

表 6 剖検所見(6時間暴露)

## 1回目暴露終了時解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1001	著変なし	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1101	著変なし	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 1日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	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	肝臓	肺	脳
対照群	1001	著変なし	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1101	著変なし	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 1日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.1 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし	著変なし
0.3 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
1 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし	著変なし

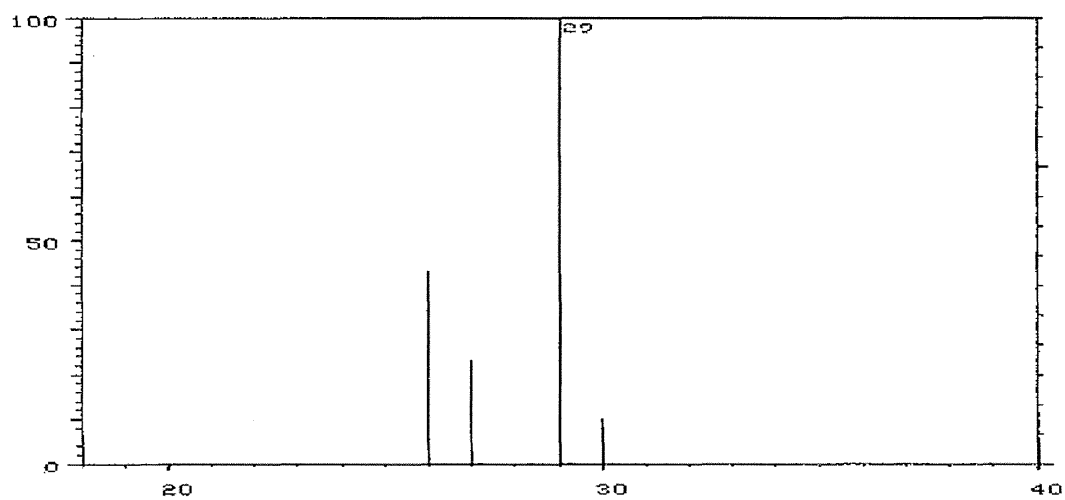


図 1-1 被験物質のマススペクトル

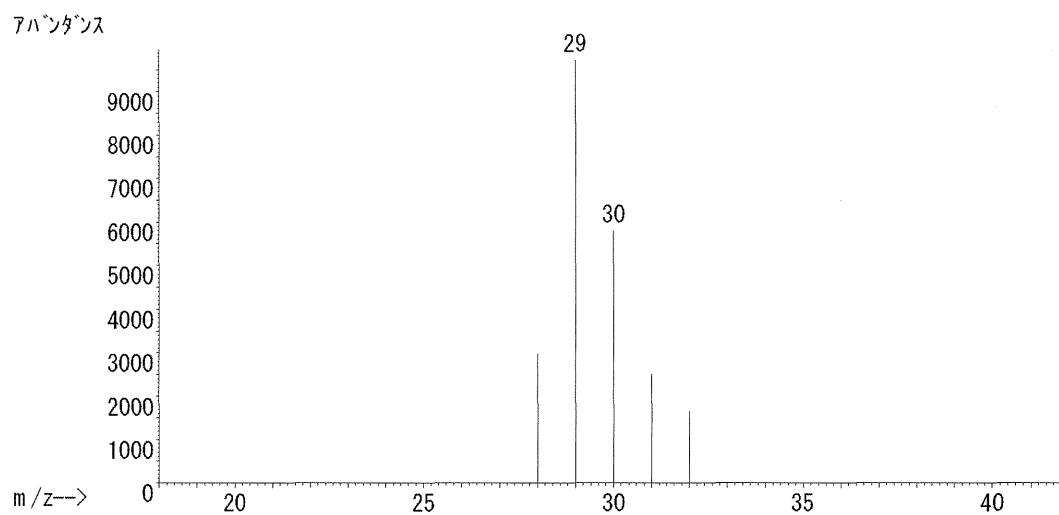


図 1-2 ホルムアルデヒドのマススペクトル(文献1)

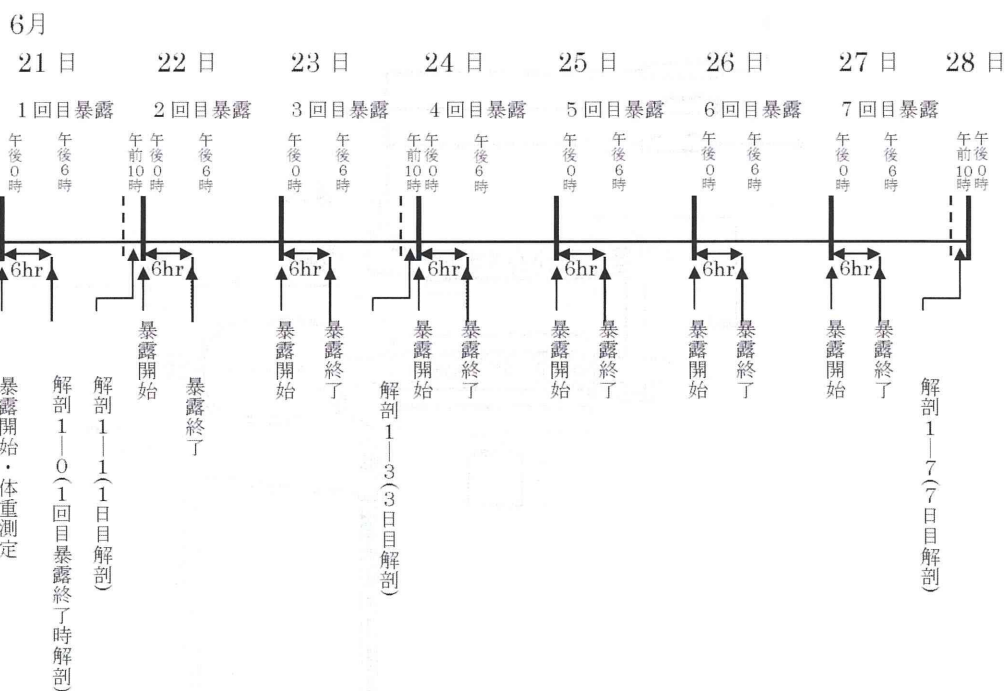
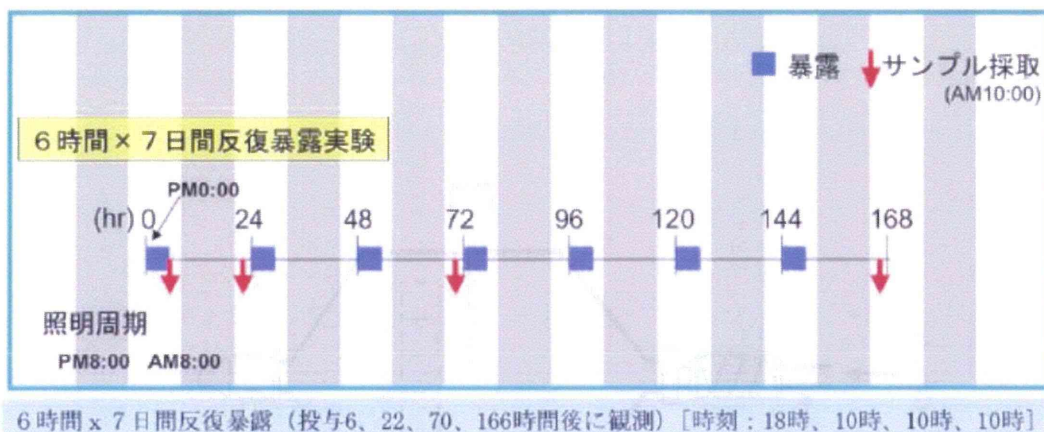


図 2 試験スケジュール(6時間暴露)

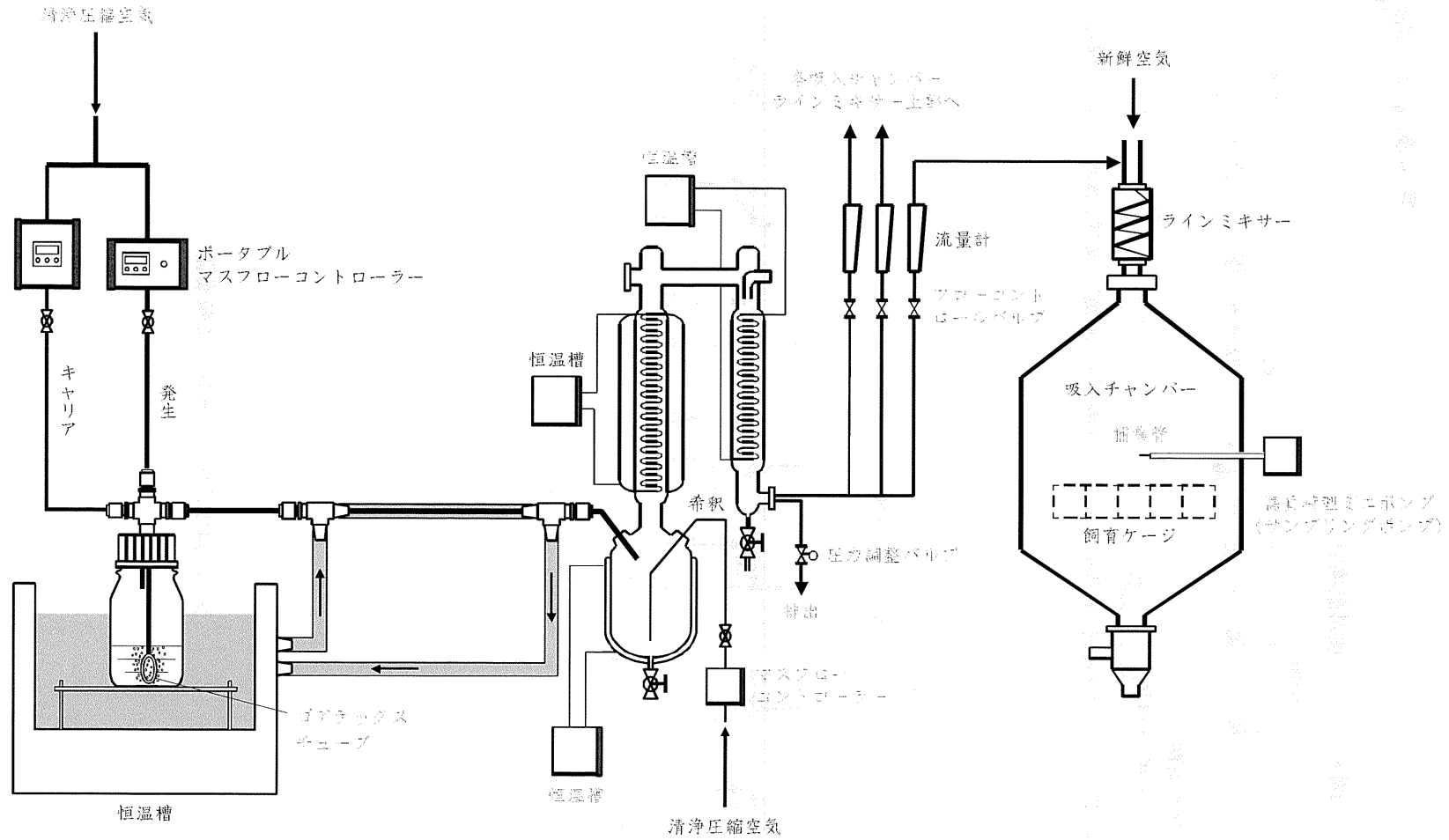


図 3 吸入装置のシステム

別紙-1

## 検査成績書

2011年5月9日  
和光純薬工業株式会社

Code No. 064-00406

ホルムアルデヒド液

規格/等級 試薬特級

Lot No. DCR2374

数量 500mL

検査項目	検査成績	規格値
性状	試験適合	試験適合
濃度(HCHO)	37.3%(mass/mass)	36.0~38.0%(mass/mass)
外観	ハーゼン10以下	ハーゼン10以下
密度(20℃)	1.094g/mL	1.085~1.100g/mL
強熱残分(硫酸塩)	0.002%(mass/mass)以下	0.002%(mass/mass)以下
酸(HCOOHとして)	0.04%(mass/mass)以下	0.04%(mass/mass)以下
塩化物(Cl)	2ppm(mass/mass)以下	2ppm(mass/mass)以下
硫酸塩(SO4)	0.002%(mass/mass)以下	0.002%(mass/mass)以下
銅(Cu)	2ppm(mass/mass)以下	2ppm(mass/mass)以下
鉛(Pb)	2ppm(mass/mass)以下	2ppm(mass/mass)以下
鉄(Fe)	2ppm(mass/mass)以下	2ppm(mass/mass)以下
メタノール(安定剤)	7.4%(mass/mass)	5.0~10.0%(mass/mass)

検査年月日 2010/12/27

判定	合格	検査責任者	稲垣栄二
----	----	-------	------

成績書発行番号 S208157



## 委託研究報告書

### II. ホルムアルデヒド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：0779

CAS No. 50-00-0

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ホルムアルデヒドを 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、0.1、0.3 及び 1 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。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、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 0.1、0.3 及び 1 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ  $0.101 \pm 0.003$  ppm（0.096 ppm～0.104 ppm）、 $0.301 \pm 0.021$  ppm（0.278 ppm～0.330 ppm）及び  $1.028 \pm 0.050$  ppm（0.973 ppm～1.120 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。

## I 試験材料

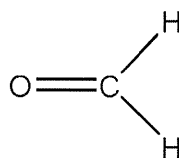
## I-1 被験物質の性状等

## I-1-1 名称等

名 称：ホルムアルデヒド  
別 名：メタナール、オキシメタン  
CAS No.：50-00-0

## I-1-2 構造式及び分子量

構造式：



分子量：30.03

## I-1-3 物理化学的性状等

性 状：刺激臭のある無色液体  
沸 点：-19.2℃  
蒸 気 圧：1.33kPa (10mmHg) (-88℃)  
比 重：0.815

## I-2 使用ホルムアルデヒド発生用原液

名 称：ホルムアルデヒド液  
製 造 元：和光純薬工業株式会社  
カタログ番号：064-00406  
ロット番号：DCR2374  
純 度：37.3% (メタノールを7.4%含有)  
\* 詳細は別紙 - 1参照

## 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、ホルムアルデヒド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（2011年4月5日生まれ）で導入し、検疫（1週間）、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、24.4～30.4 g）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（2011年4月12日生まれ）で導入し、検疫（1週間）、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、24.6～28.2 g）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（0.1 ppm 群；午後0時30分から翌日午前10時30分、0.3 ppm 群；午後0時15分から翌日午前10時15分、1 ppm 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、0.1、0.3及び1 ppm の3段階に設定した。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。

#### 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ヒトへ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、0.1 ppm 群は午後0時30分から翌日午前10時30分、0.3 ppm 群は午後0時15分から翌日午前10時15分、1 ppm 群は午後0時から翌日午前10時とした。

投与濃度はホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppm を考慮して、1、0.3及び0.1 ppm 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。5°Cに設定した循環式恒温槽（TRL-N11L、トーマス科学器械製）中のホルムアルデヒド液入り密封容器に、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、ジャパングアテックス製) を発生容器内のホルムアルデヒド液に浸し、これに清浄空気（発生空気及び搬送空気）を供給し、バブリングすることでホルムアルデヒドを気化させた。このホルムアルデヒド（気体）を含む空気を被験物質供給装置（柴田科学(株)特注）に導入し、同装置内で清浄空気（希釈空気）と混合し、循環式恒温槽で一定温度（23°C）にした後、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た。対照群は新鮮空気の換気のみとした。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、2 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 (LpDNPH H30、スペルコ社) 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) 被験物質濃度の測定

2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管 LpDNPH H30(カタログ番号: 505323 スペルコ社)で捕集したホルムアルデヒドは、捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HPLC 分析用 和光純薬工業株式会社)20 mL によりメスフラスコに抽出し、濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-10 島津製作所)により分析を実施した。なお、HPLC の分析条件に関して、移動相組成はアセトニトリル：蒸留水=60：40、流量は 1 mL/min、カラムは L-column ODS(4.5 mm φ×150 mm、粒径：5 μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長は UV 260 nm、試料注入量は 10 μL とした。

また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品ホルムアルデヒド-DNPH(カタログ番号: 4M7177 スペルコ社)を用い、0.1~10 μg/mL の範囲で検量線を作成した。

## 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	0.1 ppm 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	0.3 ppm 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	1 ppm 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 4511 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（518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； $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$ < $22.4^{\circ}\text{C} \sim 22.9^{\circ}\text{C}$ >
湿度	： 検疫室； $55 \pm 15\%$ 吸入チャンバー内； $30 \sim 70\%$ < $50.4\% \sim 54.4\%$ >
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； $12 \pm 1$ 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(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- $\gamma$ 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)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は本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、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

#### <検査及び馴化期間>

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。

### II-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。

### II-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。

## (I) 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た状態とし、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+ $\alpha$ 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  $\mu$ L/tube、Lung : 1,000  $\mu$ 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)  $\mu$ 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て行った。)

- 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て行った。）

- 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置いておいた。
- 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。

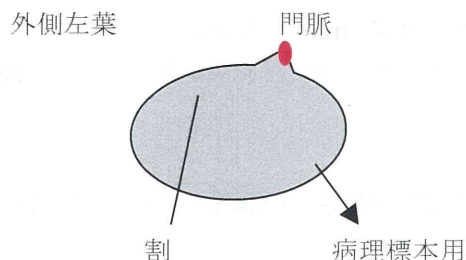
## 2) 天秤・麻酔

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（胆嚢のついている葉）。
- 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ア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。各サンプルの厚さが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、氷上のマイクロア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