

3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
0.07ppb 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
0.21ppb 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
0.7ppb 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

7日目解剖

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
0.07ppb 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
0.21ppb 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
0.7ppb 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(6時間暴露)

1回目暴露終了時解剖

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
0.07ppb 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
0.21ppb 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
0.7ppb 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

1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
0.07ppb 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
0.21pb 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
0.7ppb 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

3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
0.07ppb 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
0.21ppb 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
0.7ppb 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

7日目解剖

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
0.07ppb 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
0.21ppb 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
0.7ppb 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

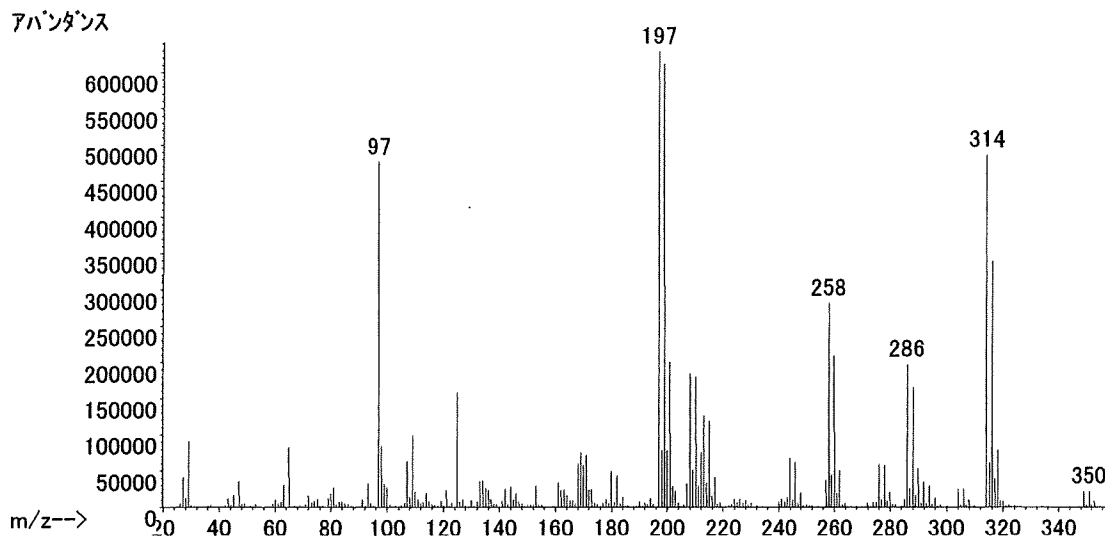


図 1-1 被験物質のマススペクトル

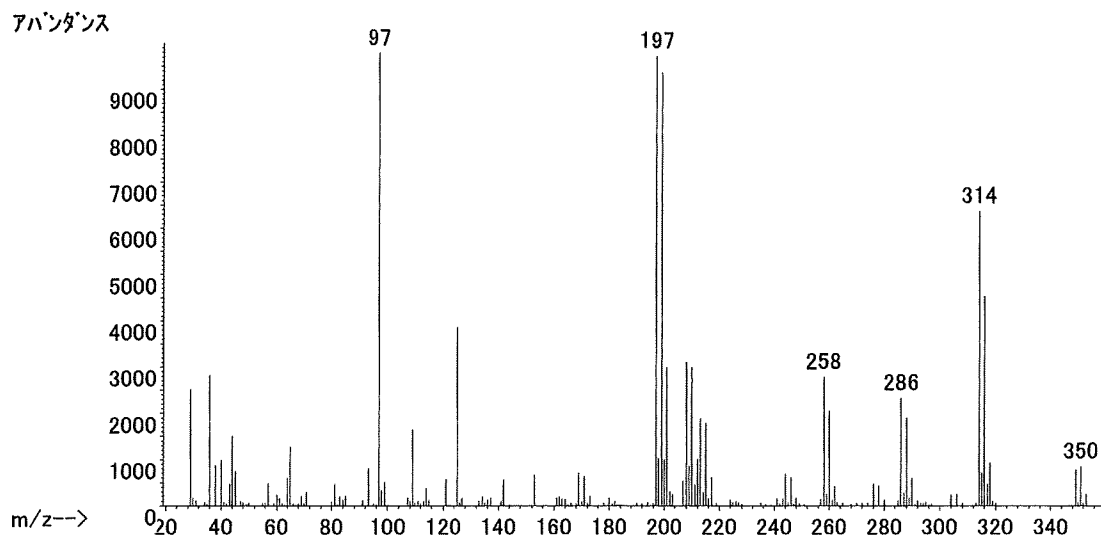


図 1-2 クロルピリフォスのマススペクトル(文献1)

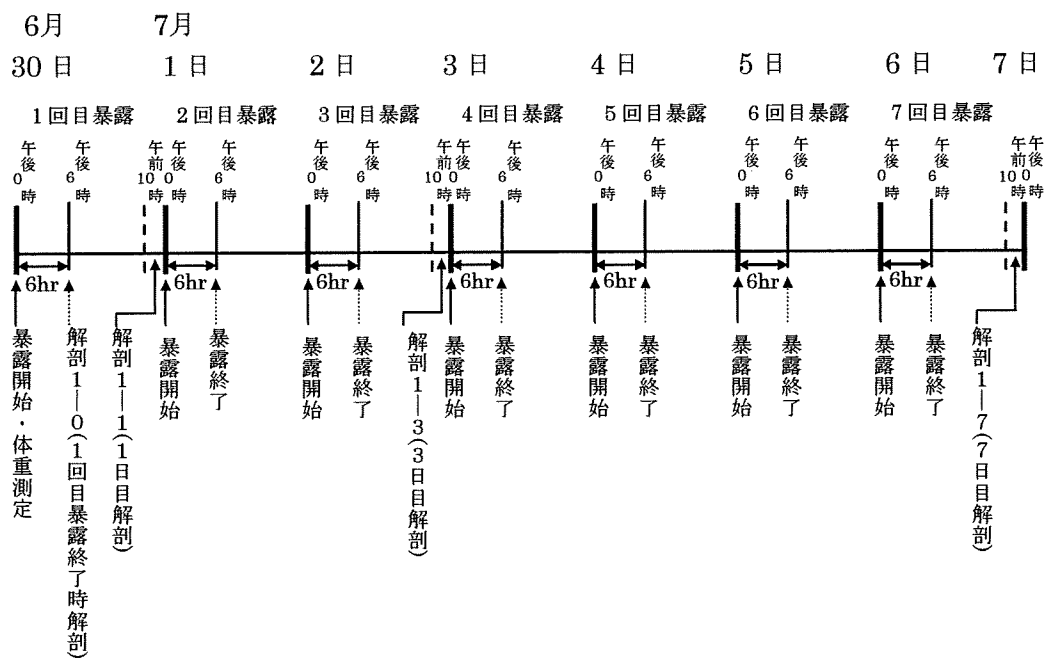


図 2 試験スケジュール(6時間暴露)

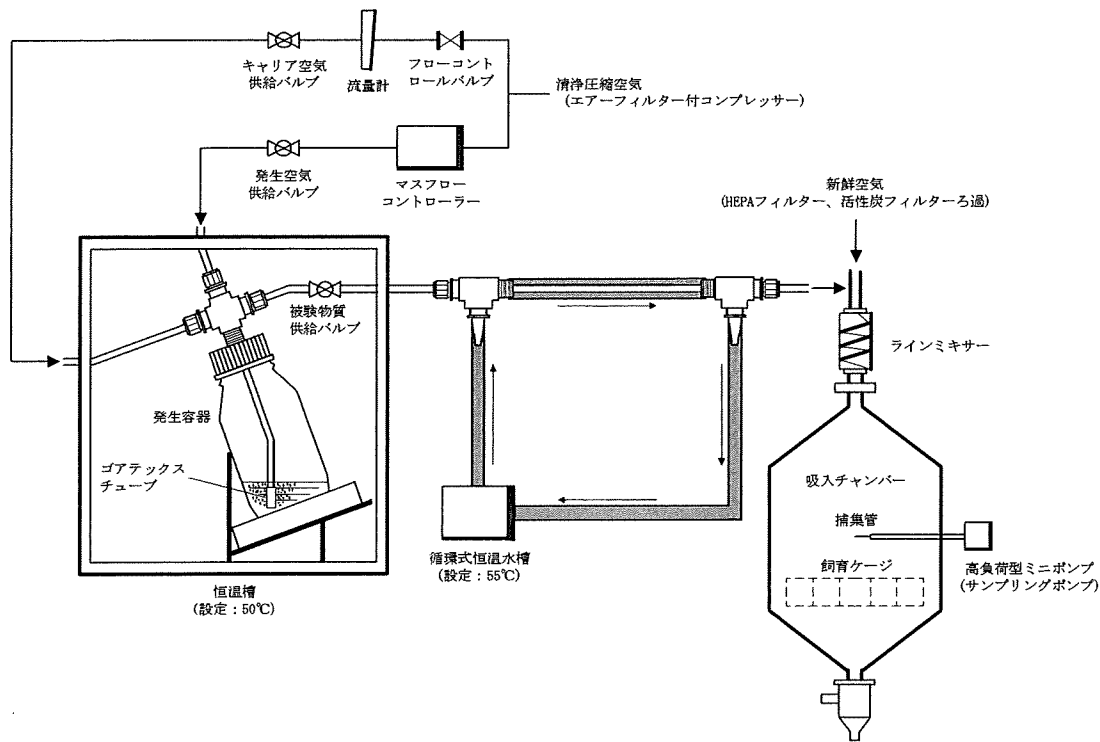


図 3 吸入装置のシステム

委託研究報告書

Ⅱ) クロルピリフォスのマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(22 時間／日、7 日間暴露)

試験番号：0742

CAS No. 2921-88-2

2009 年 12 月 17 日

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

クロルピリフォス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クロルピリフォス（被験物質番号 1237）をマウスに 22 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	2009年 6月 15日
動物導入日	2009年 7月 1日
動物馴化開始日	2009年 7月 7日
群構成日	2009年 7月 14日
被験物質投与開始日	2009年 7月 14日
被験物質投与終了日	2009年 7月 21日
定期解剖日	2009年 7月 15日 (1日目解剖) 2009年 7月 17日 (3日目解剖) 2009年 7月 21日 (7日目解剖) 2009年 7月 22日 (暴露終了翌日解剖)
試験終了日	2009年 12月 17日

試験関係者一覧

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

2009年 12月 17日

陳 述 書

試験名：クロルピリフォス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）

本試験は、試験計画書（試験番号 0742）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
2009 年 12 月 17 日

運営管理者 長野嘉介
2009 年 12 月 17 日

クロルピリフォスのマウスを用いた極低濃度暴露試験報告書

(22 時間／日、7 日間暴露)

試験番号 : 0742

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クロルピリフォスを C57BL/6 Cr Slc 雄マウスに 22 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、0.07、0.21 及び 0.7 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。暴露開始後 1 日目、3 日目、7 日目及び暴露終了翌日に各群 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 0.07、0.21 及び 0.7 ppb に対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 0 ± 0 ppb（全期間とも 0 ppb）、 0.070 ± 0.006 ppb（0.053 ppb～0.115 ppb）、 0.247 ± 0.004 ppb（0.200 ppb～0.317 ppb）及び 0.750 ± 0.014 ppb（0.687 ppb～0.867 ppb）であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肺と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

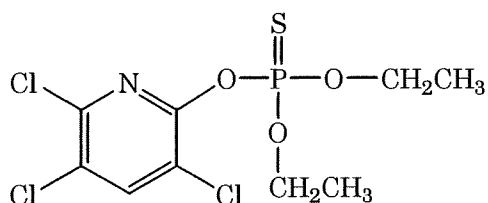
名 称： クロルピリフォス(chlorpyrifos)

別 名： O,O-ジエチル-O-3,5,6-トリクロロ-2-ピリジルフォスホロチオエート、
O,O-ジエチル-O-(3,5,6-トリクロロ-2-ピリジニル)フォスホロチオエート)

CAS No. : 2921-88-2

I-1-2 構造式及び分子量

構 造 式 :



分 子 量 : 350.59

I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 白色の結晶

融 点 : 36~38℃

沸 点 : 沸点以下 160℃で分解する

蒸 気 圧 : 0.0024 Pa(25℃)

I-2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : TRC(株)

ロット番号 : 3-ABY-19-1

純 度 : 98.0% (TRC(株)測定値)

保 管 条 件 : 冷蔵保管

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、クロルピリフォス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

日本チャールス・リバー (株) 筑波飼育センター (茨城県新治郡八郷町大字上林 955) の C57BL/6J マウス (SPF) の雄を使用した。

1 日目及び 3 日目解剖動物は、29 匹を 10 週齢 (2009 年 4 月 22 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 24 匹（群構成時体重範囲、24.5～27.8g）を選別し、試験に用いた。7 日目及び暴露終了翌日解剖動物は、29 匹を 9 週齢（2009 年 4 月 28 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 24 匹（群構成時体重範囲、24.3～27.2g）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 22 時間暴露（0.07 ppb 群；午後 0 時 30 分から翌日午前 10 時 30 分、0.21 ppb 群；午後 0 時 15 分から翌日午前 10 時 15 分、0.7 ppb 群；午後 0 時から翌日午前 10 時）で最長 7 日間とし、暴露開始後 1 日目、3 日目、7 日目及び暴露終了翌日の解剖群を設けた。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、0.07、0.21 及び 0.7 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、暴露開始後 1 日目、3 日目、7 日目及び暴露終了翌日の解剖群を設けた。投与時間は、室内環境での暴露形態（24 時間）から、動物の飼育作業に要する時間（2 時間）を差し引いて、1 日 22 時間とした。また、投与時刻は、解剖時間を午前 10 時から 12 時とするため、0.07 ppb 群は午後 0 時 30 分から翌日午前 10 時 30 分、0.21 ppb 群は午後 0 時 15 分から翌日午前 10 時 15 分、0.7 ppb 群は午後 0 時から翌日午前 10 時とした。

投与濃度はクロルピリフォスの室内濃度指針値である 0.07 ppb を考慮して、0.07、0.21 及び 0.7 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。クロルピリフォスは常温で白色結晶状の固体（融点：36～38℃）であるため、恒温槽（SNS-112S、いすゞ製作所製）に収納した発生容器内で融解（50℃）させ、液体とした。末端を閉じたゴアテックス製チューブ（最大孔径 3.5 μm）（GORE™ チューブ、ジャパンゴアテックス製）をクロルピリフォス溶液に浸し、これに清浄空気（発生空気）を通気し、バブリングすることでクロルピリフォス蒸気を発生させた。さらに、この蒸気を発生容器出口で清浄空気（搬送空気）と混合し、全量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。なお、恒温槽出口からラインミキサーまでのクロルピリフォス供給配管は、循環式恒温水槽（55℃）（CU-85, WB-K1、柴田科学製）を用いて保温した。対照群は新鮮空気の換気のみとし、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。

初日及び 2 日目の暴露は予備暴露により決定した供給流量を用いて行い、3 日目以降は機器分析による濃度結果を基にして供給流量を微調整した。暴露中はこの流量を維持した。

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、動物を収容した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 0.3 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 22 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、投与群は各濃度とも 3 本とした。

(2) 捕集管の前処理及び分析条件

捕集管の充填剤（1 層）を取り出し、各々、かつ色バイアルビン（日電理化硝子製）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。0.7 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 GC/MS（Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N）により測定した。

GC/MS の分析条件は、カラムは DB-1（0.25 mmφ × 60m）、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は 100℃→(10℃/min)→250℃(15min)、注入口温度は 200℃、イオン源温度は 230℃、フラグメントピークは 197m/z、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、暴露開始後 1 日目、3 日目、7 日目及び暴露終了翌日の解剖期を設けた。

群番号	群名称	解剖期	雄 使用動物数(動物番号)
0	対照群	1 日目解剖	3 匹 (1001~1003)
		3 日目解剖	3 匹 (1004~1006)
		7 日目解剖	3 匹 (1007~1009)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1010~1012)
1	0.07 ppb 群	1 日目解剖	3 匹 (1101~1103)
		3 日目解剖	3 匹 (1104~1106)
		7 日目解剖	3 匹 (1107~1109)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1110~1112)
2	0.21 ppb 群	1 日目解剖	3 匹 (1201~1203)
		3 日目解剖	3 匹 (1204~1206)
		7 日目解剖	3 匹 (1207~1209)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1210~1212)
3	0.7 ppb 群	1 日目解剖	3 匹 (1301~1303)
		3 日目解剖	3 匹 (1304~1306)
		7 日目解剖	3 匹 (1307~1309)
		暴露終了翌日解剖	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 日目及び暴露終了翌日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 4478 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±2℃ 吸入試験室 ; 21±2℃ 吸入チャンバー内 ; 20～24℃ <22.0℃～22.4℃>
湿度	: 検疫室 ; 55±15% 吸入チャンバー内 ; 30～70% <48.7%～55.1%>
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～-15×10Pa
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(W)×212(D)×120(H) mm/匹) 馴化期間 ; ステンレス製6連網ケージ (95(W)×116(D)×120(H) mm/匹) 投与期間 ; ステンレス製5連網ケージ (100(W)×116(D)×120(H) 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、水道法を参考にして規

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

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死の確認及び一般状態の観察を毎日1回行った。

II-3-2 体重測定

解剖時に体重を測定した。

II-3-3 病理学的検査

(1) 解剖

各解剖期とも午前10時から12時の間に解剖した。

動物は、エーテル麻酔下で腋窩部の切断により放血屠殺した後、病理組織検査と遺伝子発現解析に供する臓器を肝臓、胸腔臓器の順に摘出した。開胸は肝臓の摘出後とし、胸腔臓器の摘出に先立ちRNA later® 2.0 mLを気管から肺に注入(18G針付き2.5 mLシリンジを使用)した。摘出した胸腔臓器から気管、食道、心臓、胸腺、肺副葉を外して肺(左肺と右肺)を採取した。解剖・臓器の摘出に際しては、遺伝子発現解析を妨げないよう、白衣、マスク及びヘアキャップを着用し、動物の被毛や器具の清拭により術者の唾液・汗や毛髪等による汚染及び動物の被毛や消化管内容等による汚染が起きないように配慮した。麻酔からサンプリングの終了までの所要時間は5分以内とした。

(2) 剖検

全ての解剖動物について、肝臓と肺の肉眼的観察を行った。

(3) 臓器重量

全ての解剖動物について、肝臓の湿重量を測定した。

(4) 病理組織学的検査

全ての解剖動物の肺と肝臓について、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

II-3-4 サンプルの採取

(1) 肝臓からのサンプルの採取

全ての解剖動物について、下記の方法により、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、病理組織検査用サンプルを採取した。

(1) -1 RNA 用サンプルの採取

生検用トレパン (5mm 径) にて肝臓の内側右葉 (胆嚢のついている葉) を 3カ所打ち抜き、total RNA 精製用として別々のチューブ (あらかじめ風袋重量を測定済み) の RNA *later*® に浸漬し、氷上に移した。サンプル採取終了後、4℃に一晩放置後-80℃で凍結保存した。

(1) -2 病理組織検査用サンプルの採取

外側左葉を門脈部で他の葉から切り離し、横軸方向に割入れし、外側左葉以外の葉と共に 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

(2) 肺からの採取

全ての解剖動物について、下記の方法により、肺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、病理組織検査用サンプルを採取した。

左肺と右肺をそれぞれ体軸方向に二分割 (肺門側と末梢側) した。左肺と右肺の肺門側を病理組織検査用サンプルとし、左肺と右肺の末梢側を RNA 用サンプルとした。RNA 用サンプルは、胸腔に付けたままで肺に RNA *later*® の注入を行い、1 mL の RNA *later*® を入れたサンプルチューブに採取した肺を漬け、解剖中は氷上に置いた。その後、4℃に一晩放置後-80℃で凍結保存した。病理組織検査用サンプルは、薄切面を下にしてろ紙に貼り付けてから、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

II-3-5 遺伝子発現解析のためのサンプルの保存

肝臓と肺の RNA 用サンプルは 4℃で一晩保存後、超低温庫 (-80℃) で凍結して委託者に返送するまで保存した。

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppb を単位として測定し、表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

臓器実重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示す桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。