

ノ ー ト

血清中ホルムアルデヒド定量のための
間接競合酵素免疫吸着測定法の開発近藤 文雄^{®1,4}, 小林 慎一¹, 斎藤 寛史¹, 岡 尚 男¹,
中澤 裕之², 小田島安平³, 宮 崎 豊¹

1 緒 言

ホルムアルデヒドは、自動車排気ガス、たばこの煙、燃焼器具類などの燃焼排ガス中に高濃度に存在する普遍的な空気汚染物質である¹⁾。近年、ホルムアルデヒド等の揮発性化学物質を放散する新建材、家具、生活用品の使用や住宅構造の気密化により、室内空気汚染問題が顕在化している²⁾。特に、新築・改築の住宅やビルにおいて、居住者やそこで働く人々に頭痛、目やのどの痛み、めまいなどの多様な症状が出現するシックハウス症候群や、極微量の化学物質暴露により非特異的で多彩な症状が出現する化学物質過敏症が社会問題となっている³⁾。また、職業的ホルムアルデヒド暴露環境にある人の鼻咽腔がん及び白血病の発生率増加が確認されたため、国際がん研究機関は2004年7月にホルムアルデヒドの発がん性危険度をそれまでのGroup 2A（ヒトに対しておそらく発がん性がある）からGroup 1（人に対して発がん性がある）に変更している⁴⁾。一方、ホルムアルデヒド放出プロドラッグである酪酸アシルオキシエステル類は、ヒト前骨髄性白血病 HL-60 細胞の増殖を濃度依存的に阻害することから、抗がん剤として利用される可能性が広がっている⁵⁾。

ホルムアルデヒドは、呼吸器官及び胃腸器官により容易に吸収され、血中に入ったホルムアルデヒドはギ酸に酸化された後、二酸化炭素と水になる⁶⁾。一方、生体内に取り込まれたホルムアルデヒドの大部分は、タンパク質のアミノ基等と共有結合することが報告されている⁷⁾。シックハウス症候群患者では、グルタチオン-S 転移酵素などの代謝酵素の活性に問題があり、日常的に酸化ストレス状態にあることが指摘されている⁸⁾。したがって、こうした患者の体内では、代謝されずに蓄積された化学物質の濃度が高

くなる可能性も考えられるため、それらの生体内濃度を測定することが疾患発症との関連を調べるために必要と考えられる。

これまで、ホルムアルデヒドに対する暴露評価に関しては、喘息、透析患者等の血中ホルムアルデヒド特異免疫グロブリン E (IgE) 抗体価⁹⁾及びホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体に対する免疫グロブリン G (IgG) 抗体価を指標とした試み¹⁰⁾が報告されているが、いずれも抗体価と症状との間に相関は認められていない。また、喫煙者の血中ホルムアルデヒド-血清アルブミンに対する抗体価が、非喫煙者と比べて有意に高いことが報告されている¹¹⁾。更に、ヘッドスペース質量分析法を用いて、膀胱がん及び前立腺がん患者と健康人の尿中ホルムアルデヒド濃度が測定され、がん患者のほう健康人よりも高濃度であることが報告されている¹²⁾。

イムノアッセイを用いた分析法は、臨床化学分野における微量成分の分析に重要な役割を果たしている。酵素免疫吸着測定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法は、測定対象物質を特異的に検出でき、また、迅速かつ簡便に多検体を一度に測定することが可能である。こうした利点を生かして、ELISA 法は様々な分野に応用されているが、生体試料中のホルムアルデヒド濃度の測定法に関する報告はなされていない。本研究では、シックハウス症候群患者等のホルムアルデヒドに対する暴露評価、及び実験動物に暴露させたホルムアルデヒドの体内動態の検討に用いるための、血中ホルムアルデヒド濃度測定法の開発を試みた。具体的には、ホルムアルデヒド-ウサギ血清アルブミン結合体に対する抗体を作製し、この抗体を用いた ELISA 法による血中ホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体測定法について検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

ホルムアルデヒド液、アセトアルデヒド、アセトンは関東化学製試薬特級、ウサギ (rabbit serum albumin, RSA)、ヒト (human serum albumin, HSA)、ウシ (bovine serum

¹ 愛知県衛生研究所: 462-8576 愛知県名古屋市北区辻町字流 7-6² 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41³ 昭和大学医学部: 142-8666 東京都品川区旗の台 1-5-8⁴ 現在所属 愛知医科大学医学部: 480-1195 愛知県長久手町大字岩作字雁又 21

albumin, BSA) 及びラット血清アルブミン (rat serum albumin, RatSA) はシグマ製, 炭酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, 塩化ナトリウム, アジ化ナトリウム, ポリ(オキシエチレン)ソルビタンモノラウレート (Tween 20), 過酸化水素水, 硫酸, *o*-フェニレンジアミン (OPD) 錠は和光純薬製, Freund's complete adjuvant は DIFCO LABORATORIES 製, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体はダコサイトメーション製を使用した。

2・2 免疫用抗原の作製

免疫用抗原の作製は、既報¹³⁾に従って行った。まず、ホルムアルデヒド液 (36~38%) 0.25 mL をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS; 8.0 g/L 塩化ナトリウム, 0.2 g/L リン酸二水素ナトリウム, 0.2 g/L 塩化カリウム, 0.5 g/L Tween 20, 0.2 g/L アジ化ナトリウム, pH 7.4) 19.75 mL に溶解後、ウサギ血清アルブミン 20 mg を添加した。本溶液を 37℃ で 30 分間インキュベート後、PBS で 3 回透析を行い、最後に 0.2 µm のフィルターで濾過してホルムアルデヒド-ウサギ血清アルブミン結合体 (formaldehyde-rabbit serum albumin, F-RSA) を得た。

2・3 動物への免疫及び抗体価の測定

2・2 で調製した F-RSA 1 mL に RSA 20 mg を添加後、Freund's Complete Adjuvant 1 mL を加えてよく混合しエマルジョン溶液を作製した。このエマルジョン溶液をウサギの背中数箇所にて皮内注射した。その後、2 週間間隔で 4 回追加免疫を行った。最終免疫の 1 週間後に全採血を行い、採取した抗血清は -80℃ で保存した。抗体価の上昇は、各回の免疫 2 週間後に採取した血液を用いて以下の方法で調べた。F-RSA をコーティング用緩衝液 (1.59 g/L 炭酸ナトリウム, 2.93 g/L 炭酸水素ナトリウム, 0.2 g/L アジ化ナトリウム, pH 9.6) で 1 µg/mL (RSA 濃度として) に希釈後、96 ウェルプレート (Nunc 製) に 1 ウェル当たり 200 µL 注入し、4℃ で 15 時間静置して固相化させた。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、2% BSA-PBS 溶液 150 µL を注入し、4℃ で 15 時間静置することによりブロッキングを行った。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、PBS で 1000 倍希釈した抗血清 100 µL をウェルに注入し、37℃ で 1 時間インキュベートした。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、PBS で 10000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体溶液 100 µL を注入し、37℃ で 1 時間インキュベートした。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、発色基質溶液 (2 mg/mL OPD, 0.02% 過酸化水素含有) 100 µL を注入し、室温で反応させた。15 分後、2 N 硫酸 50 µL を注入して発色を停止し、492 nm の吸光度を測定した。

2・4 抗血清の反応性

抗血清の RSA, HSA, RatSA, BSA 及びそれらのホルムアルデヒド結合体に対する反応性について、次の 2 つの方法を用いて検討した。まず、各血清アルブミン及びそれらのホルムアルデヒド結合体を 1 µg/mL (各血清アルブミン濃度として) に希釈後、96 ウェルプレート (Nunc 製) に 1 ウェル当たり 200 µL 注入し、4℃ で 15 時間静置して固相化させた。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、2% BSA-PBS 溶液 150 µL を注入し、4℃ で 15 時間静置することによりブロッキングを行った。ウェルを 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、PBS で $10^3 \sim 2^7 \times 10^3$ 倍に段階希釈した抗血清 100 µL をウェルに注入し、37℃ で 1 時間インキュベートした。以後の操作は 2・3 と同様に行った。

次に、間接競合法を用いて検討を行った。抗血清 50 µL (最終希釈 1000 倍) と血清アルブミン (HSA, RatSA, BSA) 及びそれらのホルムアルデヒド結合体 50 µL (血清アルブミン濃度として 0.005~5000 ng/well) を混合し、37℃ で 1 時間インキュベートした。この反応液をあらかじめ各結合体で固相化したウェルに注入し、37℃ で 1 時間インキュベートした。以後の操作は 2・3 と同様に行った。

2・5 ヒト血中 F-HSA 測定時の HSA, アセトアルデヒド及びアセトンの影響

試料中の HSA 濃度の影響を調べるため、反応液中の HSA 濃度を 0, 10, 25, 50 mg/mL とし、間接競合 ELISA 法により F-HSA の測定を行った。また、試料中のアセトアルデヒド、アセトンの影響を調べるため、試料中濃度としてホルムアルデヒドは 10 及び 25 µg/mL, アセトアルデヒド及びアセトンは 25, 100 及び 500 µg/mL となるよう添加し、間接競合 ELISA 法により F-HSA の測定を行った。

3 結果及び考察

3・1 抗血清の作製及びその評価

本研究では、ハプテン化の担体として RSA を選択し、更にホルムアルデヒドが生体内でタンパク質 (主にアルブミン) と結合する事実⁷⁾¹³⁾を背景として、ホルムアルデヒド-タンパク質結合体のモデルとして F-RSA を免疫原に使用した。抗血清の F-RSA に対する抗体価の変化を Fig. 1 に示した。最初の追加免疫 (14 日目) 後から顕著な上昇が認められ、4 回目の追加免疫 (56 日目) 後にはほぼプラトーに達した。これに対して、抗血清の RSA に対する反応性は認められなかった。

作製した抗血清の反応性を検討するため、各種血清アルブミン及びそれらのホルムアルデヒド結合体を固相化後、

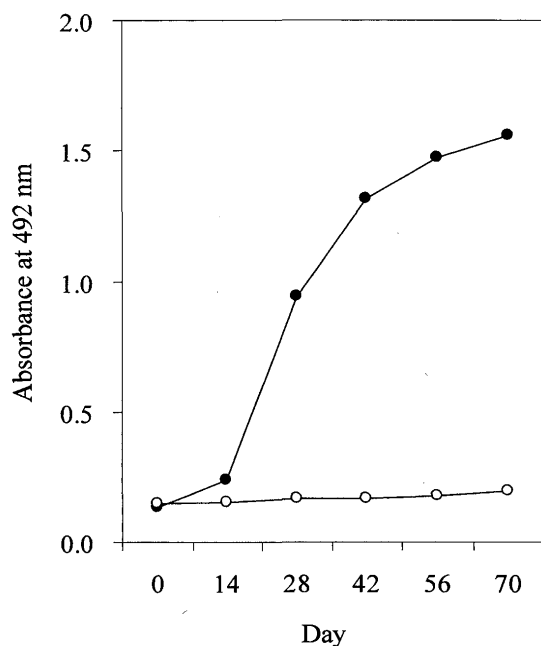


Fig. 1 Antiserum titers obtained with formaldehyde-rabbit serum albumin conjugate

●: F-RSA; ○: RSA

段階希釈した抗血清との反応性を測定した (Fig. 2). 抗血清は, 免疫用抗原の F-RSA とは $2^7 \times 10^3$ 倍希釈でも反応性が認められ, また, F-RSA と同じ方法で作製した他のホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体とも反応した. F-RSA に対する抗体価を 1 とした場合, F-HSA, F-RatSA 及び F-BSA に対する抗体価はそれぞれ 0.35, 0.35, 0.18 であった. 一方, RSA に対しては, 非特異的な反応によるものと考えられる一定のバックグラウンドが認められた. また, HSA に対しては, 抗血清の希釈倍率が低い場合にわずかに反応性が認められたが, RatSA 及び BSA に対する反応性は認められなかった. 抗体は, 抗原全体を認識するわけではなく, 抗原の比較的小さな一部分 (エピトープ) のみを認識して結合する. また, 抗体はエピトープの高次構造なども厳密に認識して結合する. 今回用いた 4 種の血清アルブミンのアミノ酸配列は, いずれの組み合わせも 69.9~76.3% と比較的高い相同性を示した (GENETYX®-MAC, GENETYX CORPORATION 製を用いて検索). しかし, ホルムアルデヒドとの主な結合部位であるリジン周辺のアミノ酸配列は, 各血清アルブミン間で異なる部分も多く存在し, 抗体の反応性の違いとなって現れたと考えられた. 更にホルムアルデヒドと各血清アルブミンとの結合量の違いも要因の 1 つとして考えられた.

次に抗血清の反応性を間接競合法により検討した. F-HSA, F-RatSA 及び F-BSA を固相化したプレートに, 抗血清と各結合体を加えて競合的に反応させた. その結果, 各結合体ともに 0.5~500 ng/well (血清アルブミン濃度とし

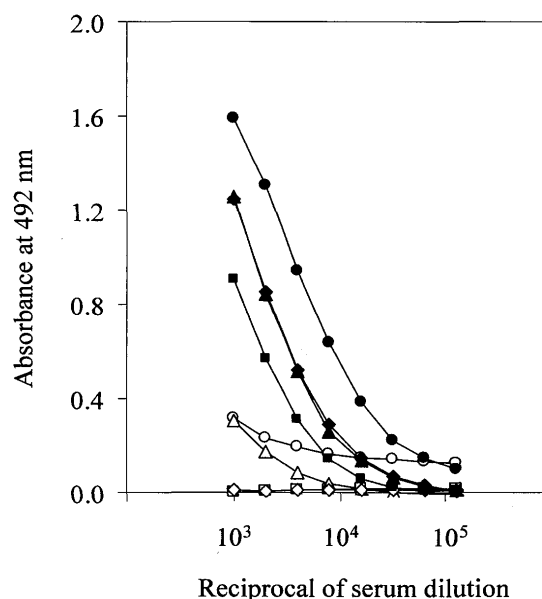


Fig. 2 Reactivity of antiserum to formaldehyde conjugated to rabbit, human, rat and bovine serum albumins, and unconjugated albumins

●: F-RSA; ◆: F-RatSA; ▲: F-HSA; ■: F-BSA; ○: RSA; ◇: RatSA; △: HSA; □: BSA

て) の範囲で良好な標準曲線を得ることができた (Fig. 3). 一方, RatSA 及び BSA は反応性が認められず, HSA はわずかに反応性が認められたが, F-HSA の測定に影響を及ぼすほどではないと考えられた (Fig. 3). したがって, 本抗血清はホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体を特異的に認識していると考えられた.

3.2 間接競合 ELISA 法を用いたヒト血中ホルムアルデヒド測定系の構築

ヒト血清に F-HSA を添加して間接競合 ELISA 法により標準曲線を作成したところ, ヒト血清を含まない場合と比べて吸光度が減少する傾向が認められた. この要因の一つとして, 血清中のタンパクの影響が考えられた. ヒト血清中総タンパク濃度の正常値は 65~80 mg/mL で, そのうちアルブミンが約 60% (40~48 mg/mL) と最も多い成分である¹⁴⁾. そこで, HSA 濃度の影響を検討した結果, HSA 濃度が高くなるに従って感度も低下する傾向が認められた (Fig. 4). したがって, 血清試料を測定する場合には, 標準試料に HSA を添加して標準曲線を補正する必要があると考えられた. 測定濃度範囲は, 0.5~500 ng/well (HSA 濃度として) であった. また, 他のホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体についても測定濃度範囲は同じであった. なお, 血清中のアルブミン以外のタンパクとのホルムアルデヒド結合体の存在も想定されるため, 今後より詳細な検討が必要と考えられる.

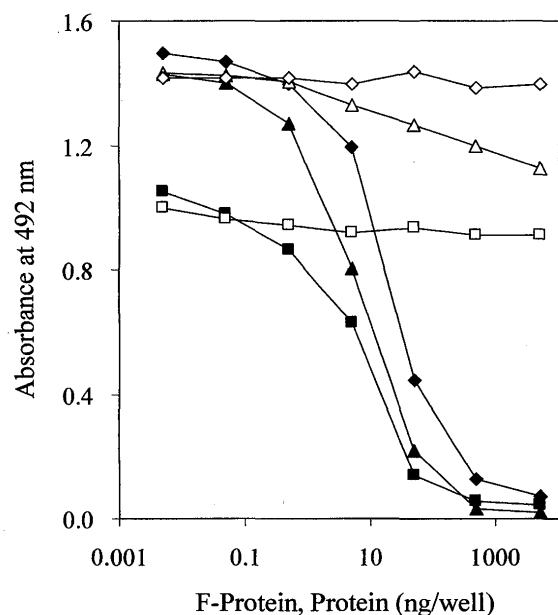


Fig. 3 ELISA inhibition curves for formaldehyde conjugated to human, rat and bovine serum albumins, and unconjugated albumins

◆: F-RatSA; ▲: F-HSA; ■: F-BSA; ◇: RatSA; △: HSA; □: BSA

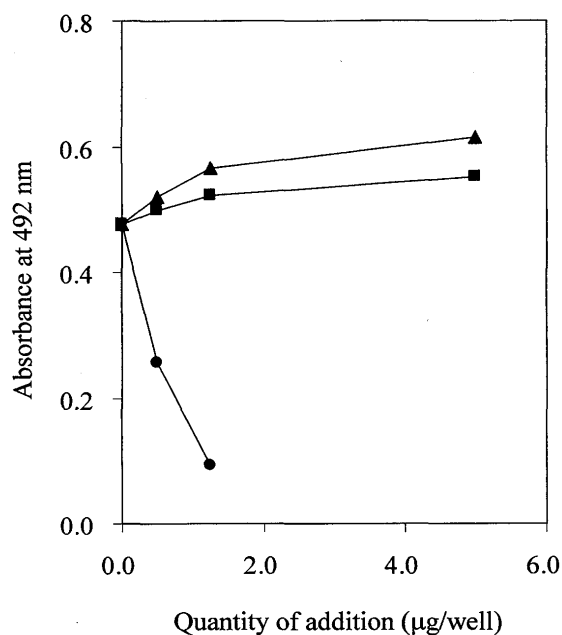


Fig. 5 Influence of acetaldehyde and acetone on the detection of formaldehyde-rabbit serum albumin conjugate

●: formaldehyde; ■: acetaldehyde; ▲: acetone

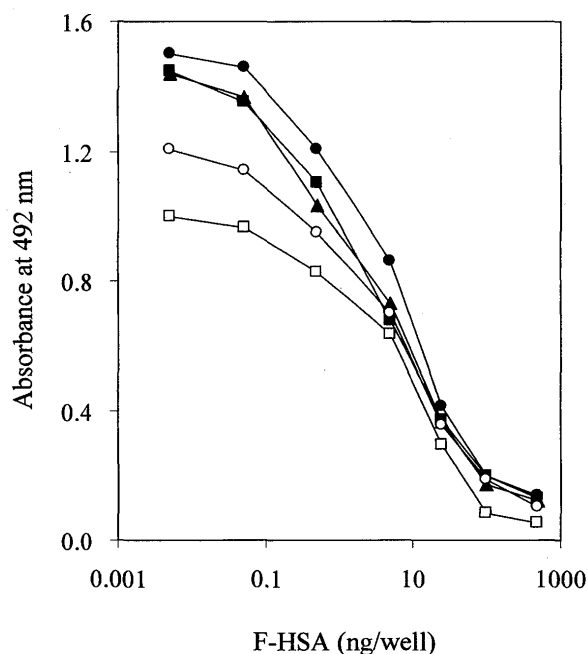


Fig. 4 Influence of human serum albumin concentrations on the standard curves

●: 0 mg/mL; ■: 5 mg/mL; ▲: 10 mg/mL; ○: 25 mg/mL; □: 50 mg/mL

次に、ホルムアルデヒドとともに室内空气中から高頻度に検出され、我々が日常的に暴露していると考えられるアセトアルデヒド及びアセトンの影響を検討した。ヒト血清

に各物質を一定量添加し、間接競合 ELISA 測定を行った。その結果、ホルムアルデヒドでは添加濃度 (0.5~1.25 $\mu\text{g}/\text{well}$) の増加とともに吸光度が減少し、量-反応関係が認められた。一方、アセトアルデヒド及びアセトンを 0.5~5 $\mu\text{g}/\text{well}$ 添加した場合、添加濃度の増加とともに最終的に 2 割程度吸光度が上昇した (Fig. 5)。この原因については不明であるが、アセトアルデヒド及びアセトンが高濃度に存在した場合の影響も含め、今後の検討課題と考えている。

今回、間接競合 ELISA 法を用いた血中のホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体の測定法を開発した。本法は、血中のホルムアルデヒド-血清アルブミン結合体を 0.5~500 ng/well (血清アルブミン濃度として) の範囲で測定することが可能であった。これまで、血中ホルムアルデヒド又は結合体濃度の報告例はなく、本法が要求される測定範囲を満たしているかどうかは不明である。今後、シックハウス症候群患者やホルムアルデヒドを吸入させた実験動物の血中濃度測定への適用性について検討する予定である。もし検出感度が不足するようであれば、蛍光あるいは生物発光検出法の導入、抗体の F(ab')_2 化による非特異結合の低減化などにより、更に高感度な測定法の開発も検討する予定である。

本研究の一部は、厚生労働科学研究費による助成を受けて実施された。

文 献

- 1) 谷 孝之: 神奈川県衛生研究所研究報告, **29**, 1 (1999).
- 2) 宮島江里子, 相澤好治: 臨床免疫・アレルギー科, **46**, 161 (2006).
- 3) 鳥居新平: アレルギー, **55**, 1515 (2006).
- 4) International Agency for Research on Cancer, < www.iarc.fr / >.
- 5) A. Nudelman, I. Levovich, S. M. Cutts, D. R. Phillips, A. Rephaeli: *J. Med. Chem.*, **48**, 1042 (2005).
- 6) J. F. Kitchens, R. E. Casner, G. S. Edwards, W. E. Harward, B. J. Macri: "Investigation of selected potential environmental contaminants", p. 204 (1976), (US Environmental Protection Agency, Washington, DC).
- 7) H. M. Bolt: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **113**, 305 (1987).
- 8) 坂部 貢, 石川 哲, 宮田幹夫: 厚生労働科学研究費補助金 (健康科学総合研究事業) 「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明, 診断, 治療対策に関する研究」総合報告書 (H15-17 年度), p. 46.
- 9) L. C. Grammer, K. E. Harris, D. W. Cugell, R. Patterson: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **92**, 29 (1993).
- 10) 馬場研二, 八木健郎, 丹羽さやか, 榊原綾子, 服部 努, 小石川 功, 吉田和仁, 小林 正: アレルギー, **49**, 404 (2000).
- 11) E. Carraro, S. Gasparini, G. Gilli: *Environ. Res.*, **80**, 132 (1999).
- 12) P. Spanel, D. Smith, T. A. Holland, W. Al Singary, J. B. Elder: *Rapid Commu. Mass Spectrom.*, **13**, 1354 (1999).
- 13) R. Patterson, K. E. Harris, L. C. Grammer: *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 93 (1985).
- 14) 藤井達三, 渡辺富久子, 奥田 潤: "臨床化学総論", 第2改稿版, (1988), (廣川書店).

Development of Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Formaldehyde in Serum

Fumio KONDO^{1,4}, Shinichi KOBAYASHI¹, Hiroshi SAITO¹, Hisao OKA¹,
Hiroyuki NAKAZAWA², Yasuhei ODAJIMA³ and Yutaka MIYAZAKI¹

¹ Department of Toxicology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya-shi, Aichi 462-8576

² Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

³ Department of Pediatrics, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666

⁴ Present address, Department of Pharmacology, School of Medicine, Aichi Medical University, Nagakute-machi, Aichi 480-1195

(Received 18 July 2007, Accepted 26 September 2007)

Sick-building syndrome symptoms associated with indoor air volatile organic compounds, including formaldehyde in new or newly remodeled houses, have been increasingly highlighted, and are known as "sick house syndrome" in Japan. We developed a competition enzyme-linked immunosorbent assay for measuring formaldehyde in serum. The specificity of the antiserum generated with formaldehyde-rabbit serum albumin conjugates and the application to the detection of formaldehyde in serum were evaluated. The antiserum selectively reacted with formaldehyde conjugated to rabbit, human, rat and bovine-serum albumins, but not with unconjugated albumins. The quantitative working range of formaldehyde-human serum albumin conjugates was from 0.5 to 500 ng/well.

Keywords : formaldehyde; sick house syndrome; ELISA; serum.