

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590766

研究課題名(和文) バイオ燃料ETBEの生体影響および代謝酵素遺伝子多型の修飾作用について

研究課題名(英文) Health effects of the biofuel ETBE as modified by the genetic polymorphisms of its metabolizing enzyme

研究代表者

王 瑞生 (WANG, Rui-Sheng)

独立行政法人労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究グループ・上席研究員

研究者番号：10321895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：エチルターシャリーブチルエーテル(ETBE)はバイオ燃料として使用されている。先行研究では高濃度ばく露後、マウスの肝障害を誘発し毒性が弱いことが示唆された。代謝酵素ALDH2活性の高、低と無の3種類マウスを用いて低濃度ETBEの吸入ばく露実験を行った。酵素活性高のマウスでは肝臓などにDNA損傷度の上昇はなかったが、活性の低と無マウスでは200ppm以上のばく露により有意に上昇した。ETBE曝露後血中及び尿中の代謝物を解析した結果、ALDH2酵素はETBEの中間代謝物アセトアルデヒドだけではなく、もう一つの中間代謝物であるターシャリーブチルアルコールの代謝と毒性発現にも関与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Ethyl tertiary-butyl ether (ETBE) is a biofuel for vehicles. ETBE had toxicity only at high concentrations as showed in earlier experiments. However, it is not known if it induces damages when its metabolizing enzyme ALDH2 (aldehyde dehydrogenase 2) is inactive. Mice with normal, low active or inactive ALDH2 were exposed to ETBE at low concentrations (50-500 ppm). DNA damages in liver and sperm were observed in mice with low active and inactive ALDH2 exposed to 200 and 500 ppm ETBE, but not in mice with normal enzyme activity. Metabolites in blood and urine of mice exposed to ETBE or its intermediate metabolite TBA (tertiary-butyl alcohol) were analyzed and it was shown that ALDH2 is involved in the metabolism and toxicity of TBA, too. Our findings suggested that only exposure to high concentrations of ETBE may result in DNA damages in mice with active ALDH2, while low active and inactive ALDH2 enzyme can significantly enhance ETBE-induced damage even at low concentrations.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学 衛生学

キーワード：ETBE 遺伝毒性 代謝酵素 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) はバイオ燃料としてガソリンと混合して使用される。このバイオ燃料使用の背景は、平成 17 年に閣議決定された「京都議定書目標達成計画」に輸送用燃料におけるバイオマス由来燃料の導入が目標とされていることにある。ETBE はバイオエタノールを原料として製造され、そのメリットとして、高オクタン価でオクタン価向上剤として活用される；蒸気圧が低いため燃料が揮発しにくい；バイオマスからも製造可能で、再生可能な燃料である；などがある。従って、ETBE の使用は、二酸化炭素排出量の削減、さらに石油依存度の低減につながる。数年前からフランス、ドイツ、スペインなどの国で使用されている。日本は、平成 19 年度から ETBE 混合ガソリンが試験的に使用され、平成 22 年から、全国に本格的に導入された。バイオ ETBE は海外からの輸入が主な割合を示しているが、平成 21 年から日本国内での製造も開始した。このように、ETBE は、職業的曝露に限らず、一般の人もその曝露を受ける可能性が高くなってきている。

ETBE に対する先行の毒性研究では、マウスやラットの種々の組織や機能に対する毒性が弱いことが示唆された。90 日間反復吸入毒性試験は、1500 ppm 以上の曝露群に粘膜刺激症状や肝障害などが観察されたため、ETBE の無毒性量 (NOAEL) は 500 ppm としている。一方、微生物を用いた変異原性試験は陰性、発がん試験も陽性の結果が得られなかった報告があり、ETBE は遺伝毒性がないのではないかと思われる。しかし、米国産業衛生専門家会議も「現時点では、ETBE の動物または人に対する発がん性を評価する十分な証拠がない」としている。実際、オーストラリアやアメリカのいくつかの州では、ETBE の毒性に関する知見が不十分としてガソリンへの添加使用を禁止している。

体内で ETBE はまず CYP2A6 や 2E1 という酵素によってアセトアルデヒドとターシャリーブタノールに (TBA) 代謝され、後者からも次の代謝過程においてアルデヒド類が生じる。これらの中間代謝物は体内で毒性を示す可能性がある。特にアセトアルデヒドは細胞毒性があり、ヒトおよび動物の潜在的な発がん物質として分類されている。アルデヒドはカルボニル基を持つ反応性の高い性質があり、タンパク質側鎖のアミノ基と結合し、架橋反応を起こして、タンパク質を変性させる。飲酒の場合、アセトアルデヒドは肝細胞のミトコンドリアタンパク質を変性して、肝障害を誘発することが知られている。

体内でアルデヒドを解毒する主な酵素はミトコンドリアに局在しているアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) である。その遺伝子変異によってタンパク質の第 489 番アミノ酸が Glu から Lys に変わり、酵素活性が殆どなくなる。日本人を含め、東アジア人の約 4 割

は変異型遺伝子アレルを持っており (ヘテロ接合型、またはホモ接合型)、酵素活性が欠損、または著し低下している。ALDH2 酵素は短鎖脂肪族アルデヒド類の代謝に重要な役割を果たしていることが知られている。ETBE から生じるアルデヒド類もこのタイプの物質であり、ALDH2 はその代謝に関与すると思われる。従って、この酵素の活性が欠損した場合、ETBE の体内代謝およびその生体影響も変わる可能性は高いが、これについては殆ど証明されていない。本研究は、ETBE の生体影響および代謝酵素活性変動などの因子による修飾作用を明らかにし、総合的に ETBE の有害性を評価するために有用なエビデンスを提供する。

2. 研究の目的

ETBE はバイオ燃料として、昨年から日本全国で使用されている。一般毒性は弱いと言われているが、体内でアルデヒド類などに代謝され、遺伝物質への影響が懸念されている。アルデヒド類の解毒にアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) が関与しているが、日本人によく見られるこの酵素活性の欠損は ETBE の毒性発現にどう影響するかについて不明であり、早く解明する必要がある。本研究は、種々のバイオマーカーを用いて ETBE の長期曝露による生体影響を評価すると同時に、代謝酵素の欠損による修飾作用を明らかにし、さらに各代謝物の毒性を調べ、ETBE の生体影響の発生機序の解明を行う。日本人によく見られる遺伝子多型によって、ETBE の生体影響はどう変わるかについての知見を得て、今後日本における ETBE の諸基準の設定に重要な根拠を提供する。

3. 研究の方法

ETBE の慢性吸入曝露実験および種々の生体影響の評価を行う。代謝酵素 ALDH2 の遺伝子多型の影響を検討するため、この酵素の遺伝子ノックアウトマウスおよびその野生型マウスを用いる。一定期間のばく露終了後、血液、肝組織、生殖組織 (精子) などを採集し、遺伝毒性を中心に、様々な毒性指標を用いて解析を行う。主な解析方法は、フローサイトメーター法による網状赤血球における小核頻度の測定、コメットアッセイ法による各種組織における DNA 損傷度の検出、液クロと電気化学検出法などによる組織中の酸化ストレスマーカーである 8-OH-dG の検出と定量、などである。

ETBE の体内代謝および毒性発現との関連を解析するため、曝露開始前および曝露開始後、定期的にマウスの血液や尿を収集し、ETBE とその代謝物を測定し、体内動態および ETBE 毒性との関連性を解析する。

ETBE による生体影響の発生機序を解明するため、毒性がほとんど知られていない中間代謝物であるターシャリーブチルアルコール (TBA) を野生型および ALDH2 酵素活性の

無いマウスに投与し、各種生体影響および両タイプマウスにおける差異を解析する。さらに、ETBE ばく露後のマウス肝組織からミトコンドリア細胞小器官を分画し、その機能変動を測定することによって、ミトコンドリア機能障害経路による肝障害を解析する。

4. 研究成果

(1) ETBE の代謝に関与している酵素 ALDH2 の遺伝子ノックアウト (活性のない KO マウス、活性の低い HT マウス) およびその野生型マウス (活性が高い) を用いて、ETBE の比較的低濃度において吸入ばく露実験を行い、ETBE の生体影響および Aldh2 遺伝子型の影響について検討した。血球数やヘモグロビン濃度などに対し、いずれの遺伝型マウスにおいてもばく露による影響はなかった。白血球における DNA 損傷度の測定 (コメットアッセイ法) を行った。その結果、野生型マウスでは ETBE ばく露による損傷度 (テールの輝度) の上昇はなかったが、KO と HT マウスでは 200ppm 以上のばく露により有意に上昇した。肝細胞における DNA 損傷についても解析し、白血球での結果と一致している。肝臓の組織学解析を行い、KO マウスでは 500ppm の ETBE ばく露で小葉中心性肝細胞腫大やびまん性微細空胞などの変化は観察され、野生型マウスより顕著であったことが認められた。これらの結果は、ALDH2 酵素は ETBE の体内代謝に関与し、その毒性発現に影響を与えることを示唆した。また、Aldh2 遺伝子ノックアウトマウスにおいては、報告された ETBE の最大無毒性用量 500ppm より低い濃度においても、白血球や肝細胞における DNA 損傷度の上昇などが観察され、この酵素活性の欠損によって ETBE に対する感受性が高くなることを示唆した。

(2) ETBE 曝露による生殖系への影響および ALDH2 遺伝子多型の修飾作用について検討した。ETBE ばく露後 (50、200、500 ppm) マウスの精子運動能や生殖系細胞における DNA 損傷について解析した。精巣上体尾部における精子運動能の解析結果、野生型マウスでは ETBE 曝露の影響が殆ど観察されなかった。ALDH2 遺伝子ノックアウトの KO と HT 型マウスにおいて 200 と 500 ppm ばく露群では、精子運動率が有意に減少したことが認められた。精子における DNA 損傷は ALDH2 遺伝子ノックアウト (KO および HT 型) では 200 ppm 以上の曝露によって有意に上昇した。また、DNA 上の酸化損傷を特異的に認識し除去する酵素 (hOGG1) で試料を処理した後のコメット解析では、ETBE 曝露後、DNA 上の酸化損傷は 200 ppm 以上の ETBE にばく露した ALDH2 ノックアウトマウスにおいて上昇傾向が観察された。これらの結果からも、ETBE の最大無毒性濃度は ALDH2 活性の欠損マウスでは、通常マウスの 500 ppm より低く、またその DNA 障害は酸化損傷が関与していることが判明した。

(3) ETBE の体内代謝と毒性の関係についても検討した。野生型および ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスを 500 ppm の ETBE に曝露させ、終了後定時的に血液や肝組織を採集し、代謝物 (一次代謝産物であるアセトアルデヒドとターシャリーブチルアルコール (TBA) および TBA の代謝物である 2-メチル-1,2-プロパンジオール (MPD)) の定量を解析し、野生型と遺伝子ノックアウトマウスとの差異を比較した。3つの代謝物の血中濃度は曝露終了後比較的早く減少したが、ばく露期間中およびその後、ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスの方が野生型に比べて高かった。これらの結果から TBA 代謝にも ALDH2 が関与していることが示唆された。ETBE の遺伝毒性が ALDH2 活性の無いマウスでより強く示されたのは、これらの代謝物の体内保留と関係し、それにより感受性が増大されたことが示唆された。

(4) ETBE の遺伝毒性や肝障害性の発生機序について検討した。ETBE の中間代謝物であるターシャリーブチルアルコール (TBA) の体内代謝においてアルデヒド類が産生されるため、ALDH2 酵素がその後の代謝に関与すると推測される。雄性 C57BL/6J (WT) マウスおよび ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスに、TBA を 0、5 または 20 mg/ml を添加した飲用水を連続 6 週間与えた。白血球における DNA 損傷をコメットアッセイ法で解析した。その結果、野生型マウスでは DNA 損傷度は高用量群においては上昇したが、低用量群は変化しなかった。ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスでは低い用量群においても対照群より上昇した。このように TBA は ALDH2 活性欠損マウスにおいてより低濃度で DNA 損傷を誘発することができ、この酵素は TBA の代謝や毒性発現に関与し、TBA が ETBE の生体影響の少なくとも一部に係わっていることが示唆された。

ETBE に吸入曝露した野生型と ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスの肝組織からミトコンドリアを分画し、内膜におけるコンプレックス I、II と V の機能を解析した。コンプレックス II と V は両タイプのマウスのどちらにおいても ETBE ばく露による影響は見られなかったが、コンプレックス I は ALDH2 遺伝子ノックアウトマウスでは抑制された傾向が見られ、肝障害の発生に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

王 瑞生, 須田 恵, 大谷勝己, 柳場由絵, 鈴木哲矢 (2012) ETBE 低濃度ばく露後マウスの各種組織における DNA 損傷について. 第 40 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p24.

Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Katsumi Ohtani, Zuquan Weng (2013) Enhanced genotoxic effects of ethyl tertiary butyl ether in sperm of Aldh2 gene knockout mice. 11th International Conference on Environmental Mutagens, Program and Abstract Book, p228.

Rui-Sheng Wang, Zuquan Weng*, Katsumi Ohtani, Megumi Suda and Yukie Yanagiba (2014) Assessment of the reproductive toxicity of inhalation exposure to Ethyl tertiary Butyl Ether in male mice with normal, low active and inactive ALDH2. The 53rs Annual Meeting of the Society of Toxicology, Toxicologist 2014, page 442.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

王 瑞生 (Rui-Sheng Wang)
独立行政法人 労働安全衛生総合研究所
研究者番号：10321895

(2)研究分担者

須田 恵 (Megumi Suda)
独立行政法人 労働安全衛生総合研究所
研究者番号：90415969

研究分担者

翁 祖銓 (Zuquan Weng)
独立行政法人 労働安全衛生総合研究所
研究者番号：10541170

研究分担者

柳場 由絵 (Yukie Yanagiba)
独立行政法人 労働安全衛生総合研究所
研究者番号：90467283

研究分担者

佐治 (鈴木) 哲矢 (Tetsuya Suzuki)
独立行政法人 労働安全衛生総合研究所
研究者番号：20573950