

Aldh2 遺伝子ノックアウトマウスにおける ETBE 代謝物の体内動態

須田 恵^{*1} 翁 祖 銓^{*1,*2} 柳 場 由 絵^{*1} 大 谷 勝 己^{*3} 王 瑞 生^{*1}

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はバイオ燃料の一つで、わが国では平成 22 年度からガソリンに添加されている。一般毒性については、石油産業活性センターによる大規模な動物実験によって低毒性、弱い発がん性があると結論付けられている。しかし、ETBE の代謝には ALDH2 という酵素が関わっており、この酵素は日本人労働者の 4~5 割の人で活性が低いと、ALDH2 の活性が低いヒトへの有害性評価は不十分である。我々は Aldh2 遺伝子ノックアウトマウス (KO 型) を用いた同一プロジェクト内の別テーマの研究で、上記の大規模実験より低濃度から有意な影響が起きるといった結果を得た。そのメカニズムの解明の一助とすべく ETBE の代謝物の体内動態について調べた結果を報告する。体内動態は 3 種類の方法で調べた。まず、雌雄の KO 型と野生型のマウスを ETBE 濃度 500 ppm で 6 時間ばく露し、ばく露開始から 30 時間後までの血液、肝臓、脳、精巣 (雄のみ) の代謝物濃度を経時的に測定した。次いで、ETBE やその代謝物であるアセトアルデヒドの代謝速度を ETBE で垂慢性ばく露した雌雄の動物の肝臓を用いて二次代謝物等も含めて測定した。最後に雌雄の動物で、実際の労働現場の ETBE 濃度付近から 500 ppm まで 5 濃度 (対照群も含む) 6 時間ばく露後の尿中代謝物を経時的に測定した。以上の結果から ETBE から代謝されたアセトアルデヒドがエタノールとして生体で留保される可能性と、留保への依存度が雌雄で違う可能性が示唆された。また、ETBE の一次代謝物であるターシャリーブチルアルコール (TBA) の血液中の濃度変化や尿中への排出時間が延長することから、TBA の代謝にも ALDH2 が関与することが示唆された。

キーワード: エチルターシャリーブチルエーテル, Aldh2 遺伝子ノックアウトマウス, 吸入ばく露, 性差, 体内動態。

1 はじめに

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はバイオエタノールを原料とするいわゆるバイオ燃料で平成 17 年の閣議決定によってガソリンの添加物として使用されることになった物質のひとつで、平成 22 年度より本格導入されている。本格導入前の平成 19 年度に石油産業活性センターにより大規模な動物試験が行われ無毒性量 (NOAEL) が 500 ppm と結論付けられており¹⁾、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²⁾。

図 1 に ETBE の代謝経路を示すが、ETBE は生体内でアセトアルデヒドとターシャリーブチルアルコール

(TBA) に分解される^{3,4)}。アセトアルデヒドは飲酒の経路から体内に取り込まれた場合 IRAC の発がん評価が 1 (ヒトで発がん性がある) となる物質であり、主に酵素のアルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (ALDH2) によって無毒化される。一方、東アジア人、特に日本人にはこの ALDH2 の活性が低い労働者が 4~5 割いる⁵⁾。従って

ETBE にばく露されるということは、飲酒に類似する形態でアセトアルデヒドにばく露されることになり、ALDH2 活性が低い 4~5 割の日本人の労働者に対する有害性評価が不十分なのではないかと懸念された。また、TBA のさらなる代謝過程でも ALDH2 が関与する可能性が高く、TBA 代謝の遅れによる毒性発現の可能性も考えられる。

そこで我々は遺伝子改変により ALDH2 の活性を無くしたマウスを用いて、0, 500, 1,750, 5,000 ppm の濃度、6 時間/日、5 日/週の条件で 13 週間のばく露実験を行った。対照群と比較して、遺伝子改変をしていない (野生型) 雄性マウスでは白血球や肝臓において 5,000 ppm ばく露群のみで有意な DNA 損傷は起きるが、雄性の遺伝子改変 (KO 型) マウスでは我々が設定した最低濃度 500 ppm 以上の全ての濃度で有意に用量依存的に増加するという結果を得た^{6,7)}。また、この結果により 500 ppm より更に濃度を下げた設定で実験を行ったところ、0, 50, 200, 500 ppm の濃度、6 時間/日、5 日/週の条件で 9 週間ばく露した結果、雄においては 200 ppm でも KO 型では有意に DNA 損傷が起きた⁸⁾。雌性マウスでは野生型は有意な白血球の DNA 損傷は起こらず、KO 型でも 1,750 ppm 以上で用量依存的に DNA 損傷が起こる結果であった⁹⁾。このような雄に強く影響が出るメカニズムは何なのか、ETBE の代謝系でどの様な違いが雌雄にあるのかを考察するため、ETBE、ETBE 代謝物であるアセトアルデヒド、TBA、2-メチル-1,2-プロパンジオール (MPD)、アセトアルデヒドが酵素の ADH などにより触媒されて変化するエタノール、TBA の最終代謝物質である 2-ヒドロキシイソ酪酸 (HIBA)、HIBA の極

*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 須田 恵^{*1}

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

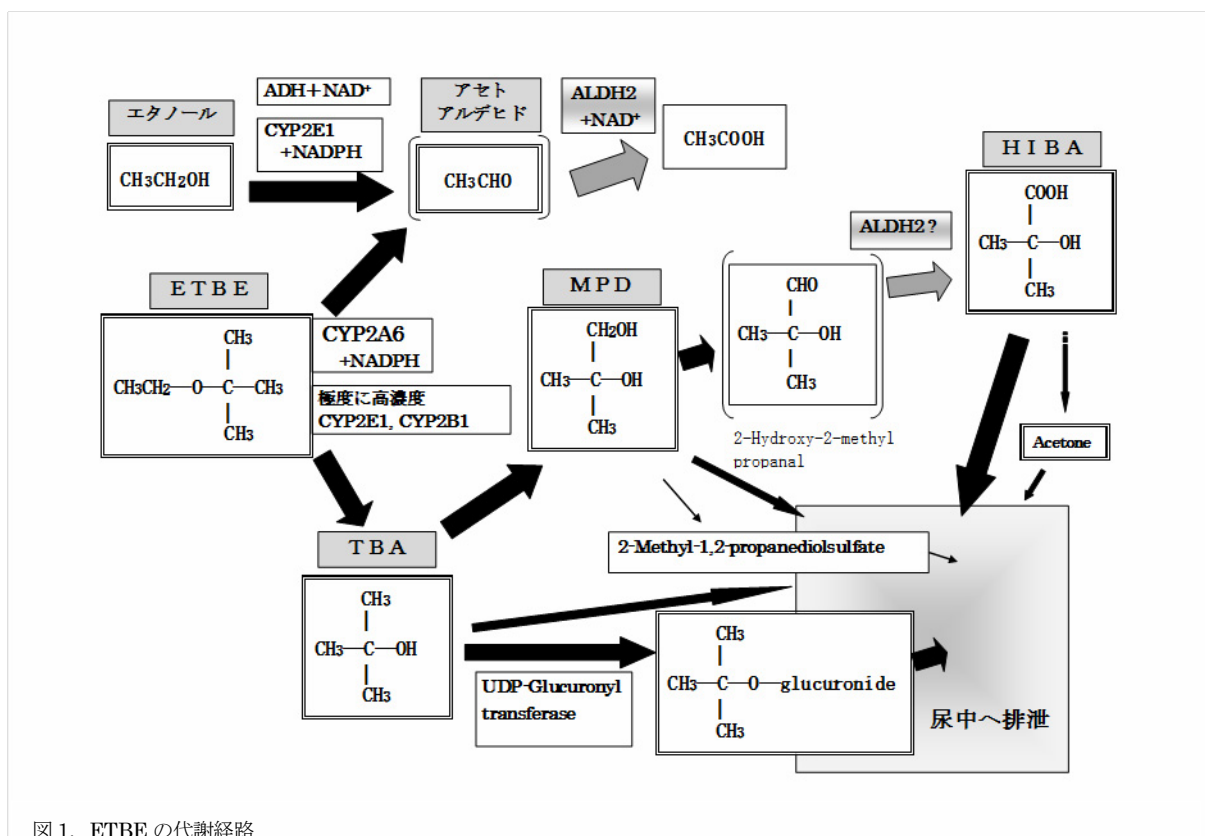


図1. ETBEの代謝経路

二重線で囲った物質を測定した。ADH, ALDH2, CYP2A6, CYP2E1, CYP2B1, UDP-Glucuronyltransferase は代謝に関与する酵素の略号および名称。NAD⁺とNADPHは代謝に関与する補酵素の略号。主要経路は矢印が太くなっている。

一部が代謝されるアセトン³⁾など(図1)を、以下の3種類の実験によって測定した。

実験① ばく露動物の血液・組織中の代謝産物の経時的变化

実験② ばく露動物の肝臓を用いた代謝物の生成速度

実験③ ばく露動物の尿中代謝物の経時的变化

これらの結果を元に、ETBEばく露による代謝産物の体内動態や経時的变化について検討を行った。

2 方法

1) 動物

雌雄の8週齢のC57BL/6J系マウス(野生型)は日本チャールス・リバー株式会社より7週齢で購入し(1週間の馴化),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)は自家繁殖して実験に用いた。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)および水は自由に摂取させた。

2) 試薬類

ETBE(純度95%),TBA(純度99%),UV化剤 *m*-Methoxyphenacyl bromide (PMPB),反応促進剤 *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA)は東京化成製品,ペントバルビタールナトリウム(純度98%)はナカライテック製品,プロピレングリコール(純度98%,食品添加物用),5M-塩酸,1M-塩酸,60%過塩素酸,水酸化カ

リウム(試薬特級),硫酸ナトリウム(試薬特級),塩化ナトリウム(試薬特級),エタノール(純度99.5%),メタノール(純度99.8%),アセトン(純度99.5%),テトラヒドロフラン(純度99.5%),ダルベコPBS,アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用),HIBA(純度98%),3-ヒドロキシ酪酸(3HB)は和光純薬製品,アセトアルデヒド(純度99%)はMerck株式会社製品を用い,MPD(純度97.5%)およびTBA-グルクロン酸抱合体は株式会社ケミカルソフト開発研究所¹⁾に合成を依頼した。クレアチニンキットとしてデタミナー-L CRE(試薬R-1,試薬R-2:協和メデックス)を用い,クレアチニン標準液も協和メデックス製品を用いた。

3) 投与・採取方法

実験① ばく露動物の血液・組織中の代謝産物の経時的变化

本実験では,ばく露中に生体内に蓄積されるETBEやその代謝物の量と,ばく露後にETBEやその代謝物が生体内からどのくらい排出されたかを,血液中や組織中の濃度から検討を行った。この実験から得られた情報を元に,実験期間中におけるETBEやその代謝物の体内動態を算出した(図2を参照)。最終的に,野生型の雄,野生型の雌,KO型の雄,KO型の雌の4つのグループ間の差異について,DNA損傷の結果と比較して,DNA損傷の発生と関連する物質を特定することを目的とした。

動物は野生型の雌雄のマウスを各 22 匹と KO 型の雌雄のマウスを各 20 匹用いた。動物を ETBE 濃度 500 ppm で 6 時間ばく露し、ばく露開始から 1, 2, 4, 6 時間目までは、ばく露装置から直接取り出して後述する麻酔と臓器採取の処置をした。そして 6 時間ばく露終了後に、ばく露装置から取り出して清浄空気の飼育室に置き、ばく露開始から数えて 8, 10, 12, 14, 30 時間後に次のような処置をした。動物はペントバルビタールナトリウムにより麻酔し、血液採取後に放血し、肝臓、脳、精巣(雄のみ)を採取した。なお、エタノールが代謝に関わってくるため、エタノールを含む市販の麻酔薬のネブタールやソムノペンチルは用いず、ペントバルビタールナトリウムをプロピレングリコールと MilliQ 水で溶解し (5 g/dl, pH 9.4), 0.1 ml/10 g の割合で投与し麻酔した。採取した組織は、マスマスペクトロメータ付きガスクロマトグラフでアセトアルデヒド、エタノール、アセトン、TBA, MPD, ETBE の 6 物質を測定した (分析方法の詳細については「4) 分析方法」を参照のこと)。採取時間のまとめを図 3 に示す。

実験② ばく露動物の肝臓を用いた代謝物の生成速度酢酸へのアセトアルデヒド代謝能が低い KO 型ではアセトアルデヒド濃度は野生型よりも高いという予測であったが、実験①において脳中のアセトアルデヒドは雌雄とも野生型と KO 型の間に差異はなく、雄の肝臓では予測とは逆に KO 型のアセトアルデヒド濃度が有意に低くなっていた。本実験では、この疑問点を解明するため、過剰のアセトアルデヒドがあった場合の肝臓酵素の代謝速度および代替経路の探索を行った。ETBE からの代謝では ETBE がアセトアルデヒドに代謝されるステップが増えるので、このアセトアルデヒド排除機構にどの程度負担をかけるのかを確認するための実験も行った。

雌雄の野生型と KO 型のマウスを 1 群 5 匹で 0, 500, 1,750, 5,000 ppm の濃度、6 時間/日、5 日/週の条件で 13 週間ばく露し、ばく露終了後から 20 時間絶食 (水は自由摂取) させて、エーテル麻酔下で肝臓を採取した。この肝臓は文献 7 で使用した肝臓と同じ肝臓である。

実験③ ばく露動物の尿中代謝物の経時的変化

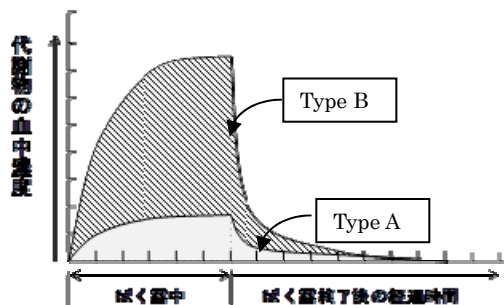


図 2. 生体の代謝物にばく露される量と時間の関係
グレーや斜線で示す部分は生体が経時的に受けているばく露総量で、Type B の方が斜線のみで余分にばく露を受けていると考え、この差に焦点を当てる。

実験①の結果で TBA 代謝が ALDH2 の関与を受ける事が示唆されたため、TBA の尿中への排出量や排出速度の検討を行った。文献 9)による実際の労働現場の ETBE 濃度付近 (平均 4.12 ppm, 0.93-8.71 ppm) を含めて、実験①の濃度までばく露し、野生型と KO 型の差異が代謝物 (TBA) の時間変動に与える影響について、各濃度ばく露個体から得た尿サンプルを分析し検討を行った。

野生型と KO 型の雌雄のマウス各 15 匹を用いて 1 週間間隔で、0, 1, 5, 50, 500 ppm の濃度において ETBE に 6 時間ばく露し、同じグループの動物 3 匹を 1 組として計 20 組に分けて採尿ケージに入れ、0-1, 1-2, 2-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-24 の時間に分けて尿を採取した。

4) 分析方法

実験①では、まず、ヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトルに血液を 0.1 ml 取り、酵素類の活性を止めるため 0.6N-PCA (過塩素酸) 0.1 ml を添加して軽く攪拌した後、6M-KOH 10 μ l で中和して THF 内部標準液 (テトラヒドロフラン 20 μ l/dl-H₂O) 10 μ l と硫酸ナトリウム 0.2 g を加えてシールして測定用試料とした。測定用試料はヘッドスペースサンプラーを用いてマスマスペクトロメータ付きガスクロマトグラフに導入し、アセトアルデヒド、エタノール、アセトン、TBA, ETBE の 5 物質を測定した。

組織は、ガラスの試験管に冷えた 0.6N-PCA と一緒に入れて Polytron ホモジナイザーで 10~20 秒ホモジナイズし、0°C で 3,000 rpm×10 分間遠心分離してその上清をヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトルに取り、6M-KOH で中和して内部標準液と硫酸ナトリウムを加えてシールし、血液と同様に GC/MS で上記の 5 物質を測定した。

測定条件は以下のとおりである：ヘッドスペースサンプラーのオープン温度は 70°C、サンプルループ温度は 110°C、トランスファーライン温度は 140°C、この条件下で 2 分間の平衡時間の後に試料 1 ml を GC に導入した。GC の注入口温度 170°C、GC/MS 間のトランスファーライン温度 230°C で、オープン温度は初期値 50°C を 10 分間保った後、1 分間当たり 10°C の昇温条件で 80°C まで昇温した。移動相はヘリウムで流速は 1.5 ml/min、スプリット比は 13.4:1、検出にはセレクテッド・イオン・モニター法を用いて注入後 4 分から測定を開始した。選択したイオンは 29, 31, 41, 43, 59 であった。

MPD は同じ処理では測定できないので文献 10)を参考に塩酸下でイソブチルアルデヒドに変化させて測定する

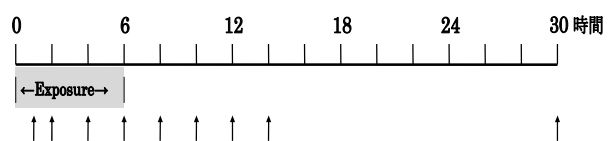


図 3. 実験①のばく露開始を 0 時間とした血液等の採取時間
0-6 時間まではばく露中。↑の部分で採取。

方法を採用した。血液の場合は全血を 0.1 ml、組織の場合は上記の遠心上清 0.1 ml を別のヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトルに取り、5 M-塩酸を 50 μ l、上記の THF 内部標準 10 μ l、塩化ナトリウム 0.2 g 加えてシールし、アルミブロックヒーターを用いて 90°C で 30 分間加温してから上記の GC/MS 条件で測定した。

実験②では採取した肝臓 50~80 mg に氷冷した 2.2 ml のダルベコ PBS を加えて、ポッター型ホモジナイザーで 10 秒ほどホモジナイズし、氷冷したヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトル (1 サンプル当たり 20 本) にダルベコ PBS とホモジネートを 0.025 ml ずつ分注した。それらを、補酵素無しの群 (ダルベコ PBS 0.02 ml 添加)、補酵素 NAD⁺ のみの群 (10 mM×0.01 ml+ダルベコ PBS 0.01 ml 添加)、補酵素 NADPH のみの群 (10 mM×0.01 ml+ダルベコ PBS 0.01 ml 添加)、両補酵素の群 (各補酵素 0.01 ml 添加) に分けた (図 4 に分析の組み合わせを図解)。それぞれに THF 内部標準液 (テトラヒドロフラン 20 μ l/dl-ダルベコ PBS) 0.01 ml とアセトアルデヒド溶液 (4.79 mM, ダルベコ PBS に溶解) 0.02 ml を添加してシールし、各群とも 37°C でインキュベートを 0, 1, 3, 5, 7 分間行い、直ちに 95°C のアルミブロックヒーターで 1 分間加熱して反応を止めて、上記 GC/MS の条件でアセトアルデヒド、エタノール、TBA の 3 種類の反応生成物量を測定し、最小二乗法を用いて各代謝物の生成速度を求めた。

同様の方法で、肝臓ホモジネート量を 0.05 ml に増やしダルベコ PBS を減らして各ボトルに分注し、アセトアルデヒド溶液の代わりに ETBE 溶液 (1.89 mM, ダルベコ PBS に溶解) を 0.02 ml 添加して各代謝物の生成速度を求めた。

実験③では尿中代謝物の補正の為に自動生化学分析装置を用いて尿中クレアチニンをクレアチニンキットで測定した。

尿中遊離 TBA はヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトルに尿 10 μ l と THF 内部標準液 (テトラヒドロフラン 20 μ l/dl-H₂O) 10 μ l を入れてシールし、上記 GC/MS 条件下で測定した。

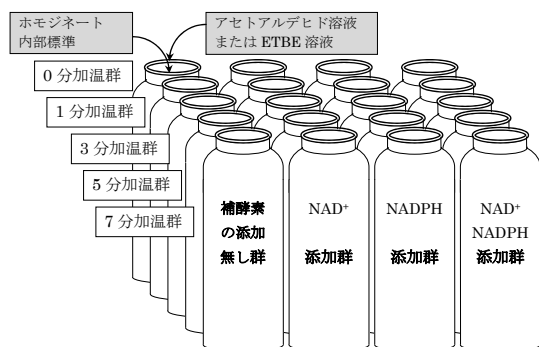


図 4. 実験②における分析の組み合わせ
各ボトルに肝臓ホモジネートと内部標準液とアセトアルデヒド溶液または ETBE 溶液を加えてシールし、各時間加温する。

尿中 TBA-グルクロン酸抱合体と MPD はヘッドスペースサンプラー用の 20 ml ボトルに尿 20 μ l、THF 内部標準液 10 μ l、1M-塩酸 40 μ l を入れてシールし、90°C のアルミブロックヒーターで 30 分間加温してから上記 GC/MS 条件で測定した。

尿中 HIBA は以下のように測定した。

まず、UV 化剤の PMPB は購入時のままでは定量分析を阻害するピークがあるので、次のような再結晶を繰り返して純度を高めた。耐溶剤製のスクリュウキャップ付きの 10 ml ガラス試験管に PMPB を 3 g 取り、アセトニトリル 5 ml を加えて掌で温めて完全に溶解し、その後 -20°C の冷凍庫で一晩冷却して再結晶させ、上澄みを取り除いた。この操作を 4 回繰り返す、エバポレータで加温せずに乾燥させた。これを用いて PMPB 溶液 (0.5 g/5 ml アセトニトリル) を作製した。

次いで、耐溶剤製のスクリュウキャップ付き 10 ml ガラス試験管に尿 10 μ l、3HB 内部標準液 (0.137 g/250 ml-H₂O) 10 μ l、アセトニトリル 200 μ l、PMPB 溶液 30 μ l、DIPEA 溶液 (0.5 g/5 ml アセトニトリル) 30 μ l を加えて密閉し、70°C のアルミブロックヒーターで 2 時間インキュベートして、室温に放置し荒熱を取った後 0°C で 3,000 rpm×10 分間遠心し、この上清を試料とした。

試料は UV 検出器付高速液体クロマトグラフィーで分離定量した。ガードカラム Inertsil ODS-3

(5 μ m×4.0 ϕ ×10 mm) 付きカラム Inertsil ODS-3V (5 μ m×4.6 ϕ ×150 mm) を用い、試料添加量は 4 μ l、流速は 0.5 ml/min、恒温槽温度は 37°C、検出波長は 254 nm、AUX レンジは 1 AU/V の条件で、移動相は超純水とアセトニトリルのグラジエント法を用いた。グラジエントは初期値 60:40 (水:アセトニトリル) で 8 分間保持し、8 分から 18 分までかけて 52:48 に変え、その後、洗浄の為に 2 分間でアセトニトリル 100% に変えて 10 分保持、さらに 2 分間で水 100% に変えて 5 分保持し、初期値に戻して 5 分平衡時間を取って終了するプログラムを組んだ。

5) 統計解析

実験①については、雌雄における野生型と KO 型の違い、各タイプにおける雌雄差を検出するために、各代謝物の平均濃度を算出し、スチューデントの *t*-検定を行った。実験②については、各ばく露濃度における野生型と KO 型の違いをスチューデントの *t*-検定によって検出した。また、各タイプにおける濃度による変化の有意差はダネットの多重 *t*-検定によって検出した。実験③については各時間、各濃度についての野生型と KO 型の違いを検出するためスチューデントの *t*-検定を行った。なお、統計学的検討は統計ソフト SPSS (日本アイ・ビー・エム株式会社) を用い、統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

3 結果

実験①について、表 1 に雌雄における野生型と KO 型の間での *t*-検定の結果と、各タイプにおける雌雄間の *t*-

表1 各組織における ETBE および ETBE 代謝物濃度の ALDH2 活性タイプまたは雌雄の間で行った t 検定結果

		血中			肝臓中			脳中		
		WT雄	KO雄	KO雌	WT雄	KO雄	KO雌	WT雄	KO雄	KO雌
ETBE濃度	WT雄	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	WT雌	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KO雌	—	—	N.D.	—	—	雄<雌	—	—	雄<雌
アセトアルデヒド濃度	WT雄	雄<雌	WT<KO	—	雄<雌	WT>KO	—	雄<雌	N.D.	—
	WT雌	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO	—	—	N.D.
	KO雌	—	—	N.D.	—	—	雄<雌	—	—	N.D.
エタノール濃度	WT雄	雄<雌	WT<KO	—	雄<雌	WT<KO	—	雄>雌	WT<KO	—
	WT雌	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO
	KO雌	—	—	N.D.	—	—	雄>雌	—	—	雄>雌
TBA濃度	WT雄	雄<雌	WT<KO	—	N.D.	N.D.	—	N.D.	N.D.	—
	WT雌	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO
	KO雌	—	—	N.D.	—	—	雄<雌	—	—	N.D.
MPD濃度	WT雄	N.D.	N.D.	—	N.D.	N.D.	—	N.D.	N.D.	—
	WT雌	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO
	KO雌	—	—	N.D.	—	—	N.D.	—	—	N.D.
アセトン濃度	WT雄	雄<雌	WT<KO	—	N.D.	N.D.	—	雄>雌	WT<KO	—
	WT雌	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO	—	—	WT<KO
	KO雌	—	—	雄<雌	—	—	雄<雌	—	—	雄<雌

WT:野生型マウス, KO:*Aldh2*遺伝子 KO 型マウス.

測定された各物質の 0~30 時間における濃度の平均値でスチューデントの t 検定を行った. 測定限界値以下の測定点は 0 を代入せず, 欠損値として扱った. 検定を行っていない部分は「-」マークを表示し, 有意差が無い場合には「N.D.」と表示し, 有意差がある場合に不等号記号を付けた.

検定の結果を示した. 野生型の方が KO 型よりも濃度が高かったのは肝臓のアセトアルデヒドのみで, 他の測定物質は KO 型の方が濃度は高いか同じ位であった.

血液中や組織中の MPD については, KO 型の雌は野生型の雌と比較して有意に高かったが, 雌雄差および KO 型の雄と野生型の雄では差は検出されなかった. 組織中の TBA についてもほぼ同様の傾向であった. 血液中の TBA に関しては野生型の雄は野生型の雌や KO 型の雄と比較して有意に高濃度であった. 組織中のエタノールにおいては KO 型の雄の方が KO 型の雌よりも有意に高濃度であった.

TBA の経時的な濃度変化は雌雄ともに血, 肝臓, 脳, 精巣 (雄のみ) のどの部位でも図 5 に示したような性状であった. 雄の場合, 血液中濃度は最大値が野生型で 360, KO 型で 1,460 nmol/ml であった. 雄の野生型の脳内では 1,190, 精巣では 802 nmol/g, KO 型では, 脳で 2,600, 精巣では 2,600 nmol/g であった. ばく露開始から 6 時間目の血液中 TBA 濃度の KO 型/野生型の比は雄で 4.04,

メスで 3.17 であった. ばく露開始から 10~12 時間後には雌雄どちらも TBA 濃度の野生型と KO 型の差はなくなっていた (図 5). しかし, エタノールやアセトアルデヒドは経時的な変動は見せず (図 5), ばく露開始から 30 時間目まで野生型も KO 型もタイプ間に差はあったが, それぞれ一定の濃度を保っていた. 表 1 に示すように, 雄の肝臓のアセトアルデヒドを除いて雌雄どちらも KO 型の方が野生型よりも濃度は高かった.

実験②について, 表 2 にアセトアルデヒドを添加した場合の, 雄のアセトアルデヒドの代謝能とエタノールの生成速度を示す. アセトアルデヒド代謝能の野生型の 0 ppm の平均値を 1 とした相対値で示した. NAD⁺を添加した群でアセトアルデヒドが代謝されエタノールが増加していた. アセトアルデヒドを添加した場合の雌のアセトアルデヒド代謝能は大変高く, 雄と同じ条件で測定したにも関わらず, 約 1 分で基質の 50~70% が反応してしまい, アセトアルデヒドの代謝速度, エタノールの生成速度は測れなかった. 代謝能, 生成速度としては正確な

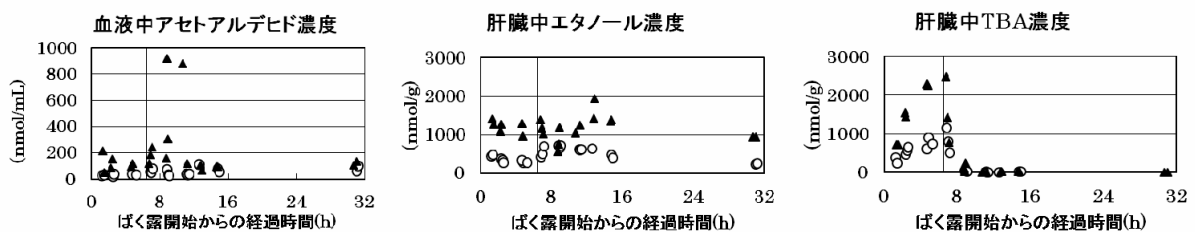


図 5. 雄性マウスの血液中アセトアルデヒド濃度および肝臓中のエタノールと TBA 濃度

○: 野生型マウス, ▲: *Aldh2*遺伝子 KO マウス.

表2 雄性マウスの肝臓へのアセトアルデヒド添加時のアセトアルデヒド代謝能とエタノール生成速度

添加物	アセトアルデヒド代謝能				単位時間当たりのエタノール生成量			
	PBS	+NAD ⁺	+NADPH	+NAD ⁺ +NADPH	PBS	+NAD ⁺	+NADPH	+NAD ⁺ +NADPH
WT								
0 ppm	1.0	26.4	4.3	30.5	0.0	18.2	3.4	19.0
500 ppm	1.0	25.9	2.7	34.8	0.0	21.1	1.8	17.1
1,750 ppm	1.0	31.1	4.2	34.9	0.0	17.7	0.3	22.5
5,000 ppm	0.9	25.6	2.7	36.5	0.2	17.3	1.5	25.1
KO								
0 ppm	0.8	17.8	5.0	19.6 *	0.0	13.4	3.5	15.5
500 ppm	1.9	18.9	2.9	21.6	0.1	14.4	1.0	18.3
1,750 ppm	1.8	20.5	5.2	28.7	0.2	28.7	4.0	30.9
5,000 ppm	1.1	24.5	4.6	32.0	0.1	25.2	3.7	42.0

WT：野生型マウス，KO：Aldh2遺伝子 KO型マウス。

アセトアルデヒド代謝能における PBS 添加グループの野生型 0 ppm 群を 1 とした時の各群の反応量。(245 nmol/g/min = 1)。

*：野生型と KO 型の間のスチューデントの t 検定で p < 0.05 で有意であることを示す。

値ではないが、1 分目の値でアセトアルデヒドの減少量を計算すると、野生型 0 ppm 群の場合 PBS 添加で、24±41，NAD⁺添加で 63600±17900，NADPH 添加で 81800±29300，両補酵素添加で 115000±10800（単位は nmol/g）であり、1 分目で測定された野生型 0 ppm 群のエタノール濃度は PBS 添加で、11±24，NAD⁺添加で 38100±17400，NADPH 添加で 115000±42900，両補酵素添加で 136000±21100（単位は nmol/g）であった。各ばく露濃度における野生型と KO 型間の t 検定や各タイプにおけるばく露濃度間のダネット多重 t 検定を行ったが、差は検出されなかった。雌の場合、雄のような補酵素の違いによる差は見受けられなかった。ETBE 添加群の両補酵素を添加した群では、雄はエタノールの生成速度のみが、野生型群に比べて KO 群が有意に高かった（データ非表示）。雌はエタノール生成速度に野生型と KO 型の差はなく、各タイプとも TBA の生成速度が対照群に比べて 5,000 ppm で有意に増加した（データ非表示）。

実験③について、ばく露終了直後から 1 時間の間に排出された雄の尿中総 TBA 濃度は、1 ppm では KO 型の方が有意に野生型よりも濃度が高く、野生型、KO 型の両方のタイプで用量依存的に増加したが、5 ppm 以上の濃度では各タイプ間に有意差はなかった（表 3）。しかし、ばく露終了後 1-2 時間の雄の採取尿では 1 ppm，5 ppm と 50 ppm で、また、2-3，3-5 時間の雄の採取尿では、ばく露群は全て KO 型の方が総 TBA 濃度は有意に高かった（表 3）。

4 考察

ETBE はヒトやラットでは CYP2A6 などによりアセトアルデヒドと TBA に代謝され、さらにアセトアルデヒドは ALDH2 などの酵素によって無毒化される³⁾。アセトアルデヒドは発がん性があり、ALDH2 が主要代謝酵素なので、問題にしている DNA 損傷の主因候補であ

る。また、TBA の代謝も関連酵素は明らかにされていないが、主な代謝経路として MPD と 2-ヒドロキシ-2-メチルプロパナールを経て HIBA に代謝されて尿中に排泄されることが知られている³⁾。2-ヒドロキシ-2-メチルプロパナールはアルデヒドなので ALDH2 が代謝に関与していることが疑われ、DNA 損傷の一因である事が否定できない状態である。

まず、TBA 代謝への ALDH2 の関与についての考察をするため、実験①にての TBA と MPD の濃度に注目した。雄の血液中の 30 時間における平均 TBA 濃度には野生型と KO 型の両タイプのマウス間に有意差があり、組織中の TBA 濃度に有意差はなかったが（表 1）、6 時間ばく露直後の濃度は組織中で 2~3 倍程度あり（図 5）、血液中濃度と比例関係にある経時的な動きは見せていた。雌の TBA 濃度は KO 型マウスにおいて血液中、組織中共に有意に濃度が高かった（表 1）。MPD 濃度においても雄は有意差が無かったが（表 1）、6 時間ばく露直後の KO 型の MPD 濃度は野生型の 1.4~2.1 倍を示し（データ非表示）、雌では TBA と同じく血液中、組織中共に有意に濃度が高かった（表 1）。これらの結果により、ALDH2 が 2-ヒドロキシ-2-メチルプロパナールから HIBA への代謝に関与しているので KO 型では代謝が進まず、TBA や MPD の濃度が高くなったのではないかと考えられる。主なルートではないが、MPD はそのまま、TBA はグルクロン酸抱合体として尿中に排泄されることも知られている³⁾。ばく露終了直後から 1 時間の間に排出された雄の尿中総 TBA 濃度は、1 ppm では KO 型の方が有意に野生型よりも濃度が高かったが、5 ppm 以上の濃度では差はなかった（表 3）。しかし、ばく露終了後 1-2 時間の雄の尿では 1 ppm，5 ppm と 50 ppm で、ばく露終了後 2-3，3-5 時間の雄の尿では、ばく露群は全て KO 型の方が総 TBA 濃度は有意に高かった（表 3）。TBA の排出から考察すると、おそらくグルクロン酸抱合

表3 ETBE6時間ばく露後の雄マウスの尿中総TBA濃度の平均値の経時変化

ばく露後の 経過時間	0-1h			1-2h			2-3h			3-5h			5-7h		
	n	平均値		n	平均値		n	平均値		n	平均値		n	平均値	
WT															
0 ppm	10	0.0		10	0.0		7	0.0		7	0.0		6	0.0	
1 ppm	5	114.2	**	4	58.2	**	3	40.0	*	5	26.3	*	3	19.5	
5 ppm	5	470.3		5	295.4	*	4	104.2	**	5	71.6	**	4	47.4	*
50 ppm	5	3109.3		5	2269.7	*	3	1029.8	*	5	569.6	*	4	210.1	*
500 ppm	5	67261.9	‡	5	53804.6	‡	5	22657.0	**‡	5	8189.8	**‡	5	4064.4	*‡
KO															
0 ppm	7	0.0		9	0.0		3	0.0		9	0.0		6	0.0	
1 ppm	4	173.8	**	3	130.6	**	4	101.8	*	3	100.1	*	2	44.2	
5 ppm	5	559.9		9	464.5	*	5	302.3	**	6	183.6	**	5	129.7	*
50 ppm	7	4233.8		6	3726.8	*	5	2165.2	*	10	1622.7	*	2	825.9	*
500 ppm	6	68355.7	‡	7	62312.6	‡	7	46184.6	**‡	8	30047.5	**‡	5	14345.0	*‡

WT：野生型マウス，KO：Aldh2遺伝子 KO型マウス．単位は $\mu\text{mol/g}$ -クレアチニン．

ETBE6時間ばく露直後を0時間として尿を採取した．1組3匹で採尿ケージに入れ，野生型，KO型のそれぞれに5組作り，ばく露開始前の2週間で2回対照群(0 ppm)として尿を採取し，1週間ごとに低濃度から高濃度へと濃度を変えETBEに6時間ばく露して採尿した．KO型の5，50，500ppmばく露ではnが少なかったため，4週間置き，5，50，500ppmの濃度で再度1回ずつ採尿してnを増やした．

*：野生型とKO型の間のスチューデントのt検定で $p < 0.05$ で有意であることを示す．**：野生型とKO型の間のスチューデントのt検定で $p < 0.01$ で有意であることを示す．‡：各タイプ各時間におけるばく露濃度間で行ったダネットの多重t検定で $p < 0.01$ で有意であることを示す．

に関わる何らかの限界があるのでばく露直後では両タイプに差は見受けられなかったが，時間経過によって代謝が進み，グルクロン酸抱合に関わる何かが律速を脱した時点でALDH2によるHIBAへの代謝の有無が表れてきたのではないと思われる．これらの二つの実験結果からALDH2のTBAの代謝への関与が示唆された．

本プロジェクト研究による我々のETBE誘導性のDNA損傷の報告⁶⁾では，我々は野生型の雄，KO型の雄，野生型の雌，KO型の雌という4つのグループそれぞれに，0，500，1,750，5,000 ppm×6時間/日，5日/週の条件で13週間ばく露し，ばく露終了20時間後にコメットアッセイを行って，DNA損傷を評価した．それぞれの対照群に対して，DNA損傷の指標である白血球のTail intensity (TI)が有意に上昇したのは野生型の雄の5,000 ppm群，KO型の雌の5,000 ppm群とKO型の雄の500，1,750，5,000 ppm群であった．500 ppmにおいては，有意にTIが上昇したのは雄のKO型のみということになる．この結果を元に，実験①にてETBEばく露で変動が予測される5種類の代謝産物について測定を行い，各代謝産物について濃度を比較することで，組織依存性，雌雄差および野生型/KO型の差異を検討した．その結果，DNA損傷の主因候補であるアセトアルデヒドは，雌において血液中も肝臓中もKO型の方が濃度は有意に高かった(表1)．雄は血液中ではKO型の方が野生型よりも有意に濃度は高いが，肝臓では野生型の方が高く(表1)雌雄で反応の違いがあった．しかし，コメットアッセイで得られた白血球のTIの上昇とは逆の関係であった．一方で，エタノールは雌雄ともに血液，肝臓，脳においてKO型の方が有意に濃度は高かった(表1)．そして

KO型の雌雄差について，血液中では有意差は無かったが，組織中では雄の濃度の方が有意に高かった(表1)．これは他の代謝物等では見受けられず，白血球のTIの上昇と合致する結果であった．

また，TBAについても，雌雄で反応の違いが観察された．雄では血液中で野生型よりもKO型の方が濃度は高かったが，組織中では有意差が無かった．しかしながら，ETBE誘導性DNA損傷の実験結果とは合致しないことから，候補因子として適当ではないと考えられる．MPDについてもTBAと同様に，雄ではタイプ間の差が無く，雌ではKO型の濃度が高いという，白血球のTIの上昇のとは一致しないパターンであった．

アセトン濃度に関しては，元々HIBAから生成する量はごく少量と報告があるため³⁾，KO型におけるアセトンの減少が捉えられなかった可能性が考えられる．MPDからHIBAへの代謝にALDH2が関与するので，HIBAへの代謝が減少し，代謝産物のアセトンも同様に減少するのではないかとこの予測とは異なり，KO型でアセトン濃度が高かった(表1)．本実験から得られた結果のみでは適切な経路を提唱することは不可能であるが，ETBEばく露によって他の代謝系が影響されたことを窺わせるものであり，今後さらに検討が必要である．しかし，KO型群において濃度上昇が観察されたのは雌であったので，白血球のTIの上昇パターンとは一致しないため，コメットアッセイで雄のKO型のみで観察されたTI上昇との整合性は得られなかった．

以上をまとめると，著者らが先行研究で得たETBE誘導性DNA損傷の実験結果である，白血球のTIの上昇と最も整合性が認められるのはエタノールであった．しか

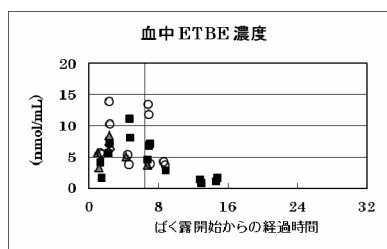


図6. 血液中 ETBE 濃度の経時的変化

◇:野生型の雄マウス, ■: *Aldh2* 遺伝子 KO 型の雄マウス,
△:野生型の雌マウス, ○: *Aldh2* 遺伝子 KO 型の雌マウス.

しながら、エタノールの毒性は代謝物のアセトアルデヒドに起因することは既知であり、有機化学的側面から考慮しても、エタノールよりはアセトアルデヒドの方が反応性に富むため、DNA 突然変異や修復機能への関与が疑われる DNA アダクト（付加体）を作りやすいように思われる。

実験②の結果は、添加したアセトアルデヒドの減少がエタノールの増加という形で表れることが示されている。この結果は、ETBE 代謝によって作られた過剰のアセトアルデヒドの排除が間に合わない際に、一時的にエタノールの形で留保される可能性を示すものと考えられる。

また、KO 型において組織中のエタノール濃度が雄よりも雌の方が低い（表 1）ことから、雌の方が雄よりアセトアルデヒドの酢酸への代謝が速いであろうことは推察できる。エタノール濃度が雄よりも雌の方が低いことの他の理由として、CYP2A6 などによる ETBE からアセトアルデヒドへの代謝が雌で遅いことも考えられ、雌の血液中の ETBE 濃度が KO 型において雄よりも高濃度であった（表 1）ことはこの考え方を支持すると思われる。しかしながら、文献的には、C57BL/6J 系マウスの CYP2A6 活性に顕著な性差は認められていない¹¹⁾。また、雌の方が ETBE の生体からの排出は早く、ばく露開始から 12 時間目には測定限界値に達して測定不能であった（図 6）。それに対して雄では、ばく露開始から 14 時間目でも低濃度で測定できた（図 6）。このことから寄与度は低いと考えられる。これらのことから ETBE の分解経路におけるアセトアルデヒド代謝に関して、潜在的な雌雄差の可能性を示すものと考えられる。

5 倫理規定

本実験は「労働安全衛生総合研究所動物実験委員会」の承認を受け、労働安全衛生総合研究所動物実験指針に準拠して行った。

6 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的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。

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) 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
- 3) McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review. *Crit. Rev. Toxicol.* 2007; 37: 287-312.
- 4) Le Gal A, Dréano Y, Giovanni P, Berthou F. Human cytochrome P450 2A6 is the major enzyme involved in the metabolism of three alkoxyethers used as oxyfuels. *Toxicol. Letters.* 2001; 124: 47-58.
- 5) Takeshita T, Morimoto K, Mao XQ, Hashimoto T, Furuyama J. Phenotypic differences in low K_m aldehyde dehydrogenase in Japanese workers. *Lancet.* 1993; 341: 837-838.
- 6) Weng Z, Suda M, Ohtani K, Mei N, Kawamoto T, Nakajima T, Wang RS. *Aldh2* knockout mice were more sensitive to DNA damage in leukocytes due to ethyl tertiary butyl ether exposure. *Ind. Health.* 2011; 49 : 396-399.
- 7) 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.
- 8) 王 瑞生, 翁 祖銓, 須田 恵, 大谷勝己, 柳場由絵. 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 2012; 54(Suppl.): 464.
- 9) Eitaki Y, Kawai T, Omae K. Exposure assessment of ETBE in gas station workers and gasoline tanker truck drivers. *J. Occup. Health.* 2011; 53: 423-431.
- 10) Amberg A, Rosner E, Dekant W. Biotransformation and kinetics of excretion of methyl-tert-butyl ether in rats and humans. *Toxicol. Sci.* 1999; 51: 1-8.
- 11) van Iersel M, Walters DG, Price RJ, Lovell DP, Lake BG. Sex and strain differences in mouse hepatic microsomal coumarin 7-hydroxylase activity. *Food Chem. Toxicol.* 1994; 32: 387-390.