

ETBE の生体影響に対する雌雄，加齢，遺伝素因の修飾作用

王 瑞生*1 翁 祖銓*1,*2 須田 恵*1 柳場 由絵*1 大谷 勝己*3

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はガソリンに混合して車両用の燃料として平成 22 年から本格的に使用されている。動物を用いた毒性研究から，ETBE は基本的に低毒性物質であると判明している。しかし，この物質に対する毒性評価は十分とは言えず，その生体影響に対する懸念からいくつかの国・地域で使用禁止となっている。現在まで，ETBE の毒性評価は一般的な実験動物で行われている。しかし，多様な労働者集団を考慮すると，性，年齢，代謝酵素活性の欠損などの生体因子による修飾作用を検討し，ETBE 毒性に対する感受性の変化を明らかにする必要がある。本研究では，種々のエンドポイントから ETBE の生体影響に雌雄差が存在することが判明し，雌性マウスより雄性マウスにおいて ETBE の生体影響が著しく大きいことを明らかにした。また，若年 (2 か月) と老齢 (15 か月) マウスを用いて検討した結果，両者の間に大きな違いがなく，加齢による ETBE 作用への修飾はないことを明らかにした。さらに ETBE の体内代謝に関与している CYP2E1 および ALDH2 酵素の遺伝子ノックアウトマウスを用いて検討した結果，CYP2E1 の欠損は ETBE による種々の生体作用に対して殆ど影響を与えないこと，ALDH2 の欠損では ETBE の生体作用がより大きく検出され，毒性に対する感受性が高くなることを明らかにした。これらの結果から ETBE の有害性評価や職場のばく露限界値設定においては性差や代謝酵素などの生体因子を考慮する必要があ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, DNA 損傷, 性差, 加齢, 遺伝子多型, 吸入ばく露。

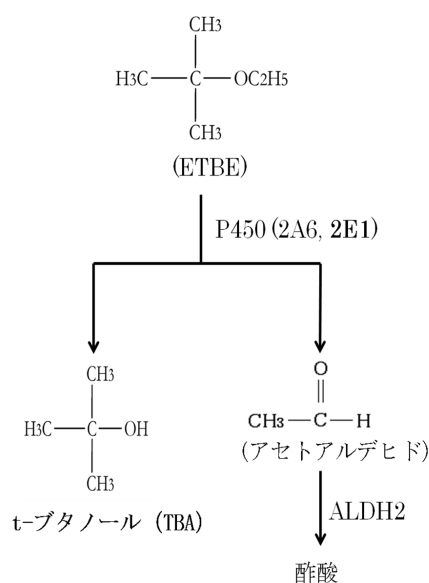
1 はじめに

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はガソリンに混合して輸送車両用の燃料として平成 22 年から本格的に使用されている¹⁾。動物を用いた毒性研究から，ETBE は基本的に低毒性物質であると判明している。先行の動物実験から，高濃度 ETBE の慢性曝露後，動物肝臓の重量増加や肝細胞肥大が観察され，これらの結果から 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，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³⁾。しかし，ETBE に対する毒性評価は必ずしも十分とは言えず，その生体影響に対する懸念が依然としてある。オーストラリアやアメリカのいくつかの州では，ヒトの健康への影響に対する懸念からその使用が禁止されている。

ETBE は体内で CYP2E1 などの酵素の触媒作用によってアセトアルデヒドとターシャリーブチルアルコール (TBA) に代謝され，TBA はさらにアルコール系物質の代謝経路で中間のアルデヒド類物質を経由して代謝・排泄される (図 1)。この過程は性や加齢によって影響を受ける可能性があり，その結果，ETBE の体内における毒性発現が変わってくるのが考えられる。特にアルデヒ

ド類の代謝に関与しているアルデヒド脱水素酵素の ALDH2 は，多くの東アジア人にその酵素活性が低いことが知られており^{4,5)}，これらの個体では ETBE は異なる毒性発現を示す可能性がある。労働現場には女性や高齢の労働者が多く進出しており，また，遺伝素因などによる代謝酵素活性の個人差も明らかに存在している。これらの現状を考慮した ETBE の有害性評価を行う必要があると思われる。

本研究では，雌雄動物，若年と老齢動物，CYP2E1 や ALDH2 酵素欠損動物を使用し，コメットアッセイによる ETBE ばく露による DNA 損傷程度や酸化ストレスの



*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

図 1. ETBE の体内における代謝経路

検討や網状赤血球の小核含有を指標とした毒性評価により、ETBE ばく露後の種々の生体影響を調べ、これらの生体因子による修飾作用の有無を解明した。

2 方法

1) 性差についての実験

本実験では、雌雄 C57BL/6J 系マウス（野生型，8 週齢，日本チャールス・リバー株式会社より購入）及び雌雄の *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス（KO 型）を使用した。KO 型マウスは自家繁殖で作製した⁶⁾。全ての動物は室温 22±1℃，湿度 55±5% の SPF 環境下で飼育され、餌（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 4 群に分け，ETBE（純度 97% 以上，東京化成）を 0（対照群），500，1750，5000 ppm の濃度で各群に投与した。投与スケジュールは，毎日 6 時間，5 日/週で 13 週間吸入曝露とした。ばく露濃度の選定は先行の研究を参照した⁷⁻⁹⁾。動物は，最終曝露の 20 時間後に解剖した。腹腔静脈から採血して，白血球における DNA 損傷を測定するためのコメットアッセイ用および網状赤血球における小核頻度を評価するためのフローサイトメトリー分析用に分けた。

アルカリ性コメットアッセイ（シングルセル電気泳動アッセイ法）^{10,11)}を行うため，EDTA 抗凝固剤を添加し

た新鮮血液を 5 μl を取って 200 μl の 1% 低熔点アガロースと 38℃ 下で混合した後，30 μl を 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 分間溶解した。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 個の細胞のコメットテールを観察した。DNA 損傷度は最も使われているテールインテンシティ（tail intensity, TI）を用いた¹²⁾。

網状赤血球における小核頻度の測定は Dertinger らの方法を使用した¹³⁾。150 μl の生食水（500 U ヘパリン/ml を含む）に 50 μl の血液を混合して，予め一晩 -80℃ で冷却しておいたメタノールに素早く固定して，解析まで -80℃ で保存した。解析は Litron 社の MicroFlow Plus Kit を使用した。すなわち，幼若赤血球に特異的な CD71 抗原を使用して，網状赤血球の比率を測定し，小核の有無は propidium iodide の DNA に対する核染色で識別することによりフローサイトメトリーを用いて網状赤血球中の小核含有の比率を算出した。

2) 加齢影響についての実験

2 ヶ月および 15 ヶ月の雄性 C57BL/6 系野生型（WT）マウスと *Aldh2* 遺伝子ノックアウト（KO）マウスを使

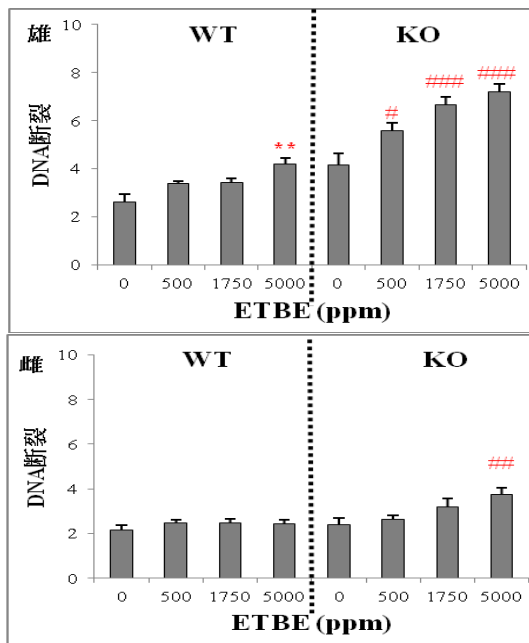


図 2. ETBE 13 週間ばく露後のマウス白血球における DNA 損傷度。

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。

WT: 野生型マウス，KO: *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス。

** p < 0.01, 野生型マウス対照群との比較。

p < 0.05, ### p < 0.01, #### p < 0.001, KO マウス対照群との比較。

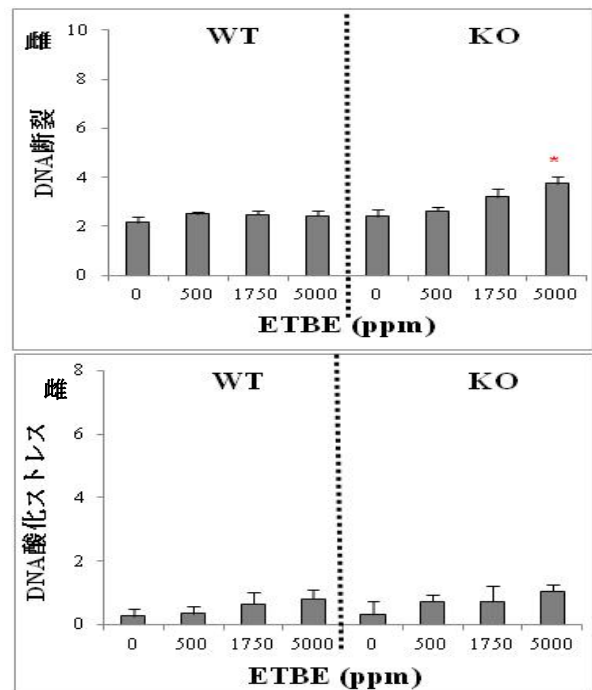


図 3. ETBE 13 週間吸入ばく露後の白血球における DNA 酸化損傷。

hOGG1 コメットアッセイ測定のコメットテール輝度 (TI 値) の増加分。

WT: 野生型マウス，KO: *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス。

* p < 0.01, KO マウス対照群との比較。

用した。WT マウスは日本チャールス・リバー社から購入し、KO マウスは自家繁殖したものであった。マウスに 0, 500, 1,750 と 5,000 ppm の ETBE を 6 時間/日、5 日/週、計 6 週間曝露させた。最終曝露が終了した 20 時間後、血液を採集し、コメットアッセイ（シングルセル電気泳動アッセイ法）を用いて、白血球における DNA の初期損傷を解析した。この測定は DNA 損傷の標準評価法のアルカリ性コメットアッセイ法^{11,12}と hOGG1 (8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ) 処理後のコメットアッセイ法¹⁴で行った。DNA 損傷度は最も使われているコメットテールの輝度（テールインテンシティ, tail intensity, TI）を用いた。動物の購入または自家繁殖、飼育環境などは本プロジェクト研究の他の報告記載と同様である。

3) *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウスを使用した実験

SV129 系野生型とその *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウス¹⁵は名古屋大学で自家繁殖されたものを導入して、最低 1 週間順化した後、吸入ばく露実験に使用した。雌雄のマウスに 0 ppm, 500 ppm, 1,750 ppm と 5,000 ppm の ETBE を、6 時間/日、5 日/週、連続 6 週間反復曝露させた。最終曝露が終了した 20 時間後、血液を採集し、コメットアッセイ（シングルセル電気泳動アッセイ法）を用いて、白血球における DNA の初期損傷を解析した。この測定は DNA 損傷の標準評価法のアルカリ性コメットアッセイ法^{11,12}と hOGG1 (8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ) 処理後のコメットアッセイ法¹⁴で行った。飼育環境などは本プロジェクト研究の他の報告と同様である。

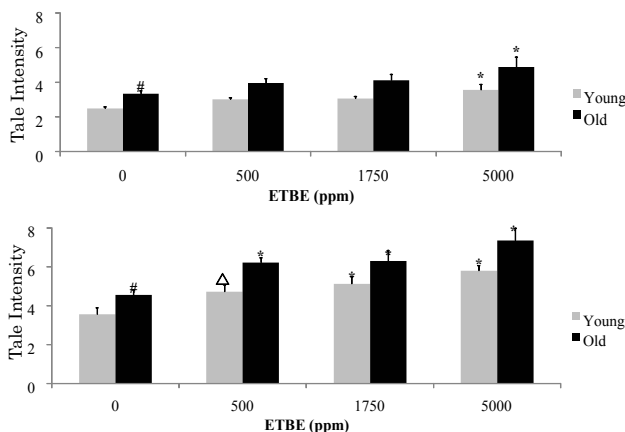


図 4. ETBE 6 週間ばく露後の若齢と老齢雄性マウスの白血球における DNA 損傷度
コメットテールの輝度, TI 値, バーは平均値と標準誤差を表している。

上の図は野生型マウス, 下の図は *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス。

* $p < 0.05$, それぞれの対照群との比較。

$p < 0.05$, 若齢対照群との比較。

△, $p = 0.060$ 。

4) *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスを使用した実験

加齢影響の実験と並行して行ったため、動物等はその中で記載した通りである。

5) 統計解析

データを分散分析で検討した後、Dunnett 法で各群間の有意差検定を行った。統計的有意差水準は $p < 0.05$ を使用した。

上記一連の動物実験は「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み換え DNA 委員会」の審査・承認を受け実施された。

3 結果

1) 性差についての実験結果

雄性マウスは、野生型では 5,000 ppm 曝露群のみにおいて白血球の TI 値が有意に上昇した。しかし、KO タイプでは、曝露濃度依存的に TI 値の上昇傾向があり、いずれの群も対照群より有意に高かった (図 2)。一方、雌マウスは、野生型ではどちらの曝露群においても DNA 損傷の増加は認められなかった。KO タイプでも 5,000 ppm 群のみ、TI 値の上昇が観察された。hOGG1 酵素処理後、TI 値の増加分は細胞内の 8-OH-dG に相当すると思われる。今回、この増加は雄の KO マウス曝露群で増加傾向が認められ、有意差は高濃度群と対照群の間だけに検出されたが、雌性マウスでは有意な増加はなかった (図 3)。網状赤血球小核の頻度はベースラインとして KO マウスでは野生型マウスより著しく高かった。ETBE ばく露後の小核頻度はコメットアッセイと類似した結果が得られた。つまり、雄性マウスは、野生型では 5,000 ppm 曝露群のみにおいて小核頻度が有意に上昇し、KO タイプでは、1750 ppm と 5000 ppm 群において有意に上昇した。雌性マウスは、野生型ではいずれの群においても変化が認められず、KO マウスでも高濃度群のみ対照群との差はあったが、 $p = 0.052$ で統計的に有意ではなかった。

2) 加齢影響についての実験結果

若齢と老齢の野生型マウスにおいて、白血球 DNA 損傷の上昇は高濃度曝露群のみにおいて有意に上昇した。KO マウスにおいては両週齢のマウスのどちらも ETBE ばく露濃度と DNA 損傷の間に有意な用量反応が示された (図 4)。また、DNA 酸化損傷度を表す hOGG1 識別した TI 値の上昇値は、KO マウスの高ばく露群で認められた (図 5)。これらの結果は私達が行った 13 週間ばく露実験の結果と一致している。一方、同じばく露濃度では、若齢マウスと比べて、老齢マウスの DNA 損傷が高かった。しかし、総 DNA 損傷からベースライン DNA

損傷を引いた後、ETBE ばく露によって誘発されたネット DNA 損傷は両遺伝タイプの老齢と若齢マウスの間には有意な差が認められなかった。

3) *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウスを使用した実験結果

野生型の雄マウスにおいて、低濃度曝露群と非曝露群の間に TI 値の有意差が認められなかったが、中濃度と高濃度曝露群は非曝露群と比べて、TI 値が有意に高くなった (図 6)。雄の *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウスは、高濃度曝露群のみにおいて TI 値が有意に上昇した。DNA 損傷修復酵素 hOGG1 の修飾コメットアッセイ法では、雄の野生型または *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウスはいずれの ETBE 曝露群においても、DNA 酸化損傷を表す TI 値の上昇値は非曝露群に比べて、有意な上昇は認められなかった (図 7)。一方、雌の野生型または *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウトマウスでは、すべての ETBE 曝露群で、非曝露群と比べて、基礎 TI 値及び hOGG1 修飾法 TI 値の上昇値に有意な変化は認められなかった。

4) *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスを使用した実験結果

加齢影響の実験結果の中で記載した通りである。

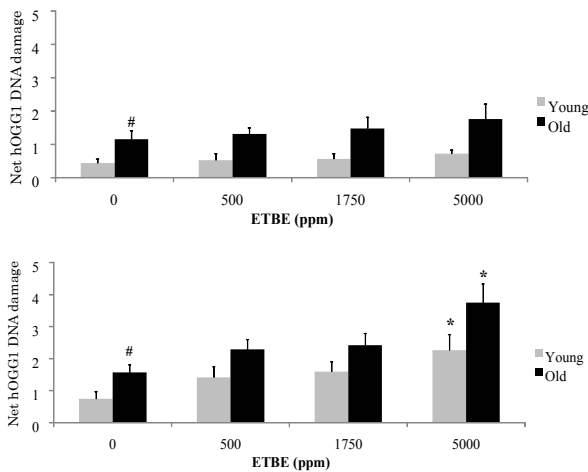


図5. ETBE 6週間ばく露後の若齢と老齢雄性マウスの白血球における DNA 酸化損傷

hOGG1 コメットアッセイ測定のコメットテール輝度の増加分。

バーは平均値と標準誤差を表している。

上の図、野生型マウス、下の図、*Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウス。

* $p < 0.05$, それぞれの対照群との比較。

$p < 0.05$, 若齢対照群との比較。

4 考察

ETBE の体内代謝の過程でアセトアルデヒドや他のアルデヒド類が生成される。アルデヒド類物質は種々の毒

性を有しており^{16,17}、DNA や染色体に対しても毒性を示しているため、国際がん研究機関はアセトアルデヒドをグループ 2B (人に対して発がん性があるかもしれない) に分類している¹⁸。従って ETBE ばく露後、生体内の細胞 DNA 上に損傷が発生する可能性があると思われる。DNA またはそれで構成される染色体の損傷には種々のものがあるが、アルカリ性コメットアッセイ法で検出できる損傷は早期の損傷と言われている。また、末梢血中に出た小核を持つ赤血球は異常赤血球であるが、マウスでは脾臓でトラップされ壊されることなく、正常な赤血球と同様の寿命 (約 30 日) を全うする。従って、網状赤血球の小核頻度は蓄積される遺伝子影響の指標として、被験物質の長期影響の評価が可能である。さらに本研究で特異的に DNA 上の酸化損傷を識別できる hOGG1 を用いた解析より、ETBE ばく露の DNA 損傷における酸化損傷の寄与を評価することができた (図 3, 5)。

性差についての実験結果から、野生型と *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスのいずれにおいても ETBE の生体影響に有意な性差が観察された (図 2, 3)。野生型の場合、雄マウスでは 5000 ppm の ETBE ばく露で DNA 損傷が検出されたが、雌マウスでは検出されなかった。*Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスでも、雌では最高濃度の 5,000 ppm ETBE ばく露群のみで損傷が認められたが、雄マウスでは 500 ppm 群でも検出された。別の実験

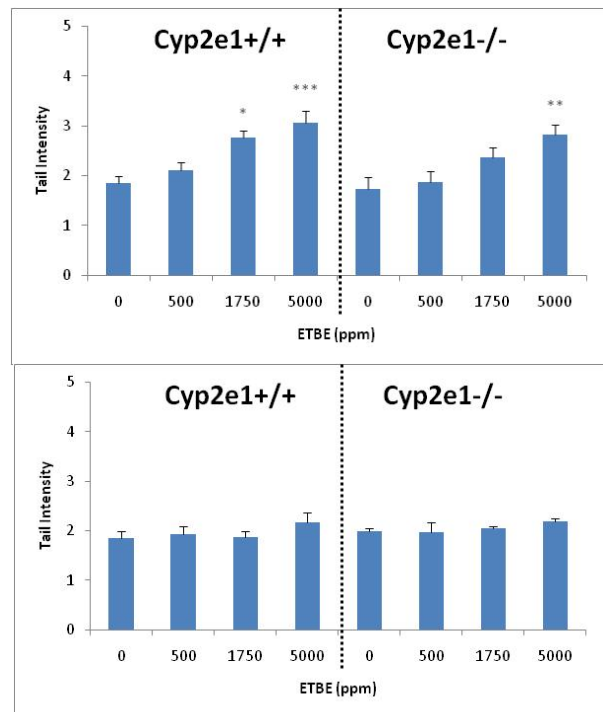


図 6. ETBE 6週間ばく露後の野生型 (*CYP2e1*^{+/+}) および *CYP2e1* 遺伝子ノックアウト (*CYP2e1*^{-/-}) マウス白血球 DNA 損傷度。

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。

上のパネルは 雄性マウス、下のパネルは雌性マウスである。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, それぞれの対照

では、この作用は 200 ppm の低い濃度でも検出され、雄、雌マウスの ETBE 毒性に対する感度は 10 倍以上の差があり、ETBE の影響は雄マウスでより顕著であることを示唆した。この遺伝損傷の性差のメカニズムについては不明である。吸入ばく露時の ETBE 体内吸収率、ETBE の代謝率や DNA 修復能に対する性ホルモンの影響など、いくつかのステップにおける雌雄間の差が考えられるが、さらなる検討が必要である。

加齢の影響について検討した結果、老齢マウスにおいても ETBE ばく露によって DNA 損傷が誘発され、この作用は両週齢のマウスの間に同程度であることが判明した (図 4, 5)。また、若齢と同様、老齢マウスにおいても ALDH2 酵素活性の欠損によって ETBE の遺伝毒性作用が増強されることが確認された。一方、加齢によるベースライン DNA 損傷への影響も示唆されたが、これは老化に伴う DNA 修復能の低下によって内在性 DNA 損傷が蓄積することと関係していると思われる¹⁹⁾。

CYP 2E1 酵素は ETBE の代謝に関与するが、本研究ではその欠損があっても ETBE ばく露による遺伝子損傷などに特に変化がないことが判明した (図 6)。これは、CYP2E1 の欠損が、他の酵素 (例えば CYP2A6) によって補われた可能性を示唆するものと考えられた。今後、タンパク質や mRNA レベルでの発現および酵素活性の変動について検討して証明したい。

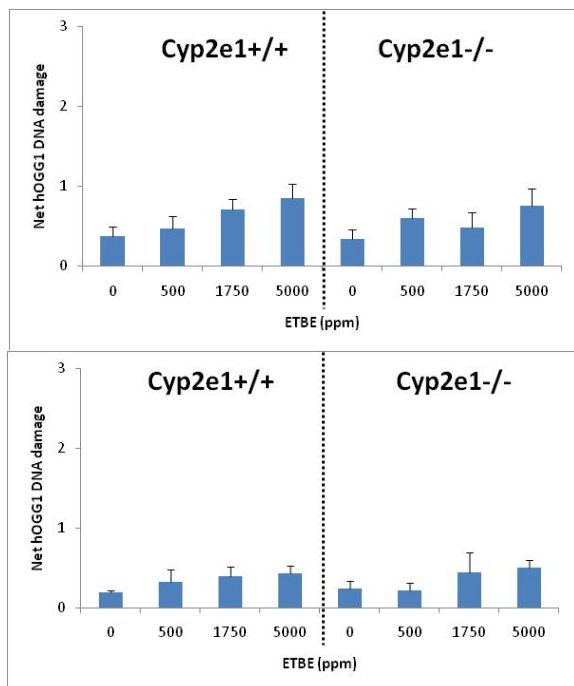


図 7. ETBE 6 週間ばく露後の野生型 (*Cyp2e1*^{+/+}) および *Cyp2e1* 遺伝子ノックアウト (*Cyp2e1*^{-/-}) マウス白血球における hOGG1 識別した DNA 損傷度

縦軸は hOGG1TI 値とベースライン TI 値との差、バーは平均値と標準誤差を表している。

上のパネルは雄性マウス、下のパネルは雌性マウスである。

Aldh2 遺伝子ノックアウトマウスを用いた一連の検討から、この酵素が欠損した場合、ETBE ばく露による DNA 損傷が白血球においても著しく高くなることが示唆され、肝細胞での結果と一致したものとなった²⁰⁾。さらに蓄積した遺伝毒性の指標であるマウス外周血の小核頻度の上昇からも、ETBE の毒性に対する *Aldh2* 遺伝子ノックアウトマウスの高感受性が証明された。このタイプのマウスにおいては、エタノール投与後に血中アセトアルデヒドが高濃度になること¹⁷⁾や、ETBE 急性ばく露時に血中アセトアルデヒドおよび TBA が高濃度になること (未発表結果) が知られており、この遺伝毒性に対する高感受性は少なくとも ETBE ばく露後にアルデヒド類が体内で高濃度となることに寄与していると考えられる。また、この遺伝子損傷は少なくとも、一部は DNA 塩基の酸化損傷によるものと解釈できる。

一連の実験の結果をまとめると以下のとおりである。ETBE の吸入ばく露は白血球の DNA に酸化損傷などの障害を与えて DNA 鎖の断裂や染色体の異常を誘発する。このような遺伝損傷は、雌より雄のほうでより顕著に現れる。加齢により細胞内の DNA 損傷レベルが上がるが、ETBE ばく露の遺伝影響に対しては特に修飾作用を有していない。ETBE の代謝に関与している CYP2E1 酵素の欠損により遺伝毒性は特に影響を受けないが、もう一つの酵素である ALDH2 の欠損によって ETBE の遺伝毒性作用は大きく増強される。このように化学物質の生体影響は、その物質自身の物理化学性質に大きく左右されるが、生体側の種々の因子にも著しく影響されることもある。未知の部分が多い新しい産業化学物質のリスク評価や作業環境の基準値設定にあたっては、これらの因子を考慮に入れる必要がある。

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。

なお、本文内容の一部および図 1 は以下の雑誌で発表した。

Weng Z, Suda M, Ohtani K, Mei N, Kawamoto T, Nakajima T and Wang RS. *Aldh2* knockout mice were sensitive to DNA damage in leukocyte due to ethyl tertiary butyl ether exposure. *Ind Health*. 2011; 49:396-399.

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
 - 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) Yokoyama A, Omori T, Yokoyama T. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and a new strategy for prevention and screening for cancer in the upper aerodigestive tract in East Asians. *Keio J Med.* 2010; 59,115:30.
 - 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) Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 2008; 23: 143-51.
 - 13) Dertinger SD, Torous DK, Tometsko KR. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res.* 1996; 371(3-4): 283-92.
 - 14) 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.
 - 15) Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 12063-7.
 - 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.
 - 18) International Agency for Research on Cancer. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1999; 71.
 - 19) Bertram C, Hass R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol. Chem.* 2008; 389, 211-20.
 - 20) 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.