

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340064

研究課題名(和文) 化学物質特異的抗体の健康影響マーカーとしての意義とそのエピソード

研究課題名(英文) Significance of specific antibodies against chemical substances as health effect markers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：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結合体に対する化学物質特異的抗体(IgG)の半定量法を開発した。本半定量法の再現性は90%以上であり、信頼性および再現性の高い測定法と考えた。化学物質特異的抗体以外の既存のアレルギーのマーカーはエポキシ樹脂による皮膚炎の有無との間に関係が認められなかった。化学物質アレルギー患者の化学物質特異的抗体は、いずれの化学物質-ヒト血清アルブミン結合体とも反応していた。

研究成果の概要(英文)：研究成果の概要(英文)：A new method to semi-quantitatively measure serum antibodies against plastic resin materials were developed by using western-dot blotting. The method was highly reproducible and reliable. Existing allergy markers other than the serum antibodies against plastic resin materials were not related to the dermatitis caused by epoxy resins. The antibodies from chemical allergy patient reacted with all chemico-human serum albumin complexes.

研究分野：産業衛生 環境保健

キーワード：環境 アレルギー 健康影響評価委 特異的抗体 化学物質 タンパク質 プラスチック 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)の増加に化学物質が関与していると指摘されているが、申請者はその原因として「化学物質(特に樹脂(プラスチック)原料)が生体内蛋白質と結合して抗原性を生じ、体内でこれに対する特異的抗体(IgGおよびIgE)が産生されているためではないか」という仮説を立てた。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次構造も容易に変化させる。そこで、研究代表者はこの3次構造の変化した化学物質-HSA結合体を診断用抗原として化学物質特異的抗体(IgG及びIgE)の検出法を考案した。

## 2. 研究の目的

本研究では化学物質特異的抗体の健康影響マーカーとしての意義とそのエピトープを明らかにするため、以下の3つの検討を行う。

(1) 化学物質特異的抗体(IgG)測定の半定量化と再現性の検討

ニトロセルロース膜に診断用抗原と同時に種々の標準濃度のHuman IgG(スタンダード)をスポットし、HSA-樹脂(プラスチック)原料結合体反応液と調査対象者の血清との反応による発光強度とスタンダードの発光強度とを比較することにより特異的抗体量を半定量する方法を開発する。

さらに、独立した3日間に同じ測定を繰り返して再現性の検討を行う。

(2) 化学物質特異的抗体とアレルギー症状についての検討

化学物質に対してアレルギー症状を有する者と有しない者を対象として、血清中特異的抗体、およびその他のアレルギーに関するマーカーを調べる。また、一般集団を対象に化学物質特異的抗体の保有状況を調べる

(3) 化学物質特異的抗体が認識するエピトープについての検討

化学物質がHSAと結合することによりできる化学物質-HSA結合体の中に化学物質特異的抗体が認識する結合体あるいは結合部があるかどうか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 化学物質特異的抗体(IgG)測定の半定量化と再現性の検討

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)の検出法の半定量化を行う。

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(P-PEA)を対象化学物質とした。

上記対象化学物質とHSAを37℃で48時間インキュベートする。その際バッファの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結合体を作製した。

続いて、作製したHSA-樹脂(プラスチック)原料結合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。

次に、ニトロセルロース膜に診断用抗原とスタンダードである4濃度(0, 1, 10, 100 ug/ml)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半定量する方法を開発した。

3人分の血清を用いて、判定者間の個人差に関する検討、日間差(同じ測定を3日間独立して行い、結果の一致度)を検討した。

(2) 化学物質特異的抗体とアレルギー症状についての検討

エポキシ樹脂によるアレルギー性皮膚炎を有する11名とその対照者9名を対象として、血清中の食物・吸入抗原26種に対する特異的IgE抗体および総IgE量、総IgG両、cortisol, IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-5, IL-4, IL-6, and the CD4/CD8比を測定した。

北九州市およびその近隣の住民に対して、インフォームド・コンセントを得たのち血液の収集を行った。血清分離後に(1)で検討した方法を用いて種々の樹脂(プラスチック)原料に対する抗体(IgG)の測定を行った。

(3) 化学物質特異的抗体が認識するエピトープについての検討

上記6種類の化学物質と反応させたHSA(化学物質-HSA結合体)をSDS-PAGEにより分離し、クマシー・ブルー染色により、HSAの三次構造の変化を調べる。さらに、化学物質に対してのアレルギーを有する患者の血清を用いてウェスタン・ブロットを行い、化学物質特異的抗体が結合する化学物質-HSA結合体を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 化学物質特異的抗体(IgG)測定の半定量化と再現性の検討

図1にヒト血清を用いたウェスタン・ドットプロットの結果を示した。血清中の化学物

質特異的 IgG の発光強度を HSA 溶液のスタンダード・スポットの発光強度と比較して、発光のないものを (-) 0~1.0 µg/ml の発光強度を (±) 1.0~10.0 µg/ml を (+) 10.0~100 µg/ml を (2+) 100 µg/ml 以上を (3+) と半定量を行った。

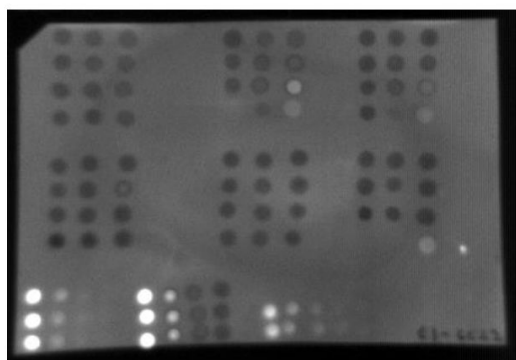
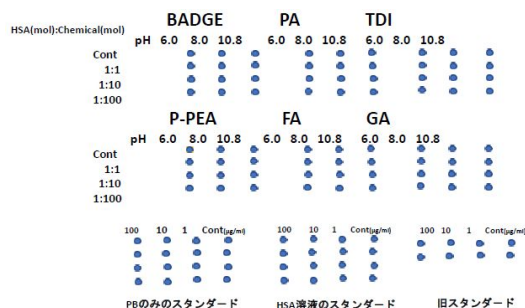


図1 血清中の化学物質特異的 IgG 測定と標準 IgG (スタンダード) の発光強度

表1 化学物質特異的抗体 (IgG) 測定の再現性試験結果

Between judges	Complete concordance	Acceptable concordance
BADGE	98.1%	100.0%
PA	81.5%	94.4%
TDI	90.3%	99.1%
P-PEA	100.0%	100.0%
FA	100.0%	100.0%
GA	92.2%	94.4%

Among measurements	Complete concordance	Acceptable concordance
BADGE	91.7%	97.5%
PA	79.2%	97.2%
TDI	91.7%	100.0%
P-PEA	94.4%	100.0%
FA	100.0%	100.0%
GA	90.0%	93.3%

この半定量の一致率を表1に示した。判定者間、あるいは3回(3日間)の繰り返し測定間で、(-) (±) (+) (2+) (3+) が完全に一致していたものを完全一致 (Complete concordance) とした。一方、(±) が、(-) あるいは (+) に判定された場合は許容可能と考え、許容可能な一致 (Acceptable concordance) とした。表1か

らもわかるようになりに高い一致率となった。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)原料特異的抗体測定法が確立できたと考えた。

## (2) 化学物質特異的抗体とアレルギー症状についての検討

樹脂(プラスチック)原料を取り扱う作業者について、作業内容とアレルギー症状の有無についての調査を行った。末梢血中の白血球数、白血球分画、血清中の非特異的IgE、吸入および食事アレルギーに対する特異的IgE、サイトカイン(IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6)、コルチゾール、総カルチニン、遊離カルチニン、アシルカルチニン、リンパ球サブセット(CD4, CD8, CD4/CD8比)を調べた。さらに上記と同じ方法で種々の化学物質に対する特異的IgEおよびIgGも調べた。樹脂(プラスチック)原料を取り扱う作業者の血清から種々の化学物質に対する特異的IgEは検出されなかった(検出感度以下)が、IgGは検出された。エポキシ樹脂によるアレルギー皮膚炎と化学物質特異的IgGとの関係が認められたが、皮膚炎症状の有無と、白血球数、白血球分画、非特異的IgE、吸入および食事アレルギーに対する特異的IgE、リンパ球サブセット(CD4, CD8, CD4/CD8比)との間には関係は認められなかった。

表2 吸入および食事アレルギーに対する特異的IgEについての比較

Dermatitis	Yes		No		
	Median	(Range)	Median	(Range)	
Nonspecific IgE (IU/mL)	84.3	(15.1 - 442)	76.6	(6.9 - 1,930)	n.s.
Dermatophagoides farinae	0.44	(0 - 68.3)	20.8	(0.24 - 99.9)	p<0.05
House dust	0.32	(0 - 3.43)	0.38	(0 - 19.1)	n.s.
Cat	0.16	(0 - 5.19)	0.23	(0 - 1.46)	n.s.
Dog	0.28	(0.07 - 0.56)	0.43	(0 - 24.1)	n.s.
Timothy grass	0.32	(0.16 - 18.4)	0.8	(0 - 99.6)	n.s.
Vernal grass	0.09	(0 - 12.7)	0.33	(0 - 75.3)	n.s.
Ragweed mix	0.06	(0 - 0.16)	0.02	(0 - 4.46)	n.s.
Mugwort	0.08	(0 - 1.93)	0	(0 - 96.4)	n.s.
Japanese cedar	0.72	(0 - 81.5)	0.65	(0 - 49.8)	n.s.
Penicillin	0	(0 - 0.07)	0	(0 - 2.38)	n.s.
Cladosporium	0	(0 - 0.25)	0.01	(0 - 2.08)	n.s.
Candida	0	(0 - 0.33)	0	(0 - 1.17)	n.s.
Alternaria	0	(0 - 0.12)	0	(0 - 0.77)	n.s.
Aspergillus	0.13	(0 - 0.32)	0.3	(0 - 3.99)	n.s.
Wheat	0	(0 - 0.1)	0	(0 - 1.56)	n.s.
Soy bean	0.05	(0 - 0.21)	0.02	(0 - 2.58)	n.s.
Rice	0.02	(0 - 0.14)	0	(0 - 2.93)	n.s.
Tuna	0.02	(0 - 0.26)	0.11	(0 - 1.26)	n.s.
Salmon	0.05	(0 - 0.23)	0.09	(0 - 0.59)	n.s.
Shrimp	0	(0 - 0.27)	0.18	(0 - 0.98)	p<0.05
Crab	0.04	(0 - 0.22)	0.13	(0 - 9.48)	n.s.
Cheddar cheese	0.01	(0 - 0.27)	0	(0 - 0.21)	n.s.
Milk	0.08	(0 - 0.42)	0	(0 - 1.13)	n.s.
Beef	0	(0 - 0.16)	0	(0 - 0.8)	n.s.
Chicken	0	(0 - 0.08)	0.01	(0 - 1.02)	n.s.
Egg white	0.12	(0 - 0.36)	0.08	(0 - 0.53)	n.s.

Significance was calculated using Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test  
\*: Lumicount by multiple allergen simultaneous test (MAST)-26 chemiluminescent assay systems

特異的抗体保有率を調査したプラスチック樹脂モノマーは、ビスフェノールAジグリシジルエーテル、無水フタル酸、トルエン-2,4-ジイソシアネート、p-フェニレンジアミン、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドの6物質であった。その結果、化学物質特異的IgG

の保有率は、無水フタル酸>グルタルアルデヒド>トルエン-2,4-ジイソシアネート>ビスフェノールAジグリシジルエーテル ホルムアルデヒド>p-フェニレンジアミンの順であった。

### (3) 化学物質特異的抗体が認識するエピトープについての検討

化学物質と反応させ化学物質-HSA結合体をSDS-PAGEにより分離したところ、HSA(コントロール)は分子量55,000付近にブロードなバンドとして認められたが、化学物質-HSA結合体は見かけの分子量が55,000よりも低いところに移動しているものや、二量体、三量体を形成していると考えられるものを認めた。さらに化学物質アレルギー患者の血清を用いたウェスタン・ブロット解析では、患者の化学物質特異的抗体は、いずれの見かけの分子量の化学物質-HSAとも反応した。

## 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15件)

Tsuiji M, Ayabe T, Tanaka R, Senji A, Shibata E, Araki S, Morokuma S, Sanefuji M, Kusuvara K, Kawamoto T. Comparative study on three different methods for arm-span measurement: the Japan environment and Children's study pilot. Environmental Health and Preventive Medicine 査読有 22:28, 2017 DOI 10.1186/s12199-017-0632-9  
Senju A, Suga R, Tsuiji M, Shibata E, Anan A, Yamamoto Y, Kusuvara K, Kawamoto T. Postal contact with participating children and its impact on response rate: Japan Environment and Children's Pilot Study. Pediatr Int. 査読有 58(12):1328-1332, 2016. DOI: 10.1111/ped.13019.  
Matsumoto A, Thompson D, Chen Y, Vasiliou V, Kawamoto T, Ichiba M. Heme oxygenase 1 protects ethanol-administered liver tissue in *Aldh2* knockout mice. Alcohol 査読有 52:49-54, 2016. DOI: 10.1016/j.alcohol.2016.02.004  
Ishihara Y, Tsuiji T, Kawamoto T, Yamazaki T. Involvement of reactive oxygen species derived from mitochondria in neuronal injury elicited by methylmercury. J. Clin. Biochem. Nutr. 査読有 59(3): 182-190, 2016 DOI: 10.3164/jcbrn.16-19  
Morokuma S, Shimokawa M, Kato K,

Sanefuji M, Shibata E, Tsuiji M, Senju A, Kawamoto T, Kusuvara K, Japan Environment & Children's Study Group. Relationship between hyperemesis gravidarum and small-for-gestational-age in the Japanese population: the Japan Environment and Children's Study (JECS). BMC Pregnancy and Childbirth 査読有 16:247, 2016. DOI: 10.1186/s12884-016-1041-6  
Tsuiji M, Koriyama C, Yamamoto M, Anan A, Shibata E, Kawamoto T. The association between maternal psychological stress and inflammatory cytokines in allergic young children. PeerJ 査読有 4:e1585, 2016. DOI: 10.7717/peerj.1585  
Michikawa T, Nitta H, Nakayama SF, Ono M, Yonemoto J, Tamura K, Suda E, Ito H, Takeuchi A, Kawamoto T, for the Japan Environment and Children's Study Group. The Japan Environment and Children's Study (JECS): a preliminary report on selected characteristics of approximately 10,000 pregnant women recruited during the first year of the study. J Epidemiol 査読有 25(6):452-458, 2015. DOI: 10.2188/jea.JE20140186  
Kawamoto T, Tsuiji M, Isse T. Comparison of IgG against plastic resin in workers with and without chemical dermatitis. BMC Public Health 査読有 15:930, 2015. DOI: 10.1186/s12889-015-2302-4  
Amanuma Y, Ohashi S, Itatani Y, Tsurumaki M, Matsuda S, Kikuchi O, Naka Y, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Whelan KA, Nakagawa H, Chiba T, Matsuda T, Muto M. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium. Sci Rep 査読有 5:14142, 2015 DOI: 10.1038/srep14142  
Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Satoh H and Working Group of the Epidemiological Research for Children's Environmental Health. Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). BMC Public Health 査読有 14:25, 2014 DOI: 10.1186/1471-2458-14-25

Matsumoto A, Vasiliou V, Kawamoto T, Tanaka K, Ichiba M. Ethanol reduces Lifespan, body weight and serum alanine aminotransferase level of aldehydde dehydrogenase 2 knockout mouse. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 査読有 38(7): 1883-1893, 2014 DOI: 10.1111/acer.12462

Weng Z, Ohtani K, Suda M, Yanagiba Y, Kawamoto T, Nakajima T, Wang R-S. Assessment of the reproductive toxicity of inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether in male mice with normal, low active and inactive ALDH2. *Arch. Toxicol.* 査読有 88(4):1007-21, 2014. DOI: 10.1007/s00204-014-1192-z

Aiko Y, Askew DJ, Aramaki S, Myoga M, Tomonaga C, Hachisuga H, Suga R, Kawamoto T, Tsuji T, Shibata E. Differential levels of amino acid transporters System L and ASCT2, and the mTOR protein in placenta of preeclampsia and IUGR. *BMC Pregnancy and Childbirth*. BMC Pregnancy & Children. 査読有14:181, 2014 DOI: 10.1186/1471-2393-14-181

Kwon HJ, Won YS, Park O, Chang B, Duryee MJ, Thiele GE, Matsumoto A, Singh S, Abdelmegeed MA, Song BJ, Kawamoto T, Vasiliou V, Thiele GM, Gao B. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology* 査読有 60(1):146-157, 2014. DOI: 10.1002/hep.27036.

Tsuji M, Aiko Y, Kawamoto T, Hachisuga T, Kooriyama C, Myoga M, Tomonaga C, Matsumura F, Anan A, Tanaka M, Yu H-S, Fujisawa Y, Suga R, Shibata A. Polychlorinated biphenyls (PCBs) decrease the placental syncytiotrophoblast volume and increase placental growth factor (PIGF) in the placenta of normal pregnancy. *Placenta* 査読有 34:619-623, 2013. DOI:10.1016/j.placenta.2013.03.007

[学会発表](計11件)

川本俊弘, 辻 真弓, 土屋卓人: プラスチック樹脂取扱者における皮膚炎. 第87回日本衛生学会 フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市). 平成29年3月26日~28日

Kawamoto T. Diagnostic significance of specific immunoglobulin G against

plastic resins. The 8<sup>th</sup> National Conference on Occupational and Environmental Diseases & The 1<sup>st</sup> International Conference on Occupational and Environmental Diseases. Bangkok(Thailand). Mar. 1-3, 2017.

Kawamoto T, Nitta H, Nakayama SF, Michikawa T, Suzuki K, Yamamoto-Harada K. Present status and preliminary results of JECS (Japan Environment and Children's Study) ISEE-ISES AC2016, Conference of International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science - Asia Chapter 2016. 北海道大学(北海道・札幌市) Jun. 26-29, 2016.

Kawamoto T. Preliminary results of the Japan Environment and Children's Study (JECS). 4<sup>th</sup> JECS International Symposium. 国連大学(東京都・渋谷区) Dec. 15, 2015.

Kawamoto T, Tsuji M, Tsuchiya T. Detection of Specific Immunoglobulin G Against Plastic Resin in Workers with Dermatitis. International Symposium of Environmental Science 25<sup>th</sup> Meeting. Henderson(U.S.A.), Oct. 18-22, 2015

川本俊弘: 環境中の化学物質と小児の健康 第29回日本医学会総会2015 関西京都大学百周年時計台記念館(京都府・京都市) 平成27年4月12日

Kawamoto T. Present status of JECS (Japan Environment and Children's Study) and its utilization as an individual researcher. International Symposium of Environmental Medicine. Taipei(Taiwan), Oct. 16-17, 2014.

Tsuji M, T Kawamoto T, Matsumura F. Challenges of Connecting Environmental Toxicology and the Epidemiology of Childhood Allergies. In; Fifty Years of Research and Mentoring: Symposium in Honor of Dr. Fumio Matsumura. 248<sup>th</sup> ACS National Meeting. San Francisco(U.S.A.), Aug. 10, 2014.

辻 真弓, 川本俊弘, Fumio Matsumura: 環境中化学物質が小児に与える影響の検討. 第41回日本毒性学会学術年会、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市) 平成26年7月2日~4日

Kawamoto T, Tsuji M. Specific antibodies against plastic resins. Conference of ISEE, ISES and ISIAQ. Basel(Switzerland), Aug. 19-23, 2013.

Kawamoto T, Tsuji M. Development of

evaluating methods for sensitizing chemicals by using chemico-protein adducts. The XIII International Congress of Toxicology. Seoul(Korea), Jun.30-Jul.4, 2013,

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(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

番号：特許第5757519号

取得年月日：平成27年(2015)年6月12日

国内外の別：国内

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

辻 真弓(TSUJI, Mayumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40457601