

表11 特異的IgE検出と臨床症状出現の関係

	発症者数	特異的IgE 陽性者数*	割合	未発症者数	特異的IgE 陽性者数*	割合
東久留米1	11	5	45.5%	11	1	9.1%
東久留米2	7	0	0.0%	16	1	6.3%
東久留米計	18	5	27.8%	27	2	7.4%
旭川1	9	4	44.4%	13	4	30.8%
旭川2	7	4	57.1%	11	0	0.0%
旭川3	6	2	33.3%	4	1	25.0%
旭川4	7	0	0.0%	5	2	40.0%
旭川5	6	2	33.3%	5	0	0.0%
旭川6	5	1	20.0%	9	3	33.3%
旭川7	11	3	27.3%	2	0	0.0%
旭川計	51	16	31.4%	49	10	20.4%
総計	69	21	30.4%	76	12	15.8%

\* QAS II の7種アレルギーのどれかが陽性

表12 総IgE値が高い、あるいは特異的IgEが検出された3歳児のアレルゲン別IgE抗体測定  
(東久留米の検体、スギ及び草花粉)

試料 No	総IgE (IU/ml)	検査項目												
		ハウスダスト (判定0~4)	コナヒゲタニ (判定0~4)	ネコ上皮 (判定0~4)	小麦 (判定0~4)	大豆 (判定0~4)	牛乳 (判定0~4)	卵白 (判定0~4)	ハルガヤ (判定0~4)	カモガヤ (判定0~4)	ブタクサ (判定0~4)	スギ (判定0~4)		
H1-02	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-03	153	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-07	988	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-09	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-11	1227	2	4	0	0	0	0	±(0~1)	0	0	0	0	0	
H1-18	583	±(0~1)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-25	387	3	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
H1-26	470	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H1-27	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-09	344	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-10	220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±(0~1)	0	
H2-16	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-25	129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-27	267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-29	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-30	164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H2-32	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
陽性者数/総人数		5/17	6/17	0/17	0/17	0/17	0/17	2/17	0/17	0/17	0/17	1/17		

表13 シラカンバ特異的IgE測定結果

検体No <sup>*1</sup>	総IgE (IU/ml)	シラカンバ特異的IgE <sup>*2</sup>	検体No <sup>*1</sup>	総IgE (IU/ml)	シラカンバ特異的IgE <sup>*2</sup>
A1-01	120	0	A3-08	128	0
A1-11	117	0	A3-09	126	0
A1-18	183	0	A4-02	107	0
A1-19	216	0	A4-10	164	0
A1-20	218	0	A5-01	130 <sup>*3</sup>	0
A1-23	101	0	A5-06	889	2(0.76)
A1-24	718	0	A5-10	237	1(0.36)
A2-07	420	2(1.42)	A6-01	166	0
A2-13	186	0	A6-15	283	0
A2-14	169	1(0.50)	A7-01	636	0
A2-17	525	0	A7-09	114	0
A2-18	164	0	A7-13	226	0
A3-05	184	0			
A3-06	166	0			

26人中4人陽性、陽性率 15.4%

\*1: total IgE 100 IU/ml 以上の検体

\*2: シラカンバ特異的IgEの判定 0-6 (IU/ml) 0は0.34 IU/ml 以下

\*3: MESACUP IgEによる測定結果

表14 花粉アレルギー陽性者の年度別推移

年度	花粉アレルギー陽性者数/被験者数*
2000	4/10 (40.0%) (内、スギ 3, カモガヤ 1)
2001	5/22 (22.7%) (内、スギ 4, カモガヤ 1)
2002	2/21 (9.5%) (内、スギ 1, シラカバ 1)
2003	2/13 (15.4%) (内、シラカバ 2)

\*被験者: 血清中総IgEが200IU/mlを超え、かつ何らかの特異的IgEが検出された者の血清を使用

表15 スギ花粉アレルゲン Cry j 1およびCry j 2に対する抗体保持者

	人数 (名)	Cry j 1 陽性者(名) (陽性率 %)	Cry j 2 陽性者(名) (陽性率 %)	j1 j2のいずれか 陽性者(名) (陽性率 %)
2001	185	24 (12.9%)	10 (5.4%)	29 (15.7%)
2002	78	8 (10.3%)	2 (2.6%)	9 (11.5%)
2003	44	10 (22.7%)	2 (4.5%)	10 (22.7%)
計	307	42 (13.7%)	14 (4.6%)	48 (15.6%)

表16 総IgE濃度による各種アレルゲン特異的抗体保持率の違い

2001-2003 年度

総IgE (IU/ml)	人数 (名)	食物アレルゲン 陽性者(名) (陽性率 %)	室内吸入アレルゲン 陽性者(名) (陽性率 %)	スギアレルゲン 陽性者(名) (陽性率 %)
≥100	89	14 (15.7 %)	55 (61.8 %)	22 (24.7 %)
<100	218	6 (2.8 %)	25 (11.5 %)	26 (11.9 %)
計	307	20 (6.5 %)	80 (26.1 %)	48 (15.6 %)

図1 総IgE濃度と検出された特異的IgEの数の関係

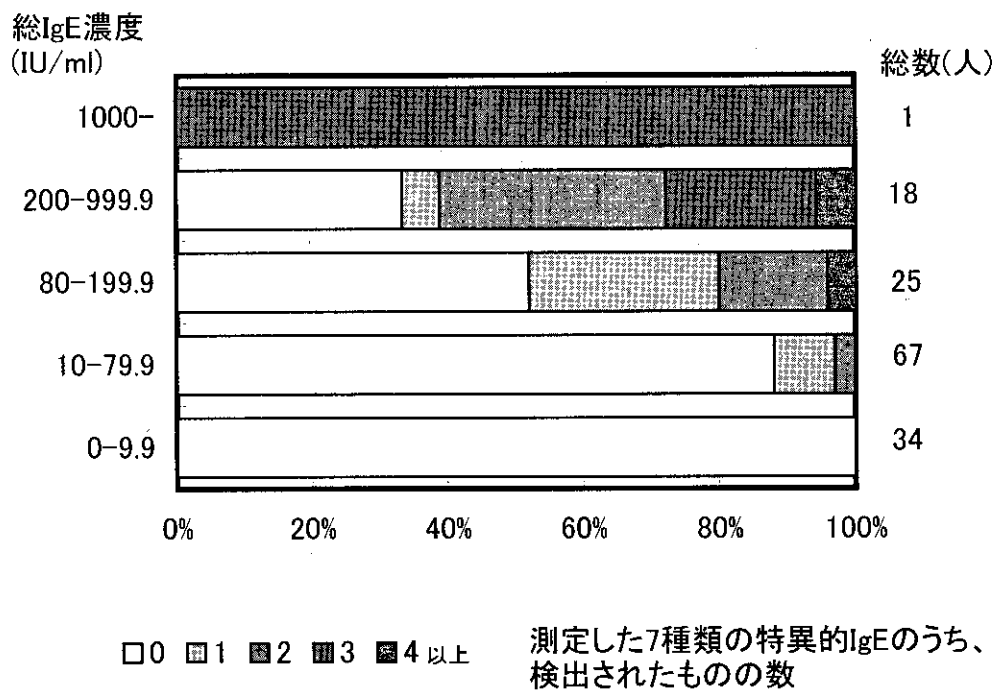
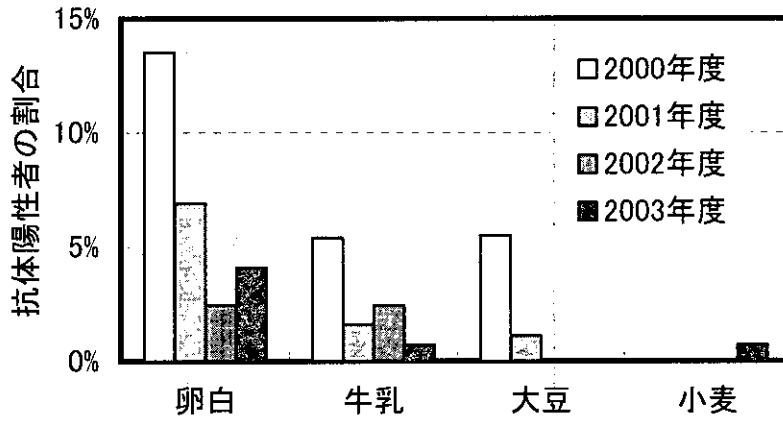


図2 年度別アレルギー特異的IgE保持率

a 食物アレルギー特異的IgE



b 吸入アレルギー特異的IgE

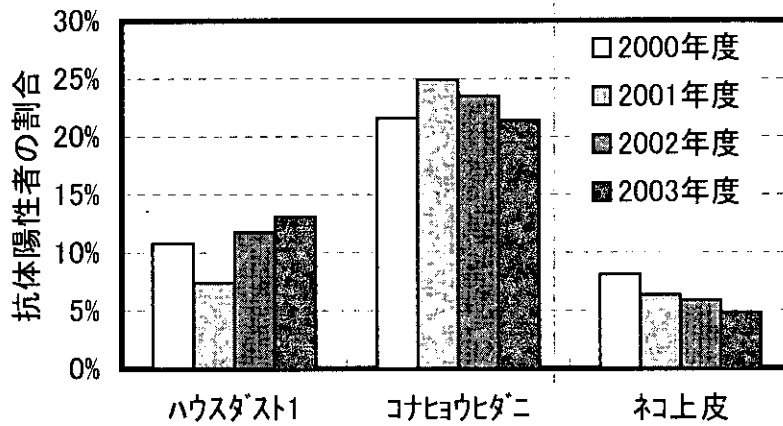
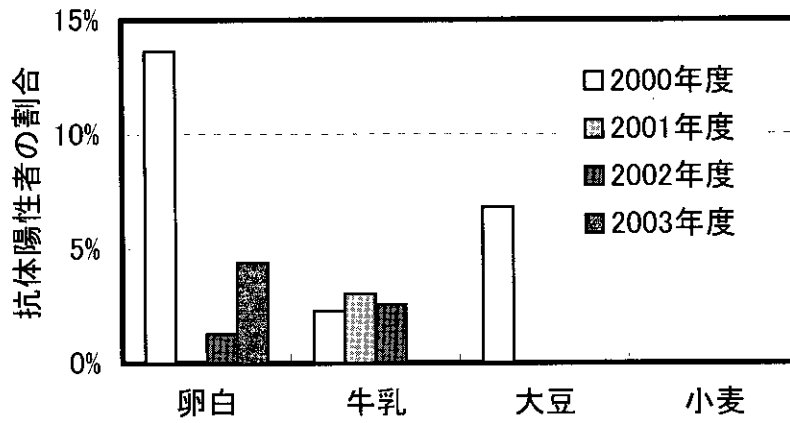
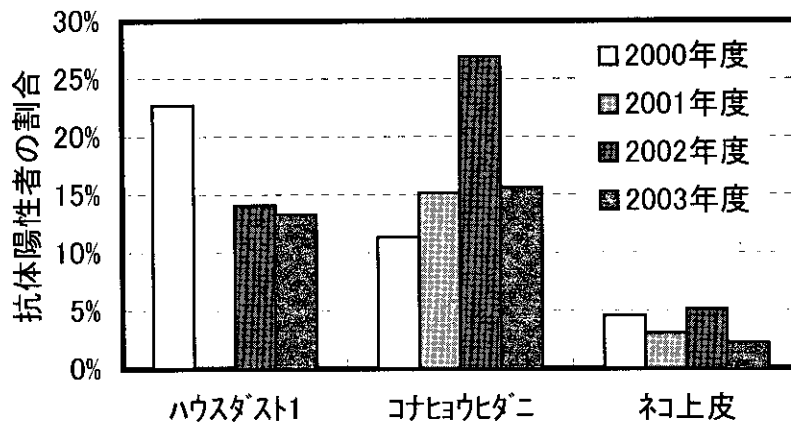


図3 東久留米年度別アレルギー特異的IgE保持率

a 東久留米市食物アレルギー特異的IgE



b 東久留米市吸入アレルギー特異的IgE



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（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

—小児での毒性評価指標としてのサイトカインバランスの解析—

（分担）研究者 大沢基保 帝京大学薬学部教授

研究要旨

本分担研究ではTh1特異的なサイトカインであるIFN- $\gamma$ とTh2特異的なサイトカインであるIL-4の発現量ならびにそれらのバランスを末梢血サンプルにおけるmRNA量で測定し、環境因子の健康影響を評価しようとするものであり、昨年度までに測定法を確立し、東久留米および旭川における調査を実施している。今年度は同一地域から得たサンプルを用いて継続的に調査を行い、測定値の比較検討を行った。東久留米29サンプルおよび旭川89サンプル、計118サンプルに関して測定を行った結果、両地域でIL-4 mRNA発現量はほぼ同等であるが、その一方で旭川のサンプルではIFN- $\gamma$  mRNAが検出限界以下のものが多く、全体として東久留米と比較して旭川ではTh2優位である傾向が認められた。また、昨年度の旭川のサンプルは両サイトカインmRNAとも比較的発現量が高かったことも分かった。これらの結果は何らかの原因による地域差や年次変化を反映している可能性がある。また、今後の継続的な調査研究において、構成的発現をするG3PDH mRNA量を用いた測定値の標準化がきわめて有効であることが分かった。

研究協力者

大塚文徳（帝京大学薬学部助教授）

高橋和子（帝京大学薬学部助手）

A. 研究目的

細胞性・液性免疫応答の方向性はTリンパ球のサブセットであるTヘルパー-1細胞（Th1）とTヘルパー-2細胞（Th2）のバランスによって制御され

ており、その異常な偏りと様々な疾患との関連が認識されるようになってきている<sup>1,2)</sup>。このことはTh1機能とTh2機能のバランスを指標として、環境要因の健康影響を予見できる可能性を示唆しているが、ヒトから得られる生体試料は限られている上に多くのサンプルに関してそれぞれのT細胞機能を測定することは困難である。一方、



Th1 および Th2 細胞はそれぞれ特異的なサイトカインを産生しており、現在ではこれらのサイトカインの産生量やバランスを指標として多くの研究が行われるようになってきている。そこで本研究班では、ヒト末梢血を用いて Th1 特異的なサイトカインである IFN- $\gamma$  と Th2 特異的な IL-4 に着目してその測定法を検討してきた。その結果、それらサイトカイン mRNA を高感度かつハイスループットで測定できる RT-PCR 法を確立し、前年度においては東京都東久留米市あるいは北海道旭川市で得た 3 歳児末梢血サンプル中のサイトカインレベルを測定し、その発現レベルやバランスには地域差がある可能性を見いだしている。本年度はそのような地域差に加えて年次変化の有無に関する情報を得るため、同一地域から得た 3 歳児末梢血を用いて継続的な調査を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 血液サンプルの採取・保存ならびに RNA 調製

3 歳児（東久留米・旭川、計 118 名）から採取した血液 (0.5 ml) は、PAXgene 試薬 (PreAnalytiX/QIAGEN) 1.38 ml が入ったプラスチックチューブに添加し、穏やかに 10 回転倒混和した。これらのサンプルは、常温で 2 時間以上放置後、RNA 調製時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

上記血液サンプルを室温で融解し、よく攪拌した後、 $4000 \times g$  で 10 分間遠心し、上清を吸引除去した後、沈

査を RNase-free の超純水 1 ml で再懸濁・遠心を 2 回繰り返して洗浄した。RNA の単離は PAXgene の精製キットマニュアルに従って行った。すなわち、沈査に含まれるタンパクを Proteinase K によって分解した後、シリカゲルメンブレンを装着したミニカラムに添加し、遠心によって RNA をトラップした。エタノールを含む溶液で洗浄後 RNase-free の超純水でメンブレンより RNA を抽出した。

### 2. RNA の定量と保存

単離した RNA サンプル  $1 \mu\text{l}$  を 8 倍に希釈して分光光度計 (GeneQuant Pro; Amersham Pharmacia Biotech) によりその濃度を測定した。各サンプルは定量値に基づいて  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  に希釈して  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 3. RT-PCR と増幅産物の定量

RT-PCR は Ready To Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を用い、逆転写後に PCR プライマーを添加する 2 ステップ法によって行った。RT-PCR Beads を適量の RNase フリーの精製水で溶解し、total RNA (IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA 測定には  $100 \text{ ng}$ 、G3PDH mRNA 測定には  $50 \text{ ng}$ ) と  $1 \mu\text{l}$  の  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  oligo(dT)<sub>12-18</sub> を加えて全量を  $47.5 \mu\text{l}$  とし、 $45^{\circ}\text{C}$ 、30 分間逆転写した。 $95^{\circ}\text{C}$  5 分加熱して逆転写酵素を失活させた後、それぞれに対する増幅用プライマーセット ( $5 \text{ pmole each}$ ) を添加して PCR を行った。PCR の条件は、 $95^{\circ}\text{C}$  5 分で cDNA を変性させた後、 $90^{\circ}\text{C}$  70 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  70 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  115 秒の反応を 34 サイクル (G3PDH の場合は

22 サイクル) 行った後、72°C 10 分間の伸長反応を行った。

RT-PCR 測定では毎回精製した各 cDNA の希釈系列を作成し、RNA サンプルの代わりに反応液に添加して PCR を行い、検量線を作成した。IFN- $\gamma$  と IL-4 cDNA においては反応当たり  $1 \times 10^6$  copies から、G3PDH cDNA では  $1 \times 10^5$  copies から、2 倍希釈によってそれぞれ 8 点の濃度系列を作成した。

反応終了後、泳動用色素液 (0.5M EDTA, 50% glycerol, 0.3 % Bromophenol blue) 5ml を添加し、その 5  $\mu$ l を 1.1 % アガロース電気泳動に供した。泳動用緩衝液は 0.5 X トリス-ホウ酸-EDTA 緩衝液を用い、増幅産物の染色のためにアガロースゲルは 10,000 倍希釈した GelStar (FMC Bioproducts) を含有させた。泳動終了後、トランスイルミネーター (330nm) 上で DNA を検出し、ポラロイド写真を撮影した。増幅産物の定量は、写真をスキャナーによってコンピュータに取り込み (600dpi; グレイスケール)、画像処理プログラム (Photoshop Element) および画像解析プログラム (NIH Image Ver1.60) によって行った。増幅された IFN- $\gamma$ 、IL-4 cDNA の解析値は G3PDH cDNA  $10^6$  コピーあたりに換算して表示した。

定量値の統計解析は、ノンパラメトリック検定である Mann-Whitney の U 検定を用いた。

### C. 研究結果および考察

#### 1. G3PDH mRNA による測定値標準化

の有用性

東京都東久留米市並びに北海道旭川市在住の 3 歳児から得た血液サンプル (それぞれ 29 サンプルおよび 89 サンプル、計 118 サンプル) を用い、昨年度と同じ RNA 調製法と RT-PCR 法により IFN- $\gamma$ 、IL-4 および G3PDH の mRNA 量を測定した (表 1-1-3)。

内部標準として用いた G3PDH mRNA の発現量は昨年同様個人差があり、最大で 26 倍の開きがあった (表 1-2: A1-11 と A2-18)。また、東久留米と旭川のサンプルを比較すると、東久留米の方が旭川よりも平均値で約 1.3 倍高く、これも昨年度と全く同じ傾向を示した (表 1-1-3)。しかし、東久留米、旭川両サンプルとも total RNA 100 ng 当たりの G3PDH mRNA 量の平均値は、昨年度の 1/4 程度であったが、IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA 量も同じく昨年度よりも低レベルであるため、G3PDH mRNA 当たりで標準化すると昨年度とほぼ同レベルとなる。このことは、G3PDH mRNA 量による測定値の標準化は個人差の補正のみならず、アッセイごとの測定値変動を補正するためにも有用であると考えられる。

#### 2. 東久留米、旭川における IFN- $\gamma$ および IL-4 mRNA 発現の比較

G3PDH mRNA 当たりで補正した IFN- $\gamma$  および IL-4 mRNA それぞれの発現レベルの分布を図 1 に示す。IFN- $\gamma$  mRNA の発現レベルは東久留米と旭川の間で差がないように見えるが、統計的には旭川が東久留米に比して有意に低い ( $p < 0.0001$ )。これは図 2 の IFN-

$\gamma$  と IL-4 mRNA 発現量の対散布図からもわかるように、東久留米のサンプルでは 29 例中 1 例のみが検出限界以下であるのに対して、旭川の場合では約半数 (51.6%) ものサンプルが検出限界以下であったためである。しかし、IFN- $\gamma$  mRNA を発現しているサンプルにおいてはその量の分布に地域差は認められなかった。一方、IL-4 mRNA の発現レベルに関しては、旭川のサンプルの数例が高い値を示しているが東久留米に比して際だって有意な差は認められない。従って、IFN- $\gamma$ /IL-4 の値で考えた場合、旭川のサンプルは東久留米に比して Th2 優位に傾いていることになる (図 3)。しかし、IL-4/IFN- $\gamma$  値は IFN- $\gamma$  が発現していないサンプルを計算に入れないために両地域での有意差はない。これは IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA がともに発現しているサンプルに関する限り、両地域においてサイトカインバランスに差がないことを示している。

### 3. 昨年度の測定値との比較

同一地域から得たサンプルを同じ方法によって測定した昨年度の結果との比較を IFN- $\gamma$  と IL-4 mRNA 発現量の対散布図で図 4 に示した。一見して昨年度は両サイトカイン mRNA とも旭川のサンプルの方が東久留米のものよりも発現量が高いことが分かる。一方、東久留米においては昨年度も今年度も同様な分布を示していることから、昨年度の旭川のサンプルにおける高発現は単純な測定法の問題とは考えられないが、その原因は今のところ

不明である。また昨年度の旭川の測定値を除くと残り 3 グループの分布はよく似ている。これらの分布は 3 歳児の標準的なサイトカイン発現パターンを示しているものと考えられ、今後多様な地域のサンプルを測定解析する際の基準となりうる。

### 4. 臍帯血サンプルの測定

環境要因の胎児への影響を調べるための試料として臍帯血が有用であるかどうかを検討するため、旭川医科大学医学部付属病院で採取された臍帯血 13 例に関して、IFN- $\gamma$  および IL-4 mRNA 発現レベルを測定した<sup>3)4)</sup>。各サイトカイン mRNA 発現レベルの分布図 (図 5) から明らかなように、IFN- $\gamma$  mRNA はすべてのサンプルに関して検出できなかった。一方、IL-4 mRNA の発現はすべてのサンプルにおいて認められ、そのレベルは臍帯血サンプルと同年度に採取した昨年度旭川の三歳児とほぼ同等であった。従って、臍帯血サンプルでは Type 2 サイトカイン優位すなわち Th2 優位であることがわかる。これは、Th1/Th2 バランスが幼年期に Th2 優位から Th1 優位へシフトするという考え方と一致し、Th1/Th2 バランスをサイトカイン mRNA の発現量によって測定することの妥当性を裏付けるとともに、臍帯血サンプルが胎児に対する環境要因の影響を評価する上で有用であることを示唆している。

#### D. 結論

本年度は、本研究班が確立したハイスループット RT-PCR 法を用いて、前年度と同じ地域（東久留米と旭川）から得た3歳児末梢血サンプルにおける Th1 サイトカイン（IFN- $\gamma$ ）と Th2 サイトカイン（IL-4）の mRNA を測定した。その結果、

- 1) 試薬のロット差や測定者の違いによって測定値が変動しやすい RT-PCR 法を用いて何年にもわたる継続的な調査を行うには測定値の標準化が必要であるが、その目的のためには構成的に発現している G3PDH mRNA 量による補正が有効であることが分かった。
- 2) 今年度の旭川のサンプルは東久留米のものに比べて IFN- $\gamma$  mRNA が検出限界以下となるものが多く、なんらかの地域差を反映している可能性がある。しかし、両方のサイトカイン mRNA を発現しているものに関してはその発現量の分布に地域差は認められなかった。一方、前年度報告しているように、臍帯血においては IFN- $\gamma$  mRNA の発現が認められないことから考えて、この結果は両地域における環境因子の影響以外に3歳児の発育状況などの要因も関与している可能性もあり、成人型である Th1 優位な状態への移行がヒトにおいていつ頃起こるのかという点に関して基礎的な研究が必要である。
- 3) 昨年度との比較から、昨年度の旭川のサンプルで IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA がともに高発現していた可能性がある。また、3歳児血液サンプルにおけ

る両サイトカイン mRNA の発現分布に関して基準となるものが得られ、今後広範囲の調査を行う際に有用であると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Shearer, G. M., Mechanisms Ageing Development, 94:1-5, 1997.
- 2) 大沢基保、第6回免疫毒性研究会・要旨集、p5-6、1999.
- 3) 笹本 繁、大塚文徳、高橋和子、吉田貴彦、大沢基保、日本薬学会第123年会・要旨集-3、p193、2003.
- 4) 大塚文徳、笹本 繁、高橋和子、吉田貴彦、大沢基保、第10回免疫毒性研究会・要旨集、2003.

表1-1

Sample (東久留米)	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 <sup>6</sup> copies of G3PDH mRNA		Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$ /IL-4	IL-4/IFN- $\gamma$
H1-02	8520738	3060	9710	359	1140	0.32	3.17
H1-05	10349425	4717	17479	456	1689	0.27	3.71
H1-07	15439005	2493	5936	161	384	0.42	2.38
H1-09	15611492	2950	26886	189	1722	0.11	9.11
H1-10	9312749	0	9710	0	1043	0.00	-
H1-12	15962267	4307	18973	270	1189	0.23	4.41
H1-13	7971255	2633	14045	330	1762	0.19	5.33
H1-16	23549007	28148	20736	1195	881	1.36	0.74
H1-17	12853026	11111	26340	864	2049	0.42	2.37
H1-18	16874076	35029	16892	2076	1001	2.07	0.48
H1-19	23549007	3949	22818	168	969	0.17	5.78
H1-20	16780599	14406	47413	858	2825	0.30	3.29
H1-24	23680188	6700	5936	283	251	1.13	0.89
H1-25	17253221	3398	23451	197	1359	0.14	6.90
H1-26	18340373	2793	25805	152	1407	0.11	9.24
H1-27	15353478	2550	7910	166	515	0.32	3.10
H1-28	14850173	3074	33005	207	2223	0.09	10.74
H2-01	19280622	8225	2425	427	126	3.39	0.29
H2-09	18238773	21028	6947	1153	381	3.03	0.33
H2-10	14125981	2743	19234	194	1362	0.14	7.01
H2-13	21072775	31833	12504	1511	593	2.55	0.39
H2-15	19713840	11010	5936	558	301	1.85	0.54
H2-16	14523836	13890	3187	956	219	4.36	0.23
H2-18	15962267	6431	11209	403	702	0.57	1.74
H2-22	22903924	8188	31678	357	1383	0.26	3.87
H2-23	14443379	6460	4547	447	315	1.42	0.70
H2-27	14850173	6033	20878	406	1406	0.29	3.46
H2-31	9057642	5384	7697	594	850	0.70	1.43
H2-32	20956039	14210	3781	678	180	3.76	0.27
Average	16254460	9198	15968	539	1042	1.03	3.28
SD	4526997	9116	10825	469	684	1.25	3.05

表1-2

Sample (旭川)	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 <sup>6</sup> copies of G3PDH mRNA			Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$ /IL-4	IL-4/IFN- $\gamma$	
A1-01	27942422	4346	12967	156	464	0.34	2.98	
A1-04	19361539	3476	2785	180	144	1.25	0.80	
A1-05	24297922	27766	6385	1143	263	4.35	0.23	
A1-06	11940888	2858	13080	239	1095	0.22	4.58	
A1-07	21128770	2693	15682	127	742	0.17	5.82	
A1-08	23191962	0	8418	0	363	0.00	-	
A1-09	20642315	4426	4365	214	211	1.01	0.99	
A1-10	23738502	0	15149	0	638	0.00	-	
A1-11	60973906	3605	2076	59	34	1.74	0.58	
A1-12	17536691	4426	3835	252	219	1.15	0.87	
A1-13	17742122	4077	15413	230	869	0.26	3.78	
A1-14	15428036	0	7021	0	455	0.00	-	
A1-15	13892789	3540	3610	255	260	0.98	1.02	
A1-16	34862966	0	3037	0	87	0.00	-	
A1-17	22790331	0	5806	0	255	0.00	-	
A1-18	26361766	0	15682	0	595	0.00	-	
A1-19	9514969	3445	21590	362	2269	0.16	6.27	
A1-20	7851486	0	11490	0	1463	0.00	-	
A1-23	18696752	0	11894	0	636	0.00	-	
A1-24	13337879	0	8132	0	610	0.00	-	
A2-02	13183443	2781	3704	211	281	0.75	1.33	
A2-03	5800243	0	2058	0	355	0.00	-	
A2-05	10203633	0	25663	0	2515	0.00	-	
A2-06	10323162	5433	4403	526	427	1.23	0.81	
A2-07	3434316	3276	4403	954	1282	0.74	1.34	
A2-08	9514969	0	2264	0	238	0.00	-	
A2-09	9682650	2781	11293	287	1166	0.25	4.06	
A2-10	12080768	2897	29214	240	2418	0.10	10.08	
A2-11	8568133	2470	7082	288	827	0.35	2.87	
A2-12	21128770	0	2303	0	109	0.00	-	
A2-13	13415774	0	24366	0	1816	0.00	-	
A2-14	10085488	2493	4217	247	418	0.59	1.69	
A2-15	12365462	0	2577	0	208	0.00	-	
A2-17	10203633	0	5418	0	531	0.00	-	
A2-18	2324879	0	10630	0	4572	0.00	-	
A2-19	13652198	3018	26110	221	1913	0.12	8.65	
A3-01	7581901	0	5756	0	759	0.00	-	
A3-03	7194780	0	2041	0	284	0.00	-	
A3-04	6787784	0	0	0	0	-	-	
A3-05	2917625	2858	1971	979	676	1.45	0.69	
A3-06	10203633	0	21220	0	2080	0.00	-	
A3-07	10085488	0	13776	0	1366	0.00	-	
A3-08	7670719	0	1521	0	198	0.00	-	
A3-09	12080768	0	4480	0	371	0.00	-	
A3-10	11397379	3130	2668	275	234	1.17	0.85	
A4-01	14898307	0	2323	0	156	0.00	-	
A4-02	10566437	0	12745	0	1206	0.00	-	
A4-03	5601089	0	1495	0	267	0.00	-	
A4-04	8924602	0	5659	0	634	0.00	-	
A4-05	7851486	0	9979	0	1271	0.00	-	
A4-06	9241929	0	3939	0	426	0.00	-	
A4-07	10752648	2481	11133	231	1035	0.22	4.49	
A4-08	8468925	0	4770	0	563	0.00	-	
A4-09	11134973	0	8946	0	803	0.00	-	
A4-10	5073180	0	17963	0	3541	0.00	-	
A4-11	3092567	2871	12250	928	3961	0.23	4.27	
A4-12	2720709	0	8241	0	3029	0.00	-	
A5-03	6329662	2793	4578	441	723	0.61	1.64	
A5-06	7670719	0	15668	0	2043	0.00	-	
A5-07	4463168	3032	3629	679	813	0.84	1.20	
A5-08	4730780	2832	8185	599	1730	0.35	2.89	
A5-09	6827425	2585	7644	379	1120	0.34	2.96	
A5-10	5223060	2425	2375	464	455	1.02	0.98	
A5-12	3128794	2562	5321	819	1701	0.48	2.08	

表1-3

Sample (旭川)	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 <sup>6</sup> copies of G3PDH mRNA		Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-4	IFN- $\gamma$ /IL-4	IL-4/IFN- $\gamma$
A6-01	4335093	4739	7489	1093	1728	0.63	1.58
A6-02	12222286	2515	3604	206	295	0.70	1.43
A6-03	14985315	6229	4641	416	310	1.34	0.75
A6-04	11530892	2550	2723	221	236	0.94	1.07
A6-05	10628146	4040	2916	380	274	1.39	0.72
A6-06	8618172	0	4641	0	539	0.00	-
A6-07	16738480	3116	12335	186	737	0.25	3.96
A6-08	8273942	2493	4869	301	588	0.51	1.95
A6-11	14985315	0	2492	0	166	0.00	-
A6-12	8872784	0	0	0	0	-	-
A6-13	13731929	0	6713	0	489	0.00	-
A6-14	9188268	0	3654	0	398	0.00	-
A6-15	10383451	3638	7644	350	736	0.48	2.10
A7-01	6947744	3060	3729	440	537	0.82	1.22
A7-02	5936931	0	0	0	0	-	-
A7-03	6292911	0	2425	0	385	0.00	-
A7-04	6899229	0	4160	0	603	0.00	-
A7-05	12091145	2806	3654	232	302	0.77	1.30
A7-06	10065920	0	6270	0	623	0.00	-
A7-08	22030385	0	5737	0	260	0.00	-
A7-09	5743632	2755	5659	480	985	0.49	2.05
A7-11	11825438	0	8074	0	683	0.00	-
A7-12	12226228	2743	3017	224	247	0.91	1.10
A7-13	13288644	2706	4578	204	345	0.59	1.69
A7-14	11759929	2657	4770	226	406	0.56	1.80
Average	12128363	1836	7530	190	832	0.38	2.41
SD	8134774	3266	6264	274	874	0.62	2.14

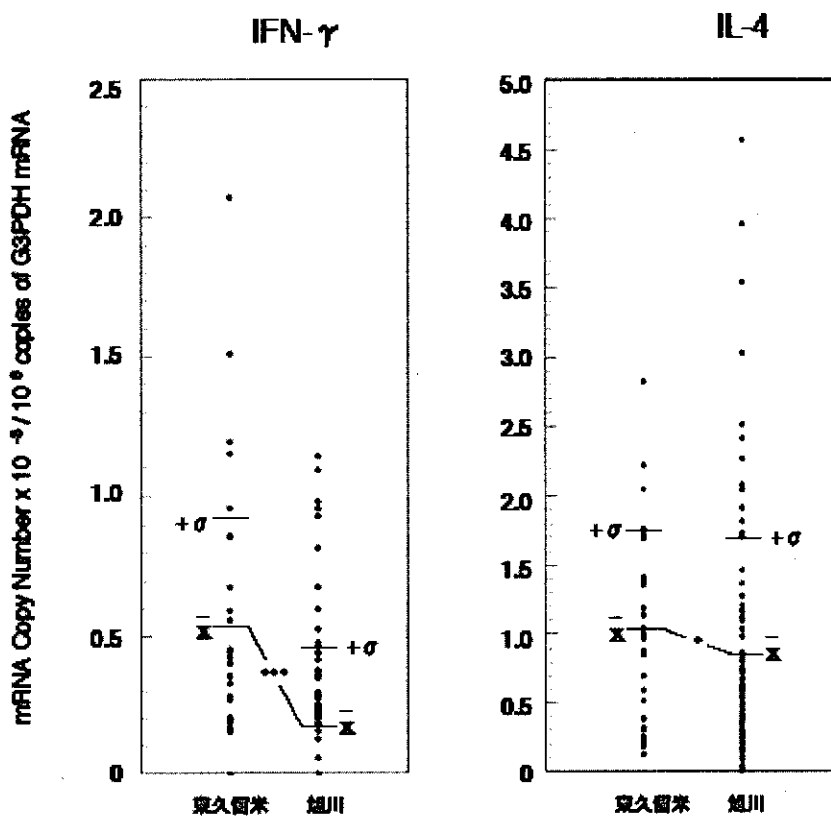


図1 東久留米と旭川の血液サンプル中のIFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA発現レベルの比較  $\bar{x}$  : 平均値 + $\sigma$  : 平均値+標準偏差、\* : 0.01<p<0.05、\*\*\* : p<0.001

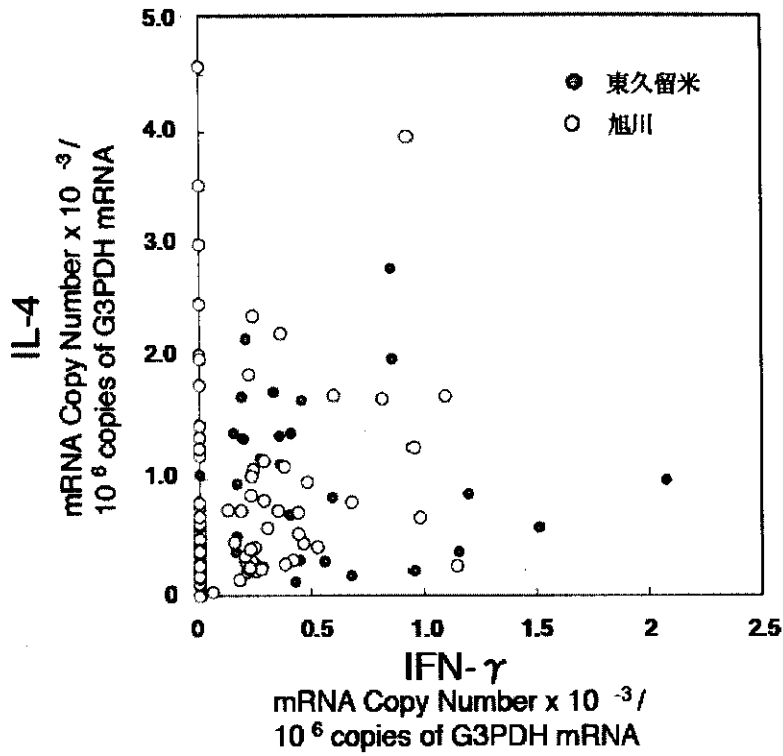


図2 IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA発現レベルの対散布図  
 (東久留米と旭川の比較)

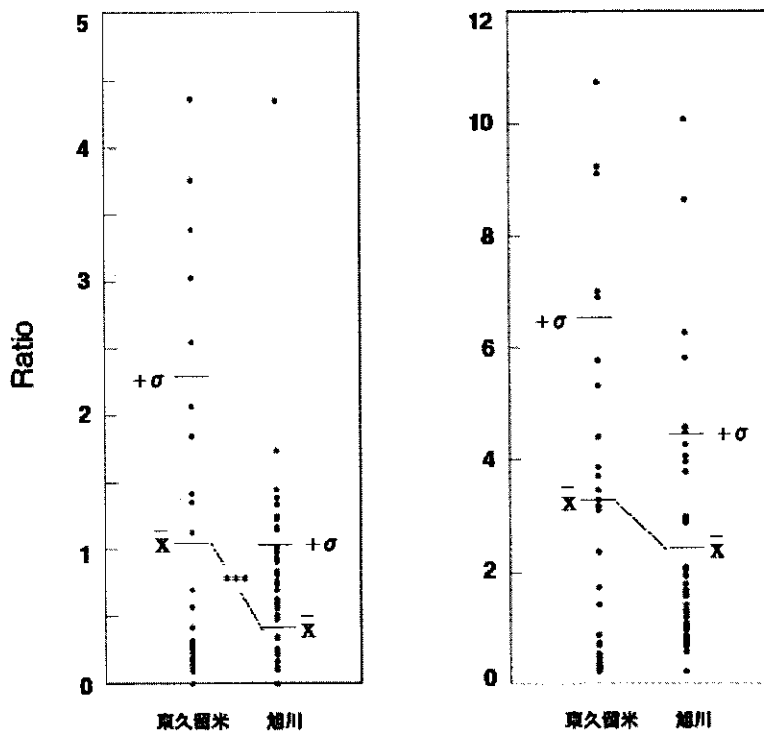


図3 サイトカインバランスの比較  
 \*\*\* :  $p < 0.001$



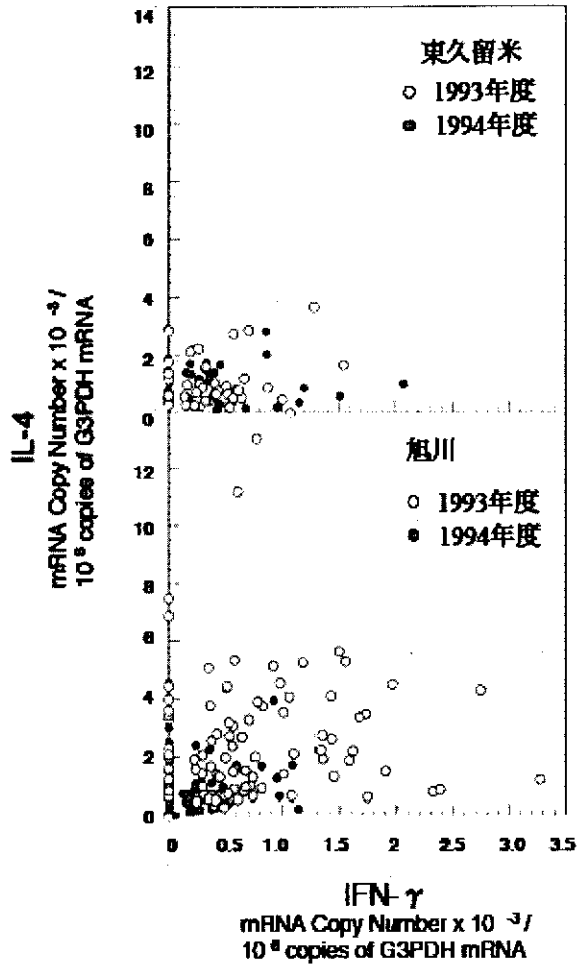


図4 IFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA発現レベルの年次推移

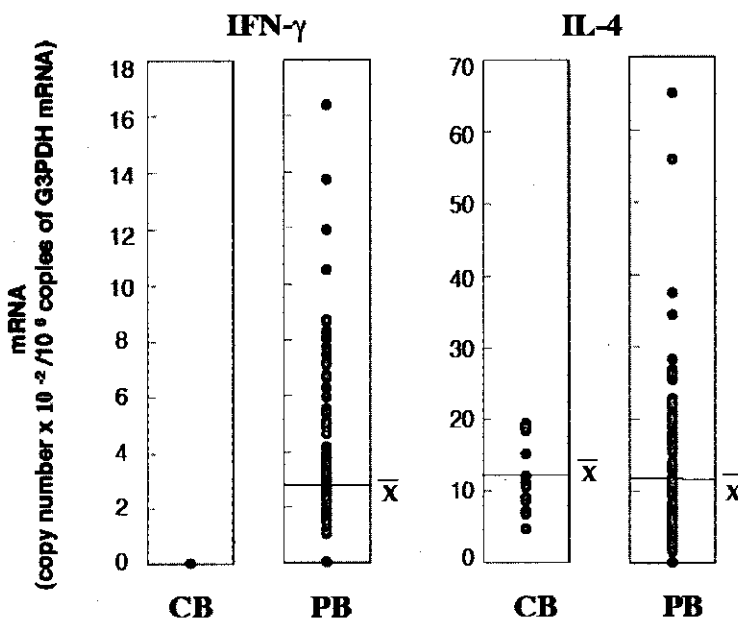


図5 臍帯血サンプルにおけるIFN- $\gamma$ 、IL-4 mRNA発現レベル

CB: cord blood,

PB: peripheral blood (2002年度旭川のサンプル)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（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

—小児全血中金属濃度の測定—

（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長

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の1つと考えられる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。第2年度に続いて第3年度（平成15年度）には、原子吸光光度法に比較して、前処理法がより簡便で、しかも微量で複数の金属を同時に測定が可能であることを特徴とする荷電粒子励起X線発光分光分析を用いて検討した。全血を用いて総計29種の金属元素等を同定定量する条件が検討できた。採血した血液について、確立した方法で測定した結果から、旭川市と東久留米市の間の比較において、有意な差を示した金属元素等は、有意水準0.01ではRb、Pb、Fe、Co、Mg、Al、Cl、K、Ni、Ag、Pであり、0.05ではGa、Br、Na、Asであった。今後、これらの値とアンケート調査の項目等との詳細な相関性の検討等により、さらに有益な情報が得られることが期待される。

研究協力者

金澤由基子（食品薬品安全センター秦野研究所）

新藤智子（食品薬品安全センター秦野研究所）

A. 研究目的

環境リスクの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

条件等を我々は検討してきている。初年度は鉛に着目して、マイクロウェーブ法による湿式灰化前処理を行い、原子吸光光度法による測定を検討した。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分布差があるのではないかと考えられる結果であったが、検出限界以下の値が相当数あったこと、検体数が限られていたこと、などもあり、必ずしも環境要因との相関は明確にはならなかった。そこで、第2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

情から採血量に必ずしも多くが期待できず、測定に用いることのできる血液量に限界があること、などを考えて、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、原子吸光光度法に比較して前処理法もより簡便でしかも微量で測定が可能な、荷電粒子励起 X 線発光分光分析を試みた。この方法では複数の金属を同時に極めて高感度で検出定量できることが期待される。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。こ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良いこと、検出感度が原子吸光光度法に比べると優れていること、などの利点がある。第 2 年度に続いて、第 3 年度も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を用いて測定条件等を含めて検討を行ったのち、その測定値について検討した。

## B. 研究方法

限られた試験試料でできるだけ多くの情報を得ることを期待して、荷電粒子励起 X 線発光分光分析を用いることとした。これは日本アイソトープ協会が運営する仁科記念サイクロトロンセンターで、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が、さらにどのような金属元素等の測定が可能であるかも検討した。通常は 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 $\mu$ 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 装置にかける。照射陽子は 2.9MeV のエネルギーで、平均電流は 80nA である。検出感度の向上、鉛以外の金属についての動態の解明、3 歳児検診時の採血という事情から採血量に必ずしも多くが期待できず、測定に用いることのできる血液量に限界があること、などを考えて、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、条件設定を行った。

## C. 研究結果および考察

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良いこと、検出感度が原子吸光光度法に比べると優れていること、などの利点を確認できた。ただし、利用できる日時が現時点では限られること、放射性物質の取扱いに留意しなくてはならないこと、などの点で、効率的な測定へ向けた検討がさらに必要である。

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った後、全サンプルを測定に供した。そして、客観的環境汚染因子指標として血液中に存在するどの微量金属が免疫指標として採用できるか検討を加えた。

測定が可能であった金属元素等を周期律表の族の順に並べると、第 1 族はナトリウ

ム (Na)、カリウム (K)、ルビジウム (Rb)、第 2 族はマグネシウム (Mg)、カルシウム (Ca)、ストロンチウム (Sr)、第 3 族はイットリウム (Y)、第 4 族はチタン (Ti)、第 5 族はバナジウム (V)、ニオブ (Nb)、第 6 族はクロム (Cr)、モリブデン (Mo)、第 7 族はマンガン (Mn)、第 8 族は鉄 (Fe)、第 9 族はコバルト (Co)、第 10 族はニッケル (Ni)、第 11 族は銅 (Cu)、銀 (Ag)、第 12 族は亜鉛 (Zn)、水銀 (Hg)、第 13 族はアルミニウム (Al)、ガリウム (Ga)、第 14 族は鉛 (Pb)、第 15 族はリン (P) ヒ素 (As)、第 16 族は硫黄 (S)、セレン (Se)、第 17 族は塩素 (Cl)、臭素 (Br) の 29 元素であった。全てのサンプルで明らかに検出限界値以上の値を示した元素は Ca、Rb、Fe、Cu、Zn、Br、Na、Mg、S、Cl、K、P であった。検出限界値以下の測定値を含む例が認められた元素は、Mn(0.000085)、Pb(0.000295)、Ti(0.0497)、Cr(0.000445)、Co(0.00001)、Ga(0.00001)、Hg(0.000185)、Se(0.000065)、Sr(0.00029)、Nb(0.0001)、Al(0.0095)、As(0.0008)、Y(0.000055)、V(0.000345)、Ni(0.000055)、Mo(0.000055)、Ag(0.00135) で、括弧内に示した値が検出限界値で ppm または  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である。

旭川市 (112 例) と東久留米市 (54 例) のそれぞれの平均と SD、最大値と最小値、それに相互の有意差検定の結果は表 1 に示した。測定値の中には最大値と最小値の間に、大きな開きがある元素類もあるが、個別のサンプルについて明らかに除くべき理由が見当たらない測定値については、そのままの測定値を統計処理に用いることとした。検出限界値が数値として示されているものは、その数値をそのまま用いて統計計

算処理を行った。旭川市と東久留米市の間の比較において、有意な差を示した金属は、有意水準 0.01 では Rb、Pb、Fe、Co、Mg、Al、Cl、K、Ni、Ag、P であり、0.05 では Ga、Br、Na、As であった。ただし、Co は旭川市では全てが検出限界値以下の値であった。また、Ni と Ag は、東久留米市において両者ともほとんどの例で検出限界値以下であった。他の有意差のあった 12 金属については、分布図 (図 1-12) を作成した。

また、同じ市内で相互の金属量に相関があるかを見た結果のうち、相関係数 0.5 以上のものをみると、旭川市では、Nb と Ga (相関係数:0.505、小数点以下第 4 位を四捨五入、以下同様)、Cl と Na (0.751)、V と Br (0.911)、Mo と Ni (0.920)、Ag と Pb (0.827) であり、東久留米市では、Co と Ti (0.856)、Zn と Ti (0.656)、Zn と Co (0.792)、Hg と Cu (0.526)、Nb と Ga (0.841)、K と S (0.583)、Mo と Se (0.644) であった。これらの中で、両市に共通して相関係数 0.5 以上で有意な関係が認められたのは、Nb と Ga のみであった。この相関にどのような意味があるか、これから検討が必要と考えられる。加えて、一方の値が偏っていたり、1 ないし数点が突出しているため見かけ上相関が大きく出ていると考えられるものもあるが、現段階ではあえて除くことはせず、今後の他因子との関連も含めて考えるためにそのまま表示した。この他に各金属元素の量を群別に合算し、群別ごとの相関を見てみたが、相関のある群別間の関係で、旭川市にも東久留米市にも同時に認められたものはなかった。

日常生活環境の中で、血液中の金属成分に影響を与える環境因子としては、水、