

**特 集**

「第16回日本臨床環境医学会総会受賞論文」奨励賞

**シックハウス症候群における *Neuropathy Target Esterase (NTE)*  
酵素活性と遺伝子多型**松坂恭成<sup>1)</sup> 青山美子<sup>2)</sup> 角田和彦<sup>3)</sup>  
坂部貢<sup>4,5)</sup> 石川哲<sup>5)</sup> 木村穰<sup>1)</sup>

- 1) 東海大学医学部基礎医学系
- 2) 青山内科小児科医院
- 3) かくたこども&アレルギークリニック
- 4) 北里大学薬学部公衆衛生学
- 5) 北里研究所病院臨床環境医学センター

**Enzymatic activity and polymorphisms of *Neuropathy Target Esterase (NTE)* in sick building syndrome**Yasunari Matsuzaka<sup>1)</sup> Yoshiko Aoyama<sup>2)</sup> Kazuhiko Kakuta<sup>3)</sup>  
Kou Sakabe<sup>4,5)</sup> Satoshi Ishikawa<sup>5)</sup> Minoru Kimura<sup>1)</sup>

- 1) Department of Basic Molecular Science and Molecular Medicine,  
Tokai University School of Medicine
- 2) Aoyama Internal Medicine Children's Hospital
- 3) Kakuta Children & Allergy Clinic
- 4) Department of Public Health and Molecular Toxicology,  
Kitasato University School of Pharmaceutical Sciences
- 5) Division of Environmental Medical Center, Kitasato Institute hospital,  
The Kitasato Institute

**要約**

シックハウス症候群は、ホルムアルデヒドやトルエン、キシレン、有機リン (OP) などの種々の空気汚染化学物質によってもたらされる慢性疾患である。神経障害標的エステラーゼ (*NTE*) は、もともと有機リンとの反応により同定され、これは遅延型神経毒性を示し OPIDN の標的分子であることが知られている。しかしながら、シックハウス症候群の病態に関する遺伝的要因については未だ明らかにされていない。

受付：平成19年11月19日 採用：平成19年12月10日

別刷請求宛先：松坂恭成

〒259-1193 伊勢原市下糟屋143 東海大学医学部基礎医学系

Received: November 19, 2007 Accepted: December 10, 2007

Reprint Requests to Yasunari Matsuzaka, Department of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193 Japan

そこで、我々は NTE 酵素活性を測定し、さらに、NTE 遺伝子領域における遺伝的多型をダイレクトシーケンシングによって調べたので、シックハウス症候群と NTE 酵素活性、さらに NTE 遺伝子多型との相関関係について報告する。

(臨床環境16:98~103, 2007)

## Abstract

Sick building syndrome (SBS) defined as chronic disorder is caused by various indoor environmental pollution, such as formaldehyde, toluene, xylene, and organophosphates (OP). *Neuropathy Target Esterase (NTE)* is a neuronal, membrane bound protein with serine esterase activity but with no significant homology to any known serine esterase or protease outside the active site. *NTE* was originally identified by its reactivity with specific OP, which cause delayed neuropathy and is the target molecule in the mechanism of organophosphate-induced delayed neuropathy (OPIDN). However, specific involvement of a genotype in the SBS pathogenesis has not yet been established.

We measured the *NTE* enzymatic activity and screened the *NTE* gene region for sequence variations by direct sequencing. Herein, we report on the association between *NTE* enzymatic activity and SBS, and genetic polymorphisms and SBS.

(Jpn J Clin Ecol 16:98~103, 2007)

---

《Key words》 *NTE*, SNPs, microsatellite, enzymatic activity, sick building syndrome

---

## I. はじめに

シックハウス症候群は、ホルムアルデヒドや有機リン (OP)、揮発性有機化合物 (TVOC)、トルエン、キシレンなどの空気汚染化学物質がこの疾患の発症に関する環境要因であると考えられている。しかしながら、同一環境下におけるシックハウス症候群の発症には個人差が見られる。現在ではこのような疾患の発症に関する個人差の一部を遺伝子型の違いによって説明することができる。

今回我々はシックハウス症候群の候補遺伝子として、*NTE* (*Neuropathy Target Esterase*) 遺伝子を選定した。ヒトにおいて、有機リンや化学物質の曝露によって生ずる神経性の疾患が湾岸戦争での兵士や慢性的に化学物質に曝露されたヒトにおいて報告されているが、これは有機リンが *NTE* と反応することによって引き起こされると考えられている<sup>1)</sup>。この *NTE* 遺伝子を遺伝的に欠損させた *Nte* 遺伝子欠損マウスについては、ホモ型欠損マウスにおいて胎児期に死亡する。一方、*Nte*+/-マウスでは野生型マウスに比べて多動であることが報告された<sup>2)</sup>。また、野生型マウスに *Nte* の阻害物質である EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) を少量加えた場合も

また同様に、多動性が著しく上昇することも報告された<sup>1)</sup>。このようなことから、*Nte* 活性の阻害が遺伝的にも化学的にも神経機能に影響を与えていることが明らかにされた。

そこで、我々はシックハウス症候群患者集団および健常者集団における *NTE* 酵素活性を測定し、両群間における違いを有意差検定によって解析した。さらに、*NTE* 遺伝子領域に存在する遺伝的多型の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度と *NTE* 酵素活性、さらにシックハウス症候群との関連性について解析を行った。

## II. 研究方法とアプローチ

東海大学および北里研究所・北里研究所病院の協力により、インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。本研究において、188名のシックハウス症候群患者および401名の一般健常者のゲノム DNA が解析に用いられ、マイクロサテライト繰り返し多型および SNPs のタイピングが行われた。これらのうち、患者42名および一般健常者52名については、*NTE* 酵素活性の測定が行われた。シックハウス症候群患者集団の平均年齢は、37.8±16.5歳、一

一般健常者集団が $37.3 \pm 12.1$ 歳である。また、シックハウス症候群患者集団では、70.9%が女性であり、一般健常者集団では、67.7%が女性である。採血時の採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10mlの採血を行った。このうち5.0mlを用いて、リンパ球の分離を行い、NTE 酵素活性を測定した。NTE 酵素活性は、Atkins らによって以前に報告された通りに行われた (Atkins and Glynn, 2000)<sup>3)</sup>。この NTE 活性は、NTE 以外のエステラーゼ活性を阻害する paraoxon での前処理を行った好中球と全てのエステラーゼ活性を阻害する paraoxon および mifafox 存在下での前処理を行った好中球における phenyl valerate の加水分解活性の差によって算出した。血液のうち残る0.4mlを用いて、カートリッジ (キアゲン社) による DNA の抽出を行い、得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判定を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。各試料はコード化をはかり、特定の個人情報とは簡単に連結できないように配慮し、個人情報管理は東海大学医学部個人情報管理部で管理されている。

PCR 増幅については、ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、増幅断片を2.0%アガロースゲル電気泳動等によって確認した。塩基配列の決定は、増幅 DNA 断片を Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてサイクルシーケンシングを行った。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。

上記の解析で得られた多型データについて、患者集団および健常者集団における酵素活性、対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を算出し、両集団間の各頻度についての有意差検定を  $\chi^2$  検定およびフィッシャーの Probability 検定により解析した。

なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指

針」に従い、北里研究所・北里研究所病院および東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るように十分配慮した。

### III. 結果

#### 1. NTE 酵素活性とシックハウス症候群

シックハウス症候群患者42名および一般健常者52名の末梢血からリンパ球を分離し、室温で8時間以内に NTE 酵素活性を測定した。その結果、シックハウス症候群患者集団において統計学的に有意に NTE 活性が上昇していた (図1、 $P < 0.0005$ )。

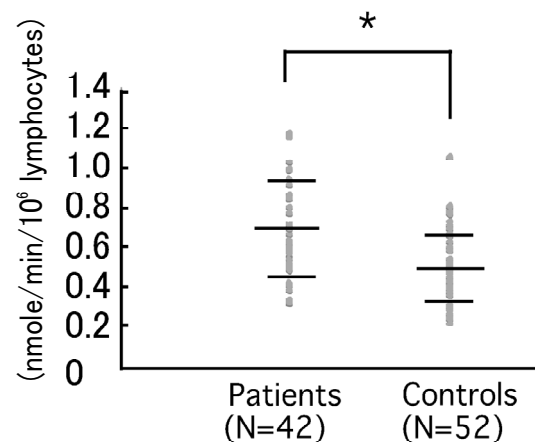


図1 シックハウス症候群患者および一般健常者の末梢血リンパ球における NTE 酵素活性。

\* :  $P < 0.0005$  (Mann-Whitney U-test)

#### 2. マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝学的相関解析

NTE 遺伝子の3'flanking 領域に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (ATT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団370人とシックハウス症候群患者180人におけるタイピングの結果、9から19回の繰り返し数を示す11個の対立遺伝子が存在していた。このうち17回繰り返しを示す対立遺伝子 (allele 9) につい

**表 1 シックハウス症候群集団と対照集団における NTE 遺伝子マイクロサテライト繰り返し多型の対立遺伝子出現頻度の比較**

Allele	PCR product		PATIENTS (n=180)	CONTROLS (n=370)	Odds ratio	$\chi^2$	P-value
	length	Repeat					
Allele 1	284	9	0.000	0.001	0.00	0.49	0.485
Allele 2	287	10	0.169	0.185	0.90	0.40	0.525
Allele 3	290	11	0.003	0.005	0.51	0.37	0.543
Allele 4	293	12	0.069	0.061	1.15	0.30	0.582
Allele 5	296	13	0.067	0.064	1.05	0.04	0.842
Allele 6	299	14	0.072	0.070	1.03	0.01	0.906
Allele 7	302	15	0.394	0.380	1.06	0.22	0.638
Allele 8	305	16	0.192	0.174	1.12	0.49	0.482
Allele 9	308	17	0.028	0.055	0.49	4.18	0.041*
Allele 10	311	18	0.006	0.003	2.06	0.54	0.461
Allele 11	314	19	0.000	0.001	0.00	0.49	0.485

\* ; P value is significant

て、患者集団において出現頻度が低く、対照集団との間に統計学に有意差があった(表1、 $P < 0.05$ )。

### 3. SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) を用いた遺伝学的相関解析

NTE 遺伝子はヒト19番染色体における約27.6 Kb のゲノム領域にわたり、現在までのところ106個の SNP の存在が確認されている。これらの SNP に関して遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が0.2以上のものを選別するために、106個の SNP のうち81個について、患者群10名、対照群10名の SNP のタイピングを行った。その結果、SNP81箇所中66箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認された66個の SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が0.2以上の SNP を66箇中59箇所を確認した。

これらの遺伝マーカーとしての有用性を確認された59個の SNP およびエクソン9における同義

置換を示すことが知られている SNP について、シックハウス症候群患者集団188名および健常者集団402名において出現頻度を比較した。その結果、NTE 遺伝子のエクソン-イントロン領域におけるイントロン21に位置する SNP (rs480208) において統計学的有意差を示す対立遺伝子が見出された(表2、 $P < 0.007$ )。また、この遺伝マーカーの遺伝子型頻度に関する有意差検定の結果、患者集団において遺伝子型 AA の出現頻度が対照群に比べて有意に低かった(表3、 $P < 0.007$ )。

### 4. NTE 酵素活性と遺伝子型

シックハウス症候群患者集団および健常者集団における NTE 酵素活性をイントロン21領域に位置する SNP (rs480208) の遺伝子型に従って、遺伝子型 AA 群および AG+GG 群に分類し両群間における NTE 酵素活性について有意差検定を行った。その結果、遺伝子型 AA 群において NTE 酵素活性が統計学的有意に低下していた(図2、 $P < 0.05$ )。

表2 シックハウス症候群集団と対照集団における NTE 遺伝子領域の SNP の対立遺伝子出現頻度の比較

No.	rs No.	Location	Major/Minor allele	Allele frequency		OR (95% CI)	P-value
				Patients (2n=378) †	Controls (2n=802) †		
1	rs560849	Promoter	T/c	0.523	0.539	0.94 (0.71-1.24)	0.655
2	rs540516	intron 1	C/t	0.589	0.631	0.84 (0.63-1.12)	0.229
3	rs604959	exon 2	A/c	0.582	0.630	0.82 (0.63-1.07)	0.137
4	rs541271	intron 6	G/a	0.565	0.612	0.82 (0.63-1.07)	0.151
5	rs526411	intron 6	C/t	0.568	0.608	0.85 (0.65-1.11)	0.229
6	rs654059	intron 6	T/c	0.500	0.503	0.99 (0.76-1.29)	0.926
7	rs522750	intron 6	G/a	0.479	0.524	0.84 (0.62-1.12)	0.234
8	rs488886	intron 6	C/t	0.569	0.629	0.78 (0.57-1.07)	0.122
9	rs491518	intron 6	C/a	0.500	0.525	0.90 (0.67-1.23)	0.524
10	rs591040	exon 9	C/t	0.972	0.983	0.61 (0.26-1.38)	0.233
11	rs492092	intron 12	C/g	0.440	0.439	1.00 (0.76-1.32)	0.992
12	rs620744	intron 14	C/t	0.525	0.560	0.87 (0.66-1.14)	0.313
13	rs586551	intron 16	C/t	0.572	0.623	0.81 (0.60-1.09)	0.167
14	rs577219	intron 19	G/t	0.430	0.379	0.81 (0.59-1.11)	0.186
15	NEW	intron 19	DEL/a	0.577	0.611	0.87 (0.63-1.19)	0.374
16	rs473899	intron 21	A/g	0.390	0.401	0.95 (0.71-1.29)	0.762
17	rs661825	intron 21	G/c	0.377	0.381	0.98 (0.72-1.34)	0.917
18	rs2303177	intron 21	G/a	0.181	0.202	0.87 (0.59-1.27)	0.474
19	rs661825	intron 21	C/g	0.377	0.381	0.98 (0.72-1.34)	0.917
20	rs496380	intron 21	A/g	0.377	0.381	0.98 (0.72-1.34)	0.917
21	rs557596	intron 21	T/c	0.385	0.379	0.98 (0.72-1.33)	0.876
22	rs2432110	intron 21	T/c	0.401	0.414	0.95 (0.65-1.38)	0.883
23	rs793864	intron 21	C/g	0.250	0.321	0.77 (0.51-1.16)	0.121
24	rs1645799	intron 21	G/a	0.553	0.553	0.95 (0.66-1.38)	0.994
25	NEW	intron 21	C/g	0.507	0.563	0.80 (0.53-1.20)	0.283
26	NEW	intron 21	T/a	0.507	0.563	0.80 (0.53-1.20)	0.283
27	NEW	intron 21	C/g	0.507	0.576	0.76 (0.51-1.14)	0.183
28	NEW	intron 21	G/t	0.507	0.563	0.80 (0.53-1.20)	0.283
29	rs688348	intron 21	A/c	0.522	0.576	0.81 (0.54-1.21)	0.295
30	rs480208	intron 21	A/g	0.540	0.623	0.71 (0.55-0.91)	0.006*
31	rs581698	intron 21	G/c	0.525	0.572	0.78 (0.60-1.01)	0.170
32	rs582611	intron 21	A/g	0.571	0.572	1.00 (0.68-1.48)	0.994
33	rs534758	intron 21	G/t	0.253	0.264	1.16 (0.80-1.68)	0.775
34	rs583984	intron 21	T/c	0.523	0.554	0.97 (0.69-1.35)	0.493
35	rs50874	intron 21	A/g	0.500	0.539	0.94 (0.67-1.33)	0.396
36	rs534464	intron 23	G/c	0.283	0.313	0.87 (0.64-1.17)	0.359
37	rs563266	intron 23	T/c	0.590	0.610	0.92 (0.70-1.22)	0.558
38	rs597582	intron 23	C/t	0.277	0.302	0.88 (0.65-1.20)	0.429
39	rs598023	intron 23	A/g	0.282	0.302	0.91 (0.67-1.23)	0.532
40	rs598028	intron 23	C/g	0.280	0.303	0.89 (0.66-1.21)	0.463
41	rs599328	intron 24	C/g	0.689	0.719	0.86 (0.61-1.23)	0.417
42	rs599330	intron 24	C/t	0.681	0.694	0.94 (0.66-1.33)	0.728
43	rs524530	intron 24	A/g	0.718	0.721	0.99 (0.69-1.41)	0.950
44	rs539887	intron 24	A/c	0.714	0.718	0.98 (0.69-0.98)	0.914
45	rs563826	intron 25	A/g	0.711	0.713	0.99 (0.68-1.44)	0.951
46	rs2446176	intron 29	G/a	0.337	0.341	0.98 (0.71-1.35)	0.905
47	rs1645800	intron 30	G/a	0.380	0.418	0.85 (0.62-1.16)	0.314
48	rs503336	intron 30	A/g	0.375	0.418	0.84 (0.61-1.14)	0.256
49	rs518321	intron 30	T/c	0.629	0.587	0.84 (0.62-1.14)	0.268
50	rs504149	intron 30	T/G/c	0.393	0.430	0.86 (0.63-1.17)	0.333
51	rs504934	intron 30	C/t	0.382	0.420	0.85 (0.63-1.16)	0.314
52	rs7245592	intron 30	G/a	0.421	0.414	0.97 (0.65-1.46)	0.890
53	rs521032	intron 30	T/c	0.577	0.602	0.90 (0.60-1.35)	0.623
54	rs506104	intron 30	C/a	0.592	0.609	0.93 (0.62-1.40)	0.732
55	rs538850	intron 31	C/t	0.375	0.410	0.87 (0.62-1.20)	0.388
56	rs538852	intron 31	G/a	0.717	0.746	0.86 (0.60-1.23)	0.412
57	rs577029	intron 31	T/c	0.379	0.417	0.86 (0.62-1.19)	0.350
58	rs577145	intron 31	T/c	0.379	0.413	0.87 (0.62-1.21)	0.396
59	rs541600	intron 31	C/t	0.379	0.412	0.87 (0.63-1.21)	0.409
60	rs89621	intron 31	C/t	0.379	0.412	0.87 (0.63-1.21)	0.409

\* ; P value is significant

† ; total alleles



表3 シックハウス症候群集団と対照集団における NTE 遺伝子型出現頻度の比較

rs No.	Location	Genotype	Genotype frequency		Odds ratio (90% CI)	$\chi^2$	P-value
			Patients (n=188)	Controls (n=401)			
rs480208	intron 21	A/A	0.314	0.434	0.60 (0.41–0.86)	7.72	0.006*
		A/G	0.452	0.379	1.35 (0.95–1.92)	2.84	0.092
		G/G	0.234	0.187	1.33 (0.87–2.02)	1.75	0.185

\* ; P value is significant

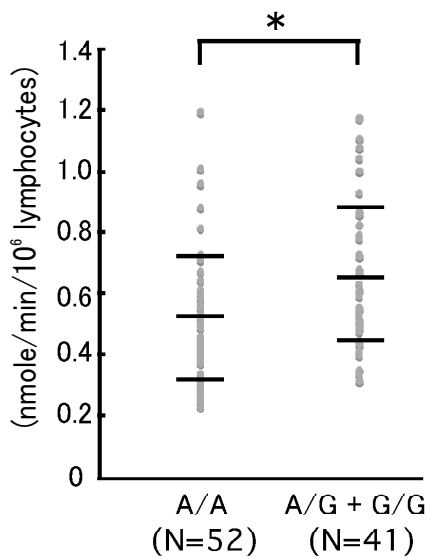


図2 SNP (rs480208) の遺伝子型と NTE 酵素活性。

\* : P<0.05 (Mann-Whitney U-test)

#### IV. まとめ

本研究ではシックハウス症候群の遺伝的要因を解析するために、本疾患の候補遺伝子として NTE 遺伝子を選定し、NTE 酵素活性をシックハウス症候群患者集団および健常者集団において測定した。その結果、NTE 酵素活性は、シックハウス症候群患者集団において有意にその活性が上昇していた。また、NTE 遺伝子のイントロン21に存在する SNP の遺伝子型 AA がシックハウス症候群患者集団において有意にその頻度が低かった。さらに、遺伝子型 AA の NTE 酵素活性は他の遺伝子型 AG+GG と比べて統計学的に有意な低下を示した。このことより、遺伝子型 AA を

有することと NTE 酵素活性の低下との関連が予想され、健常者集団と比べてシックハウス症候群患者集団における遺伝子型 AA の頻度低下とともに、シックハウス症候群患者集団における NTE 酵素活性の上昇が観察されたと考えられる。一般に NTE タンパク質は、生体内において有機リンと結合し、エステルを生成する。このエステルは炭化水素基を解離しエステラーゼ活性を有する「Aged Esterase」に変化し、次なるエステル化反応を行うモデルが提唱されているが、ここで生成された「Aged Esterase」は細胞毒性を示すと考えられている<sup>2)</sup>。シックハウス症候群患者においては、NTE 酵素活性の上昇によりこの有機リン代謝経路の中間生成物である有毒な「Aged Esterase」の生成量が健常者に比べて増加することによって、慢性的な神経毒性が引き起こされている可能性があるのではないかと考えられる。

#### 文献

- 1) Glynn P: NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? Bioessays 25: 742-745, 2003
- 2) Winrow CJ, et al: Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Nature genetics 33: 477-485, 2003
- 3) Atkins J, Glynn P: Membrane association of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. J Biol Chem 275: 24477-24483, 2000