

---

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  
生化学的検査法開発に関する研究

---

1 6 3 9 0 1 6 7

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

研究代表者 吉田貴彦  
(旭川医科大学医学部教授)

## 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）

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）

研究協力者：杉岡 良彦（旭川医科大学医学部講師）

小島 貴志（旭川医科大学医学部非常勤講師）

## 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16年度	7,400	0	7,400
平成17年度	6,800	0	6,800
総計	14,200	0	14,200

## 研究発表

### 口頭発表

- ・ 小島弘幸、伊藤俊弘、中木良彦、安住 薫、武内伸治、小林 智、神和夫、吉田貴彦  
ホルムアルデヒド曝露によるマウス海馬・嗅球での遺伝子発現に及ぼす影響  
第13回日本臨床環境医学会総会  
2004年7月
- ・ 松井孝子、川上智史、坂部 貢、吉田貴彦  
シックハウス症候群の診断における神経眼科学的検査とアトピー性皮膚炎患者群との比較  
2004年日本職業・環境アレルギー学会  
2004年9月
- ・ 松本基督、吉田貴彦  
ホルマリン反応生成物による免疫毒性について  
2005（平成17）年度日本水産学会大会  
2005年4月
- ・ 中木良彦、伊藤俊弘、坂部 貢、吉田貴彦  
飲食品中に含まれるホルムアルデヒドの生体影響  
第14回日本臨床環境医学会総会  
2005年7月

- Trail therapy for patients with multiple chemical sensitivity  
using rest house

吉田貴彦

ISOEAID'05

2005年9月

- 解剖学実習におけるホルムアルデヒド曝露が学生の自覚症状に及ぼす  
影響

伊藤俊弘、中木良彦、廣岡憲造、杉岡良彦、遠藤 整、吉田成孝、吉  
田貴彦

第76回日本衛生学会

2006年3月

## I. 序論

森林等の資源節約と省エネルギーを目指して、新建材の開発・普及、居住スペースの気密化が導入されて久しい。こうした住居形態は、従来の日本型の住居と趣を大きく異にするものであり、住居内の湿度の上昇とそれに伴う結露、カビの発生、ダニ等の衛生害虫の問題をもたらした。さらに、暖房、調理、喫煙などにより発生する燃焼生成物、および新建材、家具類、防燃・防煙加工カーテンやカーペット、ドライクリーニング済み衣類、日常消耗品から揮発する有機溶剤、殺虫剤や室内芳香剤・消臭剤など、住環境、生活様式の変化にともない、住居、学校、公共施設、オフィスなどの空気質を汚染する化学物質の種類が増加した事が指摘されている。

こうした状況にあって近年、住宅や学校・公共施設の新築・改築後の室内空気質の悪化に起因して居住者・利用者に種々の健康被害を訴える者が増え、こうした状況をシックハウス症候群やシックスクール症候群などと呼び社会問題となっている。特に化学物質への長期間の極微量曝露、あるいは比較的高濃度の曝露後に、大多数のヒトには何らの健康被害をもたらさない程度の極微量の化学物質曝露をきっかけとして生じる非特異的で多彩な症状を呈するヒトの存在が指摘され、喫急の対策が迫られている。こうした病像に対し多種類化学物質過敏症 (Multiple Chemical Sensitivity、MCS)、本態性多種化学物質過敏状態などが提唱され、その病態解明のための研究がはじまっている。

旭川において 2001 年に産官学共同研究グループである「化学物質過敏症患者のための転地療養研究組織」が組織され、その中核を旭川シックハウス症候群検討委員会として旭川医科大学および旭川市が構成した。本研究グループでは化学物質過敏症患者が転地療養によって症状が改善するかについて検証するた

め、化学物質過敏症転地療養施設が 2000 年竣工され 2002 年にシックハウス症候群患者の受入れを開始した。2002 年から 2004 年にかけて転地療養施設に北里研究所病院臨床環境医学センターにてシックハウス症候群と診断された患者 12 名を定期的 (2 ヶ月ずつ 2 名) に受入れ、室内空気汚染揮発性化学物質の濃度が非常に低い環境下に転地するのみで一定の症状の緩和が見られる事を確認した。これらの成果を受けて、化学物質過敏症患者のための入居施設が各地に建設されている。また、一般住宅や公共施設についても、ホルムアルデヒドを無使用あるいは低減した建材が開発、使用される様になった結果、室内空気質を汚染しシックハウス症候群の原因として最も多かったホルムアルデヒドに起因する症例の新規発生が減るなど、一見してシックハウス症候群、化学物質過敏症の問題は好転したかに思われる。これをもって、直近の新たな患者の発生が減ったこともあり同疾患についての社会的な関心も薄れているようにも感じられる。

一方、シックハウス症候群、化学物質過敏症の発症メカニズムや病態の解明は進んでいなく、患者の健康回復についても根本的な解決は図られていない。さらに、ホルムアルデヒドによる発症が少なくなったとは言え、ホルムアルデヒドによってマスクされていた別の化学物質が存在し、またホルムアルデヒドの代替物質が用いられるなど、新たな原因化学物質による患者の発生が危惧されているものの、社会一般には一時期の関心の大きさは無い。

こうしたシックハウス症候群に対する医学的研究、診断治療に対する関心の薄さは、シックハウス症候群の病態解明が遅々として進まない事に加え、症状が自覚症状中心であり、かつ現在行いうる検査方法が神経眼的検査を中心とした自律神経系項目など特殊施設を要する検査に限られ、かつ原因化学物質を特定するためには化学物質等を可能な限り除去した環境下 (化学物質的クリーンルーム) での負荷試験が必要であり、一部の医療機関でなければ確定診断を

行えない現状にある事が大きな要因となっている。さらに生化学的検査法が無いことなどにより我が国でのシックハウス症候群患者、化学物質過敏症の把握すらもままならない状況にあることも影響していると考えられる。したがって、シックハウス症候群、化学物質過敏症についての研究は、病態解明にとどまらず簡易な診断方法の開発研究も急務であると考えられる。

前述したように、旭川医科大学は旭川市とともに旭川シックハウス検討委員会を2001年に設置し、産官学組織によりシックハウス症候群の転地効果を検証するための共同研究グループを組織した。その共同研究の場となるシックハウス症候群患者転地療養施設が旭川市内に2001年に竣工し、2003年からシックハウス症候群と診断された患者を定期的に受け入れてきた。さらに2001年に旭川医科大学附属病院にシックハウス症候群患者外来が開設され、療養施設に入所した患者を始め北海道内在住の患者が定期的に受診している。このように旭川市はシックハウス症候群、化学物質過敏症患者の研究にとって有利な状況にある事などが本研究の背景となっている。

## II. 目的

化学物質過敏症には特異的症状が無く、自律神経の変調に伴う不定愁訴や精神神経症状を初めとする多彩な症状が前面に現れる場合が多いものの、アレルギーや免疫応答が関与した症状や、呼吸、消化器、内分泌、感覚器、運動機能症状なども同時に呈する者も少なくないなど、その病態解明は容易ではない。また、症状の発現や程度には個人差が大きく、個々の患者であっても時間経過によって症状が変化するなど、その診断には困難さがともなう。現在、化学物

質過敏症の診断には、北里研究所病院の石川哲らによって提唱されている診断基準があるが、自律神経系の変調症状を評価する神経眼科的理学検査など特殊な検査が多いうえに、確定診断を行なうためには空気質を汚染する化学物質を排除した化学的クリーンルーム内での当該原因物質への曝露検査が必須であり特殊施設が必要となる。このように一般の医療機関において実施可能な生化学的検査法などの客観的診断指標の無いことが、医療従事者にとって化学物質過敏症の認知が進まない要因となっている可能性がある。そこで、患者に対する侵襲の少なさと一般による受け入れられ易さから、検査対象とする生体試料すなわち surrogate として末梢血を位置付ける。最初に末梢血から抽出される mRNA から得る cDNA を用いて網羅的に、シックハウス症候群あるいは化学物質過敏症患者群において変動する遺伝子群を検索し、それらの遺伝子産物を末梢血、尿など非侵襲的に得られる surrogate 中に探索し、一般医療機関においても検査が可能な診断検査法を確立する事を本研究の目的とする。

### Ⅲ. 研究方法

#### 研究対象患者

研究対象とした化学物質過敏症 (multiple chemical sensitivity, MCS) 患者と対照群とした健常者の採血年月・性別・年齢を表 1 に示した。

MCS 患者は、我が国において最も確実にシックハウス症候群あるいは MCS を診断する事の出来る北里研究所病院臨床環境医学センターにおいて MCS と診断された男性 3 名、女性 13 名の計 16 名である。MCS 患者からの採血は、2003 年春から 2005 年秋までの間に行なった。なお MCS-a1, a2, a3, a4, a5, a6 は旭川

表1 調査対象の MCS 患者とおよび健常者の採血年月・性別・年齢

①MCS患者 (n=16)

Sample No.	Date	Sex	Age
MCS-a1	2004.Feb	Female	30
MCS-a2	2004.Feb	Female	33
MCS-a3	2004.May	Female	41
MCS-a4	2005.Feb	Female	29
MCS-a5	2005.Feb	Female	44
MCS-a6	2003.Sep	Male	29
MCS-k1	2005.Oct	Female	49
MCS-k2	2005.Oct	Male	37
MCS-k3	2005.Oct	Female	44
MCS-k4	2005.Oct	Female	36
MCS-k5	2005.Oct	Female	52
MCS-k6	2005.Oct	Female	56
MCS-t2	2004.Nov	Female	63
MCS-t3	2004.Nov	Male	34
MCS-t4	2004.Nov	Female	71
MCS-t6	2004.Nov	Female	40

②健常者 (n=9)

Sample No.	Date	Sex	Age
Health-a1	2004.Feb	Female	48
Health-a2	2004.Feb	Female	40
Health-a3	2004.Feb	Male	48
Health-k1	2006.Jan	Male	42
Health-k2	2006.Jan	Female	35
Health-k3	2006.Jan	Female	57
Health-t2	2004.Nov	Male	42
Health-t3	2004.Nov	Male	30
Health-t4	2004.Nov	Male	45

③コントロール群

Sample No.	Date	Sex	Age
Health-c1	2004.Jun	Female	41
Health-c2	2004.Jun	Female	55
Health-c3	2004.Jun	Female	33
Health-c4	2004.Jun	Female	38

医科大学病院産婦人科シックハウス症候群外来を訪れた患者であり、MCS-k1, k2, k3, k4, k5, k6, t2, t3, t4, t6 は、北里研究所病院臨床環境医学センターを受診した患者である。健常者は既往歴、家族歴にアトピー疾患のない男性5名、女性8名の計13名であり、そのうちの女性4名 (Health-c1, c2, c3, c4) の末梢血単核球 (peripheral blood mono-nucleus cells, PBMCs) から抽出したRNAを等量混合してコントロール群とした。残りの健常者9名 (Health-a1, a2, a3, k1, k2, k3, t2, t3, t4) について、MCS患者と同様に遺伝子発現解析を行った。健常者対照群およびコントロール群は、研究組織である旭川医科大学健康科学講座、北里研究所病院臨床環境医学センター、北海道立衛生研究所の職員ボランティアとした。

## 患者、健常者ボランティアの基本情報

本研究の被験者となる MCS 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。

## 倫理問題への対処

本研究に被験者として協力される、MCS 患者及び健康対照としてのボランティアには、主治医ないし研究協力者から文章（資料 2、3）による説明を行い、インフォームド・コンセントを（資料 4）文章にて得て、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 5）。本研究の実施に際して、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た。

## 外来受診および末梢血液の採取・検体処理

ヒト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。上清の血漿を分離し生化学的な検索に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。血漿を除いた後の血球分画に生理食塩水を 5ml 加え血球を再浮遊させた。15ml プラスチック遠心管にリンパ球比重分離液 Lymphoprep<sup>TM</sup> (Axis-Shield 社) 5ml を分注し、その上に血球浮遊液を静かに重層したのち、室温にて 2000rpm、20 分間遠心した。比重遠心分離後の中間層に位置する PBMCs 画分を回収し、過剰量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄して PBMCs ペレットを得た。

## RNA の抽出・精製

得られた PBMCs ペレット（約  $5 \times 10^7$  個）に RNA 抽出試薬 TRIzol Reagent（イ

ンビトロゲン社) 1ml を添加し溶解した後に、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 ( $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$ ) total RNA として十分な純度で有る事を確認した。抽出・生成した total RNA 検体は RNA 発現の確認まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。なお、健常者 4 名から得た total RNA を等量混合し、コントロール群サンプルとした。

### **RNA の品質評価と cDNA 作成**

凍結保存した total RNA サンプルを溶解後に、およそ  $1\mu\text{g}$  を用いて Agilent 2100 バイオアナライザ (アジレント社) により RNA 品質を評価した。RNA サンプルの 18S と 28S のピーク比とから RNA の分解がほぼ無視しうる程度にあることを確認後に、コントロール群、個々の患者あるいは健常者から得られた total RNA  $2.5\mu\text{g}$  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) を用いて逆転写 (reverse transcription) 反応で cDNA を作製した。

### **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個々の患者あるいは健常者サンプルから作成した cDNA について、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 (患者あるいは対照としての健常者) を作製した。Cy3 標識されたコントロール群の cRNA ( $1\mu\text{g}$ ) と Cy5 標識された個々の患者あるいは健常者対照の cRNA 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×SSC 液 (室温、10 分間) と 0.1×SSC 液 (4°C、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、スクエ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。

### **患者群において特異的に変動する遺伝子群の特定と生化学検査法の提案**

DNA マイクロアレイによる検索データをもとに、患者群において特異的に変動する生物活性遺伝子群を抽出する。ついで、MCS に特徴的な臨床症状および現在実施されている理学検査結果と照合し合理的に説明可能な意義のある変動遺伝子群を絞り込む。絞り込んだ遺伝子群について、生成される産物 (蛋白等の生物活性物質) ないし代謝産物を末梢血、尿ないし分泌液などの比較的容易に採取可能な検体中に見出す。既存の測定法が確立されている場合には、さらなる改良について検討する。測定法が未確立の場合には、末梢血、尿ないし分泌液などの検体にて生化学的に測定可能な方法を考案する。

## **IV. 結果**

### **RNA 試料の RNA の質の検定**

コントロール群および MCS 患者、健常者の末梢血から調整された PBMCs 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 1 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 の存在比率は約 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）を判定することが出来る。図 1 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いない高品質に保存されていた事が確認された。

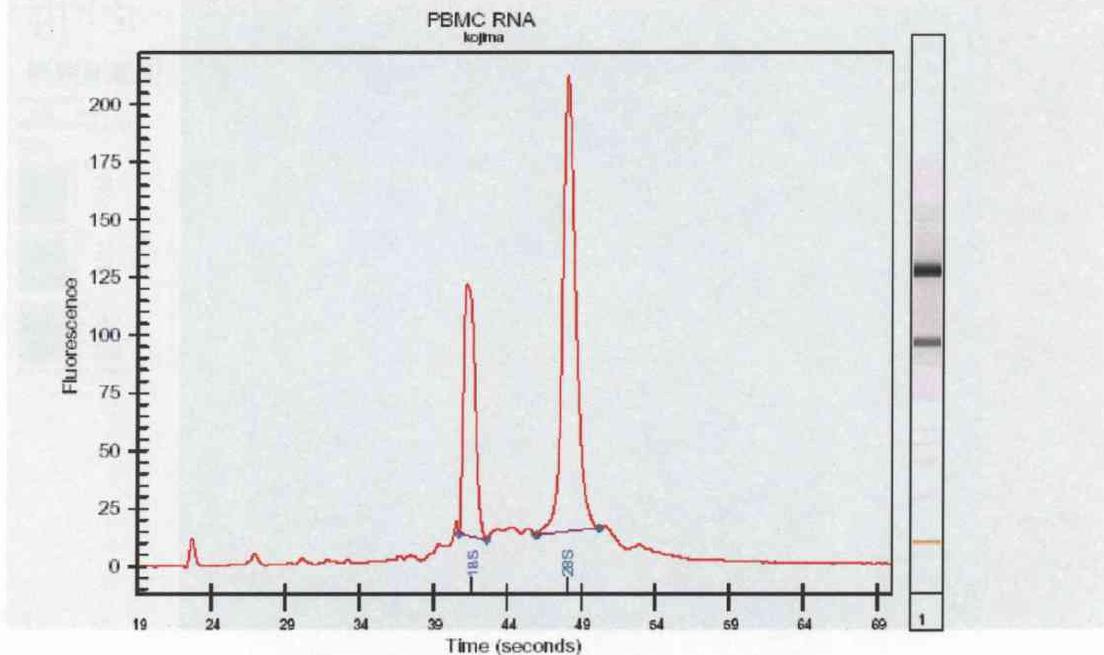


図1 バイオアナライザによる Total RNA の解析パターン

### マイクロアレイによる RNA 発現解析

コントロール群（健常者 4 名の混合）の total RNA を Cy3 で標識し、MCS 患者 16 名と健常者 9 名の total RNA をそれぞれ Cy5 で標識して得た cRNA について遺伝子発現解析を行ったマイクロアレイのカラーイメージ画像の一例を図 2 に示す。赤・黄・緑の 3 色のスポットのうち、赤色はコントロール群に比べ個々の患者（ないし健常者）で発現が増加した遺伝子、黄色は発現量に変化の患者で発現の高い mRNA 遺伝子を、直線の下にプロットされた mRNA 遺伝子は患

無かった遺伝子、緑色はコントロール群に比べ個々の患者（ないし健常者）で発現が抑制された遺伝子を表す。

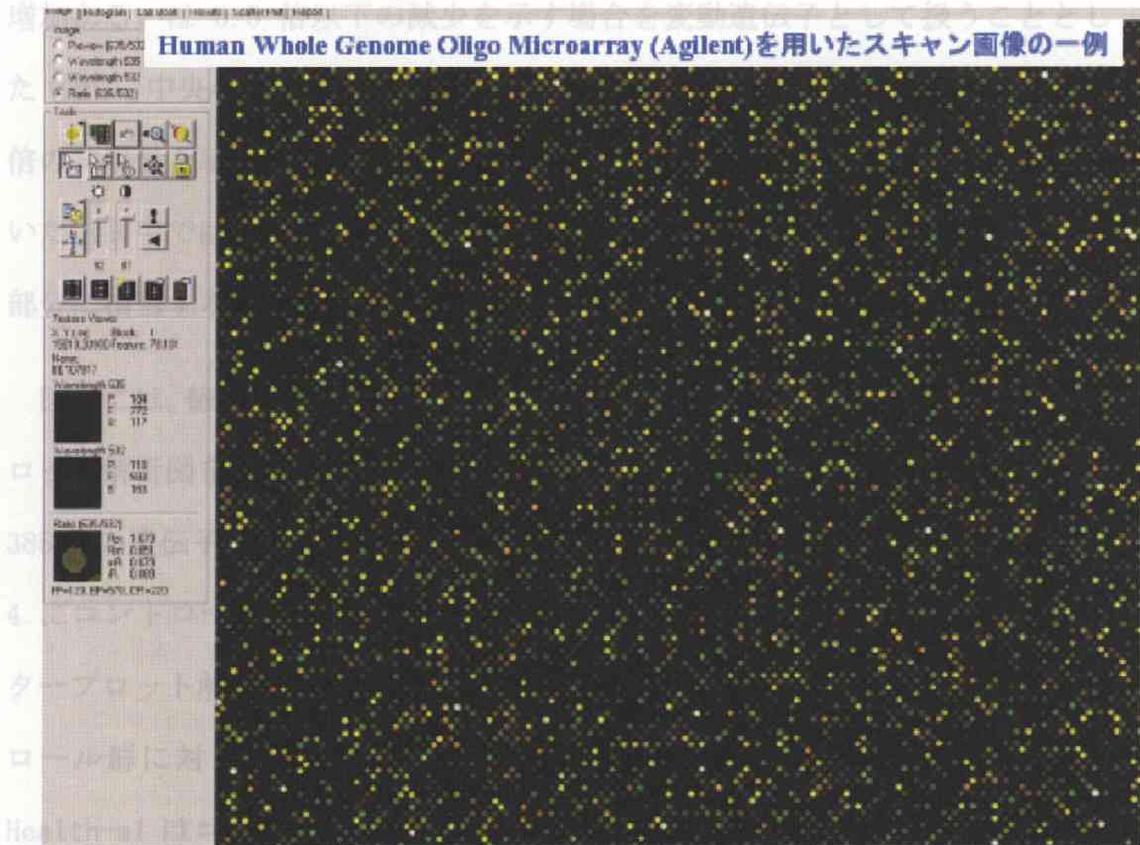


図2 ヒト全ゲノム・マイクロアレイのカラーイメージ画像

遺伝子が発現減少した遺伝子、赤色はコントロール群に比べ個々の患者（ないし健常者）で発現が増加された遺伝子を表す。MCS 患者群と健常者群の間で大きく傾向の異なるパターンは認められなかった。また、いずれの群においても、遺伝子発現の変動のあった遺伝子数の mRNA 遺伝子の発現強度を表したスキャッタープロットによる解析

— PBMCs 由来 total RNA を用いて解析した、コントロール群に対する MCS 患者の個々の mRNA 発現量を蛍光強度として表したスキャッタープロット・イメージ画像を図 3 に示した。縦軸は個々の MCS 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は原点を通り右上がり 45 度の直線上に位置し、直線の上にあるプロットは MCS 患者で発現の高い mRNA 遺伝子を、直線の下にプロットされた mRNA 遺伝子は患

者で発現が低い事を意味し、直線からの距離が大きいほどその程度が大きい。今回の解析では、コントロール群に対して mRNA 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て扱うこととした(図中、中央の原点を通る 45 度の直線に平行する上下 2 本の線が 2 倍と 0.5 倍の発現量を示す)。なお、発現強度の極めて低い mRNA 遺伝子群は解析から除いた(図中では、原点に近い Cy3 蛍光強度 10 以下で、プロットされていない部分に相当する)。

図 3 には、個々の MCS 患者におけるコントロール群に対するスクアッタープロット解析図を示した。図 3 左上に示した MCS-a1 はコントロール群に対して、385 個の遺伝子が発現増加、438 個の遺伝子が発現減少していた。同様に、図 4 にコントロール群に対する個々の健常者の遺伝子発現パターンをスクアッタープロット解析図として示した。健常者においても MCS 患者と同様にコントロール群に対して遺伝子発現量の変動が認められた。図 4 左上に示した Health-a1 はコントロール群に対して、487 個の遺伝子が発現増加、988 個の遺伝子が発現減少していた。図 3、4 から、スクアッタープロット解析図において、MCS 患者群と健常者群の間で大きく傾向の異なるパターンは認められなかった。また、いずれの群においても、遺伝子発現の変動のあった遺伝子数の多少、また変動の程度、発現の増加減少のいずれかの優位性、発現強度のパターンには大きな個人差がある事がわかった。

MCS 患者 16 名と健常者 9 名の mRNA 遺伝子発現解析の結果、コントロール群に対して増減を示した変動遺伝子の数は、個人差はあるものの、MCS 患者で 150 ~ 2003 個、健常者で 118 ~ 1984 個であり、MCS 患者と健常者の変動遺伝子数に差は認められなかった(表 2)。

MCS患者 (Cy5、蛍光強度)

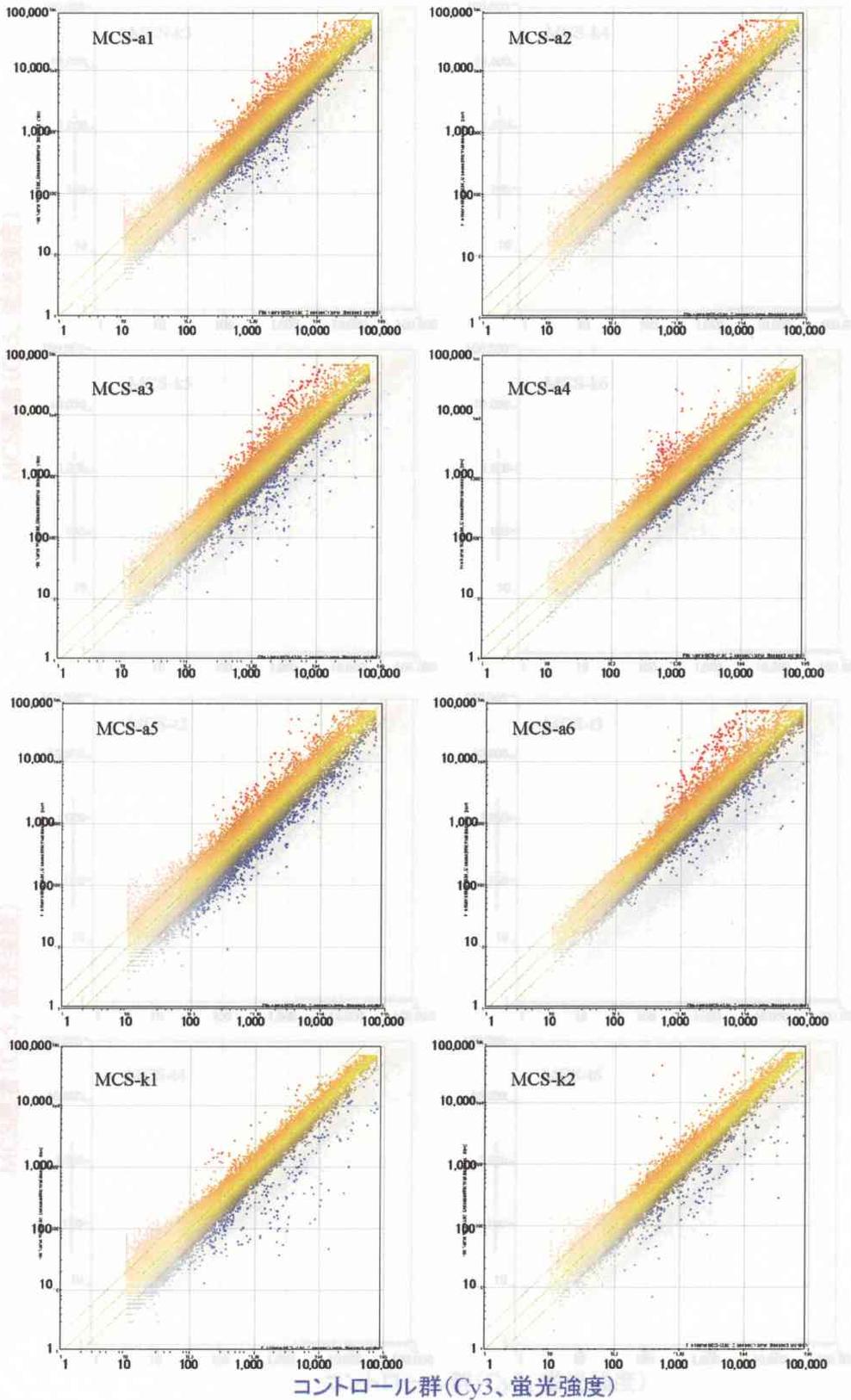
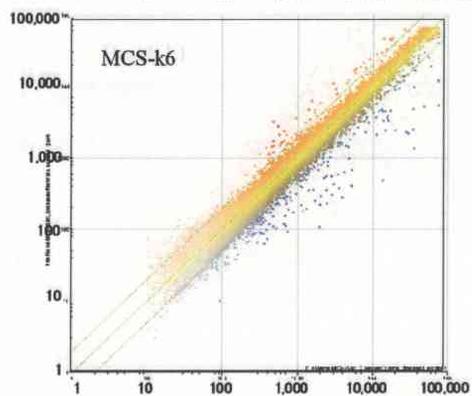
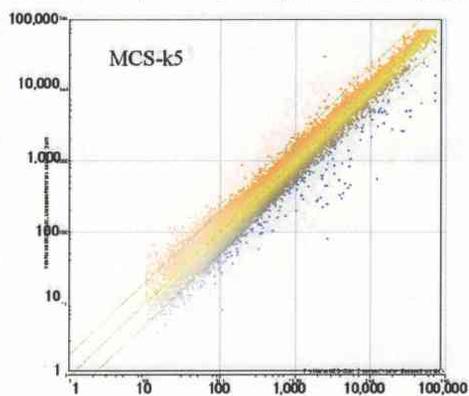
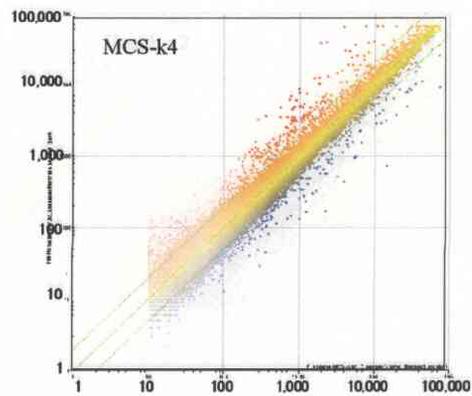
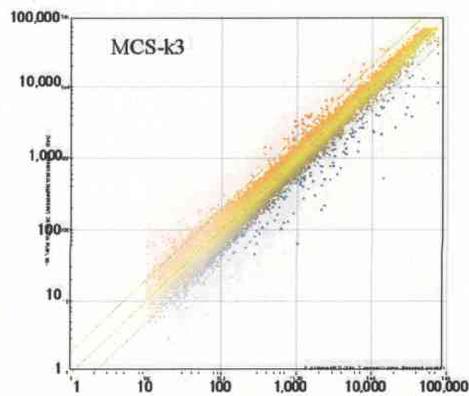
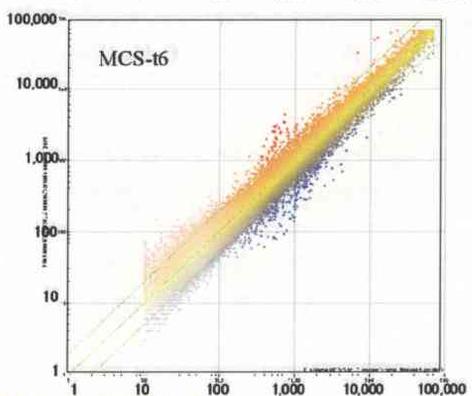
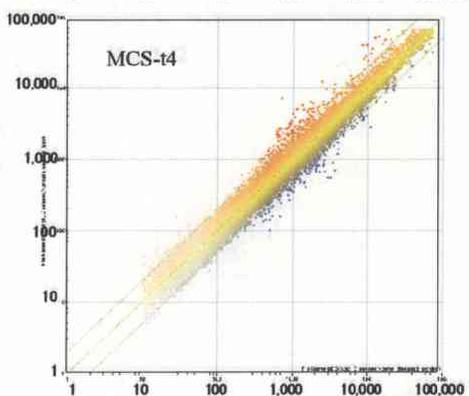
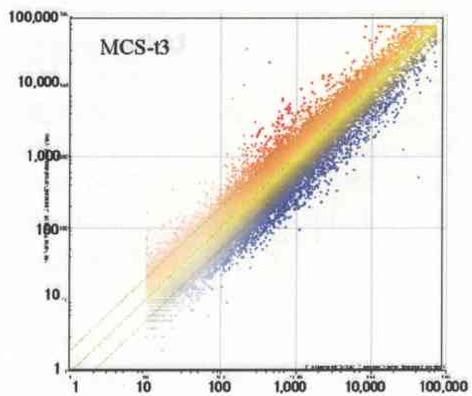
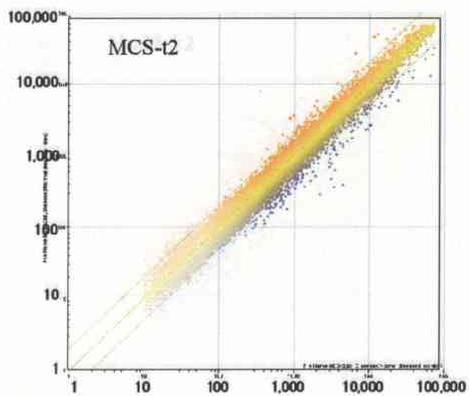


図3 コントロール群に対する MCS 患者のスクアッタープロット解析

MCS患者 (Cy5、蛍光強度)



MCS患者 (Cy5、蛍光強度)



コントロール群 (Cy3、蛍光強度)

図3(続き) 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

健常者 (Cy5、蛍光強度)

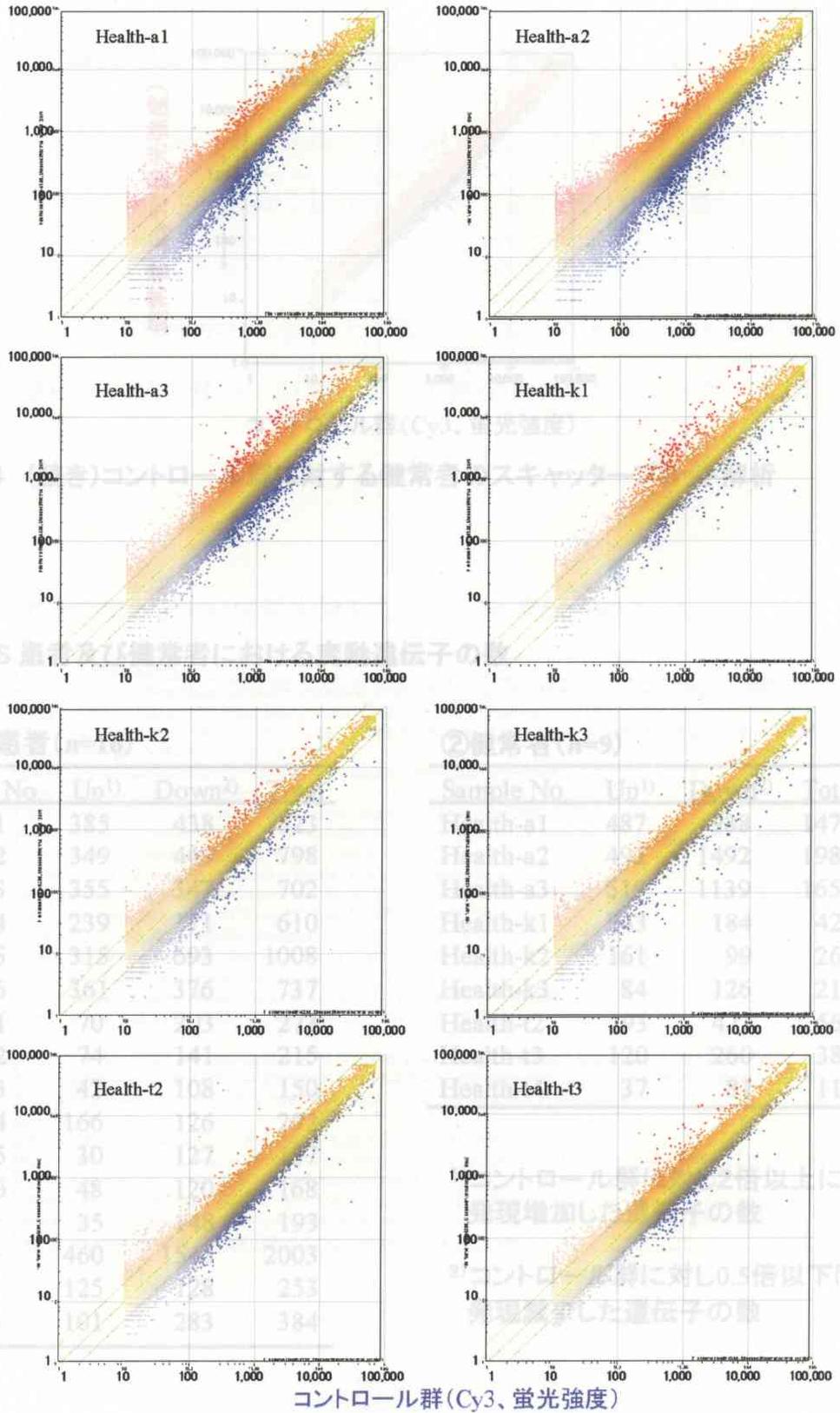


図4 コントロール群に対する健常者のスクアットプロット解析

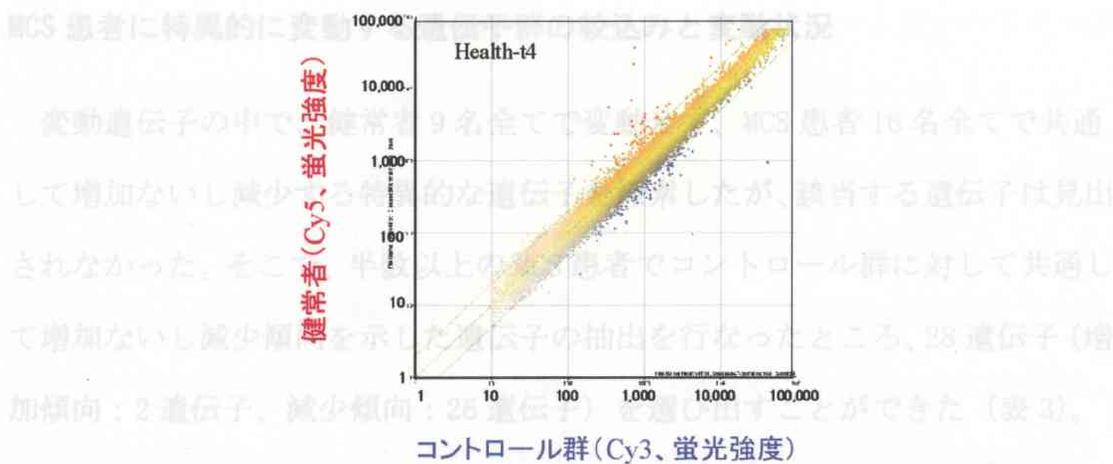


図4 (続き)コントロール群に対する健常者のスキャッタープロット解析

表3 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

表2 MCS患者及び健常者における変動遺伝子の数

①MCS患者(n=16)				②健常者(n=9)			
Sample No.	Up <sup>1)</sup>	Down <sup>2)</sup>	Total	Sample No.	Up <sup>1)</sup>	Down <sup>2)</sup>	Total
MCS-a1	385	438	823	Health-a1	487	988	1475
MCS-a2	349	449	798	Health-a2	492	1492	1984
MCS-a3	355	347	702	Health-a3	519	1139	1658
MCS-a4	239	371	610	Health-k1	243	184	427
MCS-a5	315	693	1008	Health-k2	161	99	260
MCS-a6	361	376	737	Health-k3	84	126	210
MCS-k1	70	203	273	Health-t2	93	471	564
MCS-k2	74	141	215	Health-t3	120	260	380
MCS-k3	42	108	150	Health-t4	37	81	118
MCS-k4	166	126	292				
MCS-k5	30	127	157				
MCS-k6	48	120	168				
MCS-t2	35	148	193				
MCS-t3	460	1543	2003				
MCS-t4	125	128	253				
MCS-t6	101	283	384				

1) コントロール群に対し2倍以上に発現増加した遺伝子の数

2) コントロール群に対し0.5倍以下に発現減少した遺伝子の数

## MCS 患者に特異的に変動する遺伝子群の絞込みと変動状況

変動遺伝子の中で、健常者 9 名全てで変動せず、MCS 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。そこで、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た（表 3）。

表3 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

そこで、比較的特徴のある 28 遺伝子について、コントロール群に対する MCS 患者および健常者の個別発現比率を検討した。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) が、MCS 患者、健常者のいずれの解析でも、殆ど変動していないことを確認したうえで、MCS 患者および健常者の個別遺伝子発現を図 5 に示した。MCS 患者群のうち数名を除いて、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) などが大きな変化傾向として見られるが、それらの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い。



図5 G3PDH とリストアップされた遺伝子の個人別発現変動

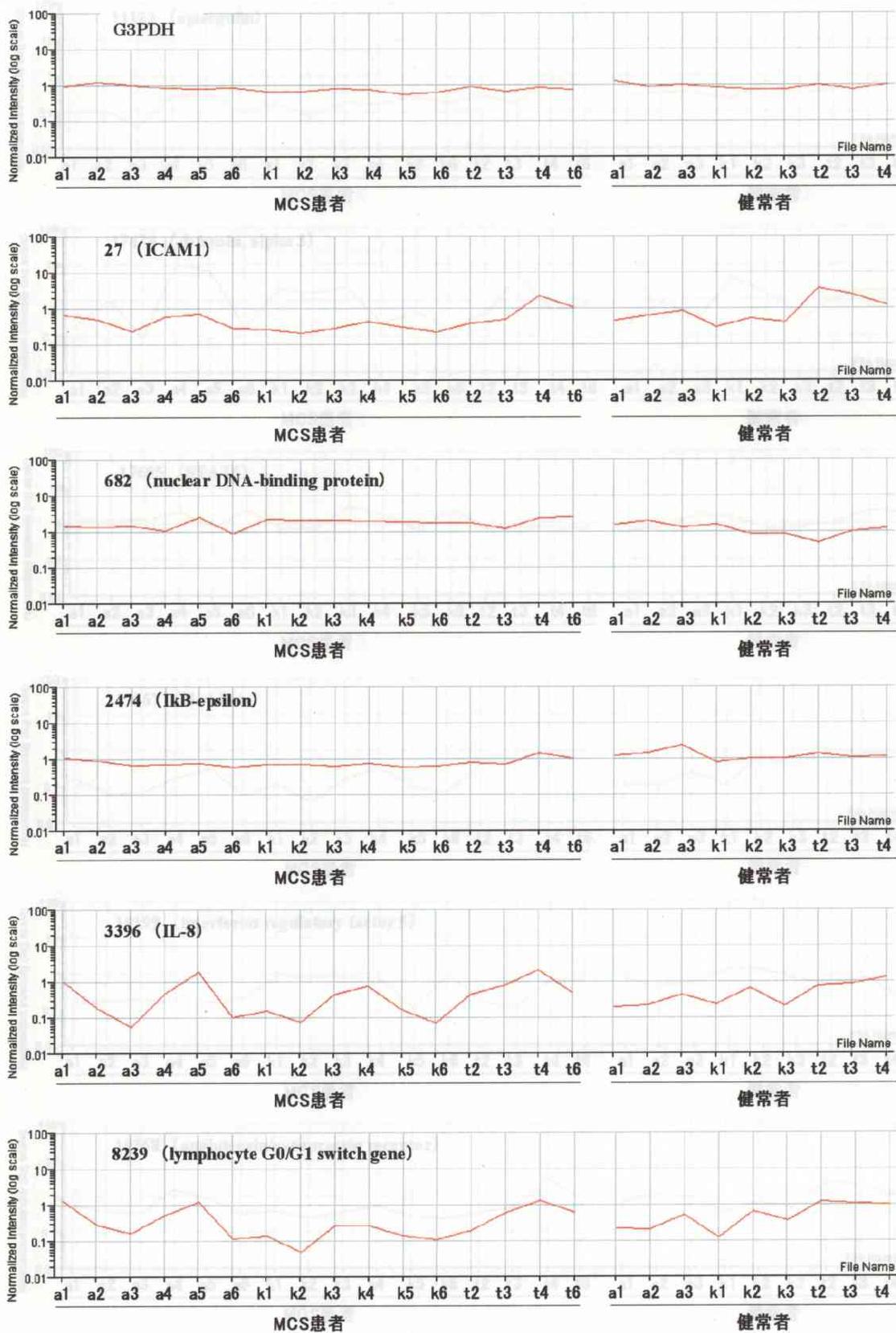


図5 G3PDH とリストアップされた遺伝子の個人別発現変動

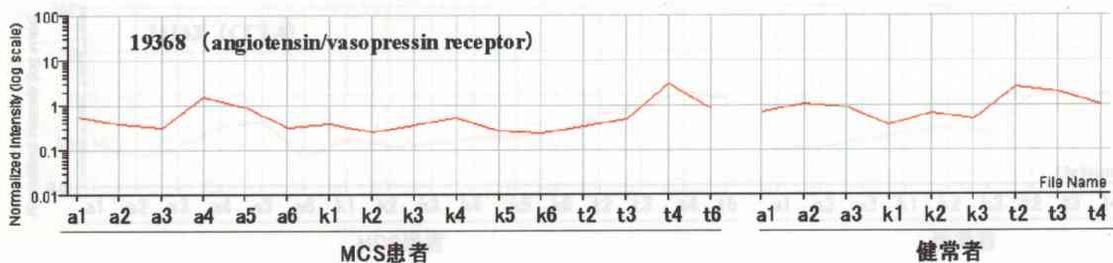
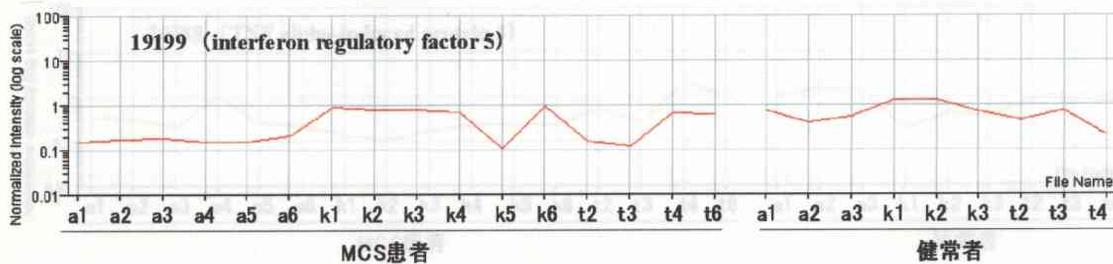
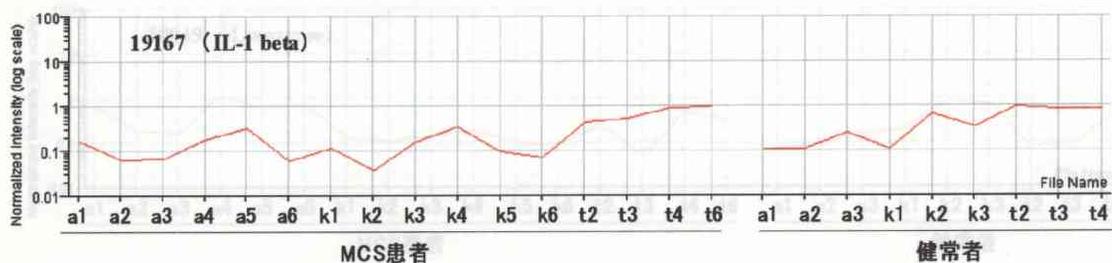
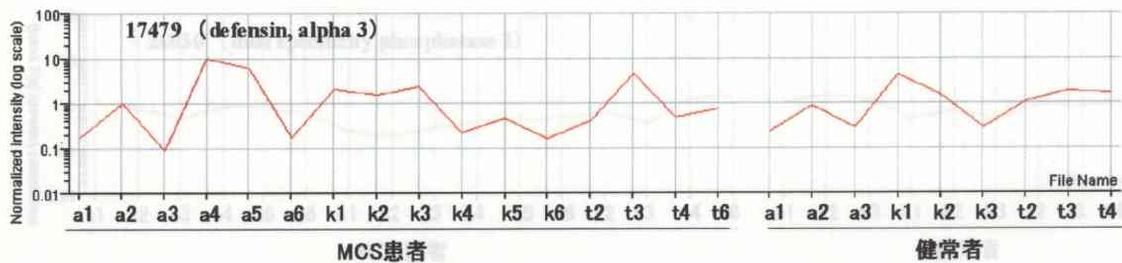
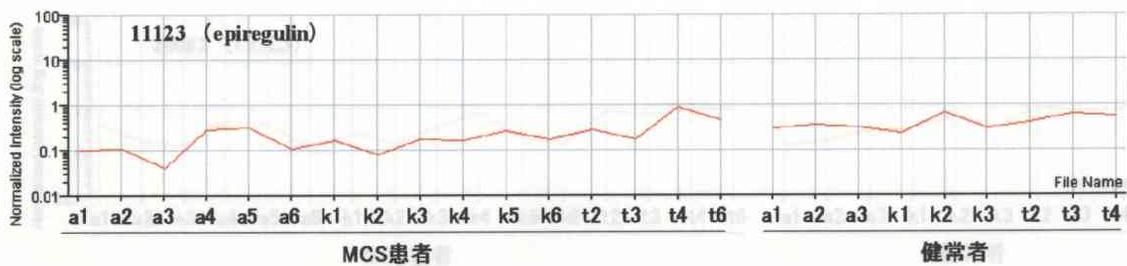


図5(続き) リストアップされた遺伝子の個人別発現変動

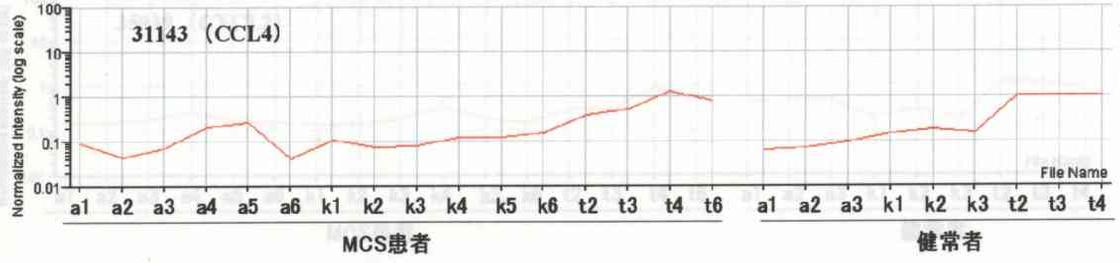
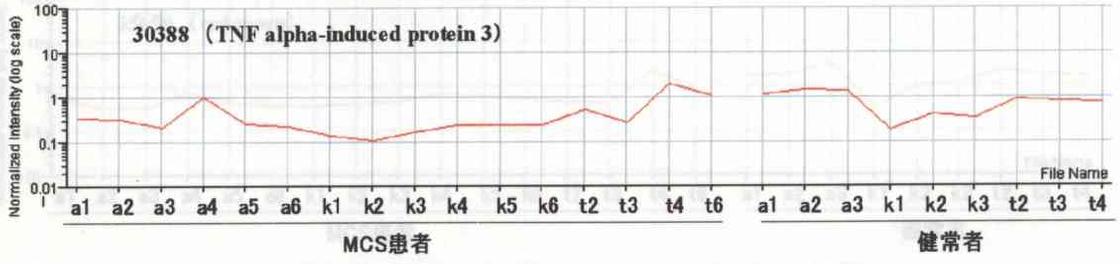
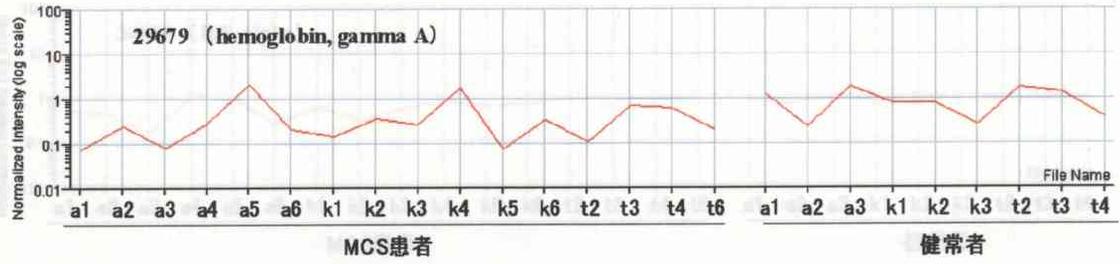
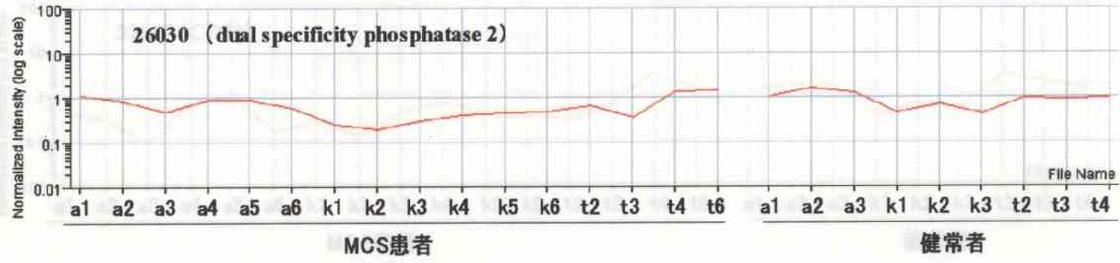


図5(続き) リストアップされた遺伝子の個人別発現変動

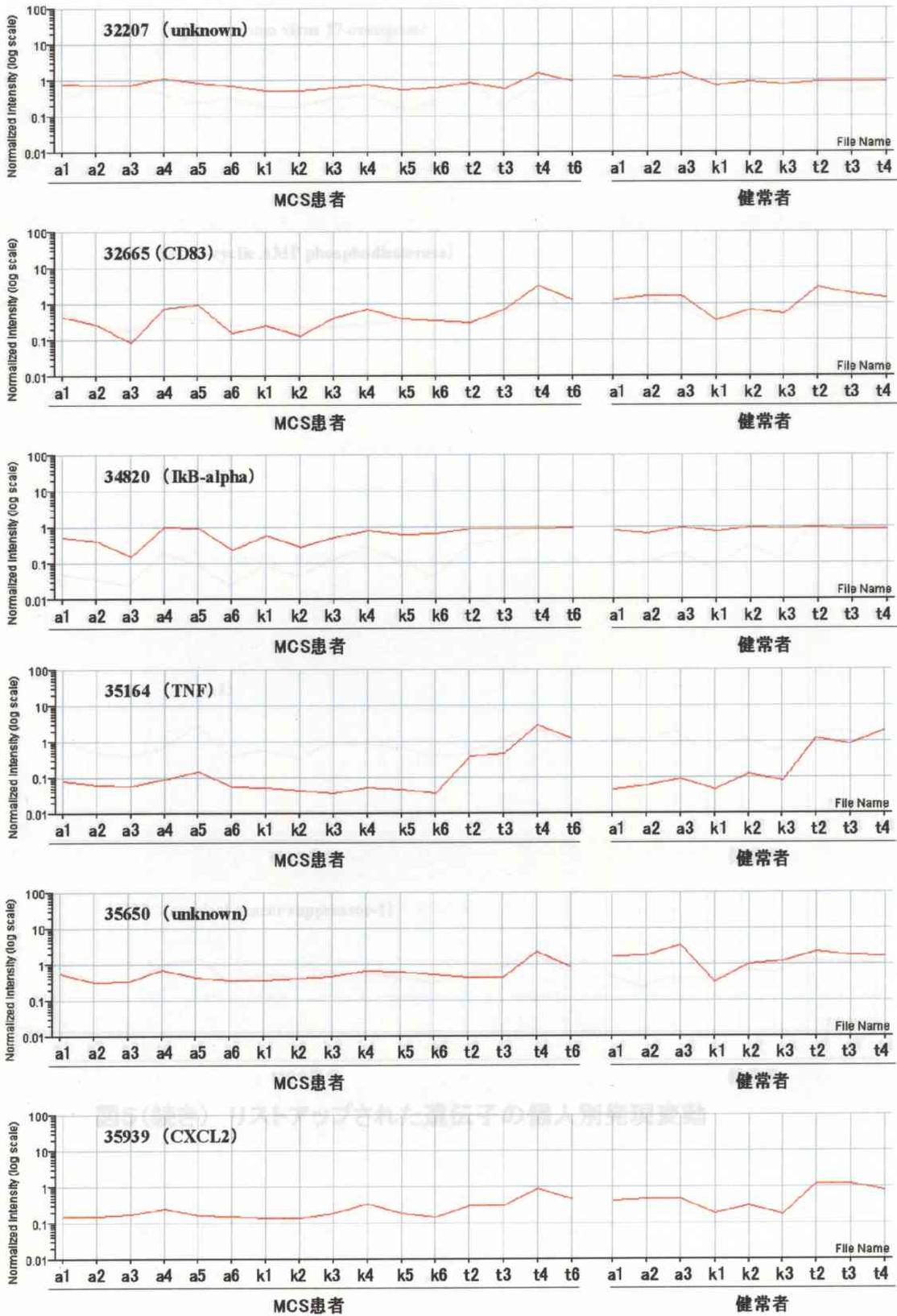


図5(続き) リストアップされた遺伝子の個人別発現変動

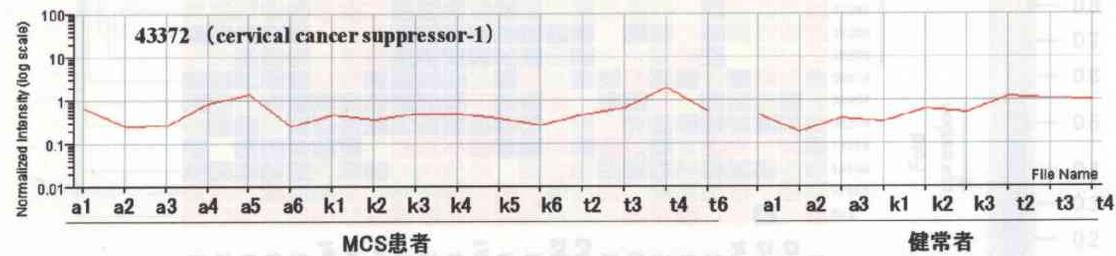
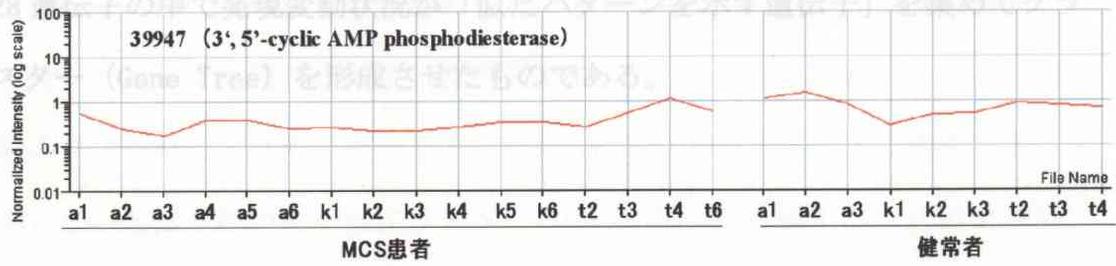
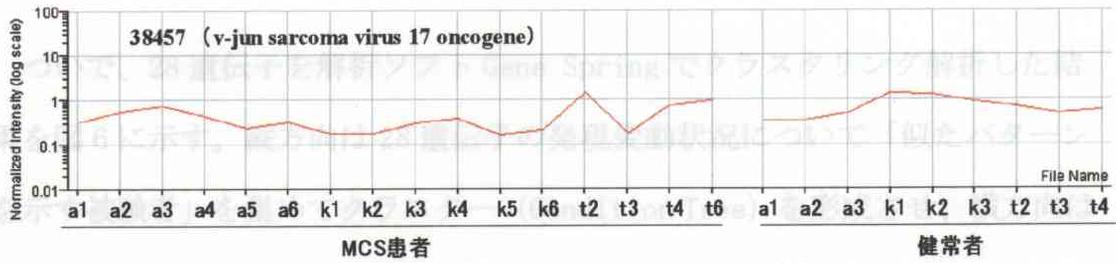


図5(続き) リストアップされた遺伝子の個人別発現変動

図6 個人別 28 遺伝子のクラスタリング解析



MCS 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) に分割可能であることが示された。MCS 高変動群は MCS に関連する病勢が強い段階にあると解釈することも可能である。そこで MCS 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、MCS 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 (I $\kappa$ B-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。

## V. 考察

多種類化学物質過敏症 (MCS) やシックハウス症候群の診断が、一般医療機関においても可能ならしめる末梢血、尿など非侵襲的に得られる検体を用いて実施する生化学的検査法を確立する事を本研究の目的とした。目的達成のために、MCS 患者群において変動する遺伝子群を末梢血から抽出される mRNA から得る cDNA を用いて網羅的に検索する事を試みた。

MCS 患者の診断自体が困難さを伴うために、我が国の MCS の診断において最も信頼できる北里研究所病院にてにおいて MCS と診断を受けた患者 16 名 (うち 6 名

は旭川医科大学産婦人科シックハウス外来受診者)を被験者とするなど研究の質の管理には十分配慮した。しかし、MCS 患者は症状の発現や程度には個人差が大きく、対症療法ではあっても治療を受けることや、原因化学物質などの環境要因の改善などによって個々の患者においても時間経過によって症状が変化するのは当然のことである。こうした変動があることを承知の上で、MCS の病態に関連が深いと考えられる遺伝子群を追求した。

16 名の MCS 患者および DNA マイクロアレイ解析を行い、コントロール群検体に対して健常者検体で変動せず MCS 患者検体の遺伝子発現が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下を示した変動遺伝子として網羅的に探索を試みた。しかしながら、MCS 患者の全例において共通して変動する遺伝子は無かったので、半数以上に共通して変動する遺伝子をリストアップしたところ 28 遺伝子 (増加傾向: 2 遺伝子、減少傾向: 26 遺伝子) が見出された。これらの遺伝子には、インターロイキン (IL) 1 $\beta$ 、IL-8、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカインやケモカイン (CCL3、CCL4、CXCL2) が含まれていた。シックハウス症候群や MCS の患者では、アレルギー疾患などの免疫応答の関与する疾患の併発や既往の多いことが良く知られていることと符合するものであり、これらの遺伝子群が MCS 等の病態と何らかの関連を有する可能性が高いと考えられた。

そこで、比較的特徴があり MCS とも関連が考えられた 28 遺伝子について、コントロール群に対する MCS 患者および健常者の個別発現比率を検討した。陰性対象としたハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) が、MCS 患者、健常者のいずれの解析でも、殆ど変動していないことを確認したうえで、個別遺伝子発現について検討した。図 5 の結果に示したとおり、MCS 患者群のうち数名を除いて、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)、lysozyme などが大きな変化傾向として見られるが、それらの健常者での発現も数例を除き低下傾向を示す者が多いなど、両群間で際立った差は認められなかった。また、発現低下の程度が弱いながらも MCS 患者群で比較的揃って低下が見られる、interferon regulatory factor 5、IkB-alpha、3' 5' -cyclin AMP、phosphodiesterase なども注目に値したが、同様にそれらの健常者での発現に一貫性が無いなど、両群間で際立った差は認められなかった。一部、MCS 患者群の症例 t4 が、28 遺伝子から MCS 患者群で増強傾向が観察された 2 遺伝子を除いた 26 遺伝子において、全体傾向として発現の減少が見られる中であって、18 遺伝子について逆に増強傾向を示し特異な変動パターンを示した。症例 t4 は 71 歳であり、他の被験者に比して年齢が高かったことが、異なった変動をもたらしている可能性も考えられる。

ついで、前述の 28 遺伝子を解析ソフト Gene Spring でクラスタリング解析し、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」、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」をそれぞれクラスター (Condition Tree および Gene Tree) を形成させた。MCS 患者群が高変動群と低変動群に分割可能であったことは、MCS の病勢の強さを反映していると解釈することも可能である。そこで MCS 高変動群と同じく遺伝子発現が高変動する健常者群において比較したところ、MCS 患者群で変動する一方、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。2 つの Unknown 遺伝子を含むこれらの 10 遺伝子は全て発現減少の傾向を示し、28 遺伝子の中でも MCS 患者に特に特異性が高い遺伝子群であると考えられた。また、このクラスタリング解析においても、MCS 患者症例 t4 は他の被験者と異なるクラスターに属することが確認された。この事実は、シックハウス症候群や MCS について研究する際に、年齢要因についても考慮に入れる必要のある事を示唆するものである。

さて、以上の 28 遺伝子、更に狭く選択された 10 遺伝子とも、免疫機構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 MCS 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 MCS と何らかの関連を有する可能性があると考えられた。しかし、今回抽出された遺伝子群が今回の被験者となった MCS 患者群において、MCS の病態発現においても中心的な役割を果たしているとは単純には考えられない。MCS は微量化学物質等の刺激による知覚神経系からの入力中枢神経系に作用し、非アレルギー性の過敏反応が引き金となって起こる一連の生体反応によって多くの不定愁訴が現れるという説がある。なかでも、微量の化学物質が嗅覚器官に刺激をもたらす嗅球を通じて大脳辺縁系に神経刺激が伝達され影響を及ぼし、神経系の複雑系を経て神経線維、神経ペプチド、サイトカインなどを介して神経-内分泌-免疫軸に影響する結果、多彩な症状を呈するとの考えが注目される。神経、内分泌、免疫に広く渡る症状が同時に現れる事を説明するには、微量化学物質曝露の初期の段階で起こる生体影響こそ共通すると考えるのが妥当であり、この点で今回、MCS 患者群に見出された遺伝子群はあまりにも免疫系に関連が深いものに過ぎていると思われる。すなわち、MCS 患者が微量の化学物質に曝露する異により受けた神経系のストレスが、二次的あるいは三次的に免疫系に影響し今回の結果を示しているとも考えられる。すなわち、

今回の研究では、非侵襲的に得られる mRNA 遺伝子発現を観察できる surrogate として末梢血単核球 (PBMCs) を採用したところに限界があったと思われる。一方、MCS に関連して変動する mRNA 遺伝子群の産生産物ないしその代謝物等を末梢血等に求めることは、血液が全身の組織中をめぐり水溶性物質を運ぶ事を考えるならば妥当な選択と考えられる。MCS 患者の嗅覚などの感覚器、嗅神経、嗅球、大脳辺縁系などの組織を surrogate として、mRNA 遺伝子発現を検索できたならば、より MCS に関連の大きい遺伝子が見出され、それを基にその産生産物ないし代謝物等を末梢血等に求めたならば、大きな成果が得られることは間違いないであろう。しかしながら、現実的にそうした組織は得られようも無い。我々の研究グループは、こうした困難さを克服するために、ホルムアルデヒド (HCHO) を曝露したマウスにおいて、中枢神経系、免疫系の組織を得て、HCHO 曝露によって変動する mRNA 遺伝子群についてマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行なっている。HCHO 曝露マウス (雄) において、今回最終的に選択された 10 遺伝子のうち 5 遺伝子で PBMC および脾細胞 (主にはリンパ球) で MCS 患者同様の発現減少が観察された。MCS 患者や HCHO 曝露マウスで共通に変動した遺伝子が見出されていることは注目に値すると考える。こうした遺伝子群は、どちらかといえば中枢神経系への影響が二次的ないし三次的に免疫系に作用した結果であって、MCS の発症と必ずしも関連付けられないものの、強い神経系へのストレスにより変動するものと考えられ、MCS 診断の際のマーカー遺伝子となり得る可能性があるだろう。今回、MCS 患者において共通して変動する遺伝子群として抽出されたものについて、その生体因子産物を血漿・血清サンプル中に探ることを検討したが、組織・細胞内に発現するのみで血液中に現れない酵素や受容体であったり、サイトカイン、ケモカインなど血液中にも見出されるものの濃度が低く測定に適さないものばかりであった。そのため、一般医療機関におい

でも測定しうる MCS 診断のための検査法の確立は出来なかった。マウスなどの実験からも MCS 診断のためのマーカー遺伝子となる候補が見出されているものの、貴重な血漿を用いて生化学的な検索をするために、動物実験によってより多くのマーカー遺伝子候補が得られて後に満を持して測定に供すべく、保管中である。

## VI. 結論

MCS 患者において共通して変動する遺伝子群を抽出したところ、免疫系に関連した遺伝子群が得られた。こうした遺伝子群は、中枢神経系へのストレス影響が二次的ないし三次的に免疫系に作用した結果であって、MCS の発症と必ずしも一次的に関連付けられないものの、MCS 診断の際のマーカー遺伝子となり得る可能性があると考えられる。抽出された遺伝子について、その生体因子産物を血漿・血清サンプル中に探ることを検討したが、測定に適さないものばかりであった。そのため、一般医療機関においても測定しうる MCS 診断のための検査法として用いるものの特定は出来なかった。ホルムアルデヒド曝露マウスにおいての実験等からも、MCS 診断の際のマーカー遺伝子となり得る可能性のあるものを検索し、今回保存している血漿を用いて生化学的な検索を行なう予定である。

# 健康調査票

(資料1)

整理番号:

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。

- 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
- 婚姻状況 0 未婚 1 既婚 2 生別 3 死別
- 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
- 現住所(市町村および町名・地域名まで) \_\_\_\_\_ 市町村・ \_\_\_\_\_、 \_\_\_\_\_ 年前から)
- 近所(100mほど)に農地(田畑)がありますか。 0 ない 1 ある
- 近所で農業の散布を目にしたたり、臭いを感じることがありますか。 0 ない 1 ある
- 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 \_\_\_\_\_)
- 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 \_\_\_\_\_)
- 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)
- 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
- 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 クッションフロアー(ビニール製) 4 畳 5 じゅうたん
- 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 \_\_\_\_\_)
- 炊事のエネルギーは何ですか。 1 電気 2 ガス 3 その他( \_\_\_\_\_)
- 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
- 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
- 住居の夏季のクーラーの使用。 0 なし 1 ある
- 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
- 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 \_\_\_\_\_)
- 寝具は何を使っていますか。 1 床に直接布団 2 ベッド
- 1日何回食事をとりますか。 1日( \_\_\_\_\_ 回程度)
- 1週間に何回、コンビニ弁当やおにぎりを食べますか。 1週( \_\_\_\_\_ 回程度)
- 1週間に何回、カップ麺を食べますか。 1週( \_\_\_\_\_ 回程度)
- 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 \_\_\_\_\_)
- 嫌いな食べ物がありますか。 0 ない 1 ある(何ですか \_\_\_\_\_)
- 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 \_\_\_\_\_)
- 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

裏面につづく→

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病態解明調査研究へのご協力をお願い

最近、私たちの身の回りの生活環境中の化学物質による健康影響の問題が多く取り上げられています。シックハウス症候群の潜在患者数は人口の5%とも言われるほど重要な病態であると認識されています。しかし、シックハウス症候群の研究はまだ不十分であり、多くの患者さんが治療法も無いまま不自由な生活を強いられており、また今後も多くの患者さんの発生が危惧されています。そのため、日常生活の中でさらされる化学物質による健康影響の調査や病態把握、診断・治療法等の研究が強く望まれています。

シックハウス症候群は自覚症状が中心であるために実験動物での研究ができません。そのため患者さんの診断、生活調査と環境調査などに頼らざるを得ない状況にあります。現在、旭川市郊外にはシックハウス症候群患者用保養施設があり、入居患者さんの了解・協力のもとに、旭川医科大学中心の研究チームによる症状の経過観察と、症状と環境のかかわりを評価する体制が確立されています。これらの実績を踏まえて、「シックハウス症候群」の病態の解明、治療方針の確立、患者さんが安心して住める環境や新たな患者さんの発生を防止するための基準作りを目指す、総合的な研究を行うこととなりました。その遂行には関係分野の複合的研究体制が必要です。そこで、旭川医科大学を中心とした医学的研究チームと、東京大学、横浜国立大学の環境工学研究チーム、さらには旭川市保健所および北海道衛生研究所の連携体制が編成されました。

今回の調査では、旭川医科大学シックハウス症候群外来を受診された際に、通常の検査に用いる以外に、研究用として20mlほどの血液をいただきます。また、シックハウス症候群の発症には生活環境が密接に関連します。そのため、生活環境を中心とした質問票にもお答えいただきます。また、必要に応じて御協力が得られる方には、室内空気質の測定なども行わせていただく場合があります。ご提供いただきました血液は、シックハウス症候群と関連があると言われる免疫検査、化学物質代謝にかかわる酵素活性の検査、シックハウス症候群は個人差が大きいことからその素因を調べる検査、などを行います。素因の調査では遺伝子の抽出がなされますが、研究者段階では得られる結果と個人名が結び付けられない配慮を行います。具体的には、血液などのサンプル、質問票などは外来受診の段階で、整理番号を付けて扱い、検査やデータのまとめを行う研究者には誰の結果であるかわからなくします。なお、ご提供いただいた血液などのサンプルや調査票を、シックハウス症候群の病態解明以外の目的に使用することは一切ありません。こうした配慮を行いますので、ご協力いただいた皆様へご迷惑をおかけすることはありません。

このような研究にご協力いただく場合には、研究に関する説明と、協力者の同意「インフォームド・コンセント」が必要とされています。この説明書の内容をご理解された上で、研究協力に同意していただける場合には、「シックハウス症候群病態解明研究調査への協力同意文書」にご署名下さい。なお、今回の研究に御協力されない場合でも、外来での診療等につき、不利となる扱いは一切受けません。シックハウス症候群で苦しむ患者さん、国民全体の健康リスクを少しでも減らすことを目的とするこの調査に、どうぞよろしくご協力下さいますようお願い申し上げます。

# 「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」に関する説明

## 1. 研究組織

	研究機関名	研究者名	職名
研究代表者	旭川医科大学医学部	吉田 貴彦	教授
分担研究者	旭川医科大学医学部	石川 睦男	教授
		飯塚 一	教授
		高後 裕	教授
		吉田 晃敏	教授
		千葉 茂	教授
		千石 一雄	助教授
	北里大学研究所病院	坂部 貢	センター長
	宮崎医科大学医学部	加藤 貴彦	教授
	東京大学大学院環境	柳沢 幸雄	教授
	横浜国立大学大学院	中井 里史	助教授
	旭川市保健所	相田 一郎	所長
	北海道衛生研究所	小林 智	科長
外来担当者	旭川医科大学医学部	鳥本 悦宏	講師
		小島 貴志	助手

## 2. 研究目的

シックハウス症候群患者について、通常の診療をするとともに、その病態解明に用いることができる新たな検査法の確立を目指した基礎研究的な検査を実施し、患者さんの住居内・外の空気や飲料水中の化学物質、温熱等の物理因子、精神的ストレス等の心理因子などの環境因子について測定・評価を行います。患者さんが示す個々の症状と環境因子の測定結果を比較検討する事により、シックハウス症候群の病態形成に係る可能性のある因子を推定し、患者さんの治療と再発防止、さらに公衆衛生的規模でのシックハウス症候群の発症の抑制に有用な知見と技術を集積することを目的とします。これにより、シックハウス症候群の治療法が進展し、患者さんの症状が改善されることが出来るかもしれません。また、新たにシックハウス症候群を発症することを防止する対策が立てられるものと考えています。

## 3. 調査の方法と危険性など

ご協力いただきたいことは、旭川医科大学シックハウス症候群外来の受診の際に、通常の検査に用いる以外に研究用として約20mlの末梢血をいただくことです。また、生活環境を中心とした質問票についても記載をしていただきます。さらに、必要に応じて協力が得られる方に対しては別途、居住室内空気・飲料水などの測定などを実施させていただく場合があります。調査によって、また結果から社会的に不利益を被ることはありません。外来において診療のために行われる診察・検査・投薬などの費用は通常通りご負担願います。研究のための血液の提供は無償であり、また検査の費用等のご負担はありません。研究の成果は多くの方々の集団としてのデータとなって始めて意味あいを持つようになります。また、研究段階で個人の方のデータが診療に対して直ぐに役立つものではありません。従いまして、個人の調査の結果はお知らせする事が出来ませんことをご理解下さい。

## 4. 検査内容

協力患者さんの了解のもとにいただきました末梢血を用いて、リンパ球の種類解析、免疫グロブリン、各種サイトカイン・増殖因子 mRNA 発現量の測定等の免疫学的な検査、末梢白血球の分化程度の解析、化学物質を代謝する酵素について mRNA 発現量による測定、および症状の発現に関連する素因の解析のため DNA を抽出し PCR 法にて遺伝子の多型性パターンを解析します。DNA 解析の対象は、既に知られている化学物質代謝酵素、免疫調節、血管の収縮・拡張の調整、細胞増殖の調整などに関わる遺伝子の多型性です。将来、新たに有望な遺伝子の多型が発見された場合には、それらも対象となる可能性があります。

## 5. 健康に関して

末梢血の採血量は、通常の検査分を含めても 25ml ほどであり、健康に関して全く影響はありませんので、ご心配はありません。献血などで採血される量は、少量の場合で 200ml、現在すすめられている多い目の採血では 400ml ほどですので、それに比較しても特段多い量ではありません。また、採血方法は通常の方法でおこなわれますので、特別な危険はありません。

## 6. 個人情報の保護について

本研究では対象となる疾病の病態と発症の解析に重点を置くことから、協力患者さんの個人個人のデータを素因や生活様式と関連付けて解析されなければなりません。しかし、個人名は外来担当者のみが知る事とし、検体やデータは整理番号を付けて扱う事としますので、外来担当者以外の研究者にはどなたの検体およびデータであるかわからない状態で研究いたします。さらに、調査研究が進み同じような素因や生活要因を持つ対象者のデータが多く集まれば、集団の成績として扱われる様になり、外来担当者においてすら個人が特定されることがなくなります。

現在、シックハウス症候群の研究がその発端にあり、まだ個人情報の段階で対処しなければならない状況にあります。こうした手法は、今では当然のことのように考えられている、「塩分の取りすぎは血圧を高くする。」「喫煙は肺癌となる危険性を増す。」といった医学の医常識を導き出すことに役立ってきました。この様な理由で協力いただく方の個人データを扱わざるを得ないことを御理解いただきたいと思います。しかしながら、研究班としては協力された方に不利となることが一切無いように細心の注意を払い調査研究をすすめることと致します。

同意書の性格上の理由からご署名が必要ですが、一般検査データ、血液検体などのサンプルや生活環境調査票には整理番号のみを付して用いますので、研究者段階では、個人が特定されることは絶対にありません。個人名などが照合可能な資料は外来カルテと同意書のみとなりますが、カルテは大学附属病院が、また同意書と協力者名簿は外来担当者が、それぞれ検査データや生活習慣や住居環境などのデータなどの研究結果と別個に厳重に管理いたします。

## 7. 研究への協力が同意されない場合でも不利益を受けないこと

この研究への協力、すなわち血液検体などのサンプルや生活環境調査票等の提供は全くのあなたの自由です。たとえ、この研究への協力を断られても外来担当者は今後の医療に最善を尽くします。

## 8. 調査への協力の撤回について

この研究への協力の同意はいつでも撤回できます。別紙の「検体の使用・保存の中止請求書」にて外来担当者にお申し出下さい。その際にも、外来担当者は今後の医療に最善を尽くします。ただし、調査研究の結果が既に公表されている場合は、研究結果の廃棄ができないことがありますので、ご了承下さい。

## 9. 解析結果の公表

本研究による成果は、学会発表あるいは論文として公表される場合もあります。公表することによって初めて、多くの人々に役立つ資料とすることが出来ます。本研究によって解明された成果が社会に還元されることにより、あなたは研究に協力された一員として、次世代の人々のために生活環境の改善に向けて貢献されることとなります。

## 10. 研究に協力される方の人権に関すること

この研究への協力、すなわち血液検体などのサンプルや生活環境調査票等の提供は全くのあなたの自発的なものですから、ご協力者の方の意志を十分に尊重して研究を行います。この研究について説明を求めたいときは外来担当者までお申し出下さい。この研究の成果は学会や学術雑誌などで公表される事がありますが、ご協力された方のプライバシーは最大限守られ、個人名などが公表される事は一切ありません。外来担当者は、個人の氏名や全ての検査の結果を知りうる立場にありますが、個人名や検査結果が外部に漏れることはありません。また、DNAなどはこの研究の目的以外に用いられることは一切ありません。提供いただいたDNAなどサンプルに余りがある場合は保存されますが、この研究の終了後に、当研究に直接関わらない第三者の立ち会いのもとにすべて廃棄されます。

## 11. その他

この研究から知的財産権が生じた場合、その権利は協力者に属しませんことをご理解下さい。

## 12. 協力事項に関する問い合わせ先

研究代表者

旭川医科大学医学部健康科学講座 吉田 貴彦

連絡先 TEL/FAX 0166-68-2402/2409

外来担当者

旭川医科大学医学部産婦人科学講座 小島 貴志

連絡先 TEL/FAX 0166-68-2562/2569

旭川医科大学医学部第三内科学講座 鳥本 悦宏

連絡先 TEL/FAX 0166-68-2462/2469

様

年 月 日

説明者

医師

印 (自署または記名・押印)

## 検査内容についての語句等の説明

「シックハウス症候群病態解明調査研究へのご協力のお願い」中の 5. 検査内容 で使われております語句について、以下に補足的に説明をいたしましたのでご参考にして下さい。さらにご質問がありましたら、外来の担当医にお尋ね下さい。

### 末梢血:

ヒトの血液のうち腕や足の四肢の静脈から採取した場合の血液を末梢血といいます。通常では肘の内側から採取する事が多いです。それは肘の内側には皮膚に近い浅いところに比較的太い静脈がある事と、その部分の皮膚には痛みを感じず神経が少ないために採血用の針を刺した時の苦痛が小さくてすむからです。肘静脈からの採血が困難な場合には、手の甲などから行う場合もあります。

### リンパ球の種類解析:

ヒトの血液の血球成分は、赤血球、白血球と血小板に分けられますが、その白血球はさらに顆粒球とリンパ球に分けられます。リンパ球は身体に侵入する病原体などを排除する機能である免疫能を調節する役割を担ったり、抗体を産生する細胞に分化したり、直接に病原体や身体に不利益な自己細胞(腫瘍細胞など)を攻撃したりします。リンパ球のうち、Tc(細胞傷害性T細胞)やNK(ナチュラル・キラー細胞)は病原体などの攻撃の役割、B細胞は分化して抗体を産生する細胞となり、Th(ヘルパーT細胞)はそうした応答を促進的に調整し、Ts(サブプレッサーT細胞)は抑制的に調整する役割を持ちます。それらの細胞の数を測定すると免疫機能の働きのバランスや強さを知る事が出来ます。

### 免疫グロブリン:

身体に侵入した病原体を排除する免疫機構には免疫細胞が直接に病原体を攻撃するタイプと体液に溶けた成分が働くタイプがあります。そのうち体液に溶けた成分が働くタイプの免疫機構の主役となるのが免疫グロブリンです。免疫グロブリンは蛋白質なので蛋白質の分類上の名前であるグロブリンと呼ばれますが、病原体などの外来異物の形状(抗原)に「鍵と鍵穴」との関係で結合して、その力を失わせる働きを持つので(免疫)抗体とも呼ばれます。

### サイトカイン・増殖因子:

私たちの身体を構成する組織や細胞同士がそれぞれの増殖や分化、活性の調節に関わりあう事によって身体全体の機能が統合されて、私たちは一つの個体として生きていくことが出来ます。それら細胞が作り出す増殖や分化、活性の調節にかかわる成分は主に蛋白質で体液に溶けて他の細胞や組織に達して作用します。こうした成分をサイトカインあるいは増殖因子と呼びます。

### **mRNA:**

生体を構成する成分の設計図である DNA から写し取られて、細胞の中で目的の物質(成分)を作る働きを担うものを mRNA といいます。個人の血液細胞などから得られた mRNA の量を調べると、その個人における、その mRNA から作られる物質の量が推測できます。目的の物質の量が極めて少なく測定が困難な場合などに、かわりに mRNA を測定する事が一般的に行われます。mRNA の測定対象となる成分はどの個人にも共通の物(ホルモンなどが物質として誰でも同じであるように)ですので、それらを調べても個人の特定にはつながりません。

### **酵素:**

生体内において行われる生化学反応の過程を、触媒として働いて反応を進める役割をもつ蛋白質を酵素といいます。酵素の働きは人によって微妙に差がある事が知られています。それは、DNA から mRNA に写し取る段階や mRNA から蛋白質が合成される段階に差がある場合と、設計図である DNA に微細な変異があるために起こる場合とがあります。

### **DNA:**

DNA は遺伝子の本体を成すもので、A(アデニン)、T(チミン)、C(シトシン)、G(グアニン)という4種類の塩基があり、それらがつながって鎖状になったものを遺伝子といいます。遺伝子が幾つもつながり折りたたまれて棒状になったものが染色体です。

### **遺伝子:**

生体の構成成分の設計図であり、その生物の特性(体質など)を子孫に伝える役割を担う物を遺伝子といいます。遺伝子には生物として生きるために必要な成分を作る誰にでも共通の部分と、顔立ちや性格などの個人ごとの違いを形作る個人に特異的な部分とがあります。人間の細胞には数万種類の遺伝子があり、それらを総称してゲノムと呼びます。身体を構成する全ての細胞に同じゲノムが一式ずつ含まれています。遺伝子解析の研究が問題となるのは、ある遺伝子が特定のタイプ(多型性パターン)であると特定の病気が起こる可能性が高い事が明確にされている場合で、遺伝子解析でそのタイプの遺伝子が見つかった人が将来その病気になる可能性が高い事が事前にわかることです。しかしこのような例は極少数の遺伝子にのみわかっているに過ぎません。今回の研究では、身体内で物質が代謝される時に関わる酵素や、免疫や血管の収縮・拡張の調整、サイトカイン・増殖因子などの遺伝子を解析するもので、これらの遺伝子のタイプが特定の病気に直結するものではありません。したがって、今回の遺伝子解析からは個人が将来にどのような病気になるかなどはわかりません。

## 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 \_\_\_\_\_