

健康障害が懸念される産業化学物質の毒性評価に関する研究

Study on the Toxicities of Occupational Chemicals with Potential Health Damages

王 瑞生^{*1}, 須田 恵^{*1}, 大谷勝己^{*2}, 翁 祖銓^{*1 *5}, 北條理恵子^{*1}, 柳場由絵^{*1}, 李 卿^{*3}, 那須民江^{*4}

^{*1} 健康障害予防研究グループ, ^{*2} 有害性評価研究グループ, ^{*3} 日本医科大学衛生学公衆衛生学教室, ^{*4} 名古屋大学医学部環境労働衛生学教室, ^{*5} 現在所属: 米国国立毒性研究センター (NCTR/FDA) システムトキシコロジー研究部

WANG Rui-Sheng^{*1}, SUDA Megumi^{*1}, OHTANI Katsumi^{*2}, WENG Zuquan^{*1 *5}, HOJO Rieko^{*1}, YANAGIBA Yukie^{*1}, LI Qing^{*3} and NASU Tamie^{*4}

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はバイオ燃料としてH22年から本格的に導入された。ETBEに対する先行の毒性研究では、マウスやラットの種々の組織や機能に対する毒性が弱いことが示唆された。しかし、ETBEの生体影響についての研究は必ずしも十分ではない。本プロジェクト研究では、今まで検討されていない生体の遺伝子損傷、免疫系異常等を中心に ETBE 吸入ばく露後の健康に及ぼす影響について検討し、さらに生体側の種々の因子、例えば、性差、加齢、代謝酵素の欠損などによる ETBE の健康障害に対する修飾作用についても検討した。9 または 13 週間 ETBE ばく露後、野生型マウスの 5,000 ppm 群において肝臓小葉中心性細胞肥大や肝細胞 DNA 損傷などが検出されたが、アルデヒド脱水素酵素 ALDH2 欠損マウス (KO) では 200 ppm の低い濃度においても DNA 損傷などが認められた。しかし、雄性マウスで観察された上記の影響は雌マウスでは 5,000 ppm の高濃度群しか認められなかった。老齢マウスでは DNA 損傷のベースラインが高かったが、ETBE ばく露による損傷度の上昇は若齢マウスと殆ど同じであった。ETBE の体内代謝に関与しているもう一つの酵素 CYP2E1 の欠損マウスでは、ETBE の影響は野生型マウスと比べて特に違いはなかった。遺伝子損傷について更に検討した結果、ETBE ばく露後、生体内の DNA 酸化損傷度の上昇、8-OHdG 数の増加などが観察され、少なくとも酸化ストレスが ETBE の生体影響に寄与していることが示唆された。ETBE の体内代謝についても検討し、その結果、ALDH2 欠損マウスでは ETBE ばく露後体内にアセトアルデヒドなどの代謝物質が滞留したことが判明し、ETBE による遺伝子損傷などに中間代謝物アルデヒド類の代謝低下が関わっていることが示唆された。ETBE ばく露による生体影響として、膵臓における T 細胞の選択的減少、雄性マウスにおける精子運動能の低下、行動への影響なども観察され、性差または ALDH2 欠損による影響も認められた。このように野生型マウスでは最大無毒性用量は 500 ppm であるが、ALDH2 欠損個体では 50 ppm と推定でき、ETBE の毒性に対する感受性が高くなることが示唆された。また、ETBE ばく露による種々の損傷の中に性差が明確に認められた。これらの結果から ETBE の有害性評価や作業場のばく露限界値設定の根拠となる有益な情報を提供できるものと考えられる。

^{*1} Mechanism of Health Effects Research Group, and ^{*2} Hazard Evaluation and Epidemiology Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health, Kawasaki; ^{*3} Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School, Tokyo; ^{*4} Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ^{*5} present address: Division of Systems Biology, National Center for Toxicological Research (NCTR), Jefferson, USA.

1 はじめに

職場で使用されている化学物質には、生体影響が必ずしも明確になっていないものも多い。また、毎年新たな化学物質が産業現場に入ってくる。化学物質の毒性は物質の物理化学特性に大きく関係しているが、一方で、性

差，加齢，体質等の人体の生理機能によっても左右される。現在ではこのような生体機能の違いを考慮した毒性評価は検討がなされていない。しかしながら，近年，労働現場の状況は急速に変わりつつある。労働者においてその数や職域の拡大に伴い，女性も，男性と同様に産業有害因子にばく露される機会が増えてきている。女性は，生理学・生化学的に男性と異なっている機能も多くある。また，労働現場でのもう一つの変化は高年齢労働者の割合が高くなってきたことである。加齢に伴い，種々の生体機能の変化も見られ，化学物質に対する感受性が変化することが推測される。産業有害因子などの外部因子に対して男女や違年齢層がそれぞれ示す反応は違うだろうと思われているが，不明な部分は依然として多い。労働者の多様性を考慮する際，もう一つ重要な因子は体質の個体差といえる。近年，ヒトゲノム研究や関連する分子生物・医学研究の結果，種々の遺伝子塩基配列の多型や遺伝子発現の違いなどが報告され，外部因子に対する感受性の個体差との関連が明らかになりつつある。今後，

組織や機能に対する毒性が弱いことが示唆された。高濃度 ETBE の慢性ばく露後，動物肝臓の重量増加や肝細胞肥大が観察されたが，遺伝毒性，生殖発生毒性などはなく，それ以外の影響についての報告はなかった。これらの動物実験の結果から，ETBE の最大無毒性量

(NOAEL) は 500 ppm と推定された^{1,2)}。平成 22 年には「ETBE 発がん性試験事業報告書」の概要も公表されて，ヒトへの外挿が否定できない発がんプロモーション作用はあるものの，発がん性は弱いと報告された³⁾。日本のほか，欧州の国でも使用されているが，オーストラリアや米国のいくつかの州では ETBE のヒトの健康影響への懸念からその使用は禁止されている。

一方では，体内で ETBE からアセトアルデヒドなどのアルデヒド類が代謝される(図 1)。これらの中間代謝物は毒性を示す可能性があり，特にアセトアルデヒドは動物試験では発がん性を有することが分かっており，国際がん研究機構(IARC)ではグループ 2B(おそらくヒトに対する発がん性がある物質)に分類されている⁴⁾。ま

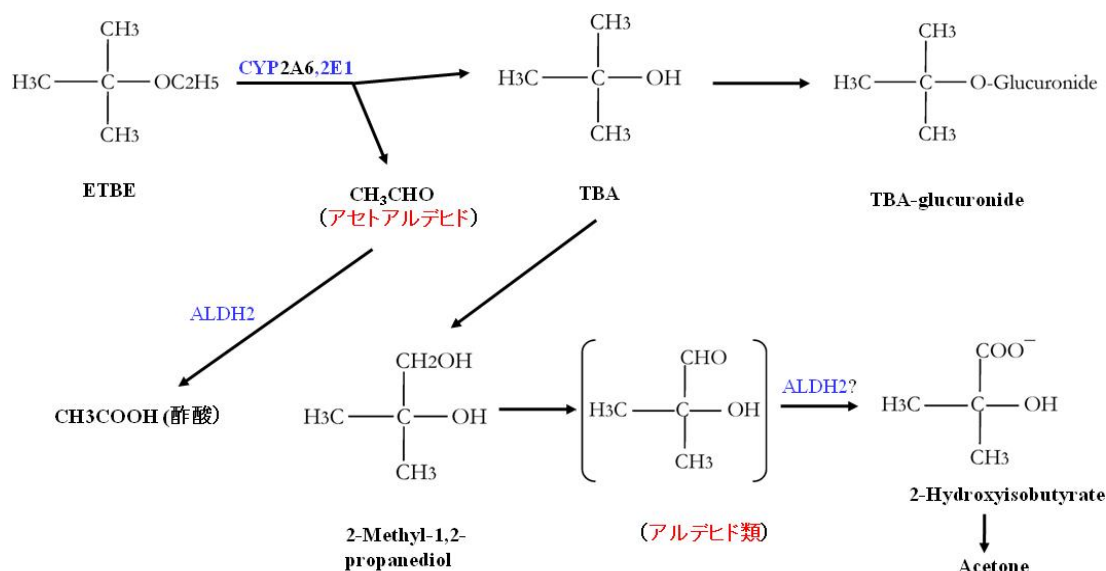


図1 ETBEの代謝経路。

アセトアルデヒドなどのアルデヒド類物質が生成されるが，それを代謝する酵素である ALDH2 が欠損する場合，代謝および毒性発現はどう変わるか，興味深い。

た，産業化学物質の有害性やリスク評価の時には，種々の生体因子を考慮に入れ行なう必要がある。

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はバイオ燃料としてH22年から全国で本格的に導入され，車両の燃料に使用されている。これは二酸化炭素排出量の削減や石油依存度の低減に貢献できる。ETBEはバイオエタノールと石油の副製品であるイソブテンから合成された物質で，日本は輸入だけではなく，国内の工場でも生産されている。このように今後 ETBE の使用と生産の増加とともに，そのばく露者数も増えると思われる。ETBE に対する先行の毒性研究では，マウスやラットの種々の

た，東アジア人の約 4 割はアルデヒドを解毒する酵素(アルデヒド脱水素酵素 2, ALDH2)の活性が著しく低い⁵⁾。このような個体では ETBE から生成されるアセトアルデヒドなどのアルデヒド類は代謝されにくく，体内に比較的高濃度で滞留する可能性があり，そのため種々の生体損傷を誘発する可能性が高い。また，ETBE の代謝に加えて，ばく露時の吸収や排泄，損傷修復に対する性ホルモンや加齢などの影響も有り得るので，最終的にはこれらの生体因子の修飾作用によって ETBE ばく露の健康影響は変わってくることとなる。

ETBE ばく露後、報告された生体影響以外に影響がないか、特に重大な関心である遺伝子損傷、免疫系損傷などに問題がないか、性差、加齢、体質による差がないか、生体影響の発生機構は何か、などを解明するため、われわれは一連の実験を行って有用な情報を得た。

2 課題へのアプローチ

(1) ETBE の有害性評価.

ETBE が有害性を示すばく露濃度について、先行の研究を参考にして比較的到高濃度のばく露実験を行い、その結果を踏まえてさらに比較的に低い濃度領域で検討した。有害性の評価指標として、一般毒性に加えて、早期遺伝子損傷の指標であるコメットアッセイ法による DNA 損傷度の測定、遺伝子損傷蓄積の指標である外周血小核頻度の解析、免疫細胞への影響解析、雄性動物の生殖系への影響、神経行動学的解析など、今まで十分に検討されていないエンドポイントを中心に実施した。

(2) ALDH2 欠損マウスを用いての検討.

ETBE の代謝経路およびアルデヒド類の有害性情報から ALDH2 酵素は ETBE の毒性発現に一つのカギになっていると予想される。そのため、ヒトの ALDH2 欠損モデルとして、この酵素の遺伝子欠損マウス（ホモおよびヘテロ欠損）を用いて、ETBE ばく露による生体影響の評価を行った。ここから得るエビデンスに基づいて、この場合の NOAEL を推測し、野生型個体との比較を行った。

(3) 性差、加齢、代謝酵素 CYP 欠損などによる ETBE 生体影響への修飾作用の検討.

ETBE ばく露実験時には、雄性と雌性マウス、若齢と老齢マウス、CYP2e1 野生型とその遺伝子ノックアウトマウスを使用することにより、これらの個体因子による ETBE の毒性発現への修飾作用を検討した。

(4) ETBE 代謝についての検討.

ETBE の吸入ばく露を行い、ばく露期間中およびばく露終了後、ETBE およびその数種類の代謝物の血中や組織における濃度の経時変化を解析した。またこの変化に対応する性差や代謝酵素欠損との関連から ETBE の代謝と生体影響発生メカニズムを検討し、有用なばく露および生体影響のバイオマーカーの選定を試みた。

3 研究成果

個々の実験の詳細な結果については、それぞれの報告文を参照されたい。ここで本プロジェクト研究から得られた主な成果を述べる。

ETBE 吸入ばく露実験の結果、肝細胞の肥大、肝細胞および白血球の DNA 損傷、染色体の異常（小核）、脾臓における T 細胞の選択的減少、精子の運動能低下、運動機能の抑制などが認められた。肝障害や DNA 損傷などの結果から推測した ETBE の NOAEL は 500 ppm であ

り、文献報告と一致している^{1,2)}。しかし、ALDH2 欠損マウスの場合、200 ppm の低濃度においても DNA 損傷度の上昇があったため、このような個体では NOAEL は 50 ppm となった。

雄性と雌性マウスの間、ETBE ばく露による生体影響は明らかな性差が存在した。雄の野生型マウスでは肝障害や DNA 損傷は 5,000 ppm において検出され、ALDH2 欠損マウスでは 200 ppm においても検出されたが、雌マウスは野生型では検出されず、欠損マウスでも最高濃度でしか認められなかった。この性差は 10 倍以上があることが判明した。

老齢マウスにおいては DNA 損傷などのバックグラウンド値は若齢より高かったが、ETBE ばく露後、損傷の上昇分は両週齢マウスの間に有意な差がなく、加齢による ETBE の生体影響に対する修飾作用がないことが示唆された。

アルデヒドの代謝酵素である ALDH2 の欠損によって ETBE の生体影響は多くの指標に大きな変化が現れるように、ETBE の毒性に対する感受性の増大が判明した。しかし、ETBE 代謝に関与している CYP2E1 の欠損は ETBE の毒性発現に大きな影響を与えなかった。この酵素は ETBE の最初の分解に触媒しているが、CYP2A6 も関与しているので、作用が互いに代替されているのかもしれない。

ETBE の急性吸入ばく露の期間中およびその後、血液や組織中におけるアセトアルデヒド、ターシャリブチルアルコールなどの代謝物質濃度は ALDH2 欠損マウスでは野生型より高く、また雌雄の間にも差があることが判明した。この代謝過程の差は ETBE の生体影響に現れた差異の原因の一部と思われる。

4 おわりに

ETBE は基本的には毒性の弱い物質であるが、その生体影響はよく検討されていた肝臓以外の他の組織や臓器でも検出された。特に早期の遺伝損傷の指標を用いての解析では多くの組織に影響が認められた。ETBE の生体影響はその吸入ばく露時の濃度と関係していることは言うまでもないが、生体側の種々の因子（性別、加齢、代謝酵素の遺伝的差異など）によって大きく影響されることもあり、その差の程度は 10 倍以上にも達した。この差異は体内での代謝と密接に関係している。

以上の結果は、ETBE の有害性を評価する時に、早期・軽微な生体影響を検出できる指標の使用が重要であること、また生体側の因子を考慮に入れる必要があることを示唆した。これらのデータを考慮して作業環境などにおける ETBE のばく露限界設定を検討することで、労働衛生管理がより適切なものとなるのではないかとと思われる。

参 考 文 献

- 1) 財団法人 石油産業活性化センター. 平成 19 年度非化石エネルギー導入促進対策調査等 (バイオマス由来燃料導入調査研究) に関する報告書. 財団法人石油産業活性化センター ; 2008.
- 2) McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review. *Crit. Rev. Toxicol.* 2007; 37: 287-312.
- 3) 財団法人 石油産業活性化センター. 平成 21 年度 E T B E 発がん性試験事業報告書 概要. 財団法人石油産業活性化センター ; 2011.
http://www.peci.or.jp/english/news/pdf/H220513_etbe02.pdf
- 4) International Agency for Research on Cancer (1999). Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 71.
- 5) Hamajima N, Takezaki T, Tajima K. Allele frequencies of 25 polymorphisms pertaining to cancer risk for Japanese, Koreans and Chinese. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2002; 3: 197-206.

研究業績リスト

課題名:健康障害が懸念される産業化学物質の毒性評価に関する研究

平成24年度(2012年)		
1	原著論文	Zuquan Weng, Megumi Suda, Katsumi Ohtani, Nan Mei, Toshihiro Kawamoto, Tamie Nakajima, Rui-Sheng Wang (2012) Differential genotoxic effects of subchronic exposure to ethyl tertiary butyl ether in the livers of Aldh2 knockout and wild-type mice. Arch Toxicol 86:675-682
2	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Katsumi Ohtani, Zuquan Weng, Yukie Yanagiba and Megumi Suda (2012) Enhanced Reproductive Effects of Exposure to ETBE in Aldh2 Knockout Mice. The 48th Congress of the European Societies of Toxicology, Toxicology Letters 211S, S183.
3	国内外の研究集会発表	須田 恵, 大谷勝己, 翁 祖銓, 柳場由絵, 王 瑞生(2010)ETBE亜慢性曝露後のマウス肝におけるETBE代謝の雌雄差. 第85回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 54 (Suppl.), 394.
4	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 柳場由絵(2012)ETBEの低濃度ばく露後のマウス肝臓における遺伝損傷について. 第85回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 54 (Suppl.), 464.
5	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 大谷勝己, 柳場由絵, 須田 恵(2012)ターシャリーブチルアルコール投与後のマウスにおける毒性発現. 第59回日本実験動物学会総会, 講演要旨集, p283.
平成23年度(2011年)		
1	原著論文	Zuquan Weng, Megumi Suda, Katsumi Ohtani, Nan Mei, Toshihiro Kawamoto, Tamie Nakajima, Rui-Sheng Wang (2011) Aldh2 knockout mice were sensitive to DNA damage in leukocyte due to ethyl tertiary butyl ether exposure. Ind Health 49 (3) 396-399.
2	原著論文	Qing Li, Maiko Kobayashi, Hirofumi Inagaki, Yukiyo Hirata, Kimiko Hirata, Takako Shimizu, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Toshihiro Kawamoto, Tamie Nakajima and Tomoyuki Kawada (2011) Effects of subchronic inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on splenocytes in mice. Int J Immunopathol Pharmacol 24(4) 837-47.
3	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Katsumi Ohtani, Zuquan Weng, Megumi Suda (2011) Reproductive effects of exposure to ethyl tertiary butyl ether as modified by aging in male Aldh2 knockout mice. The 47th Congress of EuroTox Abstracts, Toxicology Letters vol.205S, p S255.
4	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Katsumi Ohtani, Zuquan Weng, and Megumi Suda (2012) Effects of Exposure to Ethyl Tertiary Butyl Ether at Low Concentrations in Aldh2 Knockout Mice. The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology, p59.
5	国内外の研究集会発表	須田 恵, 大谷勝己, 翁 祖銓, 柳場由絵, 王 瑞生(2011)ETBE慢性曝露後のマウス肝におけるアセトアルデヒドの代謝およびAldh2遺伝子多型の影響. 第84回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌53(Suppl.), p400.
6	国内外の研究集会発表	北條理恵子, 久保田久代, 須田 恵, 柳場由絵, 王 瑞生(2011)ETBE慢性曝露によるマウスの行動変化および脳内c-fos活性変化について. 第84回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌, 53(Suppl.), p12.
7	国内外の研究集会発表	翁 祖銓, 柳場由絵, 須田 恵, 大谷勝己, 王 瑞生(2011)Cyp2e1ノックアウトマウスにおけるETBE吸入曝露の白血球遺伝毒性について. 第84回日本産業衛生学会, 東京, 産業衛生学雑誌53(Suppl.), p402.

8	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 柳場由絵, 大谷勝己, 須田 恵, 翁祖銓(2011)Cyp2e1ノックアウトマウスにおけるETBE吸入曝露の生殖毒性について. 第84回日本産業衛生学会講演集, 産業衛生学雑誌, 53(Suppl.), p401.
9	国内外の研究集会発表	大谷勝己, 須田 恵, 翁 祖銓, 柳場由絵, 王 瑞生(2011)ETBE吸入曝露後の雄マウス生殖系の障害および加齢の影響について. 第84回日本産業衛生学会講演集, 産業衛生学雑誌, 53(Suppl.), p400.
10	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 大谷勝己, 須田 恵, 翁 祖銓(2011)マウスにおけるETBEばく露の生殖系への影響および加齢の修飾作用. 第38回日本トキシコロジー学会, The journal of Toxicological Sciences, vol. 36 supplement, p S152.
11	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 須田 恵, 翁 祖銓, 大谷勝己, 柳場由絵(2011)ETBEばく露によるマウスの遺伝損傷について. 第39回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 発表講演集.
12	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 大谷勝己, 須田 恵, 翁 祖銓(2011)ETBEの低濃度ばく露によるマウスの生殖系への影響について. フォーラム2011 衛生薬学環境トキシコロジー, 発表講演集, p294.
13	国内外の研究集会発表	翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 王 瑞生(2011)ETBEばく露によるマウスの白血球における遺伝および加齢とALDH2遺伝子改変の影響について. フォーラム2011 衛生薬学環境トキシコロジー, 発表講演集, p170.
平成22年度(2010年)		
1	国内外の研究集会発表	Megumi Suda, Zuquan Weng, Katsumi Ohtani, Rui-Sheng Wang (2010) Toxicokinetics of ethyl tertiary butyl ether metabolites in blood and tissues in Aldh2 knockout and wild type mice. The XII International Congress of Toxicology (IUTOX), Toxicol Lett 196S, S107.
2	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Katsumi Ohtani, Megumi Suda, Zuquan Weng (2010) Toxic effects of ethyl tertiary butyl ether exposure as modified by Aldh2 genotypes in mice. The XII International Congress of Toxicology (IUTOX), Toxicol Lett 196S, S75.
3	国内外の研究集会発表	Zuquan Weng, Megumi Suda, Katsumi Ohtani, Rui-Sheng Wang (2010) Difference in the genotoxicity of chronic inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether in sperm between Aldh2 wild type and Aldh2 knockout mice. The XII International Congress of Toxicology (IUTOX), Toxicol Lett 196S, S72.
4	国内外の研究集会発表	Rieko Hojo, Hisayo Kubota, Megumi Suda, Yukie Yanagiba, Rui-Sheng Wang (2011) Effects of 12-week-inhalation exposure to Ethyl tert-butyl ether (ETBE) on behavior and brain in C57BL/6J and Aldh2(-/-) mice. The 50th annual meeting of the Society of Toxicology, p320.
5	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Yukie Yanagiba, Katsumi Ohtani, Megumi Suda, Zuquan Weng, Tamie Nakajima (2011) Toxic effects of ethyl tertiary butyl ether exposure in CYP2E1 knockout mice. The 50th annual meeting of the Society of Toxicology, p110.
6	国内外の研究集会発表	須田 恵, 大谷勝己, 翁 祖銓, 王 瑞生(2010)ALDH2遺伝子ノックアウトマウスにおけるETBE血液および組織中代謝物の経時変動. 第83回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 52 (Suppl.), 616.
7	国内外の研究集会発表	李 卿, 稲垣弘文, 平田幸代, 川田智之, 須田 恵, 王 瑞生(2010)13週間ETBE慢性吸入ばく露によるマウス脾臓細胞への影響. 第83回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 52 (Suppl.), 477.

8	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 大谷勝己, 須田 恵, 翁 祖銓(2010)13週間ETBE慢性吸入ばく露によるマウス生殖系への影響. 第83回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 52(Suppl.), 615.
9	国内外の研究集会発表	翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 王 瑞生(2010)13週間ETBE慢性吸入ばく露によるマウスの白血球DNA損傷について. 第83回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 52(Suppl.), 615.
10	国内外の研究集会発表	翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 王 瑞生(2010)ETBE慢性吸入ばく露によるALDH2遺伝子ノックアウトマウスの肝臓DNA損傷について. 第37回日本トキシコロジー学会, J Toxicol Sci v35(Suppl), S191.
11	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 大谷勝己, 須田 恵, 翁 祖銓(2010)ETBE慢性吸入ばく露によるALDH2遺伝子ノックアウトマウスの生殖系への影響について. 第37回日本トキシコロジー学会, J Toxicol Sci v35(Suppl), S225.
12	国内外の研究集会発表	北條理恵子, 久保田久代, 須田 恵, 柳場由絵, 王 瑞生(2010)ETBE慢性ばく露によるマウスの行動変化について. 第38回有機溶剤中毒研究会.
13	国内外の研究集会発表	王 瑞生, 翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 柳場由絵(2010)ETBE慢性ばく露によるマウス遺伝物質の損傷について. 第38回有機溶剤中毒研究会.
平成21年度(2009年)		
1	国内外の研究集会発表	須田 恵, 大谷勝己, 翁 祖銓, 王 瑞生(2009)遺伝子多型によるETBE代謝物の体内濃度への影響. 日本産業衛生学会第37回有機溶剤中毒研究会第42回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会, 抄録集(ページ無し).