

# ETBE 吸入ばく露によるマウス肝細胞の遺伝損傷

翁 祖 銓\*1,\*2 須 田 恵\*1 大 谷 勝 己\*3 柳 場 由 絵\*1 王 瑞 生\*1

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平成 22 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。ETBE の肝臓影響について、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、それ以外の影響についての報告はない。本研究では、ETBE ばく露後、肝臓における障害、肝細胞の遺伝物質の損傷および ETBE の代謝に関与している ALDH2 酵素の活性欠損による修飾作用について検討した。ETBE ばく露実験は高濃度と低濃度の二つのばく露からなる。高濃度ばく露では、野生型とその ALDH2 遺伝子ノックアウトマウス (KO マウス) に 0, 500, 1,750 と 5,000 ppm の ETBE を、6 時間/日、5 日/週、13 週間ばく露させた。肝臓小葉中心性細胞肥大は雄の野生型マウスでは高濃度ばく露群のみにおいて検出されたが、KO マウスは低、中濃度ばく露群においても認められた。コメットアッセイ法による肝細胞中の DNA 損傷度を解析した結果、野生型マウスの 5,000 ppm 群で有意に上昇したが、KO マウスはいずれのばく露群も、非ばく露群との間に有意差が認められた。また、肝組織中の DNA 酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 濃度 (10<sup>6</sup> dG で算出した) の変化は、コメットアッセイと類似した挙動を示した。低濃度ばく露実験では、野生型マウスと KO マウスのほか、ALDH2 遺伝子のヘテロノックアウト (HT) マウスも使用し、これらのマウスに 0, 50, 200 と 500 ppm の ETBE を、6 時間/日、5 日/週、9 週間反復ばく露させた。肝臓重量およびその体重比は ETBE ばく露による有意な影響が認められなかった。肝臓の小葉中心性細胞腫大は WT マウスでは ETBE ばく露による増加はなかったが、HT と KO マウスの高濃度ばく露群では有意に増加し、軽度のびまん性微細空胞変性も観察された。ETBE ばく露による肝細胞 DNA 損傷は WT マウスにおいては認められなかったが、HT および KO マウスでは、低濃度の 50 ppm ばく露群は対照群との間に有意な変化がなく、200 と 500 ppm ばく露群は対照群より有意に上昇した。このように ALDH2 酵素活性の低い個体では 200 ppm の低い濃度の ETBE ばく露によって肝細胞における遺伝損傷などが検出され、これらの個体においては ETBE の無毒性量が低く、その毒性に対する感受性が高いことが示唆された。

キーワード: エチルターシャリーブチルエーテル, 肝障害, コメットアッセイ, *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス, 吸入ばく露.

## 1 はじめに

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、輸送車両の燃料に使用されている<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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、それ以外の影響についての報告は殆どない。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<sup>1)</sup>。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ている<sup>3)</sup>。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<sup>2)</sup>。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潜在的な発がん物質として分類されている。また、東アジア人の約 4 割はアルデヒドを解毒する酵素 (ALDH2) の活性を欠損しており、いわゆる、酒を飲めないタイプおよび酒に弱いタイプである<sup>4)</sup>。体内のアセトアルデヒドなどのアルデヒド類は ALDH2 の触媒ですぐに酢酸に代謝されて、これは一般の野生動物ではその毒性の発現が弱い原因の一つと思われる。しかし、ALDH2 酵素活性が欠損している場合、ETBE から生成された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、体内に蓄積される可能性があり、そのため種々の生体影響が現れるかもしれない。

ETBE が体内に入ってから主な代謝器官・組織は肝臓である。また、アセトアルデヒドなどのアルデヒド類は肝臓に毒性を有することがよく知られている<sup>5)</sup>。今回の実験では、野生型マウスおよび ALDH2 酵素活性欠損マウスを使用し、ETBE ばく露後、肝臓の形態学および肝細胞の早期 DNA 損傷、酸化ストレスレベルを解析することによって、ETBE ばく露による生体影響を高感度で検出し、ALDH2 活性欠損による感受性変化の有無を検討した。

\*1 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ。

\*2 現在所属: 米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

\*3 労働安全衛生総合研究所有害性評価研究グループ

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ 王 瑞生

E-mail: wang@h.jniosh.go.jp

## 2 方法

### 1) 動物および吸入ばく露

本実験は「労働安全衛生総合研究所動物実験委員会」の審査を受け承認され、労働安全衛生総合研究所動物実験指針に従って行った。また、遺伝子改変動物の使用は「労働安全衛生総合研究所組換え DNA 実験委員会」の審査を受け承認された。

高濃度レベルおよび低濃度レベルという二つの ETBE ばく露実験を行った。高濃度ばく露実験では、動物は雌雄の 8 週齢の C57BL/6J 系マウス（野生型）を日本チャールス・リバー株式会社より 7 週齢で購入（1 週間の馴化）と自家繁殖した 8 週齢の雌雄の C57BL/6J 系 *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス（KO 型）<sup>6)</sup>を用いた。これらの動物は室温 22±1℃、湿度 55±5% の環境下で飼育され、固形飼料（CE-2、日本クレア株式会社）や水は自由に摂取させた。マウスを 0（対照群）、500、1750、5000 ppm 群に分け、ETBE（純度 97%以上、東京化成）を毎日 6 時間、5 日/週のスケジュールで 13 週間吸入ばく露させた。ばく露濃度の選定は先行の研究を参照した<sup>7-9)</sup>。最終ばく露の 20 時間後に解剖した。肝臓を摘出して、少量の組織を採集し、直ちにコメットアッセイ用に処理を行った。一部は中性ホルマリンに固定し、H-E 染色後病理検査を実施した。

低濃度ばく露実験では、上記の野生型と KO 型マウスを交配させ、生まれたヘテロマウスをさらに交配させ、雄性仔マウスの尻尾から採取した組織から DNA を抽出し、特異プライマーを用いて PCR 法で各個体の遺伝型を同定して、その結果、野生型、KO 型およびヘテロ型（HT）の 3 タイプに分けた<sup>6)</sup>。また、実験に使用した個体は実験終了後、肝組織を用いて、同様の方法で遺伝型

を確認し、実験前の結果と照合した。これらの 3 タイプ雄マウスをそれぞれ 0（対照群）、50、200、500 ppm 群に分け、高濃度ばく露実験と同じスケジュールで合計 9 週間吸入ばく露させた。ばく露終了後の処置は同じであった。

### 2) アルカリ性コメットアッセイ解析

肝細胞における DNA 断裂を解析するため、インビボアルカリ性コメットアッセイ法を用いた<sup>10,11)</sup>。簡潔に述べると、少量の肝組織をミンスし、氷冷したバッファー（0.075 M NaCl, 0.024 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.5）にサスペンドして Potter 型ホモジナイザーで軽く研磨した後、遠心法で細胞核分画を得た。38℃で溶解した 1%低溶点アガロースと混合してすぐ 20 ウェルの CometSlide に移した。4℃で 15 分間冷却後、溶解液（2.5 M NaCl, 10% DMSO, 100 mM Trizma base, 1% Triton X-100, pH=10）中で 60 分間溶解する。Trevigen 社の泳動システムを用い 21 V（1 V/cm）の下で 15 分間泳動してから中和バッファー（0.4 M Tris buffer, pH 7.5）で 3 回洗浄した後、SYBR Green I で DNA 染色し、蛍光顕微鏡の下で Perceptive Instruments 社の Comet IV を用いて 1 試料につき 100 個細胞のコメットテールを観察した。本稿では DNA の損傷度にテール輝度（TI 値）を用いた。

### 3) hOGG1 コメットアッセイ解析

Smith 氏の hOGG1（8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ）コメットアッセイ法を用いて肝細胞 DNA の酸化損傷の評価を行った<sup>12)</sup>。8-OH-dG を解析した。基本的にコメットアッセイは上記の方法と同じであったが、異なった点は電気泳動後、hOGG1 バッファー（40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA と 0.2 mg/ml bovine serum albumin）で洗浄し、その後各ウェルに 0.08 U

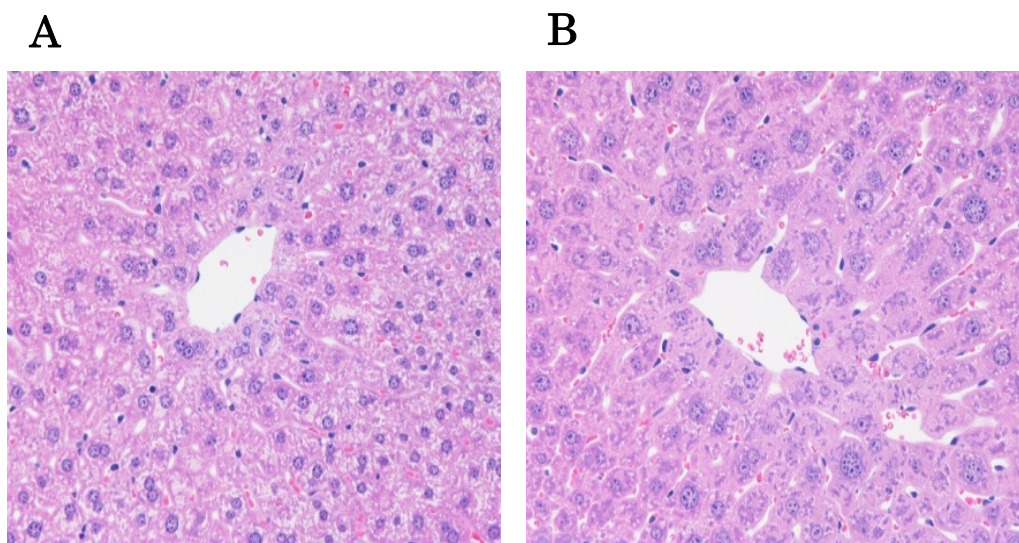


図 1. マウスの肝臓顕微鏡像（H-E 染色）

A, 対照群マウス, B, ETBE ばく露群マウス(中度の小葉中心性肝細胞肥大).

表 1. ETBE 13 週間吸入ばく露後のマウス肝臓病理 (小葉中心性肝細胞肥大の程度と発生頻度)

Mice	No. of Mice	Histopathology (Centrilobular hypertrophy)*																			
		ETBE (ppm)																			
		0					500					1,750					5,000 <sup>#</sup>				
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
WT male mice	5	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	3	1	0
KO male mice	5	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	1	1	0	0	0	1	2	2	0
WT female mice	5	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	1	4	0	0
KO female mice	5	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0

\*: damaged degree, -: none; ±: extremely slight; +: slight; ++: moderate; +++: severe.

#: Significantly different from controls by Chi-Square tests in both sexes mice of two genetic types, p < 0.05.

の hOGG1 酵素を含む hOGG1 バッファーを添加し 37°C, 15 分間処理した. この処理によって DNA 上の酸化塩基 8-OH-dG が特異的に切断される. コントロールウェルは酵素なしのバッファーで同様の処理を行った. その後の処理はアルカリ性コメットアッセイ法と同じであった. このように hOGG1 処理後の TI 値増加は DNA の酸化損傷になる.

#### 4) 液クロ-電気化学検出器による 8-OH-dG の定量

キアゲン社の EZ1 tissue DNA kit を用いて肝臓組織から DNA を精製して 20 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.8) に溶かした. その後, nuclease P1 とアルカリホスファターゼで 37°C においてそれぞれ 60 分間処理した後, Ultrafree-Proind filter (Millipore 社) に入れて 10,000 g で 5 分間遠心した. 試料中の DNA 加水分解産物, 8-OH-dG およびデオキシングアノシン (dG) の分離・定量は液クロ-電気化学検出器系を用いて行った. 液クロは Agilent 社の HP 1100 系, 分析カラムは同社の Zorbax SB-C18, 溶離液は 8%メタノールを含む 10 mM リン酸ナトリウム溶液であった. UV 検出器で 290 nm 波長において dG を検出・定量した. 電気化学検出器は ESA 社の CoulochemII および装備されている同社の 5020 guard cell (0.35 V) と 5011 analytical cell (electrode 1, 0.15 V, electrode 2, 0.3 V) で, シリーズ濃度の標準試料を用いて 8-OH-dG を検出・定量した. これらのデータから 10<sup>6</sup> dG あたりの 8-OH-dG 数を算出した.

さらに野生型と比べて KO マウスのほうは多くなる傾向があったが, 統計学的にはどちらの遺伝タイプマウスも 5,000 ppm 群のみは対照群との間に有意差が認められた. 雌性マウスにおいても雄性マウスと同じ傾向が見られた. 一方, 雌性の KO マウスでは, 5,000 ppm 群だけ損傷があったが, 雄性 KO マウスではもっと低い濃度で損傷が検出され, 雌雄差があったことを示唆した. 小葉中心性肝細胞肥大以外の肝組織病理像は軽微なもので, おそらく ETBE ばく露によるものではなかった.

### 3 結果

#### 1) 肝臓の病理検査結果

13 週間の高濃度 ETBE ばく露後, 一部のマウス肝臓において小葉中心性肝細胞肥大が観察された (図 1 で示し). 各群におけるこの損傷の程度および頻度を表 1 にまとめた. 雄性マウスでは, 非ばく露群と比べて ETBE の 3 ばく露群に小葉中心性肝細胞肥大を示したマウス数,

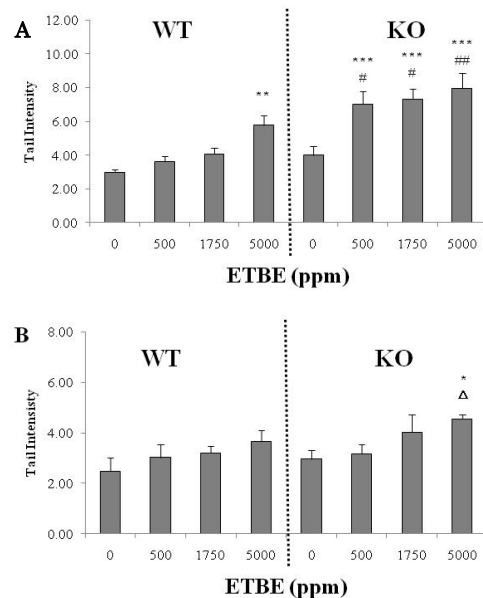


図 2. ETBE 13 週間ばく露後のマウス肝細胞 DNA 損傷度 コメットテールの輝度, TI 値, バーは平均値と標準誤差を表している.

A, 雄性マウス, B, 雌性マウス.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, 野生型マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).

# p < 0.05, ## p < 0.01, Δ, p = 0.052, KO マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).

2) 肝細胞 DNA 損傷

アルカリ性コメットアッセイ解析から肝細胞の DNA 断裂程度 (TI 値) が示された。13 週間の高濃度ばく露実験について Two-way ANOVA 解析の結果、遺伝タイプと ETBE ばく露のいずれも TI 値に有意に影響を与えた (ただし、雄性マウスの場合のみ、遺伝タイプは  $F=3.58$ ,  $p=0.063$ )。雄性の KO マウスでは 500, 1,750 と 5,000 ppm 群における TI 値はそれぞれ対照群の 1.76 倍, 1.83 倍と 1.99 倍であって、いずれも統計的有意差が認められた。しかし、野生型マウスでは最高濃度の 5,000 ppm 群のみ対照群より有意に上昇した (対照群の 1.93 倍)。一方、雌性の KO マウスでは 5,000 ppm 群のみ対照群より上昇し (対照群の 1.93 倍)、野生型マウスでは、いずれの ETBE ばく露群においても TI 値の有意な上昇は認められなかった (図 2)。

3) 肝細胞の DNA 酸化損傷

hOGG1 コメットアッセイ法および標準のアルカリ性測定法の結果比較からこの酵素が特異的に識別できる DNA 酸化損傷の程度が判明できる。13 週間の高濃度ばく露実験について、Two-way ANOVA 解析の結果、遺伝タイプと ETBE ばく露のいずれも DNA 酸化損傷の上昇に影響を与えた (ただし、雌性マウスの場合のみ、ETBE ばく露濃度は  $F=2.28$ ,  $p=0.053$ )。雄性の KO マウスでは 500, 1,750 と 5,000 ppm 群における DNA 酸化損傷度はそれぞれ対照群の 2.71 倍, 2.51 倍と 3.44 倍であっ

て、いずれも統計的有意差が認められた。野生型マウスでは最高濃度の 5,000 ppm 群のみ対照群より有意に上昇した (対照群の 2.99 倍)。一方、雌性の KO マウスでは 5,000 ppm 群のみ対照群より上昇した (対照群の 2.42 倍)。雌性の野生型マウスでは、いずれの ETBE ばく露群においても DNA 酸化損傷度の有意な上昇は認められなかった (図 3)。

4) DNA 上の 8-OH-dG 数

13 週間高濃度 ETBE ばく露後の 20 時間において肝細胞 DNA 上の 8-OH-dG 数 ( $10^6$  dG あたり) の変化を解析した。DNA 酸化損傷と同様で、Two-way ANOVA 解析の結果、遺伝タイプと ETBE ばく露のいずれも 8-OH-dG 数に影響を与えた (ただし、雌性マウスの場合のみ、遺伝タイプは  $F=14.11$ ,  $p=0.083$ )。雄性の KO マウスでは 500, 1,750 と 5,000 ppm 群における 8-OH-dG 数はそれぞれ対照群の 1.81 倍, 1.74 倍と 1.93 倍であって、いずれも統計的有意差が認められた。野生型マウスでは最高濃度の 5,000 ppm 群のみ対照群より有意に上昇した (対照群の 1.31 倍)。一方、雌性の KO マウスでは 5,000 ppm 群のみ対照群より上昇した (対照群の 1.61 倍)。雌性の野生型マウスの肝細胞 DNA 上の 8-OH-dG 数はいずれの ETBE ばく露群においても有意な増加が認められなかった (図 4)。

5) 低濃度ばく露実験の結果

50~500 ppm の比較的 low 濃度の ETBE ばく露後、肝

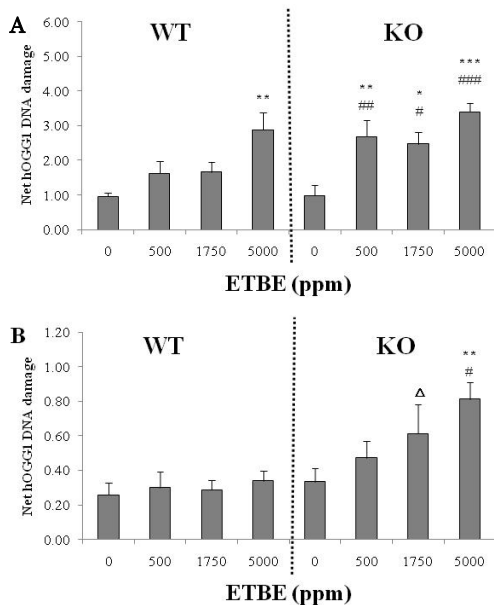


図 3. ETBE 13 週間吸入ばく露後の肝細胞 DNA 酸化損傷 hOGG1 コメットアッセイ測定から hOGG1 処理によるコメットテール輝度の増加。バーは平均値と標準誤差を表している。  
A, 雄性マウス, B, 雌性マウス。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $\Delta$ ,  $p = 0.070$ , 野生型マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).  
#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ , KO マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).

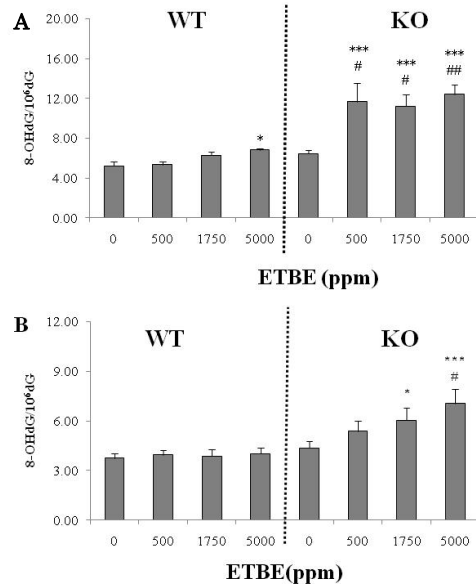


図 4. ETBE 13 週間吸入ばく露後のマウス肝細胞 DNA 上の 8-OH-dG 数  
バーは平均値と標準誤差を表している。  
A, 雄性マウス, B, 雌性マウス。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , 野生型マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).  
#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ , KO マウス対照群との比較 (Dunnett's post hoc test).

臓重量およびその体重比は ETBE ばく露による有意な影響が認められなかった。肝臓の小葉中心性細胞腫大は野生型マウスでは ETBE ばく露による増加はなかったが、HT と KO マウスでは有意差がないものの、増加傾向が見られ、また軽度のびまん性微細空胞変性も観察された（データ未掲載）。ETBE ばく露による肝細胞 DNA 損傷はアルカリ性コメットアッセイ法を用いて行った。その結果、野生型マウスにおいては DNA 損傷の上昇が認められなかったが、HT および KO マウスでは、低濃度の 50 ppm ばく露群は対照群との間に有意な変化がなく、200 と 500 ppm ばく露群は対照群より有意に上昇した（図 5）。

#### 4 考察

ETBE について一般的にその急性毒性が低く、また高濃度による肝臓病理変化以外の特異的作用は殆ど知られていない<sup>2)</sup>。しかし、ETBE と非常に似ているメチルターシャリーブチルエーテル（MTBE）は動物に発がん作用がある。MTBE ばく露後、雄性ラットでは腎の尿細管がん、マウスでは肝臓がんが誘発されると報告された<sup>13)</sup>。両物質は物理化学性質や体内での代謝など、類似している点が多く<sup>14)</sup>、そのため ETBE は MTBE と同様の毒性を持っている可能性があるかと推測できる。

本研究の肝臓組織病理検査から 13 週間 5,000 ppm ばく露を受けた雄性と雌性の野生型および KO マウスでは小葉中心性肝細胞肥大が検出され、他の報告と一致している<sup>9)</sup>。この損傷の程度および頻度は雄性の KO マウスにおいて雄性の野生型より多くなる傾向が見られたが、両タイプのマウスの間、統計的有意差がなかった。全体的に病理変化は小さく、上記の差は ALDH2 欠損との関

連について更に検討する必要がある。

本研究では ETBE ばく露による肝細胞の DNA 損傷の上昇は初めて検出できた。コメットアッセイ法によるこの DNA 鎖断裂の上昇は、野生型雄性マウスでは 5,000 ppm のみにおいて検出されたが、雄性 KO マウスは 13 週間ばく露実験の低濃度（500 ppm）と中濃度（1,750 ppm）においても検出され、ALDH2 活性欠損マウスでは、報告された NOAEL の 500 ppm<sup>7,8)</sup>よりさらに低いことを示唆した。ETBE の低濃度領域において 9 週間吸入ばく露実験でさらに検討した結果、野生型マウスでは検出されなかったが、雄性 KO マウスでは 200 と 500 ppm ばく露群で有意に上昇した。これらの結果から ALDH2 酵素活性欠損マウスの場合、ETBE の NOAEL は 50 ppm と推測され、野生型マウスより著しく低いことが判明した。ETBE ばく露による肝細胞 DNA 損傷の上昇は DNA 酸化損傷の上昇や 8-OH-dG 数の増加などと一致しており、この酸化損傷は少なくとも肝細胞 DNA 損傷上昇に関与していることも示唆された。

ETBE の体内代謝過程でアセトアルデヒドが中間代謝物として生成される。このアルデヒド物質の毒性は広く検討された。アセトアルデヒドは種々の DNA 損傷（突然変異、姉妹染色分体交換上昇、DNA 鎖の断裂、塩基の酸化修飾、染色体異常、など）を誘発し、がん原性物質として知られている<sup>15,16)</sup>。エタノールの代謝実験から KO マウスではアセトアルデヒドの血中濃度は野生型マウスより高いことが Isse らに報告された<sup>17)</sup>。われわれの代謝実験の結果、ETBE 急性吸入ばく露後、KO マウスの血中アセトアルデヒド濃度は野生型マウスより高かったことが観察された（未発表結果）。また、ETBE の中間代謝物質であるターシャリーブチルアルコールが更

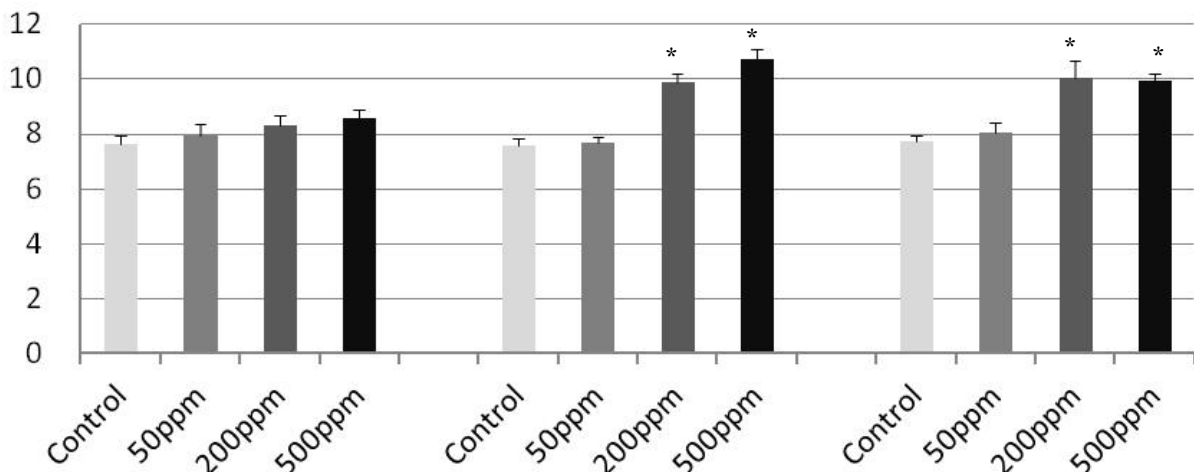


図 5. ETBE 9 週間ばく露後の 3 つの遺伝タイプ雄性マウスの肝細胞 DNA 損傷度

左パネル:野生型マウス,中間パネル:HT マウス,右パネル:KO マウス

縦軸はコメットテールの輝度(TI 値),バーは平均値と標準誤差を表している。

\*  $p < 0.05$ , それぞれの対照群との比較。

に代謝され、別のアルデヒド物質 (2-hydroxy-2-methyl propanal) が作られ、この物質の作用による肝細胞 DNA 損傷への関与も可能であるが、詳細な検討が必要である。

本研究は ETBE の主な代謝器官である肝臓の損傷に注目し、アルコールやアルデヒド類の毒性検出に高感度の *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、DNA 鎖断裂や酸化損傷などの早期マーカーで検討を行った。

ETBE ばく露は野生型マウスでは高濃度のみにおいて肝細胞の DNA 損傷の上昇を誘発し、その NOAEL は先行研究で報告された 5,000 ppm と一致している。しかし、ALDH2 酵素活性欠損マウスでは更に低い濃度においても遺伝毒性を示し、この場合の推定 NOAEL は前述値の 10 分の 1、つまり、50 ppm となる。ALDH2 活性欠損個体は ETBE の毒性に対する感受性が高くなり、それは中間代謝物質であるアセトアルデヒドなどのアルデヒド類物質の蓄積によると思われる。これらの結果は ETBE に対するリスク評価、作業環境の基準策定時に有意に参考できる。

## 5 謝辞

渡辺智子氏 (株式会社アニマルケア) には遺伝子改変動物の繁殖および動物の解剖にご尽力賜った。また、遺伝子改変動物の使用にあたって、産業医科大学の川本俊弘教授および名古屋大学の那須民江教授にご助力いただき感謝する。

本研究は労働安全衛生総合研究所のプロジェクト研究「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 (P21-03)」の研究費で行われた。

なお、本文内容の一部および図 1~4 と表 1 は以下の雑誌で発表した。

Weng Z, Suda M, Ohtani K, Mei N, Kawamoto T, Nakajima T, Wang RS. Differential genotoxic effects of subchronic exposure to ethyl tertiary butyl ether in the livers of *Aldh2* knockout and wild-type mice. *Arch. Toxicol.* 2012; 86:675-682.

## 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.pecj.or.jp/english/news/pdf/H220513\\_etbe02.pdf](http://www.pecj.or.jp/english/news/pdf/H220513_etbe02.pdf)
- 4) 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.
- 5) Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol.* 2005; 35: 187-93.
- 6) Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, Nakayama K, Nakayama K. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde: in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and *Aldh2* gene targeting mouse. *FEBS Lett.* 2000; 476: 306-11.
- 7) White RD, Daughtrey WC, Wells MS. Health effects of inhaled tertiary amyl methyl ether and ethyl tertiary butyl ether. *Toxicol. Lett.* 1995; 82-83: 719-24.
- 8) Bond JA, Medinsky MA, Wolf DC. ETBE: 90-day vapor inhalation toxicity study with 5 neurotoxicity evaluation in F344 rats. Report No.95029. Chemical Industry Institute of 6 Toxicology, Research Triangle Park, NC; 1996.
- 9) Medinsky MA, Wolf DC, Cattley RC, Wong B, Janszen DB, Farris GM, Wright GA, Bond JA. Effects of a thirteen-week inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on fischer-344 rats and CD-1 mice. *Toxicol. Sci.* 1999; 51:108-118.
- 10) Sasaki YF, Nishidate E, Izumiyama F, Matsusaka N, Tsuda S. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat. Res.* 1997; 391(3): 215-31.
- 11) Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat. Res.* 1997; 388(1): 33-44.
- 12) Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis.* 2006; 21: 185-190.
- 13) Bird MG, Burleigh-Flayer HD, Chun JS, Douglas JF, Kneiss JJ, Andrews LS. Oncogenicity studies of inhaled methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *J. Appl. Toxicol.* 1997;17 Suppl 1, S45-55.
- 14) Amberg A, Rosner E, Dekant W. Biotransformation and kinetics of excretion of ethyl tert-butyl ether in rats and humans. *Toxicol. Sci.* 2000; 53(2): 194-201.
- 15) Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2007; 7(8): 599-612.
- 16) Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Coglianò V. Carcinogenicity of

alcoholic beverages. WHO International Agency for  
Research on Cancer Monograph Working Group.  
Lancet Oncol. 2007; 8: 292-3.

- 17) Isse T, Matsuno K, Oyama T, Kitagawa K, Kawamoto T.  
Aldehyde dehydrogenase 2 gene targeting mouse  
lacking enzyme activity shows high acetaldehyde level  
in blood, brain, and liver after ethanol gavages. Alcohol  
Clin. Exp. Res. 2005; 29:1959-64.