

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510036

研究課題名（和文）樹脂（プラスチック）原料への感作状況に関する実態調査

研究課題名（英文）Investigation on sensitized status to plastic resin materials

研究代表者

川本 俊弘（KAWAMOTO TOSHIHIRO）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60177748

研究成果の概要（和文）：樹脂（プラスチック）原料のヒト血清アルブミンへの付加体に対する血清中特異的抗体の検出法を開発した。この検出法を用いて100名の女性の抗体の保有率を調べたところ、一部の化学物質に対する特異的IgGの陽性率は非常に高かった。また、アレルギー性皮膚炎患者の症状と原因化学物質に対する抗体価の間に相関を認めた。以上の結果からアレルギー一発症に化学物質特異的抗体が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to verify a hypothesis that recent increase of allergy patients is partly explained by antibodies against plastic resin materials. A new method to detect serum antibodies against plastic resin materials were developed by using western-dot blotting. Among 100 women, the positive rates of IgG against phthalic anhydride and glutaraldehyde were very high. That against toluene 2,4-diisocyanate was around 50%, and those against bisphenol A diglycidyl ether, p-phenylenediamine and formaldehyde were very low. The antibody titers against the causal chemical were related to the severity of allergies. From this study, it is suggested that antibodies against plastic resin materials related the onset of allergies.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境影響評価・環境政策

キーワード：健康影響評価、アレルギー、樹脂

1. 研究開始当初の背景

近年、アレルギー疾患（気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎）の有病率

は厚生省が1992～1996年に行った「アレルギー疾患の疫学に関する研究」によると小中学生で32.6%、成人で30.6%であり、その後も増加の一途をたどっている。この原因と

して、化学物質曝露、食事の西洋化、衛生仮説（小児期に細菌感染を受けてない）などが言われているが、いずれも近年の環境変化を反映したものである。一方、我々の身の回りは新規の化学物質で囲まれているといっても過言ではない。特にプラスチック製品が非常に多くなっている。具体的には建材、家具、日用品、文房具、印刷・コピーのインク、洋服など多岐に渡っており、プラスチックの普及がアレルギーの増加と関連しているのではないかと考えた。

樹脂（プラスチック）原料は重合するために一分子あたり2つの反応基を有しているが、反応性が非常に高いため体内に入れば生体内蛋白質と共有結合し、蛋白質の3次構造も容易に変える。そこで、われわれは、化学物質と血清アルブミンの結合性を調べることからその物質の感作性を予測できると考え、化学物質の感作性のスクリーニング法を開発した（特許出願公開番号：2006-220518）。さらに、この3次構造の変化した生体内蛋白質がアレルギーの原因となっているならば、この化学物質結合蛋白質を診断用抗原として特異的抗体（IgE 及び IgG）を調べれば、環境中化学物質によるアレルギー疾患の診断と原因物質の同定が同時にできると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、近年増加しているアレルギーの原因の一つとして、「樹脂（プラスチック）原料が生体内蛋白質と結合し抗原性を生じ、ヒトの体の中でこれに対する特異的抗体（IgEおよびIgG）が産生されているためではないか」という仮説を立て、それを検証することを目的とする。まず、蛋白質-樹脂（プラスチック）原料付加体に対する患者血清中の特異的抗体を検出する方法を開発する。続いて、この検出法を用いて、様々な集団（学生、職域、年齢層など）における樹脂（プラスチック）原料に対する特異的抗体の存在を調べ、樹脂による感作の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

樹脂（プラスチック）原料とヒト血清アルブミン（HSA）を反応させた診断用抗原を作製し、これを利用した血清中特異的抗体（IgEおよびIgG）の検出法を確立する。続いて一般の集団から採血を実施し、血清中の樹脂（プラスチック）原料に対する特異的抗体の保有率を明らかにする。

(1) 化学物質に対する特異的抗体（IgE および IgG）の検出法の確立

ウレタン樹脂、エポキシ樹脂、アクリル樹

脂などの原料であるトルエン 2,4-ジイソシアネート（TDI）、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）、グルタルアルデヒド（GA）、p-フェニレンジアミン（PEA）を対象化学物質とした。

上記対象化学物質と HSA を 37°C で 48 時間インキュベートする。その際バッファーの pH や、樹脂（プラスチック）原料と HSA の混合比を変えて種々の付加体を作製した。

続いて、作製した HSA-樹脂（プラスチック）原料付加体反応液を診断用抗原としてニトロセルロース膜にスポットし、アレルギー患者の血清と反応させ、さらに標識した抗ヒト IgE 抗体あるいは抗ヒト IgG 抗体（2次抗体）を用いて、血清中の特異的抗体の有無を検出する。

さらに、ニトロセルロース膜に診断用抗原と同時に種々の濃度の Human IgG をスポットし、発光強度を比較することにより特異的抗体を定量する方法を開発する。

(2) 樹脂（プラスチック）原料への感作状況に関する実態調査

北九州市およびその近隣の市町村に在住する妊婦10名に対して、病院（診療所）にてインフォームド・コンセントを得たのちに質問票調査および血液の収集を行った。調査時期は妊娠初期から中期である。血清分離後に（1）で確立した方法を用いて樹脂（プラスチック）原料に対する抗体（IgG）の測定を行った。

(3) 抗体価とアレルギー症状の関係について

エポキシ樹脂を取り扱う作業に従事する作業員で作業によるアレルギー性皮膚炎を有する者10名と同じ化学物質を取扱いながらアレルギー症状を有しない健常者9名を対象にインフォームド・コンセントを得たのちに採血を行った。皮膚炎はその程度により（+）～（+++）の3段階に分けた。健常者は（-）とした。作業に用いている製剤（主剤）をHSAに加え、診断用抗原を作製し、（1）で確立した方法を用いて製剤に対する免疫グロブリン（IgG）の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 化学物質に対する特異的抗体（IgE および IgG）の検出法の確立

① ヒト血清アルブミン（HSA）の純度について

診断用抗原が非特異的に抗ヒトIgG抗体（2次抗体）と反応することがわかった。この理由について検討したところ、診断用抗原作製に用いたヒト血清アルブミン（HSA）の純度が低く、免疫グロブリンが混入しているためと判明した。そこでグロブリン・フリーのHSAを用いることにより問題を解決した。

② 色素による化学発光への影響

ドット・プロットにおいて作業能率向上と取り違い防止のために添加していた色素（BPB: Bromophenol blue）が化学物質付加HSAの抗原性を修飾することがわかった。そこでBPB濃度を最小限とすることにより、BPBによる抗原性修飾を無視できるレベルに下げた。

③ 半定量化

ウェスタンドットプロットのメンブランを用い、ドットの発光強度を半定量化することで、標準化システムを開発できないか検討した。

(i) 標準曲線の作成

最初に種々の濃度（25 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.76 $\mu\text{g/ml}$ ）のHuman IgGを標準物質としてメンブランにスポットし（各スポットは 0.5 μl ）、抗 human IgG-HRP 抗体で処理した後、基質と反応させ、それぞれのドットの発光強度を定量した。図1に示すように、濃度依存的に発光強度が測定できた。またスポットによる実験誤差（縦に同じ濃度をトリPLICATEでスポットしている）も少ないことが示された。

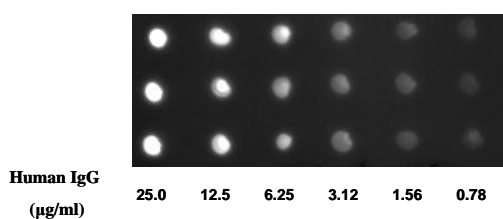


図1 Human IgG をスポットしたメンブランのキャプチャー像

各スポットの発光強度の実測値の平均が図2上のテーブルである。このテーブルをグラフにプロットしたものが図2下である。このグラフの近似曲線を解析すると $y = 0.1805 \times \text{Exp}(0.0002 \times \text{density})$ という式になった。Density は発光強度の実測値で、yは抗原特異的なIgGの濃度である。R2乗は0.98であった。

| $\mu\text{g/ml}$ | density |
|------------------|---------|
| 25.0 | 31522 |
| 12.5 | 26983 |
| 6.25 | 25232 |
| 3.12 | 17774 |
| 1.56 | 13058 |
| 0.78 | 10424 |

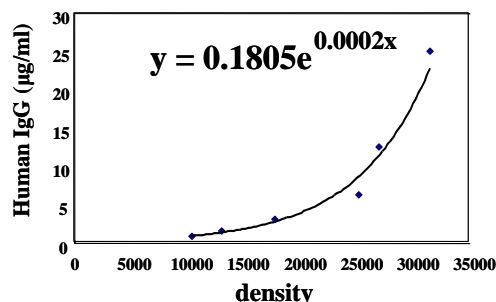


図2 Human IgGを用いた標準曲線の作成

(ii) メンブラン上のスポットの構成

化学物質処理した抗原をメンブランにスポットし、ウェスタンドットプロットを行った（図3）。化学物質に対する特異的抗体が血清中に存在すると化学発光が認められる。下部のPositive controlには半定量用にHuman IgGをスポットしている。

以上により、信頼性および再現性の高い樹脂（プラスチック）原料曝露の評価方法が確立できた。

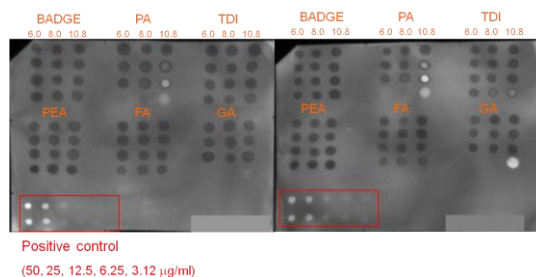


図3 ドットプロット法による化学物質に対する特異的抗体の検出

(2) 樹脂(プラスチック)原料への感作状況に関する実態調査

PAとGAに対する特異的IgGの陽性率は非常に高かった。TDIに対する特異的IgGの陽性率はおよそ50%であった。一方、BADGE、PEA、FAに対する抗体の陽性率は低かった（図4）。

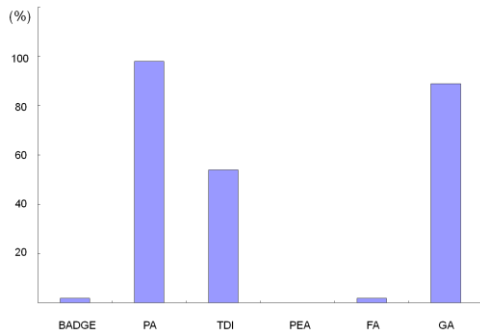


図4 各樹脂（プラスチック）原料に対する特異的抗体（IgG）の陽性率

(3) 抗体価とアレルギー症状の関係について

取り扱い製剤（主剤）をHSAに加えた診断用抗原を用いてドットプロット法で得られた発光強度を、それぞれのメンブランの標準曲線から換算し、抗原（化学物質）特異的IgG濃度を定量した。一方、アレルギーの程度を皮膚所見により4段階に分けた。3人がアレルギー+++、5人がアレルギー++、3人がアレルギー+、9人がアレルギー症状なし、という結果であった。+が多いほど、アレルギー症状が強いことを表している。図5の縦線は平均±SDを表している。コントロール群に対してt-testを行ったところ、アレルギー+++群とは $p = 0.0047$ 、アレルギー++群とは $p = 0.0065$ 、アレルギー+群とは $p = 0.13$ と、アレルギー+++群とアレルギー++群はコントロール群に対して特異的抗体が有意に高いことが認められた。

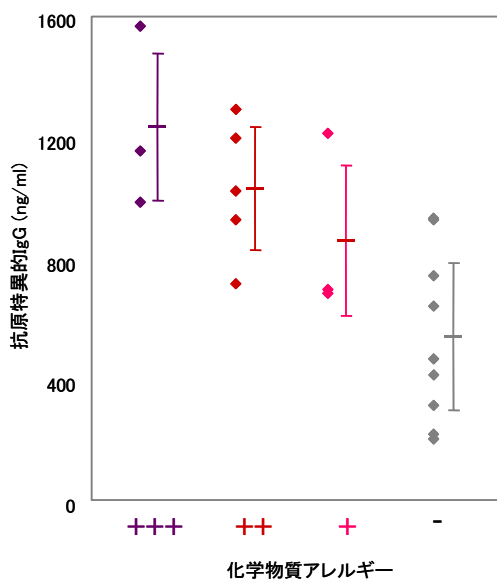


図5 皮膚所見と特異的IgG

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Tsukimori K, Morokuma S, Hori T, Takahashi K, Hirata T, Otera Y, Fukushima K, Kawamoto T, Wake N. Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 査読有、39(1): 83-90. 2013. DOI:10.1111/j.1447-0756.2012.01906.x
- ② Wang Z, Suda M, Ohtani K, Mei N, Kawamoto T, Nakajima T, Wang RS. Differential genotoxic effects of subchronic exposure to ethyl tertiary butyl ether in the livers of *Aldh2* knockout and wild-type mice. *Arch Toxicol*. 査読有、86: 675-682, 2012. DOI 10.1007/s00204-011-0779-x
- ③ Oyama T, Uramoto H, Kagawa N, Yoshimatsu T, Osaki T, Nakanishi R, Nagaya H, Kaneko K, Muto M, Kawamoto T, Tanaka F, Gotoh A. Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer related to exogenous chemical metabolism. *Frontiers in Bioscience*. 査読有、S4: 1539-1546, 2012.
- ④ Tsuji M, Vogel CFA, Koriyama C, Akiba S, Katoh T, Kawamoto T, Matsumura F. Association of serum levels of polychlorinated biphenyls with IL-8 mRNA expression in blood samples from asthmatic and non-asthmatic Japanese Children. *Chemosphere*. 査読有、87(11):1228-1234, 2012. DOI:10.1016/j.chemosphere.2012.01.022.
- ⑤ Yu H-S, Oyama T, Matsuda T, Isse T, Yamaguchi T, Tanaka M, Tsuji M, Kawamoto T. The effect of ethanol on the formation of N2-ethylidene-dG adducts in mice: Implications for alcohol-related carcinogenicity of the oral cavity and esophagus. *Biomarkers*. 査読有、17(3):269-274, 2012. DOI: 10.3109/1354750X.2012.666675
- ⑥ Lee HS, Isse T, Kawamoto T, Woo HS, Kim

- AK, Park JY, Yang M. Effects and Action Mechanisms of Korean Pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Shingo) on Alcohol Detoxification. *Phytother Res.* 査読有、26(11): 1753-1758, 2012.
DOI: 10.1002/ptr.4630.
- ⑦ Tsuji M, Kawamoto T, Koriyama C, Matsumura F. IL-22 mRNA expression in blood sample as a useful biomarker for assessing the adverse health effects of PCBs on allergic children. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 査読有、9:4321-4332, 2012
DOI 10.3390/ijerph9124321.
- ⑧ Ogawa M, Suzuki Y, Endo Y, Kawamoto T, Kayama F: Influence of coffee intake on urinary hippuric acid concentration. *Industrial Health.* 査読有、49:195-202, 2011.
- ⑨ Shimizu Y, Sakai A, Menuki K, Mori T, Isse T, Oyama T, Kawamoto T, Nakamura T. Reduced bone formation in alcohol-induced osteopenia is associated with elevated *p21* expression in bone marrow cells in aldehyde dehydrogenase 2-disrupted mice. 査読有、*Bone.* 48: 1075-1086, 2011.
- ⑩ Weng Z, Suda M, Katsumi Ohtani K, Mei N, Kawamoto T, Nakajima T and Wang R-S. *Aldh2* Knockout Mice Were More Sensitive to DNA Damage in Leukocytes due to Ethyl Tertiary Butyl Ether Exposure. *Industrial Health.* 査読有、49: 396-399, 2011.
- ⑪ Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Hirata K, Shimizu T, Wang R-S, Suda M, Kawamoto T, Nakajima T, Kawada T. Effects of subchronic inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on splenocytes in mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology.* 査読有、24: 837-847, 2011.
- ⑫ Kawamoto T, Pham TTP, Matsuda T, Oyama T, Tanaka M, Yu H-S, Uchiyama I. Historical review of development of environmental quality standards and guideline values for air pollutants in Japan. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 査読有、214:296-304, 2011.
- ⑬ Kim YD, Eom SY, Zhang YW, Kim H, Park JD, Yu SD, Lee CH, Arashidani K, Kawamoto T, Kim H. Modification of the relationship between urinary 8-OHdG and hippuric acid concentration by GSTM1, GSTT1, and ALDH2 genotypes. *Human Experimental Toxicology.* 査読有、30(4): 338-342, 2010
- ⑭ Oyama T, Nagayoshi H, Matsuda T, Oka M, Isse T, Yu H-S, Pham TTP, Tanaka M, Kagawa N, Kanako K, Kawamoto T: Effects of acetaldehyde inhalation in mitochondrial aldehyde dehydrogenase deficient mice (*Aldh2*^{-/-}). *Frontiers in Bioscience E2*, 査読有、1344-1354, 2010.
- ⑮ Ma H, Yu L, Byra EA, Hu N, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Ren J. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethano-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. *Journal fo Molecular and Cellular Cardiology.* 査読有、49(2):322-329, 2010.
- ⑯ Yu H-S, Oyama T, Isse T, Kitagawa K, Pham TTP, Tanaka M, Kawamoto T. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. *Chemico-Biological Interactions.* 査読有、188: 367-375. 2010.
- ⑰ Pham TTP, Isse T, Yu H-S, Oyama T, Tanaka M, Kawamoto T. Comparison between the Local Lymph Node Assay and Tryptophan Fluorescence Assay. *Journal of Preventive Medicine.* 査読有、5(3):3-8, 2010.

[学会発表] (計 27 件)

- ① 川本俊弘、辻 真弓、余 旭勝: 樹脂(プラスチック)原料に対する特異的抗体の検出. 第12回分子予防環境医学研究会. 平成25年2月1日~2日. つくばサイエンス・インフォメーションセンター (つくば)
- ② 余 旭勝、辻 真弓、吉田安宏、田中政幸、川本俊弘: 化学物質曝露による特異的抗体の検出に関する研究. 第30回産業医科大学学会. 平成24年10月20日~21日. 産業医科大学ラムツイーニ・ホール (北九州)
- ③ Kawamoto T. Pilot studies in JECS. Japan Environmental and Children's

- Study (JECS) International Symposium in Kitakyushu, Japan. Feb. 28, 2012 Kitakyushu, Japan.
- ④ Kawamoto T, Kayama F, Morokuma S, Katoh T, Toda E, Hayashi N, Ohya Y, Satoh H. The Pilot Study for Japan Environment and Children's Study (JECS) Internatioanl Society for Environmental Epidemiology 24rh Annual Conference (ISEE 2012), Aug. 26-30, 2012. Columbia, SC, USA.
- ⑤ Kawamoto T, Kayama F, Morokuma S, Katoh T, Toda E, Hayashi N, Ohay Y, Satoh H. The Pilot Study for Japan Environment and Children's Study (JECS). International Society for Exposure Sciences (ISES). 22nd Annual Meeting. Oct. 28-Nov. 1, 2012. Seattle, WA, USA.
- ⑥ Kawamoto T, Yu H-S, Pham TTP, Tanaka M, Askew DJ, Shibata E, Isse T, A quantitatively prediction of the sensitizing potentials by measuring tryptophan fluorescence. The 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox) Aug 28-31, 2011. Paris, France.
- ⑦ Kawamoto T, Yu H-S, Oyama T, Tanaka M, Anan A, Kawamoto R, Uchiyama I. Establishment of EQSs and Guideline Values for Plastic Resins (vinyl chloride monomer) and Other Hazardous Air Pollutants. The 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox) Aug 28-31, 2011. Paris, France.
- ⑧ Kawamoto T, Tsukamoto N, Tanto M, Nitta H, Murata K, Kayama F, Kishi R, Satoh H. Japan Environment and Children's Study (JECS). In a symposium; Longitudinal Birth Cohort Studies in Asia (chaired by Kawamoto T and Chen P-C). ISES-ISEE2010 (2010 Joint Conference of International Society of Exposure Science & International Society for Environmental Epidemiology. Aug. 28-Sep.1, 2010. Seoul, Korea.
- ⑨ 川本俊弘、市場正良：生物学的モニタリング・ハ
イマーカー研究会の活動と成果。シンポジウ
ム「有機溶剤中毒・生物学的モニタリング・ハ
イマーカー 研究の未来－産業現場と研究の
接点を求めて－」。日本産業衛生学会 第
38回有機溶剤中毒研究会・第43回生物学

的モニタリング・ハイマーカー研究会 合同研究会。
平成22年10月9日～10日。サンプラザ・シ
ーズンズ (名古屋)

〔図書〕 (計2件)

- ① Nriagu JO, Kacew S, Kawamoto T, Patz JA, Rennie DM. Encyclopedia of Environmental Health. Vol. 1-5, 全ページ、Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 2011. ISBN: 978-0-444-52273-3
- ② 川本俊弘：Ⅲ-3 曝露・影響評価と生物学的モニタリング。分子予防環境医学研究会編：分子予防環境医学 改訂版。(株)本の泉社。東京。改訂版第1刷 平成22年12月1日 p559-567

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：合成樹脂原料モノマーまたは合成樹脂前駆体への曝露の検出法
発明者：川本俊弘・吉田安宏・一瀬豊日
権利者：産業医科大学
種類：特許出願
番号：特願 2011-033755
出願年月日：2011年2月18日
国内外の別：国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
川本俊弘 (TOSHIHIRO KAWAMOTO)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：60177748
- (2) 研究分担者
小山倫浩 (OYAMA TSUNEHIRO)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00309965
(平成22年度のみ)
田中政幸 (TANAKA MASAYUKI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：80412633
(平成22、23年度)
辻 真弓 (TSUJI MAYUMI)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：40457601
(平成23、24年度)
- (3) 連携研究者
なし