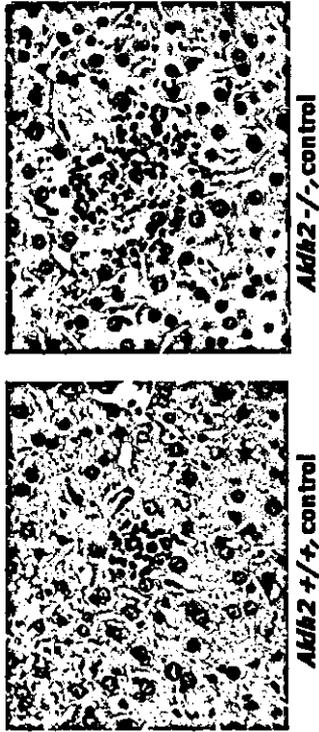
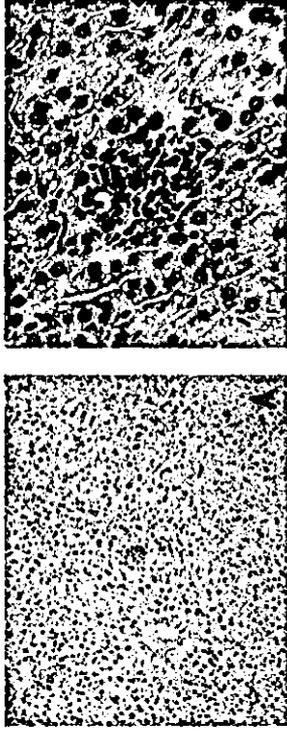


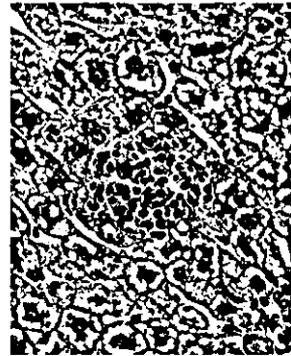
**Figure VII-2 Liver**  
Inflammatory cell nest  
*Akh2 +/+* and *Akh2 -/-*, control



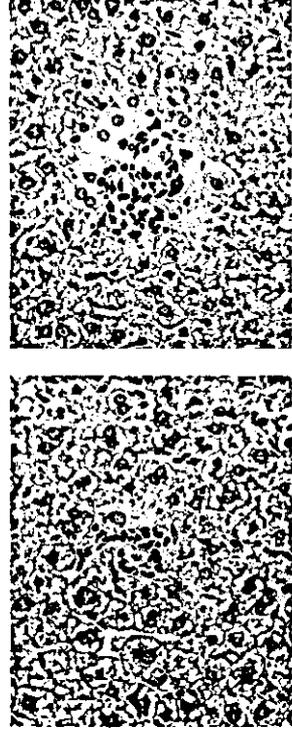
**Figure VII-4 Liver**  
Inflammatory cell nest with necrosis  
*Akh2 +/+*, 500ppm acetaldehyde exposure case



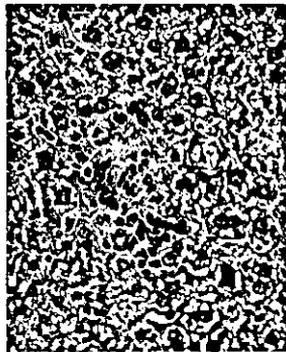
**Figure VII-3 Liver**  
Inflammatory cell nest  
*Akh2 +/+*, 125ppm acetaldehyde exposure case



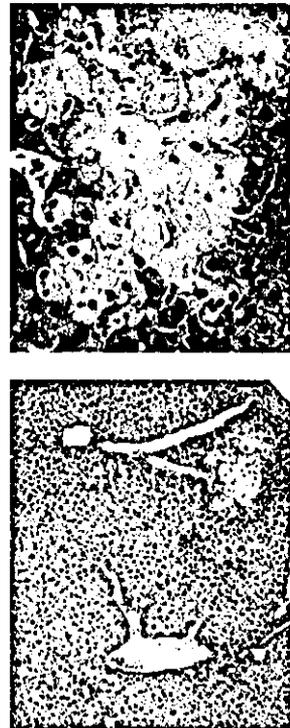
**Figure VII-5 Liver**  
Inflammatory cell nest with necrosis  
*Akh2 -/-*, 125ppm acetaldehyde exposure case



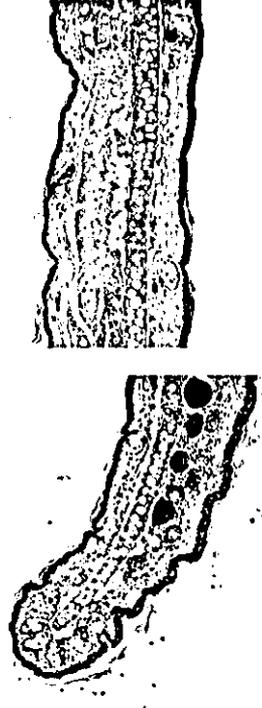
**Figure VII-6 Liver**  
**Inflammatory cell nest with necrosis**  
*Aklh2* *-/-*, 500ppm acetaldehyde exposure case



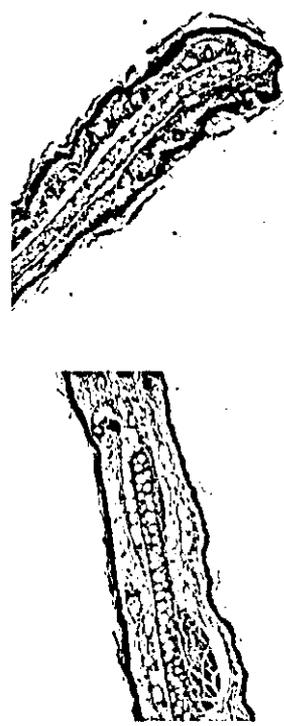
**Figure VII-7 Liver**  
**Focal necrosis**  
*Aklh2* *-/-*, 500ppm acetaldehyde exposure case



**Figure VIII-1 Auricle**  
*Aklh2* *+/+*, control



**Figure VIII-2 Auricle**  
**Hyperkeratinization with desquamation**  
*Aklh2* *+/+*, 500ppm acetaldehyde exposure case



**Figure VIII-3 Auricle**  
**Hyperkeratinization with desquamation**  
*Aklh2* *-/-*, 500ppm acetaldehyde exposure case



**Figure IX-2 Dorsal skin**  
**Slightly and Moderately degeneration**  
*Aklh2* *-/-*, 500ppm acetaldehyde exposure case



**Figure IX-1 Dorsal skin**  
*Aklh2* *+/+*, control



**Figure IX-3 Dorsal skin**  
**Moderately degeneration**  
*Aklh2* *-/-*, 500ppm acetaldehyde exposure case



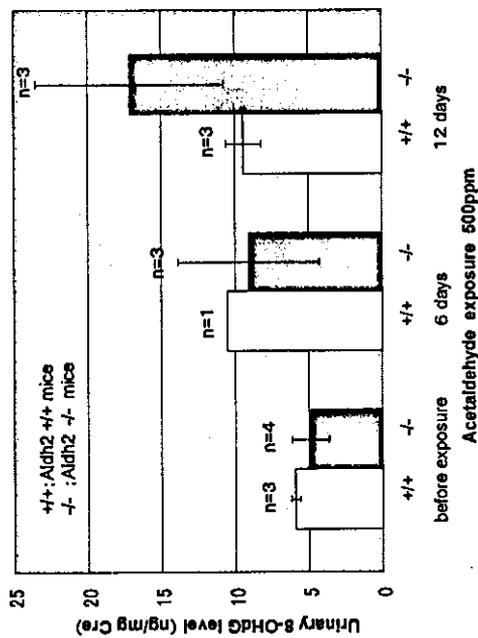


Fig. 3-21 500ppm アセトアルデヒド全身曝露による尿中8-OHdGの変化  
 採尿時期は曝露前、6日間曝露、12日間曝露。午前10時ごろに採尿した随時尿を検体として使用した。  
 尿中8-OHdG値は尿中クレアチニン値で補正した。Aldh2+/+: わずかに上昇。Aldh2-/-: 経時的に上昇。  
 12日間曝露では、+/+の1.5倍程度上昇したが、有意差を認めなかった。

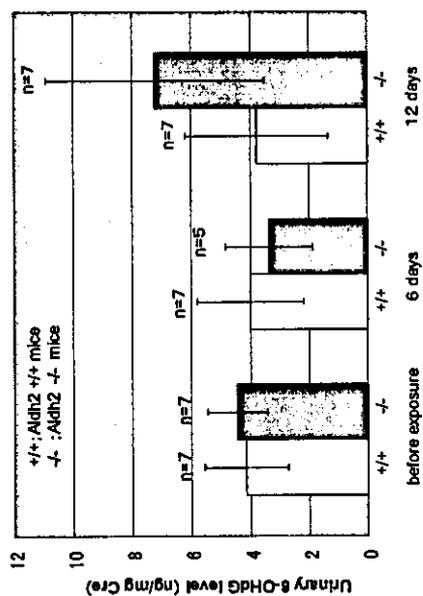


Fig. 3-22 125ppm アセトアルデヒド全身曝露による尿中8-OHdGの変化  
 採尿時期は曝露前、6日間曝露、12日間曝露。午前10時ごろに採尿した随時尿を検体として使用した。  
 尿中8-OHdG値は尿中クレアチニン値で補正した。125ppm曝露 Aldh2+/+: 変化なし。Aldh2-/-: 12  
 日間曝露で上昇したが、有意差を認めなかった。

## *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 (3)

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 ALDH2 の活性を持たない (ALDH2 不活性型) ものが約半数おり、この ALDH2 不活性型のヒトでは、アセトアルデヒドに対しても感受性が高く、低濃度のアセトアルデヒド曝露により症状を呈すると考えられる。そこで、ALDH2 遺伝子多型により生じる個人差を科学的に解明するために、本研究では ALDH2 不活性型のヒトのモデル動物として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、以降 *Aldh2*<sup>-/-</sup>)、対照として野生型マウス (C57BL/6Jcrj, 以降 *Aldh2*<sup>+/+</sup>) を用いて、アセトアルデヒドに対する感受性の相違の検討を試みてきた。平成 16 年度はアセトアルデヒド曝露による感受性の相違に関連する遺伝子の同定、およびアセトアルデヒド曝露による酸化ストレスの検討のため、平成 15 年度のアセトアルデヒド吸入曝露試験で得た試料を用いて①と②の研究を行った。さらに、体内アセトアルデヒド曝露が高いと考えられる常習飲酒歴のある ALDH2 不活性のヒトは口腔、咽頭や食道などの扁平上皮癌に罹患しやすいことが疫学的に明らかにされているため、③扁平上皮発癌に関する研究を行った。

#### ①アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析

アセトアルデヒド吸入曝露を行った *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の肝における mRNA 発現をマイクロアレイ法により検討した。アセトアルデヒド吸入曝露により、特定の金属結合蛋白や障害蛋白認識・除去にかかわる蛋白遺伝子の発現が変動しており、このうち *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> 間で明らかに遺伝子発現の差を認める遺伝子を同定した。

#### ②アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討

アセトアルデヒド吸入曝露前後の尿中 8-ヒドロキシグアニンおよび血漿中マロンジアルデヒド濃度を測定した。アセトアルデヒド吸入曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> では酸化的 DNA 損傷が増加する可能性が示された。

#### ③扁平上皮発癌に関連した研究

*Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> に約 1 年間エタノールおよびアセトアルデヒドを皮下投与し、扁平上皮の変性や癌の発症を認めた。アセトアルデヒド皮下投与により、表皮の扁平上皮癌が *Aldh2*<sup>-/-</sup> で発症することが示された。

遺伝要因による化学物質感受性の個人差は、今後、健康影響評価において重要な課題になると考えられる。*Aldh2*<sup>-/-</sup> を用いた研究は、疫学的検討が不可能であったアセトアルデヒド感受性の機序の解明や、アセトアルデヒド曝露障害モデル研究として有用であることが示された。さらに、アセトアルデヒド曝露により大きく発現が変動する遺伝子の同定は健康影響のバイオマーカーの開発の一助になると考えられる。また、*Aldh2*<sup>-/-</sup> を用いたアセトアルデヒド曝露障害モデル研究は健康障害の予防や治療法のアプローチの手段として有用であると考えられる。

### 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ALDH2の活性を持たない(ALDH2不活性型)ものが約半数おり、このALDH2不活性型のヒトでは、アセトアルデヒドに対しても感受性が高く、低濃度のアセトアルデヒド曝露により症状を呈すると考えられる。そこで、ALDH2遺伝子多型により生じる個人差を科学的に解明するために、本研究ではALDH2不活性型のヒトのモデル動物として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、以降*Aldh2*<sup>-/-</sup>)、対照として野生型マウス(C57BL/6Jcrj、以降*Aldh2*<sup>+/+</sup>)を用いて、アセトアルデヒドに対する感受性の相違の検討を試みてきた。平成16年度はアセトアルデヒド曝露による感受性の相違に関連する遺伝子の同定、およびアセトアルデヒド曝露による酸化ストレスの検討ため、平成15年度のアセトアルデヒド吸入曝露試験で得た試料を用いて①アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析、②アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討を行った。さらに、体内アセトアルデヒド曝露が高いと考えられる常習飲酒歴のあるALDH2不活性のヒトは口腔、咽頭や食道などの扁平上皮癌に罹患しやすいことが疫学的に明らかにされているため、③扁平上皮癌に関連した研究を行った。

## 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/6Jcrjマウスに10世代以上戻し交配したものを用いた。

### 2) 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、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、同時に実験を行った(非曝露群)。曝露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群を構成した。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匹ずつ用いた。曝露期間は2週間連続1日23時間とした。曝露終了後直ちに臓器、尿、血液等の標本を採取し-80℃に凍結保存し、発現遺伝子の網羅的解析および酸化ストレスの検出に用いた。

### 2-1) アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析

500ppm曝露群および非曝露群の15週齢の*Aldh2*<sup>-/-</sup>および*Aldh2*<sup>+/+</sup>を各10匹のうち各1例の採取肝のtotal RNAを抽出した。RNAの品質をAgilent RNA analyzerにて確認した後に、網羅的発現遺伝子の解析をTakaRa InteliGene II Mouse CHIPを使用し、非曝露群および500ppm曝露群における*Aldh2*<sup>+/+</sup>および*Aldh2*<sup>-/-</sup>の遺伝子発現の差の網羅的解析を実施した。

### 2-2) アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討

#### 2-2-1) 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個体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濃度を測定した。なお尿濃度補正のためクレアチニン補正を行った。

#### 2-2-2) 血漿中MDA濃度測定

2週間の吸入曝露終了後直ちに、心臓からヘパリンコートシリンジで採血した。採血後直ちに遠心分離し血漿を採取した。過酸化脂質比色定量キット(Oxis)にて血漿中のMDA濃度を測定した。

### 3) 扁平上皮の発癌に関連した実験

#### 3-1) アセトアルデヒド皮下投与による表皮内*Aldh2*・*Cyp2e1*発現の変動 - *Aldh2*<sup>+/+</sup>と*Aldh2*<sup>-/-</sup>の比較 -

10週齢雄の *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> を用い、生理食塩水と0.5%アセトアルデヒド0.9mL/匹/日を2週間・4週間皮下投与し(各群 n=3)、表皮の病理学的変化を検討し、*Aldh2*、*Cyp2e1* の発現を免疫組織化学染色法(IHC)、ウェスタンブロット法(WB)にて検出した。

### 3-2) アセトアルデヒド・エタノール皮下投与による発癌に関するパイロット研究 - *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の比較 -

*Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> にアセトアルデヒドを100mg/kg体重(LD<sub>50</sub>の1/5量に相当)あるいはエタノール1g/kg体重(アセトアルデヒド投与量の10倍で、ヒトでは日本酒600mL程度に相当)を皮下に約1年間投与し(5日間連続投与後2日間の投与休止を繰り返す投与方法)、皮膚病変を検討した。

### 3-3) 腫瘍発症マウスの扁平上皮癌確認に関する研究 - スキッドマウスへの腫瘍組織移植実験 -

方法3-2)でアセトアルデヒド投与したマウスに投与4ヶ月後と5ヶ月後の2回、腫瘍組織生検を行った。生検組織をスキッドマウス(複合免疫不全マウス)の背部表皮下に移植して、病理学的・分子生物学的検討を施行し、腫瘍細胞の cell line 化を試みた。

## C. 研究結果

### 1) アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析

両マウスの非曝露群解析および500ppm曝露群解析をScatter Plot表示し、各遺伝子を非曝露から500ppm曝露へのベクトルとして表現することで、「*Aldh2* 遺伝子型の影響を受けないアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」と、「*Aldh2* 遺伝子型により影響を受けるアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」を分類できる。

「*Aldh2* 遺伝子型の影響を受けないアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」として、DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 482, expressed (NM 134046), Reversion induced LIM gene (NM 019417), Exostoses (multiple)-like 1 (NM 019578), Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 (NM 011404), SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1 (NM 020618), Calcium channel, voltage-

dependent, alpha2/delta subunit 1 (NM 009784), Ubiquitin specific protease 14 (NM 021522) など、脂質代謝、第2相薬物代謝にかかわる遺伝子およびホルモン・ミネラル結合蛋白の遺伝子に差が見出された。

「*Aldh2* 遺伝子型により影響を受けるアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」として、Metallothionein 1 (NM 013602), Betaine-homocysteine methyltransferase (NM 016668), Ubiquitin specific protease 2 (NM 016808), Melanoma antigen, 80 kDa (NM 008581), RIKEN cDNA 4933433D23 gene (NM 026232), Adenylate kinase 4 (NM 009647), Neuregulin 4 (NM 032002), Dopachrome tautomerase (NM 010024), X-linked lymphocyte-regulated 3b (NM 011727), Cytokine inducible SH2-containing protein (NM 009895) など金属結合蛋白の遺伝子や障害蛋白認識・除去にかかわる蛋白の遺伝子に差が見出された。

### 2) アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討

#### 2-1) 尿中8-ヒドロキシグアニン(8-OHdG)測定

*Aldh2*<sup>+/+</sup> の尿中8-OHdGは、125ppm曝露群に明らかな変化は認めなかったが、500ppm曝露群では曝露6日目、12日目ともに非曝露群に比べ有意な上昇を示した(資料2)。*Aldh2*<sup>-/-</sup> ではアセトアルデヒドの吸入曝露により曝露12日目で曝露前に比べ、約1.6倍高値傾向を示した。一方、500ppm吸入曝露では、曝露前に比べ、6日目、12日目とも有意に高値を示した。

#### 2-2) 血漿中MDA濃度測定

非曝露群、125ppm曝露群、および500ppm曝露群の比較で血漿中MDA濃度は有意な変化は認めなかったが、曝露濃度の上昇に伴い血漿中MDA濃度が上昇の傾向を認めた。各群の *Aldh2*<sup>+/+</sup> および *Aldh2*<sup>-/-</sup> 間の比較において有意差は認められなかった。

### 3) 扁平上皮の発癌に関連した実験

#### 3-1) アセトアルデヒド皮下投与による表皮内 *Aldh2*・*Cyp2e1* 発現の変動 - *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の比較 -

*Aldh2*・*Cyp2e1* ともに表皮に発現し、表皮局所においてアセトアルデヒド代謝に関与している可能性が示

された。*Aldh2*<sup>+/+</sup>においてアセトアルデヒドに曝露されることによって表皮局所の*Aldh2*・*Cyp2e1*ともに発現が誘導される可能性が示された。アセトアルデヒドに曝露の有無に関わらず*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>において表皮局所の*Cyp2e1*発現は高値である可能性が示された。

### 3-2) アセトアルデヒド・エタノール皮下投与による発癌に関するパイロット研究 -*Aldh2*<sup>+/+</sup>と*Aldh2*<sup>-/-</sup>の比較-

エタノール投与群・アセトアルデヒド投与群ともに*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ*Aldh2*<sup>-/-</sup>で体重減少傾向を認めた。*Aldh2*<sup>-/-</sup>・エタノール投与群で皮膚表面を進展する腫瘍発症を20% (1/5) に認めた。腫瘍は構造異型と細胞異型を有し、腫瘍細胞はp53発現異常とp53遺伝子点突然変異を認めた。

### 3-3) 腫瘍発症マウスの扁平上皮癌確認に関する研究 -スキッドマウスへの腫瘍組織移植実験-

スキッドマウス内で増殖した腫瘍細胞は移植した腫瘍細胞と同様に構造異型と細胞異型を有していた。スキッドマウス内で増殖した腫瘍細胞はp53発現異常を有し、移植した腫瘍細胞と同じp53遺伝子点突然変異を認めた。本研究では腫瘍細胞のcell line化はできなかったが、腫瘍細胞は培養液中で2ヶ月以上増殖を続けた。

## D. 考察

### 1) アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析

アセトアルデヒド曝露の結果、ALDH2活性によらず共通して生じる遺伝子発現変化を、脂質代謝、第2相薬物代謝にかかわる遺伝子およびホルモン・ミネラル結合蛋白の遺伝子の一部に認めた。

アセトアルデヒド曝露の結果、ALDH2活性の有無により遺伝子発現に相違を生じる遺伝子として、金属結合蛋白の遺伝子および障害蛋白認識・除去にかかわる蛋白の遺伝子の一部が認められた。これらの遺伝子はアセトアルデヒド以外の化学物質曝露における毒性発現の機序に関与しているため、アセトアルデヒド曝露の感受性の相違を生じる機序に関与している可能性がある。また、昨年度の実験結果より500ppm曝露における血中アセトアルデヒド濃度の差は5倍以下であった。これに対して一部の遺伝子の発現量は5から

10倍以上の差を示しており、血中アセトアルデヒド濃度の測定よりも鋭敏な健康影響のバイオマーカーとして使用できる可能性がある。

*Aldh2*<sup>+/+</sup>と*Aldh2*<sup>-/-</sup>の遺伝的背景の差は、遺伝子改変マウス作成の手順により、129系統由来の染色体が*Aldh2*遺伝子の存在する第5番染色体では相同組み換えによる入れ替えしか生じないために一番多く存在し、X染色体では完全にC57BL/6系統由来の染色体に組み変わっているため遺伝的背景の差がないと考えられる。今回使用したマウスでは第5番染色体の*Aldh2*遺伝子近傍数百個程度の遺伝子の領域が129系統由来である確率が非常に高い。染色体別に解析を行った結果、アセトアルデヒド曝露により*Aldh2*<sup>+/+</sup>と*Aldh2*<sup>-/-</sup>間で発現量が異なる遺伝子は、第5番染色体に集中していなかった。また、*Aldh2*遺伝子近傍に転写調節に影響を与え、かつ129系統とC57BL/6系統で遺伝子多型が報告されている遺伝子はない。遺伝的背景の差の影響は完全には否定できないが、今回*Aldh2*<sup>+/+</sup>と*Aldh2*<sup>-/-</sup>で遺伝子発現量が異なっていた原因の主因はALDH2活性の有無による影響と考えられる。

### 2) アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討

*Aldh2*<sup>-/-</sup>はアセトアルデヒドの代謝速度が*Aldh2*<sup>+/+</sup>と比べ小さいため、血中アセトアルデヒド濃度が高値を示す。そのためアセトアルデヒドの吸入曝露の結果、*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ酸化的DNA損傷が増加する傾向にあると考えられる。

### 3) 扁平上皮の発癌に関連した実験

扁平上皮においてアセトアルデヒド代謝酵素である*Aldh2*・*Cyp2e1*が発現しており、アセトアルデヒド曝露により表皮扁平上皮内の*Aldh2*・*Cyp2e1*発現は誘導されることが示された。また、アセトアルデヒド皮下投与により扁平上皮癌がALDH2不活性型の*Aldh2*<sup>-/-</sup>に発症することが病理学・分子生物学的に示された。本研究結果はALDH2不活性型のヒトにおける扁平上皮癌発症に発癌メカニズムを解明する一助となることが考えられる。

## E. 結論

①アセトアルデヒド吸入曝露により、特定の金属結合蛋白や障害蛋白認識・除去にかかわる蛋白遺伝

子の発現が変動しており、このうち *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> 間で明らかに遺伝子発現の差を認める遺伝子を同定した。

- ②アセトアルデヒド吸入曝露により *Aldh2*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> では酸化的 DNA 損傷が増加する可能性が示された。
- ③アセトアルデヒド皮下投与により、表皮の扁平上皮癌が *Aldh2*<sup>-/-</sup> で発症することが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 大崎敏弘, 小山倫浩, 安元公正 肺癌 - 21世紀の肺癌の診断と治療のストラテジー Medical Practice 21: 1301-1303 (2004)
- 2) Oyama T, Morita M, Isse T, Kagawa N, Nakata S, So T, Mizukami M, Ichiki Y, Ono K, Sugaya M, Uramoto H, Yoshimatsu T, Hanagiri T, Sugio K, Kawamoto T, Yasumoto K: Immunohistochemical evaluation of cytochrome p450 (cyp) and p53 in breast cancer. Front Biosci in press (2005)
- 3) Oyama T, Isse T, Kagawa N, Kinaga T, Kim Y-D, Morita M, Sugio K, Weiner H, Yasumoto K, Kawamoto T: Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the *aldh2* gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. Front Biosci 10: 951-960 (2005)
- 4) Gu C, Oyama T, Osaki T, Li J, Takenoyama M, Izumi H, Sugio K, Kohno K, Yasumoto K: Low Expression of Polypeptide GalNAc N-Acetylgalactosaminyl Transferase-3 in Lung Adenocarcinoma: Impact on Poor Prognosis and Early Recurrence. Brit J Cancer 90: 436-442 (2004)
- 5) Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, Suzuki R, Kinaga T, Yashima Y, Ozaki S, Isse T, Kim Y-D, Kim H, Kawamoto T: Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. Front Biosci 9: 1967-1976 (2004)
- 6) Kim Y-D, Todoroki H, Oyama T, Isse T, Matsumoto A, Yamaguchi T, Kim H, Uchiyama I, Kawamoto T: Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. Environ Res 94: 262-266 (2004)
- 7) Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Morita M, Funa K, Yasumoto K. Expression of

*deltaNp73* predicts poor prognosis in lung cancer. Clin Cancer Res 10: 6905-6911 (2004)

### 2. 学会発表

- 1) 小山倫浩, 一瀬豊日, 村上朋絵, 小川真規, 山口哲右, 奈良井理恵, 木長 健, 八嶋康典, 尾崎真一, 樺田尚樹, 川本俊弘: 気管支上皮・肺癌における芳香族炭化水素レセプター・チトクローム P4501A1 の発現 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 2) 尾崎真一, 河野慶三, 小山倫浩, 村上朋絵, 鈴木理恵, 八嶋康典, 一瀬豊日, 川本俊弘: 禁煙サポートとチトクローム P450(CYP)2A6 遺伝子多型 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 3) 一瀬豊日, 北川恭子, 小山倫浩, 樺田尚樹, 松野康二, 小川真規, 木長健, 奈良井理恵, 村上朋絵, 山口哲右, 川本俊弘: アルデヒド脱水素酵素 (*Aldh*)2 ノックアウトマウス肝のアセトアルデヒド曝露による発現遺伝子の変化 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 4) 八嶋康典, 瀬戸篤, 森朋子, 森田哲也, 馬場郁子, 奈良井理恵, 高橋法人, 小山倫浩, 尾崎真一, 藤野昭宏, 川本俊弘: 職場における肝炎労働者の肝機能値の検討 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 5) 奈良井理恵, 小山倫浩, 一瀬豊日, 井上正岩, 岡林 賢, 尾崎真一, 落合秀夫, 森口次郎, 八嶋康典, 小川真規, 木長 健, 村上朋絵, 山口哲右, 川本俊弘: 職場におけるウイルス性肝炎の健康管理【第1報】感染者の発見経緯から 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 6) 木長 健, 小山倫浩, 一瀬豊日, 落合秀夫, 小川真規, 奈良井理恵, 村上朋絵, 山口哲右, 岡林賢, 川本俊弘: 職場におけるウイルス性肝炎の健康管理【第2報】有害業務について 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 7) 小川真規, 奈良井理恵, 小山倫浩, 一瀬豊日, 落合秀夫, 尾崎真一, 八嶋康典, 木長 健, 村上朋絵, 山口哲右, 鎗田圭一郎, 川本俊弘: 職場におけるウイルス性肝炎の健康管理【第3報】増悪因子に関する検討 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 8) 村上朋絵, 奈良井理恵, 小山倫浩, 藤野昭宏, 堀江正知, 竹田 透, 鎗田圭一郎, 一瀬豊日, 落合秀夫, 尾崎真一, 八嶋康典, 小川真規, 木長 健, 山口哲右, 川本俊弘: 職場におけるウイルス性肝炎の健康管理【第4報】健康管理の提言 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)
- 9) 山口哲右, 小山倫浩, 一瀬豊日, 小川真規, 木長 健, 奈良井理恵, 村上朋絵, 川本俊弘: マウス肝におけるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の特徴 第78回 日本産業衛生学会総会 東京 4/20-4/23 (2005)

- 10) 小山倫浩、一瀬豊日、村上朋絵、小川真規、山口哲右、奈良井理恵、木長 健、川本俊弘：気管支上皮内チトクローム P450 (CYP) 発現プロファイル 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 11) 奈良井理恵、小山倫浩、一瀬豊日、尾崎真一、八嶋康典、小川真規、山口哲右、木長 健、村上朋絵、川本俊弘：ウイルス肝炎の感染リスクが高い職場に関する調査 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 12) 木長 健、小山倫浩、一瀬豊日、小川真規、山口哲右、奈良井理恵、北川恭子、川本俊弘：Aldh2 ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒド 500ppm 全身曝露後の肝臓内 ALDH2、CYP2E1 の発現 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 13) 小川真規、小山倫浩、一瀬豊日、木長健、山口哲右、奈良井理恵、村上朋絵、川本俊弘：化学物質のヘモグロビン付加体形成についての現状 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 14) 市場正良、松本明子、堀田美加子、近藤敏弘、花岡知之、小山倫浩、川本俊弘、友国勝磨：アルコールによる多環芳香族炭化水素 DNA 付加体形成への影響 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 15) 松本明子、市場正良、北川恭子、一瀬豊日、小山倫浩、川本俊弘、友国勝磨：ALDH2 遺伝子多型でアルコール性肝障害が緩和される可能性 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 16) 一瀬豊日、小山倫浩、松野康二、樺田尚樹、小川真規、木長 健、奈良井理恵、山口哲右、村上朋絵、川本俊弘：ALDH2 ノックアウトマウスを用いた ALDH2 遺伝子多型によるアセトアルデヒド亜慢性全身曝露の検討 第 75 回 日本衛生学会総会 新潟 3/27-3/30 (2005)
- 17) 小山倫浩、一瀬豊日、村上朋絵、小川真規、山口哲右、奈良井理恵、木長 健、樺田尚樹、川本俊弘：アセトアルデヒド全身曝露による病理学的変化 - 野生型・アセトアルデヒド脱水酵素 2 ノックアウトマウスの比較 - 第 4 回 日本分子予防環境研究会 東京 12/20-12/21 (2004)
- 18) 一瀬豊日、小山倫浩、松野康二、樺田尚樹、小川真規、木長 健、奈良井理恵、村上朋絵、山口哲右、北川恭子、川本俊弘：Aldh2 ノックアウトマウスを用いたアセトアルデヒド曝露毒性評価 第 4 回 日本分子予防環境研究会 東京 12/20-12/21 (2004)
- 19) 樺田尚樹、加藤文雄、小山倫浩、川本俊弘、法村俊之：放射線誘発突然変異の修復と p53 遺伝子依存性アポトーシス 第 4 回 日本分子予防環境研究会 東京 12/20-12/21 (2004)
- 20) 山口哲右、小山倫浩、一瀬豊日、小川真規、木長 健、奈良井理恵、村上朋絵、川本俊弘：Aldh2 ノックアウトマウスを用いた各種アルデヒド類の代謝 第 33 回 生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会・第 5 回 Aldh2 ノックアウトマウス学会 北九州 12/11 (2004)
- 21) 小川真規、小山倫浩、一瀬豊日、樺田尚樹、山口哲右、木長 健、奈良井理恵、村上朋絵、北川恭子、川本俊弘：Aldh2 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いたアセトアルデヒド吸入曝露による尿中 8-OHdG・血漿中 MDA 濃度の検討 第 33 回 生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会・第 5 回 Aldh2 ノックアウトマウス学会 北九州 12/11 (2004)
- 22) 木長 健、小山倫浩、一瀬豊日、山口哲右、小川真規、奈良井理恵、村上朋絵、樺田尚樹、北川恭子、川本俊弘：アセトアルデヒド皮下投与によるマウス表皮内 ALDH、2CYP2E1 の変動 第 33 回 生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会・第 5 回 Aldh2 ノックアウトマウス学会 北九州 12/11 (2004)
- 23) 一瀬豊日、小山倫浩、松野康二、樺田尚樹、小川真規、木長 健、奈良井理恵、村上朋絵、山口哲右、北川恭子、川本俊弘：ノックアウトマウスのアセトアルデヒド血中動態から予測したアセトアルデヒドのリスク評価 第 33 回 生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会・第 5 回 Aldh2 ノックアウトマウス学会 北九州 12/11 (2004)
- 24) 小山倫浩、一瀬豊日、村上朋絵、小川真規、山口哲右、奈良井理恵、木長 健、松本明子、市場正良、北川恭子、樺田尚樹、川本俊弘：野生型・Aldh2 ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒド全身曝露による病理学的変化 第 33 回 生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会・第 5 回 Aldh2 ノックアウトマウス学会 北九州 12/11 (2004)
- 25) 山口哲右、小山倫浩、木長 健、川本俊弘：マウスにおける各種アルデヒド類の代謝 第 4 回 日本予防医学会 広島 12/3 (2004)
- 26) 松本明子、市場正良、堀田美加子、武藤文博、一瀬豊日、小山倫浩、川本俊弘、友国勝磨：ALDH2 遺伝子多型が肝障害に及ぼす影響の検討 第 32 回有機溶剤中毒研究会 東京 10/31 (2004)
- 27) 小山倫浩、杉尾賢二、西川仁士、平岡史郎、中川 誠、下川秀彦、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、菅谷将一、仲田庄志、小野憲司、浦本秀隆、吉松隆、花桐武志、竹之山光広、大崎敏弘、一瀬豊日、川本俊弘、安元公正：非小細胞肺癌におけるチトクローム P450 の発現 第 45 回 日本肺癌学会総会 横浜 10/25-10/26 (2004)
- 28) 菅谷将一、杉尾賢二、小野憲司、浦本秀隆、吉松隆、小山倫浩、花桐武志、森田 勝、安元公正：原発性肺癌切除症例における術前腫瘍マーカーの有用性に関する検討 第 45 回 日本肺癌学会総会 横浜 10/25-10/26 (2004)
- 29) 小山倫浩、杉尾賢二、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、

- 菅谷将一、仲田庄志、小野憲司、浦本秀隆、吉松 隆、花桐武志、森田 勝、竹之山光広、大崎敏弘、安元公正：肺癌における芳香族炭化水素レセプターとチトクローム P450IA1 発現の意義 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 30) 浦本秀隆、杉尾賢二、仲田庄志、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、小野憲司、菅谷将一、吉松 隆、花桐武志、小山倫浩、森田 勝、安元公正 原発性肺癌における  $\Delta$  Np73 の発現とその生物学的意義 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 31) 菅谷将一、馬場哲朗、福山 隆、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、安田 学、竹之山光広、吉松 隆、小山倫浩、花桐武志、森田 勝、杉尾賢二、安元公正：肺癌細胞株樹立と癌特異的細胞傷害性 T リンパ球が認識する腫瘍抗原 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 32) 馬場哲朗、福山 隆、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、菅谷将一、安田 学、吉松 隆、竹之山光広、花桐武志、小山倫浩、森田 勝、杉尾賢二、安元公正：肺癌細胞株より同定した腫瘍抗原に対する細胞性および液性免疫応答の解析 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 33) 市来嘉伸、馬場哲朗、福山 隆、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、菅谷将一、安田 学、竹之山光広、吉松 隆、小山倫浩、花桐武志、森田 勝、杉尾賢二、安元公正：肺癌および食道癌の転移形成過程における免疫監視からの逃避機構の解析 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 34) 森田 勝、仲田庄志、小野憲司、菅谷将一、浦本秀隆、吉松 隆、小山倫浩、花桐武志、杉尾賢二、安元公正：食道癌症例における飲酒・喫煙歴と癌関連遺伝子タンパクの発現に関する研究 第 57 回 日本胸部外科学会総会 札幌 10/20-10/22 (2004)
- 35) 小山倫浩、森田 勝、一瀬豊日、末永玲子、小川真規、山口哲右、鈴木理恵、木長 健、樺田尚樹、杉尾賢二、安元公正、川本俊弘：Aldh2 欠損マウスによるアルコール性臓器障害の機序解明とその産業医学への応用 第 22 回 産業医科大学学会総会 北九州 10/20 (2004)
- 36) 木長 健、小山倫浩、一瀬豊日、小川真規、山口哲右、鈴木理恵、北川恭子、川本俊弘：アセトアルデヒド 500ppm 全身曝露における Aldh2 ノックアウトマウス肝臓内 ALDH2、CYP2E1 発現の変動 第 22 回 産業医科大学学会総会 北九州 10/20 (2004)
- 37) 小山倫浩、小川真規、木長 健、一瀬豊日、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、菅谷将一、浦本秀隆、花桐武志、杉尾賢二、安元公正、川本俊弘：非小細胞肺癌におけるチトクローム P450 (CYP) 酵素発現プロファイル 第 63 回 日本癌学会総会 福岡 9/29-10/1 (2004)
- 38) 小川真規、小山倫浩、川本俊弘：アセトアルデヒド吸入曝露による Aldh2 ノックアウトマウス及び野生型マウスの尿中 8-OHdG・血漿中 MDA の変動 第 63 回 日本癌学会総会 福岡 9/29-10/1 (2004)
- 39) 浦本秀隆、杉尾賢二、宗 哲哉、市来嘉伸、菅谷将一、吉松 隆、花桐武志、小山倫浩、和泉弘人、河野公俊、安元公正：SV40LT による PDGHRb receptorp の転写抑制機構における Rb、Myc、p53 の重要性 第 63 回 日本癌学会総会 福岡 9/29-10/1 (2004)
- 40) 菅谷将一、馬場哲朗、福山 隆、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、竹之山光広、吉松 隆、小山倫浩、花桐武志、杉尾賢二、安元公正：非小細胞肺癌におけるチトクローム P450 (CYP) 酵素発現プロファイル 第 63 回 日本癌学会総会 福岡 9/29-10/1 (2004)
- 41) 鈴木理恵、小山倫浩、一瀬豊日、落合秀夫、尾崎真一、八嶋康典、樺田尚樹、小川真規、山口哲右、木長 健、川本俊弘：事業所におけるウイルス肝炎対策 - 産業医と労働者の意識調査 - 平成 16 年度 日本産業衛生学会九州地方会学会 宮崎 6/18-6/19 (2004)
- 42) 小山倫浩、一瀬豊日、山口哲右、鈴木理恵、小川真規、木長健、松本明子、長縄竜一、長野嘉介、川本 俊弘：アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウス・野生型マウスの病理学的変化 平成 16 年度 日本産業衛生学会九州地方会学会 宮崎 6/18-6/19 (2004)
- 43) 小山倫浩、森田 勝、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、安田 学、菅谷将一、小野憲司、浦本秀隆、竹之山光広、花桐武志、吉松 隆、大崎敏弘、杉尾賢二、川本俊弘、安元公正：乳癌におけるチトクローム P450 (CYP) 酵素発現の意義 第 21 回 日本乳癌学会総会 北九州 6/11-6/12 (2004)
- 44) 仲田庄志、森田 勝、小野憲司、菅谷将一、安田 学、竹之山光広、花桐武志、小山倫浩、杉尾賢二、篠栗毅和、濱田哲夫、安元公正：消化器癌転移を認めた乳腺浸潤性小葉癌の 1 例 第 21 回 日本乳癌学会総会 北九州 6/11-6/12 (2004)
- 45) 森田 勝、仲田庄志、小野憲司、菅谷将一、安田 学、竹之山光広、小山倫浩、花桐武志、杉尾賢二、安元公正、篠栗毅和：乳腺 Invasive micropapillary carcinoma の 1 例 第 21 回 日本乳癌学会総会 北九州 6/11-6/12 (2004)
- 46) 杉尾賢二、仲田庄志、永田好香、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、安田 学、菅谷将一、浦本秀隆、竹之山光広、花桐武志、小山倫浩、森田 勝、安元公正：第 I 期肺癌の分子生物学的予後診断 第 21 回 日本呼吸器外科学会総会 横浜 5/27-5/29 (2004)
- 47) 小山倫浩、杉尾賢二、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉伸、安田 学、菅谷将一、仲田庄志、小野憲司、浦本秀隆、

- 竹之山光広、花桐武志、吉松 隆、大崎敏弘、安元公正  
喫煙者肺癆における芳香族炭化水素レセプター (AH-R)  
発現の意義 第 21 回 日本呼吸器外科学会総会 横  
浜 5/27-5/29 (2004)
- 48) 浦本秀隆、杉尾賢二、仲田庄志、永田好香、水上真紀子、  
宗 哲哉、市来嘉伸、安田 学、菅谷将一、竹之山光  
広、花桐武志、小山倫浩、安元公正：原発性肺癆にお  
ける deltaNp73 の発現解析と予後因子としての可能性  
第 21 回 日本呼吸器外科学会総会 横浜 5/27-5/29  
(2004)
- 49) 竹之山光広、杉尾賢二、仲田庄志、小野憲司、安田 学、  
菅谷将一、小山倫浩、森田 勝、花桐武志、安元公正：  
大腸癌肺転移症例に対する外科治療成績 第 21 回  
日本呼吸器外科学会総会 横浜 5/27-5/29 (2004)
- 50) 菅谷将一、杉尾賢二、小野憲司、安田 学、浦本秀隆、  
竹之山光広、小山倫浩、花桐武志、安元公正：原発性  
肺癆患者における術前 CEA および再発患者における腫  
瘍マーカーの臨床的意義 第 21 回 日本呼吸器外科学  
会総会 横浜 5/27-5/29 (2004)
- 51) 山口哲右、小山倫浩、一瀬豊日、小川真規、木長 健、  
鈴木理恵、樺田尚樹、北川恭子、川本俊弘：マウス肝  
におけるアルデヒド脱水素酵素の基質特異性 第 77 回  
日本産業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16 (2004)
- 52) 一瀬豊日、北川恭子、小山倫浩、樺田尚樹、松野康二、  
小川真規、木長 健、鈴木理恵、山口哲右、川本俊弘：  
アルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウト (Aldh2) マウスを  
用いたアセトアルデヒド全身暴露実験 第 77 回 日本  
産業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16 (2004)
- 53) 小川真規、小山倫浩、一瀬豊日、山口哲右、木長 健、  
鈴木理恵、松本明子、北川恭子、樺田尚樹、川本俊弘：  
アセトアルデヒド吸入暴露実験による Aldh2 ノックアウト  
マウスおよび野生型マウスの尿中 8-OHdG 濃度の変化  
第 77 回 日本産業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16  
(2004)
- 54) 小山倫浩、一瀬豊日、小川真規、山口哲右、鈴木理恵、  
木長 健、樺田尚樹、松本明子、八嶋康典、尾崎真一、  
川本俊弘：気管支上皮におけるチトクローム酵素 (CYP)  
の発現 第 77 回 日本産業衛生学会総会 名古屋  
4/13-4/16 (2004)
- 55) 尾崎真一、河野慶三、小山倫浩、八嶋康典、一瀬豊  
日、川本俊弘：当事業所における禁煙サポートの現状  
第 77 回 日本産業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16  
(2004)
- 56) 落合秀夫、鈴木理恵、八嶋康典、織田 進、小山倫浩、  
川本俊弘：職域における肝炎検査について 第 77 回  
日本産業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16 (2004)
- 57) 鈴木理恵、小山倫浩、一瀬豊日、森口次郎、岡林 賢、  
井上正岩、落合秀夫、尾崎真一、八嶋康典、樺田尚樹、  
小川真規、山口哲右、木長 健、川本俊弘：事業所に  
おける肝炎労働者の情報管理方法 第 77 回 日本産  
業衛生学会総会 名古屋 4/13-4/16 (2004)
- 58) 小山倫浩、杉尾賢二、水上真紀子、宗 哲哉、市来嘉  
伸、安田 学、菅谷将一、井上政昭、花桐武志、竹之  
山光広、森田 勝、吉松 隆、大崎敏弘、川本俊弘、  
安元公正：非小細胞肺癆患者における気管支上皮内チト  
クローム P450 (CYP) 酵素発現の意義 日本外科学会  
総会 大阪 4/7-4/9 (2004)
- 59) 森田 勝、小山倫浩、仲田庄志、小野憲司、菅谷将一、  
安田 学、竹之山光広、花桐武志、杉尾賢二、安元公正  
食道上皮および癌部における Fhit の発現に関する研究 -  
飲酒、喫煙、食道内癌多発との相関について- 日本外  
科学会総会 大阪 4/7-4/9 (2004)
- 60) 竹之山光広、永田好香、福山 隆、水上真紀子、宗  
哲哉、仲田庄志、市来嘉伸、安田 学、菅谷将一、小  
野憲司、小山倫浩、花桐武志、森田 勝、杉尾賢二、  
安元公正：自己肺癆特異的 CTL クローンの樹立と CTL  
の認識する抗原の多様性 日本外科学会総会 大阪  
4/7-4/9 (2004)
- 61) 仲田庄志、杉尾賢二、永田好香、水上真紀子、宗 哲  
哉、市来嘉伸、小野憲司、安田 学、菅谷将一、竹之  
山光広、花桐武志、小山倫浩、森田 勝、安元公正：  
非小細胞肺癆患者における DNA メチル化 (RASSF1A、  
CDH1、p16) の検出の意義とその臨床的意義 日本外科  
学会総会 大阪 4/7-4/9 (2004)
- 62) 菅谷将一、竹之山光広、福山 隆、永田好香、水上真紀子、  
宗 哲哉、仲田庄志、市来嘉伸、安田 学、小野憲司、  
小山倫浩、花桐武志、森田 勝、杉尾賢二、安元公正：  
腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球が認識する HLA-A24  
拘束性共通抗原の解析 日本外科学会総会 大阪  
4/7-4/9 (2004)
- 63) 市来嘉伸、花桐武志、福山 隆、永田好香、仲田庄志、  
水上真紀子、宗 哲哉、菅谷将一、安田 学、小野憲司、  
竹之山光広、小山倫浩、森田 勝、杉尾賢二、安元公正  
肺癆患者における癌特異的発現分子 survivin に対する  
免疫応答の解析 日本外科学会総会 大阪 4/7-4/9  
(2004)
- 64) 永田好香、竹之山光広、菅谷将一、福山 隆、水上真紀子、  
宗 哲哉、市来嘉伸、仲田庄志、小野憲司、安田 学、  
花桐武志、森田 勝、小山倫浩、杉尾賢二、安元公正：  
肺大細胞癌症例より得られた HLA-Cw7 拘束性腫瘍特  
異的 CTL clone が認識する腫瘍抗原同定 日本外科学  
会総会 大阪 4/7-4/9 (2004)
- 65) Kawamoto T, Oyama T, Isse T, Suenaga R, Kim Y-D,  
Yang M, Matsumoto A, Ichiba M, Kinaga T, Ogawa M,  
Yamaguchi T, Suzuki R, Kunugita N, Matsuno K, Kim  
H, Tomokuni K, Kitagawa K: Aldh2 knockout mouse  
as a model animal for individual susceptibility  
study by ALDH2 polymorphism. 6th International

Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health Heidelberg, Germany 9/6-9/8 (2004)

- 66) Kawamoto T, Kitagawa K, Kunugita N, Oyama T, Isse T, Suzuki R, Kinaga T, Ogawa M, Yamaguchi T: Effects of CYP2A6 polymorphism on nicotine metabolism and smoking habit. 10th International Congress of Toxicology, Satellite Meeting on Molecular Epidemiology Provo, Finland 7/7/10 (2004)
- 67) Isse T, Oyama T, Kunugita N, Matsuno K, Kitagawa K, Ogawa M, Kinaga T, Suzuki R, Yamaguchi T, Yoshida

A, Uchiyama I, Kawamoto T: Acetaldehyde elimination changes in the transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase 2 activity. 12th International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Methabolism Burlington, Vermont, USA 7/6-7/11 (2004)

#### 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 |



## 資料 1



## 1. アセトアルデヒド吸入曝露による遺伝子発現の網羅的解析

### 【目的】

アセトアルデヒド曝露による感受性は *Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>で異なっており、ヒトにおいても ALDH2 活性の有無により感受性が異なる可能性が高い。アセトアルデヒド曝露による感受性が異なる主因はアセトアルデヒドの代謝活性の有無によると考えられるが、感受性の相違を生じる機序や、鉛曝露におけるデルタアミノレブリン酸のような障害の防止に役立つような健康影響のバイオマーカーなどは不明である。本実験では 500ppm アセトアルデヒド 2 週間吸入曝露群 (500ppm 曝露群) および対照としてとして室内空気を 2 週間吸入した非曝露群 (非曝露群) の *Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>の肝臓を試料とし、cDNA Microarray 法で遺伝子発現量を比較することで、*Aldh2* 活性の有無により遺伝子発現に差を生じている遺伝子を見出し、有効な健康影響のバイオマーカー候補遺伝子を検索、アセトアルデヒド曝露による感受性の相違を生じる機序の検索を目的とした。

### 1-I 方法

500ppm アセトアルデヒド 2 週間吸入曝露群 (500ppm 曝露群) および対照としてとして室内空気を 2 週間吸入した非曝露群 (非曝露群) を、15 週令の *Aldh2*<sup>+/+</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup> 各 10 匹に対して実施した。採取し-80℃で保存した肝の各 1 例ずつの total RNA を抽出した。RNA の品質を確認(Fig1-I-1)した後に、遺伝子発現の網羅的解析を TakaRa InteliGene II Mouse CHIP を使用(Fig. 1-I-2 実験方法の概略図)し、実施した。

#### 1-I-1. 解析の組み合わせ

表 1-I-1

解析 No.	Cy3	Cy5	使用 CHIP
1	肝① <i>Aldh2</i> <sup>+/+</sup> mice control	肝② <i>Aldh2</i> <sup>-/-</sup> mice control	InteliGene II Mouse CHIP
2	肝③ <i>Aldh2</i> <sup>+/+</sup> mice Ac500ppm	肝④ <i>Aldh2</i> <sup>-/-</sup> mice Ac500ppm	InteliGene II Mouse CHIP

#### 1-I-2. 蛍光標識

ラベル方法: total RNA を鋳型として IVTlabeling により Cy3、Cy5-UTP を取り込ませた。また、internal control として lambda polyA RNA を等量ずつ添加した。

プライマー: T7 oligo dT primer 100 pmol

サンプル使用量: Cy3 total RNA 5.0 μg Lambda A 10 pg

Cy5 total RNA 5.0 μg Lambda A 10 pg

1-I-3. ハイブリダイゼーション

ターゲット： Cy3 標識ターゲットと Cy5 標識ターゲットを混合して使用。

ハイブリ液組成： 6XSSC, 0.2%SDS, 5Xdenhardt's 溶液, Carrier DNA, 50%Formamide

ハイブリ条件： 65°C 14 時間

1-I-4. 洗浄

洗浄条件： (1) 2 X SSC/ 0.2% SDS 65°C 5 分  
(2) 2 X SSC/ 0.2% SDS 65°C 5 分  
(3) 2 X SSC/ 0.2% SDS 65°C 5 分  
(4) 0.05 X SSC 室温 リンス

1-I-5. スキャンニング

解析方法： Cy3、Cy5 各検出波長においてシグナル強度に応じた 2 段階検出感度で測定。

スキャナー： Affmetrix 428 Array Scanner

1-I-6. データ解析

解析ソフト： BioDiscovery ImaGene Ver.4.2.

解析画像： 2 段階検出感度のうち、低感度で主キャンニングした画像(Fig 1-I-6-1,2)を使用。

1-I-7. 出力されたデータの解析

実験結果を Scatter plot 表示したので、それぞれの解析毎の座標を下記のように定義し、以降表記した。

表 1-I-7

解析 No.	Cy3	Cy5
1	x1	y1
2	x2	y2

## 1-II 実験結果の解析方法

### 1-II-1 補正方法の選択

Global normalization, House keeping normalization, External control normalization の3種の補正方法を検討した。しかし、いずれの方法により結果も大きな差はなかったため、補正する遺伝子数の一番多い Global normalization による値を補正方法として選択し、使用した。

Scatter Plot の移動距離および移動方向による篩い分け法の計算には、上記三種の補正方法および生データで発光強度に大きな順位の入れ替えなどの差を生じなかった。このため、補正を行っていない蛍光強度のデータを用い検討を行った。

### 1-II-2 実験を比較する解析方法の選択

「一般的な 2 実験の差を検出する手法（チップ間の誤差検定によく用いる）での検討」(Fig1-II-2-1)と「Scatter Plot の重ねあわせによるベクトル表示法」(Fig1-II-2-2-1 および 2)に関して、特徴を検討した。「Scatter Plot の重ねあわせによるベクトル表示法」を行い 2 実験の結果をベクトル表示することで以下のグループ分け、篩い分けが可能であったので「Scatter Plot の重ねあわせによるベクトル表示法」を解析方法として選択した。ベクトルの移動方向による分類で、「*Aldh2* 遺伝子型の影響を受けないアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」と、「*Aldh2* 遺伝子型により影響を受けるアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」を分類できる。また、移動距離による順位づけが可能であり、蛍光強度によるデータの信頼性の検討、実験誤差の検討が図中で可能であるため、直観的に遺伝子発現の増減の判断がし易かった。

## 1-III 実験結果

### 1-III-1-1 解析法 1-1 Scatter Plot 移動距離とベクトルの方向による分類

Spot 判定が全て陽性で移動距離が大きい遺伝子上位 250 位までを検討した。Cytochrome P450, 2b9, type a (NM 010000), Sterol-C4-methyl oxidase-like (NM 025436), Reticulon 4 (NM 024226), Apolipoprotein A-IV (NM 007468), FMS-like tyrosine kinase 1 (NM 010228), Calreticulin (NM 007591), Stromal antigen 2 (NM 021465), Solute carrier family 13 (sodium-dependent decarboxylase transporter, member 3 (NM 054055), Cocaine and amphetamine regulated transcript (NM 013732), Cytochrome P450, 7b1 (NM 007825), Lipin 2 (NM 022882), NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like (NM 010941), RIKEN cDNA 2810052M02 gene (NM 023320), Biglycan (NM 007542), Aspartoacylase (aminoacylase) 2 (NM 023113), Betaine-homocysteine methyltransferase (NM 016668), Phosphatase and tensin homolog (NM 008960), Synbindin (NM 021789), Metallothionein 1 (NM 013602), ADP-ribosylation factor 3 (NM 007478)などの遺伝子が、アセトアルデヒド曝露による発現量の変動が大きかった。「*Aldh2* 遺伝子型の影響を受けないアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」と、「*Aldh2* 遺伝子型により影響を受けるアセトアルデヒド曝露による遺伝子発現の変動」を区別するため、次の解析を行った。

### 1-III-1-2 解析法 1-2 曝露前後の発現変動 $y=x$ 方向の移動距離の大きい上位 250 遺伝子

Spot 判定が全て陽性で  $y=x$  方向の移動距離移動距離が大きい遺伝子上位 250 について解析し、DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 482, expressed (NM 134046), Reversion induced LIM gene (NM 019417), Exostoses (multiple)-like 1 (NM 019578), Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter,  $y+$  system), member 5 (NM 011404), SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1 (NM 020618), Calcium channel, voltage-dependent,  $\alpha 2/\delta$  subunit 1 (NM 009784), Ubiquitin specific protease 14 (NM 021522), Potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 1 (NM 008420), G-protein coupled receptor 12 (NM 008151), Holocarboxylase synthetase (biotin-[propionyl-Coenzyme A-carboxylase (ATP-hydrolysing)] ligase) (NM 139145)などの遺伝子の発現変動量が大きかった。これら多くは、脂質代謝、第 2 相薬物代謝にかかわる蛋白の遺伝子およびホルモン・ミネラル結合蛋白の遺伝子であった。

### 1-III-1-3 解析法 1-3 曝露前後の発現変動 $y=-x$ 方向の移動距離の大きい上位 100 遺伝子

Spot 判定が全て陽性で  $y=-x$  方向の移動距離移動距離が大きい遺伝子上位 100 について解析し、Metallothionein 1 (NM 013602), Betaine-homocysteine methyltransferase (NM 016668), Ubiquitin specific protease 2 (NM 016808), Melanoma antigen, 80 kDa (NM 008581), RIKEN