

委託研究報告書

II. 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

(22 時間／日、7 日間暴露)

試験番号：0823

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 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 0.0390 ± 0.002 ppm（0.0368 ppm～0.0404 ppm）、 0.123 ± 0.002 ppm（0.118 ppm～0.130 ppm）及び 0.402 ± 0.007 ppm（0.394 ppm～0.410 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

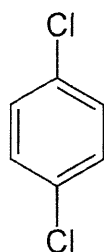
1-1-1 名称等

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℃

沸点：174℃

蒸気圧：0.17kPa (20℃)

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日目及び3日目解剖動物 : 29匹
7日目解剖動物及び暴露終了翌日解剖動物 : 29匹

1-4-3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後10週齢2013年4月2日生まれ (1日目及び3日目解剖動物)
生後9週齢2013年4月9日生まれ (7日目及び暴露終了翌日解剖動物)
投与開始時週齢 : 生後12週齢 (1日目及び3日目解剖動物)
生後11週齢 (7日目及び暴露終了翌日解剖動物)
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6月11日～2013年6月18日)
馴化期間 : 7日間 (2013年6月18日～2013年6月25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22時間暴露(午後0時から午前10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HEPA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日目、3日目、7日目、暴露終了翌日解剖群を設けた。

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時から午後0時とするため、午後0時から午前10時とした。

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℃)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。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℃)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-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、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（22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）、 0.040 ± 0.005 ppm（0.034 ppm～0.047 ppm）、 0.120 ± 0.013 ppm（0.107 ppm～0.141 ppm）及び 0.404 ± 0.050 ppm（0.342 ppm～0.465 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、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。1日目、3日目、7日目、暴露終了翌日の解剖期を設けた。

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 24 匹、11週齢 24 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 4535 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±2℃
	吸入試験室; 21±2℃
	吸入チャンバー内; 20～24℃ <22.5～22.8℃>
湿度	: 検疫室; 55±15%
	吸入チャンバー内; 30～70% <53.7～57.3%>
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<11.9～12.1 回>
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、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-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

<検疫及び馴化期間>

測定時に生存する全動物について、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: 暴露開始後1日目、暴露開始後3日目、暴露開始後7日目及び暴露終了翌日解剖動物は午前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。
- ③ サンプルチューブから登録用シールを剥がし、本体用シールだけが貼られた状態のサンプルチューブを天秤にのせ、この重量を測定した。
重量が、一割以上少ないものや2割以上多いものについては、RNAlaterを分注しなおし、再測定した。
- ④ 測定後、直ちに登録用シールを元の状態になるようサンプルチューブに貼り、本体用と登録用シールの番号が同一であることを確認した。
- ⑤ ④のサンプルチューブを新しいフリーズボックスに収納した。
- ⑥ 同様に次のサンプルチューブを測定した。

* 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ることとした。

(2) 採取手順

1) 肝の摘出

トレイと生食をいれたカップは、匹数分を準備し、1匹/枚（個）で使用した。

- ① 動物を麻酔し、右腋窩動静脈を切断し放血致死させた。
- ② 動物を仰臥位にし、70%エタノールをスプレーし、ハサミを用いて、腹部（中央より数mm尾側）の皮膚をリングピンセットでつまみ、正中線に対して垂直方向にハサミで切れ目を入れた。
- ③ 切れ目の両端を引っ張って皮を剥いだ。この際、指についた動物の毛を生理食塩水（以下、生食）で洗浄、除去した。
- ④ 筋層にVの字に切れ込みを入れ、肝を露出させた。
- ⑤ 横隔膜の方から肝を徐々に切り離し、肝は生食につけた状態でおいておいた。
- ⑥ 肝を生食から引き上げ、氷上のバランスディッシュへのせた。
- ⑦ ハサミ、ピンセットを生食で洗浄し、新しいトレイを準備し、次の動物を待った。

2) 天秤・麻酔

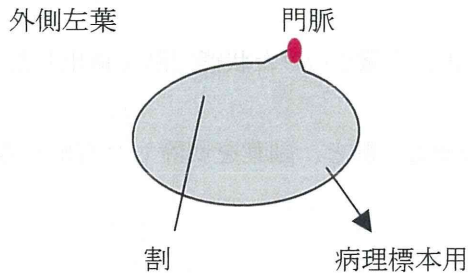
各解剖の開始・終了時間を記録した。

- ① 天秤で肝の重量を測定、記録した。
- ② ピンセットは生食を入れたチューブで洗浄した。（生食は群ごとに交換した）。
- ③ 臓器を担当者に渡し、次の動物を準備し、約2分30秒間隔で動物を麻酔瓶に入れた。

3) 肝サンプリング

- ① 肝を、シルキーテックスを貼ったシャーレ（氷上）にのせた。
- ② 肝を背側が上になるようにおき、外側左葉をめくって内側右葉を露出させた（胆嚢のついてる葉）。
- ③ ②の状態、胆嚢の左側の葉を1カ所（A）、右側の葉を2カ所（門脈近位：B、門脈遠位：C）トレパンで抜き取った。

- ④ 3 mm径リングピンセットでAサンプルをマイクロレイ用チューブに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。B,Cサンプルについても同様に行った。各サンプルの厚さになるべく揃うように（重量としては30~40 mg）採取した。
- ⑤ 肝の外側左葉を門脈部で他の葉から切り離し、下図の実線の位置で割をいれた。



- ⑥ 門脈を含む方を病理標本用サンプルとし、⑤で切り離した他の葉と共に10%ホルマリン液に移した。
- ⑦ 使用した器具を生食で洗浄し、水気をふき取り、次のサンプリングに用いた。（生食は群ごとに交換した。）洗浄する時間がない場合は、もう1セットのハサミおよびピンセットを使用した。
- ⑧ 解剖終了後、氷上のマイクロレイ用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時にサンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルを収納した一時保管用箱は、4℃に移動し保管した。

<腫瘍や白点など限局した病変（変化）部のある個体のサンプル採取について>

病変(変化)部を含まないようにマイクロレイ用サンプル採取した。その部分を避けて 3カ所から採取することが難しい場合、外側左葉の門脈遠位部（病理標本用サンプルの割を入れる付近）から採取した。

いずれの場合も所見と採取部位を登録台紙に記録した。いずれの場合も病変（変化）の性状を登録台紙に記録した。（動物の番号を丸でかこみ、その番号付近に病変（変化）の性状を記録した。また、指定外の部位から採取したものは、チューブ番号を丸でかこみ、その番号付近に部位を記録した。）

4) 肺サンプリング

① マウスの受け取り

解剖担当者から肝摘出後のマウスをトレイごと受け取った。

② 横隔膜の切離

横隔膜を肋骨弓から切り離した。（食道は切断しても、しなくてもよいこととした。）

③ 肋骨の切断

肺を傷つけないように胸腔内臓器を片側によせ、左右の最後位肋骨から第1肋骨までを切断した。胸骨の延長線は、頸部とつながった状態にし、完全に切り離さないこととした。

④ 気管の露出

片手で尾を固定し、胸骨を頭側方向に手で引き上げ、気管を露出させた。

⑤ 気管の切断

気管を甲状腺の下で切断し、断端を持ち上げ気管を胸腔前口まで遊離させた。

⑥ RNAlaterの注入

気管断端に注射針（18G x 1 1/2 注射針+2.5 mL シリンジ）を針穴が隠れる程度挿入した。液漏れしないよう気管の上からピンセットで針を固定し、一気にRNAlater（2 mL）を注入した。

⑦ 肺の摘出1

気管をピンセットではさんだまま、注射針を抜き、心臓をつけた状態で肺を摘出した。

⑧ 肺の摘出2

摘出した肺をディッシュに移した。気管支を切断し左肺と、副葉を切除した右肺を取り出した。

⑨ RNA用サンプル採取：肺の切断

左肺を長軸方向で葉の幅1/2のところを切断し、肺門の遠位側をRNA用サンプルとし速やかにA tubeに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。

右肺を長軸方向で葉の幅1/2のところを切断し、肺門の遠位側をRNA用サンプルとし、速やかにB tubeに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。

⑩ 病理標本用サンプル採取

肺門の近位側を病理標本用サンプルとし、左・右肺ともに断面をろ紙に（右肺は3葉の各断面がろ紙に接するように）貼り付け、ホルマリン固定した。

（肺は浮きやすいので、サンプルがホルマリンに浸かっていることを確認した。）

⑪ 器具の洗浄

使用した器具を、生食で洗浄し水気をふき取り、次のサンプリングに用いた。
特に肺の切断用は、よく水気をふき取ることとした。

⑫ 解剖終了後のサンプル管理・マイクロアレイ用サンプル

氷上のRNA用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時にサンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルを収納した一時保管用箱は、4℃に移動し保管した。

⑬ 解剖終了後のサンプル管理・病理標本用サンプル

サンプルの入った標本びんを、しんとう機に移し60分間しんとうした。

<腫瘍や白点など限局した病変（変化）がある個体のサンプル採取について>

病変（変化）部を含まないようにマイクロアレイ用サンプルを採取した。

いずれの場合も病変（変化）の性状を登録台紙に記録した。（動物の番号を丸でかこみ、その番号付近に病変（変化）の性状を記録した。）

5) 脳摘出

① マウスの受け取り

「解剖担当者は剥皮する際に、できるだけ頭部先端までむくこととした」
解剖担当者から肝、肺摘出後のマウスをトレイごと受け取った。

② 頭部の剥皮

術野を広くとれるようにハサミにて頭部全体の皮をむき、左手にて左右の皮にテンションがかかるようにしつつ、頭部をもった。

③ 延髄部の切断

ハサミにて延髄部を切断した。この際、体部の筋・皮膚は頭部に付着した状態であり、完全に切り離さないようにした。

④ 頭蓋骨の切断

脳を傷つけないように、ハサミを延髄側から頭蓋骨の正中に入れ、目の部位まで切断した。

⑤ 脳の露出

脳が傷つかないように爪をひっかけるように指を使って、頭蓋骨を正中から左右に開き（観音開き）、脳を露出させた。

⑥ 脳の摘出

先曲ピンセットを、横から頭蓋と脳の間に入れ（右側の方が容易）（脳をできるだけ触らないように頭蓋にあてる感じで）、硬膜の付着の有無を確認しつつ、硬膜の付着がある場合は除去し、徐々に頭蓋と脳の隙間を広げていき、視交差を切断し、最終的に先曲部分全体で脳底部を反転するようにして脳を摘出し、これを氷冷した硝子シャーレ上にある、生理食塩水で十分に湿らせたろ紙(ADVANTEC Filter paper 2)上においた。※嗅球は切除し、脳としては採取しなかった。

6) 脳サンプリング

① 脳の左右の分離

切断しやすい様に、脳を適当な位置にシャーレの回転やピンセットを利用し置き、カミソリ刃にて正中で左右に切断し、右半分をピンセットにてろ紙に貼り付け、ホルマリンに入れ、左半分をろ紙上に、切断面を下側にして置いた。
⇒作業者Bに渡した。

② 小脳の分離「作業者B分担分」

あらかじめ氷冷したピンセット2本を使用した。
延髄部分にピンセットを添えながら、先曲ピンセットを、小脳とその他との境界部に入れ、底面までおろし、ろ紙上を滑らせるようにして小脳を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブに入れた）。

③ 脳幹の分離

延髄部分にピンセットを添えながら、大脳皮質と脳幹部の境界に、優しく先曲ピンセットの先曲部分を添え、両部位を少し剥離する様、境界を少しあけるようにし、海馬を見据えた後、脳幹部の底部のみを先曲ピンセットで挟み込む様になつて、脳幹部を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブに入れた）。

④ 海馬と大脳皮質の分離

残った脳部分の（小脳側に）海馬がみえる。海馬の境界をしっかりと認識した後に、大脳皮質と海馬の境界部分に優しく先曲ピンセットの先曲部分を添え、海馬部位を軽くめくるように反転することにより海馬を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブ

に入れる)。白い部分は線条体であり、先曲ピンセットにてつまむように剥離し、大脳皮質の方に付着させた。

・残りが大脳皮質。

⑤ RNAサンプル

各サンプルをRNA用サンプルチューブに入れ、RNAlaterに浸かっていることを確認しサンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移した。登録用シールは、登録台紙に貼った。

⑥ 器具の洗浄

使用した器具を、生理食塩水で洗浄し水気を取り、次のサンプリングに用いた。

⑦ 解剖終了後のサンプル管理・RNA用サンプル

氷上のRNA用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時に、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。全てを移し終わったら箱の中のサンプル数を数え、tube check sheetにチェックを入れた。サンプリング担当者以外の人に同様にサンプル数をチェックしてもらい、問題がなければサンプルの入った一時保管用箱を4℃に移動し保管した。

⑧ 解剖終了後のサンプル管理・病理標本用サンプル

サンプルの入った標本びんをしんとう機に移し60分しんとうした。

7) 注意事項

全ての作業は作業着、手袋及びマスクを着用して行うこととした。作業台をRNase AWAYで清拭し、RI実験用の紙（ポリエチレンろ紙）を敷いて作業した。臓器摘出、秤量以外の操作は氷上で行うこととした。

サンプルに動物の毛、血液、他の臓器が混入しないようにした。日内変動で遺伝子発現量が変わるため、各採取時期のサンプル採取は約30分以内（2分半/匹）に終わらせることとした。

8) 試料の処理

すべてのマイクロアレイ用サンプルは、RNAlater入りのサンプルチューブ内で一晩冷蔵（4℃）後、サンプル重量測定し、-80℃で保存した。

(3) マイクロアレイ用サンプル（RNAlaterに浸かっているもの）重量測定

マイクロアレイ用サンプルは、RNAlaterに4℃で一晩静置した後（全ての解剖が終了した翌日）、重量測定を行った。

（サンプルチューブに入った状態で重量測定し、その値から風袋を差し引いたものをサンプル重量とした。）

準備するもの

マイクロアレイ用サンプル（RNAlaterに浸かったもの）

マイクロアレイ用サンプルは、RNAlaterに4℃で一晩静置した後（全ての解剖が終了した翌日以降）、重量測定を行った。

フリーズボックス（フリーズボックスは新しいものを準備し、ラベルしておいた）

手袋

マスク

氷

Ice box (マイクロアレイ用サンプルを収納している箱と新しいフリーズボックスがいれられる大きさのもの)

手順 (作業は、手袋とマスクを着用し行うこととした。)

- ① Ice boxに氷をいれ、この上に、マイクロアレイ用サンプルを収納している箱と新しいフリーズボックスをおいた。
- ② サンプルは、1種類ずつ、一番小さいSample No.から測定しはじめた。
- ③ サンプル1本をとり、番号を確認し、重量を測定した。
この時、RNAlaterに浸かっていなかったサンプルは、番号を記録した。
- ④ 測定後、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認し、サンプルを新しいフリーズボックスに収納した。
同様に次のサンプルを測定した。
- ⑤ 測定後のサンプルは、 -80°C で保管した。
- ⑥ この測定値から、風袋を差し引いたものをサンプル重量とした。

(4) マイクロアレイ用サンプルの保存及び送付

肝、肺及び脳のmRNA測定用サンプルは 4°C で一晩保存後サンプル重量測定し、超低温庫 (-80°C) で凍結して保存した。

これらの保存サンプルは、解剖から1週間以内にドライアイスを含めて、下記宛先に送付した。

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

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 五十嵐 勝秀

2-3-4 病理学的検査

(1) 剖検

全ての解剖動物について、肝、肺及び脳の肉眼的観察を行った。

(2) 臓器重量

全ての解剖動物について、肝、肺及び脳の湿重量を測定した。

(3) 病理組織学的検査

2-3-3に記載した病理組織学検査用に採取した肝、肺及び脳について、切り出し、パラフィン包埋した。その後、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査し、病理組織診断結果のみを報告した。なお、病理標本 (パラフィンブロックとプレパラート) は日本バイオアッセイ研究センターで保管する。

2-4 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 ppm 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。

臓器湿重量は、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。

3 試験成績

3-1 吸入チャンバー内の被験物質濃度

吸入チャンバー内の被験物質濃度を表 4 に示した。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 0.0390 ± 0.002 ppm (0.0368 ppm～0.0404 ppm)、 0.123 ± 0.002 ppm (0.118 ppm～0.130 ppm) 及び 0.402 ± 0.007 ppm (0.394 ppm～0.410 ppm)であった。

3-2 動物の生死及び一般状態

全ての動物が、定期解剖時まで生存した。また、いずれの動物も特記すべき一般状態の変化を認めなかった。

3-3 体重

解剖時の体重を表 5 に示した。

3-4 病理学的検査

3-4-1 剖検観察

肝、肺及び脳の剖検所見を表 6 に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。

3-4-2 臓器重量

肝臓重量(g)を表 5 に示した。

3-4-3 病理組織学的検査

肝、肺及び脳の病理組織学的検査の結果を表 6 に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果:温度(22時間暴露)

単位:°C

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	0.04 ppm 群	0.12 ppm 群	0.40 ppm 群
全期間				
平均値	22.5	22.6	22.5	22.6
標準偏差	0.3	0.4	0.3	0.4
日別平均値				
6月25日	22.5	22.5	22.6	22.8
6月26日	22.5	22.6	22.6	22.6
6月27日	22.5	22.6	22.5	22.5
6月28日	22.5	22.6	22.5	22.6
6月29日	22.5	22.6	22.5	22.5
6月30日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月1日	22.5	22.6	22.6	22.6
7月2日	22.5	22.6	22.5	22.6
7月3日	22.6	22.6	22.6	22.5

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果:湿度(22時間暴露)

単位:%

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	0.04 ppm 群	0.12 ppm 群	0.40 ppm 群
全期間				
平均値	55.0	55.1	54.2	55.2
標準偏差	1.4	1.4	1.1	1.9
日別平均値				
6月25日	55.2	55.4	54.5	55.3
6月26日	55.1	55.0	54.3	55.4
6月27日	55.3	55.1	54.2	55.3
6月28日	55.1	55.0	54.1	54.8
6月29日	54.7	54.6	53.7	54.4
6月30日	54.9	54.9	54.1	55.3
7月1日	54.8	55.1	54.0	55.1
7月2日	54.8	55.1	54.1	55.5
7月3日	55.8	57.3	55.5	57.3