

図 16 *Aldh2* +/+および *Aldh2* -/-マウス肝 Cyp2b1 蛋白量の比較

免疫組織化学染色では局在および染色性に差を認めなかったが、ウエスタン・ブロット法で肝蛋白量を比較したところ、*Aldh2* -/-マウスは *Aldh2* +/+マウスに比べ Cyp2b1 蛋白が多く発現していた。エタノール投与により *Aldh2* +/+マウスの Cyp2b1 蛋白は誘導された。

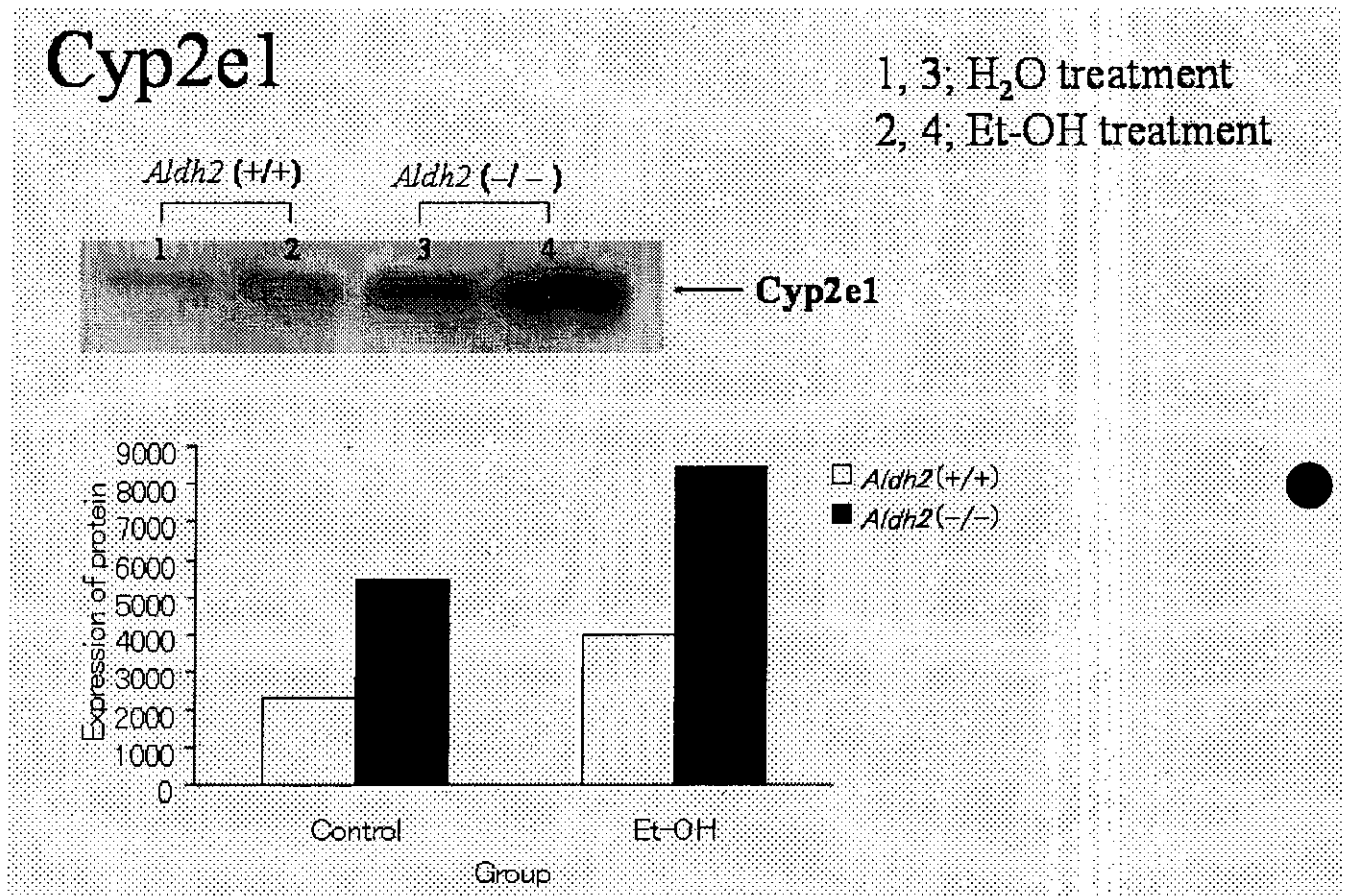


図 15 *Aldh2* +/+および *Aldh2* -/-マウス肝 Cyp2e1 蛋白量の比較

免疫組織化学染色では局在および染色性に差を認めなかったが、ウエスタン・ブロット法で肝蛋白量を比較したところ、*Aldh2* -/-マウスでは *Aldh2* +/+マウスに比べ Cyp2e1 蛋白が多く発現していた。両マウスとも Cyp2e1 蛋白はエタノール投与により誘導された。

## Cyp4b1 staining in *Aldh2* +/- mice liver



図 14 Cyp4b1 免疫組織化学染色 肝切片の拡大  
Cyp4b1 蛋白発現は、肝細胞核周辺部で強かった。免疫組織化学染色法では *Aldh2* +/- および *Aldh2* -/- マウスの Cyp4b1 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

# Cyp4b1 staining in wild mice

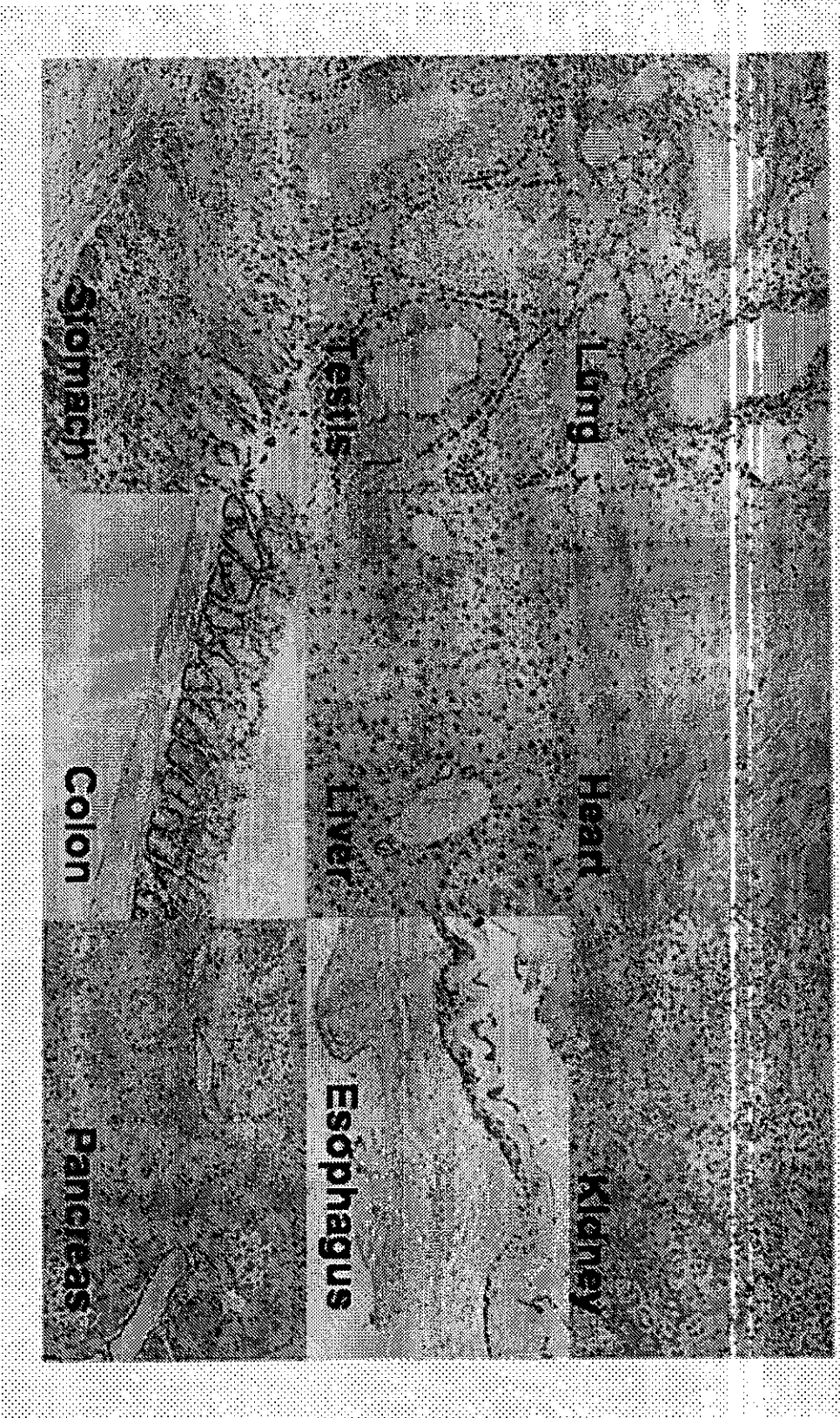


図 13 Cyp4b1 免疫組織化学染色

Cyp4b1 蛋白発現を認めたのは 気管支粘膜上皮、肺胞上皮、心筋、腎尿管、精巢上皮基底部、肝、食道粘膜上皮基底部、胃粘膜上皮、大腸粘膜上皮基底部、膵であった。免疫組織化学染色法では *Aldh2* +/+ および *Aldh2* -/- の *Cyp4b1* 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

## Cyp2e1 staining in Aldh2 +/- mice liver



图 12 Cyp2e1 免疫組織化学染色 肝切片の拡大  
Cyp2e1 蛋白発現は、肝門脈周辺部で強い。免疫組織化学染色法では Aldh2 +/- および Aldh2 -/- マウスでの Cyp2e1 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

# Cyp2e1 staining in *Aldh2* +/- mice

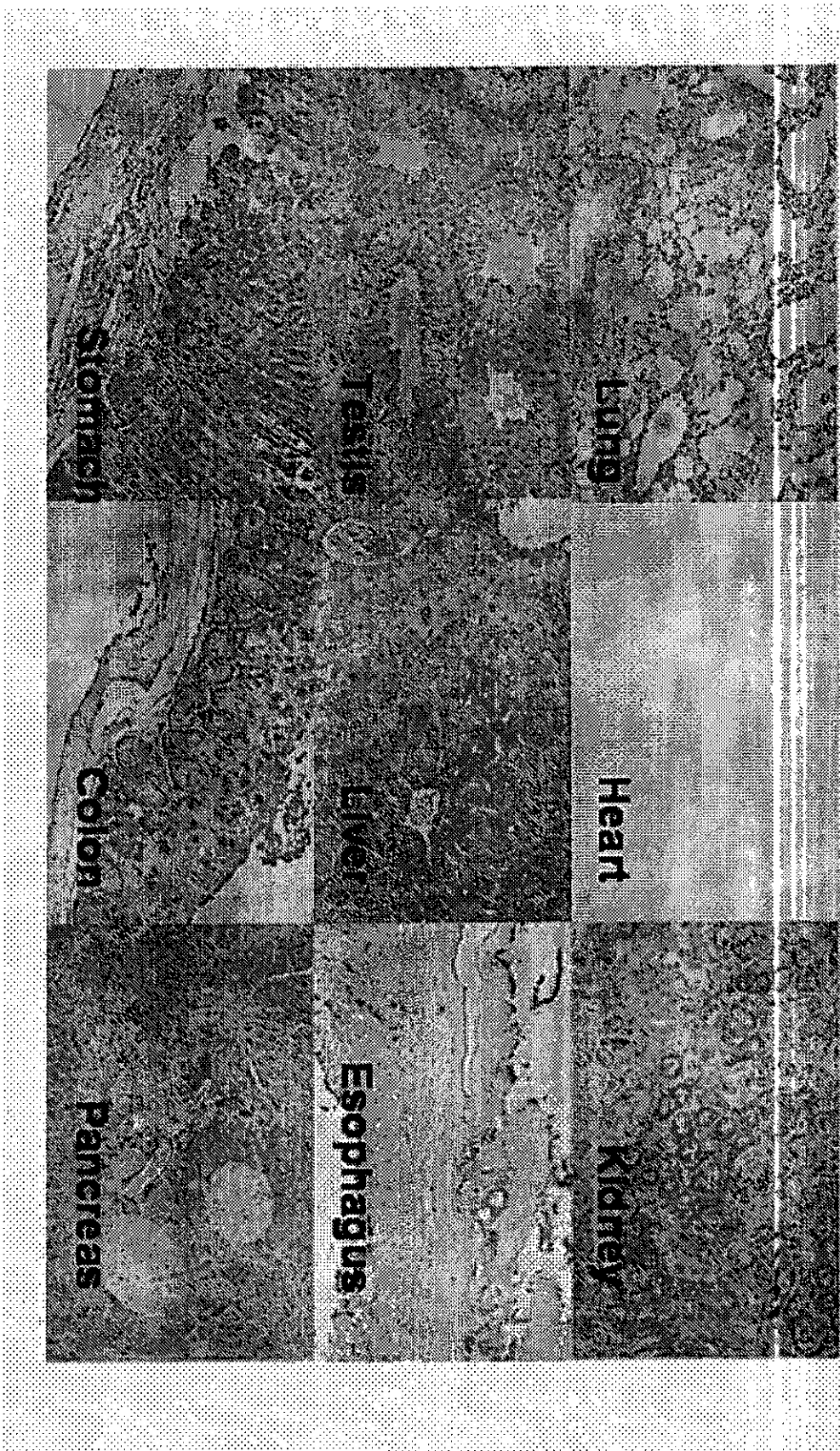


図 11 Cyp2e1 免疫組織化学染色

Cyp2e1 蛋白発現を認めたのは、気管支粘膜上皮、肺胞上皮、腎尿管、精巣上皮、肝、食道粘膜上皮、胃粘膜上皮、大腸粘膜上皮、睪であった。免疫組織化学染色法では *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> の Cyp2e1 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

## Cyp1a1 staining in *Aldh2* +/- mice liver

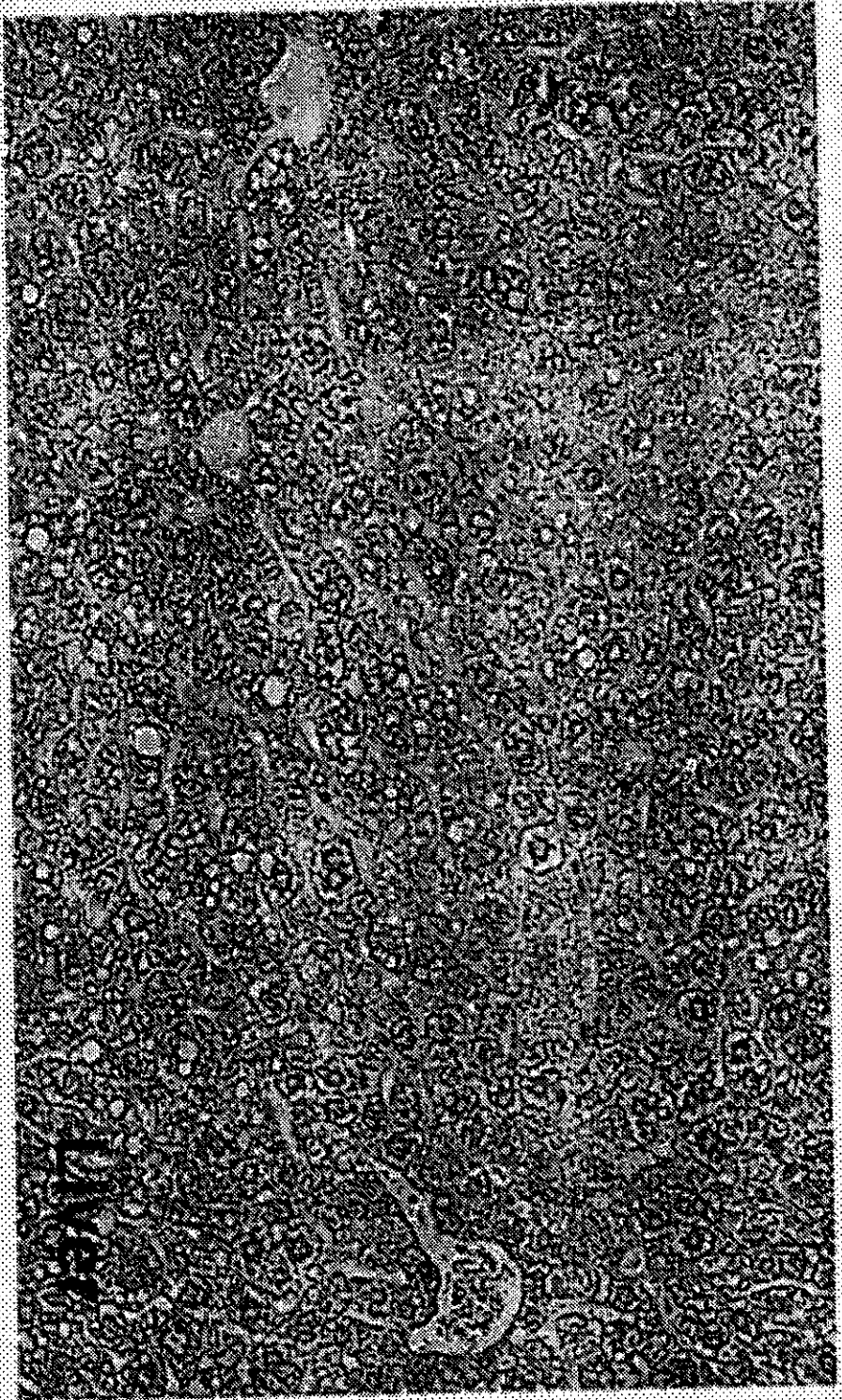


図 10 Cyp1a1 免疫組織化学染色 肝切片の拡大  
Cyp1a1 蛋白発現は、肝門脈周辺部で強い。免疫組織化学染色法では *Aldh2* +/- および *Aldh2* -/- マウスの Cyp1a1 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

# Cyp1a1 staining in *Aldh2*<sup>+/-</sup> mice

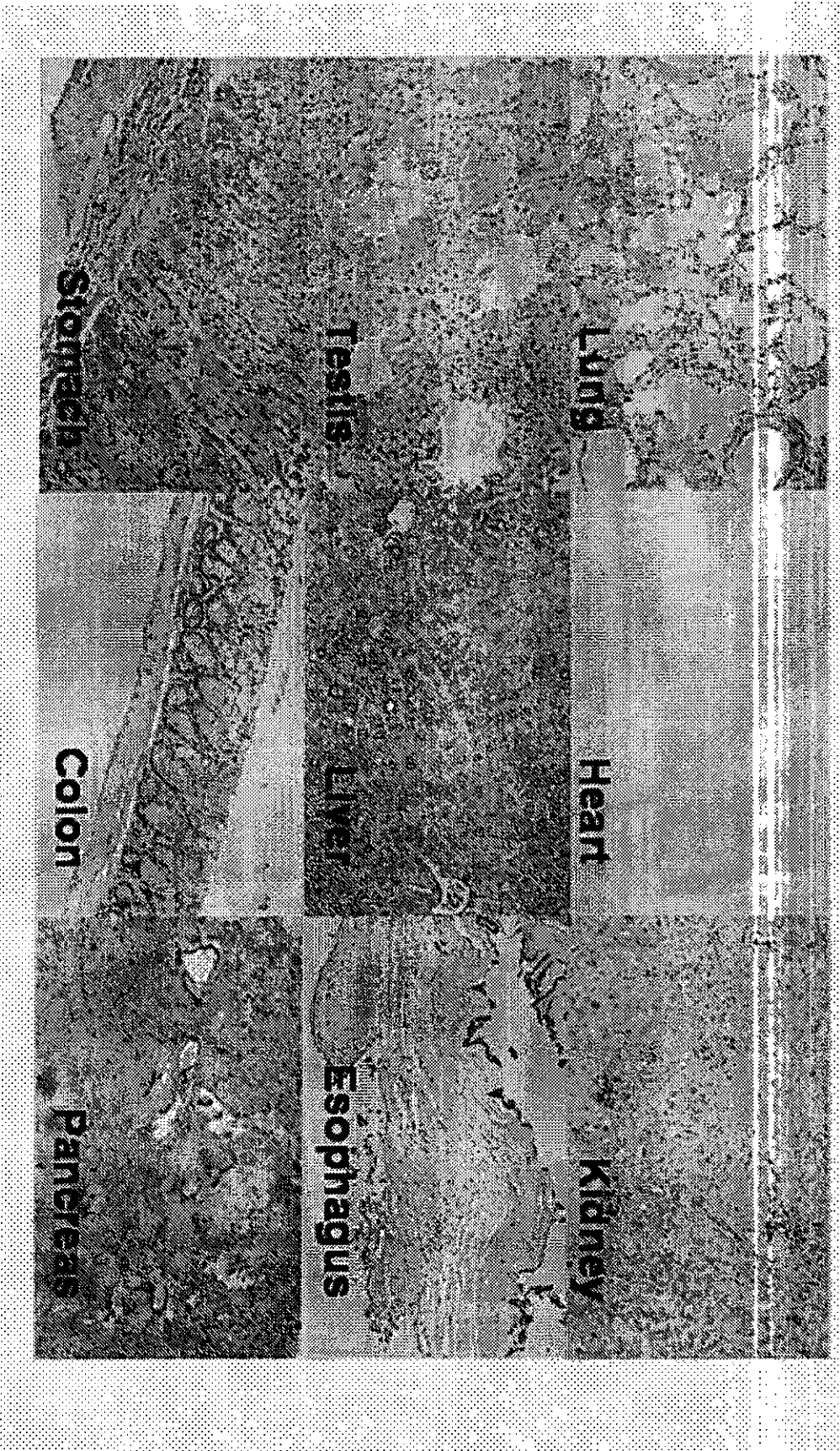


図9 Cyp1a1免疫組織化学染色  
Cyp1a1蛋白発現を認めたのは、気管支粘膜上皮および肺胞上皮、腎尿管、精巣上皮、肝、食道粘膜上皮、胃粘膜上皮基部、大腸粘膜上皮、膵であった。免疫組織化学染色法では *Aldh2*<sup>+/-</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup>マウスに明らかかな Cyp1a1蛋白発現の差は認めなかった。



## Aldh2 staining in Aldh2 +/+ mice and Aldh2 -/- mice

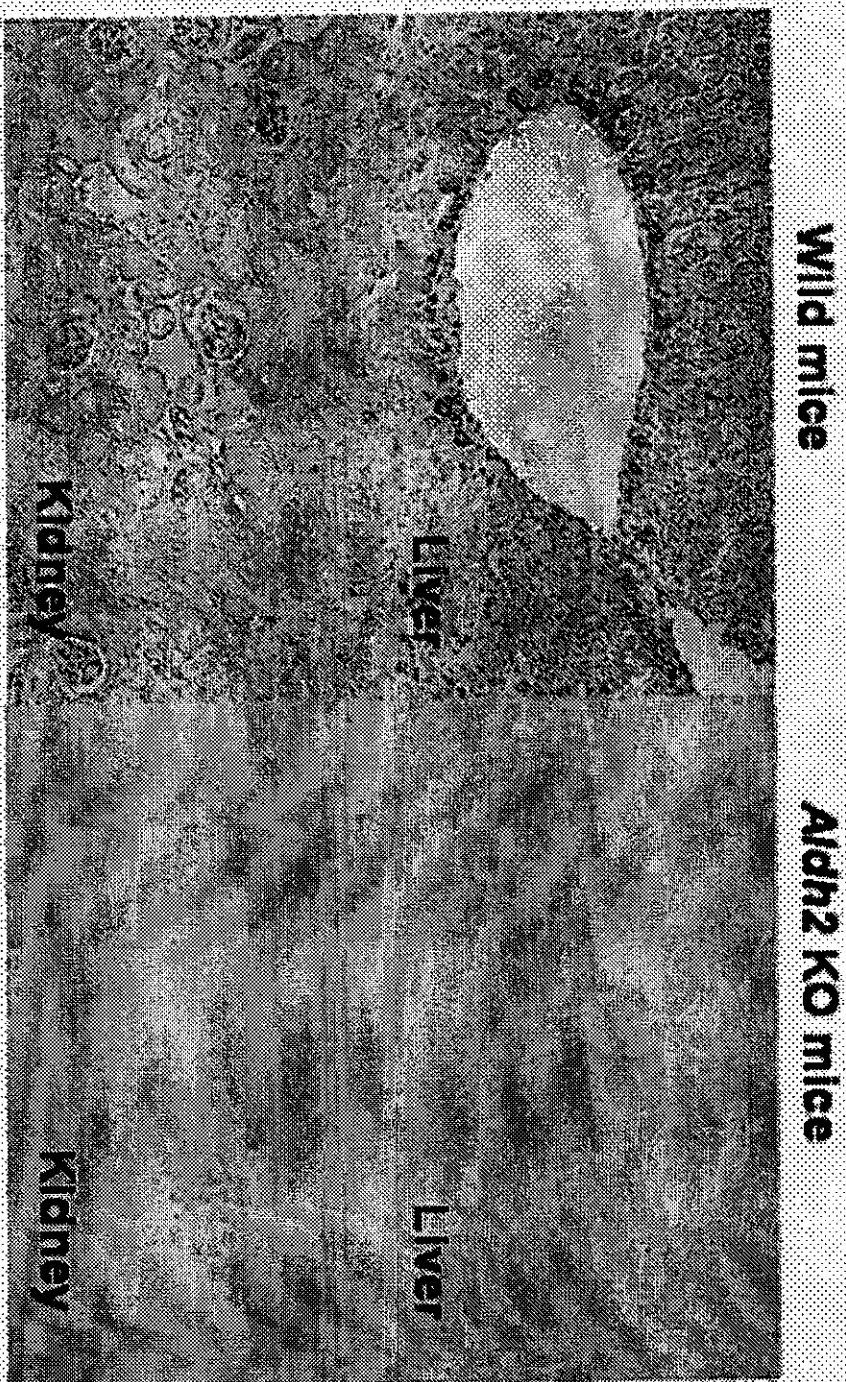


図 8 *Aldh2* +/+および *Aldh2* -/-マウスでの *Aldh2* 免疫組織化学染色の比較  
*Aldh2* +/+マウスでは *Aldh2* 蛋白発現を認めるが、*Aldh2* -/-マウスでは *Aldh2* 蛋白発現を認めない。

## Aldh2 staining in Aldh2 +/- mice

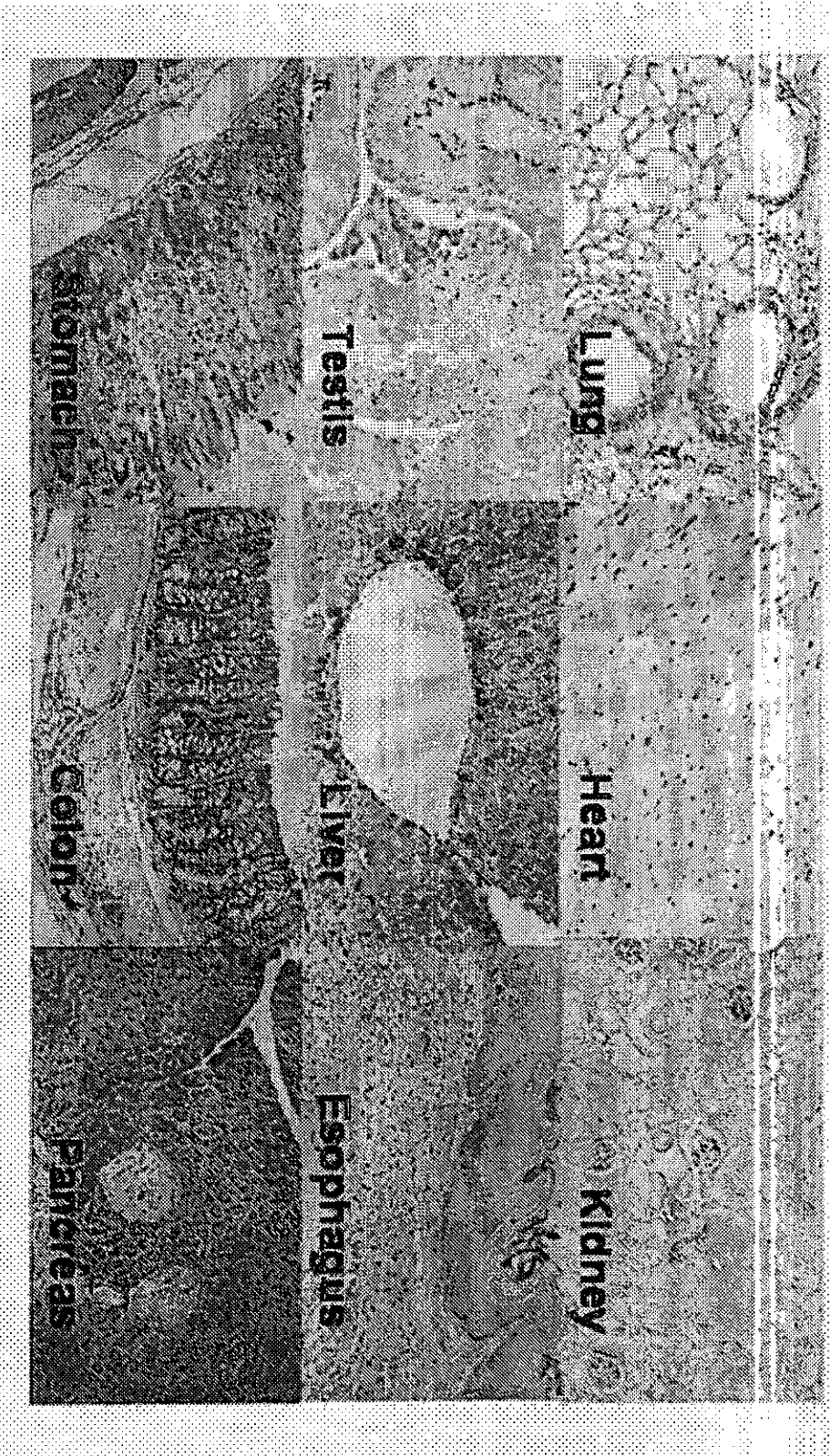


図7 Aldh2免疫組織化学染色

Aldh2 蛋白の発現を、気管支粘膜上皮および肺胞上皮、腎尿管、精巣間質細胞、肝門脈周辺部、食道粘膜上皮、胃粘膜上皮、大腸粘膜上皮、脾で認めた。心筋での発現はごく弱かった。免疫組織化学染色法では Aldh2 +/-マウスのみ Aldh2 蛋白発現を認め、Aldh2 -/-マウスでは全く Aldh2 蛋白発現を認めなかった。

## Aldh1 staining in Aldh2 +/- mice liver

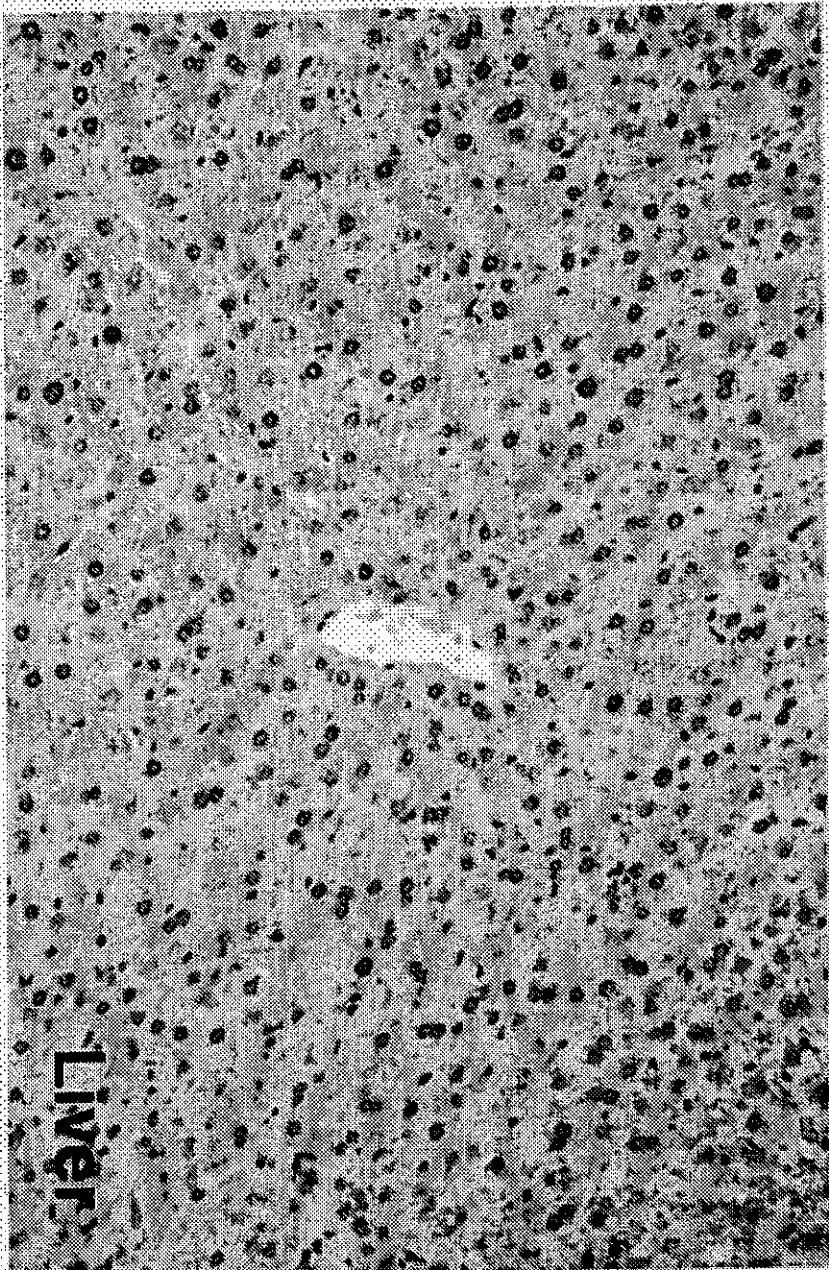


図 6 Aldh1 免疫組織化学染色 肝切片拡大図  
Aldh1 蛋白の発現は、肝細胞の核周辺部で強かった。免疫組織化学染色法では *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> マウスの Aldh1 蛋白発現に明らかな差は認めなかった。

# Blood, Brain and Liver Ethanol Level after Ethanol Gavage

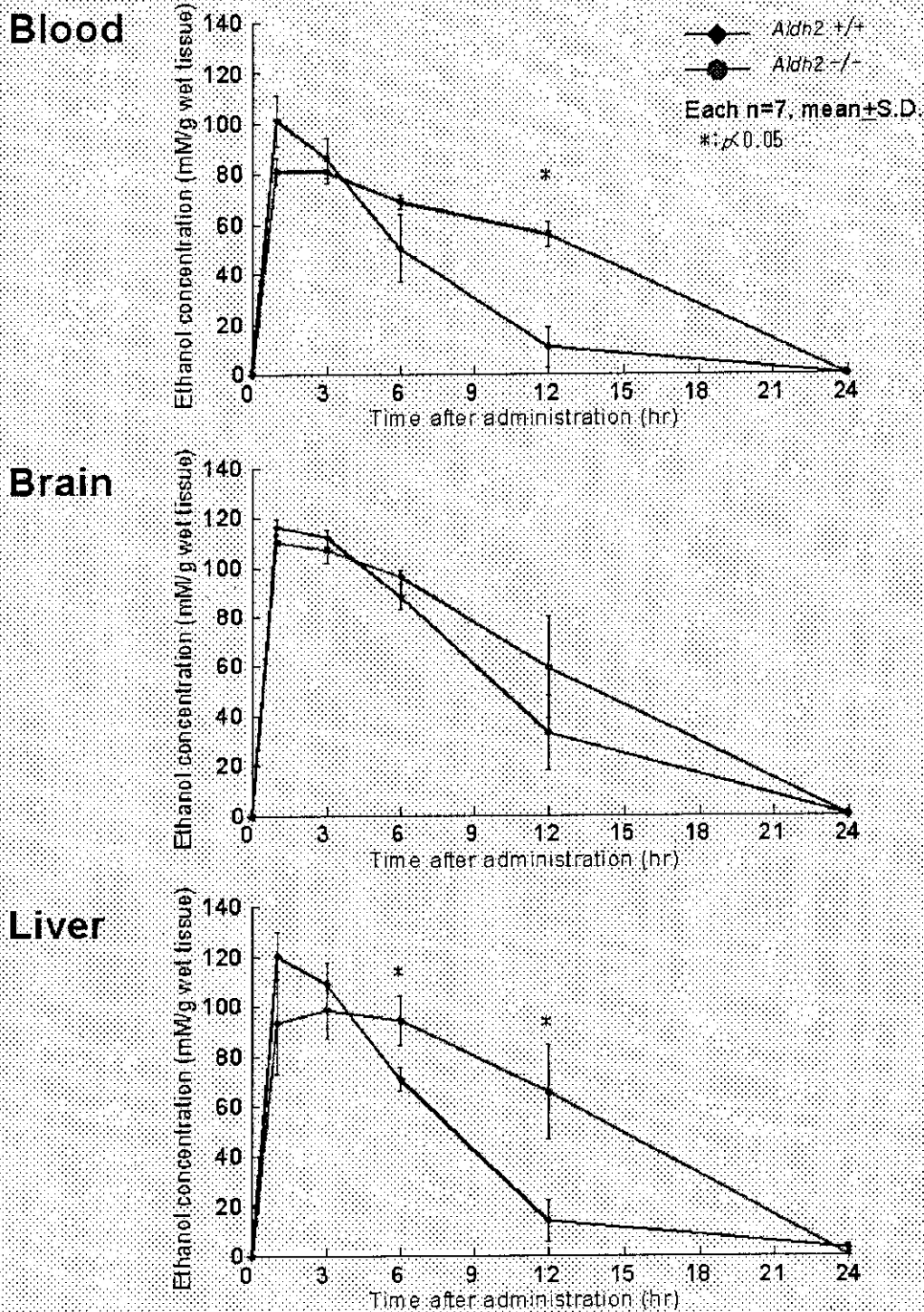


図 18 20%エタノール 5g/kg 経口投与の血液、脳、肝臓中エタノール濃度の比較  
*Aldh2* -/-マウスでは *Aldh2* +/+マウスに比べエタノール濃度低下の遷延を認める。

# Blood, Brain and Liver Acetaldehyde Level after Ethanol Gavage

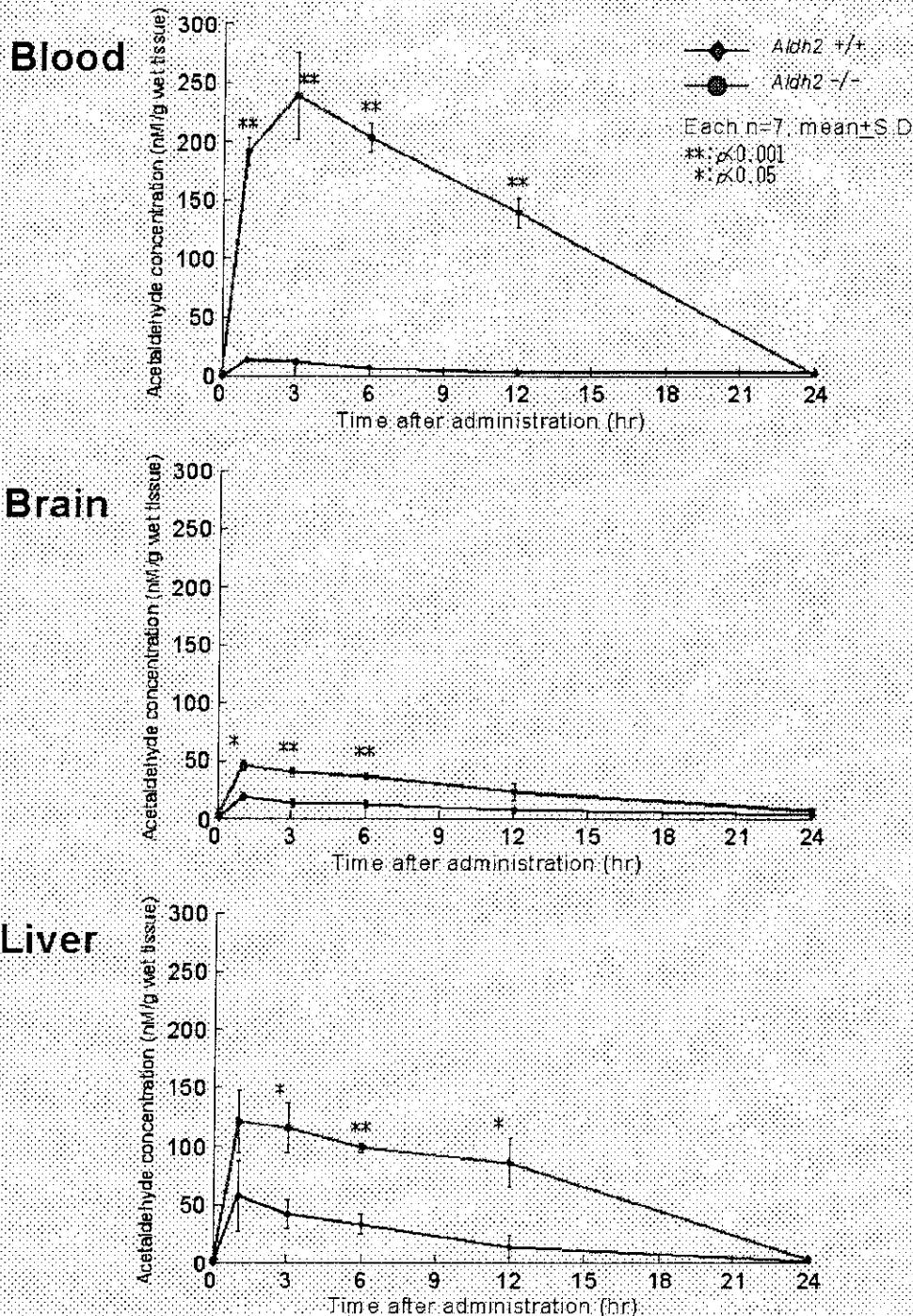


図 19 20%エタノール 5g/kg 経口投与の血液、脳、肝臓中アセトアルデヒド濃度比較  
*Aldh2* -/-マウスは *Aldh2* +/+マウスに比べ、アセトアルデヒド濃度の顕著な高値を示し、アセトアルデヒド濃度低下の遷延を認める。

「*Aldh2*  $-/-$  および  $+/+$ マウスのアセトアルデヒド単回腹腔内投与における  
半致死量(LD50 値)比較試験」のための予備的検討試験

- 最終報告書 -

2003年 1月15日

## 結果および総括

「*Aldh2* <sup>-/-</sup>マウスのアセトアルデヒド単回腹腔内投与における半致死量(LD50 値)比較試験」のための予備的検討として、*Aldh2* <sup>-/-</sup>(ノックアウトホモ)およびC57BL/6N Crjにアセトアルデヒドを単回腹腔内投与し、その致死量および急性症状について予備的な比較検討をおこなったので、以下に報告する。

投与量 (mg/kg)	濃度 (%)	投与容量 (mL/kg)	性別	C57BL/ Crj 死亡/使用数	<i>Aldh2</i> <sup>-/-</sup> 死亡/使用数	一般状態
生食	0	20	♂	0/1	—	異常なし
250	2	5	♂	0/1	—	250 mg/kg以上の群で、投与後1分から活動性低下およびよろめき歩行が認められ、投与後3分から皮膚蒼白、腹臥位、痛覚反射の消失および腹式の呼吸深大が認められた。死亡の発生は、投与後5分から15分間に認められ、死亡例では、死戦期の開口呼吸(クリック音を伴う)および体温低下が認められた。生存例では、投与後15分ないし45分より活動性および呼吸数の回復傾向が認められたのち、皮膚の紅潮および軽い立毛が認められたが、いずれの症状も投与後3ないし6時間には消失した。また、C57BL/6N Crjおよび <i>Aldh2</i> <sup>-/-</sup> において、症状の種類および発現・消失時間に明らかな差異は認められなかった。
500	2or5	25or10	♂	0/3	0/3	
600	5	12	♂	1/5	3/5	
650	5	12.5	♂	1/5	4/5	
700	5	14	♂	3/3	—	
750	5	15	♂	1/1	—	
1000	5	20	♂	1/1	—	

—：未実施

以上の結果より、本試験条件下における*Aldh2* <sup>-/-</sup>マウスのアセトアルデヒド単回腹腔内投与における致死量は、C57BL/6N Crjマウスの致死量と明らかな差は認められなかった。また、*Aldh2* <sup>-/-</sup>マウスおよびC57BL/6N Crjマウスにおける急性症状の種類および発現・消失時間にも明らかな系統差は認められなかった。

したがって、今後実施する本試験では、*Aldh2* <sup>-/-</sup>マウスおよびC57BL/6N Crjマウスともに同じ用量設定にて致死量の比較検討を実施すべきと考えられた。また、雌雄を使った予備試験を実施し、性差を確認した上で、本試験の投与量を設定するのが好ましいと考えられた。

*Aldh2* マウスのアセトアルデヒド単回腹腔内投与  
における半致死量(LD<sub>50</sub>値)比較試験

— 最終報告 —

2003年2月26日



## 目次

	頁
試験日程	ii
試験の実施指針・基準	ii
試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期しえなかった事態	ii
要約	
試験目的	
試験材料および方法	
試験成績	
考察	
Fig. 1 Body weight changes in C57BL/6N mice	
Fig. 2 Body weight changes in Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 1 Mortality and LD <sub>50</sub> values in C57BL/6N mice and Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 2 Clinical signs in C57BL/6N mice	
Table 3 Clinical signs in Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 4 Body weights in C57BL/6N mice	
Table 5 Body weights in Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 6 Necropsy findings in dead male C57BL/6N mice	
Table 7 Necropsy findings in dead female C57BL/6N mice	
Table 8 Necropsy findings in dead male Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 9 Necropsy findings in dead female Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 10 Necropsy findings in survived male C57BL/6N mice	
Table 11 Necropsy findings in survived female C57BL/6N mice	
Table 12 Necropsy findings in survived male Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Table 13 Necropsy findings in survived female Aldh2 <sup>-/-</sup> mice	
Appendix	

試験日程

1. 試験開始日 : 2003年1月15日
2. 動物入荷
  - 2.1. 予備、本試験1 : 2003年1月16日
  - 2.2. 本試験2 : 2003年2月18日
3. 予備試験 : (C57BL/6N Crj)2003年1月24日～2003年1月27日
4. 本試験1
  - 4.1. 投与日 : (C57BL/6N Crj) 2003年1月29日  
(Aldh2-/-)2003年1月30日
  - 4.2. 剖検日 : (C57BL/6N Crj) 2003年2月12日  
(Aldh2-/-)2003年2月13日
5. 本試験2
  - 5.1. 投与日 : (C57BL/6N Crj) 2003年2月25日  
(Aldh2-/-)2003年2月26日
  - 5.2. 剖検日 : (C57BL/6N Crj) 2003年3月11日  
(Aldh2-/-)2003年3月12日
6. 試験完了日 : 2003年3月31日

試験の実施指針・基準

1. 試験法ガイドライン

組換え DNA 実験指針(平成9年2月、科学技術庁研究開発局ライフサイエンス課長通知)に従って実施した。

試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期しえなかった事態

1. 試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期しえなかった事態  
なし

## 要約

アセトアルデヒドを1群雌雄各8匹のC57BL/6N Cj(ワイルド、対照)およびAldh2<sup>-/-</sup>(ノックアウトホモ)に515、556、600、648および700 mg/kgの用量で1回腹腔内投与し、Aldh2<sup>-/-</sup>マウスのアセトアルデヒドに対する感受性を半致死量(LD<sub>50</sub>値)により比較検討した。以下に結果を示した。

### 1. 死亡の発生状況および半致死量(LD<sub>50</sub>値)の比較

C57BL/6N マウスでは、556 mg/kg 群の雌2例、600 mg/kg 群の雄5例および雌2例、648 mg/kg 群の雄7例および雌8例、700 mg/kg 群の雌雄8例に死亡が認められ、LD<sub>50</sub>値は、雄602 mg/kg (95%信頼限界577~624 mg/kg)、雌598 mg/kg (95%信頼限界575~625 mg/kg)であった。一方、Aldh2<sup>-/-</sup>マウスでは、556 mg/kg 群の雌雄3例、600 mg/kg 群の雄7例および雌4例、648 mg/kg 群の雌雄8例、700 mg/kg 群の雌雄8例に死亡が認められ、LD<sub>50</sub>値は、雄567 mg/kg (95%信頼限界545~589 mg/kg)、雌587 mg/kg (95%信頼限界564~616 mg/kg)とC57BL/6N マウスに比べて、半致死量が低下する傾向にあった。

### 2. 一般状態観察

C57BL/6N および Aldh2<sup>-/-</sup>マウスともに、雌雄の515 mg/kg 以上の群で、投与直後(0~1分)から活動性低下およびよろめき歩行が認められ、投与後5分から皮膚蒼白、腹臥位、昏睡および腹式の深大呼吸が認められた。死亡の発生は、C57BL/6N マウスでは、投与後15分から30分の間に、Aldh2<sup>-/-</sup>マウスでは、投与後5分から15分の間に認められた。死亡例では、C57BL/6N および Aldh2<sup>-/-</sup>マウスともに、呼吸困難、喘鳴(クリック音)および体温低下が認められた。生存例では、C57BL/6N では、投与後15分ないし45分より、うずくまり、呼吸緩徐、皮膚の紅潮および立毛が認められ、いずれの症状も投与後45分ないし2時間に消失した。また、Aldh2<sup>-/-</sup>マウスでは、投与後30分ないし1時間より、うずくまり、呼吸緩徐、皮膚の紅潮および立毛が認められ、いずれの症状も投与後1時間ないし2時間に消失した。

以上のように、Aldh2<sup>-/-</sup>マウスでは、症状の種類および発現はC57BL/6N マウスとほぼ同じであったが、症状の消失(回復)はやや遅く、死亡の発生はやや早かった。

### 3. 体重測定

生存したC57BL/6N および Aldh2<sup>-/-</sup>マウスのすべての投与群で、投与翌日に体重の減少が認められたが、投与後3日より順調な増加が認められた。

#### 4. 病理学的検査

C57BL/6N および *Aldh2* <sup>-/-</sup>マウスの死亡例および生存例ともに、アセトアルデヒド投与によると思われる肉眼的異常は認められなかった。