

- 研究者石川哲) : 119-141、2003
- 2) 角田和彦 : シックハウス症候群とシックスクール症候群 : 小児科の見地から. アレルギー・免疫 10 卷 : 1595-1604. 2003
- 3) 角田和彦ら : シックハウス症候群の診断と経過観察-クリーンルームでない一般検査室で実施した近赤外線脳内酸素モニターによるガス吸入負荷試験 (ポリ袋を使った簡易吸入法) と起立試験の有用性の研究. 平成 12 年度~14 年度厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業-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-総括・分担研究報告書 (主任研究者石川哲) : 142-183、2003
- 泉邦彦 : 衣料用防虫剤の毒性と環境影響. 社会薬学 13 : 11-20、1994
- 4) 角田和彦:近赤外線脳内酸素モニターによるシックハウス症候群の診断. 臨床環境医学 Japanese Journal of Clinical Ecology Vol.12 : 15-26、2003
- 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) Iida N, Yoshino H, Amano K, Kakuta K, Hojo S, Ishikawa S: Field survey about residential environment and health condition in sick houses. Japanese Journal of Clinical Ecology 11:77-87, 2002
- 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
- 7) MacQueen J et al : Manual Colormetric Methods for Pseudocholinesterase and Red Cell (True) Cholinesterase. Clinical Chemistry 17 : 481-485, 1971
- 8) 小山智典、立森久照、長田洋和、戸張美佳、石田博美、栗田広 : WISC-IIIによる高機能広汎性発達障害と注意欠陥/多動性障害の認知プロフィールの比較、精神医学 45 : 809-815、2003
- 9) 泉邦彦 : 衣料用防虫剤の毒性と環境影響. 社会薬学 13 : 11-20、1994
- 10) Li G、宮田幹夫、石川哲、花井義道 : 環境中有機塩素化合物の実験的アレルギー性結膜炎への影響 クロロホルムおよび p-ジクロロベンゼンについて、日本眼科紀要 45 : 475-480、1994
- 11) Miyai I, Hirono N et al: Reversible ataxia following chronic exposure to paradichlorobenzene. J Neurol Neurosurg Psychiatry 51:453-454, 1988
- 12) Henk PM, Vijverberg JM, van der Zalm & Joep van den Bercken: Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. Nature 295:601-603, 1982
- 13) Coats JR: Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. Environ Health Perspect 87:255-262, 1990
- 14) Narahashi T :Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. Trends Pharmacol Sci.13:236-241, 1992
- 15) Narahashi T:Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. Pharmacol Toxicol 79:1-14, 1996
- 16) 小宮山政敏、森千里 : 胎児複合暴露の影響評価、医学のあゆみ 201:137-142、

2002

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表1 シックハウス症候群診断基準

シックハウス症候群・シックスクール症候群、及び化学物質過敏症診断基準	
	(坂総合病院小児科)
1) 以下の状態であり、かつ、他の慢性疾患が除外されていること	
① 発病前に、繰り返し化学物質に曝露された、または、短期間に大量の化学物質に曝露された経験がある (新築家屋・改築後家屋への転居、新しい家具の購入後、仕事や趣味での化学物質使用など)	
② その場を離れる、または、原因化学物質の曝露がなければ症状は一定改善される	
③ その場に行く、または、原因化学物質を曝露されると症状は再燃する	
④ いったん発病すると、他の場所や他の化学物質でも症状が誘発される	
⑤ 症状は全身の臓器に広がり、多種の症状に進展していく	
⑥ 症状は慢性的に経過する	
2) 症状(以下のようなものを中心にあらゆる症状が起こる)	
① 末梢神経・中枢神経系の症状:頭痛、吐き気、立ちくらみ、視力低下、 精神的な不安定、不眠、全身疲労感など	
② アレルギー性疾患の悪化、または、発病:気管支喘息、アトピー性皮膚炎、 じんましん、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎など	
③ 粘膜刺激症状:目のちかちか、目の痛み、鼻水、鼻閉、鼻粘膜の痛み、 喉の痛み、咳、痰など	
3) 上記に加えて、以下で所見があれば確実	
① 症状出現場所では、環境中化学物質測定で化学物質濃度が高値である (シックハウス症候群・シックスクール症候群)	
② 近赤外線脳内酸素モニターNIRO300による化学物質吸入負荷試験で陽性 (化学物質吸入負荷試験、起立試験)	
4) 以下で所見があれば疑いが濃厚	
① QEESI 問診票で化学物質過敏症の疑いが持たれる	
② 滑動性眼球運動、瞳孔反応に異常がある	
③ 赤血球コリンエステラーゼが低値(1.7 単位未満)など	
5) 以上の状態が	
① 新築家屋・改築後家屋に関連して起きた場合はシックハウス症候群・シックスクール症候群とする	
② 極微量の化学物質(指針値以下の微量)でも症状が誘発され、末梢神経・中枢神経系の症状を伴う場合は化学物質過敏症とする	

表2 WISC-IIIを実施する発達相談室の室内化学物質濃度は低値であった。

測定箇所		発達相談室	診療室	待合室	スタッフルーム	外気	室内濃度指針値(両単位の換算は、25°の場合による)
測定時平均温度	°C	24.5	23.2	24.8	26.1	19.3	
測定時平均湿度	%RH	58.8	60.3	57.6	53.1	82.1	
濃度							
2-ethylhexanol	μg/m ³	1.3	12.8	24	36.3	0.2未満	
トルエン	μg/m ³	1.3	8.5	9.3	17	1.3	260 μg/m ³ (0.07ppm)
キシレン	μg/m ³	0.7	8.4	4.8	9.9	0.8未満	870 μg/m ³ (0.20ppm)
エチルベンゼン	μg/m ³	0.6	3.4	2.8	9.5	0.4	3800 μg/m ³ (0.88ppm)
スチレン	μg/m ³	0.2未満	0.2未満	0.2未満	0.2未満	0.2未満	220 μg/m ³ (0.05ppm)
1,4-dichlorobenzene	μg/m ³	0.3	0.9	1.6	1.2	3	240 μg/m ³ (0.04ppm)
テトラドカン	μg/m ³	1.1	22.6	20.5	29.1	0.3未満	330 μg/m ³ (0.04ppm)
ノナナール	μg/m ³	1.4	5	4	7.7	3.8	41 μg/m ³ (7.0ppb)(情報量が乏しいことから暫定)
ホルムアルデヒド	μg/m ³	9.4	19.1	31.7	45.9	2.7	100 μg/m ³
	ppm	0.008	0.015	0.026	0.037	0.002	0.08ppm
アセトアルデヒド	μg/m ³	0.0	14.2	15.7	25.7	1.5	48 μg/m ³
	ppm	0.000	0.009	0.010	0.016	0.001	0.03ppm

ロスナイ換気扇 機動中 換気扇停止中 換気扇停止中 換気扇停止中

図1

2000-2002年度 測定方法

	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時間アクティブサンプリング (通気量: 100ml/min)	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: 300ml/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	二硫化炭素 (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	国立保健医療科学院建築衛生部にて分析 分析機器: HPLC (HEWLETT PACKARD)	東スリーエス (株) 研究開発分析室にて分析 分析機器: GC/MS (島津製作所 (株) QP-5050型)

2003年度 測定方法

	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	二硫化炭素 (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於て分析 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 μm × 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°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: GP-Sil8cb (100m × 530 μm × 5.0 μm) 移動相: 窒素 移動相の流速: 18ml/min カラム温度: 40°C-320°C DET: 280°C インジェクション: 280°C

表3 言語性IQ、動作性IQと苦手科目（苦手項目）、得意科目

年齢	性	言語性IQ	動作性IQ	全IQ	苦手科目	苦手項目	得意科目
5	男	101	66	83			
6	男	110	79	95		文字を読まない	
15	男	103	83	93	社会・英語	地図・スペル	数学・国
7	女	104	86	95	音楽		算数
11	女	95	87	90	算数		国語
9	男	123	97	112	体育		理科
15	女	106	100	104	体育		数学・英語
9	男	109	104	108	国語	漢字	数学
13	男	114	106	111	国語	漢字	数学・英語
14	女	109	110	110	英語	スペル	数学
11	男	106	110	109	社会	漢字	理科

図2 WISC-III 言語性IQ、動作性IQ、全検査IQと4種類の群指数
VIQとPIQは統計学的な有意差があった（t検定：p<0.01）

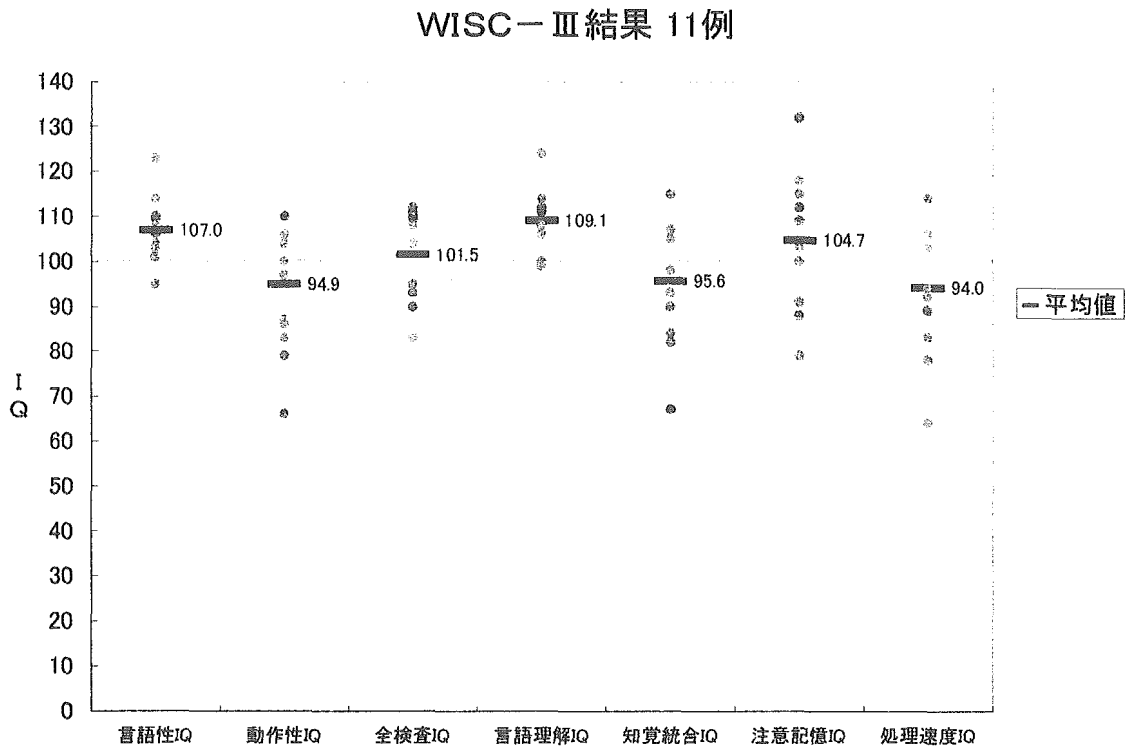


図3 WISC-III 下位検査評価点数

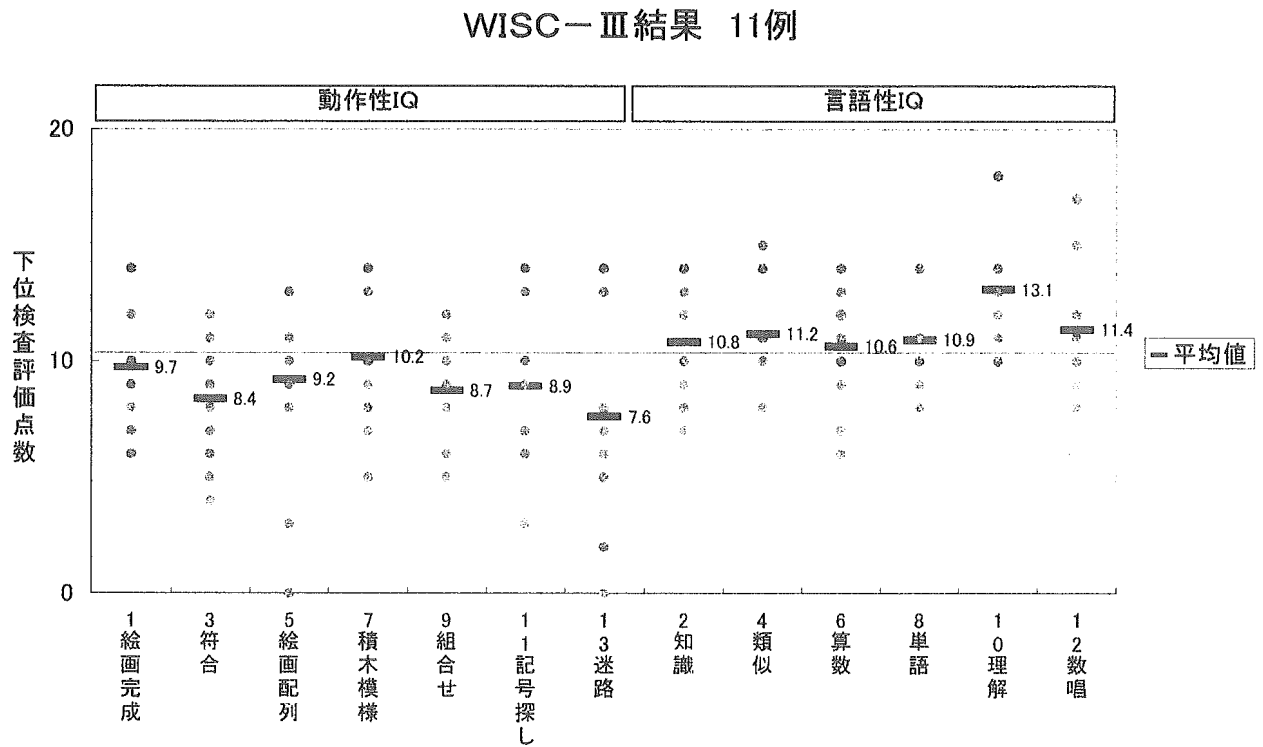


表3 「オレンジ」、「格子」図版と記号探し点数

「オレンジ」の図に正答できた例：○・正答できなかった例：×	記号探し点数	「格子」の図に正答できた例：○・正答できなかった例：×
×	3	×
×	6	○
×	6	×
×	7	未実施（実施レベルまで検査が到達しなかった）
×	7	未実施（実施レベルまで検査が到達しなかった）
×	7	未実施（実施レベルまで検査が到達しなかった）
×	10	○
×	13	×
○	9	○
○	13	○
○	14	○

図4 「オレンジ」の図の回答と記号探し点数

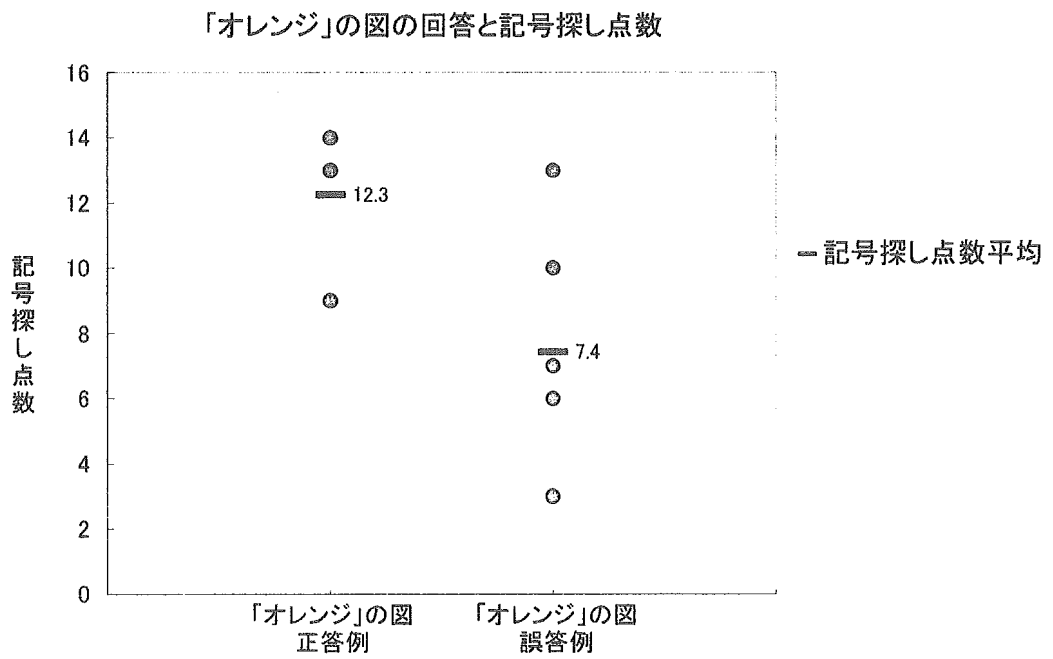


図5 「オレンジ」の図の回答と動作性IQ(PIQ)

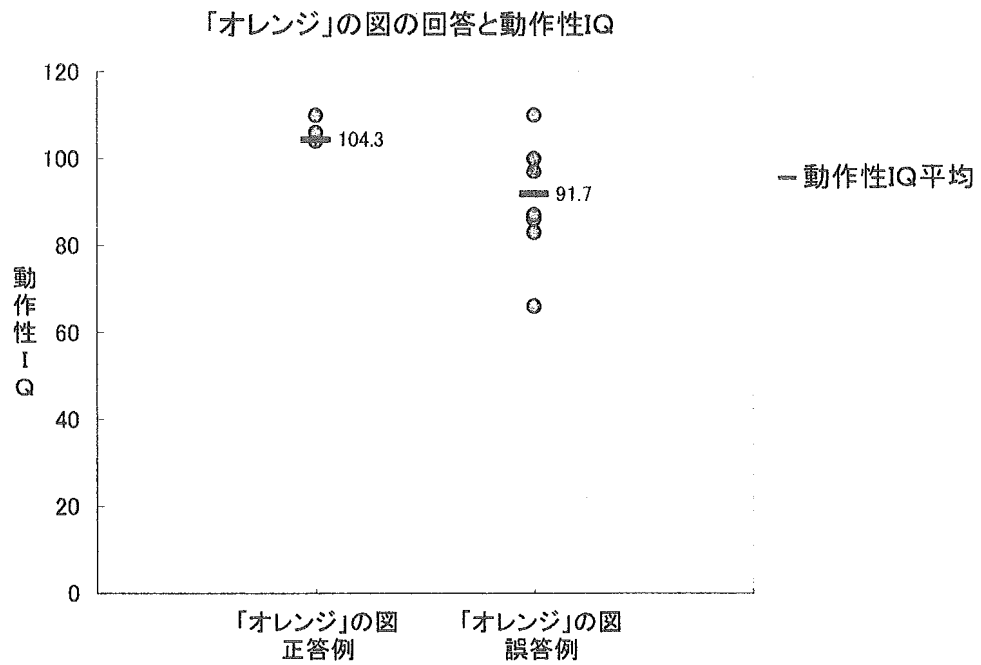


図6 「オレンジ」の図の回答と室内パラジクロロベンゼン濃度

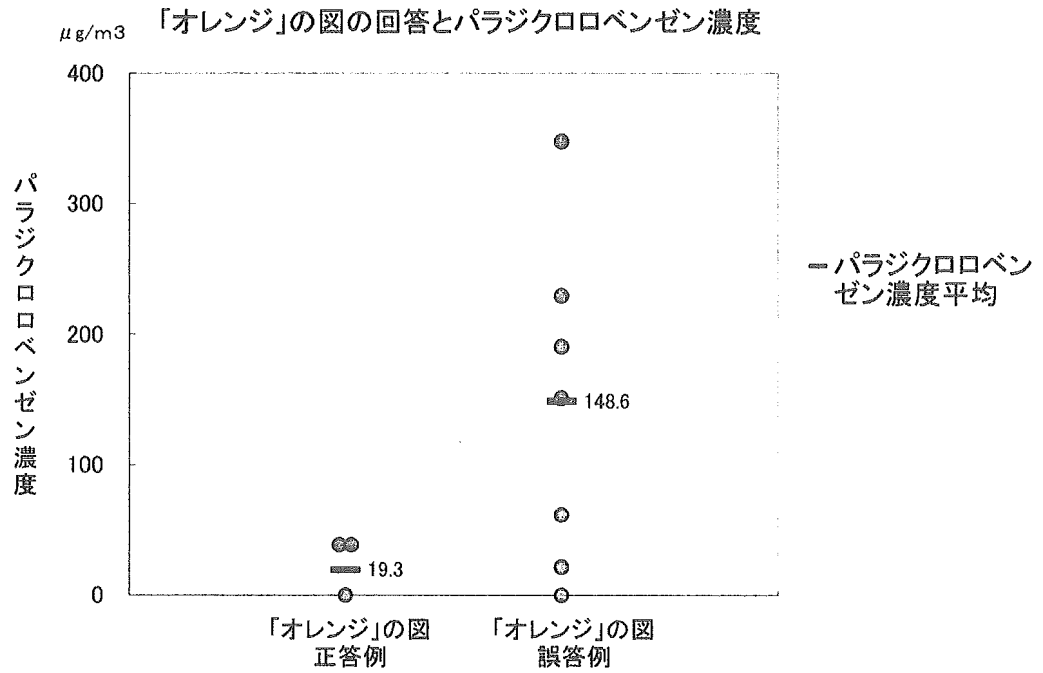


図7 PIQ とパラジクロロベンゼン濃度

相関係数： -0.655 ($p < 0.05$) の関係があった。

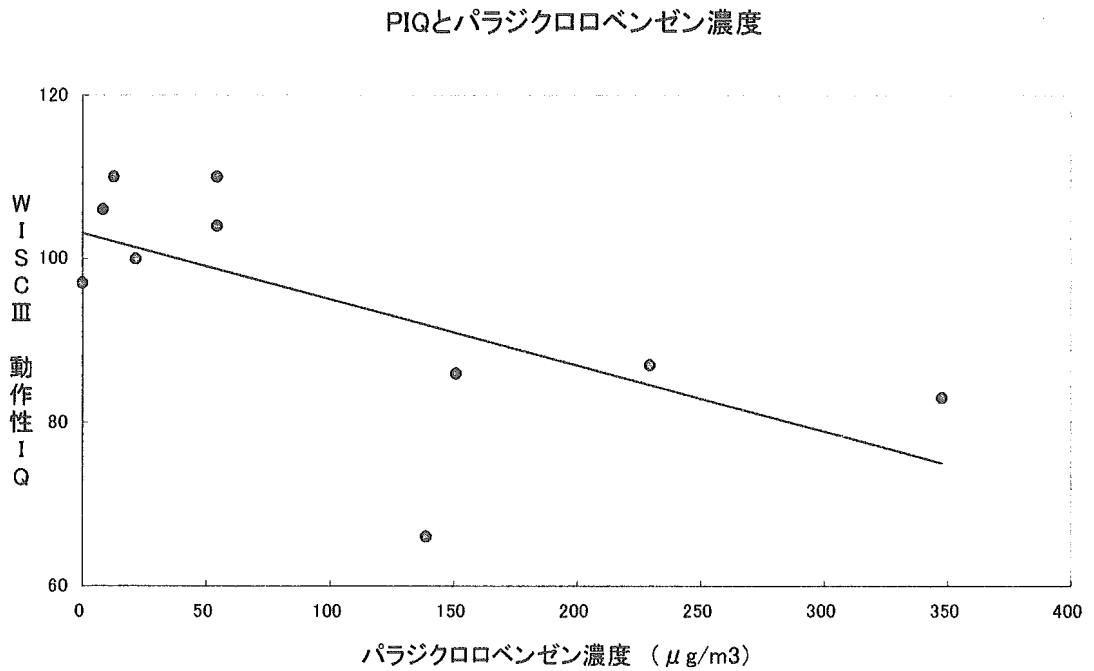


図8 PIQとホルムアルデヒド濃度

相関係数： -0.719 ($p < 0.05$) の関係があった。

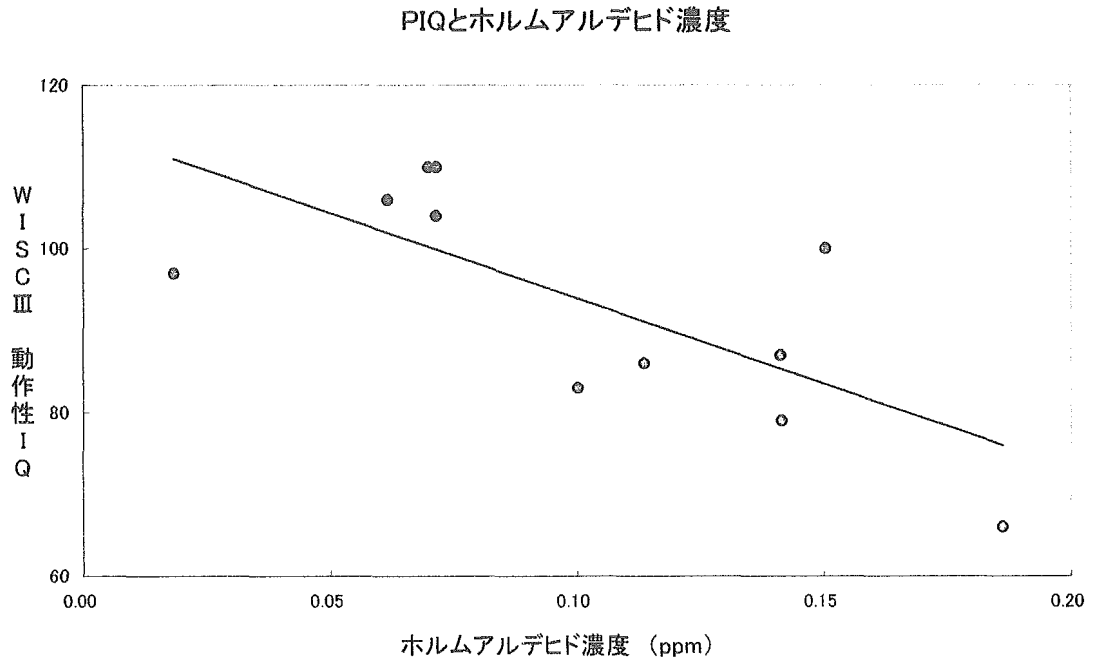


図9 PIQと脂肪族炭化水素合計濃度

相関係数： -0.606 ($p < 0.05$) の関係があった。

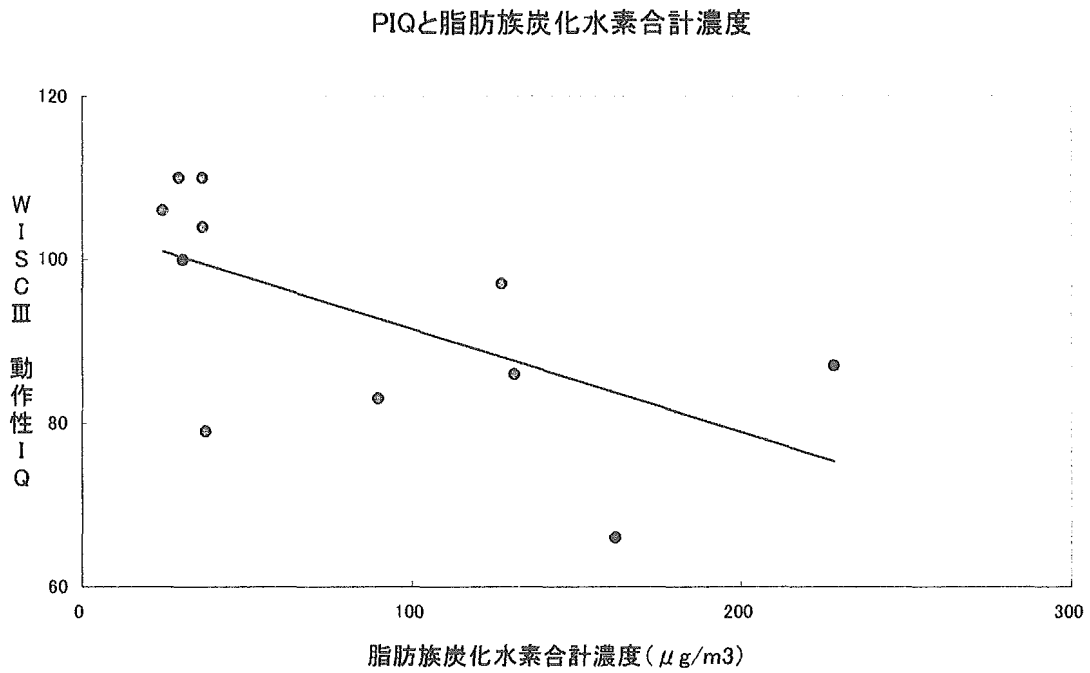


図10 PIQとTVOC濃度

相関係数：-0.600 (p=0.051)

TVOCが高いほどPIQが低くなる傾向があった。

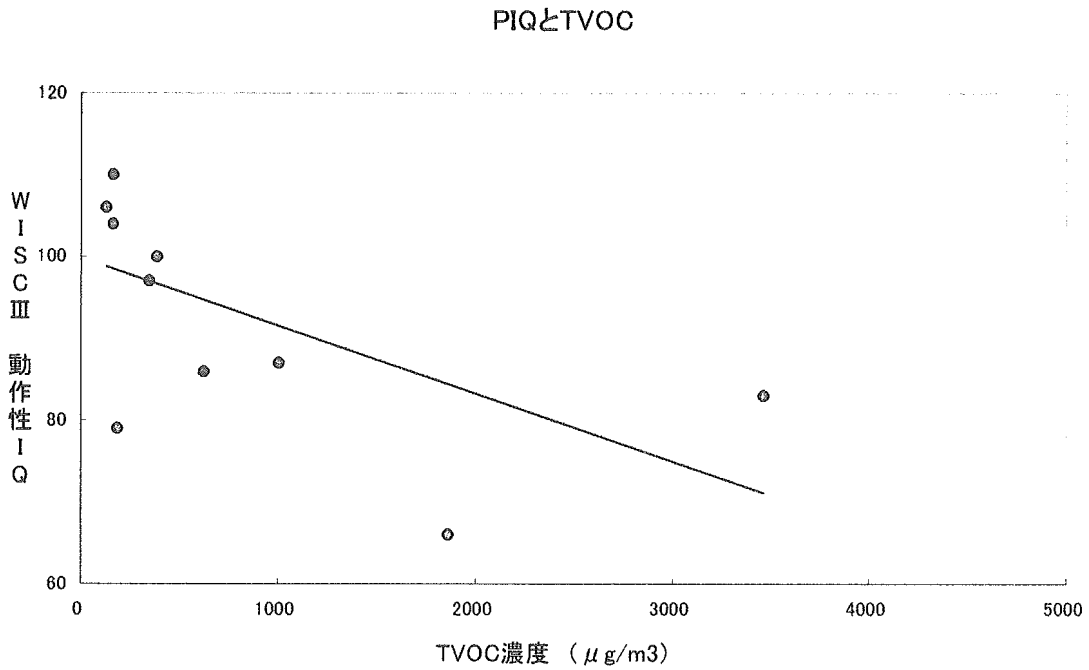


図11 PIQと赤血球コリンエステラーゼ

赤血球コリンエステラーゼとPIQが正の相関をする症例群と、赤血球コリンエステラーゼ値に関係が正常となる症例群が存在した。

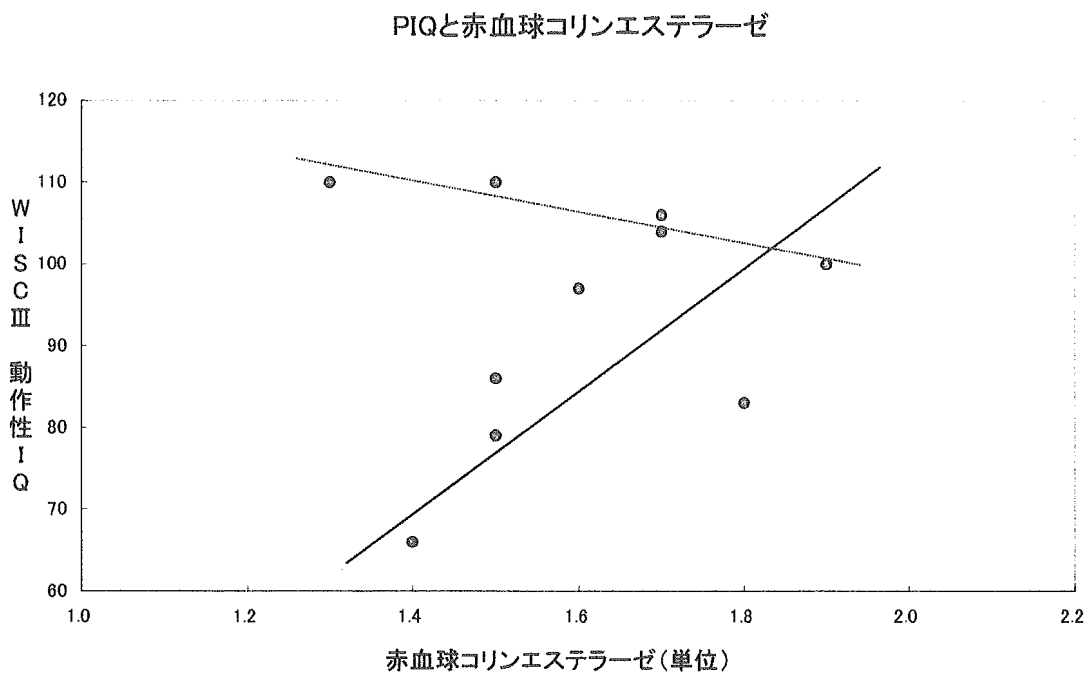


図12 PIQと毛髪中カドミウム濃度

相関係数： -0.798 ($p < 0.05$) の関係があった。

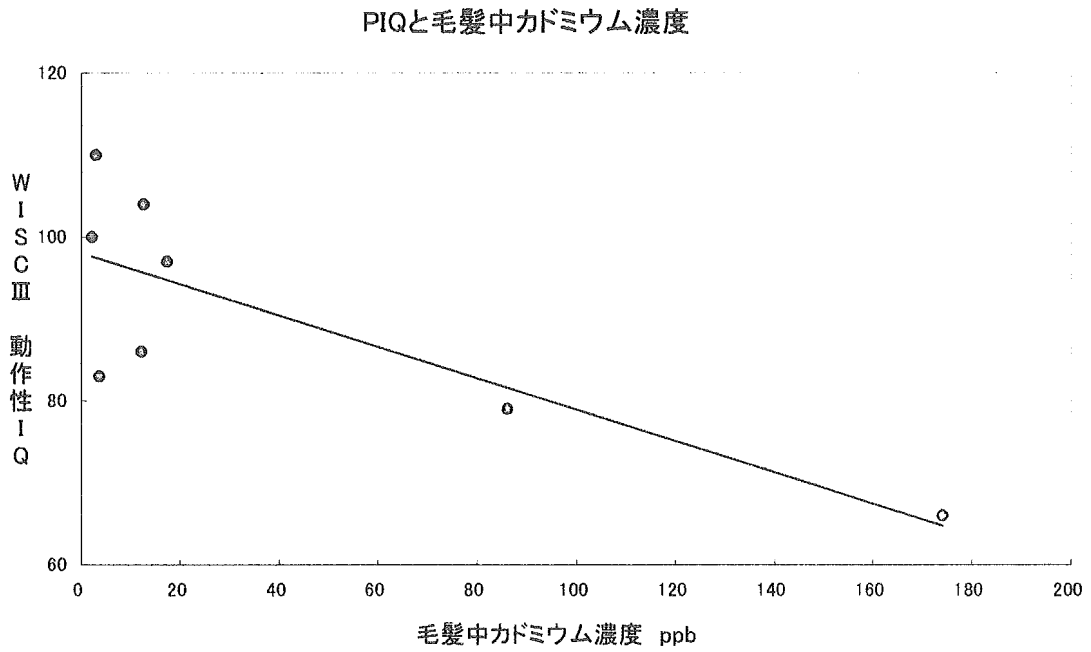


図13 PIQと毛髪中アルミニウム濃度

相関係数： -0.888 ($p < 0.01$) の関係があった。

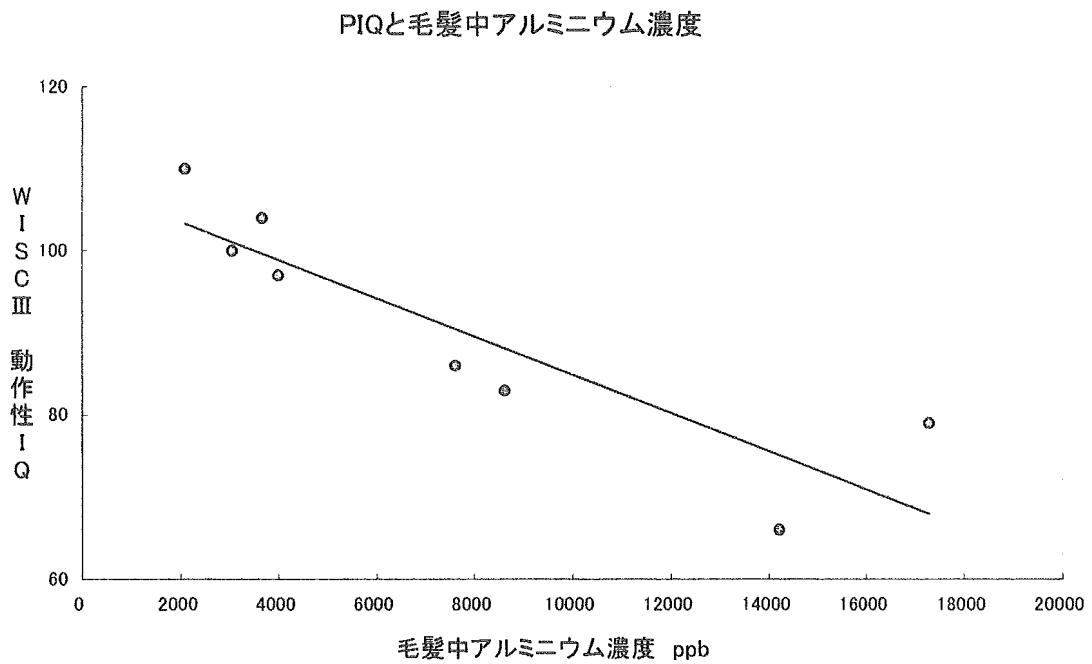


図14 PIQと毛髪中鉛濃度

相関係数：-0.798 (p<0.05) の関係があった。

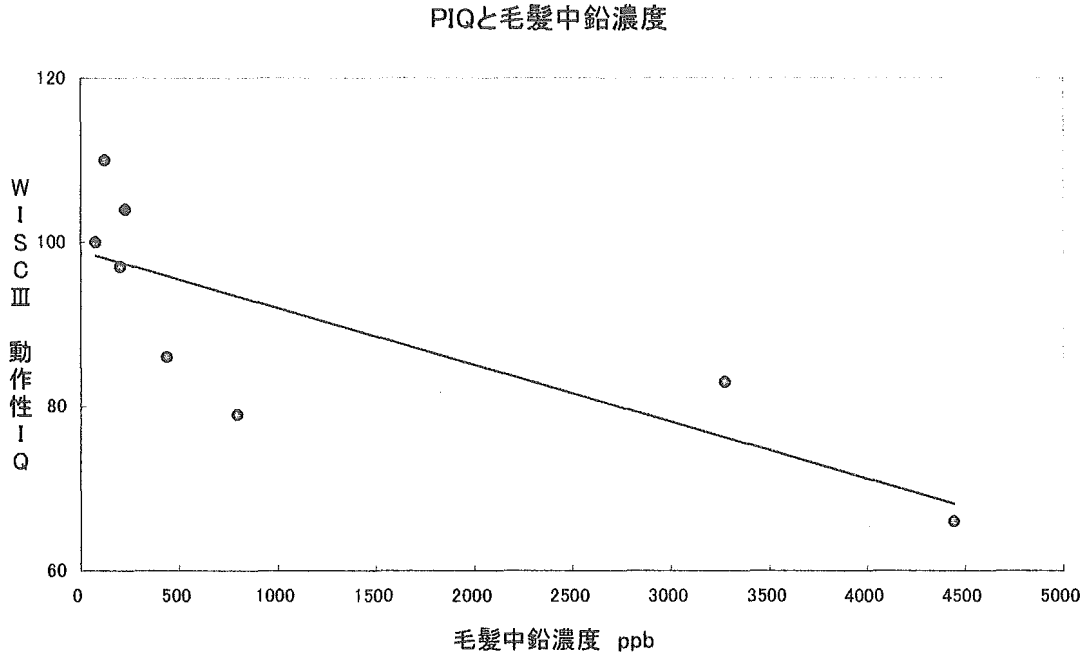
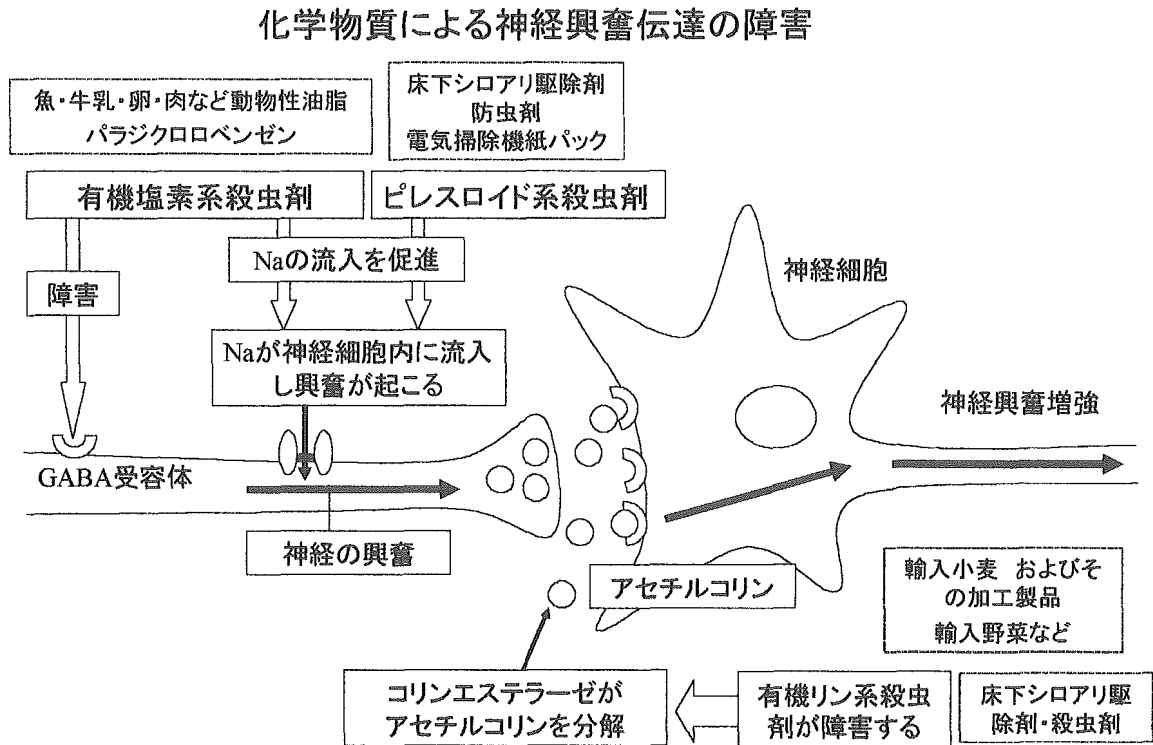


図15 化学物質による神経興奮伝達の障害



V. シックハウス症候群に関する

遺伝要因に関する研究

東海大学医学部基礎医学系

北里研究所病院臨床環境医学センター

青山内科小児科医院

宮城厚生協会坂総合病院小児科

木村 穰

松坂 恭成

猪子 英俊

石川 哲

坂部 貢

青山 美子

角田 和彦

分担研究報告書

シックハウス症候群に関する遺伝要因に関する研究

分担研究者	東海大学医学部基礎医学系	木村 穰
研究協力者	東海大学医学部基礎医学系	松坂 恭成
研究協力者	東海大学医学部基礎医学系	猪子 英俊
研究協力者	北里研究所病院	石川 哲
研究協力者	北里研究所病院	坂部 貢
研究協力者	青山内科小児科病院	青山 美子
研究協力者	坂総合病院	角田 和彦

研究要旨

シックハウス症候群の遺伝要因を追求するために、本年度は新たに NTE (Nueropathy target esterase) 遺伝子を疾患感受性候補遺伝子とし、その遺伝的多型箇所の検索および遺伝マーカーとしての有用性の検討を行い、このようにして設定された遺伝マーカーの一部を用いて遺伝学的相関解析を行った。今年度、検討した多型箇所は合計で 27 箇所であり、これらの多型箇所に関して解析方法を確立し、20 箇所について多型性を確認した。さらに、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の多型箇所を 11 箇所見出した。

このようにして見いだされた多型箇所のうち 5 遺伝子座について、シックハウス症候群患者集団および健常者集団を用いて有意差検定を行ったが、患者集団において統計的有意差を示す対立遺伝子や遺伝子型は見いだされなかった。また、この検定に使用した日本人集団はハーディ・ワインベルグ平衡を満たしていた。

A. 研究目的

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の様々な揮発性有機化合物がその発症に関与していることは疑いが無いが、この疾患のかかりやすさ（感受性）に個人差があること

も事実である。このような疾患感受性は、現在では遺伝子型の違いによって説明することができる。

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されると考えら

れるが、現在までに進められてきたヒト疾患の遺伝的要因の解析は、連鎖解析 (Linkage analysis) による単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝性疾患に限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の原因遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた遺伝的相関解析 (Association study) を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示された。

シックハウス症候群についても、種々の揮発性化合物に対する症状が調べられており、複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられる。このような疾患については、高度に多型性を示す遺伝的マーカーをヒトゲノム上に高密度に配置し、これらの遺伝マーカーを用いた相関解析によってその遺伝的要因を明らかにすることができる可能性がある。

遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する、すなわち機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、本研究では後者の方法によってシックハウス症候群の遺伝的要因に関する情報を蓄積することを目指した。

シックハウス症候群の候補遺伝子として、*NTE* (Nueropathy target esterase) 遺伝子を選定した。ヒトにおいて、有機リンや化学物質の暴露によって神経性の疾患が湾岸戦争での兵士や慢性的に化学物質に暴露されたヒトにおいて報告されているが、これは有機リンが *NTE* と反応することによって引き起こされると考えられている (文献 1)。*Nte* 遺伝子欠損マウスは、ホモ型欠損マウスにおいては胎児期に死亡してしまう。一方、*Nte*+/-マウスでは野生型マウスに比べて EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) に対する過敏性が有意に高かったことが報告された。また、*Nte*+/-マウスに *Nte* の阻害物質を加えた場合、その過敏性が著しく低下することも報告された。このようなことから、*Nte* 活性の阻害が遺伝的にも化学的にも神経毒性的効果に影響を与えていることが明らかにされた (文献 2)。

そこで、この *NTE* 遺伝子の遺伝子多型を検索し、シックハウス症候群患者集団および健常者集団においてその対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を解析することによって、*NTE* 遺伝子とシックハウス症候群との関連を明らかにすることを目的とした。

本疾患は、その原因因子として環境要因の特定およびその基準値の設定を明確にしなければならないという問題があるが、さらに本疾患の感受性の違いを明ら

かにすることは、本疾患の発症および病態を解明し、治療法を開発するための手がかりとなると思われる。したがって、本疾患に関連性が高いと予想される遺伝子を科学的根拠に基づいて選定し、その遺伝子と本疾患との関連を詳細に解析することは、本疾患の病因および発症における重要な事実を蓄積することができる。と期待している。本年度は、*NTE* 遺伝子領域を遺伝的多型の連鎖不平衡によって網羅的に解析するために遺伝マーカーの設定を行い、シックハウス症候群集団および健常者集団を用いた関連解析によって各遺伝的多型マーカーの対立遺伝子頻度について有意差検定を行い、疾患との関連性を解析した。

B. 研究方法

1) DNA の抽出

北里研究所・北里研究所病院の協力により、インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10ml を採血した。このうち 0.4ml を用いて、カートリッジ（キアゲン社）による DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判定を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。各試料はコード化をはかり、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。

個人情報管理は東海大学医学部個人情報管理部で管理されている。

2) DNA 配列情報および一塩基置換 (SNP) の検索

NTE 遺伝子のゲノム領域内において SNPs の検出を行うために、この遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、GenBankDNA database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。得られたゲノム配列について、*NTE* 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにした。SNP のなかには、調節領域に存在する rSNP(regulatory SNP)やコーディング領域に存在する cSNP(coding SNP), イントロン領域に存在する iSNP(intron SNP), 遺伝子間の介在領域に存在する gSNP(genomic SNP)がある。これらのうち、直接的に表現型に影響を与える SNPs は、rSNP、cSNP、iSNP であり予めこれらの情報を整理しておくことは、疾患感受性遺伝子のマッピングするうえで大変重要である。

現在までにヒトゲノム上で見出された SNP についてはデータベースに登録されており、*NTE* 遺伝子領域に存在する SNP についてもこのデータ

ベースを検索することによって SNP の位置を明らかにした (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

3) プライマーの設計

PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のプライマーを各 SNP ごとに設計した。このソフトウェアは PCR の適した条件の必要事項である T_m 値、GC 含量、プライマー配列の2次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことが重要である (表1 参照)。

4) PCR 増幅

ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行った。増幅断片を 2.0%アガロースゲル電気泳動等によって確認した。このとき、予想されるサイズの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が

検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を検討することによって特異的な DNA 増幅の検出を確認した。SNP 検出は、最終段階の塩基配列の決定において偽陽性あるいは偽陰性が検出される場合があるため、PCR 増幅条件を十分に検討することは重要である。

5) 塩基配列の決定

増幅 DNA 断片を Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてサイクルシーケンシングを行う。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100 シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。明確な波形データが得られない場合は、入れ子 (nested) プライマーを用いて再度サイクルシーケンシングを行った。

6) 統計解析

上記の解析で得られた多型データについて、患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度は直接カウントして算出した。また、両集団間の各頻度についての有意差は χ^2 検定およびフィッシャーの Probability 検定によって、解析した。

なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、北里研究所・北里研究所病院および東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るように十分配慮した。

一方この研究について、東海大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリングの体制も十分備えて万全を期している。

C. 研究成果

1. 遺伝的多型箇所の検索

シックハウス症候群の候補遺伝子である *NTE* 遺伝子について、遺伝的多型箇所をデータベース検索によって調べた。この遺伝子は 27.6Kb のゲノム領域にわたり、現在までのところ 133 個の SNP と 7 個のマイクロサテライトが存在する。SNP に関しては、その対立遺伝子頻度の情報が全ての SNP について明らかにされていないため、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency の高い遺伝マーカーを実際実験的に調べる必要がある。そこで、上記の検索によって検出された SNP についてランダムにいくつかの SNP について対立遺伝子頻度を求めることとした。

2. PCR プライマーおよび PCR 条件の設定

本年度はまず遺伝的多型の解析方法を確立するために、a)DNA 抽出方法、b)PCR プライマーの設定と PCR 条件の決定、c)PCR 産物の抽出方法、d)Sequencing 方法の決定を行った。DNA の抽出方法については、0.4ml の末梢血試料をカートリッジ（キアゲン社）を使用して DNA の調製を行った。このようにして抽出されたゲノム DNA は次ぎの PCR 反応条件に適切な DNA 濃度および品質を保っていた。PCR プライマーは、SNP 箇所を挟み込む形で設定してその増幅 DNA 断片が 1.5kb 以下になるように設計された。PCR 反応条件は、94°C 30sec、56~60°C 30sec、72°C 2min のサイクルを 30 回繰り返すことで標的 DNA 断片の増幅を確認できた（表 1）。また、近接する SNP 箇所については 1 つの PCR 断片の中に複数の SNP が含まれるように PCR プライマーを設定し、多型解析の効率化を図った（表 2 中の黒太線部分が増幅 DNA 断片を示す）。PCR 増幅断片を含む PCR 産物には、PCR プライマーおよび dNTPs（デオキシリボヌクレオチド三リン酸）が含まれているため、これらを Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって除去し、1/100 量を Sequencing 反応に使用した。

3. DNA 多型解析

DNA 多型の解析方法が確立された SNP について、その対立遺伝子頻度を求め遺伝的多型マーカーとしての有用性を検討した。患者群 10 名、対照群 10 名について、*NTE* 遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムにいくつかの SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、SNP27 箇所中 20 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP を 11 箇所を確認した（表 2、図 1）。

さらに、Minor allele frequency が 0.2 以上の 11 個の SNP うち、5 個の SNP について患者集団および健常者集団を用いて再度対立遺伝子頻度を解析した。その結果、調べた 5 個全ての SNP について Minor allele frequency が、約 0.4 以上であった。

また、上記の解析を行った集団が日本人集団の対立遺伝子頻度分布を反映しているかを検定するために、5 遺伝子座×2 集団=合計 10 集団の対立遺伝子頻度について、ハーディ・ワインベルグ平衡の検定を行ったところ、すべての集団において平衡状態に達していた（表 3）。

4. 相関解析

上記において遺伝マーカーとしての有

用性を検定された 5 個の SNP について、シックハウス症候群患者集団において特異的な対立遺伝子を解析するために、シックハウス症候群集団および健常者集団を用いた相関解析を行った。しかしながら、2 つの集団において有意に対立遺伝子頻度の異なる対立遺伝子は見い出されなかった（表 4）。同様に、遺伝子型頻度についても有意差検定を行ったが患者集団において有意にその頻度が上昇する遺伝子型が見い出されなかった（表 5）。

D. 考察

本年度は、シックハウス症候群の感受性候補遺伝子として *NTE* 遺伝子を選定した。この遺伝子はマウスにおいて、その酵素活性の阻害を通して有機リンによる神経毒性効果を及ぼすことを初めて示したもので、シックハウス症候群を含む神経性疾患に遺伝的要因が関与することを明らかにしたものである。このことより、*NTE* 遺伝子の遺伝子多型がシックハウス症候群に影響を及ぼすかということをいち早く解析した。現在までに、ヒト *NTE* 遺伝子に関しては他の疾患に関しても遺伝的な多型解析は行われておらず、その多型情報や疾患との関連性については未解析の部分が多い。本研究は、このような点から本疾患に関与する遺伝子を科学的根拠に基づき選定し、その遺伝的関与を詳細に解析するという点で独創的な研究であると考えられる。

現在までに行われてきた疾患感受性遺伝子の解析は、その遺伝子の翻訳領域を中心とした解析が中心であった。これはそれまで、ヒトのゲノム情報の不完全さが原因であり、そのため大変低い対立遺伝子頻度を対象とした解析により実際にはその疾患に重要な遺伝子多型を見逃してしまう可能性があった。

しかしながら、現在ではヒトのゲノム情報を簡単迅速に入手することが可能となり、疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においてもその遺伝子領域全体を高密度な遺伝的多型マーカーを用いて網羅的に解析することが可能となった。このようなことから、高度な多型性を示す遺伝マーカーを高密度に設定し、疾患との感受性を解析することにより、より信頼性の高い解析結果と評価が可能であると予想される。本年度は、5 遺伝子座について検定を行い、統計的有意差を示す対立遺伝子は見い出されなかったが、さらに遺伝マーカーを設定し現在の対象遺伝子について詳細に解析すると共に、他の遺伝子領域についても有意差検定を行うことは、本疾患との関連を高い信頼性で評価できるものと考えている。さらに、各多型マーカーについてハプロタイプの推定を行い検出力を高めることによって比較的弱い遺伝効果についても評価することができる可能性がある。

また、本研究において、見出された高度な多型性を示す遺伝マーカーは本疾

患との関係を詳細に解析するだけでなく、今後の疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においても重要な知見をもたらすことは間違いないと期待される。

しかしながら、ヒトゲノム上には約 3 万から 3 万 5000 個の遺伝子が存在すると予想されており、未だその機能が明らかにされている遺伝子は半数もない。このようなことから、本研究において選定した *NTE* 遺伝子以外にも多くの遺伝子がシックハウス症候群の感受性に関与している可能性も考えられ、さらに候補遺伝子の選定を行うことが必要であろう。

E. 結論

今年度の主な成果は下記の通りである。

1. *NTE* 遺伝子をシックハウス症候群の候補遺伝子とし選定し、高密度な多型マーカーを *NTE* 遺伝子領域に設定するために多型情報の検索を行った。また、*NTE* 遺伝子領域において、遺伝的多型マーカーとして高度な多型性を示すことが予想されるマイクトサテライトについてもそのゲノム上の位置を明らかにした。
2. *NTE* 遺伝子について、多型箇所を増幅する PCR 系とそれに続く塩基配列の決定システムを 27 遺伝子座について確立した。
3. *NTE* 遺伝子について、患者群 10 名、