

は白色家兎で有意に高かった。一方、Substance P による収縮には変化を及ぼさなかった(図4)。また瞳孔散大筋条片は DDVP (1 μ M) 投与による影響を受けなかった(図5)。

D. 考察

今回の実験から摘出瞳孔括約筋条片において有機リン投与によりフィールド刺激による収縮が増大した。これは有機リンの瞳孔括約筋のムスカリン受容体への作用ではなく、有機リンの不可逆性抗アセチルコリンエステラーゼ作用により神経筋接合部に放出された内因性アセチルコリン活性が上昇し収縮が増強したものと考えられる。

一般に、ヒト瞳孔の神経支配に関しては、副交感神経に支配されている瞳孔括約筋の収縮によって縮瞳が、交感神経支配を受けている瞳孔散大筋の収縮によって散瞳が発現すると考えられてきた。しかし近年、散大筋はアドレナリン作働性興奮、コリン作働性抑制の二重神経支配を受けていることが明らかとなっている³⁻⁵⁾。すなわち副交感神経の興奮は括約筋の収縮と散大筋の弛緩によって縮瞳を引き起こす。このように瞳孔は二重の神経支配を受けているが今回の実験では有機リンは瞳孔散大筋には影響を及ぼさなかった。

さらに1979年 Billらは三叉神経を刺激することによってウサギの前房中に substance P と思われる物質が増加すると共に縮瞳、血液房水関門の破綻などが起こることを報告した^{6, 7)}。すなわち痛み刺激や眼内の炎症がこの物質を通して瞳孔径に影響を与えていることが示唆された。しかし有機リンは摘出家兎瞳孔括約筋のゆっくりした収縮へは影響を及ぼさなかった。すなわち上述した三叉神経への影響はないものと考えられる。

急性有機リン中毒では瞳孔は pine hole pupil と呼ばれる非常に強い縮瞳が生ずることが知られている。今回予備実験を行い家兎に 10 mg/kg の DDVP を筋注したところ4羽中2羽が死亡したが瞳孔径には有意な縮瞳は認められなかった。その結果を踏まえ DDVP を直接結膜下に投与したが瞳孔径には変化がなかった。同薬剤は摘出標本では非常に強い括約筋

の収縮増強作用が認められた。このため薬物活性が低いことは考えられない。この *in vivo*、*in vitro* の結果の差にはいくつかの原因が考えられる。

(1) 眼球は角膜、強膜という非常に強いバリアがあるため薬物は容易には眼内に浸潤できないこと。特に角膜は上皮、実質、内皮がそれぞれ疎水性、親水性、疎水性であり水溶性、脂溶性薬物のどちらも角膜を通過することが困難であること(角膜の bioavailability は数%とも言われている)。

(2) 血中の有機リンも血液—網膜関門、血液—房水関門が存在するためやはり眼内に移行できない。

(3) 動物種差

(4) 試薬の脂溶性、水溶性の差

(5) 眼内のメラニン色素の存在

特に上記(5)、瞳孔への薬物の作用、副作用を検討するうえで瞳孔に存在するメラニン色素の存在は非常に重要である。すなわち瞳孔はメラニン色素に覆い被されているため薬物は色素に沈着して平滑筋自体に有効濃度が達しにくいといわれている。しかしひとたび薬物の効果が現れると色素に沈着した薬物はゆっくりと作用が持続する。特に有機リン系の薬剤は色素親和性が強いいためある程度蓄積されるまでは症状が出ないものの、ひとたび中毒症状が出現すると長期にわたり持続するという性質がある。今回の *in vitro* の結果から有色家兎瞳孔括約筋での収縮増加作用が白色のそれを有意に下回る結果も有機リンの虹彩色素への取り込みを指示しているものと考えられる。

pine hole pupil を呈する病態は有機リン中毒の他に脳幹(橋)病変がある。これは中脳に存在する EW 核への抑制が減少し(disinhibition)縮瞳すると考えられている。有機リン中毒での縮瞳も中枢からの抑制の解除もメカニズムのひとつとし考慮すべきと考えられる。

今後、持続的な有機リンの投与、脂溶性有機リンの使用、動物種の変更など方法を変え実験する必要があると思われる。

E. 結論

有機リンは抗アセチルコリンエステラーゼ作用により家兎瞳孔括約筋の神経末端からのアセチルコリン活性を増加させ収縮を増強させた。しかし実際に生体に有機リンを負荷した場合には眼内への移行、房水動態などに左右される。今後シックハウス患者の瞳孔異常、眼内平滑筋の異常を症候群の診断指標とする際には注意が必要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 石川均、浅川賢、後関利明、榊原七重、石川哲、坂部貢、相澤好治: シックハウス症候群患者の瞳孔組織所見. 第16回日本臨床環境医学会. 2007、東京.

G. 参考文献

1. 宮田幹夫, 坂部貢, 松井貴子, 遠乗秀樹, 石川哲. 多種類化学物質過敏症患者の二重盲検ホルムアルデヒド負荷試験と瞳孔. *神眼* 19 : 155-161, 2002
2. 坂部貢, 宮田幹夫, 石川哲, 角田和彦. シックハウス症候群と脳循環. *神眼* 19 : 162-168, 2002
3. Yoshitomi T, Ito Y, and Inomata H. Adrenergic excitatory and cholinergic inhibitory innervations in the human iris dilator. *Exp. Eye Res.*, 40: 453-459, 1985.
4. Yoshitomi T and Ito Y. Double reciprocal innervations in dog iris sphincter and dilator muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27: 83-91, 1986.
5. Yoshitomi T, Ito Y and Inomata H. Functional innervation and contractile properties of the human iris sphincter muscle. *Exp. Eye Res.*, 46: 979-986, 1988.
6. Bill A, Stjernschantz J, Mandahl A, Brodin E and Nilsson G. Substance P: release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye. *Acta Physiol. Scand.*, 106: 371-373, 1979.
7. Ueda N, Muramatsu I, Sakakibara Y and Fujiwara M. Noncholinergic, nonadrenergic contraction and substance P in rabbit iris sphincter muscle. *Jpn. J. Pharmacol.*, 31: 1071-1079, 1981.

写真の説明

写真1 : DDVP 注射方法

家兎固定後上眼瞼を反転し球結膜、瞼結膜移行部付近に DDVP もしくは生食を注射

写真2 : 瞳孔径計測方法

Caliper (写真は5mm) を用い瞳孔直径を写真上で比例計算し計測

A : DDVP 注射前

B : DDVP 注射60分後

C : 有色家兎瞳孔

図1 : 摘出家兎瞳孔平滑筋条片作成方法

A : 瞳孔括約筋

B : 瞳孔散大筋

図2 : 瞳孔平滑筋条片懸垂

灌流槽 (1.5ml) へ標本を懸垂しクレブス液を持続的に灌流。薬物はクレブス液中へ溶解し、またフィールド刺激は一對の塩化銀電極を通して行った。

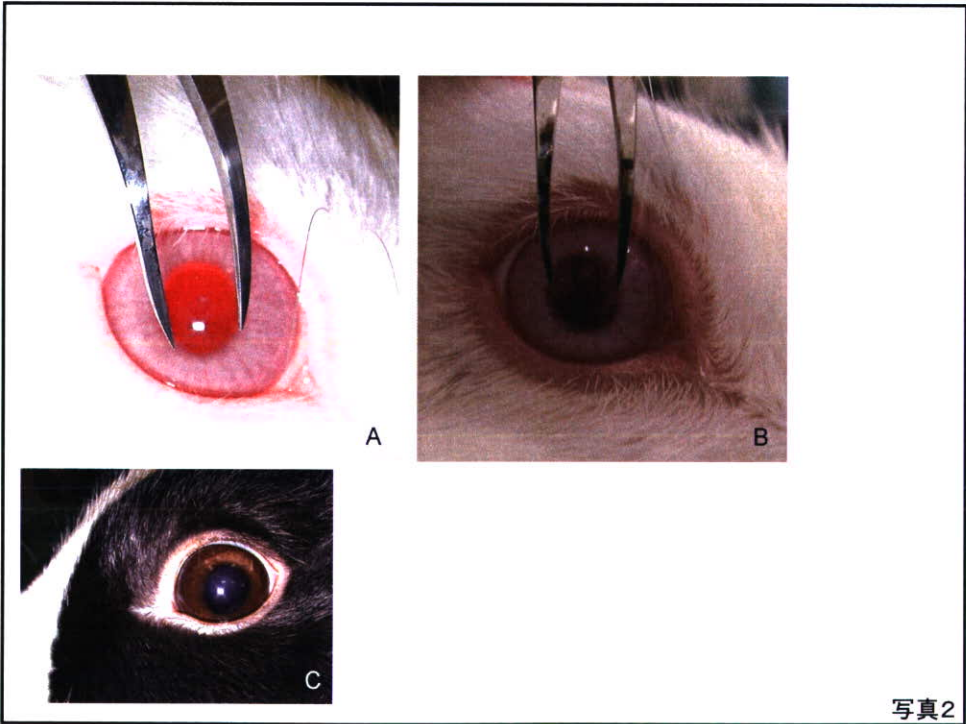
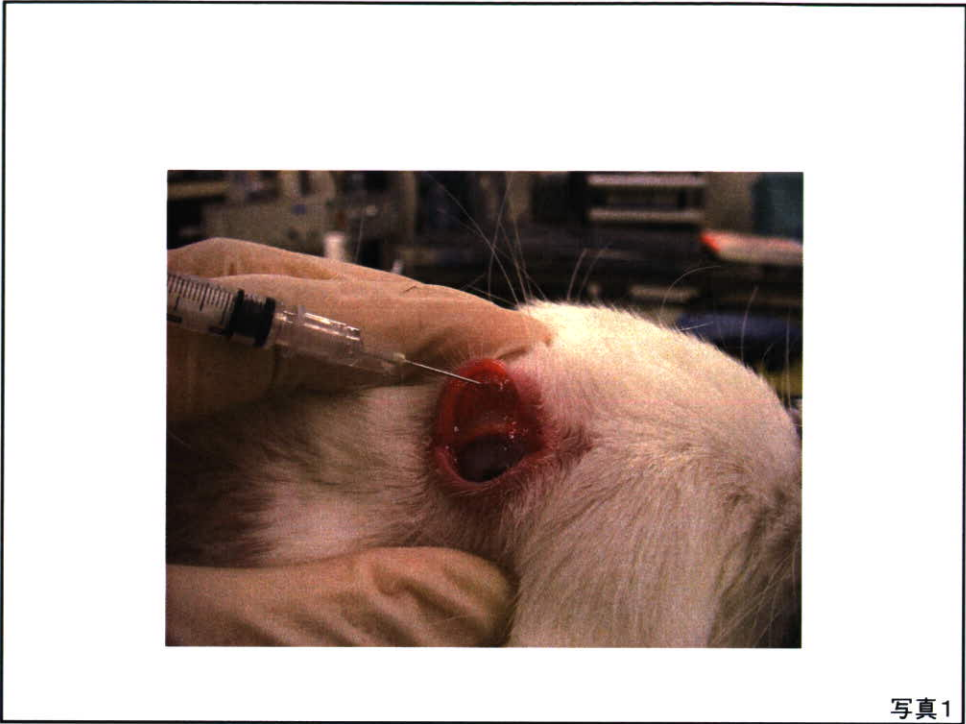
図3 : DDVP、生食注射前後の瞳孔径の推移
白色、有色家兎 (各々3羽) に DDVP、対照 (生食) を結膜下に注射し注射前、および注射直後、10分、30分、60分、180分後に瞳孔径を計測。

図4 : 瞳孔括約筋のフィールド刺激・カルバコールによる収縮

白色 (A) 有色 (B) 家兎瞳孔括約筋条片にフィールド刺激 (FS) を加えると一過性の早い収縮とそれに続くゆっくりとした収縮が惹起される。DDVP 投与により早い収縮は増強。TTX 投与により消失。消失後も外因性に投与したカルバコールにより収縮。

図5 : 瞳孔散大筋のフィールド刺激・フェニレフリンによる収縮

白色 (A) 有色 (B) 家兎瞳孔括約筋条片にフィールド刺激 (FS) を加えると早い収縮が惹起される。TTX 投与により消失。消失後も外因性に投与したフェニレフリン (PE) により収縮。



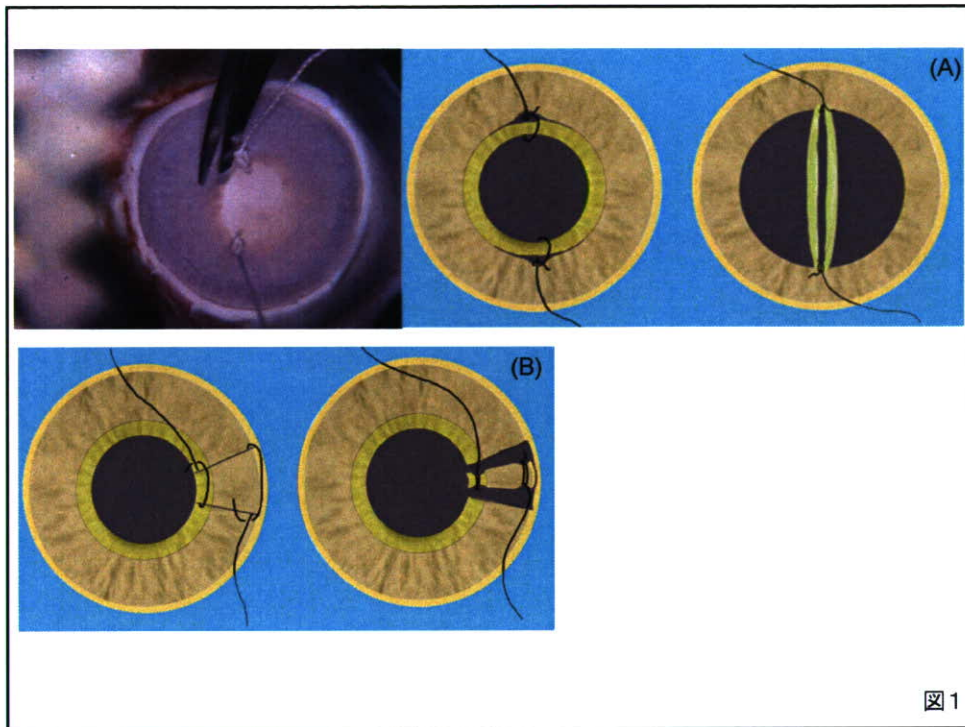


図1

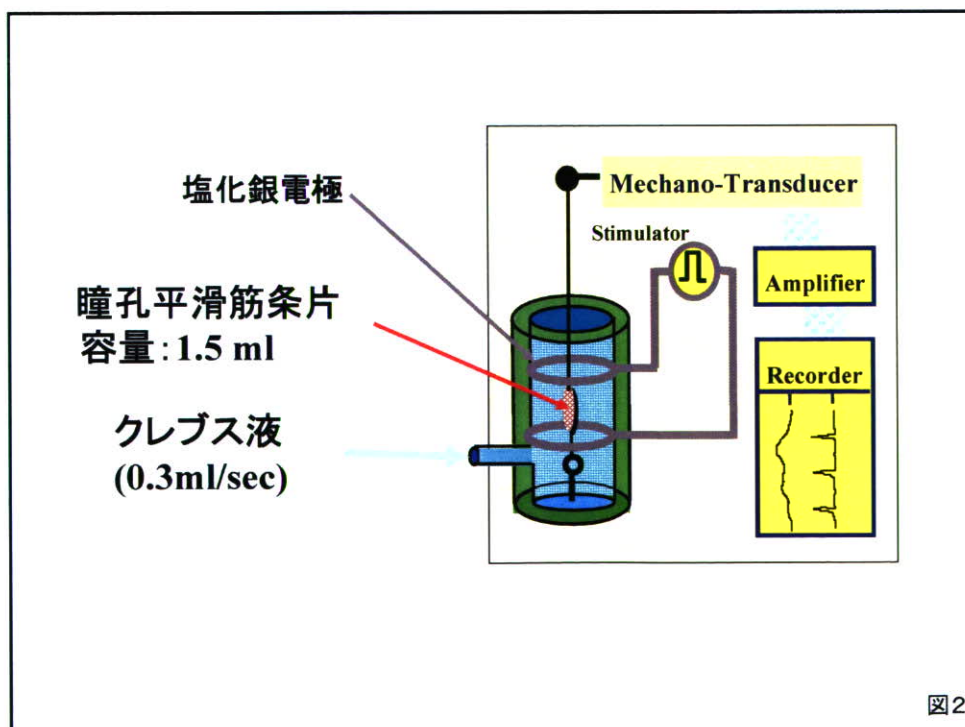
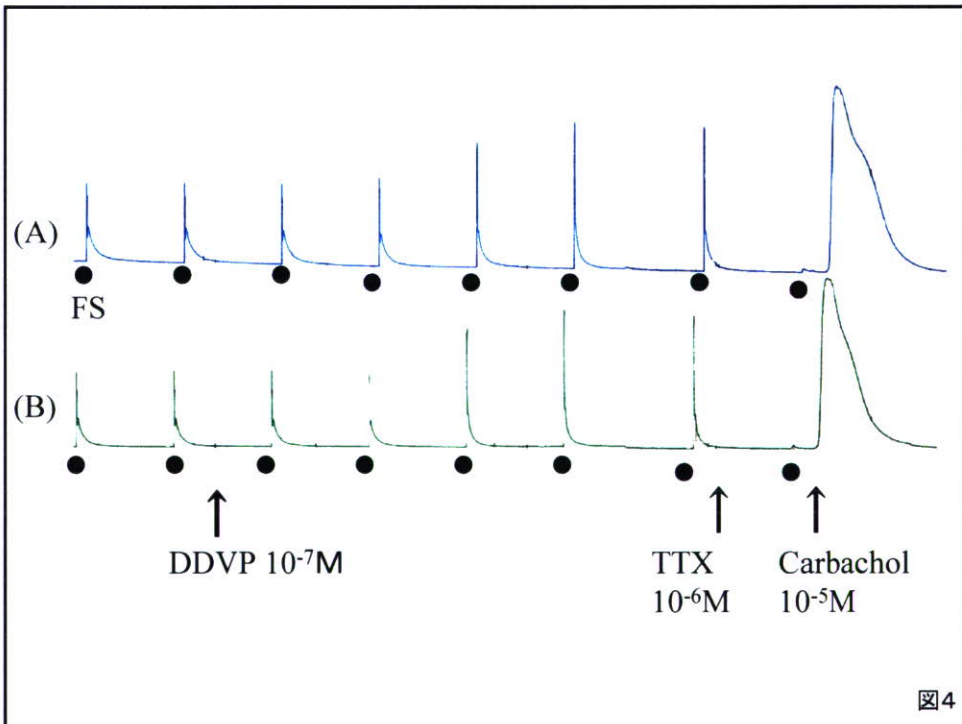
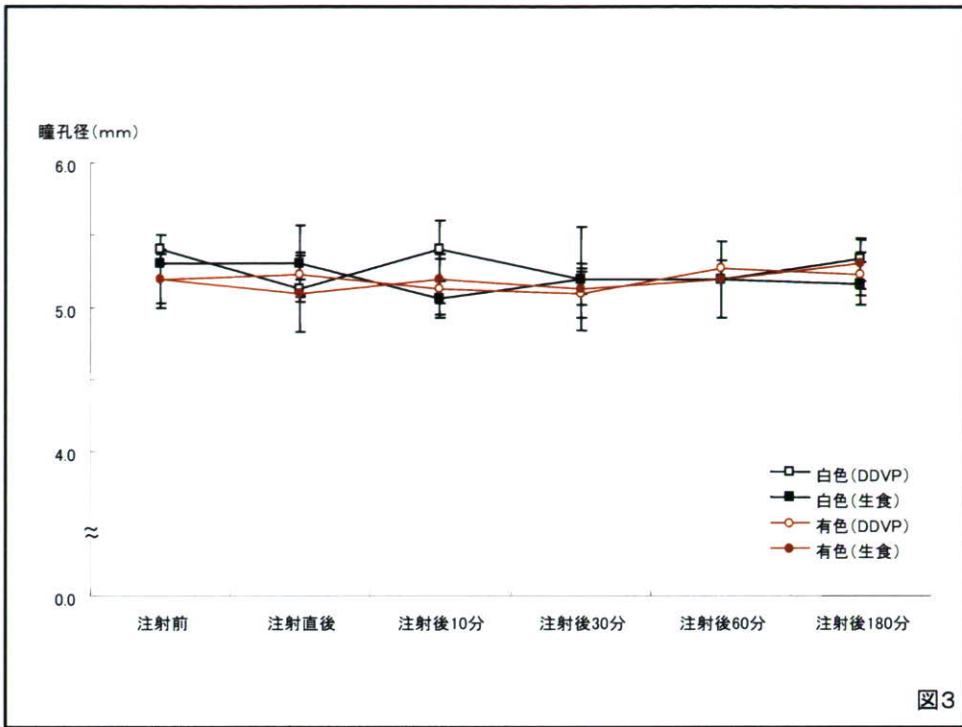
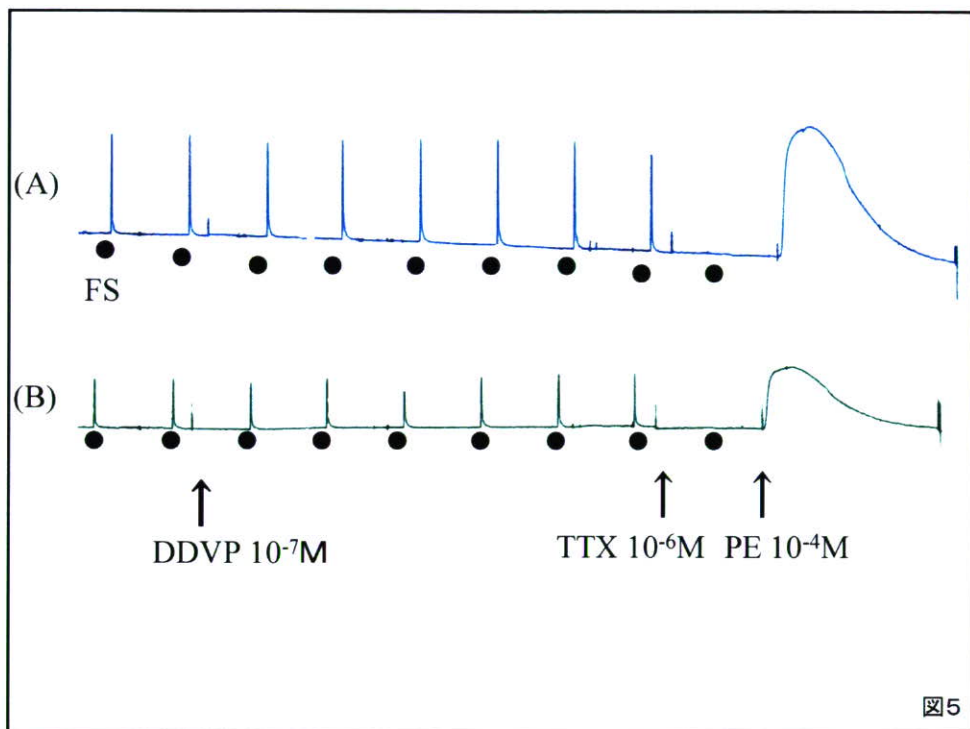


図2





平成19年度厚生科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)
分担研究報告書

環境中微量化学物質の健康影響に関する分子疫学研究

分担研究者 加藤 貴彦 熊本大学大学院医学薬学研究部 公衆衛生・医療科学分野 教授
研究協力者 辻 真弓 熊本大学大学院医学薬学研究部 公衆衛生・医療科学分野 助教

研究要旨

微量化学物質によるとされる病態として中毒、アレルギー疾患、心因反応、多種化学物質過敏状態 (MCS) がある。本研究では、化学物質によってこれらの病態を引き起こす人々を“化学物質高感受性集団” (Chemical Hyper susceptible Population: 以下CHPと略) と定義し、その実態把握と病態を明らかにすることを目的とする。

CHPの実態把握を目的とし、新たに有機溶剤取扱い作業に従事する九州北部の企業社員男性345名を対象として Quick Environmental Exposure AND Sensitivity Inventory (QEESI) による質問票調査を行った。Millerらの設定した3項目すべてのカットオフ値を満たしていた人の割合は2.3%であった。この値は、昨年度報告した九州南部のA社 0.3%、B社 1.1%と比較し、約2倍であった。

また遺伝子解析の同意の得られている九州南部2つのA・B企業社員を対象とし、個体の感受性要因の同定を目的としてCytochrome P4502E1 (CYP2E1)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(Glutathione S-transferase, GSTP1) の遺伝子多型を分析し、QEESIによる質問票調査結果との関連性に関し検討した。対象数は総計1028名、A社449名 (男性348名、女性101名)、B社579名 (男性576名、女性3名) であった。質問票による調査結果を、“症状”、“化学物質曝露”の2つの質問項目はハイスコア群 (≥ 40)、ミドルスコア群 ($1 \leq$, < 40)、ロースコア群 (0) の3群、“その他の化学物質曝露” に関しては、質問項目をハイスコア群 (≥ 25)、ミドルスコア群 ($1 \leq$, < 25)、ロースコア群 (0) の3群に分け、CYP2E1、GSTP1の遺伝子多型の頻度を比較検討した。その結果、いずれの遺伝子多型頻度も、3種類の質問項目のハイスコア群、ミドルスコア群、ロースコア群のあいだに統計学的に有意な差は認められなかった。

A. 研究目的

近年、身近に存在する化学物質の種類が増加やオフィス・住宅の建材の変化・気密性の増加などによって種々な症状を訴える人が増加している。これらの症状は、シックハウス症候群、多種化学物質過敏状態 (MCS) などの名称で呼ばれているが、その概念・病態については十分に解明されておらず、有効な健康影響のバイオマーカーも見つかっていない。我々は、これらの病態を引き起こす人々を“化学物質高感受性集団 (Chemical Hyper susceptible Population: 以下 CHP と略)” (Fig 1) と定義し、その病態を検討した。

本年度は、新たな調査対象として九州北部に在する企業の有機溶剤取扱い作業者を対象として、Quick Environmental Exposure AND

Sensitivity Inventory (QEESI) 調査を行った。また、昨年までの調査対象であった2つの九州南部企業社員総計 1028 名、A社 449 名 (男性 348 名、女性 101 名)、B社 579 名 (男性 576 名、女性 3 名) に対し、Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1) の遺伝子多型を解析し、QEESI による質問票調査結果との関連性について検討した。

B. 研究方法

1. 調査対象者および調査期間

(1-1) QEESIによる質問票による調査
自動車を生産品とする九州北部C社のうち有機溶剤取扱い作業者男性345名を対象とし

た。調査は平成18年4月～6月に行った。

(1-2) 遺伝子解析

九州南部の2つの企業、I C基盤を主な生産品とするA社1310名(男936名、女374名)、紙パルプ製品を生産品とするB社891名(男778名、女113名)と対象とした。QEESIによる質問票調査は平成15年8月～10月に行った。そのなかで遺伝子解析に関する同意が得ることができ、解析可能なゲノムDNAが得られた対象数は、総計1028名、A社449名(男性348名、女性101名)、B社579名(男性576名、女性3名)であった。

2. 調査内容および研究方法

QEESIは、Millerらがカレンらによって提唱された Multiple Chemical Sensitivity (MCS) のスクリーニングのための調査票として開発したものである [1]。CHPの特徴に関する調査項目は、石川らが日本人向けに翻訳し [2]、さらに内山らが改良を加えたものを参考に作成した [3]。

Millerらが開発したオリジナルのQEESIは、“Chemical Exposure (化学物質曝露による反応) ”、“Other exposure (その他の化学物質曝露による反応)”、“Symptoms (症状)”、“Masking Index (症状のマスキング)”、“Impact of Sensitivities (日常生活の障害の程度)”の5項目、各10問から成っている。我々の研究対象が患者ではなく一般集団のため、これらの全5項目のうち、1999年、Millerらが、カットオフ値を設定することで化学物質に感受性の高い人や対照群となる人を設定できるとした“Chemical Exposure (化学物質曝露による反応) ”、“Other exposure (その他の化学物質曝露による反応)”、“Symptoms (症状)”の3項目について調査を行った。調査結果は3項目の10問それぞれについて0から10段階で回答を依頼し、各項目の合計を0から100のスコアとして算出した。

今年度の解析対象遺伝子は、代表的な第1相薬物代謝酵素である CYP2E1、と第2相薬物代謝酵素である GSTP1 である。統計解析にはロジスティック回帰分析を行った。解析には SPSS II for Windows software (version 11.0J, SPSS JAPAN, Tokyo, Japan) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に従うことを表明記述した書類を宮崎医科大学倫理委員会に申請し、平成13年9月6日(受付番号30)、平成15年4月9日(受付番号82)に承認されている。そして記述内容に基づき、すべての研究協力者から、遺伝子解析に関する文書による研究協力の同意を得ている。調査票を使用するにあたっては、調査に関し同意を得ること、その解析は集団で行い個人情報保持されることを表明している。

C. 研究結果

1. 化学物質過敏症に関連する調査結果：C企業

(1-1) 診断履歴 (Fig 2-a)

シックハウス症候群と診断されたことがある人は1名(0.3%)、化学物質過敏症と診断されたことがある人は1名(0.3%)、アレルギー疾患と診断されたことがある人は84名(26.4%)であった。

(1-2) カットオフ値によるスクリーニング (Fig 3-a)

Millerらが、設定したカットオフ値である、「症状」と「化学物質曝露」 \geq スコア40、「その他の化学物質の曝露」 \geq スコア25のうちいずれか2項目を超えた人の割合は4.3%、3項目すべてを超えた人の割合は2.3%であった。

2. 遺伝子多型の分析結果

(2-1) 症状

スコアの分布は Fig 4、Fig 5 に示している。CYP2E1、GSTP1の遺伝子型の頻度は、全く症状の無いと回答した群(スコア0)、1～40のスコアを示す群、40以上のスコアを示す群のいずれの群においても、統計学な有意差は認められなかった。

(2-2) 化学物質曝露による反応

スコアの分布は Fig 6、Fig 7 に示している。CYP2E1、GSTP1の遺伝子型の頻度は、全く症状の無いと回答した群(スコア0)、1～40のスコアを示す群、40以上のスコア群を示す群のいずれの群においても、統計学な有意差は認められなかった。

(2-3) その他の化学物質曝露による反応

スコアの分布は Fig 8、Fig 9 に示している。CYP2E1、GSTP1の遺伝子型の頻度は、全く

症状の無いと回答した群（スコア0）、1～25のスコアを示す群、25以上のスコア群を示す群いずれの群においても、統計学な有意差は認められなかった。

D. 考察

我々のこれまでの調査では、化学物質過敏症、シックハウス症候群と診断されたことがある人は、いずれの企業においても1%以下であった（Fig 2-a, b）。ただし、これらの健康障害が十分に社会的に認知されているとはいえ、診断をする医師の認識の差を反映している可能性も現時点では否定できない。

MillerらのQEESIを用いた調査によれば、対象群の6.6%が設定した3項目のカットオフ値を満たし、15.8%が2項目を満たしていた[4]。日本で実施された調査としては、2000年の内山らの一般住民を対象とした研究報告がある[3]。内山らは全国からの層化2段階無作為抽出した20歳以上の男女4000人以上（有効回答数2851（71.3%））を対象とし、QEESIを翻訳した質問票による面接調査を行っている。その報告によれば、設定したカットオフ値の3項目を満たし、化学物質に対して高感受性を持つと考えられる人は全体で0.74%であり、米国における割合の10分の1であった（Fig 3-a, b）。内山らの報告と同様に我々の就業者を対象とした調査でも、3項目のカットオフ値を満たしていた人は、A社 0.3%、B社 1.1%、C社2.3%であり、米国人と比較し日本人の化学物質高感受性者の割合が低いという結果が示された。

北条らの報告[5]によれば、日本人のMCS自覚者群のQEESI得点分布が、米国のMCS自覚者群と比較し高得点者が少なく、分布幅が広いことを指摘している。従って、米国人のデータを基に設定されたカットオフ値は、日本人においては適切に高感受性者をひろいあげていない可能性がある。QEESIの調査表には、日本人の生活スタイルに合わない項目も含まれており、今後日本人の高感受性群を適切に判定できる質問票の開発とその実態把握のために継続的な疫学調査が必要だと考える。

本年度新たに研究対象とした九州北部C企業での調査では、Millerらの設定した3項目すべてのカットオフ値を満たしていた人の割合は2.3%であり、昨年度に報告した九州南部の

A社 0.3%、B社 1.1%と比較し約2倍であった。C企業での調査は環境からの有機溶剤の曝露がA、B企業と比較し多いことを想定し調査を実施したが、実際にはこのC企業の作業環境は基準以下、管理区分も第一管理区分であった。従って、環境からの曝露量が大きいためによるスコアの高値とは考えにくい。むしろ仮説ではあるが、QEESIの調査票が、作業現場における中等度の労働負荷による疲労度を反映している可能性があり、この点については今後も検討していきたい。

室内空气中化学物質による健康障害に関し、1) 中毒 2) 免疫学的機序 3) 心因的機序そして病態が明らかにされていない 4) MCS (Multiple Chemical Sensitivity) の4つの病態機序が推定されている。そして原因化学物質として、ホルムアルデヒド、トルエン、キシレンのような物質や有機リン系の殺虫剤が発症に関与していると考えられている。本年度は、これら化学物質に対する高感受性要因の一つとして、CYP2E1、GSTP1 遺伝子多型に焦点を合わせて研究を実施した。

ホルムアルデヒドは、GSH 抱合により、ハイドロキシメチルグルタチオンに変換され、その後 NAD および NADH を補酵素とするホルムアルデヒド脱水素酵素により代謝され、最終的に蟻酸になる。この代謝の第一段階に関与すると推定されている GST は、生体外化学物質、薬剤の抱合、解毒に関与する代表的な第2相薬物代謝酵素である。GST には多数 (μ , θ , π , α クラス等) の分子種があることが知られ、現在までに多数の遺伝子多型の存在が明らかとなっている。これらの分子種のなかで、Pangらは GST 分子種の一つである GSTP1 遺伝子多型が化学物質過敏症と関連性があることを報告している[6]。GSTP1 は GSTM1 と同様にベンツピレンの代謝に関与しているが、GSTM1 と異なり、肝以外（肺、消化管、腎臓）で主に発現していることに特徴がある。従って、吸入曝露された化学物質の代謝に対し、最初に関与する GST 分子種であると考えられる。

一方、Cytochrome P450 (CYP) は、トルエンから、ベンジルアルコール、P-Cresol の代謝に関与。キシレンのメチルベンジルアルコールへの代謝にも関与している。

今回の分析結果で、QEESI のスコアと

CYP2E1、GSTP1 の遺伝子多型頻度とのあいだに有意な関連性は認められなかった。すなわち、ハイスコアを示す群において、2つの遺伝子の化学物質高感受性と考えられているCYP2E1 valiant タイプ、GSTT1 valiant タイプ保有者が多いとはいえない結果であった。

次年度は、NAT2 と有機リン系農薬の代謝酵素 PON 1 の遺伝子多型に関する分子疫学的解析をすすめていきたい。また、化学物質に対する訴えは、中年女性に多いことが報告されており、性別にわけた解析も行っていきたい。

E. 結論

有機溶剤取扱い作業に従事する九州北部の企業社員男性を対象に Quick Environmental Exposure AND Sensitivity Inventory (QEESI) による質問票調査を行った。Millerらの設定した3項目すべてのカットオフ値を満たしていた人の割合は2.3%であった。この値は、昨年度報告した九州南部のA社 0.3%、B社 1.1%と比較し、約2倍であった。

化学物質に対し高い感受性を示す“化学物質高感受性集団” (Chemical Hyper susceptible Population: 以下CHPと略) の個体感受性要因の同定を目的としてホルムアルデヒド、トルエンの代謝に関与するCYP2E1、GSTP1の遺伝子多型とQEESIのスコアとの関連性について検討した。しかし、統計学的に有意な関連性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 加藤貴彦, 黒田嘉紀, 小宮康裕: 工場労働者における化学物質過敏状態の質問票調査, 産衛誌, 49: 98-99, 2007.
2. 関明彦, 瀧川智子, 岸玲子, 坂部貢, 鳥居新平, 田中正敏, 吉村健清, 森本兼曩, 加藤貴彦, 吉良尚平, 相澤好治, シックハウ

ス症候群に係る医学的知見の整理, 日衛誌, 62: 939-948, 2007.

学会発表

1. 加藤貴彦, 辻真弓: 環境中微量化学物質の健康影響に関する分子疫学研究, 第78回日本産業衛生学会(熊本), 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む) 該当せず

参考文献

- 1) Miller C: The compelling Anomaly of Chemical Intolerance. The role of Neural Plasticity in Chemical Intolerance. The New York Academy of Sciences, p1-23, 2001.
- 2) 石川哲, 宮田幹夫. 化学物質過敏症—診断基準・診断に必要な検査法—, アレルギー・免疫 1999; 6: 34-42.
- 3) 内山巖夫, 村山留美子. 平成11年度厚生科学研究費補助金報告書—公衆衛生学的立場から見た化学物質過敏症 2000; 1-5.
- 4) Miller C, Prihoda T. The environmental exposure and sensitivity inventory (EESI): a standardized approach for measuring chemical intolerances for research and clinical applications. Toxicol Ind Health 1999; 15: 370-385.
- 5) 北条祥子. 日本人に対するQEESI応用の試み, 平成12年度~14年度厚生科学研究費補助健康科学総合研究事業シックハウス症候群の病態解明. 診断治療に関する研究報告書. 2003; 183-199.
- 6) Pang N.S., et al. Genetische susceptilitaet gengenuber umweltgifen. Zeitschrift fur umweltmedizin. 2001; 9: 38-45.

Fig 1 化学物質高感受性集団の定義

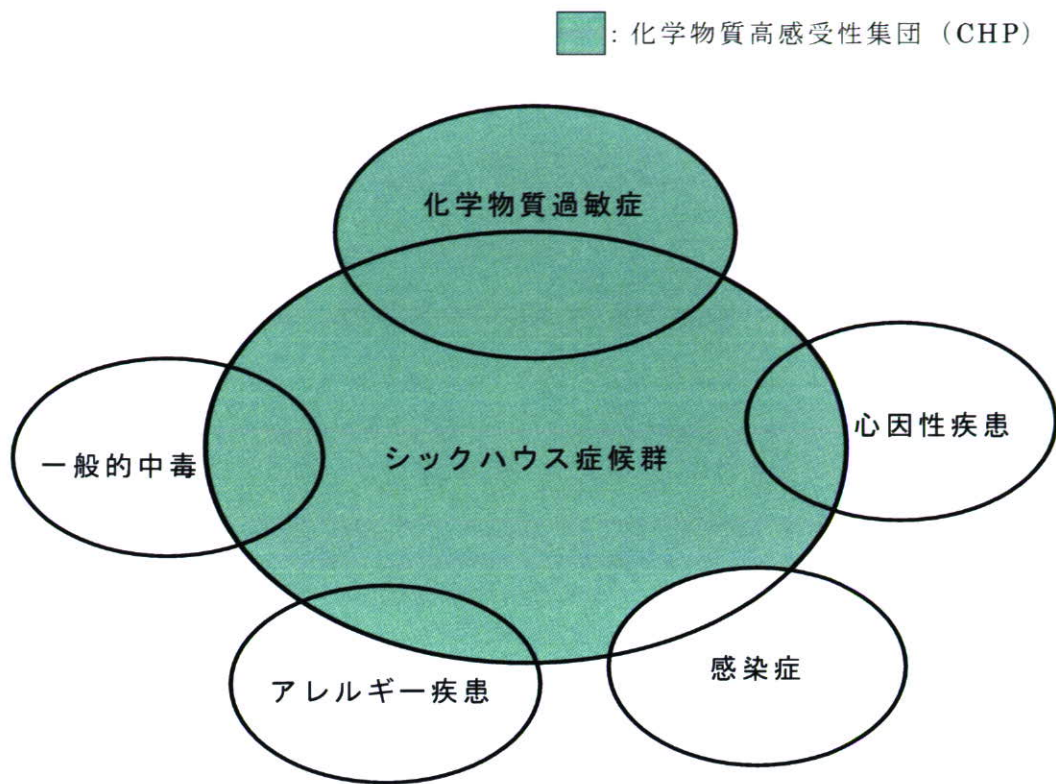


Fig 2-a 診断されたことがある人の割合（C社）

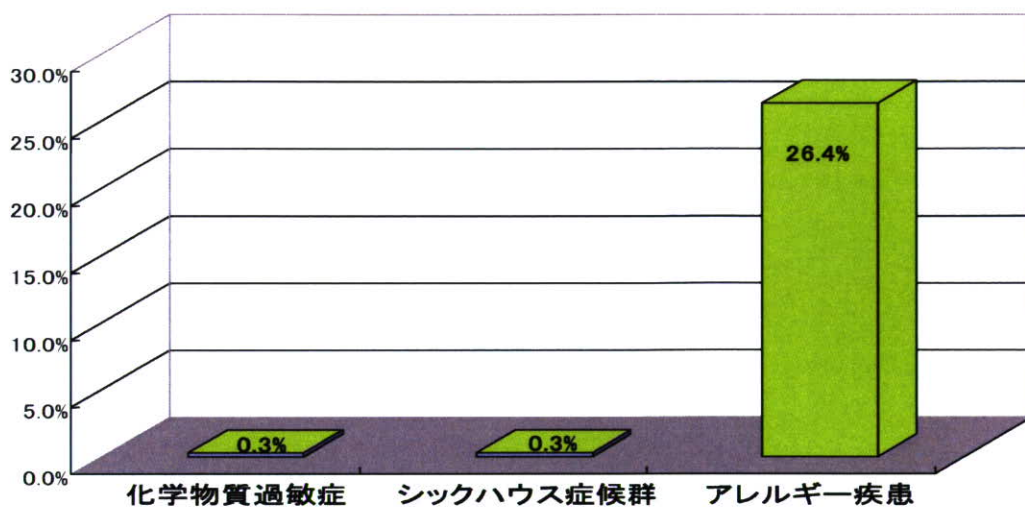


Fig 2-b 診断されたことがある人の割合（A, B社）

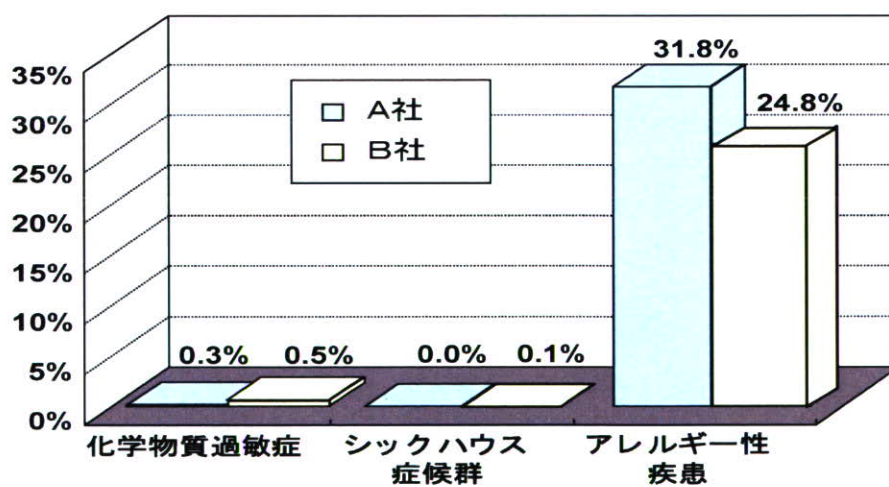


Fig 3-a Percentage of subject meeting 2 or 3 cut-off point in the 3 studies.

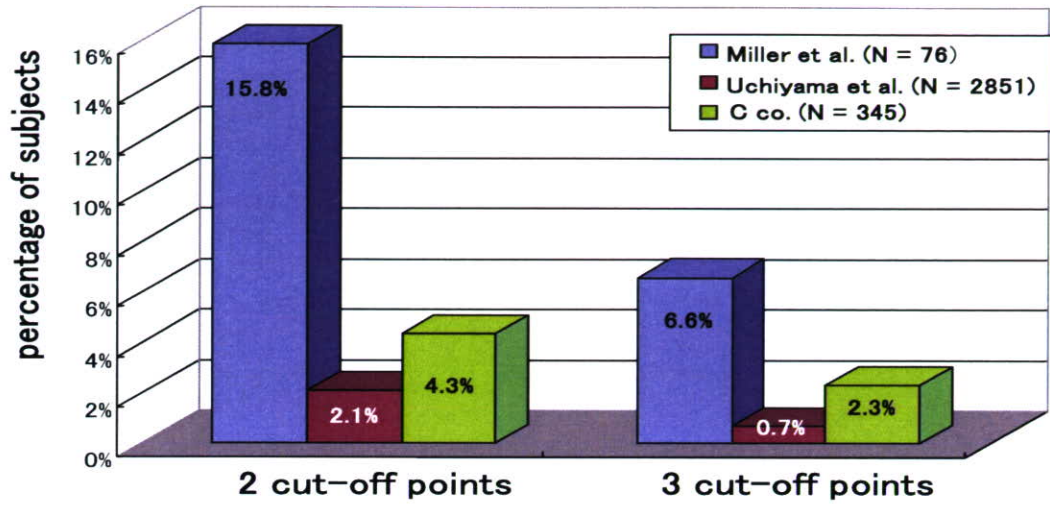


Fig 3-b Percentage of subject meeting 2 or 3 cut-off point in the 3 studies.

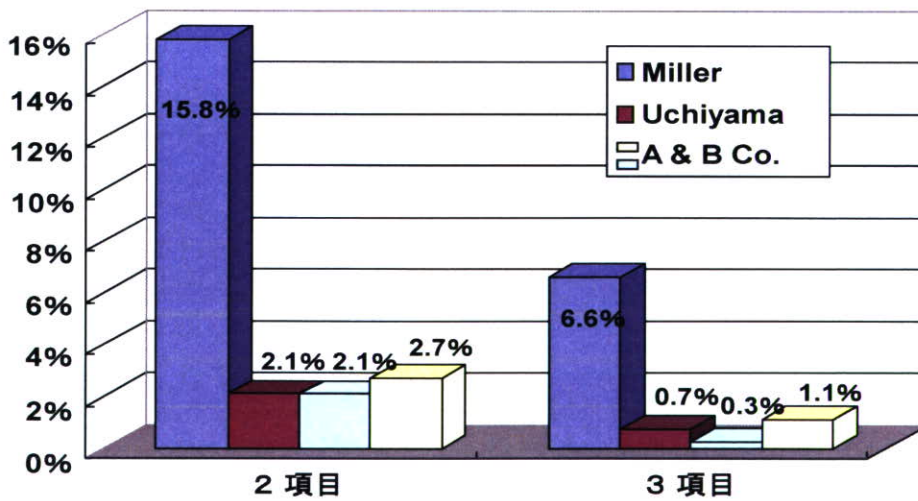


Fig 4 The relationship between the Symptoms and the CYP2E1

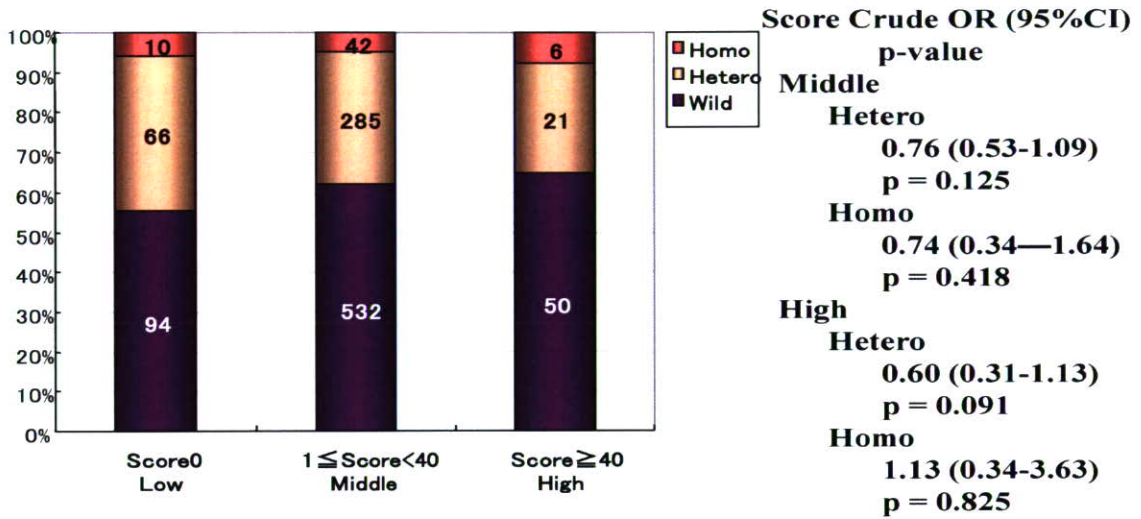


Fig 5 The relationship between the Symptoms and the GSTP1

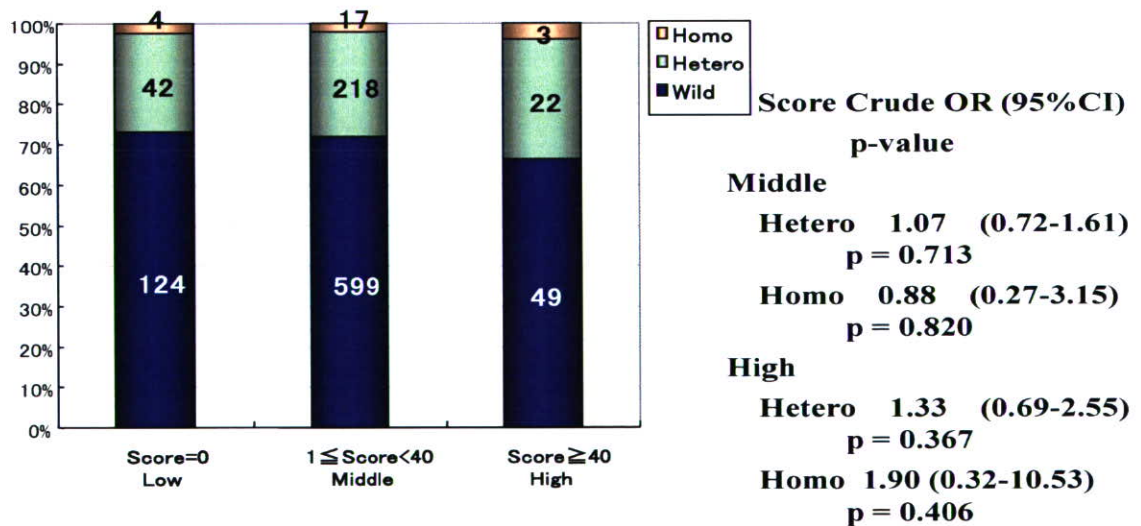


Fig 6 The relationship between the chemical exposures and the CYP2E1

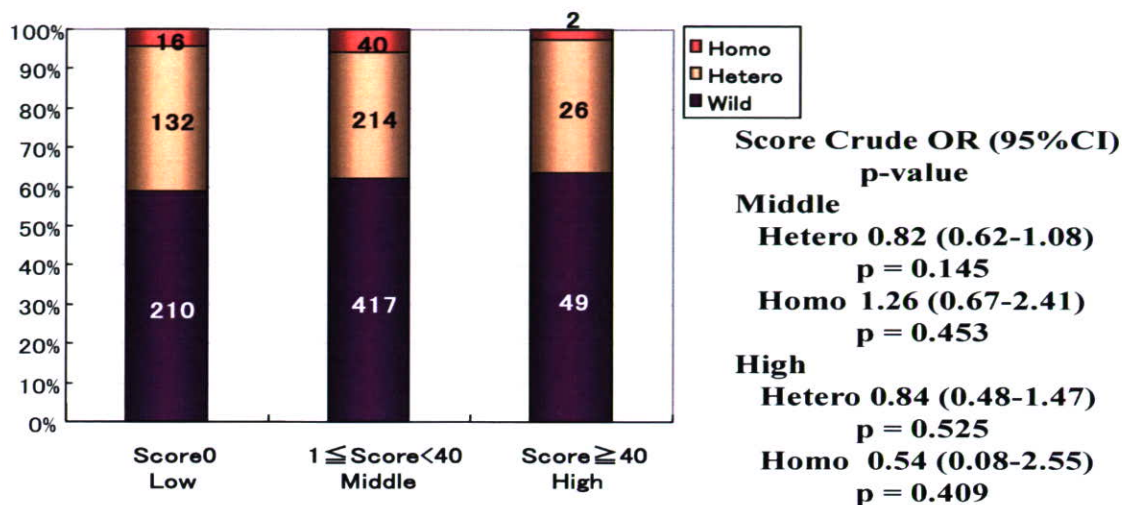


Fig 7 The relationship between the chemical exposures and the GSTP1

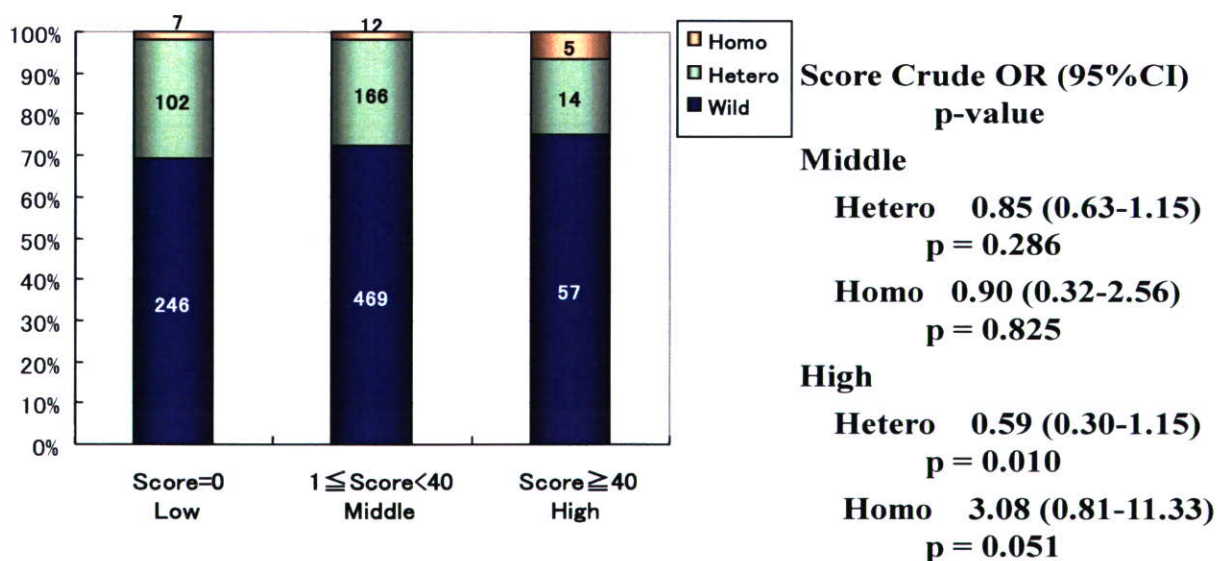


Fig 8 The relationship between the other chemical exposures and the CYP2E1

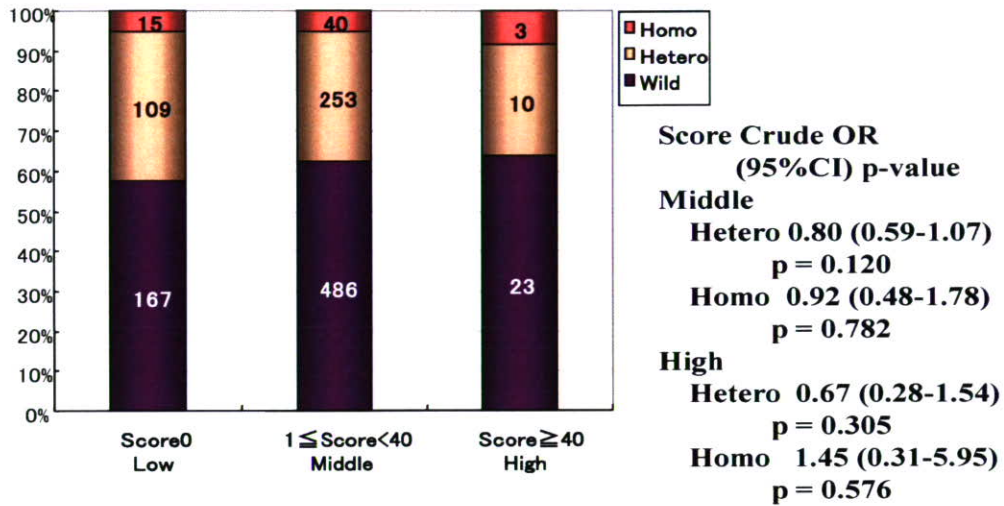
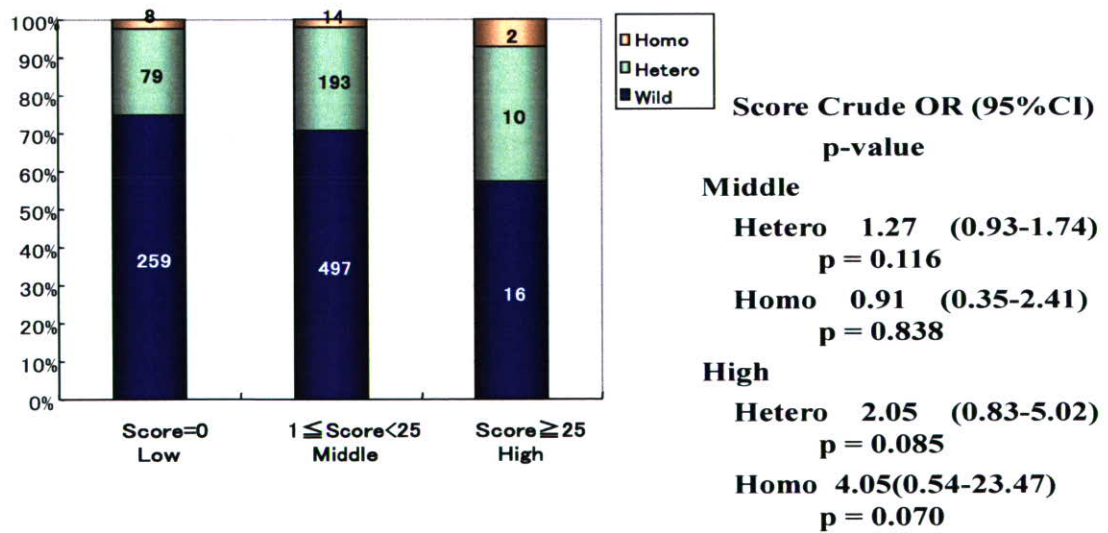


Fig 9 The relationship between the other chemical exposures and the GSTP1



短 報

工場労働者における化学物質過敏状態の 質問票調査

Questionnaire Survey of Factory Workers Regarding Chemical Sensitivity

加藤貴彦¹, 黒田嘉紀², 小宮康裕²

¹熊本大学大学院公衆衛生学・医療科学,

²宮崎大学医学部社会医学講座公衆衛生学分野

Takahiko KATO¹, Yoshiki KURODA² and
Yasuhiro KOMIYA²

¹Department of Public Health, Graduate School of
Medical Sciences, Kumamoto University and

²Division of Public Health, Department of Social
Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki,
Japan

キーワード: Chemical sensitivity, QEESI, Epidemiology

はじめに

近年, 身近に存在する化学物質の種類増加やオフィス・住宅の建材の変化・気密性の増加などによって種々の症状を訴える人が増加している。これらの症状は, 多種化学物質過敏状態 (Multiple chemical sensitivity (MCS)), シックハウス症候群などの名称で呼ばれているが, その概念・病態については十分に解明されておらず, 日本においてはその頻度に関する報告も少ない。本研究では, Millerらによって開発され, 米国にて妥当性, 信頼性が確認された化学物質曝露及び過敏症に関する質問票「Quick Environmental Exposure AND Sensitivity Inventory (以下 QEESI)」¹⁾を用い, 九州内2つの工場労働者を対象に, 化学物質過敏状態に関する実態調査を行った。

対象と方法

南九州に在し, IC基盤を主な生産品とするA社1,310

名(男936名, 女374名)と紙パルプ製品を生産品とするB社894名(男778名, 女113名)の計2,204名を対象者とした。A社の男の平均年齢39.4歳±8.8歳, 範囲19~67歳, 女の平均年齢32.8歳±8.7歳, 範囲18~67歳。B社の男の平均年齢42.8歳±10.4歳, 範囲16~65歳, 女の平均年齢47.6歳±9.7歳, 範囲19~67歳。調査は2003年8月から10月までの期間に, 自己記入式の質問紙法によって行った。有効回答数は, A社1,098名(83.8%), B社888名(回収率99.3%)であった。用いた質問票は, QEESIを石川らが日本人向けに翻訳し²⁾, さらに内山らが改良を加えたもの³⁾を参考に作成した。Millerらが開発したオリジナルのQEESIは, 「化学物質曝露 (Chemical Exposure)」「その他の化学物質曝露による反応 (Other exposure)」「症状 (Symptoms)」「症状のマスキング (Masking Index)」「日常生活への障害の程度 (Impact of Sensitivities)」の5項目, 各10問から成っている。本研究は対象者が患者ではなく就業者のため, 5項目のうち, Millerらが, カットオフ値を設定することで化学物質に対する高感受性者をスクリーニングできるとした¹⁾, 「化学物質曝露による反応」「その他の化学物質曝露による反応」「症状」の3項目について調査を行った。調査結果は3項目の10問それぞれについて, 0から10の段階で回答してもらい, 各項目の合計を0から100のスコアとして算出した。また, 同時に「化学物質過敏症」や「シックハウス症候群」と診断されたことがあるかについても質問した。尚, A社とB社は生産品に加え, 所在地の生活環境に違いがあるため, 別々に集計を行った。

本疫学研究に関しては, 研究内容を記述した書類を宮崎医科大学倫理委員会に申請し, 平成13年9月6日(受付番号30), 平成15年4月9日(受付番号82)に承認されている。質問票を使用するにあたっては, 調査に関し同意を得ること, その解析は集団で行い個人情報保持されることを表明している。

結 果

1. 化学物質過敏症やシックハウス症候群の診断歴

過去に「化学物質過敏症と診断されたことがある」と回答した人は, A社1,098名中3名(0.3%; 男性1名(57歳), 女性2名(30歳, 37歳)), B社888名中4名(0.5%; 男性3名(45歳, 46歳, 46歳), 女性1名(33歳))であり, 「シックハウス症候群と診断されたことがある」と回答した人は, A社1,011名中0名(0.0%), B社888名中1名(0.1%; 女性1名(33歳))であった。「化学物質過敏症とシックハウス症候群の両方の診断をされたことがある」と回答した人はいなかった。

2006年12月28日受付; 2007年2月15日受理

連絡先: 加藤貴彦 〒860-8556 熊本県熊本市本荘1-1-1 熊本大学大学院公衆衛生学・医療科学. Correspondence to: T. Katoh, Department of Public Health, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjou, Kumamoto 860-8556, Japan

(e-mail: katoht@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

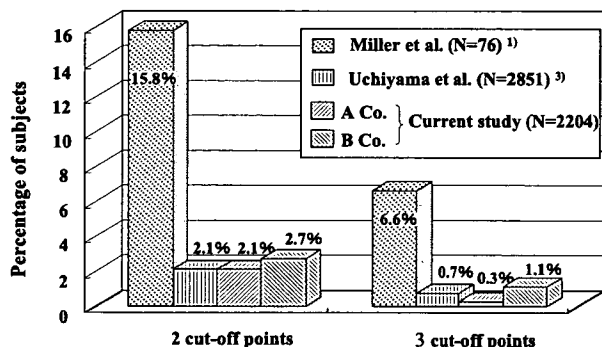


Fig. 1. Percentage of subjects meeting 2 or 3 cut-off point in the 3 studies.

Cut-off point: Symptom ≥ 40 , Chemical Intolerance ≥ 40 and Other Intolerance ≥ 25 .

2. カットオフ値によるスクリーニング

Millerらの報告に習い、「化学物質曝露による反応」「その他の化学物質曝露による反応」「症状」の3項目それぞれについて、 ≥ 40 、 ≥ 25 、 ≥ 40 のカットオフ値を設定し、化学物質に対して感受性の高い群をスクリーニングした¹⁾。今回の我々の調査でこれら3項目すべてのカットオフ値を満たしていた人は、A社 0.3%、B社 1.1%であり、いずれか2つの基準を満たしていた人は、A社 2.1%、B社 2.7%であった (Fig. 1)。

考 察

我々の調査では、化学物質過敏症、シックハウス症候群と診断されたことがある人は、いずれの企業においても1%以下であった。ただし、これらの健康障害が十分に社会的に認知されているとはいえ、診断をする医師の認識の差を反映している可能性も現時点では否定できない。

MillerらのQEESIを用いた調査によれば、対象群の6.6%が設定した3項目のカットオフ値を満たし、15.8%が2項目を満たしていた¹⁾。日本で実施された調査としては、2000年の内山らの一般住民を対象とした

研究報告がある³⁾。内山らは全国からの層化2段階無作為抽出した20歳以上の男女4,000人以上（有効回答数2,851（71.3%））を対象とし、QEESIを翻訳した質問票による面接調査を行っている。その報告によれば、設定したカットオフ値の3項目を満たし、化学物質に対して高感受性を持つと考えられる人は全体で0.74%であり、米国における割合の10分の1であった (Fig. 1)。

内山らの報告と同様に我々の調査結果でも、3項目のカットオフ値を満たしていた人は、A社 0.3%、B社 1.1%であり、米国人と比較し日本人の化学物質高感受性者の割合が低いという結果が示された。

北条らの報告⁴⁾によれば、日本人のMCS自覚者群のQEESI得点分布が、米国のMCS自覚症群と比較し、高得点者が少なく、分布幅が広いことを指摘している。従って、米国人のデータを基に設定されたカットオフ値は、日本人においては適切に高感受性者をひろいあげていない可能性がある。QEESIの調査表には、日本人の生活スタイルに合わない項目も含まれており、今後日本人の高感受性群を適切に判定できる質問票の開発とその実態把握のために継続的な疫学調査が必要だと考える。

謝辞：本研究の一部は、厚生労働省厚生科学研究費補助金（厚生科学総合研究事業）によって行われた。

文 献

- 1) Miller C, Prihoda T. The environmental exposure and sensitivity inventory (EESI): a standardized approach for measuring chemical intolerances for research and clinical applications. *Toxicol Ind Health* 1999; 15: 370-385.
- 2) 石川 哲, 宮田幹夫. 化学物質過敏症—診断基準・診断に必要な検査法—. *アレルギー・免疫* 1999; 6: 34-42.
- 3) 内山巖雄, 村山留美子. 平成11年度厚生科学研究費補助金報告書—公衆衛生学的立場から見た化学物質過敏症. 2000; 1-5.
- 4) 北条祥子. 日本人に対するQEESI応用の試み, 平成12年度~14年度厚生労働科学研究費補助健康科学総合研究事業シックハウス症候群の病態解明, 診断治療に関する研究報告書. 2003; 184-199.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
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	木村 穰	東海大学医学部基礎医学系
研究協力者	松坂 恭成	東海大学医学部基礎医学系
	猪子 英俊	東海大学医学部基礎医学系
	津田 道雄	東海大学医学部教育支援センター
	大久保朋一	東海大学医学部基礎医学系
	石川 哲	北里研究所病院臨床環境医学センター
	坂部 貢	北里大学薬学部
	青山 美子	青山内科小児科病院
	角田 和彦	かくたこども&アレルギークリニック

研究要旨

本年度は昨年度に引き続き *NTE*(*Neuropathy Target Esterase*)遺伝子とシックハウス症候群との遺伝学的な相関について *NTE* 遺伝子発現を中心に調べた。昨年度までに、シックハウス症候群患者集団および健常者集団を用いた一塩基多型の出現頻度に関する有意差検定の結果、*NTE* 遺伝子領域のイントロン 21 に位置する一塩基多型 (rs480208) について、その対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度に統計学的な有意差を見出し、さらにリンパ球における *NTE* は一塩基多型 (rs480208) の遺伝子型 A/A をもつ人が、他の遺伝子型 (A/G または G/G) をもつ人に比べて、統計学的に有意に低い酵素活性を示すことを報告した。本年度はさらに一塩基多型 (rs480208) の遺伝子型 AA と *NTE* 遺伝子の発現量との関連性を定量的 PCR によって解析した。その結果、まだデータは少ないが発現量との相関傾向が観察され、酵素活性測定の高難易さが定量的 PCR 法で解消される可能性が示された。また、モデル生物系として線虫(*C.elegance*)を用いた有機リン暴露による表現型への影響解析を開始した。

A. 研究目的

NTE (Nueropathy target esterase) 遺伝子は、セリンエステラーゼ活性をもつ膜タンパク質である。このエステラーゼはもともと有機リンとの反応性によって見出されたもので、*NTE* と有機リンとの結合は遅延型神経毒性 (OPIDN) を引き起こすことが知られている (文献 1)。

Nte 遺伝子欠損マウス (*Nte*^{+/-}) 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、野生型マウスに *Nte* の阻害物質である EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) を少量加えた場合もまた同様に、多動性が著しく高くなることも報告された (文献 2)。このようなことから、*Nte* 活性の低下が遺伝

的にも化学的にも神経毒性的効果を与えていることが明らかにされた (文献 2)。

そこで、*NTE* 遺伝子とシックハウス症候群との関連を詳細に解析するために、昨年度までに遺伝的多型マーカーを用いた遺伝学的相関解析を行ってきた。その結果、*NTE* 遺伝子領域におけるイントロン 21 に存在する一塩基置換 (rs480208) について統計学的有意差が観察された。

本年度は、ヒト好中球における *NTE* 遺伝子の発現量の定量的 RT-PCR による測定系を確立し、*NTE* 遺伝子の発現量と *NTE* 遺伝子多型について調べた。また扱いが簡単で世代時間が短い線虫をモデル生物として用い

た有機リンに対する解析系の基礎実験を開始した。

B. 研究方法

1) *NTE* 遺伝子発現量の測定

ヒト末梢血 10ml より室温で8時間以内に好中球を分画し、Total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen) 用いて抽出した。これらの RNA を鋳型に TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, UA) を用いて cDNA を合成し、7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) によって *NTE* 遺伝子の発現量を測定した。使用された Oligonucleotide PCR primers および TaqMan probe は次の通りである。NTE_forward PCR primer:

5'- TTCCAGACATGGCTGAAATCC -3',

a NTE_reverse PCR primer:

5'- CGCAGTAGGAGCTGGACTTGA -3',

a NTE_TaqMan probe:

5'-TGTCCTGTGTGCGGCAGCTAGAGGT-3',

TaqMan probe は FAM (5'-reporter) および TAMURA (3'-quencher) によって標識されたものを使用した。定量的 RT-PCR の cycling conditions は次の通りである。48 °C 30 分, 95 °C 10 分, 40 サイクル [15 秒 95 °C 、 1 分 60 °C]。RNA input および RNA quality さらに逆転写効率におけるサンプル間の違いを補正するために TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent VIC probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いた。

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体制も十分備えて万全を期している。

2) 線虫の相同遺伝子クローニング

線虫の相同遺伝子をデータベースより探索

し、その遺伝子塩基配列よりほぼ全長を含むようにプライマー配列設定を行った。*EcoRI* 配列をプライマー末端に配置し、PCR で増幅した N2 株由来の 7Kb DNA 断片を pGEM-Teasy ベクター (Promega 社) の *EcoRI* 部位にクローニングした。

3) 線虫の *NTE* 酵素活性測定

L4 期の線虫が多く含まれる非同調培養線虫を集め、これまでと同様に人工基質を用いて *NTE* 酵素活性を測定した (昨年度報告書参照)。

C. 研究成果

1. 遺伝子型に対するヒト *NTE* 活性と *NTE* mRNA 発現の比較。

昨年度までに、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 188 名および健常者集団 401 名を用いた関連解析の結果、イントロン 21 領域 (rs480208) 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)。また、こ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、遺伝子型 AA の頻度が、一般健常者集団において 43.4% であるのに対して、シックハウス症候群患者集団においては 31.3% と有意に遺伝子型頻度が減少していた (表 2、 $P=0.005$)。

さらに、シックハウス症候群患者 42 名および健常者 52 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結果、患者集団において統計学的有意に酵素活性が高いことも昨年度までに観察した ($P<0.0005$ 、図 1)。また、遺伝的相関解析より有意差の観察された一塩基多型 (rs480208) の遺伝子型 A/A をもつ人が、他の遺伝子型 (A/G または G/G) をもつ人の酵素活性よりも有意に低下していることも昨年度までに報告した ($P<0.01$ 、図 2)。

本年度は、さらに一塩基多型 (rs480208) の遺伝子型と *NTE* 遺伝子発現について解析を行った。ヒトの好中球より抽出した Total RNA を用いて定量的 PCR によって *NTE* 遺伝子の発現量を測定した。その結果、*NTE* 酵素活性と同様に一塩基多型 (rs480208) の