

平成16年度厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

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	東海大学医学部基礎医学系	津田 道雄
研究協力者	東海大学医学部教育研究支援センター	大久保朋一
研究協力者	北里研究所病院臨床環境医学センター	石川 哲
研究協力者	北里大学薬学部	坂部 貫
研究協力者	青山内科小児科病院	青山 美子
研究協力者	かくたこども&アレルギークリニック	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、本年度は昨年度に引き続き NTE 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。検討した多型箇所は合計で 81 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、66 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 55 箇所見出した。

このようにして見出された多型箇所のうち 45 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、検索した限り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出されなかった。

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なく、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感受性遺伝子についても、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* (Neuropathy 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生ずる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多動であることが報告された。また、*Nte* +/-マウスに *Nte* の阻害物質である EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) を少量加えた場合、その多動性が逆に著しく低下することや投与量を増加させると致死率が野生型マウスに比べて高くな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、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。

本年度は昨年度に引き続き、*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さらに高密度な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相関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。

現在までにトヒゲノム上で見いだされた 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 Tm 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り、この点にも留意した (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した。

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い、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検定は 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 106 個の SNP と 7 個のマイクロサテライトが存在する(表 2)。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

実際に実験的に調べる必要性がある。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

本年度も昨年度に引き続き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。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、SNP81 箇所中 66 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 55 箇所を確認した (表 3、図 1)。

さらに、Minor allele frequency が 0.2 以上の 55 個の SNP うち、45 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 45 個全ての SNP について Minor allele frequency が、約 0.2 以上であった。

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 45 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は見出されなかった。

5. マイクロサテライトマーカー解析

NTE 遺伝子の 3'flanking 領域に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (ATT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団 101 人とシックハウス症候群患者 73 人におけるタイピングの結果、8 個の対立遺伝子が存在していた。このうち 1 個の対立遺伝子において患者集団において数を増やしている正の統計学的な有意差を示した。*NTE*-3'flanking-MS-att-297 ($P=0.003$ Odds Ratio=3.67, $\chi^2=8.83$) (表 5)。

D. 考察

本年度は昨年度に引き続き、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、遺伝的多型部位の解析を行った。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一早く解析した。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、45 遺伝子座について検定を行ったが、統計的有意差を示す対

立遺伝子は見い出されなかった。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ロ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 81 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、対照群 10 名を用いた DNA 多型解析の結果、Minor allele frequency が 0.2 以上の多型性を示す多型箇所を 55 箇所見出した。
 4. 上記の 55 個の多型箇所のうち 45 箇所について、相関解析を行ったが患者集団において統計学的有意差を示す対立遺伝子座は見いだされなかった。
 5. NTE 遺伝子の 3'flanking 領域に存在するマイクロサテライト繰り返し配列 (ATT) のタイピングの結果、1 個の対立遺伝子において患者集団において相対数を増やしている正の統計学的有意差を示した。NTE-3'flanking-MS-att-297 (P=0.003 Odds Ratio=3.67, $\chi^2=8.83$) (表 5)。

参考文献

1. Glynn P. NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? *Bioessays* 25(8):742-745, 2003.

2. Winrow CJ et al. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nature genetics* 33: 477-485, 2003.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

ア) 発表論文

本研究とは直接関連がないが本年度の発表論文を挙げておく。

1. Sato M., Nagashima A., Watanabe T., and Kimura M. Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa (ITS), a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19(11), 523-530. (2003)
2. Sato, M, Tanigawa, N., Kikuti, N., Nakamura, S., and Kimura, M. Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation *Genesis* 35, 167-174 (2003)
3. Kurihara, Y., Tokuriki, M., Myojin, R., Hori T., Kuroiwa A., Matsuda Y., Sakurai, T., Kimura M., Hecht N.B. and Uesugi S. CPEB2, A Novel

- Putative Translational Regulator in Mouse Haploid Germ Cells. *Biology of Reproduction* 69, 261-268 (2003)
4. Nomura, E., Sato, M., Suemizu, H., Watanabe, T., Kimura, T., Yabuki, K., Goto, K., Ito, N., Mizuki, N., Ohno, S. and Kimura M. Hyperkeratosis and leukocytosis in transgenic mice carrying *MHC classI-related gene B(MICB)*. *Tissue Antigen* 61, 1-8 (2003)
 5. Taniguchi Y., Moriuchi T., Inoko H. and Kimura M. HOXD3 mediates the switchover of cadherin 4 to $\beta 3$ integrin gene expression in human erythroleukemia HEL cells. *Biomedical Research* 24(3), 133-140 (2003)
 6. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Ozato K., Inoko H and Kimura M. Comparative analysis of a 229 kb medaka genomic region, containing the *zic1* and *zic4* genes, to *Fugu*, human and mouse. *Genomics in press* (2003)
 7. Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki Y., Okano, H. and Kimura, M. Growth and differentiation potential of main- and side- population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291, 83-90 (2003)
 8. Nakamura, S., Terashima, M., Kikuchi, N., Kimura, M., Saito, A. and Sato, M. A new mouse model for renal lesions produced by intravenous injection of diphtheria toxin A-chain expression plasmid. *BMC Nephrology* (submitted)
 9. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Kinoshita, M., Wittbrodt, J., Takeda, H., Wakamatsu, Y., Ozato K., Inoko H and Kimura M. Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified within the medaka *Double anal fin(Da)* locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related to the phenotypes of the *Da* mutant). *Genomics submitted*
 10. Kimura M., Kimura, T., Sato, M., Watanabe, T., Ohno, S., Inoko, H. and Nomura, E. An Attempt To Create A Behcet's Disease Model In Mice. In *Immunology of Behcet's Disease* Ed. By Zierhut M. and Ohno, S. Swets & Zeitlinger 87-101 (2003)
- イ) 学会発表
直接的に関与する発表はないので省略する。
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

表 1. NTE 遺伝子のPCRおよびSequencing用プライマーの配列

Location	Forward sequences (5' to 3')	Reverse sequences (5' to 3')	product (bp)	temperature (°C)
promoter - intron 1	TCTCTGCTGCTGCGGAAGGTTGAGTC	CCGGTGTGAAAAACACCTGCCGAGACGTG	758	56
exon 1 - intron 2	CGGCCCTCAGTCGGCCCTTCCAAGCATGG	CTACCAGACGCCCGCCTGTCCAAC	1186	58
intron 6	TCCTTCCACTGGAGTATCTGAGC	GACTGCCATTGCAGGACTATTG	547	58
exon 9	GAGATGCCCTGCTCGTTGGAAG	CATCGGCAGCATAACGGATGAACC	337	56
intron 12	TCAGCACCTCAGCTACAGAGC	GACCTGGATTCAAACCTGGAAG	525	58
intron 14	GGCGTTGATTAGTCATGTCTGC	GGCCGACTCATCCTCACAG	572	57
intron 19	AGTGGCAAGAAGGAGCTGGTG	GTGTAGGGAAGCAAGCCCTCG	298	58
intron 21	CGCTTCCCAGGTCTCACTG	CGGCCCTGCCATCATATTG	506	58
intron 21	TCTACATTGTGGTGCCAGA	ACTTTGACCCAGCTGTTGCT	902	59
intron 21	ACTGAGGAGGAAAGCGATCA	GGTTGGTGAGTCCGAGTGTGG	921	59
exon 23 - 24	CTACTCCTTAACAGTGACATCATC	CACAAATGAGGATGCAGTCGGCCTG	474	56
exon 24 -26	ACACCGTATCGTACTCTACCAGAC	GCCAAGCGGGAGAAGTCGCTGTG	711	58
intron 27 - exon 30	ACCTCCTGTCTACTGACCCCTAACC	GGCAGGTAGCCCCGACAGCGTCATGC	1232	58
intron 30	TGGTGAACCCCGTCTCTAC	CTGTGCACATGTGCCTGTGTGTACAC	414	58
exon 31- intron 31	AACGGTCATCGCCATTGACGTGG	TGCTGGGATTAATGCATGA	1016	58
3' flanking region	GGGCGTATTGAGATCCTGT	TCGCAGTGAGCAGAGATCATGCCACTGC	748	58

表 2. NTE 遺伝子におけるSNPs

REGION	SNPs
Promoter	2
Exon	4
Intron	96
3' Flanking	4
	106

表 3. NTE 遺伝子における SNPs の Minor Allele Frequency

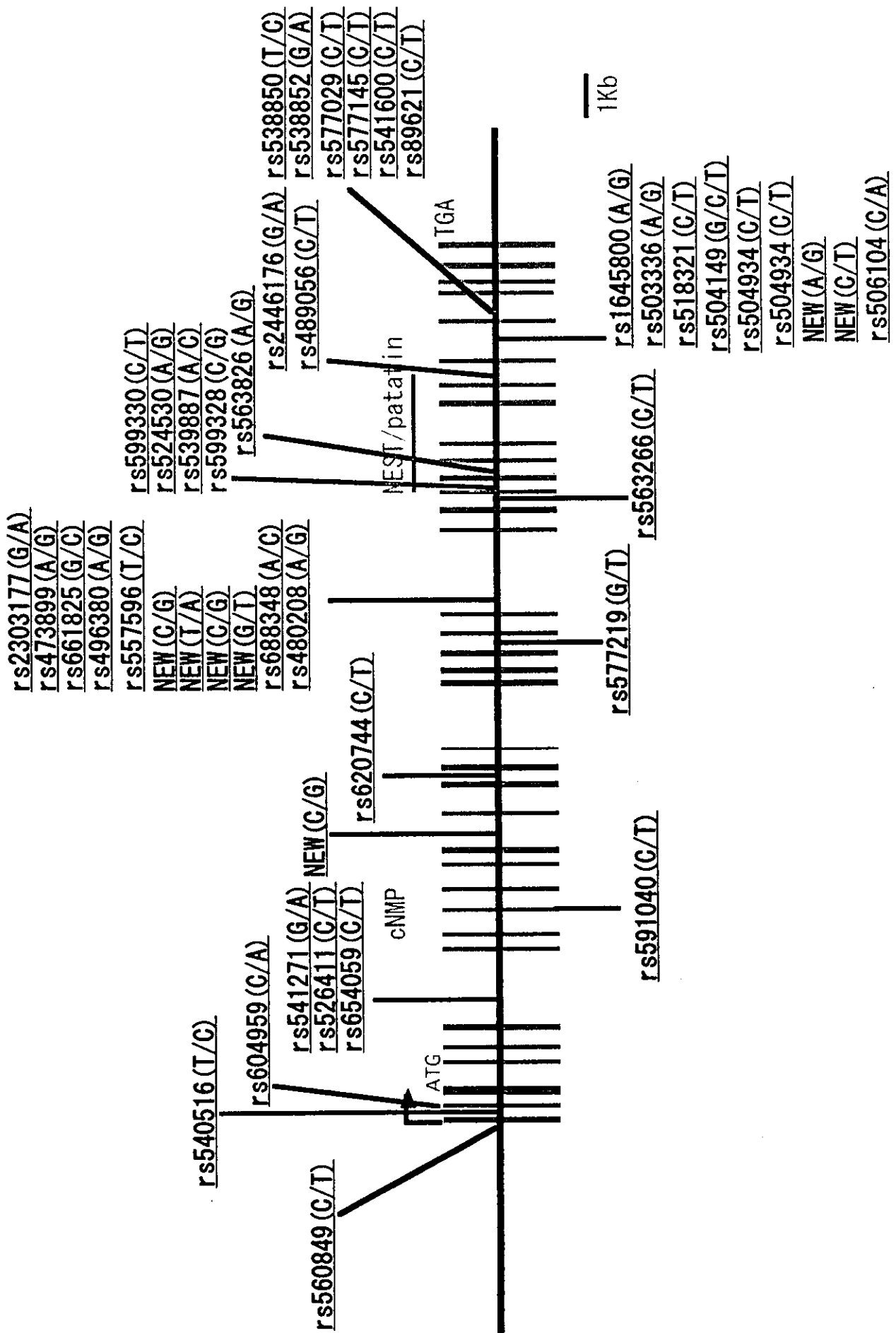
Minor Allele Frequency							Minor Allele Frequency						
No.	dbSNP ID	Major allele	Minor allele	Control	Case	Location	No.	dbSNP ID	Major allele	Minor allele	Control	Case	Location
1	rs686796	G	C	0.00	0.00	promoter	41	rs534758	G	T	0.15	0.20	intron 21
2	rs560849	C	T	0.50	0.25	promoter	42	rs583984	C	T	0.30	0.40	intron 21
3	rs540516	T	C	0.50	0.35	intron 1	43	rs50874	G	A	0.30	0.40	intron 21
4	rs604959	C	A	0.50	0.30	exon 2	44	rs534464	G	C	0.10	0.10	intron 23
5	rs889368	C	G	0.00	0.00	intron 2	45	rs563266	C	T	0.35	0.45	intron 23
6	rs736280	G	T	0.00	0.00	intron 2	46	rs597582	C	T	0.10	0.10	intron 23
7	rs746130	T	C	0.00	0.00	intron 2	47	rs598023	A	G	0.10	0.10	intron 23
8	rs736279	G	T	0.00	0.00	intron 2	48	rs598028	C	G	0.10	0.10	intron 23
9	rs541271	G	A	0.45	0.40	intron 6	49	rs522776	G	A	0.00	0.00	exon 24
10	rs526411	C	T	0.45	0.40	intron 6	50	rs599328	C	G	0.10	0.20	intron 24
11	rs654059	C	T	0.45	0.30	intron 6	51	rs599330	C	T	0.10	0.20	intron 24
12	rs591040	C	T	0.00	0.10	exon 9	52	rs524530	A	G	0.10	0.20	intron 24
13	rs492092	C	G	0.00	0.00	intron 12	53	rs539887	A	C	0.10	0.35	intron 24
14	NEW	C	G	0.40	0.30	intron 12	54	rs563826	A	G	0.40	0.35	intron 25
15	rs2303176	T	G	0.00	0.00	intron 12	55	rs2432261	G	A	0.15	N.D	intron 27
16	rs574930	C	T	0.00	0.00	intron 13	56	rs2446175	A	G	0.15	N.D	intron 27
17	rs620744	C	T	0.40	0.35	intron 14	57	rs485232	C	T	0.00	N.D	intron 27
18	rs577219	G	T	0.30	0.20	intron 19	58	rs489056	C	T	0.30	0.40	intron 29
19	rs473899	A	G	0.30	0.20	intron 21	59	rs2446176	G	A	0.25	0.25	intron 29
20	rs2303177	G	A	0.10	0.20	intron 21	60	rs477246	A	G	0.00	0.00	intron 29
21	rs661825	G	C	0.30	0.20	intron 21	61	rs1645800	A	G	0.40	0.40	intron 30
22	rs496380	A	G	0.30	0.20	intron 21	62	rs503336	G	A	0.40	0.40	intron 30
23	rs557596	T	C	0.30	0.20	intron 21	63	rs518321	C	T	0.40	0.40	intron 30
24	NEW	C	G	0.43	0.49	intron 21	64	rs2446177	A	C	0.00	0.00	intron 30
25	NEW	T	A	0.43	0.48	intron 21	65	rs504149	G	T/C	0.30	0.40	intron 30
26	NEW	C	G	0.41	0.49	intron 21	66	rs504934	C	T	0.41	0.47	intron 30
27	NEW	G	T	0.43	0.49	intron 21	67	rs504934	T	C	0.35	0.40	intron 30
28	rs688348	A	C	0.41	0.48	intron 21	68	NEW	A	G	0.40	0.40	intron 30
29	rs480208	A	G	0.39	0.48	intron 21	69	rs521032	A	G	0.00	0.00	intron 30
30	rs2432110	C	T	0.40	0.50	intron 21	70	NEW	C	T	0.40	0.40	intron 30
31	rs793864	C	G	0.15	0.25	intron 21	71	rs506104	A	C	0.40	0.40	intron 30
32	rs1645799	A	G	0.35	0.40	intron 21	72	rs538850	T	C	0.40	0.40	intron 31
33	NEW	G	C	0.35	0.40	intron 21	73	rs538852	G	A	0.20	0.20	intron 31
34	NEW	A	T	0.35	0.40	intron 21	74	rs577029	C	T	0.40	0.40	intron 31
35	NEW	G	C	0.35	0.40	intron 21	75	rs577145	C	T	0.40	0.40	intron 31
36	NEW	T	G	0.35	0.40	intron 21	76	rs541600	T	C	0.40	0.40	intron 31
37	rs688348	C	A	0.40	0.50	intron 21	77	rs89621	T	C	0.40	0.40	intron 31
38	rs480208	G	A	0.35	0.40	intron 21	78	rs2303178	G	A	0.10	N.D	3' flanking region
39	rs581698	C	G	0.35	0.20	intron 21	79	rs3214471	A	DEL	0.10	N.D	3' flanking region
40	rs582611	G	A	0.35	0.40	intron 21	80	rs516416	A	G	0.00	N.D	3' flanking region
							81	rs517435	A	G	0.00	N.D	3' flanking region

表 4. NTE 遺伝子とシックハウス症候群における相関解析

No.	rs No.	Location	Allele	Patients (2n=178) Controls (2n=244)		(OR 90% CI)	χ^2	P-value
				Allele frequency	Allele frequency			
1	rs560849	Promoter	T/c	0.450	0.550	1.11 (0.75 - 1.63)	0.269	0.604
2	rs540516	intron 1	C/t	0.639	0.361	1.09 (0.73 - 1.62)	0.178	0.673
3	rs604959	exon 2	A/c	0.412	0.381	1.14 (1.68 - 0.77)	0.418	0.518
4	rs541271	intron 6	G/a	0.609	0.598	1.05 (0.70 - 1.56)	0.050	0.823
5	rs526411	intron 6	C/t	0.609	0.586	1.10 (0.74 - 1.64)	0.226	0.635
6	rs654059	intron 6	T/c	0.506	0.488	1.07 (0.73 - 1.59)	0.132	0.716
7	rs591040	exon 9	C/t	0.989	0.980	1.80 (0.35 - 9.17)	0.499	0.480
8	NEW	intron 12	C/g	0.575	0.570	1.02 (0.69 - 1.51)	0.011	0.918
9	rs620744	intron 14	T/c	0.455	0.434	1.08 (0.73 - 1.60)	0.168	0.682
10	rs577219	intron 19	T/g	0.409	0.385	1.10 (0.74 - 1.64)	0.243	0.622
11	NEW	intron 19	AA/a	0.416	0.398	1.08 (0.73 - 1.60)	0.141	0.707
12	rs473899	intron 21	A/g	0.612	0.607	1.02 (0.69 - 1.52)	0.015	0.904
13	rs661825	intron 21	G/c	0.635	0.615	1.09 (0.73 - 1.62)	0.177	0.674
14	rs496380	intron 21	A/g	0.640	0.615	1.12 (0.75 - 1.67)	0.290	0.590
15	rs557596	intron 21	T/c	0.652	0.615	1.17 (0.78 - 1.75)	0.602	0.438
16	NEW	intron 21	C/g	0.489	0.430	1.26 (0.86 - 1.87)	1.402	0.236
17	NEW	intron 21	T/a	0.483	0.430	1.24 (0.84 - 1.82)	1.159	0.282
18	NEW	intron 21	C/g	0.489	0.414	1.35 (0.92 - 2.00)	2.310	0.129
19	NEW	intron 21	G/t	0.489	0.430	1.26 (0.86 - 1.26)	1.402	0.236
20	rs688348	intron 21	A/c	0.477	0.414	1.29 (0.88 - 1.91)	1.664	0.197
21	rs480208	intron 21	A/g	0.477	0.393	1.41 (0.95 - 2.08)	2.934	0.087
22	rs534464	intron 23	G/c	0.756	0.684	1.43 (0.92 - 2.20)	2.570	0.109
23	rs563266	intron 23	C/t	0.456	0.410	1.20 (0.82 - 1.78)	0.884	0.347
24	rs597582	intron 23	C/t	0.756	0.705	1.29 (0.84 - 2.00)	1.336	0.248
25	rs598023	intron 23	A/g	0.753	0.705	1.27 (0.82 - 1.97)	1.184	0.276
26	rs598028	intron 23	C/g	0.756	0.705	1.29 (0.84 - 2.00)	1.336	0.248
27	rs599328	intron 24	C/g	0.764	0.721	1.25 (0.80 - 1.95)	0.975	0.323
28	rs599330	intron 24	C/t	0.730	0.684	1.25 (0.81 - 1.91)	1.041	0.308
29	rs524530	intron 24	A/g	0.775	0.705	1.44 (0.92 - 2.25)	2.614	0.106
30	rs539887	intron 24	C/a	0.303	0.279	1.13 (0.74 - 1.72)	0.305	0.581
31	rs563826	intron 25	G/a	0.299	0.291	1.04 (0.68 - 1.59)	0.030	0.862
32	rs2446176	intron 29	G/a	0.694	0.664	1.15 (0.76 - 1.74)	0.441	0.507
33	rs503336	intron 30	G/a	0.428	0.406	1.09 (0.74 - 1.62)	0.207	0.649
34	rs518321	intron 30	C/t	0.428	0.406	1.09 (0.74 - 1.63)	0.207	0.649
35	rs504149	intron 30	G/T/c	0.473	0.434	1.17 (0.79 - 1.71)	0.611	0.434
36	rs504934	intron 30	C/t	0.466	0.410	1.26 (0.85 - 1.86)	1.336	0.248
37	NEW	intron 30	A/g	0.444	0.402	1.19 (0.81 - 1.76)	0.779	0.377
38	NEW	intron 30	C/t	0.450	0.377	1.35 (0.91 - 2.00)	2.282	0.131
39	rs506104	intron 30	A/c	0.444	0.373	1.35 (0.91 - 1.99)	2.200	0.138
40	rs538850	intron 31	T/c	0.443	0.398	1.21 (0.81 - 1.79)	0.876	0.349
41	rs538852	intron 31	A/g	0.273	0.254	1.10 (0.71 - 1.71)	0.184	0.668
42	rs577029	intron 31	C/t	0.449	0.410	1.18 (0.80 - 1.74)	0.660	0.417
43	rs577145	intron 31	C/t	0.443	0.410	1.15 (0.77 - 1.70)	0.466	0.495
44	rs541600	intron 31	T/c	0.443	0.410	1.15 (0.77 - 1.70)	0.466	0.495
45	rs89621	intron 31	T/c	0.443	0.410	1.15 (0.77 - 1.71)	0.466	0.495

表 5. NTE遺伝子3'flanking領域におけるマイクロサテライト(ATT)を用いた相関解析

Allele	PCR product length	PATIENTS		CONTROLS		χ^2	P-value
		(2n=146)	(2n=202)	(OR 90% CI)	(OR 90% CI)		
Allele 1	285	0.04	0.02	1.69 (0.51 - 5.57)	1.69 (0.51 - 5.57)	0.74	0.390
Allele 2	288	0.14	0.15	0.88 (0.48 - 1.61)	0.88 (0.48 - 1.61)	0.18	0.668
Allele 3	294	0.05	0.06	0.73 (0.29 - 1.88)	0.73 (0.29 - 1.88)	0.42	0.516
Allele 4	297	0.12	0.03	3.67 (8.66 - 1.56)	3.67 (8.66 - 1.56)	8.83	0.003
Allele 5	300	0.10	0.07	1.43 (0.68 - 3.01)	1.43 (0.68 - 3.01)	0.87	0.350
Allele 6	303	0.35	0.42	0.75 (0.49 - 1.17)	0.75 (0.49 - 1.17)	1.58	0.209
Allele 7	306	0.19	0.17	1.17 (0.67 - 2.04)	1.17 (0.67 - 2.04)	0.32	0.572
Allele 8	309	0.01	0.06	0.20 (0.05 - 0.79)	0.20 (0.05 - 0.79)	5.27	0.022



VI. シックハウス症候群は心身医学的に どのような病気か

東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学

久保木富房

熊野 宏昭

吉内 一浩

齊藤麻里子

石澤 哲郎

辻内 優子

千葉大学大学院社会文化研究科

鈴木 勝己

早稲田大学人間科学学術院健康福祉科学科

辻内 琢也

「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明、診断・治療対策
に関する研究」

シックハウス症候群は心身医学的にどのような病気か

分担研究者 久保木富房 東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学教授

研究協力者 熊野宏昭 吉内一浩 齊藤麻里子 石澤哲郎 辻内優子

東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学

鈴木勝己

千葉大学大学院社会文化研究科

辻内琢也

早稲田大学人間科学学術院健康福祉科学科

研究要旨

【目的】本研究の目的は、シックハウス症候群の主要な基礎疾患の一つと考えられている化学物質過敏症（MCS; Multiple Chemical Sensitivity）に関して、心身医学的にどのような病気であることを明らかにすることである。その方法は、Ecological Momentary Assessment（EMA）による日常生活での自覚症状・化学物質負荷・体動・心拍変動の数量的研究と、「質的研究」による患者自身の「MCSという病い」の体験の心理・社会・文化的側面からの解析による。

【方法】EMAによる数量的研究：本年度は、心拍変動の解析を Smoothed Pseudo-Wigner-Ville distribution（SPWVD）法と Coarse Graining Spectral Analysis（CGSA, 粗視化スペクトル解析）法の2つによって行い、症状出現時の自律神経系の特徴と、症状非出現時の心拍の長期相関（ホメオスタシス維持傾向）の特徴を検討した。グラウンデッド・セオリー・アプローチによる質的研究（計画段階）：EMA研究に参加した14名を対象に、聞き取り調査の同意が得られたもの10名～20名を対象にし、1対1による直接面接法で半構造的インタビュー方式による聞き取り調査を行なう。

【結果】SPWVD法による解析：症状非自覚時では、患者群とコントロール群の間で有意差を認めた項目はなかった。症状自覚時では非自覚時と比べて、呼吸数が低下し、交感神経系も副交感神経系もともに賦活されたが、特に後者の賦活が大きかった。CGSA法による解析：LF、HFなどの周期成分で、患者群とコントロール群の間で有意差を認めたものはなかった。その一方で、フラクタル指数 β は、日中、夜間を通して患者群の方で大きな値となっていた。

【結論】SPWVD法により「多様な症状が、低濃度の多様な化学物質に反応して多臓器に起こり、化学物質を回避することによって症状が消失する」という本病態の定義が、自律神経の面からも確認された。一方、CGSA法による解析からは、長期的に見て心拍のホメオスタシスを維持する力が弱いことが示唆された。来年度は、さらに体動、心拍変動データの例数を増やすと同時に、質的研究も進め、本研究全体の総括ができるようにしたい。

A. 本研究の目的

本研究全体の目的は、シックハウス症候群の主要な基礎疾患の一つと考えられている化学物質過敏症（MCS; Multiple Chemical Sensitivity）に関して、心身医学的にどのような病気であるかを明らかにすることである。その方法は、Ecological Momentary Assessment（EMA）による日常生活での自覚症状・化学物質負荷・体動パターン・心拍変動の量的解析と、「質的研究」による患者自身の「MCSという病い」の体験の心理・社会・文化的側面からの解析による。本年度は、2種類の方法によって心拍変動の解析を進め、質的研究の具体的な準備を進めた。

【EMAによる数量的研究】

B. 研究目的

MCSは1987年にCullenによって以下のように定義された[1]。

- ①同定できる環境暴露に関連した獲得性の障害として発症する。
 - ②症状は複数の臓器に関係する。
 - ③症状は問題の刺激物質に反応して増減する。
 - ④症状は多様な化学物質によっておこる。
 - ⑤検出しうる暴露により症状がおこる。
 - ⑥症状は、通常ではおこらない極めて低濃度の化学物質暴露でおこる。
 - ⑦通常の身体機能検査では症状を説明できない。
- さらに、現在では以下の1999年のコンセンサスクライテリアが広く用いられている[2]。
- ①症状は、繰り返す化学物質への暴露により再現される。

②慢性的な病態である

③症状は、以前は問題なかったか通常であれば問題を起ささない極めて低濃度の化学物質暴露でおこる。

④刺激物質が除去されると、症状は改善するか消失する。

⑤反応は多様な化学物質によっておこる。

⑥症状は複数の臓器に関係する。

MCS患者の臨床的な特徴は、QEESIなどの質問紙か[3]臨床面接によってなされるが、その際に得られる情報は、患者の回顧的な自己報告に完全に依存している。しかし、人間の記憶能力には限界があり、時間が経つとエピソード記憶は急速に薄れてしまう[4,5]。MCS患者において、「多様な症状が、低濃度の多様な化学物質に反応して多臓器に起こり、化学物質を回避することによって症状が消失する」という本病態の定義を、実生活中で確認した報告はこれまでにない。さらに、QEESIには気分の障害を評価する項目が含まれており、精神疾患も高率に合併することが報告されているにも関わらず[6,7]、われわれのこれまでの研究によれば、クリーンルーム内では身体症状に比して精神症状の訴えが少ないという結果が得られている[8]。このことは、実生活の中で自覚される症状と化学物質の負荷がない条件で回顧的に報告される症状との間に解離があることを示している可能性がある。したがって、MCS患者が、いつ、どこで、どの程度、身体症状のみならず精神症状も自覚しているのかを明らかにする必要がある。通常の質問紙（紙と鉛筆を用いたもの）が、日常生活での症状を記録するためにも利用さ

れているが、実際のコンプライアンスという観点からは（受診前にまとめて記入する被験者がいるなど）大きな問題がある[9]。近年、小型コンピュータを用いた EMA が開発され、様々な現象を実生活の中でそれが起こった瞬間に捉え、生態学的な妥当性を最大化し、回顧的想起やコンプライアンスの問題を避けることを可能にした[10]。しかし、コンピュータ化した EMA を用いて MCS 患者の評価を行なった報告はこれまでにはなされていない。

化学物質の負荷テストが、患者が実際に微量の化学物質に反応して症状を出しているかどうかを検討するために使われてきた[10-12]。しかし、この方法では、日常生活中で問題になりうる多くの化学物質のうちごく限られたものしか検討の対象にできず、負荷テストの結果症状発現の原因とされた化学物質が、実生活の中でも症状を引き起こす主要な物質になっているかどうかは確定できない。この問題を解決するために、篠原らはアクティブサンプリングとパッシブサンプリングを組み合わせて、過敏症症状を引き起こす室内環境中のカルボニル化合物と揮発性化合物を特定しその濃度を測定するための AS-PS 法を開発した。MCS 患者は 1 週間連続でサンプラーを携帯し、パッシブサンプリングは連続的に、アクティブサンプリングは症状があるときのみ実施することにより、症状が出現した際に濃度が高くなっている化学物質を特定することが可能になる。

上記の 2 方法を組み合わせることで、「多様な症状が、低濃度の多様な化学物質に反応して多臓器に起こり、化学物質を回避するこ

とによって症状が消失する」という本病態の定義を確認することは可能であるが、それでも、条件付けによって出現する病態との区別は困難である。すなわち、ある化学物質が存在する特定の環境下で化学物質以外の原因で体調が悪くなることを繰り返した場合、その環境に対する条件付けが成立し同一環境下で症状が誘発されるようになる可能性がある。そしてその場合は、ガスサンプリング法でも特定の化学物質の関与が示されることになる。この病態を区別するためには、二重盲見法による負荷試験によって化学物質の関与が認められないことを示せばよいが、上記のとおり負荷試験で全ての候補物質に関して検討することは不可能である。そこで、自覚症状以外に本病態に特徴的な他覚所見の存在を確認することが重要になる。

そこで、EMA を用いた本研究は、以下を検討課題として実施した。

①AS-PS 法（Active サンプリングと Passive サンプリングを用いて、症状出現時と非出現時の差異を明らかにする方法[13]）で、自覚症状の出現に、どのような化学物質が関与しているかを検討する。

⇒化学物質が関与していない症例を除外できる。

②携帯型コンピュータによる電子日記によって、症状出現のパターンを明らかにする。

⇒化学物質の負荷のある状況でのみ症状が出現していれば、化学物質か条件付けが引き起こす病態であると判断できる。

③体動、心拍変動などの解析で、症状非出現時の身体、行動面の異常を検討する。

⇒条件付けによる病態とする主張の反証となる。

そして、昨年度までの研究結果で、以下のことが明らかになった。

①対象患者 14 名中 12 名が記録期間中に自覚症状を認めたが、そのうち 1 名を除き、AS-PS 法で候補物質が特定できた。

②症状自覚時には、腹痛、皮膚のかゆみ・異常を除いた全身体・精神自覚症状項目で、有意に得点が高くなっていた。その一方で、症状非自覚時には、コントロール群との間に有意差を認める項目は無かった。一方、認知機能には、異常は認めなかった。

③体動では、日中体動が持続しない一方で、睡眠中はだらだら動いており、急に動きを止めてまた急に動き出すといった特徴を持つことが窺われた。

そこで、本年度は、心拍変動の面からも、この病態に特徴的な所見が認められるかどうかを検討することを目的とし、以下の 2 種類の解析を実施した。

① 時間 - 周波数解析 : Smoothed Pseudo-Wigner-Ville distribution (SPWVD) 法による解析

⇒FFT などでは解析できない心拍変動の短時間での変化を、細かい周波数帯域毎に解析できるため、症状出現時の自律神経系の変化を検討可能。

②フラクタル成分を求める解析 : Coarse Graining Spectral Analysis (CGSA, 粗視化スペクトル解析) 法による解析

⇒心拍変動の周波数分析結果から、呼吸や血圧の変動に関連する周期的成分を除い

た非周期的成分を求める。長期相関 (フラクタル指数) による検討が可能であり、症状非出現時の特徴を解析できる。

C. 研究方法

1. 対象 (Table 1)

〔患者群〕

北里研究所病院臨床環境センターのアレルギー科化学物質過敏症外来を受診し、石川らの診断基準[16]と 1999 年コンセンサスによって、化学物質過敏症と診断された患者 18 名に測定を導入したが、4 人を以下の理由で除外した。1 名は EMA の操作に対するコンプライアンスが悪く、1 名は期間中感冒に罹患、1 名は期間中うつ状態が悪化、そして 1 名が機材の臭いに耐えられなかった。14 名中 11 名は新しい住居やオフィスに引っ越すなど、症状出現の契機となった化学物質への暴露歴が特定できたが、3 名は明確なものではなかった。Fiedler らに倣うと、前者は MCS、後者は CS (Chemical Sensitivity) と区別される (Table 2)。

〔コントロール群〕

雑誌の広告によって、新改築 3 年以内かつ自覚症状のない健常者を募集し、本研究への参加を了承した 12 名をコントロール群とした。

〔倫理面への配慮〕

本研究の実施に際しては、北里研究所病院倫理委員会の承認を得、参加者本人からはインフォームドコンセントを得た。すなわち、本研究の参加に先立ち、研究担当医師が研究参加への同意を説明文付きの同意書を用いて得た。説明項目は、以下のものであった。