

7 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1007	28.0	1.653
	1008	30.1	1.857
	1009	29.3	1.718
200ppb 群	1107	27.7	1.591
	1108	27.8	1.524
	1109	29.8	1.180
700ppb 群	1207	27.0	1.411
	1208	29.5	1.711
	1209	27.8	1.573
2000ppb 群	1307	29.8	1.779
	1308	27.5	1.437
	1309	27.4	1.614

暴露終了翌日解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1010	27.0	1.506
	1011	27.2	1.487
	1012	26.5	1.503
200ppb 群	1110	27.1	1.522
	1111	28.2	1.559
	1112	25.7	1.350
700ppb 群	1210	28.9	1.478
	1211	28.4	1.080
	1212	28.3	1.540
2000ppb 群	1310	26.9	1.509
	1311	26.3	1.471
	1312	29.7	1.660

表 6 剖検所見 (22時間暴露)

1 日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1001	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし
200ppb 群	1101	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし
700ppb 群	1201	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1301	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし

3 日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1004	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし
200ppb 群	1104	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし
700ppb 群	1204	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1304	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし

7日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1007	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし
200ppb 群	1107	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし
700ppb 群	1207	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1307	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし

暴露終了翌日解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1010	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし
200ppb 群	1110	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし
700ppb 群	1210	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1310	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし

表 7 病理組織所見 (22時間暴露)

1 日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1001	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし
200ppb 群	1101	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし
700ppb 群	1201	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1301	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし

3 日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1004	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし
200ppb 群	1104	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし
700ppb 群	1204	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1304	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし

7 日目解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1007	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし
200ppb 群	1107	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし
700ppb 群	1207	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1307	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし

暴露終了翌日解剖

群	動物番号	肺	肝臓
対照群	1010	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし
200ppb 群	1110	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし
700ppb 群	1210	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし
2000ppb 群	1310	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし

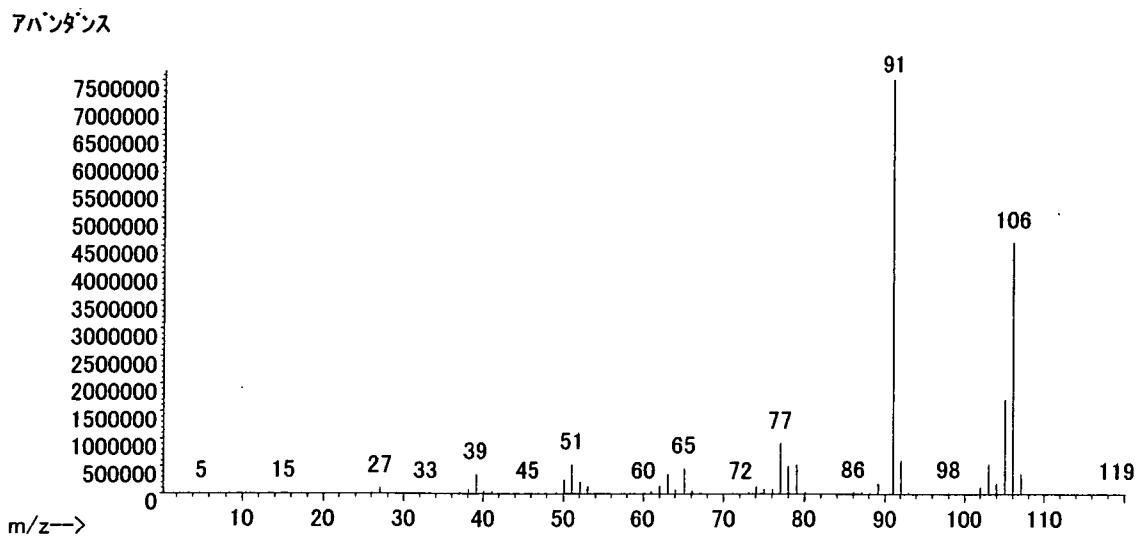


図 1-1-A 被験物質のマススペクトル (σ 体)

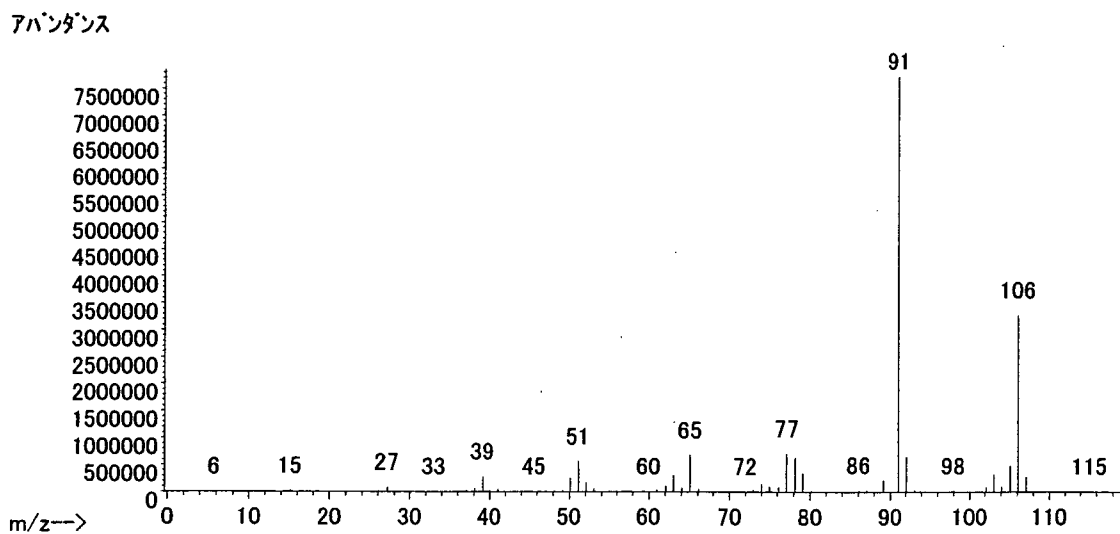


図 1-1-B 被験物質のマススペクトル (m 体)

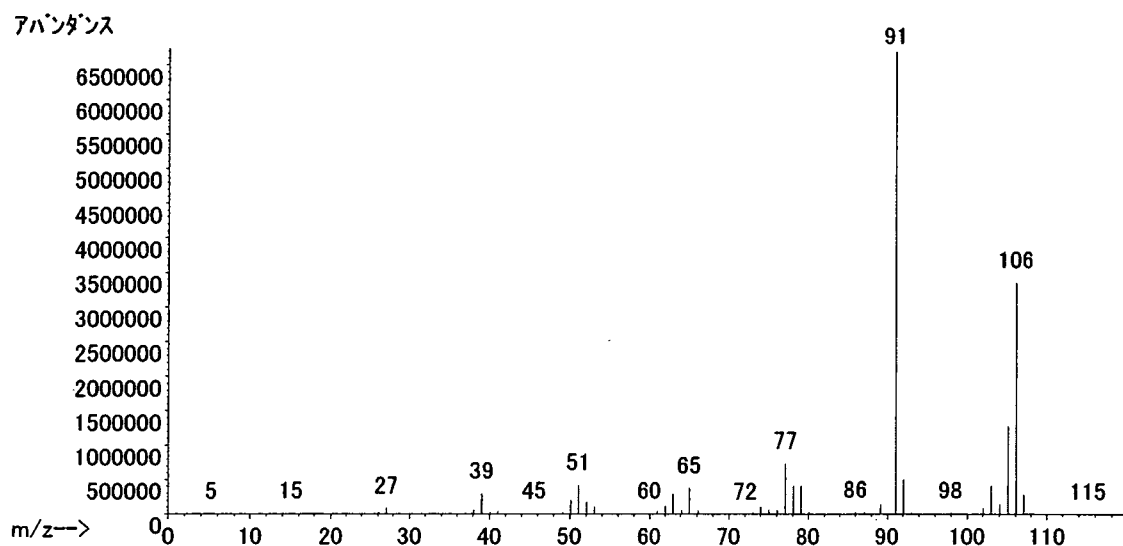


図 1-1-C 被験物質のマススペクトル (p-体)

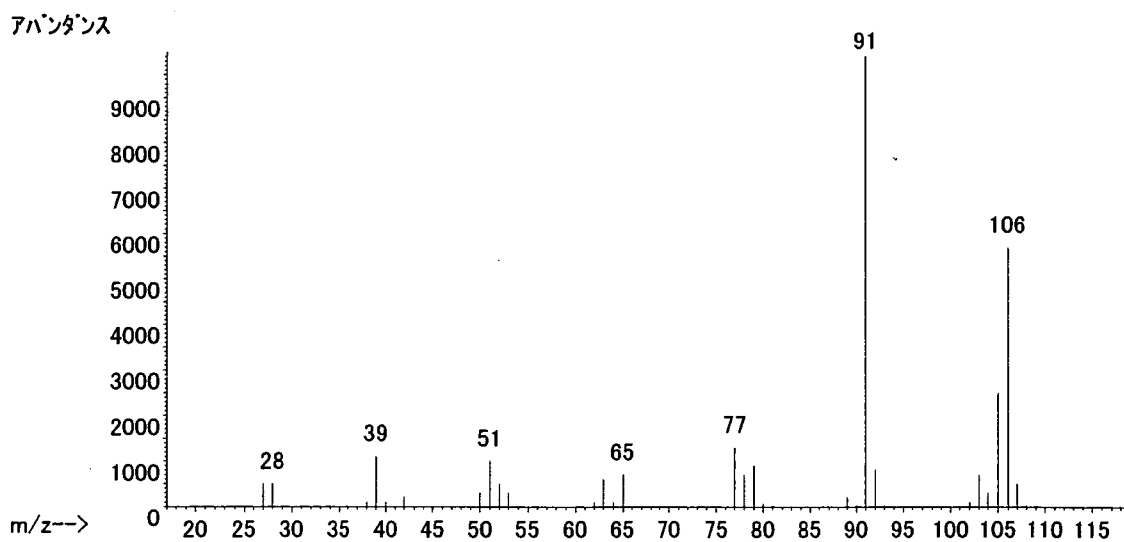


図 1-2 キシレンのマススペクトル (文献1)

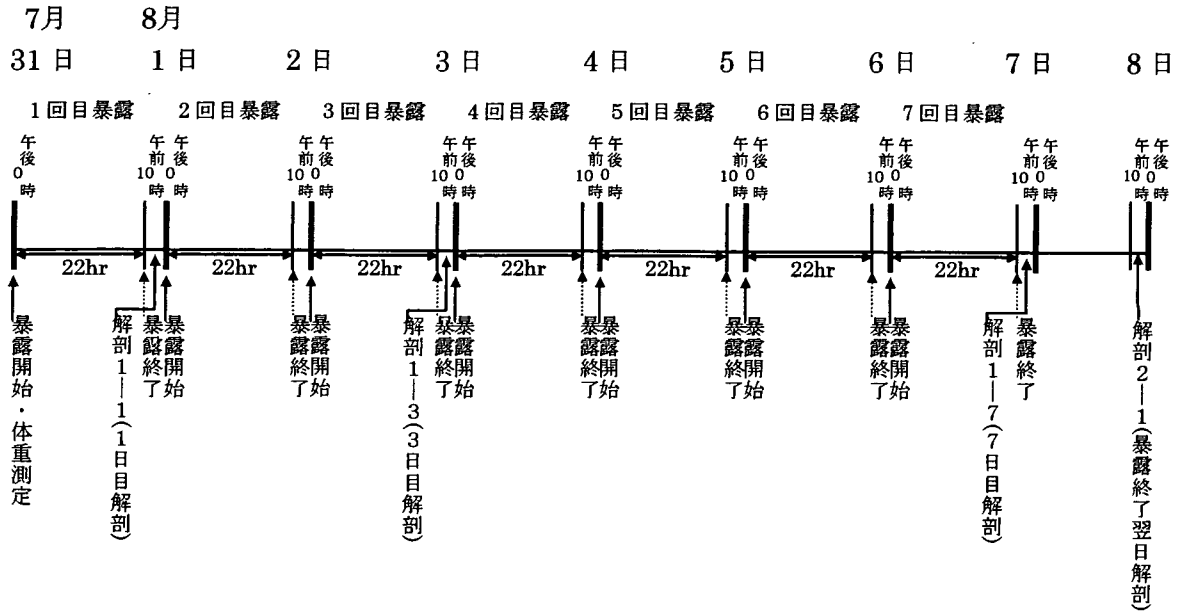


図 2 試験スケジュール (22 時間暴露)

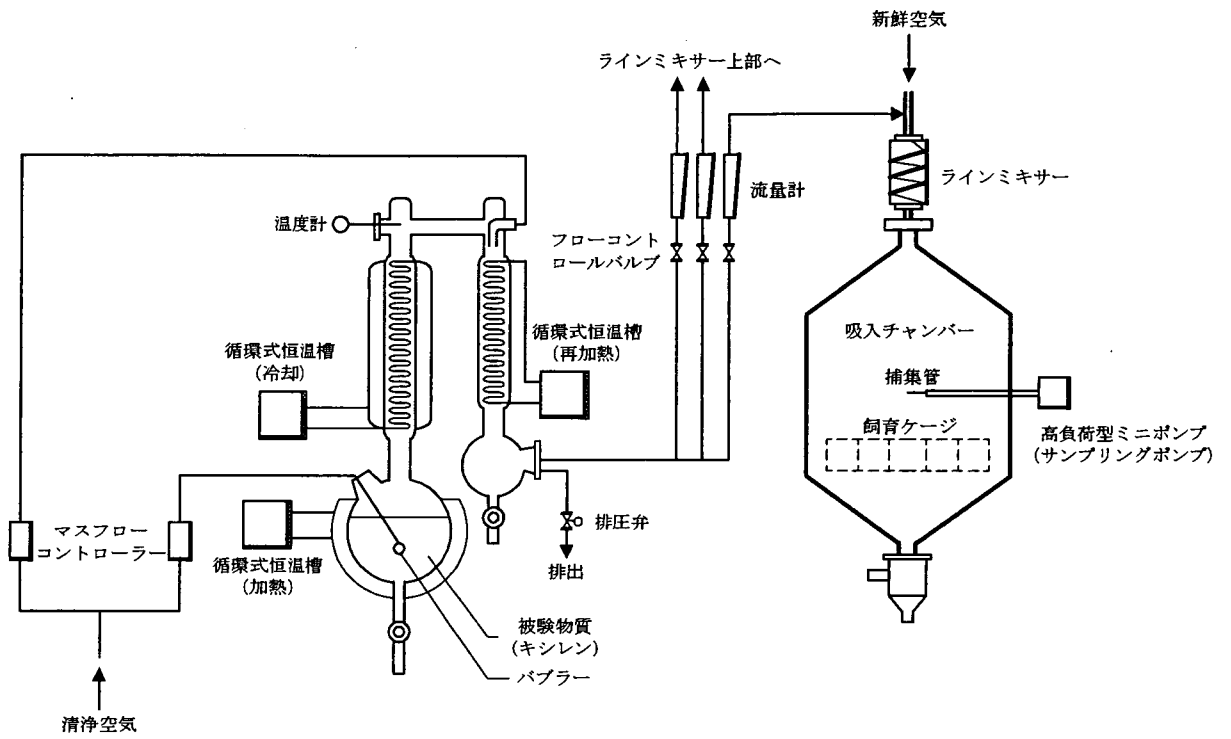


図 3 吸入装置のシステム

委託研究報告書

Ⅲ) スチレンのマウスを用いた極低濃度暴露試験

(6時間/日、7日間暴露)

試験番号：0687

CAS No. 100-42-5

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

標題

スチレンのマウスを用いた極低濃度暴露試験（6時間／日、7日間暴露）

試験目的

化学物質の極低濃度暴露による生体影響検出の技術開発を目的として、生活環境中の濃度に即した極低濃度のスチレン（被験物質番号 1211）をマウスに6時間／日、7日間全身暴露（経気道投与）し、遺伝子発現解析用の肺及び肝臓組織を採取する。採取した肺及び肝臓は試験委託者に送付する。

試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究センター
毒性部 小川 幸男
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

試験施設及び運営管理者

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
長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2007年 4月 23日
動物導入日	2007年 5月 10日
動物馴化開始日	2007年 5月 16日
群構成日	2007年 5月 23日
被験物質投与開始日	2007年 5月 23日
被験物質投与終了日	2007年 5月 29日
定期解剖日	2007年 5月 23日 (1回目暴露終了時解剖) 2007年 5月 24日 (1日目解剖) 2007年 5月 26日 (3日目解剖) 2007年 5月 30日 (7日目解剖)
試験終了日	2008年 1月 25日

試験関係者一覧

試験責任者	:	長野 嘉介	(試験管理部、(兼)病理検査部)
被験物質の分析・ 投与・管理	:	西沢 共司 笠井 辰也 齋藤 新 大西 誠 武 信	(試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 分析室) (試験管理部 分析室)
動物管理	:	野口 忠 片桐 卓 上垣外智之 佐々木俊明	(試験管理部 動物管理室) (試験管理部 動物管理室) (試験管理部 動物管理室) (試験管理部 動物管理室)
病理検査	:	相磯 成敏 妹尾 英樹 梅田 ゆみ 齋藤美佐江	(病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室)
データ処理及び統計	:	伊川 直樹 石川 寛明 峯 多加志	(企画調整部 情報管理室) (企画調整部 情報管理室) (企画調整部 情報管理室)

試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、その他本試験に係る試資料は、試資料保管施設に保管する。

保管期間は、最終報告書提出後、原則として5年間とする。なお、この期間にあっても標本については品質が評価に耐え得る期間保管する。

試験責任者（最終報告書作成者）の署名及び日付

長野 嘉介

2008年 1月 25日

陳 述 書

試験名：スチレンのマウスを用いた極低濃度暴露試験（6時間／日、7日間暴露）

本試験は、試験計画書（試験番号 0687）に基づき実施された。

本報告書はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

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

試験責任者 長野 嘉介
2008年 1月 25日

運営管理者 長野 嘉介
2008年 1月 25日

要約

化学物質の極低濃度暴露による生体影響検出の技術開発を目的として、生活環境中の濃度に即した極低濃度のスチレンを C57BL/6 Cr Slc 雄マウスに 6 時間/日、7 日間全身暴露（経気道投与）し、遺伝子発現解析用の肺及び肝臓組織を採取した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群 12 匹、合計 48 匹のマウスを用いた。暴露濃度は、50、150 及び 500 ppb とした。対照群は清浄空気による換気のみとした。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により測定した。1 回目暴露終了時、並びに暴露開始後 1 日目、3 日目及び 7 日目に各群 3 匹の動物を解剖し、肺と肝臓から遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルを採取するとともに、病理組織学的検査用サンプルを採取した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0、50、150 及び 500 ppb に対し、測定値の平均±偏差（最低～最高値）は、それぞれ 0 ± 0 ppb（全期間とも 0 ppb）、 47 ± 5 ppb（44 ppb～55 ppb）、 145 ± 6 ppb（132 ppb～149 ppb）及び 488 ± 18 ppb（469 ppb～516 ppb）であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肺及び肝臓に特記すべき所見を認めなかった。遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルは試験委託者に送付した。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : スチレン(Styrene)

CAS No. : 100-42-5

I-1-2 示性式及び分子量

示 性 式 : $C_6H_5CH=CH_2$

分 子 量 : 104.15

I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 無色の液体

沸 点 : 145~146°C

蒸 気 圧 : 0.67kPa (20°C)

比 重 : 0.9059 (20°C)

I-2 被験物質の使用ロット等

性 状 : 高圧標準ガス (120 L ボンベ、充填量 0.9 Mpa)

標準ガスボンベの濃度 : 150 ppm 相当 (高千穂商事(株) 検査成績書データ)

製 造 元 : 高千穂商事(株)

使用ロット番号 (濃度) (使用期間) :

GMY16812(146 ppm) (2007/5/23~2007/5/24)

GMY16809(147 ppm) (2007/5/25~2007/5/26)

GMY16810(151 ppm) (2007/5/27~2007/5/28)

GMY16811(148 ppm) (2007/5/29)

保管条件 : 室温で保管 (516 室)

I-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、GC/MS (Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N) を用いて定性した。その結果、スチレ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 (文献 1) を確認した (図 1)。

I-4 試験動物

動物は、日本エスエルシー (株) (静岡県浜松市湖東町 3371 番地の 8) 春野支所の C57BL/6 Cr Slc マウス (SPF) の雄を使用した。

1 回目暴露終了時、1 日目及び 3 日目解剖動物は、48 匹を 10 週齢 (2007 年 3 月 1~2

日生まれ)で導入し、検疫(6日間)、馴化(1週間)を実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い36匹(群構成時体重範囲、24.1~28.2g)を選別し、試験に用いた。7日目解剖動物は、21匹を9週齢(2007年3月8~9日生まれ)で導入し、検疫(6日間)、馴化(1週間)を実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い12匹(群構成時体重範囲、23.6~25.6g)を選別し、試験に用いた。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露した。

II-1-3 投与期間

投与期間は1日6時間暴露(50 ppb群;午後0時30分から午後6時30分、150 ppb群;午後0時15分から午後6時15分、500 ppb群;午後0時から午後6時)で最長7日間とし、1回目暴露終了時、暴露開始後1日目、3日目及び7日目の解剖群を設けた。試験スケジュールを図2に示した。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、50、150及び500 ppbの3段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は室内環境での暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、継続暴露による影響を検索するため、最長7日間とし、1回目暴露終了時、暴露開始後1日目、3日目及び7日目の解剖群を設けた。投与時間は、通常の吸入試験で採用されている1日6時間とした。また、投与時刻は、「スチレンのマウスを用いた極低濃度暴露試験(22時間/日、7日間暴露)、試験番号0688」に合わせ、50 ppb群は午後0時30分から午後6時30分、150 ppb群は午後0時15分から午後6時15分、500 ppb群は午後0時から午後6時とした。

投与濃度はスチレンの室内濃度指針値である50 ppbを考慮して、50、150及び500 ppbの3段階(公比約3)に設定した。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

吸入装置のシステムを図 3 に示した。スチレン標準ガスを吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、新鮮空気と混合することにより、設定濃度の被験物質を吸入チャンバーに送り込んだ。スチレン標準ガスのラインミキサーへの供給量は、流量計を用いて調節した。

なお、新鮮空気は HEPA フィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。

II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定した。

(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)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(ORBO™-100 Adsorbent、SUPELCO 製)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 0.5 L/分とした。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ 6 時間とした。捕集管の暴露 1 回当たりの使用本数は、対照群は 1 本、暴露群は各濃度とも 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層及び2層)を取り出し、各々、かつ色バイアルびん(柴田科学製)に入れ、トルエン(和光純薬工業製、∞Pure) 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。500 ppb 群の活性炭 1 層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。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(ヒューレットパッカード社製 HP5890A)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-1 (0.53 mmφ × 60m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器は FID を用い、カラム温度は 100°C、注入口温度は 200°C、検出器温度は 200°C、試料注入量は 1 μL とした。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群 12 匹の動物を用いた。また、1 回目暴露終了時、暴露開始後 1 日目、3 日目及び 7 日目の解剖期を設けた。

群番号	群名称	解剖期	雄 使用動物数(動物番号)
0	対照群	1回目暴露終了時解剖	3匹 (1001~1003)
		1日目解剖	3匹 (1004~1006)
		3日目解剖	3匹 (1007~1009)
		7日目解剖	3匹 (1010~1012)
1	50 ppb 群	1回目暴露終了時解剖	3匹 (1101~1103)
		1日目解剖	3匹 (1104~1106)
		3日目解剖	3匹 (1107~1109)
		7日目解剖	3匹 (1110~1112)
2	150 ppb 群	1回目暴露終了時解剖	3匹 (1201~1203)
		1日目解剖	3匹 (1204~1206)
		3日目解剖	3匹 (1207~1209)
		7日目解剖	3匹 (1210~1212)
3	500 ppb 群	1回目暴露終了時解剖	3匹 (1301~1303)
		1日目解剖	3匹 (1304~1306)
		3日目解剖	3匹 (1307~1309)
		7日目解剖	3匹 (1310~1312)

II-2-2 群分け及び個体識別方法

群分けは、投与開始日に行った。供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物を体重の重い順より各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した。ただし、7日目解剖動物は週齢が他の解剖期の動物と異なるため、試験番号4422として別途群構成を行った。

動物の個体識別は、検疫期間、馴化期間及び投与期間ともケージに個体識別番号を記したラベルを付すことにより行った。なお、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示した。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（516室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。また、吸入チャンバー内環境の実測値を<最低値～最高値>と表 1～3 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度 : 検疫室 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
吸入試験室 ; $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$
吸入チャンバー内 ; $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$ < $21.9^{\circ}\text{C} \sim 22.1^{\circ}\text{C}$ >

湿度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$
吸入チャンバー内 ; $30 \sim 70\%$ < $51.9\% \sim 53.7\%$ >

明暗サイクル : 12 時間点灯(8:00～20:00) / 12 時間消灯(20:00～8:00)

換気回数 : 検疫室 ; 15～17 回/時
吸入試験室 ; 5～7 回/時
吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回/時

圧力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

吸入チャンバー容積 : 1060L

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ ($112(\text{W}) \times 212(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}$ /匹)

馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ ($95(\text{W}) \times 116(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}$ /匹)

投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ ($100(\text{W}) \times 116(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}$ /匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場 : 千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30KGy- γ 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター (東京都渋谷区元代々木町 52-1) の分析データを使用ロットごとに入手し、試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に依頼して、水道法を参考にし、規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法