

Preference for Ethanol in *Aldh2*^{-/-} mice

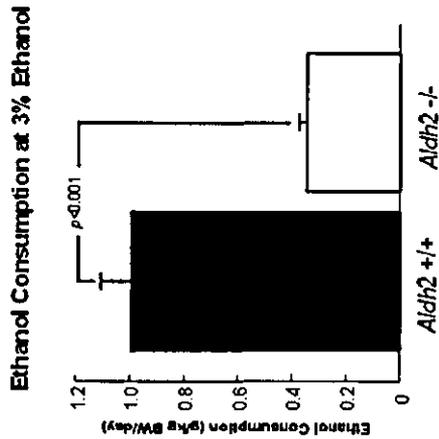


図 17 *Aldh2*^{+/+}および*Aldh2*^{-/-}マウスの自発的飲酒量の比較

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。

Blood, Brain and Liver Ethanol Level after Ethanol Gavage

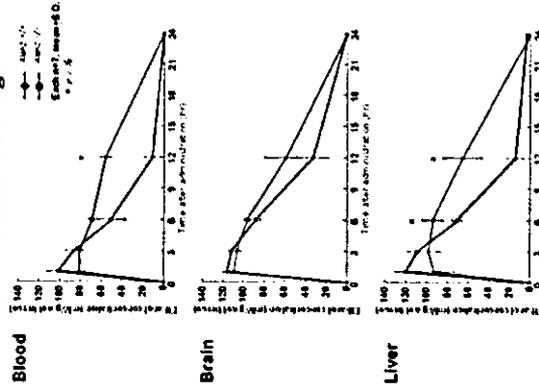


図 18 20%エタノール 5g/kg 経口投与の血液、脳、肝臓中エタノール濃度の比較
Aldh2^{-/-}マウスでは *Aldh2*^{+/+}マウスに比べエタノール濃度低下の遅延を認める。

Blood, Brain and Liver Acetaldehyde Level after Ethanol Gavage

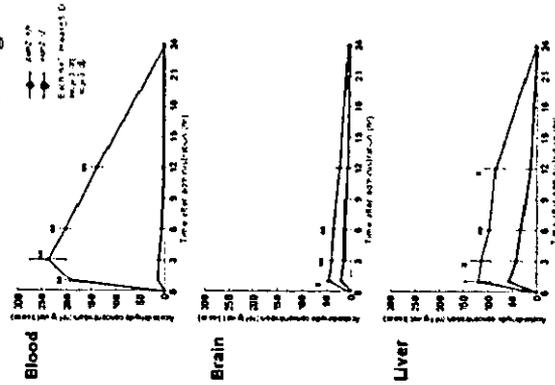


図 19 20%エタノール 5g/kg 経口投与の血液、脳、肝臓中アセトアルデヒド濃度比較
Aldh2^{-/-}マウスは *Aldh2*^{+/+}マウスに比べアセトアルデヒド濃度の顕著な高値を示し、アセトアルデヒド濃度低下の遅延を認める。

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 (2)

分担研究者 川本俊弘 産業医科大学医学部 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

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*^{-/-} 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*^{-/-} およびコントロールマウス (C57BL/6Jcrj、以後 *Aldh2*^{+/+} 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*^{-/-} は、*Aldh2*^{+/+} 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*^{-/-} は *Aldh2*^{+/+} 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*^{-/-} は *Aldh2*^{+/+} 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*^{-/-} 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*^{+/+} と比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-} の血中濃度を *Aldh2*^{+/+} 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
病理検査部部长
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研修コース
専門修練医
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

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*^{-/-} と表記) およびコントロールマウス (C57BL/6Jcrj, 以降 *Aldh2*^{+/+} 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。

B. 研究方法

1) 実験動物

Aldh2^{-/-} 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川いた。

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 (Fig3 - 10 ~ 15)。

3) アセトアルデヒド腹腔内投与試験

Aldh2^{-/-} が *Aldh2*^{+/+} 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 のデシケーターに *Aldh2*^{-/-} および *Aldh2*^{+/+} 各 1 匹を投入、4 時間デシケ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 (Fig2-1 ~ 5, Table2-1)。

5) アセトアルデヒド 2 週間吸入曝露

Aldh2^{-/-} および *Aldh2*^{+/+} 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*^{+/+} および *Aldh2*^{-/-} 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^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} をそれぞれ 7 匹ずつ、アセトアルデヒド 500ppm 曝露群では *Aldh2*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} をそれぞれ 10 匹ずつを川いた (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*^{+/+} および *Aldh2*^{-/-} 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 2X 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 (Fig3-19))。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、パラフィン抱埋、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) を川いて尿中 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川いた (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^{-/-} は、*Aldh2*^{+/+} 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 のデシケーターにマウスを入れたとき、*Aldh2*^{-/-} は意識障害を呈したのに対し、*Aldh2*^{+/+} 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*^{-/-} が *Aldh2*^{+/+} 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*^{+/+} 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*^{-/-} 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*^{+/+} 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*^{-/-} 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*^{+/+} 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*^{-/-} 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*^{-/-} は、*Aldh2*^{+/+} 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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} で認めた病理学的変化を示す。

1. 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) と第一白

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*^{+/+} ・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*^{+/+} ・500ppm 曝露群で 80%(4/5)、*Aldh2*^{+/+} ・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-} ・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*^{+/+} ・*Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+} ・500ppm 曝露群の過角化を示す。I-5-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*^{+/+} ・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*^{-/-} ・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*^{-/-} ・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*^{-/-} ・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*^{+/+}・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*^{+/+}・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*^{+/+}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群でそれぞれ 25%(1/4) と 20%(1/5) に、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} でびらんを発症する傾向を認めた。また、*Aldh2*^{+/+}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群でそれぞれ 50%(2/4) と 60%(3/5) に、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-} 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*^{+/+}・125ppm 曝露群や *Aldh2*^{+/+}・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*^{-/-}・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*^{+/+}・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*^{+/+}・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*^{-/-}・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*^{-/-}・500ppm 曝露群において上皮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*^{+/+}・500ppm 曝露群の 20%(1/5) に、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}・500ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群ではそれぞれ 50%(2/4) と 80%(4/5) に上皮出血を認め、アセトアルデヒド曝露により *Aldh2*^{+/+} (0/9) に比べ *Aldh2*^{-/-} (6/9) で有意に上皮出血を発症していた ($p < 0.05$)。レベル I における上皮出血を示す (Figure I-20)。レベル I における *Aldh2*^{+/+}・非曝露群の正常所見と同一部位における *Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群の上皮出血を示す (Figure I-21)。鼻腔内に滲出液の貯留を伴った上皮出血も認めた (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*^{+/+}においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} で鼻腔内出血する傾向を認めた。また、*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群で 80%(4/5) に、*Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群では 100%(5/5) と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-}・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長く、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*^{+/+}・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*^{+/+}・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*^{-/-}・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*^{+/+}・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*^{+/+}・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関しても検討した。また、上皮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*^{+/+}・125ppm 曝露群では 75%(3/4) に、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}・曝露群の 27%(3/11) に比べ *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}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*^{-/-}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*^{+/+}・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*^{-/-}・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*^{-/-}・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*^{+/+}・500ppm 曝露群で 14%(1/7) に、*Aldh2*^{-/-}・非曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・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*^{-/-}・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、肺実質に対して肺胞出血

(Alveolar hemorrhage)、肺胞間質の肥厚 (Interstitial thickness)、気管支辺縁の変化 (Peribronchial changes) に関する検討を行った。*Aldh2*^{+/+} と *Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-}・125ppm 曝露群を除いて 11% から 40% に肺胞内出血を認め、肺胞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*^{+/+}・非曝露群の気管支・動静脈・肺を示す。Figure VI-2 に *Aldh2*^{+/+}・非曝露群の気管支内出血を示し、Figure VI-3-A には肺胞内出血を示して Figure VI-3-B にその強拡大像を示す。また、肺胞内出血は *Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群や (Figure VI-4)、*Aldh2*^{-/-} 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 (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*^{+/+}・非曝露群の炎症性細胞集簇を認める症例の頻度 10%(1/10) に比べ、*Aldh2*^{+/+}・曝露群では 57%(8/14) と高値傾向を認めた。また、*Aldh2*^{-/-}・非曝露群の炎症性細胞集簇を認める症例の頻度 20%(1/10) に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}・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*^{+/+} と *Aldh2*^{-/-} の非曝露群における炎症性細胞集簇を示し、VII-3 には *Aldh2*^{+/+}・125ppm 曝露群の炎症性細胞集簇を示す。*Aldh2*^{+/+}・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*^{-/-}・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*^{-/-}・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*^{-/-}・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 上皮下組織 (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*^{+/+}・非曝露群の過角化した症例の頻度 0%(0/10) に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} で耳介では過角化を起こしていた。また、*Aldh2*^{+/+}・非曝露群の過角化した症例の頻度 0% に比べ、*Aldh2*^{+/+}・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*^{-/-}・非曝露群の過角化した症例の頻度 50%(5/10) に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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下組織を認め、全周性に扁平上皮で被われている。*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群や *Aldh2*^{-/-}・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関しても耳介と同様の検討を行った。*Aldh2*^{-/-}・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^{+/+}・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*^{+/+}に比べ*Aldh2*^{-/-}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*^{-/-}・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-ヒドロキシグアニンの変化

尿中8-OHdGは、500 ppm 曝露により*Aldh2*^{+/+}でわずかに上昇したが、*Aldh2*^{-/-}では12日間曝露後に*Aldh2*^{+/+}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*^{+/+}に変化は見られなかった。*Aldh2*^{-/-}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*^{+/+}と*Aldh2*^{-/-}を比較すると有意差はなかったが(p=0.06)、*Aldh2*^{-/-}の方が*Aldh2*^{+/+}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、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*^{-/-}は*Aldh2*^{+/+}より感受性が高い。この感受性の差は*Aldh2*^{-/-}マウスが*Aldh2*^{+/+}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^{-/-}の血中アセトアルデヒド濃度を、*Aldh2*^{+/+}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*^{-/-}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不活性のヒド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)

- ・副鼻腔内出血を*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群で20%に認めた。
- ・気管内腔への出血は*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群で14%に、*Aldh2*^{-/-}・非曝露群と*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}と*Aldh2*^{-/-}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*^{-/-}・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すべての群で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*^{+/+}・500ppm 曝露群で80%、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・非曝露群の過角化した症例の頻度は0%であり*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群では100%と有意に高値を示し(p<0.01)、*Aldh2*^{-/-}・非曝露群の過角化した症例の頻度50%に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・125ppm 曝露群と*Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群でそれぞれ50%と60%に、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と

Aldh2^{-/-}・500ppm 曝露群では75%と80%に認め、特に *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}・125ppm 曝露群では75%に、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群では75%と44%に認めた。
- ・ *Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群で80%(4/5)に、*Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群では100%(5/5)と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・500ppm 曝露群で20%に、*Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群でも20%に認めた。
- ・ *Aldh2*^{+/+}・非曝露群の炎症性細胞集簇巣を認める症例の頻度10%に比べ、*Aldh2*^{+/+}・曝露群では57%と高値傾向を認め、*Aldh2*^{-/-}・非曝露群の炎症性細胞集簇巣を認める症例の頻度20%に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・*Aldh2*^{-/-} 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巣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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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は *Aldh2*^{+/+}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{+/+}・500ppm 曝露群でそれぞれ25%と20%に、*Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群では100%に認めた。
 - ・鼻部における上皮出血は *Aldh2*^{+/+} においてアセトアルデヒド曝露では認めなかったが、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群ではそれぞれ50%と80%に認めた。
 - ・鼻腔内出血は *Aldh2*^{+/+} においてアセトアルデヒド曝

露では認めなかったが、*Aldh2*^{-/-}・125ppm 曝露群と *Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+}・曝露群の27%に比べ *Aldh2*^{-/-}・曝露群の54%は高値傾向を示した。
- ・ *Aldh2*^{-/-}・500ppm 曝露群の背部表皮が変性した症例の頻度0%に比べ、*Aldh2*^{+/+}・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下出血や鼻腔内出血はアセトアルデヒド曝露により *Aldh2*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} で発症する傾向を認めた。また、*Aldh2*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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下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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+}・非曝露群の0%に比べ、*Aldh2*^{-/-}・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*^{+/+} に比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-} 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*^{-/-} は *Aldh2*^{+/+} より感受性が高い。
- ③2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*^{+/+} と比べ *Aldh2*^{-/-} 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*^{-/-} 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、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*^{-/-} 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*^{-/-}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) 樺田尚樹, 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^{-/-}) 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

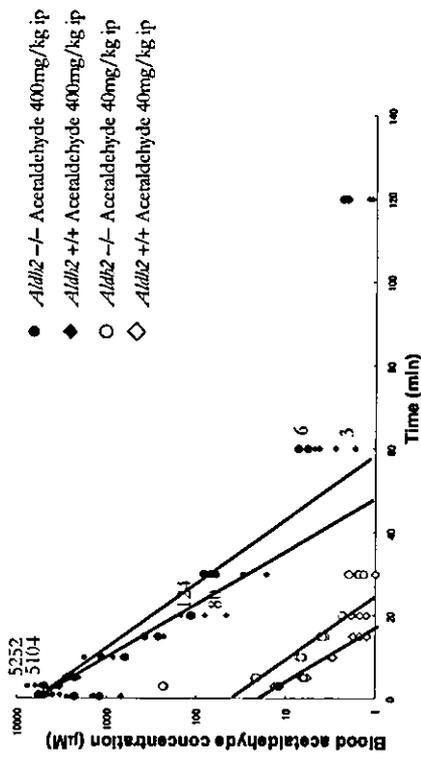


Fig. 1-1 アセトアルデヒド腹腔内投与後の血中アセトアルデヒド濃度の推移

厚生労働省科学

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 週齢の *Aldh2*^{+/+} および *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+} および *Aldh2*^{-/-} 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*^{+/+} および *Aldh2*^{-/-} の血中アセトアルデヒド消失定数は、*Aldh2*^{+/+} にくらべて *Aldh2*^{-/-} 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 5000 ppm を選択

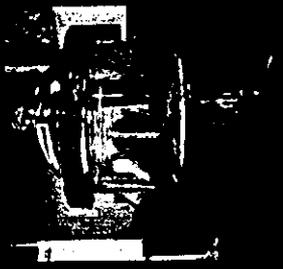
Fig. 2-1 簡易急性曝露試験 (クラス法を閉鎖チャンパー法に適用し実施) の背景

方法

動物: 同程度の体重、週齢の *Aldh2*^{+/+} (57匹), *Aldh2*^{-/-} 雄 1 匹, *Aldh2*^{-/-} 雌 1 匹 を 1335ml, デンケターーに投入。
 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ろシリンジで投入。(換気なし)
 4 時間経過を観察した後、直ちに血液採取し、Head-space 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パー法に適用し実施) 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ター中の大気を攪拌し、デシケ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二匹を入れた。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、水等は入れなかった。

マウスに吸吸・吸精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。

112

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) の曝露チャンパー

5000ppm 2時間曝露後のマウス



耳鼻尾の皮膚紅潮が強い。
呼吸数は正常に展っている。体をめめたままじっとしていた。
音や振動に対する反応が鈍い。

流涎があわ立って偽寝状になっている。
耳鼻尾の皮膚が白っぽく生きている。
よろめき歩行を示しふらつく。姿勢保持困難。
慣れこむ様態をとることが多くなってきた。
呼吸数が減少し、呼吸様態は胸隔膜および胸郭を深く伸縮させた深い呼吸で、徐々にリズムも乱れてきた。

5000ppm 40分曝露後のマウス



右: Aldh2+/+
左: Aldh2-/-
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

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+/+は活動性低下を認める程度に対し、Aldh2-/-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>Alch2</i> +/+	80.0	
<i>Alch2</i> -/-	255.0	3.2
<i>Alch2</i> +/+	226.7	
<i>Alch2</i> -/-	478.4	2.1
<i>Alch2</i> +/+	88.2	
<i>Alch2</i> -/-	188.2	2.1
<i>Alch2</i> +/+	86.5	
<i>Alch2</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 *Alch2*+/+ に比べ *Alch2*-/- の方が強い毒性症状を呈した。
- *Alch2*+/+ に比べ *Alch2*-/- 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。
- *Alch2*+/+ に比べ *Alch2*-/- 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症状の差を生じると予想される

2 週間 23 時間/日 アセトアルデヒド全身曝露曝露試験の構成	Table3-1	P10
曝露試験操作手順書		P11-29
アセトアルデヒドガス濃度測定チェックリスト		P30
アセトアルデヒドガス発生装置のチェックリスト		P31
アセトアルデヒドガス曝露チャンパー	Fig. 3-1	P32
アセトアルデヒドガス発生装置	Fig3-2~9	P33-40
アセトアルデヒドガス濃度測定	Fig3-10~15	P41-46
アセトアルデヒド曝露による体重変化	Fig3-16	P47
アセトアルデヒド曝露による血中アセトアルデヒド濃度	Table3-2	P48-49
アセトアルデヒド曝露による外的所見	Fig3-17	P50
アセトアルデヒド曝露による肉眼的病理所見	Fig3-18	P51
アセトアルデヒド曝露による病理標本を制作した部位	Fig3-19~20	P52-53
アセトアルデヒド曝露による組織病理所見	Table1, Fig1-1~VII-6	P54-100
アセトアルデヒド曝露による尿中 8-OHdG 量変化	Fig3-21~22	P101-102

全身曝露 23hr/day 14days

動物：同程度の体重、15週齢

0ppm	C57Bl/6 crj(<i>Aldh2</i> +/+)	雄	10匹
	<i>Aldh2</i> -/-	雄	10匹
500ppm	C57Bl/6 crj(<i>Aldh2</i> +/+)	雄	10匹
	<i>Aldh2</i> -/-	雄	10匹
125ppm	C57Bl/6 crj(<i>Aldh2</i> +/+)	雄	7匹
	<i>Aldh2</i> -/-	雄	7匹

Table. 3-1 アセトアルデヒドガス2週間曝露試験の構成

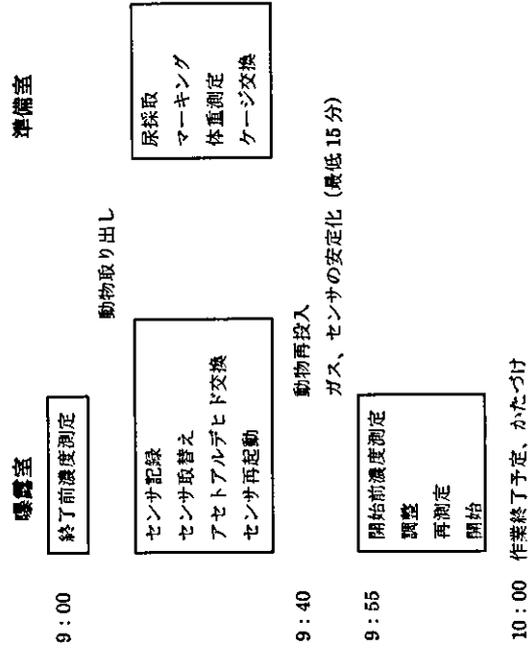
2週間アセトアルデヒド全身曝露実験 作業標準手順書

0. 衛生学教室7Fからの準備品
 毎回持っていくもの
 アイスボックス：アセトアルデヒド、アセトアルデヒド廃棄用瓶
 DNPH管：最低2本+予備2本
 アセトアルデヒド検知管 (92, 92M)
 はさみ

適直持っていくもの
 窒素ガスボンベ：2日で1本消費する。
 ビニルテープ

曝露実験の毎日の作業のスケジュール

- 8:45 7F衛生学カンファに集合
 準備
 8:50 出発



1. 曝露交換前の濃度測定

1.1. 準備、気温湿度の記録

- 1.1.1. 発生装置、曝露チャンパー、吸引ポンプ、マウスの様子を概観して異常のないことを確認する。異常を認めた場合、その内容をノートに記入する。
- 1.1.2. チャンパー内温度・湿度をノートに記録しておく。
- 1.1.3. 湿度湿度が前日開始時と同じ場合、アセトアルデヒドセンサー記録紙上 3-5 ミリの低下が観察される。濃度変化の目安として異常のないことを確認する。(大きな上昇低下は湿度上昇低下を反映している)
- 1.1.4. 接続ガラス管、検知ポンプ、検知管 (型番 92 高濃度用)、DNPH 管を手元に準備する。
- 1.1.5. DNPH 管、および袋に通し番号を記入する。
- 1.1.6. 検知管の両端を閉口しておく。

1.2. 脱気

- 1.2.1. 検知ポンプにガラス管を接続する。このとき接続用ガラス管を検知ポンプに押し込みすぎない。検知ポンプの流量調節弁が破損し正しく測定できなくなる。
- 1.2.2. 三方活栓を開く。このとき三方活栓をしっかり保持し両手を使って操作する。片手で操作すると三方活栓が開いてなかつたり、ゴム栓が外れたり、チャンパー内チューブを脱落させるなどのトラブルを起こす。
- 1.2.3. 検査用穴のゴム栓が外れていないか？チャンパー内の吸引チューブが外れていないか確認する。
- 1.2.4. 100mL を三回吸引し、検査用チューブ内の空気を排出する。このとき、排気にアセトアルデヒド臭がすることを確認する。臭いがしていない、あるいは極端に薄い場合は、三方活栓が開いていない、測定部位ゴム栓が外れている、チャンパー内アセトアルデヒド濃度が薄いなどの原因が考えられる。測定前に測定系流路の問題かチャンパー内濃度の問題か把握する。
- 1.2.5. 検知ポンプ、接続ガラス管を検知ポンプから外す。このときシリコンチューブは折り曲げて押さえておく。チャンパー内は陰圧なのでシリコンチューブを押さえていないとチューブ内に空気を引いてしまい、アセトアルデヒド濃度が実際よりも薄く測定されてしまう。

1.3. 検知管測定

- 1.3.1. 検知ポンプの排気を行っておく。
- 1.3.2. 検知管をシリコンチューブに両手でまっすぐ、かつ十分差し込む。不十分な接続はエアリークを生じ濃度が実際よりも薄く測定される。片手での操作、斜めの差し込みはシリコンチューブを傷つけチューブに穴を生じエアリークを起こす。接続時シリコンチューブは折り曲げたままにしておく。
- 1.3.3. 検知管を検知ポンプに差し込む。このとき接続用ガラス管を検知ポンプに押し込みすぎ

ない。検知ポンプの流量調節弁が破損し正しく測定できなくなる。逆にゆるすぎることでエアリークを生じる。

- 1.3.4. シリコンチューブ折り曲げを外した後、流路をまっすぐに保ち 1 回目の 100mL 吸気を直ちに行う。このとき検知ポンプの吸引はゆっくり行う必要はないが、一定速度で行う。(あまりに急激な吸引はエアリークを生じやすいので避けること)
 - 1.3.5. およそ 2 分間静置。ポンプが戻らないことを確認し、ポンプは外さずに排気する。(排気は廃棄弁を通じて出るので測定に影響しない。)
 - 1.3.6. 2 回目の 100mL 吸引を行う。(合計 200mL 吸引)
 - 1.3.7. およそ 2 分間静置。ポンプが戻らないことを確認し、濃度読み取り。目盛りが均等でないので読み取り方に注意する。変色感が水平でないときの読み取り方などは添付説明書に記載してある。
 - 1.3.8. 測定値をノートに記入。
 - 1.3.9. シリコンチューブを折り曲げ押さえながら、検知管および検知ポンプを外す。
- ### 1.4. DNPH 管測定
- 1.4.1. 検知ポンプを排気しておく。
 - 1.4.2. DNPH 管の両端のふたを外す。(測定周囲のアセトアルデヒドを吸着しないようにふたは直前まで外さない)
 - 1.4.3. シリコンチューブに DNPH 管の細口部を接続。
 - 1.4.4. 検知管に DNPH 管の太口部を接続。
 - 1.4.5. 1 分程度かけゆっくり 50mL 吸引する。(検知管と異なり内部に抵抗構造がないので早く吸引すると透過してしまう。)
 - 1.4.6. 検知ポンプ、DNPH 管をはずし、三方活栓を両手で丁寧に閉める。
 - 1.4.7. DNPH 管は直ちに密栓し、冷暗所に保存する。(開封した袋に戻し、教室冷蔵庫の指定場所に保存)

4. 発生装置の準備

4.1. 準備

- 4.1.1. 氷上にオートピペットのチップを刷し冷却しておく
- 4.1.2. アセトアルデヒド、廃棄用瓶、ピペットチップが冷えていることを確認
- 4.1.3. 手元にメジャー、記録ノート、ピンセットがあることを確認。

4.2. 窒素ガス停止

- 4.2.1. 窒素ガスボンベ残圧を確認。満タン時ガス圧は 150、1 日使用後は 75-80、2 日目は一行の数値を示している。
- 4.2.2. クランチを用いてガスボンベの主弁を開鎖する。
- 4.2.3. ガス圧 0 になるのを確認。
- 4.2.4. 流量 0 となるのを確認。

4.3. ボンベ交換

ボンベ交換は 2 日毎に行う。ただし 1 日使用後ガス残圧が 70 以下の際は 1 日でボンベを交換する。

4.3.1. 流量計の弁を閉じる。

4.3.2. モンキーレンチ 2 本を用いてボンベから流量計を外す。

4.3.3. 接続管（真鍮製）もモンキーレンチを用いて外す。

4.3.4. ボンベを交換。ボンベ移動時に電源コード上にボンベを載せたり、はさまないように注意する。（断線は電気火災の原因となる。）転倒防止鎖を必ず装着する。

4.3.5. 流量計接続部、接続管に、ごみの付着やパッキンの様が無いことを確認。

4.3.6. ボンベに接続管（真鍮製）を接続。

4.3.7. ボンベに流量計を接続。流量計は直立するように接続する。

4.3.8. クランチを用いてガスボンベ主弁を開放する。

4.3.9. 流量を流量ポール上端が 1.8 liter/min 程度になるように流量を調整する。

* 流量計は直立していないと正しい表示を示すことができない。

* 使用している流量計は酸素ボンベ用フロー式流量計であるのに対して、接続しているのは窒素ガスボンベである。圧力表示部は正しい値が表示されているが、酸素より窒素の気体密度が小さいためガス流量が、実際の流量より小さく表示されている。

* 通常は、流量計の目盛り読み取りは、ポール中央の値を読み取る。

4.4. 保護着用

- 4.4.1. ゴム手袋、防毒マスクを着用する。吸着缶は VOC 低濃度用の活性炭缶を使用。高濃度曝露には適さない。発生源直上のガスを吸引しないよう注意する。
- 4.4.2. 防毒マスクは着用後に顔面へのフィットの確認、およびエアリークの無いことを確認する。

4.5. セパラブルフラスコ閉口

4.5.1. 保護具着用が終了し、保護具着用者以外が避難したことを確認する。

4.5.2. 曝露室ドアが閉まっていることを確認。

4.5.3. セパラブルフラスコ上の方 3 箇所を緩める。緩めすぎでねじが水槽に脱落しないように注意する。

4.5.4. セパラブルフラスコ手前の側方ねじを緩め、ホルダーを外す。

4.5.5. セパラブルフラスコのふたを側方にずらし外す。外したふたは、ガス管が水にぬれないよう上げながら、ぶら下げておく。

4.5.6. セパラブルフラスコ内のメスシリンダーを落とさないように、かつ暖めないように取り出す。（手で把持しにくいときはピンセットなどを用いる。）

4.6. 記録

4.6.1. 取り出したメスシリンダーを氷上に静置し、液量を測定する。

4.6.2. メジャーを用いて、液面高さを測定する。液面高はメスシリンダー上端最下部から液面上端までを mm 表示する。測定値をノートに記録する。同時にメスシリンダー目盛り上の残液量も記録する。

4.7. アセトアルデヒド交換

4.7.1. オートピペットを用い、メスシリンダーの液体を廃液瓶に廃棄する。

4.7.2. 次に同じチップを用いて、新しいアセトアルデヒド液をメスシリンダーに投入する。

4.7.3. 今回液量は 35mL になるようにする。

* 本装置を用いてのアセトアルデヒド 125ppm \pm 30%の発生には、液高が液量 35mL \sim 25 mL の範囲である必要がある。（設定温度により多少変動）35mL 時から開始するとおよそ 24 \sim 30 時間で液量が 25mL となる。

4.8. セパラブルフラスコ閉口、排水

4.8.1. アセトアルデヒド液を交換したメスシリンダーを落とさないようセパラブルフラスコに入れる。

4.8.2. ガス管先がメスシリンダー内に入らないように、セパラブルフラスコ中に入れる。

4.8.3. ふたを閉じ、ホルダーをきつく締める。ふたがずれていると、ホルダーにきちんとはまらないので注意する。

4.8.4. 接続している管が外れていないこと、ガスが流れていることを確認。

4.8.5. 恒温槽の凝結水受けに溜まった水をシリンジを用いて捨てる。

5. 曝露再開

5.1 マウス投入

発生装置のアセトアルデヒド交換終了しかつ、尿採取、体重測定、マーキングおよびケーシング交換が終了したマウスをチャンパーに再投入する。

5.1.1. 逃亡したマウスがないかケーシング内匹数を再確認。

5.1.2. 十分量なえさが与えられているか、とじきぎが交換されているか、識別札がかかっているか再確認。

5.1.3. ケージをあげ、センサおよび濃度測定用管に当てたり、外したりしないように注意しケーシングを収納する。このときアセトアルデヒド臭がしていることを確認。

5.1.4. 水ボトルをケーシングにつける。

5.1.5. 温度湿度計を見えやすいところにいれ、曝露チャンパーふたを閉じる。

5.2 馴化

アセトアルデヒドの交換、マウスを再投入した後最低 15 から 20 分は待たないといけない。これは、チャンパー容積が 130L であるのに対して、換気量が 20L/min であるので、チャンパー内の過度およびアセトアルデヒド濃度が安定するのに必要な時間だからである。

5.3 測定・記録

5.3.1. 検知管を用いてアセトアルデヒド濃度を測定。測定値を記録する。

5.3.2. 濃度が 140ppm 程度であれば特に調整を行わず、DNPH 管測定を実施する。

5.3.3. 濃度が高すぎる場合および低すぎる場合は調整を行い、馴化後に再測定する。

5.4 調整

別紙参照

5.5. 記録再開

5.5.1. 周波数電圧変換機の ΔF 値をリセットする。 上段中央ボタンを押すと ΔF 値がリセットされる。

5.5.2. 開始前の測定値が 150-120ppm であったら、センサ記録を再開する。オシログラフレコーダーの開始ボタン（緑色）を押すと、緑色のパイロットランプがつき、記録紙が伸展し始め、液晶画面が暗くなる。

6. 確認

発生装置のラインは外れていないか？ 恒温槽温度に以上はないか？ ポンプは異常加熱していないか？ マウスに異常はないか確認し、清掃し教室に戻りサンプルを保存する。

アセトアルデヒド濃度測定チェックリスト

検知管測定で濃度が予想していた値を示さないとき、ほとんどの原因は検知管測定に問題がある。測定操作自体は難しくないので、正しく測定対象気体を採取できているかに注意を払い測定を行うことが必要。

次いで多い原因が、ガス流路のはずれや緩みである。ほとんどが交換時や測定時の不注意で生じたはずれや緩みなので、交換時毎の点検で防止ができる。

検知管測定に問題がある場合

濃度	考えられる原因	対処法
高値	検知ポンプをきちんとしておらず、戻し引きしなかった。	再測定する。
低値	濃度測定チューブに穴が開いている。	チューブ補修し再測定
	検知管が測定チューブにしっかりと固定されておらずエアリークがある	再測定：検知管をチューブにしっかりと固定する
	濃度測定用穴のシリコン栓のはずれや緩み	栓をきちんと締め再測定
	三方活栓の開ける方向の誤り	再測定
	検知管両端がきちんと開口していない	再測定
	2 回吸気し読み取る検知管を、1 回吸気しかしていない。	正しい吸気量で測定する
	検知ポンプの流量調節弁の破損	弁交換

アセトアルデヒドガス発生装置チェックリスト

濃度	考えられる原因	対処法
異常高値	アセトアルデヒドをセパラブルフラスコ内にこぼした チャンバーから静音ポンプにいたる流路にリークを生じ、チャンバーへの空気流入がごく少ない。	フラスコ内にこぼれているアセトアルデヒドをふき取る。 はずれ、ゆるみをなおす
高値	アセトアルデヒド交換中メスシリンダーが温まってしまった。 発生装置のセパラブルフラスコが十分冷えていない。 静音ポンプの流量変化：とこじきチップが流路につまり流量が低下した。	時間をあけて再測定する。 恒温槽の水位を上げフラスコが十分に浸かるようにする。 とこじきを除く。 静音ポンプ流量微調整
低値	チャンバーにエアリークを生じている。：センサ部、測定用穴および気液分離装置部位のシリコン栓 メスシリンダー内への水の混入 至察ガス管が外れている、流量がごく少ない	はずれ、ゆるみをなおす アセトアルデヒド交換 はずれ、緩みをなおす。流量調節部。
異常低値	発生装置から、チャンバーにいたる経路が外れている。 セパラブルフラスコ破損	はずれ、緩みをなおす。 セパラブルフラスコ交換

アセトアルデヒド曝露チャンバー

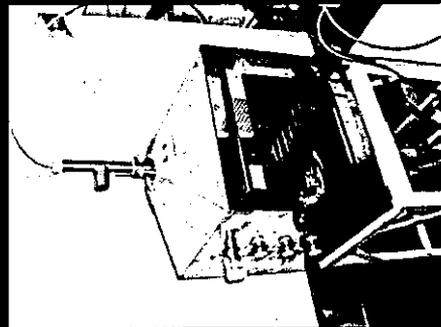


Fig. 3-1 2 週間 23 時間/日アセトアルデヒド曝露に使用したチャンバー
柴田科学 SUS304 型動物ガス曝露チャンバーを使用