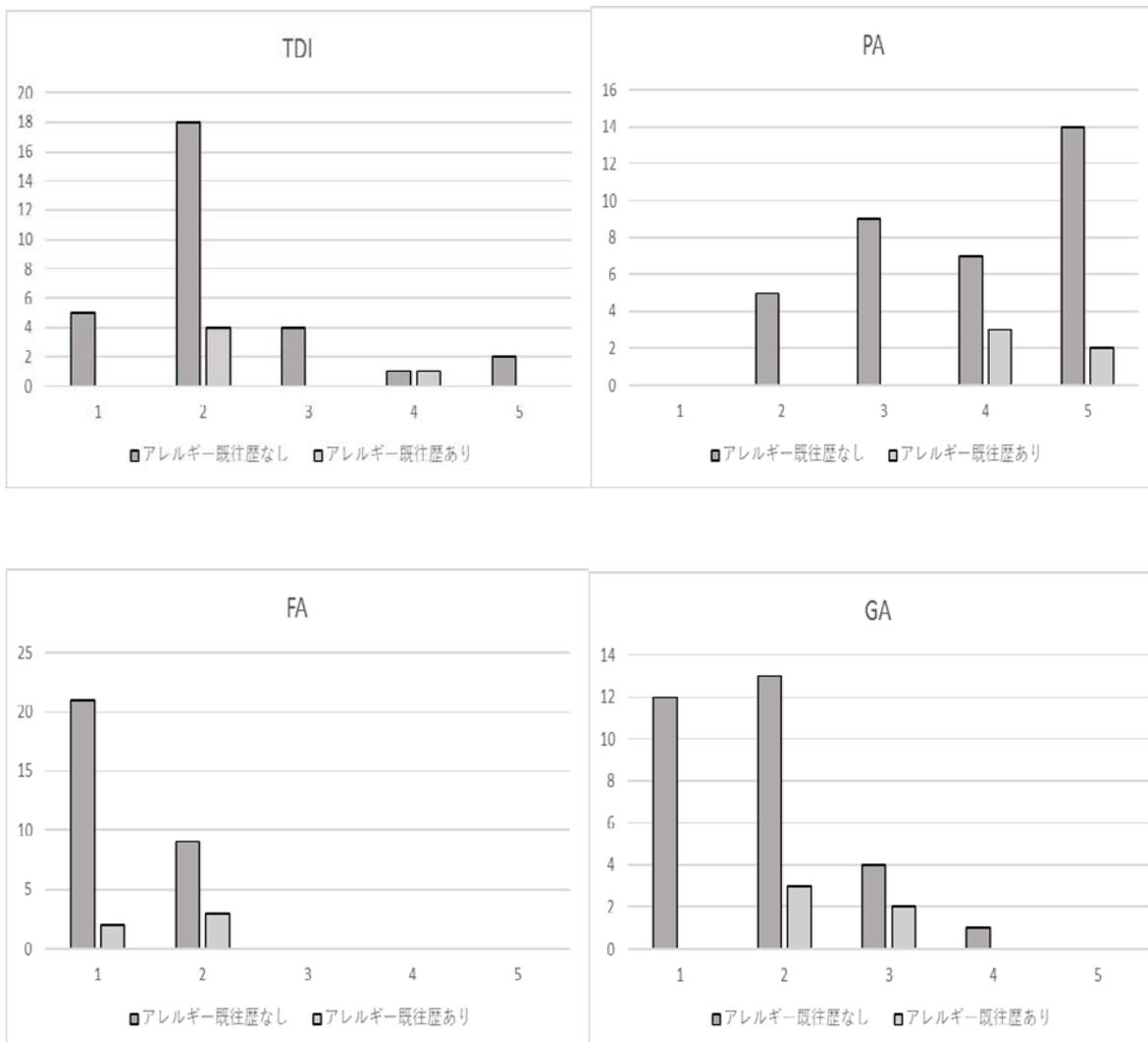
### (3)特異的 IgE 値

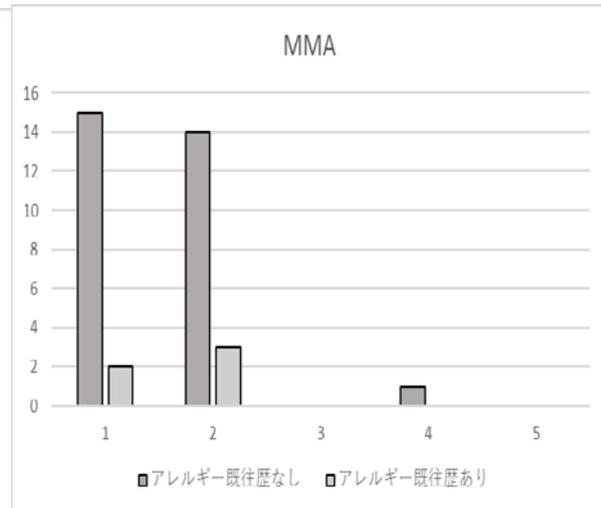
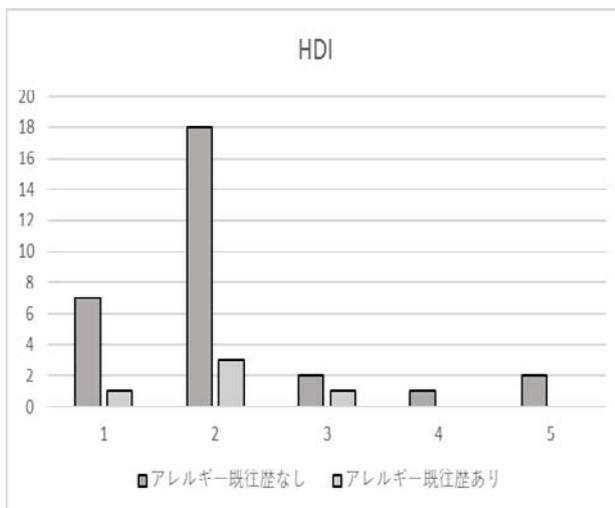
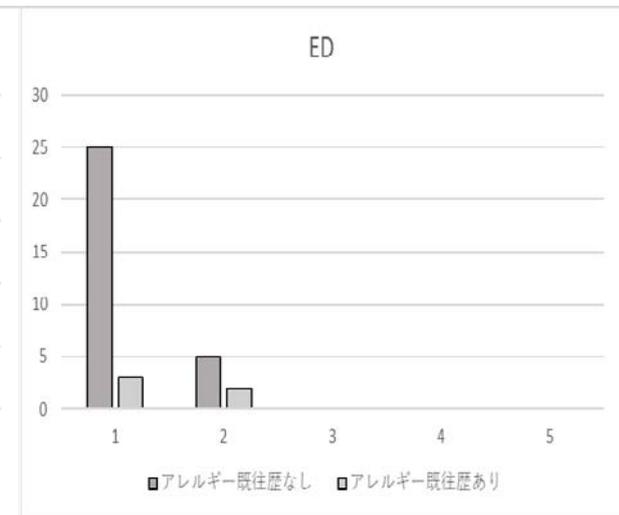
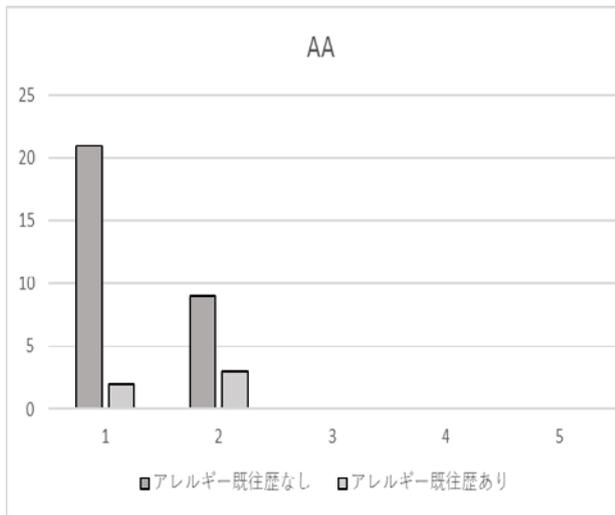
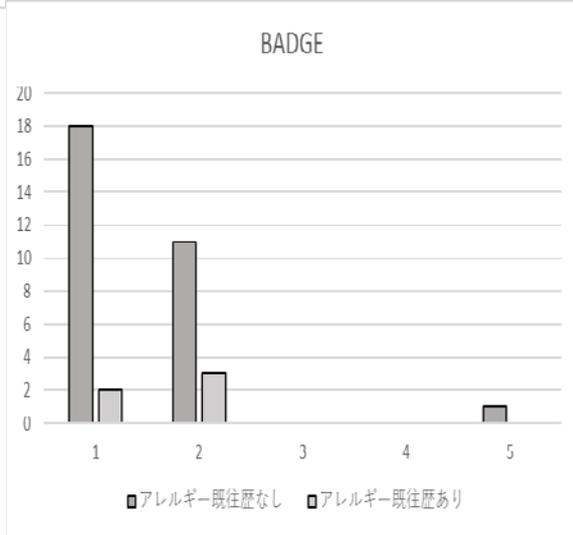
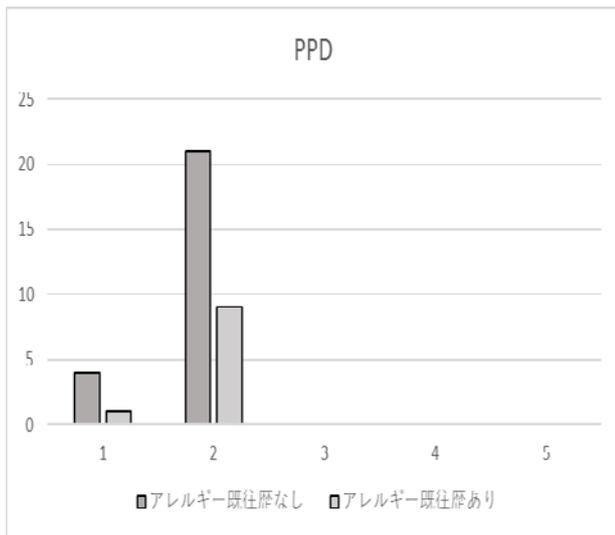
	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	34	1
FA	35	0
PA	35	0

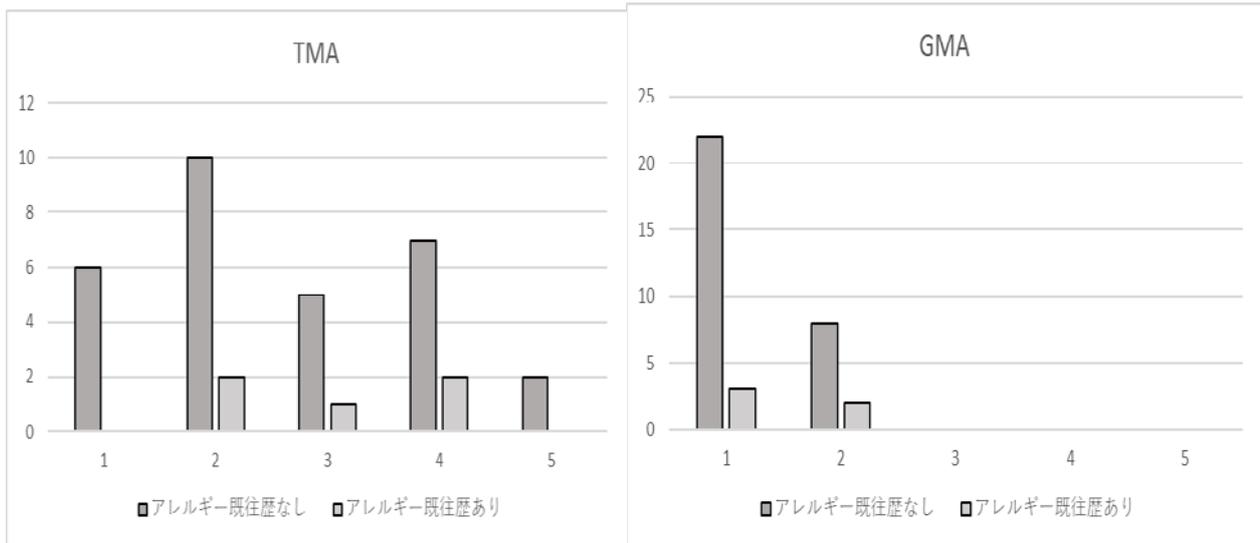
### (4)特異的 IgG 値 と アレルギー既往歴

\* 特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ ) のクラス分け基準 \*

class1(-):  $0\mu\text{g/ml}$ , class2(±):  $>0, <3.125$ , class3(+):  $\geq 3.125, <6.25$   
class4(≡):  $\geq 6.25, <12.5$ , class5(≡):  $\geq 12.5$







### (5)特異的 IgG 値の一般人・b 社比較

#### TDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	44	5	1.00	(ref)	
>0, <3.125	102	22	1.38	0.45-4.16	0.572
$\geq 3.125$ , <6.25	19	4	2.05	0.43-9.87	0.370
$\geq 6.25$ , <12.5	7	2	1.29	0.19-9.06	0.795
$\geq 12.5$	11	2	1.06	0.16-7.05	0.952

#### PA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	6	0	—		
>0, <3.125	15	5	2.90	0.75-11.2	0.121
$\geq 3.125$ , <6.25	35	9	1.74	0.63-4.86	0.284
$\geq 6.25$ , <12.5	53	7	0.80	0.28-2.27	0.673
$\geq 12.5$	74	14	1.00	(ref)	

## FA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	128	23	1.00	(ref)	
>0, <3.125	53	12	1.01	0.44-2.32	0.976
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## GA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	61	12	1.00	(ref)	
>0, <3.125	97	16	0.74	0.31-1.78	0.507
$\geq$ 3.125, <6.25	19	6	1.61	0.44-5.87	0.473
$\geq$ 6.25, <12.5	5	1	1.42	0.12-16.6	0.778
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	140	25	1.00	(ref)	
>0, <3.125	43	10	1.08	0.45-2.58	0.863
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	133	20	1.00	(ref)	
>0, <3.125	49	14	1.63	0.72-3.69	0.240
$\geq$ 3.125, <6.25	1	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	1	—		

## AA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	118	23	1.00	(ref)	
>0, <3.125	61	12	0.82	0.36-1.86	0.632
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## ED

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	137	28	1.00	(ref)	
>0, <3.125	45	7	0.63	0.24-1.64	0.344
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	49	8	1.00	(ref)	
>0, <3.125	112	21	1.01	0.39-2.62	0.982
$\geq$ 3.125, <6.25	12	3	1.20	0.22-6.43	0.830
$\geq$ 6.25, <12.5	8	1	0.47	0.05-4.66	0.516
$\geq$ 12.5	1	2	36.5	0.71-1868	0.073

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	116	17	1.00	(ref)	
>0, <3.125	63	17	1.31	0.59-2.91	0.504
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	1	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## TMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	32	6	1.00	(ref)	
>0, <3.125	78	12	0.83	0.27-2.60	0.751
$\geq$ 3.125, <6.25	37	6	0.73	0.19-2.75	0.640
$\geq$ 6.25, <12.5	19	9	2.60	0.70-9.62	0.153
$\geq$ 12.5	15	2	0.57	0.09-3.60	0.550

## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	b 社(N=35)	OR	95%CI	P 値*
0	130	25	1.00	(ref)	
>0, <3.125	52	10	0.88	0.37-2.10	0.769
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

### 3. c 社 自動車関連会社 (塗装)

#### A 質問票の結果

- ①主たる使用樹脂: ポリアミド樹脂(Orgalloy® RS 66)、ポリプロピレン樹脂(NOVATEC-PP)、  
ポリエチレン樹脂、ウレタン樹脂等

その他製造工程から c 社で使用されていると予想される樹脂: メタクリル樹脂

- ② 対象者 97 名(男性) 3 名(女性)  
生産工程従事者(製品製造)
- ③ 年齢 mean (S.E.) 32.8 (0.7)
- ④ アレルギー疾患既往歴 なし 61 名(61%) あり 39 名(39%)

#### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=100	%
吸わない	28	28
やめた	15	15
吸う	57	57

#### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=98	%
飲まない・機会飲酒	55	56
ほぼ毎日飲んでいる	43	44

#### B 採取試料(血清)から得られた結果

##### (1) 総 IgG 値、総 IgE 値

	総 IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1271 (21)	243 (53)

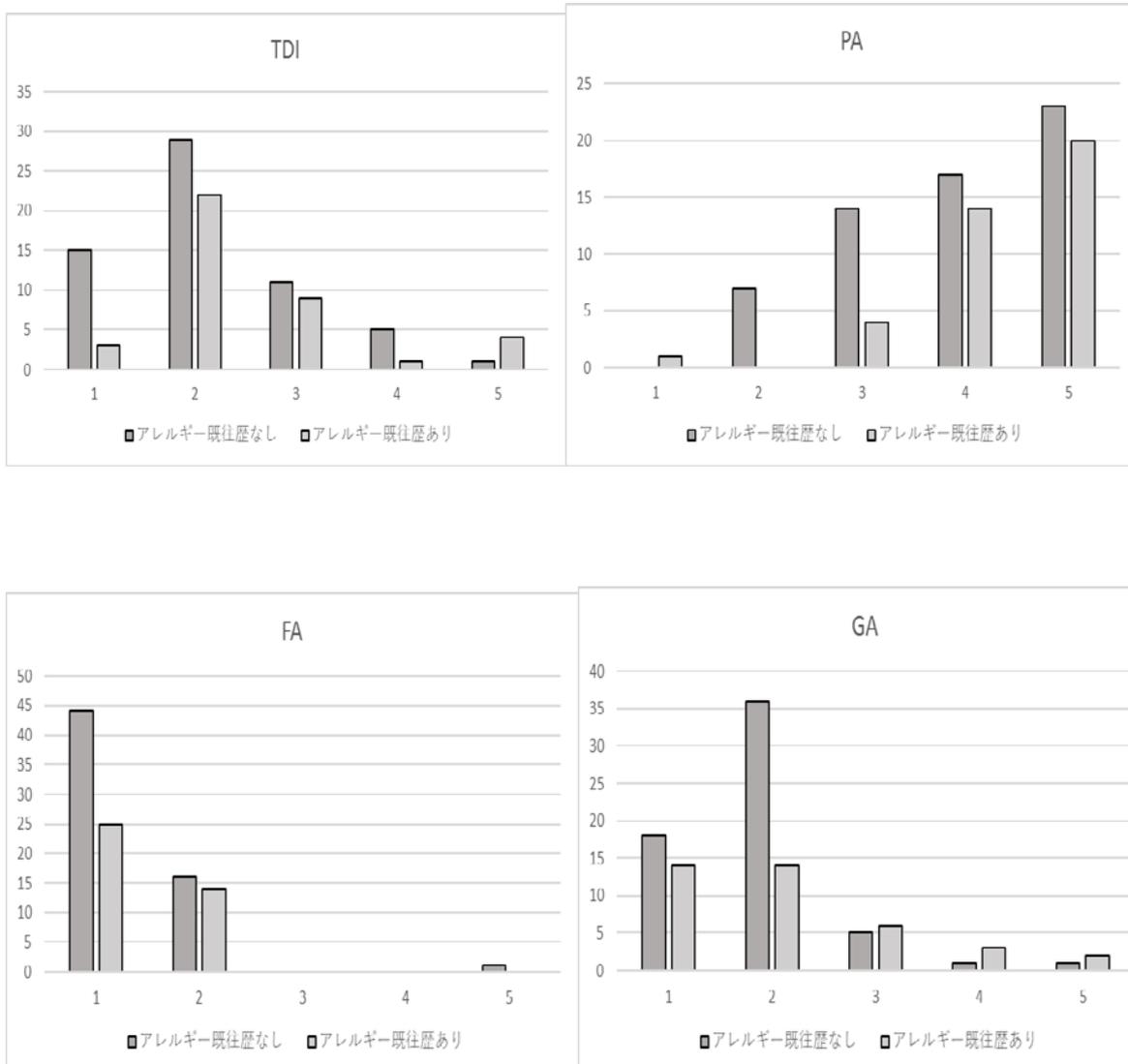
##### (2) アレルギー既往歴別

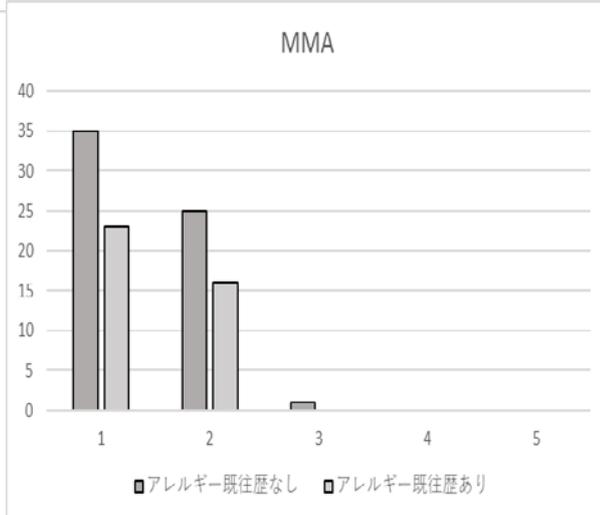
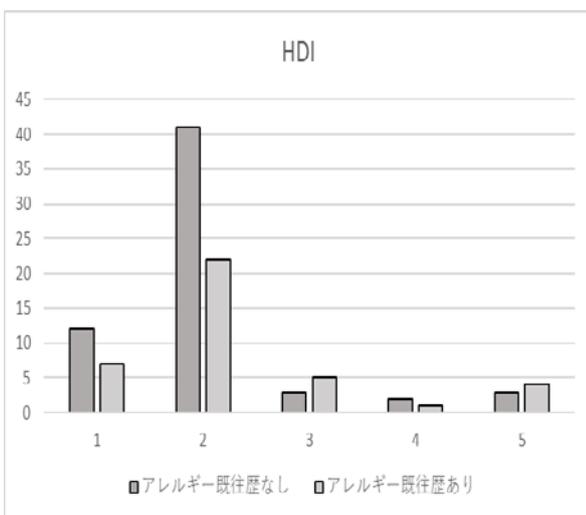
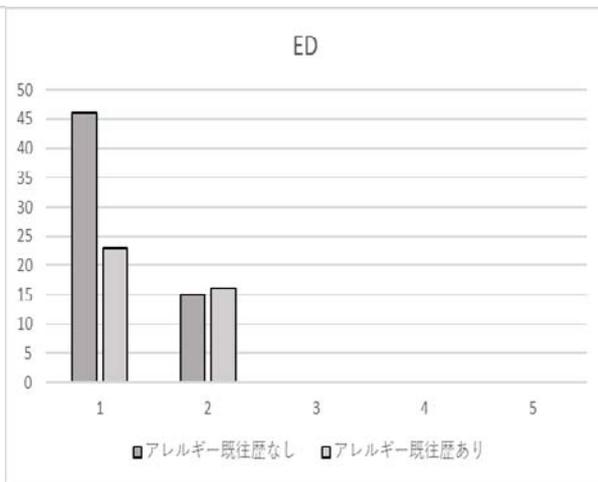
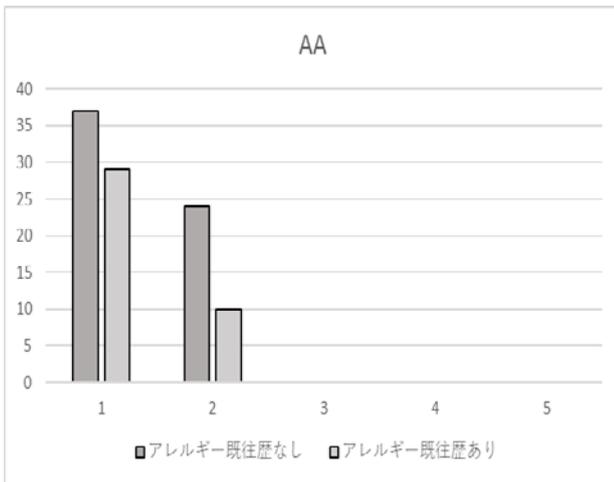
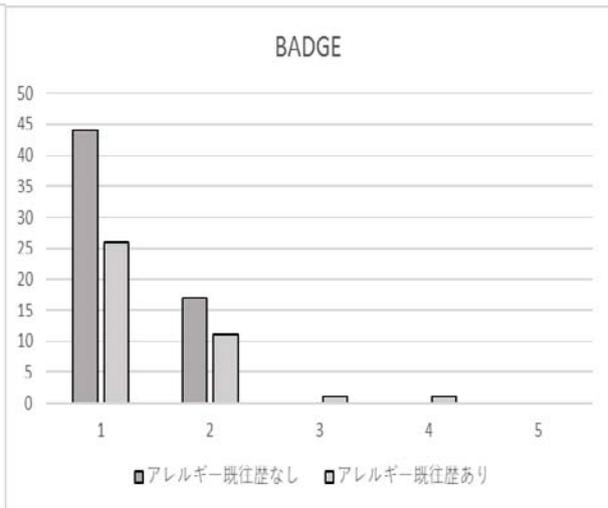
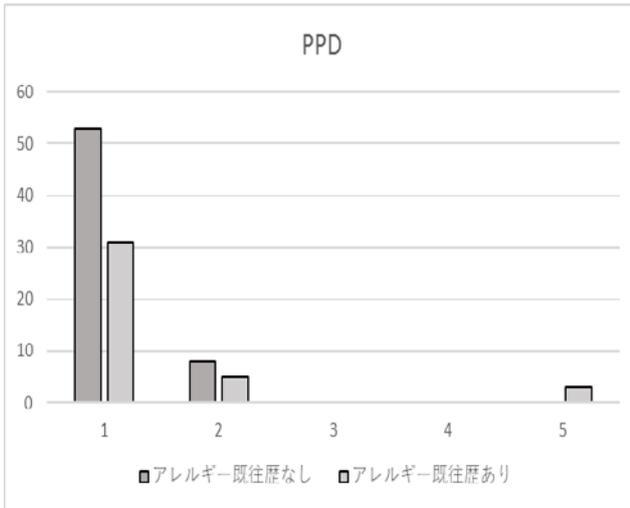
アレルギー既往歴	総 IgG(mg/dl)	総 IgE(IU/ml)
	mean(S.E.)	mean(S.E.)
なし (N=61)	1161(28)	180(41)
あり (N=39)	1186(33)	340(118)

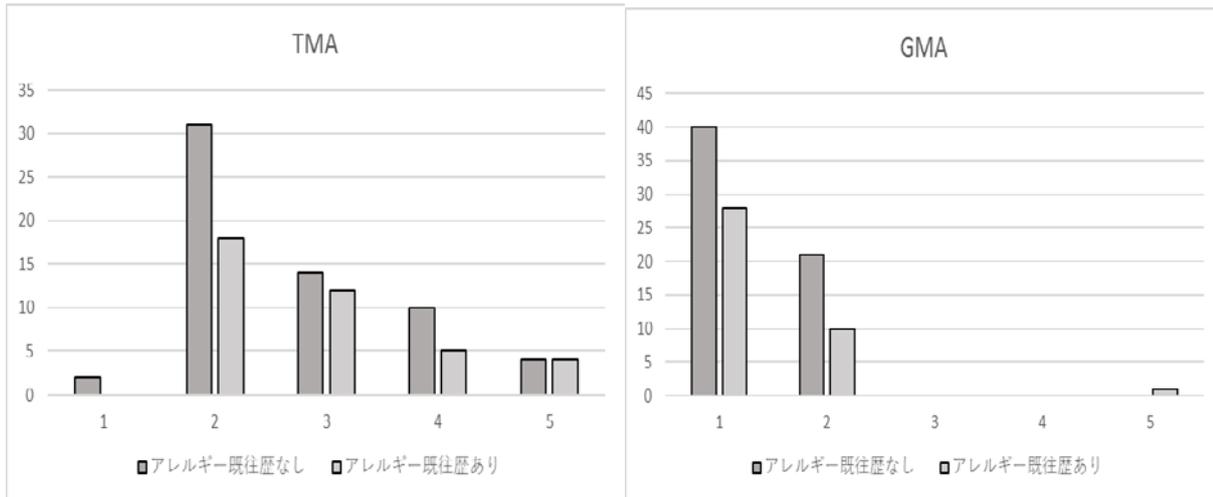
### (3) 特異的 IgE 値

	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	93	7
FA	96	4
PA	97	3

### (4) 特異的 IgG 値 と アレルギー既往歴







### (5) 特異的 IgG 値の一般人・c 社比較

#### TDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	44	18	1.00	(ref)	
>0, <3.125	102	51	0.85	0.34-2.12	0.724
$\geq 3.125$ , <6.25	19	20	2.35	0.67-8.25	0.181
$\geq 6.25$ , <12.5	7	6	0.75	0.15-3.82	0.725
$\geq 12.5$	11	5	0.37	0.08-1.76	0.213

#### PA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	6	1	1.00	(ref)	
>0, <3.125	15	7	10.8	0.54-215	0.120
$\geq 3.125$ , <6.25	35	18	7.38	0.48-113	0.151
$\geq 6.25$ , <12.5	53	31	9.71	0.65-145	0.100
$\geq 12.5$	74	43	5.70	0.40-81.6	0.200

### FA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	128	69	1.00	(ref)	
>0, <3.125	53	30	0.79	0.38-1.65	0.528
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	1	—		

### GA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	61	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	97	50	0.85	0.38-1.65	0.656
$\geq$ 3.125, <6.25	19	11	0.74	0.40-1.78	0.644
$\geq$ 6.25, <12.5	5	4	1.06	0.21-0.13	0.954
$\geq$ 12.5	1	3	2.00	0.14-28.3	0.608

### PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	140	84	1.00	(ref)	
>0, <3.125	43	13	0.34	0.14-0.36	0.023
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	3	—		

### BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	133	70	1.00	(ref)	
>0, <3.125	49	28	1.00	0.45-2.09	1.000
$\geq$ 3.125, <6.25	1	1	1.57	0.03-74.3	0.819
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	1	—		

## AA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=183)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	118	66	1.00	(ref)	
>0, <3.125	61	34	1.04	0.51-2.13	0.907
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## ED

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	137	69	1.00	(ref)	
>0, <3.125	45	31	1.04	0.50-2.18	0.915
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	49	19	1.00	(ref)	
>0, <3.125	112	63	1.34	0.59-3.14	0.472
$\geq$ 3.125, <6.25	12	8	0.35	0.08-1.57	0.170
$\geq$ 6.25, <12.5	8	3	0.41	0.07-2.59	0.343
$\geq$ 12.5	1	7	56.3	0.09-35840	0.221

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	116	58	1.00	(ref)	
>0, <3.125	63	41	0.76	0.37-1.53	0.504
$\geq$ 3.125, <6.25	2	1	0.26	0.01-4.67	0.358
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## TMA

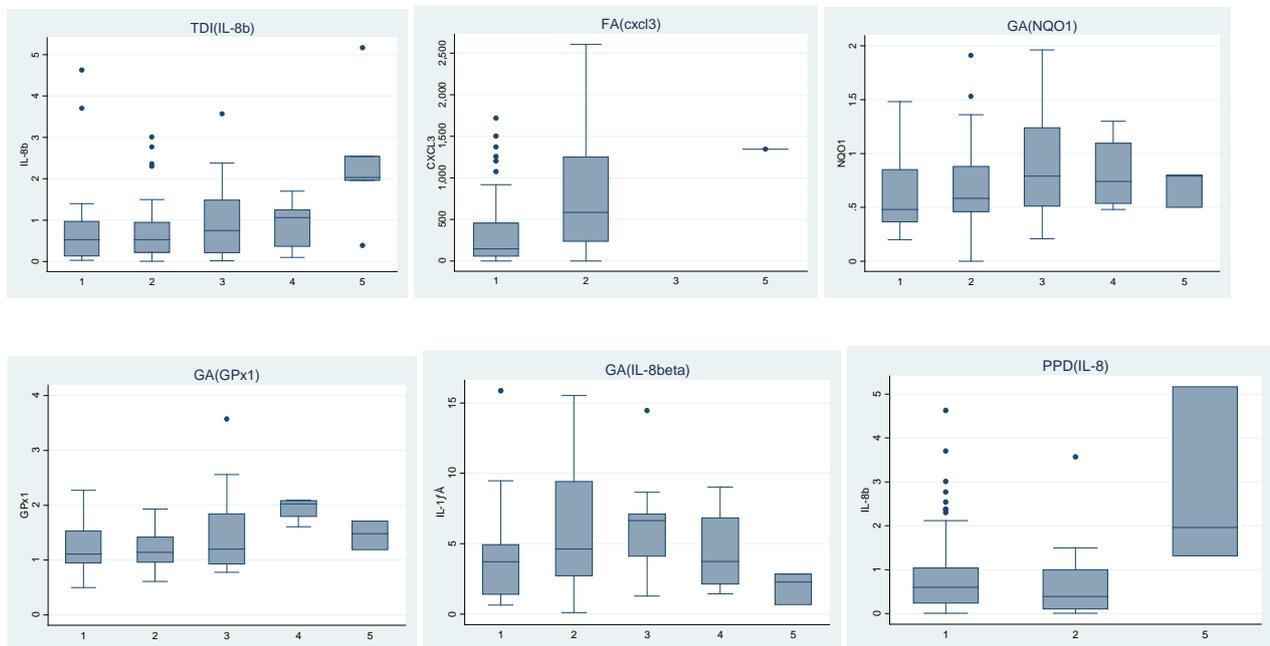
特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	c社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	32	2	1.00	(ref)	
>0, <3.125	78	49	8.92	1.62-49.2	0.012
$\geq 3.125$ , <6.25	37	26	6.27	1.06-37.2	0.043
$\geq 6.25$ , <12.5	19	15	10.8	1.66-70.7	0.013
$\geq 12.5$	15	8	5.40	0.75-38.9	0.094

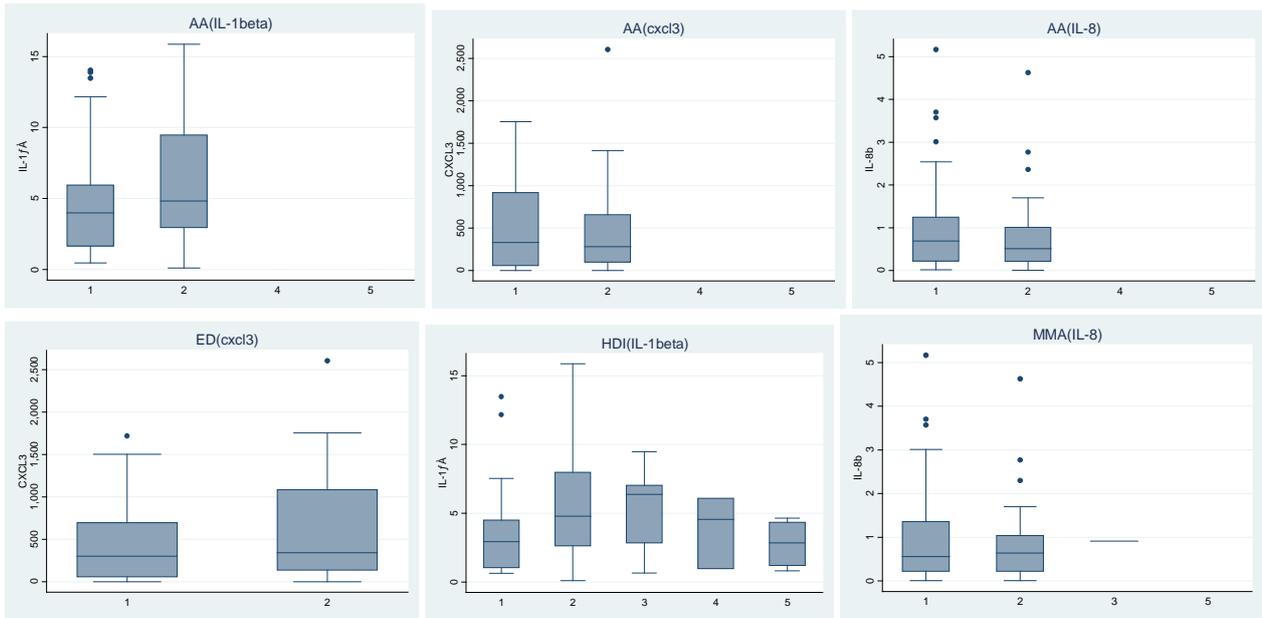
## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=182)	c社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	130	68	1.00	(ref)	
>0, <3.125	52	31	0.81	0.39-1.69	0.575
$\geq 3.125$ , <6.25	0	0	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	0	0	—		
$\geq 12.5$	0	1	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

## (6) a社の結果と同傾向を示す mRNA 発現量の結果





#### 4. c社 新入社員

##### A 質問票の結果

- ① 主たる使用樹脂： なし
- ② 対象者      34名(男性) 4名(女性)
- ③ 年齢          mean (S.E.) 19.3 (0.37)
- ④ アレルギー疾患既往歴 なし 18名(47%)    あり 20名(53%)

##### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=38	%
吸わない	31	81
やめた	3	8
吸う	4	11

##### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=38	%
飲まない・機会飲酒	37	97
ほぼ毎日飲んでいる	1	3

## B 採取試料(血清)から得られた結果

### (1) 総 IgG 値、総 IgE 値

	総 IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1137 (32)	292(65)

### (2) アレルギー既往歴別

アレルギー既往歴	総 IgG(mg/dl)	総 IgE(IU/ml)
	mean(S.E.)	mean(S.E.)
なし (N=14)	1100(54)	242(97)
あり (N=12)	1171(36)	337(88)

### (3) 特異的 IgE 値

	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	37	1*
FA	38	0
PA	38	0

\*0.11UA/ml

### (5) 特異的 IgG 値の一般人・新入社員(cn)比較して有意な結果なし

## 5. d社 ボイラー・電気機器製造会社

### A 質問票の結果

①主たる使用樹脂： ウレタン樹脂、エポキシ樹脂等 複数の樹脂

② 対象者 39名(男性) \*特化物健診対象者  
生産工程従事者(製品製造)

③ 年齢 mean (S.E.) 37.5 (1.7)

④ アレルギー疾患既往歴 なし 36名(92%) あり 3名(8%)

#### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=39	%
吸わない	22	56
やめた	6	15
吸う	11	28

#### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=39	%
飲まない・機会飲酒	29	74
ほぼ毎日飲んでいる	10	26

### B 採取試料(血清)から得られた結果

#### (1) 総IgG値、総IgE値

	IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1178 (32)	193 (41)

#### (2) アレルギー既往歴別

アレルギー既往歴	総IgG(mg/dl)	総IgE(IU/ml)
	mean (S.E.)	mean (S.E.)
なし (N=36)	1179 (32.5)	177 (41.5)
あり (N=3)	1166 (159)	385 (187)

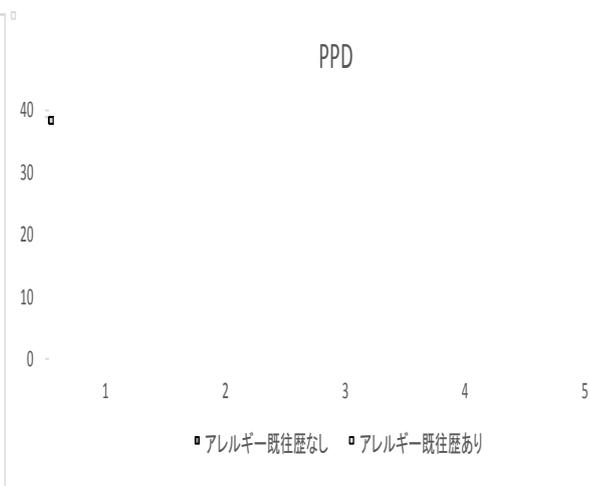
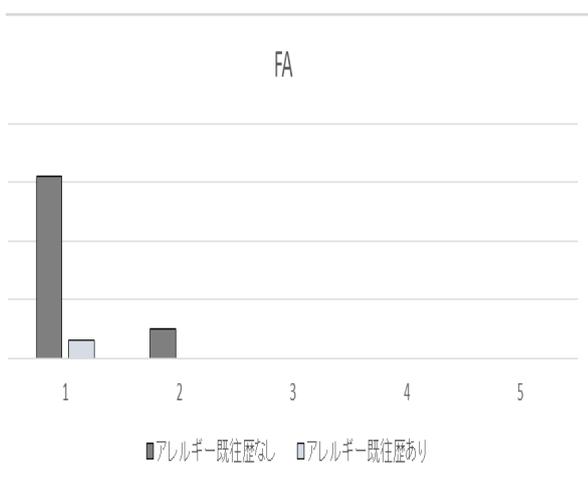
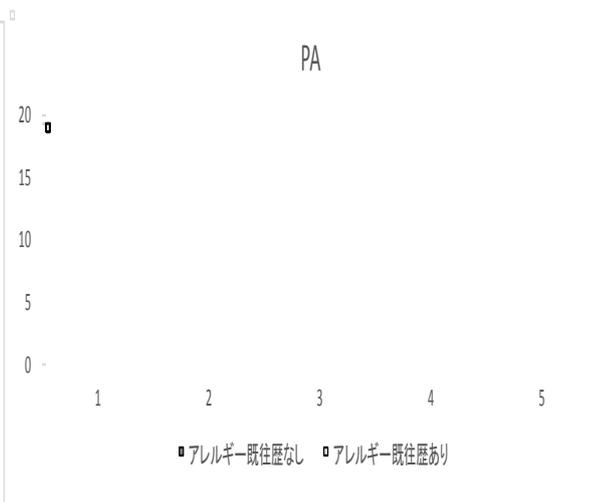
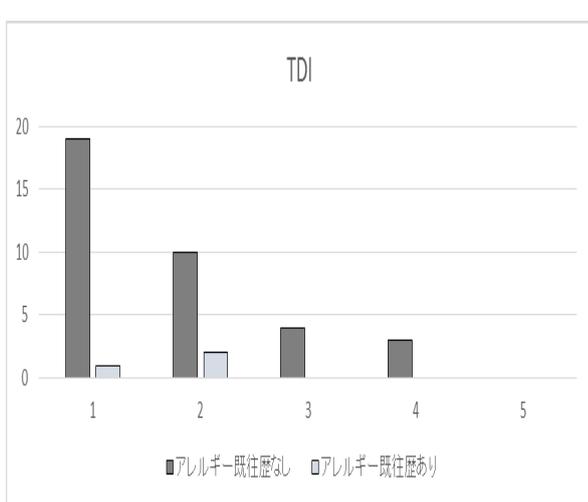
### (3)特異的 IgE 値

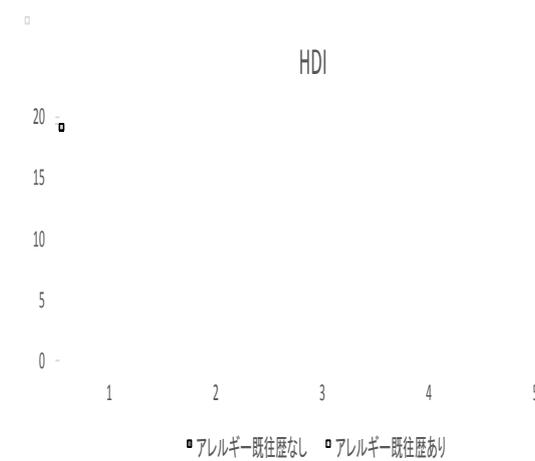
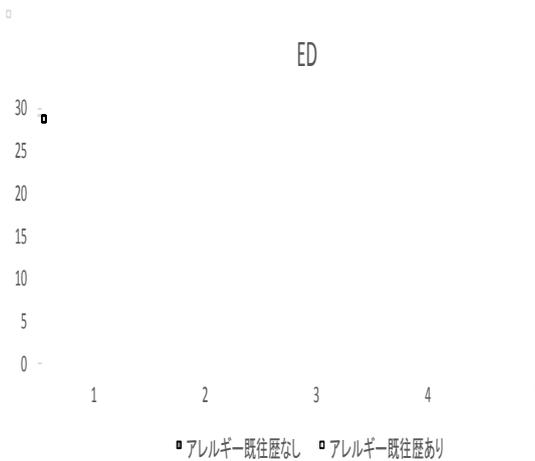
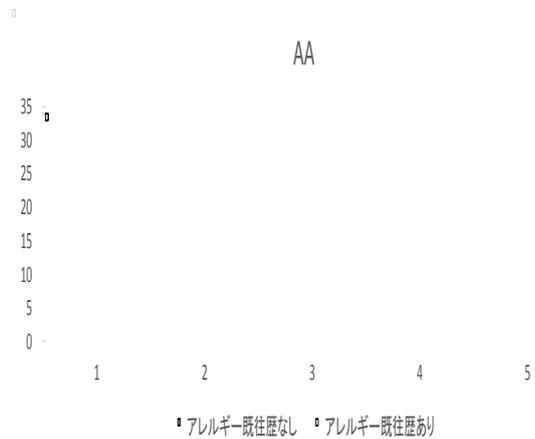
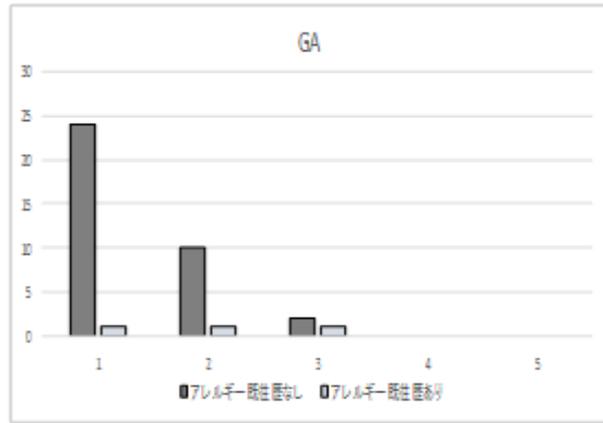
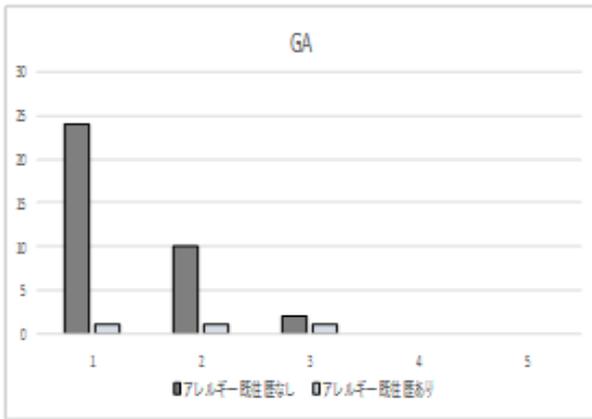
	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	34	1
FA	39	0
PA	39	0

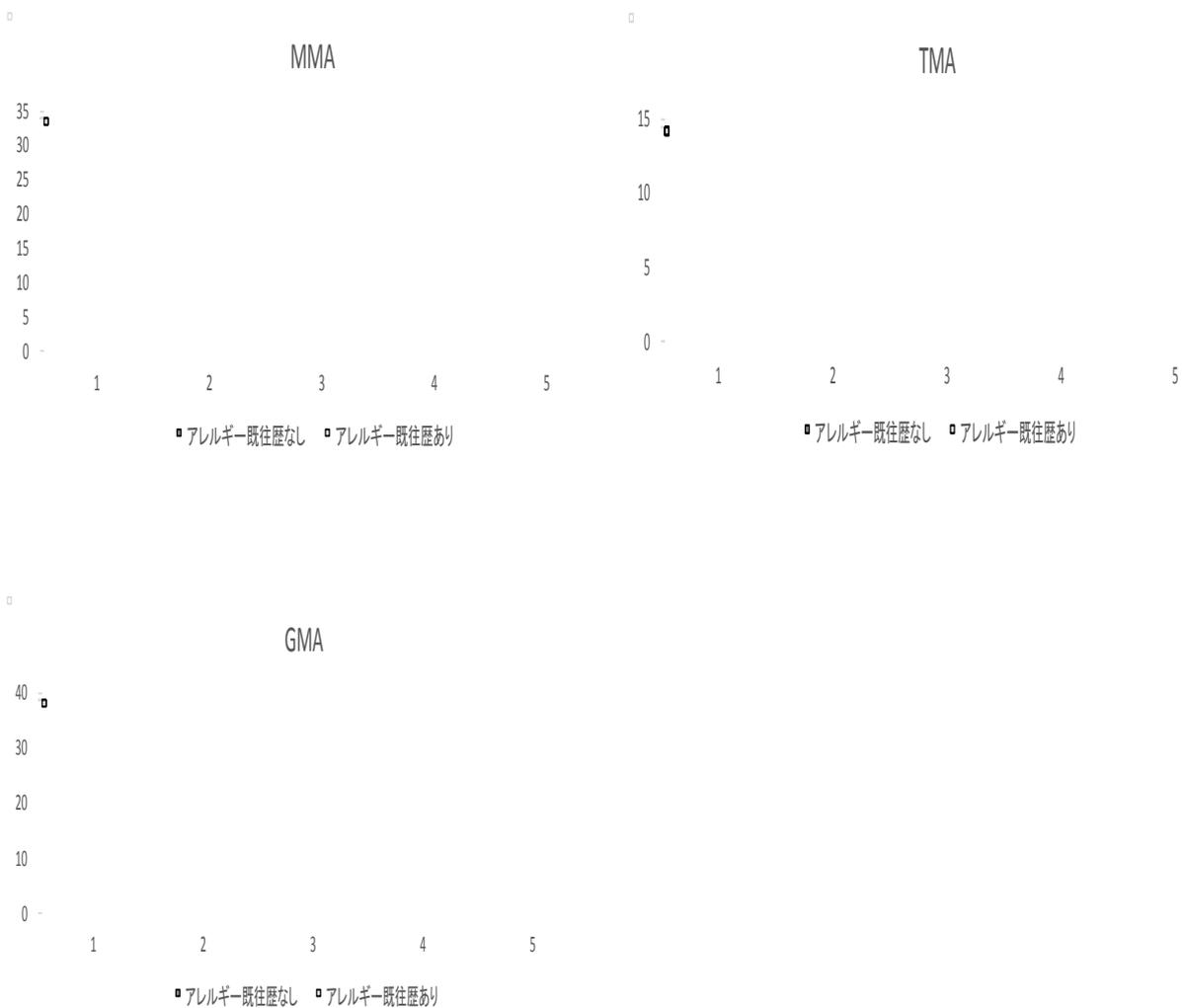
### (4)特異的 IgG 値 と アレルギー既往歴

\* 特異的 IgG 値 (μg/ml) のクラス分け基準 \*

class1(-): 0 μg/ml,                      class2(±): >0, <3.125,                      class3(+): ≥3.125, <6.25  
class4(≡): ≥6.25, <12.5,                      class5(≡): ≥12.5







(5)特異的 IgG 値の一般人・d 社比較

TDI

特異的 IgG 値 (μg/ml)	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	40	20	1.00	(ref)	
>0, <3.125	36	12	0.38	0.12-1.20	0.098
≧3.125, <6.25	11	4	0.61	0.14-2.62	0.505
≧6.25, <12.5	8	3	1.14	0.14-9.37	0.900
≧12.5	9	0	—		

## PA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	6	0	—		
>0, <3.125	5	4	1.00	(ref)	
$\geq 3.125$ , <6.25	7	6	0.30	0.03-3.14	0.318
$\geq 6.25$ , <12.5	20	12	1.94	0.30-12.4	0.303
$\geq 12.5$	66	17	2.89	0.50-16.7	0.503

## FA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	95	34	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	5	1.14	0.25-5.28	0.868
$\geq 3.125$ , <6.25	2	0	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	0	0	—		
$\geq 12.5$	0	0	—		

## GA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	58	25	1.00	(ref)	
>0, <3.125	35	11	0.69	0.25-1.89	0.465
$\geq 3.125$ , <6.25	7	3	0.83	0.17-4.01	0.820
$\geq 6.25$ , <12.5	2	0	—		
$\geq 12.5$	2	0	—		

## PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	85	38	1.00	(ref)	
>0, <3.125	16	1	0.09	0.01-0.83	0.033
$\geq 3.125$ , <6.25	1	0	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	1	0	—		
$\geq 12.5$	1	0	—		

### BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	96	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	5	1.83	0.48-6.92	0.375
$\geq$ 3.125, <6.25	1	1	2.67	0.13-53.7	0.520
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	1	—		

### AA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	37	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	7	0.86	0.20-3.85	0.843
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

### ED

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	42	28	1.00	(ref)	
>0, <3.125	2	11	4.61	0.46-46.4	0.194
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

### HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	26	18	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	20	0.95	0.30-3.06	0.939
$\geq$ 3.125, <6.25	3	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	4	1	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	39	36	1.00	(ref)	
>0, <3.125	4	3	2.04	0.17-24.3	0.573
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## TMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	21	9	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	15	1.24	0.33-4.70	0.755
$\geq$ 3.125, <6.25	5	6	0.85	0.15-4.80	0.858
$\geq$ 6.25, <12.5	3	7	1.62	0.22-11.9	0.635
$\geq$ 12.5	4	2	0.67	0.08-5.61	0.715

## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	d 社(N=39)	OR	95%CI	P 値*
0	39	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	7	1.04	0.24-4.45	0.961
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

## 6. e 社 電気機器製造会社

### A 質問票の結果

#### ①主たる使用樹脂： エポキシ樹脂

e 社で確認された使用製品

・エピホーム(K8846F A) (ソマール(株))

主な原料 ビスフェノール液状エポキシ樹脂  
脂肪族ジグリシジルエーテル

・EPOXY RESIN XNR3114

主な原料 ビスフェノール A 型エポキシ樹脂

パラターシャブリチルフェニルグリシジルエーテル

② 対象者 35 名(男性) 1 名(女性)  
生産工程従事者(製品製造) (質問票完答者 N=35)

③ 年齢 mean (S.E.) 34.7 (1.6)

④ アレルギー疾患既往歴 なし 13 名(37%) あり 22 名(63%)

#### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=35	%
吸わない	11	33
やめた	8	23
吸う	16	46

#### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=35	%
飲まない・機会飲酒	18	51
ほぼ毎日飲んでいる	17	49

## B 採取試料(血清)から得られた結果

### (1) 総IgG値、総IgE値

	総 IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1270 (48)	245 (52)

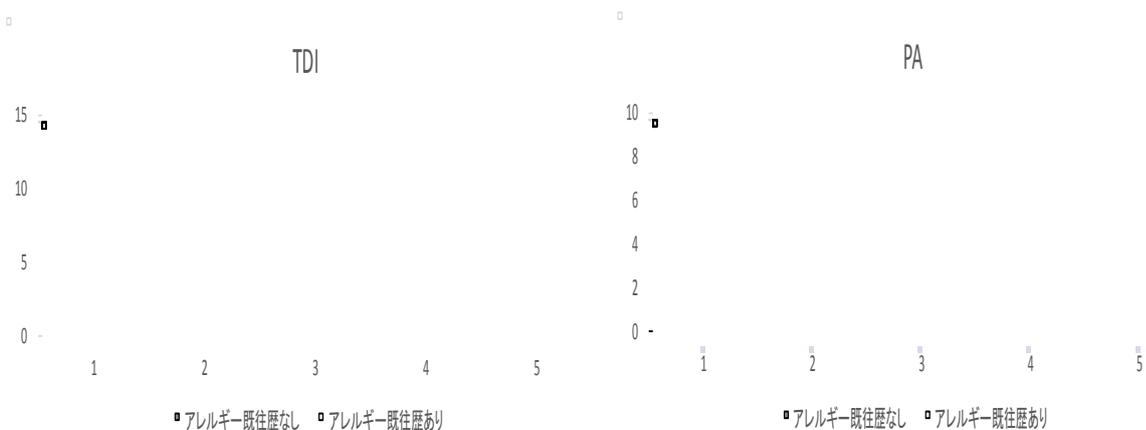
### (2) アレルギー既往歴別

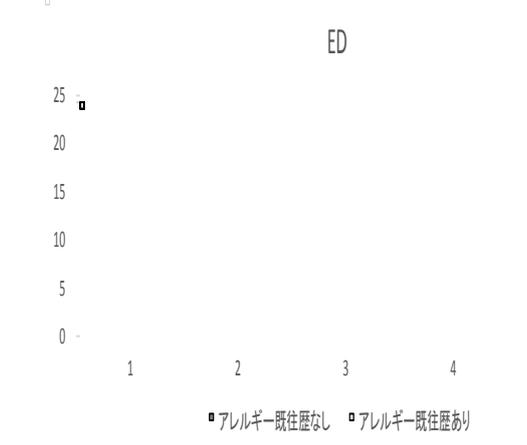
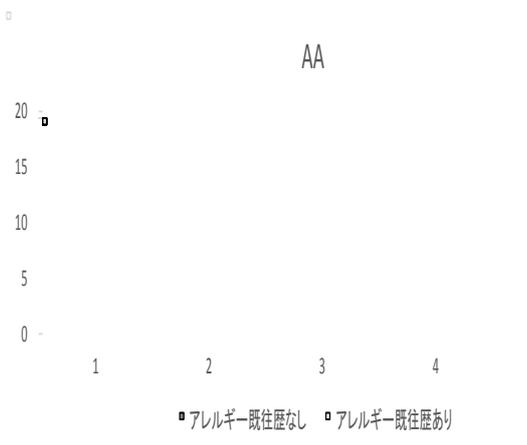
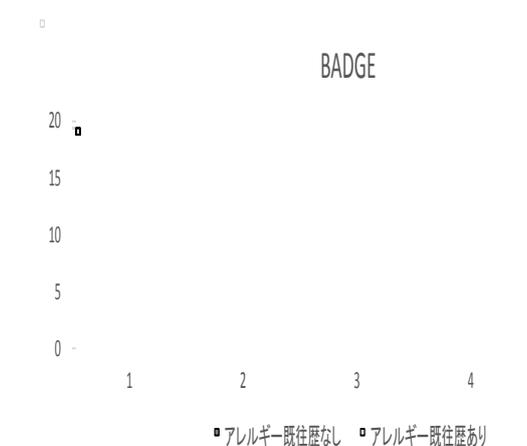
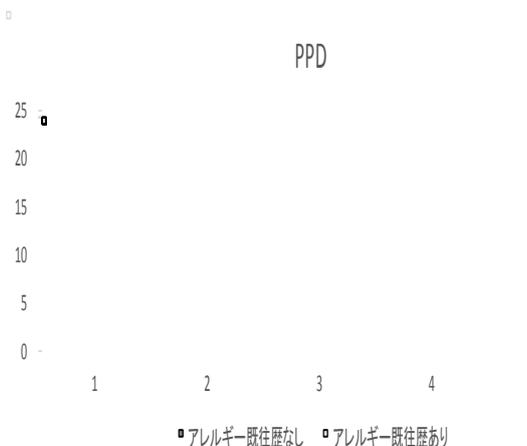
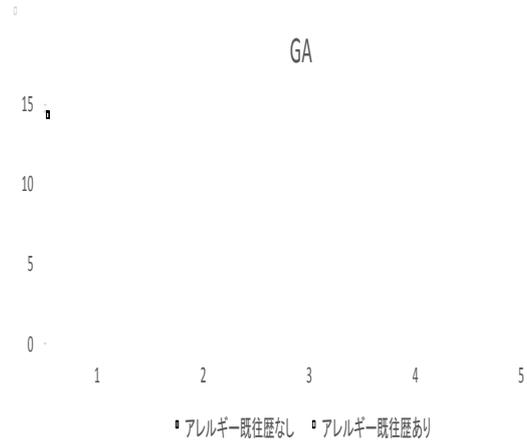
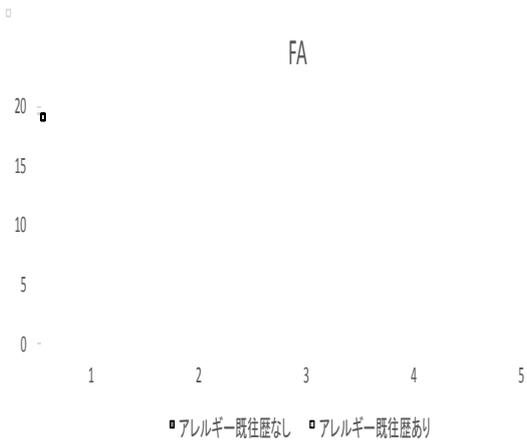
アレルギー既往歴	総 IgG(mg/dl)	総 IgE(IU/ml)
	mean(S.E.)	mean(S.E.)
なし (N=13)	1270(95.0)	289(118)
あり (N=22)	1269(55.6)	211(49.3)

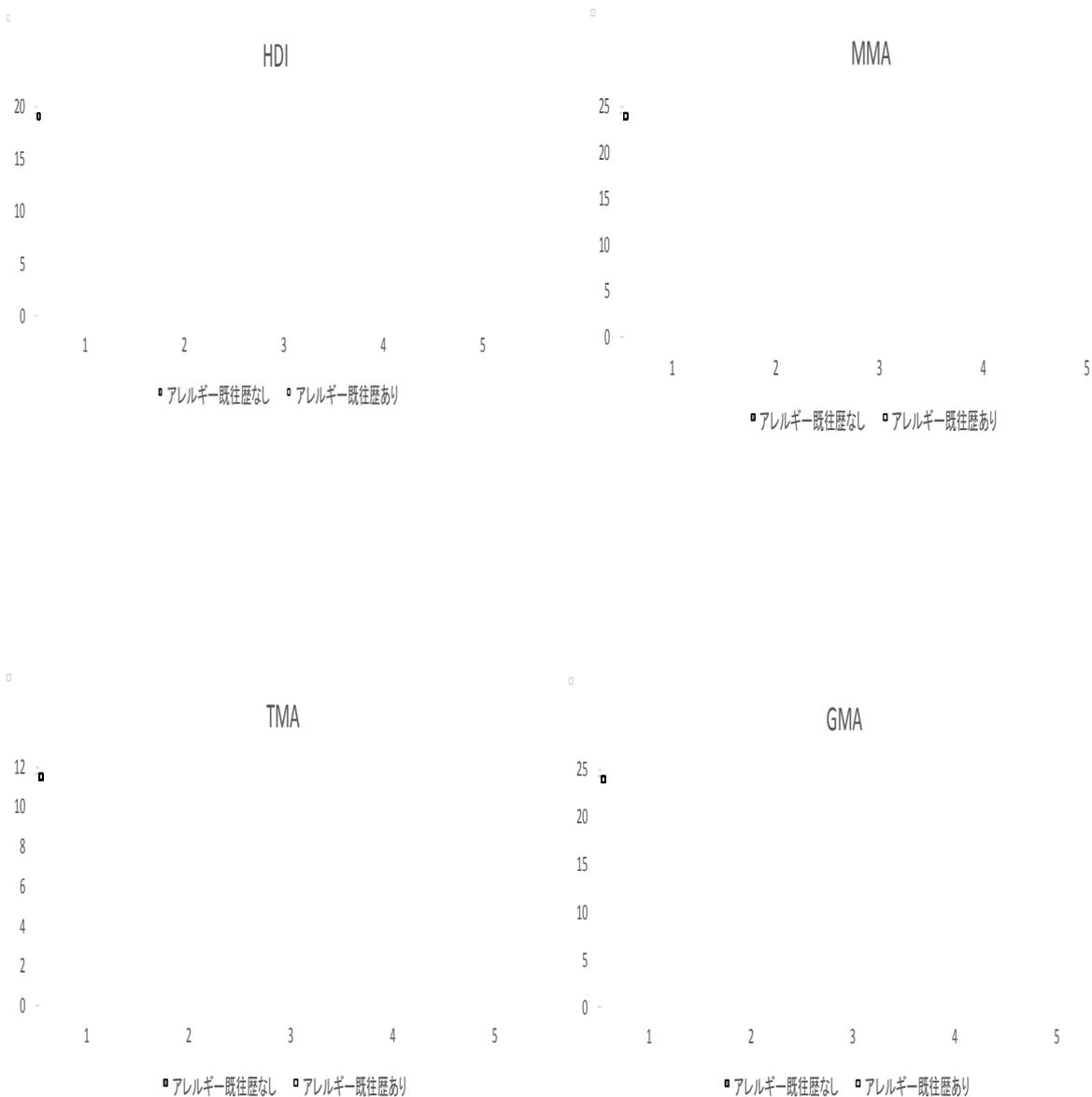
### (3) 特異的 IgE 値

	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	35	1
FA	36	0
PA	36	0

### (4) 特異的 IgG 値 と アレルギー既往歴







## (5) 特異的 IgG 値の一般人・e 社比較

### TDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	40	18	1.00	(ref)	
>0, <3.125	36	15	0.60	0.20-1.75	0.346
$\geq$ 3.125, <6.25	11	1	0.19	0.02-2.29	0.192
$\geq$ 6.25, <12.5	8	1	0.21	0.01-3.16	0.258
$\geq$ 12.5	9	1	0.09	0.007-1.20	0.068

## PA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	6	2	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	9	2.55	0.19-35.0	0.483
$\geq$ 3.125, <6.25	7	3	1.55	0.09-26.8	0.764
$\geq$ 6.25, <12.5	20	9	0.38	0.03-4.45	0.438
$\geq$ 12.5	66	13	0.25	0.02-2.68	0.254

## FA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	95	30	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	6	1.94	0.43-8.710.387	0.974
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## GA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	58	21	1.00	(ref)	
>0, <3.125	35	13	0.84	0.29-2.40	0.591
$\geq$ 3.125, <6.25	7	1	0.35	0.03-4.09	0.401
$\geq$ 6.25, <12.5	2	1	0.73	0.04-13.8	0.839
$\geq$ 12.5	2	0	—		

## PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	85	33	1.00	(ref)	
>0, <3.125	16	2	0.20	0.03-1.11	0.066
$\geq$ 3.125, <6.25	1	1	4.30	0.24-75.6	0.318
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

### BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	96	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	4	1.13	0.15-8.30	0.905
$\geq$ 3.125, <6.25	1	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

### AA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	37	28	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	7	1.13	0.25-5.11	0.876
$\geq$ 3.125, <6.25	0	1	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

### ED

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	42	32	1.00	(ref)	
>0, <3.125	2	4	1.00	0.10-9.92	0.997
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

### HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	26	25	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	10	0.76	0.20-2.83	0.677
$\geq$ 3.125, <6.25	3	1	0.26	0.01-5.96	0.406
$\geq$ 6.25, <12.5	4	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	39	31	1.00	(ref)	
>0, <3.125	4	4	2.65	0.31-22.8	0.374
$\geq 3.125$ , <6.25	0	1	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	0	0	—		
$\geq 12.5$	1	0	—		

## TMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	21	10	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	18	1.72	0.45-6.59	0.430
$\geq 3.125$ , <6.25	5	2	0.35	0.04-3.20	0.354
$\geq 6.25$ , <12.5	3	4	1.94	0.17-22.7	0.598
$\geq 12.5$	4	2	0.56	0.06-5.11	0.609

## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	e 社(N=36)	OR	95%CI	P 値*
0	39	34	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	2	0.67	0.09-4.77	0.688
$\geq 3.125$ , <6.25	0	0	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	0	0	—		
$\geq 12.5$	0	0	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

## 7. f社 自動車部品製造会社

### A 質問票の結果

- ① 主たる使用樹脂： ポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂
- ② 対象者        26名(男性) 0名(女性)  
                  生産工程従事者(製品製造、プレス)
- ③ 年齢            mean (S.E.)    34.7 (1.6)
- ④ アレルギー疾患既往歴    なし 14名(54%)    あり 12名(46%)

#### ⑤ 喫煙習慣

喫煙習慣	N=26	%
吸わない	9	35
やめた	4	15
吸う	13	50

#### ⑥ 飲酒習慣

飲酒習慣	N=26	%
飲まない・機会飲酒	16	61
ほぼ毎日飲んでいる	10	39

### B 採取試料(血清)から得られた結果

#### (1) 総IgG値、総IgE値

	総 IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1141 (61)	568 (275)

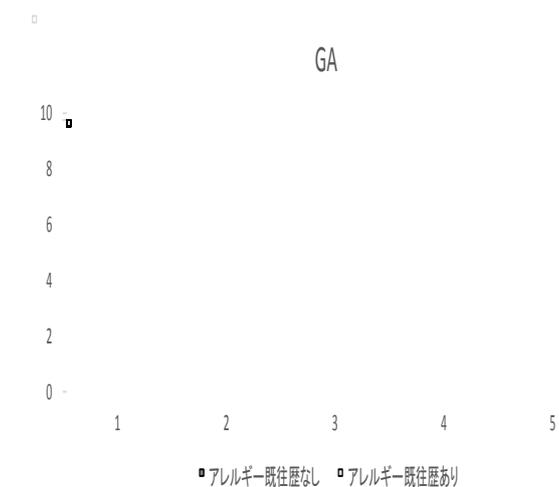
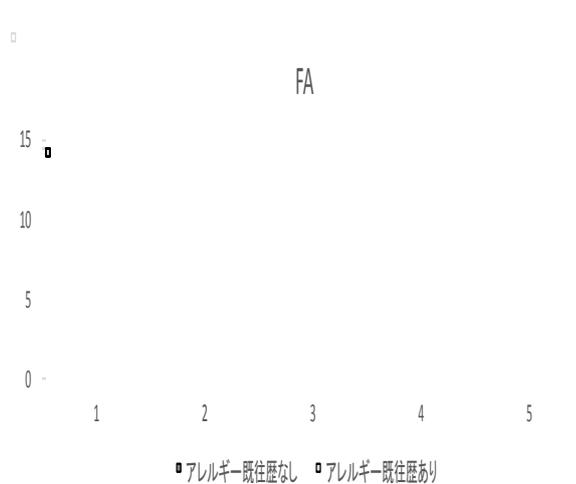
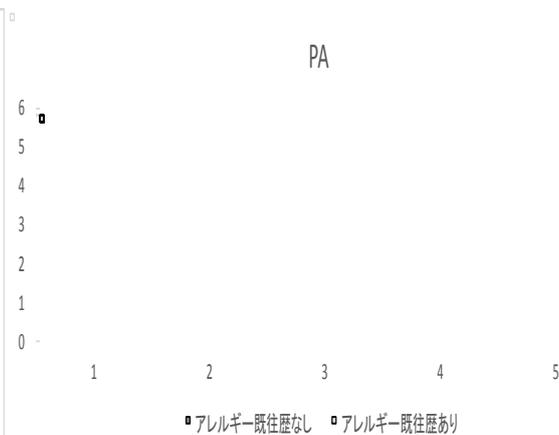
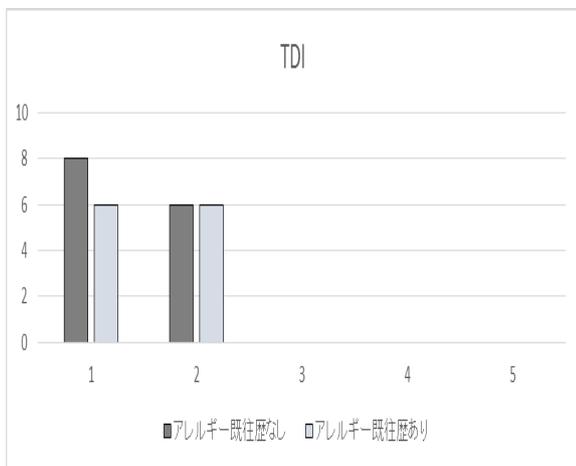
#### (2) アレルギー既往歴別

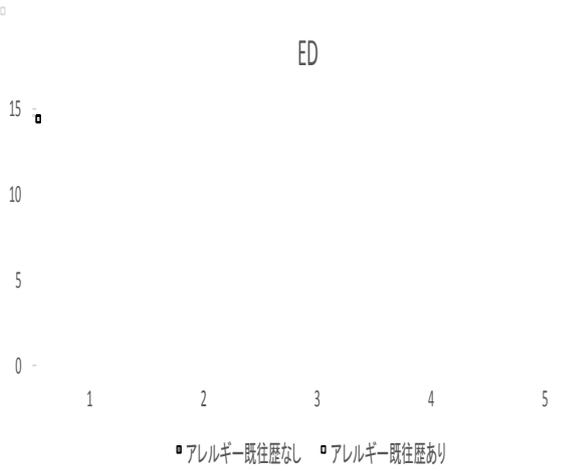
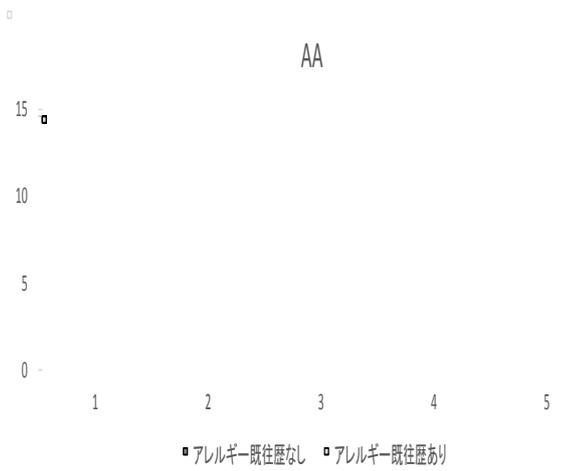
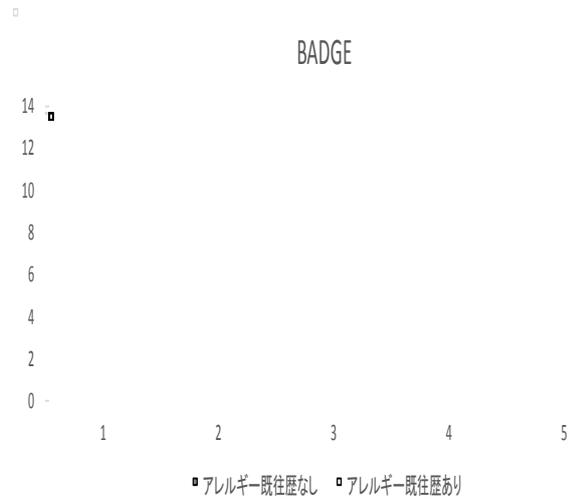
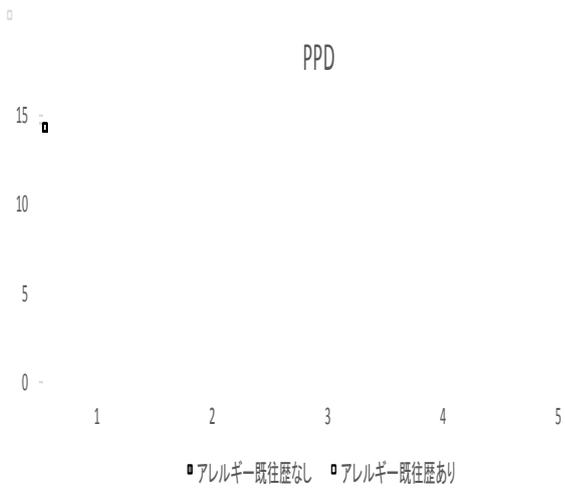
アレルギー既往歴	総 IgG(mg/dl)	総 IgE(IU/ml)
	mean(S.E.)	mean(S.E.)
なし (N=14)	1093(66)	188(68)
あり (N=12)	1196(108)	1012(577)

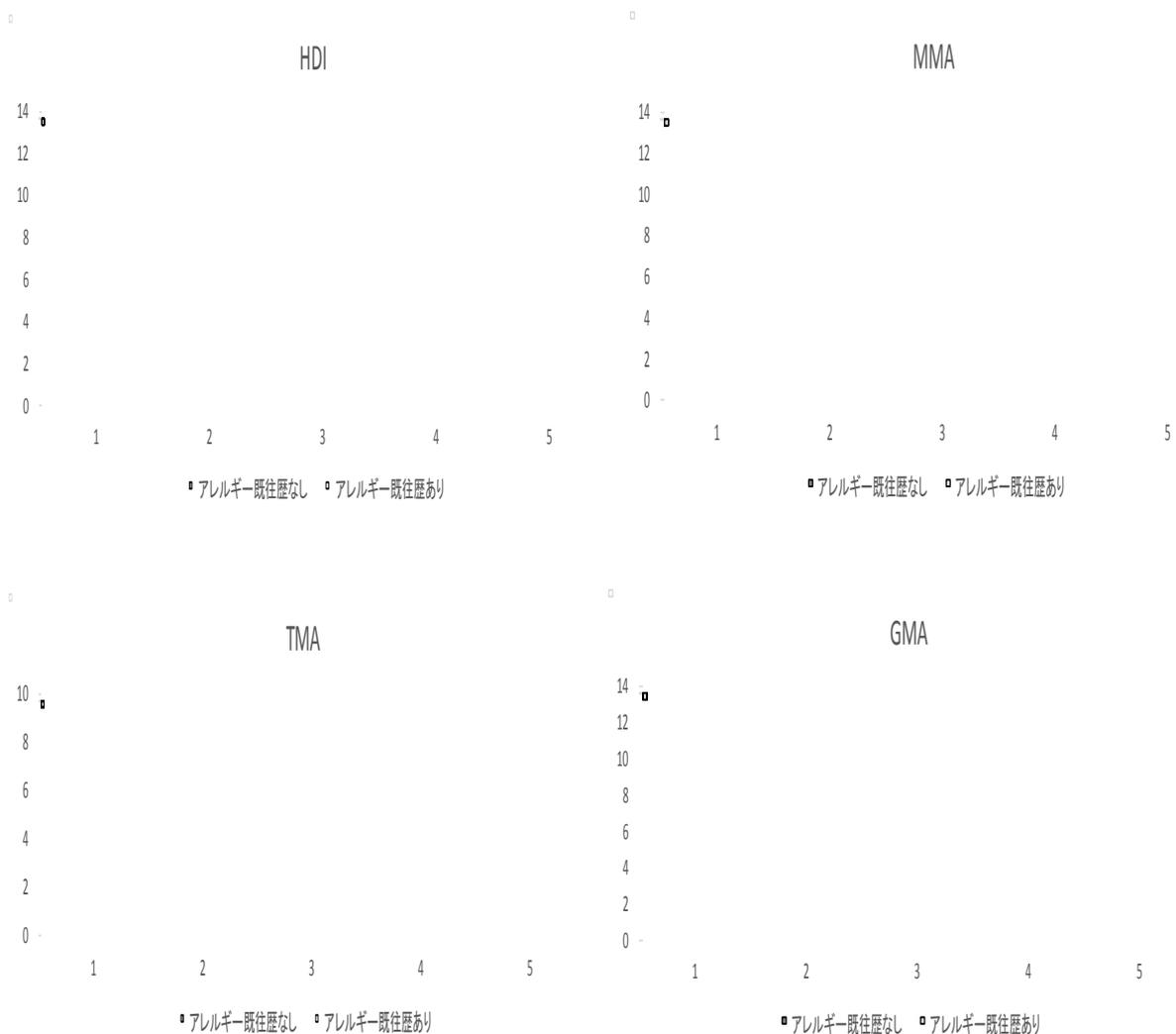
### (3) 特異的 IgE 値

	特異的 IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	22	4
FA	23	3
PA	25	1

### (4) 特異的 IgG 値 と アレルギー既往歴







### (5) 特異的 IgG 値の一般人・f 社比較

TDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	40	14	1.00	(ref)	
>0, <3.125	36	12	1.18	0.35-3.96	0.783
$\geq 3.125$ , <6.25	11	0	—		
$\geq 6.25$ , <12.5	8	0	—		
$\geq 12.5$	9	0	—		

## PA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=98)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	6	0	—		
>0, <3.125	5	9	1.00	(ref)	
$\geq$ 3.125, <6.25	7	10	1.26	0.14-11.5	0.915
$\geq$ 6.25, <12.5	20	3	0.06	0.009-0.45	0.007
$\geq$ 12.5	66	4	0.03	0.004-0.22	0.001

## FA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	95	22	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	4	1.52	0.27-8.65	0.635
$\geq$ 3.125, <6.25	2	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## GA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	58	16	1.00	(ref)	
>0, <3.125	35	8	0.71	0.21-2.40	0.580
$\geq$ 3.125, <6.25	7	2	0.85	0.11-6.56	0.874
$\geq$ 6.25, <12.5	2	0	—		
$\geq$ 12.5	2	0	—		

## PPD

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	85	24	1.00	(ref)	
>0, <3.125	16	2	0.30	0.05-1.81	0.200
$\geq$ 3.125, <6.25	1	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

### BADGE

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=104)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	96	22	1.00	(ref)	
>0, <3.125	7	4	6.88	0.83-56.7	0.073
$\geq$ 3.125, <6.25	1	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

### AA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	37	25	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	1	0.19	0.01-2.55	0.211
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	1	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

### ED

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	42	23	1.00	(ref)	
>0, <3.125	2	3	4.93	0.33-73.6	0.247
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

### HDI

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	26	18	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	20	0.27	0.04-1.77	0.173
$\geq$ 3.125, <6.25	3	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	4	1	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

## MMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	39	22	1.00	(ref)	
>0, <3.125	4	4	20.7	1.63-263	0.020
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	1	0	—		

## TMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	21	9	1.00	(ref)	
>0, <3.125	11	13	1.48	0.32-6.74	0.616
$\geq$ 3.125, <6.25	5	2	0.55	0.05-6.22	0.633
$\geq$ 6.25, <12.5	3	1	0.27	0.01-5.06	0.381
$\geq$ 12.5	4	1	0.60	0.04-9.60	0.720

## GMA

特異的 IgG 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	一般人(N=44)	f 社(N=26)	OR	95%CI	P 値*
0	39	22	1.00	(ref)	
>0, <3.125	5	4	1.12	0.19-6.71	0.905
$\geq$ 3.125, <6.25	0	0	—		
$\geq$ 6.25, <12.5	0	0	—		
$\geq$ 12.5	0	0	—		

\*性、年齢を共変数とした多変量ロジスティック回帰分析結果

## 化学物質付加によるヒト血清アルブミン立体構造変化の解析と 化学物質曝露状況評価や化学物質アレルギー診断を指向した 血液中化学物質特異的 IgG 定量のための新規ペプチド ELISA の構築

分担研究者 石原 康宏 広島大学 大学院総合科学研究科 助教

### 研究要旨

本研究では、川本らが報告した化学物質特異的 IgG 抗体を測定するドットブロット法を改良し、多検体を短時間で処理できる ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を構築することを目的とする。候補化学物質として、カルボニル化合物、ホルムアルデヒド、無水フタル酸、トルエンジイソシアネートを選択した。まず、ヒト血清アルブミンと化学物質の付加体の立体構造を詳細に解析し、ヒト血清アルブミンと化学物質との反応について、立体構造変化を引き起こすかという点に焦点を当てて解析した。アミノ基定量の結果、ヒト血清アルブミン中のリシン残基が、化学物質中のカルボニル基と反応することが明らかとなった。この反応によりヒト血清アルブミンの微細な立体構造が変化することを電気泳動、円二色性スペクトル、および蛍光スペクトル測定から示した。残念ながら、ヒト血清アルブミンと化学物質の反応のモル比を明らかにすることはできなかった。これらの結果より、ヒト血清アルブミンはハプテンである化学物質と反応して付加体を形成し、その結果、立体構造を変化させることによって感作性を獲得すると考えられる。

ヒト血清アルブミンと化学物質との付加体を用いて ELISA を行なったところ、一般住民や事業所従業員の血清中からヒト血清アルブミン-化学物質を認識する IgG が検出された。この結果は、暴露された化学物質の少なくとも一部はヒト血清アルブミンと反応し、それが抗原となって抗体が産生されたことを支持する。しかし、ヒト血清アルブミンと化学物質との付加体を用いた ELISA は測定誤差が大きく、臨床検査に応用するには正確性に問題があると思われた。

そこで、リシン残基を含むヒト血清アルブミン部分ペプチドを設計し、カルボニル化合物とリシン残基との反応様式を調べたところ、ホルムアルデヒドはイミンを、無水フタル酸は 3 級アミンを介してリシン残基を修飾することが明らかとなった。一般住民と樹脂工場労働者の血清検体中の抗ホルムアルデヒド-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG および抗無水フタル酸-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG 量を、これら化学物質とヒト血清アルブミン部分ペプチドとの付加体を抗原とした ELISA で調べたところ、一般住民と比較して工場労働者の血清中に高い抗体量が認められた。従って、本ペプチド ELISA は、ホルムアルデヒドや無水フタル酸の曝露状況評価に用いることができると考えられる。また、血清中の抗ホルムアルデヒド-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG および抗無水フタル酸-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG 抗体価が高い被験者の中には、成人後にアレルギーを発症した被験者が含まれていた。従って、血清中抗ホルムアルデヒド-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG 量および抗無水フタル酸-ヒト血清アルブミン部分ペプチド IgG 量とアレルギーとの関連が示唆されたが、さらに詳細な解析が必要である。

今後は、ここで作製した ELISA がカルボニル化合物の曝露状況評価に用いることができるか、さらに、カルボニル化合物によるアレルギー診断に用いることができるかについて、慎重に調べ、ELISA をさらに改良して、検査或いは診断の場で使用できるより簡便で精度の高い、IgG 検出法の構築を目指す。

## 分担研究者

該当なし

## 研究協力者

石原 波 (広島大学 自然科学研究支援開発センター 遺伝子実験部門)

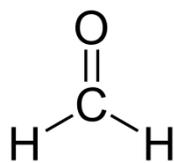
根平 達夫 (広島大学 大学院総合科学研究科)

川本 俊弘 (産業医科大学 医学部 産業衛生学講座)

土屋 卓人 (産業医科大学 医学部 産業衛生学講座)

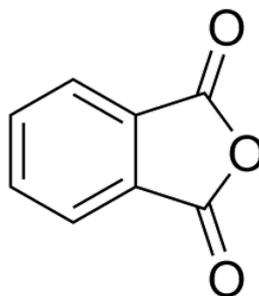
## A.研究目的

現在、10万種類にもおよぶ化学物質が工業的に生産され、産業、農業や医療等さまざまな分野で使用されている。一方、化学物質を取り扱う職場での化学物質曝露に伴う様々な健康被害も報告されている。ホルムアルデヒドは接着剤、塗料、防腐剤などの成分であり、安価なためフェノール樹脂、メラミン樹脂、尿素樹脂などの原料として建材に広く用いられている。しかし、ホルムアルデヒドは濃度によって粘膜への刺激性を中心とした急性毒性があり、蒸気は呼吸器系、目、のどなどの炎症を引き起こし、水溶液への接触により、皮膚の炎症が生ずる (Alexandersson and Hedenstierna 1988, 1989; Fowler et al. 1992; Ritchie and Lehnen 1987; Wantke et al. 1995)。「シックハウス症候群」の対策として現在、建築基準法によりホルムアルデヒドを放散する建築材料の使用制限が設けられ、居室内の気中濃度として世界保健機関 (World Health Organization: WHO) や厚生労働省により0.08 ppmの指針値が定められている。さらに、ホルムアルデヒドは国際がん研究機関によりグループ1の化学物質に指定され、発癌性があると警告されている。ホルムアルデヒドは日本産業衛生学会が定める感作性物質分類で気道感作性物質第2群、皮膚感作性物質第1群に分類されている。改正労働安全衛生法の感作性分類において呼吸器感作性区分1、皮膚感作性区分1に分類されている。



ホルムアルデヒド

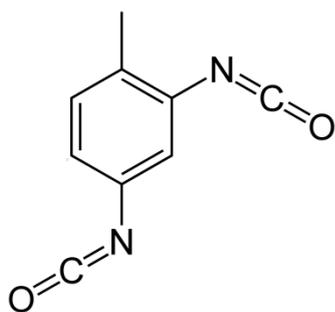
無水フタル酸は、軟質ポリ塩化ビニル製品及びゴム製品の可塑剤として用いられる他、フタル酸樹脂塗料(無水フタル酸を原料とするアルキド樹脂を塗膜形成要素とする塗料)として建築物の塗装に用いられている。また、エポキシ樹脂の硬化剤としての需要もあり、経済産業省生産動態統計年報によると、平成25年において本邦では160,153トンの無水フタル酸が生産された。無水フタル酸は、特定化学物質には指定されていない。しかし、眼、皮膚、呼吸器系に対して刺激性を有し、これに起因した喘息、慢性気管支炎が認められる。また、皮膚接触による感作性もみられる。樹脂製造工場において無水フタル酸に暴露した労働者に鼻炎、上気道炎症、気管支喘息、結膜炎などの症状が認められており (Wernfors et al. 1986; Nielsen et al. 1988; Nielsen et al. 1991)、無水フタル酸は日本産業衛生学会が定める感作性物質分類で気道感作性物質第1群(人間に対して明らかに感作性のある物質)に分類されている。改正労働安全衛生法の感作性分類において呼吸器感作性区分1(ヒトに対し当該物質が特異的な呼吸器過敏症を引き起こす証拠がある場合、又は適切な動物試験より陽性結果が得られている場合)、皮膚感作性区分1に分類されている。



無水フタル酸

トルエンジイソシアネートはポリウレタン樹脂の原料として自動車用のシートクッションや寝具の製造に幅広く使用されており今後も需要の増大が予想されている。トルエンジイソシアネートの健康影響については皮膚や粘膜の刺激作用があり、化学火傷、接触皮膚炎、眼に暴露すれば流涙、炎症、角膜上皮浮腫(一過性視力障害)を生じることがある。吸入した場合は咳、分泌充進、胸痛、呼吸困難が現れるほか、重篤な場合では肺水腫を引き起こすことがある。さらに皮膚・気道感作性があり、喘息を発生させる。ラットを用いた実験により、トルエンジイソシアネートは、血液中では血漿に

74-87%分布し、それらの 97-100%が 10kDa 以上の生体高分子との付加体を形成していることが明らかになっている (Kennedy et al. 1994)。トルエンジイソシアネート製造工場やポリウレタンフォーム製造工場労働者における疫学的研究から、トルエンジイソシアネートはトルエンジイソシアネート喘息と称する喘息症状を引き起こし、また、閉塞性肺機能変化の原因となる (Diem et al. 1982; Omae et al. 1992; Pisati et al. 1993)。トルエンジイソシアネートの職業暴露による発ガンリスクは認められていない (Sorahan and Pope 1993)。日本産業衛生学会が定める感作性物質分類で気道感作性物質第 1 群、皮膚感作性物質第 2 群(人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質)に分類されている。改正労働安全衛生法の感作性分類において呼吸器感作性区分 1、皮膚感作性区分 1 に分類されている。



2,4-トルエンジイソシアネート

上述のように、近年化学物質に起因したアレルギー疾患(気管支喘息、アレルギー性皮膚炎など)の報告が増加し産業衛生分野における大きな課題となっている。しかしそのメカニズムは明らかではなく、化学物質に起因するかどうかの診断法も確立されていない。ヒトが化学物質に暴露すると免疫反応が惹起されて抗体が産生されると考えられるが、化学物質そのものはハプテンであり免疫原性を欠いているため抗体産生を刺激しない。一方、体内に取り込まれた反応性の高い化学物質は、高分子のキャリアタンパク質と結合することにより免疫原性をもつようになる。現在、ヒト血清アルブミンやヘモグロビン、ケラチン 18、グルコース調節タンパク質、アクチン、チューブリンなど、生体内で化学物質が様々なタンパク質と付加体を形成することが報告されているが、その病態生理学的意義は不明である (Day et al. 1996; Lange et al. 1999; Wisniewski et al.

2000; Hettick and Siegel 2011)。最近、川本らはヒト血清アルブミンと化学物質との付加体を用いたドットプロット法により、血液中化学物質 IgG を測定する方法を開発し (特許第 5757519 号)、この方法を用いて労働者の血液中化学物質 IgG と化学物質による皮膚炎との関連を示した (Kawamoto et al. 2015)。この報告は、血液中化学物質特異的 IgG の測定を可能としたのみならず、化学物質特異的 IgG が化学物質アレルギーの診断に使用できるとの可能性を示した点で意義がある。ドットプロット法は多種類の抗原を使用できる点で優位性があるが、定量性を欠き、また、多検体の処理には向かない。事業所で起こりうる化学物質アレルギーを予防するためには、事業所従業員全員に対して、各事業所で暴露しうる(工業的に用いている、あるいは合成している)化学物質に対する抗体を調べねばならず、そのためには、短時間で多検体を処理するアッセイ法が必要である。さらに、血液中化学物質特異的抗体とアレルギーとの関係を明らかにするためには、化学物質特異的抗体の“定量”が不可欠である。そこで、本研究では、トルエン-2,4-ジイソシアネート (2,4-Toluene Diisocyanate : TDI)、無水フタル酸 (Phthalic Anhydride : PA)、ホルムアルデヒド (Formaldehyde : FA) の 3 種の化学物質を対象とし、血液中の化学物質特異的 IgG を迅速かつ正確に定量できる ELISA を作製し、労働者の血液中化学物質 IgG を測定し、一般住民と比較することによって、ELISA の化学物質アレルギー診断における有用性を明らかにすることを目的とした。その前段階として、ヒト血清アルブミンが化学物質と反応することにより構造変化を起こし、免疫原性を獲得することも併せて示した。

また、ヒト血清アルブミンを plate に結合させて ELISA を行う場合、その結合様式は疎水性相互作用である。疎水性相互作用は、ヒト血清アルブミンと化学物質との付加体形成により干渉を受けると考えられる。そこで、N 末端をビオチンで修飾したヒト血清アルブミンの部分ペプチドをストレプトアビジンコート plate に結合させて行うペプチド ELISA の構築も併せて行う。ペプチド ELISA では、ペプチドが常に同一の配向性で plate に結合するため、結果のバラつきが少なくなることが期待される。

## B. 研究方法

### 1. ヒト血清アルブミンと化学物質との付加体の形成

樹脂原料などの化学物質は、分子量が小さいためそれ単体では抗原とならず（ハプテン）、生体内でタンパク質と結合して初めて抗原性を獲得すると考えられる。川本らは、化学物質とヒト血清アルブミン（HSA）との付加体が、ヒト血液中化学物質 IgG の検出に適していることを報告した（Kawamoto et al. 2015）。そこで、本研究では、化学物質と HSA を反応させた HSA-化学物質付加体を使用した。

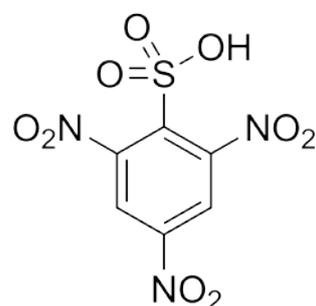
対象とする化学物質はトルエン-2,4-ジイソシアネート（2,4-Toluene Diisocyanate: TDI）、無水フタル酸（Phthalic Anhydride : PA）、ホルムアルデヒド（Formaldehyde : FA）の3種とした。いずれも樹脂原料や可塑剤として広く用いられている化学物質であり、かつ、カルボニル基を有しているためタンパク質中のリシンとの反応し、付加体を形成すると考えられる（図1）。HSA は Sigma 社から購入したものをを用いた。

化学物質は終濃度 1M、0.1M でジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide : DMSO）に溶解した。HSA は終濃度 2mM で蒸留水に溶解した。化学物質と HSA との反応は3種類の pH 条件、3種類の化学物質と HSA のモル比により行なった。即ち、リン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0 と 8.0、炭酸ナトリウム緩衝液 pH10.8 を使用した。HSA と化学物質の比が 1:1、1:10、1:100 となるように混合した。反応溶液中の HSA の終濃度は 1mM、DMSO の終濃度は 10%、緩衝液の終濃度は 100mM とした。HSA と化学物質との混合溶液を 37℃ で 1 時間インキュベートした後遠心分離し、上清を HSA-化学物質付加体溶液とした。HSA-化学物質付加体溶液はエッペンチューブに分注し、実験に使用するまで-80℃で保存した。

### 2. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) によるアミノ基の定量

TNBS はアミノ基と反応すると黄色に呈色する化学物質であり、呈色反応はアミノ基の物質量に比例することから、リシンやその他アミノ酸で検量線を作製することにより、タンパク質中のリシン残基を定量することができる（Sarantonis et al. 1986）。また、TNBS は、プロリンや尿素、アンモニアとは反応しないこ

とから（Brown 1968）、TNBS は HSA-化学物質付加体との反応においては、リシン残基に特異的な反応であると考えられることができる。



TNBS の構造式

HSA 6.6μg を含む HSA-化学物質付加体 100μL に 4%炭酸水素ナトリウム溶液 50μL を加えた後、0.01% TNBS 水溶液を 50μL 加えて 42℃で 2 時間インキュベートした。1M 塩酸を 50μL 加えた後、340nm における吸光度を測定した。10、30、100、300μM リシン水溶液を作製し、検量線として使用した。また、ペプチドを使用する場合、付加体形成反応後のペプチド溶液 50μL を測定に供した。

### 3. SDS-PAGE

HSA-化学物質付加体を Laemmli's loading buffer に溶解し、100℃で 5 分間加熱した。加熱後の溶液を 10%(w/v)ポリアクリルアミドゲルにアプライし、定法に従って電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した。

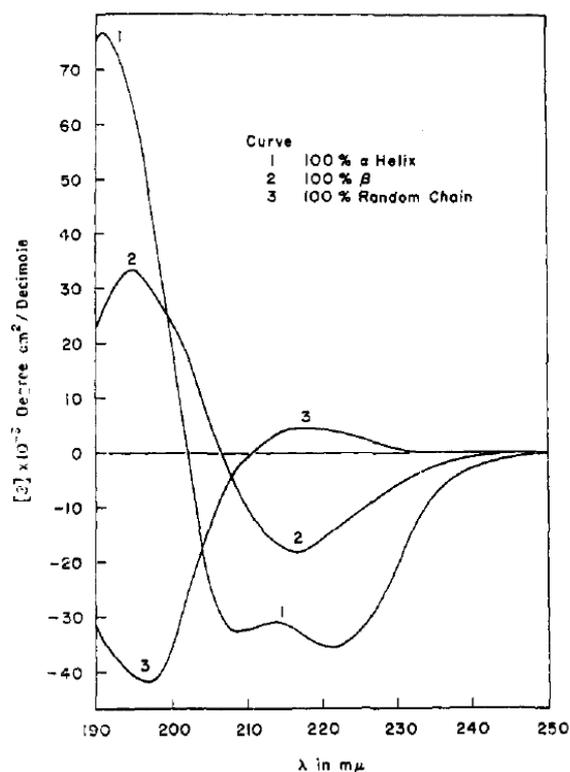
### 4. Native PAGE

Native PAGE ではタンパク質が従来の構造を保ったままで電気泳動されるため、泳動像から分子量を求めることはできないが、泳動度の違いを構造の違いとして解釈することが可能である。3で示した SDS-PAGE について、緩衝液類から SDS を除き、さらに、Laemmli's loading buffer から β-メルカプトエタノール、および、混合後の加熱を除いたプロトコールにより Native PAGE を行なった。

### 5. 円二色性 (CD: circular dichroism) 測定によるタンパク質 2 次構造変化の検出

CD とは、左円偏光と右円偏光に対して吸光度に差が生じる現象であり、キラルな物質の検出する手法である。この測定法をタンパク質に応用すると、αヘリックス、β構造、不規則構造のそれぞれで紫外外部領域でのスペクトルパ

ターンと CD 強度が異なるため、タンパク質の 2 次構造を推定することが可能となる。合成ポリアミノ酸であるポリ-L-グルタミン酸あるいはポリ-L-リジンなどでは、pH を変えたり、加熱することにより二次構造が変わる。それらの CD スペクトルでは、 $\alpha$  ヘリックスの場合に 208-209、222 nm に負の極大、191-193 nm に正の極大、 $\beta$  構造では 216-218 nm に負の極大、195-200 nm に正の極大、不規則構造では 195-200 nm に負の極大が観察される (下図、Greenfield and Fasman 1969)。



そこで、本研究では、CD スペクトル測定により、HSA-化学物質付加体の二次構造を評価した。CD 測定には Jasco J-715 (日本分光) を使用した。HSA-化学物質付加体溶液を 10mM 緩衝液 (1 に記載) で希釈し、終濃度 0.2mg/mL に調製した。測定条件: 波長 185nm ~ 250nm、分解能 1nm、スキャン速度 100nm/min、積算 8 回、HT 電圧 405V で CD スペクトルを測定した。

#### 6. 蛍光スペクトル測定によるタンパク質立体構造変化の測定

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、トリプトファンは蛍光を発する。また、トリプトファンの蛍光は、トリプトファン残基の周囲の環

境に影響される。従って、タンパク質の (トリプトファン由来の) 蛍光を測定することにより、タンパク質の微小な構造変化を検出することが可能である (Pham et al. 2009)。

蛍光測定には分光蛍光光度計 F-7000 (日立ハイテクサイエンス) を使用した。HSA-化学物質付加体溶液を 50mM 緩衝液 (1 に記載) で希釈し、終濃度 20 $\mu$ g/mL に調製した。測定条件: 励起波長 231nm、蛍光波長 250nm ~ 400nm、スキャン速度 240nm/min、励起スリット 5nm、蛍光スリット 5nm、フォトマル電圧 500V にて蛍光スペクトルを測定した。

#### 7. AXIMA CFR plus MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS を用い、HSA-化学物質付加体の分子量を測定することにより、HSA と化学物質の反応のモル比を実験的に求めることを目的とした。サンプルプレートに HSA-化学物質付加体 0.5 $\mu$ L を滴下し、続いてマトリックスである 10mg/mL sinapic acid を 0.5 $\mu$ L 滴下した。これらの溶液を風乾させた後、測定に供した。ウシ血清アルブミンを用いてキャリブレーションを行い、以下の条件で測定した。測定範囲 10,000 ~ 75,000m/z、測定モード MS/positive/Linear。

#### 8. 血液の採取と血清の分離

福岡県の事業所従業員 (樹脂工場労働者) および鹿児島県の一般住民を対象とし、インフォームドコンセントを十分に行なった後、自記式質問票調査 (年齢、性別、職種、飲酒、喫煙、アレルギー性疾患既往歴と発症年齢を含む) と血液の採取を行なった。血液を 37°C で凝固させたのち遠心分離し、血清を得た。血清は -80°C で保存した。また、一部の血清は株式会社 LSI メディエンスに送付し、総 IgG 量および総 IgE 量の測定を委託した。

#### 9. 全長 HSA を用いた ELISA

マキシソープ 96 well 白色 plate (Thermo Scientific) を使用した。マキシソープは、well の底面が疎水性に加工されており、タンパク質を疎水性相互作用で結合させることができる。Plate にモル比 1:100 で反応させた HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体と HSA-無水フタル酸を加えて室温で 1 時間インキュベートした。0.1% Tween20 を含む PBS で plate を洗浄した後、ブロッキング液を加え、室温で 1 時間インキュベートした。1 次抗体溶液 (ヒ

ト血清)を加えて室温で1時間インキュベートした後、plateを洗浄し、Anti-human IgG, HRP conjugate (Thermo Scientific, 20,000倍希釈)を添加して1時間培養した。SuperSignal ELISA Femto Substrate (Thermo Scientific)を基質とした発光をFlexStation 3 (Molecular Devices)で検出した。尚、1次抗体と2次抗体はCan Get Signal (東洋紡)を用いて希釈した。

### 1 0. リシン含有ヒト血清アルブミン (HSA) 部分配列の設計と合成

Hettickらは気相のトルエンジイソシアネートとHSAを反応させ、質量分析計で解析することによって、HSA中のLys351、Lys413、Lys414、Lys524、Lys525の5つのリシンがトルエンジイソシアネートと強く反応することを明らかにした(Hettick et al. 2012)。この反応性の高い5つのリシンには、2種の連続したリシンが含まれる。この点に着目し、以下の2種類のHSA部分ペプチドを設計した(図2)。

HSA Peptide Lys1 :  
Biotin-ALLVRYTKKVPQVSTP-COOH  
(MW=2026.45)

HSA Peptide Lys2 :  
Biotin-ERQIKKQTALVELV-COOH  
(MW=1881.24)

尚、HSAペプチドのN末端はbiotinで修飾し、ストレプトアビジンコートプレートに同じ配向性で結合させられるように設計した。これらのペプチドそれぞれ10mgをユーロフィンジェノミクスに合成を委託した。ペプチドはHPLC(日立ハイテック)で精製したものを使用した。

### 1 1. Lys含有HSA部分ペプチドと化学物質との付加体の形成

無水フタル酸とホルムアルデヒドを終濃度100mMでジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide : DMSO)に溶解し、DMSOでさらに希釈して5mM DMSO溶液を調製した。HSA peptide 1mgをPBS 100 $\mu$ Lに溶解し、10mg/mL (5mM) peptide溶液を調製した。無水フタル酸はpH8.0のリン酸ナトリウム緩衝液中で、ホルムアルデヒドはpH10.8の炭酸

ナトリウム緩衝液中で化学物質と反応させた。HSA peptideの終濃度は0.1mM、化学物質とのモル比は1:100、緩衝液の終濃度は100mMとした。HSA peptideと化学物質混合溶液を37°Cで1時間インキュベートした後遠心分離し、上清をHSA peptide-化学物質付加体とした。HSA peptide-化学物質付加体はエッペンチューブに分注し、実験に使用するまで-80°Cで保存した。

### 1 2. MALDI-TOF MS 解析によるペプチドの分子量の決定

測定装置のキャリブレーションには、ProteoMass™ Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich)を使用した。キット中のAngiotensin II ((M+H)<sup>+</sup> = 1046.5423)とACTH Fragment18-39 ((M+H)<sup>+</sup> = 2465.1989)を0.1% trifluoroacetic acid 200 $\mu$ L (終濃度50pmol/ $\mu$ L)に溶解し、ストック溶液を作製した。ストック溶液を0.1%trifluoroacetic acid : acetonitrile = 7 : 3となるように調製した溶液で4 pmol/ $\mu$ Lに希釈し、ワーキング溶液を調製した。Acetone およびmethanol溶液(体積比methanol : 蒸留水 = 1 : 1)を用いて、それぞれ15分ずつ超音波洗浄でよく洗浄したサンプルプレートに、マトリックスとして10mg/mL 2,5-dihydroxy benzoic acid (0.1%trifluoroacetic acid : acetonitrile = 3 : 2の溶液に溶解)を0.5 $\mu$ L滴下した。次に、ワーキング溶液を0.5 $\mu$ Lをマトリックス溶液の上から滴下した。これら溶液を自然乾燥させ、キャリブレーション用サンプルとした。島津/KRATOS飛行時間型質量分析装置AXIMA-QIT(島津製作所)にプレートを挿入し、プレートを真空に保った。測定モードはpositive、測定質量範囲は750-3000m/zを設定し、サンプルにレーザーを照射した。尚、レーザーパワーは80~120の範囲で調製した。Angiotensin IIおよびACTH Fragment18-39の測定により得られたピークをそれぞれ1046.5423、2465.1989に設定した(図3)。

MALDI-TOFによる質量分析では、サンプル中に含まれるイオンにより測定対象分子のイオン化が抑制されることが知られており、我々の予備実験によると、100mMリン酸緩衝液を含むサンプルはイオン化しないが、イオン強度を10mMまで下げるとレーザーによるイオン化が可能となる。この予備的知見を踏まえて、本研究では研究方法11で作製したpeptide-化学物質付加体を蒸留水で10倍希釈し、測定に供した。

サンプルプレートに HSA-化学物質付加体 0.5 $\mu$ L を滴下し、続いて、10mg/mL 2,5-dihydroxy benzoic acid 0.5 $\mu$ L を滴下した。風乾指せた後、AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS 測定に供した。測定範囲は 200~5000m/z、測定モードは MS/positive とした。得られたデータは、MALDI-MS Application ソフトウェア（島津製作所）を用いて解析した。

### 1.3. ビオチン標識 IgG の作製

ELISA による IgG の定量のためには、検量線作成のためのビオチン標識されたヒト IgG が必要である。そこで、Biotin Labeling Kit-NH<sub>2</sub> (同仁化学研究所) を用いてヒト IgG (Human IgG, Whole Molecule Control, Thermo) をビオチン化した。

ヒト IgG 200 $\mu$ g を Filtration tube に添加し、MS Buffer 100 $\mu$ L を加えた。8,000g で 10 分間遠心分離した後、Reaction Buffer 100 $\mu$ L と NH<sub>2</sub> Reactive Biotin 10 $\mu$ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした後、上記と同様に遠心分離した。Filtration tube を WS Buffer で 3 回洗浄した後、Filtration tube に WS Buffer 200 $\mu$ L を添加し、ピペッティングによりビオチン標識されたヒト IgG を回収した。BCA 法によりタンパク定量し、IgG 濃度を決定した後、分注して-80 $^{\circ}$ C で保存した。尚、ビオチン標識ヒト IgG の収率は 73%であった。

### 1.4. Lys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA

HSA peptide を PBS に溶解し、10 $\mu$ g/mL 溶液を調製した。この溶液を 100 $\mu$ L/well となるようにストレプトアビジンがコートされた透明 96 well plate (IMMOBILIZER<sup>TM</sup>, Thermo Scientific) に加え、室温で 1 時間静置した。また、Background として biotin を使用した。5mM biotin を蒸留水で調製し、PBS-T で 1,000 倍希釈した後、100 $\mu$ L/well で plate に添加した。モル比が 1:100、pH8.0 条件で無水フタル酸をモル比が 1:100、pH10.6 条件でホルムアルデヒドを各 well に 100 $\mu$ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。Protein-free blocking buffer (Pierce) を加えて室温で 1 時間静置した後、ヒト血清を 1,000 倍希釈 (無水フタル酸) または 100 倍希釈 (ホルムアルデヒド) して各 well に 100 $\mu$ L ずつ添加した。室温で 3 時間振盪した後、HRP を結合した抗ヒト IgG モノクローナル抗体

(Abcam) 2,000 倍希釈溶液を 100 $\mu$ L/well で加えて室温で 1 時間振盪した。1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific) で発色させた後、450nm における吸光度を測定した。

検量線として研究方法 1.3 で作製したビオチン標識ヒト IgG を使用した。ビオチン標識ヒト IgG 100pg/mL~3ng/mL を 100 $\mu$ L/well で plate に加え、上記と同様に 2 次抗体と反応させ、発色させた。ビオチン標識ヒト IgG の検量線から、血清中の抗 HSA peptide-無水フタル酸 IgG と抗 HSA peptide-ホルムアルデヒド IgG を定量した。

### 1.5. システイン含有 HSA 部分配列の設計と合成

メタクリル酸メチル (MMA) やアクリル酸メチル (MA) はアクリル樹脂やアクリル繊維の原料として産業的に広く用いられている一方、皮膚感作性や気道感作性を示すアレルギー誘発物質である。メタクリル酸メチルやアクリル酸メチルも無水フタル酸やホルムアルデヒドと同様、ハプテンとして生体内蛋白質が結合して初めて抗原性を発現すると考えられる。メタクリル酸メチルやアクリル酸メチルの標的となるアミノ酸はシステインであるため (Bohme at al., 2009)、システイン含有 HSA 部分ペプチドを用いると、メタクリル酸メチルやアクリル酸メチルに対する IgG が定量できるかもしれない。そこで、システイン含有 HSA ペプチドを設計した。

HSA はその分子中に 35 個のシステイン残基を有しているが、そのうち 17 対 34 個は分子内ジスルフィドを形成し、HSA の構造安定化に大きく寄与している。一方、Cys34 のみがチオール基がフリーの状態が存在している。そこで、Cys34 を含む HSA 部分ペプチドを設計した。

HSA Peptide Cys34 :  
Biotin-AFAQYLQQCPFED-COOH  
(MW=1785.99)

HSA ペプチドの N 末端は biotin で修飾し、ストレプトアビジンコートプレートに同じ配向性で結合させられるように設計した。これらのペプチドそれぞれ 10mg をユーロフィンジェノミクスに合成を委託した。ペプチドは HPLC (日立ハイテック) で精製したものを使用

した。

### 1.6. Cys 含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体の形成

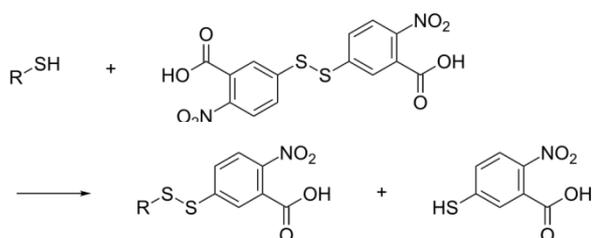
アクリル酸メチルメチルとメタクリル酸メチルを DMSO に渡過し、10mM、100mM DMSO 溶液をそれぞれ調製した。Protein Low Bind Tube で以下の溶液を混合した。

250mM NaPhos Buffer, pH8.0	240μL
H <sub>2</sub> O	300μL
10mM MA or 100mM MMA (または DMSO)	60μL
<u>(final 1mM MA and 10mM MMA)</u>	
Total	600μL

この混合液に HSA Peptide Cys34 を 0.1mg 加え、Vortex により溶解した(終濃度 0.1mM)。37°C で 1 時間インキュベートした。下記、Ellman 法によりアクリル酸メチル、メタクリル酸メチルとシステイン残基との反応を追跡した。

### 1.7. Ellman's reagent を用いたペプチド中システイン残基の定量

チオールは Ellman's reagent と反応すると、ジスルフィド結合を分離し 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸 (TNB) を生成する。1 モルのチオール試料から 1 モルの TNB が即座に生成されるため、TNB の吸光度 ( $\lambda_{\max}=412 \text{ nm}$ 、 $\epsilon=14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) からチオールの濃度が定量できる (Ellman, 1959)。



Ellman's reagent とチオールとの反応

研究方法 1.6 で得た反応溶液 50μL を 96 well half area plate に添加し、DTNB Buffer (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid)を終濃度 1mM で 0.5M Tris-HCl, pH7.6 に溶解) 50μL を加えた。暗所で 10 分間インキュベートした後、412nm における吸光度を測定した。10, 30, 100, 300, 1000μM システイン水溶液を用いて検量線を作成し、ペプチド中のシステ

イン量を定量した。

### 1.8. Cys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA

研究方法 1.6 で得た反応溶液を PBS-T で 20 倍希釈し、100μL/well でストレプトアビジンがコートされた透明 96 well plate (IMMOBILIZER™, Thermo Scientific) に加えた。また、Background として biotin を使用した。5mM biotin を蒸留水で調製し、PBS-T で 1,000 倍希釈した後、100μL/well で plate に添加した。Protein-free blocking buffer (Pierce) を加えて室温で 1 時間静置した後、ヒト血清を 100 倍希釈して各 well に 100μL ずつ添加した。室温で 3 時間振盪した後、HRP を結合した抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (Abcam) 2,000 倍希釈溶液を 100μL/well で加えて室温で 1 時間振盪した。1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific) で発色させた後、450nm における吸光度を測定した。

### 1.9. 二次元電気泳動

HSA-化学物質付加体と膨潤液 (7M Urea, 2M Thiourea, 1.2% CHAPS, 0.4 %ASB14, 0.0025 % Orange G, 20 mM DTT, 0.25% Biolyte 3-10) と混合し、20°C で 20 分間インキュベートした後に遠心分離し、上清を泳動サンプルとした。Immobiline Dry Strips; pI 3-10, 3-10 NL, 4-7, 6-11 (GE Healthcare) を膨潤し、50V、20°C で一晩前泳動した後、サンプルをロードして下記のプログラムで等電点電気泳動を行った。

Steps	Voltage (V)	Vh
1	200	66
2	500	750
3	700	175
4	1000	250
5	1500	375
6	2000	500
7	2500	625
8	3000	750
9	3500	10500
(10)	(500)	(Hold)

泳動後のストリップを還元緩衝液（6 M Urea, 2 % SDS, 20 % Glycerol, 0.002 % BPB, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM DTT）に浸して 25 分間インキュベートした。ストリップを 10%アクリルアミドゲルの上方にアガロースで固定し、定法に従って SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した。

## 2.0. ゲル内消化と AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS 解析

染色後のゲルからメスでスポットを切り出し、脱色液（50% アセトニトリル, 5mM 炭酸水素ナトリウム）に浸して 4°Cで一晩静置した。脱色液を除き、アセトニトリルを加えて 5 分間浸透した。アセトニトリルを真空デシケーターで減圧乾燥し、還元液（10mM DTT, 5mM 炭酸水素ナトリウム）を添加して 56°Cで 1 時間インキュベートした。還元液を除き、アルキル化液（55mM iodoacetamide, 5mM 炭酸水素ナトリウム）を添加して、室温で 45 分間振盪した。アルキル化液を除き、洗浄液（5mM 炭酸水素ナトリウム）で洗浄した後、再度アセトニトリルを加えて脱水した。トリプシン溶液（12.5 ng/μL Trypsin, 5mM 炭酸水素ナトリウム）を加え、4°Cで一晩反応させた後、抽出液（75% アセトニトリル, 0.1% TFA）でペプチドを抽出し、測定サンプルとした。

サンプルプレートに HSA-化学物質付加体 0.5μL を滴下し、続いて、マトリックスである 10mg/mL 2,5-dihydroxy benzoic acid を 0.5μL 滴下した。これらの溶液を風乾させた後、AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS 測定に供した。測定範囲は 200~5000m/z、測定モードは MS/positive とした。

## 2.1. MASCOT 検索によるタンパク質の同定

AXIMA-QIT-plus-MALDI-TOF/MS 解析で得られた MS スペクトルを Mascot (HP : [http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)) に入力し、データベース NCBIInr にて検索した。得られた Protein Score について、統計的にランダムヒットを除き、スコアの高いタンパク質を選択した。

(倫理面への配慮)

生体試料（血液）の採取にあたっては、産業

医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、厚生労働省と文部科学省の合同委員会による「疫学に関する倫理指針」を遵守して行い、結果に関してはプライバシーに十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 化学物質との反応による HSA の構造変化

トルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドはいずれも樹脂原料であり、国内で大量に製造、使用されている化学物質である。一方、これら化学物質暴露による健康影響、特にアレルギー疾患が引き起こされることが報告されている。トルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドはカルボニル基を有することから、タンパク質中のリシン残基と反応すると考えられる。カルボニル炭素は親電子性を有し、アミノ基の窒素原子中の非共有電子対と反応する（図 1）。その反応性はタンパク質中のリシン残基の pKa に依存し、pKa が大きいリシン残基ほど反応性が高くなる。HSA は 1 分子内に 59 個のリシン残基を有し、それぞれのカルボニルに対する反応性が異なることが報告されている (Hettick et al. 2012)。

HSA と化学物質の反応に影響する因子は、HSA と化学物質のモル比と反応時の pH である。pH が高くなるとアミノ基の平衡がイオン型 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) から分子型 (-NH<sub>2</sub>) に移動し、求核性が高くなる。そこで、3 種類のモル比 (HSA : 化学物質 = 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100) と pH (6.0, 8.0, 10.8) の条件化で HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドをそれぞれ反応させ、HSA 中のアミノ基を定量した。トルエン-2,4-ジイソシアネートにおいては、pH6.0, 8.0 ではアミノ基はほとんど反応しなかったが、pH10.8、モル比 1 : 100 条件でアミノ基の減少が認められた（図 4）。HSA と無水フタル酸、或いはホルムアルデヒドとの反応において、pH6.0 ではアミノ基の減少はわずかであったが、pH8.0, 10.8 ではアミノ基が大きく減少した（図 4）。また、減少率は化学物質の比が大きくなるに従って増大した（図 4）。以上の結果より、化学物質は HSA のリシン残基と反応すること、さらに、HSA と化学物質との反応は化学物質のモル比が大きくなるほど、また、pH が高くなるほど増加することが明らかと

なった。従って、反応条件を変化させることにより、効率的に HSA-化学物質付加体を得ることができる。3種の化学物質で反応性が異なるのはカルボニル基周囲の構造に起因すると考えられる。

次に、作製した HSA-化学物質付加体の HSA との立体構造の違いを評価した。SDS-PAGE により電気泳動を行なったところ、HSA-無水フタル酸付加体の泳動度は HSA のそれと比較して減少した (図5)。従って、HSA が無水フタル酸と反応してアミノ基に付加し、分子量が増加していると考えられる。トルエン-2,4-ジイソシアネートと HSA との反応産物の泳動度は HSA と同程度であった。また、Native PAGE における泳動度を比較したところ、HSA-無水フタル酸付加体、および、HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネートを 1:100 で反応させた反応産物の泳動度が増加した (図5)。従って、これらのサンプルの立体構造は、HSA の構造と異なると考えられる。泳動度が増加していることから、アクリルアミドの網目構造を容易に通過できる構造に変化していることが示唆される。

CD スペクトル測定はタンパク質の二次構造の解析に広く用いられている手法であり、スペクトル変化から、 $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$ -構造の変化を推察することができる。HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体と HSA-無水フタル酸付加体の 250~350nm における CD スペクトルを測定したところ、スペクトルに HSA と化学物質のモル比依存的な変化は認められなかった (図6)。また、同様に、185~250nm における CD スペクトルを測定したところ、HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体、HSA-無水フタル酸付加体共に、238nm 付近の負のピークが HSA と化学物質のモル比依存的に減少した (図7)。CD スペクトルのみで二次構造変化を確実に検出することは困難であるが、HSA の構造と CD スペクトルに変化があった波長を鑑みると、トルエン-2,4-ジイソシアネートや無水フタル酸との反応により、HSA の  $\alpha$ -ヘリックス構造が失われていると推察される。

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、トリプトファンは比較的強い蛍光特性をもつ。HSA は 214 番目に 1 つだけトリプトファン残基を有するため、HSA の蛍光は 214 番目トリプトファン付近の構造を反映する。従って、HSA と HSA-化学物質付加体の蛍光を測定す

ると、214 番目トリプトファン付近の構造の微細変化が観察できる。HSA を 231nm で励起すると、348nm 付近にピークをもつ蛍光スペクトルが観察された (図6 8)。このスペクトルは、HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネートまたは無水フタル酸との反応により大きく変化した (図8)。従って、HSA のトリプトファン残基周辺が化学物質の影響を受けていると考えられ、化学物質による HSA の立体構造変化が示唆された。

次に、HSA-化学物質付加体のより正確な立体構造の理解を目指し、AXIMA CFR plus MALDI-TOF MS を用いて詳細な分子量の測定を試みた。HSA-化学物質とマトリックスを混ぜた後レーザーでイオン化し、質量分析を行なった。しかし、結果としてブロードなピークが得られた (図9)。レーザーパワーを調節し、また、異なるマトリックスを使用しても同様の結果であった。コントロールとしてアポミオグロビンの分析を行なったところ、シャープなピークが観察され、分子量の決定が可能であったことから (図10)、測定系は機能していると考えられる。原因は不明であるが、HSA-化学物質付加体の正確な分子量の決定には至らず、HSA に対する化学物質の付加におけるモル比は不明である。

以上の結果を表1に纏めた。トルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドは HSA のアミノ基 (リシン残基) と反応し、付加体を形成する。アミノ基は塩基性下で分子型となり求核性が増加するので、付加体系性反応は塩基性下で促進すると考えられる。Native PAGE、CD スペクトルおよび蛍光スペクトルの測定結果より、HSA が付加体形成により立体構造を変化させることが明らかとなった。化学物質自身はハプテンであり免疫原性を欠いているが、HSA と反応することにより生じる HSA-化学物質付加体は HSA と異なる構造をもつことから、免疫原性を有すると考えられる。

## 2. ヒト血液中化学物質特異的 IgG の ELISA による測定

HSA-化学物質付加体は HSA と異なる構造を有することが明らかとなったため、次に、HSA-化学物質付加体を認識する抗体 (IgG) が血液中に存在することを確認すると共に、多検体中の化学物質特異的抗体をより短時間で測定するための ELISA の作製を目指した。川

本らはドットブロットにより化学物質特異的 IgG の検出に成功しているため (Kawamoto et al. 2015)、ELISA 系の作製には川本らの方法を参考にした (図 1 1、1 2)。

HSA を化学物質と反応させた後、マキシム 96 well plate に疎水性相互作用で結合させた。HSA と HSA-化学物質付加体の plate への結合を抗 HSA 抗体で確認したところ、plate に対する HSA の結合は HSA の濃度依存的に増加し、また、HSA と HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体、HSA-無水フタル酸付加体とのあいだで差は認められなかった (図 1 3)。次に、plate のブロッキング剤を検討した。スキムミルクや BSA をブロッキングに用いると、バックグラウンドが上昇する検体が見受けられた (図 1 4)。一方、非タンパク質性のブロッキング剤はバックグラウンドが低く、中でも Pierce 社製の Protein-free blocking buffer が最もバックグラウンドが低かった (図 1 4)。これらの結果から、plate のブロッキングには Protein-free blocking buffer を使うこととした。タンパク質性のブロッキング剤は、ヒト血清中にそれらを認識する抗体が含まれる場合にバックグラウンドが上昇すると考えられる。さらに、一次抗体として使用するヒト血清の希釈率も検討したところ、10,000 希釈により、測定に最適なシグナル強度が得られることが明らかとなった (図 1 5)。

福岡県の事業所従業員 81 名 (事務員と化学物質を取り扱う従業者を含む) より得た血清を用い、抗原として HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート、HSA-無水フタル酸を使用して ELISA を行った。HSA 未修飾体を抗原として ELISA を時に得られるシグナルをバックグラウンドとして差し引き、ELISA スコアを算出した (図 1 6)。正のスコアが得られていることから、従業員血清中には化学物質特異的 IgG が含まれると考えられる。しかし、同一条件でもう一度 ELISA を行ってみると、ELISA スコアに再現性の得られない検体が認められた (図 1 6)。HSA や HSA-化学物質付加体を疎水性相互作用で plate に結合させているため、HSA の配向性が一定とならないこと、感度を上げるために発光で検出しているが、発光強度にバラつきが生じる (定量性がない) こと、さらに、検量線を用いていないためプレート間の測定値を補正できていないことに問題があると考えられた。そこで、これらの点を改善し、化学物質特異的 IgG の定量するための ELISA

を構築した。

### 3. 化学物質との反応によるリシン含有 HSA 部分ペプチドの修飾

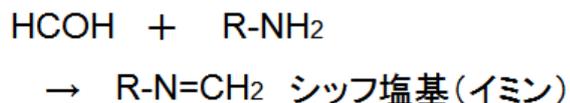
無水フタル酸 (PA)、ホルムアルデヒド (FA) は樹脂や接着剤の原料であり、国内で大量に製造、使用されている化学物質であるが、暴露による健康影響、特にアレルギー疾患を引き起こすことが報告されている。しかし、無水フタル酸とホルムアルデヒドは低分子化学物質であり、それ自身が抗原となることは考え難く、ハプテンとして生体内蛋白質が結合して初めて抗原性を発現すると考えられる。無水フタル酸とホルムアルデヒドはカルボニル基を有することから、タンパク質中のリシン残基と反応すると考えられる。カルボニル炭素は求核性を有し、アミノ基の窒素原子中の非共有電子対と反応する (図 1)。その反応性はタンパク質中のリシン残基の pKa に依存し、pKa が大きいリシン残基ほど反応性が高くなる。HSA は 1 分子内に 59 個のリシン残基を有し、それぞれのカルボニルに対する反応性が異なることが報告されている (Hettick et al. 2012)。

我々は、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA を作製するにあたり (図 1 8)、上記知見を鑑みて、反応性の高い連続したリシンを含むペプチドを 2 種類設計した (HSA Peptide Lys1 と HSA Peptide Lys2)。私たちは、HSA 中のリシン残基が無水フタル酸やホルムアルデヒドと、ホルムアルデヒドでは pH10.6 で、無水フタル酸では pH8.0 でよく反応することを報告している (Tsuji et al., 2016)。そこで、合成した部分ペプチドをそれぞれの pH でホルムアルデヒドまたは無水フタル酸と反応させ、TNBS 法によりリシン残基を定量した。

HSA Peptide Lys1 と DMSO との混合液は 55nmol アミノ基/mg peptide であり、ほぼすべてのアミノ基がフリーで存在することが予測される (図 1 9)。HSA Peptide Lys1 とホルムアルデヒドとをモル比 1 : 100、pH10.6 条件で反応させるとペプチドが有するアミノ基は 5nmol アミノ基/mg peptide となり、ホルムアルデヒドとの反応により 90%以上のアミノ基が失われていることが明らかとなった (図 1 9)。同様に、HSA Peptide Lys1 と無水フタル酸とをモル比 1 : 100、pH8.0 条件で反応させると、アミノ基の 90%以上が失われた (図 1 9)。従って、ホルムアルデヒドと無水フタル酸は、HSA Peptide Lys1 に含まれる

2つのリシンと反応することにより、リシン残基を修飾していると考えられる。また、HSA Peptide Lys2 について同様の実験を行ったところ、HSA Peptide Lys2 のリシン残基もホルムアルデヒドや無水フタル酸との反応で失われた (図 1 9)。従って、本反応条件により、HSA 部分ペプチドのリシン残基がほぼ完全に反応することが分かる。本研究では、HSA Peptide Lys1 と HSA Peptide Lys2 のホルムアルデヒドと無水フタル酸に対する感受性の違いは検出されず、いずれのペプチドもホルムアルデヒドと無水フタル酸とよく反応することが明らかとなった。

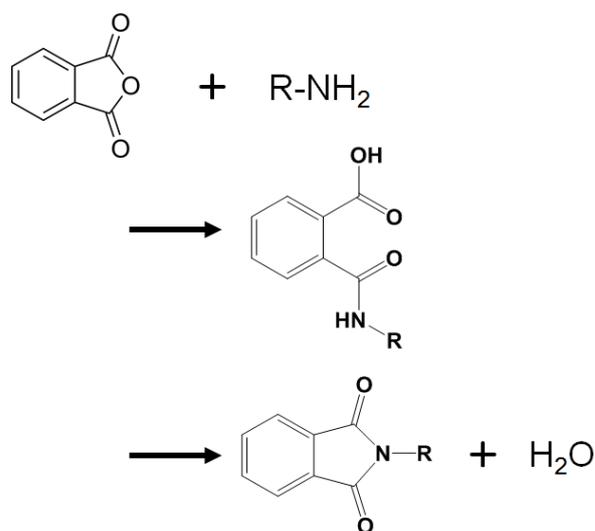
次に、MALDI-TOF MS により、ペプチドと化学物質の付加体の分子量を測定することにより、化学物質のリシン残基に対する反応の推定を試みた。HSA Peptide Lys1 とそのホルムアルデヒド付加体の MS スペクトルを比較すると、ホルムアルデヒド付加体においては未修飾体のピークがほぼ完全に消失し、分子量が 24 増加した位置に主要なピークが出現した (図 2 0)。HSA Peptide Lys2 についても、ホルムアルデヒドと反応させることにより、分子量が 24 増加した (図 2 1)。ホルムアルデヒド分子中のカルボニル基はアミノ基中の窒素原子による求核攻撃を受け、シッフ塩基を生ずると考えられる (図 1)。このとき、修飾を受けたリシン残基の分子量は 12 増加する。HSA Peptide Lys1、HSA Peptide Lys2 ともに 2 つのリシン残基を有することから、これら 2 つのリシン残基が共にシッフ塩基へと反応すると、ペプチドの分子量は 24 増加することとなる。つまり、ホルムアルデヒドと HSA 部分ペプチドとの反応は、① TNBS 法により、ペプチドのアミノ基はほぼすべて修飾されている、② ホルムアルデヒドとペプチドとの反応により、ペプチド分子量は 24 増加することから、以下の反応に従ってペプチド中のリシン残基が修飾されていると考えられる。



リシン含有 HSA 部分ペプチドとホルムアルデヒドとの推定反応機序

次に、無水フタル酸付加体についても同様に解析した。HSA Peptide Lys1 とその無水フタ

ル酸付加体の MS スペクトルを比較すると、未修飾体よりも分子量が 130 大きい位置にピークが現れた (図 2 2)。しかし、無水フタル酸との反応生成物の測定に際しても、未修飾体と思われるピークも残っていた (図 2 2)。HSA Peptide Lys2 についても、無水フタル酸と反応させることにより、分子量が 130 増加したピークが現れ、未修飾体のピークも残存した (図 2 3)。無水フタル酸もホルムアルデヒドと同様、カルボニル化合物であり、アミノ基の求核攻撃を受ける。分子量が 130 増加することを考えると、下記の反応により 3 級アミンが生成していると考えられる。



リシン含有 HSA 部分ペプチドと無水フタル酸との推定反応機序

無水フタル酸とリシン含有 HSA 部分ペプチドとの付加体においては、TNBS 法によりペプチド中のアミノ基がほぼ完全に失われているにも関わらず、MS のスペクトルを見ると、未反応体が多く存在するとの結果が得られた。また、ペプチド中の 2 つのリシンがともに 3 級アミンへと反応していれば分子量が 260 増加するはずであるが、未修飾体と比して分子量が 130 増加しているピークのみ観察された。この原因として、MALDI-TOF MS 測定の際のレーザー照射が挙げられる。レーザーによるイオン化の際、リシン残基のアミノ基と結合していた無水フタル酸が解離したと考えられる。結論として、リシン含有 HSA 部分ペプチドはカルボニル化合物と反応し、ホルムアルデヒドはシッフ塩基 (イミン) を形成し、無水フタル酸は 3 級アミンを形成すると考えられる。TNBS 法によりアミノ基の減少が検出される

ことから、これらイミンや 3 級アミンは室温では安定であることが示唆される。次に、イミンや 3 級アミンを介して結合するペプチド化学物質付加体を抗原として用い、血液中化学物質特異的 IgG の定量を試みた。まず、ELISA の諸条件を決定した。

#### 4. リシン含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体を抗原とした、ELISA によるヒト血液中化学物質特異的 IgG の定量

リシン含有 HSA 部分ペプチドとカルボニル基を有する化学物質は、イミンや 3 級アミンを介して結合することが明らかとなった。HSA 部分ペプチドの N 末端はビオチンで修飾されており、ストレプトアビジンでコートされたプレートに強い親和力で結合するため、これら付加体を用いた ELISA を行うことができる。そこで、まず、ELISA を行うにあたり、諸条件を検討した。

#### Blocking 試薬の検討

Blocking 試薬として、10 $\mu$ M ビオチン、3% スキムミルク、1% ウシ血清アルブミン(BSA) および Pierce 社製の Protein-free blocking buffer を候補とした。未修飾の HSA Peptide Lys1 または HSA Peptide Lys2 を plate に結合させ、ヒト血清 20 検体を用いて 450nm における吸光度を測定した。スキムミルクや BSA といったタンパク質性の Blocking 試薬を用いると、検体によっては非常に強いシグナルが検出され、測定誤差が極めて大きくなった(図 2 4)。一方、Protein-free blocking buffer を用いると、450nm における吸光度は低い値で安定していた(図 2 4)。これらの結果より、本研究では Protein-free blocking buffer を Blocking 試薬として使用することとした。ヒト血清中には様々なタンパク質に対する抗体が含まれ、またその含有量は検体によって大きく異なる。従って、タンパク質性の Blocking 試薬は、ヒト血清を 1 次抗体として用いる ELISA には適さないと考えられる。

#### 検量線の検討

血液中化学物質特異的 IgG とアレルギーとの関係性を評価するためには、血液中化学物質特異的 IgG を定量する必要がある。本研究では IgG 定量法について、① 2 次抗体として用いるモノクローナル抗ヒト IgG 抗体-HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) 修飾体において、抗

体 1 分子あたりに結合している HRP の分子数を明らかにし、HRP のシグナル強度から化学物質特異的 IgG 量を計算する。② 商用ヒト IgG をビオチン化し、ストレプトアビジンコート plate に結合させることにより検量線を作成し、化学物質特異的 IgG を定量する、の 2 点について検討した。

モノクローナル抗ヒト IgG 抗体-HRP 修飾体について、IgG の分子量は約 15 万であり HRP の分子量は約 4 万である。従って、SDS-PAGE により分子量を求めると、抗体と HRP のモル比が求まる。また、IgG は還元すると軽鎖(分子量約 25,000)と重鎖(分子量約 50,000)に分かれて検出されるため、抗体と HRP のモル比の測定が容易になると考えられる。

Mouse monoclonal H2 anti-Human IgG Fc (HRP) (ヒト IgG の Fc 領域に対するモノクローナル抗体、Abcam ab99765) を SDS-PAGE で泳動したところ、ラダー様のバンドが認められた。250kDa を超える高分子量のバンドも検出された(図 2 5)。また、重要なことに、HRP と同じ分子量のバンドが検出され(図 2 5)、抗体から HRP が遊離していることが示唆された。従って、2 次抗体の抗体 1 分子あたりに結合している HRP の分子数の決定には至らなかった。

Human IgG Whole Molecule Control (Thermo 31154, Lot No. QE2023531) を Biotin Labeling Kit-NH<sub>2</sub> を用いてビオチン化した。このときの収率は 73%であった。ここで作製したビオチン化 human IgG を 1fg/mL から 10 $\mu$ g/mL の濃度に希釈し、ストレプトアビジンコートプレートに結合させた後、2 次抗体(モノクローナル抗ヒト IgG 抗体-HRP 修飾体)で検出した。濃度依存的に 450nm における吸光度の上昇が認められ、特に、100pg/mL から 3ng/mL の濃度範囲においては IgG 濃度と 450nm における吸光度との間に直線性が認められた( $R^2 = 0.9966$ )(図 2 6)。従って、ビオチン化ヒト IgG を検量線に用いると、ヒト血液中 IgG が定量でき、また、検出限界値は 0.1ng/mL であることが明らかとなった。

以上より、ELISA による定量条件が決定したため、福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名について、血液中化学物質 IgG の測定を行った。

### ヒト血清中抗ホルムアルデヒド-IgG の定量

HSA peptide Lys1 と HSA peptide Lys2 をストレプトアビジンコート plate に固定化し、ホルムアルデヒドと反応させた。福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名の血清中抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体と抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体を定量した。検量線の有効濃度内に収まる結果を得るため、ヒト血清は 100 倍希釈して測定に供することとした。

抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体、抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体共に、一般住民と工場労働者両方から検出された (図 2 7)。一般住民と工場労働者の血清中抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys 抗体の平均値を比較すると、抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体、抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体共に、行動労働者の方が血清中の抗体量が多い傾向にあった (図 2 7)。しかし、有意差は得られなかった。各検体における抗体量のばらつきが非常に大きいためである (表 2)。検体ごとに測定値と質問票から得られるアレルギーについて、関連を解析する必要があるであろう。また、ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体と抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体の量に関して、抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体の絶対量が多い傾向にあったが (図 2 7、表 1)、抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体が検出される検体は抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体を有していることも多く (表 1)、2 種類のペプチドを使用し、測定値を比較することによって測定の validation を行うことができるかもしれない。

### ヒト血清中抗無水フタル酸-IgG の定量

ホルムアルデヒド抗体測定の際と同様、HSA peptide Lys1 と HSA peptide Lys2 をストレプトアビジンコート plate に固定化し、無水フタル酸と反応させた。福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名の血清中抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体と抗無水フタル酸-HSA peptide Lys2 抗体を定量した。検量線の有効濃度内に収まる結果を得るため、ヒト血清は 1,000 倍希釈して測定に供することとした。

抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体、抗無水フタル酸-HSA peptide Lys2 抗体共に、一般住民と工場労働者両方の血清から検出され

た (図 2 8)。工場労働者の血清中抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体量は一般住民のそれと比較して有意に多かった (図 2 8)。抗無水フタル酸-HSA peptide Lys2 抗体量については、工場労働者と一般住民の群間で有意な差は得られなかった (図 2 8)。また、抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体と抗無水フタル酸-HSA peptide Lys2 抗体の血液中の絶対量を比較すると、抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体量の方が極めて多い結果が得られた (図 2 8)。従って、血清中抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体量の方が、無水フタル酸曝露をより顕著に表す可能性が考えられる。表 1 より、ホルムアルデヒドの場合と同じく、抗無水フタル酸-HSA peptide Lys 抗体量の検体間のバラつきが大きかった。従って、無水フタル酸についても、検体ごとの個別の評価が重要となってくるであろう。

以上より、リシン含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体を抗原として用いた ELISA により、ヒト血清中の化学物質 IgG を、検出限界 0.1ng/mL という非常に高感度で定量することができた。

### 5. ヒト血液中化学物質特異的 IgG 量とアレルギーとの相関

福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名について質問票の回答およびヒト血清中の化学物質 IgG 量を表 2 に示した。工場労働者の中には、成人してから気管支喘息などのアレルギーを発症した 3 名が含まれており、この 3 名は高い血清中ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys 抗体、或いは無水フタル酸-HSA peptide Lys 濃度を示している。

### 6. 化学物質との反応によるシステイン含有 HSA 部分ペプチドの修飾

上述のように、ホルムアルデヒドや無水フタル酸といったカルボニル化合物と HSA 部分ペプチドとの付加体に対する IgG がヒト血液中には存在し、さらに、このような化学物質特異的 IgG は一般住民と比較して樹脂工場労働者の血清中に多く検出されることから、上記で確立した HSA 部分ペプチドを用いた ELISA は化学物質の曝露状況評価や化学物質アレルギー診断に応用できるかもしれない。一方で、感受性を示す化学物質の中には、リシン以外のアミノ酸を特異的な標的とするものもある。アク

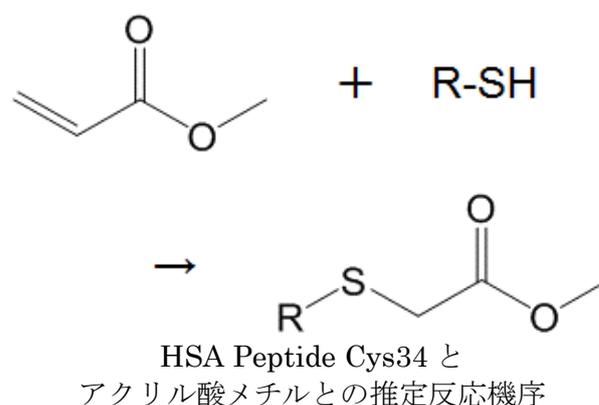
リル酸メチル (MA) やメタクリル酸メチル (MMA) はアクリル繊維やアクリル樹脂の原料として産業的に広く用いられている一方、皮膚感作性や気道感作性を示すアレルギー誘発物質である。メタクリル酸メチルやアクリル酸メチルも無水フタル酸やホルムアルデヒドと同様、ハプテンとして生体内蛋白質が結合して初めて抗原性を発現すると考えられる。メタクリル酸メチルやアクリル酸メチルの標的となるアミノ酸はシステインである (Bohme et al., 2009)。そこで、システイン含有 HSA 部分ペプチドを用い、アクリル酸メチルやメタクリル酸メチルに対する抗体を検出できる ELISA の構築を試みた。

HSA はその分子中に 35 個のシステイン残基を有しているが、そのうち 17 対 34 個は分子内ジスルフィドを形成し、HSA の構造安定化に大きく寄与している。一方、Cys34 のみがチオール基がフリーの状態が存在している。従って、曝露後、生体内に取り込まれたアクリル酸メチルやメタクリル酸メチルが HSA と反応しているのであれば、反応部位は Cys34 が最有力である。そこで、Cys34 を含む HSA 部分ペプチドを設計し (HSA Peptide Cys34)、アクリル酸メチル、メタクリル酸メチルと反応させた後、チオール量を Ellman 法により測定した。

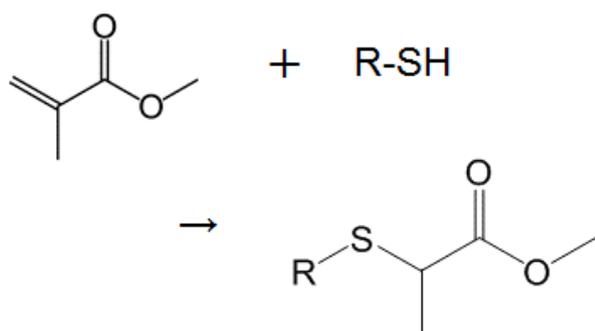
HSA Peptide Cys34 を DMSO の存在下でインキュベートすると、ペプチドに含まれるチオールはインキュベート時間依存的に失われた (図 2 9)。従って、HSA Peptide Cys34 は自動酸化、おそらくは分子間ジスルフィド結合の形成により、チオール基を失うと考えられる。HSA Peptide Cys34 とアクリル酸メチルとを混合し、インキュベートすると、チオールの減少速度は HSA Peptide Cys34 の自動酸化と比較して大きく増大した (図 2 9)。従って、アクリル酸メチルは HSA Peptide Cys34 のチオール基と反応していると考えられる。一方、HSA Peptide Cys34 とメタクリル酸メチルとを混合しインキュベートしたところ、時間依存的なチオール基の減少は認められたが、その減少速度は自動酸化のそれと大きく変わらなかった (図 2 9)。以上の結果から、アクリル酸メチルのチオールに対する反応性は非常に高い一方、メタクリル酸メチルのそれは比較的低いと考えられる。従って、部分ペプチド ELISA を構築する場合、アクリル酸メチルと HSA Peptide Cys34 との付加体を抗原として使用

することは可能であるが、メタクリル酸メチルと HSA Peptide Cys34 との付加体を多く得ることは難しいことが示唆された。

次に、MALDI-TOF MS により、ペプチドと化学物質の付加体の分子量を測定することにより、化学物質のシステイン残基に対する反応の推定を試みた。HSA Peptide Cys34 とそのアクリル酸メチル付加体の MS スペクトルを比較すると、アクリル酸メチル付加体においては未修飾体のピークがほぼ完全に消失し、分子量が 86 増加した位置に主要なピークが出現した (図 3 0)。アクリル酸メチルはシステイン残基中チオールと反応し、チオエーテルを形成すると考えられる (Böhme et al., 2009)。このとき、HSA Peptide Cys34 の分子量は 86 増加する。従って、HSA Peptide Cys34 は以下の反応様式でアクリル酸メチルと反応していると考えられる。



HSA Peptide Cys34 とそのメタクリル酸メチル付加体の MS スペクトルを比較すると、メタクリル酸メチル付加体においては未修飾体のピークがほぼ残っていた一方、分子量が 100 増加した位置に小さなピークが出現した (図 3 1)。メタクリル酸メチルもアクリル酸メチルと同様、システイン残基中チオールと反応し、チオエーテルを形成すると考えられる (Böhme et al., 2009)、このとき、HSA Peptide Cys34 の分子量は 100 増加する。従って、反応量は少ないものの、アクリル酸メチルと同様のメカニズムでメタクリル酸メチルがシステインと結合すると考えられる。



HSA Peptide Cys34 と  
メタクリル酸メチルとの推定反応機序

以上より、アクリル酸メチル、メタクリル酸メチルともにチオエーテルを介してシステイン残基を修飾すると考えられる。しかし、Ellman 法によるチオール定量の結果より、アクリル酸メチルは反応性が高く、メタクリル酸メチルは低かった。MALDI-TOF MS 測定における未修飾体のピークの高さからも同様の推察ができる。そこで、アクリル酸メチルと HSA Peptide Cys34 との付加体を抗原として ELISA を行うこととした。

#### 7. システイン含有 HSA 部分ペプチドとアクリル酸メチルとの付加体を抗原とした、ELISA によるヒト血液中化学物質特異的 IgG の定量

アクリル酸メチルは HSA Peptide Cys34 と 30 分間反応させるとほぼすべてのチオールを修飾する (図 2 9)。そこで、アクリル酸メチルと 30 分間反応させた HSA Peptide Cys34 をストレプトアビジンコート plate に結合させ、研究結果 4 に準じた方法により、1000 倍、100 倍に希釈したヒト血清を用いて ELISA を行った。しかし、一般住民検体、工場労働者検体ともに 450nm における吸高度の増大は観察されなかった (data not shown)。従って、ヒト血清中には、アクリル酸メチル-HSA Peptide Cys34 を認識する IgG は含まれていない、あるいは、存在したとしてもごく微量であると考えられる。

#### 8. プロテオミクスの手法を用いた血液中 HSA-化学物質付加体検出の試みと新規血液中化学物質暴露マーカーの探索

生体内に取り込まれた化学物質は、HSA やヘモグロビン、アクチン、チューブリンなど様々なタンパク質と付加体を形成して免疫原性を獲得し、その結果、化学物質アレルギーが発症すると考えられる (Day et al. 1996;

Lange et al. 1999; Wisnewski et al. 2000; Hettick and Siegel 2011)。従って、血液中における化学物質付加体を検出することができれば、化学物質暴露のマーカーや診断手法に応用できるかもしれない。このような背景の下、一般事務員と職場でトルエン-2,4-ジイソシアネートを使用している労働者の血清とをプロテオミクスの手法で解析し、労働者の血清中のタンパク質-化学物質付加体の検出を目指し、さらに、労働者の血清中で増減するタンパク質も検索し、新規化学物質暴露マーカーとしての可能性を検討することを目的とした。

トルエン-2,4-ジイソシアネートを取り扱っている労働者の血清と一般事務員 (トルエン-2,4-ジイソシアネートを扱わない) の血清を二次元電気泳動で展開し、CBB 染色すると複数のスポットが認められた (図 3 2)。スポットを切り取り、トリプシンで消化した後、AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS を用いてタンパク質の同定を試みたところ、図 1 6 中のスポット 3 が HSA であることが明らかとなった (図 3 3、3 4)。スポット 3 の周囲には複数のタンパク質が配置しており、これらは HSA の修飾体であると考えられる。現在の二次元電気泳動ではスポットの分離が悪く、CBB 染色であるため検出感度も低い。グラジエントゲルを用いて分解能を上げ、さらに、蛍光染色により感度を上げて、HSA の化学物質付加体の分離を目指したい。HSA に対する化学物質の結合部位、および、結合のモル比が明らかになると、これらにフォーカスした ELISA を作製することが可能となり、化学物質暴露の検出感度がさらに高まり、化学物質アレルギーとの関連についてより高度な議論が展開できる。

二次元電気泳動の結果、分解能よく単離された HSA 以外の 3 つのスポットについて、タンパク質の同定を試みた。スポット 2 のタンパク質は同定できなかったが、スポット 1 のタンパク質はアポリポプロテイン A-I、スポット 2 のタンパク質は  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質と同定できた (図 3 5、3 6)。アポリポプロテイン A-I はトルエン-2,4-ジイソシアネート取り扱い労働者において増加しており、 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質は減少していた。アポリポプロテイン A-I は、脂質運搬タンパク質であり、HDL の変化を知るための指標として臨床検査の場で使用されている。一方、 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質は外傷、外科手術、熱傷、心筋梗塞、腫瘍疾

患、炎症性疾患（リウマチ、クローン病など）、感染症時などに激増する急性期蛋白であり、塩基性化学物質と強く結合する特徴がある。まだ1例だけであるため、これらのタンパク質と化学物質暴露との関連は不明であるが、例数を増やし、プロテオミクスの手法からもタンパク質の化学物質付加体を同定し、また、新たな血液マーカーを探索して、化学物質暴露指標の決定や化学物質とアレルギーとの関連の解明に貢献したい。

#### D. 考察

職業性アレルギーは、労働者が職場内において原因物質に曝露されることによって感作され、物質への曝露が継続されることで症状を呈する。10万種類にもおよぶ化学物質が工業的に生産され、産業、農業や医療等さまざまな分野で使用されていることから、化学物質に起因したアレルギー障害が産業保健現場での大きな課題となっている。化学物質への曝露は経気道、或いは、経皮が中心であることから、症状として、気管支喘息やアレルギー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎などが目立つ。本研究では、本邦における使用量が多い樹脂原料（可塑剤を含む）であり、かつ、生産物が一般に広く流通している（一般住民も生産物に日常的に接する）化学物質として、トルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドに焦点を当てて解析した。

樹脂原料や薬物など低分子はハプテンでありそれ単独では免疫原性をもたない。しかし、生体内高分子と結合し、高分子の構造が変化することによって免疫原性を獲得すると考えられる。従って、化学物質の反応性とタンパク質を（部分的に）変性させる活性が化学物質アレルギーの起こりやすさを決定する一因であろう。本研究ではハプテンが免疫原性獲得に至る過程で特に重要なタンパク質変性活性を6つの手法で解析した。今回、用いたトルエン-2,4-ジイソシアネート、無水フタル酸、ホルムアルデヒドはすべてカルボニル基を有している。カルボニル基は親電子性であり、アミノ基と反応する。従って、HSA中のリシン残基がこれらの化学物質の標的となっていると考えられる。実際、TNBS法により、化学物質と反応させたHSAは、分子中に含まれるアミノ基数が減少していることが明らかとなり、化学物質がリシン残基と反応していること証明された。

HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体、および、無水フタル酸付加体は電気泳動、CDスペクトル、蛍光スペクトルの変化が観察され、質量分析による付加体の分子量の決定には至らなかったものの、化学物質の付加により構造が変化することが明らかとなった。ホルムアルデヒドについても、トルエン-2,4-ジイソシアネートや無水フタル酸と同様の機構でHSAと反応することから、HSAの構造変化を引き起こすと考えられる。さらに、これら付加体を用いたELISAにより、ヒト血液中に抗HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体特異的IgG、抗HSA-無水フタル酸付加体特異的IgGが検出された。従って、経皮曝露、あるいは、経気道曝露により体内に取り込まれたトルエン-2,4-ジイソシアネートや無水フタル酸の一部は血液中に取り込まれ、HSAと付加体を形成することによって抗体産生を刺激していると考えられる。

実験室レベルでHSA-化学物質付加体を作製する場合、リシン残基の電離平衡は塩基性領域で分子型に偏ることを利用し、塩基性下でHSAと化学物質を反応させることにより効率的にリシンへの付加反応を進めることができる。しかし、図4より、pH10.8、モル比1:100でHSAと化学物質とを反応させても、すべてのリシン残基が化学物質と反応しなかった。Hettickらは、HSAとトルエン-2,4-ジイソシアネートとの反応について、反応性の高いリシン残基をMALDI-TOF MSを用いて同定している（Hettick et al. 2012）。タンパク質中のアミノ酸のpKaは、周囲のアミノ酸に影響される。例えば、カスパーゼやプロテインホスファターゼPTP1Bの活性中心に存在するシステインは、塩基性アミノ酸に囲まれているために一般的なシステインと比較して低いpKaをもつ（Peters et al. 1998; Rotonda et al. 1996; Winterbourn and Metodiewa 1999）。このことは、酵素の触媒反応に寄与すると共に、これらタンパク質の親電子物質に対する脆弱性の原因にもなっている。HSA中のリシン残基についても、周囲を取り囲むアミノ酸を解析することにより、in silicoでHSA-化学物質付加体のどのリシンに化学物質が付加しているかを見積もることができるかもしれない。

HSAは血液中における生体内低分子のキャリアであり、HSAは薬物をはじめとした低分子と結合して構造を変化させることが報告されている。また、CDスペクトルは、タンパク

質の立体構造変化を簡便に観察できることから、HSA の立体構造研究にも頻用されており、胆汁酸やイブプロフェン、ゲムフィプロジル、5-アザシチジン、クルクミン、イソフラボンなど、生体内外の低分子との結合による HSA の構想変化が CD スペクトル変化により測定されている (Mahesha et al. 2006; Pulla Reddy et al. 1999; Tunç et al. 2013; Zsila 2013)。本研究において、化学物質との反応により HSA の CD スペクトルは大きく変化することから (図 7)、上記の報告は、本研究における HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体、および、無水フタル酸付加体の立体構造変化を強く支持すると考えられる。

HSA と化学物質との付加体を抗原とした ELISA を行う場合、HSA を ELISA 用 plate に結合させる必要があり、一般的に、タンパク質は疎水性相互作用で plate に結合させる。しかし、HSA-化学物質付加体を疎水性相互作用で plate に結合させた ELISA では、測定結果のバラツキが大きく、信用に足る結果が得られなかった。この原因として、HSA-化学物質付加体の plate への結合の不安定性 (配向性が異なる) が考えられた。そこで、本研究では、HSA の部分ペプチドを抗原として使用し、そのアミノ末端をビオチンで修飾した。ストレプトアビジンコート plate を用いると、ビオチン-HSA 部分ペプチドを常に一定の方向性で plate 結合させることができるため、バラツキの少ない結果が得られると考えた。

リシン残基を含有する HSA 部分ペプチドは、ホルムアルデヒドや無水フタル酸と反応し、リシン残基を失うことが明らかとなった、また、質量分析計による解析の結果、リシン残基はイミンや 3 級アミンを介して修飾されていることが明らかとなった。さらに、一般住民、樹脂工場労働者の血清を用いた ELISA により、ヒト血清中にはホルムアルデヒドや無水フタル酸と反応した HSA Lys413、Lys414、Lys524 および Lys525 と反応する IgG が含まれていることが分かる。さらに、樹脂工場労働者血清中のホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG および無水フタル酸-HSA 部分ペプチド IgG は、一般住民のそれと比較して多かったことから、本研究で作成したホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチドや無水フタル酸-HSA 部分ペプチドを抗原として用いた ELISA は、ホルムアルデヒドや無水フタル酸の曝露状況評価に用いることができると考えられる。今後は検体数

を増やすとともに、ことなる環境から得られた検体の測定を行うことにより、本 ELISA の曝露状況評価法としての有用性について慎重に検討したい。

質問表より得られたアレルギーに関する状況と定量したホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG および無水フタル酸-HSA 部分ペプチド IgG 量を比較すると、IgG 量が高い工場労働者において、成人後アレルギーを発症した例が 3 例認められた。従って、ホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG および無水フタル酸-HSA 部分ペプチド IgG 量が化学物質アレルギーの指標に成り得るかもしれないが、現状、実験結果に乏しく更なる解析が必要であろう。化学物質アレルギーをどのように診断するかが重要な点であり、また、質問表だけでなくサイトカイン量やケモカイン量、C reactive protein など、様々な指標によりアレルギーを診断し、血清中ホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG および無水フタル酸-HSA 部分ペプチド IgG 量との創刊を調べることが必要であろう。

本研究で構築したペプチド ELISA の利点は、抗体 (血清中 IgG) の認識部位が明らかであることである。つまり、血清中 IgG とアレルギーとの関係が示せれば、化学物質が HSA の特異的アミノ酸と結合して抗体産生を刺激するといった、化学物質がどのような機序でアレルギーを引き起こすかを分子メカニズムレベルで示すことができる。このことは、抗体量測定の前段階として、HSA をはじめとしたキャリアタンパク質の修飾状態でアレルギーを予測することを可能とするため、アレルギーの発症前診断への道を開くことが期待される。

ホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG および無水フタル酸-HSA 部分ペプチド IgG がヒト血清中で検出された一方、アクリル酸メチル-HSA 部分ペプチド IgG はヒト血清中に検出されなかった。アクリル酸メチルは、チオエーテルとして HSA 部分ペプチドと結合することを明らかにしているため、抗原の作製に問題はない。アクリル酸メチル-HSA 部分ペプチド IgG はヒト血清中に検出されなかった原因として、ハプテンとしての働きの違いが推察される。すなわち、カルボニル化合物は、リシン残基への特異的結合を介してタンパク質の立体構造変化を引き起こすが、アクリル酸メチルはシステイン残基を介した結合により抗原性を惹起する訳ではない。他の結合様式、おそら

くは疎水性相互作用によりタンパク質と相互作用し、構造変化を引き起こすと考えられる。アクリル酸メチルには感査性が認められることから何らかの機序により抗体産生を引き起こしているはずであり、このことは、アクリル酸メチルによる疎水性相互作用によるタンパク質構造変化を支持する。また、これらの知見は、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA の限界も示しており、化学物質がタンパク質の特定のアミノ酸への結合以外の様式でタンパク質の立体構造を変化させる場合には、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA による IgG の検出は難しい。このような場合は、HSA 分子を用いた ELISA を行うべきであろう。化学物質に応じて適切な検出系を使い分けることが、ELISA による化学物質の曝露状況評価、アレルギー診断に重要であろう。

職業性アレルギー疾患の予防のためには起因抗原の正確な診断が重要である。正確な診断のためにはまず検査の前に経過や症状の程度、職業歴や既往歴などの詳細な問診が必要である。問診の後アレルギー性が疑われるようであれば検査を行うことになるが、アレルギー性皮膚炎の診断で最も行われているのがパッチテストである。十分な量のアレルゲンを強制的に経皮吸収させ、アレルギー反応を惹起させ、紅斑、膨疹といった局所反応がみられれば陽性という判定になる。イギリスの接触皮膚炎ガイドラインでは、パッチテストの感度と特異度が70~80%とされており、パッチテストは接触皮膚炎の原因検索を行う際に必須であると判断されている。一方でパッチテストによる副作用も指摘されており、日本皮膚科学会接触皮膚炎診療ガイドラインではパッチテストにより、強刺激物質や腐食性化学物質は強い反応を生じることがあり、それに伴い色素沈着や色素脱失、瘢痕を形成することがあり、強感作物質はパッチテストにより新たな感作を起こすことがあるとされている。よって妊婦への使用は診断上の有益性が危険性を上回ると判断される場合にのみしか使用できないとされていることや、あるいは併用内服薬（プレドニゾロンを1日15mg以上経口内服している患者など）によってはパッチテストを実施できないなど簡便にできる検査とは言えない。従って、より安全アレルギー診断法の確立が待たれている。

アレルギー性皮膚炎は一般的に、表皮にいる抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞を介した遅延型のアレルギー反応（IV型）とされて

いる。気管支喘息やアレルギー性鼻炎は IgE を介した即時型（I型）とされているが最近では IgG が関与した遅発性アレルギーの報告もあり化学物質に起因したアレルギー疾患の発生病序は不明な点が多い。川本らは化学物質特異的 IgG と皮膚炎との関連を示しており

（Kawamoto et al. 2015）、IgG も化学物質アレルギーの指標になり得ると考えられる。IgG 抗体は血中に最も多く存在し免疫グロブリン全体の約 80%を占める一方、IgE のそれは0.001%以下と極微量しか存在しない。従って、IgG が化学物質アレルギーの指標になり得るとの知見が集積すれば、IgG をターゲットとする診断の方が鋭敏にアレルギーを診断できることが期待される。現在でも特定の抗原に対する特異的 IgE 抗体を測定する RAST（radioallergosorbent test）や ELFA（Enzyme-Linked Fluorescence Assay）が商業ベースで使用されているが、測定できる抗原の数も少なく、また、化学物質アレルギーを反映するかについては十分な証拠もない。さらに、これらの測定では、化学物質抗体を定量できない。また、特異的 IgG 抗体の測定については食物抗原特異的 IgG 抗体検査が行われているがその有用性については議論がある。

本研究では、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA により、血液中の化学物質特異的 IgG の定量に成功した。タンパク質と化学物質付加体を抗原として化学物質抗体を測定している報告は少ないながらも存在するが（Bernstein et al. 1982; Nielsen et al. 1988; Pakarinen et al. 2002; Park et al. 2002）、部分ペプチドを使用した例は初である。部分ペプチドはタンパク質に比べてハンドリングが容易であり、さらに、検出した抗体の認識部位を決定できることから、部分ペプチドを化学物質特異的抗体の検出に用いる優位性がある。また、本 ELISA は、一般的な ELISA と同じく、2次抗体を変更するだけで IgE など他の分子種の測定も可能である。また、他の化学物質特異的 IgG の検出もできるであろう。本 ELISA は様々な測定に応用できる可能性を秘めている。

Lemons らは、60G2 というトルエン-2,4-ジイソシアネートに対する抗体を用い、血液中の HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体を検出するためのサンドイッチ ELISA を開発したと報告している（Lemons et al. 2013）。60G2 は、トルエン-2,4-ジイソシアネートを Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) をキャ

リアとしてマウスに免疫して作製したモノクローナル抗体であり、HSA や MSA、ケラチンなど様々なトルエン-2,4-ジイソシアネート付加体を認識するとされる (Ruwona et al. 2011)。血液中のトルエン-2,4-ジイソシアネート付加体を定量するためには非常に有用なツールであると考えられ、研究が進むと、トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体の絶対量とアレルギーとの関連を考察することも可能となるかもしれないが、抗体のターゲットが不明 (トルエン-2,4-ジイソシアネートは低分子であり、それ自身が抗体の産生を刺激するとは考え難い) であることや、付加体間で親和性が異なることなど、60G2 の詳細な解析が必要であろう。トルエン-2,4-ジイソシアネート付加体を用いて血液中の IgG と IgE を検出した報告は少ないながらも存在する。Park らは、トルエン-2,4-ジイソシアネート喘息患者を、I : 診断の後薬物治療によっても改善しない群、II : 改善はしたが喘息症状が残り薬物の投与を必要とする群、及び、III : 寛解した群の 3 群に分け、血液中の HSA-トルエン-2,4-ジイソシアネートを認識する IgG と IgE を ELISA で測定している (Park et al. 2002)。結果として、IgG は I 群の方が高く、IgE は II 群の方が高いという結果を得た。この報告では、例数が 10 例程度であるため、例数の追加が必要であると思われるが、IgE と IgG との反応が異なる点で非常に興味深い。本研究において、HSA-化学物質付加体を用いた ELISA では、同一検体でも結果がバラつき、validation をとるのが難しいことが明らかとなっている。新規 ELISA 法により、IgG に加えて IgE も定量し、それらの相関も調べるべきであると考えられる。

本研究により、HSA-化学物質付加体の立体構造を解析し、化学物質の結合により、HSA の構造が変化することを明らかにした。HSA 分子を用いた ELISA では、測定結果にバラツキが大きく、実用は難しいように思えた。しかし、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA 系を構築できた。即ち、HSA のリシン残基がイミンや 3 級アミンを介してカルボニル化合物により修飾を受けることが明らかとなった。HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体を用いた ELISA により、ヒト血清中の化学物質特異的 IgG の定量に成功し、本法が工場労働者の化学物質曝露状況評価や化学物質アレルギー診断に応用できることを示唆した。本 ELISA は、ここで調べた化学物質以外の物質

を評価することも可能であり、また、化学物質特異的 IgE の定量にも応用できる。本研究は、定量値に基づく新たな化学物質曝露評価法、化学物質アレルギー診断法を提案した点で非常に意義がある。

## E. 結論

本研究において、HSA-化学物質付加体の立体構造を詳細に解析し、化学物質により HSA の微細構造が変化することを明らかにし、化学物質が免疫原性を獲得するに至る過程を示した。カルボニル化合物であるホルムアルデヒド (FA) と無水フタル酸 (PA) と、リシン含有 HSA 部分ペプチドとの反応様式を詳細に検討し、これら化学物質がイミンや 3 級アミンを介してリシン残基を修飾することを明らかにした。さらに、ホルムアルデヒドまたは無水フタル酸と HSA 部分ペプチドとの付加体を抗原として用いた ELISA により、ヒト血液中のホルムアルデヒドまたは無水フタル酸付加体特異的 IgG の定量に成功した。従って、本研究はで構築した HSA 部分ペプチドを用いた ELISA は、定量値に基づく新たな化学物質曝露評価法、化学物質アレルギー診断法を提案した点で非常に意義がある。

## 参考文献

- Alexandersson R, Hedenstierna G. Respiratory hazards associated with exposure to formaldehyde and solvents in acid-curing paints. Arch Environ Health. 43:222-7, 1988.
- Alexandersson R, Hedenstierna G. Pulmonary function in wood workers exposed to formaldehyde: a prospective study. Arch Environ Health. 44:5-11, 1989.
- Bernstein DI, Patterson R, Zeiss CR. Clinical and immunologic evaluation of trimellitic anhydride and phthalic anhydride-exposed workers using a questionnaire with comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent and radioimmunoassay studies. J Allergy Clin Immunol. 69:311-8, 1982.
- Böhme A, Thaens D, Paschke A, Schürmann G. Kinetic glutathione chemoassay to quantify thiol reactivity of organic electrophiles--application to

- alpha,beta-unsaturated ketones, acrylates, and propiolates. *Chem Res Toxicol.* 22:742-50, 2009.
- Brown HH. A study of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for automated amino acid chromatography. *Clin Chem.* 14:967-78, 1968.
  - Day BW, Jin R, Karol MH. In vivo and in vitro reactions of toluene diisocyanate isomers with guinea pig hemoglobin. *Chem Res Toxicol.* 9:568-73, 1996.
  - Diem JE, Jones RN, Hendrick DJ, Glindmeyer HW, Dharmarajan V, Butcher BT, Salvaggio JE, Weill H. Five-year longitudinal study of workers employed in a new toluene diisocyanate manufacturing plant. *Am Rev Respir Dis.* 126:420-8, 1982.
  - Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 : 70–7, 1959.
  - Fowler JF Jr, Skinner SM, Belsito DV. Allergic contact dermatitis from formaldehyde resins in permanent press clothing: an underdiagnosed cause of generalized dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 27:962-8, 1992.
  - Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8:4108-16, 1969.
  - Hettick JM, Siegel PD. Determination of the toluene diisocyanate binding sites on human serum albumin by tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 414(2):232-8, 2011.
  - Hettick JM, Siegel PD, Green BJ, Liu J, Wisnewski AV. Vapor conjugation of toluene diisocyanate to specific lysines of human albumin. *Anal Biochem.* 421:706-11, 2012.
  - Kawamoto T, Tsuji M, Isse T. Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis. *BMC Public Health.* 15:930, 2015.
  - Kennedy AL, Wilson TR, Stock MF, Alarie Y, Brown WE. Distribution and reactivity of inhaled <sup>14</sup>C-labeled toluene diisocyanate (TDI) in rats. *Arch Toxicol.* 68:434-43, 1994.
  - Lange RW, Lantz RC, Stolz DB, Watkins SC, Sundareshan P, Lemus R, Karol MH. Toluene diisocyanate colocalizes with tubulin on cilia of differentiated human airway epithelial cells. *Toxicol Sci.* 50:64-71, 1999.
  - Lemons AR, Bledsoe TA, Siegel PD, Beezhold DH, Green BJ. Development of sandwich ELISAs for the detection of aromatic diisocyanate adducts. *J Immunol Methods.* 397:66-70, 2013.
  - Mahesha HG, Singh SA, Srinivasan N, Rao AG. A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS J.* 273:451-67, 2006.
  - Nielsen J, Welinder H, Schütz A, Skerfving S. Specific serum antibodies against phthalic anhydride in occupationally exposed subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 82:126-33, 1988.
  - Nielsen J, Bensryd I, Almquist H, Dahlqvist M, Welinder H, Alexandersson R, Skerfving S. Serum IgE and lung function in workers exposed to phthalic anhydride. *Int Arch Occup Environ Health.* 63:199-204, 1991.
  - Omae K, Higashi T, Nakadate T, Tsugane S, Nakaza M, Sakurai H. Four-year follow-up of effects of toluene diisocyanate exposure on the respiratory system in polyurethane foam manufacturing workers. II. Four-year changes in the effects on the respiratory system. *Int Arch Occup Environ Health.* 63:565-9, 1992.
  - Pakarinen M, Koivuluhta M, Kalkkinen N, Keskinen H, Nordman H, Estlander T, Tupasela O, Jolanki R, Lauerma AI, Pfäffli P, Alenius H. Phthalic anhydride allergy: development and characterization of optimized hapten-carrier conjugates for improved diagnosis. *Allergy.* 57:894-9, 2002.
  - Park HS, Lee SK, Kim HY, Nahm DH, Kim SS. Specific immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to toluene diisocyanate-human serum albumin conjugate: useful markers for predicting long-term prognosis in toluene diisocyanate-induced asthma. *Clin Exp Allergy.* 32:551-5, 2002.
  - Peters GH, Frimurer TM, Olsen OH. Electrostatic evaluation of the signature motif (H/V)CX5R(S/T) in protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry* 37:5383-93, 1998.
  - Pham TT, Oyama T, Isse T, Kawamoto T. Application of tryptophan fluorescence to assess sensitizing potentials of chemicals. *Arch Environ Contam Toxicol.* 57:427-36,

2009.

• Pisati G, Baruffini A, Zedda S. Toluene diisocyanate induced asthma: outcome according to persistence or cessation of exposure. *Br J Ind Med.* 50:60-4, 1993.

• Pulla Reddy AC, Sudharshan E, Appu Rao AG, Lokesh BR. Interaction of curcumin with human serum albumin--a spectroscopic study. *Lipids.* 34:1025-9, 1999.

• Ritchie IM, Lehnen RG. Formaldehyde-related health complaints of residents living in mobile and conventional homes. *Am J Public Health.* 77:323-8, 1987.

• Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3:619-625, 1996.

• Ruwona TB, Johnson VJ, Hettick JM, Schmechel D, Beezhold D, Wang W, Simoyi RH, Siegel PD. Production, characterization and utility of a panel of monoclonal antibodies for the detection of toluene diisocyanate haptenated proteins. *J Immunol Methods.* 373(1-2):127-35, 2011.

• Sarantonis EG, Diamandis EP, Karayannis MI. Kinetic study of the reaction between trinitrobenzenesulfonic acid and amino acids with a trinitrobenzenesulfonate ion-selective electrode. *Anal Biochem.* 155:129-34, 1986.

• Tsuji M, Yu HS, Ishihara Y, Isse T, Ikeda-Ishihara N, Tsuchiya T, Kawamoto T. A Simple Method for Detection of Multiple Chemical-Specific IgGs in Serum Based on Dot Blotting. *Health.* 8:1645-1653, 2016.

• Sorahan T, Pope D. Mortality and cancer morbidity of production workers in the United Kingdom flexible polyurethane foam industry. *Br J Ind Med.* 50:528-36, 1993.

• Tunç S, Cetinkaya A, Duman O. Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins. *J Photochem Photobiol B.* 120:59-65, 2013.

• Wantke F, Hemmer W, Haglmüller T, Götz M, Jarisch R. Anaphylaxis after dental treatment with a formaldehyde-containing tooth-filling material. *Allergy* 50:274-6,

1995.

• Wernfors M, Nielsen J, Schütz A, Skerfving S. Phthalic anhydride-induced occupational asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 79:77-82, 1986.

• Wisnewski AV, Srivastava R, Herick C, Xu L, Lemus R, Cain H, Magoski NM, Karol MH, Bottomly K, Redlich CA. Identification of human lung and skin proteins conjugated with hexamethylene diisocyanate in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:2330-6, 2000.

• Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 27:322-328, 1999.

• Zsila F. Circular dichroism spectroscopic detection of ligand binding induced subdomain IB specific structural adjustment of human serum albumin. *J Phys Chem B.* 117:10798-806, 2013.

## F.健康危険情報

該当無し

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Tsuji M, Yu HS, **Ishihara Y**, Isse T, Ikeda-Ishihara N, Tsuchiya T, Kawamoto T. A Simple Method for Detection of Multiple Chemical-Specific IgGs in Serum Based on Dot Blotting. *Health.* 8:1645-1653 (2016).

### 2. 学会発表

該当無し

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当無し

### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し

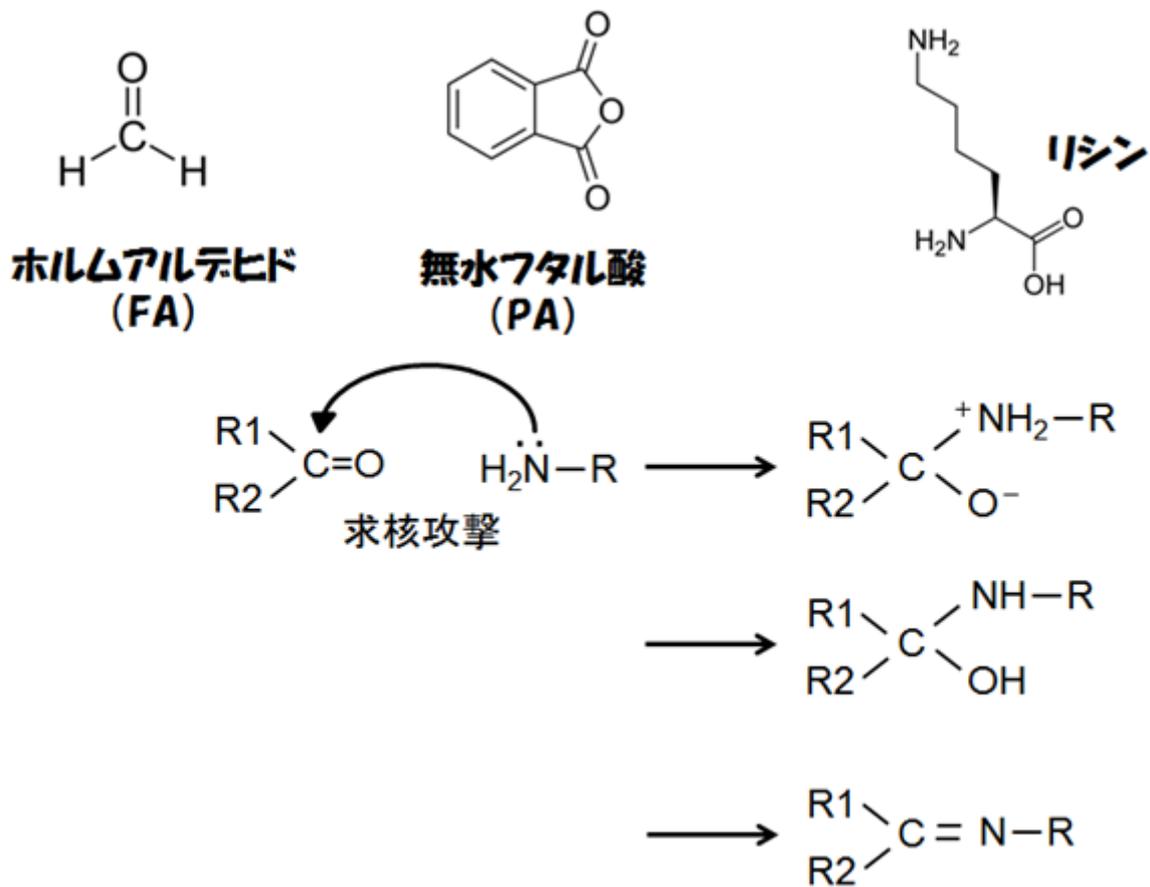


図1. カルボニル基を有する化学物質とタンパク質リシン残基との反応

トルエン-2,4-ジイソシアネートや無水フタル酸のカルボニル基は、電荷の偏りのため親電子性をもち、タンパク質リシン残基の非共有電子対と反応する。リシンのε-アミノ基のpKaは10.5なので、塩基性条件で分子型となり、カルボニル基との反応が促進する。

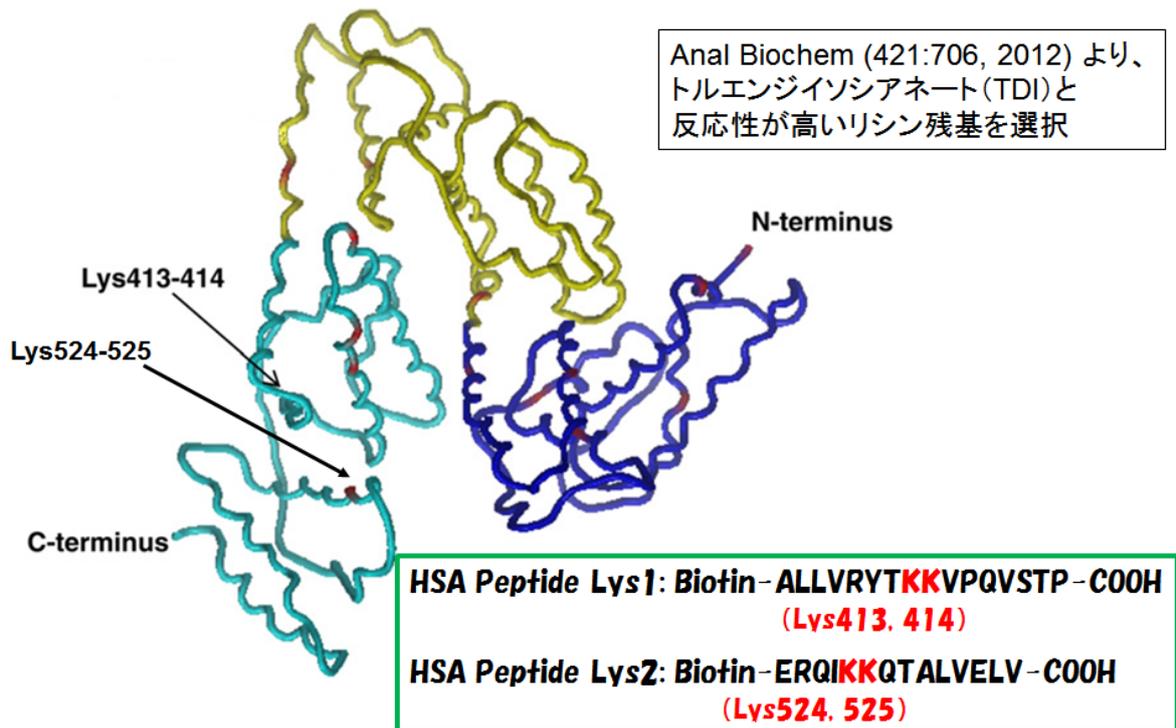


図2. HSA リシン残基の反応性と HSA 部分ペプチドの設計  
(Hettick et al. 2012 に掲載の図表を一部改変)

Hettick らの HSA のリシン残基とトルエンジイソシアネートとの反応性の解析結果より、2 個の連続した反応性リシン残基を含むペプチド HSA-Peptide Lys1 と HSA-Peptide Lys2 を設計した。

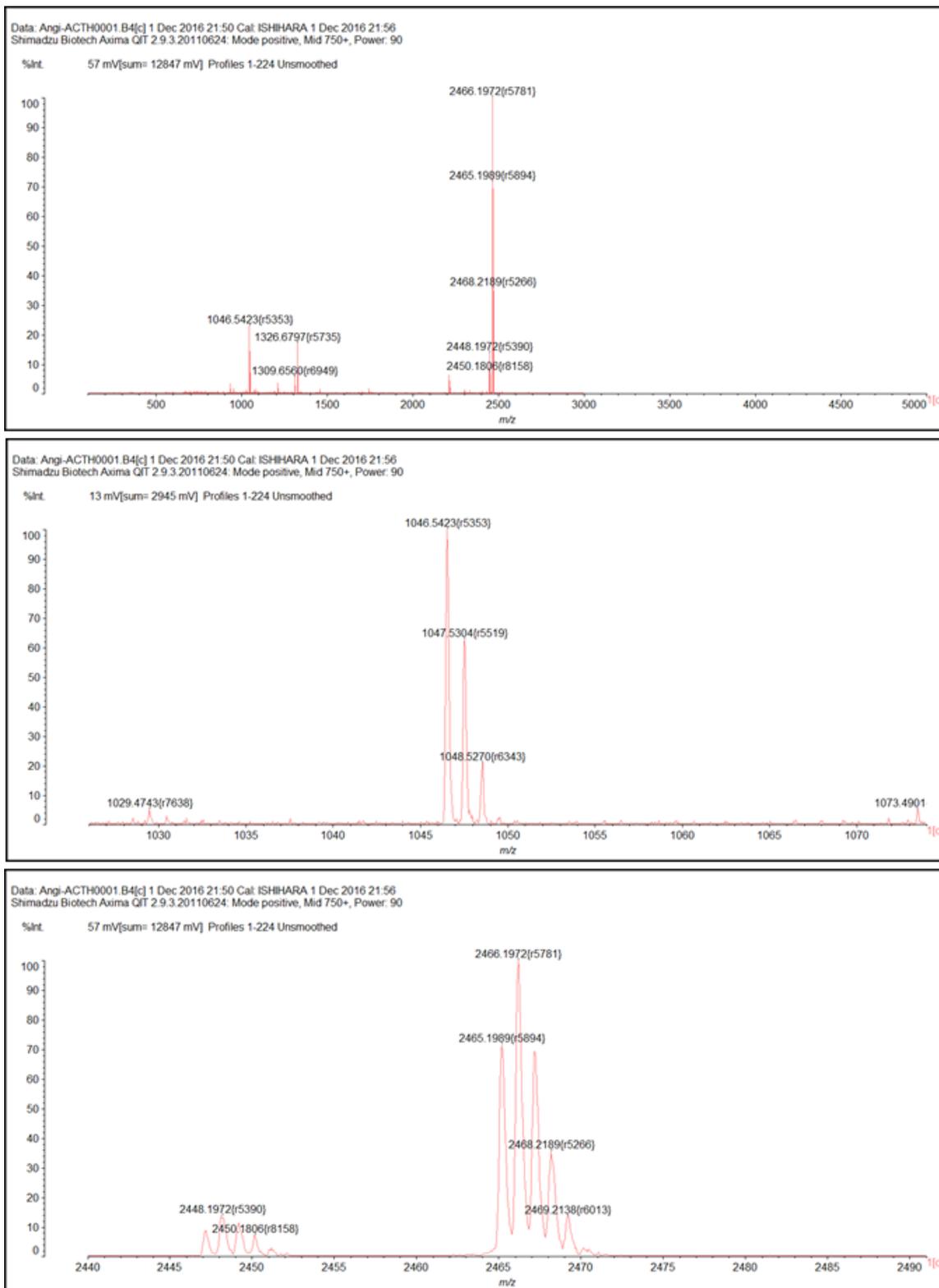


図 3. MALDI-TOF MS のキャリブレーション

Angiotensin II ((M+H)<sup>+</sup> = 1046.5423) と ACTH Fragment 18-39 ((M+H)<sup>+</sup> = 2465.1989) によりキャリブレーションを行った。上段: 200~5000m/z の範囲のスペクトル、中段および下段: Angiotensin II および ACTH Fragment 18-39 のピークの強拡大図。

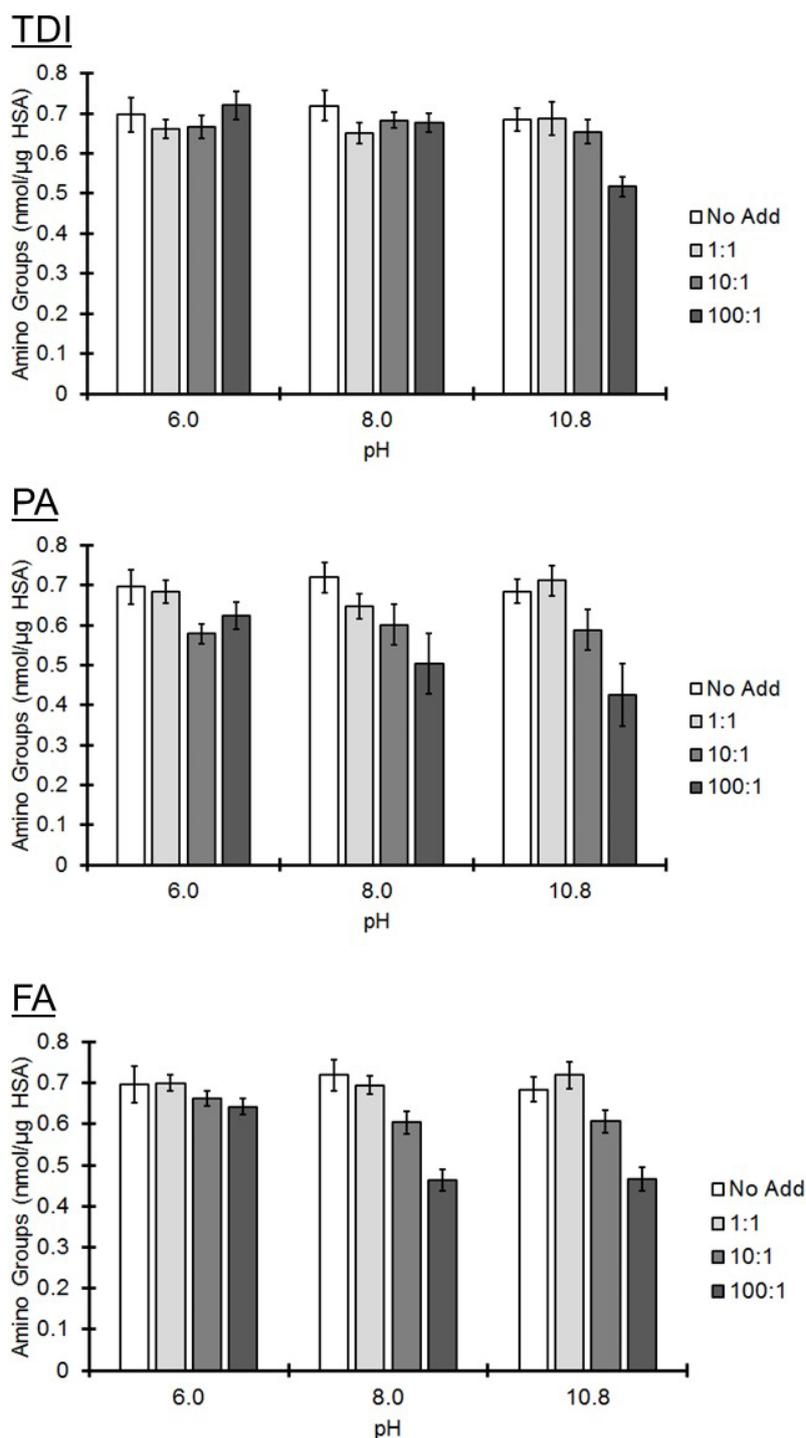
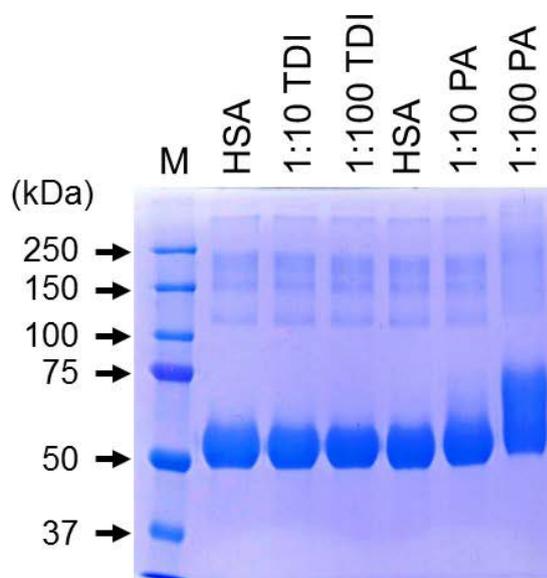


図4. HSA-化学物質付加体に含まれるアミノ基の定量

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI)、無水フタル酸 (PA)、ホルムアルデヒド (FA) を反応させた後、アミノ基を TNBS 法により定量した。尚、反応条件は、pH が 3 条件 (6.0、8.0、10.8)、HSA と化学物質のモル比が 3 条件 (1:1、1:10、1:100) である。PA と FA は、pH が高いほど、化学物質の比が大きいほどアミノ基が多く失われることが明らかとなり、TDI は pH10.8、モル比 100:1 のときのみアミノ基が減少した。Values are the mean  $\pm$  S.E. of 6 separate experiments.

## SDS-PAGE



## Native PAGE

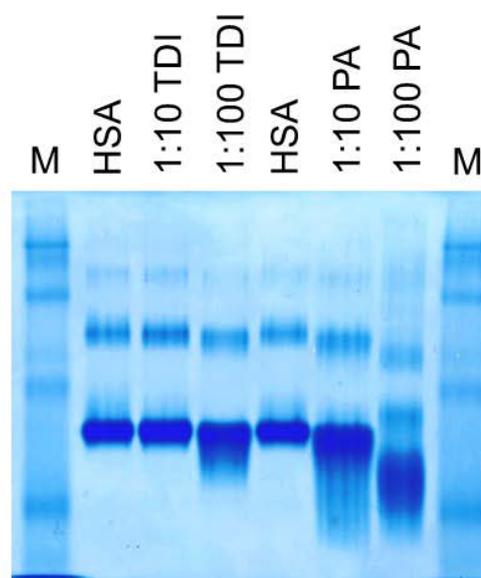
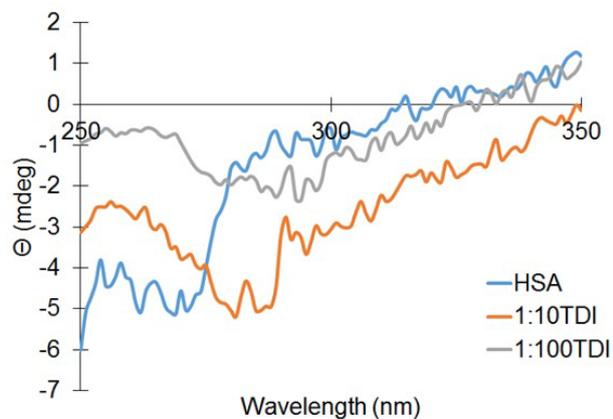


図5. タンパク質電気泳動法による立体構造変化の解析

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI) 、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:10 または 1:100 で反応させた後、SDS-PAGE (左図) と Native-PAGE (右図) を行った後、CBB で染色した。TDI については、SDS-PAGE による分子量の変化は検出できなかったが、1:100 条件で反応させた際のタンパク質の構造変化が認められた。PA について、分子量はモル比依存的に増加し、また、構造変化もモル比依存的に大きくなるとの結果を得た。

## 250 - 350 nm

### HSA-TDI 付加体



### HSA-PA 付加体

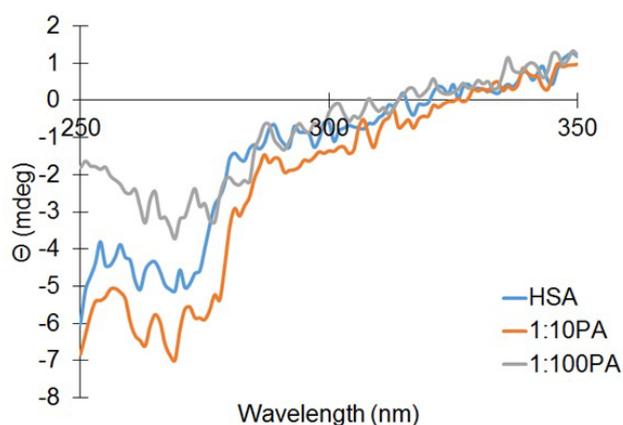


図6. CD スペクトル測定による HSA 二次構造の解析 (1)

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI)、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:10 または 1:100 で反応させた。反応産物を CD スペクトル測定に供し、HSA と DMSO の混合液とスペクトルを比較した。250~350nm の波長の範囲において、HSA-TDI 付加体と HSA-PA 付加体のモル比依存的なスペクトル変化は検出されなかった。

## 185 - 250 nm

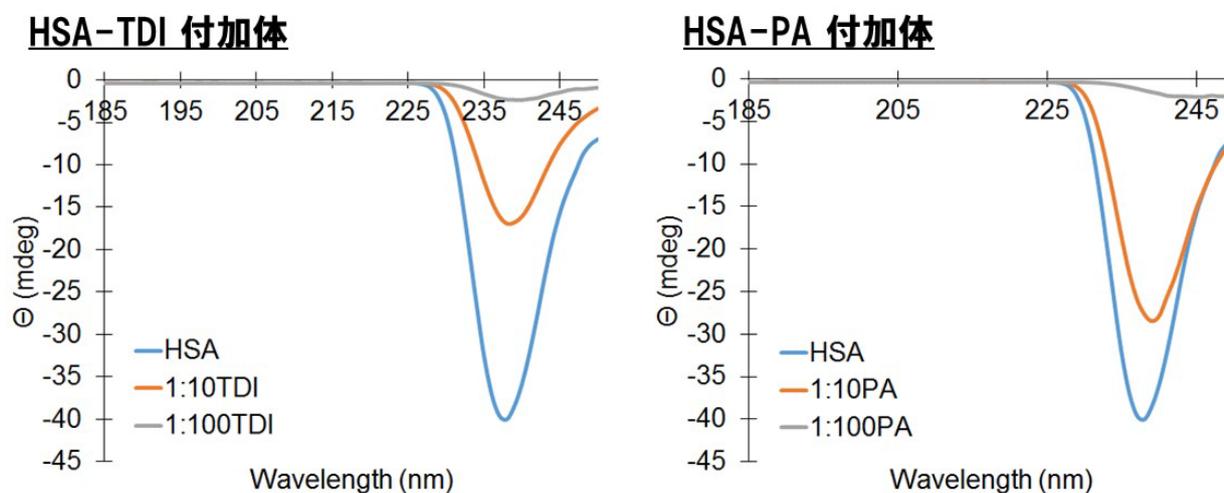
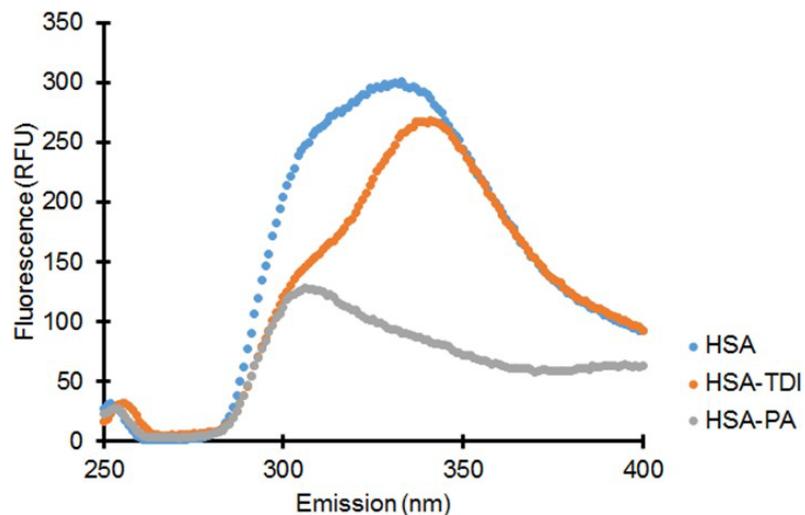


図7. CD スペクトル測定による HSA 二次構造の解析 (2)

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI)、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:10 または 1:100 で反応させた後、185nm~250nm における CD スペクトルを測定した。HSA-TDI 付加体、HSA-PA 付加体ともに 238nm で認められる負のピークが化学物質のモル比依存的に減少した。従って、化学物質の濃度依存的に HSA の二次構造が変化していると考えられる。

## Ex: 231 nm(トリプトファンを励起)

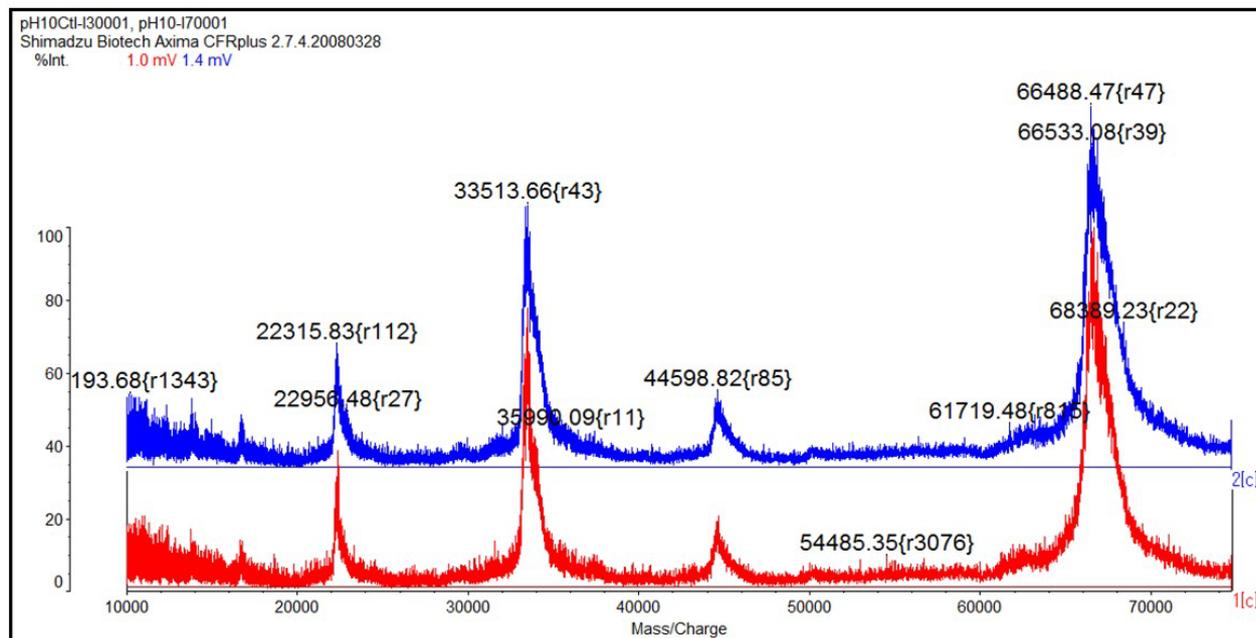


1:100 TDI  
1:100 PA

図8. 蛍光スペクトル測定によるタンパク質立体構造変化の解析

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI)、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:100 で反応させた後、231nm で励起したときの蛍光スペクトルを測定した。尚、231nm は、トリプトファン残基の励起波長である。HSA の蛍光スペクトルと比較して、HSA-TDI 付加体、HSA-PA 付加体のスペクトルはピーク波長が変わるなど大きく変化しており、特に HSA-PA 付加体において顕著であった。従って、TDI や PA との反応により、HSA は構造を変化させていることが明らかとなった。

赤: Cont HSA, pH10.8, 青: HSA-TDI, pH10.8



赤: Cont HSA, pH10.8, 青: HSA-TDI, pH10.8  
(拡大図)

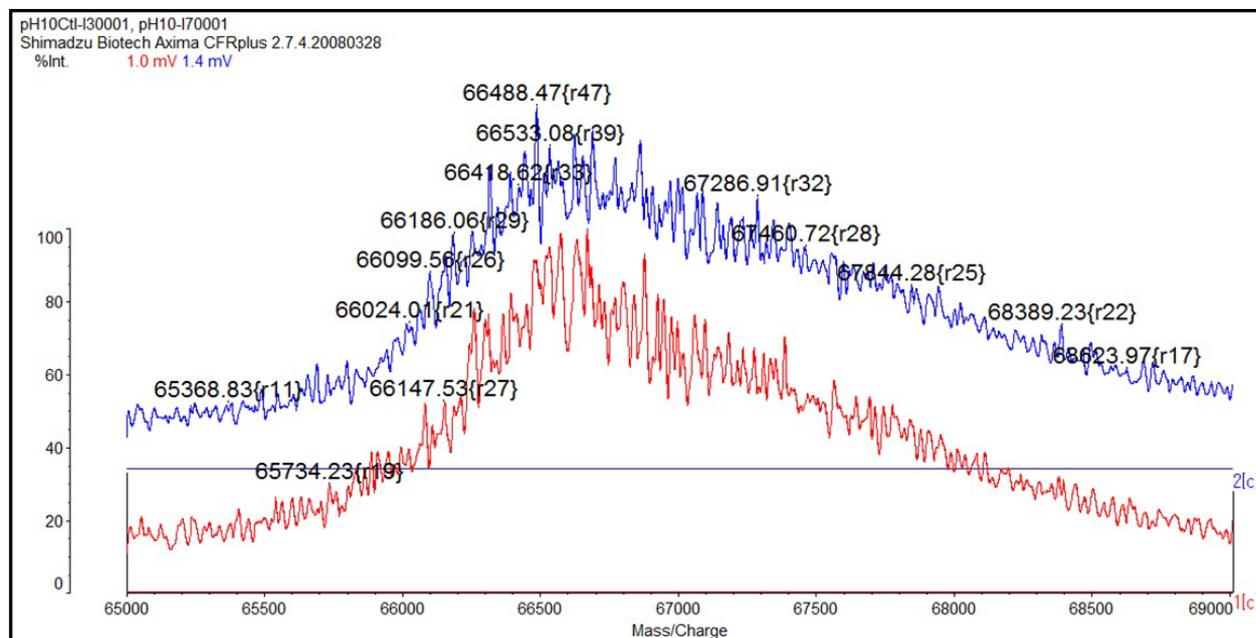
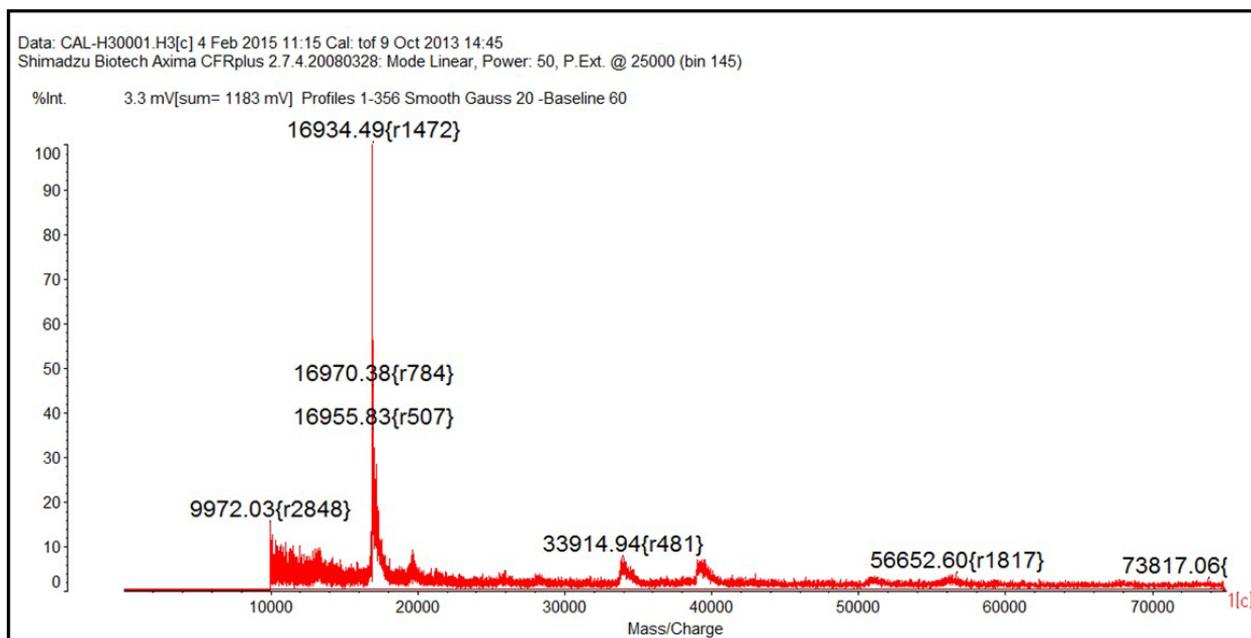


図9. AXIMA-CFR-plus-MALDI-TOF/MSによるHSA-化学物質付加体の分子量決定の試み

HSAとトルエン-2,4-ジイソシアネート(TDI)をpH10.8、HSAと化学物質とのモル比1:100で反応させた後、マトリックスと混合し、AXIMA-CFR-plus-MALDI-TOF/MSによりMSスペクトルを測定した(上図:広域図、下図:拡大図)。HSAの分子量(66kDa)付近にピークが得られたもののブロードとなり、正確な分子量の決定には至らなかった。

## Calibration: Apomyoglobin (16952Da, Ave)



## Calibration: Apomyoglobin (16952Da, Ave) (拡大図)

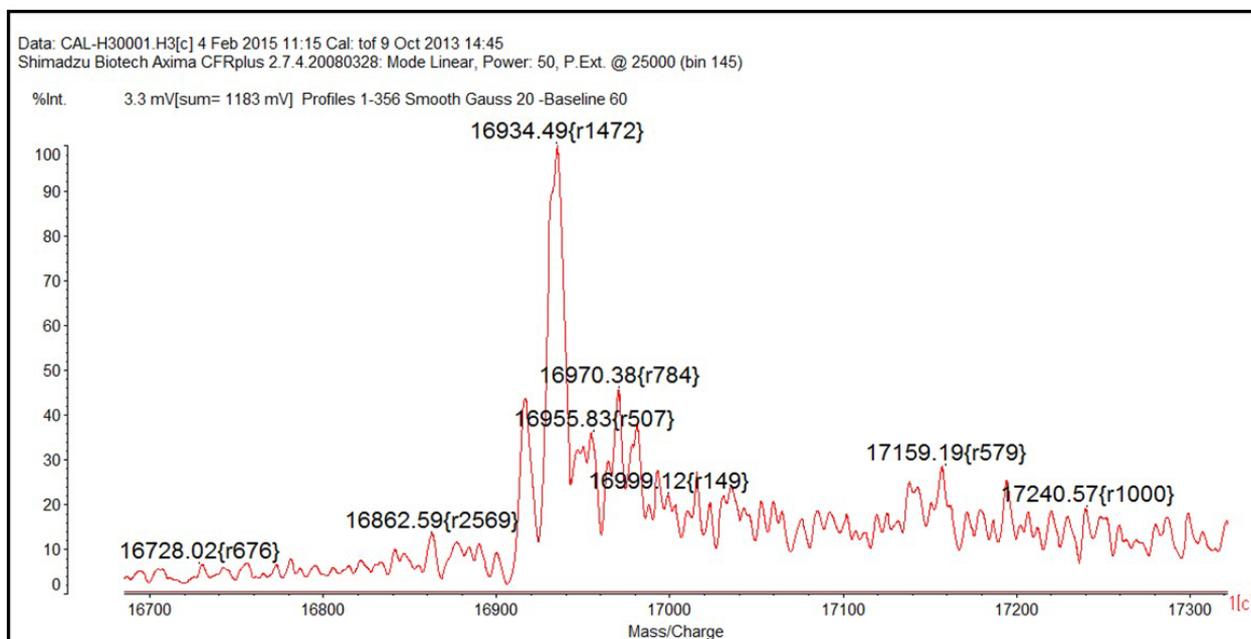


図 10. AXIMA-CFR-plus-MALDI-TOF/MS のキャリブレーション：分解能の確認

アポミオグロビンをマトリックスと混合し、AXIMA-CFR-plus-MALDI-TOF/MS により MS スペクトルを取得した。非常にシャープなピークが 1 本観察され、AXIMA-CFR-plus-MALDI-TOF/MS にて分子量決定に足るスペクトルが得られることを確認した。

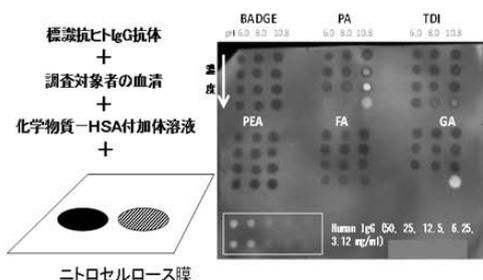
表 1. 化学物質の HSA に対する作用

	TDI	PA	FA
TNBS	アミノ基修飾	アミノ基修飾	アミノ基修飾
SDS-PAGE	検出されず	分子量増加（付加）	N.D.
Native-PAGE	泳動度増加	泳動度増加	N.D.
CD	$\alpha$ -ヘリックス減少？	$\alpha$ -ヘリックス減少？	N.D.
Fluorescence	微細構造変化	微細構造変化	N.D.
MALDI-TOF CFR	検出されず	検出されず	N.D.

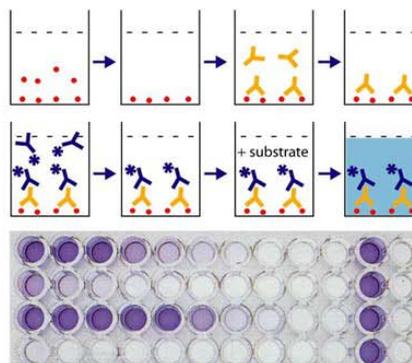
N.D.: Not determined

※ 図 2～7 で得られた結果を表として纏め、HSA と化学物質との反応による構造変化について示した。

## Dot Blot



## ELISA



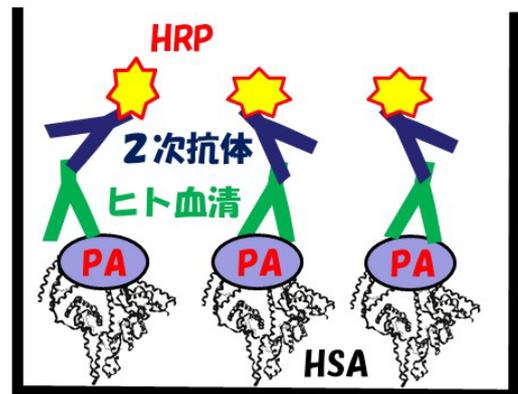
**数種類の化学物質抗体を一斉検出可能**

**数百検体を一度に測定可能  
検量線により定量可能**

図 1 1. Dot Blot と ELISA の比較

Dot Blot はニトロセルロースメンブレン或いは PVDF メンブレンに抗原をスポティングするため、一度に複数種の化学物質に対する抗体を検出できるが、検体数だけのメンブレンを準備する必要があり、多検体の解析には向かない。また、メンブレンへの抗原の結合を定量できないことから、抗体の絶対定量は不可能である。一方、ELISA は、多検体の分析に長じており、96well plate や 384well plate など用いる plate によって同時に分析できる検体数がことなる。しかし、複数種の化学物質抗体の同時検出については、可能であるが操作が煩雑となる。検量線を作成することによって、化学物質抗体を定量することも可能である。

1. ヒト血清アルブミン-  
化学物質付加体の作製
2. 付加体を plate に結合  
(疎水性相互作用)
3. ヒト血清を添加
4. 標識2次抗体を添加
5. 検出 (発光法)



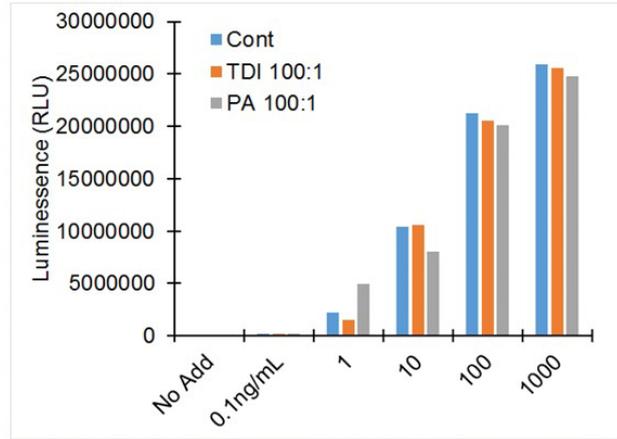
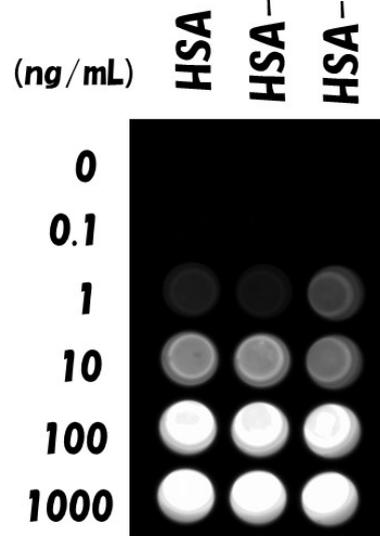
96 well plate

HSA: Human Serum Albumin  
PA: Phthalic Anhydride  
HRP: Horseradish Peroxidase

図 1 2. HSA-化学物質付加体を抗原とした ELISA の模式図

HSA と化学物質を反応させた後、HSA-化学物質付加体を 96well plate に疎水性相互作用で結合させる。ヒト血清を1次抗体、HRP を結合させた抗ヒト IgG 抗体を2次抗体とし、HRP の基質を用いて発光法により化学物質特異的 IgG を検出する。

1:100 TDI  
1:100 PA



MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate (White, Nunc)  
Anti-HSA, HRP conjugate  
SuperSignal ELISA Femto Substrate

マキシソープ 疎水性相互作用 親水性/疎水性ドメインの混在する分子に高い親和性がある。 600~650ng/cm<sup>2</sup> IgG クリア:5%以内 ホワイト/ブラック: 10%以内 IgG抗体、タンパク質、リボプロテイン、グロブリン、ポリペプチド pH>pl (例:炭酸バッファー)

図 1 3. HSA-化学物質付加体の ELISA プレートへの結合  
(一部、Thermo Scientific 社 HP より抜粋)

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI) 、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:100 で反応させた後、反応産物をマキシソープ 96well plate (白色) に添加した。HRP を結合させた抗 HSA 抗体を用いて well に結合した HSA を検出し、HSA、HSA-TDI 付加体、HSA-PA 付加体が well への添加量依存的に well 底面に結合することを確認した。

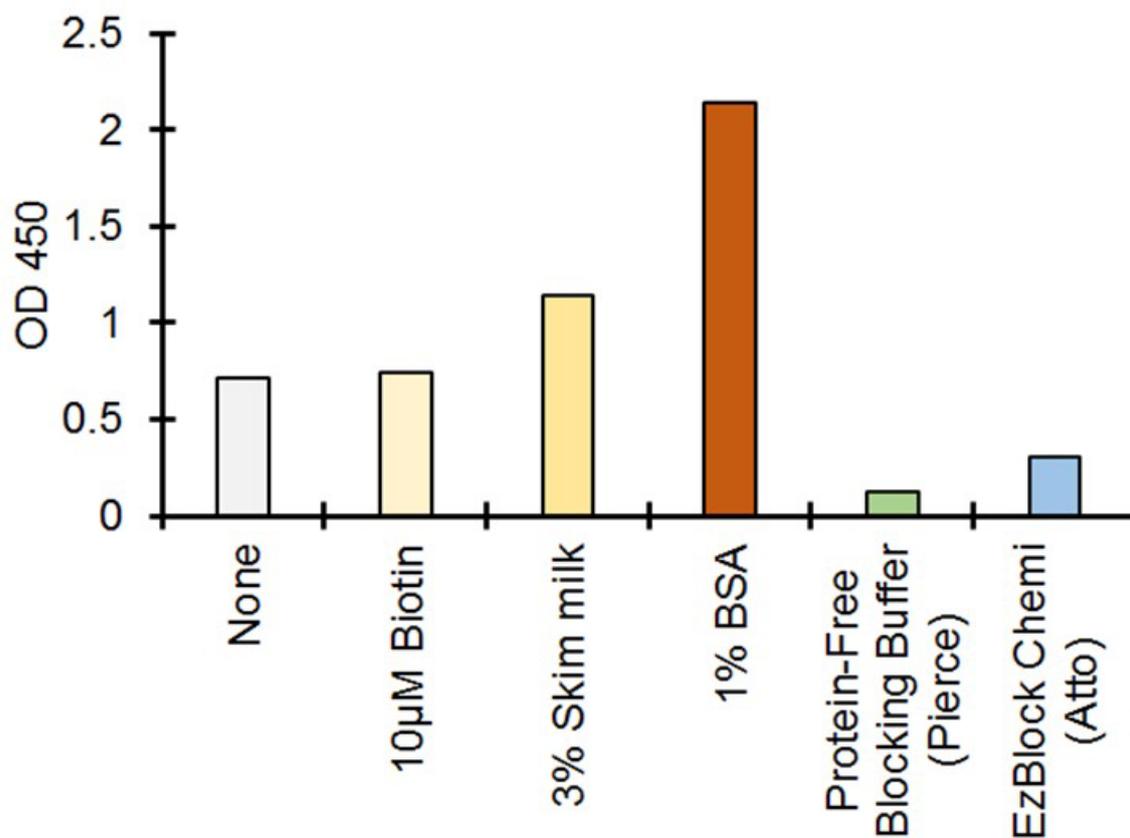
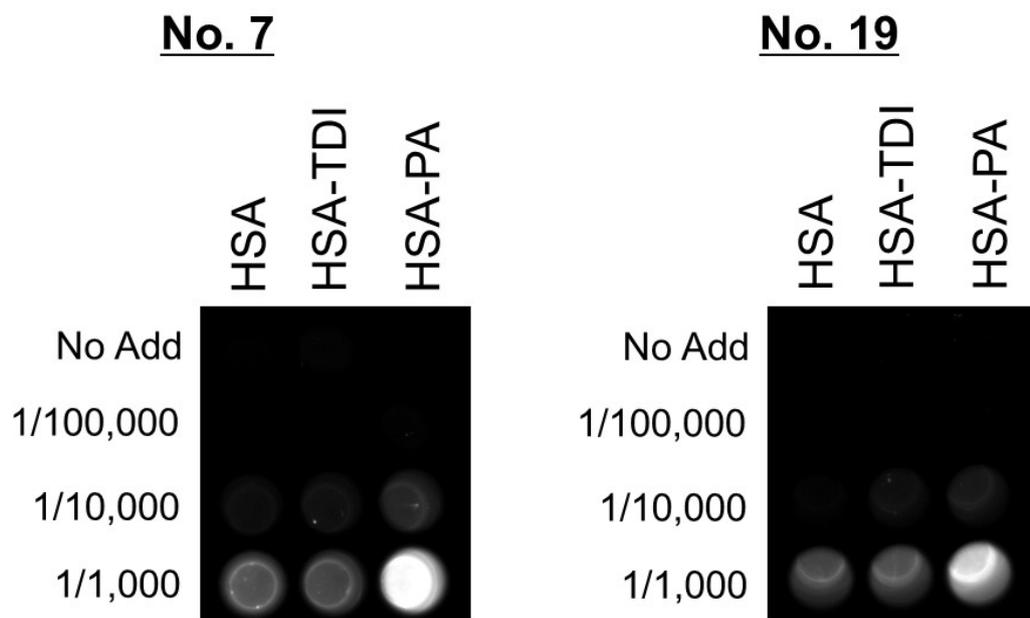


図14. ELISAにおけるプレートのブロッキングの検討

ELISAを行なうにあたり、5種類のブロッキング剤のバックグラウンドを測定した。HSAをplateに固定した後、10µM Biotin、Skim milk、1% BSA、Protein-Free Blocking Buffer、EzBlock Chemiそれぞれでブロッキングした後、10種類の検体（ヒト血清）を使用し、ELISAを行なった。上記グラフは10種類の検体の中でもっとも高いシグナルを示した検体のOD450値を示している。Skim milkやBSAといったタンパク質性のブロッキング剤により、検体によってはバックグラウンドが上昇することが分かる。



MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate (White, Nunc )  
 Blocking: 3% skim milk  
 1<sup>st</sup> Ab: human serum (in Can Get Signal 1)  
 2<sup>nd</sup> Ab: Anti-human IgG, HRP conjugate (in Can Get Signal 2)  
 SuperSignal ELISA Femto Substrate

図 1 5. ELISA におけるヒト血清希釈率の検討

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI) 、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:100 で反応させた後、反応産物をマキシソープ 96well plate (白色) に添加した。2 種類の検体 (ヒト血清) について希釈率を変えて ELISA を行い、検体の 1 次抗体としての希釈率を検討した。最適なシグナルが得られる希釈率として、希釈率を 1/10,000 と決定した。

## 81検体の発光を測定 HSA化学物質付加体の値から未修飾HSAの値を引き算

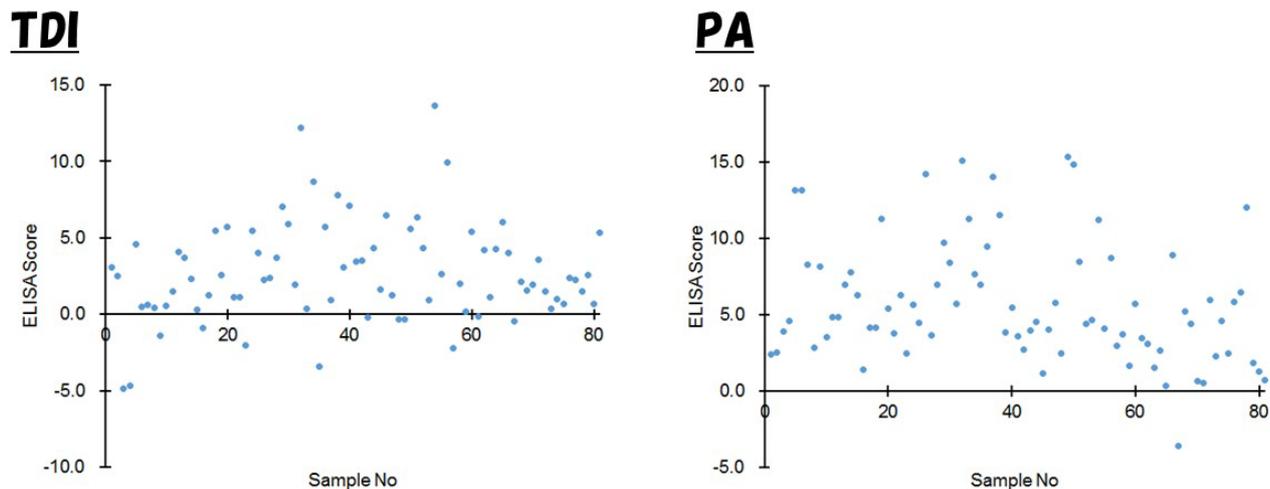


図 1 6 . ELISA による労働者血液中の化学物質抗体の測定 ( 1 )

HSA とトルエン-2,4-ジイソシアネート (TDI) 、および、無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:100 で反応させた後、マキシソープ 96 well plate に結合させた。Protein-Free Blocking Buffer を用いてブロッキングした後、ヒト血清を 1 次抗体、HRP を結合させた抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体として用いて ELISA を行なった。HSA-化学物質付加体の OD450 から HSA 未修飾の OD450 を差し引き、ELISA Score としてグラフに表した。横軸は 81 検体のサンプル番号を示す。

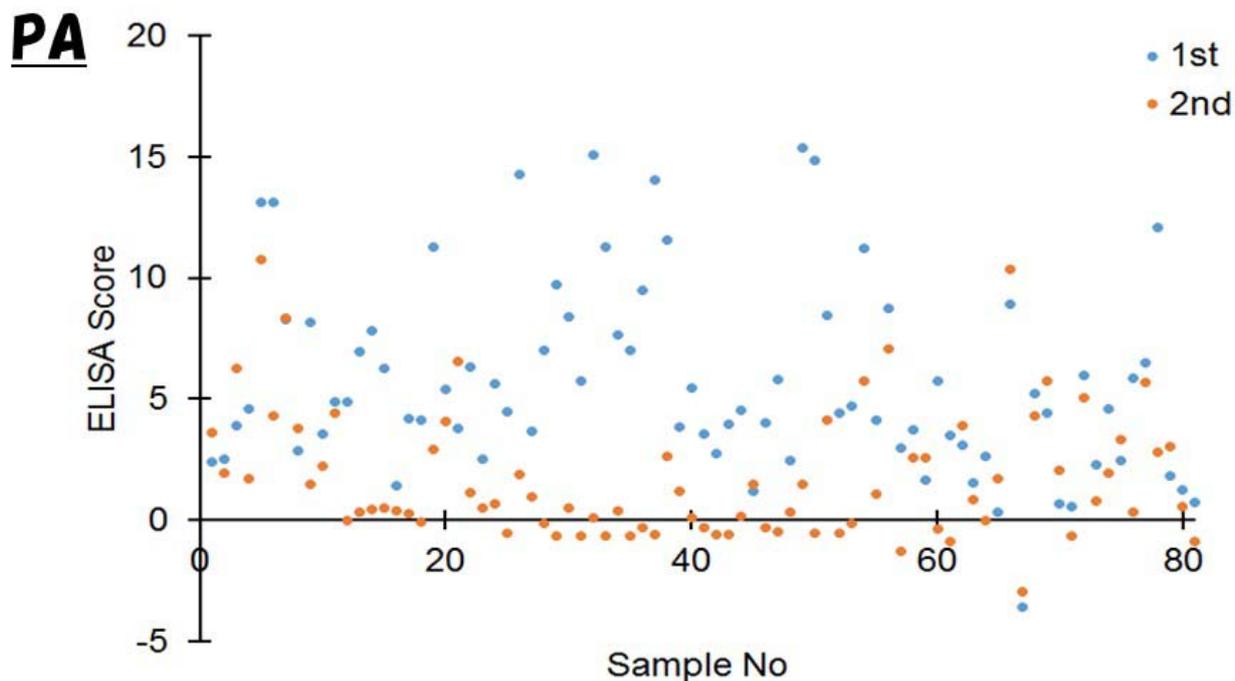
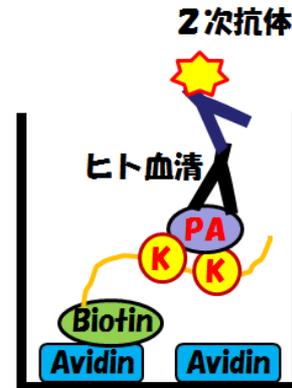


図 1 7. ELISA による労働者血液中の化学物質抗体の測定 (2)

HSA と無水フタル酸 (PA) を pH10.8、HSA と化学物質とのモル比 1:100 で反応させた後、マキシソープ 96 well plate に結合させた。Protein-Free Blocking Buffer を用いてブロッキングした後、ヒト血清を 1 次抗体、HRP を結合させた抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体として用いて ELISA を行なった。HSA-化学物質付加体の OD450 から HSA 未修飾の OD450 を引き、ELISA Score としてグラフに表した。独立した 2 度の試行の結果をグラフに示した。

- ① **ビオチンを付加した、HSAリシン残基を含むペプチドを合成し、ストレプトアビジン固定化プレートに結合**
- ② **プレートに FA または PA を添加し、リシン残基を修飾**
- ③ **ヒト血清を1次抗体、抗ヒト IgG 抗体を2次抗体に用いて ELISA を行う**
- ④ **ペプチドの代わりにビオチンを用い、ブランクとする**



ストレプトアビジン固定化  
96 well plate

抗体認識部位の構造を決定することができ、  
かつ、安定した結果が得られる

ビオチンとストレプトアビジンの解離定数(Kd):  
約  $10^{-15}$  mol/L(抗原抗体反応より百万倍以上強い)

図18. HSA 部分ペプチドを用いた ELISA の概略

N 末端をビオチンで標識した HSA 部分ペプチドを合成し、ストレプトアビジンを固定化した 96 well plate に結合させて ELISA を行なう。ビオチン-ストレプトアビジン間の結合は共有結合と同程度の強度であり、かつ、HSA 部分ペプチドを用いることにより、常に plate に同一の配向性で結合させることができる。

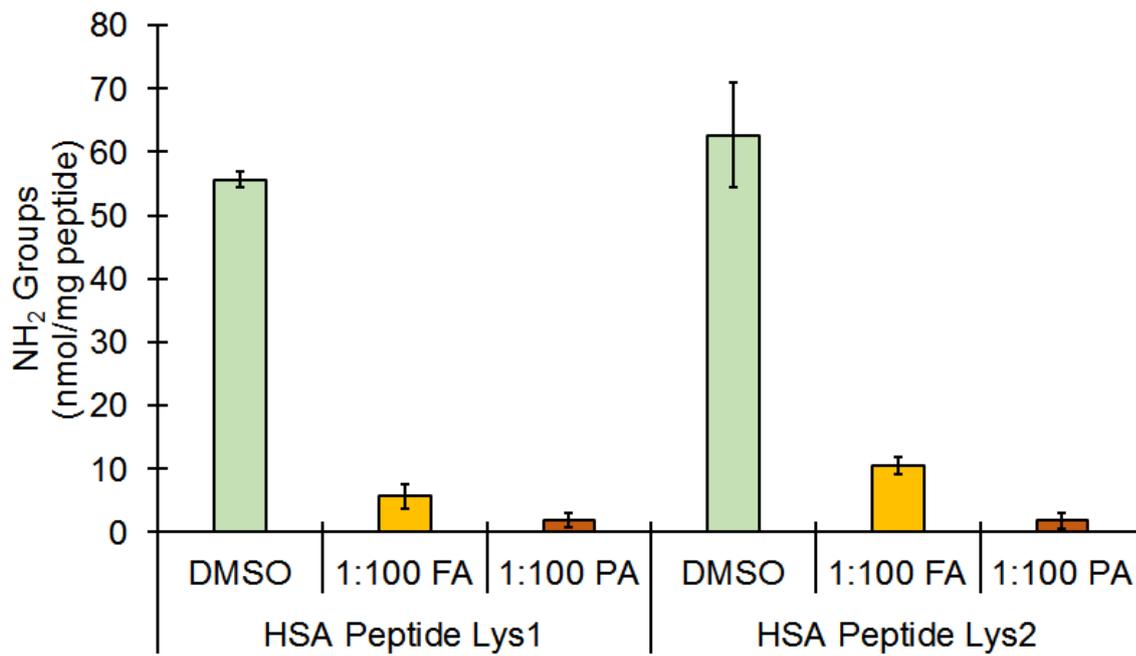


図19. ホルムアルデヒド、無水フタル酸による HSA 部分ペプチドのリシン残基の修飾  
 リシン含有 HSA 部分ペプチド (HSA Peptide Lys1 と HSA Peptide Lys2) とホルムアルデヒド (FA) または無水フタル酸 (PA) をモル比 1 : 100 で反応させ、TNBS 法によりアミノ基を定量した。N = 4, 図中の Bar は標準誤差を示す。

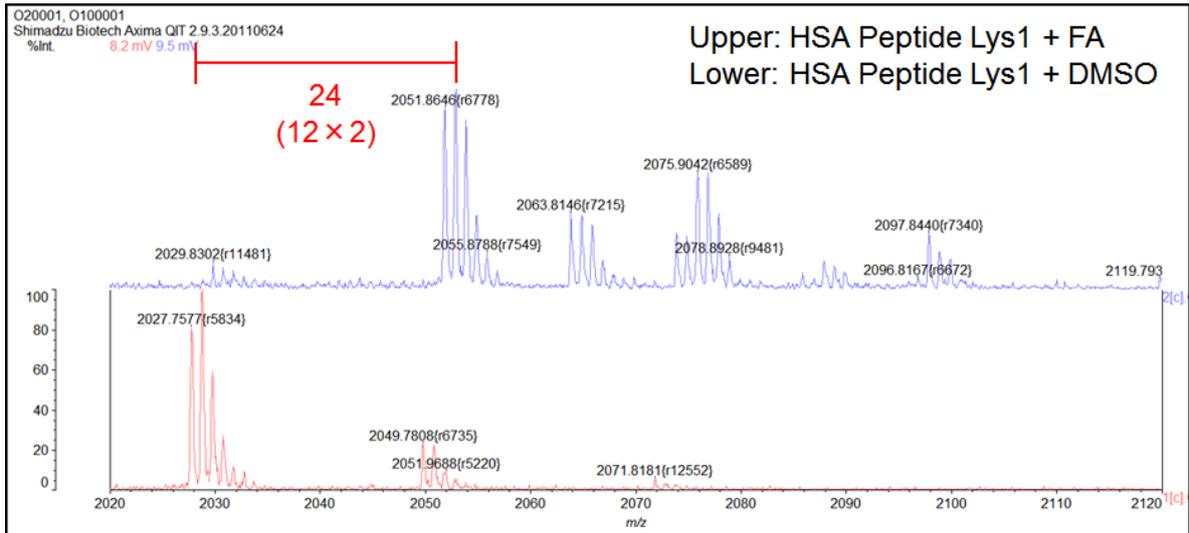


図 20. HSA Peptide Lys1 とホルムアルデヒドとの付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys1 をホルムアルデヒド (FA) と反応させた後、アミノ基の消失を TNBS 法により確認した。反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は FA と反応させた HSA Peptide Lys1 の MS スペクトル、下部は FA の代わりに DMSO を加えた時の MS スペクトルである。

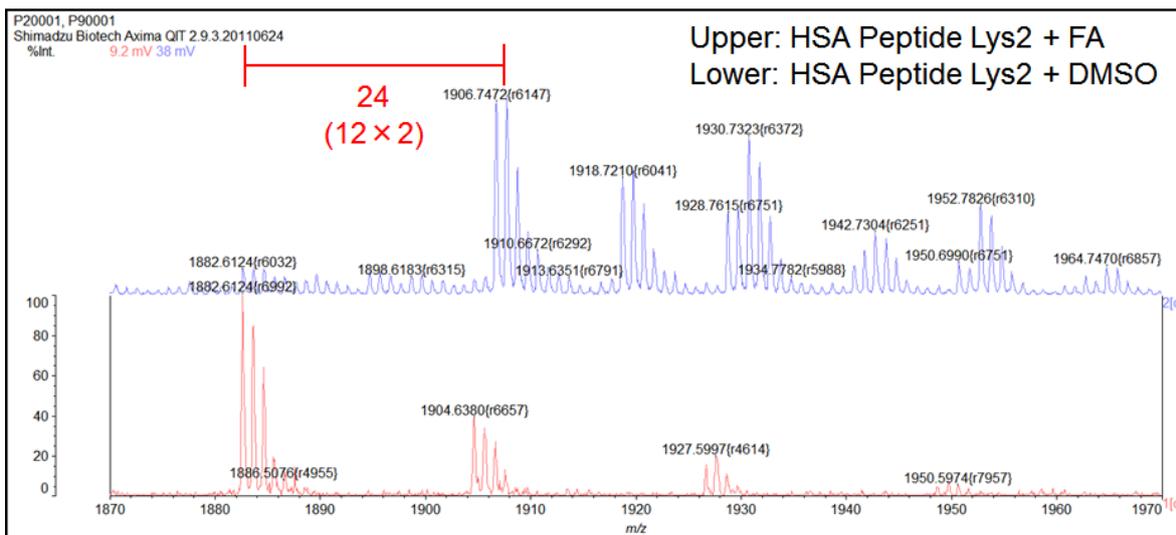


図 2 1 . HSA Peptide Lys2 とホルムアルデヒドとの付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys2 をホルムアルデヒド (FA) と反応させた後、アミノ基の消失を TNBS 法により確認した。反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は FA と反応させた HSA Peptide Lys2 の MS スペクトル、下部は FA の代わりに DMSO を加えた時の MS スペクトルである。

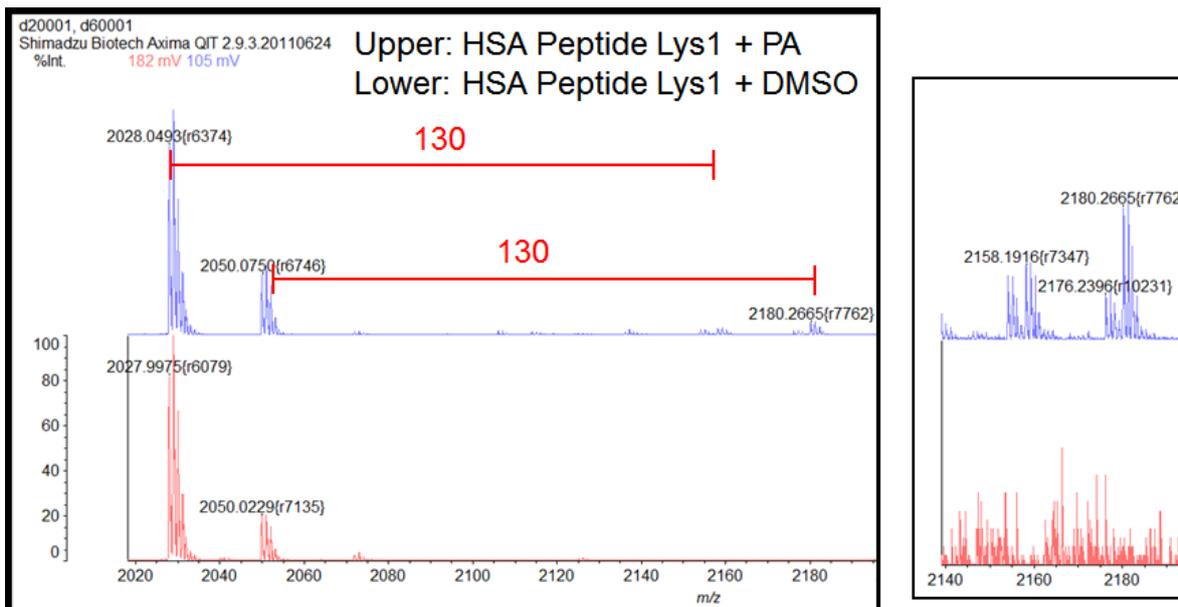


図 2 2. HSA Peptide Lys1 と無水フタル酸との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys1 を無水フタル酸 (PA) と反応させた後、アミノ基の消失を TNBS 法により確認した。反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は PA と反応させた HSA Peptide Lys1 の MS スペクトル、下部は PA の代わりに DMSO を加えた時の MS スペクトルである。また、右図は 2150m/z 付近の拡大図を示す。

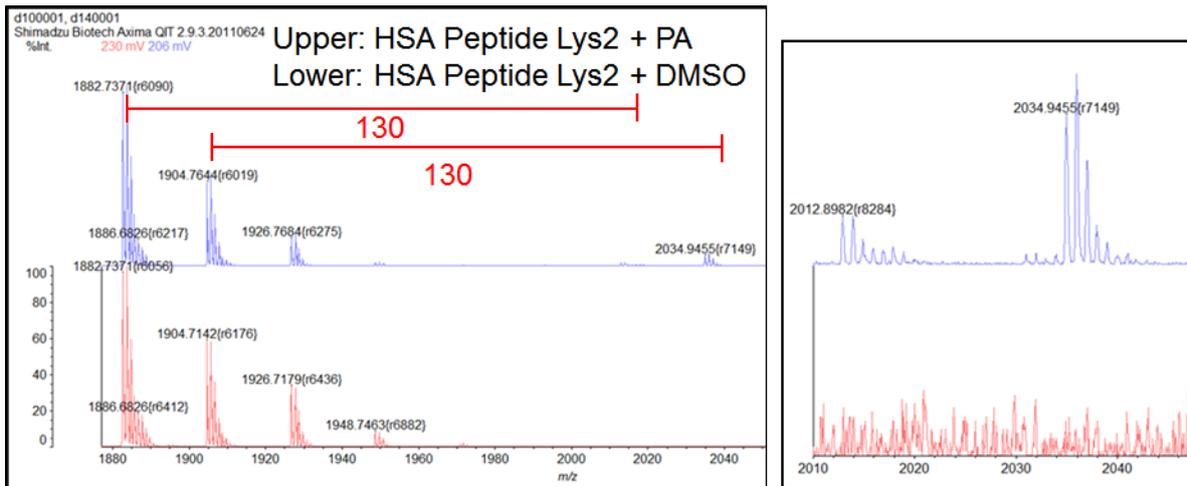


図 2 3 . HSA Peptide Lys2 と無水フタル酸との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys2 を無水フタル酸 (PA) と反応させた後、アミノ基の消失を TNBS 法により確認した。反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は PA と反応させた HSA Peptide Lys2 の MS スペクトル、下部は PA の代わりに DMSO を加えた時の MS スペクトルである。また、右図は 2030m/z 付近の拡大図を示す。

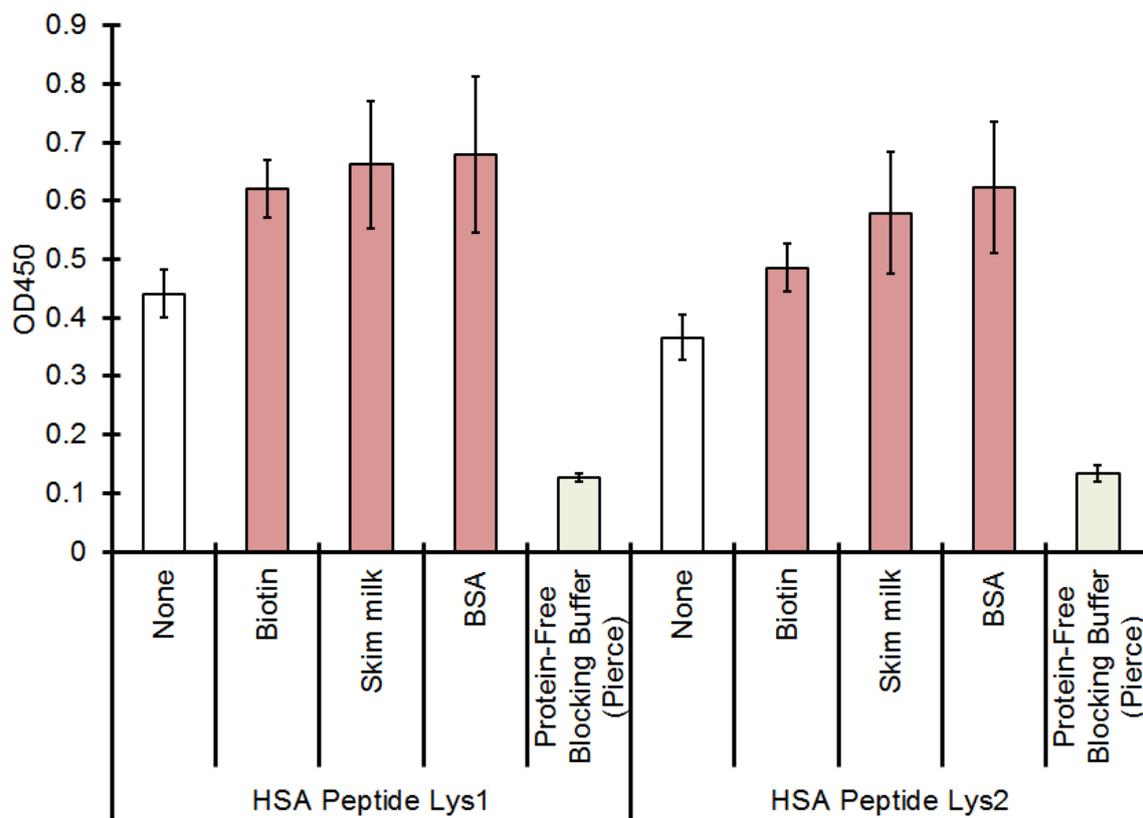


図 2 4. ELISA におけるブロッキング試薬の検討

ELISA を行なうにあたり、4 種類のブロッキング剤のバックグラウンドを測定した。HSA 部分ペプチドを plate に固定した後、10 $\mu$ M Biotin、3% Skim milk、1% BSA、Protein-Free Blocking Buffer (Pierce) それぞれでブロッキングを行なった。20 種類の検体 (ヒト血清) を使用して ELISA を行ない、OD450 の平均値を示す。N = 20、図中の Bar は標準誤差を示す。

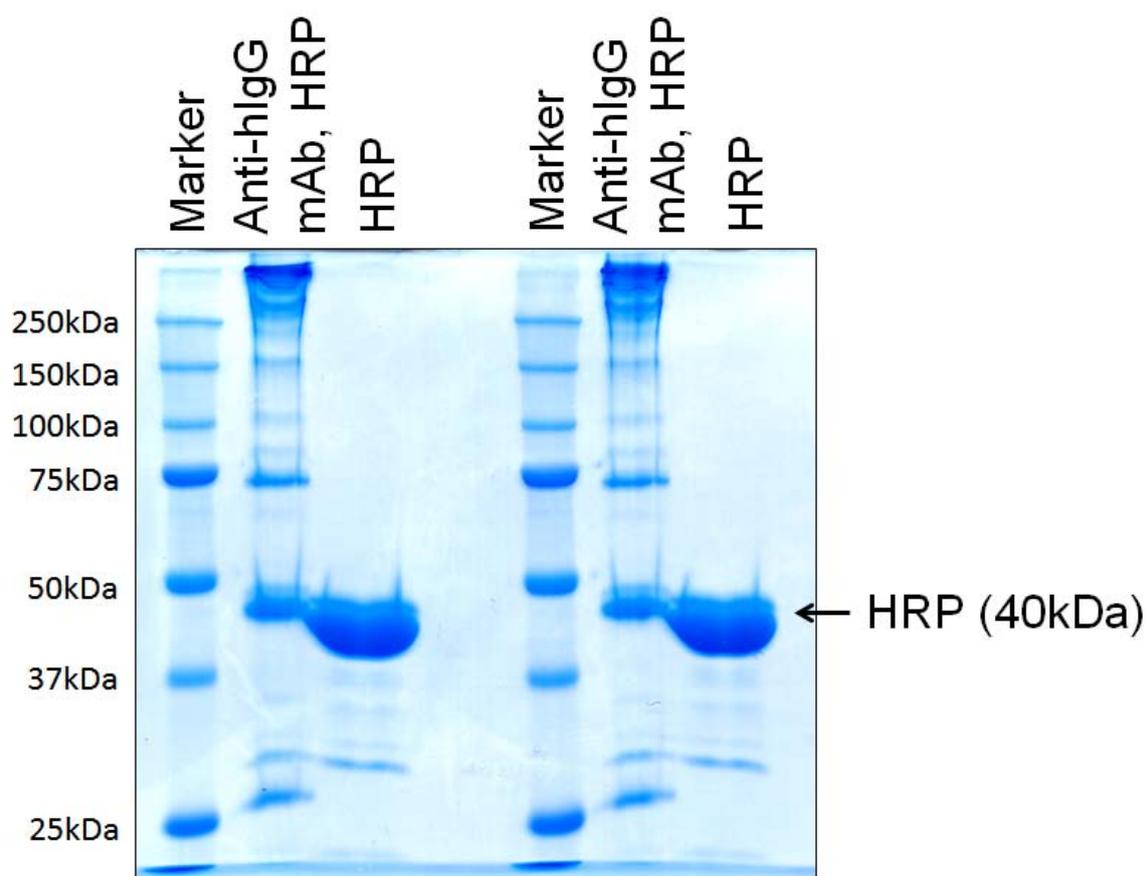


図 2 5 . HRP 修飾抗体の SDS-PAGE

Mouse monoclonal H2 anti-Human IgG Fc (HRP) (ヒト IgG の Fc 領域に対するモノクローナル抗体、Abcam ab99765) を還元化で SDS-PAGE に供した。また、HRP (和光純薬) も同様に SDS-PAGE を行った。

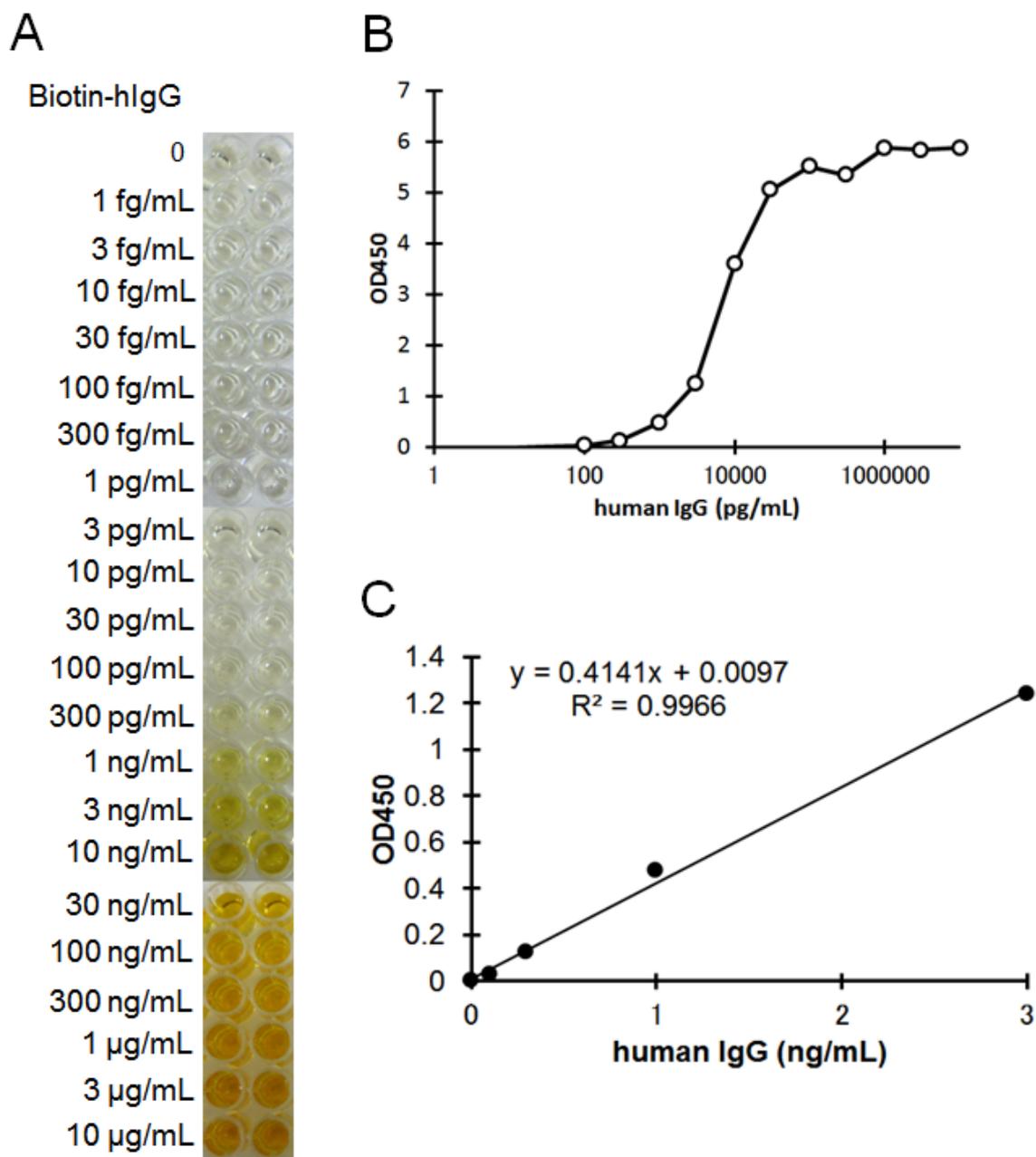


図 2 6 . ビオチン化ヒト IgG を用いた検量線の作成

ビオチン化ヒト IgG を 1fmol/mL から 10µg/mL の濃度でストレプトアビジンコート plate に結合させ、抗ヒト IgG モノクローナル抗体を用いて検出した。(A) 発色させた plate の代表的な写真、(B) 450nm における吸光度 (横軸は対数目盛)、(C) (B) において、IgG 濃度と 450nm 吸光度に直線性が見られる領域の抜粋。

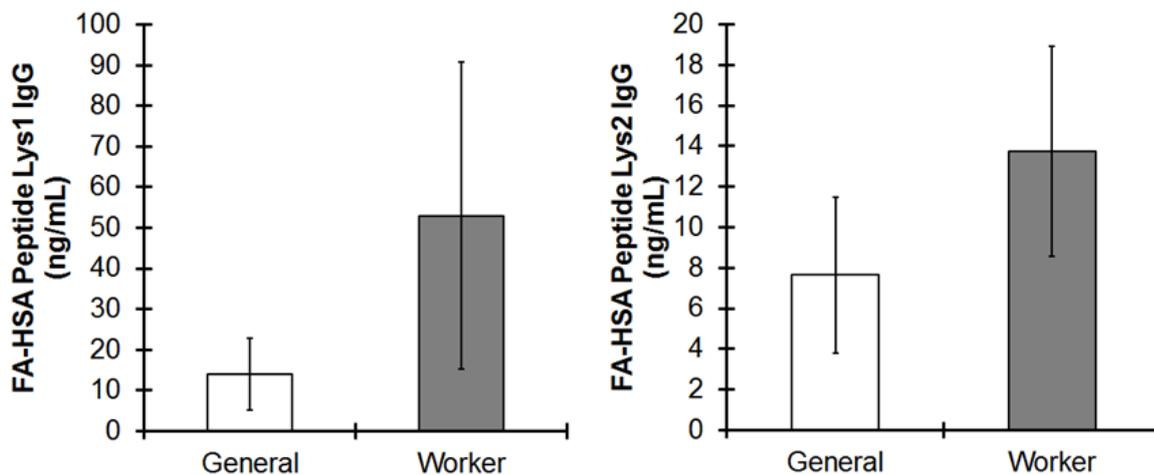


図 2 7. ヒト血清中抗ホルムアルデヒド-HSA Peptide Lys 抗体の定量

福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名の血清中抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys1 抗体と抗ホルムアルデヒド-HSA peptide Lys2 抗体を定量した。検出限界以下の検体は便宜上 0ng/mL として平均値を算出した。各検体の数値は表 1 に示した。N = 10, 図中の Bar は標準誤差を示す。

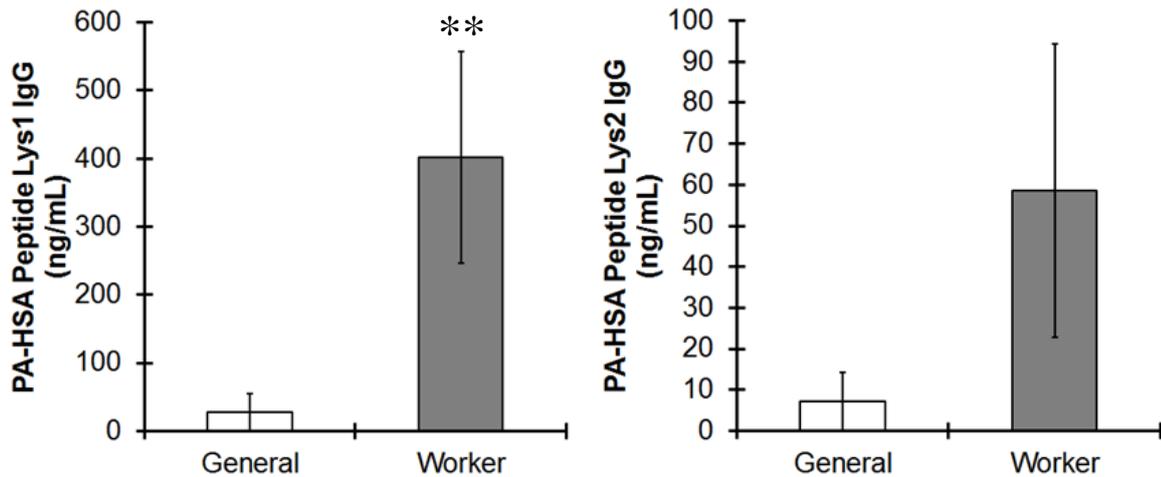


図 28. ヒト血清中抗無水フタル酸-HSA Peptide Lys 抗体の定量

福岡県樹脂工場労働者 10 名、鹿児島県一般住民 10 名の血清中抗無水フタル酸-HSA peptide Lys1 抗体と抗無水フタル酸-HSA peptide Lys2 抗体を定量した。検出限界以下の検体は便宜上 0ng/mL として平均値を算出した。各検体の数値は表 1 に示した。N = 10, 図中の Bar は標準誤差を示す。Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test により群間を比較し、P < 0.01 の場合 \*\* と表記した。

表 2. 質問票の回答と血清中化学物質抗体量

		Age	Sex	Drinking	Smoking	total IgG (mg/dL)	total IgE (IU/mL)	Anti-Chemical-HSA peptide antibody (ng/mL)				Allergy	Acquired Allergy in Adult
								FA-P1 IgG	FA-P2 IgG	PA-P1 IgG	PA-P2 IgG		
General	1	47	male	No	No	1059	643	89.8	<0.1	268.4	70.6	No	No
	2	44	male	Yes	No	1514	394	<0.1	6.1	<0.1	<0.1	No	No
	3	56	male	Yes	No	1361	12.2	29.1	5.6	11.0	<0.1	No	No
	4	53	male	No	No	1225	20.0	3.5	4.2	<0.1	<0.1	No	No
	5	51	female	No	No	1074	45.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	No	No
	6	39	female	No	No	900	8.5	<0.1	28.4	<0.1	<0.1	No	No
	7	52	male	No	Yes	1145	179	8.8	<0.1	<0.1	<0.1	No	No
	8	35	male	Yes	Yes	1003	195	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	No	No
	9	31	female	No	No	1522	54.5	8.3	32.1	<0.1	<0.1	No	No
	10	42	male	Yes	Yes	970	226	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	Yes	No
Worker	1	43	male	Yes	No	1597	29.7	<0.1	1.2	39.8	<0.1	Yes	No
	2	39	male	Yes	No	1064	18.1	42.1	7.3	1237.7	<0.1	No	No
	3	35	male	Yes	No	1003	1400	<0.1	1.8	166.9	44.5	Yes	No
	4	34	male	No	No	847	8.3	<0.1	12.9	<0.1	<0.1	No	No
	5	34	male	No	Yes	1040	118	68.1	7.7	234.5	286.4	Yes	Yes
	6	35	male	No	No	1149	5190	10.9	<0.1	149.5	<0.1	Yes	No
	7	57	male	No	No	1441	59.2	6.6	52.2	918.7	<0.1	Yes	Yes
	8	32	male	No	No	1078	6400	<0.1	15.1	124.6	<0.1	Yes	No
	9	28	male	No	Yes	1165	10.2	387.0	31.7	1137.2	255.4	Yes	Yes
	10	27	male	Yes	Yes	802	<5.0	15.0	7.4	10.47	<0.1	No	No

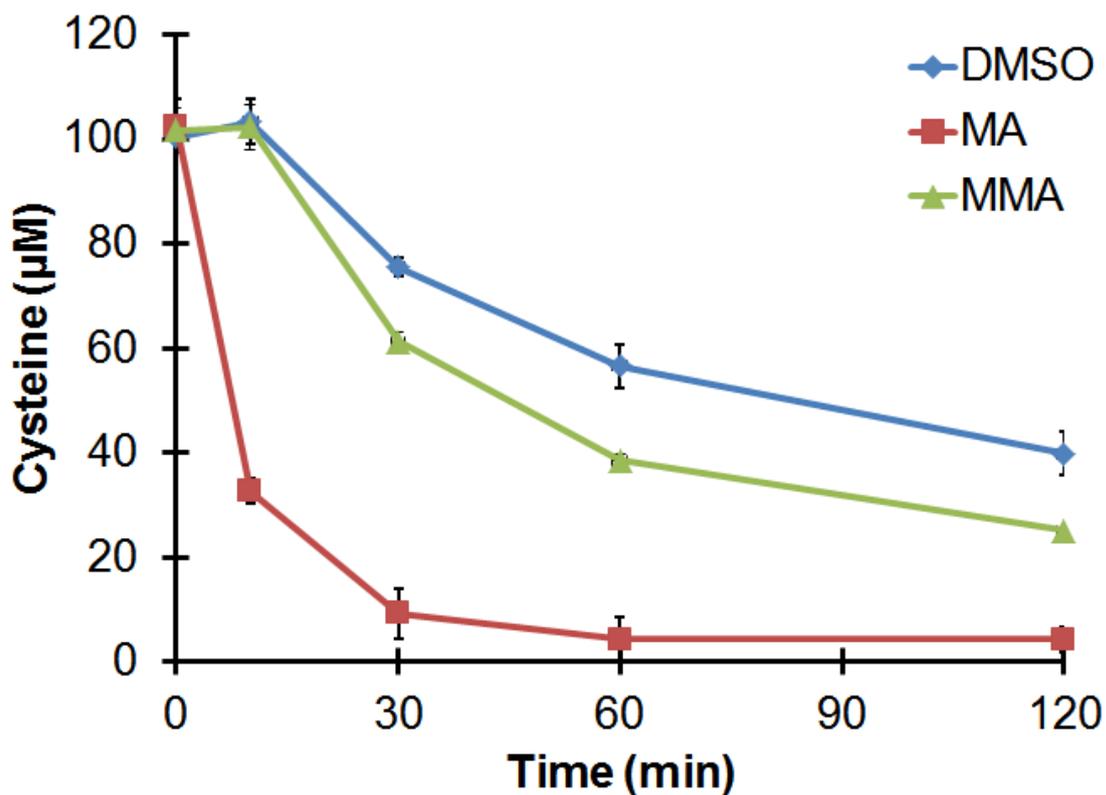


図 2 9. HSA peptide Cys34 とアクリル酸メチル、メタクリル酸メチルとの反応

システイン含有 HSA 部分ペプチド (HSA Peptide Cys34) とアクリル酸メチル (MA) またはメタクリル酸メチル (MMA) をモル比 1 : 100 で反応させ、Ellman 法によりチオールの変化を経時的に定量した。N = 3, 図中の Bar は標準誤差を示す。

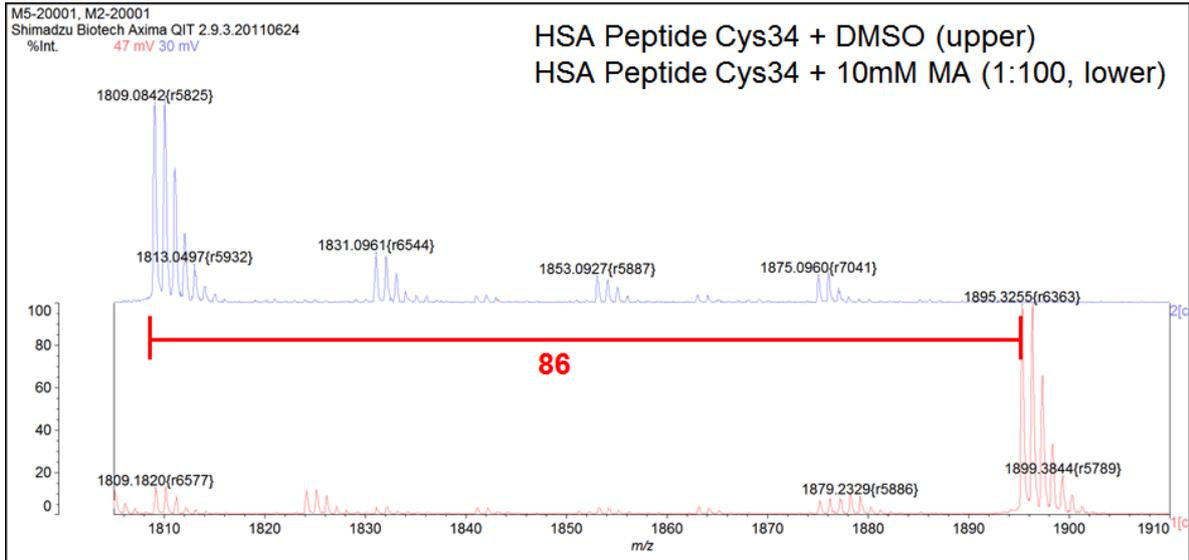


図 30. HSA Peptide Cys34 とアクリル酸メチルとの付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Cys34 をアクリル酸メチル (MA) と反応させた後、反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は DMSO と反応させた HSA Peptide Cys34 の MS スペクトル、下部は MA と反応させたときの MS スペクトルである。

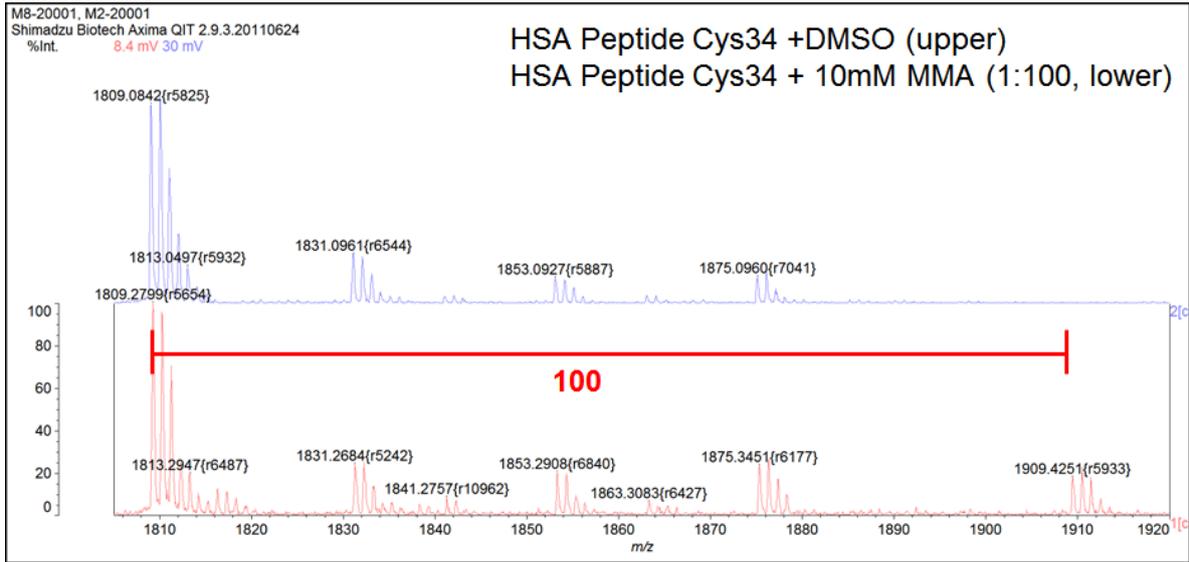


図 3 1 . HSA Peptide Cys34 とメタクリル酸メチルとの付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Cys34 をメタクリル酸メチル(MMA)と反応させた後、反応生成物を MALDI-TOF MS 測定に供し、分子量を決定した。上部は DMSO と反応させた HSA Peptide Cys34 の MS スペクトル、下部は MMA と反応させたときの MS スペクトルである。

human serum No. 4 (TDI取り扱いなし)

human serum No. 23 (TDI取り扱いあり)

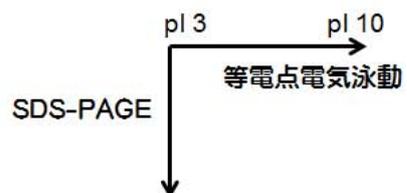
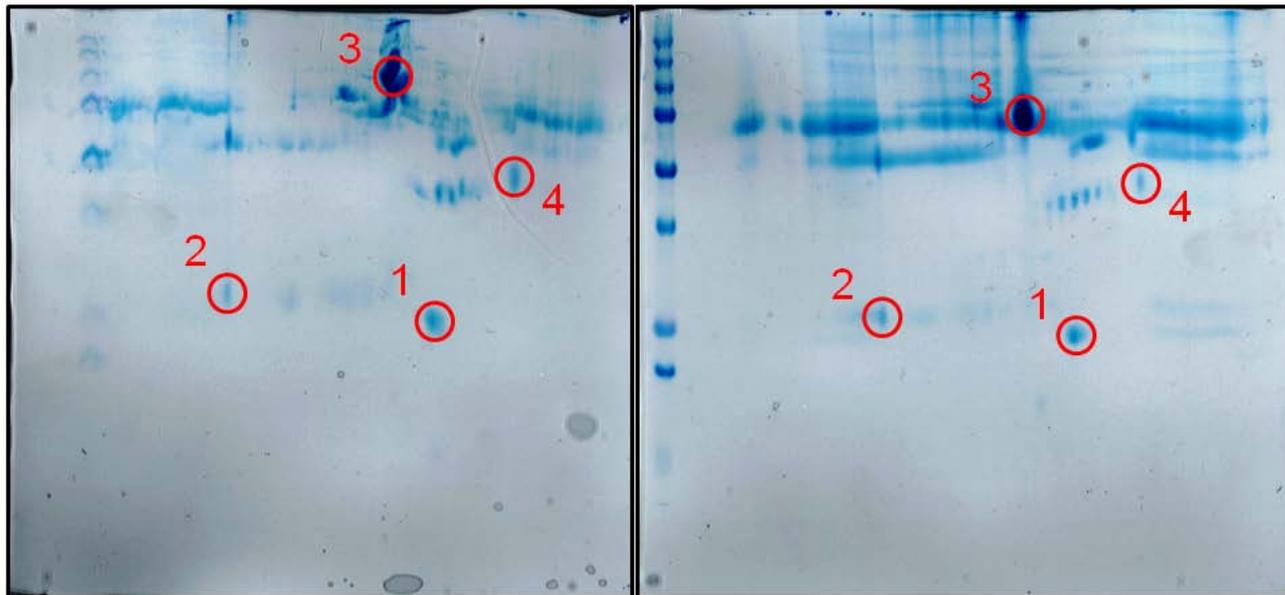


図 3 2. 事業所事務員と事業所従業員の血清の二次元電気泳動パターンの比較

事業所事務員（左）と事業所従業員（右、トルエン-2,4-ジイソシアネート（TDI）の取り扱いあり）の血清を二次元電気泳動により分離し、CBBにより染色した。着目したスポットを1～4の数字で示す。

## Spot No. 3

### Chain A, Structure Of Human Serum Albumin

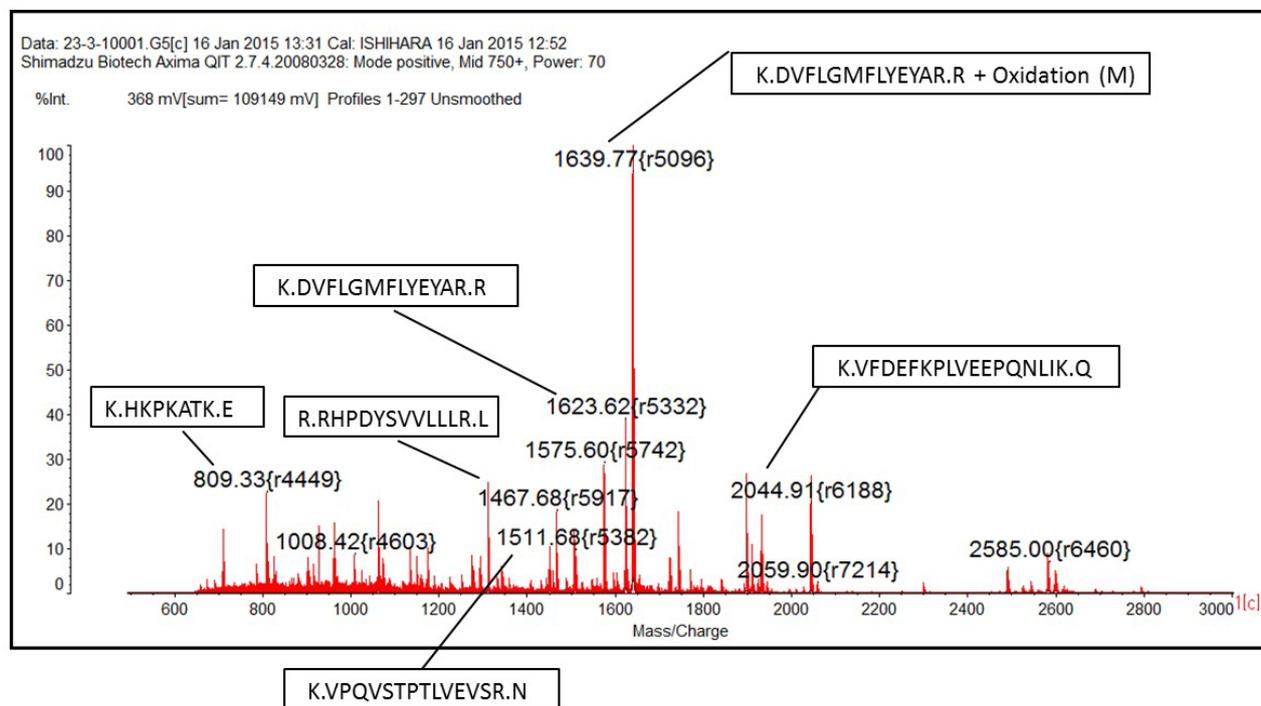


図 3 3. 染色スポットの MALDI TOF QIT 解析 (1)

図 1 6 スポット 3 のタンパク質をトリプシンにより消化し、マトリックスと混合して AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS で解析した。代表的な MS スペクトルを示す。

## Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)  
Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)  
Mass values searched: 20  
Mass values matched: 12

## Protein sequence coverage: 19%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1  EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA
51  DESAENCCKS LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLOH
101 KDDNPNLPRP VRPEVDVMCT AFHDNEETFL KKYLYEIAAR HPYFYAPELL
151 FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLEDEL RDEGKASSAK QRLKCASLQK
201 FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC CHGDLLECAD
251 DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLEE KSHCIAEVEN DEMPADLPSL
301 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEYA RRHPDYSVVL LLRLAKTYET
351 TLEKCCAAAD PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCELF EQLGEYKFNQ
401 ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE VSRNLGKVGS KCKKHPEAKR MPCAEDYLSV
451 VLNQLCVLHE KIPVSDRVTK CCTESLVNRR PCFSALEVDE TYVPKEFNAE
501 TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK AVMDDFAAFV
551 EKCKKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALG
```

Unformatted sequence string: [579 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	M	Peptide
60 - 76	1931.8400	1930.8327	1931.0299	-0.1972	1	<b>K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E</b>
77 - 88	1450.6500	1449.6427	1449.5210	0.1217	0	<b>R.ETYGEMADCCAK.Q + Oxidation (M)</b>
133 - 139	927.3700	926.3627	926.4861	-0.1234	0	<b>K.YLYEIAAR.R</b>
141 - 154	1742.7300	1741.7227	1741.8868	-0.1641	0	<b>R.HPYFYAPELLFFAKR.R</b>
141 - 155	1898.8000	1897.7927	1897.9879	-0.1952	1	<b>R.HPYFYAPELLFFAKR.Y</b>
319 - 331	1623.6200	1622.6127	1622.7803	-0.1676	0	<b>K.DVFLGMFLYEYAR.R</b>
319 - 331	1639.7700	1638.7627	1638.7752	-0.0125	0	<b>K.DVFLGMFLYEYAR.R + Oxidation (M)</b>
332 - 343	1467.6800	1466.6727	1466.8358	-0.1630	1	<b>R.RHPDYSVLLLR.L</b>
333 - 343	1311.6200	1310.6127	1310.7347	-0.1219	0	<b>R.HPDYSVLLLR.L</b>
368 - 384	2044.9100	2043.9027	2044.0881	-0.1853	0	<b>K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q</b>
410 - 423	1511.6800	1510.6727	1510.8355	-0.1628	0	<b>K.VPQVSTPTLVEVSR.N</b>
530 - 536	809.3300	808.3227	808.4919	-0.1692	1	<b>K.HKPKATK.E</b>

No match to: 710.2800, 962.4700, 1061.4600, 1135.4500, 1175.4000, 1508.5900, 1575.6000, 1910.6900

図 3 4. MALDI TOF QIT で得られたパターンの MASCOT 検索結果

図 3 3 で得た MS スペクトルを NCBI データベースにおいて MASCOT 検索を行なった。HSA の断片が複数同定され、スポット 3 は HSA であることが明らかとなった。

Spot No. 1

## Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I

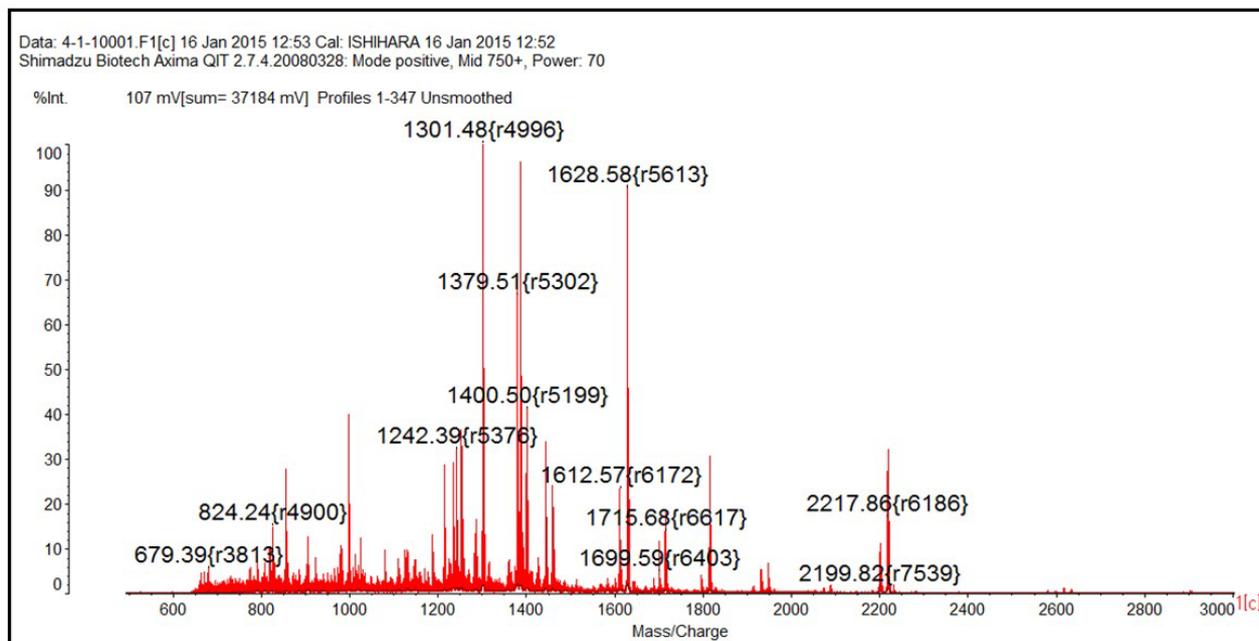


図 3 5. 染色スポットの MALDI TOF QIT 解析 (2)

図 3 2 スポット 1 のタンパク質をトリプシンにより消化し、マトリックスと混合して AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS で解析した。代表的な MS スペクトルを示す。

## Spot No. 4

### Chain A, Crystal Structure Of Human Alpha 1 Acid Glycoprotein

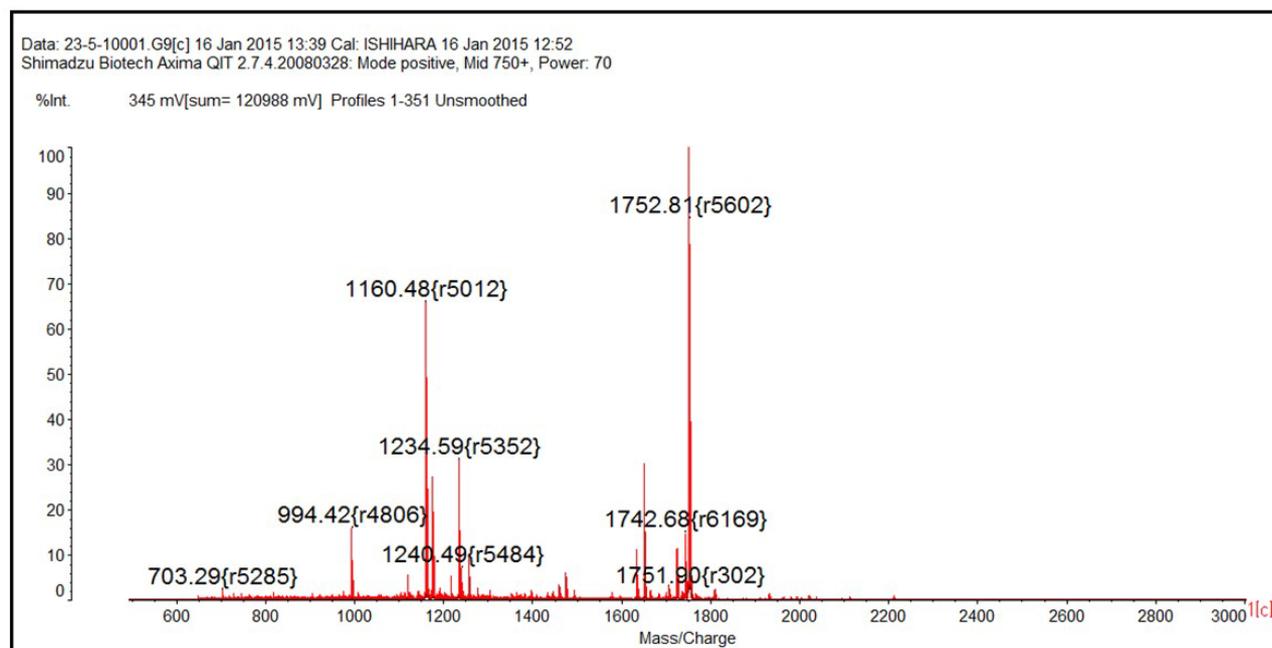
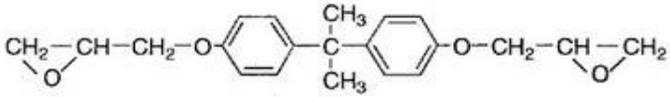
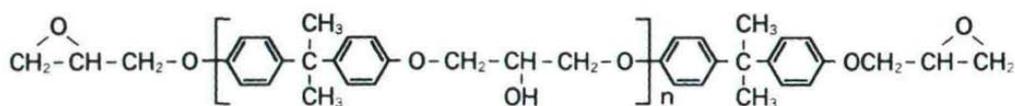


図 3 6 . 染色スポットの MALDI TOF QIT 解析 ( 3 )

図 3 2 スポット 4 のタンパク質をトリプシンにより消化し、マトリックスと混合して AXIMA QIT plus MALDI-TOF MS で解析した。代表的な MS スペクトルをここに示す。

【捕捉資料:化学物質概要】

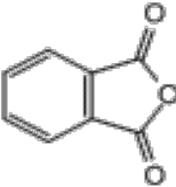
ビスフェノールAジグリシジルエーテル (Bisphenol A Diglycidyl ether : BADGE)	
化学式	 <p style="text-align: center;">BADGE (下記ビスフェノールA型エポキシ樹脂における n=0のオリゴマー)</p>
性質	分子量340.42 淡黄色粘着性の液体 融点8~12°C (n=0)
用途	接着剤や, 塗料, 歯科材料に 使われるエポキシ樹脂の原料
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	規定なし
許容濃度 (日本産業衛生学会)	規定なし



ビスフェノールA型エポキシ樹脂

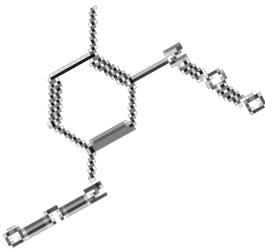
ビスフェノールAジグリシジルエーテルの概要

無水フタル酸  
(Phthalic Anhydride : PA)

化学式	
性質	分子量148.12 白色、光沢のある針状結晶。特有の息詰まるような臭い。 融点130.8℃ 沸点295℃
用途	フタル酸系可塑剤原料、塗料、ポリエステル樹脂、染料中間体（フタイルイミド、フタロニトリル、 <b>O</b> -ベンゾイル、安息香酸、テレフタル酸、医薬、香料
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	気道感作性物質第1群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	0.33ppm、 2mg/m3

無水フタル酸の概要

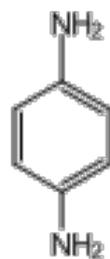
トルエン-2,4-ジイソシアネート  
(2,4-Toluene Diisocyanate : TDI)

化学式	 <p>工業的に使用されるのはトルエン-2,4-ジイソシアネートとトルエン-2,6-ジイソシアネートとの2つの異性体との混合物(トルエンジイソシアネート)</p>
性質	分子量174 白色、常温で液体 融点22℃ 沸点250℃
用途	接着剤、塗料、バインダー、防水材、 弾性繊維、合成皮革等に使われる ポリウレタン樹脂の原料
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	気道感作性物質第1群 皮膚感作性物質第2群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	0.005ppm、 0.035mg/m <sup>3</sup>

トルエン-2,4-ジイソシアネートの概要

パラフェニレンジアミン  
(para-Phenylenediamine : PEA)

化学式



PEAは別名1,4-ジアミノベンゼンという

性質

分子量108.15 白色または淡紅色の結晶  
融点147°C 沸点267°C

用途

染料の中間体や硬化剤

感作性物質分類  
(日本産業衛生学会)

皮膚感作性物質第1群

許容濃度  
(日本産業衛生学会)

0.1mg/m<sup>3</sup>

パラフェニレンジアミンの概要

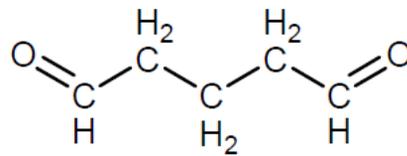
ホルムアルデヒド  
(Formaldehyde : FA)

化学式	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \end{array}$
性質	分子量30.03 刺激臭のある透明な液体 融点-92℃ 沸点-19.5℃
用途	石炭酸系・尿素系・メラミン系合成樹脂原料、ポリアセタール樹脂原料、界面活性剤、農薬、消毒薬、その他一般防腐剤、有機合成原料
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	気道感作性物質第2群 皮膚感作性物質第1群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	0.1ppm、0.12mg/m <sup>3</sup>

ホルムアルデヒドの概要

グルタルアルデヒド  
(Glutaraldehyde : GA)

化学式



GAは別名グルタルジアルデヒドという

性質

分子量100.13 無色透明の液体  
沸点187～189°C

用途

医療器具の消毒剤やなめし剤、  
紙・プラスチック等への定着剤

感作性物質分類  
(日本産業衛生学会)

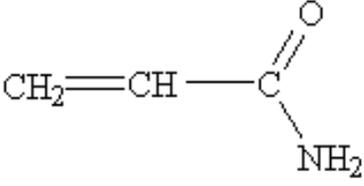
気道感作性物質第1群  
皮膚感作性物質第1群

許容濃度  
(日本産業衛生学会)

0.03ppm

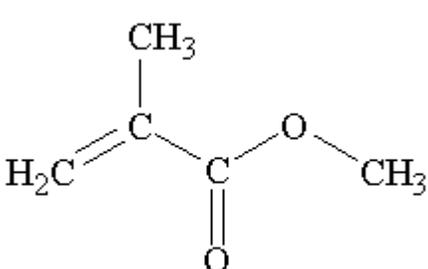
グルタルアルデヒドの概要

アクリルアミド  
(Acrylamide:AA)

化学式	
性質	分子量70.08 無臭の白色結晶 融点84.5℃ 沸点125℃ (25mmHg)
用途	凝集剤、土壌改良剤、繊維の改質及び樹脂加工、紙力増強剤、接着剤、塗料、石油回収剤
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	皮膚感作性物質第2群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	0.10mg/m <sup>3</sup>

アクリルアミドの概要

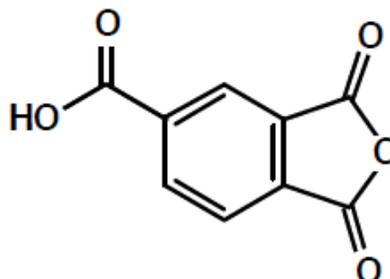
メタクリル酸メチル  
( Methyl methacrylate: MMA )

<p>化学式</p>	
<p>性質</p>	<p>分子量100 無色透明の液体 融点-50℃ 沸点101℃</p>
<p>用途</p>	<p>建築材料、成型用ペレット、照明器具、 広告看板、日用品、塗料、接着剤</p>
<p>感作性物質分類 (日本産業衛生学会)</p>	<p>気道感作性物質第2群 皮膚感作性物質第2群</p>
<p>許容濃度 (日本産業衛生学会)</p>	<p>2ppm、 8.3mg/m3</p>

メタクリル酸メチルの概要

無水トリメリット酸  
( Trimellitic Anhydride : TMA)

化学式



性質

分子量192.12 白色の粉末  
融点168°C 沸点390°C

用途

水溶性塗料、エステル系耐熱性可塑剤、ポリアミドイミド原料、エポキシ樹脂硬化剤、接着剤、繊維処理剤、界面活性剤、染料、顔料、エポキシ樹脂やウレタン樹脂の硬化剤または改質剤として有用である。

感作性物質分類  
(日本産業衛生学会)

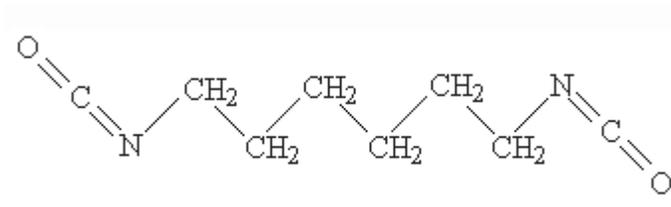
気道感作性物質第1群

許容濃度  
(日本産業衛生学会)

0.0005mg/m<sup>3</sup>  
最大許容濃度0.004mg/m<sup>3</sup>

無水トリメリット酸の概要

ヘキサメチレンジイソシアネート  
(Hexamethylene Diisocyanate : HDI)

化学式	
性質	分子量168.2 低刺激臭、無色の液体 融点-67°C 沸点130~132°C
用途	ポリウレタン樹脂、ポリウレタンプレポリマー等の原料、水性高分子イソシアネート系接着剤の架橋剤
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	気道感作性物質第1群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	0.005ppm、 0.034mg/m <sup>3</sup>

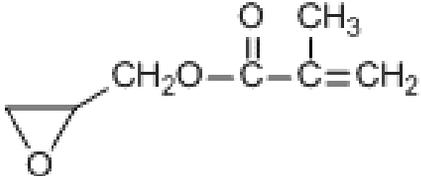
ヘキサメチレンジイソシアネートの概要

エチレンジアミン  
( Ethylenediamine : ED)

化学式	$\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$
性質	分子量60.11 強いアンモニア臭、 無色透明の液体 融点11.3℃ 沸点117.26℃
用途	キレート剤・エポキシ樹脂硬化剤・殺菌剤・ 可塑剤・ゴム薬品合成原料・繊維関係薬品 (防しわ剤・界面活性剤・染料固着剤)
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	気道感作性物質第2群 皮膚感作性物質第2群
許容濃度 (日本産業衛生学会)	10ppm、 25mg/m <sup>3</sup>

エチレンジアミンの概要

メタクリル酸グリシジル  
( Glycidyl Methacrylate : GMA)

化学式	
性質	分子量142.15 無色透明の液体 融点-65℃ 沸点189℃
用途	塗料、帯電防止剤、イオン交換樹脂
感作性物質分類 (日本産業衛生学会)	規定なし
許容濃度 (日本産業衛生学会)	規定なし

メタクリル酸グリシジルの概要

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawamoto T, Tsuji M, Isse T	Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis.	BMC Public Health.	15 (930)	6 p	2015
Tsuji M, Yu H-S, Ishihara Y, Isse T, Ikeda-Ishihara N, Tuchiya T, Kawamoto T,	A simple method for detection of multiple chemical-specific IgGs in serum based on dot blotting.	Health	8	1645-1653	2016