

lovew/) によって行った (文献3)。

#### 7) NTE 酵素活性の測定

ヒト末梢血 10ml より室温で 8 時間以内にリンパ球を分画した。NTE 活性は、0.8mM Paraoxon の存在下および 0.8mM Paraoxon、0.2mM mipafox の存在下における 5.3mM Phenyl valerate の加水分解の割合によって算出された。

#### 8) 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、ハプロタイプ頻度、NTE 酵素活性を算出し、両集団間の各頻度についての有意差検定は  $\chi^2$  検定およびフィッシャーの Probability 検定により解析を行った。

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。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。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。

さらに、Minor allele frequency が 0.2 以上の 55 個の SNP うち、53 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 53 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 53 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 60 名および健常者集団 152 名を用いた相関解析を行った。その結果、エクソン 2 における非翻訳領域に存在する遺伝マーカー (rs604959) において、統計学的有意差を示す対立遺伝子が見出された (表 1 図 1、 $P=0.037$ )。同様に、遺伝子型頻度についても有意差検定を行った結果、上記の対立遺伝子頻度において有意差の得られた遺伝マーカーに加えて、プロモーター領域 (rs560849)、イントロン 1 領域 (rs540516) において統計学的有意差を示す遺伝子型が見出された (表 2)。これら 3 個の遺伝マーカーの遺伝子型頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、遺伝マーカー (rs604959) においてのみ統計学的有意差が得られた (表 2、 $P=0.019$ )。

### 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 151 人とシックハウス症候群患者 59 人におけるタイピングの結果、7 個の対立遺伝子が存在していた。このうち 2 個の対立遺伝子 (allele 3 および 4) 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 (表 3)。これら 2 個の対立遺伝子頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、一方の対立遺伝子においてのみ統計学的有意差が得られた (表 3、 $P_c=0.040$ )。

#### 6. ハプロタイプ解析

上記の遺伝学的相関解析に使用した 53 個の遺伝マーカー間の連鎖不平衡値  $D'$  を解析ソフトウェア「Haploview」によって算出し、 $D' > 0.94$  を満たすハプロタイプを推定した。その結果、53 個の遺伝マーカーは 9 個のハプロタイプブロックに分けられた (図 2)。9 個のハプロタイプブロックそれぞれについて、ハプロタイプ頻度を推定し、有意差検定を行った。その結果、ハプロタイプブロック 1 および 3 において、統計学有意差が示された (図 2、表 4)。ハプロタイプブロック 1 においては、遺伝子型頻度についての有意差検定において相関の得られたイントロン 1 (rs540516) およびエクソン 2 (rs604959) が含まれているが、さらにプロモーター領域 (rs560849) 遺伝マーカーを加えた 3 個の遺伝マーカーについ

て TCA, CTC, CCA, TCC の 4 個のハプロタイプが推定された (表 5)。これらのハプロタイプのうち、ハプロタイプ TCC の頻度については、シックハウス症候群患者集団において有意に増加していた ( $P=0.000004$ )。さらに、プロモーター領域 (rs560849 およびイントロン 1 (rs540516) における 2 個の遺伝マーカーについてハプロタイプの推定を行った結果、3 個のハプロタイプ (TC, CT, CC) が推定されたが、その頻度については患者群および健常者群において統計学的有意差を示すハプロタイプは見られなかった (表 5)。また、イントロン 1 (rs540516) およびエクソン 2 (rs604959) における 2 個の遺伝マーカーについてハプロタイプの推定を行った結果、3 個のハプロタイプ (TA, TC, CC) が推定された。これらのハプロタイプ頻度について患者群および健常者群において有意差検定を行った結果、ハプロタイプ CC において統計学的有意差が見られた ( $P=0.000003$ 、表 5)。

#### 7. NTE 酵素活性

シックハウス症候群患者 9 名および健常者 10 名を用いて、末梢血から分画したリンパ球における NTE 酵素活性を測定した。両群間の酵素活性について有意差検定を行った結果、患者集団において統計学的有意に酵素活性が上昇していた ( $P=0.0005$ 、図 3)。

#### 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、遺伝的多型部位の数を増やし遺伝学的相関解析を行った。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。

本年度は、ヒト *NTE* 遺伝子領域において合計 53 個の遺伝マーカーに関して、シックハウス症候群患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度さらにハプロタイプ頻度に関する有意差検定を行った。その結果、対立遺伝子頻度に関しては、エクソン 2 の非翻訳領域に存在する遺伝マーカー (rs604959) においてシックハウス症候群との相関が見られ、さらに、この遺伝マーカーに加えて、これより上流に存在する 2 つの遺伝マーカー (rs560849、rs540516) の 3 個の遺伝マーカーともに遺伝子型頻度についてシックハウス症候群と相関が見られた。さらに、この 3 個の遺伝マーカーを含むハイプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ TCC が健常者集団において 0.3%のみであるのに対してシックハウス症候群患者集団では 8.3%と有意にその頻度が増加

していた。このことから、*NTE* 遺伝子の 5' 上流領域に存在するハプロタイプ TCC がシックハウス症候群の感受性ハプロタイプであると考えられる。本結果は、現在までに全く報告されておらず、シックハウス症候群の遺伝的関与を明らかにした最初の研究である。

また、シックハウス症候群患者集団および健常者集団も用いたヒトリンパ球における *NTE* 酵素の活性解析についても、*NTE* 酵素はシックハウス症候群患者集団において有意にその活性が上昇していた。上記ハプロタイプ解析により同定されたシックハウス症候群感受性ハプロタイプが *NTE* 遺伝子のプロモーター領域に位置していることからこの *NTE* 酵素活性の上昇が *NTE* 遺伝子の遺伝的多型による可能性が考えられる。

一般に *NTE* タンパク質は、生体内において有機リンと結合し、エステルを生成する。このエステルは有毒であるが、炭水素基を解離しエステラーゼ活性を有する「Aged Esterase」に変化し、次なるエステル化反応を行う。シックハウス症候群患者においては、*NTE* 活性が上昇していることから、この有機リン代謝経路の中間生成物である有毒なエステルの生成量が健常者に比べて増加し、慢性的な神経毒性が表われる可能性があることが考えられる。

## 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 55 箇所うち 53 箇所について、相関解析を行った結果、患者集団において統計学的有意差を示す遺伝マーカーをエクソン 2 領域に見い出した。また、この遺伝マーカーに加えて、上流に存在する 2 個の遺伝マーカーの合計 3 個の遺伝マーカーについては、遺伝子型頻度についても統計学的有意差が見られた。さらに、この 3 個の遺伝マーカーを含むハプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ TCC がシックハウス症候群患者集団において、統計学的に有意にその頻度が上昇していた。
2. ヒトリンパ球を用いた *NTE* 活性の測定系を確立した。さらに、一般健常者集団に比べて、シックハウス症候群患者集団における *NTE* 活性が有意に上昇していた。

## 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.

3. Barrett JC et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265,2005.

## 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 class I-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 . PCR oligonucleotide primers used for sequencing analysis of the human NTE gene

Location	Forward sequences (5' to 3')	Reverse sequences (5' to 3')	Sequencing primers (5' to 3')	PCR product (bp)	annealing temperature ( °C)
promoter - intron 1	TCTCTGCTGCTGCGGAAGGTTGGAGTC	CCGGTGTGAAACACCTGCCGAGACGTG		758	56
exon 1 - intron 2	CGGCCTCAGTGGCCCTCCAAGCATGG	CTACCAGACGCCCGCCTGTCCAAC	GTATTGTAATCCTCAGAATCTCAGTAAC	1186	58
intron 6	TCCTTCCACTGGAGTATCTGAGC	GACTGCCATTGCAGGACTATTG		547	58
exon 9	GAGATGCCCTGCTCGTTGGGAAAG	CATCGGCAGCATACGGATGAACC		337	56
intron 12	TCAGCACCTCAGCTACAGACG	GACCTGGATTCAAACCTGGAAG		525	58
intron 14	GGCGTTGATTAGTCATGTCTGC	GGCCGACTCATCTCACAG		572	57
intron 19	AGTGGCAAGAGGAGCTGGTG	GTGTAGGGAAGCAAGCCTCG		298	58
intron 21	CGCTTCCAGGTTCTCACTG	CGGCCCTGCCATCATATTC		506	58
intron 21	TCTACATTGTGGTGGCCAGA	ACTTTGACCCAGCTGTTGCT		902	59
intron 21	ACTGAGGAGGAAAGCGATCA	GGTTGGTGAGTCCGAGTGTTGG		921	59
intron 23 - exon 24	CTACTCCTAACAGTGACATCATC	CACAATGAGGATGCAGTCGGCCTG		474	56
exon 24 - intron 25	ACACCGTATCGTACTCTACCAGAC	GCCAAAGCGGAGAAAGTCGCTGTG		711	58
intron 27 - exon 30	ACCTCCTGTCTACTGACCCCTAACC	GGCAGGTAGCCCGACAGCCGTCATGC		1232	58
intron 29 - intron 30	CGTTAAACAACGTCCCAGGTC	CTGTGCACATGTGCCCTGTGTGTACACGTG	AGGCTGGAGTGCAGTAGCAT	949	63
exon 31 - intron 31	AACGGTCATCGCCATTGACGTTGG	TGCTGGGATTAATGCATGA		1016	58



表2. Allelic association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome.

No.	rs No.	Location	Allele	Allele frequency		OR (90% CI)	$\chi^2$	P-value
				Patients (2n=120)	Controls (2n=304)			
1	rs560849	Promoter	T/c	0.500	0.447	1.24 (0.81 - 1.89)	0.947	0.330
2	rs540516	intron 1	C/t	0.407	0.362	1.21 (0.78 - 1.87)	0.733	0.392
3	rs604959	exon 2	A/c	0.475	0.365	1.57 (1.03 - 2.41)	4.341	0.037
4	rs541271	intron 6	G/a	0.418	0.388	1.13 (0.74 - 1.74)	0.325	0.569
5	rs526411	intron 6	C/t	0.418	0.398	1.09 (0.71 - 1.66)	0.145	0.704
6	rs654059	intron 6	T/c	0.508	0.497	1.05 (0.69 - 1.59)	0.046	0.830
7	rs591040	exon 9	C/t	0.017	0.016	1.05 (0.20 - 5.48)	0.003	0.955
8	rs492092	intron 12	C/g	0.598	0.566	1.14 (0.75 - 1.75)	0.378	0.539
9	rs620744	intron 14	C/t	0.451	0.438	1.06 (0.69 - 1.61)	0.063	0.802
10	rs577219	intron 19	G/t	0.415	0.382	1.15 (0.75 - 1.77)	0.405	0.525
11	NEW	intron 19	DEL/a	0.415	0.395	1.09 (0.71 - 1.68)	0.149	0.699
12	rs473899	intron 21	A/g	0.393	0.385	1.04 (0.67 - 1.59)	0.027	0.870
13	rs661825	intron 21	G/c	0.631	0.625	1.03 (0.66 - 1.59)	0.014	0.906
14	rs496380	intron 21	A/g	0.639	0.625	1.06 (0.69 - 1.65)	0.077	0.782
15	rs557596	intron 21	T/c	0.648	0.628	1.09 (0.70 - 1.68)	0.139	0.709
16	rs2432110	intron 21	T/c	0.458	0.410	1.21 (0.79 - 1.86)	0.787	0.375
17	rs793864	intron 21	C/g	0.754	0.679	1.45 (0.90 - 2.35)	2.299	0.129
18	rs1645799	intron 21	G/a	0.492	0.443	1.21 (0.79 - 1.86)	0.793	0.373
19	NEW	intron 21	C/g	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
20	NEW	intron 21	T/a	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
21	NEW	intron 21	C/g	0.508	0.424	1.40 (0.92 - 2.14)	2.454	0.117
22	NEW	intron 21	G/t	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
23	rs688348	intron 21	A/c	0.492	0.424	1.31 (0.86 - 2.00)	1.580	0.209
24	rs480208	intron 21	A/g	0.492	0.408	1.40 (0.92 - 2.15)	2.461	0.117
25	rs581698	intron 21	G/c	0.517	0.434	1.39 (0.91 - 2.13)	2.345	0.126
26	rs582611	intron 21	A/g	0.500	0.433	1.31 (0.85 - 2.01)	1.519	0.218
27	rs534758	intron 21	G/t	0.750	0.733	1.09 (0.67 - 1.78)	0.120	0.729
28	rs583984	intron 21	T/c	0.491	0.447	1.20 (0.78 - 1.84)	0.673	0.412
29	rs50874	intron 21	A/g	0.509	0.470	1.17 (0.76 - 1.80)	0.508	0.476
30	rs534464	intron 23	G/c	0.742	0.704	1.21 (0.75 - 1.94)	0.600	0.438
31	rs563266	intron 23	T/c	0.458	0.421	1.16 (0.76 - 1.78)	0.487	0.485
32	rs597582	intron 23	C/t	0.742	0.720	1.11 (0.69 - 1.80)	0.196	0.658
33	rs598023	intron 23	A/g	0.737	0.720	1.09 (0.67 - 1.76)	0.122	0.727
34	rs598028	intron 23	C/g	0.742	0.720	1.11 (0.69 - 1.80)	0.196	0.658
35	rs599328	intron 24	C/g	0.742	0.737	1.03 (0.63 - 1.66)	0.010	0.919
36	rs599330	intron 24	C/t	0.708	0.701	1.04 (0.65 - 1.65)	0.024	0.876
37	rs524530	intron 24	A/g	0.750	0.701	1.28 (0.79 - 2.07)	1.027	0.311
38	rs539887	intron 24	A/c	0.717	0.714	1.01 (0.63 - 1.62)	0.003	0.953
39	rs563826	intron 25	A/g	0.717	0.704	1.06 (0.67 - 1.70)	0.067	0.795
40	rs2446176	intron 29	G/a	0.690	0.671	1.09 (0.69 - 1.73)	0.133	0.716
41	rs1645800	intron 30	G/a	0.456	0.418	1.17 (0.76 - 1.80)	0.499	0.480
42	rs503336	intron 30	A/g	0.442	0.418	1.10 (0.72 - 1.69)	0.201	0.654
43	rs518321	intron 30	T/c	0.442	0.418	1.10 (0.72 - 1.69)	0.201	0.654
44	rs504149	intron 30	T/G/c	0.500	0.441	1.27 (0.83 - 1.94)	1.215	0.270
45	rs504934	intron 30	C/t	0.474	0.421	1.24 (0.81 - 1.90)	0.962	0.327
46	rs7245592	intron 30	G/a	0.432	0.414	1.08 (0.70 - 1.65)	0.110	0.740
47	NEW	intron 30	T/c	0.432	0.398	1.15 (0.75 - 1.77)	0.411	0.521
48	rs506104	intron 30	C/a	0.432	0.391	1.18 (0.77 - 1.82)	0.587	0.444
49	rs538850	intron 31	C/t	0.448	0.408	1.18 (0.77 - 1.82)	0.562	0.453
50	rs538852	intron 31	G/a	0.741	0.737	1.02 (0.63 - 1.67)	0.009	0.925
51	rs577029	intron 31	T/c	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
52	rs577145	intron 31	T/c	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
53	rs541600	intron 31	C/t	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
54	rs89621	intron 31	C/t	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572

表3. Genotype association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome.

No.	rs No.	Location	Genotype	Genotype frequency		OR (90% CI)	$\chi^2$	P-value	Pc-value
				Patients (2n=120)	Controls (2n=304)				
1	rs560849	Promoter	C/C	0.305	0.151	2.46 (1.23 - 4.94)	6.419	0.011	0.068
			C/T	0.390	0.592	0.44 (0.24 - 0.81)	6.991	0.008	0.049
			T/T	0.305	0.257	1.27 (0.66 - 2.47)	0.507	0.476	1.000
2	rs540516	intron 1	C/C	0.390	0.375	1.06 (0.57 - 1.97)	0.040	0.842	1.000
			C/T	0.407	0.526	0.62 (0.34 - 1.13)	2.430	0.119	0.714
			T/T	0.203	0.099	2.33 (1.04 - 5.25)	4.176	0.041	0.246
3	rs604959	exon 2	A/A	0.317	0.375	0.77 (0.41 - 1.46)	0.637	0.425	1.000
			A/C	0.417	0.520	0.66 (0.36 - 1.21)	1.829	0.176	1.000
			C/C	0.267	0.105	3.09 (1.46 - 6.53)	8.744	0.003	0.019

表4. Allele frequencies of ATT repeat polymorphism of the NTE gene in patients with Sick house syndrome and controls

Allele	PCR product		PATIENTS (2n=118)		CONTROLS (2n=302)		OR ( 90% CI)	$\chi^2$	P -value	Pc
	length	Repeat								
Allele 1	286	10	0.17	0.18	0.94 (0.53 - 1.65)	0.05	0.822	1.000		
Allele 2	292	12	0.07	0.06	1.22 (0.51 - 2.90)	0.20	0.654	1.000		
Allele 3	295	13	0.13	0.06	2.44 (1.20 - 4.97)	6.05	0.014	0.084		
Allele 4	298	14	0.14	0.06	2.63 (1.31 - 5.28)	7.37	0.007	0.040		
Allele 5	301	15	0.34	0.42	0.70 (0.45 - 1.09)	2.55	0.111	0.664		
Allele 6	304	16	0.16	0.17	0.92 (0.52 - 1.64)	0.08	0.784	1.000		
Allele 7	307	17	0.00	0.06	-	-	-	-		

表5. Haplotype association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome.

Block	No.	Haplotype	Haplotype frequency		$\chi^2$	P-value	Pc-value
			Patients (2n=120)	Controls (2n=304)			
		2-3					
1	1	CA	0.508	0.639	6.12	0.013	0.080
	2	TC	0.392	0.357	0.43	0.512	1.000
	3	CC	0.083	0.003	21.53	0.000003	0.000021
		4-5-6					
2	1	GCT	0.483	0.500	0.098	0.755	1.000
	2	ATC	0.424	0.388	0.449	0.503	1.000
	3	GCC	0.093	0.102	0.073	0.788	1.000
		7-8					
3	1	CC	0.534	0.562	0.281	0.596	1.000
	2	GT	0.398	0.434	0.448	0.503	1.000
	3	CT	0.059	0.003	14.308	0.0002	0.004
		10-13					
4	1	AGGA	0.450	0.411	0.529	0.467	1.000
	2	GGCG	0.358	0.372	0.066	0.797	1.000
	3	AAGA	0.133	0.197	2.398	0.122	1.000
	4	GGGA	0.042	0.013	3.357	0.067	1.000
		14-25					
5	1	TCCAGAGTCCG	0.431	0.354	2.154	0.142	1.000
	2	CTGGCTCGAGA	0.226	0.242	0.121	0.728	1.000
	3	TTCGCTCGAGA	0.108	0.146	1.027	0.311	1.000
	4	CTCGCTCGAGA	0.112	0.087	0.609	0.435	1.000
	5	TTGGCTCGAGA	0.020	0.044	1.393	0.238	1.000
	6	TTCAGAGTCCG	0.034	0.017	1.206	0.272	1.000
		26-27					
6	1	GC	0.491	0.446	0.693	0.405	1.000
	2	GT	0.259	0.284	0.264	0.608	1.000
	3	TT	0.250	0.270	0.176	0.675	1.000
		28-43					
7	1	GGCCACCCAAAAGCT	0.396	0.389	0.021	0.885	1.000
	2	ACTTGGGTGAAGATC	0.198	0.245	1.063	0.303	1.000
	3	AGTCACCCACGGATC	0.203	0.232	0.407	0.524	1.000
	4	GGTCACCCACGGATC	0.041	0.027	0.602	0.438	1.000
	5	ACTTGGCTGAAGATC	0.017	0.013	0.081	0.776	1.000
		44-46					
8	1	GTC	0.559	0.579	0.134	0.715	1.000
	2	ACA	0.415	0.391	0.201	0.654	1.000
	3	ATC	0.009	0.023	0.964	0.326	1.000
		47-52					
9	1	TGCCTT	0.448	0.408	0.562	0.453	1.000
	2	CGTTCC	0.293	0.319	0.264	0.607	1.000
	3	CATTCC	0.259	0.263	0.009	0.925	1.000

表6. Haplotype association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome.

No.	Haplotype	Haplotype frequency		$\chi^2$	P-value	Pc-value
		Patients (2n=120)	Controls (2n=304)			
1-2-3						
1	TCA	0.417	0.553	6.38	0.012	0.108
2	CTC	0.392	0.357	0.43	0.512	1.000
3	CCA	0.092	0.086	0.03	0.855	1.000
4	TCC	0.083	0.003	21.52	0.000004	0.000036
1-2						
1	TC	0.500	0.556	1.10	0.295	1.000
2	CT	0.408	0.358	0.95	0.331	1.000
3	CC	0.092	0.086	0.03	0.855	1.000
2-3						
1	CA	0.508	0.639	6.12	0.013	0.080
2	TC	0.392	0.357	0.43	0.512	1.000
3	CC	0.083	0.003	21.53	0.000003	0.000021

图 1

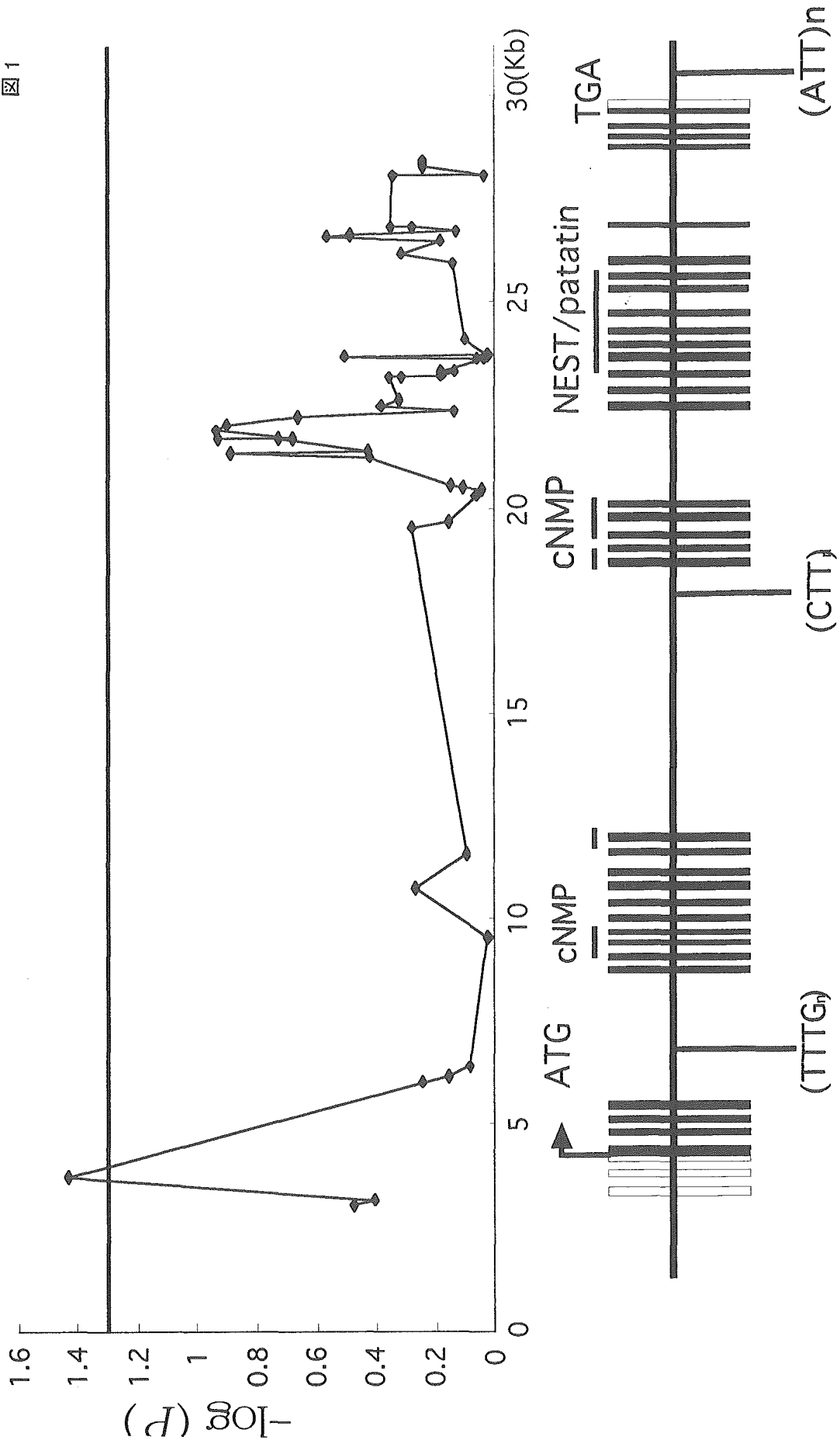
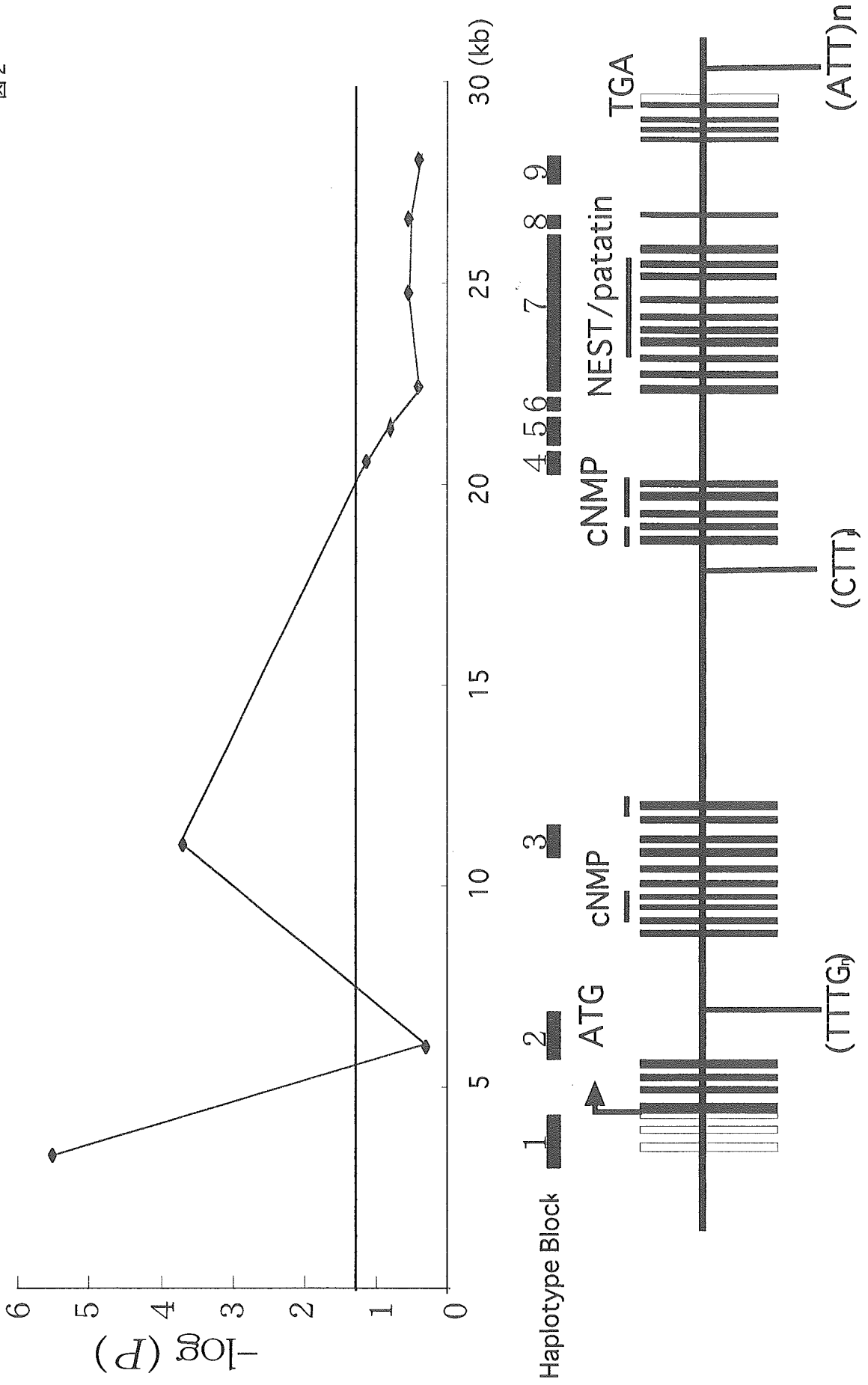
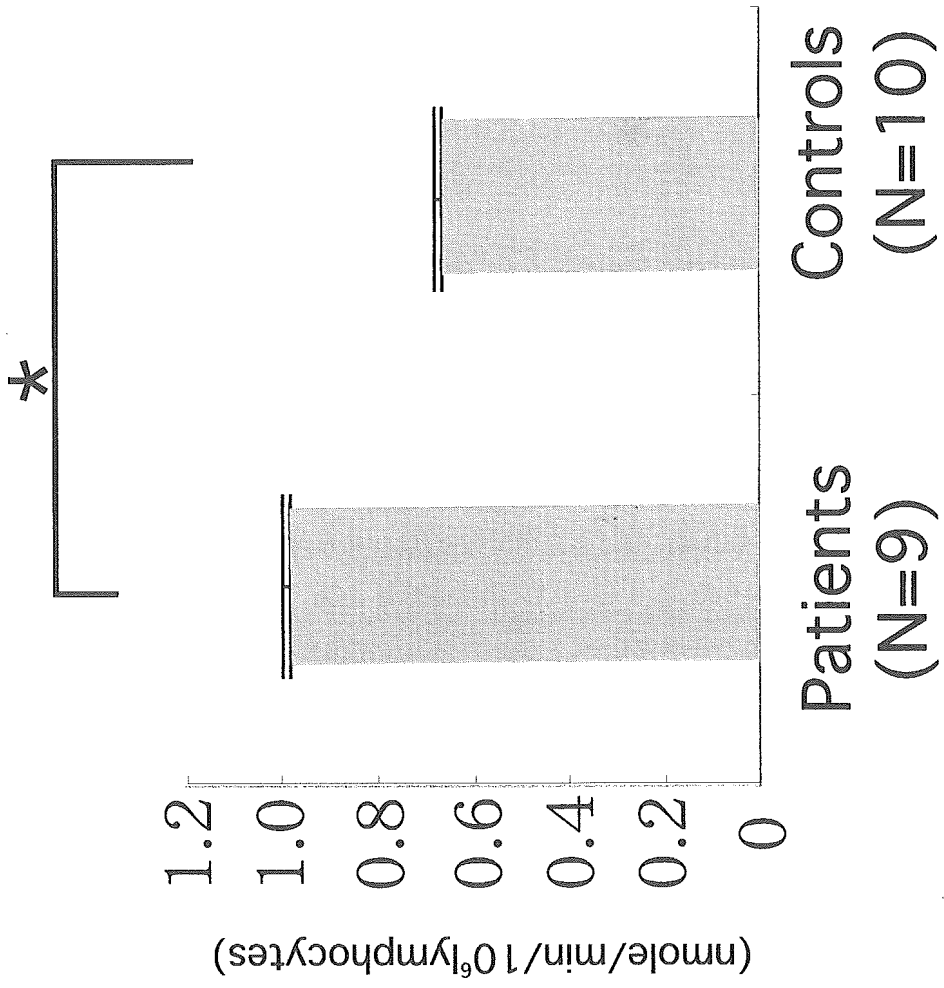


图 2





\* : P=0.0005



「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明、診断治療に関する研究」

分担研究報告書

シックハウス症候群の眼血流動態に関する研究

（分担研究者）吉田晃敏 （旭川医科大学眼科学講座・教授）

（研究協力者）長岡泰司 （ 同 ・助手）

（研究協力者）佐藤栄一 （ 同 ・医員）

（研究協力者）高橋淳士 （ 同 ・医員）

研究要旨

眼球への血液循環、眼循環の分布をみると、その90%は脈絡膜への循環、残りの10%が網膜への循環である。眼循環異常で起こる眼所見は、血管の形態異常、網膜出血、硬性白斑、軟性白斑、毛細血管の閉塞、網膜血管新生など多彩である。

シックハウス症候群患者の眼科的所見として、充血、眼刺激症状、結膜炎などに加え、視力低下などが報告されているが、病因は未だ未解明である。そこで我々は、平成16年度研究において、シックハウス症候群患者における眼循環動態、特に網膜循環と中心窩脈絡膜循環を評価し、眼循環障害の関与を検討した。シックハウス症候群患者では、正常者に比べ中心窩脈絡膜血流量が有意に低下していることを報告した。《シックハウス症候群の眼血流動態 長岡泰司、佐藤栄一、高橋淳士、吉田晃敏 臨床環境医学 13 巻 1 号 Page51-54 (2004.06)》。網膜血流量には、正常者との有意な差はみられなかったが、本年度は、網膜動脈における収縮期/拡張期血流速度比を行い、健常者と比較検討した。また、平成16年度研究においてシックハウス症候群の主要な原因物質の一つであるホルムアルデヒドの高濃度曝露の眼循環への影響を調べるため、医学部学生における人体解剖学実習時の眼循環変化を検討した。Heidelberg Retina Flowmeter (HRF)を用いて解剖実習前後では網膜組織血流量は有意な変化は認められなかったが、視神経乳頭血流量は平均12.2%減少したことを報告した。本年度は、人体解剖学実習によって全身症状を呈した学生と呈しない学生の2群において、シックハウス患者に用いた網膜動脈血流測定、中心窩脈絡膜血流測定を前後で施行し、シックハウス患者とホルムアルデヒド曝露との類似性を検討する。

## I) シックハウス症候群患者の 網膜動脈—収縮期/拡張期血流速度比

### A. 研究目的

これまでに我々は、シックハウス症候群患者の脈絡膜血流量は正常者に比べ減少している事、網膜血流量は正常者に比べ差はなかったことを報告してきた。今回は、網膜血流速度、収縮期/拡張期血流速度比に着目し、シックハウス症候群患者における網膜循環動態を評価し、検討を加えた。

### B. 研究方法

#### 1) 対象

平成 13 年 12 月から平成 17 年度 9 月までに、旭川医科大学化学物質過敏症外来を受診し、シックハウス症候群の診断基準を満たし、シックハウス症候群と診断され、旭川医科大学付属病院眼科に紹介された女性患者 21 名を対象とした。シックハウス症候群と年齢および性別をマッチさせた健常人 21 名を対照とした。

#### 2) 方法

自動血圧測定器により、血圧と心拍数を測定し、キャノンのレーザードップラー血流計 CLBF model 100 を用いて、非侵襲的に網膜動脈の血管径、血流速度、血流量を計測した。また、心拍周期における血流速度波形から、収縮期/拡張期血流速度比(Pulsatility Ratio)を算出した。一般に、Pulsatility Ratio は血管抵抗の指標の一つで、測定部位よりも末梢側の血管抵抗を反映すると考えられている。

### C. 研究結果

血圧、心拍数は両群で差はなかった。以前、我々が報告したと同様に、シックハウス症候群患者の網膜血流量は、正常者に比べ有意差は認められなかった ( $11.6 \pm 3.4 \mu\text{l}/\text{min}$  vs  $11.9 \pm 2.5 \mu\text{l}/\text{min}$ , unpaired t-test,  $P=0.70$ )。シックハウス症候群患者の血管径 ( $108 \pm 14.7 \mu\text{m}$ )、平均血流速度 ( $42.6 \pm 9.6 \text{mm}/\text{sec}$ )、は正常者の血管径 ( $113.2 \pm 9.3 \mu\text{m}$ )、平均血流速度 ( $39.6 \pm 6.8 \text{mm}/\text{sec}$ ) に比べ有意差は認められなかった ( $P=0.18$ ,  $P=0.25$ )。シックハウス症候群患者の網膜血流速度波形は、正常者に比べ振幅が増大しており、Pulsatility Ratio は、正常者に比べ有意に増加していた。 ( $3.47 \pm 0.5$  vs  $2.58 \pm 0.5$ ,  $P<0.001$ )

#### D. 考察

シックハウス症候群患者の網膜血管径、網膜動脈平均血流速度、網膜血流量は正常者に比べ、有意差はなかった。しかしながらシックハウス症候群患者の Pulsatility Ratio は、有意に増大していた。一般に、Pulsatility Ratio の増大は、測定部位よりも末梢側の血管抵抗増大を示唆し、血流量の減少が予測される。しかしながら、本研究のシックハウス症候群患者では、Pulsatility Ratio の増大にも関わらず、血流量の減少はなかった。このことは、シックハウス症候群患者における Pulsatility Ratio の増大は、末梢側の血管抵抗増大によるのではなく、測定部位よりも中枢側、つまり、全身循環の異常によることが推測された。過去に、シックハウス症候群患者では、神経支配のない網膜の血流量は変化がなく、神経支配の豊富な脈絡膜の血流量は減少していたことを報告した。さらに本研究では、網膜循環動態の解析により、シックハウス症候群患者での全身循環の異常が推測された。シックハウス症候群患者では自律神経系の異常が指摘されており、眼循環の異常、全身循環の異常は自律神経の異常によって引き起こされている可能性が考えられた。

#### E. 結論

シックハウス症候群患者では、網膜より中枢側、つまり全身循環にも異常がある可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

論文発表：投稿予定

学会発表：発表予定

#### H. 知的所有権の取得状況

未取得

## II) 医学部学生人体解剖実習前後における網膜及び脈絡膜循環動態の検討

### A. 研究目的

シックハウス症候群の主要な原因物質の一つにホルムアルデヒドが挙げられる。我々はこれまでの研究から、シックハウス症候群患者では眼循環障害が引き起こされていることを報告した。そこで平成16年度研究において、医学部学生における人体解剖実習（高濃度ホルムアルデヒド曝露）による眼循環動態への影響を検討した。人体解剖実習開始前および実習終了後（実習時間：午後1時～5時）に Heidelberg Retina Flowmeter (HRF)を用いて網膜組織血流量と、大部分が脈絡膜循環に支配される視神経乳頭の血流量を測定した。その結果、解剖実習前後では網膜組織血流量には有意な変化を認めなかったが、視神経乳頭血流量は平均12.2%減少していた。そこで本年度は、シックハウス患者に用いた網膜動脈血流測定、中心窩脈絡膜血流測定を人体解剖実習によってシックハウス患者様症状を呈した学生と呈しない学生の2群に分け、人体解剖実習前後で施行し、シックハウス患者とホルムアルデヒド曝露との類似性を検討する。

## B. 対象と方法

対象は旭川医科大学医学部医学科2年生9名9眼（男性5名、女性4名）であった。以前の人体解剖学実習で頭痛、めまい、蕁麻疹、吐き気、腹痛、胸焼けなどの全身症状のいずれかを自覚した者の4名を症状あり群、いずれの全身症状を自覚しなかった者の5名を症状無し群とした。約1ヶ月の冬季休暇後の人体解剖実習の開始日前日と実習3日間実習終了60分後（実習時間：午後1時～5時）で眼循環測定を行った。眼循環測定は、シックハウス患者に用いて測定した網膜動脈血流測定、中心窩脈絡膜血流測定を測定した。

眼科一般的検査終了後、散瞳下で眼循環測定を以下の方法を用いて施行した。

### <眼循環測定>

#### \* レーザードップラー眼血流計

##### (Oculix LDF-4000)

網膜は、外層2/3を脈絡膜循環から栄養されている。さらに、網膜の中でも中心窩は視力を司る部位であり、欧米では成人中途失明原因の第一位となっている加齢黄斑変性は中心窩の異常により重篤な視力障害を引き起こす疾患である。この部位の脈絡膜循環を評価する方法として、レーザードップラー血流計が1994年Rivaらによって開発された。この方法を用いて、加齢黄斑変性の発症に中心窩脈絡膜循環異常が関与していることが報告されている。我々の施設では国内では唯一この測定機器を有しており、現在この方法を用いて様々な疾患における中心窩脈絡膜循環動態を評価している。

レーザードップラー血流計で算出される中心窩脈絡膜血流量は基本的には相対値であり arbitrary unit (A.U.)で示される。しかしこれまでの報告から、この値は正常人ではおおよそ10-15A.U.であるとされ、同じ機械を用いれば正常者と患者の測定値の直接比較も可能であるとされる。またこの方法で測定される中心窩脈絡膜血流量は、脈絡膜のなかでも網膜のすぐ下に存在する脈絡毛細血管の血流量を反映するとされており、網膜に与える脈絡膜循環の影響を評価するには非常に有用な方法であると考えられる。

#### \* レーザードップラー眼底血流計

##### (キャノン CLBF model 100)

1972年Rivaらにより網膜血管中の血流を直接非侵襲的に測定するレーザードップラー法が開発され、それに2方向からドップラー信号を解析することで血流速度の絶対値を解析し、測定した血管径を用いて、血流量の絶対値が算出できるようになった。本装置ではこの血流速度測定法に加え、眼球の固視微動に対応できる血管の自動トラッキング装置が備わり、データ解析も自動化し、短時間で手軽に網膜血流量を測定できるようになり、臨床での応用が初めて可能になった。

\* 検査に際しては倫理面に配慮し、患者に十分な説明をし、書面による同意を得てから検査を施行した。