

厚生労働科学研究研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

生活環境汚染物質による小児での毒性評価の  
ための免疫指標の開発に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 吉田貴彦

平成15（2003）年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究・・・ 1

吉田貴彦

## II. 分担研究報告

1. 3歳児における免疫指標の検討と諸指標間の相関の検討・・・・・・ 68

及び 初年度の成績の多変量解析による検討

吉田貴彦

2. アレルゲン別 IgE 抗体測定・・・・・・ 92

手島玲子

3. 小児での毒性評価指標としてのサイトカインバランスの解析・・・・・・ 108

大沢基保

4. 小児での全血中鉛濃度の測定・・・・・・ 126

小島幸一

## III. 資料

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
（総括）研究報告書

生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための  
免疫指標の開発に関する研究

（主任）研究者 吉田貴彦 旭川医科大学医学部教授

研究要旨

初年度に再現性について検討した、生活環境汚染の影響を検出する健康影響指標としての免疫学的検索法について、3年間連続となる関東地方の1保健センター、さらに環境の大きく異なる北海道の1保健センターにおいて3歳児健診時にあわせて調査を実施し環境リスク評価のための免疫指標の普遍性を検討した。

総IgE抗体価、アレルゲン別特異的IgE抗体価、抗麻疹IgG抗体価、抗風疹IgG抗体価、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA発現比率などの免疫指標が環境因子により影響を受けることが再確認され、環境リスク評価にとって有用な指標となることが確認された。また、臍帯血を用いた胎児の免疫指標について、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA発現比率など一部の測定が可能となった。

分担研究者氏名

大沢基保（帝京大学薬学部教授）  
小島幸一（食品薬品安全センター  
野研究所試験部部長）  
手島玲子（国立医薬品食品衛生研究  
所機能生化学部室長）

た。こうした高度成長期の高度環境汚染は、科学技術の発達による環境汚染低減技術の開発・普及に支えられた環境行政の展開により、国内の古典的汚染物質による高度の環境汚染は大幅に改善されるに至った。このような古典的な環境汚染物質による環境汚染は急激な開発にさらされる発展途上国において顕著であり、地球的な環境汚染が危惧されている。一方、一見して環境汚染から開放されたかのような我が国をはじめとした先進国においては、膨大な数の科学物質が次々と生み出され、産業現場、日常生活に導入され、広く環境に拡散するこ

A. はじめに

我が国における1970年代までの高度成長期の間、環境は高度の汚染状態にあり、多くの公害が問題化していた。それらの状況の把握のために、典型的環境汚染物質を対象として全国的な環境測定体制が敷かれ

ととなった。しかし、かつての典型的な環境汚染の反省からその汚染の度合いは低いものとなっている。1990年代に入って微量の汚染物質による野生生物をはじめヒトへの生態影響が問題となり、内分泌攪乱化学物質による問題はその典型的な例となった。こうした近年の環境汚染は微量ではあるが多岐にわたる化学物質、特に長寿命を付加した石油系合成化学物質による複合汚染が地球上広く報告されるようになった。こうした状況に対応すべく、環境省では化学物質による環境汚染を把握するために重点的に測定すべき対象化学物質を漸次増やし全国的な測定を展開してきた。ところが環境中に放出される化学物質の数は止まることを知らず膨大となり、生体への悪影響が指摘される化学物質も次第に多くなっており、環境中において測定すべき化学物質の数は物理的に可能な範囲を超えつつある。こうした状況を踏まえて、鋭敏な健康指標を用いた全国的な国民の健康状況の把握を行い、健康指標の異常傾向が検出された地域での詳細な環境汚染状況調査を実施するといった環境行政への変換が検討されている（図1）。

健康影響の評価などに用いられるスクリーニング指標としては、特異度とともに感度が良いことが求められる。しかし環境に存在する種々の環境汚染物質によって引き起こされる生体影響を把握することを目的として調査が行われる場合には、対象とな

る化学物質が多岐にわたるために特異性は特には求められず、感度の良い指標が求められる事となる。

我々の研究班は、従来より免疫系を各種有害因子の標的としてとらえ各種免疫学的検査および免疫応答を指標として生体影響を評価する方法および学問である免疫毒理学に取り組んできた。免疫機構は、神経系、内分泌系、精神系などの諸生体機構と相互に密接な関連を保ち生体の恒常性維持に重要な働きを担っている。また、免疫機構は多くの担当細胞群と液性因子の相互作用からなる複雑なネットワークの上に成り立ち、生体防御機構の重要な部分を占めている。この複雑系ゆえに、環境汚染物質が生体に負荷されたとき、直接あるいは間接に影響を受けやすく、免疫バランスが狂うことによつて、アレルギー疾患、自己免疫疾患、種々の感染症、腫瘍の発生といった健康障害が現れると考えられている（図2）。従つて、この免疫機構は環境汚染物質の負荷影響を感度良く検出できる指標となりうると考えられている。

1998-2000年度に、厚生省委託研究事業「環境リスク対策における予見的アプローチに関する調査研究（免疫影響）」が本研究班分担者である帝京大学薬学部大沢基保教授のもとに実施された。1、2年度目に動物実験によって生体外から作用する環境物質による影響を検出可能な免疫学的検索法（免疫指標）について、ヒトへの応用が可

能なもので、かつ、環境リスクの予見評価が可能なバイオマーカーとして、将来の全国展開が可能である事などを念頭において検討された<sup>1, 2)</sup>。その結果、環境物質による影響を検出可能な免疫学的検索法であって、採取後の検体の処理が簡単であり、特殊な装置や技術が必要でなく実施する者の技量に影響されないこと、現場での簡易処理済み検体の運搬のために検査そのものが後日行えるものであること、などが考慮され絞込みが行われた。その際に、考慮された事柄は以下のごとくである。従来型の環境リスク要因とヒト免疫影響の関係の研究は事例検討的な手法が採用され、少数の特定曝露者を対象集団とするために、リンパ球培養を伴う増殖反応や皮膚反応試験など手間のかかる検査法も用いられてきた。しかし、多くの調査人数を対象とする免疫学的なフィールド研究では、手間のかかる検査は行えず主に血清または血漿の抗体測定などが行われてきた。その例として、アレルギー指標の血清中 IgE 測定は一般的であるし、血清中特異的 IgE 測定は個々のアレルギー感作状態の把握ができる。また、生体の免疫反応は Th 細胞サブセットである Th1 細胞と Th2 細胞の機能バランスに依存していることが明らかになったが、それぞれの Th に特異的なサイトカイン mRNA の発現量を測定し比率を評価することによって Th1、Th2 細胞の機能バランスが間接的に測定できる。この mRNA 測定は細胞培養等を必

要とせず、採血現場での簡単な操作を行った後に凍結にて保存され後日に測定ができるという点で、フィールド調査に適した方法である。さらに、抗体産生応答は免疫機構が持つ本来の働きである感染性異物排除に関して免疫担当細胞群や液性因子のほぼ全てが関与する生体反応である。人工的な異物であるワクチン接種によっても自然感染に近い抗体産生応答が惹起される。従って一定時期に接種されたワクチンによって産生される血清中の特異的 IgG 抗体の測定は、感染防御能を反映する良い免疫指標となると期待された。

これを受けて3年度目に、実際のヒト集団において実施可能と思われる免疫指標を以下のように選定した。採取末梢血から分離した血清を用いての、アレルギー状態を把握するための総 IgE 抗体および抗原特異的 IgE 抗体、感染防御能としての抗体産生応答をみるための麻疹ワクチン接種後の抗麻疹特異的 IgG 抗体、さらに末梢血細胞から抽出した mRNA の RT-PCR による IL-4 および IFN- $\gamma$  mRNA 発現評価などである。それらの免疫指標を用いて、2000年11、12月に実際のヒト集団において選定した免疫指標を応用した環境リスク評価の検証を行った。東京都東久留米市保健センター、多摩市保健センターにおいて3歳児健診に訪れた3歳児のうちインフォームドコンセントの後に同意書が得られた者を対象集団とした。この対象者集団は人工的な麻疹抗原へ

の感作に相当する麻疹ワクチン接種から 1～2 年が経過したものであり、抗麻疹 IgG 抗体価の上昇が期待された。この集団に先に選定された免疫指標を測定し、さらに同時に調査した生活環境および生活習慣に関する調査票および大気汚染測定結果から環境因子をもとめ、免疫指標と環境因子との相関関係を検討することによってその実用性を検証した。その結果、新築家屋での居住歴を有する者に抗麻疹 IgG 抗体価が高値となるなど、免疫指標が環境因子による生体影響をある程度に検出可能であることが確認され、環境リスク評価のための免疫指標の利用が有効であることが示唆された<sup>3)</sup>。

これを受けて、2001 年度から、厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」が開始された。

## B. 昨年度までの本研究のまとめ

生活環境汚染の影響を検出する健康影響指標としての免疫学的検索法の再現性を確認する目的で、関東地方の東京都東久留米市及び横浜市旭区の 2 保健センター（旭区は保健所）において 3 歳児健診時にあわせて調査を実施し、環境因子と免疫指標との相関を評価して、免疫指標が環境リスク評価のための指標となりうるかについて検討した。

全対象者を用いての検討では、免疫指標と環境要因との間に有意差が認められる項目がなかった。しかし、環境因子から受ける影響が大きいと想定される第 1 出生児およびアレルギー体質者（総 IgE が 80IU/ml 以上の者）について検討したところ、抗麻疹 IgG 抗体価、総 IgE 抗体価、抗風疹 IgG 抗体価、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率などの検査の免疫指標と、またアレルギー自覚症状やアレルギースコアと、環境因子のうち居住地域の相違（東京都東久留米市と横浜市旭区）、住居形態、幹線道路や大規模プラントへの近接居住、喫煙同居者の有無、ペットとの保有、寝具の相違（布団かベッド）などとの間に相関が見いだされた。委託研究での新築家屋居住歴と抗麻疹 IgG 抗体価との相関（新築家屋居住者で抗体価高値）が認められた事などを考え合わせると、初年度に用いた免疫指標が何らかの環境因子によって影響を受けていることが示唆された。これらの免疫指標がスクリーニング的に展開されるならば、小さな環境因子(リスク)の存在を検出できる可能性があると考ええる。こうした異常が検出される地域に対して詳細な環境測定を行う意義があるとする根拠となり、環境行政の推進に有用な資料となると思われる。同時に、地域住民の健康状態の把握が可能となり、我が国の今後の健康維持増進のための施策立案への貢献も期待される。今年度以降に、現在運用の準備段階にある臍帯血を用いた胎児の免

疫指標を確立し実地調査研究を開始することにより、胎児期から小児期にかけての環境リスク評価のための免疫指標の有用性について確認することが期待された。

## B. 当該年度の本研究の目的

胎児期から小児期にかけては生体組織・機能が発育段階にあり未熟であるために環境有害因子に対して感受性が高い時期 (critical window) と考えられている。また、胎児期から小児期に受けた影響は生涯にわたって続く障害となる場合が少なくない。この時期の化学物質曝露は、ヒトではアトピー体質の増加に、動物実験では成長後の自己免疫疾患の誘発に関連するとの報告がある。少子高齢化を迎えた我が国にとって将来を担う小児の健康の確保は至上命題である。そこで、我々が健康障害の把握法として採用し研究してきた免疫毒性学的検索法を、生活環境汚染物質による小児および新生児 (胎児) での生体影響評価のための免疫指標として用いることを可能とするための研究・開発が本研究の目的である。研究は以下の2つの領域から成る。

### 1. 小児での免疫指標の確立

初年度の成果を受けて、環境汚染物質につき影響を検出する健康影響指標としての免疫学的検索法の普遍性を確認する目的で、調査地点を北海道に広げ、前年同様の調査を実施する。聞き取り調査票による生活環境および当該地域の公表公害環境測定結果

などから推定される環境リスクの評価法としての免疫学的検索法の意義を検証する事とする。

### 2. 胎児 (出生時) での免疫指標の確立

初年度の成果を受けて、旭川医科大学産婦人科の協力を得て、出産時に得た臍帯血及び臍帯を用いて、臍帯血の免疫指標と臍帯ないし臍帯血中の有害因子濃度を測定し、胎児期に胎盤を介して胎児が受けた有害物質曝露による生体影響の評価を行うこととする。同時に得る生活環境調査票から、母体を介して胎児が受ける環境リスクに対して臍帯血を用いた免疫指標が有効であることを検証する。特に、今年度は胎児 (出生時) でのより良い免疫影響検索法の確立について検討する。

## C. 調査対象および方法

### 1. 小児での免疫指標の確立

#### 1) 対象者

2002年1月に東京都東久留米保健福祉センターおよび北海道旭川市保健所において実施された3歳児健診受診者のうち、親権者の協力が得られ調査に対するインフォームドコンセントが得られた者を対象者とした。なお、調査開始にあたって、研究代表者の所属する旭川医科大学および研究分担者、手島玲子の所属する国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会での承認を取得した。前者84名の協力者のうち採血不可能者7名を除く77名、後者127名の協力者のうち

採血不可能者 1 名を除く 126 名について調査を行った。アンケートから得られる家屋内および家屋外環境および大気汚染測定データ、血中金属量を環境要因とし、免疫影響指標との間で相関等について検討した。

調査に際して、各保健所から 3 歳児健診の案内の郵送通知に、調査研究への協力依頼文章「免疫影響調査へのご協力をお願い」

(資料 1)、調査研究同意書「免疫影響調査協力同意書」(資料 2)、アンケート調査票「生活環境・免疫影響についてのアンケート調査票」(資料 3) を同封し発送した。3 歳児健診当日に、健診開始前に調査研究についての集団説明を口頭にて行った。3 歳児健診全項目終了後に免疫調査会場に来場した協力者に対して同意書を確認のうえで調査を行った。さらに調査の詳細な説明を「免疫影響調査へのご協力をお願い」(資料 4) の文章を配布して行った。協力者名簿(資料 5) を作成し、同時に補足質問項目(哺乳状況、離乳開始時期、フォローアップミルクの使用の有無)について質問し記載した。検体には受付番号のみを記し、結果通知希望協力者への「免疫影響検査結果通知書」(資料 6) による通知書発送時以外は、連結不可能匿名化をはかった。現場での調査は「免疫影響調査マニュアル」(資料 7) によって行った。

採取血液量の少ない者では限られた項目の解析しか行えず、総 IgE 抗体価 ; 78、125 名 (前 : 東久留米、後 : 旭川、以下同様)、

アレルゲン別 IgE 抗体価 ; 78、126 名、抗麻疹 IgG 抗体価 ; 77、125 名、抗風疹 IgG 抗体価 ; 78、125 名、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現 ; 47、112 名が解析可能であったため、それらについて統計的解析を行った。

## 2) 免疫学的検索項目 (免疫指標)

今回、採用した免疫指標は、総 IgE 抗体価、アレルゲン別特異的 IgE 抗体価、抗麻疹 IgG 抗体価、抗風疹 IgG 抗体価、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率を採用した。総 IgE 抗体価、抗麻疹 IgG 抗体価、抗風疹 IgG 抗体価については BML に測定を委託した。

### (1) 総 IgE 抗体価

蛍光酵素免疫測定法 (Fluorescence Enzyme Immunoassay、FEIA 法) にて測定した。測定に用いたキットはファルマシア株式会社製、ユニキャップ総 IgE である。単位は国際単位 (IU/ml) で得られる。最小検出感度は 2IU/ml である。

総 IgE 抗体価の実測値を、高値群と低値群を分けカテゴリー化する際には中央値をもちい、5 群にカテゴライズする際には、20、50、100、200IU/ml をカットオフ値とした。全対象者の度数分布を図 5 に示す。

### (2) 抗麻疹 IgG 抗体価

酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay 法、EIA 法) によって測定した。単位は EIA 価で得られるが、国際単位 (IU/ml) への変換は、22.2 で除すことによって得られる。測定にはデンカ生研株式会社製、麻疹 IgG(II)-EIA「生研」のキットを用いた。

ワクチン接種は人工的な抗原曝露であり、天然の感染に似た免疫反応が生体内でおこる。ワクチン接種後の特異的抗体価の上昇不良は感染症時の抗体産生応答の不良を反映すると考えられる。ワクチン接種がなければ免疫応答が起こらないので特異的抗体産生は誘導されない。一方、自然感染が起こった場合は、自然免疫応答が起こるためワクチン接種と異なった免疫応答が起こり、さらに抗原量がほぼ一定であるワクチン接種と異なり抗原量が不定であるために応答の強さも異なる。そこで、ワクチン接種からほぼ同一時期の3歳児での抗麻疹 IgG 抗体価および抗風疹 IgG 抗体価を免疫指標とする際に、それぞれのワクチン非接種者と自然感染者は除外して環境影響因子との相関等の検定を行った。ただし、抗麻疹 IgG 抗体価および抗風疹 IgG 抗体価以外の免疫指標と環境影響因子との相関等の検討の際にはワクチン非接種者と自然感染者も含めて行った。抗風疹 IgG 抗体価の実測値を、5群にカテゴライズする際には、1、2、3、4IU/ml をカットオフ値とした。

### (3) 抗風疹 IgG 抗体価

初年度の横浜市旭区保健所での調査から、感染防御能としての抗体産生応答をみるためのワクチン接種後の抗風疹 IgG 抗体の測定も新たに加えた。赤血球凝集抑制試験 (Hemagglutination Inhibition Assay、HI 法) によって測定した。単位は HI 抗体価で得られる。測定にはデンカ生研株式会社製、

風疹ウイルス HI 試薬「生研」キットを用いた。検体血清量が限られているために抗体価 8 倍から測定した。なお抗体力価 8 倍未満は陰性と判定される。抗風疹 IgG 抗体価の実測値を、5 群にカテゴライズする際には、 $<32$ 、64、128、256、 $512 <$  IU/ml をカットオフ値とした。全対象者の度数分布を図 5 に示す。

### (4) 抗原特異的 IgE 抗体測定

抗原特異的 IgE 抗体測定は酵素免疫測定法 (EIA 法) に基づく半定量測定を行い、結果は「-」、「+/-」、「1+」から「4+」までに判定した。測定には富士レビオ社輸入、Quidel 社製、クイーデルアレルギースクリーン (QAS-II) を用いた。測定対象アレルゲンは、食餌性アレルゲン 4 種 (卵白、牛乳、大豆、小麦) 及び吸入性アレルゲン 3 種 (ネコ上皮、コナヒョウヒダニ、ハウスダスト 1) である。詳細については研究分担者報告を参照。「-」を陰性、「+/-」以上を陽性と分類した。

免疫指標として、7 項目のアレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数、3 項目の吸入性アレルゲンへの特異的 IgE 抗体陽性数、4 項目の食餌性アレルゲンへの特異的 IgE 抗体陽性数を採用した。

### (5) IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率

免疫応答はヘルパー T 細胞のサブセットである Th1 細胞と Th2 細胞の機能バランスに依存しているため血液中の Th1、Th2 細胞数のバランスが免疫指標として注目されて

いる。しかし、蛍光標識抗体による標識を要する細胞の分別測定 (florescent activated cell sorter, EACS) を多数の検体に対して実施することは労力が大きく困難である。そのため各細胞から特異的に産生されるサイトカインのバランスにより Th1、Th2 細胞の機能バランスが推測可能であるが、血中サイトカイン濃度は検出限界付近の値にすぎない。そこで RT-PCR 法を用いた Th1 細胞が産生する Type 1 サイトカインの mRNA および Th2 細胞が産生する Type 2 サイトカインの mRNA の発現比率をもって Th1 細胞と Th2 細胞バランスが間接的に測定することが一般的であり、初年度の成果により、3 歳児健診の対象児から得た血液試料中のサイトカイン mRNA 量測定の実用性が検証されている。そこで測定対象の mRNA は、初年度同様に Type 1 サイトカインとして IFN- $\gamma$ 、Type 2 サイトカインとして IL-4 を選択した。

末梢血全血サンプル約 0.5ml に、PAXgene Blood 試薬(QIAGEN)を添加し凍結保存し検体として mRNA 測定に供した。抽出した RNA から mRNA を精製し、RT-PCR 法にて G3PDH をハウスキーピングジーンとして補正し、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率を求めた。詳細については研究分担者の報告を参照。

#### (6) 自他覚症状としての免疫指標

免疫指標として、上記の検査による項目の他に、アンケート調査票 (資料 3) から得た、アレルギー関連自覚症状の有無ない

し数、アレルギー診断の既往の有無ないし数を、検査によらない主観的な免疫指標として用いた。

#### 3) 免疫指標に影響を及ぼす環境因子

免疫指標との関連を検討する環境因子として以下の項目を設定した。範囲の大きな環境因子として、2 つの調査実施地域における大気汚染状況を行政により調査・公表される大気汚染測定結果から得た。また、範囲の小さな環境因子として、協力者個々のアンケート調査票 (資料 3) から、家屋外環境因子と家屋内環境因子を得た。

##### (1) 居住地域

3 歳児健診が市区町村で行われることから、調査を行った保健所の所属する地域の環境因子として、データの得られやすい大気汚染物質について資料を収集した。一般環境大気観測局および自動車排出ガス測定局における、二酸化硫黄、二酸化窒素、一酸化窒素、浮遊粒子状物質、一酸化炭素、光化学オキシダント、メタン、非メタン炭化水素の年平均値を得た。東京都東久留米市には一般環境大気観測局がないため、隣接する小平市と清瀬市の一般環境大気観測局 (図 3) のデータを用い、自動車排出ガス測定局については東久留米市のデータを用いた。旭川市については市内 6 箇所的一般環境大気観測局 (図 4) のデータを用いた。両地域の大気汚染物質の年平均濃度を表 3 にまとめた。

##### (2) 交通量の多い幹線道路への近接居住

ディーゼル排気物 (diesel exhaust particles, DEP) が喘息などのアレルギー性疾患を増悪するとの報告がある<sup>4)</sup>。交通量が多い幹線道路にあつては自動車通行量が多く排気ガスの濃度が高くなり生体影響を及ぼす可能性が高いことから、回答者の判断において交通量が多いとする国道〇〇号線、〇〇街道などの幹線道路を「交通量の多い幹線道路」とし、そこからおおむね100m以内に居住することを「幹線道路への近接居住」の環境因子項目とし「あり」、「なし」を回答させた。

### (3) 近接大規模プラントへ近接居住

焼却場、火力発電所、各種工場からは程度の差こそあるものの排気になされる。こうした排気中の未知の影響因子を環境因子としてとらえ、回答者の判断において焼却場や大きな工場を「大規模プラント」とし、そこからおおむね100m以内に居住することを「大規模プラントへの近接居住」の環境因子とし、「あり」、「なし」を回答させた。

### (4) 住居形態

近年のコンクリート造家屋は省エネルギー対応設計とあいまって換気性に乏しくかつコンクリートの持つ水分により高湿度となることが指摘されている。低換気性は室内空気汚染化学物質濃度が高くなる要因となり、高湿度はカビやダニの発生を助長する要因となる。そこで、コンクリート造と木造の二つの「住居形態」を環境因子とし、どちらであるかを回答させた。

### (5) 新築家屋居住歴

建材や壁紙などから揮発性有機化学物質が発散され新築家屋にあつてはその濃度が高値であることが知られ、特に新築後3年までが高濃度となりやすいことが報告されている<sup>5)</sup>。そこで、新築後3年以内の家屋での居住歴を環境因子としてとらえ、居住年数を「新築家屋居住歴」として回答を得た。3歳児健診時点では0年から3年である。居住年数の長さによる影響を見るために、居住なしを0年、ありとしたものはその年数1、2、3年と分類した。「あり」群、「なし」群に分類する際には、0年を「なし」、1年から3年を「あり」とした。

### (6) 床材質

畳および絨毯などの床材質は、板張りやタイルなどの床材質に比して、掃除による塵埃除去の効率が悪く、ダニなどの発生が容易となることが指摘され、一定面積から回収されるダニなどの量が多くなることが知られている。そこで家屋内での畳および絨毯の使用を「ダニ発生の好発状況」の環境要因とし、「床材質」について住居内にて滞在時間が長いと思われる居間および寝室ごとに回答させた。

### (7) 寝具形態

一般的に布団はベッド使用に対して水分が蓄積しやすいとされ、ダニ等の発生が多いと考えられる。また、就寝中の呼吸域がベッドよりも布団が床に近いために塵埃の吸入量が多いと考えられる。両方の要因と

もアレルギーを誘発しやすい要因となるために「寝具形態」を環境因子としてとらえ、「布団」または「ベッド」として回答させた。

#### (8) 暖房器具

燃料を燃焼させるタイプの暖房装置の中には、排気が室外に排出されなく室内空気汚染源となる種類のものがある。これらの暖房器具の使用は室内空気汚染の原因となることから環境因子とし、「室内空気汚染暖房」につき器具使用群とFF式石油ストーブなど室内空気を汚染しない暖房器具使用群とに分類し、回答させた。

#### (9) ペット同居歴

犬、猫、ハムスター、鳥などの陸棲動物で空気を呼吸し体表が常に空気に触れているペットは、その飼育によって体表成分、尿や体液成分が空気中に飛散し、アレルギーを惹起する要因となりうることから「ペット保有」を環境因子とし、「ペット保有歴」について「あり」、「なし」を回答させた。金魚、熱帯魚、亀などの水棲ペットは対象外とした。

#### (10) 同居喫煙者

居住をともにする者のうち当該小児の傍で喫煙をする者がある場合、間接喫煙曝露の環境にあると判断され、児に対して影響があると考えられる。そこで間接喫煙を環境因子としてとらえ、この様な喫煙者を「同居喫煙者」とし、その「あり」、「なし」を回答させた。

#### 4) その他の因子

その他、免疫応答ないしアレルギーに影響を与えうる、要因について把握するために以下の項目について回答させた。

##### (1) 再発性中耳炎

中耳炎を繰り返えす場合、免疫能力が低下していることが考えられるため、中耳炎を繰り返えすかどうかを回答させ、「中耳炎頻回罹患」者として把握した。この項目に関しては解析したデータの解釈に疑問が感じられた場合に参考とした。

##### (2) 哺乳・離乳状況

消化管免疫バリアーの完成が不完全な乳児期に異種タンパクに高度に曝露することは食餌性アレルギーに感作される機会をますこととなる。そこで質問票に質問項目として採用しなかったために、検査場において口頭にて質問し、協力者名簿(資料5)に記載した。哺乳及び離乳の状況(母乳、母乳・人口乳の併用、フォローアップミルクの使用の有無)についても追加質問項目として、検査受付の段階で聞き取りを行った。この項目に関しては解析したデータの解釈に疑問が感じられた場合に参考とした。

##### (2) 遺伝的素因

一般にアレルギー性疾患は遺伝的素因が関与するので、両親のアレルギー疾患の診断既往、アレルギー関連症状の有無について回答を得た。

当該小児の両親のうち一方でも、「喘息」、「アトピー性皮膚炎」、「アレルギー性鼻炎」、「アレルギー性結膜炎」、「食物アレルギー」

ギー」などのアレルギー関連疾患の診断既往があったとした場合、両親のアレルギー「あり」群、なしとした場合を「なし」群とした。重症度を加味し、診断項目数0、1、2、3、4とした。「蕁麻疹」についてはアレルギーの関与が曖昧であるので除外した。同様に、アレルギー関連症状の有無についても検討した。

### (3) その他

免疫指標に影響を与える可能性のある要因として、アレルギー疾患の治療状況(現在および過去、アレルギーの原因、使用薬剤)、アレルギー疾患に対する民間療法の利用状況、および検査実施日を含めた1週間以内での体調、検査実施日の使用薬剤の有無と目的、について回答させた。この項目に関しては解析したデータの解釈に疑問が感じられた場合に参考とした。

### 5) 客観的環境因子

調査対象者が環境から受ける曝露を客観的に把握するための検査として、血中微量金属類の測定を行うこととした。初年度は、水道管材質に含まれる鉛の溶出による飲料水を介する曝露、過去の有鉛ガソリン使用時代に大気中に放出された鉛を含む空気吸入を介する曝露、ペンキ等塗料の剥離による鉛含有室内塵埃の吸入を介する曝露、陶磁器食器の釉薬から溶出する鉛の飲食物を介する曝露の存在が知られる鉛に着目して調査を行った。今年度は、より多くの金属類の測定を試みることにした。詳細につい

ては分担報告書を参照。

### 2. 胎児(出生時)での免疫指標の確立

従来から実施していた3歳児に対する免疫指標を用いての環境リスク評価の検討に加えて、胎児(出生時)での免疫影響検索法の確立について検討する。

初年度の研究により、研究調査への協力依頼書の作成、研究調査への同意書の作成、調査アンケート用紙の作成、検体の収集マニュアルの作成、検体採取協力者への依頼、調査計画の倫理委員会への承認取得など、実際の調査での運用に用いる文章やマニュアルについて確立したので、その方法に則って実施した。

#### 1) 臍帯血を用いた免疫指標の確立

出産時に得られる臍帯血を用いた、免疫調査項目について検討する。

#### 2) 臍帯血、臍帯を用いた環境汚染物質曝露の推定法の確立

出産時に得られる臍帯血ないし臍帯を用いての環境汚染物質曝露の推定法の確立について検討する。

## D. 研究結果

### 1. 居住地域間の免疫指標の比較

始めに、東京都東久留米市保健福祉センターおよび旭川保健所の管轄地域すなわち対象者の居住地域差について免疫指標との関連を検討した。結果を表1にまとめた。

#### 1) 抗麻疹 IgG 抗体価

両地域の抗麻疹 IgG 抗体価の中央値に差

が無く、交絡因子の調整により旭川市で低値傾向が見られるものの有意ではなかった(図6)。

#### 1) 抗風疹 IgG 抗体価

両地域の抗風疹 IgG 抗体価の中央値では旭川で高値傾向、交絡因子の調整によっても旭川市で高値傾向が見られるものの有意ではなかった(図7)。

#### 1) 総 IgE 抗体価

両地域の総 IgE 抗体価の中央値では東久留米で有意に高値であったが、交絡因子の調整により東久留米での高値傾向は弱く有意ではなかった(図8)

#### 4) アレルゲン別特異的 IgE 抗体

7項目のアレルゲンごとの特異的 IgE 抗体の陽性者の割合につき、両地域間で比較したところ、東久留米に対する旭川のオッズ比は 1.099 と両地域で差がなかった(図9)。

#### 5) アレルギー関連症状数

アレルギー関連症状の有る者の割合について、両地域間で比較したところ、度数分布では旭川で症状の強い者が多い傾向があったが、交絡因子調整により両地域で差がなかった(図10)。

#### 6) アレルギー疾患診断数

アレルギー診断の既往の有る者の割合について、両地域間で比較したところ、度数分布では旭川で多い傾向があり、交絡因子調整により旭川で多くなる傾向が確認されたが有意ではなかった(図11)。

## 2. 居住地域間の大気汚染状況の比較

東京都東久留米市保健福祉センターおよび旭川保健所の管轄地域の大気汚染データの比較(表2)によると、二酸化硫黄が旭川中央測定局で他地域に比して高値であった。二酸化窒素は東久留米で旭川中央以外の旭川の各測定局に比して高値であった。浮遊粒子状物質は東久留米旭川の各測定局に比して高値であった。初年度に免疫指標への影響が考えられた、メタン系炭化水素、非メタン系炭化水素については旭川の各測定局について入手出来なかった。

## 3. 居住地域ごとの対象者の個人基礎データの比較

保健所管轄地域すなわち対象者の居住地域差について免疫指標との関連を検討する前に、居住地域毎の対象者の基礎データを比較した(表3)。

### 1) 一般基礎個人情報

東京都東久留米市保健福祉センターの解析対象者の性別内訳は、男 42 名(49.4%)、女 43 名(50.6%)、兄弟内での出生順位は 1 番目 44 名(52.4%)、2 番目 30 名(35.7%)、3 番目以降 10 名(11.9%)、無回答 1 名であった。旭川市保健所の解析可能対象者の内訳は、男 59 名(46.5%)、女 68 名(53.5%)、兄弟内での出生順位は 1 番目 62 名(48.8%)、2 番目 48 名(37.8%)、3 番目以降 17 名(13.4%)、無回答 0 名であった。東久留米で男性が多く、また第 1 子の割合が高い傾向があったが、両地域間に大きな違いはなかった。

基本的事項として、性別による免疫指標の比較を行った。抗麻疹 IgG 抗体価は女性において有意に高値であり、交絡因子の調整によってもその傾向は変わらなかった(図 12)。抗風疹 IgG 抗体価については両性においてやや低い傾向があったが有意でなかった。総 IgE 抗体価は男性で高値と鳴る傾向があったが、交絡因子調整により有意性は否定された(図 13)。特異的 IgE 抗体陽性者の割合は、やや男性に多い傾向があったが有意ではなかった。アレルギー関連症状の有無、アレルギー診断の既往の有無の割合は男性でやや多い傾向があったが有意ではなかった。これらから、少なからず免疫指標に性差があることから、交絡因子としての調整が必要と思われる。

## 2) 免疫指標に影響する個人情報

免疫指標に影響する個人情報について比較した(表 3)。

### (1) 麻疹

健診対象となった 3 歳児のうち、抗麻疹 IgG 抗体価を測定できた者 85、127 (前：東久留米、後：旭川、以下同様) 名中 80、123 名は検査前 4 から 32 ヶ月の間(中央値 668、689 日前)に麻疹ワクチンの接種を受けていた。麻疹ワクチン非接種と答えた者は 5(5.9%)、4 名(3.1%) (前：東久留米、後：旭川、以下同様) であった。そのうち麻疹自然感染の既往がありと答えた者は 4、3 名であった。一方、抗麻疹 IgG 抗体価が 0.09IU/ml 未満の者は 3 名あり、うち 3 名

が非接種で麻疹感染既往なしの者であった。また、非接種で麻疹感染既往なしと答えた 4 名中 1 名は抗麻疹 IgG 抗体陽性であった。親権者の記憶違いと医師の診断違いである可能性がある。いずれにしても、ワクチン非接種と自然感染の申告のあった者および感染に関して無記入の者 11 名は抗麻疹と環境因子との統計的な検討から除外し、最終的に 201 名にて検討した。全対象者の度数分布を図 5 に示す。麻疹ワクチン接種率、接種から検査実施日までの期間、自然罹患状況に差がなかった。

### (2) 風疹

抗風疹 IgG 抗体価を測定できた者 85、127 名 (前：東久留米、後：旭川、以下同様) 中 70、103 名は検査前 2 から 36 ヶ月の間(中央値 503、556 日前)に風疹ワクチンの接種を受けていた。

風疹ワクチン非接種と答えた者は 15(17.6%)、24(18.9%) 名であった。そのうち風疹自然感染の既往ありと答えた者は 0、2 名であった。一方、抗風疹 IgG 抗体価が 8IU 未満の者は 38 名あり、うち 35 名が非接種で風疹感染既往なしの者であった。また、非接種で風疹感染既往なしと答えた 0 名中 0 名は抗風疹 IgG 抗体陽性であった。親権者の記憶違いないし医師の診断違いである可能性がある。風疹についても、ワクチン非接種と自然感染の申告のあった者および感染に関して無記入の者 39 名は、麻疹と同様の理由で、抗風疹 IgG 抗体価と環境

因子との統計的な検討から除外し、最終的に173名にて検討した。

風疹ワクチン接種率は両地域で差が無かったが、接種から検査実施日までの期間が旭川で早期のワクチン接種が行われていることが伺えた。風疹自然感染既往歴のある者は旭川のみに見られた。

### (3) 中耳炎

頻回に中耳炎を起こす者の比率は旭川において高率であった。

### 3) アレルギー関連項目

主観的免疫指標としても用いるアレルギーに関連する個人情報について比較した(表1)。

#### (1) アレルギー関連自覚症状の有無

アレルギー関連自覚症状について、「喘息様呼吸器症状」、「持続する鼻汁・くしゃみなど鼻症状」、「アレルギー性結膜炎様眼症状」を有意な回答とした。「皮膚掻痒感・発赤」などアトピー性皮膚炎を想定した項目には他の皮膚疾患による症状が混入するおそれがあるために有意としなかった。

#### (2) アレルギー疾患診断既往数

アレルギー疾患について、「喘息」、「アトピー性皮膚炎」、「アレルギー性鼻炎」、「アレルギー性結膜炎」、「食物アレルギー」有意な回答とした。「蕁麻疹」はアレルギー以外の要因も関与することから除外した。従って、5項目のアレルギー疾患診断既往について解析した。いずれか1項目あれば「1」、2つ以上ある場合を「2以上」と

して比較した。

### 4. 居住環境による環境因子データの比較

#### 1) 大気汚染状況

両地域での大きな環境因子としての大気環境測定データは前述のごとく表2に示した。

#### 2) 家屋内環境因子

アンケート調査から、調査対象者個々について得た家屋外環境因子と家屋内環境因子についての結果を表3にまとめた。

##### (1) 幹線道路への近接居住

交通量の多い幹線道路への近接居住は旭川の対象協力者が多かった。

##### (2) 大規模プラントへの近接居住

対象者の自己判断による大規模プラントが居住地に近くあるとする者は、「あり」とする者の例数自体が少なく、また両地域で差が無かった。

##### (3) 住居形態

それぞれの対象協力者において、東久留米では木造、旭川市ではコンクリート造の住居に居住すると答えた者が多かった。

##### (4) 新築家屋居住

両地域で居住歴の有無、居住年数に大きな違いがなかった。

##### (5) 床材質

ダニの発生を容易とする床材質(畳、絨毯)があると答えた者は、東久留米においてやや多かった。

##### (6) 寝具形態

アレルギーを惹起しやすいと考えられる

布団の使用は東久留米に多かった。床材質に畳等が多いことと一致する回答傾向であった。

#### (7) 暖房器具

室内空気を汚染する暖房器具の使用は、東久留米で旭川を大きく上回った。

#### (8) ペット保有

ペットを保有し同居し触れる機会の多い者は、東久留米にやや多い傾向にあった。

#### (9) 同居喫煙者

対象者にとって間接喫煙となる環境因子があると答えた者は、旭川に多く、北海道地域の喫煙率の高さが反映された結果と思われる。

### 5. 家屋外環境因子および家屋内環境因子と免疫指標との関連の検討

東京都東久留米市と旭川市のそれぞれを対象者において、大気汚染状況などに居住地域差があったことは既に述べた。一方、免疫指標にも地域差と考えられる差が得られた。そこで、地域の違いをも調整変数として考慮しつつ調整し有意性を検定することとし、両地域の協力者全てを対象に、身近な家屋外環境因子および家屋内環境因子と免疫指標との関連性の検討において解析した。

#### 1) 家屋外環境因子と免疫指標との関連の解析

幹線道路への近接居住者群において抗麻疹 IgG 抗体価が低値となる傾向がみられた (図 14)。総 IgE 抗体価は幹線道路への近

接居住者群においてやや高値となる傾向が見られた (図 15)。特異的 IgE 抗体陽性者の割合は幹線道路への近接居住者群において低い傾向があった (図 16)。幹線道路への近接居住者群において、アレルギー関連症状のある者およびアレルギー疾患診断既往のある者の割合が多い傾向があった (図 17、8)。しかし、いずれも有意性は低かった。

大規模工場への近接居住者群において、総 IgE 抗体価が有意に低かったが、その例数は 15 名で 7%に過ぎず信頼性にかける (図 19)。一方、大規模工場への近接居住者群のアレルギー関連症状のある者の割合はやや多い傾向があったが有意性は無かった (図 20)。

#### 2) 家屋内環境因子と免疫指標との関連の解析

住居形態別の解析により、コンクリート造に居住する群で、抗麻疹 IgG 抗体価の有意な高値傾向が見られた (図 21) が、総 IgE 抗体価の低値傾向のみで有意性ははかかった (図 22)。さらに、コンクリート造に居住する群で、アレルギー関連症状およびアレルギー疾患診断既往のある者の割合が高い傾向がみられ、前者ではその傾向が強かった (図 23)。

新築 3 年以内の住居への居住歴については、抗麻疹 IgG 抗体価 (図 24)、総 IgE 抗体価 (図 25) はじめ、客観的免疫指標項目の全てについて居住歴の有無に関して差がな

かった。

室内アレルゲンの増加に関連すると考えられる絨毯、畳の使用に関する解析では、寝室にてそれらを用いていない群においてアレルギー関連疾患診断既往のある者が多くなる傾向が見られた(図 26)。同様に寝具にベッドを用いている群においてアレルギー関連疾患診断既往のある者が多くなる有意な傾向が見られた(図 27)。一方、ベッド使用者において、特異的 IgE 抗体陽性者の割合が高い傾向が見られた(図 28)。

室内空気を汚染する暖房器具を使用する群で、総 IgE 抗体価が低値となる傾向が見られたが、有意性は無く、不使用者群に比較的高値の総 IgE 抗体価を示す者の割合が高いことが影響しているものと思われる(図 29)。

喫煙同居者の有無では、有り群で総 IgG 抗体価が低地となる傾向(図 30)が見られ、抗麻疹 IgG 抗体価には差が見られなかった(図 31)。同居喫煙者有り群でアレルギー関連症状のある者の割合が高い傾向があった(図 32)。

#### 1) 遺伝的素因に関する検討

父親がアレルギー診断の既往がある群では、抗麻疹 IgG 抗体価の低値、抗風疹 IgG 抗体価の有意に低値(図 33)、総 IgE 抗体価の高値(図 34)、特異的 IgE 抗体陽性者の割合の有意な高値(図 35)、アレルギー診断既往のある者の割合が高い傾向が見られた(図 36)。

一方、母親がアレルギー診断の既往がある群では、抗麻疹 IgG 抗体価に差が無く、抗風疹 IgG 抗体価の有意な高値(図 37)、総 IgE 抗体価、特異的 IgE 抗体陽性者の割合に差が無く、アレルギー診断既往およびアレルギー関連症状のある者の割合が高い傾向が見られた(図 38、39)。

#### 3) 出生順位の違いに関する検討

母体を経て環境汚染物質が多く移行すると指摘されている<sup>6)</sup> 出生順位 1 番の者と 2 番目以降の者を比較したところ、第 1 出生児で抗麻疹 IgG 抗体価が高値となる傾向が見られたが有意性は無かった。また、その他の指標等にも有意な差が無かった。

#### 6. 金属類の測定

金属類の測定に関しては測定の遅れから免疫指標等との相関などの解析は出来なかった。詳細は分担報告を参照。

#### 7. 胎児(出生時)での免疫指標の確立

結果等については分担者報告を参照。

##### 1) 胎児(出生時)での免疫影響検索の運用の手順

初年度より臍帯血を用いた新生児の免疫指標を用いた環境リスク調査を確立するために、一連の検体入試から測定までの手順を整備した。

##### (1) 研究調査への協力依頼書

出産する妊婦に配布されて、免疫影響調査について説明する文章を、「出産されるお子さまの免疫影響調査へのご協力をお願い」(資料 8)として作成した。外来主治医

より出産前の健診児に説明の上、手渡した。

#### (2) 研究調査への同意書

出産する妊婦に研究調査協力依頼書とともに配布されて、免疫影響調査について同意し調査に協力する意志を確認するための文章を、「免疫影響調査協力同意書」(資料 9)として作成した。出産前に得ることとした。

#### (3) 調査アンケート用紙

出産する妊婦に研究調査協力依頼書および協力同意書とともに配布されて、免疫影響調査に協力表明した者に関して個人一般情報および環境因子を調査するための文章を、「生活環境・免疫影響についてのアンケート調査票」(資料 10)として作成した。出産後の退院までに回収した。

#### (4) 検体の収集マニュアル

検体採取協力者に依頼し、妊婦への研究協力依頼の方法、同意書とアンケート用紙の回収方法、出産時の臍帯血及び臍帯の採取方法と受け渡し方法等に関するマニュアル文章を、「免疫影響調査マニュアル<臍帯血>」(資料 11)として作成し、これに基づき、外来主治医、出産担当医、検体処理担当者、測定担当者がそれぞれの作業を行った。

#### (5) その他

調査計画について、研究代表者の所属する旭川医科大学および研究分担者、手島玲子の所属する国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会での承認取得を行った。

#### 2) 臍帯血を用いた免疫指標の確立

出産時に得られる臍帯血を用いた、今年度は臍帯血を用いた IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率について検討を中心に行い、他の免疫調査項目についても検討中する。

#### 3) 臍帯血、臍帯を用いた環境汚染物質曝露の推定法の確立

出産時に得られる臍帯血ないし臍帯を用いての、環境汚染物質曝露の推定法について検討中する。

#### 4) 検体の収集

研究代表者の所属する旭川医科大学産婦人科学から検体の供与を受けることとし、母体に慢性持続性感染症および免疫系に影響を及ぼす可能性のある疾患既往のある場合は、対象から除外した。

### E. 考察

生活環境汚染物質による小児および新生児(胎児)での生体影響評価のための免疫指標を開発するために、3歳児健診受診者および出産時の新生児の2集団に対して免疫影響調査を行った。出産時の新生児の免疫影響調査は、収集された検体数が小数であるために、まだ環境リスク評価のための免疫指標としての検討には至っていない。そこで、先行している3歳児の環境リスク評価のための免疫指標の確立に向けての再現性、信頼性、普遍性等の検証について考察する。

今回、免疫指標として抗麻疹 IgG 抗体価、

抗風疹 IgG 抗体価、総 IgE 抗体価、IFN- $\gamma$  /IL-4 mRNA 発現比率、アレルゲン別特異的 IgE 抗体陽性数、吸入性アレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数、食餌性アレルギー特異的 IgE 抗体陽性数、アレルギー関連自覚症状数、アレルギー疾患診断既往数を採用した。また、環境因子として、大きな地域環境としての居住し管轄を受ける保健所ごとの地域、交通量の多い幹線道路への近接居住、大規模工場等への近接居住、家屋内環境因子として、住居形態（木造、コンクリート造）、新築家屋への居住歴、塵埃を除去し難い床材質、寝具形態、室内空気を汚染する暖房器具、ペット保有歴、同居喫煙者などについて検討した。

抗麻疹 IgG 抗体と抗風疹 IgG 抗体価などの人工的抗原投与によって惹起される免疫応答の結果としての IgG 抗体価と総 IgE 抗体価、アレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数、アレルギー症状数、アレルギー診断数には相関が見られなかった。総 IgE 抗体価とアレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数には当然のことながら強い正の相関が見られた。また、総 IgE 抗体価とアレルギー症状数アレルギー診断数にも正の相関が見られた。アレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数とアレルギー症状数、アレルギー診断数にも強い正の相関が見られた。当然のことながら、アレルギー診断数とアレルギー症状数にも強い正の相関が見られた。

東久留米市と旭川市におけるデータにつ

き、単変量解析を行い 10%未満の有意確率が得られた環境要因を変数として強制投入し、環境要因と免疫影響指標との関連を多重ロジスティック分析を行った。単変量解析を行い 10%未満の有意確率が得られた環境要因とその関連が見出された組み合わせは、性別が抗麻疹 IgG 抗体価および総 IgE 抗体価に、居住区域の別が総 IgE 抗体価に、寝室における室内塵発生に差をもたらす可能性のある床材質がアレルギー関連疾患の診断数と、就寝中の室内塵の吸入機会に差を生じさせる可能性のある寝具の形態がアレルギー関連疾患の診断数と、喫煙する同居人の数と総 IgE 抗体価である。環境要因ではないが単変量解析により免疫影響指標との関連が有意となった因子は、父親のアレルギー関連疾患の診断の有無が総 IgE 抗体価およびアレルゲン特異的 IgE 抗体陽性数とその関連が見出された組み合わせは、母親のアレルギー関連疾患の診断の有無とアレルギー症状数であった。多重ロジスティック分析の結果、抗麻疹 IgG 抗体価と性別に有意な関連が認められ、女兒に高く男児に低かった。父親のアレルギー関連疾患の診断がある群では、抗風疹 IgG 抗体価の低値に、アレルゲン特異的 IgE 抗体陽性に、アレルギー関連疾患の診断が在るとの項目に関連が認められた。母親のアレルギー関連疾患の診断がある群では、抗風疹 IgG 抗体価の高値となる関連が認められた。純粹なる環境要因との関連に関して、有意性は