

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

室内汚染微量化学物質の生体モニタリングと健康影響との関連に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 内山 巖雄

平成 15(2003)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

室内汚染微量化学物質の生体モニタリングと健康影響との関連に関する研究-----	1
内山巖雄	

II. 分担研究報告書

<i>Aldh2</i> ノックアウトマウスを用いた個体差の解明に関する研究-----	9
川本俊弘他	
(資料)「 <i>Aldh2</i> ^{-/-} および ^{+/+} マウスのアセトアルデヒド単回腹腔投与における 半数致死量(LD ₅₀)比較試験」のための予備的検討試験-----	35

室内汚染微量化学物質の生体モニタリングに関する研究-----	117
内山巖雄他	

家庭内の化学物質の種類と放出量の推定と季節変動の検討-----	129
嵐谷奎一他	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	177
--------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	179
----------------------	-----

室内汚染微量化学物質の生体モニタリングと健康影響との関連に関する研究

主任研究者 内山巖雄 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 教授

研究要旨：最近、室内汚染微量化学物質の問題がなっているが、これまで個人曝露評価が十分でなく、症状との関連も明らかではなかった。そこで本研究では、各分担研究者の特徴を生かし、化学物質の室内濃度、個人曝露濃度、尿中の濃度と症状との関連、*Aldh2* ノックアウトマウスを用いた個人差の解明等を目的とし、平成 14 年度は以下の結果を得た。

化学物質の室内発生源の一例としてドライクリーニング済み衣服からの VOC を測定した結果、パラフィン系炭化水素、芳香族炭化水素類が認められた。また代表的な VOC の室内濃度、個人曝露濃度の季節変化を測定し、冬季の暖房器具の使用による変動が大きかった。

東京都郊外 3 地区の新築マンション入居住民のうち本人の同意と測定希望のあった 18 世帯の 10~60 歳代の 34 名（男性 12 名、女性 22 名）の VOC の個人曝露量及び尿中濃度を測定した。

尿中ベンゼン濃度は喫煙者が非喫煙者に比して有意に高値を示した。p-ジクロロベンゼンは 3 世帯が室内環境指針値を超えており、尿中の p-ジクロロベンゼン濃度は個人曝露濃度と良く相関し、室内環境指針値を超える部屋で生活している人は有意に高い値を示した。

その他のトルエン、キシレン等については、調査したマンションがこれらの物質の使用を制限していたこと、24 時間換気システムがついていた事などから特に高い値は示されなかった。

分担研究者川本が開発した *Aldh2* ノックアウトマウス (*Aldh2* ^{-/-}マウス) は *Aldh2* ^{+/+} と比べ、自由摂取ではエタノール摂取量が有意に少なく、エタノール強制投与では血中アセトアルデヒド濃度が有意に高値となった。さらにアセトアルデヒド腹腔内投与で、*Aldh2* ^{-/-}マウスの LD₅₀ は *Aldh2* ^{+/+}マウスに比べ有意に低く、アセトアルデヒド感受性が高いことが示唆された。

分担研究者

嵐谷奎一・産業医科大学産業保健学部・教授

川本俊弘・産業医科大学医学部・教授

研究協力者

樺田尚樹・産業医科大学産業保健学部・助教授

小山倫浩・産業医科大学医学部・助教授

一瀬豊日・産業医科大学医学部・助手

金容大・産業医科大学医学部・海外流動研究員

北川恭子・浜松医科大学医学部・助手

松野康二・産業医科大学

共同利用研究センター・助教授

村山留美子・京都大学大学院工学研究科・助手

A. 研究目的

住環境が従来の開放型のものから閉鎖型の家屋に移行し、さらに、様々な化学物質を用いて作られる建材や家庭用品の使用、調理・暖房器具の使用が増えているのに伴い、室内の化学汚染物質の増大と、その汚染物質による人への

健康影響についての関心が高まっている。しかし、それらの化学物質について、実際にそこに住む人がどの程度曝露されているか、という曝露評価は現在ほとんど研究がなされていないのが現状である。室内汚染化学物質については、シックハウス症候群や化学物質過敏症といった症状との関連も報告されており、これらの物質について健康影響評価を行い、有効な対策を立てるためには個人曝露の評価が急務であると思われる。そこで、本研究は我々が開発した手法により、ベンゼン、トルエン、ホルムアルデヒド等の生体試料中（尿中、赤血球付加体）の濃度（内山、村山、嵐谷）と室内環境中濃度（嵐谷）を測定して、より正確な曝露アセスメントを行うと共に、対象者の症状と体内濃度との関連を検討する。また、分担研究者（川本）が開発した *Aldh2* ノックアウトマウスを用いてアセトアルデヒドを例とした感受性の違いや、有害性の検討を行い、いわゆる個体差を科

学的に解明することを目的とし、以下の結果を得た。

B. 研究方法

1) 衣類等からの化学物質発生量測定 (分担研究者・嵐谷奎一)

現在、クリーニング店で最もよく使われている石油系ドライクリーニング剤をジクロロメタンで希釈し、約 1 μ l をガスクロマトグラフ質量分析計 (日本電子製オートマス GC/MS) に注入し、含有成分の同定を行った。

次いでドライクリーニングを行った白衣を、デシケーター中に室温 (19 $^{\circ}$ C) で 24 時間放置し、気化した VOCs を捕集した。活性炭に捕集した VOCs 成分を 1ml の二硫化炭素で脱着し、ガスクロマトグラフからドライクリーニング済み衣類から発生する VOCs を同定した。

さらにドライクリーニング作業場内 3 箇所 NO₂ フィルターバッジ (東洋濾紙製)、アルデヒド・ケトン用パッシブガスチューブ (柴田科学製)、VOCs 用パッシブガスチューブ (柴田科学製)、をそれぞれ 24 時間放置し、化学物質を吸着捕集しそれぞれ測定した。また同様に個人曝露濃度を測定した。

2) 一般家庭を対象とした代表的化学物質の (分担研究者・嵐谷奎一)

VOCs は、拡散チューブに粒状活性炭を充填したパッシブガスチューブ (柴田科学製) を用いて行った。NO₂ の捕集には、フィルターバッジ・NO₂ サンプラーを用いて行った。アルデヒド類の測定にはパッシブガスチューブ (柴田科学製) を用いた。

3) HCHO の生物学的モニタリング (HCHO-Hb 測定) (分担研究者・嵐谷奎一)

血液はインフォームドコンセントを得た学生よりへパリン加採血し、遠心分離をすることによって血漿と赤血球層を分離させた。赤血球層は生理食塩水で三回洗浄後、蒸留水を加えて溶血し、さらに四塩化炭素を加えて高速遠心分離 (15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10min) し、debris の除去を行った。上層をエッペンドルフチューブに

分注し (=A 液)、測定試料とし、測定までに -80 $^{\circ}$ C にして凍結保存した。測定時には、さらに A 液を蒸留水で 4 倍希釈して A' 液を作り、よく混合した後、以下の処理をして測定した。反応溶液は酢酸アンモニウム (Wako 製、特級) 12.5g、dimedone (Wako 製、特級) 0.15g、酢酸 (Wako 製、特級) 0.2ml を蒸留水で 50ml にメスアップし、40 $^{\circ}$ C の温浴で溶かしたものをを用いた。反応は試料液 (=A' 液) と dimedone 溶液をそれぞれ 0.2ml ずつ混合し、沸騰水で 10 分加温した後、水で 5 分冷やして反応を停止させた。その後に酢酸を 4 μ l 加えた後、よく混合し HPLC で分離・定量した。反応後の時間によるピーク減衰があるため、溶液を混合し反応させた後から、HPLC での注入までは約 25 分間と常に同じ時間で行った。測定値はヘモグロビン濃度補正を行って求めた。

4) 室内汚染微量化学物質の尿中濃度の測定 (分担研究者・内山巖雄・村山留美子)

東京都郊外 a 市、b 区、c 市の新築マンション 3 戸の入居者のうち同意を得た上、尿中濃度測定の希望のあった 18 世帯の 10~60 歳代の 34 名 (男性 12 名、女性 22 名) を対象とした。対象マンションは同一会社が建築したものであり、低ホルムアルデヒド仕様、壁紙の接着剤はトルエンフリー、24 時間換気システムを備えていた。住んでからの体調の変化などを聞くアンケートを行った上、VOC 等の室内環境及び個人曝露濃度と尿中濃度を測定した。調査は 2003 年 1 月 18 日~3 月 4 日の期間に行った。

VOC パッシブサンプラー (SUPELCO 社製 VOC-SD) を 1 世帯につき居間と対象者の希望のあった 1 室の 2 箇所に 24 時間置き、室内濃度を測定した。また同様のパッシブサンプラーにストラップをつけて、対象者に首から提げ、24 時間普段と同様に生活してもらい個人曝露濃度を測定した。

さらに事前に、洗浄済み 10ml バイアルビンと採尿用紙コップを渡し、個人曝露濃度測定を行った同日の朝・昼・夜及び翌朝の原則 4 回の採尿後バイアルビンに密閉し、保冷箱に入れて

保存した。全採取終了後京都大学へ送付した。送付されたサンプルは測定終了まで4℃で保存した。室内環境濃度評価、個人曝露濃度評価の対象物質は、ベンゼン、トルエン、キシレン、p-ジクロロベンゼンの4種とした。定量下限値はいずれも0.02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

なお、室内環境及び個人曝露濃度の測定値については、東京都健康局より資料提供を受けた。

尿中のVOC測定対象物質はクロロホルム、ベンゼン、トルエン、m,p-キシレン、o-キシレン、p-ジクロロベンゼン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンとした。

尿は採取・保存用バイアルビンからシリンジを用いて2mlを抜取り、測定用バイアルに移し、内部標準物質（フルオロベンゼン GLサイエンス社製）を加え20℃で90分静置した後に、ダイナミックヘッドスペース/GC/MS法で測定した。ヘッドスペース導入装置にはパージ&トラップシステム（VOC-100、DKKエンジニアリング社製）を用い、パージガスにはHeを用いた。ガスクロマトグラフ質量分析計にはGCMS-QP2010（島津製作所製）、カラムにはキャピラリーカラム（Ultra Alloy UA-502）を用いた。測定対象とした8物質の内、クロロホルム、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンはほとんどのサンプルでピークが検出されなかったので残る4物質について定量した。

ベンゼン、トルエン、m-キシレン+p-キシレン、o-キシレン、p-ジクロロベンゼンの各定量下限値はそれぞれ、24.3ng/l、49.0ng/l、33.4ng/l、28.4ng/l、45.3ng/lであった。

測定値が定量下限値未満の場合は、定量下限値の1/2を測定値とした。

5) *Aldh2* ノックアウトマウスを用いた個体差の科学的解明に関する研究（分担研究者・川本俊弘）

川本が開発した *Aldh2* ノックアウトマウス（以後 *Aldh2* $-/-$ マウス）とコントロールマウス（C57BL/6Ncrj、以後 *Aldh2* $+/+$ マウス）を用いて、血液生化学的検査、各臓器の組織学的検査、CYPsの免疫組織科学検査、ウエス

タン・プロット法による肝のCyp蛋白量発現量を検討した。また *Aldh2* $-/-$ マウスにおけるアセトアルデヒド動態を検討し、腹腔内投与によるLD₅₀量を求めた。LD₅₀検査は（株）パナファーム・ラボラトリーズ安全性研究所に委託した。

（倫理面への配慮）

上記の調査および動物実験は、いずれも産業医科大学、および東京都の倫理規定に従って行った。特に生体試料の提供については、十分なインフォームドコンセントを行い、尿の提供は測定希望者に限って行い、測定者には個人名等の個人を同定できる情報は与えないなど、倫理面への配慮は十分注意して行った。

C. 研究結果

1) 衣類等からの化学物質発生量測定（分担・嵐谷）

石油系ドライクリーニング剤中の主要な化学物質としてノナン、デカン、ウンデカンを確認した。またドライクリーニング済み衣類からもノナン、デカン、ウンデカンを確認した。一方ドライクリーニング作業場、受付箇所、及び応接間の3ヶ所の測定ではウンデカン、1,2,4-トリメチルベンゼン、m/p-キシレンが比較的高値であり、作業従事者5人の個人曝露濃度を測定した結果、全員からベンゼン、m/p-キシレン、1,2,4-トリクロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン、ウンデカンを検出した。

2) 一般家庭を対象とした化学物質の測定（分担・嵐谷）

夏期のVOCsは20種類を検出し、p-ジクロロベンゼン、ウンデカンが比較的高値であった。冬期VOCsは22種類を検出した。オクタン、トルエン、1,2,4-トリメチルベンゼンが比較的高値であった。個人曝露濃度はトルエン、ノナン、デカン、p-ジクロロベンゼン、ウンデカンが4~7ppbと比較的高く、ベンゼンは約2ppbであった。夏期に比べ冬期のVOCs濃度が高い傾向であった。冬期NO₂濃度は台所>居間>個人>寝室>屋外で明らかに差が認められた

が、夏期はほぼ同じ値であった。冬季の屋外濃度は約 15ppb であったが、屋内は 3 倍から 4 倍の高値を示した。冬期のアルデヒド類濃度を測定した。冬期のアルデヒド類を測定した結果、HCHO 以外にアセトアルデヒド、プロピルアルデヒド、イソブチルアルデヒドを検出した。HCHO 濃度は室内は 10~20ppb で WHO の基準 (80ppb) 以下であった。アルデヒド濃度はいずれの箇所ともプロピルアルデヒド>ホルムアルデヒド>アセトアルデヒド>イソブチルアルデヒドで室内ではいずれの箇所も、同程度であった。

3) ホルムアルデヒド-Hb 付加体の測定法の確立(分担・嵐谷)

1,3-シクロヘキサジオン試薬を用いての HCHO-Hb 測定では感度が高く、また得られたクロマトグラムは単一ピークであったが、HCHO ピークの安定性と試薬 blank が高くなる難点があった。本研究に用いた Dimedone 試薬ではアルデヒド類がそれぞれ単一ピークで得られ、blank も比較的小さかった。赤血球を用いて得られた HCHO-Dimedone 誘導体のクロマトグラムのベースは低く、単一ピークとして得られた。HCHO 標準物質の保持時間と、血液試料を用いて得られた HCHO の保持時間のピークとが一致した。従って、試薬を用事調整する必要はあるが、blank も比較的小さい Dimedone 試薬を用いることによって、曝露指標としての HCHO-Hb 付加体の測定が可能であると考えられた。

4) 尿中 VOC のクロマトグラム(分担・内山)

GC/MS の SIM 法で測定したクロマトグラムは一般的に見られるクロマトグラムと、個人によっては稀に非常に多くのピークが現れるサンプルがあったが、今回は SIM 法のみでの測定であるために、m/z を指定した物質以外は同定できなかった。

5) 室内環境濃度(分担・内山)

ベンゼン、トルエン、キシレン、p-ジクロロベンゼンの各室内濃度の平均値 (Mean±SD)

はそれぞれ、 $2.31 \pm 1.28 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.93~7.48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、 $18.3 \pm 8.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (7.19~58.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、 $7.56 \pm 4.70 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (2.96~29.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、 $125.7 \pm 268.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.77~1043.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。p-ジクロロベンゼンについては3世帯で測定対象となった6室すべてで環境指針値を超えていた。なお、室内環境濃度については、現在より詳細な解析を行っている。

6) 個人曝露濃度及び尿中 VOC 濃度(分担・内山)

尿は対象者が1日に2~4サンプルを採取しており、尿中濃度の地域、性、年齢別や喫煙による差や個人曝露濃度のとの関連の検討には、個人毎に採取したサンプルの各物質の濃度の平均値を算出し、代表値として検討に用いた。ベンゼン：個人曝露濃度は $1.29 \sim 6.12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Mean±SD : $2.32 \pm 0.98 \mu\text{g}/\text{m}^3$) であり、各対象者あたりの尿中ベンゼンの平均値は 12.2~138.5ng/l であった。ベンゼンの個人曝露濃度と尿中濃度の平均値の間には明らかな相関は認められなかった。喫煙者は34名中4名のみであったが、尿中濃度は非喫煙者 $38.6 \pm 19.0\text{ng}/\text{l}$ 、喫煙者 $107.8 \pm 30.2\text{ng}/\text{l}$ と喫煙者の方が有意に高い値を示し ($p < 0.001$)、喫煙がベンゼン曝露の大きな要因となる可能性が示唆された。以下の解析では非喫煙者 ($n=30$) のみのデータを対象とした。3地区(それぞれ $n=9$, $n=6$, $n=15$) 別に尿中ベンゼン濃度平均値について ANOVA で検討したところ、c市の対象者が有意に低くなった。主に住宅地に囲まれた a 市、b 区に対し、c 市にあるマンションは付近に非常に広い面積を持つ緑地公園があることから、屋外濃度が影響している可能性もある。

性・年齢別においては、平均値に差は認められなかった。非喫煙者の尿中ベンゼン濃度はトルエン ($r=0.54$ $p < 0.01$)、m,p-キシレン ($r=0.39$ $p < 0.05$) との間にそれぞれ有意な相関が認められた。

トルエン：対象者の個人曝露濃度の分布は $9.0 \sim 40.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($18.8 \pm 6.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$) であった。また対象者ごとの尿中濃度の平均値の分布は

69.0~294.0ng/l (147.2 ± 49.3ng/l) であった。3地区(a市、b区、c市それぞれ n=9, n=7, n=18)の比較ではc市の対象者が有意に低かった (p<0.001)。

m,p-キシレン及びo-キシレン: m-,p-,o-キシレンを合わせたキシレンの個人曝露濃度は 3.8~19.4 µg/m³ (7.8±3.6 µg/m³) であった。また対象者ごとの m,p-キシレン、o-キシレンの尿中濃度の平均値の分布はそれぞれ、16.7~42.8ng/l (18.7 ± 6.8ng/l)、14.2~33.2ng/l (15.7±4.8ng/l) であった。尿中キシレン濃度については定量下限値未満であったサンプルが非常に多く、個人曝露濃度とも関連は認められなかった。

p-ジクロロベンゼン: 個人曝露濃度の分布は 0.88~1149.1 µg/m³ (87.8±240.6 µg/m³) であった。対象者ごとの尿中濃度の平均値の分布は 22.7~1509.2ng/l (171.1±347.6ng/l) であった。個人曝露濃度と尿中濃度との間には有意な正の相関が認められた (r=0.84, p<0.01)。p-ジクロロベンゼンが室内環境指針値を超えた世帯は3世帯で、同世帯の対象者4名の個人曝露濃度も同様に室内環境指針値を超える曝露を受けており、尿中濃度も非常に高い値を示した。

性・年齢別、立地場所別においては平均値に有意差は認められなかった。他のVOCの尿中濃度との間には関連は認められなかった。

7) *Aldh2* ノックアウトマウスを用いた個体差の科学的解明に関する研究(分担・川本)

Aldh2 ノックアウトマウス (以後 *Aldh2* -/マウスと記述) は、*Aldh2* 蛋白の発現を認めず、コントロールマウス (C57BL/6Ncrj、以後 *Aldh2* +/+マウスと記述) と比べ肝臓でのチトクロム P450 2b1 (Cyp2b1)、および Cyp2e1 蛋白発現量が多かった。血液生化学検査値に有意な差は認めなかった。また、全身臓器における組織学的・免疫組織化学的検討で差は認めなかった。

Aldh2 -/マウスは *Aldh2* +/+ と比べ、自由摂取のエタノール摂取量が有意に少なく、エタノール強制投与では血中アセトアルデヒド濃度が有意に高値となった。

アセトアルデヒド腹腔内投与で、*Aldh2* -/マ

ウスの LD₅₀ は雄 567mg/kg、雌 587mg/kg、*Aldh2* +/+マウスの LD₅₀ は雄 602mg/kg、雌 598mg/kg であった。*Aldh2* -/マウスは *Aldh2* +/+マウスに比べ、アセトアルデヒド感受性が高い可能性が示唆された。

D. 考察

家庭内で発生する化学物質の一例として石油系ドライクリーニング剤でドライクリーニング済みの衣服から発生する化学物質を測定したが、ノナン、デカン、ウンデカンの炭化水素類が検出され、その他の有害化学物質は特に検出されなかった。しかし、クリーニング作業場内や作業者の個人曝露濃度では、異なるVOCが検出され、以前使用されていたパークレン系の溶剤、またその他の因子からの汚染の影響を強く受けていることが示唆された。

一般家庭を対象に夏期、冬期のVOCsとNO₂濃度を計測した結果はVOCsは冬期が夏期に比べ高い値を示したものの、特に高い値を示したものはなかった。またホルムアルデヒドを含む4種のアルデヒド類の濃度はイソブチルアルデヒドを除いていずれも屋外より、屋内の濃度が高かったが、ホルムアルデヒドは基準値をこえるものはなかった。これは調査した家庭が新築や、最近リフォームをした家庭ではなかったためと考えられた。NO₂濃度については、冬期の室内と個人曝露濃度とも高値を示し、機密性の高い室内で石油系暖房器具を使用する場合高濃度のNO₂に比較的長期の曝露を受けることが示唆された。

我々はこれまでにベンゼン等のVOCの尿中濃度の測定手法を確立し、一般の人の尿においても対応できるよう改良を行ってきた。しかし、環境中ベンゼンの濃度が近年急速に低下していることを考慮してさらに低濃度の測定を可能にするために検討を加え、これまで定量下限値が50.0ng/lであったのに対して、本研究においては24.3ng/lまで測定が可能になった。

先に述べたように対象となった3戸のマンションはすべて同一の会社が手がけたものであり、低ホルムアルデヒド仕様、壁紙の接着剤

はトルエンフリーのものを用いており、24 時間換気システム等を備えたマンションであり、最近の大手建設会社の新築マンションはこの様な仕様が多くなっていることは、近年の対策の効果と言える。実際、トルエン、キシレンが室内環境指針値を超えた対象家庭はなかった。

一方、p-ジクロロベンゼンについては、3 世帯 6 室で室内環境指針値を超えており、室内環境指針を超えていた室内で生活している人の暴露濃度は $668.5 \pm 323.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で、指針値以下であった室内で生活している人が $7.66 \pm 11.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であったのに比較すると非常に高値になっていた。尿中の p-ジクロロベンゼン濃度については個人の曝露濃度と良く相関し、室内環境指針値を超える部屋で生活している人は平均で $1071.8 \pm 295.2 \text{ng}/\text{l}$ で、そうでない人の $52.0 \pm 41.1 \text{ng}/\text{l}$ と比較して非常に高かった。さらに尿の全サンプルにおいて指針値を超えない部屋で生活している人よりも明らかな高値を示していることから、今回使用したような 1 回のスポット尿の測定で、より簡便に p-ジクロロベンゼンの曝露状況の把握が可能であることが示唆された。

さらに、室内の汚染の原因としては喫煙があげられる。我々の先行研究では、喫煙の有無によって尿中ベンゼン濃度が喫煙者で有意に高いことを明らかにしているが、今回も同様の結果を得ており、喫煙がベンゼン曝露に対して大きな要因になる可能性があるものと思われた。しかし今回は個人曝露濃度については有意差はなく、個人曝露濃度と尿中濃度との間には明らかな相関は認められなかった。これは個人曝露濃度サンプラー位置が異なっていたためとも考えられるが、代謝の個人差により必ずしも曝露濃度とは相関しない可能性もある。そのような結果を反映していた場合には、曝露量と尿中濃度の関連によりハイリスク群などの同定等も可能になることが考えられる。

化学物質の健康影響評価において、ヒトの個体差は、いままでヒト集団を用いた疫学的検討でのみ明らかにされていた。今回の *Aldh2* -/-マウスの開発により、動物実験からの外挿でヒ

トの化学物質感受性の個体差を科学的根拠の基に検出・評価できる可能性が高まった。

マウスにおいて *Aldh2* 酵素の欠損により *Cyp2e1* および *Cyp2b1* 蛋白発現量が変化していた。ヒトにおける *ALDH2* 多型は、*ALDH2* の基質となる環境化学物質に対する感受性相違の原因となるのみならず、*ALDH2* 不活性が *CYP2E1* の発現量に変化を与え、*CYP2E1* の基質となる環境化学物質に対する感受性に 2 次的に影響を与える可能性がある。今後の検討が必要だと考える。

E. 結論

家庭内で発生する化学物質は、建材の他に多くのものがあるが、今年度の調査では、最近新築された大手の建設会社のマンションは低ホルムアルデヒド化、24 時間強制換気システム仕様が普及してきており、対策の一定の効果は認められている。今回の調査では、防虫剤としての p-ジクロロベンゼン、喫煙者のベンゼン、冬期暖房使用による窒素酸化物等の室内汚染が明らかとなった。また個人曝露濃度と生体内濃度の測定および症状の有無等を検討することにより、シックハウス症候群や化学物質過敏症の予防や診断、対策に役立つことが示唆されたのみでなく、*Aldh2* -/-マウスを用いた実験結果と組み合わせることにより、個体差の科学的解明につながることも示唆され、次年度以降の研究でさらに詳細を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isse, T., Kawamoto, T., et al.: Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity, *Pharmacogenetics*, 2002 12 : 621- 626

2. 学会発表

- 1) 小山倫浩,川本俊弘ら: 野性型及び *Aldh2* ノックアウトマウス (C57BL/6) における ALDH・CYP 酵素発現、第 20 回産業医科大学学会、北九州、2002 年 10 月
- 2) 一瀬豊日,川本俊弘ら: エタノール投与後のアルデヒド脱水素酵素 (*Aldh2*) ノックアウトマウスの臓器中アセトアルデヒド濃度第 20 回、産業医科大学学会、北九州、2002 年 10 月
- 3) 松本明子, 川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の Cyp2e1 発現の検討、第 30 回有機溶剤中毒研究会、倉敷、2002 年 10 月
- 4) Kawamoto, T.: Biological and monitoring and genetic polymorphisms. The Occupational Safety & Hygiene International Symposium on 2002 -The Laboratory's Safety & Hygiene in Campus-. Pingtung, 2002 年 10 月
- 5) 小山倫浩, 川本俊弘ら: C57BL/6 野生型及び *Aldh2* ノックアウトマウスの各臓器における ALDH・CYP 酵素発現、第 2 回分子予防環境医学研究会、東京、2002 年 12 月
- 6) Isse, T., Kawamoto, T., et al.: High acetaldehyde levels after ethanol gavages in aldehyde dehydrogenase 2 (*Aldh2*) gene targeting mice, The 42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City, 2003 年 3 月
- 7) Matsumoto, A., Kitagawa, K., et al.: Hepatotoxicity by acute ethanol intake in *Aldh2* gene targeting mouse. The 42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology. Salt Lake City, 2003 年 3 月
- 8) 一瀬豊日, 川本俊弘ら: 飲酒後アセトアルデヒドおよびエタノール濃度のアルデヒド脱水素酵素 2 (*Aldh2*) 欠損マウスを用いた検討、第 73 回日本衛生学会総会、大分、2003 年 3 月
- 9) 櫻田尚樹,川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の網状赤血球小核発見、第 73 回日本衛生学会総会、大分、2003 年 3 月
- 10) 松本明子,川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の肝内グルタチオン量の変動、第 73 回日本衛生学会総会、大分、2003 年 3 月

分担研究報告書

Aldh2 ノックアウトマウスを用いた個体差の解明に関する研究

分担研究者	川本俊弘	産業医科大学医学部	教授
研究協力者	小山倫浩	産業医科大学医学部	助教授
	一瀬豊日	産業医科大学医学部	助手
	金 容大	産業医科大学医学部	海外流動研究員
	北川恭子	浜松医科大学医学部	助手
	松野康二	産業医科大学	共同利用研究センター 助教授

研究要旨

- ① *Aldh2* ノックアウトマウス(以後 *Aldh2*^{-/-}マウスと記述)は、*Aldh2* 蛋白の発現を認めず、コントロールマウス(C57BL/6Ncrj、以後 *Aldh2*^{+/+}マウスと記述)と比べ肝臓でのチトクロム P4502b1(Cyp2b1)、および Cyp2e1 蛋白発現量が多い。血液生化学検査値に有意な差は認めなかった。また、全身臓器における組織学的・免疫組織化学的検討で差は認めなかった。
- ② *Aldh2*^{-/-}マウスは *Aldh2*^{+/+}と比べ、自由摂取ではエタノール摂取量が有意に少なく、エタノール強制投与では血中アセトアルデヒド濃度が有意に高値となった。
- ③ アセトアルデヒド腹腔内投与で、*Aldh2*^{-/-}マウスの LD₅₀ は雄 567mg/kg、雌 587mg/kg、*Aldh2*^{+/+}マウスの LD₅₀ は雄 602mg/kg、雌 598mg/kgであった。*Aldh2*^{-/-}マウスは *Aldh2*^{+/+}マウスに比べ、アセトアルデヒド感受性が高いことがわかった。

化学物質の健康影響評価において、ヒトの個体差は、いままでヒト集団を用いた疫学的検討でのみ明らかにされていた。今回の *Aldh2*^{-/-}マウスの開発により、動物実験からの外挿でヒトの化学物質感受性の個体差を科学的根拠の基に検出・評価できる可能性が高まった。

マウスにおいて *Aldh2* 酵素の欠損により Cyp2e1 および Cyp2b1 蛋白発現量に変化していた。ヒトにおける ALDH2 多型は、ALDH2 の基質となる環境化学物質に対する感受性相違の原因となるのみならず、ALDH2 不活性が CYP2E1 の発現量に変化を与え、CYP2E1 の基質となる環境化学物質に対する感受性に二次的に影響を与える可能性がある。今後の検討が必要だと考える。

A. 研究目的

アセトアルデヒドは、アルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2)により代謝・解毒されるが、日本人の約半数はこの ALDH2 が不活性型である。この ALDH2 不活性型者はアセトアルデヒドに対して高感受性を示す危険性が指摘されている。

そこで、われわれの開発した *Aldh2* ノックアウトマウスを用いてアセトアルデヒドの毒性発現の差を検討し、ヒトにおける ALDH2 多型による感受性の違いを科学的に解明することを試みる。

B. 研究方法

Aldh2 ノックアウトマウス(以後 *Aldh2*^{-/-}マ

ウスと記述)とコントロールマウス(C57BL/6Ncrj、以後 *Aldh2*^{+/+}マウスと記述)を実験に用いた。

① *Aldh2*^{-/-}マウスの *Aldh2* 酵素欠損を確認するためウエスタン・ブロット法および酵素活性測定を実施した。また、*Aldh2*^{-/-}マウスと *Aldh2*^{+/+}マウスを以下の検査で比較した。

- (1) 血液生化学検査
- (2) 各臓器の HE 組織染色検査、CYPs 等 (*Aldh1*, *Aldh2*, *Cyp1a1*, *Cyp2e1*, *Cyp4b1*)の免疫組織化学検査
- (3) ウエスタン・ブロット法による肝の Cyp 蛋白量発現量(*Cyp2e1*, *Cyp2b1*)の検査

② *Aldh2*^{-/-}マウスにおけるアセトアルデヒド

動態を検討した。すなわち生体内アセトアルデヒド測定法を確立した後、エタノール投与し、中間代謝物であるアセトアルデヒド体内濃度を測定し、*Aldh2*^{-/-}マウスおよび *Aldh2*^{+/+}マウスを比較した。

③アセトアルデヒド腹腔内投与による LD₅₀ 量を求めた。株式会社パナファーム・ラボラトリーズ安全性研究所(熊本県宇土市)に委託し LD₅₀ 検査を実施した。アセトアルデヒドの調製および使用前後の濃度確認は、分担研究者自身が産業医科大学にて実施した。

C. 研究結果

① *Aldh2*^{-/-}マウスは、*Aldh2*^{+/+}マウスと比べ、肝臓での Cyp2b1, Cyp2e1 蛋白発現量が多く、*Aldh2* 酵素の発現は認められなかった。血液生化学検査値、各臓器での組織学・免疫組織化学検討において両マウスに差は認められなかった。

② *Aldh2*^{-/-}マウスは、*Aldh2*^{+/+}と比べ自発的エタノール摂取量が有意に少なく、エタノール強制投与では血中アセトアルデヒド濃度が有意に高値であった。

③アセトアルデヒド腹腔内投与で、*Aldh2*^{-/-}マウスの LD₅₀ は雄 567mg/kg、雌 587mg/kg、*Aldh2*^{+/+}マウスの LD₅₀ は雄 602mg/kg、雌 598mg/kg であった。アセトアルデヒド投与後 5-30 分で死亡例を生じたが、両マウスに出現した症状に相違は認められなかった。死亡例生存例ともにアセトアルデヒド投与によると考えられる肉眼的病理所見は認められなかった。

D. 考察

①化学物質投与前であっても *Aldh2*^{-/-}マウスは、*Aldh2*^{+/+}と比べ肝臓での Cyp2b1, Cyp2e1 蛋白発現量が多い。したがって Cyp2b1, Cyp2e1 により代謝される化学物質に対する感受性が *Aldh2*^{-/-}マウスと *Aldh2*^{+/+}マウスで異なっている可能性がある。

② *Aldh2*^{-/-}マウスにおけるアセトアルデヒド腹腔内投与の LD₅₀ は *Aldh2*^{+/+}における LD₅₀

と比べ低い。一般に室内汚染では低濃度長期曝露が問題となるので、次年度以降は低濃度長期曝露におけるアセトアルデヒド感受性について検討していきたい。

E. 結論

① *Aldh2*^{-/-}マウスは、ヒト ALDH2 不活性型の動物モデルとして有用である。

② *Aldh2*^{-/-}マウスは化学物質投与前であっても、*Aldh2*^{+/+}と比べ肝臓での Cyp2b1, Cyp2e1 蛋白発現量が多い。したがって Cyp2b1, Cyp2e1 の基質となる化学物質に対する感受性が *Aldh2*^{-/-}マウスと *Aldh2*^{+/+}マウスで異なっている可能性がある。

③ *Aldh2*^{-/-}マウスは、*Aldh2*^{+/+}マウスに比べアセトアルデヒド腹腔内投与 LD₅₀ 即ち急性曝露における半致死量が低い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Isse, T., Kawamoto, T., et al.: Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity, *Pharmacogenetics*, 2002 12 : 621- 626

2. 学会発表

- 1) 小山倫浩, 川本俊弘ら: 野性型及び *Aldh2* ノックアウトマウス (C57BL/6) における ALDH・CYP 酵素発現、第 20 回産業医科大学学会、北九州、2002 年 10 月
- 2) 一瀬豊日, 川本俊弘ら: エタノール投与後のアルデヒド脱水素酵素(*Aldh*)2 ノックアウトマウスの臓器中アセトアルデヒド濃度第 20 回、産業医科大学学会、北九州、2002 年 10 月
- 3) 松本明子, 川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の Cyp2e1 発現の検討、第 30 回有機溶剤中毒研究会、倉敷、2002 年 10 月
- 4) Kawamoto, T.: Biological and monitoring and genetic polymorphisms. The Occupational Safety & Hygiene International Sym-

- posium on 2002 -The Laboratory's Safety & Hygiene in Campus-. Pingtung , 2002年10月
- 5) 小山倫浩, 川本俊弘ら: C57BL/6 野生型及び *Aldh2* ノックアウトマウスの各臓器における ALDH・CYP 酵素発現、第2回分子予防環境医学研究会、東京、2002年12月
 - 6) Isse, T., Kawamoto, T., et al.: High acetaldehyde levels after ethanol gavages in aldehydedehydrogenase 2 (*Aldh2*) gene targeting mice, The 42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City, 2003年3月
 - 7) Matsumoto. A., Kitagawa. K., et al.: Hepatotoxicity by acute ethanol intake in *Aldh2* gene targeting mouse. The 42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology. Salt Lake City, 2003年3月
 - 8) 一瀬豊日, 川本俊弘ら: 飲酒後アセトアルデヒドおよびエタノール濃度のアルデヒド脱水素酵素 2(*Aldh2*)欠損マウスを用いた検討、第73回日本衛生学会総会、大分、2003年3月
 - 9) 櫻田尚樹, 川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の網状赤血球小核発見、第73回日本衛生学会総会、大分、2003年3月
 - 10) 松本明子, 川本俊弘ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール投与後の肝内グルタチオン量の変動、第73回日本衛生学会総会、大分、2003年3月

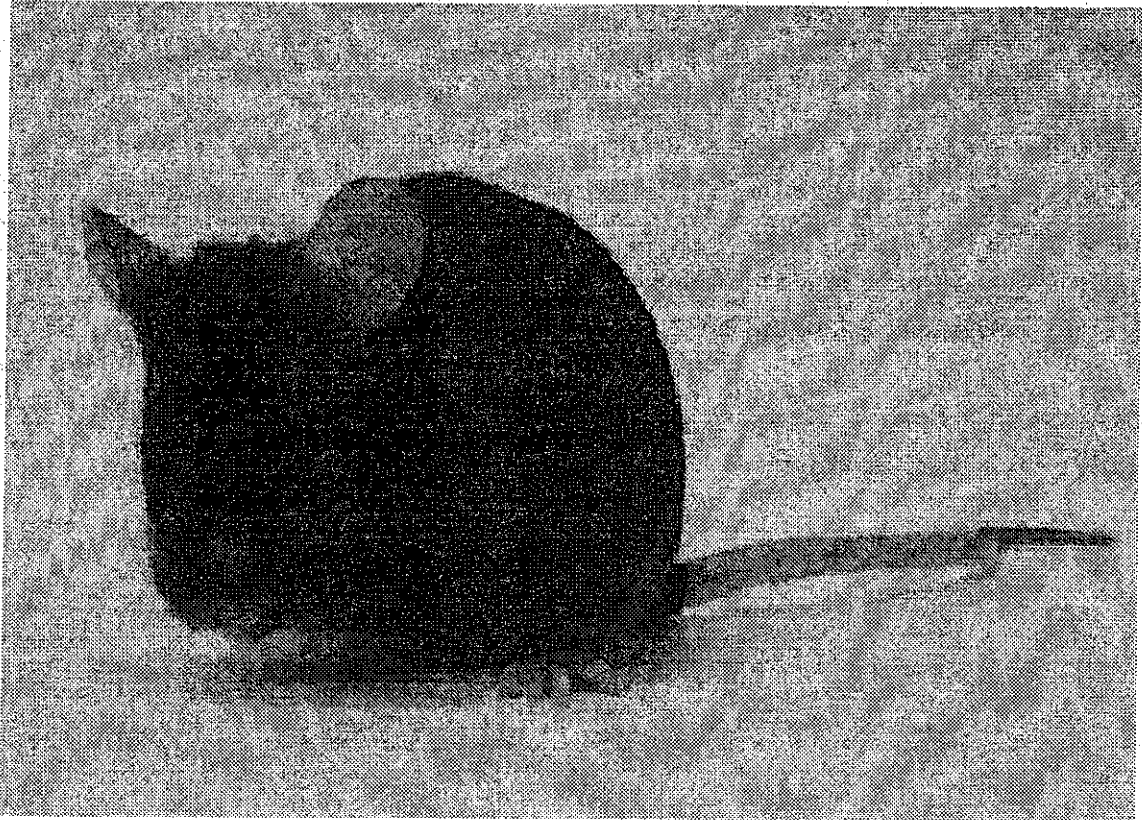


図1 *Aldh2* $-/-$ マウス
外見上 C57BL/6N Crj (*Aldh2* $+/+$) マウスと区別がつかない。

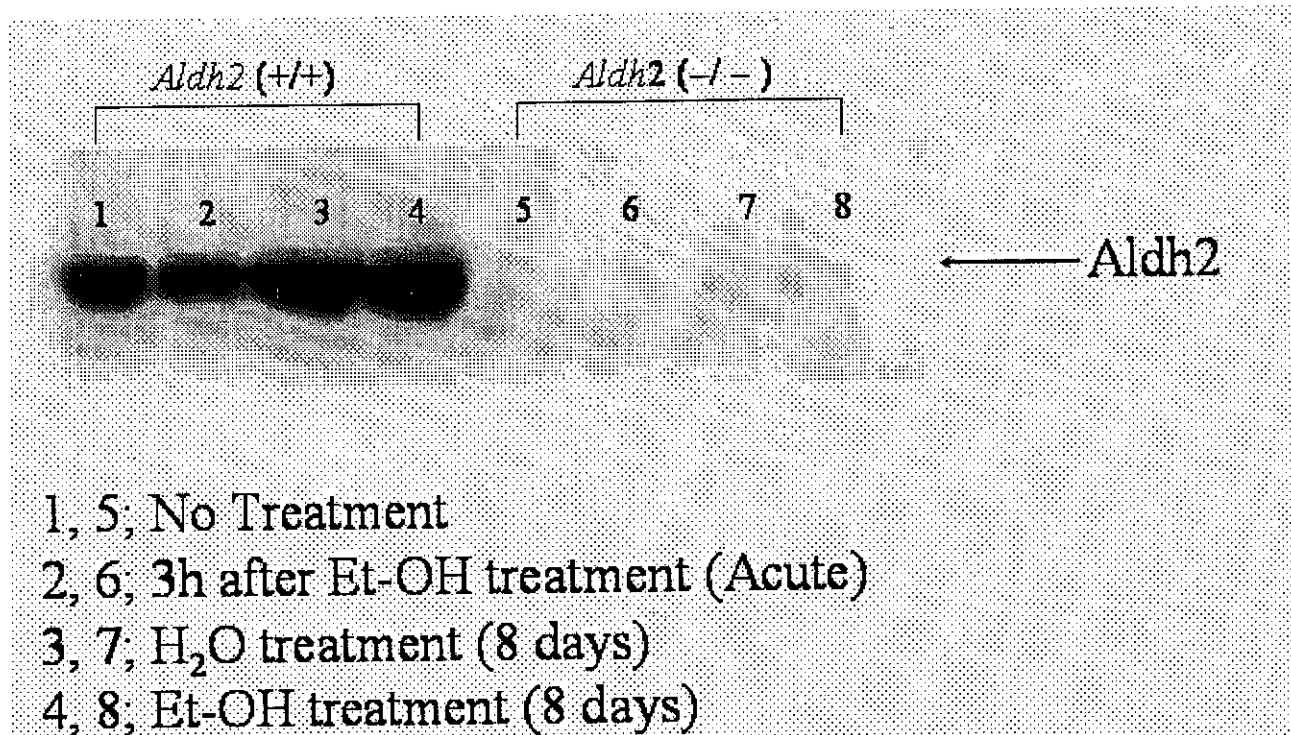


図2 ウェスタン・ブロット法によるAldh2 蛋白量の比較

1, 2, 3, 4 : *Aldh2* +/+ マウス肝ミトコンドリア分画
 5, 6, 7, 8 : *Aldh2* -/- マウス肝ミトコンドリア分画

Aldh2 +/+ マウス肝ミトコンドリア分画では Aldh2 酵素が検出され、40% エタノール 2g/kg 体重を 8 日間強制経口投与した群で Aldh2 酵素の増加が検出された。しかし *Aldh2* -/- マウス肝ミトコンドリア分画では、Aldh2 酵素が検出されずエタノール投与を行っても酵素は発現しなかった。

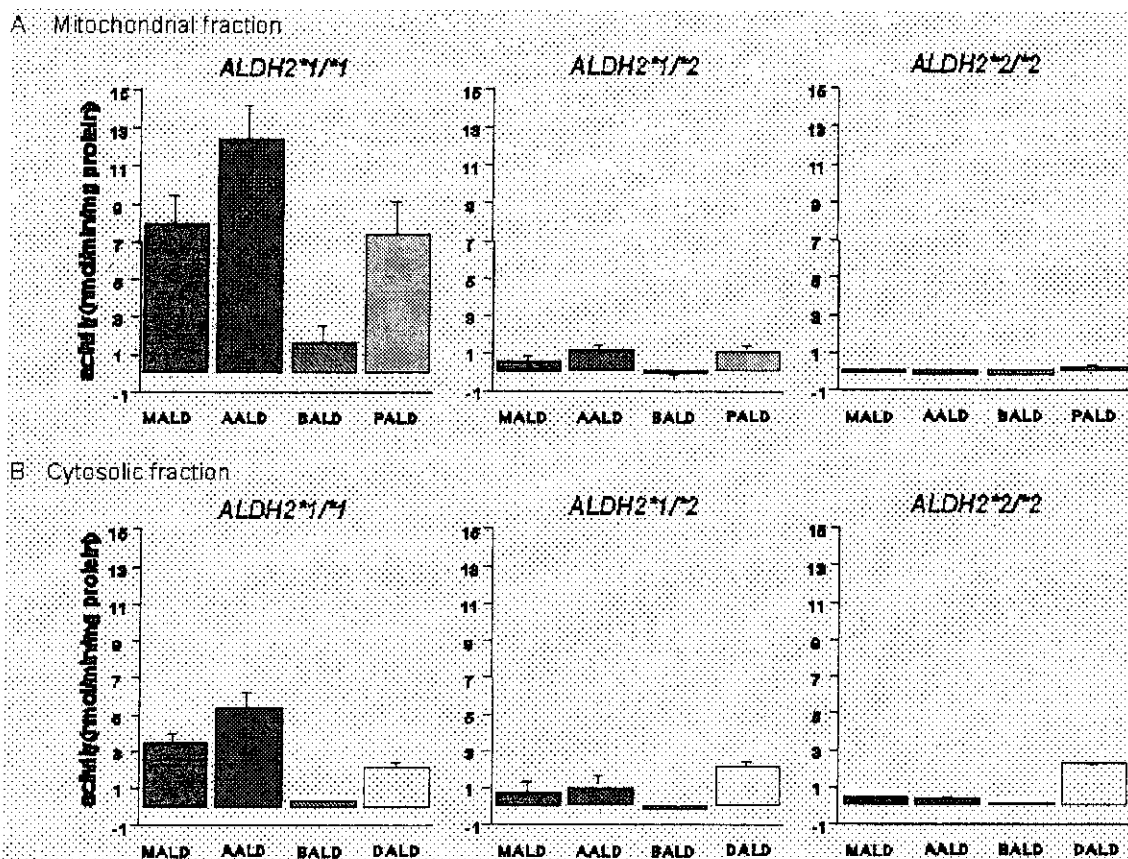


図3 *ALDH2* 遺伝子型別のヒト肝ミトコンドリア分画および細胞質分画におけるアルデヒド酸化活性。

Methoxyacetaldehyde (MALD), Acetaldehyde (AALD), Benzaldehyde (BALD), Propionaldehyde (PALD), Decylaldehyde (DALD)

*ALDH2**1/*2 および *ALDH2**2/*2 の人から採取した肝ミトコンドリア分画はアセトアルデヒドに対する活性をほとんど示さなかった。

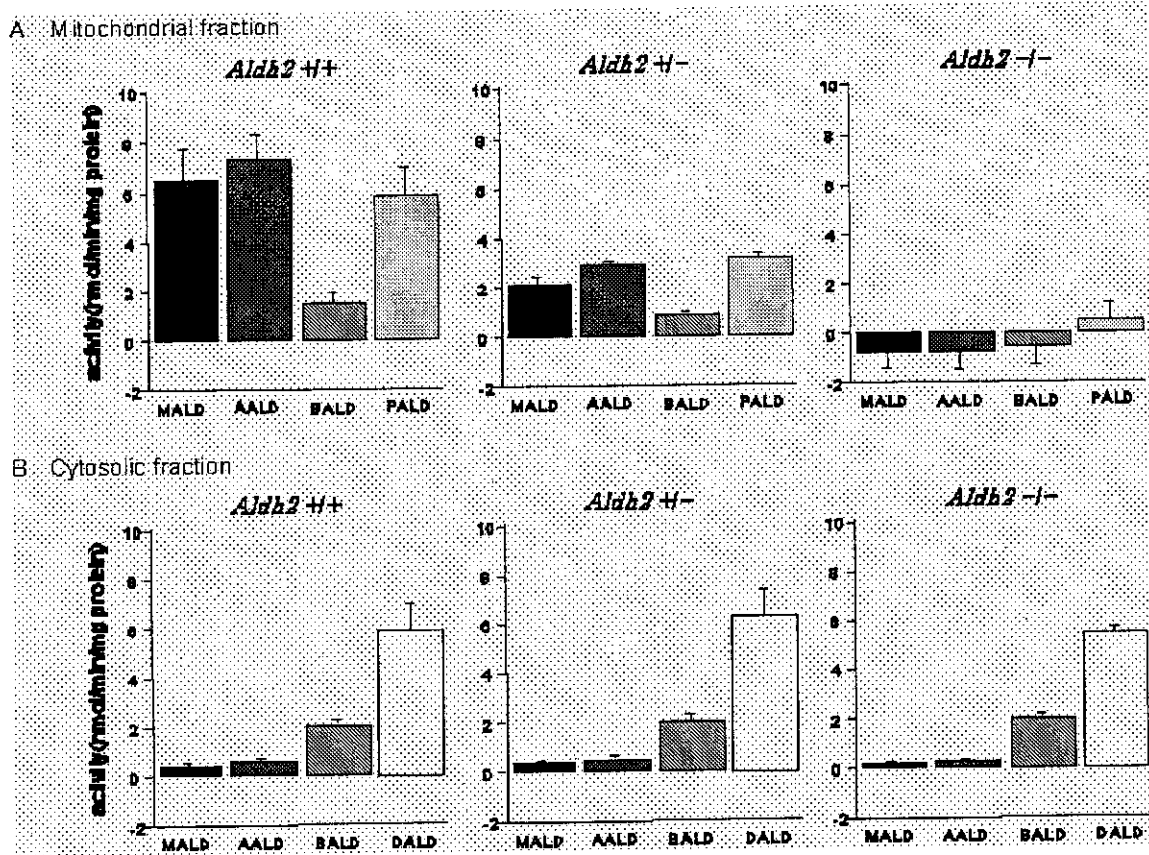


図4 *Aldh2* ノックアウトマウスの遺伝子型別の肝ミトコンドリア分画および細胞質分画におけるアルデヒド酸化活性。

Methoxyacetaldehyde (MALD), Acetaldehyde (AALD), Benzaldehyde (BALD), Propionaldehyde (PALD), Decylaldehyde (DALD) ...

Aldh2 ^{-/-}マウスの肝でアセトアルデヒドを基質とした活性が欠損している。

Complete Control (mean \pm S.E.)

Male	GOT	GPT	γ -GTP	LDH	ALP
+/+	53.3 \pm 4.7	25.8 \pm 1.0	1.7 \pm 0.32	242.6 \pm 20.2	218.2 \pm 7.0
+/-	57.7 \pm 5.6	25.9 \pm 1.4	1.5 \pm 0.22	247.8 \pm 18.5	240.7 \pm 10.0
-/-	57.8 \pm 3.3	23.8 \pm 1.2	1.7 \pm 0.32	245.0 \pm 22.4	231.6 \pm 7.0

Female	GOT	GPT	γ -GTP	LDH	ALP
+/+	71.6 \pm 7.4	23.6 \pm 1.4	2.0 \pm 0.28	231.4 \pm 16.8	330.7 \pm 13.7
+/-	71.6 \pm 7.4	24.5 \pm 1.2	2.4 \pm 0.29	235.2 \pm 21.6	367.6 \pm 11.8
-/-	60.1 \pm 5.4	22.2 \pm 1.4	2.3 \pm 0.35	237.3 \pm 8.9	327.4 \pm 12.4

Male	AMY	CHE	t-Bil	TP	ALB
+/+	4409.9 \pm 137.2	22.0 \pm 0.6	0.28 \pm 0.04	5.04 \pm 0.05	2.49 \pm 0.03
+/-	4358.2 \pm 198.1	21.9 \pm 0.8	0.28 \pm 0.03	5.00 \pm 0.07	2.46 \pm 0.03
-/-	4794.8 \pm 151.7	23.3 \pm 0.8	0.28 \pm 0.04	4.96 \pm 0.06	2.43 \pm 0.03

Female	AMY	CHE	t-Bil	TP	ALB
+/+	3344.3 \pm 73.6	28.4 \pm 0.8	0.32 \pm 0.05	4.89 \pm 0.08	2.50 \pm 0.05
+/-	3460.4 \pm 86.7	28.9 \pm 1.1	0.27 \pm 0.03	4.89 \pm 0.06	2.47 \pm 0.04
-/-	3573.9 \pm 68.2	28.8 \pm 0.5	0.24 \pm 0.02	4.93 \pm 0.06	2.51 \pm 0.03

Male	t-Chol	TG	HDL-C
+/+	95.8 \pm 2.5	134.6 \pm 7.7	73.8 \pm 2.7
+/-	95.6 \pm 3.1	147.5 \pm 8.6	70.4 \pm 2.2
-/-	92.8 \pm 3.2	145.3 \pm 9.6	70.5 \pm 2.8

Female	t-Chol	TG	HDL-C
+/+	77.5 \pm 2.7	112.3 \pm 7.8	50.2 \pm 2.4
+/-	74.0 \pm 2.8	95.8 \pm 5.9	47.5 \pm 2.9
-/-	73.9 \pm 3.3	102.8 \pm 5.1	52.1 \pm 3.1

表1 *Aldh2* ノックアウトマウスの遺伝子型別の血液性化学検査結果

雄雌の性差による差は認められるが、*Aldh2* 遺伝子型による検査値に有意な差は認められない。

1st Antibodies for IHC

Antigen	Duration of primary antibody	Primary antibody	Secondary antibody	Blocking	Dilution (folds)
Aidh1	From Dr Wehner, University of Purdue	Rabbit anti-human	Goat anti-rabbit polyclonal antibody	Goat serum	200
Aidh2	From Dr Wehner, University of Purdue	Rabbit anti-human	Goat anti-rabbit polyclonal antibody	Goat serum	200
Aidh2	From our laboratory, UDEH	Rabbit anti-mouse	Goat anti-rabbit polyclonal antibody	Goat serum	2000
Cyp1a1	Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.	Goat anti-rat	Rabbit anti-goat polyclonal antibody	Rabbit serum	200
Cyp2e1	Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.	Goat anti-rat	Rabbit anti-goat polyclonal antibody	Rabbit serum	200
Cyp4b1	Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.	Rabbit anti-mouse	Goat anti-rabbit polyclonal antibody	Goat serum	200

表 2 免疫組織化学染色に用いた抗体の一覧表

Aldh1 staining in Aldh2 +/- mice

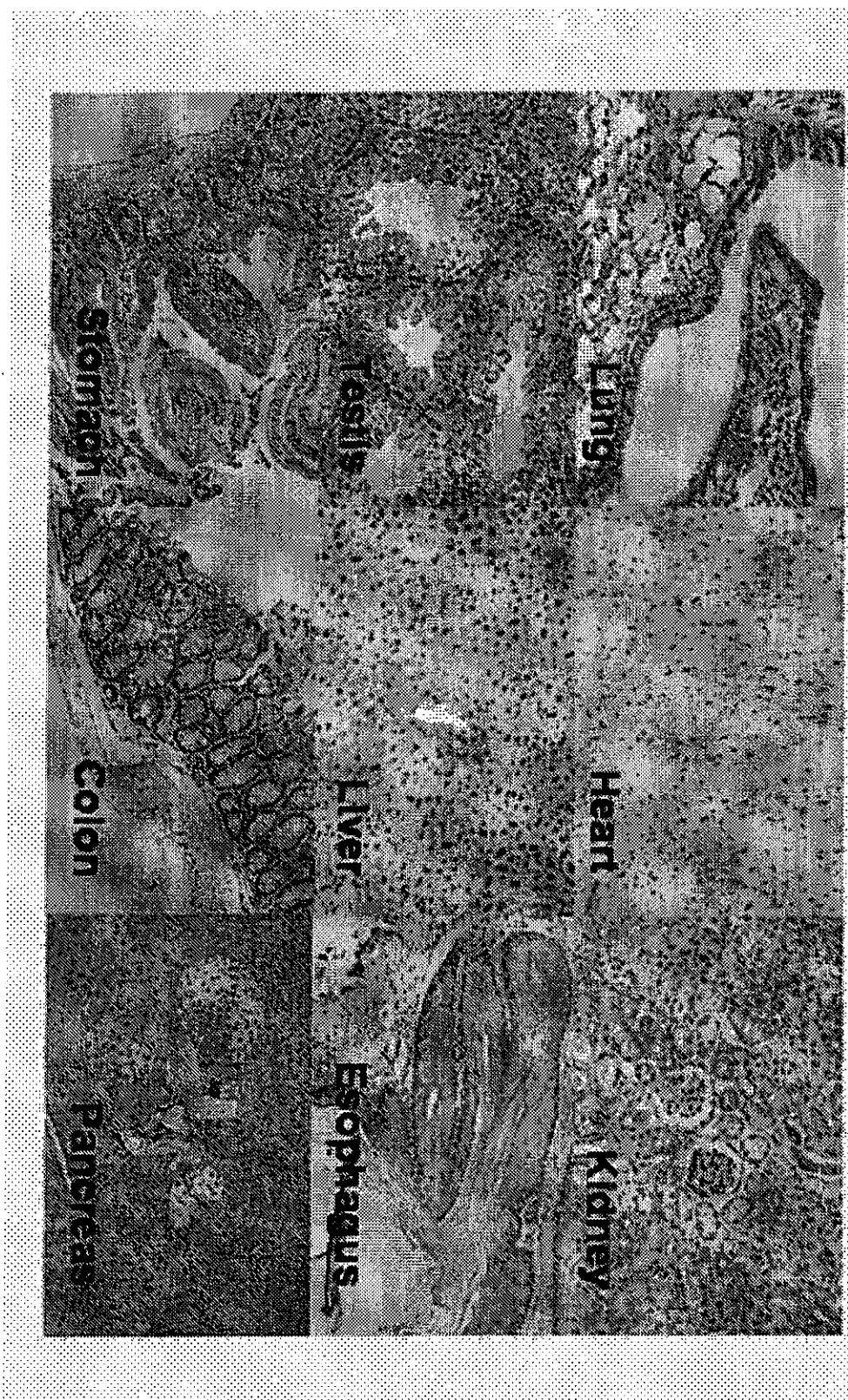


図5 Aldh1免疫組織化学染色
Aldh1蛋白の発現を、気管支粘膜上皮、肺胞上皮、心筋の一部、腎尿管、精巢上皮、肝、食道粘膜上皮、胃粘膜上皮、大腸粘膜上皮、膵で認めた。免疫組織化学染色法ではAldh2 +/+およびAldh2 -/-マウスのAldh1蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

Preference for Ethanol in *Aldh2* $-/-$ mice

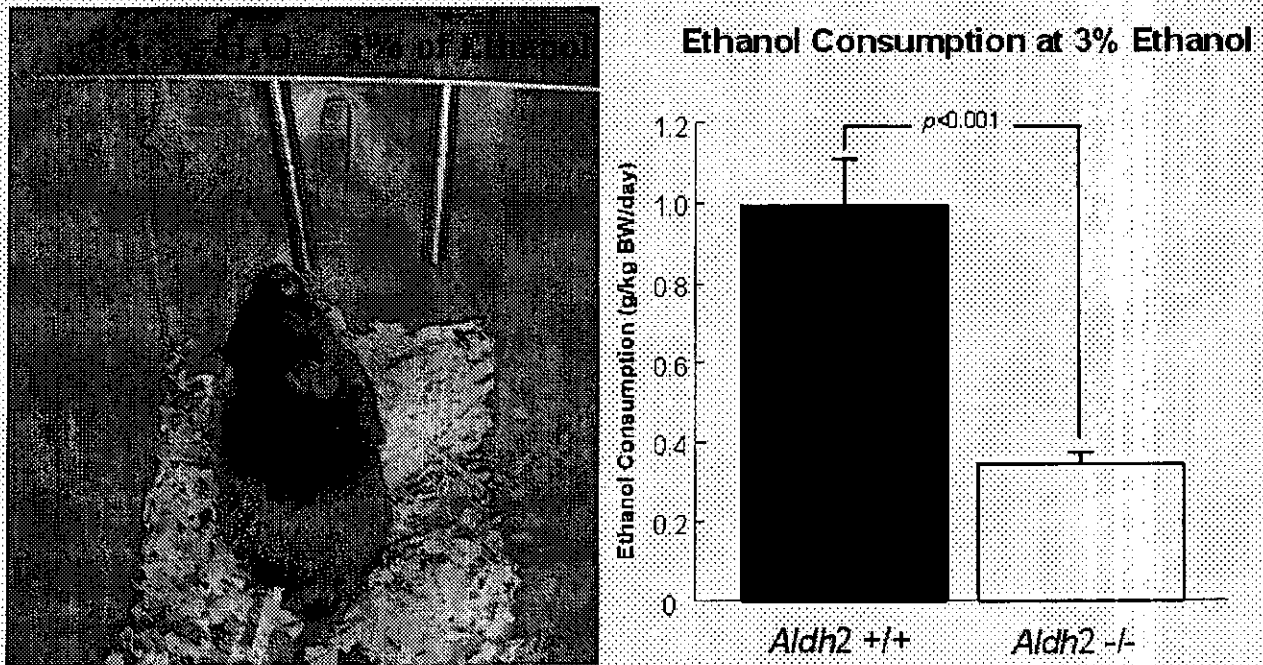


図 17 *Aldh2* $+/+$ および *Aldh2* $-/-$ マウスの自発的飲酒量の比較

水および3%エタノールを自由摂取させ *Aldh2* $+/+$ および *Aldh2* $-/-$ マウスの飲酒量を比較した。8日間観察を行った際の、1日エタノール摂取量は *Aldh2* $-/-$ マウスで有意に少なかった。体重、摂食量、飲水量に有意な差は認めなかった。