

シックハウス症候群に関する遺伝要因に関する研究

研究分担者	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 *NTE* 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さらに詳細に調べるとともに、実験動物として線虫を用い、シックハウス症候群の発症メカニズム解明に利用できるかどうかの検討を行った。まず前者は、シックハウス症候群患者集団および健常者集団の比較の結果、*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した。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、発現量との相関傾向が観察された。また、後者は相同遺伝子のクローニングを行うとともに、線虫における有機リンの感受性を求めた。その結果、線虫の相同遺伝子は約 7Kb におさまり、ヒトやマウスの 5 分の 1 程度であったが、タンパク質のドメイン構造はよく保存され、NEST ドメインにおけるアミノ酸相同性は約 90 % であった。一方、マウスやニワトリより低いものの、線虫で *NTE* 酵素活性を検出することができ、かつ有機リンの一種 DDVP に対する線虫の感受性は LD50 = 約 2.5mg/ml 程度であることが判明した。

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效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'-TTCCAGACATGGCT-GAAATCC-3', a NTE_reverse PCR primer : 5'-CGCAGTAGGAGCTG-GACTTGA-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℃ 30 分, 95℃ 10 分, 40 サイクル [15 秒 95℃、1 分 60℃]。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。さらに、有機リンの一種である DDVP に対する感受性を検討した。

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および化学物質過敏症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、本群集団 188 名および健常者集団 401 名を用いた相関解析の結果、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および化学物質過敏症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および化学物質過敏症患者 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をすでに報告している ($P<0.01$ 、図 2)。

昨年度から本年度にかけては、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) の遺伝子型 AA をもつヒトが、他の遺伝子型 (AG+GG) をもつヒトの *NTE* 遺伝子の発現量よりも低下していることが観察された。

2. 線虫を用いた *NTE* の基礎的解析

NTE に関しては遺伝子解析からのアミノ酸配列の推測などから、ヒトからバクテリアに至るまでの活性ドメイン (NEST ドメイン) のアミノ酸配列の保存性の高さが指摘されている (活性中心のセリン残基中心のアミノ酸配列の相同性は線虫とヒトとの間でも 80% 以上と非常に高値を示している)。

線虫は世代が数日と短く、体長が 2 - 3cm と小さく透明性の高いことから顕微鏡下での観察も容易である点で部分的にはヒトの表現型の解析系に十分持ちうる価値のある実験動物であり、ヒト疾患と同様の変異体も多数見つかった。

そこでまず線虫の *NTE* 遺伝子は DNA データベースより得られた配列をもとにプライマーを作成し、7Kb の遺伝子領域をクローニングしていたが、制限酵素の位置等からヒトの *NTE* 遺伝子の相同遺伝子であることが判明した。今後、遺伝子発現の検出プローブや、遺伝子導入のツールとして利用価値が高い。

3. 線虫を用いた解析

昨年度クローニングに成功した相同遺伝子のさらなる解析を行うとともに、昨年度予備的に行ったヒト血液と同様の *NTE* 活性測定系において線虫の *NTE* 活性測定を L4 期の成虫について検出した (図 3)。

次いで、有機リンに対する線虫の感受性を求め、おおよそ 1-5mg/ml 程度の濃度で DDVP (ジクロルボス) に L1 期に暴露すると約半数が L4 期までに死亡することが判明した。

D. 考察

これまでの研究結果から、*NTE* 酵素活性を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測定し、*NTE* 酵素活性は、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高値を示すことを観察した。また、*NTE* 遺伝子のイントロン 21 に存在する SNP の遺伝子型 AA がシックハウス症候群患者集団において有

意にその頻度が低いことも見出された。さらに、遺伝子型 A/A の *NTE* 酵素活性は他の遺伝子型 A/G+G/G と比べて統計学的に有意な低値を示すことも観察された。本年度は、同様の遺伝子型と *NTE* 遺伝子発現との関連性について測定を行ったが、*NTE* 酵素活性と同様に遺伝子型 A/A の *NTE* 遺伝子の mRNA 発現量は他の遺伝子型 A/G+G/G と比べて低いことが観察された。

このことより、遺伝子型 A/A を有することと *NTE* 酵素活性および遺伝子発現の低下との関連が予想され、健常者集団と比べてシックハウス症候群患者集団における遺伝子型 A/A の頻度低下にとともに、シックハウス症候群患者集団で *NTE* 酵素活性が高い傾向が観察されたと考えられる。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。このエステルは炭化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モデルが提唱されているが、ここで生成された「Aged Esterase」は細胞毒性を示すと考えられている。シックハウス症候群患者においては、*NTE* 酵素活性の上昇によりこの有機リン代謝経路の中間生成物である有毒な「Aged Esterase」の生成量が健常者に比べて増加することによって、慢性的な神経毒性が引き起こされている可能性があるのではないかと考えられる。研究対象の病態は多様であるため、今後、診断基準に従って選ばれた対象について検討する必要があると思われる。

一方、実験動物を用いる解析は今後の環境要因物質の測定系、あるいは発症機構の解析のために非常に重要性を増すと思われる。線虫の *NTE* 遺伝子クローニングや活性測定系の確立を行っていたが、今回、LD50 と言える数値を求めることができた。ヒトのモデル生物として線虫の利用価値の高いことが判明したと言える。今後、例えば有機リン暴露にともなう行動変化と活性変化、酵素量変化などの相関関係を観察していきたい。

現在、線虫のみならず遺伝子操作マウスの入手、作成も検討中である。

E. 結論

今年度の主な成果は下記の通りである。

1. ヒト好中球における定量的 PCR を用いた *NTE* 遺伝子発現の測定系を確立した。採血後即時解析する必要のある *NTE* 活性測定にとってかわる方法となる可能性がある。
2. 遺伝子型 AA (rs480208) の *NTE* 遺伝子発現は他の遺伝子型 AG+GG と比べて低下することが観察された。
3. 実験動物としての線虫の *NTE* 遺伝子のクローニングと低値ながらも *NTE* 活性測定に成功した。

F. 研究発表

1. 発表論文
なし

2. 学会発表

松坂恭成他、シックハウス症候群における *Neuropathy Target Esterase* (*NTE*) 酵素活性および遺伝子多型、第 16 回日本臨床環境医学会、2007 年 7 月 東京

参考文献

1. Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy-Is *NTE* alive and well? *Toxicol Appl Pharmacol* 102:385-399, 1990
2. Winrow CJ. et al. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nature Genetics* 33: 477-485, 2003.

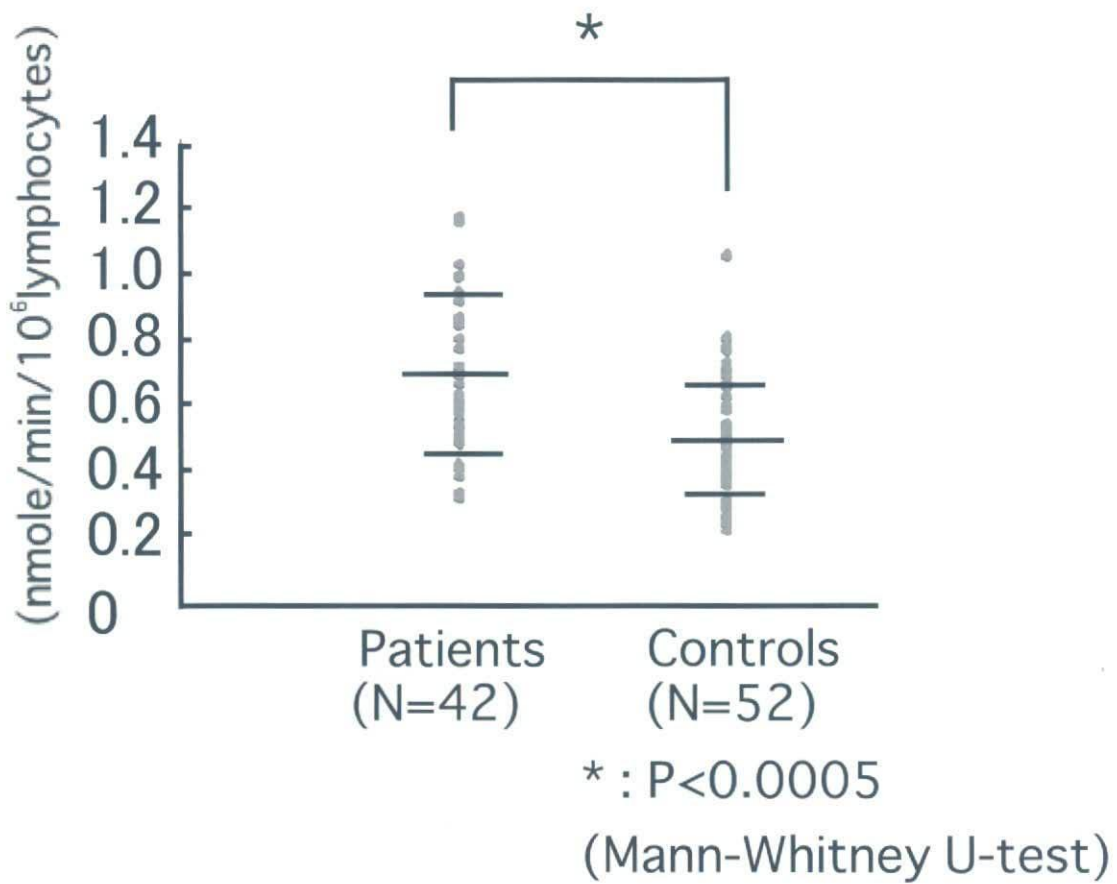


図1.ヒトリンパ球におけるNTE酵素活性

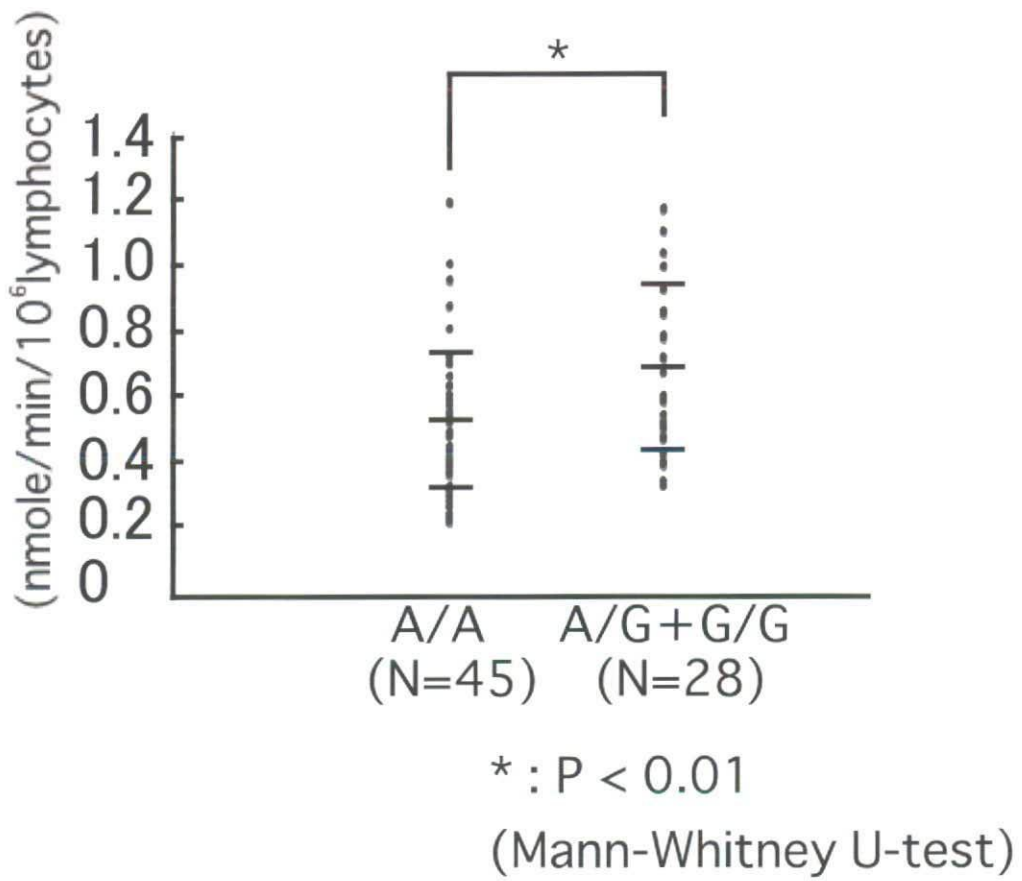
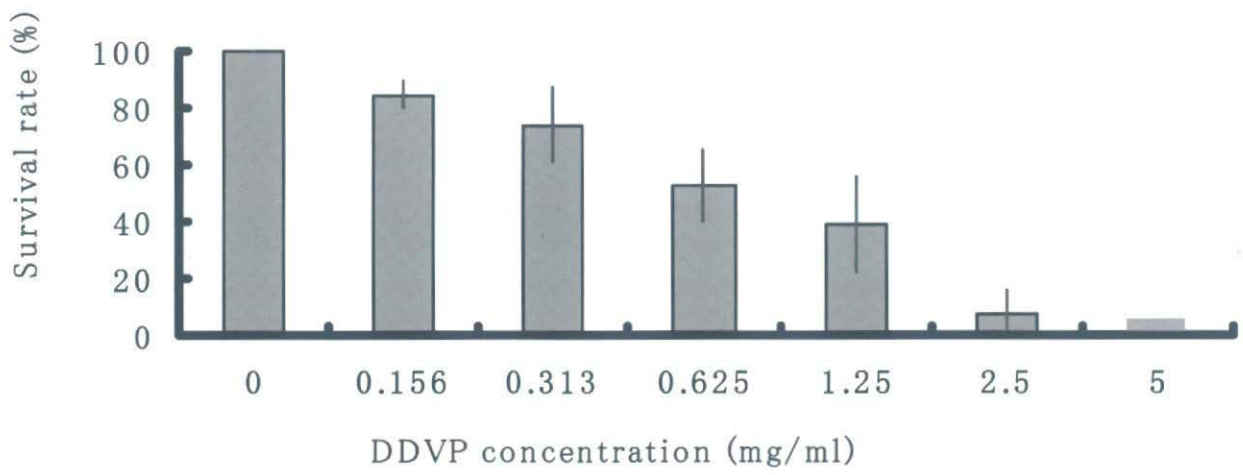


図2. *NTE* 酵素活性と 遺伝子型 (rs480208)



☒ 3 Survival rate after DDVP exposure in *C. elegans*

シックハウス症候群の診断・治療法及び具体的対応方策に関する研究
シックハウス症候群患者における VOC 曝露と心拍変動のリアルタイムモニタリング

研究分担者	熊野 宏昭	東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学准教授
研究協力者	水越 厚史	東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学
	柳沢 幸雄	東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学
	吉内 一浩	東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学
	坂部 貢	北里大学薬学部公衆衛生学
	松井 孝子	北里研究所病院臨床環境医学センター
	宮田 幹夫	北里研究所病院臨床環境医学センター
	石川 哲	北里研究所病院臨床環境医学センター

研究要旨

【目的】シックハウス症候群および化学物質過敏症患者に対して、日常生活下での症状や心拍変動に加え、化学物質への曝露の経時的な調査を行い、病態の把握や診断及び具体的な対応方策のための客観的なデータを得ることを目的とした。【方法】患者 8 名に、日常生活下で Holter モニタと VOC モニタを携帯してもらい、心拍変動と TVOC 個人曝露濃度を 24 時間記録した。また同時に行動・症状記録表に滞在した場所と活動の種類、自覚症状の種類の記事を依頼した。心拍変動は RR 間隔の時系列データを wavelet 解析して 10 秒間毎の HF と LF/HF の平均値を求め、5 分間の平均値とした。TVOC は、20 秒～1 分間毎の平均値、最大値、最小値を記録し、5 分間隔の値とした。また、変化量の指標として最大値と最小値の差 (Δ TVOC)、5 分前からの濃度増加量 ($d+$ TVOC) と減少量 ($d-$ TVOC) を求めた。これらの指標について交絡因子となる活動時のデータを除去後、解析を行った。【結果と考察】すべての指標に関して健常者 7 名の結果と比較したところ、有意な差は確認されなかった (wilcoxon の検定)。TVOC と心拍変動の指標の相関を確認したところ (Spearman の順位相関係数)、TVOC 濃度の変化量と HF の間に負の相関、LF/HF の間に正の相関が見られる例が多く、TVOC 濃度の変化が、増加あるいは減少にかかわらず、引き続き自律神経活動と関連していることが示唆された。症状自覚時と通常時で比較すると (wilcoxon の検定)、1 名を除く全ての患者において、統計的に有意ではないが TVOC 濃度または Δ TVOC が症状自覚時に高値を示し、患者は TVOC 濃度が高いか、変化量が大きいときに症状を自覚する可能性が示唆された。また、症状自覚時に HF が低下する被験者が多かった (8 名中 6 名)。個々の患者の TVOC 濃度と心拍変動の時系列データをみると、症状と心拍変動が良く関連しているように見える患者とそうでない患者がいたことから、VOC の曝露を避けたほうが良いのか、副交感神経の働きを高める治療を心がけたほうが良いのか等、それぞれの結果を基に、症状の予防対策を提言することができると考えられた。

A. 研究目的

シックハウス症候群の研究において、化学物質曝露と症状の実態を把握することは急務であるが、揮発性有機化合物 (VOC) の個人曝露濃度を測定し、症状出現との関連を調べた研究

は稀である。前年度は、VOC のリアルタイムモニタを用いて曝露濃度を測定し、自覚症状と心拍変動の関係を調べる調査を健常者に対して行い、調査方法の有効性を確認した。その結果、TVOC 曝露濃度の変化 (5 分間隔) が自律神経

活動へ影響を及ぼすことが示唆された¹⁾。そこで今年度は、同様の調査を患者に対して行い、シックハウス症候群患者の病態の把握や診断及び具体的な対応方策のための客観的なデータをを得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象者

〔被験者〕

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、診察および各種検査後、専門医によりシックハウス症候群および化学物質過敏症と診断された患者8名(男性3名、女性5名、年齢は、31歳～62歳)に協力を依頼した。

〔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、研究担当員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。

- ① 検査の目的。
- ② 検査の内容。
- ③ 安全性および考えられる不都合。
- ④ 参加の同意や中途での中止は本人の自由であり、それによって何ら不利益は受けないこと。
- ⑤ 名前や個人が特定できる情報は、本研究結果の報告の際にも公表しないこと。
- ⑥ 結果は本人に知らせ、治療にも役立てること。

2. 調査方法

〔概要〕

調査は2006年7月から2007年12月にかけて行った。日常生活においてVOCモニタ(ppbRAE、RAE systems)やHolter心電計(FM-150またはFM-180、フクダ電子)を用いてTVOCの曝露と心拍変動のリアルタイムモニタリングを行った。測定は午前8時から24時間連続で行った。同時に行動記録表への記入を依頼した。以下にそれぞれについて詳細を述べる。

〔VOCモニタ〕

VOCモニタにより24時間のTVOCの個人

曝露濃度を測定した。検出器は光イオン化検出器(PID)であり、10.6 eVのUVランプを使用した。測定の前には純空気(G1)と10ppmまたは100ppmのイソブチレンガスによって校正した。また、モニタの値を見ることによる心理的なバイアスを防ぐため、ディスプレイにシールを貼って、読み取り値が見えないようにした。また、ポンプの騒音を防ぐため、消音ボックスに入れた状態にした。被験者には、モニタを手提げバッグに入れ、持ち運ぶか、身近なところに置いておくように指示した。測定期間中の20秒間か1分間のTVOC濃度の平均値、最小値、最大値を記録した。また、温室時計(HOBO U10、Onset)もバックに入れ、同じ時間間隔で温湿度を記録した。

〔Holter心電計〕

Holter心電計により24時間の心電図を記録した。被験者には4つの電極を規定の場所双極誘導(CM5、NASA)に張り付けるよう指示した。電極シールに反応しないよう、使用前は空気にさらし、なるべく匂いがなくなるようにした。心電計はゆれや振動によるノイズを避けるため、おなかの部分にシールで固定し、ひもで首から提げてもらった。心電図データは125 Hzで記録し、マルチメディアカードに記録した。

〔行動記録表〕

行動記録表を図1に示す。健常者と同様、被験者には測定期間中に滞在した環境(自宅、職場、その他室内、屋外)と行った活動(着席、起立、徒歩、運動、睡眠、食事)を選択肢の中から選んでもらった。また、自覚症状を感じた場合、症状のレベルを10段階で表し、QESSIの症状の項目から該当するものを複数選択可で選んでもらった。以上の項目は、5分間隔で記入するように依頼した。

3. 解析方法

〔TVOC〕

VOCモニタにより記録した値は、イソブチレンからトルエンへの換算係数0.5を用いてトルエン濃度に換算し²⁾、さらに温度補正して $\mu\text{g m}^{-3}$ に変換した。この値を用いて、5分間隔のTVOCの平均濃度、最高濃度、最低濃度を求めた。

濃度の絶対値に加え、濃度の変化量の指標と

して、最大値と最小値の差（以下、 Δ TVOC）を求めた。この値は5分間内での濃度変化の最大値を表す。濃度増加時、減少時のどちらも正の値となることに留意する必要がある。この値に加え、ひとつ前（5分前）の平均値との差分を求め、正の値を $d+TVOC$ 、負の値を $d-TVOC$ とした。これらの値は、5分前からの濃度増加、あるいは減少を表す。

〔心拍変動〕

記録された心電図のRR間隔の時系列データに対して、Gabor関数を用いたwavelet変換を行い（Fluclet WT、大日本住友製薬）、10秒間の低周波領域（LF、0.04 - 0.15 Hz）と高周波領域（HF、0.15 - 0.40 Hz）のパワー（msec²）およびLF/HFを求め、5分間隔の平均値とした。なお、HFは副交感神経活動、LF/HFは交感神経活動との関連が報告されている³⁾。

〔除外データ〕

生理学的状態と心拍変動の関係については多くの研究がなされている。様々な条件により必ずしも一貫した傾向はないが、運動によるHFの減少⁴⁾、食事によるLF/HFの増加とHFの減少⁵⁾、睡眠時のLFの減少、HFの増加⁶⁾等が報告されている。したがって、これらの交絡因子の影響を除くため、これらの活動（運動、食事、睡眠）およびその影響が続くと考えられる時間（運動+15分、食事+60分）のデータは解析から除外した。

C. 結果と考察

1. 各指標の健常者との比較

TVOCや心拍変動の指標に関して、健常者と比較した結果を表1に示す。すべての指標に関して、健常者と患者の間に有意な差は確認されなかった（wilcoxonの検定）。TVOC曝露濃度に関しては、患者のほうが高い傾向が示されたが、自宅での曝露濃度は低く、環境の改善が可能な自宅においては、濃度を低減する対策を行っていることが考えられた。また、患者のHFの値は健常者の6割程度と低い値を示した。

2. TVOCと心拍変動の関係

TVOCと心拍変動の間関係を調べるため、二変量の相関解析を行った。データの分布が正規分布に従わなかったことと、外れ値の影響を

低減するため、Spearmanの順位相関係数を求めた。統計ソフトはJMP7（SAS）を用いた。結果を表2と図2、3に示す。TVOC濃度とHFの間には、8名中4名に負の相関が示された（2名は有意、 $p < 0.05$ ）のに対し、 Δ TVOCとHFの間には、5名に負の相関が確認された（4名は有意、 $p < 0.05$ ）。一方、TVOC濃度とLF/HFの間には、4名の被験者に正の相関が示された（1名は有意、 $p < 0.05$ ）のに対し、 Δ TVOCとLF/HFの間には、6名に正の相関が確認された（1名は有意、 $p < 0.05$ ）。このことから、VOC濃度の変化量が大きいつき、副交感神経活動が抑制され、交感神経活動が賦活することが考えられた。

さらに $d+TVOC$ と $d-TVOC$ についてみると、 $d+TVOC$ とHFは負の相関の傾向（7名が負の相関、うち4名は有意、 $p < 0.05$ ）、 $d-TVOC$ とHFは正の相関の傾向（7名が正の相関、うち5名は有意、 $p < 0.05$ ）が示された。また、 $d+TVOC$ とLF/HFは正の相関の傾向（7名が正の相関、そのうち4名は有意）、 $d-TVOC$ とLF/HFは負の相関の傾向（7名が負の相関、そのうち3名は有意）が示された。これらの傾向は、TVOC濃度の変化が、増加あるいは減少にかかわらず、引き続き心拍変動の指標と関連していることを示唆している。

これらの傾向は、健常者にもよく見られる傾向であったことから（図2、3）、VOC曝露に対して患者と健常者は同様の反応を示すことが示唆された。

3. 自覚症状時と通常時との比較

自覚症状時と通常時の各指標の比較を表3と図4に示した。症状時に6名はTVOC曝露濃度が高く、3名はTVOC変化量が高く、統計的に有意ではないが（wilcoxonの検定）、患者fを除く全ての被験者において、TVOC濃度あるいは変化量が高値を示していた。患者fは症状自覚時間が短かったため（0.3時間）、他の患者と異なる傾向を示した可能性がある。この結果から、患者はTVOC濃度が高いとき、あるいは変化量が大いつきに症状を自覚する可能性が示唆された。

心拍変動に関しては、症状自覚時にHFが低下する被験者が多かった（8名中6名）。また、6名の患者は、湿度が高いときに自覚症状を感

じており、症状出現に湿度の影響があることも示唆された。

4. ケーススタディ

これまでの結果から、患者における曝露と症状の実態を把握できたと考えられる。そこで、具体的な対応方策を提案するために、患者それぞれの傾向を確認した。そのなかで特徴的だった2例を以下に紹介する。

[患者 a]

患者 a は 39 歳男性で研究職に就いている。調査期間中、症状を感じていた時間は 2.7 時間。症状の種類とその症状を感じていた時間の割合は、気管粘膜 (91%)、神経・末梢神経 (91%)、頭部 (91%)、皮膚 (3%) であった。反応したもの (と感じたもの) は、殺虫剤、たばこ、化粧品、芳香剤、ペンキ、洗剤、煙、館内消毒等であった。通常時と自覚症状時を比較すると、自覚症状時は、TVOC 濃度と HF が低く、 Δ TVOC と LF/HF が高かった (表 3)。

TVOC 濃度と HF の経時変化を図 5 に示す。全体として、HF が低下しているときに自覚症状が出現している傾向が見られた。特に 18:30 ~ 0:30 のグラフをみると、TVOC 曝露濃度が高いときに HF が減少し、ある程度まで低下した段階で急激な曝露をした時に自覚症状が出現している。また、HF が上昇した後に症状が治まっている。以上の傾向から、HF が低下しているときに、TVOC 濃度が上昇すると症状が引き起こされる可能性がある。したがって、グラフに示されたような急激な曝露 (殺虫剤、たばこ、化粧品) やその環境 (特に屋外) を避けるように注意し、副交感神経の活動を高めるような生活を心がけることにより症状の出現を抑えることができるかもしれない。

[患者 d]

患者 d は 62 歳女性で主婦をしている。調査期間中、症状を感じていた時間は 9.8 時間。症状の種類とその症状を感じていた時間の割合は、肺 (8%)、気管粘膜 (85%)、心・循環 (85%)、胃腸 (3%)、認識 (1%)、神経・末梢神経 (92%)、頭部 (92%)、皮膚 (2%) であった。通常時と自覚症状時を比較すると、自覚症状時は、HF と LF/HF が低く、TVOC と Δ TVOC が高かった (表 3)。

TVOC 濃度と HF の経時変化を図 6 に示す。

8:00 から 14:00 にかけて自覚症状が多発しているが、TVOC 濃度は一定であり、HF との関連もグラフからは確認できない。よって、患者 d は VOC モニタで検知できない物質に反応しているか、あるいは学習性の症状を発現している可能性がある。一方、16:00 以降は症状が持続している。このときの \log_{10} HF は 8:00 ~ 14:00 のグラフと比べて低く、1 程度であった。よって、この患者に関しても HF が低い時に症状を感じるという傾向があるといえる。そのため、VOC の曝露を低減するよりも、副交感神経の活動を高めるような生活を心がけることが症状の予防には効果的かもしれない。

D. 結論

シックハウス症候群および化学物質過敏症患者 8 名に関して、TVOC と心拍変動のリアルタイムモニタリングを行った。健常者 7 名の結果と比較したところ、すべての指標に関して有意な差は確認されなかった (wilcoxon の検定)。TVOC と心拍変動の指標の相関を確認したところ (Spearman の順位相関係数)、TVOC 濃度の変化量と HF の間に負の相関、LF/HF の間に正の相関が見られる例が多く、TVOC 濃度の変化が、増加あるいは減少にかかわらず、引き続き自律神経活動と関連していることが示唆された。症状自覚時と通常時で比較すると (wilcoxon の検定)、1 名を除く全ての患者において、統計的に有意ではないが TVOC 濃度または Δ TVOC が症状自覚時に高値を示し、患者は TVOC 濃度が高いか、変化量が大いときに症状を自覚する可能性が示唆された。また、症状自覚時に HF が低下する被験者が多かった (8 名中 6 名)。個々の患者の TVOC 濃度と心拍変動の時系列データをみると、症状と心拍変動が良く関連しているようにみえる患者とそうでない患者がいたことから、VOC の曝露を避けたほうが良いのか、副交感神経の活性化を心がけたほうが良いのか等、それぞれの結果を基に、症状の予防対策を提言することができると考えられた。

研究対象の病態は多様であり今回提案した狭義のシックハウス症候群の定義と診断基準により選ばれた症例で、今後は検討することが必要であると思われる。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 水越厚史、熊谷一清、山本尚理、野口美由貴、吉内一浩、熊野宏昭、小沢 学、松井孝子、坂部 貢、柳沢幸雄、化学物質過敏症患者における VOC 曝露と心拍変動のリアルタイムモニタリング、第 17 回日本臨床環境医学会総会、2008.

参考文献

- 1) Mizukoshi A, Yamamoto N, Kumagai K, Yoshiuchi K, Kumano H and Yanagisawa Y, Real-time measurements of VOC exposure and heart rate variability in indoor and outdoor environments, the 6th International Conference on Indoor Air Quality Ventilation & Energy Conservation in Buildings, 2007.
- 2) RAE systems: Application & Technical Notes 3rd Edition, 2005.
- 3) Camm AJ, Malik M, Bigger JT, G, Cerutti S, Cohen RJ, Coumel P, Fallen EL, Kennedy HL, Kleiger RE, Lombardi F, Malliani A, Moss AJ, Rottman JN, Schmidt G, Schwartz PJ and Singer DH: Heart rate variability Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal* 17: 534-381, 1996.
- 4) Casadei B, Cochrane S, Johnston J, Conway J and Sleight P: Pitfalls in the interpretation of spectral-analysis of the heart-rate-variability during exercise in humans. *Acta Physiologica Scandinavica* 153: 125-131, 1995.
- 5) Lu CL, Zou XP, Orr WC and Chen JDZ: Postprandial changes of sympathovagal balance measured by heart rate variability. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 857-861, 1999.
- 6) Baharav A, Kotagal S, Gibbons V, Rubin BK, Pratt G, Karin J and Akselrod S: Fluctuations in autonomic nervous activity during sleep displayed by power spectrum analysis of heart-rate-variability. *Neurology* 45: 1183-1187, 1995.

表 1 Comparison between controls subjects and patients.

	Controls		Patients		p ^c
	n ^a	Mean ± SD ^b	n	Mean ± SD ^b	
TVOC exposure concentration ($\mu\text{g m}^{-3}$)					
Total	7	176 ± 130	8	298 ± 149	0.12
Home	7	299 ± 267	8	254 ± 204	0.95
Office	6	99 ± 21	2	262 ± 193	0.52
Other indoor	5	197 ± 118	5	291 ± 258	1.00
Outdoor	6	154 ± 72	5	181 ± 191	1.00
HRV					
HF (msec ²)	7	104.2 ± 89.0	8	65.5 ± 33.1	0.52
LF/HF	7	15.3 ± 19.0	8	12.7 ± 7.4	0.77

^a Sample size

^b Standard deviation

^c Wilcoxon non- parametric test

表 2 Correlations between TVOC and HRV.

	Subjects														
	a	b	c	d	e	f	g	h	- ^c	+ ^d					
TVOC vs HF	-0.33	** ^b	-0.03	0.02	0.20	* ^b	-0.17	*	0.17	*	0.06	-0.15	4(2)	4(2)	
Δ TVOC vs HF	-0.43	**	0.11	-0.33	**	0.00	-0.05	0.03	-0.24	*	-0.30	**	5(4)	3(0)	
d+TVOC vs HF	-0.48	**	0.13	-0.37	*	-0.16	-0.09	-0.15	-0.38	*	-0.46	**	7(4)	1(0)	
d-TVOC vs HF	0.36	**	0.09	0.45	**	-0.08	0.38	**	0.30	*	0.15	0.30	**	1(0)	7(5)
TVOC vs LF/HF	0.04		0.03	-0.12	-0.07	0.20	**	-0.24	**	-0.12	0.03	0.03	4(1)	4(1)	
Δ TVOC vs LF/HF	0.06		0.17	0.20	0.13	-0.05	-0.05	0.30	**	0.10	0.10	0.10	2(0)	6(1)	
d+TVOC vs LF/HF	0.07		0.42	*	0.40	*	0.04	0.03	0.25	*	0.34	*	-0.04	1(0)	7(4)
d-TVOC vs LF/HF	0.10		-0.15	-0.38	*	-0.21	-0.36	**	-0.26	*	-0.16	-0.12	7(3)	1(0)	

^a ** Spearman rank correlation, $p < 0.01$

^b * Spearman rank correlation, $p < 0.05$

^c - Numbers of the subjects showing negative correlation (significant)

^d + Numbers of the subjects showing positive correlation (significant)

表 3 Comparison between symptom and normal condition.

	Subject								↓ ^e	↑ ^f			
	a	b	c	d	e	f	g	h					
TVOC	↓	↑	↑	↑	**	↑	↓	↑	↑	2(0)	6(1)		
Δ TVOC	↑ ^a	↓	↓	↑		↓	↓	↑	↓	5(0)	3(0)		
HF	↓ ^b	↓	** ^c	↓	↓	**	↑	**	↓	6(2)	2(1)		
LF/HF	↑	↑	**	↑	↓	↓	↓	↓	↓	5(0)	3(1)		
Temp	↓	↓		↑		-	↑	↓	**	↓	*	5(2)	2(0)
RH	↑	↑	* ^d	↑	↑	**	-	↓	↑	*	↑	1(0)	6(3)

^a ↑ increase during symptoms

^b ↓ decrease during symptoms

^c ** Wilcoxon non-parametric test, p<0.01

^d * Wilcoxon non-parametric test, p<0.05

^e Number of the subjects showing change of decrease (significant)

^f Number of the subjects showing change of increase (significant)

時刻	場所			活動					症状出現 症状レベル	症状の種類							備考						
	自宅	職場	その他室内	屋外	着席	起立	徒歩	運動		睡眠	食事	筋	気管粘膜炎	心・循環	胃腸	泌尿		情緒	神経・末梢神経	頭部	皮膚	泌尿・生殖器	
8:00																							
8:05																							
8:10																							
8:15																							
8:20																							
8:25																							
8:30																							

図 1 Time-activity pattern log.

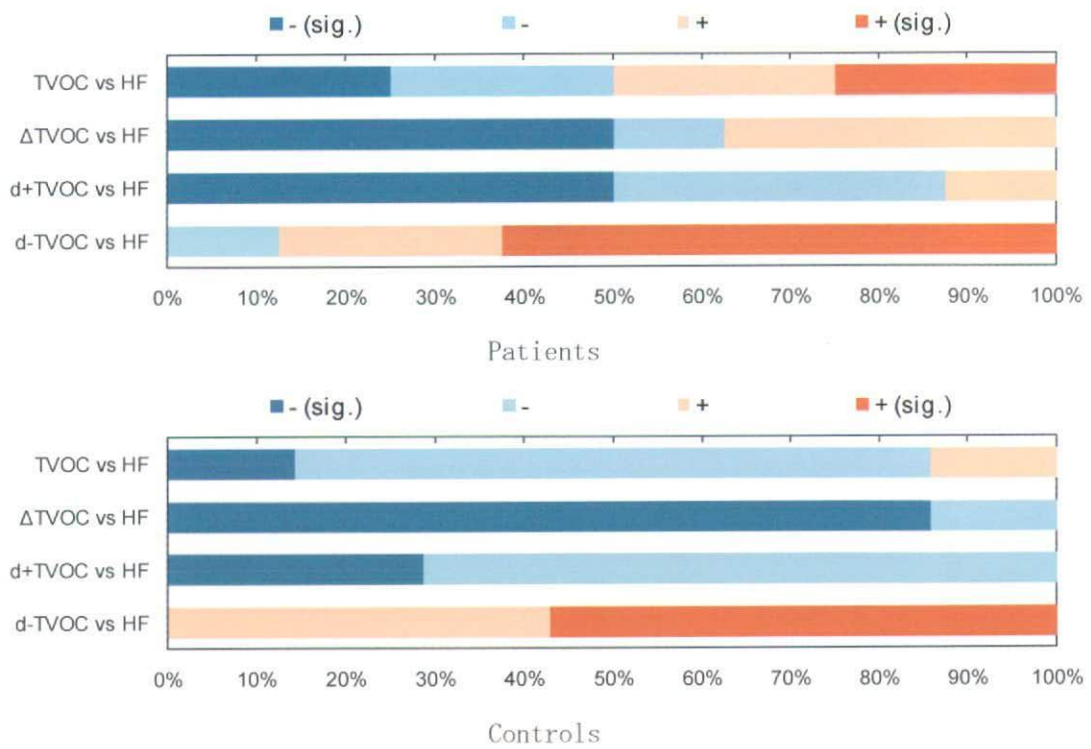
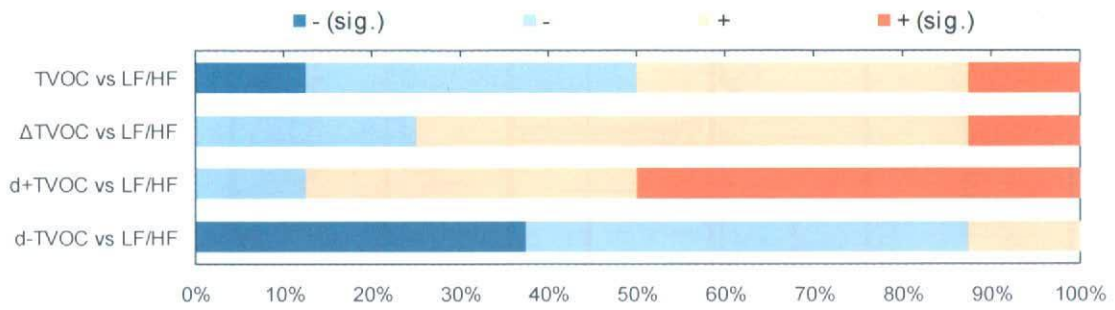
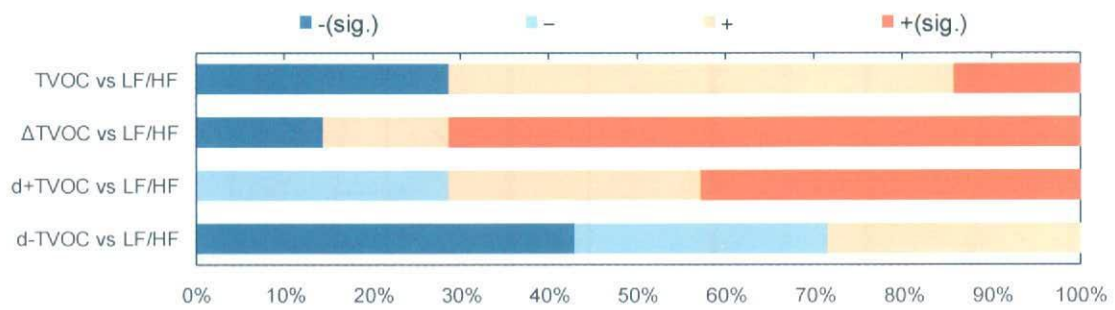


図 2 Correlation between TVOC parameters and HF.

-: Negative correlation, +: Positive correlation, (sig.): Significant correlation.



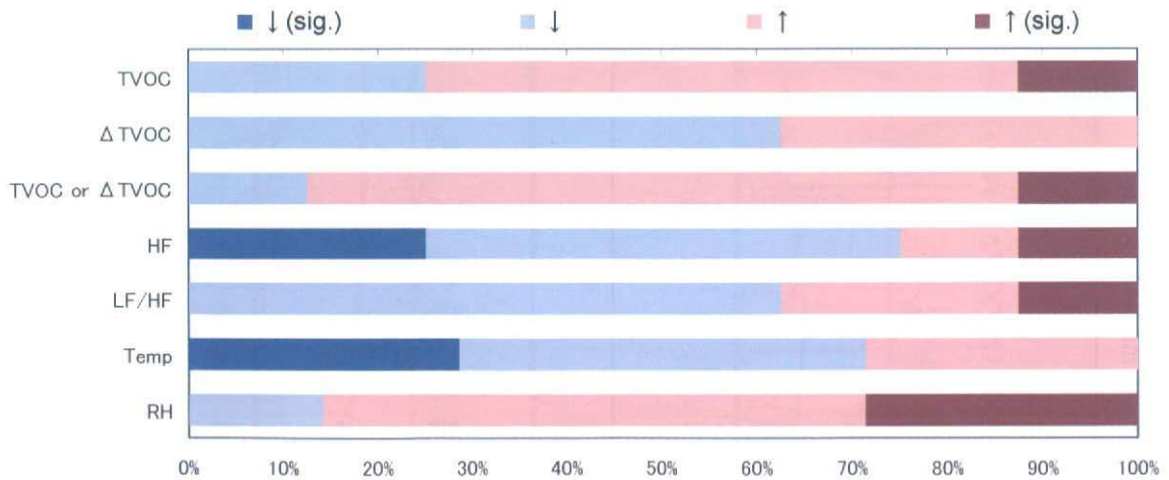
Patients



Controls

☒ 3 Correlation between TVOC parameters and LF/HF.

-: Negative correlation, +: Positive correlation, (sig.): Significant correlation.



☒ 4 Comparison between symptom and normal condition.

↓: decrease during symptoms, ↑: increase during symptoms, (sig.): significant.

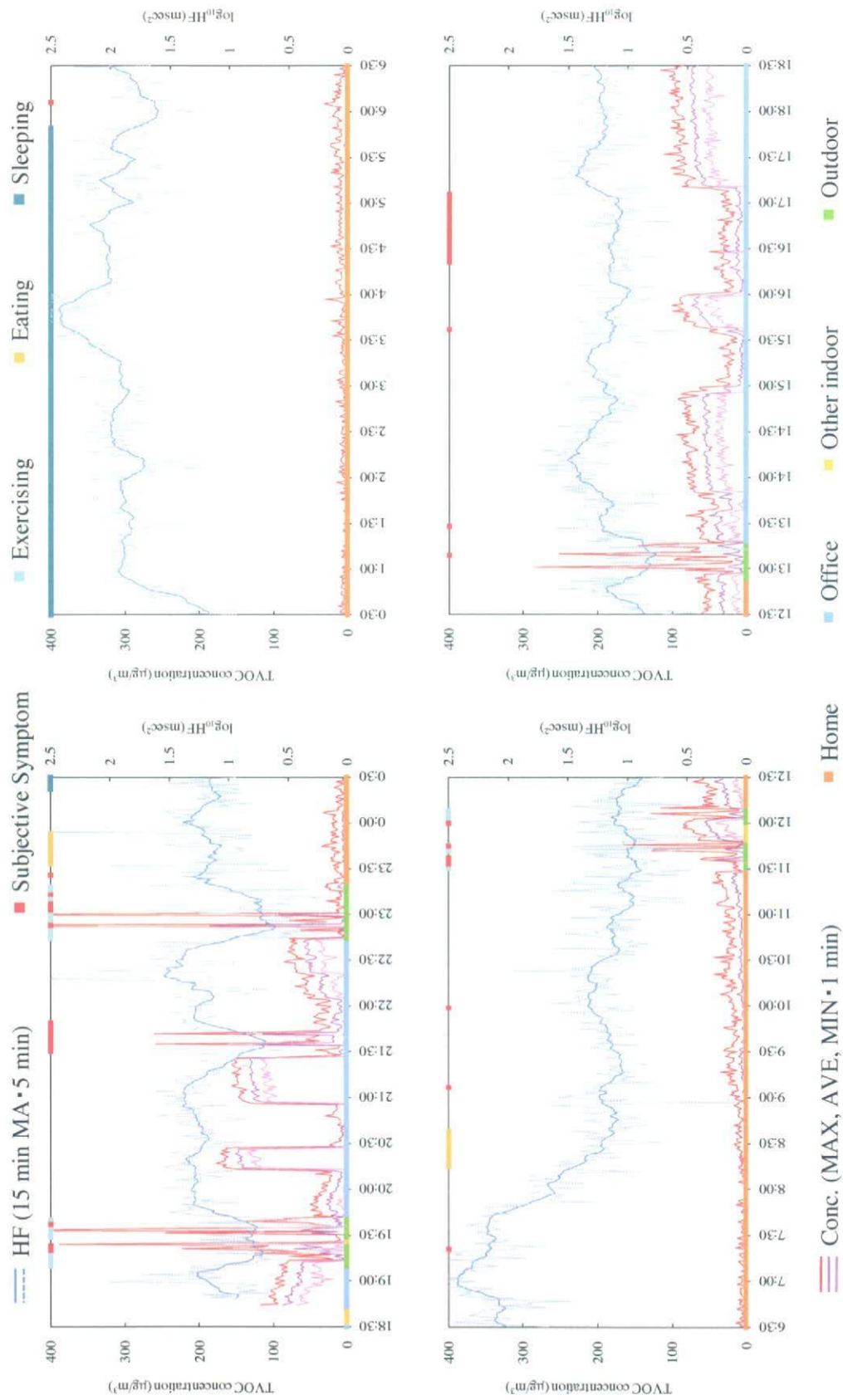
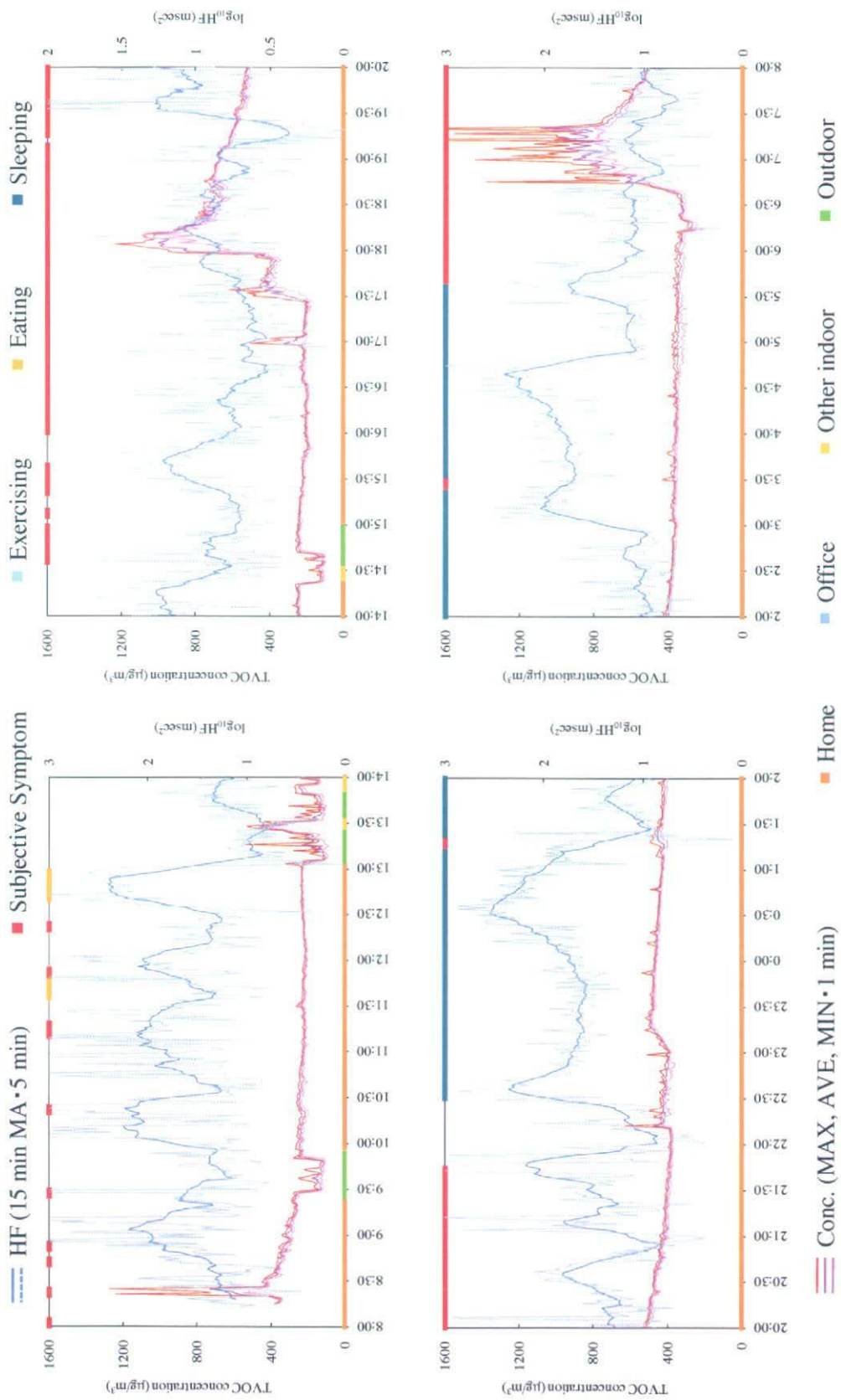


Figure 5 Time-series data of TVOC and HF (subject a).



☒ 6 Time-series data of TVOC and HF (subject d).

平成 20 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共通の客観的診断法に関する研究
—神経学的手法を用いた総合評価—

研究分担者	坂部 貢	北里大学薬学部公衆衛生学講座
研究協力者	相澤 好治	北里大学医学部衛生学公衆衛生学
	石川 哲	北里研究所病院臨床環境医学センター 北里大学名誉教授
	宮田 幹夫	北里研究所病院臨床環境医学センター 北里大学名誉教授
	松井 孝子	北里研究所病院臨床環境医学センター
	小沢 学	北里研究所病院臨床環境医学センター
	清野 正子	北里大学薬学部公衆衛生学講座
	中村 亮介	北里大学薬学部公衆衛生学講座

研究要旨

A. 研究目的

シックハウス症候群（SHS）の客観的診断において、神経系の異常所見は有用な指標となる。そこで平成 18 年度の研究では、本症の病型分類と中枢性眼球運動障害との関連性について検討した。次に平成 19 年度の研究では、推定原因物質と自律神経機能障害との関連性について検討し、興味ある知見が得られた。さらに 3 年目となる本年度は、本研究班で作成中の診療ガイドラインを意識し、本症に共通の客観的指標としての神経学的所見を中心に総括的検討を行った。

B. 研究結果

健常者と患者群（狭義の SHS 患者）のサッケード率（眼球の滑動性追従運動異常の程度）は、患者群で高く、統計学的有意差が認められた。またサッケード率の程度は、自覚症状の程度（QEESI スコア）とある程度の相関が認められた。さらに、自覚症状の出現が化学物質曝露によるものでなく、主として精神的要因によって生じていると判断される群では、サッケード率の程度は低く、狭義の SHS 患者群との鑑別が眼球運動検査によってある程度可能であることがわかった。重心動揺検査におけるニューラルネット分析では、異常識別とその割合は、末梢神経の異常成分を含む迷路障害性、中枢神経異常成分を含む脳障害性の割合が検討されたが、化学物質過敏症群、アレルギー疾患群において脳障害性の割合が高いことがわかった。高位視覚検査の一つである視覚空間周波数特性検査（視覚コントラスト感度検査）では、特に高周波数領域において患者群では感度低下が認められ、健常者群と統計学的有意差が認められた。

C. 結論

神経学的検査、特に神経眼科学的検査は、異常値の検出能力が高いことから、SHS の客観的検査指標として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

シックハウス症候群患者の客観的評価法にお

いて、神経眼科学的指標の有用性についてこれまで報告してきた (1)。しかしながら、実際の

医療現場では、多彩な病態生理学的特徴を呈する患者を「シックハウス症候群」と一括りにして評価している一面があり、シックハウス症候群の診断における客観的評価法としての神経眼科学的検査の標準化には、いくつものハードルが残されている。平成18年度の研究では、本研究班・主任研究者の相澤らのグループにより提唱された「シックハウス症候群の臨床分類」に則して患者を分類し、神経眼科学的検査の病型別評価を行った。引き続き平成19年度は、その詳細をさらに検討するために、原因物質別に評価を試み、原因物質の相違による特徴的な所見が示され、臨床的上有用な客観的指標に成り得ることがわかった。そこで本年度は、本研究班で作成中の診断ガイドラインを意識し、本症に共通の客観的指標としての神経学的所見を中心に総括的検討を行った。

B. 研究方法

a) 対象

対象は、北里研究所病院・臨床環境医学センターを受診し、内服薬を過去に1ヶ月以上服用していない受診患者117名（男性34名、女性83名、平均年齢 39.93 ± 12.31 才）。これら対象者を、グループ1：健常者群、グループ2：狭義のシックハウス症候群（相澤病型分類2型）、グループ3：化学物質過敏症（MCS）、グループ4：アレルギー疾患群、グループ5：中毒症群（相澤病型分類1型）、グループ6：精神疾患群、グループ7：その他の疾患群に分類した。（方法-1）

（倫理面への配慮）

本研究は、北里研究所病院臨床研究審査委員会および同倫理委員会の承認に基づいて施行された。本研究に先立ち、研究担当医師が研究趣旨、研究により得られた結果の取扱、個人情報取扱に関して研究協力者に十分な説明を行い、同意を得た者のみを対象とした。

b) 方法

眼球運動測定

Permobil Meditech社製OberII眼球運動測定装置を用いた。この装置は角膜反射法を利用し、水平・垂直方向での滑動性追従運動を測定、サッケード成分の割合を評価した（方法-2）。

重心動揺検査

アニマ社製重心動揺計グラビコーダーGS-11を用いた。総軌跡長、単位軌跡長、単位面積軌跡長、外周面積、実効面積等を解析項目とし、内臓コンピューター上のニューラルネットワーク分析から、迷路障害性異常、脳障害性異常の割合を求めた（方法-3）。

視覚空間周波数測定検査（視覚コントラスト感度検査）

鵜飼式コントラスト感度測定装置を用いた。片眼ずつ（右眼→左眼）、矯正視力（1.0）となる完全矯正下にて実施し、解析は練習効果を配慮し、1回目の測定結果を解析データとした（方法-4）。

C. 研究結果

眼球運動測定結果

健常者と患者群（狭義のSHS患者）のサッケード率（眼球の滑動性追従運動異常の程度）は、患者群で高く、統計学的有意差が認められた。またサッケード率の程度は、自覚症状の程度（QEESIスコア）とある程度の相関が認められた。さらに、自覚症状の出現が化学物質曝露によるものではなく、主として精神的要因によって生じていると判断される群では、サッケード率の程度は低く、狭義のSHS患者群との鑑別が眼球運動検査によってある程度可能であることがわかった（結果1）。

重心動揺検査結果

シックハウス症候群、化学物質過敏症共に、総軌跡長が15cm以上長くなることが示された。また、外周面積の比較では、健常者群に対して、シックハウス症候群、化学物質過敏症、アレルギー疾患群で、約2倍面積が広いことがわかった（結果2-1）。ニューラルネット分析における異常識別とその割合は、末梢神経の異常成分を含む迷路障害性、中枢神経異常成分を含む脳障害性の割合を検討したが、化学物質過敏症群、アレルギー疾患群において脳障害性の割合が高いことがわかった（結果2-2）。

眼球運動検査と重心動揺検査の結果で、水平もしくは垂直方向の眼球運動が異常で、さらに重心動揺検査のニューラルネットワーク分析から迷路障害性異常もしくは脳障害性異常に属する割合を検討した結果、眼球運動・重心動揺検