

・CYP2E1 酵素の発現：アフリカミドリザル腎由来細胞の COS-1 細胞は牛胎児血清（10%）を含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で 5%二酸化炭素下，37°C で培養した。細胞（ 5.5×10^4 ）はトランスフェクションの 1 日前に直径 10 cm の培養皿に播種した。翌日，培地を OPTI-MEM medium に交換し，野生型および変異型 CYP2E1 cDNA の発現プラスミドを Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。48 時間後，phosphate buffered saline で二回洗浄し，250 mM sucrose-100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) で細胞を回収した。さらに，Ekins らの方法 [18] に準拠してミクロソーム画分を調製し，10% glycerol-100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) に懸濁した。調製したミクロソーム画分は使用するまで -80°C で保存した。総タンパク量は，Lowry らの方法 [19] に準拠して測定した。

・ウェスタンブロッティング：COS-1 細胞のミクロソームを Laemmli らの方法 [20] に準拠して，10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動に付した。泳動後，Towbin らの方法 [21] に従いタンパクを PVF シートに転写した。PVF シートは一次抗体として抗ヒト CYP2E1 抗体を，二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリンを加え，インキュベートした。洗浄後，抗体と結合したタンパクを化学発光法により検出した。そのバンド強度は Typhoon 9400 (Amersham Biosciences) を用いて定量した。

・CYP2E1 依存性酵素活性：

①クロルゾキサゾン 6-水酸化活性

Potassium phosphate	
buffer (pH 7.4)	50 mM
Chlorzoxazone	20~1000 μ M
COS-1 cell microsomes	500 μ g protein/ml
NADPH generating system	
NADP ⁺	1 mM
Glucose 6-phosphate	10 mM
Glucose 6-phosphate	
dehydrogenase	2 U/ml
MgCl ₂	5 mM

Final	500 μ l
-------	-------------

Lucasu らの方法 [22] に準拠して，上記の組成で行った。基質（クロルゾキサゾン）はメタノールに溶かし（最終濃度は 0.5% v/v），37°C で 2 分間プレインキュベーションした後，NADPH generating system を添加し反応を開始した。37°C で 20 分間インキュベーションした後，酢酸エチル 3 ml を添加して反応を停止した。内標準物質として 1500 pmol の 4-ニトロフェノールを添加し，2 分間激しく振盪した後，2000xg で 15 分間遠心分離した。有機溶媒相を分取し，35°C で窒素ガス気流下で乾固させた。残渣は 200 μ l のメタノール-水（50:50, v/v）に溶解し，HPLC で 6-ヒドロキシクロルゾキサゾン定量した。HPLC 条件は下記のように設定した。

<HPLC 条件>

Column: Inertsil ODS- 80A column
 Column temperature: 40°C
 Mobile phase: 80 mM acid-acetonitrile(82:18,v/v)
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Detection: UV 295 nm
 Injection: 50 μ l

②4-ニトロフェノール 2-水酸化活性

Potassium phosphate	
buffer (pH 7.4)	50 mM
4-ニトロフェノール	10~500 μ M
COS-1 cell microsomes	500 μ g protein/ml
NADPH generating system	
NADP ⁺	1 mM
Glucose 6-phosphate	10 mM
Glucose 6-phosphate	
dehydrogenase	2 U/ml
MgCl ₂	5 mM
Final	500 μ l

Tassaneeyakul らの方法 [23] に準拠して，上記の組成で行った。基質(4-ニトロフェノール)はメタノールに溶かし（最終濃度は 0.5% v/v），

37°C で2分間プレインキュベーションした後、NADPH generating system を添加し反応を開始した。37°C で20分間インキュベーションした後、酢酸エチル 3 ml を添加して反応を停止した。内標準物質として 1000 pmol のサリチルアミドを添加し、2分間激しく振盪した後、2000xg で15分間遠心分離した。有機溶媒相を分取し、35°C で窒素ガス気流下で乾固させた。残渣は 200 µl のメタノール-水 (50:50,v/v) に溶解し、HPLC で4-ニトロカテコールを定量した。HPLC 条件は下記のように設定した。

<HPLC 条件>

Column: Inertsil ODS-80A column

Column temperature: 40°C

Mobile phase: 20 mM triethylamine
(pH3.0)-acetonitrile-methanol (78:12:10, v/v/v)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: UV250 nm

Injection: 50 µl

・計算方法：速度論的パラメーター (K_m および V_{max}) は Prism v3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、ミカエリス-メンテン式に基づいて求めた。In vitro クリアランス値は V_{max}/K_m として求めた。いずれの値も3回の実験の平均値±SD とした。有意差検定は、Stat View v5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて Dunnet's post-hoc テストを行い、有意差の有無は棄権率 5% を基準とした。

C. 結果

・COS-1 細胞における野生型及び変異型 CYP2E1 タンパクの発現: COS-1 細胞で発現された CYP2E1 タンパク量はウェスタンブロッ

ティングにより測定した (Fig.1)。野生型及び変異型 CYP2E1 のいずれも CYP2E1 に相当するバンドが検出された。CYP2E1.1 タンパクの発現量は 3.5 pmol/mg protein であった。CYP2E1.3 タンパク及び CYP2E1.4 タンパクの発現量も CYP2E1.1 に類似していたが、CYP2E1.2 タンパクの発現量は CYP2E1.1 の 29% まで減少した。

・野生型及び変異型 CYP2E1 の酵素的性質: COS-1 細胞のミクロソームに発現した CYP2E1 タンパクを用いて、6-ヒドロキシクロルゾキサゾンと 4-ニトロカテコールに対する活性を測定した。Fig.2 および Fig.3 は一点の基質濃度 (クロルゾキサゾンは 300 µM ; 4-ニトロフェノールは 150 µM) での CYP2E1.1 に対する相対的な活性を示したものである。ミクロソームタンパク当たりの活性では、いずれの基質に対しても CYP2E1.3 と CYP2E1.4 の活性は CYP2E1.1 とほぼ同程度であったが、CYP2E1.2 は CYP2E1.1 の 70-72% まで減少した (CYP2E1.1: クロルゾキサゾン 6-水酸化, 25 pmol/min/mg protein ; 4-ニトロフェノール 2-水酸化, 33 pmol/min/mg protein) (Fig.2)。一方、CYP2E1 含量当たりでは、CYP2E1.2 のクロルゾキサゾン 6-水酸化および 4-ニトロフェノール 2-水酸化活性は、逆に CYP2E1.1 の 2.8 倍と有意に高かった (CYP2E1.1: クロルゾキサゾン 6-水酸化, 7.5 pmol/min/pmol CYP2E1 ; 4-ニトロフェノール 2-水酸化, 9.7 pmol/min/pmol CYP2E1) (Fig.3)。

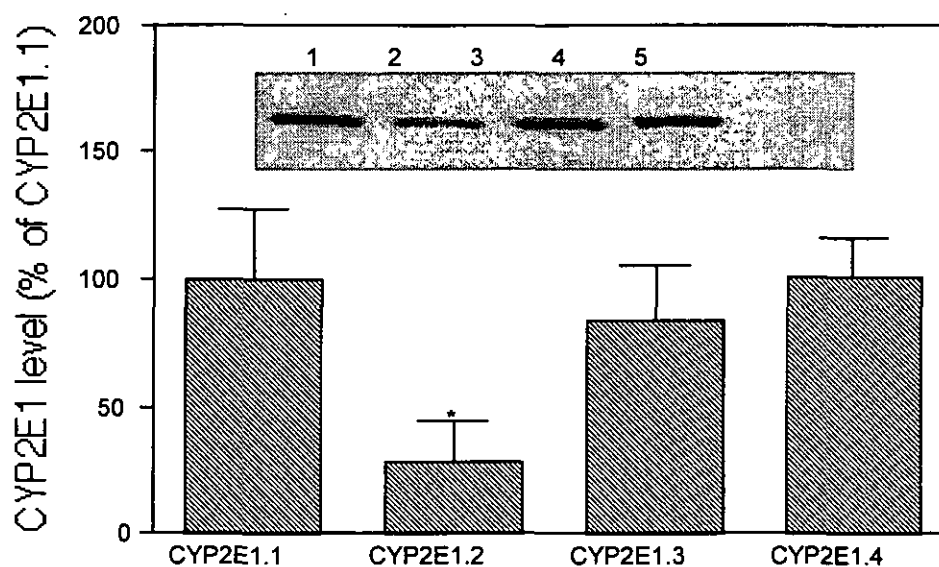


Fig. 1. CYP2E1 protein levels in microsomes from COS-1 cells expressing wild-type and variant CYP2E1s. Experimental conditions are described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of levels of CYP2E1.1. The level of CYP2E1.1 was 3.49 ± 0.96 pmol CYP2E1/mg protein. Each bar represents the mean \pm SD of three separate experiments derived from independent preparations. * $p < 0.01$ versus CYP2E1.1. Inset, immunoblotting of pooled microsomes from three independent preparations. Lane 1, CYP2E1.1; lane 2, CYP2E1.2; lane 3, CYP2E1.3; lane 4, CYP2E1.4; lane 5, negative control.

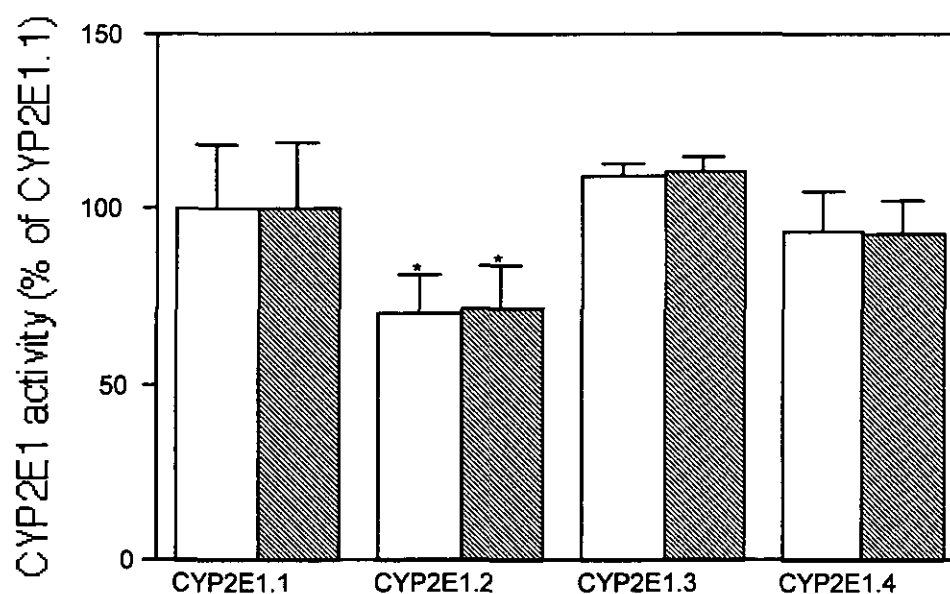


Fig. 2. CYP2E1-dependent enzymatic activities on the basis of the microsomal protein level in microsomes from COS-1 cells expressing wild-type and variant CYP2E1s. The substrate concentrations used were $300 \mu\text{M}$ for chlorzoxazone 6-hydroxylation and $150 \mu\text{M}$ for 4-nitrophenol 2-hydroxylation. Experimental conditions are described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of the activity of CYP2E1.1. The activities of CYP2E1.1 for chlorzoxazone 6-hydroxylation and 4-nitrophenol 2-hydroxylation were 25.3 ± 4.5 and 32.8 ± 6.0 pmol/min/mg protein, respectively. Each bar represents the mean \pm SD of three separate experiments derived from independent preparations. Open bar, chlorzoxazone 6-hydroxylation; hatched bar, 4-nitrophenol 2-hydroxylation. * $p < 0.05$ versus CYP2E1.1.

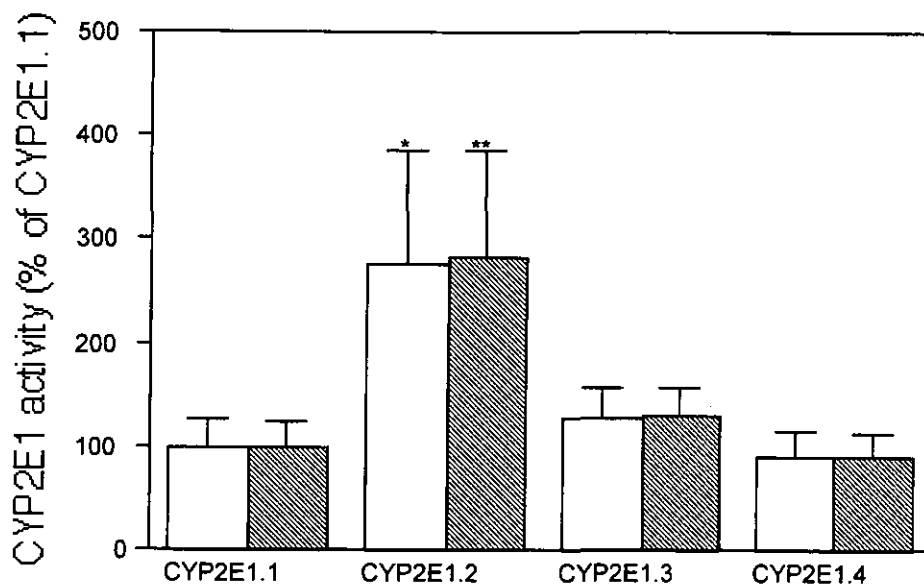


Fig. 3. CYP2E1-dependent enzymatic activities on the basis of the CYP2E1 protein level in microsomes from COS-1 cells expressing wild-type and variant CYP2E1s. The substrate concentrations used were 300 μ M for chlorzoxazone 6-hydroxylation and 150 μ M for 4-nitrophenol 2-hydroxylation. Experimental conditions are described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of the activity of CYP2E1.1. The activities of CYP2E1.1 for chlorzoxazone 6-hydroxylation and 4-nitrophenol 2-hydroxylation were 7.51 ± 1.92 and 9.73 ± 2.46 pmol/min/pmol CYP2E1, respectively. Each bar represents the mean \pm SD of three separate experiments derived from independent preparations. Open bar, chlorzoxazone 6-hydroxylation; hatched bar, 4-nitrophenol 2-hydroxylation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus CYP2E1.1.

野生型および変異型 CYP2E1 の酵素化学的性質をさらに得るために、6-ヒドロキシクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノール代謝の速度論的解析を行った。その速度論的パラメーターを Table 6 および Table 7 にそれぞれ示す。クロルゾキサゾン 6-水酸化における野生型および変異型 CYP2E1 の K_m 値は 250-300 μ M であり、野生型と変異型との間に有意な差は認められなかった。ミクロソームタンパク量あたりでは野生型および変異型 CYP2E1 の V_{max} 値は 34-55 pmol/min/mg protein であり、 V_{max}/K_m の値は 130-190 nl/min/mg protein であった。 V_{max}/K_m 値は野生型と変異型の間には大きな差はなかったが、CYP2E1.2 の V_{max} 値は CYP2E1.1 に比べて有意に低かった。一方、CYP2E1 発現量あたりでは、CYP2E1.1 の V_{max} 値は 15 pmol/min/pmol CYP2E1 であり、 V_{max}/K_m の値は 51 nl/min/pmol CYP2E1 であり、CYP2E1.2 の V_{max} および V_{max}/K_m の値は CYP2E1.1 に比べてそれぞれ 2.7 および 2.9 倍有

意に高かった。4-ニトロフェノール 2-水酸化における野生型および変異型 CYP2E1 の K_m 値は 120-140 μ M であり、これらの K_m 値は類似した。ミクロソームタンパク量あたりでは、野生型 CYP2E1 の V_{max} および V_{max}/K_m 値はそれぞれ 63 pmol/min/mg protein および 450 nl/min/mg protein であった。CYP2E1.2 の V_{max} 値は CYP2E1.1 の 68% にまで減少したが、 V_{max}/K_m 値は野生型と変異型 CYP2E1 の間で有意な差はなかった。CYP2E1 発現量に基づく CYP2E1.1 の V_{max} および V_{max}/K_m 値はそれぞれ 19 pmol/min/pmol CYP2E1 および 130 nl/min/pmol CYP2E1 であった。CYP2E1.2 の V_{max} および V_{max}/K_m の値は CYP2E1.1 に比べてそれぞれ 2.7 および 3.0 倍有意に高かった。しかし、いずれの基質においても CYP2E1.3 と CYP2E1.4 の V_{max} および V_{max}/K_m 値は CYP2E1.1 との間に有意な差は認められなかった。

Table 6. Kinetic parameters for chlorzoxazone 6-hydroxylation by microsomes from COS-1 cells expressing wild-type and variant CYP2E1s

Variant	Km ^a	Vmax		Vmax/Km	
		Protein ^b	P450 ^c	Protein ^d	P450 ^e
CYP2E1.1	283 ± 13	48.9 ± 9.0	14.5 ± 3.9	173 ± 24	51.2 ± 12.3
CYP2E1.2	272 ± 19	33.7 ± 3.7*	39.4 ± 14.8*	125 ± 22	146 ± 61*
CYP2E1.3	297 ± 13	54.8 ± 2.1	19.3 ± 4.3	185 ± 10	64.8 ± 13.7
CYP2E1.4	247 ± 18	42.9 ± 4.3	12.4 ± 3.1	175 ± 29	51.0 ± 15.7

Each value represents the mean ± SD of three separate experiments derived from independent preparations. ^aμM. ^bpmol/min/mg protein. ^cpmol/min/pmol CYP2E1. ^dnl/min/mg protein. ^enl/min/pmol CYP2E1. **p*<0.05 versus CYP2E1.1.

Table 7. Kinetic parameters for 4-nitrophenol 2-hydroxylation by microsomes from COS-1 cells expressing wild-type and variant CYP2E1s

Variant	Km ^a	Vmax		Vmax/Km	
		Protein ^b	P450 ^c	Protein ^d	P450 ^e
CYP2E1.1	141 ± 11	63.3 ± 9.8	18.9 ± 5.0	453 ± 87	133 ± 32
CYP2E1.2	124 ± 13	43.3 ± 8.9*	51.2 ± 22.6*	346 ± 43	404 ± 139**
CYP2E1.3	129 ± 16	67.8 ± 3.3	23.7 ± 6.0	524 ± 46	183 ± 34
CYP2E1.4	120 ± 10	54.9 ± 4.8	15.9 ± 3.8	460 ± 59	134 ± 37

Each value represents the mean ± SD of three separate experiments derived from independent preparations. ^aμM. ^bpmol/min/mg protein. ^cpmol/min/pmol CYP2E1. ^dnl/min/mg protein. ^enl/min/pmol CYP2E1. **p*<0.05, ***p*<0.01 versus CYP2E1.1.

D. 考察

CYP2E1 は様々な異物の代謝に関わっており、その代謝能に大きな個体差があることが報告されている [5-8]。その個体差には少なくとも一部は CYP2E1 の遺伝的多型が関わっていると考えられている [7,8,24]。また、CYP2E1 の遺伝的多型と癌などの疾病との因果関係が指摘されていることから、CYP2E1 は環境化学物質の重要なリスクファクターになっているものと思われる [12,24]。本研究では、野生型および3種の変異型 CYP2E1 タンパクを COS-1 細胞で発現させ、ミクロソーム画分におけるクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノールに対する代謝を速度論的方法により検討し、CYP2E1 の機能解析を行った。

ウエスタンブロッティングによる CYP2E1.3 と CYP2E1.4 のタンパク発現量は CYP2E1.1 と同程度であったが、CYP2E1.2 に対しては著し

く低下することが明らかとなった。Hu らも、CYP2E1*2 を COS-1 細胞に発現させると mRNA 量は野生型とほぼ同程度であるにもかかわらず、P450 タンパク発現量は著しく減少することを報告している [9]。本研究で得た CYP2E1 の発現パターンは Hu らの報告と一致し、CYP2E1.2 の CYP2E1 タンパク発現量の減少は、低転写効率よりむしろタンパクの立体構造の不安定さに起因しているものと考えられた。基質としてクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノールの酸化的代謝を指標として CYP2E1 の代謝能を検討した。いずれの変異型 CYP2E1 も野生型 CYP2E1 と同様にクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノールに対して活性を示した。しかし、一つの変異型 CYP2E1 (CYP2E1.2) は著しく他と異なる結果を得た。ミクロソームタンパク量当たりではいずれの基質に対しても CYP2E1.1 に比べて有意に低か

ったに対し、CYP2E1 タンパク発現量当たりでは有意に高かった。Hu とも CYP2E1.3 のクロルゾキサゾン 6-水酸化活性は CYP2E1.1 と同程度であるが、CYP2E1.2 は CYP2E1.1 の 36% に減少することを報告している [9]。興味深いことに、野生型および変異型のクロルゾキサゾンと 4-ニトロフェノールに対する相対的活性のパターンはよく似ており、クロルゾキサゾンと 4-ニトロフェノールに対する CYP2E1 の基質結合部位は同一である可能性が考えられた。

著者は予備実験で、野生型 CYP2E1 を発現させた昆虫細胞のミクロソームにおいて、6-ヒドロキシクロルゾキサゾン 6-水酸化および 4-ニトロフェノール 2-水酸化はミカエリス-メンテンの単一酵素モデルに一致し、野生型 CYP2E1 の K_m 値はそれぞれ 560 および 350 μM であることを確認している。一方、他の研究グループは、野生型 CYP2E1 の K_m 値は昆虫細胞発現させたミクロソームでは 660 μM であり、B リンパ芽球様細胞のミクロソームでは 81 μM であることを報告している [11,25]。このように本研究で得られた CYP2E1.1 の K_m 値は他の研究とは異なっており、この違いは異型細胞発現系に起因するものと考えられた。6-ヒドロキシクロルゾキサゾン 6-水酸化および 4-ニトロフェノール 2-水酸化の野生型と変異型 CYP2E1 の K_m 値は類似していたが、CYP2E1 タンパク発現量に基づいた CYP2E1.2 の V_{max} および V_{max}/K_m 値は CYP2E1.1 よりも高かった。一方、CYP2E1.3 と CYP2E1.4 の速度論的パラメーターはいずれの代謝においても CYP2E1.1 とほぼ同じであった。また、CYP2E1.4 の 6-ヒドロキシクロルゾキサゾン 6-水酸化の K_m および V_{max} 値は以前に報告されている値と類似しており [11]、Arg76His 置換が CYP2E1 の酵素的機能を変化させていることが示唆された。

CYP2E1 は未だ結晶化されていないため CYP2E1 酵素の 3 次元構造の情報を得ることができないが、Hu らはバクテリアの P450 (CYP101, CYP102 および CYP108) の結晶構造を鋳型として CYP2E1.2 の変異部位である 76 番目のアミノ酸は $\beta 1$ シートに位置するこ

とを推測している [9]。また、ほとんどの哺乳動物の CYP2E1 は Arg76 が保存されていることから [26-29]、CYP2E1 の構造・機能保持にはこのアミノ酸が重要な役割を果たしていると考えられた。CYP2E1 はベンゼン、トルエンやニトロソアミンなどの環境化学物質に関わっていることが示唆されている [12,30]。また、その毒性発現の原因は基本的には脂質過酸化やフリーラジカルの発生である。さらに肝臓病、糖尿病、アルコール依存症、癌の発生率の増加は CYP2E1 と深く関連していることが指摘されている [24,31-33]。従って、著者は CYP2E1 の Arg76His 置換は異物の毒性発現において重要な要因であると考えている。しかし、CYP2E1 遺伝子のアミノ酸翻訳領域は、どの人種でもよく保存されており [34]、タンパク発現を制御する 5' 上流域の塩基配列も異物毒性の個体差に関わっていることも否定できない。

E. 結論

本研究では異物の毒性発現に対する CYP2E1 の遺伝的多型の影響を明らかにするために、野生型および 3 種の変異型 CYP2E1 タンパクを哺乳動物細胞に発現させ、それらの酵素化学的性質を検討し、以下の知見を得た。

1. Arg76His 置換のある変異体 CYP2E1.2 は野生型 CYP2E1 (CYP2E1.1) に比べタンパク発現量は著しく低かった。
2. CYP2E1 タンパク発現量あたりの CYP2E1.2 のクロルゾキサゾンおよび 4-ニトロフェノール代謝の V_{max} および V_{max}/K_m 値は CYP2E1.1 に比べて有意に高かった。
3. CYP2E1.3 (Val389Ile 置換) および CYP2E1.4 (Val179Ile 置換) の CYP2E1 タンパク発現量および酵素活性は CYP2E1.1 とほぼ同程度であった。

以上の結果より、CYP2E1 の遺伝的多型による異物毒性発現の個体差は Arg76His 置換が最も大きな影響を与えていることが示唆された。更に、このアミノ酸残基の変異が、酵素機能変化を引き起こし、環境化学物質の毒性発現に何らかの影響を与える可能性が示唆された。また、CYP は外来性化学物質の解毒化に重要

な役割を果たしている酵素であるが、化学物質の中には、この酵素による代謝がなければ副作用を示すことはないという例も多数見られる。今年度検討した CYP2E1 は、トルエン等の比較的体分子の有機溶剤の代謝に関与していることが報告されていることから、これらの機能解析を検討していく予定である。

F. 参考文献

- [1] Gonzalez, F.J.: Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.* 1990, **45**, 1-38.
- [2] Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996, **6**, 1-42.
- [3] Guengerich, F.P. and Shimada, T.: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 1991, **4**, 391-407.
- [4] Rendic, S. and Di Carlo, F.J.: Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 1997, **29**, 413-580.
- [5] Yoo, J.S., Guengerich, F.P. and Yang, C.S.: Metabolism of *N*-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res.* 1988, **48**, 1499-1504.
- [6] Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. and Guengerich, F.P.: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, **270**, 414-423.
- [7] Kim, R.B. and O'Shea, D.: Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995, **57**, 645-655.
- [8] Lucas, D., Menez, C., Girre, C., Berthou, F., Bodenez, P., Joannet, I., Hispard, E., Bardou, L.G. and Menez, J.F.: Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995, **5**, 298-304.
- [9] Hu, Y., Oscarson, M., Johansson, I., Yue, Q.Y., Dahl, M.L., Tabone, M., Arinco, S., Albano, E. and Ingelman-Sundberg, M.: Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Mol. Pharmacol.* 1997, **51**, 370-376.
- [10] Hu, Y., Hakkola, J., Oscarson, M. and Ingelman-Sundberg, M.: Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of a polymorphic repeat in the human gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, **263**, 286-293.
- [11] Fairbrother, K.S., Grove, J., de Waziers, I., Steimel, D.T., Day, C.P., Crespi, C.L. and Daly, A.K.: Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics* 1998, **8**, 543-552.
- [12] Tanaka, E., Terada, M. and Misawa, S.: Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2000, **25**, 165-175.
- [13] McCarver, D.G., Byun, R., Hines, R.N., Hichme, M. and Wegenek, W.: A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, **152**, 276-281.
- [14] Brockmoller, J., Cascorbi, I., Kerb, R. and Roots, I.: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine *N*-acetyltransferase 2, glutathione *S*-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* 1996, **56**, 3915-3925.
- [15] Umeno, M., McBride, O.W., Yang, C.S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J.: Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988, **27**, 9006-9013.
- [16] Kiss, I., Sandor, J., Pajkos, G., Bogner, B., Hegedus, G. & Ember, I.: Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-*S*-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res.* 2000, **20**, 519-522.
- [17] Tan, W., Song, N., Wang, G.Q., Liu, Q., Tang, H.J., Kadlubar, F.F. and Lin, D.X.: Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione *S*-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000, **9**, 551-556.
- [18] Ekins, S., Maenpaa, J. and Wrighton, S.A.: *In vitro* metabolism: subcellular fractions. In: *Handbook of Drug Metabolism*. Ed.: T.F.

- Woolf. Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 363-399.
- [19] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, **193**, 265-275.
- [20] Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**, 680-685.
- [21] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, **76**, 4350-4354.
- [22] Lucas, D., Menez, J.F. and Berthou, F.: Chlorzoxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Methods Enzymol.* 1996, **272**, 115-123.
- [23] Tassaneeyakul, W., Veronese, M.E., Birkett, D.J. and Miners, J.O.: High-performance liquid chromatographic assay for 4-nitrophenol hydroxylation, a putative cytochrome P-4502E1 activity, in human liver microsomes. *J. Chromatogr.* 1993, **616**, 73-78.
- [24] Song, B.J.: Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1996, **20**, 138A-146A.
- [25] Shimada, T., Tsumura, F. and Yamazaki, H.: Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 1999, **27**, 1274-1280.
- [26] Song, B.J., Gelboin, H.V., Park, S.S., Yang, C.S. and Gonzalez, F.J.: Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J. Biol. Chem.* 1986, **261**, 16689-16697.
- [27] Khani, S.C., Porter, T.D., Fujita, V.S. and Coon, M.J.: Organization and differential expression of two highly similar genes in the rabbit alcohol-inducible cytochrome P-450 subfamily. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 7170-7175.
- [28] Freeman, J.E., Stirling, D., Russell, A.L. and Wolf, C.R.: cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. *Biochem. J.* 1992, **281**, 689-695.
- [29] Komori, M., Kikuchi, O., Sakuma, T., Funaki, J., Kitada, M. and Kamataki, T.: Molecular cloning of monkey liver cytochrome P-450 cDNAs, similarity of the primary sequences to human cytochromes P-450. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992, **1171**, 141-146.
- [30] Novak, R.F. and Woodcroft, K.J.: The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch. Pharm. Res.* 2000, **23**, 267-282.
- [31] Albano, E., Clot, P., Morimoto, M., Tomasi, A., Ingelman-Sundberg, M. and French, S.W.: Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* 1996, **23**, 155-163.
- [32] Dupont, I., Bodenez, P., Berthou, F., Simon, B., Bardou, L.G. and Lucas, D.: Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* 2000, **35**, 98-103.
- [33] Lieber, C.S.: Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N. Engl. J. Med.* 1988, **319**, 1639-1650.
- [34] Ronis, M.J.J., Lindros, K.O. and Ingelman-Sundberg, M.: The CYP2E subfamily: subcellular fractions. In: *Cytochrome P450: Methods and Toxicology Aspects*. Ed.: C. Ioannides. CRC Press, London, 1996, pp. 211-239.

X II. 化学物質過敏症患者の診断と治療に関する研究

X II - 1 急性中毒から化学物質過敏症へ移行した患者の長期積極治療の効果

分担研究者	石川 哲	北里研究所病院
研究協力者	宮田幹夫	北里研究所病院
	松井孝子	北里研究所病院
	佐々木恵子	北里研究所病院
	坂部貢	北里研究所病院
	尾島正幸	北里大学医学部公衆衛生学・衛生学

1. 緒言

シックハウス症候群には、室内空気汚染から発症する、中毒と関連が深い例、免疫系を中心とした異常アレルギー反応、および神経系を中心とした化学物質過敏症が中に含まれている。この化学物質過敏症は、一旦発症するとその後極めて微量な複数の化学物質に反応し症状の出現、悪化をきたすことを特徴としている。化学物質過敏症は Cullen の定義からも示されているように、急性、亜急性中毒または亜慢性中毒の延長線上に存在しているとされる。一方化学物質過敏症は、1999 年米国臨床環境医学会の合意事項如く慢性に経過する特徴を有している。本症の過敏性反応の病態は完全には解明されていないが、病態不明だからとして放置されるべきではなく、積極的に治療を行い、少しでも症状を軽減させる様な救済処置をとるべき時点に来ていると考えられる。300 例以上の患者を診察している中で、原因をつかみにくかった症例で、2 年以上にわたり、繰り返し積極的治療を行った化学物質過敏症患者の臨床経過を追うことが出来た症例が存在した。今回その患者の経過を提示することにより、多くのシックハウス症候群患者救済への一里塚になればと思ひ茲に報告する。

2. 症例および治療経過

37 歳男性

主訴：頭痛、倦怠感、筋肉痛

現病歴：某化学研究所の廃液ガス吸入から上記主訴にて発症。最初は目の痛み、頭痛であり、多少気持ちが悪い程度であった。肝機能検査を含めて一般内科臨床検査では異常なしと診断された。他院で、CT を含めて神経内科的に検査しても特に異常なしと言われた。しかし、同僚にも同じ症状を示した例が数名発症した。本人はその後疲労感が更に強く出現してきた。全身の筋肉痛、疲労感、記憶力低下、集中力低下が著明となってきた。頭痛は相変わらず続いている。また、車の排気ガス、他人のタバコ臭、消毒薬、化粧品などの臭いに敏感に反し嫌悪感を示すようになってきた。以前は喫煙していたが今はしてない。

検査所見：尿、一般血液検査、一般生化学検査では異常所見なし。

血清マグネシウム 2.3mg/dl（正常範囲 1.8—2.6）

血清亜鉛 74 μ g/dl（正常範囲 65—110、扁桃肥大あり、神経検査にて

ロンベルグ試験陽性、手袋・靴下型末梢神経知覚障害なし

MRI にて副鼻腔陰影を認めた。

SpO₂ 97%

呼吸機能検査 ピークフロー51%、50%肺活量流量65%、

25%肺活量流量83%と不良

神経眼的検査：眼球追従運動障害著明、視覚感度 (contrast sensitivity) 低下

電子瞳孔計検査で暗所での瞳孔面積の散瞳、光刺激後の瞳孔の早過ぎる戻りという交感神経緊張型を示す自律神経失調を認めた。

既往歴：以前より蕁麻疹、湿疹になりやすい。現在は花粉症で悩んでいる。

経過：生活指導、グルタチオン内服等による加療のみでは症状好転せず。

13年9月に末梢血 PO₂ 測定し 165.mmHg と異常高値を示す。そのために、クリーンルームのある臨床環境医学施設に入院。酸素吸入療法、ビタミン C、ビタミン B 群、グルタチオン、マグネシウム、セレンの点滴療法を5日間連続して行う。この治療開始2日目は、治療の初期悪化 (initial worsening) として、自覚症状は悪化し、睡眠も不良となる。しかしその後は徐々に自覚症状が改善し、末梢血 PO₂ も改善される。しかし、経過を追うと自覚症状は時に悪化し、末梢血 PO₂ も上昇を繰り返した。そのために、上記治療を頻回に繰り返すこととなった。上記5日間の治療を1クールとして、平成15年3月までに都合10クールの入院治療を繰り返した。

その間の自覚症状の経過は、北里臨床環境医学センター、アメリカマサチューセッツ工科大学、テキサス大学、アリゾナ大学等で使用されている問診票 (通称 QEESI 表1) の症状記入票を使用しての自己記入による各器官別のスコアを、レーダーチャートに記入した (図1、図2)。経過が長いために、図を2枚に分けて示したが、治療を重ねるとともに、間違いなく症状は好転してきた。

次に末梢血液の酸素分圧 (PO₂) と炭酸ガス分圧 (PCO₂) の治療経過を図3に示した。初期に

異常に高値を示した PO₂ は治療により一気に正常化した。しかし時に異常高値を繰り返した。

神経眼科学的検査で著明な異常を示した瞳孔の対光反応も詳しく経過を追うことが出来たが、その結果は図4、図5に示した。図4で示した A1 は、暗所で大きくなっている瞳孔面積を意味している。正常値より大幅に増大している瞳孔面積は、自覚症状の改善にも関わらず改善傾向はいまだ認められていなかった。図5の T5 は光刺激で縮瞳したあとの戻りの時間を示しているが、早過ぎる戻りの時間がまだ改善されていない。自覚症状が改善されても神経機能を検査するとまだ正常には戻ってこない症例である。このような症例は一番治療していて、悩む症例である。

3. 考察

シックハウス症候群の一部を占める化学物質過敏症は、患者が多数存在しているにも拘らず、いまだにその発症機序が明らかになっていない疾患である。急性中毒後の微量化学物質との接触で発症が始まることが多いことから、化学物質負荷と、その解毒機能の異常、アンバランスなどから神経系の過敏症状が出現してくることが考えられている。これを米国では neural sensitization とよび、大脳辺縁系にその因を求めている。一方患者の解毒機構の解析が試みられ、遺伝的に解毒機能の遅鈍性を示すことも報告されている。

治療法の大きな柱は、生体異物の減量を図ることが主要な目的となる。すなわち体内への化学物質取込みを減らすこと、および解毒の促進である。体内への取込みを減らすためには自己の環境改善と生活関係の指導が必要であり、患者に対する日常の生活指導は極めて詳細かつ複雑である。今回の症例の如く環境検査では明瞭な原因が判明せず、訴えが強いと心因性疾患が100%疑われるであろう。しかし、神経系の検査ではあきらかに以上を探知できたこと、血中酸素分圧の異常は考慮すべき重要な課題であった。これを知るために外来でも極めて長時間の診察時間を必要とし

ていた。この症例は体内の化学物質、すなわち生体異物減量のため、通常の解毒療法を行ったが、同時に生体異物により発生するとされる活性酸素除去のためビタミンC: 10gという大量点滴療法を行った。この量はすでに市邊らが急性視神経炎の治療に使用し効果をあげているが、同時にセレン投与は解毒の主役グルタチオンはスーパーオキシダーゼ除去のため、マグネシウム投与は筋の弛緩作用など、亜鉛を含めてそれぞれの薬理作用を期待して投与したものであるが、その詳細は成書を参照されたい(Chemical sensitivity WJ Rea Lewis Publishers, Boca Raton, 1995)。

今回の治療で最も特異的な治療法は酸素補充療法と思われる。本症患者の脳の血流障害はすでにいくつか画像で報告されており、本症の基本的な所見は末梢を含めての酸素欠乏状態と考えられる。末梢での酸素欠乏は血管内皮の浮腫をきたし、そのためにさらに酸素透過性の障害、それに続いてのさらなる酸素欠乏を引き起こすと言う悪循環を繰り返していると考えられる。この悪循環の解消のためには、酸素補充療法が最良の方法と考えられている。本法は非常に重要な治療法であり、文末にその意味を詳しく記してあるChemical sensitivity WJ Rea Lewis Publishers, Boca Raton, 1995の関連部分を訳出して、付録として添付した。もちろん大量の酸素吸入を行うためには、患者の酸素耐性の問題は常に注意しておく必要があり、高濃度の酸素吸入に耐える力には、非常に個人差が大きい事を念頭に置いて注意して行うべきものである。また酸素吸入マスクの材料にも悪臭を発する健康障害性のある塩化ビニールを避ける必要がある。加湿装置の水入りのピ

ンもガラス製にするように細心の注意を払う必要がある。

これらの治療法で患者の自覚症状は極めて改善されたことは、図1, 2からも明らかである。また末梢血液の酸素濃度もやや不安定ではあるが、改善されている(図3)。その意味で、本治療法が難治性の化学物質過敏症に有効であることが示されたと言える。一方瞳孔の対光反応はまったく改善されていなかった。この神経系の異常所見は、慢性中毒患者での神経障害の後遺症で固定してままである可能性が強いが今後も継続して経過を観察して行きたい。

4. 結論

何等かの化学物質との接点が考えられるおそらく中毒から発症したと考えられた極めて難治性であった化学物質過敏症患者に対して2年間にわたり10クール点滴治療(1クールは5日入院点滴治療)および酸素吸入療法を行い、その治療経過を観察した。その結果、自覚症状の大幅の改善、末梢血の異常酸素分圧高値の解消が得られ、本治療法が化学物質過敏症患者に非常に有効であることが証明された。心因性などとして放置されやすいこの様な化学物質過敏症でも治療が可能であることが今回の症例から明らかになった。全身的な不定愁訴は改善されたが、瞳孔を正確に記録観察してデータでは自律神経機能検査で明らかに異常値が残存したままであり、神経機能上のトラブルは極めて難治であることがわかる。従って、症状軽快後も、今後継続した経過観察が必要であることを痛感している。

XII-2 日本人に対する QEESI 応用の試み

分担研究者 石川 哲 北里研究所病院臨床環境医学センター
北條祥子 尚綱学院大学生生活創造学科
吉野 博 東北大学大学院工学研究科建築
柳沢幸雄 東京大学大学院・新領域創成科学研究科

研究要旨 米国の Miller^{1,2)}は世界共通の化学物質過敏症（MCS）患者の研究、診断、スクリーニングに役立つ問診票として、QEESI（Quick Environment Exposure Sensitivity Inventory）を開発し、これを日本でも使用して欲しい旨要請があった。そこで、本研究では、A群131名（MCS自覚者群、北里研究所外来患者）およびC群420名（MCS非自覚者群、宮城県内の一般人）を対象にして、QEESIを用いたアンケート調査を行った。

A群は59名（46%）、C群は21名（5%）がMillerとPrihodaの診断基準でMCSの疑いが非常に強い“Very suggestive”に分類された。C群で“Very suggestive”に分類された21名中15名に電話での詳細な聞き取り調査を行った結果、15名中14名が別の病名で通院していた。そこで、北里研究所病院臨床環境医学センターのMCS専門医の集団検診を紹介したところ、6名が受診し、6名全員がMCS患者であると診断された。以上の結果から、QEESIは日本でもMCS患者のスクリーニングとしては役立つことが示された。ただし、ロジスティック回帰分析とROC分析では、症状以外は感度や特異度が低く、改良が必要だと思われる。改良点を検討するため、頻度分布の比較、一元配置分散分析、マスキングの影響、因子分析などを行った。これらの結果を総合すると、QEESIの改良点は生物学的アレルギーに関する項目と日本人の食生活に関する項目（食品添加物、嗜癖、食事障害など）であることが示唆された。また、マスキングの影響を慎重に考慮してカットオフ値を設定することが必要であることも判明した。

今後、自覚的症状と他覚的な臨床検査データとの関係などを検討し、新たな日本のMCS患者の診断補助やスクリーニングに役立つ感度や特異度が高い問診票を作成していきたい。

A 研究目的

米国では人口の約10%程度が化学物質過敏症（MCS）患者であると報告されており、患者の増加が大きな社会問題となりつつある。これに対し、日本は欧米と比べMCSの概念が社会的に認知されておらず、医師の中にもこの病気の概念に対して賛否両論があるため、患者や潜在患者の実態はほとんどわかっていない。このように日本ばかりでなく、世界的にもMCSに関する調査や研究が遅れている一因として、国際的に共通に使用できる問診票がないことがあげられる。

1998年、テキサス大学のMiller^{1,2)}は世界共通に使用できる問診票QEESIを考案し、これを日本でも使用して欲しい旨、石川に要請があった。そこで、本研究では、国際比較ができる日本人向けのMCS患者の研究、診断、およびスクリーニングに役立つ問診票を開発するための予備的検討として、日本人を対象としてQEESIを用いたアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1) 調査対象

(1) A群 (MCS 自覚群) : 131名(男 40名、女 91名)。平均年齢は 43.6 歳(9~73 歳)で、MCS 診断治療を目的とした北里研究所病院臨床環境医学センター設立当初(1998 年)の外来初診患者。本人、または主治医が MCS を疑って来院し、専門医による診察を受ける前の患者である。

(2) C群 (対照群) : 420名 (男 45名、女 385 名)。平均年齢は 32.5 歳 (12~66 歳)で、宮城県内に居住し、環境関係の講演会に参加した一般市民、または環境関連の講義を受講した女子大生、及びその一部の家族である。この中には医師から MCS と診断された人および自分で MCS 患者を疑っている人は一人も含まれていない。

2) 調査に用いた質問票と記入方法

調査に用いた質問票は上述の QEESI (日本語訳版、巻末資料参照)で、自己記入方式で行った。A 群は初診外来時の医師の受診前に自己記入してもらった。ただし、重症患者で、自分で記入できない患者に対しては、看護婦が記入を手伝った。

C 群は講演会または講義の中で MCS に関連する話を聞いた後、調査の趣旨を記載した依頼文を渡し、協力の得られた者にその場で質問票に自己記入してもらい回収した。なお、家族の調査も希望する人には、依頼文および同意書と共に質問票を渡し、家族本人に自己記入してもらった後、それを郵送してもらった。

3) 個人情報に対する配慮

データの個人情報に対する配慮のため、質問票の配布前に調査の目的以外にはデータを使用しないことなどを記載した依頼文を渡し、それに同意した人にのみ質問票を配布し回収された質問票は一括保存し解析用データベースには個人名は記載しないなどの注意をはらった。

C. 研究結果および考察

1) 回収率

以上のように同意が得られた希望者のみに依頼したので、回収率は 100%であった。

2) 本調査の対象者の Miller と Pihoda の診断基準による分類

Table 1 に Miller と Pihoda の診断基準およびその基準によって本調査の 2 つの対象群を分類した結果を示した。

3) 北里研究所病院臨床環境医学センターの専門医による専門医による集団検診

集団検診は、2000 年から 2003 年の 4 年間に計 5 回行われた。検診には北里研究所病院臨床環境医学センターの石川哲医師、宮田幹夫医師、坂部貢医師、松井孝子臨床検査技師が測定器具持参で来仙し、角田和彦医師および武田篤医師の協力の下に坂総合病院で行われた。検診の際には、他覚的臨床検査としては、ファンクショナル MRI、活動性眼球追従運動、眼科一般検査、視覚のコントラスト感度検査、瞳孔反応検査、脳内血流状態の測定、嗅覚検査が行われた。なお、上記検診には北條も立ち会った。

4) C 群の Very suggestive に分類され人に対する聞き取り調査と専門医による検診

C 群で “Very suggestive” に分類された 21 名 (5%) 中 15 名に対し、北條が電話での詳細な聞き取り調査を行った結果、15 名中 14 名が別の病名で通院していることがわかった。そこで上記の北里研究所病院臨床環境医学センターの専門医による MCS に関する集団検診を紹介したところ、6 名が受診し、専門医により 6 名全員が MCS 患者と診断された。

以上の結果は QEESI は日本でも MCS 患者のスクリーニング用問診票として有効なことを示していた。

5) ROC (受信者動作特性分析) における Cut OFF Point の検討

日本の結果を基に Miller と同様に感度と特異度がほぼ同じ値となるように Cut Off Point を求めた。その結果を Fig.1 に示した。症状だけは感度と特異度はある程度高い値を示したものの、それ以外は低い値しか示さなかった。

6) 多重ロジスティック回帰分析

Table 2 に A 群の多重ロジスティック回帰分析の結果を示したが、このオッズ比は Miller らの値と類似していた。

7) 対象群別平均得点の比較

Table 3 に A 群と C 群の Q E E S I の 50 の質問項目の平均値を示し、一元配置分散分析で両群の間に有意差が認められた項目には*印を記した。

(1) 化学物質曝露による反応 (Q1-1~Q1-10) : A 群は C 群と比較して 10 項目すべての平均値が有意に高かった。A 群が特に反応性が高かったのはペンキ・シンナー、殺虫剤、ガソリン、タバコ煙、芳香剤であった。C 群でも中程度 (2~4 点) の反応を示す項目が多いことが注目された。

(2) その他の化学物質による反応 (Q2-1~Q2-10) : 食品や食品添加物、医薬品、嗜好品、花粉など古典的アレルゲン等に対する反応性をみるための項目である。最も特徴的な点は両群とも花粉・カビなどに対する古典的アレルギー反応の得点が際立って高いことであった。A 群は C 群と比べ、古典的アレルギーを含め 7 項目で有意に高得点を示したが、3 項目 (水道のカルキ臭、食品・食品添加物、食後の不快感) では有意差が認められなかった。

(3) 症状 (Q3-1~Q3-10) : A 群は C 群と比べ 10 項目すべてにおいて有意に高得点を示し、殊に呼吸器・気管・粘膜症状、認識障害、頭部症状、神経・末梢神経障害、情緒障害の得点が高かった。

(4) 日常生活障害 (Q5-1~Q5-10) : A 群の得点が C 群と比較して際立って高く、殊に仕事・学校障害、新しい家具・調度品障害、化粧品・防臭剤障害、旅行・ドライブ障害などで高得点を示した。しかし、唯一の例外は食事障害で、両群間で有意差は認められなかった。

8) マスキング (Q4-1~Q4-10) : マスキングとは、喫煙、飲酒、嗜好品などを常時摂取していると、化学物質に対する一種の適応反応として症状の減弱や増強が起こる現象であり、MCS 患者の大きな特徴とされている。マスキング項目は有無の 2 択で回答する形となっているので、有を 1 点、無を

0 点として、各群のマスキング指数 (マスキングの割合) を比較した。

A 群は C 群と比べ、化粧品使用率、受動喫煙率、開放型暖房器具使用は有意に低く、逆に薬剤服用率、仕事趣味による化学物質曝露率は有意に高かった。

次に、各群をマスキング 10 項目別に、有群と無群の 2 つに分類して、QEESI の 40 質問項目の得点を一元配置分散分析で比較した。有群と無群の 2 群間で有意差が認められたもので、有群 < 無群を隠蔽作用、無群 < 有群を増強作用と考え区別した。

A 群では、喫煙、飲酒、コーヒー摂取、香料入り化粧品使用は隠蔽項目が多く、増強作用項目は仕事・趣味での化学物質曝露、受動喫煙、薬品服用の 3 項目だけであった。一方、C 群は A 群と比べ、有意差の認められる項目が多く、中でも隠蔽項目より増強項目が多かった。ことに“医薬品の服用”と“仕事での化学物質曝露”は多くの症状を増強させることが示唆された。

以上の結果は、QEESI を用いる場合は、マスキングの影響を考慮した点数評価が必要なことを示唆していた。

9) 両群の得点の頻度分布の比較

C 群は大部分が最頻度 0 の右肩下がりの分布をしていた。一方、A 群は最頻度が 5 以上の単峰性や 2 峰性の分布をするものが多かった。しかし、中には最頻度 0 で右肩下がりの分布をしているものも存在し、そのような項目は一元配置分散分析 (Table 3) で有意差が認められなかった項目とほぼ一致していた。問診票の感度を上げるためには、これらの項目は日本人にライフスタイルに合わせた項目に改良する必要があると思われた。

10) 因子分析の結果と考察

両群の QEESI の 40 質問回答結果を因子分析 (固有値 1 以上、主因子法、バリマックス) を行った。A 群は 10 個、C 群は 8 個の因子が抽出され、全体の説明された分散の累積% (説明率) は、それぞれ、61.5%、54.1%であった。A 群の因子

分析結果のまとめを Fig.2 に示したが、この結果から、MCS 患者の問診票には、精神的要因が関与した症状や行動障害が大きな指標になることが示唆された。例えば、症状(

心・循環器、認識、情緒、神経・末梢神経)と行動障害(趣味と社会活動)である。

D. 結論および今後の課題

日本人を対象にして、米国Milletが開発したQEESIを使用したアンケート調査を行った。その結果以下のことが示唆された。

1) 全く自覚していなかった人が、QEESIでMCSの疑いが強い(Very suggestive)に分類された結果、専門医の診断を受け、MCSと診断された。このことから、QEESIは日本でもMCS患者のスクリーニング用問診票として役立つことが示された。

2) ただし、ROC分析やロジスティック回帰分析の結果、症状以外の項目は、感度や特異度が低かった。

3) 両群の得点の分散や分布の比較から、古典的アレルギーに関する項目と食生活に関する項目(食品添加物、嗜癖、食事障害など)などを日本人のライフスタイルに合わせて改良すると感度や得意度が上がる可能性が示唆された。

4) マスキングの影響を検討した結果、QEESIを使用する場合は、日本人のマスキングの影響を考慮したカットオフ値の設定が必要なこともわかった。

今後の検討課題としては、問診票による主観的な自覚症状と客観的な臨床検査所見との関連の検討、原因物質の種類や濃度と症状との関係の検討、遺伝子多型と症状の個人差、ストレスと発症の関係などの解析をすすめ、日本のMCS患者のスクリーニングおよび予防に役立つ問診票の作成をめざしたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Sachiko Hojo, Hiroshi Yoshino, Kazuhiko Kakuda, Satoshi Ishikawa: A Questionnaire Survey among Japanese using the QEESI, Proceedings of 2003 International Symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards, 177-185, January 2003

2) I.Uchiyama and R.Murayama

Study on Current Situation of Chemical Sensitivity in Japan. Proceedings of 2003 International Symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards, 186-190, January 2003

3) Hiroshi Yoshino, Kentaro Amano, Nozomi Iida, Mari Matsumoto, Kouichi Ikeda, Atsuo Nozaki, Kazuhiko Kakuda, Sachiko Hojo, Satoshi Ishikawa: Field Survey on Indoor Air Quality and Occupants' Health Conditions in Sick Houses, Proceedings of 2003 International Symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards, 191-207, January 2003

4) Hiroshi Yoshino, Haruki Osawa, Yasuko Kuwasawa, Teruaki Mitamura, Norie Takizawa, Miki Takada, Sachiko Hojo: IAQ Measurement of Three School Buildings in Miyagi Prefecture, Japan, Proceedings of 2003 International Symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards, January 2003

5) Kazuhiko Kakuda, Hiroshi Yoshino, Kentaro Amano, Nozomi Iida, Miki Takada, Mari Matsumoto, Kazumi Katagiri, Sachiko Hojo, Atsushi Takeda, Satoshi Ishikawa: Diagnosis and Follow-up of Sick house syndrome, Proceedings of 2003 International Symposium on Indoor Air Quality and Health Hazards, 69-90, January 2003

6) 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、vol1, 77-87, 2002年12月

7) 吉野博、北條祥子、高田美紀、角田和彦、宮城県の児童を対象とした生活環境と健康障害との関連についての調査研究、日本建築学会計画系論文集、第558号、87-94、2002年8月

- 8) 北條祥子 : 日本における MCS 患者のスクリーニング用問診票としての QEESI の使用、神経眼科, 第 19 巻、169-175, 2002 年 6 月
- 9) 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, 第 19 巻、176-187、2002 年 6 月
- 10) H. Yoshino, K. Amano, K. Ikeda, N. Atsuo, N. Iida, K. Kakuta, S. Hojo, Ishikawa: Field : S. Field survey on indoor air quality and health conditions sick houses. Indoor Air 2002, the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, 2002. July
- 11) 北條祥子、吉野博、角田和彦、佐藤洋 : 宮城県の児童の生活環境と健康に関する実態調査—児童の生活環境と呼吸器・アレルギー疾患有症率の地域比較、環境科学会誌、vol. 14、451-463、2001 年 9 月

参考文献

- 1) Miller CS and Prihoda TJ: The Environmental Exposure and Sensitivity Inventory (EESI): a standardized approach for measuring chemical intolerances for research and clinical applications. *Toxicology and Industrial Health*, 15, 373-385, 1999.
- 2) Miller CS and Prihoda TJ: Controlled comparison of symptoms and chemical intolerances reported by Gulf War veterans, implant recipients, and persons with multiple chemical sensitivity. *Toxicology and Industrial Health*, 15, 386-396, 1999.

Table 1. Miller と Prihoda の診断基準による分類結果

Risk Criteria by Miller&Prihoda				% of each group meeting risk criteria	
is suggested ²	Symptom Severity	Chemical Intoleranc	Masking score	C group (n = 420)	A group (n = 131)
Very suggestive	≥40	≥40	≥4	4	3
Very suggestive	≥40	≥40	<4	1	3
Somewhat suggestive	≥40	<40	≥4	8	4
Not suggestive	≥40	<40	<4	2	0
Problematic	<40	≥40	≥4	4	28
Problematic	<40	≥40	<4	3	5
Not suggestive	<40	<40	≥4	47	42
Not suggestive	<40	<40	<4	33	16

Table 2. A 群の多重ロジスティック回帰分析結果

	p-value	Odds ratio for 1-point increase	Odds ratio for 5-point increase
Chemical Intolerance	0.0001	1.047	1.257
Other Intolerance	0.0001	1.056	1.312
Symptom	0.0001	1.077	1.451

Fig.1.. ROC 分析による Cut Off Point のとり方と感度および特異度の関係

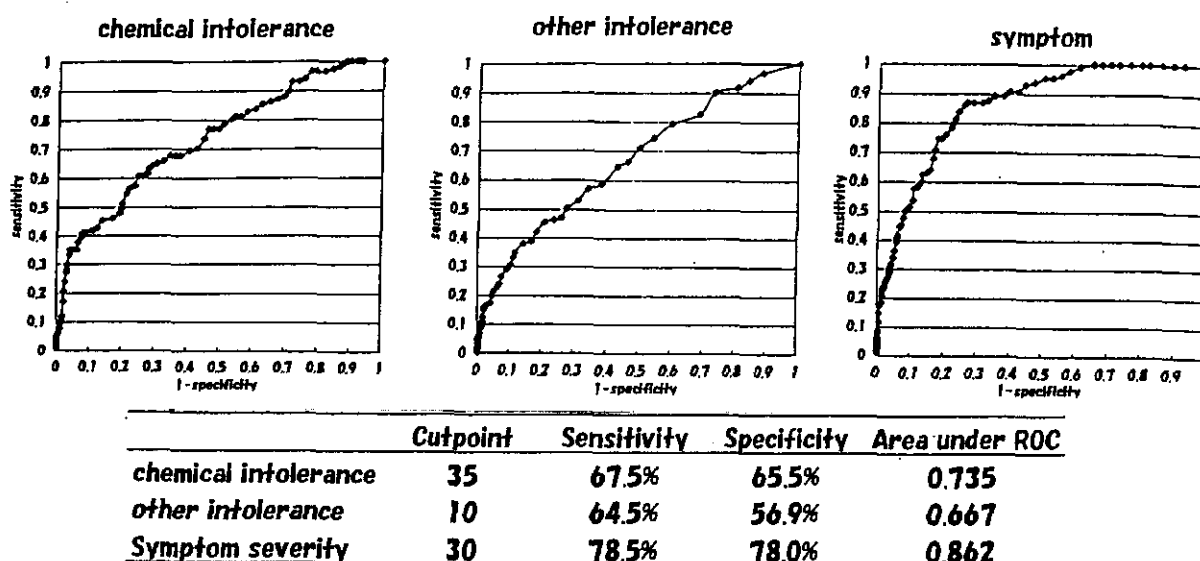


Table 3. 両群間の QEESI の 40 質問項目の平均得点の比較 (一元配置分散分析)

(* < 0.05 ** < 0.01 *** < 0.001)

		A群(北里)			C群(健常者)				A群(北里)			C群(健常者)		
		差意有	平均値	SE	平均値	SE	差意有		平均値	SE	平均値	SE		
Q1-1	車の排気ガス	***	4.5	0.2	3.2	0.1	Q3-1	筋	***	4.2	0.3	1.3	0.1	
Q1-2	タバコの煙	***	4.7	0.2	3.4	0.1	Q3-2	気管粘膜	***	6.0	0.2	2.0	0.1	
Q1-3	殺虫剤・除草剤	***	5.3	0.3	3.3	0.1	Q3-3	心・循環	***	3.9	0.3	1.4	0.1	
Q1-4	ガソリン臭	***	4.9	0.2	3.1	0.1	Q3-4	胃腸	***	4.5	0.3	2.3	0.1	
Q1-5	ペンキ・シンナー	***	5.7	0.3	3.7	0.1	Q3-5	認識	***	5.3	0.3	2.2	0.1	
Q1-6	消毒剤・クリーナー	***	4.4	0.3	2.7	0.1	Q3-6	情緒	***	4.3	0.3	2.3	0.1	
Q1-7	香水・芳香剤など	***	4.7	0.3	2.6	0.1	Q3-7	神経	***	4.9	0.3	2.2	0.1	
Q1-8	コールドクールやアスファルト臭	***	4.2	0.3	2.7	0.1	Q3-8	頭部	***	5.0	0.3	1.7	0.1	
Q1-9	マニキュア・ヘアスプレー	***	4.5	0.3	2.6	0.1	Q3-9	皮膚	***	3.9	0.3	2.0	0.1	
Q1-10	新しい絨毯・新車などの臭い	***	4.0	0.3	2.0	0.1	Q3-10	泌尿	***	3.2	0.3	2.0	0.1	
Q1-SUM		***	46.0	1.9	29.2	0.9	Q3-SUM		***	45.0	1.6	19.1	0.8	
Q2-1	カルキ臭		2.2	0.2	1.8	0.0	Q5-1	食事		1.7	0.2	1.3	0.1	
Q2-2	添加物	***	1.8	0.2	1.0	0.0	Q5-2	仕事	***	4.2	0.3	0.9	0.0	
Q2-3	習慣食物		0.4	0.1	0.6	0.0	Q5-3	新しい家	***	3.9	0.3	0.8	0.0	
Q2-4	食後気持ち悪い	***	1.1	0.2	0.5	0.0	Q5-4	衣類	***	2.5	0.3	0.8	0.0	
Q2-5	コーヒー有り 気持ち悪い	***	1.4	0.2	0.4	0.0	Q5-5	旅行	***	3.5	0.3	1.0	0.0	
Q2-6	コーヒー無し 気持ち悪い		0.3	0.1	0.3	0.0	Q5-6	化粧品	***	3.7	0.3	0.8	0.0	
Q2-7	アルコール	***	2.2	0.3	0.9	0.0	Q5-7	社会活動	***	3.2	0.3	0.5	0.0	
Q2-8	皮膚接触繊維 化粧品など	***	2.3	0.3	0.9	0.0	Q5-8	趣味	***	3.0	0.3	0.5	0.0	
Q2-9	医薬品インプラ	***	2.4	0.3	1.0	0.0	Q5-9	人間関係	***	2.2	0.3	1.0	0.1	
Q2-10	アレルギー反応	**	4.3	0.3	3.3	0.2	Q5-10	家事	***	3.1	0.3	0.7	0.0	
Q2-SUM		***	17.9	1.3	10.5	0.5	Q5-SUM		***	29.9	2.1	8.3	0.7	

Fig.2 因子分解の結果のまとめ (固有値1以上、主因子法、バリマックス回転)

A 群のQEESIの 40 質問項目の因子分析を行ったところ、10 個の因子が抽出され、全体の説明率は 54.1%であった。

第1因子(16.324%) : 化学物質に対する反応性9項目(例外タバコ煙) + Q2.1(水道のカルキ臭)

→ 主要発症要因では?

第2因子(11.535%) : 症状1項目(心・循環)および日常生活障害6項目(仕事障害、社会活動障害、家事障害、趣味障害、家族関係障害)

→ 精神的要因が大きく関係した症状や行動障害では?

第3因子(6.063%) : 症状4項目(認識、頭部、情緒、神経)

→ 神経系の症状では?

第4因子(5.506%) : その他の3項目(食品添加物、食後の不快感、嗜好品中毒)

→ 食品から摂取される化学物質による反応では?

3. 病院等多量放散施設における

室内空气中化学物質の調査と評価に関する研究

XⅢ. 医療機関における空气中化学物質の経年的存在量に関する研究

国立保健医療科学院 建築衛生部 池田耕一

XⅣ. 新棟施設の入居直前：1ヶ月经ての医療機関における

空气中化学物質の存在量に関する研究

国立保健医療科学院 建築衛生部 池田耕一

XIII. 医療機関における空气中化学物質の経年的存在量に関する研究

分担研究者 池田耕一 国立保健医療科学院
研究協力者 塩津弥佳 国立保健医療科学院
長谷川あゆみ 住化分析センター

研究要旨 昨年調査を行った医療施設で、できるだけ多くの成分を分析対象として、追跡調査を行った。1 年前の調査で濃度の高かったトルエン、キシレンは今回の調査ではおおむね 10 分の 1 に、TVOC においても暫定目標値の $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ をいずれのポイントでも下まわっていた。しかし、今回測定に加えた病理検査室染色室では、トルエン、キシレンは他の化合物に比べ、濃度は高く TVOC も $1600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。これらの濃度が高かったのは、染色室で行われる作業内容によると考えられた。室内空気環境を良好に維持するためには換気設計も十分配慮しなくてはならない。

A. 研究目的

いわゆる化学物質過敏症が発症、もしくは疑われた際におこる体の不調からまず医療機関へ足を運ぶ機会が多い。しかし、そうした人々の多くからは、病院に行きたくても病院に入る事ができないという声をよく耳にする。そこで我々は診察を受ける医療施設内の空気質の実態に注目をした。

医療施設における室内化学物質汚染の原因は医療行為が化学物質の発生を伴う事が多い。しかし医療施設事態の実態を把握するためにはそれだけではなく、建物、寝具・家具などの物品、医療機器、衛生材料、医療行為などそれぞれの発生量を把握することが重要である。

今年度は、昨年調査を行った医療施設で追跡調査を行なった。そこで、医療施設建物および寝具・家具類のみしか入っていない状態と医療行為が行われた場合での結果を照らし合わせて医療行為と建物からの化学物質の発生に関する関係を考察した。

B. 研究方法

B-1 開院より約 1 年経過した医療機関での空気質調査について

①調査日時

2003 年 2 月 14 日（金）

②調査対象と測定ポイント概要

S 病院（東京都世田谷区）

外気 1ヶ所と院内 11ヶ所。院内の測定ポイントの対象は、前年度調査を行った 6 ポイントと、においについて苦情があったり、においの気になる場所を施設管理者とともに話し合い決定した。また病理検査室は病院の中で有機溶剤を医療行為上使用する機会があるので高濃度になる傾向があるため対象とした。（2F 小児内科中待合ホール、2F 診療室、6F ナースステーション、6F 個室、7F ナースステーション、7F 1人病室、1F 総合受付、1F 事務室、2F 病理検査染色室、1F ギャラリー廊下、スケルトンエレベータ）

2001 年 12 月竣工、3 月 1 日より開院。対象施設はいわゆるシックハウス対策を行うため建