

表 21 空气中揮発性有機化合物濃度の測定結果

化合物名	空气中濃度 (mg/m ³)							
	サンプル A	サンプル B	サンプル C	サンプル D	サンプル E	サンプル F	サンプル G	ND 値
メチルエチルケトン	2.5	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
酢酸エチル	0.8	0.0	0.1	0.0	ND	0.0	0.0	0.0
n-ヘキサン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
クロロホルム	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.7	0.8	0.0
1,2-ジクロロエタン	ND	ND	0.0	ND	0.0	0.0	0.0	0.0
1,1,1-トリクロロエタン	ND	ND	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.0
n-ブタノール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0
ベンゼン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
四塩化炭素	0.0	ND	0.0	ND	0.0	0.2	0.2	0.0
トリクロロエチレン	180	90.9	151	120	206	327	365	0.0
メチルイソブチルケトン	ND	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
トルエン	9.4	0.7	2.0	0.9	0.3	0.4	0.4	0.0
酢酸ブチル	ND	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
テトラクロロエチレン	0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
m, p-キシレン	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
スチレン	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
o-キシレン	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
p-ジクロロベンゼン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0
キシレン混合物	0.5	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0

ND：定量下限値未満

6. 平成 13 年度の研究のまとめ

今年度の研究成果をまとめると以下のようになる。

- 1) 一般住居内空気汚染物質の濃度と居住者の自覚症状との関係を解析し、居間・寝室・外気において、「のどの調子がおかしい」「咳がよく出る」という症状とホルムアルデヒドやアセトアルデヒド濃度との有意な関連性、または有意ではないものの関連が推定される結果を得た。感受性の高い集団では、室内濃度指針値以下の低濃度でもこれらの症状がひき起こされる可能性を示唆するデータと考えられる。
- 2) 新築後 3 年余を経た建物で、現在日本で必須 VOC としての測定が行われていない 2-エチル-1-ヘキサノールによる室内空気汚染が顕著な事例を見だし、この物質によりシックハウス（シックビルディング）症状の生じる可能性を明らかにした。
- 3) 日本とスウェーデンの 2 都市間で住居内空気中のホルムアルデヒド、二酸化窒素、ク

クロホルム、1,1,1-トリクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、四塩化炭素、パラジクロロベンゼンの濃度比較を行った。名古屋はウブサラに比べ住宅の室内空気ならびに大気はより汚染されているといえることが明らかになった。建材中の化学物質含有量、室内排気型暖房器具や衣類防虫剤の使用状況が二国間で異なることが汚染度の異なる原因の一端として示唆された。

- 4) トリクロロエチレン曝露作業者に発生した皮膚および肝障害の解析を行った。トリクロロエチレンに対するアレルギー機序の存在を示唆する結果を得た。

7. 研究発表

7-1 論文発表

Kamijima M, Sakai K, Shibata E, Yamada T, Itohara S, Ohno H, Hayakawa R, Sugiura M, Yamaki K, and Takeuchi Y.

2-Ethyl-1-hexanol in indoor air as a possible cause of sick building symptoms.

J Occup Health 2002, in press.

Gotoh M, Saito I, Huang J, Fukaya Y, Matsumoto T, Hisanaga N, Shibata E, Ichihara G, Kamijima M, and Takeuchi Y.

Changes in cholinesterase activity, nerve conduction velocity, and clinical signs and symptoms in termite control operators exposed to chlorpyrifos.

J Occup Health 2001; 43: 157-164.

Sakai K, Hisanaga N, Kohyama N, Shibata E, and Takeuchi Y.

Airborne fiber concentration and size distribution of mineral fibers in area with serpentinite outcrops in Aichi Prefecture, Japan.

Ind Health 2001; 39:132-140

久永直見、城内 博、兪 小忠、小川康恭、毛利一平、上島通浩、市原 学、柴田英治、竹内康浩。

トリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレンに曝露された労働者に発生する急性肝炎を伴うスチーブンス・ジョンソン症候群。

産業衛生学雑誌 2002 (印刷中)

竹内康浩

化学物質による健康障害とリスクアセスメント

労働と健康 2001; 27:1-6

学会・研究会発表

上島通浩、酒井 潔、柴田英治、山田哲也、糸原誠一郎、大野浩之、王 海蘭、市原 学、
竹内康浩

2-エチル-1-ヘキサノールによると考えられたシックビルディング症候群

第 72 回日本衛生学会（2002 年 3 月 27-29 日、津）

酒井 潔、Dan Norbäck、Yahang Mi、柴田英治、上島通浩、山田哲也、三谷一憲、
竹内康浩

日本とスウェーデンにおける住環境中空気汚染物質濃度の比較

第 72 回日本衛生学会（2002 年 3 月 27-29 日、津）

上島通浩、酒井 潔、柴田英治、山田哲也、糸原誠一郎、市原 学、杉浦真理子、早川律子、
竹内康浩

2-エチル-1-ヘキサノールによるシックハウス症状が疑われた化学物質過敏症の 1 例

第 29 回有機溶剤中毒研究会（2001 年 9 月 21-22 日、小樽）

X. 室内有害化学物質の代謝と毒性

名古屋大学大学院医学研究科環境労働衛生学
旭川医科大学公衆衛生学
信州大学医学部解剖学

那須 民江
羽田 明
高本 雅哉

室内有害化学物質の代謝と毒性

研究代表者 那須民江 (名古屋大学大学院医学研究科環境労働衛生学)
羽田 明 (旭川医科大学公衆衛生学) 高本雅哉 (信州大学医学部解剖学)
(研究概要)

ホルムアルデヒドは合板の糊の防腐剤として使われ、一般生活環境に広く分布している化学物質である。発がん性(鼻腔扁平上皮がん)、肝毒性等の職業病として重要視されていたが、最近はこの室内汚染によるシックハウス症候群あるいは化学物質過敏症として、一般生活環境での問題が注目されるようになった。これらの最近の話題は、従来は安全とされた濃度で症状が出ているということである。即ち人によって感受性が異なり、低濃度のホルムアルデヒドにも過敏に反応する者がいることが想定される。

日本人のアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) には多型が見られ(活性型ホモ接合体、ALDH2*1/*1 型; 活性・不活性ヘテロ接合体、ALDH2*1/*2 型; 不活性ホモ接合体、ALDH2*2/*2 型)がある。ホルムアルデヒドもこの代謝酵素で代謝される。即ち、シックハウス症候群あるいは化学物質過敏症にホルムアルデヒドが関与している場合、この遺伝子多型が感受性の差異に関与している可能性がある。

申請者らは抱水クロラルで ALDH の活性を低下させた(人工的に ALDH2 の不活性型にした)ラットに 0.1% のホルムアルデヒドを 10 ヶ月投与した。するとホルムアルデヒドの肝障害と精巣の Leydig 細胞の過形成が抑制された。これはホルムアルデヒドの毒性に ALDH2 の遺伝子多型が関与していることを示唆するものである。

一方、フタル酸エステル類はプラスチック可塑剤として汎用されている物質である。PPAR α のリガンドとなり、発がん等の様々な影響を与える。これまで多くの毒性影響が PPAR α との関わりにおいて検討されてきたが、生殖毒性に関しては PPAR α との関連性からのアプローチは少ない。また、代謝およびその影響因子に関する情報も乏しい。

本研究では、以下の 3 点を目的として実験計画をたてた。1) ALDH2 ノックアウトマウスを作成する(担当羽田)。予備実験として、ホルムアルデヒド、ビスフェノール A、フタル酸エステル類の免疫毒性実験(担当高本)、ホルムアルデヒドおよびフタル酸エステル類の代謝の検討(担当那須)を行い、作成した ALDH2 ノックアウトマウス動物を用いた次年度の実験の準備を行う。

ホルムアルデヒドの代謝

ホルムアルデヒドはまずアルデヒド脱水素酵素(ALDH)により代謝され、蟻酸となる。この代謝はトリクロロエチレン曝露により阻害され、その原因は代謝物の抱水クロールにより ALDH が阻害されるためである(図 1)。

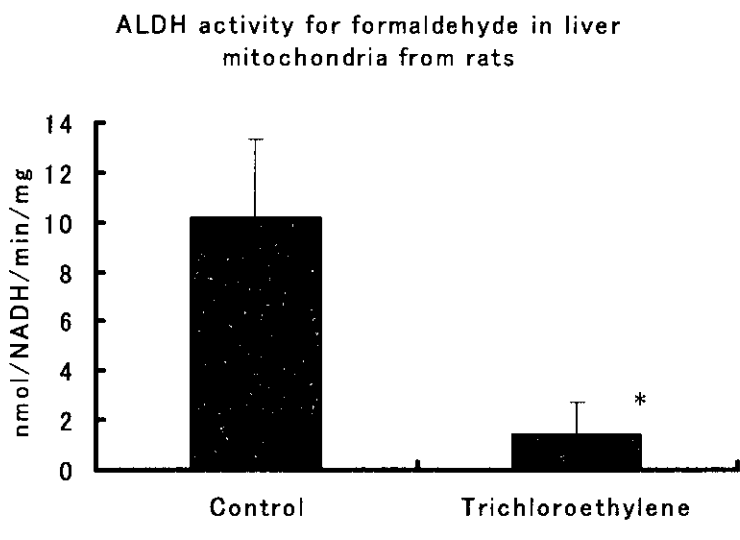


図 1 ホルムアルデヒド代謝に対するトリクロロエチレンの影響

ヒト肝におけるホルムアルデヒドの代謝を図 2 に示す。検討した 39 名の中に不活性ホモ接合体、ALDH3*2/*2 型はいなかった。ALDH2*1/*1 型は 31 名、ALDH2*1/*2 型は 8 名であった。図から、ALDH2*1/*2 型のホルムアルデヒド代謝は ALDH2*1/*1 型より明らかに低いことが判明した。

ALDH とフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝

代表的フタル酸エステルであるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)はリパーゼにより加水分解され、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)と2-エチルヘキサノール(2EH)となる。2-EH は ADH(アルコール脱水素酵素)および ALDH により代謝される。図 3 は 2EH の代謝物のアルデヒド、すなわち、2-エチルヘキサナールの ALDH による代謝を示す。代謝には明らかな種差が認められ、マウス<マーモセット<ラットの順であった。もしヒトの ALDH 活性がマーモセットに類似している場合、ヒトはラ

ットとマウスの中間的な活性を示すことになる。

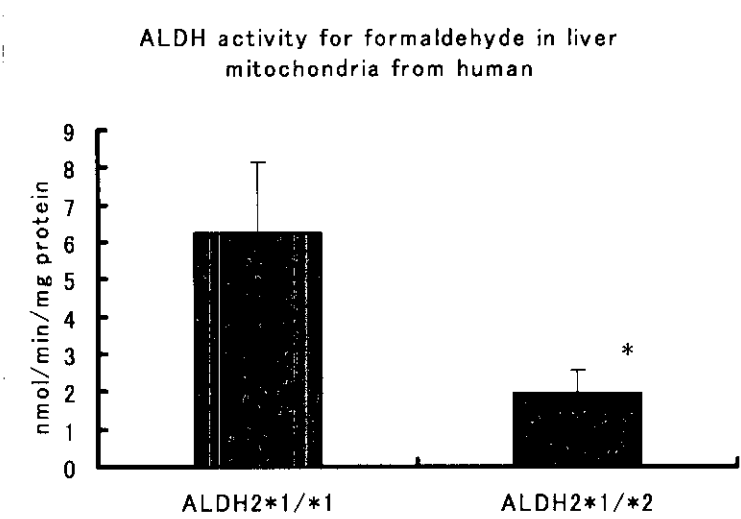


図2 ALDH2 遺伝子型とホルムアルデヒドの代謝

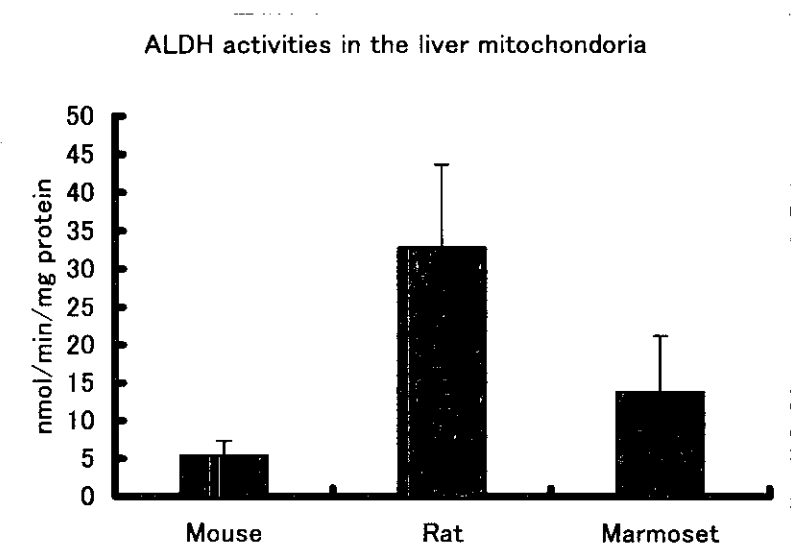


図3 2-エチルヘキサナールの ALDH 活性の種差

このような結果を踏まえて、14年度は ALDH ノックアウトマウスを用いてシックハウス原因化学物質の代謝に与える ALDH2遺伝子型の影響およびシックハウスとの関連性を検討する計画である。

室内有害化学物質代謝に関する遺伝子ノックアウトマウスの作成

1. 研究の背景と目的

化学物質過敏症は、生活習慣病などと同様、複数の遺伝子による遺伝要因と複数の環境要因により発症すると考えられる。環境要因は食生活などの生活習慣要因と共に、化学物質への暴露、感染、ストレスなどの外的刺激要因から構成される。化学物質過敏症の定義は 1985 年以來、9 種類が知られているが（表 1. <http://web.health.gov/environment/mcs/table1.htm>）、未だに一致を見ていないのが現状である。一方、遺伝要因に関しても複数の疾患感受性遺伝子とその変異により決定されると考えられるが、具体的な遺伝子名は明らかではない。しかし、同じ環境に居住していながら、発症するヒトと発症しないヒトが存在することは、遺伝素因の差があるとする事で、最も理解しやすい。一般に疾患発症においてどの程度遺伝素因が関与しているかを調べるには、一卵性双生児と二卵性双生児の双生児間での疾患発症の一致率から計算される。これまで身長、血圧などの遺伝率は計算されている。しかし、化学物質過敏症におけるデータはない。

一般に多因子遺伝病の原因遺伝子探索の戦略として、連鎖解析法と関連解析法が知られている。連鎖解析法では allele sharing method として罹患同胞対法などがある。しかし、相対危険度がある程度以上のものしか検出できないことがわかっている。まだ、多因子遺伝病での成功例は少ない。一方、関連解析法では一塩基多型である SNPs (single nucleotide polymorphisms) を利用したものが知られている。当初は疾患の候補遺伝子の SNPs を使った関連解析が試みられていたが、ヒトゲノム計画の進展に伴い、ヒト SNPs も全染色体にわたり 140 万個以上が公開されている。この SNPs を使って全ゲノムにわたる関連解析が試みられようとしている。また、最近では主に、タイピングする SNPs を減らす為に、連鎖不平衡にある領域で SNPs を基にハプロタイプを構築し、ハプロタイプによる関連解析が注目を浴びている。これらの方法が疾患ごとに成功を収めれば、化学物質過敏症においても遺伝素因の全ゲノムを対照とした探索が可能になるであろう。

しかし、その定義さえも一致を見ていない現状では、全ゲノムスクリーニングに利用するヒト患者集団とそのコントロールを大量に収集することは困難である。従って、遺伝素因の本態をさぐる為には、遺伝子改変による動物モデルなどを使った病態解明をとおして考えることが現状では最良の戦略であるだろうと判断した。

化学物質過敏症の感受性遺伝子で明らかになったものはない。そこで、次のような

仮説を前提として、候補遺伝子を考えることにした。

- ①発症には体内にある原因化学物質の量が関与する。
- ②原因化学物質の代謝が関与する。
- ③原因化学物質を産生する酵素の活性上昇または分解酵素の活性低下が原因となる。

動物モデルは、特定遺伝子のみをノックアウトする、ホモログスリコンビネーションによる方法で作成する。この方法で作成したノックアウトマウスではその遺伝子以外の遺伝的背景が同一であるマウスを野生型として比較することができ、実験計画、結果の解釈が容易である。

次に対象となる原因化学物質は、化学物質過敏症の原因として最も一般的なホルムアルデヒドから始めることにする。ホルムアルデヒドの代謝はアルコールの代謝産物であるアセトアルデヒドの代謝も担うアセトアルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2)が主要な代謝酵素であると考えられている。

ヒトには 9 種類の ALDH が存在する。そのうち細胞質に局在する ALDH1 とミトコンドリアに局在する ALDH2 が重要である。東洋人では ALDH2 の欠損症が、約半数近くに存在する。活性型を ALDH2*1、不活性型を ALDH2*2 と表記する。ALDH2*1 では 487 番目のグルタミン酸がリジンに置換している変異が活性を失った原因であることが分かっている。東洋人では不活性型のヘテロにおいて、飲酒時のフラッシングが見られる。これは、アセトアルデヒドの代謝が活性型のホモに比べて約 50%の能力しか持たないことで、血中濃度が高くなる事が原因である。不活性型のホモは全く酒が飲めないと考えて良いだろう。ホルムアルデヒドによる化学物質過敏症発症に ALDH2 の遺伝子型が関与している可能性もある。

一方アルコール脱水素酵素(ADH)のうち、ADH3 はグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素として働くことが知られており、すでにノックアウトマウスの報告例がある(Deltour L et al. J Biol Chem, 274, 16796-16801, 1999)。

今回の研究ではマウス ALDH2 のノックアウトマウスを作成し、ホルムアルデヒドによる化学物質過敏症の発症におけるこの酵素の関与を検討することが目的である。ADH3 ノックアウトマウスの入手も試み、ALDH2 ノックアウトマウスとの比較、掛け合わせなども検討する。

2. 研究方法

2-1. マウス ALDH2 遺伝子クローンの単離

マウスの ALDH2 遺伝子の塩基配列は cDNA のみがウェブ上から入手可能であった。また、遺伝子は 13 個のエクソンから構成され、エクソンとイントロンの境界領域の塩基配列も公表されている。そこで、エクソン 1, 2, 6, 10 の塩基配列を参考にして、それぞれのエクソンを増幅する PCR プライマーを作成した。このうち、最終的にはエクソン 2 と 10 の増幅プライマーを遺伝子クローンのスクリーニングに使用した。プライマーのシーケンスは、エクソン 2 が 5'-ATCTTCATTAACAATGAGTG-3' と 5'-CTTGTTC-CCTTCGGCCACCT-3', エクソン 10 が 5'-GGCTACATCAAATCGGGACA-3' と 5'-CAATGGTCATCCCGTCTTTT-3' である。Genomic BAC clone のスクリーニングは Incyte 社のマウス BAC1, II PCR screening kit を使用し、ポジティブクローンを Incyte 社に注文し、郵送で入手する。

2-2. ターゲッティングベクターの作成

- ①ターゲッティングベクターは熊本大学で開発した pMCDT-A を使用した。このベクターは Diphtheria toxin A の遺伝子を持っている。
- ②G418 耐性マーカーとして PGKneo 遺伝子を使用した。この遺伝子も熊本大学で作られた HXPGKneo ベクター (約 4.2kb) から切り出した。
- ③マウス作成後、発現部位を同定するためのマーカー遺伝子として、IRES-GFP 遺伝子を使った。この遺伝子は Clontech 社の pIRES2-EGFP ベクターを購入し (Catalog#6029-1), 必要な部分を切り出して使用した。
- ④BAC 遺伝子クローンのサブクローニングには Stratagene 社の pBluescriptII SK (+) を使用した。

2-3. ES 細胞のスクリーニング

できあがったコンストラクトを一本鎖にし、ES 細胞に導入、G418 を培養液に入れ、neo 遺伝子を発現している細胞クローンを数百個、クローニングした。その中から、スクリーニング用コンストラクトをポジティブコントロールとし、スクリーニング PCR をおこない、目的とするクローンを得る。

2-4. マウス卵への導入

2-3 で得た ES クローンを卵に打ち込む。熊本大学動物実験施設に委託する。得られたヘテロ欠損マウスをかけ合わせ、ALDH2 の欠損ホモマウス、ヘテロマウス、野生型のマウスをそれぞれ作り、以後の実験に使用する。

マウスの飼育は名古屋大学, 旭川医科大学, 信州大学の動物実験施設の SPF 室でおこない, 系統を維持し, 実際の暴露実験などは講座の研究室でおこなう。

3. 研究結果

3-1. マウス ALDH2 遺伝子クローンの単離

3-1-1. PCR プライマーのチェック

エクソン 1, 2, 6, 10 を増幅する目的で作成したプライマーセットのうち, エクソン 1 のセットでは PCR ができなかった。そこで, 残りの 3 種類のプライマーセットを使用することにした。

3-1-2. 遺伝子クローンのスクリーニング

まずエクソン 10 のプライマーセットでスクリーニングした。その結果, 137g11, 40814 の 2 個のクローンがとれたので, BAC クローンを注文した。到着後, エクソン 2, 6 のプライマーセットでチェックしたところ, 両クローンともエクソン 6 を含むものの, エクソン 2 は含まないことがわかった。今回の目的では, truncated protein の影響を除外するため, できるだけ遺伝子の 5' 側のクローンをとる必要があるので, エクソン 2 の増幅セットで再度スクリーニングをおこなった。その結果, 34417 のクローンが得られた。このクローンはエクソン 2 からエクソン 10 までを含むことがわかったので以後の実験に使用した。BAC クローン DNA は大きなサイズのクローン DNA 抽出キットである nucleobond AX (Macherey-nagel 社)を使用した。

3-1-3. BAC クローン DNA の解析

まず, 得られたクローンを BamHI, EcoRI, HindIII, BamHI/EcoRI, BamHI/HindIII, EcoRI/HindIII 切断後, 0.8%アガロース電気泳動をおこない, エクソン 1 およびエクソン 2 のオリゴプローブでサザンブロット解析をした。その結果, エクソン 1 は含まないものの, エクソン 2 は 0.6kb の BamHI 断片, 2.5kb の EcoRI 断片, 9.0kb の HindIII 断片に含まれることが明らかになった。そこで, 各断片を pBluescriptII SK (+) (pBII SK+) のマルチクローニングサイトにある各制限酵素部位にサブクローニングを試みた。その結果, 9.0kb の HindIII 断片をサブクローニングする事ができた (pBHind9.0)。

3-1-4. 9.0kb の HindIII 断片の解析

pBHind9.0 を解析するために Bgl II, EcoRV, Hinc II, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sac I, Sal I, Sma I, Stu I, Xho I などの制限酵素を使用して制限酵素地図を作製した。また, 各エクソンの配列を基に作成したオリゴヌクレオチドをプローブとして, サザンブロット解析をおこなった。その結果, この断片はイントロン 1 からイントロン 7 まで

の領域を含むクローンであることが明らかとなった。図 1 に、制限酵素地図を示す。確定した制限酵素部位のみを記載した。

3-2. ターゲティングベクターの作成

3-2-1. コンストラクトの設計

エクソン 2 からイントロン 1 の HindIII 認識部位まで、約 2.2kb を 5'-arm とし、エクソン 3 からイントロン 7 の HindIII 認識部位までの約 5.8kb を 3'-arm とする。5'-arm を pBIISK+ に挿入後、PGKneo, IRES-GFP を順次挿入する。次に pMCDT-A に 3'-arm を挿入し、その 5' 側に pBIISK+ で作成した 5'-arm, PGKneo, IRES-GFP を挿入して完成させる。

3-2-2. 5'-arm の作成

- ① Exon 2 のアンチセンスシーケンスに EcoRV の認識部位をつけた PCR プライマーを合成した。塩基配列は 5'-AAAAGATATC/TGTTCCCTTCGGCCACCTGG--3' である。下線部は EcoRV 認識部位であり、3' 側がエクソン 2 の塩基配列である。
- ② pBIISK+ の配列を基にしたプライマーと①で作成したプライマーを使い、pBHind9.0 を鋳型として PCR をおこなった。
- ③ ②の PCR 産物を EcoRV/HindIII で切断し、新たに調整した pBIISK+ を EcoRV/HindIII の部位にサブクローニングした。

3-2-3. PGKneo の挿入

- ① HXPGKneo から、PGKneo を BamHI/BglII で切り出した。
- ② ①のフラグメントを 3-2-2 で作成したコンストラクトの BamHI 部位のサブクローニングした。

3-2-4. IRES-GFP の挿入

- ① pIRES2-EGFP の DNA を BamHI/NotI で切断し、1326bp のフラグメントを切り出した。

- ② 切断面の両端を fill-in し, blunt end に調整した後, 3-2-3 で作成したコンストラクトの EcoRV 部位にサブクローニングした.

3-2-5. 3'-arm の作成

- ① イントロン 6 からイントロン 7 の調整

エクソン 7 を含む XbaI/HindIII の 1.3kb を pBlISK+ の XbaI/HindIII 部位にサブクローニングした.

- ② イントロン 3 からイントロン 6 までの調整

エクソン 4, 5, 6 を含む 4.2kb の XbaI 断片を①の XbaI 部位にサブクローニングした.

- ③ XbaI 認識部位の変更

以後の調整に不都合となる, エクソン 6 と 7 の間にある XbaI をつぶし, イントロン 3 にある XbaI を残すため, ②で作成したコンストラクトを XbaI で部分切断し, 切断部分の fill in により目的とするコンストラクトを得た. このコンストラクトを XbaI/HindIII で切断し, イントロン 3~イントロン 6 までを含む DNA 断片を得た.

- ④ エクソン 3 からイントロン 3 までの調整

エクソン 3 の塩基配列に HindIII 認識部位を入れた PCR プライマーを合成した. 塩基配列は 5'-TGCAAGCTT/GAGGACGTAGACAAGGCAGTG-3' である. 下線部が HindIII 認識部位である. このプライマーとイントロン 3 にある XbaI 認識部位よりも 3' 側の塩基配列を基に作ったプライマー(5'-CCTGTGTAAGAGAAACACTA-3')で PCR をおこない, 目的の領域を含む産物を得た. この産物を XbaI/HindIII で切断し, 調整した.

- ⑤ 3'-arm の DT-A ベクターへの挿入

DT-A ベクターのクローニングサイトである HindIII 認識部位に, ③, ④で調整した DNA 断片をサブクローニングした.

- ⑥ コンストラクトにおける 3' 側 HindIII 認識部位の変更

作成したコンストラクトを HindIII で部分切断する. 切断部分を fill in した.

⑦ DT-A ベクターの SalI と HindIII の二重切断

DT-A ベクターのクローニングサイトでは SalI と HindIII が隣接している。従ってこの両者の二重切断は通常、うまくいかない。その為、以下のような操作を加えた。⑥で作成したコンストラクトで残った HindIII 切断部位(挿入断片の 5' 端)で切断。Fill in で blunt end にした後、HindIII リンカーをライゲーションした。この状態で SalI 切断し、アガロース電気泳動で一本鎖になったことを確認後、HindIII 切断をおこなった。これを電気泳動後抽出し、SalI/HindIII の DNA 断片を挿入するためのベクターを作成した。

3-2-6. 5'-arm の挿入

① 5'-arm の調整

5'-arm と IRES-GFP, PGKneo を含んだコンストラクト(3-2-4 で作成したもの)を SalI/StuI で切断する。SalI は pBIISK+のクローニングサイトにある。一方, StuI は PGKneo の遺伝子内に存在する。これによって、5'-arm と PGKneo の前半部をもった DNA 断片が得られる。

② PGKneo の後半部分の調整

HXPGKneo を StuI/HindIII で二重切断する。この StuI は①で記載したように PGKneo 遺伝子内に存在する。HindIII は BamHI よりも下流に存在する。

③ 最終コンストラクト(図 2)

3-2-5 で作成した SalI/HindIII ベクターに上記①, ②のインサートをライゲーションし、最終的なコンストラクトを作成した。

③ スクリーニング用コンストラクトの作成

5'-arm, IRES-GFP, PGKneo で作ったコンストラクトの 5' 側に、さらに 5' 遺伝子領域を含む EcoRI/HindIII 断片をサブクローニングする。挿入した領域のプライマーと IRES-GFP のアンチセンスプライマーを合成し、スクリーニング用コンストラクトでは PCR 可能だが、マウス遺伝子では PCR できないことを確認した。

3-3. ES 細胞への導入

①フィーダー細胞の調整

前日、ゼラチンコートした 5 枚のシャーレに凍結保存しておいたフィーダー細胞をまく。

②ES 細胞の培養

2 日後、フィーダー細胞上に、ES 細胞をまく。約 3 日間でコンフルエントになったのを確認し、25 枚のシャーレのサブカルチャーする。そのうち、12 枚にマイトマイシン処理する(約 20 時間)。

③エレクトロポレーション

増殖した ES 細胞をトリプシンではがし、PBS で洗浄する。ターゲティングベクターを Sall で切断し、一本鎖にしたものを用意し、ES 細胞とまぜ、エレクトロポレーションをおこなう。エレクトロポレーションをおこなった ES 細胞をシャーレにまく。G418 を含んだ培養液で培養すると、Neo 遺伝子が発現している細胞のみが生き残る。

④コロニーをひろう

コロニーを拾い、PCR でスクリーニング用のコンストラクトをポジコンとして、各コロニーをチェックした。

合計、264 個以上のコロニーをチェックしたが、目的とする ES 細胞は今のところ得られていない。現在、コンストラクトのチェック、3'-arm の延長などを続けている。

4. 考察

これまで、目的とする ES 細胞が得られていないことに関して、以下の二つの可能性を考えている。

①マウスの aldh2 クローンにおいて、キメラがおこっていて、現在、イントロン 1 と考えているものが別の遺伝子である可能性がある。

②IRES-GFP の 3' 側にポリ A 添加シグナルを入れていない。

①に関しては、最近、マウスの aldh2 遺伝子の塩基配列が、一部ではあるが公表されている。約 500 万塩基対のファイルであるので、検索に手間取っているが、問題となる部分の塩基配列が明らかになれば、この可能性についての答えが得られる。②に関しては、深刻な影響はないと思われるが、念のため IRES-GFP をいれていないコンストラクトを作成する。

ALDH2 欠損マウスが作成できた後の計画は以下の通りである。

① 環境ホルムアルデヒド暴露

10%ホルムアルデヒド水溶液に空気を吹き込んでバブリング法でホルムアルデヒドを発生させる。暴露濃度はガスマスによって管理する。暴露期間は 1 日 8 時間、1 週 6 日間の 4 週間とする。

② アレルギー学的評価

- 1) 遅延型アレルギー反応: 暴露後半にマウス背部を剃毛しオキサゾロンにて感作し, 5 日後に耳介の一方にオキサゾロンを塗布し反対側を対照として遅延型アレルギー反応を観察する.
- 2) 即時型アレルギー反応: 暴露中間点から 5 日おきに 3 回, 卵白アルブミンをウレタン麻酔下に鼻腔内投与ないし気管内投与する. 暴露終了後に, 同一経路で再チャレンジし, 気道抵抗を呼吸機能解析装置でモニターする.
- 3) アレルギー感作応答: アレルゲン投与による感作成立の段階を, オキサゾロンないしトリメタノールアミンの 3 日間 3 回連続耳介塗布後 2 日後の局所リンパ節反応測定法(LLNA)により観察する.

以上のアレルギー反応がマウスの ALDH2 の遺伝子型(野生型(+/+), ヘテロ(+/-), ホモ(-/-)の 3 種類)により, 有意な差が見られるかを検討する.

③ 飲料水によるホルムアルデヒドの暴露実験による検討

マウスの遺伝子型ごとに飲料水によるホルムアルデヒド暴露を各 10 匹ずつおこない, 3 ヶ月毎にこれまでに報告のある肝臓障害と, 精巣 Leydig 細胞の過形成抑制の有無を検討する. 9 ヶ月まで続ける.

化学物質過敏症の原因物質はホルムアルデヒドだけではない. 他の化学物質の代謝に関与する遺伝子群も, 今後検討していく必要がある. 特に生体に入った化学物質の解毒を担う酵素群の遺伝子は重要な候補となりうる. その中でもグルタチオン-S-トランスフェラーゼ群(GST)およびN-アセチルトランスフェラーゼ 2 遺伝子(NAT2)に注目したい. GST 群は広範囲の物質に対する解毒を担っている酵素群である. 還元型グルタチオンを産生することによって解毒をおこなっている. 哺乳動物の細胞質型 GST は alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta の 6 クラスに分けることができる. それぞれ GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, GSTS, GSTZ と呼ばれる. また, サブクラスもあり, 数字で示す. そのうち, 化学物質過敏症との関連が疑われているのは GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2 などである. GSTP1 に関してはノックアウトマウスが既に作成されていて, 皮膚がんになりやすい事が報告されている. 今後, これらの遺伝子も含めて, 化学物質過敏症の遺伝素因を研究していくべきであろう.

表 1. 1985 年以来, 発表された化学物質過敏症の定義

1985	ad hoc Committee, Ontario Ministry of Health: More than 3 months duration Multisystem disorder Intolerance to foods, chemicals, environmental agents at levels generally tolerated by majority No objective physical findings; no consistently altered laboratory test Symptoms diminish with avoidance; recur with exposure.
1987	Cullen: Multiple chemical sensitivities is an acquired disorder characterized by recurrent symptoms, referable to multiple organ systems, occurring in response to demonstrable exposure to many chemically unrelated compounds at doses far below those established in the general population to cause harmful effects. No single widely accepted test of physiologic function can be shown to correlate with symptoms.
1991	Ashford and Miller: The patient with multiple chemical sensitivities can be discovered by removal from the suspected offending agents and by rechallenge, after an appropriate interval, under strictly controlled environmental conditions. Causality is inferred by the clearing of symptoms with removal from the offending environment and recurrence of symptoms with specific challenge.
1992	American Academy of Environmental Medicine: Ecologic illness is a chronic multi-system disorder, usually polysymptomatic, caused by adverse reactions to environmental incitants, modified by individual susceptibility and specific adaptation. The incitants are present in air, water, food, drugs, and our habitat.
1992	National Research Council (NRC), Workshop on Multiple Chemical Sensitivities, Working Group on Research Protocol for Clinical Evaluation: Symptoms or signs related to chemical exposures at levels tolerated by the population at large that are distinct from such well recognized hypersensitivity phenomena as IgE-mediated immediate hypersensitivity reactions, contact dermatitis, and hypersensitivity pneumonitis. Sensitivity may be expressed as symptoms and signs in one or more organ systems Symptoms and signs wax and wane with exposures. It is not necessary to identify a chemical exposure associated with the onset of the condition. Preexistent or concurrent conditions (e.g., asthma, arthritis, somatization disorder, or depression) should not exclude patients from consideration.
1992	Association of Occupational and Environmental Clinics: Workshop on Multiple Chemical Sensitivity, Working Group on Characterizing Patients: A change in health status identified by the patient Symptoms triggered regularly by multiple stimuli Symptoms experienced for at least 6 months A defined set of symptoms reported by patients Symptoms that occur in three or more organ systems Exclusion of patients with other medical conditions (psychiatric conditions are not considered exclusionary).
1993	Nethercott et al.: The symptoms are reproducible with exposure. The condition is chronic. Low-level exposure results in manifestations of syndrome. Symptoms improve or resolve when incitants are removed. Responses occur to multiple, chemically unrelated substances.
1995	Kurt: The symptoms are "odor-triggered" and "exposure perceived" at very low levels, but are manifest as a multitude of neurobehavioral symptoms that correspond to the accepted definitions of panic disorder.
1996	International Program on Chemical Safety (IPCS): An acquired disorder with multiple recurrent symptoms; associated with diverse environmental factors tolerated by the majority of people; not explained by any known medical or psychiatric disorders.

図 1. pBHind9.0 の制限酵素マップ

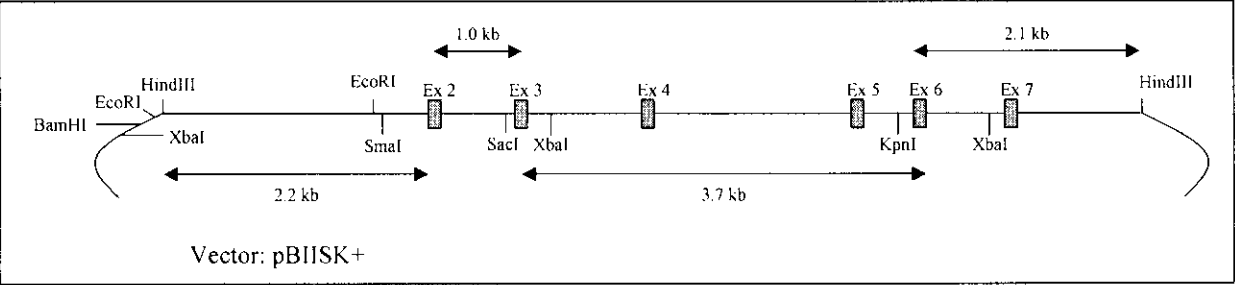
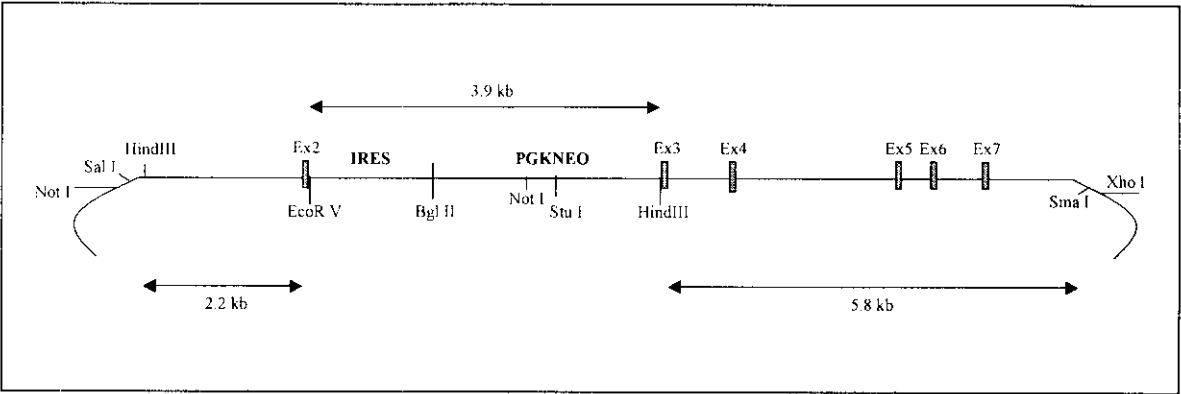


図 2. 完成したターゲティングベクター



免疫系への影響

1. ホルムアルデヒドの粘膜免疫に及ぼす影響の検討

【目的】

ホルマリン吸入が鼻粘膜における免疫に対して影響を及ぼすかどうかを検討する目的で、ホルムアルデヒドを抗原曝露と同時にマウスに曝露させ、免疫系への質的・量的な影響を調べた。ヘルパーT細胞の分化の方向(1型または2型)やヘルパーT細胞からのサイトカイン産生量にホルムアルデヒドが及ぼす影響を詳細に検討した。

【方法】

マウスの免疫

BALB/c マウス(オス8週齢)を4群に分け、各群3匹ずつ経鼻腔的に keyhole limpet hemocyanin (KLH) 50 μ g で免疫した。第1群と第2群は粘膜免疫を誘導する機能を持つ cholera toxin B subunit (CTB, Sigma 社) 20 μ g を加え、第1群と第3群は最終濃度で1%となるようにホルマリンを加えた。10 日おきに免疫を行い、最終免疫後7日目にマウスを採血後屠殺し、脾細胞を採取し培養に用いた。

脾細胞の培養

400 万個の脾細胞を4~100 μ g と共に 10%FCS、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 medium 1ml 中で、5%CO₂ 存在下 37°C48 時間培養した。培養終了後、遠心により上清を分離しサイトカイン産生量を測定した。

抗体価の測定

KLH に対する抗体価を ELISA 法により測定した。96-ウェルプレートに 3 μ g/ml の KLH を加え4°Cで1晩結合させた。PBS-0.1% Tween20 で洗浄後、10%FCS でブロッキングを行い、さらに段階希釈した血清を加えて室温で1時間静置した。洗浄後、西洋ワ