

平均値±標準偏差、最小～最大値) はそれぞれ、 0.0385 ± 0.0095 ppm (0.022～0.057 ppm)、 0.1241 ± 0.0304 ppm (0.082～0.192 ppm)、 0.4097 ± 0.1084 ppm (0.260～0.636 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ 96.3%、103.4%、102.4%となり、各濃度群ともほぼ目標濃度が得られた。従って、加熱法によって、パラジクロロベンゼンの室内濃度指針値である 0.04 ppm を考慮した 0.04、0.12 および 0.40 ppm を目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた (図 7C)。

また対照群チャンバー内にパラジクロロベンゼンは検出されなかった。

・(環境省、2003)

環境省環境保健部環境安全課「平成 14 年度地方公共団体等における有害大気汚染物質のモニタリング調査結果(表 7)」(2003)
http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mo_n_h14/hyo_07.html

・(国土交通省、2003)

国土交通省住宅局住宅生産課「平成 14 年度室内空気中の化学物質の実態調査の結果について(2003)
http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/071219_.html

D. 結論

平成25年度(今年度)は、パラジクロロベンゼン(指針値: 0.04 ppm)について極低濃度下(0、0.04、0.12及び0.40 ppm)での6時間/日×7日間反復、22時間/日×7日間反復、及び22時間/日×28日間反復吸入暴露をマウスに対して実施した。その結果、0.04、0.12および0.40 ppmの目標暴露濃度に対して、前二者の場合は、それぞれ 0.0397 ± 0.001 、 0.117 ± 0.003 、 0.399 ± 0.009 及び、 0.0390 ± 0.002 、 0.123 ± 0.002 、 0.402

± 0.007 、後者のプロトコールでは、 0.0385 ± 0.0095 、 0.1241 ± 0.0304 、 0.4097 ± 0.1084 (平均値±標準偏差)と、ほぼ目標暴露濃度(96.3～103.4%)にて、パラジクロロベンゼンをマウスに安定して吸入暴露することができた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, and Kodama Y, Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci* 38: 643-654, 2013.

2. 学会発表

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクス、第 40 回日本毒性学会学術年会(2013.6.18.)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety: A flavor, estragole appears to be a PPAR-alpha agonist, The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013.7.3.), Seoul, Korea

種村健太郎、五十嵐 勝秀、古川佑介、大塚まき、白形芳樹、相崎 健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野 純、発生～発達期マウスへの低用量ビスフェノールA暴

露による晩発中枢影響解析、第 40 回日本トキシコロ
ロジー学会学術年会 (2013.6)

五十嵐 勝秀、種村健太郎、古川佑介、大塚まき、
森山紀子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発達
期における GABA シグナルの一過性活性化による遅
発中枢神経系影響の解析、第 40 回日本トキシコロ
ロジー学会学術年会 (2013.6)

Kentaro Tanemura, Katsuhide Igarashi, Yusuke
Furukawa, Maki Otsuka, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi
Kitajima, Eimei Sato and Jun Kanno, Delayed
Effects on CNS Induced by Disturbance of Neural
Activity during Development - Behavioral
Impairment in Male Adult Mice Induced by
Postnatal Oral Intake of Acephate, The XIII
International Congress of Toxicology 2013 (ICT
2013) (2013.7.), Seoul, Korea

Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Yusuke
Furukawa, Maki Otsuka, Noriko Moriyama,
Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima and Jun
Kanno, Analysis of Late-onset Effects on CNS
Induced by Transient GABA Signal Activation
with Hypnotics During Brain Development, The
XIII International Congress of Toxicology 2013
(ICT 2013) (2013.7.), Seoul, Korea

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

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パラジクロロベンゼンの濃度

	検討 1	検討 2
恒温槽の温度	27°C	27°C
発生空気流量	0.2 L/分	0.2 L/分
一次希釈空気の流量	10 L/分	10 L/分
新鮮空気の供給量	212L/分	212L/分
目標濃度 0.04 ppm		
フローメータの流量	0.82 L/分	0.80 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.0418 (105%)	0.0381 (95.2%)
目標濃度 0.12 ppm		
フローメータの流量	2.35 L/分	2.40 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.112 (93.3%)	0.110 (91.7%)
目標濃度 0.40 ppm		
フローメータの流量	7.20 L/分	7.50 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.372 (93.0%)	0.387 (96.8%)
暴露時間	6 時間	22 時間

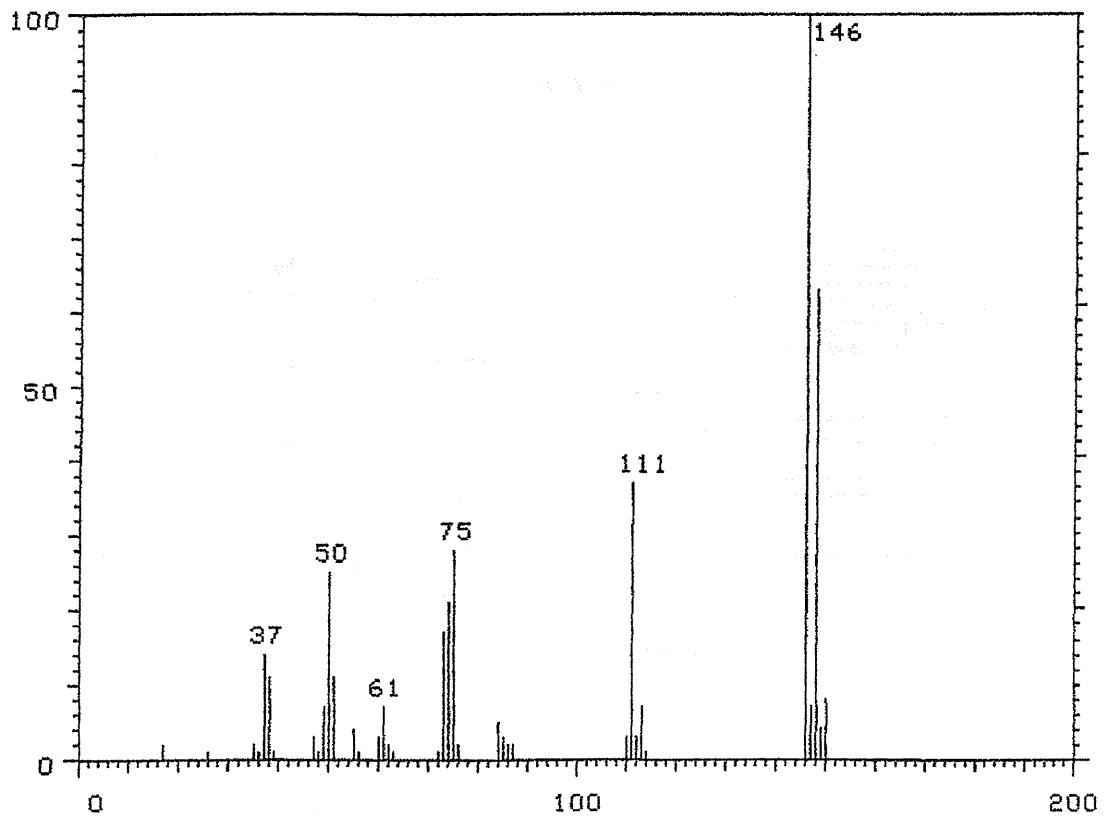


図 1-1 被験物質のマススペクトル

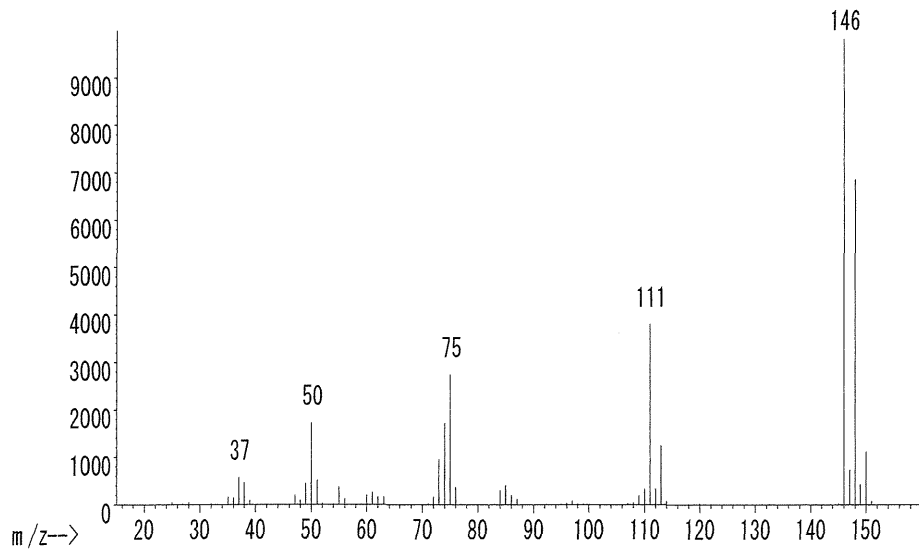


図 1-2 パラジクロロベンゼンのマススペクトル (文献データ)
 (McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.)

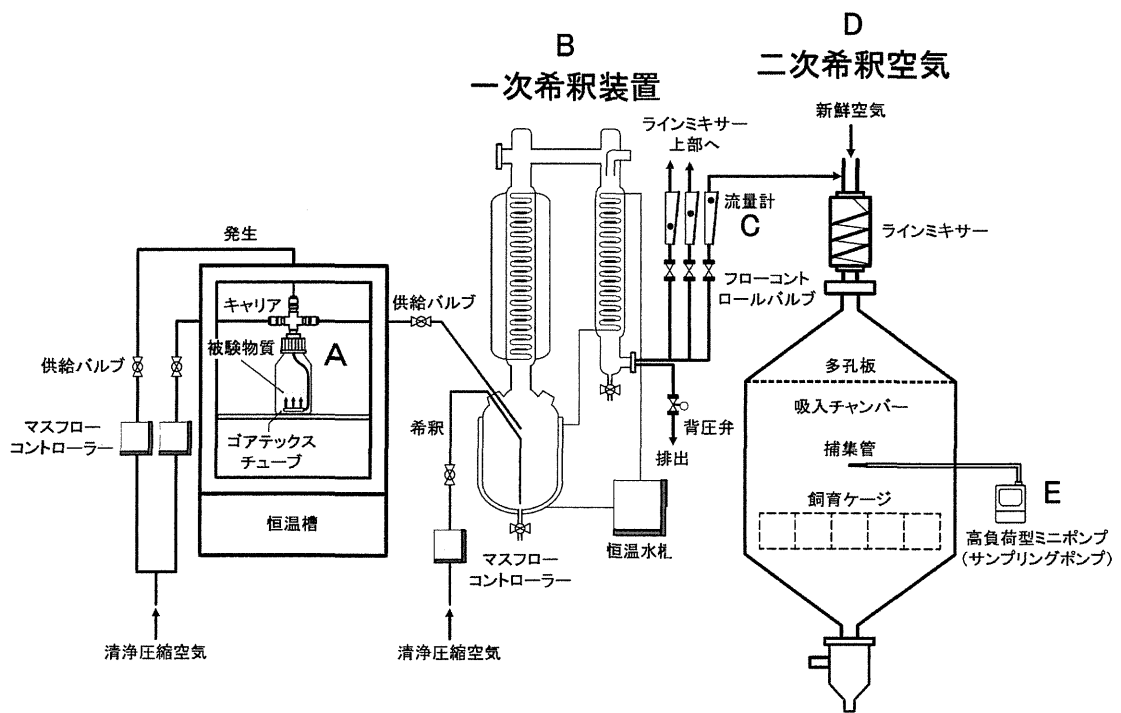


図2 吸入暴露装置のシステム (パラジクロロベンゼン)



Photo 1 3m³横層流大型チャンバー及びその発生装置(柴田科学)



Photo 2 600L縦層流大型 及び 30L小型チャンバー(柴田科学)

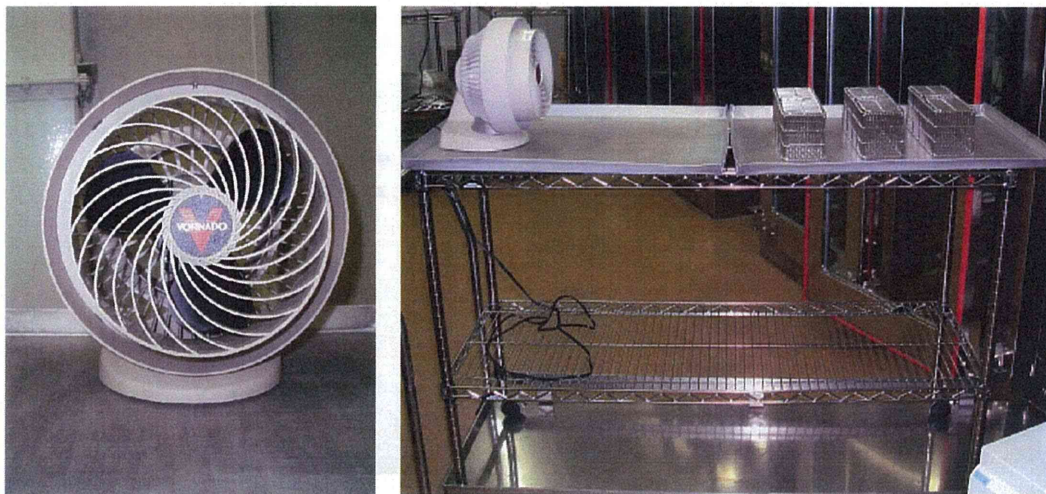


Photo 3 チャンバー内空気攪拌用サーキュレーター(ボルネード)、
及び暴露ケージ(柴田科学)を載せた架台



Photo 4 捕集管採気用ポンプ MP Σ -30、(柴田科学)

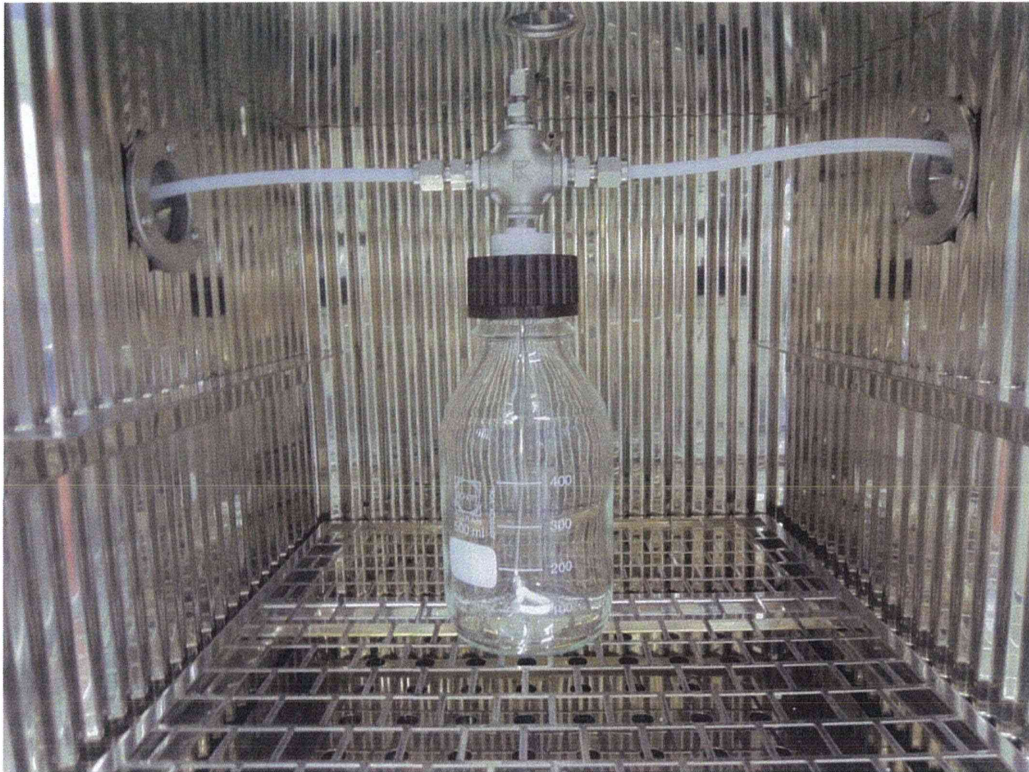


図3 恒温槽 (27°C) に収納したパラジクロロベンゼン発生容器

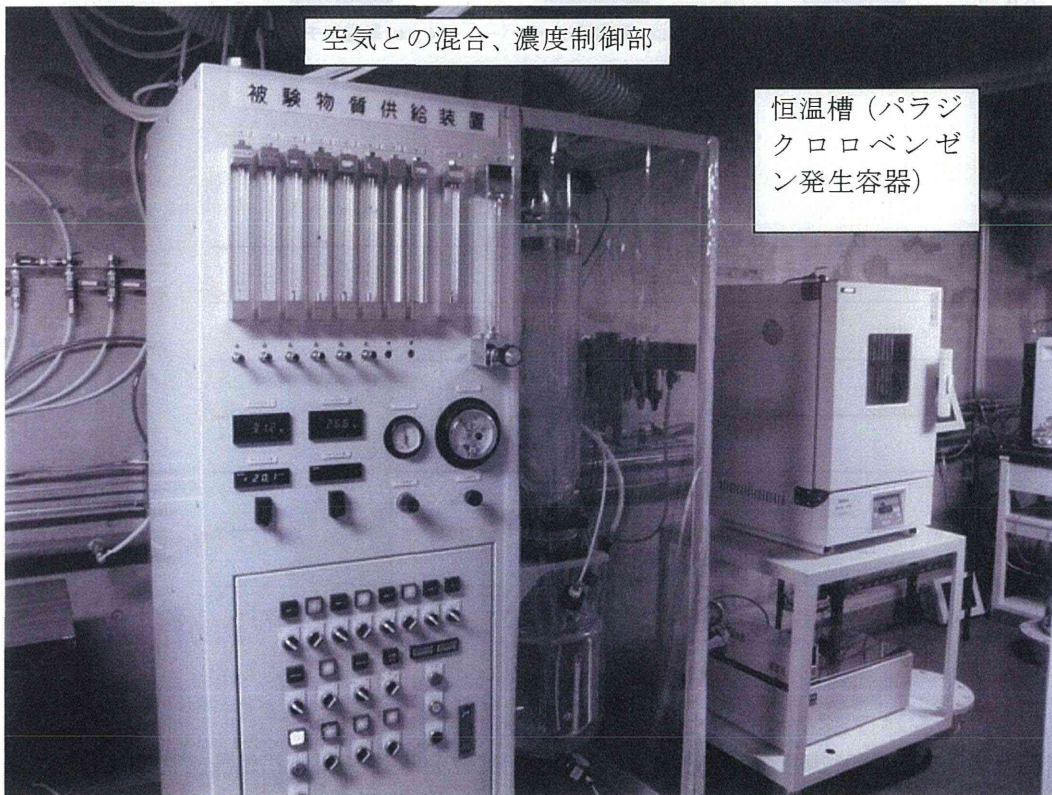


図4 恒温槽 (パラジクロロベンゼン発生容器)、空気との混合、濃度制御部の外観

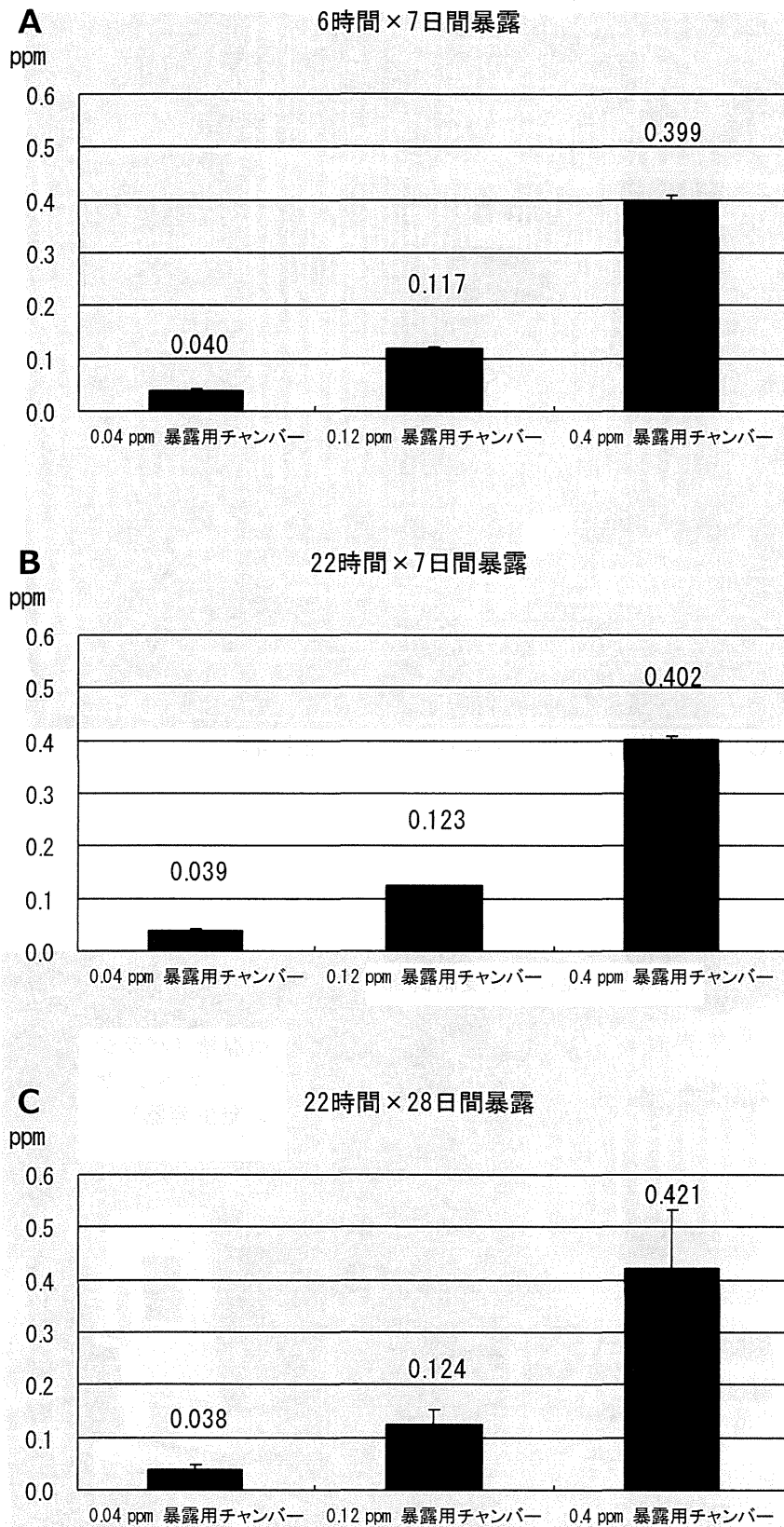


図7 本実験におけるパラジクロロベンゼン暴露濃度の測定結果
 A: 6時間/日×7日間反復暴露の場合、B: 22時間/日×7日間反復暴露の場合、
 C: 22時間/日×28日間反復暴露の場合 (平均値±標準偏差)。
 平均値をグラフ中に記載した

委託研究報告書

I. パラジクロロベンゼンのマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(6時間/日、7日間暴露)

試験番号：0822

CAS No. 106-46-7

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

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パラジクロロベンゼンを C57BL/6J 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肝、肺及び脳の組織を採取した。

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、0.04、0.12 及び 0.40 ppm 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、肝、肺及び脳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 0.04、0.12 及び 0.40 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 0.0397 ± 0.001 ppm（0.0379 ppm～0.0408 ppm）、 0.117 ± 0.003 ppm（0.104 ppm～0.128 ppm）及び 0.399 ± 0.009 ppm（0.392 ppm～0.409 ppm）であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肝、肺及び脳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。

1. 試験材料

1-1 被験物質の性状等

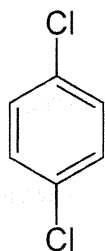
1-1-1 名称等

名称 : パラジクロロベンゼン(paradichlorobenzene)

CAS No. : 106-46-7

1-1-2 構造式及び分子量

構造式 :



パラジクロロベンゼン

分子量 : 147

1-1-3 物理化学的性状等

性状 : 白色の結晶

融点 : 53°C

沸点 : 174°C

蒸気圧 : 0.17kPa (20°C)

1-2 被験物質のロット等

製造元 : 和光純薬工業株式会社

カタログ番号 : 047-01315

ロット番号 : WEP0371

純度 : 99.9% (和光純薬工業(株)測定値) (別紙-1参照)

保管条件 : 室温で保管

1-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、GC/MS (日立社製 M-80B) を用いて定性した。その結果、パラジクロロベンゼ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を確認した(図1)。

1-4 試験動物

1-4-1 種、系統及び清浄度

種 : マウス

系統 : C57BL/6J

清浄度 : SPF

1-4-2 性及び導入匹数

雄 : 1回目暴露終了時解剖動物、1日目及び3日目解剖動物 : 43匹

7日目解剖動物 : 17匹

1-4-3 週齢

導入時週齢 : 生後10週齢2013年3月12日生まれ (1回目暴露終了時解剖動物、1日目及び3日目解剖動物)

生後9週齢2013年3月19日生まれ (7日目解剖動物)

投与開始時週齢 : 生後12週齢 (1回目暴露終了時解剖動物、1日目及び3日目解剖動物)

生後11週齢 (7日目解剖動物)

解剖サンプリング時週齢 : 生後12週齢

1-4-4 供給業者

日本チャールス・リバー (株) 厚木飼育センター

1-4-5 検疫及び馴化

動物導入後、1週間の検疫を行った。検疫期間後、動物を吸入チャンバーに移動し、1週間の馴化を行った。

検疫期間 : 7日間 (2013年5月21日～2013年5月28日)

馴化期間 : 7日間 (2013年5月28日～2013年6月4日)

2. 試験方法

2-1 投与

2-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

2-1-2 被験物質の投与方法

投与は、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、動物に全身暴露することにより行った。

2-1-3 投与期間 (図 2 参照)

投与期間は1日6時間暴露 (午後0時から午後6時) で最長7日間とした。

2-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.04、0.12及び0.40 ppmの3段階 (公比約3) に設定した。なお、対照群はHEP Aフィルターと活性炭フィルターにより濾過した新鮮空気による換気のみとした。

2-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、室内環境におけるヒトへの主な暴露経路に合わせ、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、1日目、3日目、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、「パラジクロロベンゼ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0823」に合わせ、午後0時からとした。

投与濃度はパラジクロロベンゼンの室内濃度指針値である0.04 ppmを考慮して、最高投与濃度を0.40 ppmとし、以下0.12、0.04 ppmの3段階の濃度 (公比約3) を設定した。

2-1-6 先行研究におけるパラジクロロベンゼン暴露に関する当センターでの暴露結果

当センターでは、平成20年度に化学物質を極低濃度で実験動物に経気道で暴露することを目的として、パラジクロロベンゼンを対象として室内濃度指針値 (0.04 ppm) を考慮した濃度でマウスに全身暴露する実験を実施した。恒温槽 (27°C) に収納したパラジクロロベンゼン入り密封容器に、清浄空気 (発生空気) を供給しパラジクロロベンゼンを気化させた。このパラジクロロベンゼンを含む空気と清浄空気 (キャリア空気) を混合し、被験物質供給装置 (柴田科学株式会社) の発生容器 (循環式恒温槽で27°Cに温度維持) に導入した。さらに、清浄空気 (希釈空気) で一定濃度に希釈混合した後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、設定濃度としたパラジクロロベンゼンを吸入チャンバーに送り込んだ。なお、先行研究では、パラジクロロベンゼンの発生に関して、下記の2つの点が明確であった。

1. 発生容器の口金内にキャリア空気を流し運転することにより、パラジクロロベンゼンの再結晶化が防止できた。

2. パラジクロロベンゼンの発生容器を恒温槽 (27°C) に収納したところ、パラジクロロベンゼンの昇華速度が安定し、発生濃度が安定した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定した。すなわち、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ (MP-Σ 100H、柴田科学株式会社製) 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 (ORBOTM-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO 社製) 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。捕集管の前処理及び分析条件は、捕集管の活性炭 (1層及び2層) を取り出し、各々、バイアルビン (柴田科学株式会社製) に入れ、二硫化炭素 (和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用) を加え、蓋をしてダ

イレクトミキサー（サーマル化学産業株式会社製）を用いてしんとうした。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の濃度範囲に入るように希釈した。その後、バイアルビン（Agilent Technologies社製）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent Technologies社製 HP5890A）により測定した。

先行研究（6時間/日×7日間暴露）において、0、0.04、0.12および0.40 ppmの目標暴露濃度で実験を行った結果、吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度0、0.04、0.12及び0.40 ppmに対し、測定値の平均±偏差（最低～最高値）は、それぞれ0±0 ppm（全期間とも0 ppm）、0.039±0.002 ppm（0.036 ppm～0.042 ppm）、0.119±0.010 ppm（0.108 ppm～0.137 ppm）及び0.387±0.032 ppm（0.351 ppm～0.443 ppm）であった。

2-1-7 被験物質の暴露方法（図3）

先行研究の設定条件と同様に、恒温槽（27℃）に収納したパラジクロロベンゼン入り密封容器に、清浄空気（発生空気）を供給しパラジクロロベンゼンを気化させた。このパラジクロロベンゼンを含む空気と清浄空気（キャリア空気）を混合し、被験物質供給装置（柴田科学株式会社）の発生容器（循環式恒温槽で27℃に温度維持）に導入した。さらに、清浄空気（希釈空気）で一定濃度に希釈混合した後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、設定濃度としたパラジクロロベンゼンを吸入チャンバーに送り込んだ。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。なお、暴露濃度が目標濃度となるように、ガス濃度を毎日測定し、その結果を基にガス供給量を毎日補正し、暴露を行った。具体的には、前日の濃度分析結果を基に、ガス供給量を浮子式流量計のフローコントロールバルブにて調節することにより行った。

2-1-8 被験物質濃度の測定

パラジクロロベンゼン濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定することにより算出した。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ100H、柴田科学株式会社製）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（ORBOTM-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO 社製）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。捕集管の前処理及び分析条件は、捕集管の活性炭（1層及び2層）を取り出し、各々、バイアルビン（柴田科学株式会社製）に入れ、二硫化炭素（和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用）を加え、蓋をしてダイレクトミキサー（サーマル化学産業株式会社製）を用いてしんとうした。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の範囲に入るように希釈した。その後、バイアルビン（Agilent Technologies 社製）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent Technologies 社製 HP5890A）により測定した。なお、クロマトグラム上で認められる溶媒の二硫化炭素のピークを除くと、パラジクロロベンゼンのピークは1本であった。

2-2 動物管理

2-2-1 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。

各群の使用動物数と動物番号

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	0.04 ppm 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	0.12 ppm 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	0.40 ppm 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)

2-2-2 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から、馴化終了時に測定した体重の中央値に近い動物、12 週齢 36 匹、11 週齢 12 匹を選定する。群分けは、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 日目解剖動物は解剖時週齢が他の解剖期の動物と異なるため、試験番号 4534 として別途群分けを行った。

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、動物はバリア区域内の独立した室（516 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

2-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517 室）、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、吸入チャンバー内温度・湿度の実測値の範囲<最低値～最高値>を下に、温度・湿度、

換気量と換気回数の日別平均値を表 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； $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$ < $22.5 \sim 22.6^{\circ}\text{C}$ >
湿度	検疫室； $55 \pm 15\%$ 吸入チャンバー内； $30 \sim 70\%$ < $54.7 \sim 58.0\%$ >
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 < $11.9 \sim 12.1$ 回>
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(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、被験物質暴露中を含む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 \cdot γ 線照射滅菌飼料) を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中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データを入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は、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た。

(3) 飲水

飲水は、被験物質暴露中を含む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、自動給水ノズルから自由摂取させた。

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、建築物衛生法施行規則第 4 条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録は保管した。

2-3 観察・検査項目及び方法

2-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

<検疫及び馴化期間>

生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行った。一般状態の詳細な観察は、検疫開始日 (導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日 (群構成時) に行った。

<投与期間>

生死及び瀕死の確認、一般状態の観察を毎日 1 回以上行った。

2-3-2 体重測定

<検査及び馴化期間>

測定時に生存する全動物について、検査開始日（導入時）、検査終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に体重を測定した。

<投与期間>

解剖時に測定した。

2-3-3 試料の採取と検査

解剖時期: 1回目暴露終了時解剖動物は暴露終了直後、暴露開始後1日目、暴露開始後3日目及び暴露開始後7日目解剖動物は午前10時から午後0時の間に解剖した。

採取対象: 各解剖時期に、各群の（動物番号の小さい順に）3匹から採取した。

採取方法: 動物をエーテル麻酔下で、右腋窩動静脈の切断により放血致死させた。肝、肺及び脳よりマイクロアレイ用、病理組織学的検査用の試料を採取した。解剖時間は1匹あたり2分半から3分以内に脱血し、臓器採取を行った。また、肝、肺が摘出され、皮が頭部先端までむかれた状態のマウスを受けとってから各脳サンプルを得るまで、1匹あたり3分以内で試料を採取した。各群、定められた時刻に対して前後約15分（計30分）以内に完了した。解剖開始・終了時刻を記録した。詳しい手順は下記の通りとした。

(1) マイクロアレイ用サンプルチューブの作製・RNA用チューブの作製

1) ラベルシールの切り方

準備したもの

ラベルシール

ハサミ

仕切りのある箱（サンプルの種類別に、収納できるように仕切っておいた。）

ビニール袋

手袋

マスク

手順（作業は、手袋とマスクを着用して行った。）

- ① Sample No.ごとに各種サンプル用ラベルシール一揃い（本体用・登録用）が、1枚の台紙上に連なっている。これを一番小さいSample No.が、一番上になるように番号順に重ねておいた。
- ② 番号を確認し、上から3枚をとり、ラベルシールの端と端が揃うように3枚を重ねた。
- ③ 3枚がずれないようにしっかり指ではさみ、各サンプルの種類ごとにラベルシールを切り分けた。
- ④ 切ったラベルシールは、一番小さいSample No.が一番上になるように番号順に重ねて、サンプルの種類別に箱に収めた。
- ⑤ 不必要なラベルシールは、ビニール袋にまとめて収納し、実験終了後に処分した。

* 各項の動作は、セルフチェックを兼ねているので、確認してから次の動作に移った。

2) マイクロアレイ用サンプルチューブの作製

準備したもの

DNA LoBind Tube 2.0 mL : エッペンドルフ

RNAlater

分注用ピペット

分注用ピペットのチップ(25 mL)

100 mL チューブ

チューブラック

フリーズボックス

RNase 除去剤

ラベルシール

手袋

マスク

手順 (作業は、手袋とマスクを着用し、クリーンベンチ内で行った。)

① 準備

クリーンベンチ内をRNase 除去剤でふき、準備したものを持ち込んだ。

② チューブを並べた

アルミホイル (25cm幅のものを30cmくらいに切って使用) を敷きRNase 除去剤でふいた。DNA LoBind Tubeを開封してアルミホイルの上にとり出し、必要本数のチューブを蓋のあいた状態でチューブラックに並べた。(一度、袋から出したチューブは袋には戻さないこととした。)

③ RNAlaterの分注

必要量+ α のRNAlaterを100 mL チューブに分注した。分注用ピペットで並べたチューブに(Liver : 500 μ L/tube、Lung : 1,000 μ L/tube、Brain : B- A : 小脳 (500)、B- B : 脳幹 (1,000)、B- C : 大脳 (1,000)、P- A : 海馬 (500) μ L/tube)分注した。

④ チューブの箱詰め

チューブの蓋をしめながらフリーズボックスに収納した。この時、チューブの破損がないか、分注ミスがないかを確認した。(破損しているもの、液量の少ないものは除外した。)

⑤ 後片付け

持ち込んだものを取り出し、クリーンベンチを70%EtOHでふき、元の状態に戻した。

⑥ シール貼り

マイクロアレイ用サンプルのラベルシールを貼った。(ラベルシールの切り方・貼り方を参照)

* 各項の動作は、セルフチェックを兼ねているので、確認してから次の動作に移ることとした。

3) ラベルシールの貼り方

準備したもの

- ラベルシール（サンプル別に切り分けておいたもの）
- サンプルチューブ（必要本数をフリーズボックスに詰めた状態にしておいた）
- フリーズボックス（前項のフリーズボックスとは別に新しいものを準備した）
- 手袋
- マスク

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行った。）

- ① サンプル1種類ずつ、一番小さいSample No. から貼る作業をはじめた。
- ② チューブ1本をとり、チューブに不具合がないかを確認した。
- ③ シールの番号を確認し、シール1枚をとり、右側（バーコード側）が上になるように右手でシールを持った。
- ④ ③の状態のまま、シールの台紙を縦半分（本体用と登録用の間）に二つ折りするような感じで軽く曲げ、曲げた方向から本体用シールを左手でめくり、1/3程度を台紙からはがした。
- ⑤ 左手でループが左側にくるようにチューブを持ち、その時正面となる位置にバーコードを上にし、本体用シールを貼った。④で台紙からはがした部分を先ずチューブに貼り、左手でチューブを半回転させシール全体をしっかりと貼り付けた。本体用シールをはがした後も登録用シールは、右手にもったままの状態とした。
- ⑥ 左手でチューブをもったまま、右手の登録用シールをバーコードが下になるように持ちかえた。そのまま、シールの右端（台紙の切れ目より右側）をもち、左手で本体用シールが貼られていた台紙（切れ目より左側）を取り去った。登録用シールは、一部台紙がついた状態とした。
- ⑦ 左手でループが右側にくるようにチューブを持ちかえ、その時、正面となる位置にバーコードを下にし、一部台紙のついた状態の登録用シールを貼った。シールがしっかりと貼られているかを確認し、チューブを新しいフリーズボックスに収納した。

4) サンプルチューブ風袋測定

風袋測定は、解剖実施日の2週間以上前に測定すると値が変わってしまう可能性があるため、解剖実施日の10日～1日前に行った。

準備したもの

- ラベルシールを貼ったサンプルチューブ（マイクロアレイ用：RNAlaterを分注したもの）をフリーズボックスに詰めた状態とした。
- フリーズボックス（前項のフリーズボックスとは別に新しいものを準備した）
- 手袋
- マスク

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行った。）

- ① サンプル1種類ずつ、一番小さいSample No.から測定をした。
- ② サンプルチューブ1本をとり、番号を確認し、チューブに不具合がないかを確認した。