

図1 G3PDH mRNA の発現レベル (Total RNA 100 ng 当たり)

\bar{x} : 平均値、 $+\sigma$: 平均値+標準偏差、 ** : $p=0.003$

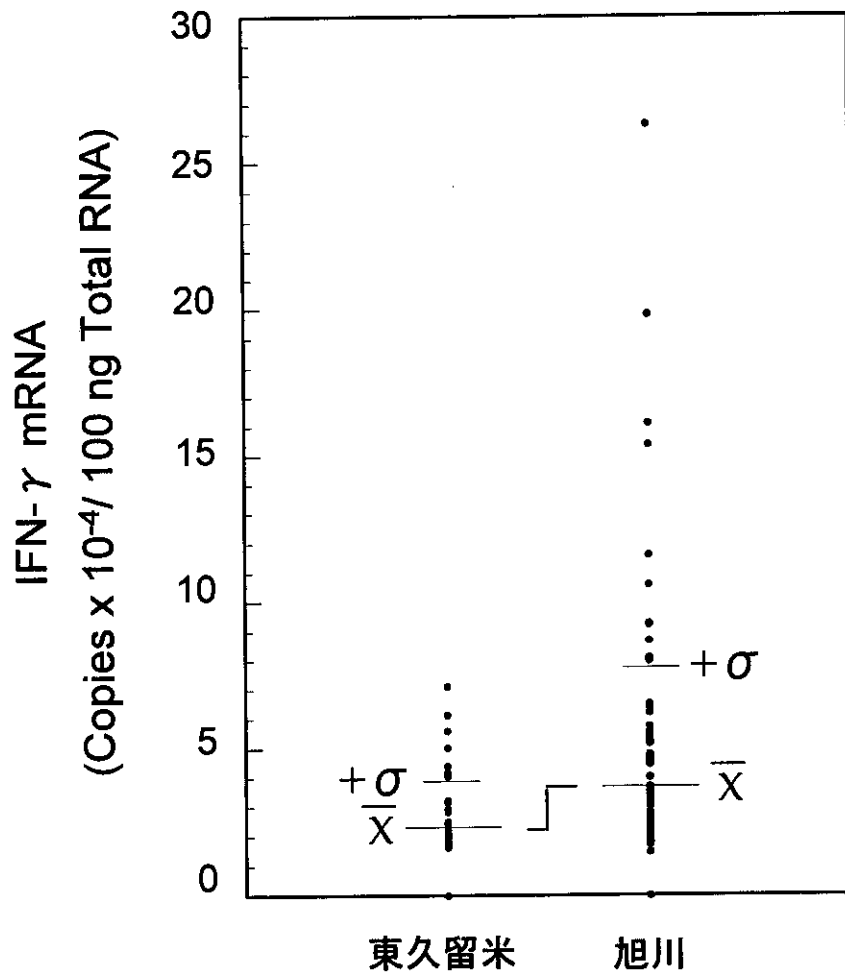


図2 IFN- γ mRNA の発現レベル (Total RNA100 ng 当たり)
 \bar{x} : 平均値 $+\sigma$: 平均値+標準偏差

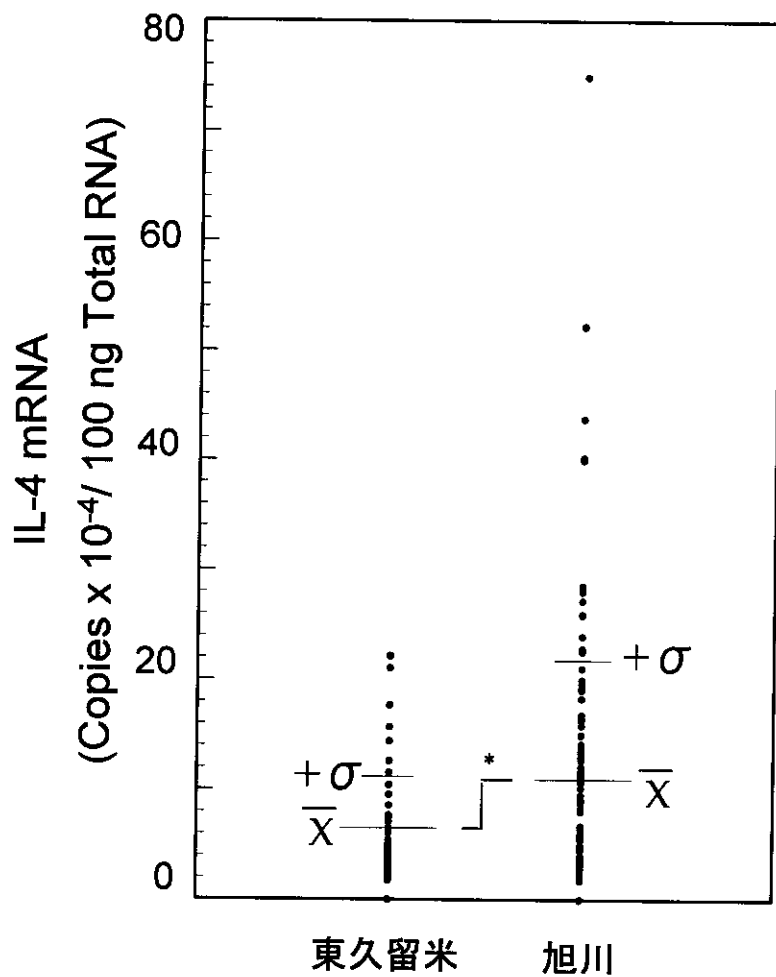


図3 IL-4 mRNA の発現レベル (Total RNA100 ng 当たり)
 \bar{x} : 平均値、 $+\sigma$: 平均値+標準偏差、 * : $p=0.017$

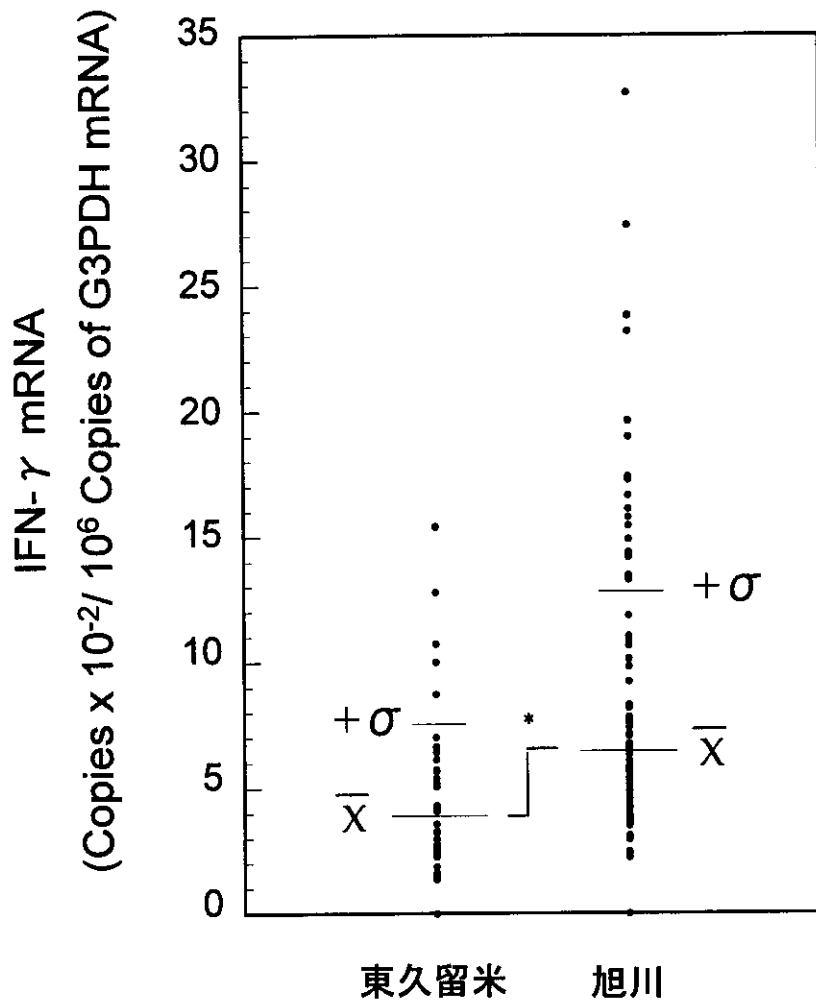


図4 IFN- γ mRNA の発現レベル (G3PDH mRNA 10^6 コピー当たり)

\bar{x} : 平均値、 $+\sigma$: 平均値+標準偏差、** : $p=0.042$

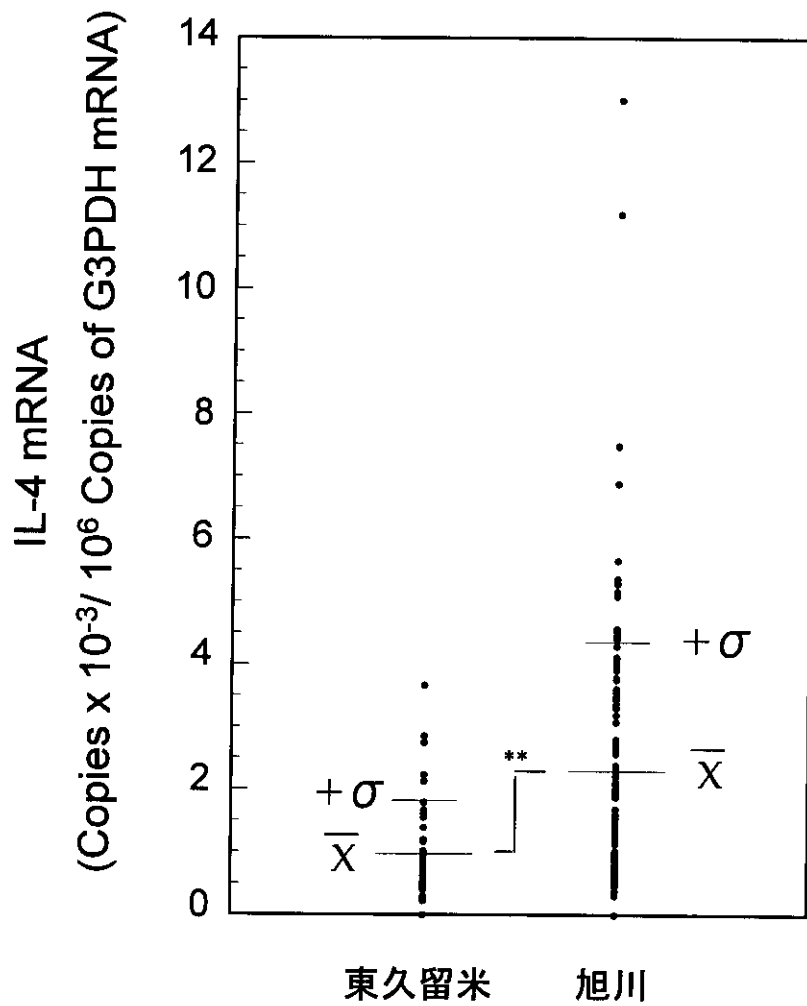


図5 IL-4 mRNA の発現レベル (G3PDH mRNA 10^6 コピー当たり)
 \bar{x} : 平均値、 $+\sigma$: 平均値+標準偏差、 **: $p < 0.0001$

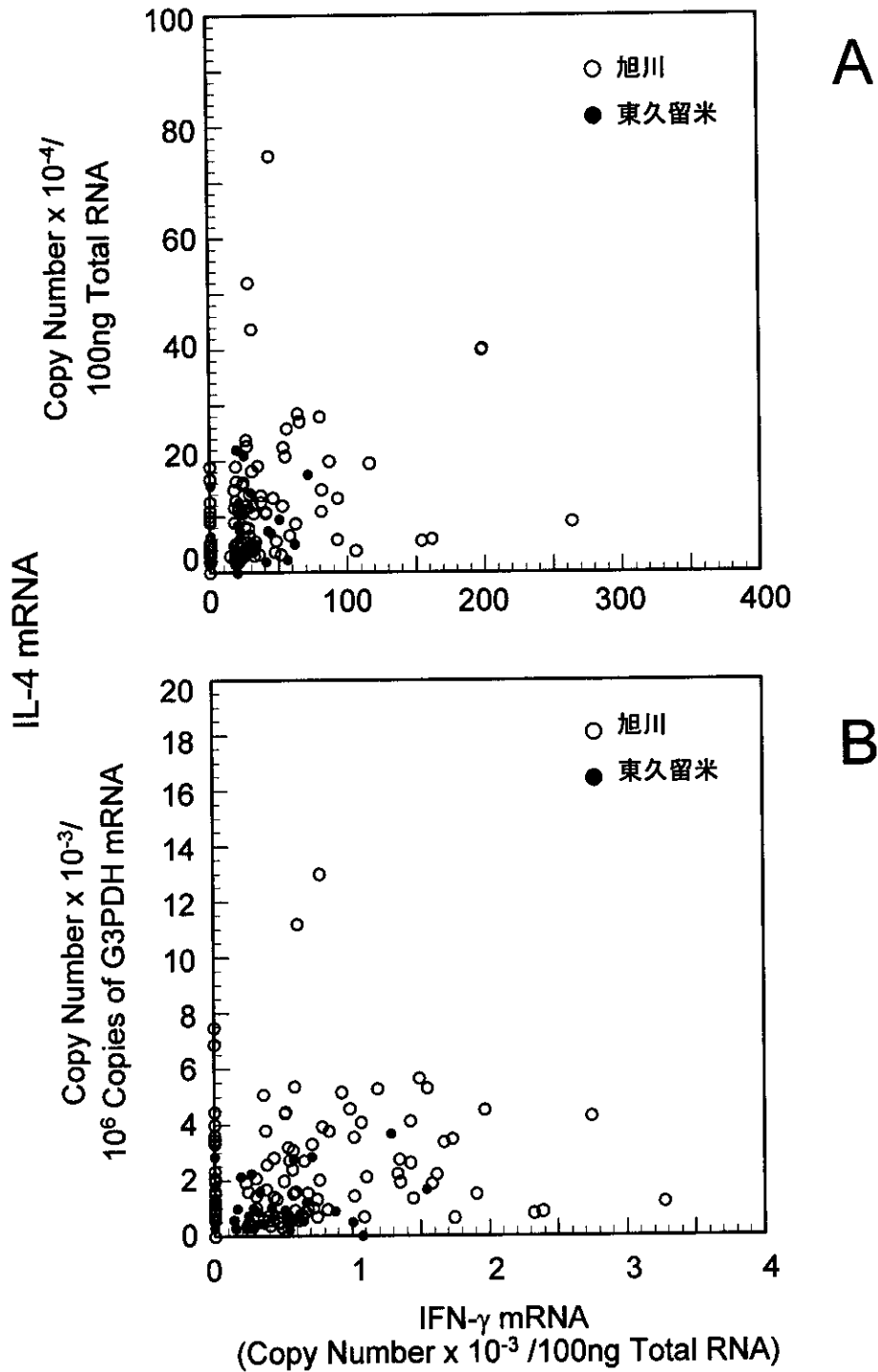
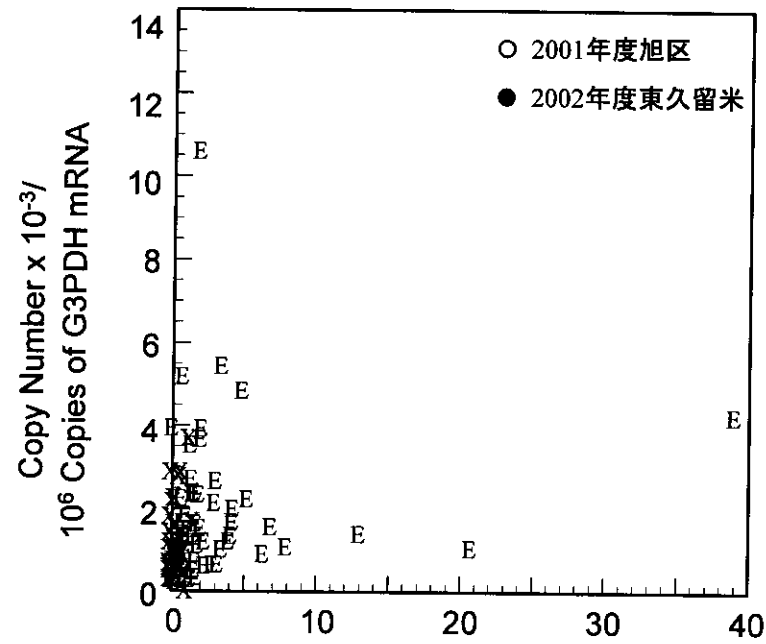
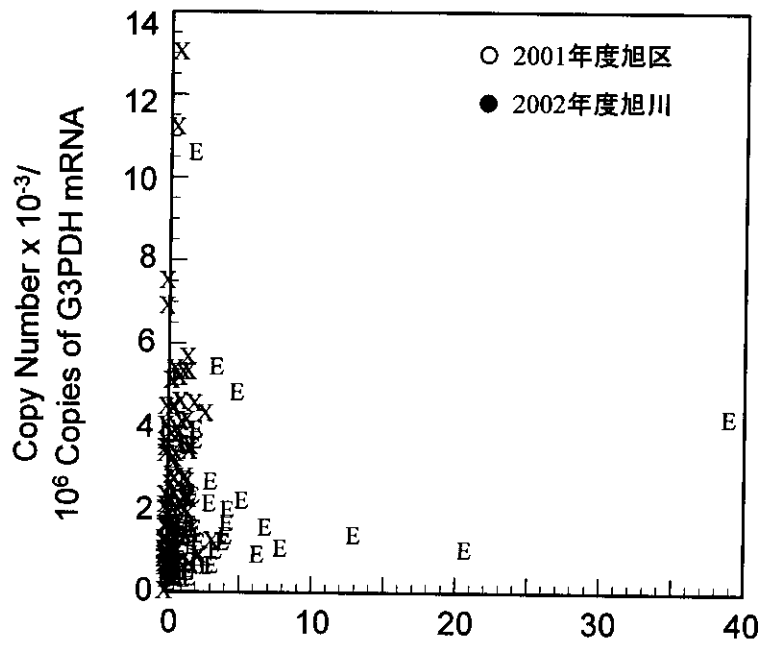


図6 IL-4、IFN- γ mRNA発現レベルの対散布図（旭川と東久留米の比較）
 A : Total RNA100 ng 当たり B : G3PDH mRNA 10^6 コピー当たり

IL-4 mRNA



A



B

IFN- γ mRNA
(Copy Number $\times 10^{-3}$ / 10^6 Copies of G3PDH mRNA)

図7 2001年度横浜市旭区の測定値との比較
A : 2001年度旭区 と 2002年度東久留米
B : 2001年度旭区 と 2002年度旭川

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）
（分担）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

—小児での全血中鉛濃度の測定—

（分担）研究者 小島幸一 食品薬品安全センター秦野研究所試験部部长

研究要旨

小児における生活環境汚染物質による生体影響評価のための免疫指標の開発に関する研究の一環として、客観的環境汚染因子指標として血液中に存在する微量金属を免疫指標として採用するための条件等を検討した。東久留米市と旭川市とで採血された3歳児の血液を用いた。昨年度検討した原子吸光法に比較して、前処理法はより簡便で、しかも微量で複数の金属を同時に測定が可能な、荷電粒子励起 X 線発光分光分析を検討した。全血を用いてできる限り多種の金属を同定定量すべく分析条件の検討を行った。条件の検討に時間を要し、採血した血液全例についての測定結果と解析は次年度に引き続いて実施することとした。

A. 研究目的

環境リスクの生体影響を評価するための健康指標として免疫影響指標の確立の研究をすすめる上で、環境汚染物質への曝露の客観的環境因子とし血液中の微量金属を用いて免疫指標との相関性などを検討し、総括研究に用いられる免疫指標の有効性を検討することとした。特に小児における生活環境汚染物質による生体影響評価のための免疫指標の開発に関する研究の一環として、鉛を環境因子として採用し昨年検討した。血中鉛の測定にはマイクロウェーブ法による湿式灰化前処理を行い、原子吸光法による測定を検討した。その結果、東久留米市

と横浜市旭区とで採血された3歳児の血液中の鉛濃度には両地域間に差があると考えられる結果であったが、検出限界以下の値も相当数あったこと、測定できた検体数が限られていたことなどから、必ずしも免疫影響指標との相関は明確にはならなかった。本年度は、限られた血液検体を有効に使い、できるだけ多くの情報を得ることを目的として新規分析法である荷電粒子励起 X 線発光分光分析を検討した。

B. 研究方法

本年度は検出感度をさらに上げること、鉛以外の金属についてもその動態を明らか

にすること、3歳児検診時の採血という事情から採血に限界があり測定に供することのできる血液量が限られることなどを考慮し、限られた試験試料の量で可能な限り多くの情報を得ることを期待して、原子吸光法に比較して前処理法もより簡便であり、しかも微量で測定が可能な、荷電粒子励起X線発光分光分析を検討することにした。この方法では複数の金属を同時に相当高感度で検出定量できることが期待される。これは、サイクロトロンで加速された陽子を用いる方法でPIXE (Particle Induced X-ray Emission) と呼ばれている。加速陽子を試料に照射すると、試料中の原子が電離され、元素固有の特性X線を発生する。このX線をSi(Li)半導体検出器で検出して定量する方法である。今までの報告では、生体由来材料で、アルミニウム、クロム、銅、水銀、マグネシウム、ニッケル、鉛、亜鉛などが測定可能とされている。通常の測定条件としては100ppmのインジウムを内部標準物質として加え、試験試料と合わせて10 μ Lを所定のポリプロピレンフィルム上に滴下して室温で乾燥させた後、PIXE装置にかけた。照射陽子は2.9MeVのエネルギーで、平均電流は80nAとした。

C. 研究結果と考察

荷電粒子励起X線発光分光分析の方法は、同時に複数の金属元素を分離定量できること、必要な試料の量が微量で可能なこと、

検出感度が原子吸光法に比べると優っていること、などの利点は確認できた。ただし、測定できる日時が現時点では限られるなどの点で、効率的な測定の検討が必要である。また、本年度は測定条件の詳細の検討に時間を要したため、東久留米市および旭川市で3歳時検診時に採血した全血試料の一部を用いて測定条件等の最終確認を行うにとどまった。従って、今年度測定できた検体は少数で統計学的な解析は困難であった。平成15年度の採血分もあわせて、今後、検体数を増やして、客観的環境汚染因子指標として血液中に存在する微量金属と免疫指標との相関を検討したい。

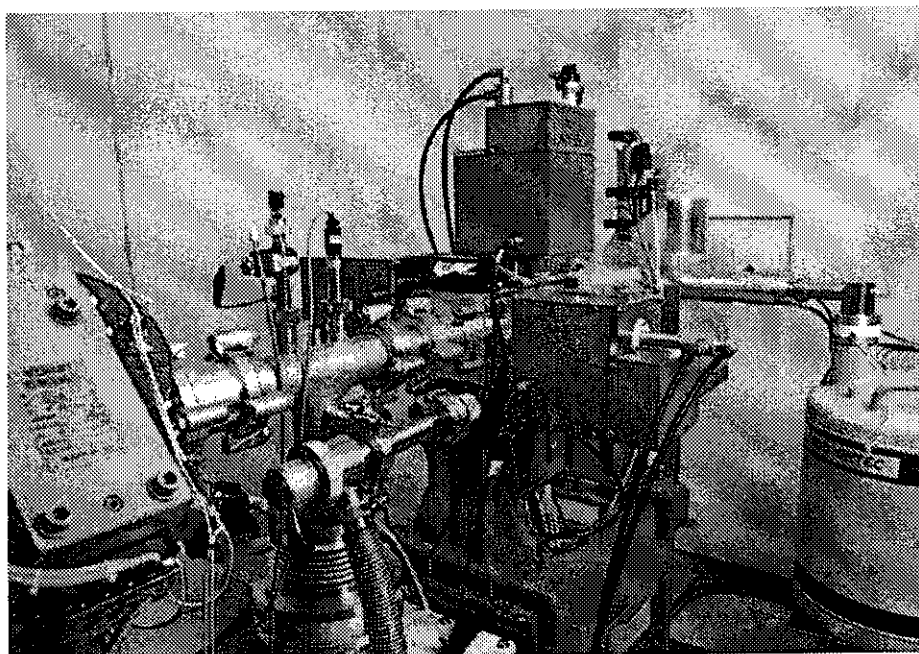
しての意味がより容易に解析できるものと考えられる。

今回は自己反転法を用いたため、バックグラウンドは良好に補正できたが、感度が低下したため、定量下限がやや高くなっている。小児からの血液のため、量を増やすことはなかなか困難であると考えられる。マトリックスモディファイアーを用いるなどして感度を上げることを試みる事を考えている。小児の周囲の生活環境の影響に加えて、母体からの影響や、食事、あるいは加齢による変動とも含めて、さらに詳細に検討することで興味深い結果も出てくると考えられる。そのためにも、測定感度のさらなる向上、測定方法の検討、他の微量金属も含めた検討等が、今後さらに必要と考えられる。

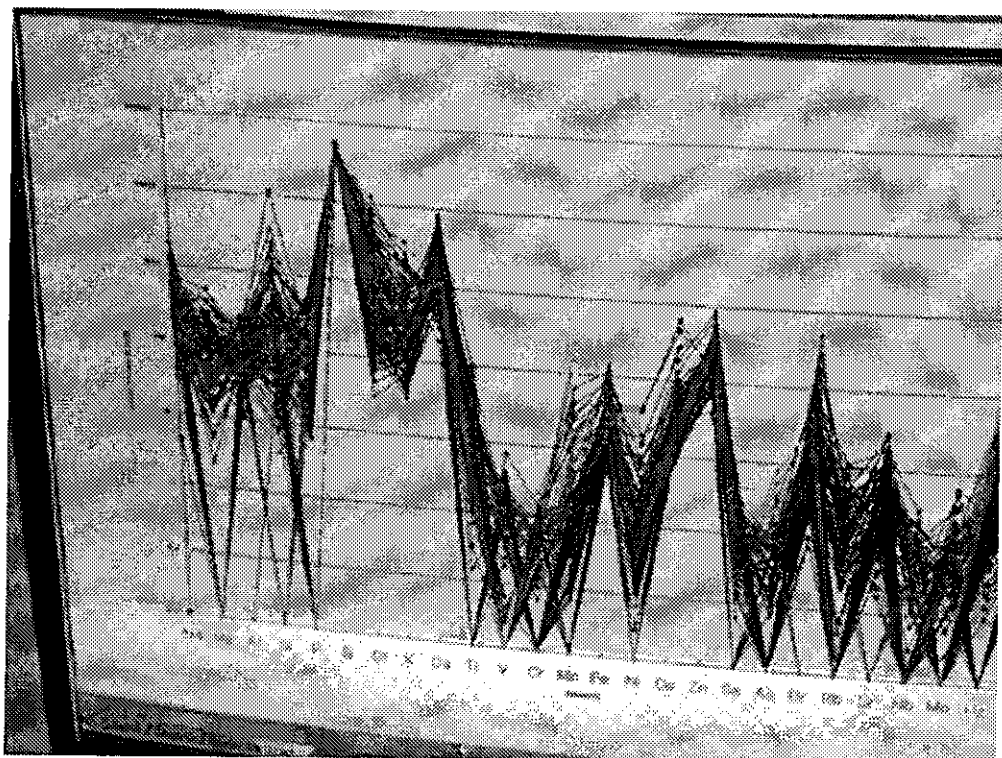
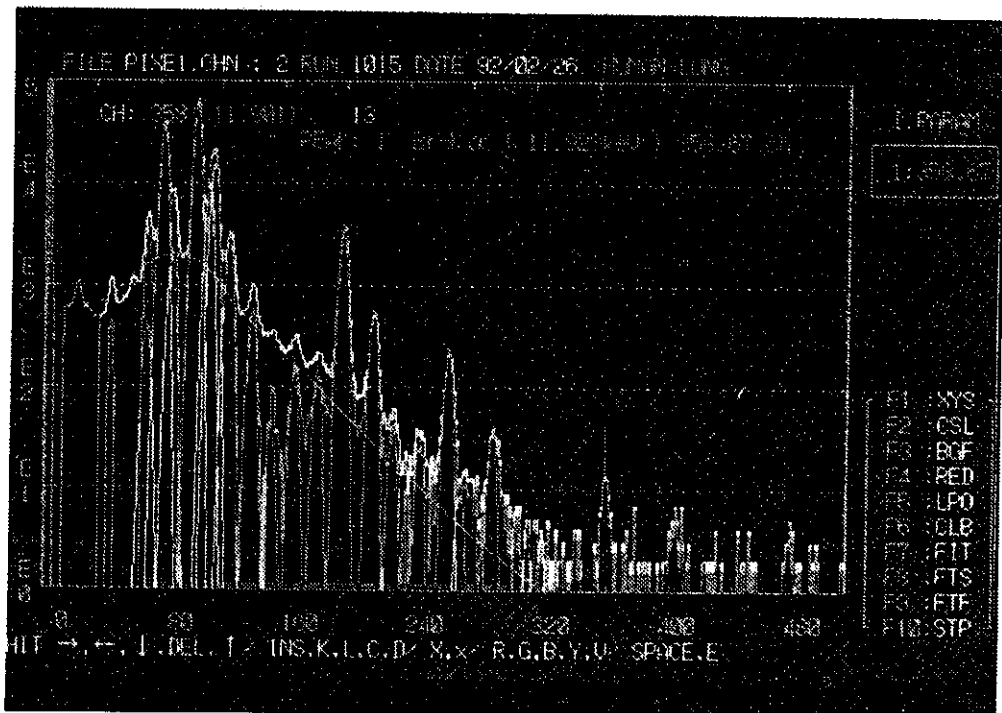


測定検体を載せるポリプロピレンフィルムとホルダー

各ホルダーの中央部円形の部分にポリプロピレンフィルムが貼られており、中央部に血液検体を滴下し乾燥の上、測定に供する。



PIXE装置本体



測定により検出された各元素のピーク

資 料

免疫影響調査へのご協力をお願い

最近、私たちの身の回りの生活環境中の化学物質による健康影響の問題が多く取り上げられるようになりました。環境汚染化学物質による健康障害は診断や治療が難しいことから、その有害な健康影響が明らかになる前に、免疫影響等の鋭敏な生体指標によって有害影響を早く察知し、生活環境中の有害要因（リスク要因）をあらかじめ取り除く事が大切と考えられています。このため厚生労働省では生活安全総合研究事業として、免疫影響を調べることによって生活環境の健康リスクを評価するための研究班を設け、検討を行っております。

東京都が行った最近の3歳児アンケート調査では約4割のお子さんが何らかのアレルギー疾患にかかっていることが報告されています。そこで研究班では昨年度から、大人に比べて地域の生活環境の影響を受けやすいと考えられる幼児（3歳児）を対象として、アレルギーや感染に関する免疫機能を調査し、異なる地域の環境要因がどのように幼児の免疫機能に影響を及ぼしているかを調査しています。

今回の調査では、3歳児健診の際にお子さん（保護者のご同意により）から、血液（腕から採血）を提供していただき、それについてアレルギーとワクチンに関する抗体等の免疫機能の検査等を行います。つきましては、皆様には、血液（約3.5ml）の提供とアンケート調査（アレルギー症状の有無と生活環境について）にご協力いただきたく、お願い申し上げます。

免疫機能検査では、感染への抵抗力の指標として麻疹（はしか）等ワクチン抗体価、アレルギーの指標として総IgE及びアレルギー（ダニ、室内のほこり、卵白、牛乳など）に対する抗体価、ならびに抗体の産生調節因子（サイトカイン）のバランス等の測定を予定しております。また、環境からの金属類の影響を見るための測定を行います。なお、ご提供いただいた血液を、これらの検査以外の目的に使用することは一切ありません。これらの検査の結果は、地域ごとのデータとして統計的に処理されますので、個人が特定されることはなく、個人情報は一切公表されませんので、ご協力いただいた皆様へご迷惑をおかけすることはありません。なお、ご希望の場合には、調査結果がまとまったところで希望された方に検査結果をお知らせいたしますので、お子さんの健康管理のご参考にしていただけます。

なお、このような研究にご協力いただく場合には、研究に関する説明と、協力者の同意「インフォームド・コンセント」が必要とされていますので、同意書にご記入下さい。

ご協力いただける場合には、別紙の調査協力同意書（白色）およびアンケート調査票（水色）にご記入の上、健診日当日

2003年1月9日(木)、14日(火)、16日(木)、

20日(月)、21日(火)、27日(月)、28日(火)

にお持ちいただくようお願いいたします。

次世代の子供たちの健康リスクを少しでも減らすことを目的とするこの調査に、どうぞよろしくご協力下さいますようお願い申し上げます。

平成14年度厚生科学研究費補助金食品・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」

研究代表者 吉田貴彦（旭川医科大学医学部衛生学講座教授）TEL/FAX 0166-68-2402/2409

免疫影響調査協力同意書

平成 14 年度厚生科学研究費補助金食品・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」

研究代表者 吉田貴彦 (旭川医科大学医学部衛生学講座教授)

私は、平成 14 年度厚生科学研究費補助金食品・化学物質安全総合研究事業に関する調査研究班が実施する免疫影響調査の趣旨について理解し、この調査に協力するため血液を提供するとともに、関連のアンケート調査に協力いたします。

平成 年 月 日

住 所： 〒 _____

氏名：^{みりがな} お子さま _____

保護者氏名 _____ 印 _____

免疫機能検査結果等の郵送希望の有無について、下記の番号を○で囲んで下さい。

1. 希望します 2. 希望しません

注意：下の太線の欄は研究班が使用しますので、何も記入しないで下さい。

受付番号：

生活環境・免疫影響についてのアンケート調査票

(選択肢のあるものについては、あてはまる項目またはその番号を ○ で囲んでください)

A. お子さまについてお尋ねします (予防接種の項目は出来るだけ母子健康手帳を見て書いてください)

1. お子さまのお住まいは

市・町	(地区・町名)
-----	---------

2. お子さまの性別は

1. 男	2. 女
------	------

3. お子さまのお生まれは

西暦	年	月	生まれ
----	---	---	-----

4. お子さまの兄弟関係は

人兄弟姉妹の	番目
--------	----

5. 麻疹(はしか)の予防接種は受けていますか
母子健康手帳に記載されています

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

はしかの予防接種を受けたのはいつですか

年	月	日
---	---	---

6. 風疹(ふうしん)の予防接種は受けていますか
母子健康手帳に記載されています

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

ふうしんの予防接種を受けたのはいつですか

年	月	日
---	---	---

7. 今までに、麻疹(はしか)と診断されたことがありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

はしかと診断されたのはいつですか

年	月または	歳	ヶ月
---	------	---	----

8. 今までに、風疹(ふうしん)と診断されたことがありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

ふうしんと診断されたのはいつですか

年	月または	歳	ヶ月
---	------	---	----

9. 今までに中耳炎に繰り返し、かかったことがありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

10. 今までに以下のような症状がありましたか
(複数回答可)

1. 胸が「せーい」、「ヒューヒュー」するようなことが年に2回以上ある
2. 熱や咳の症状がないのに、鼻水、くしゃみが長い間続く
3. 目やにがほとんどないのに、目をしきりにこすったり、かゆがる
4. 顔や身体が赤くなり、かゆがる
5. ない

11. 今までに医師から次のような診断を受けたことがありますか (複数回答可)

1. ぜんそく	2. アトピー性皮膚炎	3. アレルギー性鼻炎
4. アレルギー性結膜炎	5. 食物アレルギー	6. じんましん
7. ない		

12. 今までにアレルギーの病気で定期的に診察を受けたことがありますか

1. 受けている	2. 受けていた	3. 受けていない
----------	----------	-----------

↓

薬をつかいましたか

1. のみ薬	2. ぬり薬	3. 使わない
--------	--------	---------

アレルギーの原因がわかれば書いてください

<例：スギ花粉、ハウスダスト、卵、など>

<最近のお子さまの体調について>

13. ここ1週間以内に風邪など体調がよくない時がありましたか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

どのような症状でしたか <例：せき、ねつ、など>

14. 現在、薬を使っていますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
-------	--------	----------

↓

どのような薬ですか <例：かぜ薬、ステロイド、など>

のみ薬	ぬり薬
-----	-----

15. アレルギーに対する民間療法などを行っていますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
どのようなことですか <例：漢方薬、温泉療法、など>		

B. お子さまの生活環境についてお尋ねします

16. お子さまは、現住所に何年間住んでいますか

年	月
---	---

17. 最近1年以内に引っ越しをしましたか ……

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
以前の住所を書いてください		
市	町	

18. 新築3年以内の建物に住んだことがありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
どのくらいの期間ですか		
1. 1年未満	2. 1～2年間	3. 2～3年間

19. 自宅の近所(100m以内位)に交通量の多い道路がありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
その名前は<記入例：国道40号線、環状1号線など>		

20. 自宅の近所(100m以内位)に大きな工場や焼却場がありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
その種類は <記入例：焼却場、火力発電所、など>		

21. 住居についてお答え下さい ……

1. 木造	2. 鉄筋コンクリート	3. わからない
-------	-------------	----------

22. 暖房についてお答え下さい ……

使っているものに ○ をつけてください (複数回答可)		
1. IPON(冷暖房)	2. 排気が室外に出るストーブ	3. 排気が室外に出ないストーブ
4. 薪ストーブ	5. ガスストーブ	6. こたつ
7. セトラヒーター	8. その他	9. 使わない

23. 自宅の居間などの主な床材についてお答え下さい

あるものに ○ をつけてください (複数回答可)		
1. じゅうたん	2. たたみ	3. 板張り(フローリング)
4. ビニール床材	5. タイル	6. その他

24. お子さんが寝る場所についてお答え下さい

1. ふとん	2. ベッド	
↓		
床の材質はなにですか		
1. じゅうたん	2. たたみ	3. 板張り(フローリング)
4. ビニール床材	5. タイル	6. その他

25. 自宅でペットを飼っていて、お子さまが接したことがありますか

1. はい	2. いいえ	3. わからない
↓		
どんな動物をいつの時期ですか。<例：1年前から現在>		
種類	いつ	

26. お子さんと同居している方の中で、たばこを吸う人がいますか (お子さんの前で吸わない場合は「いいえ」に ○ をして下さい)

1. はい (何人ですか 人)	2. いいえ
-----------------	--------

C. お子さまのご両親についてお尋ねします

27. アレルギーの病気にかかったことがありますか
あればその病名に ○ をつけて下さい

父親 (複数回答可)		
1. ぜんそく	2. アトピー性皮膚炎	3. アレルギー性鼻炎
4. アレルギー性結膜炎	5. 食物アレルギー	6. じんましん
7. ない	8. わからない	

母親 (複数回答可)		
1. ぜんそく	2. アトピー性皮膚炎	3. アレルギー性鼻炎
4. アレルギー性結膜炎	5. 食物アレルギー	6. じんましん
7. ない	8. わからない	

ご協力ありがとうございました

免疫影響調査にご協力いただいた方へ

厚生労働省の「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」の研究班では、生活環境の状況と身体の免疫機能との関連を調べる研究を行っています。今回は、3歳児のお子さんについてアレルギーや免疫力等の調査を行います。つきましては、皆様には、血液（約 3.5ml）の提供とアンケート調査（アレルギー症状の有無と生活環境について）にご協力いただきたく、お願い申し上げます。

免疫機能検査では、免疫力の指標として麻疹（はしか）等ワクチン抗体価、アレルギーの指標として総 IgE 及び既知アレルゲン（ダニ、室内のほこり、卵白、牛乳など）に対する抗体価、ならびに抗体の産生調節因子（サイトカイン）のバランス等の測定を行います。

なお、このような研究にご協力いただく場合には、「研究に関する説明と、協力者の同意（インフォームド・コンセント）」が必要とされています。そのため、内容をご理解された上で、あなた（お子さんの保護者・代諾者）に研究協力に同意していただけるものとして、「調査への協力同意文書」にご署名し、ご提出いただきました。

測定されます免疫・アレルギーに関する結果は、協力された方の健康管理に役立てられますので、結果の通知を希望されます方に後日郵送にてお知らせします。個人情報の保護とお知らせする結果の内容につきましては、裏面 6. に詳しく説明しています。

本研究によって解明された成果が社会に還元されることにより、お子さん並びにあなたは研究に協力された一員として、次世代の人々のために生活環境の改善に向けて貢献されることとなります。

本研究に関する説明

1. 研究テーマ

「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」

2. 研究組織

研究機関名	研究者名	職名
研究代表者（責任者） 旭川医科大学医学部	吉田貴彦	教授
分担研究者 帝京大学薬学部 (財)食品薬品安全センター 国立医薬品食品衛生研究所	大沢基保 小島幸一 手島玲子	教授 部長 室長

3. 研究目的

この研究の目的は、免疫機能についての指標を用いて生活環境の機能影響（アレルギーや感染への感受性増加）を集団レベルで解析し、健康に対して有害な生活環境の影響を早期に検出し、健康障害の防止と環境改善の対策に結びつけようとする事です。免疫影響を調べるために、血液の中のアレルギー抗体、ワクチン抗体と、それら抗体の産生を調節しているサイトカイン（調節因子）の産生能を測定し、異なる生活環境に住む幼児（3歳児）の集団について免疫影響の程度を調べるものです。

4. 免疫影響の解析に必要なもの

免疫影響の解析に必要なものは、血液約 3.5ml と生活環境等に関するアンケートです。この血液試料について、アレルギー抗体（総 IgE 他）とワクチン抗体（抗麻疹ウイルス抗体、すなわち、麻疹の病原体に対する抗体など）とサイトカイン産生能を測定します。また、環境中の金属の影響を評価するために金属類の濃度の測定を検討します。

5. 疫影響解析の費用

この免疫指標の測定にかかる費用は、厚生労働省の研究費により支払われますので、あなたの負担はありません。

6. 個人情報の保護と結果のお知らせ

血液試料の提供者の情報（住所、氏名などの個人情報）は、分析する前に試料の整理簿から削除し、代わりに新しく符号を付けて取り扱い、さらに地域ごとのデータとして統計的に処理されますので、個人が特定されることはなく、個人情報は一切公表されません。また、試料等の提供は任意ですので、協力への同意はいつでも撤回できます。ただし、調査研究の結果が既に公表されている場合は、研究結果の廃棄ができないことがありますので、ご了承下さい。調査結果がまとまりましたら、お子さん個人の測定結果を知りたいと希望された方に限り、この符号をもとに氏名を照合し、結果を直接あなたに郵送にてお知らせいたします。

お知らせする結果は、

どのようなもの（室内のほこり、タニ、動物のフケ、卵白、小麦、大豆、牛乳）にアレルギーがあるかどうか、アレルギーの程度、麻疹（はしか）や風疹に対する抵抗力の有無です。

結果にはコメントをつけてお返ししますので、お子さんの健康管理のご参考にしていただけます。ただし、採血量が少ない場合には、測定が出来ない項目があることをご了承下さい。他地域での調査の結果とまとめるために多少時間を要しますので、結果の通知は 3 月下旬頃を予定しています。血液試料に余りがある場合は、再検査の必要に備えて保存されますが、研究終了 2 年経過後までには、当研究に直接関わらない第三者の立ち会いのもとにすべて廃棄されます。なお、今回の研究においては、DNA の抽出や検査は一切行いません。

7. 分析結果の公表

本研究で得られた結果は集団データとしてのみ解析され、厚生労働省に結果報告書として提出され公表されます。また、学会発表あるいは論文として公表される場合もあります。

6. 協力事項に関する問い合わせ先

研究代表者 吉田貴彦（旭川医科大学医学部衛生学講座教授）TEL/FAX 0166-68-2402/2409

研究分担者 大沢基保（帝京大学薬学部環境衛生学教室教授）TEL/FAX 0426-85-3753/3754

お問い合わせはできるだけ FAX にてお願いいたします。

免疫影響検査結果通知書

2003年3月12日

受付番号 _____

名前 _____ 殿 (保護者 殿)

年月日に採血しました血液の免疫影響検査結果は以下の通りです。

検査項目	感染防御抗体		アレルギー関連抗体	
	麻疹抗体価 (EIA 価)	風疹抗体価 (HI 価)	総 IgE (IU/ml)	抗原特異的 IgE
			ハウスダスト1	ネコ上皮 小麦 大豆 牛乳 卵白 (判定～4+： -は陰性、+は陽性)
備考				

(用語の解説)

麻疹抗体：はしかの病原体ウイルスの感染を防ぐ免疫グロブリンG抗体 (はしかに対する感染防御抗体)

EIA 価：酵素免疫法(EIA)という方法で測定した時の値です。予防接種が有効ですと2.0以上になります。

また、はしかに罹ると2.0以上になります。一方、はしかに罹らずなおかつ、予防接種をしていないが無効ですと2.0未満となります。

風疹抗体：風疹(三日ばしか)病原体ウイルスの感染を防ぐ免疫グロブリンG抗体 (風疹に対する感染防御抗体)。

HI 価：凝集阻止法(HI)という方法で測定した時の値です。予防接種が有効ですと8以上になります。また、風疹に罹ると8以上になります。

一方、風疹に罹らずなおかつ、予防接種をしていないが無効ですと8未満となります。

総 IgE：免疫グロブリンE抗体 (アレルギー抗体：アレルギー感受性があると増加しやすい抗体です)。

IU/ml：国際単位で表した値です。個人により高低に差が大きいのですが、アレルギーがあるとより高値となります。およそ80IU/mlを超えると高い部類に入ります。

アレルギー関連抗体：アレルギーの原因物質に対する免疫グロブリンE抗体。

- はその物質に対してアレルギーがないことを示します。+ はその数が多いほど強いアレルギーであることを示します。

今回は3歳児でアレルギーが起こりやすい7項目のみの検査です。その他の項目を検査した場合には陽性の場合もあるかもしれません。医療機関にて有料で測定してもらえます。

(問い合わせ先)

旭川医科大学衛生学講座 (4月1日より健康科学講座に改称) TEL/FAX 0166-68-2402/2409 (なるべくFAXをご利用下さい)

本通知書の内容についてのお問い合わせには、上記の受付番号が必要です。