

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 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 辻 真弓

平成29 年 (2017年) 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
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	
II. 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～	----- 6
郡山 千早	
2. 日常生活における化学物質曝露が総 IgE・IgG 抗体に及ぼす影響～1 ヶ月、3 ヶ月の 経時変化について～	----- 26
太田 雅規	
3. ネイル用塗料曝露と塗料成分特異的 IgG 抗体保有に関する研究	----- 49
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	----- 66
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 特異的 IgG 検出のための新規 ELISA 法の開発	----- 110
石原 康宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 145

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ている。本年度も引き続き、一般住民、大学教職員・学生、化学物質（樹脂）取り扱い事業所を対象として研究を行った。解析した化学物質は以下の 12 種類の化学物質（大学教職員・学生研究はうち 6 種類）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)

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。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。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 IgE、IgG 抗体との関連性を 1 ヶ月、3 ヶ月の経時変化に着目して検証した。20 歳以上の 38 名の女性（大学教職員と学生）を対象とした結果、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持たないものよりも有意に高いという結果であった。

大学教職員・学生研究②：20 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）を対象者とし、ネイル用塗料の使用状況と感作性塗料成分特異的 IgG 抗体保有の関連性を調査した。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。「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 抗体値に関しては、TMA の使用頻度が高くなるに従い平均値も高くなっていた。

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事業所 4 社を対象に、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。複数事業所において事業所内で使用している樹脂に関連する複数種類の化学物質の特異的 IgG 抗体値が一般人より高い値を示し、事業所内曝露が生じている可能性が示唆された。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と言える。

新規ペプチド ELISA の構築：カルボニル化合物、FA と PA を標的とし ELISA 作成を行った。FA はイミンを、PA は 3 級アミンを介してリン残基を修飾することが明らかとなり、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。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。本年度は昨年度同様 12 種類の化学物質特異的 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

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 ε-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. システイン含有 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テイン残基の定量
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。

特異的 IgG 抗体の分布を男性と女性で比較したところ、有意差を認めたものは、抗 FA-IgG と抗 MMA-IgG のみであり、いずれも男性において抗体価が高い傾向が認められた。

TDI においては、50 歳未満の群において特異的 IgG 抗体価が有意に高く ($p = 0.024$ 、傾向性の P 値 = 0.012)、HDI と TMA においても、50 歳未満群で特異的 IgG 抗体価が高い傾向を示した。

BMI25 未満群と比べ、BMI25 以上の群では、HDI に対する特異的 IgG 抗体価が有意に高く ($p = 0.002$ 、傾向性の P 値 = 0.071)、TDI および ED においても同様の傾向が認められた。

喫煙なし群と比べ、現在喫煙している者は、抗

MMA-IgG が有意に高く ($p = 0.032$)、他の抗体においてはそのような傾向は認められなかった。

(2) 大学教職員・学生を対象とした研究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: $p = 0.468$)。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。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」「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。

「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 抗体値に関しては、TMA の使用頻度が高くなるに従い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

a 社は主としてウレタン樹脂を取り扱っている中小企業である。一般人と比較して TDI 特異的 IgG 抗体値 3.125 以上 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 未満、 6.25 以上 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 未満の割合が有意に高くなる傾向が認められた (OR=6.99 P value=0.004, OR=10.8 P value=0.002)。また TMA 特異的 IgG 抗体値 0 より大きく $3.125 \mu\text{g/ml}$ 未満、 3.125 以上 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 未満、 6.25 以上 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 未満の割合が有意に高くなった (OR=3.98 P value=0.041, OR=5.02 P value=0.023, OR=5.23 P value=0.034)。TDI はウレタン樹脂の原料である。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ものが報告されており、事業所での TDI 曝露が今回の結果に影響を及ぼしている可能性がある。また 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。これらの点からも 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が否定できない。

c 社は PA 特異的 IgG 抗体が一般人と比較し高い。PA はポリエチレン樹脂の原料である。しかしながら香料やその他の日常品でも使用頻度が高い物質であり、一概に職場での曝露のみが原因と言える物質ではない。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。

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-1β ↑

(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

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。一般人並びに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。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 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
2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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.
 8. 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.
 9. Takuto Tsuchiya, Mayumi Tsuji, Masanori Ohta and Toshihiro Kawamoto: Relationship between the exposure to nail polish and the production of nail polish-specific antibodies. 5th 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	該当無し
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)、ジイソシアネートヘキサメチレン(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】特異的抗体価を測定した12種類中最も抗体陽性率(+以上)が高かった化学物質はPA(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(±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認めなかった。

本研究において、一般集団においても無水フタル酸に対して特異的抗体を有する割合が高いことが確認された。日常生活における何らかの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。

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

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

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°C 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)、ジイソシアン酸ヘキサメチレン(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。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。

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。

(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、実施にあたっては、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

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、保存血清を用いて、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(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(±を含む)。(図1-1、1-2)。

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1、図2-1)。

一方、抗体陰性者を除いて相関を検討したところ、対象人数は少ないものの、BADGEとGMA間で高い相関を認め($\rho=0.79$, n=18)、その他にもBADGEとFA($\rho=0.63$, n=24)、EDとGMA($\rho=0.62$, n=18)、EDとHDI($\rho=0.56$, n=43)、EDとPPD($\rho=0.52$, n=15)において比較的高い相関を認めたが、統計学的に有意な結果ではなかった(図2-2)。

性・年齢・体格別

特異的IgG抗体の分布を男性と女性で比較したところ、有意差を認めたものは、抗FA-IgGと抗MMA-IgGのみであり、いずれも男性において抗体価が高い傾向が認められた(表2)。この傾向は、統計学的には有意ではないものの、BADGEやPPDなどの他の特異的IgG抗体の分布においても認められる。

表3は、50歳未満と50歳以上の2群に分けて、特異的IgG抗体の分布を比較した結果を示す。TDIにおいては、50歳未満の群において特異的IgG抗体価が有意に高く(p=0.024、傾向性のP値=0.012)、HDIとTMAにおいても、50歳未満群で特異的IgG抗体価が高い傾向を示した。

体格(肥満度)についてはBMI25未満群と25以上の群で比較を行った(表4)。BMI25未満群と比べ、BMI25以上の群では、HDIに対する特異的IgG抗体価が有意に高く(p=0.002、傾向性のP値=0.071)、TDIおよびEDにおいても同様の傾向が認められた(表4)。

生活習慣

現在喫煙の有無別に検討した結果を表5に

示す。喫煙なし群と比べ、現在喫煙している者は、抗 MMA-IgG が有意に高く ($p=0.032$)、他の抗体においてはそのような傾向は認められなかった。

飲酒習慣および飲酒量との関連については、ドリンクスコア 2 以上の群で、抗 MMA-IgG がやや高い傾向が見られたが、その多くは +/- の判定で、抗体価が高いというわけではなかった (表 6)。

アルコールを摂取した時に“顔が真っ赤になる”ことは、アルコール脱水素酵素 (ADH) およびアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) などのアルコール代謝酵素が欠損していることが多いことで知られている。いずれの化学物質についても、特異的抗体とアルコール代謝関連の遺伝的素因との関係は見られなかった (表 7)。

緑茶の摂取状況との関連について表 8 に結果を示す。1 日 3 杯未満の摂取群では、抗 TDI-IgG ($p=0.031$) および抗 BADGE-IgG ($p=0.011$) が有意に高かった。その他、統計学的に有意ではないものの、PA および MMA においても同様の傾向が認められた。一方、コーヒーについては、1 日 2 杯以上飲むと回答した群において、いくつかの化学物質 (PPD、AA、ED、MMA など) に対する特異的 IgG 抗体が高い傾向を示したが、いずれの抗体もほとんどの対象者は +/- 以下であり、これらの結果の解釈には注意を要する。

運動習慣との有意な関連を示す特異的 IgG 抗体は認められなかった。

既往歴については、アレルギー疾患の既往歴と有意な関連が見られたのは、抗 AA-IgG のみであった (表 10)。一方、比較的抗体の高い者が多かった TMA については、アレルギー疾患既往なし群において抗体価が高い傾向にあり、他の要因との分布を検討する必要がある。高血圧、糖尿病、脂質異常症、循環器系疾患のいずれも関連は認めなかった。

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。抗体陽性者が多かった PA および TMA の抗体価の分布を、塩素系漂白剤および染料の使用の有無別に示す (図 3, 4)。

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。

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 (+ 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 (± を含む)。

特に TDI と PA の抗体間には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)。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 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 9、 $P=0.397$)。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られる。

E. 結論

特定の化学物質への曝露原因がないと思われる一般集団において、12 種類の化学物質に対する特異的 IgG 抗体の分布を検討した結果、無水フタル酸に対して特異的抗体を有する割合が高いことが確認された。日常生活における何らかの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。

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

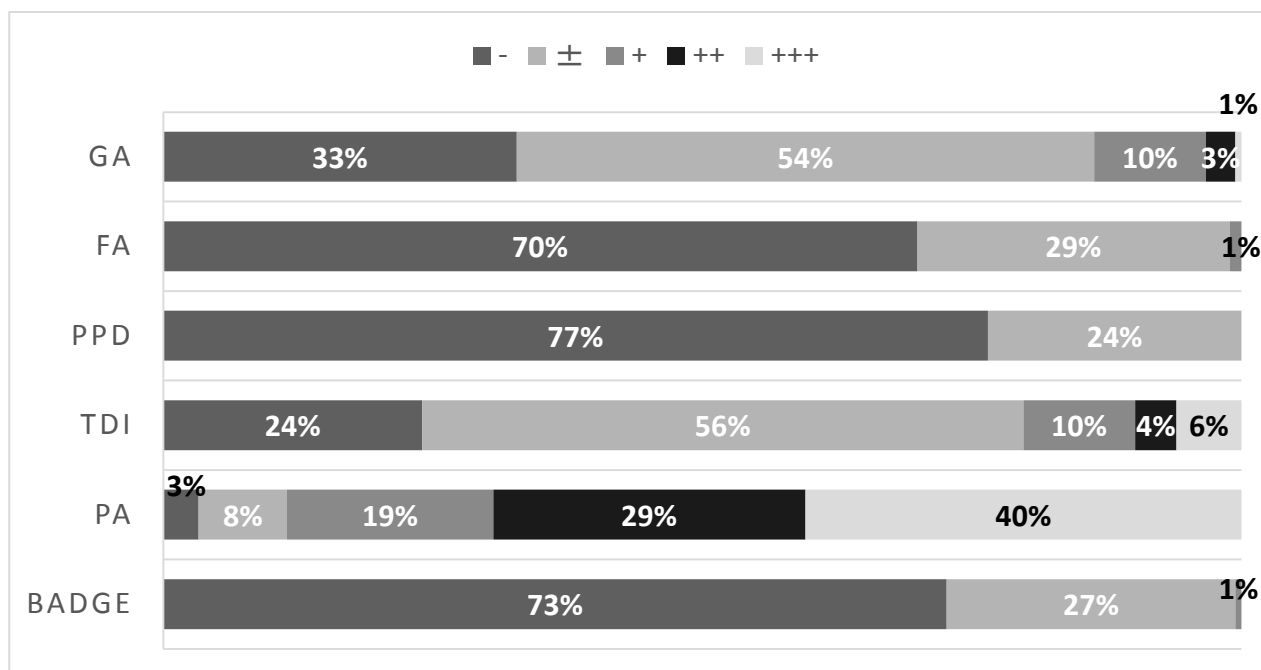
G. 研究発表

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 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

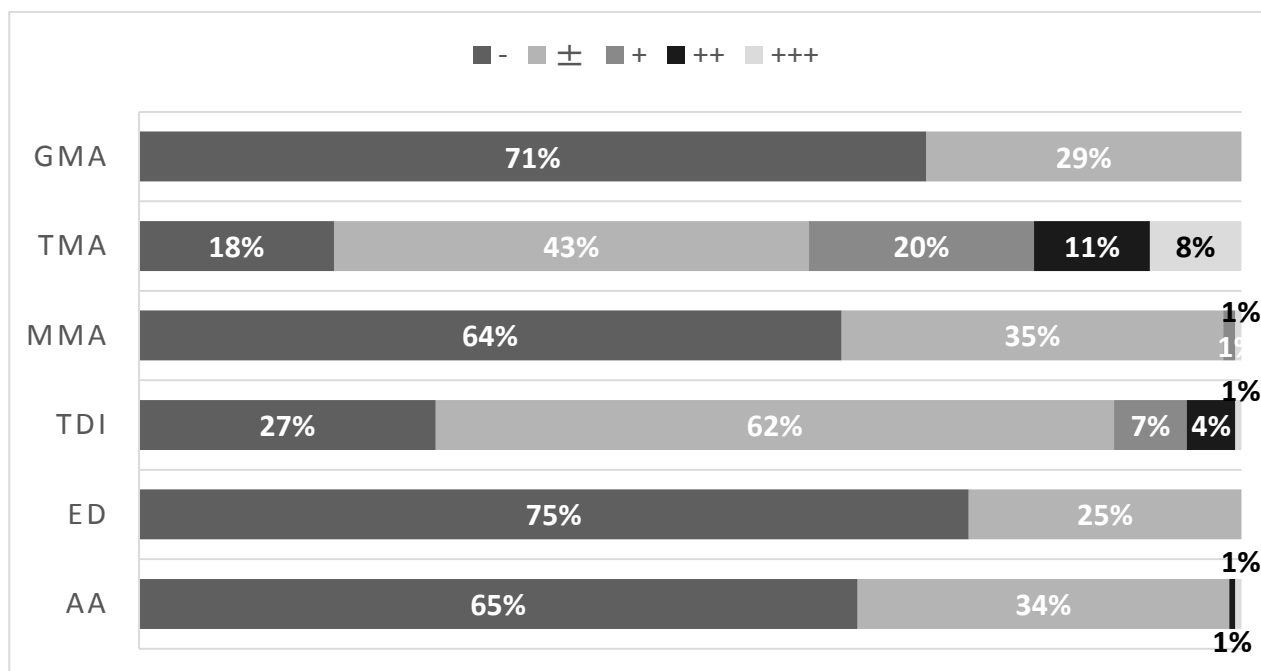
1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

図 1-1 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 1-2 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2-1 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)

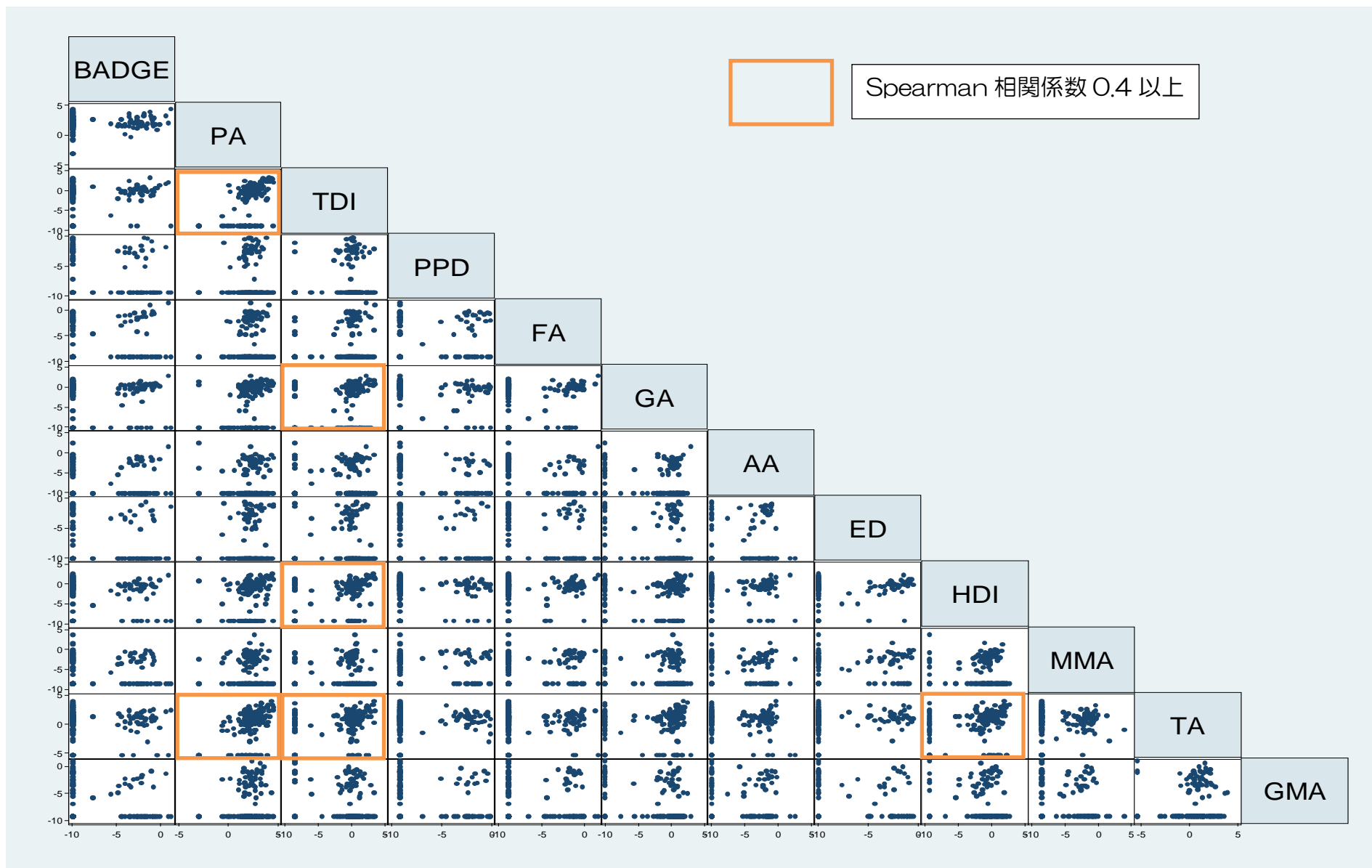


表 1 各 IgG 抗体間の相関 (Spearman 相関係数)

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	0.492 <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	0.429 <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	0.453 <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	0.430 <0.001	0.454 <0.001	0.119 1.000	0.114 1.000	0.275 0.013	0.097 1.000	0.253 0.041	0.423 <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

図2-2 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、検出限界以下は除く)

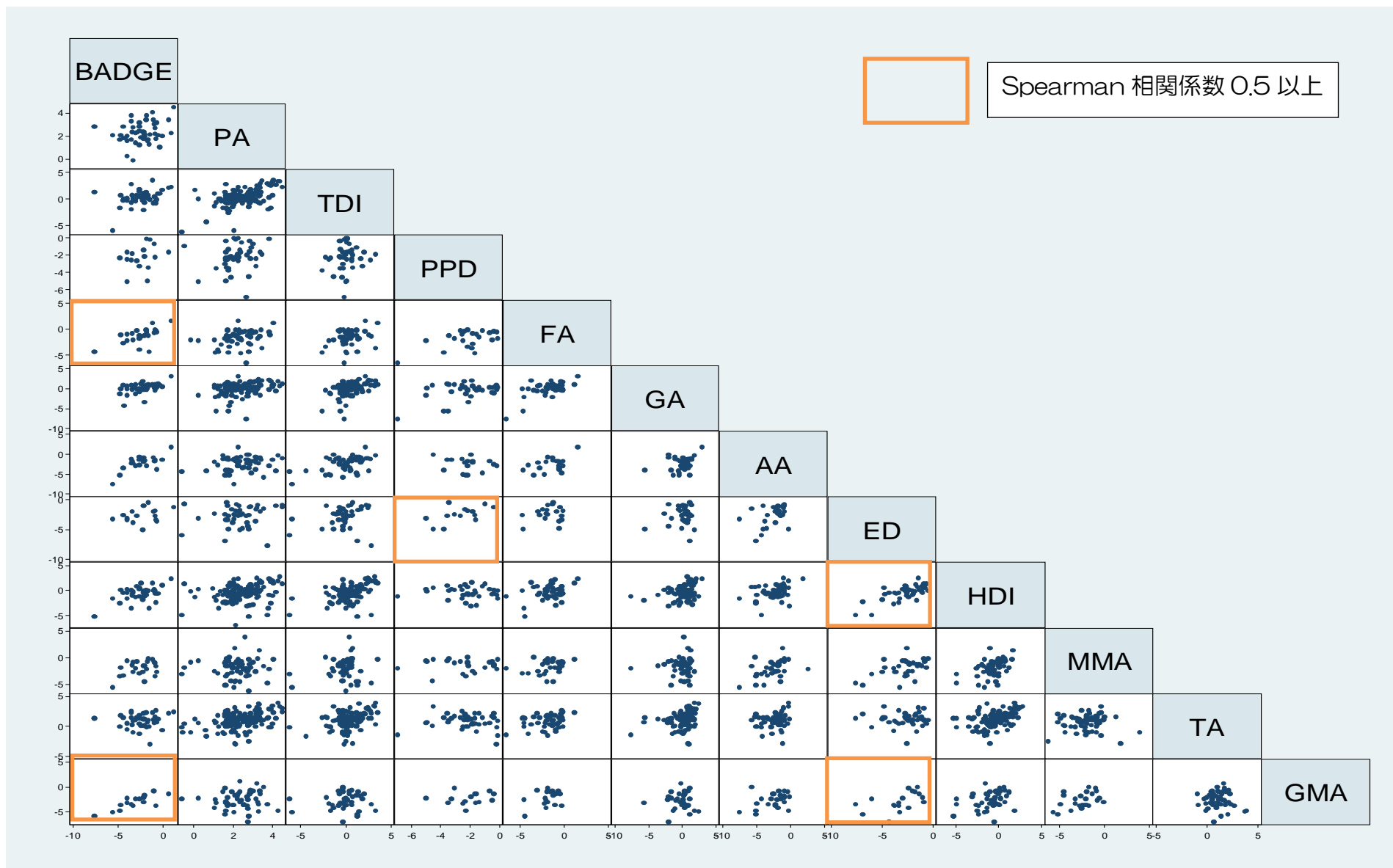


表 2 化学物質特異的 IgG 抗体 の 分布 (性別)

化学物質	性 (人数)	(%)					P value*
		- (陰性)	+/-	+	++	+++	
BADGE	男性(101)	69	30	1	0	0	0.151
	女性(82)	77	23	0	0	0	
PA	男性(101)	3	7	17	31	43	0.346
	女性(82)	4	10	22	27	38	
TDI	男性(101)	21	61	7	5	6	0.530
	女性(82)	28	49	15	2	6	
PPD	男性(101)	73	27	0	0	0	0.110
	女性(82)	80	20	0	0	0	
FA	男性(101)	63	35	2	0	0	0.016
	女性(82)	78	22	0	0	0	
GA	男性(101)	32	58	7	2	1	0.736
	女性(82)	34	48	15	4	0	
AA	男性(100)	62	36	0	1	1	0.387
	女性(81)	69	31	0	0	0	
ED	男性(100)	72	28	0	0	0	0.186
	女性(82)	79	21	0	0	0	
HDI	男性(100)	24	65	6	5	0	0.560
	女性(82)	30	57	7	4	1	
MMA	男性(100)	54	44	2	0	0	0.001
	女性(82)	76	23	0	0	1	
TMA	男性(99)	18	43	21	9	8	0.876
	女性(82)	17	43	20	12	9	
GMA	男性(100)	70	30	0	0	0	0.823
	女性(82)	73	27	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表3 化学物質特異的 IgG 抗体 の分布 (年齢別: 50 歳未満、50 歳以上)

化学物質	年齢 (人数)	%					P value*	P for trend
		- (陰性)	+/-	+	++	+++		
BADGE	50 未満 (83)	70	30	0	0	0	0.287	0.569
	50 以上 (100)	75	24	1	0	0		
PA	50 未満 (83)	4	2	22	27	46	0.195	0.067
	50 以上 (100)	3	13	17	31	36		
TDI	50 未満 (83)	17	58	8	7	10	0.024	0.012
	50 以上 (100)	30	54	12	1	3		
PPD	50 未満 (83)	75	25	0	0	0	0.514	0.800
	50 以上 (100)	78	22	0	0	0		
FA	50 未満 (83)	69	29	2	0	0	0.735	0.980
	50 以上 (100)	71	29	0	0	0		
GA	50 未満 (83)	33	52	12	2	1	0.893	0.854
	50 以上 (100)	33	55	9	3	0		
AA	50 未満 (81)	65	33	0	1	0	0.875	0.252
	50 以上 (100)	65	34	0	0	1		
ED	50 未満 (82)	77	23	0	0	0	0.687	0.927
	50 以上 (100)	74	26	0	0	0		
HDI	50 未満 (82)	23	59	9	10	0	0.059	0.033
	50 以上 (100)	30	64	5	0	1		
MMA	50 未満 (82)	65	33	1	0	1	0.973	0.368
	50 以上 (100)	63	36	1	0	0		
TMA	50 未満 (82)	12	44	20	12	12	0.059	0.050
	50 以上 (100)	22	42	21	9	5		
GMA	50 未満 (82)	68	32	0	0	0	0.538	0.194
	50 以上 (100)	74	26	0	0	0		

* Mann-Whitney U test

表 4 化学物質特異的 IgG 抗体 の分布 (肥満度別 : BMI25 未満、25 以上)

化学物質	BMI(人数)	%					P value*	P for trend
		- (陰性)	+/-	+	++	+++		
BADGE	25 未満(123)	74	25	1	0	0	0.687	0.299
	25 以上(60)	70	30	0	0	0		
PA	25 未満(123)	3	10	20	25	41	0.727	0.328
	25 以上(60)	3	5	17	37	38		
TDI	25 未満(123)	28	53	9	4	6	0.034	0.652
	25 以上(60)	15	62	13	3	7		
PPD	25 未満(123)	79	21	0	0	0	0.182	0.269
	25 以上(60)	72	28	0	0	0		
FA	25 未満(123)	71	28	2	0	0	0.837	0.921
	25 以上(60)	68	32	0	0	0		
GA	25 未満(123)	39	48	8	4	1	0.061	0.361
	25 以上(60)	20	65	15	0	0		
AA	25 未満(121)	66	32	0	1	1	0.927	0.198
	25 以上(60)	63	37	0	0	0		
ED	25 未満(122)	81	19	0	0	0	0.013	0.059
	25 以上(60)	63	37	0	0	0		
HDI	25 未満(122)	35	56	4	5	0	0.002	0.071
	25 以上(60)	10	73	12	3	2		
MMA	25 未満(122)	67	31	1	0	1	0.273	0.062
	25 以上(60)	57	42	2	0	0		
TMA	25 未満(122)	20	43	19	11	7	0.482	0.597
	25 以上(59)	14	44	24	8	10		
GMA	25 未満(122)	73	27	0	0	0	0.822	0.961
	25 以上(60)	68	32	0	0	0		

* Mann-Whitney U test

表5 化学物質特異的 IgG 抗体の分布（喫煙習慣別：現在喫煙なし、あり）

化学物質	現在喫煙(人数)	(%)					P value*
		- (陰性)	+/-	+	++	+++	
BADGE	なし(148)	74	26	0	0	0	0.282
	あり(35)	69	29	3	0	0	
PA	なし(148)	3	8	20	26	43	0.368
	あり(35)	3	9	17	40	31	
TDI	なし(148)	24	53	11	4	7	0.753
	あり(35)	23	66	6	3	3	
PPD	なし(148)	76	24	0	0	0	0.901
	あり(35)	77	23	0	0	0	
FA	なし(148)	71	29	0	0	0	0.430
	あり(35)	66	29	6	0	0	
GA	なし(148)	34	51	11	3	0	0.827
	あり(35)	26	66	6	0	3	
AA	なし(147)	65	35	0	0	0	0.573
	あり(34)	65	29	0	3	3	
ED	なし(148)	74	26	0	0	0	0.623
	あり(34)	79	21	0	0	0	
HDI	なし(148)	26	62	6	5	1	0.555
	あり(34)	29	59	9	3	0	
MMA	なし(148)	67	32	0	0	1	0.032
	あり(34)	50	44	6	0	0	
TMA	なし(147)	16	42	21	11	10	0.189
	あり(34)	24	47	18	9	3	
GMA	なし(148)	70	30	0	0	0	0.272
	あり(34)	79	21	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表6 化学物質特異的IgG抗体の分布（飲酒量別：ドリンクスコア2未満、2以上）

化学物質	ドリンクスコア(人数)	- (陰性)	+/-	+	++	+++	(%) P value*
BADGE	2未満(86)	78	22	0	0	0	0.075
	2以上(73)	62	37	1	0	0	
PA	2未満(86)	6	10	17	26	41	0.666
	2以上(73)	0	5	23	33	38	
TDI	2未満(86)	22	53	13	6	6	0.354
	2以上(73)	22	63	8	1	5	
PPD	2未満(86)	71	29	0	0	0	0.318
	2以上(73)	77	23	0	0	0	
FA	2未満(86)	71	28	1	0	0	0.477
	2以上(73)	64	34	1	0	0	
GA	2未満(86)	34	49	10	6	1	0.710
	2以上(73)	27	64	8	0	0	
AA	2未満(84)	61	37	0	1	1	0.344
	2以上(73)	66	34	0	0	0	
ED	2未満(85)	76	24	0	0	0	0.272
	2以上(73)	70	30	0	0	0	
HDI	2未満(85)	24	67	4	6	0	0.982
	2以上(73)	22	68	5	4	0	
MMA	2未満(85)	75	25	0	0	0	0.001
	2以上(73)	49	49	1	0	0	
TMA	2未満(85)	19	42	18	11	11	0.738
	2以上(73)	18	42	22	12	5	
GMA	2未満(85)	73	27	0	0	0	0.459
	2以上(73)	66	34	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表7 化学物質特異的 IgG 抗体の分布（アルコール摂取による生体反応別：お酒を飲むと顔が真っ赤になる、ならない）

化学物質	Flash(人数)	(%)					P value*
		- (陰性)	+/-	+	++	+++	
BADGE	なし(150)	72	27	1	0	0	0.517
	あり(33)	76	24	0	0	0	
PA	なし(150)	4	8	19	27	41	0.913
	あり(33)	0	9	18	36	36	
TDI	なし(150)	25	53	12	3	7	0.923
	あり(33)	21	67	3	6	3	
PPD	なし(150)	77	23	0	0	0	0.571
	あり(33)	73	27	0	0	0	
FA	なし(150)	69	30	1	0	0	0.478
	あり(33)	76	24	0	0	0	
GA	なし(150)	32	55	9	3	1	0.848
	あり(33)	36	45	15	3	0	
AA	なし(148)	66	33	0	1	1	0.693
	あり(33)	64	36	0	0	0	
ED	なし(149)	75	25	0	0	0	0.891
	あり(33)	76	24	0	0	0	
HDI	なし(149)	28	63	5	4	1	0.857
	あり(32)	24	55	15	6	0	
MMA	なし(149)	60	39	0	0	1	0.060
	あり(33)	79	15	6	0	0	
TMA	なし(149)	19	42	19	11	8	0.852
	あり(32)	13	47	25	6	9	
GMA	なし(149)	70	30	0	0	0	0.539
	あり(33)	76	24	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表 8 化学物質特異的 IgG 抗体 の分布 (緑茶摂取量別 : 1 日 3 杯未満、3 杯以上)

化学物質	緑茶 1 日(人数)	(%)					P value*
		- (陰性)	+/-	+	++	+++	
BADGE	3 杯未満(79)	63	37	0	0	0	0.011
	3 杯以上(104)	80	19	1	0	0	
PA	3 杯未満(79)	4	4	16	30	46	0.164
	3 杯以上(104)	3	12	21	28	37	
TDI	3 杯未満(79)	18	58	11	4	9	0.031
	3 杯以上(104)	29	54	10	4	4	
PPD	3 杯未満(79)	76	24	0	0	0	0.720
	3 杯以上(104)	77	23	0	0	0	
FA	3 杯未満(79)	67	32	1	0	0	0.303
	3 杯以上(104)	72	27	1	0	0	
GA	3 杯未満(79)	29	61	9	1	0	0.283
	3 杯以上(104)	36	48	12	4	1	
AA	3 杯未満(79)	59	39	0	0	1	0.183
	3 杯以上(102)	70	29	0	1	0	
ED	3 杯未満(79)	78	22	0	0	0	0.361
	3 杯以上(103)	73	27	0	0	0	
HDI	3 杯未満(79)	27	62	4	8	0	0.322
	3 杯以上(103)	27	61	9	2	1	
MMA	3 杯未満(79)	57	42	0	0	1	0.101
	3 杯以上(103)	69	29	2	0	0	
TMA	3 杯未満(79)	13	48	20	11	8	0.528
	3 杯以上(102)	22	39	21	10	9	
GMA	3 杯未満(79)	68	32	0	0	0	0.456
	3 杯以上(103)	74	26	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表9 化学物質特異的 IgG 抗体 の分布 (コーヒー摂取量別: 1日2杯未満、2杯以上)

化学物質	コーヒー1日(人数)	(%)					P value*
		- (陰性)	+/-	+	++	+++	
BADGE	2杯未満(118)	75	25	1	0	0	0.424
	2杯以上(64)	69	31	0	0	0	
PA	2杯未満(118)	4	8	17	24	47	0.090
	2杯以上(64)	2	8	23	39	28	
TDI	2杯未満(118)	27	48	11	6	8	0.607
	2杯以上(64)	19	70	8	0	3	
PPD	2杯未満(118)	84	16	0	0	0	0.001
	2杯以上(64)	63	38	0	0	0	
FA	2杯未満(118)	75	25	1	0	0	0.056
	2杯以上(64)	61	38	2	0	0	
GA	2杯未満(118)	36	46	13	4	1	0.829
	2杯以上(64)	25	69	6	0	0	
AA	2杯未満(118)	70	29	0	1	0	0.038
	2杯以上(62)	55	44	0	0	2	
ED	2杯未満(118)	81	19	0	0	0	0.023
	2杯以上(63)	65	35	0	0	0	
HDI	2杯未満(118)	30	57	6	7	1	0.811
	2杯以上(63)	22	70	8	0	0	
MMA	2杯未満(118)	73	26	0	0	1	<0.001
	2杯以上(63)	46	51	3	0	0	
TMA	2杯未満(117)	22	38	21	7	12	0.553
	2杯以上(63)	10	52	19	17	2	
GMA	2杯未満(118)	72	28	0	0	0	0.757
	2杯以上(63)	70	30	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

表 10 化学物質特異的 IgG 抗体の分布（アレルギー疾患既往歴別）

化学物質	アレルギー疾患（人数）	-（陰性）	+/-	+	++	+++	(%) P value*
BADGE	なし(115)	74	25	1	0	0	0.654
	あり(68)	71	29	0	0	0	
PA	なし(115)	2	10	21	30	37	0.397
	あり(68)	6	6	16	26	46	
TDI	なし(115)	23	57	8	4	9	0.439
	あり(68)	26	54	15	3	1	
PPD	なし(115)	73	27	0	0	0	0.152
	あり(68)	82	18	0	0	0	
FA	なし(115)	65	33	2	0	0	0.063
	あり(68)	78	22	0	0	0	
GA	なし(115)	29	58	9	3	1	0.267
	あり(68)	40	45	13	1	0	
AA	なし(114)	73	26	0	1	0	0.005
	あり(67)	52	46	0	0	1	
ED	なし(114)	77	23	0	0	0	0.439
	あり(68)	72	28	0	0	0	
HDI	なし(114)	25	60	7	7	1	0.168
	あり(68)	29	65	6	0	0	
MMA	なし(114)	64	35	0	0	1	0.839
	あり(68)	63	34	3	0	0	
TMA	なし(113)	15	42	19	11	12	0.070
	あり(68)	22	44	22	10	1	
GMA	なし(114)	73	27	0	0	0	0.595
	あり(68)	69	31	0	0	0	

* Mann-Whitney U test

図3-1 抗PA抗体の分布（性別・塩素系漂白剤使用の有無別）

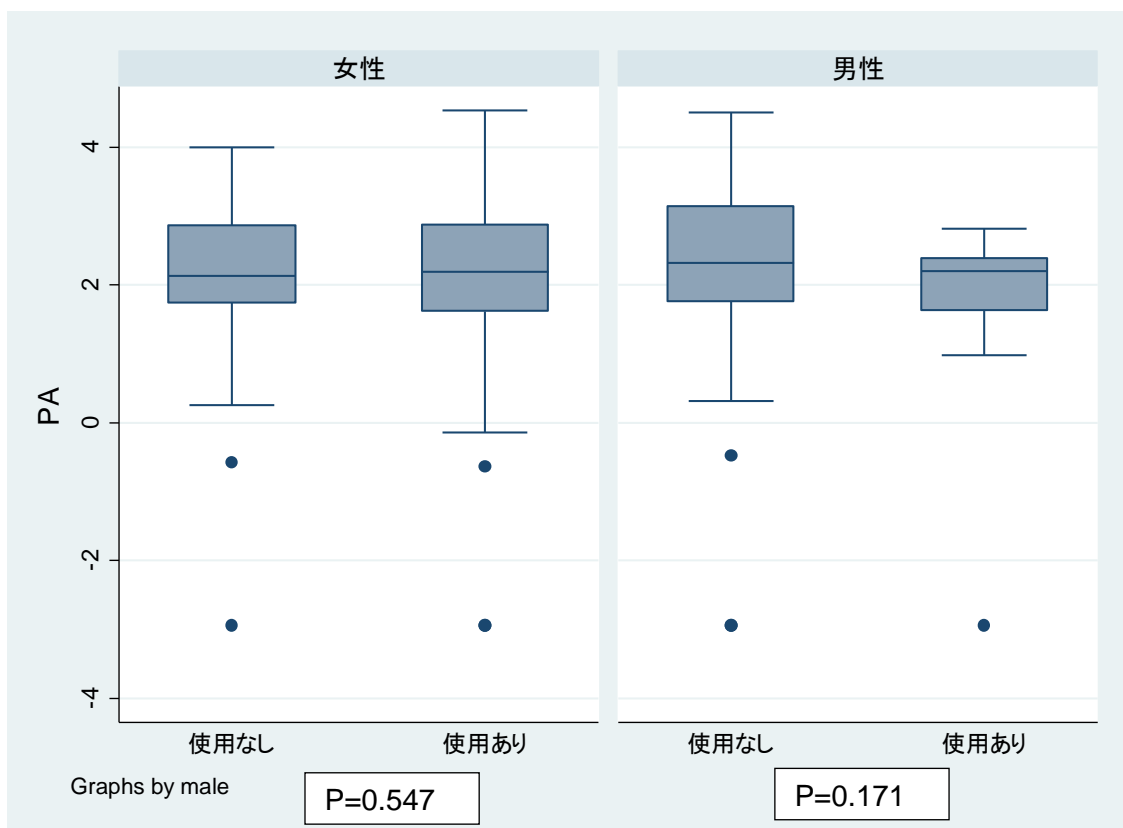


図3-2 抗PA抗体の分布（性別・染料使用の有無別）

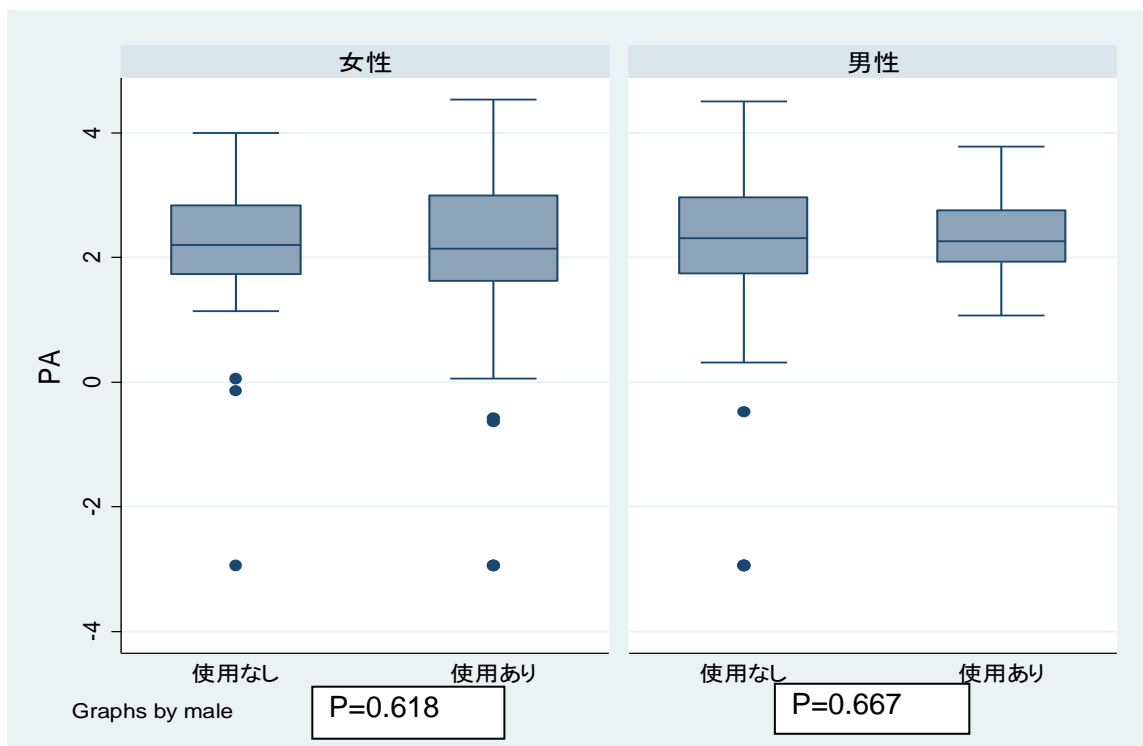


図 4-1 抗 TMA 抗体の分布（性別・塩素系漂白剤使用の有無別）

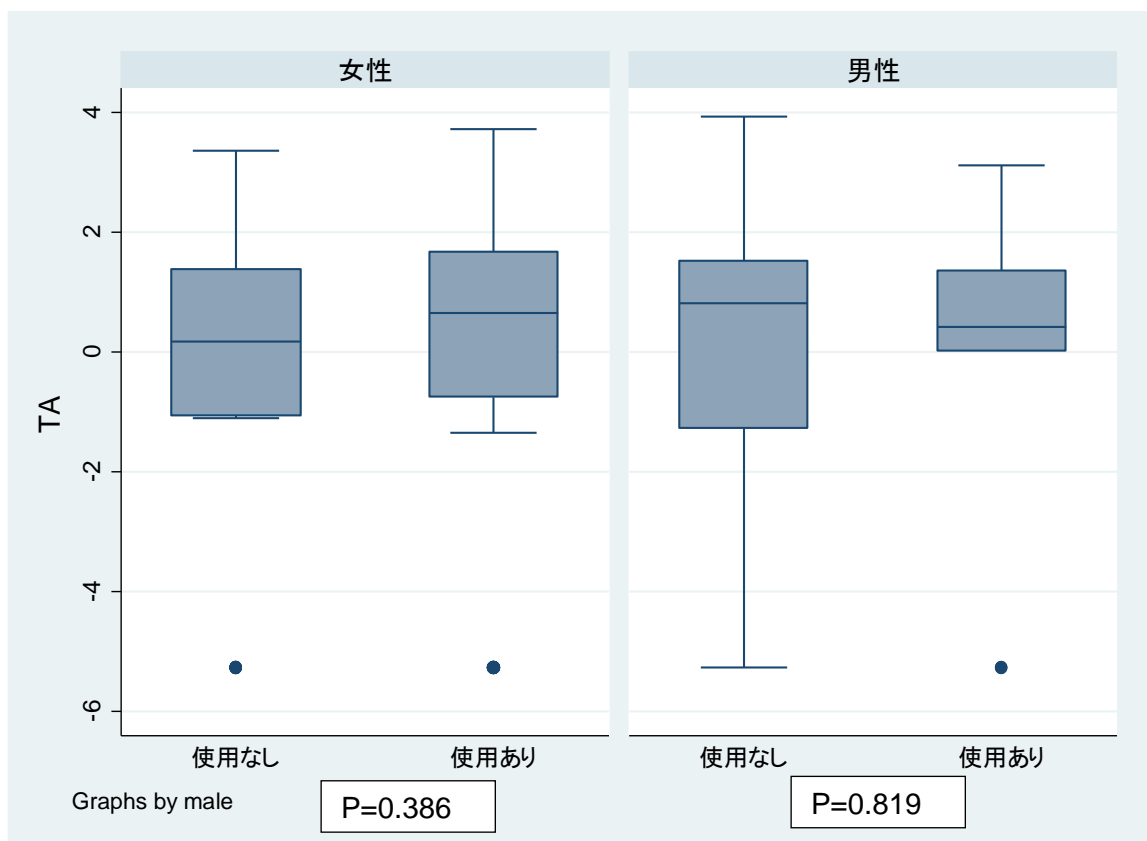


図 4-2 抗 TMA 抗体の分布（性別・染料使用の有無別）

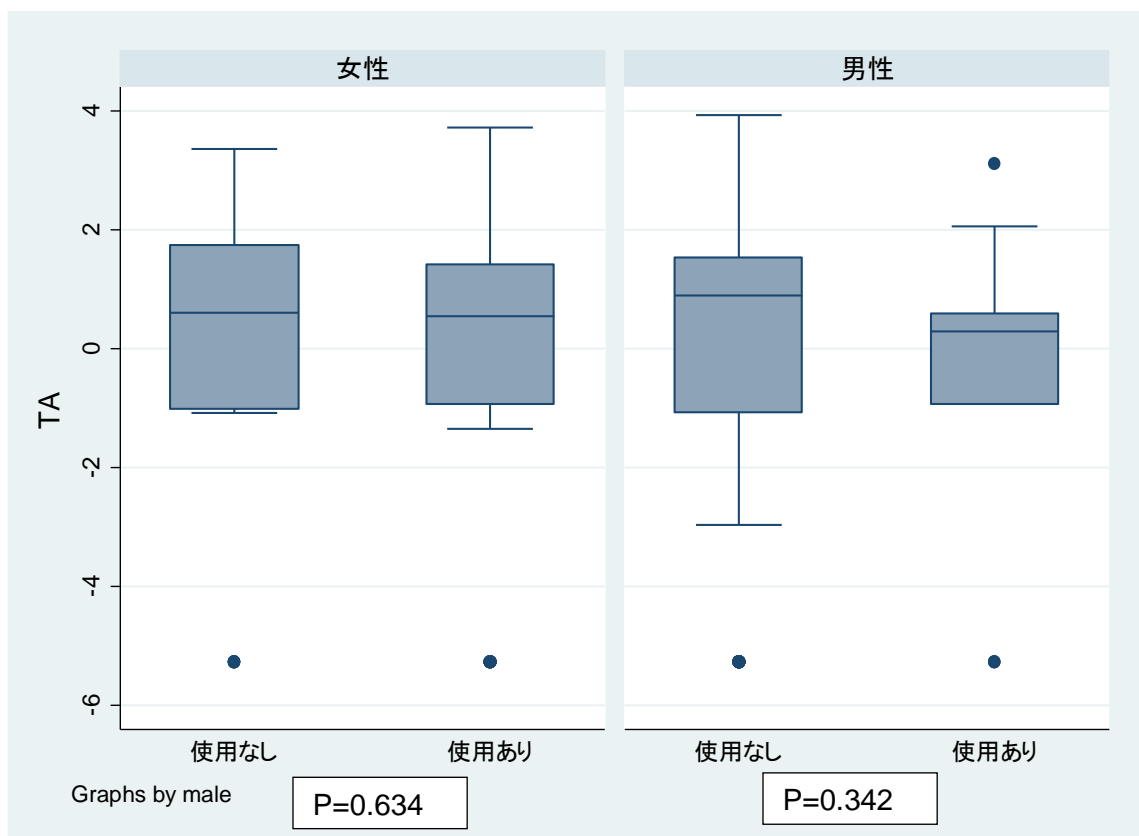


表 11 2つ以上の特異的 IgG 抗体が強陽性 (+++) を示した対象者

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

日常生活における化学物質曝露が総 IgE・IgG 抗体に及ぼす影響 ～1ヶ月、3ヶ月の経時変化について～

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 IgE、IgG 抗体との関連性を1ヶ月、3ヶ月の経時変化に着目して検証することを目的とした。20歳以上の38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、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、IgG 抗体の経時変化を検証した。その結果、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。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。今後、特異的な IgE や IgG 抗体での更なる検証を必要とする。また、特異的 IgE 抗体の検証を行うに当たっては、季節性の変化がある可能性があるため、長期に経過をフォローする場合は注意が必要であると考えられた。

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

昨年度は、一般人を対象とした横断研究を行い、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 IgE、総 IgG 抗体との関連性を検証した。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・IgG 抗体との関連性を検証ところ、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。以上のよう

な結果から、IgE 抗体の検証を行うに当たっては、飲酒習慣や喫煙習慣について層別化するか、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との報告を行った。

今年度は、横断研究の対象者の一部について1ヶ月後、3ヶ月後の3時点についての経時変化に着目した解析を行った。

昨年度の報告と同様に、本分担研究においては、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アレルギー症状、総・特異的 IgG・IgE 抗体との関連性について検証することを目的とした。

なお、本報告書においては、日常生活における化学物質曝露と総 IgE、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、ベースラインにおける調査に引き続き、1ヶ月後、3ヶ月後に喫煙歴、

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）使用の有無に関して質問した。さらに、ネイル使用者については、ベースライン時に塗布してもらい、フォローアップ期間中は、再度塗らないように指示を行った。

自記式質問票調査と同時に採血を行い、総・特異的 IgE・IgG 抗体を測定する。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 IgE・IgG 抗体との関連性を、経時変化に着目して検証した。

なお、測定の時期は、ベースラインが 8 月頃、1 ヶ月後は 9 月頃、3 ヶ月後は 11 月頃に実施した。

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 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ベースライン、1 ヶ月後、3 ヶ月後の 3 回行った。

②総 IgE, IgG 抗体の測定

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および外注検査で総 IgE, IgG 抗体を測定した。

③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 IgE, IgG 抗体の経時変化との関連について検証を行った。

4. 解析

ベースラインでの調査に協力した 80 名の女性のうち経年的調査にも協力した 38 名について集計、解析を行った。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

経時変化を検証した。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。なお、生体試料（血清）は連続可能匿名化した状態で産業医科大学医学部産業衛生学のフリーザーに保管している。

C. 研究結果

1. 対象者の特性（表 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 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 3 および図 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。

昨年度の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。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 4 および図 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 5 および図 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 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 群間に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 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 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 群間に有意な差を認めず、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 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 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

本分担研究では、昨年ベースラインでの調査に引き続き、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。昨年度の報告では、ベースラインにてアレルギー疾患がある場合に総 IgG 抗体が有意に高いことを報告したが、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^{1,2)}、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³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。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得て総 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。

昨年度に行ったベースライン調査において化学物質曝露の有無で、曝露の無い群の方が群よりも有意に総 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。昨年度の報告でも引用したように、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⁷⁾、今回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、昨年度のベースラインでの調査と同様に、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。

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、今回の経時変化による解析では、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。昨年

度行ったベースラインでの調査からも予測される内容であり、今回、経時変化においてもネー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。

飲酒習慣の有無の結果では、昨年度のベースラインでの調査結果と同様に、総 IgE 抗体レベルが、飲酒をやめた人に高いことが示され、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 および総 IgG 抗体レベルに差があることが示された。今後、特異的な IgE や IgG 抗体での更なる検証を必要とする。また、特異的な IgE 抗体の検証を行うに当たっては、季節性の変化がある可能性があるため、長期に経過をフォローする場合は注意が必要であろう。

参考文献

1. 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.
2. Shakib, et al. Elevated serum IgE and IgG4 in patients with atopic dermatitis. *British J Dermatol* 1977; 97: 59-63.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

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 |

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)

表 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)			0.114
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 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 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)					0.030	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

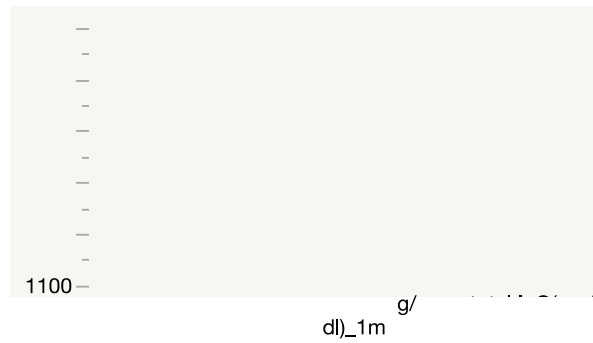


図 1. アレルギー疾患の有無と総 IgG 抗体の経時変化

表 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	0.036
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

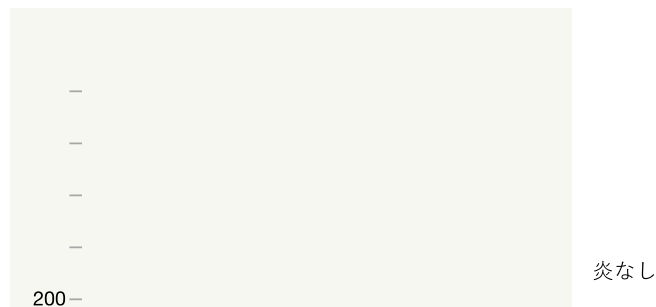


図 2. アトピー性皮膚炎の有無と総 IgE 抗体の経時変化

表 5. 化学物質曝露の有無と非特異的 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		
非特異的 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)					0.050	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

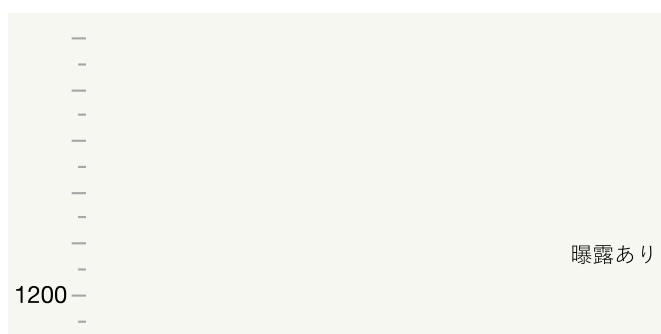


図 3. 化学物質曝露の有無と総 IgG 抗体の経時変化

表 6. 受動喫煙の有無と非特異的 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 (個体間)*	p 値 (個体内 : group x time)*
	平均	標準偏差	平均	標準偏差		
非特異的 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 7. 飲酒習慣の有無と非特異的 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		
非特異的 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 8. 息切れの有無と非特異的 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		
非特異的 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

	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		
非特異的 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 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

別添資料：今回用いた募集用質問票

質問票ご記入のお願い（1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「化学物質特異的IgGのアレルギー診断の可否と曝露モニタリングへの有用性についての研究」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（し）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 たまに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(シ)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へ

以前はしていたが今はしていない →問い6-2へ

している →問い6-3へ

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

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(シ)をつけてください。

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

「以前は飲んでいましたが止めた」方のみ

「以前は飲んでいましたが止めた」、
「現在も飲んでいる」方のみ

7-1. 以前は飲んでいまし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. 以前は飲んでいましたが止めた、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(シ)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(シ)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(シ)。

- ・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浄剤、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。ご協力ありがとうございました。

質問票ご記入のお願い（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「化学物質特異的IgGのアレルギー診断の可否と曝露モニタリングへの有用性についての研究」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

3.身長と体重を教えてください。→回答不要

身長 _____ cm

体重 _____ kg

4.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（し）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

6. 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

7. 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3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。

あてはまる回答の口にチェック(シ)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(シ)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 | <input type="checkbox"/> 以前は飲んでいましたが止めた | <input type="checkbox"/> 現在も飲んでいる |
|------------------------------|---|-----------------------------------|

「以前は飲んでいましたが止めた」方のみ

「以前は飲んでいましたが止めた」、
「現在も飲んでいる」方のみ

7-1. 以前は飲んでいまし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. 以前は飲んでいましたが止めた、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(シ)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 毎日飲んでいました

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(シ)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(シ)。

- ・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。

→ 2回目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。

→ 2回目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浄剤、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。

ネイル用塗料曝露と感作性塗料成分特異的 IgG 抗体 保有に関する研究

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

【目的】本研究の目的は、ネイル用塗料の使用状況と感作性塗料成分特異的 IgG 抗体保有の関連性を我々の教室で開発した化学物質特異的 IgG 抗体検出法を用いて明らかにすることである。

【対象と方法】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）とし、対象者には質問票調査（既往歴、飲酒・喫煙歴、ネイル用塗料使用歴、化学物質曝露歴と血液採取を行った。採取した血液より総 IgE 値、総 IgG 値を測定した。81 名をネイル用塗料の「非使用群」、「現在使用群」、「過去使用群」に分け、喫煙歴、既往歴（アレルギー疾患）割合、血清総 IgE 値、総 IgG 値およびネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体値を測定し 3 群間で比較した。対象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）、ホルムアルデヒド（FA）、アクリルアミド（AA）、メタクリル酸メチル（MMA）および無水トリメリット酸（TMA）とした。さらにネイル用塗料の曝露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 3 ヶ月調査終了後までの間に新たにネイル用塗料を塗布しなかった 13 名を対象に、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 値およびネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体値を測定し曝露の程度と測定値の経時的変化を検討した。

【結果】ネイル用塗料の「非使用群」（7 名（8.6%））、「現在使用群」（42 名（51.9%））、「過去使用群」（32 名（39.5%））で、総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値は 3 群間で統計学的有意差は認めなかった。また、3 群間における 6 種の化学物質（BADGE、PA、FA、AA、MMA、TMA）に対する特異的 IgG 抗体平均値、および特異的 IgG 抗体値が高い class3 以上（ $3.125\mu\text{g/ml}$ 以上）だった人の割合もいずれも統計学的有意差は認めなかった。初回、1 ヶ月後、3 ヶ月後においても総 IgE 抗体、IgG 抗体平均値、6 種の化学物質特異的 IgG 抗体平均値はいずれも統計学的に有意な変化は認めなかった。

【結論】今回の検討においてネイル用塗料の使用状況と感作性塗料成分特異的 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・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

A. 研究目的

ネイル用塗料の使用状況と感作性塗料成分（化学物質）特異的 IgG 抗体保有の関連性について、我々の教室で開発したドットプロット法による化学物質特異的抗体検出法を用いた検討を行っ

てきた。

前年度の分担研究報告書に記載した結果の概要を述べる。20 歳以上の大学生および大学教職員を対象とし質問票調査（既往歴、飲酒・喫煙歴、ネイル用塗料使用歴、化学物質曝露歴と血液採取を行い、血液より総 IgE 値、総 IgG 値を測定した。ネイル用塗料の使用状況について「非使用群」、「現在使用群」、「過去使用群」に分け、3 群間の喫煙歴、既往歴（アレルギー疾患）割合、および総 IgE 値、総 IgG 値を比較したところいずれも 3 群間で統計学的有意差は認めなかった。さらに 3 群の内「非使用群」と、「現在使用群」の 2 群に属する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 抗体を測定した。対象化学物質は (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) としたところ 2 群間における 6 種の化学物質 (BADGE、PA、FA、AA、MMA、TMA) に対する特異的 IgG 抗体平均値 (HSA モル濃度 : 化学物質モル濃度比が 1:1、1:10、1:100 の各濃度条件下で最も高い数値を採用) の統計学的有意差は認めなかった。

今回続報として①「過去使用群」のネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体を測定し、3 群間での特異的 IgG 抗体平均値を比較する②「現在使用群」の中で、初回調査から 1 ヶ月後、3 ヶ月後(この間一度も新たなネイル用塗料は塗布しない)に再度質問紙表調査、採血を実施しえた症例のネイル用塗料含有化学物質特異的 IgG 抗体を測定し経時的変化の有無 (特異的 IgG 抗体値が低下するか) を検討する。

B. 研究方法

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 82 名のうち血清の状態が不良であった 1 名を除く 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

前回報告書にも記載どおり、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 1)。

3. 化学物質特異的 IgG 抗体測定

前回報告書にも記載どおり、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。生体内蛋白はヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin : HSA) を用いた。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 (BADGE)、無水フタル酸 (PA)、ホルムアルデヒド (FA)、アクリルアミド (AA)、メタクリル酸メチル (MMA) および無水トリメリット酸 (TMA) の 6 種類とした。6 種はいずれも GHS 感作性分類区分では皮膚において区分 1 に該当する物質である。

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ーの 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 μ l ずつ、各濃度で 2 ブロットした。また Standard として Human IgG を 40.8 μ g/ml から順に 25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、6.25 μ g/ml、3.125 μ g/ml、0 μ g/ml とブロットした。ブ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。対象者の血清で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 ブロットの平均値) した。今回判定に用いた濃度は 1:10 とし、class1 (0 μ g/ml)、class2 (>0 μ g/ml、3.125 μ g/ml <、class3 (\geq 3.125 μ g/ml、<6.25 μ g/ml)、class4 (\geq 6.25 μ g/ml、<12.5 μ g/ml)、class5 (\geq 12.5 μ 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および総 IgE 抗体値、IgG 抗体値の比較

81 名（男性 2 名、女性 79 名）に対し質問票調査を行った。ネイル用塗料使用歴（表 1）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%）であった。各群の 3 群間の年齢、喫煙率、アレルギー疾患既往率、血清総 IgE 抗体値、IgG 抗体値は表 2 に記した。

2. 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 2）。「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 3 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 4 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った。

「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 5 に示す。特に一定の傾向は示さなかった。

3. 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 3）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 4）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 5）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 (μg/ml)、PA 10.16→8.25→8.73 (μg/ml)、FA 0.44→0.68→0.88 (μg/ml)、AA 0.08→0.001→0.02 (μg/ml)、MMA 0.26→0.02→0.14 (μg/ml)、TMA 0.76→1.09→1.01 (μg/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

今回我々は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明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。

曝露指標としての特異的 IgG 抗体の有用性については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ことが明らかとなった。

以上より本研究ではネイル用塗料の使用状況と塗料成分特異的 IgG 抗体保有との関連性を実証するに至らなかったが、症例数の増加や、同一のネイル用塗料を使用するなどの介入を行い、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、といった曝露をより明確にすることなども今後検討する必要性があると思われた。

E. 結論

今回ネイル用塗料の使用状況と感作性塗料成分（化学物質）特異的 IgG 抗体保有の関連性は明らかにはならなかった。今研究についての課題が多く、今後対象症例の増加、対象化学物質の再検討、特定のネイル用塗料を使用する（介入）などの実施がより有用な結果が得られる可能性が考えられた。

参考文献

- ・中村晋ら. 職業アレルギー. 大阪, 永井書店, 2011, 279p
- ・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 Allergy*. 7; 251-255, 2013
- ・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
- ・Mendelsohn E et al. Nail polish as a source of exposure to triphenyl phosphate. *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
- ・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 | 該当無し |
| 2. 学会発表 | 該当あり |

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

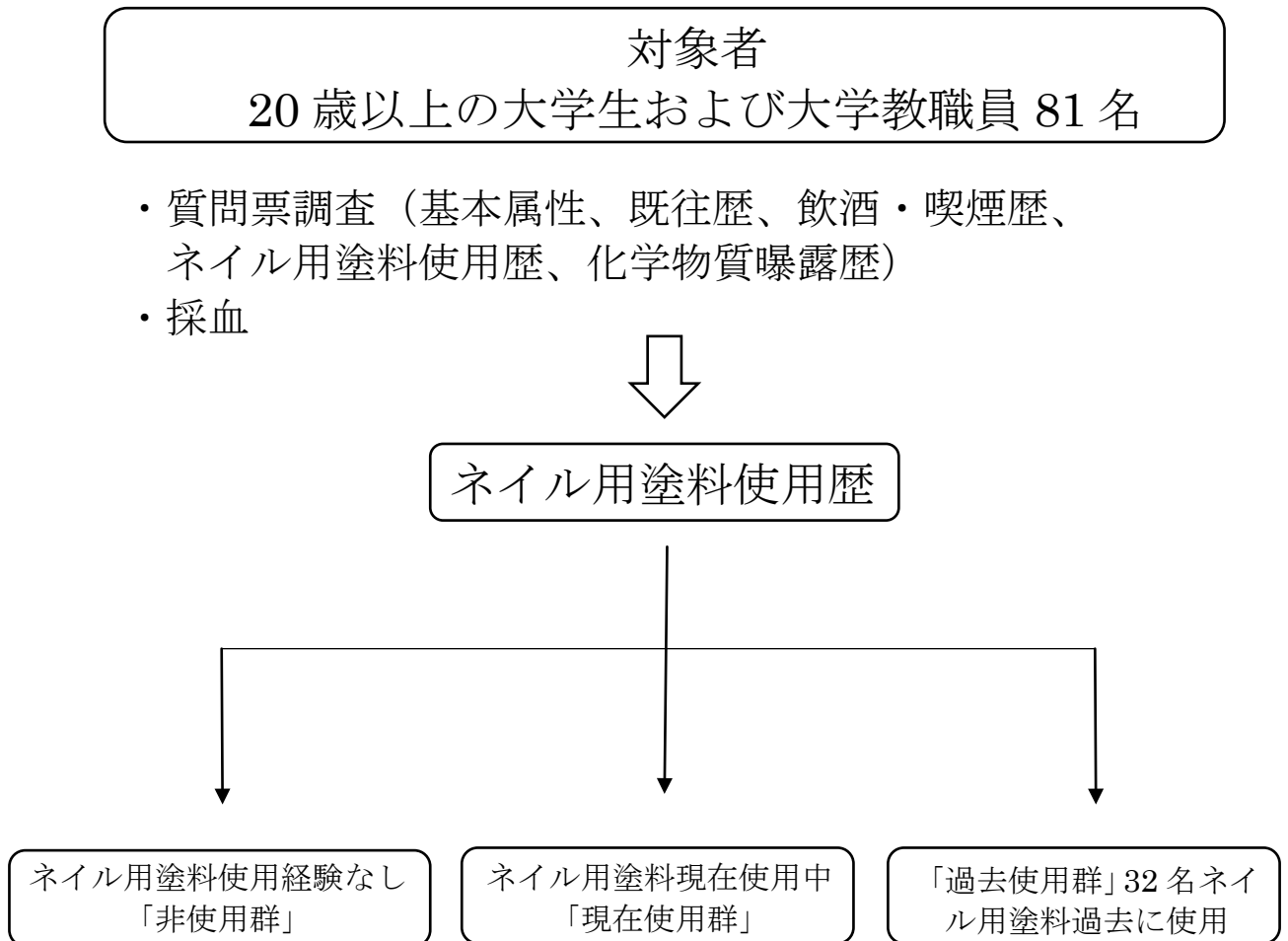
土屋卓人、辻真弓、太田雅規、川本俊弘：ネイル液使用と含有化学物質特異的抗体保有率との関連性. 第14回日本予防医学会、東京、2016年6月

Takuto Tsuchiya, Mayumi Tsuji, Masanori Ohta and Toshihiro Kawamoto: Relationship between the exposure to nail polish and the production of nail polish-specific antibodies. 5th 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. 対象者の群分け、測定項目



- ① 3群に群分けして血清総 IgE 値、IgG 値、アレルギー疾患既往者割合等比較
- ② 3群間の化学物質特異的 IgG 抗体測定（化学物質濃度 1:10）
- ③ 「現在使用群」における化学物質特異的 IgG 抗体値の縦断調査（初回、1ヶ月後、3ヶ月後）

表 1. 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 2. ネイル用塗料使用歴による群分け (全 81 名)

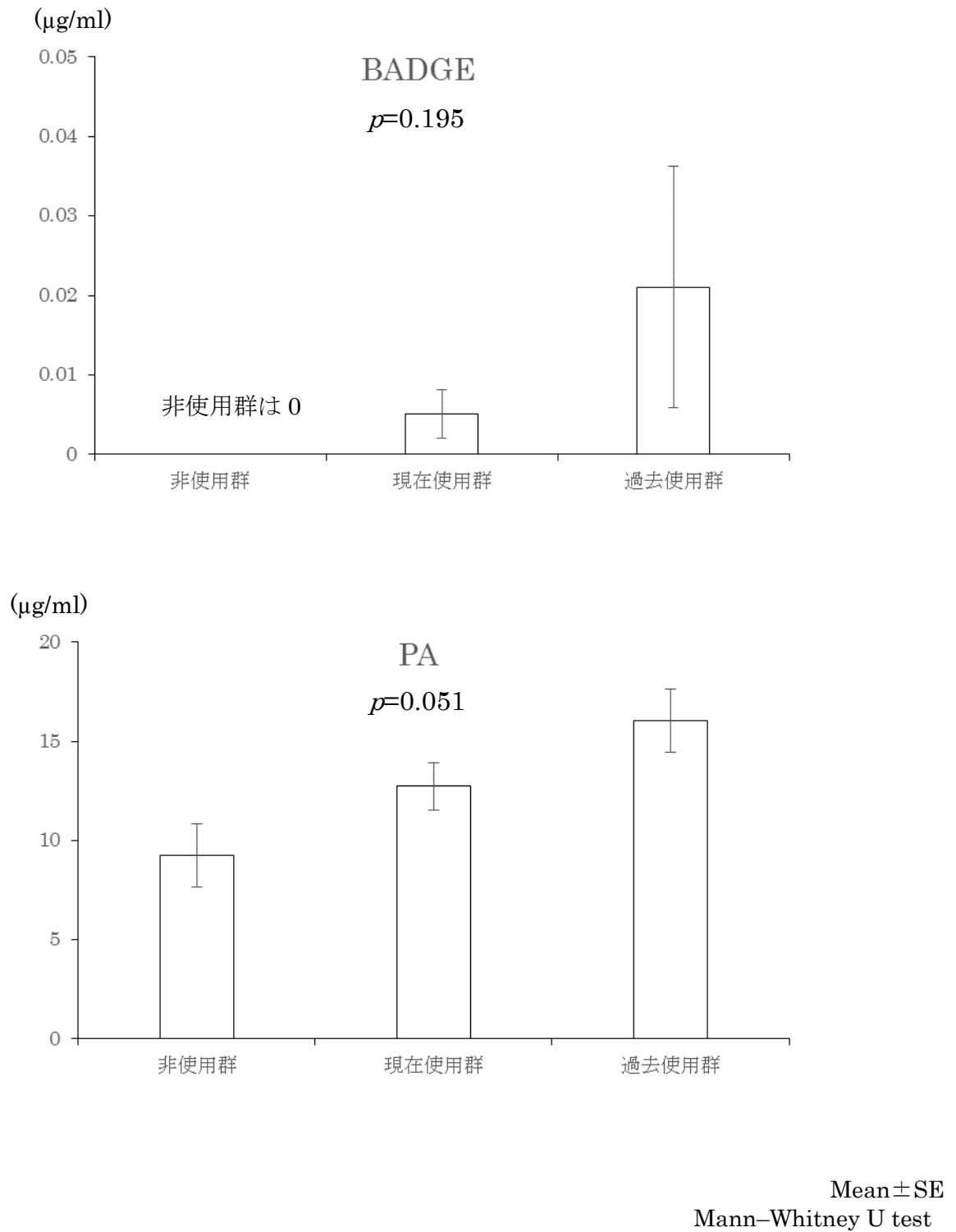
	非使用群	現在使用群	過去使用群	p 値
人数	7名(男2名、女5名)	42名(全て女性)	32名(全て女性)	
平均年齢	37.0±6.0 歳	22.3±0.5 歳	23.8±1.2 歳	0.08*
喫煙経験あり	2名(28.6%)	4名 (9.5%)	0名(0%)	0.169#
アレルギー疾患 既往歴あり	6名(85.7%)	30名 (71.4%)	15名(50.0%)	0.041#
血清総 IgE 平均値	250±176 IU/ml	436±164 IU/ml	357±78 IU/ml	0.320*
血清総 IgG 平均値	1207±83 mg/dl	1248±32 mg/dl	1250±37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

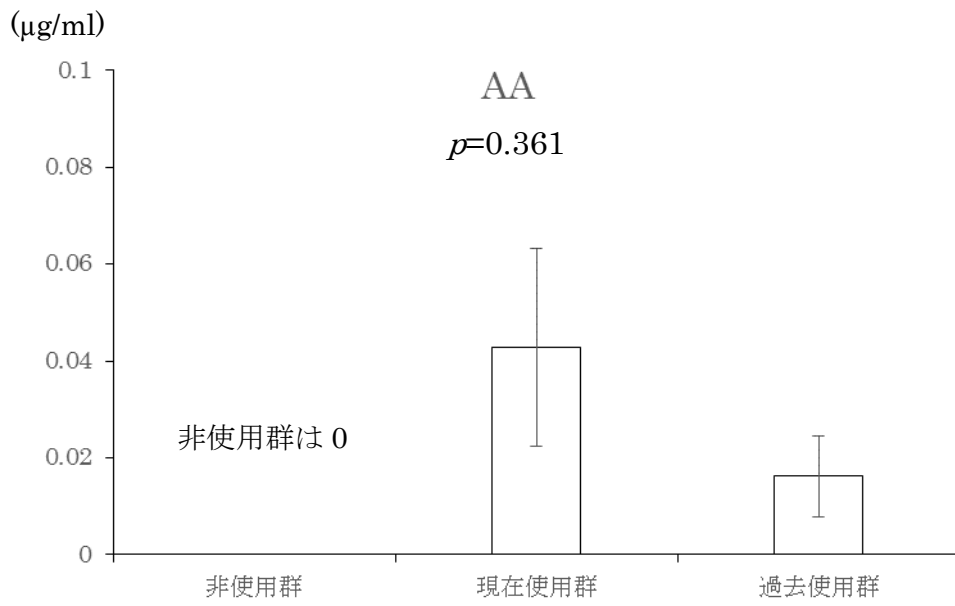
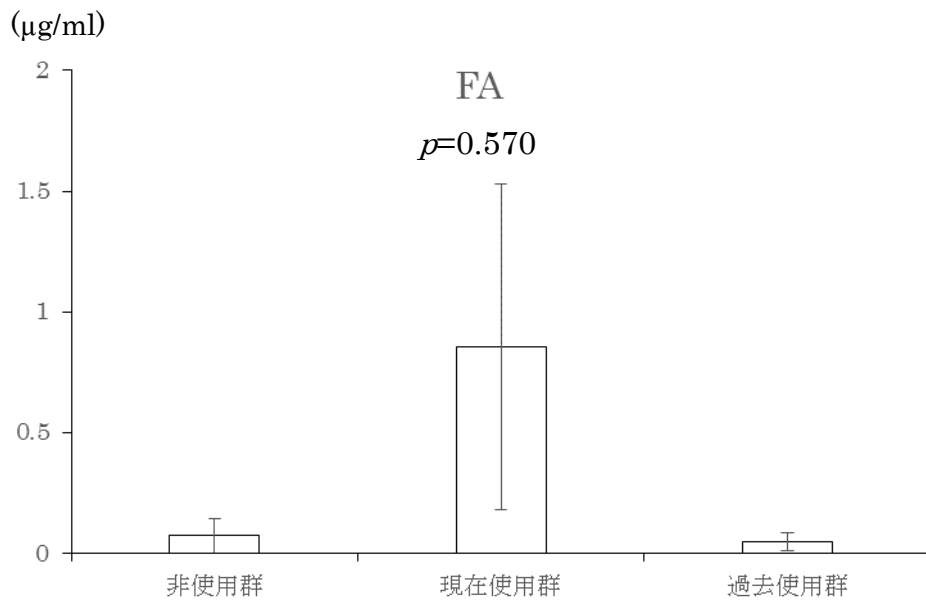
Mean±SE

* : Kruskal-Wallis test

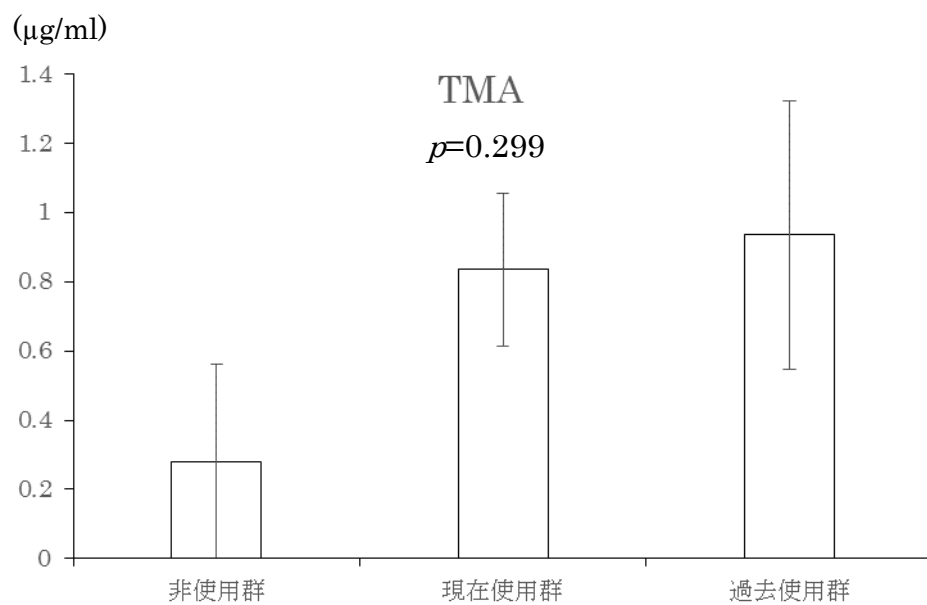
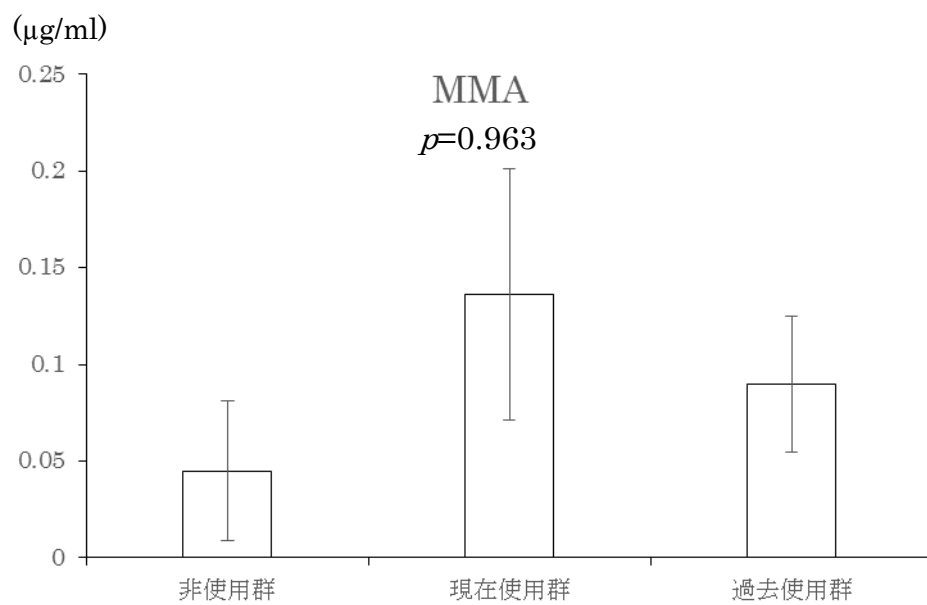
: カイ二乗検定

図 2. 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

表 3. 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 μ g/ml)

class2 (>0 μ g/ml、3.125 μ g/ml <)

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

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

class5 (\geq 12.5 μ 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 4. 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 5. 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 3. 縦断調査の対象者

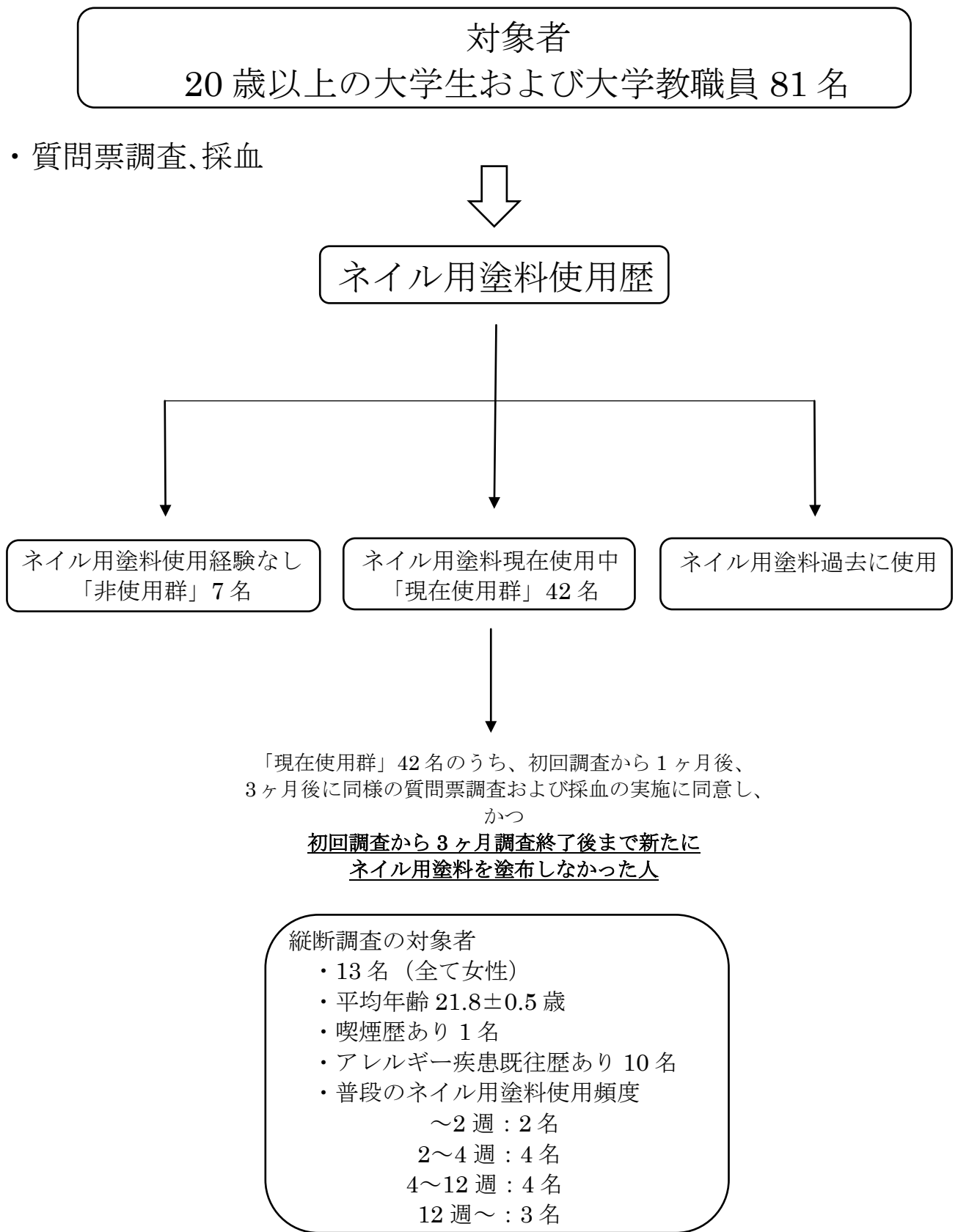
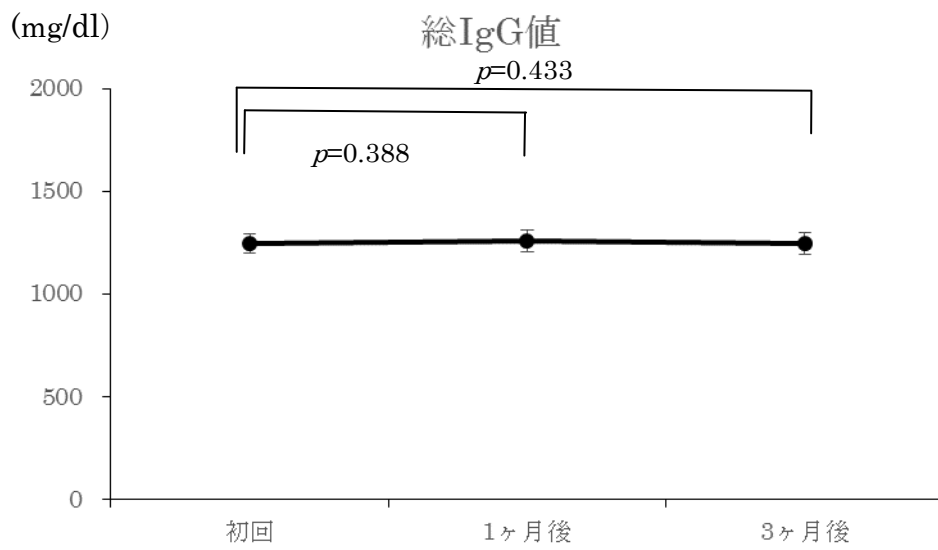
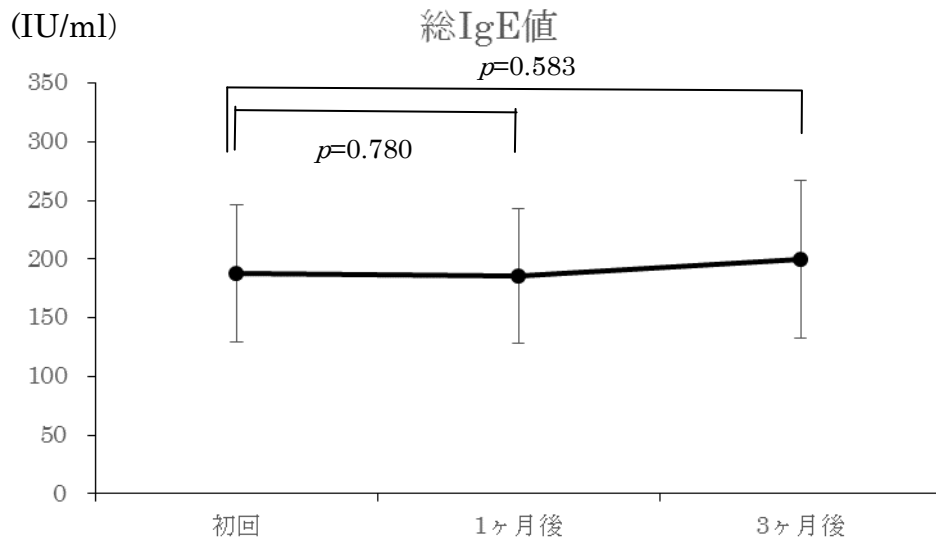
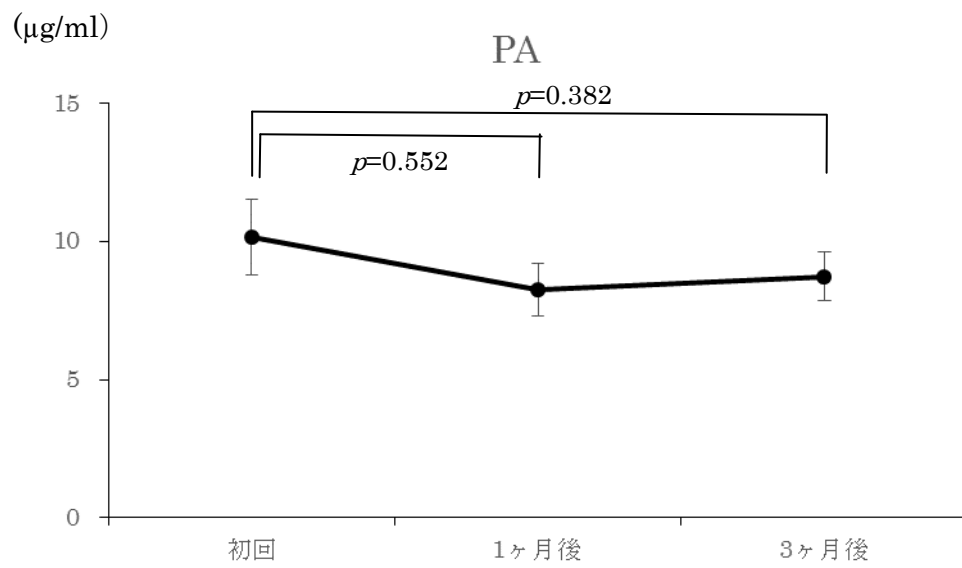
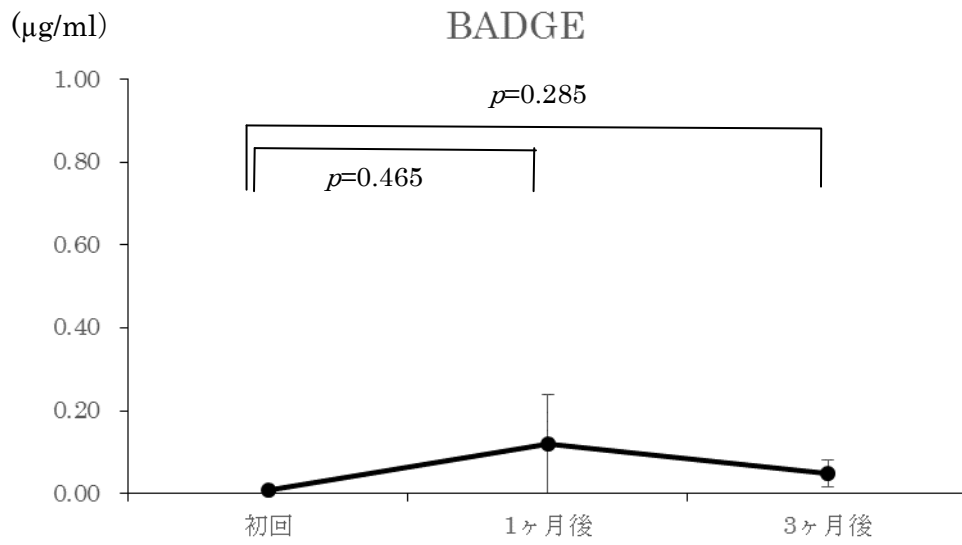


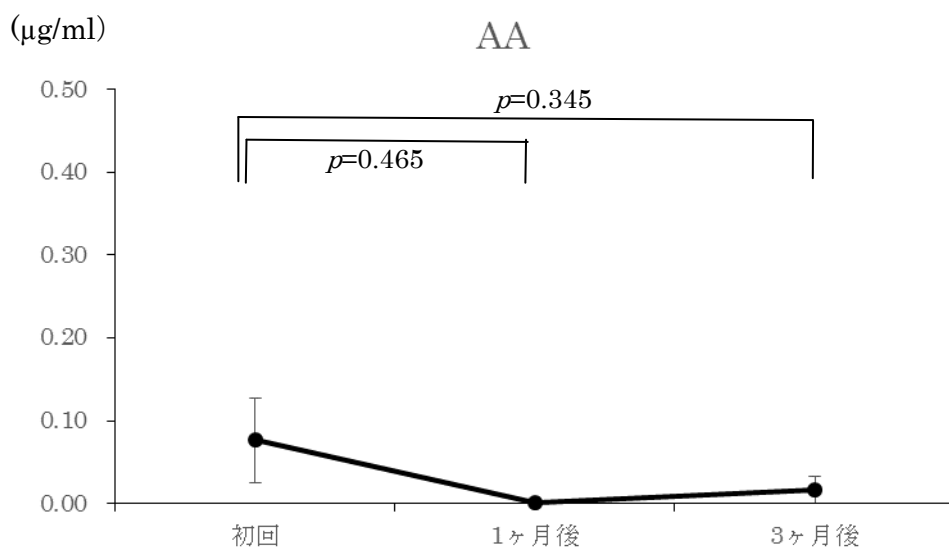
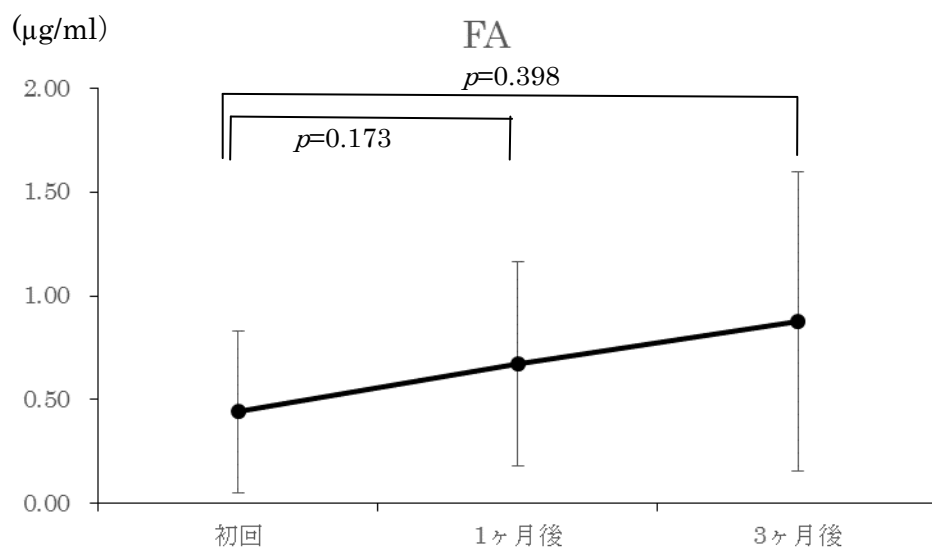
図 4. 血清総 IgE 値、総 IgG 値の経時的変化



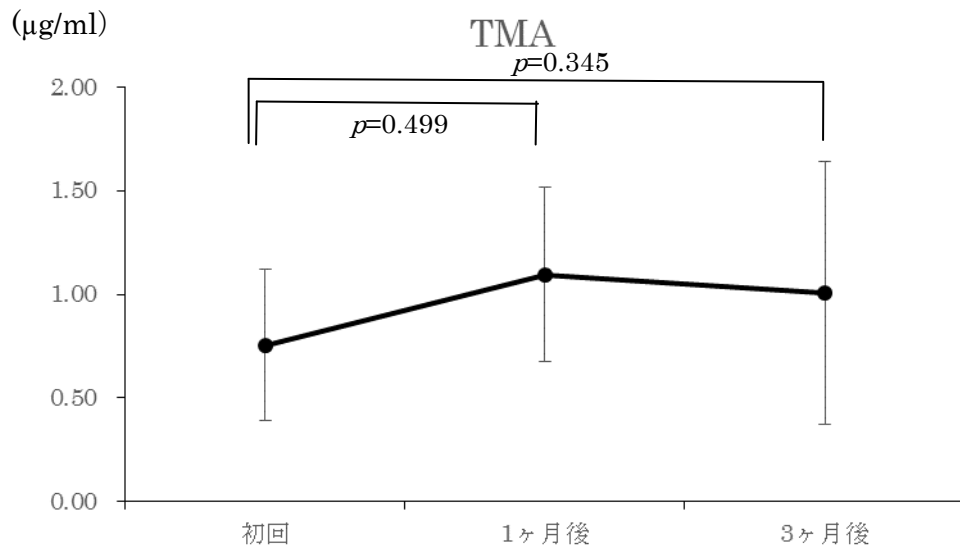
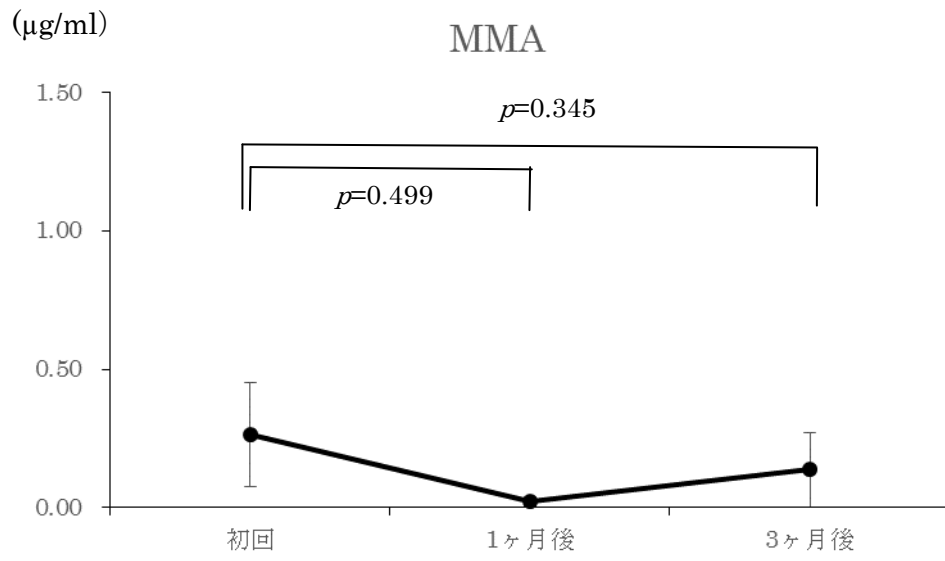
Mean \pm SE
Wilcoxon signed-rank test

図 5. 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



Mean \pm SE
 Wilcoxon signed-rank test

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）取扱い作業を含む事業所4社を対象に、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社に関しては7年前の血液と今年度採取した血液を用いIgG抗体値を比較した。今年度対象としたa事業所では、測定した化学物質12種類の中で、一般人と比較してTDI（トルエンジイソシアネート）特異的IgG抗体値及びTMA（無水トリメリット酸）特異的IgG抗体値が有意に高かった。TDIはウレタン樹脂の原料である。また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TDIと同時に使用されている可能性が高い化学物質である。両化学物質が共に一般人より高い抗体値であるため、事業所内で曝露した可能性が高いと推測される。c社はPA（無水フタル酸）特異的IgG抗体値が一般人と比較して高い傾向が認められる。PAはc社で使用しているポリエチレン樹脂の原料である。しかしながら香料やその他の日常品でも使用頻度が高い物質であり、一概に職場での曝露のみが抗体値上昇の原因と言える物質ではない。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。

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¹で計測を行った。

- 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 β , 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

平成27年度の報告書のA社と同様のため省略。

B 採取試料から得られた結果

(a) 総 IgG 抗体、総 IgE 抗体

総 IgE 抗体の平均値はアレルギー既往歴あり群は 597 IU/ml、アレルギー既往なし群は 128 IU/ml と、アレルギー既往歴あり群の方が高かった。(a社 B 採取試料から得られた結果 (1) (2))

(b) 特異的 IgG 抗体値の一般人・a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)

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 μ g/ml 未満、3.125 以上 6.25 μ g/ml 未満、6.25 以上 12.5 μ g/ml 未満、12.5 μ 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 μ g/ml 未満、12.5 μ 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 μ g/ml 未満、6.25 以上 12.5 μ g/ml 未満、12.5 μ 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 μ g/ml 未満、3.125 以上 6.26 μ g/ml 未満、6.25 以上 12.5 μ g/ml 未満、12.5 μ 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

(a) 総 IgG 抗体、総 IgE 抗体

総 IgE 抗体の平均値はアレルギー既往歴あり群は 156 IU/ml、アレルギー既往なし群は 184

IU/ml と大きな差はなかった。(b 社 B 採取試料から得られた結果 (1) (2))

(b)特異的 IgG 抗体値の一般人・b 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) 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

(a)総 IgG 抗体、総 IgE 抗体

総 IgE 抗体の平均値はアレルギー既往歴あり群は 340 IU/ml、アレルギー既往なし群は 180 IU/ml と、アレルギー既往歴あり群の方が高かった。(c 社 B 採取試料から得られた結果 (1) (2))

(b)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 μ g/ml 未満、3.125 以上 6.25 μ g/ml 未満、3.125 以上 6.25 μ g/ml 未満、6.25 以上 12.5 μ g/ml 未満、12.5 μ 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 μ 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 社補足 (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

(a)総 IgG 抗体、総 IgE 抗体

総 IgE 抗体の平均値はアレルギー既往歴あり群は 337IU/ml、アレルギー既往なし群は 242 IU/ml と、アレルギー既往歴あり群の方が高い傾向がみられた。(c 社 B 採取試料から得られた結果 (1) (2))

●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 β \uparrow

●縦断研究 d 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、HDI、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。

a 社

a 社は主としてウレタン樹脂を取り扱っている中小企業である。一般人と比較して TDI 特異的 IgG 抗体値 3.125 以上 6.25 μ g/ml 未満、6.25 以上 12.5 μ g/ml 未満の割合が有意に高くなる傾向が認められた (OR=6.99 P value=0.004, OR=10.8 P value=0.002)。また TMA 特異的 IgG 抗体値 0 より大きく 3.125 μ g/ml 未満、3.125 以上 6.25

$\mu\text{g/ml}$ 未満、6.25 以上 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 未満の割合が有意に高くなった (OR=3.98 P value=0.041, OR=5.02 P value=0.023, OR=5.23 P value=0.034)。

TDI はウレタン樹脂の原料である。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^{2,4}、先行研究を考慮すると、事業所での TDI 曝露が今回の結果に影響を及ぼしている可能性がある。また 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。これらの点からも 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が否定できない。

c 社

c 社は PA 特異的 IgG 抗体が一般人と比較し高い。PA はポリエチレン樹脂の原料である。しかしながら香料やその他の日常品でも使用頻度が高い物質であり、一概に職場での曝露のみが原因と言える物質ではない。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^{5,6}。

PPD と IL-8 の関係も報告されている⁷。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。

今年度の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 PA, GA, TMA 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化学物質である。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

a 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た。これらの化学物質は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り、この事業所では職場での曝露がある可能性がある。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. Kim JH et al. Serum cytokines markers in toluene diisocyanate-induced asthma. Respir Med. 2011 Jul;105(7):1091-4.
6. 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.

7. Corsini E, et al. Role of PKC- β in chemical allergen-induced CD86 expression and IL-8 release in THP-1 cells. Arch Toxicol. 2014 Feb;88(2):415-24.
8. 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

Mayumi Tsuji, Hsu-Sheng Yu, Yasuhiro Ishihara, Toyohi Isse, Nami Ikeda-Ishihara, Takuto Tsuchiya, 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、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

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 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 (トリ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%)

B 採取試料(血清)から得られた結果

(1) 特異的 IgG 値の一般人・a 社比較

TDI

特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$)	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 (μ 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 (μ 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 (μ 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 (μ 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 ($\mu\text{g/ml}$)	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
≥ 3.125 , <6.25	1	0	—		
≥ 6.25 , <12.5	0	0	—		
≥ 12.5	0	0	—		

AA

特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$)	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
≥ 3.125 , <6.25	0	0	—		
≥ 6.25 , <12.5	1	0	—		
≥ 12.5	1	0	—		

ED

特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$)	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
≥ 3.125 , <6.25	0	0	—		
≥ 6.25 , <12.5	0	0	—		
≥ 12.5	0	0	—		

HDI

特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$)	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
≥ 3.125 , <6.25	12	4	0.59	0.13-2.74	0.504
≥ 6.25 , <12.5	8	4	0.87	0.21-3.65	0.846
≥ 12.5	1	0	—		

MMA

特異的 IgG 値 (μ 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 (μ 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 (μ 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

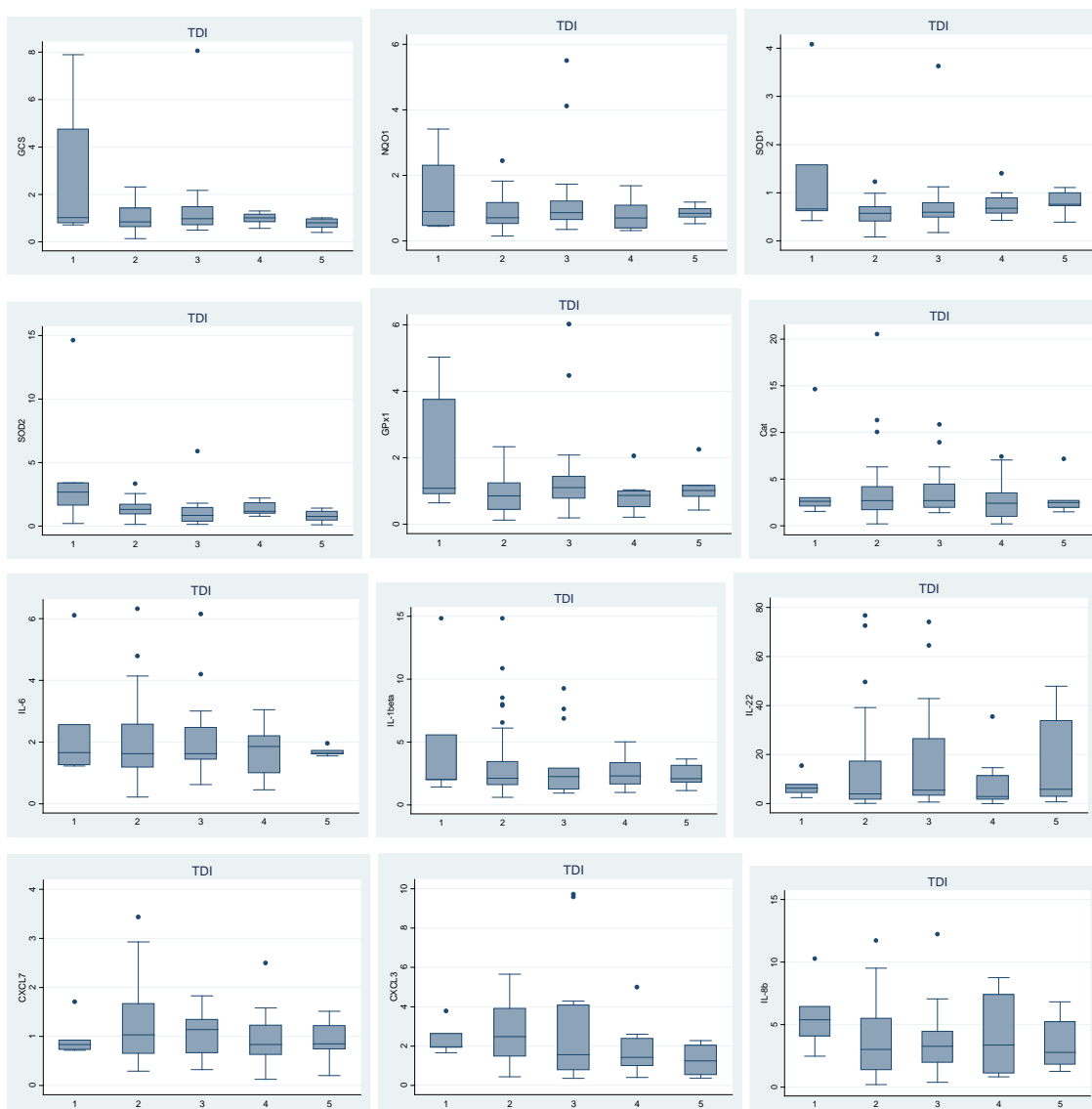
* 特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$) のクラス分け基準 *

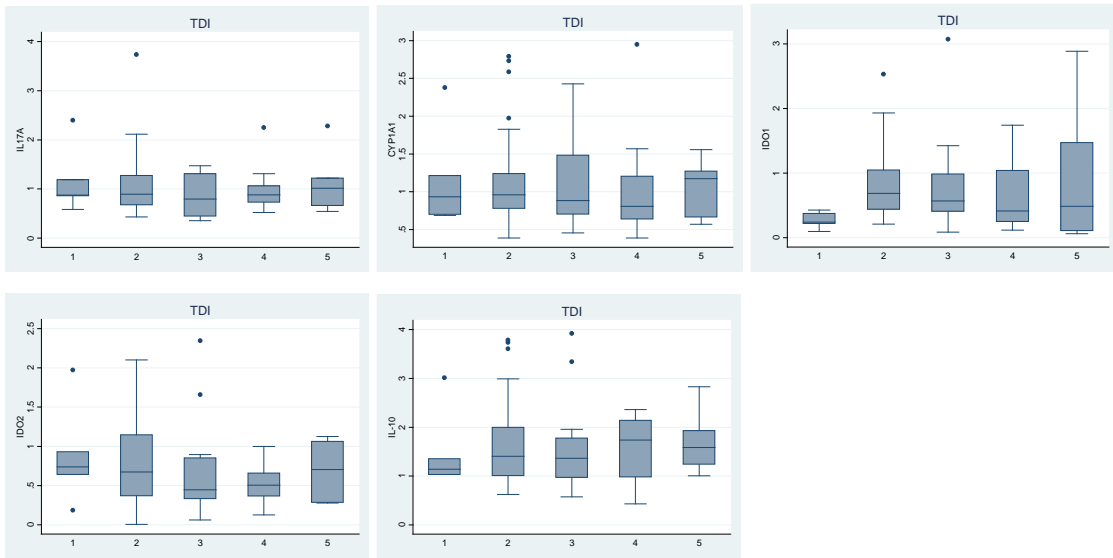
class1(-): $0 \mu\text{g/ml}$, class2(\pm): $>0, <3.125$,
 class3(+): $\geq 3.125, <6.25$ class4($\#$): $\geq 6.25, <12.5$,
 class5($\#\#$): ≥ 12.5

* サイトカインの種類 *

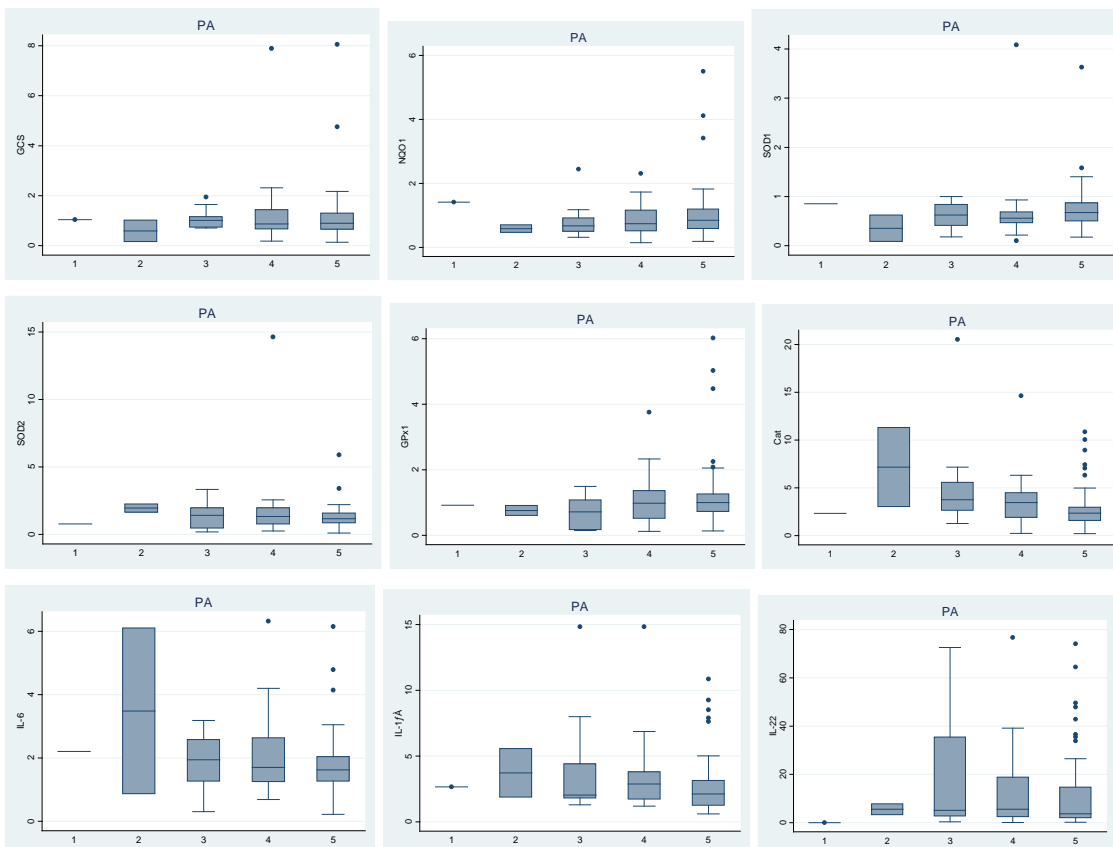
GCS NQ01 SOD1 SOD2 GPx1 Catarase
 IL-6 IL-1 β IL-22 CXCL7 IL-8b CXCL3 IL17A CYP1A1
 IDO1 IDO2 IL-10

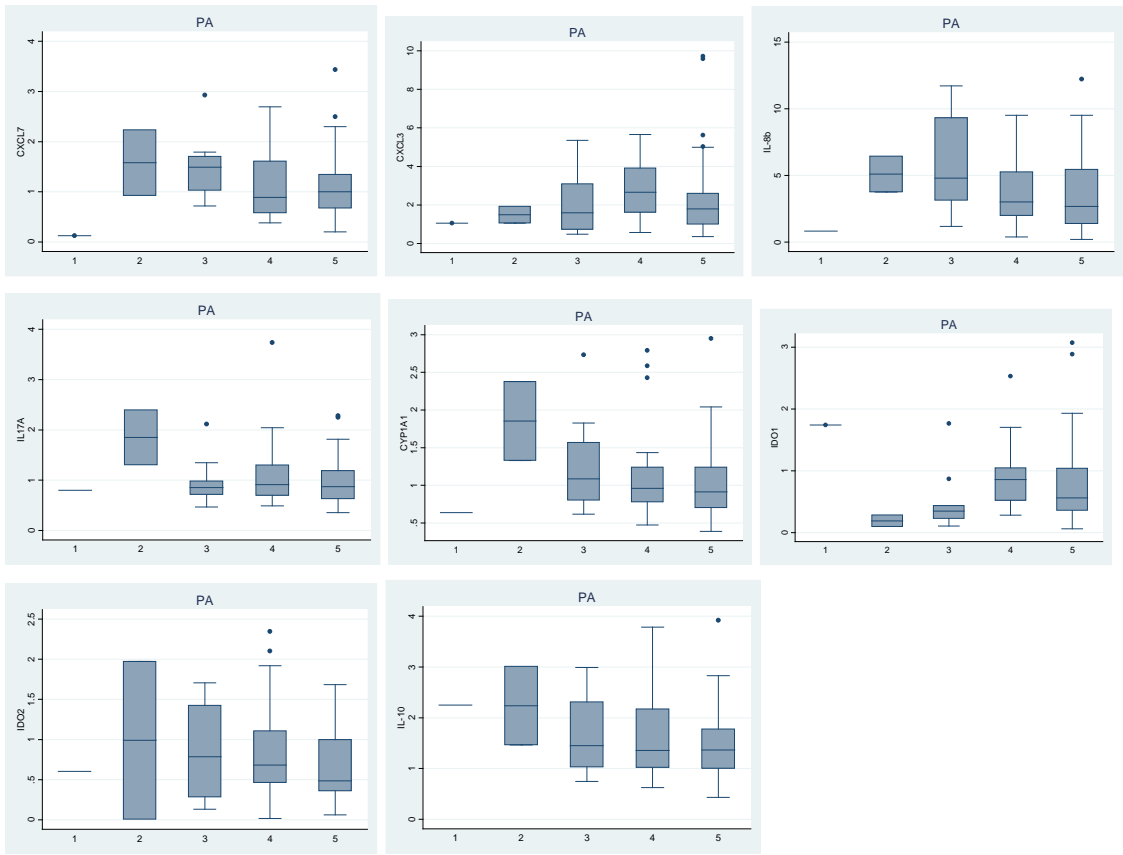
① TDI



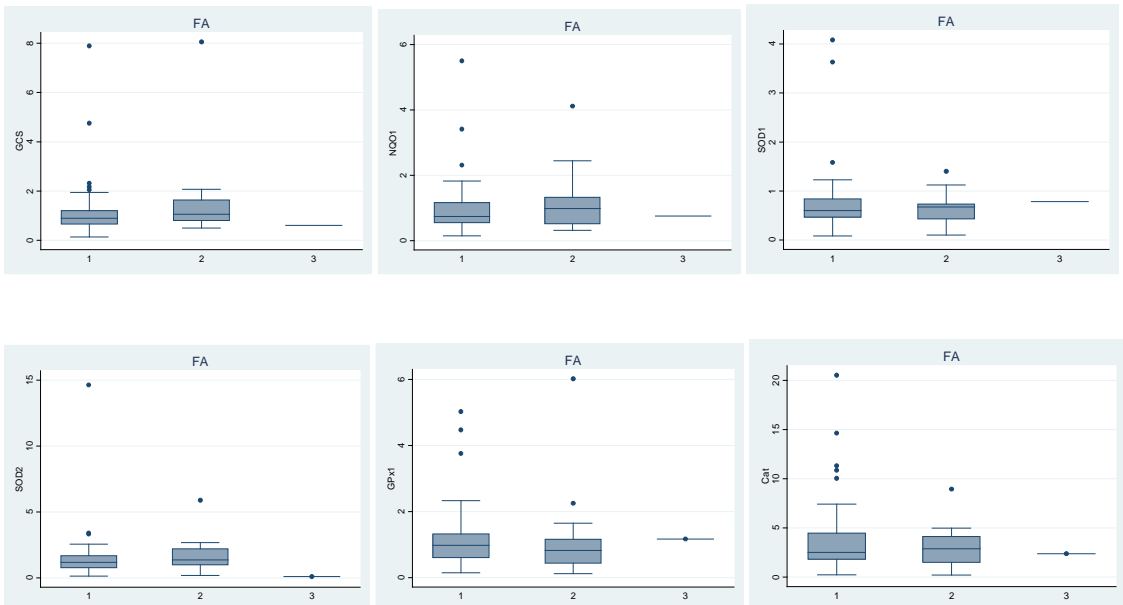


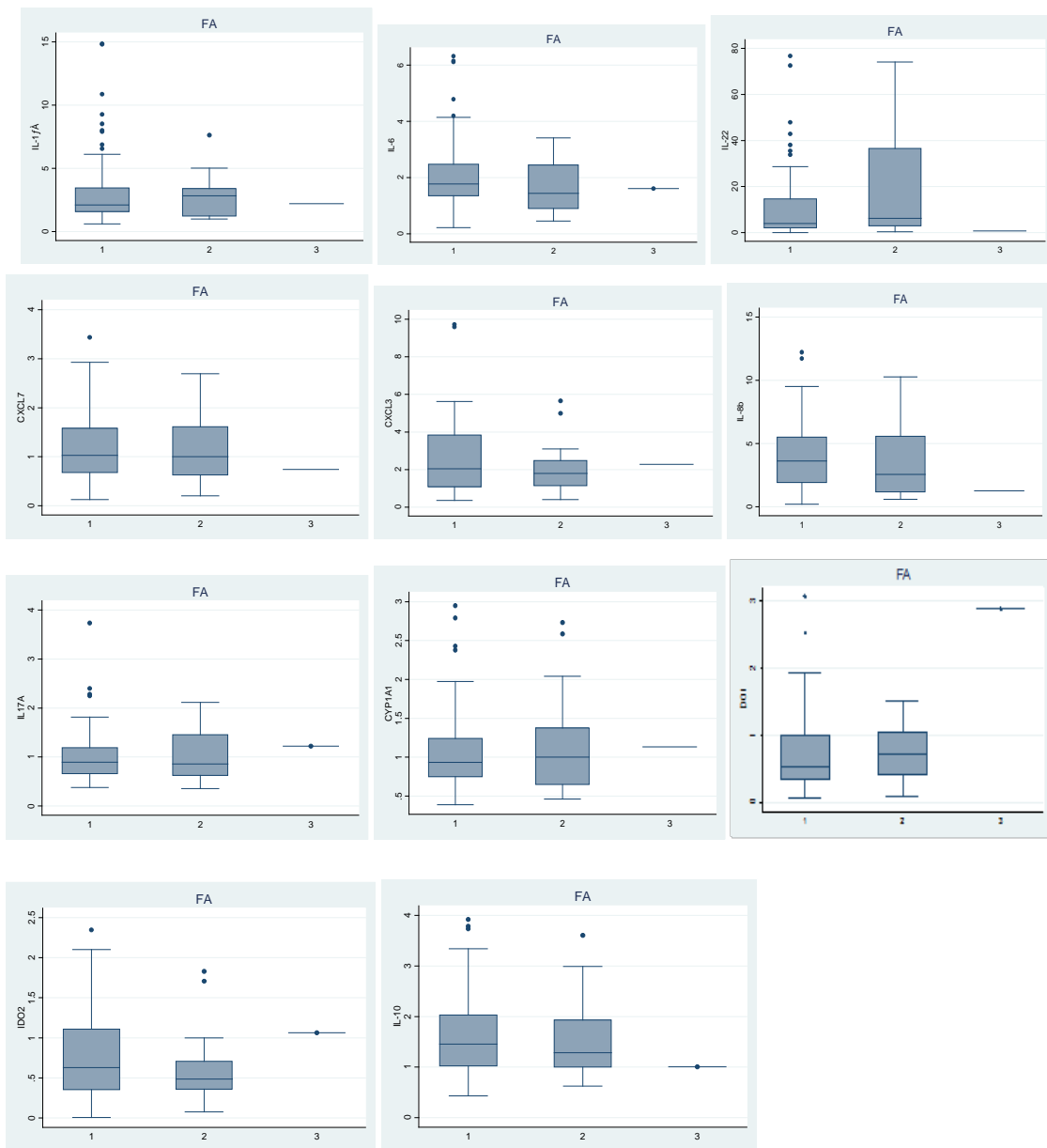
② PA



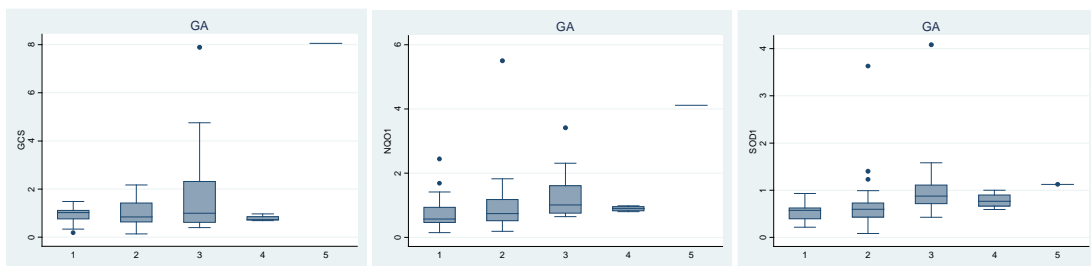


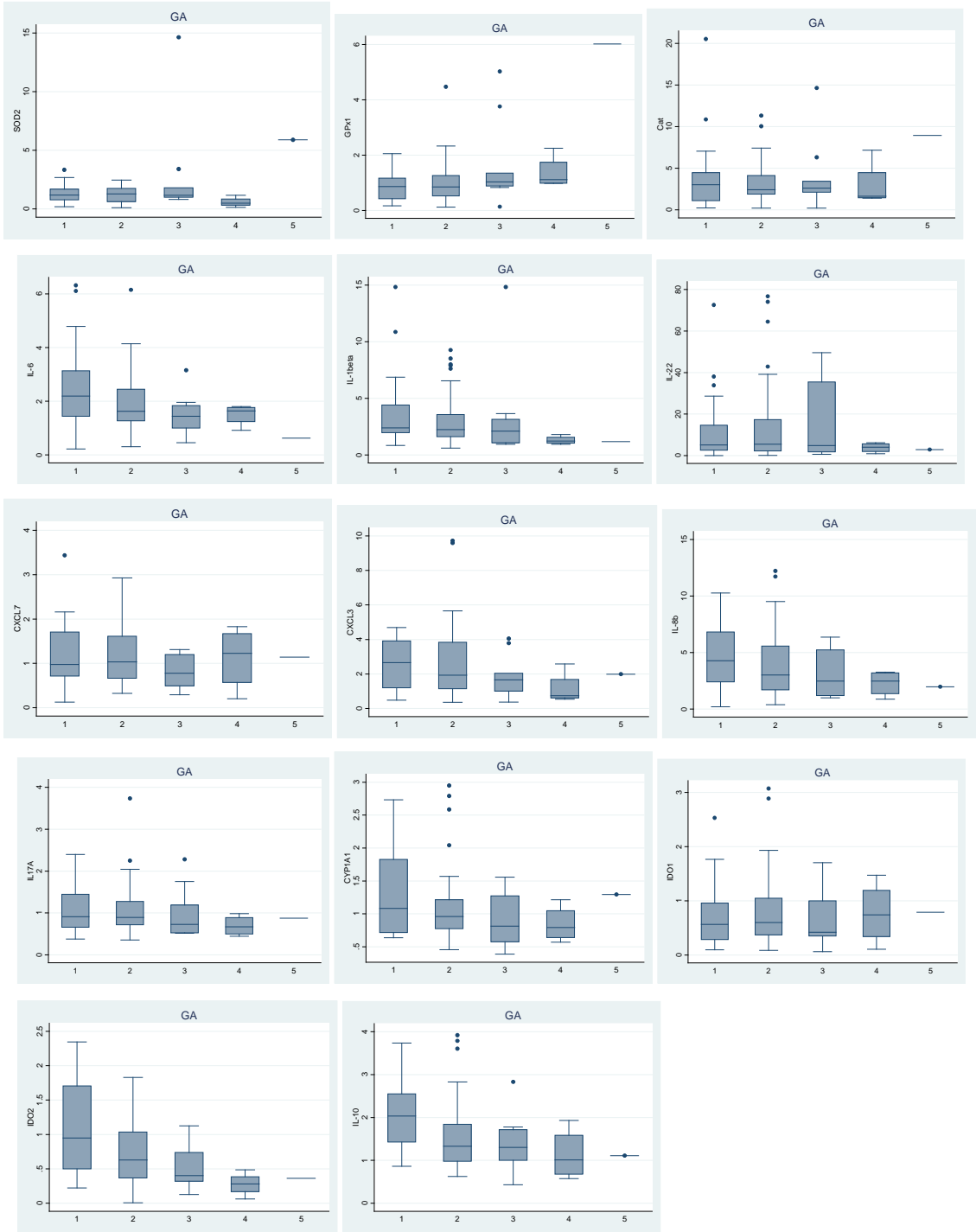
③ FA



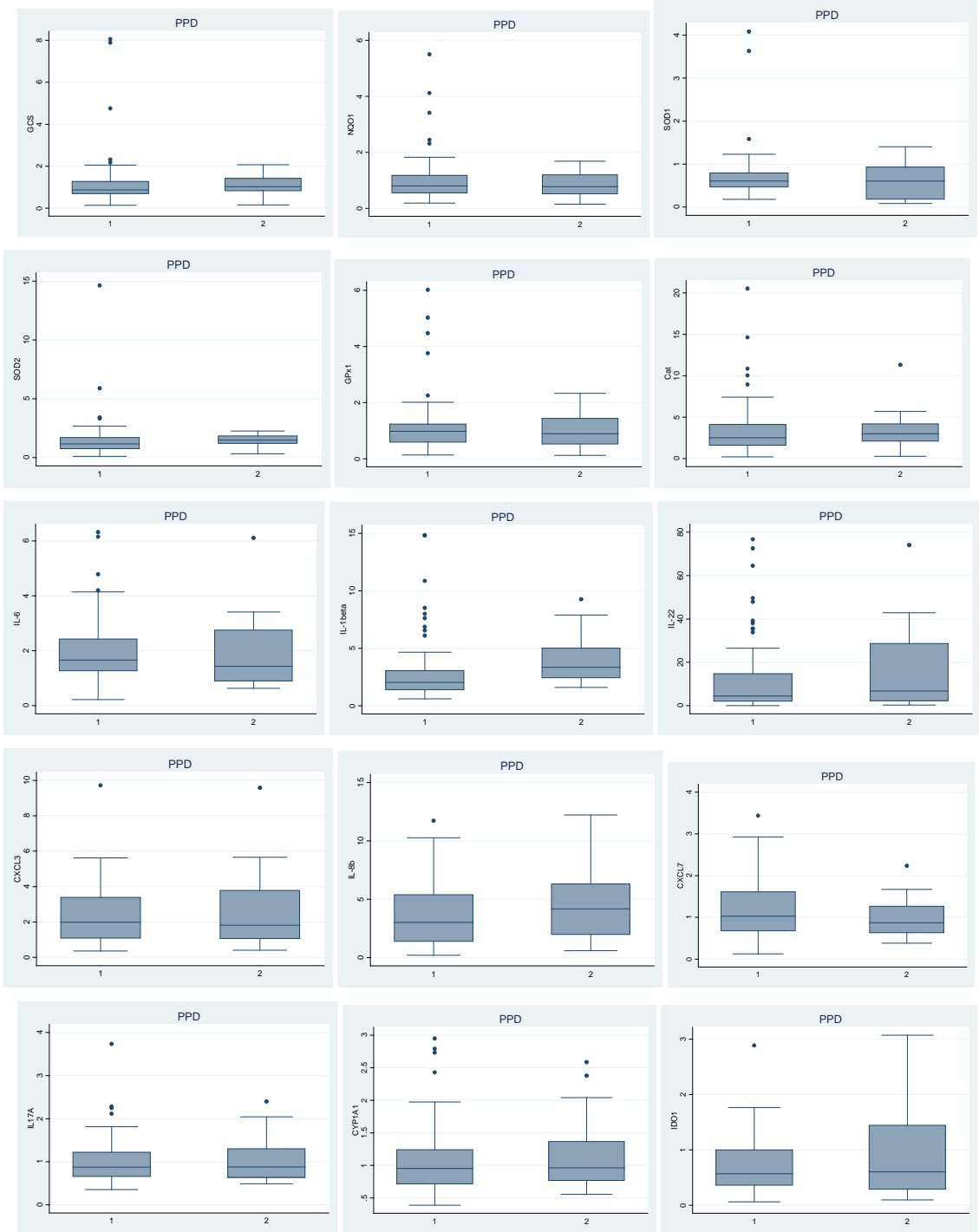


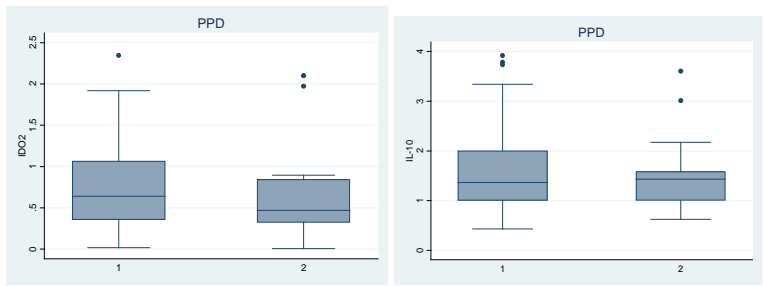
④GA



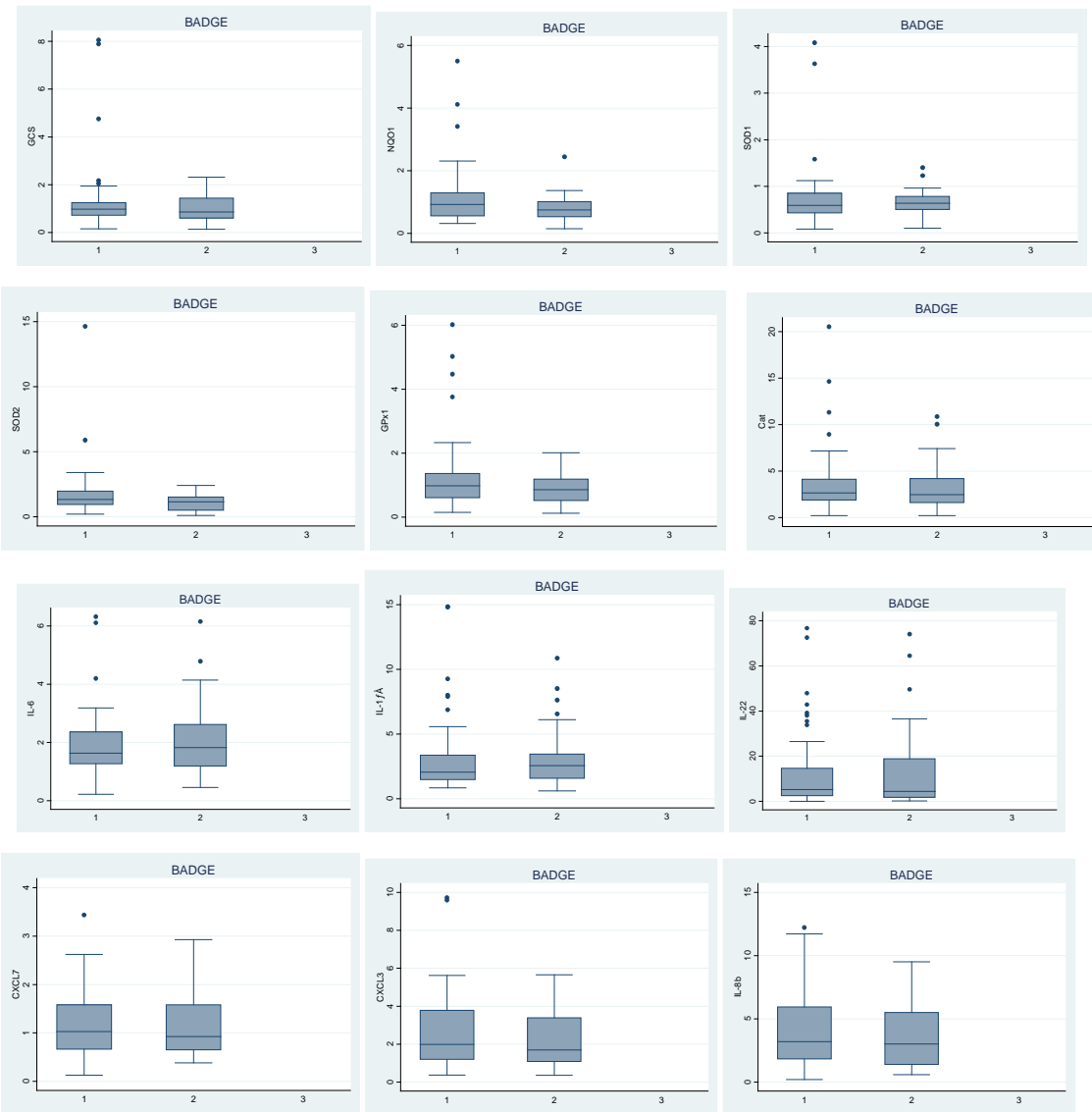


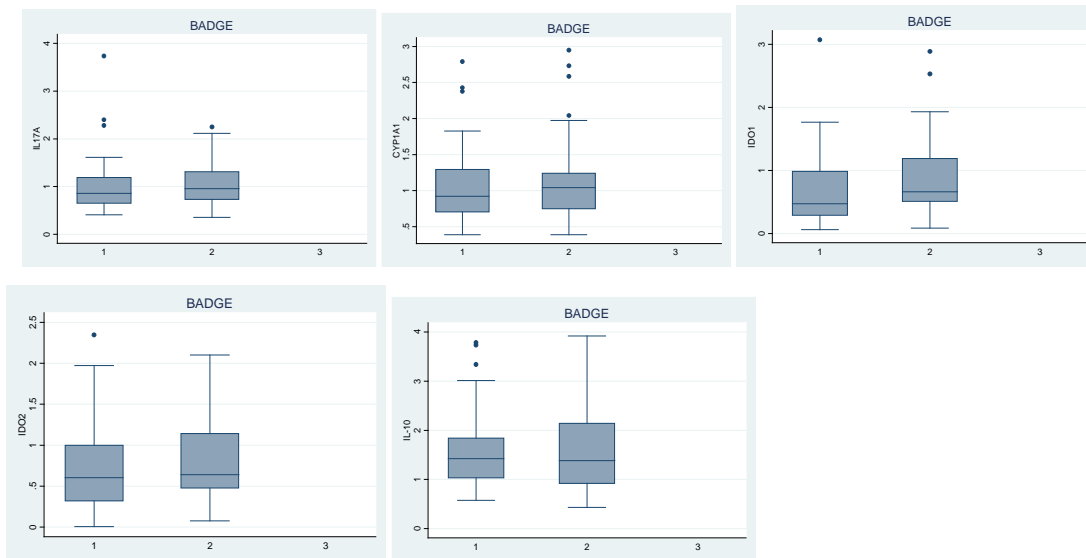
⑤ PPD



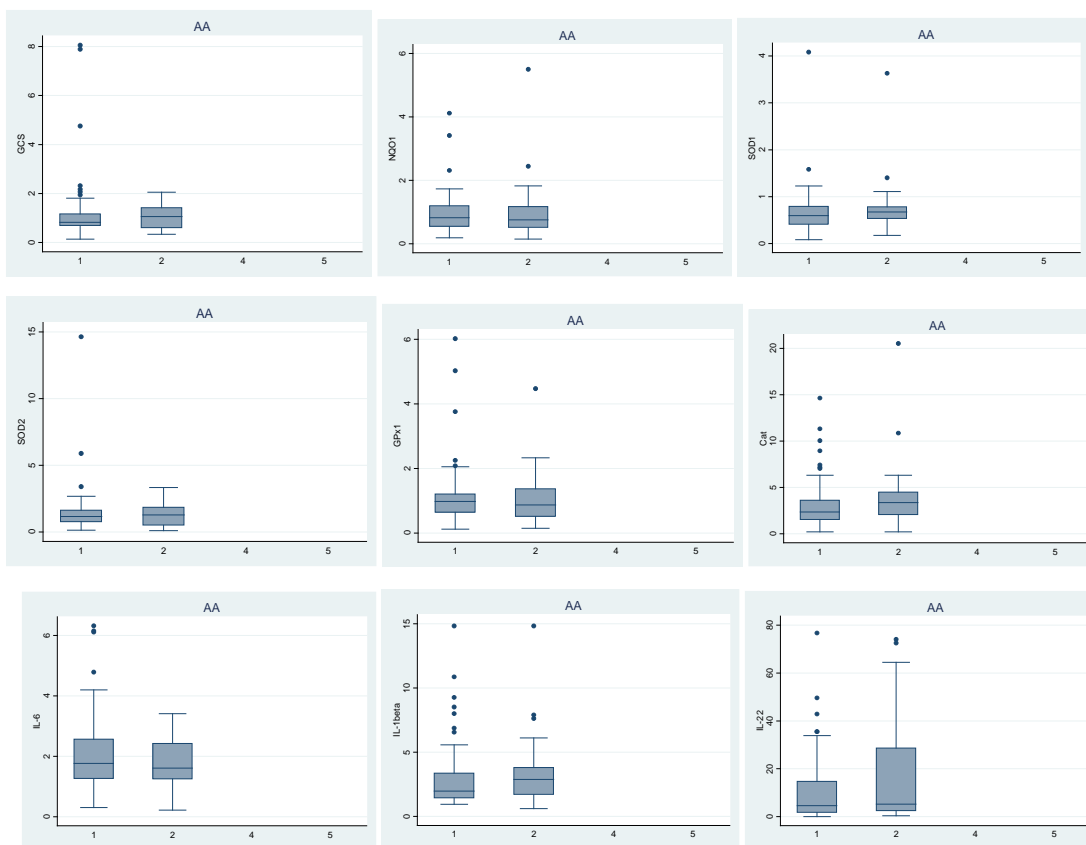


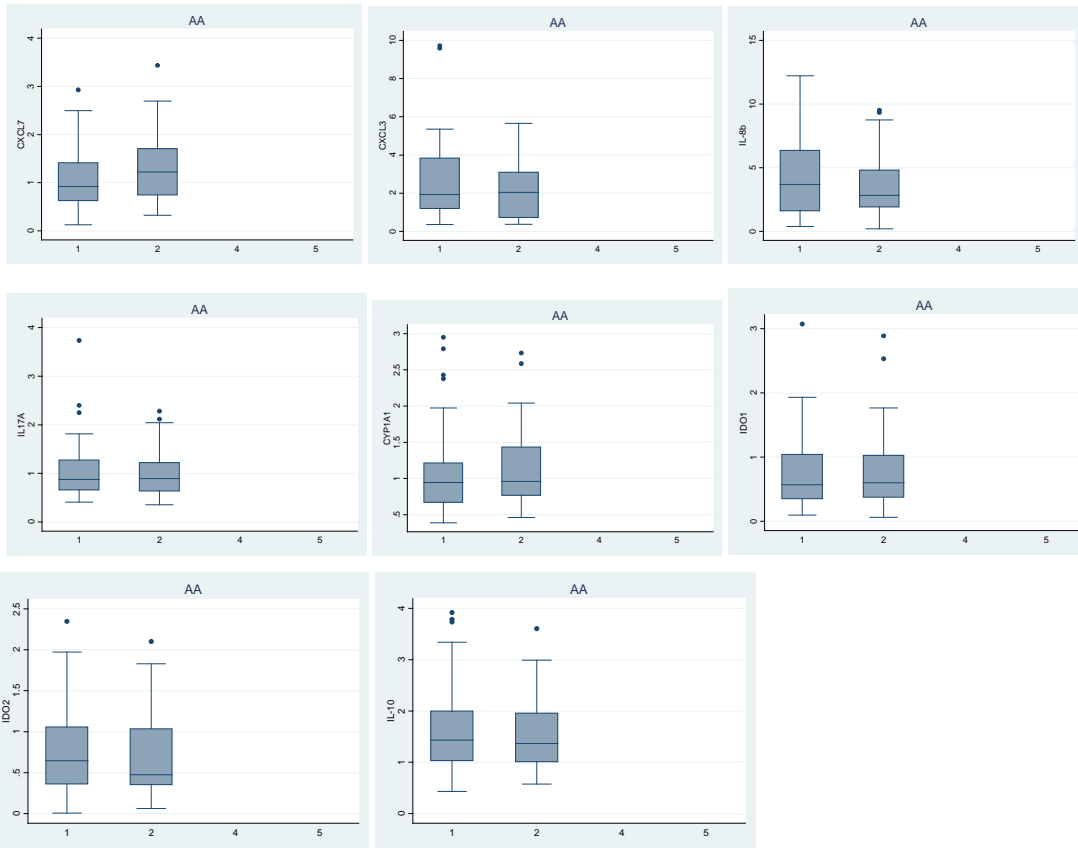
⑥BADGE



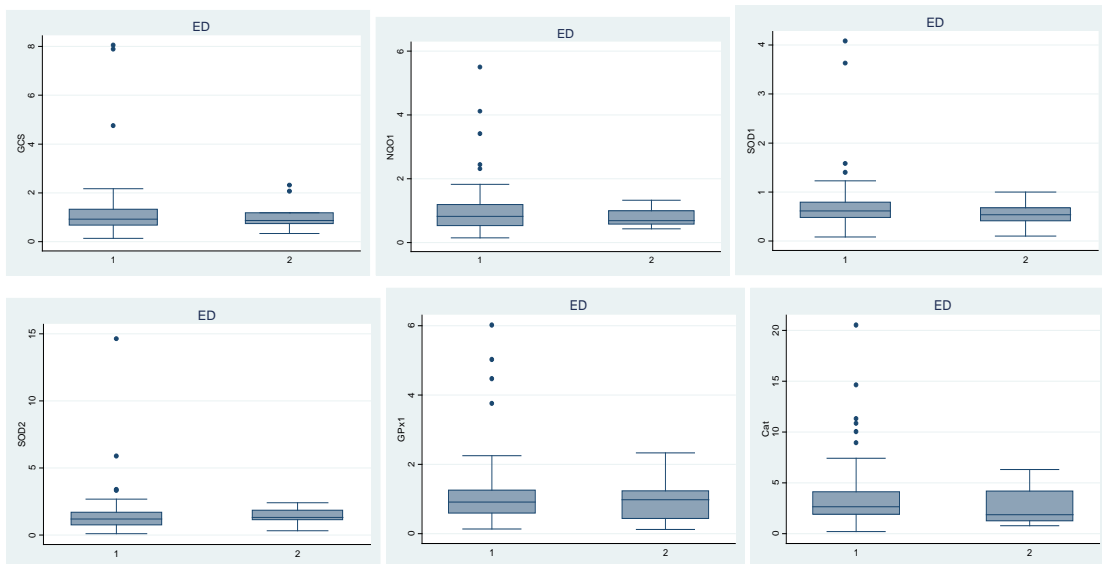


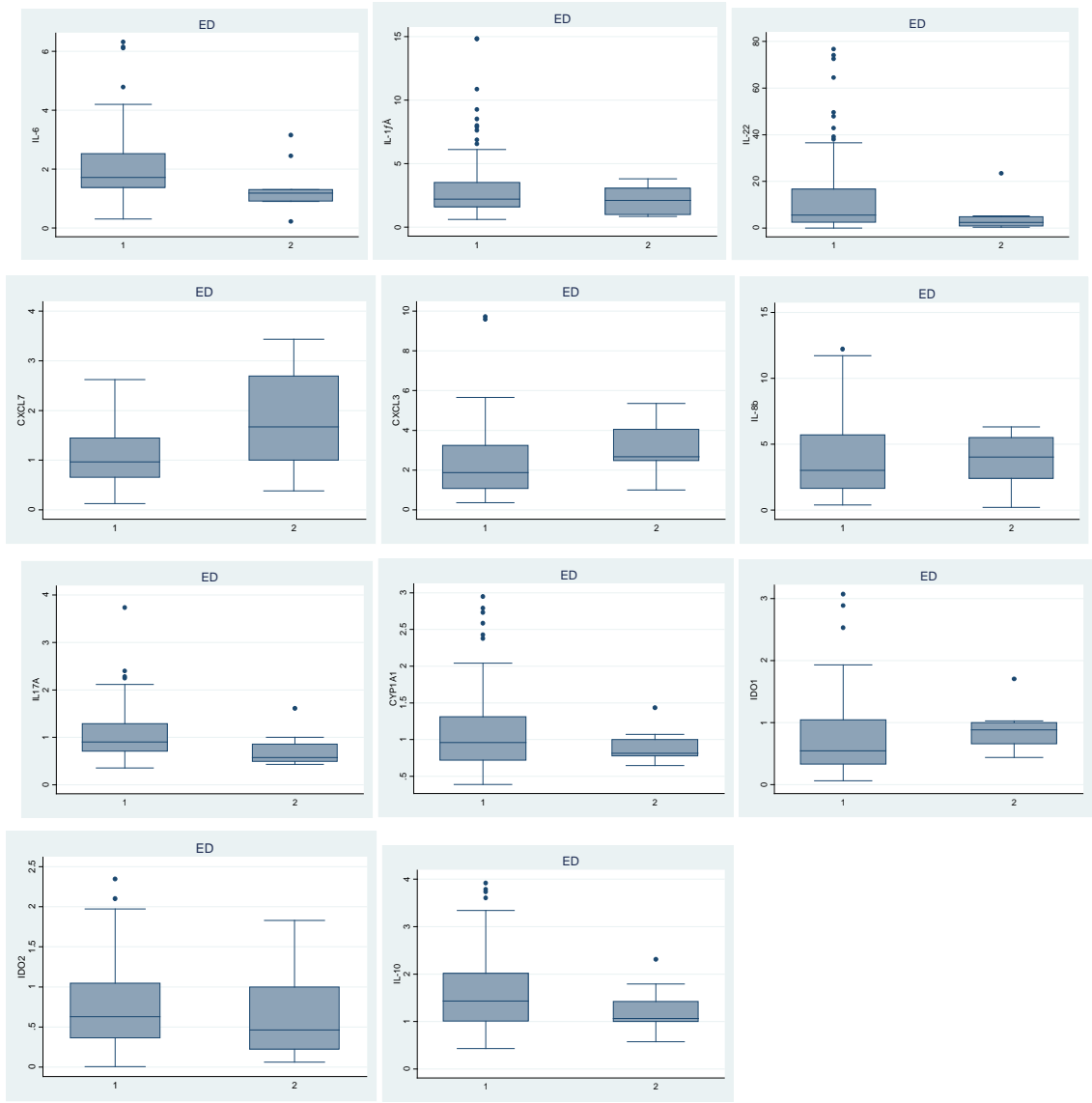
AA



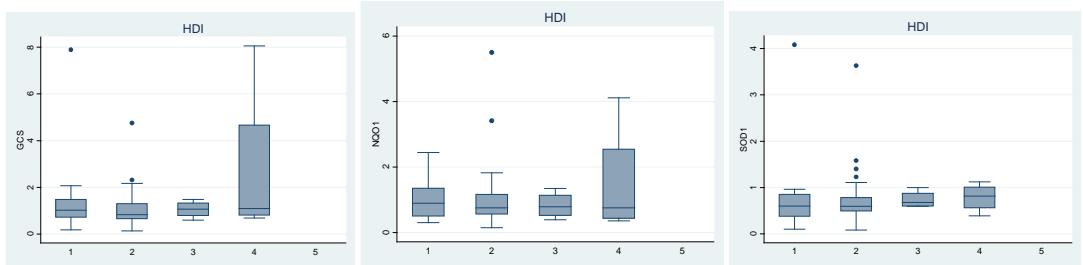


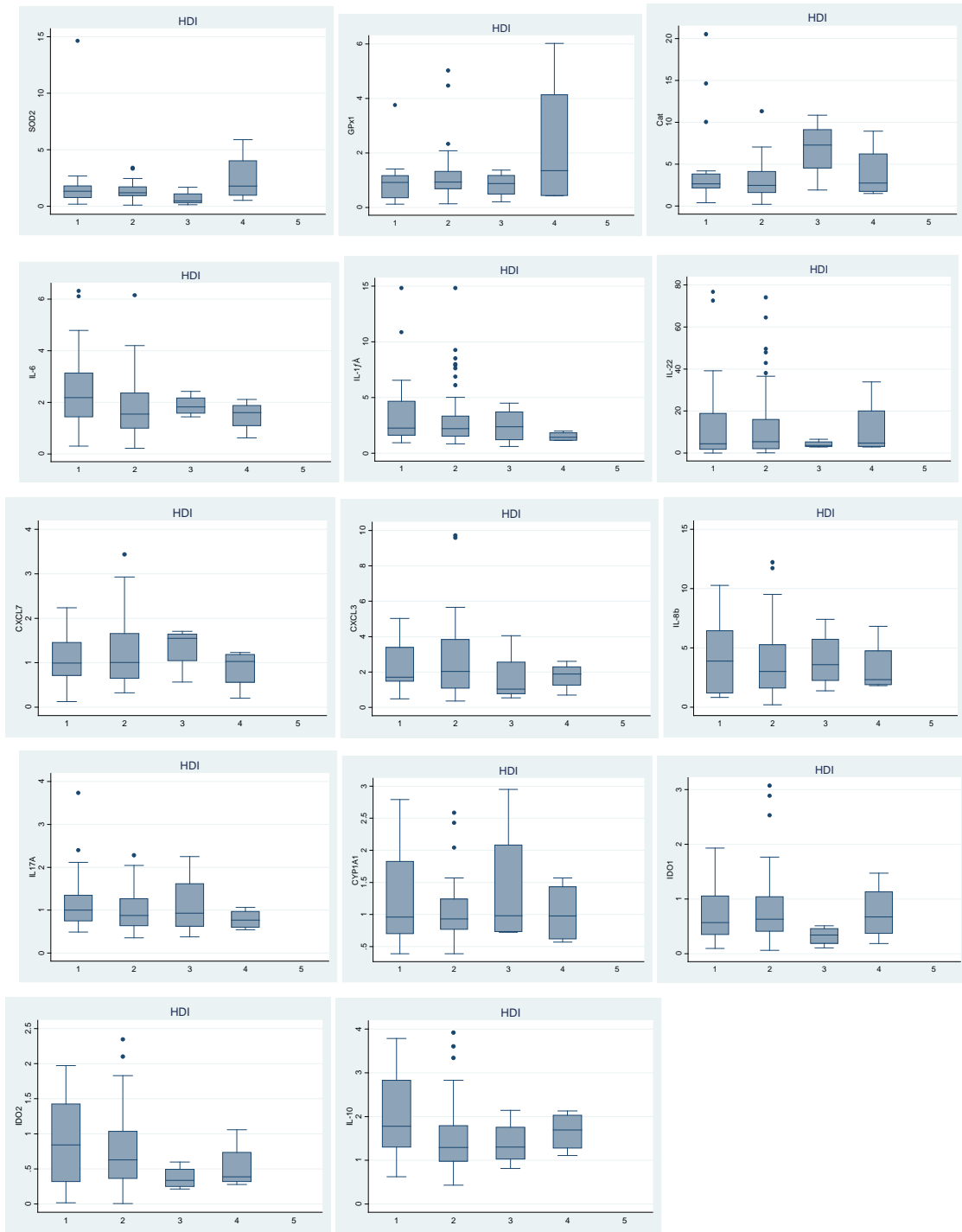
8ED

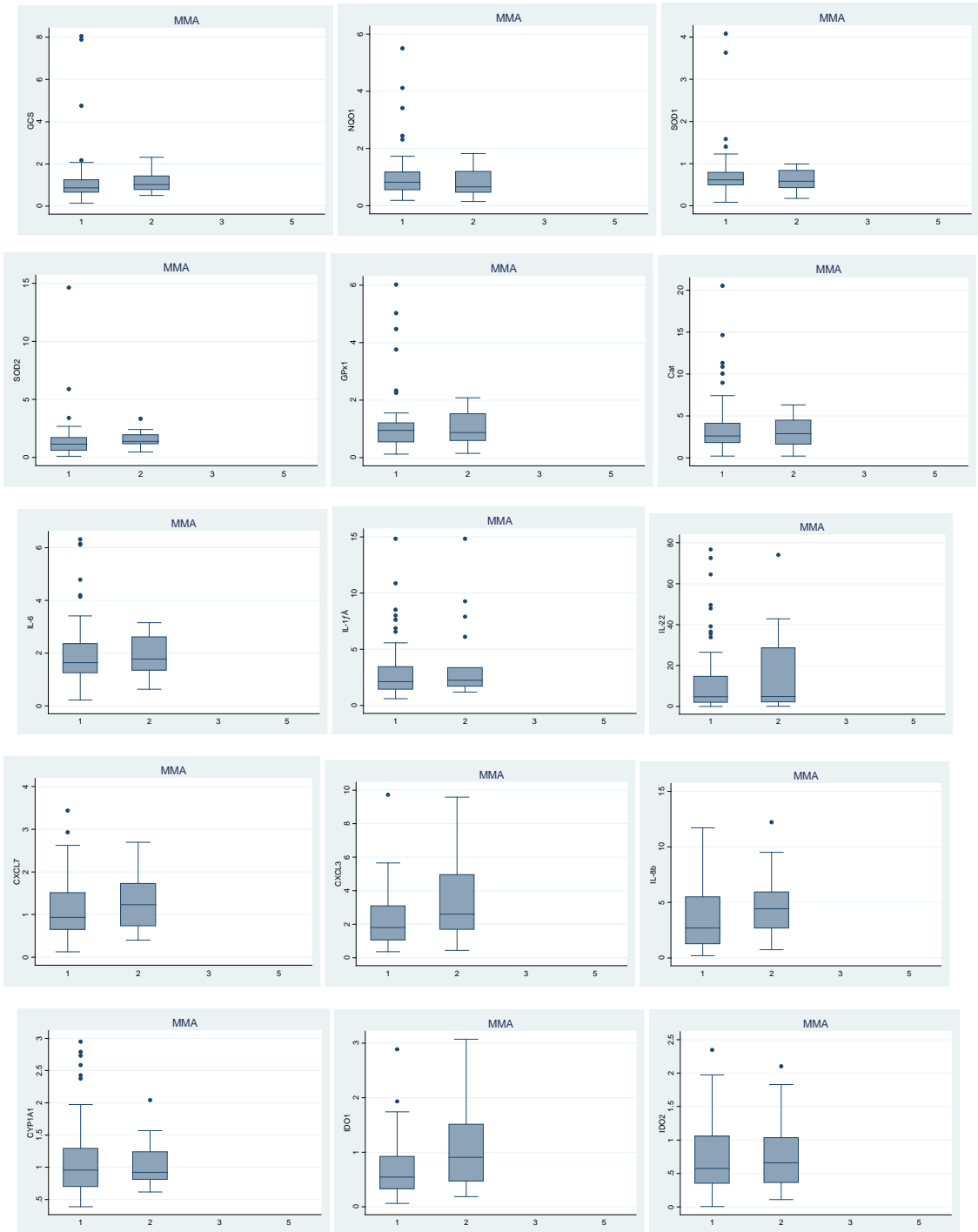


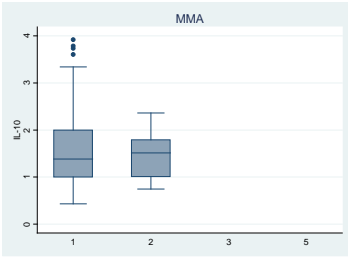
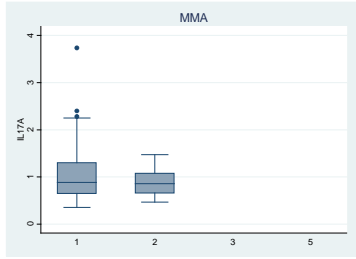


⑨HDI

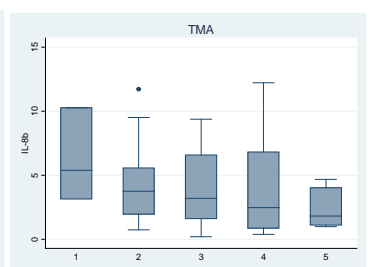
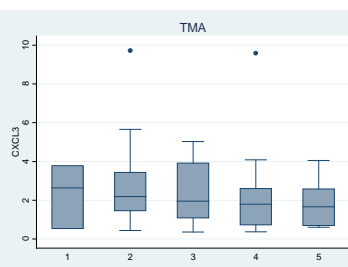
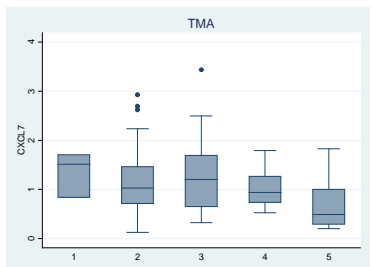
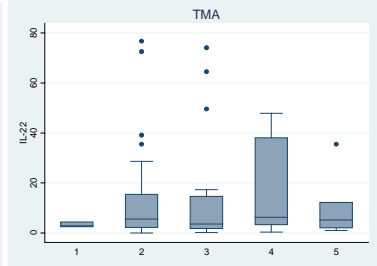
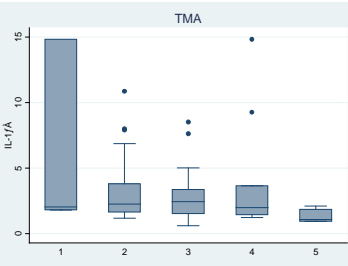
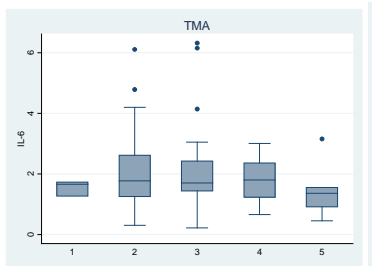
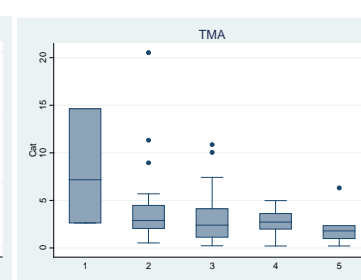
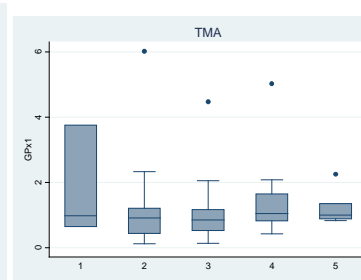
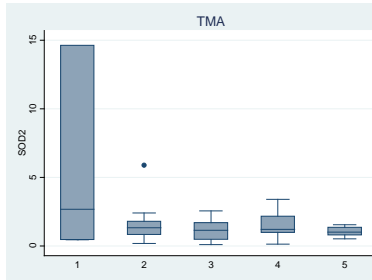
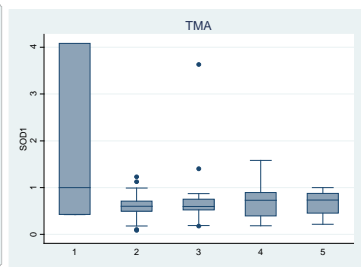
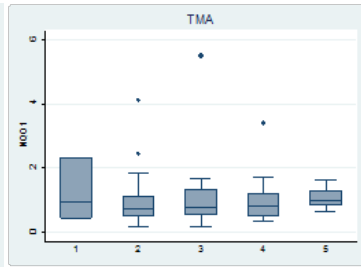
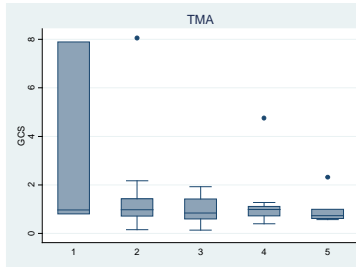


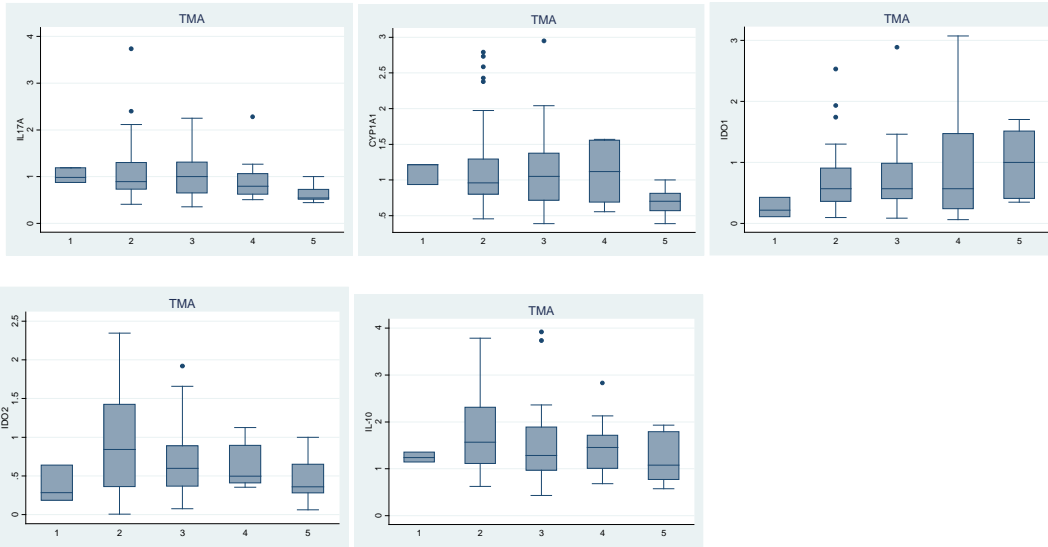




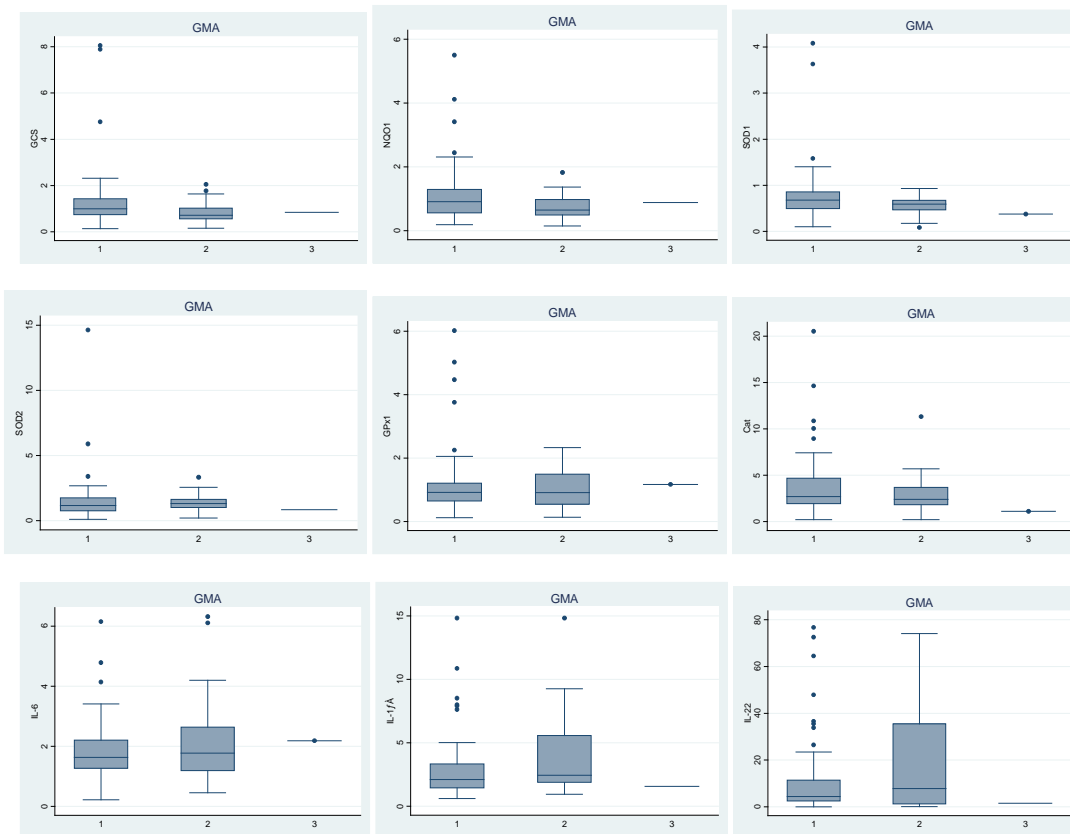


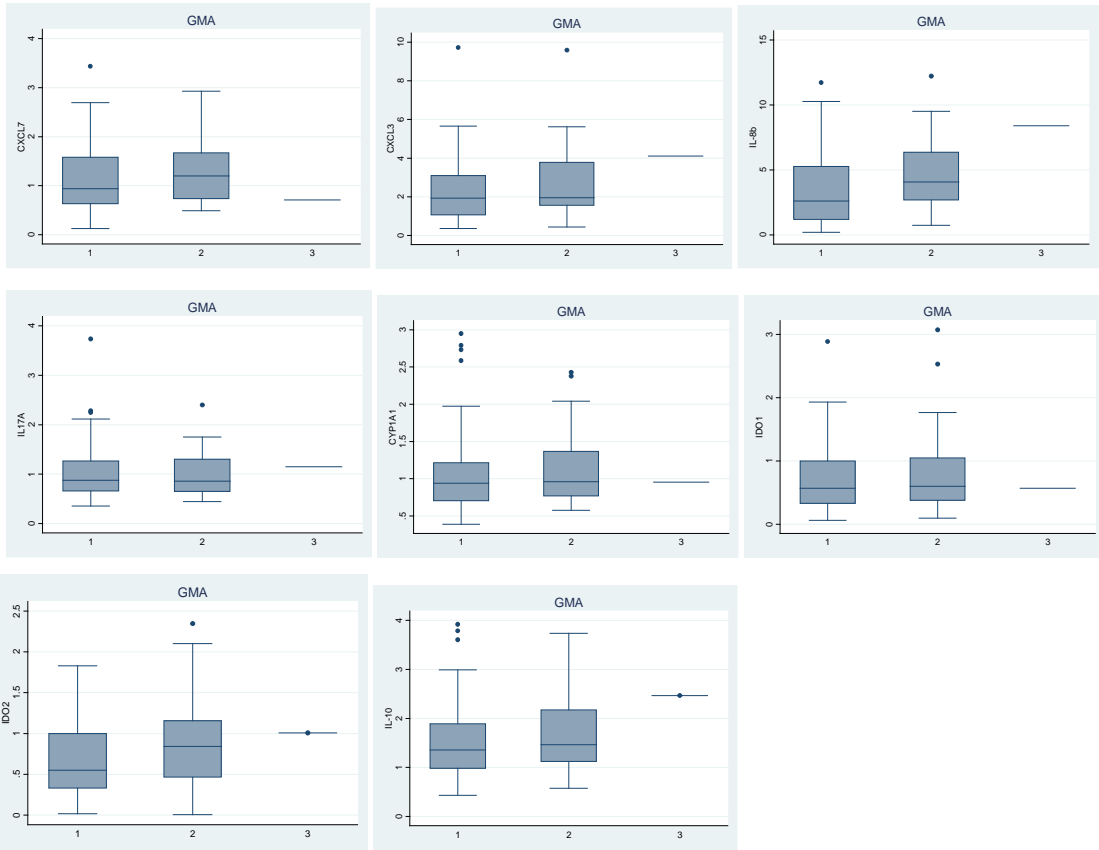
①TMA





12GMA





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

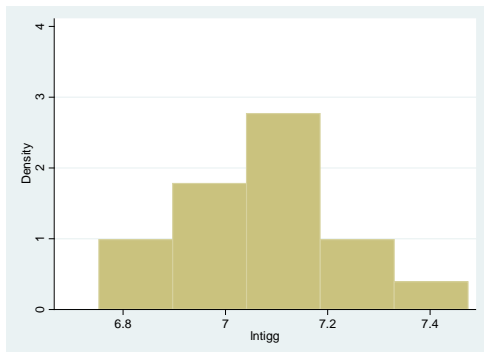
	IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
mean (S.E.)	1194 (33)	180 (33)

(2) アレルギー既往歴別

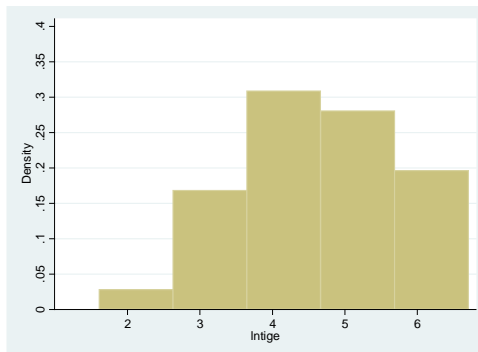
アレルギー既往歴	総IgG(mg/dl)	総IgE(IU/ml)
	mean (S.E.)	mean (S.E.)
なし (N=30)	1204 (38)	184 (35)
あり (N=5)	1134 (45)	156 (104)

グラフ1

b社 総IgG, 総IgE値
 総IgG値



総IgE値



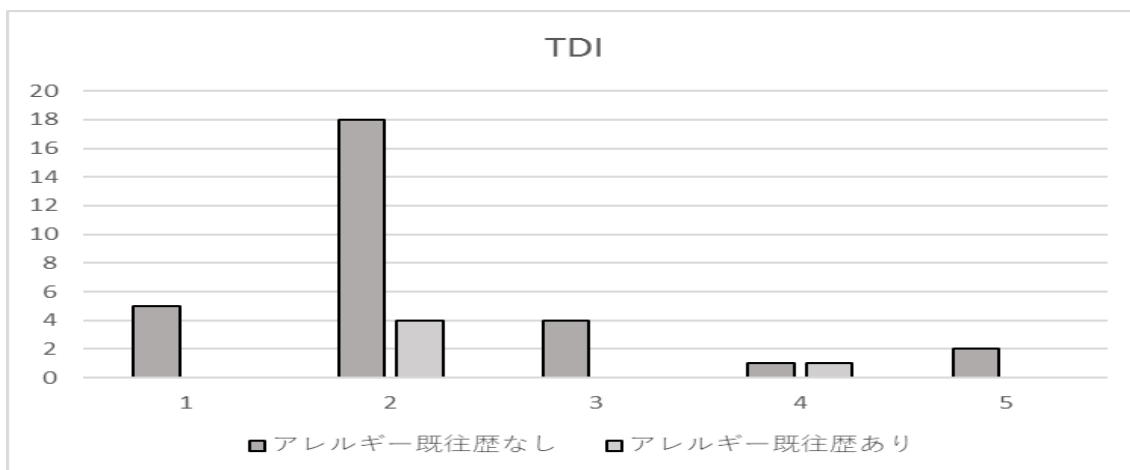
(3)特異的IgE値

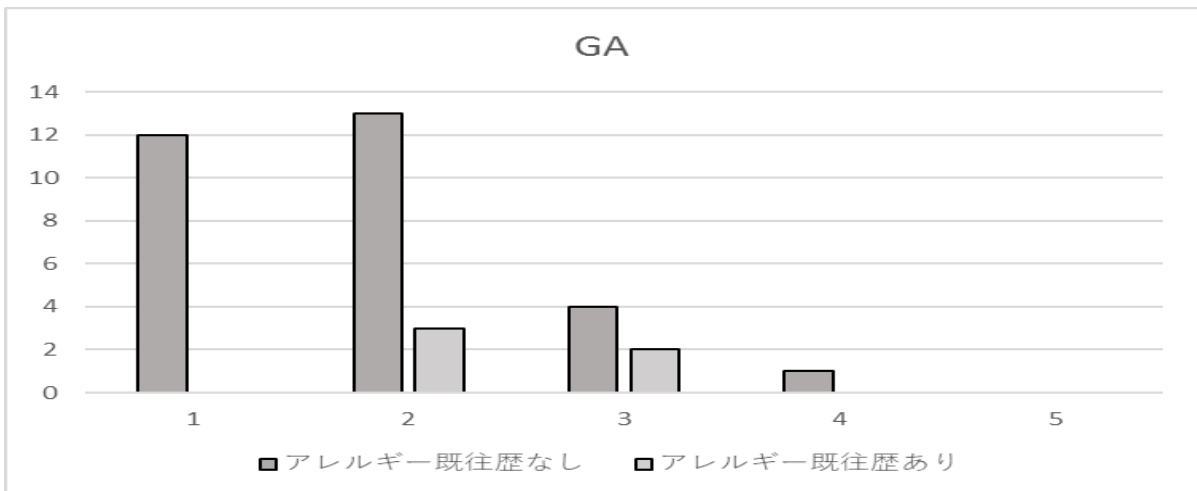
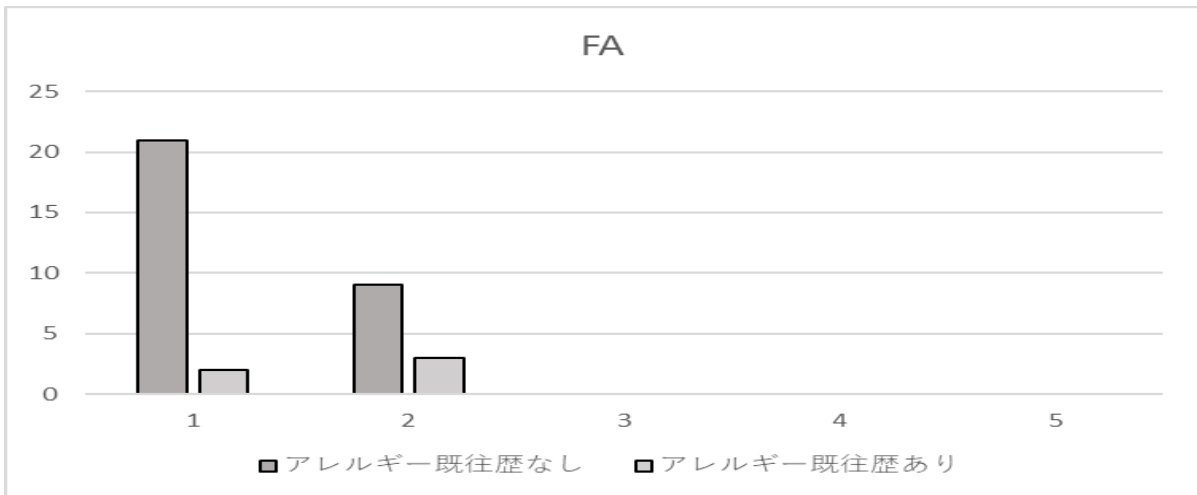
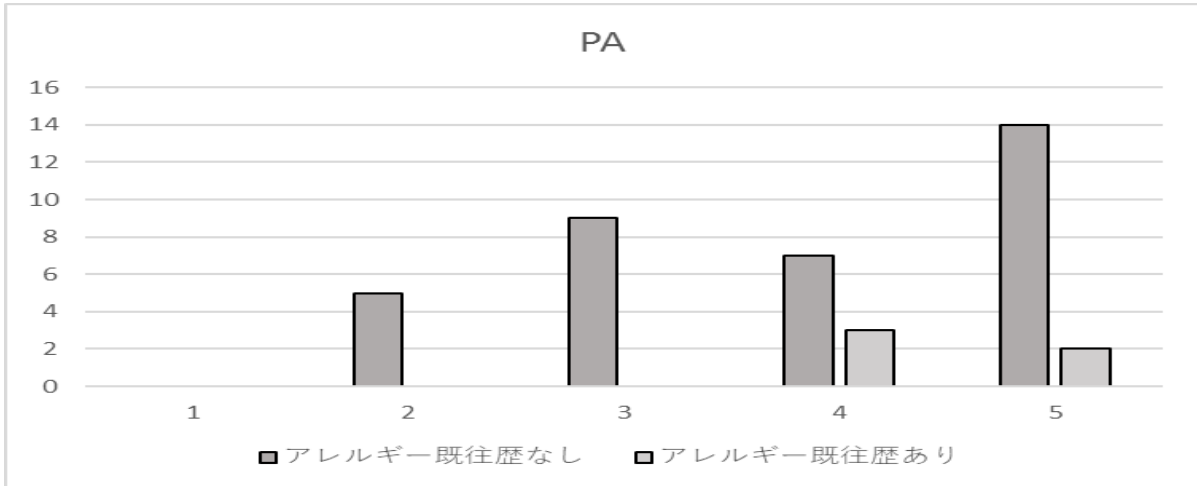
	特異的IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	34	1
FA	35	0
PA	35	0

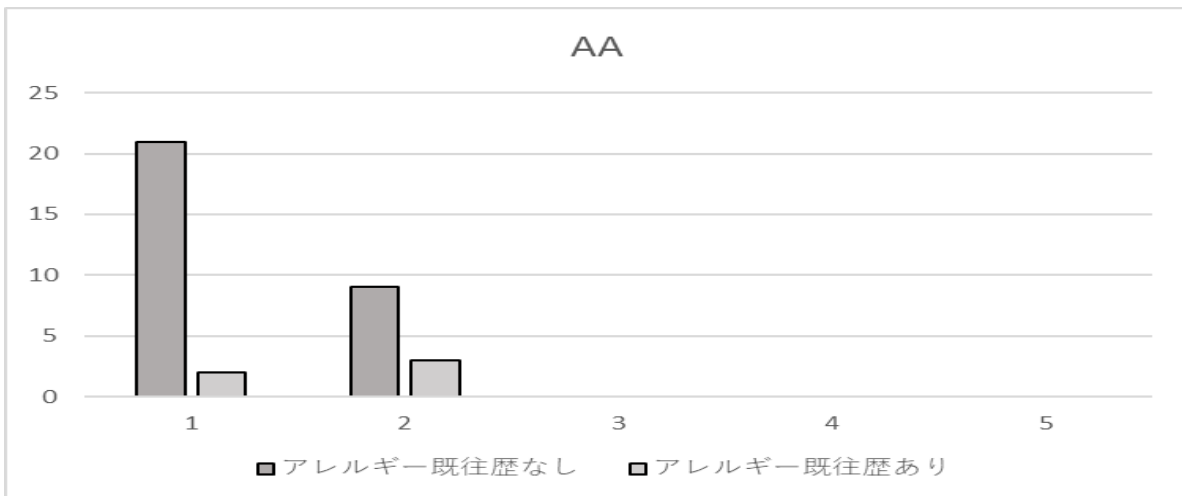
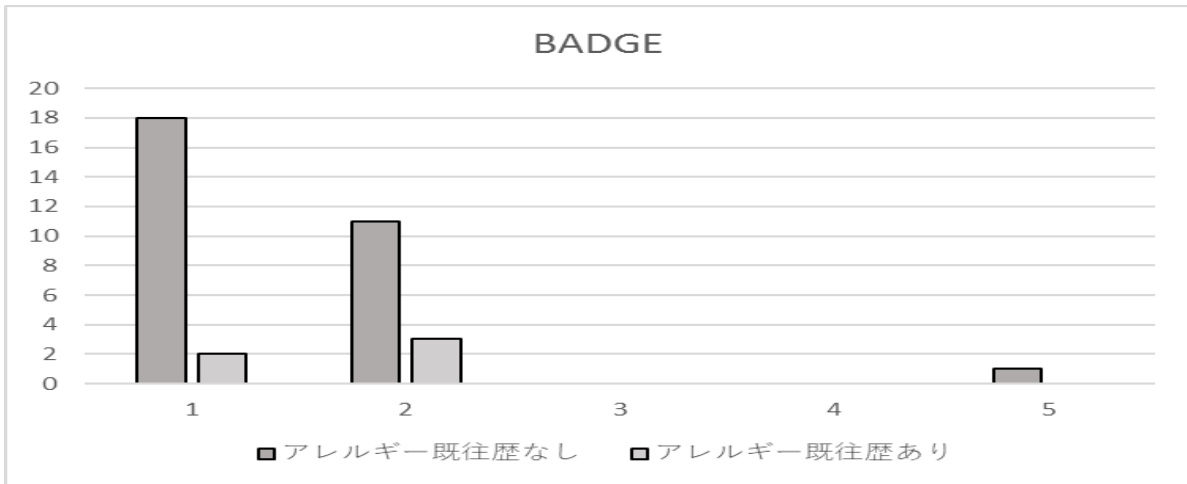
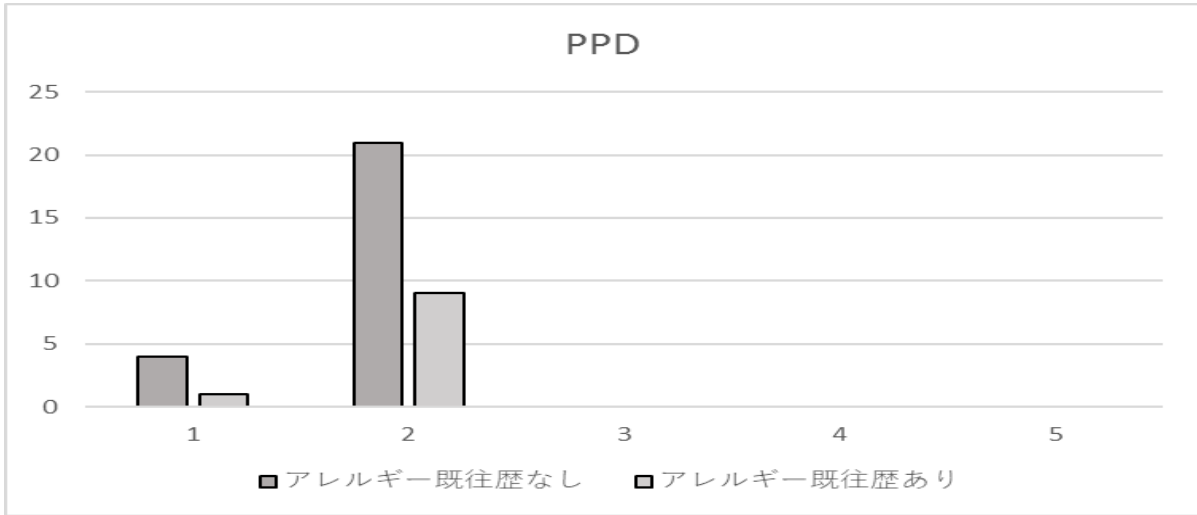
(4)特異的IgG値とアレルギー既往歴

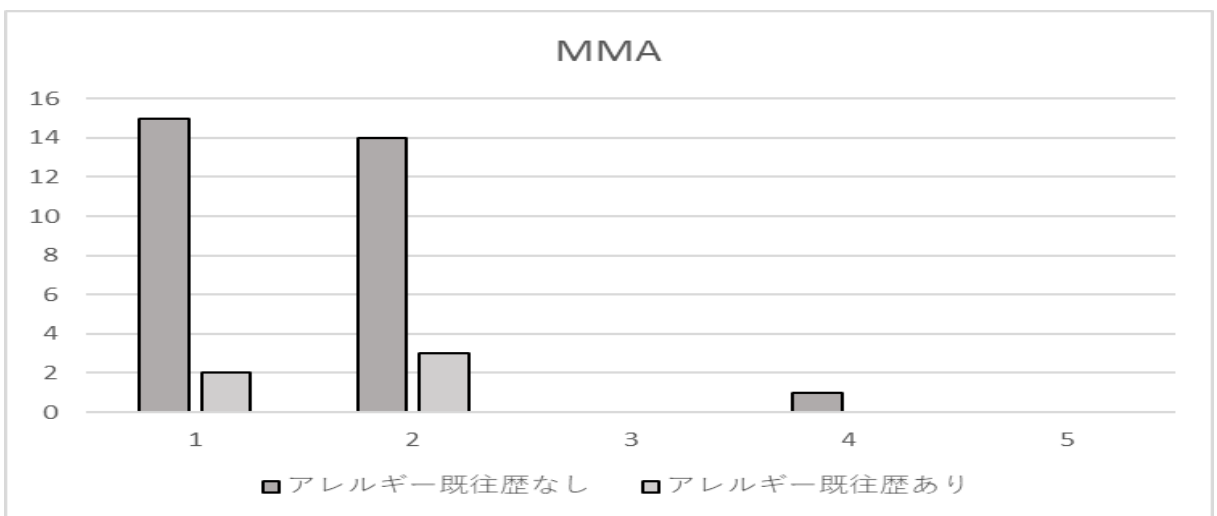
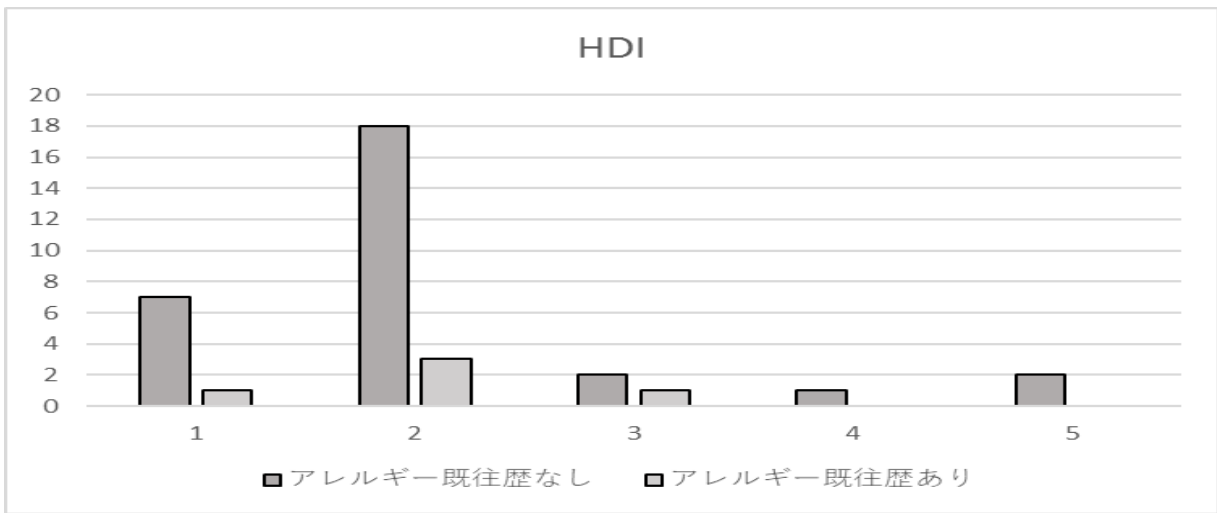
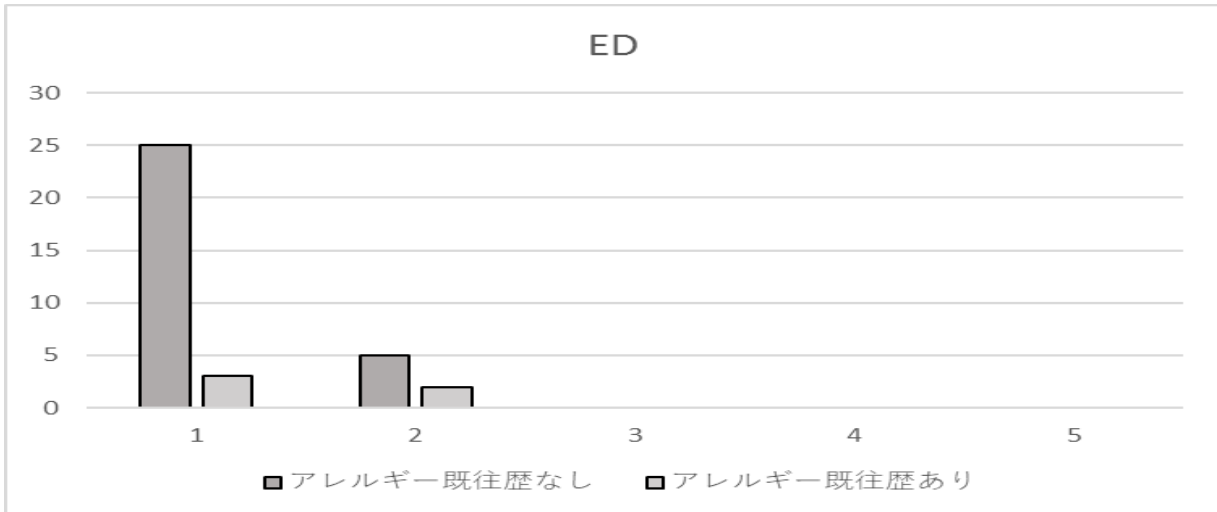
特異的IgG値 (μg/ml) のクラス分け基準

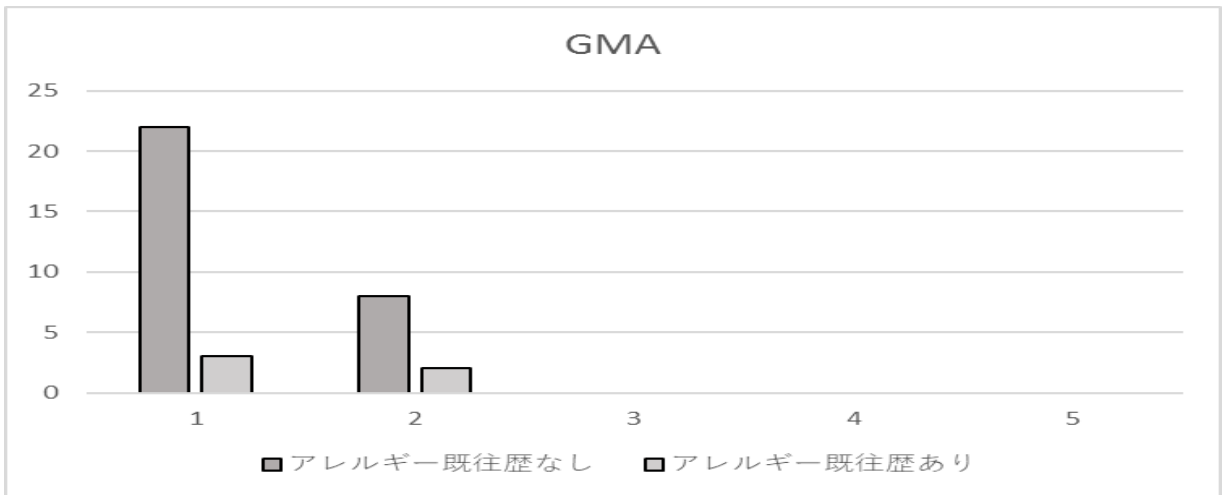
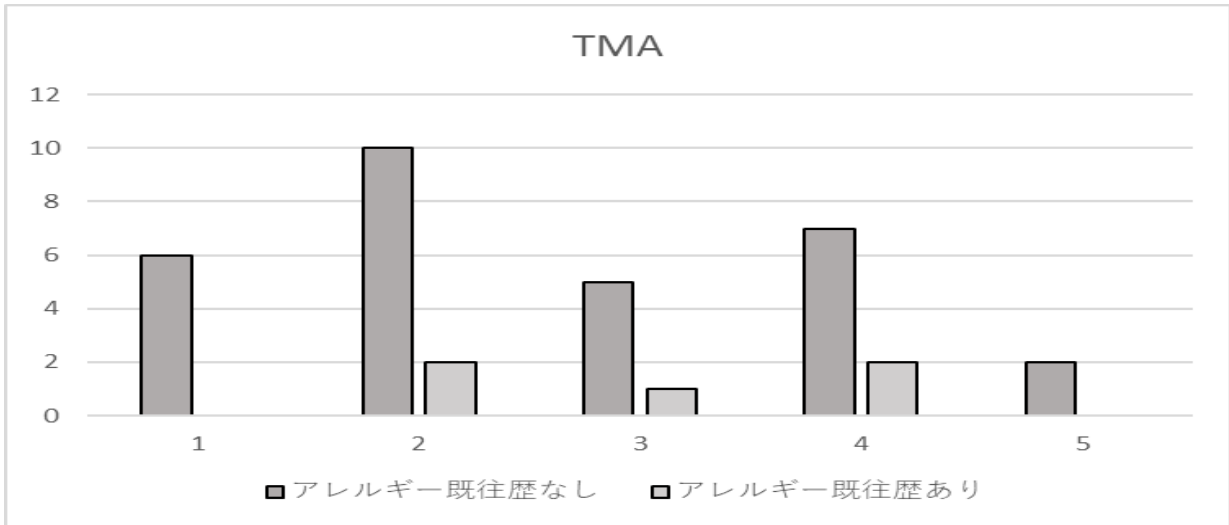
class1(-): 0 μg/ml, class2(±): >0, <3.125, class3(+): ≥3.125, <6.25
 class4(≡): ≥6.25, <12.5, class5(≡): ≥12.5











(5)特異的 IgG 値の一般人・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 自動車会社（成形・塗装部門）

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)

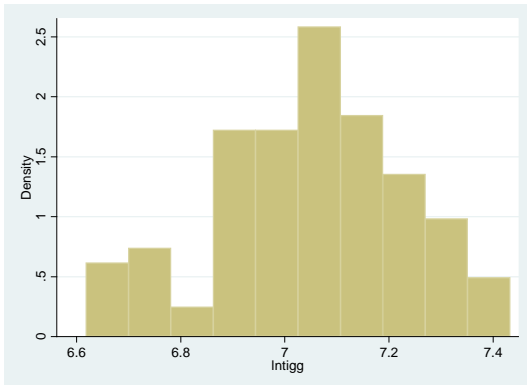
(2) アレルギー既往歴別

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)

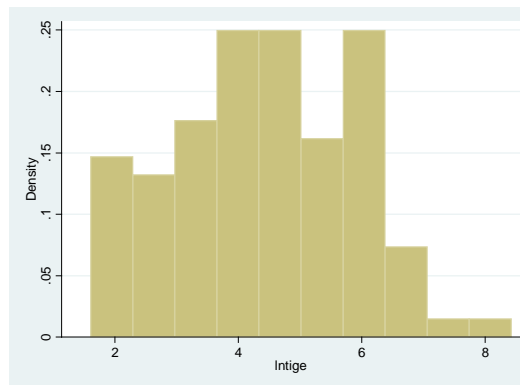
グラフ1

c社 総IgG, 総IgE値

総IgG値



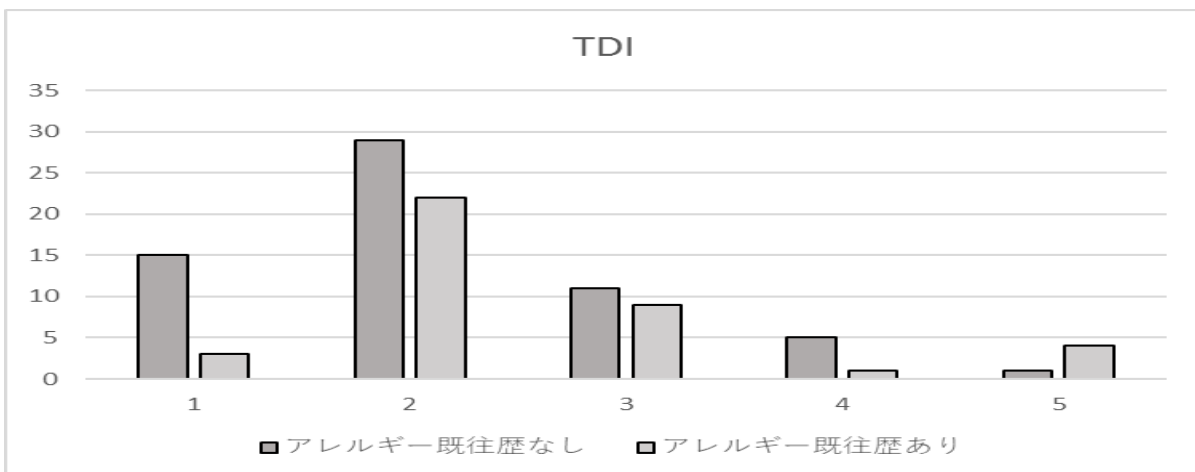
総IgE値

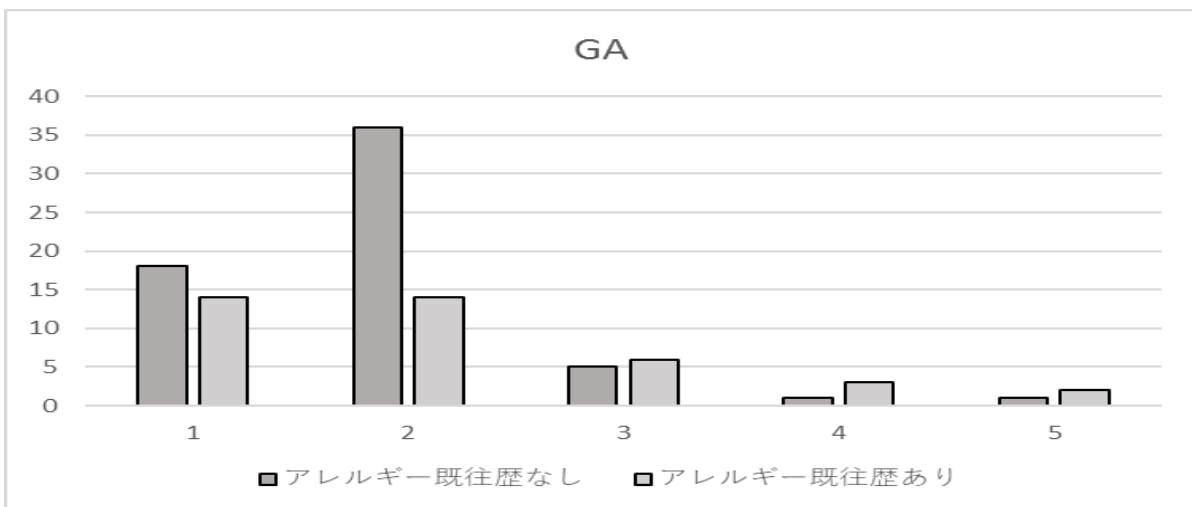
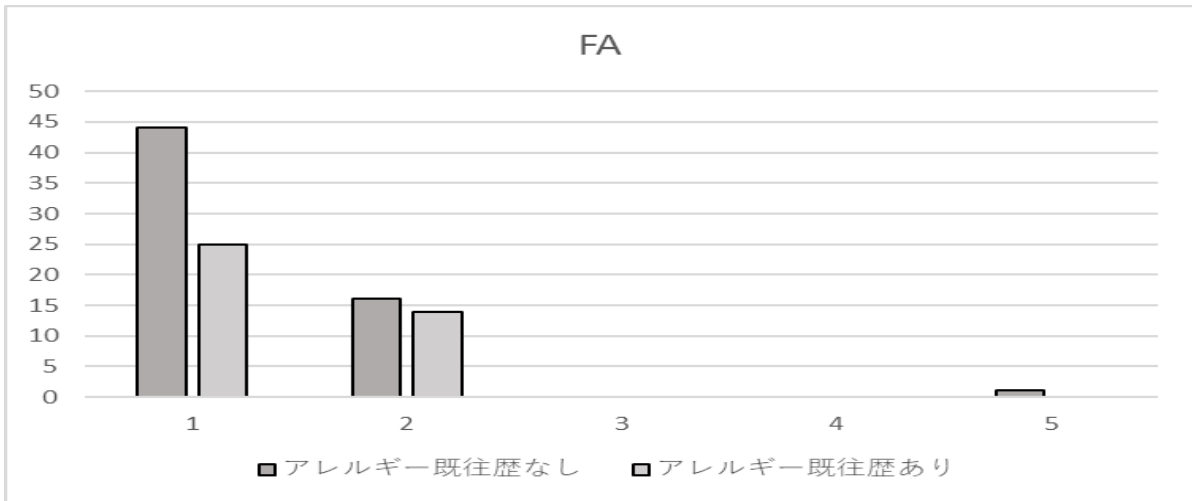
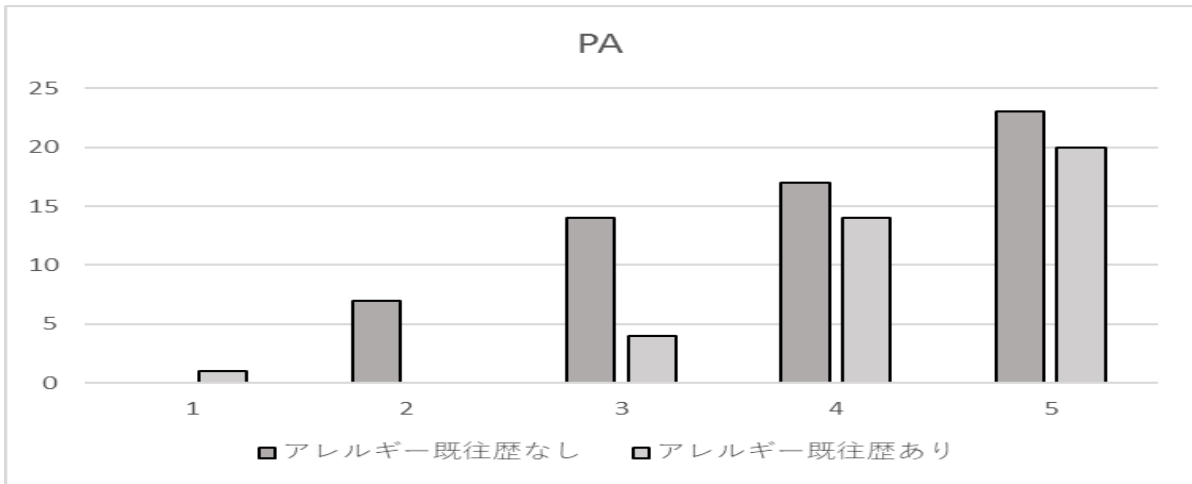


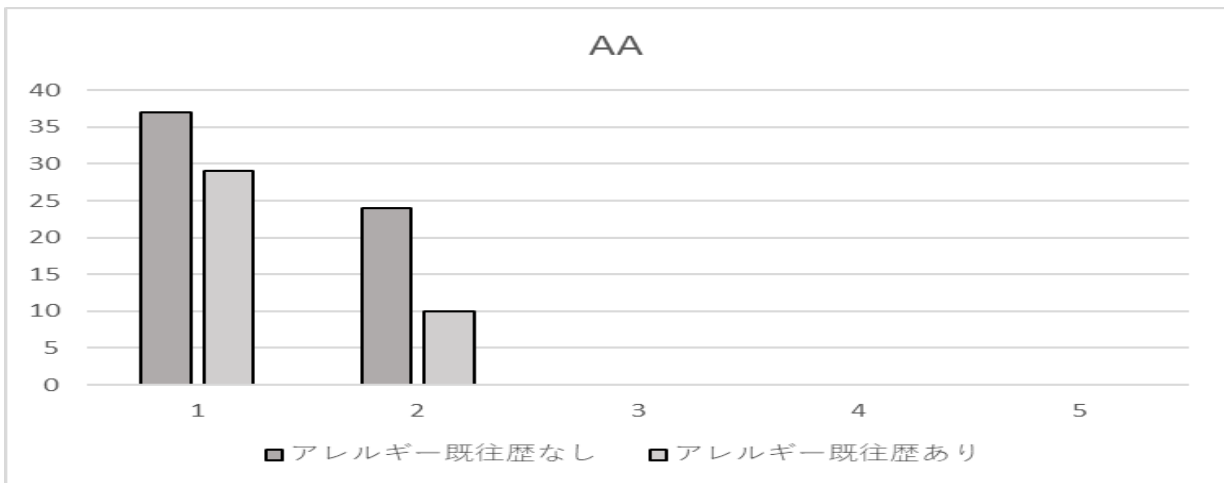
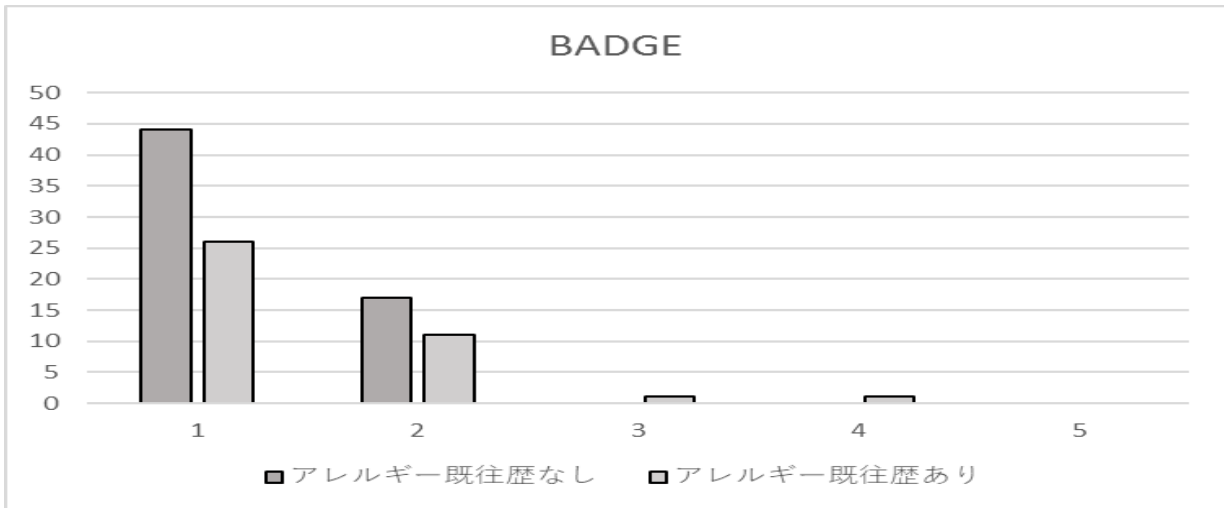
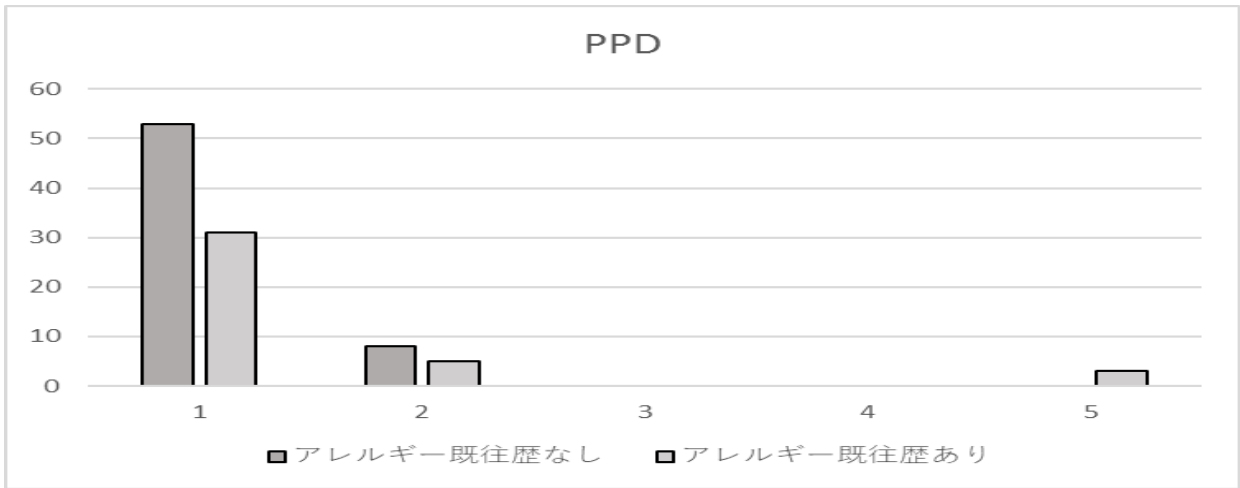
(3) 特異的IgE値

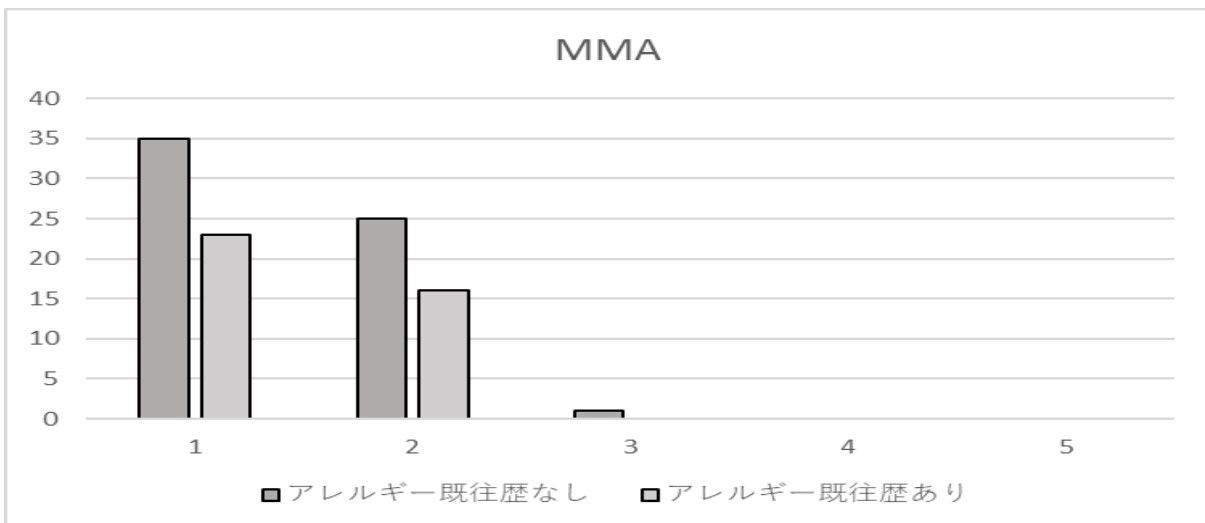
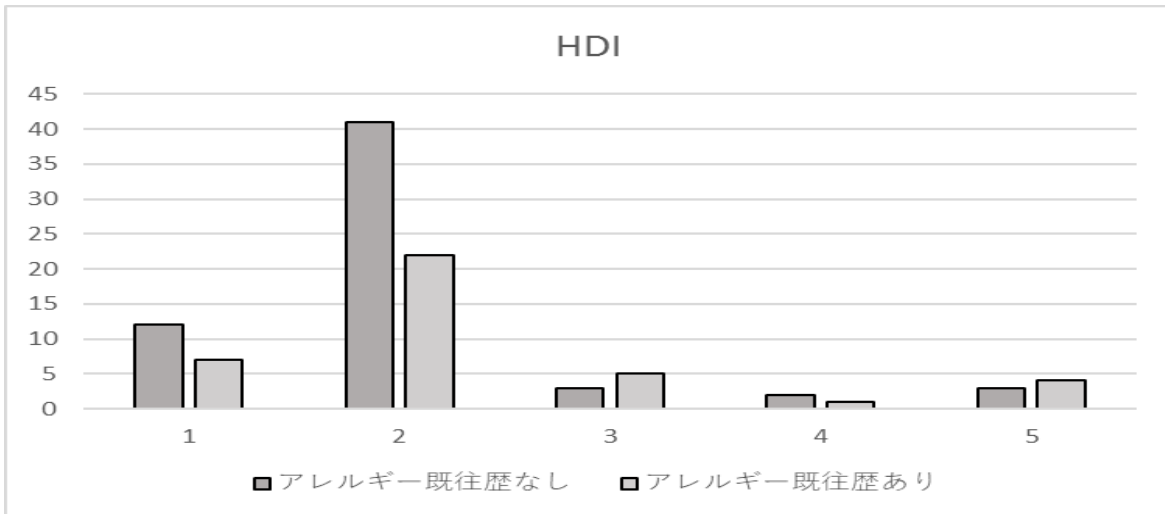
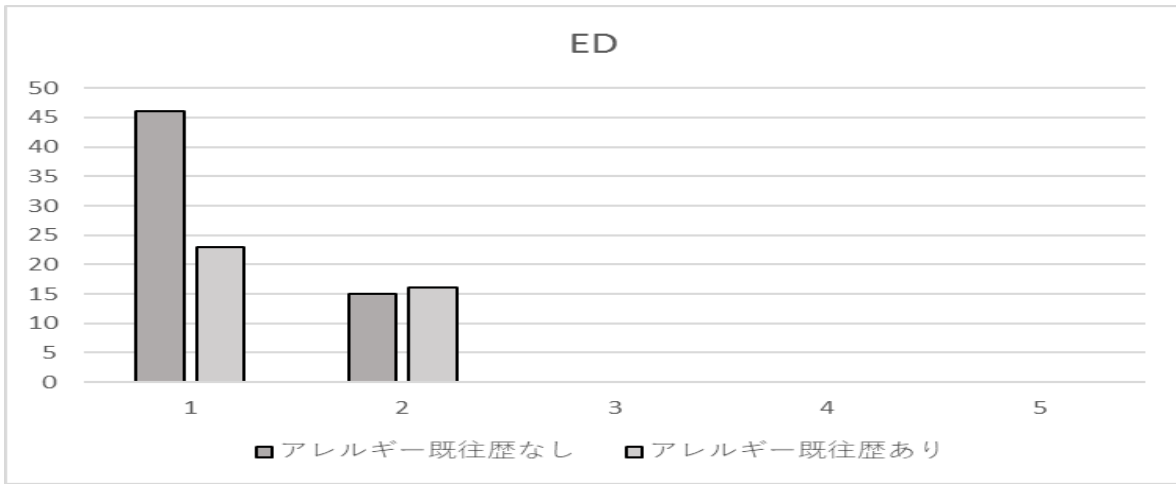
	特異的IgE	
	<0.1UA/ml	≥0.1UA/ml
TDI	93	7
FA	96	4
PA	97	3

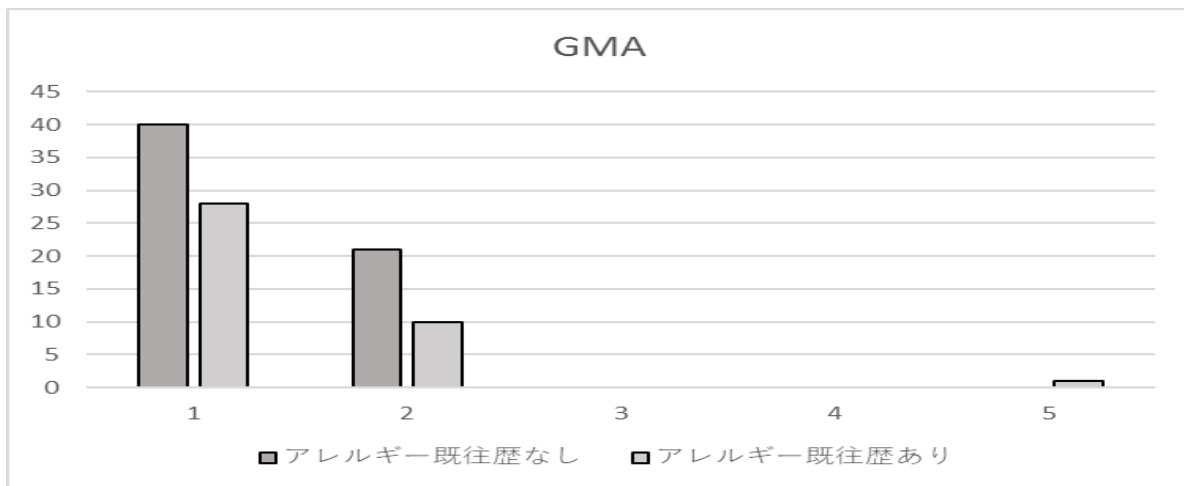
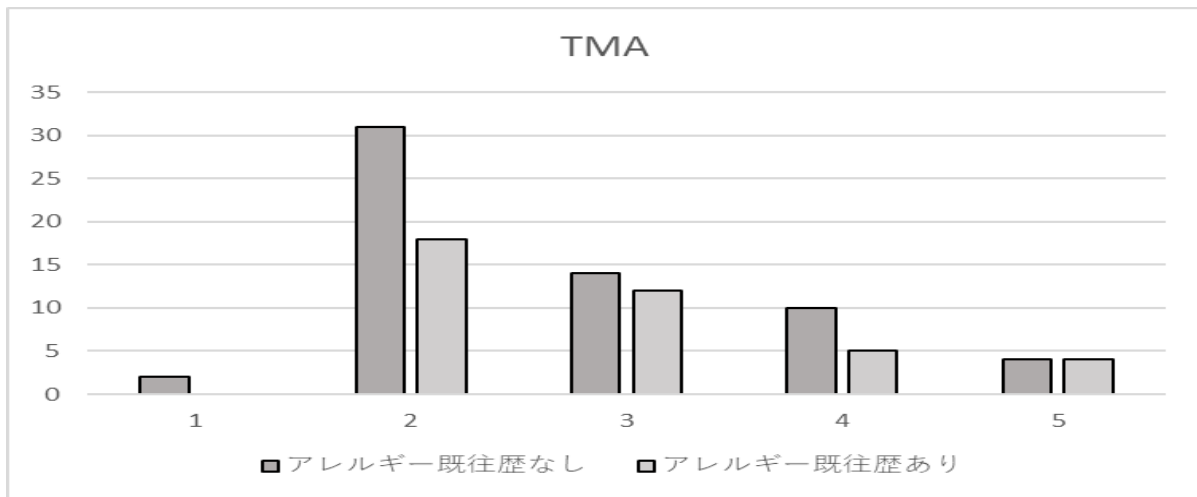
(4) 特異的IgG値とアレルギー既往歴











(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
≥ 3.125 , <6.25	1	1	1.57	0.03-74.3	0.819
≥ 6.25 , <12.5	0	0	—		
≥ 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
≥ 3.125 , <6.25	0	0	—		
≥ 6.25 , <12.5	1	0	—		
≥ 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
≥ 3.125 , <6.25	0	0	—		
≥ 6.25 , <12.5	0	0	—		
≥ 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
≥ 3.125 , <6.25	12	8	0.35	0.08-1.57	0.170
≥ 6.25 , <12.5	8	3	0.41	0.07-2.59	0.343
≥ 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

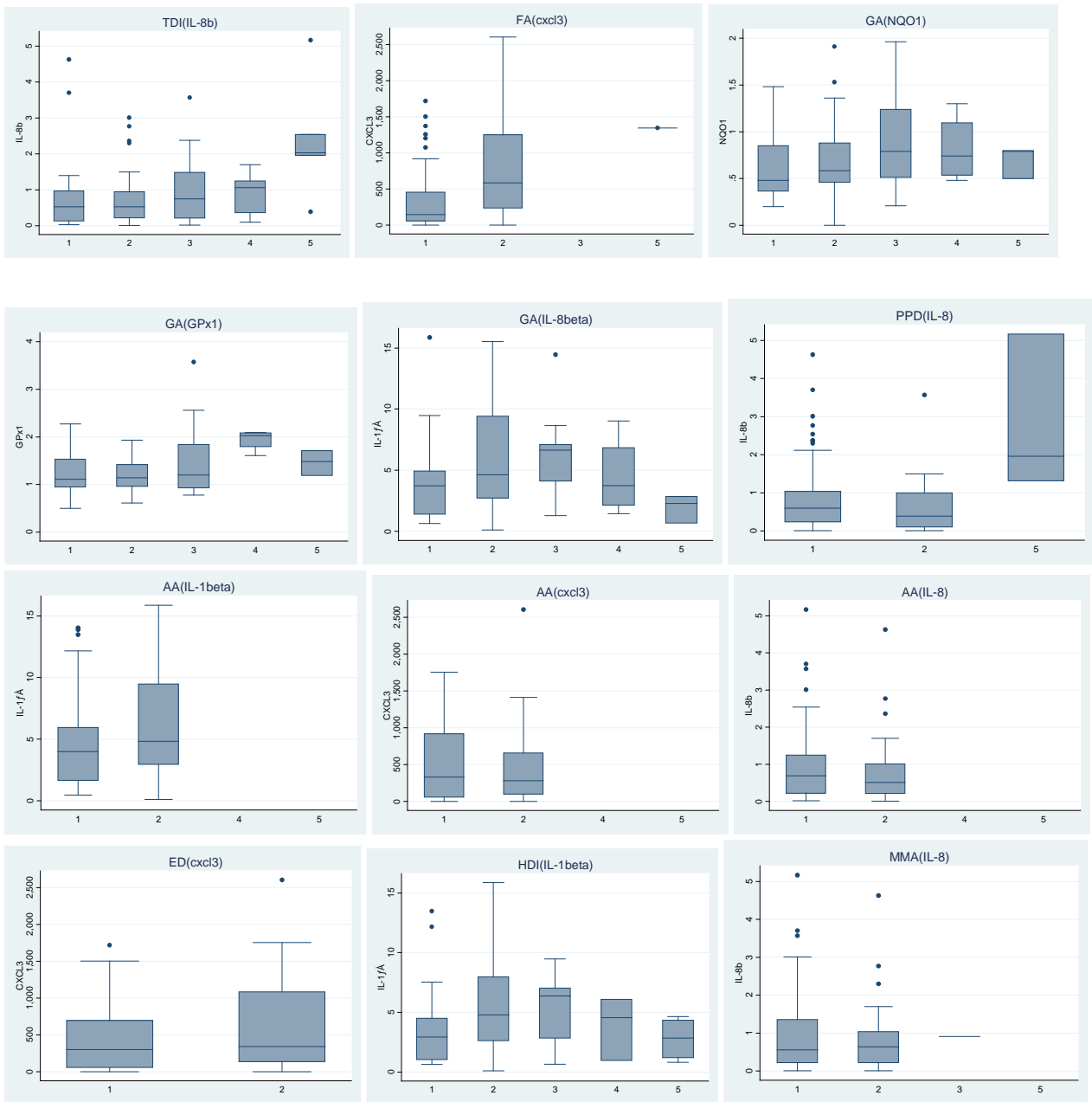
特異的 IgG 値 ($\mu\text{g/ml}$)	一般人(N=182)	c 社(N=100)	OR	95%CI	P 値*
0	32	2	1.00	(ref)	
>0, <3.125	78	49	8.92	1.62-49.2	0.012
\geq 3.125, <6.25	37	26	6.27	1.06-37.2	0.043
\geq 6.25, <12.5	19	15	10.8	1.66-70.7	0.013
\geq 12.5	15	8	5.40	0.75-38.9	0.094

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. 補足: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

(4) 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

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。前年度の研究より、HSA 分子と化学物質との付加体を用いた ELISA では、測定結果のバラツキが大きくなることが明らかとなっていることから、ここではアミノ末端をビオチンで修飾することにより、ストレプトアビジンに一樣の配向性で結合できるように設計した HSA 部分ペプチドを用いて ELISA を構築する。

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、ホルムアルデヒドと無水フタル酸を標的とした。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、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-HSA 部分ペプチド IgG および抗無水フタル酸-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、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-HSA 部分ペプチド IgG および抗無水フタル酸-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、血清中抗ホルムアルデヒド-HSA 部分ペプチド IgG 量および抗無水フタル酸-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。

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)

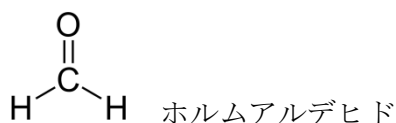
A.研究目的

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。中でも、ホルムアルデヒドや無水フタル酸などのカルボニル化合物は、カルボニル基の反応性と反応後の安定性、また、安価に合成できることから、代表的な樹脂原料として産業界で広く使用されてきた。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おり、ホル

ムアルデヒドや無水フタル酸も例外ではない。これらの化学物質は、呼吸器感作性、皮膚感作性が認められており、ホルムアルデヒドは発癌性が指摘されている。

ホルムアルデヒド

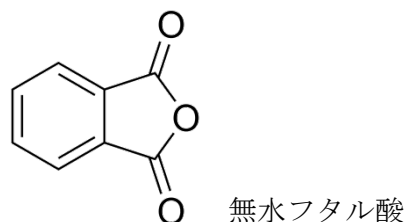
ホルムアルデヒドは接着剤、塗料、防腐剤などの成分であり、安価なためフェノール樹脂、メラミン樹脂、尿素樹脂などの原料として建材に広く用いられている。平成 25 年、本邦において、1,030,052 トンものホルマリンが製造された（経済産業省生産動態統計年報より）。しかし、ホルムアルデヒドは濃度によって粘膜への刺激性を中心とした急性毒性があり、蒸気は呼吸器系、目、のどなどの炎症を引き起こし、水溶液への接触により、皮膚の炎症が生ずる（Alexandersson and Hedenstierna 1988, 1989; Fowler et al. 1992; Ritchie and Lehnen 1987; 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。



無水フタル酸

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（経済産業省生産動態統計年報より）。

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。



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、チューブリンなどの化学物質付加体の存在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ブロット法により、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)。我々は、このドットプロット法をカルボニル化合物であるホルムアルデヒドと無水フタル酸に応用し、工場労働者の血液中 IgG の測定に成功した (Tsuji et al. 2016)。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 (図 1)。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 (事業所で工業的に使用している、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、①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 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を作製し (図 1)、②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、ここで作製した 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。

2015 年度研究報告書に記載した通り、ヒト血清アルブミンと化学物質との反応生成物を測定抗原として使用した場合、血清アルブミンと化学物質との反応が完全に追跡できず、また、測定誤差が大きくなることが分かっている (2015 年度労災疾病臨床研究事業費補助金分担研究報告書)。そこで、本研究では、抗原としてヒト血清アルブミンの部分ペプチドと化学物質との反応生成物を使用した。部分ペプチドとカルボニル化合物との反応生成物の構造を、Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 法とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) により決定し、構造既知の抗原を ELISA に用いることとした。

B. 研究方法

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

化学物質 (特に樹脂 (プラスチック) 原料) 自体は分子量が小さいため単体では抗原とならず、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。川本らは、化学物質と 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)。しかし、前年度の研究より、タンパク質である HSA を抗原として ELISA を行うと、測定結果が安定せず、この原因として、疎水性相互作用で plate 底面に結合させた HSA、或いは、HSA 化学物質付加体の不安定性、さらには、HSA と化学物質との反応性の不安定性 (常に化学的、構造的に全く同一の HSA-化学物質付加体が形成されるとは限らない) が示唆された。そこで、本研究では、HSA の部分ペプチドを化学物質との付加体を抗原として用いることにより、上記問題の解決を図った。

対象とする化学物質はホルムアルデヒド (Formaldehyde : FA) と無水フタル酸 (Phthalic Anhydride : PA) とした。いずれも接着剤や樹脂原料として産業的に広く用いられている化学物質である。これら化学物質は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 2)。そこで、HSA の一次構造の中で、反応性の高いリシン残基を含むペプチドを設計し合成することとした。

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 3)。

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と同じ

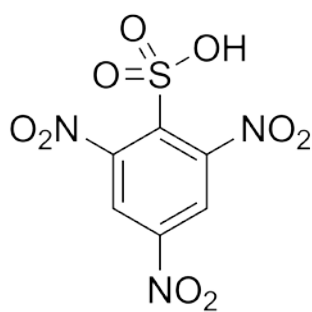
配向性で結合させられるように設計した。これらのペプチドそれぞれ 10mg をユーロフィンジェノミクスに合成を委託した。ペプチドは HPLC (日立ハイテック) で精製したものを使用した。

2. Lys 含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体の形成

PA と FA 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 μ L に溶解し、10mg/mL (5mM) peptide 溶液を調製した。PA は pH8.0 のリン酸ナトリウム緩衝液中で、FA 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で保存した。

3. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) による ϵ -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 は研究方法 2 で作製した peptide-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ることができる。



TNBS の構造式

研究方法 2 で作製した HSA peptide-化学物

質付加体 50 μ L に 4%炭酸水素ナトリウム溶液 50 μ L を加えた後、0.01% TNBS 水溶液を 50 μ L 加えて 42 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。1M 塩酸を 25 μ L 加えた後、340nm における吸光度を測定した。10、30、100、300 μ M リシン水溶液を作製し、これらの溶液を用いて作成した検量線から、peptide に含まれるアミノ基を定量した。

4. 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、ProteoMassTM Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich) を使用した。キット中の Angiotensin II ((M+H)⁺ = 1046.5423) と ACTH Fragment18-39 ((M+H)⁺ = 2465.1989) を 0.1% trifluoroacetic acid 200 μ L (終濃度 50pmol/ μ 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/ μ 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 μ L 滴下した。次に、ワーキング溶液を 0.5 μ 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 4)。

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 2 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 μ L

を滴下し、続いて、10mg/mL 2,5-dihydroxy benzoic acid 0.5 μ 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。

5. 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。

6. 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-NH₂（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 μ g を Filtration tube に添加し、MS Buffer 100 μ L を加えた。8,000g で 10 分間遠心分離した後、Reaction Buffer 100 μ L と NH₂ Reactive Biotin 10 μ L を加え、37°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 μ 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°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。

7. Lys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA

HSA peptide を PBS に溶解し、10 μ g/mL 溶液を調製した。この溶液を 100 μ 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™, 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 μ L/well で plate に添加した。モル比が 1:100、pH8.0 条件で PA をモル比が 1:100、pH10.6 条件で FA を各 well に 100 μ L ずつ添加し、37°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（PA）または 100 倍希釈（FA）して各 well に 100 μ 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 μ 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（部分ペプチドを用いた ELISA の概略を図 5 に示す）。

検量線として実験方法 6 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 μ 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-PA IgG と抗 HSA peptide-FA IgG を定量した。

8. 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。MMA や MA も PA や FA 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。MMA や MA 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、MMA や MA 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。

9. Cys 含有 HSA 部分ペプチドと化学物質との付加体の形成

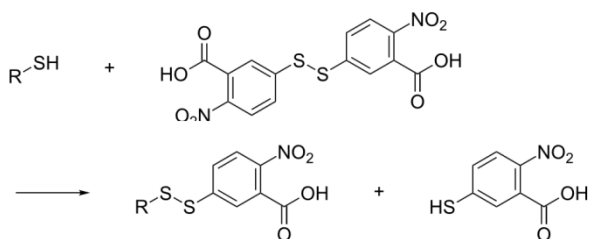
MA と MMA を DMSO に渡過し、10mM、100mM DMSO 溶液をそれぞれ調製した。Protein Low Bind Tube で以下の溶液を混合した。

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

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 MA、MMA とシステイン残基との反応を追跡した。

10. 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

実験方法 9 で得た反応溶液 50 μ L 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) 50 μ L 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, 1000 μ M 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。

11. Cys 含有 HSA 部分ペプチドを用いた ELISA

実験方法 9 で得た反応溶液を PBS-T で 20 倍希釈し、100 μ L/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、100 μ L/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 100 μ 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 μ 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。

(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、PA と FA は低分子化学物質であり、それ自体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

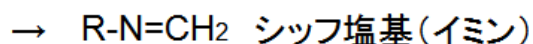
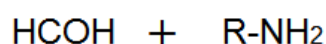
られる。PA と FA はカルボニル基を有することから、タンパク質中のリシン残基と反応すると考えられる。カルボニル炭素は求核性を有し、アミノ基の窒素原子中の非共有電子対と反応する (図 2)。その反応性はタンパク質中のリシン残基の pKa に依存し、pKa が大きいリシン残基ほど反応性が高くなる。HSA は 1 分子内に 59 個のリシン残基を有し、それぞれのカルボニルに対する反応性が異なることが報告されている (Hettick et al. 2012)。

我々は、HSA 部分ペプチドを用いた ELISA を作製するにあたり、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 PA や FA と、FA では pH10.6 で、PA 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 FA または PA 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 6)。HSA Peptide Lys1 と FA 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、FA 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 6)。同様に、HSA Peptide Lys1 と PA 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 6)。従って、FA と PA 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 FA や PA との反応で失われた (図 6)。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 FA と PA 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 FA と PA とよく反応することが明らかとなった。

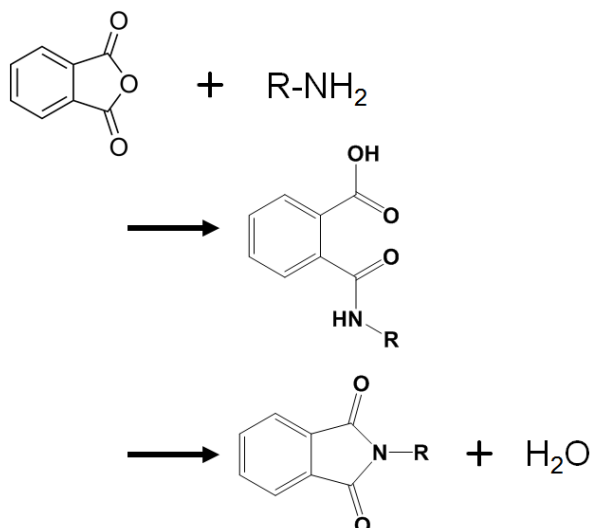
次に、MALDI-TOF MS により、ペプチドと化学物質の付加体の分子量を測定することにより、化学物質のリシン残基に対する反応の推定を試みた。HSA Peptide Lys1 とその FA

付加体の MS スペクトルを比較すると、FA 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 7)。HSA Peptide Lys2 についても、FA と反応させることにより、分子量が 24 増加した (図 8)。FA 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 2)。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、FA 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 FA 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、PA 付加体についても同様に解析した。HSA Peptide Lys1 とその PA 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 9)。しかし、PA 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 9)。HSA Peptide Lys2 についても、PA 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 10)。PA も FA 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

PA 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 つのリシンとともに 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、FA はシッフ塩基 (イミン) を形成し、PA 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。

2. 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 μ 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 1 1)。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 1 1)。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 1 2)。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 1 2)、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-NH₂ 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 10µg/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 1 3)。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 FA-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、FA 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 FA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 FA-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 FA-HSA peptide Lys1 抗体、抗 FA-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 1 4)。一般住民と工場労働者の血清中抗 FA-HSA peptide Lys 抗体の平均値を比較すると、抗 FA-HSA peptide Lys1 抗体、抗 FA-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 1 4)。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 1)。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、FA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 FA-HSA peptide Lys2 抗体の量に関して、抗 FA-HSA peptide Lys1 抗体の絶対量が多い傾向にあったが (図 1 4、表 1)、抗 FA-HSA peptide Lys1 抗体が検出される検体は抗 FA-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 PA-IgG の定量

FA 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、PA 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 PA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 PA-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 PA-HSA peptide Lys1 抗体、抗 PA-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 1 5)。工場労働者の血清中抗 PA-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 1 5)。抗 PA-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 1 5)。また、抗 PA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 PA-HSA peptide Lys2 抗体の血液中の絶対量を比較すると、抗 PA-HSA peptide Lys1 抗体量の方が極めて多い結果が得られた (図 1 5)。従って、血清中抗 PA-HSA peptide Lys1 抗体量の方が、PA 曝露をより顕著に表す可能性が考えられる。表 1 より、FA の場合と同じく、抗 PA-HSA peptide Lys 抗体量の検体間のバラつきが大きかった。従って、PA 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。

3. 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 1 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 FA-HSA peptide Lys 抗体、或いは PA-HSA peptide Lys 濃度を示している。

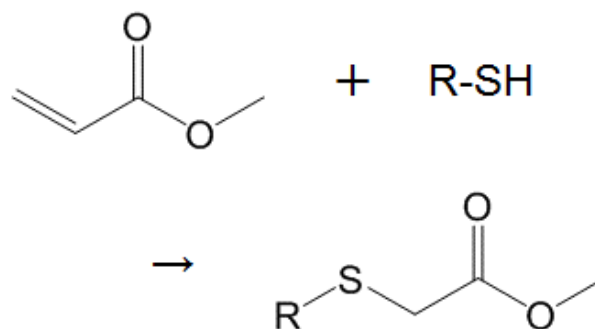
4. 化学物質との反応によるシステイン含有 HSA 部分ペプチドの修飾

上述のように、FA や PA 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、感作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。MMA や MA も PA や FA 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。MMA や MA 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、MA や MMA 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で存在している。従って、曝露後、生体内に取り込まれた MA や MMA 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)、MA、MMA と反応させた後、チオール量を Ellman 法により測定した。

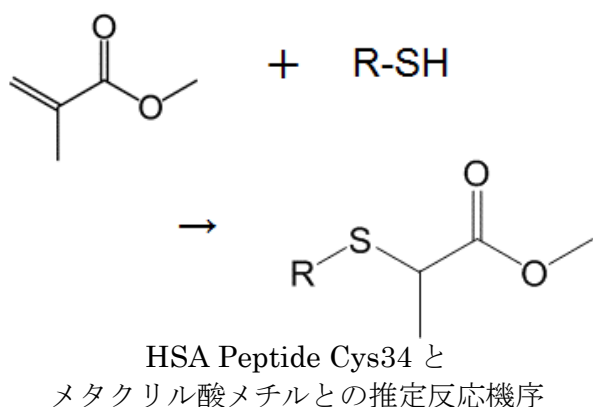
HSA Peptide Cys34 を DMSO の存在下でインキュベートすると、ペプチドに含まれるチオールはインキュベート時間依存的に失われた (図 1 6)。従って、HSA Peptide Cys34 は自動酸化、おそらくは分子間ジスルフィド結合の形成により、チオール基を失うと考えられる。HSA Peptide Cys34 と MA とを混合し、インキュベートすると、チオールの減少速度は HSA Peptide Cys34 の自動酸化と比較して大きく増大した (図 1 6)。従って、MA は HSA Peptide Cys34 のチオール基と反応していると考えられる。一方、HSA Peptide Cys34 と MMA 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 1 6)。以上の結果から、MA のチオールに対する反応性は非常に高い一方、MMA 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、MA 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、MMA 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 MA 付加体の MS スペクトルを比較すると、MA 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 1 7)。MA 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 MA と反応していると考えられる。



HSA Peptide Cys34 と
アクリル酸メチルとの推定反応機序

HSA Peptide Cys34 とその MMA 付加体の MS スペクトルを比較すると、MMA 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 1 8)。MMA も MA 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 (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、MA と同様のメカニズムで MMA がシステインと結合すると考えられる。



以上より、MA、MMA と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、MA は反応性が高く、MMA 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、MA と HSA Peptide Cys34 との付加体を抗原として ELISA を行うこととした。

5. システイン含有 HSA 部分ペプチドと MA 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

MA 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 1 6)。そこで、MA 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 2 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、MA-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。

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と呈する。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。経気道曝露、或いは、経皮曝露が中心であることから、症状は、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接着剤原料、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、2 種類の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) に焦点を当てた。また、アクリル繊維やアクリル樹脂として広く使用されているアクリル酸メチル (MA) とメタクリル酸メチル (MMA) についても解析した。

樹脂原料や薬物など低分子はハプテンでありそれ自身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、その結果、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。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。カルボニル化合物 FA と PA は、タンパク質中のリシン残基と特異的に反応する (図 2)。MA と MMA はタンパク質中のシステイン残基との反応性が高い (Böhme et al., 2009)。従って、本研究では、化学物質はタンパク質中の特定のアミノ酸残基と反応し、その結果タンパク質の高次構造が変化して免疫原性を獲得するとの仮説の基、実験を行った。標的とするタンパク質は、血液中にもっとも豊富に存在し、多種多様な化学物質を結合することが知られている HSA とした。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知られている。

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、前年度の研究成果より、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、FA や PA 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 FA や PA 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 FA-HSA 部分ペプチド IgG および PA-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 FA-HSA 部分ペプチドや PA-HSA 部分ペプチドを抗原として用いた 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 FA-HSA 部分ペプチド IgG および PA-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、FA-HSA 部分ペプチド IgG および PA-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 FA-HSA 部分ペプチド IgG および PA-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。

FA-HSA 部分ペプチド IgG および PA-HSA 部分ペプチド IgG がヒト血清中で検出された一方、MA-HSA 部分ペプチド IgG はヒト血清中に検出されなかった。MA 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。MA-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、MA 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。MA 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、MA 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原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、癬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。より安全な*in vitro*での測定法が有益である。

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機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の方がより鋭敏に抗体保有の有無の差が出やすいことが期待される。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 Enzyme-Linked Fluorescence Assay (ELFA) 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)。生体内の化学物質付加体を調べるためには、化学物質に対する抗体を作製することは1つの手法となる。しかし、トルエン-2,4-ジイソシアネートは低分子化合物であり、トルエン-2,4-ジイソシアネートに対する抗体は産生されないと考えられる。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)。しかし、抗体のターゲットが不明であることや、付加体間親和性の差異など、60G2の詳細な解析が必要であろう。

本研究により、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

本研究では、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、FA または PA 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 FA または PA 付加体特異的 IgG の定量に成功した。従って、本研究では構築した 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, Schüürmann 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.

• 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.

• 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, Wisniewski 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.

• 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.

• 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.

• 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.

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

• 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.

• 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.

F.健康危険情報

該当無し

G.研究発表

1. 論文発表

1. Takeya K*, Muto K, **Ishihara Y**, Kawase K. Monitoring theophylline concentrations in saline using terahertz ATR spectroscopy. *Appl. Sci*. 6(3):72 (2016).

2. Takemoto T, **Ishihara Y***, Tsuji M, Kawamoto T, Yamazaki T. Transcription factor activation in rat primary astrocytes exposed to methylmercury. *Fundam. Toxicol. Sci*. 3(2):63-65 (2016).

3. **Ishihara Y***, Tsuji M, Kawamoto T, Yamazaki T. Involvement of reactive oxygen species amplified in mitochondria in oxidative neuronal injury elicited by methylmercury. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 59(3):182-190 (2016).

4. **Ishihara Y***, Fujitani N, Sakurai H, Takemoto T, Ikeda-Ishihara N, Mori-Yasumoto K, Nehira T, Ishida A, Yamazaki T. Effects of sex steroid hormones and their metabolites on neuronal injury elicited by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in organotypic hippocampal slice cultures. *Steroids*. 113:71-77 (2016).

5. Ozaki H, Katoh T, Nakagawa R, **Ishihara Y**, Sueyoshi N, Kameshita I, Taniguchi T, Hirano T, Yamazaki T, Ishida A*. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) interacts with neurofilament L and inhibits its filament association. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 477:820-825 (2016).

6. 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).

7. Itoh K†*, **Ishihara Y†**, Komori R, Nochi H, Taniguchi R, Chiba Y, Ueno M, Dohgu S, Takata F, Kataoka Y. †: equally contributed. Levetiracetam treatment influences blood-brain barrier failure associated with angiogenesis and inflammatory responses in the acute

phase of epileptogenesis in post-status epilepticus mice. *Brain Res.* 1652:1-13 (2016).

* Corresponding Author

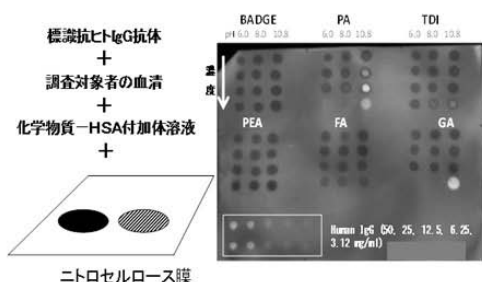
2. 学会発表

1. **石原 康宏**、櫻井 光、山崎 岳. レチノイドX受容体アゴニストによる脳内エストロゲン合成の亢進と神経保護作用. 第 57 回 日本生化学会 中国・四国支部例会 2016年5月27日～28日(高知大学医学部).
2. **石原 康宏**、竹本 拓矢、山崎 岳. メチル水銀によるアストロサイト神経栄養因子の発現亢進とその神経保護作用. 第 43 回 日本毒性学会学術年会 2016年6月29日～7月1日(ウイנק愛知).
3. **石原 康宏**、山崎 岳. SOD2 による NF-κB ネガティブフィードバックを介した神経炎症収束機構. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 2016年8月30日～31日(仙台国際センター).
4. **石原 康宏**、竹本 拓矢、山崎 岳. メチル水銀からニューロンを守るアストロサイト適応応答の分子機構の解明. 平成 28 年度 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング. 2016年12月26日(LMJ 東京研修センター).
5. **Ishihara Y.** Role of astrogliosis elicited by methylmercury in neuroprotection. Prenatal Programming and Toxicity V. Nov 13-16, 2016 (Kitakyushu International Conference Center).

H.知的財産権の出願・登録状況

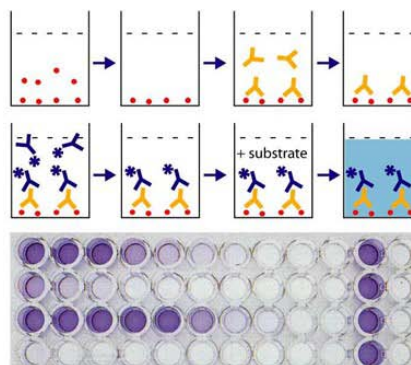
1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

Dot Blot



数種類の化学物質抗体を一斉検出可能

ELISA



**数百検体を一度に測定可能
検量線により定量可能**

図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、発色法で検出すると定量性は高いが感度が低く、発光法で検出すると感度は高くなるが定量性を欠く。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。複数種の化学物質抗体の同時検出も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。

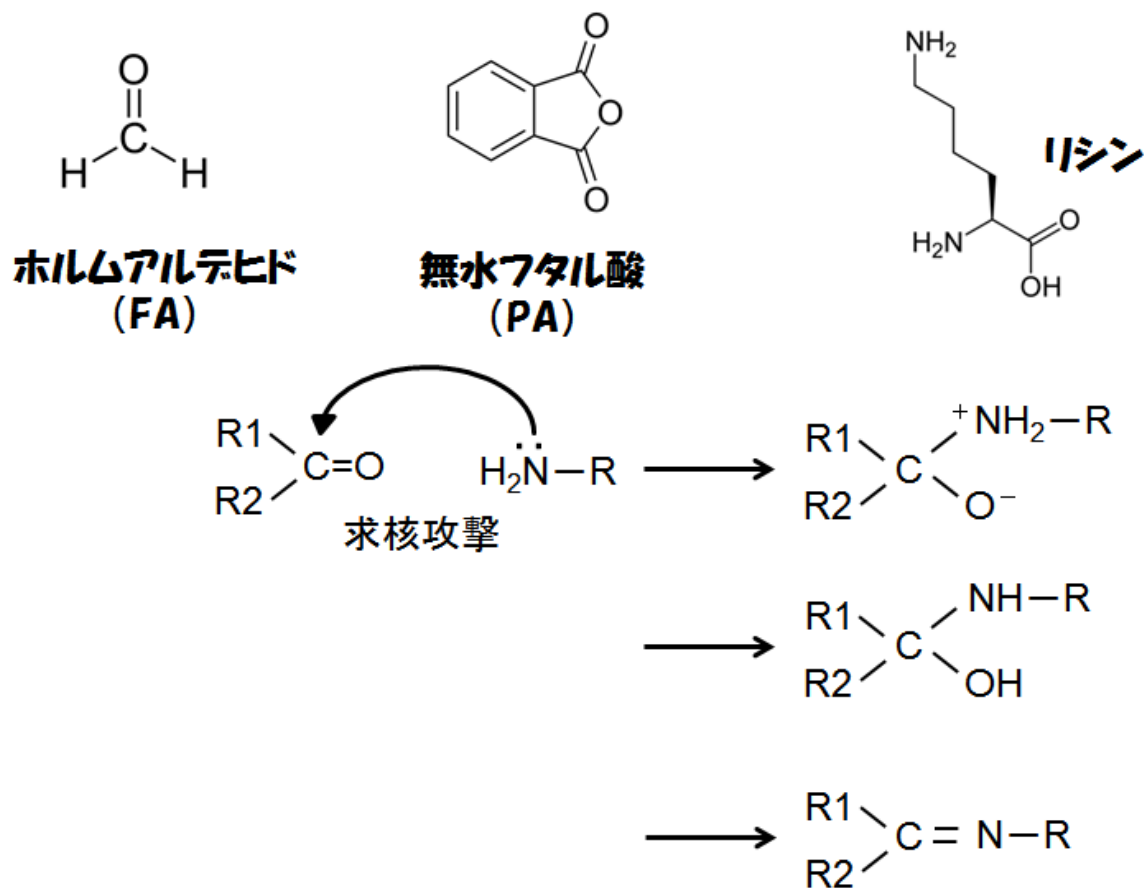


図2. カルボニル基を有する化学物質とタンパク質リシン残基との反応

カルボニル基は正の電荷の偏りをもつため、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であるため、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。上記は反応の一例である。

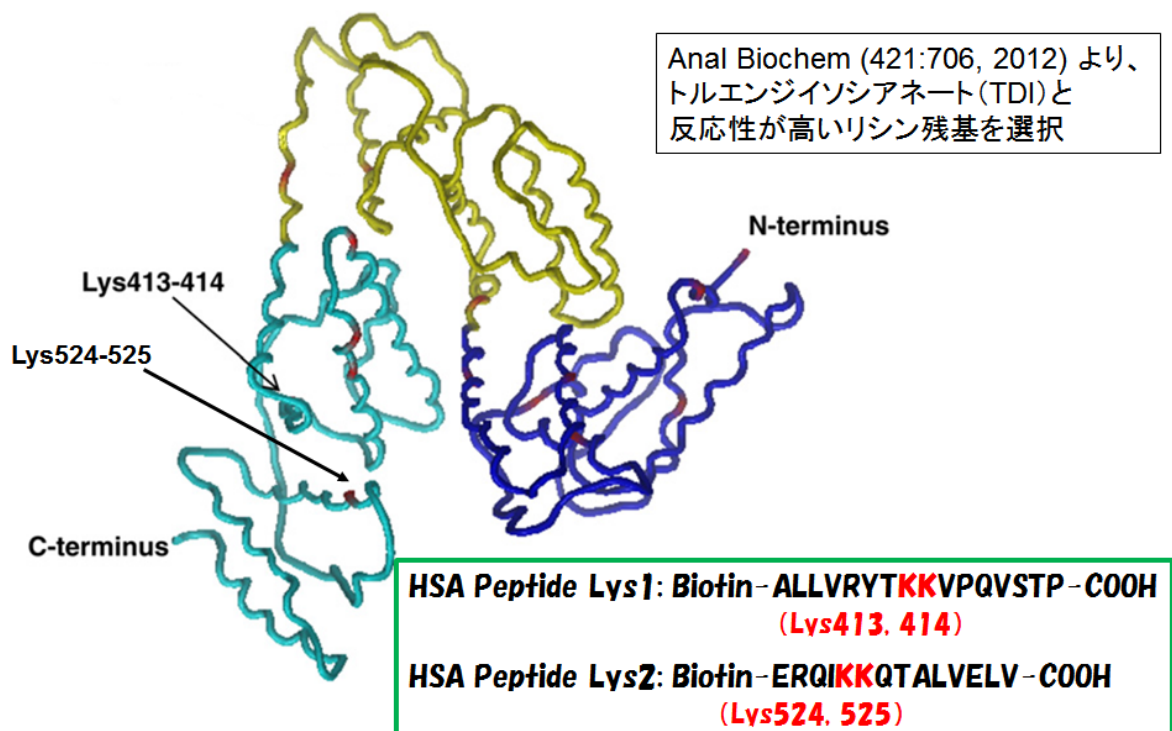


図3. HSA リシン残基の反応性と HSA 部分ペプチドの設計

(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。

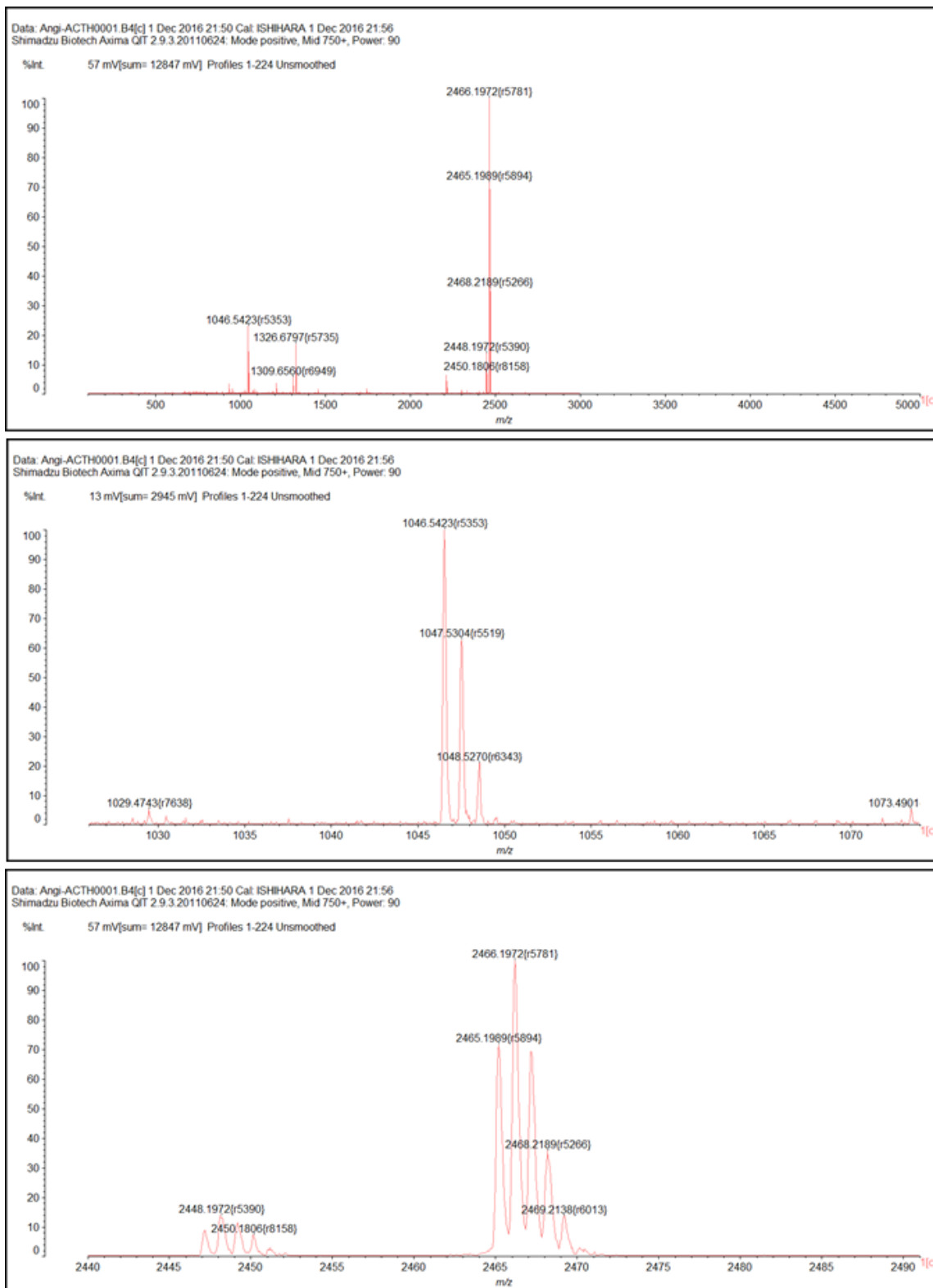
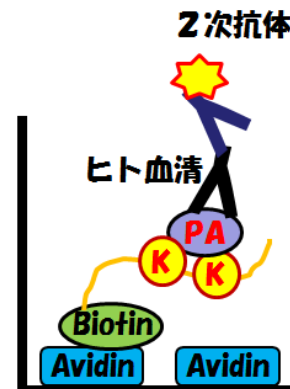


図4. MALDI-TOF MS のキャリブレーション

Angiotensin II ((M+H)⁺ = 1046.5423) と ACTH Fragment 18-39 ((M+H)⁺ = 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。

- 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、フランクとする**



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

ストレプトアビジン固定化
96 well plate

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5. 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。

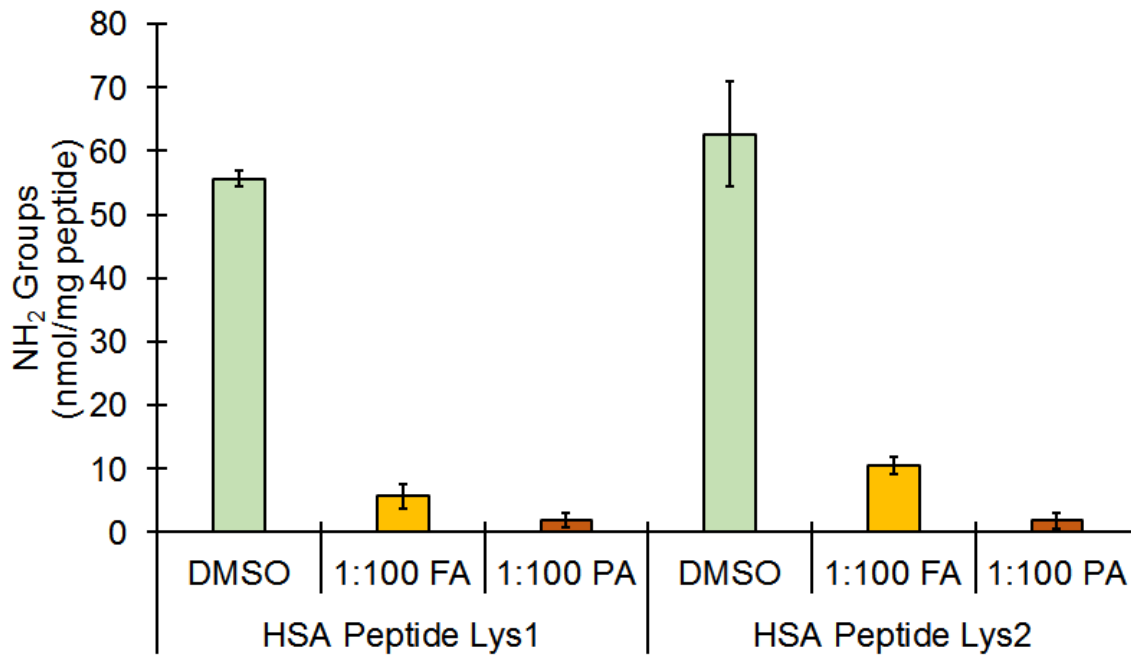


図6. FA、PAによるHSA部分ペプチドのリシン残基の修飾

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。

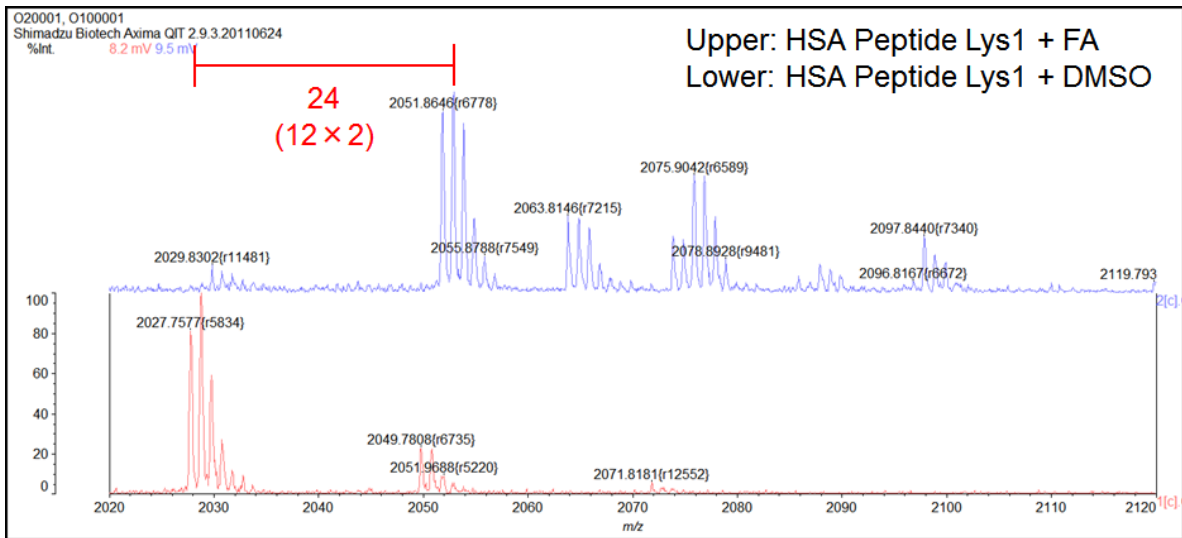


図7. HSA Peptide Lys1 と FA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys1 を 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。

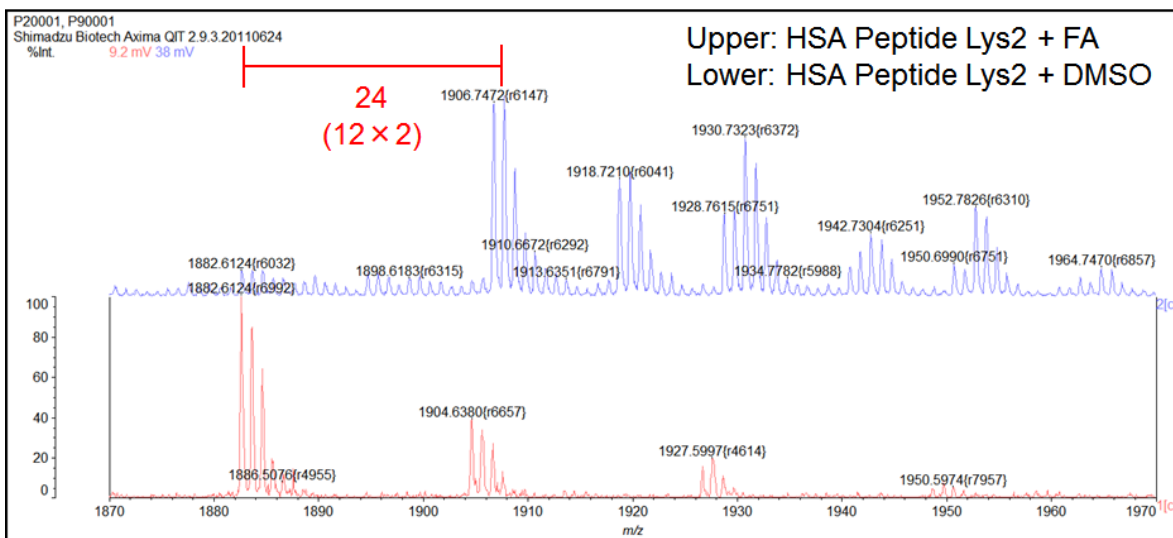


図 8. HSA Peptide Lys2 と FA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys2 を 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。

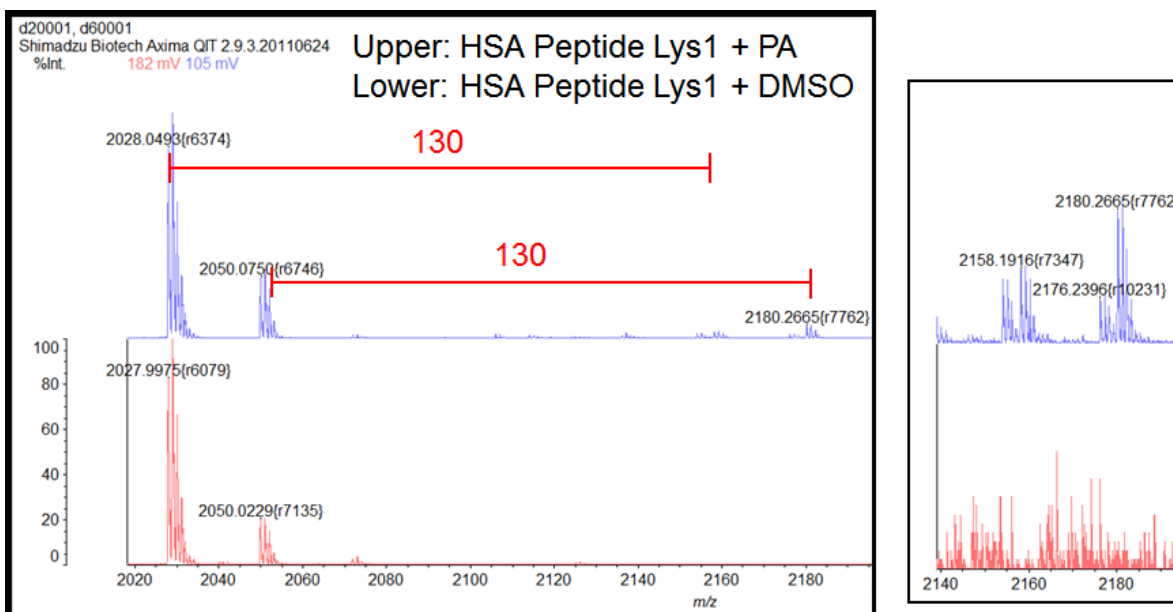


図 9. HSA Peptide Lys1 と PA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys1 を 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。

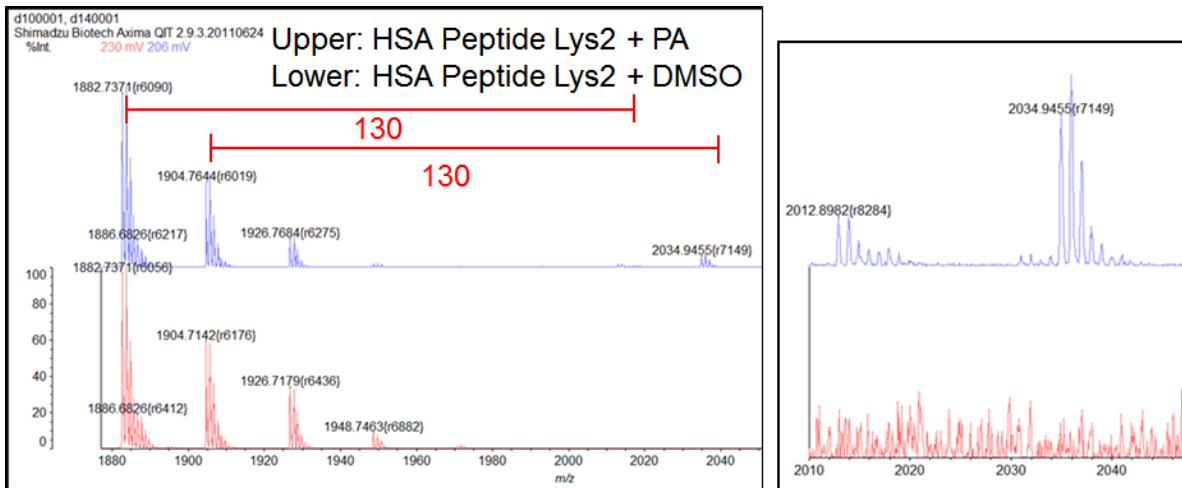


図 10. HSA Peptide Lys2 と PA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Lys2 を 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。

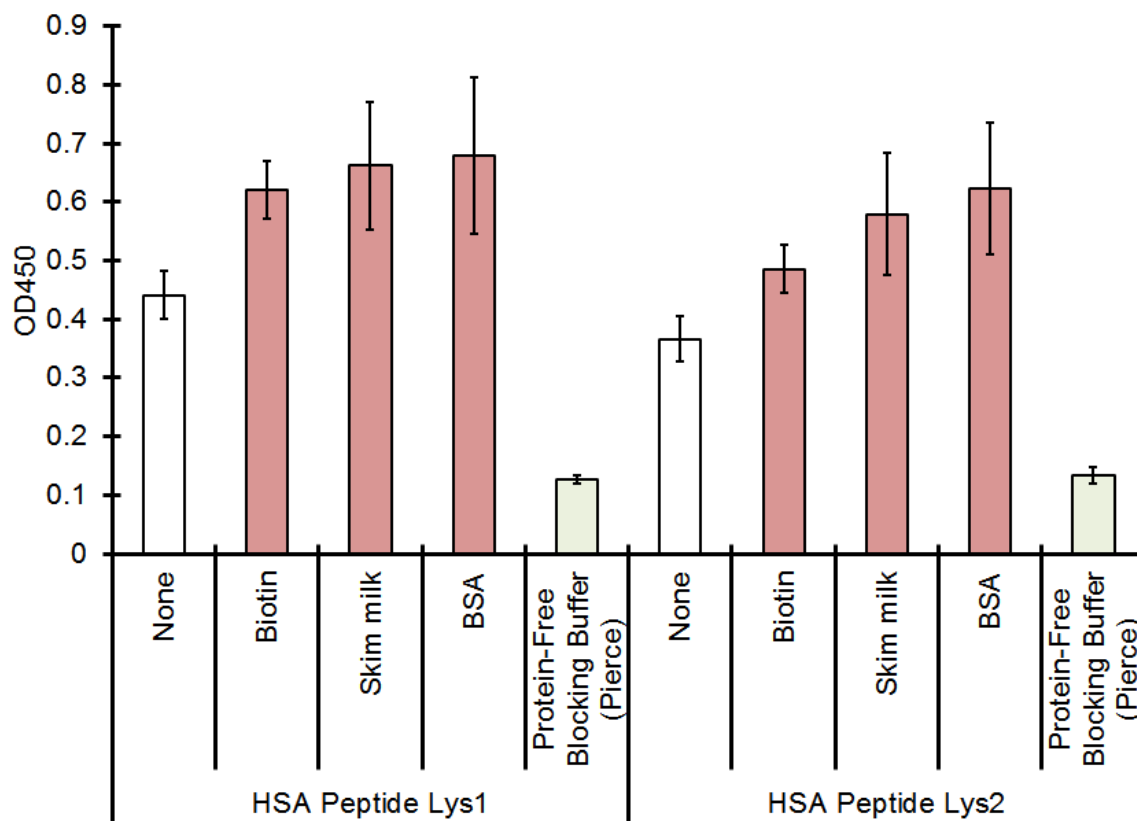


図 1 1. ELISA におけるブロッキング試薬の検討

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 μ 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。

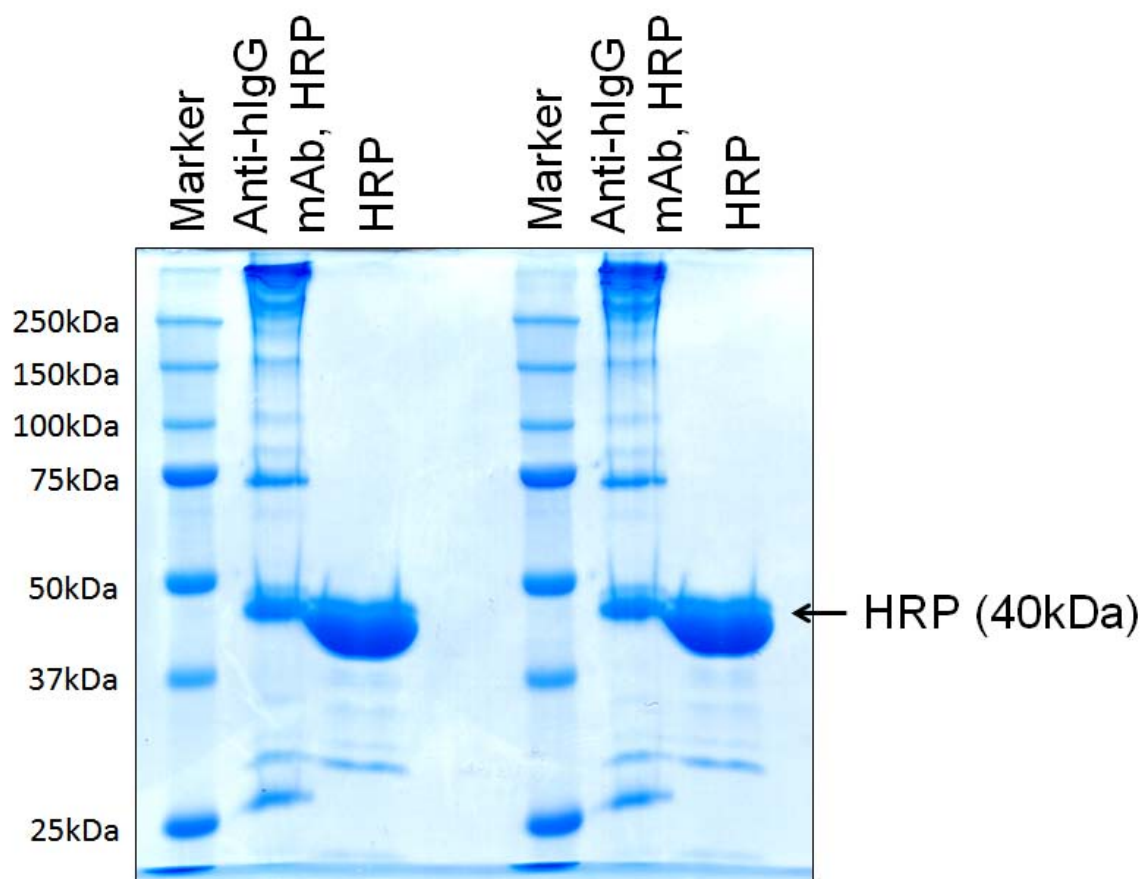


図 1 2 . HRP 修飾抗体の SDS-PAGE

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。

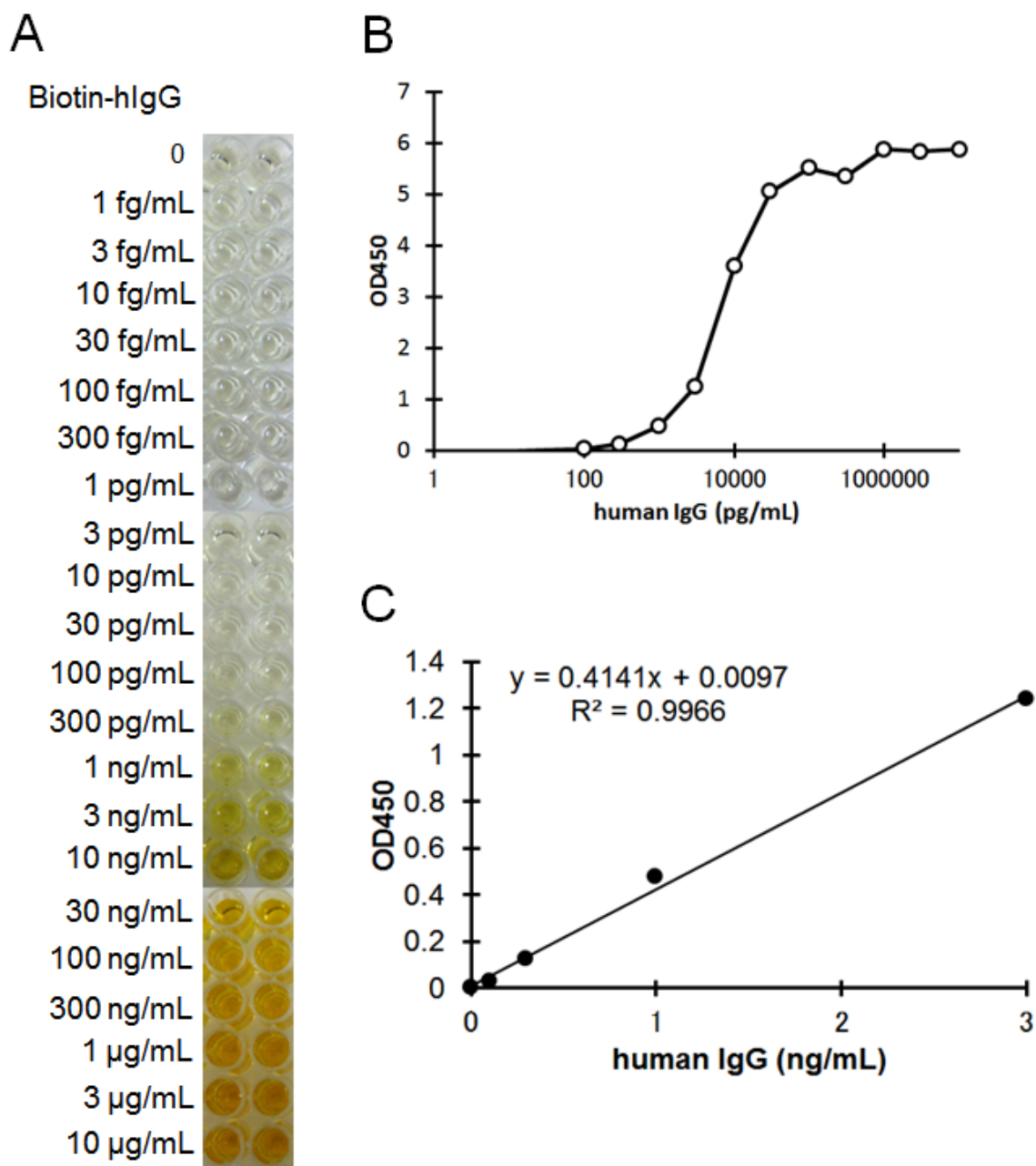


図 1 3. ビオチン化ヒト IgG を用いた検量線の作成

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。

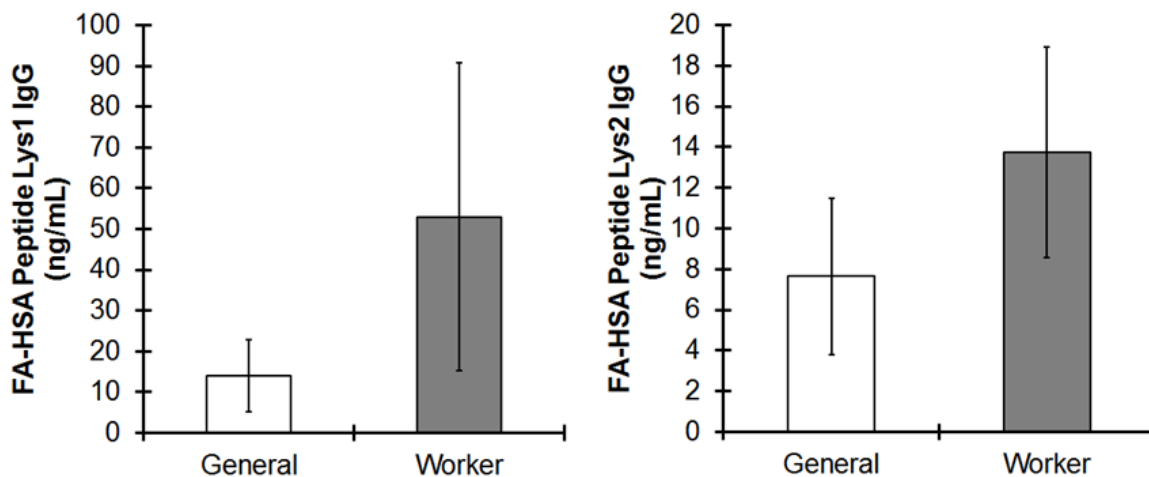


図1 4. ヒト血清中抗 FA-HSA Peptide Lys 抗体の定量

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 FA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 FA-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。

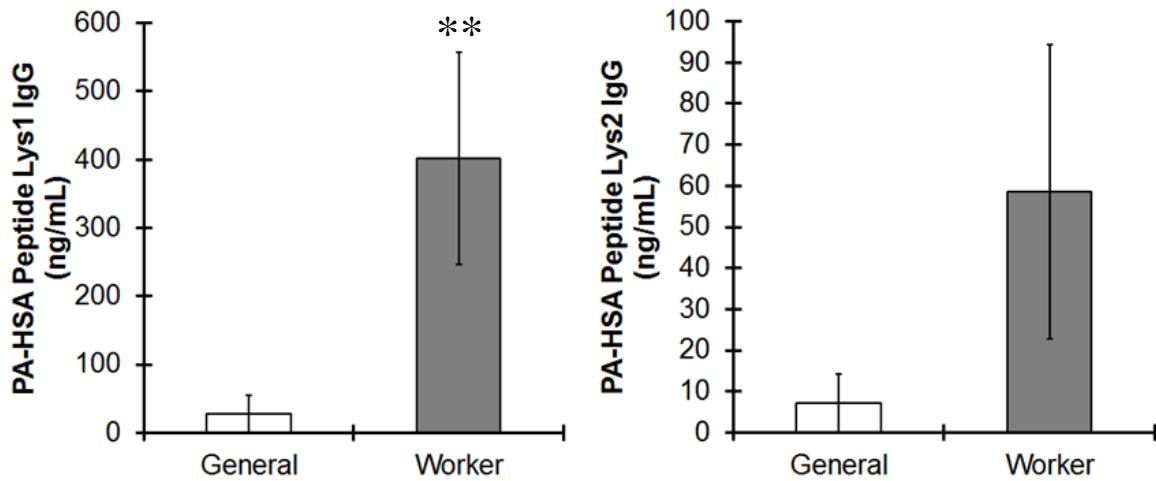


図15. ヒト血清中抗 PA-HSA Peptide Lys 抗体の定量

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 PA-HSA peptide Lys1 抗体と抗 PA-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 1. 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

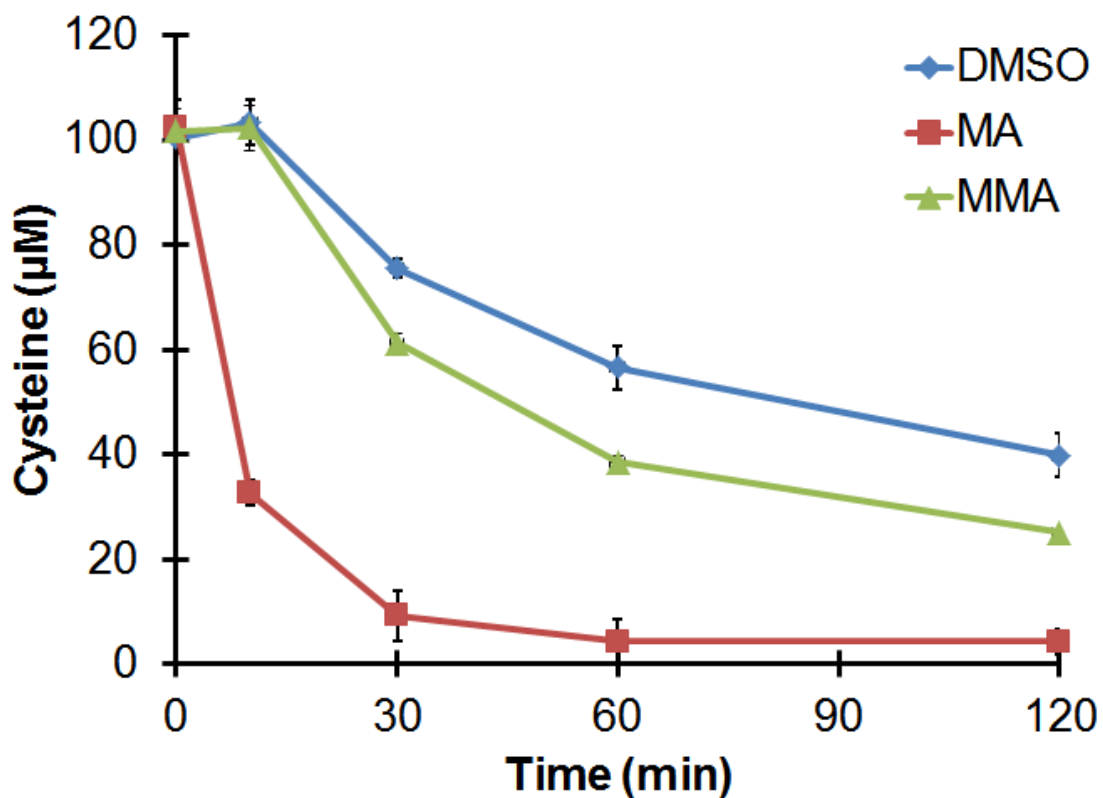


図16. HSA peptide Cys34 と MA、MMA との反応

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。

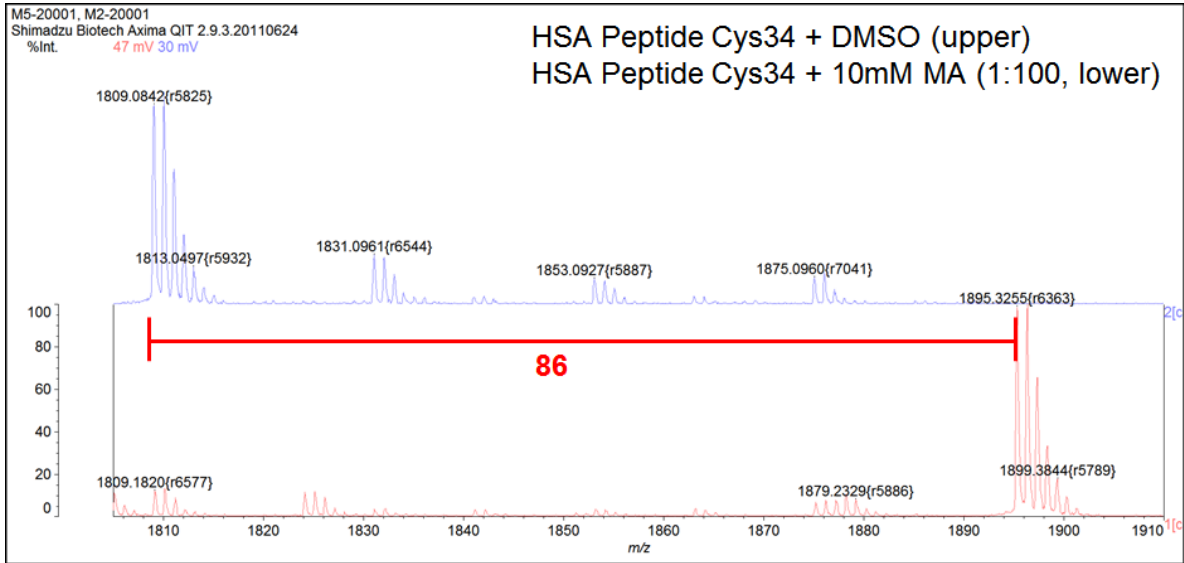


図 17. HSA Peptide Cys34 と MA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Cys34 を 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。

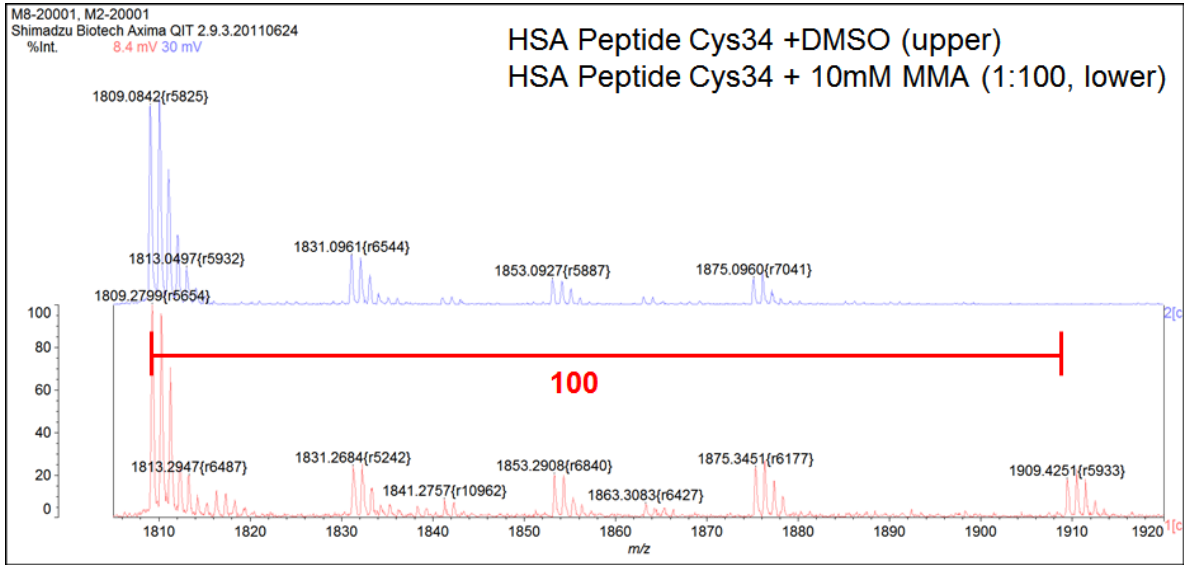


図 1 8 . HSA Peptide Cys34 と MMA との付加体の MS スペクトル

HSA Peptide Cys34 を 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。

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
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

労災疾病臨床研究事業補助金
平成 28 年度 総括・分担研究報告書

**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**

2017 年（平成 29 年） 3 月

研究代表者 辻 真弓
〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1
産業医科大学医学部産業衛生学講座
TEL 093-691-7243
FAX 093-691-9341