
シックハウス症候群の病態形成における免疫応答関与に
関する動物実験および臨床研究

1 8 3 9 0 1 7 7

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 吉田貴彦
(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

近年、建材や家具に残留し、また室内にて使用される生活用品から揮発し室内空気質を汚染する化学物質（VOC）による健康被害がシックハウス症候群、特に多種類化学物質過敏症として知られ社会問題となっている。著者らは、多種類化学物質過敏症ではアレルギー類似の症状が前面に出るなど免疫機構が関わりを持つと言われていることから、室内空気質汚染化学物質の代表的な物質であり、多種類化学物質過敏症の原因物質としても最も頻度の高いホルムアルデヒドをマウスに曝露し、免疫学のおよびアレルギー反応の変容を中心に生体影響について検索してきた。今回、ホルムアルデヒドを曝露したマウスの中樞神経系において変動するアレルギー応答を中心とした生活性因子のmRNA発現の変動を観察した。これらの動物実験の結果をもとに、多種類化学物質過敏症として診断を受けている患者において、免疫応答等にかかわる因子のmRNA発現を観察し、病態の解明を試みたものである。

その結果、動物実験ではホルムアルデヒド曝露により Th2 細胞が減少傾向となり即時型アレルギー誘発側に偏る免疫傾向が示され、アレルギー症状増強の弱い変化が認められ、総合的に判断して多種類化学物質過敏症の病態形成と免疫機構とのかかわりが示唆された。一方、多種類化学物質過敏症患者においてホルムアルデヒド曝露マウスに見られた様な変化は確認できず、実際のヒトにおいては多種類化学物質過敏症の病態形成における免疫機構の関与について明らかな関連は見いだされなかった。これらの事は、それぞれの個体によっ

て多種類化学物質過敏症を含むシックハウス症候群の発症の原因も異なれば生体反応も異なり、一つの理論で病態を説明する事が出来ない複雑な疾患群であることを裏付けるものである。今までに多くの研究者がこれらの問題に取り組んできたが未だ解明に至らないのはこうした理由によるものと考えられる。しかし、最近、多種類化学物質過敏症の病態形成に中枢神経系大脳辺縁系の関与が示唆される中で、ホルムアルデヒド曝露マウスで海馬および嗅球においてホルモンmRNAの変動が観察されるなど、病態の解明につながる可能性のある知見も得られた。今後、多種類化学物質過敏症をはじめシックハウス症候群の病態が解明され、疾病の予防と患者の症状の緩和がなされる日が来ることが待たれる。

本研究は平成18年度～平成19年度科学研究費補助金基盤研究 B(一般)
(課題番号18390177)の補助によった。

研究組織

研究代表者：吉田 貴彦（旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：伊藤 俊弘（旭川医科大学医学部講師）

杉岡 良彦（旭川医科大学医学部講師）

中木 良彦（旭川医科大学医学部助手）

坂部 貢（北里大学薬学部教授）

小島 弘幸（北海道立衛生研究所研究職員）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|--------|-------|--------|
| 平成18年度 | 7,300 | 2,190 | 9,490 |
| 平成19年度 | 7,500 | 2,250 | 9,750 |
| 総計 | 14,800 | 4,440 | 19,240 |

目 次

| | | | |
|-------|-----|-------|-----|
| I. | 序 論 | | 1 |
| II. | 目 的 | | 2 |
| III | 方 法 | | 2 |
| IV | 結 果 | | 1 0 |
| V. | 考 察 | | 1 6 |
| VI | 結 論 | | 2 1 |
| VII. | 圖 表 | | 2 3 |
| VIII. | 資 料 | | 5 2 |

I. 序論

新建材や家具の製造工程に広く用いられる揮発性の高い有機化学物質 (VOC) は、その一部が製品に残留し住居内において徐々に放散され室内空気を汚染することが知られている。一方、省エネルギーを目的として開発された高気密住宅の普及は、効果的な換気がなされない場合に、前述の VOC による室内空気の汚染を助長するとともに、室内空気の滞留による湿度の上昇を来し、室内の結露しやすさとも相まってカビの発生をもたらす。さらに高湿度やカビの発生は二次的に室内ダニの発生しやすい環境となる。こうした現代の家屋が持つ様々な問題に関連して居住者の健康が害されたものをシックハウス症候群と呼んでいる。このうち原因が VOC 等によるものを、特に化学物質過敏症と呼び、化学物質を多用する現代において特に注目を集めている。

最近、シックハウス症候群の主要な原因となるホルムアルデヒドや VOC の建材等での使用量制限などの対策が進められ、放散する化学物質量を減らすことにより室内空気質が改善され、新規の患者発生は比較的強く抑えられるようになった。一方、多種類化学物質過敏症の病態は、中枢神経系を中心とした過敏状態が基礎にあるとされながら明確にされず、依然として多くの患者が困難な生活を強いられている。さて、シックハウス症候群の患者はアレルギー疾患等の免疫応答が関与する疾病の既往を持つ者が多いと言われている。かつ、神経－内分泌－免疫軸といわれるほど三者が相互影響を及ぼしあい複雑系として生体の恒常性が維持されているにも係わらず、シックハウス症候群の病態と免疫関連疾患について関連付けた検討がなされていない。生体機能維持において神経－内分泌－免疫系が重要な役割を担う事を考えると、多種類化学物質過敏症の病態を神経系にのみ追うところに病態が明確にできない一因があるのではないだろうか。

II. 目的

本研究ではシックハウス症候群患者のうちホルムアルデヒドが主体となる化学物質過敏症の者を選び、末梢血リンパ球から抽出されたmRNAをもとに、患者に共通して変動する免疫指標や免疫応答にかかわる因子のmRNA発現量について検索を行なう。さらに、代表的な室内空気汚染化学物質であるホルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスにおいて健康影響を評価する。以上を総合して、シックハウス症候群、特に多種類化学物質過敏症の病体形成における免疫機構の関与について検討することを目的とした。

III. 実験方法

1. 動物実験

1) 実験動物

日本クレア株式会社（東京）より、米国トキシコロジー・プログラムで使用が推奨されている雌性B6C3F1マウスを購入し、1週間以上の馴化の後に6週齢から実験に供した。実験期間を通し、空気曝露時間帯を除いて、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、人工照明にて暗期19-7時、明期7-19時に管理した動物室内に設置したクリーンラック内のアルミニウムケージにて飼育した。マウスは週に2回、床敷交換を行ない健康状態を観察すると共に、週に1度、体重の測定を行なった。各群5-6匹として飼育した。

2) フォルムアルデヒド曝露

ホルムアルデヒド水溶液（特級、37%ホルムアルデヒド溶液、和光純薬工業株式会社、大阪）の40倍希釈液50mlを100mlの枝つき三角フラスコに入れ、空気でバブリングさせて発生させたFAガスを空気をを用いて段階希釈し、内容量40リットルの

プラスチック曝露箱に導入し、毎時5-6回換気にてマウスに曝露した。曝露FA濃度は500ppbに設定した。曝露濃度のモニタリングはFAカートリッジ (Supelco, LpDNPH S10, Bellefonte, PA, USA) に、1リットル/分、15分間吸引吸着後、アセトニトリルにて溶出させ液体クロマトグラフィーにて測定した。また、フォルムアルデヒド検知器 (理研計器FP-30) による簡易測定も併用した。なお、コントロール群にはフォルムアルデヒドを含まない空気を同様の条件にて曝露した。曝露時間は午前10時から午後6時までの8時間で週6回、6週間曝露した。

3) 即時型アレルギー症状発現段階の評価

実験的誘発即時型アレルギー反応の観察を目的として、フォルムアルデヒド曝露スケジュールにあるマウスに、曝露開始から3週および5週目に100 μ L OVA-Alum混合液 (PBSにて800mg/mlに調整した卵白アルブミン(OVA、和光純薬、大阪) 1mlとAlum solution (PIERCE社 Imject[®] Alum) 1mlを混合)を腹腔内投与し、6週目に1% OVA PBS液の噴霧吸入曝露 (Aeroneb社、Aeroneb Go7030にて20分間)を3日間続けて行った。コントロールにはPBSのみを投与して同じ処理をした。3回目の噴霧吸入曝露後に、小動物呼吸機能検査装置 (Neuroscience社による試作機) にマウスを入れ呼吸数、起動抵抗を10分間測定した。また、OVA感作によるマウスのくしゃみ等の行動および鼻腔部付近に対する洗顔様動作 (preening) の回数及び時間について、デジタルビデオカメラ (SONY, PC-110) にて撮影したデータを後日解析した。

4日目にマウスを二酸化炭素吸入により安楽死させ直ちにヘパリン処理したシリンジで心臓穿刺により末梢血を得て、血漿を分離後、測定まで-80 $^{\circ}$ Cに保存。OVA特異的IgE抗体価をELISA法にて測定した (大日本住友製薬、DSマウスIgE ELISA (OVA))。

4) リンパ球分画の採取・調整

i) 末梢リンパ球の調整

フォルムアルデヒド曝露終了後マウスを二酸化炭素ガス深麻酔下にて安楽死させ、ヘパリン処理したシリンジで心臓穿刺により末梢血を得た。末梢血は1200rpmで5分間遠心し、上清の血漿を除いた後、生理食塩水にて血球画分の浮遊液を調整した。これらを実験群ごとにプールし遠心管に分注したLymphoprep™ (Axis-Shield社) の上に血球希釈液を静かに重層して比重遠心分離した (室温、2000rpm、20分間)。中間層のリンパ球および単球からなる末梢単核細胞群 (PBMCs) 画分を回収し、充分量のリン酸緩衝液・生理食塩水 (PBS) で洗浄した。この後、溶血剤 (組成 : 0.83% NH_3Cl /0.02M Tris・HCl (pH 6.8)) にて処理し赤血球分画を除去し、洗浄後に細胞浮遊液を細胞濃度 1.0×10^7 /ml に調整し検体とした。

ii) 脾臓リンパ球の調整

安楽死後のマウスから脾臓を摘出した。脾臓組織は摘出後直ちに3mlの100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液中にて滅菌処理を行なったスライドガラスのフロスト部分どうしの間で潰した。これを21Gの注射針の付いたシリンジで数回吸引してリンパ細胞を単離した。さらにこれらの細胞を溶血剤で処理し赤血球分画を除去し、洗浄後に細胞浮遊液を細胞濃度 1.0×10^7 /ml に調整し検体とした。

iii) リンパ球分画の測定

マウスの末梢血および脾臓から調整したリンパ球について分画をフローサイトメーター (BD FACSCalibur) により解析した。リンパ球分画は表面マーカー、CD4 陽性細胞 (ヘルパーT細胞)、CD8 陽性細胞 (細胞傷害性T細胞)、及びCD45R 陽性細胞 (B細胞) をもって判定した。さらに、免疫バランスを判定する目的でTh1/2細胞を解析するために、インターフェロンガンマ (IFN- γ) およびインターロイキン4 (IL-4) の細胞内サイトカイン刺激誘導をおこなったのちに、細胞内標識を行ない判定した。

脾細胞浮遊液に、適度に希釈した FITC-CD4 (Beckman Coulter Co. , France)、

FITC-CD8 (Beckman Coulter Co.)、FITC-CD45R (Beckman Coulter Co.) の各蛍光標識抗体を加え 4℃、30 分培養した。0.1%Na₃-PBS にて 2 回洗浄した後、0.05%パラホルムアルデヒド PBS にて固定し、4℃にて 1 晩保存後に、フローサイトメーター (FACS、EPICS ELITE, Beckman Coulter Co.) で各蛍光抗体陽性リンパ球の比率を測定した。

細胞内サイトカインの刺激誘導は、細胞内サイトカインの活性化を 5×10^6 cell/ml に調整したリンパ球を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 25ng/ml) および Ionomycin (1 μ g/ml) にて 4 時間培養して行った。これらの細胞を FITC 標識 CD4 特異的抗体で細胞膜表面標識後に、Cytotfix Cytoperm kit (BD社) により細胞透過性を亢進させてから、それぞれ PE 標識 IFN- γ 特異的 Ig-G 抗体および PE 標識 IL-4 特異的 Ig-G 抗体にて細胞内サイトカインの細胞内標識をそれぞれ行った。サイトカインの測定は FACS により行い、CD4 陽性細胞分画中の IFN- γ および IL-4 の各抗体による標識細胞の割合を測定した。

5) 中枢神経組織の採取・調整

脳組織は、大脳、小脳、嗅球、海馬、脳下垂体に分割し各組織は数匹単位でプールして試料とし、測定に供するまで -80℃ にて保存した。

6) 広範囲 mRNA 発現の検索

脳組織中の mRNA 発現量測定のために、それぞれを TRIzol 試薬 1ml に浸し、ポリトロン型ホモジェナイザーにて組織を破碎し、クロロフォルムおよびイソプロパノール処理によって total RNA を抽出した。さらに、RNeasy Mini Kit (キアゲン社) により total RNA を精製後、260nm および 280nm での吸光度を測定し、RNA 濃度を測定した ($OD_{260}/OD_{280} > 2.0$)。total RNA サンプルは測定に供するまで -80℃ にて保存した。マウス各組織から得られた total RNA 5 μ g をそれぞれ Low RNA Input リニア増幅 & ラベル化キット (アジレント社) を用いて、それぞれ Cy3 標識 cRNA (コントロール群)

および Cy5 標識 cRNA (フォルムアルデヒド曝露群) を作製した。標識された cRNA をそれぞれ等量混合し、約 20,000 種類のマウス遺伝子 (60mer オリゴ) を搭載した Mouse オリゴ DNA マイクロアレイ (アジレント社) 上に競合ハイブリダイゼーション (65°C、16 時間) させた。アレイを良く洗浄した後、アレイ解析用スキャナー GenePix™ 4000B (Axon 社) を用いて遺伝子発現解析を行った。

7) PCR 反応による mRNA 発現の測定

脳組織中で変動が観察された mRNA について変動の定量的確認を行うために、SuperScript™ First-Strand Synthesis System (インビトロゲン社) を用いて total RNA 5 μ g から cDNA を調製し、特異的プライマーにより PCR 反応を行いその PCR 産物をアガロース・ゲル電気泳動し定量比較した。

また、末梢血および脾臓リンパ球 (約 1×10^7 個) に RNA 抽出試薬 TRIzol Reagent (インビトロゲン社) 1ml を添加し、クロロホルムおよびイソプロパノールを用いて total RNA を抽出した。これら total RNA 各 1.0 μ g の逆転写反応を Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (宝バイオ) を用いて行った。得られた IFN- γ および IL-4 の cDNA を LightCycler (ロシュ社) により増幅した。ハウスキーピング遺伝子である β -actin 遺伝子の発現に対する各遺伝子の発現比率を求め、コントロール群とフォルムアルデヒド曝露群で比較した。

2. 多種類化学物質過敏症患者での検索

1) 調査対象者

試験対象とした多種類化学物質過敏症患者については、本研究費による研究期間に集められた症例数に限りがあるために、解析の信頼性を高めるために過去の研究取組みで得た症例も加えた。末梢血単核球の mRNA 発現量の解析には平成 17 年、19 年に北里研究所病院で多種類化学物質過敏症と診断された 20 名と、平成 16 年に旭川医大

産婦人科外来（シックハウス外来）を訪れた患者2名の計22名を対象者とした。健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない5名である。そのうちの女性4名の末梢血単核球から抽出したRNAを等量混合プールして、患者群、健常者群と比較するコントロールとした。

また、血漿中の活性物質測定の対象者として、平成16、19年に北里研究所病院で多種類化学物質過敏症と診断された21名と、平成16年に旭川医大産婦人科外来（シックハウス外来）を訪れた患者5名の計26名を対象者とした。健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない12名である。調査対象の多種類化学物質過敏症患者の基本情報を表1に示す。

本研究の被験者となる多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティアについての、基本的な情報について自記式調査票（資料1）によって収集した。

これら患者及び健常者ボランティアに対して、主治医ないし研究協力者からと口頭とで説明を行ない、文章（資料2）に署名を得ることでインフォームドコンセントを得て、採血、調査票への記入を求めた。なお、同意取り消し書についても手渡した（資料3）。なお、多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティアでの検索に際しては、旭川医科大学および北海道衛生研究所においてそれぞれ倫理委員会の審査を経て承認を得て実施した。

2) 血液の採取および末梢血単核球の分離

多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティア静脈より末梢血およそ18mlをヘパリンリチウム入り真空採血管（ベクトン・ディッキンソン社）3本を用いて採血し、2000rpmで5分間遠心した。上清の血漿を採取し生化学的な検索に供するまで -80°C にて凍結保存した。一方、血漿を除いた血球画分に生理食塩水を10ml添加し血球を浮遊させた。15mlプラスチック遠心管にLymphoprep™（Axis-Shield社）5mlを加え、その上に血液浮遊液を静かに重層して比重遠心分離した（室温、2000rpm、20分

間)。中間層の末梢血単核球画分を回収し、過剰量のリン酸緩衝液・生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、末梢血単核球沈降塊をmRNA測定のための資料とした。

3) RNAの抽出・精製

i) RNAの抽出

得られたPBMCs (約 5×10^7 個) にRNA抽出試薬TRIzol Reagent (インビトロゲン社) 1mlを添加し、クロロホルムおよびイソプロパノールを用いてtotal RNAを抽出した。さらに、RNeasy MinElute™ Cleanup Kit (キアゲン社) によりtotal RNAを精製後、260nmおよび280nmでの吸光度を測定し、RNA濃度を測定した ($OD_{260}/OD_{280} > 2.0$)。total RNAサンプルは使用するまで -80°C にて保存した。なお、健常者4名から得たtotal RNAを等量混合し、コントロール群として使用した。

ii) RNAの品質評価

精製したtotal RNA (1 μg) をAgilent 2100バイオアナライザ (アジレント社) を用いて、品質を評価した。すなわち、RNAの18Sと28Sのピーク比を求めることによりRNAの分解がほとんど進んでいないことを確認し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析に用いた。

iii) Cy3・Cy5標識cRNAの作製とDNAマイクロアレイとの反応・解析

コントロール群および多種類化学物質過敏症患者 (あるいは健常者) から得られたtotal RNA 2.5 μg をそれぞれLow RNA Input リニア増幅&ラベル化キット (アジレント社) を用いて最初に逆転写反応でcDNAを作製し、つぎにT7 RNAポリメラーゼにより増幅させながらCy3-CTPおよびCy5-CTPを取り込ませ、それぞれCy3標識cRNA (コントロール群) およびCy5標識cRNA (患者あるいは健常者) を作製した。標識されたcRNA (1 μg) をそれぞれ等量混合し、ヒト全ゲノム (約4.4万個) を搭載したオリゴマイクロアレイ (Human Whole Genome Oligo Microarray、アジレント社) 上に競合ハイブリダイゼーションさせた (65°C 、16時間)。アレイを $6 \times \text{SSC}$ 液 (室温、10分間) と

0.1×SSC液（4℃、5分間）で洗浄した後、アレイ解析用スキャナーGenePix 4000B（Axon社）を用いて遺伝子発現のスキャン画像を記録した。測定データについてアレイ解析ソフトGene Spring（アジレント社）により、スキャッタープロットの作成やクラスタリング解析等を行った。

iv) 逆転写反応

健常者及び多種類化学物質過敏症患者から得た total RNA 各 2.5μg の逆転写反応を SuperScript™ First-Strand Synthesis System（Invitrogen社）を用いて行った。

v) 定量的 PCR

健常者及び多種類化学物質過敏症患者の PBMCs から調製した cDNA を鋳型として、9つの遺伝子；TNFα-induced protein 3、ICAM 1、Dual specificity phosphatase 2、CXCL2、3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase、Angiotensin/vasopressin receptor（NLRP3）、CD83、NFκB-inhibitory epsilon 及び GAPDH を ABI7700（パーキンエルマ社）により増幅した。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH 遺伝子の発現に対する各遺伝子の発現比率を求め、健常者と MCS 患者で比較した。各遺伝子を増幅されるためのプライマー及びプローブは、Biosearch Technologies, Inc.（Novato, CA, USA）から購入した。

TNFα-induced protein 3 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dgTACTgAgAAgTggCATgCATgA 3'（F）及び 5' dTgTCgAgAAgTCCggAAgCT 3'（R）を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CAATTgCCgTCACCgTTCgTTTTCA-BHQ-1 3' を用いた。

ICAM 1 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dgCgCACTCCTggTCCTgCT 3'（F）及び 5' dCaggAggTgCTgCATgTCA 3'（R）を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CTCTgTTCCCAggACCTggCAATgC-BHQ-1 3' を用いた。

Dual specificity phosphatase 2 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dAACAggTAgggCAAATCTCCA 3'（F）及び 5' dgCTgTCCCgATCTgTgCTCT 3'（R）を用いた。

また、プローブとして、5' dFAM-CAgggCCACCCTggTCgTAgACA-BHQ-1 3' を用いた。

CXCL2 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCgCCCATggTTAAgAAAATCA 3' (F) 及び 5' dCCAATAAgCTTCCTCCTTCCTTCT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-TgCTgAAAAATggCAAATCCAACCTgACC-BHQ-1 3' を用いた。3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dTTCAggCgTTCTTCTCCTAgACA 3' (F) 及び 5' dTTgCCgATACAATTCCAaggA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-ATCgCATTCAggTCCCTTCgCAACATg-BHQ-1 3' を用いた。Angiotensin/vasopressin receptor (NLRP3) 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dTgTgAAGTgCTgAAACAgCagA 3' (F) 及び 5' dCAgCTCAggCTTTTCTTCTTgAA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CTCCTgCAgAACCTggggTTgTCTgA-BHQ-1 3' を用いた。CD83 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dggCAgAgAAACCTAAgTggCAA 3' (F) 及び 5' dAgCCAgCAgCAggACAATCT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-AgAgTgACAaggATgCCCTgCACAgC-BHQ-1 3' を用いた。NFkB-inhibitory epsilon 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCTggggCCTCATgAATCACT 3' (F) 及び 5' dAgCCCTCAgCAGCTggAA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CAggTggACCAgCgTgTCTCCgT-BHQ-1 3' を用いた。GAPDH 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCgACAgTCAGCCgCATCTT 3' (F) 及び 5' dCAATACgACCAAATCCgTTgACT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-TTgCgTCgCCAgCCgAgC-BHQ-1 3' を用いた。

4) 血漿中の活性物質の測定

末梢血より分離する血漿について、必要に応じて生活性物質等の測定を行なう。

IV. 結果

1. 動物実験

1) 卵白アルブミンに対する即時型アレルギー応答の評価

OVAによる即時型アレルギーを発現させたHCHO曝露マウスの呼吸器に及ぼす影響は、小動物呼吸機能検査装置（Neuroscience社による試作機）で呼吸数、起動抵抗を10分間測定したが、これら指標のHCHO曝露による変動は確認できなかった（図1）。OVA感作によるマウスのくしゃみ等の行動は、デジタルビデオカメラ（SONY, PC-110）にて撮影したデータを後日解析した。行動観察では10分間の観察時間中にOVA曝露による明らかにくしゃみは認められなかったために鼻部付近に対する洗顔様動作（preening）の回数及び時間を計測した。対照群のpreeningの平均回数および標準偏差は 4.8 ± 1.33 回、HCHO曝露群は 6.0 ± 2.24 回、持続時間はコントロール群が 62.7 ± 20.7 秒、HCHO曝露群は 70.2 ± 24.7 秒であったが、いずれも有意ではなかった（図2）。

2) 特異的抗卵白アルブミンIgE

実験的に誘導した即時型アレルギー応答の評価のために、血清検体を用いて卵白アルブミン特異的IgE抗体価をELISA法にて測定した。空気曝露コントロール群（n=6）およびフォルムアルデヒド曝露群（n=7）の卵白アルブミン特異的IgE抗体価の平均値±SDは、それぞれ 145.4 ± 113.8 ng/mlおよび 103.6 ± 38.6 ng/mlであった。両群間の抗体価についてのt-testによる検定では有意差はみられなかった（図3）。

3) 脾臓リンパ球分画

フォルムアルデヒド曝露により脾臓リンパ球のCD4陽性細胞増加およびCD8陽性細胞減少とCD4/CD8細胞比率の上昇を確認した（図4、5）。

4) 免疫バランスの評価

i) 脾臓細胞における CD4 および CD8 細胞陽性率

曝露群で脾臓 CD4 細胞陽性に対するインターフェロン γ (IFN- γ) 陽性細胞の低下傾向と、IL-4 陽性細胞の増加傾向を認めた (図 6)。

ii) 脾臓細胞における IFN- γ および IL-4 mRNA 発現量

脾臓細胞における IFN- γ mRNA 発現量が有意に抑制される傾向を認めた。インターロイキン 4 (IL-4) mRNA 発現量も低下したが、IL-4/IFN- γ mRNA 発現量比は曝露群で上昇傾向があった (図 7)。

また、脾臓細胞において DNA アレイ法にて網羅的に遺伝子発現変動を解析した結果、フォルムアルデヒド曝露によりコントロール群に比して 2 倍以上の発現が誘導された遺伝子が 8 個、同じく 1/2 以下に発現が抑制された遺伝子も 8 個認めたが、コントロール群に対する変動倍率が最大で 2.3 倍と 0.44 倍であり、大きな変動を示す遺伝子はなかった (図 8、9)。末梢血単核球においても大きな変動を示す遺伝子はなかった (図 10、11)。

5) 中枢神経系の mRNA 発現の評価

フォルムアルデヒド曝露実験において、脳の重量には FA 曝露群とコントロール群との間に差は認めなかった。

脳より海馬および嗅球を分離し total RNA を抽出した。それぞれの total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。各群の海馬では FA 曝露により 2 倍以上の発現誘導された遺伝子 3 個と 1/2 以下に発現抑制された遺伝子 12 個が見られた (図 12、13)。嗅球ではフォルムアルデヒド曝露により 2 個の遺伝子が発現誘導され、7 個の遺伝子が発現抑制された (図 14、15)。海馬と嗅球においてフォルムアルデヒド曝露により共通して発現誘導された遺伝子として、プロラクチン遺伝子がある。海馬で 2.3 倍、嗅球で 2.8 倍の誘導が観察され、RT-PCR 法によって、ハウスキー

ピングの β -アクチン遺伝子がフォルムアルデヒド曝露により発現に影響が無かった事を確認の上で、プロラクチン遺伝子がフォルムアルデヒド曝露により両組織で発現誘導されていることを確認した。

マウスの系統によるプロラクチンのmRNA発現量の差について、無処置マウスにおいて解析した結果、系統間において大きな差があることと、個体差が大きいことが確認された（図 16、17、18）。

2. 多種類化学物質過敏症患者での検索

1) RNA 試料の RNA の質の検定

コントロール群および多種類化学物質過敏症患者、健常者の末梢血から調整された末梢血単核球由来 total RNA をバイオアナライザにより解析した泳動パターンの一例を図 19 に示す。ヒトの新鮮組織から抽出した total RNA のうち、最も多量に存在するリボゾーム RNA で約 2 kb の単一転写単位 rRNA 前駆体に由来する 28S rRNA と 18S rRNA の存在比率が約 2 : 1 となることから、両者の存在比率をもって RNA の質（被分解度）を判定した。図に示すごとく、本研究において被験者から得られた RNA 試料は殆ど分解されておらず高品質に保存されている事が確認された。

2) マイクロアレイによる RNA 発現解析

代表的なマイクロアレイのカラーイメージ画像を図 20 に示した。赤・黄・緑と 3 色に色分けされたスポットが現れ、赤色はコントロール群に比べ患者（健常者）で発現が増加している遺伝子、黄色は発現量に変化のなかった遺伝子、緑色は患者（健常者）で発現が抑制されている遺伝子を表している。

図 21 に、コントロール群と多種類化学物質過敏症患者の末梢血単核球由来 total RNA を用いて解析したイメージ画像を個々の遺伝子の発現強度で表したスクエアープロットを示した。縦軸は多種類化学物質過敏症患者の蛍光強度（Cy5）、横軸は

コントロール群の蛍光強度 (Cy3) を表しており、両者で発現レベルが同じ遺伝子の場合には右上がり 45 度の直線上に位置することを意味する。今回の解析では、コントロール群に対して遺伝子発現倍率が 2 倍以上の増加あるいは 0.5 倍以下の減少を示す場合を変動遺伝子とした(図中 45 度の直線に平行する 2 本の線が 2 倍と 0.5 倍を示す)。

我々の一連の研究の初期の検索において、変動遺伝子の中で、健常者 9 名全てで変動せず、多種類化学物質過敏症患者 16 名全てで共通して増加ないし減少する特異的な遺伝子を探索したが、該当する遺伝子は見出されなかったが、半数以上の MCS 患者でコントロール群に対して共通して増加ないし減少傾向を示した遺伝子の抽出を行なったところ、28 遺伝子 (増加傾向: 2 遺伝子、減少傾向: 26 遺伝子) を選び出すことができている (表 2)。そこで、比較的特徴のある 28 遺伝子について、陰性対象としてハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を基準として、多種類化学物質過敏症患者および健常者の個別遺伝子発現を解析したところ、全体的に比較的強く発現低下が見られる IL-1 beta、epiregulin、chemokine (CC motif) ligand 4 (CCL4)、chemokine (CXC motif) ligand 2 (CXCL2) (35939, 40163) など免疫応答の制御にかかわる遺伝子群が比較的大きな変化傾向があるものとして抽出されたが、それらは健常者での発現も数例を除き低下傾向の者が多いなど、両群間で際立った差を認めなかった。

そこで、当該 28 遺伝子を解析ソフト Gene Spring でクラスタリング解析した結果を報告したが、それを図 21 に示す。縦方向は 28 遺伝子の発現変動状況について「似たパターンを示す被験者」を集めてクラスター (Condition Tree) を形成させ、横方向は 28 遺伝子の中で発現変動状況が「似たパターンを示す遺伝子」を集めてクラスター (Gene Tree) を形成させたものである (図 22)。多種類化学物質過敏症患者群を遺伝子発現が大きく変動した高変動群 (MCS-a1, a2, a3, a6, k5, k1, k2,

k3, k6, k4 ; 10名) と変動が少ない低変動群 (MCS-a4, a5, t2, t6, t3, t4 ; 6名) に分割可能であった。多種類化学物質過敏症患者高変動群は病勢が強い段階にあると解釈することも可能であるため、高変動群と同じく遺伝子発現が高変動する健常者群 (Health-a1, a2, a3) において mRNA 遺伝子発現を比較解析したところ、多種類化学物質過敏症患者群で変動する一方で健常者群で変動しない遺伝子群が同一のクラスター (Gene Tree) に属することが判った。すなわち、39947

(3', 5' -cyclic AMP phosphodiesterase)、32665 (CD83)、35650 (unknown)、2474 (IkB-epsilon)、35939 (CXCL2)、19368 (angiotensin/vasopressin receptor)、27 (ICAM1)、32207 (unknown)、30388 (TNF alpha-induced protein 3)、36030 (dual specificity phosphatase 2) の 10 遺伝子が抽出された。

これら 10 遺伝子とハウスキーピング遺伝子としての GAPDH および β -アクチンについて、健常者および多種類化学物質過敏症患者のそれぞれの平均と個人データの比較したものを、患者 6 名分、図 23 から図 28 に示す。

3) RT-PCR による詳細な mRNA 発現の解析

上述のごとく得られた 10 遺伝子群から、2つの unknown 遺伝子を除く 8 遺伝子について、詳細な遺伝子発現を定量的に評価するために健常者 5 名と多種類化学物質過敏症患者 22 名の末梢血単核球由来 total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。結果を図 29 から図 36 に示す。また、図 37 に 8 遺伝子について健常者と多種類化学物質過敏症患者の平均値をまとめた。

4) 血漿プロラクチン濃度測定

フォルムアルデヒド曝露を行なったマウスにおいて、海馬及び嗅球においてプロラクチン mRNA 発現が亢進していたことから、化学物質過敏症患者および健常者において末梢血から分離した血漿においてプロラクチン濃度の測定を行なった。

プロラクチンの末梢血血漿中濃度も患者で高値を示す傾向があったものの有意差はなかった（図 38、39）。

V. 考察

フォルムアルデヒドを曝露したマウスの中樞神経系において変動するアレルギー応答を中心とした生活性因子の mRNA 発現の変動を観察した。さらに、これらの動物実験の結果をもとに、多種類化学物質過敏症と診断を受けた患者において、免疫応答等にかかわる因子の mRNA 発現を観察し、病態の解明を試みた

まず、フォルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスにおいて免疫応答の変容を観察することを試み、ついで化学物質過敏症の病態形成の基盤になると考えられている中樞神経系においてフォルムアルデヒド曝露によって意義付けできる変動を示す遺伝子の発現を観察し、その中に免疫機構との関連する項目を探索し、化学物質過敏症の病態と免疫機構との関連を検討することを目的して研究を行なった。

卵白アルブミンによって感作したマウスに対して、卵白アルブミン溶液を噴霧吸入させて即時型アレルギー応答を誘発し、マウスの前肢による鼻部をこする動作を観察して評価を行なった。フォルムアルデヒド曝露群において空気曝露コントロールに対して、鼻部付近に対する洗顔様動作回数および持続時間それぞれが増加する傾向が見られ、有意差がなかったことかた明らかなアレルギー症状増強の変化とは言えないものの即時型アレルギー応答の発現がフォルムアルデヒド曝露で増強される事が伺える。

さて、生体内における免疫応答の制御において、免疫応答を高める CD4 陽性 T 細胞であるヘルパー T 細胞 (Th) 細胞と、免疫応答を抑制的に制御する CD8 陽性 T 細胞であるサプレッサー (Ts) 細胞がある。CD4 および CD8 細胞の比率はこうした免疫

バランスを反映すると考えられている。さらに、免疫応答の詳細を制御している Th に亜分画 (Th1 と Th2) があり、より分化度の低い Th0 細胞から分化することが知られている。これら 2 つの Th 細胞分画のうち Th1 細胞は細胞性免疫成立に重要な役割を担い、一方 Th2 細胞は抗体産生を誘導し液性免疫成立に重要な役割を担っている。これら 2 つの Th 細胞が産生する液性因子 (サイトカイン) は自己 Th 分画への分化や増殖を高める一方で、他方への分化や増殖を抑制することが知られており、両者是对立の上にバランスを保っている。これらの Th 細胞バランスはアレルギー応答の発現にも関与している。すなわち、即時型アレルギーが成立するときには Th2 細胞が優位となり、その際には Th1 細胞が相対的に抑制された状況にある。逆に言うならば、細胞性免疫が起こりにくい状況に置かれた個体の生体内では Th1 細胞への分化が減少し、逆に Th2 細胞が優位となる状況が生まれる。こうした個体では即時型アレルギーすなわちアトピー性疾患の発症、増悪が起こるとされている。今回のフォルムアルデヒド曝露を行ったマウスで観察された免疫応答・アレルギー反応の結果は、この Th 細胞バランスによって説明できるものと考えられる。

マウス脾臓リンパ球の分画解析及び免疫バランスの指標となる mRNA 発現の評価から、フォルムアルデヒド曝露により免疫応答を亢進させる CD4 細胞の増加と抑制する CD8 細胞の減少、結果としての CD4/CD8 細胞比率の亢進が見られ免疫応答が高まる状態にあることを意味する。さらに、フォルムアルデヒド曝露により遅延型アレルギーにバランスをシフトさせる IFN- γ mRNA 発現の減少が大きく、結果として IL-4/IFN- γ mRNA 比率が増大傾向を示し、さらに細胞内サイトカイン標識の結果からも Th1 細胞の減少と Th2 細胞の増加が見られるなど、免疫応答が高まる状態に加えて即時型アレルギー誘発側に偏る免疫傾向が示されることが判った。

これらの結果を総合的に判断するならば、フォルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスが、液性免疫優位、アレルギー反応において

は同様に関連抗体の関与する即時型アレルギーを起こしやすい状態にあることを示唆し、化学物質過敏症の患者にアトピーなどの即時型アレルギーの素因を持つ場合の多いことの説明となると考えられる。

また、ホルムアルデヒド曝露によって、脳内（海馬および嗅球）でのプロラクチン産生の亢進という新しい知見も観察された、近年シックハウス症候群の発症機序に嗅球-大脳辺縁系が関与するという報告と符合する結果が得られた。

次いで、動物実験の結果をふまえて、多種類化学物質過敏症として診断を受けている患者において、免疫応答等にかかわる因子のmRNA発現を観察し、病態の解明を試みた。多種類化学物質過敏症の診断は、一般の医療機関では困難さが伴うため、本研究では北里研究所病院臨床環境医学センターにて診断を受けた者を対象者として行なった。さらに、多種類化学物質過敏症を初めシックハウス症候群患者は梅雨時期、夏季には症状が増悪する場合が多く、研究のための検体の採取には適している反面、具合が悪く受診することもままならない状況から秋から初冬にかけての検体採取となった。

我々が先行の科学研究費補助金を受けて行なったDNAアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析研究の成果から、多種類化学物質過敏症患者群で変動する一方で健常者群で変動しない遺伝子群が同一のクラスターを形成することが判った。このうち不明な遺伝子2つを除いた、39947 (3', 5'-cyclic AMP phosphodiesterase)、32665 (CD83)、2474 (IkB-epsilon)、35939 (CXCL2)、19368

(angiotensin/vasopressin receptor)、27 (ICAM1)、30388 (TNF alpha-induced protein 3)、36030 (dual specificity phosphatase 2) の遺伝子は、免疫応答等の制御等に関与するものが多かった。シックハウス症候群や多種類化学物質過敏症の患者には、アレルギー疾患などの併発や既往の在る者が多いことが知られていることから、これらの遺伝子群が多種類化学物質過敏症と何らかの関連を有する可能

性があると考えられたが、マウスで見られたような免疫バランスの変容などを説明することは出来なかった。

多種類化学物質過敏症患者の検体採取と網羅的遺伝子発現解析には手間と費用がかかるために単回の研究補助事業内での成果のまとめには、例数の制約から限界があるため、今回は先行して行なった研究を含めた3年余の一連の研究で得られた検体やデータをまとめて解析の供し、その信頼性を高めることを試みた。

8遺伝子について、詳細な遺伝子発現を定量的に評価するために健常者5名と多種類化学物質過敏症患者22名の末梢血単核球由来 total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。何れの遺伝子発現においても健常者 (Health-H1604) で高い傾向を認めた。Health-H1604 はアレイ解析で用いた Health-t04 であり、アレイ解析においても発現が高い傾向を示していた。他の健常者4名の遺伝子の発現は、多種類化学物質過敏症患者22名とほぼ同程度の発現を示した。Health-H1904 は健常者の中で常に最も低い値を示した。一方、MCS-H1912 は NF κ B-IE の発現を除き他の7遺伝子で多種類化学物質過敏症患者の中で常に最も高い発現を示した。MCS-H1702 は NF κ B-IE の発現を除き他の7遺伝子で多種類化学物質過敏症患者の中で常に最も低い発現を示した。これらの健常者群および多種類化学物質過敏症患者群のそれぞれ最も高いあるいは低い発現を示す者が特定の者であること、さらには両群における遺伝子発現の分布が重なり合うこと、すなわち個体による差が大きいことを考えると、検索した8遺伝子について多種類化学物質過敏症の病態を説明するには不十分であると思われる。

免疫グロブリン・スーパーファミリーの一員で単球/マクロファージ系の細胞に発現する CD83 遺伝子にのみ両群との間で統計学的有意差が認められたものの、病態を有意に説明することは難しい。

RT-PCR 法にて遺伝子の発現を定量的に解析した結果、健常者4名と多種類化学

物質過敏症患者 22 名でそれぞれに一定傾向のある差が得られなかつたことから、これらの 8 遺伝子が多種類化学物質過敏症の病態の形成にかかわるものと判断し、診断のマーカーとして考慮することは難しいと考えられた。マイクロアレイ解析は、ヒト全遺伝子の発現を網羅的に把握する素晴らしい方法であり、先のアレイ解析の結果は今回の RT-PCR 解析の結果でも再現されている。しかしながら、見出された遺伝子が炎症反応に関連するため非常に発現変動を起こしやすいとも考えられる。検体を得たコントロール群については対象者を増やすことで、遺伝子発現の安定したレベルが得られる可能性がある。しかし、多種類化学物質過敏症の患者は、年齢幅が大きい上に病勢も一定ではないことから、真の病態を説明できる遺伝子発現を特定することは相当の困難さであろう。遺伝子の総数が数万あるのに対しての検索で抽出された遺伝子が 10 という確率を考えると、健常者群と多種類化学物質過敏症患者群との間で有意に変動していた遺伝子として偶然にこれら 10 遺伝子が抽出された可能性は否定できないであろう。

フォルムアルデヒド曝露を行なったマウスにおいて、海馬及び嗅球においてプロラクチン mRNA 発現が亢進していたことから、化学物質過敏症患者および健常者において末梢血から分離した血漿においてプロラクチン濃度の測定を行なった。

近年、中神経系が化学物質過敏症の病態の場になることが示されていることから、フォルムアルデヒド曝露をおこなった化学物質過敏症モデルを想定したマウスにおいて DNA アレイ法によって網羅的に遺伝子発現を検索した。その結果海馬及び嗅球においてプロラクチンの発現の亢進が認められた。プロラクチンの発現亢進が化学物質過敏症の発症の説明には直接結びつかないが、化学物質過敏症においての中神経の関与の場が脳辺縁系であることから特に注目される。ただし、マウスの種差によってプロラクチン mRNA 発現量に大きな差があること、さらに純系マウスにおいても個体差が大きいことが判明し、観察された減少についてさらなる検討が

必要とされる。

化学物質過敏症患者でプロラクチンの末梢血血漿中濃度を測定したところ患者の一部に高値を示す者があったものの、健常群と患者群との間には有意差は見られなかった。

フォルムアルデヒド曝露をおこなった化学物質過敏症モデルを想定したマウスで行なった検証により、総合的に判断して多種類化学物質過敏症と免疫機構の間に関連性が関与することが示唆された。しかし、多種類化学物質過敏症患者においてフォルムアルデヒド曝露マウスに見られた様な変化は確認できず、実際のヒトにおいては多種類化学物質過敏症の病態形成における免疫機構の関与について明らかな関連は見いだされなかった。これらの事は、それぞれの個体によって多種類化学物質過敏症を含むシックハウス症候群の発症の原因も異なれば生体反応も異なり、一つの理論で病態を説明する事が出来ない複雑な疾患群であることを裏付けるものと考えられる。今までに多くの研究者がこれらの問題に取り組んできたが未だ解明に至らないのもこうした理由によるものと考えられる。しかし、最近、多種類化学物質過敏症の病態形成に中枢神経系大脳辺縁系の関与が示唆される中で、フォルムアルデヒド曝露マウスで海馬および嗅球においてホルモンmRNAの変動が観察されるなど、病態の解明につながる可能性のある知見も得られた。今後、多種類化学物質過敏症をはじめシックハウス症候群の病態が解明され、疾病の予防と患者の症状の緩和がなされる日が来ることが待たれる。

VI. 結論

動物実験ではフォルムアルデヒド曝露により Th2 細胞が減少傾向となり即時型アレルギー誘発側に偏る免疫傾向が示され、アレルギー症状増強の弱い変化が認められ、総合的に判断して多種類化学物質過敏症の病態形成と免疫機構とのかかわり

が示唆された。一方、多種類化学物質過敏症患者においてホルムアルデヒド曝露マウスに見られた様な変化は確認できず、実際のヒトにおいては多種類化学物質過敏症の病態形成における免疫機構の関与について明らかな関連は見いだされなかった。

I. 序論

新建材や家具の製造工程に広く用いられる揮発性の高い有機化学物質 (VOC) は、その一部が製品に残留し住居内において徐々に放散され室内空気を汚染することが知られている。一方、省エネルギーを目的として開発された高気密住宅の普及は、効果的な換気がなされない場合に、前述の VOC による室内空気の汚染を助長するとともに、室内空気の滞留による湿度の上昇を来し、室内の結露しやすさとも相まってカビの発生をもたらす。さらに高湿度やカビの発生は二次的に室内ダニの発生しやすい環境となる。こうした現代の家屋が持つ様々な問題に関連して居住者の健康が害されたものをシックハウス症候群と呼んでいる。このうち原因が VOC 等によるものを、特に化学物質過敏症と呼び、化学物質を多用する現代において特に注目を集めている。

最近、シックハウス症候群の主要な原因となるホルムアルデヒドや VOC の建材等での使用量制限などの対策が進められ、放散する化学物質量を減らすことにより室内空気質が改善され、新規の患者発生は比較的強く抑えられるようになった。一方、多種類化学物質過敏症の病態は、中枢神経系を中心とした過敏状態が基礎にあるとされながら明確にされず、依然として多くの患者が困難な生活を強いられている。さて、シックハウス症候群の患者はアレルギー疾患等の免疫応答が関与する疾病の既往を持つ者が多いと言われている。かつ、神経-内分泌-免疫軸といわれるほど三者が相互影響を及ぼしあい複雑系として生体の恒常性が維持されているにも係わらず、シックハウス症候群の病態と免疫関連疾患について関連付けた検討がなされていない。生体機能維持において神経-内分泌-免疫系が重要な役割を担う事を考えると、多種類化学物質過敏症の病態を神経系にのみ追うところに病態が明確にできない一因があるのではないだろうか。

II. 目的

本研究ではシックハウス症候群患者のうちホルムアルデヒドが主体となる化学物質過敏症の者を選び、末梢血リンパ球から抽出されたmRNAをもとに、患者に共通して変動する免疫指標や免疫応答にかかわる因子のmRNA発現量について検索を行なう。さらに、代表的な室内空気汚染化学物質であるホルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスにおいて健康影響を評価する。以上を総合して、シックハウス症候群、特に多種類化学物質過敏症の病体形成における免疫機構の関与について検討することを目的とした。

III. 実験方法

1. 動物実験

1) 実験動物

日本クレア株式会社（東京）より、米国トキシコロジー・プログラムで使用が推奨されている雌性B6C3F1マウスを購入し、1週間以上の馴化の後に6週齢から実験に供した。実験期間を通し、空気曝露時間帯を除いて、室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、人工照明にて暗期19-7時、明期7-19時に管理した動物室内に設置したクリーンラック内のアルミニウムケージにて飼育した。マウスは週に2回、床敷交換を行ない健康状態を観察すると共に、週に1度、体重の測定を行なった。各群5-6匹として飼育した。

2) フォルムアルデヒド曝露

フォルムアルデヒド水溶液（特級、37%フォルムアルデヒド溶液、和光純薬工業株式会社、大阪）の40倍希釈液50mlを100mlの枝つき三角フラスコに入れ、空気でバブリングさせて発生させたFAガスを空気をを用いて段階希釈し、内容量40リットルの

プラスチック曝露箱に導入し、毎時5-6回換気にてマウスに曝露した。曝露FA濃度は500 ppbに設定した。曝露濃度のモニタリングはFAカートリッジ (Supelco、LpDNPH S10、Bellefonte, PA, USA) に、1リットル/分、15分間吸引吸着後、アセトニトリルにて溶出させ液体クロマトグラフィーにて測定した。また、フォルムアルデヒド検知器 (理研計器FP-30) による簡易測定も併用した。なお、コントロール群にはフォルムアルデヒドを含まない空気を同様の条件にて曝露した。曝露時間は午前10時から午後6時までの8時間で週6回、6週間曝露した。

3) 即時型アレルギー症状発現段階の評価

実験的誘発即時型アレルギー反応の観察を目的として、フォルムアルデヒド曝露スケジュールにあるマウスに、曝露開始から3週および5週目に 100 μ L OVA-Alum混合液 (PBS にて800mg/mlに調整した卵白アルブミン(OVA、和光純薬、大阪) 1mlと Alum solution (PIERCE社 Imject[®] Alum) 1mlを混合) を腹腔内投与し、6週目に1% OVA PBS液の噴霧吸入曝露 (Aeroneb社、Aeroneb Go7030にて20分間) を3日間続けて行った。コントロールにはPBSのみを投与して同じ処理をした。3回目の噴霧吸入曝露後に、小動物呼吸機能検査装置 (Neuroscience社による試作機) にマウスを入れ呼吸数、起動抵抗を10分間測定した。また、OVA感作によるマウスのくしゃみ等の行動および鼻腔部付近に対する洗顔様動作 (preening) の回数及び時間について、デジタルビデオカメラ (SONY, PC-110) にて撮影したデータを後日解析した。

4日目にマウスを二酸化炭素吸入により安楽死させ直ちにヘパリン処理したシリンジで心臓穿刺により末梢血を得て、血漿を分離後、測定まで-80°Cに保存。OVA特異的IgE抗体価をELISA法にて測定した (大日本住友製薬、DSマウスIgE ELISA (OVA))。

4) リンパ球分画の採取・調整

i) 末梢リンパ球の調整

フォルムアルデヒド曝露終了後マウスを二酸化炭素ガス深麻酔下にて安楽死させ、ヘパリン処理したシリンジで心臓穿刺により末梢血を得た。末梢血は1200rpmで5分間遠心し、上清の血漿を除いた後、生理食塩水にて血球画分の浮遊液を調整した。これらを実験群ごとにプールし遠心管に分注したLymphoprep™ (Axis-Shield社) の上に血球希釈液を静かに重層して比重遠心分離した (室温、2000rpm、20分間)。中間層のリンパ球および単球からなる末梢単核細胞群 (PBMCs) 画分を回収し、充分量のリン酸緩衝液・生理食塩水 (PBS) で洗浄した。この後、溶血剤 (組成: 0.83% NH_3Cl /0.02M Tris·HCl (pH 6.8)) にて処理し赤血球分画を除去し、洗浄後に細胞浮遊液を細胞濃度 1.0×10^7 /ml に調整し検体とした。

ii) 脾臓リンパ球の調整

安楽死後のマウスから脾臓を摘出した。脾臓組織は摘出後直ちに3mlの100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液中にて滅菌処理を行なったスライドガラスのフロスト部分どうしの間で潰した。これを21Gの注射針の付いたシリンジで数回吸引してリンパ細胞を単離した。さらにこれらの細胞を溶血剤で処理し赤血球分画を除去し、洗浄後に細胞浮遊液を細胞濃度 1.0×10^7 /ml に調整し検体とした。

iii) リンパ球分画の測定

マウスの末梢血および脾臓から調整したリンパ球について分画をフローサイトメーター (BD FACSCalibur) により解析した。リンパ球分画は表面マーカー、CD4 陽性細胞 (ヘルパーT細胞)、CD8 陽性細胞 (細胞傷害性T細胞)、及びCD45R 陽性細胞 (B細胞) をもって判定した。さらに、免疫バランスを判定する目的でTh1/2細胞を解析するために、インターフェロンガンマ (IFN- γ) およびインターロイキン4 (IL-4) の細胞内サイトカイン刺激誘導をおこなったのちに、細胞内標識を行ない判定した。

脾細胞浮遊液に、適度に希釈した FITC-CD4 (Beckman Coulter Co. , France))、

FITC-CD8 (Beckman Coulter Co.)、FITC-CD45R (Beckman Coulter Co.) の各蛍光標識抗体を加え 4℃、30 分培養した。0.1%NaN₃-PBS にて 2 回洗浄した後、0.05%パラホルムアルデヒドPBS にて固定し、4℃にて 1 晩保存後に、フローサイトメーター (FACS、EPICS ELITE, Beckman Coulter Co.) で各蛍光抗体陽性リンパ球の比率を測定した。

細胞内サイトカインの刺激誘導は、細胞内サイトカインの活性化を 5×10^6 cell/ml に調整したリンパ球を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 25ng/ml) および Ionomycin (1 μ g/ml) にて 4 時間培養して行った。これらの細胞を FITC 標識 CD4 特異的抗体で細胞膜表面標識後に、Cytotfix Cytoperm kit (BD社) により細胞透過性を亢進させてから、それぞれ PE 標識 IFN- γ 特異的 Ig-G 抗体 および PE 標識 IL-4 特異的 Ig-G 抗体にて細胞内サイトカインの細胞内標識をそれぞれ行った。サイトカインの測定は FACS により行い、CD4 陽性細胞分画中の IFN- γ および IL-4 の各抗体による標識細胞の割合を測定した。

5) 中枢神経組織の採取・調整

脳組織は、大脳、小脳、嗅球、海馬、脳下垂体に分割し各組織は数匹単位でプールして試料とし、測定に供するまで -80℃ にて保存した。

6) 広範囲 mRNA 発現の検索

脳組織中の mRNA 発現量測定のために、それぞれを TRIzol 試薬 1ml に浸し、ポリトロン型ホモジェナイザーにて組織を破碎し、クロロフォルムおよびイソプロパノール処理によって total RNA を抽出した。さらに、RNeasy Mini Kit (キアゲン社) により total RNA を精製後、260nm および 280nm での吸光度を測定し、RNA 濃度を測定した ($OD_{260}/OD_{280} > 2.0$)。total RNA サンプルは測定に供するまで -80℃ にて保存した。マウス各組織から得られた total RNA 5 μ g をそれぞれ Low RNA Input リニア増幅 & ラベル化キット (アジレント社) を用いて、それぞれ Cy3 標識 cRNA (コントロール群)

およびCy5標識cRNA（フォルムアルデヒド曝露群）を作製した。標識されたcRNAをそれぞれ等量混合し、約20,000種類のマウス遺伝子（60merオリゴ）を搭載したMouseオリゴDNAマイクロアレイ（アジレント社）上に競合ハイブリダイゼーション（65°C、16時間）させた。アレイを良く洗浄した後、アレイ解析用スキャナーGenePix™ 4000B（Axon社）を用いて遺伝子発現解析を行った。

7) PCR反応によるmRNA発現の測定

脳組織中で変動が観察されたmRNAについて変動の定量的確認を行うために、SuperScript™ First-Strand Synthesis System（インビトロゲン社）を用いてtotal RNA 5 μgからcDNAを調製し、特異的プライマーによりPCR反応を行いそのPCR産物をアガロース・ゲル電気泳動し定量比較した。

また、末梢血および脾臓リンパ球（約 1×10^7 個）にRNA抽出試薬TRIzol Reagent（インビトロゲン社）1mlを添加し、クロロホルムおよびイソプロパノールを用いてtotal RNAを抽出した。これらtotal RNA各1.0 μgの逆転写反応をReverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)（宝バイオ）を用いて行った。得られたIFN-γおよびIL-4のcDNAをLightCycler（ロシュ社）により増幅した。ハウスキーピング遺伝子であるβ-actin遺伝子の発現に対する各遺伝子の発現比率を求め、コントロール群とフォルムアルデヒド曝露群で比較した。

2. 多種類化学物質過敏症患者での検索

1) 調査対象者

試験対象とした多種類化学物質過敏症患者については、本研究費による研究期間に集められた症例数に限りがあるために、解析の信頼性を高めるために過去の研究取り組みで得た症例も加えた。末梢血単核球のmRNA発現量の解析には平成17年、19年に北里研究所病院で多種類化学物質過敏症と診断された20名と、平成16年に旭川医大

産婦人科外来（シックハウス外来）を訪れた患者2名の計22名を対象者とした。健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない5名である。そのうちの女性4名の末梢血単核球から抽出したRNAを等量混合プールして、患者群、健常者群と比較するコントロールとした。

また、血漿中の活性物質測定の対象者として、平成16、19年に北里研究所病院で多種類化学物質過敏症と診断された21名と、平成16年に旭川医大産婦人科外来（シックハウス外来）を訪れた患者5名の計26名を対象者とした。健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない12名である。調査対象の多種類化学物質過敏症患者の基本情報を表1に示す。

本研究の被験者となる多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティアについての、基本的な情報について自記式調査票（資料1）によって収集した。

これら患者及び健常者ボランティアに対して、主治医ないし研究協力者からと口頭とで説明を行ない、文章（資料2）に署名を得ることでインフォームドコンセントを得て、採血、調査票への記入を求めた。なお、同意取り消し書についても手渡した（資料3）。なお、多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティアでの検索に際しては、旭川医科大学および北海道衛生研究所においてそれぞれ倫理委員会の審査を経て承認を得て実施した。

2) 血液の採取および末梢血単核球の分離

多種類化学物質過敏症患者および健常者ボランティア静脈より末梢血およそ18mlをヘパリンリチウム入り真空採血管（ベクトン・ディッキンソン社）3本を用いて採血し、2000rpmで5分間遠心した。上清の血漿を採取し生化学的な検索に供するまで -80°C にて凍結保存した。一方、血漿を除いた血球画分に生理食塩水を10ml添加し血球を浮遊させた。15mlプラスチック遠心管にLymphoprepTM（Axis-Shield社）5mlを加え、その上に血液浮遊液を静かに重層して比重遠心分離した（室温、2000rpm、20分

間)。中間層の末梢血単核球画分を回収し、過剰量のリン酸緩衝液・生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、末梢血単核球沈降塊を mRNA 測定のための資料とした。

3) RNAの抽出・精製

i) RNAの抽出

得られたPBMCs (約 5×10^7 個) にRNA抽出試薬TRIzol Reagent (インビトロゲン社) 1mlを添加し、クロロホルムおよびイソプロパノールを用いてtotal RNAを抽出した。さらに、RNeasy MinElute™ Cleanup Kit (キアゲン社) によりtotal RNAを精製後、260nmおよび280nmでの吸光度を測定し、RNA濃度を測定した ($OD_{260}/OD_{280} > 2.0$)。total RNAサンプルは使用するまで -80°C にて保存した。なお、健常者4名から得たtotal RNAを等量混合し、コントロール群として使用した。

ii) RNAの品質評価

精製したtotal RNA (1 μg) をAgilent 2100バイオアナライザ (アジレント社) を用いて、品質を評価した。すなわち、RNAの18Sと28Sのピーク比を求めることによりRNAの分解がほとんど進んでいないことを確認し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析に用いた。

iii) Cy3・Cy5標識cRNAの作製とDNAマイクロアレイとの反応・解析

コントロール群および多種類化学物質過敏症患者 (あるいは健常者) から得られたtotal RNA 2.5 μg をそれぞれLow RNA Input リニア増幅&ラベル化キット (アジレント社) を用いて最初に逆転写反応でcDNAを作製し、つぎにT7 RNAポリメラーゼにより増幅させながらCy3-CTPおよびCy5-CTPを取り込ませ、それぞれCy3標識cRNA (コントロール群) およびCy5標識cRNA (患者あるいは健常者) を作製した。標識されたcRNA (1 μg) をそれぞれ等量混合し、ヒト全ゲノム (約4.4万个) を搭載したオリゴマイクロアレイ (Human Whole Genome Oligo Microarray、アジレント社) 上に競合ハイブリダイゼーションさせた (65°C 、16時間)。アレイを6 \times SSC液 (室温、10分間) と

0.1×SSC液（4℃、5分間）で洗浄した後、アレイ解析用スキャナーGenePix 4000B（Axon社）を用いて遺伝子発現のスキャン画像を記録した。測定データについてアレイ解析ソフトGene Spring（アジレント社）により、スキャッタープロットの作成やクラスタリング解析等を行った。

iv) 逆転写反応

健常者及び多種類化学物質過敏症患者から得た total RNA 各 2.5µg の逆転写反応を SuperScript™ First-Strand Synthesis System（Invitrogen社）を用いて行った。

v) 定量的 PCR

健常者及び多種類化学物質過敏症患者の PBMCs から調製した cDNA を鋳型として、9つの遺伝子；TNFα-induced protein 3、ICAM 1、Dual specificity phosphatase 2、CXCL2、3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase、Angiotensin/vasopressin receptor（NLRP3）、CD83、NFκB-inhibitory epsilon 及び GAPDH を ABI7700（パーキンエルマ社）により増幅した。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH 遺伝子の発現に対する各遺伝子の発現比率を求め、健常者と MCS 患者で比較した。各遺伝子を増幅されるためのプライマー及びプローブは、Biosearch Technologies, Inc.（Novato, CA, USA）から購入した。

TNFα-induced protein 3 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dgTACTgAgAAgTggCATgCATgA 3'（F）及び 5' dTgTCgAgAAgTCCggAAgCT 3'（R）を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CAATTgCCgTCACCgTTCgTTTTCA-BHQ-1 3' を用いた。

ICAM 1 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dgCgCACTCCTggTCCTgCT 3'（F）及び 5' dCaggAggTgCTgCATgTCA 3'（R）を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CTCTgTTCCCAggACCTggCAATgC-BHQ-1 3' を用いた。

Dual specificity phosphatase 2 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dAACaggTAgggCAAATCTCCA 3'（F）及び 5' dgCTgTCCCgATCTgTgCTCT 3'（R）を用いた。

また、プローブとして、5' dFAM-CAgggCCACCCTggTCgTAgACA-BHQ-1 3' を用いた。

CXCL2 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCgCCCATggTTAAgAAAATCA 3' (F) 及び 5' dCCAATAAgCTTCCTCCTCCTTCT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-TgCTgAAAAATggCAAATCCAACCTgACC-BHQ-1 3' を用いた。3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dTTCAggCgTTCTTCTCCTAgACA 3' (F) 及び 5' dTTgCCgATACAATTCCAAggA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-ATCgCATTCAggTCCCTTCgCAACATg-BHQ-1 3' を用いた。Angiotensin/vasopressin receptor (NLRP3) 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dTgTgAAgTgCTgAAACAgCagA 3' (F) 及び 5' dCagCTCagCgTTTTCTTCTTgAA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CTCCTgCagAACCTggggTTgTCTgA-BHQ-1 3' を用いた。CD83 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dggCagAgAAACCTAAgTggCAA 3' (F) 及び 5' dAgCCAgCagCagGACAATCT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-AgAgTgACAggATgCCCTgCACAgC-BHQ-1 3' を用いた。NFkB-inhibitory epsilon 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCTggggCCTCATgAATCACT 3' (F) 及び 5' dAgCCCTCagCagCTggAA 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-CAggTggACCAgCgTgTCTCCgT-BHQ-1 3' を用いた。GAPDH 遺伝子の増幅は、プライマーとして 5' dCgACAgTCagCCgCATCTT 3' (F) 及び 5' dCAATACgACCAAATCCgTTgACT 3' (R) を用いた。また、プローブとして、5' dFAM-TTgCgTCgCCAgCCgAgC-BHQ-1 3' を用いた。

4) 血漿中の活性物質の測定

末梢血より分離する血漿について、必要に応じて生活性物質等の測定を行なう。

IV. 結果

1. 動物実験

1) 卵白アルブミンに対する即時型アレルギー応答の評価

OVA による即時型アレルギーを発現させた HCHO 曝露マウスの呼吸器に及ぼす影響は、小動物呼吸機能検査装置 (Neuroscience 社による試作機) で呼吸数、起動抵抗を 10 分間測定したが、これら指標の HCHO 曝露による変動は確認できなかった (図 1)。OVA 感作によるマウスのくしゃみ等の行動は、デジタルビデオカメラ (SONY, PC-110) にて撮影したデータを後日解析した。行動観察では 10 分間の観察時間中に OVA 曝露による明らかにくしゃみは認められなかったために鼻部付近に対する洗顔様動作 (preening) の回数及び時間を計測した。対照群の preening の平均回数および標準偏差は 4.8 ± 1.33 回、HCHO 曝露群は 6.0 ± 2.24 回、持続時間はコントロール群が 62.7 ± 20.7 秒、HCHO 曝露群は 70.2 ± 24.7 秒であったが、いずれも有意ではなかった (図 2)。

2) 特異的抗卵白アルブミン IgE

実験的に誘導した即時型アレルギー応答の評価のために、血清検体を用いて卵白アルブミン特異的 IgE 抗体価を ELISA 法にて測定した。空気曝露コントロール群 (n=6) およびフォルムアルデヒド曝露群 (n=7) の卵白アルブミン特異的 IgE 抗体価の平均値 \pm SD は、それぞれ 145.4 ± 113.8 ng/ml および 103.6 ± 38.6 ng/ml であった。両群間の抗体価についての t-test による検定では有意差はみられなかった (図 3)。

3) 脾臓リンパ球分画

フォルムアルデヒド曝露により脾臓リンパ球の CD4 陽性細胞増加および CD8 陽性細胞減少と CD4/CD8 細胞比率の上昇を確認した (図 4、5)。

4) 免疫バランスの評価

i) 脾臓細胞における CD4 および CD8 細胞陽性率

曝露群で脾臓 CD4 細胞陽性に対するインターフェロン γ (IFN- γ) 陽性細胞の低下傾向と、IL-4 陽性細胞の増加傾向を認めた (図 6)。

ii) 脾臓細胞における IFN- γ および IL-4 mRNA 発現量

脾臓細胞における IFN- γ mRNA 発現量が有意に抑制される傾向を認めた。インターロイキン 4 (IL-4) mRNA 発現量も低下したが、IL-4/IFN- γ mRNA 発現量比は曝露群で上昇傾向があった (図 7)。

また、脾臓細胞において DNA アレイ法にて網羅的に遺伝子発現変動を解析した結果、フォルムアルデヒド曝露によりコントロール群に比して 2 倍以上の発現が誘導された遺伝子が 8 個、同じく 1/2 以下に発現が抑制された遺伝子も 8 個認めたが、コントロール群に対する変動倍率が最大で 2.3 倍と 0.44 倍であり、大きな変動を示す遺伝子はなかった (図 8、9)。末梢血単核球においても大きな変動を示す遺伝子はなかった (図 10、11)。

5) 中枢神経系の mRNA 発現の評価

フォルムアルデヒド曝露実験において、脳の重量には FA 曝露群とコントロール群との間に差は認めなかった。

脳より海馬および嗅球を分離し total RNA を抽出した。それぞれの total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。各群の海馬では FA 曝露により 2 倍以上の発現誘導された遺伝子 3 個と 1/2 以下に発現抑制された遺伝子 12 個が見られた (図 12、13)。嗅球ではフォルムアルデヒド曝露により 2 個の遺伝子が発現誘導され、7 個の遺伝子が発現抑制された (図 14、15)。海馬と嗅球においてフォルムアルデヒド曝露により共通して発現誘導された遺伝子として、プロラクチン遺伝子がある。海馬で 2.3 倍、嗅球で 2.8 倍の誘導が観察され、RT-PCR 法によって、ハウスキー

ピングの β -アクチン遺伝子がフォルムアルデヒド曝露により発現に影響が無かった事を確認の上で、プロラクチン遺伝子がフォルムアルデヒド曝露により両組織で発現誘導されていることを確認した。

マウスの系統によるプロラクチンのmRNA発現量の差について、無処置マウスにおいて解析した結果、系統間において大きな差があることと、個体差が大きいことが確認された（図 16、17、18）。

2. 多種類化学物質過敏症患者での検索

1) RNA 試料の RNA の質の検定

コントロール群および多種類化学物質過敏症患者、健常者の末梢血から調整された末梢血単核球由来 total RNA をバイオアナライザにより解析した泳動パターンの一例を図 19 に示す。ヒトの新鮮組織から抽出した total RNA のうち、最も多量に存在するリボゾーム RNA で約 2 kb の単一転写単位 rRNA 前駆体に由来する 28S rRNA と 18S rRNA の存在比率が約 2 : 1 となることから、両者の存在比率をもって RNA の質（被分解度）を判定した。図に示すごとく、本研究において被験者から得られた RNA 試料は殆ど分解されておらず高品質に保存されている事が確認された。

2) マイクロアレイによる RNA 発現解析

代表的なマイクロアレイのカラーイメージ画像を図 20 に示した。赤・黄・緑と 3 色に色分けされたスポットが現れ、赤色はコントロール群に比べ患者（健常者）で発現が増加している遺伝子、黄色は発現量に変化のなかった遺伝子、緑色は患者（健常者）で発現が抑制されている遺伝子を表している。

図 21 に、コントロール群と多種類化学物質過敏症患者の末梢血単核球由来 total RNA を用いて解析したイメージ画像を個々の遺伝子の発現強度で表したスクエアープロットを示した。縦軸は多種類化学物質過敏症患者の蛍光強度（Cy5）、横軸は

コントロール群の蛍光強度 (Cy3) を表しており、両者で発現レベルが同じ遺伝子の場合には右上がり 45 度の直線上に位置することを意味する。今回の解析では、コントロール群に対して遺伝子発現倍率が 2 倍以上の増加あるいは 0.5 倍以下の減少を示す場合を変動遺伝子とした(図中 45 度の直線に平行する 2 本の線が 2 倍と 0.5 倍を示す)。

我々の一連の研究の初期の検索において、変動遺伝子の中で、健常者 9 名全てで変動せず、多種類化学物質過敏症患者 16 名全てで共通して増加ないし減少する特異的な遺伝子を探索したが、該当する遺伝子は見出されなかったが、半数以上の MCS 患者でコントロール群に対して共通して増加ないし減少傾向を示した遺伝子の抽出を行なったところ、28 遺伝子 (増加傾向 : 2 遺伝子、減少傾向 : 26 遺伝子) を選び出すことができている (表 2)。そこで、比較的特徴のある 28 遺伝子について、陰性対象としてハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を基準として、多種類化学物質過敏症患者および健常者の個別遺伝子発現を解析したところ、全体的に比較的強く発現低下が見られる IL-1 beta、epiregulin、chemokine (CC motif) ligand 4 (CCL4)、chemokine (CXC motif) ligand 2 (CXCL2) (35939, 40163) など免疫応答の制御にかかわる遺伝子群が比較的大きな変化傾向があるものとして抽出されたが、それらは健常者での発現も数例を除き低下傾向の者が多いなど、両群間で際立った差を認めなかった。

そこで、当該 28 遺伝子を解析ソフト Gene Spring でクラスタリング解析した結果を報告したが、それを図 21 に示す。縦方向は 28 遺伝子の発現変動状況について「似たパターンを示す被験者」を集めてクラスター (Condition Tree) を形成させ、横方向は 28 遺伝子の中で発現変動状況が「似たパターンを示す遺伝子」を集めてクラスター (Gene Tree) を形成させたものである (図 22)。多種類化学物質過敏症患者群を遺伝子発現が大きく変動した高変動群 (MCS-a1, a2, a3, a6, k5, k1, k2,

k3, k6, k4 ; 10名) と変動が少ない低変動群 (MCS-a4, a5, t2, t6, t3, t4 ; 6名) に分割可能であった。多種類化学物質過敏症患者高変動群は病勢が強い段階にあると解釈することも可能であるため、高変動群と同じく遺伝子発現が高変動する健常者群 (Health-a1, a2, a3) において mRNA 遺伝子発現を比較解析したところ、多種類化学物質過敏症患者群で変動する一方で健常者群で変動しない遺伝子群が同一のクラスター (Gene Tree) に属することが判った。すなわち、39947

(3', 5' -cyclic AMP phosphodiesterase)、32665 (CD83)、35650 (unknown)、2474 (IkB-epsilon)、35939 (CXCL2)、19368 (angiotensin/vasopressin receptor)、27 (ICAM1)、32207 (unknown)、30388 (TNF alpha-induced protein 3)、36030 (dual specificity phosphatase 2) の 10 遺伝子が抽出された。

これら 10 遺伝子とハウスキーピング遺伝子としての GAPDH および β -アクチンについて、健常者および多種類化学物質過敏症患者のそれぞれの平均と個人データの比較したものを、患者 6 名分、図 23 から図 28 に示す。

3) RT-PCR による詳細な mRNA 発現の解析

上述のごとく得られた 10 遺伝子群から、2つの unknown 遺伝子を除く 8 遺伝子について、詳細な遺伝子発現を定量的に評価するために健常者 5 名と多種類化学物質過敏症患者 22 名の末梢血単核球由来 total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。結果を図 29 から図 36 に示す。また、図 37 に 8 遺伝子について健常者と多種類化学物質過敏症患者の平均値をまとめた。

4) 血漿プロラクチン濃度測定

フォルムアルデヒド曝露を行なったマウスにおいて、海馬及び嗅球においてプロラクチン mRNA 発現が亢進していたことから、化学物質過敏症患者および健常者において末梢血から分離した血漿においてプロラクチン濃度の測定を行なった。

プロラクチンの末梢血血漿中濃度も患者で高値を示す傾向があったものの有意差はなかった（図 38、39）。

V. 考察

フォルムアルデヒドを曝露したマウスの中樞神経系において変動するアレルギー応答を中心とした生活性因子の mRNA 発現の変動を観察した。さらに、これらの動物実験の結果をもとに、多種類化学物質過敏症と診断を受けた患者において、免疫応答等にかかわる因子の mRNA 発現を観察し、病態の解明を試みた

まず、フォルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスにおいて免疫応答の変容を観察することを試み、ついで化学物質過敏症の病態形成の基盤になると考えられている中樞神経系においてフォルムアルデヒド曝露によって意義付けできる変動を示す遺伝子の発現を観察し、その中に免疫機構との関連する項目を探索し、化学物質過敏症の病態と免疫機構との関連を検討することを目的して研究を行なった。

卵白アルブミンによって感作したマウスに対して、卵白アルブミン溶液を噴霧吸入させて即時型アレルギー応答を誘発し、マウスの前肢による鼻部をこする動作を観察して評価を行なった。フォルムアルデヒド曝露群において空気曝露コントロールに対して、鼻部付近に対する洗顔様動作回数および持続時間それぞれが増加する傾向が見られ、有意差がなかったことかた明らかなアレルギー症状増強の変化とは言えないものの即時型アレルギー応答の発現がフォルムアルデヒド曝露で増強される事が伺える。

さて、生体内における免疫応答の制御において、免疫応答を高める CD4 陽性 T 細胞であるヘルパー T 細胞 (Th) 細胞と、免疫応答を抑制的に制御する CD8 陽性 T 細胞であるサプレッサー (Ts) 細胞がある。CD4 および CD8 細胞の比率はこうした免疫

バランスを反映すると考えられている。さらに、免疫応答の詳細を制御している Th に亜分画 (Th1 と Th2) があり、より分化度の低い Th0 細胞から分化することが知られている。これら 2 つの Th 細胞分画のうち Th1 細胞は細胞性免疫成立に重要な役割を担い、一方 Th2 細胞は抗体産生を誘導し液性免疫成立に重要な役割を担っている。これら 2 つの Th 細胞が産生する液性因子 (サイトカイン) は自己 Th 分画への分化や増殖を高める一方で、他方への分化や増殖を抑制することが知られており、両者是对立の上にバランスを保っている。これらの Th 細胞バランスはアレルギー応答の発現にも関与している。すなわち、即時型アレルギーが成立するときには Th2 細胞が優位となり、その際には Th1 細胞が相対的に抑制された状況にある。逆に言うならば、細胞性免疫が起こりにくい状況に置かれた個体の生体内では Th1 細胞への分化が減少し、逆に Th2 細胞が優位となる状況が生まれる。こうした個体では即時型アレルギーすなわちアトピー性疾患の発症、増悪が起こるとされている。今回のフォルムアルデヒド曝露を行ったマウスで観察された免疫応答・アレルギー反応の結果は、この Th 細胞バランスによって説明できるものと考えられる。

マウス脾臓リンパ球の分画解析及び免疫バランスの指標となる mRNA 発現の評価から、フォルムアルデヒド曝露により免疫応答を亢進させる CD4 細胞の増加と抑制する CD8 細胞の減少、結果としての CD4/CD8 細胞比率の亢進が見られ免疫応答が高まる状態にあることを意味する。さらに、フォルムアルデヒド曝露により遅延型アレルギーにバランスをシフトさせる IFN- γ mRNA 発現の減少が大きく、結果として IL-4/IFN- γ mRNA 比率が増大傾向を示し、さらに細胞内サイトカイン標識の結果からも Th1 細胞の減少と Th2 細胞の増加が見られるなど、免疫応答が高まる状態に加えて即時型アレルギー誘発側に偏る免疫傾向が示されることが判った。

これらの結果を総合的に判断するならば、フォルムアルデヒドを曝露したシックハウス症候群のモデルとしてのマウスが、液性免疫優位、アレルギー反応において

は同様に関連抗体の関与する即時型アレルギーを起こしやすい状態にあることを示唆し、化学物質過敏症の患者にアトピーなどの即時型アレルギーの素因を持つ場合の多いことの説明となると考えられる。

また、ホルムアルデヒド曝露によって、脳内（海馬および嗅球）でのプロラクチン産生の亢進という新しい知見も観察された、近年シックハウス症候群の発症機序に嗅球-大脳辺縁系が関与するという報告と符合する結果が得られた。

次いで、動物実験の結果をふまえて、多種類化学物質過敏症として診断を受けている患者において、免疫応答等にかかわる因子のmRNA発現を観察し、病態の解明を試みた。多種類化学物質過敏症の診断は、一般の医療機関では困難さが伴うため、本研究では北里研究所病院臨床環境医学センターにて診断を受けた者を対象者として行なった。さらに、多種類化学物質過敏症を初めシックハウス症候群患者は梅雨時期、夏季には症状が増悪するケースが多く、研究のための検体の採取には適している反面、具合が悪く受診することもままならない状況から秋から初冬にかけての検体採取となった。

我々が先行の科学研究費補助金を受けて行なったDNAアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析研究の成果から、多種類化学物質過敏症患者群で変動する一方で健常者群で変動しない遺伝子群が同一のクラスターを形成することが判った。このうち不明な遺伝子2つを除いた、39947 (3', 5'-cyclic AMP phosphodiesterase)、32665 (CD83)、2474 (IkB-epsilon)、35939 (CXCL2)、19368

(angiotensin/vasopressin receptor)、27 (ICAM1)、30388 (TNF alpha-induced protein 3)、36030 (dual specificity phosphatase 2) の遺伝子は、免疫応答等の制御等に関与するものが多かった。シックハウス症候群や多種類化学物質過敏症の患者には、アレルギー疾患などの併発や既往の在る者が多いことが知られていることから、これらの遺伝子群が多種類化学物質過敏症と何らかの関連を有する可能

性があると考えられたが、マウスで見られたような免疫バランスの変容などを説明することは出来なかった。

多種類化学物質過敏症患者の検体採取と網羅的遺伝子発現解析には手間と費用がかかるために単回の研究補助事業内での成果のまとめには、例数の制約から限界があるため、今回は先行して行なった研究を含めた3年余の一連の研究で得られた検体やデータをまとめて解析の供し、その信頼性を高めることを試みた。

8遺伝子について、詳細な遺伝子発現を定量的に評価するために健常者5名と多種類化学物質過敏症患者22名の末梢血単核球由来 total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。何れの遺伝子発現においても健常者 (Health-H1604) で高い傾向を認めた。Health-H1604 はアレイ解析で用いた Health-t04 であり、アレイ解析においても発現が高い傾向を示していた。他の健常者4名の遺伝子の発現は、多種類化学物質過敏症患者22名とほぼ同程度の発現を示した。Health-H1904 は健常者の中で常に最も低い値を示した。一方、MCS-H1912 は NF κ B-IE の発現を除き他の7遺伝子で多種類化学物質過敏症患者の中で常に最も高い発現を示した。MCS-H1702 は NF κ B-IE の発現を除き他の7遺伝子で多種類化学物質過敏症患者の中で常に最も低い発現を示した。これらの健常者群および多種類化学物質過敏症患者群のそれぞれ最も高いあるいは低い発現を示す者が特定の者であること、さらには両群における遺伝子発現の分布が重なり合うこと、すなわち個体による差が大きいことを考えると、検索した8遺伝子について多種類化学物質過敏症の病態を説明するには不十分であると思われる。

免疫グロブリン・スーパーファミリーの一員で単球/マクロファージ系の細胞に発現する CD83 遺伝子にのみ両群との間で統計学的有意差が認められたものの、病態を有意に説明することは難しい。

RT-PCR 法にて遺伝子の発現を定量的に解析した結果、健常者4名と多種類化学

物質過敏症患者 22 名でそれぞれに一定傾向のある差が得られなかつたことから、これらの 8 遺伝子が多種類化学物質過敏症の病態の形成にかかわるものと判断し、診断のマーカーとして考慮することは難しいと考えられた。マイクロアレイ解析は、ヒト全遺伝子の発現を網羅的に把握する素晴らしい方法であり、先のアレイ解析の結果は今回の RT-PCR 解析の結果でも再現されている。しかしながら、見出された遺伝子が炎症反応に関連するため非常に発現変動を起こしやすいとも考えられる。検体を得たコントロール群については対象者を増やすことで、遺伝子発現の安定したレベルが得られる可能性がある。しかし、多種類化学物質過敏症の患者は、年齢幅が大きい上に病勢も一定ではないことから、真の病態を説明できる遺伝子発現を特定することは相当の困難さであろう。遺伝子の総数が数万あるのに対しての検索で抽出された遺伝子が 10 という確率を考えると、健常者群と多種類化学物質過敏症患者群との間で有意に変動していた遺伝子として偶然にこれら 10 遺伝子が抽出された可能性は否定できないであろう。

フォルムアルデヒド曝露を行なったマウスにおいて、海馬及び嗅球においてプロラクチン mRNA 発現が亢進していたことから、化学物質過敏症患者および健常者において末梢血から分離した血漿においてプロラクチン濃度の測定を行なった。

近年、中神経系が化学物質過敏症の病態の場になることが示されていることから、フォルムアルデヒド曝露をおこなった化学物質過敏症モデルを想定したマウスにおいて DNA アレイ法によって網羅的に遺伝子発現を検索した。その結果海馬及び嗅球においてプロラクチンの発現の亢進が認められた。プロラクチンの発現亢進が化学物質過敏症の発症の説明には直接結びつかないが、化学物質過敏症においての中神経の関与の場が大脳辺縁系であることから特に注目される。ただし、マウスの種差によってプロラクチン mRNA 発現量に大きな差があること、さらに純系マウスにおいても個体差が大きいことが判明し、観察された減少についてさらなる検討が

必要とされる。

化学物質過敏症患者でプロラクチンの末梢血血漿中濃度を測定したところ患者の一部に高値を示す者があったものの、健常群と患者群との間には有意差は見られなかった。

フォルムアルデヒド曝露をおこなった化学物質過敏症モデルを想定したマウスで行なった検証により、総合的に判断して多種類化学物質過敏症と免疫機構の間に関連性が関与することが示唆された。しかし、多種類化学物質過敏症患者においてフォルムアルデヒド曝露マウスに見られた様な変化は確認できず、実際のヒトにおいては多種類化学物質過敏症の病態形成における免疫機構の関与について明らかな関連は見いだされなかった。これらの事は、それぞれの個体によって多種類化学物質過敏症を含むシックハウス症候群の発症の原因も異なれば生体反応も異なり、一つの理論で病態を説明する事が出来ない複雑な疾患群であることを裏付けるものと考えられる。今までに多くの研究者がこれらの問題に取り組んできたが未だ解明に至らないのもこうした理由によるものと考えられる。しかし、最近、多種類化学物質過敏症の病態形成に中枢神経系大脳辺縁系の関与が示唆される中で、フォルムアルデヒド曝露マウスで海馬および嗅球においてホルモンmRNAの変動が観察されるなど、病態の解明につながる可能性のある知見も得られた。今後、多種類化学物質過敏症をはじめシックハウス症候群の病態が解明され、疾病の予防と患者の症状の緩和がなされる日が来ることが待たれる。

VI. 結論

動物実験ではフォルムアルデヒド曝露により Th2 細胞が減少傾向となり即時型アレルギー誘発側に偏る免疫傾向が示され、アレルギー症状増強の弱い変化が認められ、総合的に判断して多種類化学物質過敏症の病態形成と免疫機構とのかかわり

が示唆された。一方、多種類化学物質過敏症患者においてホルムアルデヒド曝露マウスに見られた様な変化は確認できず、実際のヒトにおいては多種類化学物質過敏症の病態形成における免疫機構の関与について明らかな関連は見いだされなかった。

VII. 図表

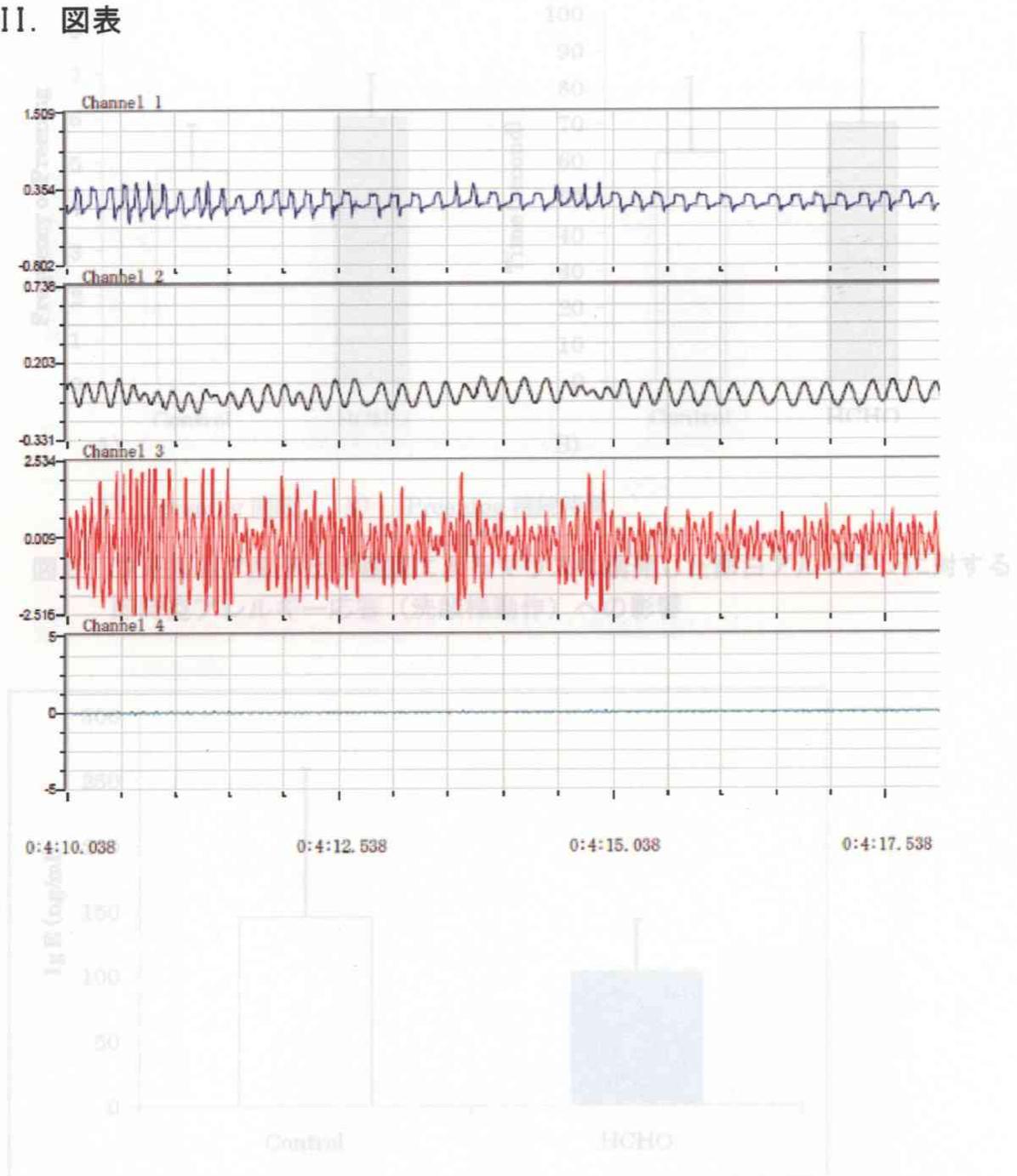
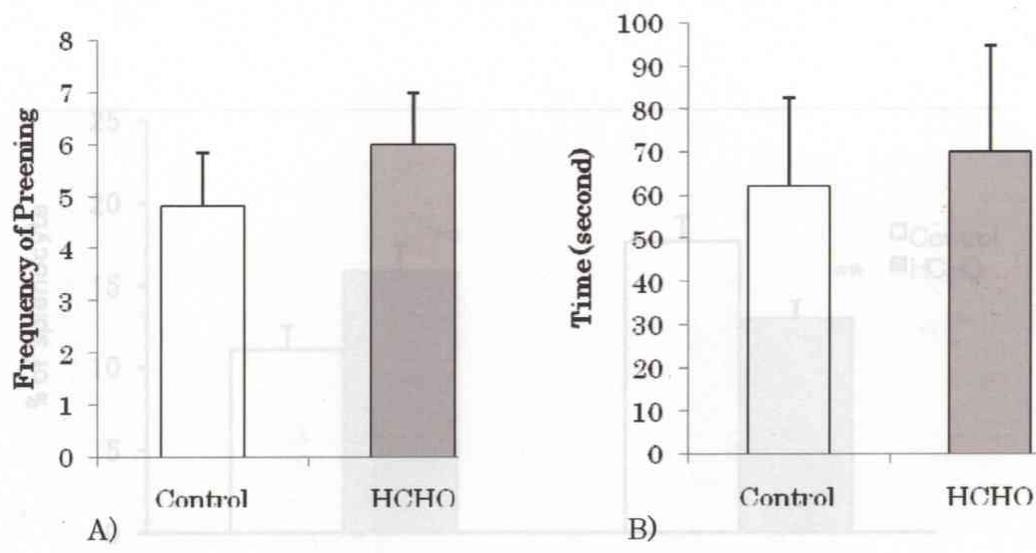


図3 フォルムアルデヒド曝露によるマウスの抗卵白アルブミン特異的 IgE 抗体への影響



A) Preening 回数、 B) Preening 持続時間

図2 フォルムアルデヒド曝露によるマウスに誘発した卵白アルブミンに対する即時型アレルギー応答（洗顔様動作）への影響

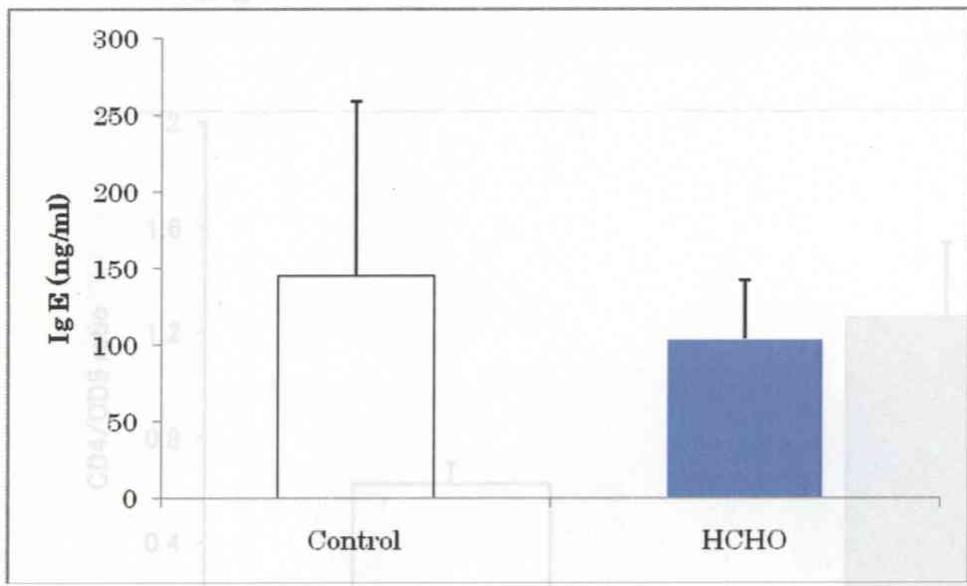
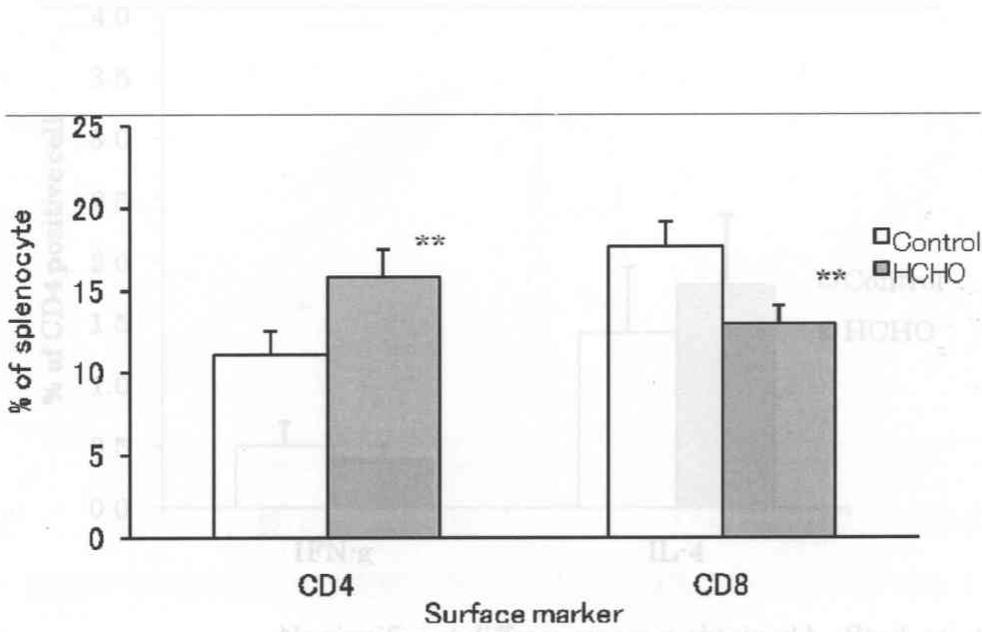


図3 フォルムアルデヒド曝露によるマウスの抗卵白アルブミン特異的 IgE 抗体への影響

** p<0.01 by Student's t-test

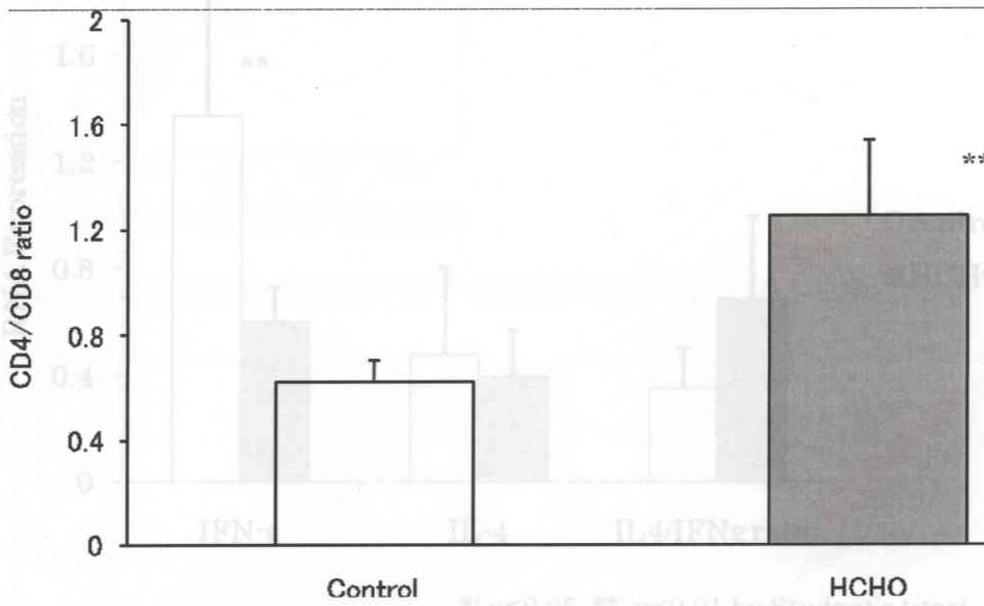
図5 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における CD4/CD8 細胞比率に対する影響



No significant differences were obtained by Student's t-test.

** : $p < 0.01$

図6 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における CD4 細胞内 IFN- γ および IL-4 の影響
 図4 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における CD4、CD8 細胞への影響



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's t-test

** : $p < 0.01$ by Student's t-test

図7 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における IFN- γ および IL-4 および IL-17A の影響
 図5 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における CD4/CD8 細胞比率に対する影響

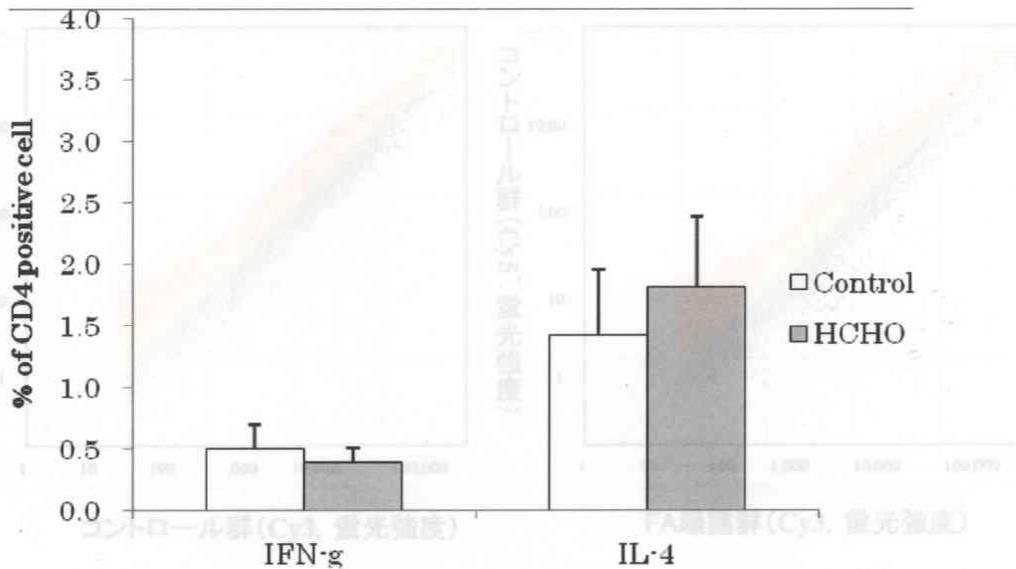
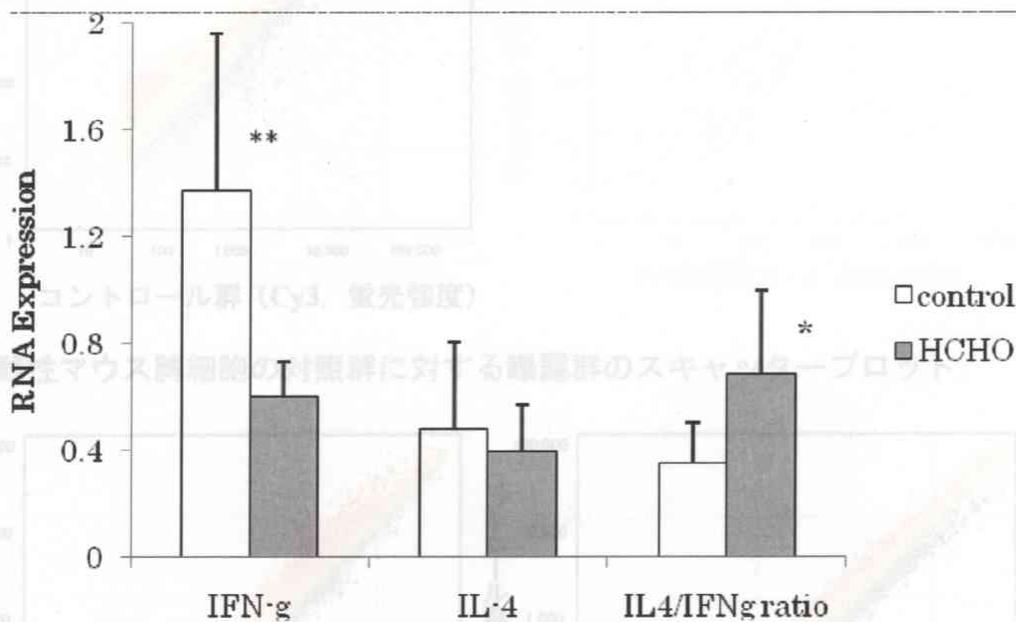


図5 雄性マウス脾細胞の対照群に対する曝露群のスクエッタープロット

No significant differences were obtained by Student's t-test.

図6 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における CD4 細胞内 IFN- γ および IL-4 陽性率への影響



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by Student's t-test

図7 フォルムアルデヒド曝露によるマウス脾臓細胞における IFN- γ および IL-4 mRNA 発現量への影響

図10 雄性マウス末梢血単核球の対照群に対する曝露群のスクエッタープロット

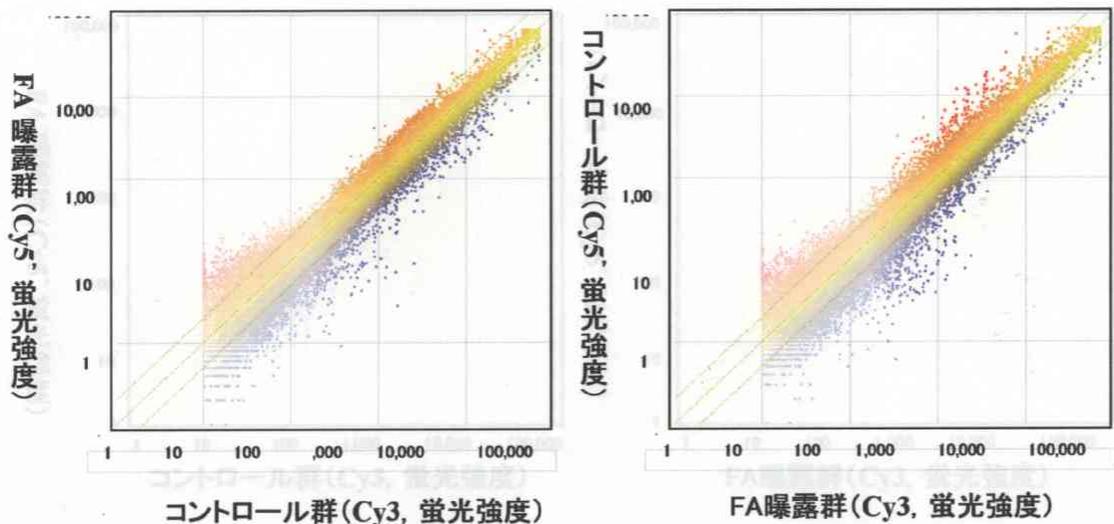


図 8 雄性マウス脾細胞の対照群に対する曝露群のスクアタープロット

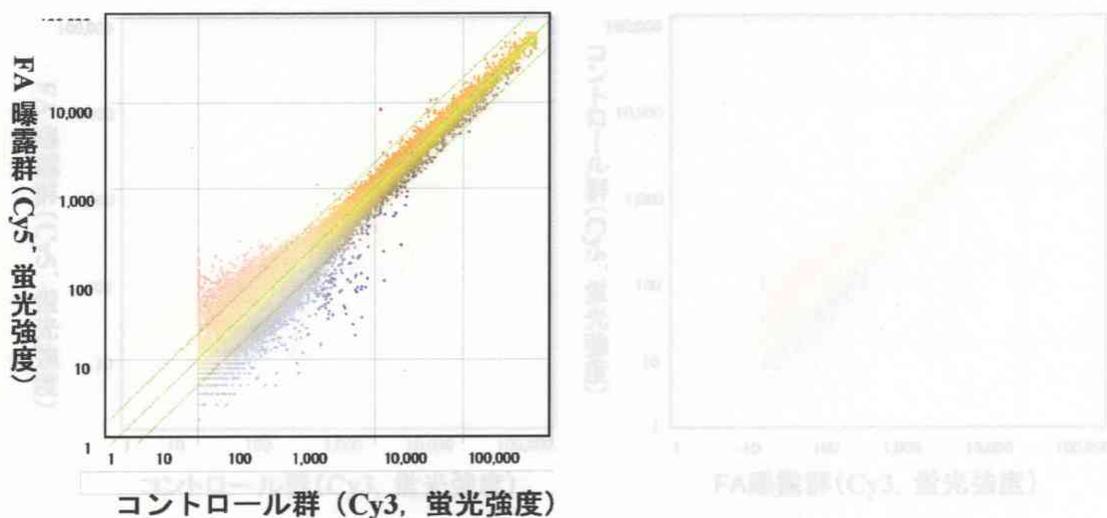


図 9 雌性マウス脾細胞の対照群に対する曝露群のスクアタープロット

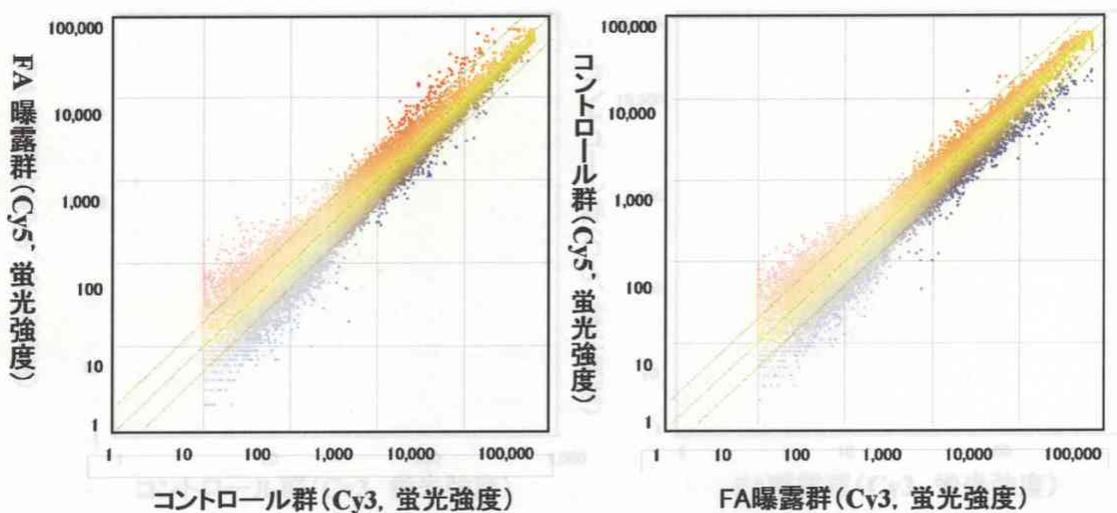


図 10 雄性マウス末梢血単核球の対照群に対する曝露群のスクアタープロット

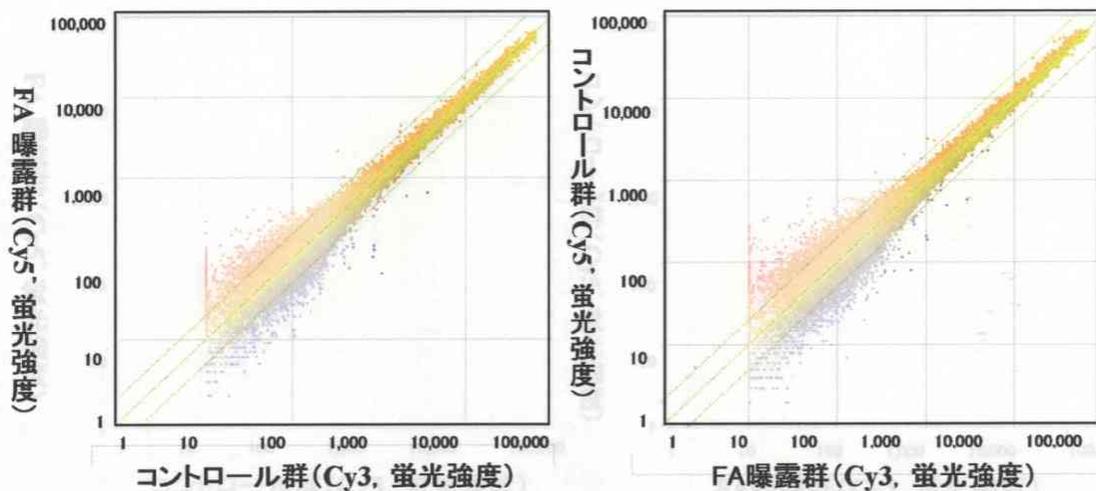


図 11 雌性マウス末梢血単核球の対照群に対する曝露群のスクアッタープロット

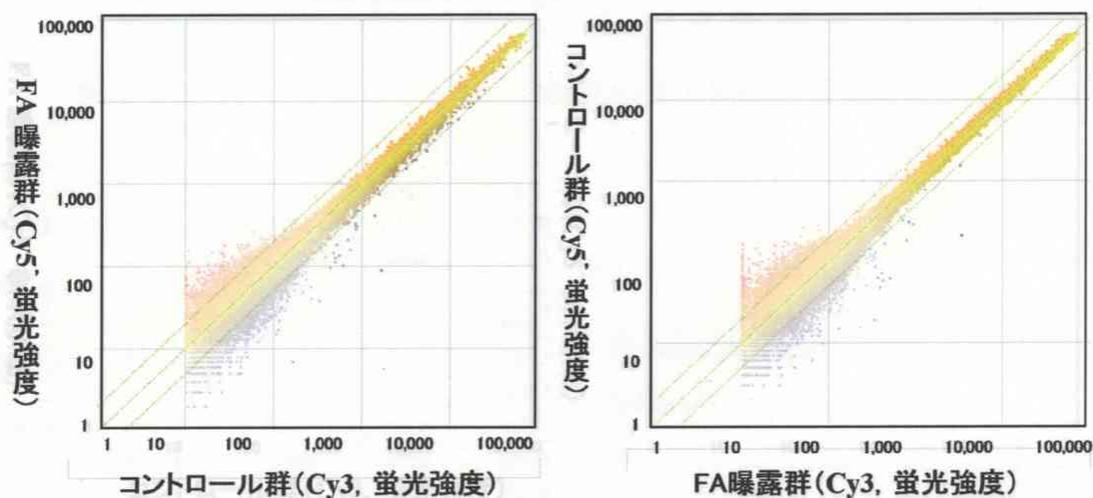


図 12 雄性マウス海馬の対照群に対する曝露群のスクアッタープロット

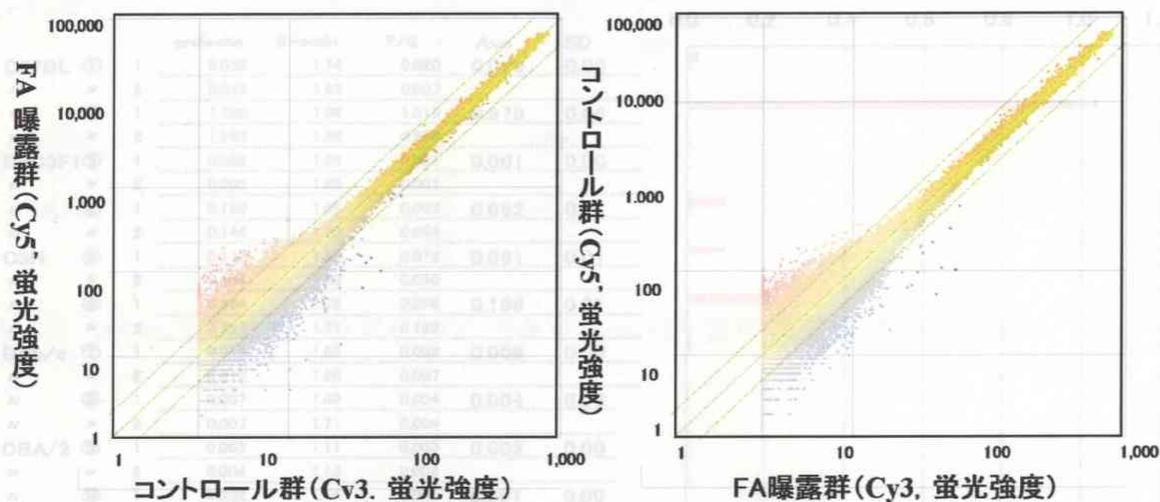


図 13 雌性マウス海馬の対照群に対する曝露群のスクアッタープロット

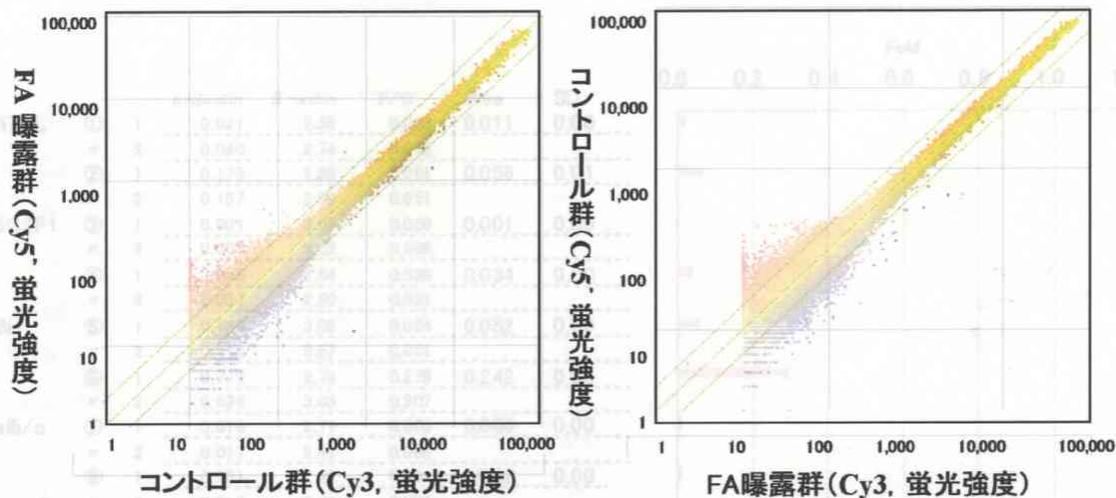


図 14 雄性マウス嗅球の対照群に対する曝露群のスクアッタープロット

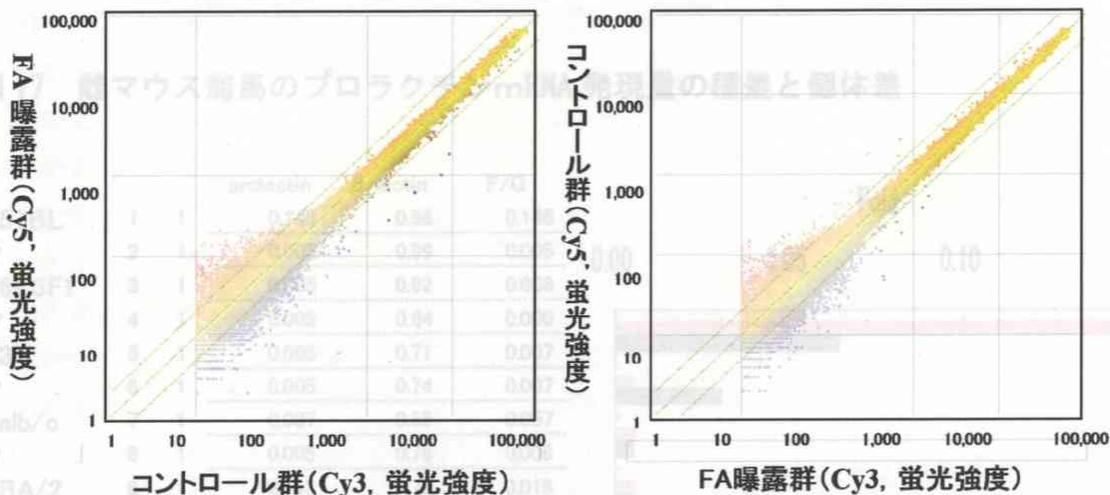


図 15 雌性マウス嗅球の対照群に対する曝露群のスクアッタープロット

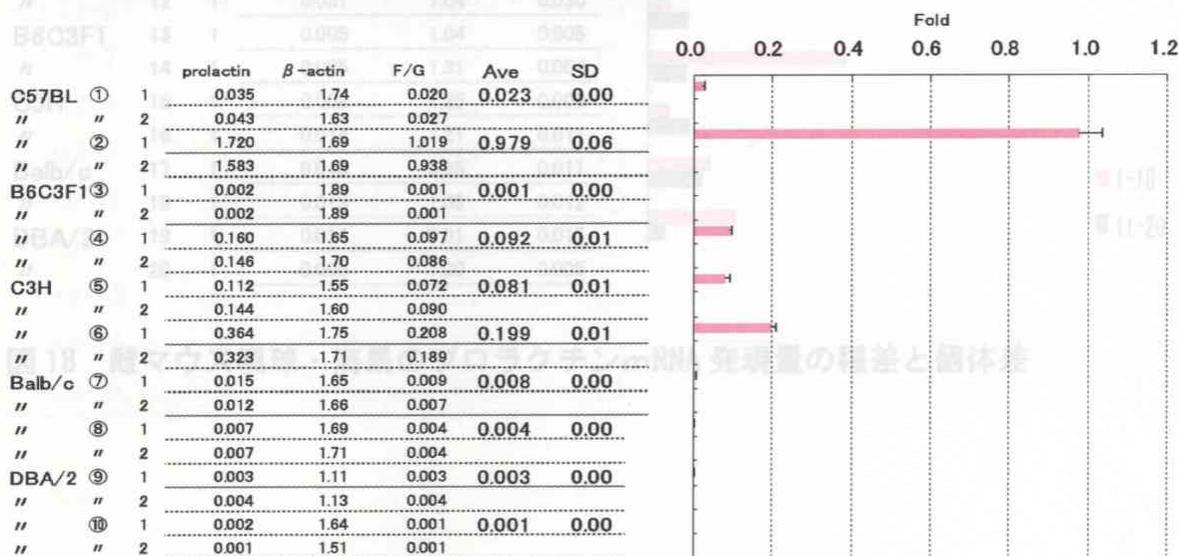


図 16 雌マウス嗅球のプロラクチンmRNA 発現量の種差と個体差

表 1 調査対象化学物質過敏症患

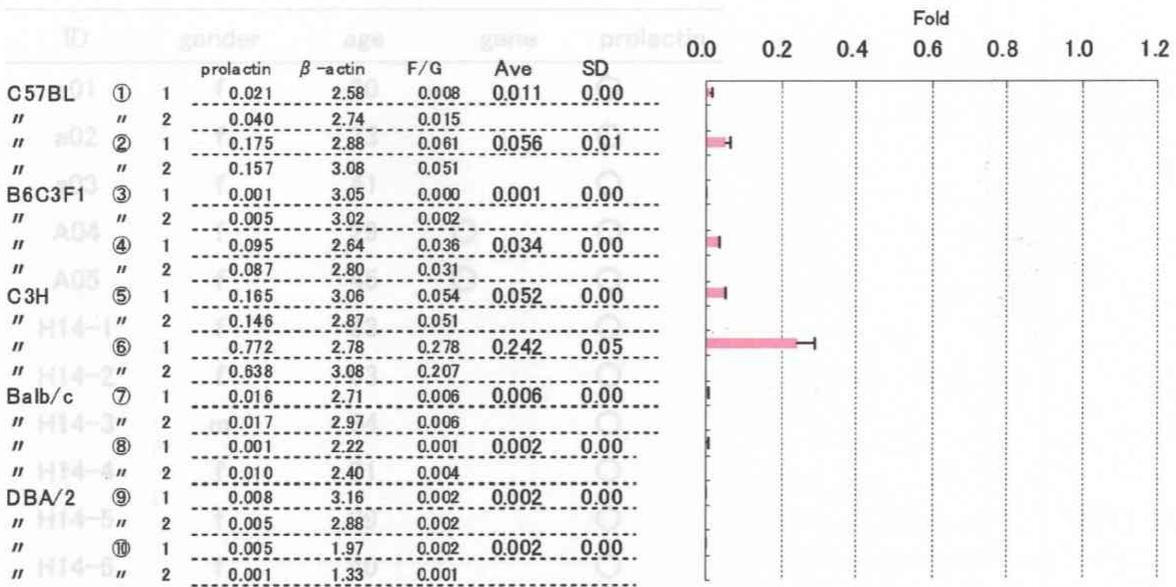


図 17 雌マウス海馬のプロラクチンmRNA 発現量の種差と個体差

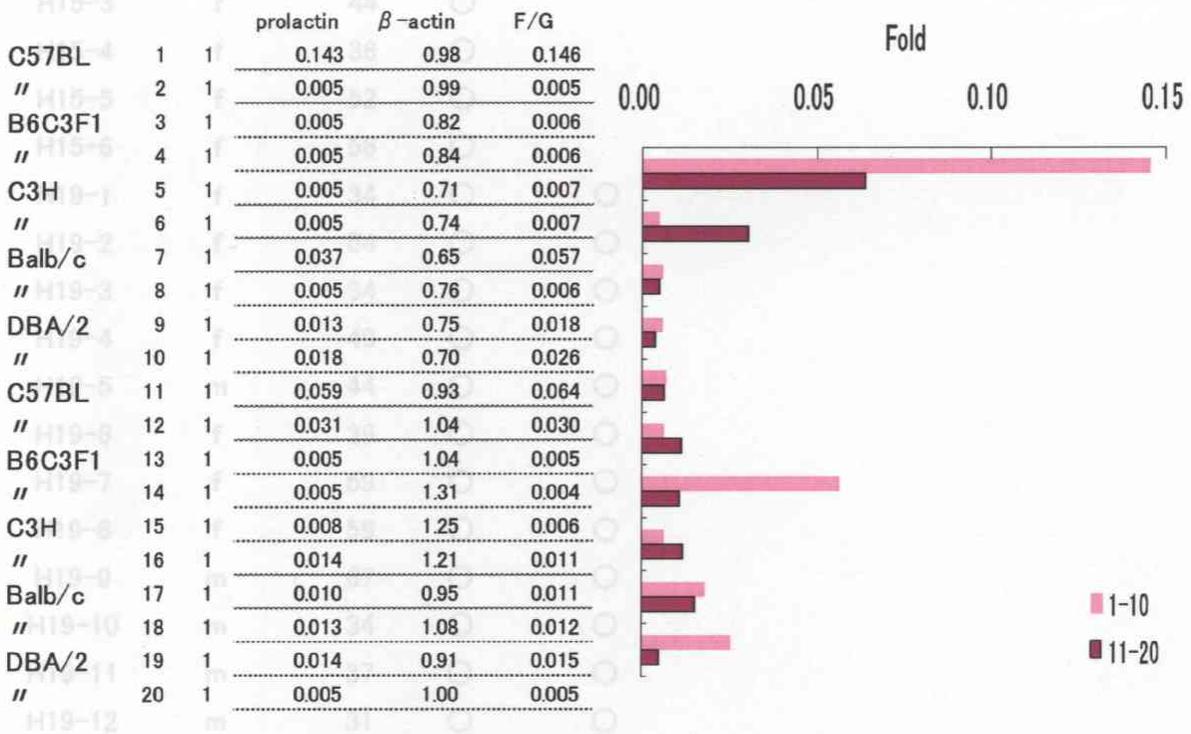


図 18 雌マウス嗅球・海馬のプロラクチンmRNA 発現量の種差と個体差

表 1 調査対象化学物質過敏症患者

| ID | gender | age | gene | prolactin |
|--------|--------|-----|------|-----------|
| a01 | f | 30 | | ○ |
| a02 | f | 33 | | ○ |
| a03 | f | 41 | | ○ |
| A04 | f | 29 | ○ | ○ |
| A05 | f | 45 | ○ | ○ |
| H14-1 | f | 63 | | ○ |
| H14-2 | f | 63 | | ○ |
| H14-3 | m | 34 | | ○ |
| H14-4 | f | 71 | | ○ |
| H14-5 | f | 29 | | ○ |
| H14-6 | f | 40 | | ○ |
| H14-7 | f | 36 | | ○ |
| H15-1 | f | 49 | ○ | |
| H15-2 | m | 37 | ○ | |
| H15-3 | f | 44 | ○ | |
| H15-4 | f | 36 | ○ | |
| H15-5 | f | 52 | ○ | |
| H15-6 | f | 56 | ○ | |
| H19-1 | f | 34 | ○ | ○ |
| H19-2 | f | 54 | ○ | ○ |
| H19-3 | f | 34 | ○ | ○ |
| H19-4 | f | 49 | ○ | ○ |
| H19-5 | m | 44 | ○ | ○ |
| H19-6 | f | 39 | ○ | ○ |
| H19-7 | f | 59 | ○ | ○ |
| H19-8 | f | 59 | ○ | ○ |
| H19-9 | m | 67 | ○ | ○ |
| H19-10 | m | 34 | ○ | ○ |
| H19-11 | m | 37 | ○ | ○ |
| H19-12 | m | 31 | ○ | ○ |
| H19-13 | f | 54 | ○ | ○ |
| H19-14 | f | 38 | ○ | ○ |

図 19 バイオアライメントによる Total RNA の解析パターン
 図 20 ヒト全ゲノム・マイクロアレイのカラーイメージ画像

表2 MOS患者で増加あるいは減少を示した28遺伝子のリスト

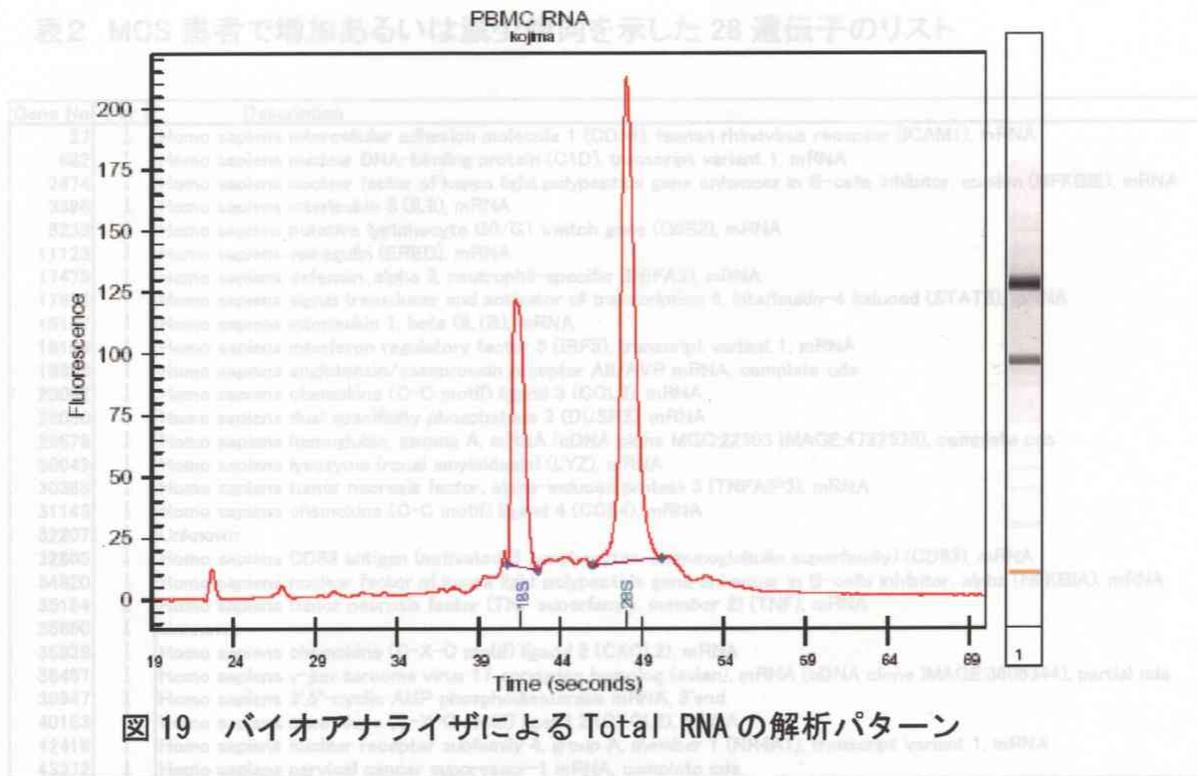


図19 バイオアナライザによる Total RNA の解析パターン

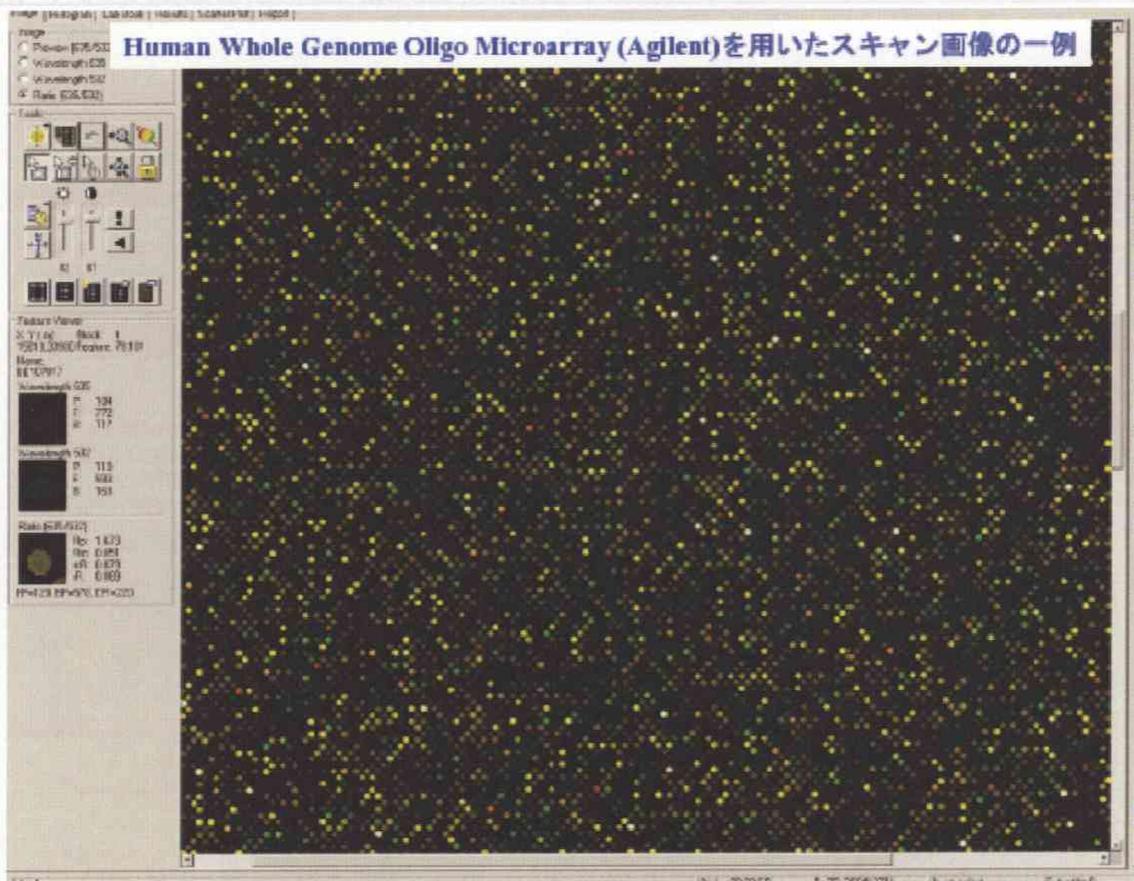


図20 ヒト全ゲノム・マイクロアレイのカラーイメージ画像

表2 MCS 患者で増加あるいは減少傾向を示した 28 遺伝子のリスト

| Gene No. | ↑ or ↓ | Description |
|----------|--------|---|
| 27 | ↓ | Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (ICAM1), mRNA |
| 682 | ↑ | Homo sapiens nuclear DNA-binding protein (C1D), transcript variant 1, mRNA |
| 2474 | ↓ | Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon (NFKBIE), mRNA |
| 3396 | ↓ | Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA |
| 8239 | ↓ | Homo sapiens putative lymphocyte G0/G1 switch gene (G0S2), mRNA |
| 11123 | ↓ | Homo sapiens epiregulin (EREG), mRNA |
| 17479 | ↓ | Homo sapiens defensin, alpha 3, neutrophil-specific (DEFA3), mRNA |
| 17655 | ↑ | Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6), mRNA |
| 19167 | ↓ | Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA |
| 19199 | ↓ | Homo sapiens interferon regulatory factor 5 (IRF5), transcript variant 1, mRNA |
| 19368 | ↓ | Homo sapiens angiotensin/vasopressin receptor AII/AVP mRNA, complete cds |
| 20082 | ↓ | Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), mRNA |
| 26030 | ↓ | Homo sapiens dual specificity phosphatase 2 (DUSP2), mRNA |
| 29679 | ↓ | Homo sapiens hemoglobin, gamma A, mRNA (cDNA clone MGC:22503 IMAGE:4732536), complete cds |
| 30049 | ↓ | Homo sapiens lysozyme (renal amyloidosis) (LYZ), mRNA |
| 30388 | ↓ | Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), mRNA |
| 31143 | ↓ | Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), mRNA |
| 32207 | ↓ | Unknown |
| 32665 | ↓ | Homo sapiens CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily) (CD83), mRNA |
| 34820 | ↓ | Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NFKBIA), mRNA |
| 35164 | ↓ | Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA |
| 35650 | ↓ | Unknown |
| 35939 | ↓ | Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA |
| 38457 | ↓ | Homo sapiens v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian), mRNA (cDNA clone IMAGE:3606344), partial cds |
| 39947 | ↓ | Homo sapiens 3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase mRNA, 3'end |
| 40163 | ↓ | Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA |
| 42418 | ↓ | Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1), transcript variant 1, mRNA |
| 43372 | ↓ | Homo sapiens cervical cancer suppressor-1 mRNA, complete cds |

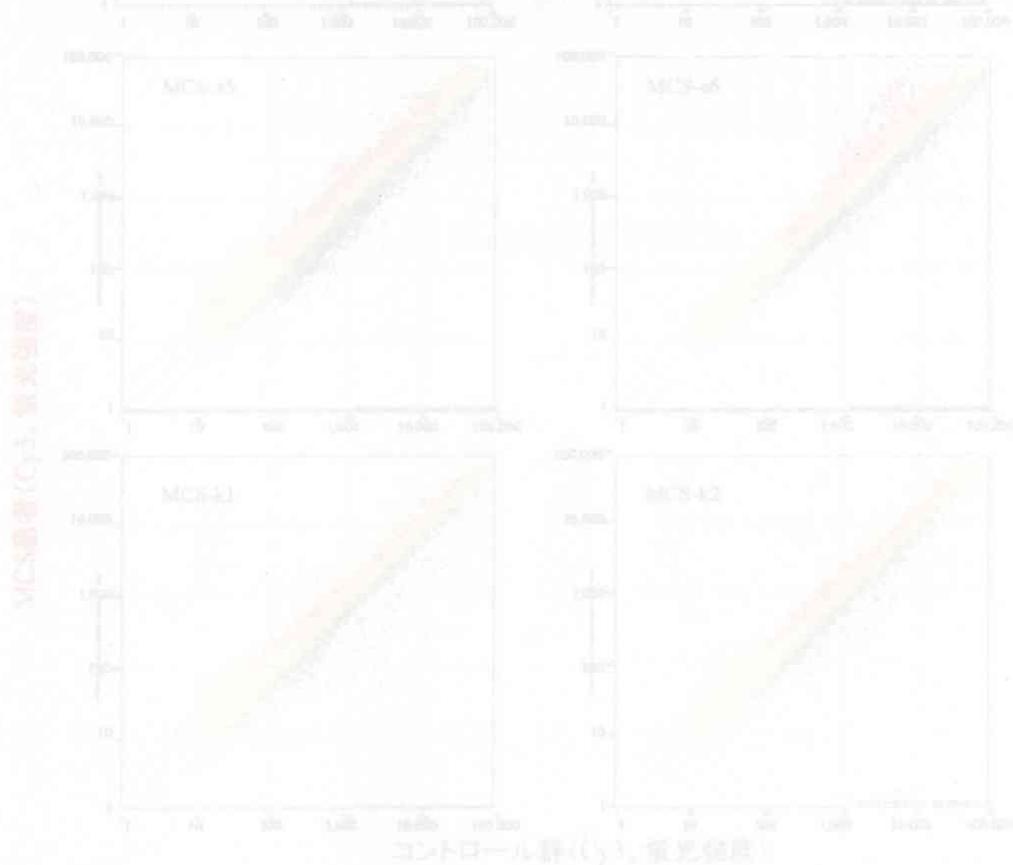


図21 コントロール群に対する MCS 患者のスクエッタープロット解析の例

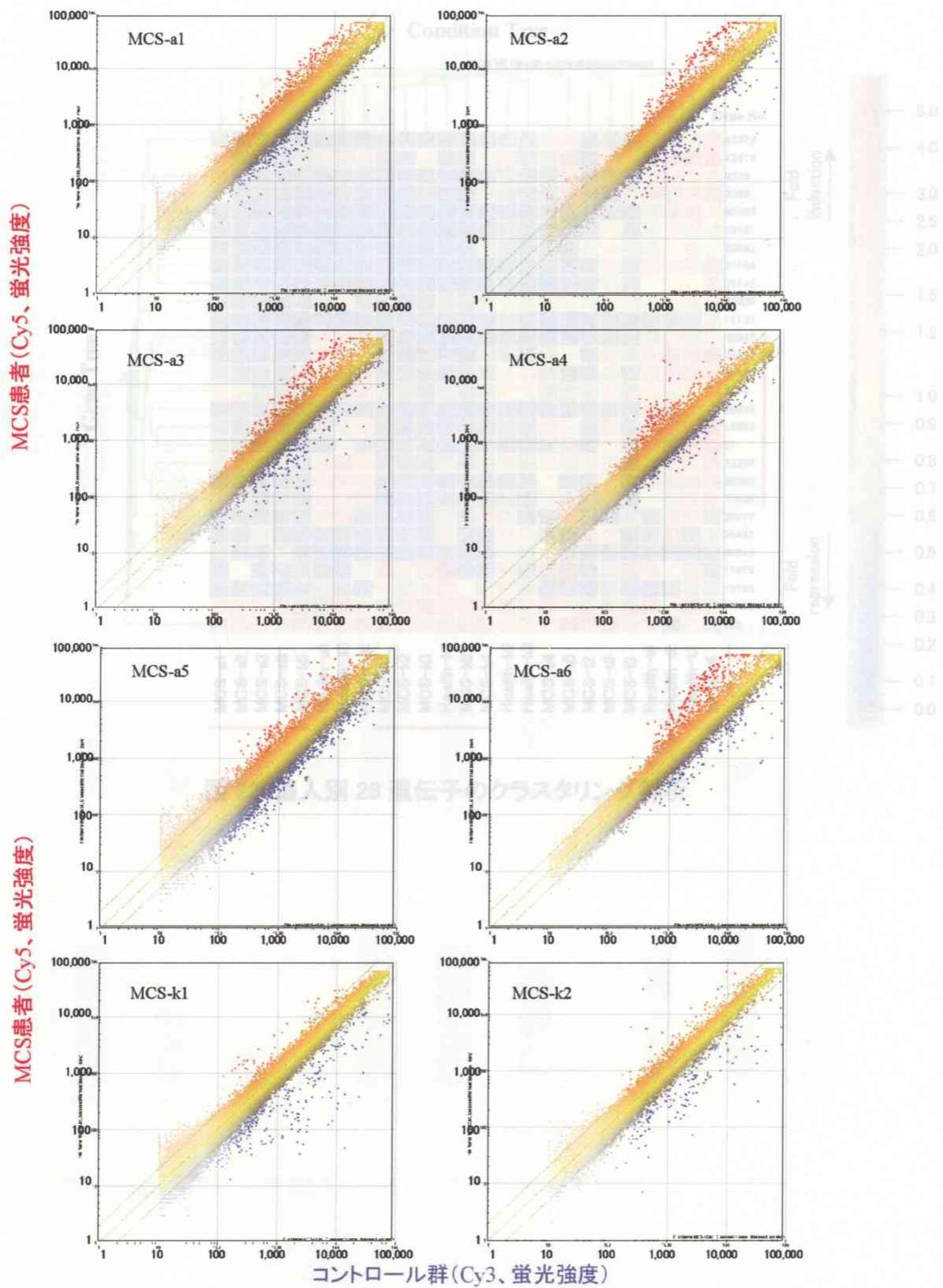


図 21 コントロール群に対する MCS 患者のスクアッタープロット解析の例

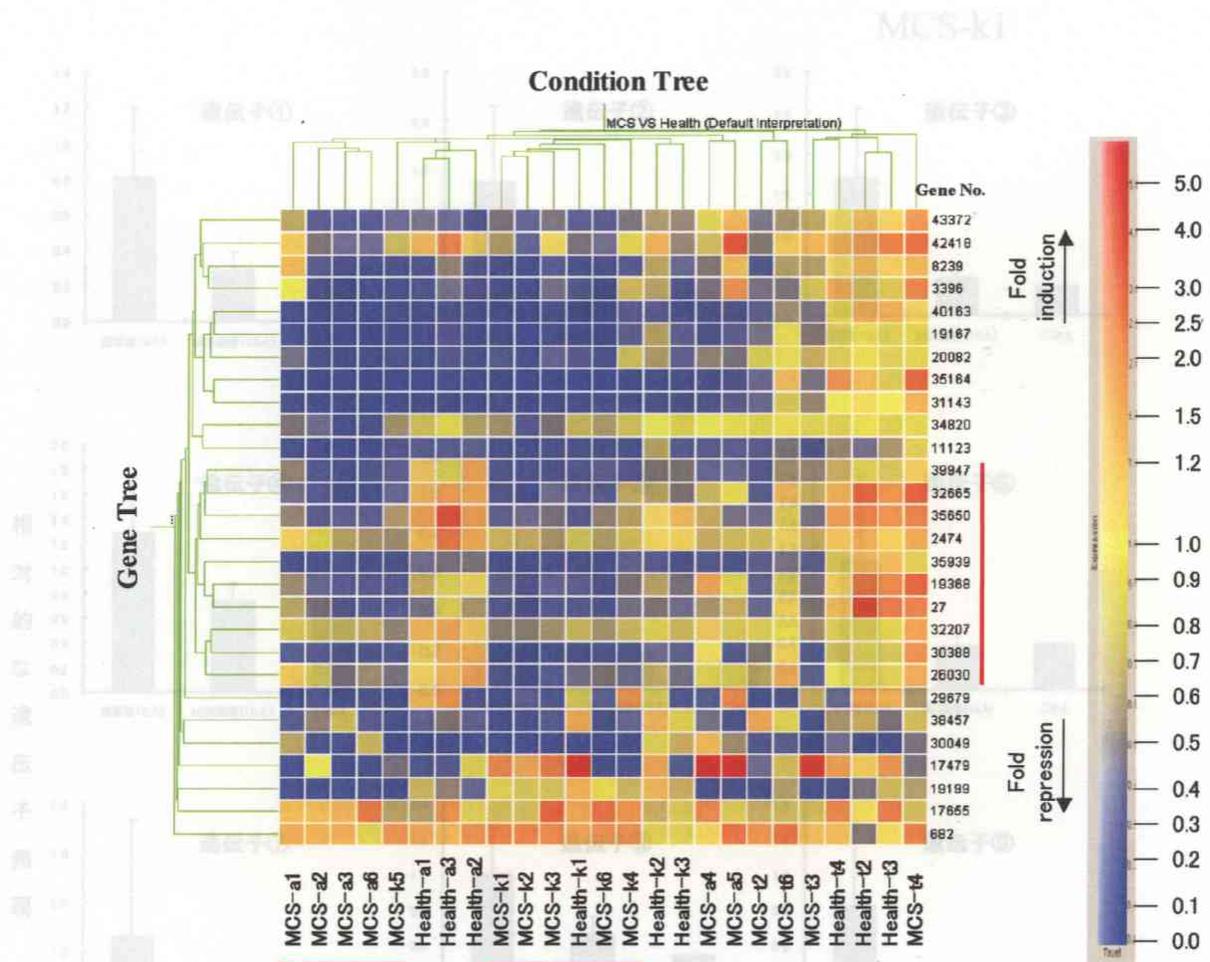


図 22 個人別 28 遺伝子のクラスタリング解析

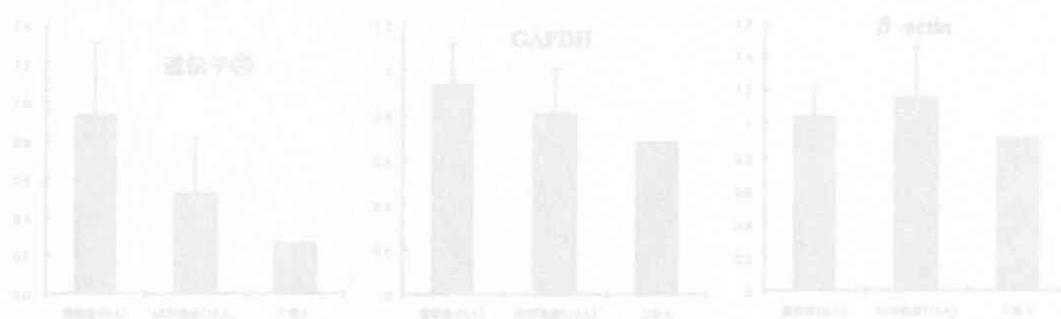


図 23 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

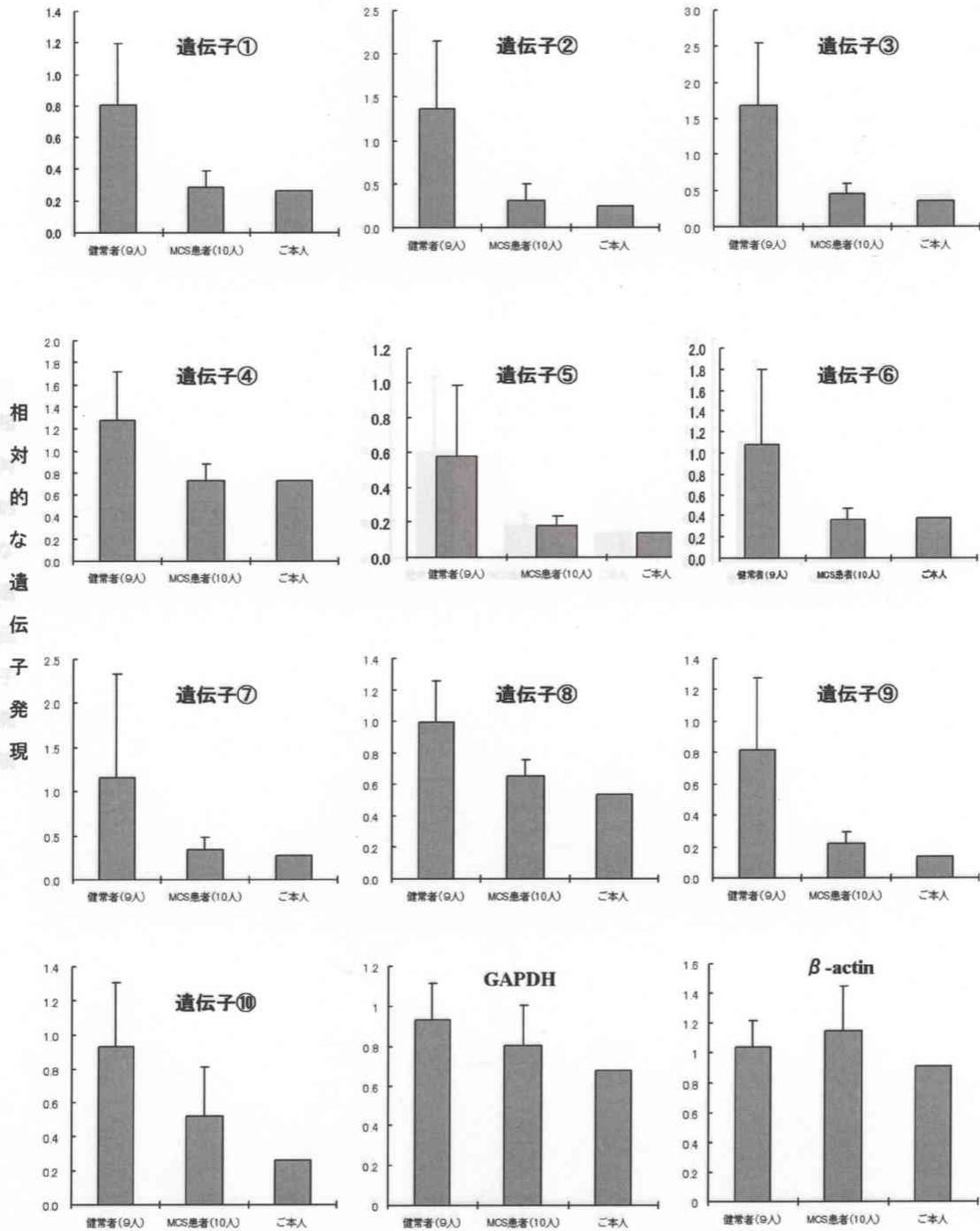


図 23 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

MCS-k2

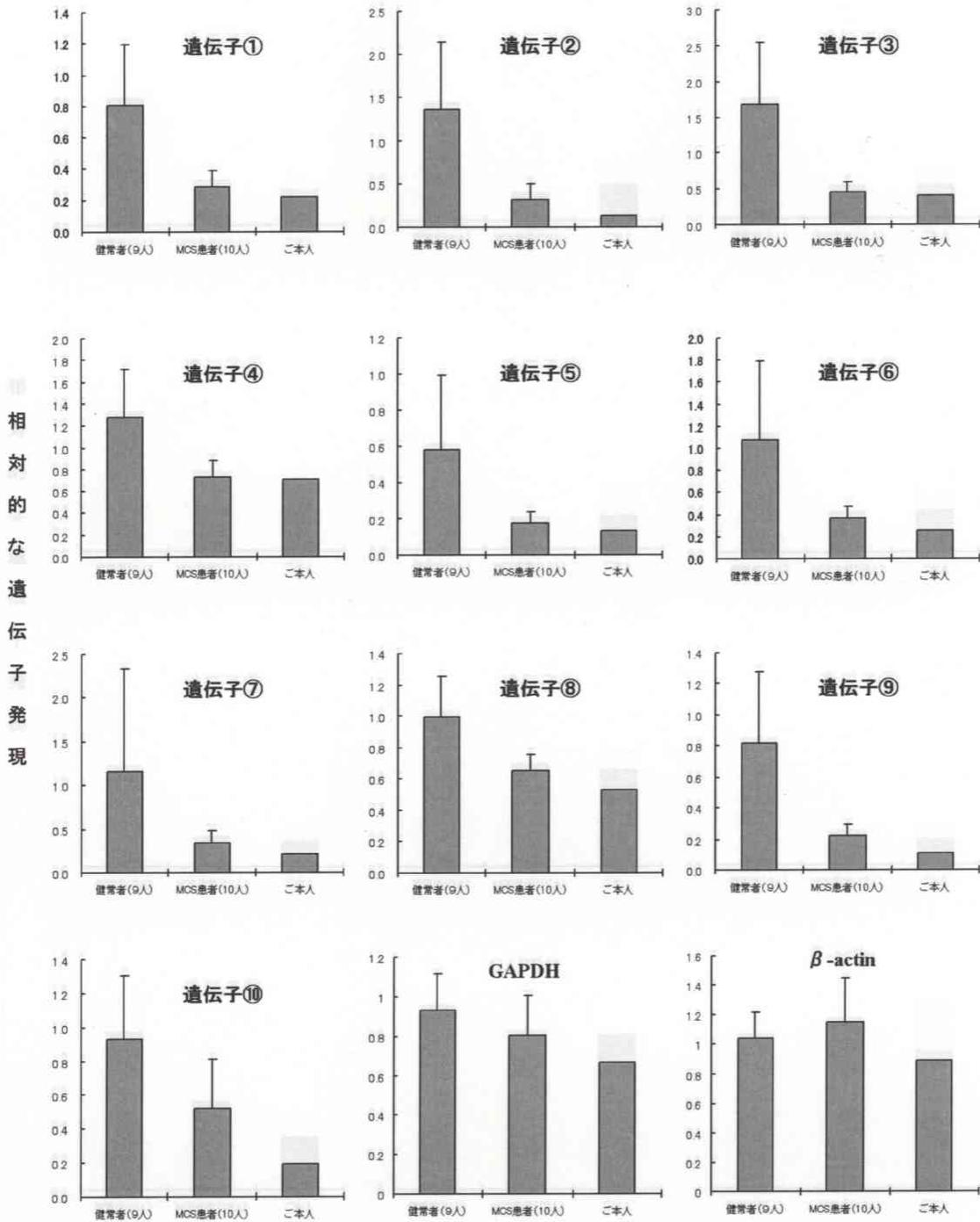


図 25 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

図 24 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

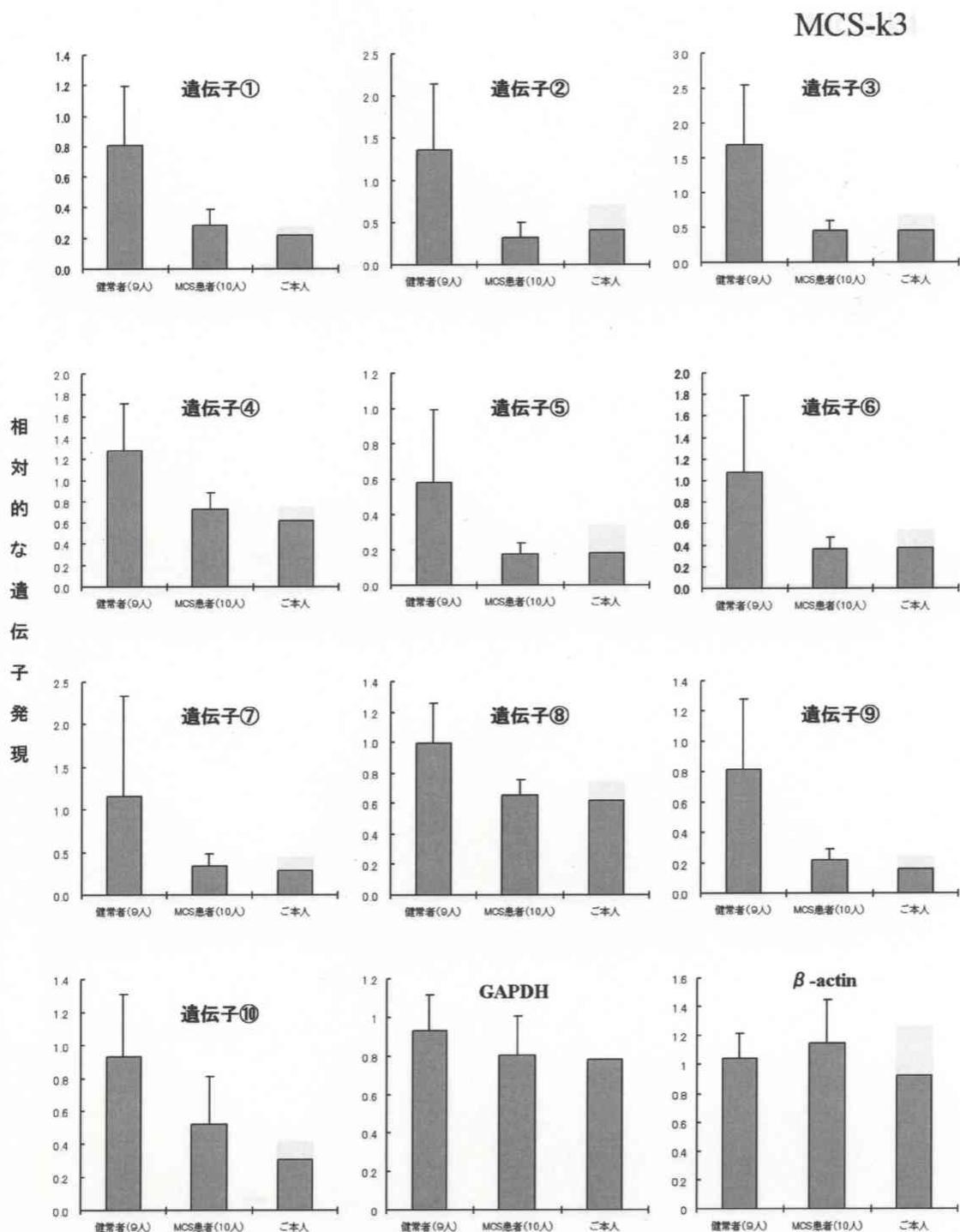


図 25 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

図 26 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

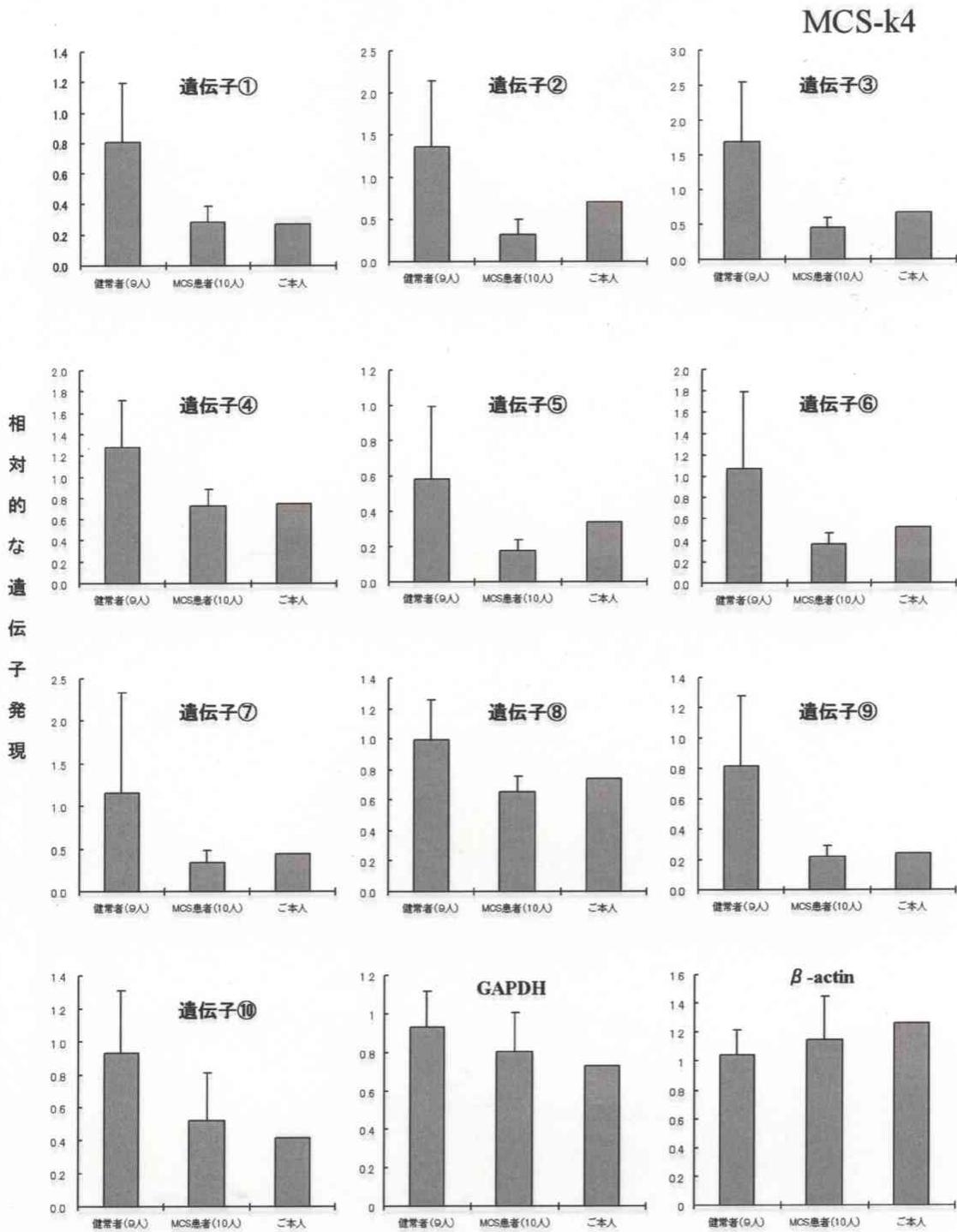


図 26 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

MCS-k5

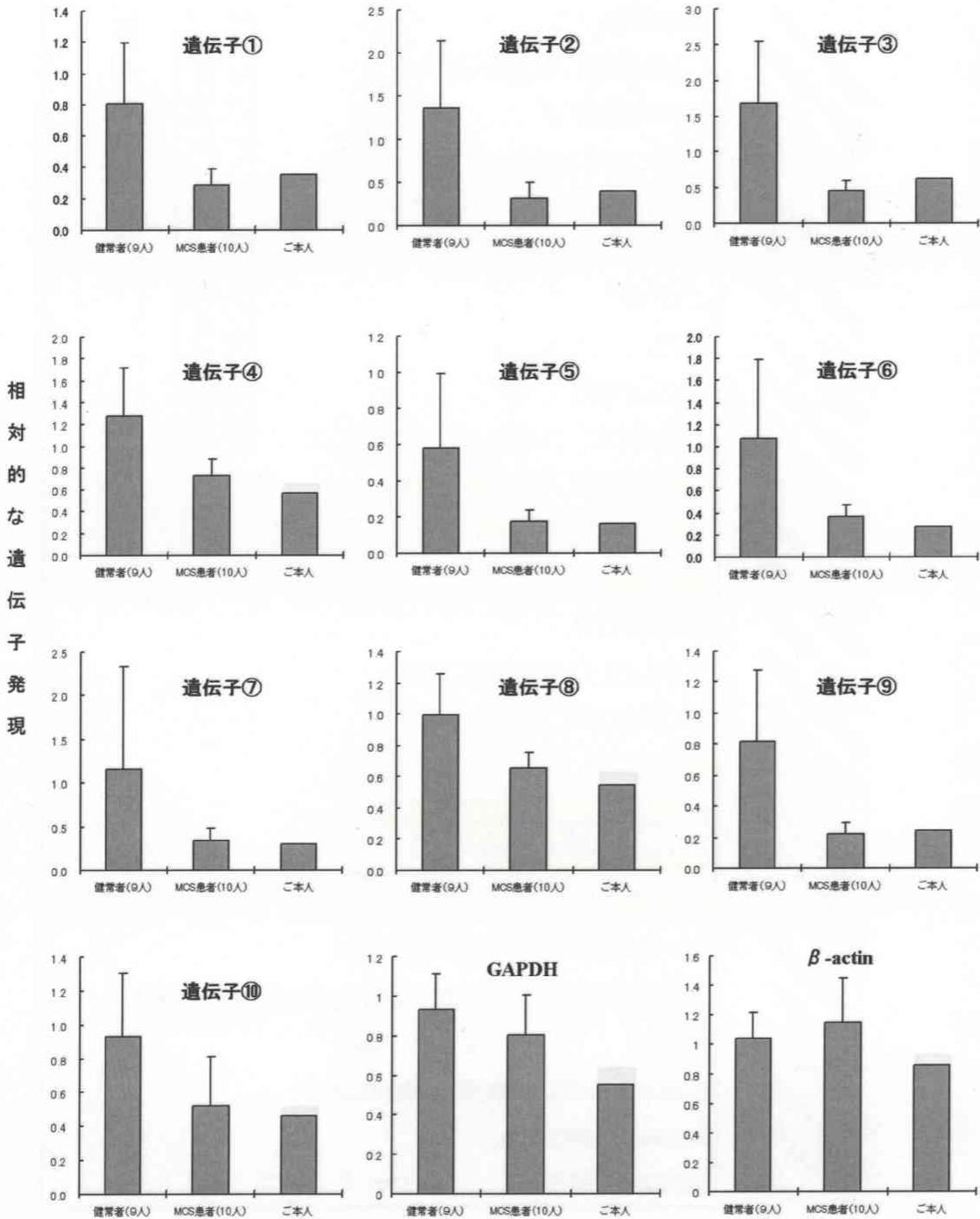


図 28 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

図 27 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

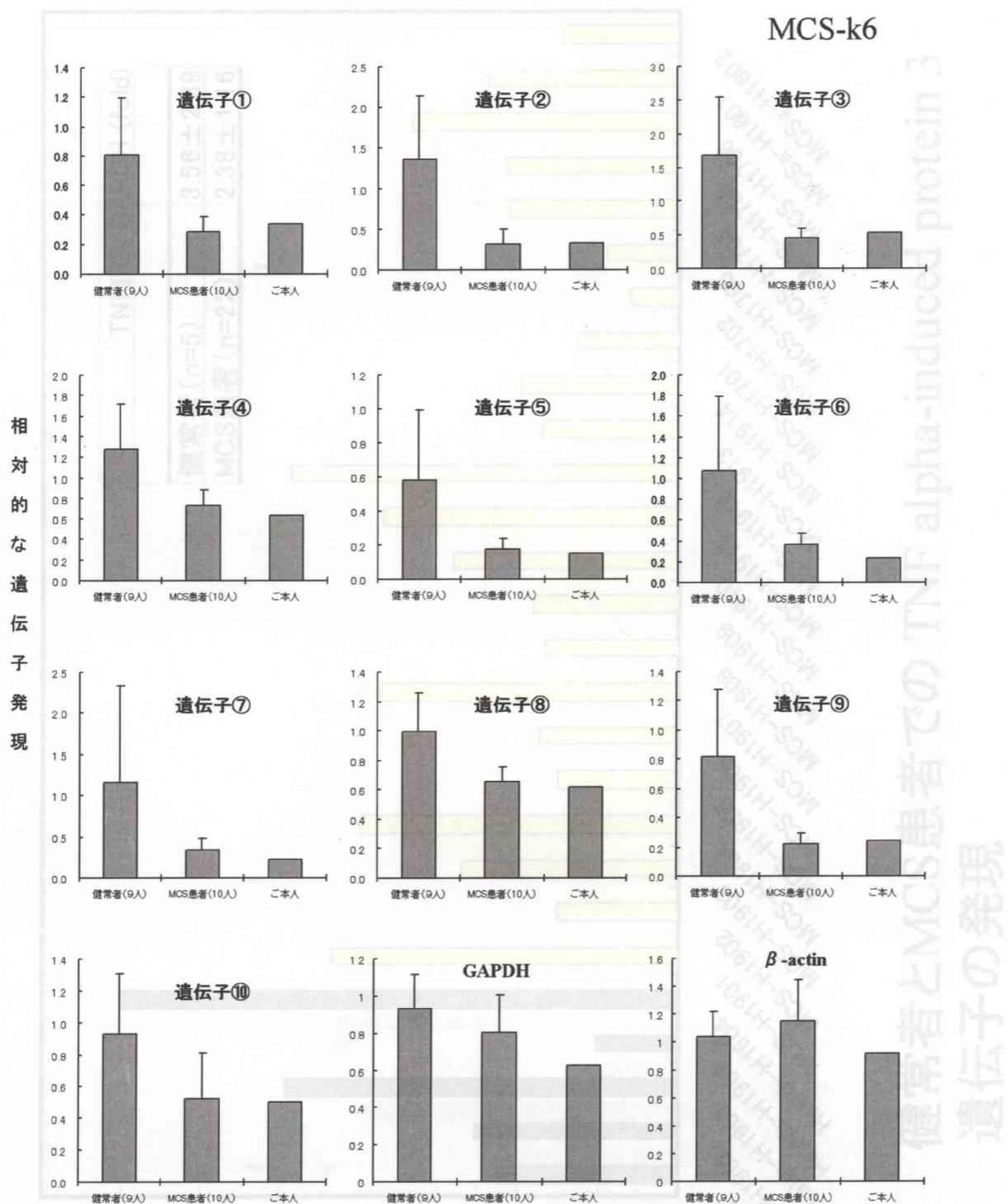


図 28 化学物質過敏症患者個々の遺伝子発現状況のまとめ

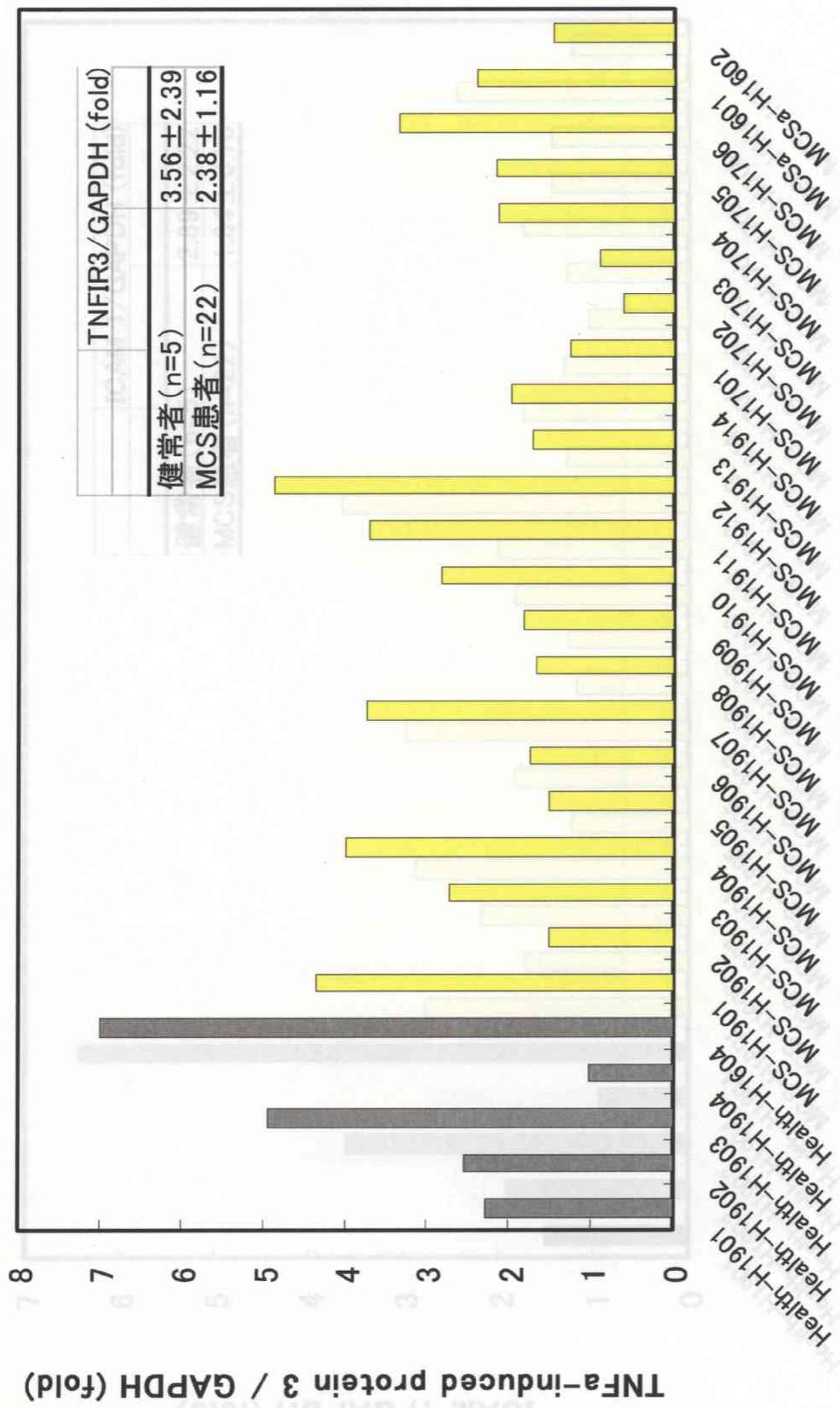


図 62 健康者とMCS患者での TNF alpha-induced protein 3 遺伝子の発現

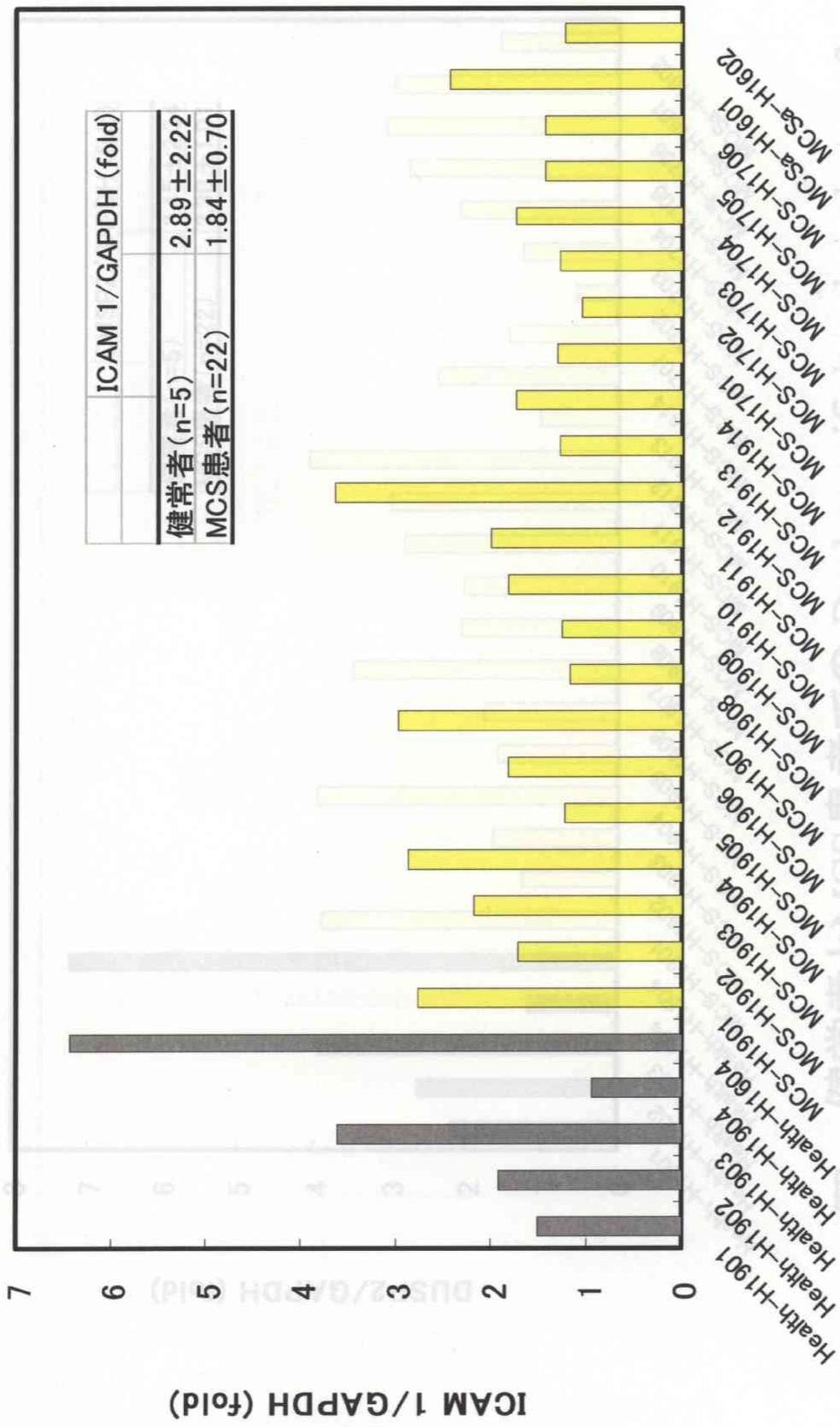


図 30 健康者とMCS患者での ICAM 1遺伝子の発現

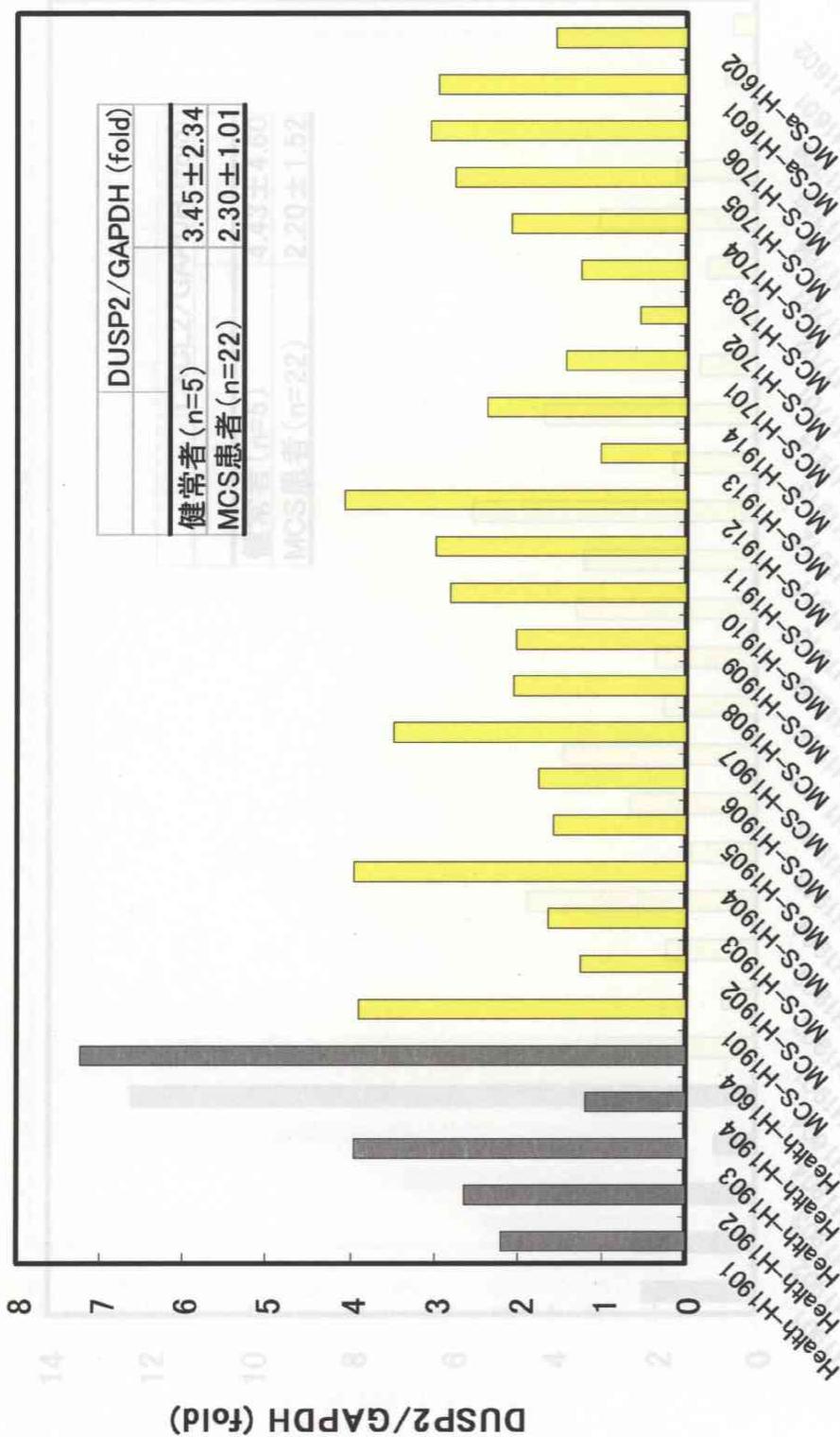
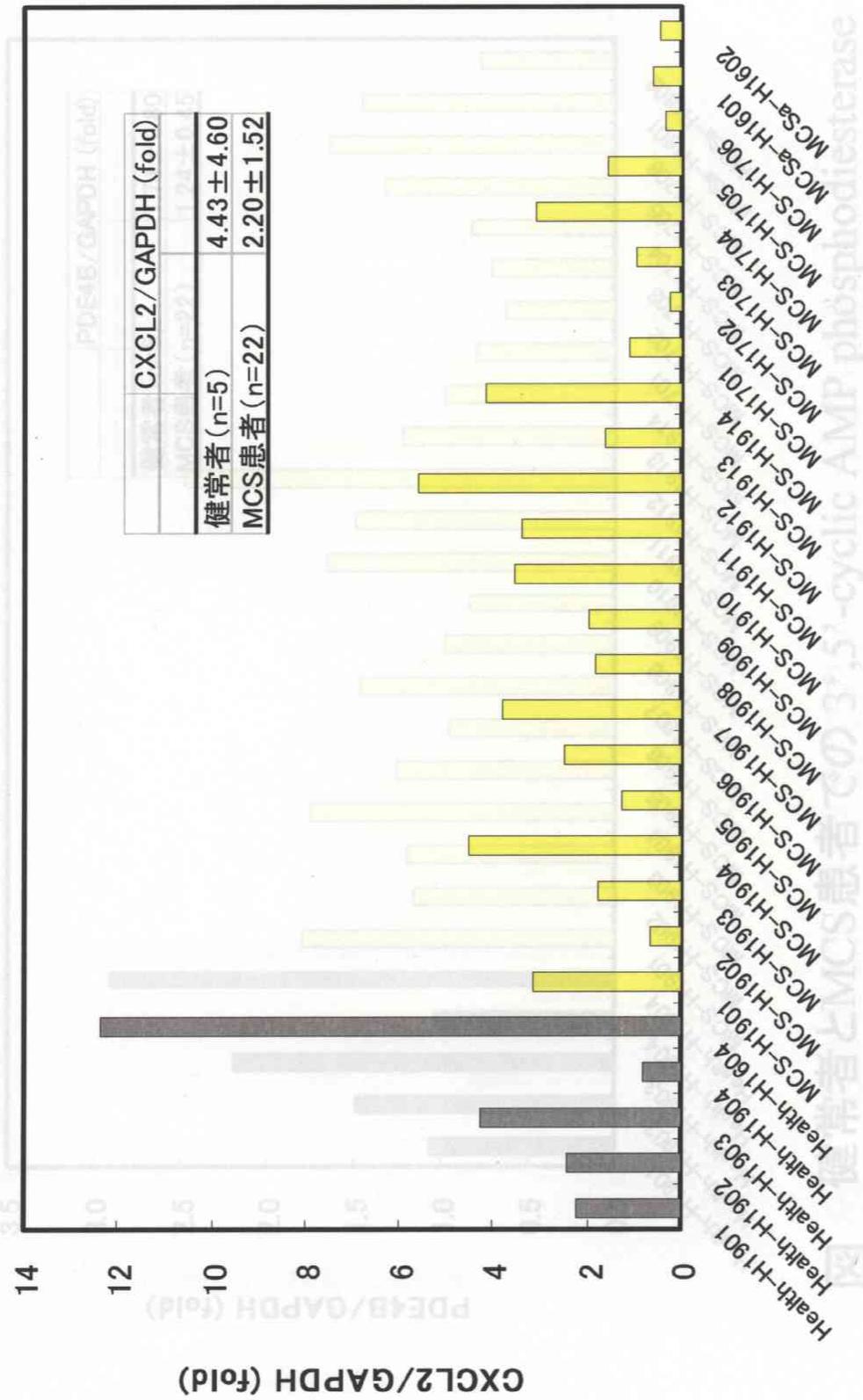


図 31 健康者とMCS患者での Dual specificity phosphatase 2 遺伝子の発現



健康者とMCS患者でのCXCL2遺伝子の発現

図 32

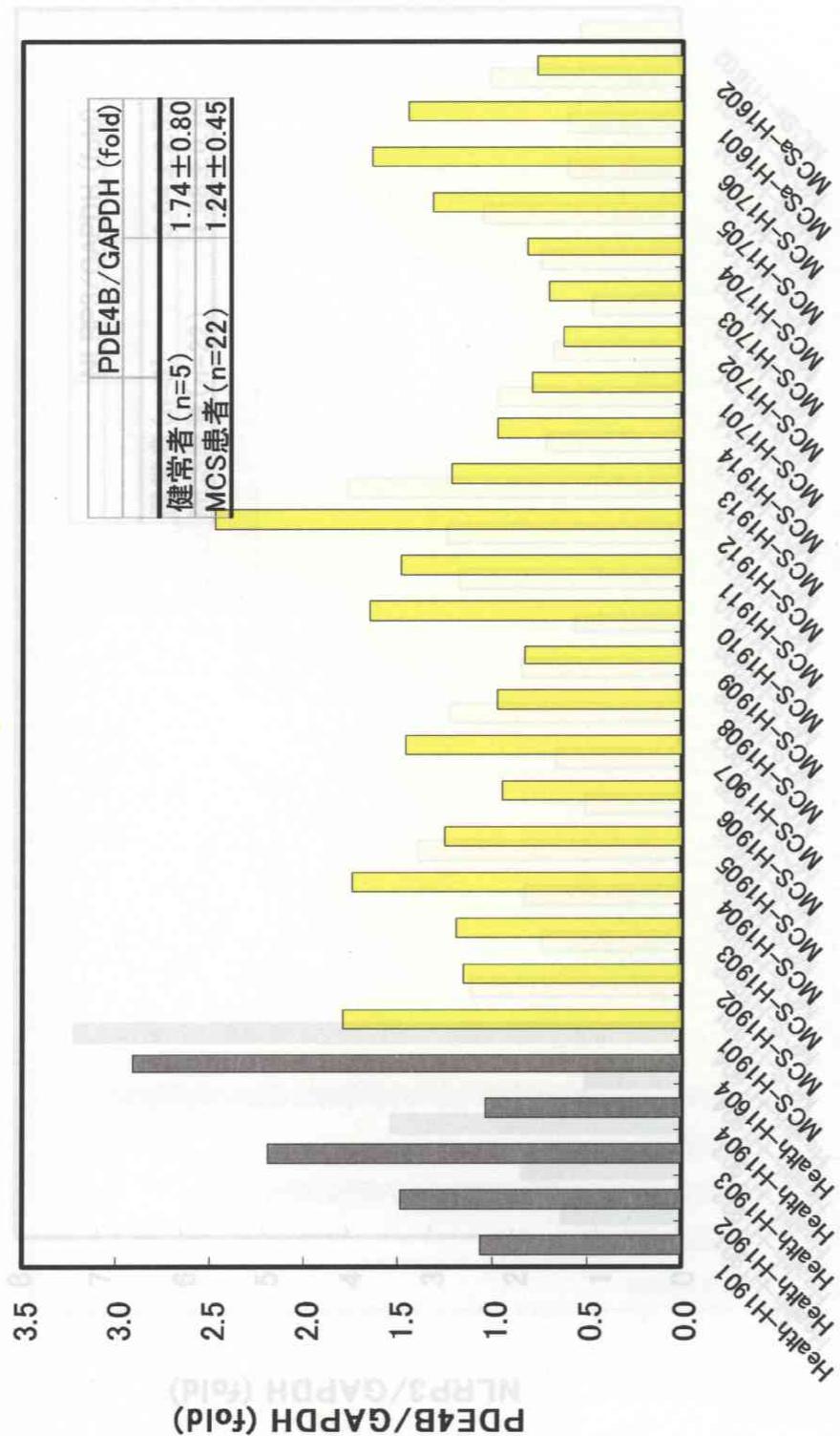


図 33 健康者とMCS患者での3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase 遺伝子の発現

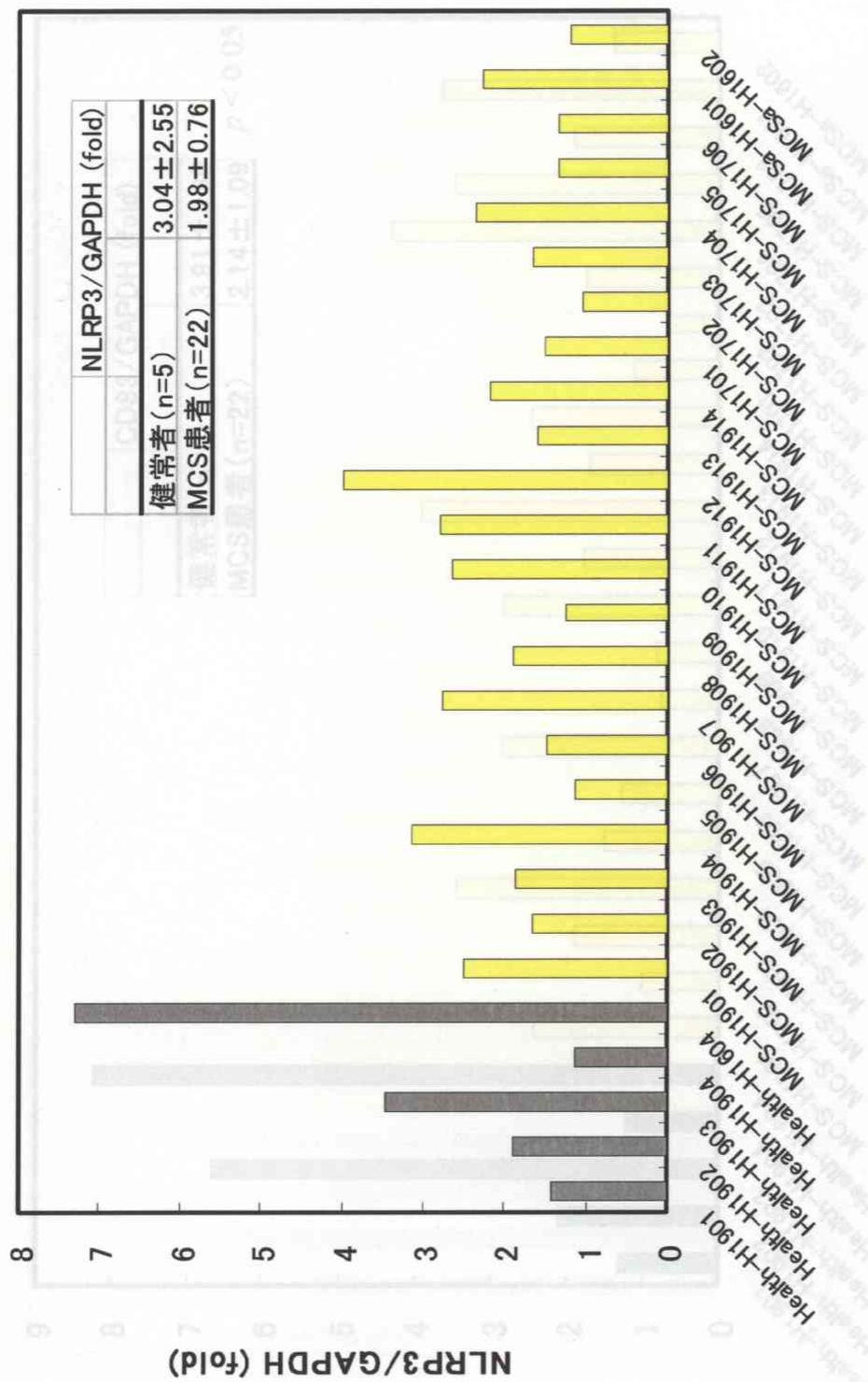


図 34 健康者とMCS患者での Angiotensin/vasopressin receptor (NLRP3) 遺伝子の発現

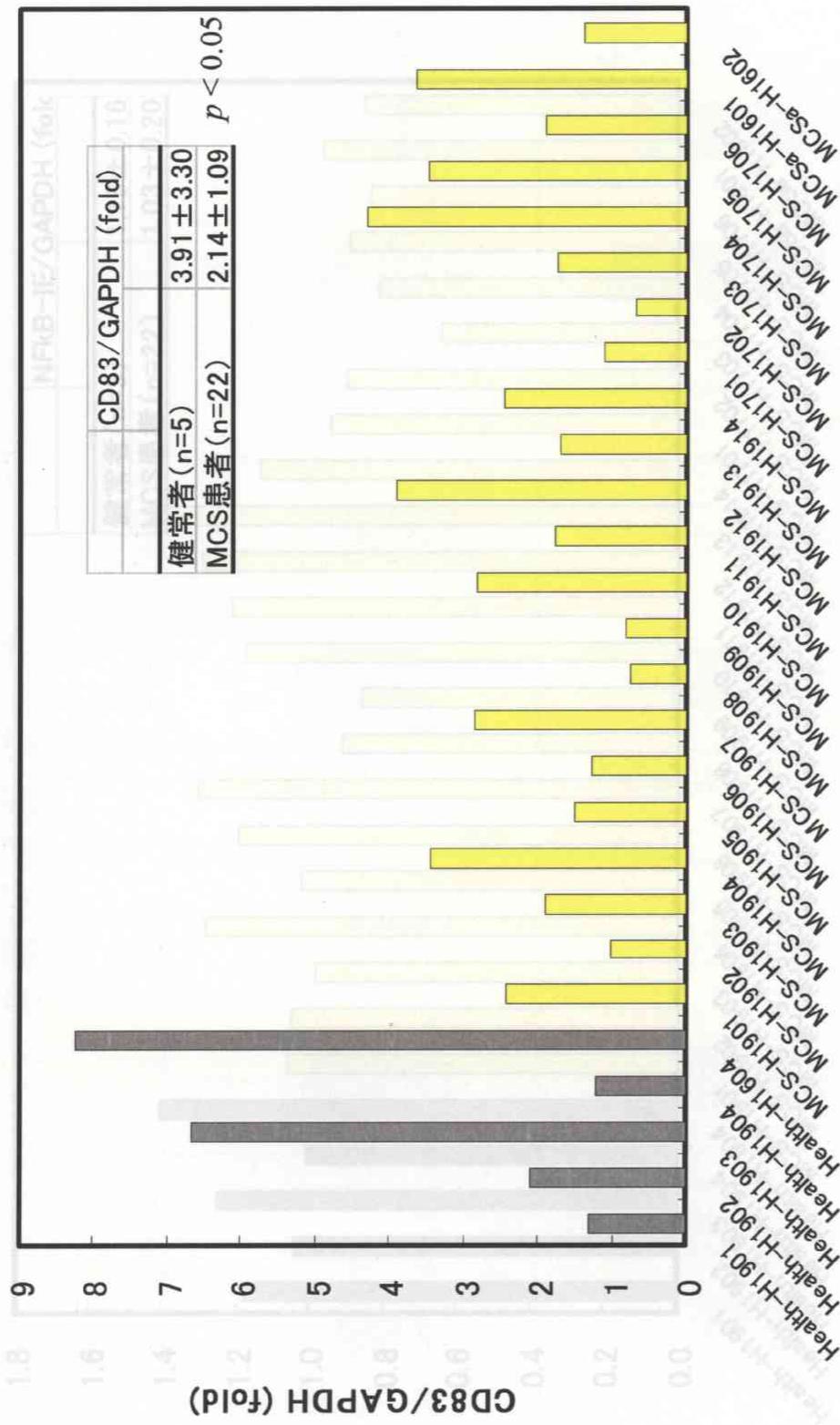
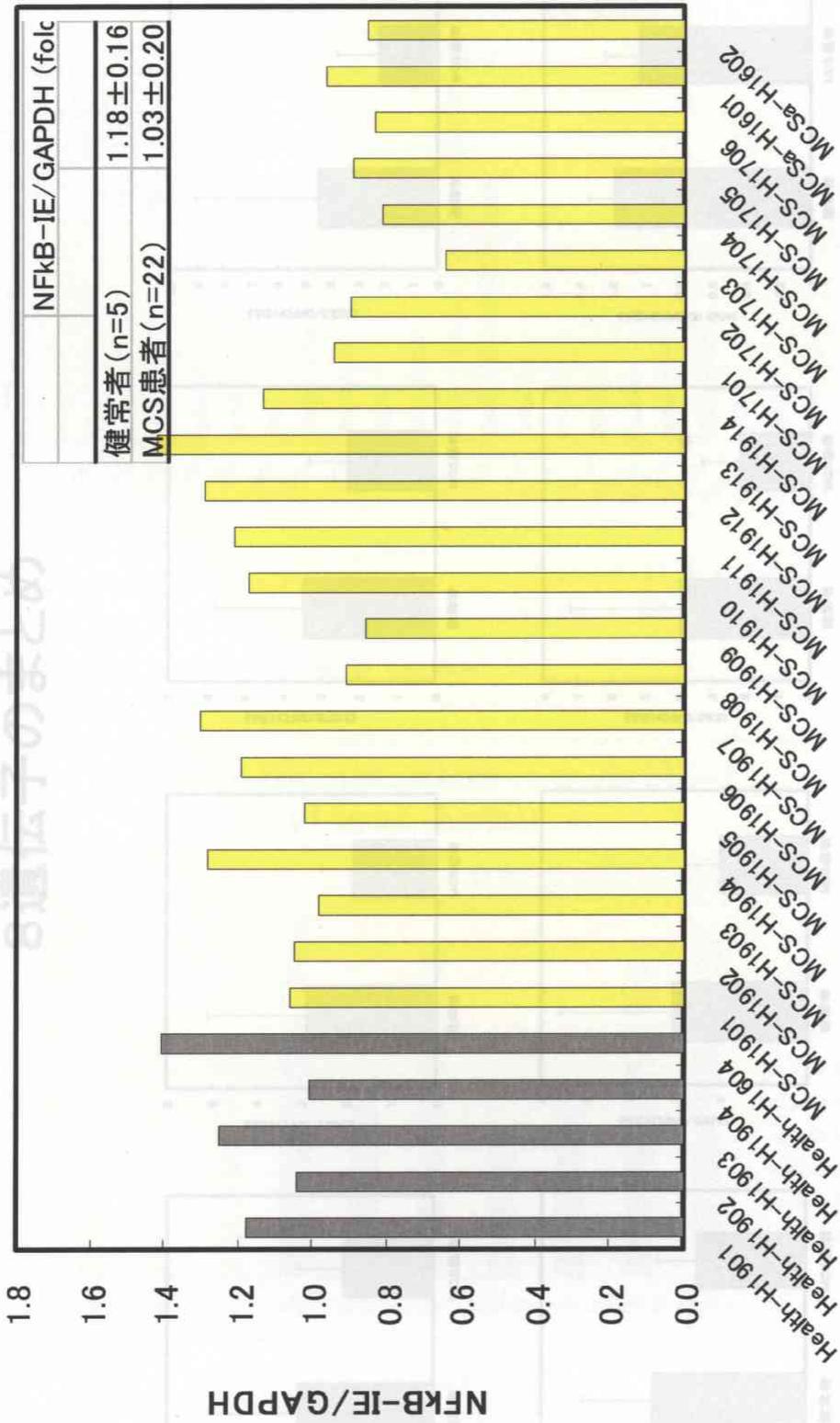


図 35 健常者とMCS患者でのCD83 遺伝子の発現

図 36



健康者とMCS患者でのNFkB-inhibitory epsilon 遺伝子の発現

図 36

図 37

8 遺伝子のまとめ

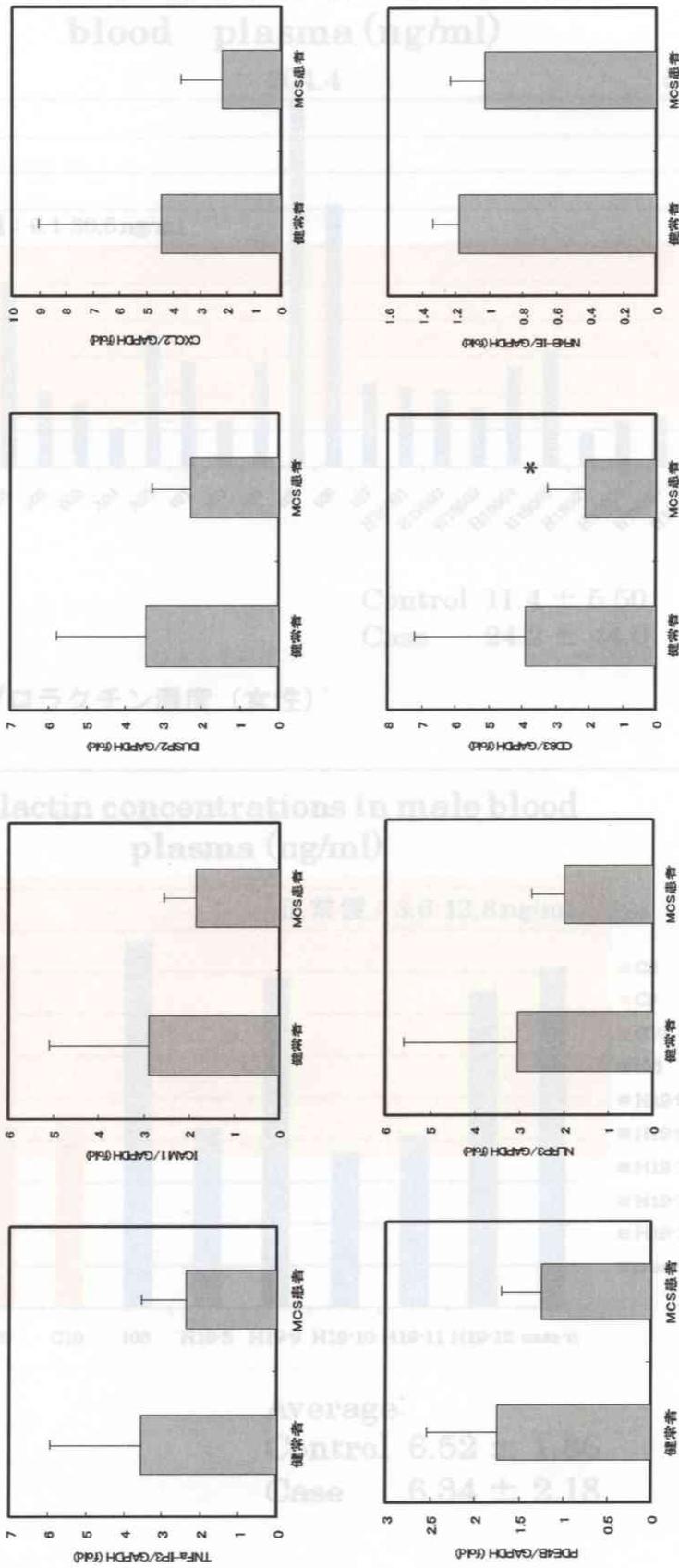
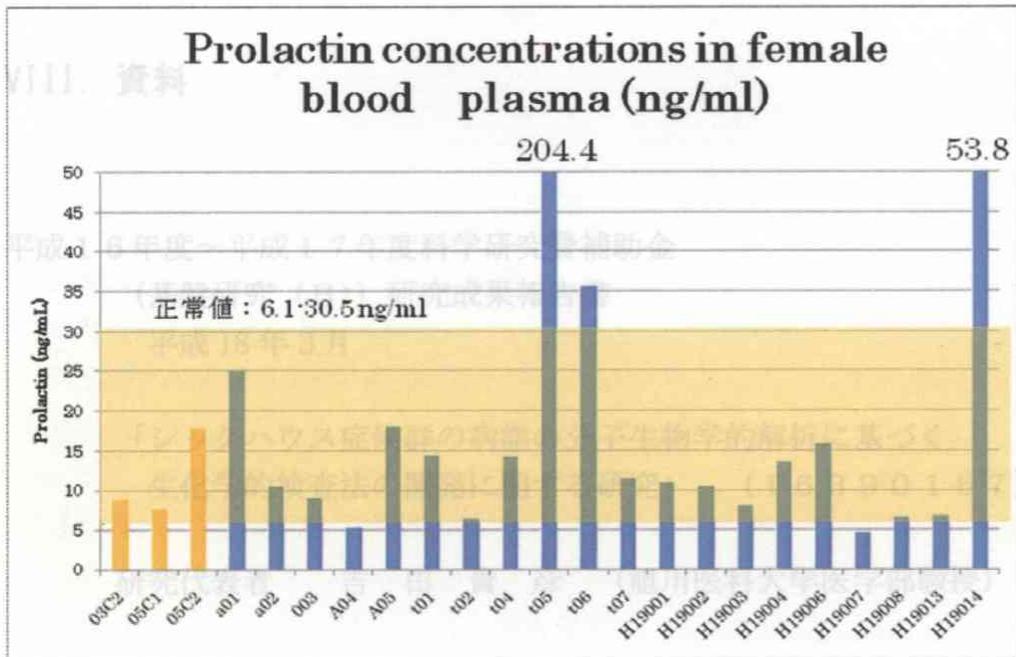


図 39 血漿中プロラクチン濃度 (男性)

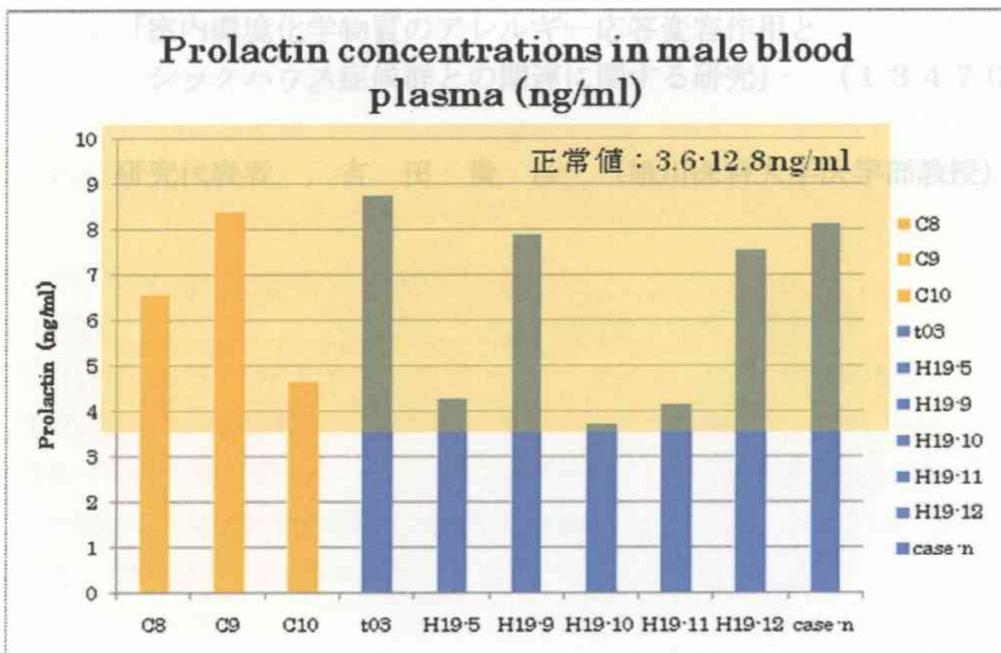
図 37



Control 11.4 ± 5.50

Case 24.2 ± 44.0

図 38 血漿中プロラクチン濃度 (女性)



Average:

Control 6.52 ± 1.86

Case 6.34 ± 2.18

図 39 血漿中プロラクチン濃度 (男性)

VIII. 資料

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成18年3月

「シックハウス症候群の病態の分子生物学的解析に基づく
生化学的検査法の開発に関する研究」 (16390167)

研究代表者 吉田貴彦 (旭川医科大学医学部教授)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成16年3月

「室内環境化学物質のアレルギー応答変容作用と
シックハウス症候群との関連に関する研究」 (13470078)

研究代表者 吉田貴彦 (旭川医科大学医学部教授)

調査へのご協力をお願いします。以下の内容に御回答ください。

氏名： _____ 年齢： _____ 歳 性別： 男・女 記入日： _____ 年 _____ 月 _____ 日

記入方法： 0、1、2などの数字には“○”を、アンダーラインには記入をお願いします。

1. あなたは何人兄弟姉妹の何番目ですか。 _____ 人兄弟姉妹の _____ 番目生まれ
2. 婚姻状況 0 未婚 1 既婚 2 生別 3 死別
3. 現在の家庭構成 0 独居 1 家族と同居 2 知人と同居 3 まかないつき下宿
4. 現住所（市町村および町名・地域名まで） _____ 市町村・ _____ 、 _____ 年前から）
5. 近所（100mほど）に農地（田畑）がありますか。 0 ない 1 ある
6. 近所で農薬の散布を目にしたり、臭いを感じることがありますか。 0 ない 1 ある
7. 近所（50mほど）に交通量の多い幹線道路がありますか。 0 ない 1 ある（路線名 _____）
8. 近所（100mほど）に大きな工場・焼却場などがありますか。 0 ない 1 ある（どんな工場 _____）
9. 引越しをしたことがある場合、以前に居住していた地域（市町村および町名・地域名まで）
 現在の前（ _____ 市町村・ _____ 、 _____ 年間）
 その前（ _____ 市町村・ _____ 、 _____ 年間）
10. 現在の住居形態はどのようなですか。（それぞれに、いずれかに○）
 a) 1 木造 2 軽量鉄骨 3 コンクリート造
 b) 1 一軒家 2 下宿・間借 3 アパート、マンション
11. 住居の床材質はどのようなものですか。（居間、寝室など長時間過ごす部屋の床について、あるものはすべて○）
 1 板張（フローリング） 2 タイル 3 クッションフロア（ビニール製） 4 畳 5 じゅうたん
12. 同じ室内に植木の植物がありますか。 0 ない 1 ある（何ですか _____）
13. 炊事のエネルギーは何ですか。 1 電気 2 ガス 3 その他（ _____）
14. 風呂、給湯のエネルギーは何ですか。（どちらかに○） 1 電気 2 ガス 3 石油 4 その他（ _____）
 ↳（どちらかに○） 1 FF式 2 煙突式
15. 住居の冬季の暖房（使うものに○、複数回答可）
 1 石油 2 ガス 3 石炭 4 薪暖房 5 電気暖房
 ↳（いずれかひとつに○） 1 FF式 2 煙突式 3 吸排気なし
16. 住居の夏季のクーラーの使用。 0 なし 1 ある
17. 住居の換気はどのようなですか。 0 自然換気 1 部屋個別換気扇換気 2 集合強制換気
18. 今までに新築後3年以内の新築家屋に居住した経験は。 0 ない 1 ある（ _____ 回）
 ある方（何年から何年頃ですか _____）
19. 寝具は何を使っていますか。 1 床に直接布団 2 ベッド
20. 1日何回食事をとりますか。 1日（ _____ 回程度）
21. 1週間に何回、コンビニ弁当やオニギリを食べますか。 1週（ _____ 回程度）
22. 1週間に何回、カップ麺を食べますか。 1週（ _____ 回程度）
23. 特に好きで多く食べるものがありますか。 0 ない 1 ある（何ですか _____）
24. 嫌いな食べ物がありますか。 0 ない 1 ある（何ですか _____）
25. アレルギーが起こる食べ物がありますか。 0 ない 1 ある
 （原因食品 _____ 症状 _____）
 （原因食品 _____ 症状 _____）
26. 普段、飲食に用いる水はどうしていますか。
 0 水道水そのまま 1 水道水をフィルターで浄水 2 市販のミネラルウォーター 3 井戸水 4 湧き水

27. タバコを吸いますか。 0 吸わない、 1 吸う（平均1日_____本、_____年間）、
2 過去に吸ったが今は吸わない（平均1日_____本、_____年間、_____年前にやめた）
28. アルコールを飲みますか。 0 飲まない、 1 飲む
普段飲む量は 1週（_____回、何を_____、_____くらい）
飲み会で飲む量は 1月（_____回、何を_____、_____くらい）
29. アルコールを飲むと赤くなりますか。 0 ならない、 1 なる
30. 父親はアルコールを飲むと赤くなりますか。 0 ならない 1 なる 2 わからない
31. 母親はアルコールを飲むと赤くなりますか。 0 ならない 1 なる 2 わからない
32. ほぼ毎日コーヒー・茶類を飲む習慣がありますか。 0 ない 1 ある（何を_____、1日_____杯くらい）
33. 普段使う健康食品がありますか。 0 ない 1 ある（何ですか_____）
34. 普段使う栄養補給剤がありますか。 0 ない 1 ある（何ですか_____）
35. 今までにアレルギー疾患と診断されたことがありますか。 0 ない 1 ある
（診断名_____、いつ_____年前、症状_____）
36. 薬（薬品）でアレルギーが起こったことがありますか。 0 ない 1 ある
（原因の薬_____、いつ_____年前、症状_____）
37. 今までに化学物質過敏症と診断されたことがありますか。 0 ない 1 ある
（原因_____、いつ_____年前、症状_____）
38. 他に大きな病気をしたことがありますか。 0 ない 1 ある（どんな病気で、いつですか。薬を使いましたか。）
（病名_____、いつ_____、薬_____）
（病名_____、いつ_____、薬_____）
39. 手術などで全身麻酔をかけられたことがありますか。 0 ない 1 ある
（何の手術_____、いつ_____）
40. 治療を受けた歯がありますか。 0 ない 1 ある 金属冠をかぶせた歯の本数（_____本）
41. 家業・趣味などで室内で化学物質を使いますか。
0 ない 1 ある（何ですか_____）
42. 化学物質や金属を使う趣味がありますか。 0 ない 1 ある
どんな趣味ですか（_____、使う物質_____）
43. 仕事先などで化学物質や金属を扱いますか。 0 使わない 1 使う
どんな仕事内容ですか（_____、使う物質_____）
44. 住居でペットを飼っていますか。 0 飼っていない 1 飼っている 2 以前に飼っていた
どんなペットですか（_____、《現在・昔》_____年、家の《外・中》で）
（_____、《現在・昔》_____年、家の《外・中》で）
45. タバコを吸う同居人がいますか。 0 いない 1 いる（_____人） 2 以前にいた（_____人）
46. 居間や寝室で芳香剤を使っていますか。 0 使わない 1 使う（どんなものですか_____）
47. 室内で殺虫剤を使っていますか。 0 使わない 1 使う（どんなものですか_____）
48. 家庭園芸などで農薬を使うことがありますか。 0 使わない 1 使う（どんなものですか_____）
49. 今までに新築・リフォーム間もない家を訪ねて、あるいは新車に乗って具合が悪くなったことがありますか。
0 ない、 1 ある いつ頃どのような状況で症状でしたか

(_____)
(_____)
(_____)

シックハウス症候群の病態解明と環境化学物質の汚染実態に関する研究協力同意書

私は、旭川医科大学等の研究班が実施する「シックハウス症候群の病態解明と環境化学物質の汚染実態に関する研究」についての説明文を読み、説明者から必要かつ適切な説明を受け、その趣旨について理解しました。以下の条件の下に、この調査に協力するために採血や諸検査を受けるとともに、関連のアンケート調査に協力することに同意します。

説明を受けて理解した項目(□の中にご自分で✓を付けて下さい)

- 研究に自分の意思で協力すること
- いつでも同意を撤回できること
- 研究の方法
- 研究に協力する方法
- 費用負担が無いこと
- 遺伝子の解析を行うこと
- 希望があれば研究計画書を見ることが出来ること
- 研究協力者の利益および不利益
- 研究成果の公表について
- 解析結果をお知らせできないこと
- 研究後の検体などの取り扱いについて
- プライバシー(個人情報)を保護する方法
- 研究から知的財産権が生じた場合、その権利が協力者に属さないこと

研究協力への同意(説明を受けて理解した項目の全ての □ に✓を記入された方は、裏面の1、2、3、4、5の「はい」、「いいえ」に○をつけて、署名してください。

1. 標記研究に協力し、カルテの情報、通常の検査結果、アンケート結果を使用されることに同意します。

はい いいえ 署名 _____

2. 提供する血液試料等が、免疫、細胞増殖、血管の収縮・拡張の調整に関与するmRNAの解析に使用されることに同意します。

はい いいえ 署名 _____

3. 提供する血液試料等が、本研究の遺伝子の解析に使用されることに同意します。

はい いいえ 署名 _____

3 の「はい」に○を付け、署名された方は、4-1 または 4-2 のどちらかを選択肢、「はい」または「いいえ」に○を付け、署名して下さい。4-1 と 4-2 の両方を記載する必要はありません。

- 4-1. 本研究が終了した時、速やかに試料等を廃棄してください。

はい いいえ 署名 _____

- 4-2. 提供する試料等が、本研究の遺伝子の解析に使用されるとともに、試料等に余分がある場合、長期間保存され、将来、新たに計画・実施される遺伝子の分析を含む医学研究に使用されることに同意します。

はい いいえ 署名 _____

5. 場合により、ご協力いただける方の居住されている家屋内外の環境測定を行わせていただく場合があります。環境測定に関して御意思をお示し下さい。環境測定がなされる事に同意します。

はい いいえ 署名 _____

_____ 年 月 日

研究協力者名（試料等提供本人） _____

説明者（外来担当者） _____

研究全て、検体の使用、検体の保存についての中止請求

説明者（外来担当者） _____様

私は、研究全て、検体の使用、検体の保存について以下のように中止したいので通知します。（該当する項目に○を付けてください）

- 1 研究の全てに関する同意を取り消す。
- 2 検体を遺伝子解析に使用することを中止する。
- 3 検体の保存を中止する。

_____年 月 日

研究協力者氏名（自署）

氏名 _____

下欄には記入しないで下さい。

上記の、（研究全て、検体の使用、検体の保存）を中止する申し出に対して、検体保存施設である旭川医科大学健康科学講座に、データ、検体の整理番号を連絡しました。別紙の通り、（研究全て、検体の使用、検体の保存）を中止した事を確認する文章を受け取りましたのでお知らせいたします。

整理番号

説明者（自署）

氏名 _____

所属 _____

電話 _____

FAX _____