

ETBE 亜慢性ばく露によるマウスの行動変化について

- 行動試験による高濃度 ETBE の神経行動毒性の検証 - †

北 條 理恵子*¹ 須 田 恵*¹ 久保田 久代*¹ 柳 場 由 絵*¹ 王 瑞 生*¹

バイオマスエタノールから生成されるエチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) は、ガソリンの添加剤であり、平成 19 年から日本でも販売が開始された。本実験は、ETBE の吸入ばく露後のマウスに数種類の行動試験を行い、運動機能への影響を詳細に調べることを目的とした。また、C57BL/6J 系マウス (WT) と C57BL/6J 系アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 2 遺伝子欠損マウス (KO) に同様の行動試験を行い、ETBE ばく露による行動変化の違いを調べた。8 週齢の雌雄の WT および KO マウスに 0, 500, 1750, あるいは 5000ppm の ETBE を 12 週間 (6 時間/日, 5 日/週) ばく露した。その 24 あるいは 48 時間後にオープンフィールドテストにて活動量を、ロータロッドテストにて運動機能変化の有無を、グリップストレングステストにて上肢の握力変化を調べた。その結果、5000ppm の ETBE ばく露後の KO のオスと対照群のオスにおいて、オープンフィールドテストでの初発反応潜時、行動距離および行動時間に差異が認められた。ロータロッドテストでは KO マウスのオスにおいて、すべてのばく露群で対照群との間に運動機能の差異が認められた。このような対照群との差異はメスには認められなかった。また、WT マウスにおいては雌雄ともに ETBE ばく露による行動への影響はみられなかった。以上の結果から ETBE の毒性が性差および ALDH2 により影響を受ける可能性が示唆された。

キーワード: エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE), オープンフィールドテスト, ロータロッドテスト, グリップストレングステスト, C57BL/6J 系マウス, C57BL/6J 系 Aldh2 遺伝子欠損マウス。

1 序論

エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) は、バイオマスエタノールから生成される自動車燃料の添加剤である¹⁾。日本では 2007 年から ETBE を 7% 混合したガソリンの試験販売を経て 2009 年に本格導入を開始した^{2, 3, 4)}。2012 年 9 月 10 日現在、バイオガソリンを販売するサービスステーションは 3200 箇所以上のぼる¹⁾。このようにバイオガソリンを取扱う店舗は増加の一途を辿っているが、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律において ETBE は、「継続的に摂取される場合には人の健康を損なうおそれがある化学物質に該当する疑いのある化学物質」と判定されている⁵⁾。ETBE 混合ガソリンの販売あるいは製造場面における職業性ばく露の機会の増加が予想され、生物体内への蓄積性はないものの^{6, 7)}、難分解性という特徴^{6, 7, 8)} から長期ばく露による健康影響が懸念されている。しかしながら、ETBE ばく露における生体影響、特に運動機能等の神経系への影響を調べた研究は数少なく、5,000ppm の慢性吸入ばく露での動物試験において運動失調が報告されているのみ⁹⁾である。そのため運動機能の詳細な評価を含めた ETBE の神経行動毒性の評価が急務と思われる。

ETBE の中間代謝物であるアセトアルデヒドは、アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) により分解され解毒

される^{11, 12)}が、東アジア人では約 4 割に遺伝子塩基配列の一塩基変異が認められることが知られている¹²⁾。ALDH2 欠損という特徴を持つ東アジア人の遺伝的背景を考慮したうえで ETBE ばく露の健康影響を調べる必要があると考える。そのため、本研究では ALDH2 欠損マウスおよび野生型マウスに対し ETBE を吸入ばく露し、ETBE の毒性影響をと比較することを目的とした。本実験では特に運動機能に焦点を当て、ETBE をばく露後に運動機能を調べる行動試験を数種類行うことにより ETBE が特に運動機能におよぼす影響と ALDH2 の関係を調べた。

2 材料と方法

1) 動物および吸入ばく露

雌雄の C57BL/6J 系マウス (野生型, WT) を日本チャールスリバー株式会社より 7 週齢で購入し、1 週間の馴化ののち 8 週齢から吸入ばく露を開始した。また、雌雄の C57BL/6J 系 Aldh2 遺伝子ノックアウトマウス (KO) は自家繁殖し、8 週齢で吸入ばく露を開始した。これらの動物は、労働安全衛生総合研究所内において室温 22±1℃、湿度 55±5%、12 時間照明 (7:00~19:00) に保たれた動物飼育施設内で飼育された。固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) および飲用水は自由に摂取させた。純度 97% 以上のエチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) を東京化成から購入し、吸入ばく露実験に用いた。ばく露濃度は先行研究³⁾を参照のうえ、0 (清浄空気, 対照群), 500, 1,750 あるいは 5,000ppm の四用量を設定した。各ばく露条件群にオスおよびメスの動物をそれぞれ 9 匹ずつ割り当て、ETBE 蒸気を動物飼育施設内にある吸入ばく露チャン

*¹ 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 北條理恵子

E-mail: hojo@h.jniosh.go.jp

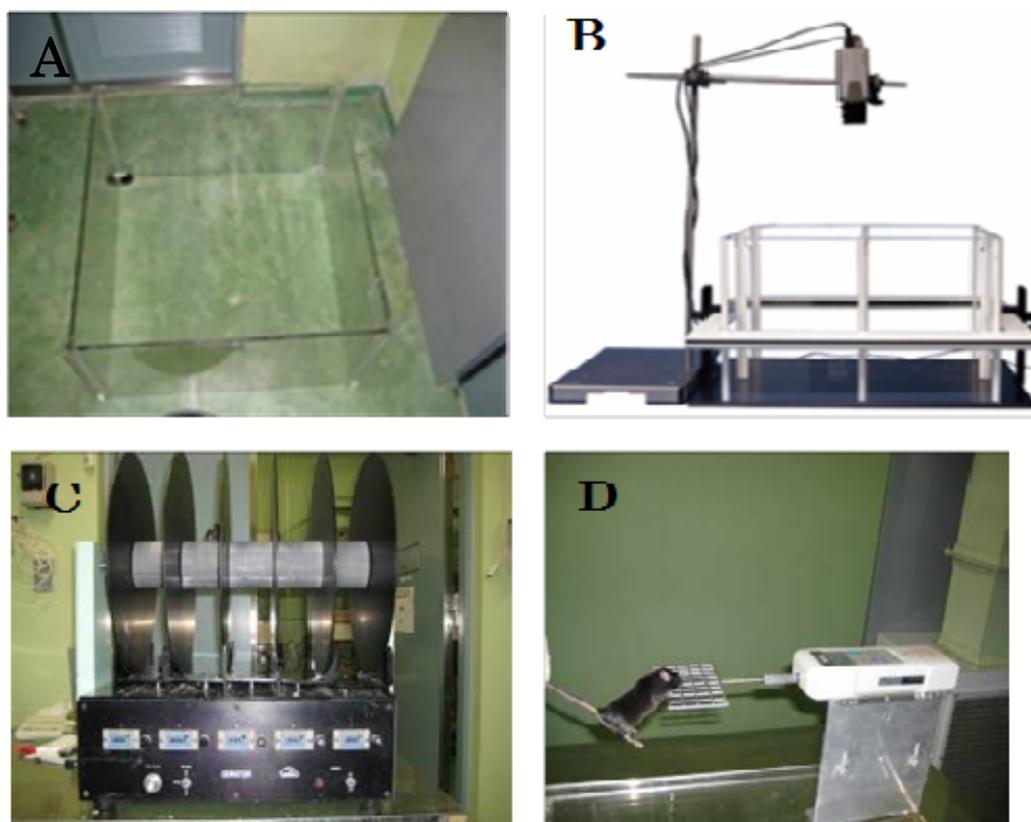


図1 行動試験用装置

A) オープンフィールドテスト装置, B) 角型オープンフィールドテスト用ビデオ・トラッキング・システム, C) マウス用5レーン仕様ロータロッドテスト用 Treadmill, D) グリップストレンクス測定用デジタルフォースゲージ.

バー(柴田科学)にて、6時間/日、5日間/週のスケジュールで12週間ばく露した。

2) 行動試験

12週間のばく露終了の24時間後にオス、48時間後にメスをそれぞれ各群より6匹をランダムに選択し、行動試験を開始した。行動試験に先立ち、ばく露終了直後に動物の一般状態の観察(毛並み・皮膚の状態、瞬目および眼球運動、呼吸、歩行状態の異常の有無)を行った。はじめに、活動量をオープンフィールドテストで測定し、さらに運動機能変化の有無を調べるためロータロッドテストを、最後に上肢における筋力の変化の測定にはグリップストレンクステストを行った。

(1) オープンフィールドテスト

動物の活動量を調べるため、高さ52cmの亚克力製の壁で囲われた角形のオープンフィールドテスト装置(遠藤サイエンス株式会社、920×920mm)を用いた(図1A)。

フィールド内に動物を置き、フィールド内における初期反応潜時(測定開始から動物が動き出すまでの時間)、総行動時間、総移動距離、区画移動数(底面を6

区画に区切り、その区画を横切った回数)を、ビデオ・トラッキング・システム(図1B、DVT-11、室町機械株式会社)により10分間記録した。オープンフィールドテスト実行中の排尿数および排便数も測定した。

(2) ロータロッドテスト

運動機能の協調性、平衡感覚および運動学習障害の有無を検討するため、5レーン仕様のマウス用ロータロッドテスト装置(Rota Rod Treadmill, ENV577: Standalone Model, Natsume)(図1C)を用いた。

各レーンの回転円柱上にマウスを載せ、毎分あたりの回転数(回転速度, rpm)を12rpmに固定し、動物が落下するまでの回転円柱上での滞在時間を測定した。測定の前に、訓練前歩行(回転していない円柱上に動物を5分間乗せた時の落下回数)、続いて訓練歩行(3~6rpm)で回転させた円柱上で歩行させた時の落下回数)を行った。訓練歩行の1時間後に、円柱に動物を乗せ、円柱を12rpmで回転させ、落下するまでの円柱上滞在時間を1日3回反復して測定した。最長滞在時間(cutoff time)を60秒に設け、それ以上動物が滞在している場合は、円柱を止め滞在時間を60秒として記録した。同一の動物における各測定は、少

表1 オープンフィールドテストにおける区画移動回数^{b)}

実験群 (ppm)	メス		オス	
	KO	WT	KO	WT
0 ^{a)}	198.50 ± 118.89 回	281.00 ± 106.24 回	194.11 ± 84.54 回	347.44 ± 67.62 回
500	196.83 ± 57.66 回	341.00 ± 162.32 回	231.33 ± 68.32 回	321.00 ± 89.83 回
1750	195.00 ± 67.20 回	352.20 ± 25.19 回	168.00 ± 79.48 回	308.11 ± 67.64 回
5000	197.00 ± 34.53 回	279.33 ± 47.26 回	141.44 ± 56.26 回	251.22 ± 72.28 回

a)コントロール群, b) 数値は平均値±標準偏差 (n=6)

なくとも1時間以上の間隔を空けて測定した。

(3) グリップストレングステスト (握力測定)

マウスの前肢における握力 (グリップストレングス) マウスの前肢の握力測定には、デジタルフォースゲージ (DPS-5, 株式会社イマダ) を使用した。デジタルフォースゲージの先端の網目に動物を前肢で捕まらせ、尾をつまんで一定の速度で後方に引き、網目を離すまでに加わった力を測定した。

3) 統計解析

行動試験で得られた結果について、ETBEの0ppm (清浄空気) ばく露群を対照群としてそれぞれの系統 (WT, KO) 内でDunnettの検定を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意水準とした。

本実験は「労働安全衛生総合研究所動物実験委員会」において審査され、承認を得たうえで実行された。実験のすべての内容は「労働安全衛生総合研究所動物実験指針」に則って行われた。

3 結果

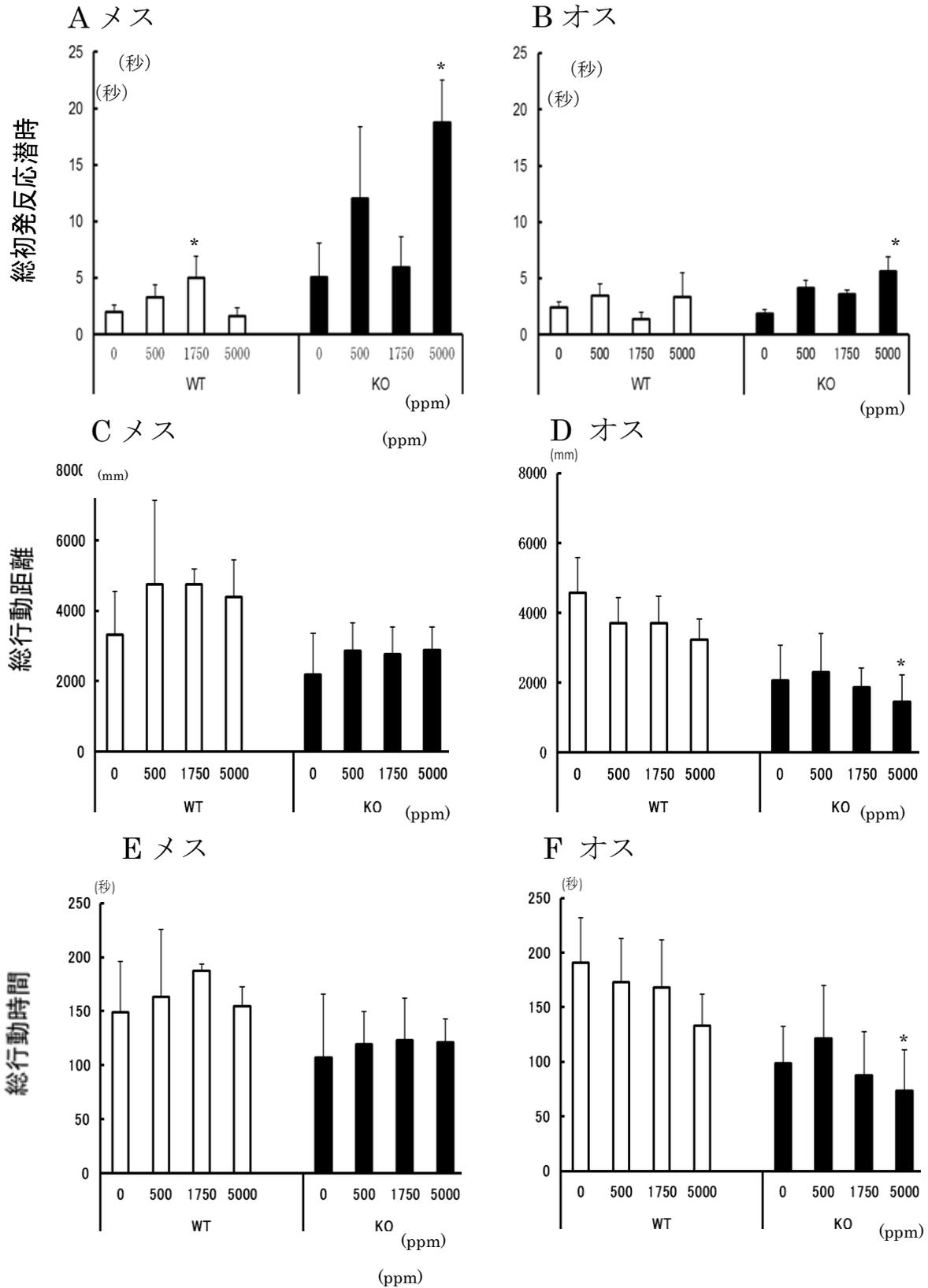
オープンフィールドテストの区画移動回数では、KOおよびWTマウスにおいて雌雄ともにコントロール群との差異がみとめられなかった (表1)。テスト中の排尿回数および排便回数にも違いがみられなかった (データ未掲載)。

KOマウスでは、コントロール群と比較すると雌雄ともに5,000ppmばく露群において、初発反応潜時の有意な延長 ($p < 0.05$) がみられた (図2A, B)。KOマウスの5000ppmばく露群オスは、オープンフィールドの測定時間 (10分間) 内に移動した距離 (総行動距離) においてもコントロール群との間に有意な差 ($p < 0.05$) がみとめられたが、その他のオスの実験群には差がみられなかった (図2D)。同様に、オープンフィールド試験中に移動した時間 (総行動時間) においても、オスのKOマウスの5000ppmばく露群のみにコントロール群と比較して有意な短縮がみられた ($p < 0.05$, 図2F)。

WTマウスにおいては、1750ppmばく露群のメスは初反応潜時の有意な延長 ($p < 0.05$) (図2A) がみられ、オスには有意な短縮 ($p < 0.05$) (図2B) がみられたが、ほかの実験群にコントロール群との差はみられなかった。また、総行動距離 (図2C) および総行動時間 (図2D) では雌雄ともにコントロール群との間に差がみられなかった。

ロータロッドテストでは、KOのオスマウスに1回目から3回目の測定すべてにおいて、全ばく露群とコントロール群との間に有意な円柱上滞在時間の短縮がみとめられた ($p < 0.05$, 図3)。一方、KOのメスマウスおよびWTマウスにおいては、コントロール群との間に差がみられなかった (データ未掲載)。

KOおよびWTマウスのグリップストレングステストでは、雌雄ともにコントロール群との間に差はみとめられなかった (データ未掲載)。



ETBEばく露群

*

図2. オープンフィールドテストにおける結果

A) メス, および B) オスの平均初期反応潜時 (秒), C) メスおよび D) オスの平均総行動距離 (mm), および E) メス, D) オスの平均総移動時間 (秒). WT: C57BL/6J 系マウス (野生型), KO: C57BL/6J 系 Aldh2 遺伝子ノックアウトマウス. 0 は対照群, 500, 1750, 5000 は ETBE のばく露量 (ppm) を示す実験群 (6 匹/群).

*:対照群と比較して有意差あり (p<0.05, Dunnett の検定).

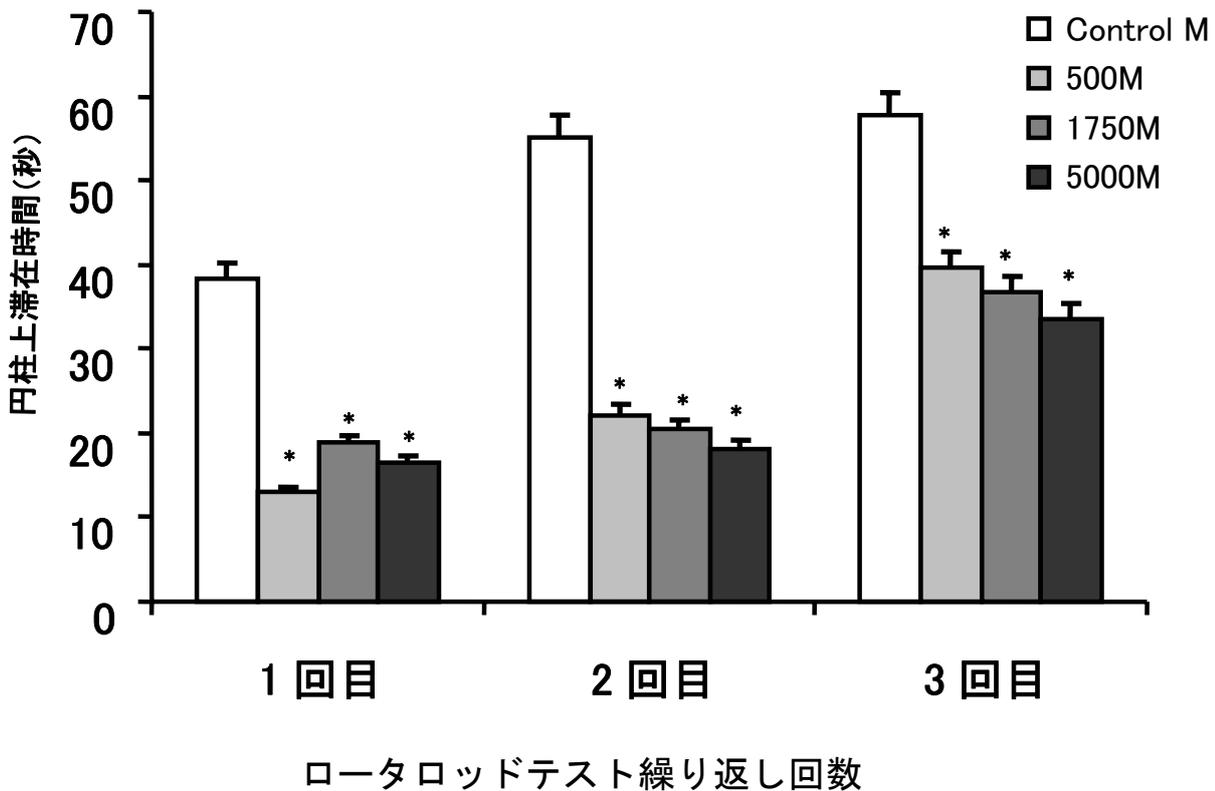


図3. ロータロッドテストにおける KO オスマウスの円柱上滞在時間 (秒). 上限時間(cut off time)を 60 秒とし, 3 回繰り返し測定した. 同一の動物における各測定は, 少なくとも 1 時間以上の間隔を空けて行った. それぞれ, □はコントロール, ■は 500, ■は 1750, ■は 5000ppm の ETBE をばく露した群 (6 匹/群). *: コントロール群と比較して有意差あり ($p < 0.05$, Dunnett の検定).

4 考察

オープンフィールドテストでは, ALDH2 酵素活性欠損マウスのオスにおいて, 高用量 (5000ppm) の ETBE ばく露群にのみ影響がみられた. 反応潜時の有意な延長および移動距離と移動時間の短縮という結果を合わせると, 5,000ppm の慢性吸入ばく露での動物試験において運動失調が生じたとする先行研究と一致する⁴⁾. また, これらの現象は, ETBE ばく露後の神経系における変化を調べた先行研究³⁾においても言及されており, オスがメスに比べてより高感度に ETBE ばく露に反応していたとの結果と一致する. しかしながら, 神経系への影響を調べた研究は数が少ないこと, 本研究ではマウスを使用しており先行研究の被験動物とは異なること, さらに実験で使用したばく露量は, 日常生じうるばく露に比べると極端に高用量であることからより現実に近い用量およびばく露期間を用いた実験が必要である.

本実験の結果の一部が ALDH2 酵素活性の欠損の有無によって異なっていた. この結果から, ALDH2 酵素活性の欠損の有無が, 化学物質 (ETBE) ばく露に対する感受性に影響を与えている可能性がある. 今後は, ALDH2 酵素活性と性差にも焦点を当てた毒性評価が必要である.

また, 今回は運動機能に特化した試験を行ったが, その他の中枢神経系も損傷される可能性があるため, ほかの行動試験法での毒性評価が必要である.

今回示された活動量および運動機能の低下が中枢神経系の損傷によるものかどうかは, 今回行った行動試験だけでは不十分であるため, ほかの運動機能を調べる行動試験を行うことに加え, 脳の組織化学的解析法を用いて ETBE ばく露により神経系レベルで変化が生じているかどうかの確認および障害の局在を明らかにする等の試みを検討することが不可欠であろう.

参 考 文 献

- 1) 石油連盟：バイオガソリンについて，<http://www.paj.gr.jp/eco/biogasoline/index.html>.
- 2) 再生可能燃料利用推進会議：バイオエタノール混合ガソリン等の利用拡大について（第一次報告），2004.
- 3) 再生可能燃料利用推進会議：ETBE について，2003.
- 4) 総合資源エネルギー調査会石油分科会石油部会燃料政策小委員会 ETBE 利用検討ワーキンググループ：ETBE 利用検討ワーキンググループとりまとめ，2006；7 - 12.
- 5) 新技術・新素材の活用等に対応した安全対策の確保に係る調査検討報告書 [バイオマス燃料（ETBE 含有ガソリン及びE3）の安全対策の調査検討報告書] 平成20年2月総務省消防庁危険物保安室
- 6) 斎藤 健一郎. 自動車用燃料におけるバイオマス利用. 季報 エネルギー総合工学, 2006；29：69 - 76.
<http://www.iae.or.jp/publish/kihou/29-2/11.html>.
- 7) 橋本 伸也, 下ヶ橋 雅樹, 周 勝, 中島田 豊, 細見 雅明. 過硫酸ナトリウムによるエチル t-ブチルエーテル (ETBE) の分解機構. 水環境学会誌, 2009；32:543-547.
- 8) McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review. Crit. Rev. Toxicol. 2007; 37: 287-312.
- 9) Dorman DC, Struve MF, Wong BA, Morgan KT, Janszen DB, Dross EB, Bond JA. Neurotoxicological Evaluation of ethyl tert-butyl ether following subchronic (90-day) inhalation in the Fisher 344 rat. J. Appl. Toxicol. 1977; 17: 235-242.
- 10) Chen YC, Peng GS, Wang MF, Tsao TP, Yin SJ. Polymorphism of ethanol-metabolism genes and alcoholism: correlation of allelic variations with the pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. Chem. Biol. Interact. 2009; 178: 2-7.
- 11) Wang RS, Nakajima T, Kawamoto T, Honma T. Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genetic polymorphisms on metabolism of structurally different aldehydes in human liver. Drug. Metab. Dispos. 2002; 30: 69-73.