

図 2 頭痛の特徴 (2)

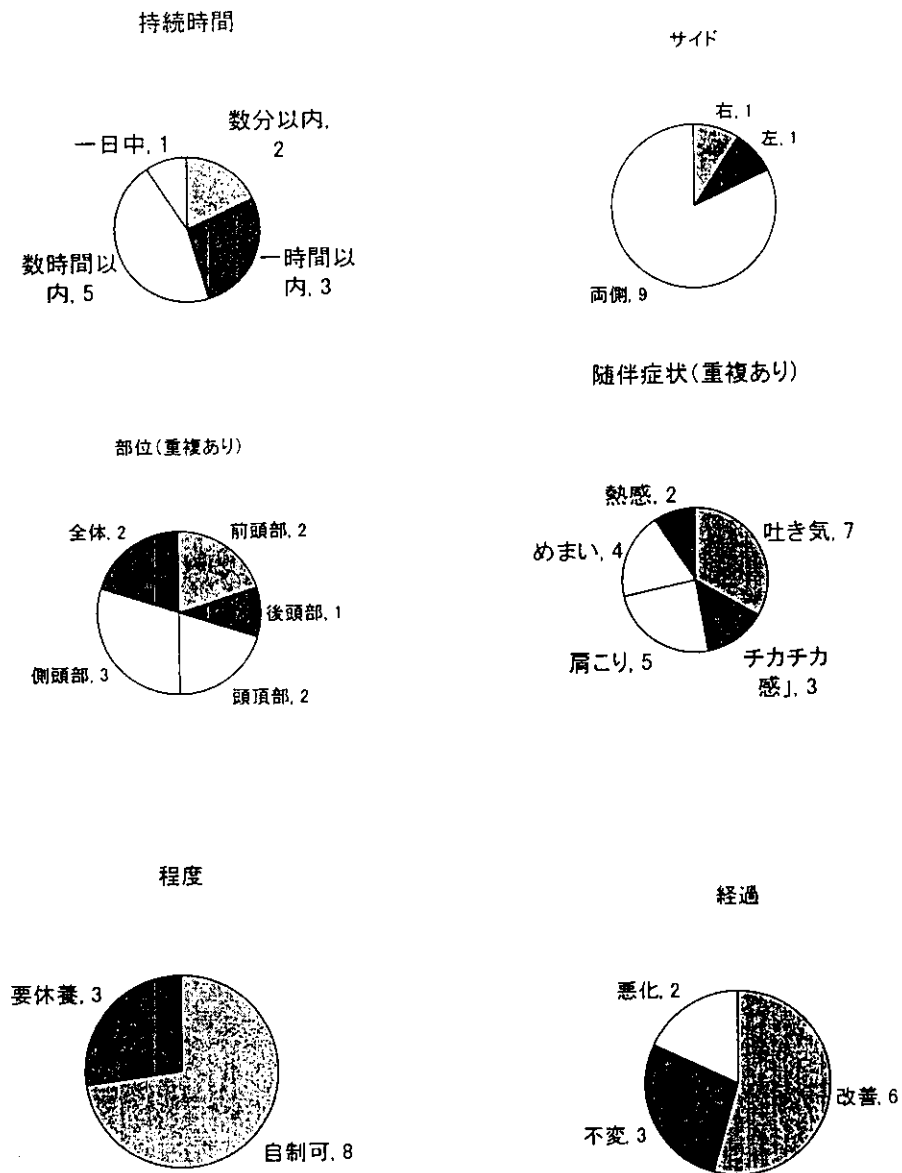


図3 めまいの特徴（1）

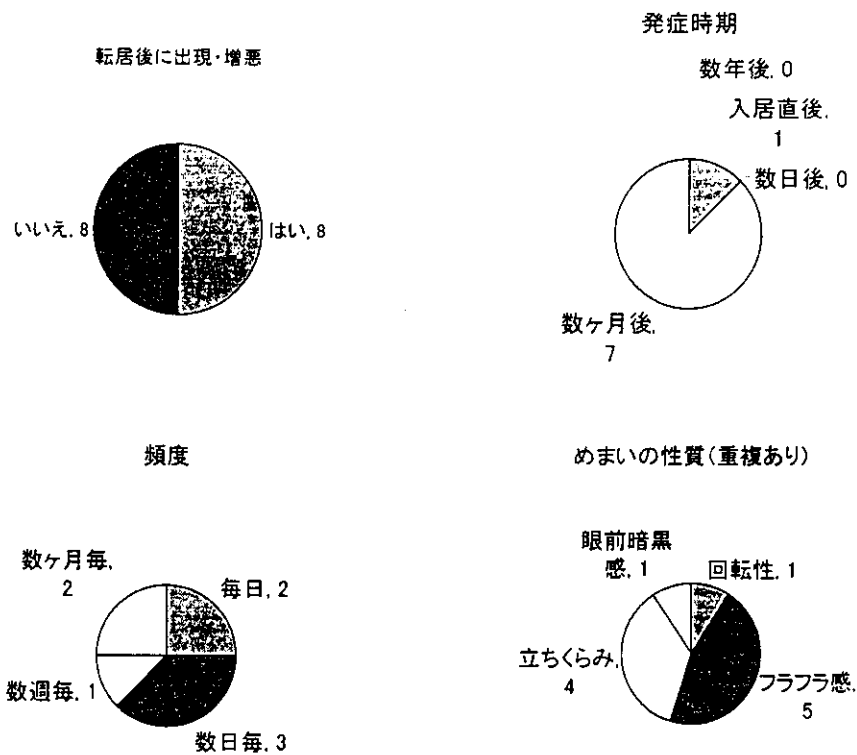


図 4 めまいの特徴（2）

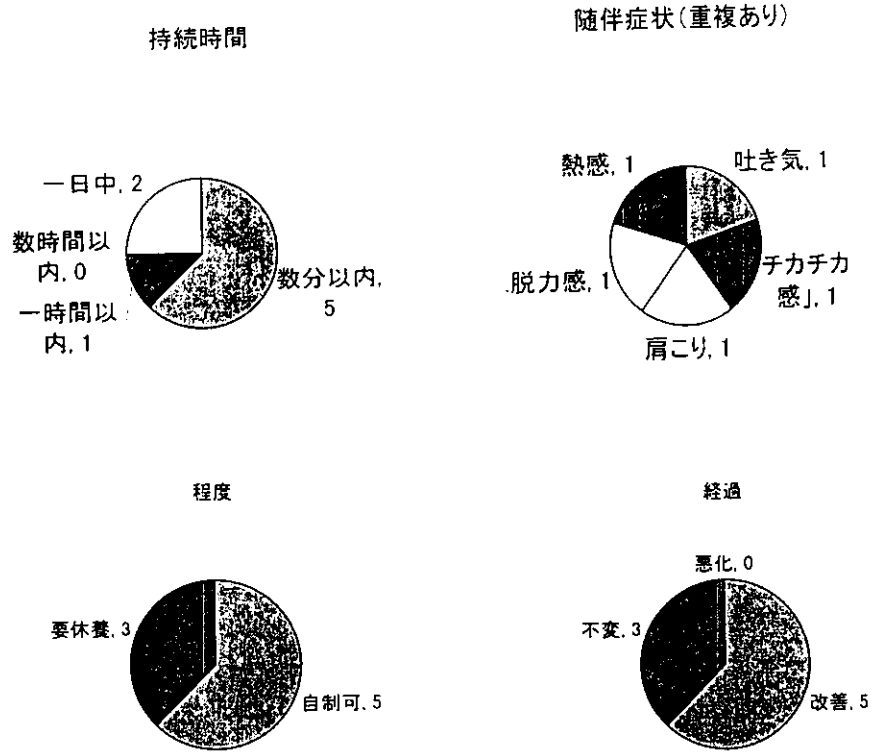
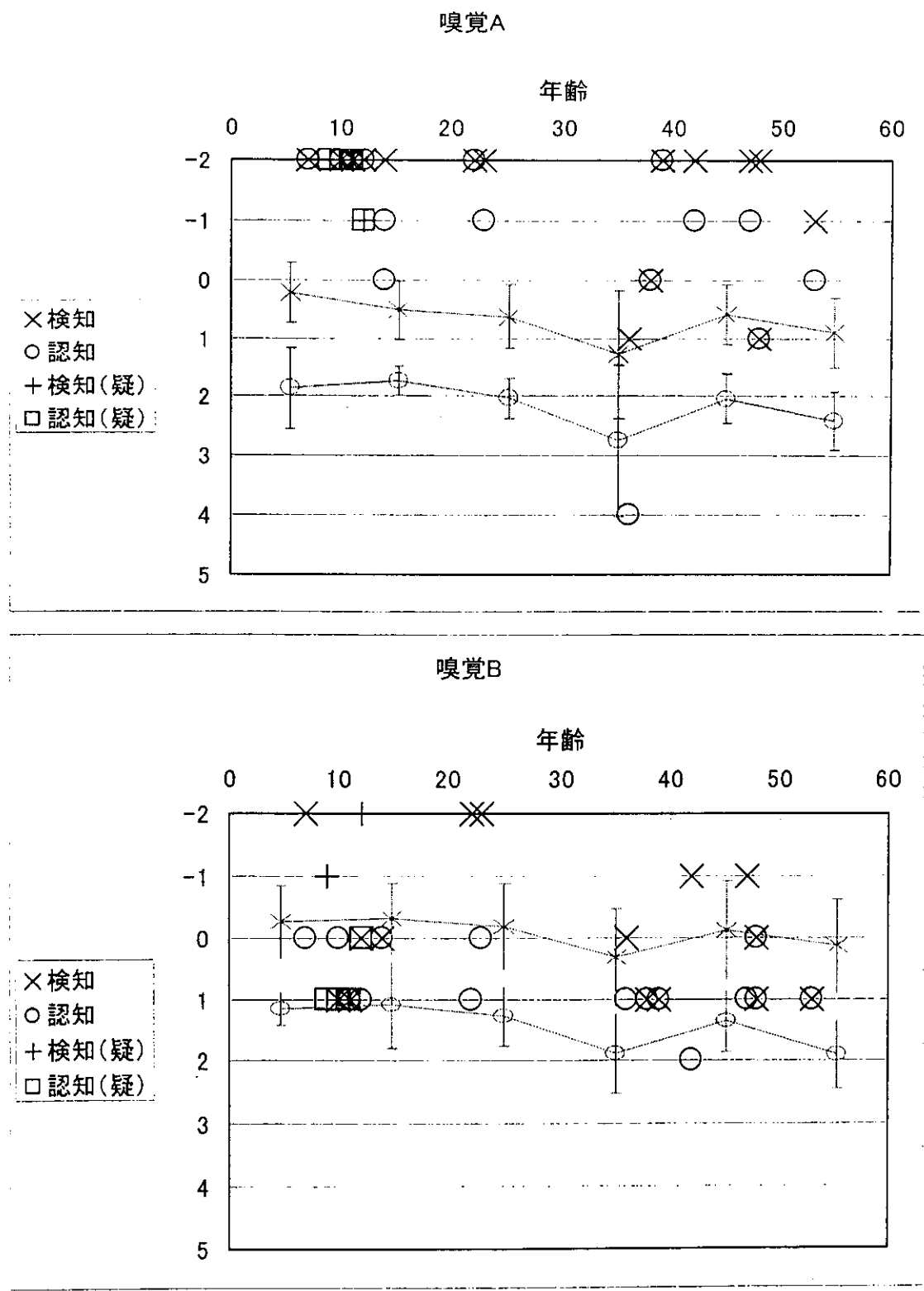
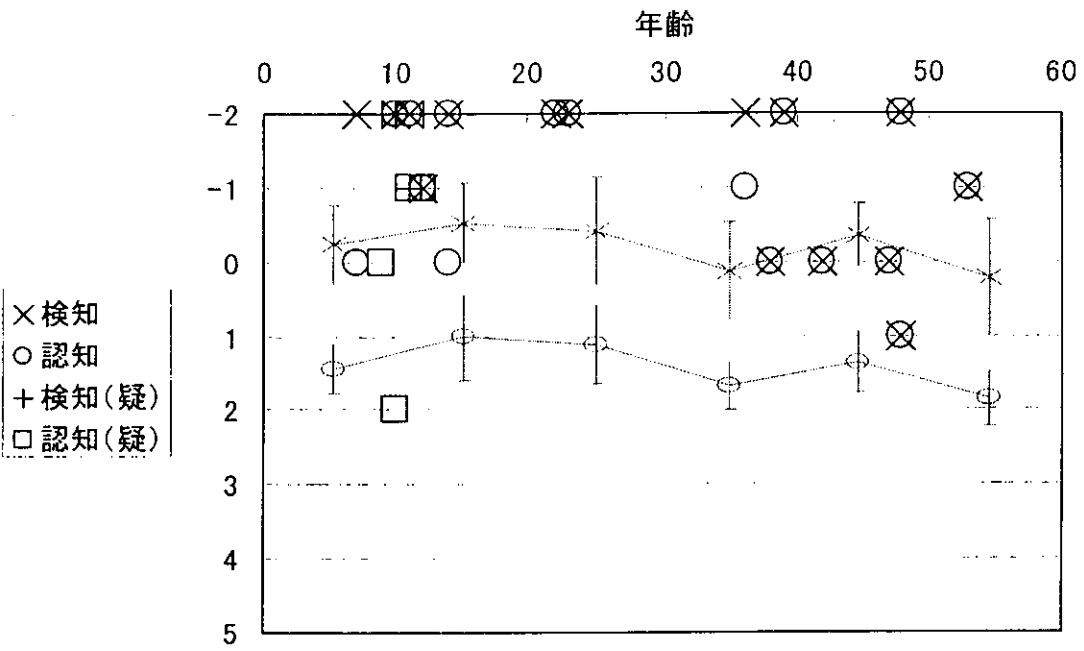


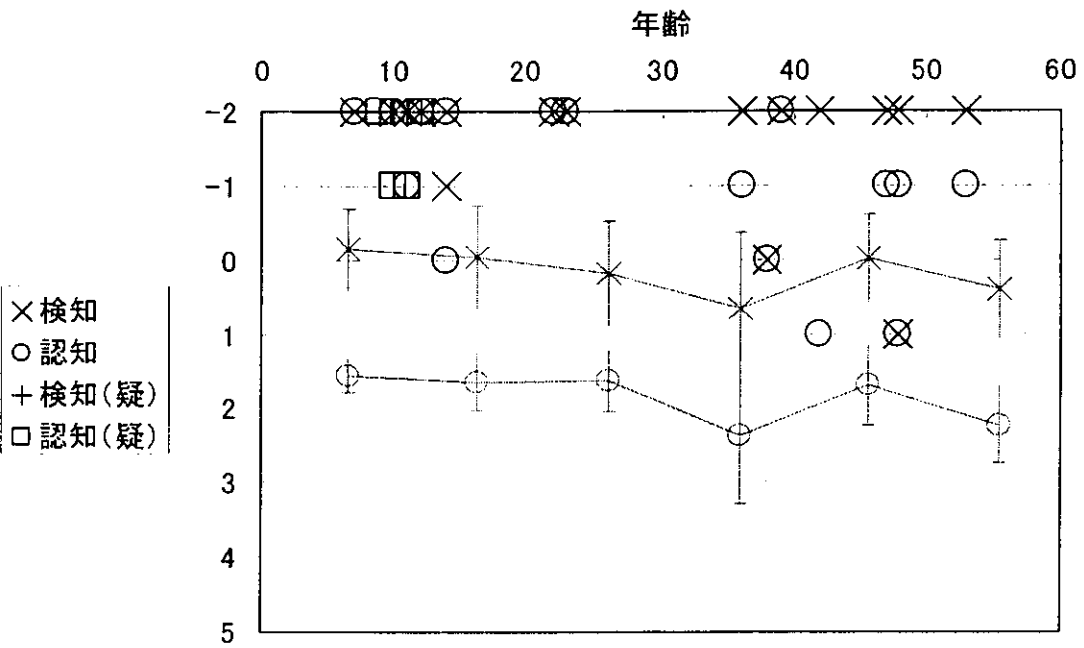
図5 嗅覚検査A-E



嗅覚C



嗅覚D



嗅覚E

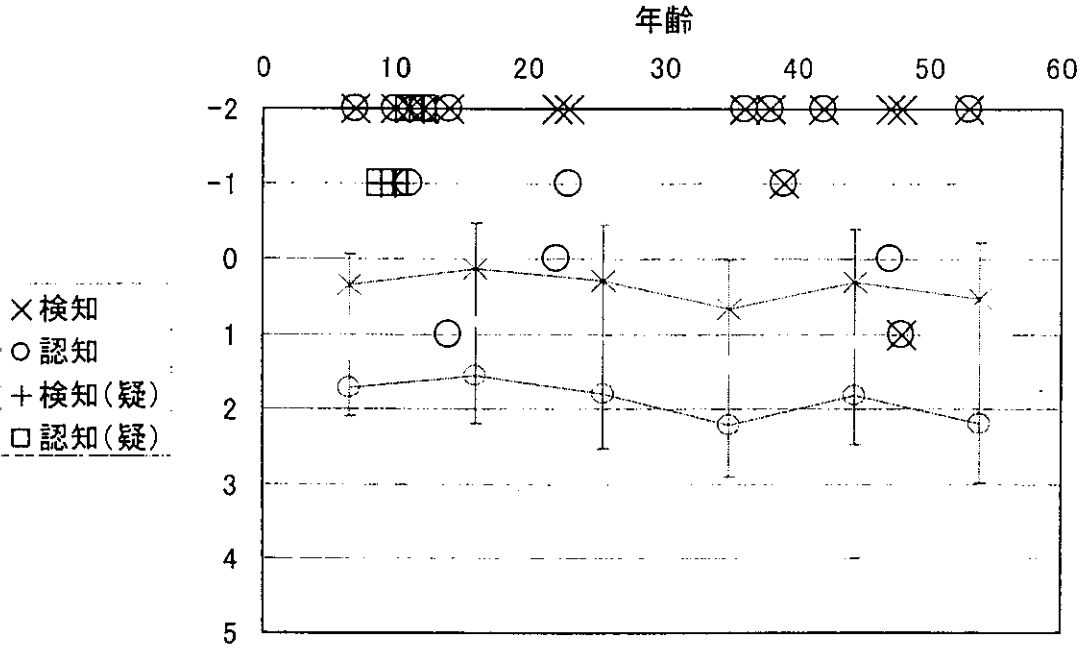
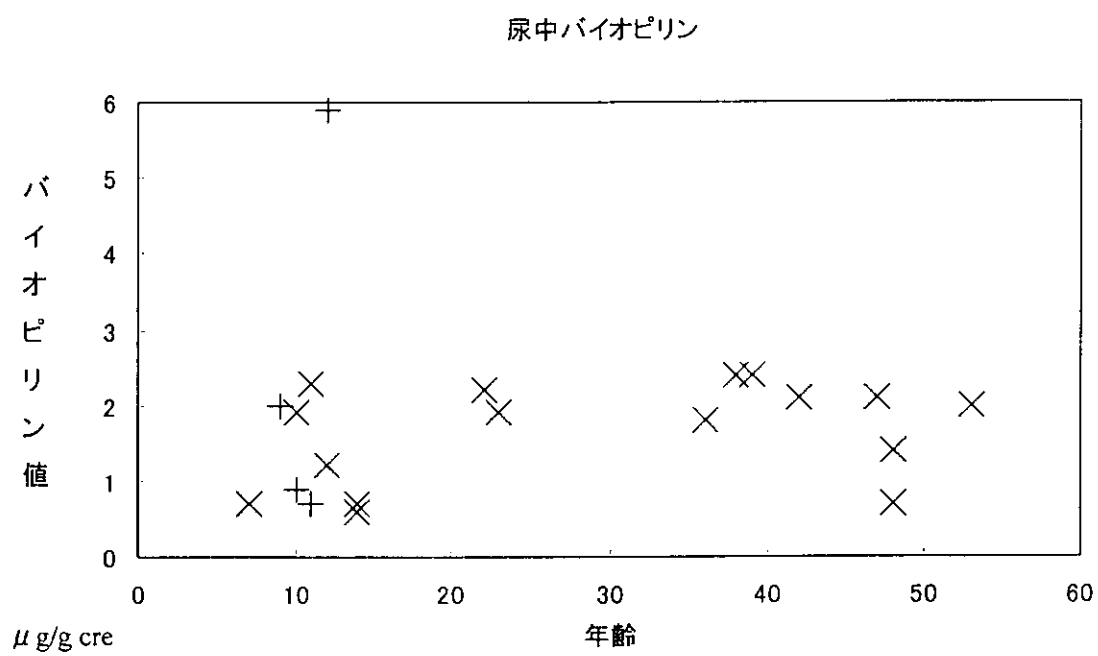


図6 シックハウス患者に於けるバイオピリン値



+ 診断疑い例

× 診断確実例

VII. シックハウス症候群に關与する

遺伝要因に關する研究

東海大学医学部分子生命科学 2 遺伝情報部門 木村 穰

シックハウス症候群に関与する遺伝要因に関する研究

分担研究者 東海大学医学部 木村 穰

研究要旨 シックハウス症候群はホルムアルデヒドや有機リン系の殺虫剤等々、様々な揮発性有機化合物がその発症のきっかけとなっていることは疑いが無いが、一方で、同様な生活環境におりながら個々には発症しやすい人、発症しにくい人があることもまた事実である。これは今までは個人差あるいは体質として認識されていたものであるが、ヒトゲノム解析が進んだ今日では、遺伝子型の違いによるものであると理解する事ができる。本研究ではシックハウス症候群の感受性の違いについて、その候補遺伝子である *PON1* 遺伝子多型との関連について明らかにすることを目的とし、患者血液から調製した DNA を用いて、塩基配列の多型性を解析した。

短期間ではあったが、その解析法を確立すると共に、これまでに知られる文献との比較から、欧米人とは異なった、日本人に特有の遺伝子多型を検出し、さらに患者に特有の遺伝子型も検出することができた。ただし、例数はまだ少ないため、中間報告としたい。

A. 研究目的

シックハウス症候群は近年問題となってきた疾患のひとつで、厚生行政としてもその物質の特定、基準値の設定、診断法の確立等、多くの早急に解決しなければ問題が多々あり、社会からも要請されるところである。また一方で、なぜこのような疾患が生じるのかを科学的根拠をもってアプローチし、その疾患の原因と対策、治療法を確立していかなければなら

ない。

ホルムアルデヒド、トルエン、キシレン等を代表とする接着剤、塗料、またその溶剤、希釈剤、またパラジクロルベンゼンなどの防虫剤、芳香剤、クロルピリホスなどの有機リン系の殺虫剤、等々様々な揮発性有機化合物がその発症のきっかけとなっていることは疑いが無い。が、一方で、同様な生活環境におりながら個々には発症しやすい人、発症しにくい

人がいることもまた事実である。これは今までは個人差あるいは体質として認識されていたものであるが、ヒトゲノム解析が進んだ今日では、遺伝子型の違いによるものであると理解する事ができる（図 1 参照）。本研究ではシックハウス症候群の感受性の違いについて、その候補遺伝子である *PON1* 遺伝子多型との関連について明らかにすることを目的とした。

PON1 遺伝子産物はシックハウス症候群の原因物質として特定されている有機リン系のクロルピリフォスの代謝酵素の一つであり、アシルスルファターゼに分類される。

B. 研究方法

分担研究者は今年度秋からこの研究班への参加を要請され準備を進めてきたが、ヒトの血液材料を用いた遺伝子解析であるため、3 省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にのっとり、インフォームドコンセントを作成した。

次いで、本研究について北里研究所・北里研究所病院および東海大学医学部の倫理委員会の承認を得て、2 月より試料の解析を始める事ができた。

- 1) 北里研究所・北里研究所病院の協力により、研究協力依頼に同

意を得たシックハウス症候群の患者 46 名（2002.3.4 現在）の血液を得た。

- 2) 血液 3-10ml につき 100ul を簡便法により、また残りはグアニジン塩酸法にしたがって DNA を調製した。この段階でコード化をはかり、特定の個人情報とは簡単に連結できないように配慮した。

- 3) *PON1* 遺伝子については計 12 箇所の遺伝子多型が報告されているが、イントロン部あるいは 3'-UTR 領域を除き、プロモーター部やコーディング領域の 7 ケ所を選定し、それらの場所についてそれぞれの DNA プライマーを設定した（図 2 参照）。そのうち 2 箇所は今回我々が独自に設定したものである（表 1 参照、枠内の部分）。

- 4) PCR 法にて DNA を増幅し、増幅部位について制限酵素切断多型に基づいて各個人の遺伝子型を特定した。

患者群の各遺伝子型について既知の報告との比較を行い、遺伝子型と本疾患との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

上述したように、本研究はヒトの血液材料を用いた遺伝子解析であるため、3 省庁の「ヒトゲノム・遺伝

子解析研究に関する倫理指針」にのっとり、まず北里研究所・北里研究所病院および東海大学医学部の倫理委員会の承認をそれぞれ 2001 年 1 月、2002 年 2 月に得た。次いで、作成したインフォームドコンセントに基づいて試料提供者からの血液材料を得た。解析対象となった血液それぞれに同意書が得られている。

C. 研究結果

今年度は途中からのスタートで、倫理面への配慮も必要であったため、実質的な解析は 2002 年 2 月からとなったが、以下の成果を得た。

1) *PON1* 遺伝子多型解析法の検討。

PON1 遺伝子多型は現在までに 12 箇所報告されているが、方法の項で述べたようにプロモーター部やコーディング領域の 7 ケ所を選定し (図 2)、それらの場所についてそれぞれの DNA プライマーを設定した。プロモーター部の 2 箇所については制限酵素による分別方法が確定していなかった。一般に塩基配列を決定する方法は確実ではあるが、非常に時間と経費がかかるため、迅速かつ多量の検体を一度に解析できる事を重視し、制限酵素による分別が可能なようにプライマーの設定を工夫した (表 1)。その結果程度の差はあるものの、7 ケ所すべてについて PCR と制限酵

素の利用による信頼度の高い遺伝子型判定系を確立した。

2) シックハウス症候群患者における *PON1* 遺伝子多型解析。

上で決定した遺伝子型判定系に基づき、シックハウス症候群患者 46 名の血液 DNA に対する *PON1* 遺伝子多型解析を行った。また健常者数名についても解析をおこなった (図 3、4、5 参照)。PCR 反応は図 3 の様に均一に良好な結果が得られるのが理想であるが、図 4 の様にいくつかのサンプルでは予想されるサイズ以外のバンドも検出され、このような場合には単一バンドになるように条件を種々検討した。

その結果、日本人の場合 L55M の部位では圧倒的に L(Leu) のホモ型が多く、欧米では L、M(Met) のハプロタイプがほぼ同数であるのに対し、極めて特徴的であった (表 2)。また、この傾向は既報の健常人のデータとも一致した。したがって、この解析には人種的な差を十分考慮する必要性があると考ええる。

また Q192R の部位では、既報の健常人のデータと比較した場合、Q(Gln) のホモ型の患者が多く、有意な差が認められた。

D. 考察

上の結果から、今後、健常者の遺伝子多型を患者の地域、年齢、性別等と一致させて慎重に検討する必要性が再認識されると共に、家族内の発症例についても注目する事が遺伝子解析をすすめる上で重要である事が確認できたと考える。

現在例数 200 例を目指して解析中であり、有機リンの代謝酵素遺伝子である *PON1* 遺伝子の機能との関連性に注目してゆきたい。

また、解析法についてもさらに確度が高く簡便な方法の開発を検討中である。

全体的には、まだ例数も少ないので何とも結論は出しにくい状況であるが、このような候補遺伝子からの解析に加え、ゲノムワイドに *PON1* 遺伝子が本当に疾患感受性領域の中心にあるのかわからないのかを特定していく必要があるだろう。

E. 結論

- 1) *PON1* 遺伝子多型解析をするために、新たに 2 箇所プライマーを設定し、さらに制限酵素により簡便に遺伝子多型を解析できる系を開発した。
- 2) シックハウス症候群患者 46 名を中心にこの方法で *PON1* 遺伝子 7 箇所についての多型を解析し、その結果、これまでに知られる文献との比

較から、*PON1* 遺伝子産物の酵素活性に影響を与えられる箇所、健常人との遺伝子多型パターンとの間に頻度差が検出された。

これまでに知られる文献との比較から、欧米人とは異なった、日本人に特有の遺伝子多型が明らかにされるとともに、患者に特有の遺伝子型が検出された。

F. 研究発表

今年度後半になってから参加させていただいたため、直接関係する発表は特になし。ただし、関連するものとしてここ 2-3 年の以下の論文を挙げておく。

1. Kajiwara, K., O-Wang, J., Sakurai, T., Yamashita, S., Tanaka, M., Sato, M., Tagawa, M., Sugaya, E., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Kimura, M.
Sez4 gene encoding an elongation subunit of DNA polymerase zeta is required for normal embryogenesis
Genes to Cells 6 99-106 (2001)
2. Shiina, T., Ando, A., Suto, Y., Kasai, F., Shigenari, A., Takishima, N., Kikkawa, E., Iwata, K., Kuwano, Y., Kitamura, Y., Matsuzawa, Y., Sano, K., Nogami, M., Kawata, H., Li, S., Fukuzumi, Y., Yamazaki, M., Tashiro, H., Tamiya, G., Kohda, A., Okumura, K., Ikemura, T., Soeda, E., Mizuki, N., Kimura, M. Bahram,

S. and Inoko, M.

Genomic Anatomy of a Premier Major
Histocompatibility Complex Paralogous
Region on Chromosome 1q21-22.

Genome Research 11 (5) , 789-802 (2001)

3. Oka, A., Tamiya, G., Tomizawa, M., Ota,
M., Katsuyama, Y., Makino, S., Shiina, T.,
Yoshitome, M., Iizuka, M., Sasao, Y.,
Iwashita, K., Kawakubo, Y., Sugai, J.,
Ozawa, A., Ohkido, M., Kimura, M.,
Bahram, S. and Inoko, H.

Association analysis using refined
microsatellite markers localizes a
susceptibility locus for psoriasis vulgaris
within a 111kb segment telomeric to the
HLA-C gene.

Human Molec. Genet. 8, 2165-2170(1999)

4. Matsuzaka, Y., Makino, S., Nakajima, K.,
Tomizawa, M., Oka, A., Kimura, M.,
Bahram, S., Tamiya, G. and Inoko, H.

New polymorphic microsatellite markers
in the human MHC classII region.

Tissue Antigens 56, 492-500 (2000)

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

環境要因

- ・交通事故による骨折
- ・シックハウス症候群？
- ・生活習慣病

単一遺伝性疾患
(例：レッシュナイン症候群)

遺伝要因

図1. ヒト疾患と2つの要因

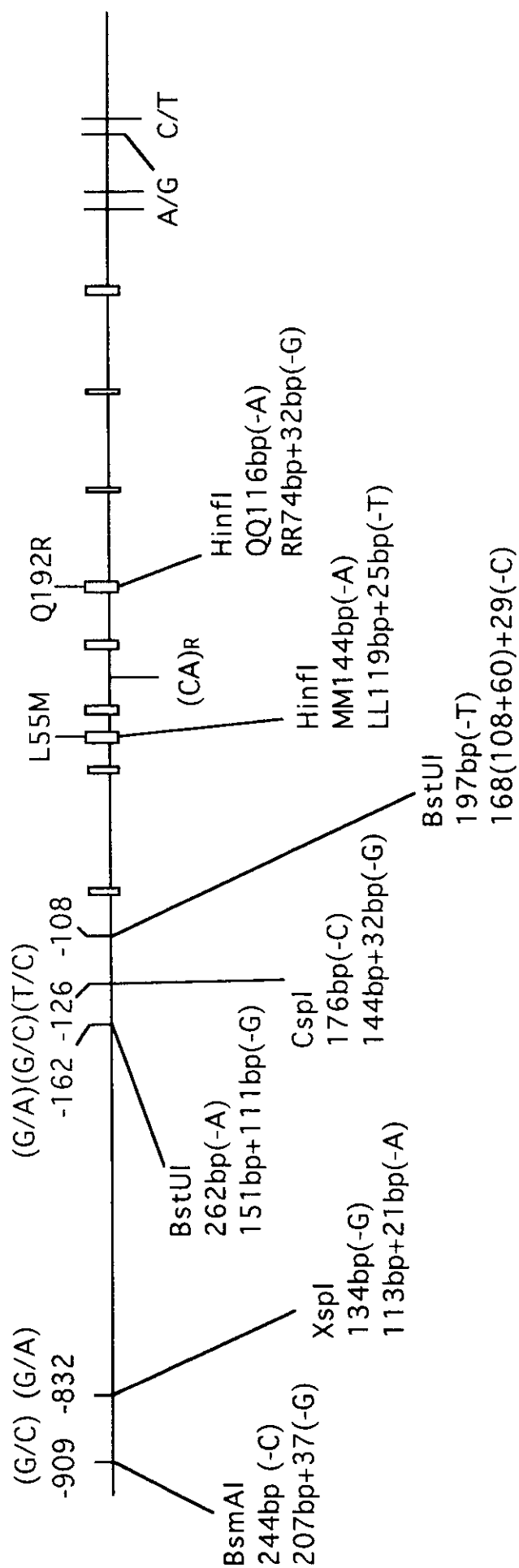


図2. *PON 1*遺伝子多型部位

この内-832と-126の部位については今回独自に設定したものである。

表1. PON 1 primers

-909 (G/C) PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

-909F 5'ATCATTACAGTAACAGCAGACAG3' 24 mer

-909R 5'TCAGCAAAACATGTCACTGTGGC3' 23 mer

PCR product 244bp - Enzyme BsmAI dig. 207 bp+37bp (-909G)

-832 (G/A) PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

-832F same of -909F

-832R 5'GGAATACCTCTGCTGAAGAC3' 21 mer

PCR product 134bp - Enzyme XspI dig. 113bp+21bp (-832A)

-162 (A/G) PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

-162F 5'CTGGACTAGGCACCTATTCT3' 20 mer

-162R 5'ATAGACAAAGGGATCGATGGGC3' 22 mer

PCR product 262bp - Enzyme BstUI dig. 111bp+151 bp(-162G)

-126 (G/C) PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

-126F same of -162F

-126R 5'ATTGGCCCCGCCCCGCCCCCTCCCCGCCCCGGT3' 30 mer

PCR product 176bp - Enzyme CspI dig. 144bp+32 bp(-126G)

-108 (T/C) PCR cond. 94.C(30")64.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

-108F same of -162F

-108R 5'CTGCTGGGGCAGCGCCGATTGGCCCGCCG3' 29 mer

PCR product 197bp - Enzyme BstUI dig. 168bp+29bp (-108C and -162A)
or 108bp+60bp+29 (-108C and-162G)

L55M PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

55F 5'GAGTGATGTATAGCCCCAGTTTC3' 23 mer

55R 5'AGTCCATTAGGCAGTATCTCCG3' 22 mer

PCR product 144bp - Enzyme HinfI dig. 119bp+25 bp (55T)

Q192R PCR cond. 94.C(30")60.C(40") 72.C(60") - 30 cycles

192F 5'GCAGTTTGAATGATATTGTTGC3' 22 mer

192R 5'CGACCACGCTAAACCCAAATACATCTCCCAGAA3' 33 mer

PCR product 116bp - Enzyme HinfI dig. 74bp+32 bp (192G)

图3. PCR Pattern 1

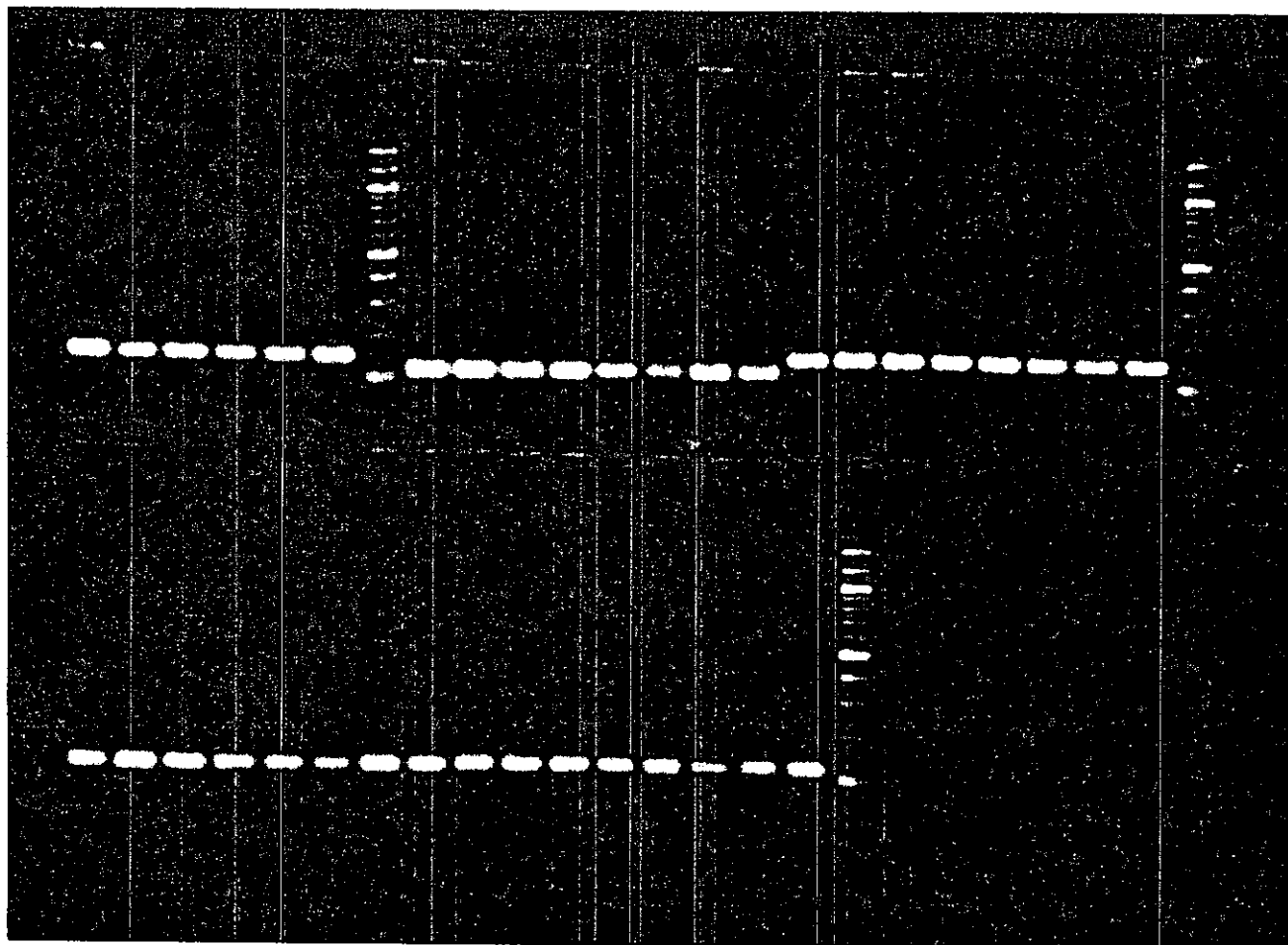
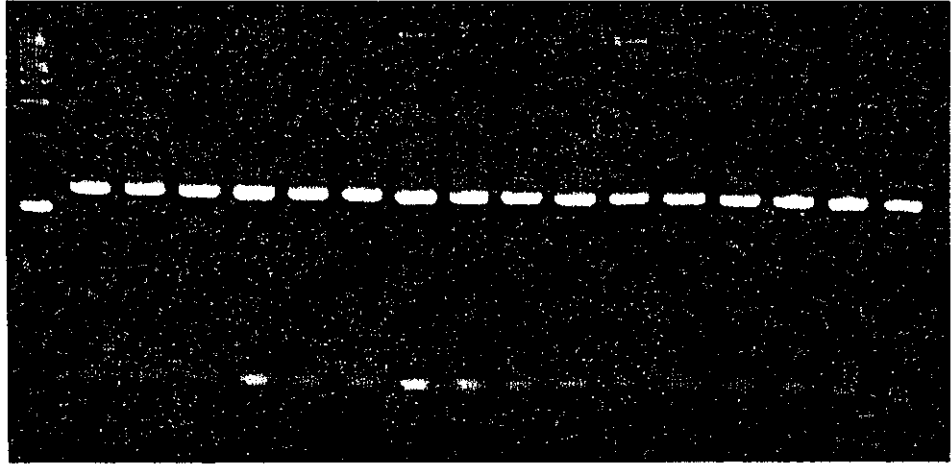


図4. PCR Pattern 2

Good



not Good (Extra bands exist.)

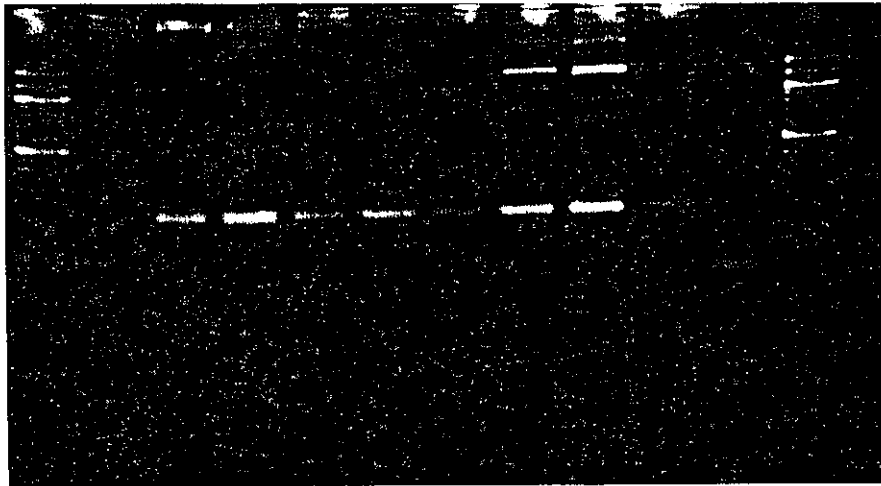
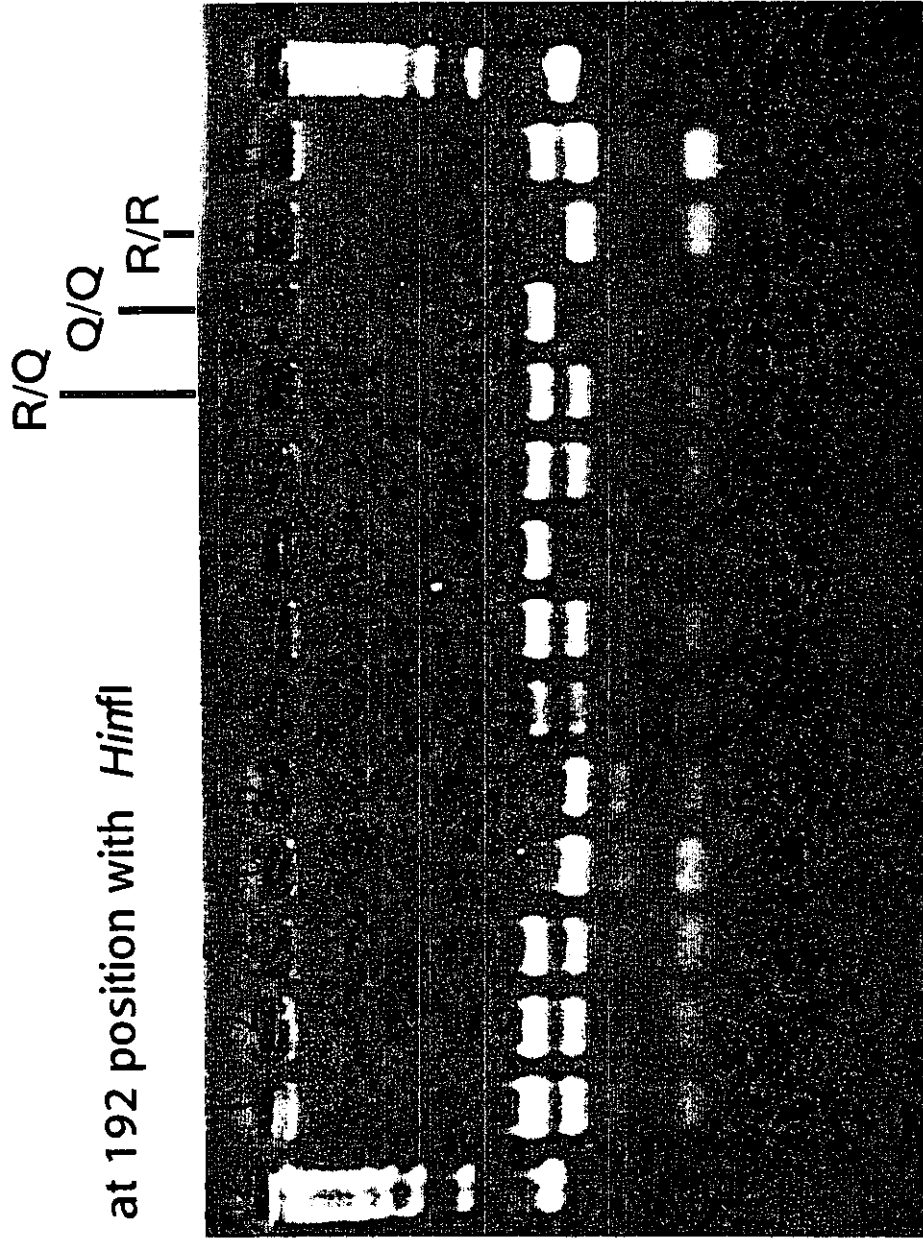


图5. DNA Typing by Restriction Enzyme Digestion of PCR Products



Patient N.	-909	-832	-162	-126	-108	55	192
1	G	G/A	G	G	C	A/T	A/G
2	C/G	G/A	A/G	C/G	T	T	A/G
3	C/G	G/A	G	G	T	A	A/G
4	G	G	G	G	T	T	G
5	G	G	G	G	T	T	G
6	C/G	G/A	A/G	C/G	T	T	A/G
7	G	G	G	G	C	T	A/G
8	G	G/A	G	G	T	T	G
9	G	G/A	A/G	C/G	C	A/T	A
10	G	A	A/G	C/G	C	T	A/G
11	C/G	G	G	G	T	T	A/G
12	G	G/A	A/G	C/G	C	A/T	A
13	G	G	G	G	T	T	G
14	C/G	G	G	G	T	T	G
15	G	G/A	A/G	G	C	T	A
16	G	G/A	A/G	C/G	C	T	A
17	G	G	G	G	C	T	A/G
18	G	G/A	G	G	C	T	A
19	G	G	G	G	T	T	A/G
20	G	G/A	A/G	C/G	T/C	T	A
21	G	G/A	G	G	T/C	T	A/G
22	C/G	G/A	G	G	T/C	A/T	A/G
23	C/G	G/A	A/G	C/G	C	T	A
24	C/G	G/A	A/G	C/G	T	T	A/G
25	G	G/A	G	G	C	T	A
26	G	G	G	G	C	T	A
27	G	G/A	G	G	C	T	A/G
28	G	G/A	G	G	C	T	A/G
29	C/G	G	G	G	T/C	T	A/G
30	C/G	G	G	G	T	T	A/G
31	G	G	G	G	T/C	T	A/G
32	G	G	G	G	T	T	G
33	G	A	A/G	C/G	T/C	T	A/G
34	G	G/A	G	G	T/C	T	A/G
35	G	G/A	G	G	T	T	G
36	G	A	A/G	C/G	C	T	A/G
37	G	G	G	G	T	T	G
38	G	G	G	G	T/C	T	G
39	G	A	A	C	T	T	A
40	C/G	G	G	G	T/C	T	A/G
41	G	G	GG	G	C	T	A
42	G	G	G	G	T	T	G
43	C/G	G/A	G	G	T/C	T	G
44	C/G	G	G	G	T	T	A/G
45	G	A	A/G	C/G	T/C	T	A/G
46	C/G	G	G	C/G	T/C	A/T	A/G
Control							
C1	C/G	G	G	G	T	T	A/G
C2	G	G	G	G	T	T	G

表2. 各DNA試料の*PON1*遺伝子上の多型解析結果