

Table 2 被験者のVOCsの個人曝露濃度及び自宅内濃度

化学物質名	個人曝露濃度			自宅及び職場濃度			
	被験者 A	被験者 C	被験者 D	被験者 A(自宅)	被験者 B(自宅)	被験者 C(職場)	被験者 E(自宅)
ヘキサン	0.85	1.81	0.47	0.27	0.06	1.98	0.32
2,4-ジメチルペンタン	0.05	0.64	0.46	0.05	0.55	0.50	0.50
ヘプタン	0.30	0.89	0.51	0.58	0.90	0.76	0.53
オクタン	0.32	0.33	0.15	0.21	0.09	0.40	0.09
ノン	0.61	0.50	0.33	0.37	0.33	0.51	0.36
デカン	1.04	18.94	4.67	1.04	1.04	19.50	23.41
ベンゼン	0.60	1.82	0.24	0.24	1.19	1.88	0.54
トルエン	2.87	8.51	3.61	2.16	4.32	7.86	3.94
エチルベンゼン	0.55	1.86	0.62	0.23	0.69	1.70	0.50
m,p-キシレン	1.26	6.93	2.31	0.68	2.42	5.73	1.54
o-キシレン	0.52	1.39	0.43	0.31	0.54	1.14	0.38
1,3,5-トリメチルベンゼン	0.09	0.34	0.09	0.09	0.09	0.24	0.09
1,2,4-トリメチルベンゼン	0.46	1.38	0.19	0.09	0.09	1.01	0.09
1,2,3-トリメチルベンゼン	0.10	0.34	0.10	0.10	0.10	0.23	0.10
クロホルム	0.10	0.33	0.27	0.10	0.29	0.28	0.30
1,1,1-トリクロロエタン	0.08	0.17	0.15	0.09	0.15	0.16	0.16
四塩化炭素	0.16	0.28	0.30	0.18	0.32	0.28	0.32
トリクロロエチレン	0.10	0.36	0.23	0.09	0.14	0.37	0.35
テトラクロロエチレン	0.08	0.30	0.12	0.14	0.13	0.26	0.12
p-ジクロロベンゼン	0.57	0.09	28.74	0.79	0.09	0.09	4.53
酢酸ブチル	0.58	0.15	0.34	0.74	0.77	0.15	0.46
メチルエチルケトン	1.06	1.57	1.46	0.85	1.63	1.54	1.57
メチルイソブチルケトン	0.06	0.54	0.15	0.06	0.06	0.67	0.34
1-ブタノール	1.00	0.51	0.56	1.05	0.55	0.48	0.06
α-ピネン	0.76	0.16	0.21	2.09	0.93	0.15	0.26
リモネン	0.42	0.12	1.16	0.78	1.84	0.05	4.06

(ppb)

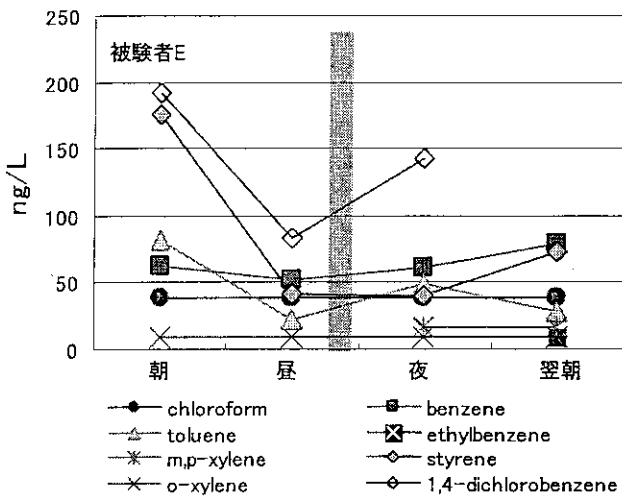
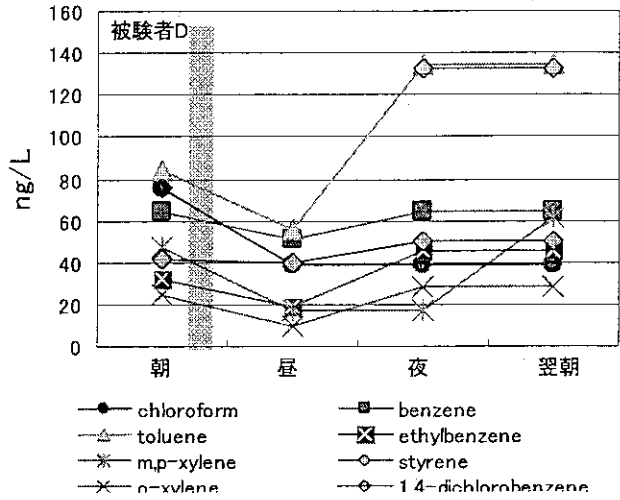
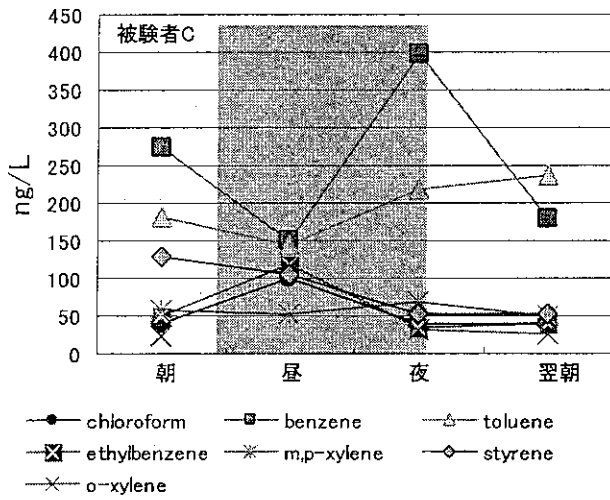
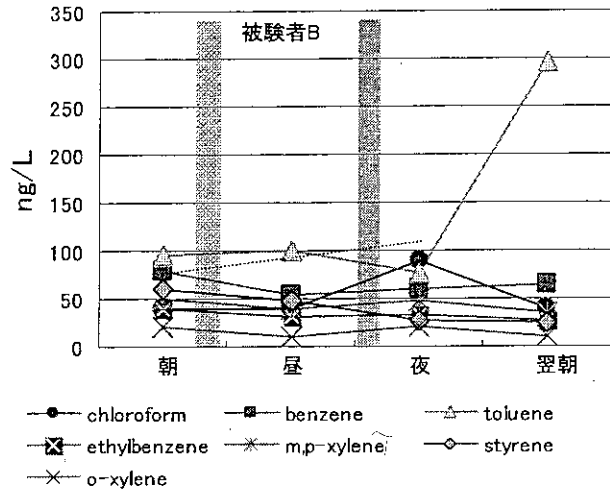
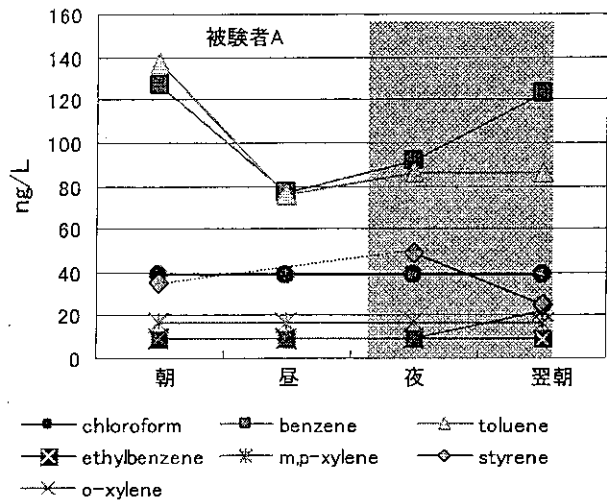
Table 3 尿中VOCs濃度の有症者\*と京都市内在住の一般の人の平均値の比較

化学物質	有症者*	京都市内在住者
クロホルム	46.1	87.1
ベンゼン	108.8	135.8
トルエン	116.2	81.2
エチルベンゼン	33.0	35.7
m,p-キシレン	34.0	61.2
スチレン	58.8	-**
o-キシレン	16.9	37.6
p-ジクロロベンゼン	62.7	425.9

(ppb)

\* シックハウス症候群又は化学物質過敏症様症状有症者

\*\* 京都市内在住者の調査においては検出されなかった



■ 症状があった時間

Fig. 15 被験者別の尿中 VOCs濃度の推移



*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  
分担研究者 小山倫浩 産業医科大学医学部 助教授  
分担研究者 一瀬豊日 産業医科大学医学部 助手

研究要旨

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 の活性が失われており、不活性型のヒトにおいては、低濃度のアセトアルデヒドでも毒性が高く、ハイリスクグループが存在することがわかってきた。そこで、本研究はアルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウス (*Aldh2* ノックアウトマウス、以下 *Aldh2*<sup>-/-</sup>と表記する) を用いて、アセトアルデヒドに対する感受性の相違を検討し、いわゆる個体差と言われる現象を科学的に説明することを目的とした。*Aldh2*<sup>-/-</sup>およびコントロールマウス (C57BL/6Jcrj、以後 *Aldh2*<sup>+/+</sup>と表記する) にアセトアルデヒドを腹腔内投与、高濃度急性吸入曝露および低濃度 2 週間吸入曝露を行い、以下の結果を得た。

- ① アセトアルデヒド腹腔内投与で、*Aldh2*<sup>-/-</sup>は、*Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ血中アセトアルデヒド消失速度が遅かった。
- ② 高濃度急性吸入曝露において *Aldh2*<sup>-/-</sup>は *Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ、強い毒性症状を呈した。また、血中アセトアルデヒド濃度も有意に高かった。
- ③ 125ppm および 500ppm アセトアルデヒド 2 週間吸入曝露において、*Aldh2*<sup>-/-</sup>は *Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ、鼻腔、皮膚、肝臓により強い病理変化像を示した。とくに *Aldh2*<sup>-/-</sup>に特徴的な点は鼻腔上皮内出血、鼻腔内出血、喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮や背部表皮に変性病変が多く観察された点である。また、血中アセトアルデヒド濃度も高かった。

吸入曝露実験では、*Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>の方が血中アセトアルデヒド濃度が高く、毒性発現も大きかった。*Aldh2*<sup>-/-</sup>の血中濃度を *Aldh2*<sup>+/+</sup>と同程度まで下げるには、曝露量（濃度）を 1/6~1/10 とすることが、血中アセトアルデヒド消失速度から推算された。

化学物質の健康影響評価における、ヒト感受性の個体差は、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* ノックアウトマウスを用いた研究により、疫学的検討が不可能な化学物質に関しても、ヒトの化学物質感受性の個体差について動物実験からの外挿により、リスクを推算できる可能性を示した。

研究協力者

長野嘉介 日本バイオアッセイ研究センター  
病系検査部長  
長縄竜一 独立行政法人産業技術総合研究所  
企画主幹  
松野康二 産業医科大学学生体情報研究センター  
助教授  
鈴木理恵 産業医科大学産業保健修練コース  
修練医  
小川真規 産業医科大学大学院医学研究科  
大学院生  
木長 健 産業医科大学大学院医学研究科  
大学院生  
山口哲右 産業医科大学大学院医学研究科  
大学院生

(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 不活性型のヒトはアセトアルデヒドに対して高い感受性を示す危険性が指摘されている。

そこで、われわれは、当教室で開発した *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た。具体的には、*Aldh2* ノックアウトマウス (以降 *Aldh2*<sup>-/-</sup>と表記) およびコントロールマウス (C57BL/6Jcrj、以降 *Aldh2*<sup>+/+</sup>と表記) におけるアセトアルデヒド腹腔内投与後の消失速度の比較、急性吸入曝露による血中アセトアルデヒド濃度測定と行動毒性学的検討、低濃度 (125ppm および 500ppm) 2 週間吸入曝露による病理組織変化と酸化ストレス指標測定を行った。

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

## B. 研究方法

### 1) 実験動物

*Aldh2*<sup>-/-</sup>マウスは、産業医科大学医学部衛生学教室が九州大学生体防御医学研究所と共同開発したマウスを、C57BL/6Ncrj マウスに 10 世代以上戻し交配したものを用いた。

### 2) 気中アセトアルデヒド測定方法

アセトアルデヒド濃度は産業技術総合研究所より供与された水晶振動子アセトアルデヒドセンサーを用いて 1.5 秒に 1 回の間隔で連続的にモニターした。また、アセトアルデヒド 検知管 (ガステック) と DNPH 吸収管 (Waters) を用いてそれぞれ 24 時間間隔でアセトアルデヒド濃度を測定することで水晶振動子アセトアルデヒドセンサーによるアセトアルデヒド濃度の測定値を補正した。以上により、アセトアルデヒドで曝露しない非曝露群 (Control: 平均曝露濃度 0ppm) とアセトアルデヒド 2 週間曝露したマウスによるアセトアルデヒド 125ppm 曝露群 (平均曝露濃度 126.3ppm)、アセトアルデヒド 500ppm 曝露群 (平均曝露濃度 510.5ppm) の 3 群を検討した (Fig 3-10~15)。

### 3) アセトアルデヒド腹腔内投与試験

*Aldh2*<sup>-/-</sup>が *Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ、血中アセトアルデヒド消失速度が遅いことを検討した。両マウスにアセトアルデヒドを腹腔内投与し、投与量および観測時間を変えて、血中アセトアルデヒド濃度を測定し、消失速度を比較した (Fig 1-1)。

### 4) アセトアルデヒド急性曝露試験

アセトアルデヒド初期濃度 5000ppm のデシケレーターに *Aldh2*<sup>-/-</sup>および *Aldh2*<sup>+/+</sup>各 1 匹を投入、4 時間デシケレーター内空気攪拌を実施しながら症状を記録、曝露 4 時間後の血中アセトアルデヒド濃度を測定した (Fig 2-1~5, Table 2-1)。

### 5) アセトアルデヒド2週間吸入曝露

*Aldh2*<sup>-/-</sup>および *Aldh2*<sup>+/+</sup>を同じ曝露チャンバーに入れ、全身吸入曝露実験を行った。マウスは両群ともに 15 週齢の雄を使用した。また、清浄空気のみを通した別のチャンバーに、*Aldh2*<sup>+/+</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup>をそれぞれ 10 匹ずつ入れ、同時に実験をおこなった (非曝露群)。アセトアルデヒド 125ppm 曝露群は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>をそれぞれ 7 匹ずつ、アセトアルデヒド 500ppm 曝露群では *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>をそれぞれ 10 匹ずつを用いた (Fig 3-1)。曝露期間は 2 週間連続 1 日 23 時間の曝露を実施した。曝露終了後に標本を採取し

(Fig 3-19,20)、病理組織 (Fig I-1~VII-6)、血中アセトアルデヒド濃度測定 (Table 3-2)、酸化ストレス指標など (Fig 3-21,22) を比較した。

### 血中アセトアルデヒド濃度測定

2 週間吸入曝露後の *Aldh2*<sup>+/+</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup>をそれぞれ 3 匹ずつ、非曝露群、アセトアルデヒド 500ppm、125ppm 曝露群の 2 X 3 群のマウスから血液を採取し、Head-space GC-MS 法にて血中アセトアルデヒド濃度を測定した (Table 3-2)。

### Hematoxylin-Eosin (HE) 染色によるマウス臓器の形態学的変化の検討

アセトアルデヒド曝露による組織形態学的変化の検討を鼻 (Nose)、鼻腔 (Nasal cavity)、副鼻腔 (Paranasal sinuses)、喉頭・咽頭・気管 (Larynx, pharynx and trachea)、気管内腔 (Tracheal cavity)、肺 (Lung)、耳介 (Auricle)、背部表皮 (Dorsal skin) および肝臓 (Liver) を対象として行った (Fig 3-19)。対象臓器は臓器採取後直ちにホルマリン固定 (鼻、鼻腔、副鼻腔は 10% ギ酸ホルマリン脱灰固定 (Fig 3-20)) し、パラフィン包埋、切片作製、HE 染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。また、125ppm 曝露マウスから採取した耳介と背部表皮に関しては組織形態学的検討を行っていない。

### 尿中 8-ヒドロキシグアニン (8-OHdG) 測定

曝露前、曝露 6 日目、曝露 12 日目の同一時刻に各マウスからスポット採尿を行い、8-OHdG ELISA キット (日本老化制御研究所) を用いて尿中 8-OHdG を測定し、各群および曝露期間別に比較検討した。なお尿中 8-OHdG 濃度はクレアチニン補正したものを用いた (Fig 3-21,22)。

## C. 研究結果

### 1) アセトアルデヒド腹腔内投与後の血中消失速度

*Aldh2*<sup>-/-</sup>は、*Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ、血中アセトアルデヒド消滅速度が遅い。また高濃度域においてアセトアルデヒド血中半減期は両マウスとも 1 分以内であった (Fig 1-1)。

### 2) アセトアルデヒド急性曝露時の行動変化

アセトアルデヒド初期濃度 5000ppm のデシケレーターにマウスを入れたとき、*Aldh2*<sup>-/-</sup>は意識障害を呈したのに対し、*Aldh2*<sup>+/+</sup>は意識障害を呈さなかった (Fig 2-1~2-5)。また、血中アセトアルデ

ヒド濃度は *Aldh2*<sup>-/-</sup> が *Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ2倍以上高かった (Table 2-1)。

### 3) アセトアルデヒド 2 週間吸入曝露

#### 3-1) 体重変化

清浄空気のみを通した実験では、*Aldh2*<sup>+/+</sup> の曝露前後の体重はそれぞれ平均 27.1±1.25g と 28.2±1.37g であり、*Aldh2*<sup>-/-</sup> では平均 26.5±1.66g と 27.9±1.73g であった。アセトアルデヒド 125ppm 曝露群における *Aldh2*<sup>+/+</sup> の曝露前後の体重はそれぞれ平均 27.8±1.33g から 27.4±1.32g であり、*Aldh2*<sup>-/-</sup> では平均 27.4±1.61g から 27.7±1.75g へと低下であった。アセトアルデヒド 500ppm 曝露においては *Aldh2*<sup>+/+</sup> の体重は曝露により平均 26.6±1.79g から 21.8±1.21g へと低下し、*Aldh2*<sup>-/-</sup> では平均 27.1±1.41g から 23.9±1.23g へと低下していた (Fig 3-16)。

#### 3-2) 血中アセトアルデヒド濃度

曝露 2 週間後の血中アセトアルデヒド濃度を比較すると、*Aldh2*<sup>-/-</sup> は、*Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ 2-3 倍高かった。非曝露群の血中からはアセトアルデヒドは検出できなかった (Table 3-2)。

#### 3-3) 病理学的検討

Table 1 に結果を示す。Green は自然に存在するか組織標本作製などで生じた変化と推定される所見を示す。Blue はアセトアルデヒド曝露による病理学的変化を示し、Yellow はアセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> で著明に認めた病理学的変化を示す。また、Red はアセトアルデヒド曝露に関係なく、*Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> で認めた病理学的変化を示す。

#### I. 鼻(Nose)

鼻腔内は常に粘液で被われ、吸入曝露の入口であり最もアセトアルデヒドによる障害を受けやすい部位だと考えられる(1, 2)。このため鼻部は切歯後端レベル(レベル I)、切歯乳頭レベル(レベル II)と第一臼歯の前端レベル(レベル III)の3つのレベルの横断面を作製した (Figure I-1-A) (3)。Figure I-1-B で示すようにレベル I では大部分が呼吸上皮 (Respiratory epithelium) に被われており一部に扁平上皮 (Squamous epithelium) を認める。レベル II では嗅上皮 (Olfactory epithelium) を上方背側に一部認めて扁平上皮 (Squamous epithelium) も下方腹側に一部認めるが、大部分は呼吸上皮 (Respiratory epithelium) に被われている。レベル III では呼吸上皮 (Respiratory epithelium) を下方腹側に一部認めるが、大部分は嗅上皮 (Olfactory

epithelium) で被われている。

以上より、Table 1 に示すように鼻部は A 扁平上皮 (Squamous epithelium)、B 呼吸上皮 (Respiratory epithelium)、C 嗅上皮 (Olfactory epithelium) に分けて検討した。Figure I-2 に *Aldh2*<sup>+/+</sup> ・コントロールのレベル I とレベル II を示す。矢印の範囲は扁平上皮で被われている部位を示している。レベル I を強拡大して扁平上皮の範囲を矢印で示す (Figure I-3-A)。Figure I-3-B には扁平上皮を形成する重層扁平上皮と呼吸上皮を形成する繊毛円柱上皮の移行部を示す。レベル II を強拡大して扁平上皮の範囲を矢印で示す (Figure I-4-A)。Figure I-4-B にレベル II の扁平上皮強拡大像を示す。Table 1-I-A に示すように扁平上皮の変化に対して過角化 (Hyperkeratinization)、扁平上皮の範囲の呼吸上皮側への広がり (Broadness to respiratory epithelium)、びらん (Erosion)、変性 (Degeneration)、過形成 (Hyperplasia) に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup> ・500ppm 曝露群で 80% (4/5)、*Aldh2*<sup>-/-</sup> ・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup> ・500ppm 曝露群でそれぞれ 25% (1/4) と 100% (5/5) に過角化を認め、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup> ・*Aldh2*<sup>-/-</sup> 両マウスともに鼻部扁平上皮は過角化すると考えられる。Figure I-5-A にレベル II における *Aldh2*<sup>+/+</sup> ・500ppm 曝露群の過角化を示す。I-4-B の非曝露に比べ扁平上皮最外部の角化部は赤色の層として認める。*Aldh2*<sup>+/+</sup> ・500ppm 曝露群の一症例では異常角化 (Keratonosis) を伴う過角化も認めた (Figure I-5-B)。Figure I-6 にレベル I における *Aldh2*<sup>-/-</sup> ・125ppm 曝露群の過角化を示す。Figure I-7-A にレベル I における *Aldh2*<sup>-/-</sup> ・500ppm 曝露群の過角化を示す。扁平上皮最外部の角化部は厚く、剥離した角化層が鼻腔内に貯留している。*Aldh2*<sup>-/-</sup> ・500ppm 曝露群では異常角化 (Keratonosis) を伴う過角化も著明に認めた (Figure I-7-B)。

Figure I-8 に *Aldh2*<sup>+/+</sup> ・非曝露のレベル II とレベル III を示す。レベル II では矢印の範囲は嗅上皮で被われている部位を示し、レベル III では矢印の範囲は呼吸上皮で被われている部位を示している。レベル II における *Aldh2*<sup>+/+</sup> ・非曝露の呼吸上皮強拡大像で繊毛円柱上皮と粘液を含んだ杯細胞が散在している (Figure I-9)。Figure I-10-A には多層となった嗅上皮と単層で繊毛を有する呼吸上皮の移行部を示し、同部の強拡大像も示す (Figure I-10-B)。Table 1-I-B に示すように呼吸上皮の変化に対して呼吸上皮の範囲の嗅上皮側への広がり (Broadness to olfactory epithelium)、びらん (Erosion)、変性 (Degeneration)、過形成

(Hyperplasia)、扁平上皮化生(Squamous cell metaplasia)、杯細胞化生(Goblet cell metaplasia)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群でそれぞれ 25%(1/4)と 20%(1/5)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では 100%(5/5)にびらんを認め、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>でびらんを発症する傾向を認めた。また、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群でそれぞれ 50%(2/4)と 60%(3/5)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では 75%(3/4)と 80%(4/5)に呼吸上皮の変性を認め、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスともに呼吸上皮は変性すると考えられる。特に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>における呼吸上皮が変性する頻度は非曝露群 0%(0/5)に比べ、曝露群では 78%(7/9)と有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。 *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群や *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で呼吸上皮が欠損したびらんを認める(Figure I-11、Figure I-12)。Figure I-12-A ではびらん辺縁の呼吸上皮の変性を認め、Figure I-12-B ではびらん中央に繊毛を有する呼吸上皮を認める。また、レベル II における *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では潰瘍から骨が露出した病変を一例に認め(Figure I-13-A)、Figure I-13-B に示すように鼻中隔膜様部では両側のびらんから鼻中隔穿孔へ進展すると推定される病変も数例に認めた。レベル I における *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群の呼吸上皮の中等度変性した病変を示す(Figure I-14-A & I-14-B)。呼吸上皮は萎縮して高さが低くなり変性した呼吸上皮の繊毛は欠損している。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で呼吸上皮が萎縮して高さが低くなり繊毛の一部が欠損した軽度変性した病変を示す(Figure I-15-A)。さらに呼吸上皮の高さが低くなり繊毛のほとんどが欠損した中等度変性した病変を示す(Figure I-15-B)。レベル II における *Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群において呼吸上皮の高さが不揃いとなって繊毛が欠損した中等度変性した病変を認め(Figure I-16)、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群において上皮下組織に出血を伴って呼吸上皮の高さが非常に低くなっている高度変性病変を認める(Figure I-17-A & I-17-B)。

Figure I-18 にレベル II における多層となった嗅上皮(通常は 5 層以上)と上皮下組織の神経線維束を認める。Table 1-I-C に示すように嗅上皮の変化に対してびらん(Erosion)、変性(Degeneration)、過形成(Hyperplasia)、扁平上皮化生(Squamous cell metaplasia)、呼吸上皮化生(Goblet cell metaplasia)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の 20%(1/5)に、

*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群でも 20%(1/5)に嗅上皮の変性を認め、アセトアルデヒド 500ppm 曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスとも嗅上皮は変性すると考えられる。Figure I-19 に *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群で僅かに嗅上皮が萎縮して多層の嗅上皮が単層様に変化している病変を示す。両マウスはともにレベル II における同一の場所に変性による病変が発症している。

Table 1-I-D に示すように上皮下組織の変化に対して出血(Hemorrhage)、毛細血管拡張(Teleangiectasia)、炎症細胞の浸潤(Infiltrate of inflammatory cells)、浮腫(Edema)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群ではそれぞれ 50%(2/4)と 80%(4/5)に上皮下出血を認め、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>(0/9)に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>(6/9)で有意に上皮下出血を発症していた( $p < 0.05$ )。レベル I における上皮下出血を示す(Figure I-20)。レベル I における *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の正常所見と同一部位における *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群の上皮下出血を示す(Figure I-21)。鼻腔内に滲出液の貯留を伴った上皮下出血も認めた(Figure I-22)。

## II. 鼻腔(Nasal cavity)

Table 1-II に示すように鼻腔に関して出血(Hemorrhage)、滲出液(Exudate)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群ではそれぞれ 25%(1/4)と 20%(1/5)に鼻腔内出血を認め、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>で鼻腔内出血する傾向を認めた。また、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で 80%(4/5)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では 100%(5/5)と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群 0%(0/5)に比べ有意に鼻腔内滲出液を認め( $p < 0.05$ )、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスともに鼻腔内に滲出液が貯留すると考えられる。レベル III における *Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群の鼻腔内出血を示す(Figure II-1)。凝固した出血巣は比較的古く、以前からの出血であることが推定される。レベル I における *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の鼻腔内滲出液(Figure II-2-A)とレベル III における *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の鼻腔内滲出液(Figure II-2-B)を示す。レベル III における *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群において出血を伴った鼻腔内滲出液も認めた(Figure II-3)。

### III. 副鼻腔(Paranasal sinuses)

Table 1-III に示すように副鼻腔に関して副鼻腔炎(Sinusitis)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で20%(1/5)に副鼻腔炎として副鼻腔内出血を認め、実験操作などで生じた変化と推定される。Figure III-1 にレベルIIで認める正常の副鼻腔を示す。Figure III-2 には *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で正常の副鼻腔と副鼻腔内出血を認める症例を示す。

### IV. 喉頭・咽頭・気管(Larynx, pharynx and trachea)

Table 1-IV に示すように喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮の変化に対してびらん(Erosion)、変性(Degeneration)、過形成(Hyperplasia)、扁平上皮化生(Squamous cell metaplasia)、杯細胞化生(Goblet cell metaplasia)に関する検討を行い、Table 1 では示していないが、喉頭・咽頭・気管の扁平上皮の変化についても検討した。また、上皮下組織のアセトアルデヒドによる変化も検討した。呼吸上皮のびらんはずべての群で14%から100%に認め、正常に起こりうる変化かあるいは実験操作などで生じた変化と推定される。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群では75%(3/4)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では75%(3/4)と44%(4/9)に呼吸上皮の変性を認め、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスともに呼吸上皮は変性していた。また、呼吸上皮の変性症例頻度は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・曝露群の27%(3/11)に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>・曝露群の54%(7/13)は高値傾向を示し、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>で呼吸上皮が変性する傾向を認めた。

Figure IV-1-A に喉頭・咽頭・気管の矢状断を示す。喉頭から気管の移行部では口側に扁平上皮を尾側に呼吸上皮を認め、境界を矢印で示す(Figure IV-1-B)。*Aldh2*<sup>+/+</sup>における非曝露群と125ppm 曝露群における気管上皮(呼吸上皮)のびらんを示し(Figure IV-2)、*Aldh2*<sup>-/-</sup>における125ppm 曝露群と500ppm 曝露群におけるびらんも示す(Figure IV-3)。Figure IV-4 には *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群における軽度から中等度の気管上皮変性を示す。*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群において気管上皮は中等度の変性を認め(Figure IV-5)、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群において軽度から中等度の変性を認める(Figure IV-6)。

### V. 気管内腔(Tracheal cavity)

Table 1-V に示すように気管内腔は出血(Hemorrhage)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群で14%(1/7)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露

群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群ではそれぞれ22%(2/9)と11%(1/9)に気管内腔に出血を認め、実験操作などで生じた変化と推定される。

Figure V-1 では *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の同一症例で認めた気管内出血とびらんを示し、Figure V-2 では *Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の同一症例で認めた気管内出血とびらんを示す。

### VI. 肺(Lung)

Table 1-VI に示すように肺はA 気管支(Bronchus)とB 肺実質(Pulmonary parenchyma)に関する検討を行った。気管支に対して気管内腔の出血(Hemorrhage)、びらん(Erosion)、変性(Degeneration)、過形成(Hyperplasia)、扁平上皮化生(Squamous cell metaplasia)、杯細胞化生(Goblet cell metaplasia)に関する検討を行い、肺実質に対して肺泡出血(Alveolar hemorrhage)、肺泡間質の肥厚(Interstitial thickness)、気管支辺縁の変化(Peribronchial changes)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>の非曝露群においてそれぞれ10%(1/10)と11%(1/9)に気管支内腔の出血を認め、気管支内腔への出血は実験操作などで生じた変化だと推定される。また、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群を除いて11%から40%に肺泡内出血を認め、肺泡内出血も実験操作などで生じた変化だと推定される。

Figure VI-1 に *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の気管支・動静脈・肺を示す。Figure VI-2 に *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の気管支内出血を示し、Figure VI-3-A には肺泡内出血を示して Figure VI-3-B にその強拡大像を示す。また、肺泡内出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群や(Figure VI-4)、*Aldh2*<sup>-/-</sup>の125ppm 曝露群や500ppm 曝露群でも認める(Figure VI-5)。

### VII. 肝臓(Liver)

Table 1-VII に示すように肝臓はA 中心静脈周辺の変化(Changes near central vein)とB 小葉間血管系周辺の変化(Changes near interlobular vessels)に関する検討を行った。肝臓の変化に対して出血(Hemorrhage)、炎症性細胞集簇巣(Inflammatory cell nest)、変性(Erosion)、巣状壊死(Focal necrosis)に関する検討を行った。中心静脈周辺の変化は明らかに認めなかった。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の炎症性細胞集簇巣を認める症例の頻度10%(1/10)に比べ、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・曝露群では57%(8/14)と高値傾向を認めた。また、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の炎症性細胞集簇巣を認める症例の頻度20%(1/10)に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・曝露群でも50%(7/14)と高値傾向を認めた。このため、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスともに肝臓に炎症性



細胞集簇が形成されると考えられる。

Figure VII-1 に *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の肝臓を示す。散在する中心静脈を認める。Figure VII-2 に *Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>の非曝露群における炎症性細胞集簇を示し、VII-3 には *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm 曝露群の炎症性細胞集簇を示す。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群における小葉間の炎症性細胞集簇を示し(Figure VII-4-A)、その強拡大像では炎症細胞に囲まれるように壊死した肝細胞を認める(Figure VII-4-B)。Figure VII-5 には *Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm 曝露群における壊死性病変を伴った炎症性細胞集簇を示す。一部にはマロリー小体(Mallory body)様の病理像も示す。また、Figure VII-6 には *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群の壊死性病変を伴う炎症性細胞集簇を示す。一部にはマロリー小体(Mallory body)様の病理像も認める。Figure VII-7 には *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群における巣状壊死像を示す。

## VIII. 耳介(Auricle)

Table 1-VIII に示すように耳介は A 扁平上皮(Squamous epithelium)と B 上皮組織(Subepithelium)に関する検討を行った。扁平上皮の変化に対して過角化(Hyperkeratinization)、変性(Degeneration)、過形成(Hyperplasia)に関する検討を行い、上皮組織の変化に対して出血(Hemorrhage)、毛細血管拡張(Teleangiectasia)、炎症細胞の浸潤(Infiltrate of inflammatory cells)、浮腫(Edema)に関する検討を行った。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度 0%(0/10)に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度 50%(5/10)と有意に高値を示し( $p < 0.05$ )。アセトアルデヒド曝露に関係なく *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>で耳介では過角化を起こしていた。また、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度 0%に比べ、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の過角化した症例の頻度は 100%(10/10)と有意に高値を示し( $p < 0.01$ )。 *Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度 50%(5/10)に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群の過角化した症例の頻度は 89%(8/9)と高値傾向を示し、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup>両マウスともに耳介扁平上皮は過角化すると考えられる。

Figure VIII-1 に耳介の病理組織像を示す。耳介は中心に軟骨を有し、その周囲に毛細血管が発達した上皮組織を認め、全周性に扁平上皮で被われている。*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群や *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群において落屑(desquamation)を有する最外部角化層が肥厚した過角化病変を認める(Figure VIII-2, Figure VIII-3)。

## IX. 背部表皮(Dorsal skin)

Table 1-VIII に示すように背部表皮についても耳介と同様の検討を行った。*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群の背部表皮が変性した症例の頻度 0%(0/10)に比べ、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm 曝露群の背部表皮が変性した症例の頻度は 78%(7/9)と有意に高値を示し( $p < 0.01$ )。アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>で有意に背部表皮の変性病変が発症していた。

Figure IX-1 に背部表皮の病理組織像を示す。扁平上皮と毛根(Hair root)を有する上皮組織を認め(Figure IX-1-A)、強拡大で角化層を有する扁平上皮を認める(Figure IX-1-B)。*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm 曝露群では扁平上皮の高さが不正となった軽度の変性や扁平上皮の高さが非常に低くなった中等度の変性を認める(Figure IX-2)。Figure IX-3 にも扁平上皮の中等度の変性病変を示す。

### 4) 尿中 8-ヒドロキシングアニンの変化

尿中 8-OHdG は、500 ppm 曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup>でわずかに上昇したが、*Aldh2*<sup>-/-</sup>では 12 日間曝露後に *Aldh2*<sup>+/+</sup>の 1.5 倍程度(有意差なし)に上昇した(Fig. 3-21,22)。アセトアルデヒド 125 ppm 2 週間吸入曝露では *Aldh2*<sup>+/+</sup>に変化は見られなかった。*Aldh2*<sup>-/-</sup>は曝露 12 日目では曝露前に比べ、有意差は認めなかったが( $p = 0.08$ )、約 1.6 倍上昇していた。曝露 12 日目の *Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>を比較すると有意差はなかったが( $p = 0.06$ )、*Aldh2*<sup>-/-</sup>の方が *Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ 2 倍弱上昇していた。

## D. 考察

アセトアルデヒド血中半減期は 1 分以内と短く、かつ血中アセトアルデヒド濃度が高濃度域では両マウスの血中アセトアルデヒド濃度に差を認めない。これが急性曝露において致死性などに差を生じない原因となっていると考えられる。この現象は、アセトアルデヒド動態が拡散相にあるため、あるいは高濃度域では ALDH2 以外の Km が高い ALDH 酵素が主たる酵素として働くことができ、ALDH2 が血中濃度低下に占める割合が低いための 2 つの可能性が考えられる。高濃度では差が認められない一方、低投与量および血中アセトアルデヒド低濃度領域では、両マウスの血中アセトアルデヒド消失速度は明らかに異なる。このためため、繰り返しおよび慢性曝露時の血中アセトアルデヒド濃度に大きな差を生じる可能性がある。

アセトアルデヒド吸入曝露において *Aldh2*<sup>-/-</sup> は *Aldh2*<sup>+/+</sup> より感受性が高い。この感受性の差は *Aldh2*<sup>-/-</sup> マウスが *Aldh2*<sup>+/+</sup> にくらべ高いアセトアルデヒド血中濃度を呈するためと考えられる。

*Aldh2*<sup>-/-</sup> の血中アセトアルデヒド濃度を、*Aldh2*<sup>+/+</sup> と同程度に下げるには、繰り返し曝露コンパートメントモデルを基に計算する曝露濃度を6-10分の1とすればよいと推算された。

アセトアルデヒドの吸入により *Aldh2*<sup>-/-</sup> ではDNAの酸化損傷が増加している可能性が示された。このことは、ALDH2不活性のヒトでもアセトアルデヒド曝露によりDNAの酸化損傷が増加している可能性が疑える。

組織学的検討では、下記の4つの変化が考えられた。

### ① 自然に存在するか実験操作などで生じた変化と推定される所見 (Table I-Green)

- ・ 副鼻腔内出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群で20%に認めた。
- ・ 気管内腔への出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群で14%に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群ではそれぞれ22%と11%に認めた。
- ・ 気管支内腔への出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の非曝露群においてそれぞれ10%と11%に認めた。
- ・ 肺胞内出血も *Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群を除いて11%から40%に認めた。
- ・ 喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮のびらんはずべての群で14%から100%に認めた。

以上、副鼻腔を含む呼吸器(気管、気管支、肺胞)の出血と喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮のびらんは実験の操作などで生じた変化であり、今後の形態学的変化を検討する場合には留意しなければならない。

### ② アセトアルデヒド曝露による病理学的変化 (Table I-Blue)

- ・ 鼻部における過角化は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群で80%、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群でそれぞれ25%と100%に認めた。
- ・ 耳介における過角化も *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度は0%であり *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群では100%と有意に高値を示し ( $p < 0.01$ )、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の過角化した症例の頻度50%に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群

の過角化した症例の頻度は89%と高値傾向を示した。

- ・ 鼻部における呼吸上皮の変性は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群でそれぞれ50%と60%に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群では75%と80%に認め、特に *Aldh2*<sup>-/-</sup> における呼吸上皮が変性する頻度は非曝露群0%(0/5)に比べ、曝露群では78%(7/9)と有意に高値を示した。
- ・ 喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮の変性は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm曝露群では75%に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群では75%と44%に認めた。
- ・ *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群で80%(4/5)に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群では100%(5/5)と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群0%(0/5)に比べ有意に鼻腔内滲出液を認めた。
- ・ 鼻部における嗅上皮の変性は *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群で20%に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群でも20%に認めた。
- ・ *Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の炎症性細胞集簇を認める症例の頻度10%に比べ、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・曝露群では57%と高値傾向を認め、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群の炎症性細胞集簇を認める症例の頻度20%に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・曝露群でも50%と高値傾向を認めた。

以上、アセトアルデヒドにより *Aldh2*<sup>+/+</sup>・*Aldh2*<sup>-/-</sup> 両マウスともに鼻部と耳介の扁平上皮は過角化し、鼻部から喉頭・咽頭・気管に至る呼吸上皮も変性すると考えられる。さらに、アセトアルデヒドにより鼻腔内滲出液は貯留して、鼻部の嗅上皮が変性する場合もあることが示された。肝臓においてもアセトアルデヒドにより炎症性細胞集簇を認める症例が増加した。ヒトにおいてもアセトアルデヒド曝露によって吸収・代謝経路となる呼吸器系、肝臓、皮膚に同様の形態学的変化を起こす可能性が示された。

### ③ アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> で著名に認めた病理学的変化 (Table I-Yellow)

- ・ 鼻部における呼吸上皮のびらん *Aldh2*<sup>+/+</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群でそれぞれ25%と20%に、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群では100%に認めた。
- ・ 鼻部における上皮出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup> においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群ではそれぞれ50%と80%に認めた。
- ・ 鼻腔内出血は *Aldh2*<sup>+/+</sup> においてアセトアルデ

ヒト曝露では認めなかったが、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・125ppm曝露群と*Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群ではそれぞれ25%と20%に認めた。

- ・ 喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮の変性症例頻度は*Aldh2*<sup>+/+</sup>・曝露群の27%に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>・曝露群の54%は高値傾向を示した。
- ・ *Aldh2*<sup>-/-</sup>・500ppm曝露群の背部表皮が変性した症例の頻度0%に比べ、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・500ppm曝露群の背部表皮が変性した症例の頻度は78%と有意に高値を示した( $p < 0.01$ )。

以上、鼻部における呼吸上皮のびらんと鼻部の上皮出血や鼻腔内出血はアセトアルデヒド曝露により*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>で発症する傾向を認めた。また、*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>ではアセトアルデヒド曝露により喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮や背部表皮は変性病変を起こしやすいことが示された。アセトアルデヒド脱水素酵素2不活性型のヒトにおいてもアセトアルデヒド曝露によって鼻部の上皮出血と鼻出血や呼吸器・表皮における上皮の変性病変を発症しやすい可能性が示された。

#### ④ アセトアルデヒド曝露に関係なく*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>で起こると推定される変化 (Table I-Red)

- ・ 耳介の過角化した症例の頻度は*Aldh2*<sup>+/+</sup>・非曝露群の0%に比べ、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・非曝露群では50%と有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。
- アセトアルデヒド曝露に関係なく*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>で耳介では過角化を起こしており、アセトアルデヒド脱水素酵素2不活性型のヒトにおいても一部の表皮では通常状態でも過角化しやすいことが推定される。

### E. 結論

- ① *Aldh2*<sup>-/-</sup>は、ヒトALDH2不活性型の動物モデルとして有用である。
- ② アセトアルデヒド吸入曝露において *Aldh2*<sup>-/-</sup>は *Aldh2*<sup>+/+</sup>より感受性が高い。
- ③ 2週間アセトアルデヒド吸入曝露において125ppm曝露で病理組織学的変化を認めた。*Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>では血中アセトアルデヒド濃度が高く、毒性発現も大きかった。特に *Aldh2*<sup>-/-</sup>に鼻腔上皮内出血、鼻腔内出血、喉頭・咽頭・気管の呼吸上皮や背部表皮に変性病変が多く観察された。血中アセトアルデヒド濃度を同程度に下

げることで、毒性発現が抑制できると仮定すると、曝露濃度を6-10分の1に下げればよいと考えられる。

- ④ アセトアルデヒドの吸入により *Aldh2*<sup>-/-</sup>ではDNAの酸化損傷が増加する可能性が示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 川本俊弘, 北川恭子ら: アルデヒド脱水素酵素2 (*Aldh2*)ノックアウトマウスのアルコール医学研究への応用 日本アルコール精神医学雑誌 2003 8 : 10(1), 3-10
- 2) Munaka, M., Koshi, K., *et al.*: Genetic polymorphisms to tobacco and alcohol-related metabolizing enzymes and the risk of hepatocellular carcinoma J Cancer Res Clin Oncol 2003 6 : 129, 355-360
- 3) Kawamoto, T., Isse, T., *et al.*: Effect of genetic polymorphism of Drug metabolizing enzymes on smoking and drinking J UOEH 2003 5 : 25( Supplement 1), 97-106
- 4) Oyama, T., Matsumoto, A., *et al.*: Evidence-based prevention (EBP): Approach to lung cancer prevention based on cytochrome 1A1 and cytochrome 2E1 polymorphism Anticancer Research 2003 4 : 23, 1731-1738
- 5) Oyama, T., Kagawa, N., *et al.*: Lung cancer and CYP1A1 or GSTM1 polymorphism Environmental Health and Preventive Medicine 2003 1 : 7(6), 230-234

## 2. 学会発表

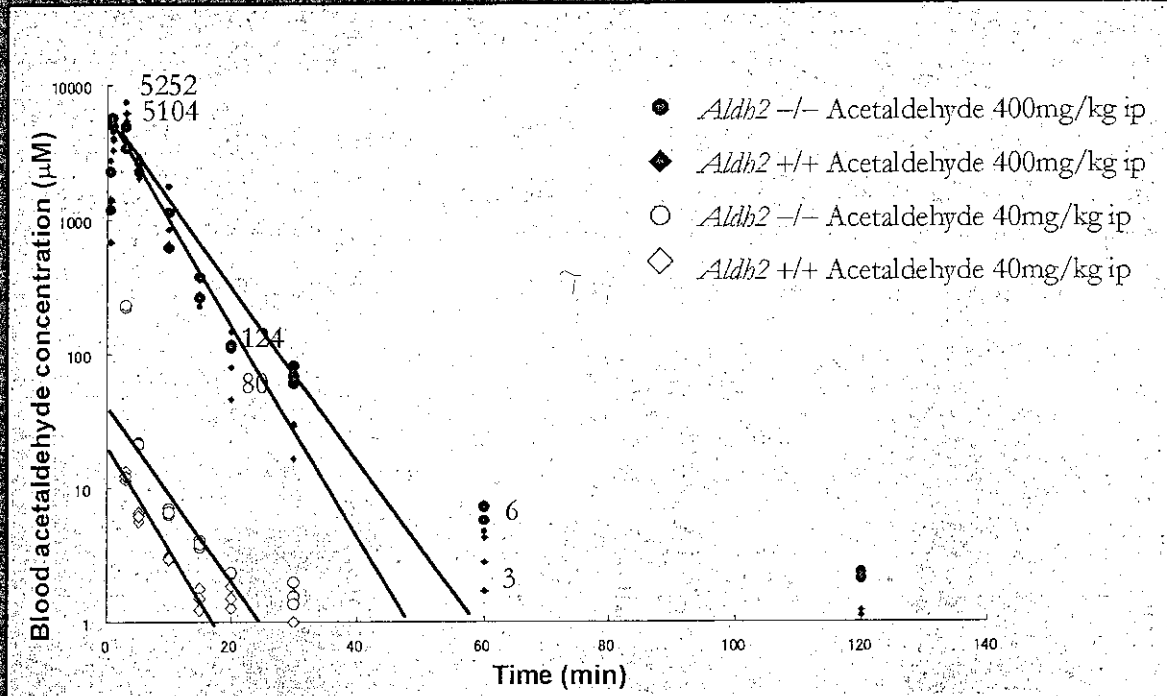
- 1) 一瀬豊日, 北川恭子ら: アルデヒド脱水素酵素2ノックアウトマウスを用いたアセトアルデヒド急性全身曝露の検討 第74回日本衛生学会総会 東京 2004年3月
- 2) 小山倫浩, 一瀬豊日ら: エタノール亜急性投与による *Aldh2* ノックアウトマウスの生存率および肝内 *Aldh* と *Cyp* の発現 第74回日本衛生学会総会 東京 2004年3月
- 3) 木長健, 小山倫浩ら: アセトアルデヒドを皮下投与した *Aldh2* ノックアウトマウスの表皮内 *Cyp2e1* 発現の変動 第74回日本衛生学会総会 東京 2004年3月
- 4) 松本明子, 市場正良ら: *Aldh2* ノックアウトマウスを用いたアルコール性肝障害の検討 第74回日本衛生学会総会 東京 2004年3月
- 5) Isse, T., Oyama, T., *et al.*: Acute toxicity of acetaldehyde on aldehyde dehydrogenase 2 gene targeting mice: single dose ip study The 43rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore(USA) 2004年3月
- 6) Kunugita, T., Isse, T., *et al.*: Increased frequencies of micronucleated reticulocytes and 8-OHdG levels in *Aldh2* knockout mice The 43rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore(USA) 2004年3月
- 7) 松本明子, 市場正良ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるアルコール性肝障害 第4回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2004年3月
- 8) 木長健, 小山倫浩ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒド皮下投与後の表皮内 *Cyp2e1* 発現の変動 第4回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2004年3月
- 9) 一瀬豊日, 小山倫浩ら: アセトアルデヒド全身曝露時の *Aldh2*<sup>-/-</sup>マウスのアセトアルデヒド血中動態 第4回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2004年3月
- 10) 小山倫浩, 一瀬豊日ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるエタノール亜急性投与による影響 第4回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2004年3月
- 11) 川本俊弘: *Aldh2* ノックアウトマウスと私 第4回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2004年3月
- 12) 小山倫浩, 一瀬豊日ら: 喫煙者肺癌における気管上皮ないチトクローム P450(CYP)代謝酵素発現検出の意義 第3回日本分子予防環境研究会, 東京, 2003年12月
- 13) Kawamoto, T.: Recent molecular biological methods to occupational and environmental health study The 31st Annual Meeting of the Korean Society of Occupational and Environmental Medicine, Kyongiyu (Korea) 2003年11月
- 14) 櫻田尚樹, 北川恭子ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおける網状赤血球小核発現と8-ヒドロキシデオキシグアノシン生成 第31回有機溶剤中毒研究会・第31回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会合同大会, 佐賀, 2003年10月
- 15) 山口哲右, 小山倫浩ら: *Aldh2* ノックアウトマウスの肝におけるアセトアルデヒド脱水素酵素の検討 第31回有機溶剤中毒研究会・第31回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会合同大会, 佐賀, 2003年10月
- 16) 小川真規, 一瀬豊日ら: 非絶食、アルコール非投与下での *Aldh2* ノックアウトおよび正常型マウスの肝における *Cyp2e1* の発現量の比較 第31回有機溶剤中毒研究会・第31回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会合同大会, 佐賀, 2003年10月
- 17) 一瀬豊日, 北川恭子ら: アセトアルデヒド単回腹腔内投与によるアセトアルデヒド脱水素酵素2ノックアウト (*Aldh2*<sup>-/-</sup>)マウスの半数致死量 (LD50)の検討 第31回有機溶剤中毒研究会・第31回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会合同大会, 佐賀, 2003年10月

- 18) 松本明子, 一瀬豊日ら: アルコール性肝障害におけるアルデヒド脱水素酵素の関与 第3回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2003年7月
- 19) 一瀬豊日, 小山倫浩ら: *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒドの血中動態 第3回 *Aldh2* ノックアウトマウス学会, 北九州, 2003年7月
- 20) Oyama, T., Kawamoto, T.; *et al.*: CYP2A6 and CYP2E1 immunoreactives in bronchial epithelial cells affected by smoking in non-small cell lung cancer patients 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington DC (USA) 2003年7月
- 21) 松本明子, 一瀬豊日ら: アルデヒド脱水素酵素がエタノールによる肝障害に与える影響-*Aldh2* ノックアウトマウスを用いた検討-平成15年度日本産業衛生学会九州地方会, 福岡, 2003年6月
- 22) 一瀬豊日, 松野康二ら: エタノール経口投与のアルデヒド脱水素酵素2 (*Aldh2*) ノックアウトマウスに対する検討 第76回日本産業衛生学会, 山口, 2003年4月

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他なし

## Blood acetaldehyde concentration after acetaldehyde intra peritoneal administration



Blood acetaldehyde levels are same during the early phases in high dose.

Fig. 1-1 アセトアルデヒド腹腔内投与後の血中アセトアルデヒド濃度の推移

### 方法

8-15 週齢雄の *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> に 5.0% アセトアルデヒド 生理食塩水溶液を、それぞれ 400mg/kg 体重および 40mg/kg 体重を腹腔内投与した。投与後それぞれ 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 分後に断頭し、体幹血を液体窒素冷却採血管に採取保存した。凍結血液は氷冷した 0.6N PCA 溶液中で融解除蛋白後、Head-space GC-MS を用いてアセトアルデヒド濃度を測定した。

### 結果

400mg/kg 投与した *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> の血中アセトアルデヒド濃度はそれぞれ、3 分後 5104µM, 5252 µM 20 分後 80 µM, 24 µM 60 分後 3 µM, 6 µM であった。高用量単回投与では、両マウスとも投与初期には血中濃度は同じ消失経過をたどるが、血中濃度が下がると低容量投与と同じ消失曲線をとる。すなわち一定速度の消失速度の点を結ぶと *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> の血中アセトアルデヒド消失定数は、*Aldh2*<sup>+/+</sup> にくらべ *Aldh2*<sup>-/-</sup> のほうが約 1.65 倍小さい。

### 考察

高用量単回曝露の初期において、両マウスの体内曝露量は変わらない。したがって、毒性に差は生じない。しかし消失速度に差があるため、低容量あるいは繰り返し曝露において両マウスの体内曝露量には大きな差が生じると予想される。この結果、体内曝露量から毒性を予測すると、毒性の感受性大きな差を生じると考えられる。

## 簡便に吸入曝露毒性を確認するために

- OECD急性吸入曝露ガイドラインに準拠
- 一定濃度のアセトアルデヒド発生させるのはコストが高い。初期濃度を一定とした拡散モデルで曝露を実施
- *Aldh2*  $-/-$ と*Aldh2*  $+/+$ における毒性発現の差を見るのが目的のため2種1組で複数回の実験を実施
- マウスのアセトアルデヒドLC50値より、さらに1段階低い濃度となる5000ppmを選択

Fig. 2-1 簡易急性曝露試験（クラス法を閉鎖チャンバー法に適用し実施）の背景

## 方法

動物: 同程度の体重、週齢の

C57BL/6 crj (*Alb2* +/+) 雄 1匹

*Alb2* -/- 雄 1匹

を13330mL デシケーターに投入。

ガス発生: 99.5% アセトアルデヒドを5000ppmになる液量を  
マイクロシリンジで投入。(換気なし)

4時間経過を観察した後、直ちに血液採取し、Headspace-GC-  
MSで血中アセトアルデヒド濃度を測定。

同様の実験を4回繰り返し実施。

Fig. 2-2 簡易急性曝露試験 (クラス法を閉鎖チャンバー法に適用し実施) の方法



## 急性曝露容器概観



マグネットスターラーでデシケーター中の大気を攪拌し、デシケーター中大気成分が均一になるようにした。

8時間密閉容器中にマウス三匹を入れた。酸欠にはならない十分な容積がある。

アセトアルデヒドを吸収するもの、水等はいれなかった。

マウスに吸収・吸着したアセトアルデヒドの分、気中濃度は時間とともに低下する。

Fig. 2-3 簡易急性曝露試験（クラス法を閉鎖チャンバー法に適用し実施）の曝露チャンバー

アセトアルデヒド急性全身曝露実験

## 5000ppm 40分曝露後のマウス



右: *Aldh2*<sup>+/+</sup>

左: *Aldh2*<sup>-/-</sup>

両者とも活動性が低下している。  
鼻頭を含め起毛している。  
姿勢保持、歩行は可能で、両者に  
あまり大きな差は認められない。  
両者に皮膚紅潮を認める。

Fig. 2-4 簡易急性曝露試験

初期投入量 5000ppm アセトアルデヒド曝露において、曝露開始 40 分後ではまだ症状に大きな差はない

# 5000ppm 2時間曝露後のマウス

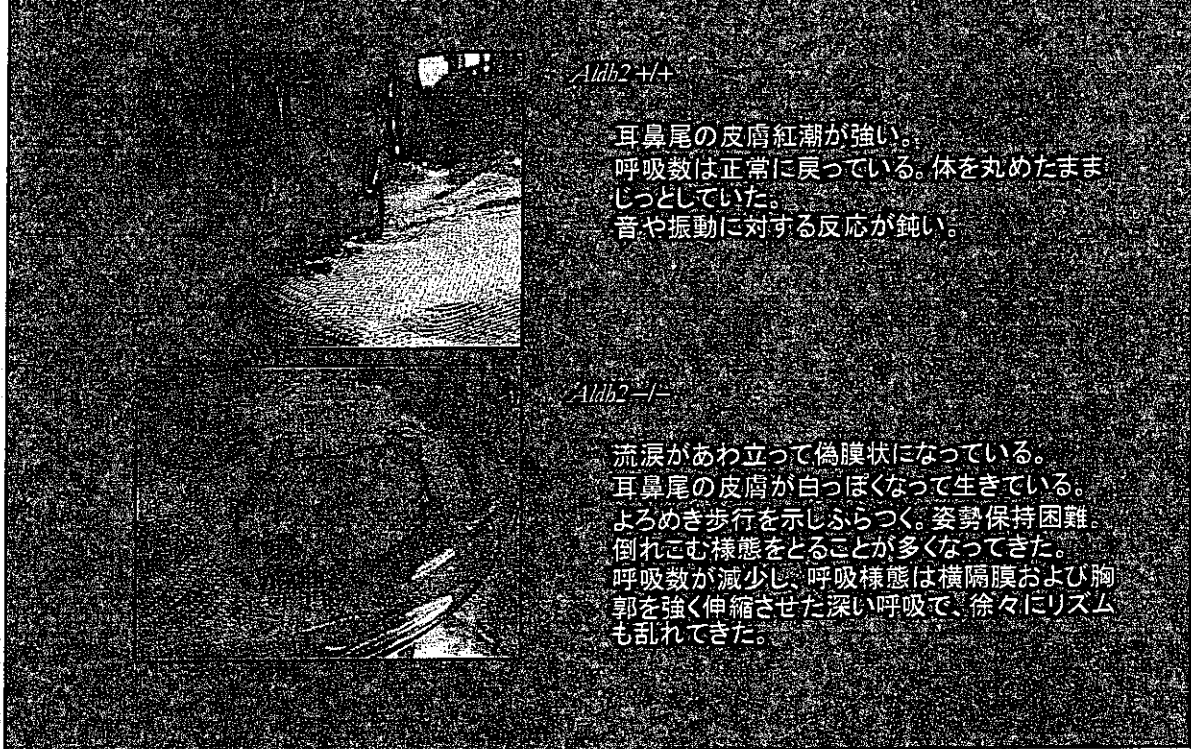


Fig. 2-5 簡易急性曝露試験

初期投入量 5000ppm アセトアルデヒド曝露における、曝露開始 2 時間後の様子  
症状に差が認められる。*Aldh2*<sup>+/+</sup>は活動性低下を認める程度に対し、*Aldh2*<sup>-/-</sup>は異常呼吸および意識  
消失など深刻な症状を呈しており、クラス法による毒性判定区分を適応すると、毒性に差ありと判定  
される。

## アセトアルデヒド血中濃度

	血中濃度 $\mu\text{M/g}$	濃度差(倍)
<i>Aldh2</i> +/+	80.0	
<i>Aldh2</i> -/-	255.0	3.2
<i>Aldh2</i> +/+	226.7	
<i>Aldh2</i> -/-	478.4	2.1
<i>Aldh2</i> +/+	88.2	
<i>Aldh2</i> -/-	188.2	2.1
<i>Aldh2</i> +/+	86.5	
<i>Aldh2</i> -/-	174.4	2.0

Table. 2-1

- アセトアルデヒド急性全身曝露において *Aldh2*+/+に比べ *Aldh2*-/-の方が強い毒性症状を呈した。
- *Aldh2*+/+に比べ *Aldh2*-/-が血中アセトアルデヒド濃度は、2倍程度高値であった。
- 血中アセトアルデヒド濃度にばらつきが大きいのは、投入アセトアルデヒド量のばらつき、マウスの呼吸状態のばらつき、および体重のばらつきに由来するものと考えられる。
- *Aldh2*+/+に比べ *Aldh2*-/-は、さらに低濃度のアセトアルデヒド吸入曝露においても毒性発現の差を生じると予想される