

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質の極低濃度暴露の実現のための技術開発に関する研究

研究分担者 長野 嘉介

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 副所長

協力研究者	西沢 共司	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部長
	笠井 辰也	日本バイオアッセイ研究センター	吸入試験室長補佐
	斉藤 新	日本バイオアッセイ研究センター	吸入試験室長補佐
	佐々木俊明	日本バイオアッセイ研究センター	吸入試験室長補佐
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	分析室長
	武 信	日本バイオアッセイ研究センター	分析室長補佐

研究要旨

化学物質を極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発を目的として、ダイアジノンを対象として室内濃度指針値（0.02 ppb）を考慮した濃度でマウスに全身暴露する方法について研究した。その結果、低温下でバブリングにより気化させる方法（冷却バブリング法）により0.02、0.07および0.2 ppbの目標暴露濃度でダイアジノン吸入暴露する方法を開発することが出来た。

A. 研究目的

化学物質の極低濃度暴露による健康影響を評価するためには、化学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発が必要である。また、毒性評価手法の開発に際しては、実際に極低濃度暴露実験を行い新たに開発した毒性評価手法の極低濃度レベルでの有効性を実証する必要がある。

これまでの研究で、生活環境中に存在しヒトが経気道的に暴露される可能性がある化学物質であるトルエン、スチレン、キシレン（混合キシレン）、パラジクロロベンゼン、テトラデカンおよびクロルピリホスを対象として、極低濃度レベルで動物（マウス）に吸入暴露

できる吸入ばく露方法の開発を行ってきた。

その結果、トルエンについては、市販の標準ガスを利用した暴露方法により、室内濃度指針値である70ppbを考慮した目標暴露濃度である70、200および700 ppbの吸入暴露を行うことができた。また、スチレンについても、市販の標準ガスを利用した暴露方法により、室内濃度指針値である50ppbを考慮した目標暴露濃度である50、150および500 ppbの吸入暴露を行うことができた。キシレン（混合キシレン）については、被験物質が複数の異性体より成る混合キシレンであるため、一般環境での暴露状態に合わせて常温に近い状態での加熱バブリング法（23℃）によりキシレンを気化させる方法を試み、室内濃度指針値で

ある200ppbを考慮した目標暴露濃度である200、700および2000 ppbの吸入暴露を行うことができた。パラジクロロベンゼンについては、固体を加熱・昇華させる方法により、室内濃度指針値である40 ppbを考慮した目標暴露濃度である40、120および400 ppbの吸入暴露を行うことができた。テトラデカンについては、加熱・バブリングにより気化させる方法により、室内濃度指針値である40 ppbを考慮した目標暴露濃度である40、120および400 ppbの吸入暴露を行うことができた。また、クロルピリホスについては、加熱・バブリング（ゴアテックスチューブで微小な泡を安定して発生）により気化させる方法により、室内濃度指針値である0.07 ppbを考慮した目標暴露濃度である0.07、0.21および0.7 ppbの吸入暴露を行うことができた。

本研究では、農薬として使用されているダイアジノンを対象として、極低濃度レベルでの吸入暴露方法の開発を試みた。すなわち、ダイアジノンの室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮し、0.02、0.07および0.2 ppbを目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った。

B. 研究方法

ダイアジノンを0.02、0.07および0.2 ppbの濃度で動物に吸入暴露する方法を開発するために、下記の方法により検討を行った。

1 ダイアジノンの吸入暴露システム

1) ダイアジノンの吸入暴露装置の概要

吸入暴露装置のシステムを図1に示した。吸入暴露装置は、①ダイアジノン蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャリア空気の流量制御装置（図1のA）、②ダイアジノン蒸気の発生装

置（図1のB）、③ダイアジノン蒸気を一次希釈装置に送気するための配管（図1のC）、④ダイアジノン蒸気を新鮮空気と混合・希釈するための一次希釈装置（図1のD）、⑤一次希釈したダイアジノン蒸気の高濃度の吸入チャンバーへの供給量を調整するフローコントロールバルブと流量計（図1のE）⑥一次希釈したダイアジノン蒸気をさらに新鮮空気と混合・希釈するためのラインミキサー（図1のF）、⑦動物をダイアジノン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー（図1のG）、⑧濃度測定のためのサンプリング装置（図1のH）を作製した。

2) 吸入チャンバー

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状になった角型のチャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。吸入チャンバーは、各群（0.02 ppb暴露群、0.07 ppb暴露群、0.2 ppb暴露群および対照群）につき1台、計4台を用いた。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ（1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H) mm）を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

2 被験物質

ダイアジノン（CAS No. : 333-41-5、別名 :

チオリン酸 O , O -ジエチル- O -(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジル)) は、下記の試薬を使用した。

製造元：Sigma-Aldrich Corporation

ロット番号：8170X、SZE8170X

純度：98.3% (製造元FID分析値)

性状：特徴的な臭気のある淡黄色の油状液体

沸点：83～84℃

蒸気圧： 9.0×10^{-5} mmHg (25℃)

0.012 Pa (25℃)

比重：1.1

保存条件：冷蔵保存 (120℃以上の温度では分解する)。

使用したダイアジノンの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N) を用いて調べた結果、ダイアジノンに相当する分子イオンピーク及びフラグメントピーク (McLafferty 1994) を確認した。

3 ダイアジノンの発生方法の検討

1) ダイアジノンの発生方法の検討

ダイアジノンは常温で液体である。また、蒸気圧は0.012 Pa (25℃) であり、揮発しにくいだが、少量は気化する。このため、ダイアジノンを空気中でバブリングし、発生する蒸気を利用する方法を選択した。

発生容器内でダイアジノン蒸気が再凝集することを防ぐために、平成20年度にパラジクロロベンゼンの発生装置のために開発した口金内にキャリア空気を流すタイプの発生容器を用いた (図2)。

バブリング部分の素材については、平成21年度に微小な泡を安定して発生させることができることがわかったゴアテックスチューブ

(ジャパングアテックス株式会社、GORE™チューブTB005、内径 5.00 ± 0.30 mm、肉厚 0.60 ± 0.05 mm、最大孔径 $3.5 \mu\text{m}$ 、穿孔率 $70 \pm 5\%$) を使用した (図3)。

発生容器を入れる恒温槽の温度については、ダイアジノンは120℃以上で分解するため、できるだけ低い温度でバブリングする必要があり、室温に近い25℃に設定した。しかし、発生濃度が安定しないため、恒温槽の温度条件について検討した。

発生空気は、新鮮空気を使用した。分解の可能性を検討するため、窒素ガスを発生空気とすることを検討した。

その他、バブリングにより発生させたダイアジノン蒸気中の変性、分解産物の存在の可能性について検討した。

2) ダイアジノンの濃度制御の方法の検討

目標吸入暴露濃度である0.02、0.07および0.2 ppbに濃度制御する方法について、ダイアジノン蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャリア空気の流量を制御する装置を試作し、各流量の設定のための検討を行った。

4 吸入チャンバー内のダイアジノンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 ppbで、6時間と22時間の暴露を行い、下記の方法により吸入チャンバー内のダイアジノンの濃度を測定した。

1) 被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学製)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポ

ンプの吸引流量は1 L/分(6時間暴露)および0.3 L/分(22時間暴露)とした(NIOSH 1994)。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。

2) 捕集管の前処理及び分析条件

捕集管の活性炭(1層)を取り出し、各々、かつ色バイアルビン(日電理化学硝子製)に入れ、アセトン(和光純薬工業製、特級)2 mLを加え、蓋をしてダイレクトミキサー(サーマル化学産業製)を用いて1時間振とうした。その後、バイアルビン(Agilent Technologies社製 2 mL用バイアルビン)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(Agilent Technologies社製 7890A)により測定した。

ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはDB-5(0.25 mmφ × 50m)、キャリアガスはヘリウムを用い、カラム温度は80°C(2min)→(20°C/min)→270°C(1min)、注入口温度は250°C、検出器温度は250°C、検出器はFPD、試料注入量は1μLとした。

C. 研究結果

試作したダイアジノンの吸入暴露装置を図2から5に示した。

1 ダイアジノンの発生方法

恒温槽内に設置した発生容器(図5)にダイアジノンを入れ、発生空気(HEPAフィルターで濾過した空気)を流しバブリングすることにより、ダイアジノン蒸気を発生させた。

発生容器内でダイアジノン蒸気が再凝集することを防ぐために、口金内にキャリア空気を流すタイプの発生容器を用いた結果、発生容器内でダイアジノンの再凝集は認められず、この発生容器がダイアジノン蒸気の発生にも利用できることが確認できた。

微量のダイアジノンを安定して気化させるためには、微小な気泡によりバブリングすることが必要である。この目的のために、バブリング部分の素材としてゴアテックスチューブを用いた。その結果、ゴアテックスチューブの採用により微小な泡が安定して発生することが確認できた(図4)。

2 ダイアジノンの濃度制御の方法

目標吸入暴露濃度である0.02、0.07および0.2 ppbに濃度制御する方法について、ダイアジノン蒸気の発生装置へ送るバブリングのための発生空気とキャリア空気の流量、恒温槽の温度の設定条件を決定するために、設定条件を修正しながら試運転を行った。

なお、一次希釈空気の流量は20 L/分とした。また、一次希釈したダイアジノン蒸気各濃度の吸入チャンバーへの供給量は、目標濃度の比に合わせ、0.02 ppb暴露群が1 L/分、0.07 ppb暴露群が3.5 L/分、0.2 ppb暴露群が10 L/分とした。吸入チャンバーへの新鮮空気の供給量は、換気回数が12回/時を確保できるように各吸入チャンバーとも212 L/分とした。

各設定条件の試運転により、下記の結果を得た(表1)。

設定条件1: 発生空気の流量を0.50 L/分、キャリア空気の流量を0.50 L/分、恒温槽の温度を25°C、ダイアジノン蒸気の再加熱温度を25°Cとし、6時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 ppbの吸入チャンバーの実測値は、それぞれ0.003±0.001(目標濃度に対し16%)、0.053±0.003(目標濃度に対し75%)および0.235±0.011(目標濃度に対し117%)であった。0.02と0.07 ppb群は目標濃度より低値、0.2 ppb群は目標濃

度に近い値であり、各濃度群の目標濃度との比に整合性がなかった。

設定条件 2：再現性を調べるため設定条件 1 と同条件で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.010 ± 0.002 (目標濃度に対し 48%)、 0.072 ± 0.005 (目標濃度に対し 103%) および 0.312 ± 0.007 (目標濃度に対し 156%) であった。設定条件 1 と同条件での運転であったが、各濃度群とも前回より高い濃度になり、再現性が得られなかった。

再現性が得られなかった原因として、ダイアジノン蒸気が配管や吸入チャンバー内面に吸着した可能性があるため、下記の検討を行った。

- ① 暴露終了の翌日、換気のみ行いながら、発生装置の出口、配管の末端部、吸入チャンバー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析した。
- ② ①の測定の後、吸入チャンバーの内面をアルコール噴霧し、高圧洗浄機で洗浄。その後換気のみ行いながら吸入チャンバー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析した。

①、②とも、ダイアジノンは検出されなかった。従って、ダイアジノン蒸気が配管や吸入チャンバー内面に吸着した可能性は少ないと考えられた。

設定条件 3：空気のバブリングによって、ダイアジノンが変性あるいは分解した蒸気が発生した可能性を考え、発生空気とキャリア空気を新鮮空気から窒素ガスに変更し、設定条件 1 と同条件で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ $0.021 \pm$

0.000 (目標濃度に対し 103%)、 0.192 ± 0.009 (目標濃度に対し 275%) および 0.535 ± 0.031 (目標濃度に対し 268%) であり、前回および前々回よりもさらに高い値になった。

設定条件 4：発生空気とキャリア空気を窒素ガスから新鮮空気に戻し、設定条件 1 と同条件で再度 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.030 ± 0.002 (目標濃度に対し 151%)、 0.348 ± 0.012 (目標濃度に対し 497%) および 1.199 ± 0.013 (目標濃度に対し 599%) であり、さらに高い値になった。

以上のように、設定条件 1 から設定条件 4 では安定したダイアジノン蒸気の発生を行うことができなかった。そこで、発生容器を入れた恒温槽の温度条件（設定条件 1 から設定条件 4 では 25℃）について、検討した。これまでのバブリングによる発生法では、蒸気の発生を安定させるために恒温槽の温度を室温より高い条件で行ってきた（加温バブリング法）。しかし、ダイアジノンの保存条件は、冷蔵保存であることから、加温バブリング法を採用せず、室温より低い温度でバブリングする方法について検討した（図 5）。

設定条件 5：恒温槽の温度を 20℃とし、発生空気の流量とキャリア空気の流量をこれまでの設定条件と同じ 0.50 L/分とし 3 時間の暴露運転を行った。なお、ダイアジノン蒸気の再加熱温度は 23℃とした。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.019 ± 0.000 (目標濃度に対し 96%)、 0.183 ± 0.013 (目標濃度に対し 258%) および 0.640 ± 0.011 (目標濃度に対し 320%) であり、前回より目標濃度に近い値にな

った。

設定条件 6：恒温槽の温度を下げ 15℃とした。また、発生空気の流量を 0.20 L/分、キャリア空気の流量を 0.40 L/分に下げ、14 時間の暴露運転を行った。ダイアジノン蒸気の再加熱温度は 23℃とした。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.040 ± 0.002 （目標濃度に対し 198%）、 0.117 ± 0.013 （目標濃度に対し 167%）および 0.321 ± 0.005 （目標濃度に対し 160%）であり、前回より目標濃度に近い値になり、また、各設定濃度における目標濃度と実測値の比が近くなった。

設定条件 7：恒温槽の温度をさらに下げ 10℃とした。また、発生空気とキャリア空気の流量を 0.26 L/分とし、6 時間の暴露運転を行った。ダイアジノン蒸気の再加熱温度は 23℃とした。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.021 ± 0.002 （目標濃度に対し 103%）、 0.069 ± 0.002 （目標濃度に対し 99%）および 0.198 ± 0.004 （目標濃度に対し 99%）であり、各濃度群とも、目標濃度に近似した条件が得られた。

設定条件 8：22 時間暴露での有効性を確認するために、設定条件 7 と同条件で 22 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.018 ± 0.000 （目標濃度に対し 92%）、 0.066 ± 0.001 （目標濃度に対し 95%）および 0.211 ± 0.003 （目標濃度に対し 106%）であり、22 時間暴露でも、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られることを確認した。

3 吸入チャンバー内のダイアジノンの濃度測定の方法

目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb で、6 時間および 22 時間の暴露を行い、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、暴露全時間にわたる 6 時間または 22 時間とした。その結果、各濃度とも 6 時間および 22 時間採気の両者で活性炭第 2 層へのダイアジノンの移行は認められず、破過はなかった。また、同時に採気した 3 本の捕集管の測定値は、各濃度とも 20% 以内であり、安定した結果が得られた。

D. 考察

ダイアジノン室内濃度指針値である 0.02 ppb を考慮し、0.02、0.07 および 0.2 ppb を目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った結果について、以下に考察する。

ダイアジノンの発生装置については、ダイアジノンの特性、すなわち、常温で液体であり、蒸気圧は 0.012 Pa (25℃) であり、揮発しにくい少量は気化するため、ダイアジノンを空気でバブリングし、発生する蒸気を利用する方法を選択した。

このバブリング法による吸入暴露装置の試運転をした結果、発生容器を入れた恒温槽の温度を室温に 25℃ に設定した場合には、チャンバー内のダイアジノン濃度を安定させることができなかった。この理由として、配管や吸入チャンバー内面へのダイアジノンの吸着の可能性が考えられた。しかし、換気のみ行いながら、発生装置の出口、配管の末端部、吸入チャンバー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析したが、ダイアジノンは検出されなかった。また、吸入チャンバー内の洗浄を行った後、再度運転

したがダイアジノン濃度は安定しなかった。これらのことから、配管や吸入チャンバー内面へのダイアジノンの吸着が濃度の不安定性の原因とは考えられなかった。また、空気のパブリングによって、ダイアジノンが変性あるいは分解した蒸気が発生した可能性について検討するため、キャリア空気を新鮮空気から窒素ガスに変えて暴露運転を行ったが、不安定性の改善はみられなかった。このため、発生容器を入れた恒温槽の温度条件について検討した。これまでの極低濃度暴露の研究では、キシレン、テトラデカン、クロロピリホスについて、発生容器を入れる恒温槽の温度を室温または室温以上の温度にしてパブリングする方法である加温パブリング法を採用し、目的の暴露濃度を得ることができていた。ダイアジノンの保存条件は、冷蔵保存であることから、加温パブリング法を採用せず、室温より低い温度でパブリングする方法（冷却パブリング法）の可否について検討した。その結果、恒温槽の温度を10℃に冷却してパブリングする条件下で、6時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 ppbの吸入チャンバーの実測値がそれぞれ0.021±0.002（目標濃度に対し103%）、0.069±0.002（目標濃度に対し99%）および0.198±0.004（目標濃度に対し99%）、22時間の暴露運転でも目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 ppbの吸入チャンバーの実測値がそれぞれ0.018±0.000（目標濃度に対し92%）、0.066±0.001（目標濃度に対し95%）および0.211±0.003（目標濃度に対し106%）になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた。従って、冷却パブリング法によって、ダイアジノンの室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮した

0.02、0.07および0.2 ppbを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できることがわかった。

なお、発生容器内でダイアジノン蒸気が再凝集することを防ぐために、口金内にキャリア空気を流すタイプの発生容器が有効であることが確認できた。また、微量のダイアジノンを安定して気化させるために、パブリング部分の素材として、ゴアテックスチューブが有効であることが確認できた。

吸入チャンバー内のダイアジノン濃度は固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管（XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc）に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からダイアジノンを溶媒抽出しガスクロマトグラフを用いて分析した。捕集時間は、6時間、22時間捕集とも破過が起きないことから暴露開始から終了までの全時間とするのが適切と考えられた。また、同時に測定した捕集管の間の測定値のばらつきは20%以内であり、安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のダイアジノン濃度は、最低濃度である0.02 ppbでも測定が可能であり、今回の方法はダイアジノンの極低濃度暴露実験で吸入チャンバー内の濃度の把握に有効であった。

以上のように、ダイアジノンを被験物質とし、室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮した0.02、0.07および0.2 ppbを目標暴露濃度として暴露技術の開発を行ない、その実用性について検証した。その結果、冷却パブリング法により気化させる方法がダイアジノンの極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

E. 結論

化学物質を極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発を目的として、ダイアジノンを対象として室内濃度指針値 (0.02 ppb) を考慮した濃度で動物に全身暴露する方法の開発を試みた。その結果、冷却・バブリングする方法により0.02、0.07および0.2 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。

参考文献

- NIOSH. 1994. Manual of analytical methods, 4th ed
- McLafferty FW. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. New York:John Wiley and Sons
- F. 研究発表
1. 論文発表
- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 783 - 795.
- Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 48: in press
- Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.
- Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.
- Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 452-459.
- Take, M., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Matsumoto, M., Nagano, K., Hirota, T., Fukushima, S: Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats. *J of Environmental Science and Health Part A*, 2010, 45: 1616-1624.
- Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T, Nagano, k., Arito, H. and

Fukushima S.: Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats. Inhalation Toxicology, 2010, 22: 1116-1126.

2. 学会発表

相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回強制気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リンパ節への移行と病理組織変化、2010年、第83回日本産業衛生学会

相磯成敏、斎藤美佐江、妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、戸谷忠雄、長野嘉介、福島昭治：気管内投与した多層カーボンナノチューブの体内動態：2010年、第25発癌病理研究会

浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会

浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、2010年、第39回日本環境変異原学会

片桐卓、高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：多層カーボンナノチューブで処理した培養細胞(CHL/IU細胞、BALB/c3T3細胞)の走査電子顕微鏡による観察：2011年、第27回日本

毒性病理学会

妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：1-ブロモ-3-クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変：2011年、第27回日本毒性病理学会

高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、長野嘉介、福島昭治：気管内投与による多層カーボンナノチューブの脳内移行：2011年、第27回日本毒性病理学会

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のダイアジノンの濃度

	設定条件 1	設定条件 2	設定条件 3	設定条件 4
恒温槽の温度	25℃	25℃	25℃	25℃
発生空気の流量	0.50 L/分	0.50 L/分	0.50 L/分	0.50 L/分
キャリア空気の流量	0.50 L/分	0.50 L/分	0.50 L/分	0.50 L/分
一次希釈空気の流量	20 L/分	20 L/分	20 L/分	20 L/分
再加熱温度	25℃	25℃	25℃	25℃
目標濃度 0.02 ppb				
一次希釈ガスの供給量	1 L/分	1 L/分	1 L/分	1 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.003 ±0.001 (16%)	0.010 ±0.002 (48%)	0.021 ±0.000 (103%)	0.030 ±0.002 (151%)
目標濃度 0.07 ppb				
一次希釈ガスの供給量	3.5 L/分	3.5 L/分	3.5 L/分	3.5 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.053 ±0.003 (75%)	0.072 ±0.005 (103%)	0.192 ±0.009 (275%)	0.348 ±0.012 (497%)
目標濃度 0.2ppb				
一次希釈ガスの供給量	10 L/分	10 L/分	10 L/分	10 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.235 ±0.011 (117%)	0.312 ±0.007 (156%)	0.535 ±0.031 (268%)	1.199 ±0.013 (599%)
暴露時間	6 時間	6 時間	6 時間	6 時間
備考		設定条件 1 と同条件 暴露終了後に、 換気のみで分 析、吸入チャン バーを洗浄	発生空気とキャ リア空気を窒素 ガスに変更	発生空気とキャ リア空気を新鮮 空気に戻す

網掛け: 変更した設定条件

表 1 (続き) 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のダイアジノンの濃度

	設定条件 5	設定条件 6	設定条件 7	設定条件 8
恒温槽の温度	20°C	15°C	10°C	10°C
発生空気の流量	0.50 L/分	0.20 L/分	0.26L/分	0.26 L/分
キャリア空気の流量	0.50 L/分	0.40 L/分	0.26 L/分	0.26L/分
一次希釈空気の流量	20 L/分	20 L/分	20 L/分	20 L/分
再加熱温度	23°C	23°C	23°C	23°C
目標濃度 0.02 ppb				
一次希釈蒸気の供給量	1 L/分	1 L/分	1 L/分	1 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.019 ±0.000 (96%)	0.040 ±0.002 (198%)	0.021 ±0.002 (103%)	0.018 ±0.000 (92%)
目標濃度 0.07 ppb				
一次希釈蒸気の供給量	3.5 L/分	3.5 L/分	3.5 L/分	3.5 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.183 ±0.013 (258%)	0.117 ±0.013 (167%)	0.069 ±0.002 (99%)	0.066 ±0.001 (95%)
目標濃度 0.2ppb				
一次希釈蒸気の供給量	10 L/分	10 L/分	10 L/分	10 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
測定値 ppb (目標濃度に対する%)	0.640 ±0.011 (320%)	0.321 ±0.005 (160%)	0.198 ±0.004 (99%)	0.211 ±0.003 (106%)
暴露時間	3 時間	14 時間	6 時間	22 時間
備考				22 時間暴露の 確認

網掛け: 変更した設定条件

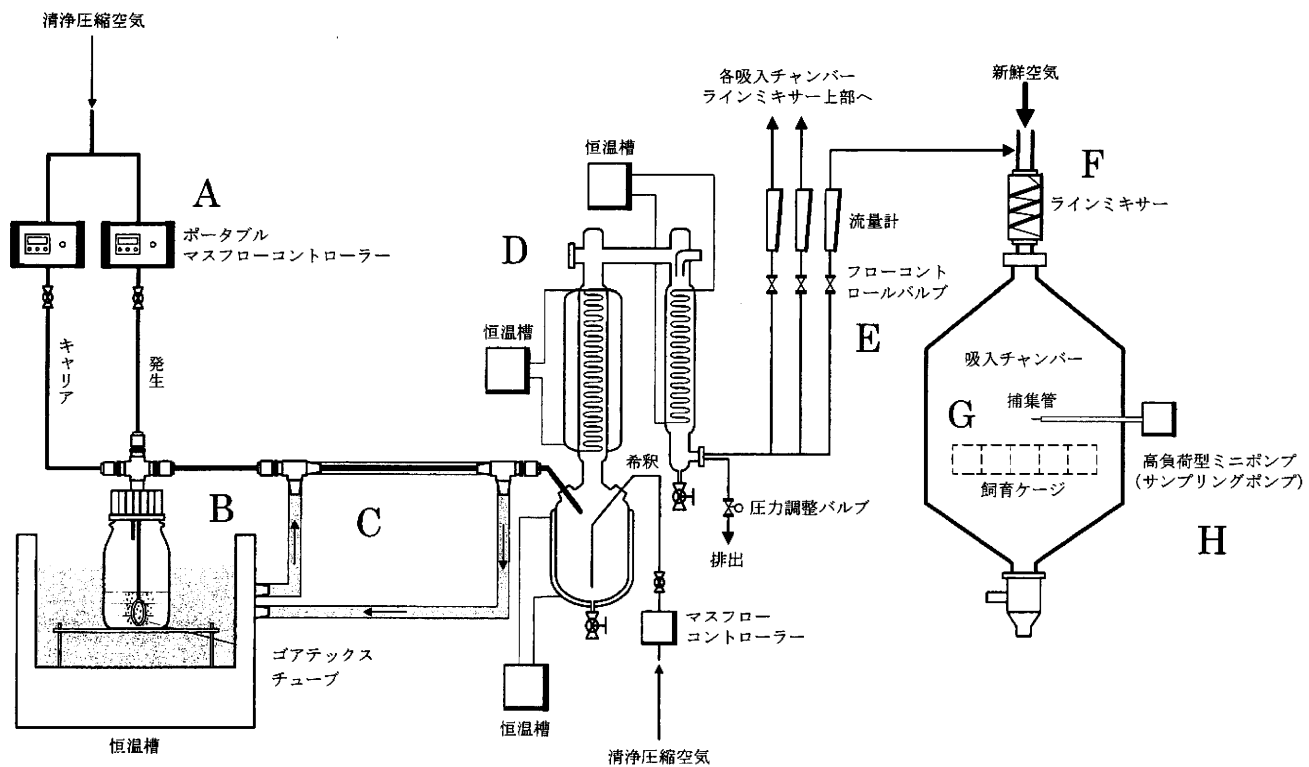


図1 吸入暴露装置のシステム (ダイアジノン)

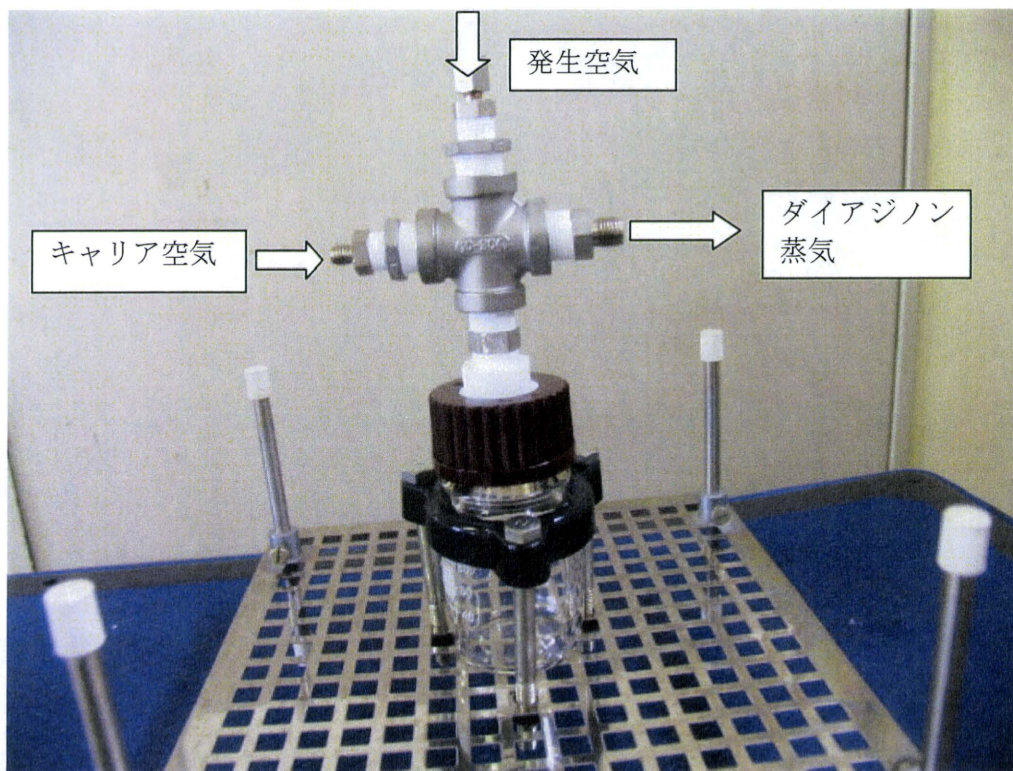


図2 ダイアジノンの発生容器

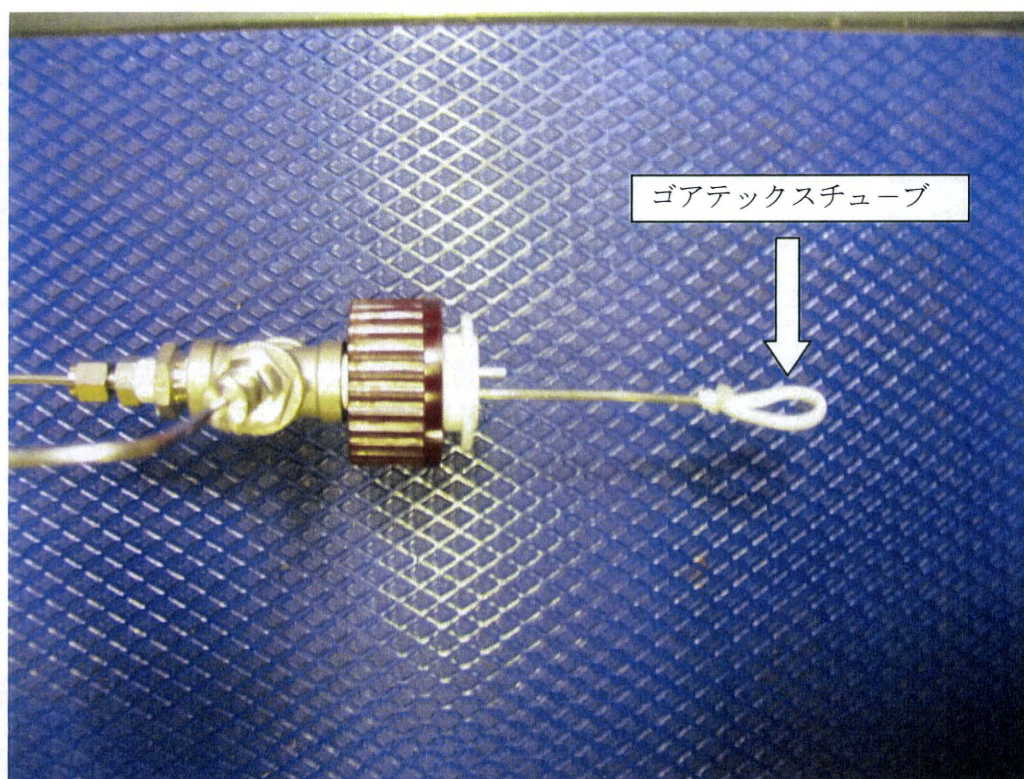


図3 ゴアテックスチューブ (矢印) を装着したバブリング部分

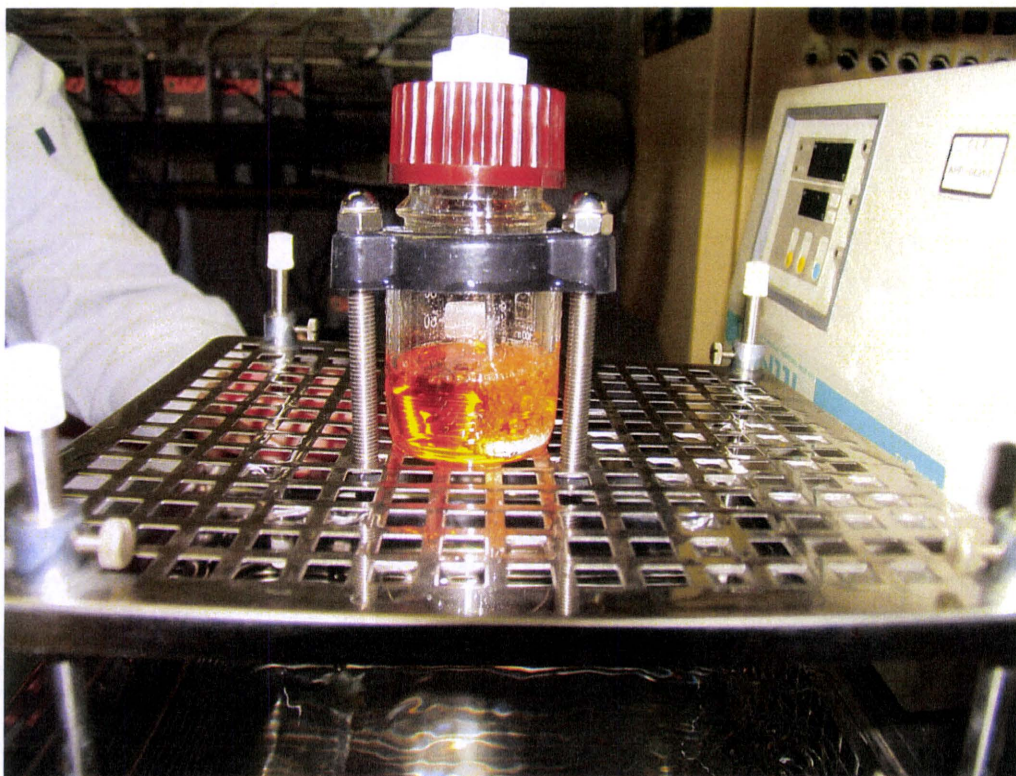


図4 ゴアテックスチューブによるダイアジノンの気泡の発生状態

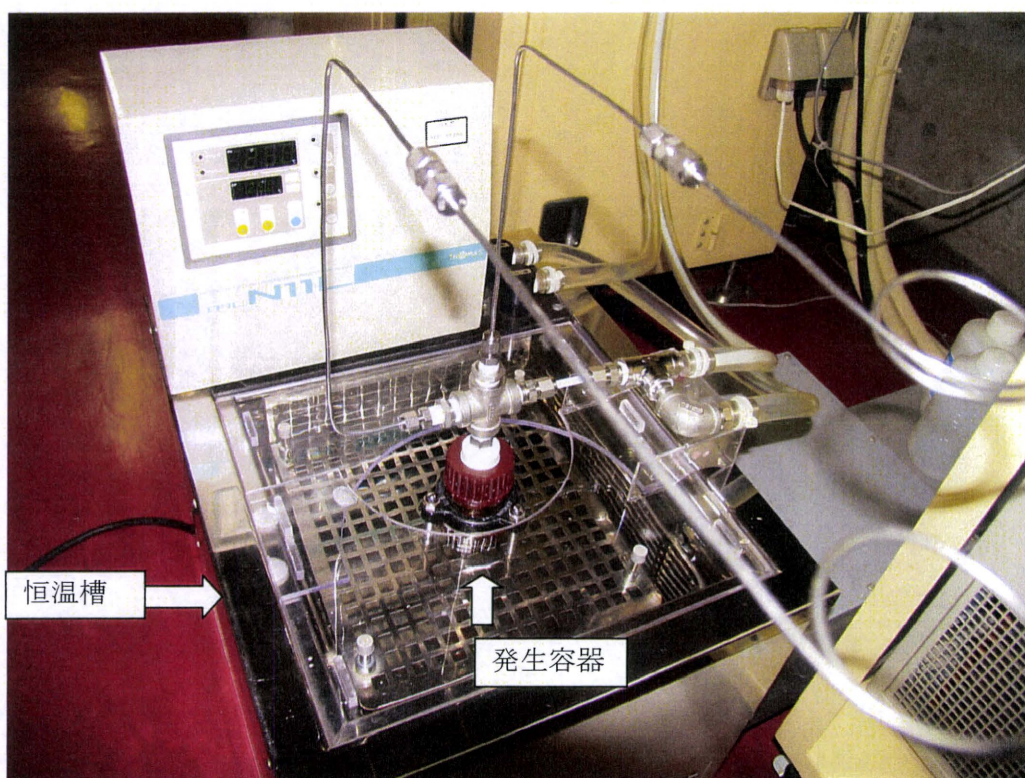


図5 恒温槽内に設置したダイアジノンの発生容器

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Matsuyama M, Miura Y, Kiwamoto T, Moriya A, Kokuho N, Shimizu K, Otsuka S, Hijikata M, Keicho N, Hayashihara K, Saito T	A case of familial pulmonary Mycobacterium avium complex disease.	Internal Med	49 (10)	949 - 953	2010
Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Promjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K.	Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis	Genes Immun	11	416 - 422	2010
Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I.	CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid.	J Gastroenterol	46 (3)	339 - 349	2011
Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y.	Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus.	Biol Reprod.	84 (4)	734 - 742	2011
Atsushi Baba, Fumiaki Ohtake, Yosuke Okuno, Kenichi Yokota, Maiko Okada, Yuuki Imai, Min Ni, Clifford A Meyer, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Myles Brown, and Shigeaki Kato	Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex.	Nature Cell Biology			accept -ed
菅野 純	Percellome トキシコゲノミ クスの進捗	医学のあゆみ	236 (12)	1125 - 1126	2011
Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A and Saga Y	The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.	Development	137	1515 - 1522	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Matsuyama M, Miura Y, Kiwamoto T, Moriya A, Kokuho N, Shimizu K, Otsuka S, Hijikata M, Keicho N, Hayashihara K, Saito T	A case of familial pulmonary Mycobacterium avium complex disease.	Internal Med	49 (10)	949 - 953	2010
Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Promjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K.	Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis	Genes Immun	11	416 - 422	2010
Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I.	CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid.	J Gastroenterol	46 (3)	339 - 349	2011
Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y.	Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus.	Biol Reprod.	84 (4)	734 - 742	2011
Atsushi Baba, Fumiaki Ohtake, Yosuke Okuno, Kenichi Yokota, Maiko Okada, Yuuki Imai, Min Ni, Clifford A Meyer, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Myles Brown, and Shigeaki Kato	Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex.	Nature Cell Biology			accept -ed
菅野 純	Percellome トキシコゲノミクスの進捗	医学のあゆみ	236 (12)	1125 - 1126	2011
Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A and Saga Y	The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.	Development	137	1515 - 1522	2011

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.	Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats.	Industrial Health	48	783 - 795	2010
Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.	Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats.	Industrial Health			accept-ed
Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.	Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers.	Journal of Occupational Health,	52	155 - 166	2010
Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.	Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats.	Journal of Occupational Health			in press
Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.	Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats.	Industrial Health	48	452 - 459	2010
Take, M., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Matsumoto, M., Nagano, K., Hirota, T., Fukushima, S	Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats.	J of Environmental Science and Health Part A	45	1616 - 1624	2010
Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima S.	Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats.	Inhalation Toxicology	22	1116 - 1126	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

A Case of Familial Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Disease

Masashi Matsuyama¹, Yukiko Miura¹, Takumi Kiwamoto¹, Ataru Moriya¹,
Nariaki Kokuho¹, Kei Shimizu¹, Shigeo Otsuka¹, Minako Hijikata²,
Naoto Keicho², Kenji Hayashihara¹ and Takefumi Saito¹

Abstract

We report one Japanese familial line in which there were three pulmonary MAC patients and one suspected patient over two generations, most of whom were diagnosed with the nodular/bronchiectatic type. In all patients, life circumstances and bacterial strains differed at the time of diagnosis. This suggests that the genes thought to affect patient susceptibility to pulmonary MAC disease may be involved in this family line. Comprehensive genotypic analysis of the *CFTR* gene, HLA typing, and analysis of the *NRAMP1* polymorphisms were performed in seven members of this family. The results suggest that female sex and menopause might be associated with onset of pulmonary MAC of the nodular/bronchiectatic type, and HLA-A26 antigen and diabetes mellitus might be involved in disease exacerbations.

Key words: familial pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease, HLA-A26 antigen, menopause, *CFTR*, *NRAMP1*

(Inter Med 49: 949-953, 2010)

(DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3023)

Introduction

Mycobacterium avium complex (MAC) lung disease is becoming increasingly prevalent, particularly the nodular/bronchiectatic type in patients with no pre-existing structural lung disease. Genetic defects have been suggested in familial cases; the sibling risk for nodular/bronchiectatic type pulmonary MAC is much higher than the population prevalence (1, 2).

Familial pulmonary MAC disease reports are very rare (2, 3). Most previous reports of pulmonary MAC disease susceptibility genes have been case-control studies of unrelated subjects, looking for polymorphisms in *HLA*, *CFTR*, and *NRAMP1* (4-11). To the best of our knowledge, this is the first report of familial pulmonary MAC disease with comprehensive genotypic analysis of the *CFTR* gene, HLA typing, and analysis of the *NRAMP1* polymorphisms. The present family included three patients and one sus-

pected patient over two generations, most of whom had nodular/bronchiectatic type pulmonary MAC. Since each patient's life circumstances and bacterial strains differed at the time of pulmonary MAC diagnosis, genes or unknown factors affecting susceptibility to pulmonary MAC disease might have been involved. Thus, the clinical manifestations and genetic polymorphisms of the pulmonary MAC disease patients and healthy family members were analyzed to identify factors implicated in the development and exacerbation of pulmonary MAC disease.

Abbreviations: *NRAMP1*: natural resistance-associated macrophage protein, *CFTR*: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, HLA: human leukocyte antigen

Case Report

Figure 1 shows the family tree. The following individuals underwent detailed assessment: Case 1 (69-year-old woman, No. 1); Case 2 (No. 2), 2nd older sister of Case 1; sus-

¹Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization, Ibaraki-Higashi National Hospital, Ibaraki and ²Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo

Received for publication October 15, 2009; Accepted for publication January 28, 2010

Correspondence to Dr. Masashi Matsuyama, brwck573@yahoo.co.jp