

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2006 ～ 2009  
課題番号：18390187  
研究課題名（和文） 環境中感作性物質に対する特異抗体検出法の開発と感作状況に関する実態調査  
研究課題名（英文） Development of a method to detect specific antibodies against environmental sensitizers and actual survey on sensitizing status  
研究代表者  
川本 俊弘 (KAWAMOTO TOSHIHIRO)  
産業医科大学・医学部・教授  
60177748

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：アレルギー、蛋白質付加体、プロテオミクス、環境化学物質、質量分析、免疫グロブリン

#### 1. 研究計画の概要

化学物質が感作性を有するメカニズムの一つとして、化学物質（ハプテン）が生体内蛋白等と結合して抗原性を獲得することが知られている。

そこで申請者らは、本研究において

- (1) 化学物質と生体内蛋白との結合体を作製し、これを診断用抗原として特異的抗体 (IgE および IgG) を検出する方法を確立し、アレルギー原因物質の同定を可能にする。
- (2) 化学物質結合蛋白の三次元構造の特徴を、最新のプロテオミクスの技術を用いて解析し、化学物質の構造式からその化学物質の感作性を予測できるようにする。
- (3) 環境中化学物質への感作の実態（それぞれの化学物質に対して特異的抗体を有しているヒトの割合）を明らかにする。
- (4) アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 欠損者（お酒を飲むと顔が赤くなり、頭痛・動悸などの不快な症状を呈するヒト）のモデル動物である *Aldh2* ノックアウトマウスを用いて、遺伝的素因によるアレルギー発症の差を明らかにする。

について検討を行った。

#### 2. 研究の進捗状況

- (1) 化学物質-HSA 付加体はその反応（混合）条件により、抗原性が異なることがわかった。化学物質-HSA 付加体を診断用抗原としたヒト（患者）の特異抗体検出では、ELISA はバックグラウンドが高く、ドットプロット法や、蛍光標識抗体の使用などの改良が必要であ

ることも分かった。

(2) 感作性化学物質を反応させた HSA では蛍光強度が低下し、その低下度から化学物質の感作性の強さを定量する方法を開発することに成功し、特許出願を行った（特願 2008-120130）。グルタルアルデヒド、トルエンモノイソシアネートの HSA の結合部位を MALDI-TOF/MS により解析した。両化学物質ともに HSA との結合部位は主にリジン、アルギニン残基であることが明らかになったが、結合するリジン、アルギニン残基の位置は両物質で異なることがわかった。

(3) 職業性喘息患者の血清を用いて Western blot を行うと、無水フタル酸で処理した HSA と TDI で処理した HSA に対する反応を認め、この患者は無水フタル酸と TDI に対する特異的抗体を有していることがわかった。この結果から、我々の開発した方法が環境中化学物質に対する特異抗体検出に有効であることがわかった。病院・診療所・ホームページにて、化学物質アレルギー（気管支喘息、アレルギー性皮膚炎等）患者および健康正常者へ研究協力を求めたところ、平成 21 年 3 月の段階で約 50 名の登録を終了した。

(4) *Aldh2* (アルデヒド脱水素酵素 2) ノックアウトマウス (*Aldh2*<sup>-/-</sup>) およびその野生型マウス (*Aldh2*<sup>+/+</sup>) にアセトアルデヒドを吸入曝露し、鼻粘膜・肺・背部表皮の組織像および DNA 付加体を調べたところ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>の方が *Aldh2*<sup>+/+</sup> より感受性が高く、ALDH2 不活性型の人（日本人の約半数）は ALDH2 活性型の

人よりもアセトアルデヒド感受性が高い可能性があると考えられた。

### 3. 現在までの達成度

#### ②おおむね順調に進展している

- (1) 化学物質に対する特異的抗体を検出する方法の開発では、診断用抗原の重要さがわかった。しかしこれまでの研究で抗原性が高くなる反応条件もわかっており、測定法の開発はあと一歩という段階まで到達している。
- (2) 「化学物質のアレルギー誘発能の簡便・迅速定量方法」の特許出願ができたことは大きな成果だった。また、感作性物質の蛋白質結合部位も明らかにすることができた。
- (3) 環境中化学物質への感作の実態の解明については、測定法の有用性も確認され、測定対象試料も順調に集まっている。
- (4) *Aldh2*ノックアウトマウスを用いた検討では、アルデヒド脱水素酵素2の遺伝子によるアセトアルデヒドへの感受性の差を組織像およびDNA付加体より明らかにし、おおむね研究目的は達成された。

### 4. 今後の研究の推進方策

- (1) 化学物質に対する特異的抗体を検出する方法の開発では、アレルギー患者の血液を用いて抗原性の高い診断用抗原を作製している。検出法では、蛍光標識抗体を利用したELISA法や、ドットプロット法を用いて改良に努める。
- (2) 二次元電気泳動とウェスタン・ブロットにより、抗原性が高いタンパク質スポットを取り出し、感作性を有する化学物質が共有結合をするアミノ酸サイトをMALDI-TOF/MSにより同定する分析する。
- (3) 化学物質アレルギー患者および対照者の血液中の化学物質への特異的抗体を測定し、我々が開発した検出法の感度・特異度を計算する。
- (4) *Aldh2*ノックアウトマウスを用いた検討結果からアルデヒド脱水素酵素2 (*ALDH2*)欠損者への外挿を試みる。

### 5. 代表的な研究成果

(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13件)

1. Kawamoto T, Yang M, Kim Y-D, Kim H, Oyama T, Isse T, Matsuno K, Katoh T, Uchiyama I.: Effects of lifestyle on urinary 1-hydroxypyrene concentration. *Journal of Occupational Health*. 49: 183-189, 2007. 査読有

2. Murakami T, Oyama T, Isse T, Ogawa M,

Sugie T, Kawamoto T.: International comparison of criteria for evaluating sensitization of PRTR-designated chemical substances. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 12: 56-65, 2007. 査読有

3. 小川真規、西中川秀太、横沢冊子、後藤浩之、川本俊弘、圓藤陽子: ホルムアルデヒドへのアレルギーを主症状としたシックハウス症候群の1例. *産業衛生学雑誌*. 50: 83-85, 2008. 査読有

[学会発表] (計19件)

1. Kawamoto T, Oyama T, Isse T, Pham TTP: An electrophoretic study on covalent bindings of sensitizing chemical substances to albumin. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology. Seattle, USA, Mar. 16-20, 2008.

[図書] (計4件)

1. Kawamoto T, Wada O: Chapter 10. Biological Monitoring: ~Nation-wide practice and future directions~. In: Irma C. Willis editor. Progress in Environmental Research. Nova Science Publishers; Inc. New York. 2007, 279-293.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 化学物質のアレルギー誘発能の簡便・迅速定量方法  
発明者: 川本俊弘  
権利者: 産業医科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-120130  
出願年月日: 平成 20 年 5 月 2 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ

[http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/eiseigak/intro\\_j.html](http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/eiseigak/intro_j.html)