

児1例、転居時年齢：平均5歳5ヶ月、最小2歳9ヶ月、最大9歳10ヶ月、転居後リンパ球刺激試験実施までの時間：平均6年10ヶ月、最小5年2ヶ月、最大9年3ヶ月、リンパ球刺激試験実施時年齢：平均11歳10ヶ月、最小7歳10ヶ月、最大15歳1ヶ月)において(表1)、スギ花粉抗原特異的リンパ球刺激試験にホルムアルデヒド添加を加えた実験系を考案して実施し、ホルムアルデヒドが免疫に及ぼす影響を調査した。

B. 研究方法

以下の研究は、患児およびその家族に検査方法を十分に説明し、その内容を理解してもらった後、同意書に署名終了後、研究を実施した。

B. 1. 室内化学物質測定方法(図2)

患者家庭室内の化学物質は、ホルムアルデヒドなどアルデヒド類については、サンプラーにDNPHカートリッジ(Waters社製、Sep-pak DNPH-Silica cartridge)を用いて24時間パッシブサンプリングし、アセトニトリルで抽出後、高速液体クロマトグラフにより定性・定量分析を行った。揮発性有機化合物(VOC)は粒状活性炭チューブ(柴田化学機械工業株式会社製、Charcoal Tube Jumbo)にポンプを用いて、500ml/minの通気量で24時間アクティブサンプリングし、二硫化炭素溶媒に抽出後、ガスクロマトグラフにより定性・定量分析を行った^{8, 9)}。約40種類のVOCを測定し、それらの総和を総揮発性有機化合物(TVOC)とした。測定は2000年5月から9月にかけて施行した。2000年以後にも測定を実施した家庭があるが、室内ホルムアルデヒド濃度は急激には低下せず、数年間ではあまり大きな変化はしないため^{8, 9)}、転居時に一番近い2000年度の測定値を使用した。

B. 2. ホルムアルデヒド添加スギ花粉リンパ球刺激試験(図3)

次のごとくに実験系を考案し、SRL(株)に依頼し実施した。検査前日の17:00ごろにノボヘパリンを添加した試験管に約20ccの血液を採取した。10%FBS加RPMI-1640medium(Immuno-Biological laboratories)を培地とし

細胞数を数 1×10^6 個/mm³に調整した。翌日13:00、精製水で5ppmに調整したホルムアルデヒド溶液を用いて培地のホルムアルデヒド濃度が0ppm(精製水のみ)、0.25ppm、0.5ppmとなるように調整し添加した。37°Cで3時間培養した後、スギ抗原を添加した。スギ抗原は鳥居社製スギ花粉エキス(診断用アレルゲンスクラッチエキス：スギ花粉を50%グリセリン食塩溶液で抽出して得た特異的アレルゲンを含むもので、原料重量に対し、20倍液{1:20}である)を10%FBS加RPMI-1640mediumで50倍に希釈して使用した。37°Cで72時間培養後、放射線ラベルした³Hチミジン(MORAVEK BIOCHEMICALS, INC.)を添加し、16時間培養後、β放射線(単位：cpm)を計測した(液体シンチレーションカウンター：Liquid Scintillation Counter1205 Betaplate、LKB)。リンパ球刺激増殖指数 Stimulation Index (S.I.)(%)=スギ抗原添加検体 cpm/スギ抗原無添加検体 cpmを計算した。また、スギ花粉抗原添加(ホルムアルデヒド添加なし)検体に対するスギ花粉抗原添加+ホルムアルデヒド添加(0.25、0.5ppm各濃度)検体の変化率を計算した。

C. 研究結果

症例提示(症例No.1)

症例No.1は新築家屋転居後に気管支喘息が悪化し、スギ花粉特異IgEが上昇した(図4)。家族歴：母はアレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎あり。父方祖母が気管支喘息であった。既往歴：生後6ヵ月ころまでアトピー性皮膚炎あり、その後気管支喘息発作を起こしていたが1歳半ごろには改善していた。現病歴：2歳9ヵ月時の秋、床下に白蟻駆除剤を使用し、換気システムは台所とトイレの換気扇のみの新築一戸建て家屋に転居した。冬になり換気が不十分な季節になってから持続する咳が始まり、気管支喘息が再燃した。以後約2年半の間発作を繰り返した。転居前、総IgE値は42.5U/ml、IgECAPRASTは陰性だったが、転居2年後には総IgE値177U/mlと増加し、スギ花粉特異的IgERASTがクラス0から4に上昇した。赤血球コリンエステラーゼは1.7単位とやや低めであつ

た。

転居後のホルムアルデヒド濃度は、簡易測定（検知管法）で転居1ヵ月後に寝室0.2ppm、10ヵ月後寝室0.6ppm、1年9ヵ月後寝室0.19ppm、2年11ヵ月後寝室0.29ppm（同時に測定したDNPHカートリッジによる測定では0.31ppm）と高濃度のホルムアルデヒドに曝露されていた。2000年7月に測定したリビングのTVOCは1300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ あり、寝室も厚生労働省の指針値400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えており、新築後約3年経過した時点でも高濃度であった。トルエンは24.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、総キシレン（m,p,o合計）は2.28 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と低値だったが、これらの化学物質は築後数年で急速に低下するため、新築当初はかなりの高濃度であった可能性が考えられた。

ホルムアルデヒド添加スギ花粉抗原特異的リンパ球刺激試験では、ホルムアルデヒド0.25ppm添加によって89.5%、0.5ppmでは88.5%に低下した。

表2は、各症例における測定結果である。スギ花粉抗原特異的リンパ球刺激試験の結果は、S.I.最小91.4%～最大174%（平均111.3 \pm 29.3%）であり、全例で180%以下（陰性）であった。

スギ花粉抗原添加（ホルムアルデヒド添加なし）における β 放射線測定値を100%とした場合、スギ花粉抗原添加+ホルムアルデヒド0.25ppm添加、スギ花粉抗原添加+ホルムアルデヒド0.5ppm添加におけるリンパ球増殖変化率をみると、症例によってはホルムアルデヒド添加で増加する例と、低下する例がみられた（図5）。

縦軸にリンパ球増殖率（ホルムアルデヒド添加0.25ppmの β 放射線測定値cpm/ホルムアルデヒド0ppmの β 放射線測定値cpm）、横軸に各症例の自宅室内ホルムアルデヒド濃度との関係を見ると、室内ホルムアルデヒド濃度が低い場合、リンパ球増殖率は上昇し、室内ホルムアルデヒド濃度が高い場合、リンパ球増殖率は低下した（相関係数 $=-0.794$ ）（図6）。

この傾向は、リンパ球増殖率（ホルムアルデヒド0.5ppmの β 放射線測定値cpm/ホルムアルデヒド0ppmの β 放射線測定値cpm）と各症例の自

宅室内ホルムアルデヒド濃度との間でも同様であった（相関係数 $=-0.744$ ）（図7）。

以上から、室内ホルムアルデヒドは新築家屋転居後にスギ花粉特異IgEが上昇した6症例の末梢血単核球を使用した実験系において、自宅室内ホルムアルデヒド濃度が低い症例ではホルムアルデヒド添加によってリンパ球増殖が亢進し、自宅室内ホルムアルデヒド濃度が高い症例では逆にリンパ球増殖が低下する傾向がみられた。したがって、ホルムアルデヒドは抗原刺激によるリンパ球増殖に影響を与え、免疫能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

D. 考察

ホルムアルデヒドがアレルギー性疾患に及ぼす影響について、現在までにさまざまな研究が行われてきた。

疫学調査では、ホルムアルデヒドによって児童のアレルギー感作状態が亢進する可能性¹⁰⁾、ホルムアルデヒドによるアトピー性皮膚炎悪化の可能性¹¹⁾が指摘されている。また、我々の調査でも、ホルムアルデヒド濃度の高い新築家屋に転居後に気管支喘息やアトピー性皮膚炎の悪化がみられた^{5, 6, 7, 8, 9)}。

げっ歯類を使った動物実験では、ホルムアルデヒドによる抗体産生の亢進^{12, 13)}、ホルムアルデヒド曝露により炎症性皮膚疾患においてTh1/Th2バランスがTh2に傾くという報告¹⁴⁾、ホルムアルデヒドによってTh1およびTh2サイトカイン産生が変化し^{15, 16)}、ホルムアルデヒド投与のタイミングによってサイトカイン産生パターンが変化するという報告¹⁶⁾、B細胞からの抗体産生やT細胞からのサイトカイン産生がホルムアルデヒド曝露により増大するという報告¹⁷⁾などがある。また、ホルムアルデヒド曝露によってアレルギー性結膜炎が濃度依存的に（最高80ppbまでの低濃度）悪化することも報告されている¹⁸⁾。

さらに、近年では、ホルムアルデヒドは濃度によって異なる影響を及ぼすことがわかってきた。秋山らは、ヒトThリンパ球クローンを使ってサイトカイン産生に及ぼすホルムアルデヒドの影響を研究し、IL-4、IL-5産生において、低濃度では

産生が増強し、高濃度では産生が低下するベル型の産生増強効果がみられることを報告した¹⁹⁾。ホルムアルデヒドの細胞増殖に対する影響の研究では、Tyihakらが、ヒト大腸癌細胞とヒト内皮細胞を使った実験を行い、低濃度のホルムアルデヒドは細胞増殖作用を生じ、高濃度では細胞障害を起こして細胞増殖が起きないことを報告した²⁰⁾。

リンパ球刺激試験は主に薬剤に対する過敏性を検査するために用いられてきた免疫学的な検査法であるが²¹⁾、最近ではハウスダストやダニ抗原に対するリンパ球反応の評価^{22, 23)}や食物抗原に対するリンパ球反応の評価などにも応用されている^{24, 25)}。

今回、我々がおこなった実験では、実際の生活空間においてホルムアルデヒドを実測し5年以上の長期間にわたって曝露されてきた症例の末梢血リンパ球を用いている点で、過去の報告とは異なっている。また、6例ともスギ花粉抗原に対するIgE値が転居後に上昇しており、スギ花粉に対するTh2反応性を有していると考えられた。

培養液に添加した0.25ppm、0.5ppmのホルムアルデヒドがリンパ球増殖に与える影響は症例ごとに異なっていたが、その反応は各症例の自宅室内のホルムアルデヒド濃度に依存していた。この点が新たに見出された点である。室内ホルムアルデヒドが低い症例ではホルムアルデヒド添加によってリンパ球は増殖し、室内ホルムアルデヒドが高い症例ではホルムアルデヒド添加によってリンパ球は減少し、秋山らやTyihakらの報告と同様にベル型の反応を示した。したがって、各症例がホルムアルデヒドから受ける影響は、生活環境中ホルムアルデヒド濃度によって差が生じる可能性が示唆された。

また、転居後リンパ球刺激試験実施までには平均6年10ヶ月、最小で5年2ヶ月、最大で9年3ヶ月を経ており、現在の状態に至るまでの間に現在の反応とは違う反応性を有していた可能性も考えられる。室内ホルムアルデヒドが高濃度でホルムアルデヒド添加によってリンパ球が減少した症例においては、過去には免疫能が亢進しIgE産生(特にスギ花粉特異的IgE産生)が活発化させ

られた時期があったことが当然予想された。

E. 結論

新築家屋転居後にスギ花粉特異IgEが上昇した6症例に対してホルムアルデヒド添加スギ花粉抗原特異的リンパ球刺激試験を実施した。その結果、反応は2つの群に分かれた。①自宅室内ホルムアルデヒド濃度が低い症例はホルムアルデヒド添加によってリンパ球増殖が亢進し、②自宅室内ホルムアルデヒド濃度が高い症例ではリンパ球増殖が低下した。以上の結果から、ホルムアルデヒドは抗原刺激によるリンパ球増殖に影響を与えており、免疫能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

F. 参考文献

- 1) 角田和彦：アレルギー外来で経験したアナフィラキシー症例の臨床像(上)．アレルギーの臨床 18:476-481, 1998
- 2) 角田和彦：アレルギー外来で経験したアナフィラキシー症例の臨床像(下)．アレルギーの臨床 18:660-666, 1998
- 3) 石川哲、宮田幹夫：化学物質過敏症—診断基準・診断に必要な検査法．アレルギー・免疫 6：990-998, 1999
- 4) Satoshi ISHIKAWA and Mikio MIYATA:CHEMICAL SENSITIVITY and ITS CLINICAL CHARACTERISTICS in JAPAN. the Asian Medical Journal 43:7-15,2000
- 5) 角田和彦、北條祥子、吉野博、石川哲：アレルギー児が思春期に受ける化学物質の影響．神経眼科 19-2：176-187, 2002
- 6) 吉野博、角田和彦、北條祥子：室内空気中の化学物質汚染に関する研究．平成12年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究報告書：82-137, 2001
- 7) 角田和彦、吉野博、北條祥子：室内化学物質汚染がアレルギー性疾患の発症・進展に及ぼす影響．アレルギー51：223, 2002
- 8) 吉野博、天野健太郎、飯田望、角田和彦、北條祥子、石川哲：シックハウスの現状：室内空気質と健康との関係．神経眼科 19-2:188-200, 2002

- 9) 飯田望、吉野博、天野健太郎、角田和彦、北條祥子、石川哲：シックハウスにおける居住環境の実態と健康に関する調査研究。臨床環境医学 11 : 77-87、2002
- 10) Garrett MH, Hooper MA, Hooper BM, Rayment PR, Abramson MJ: Increased risk of allergy in children due to formaldehyde exposure in homes. *Allergy* 54:330-337, 1999
- 11) S.TORII, T.SAKAMOTO, Y.HAYASHI: The effects dermatitis of formaldehyde and metals on atopic dermatitis. *Environ Dermatol* 5:85-91, 1998
- 12) Tarkowski M, Gorski P: Increased IgE Antioalbumin Level in Mice Exposed to Formaldehyde. *Int Arch Allergy Immunol* 106:422-424, 1995
- Riedel F, Hasenauer E, Barth PJ, Kozirowski A, Rieger CHL: Formaldehyde exposure enhances inhalative allergic sensitization in the guinea pig. *Allergy* 51:94-99, 1996
- 13) 山下直美、田下浩之、石田博文、太田健：ホルマリンの気道過敏性およびIgE産生に及ぼす影響についての検討。平成14年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究第2回班会議資料、2003
- 14) 藤井一恭、荒田次郎：ホルムアルデヒドの経気道的曝露によるアレルギー性皮膚炎への影響について（特にTh1/Th2バランスに関して）。平成12年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究報告書：265-270、2001
- 15) Saneyoshi K, Nohara O, Imai T, Shiraishi F, Moriyama H, Fujimaki H: IL-4 and IL-6 production of bone marrow-derived mast cells is enhanced by treatment with environmental pollutants. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 237-45, 1997
- 16) Iwatsuki K, Fujii K, Okazaki F, Takahashi S, Tsuji K: Formaldehyde-induced alterations of inflammatory responses in a murine allergic contact hypersensitivity model. *Proceedings of 2003-International symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards Vol1:246-249, 2003*
- 17) 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—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。平成13年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究報告書：465-466、2002
- 18) Miyata M, Ishikawa S: Animal study by low dosage chemical loading in ECU-Experimental allergic conjunctivitis. *Proceedings of 2003-International symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards Vol2: 53-55, 2003*
- 19) 秋山一男、三田晴久、斉藤博士、森昌夫、安枝浩、斉藤明美、山下義仁、東憲孝、谷口正実、前田裕二、長谷川真紀、高鳥浩介、阪口雅弘：微量化学物質による呼吸器系障害・アレルギーとの因果関係の解明をめざした研究。平成12年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究報告書：201-219、2001
- 20) Tyihak E, Bocsi J, Timar F, Racz G, Szende B: Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumor and endothelial cells. *Cell Prolif* 34: 135-41, 2001
- 21) 北見啓之、山口毅一：リンパ球を用いた薬剤アレルギーの診断。臨床免疫 15 : 727-736、1983
- 22) Kondou N, Agata H, Fukutomi O, Motoyoshi F, Orii T: Lymphocyte responses to food antigens in patients with atopic dermatitis who are sensitive to foods. *J Allergy Clin Immunol* 86: 253-260, 1990
- 23) Kondou N, Shinoda S, Fukutomi O, Agata H, Iida S, Orii T: Variable Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells to House Dust or Mites in Patients with Bronchial Asthma. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology* 9: 103-106, 1995
- 24) Kondou N, Fukutomi O, Agata H, Yokoyama Y: Proliferative responses of lymphocytes to food antigens are useful for

detection of allergens in nonimmediate types of food allergy. *J invest AllergolClin Immunol* 7: 122-126, 1997

25) 縣裕篤、鶴澤正仁、藤本孟男：食物アレルギー

—2000、2.食物アレルギーの臨床検査的診断—3) 食物抗原刺激リンパ球増殖反応とその応用. *小児科臨床* 53 : 569-574、2000

図1 転居後最大総IgE値/転居前総IgE値比と室内ホルムアルデヒド濃度

転居後最大総IgE値/転居前総IgE値の比を測定できた17症例において、転居後最大総IgE値/転居前総IgE値の比とホルムアルデヒド濃度との間には相関係数0.36の関係があり、ホルムアルデヒド濃度が高くなると、総IgE値は上昇する傾向がみられた。さらに、転居後にスギ花粉特異IgEが陽性化または上昇した11症例では、転居後最大総IgE値/転居前総IgE値比が高い傾向がみられた。

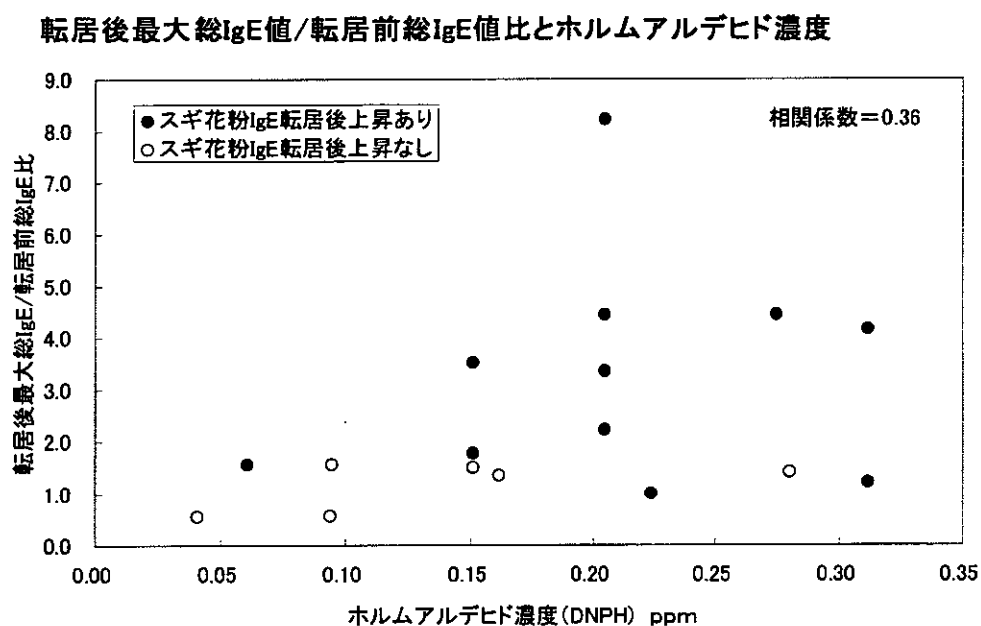


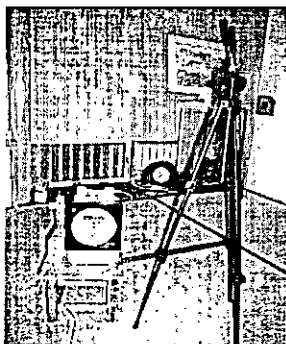
表1 各症例の個人データ

症例1と4、症例3と5は兄弟例。

症例No	性	転居時年齢	転居後リンパ球刺激試験実施までの時間	リンパ球刺激試験実施時年齢	転居前の主なアレルギー疾患	転居後の経過	転居後病状悪化までの時間	転居直前IgE(UA/ml)	転居後最大IgE(UA/ml)	転居前IgE RASTクラス2以上:()内クラス値	転居後陽性または上昇したIgE RASTクラス2以上:()内クラス値	TVOC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	ホルムアルデヒド (ppm)	アセトアルデヒド (ppm)	赤血球コリンエステラーゼ (U)	白蟻駆除または防虫剤使用	家庭内喫煙の有無
1	男	2歳9ヶ月	5年2ヶ月	7歳10ヶ月	気管支喘息	気管支喘息悪化	3か月	43	177	なし・スギ(0)	スギ(4)・シラカンバ	1300	0.31	0.189	1.7	あり	なし
2	男	3歳4ヶ月	6年7ヶ月	7歳10ヶ月	アトピー性皮膚炎・気管支喘息	転居後気管支喘息悪化	6か月	492	498	ダニ・動物上皮・卵白・牛乳・大豆・ピーナッツ・小麦・魚	スギ(4)・イネ・ソバ・ゴマ・リンゴ・トウモロコシ	525	0.22	0.167	1.6	なし	なし
3	女	3歳8ヶ月	9年3ヶ月	12歳11ヶ月	アトピー性皮膚炎・気管支喘息・アレルギー性鼻炎	咳・気管支喘息悪化・花粉症発病・アトピー性皮膚炎悪化	1年11か月	170	1400	ダニ・エビ・魚	スギ(5)・イネ(4)・卵白・牛乳・ビール酵母・カンジダ	949	0.20	0.178	1.5	なし	なし
4	男	9歳10ヶ月	5年2ヶ月	14歳11ヶ月	気管支喘息・アレルギー性鼻炎・アレルギー性結膜炎	頭痛・吐き気・立ちくらみ・近視の発病	直後	360	438	ダニ・イネ・スギ(0)・ネコ・小麦・ピーナッツ	スギ(2)	1300	0.31	0.189	1.5	あり	なし
5	男	5歳10ヶ月	9年3ヶ月	15歳1ヶ月	なし	アレルギー性鼻炎・花粉症発病	2年8か月	85	377	なし・イネ(0)・雑草(0)・スギ(0)	イネ(4)・雑草(2)・ガ・スギ(2)・小麦・ゴマ	949	0.20	0.178	1.7	なし	なし
6	男	7歳3ヶ月 11歳3ヶ月	5年6ヶ月	12歳8ヶ月	気管支喘息・アレルギー性鼻炎・アレルギー性結膜炎	頭痛・吐き気・立ちくらみの発病	最初の転居から4年、2回目の転居直後	1998	3568	ダニ・イネ・動物上皮・大豆・ピーナッツ・小麦(2)	スギ(6)・小麦(3)・ゴマ	361	0.15	0.114	ND	不明	なし

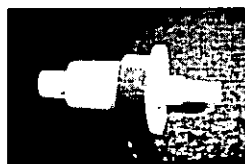
図2 室内化学物質測定方法

室内化学物質 測定方法



Scene of the measurement

	アルデヒド類	揮発性有機化合物 (VOC)
捕集方法	DNPHカートリッジ (Waters社製) 使用 24時間パッシブサンプリング	粒状活性炭チューブ (柴田化学社製) 使用 24時間アクティブサンプリング (通気量: 500ml/min)
分析方法	アセトニトリル (4ml) を溶媒として抽出 高速液体クロマトグラフ (HPLC) に導入	二酸化炭素 (2ml) を溶媒として抽出 ガスクロマトグラフに導入
分析条件	国立公衆衛生院建築衛生学部にて分析 分析機器: HPLC (高速液体クロマトグラフ) 検出器: DAD (Diode Array Detector) カラム: Eclipse XDBカラム (ポアサイズ80, 5 μ m \times 250mm) 移動相: 水:アセトニトリル=35:65 移動相の流速: 1.0ml/min カラム温度: 35 $^{\circ}$ C 検出波長: 365nm (Ref. 600nm) 輸送圧力: 78~81bar	東北文化学園大学環境計画工学科にて分析 分析機器: GC (ガスクロマトグラフ) 検出器: FID, FID感度10 (水素炎イオン化検出器) カラム: CP-Si18cb (100m \times 530 μ m \times 5.0 μ m) 移動相: 窒素 移動相の流速: 18ml/min カラム温度: 40 $^{\circ}$ C~320 $^{\circ}$ C DET: 280 $^{\circ}$ C インジェクション: 280 $^{\circ}$ C



DNPH-Silica cartridge
(formaldehyde)



Charcoal sorption tube
(VOC)

図3 ホルムアルデヒド添加スギ花粉リンパ球刺激試験

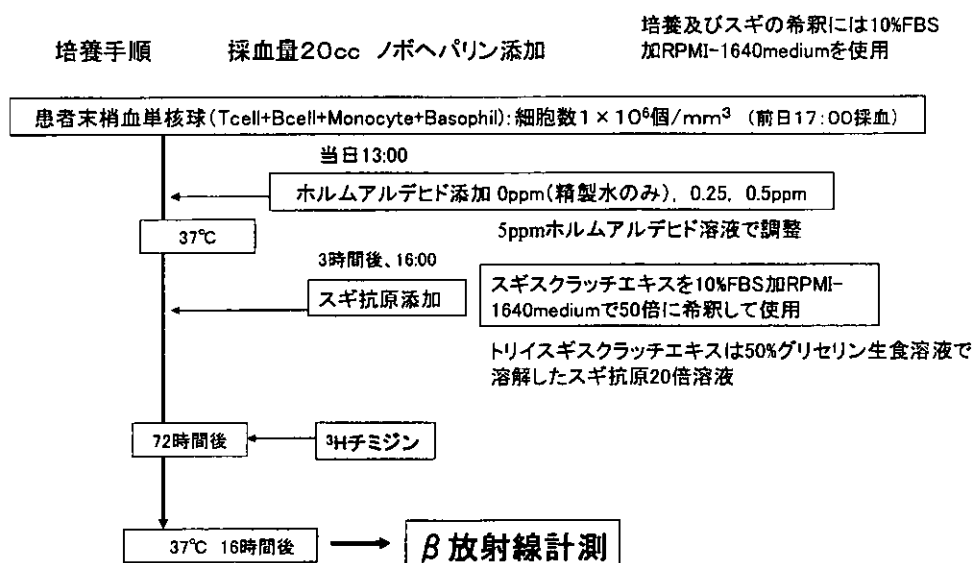


表2 ホルムアルデヒド添加スギ花粉リンパ球刺激試験結果

症例 No	性	転居時 年齢	ホルムアルデヒド濃度 (ppm) スギ抗原添加の有無	β放射線測定値 (cpm)				スギ花粉抗原添加リンパ球刺激試験における Stimulation Index (S.I.)		スギ花粉抗原+ホルムアルデヒド添加リンパ球刺激試験における変化率		
				0 (-)	0 (+)	0.25 (+)	0.5 (+)	0 (-)	0 (+)	0 (+)	0.25 (+)	0.5 (+)
1	男	2歳9ヶ月		4397	5006	4480	4432	100	113.9	100	89.5	88.5
2	男	3歳4ヶ月		4814	4420	4319	5224	100	91.8	100	97.7	118.2
3	女	3歳8ヶ月		1493	1369	1638	1810	100	91.7	100	119.6	132.2
4	男	9歳10ヶ月		4564	4171	3229	3138	100	91.4	100	77.4	75.2
5	男	5歳10ヶ月		1695	2950	3862	3297	100	174.0	100	130.9	111.8
6	男	7歳3ヶ月 11歳3ヶ月		2046	2152	2431	2280	100	105.2	100	113.0	105.9

図5 ホルムアルデヒド添加スギ花粉リンパ球刺激試験におけるリンパ球刺激増殖の変化率

ホルムアルデヒド添加によるリンパ球増殖の変化は、症例によっては増加する例と、低下する例がみられた。(FA:ホルムアルデヒドの略)

ホルムアルデヒド添加スギ花粉特異的リンパ球刺激試験結果

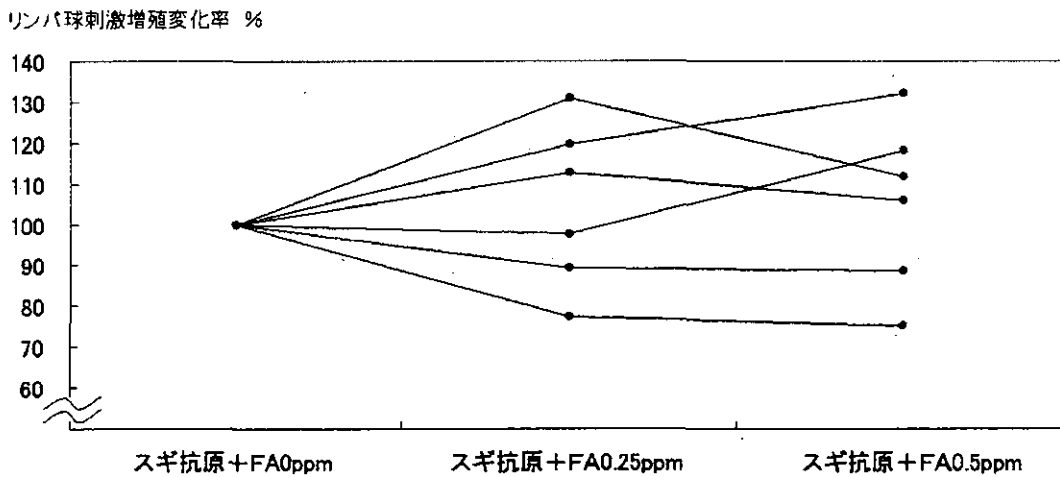


図6 リンパ球増殖率（ホルムアルデヒド0.25ppmのβ放射線測定値cpm/ホルムアルデヒド0ppmのβ放射線測定値cpm）と自宅室内ホルムアルデヒド濃度との関係

室内ホルムアルデヒド濃度が低い場合、リンパ球増殖率は上昇し、室内ホルムアルデヒド濃度が高い場合、リンパ球増殖率は低下した（相関係数=-0.794）。

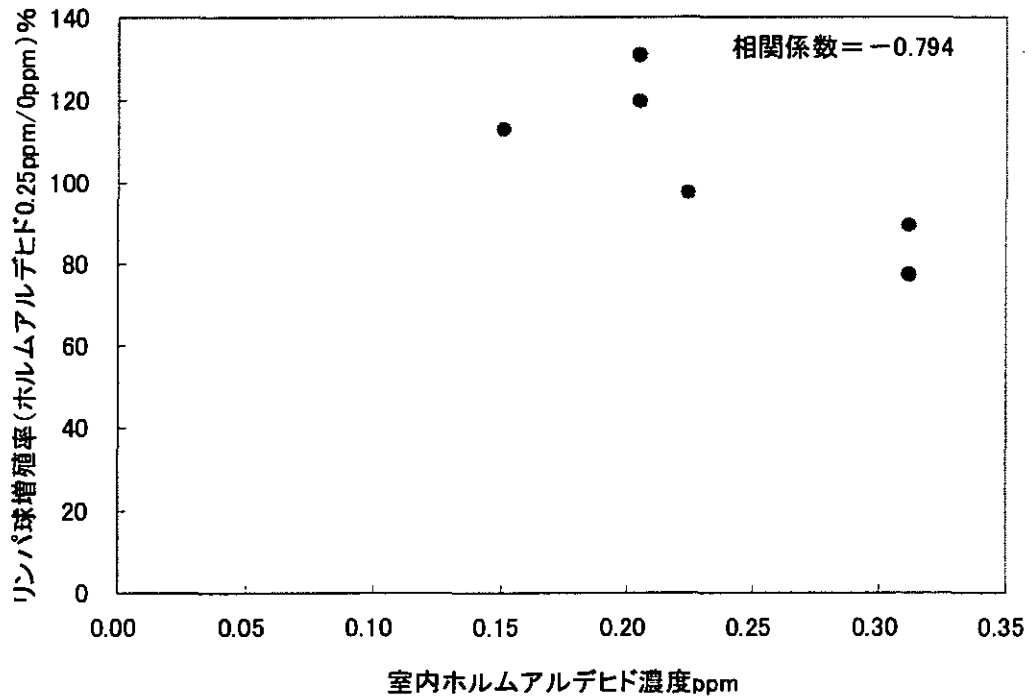
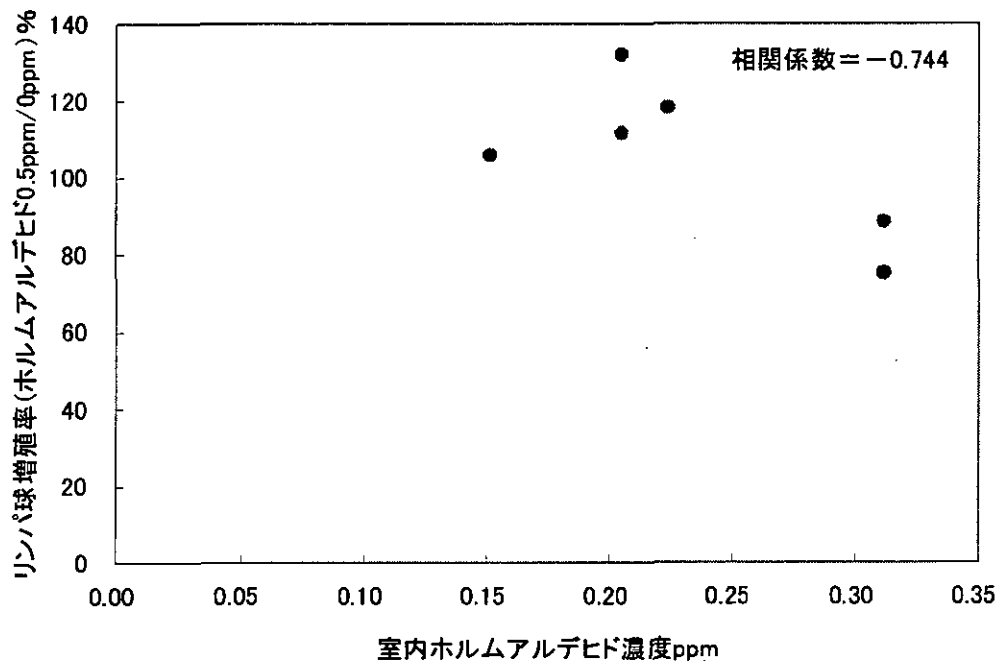


図7 リンパ球増殖率（ホルムアルデヒド 0.5ppm のβ放射線測定値 cpm/ホルムアルデヒド 0ppm のβ放射線測定値 cpm）と自宅室内ホルムアルデヒド濃度との関係

図6と同様の傾向がみられた。



X-2 ヒト末梢 T リンパ球のサイトカイン反応性に対する フタル酸エステル類の影響

分担研究者 石川 哲 (社) 北里研究所・北里研究所病院・臨床環境医学センター
研究協力者 坂部 貢、宮田幹夫 (社) 北里研究所・北里研究所病院・臨床環境医学センター

研究要旨 フタル酸エステル類は、厚生労働省による室内空気汚染物質のガイドライン値の設定されている物質として重要であるばかりか、環境省によって内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の疑いのある物質としてもリストアップされている要注意化学物質である。本研究の主旨を十分に理解し、同意の得られた 12 名の成人健康者（男性 6 名：女性 6 名）から得られた末梢血を使用した。血液は、Leuco-Prep（リンパ球分離用溶液）を用いて、総リンパ球分画得たのち、無血清培地のみにて 48 時間培養した。培養 48 時間の後、総リンパ球は、CD3-Positive-Selection カラムで T リンパ球分画のみ採集し、さらに CD4-/CD8-Positive-Selection カラムを用いてほぼ純粋な CD4 リンパ球、CD8 リンパ球を得た。培養液中で一定量にした CD4 リンパ球及び CD8 リンパ球に、各種濃度に調整したフタル酸エステル類の一つである、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)あるいはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)を添加し 24 時間培養、引き続きインターロイキン 2(IL-2)を添加し 72 時間培養した。その結果、フタル酸エステル類の添加は、サイトカインに反応した CD8 リンパ球において、細胞周期 G1 期→S 期の遂行に重要な PKC 活性、S 期の遂行に重要な ADR 活性、M 期の遂行に重要な cdc2-kinase 活性のいずれの活性も抑制させた。

一方、CD4 リンパ球は、いずれの因子も今回用いた濃度の範囲では、有意な影響を受けなかった。以上のことから、フタル酸エステル類は、主として CD8 リンパ球に対して影響をぼし、その結果として CD8 による CD4 に対する抑制作用が減弱し、免疫機能を攪乱させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

フタル酸エステル類は、壁材・床材・合成樹脂・合成ゴムの可塑剤などに頻用されている有害化学物質であり、厚生労働省による室内空気汚染物質のガイドライン値の設定されている有害物質として重要であるばかりか、環境省によって内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の疑いのある物質としてもリストアップされている要注意物質である。中枢神経作用に加え、母ラット曝露における新生仔の生殖器の構造異常、ラット経口曝露における精巣への病理学的影響などが報告されている。一方、化学物質過敏症患者における免疫機能検査では、総リンパ球数、T リンパ球分画の相対比(CD4/CD8 ratio)において異常所見を認める例があり、「総リンパ球数の減少」と「CD8 リンパ球の抑制」は、比較的高い頻度で認められる。

そこで本年度の研究では、未だ不明の点の多いフタル酸エステル類のヒト免疫機能に対する作用について主として細胞生物学的手法

を用いて検討し、本症の病態生理学的解釈をする上での有益な情報を得ることを目的とした。

B. 研究材料・研究方法

1. 使用試薬類

Methylthymidine-5'-triphosphate (³H-TTP) は、New England Nuclear (Boston, MA) より供与された。また添加したフタル酸エステル類であるフタル酸ジ-n-ブチル(DBP)およびフタル酸-2-エチルヘキシル(DEHP)は、(財) 残留農薬研究所より入手したものをを使用した。サイトカインとして使用した Interleukin-2(IL-2) は、Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) より供給を受けた。その他の試薬類はすべて特級品を用いた。

2. 細胞培養

本研究の目的と結果の取り扱いについて十分に説明、同意を得た健康成人男女 12 名（男女各 6 名）から静脈採血を施行した。採

取した血液は、末梢リンパ球分離試薬である Leuco-Prep 溶液に注入、3000rpm で 20 分間遠心した。遠心後、総リンパ球分画のみを採取(1.5x10⁶cells/ml)、無血清 RPMI1640 で 48 時間培養した。48 時間の培養後、CD3-Positive Selection カラムで CD3 陽性細胞 (T リンパ球) を分離、引き続き CD4-あるいは CD8-Positive Selection カラムを通して、ほぼ純粋な CD4(+)T リンパ球と CD8(+)T リンパ球を得た。得られた各種リンパ球は、10%AB 血清加 RPMI1640 培養液(IL-2 含む)にて 72 時間培養した。同時にフタル酸エステル類処理群には、DBP あるいは DEHP を 1.0~10 μM 濃度で添加した。

3. Protein Kinase C (PKC) 活性の測定

PKC 活性の測定は、Promega PKC detection キット (Madison, WI)を用いた。72 時間の培養後、各ウェルの細胞数を計測し、フリーザーミル (液体窒素ホモゲナイザー) にて細胞を粉砕し、トリス緩衝液にて希釈した。その後、75,000G で 60 分間超遠心分離し、上清をサンプルとした。C1 peptide (PKC によってリン酸化される基質) 反応溶液*に 10 μl の各種サンプルを添加し 30 分間反応させた。30 分反応させた溶液は、0.8%アガロースゲルに塗布し、120V で 15 分泳動、Scanning Film-Densitometer(Bio-Rad Japan) で定量化した。

*PKC reaction buffer: 100mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 6.5 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 50 mM MgCl₂, 5 mM adenosine triphosphate, 0.4 μg C1 peptide, 1mg phosphatidyl serine

4. Activator of DNA Replication (ADR) 活性の測定

ADR 活性は、Sakabe ら方法 (Int. J. Immunopharmacol. 20:205-212, 1998) に従って測定した。72 時間の培養後、各ウェルの細胞に低張緩衝液を添加し細胞を膨化させ後、超音波ホモゲナイザーで細胞を粉砕、3000g で遠心の後に上清を採取し、上清の ADR 活性を測定した。裸核にしたアフリカツメガエルの脾細胞と上清を buffer*中で反応させ、この時の ³H-TTP 取り込み量を、ADR 活性の指標とした。

*buffer:0.5 mM 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate [dATP], 0.5 mM 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate [dGTP], 0.5 mM 2'-deoxycytidine

[dCTP], 5 mM adenosine 5'-triphosphate [ATP], 125 mM phosphoenolpyruvate, 10U pyruvate kinase/ml, 38mM HEPES, 100mM KCl, 125mM sucrose, 12.5mM MgCl₂, 2mM dithiothreitol

5. p34cdc2 Kinase (cdc2) 活性の測定

cdc2 の測定は、immunoblot 法により行った。

72 時間の培養後、各ウェルの細胞を採取、超音波ホモゲナイザーで細胞を粉砕後 800G にて遠心、上清を常法通りに泳動し転写した後、転写膜を酵素免疫反応処理、最終的にバンド定量するために画像解析した。

C. 研究結果

フタル酸エステル類(DBP および DEHP)のヒトTリンパ球のサイトカイン反応性に対する影響を細胞生物学的手法で検討し、表-1、表-2 のような結果が得られた。

D. 考察

本研究では、未だ不明の点の多いフタル酸エステル類のヒト免疫系に対する影響を、細胞生物学的手法を用いて検討した。我々は、昨年度の分担研究報告で、化学物質過敏症患者等、室内空気汚染に伴う微量有害化学物質の影響を受けている患者の免疫プロファイルでは、CD8 リンパ球の減少が60%近くの患者で認められ、その結果として CD4/CD8 ratio が上昇していることを報告した。即ち、本症では、CD8 リンパ球の機能が抑制されることにより、患者の機能的免疫バランスは CD4 リンパ球有意に傾いていると言える。今回のヒトTリンパ球を用いた細胞生物学的解析は、これまでに臨床的上観察された化学物質過敏症患者に認められた免疫諸現象を、見事に培養系で再現できることを証明しただけでなく、本症患者に比較的高い頻度で観察される一般アレルギーの悪化、甲状腺に関連する自己免疫疾患の有症率の上昇等の病態生理学的解釈に寄与できる新知見と考えられる。しかしながら、「なぜ CD8 リンパ球が標的になるか？」についての答えは、未だ不明であり、今後に残された大きな課題である。

E. 結論

フタル酸エステル類は、主として CD8 リンパ球の機能を選択的に抑制することにより、免疫応答を攪乱することがわかった。

F. 健康危険情報

建材等の可塑剤として頻用されているフタル酸エステル類は、中枢神経系に作用するだけではなく、極めて微量でもアレルギーの悪化・自己免疫疾患発症等を誘発する可能性をもつ有害化学物質である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 坂部 貢、 “内分泌攪乱物質の免疫系への影響”、最新医学、57(2) : 32-29、2002
- 2) 坂部 貢、 “シックハウス症候群”、水環境学会誌、25(2) : 87-90、2002
- 3) 宮田幹夫、坂部 貢、松井孝子、遠乗秀樹、石川哲、 “多種類化学物質過敏症患者に二重盲検試験と瞳孔”、神経眼科、19(2) : 155-161、2002
- 4) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、角田和彦、 “シックハウス症候群と脳循環”、神経眼科、19(2) : 162-168、2002
- 5) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、 “シックハウス症候群の診断と治療の実状”、建築雑誌、117(1491) : 12-14、2002
- 6) 坂部 貢、 “居住環境と健康障害—シックハウス症候群を中心として”、化学と教育、50(11) : 777-779、2002
- 7) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄、 “微量環境化学物質と胸腺の微細構造”、Immunotox Letter、7(2) : 3-4、2002
- 8) Y. Fujita, T. Kakuta, M. Asano, J. Itoh, K. Sakabe, T. Tokimasa, A. Saito, “Evaluation of Na⁺ active transport and morphological changes for bioartificial renal cell device using Madin-Darby canine kidney cells”, Tissue Eng, 8(1):13-24, 2002
- 9) M. Ojima, H. Tonori, T. Sato, K. Sakabe, M. Miyata, S. Ishikawa, Y. Aizawa, “Odor perception in patients with multiple chemical sensitivity”, Tohoku J. Exp. Med., 198, 163-173, 2002

2. 学会発表

- 1) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、相澤好治、吉田貴彦、相川浩幸、永倉貢一、赤塚 明：低用量フタル酸類の一次免疫中枢に対する影響、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 2) 坂部 貢、国松佳奈、角田隆俊、齋藤明、相川浩幸、相澤好治、宮田幹夫、石川 哲：甲状腺C細胞におけるエストロゲン受容体ベータ型の意義—環境エストロゲンの作用と関連させて—、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 3) 坂部 貢、島 正則、徳永正俊、勝岡洋治、吉田貴彦、香山不二雄、相澤好治、宮田幹夫、石川 哲：環境ホルモンは前立腺癌細胞の増殖にどう影響するか？ 第11回日本臨床環境医学会、2002
- 4) 坂部 貢、山崎 等、尾上球子、相川浩幸、相澤好治、吉田貴彦、香山不二雄、宮田幹夫、石川 哲：重症筋無力症ラット (BUF/Mna) の胸腺腫発育と環境ホルモン、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 5) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄：微量環境化学物質と胸腺の微細構造—フタル酸エステル類を中心として—、第9回日本免疫毒性学会、2002
- 6) 坂部 貢、 “シックハウス症候群・化学物質過敏症”、第33回日本職業アレルギー学会、2002
- 7) K. Sakabe, “Present status of chemical sensitivity in Japan”, 20th Annual International Symposium On Man and His Environment, 2002
- 8) K. Sakabe, “Immunological analysis of the low dose exposure syndromes”, International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2002, 2002
- 9) 坂部 貢、 “化学物質過敏症の治療と対策”、第52回日本アレルギー学会総会、2002
- 10) K. Sakabe, “Objective diagnosis for patient with chemical sensitivity”, 3rd International Symposium on Indoor Air Quality, 2003

3. その他の学術講演

- 1)坂部 貢：環境ホルモンと子供の健康、愛知県保険医師会公害環境問題講演会、2002
- 2)坂部 貢：化学物質から身を守る、2002市民のための政治スクール、2002
- 3)坂部 貢：住まいと化学物質過敏症、静岡県都市住宅部シックハウス問題に係る研修

会、2002

- 4)坂部 貢：化学物質過敏症に関する最新情報、旭川市主催・シックハウス症候群医療情報講演会、2002
- 5)坂部 貢：家庭から地球規模までの環境マネジメントーシックハウス、日本薬学会主催市民フォーラム、2002

H. 知的財産の出願・登録状況：特になし

表-1 ヒト CD8 リンパ球の PKC 活性、ADR 活性および cdc2 活性に及ぼすフタル酸エステル類の影響

Treatment	PKC activity (ng/culture ± SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	59.2 ± 6.8	-
IL-2+ DBP	32.5 ± 6.9*	46
IL-2+ DEHP	42.7 ± 4.8*	28
Treatment	ADR activity (cpm/culture ± SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	12,356 ± 1,318	-
IL-2 + DBP	6,130 ± 927*	51
IL-2 + DEHP	9,765 ± 1,765*	21
Treatment	Cdc2 activity (% expression)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	100 ± 11	-
IL-2 + DBP	62 ± 7*	38
IL-2 + DEHP	77 ± 11*	23

*P<0.01 vs IL-2 alone. The mean percent suppression of PKC, ADR or cdc2 activity was calculated as (1-observed/expected) x 100, where "expected" = IL-2 alone and "observed" = IL-2 plus 1 μ M DBP/DEHP.

表-2
ヒト CD4 リンパ球の PKC 活性、ADR 活性および cdc2 活性に及ぼすフタル酸エステル類の影響

Treatment	PKC activity (ng/culture ± SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	48.6 ± 7.1	-
IL-2+ DBP	46.2 ± 5.7	-
IL-2+ DEHP	47.1 ± 5.2	-
Treatment	ADR activity (cpm/culture ± SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	9,356 ± 812	-
IL-2 + DBP	9,112 ± 764	-
IL-2 + DEHP	9,448 ± 934	-
Treatment	Cdc2 activity (% expression)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	100 ± 7	-
IL-2 + DBP	98 ± 6	-
IL-2 + DEHP	100 ± 9	-

The mean percent suppression of PKC, ADR or cdc2 activity was calculated as (1-observed/expected) x 100, where "expected" = IL-2 alone and "observed" = IL-2 plus 1 μ M DBP/DEHP.

X I . 室内空気中の化学物質の免疫学的評価に関する研究

分担研究者 埴岡 伸光 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部

協力研究者 大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部

研究要旨 家庭環境中で検出される化学物質の生体影響を代謝化学的及び免疫学的視点から評価するため、トルエン等の有機溶剤の代謝に重要な役割を与えている薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP2E1) に着目し、異物毒性発現と薬物代謝酵素の遺伝子多型性の関連性について検討した。ヒト肝臓 cDNA から PCR により増幅した野生型 CYP2E1 cDNA および CYP2B6 cDNA を pENTR/D-TOPO vector へそれぞれクローニングし CYP2E1 (Arg76His, Val389Ile, Val179Ile) の変異を導入した。さらに、これらの cDNA をサブクローニングし、COS-1 細胞で発現させた。得られた CYP2E1 の機能解析にはクロルゾキサゾン 6-水酸化および 4-ニトロフェノール 2-水酸化を測定することにより行った。変異型 CYP2E1 タンパク発現量は、Val389Ile, Val179Ile 変異型では野生型と同程度であったが、Arg76His 変異型では野生型に比べ 30%に減少した。クロルゾキサゾン 6-水酸化および 4-ニトロフェノール 2-水酸化反応の CYP2E1 タンパク発現量当たりの K_m 値は、野生型および変異型ともに有意な差は認められなかったが、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は Arg76His 変異型において有意に増加した。以上の結果から、CYP2E1 の機能維持においては Arg76 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

人類は、これまで多くの化学物質を作り出し、より文化的で快適な環境で生活を送ることができるようになってきた。しかしその反面、公害などの深刻な社会問題を発生させていることも事実である。家庭環境中では、塗料、合成接着剤、防ダニ・防虫剤、殺虫剤および芳香・消臭剤がよく使用されているが、それらの主成分となっている化学物質の中には神経毒性、免疫毒性、変異原性や発ガン性等が疑われているものがある。また、近年増加している化学物質過敏症や免疫・アレルギーの疾患等はこれら化学物質が原因の一つとなっていると考えられている。しかし、これら疾病の発症原因となる化学物質およびその発症メカニズムは、まだ十分に解明されていない。よって、家庭環境中で検出される化学物質の生体影響をシトクロム P450 (P450) による代謝化学的な視点から評価することを目的とする。シトクロム P450

(P450) は、医薬品や環境化学物質などの異物および脂肪酸、ビタミン、ステロイド類などの生体内成分の代謝に重要な役割を果たしている酵素であり、複数の分子種からなるスーパーファミリーで構成されている [1,2]。そのなかでも、エタノール誘導性の CYP2E1 は、ハロアルカン (有機溶媒) や短鎖長のニトロソアミンなどのような比較的 low molecular weight の化合物を代謝することが知られている [3,4]。また、ヒト肝ミクロソームにおいて CYP2E1 は他の P450 分子種と同様にその発現量および活性に大きな個人差がある事が報告されている [5,6]。さらに、クロルゾキサゾンをプローブ薬に用いた欧米人の研究から、その代謝能は個体により数倍近くの違いがあり、CYP2E1 の遺伝的多型の存在が示唆されている [7,8]。実際にこれまで DNA シークエンスなどの手法によりいくつかの CYP2E1 の変異体が同定されており、現在、CYP2E1 と異物毒性発現あるいは疾病との因

果関係について広く研究されている [9,10,11,12]。

5'側上流域に変異がある CYP2E1*1C および CYP2E1*1D はある塩基配列の挿入があり、そのうち CYP2E1*1D は飲酒により CYP2E1 活性が著しく誘導される変異体であることが報告されている [10,13]。一方、翻訳領域では欧米人および中国人から 3 種のアミノ置換を伴う変異型 CYP2E1 (CYP2E1*2, CYP2E1*3 および CYP2E1*4) が報告されている (Table 1) [9,11]。Arg76His 置換を引き起こす CYP2E1*2 はタンパク量および活性のいずれも減少することが報告されているが、これら 3 種の変異型

CYP2E1 の酵素化学的性質を比較した遺伝的多型の影響についての報告は少ない。CYP2E1 は、多くの有機溶媒やいくつかの発癌物質を代謝するため、CYP2E1 の遺伝的多型はグルタチオン S-トランスフェラーゼなどの薬物代謝酵素と同様に環境リスクの重要な因子となるものと考えられる [14,16,17]。本研究は、アミノ酸置換により CYP2E1 にどのような機能変化が起こるかを明らかにするため、野生型および変異型 CYP2E1 を COS-1 細胞で発現させ、それらの酵素化学的性質をクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノールを基質に用いて機能解析を行った。

Table 1. Description of CYP2E1 alleles examined in this study

Allele	Protein	Nucleic acid change		References
<i>CYP2E1</i> *1A ^a	CYP2E1.1 ^a	None	None	[15]
<i>CYP2E1</i> *2	CYP2E1.2	227G>A	Arg76His	[9]
<i>CYP2E1</i> *3	CYP2E1.3	1165G>A	Val389Ile	[9]
<i>CYP2E1</i> *4	CYP2E1.4	535G>A	Val179Ile	[11]

^aWild-type

B. 研究方法

・試薬：実験に用いた試薬は下記の会社からそれぞれ購入した。

正常ヒト肝臓 mRNA：BioChain Institute (米国, CA, Hayward)；SuperScript first-strand synthesis system, Platinum Pfx DNA polymerase, pENTR/D-TOPO vector, pcDNA-DEST40 expression vector, Lipofectamine 2000, OPTI-MEM medium：Invitrogen (米国, CA, Carlsbad)；QuikChange Multi site-directed mutagenesis kit：Stratagene (米国, CA, La Jolla)；COS-1 細胞：厚生労働省研究資源バンク (大阪)；Dulbecco's modified Eagle medium, ウシ胎児の血清：Sigma (米国, MO, St.Louis)；polyvinylidene fluoride sheet：Bio-Red Laboratories (米国, CA, Hercules)；クロルゾキサゾン, 6-ヒドロキシクロルゾキサゾン：Ultrafine Chemicals (英国, Manchester)；4-ニトロフェノール, 4-ニトロカテコール, サリチ

ルアミド：和光純薬工業 (大阪)；NADP⁺, グルコース 6-リン酸, グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (オリエンタル工業)；ABI BigDye terminator cycle sequencing reaction kit：Applied Biosystems (米国, CA, Foster City)；抗ヒト CYP2E1 抗体：Research Diagnostics (米国, NJ, Flanders)；ペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン：Chemicon International (米国, CA, Temecula)；ECL-plus reagents：Amersham Biosciences (米国, NJ, Piscataway)；その他の試薬は市販特級試薬を使用した。

・実験装置：高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置は Intersil ODS-80A カラム (150 × 4.6 mm i.d) (GLSciences, 東京) を装着した島津製作所製の LC-10AVP システム (京都) を用いた。

・CYP2E1 プラスミドの作成：RT-PCR 法を用いて、正常ヒト肝臓の mRNA から cDNA に逆転写した。Table 2 に示すプライマーで、1 本

鎖 cDNA (50 ng) から野生型 CYP2E1 を増幅した。PCR 条件は Table 3 および Table 4 に示す。その PCR 産物を pENTR/D-TOPO ベクターに挿入し、ABI BigDye terminator cycle sequencing 反応キットを用いて、DNA analyzer ABI Prism 3700 (Applied Biosystems) で、DNA シークエンスを行った。完全長の野生型 CYP2E1 cDNA を

鋳型として Table 5 に示すプライマーを用いて、3 種の変異型 CYP2E1 (CYP2E1*2, CYP2E1*3 および CYP2E1*4) を site-directed mutagenesis 法で作成し、DNA シークエンスにより変異導入の有無を確認した。これら野生型および変異型 CYP2E1 cDNA はさらに pcDNA-DEST40 哺乳動物系発現ベクターに挿入した。

Table 2. Primer set for amplification of wild-type CYP2E1

Primer	Sequence ^a	Length
F-2E1	5'-CACCATGTCTGCCCTCGGA-3'	19
R-2E1	5'-TCATGAGCGGGGAATGACAC-3'	20

These primers were 5'-phosphorylated. ^aThese letters are essential sequences for D-TOPO cloning. Bold letters were introduced to perform D-TOPO cloning.

Table 3. PCR condition for amplification of wild-type CYP2E1

	Temperature (°C)	Time (sec)	
Denaturation	94	120	
Denaturation	94	15	30 cycles
Annealing/Extention	68	120	
Extention	68	420	

Table 4. Amplification mixture (50 µl)

<i>Pfx</i> Amplification Buffer	1 x
dNTP Mix	0.3 mM
50mM MgSO ₄	1 µM
10µM CYP2E1 Primer Mix(each of forward and reverse primers)	0.4 mM
Platinum <i>pfx</i> DNA Polymerase	1 U

Table 5. Primers used for site-directed mutagenesis

Primer	Sequence ^a	Location ^b
MP-G227A	5'-GTGGGCTCGCAGCACATGGTGGTGATG-3'	214-240 (27)
MP-G1165A	5'-CCAAGGGCACAGTCATAGTGCCAACTCTGG-3'	1151-1180 (30)
MP-G535A	5'-CGCGCCCTGCAACATCATAGCCGACATC-3'	522-549 (28)

All Primers were 5'-phosphorylated. ^aBold letters indicate mutations produced by PCR-based sitedirected mutagenesis. ^bValues in parentheses indicate number of bases (mer).