

・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 0.0397 ± 0.001 ppm（0.0379 ppm～0.0408 ppm）、 0.117 ± 0.003 ppm（0.104 ppm～0.0128 ppm）及び 0.399 ± 0.009 ppm（0.392 ppm～0.409 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 7 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(6時間暴露)

単位:°C

チャンパー 群	CH-1 対照群	CH-2 0.04 ppm 群	CH-3 0.12 ppm 群	CH-4 0.40 ppm 群
全期間				
平均値	22.5	22.6	22.6	22.6
標準偏差	0.3	0.4	0.4	0.4
日別平均値				
6月4日	22.5	22.5	22.6	22.5
6月5日	22.5	22.6	22.6	22.6
6月6日	22.5	22.6	22.5	22.6
6月7日	22.5	22.6	22.5	22.6
6月8日	22.5	22.6	22.6	22.6
6月9日	22.5	22.6	22.6	22.6
6月10日	22.5	22.6	22.6	22.6
6月11日	22.5	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(6時間暴露)

単位:%

チャンパー 群	CH-1 対照群	CH-2 0.04 ppm 群	CH-3 0.12 ppm 群	CH-4 0.40 ppm 群
全期間				
平均値	56.2	56.1	55.3	56.8
標準偏差	1.8	2.1	1.7	2.4
日別平均値				
6月4日	56.0	55.7	54.7	56.3
6月5日	56.1	56.1	55.1	56.7
6月6日	55.8	55.6	54.9	56.2
6月7日	56.3	56.3	55.5	56.9
6月8日	56.4	56.3	55.5	56.9
6月9日	56.3	56.3	55.6	57.1
6月10日	56.2	56.2	55.4	57.0
6月11日	57.1	56.9	56.1	58.0

表 3 吸入チャンバー内環境の測定結果:換気量と換気回数(6時間暴露)

単位:換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー 群	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
	対照群		0.04 ppm 群		0.12 ppm 群		0.40 ppm 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	211.4	12.0	213.2	12.1	212.7	12.0	213.9	12.1
標準偏差	1.2	0.1	1.8	0.1	1.9	0.1	2.3	0.1
日別平均値								
6月4日	211.5	12.0	212.9	12.1	213.5	12.1	213.5	12.1
6月5日	211.7	12.0	213.0	12.1	213.0	12.1	214.1	12.1
6月6日	211.5	12.0	214.0	12.1	213.1	12.1	214.2	12.1
6月7日	211.1	11.9	213.2	12.1	212.6	12.0	214.6	12.1
6月8日	211.1	11.9	212.4	12.0	212.0	12.0	212.9	12.1
6月9日	211.8	12.0	213.0	12.1	212.7	12.0	214.5	12.1
6月10日	211.3	12.0	213.9	12.1	212.4	12.0	214.0	12.1
6月11日	210.7	11.9	213.1	12.1	212.2	12.0	212.0	12.0

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度(6 時間暴露)

	単位: ppm			
	対照群	0.04 ppm群	0.12 ppm群	0.40 ppm群
6 月 4 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0379	0.104	0.392
6 月 5 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0402	0.108	0.393
6 月 6 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0397	0.112	0.399
6 月 7 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0407	0.128	0.409
6 月 8 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0395	0.119	0.399
6 月 9 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0408	0.120	0.400
6 月 10 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0393	0.127	0.400
平均濃度	0	0.0397	0.117	0.399
標準偏差	0	0.001	0.003	0.009

表 5 解剖時体重及び肝臓重量(6時間暴露)

1 回目暴露終了時解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1001	25.0	1.134
	1002	28.4	1.174
	1003	25.6	1.048
0.04 ppm 群	1101	27.0	1.181
	1102	25.4	1.110
	1103	25.5	1.096
0.12 ppm 群	1201	27.4	1.204
	1202	25.4	1.040
	1203	25.8	1.126
0.04 ppm 群	1301	25.3	1.204
	1302	28.0	1.402
	1303	25.1	1.073

1 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1004	26.0	1.258
	1005	26.7	1.381
	1006	28.3	1.519
0.04 ppm 群	1104	26.1	1.384
	1105	26.5	1.305
	1106	28.5	1.626
0.12 ppm 群	1204	26.7	1.472
	1205	26.8	1.429
	1206	28.5	1.475
0.04 ppm 群	1304	27.2	0.948
	1305	28.9	1.676
	1306	25.6	1.384

3 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1007	26.5	1.287
	1008	25.8	1.317
	1009	28.9	1.445
0.04 ppm 群	1107	27.4	1.446
	1108	25.7	1.371
	1109	27.0	1.362
0.12 ppm 群	1207	27.0	1.395
	1208	26.5	1.431
	1209	27.4	1.463
0.40 ppm 群	1307	26.0	1.352
	1308	27.7	1.475
	1309	27.7	1.703

7 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1010	26.5	1.356
	1011	26.6	1.037
	1012	27.1	1.397
0.04 ppm 群	1110	27.5	1.385
	1111	27.2	1.436
	1112	26.4	1.362
0.12 ppm 群	1210	26.8	1.405
	1211	26.4	1.327
	1212	26.5	1.433
0.40 ppm 群	1310	26.2	1.328
	1311	26.2	1.395
	1312	24.8	1.227

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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
0.04 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
0.12 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
0.40 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
0.04 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
0.12 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
0.40 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
0.04 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
0.12 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
0.40 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
0.04 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
0.12 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
0.40 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

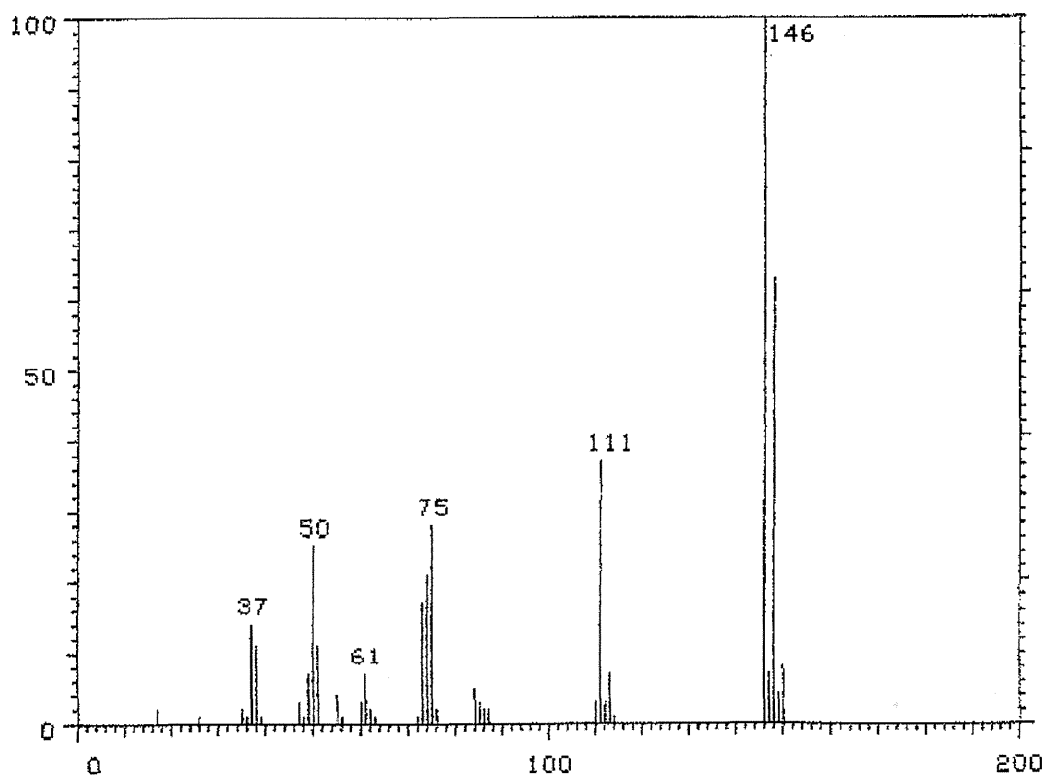
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

3日目解剖

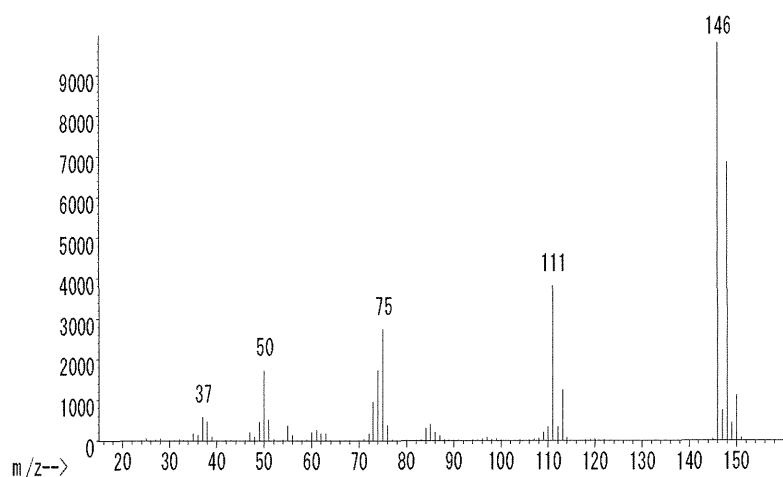
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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



被験物質のマススペクトル



パラジクロロベンゼンのマススペクトル

McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図1 マススペクトル

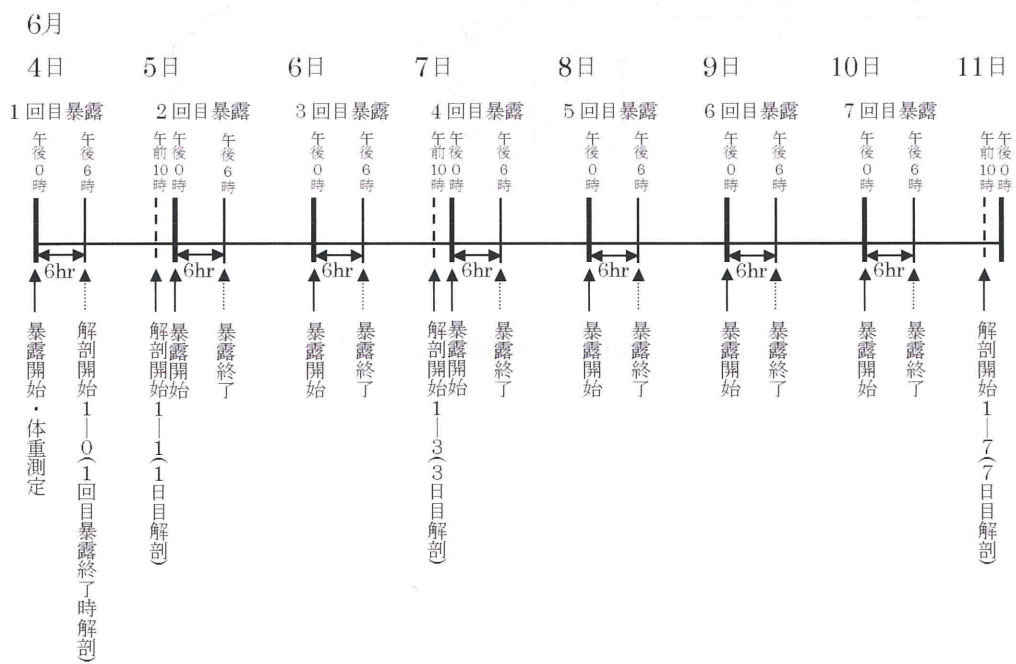
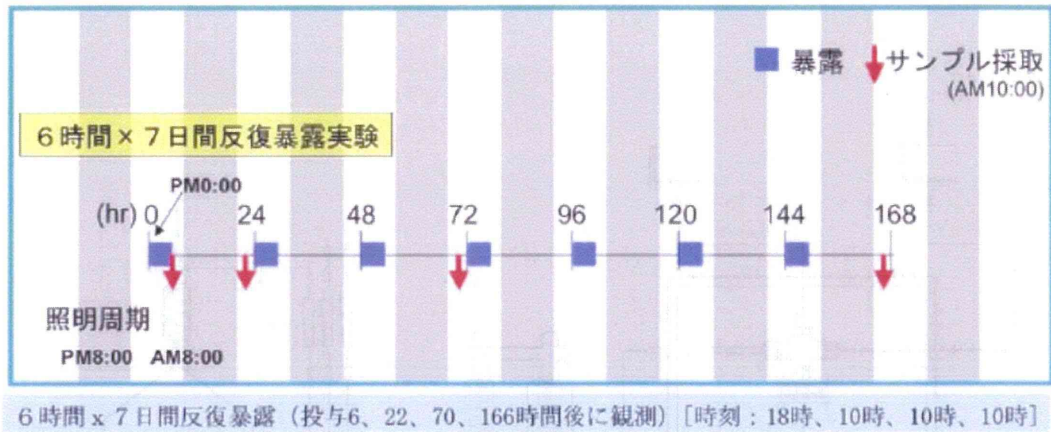


図 2 試験スケジュール(6時間暴露)

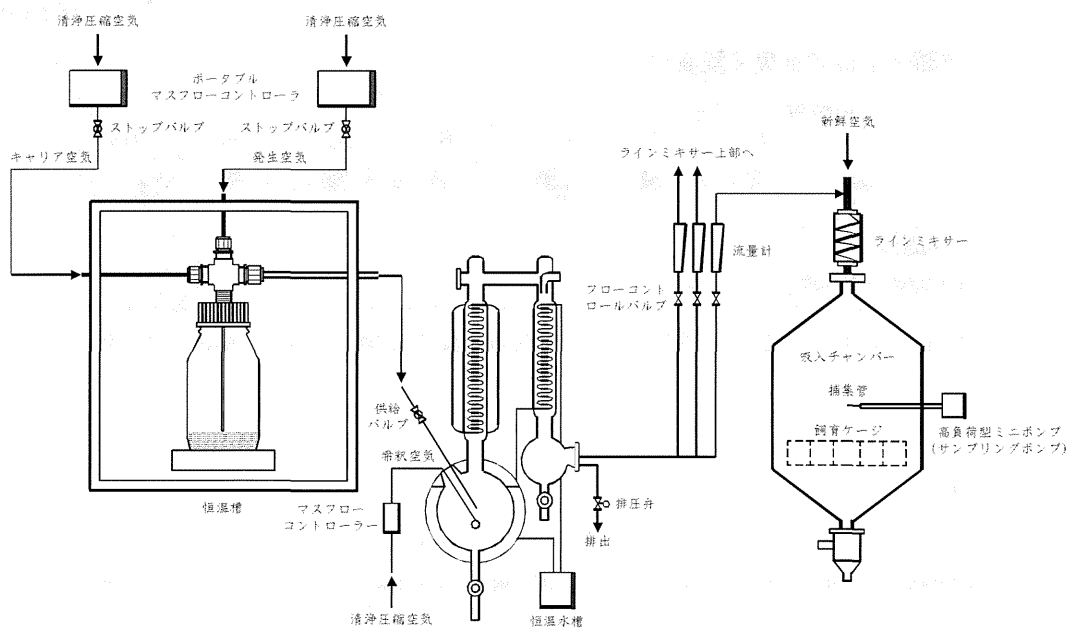


図 3 吸入装置のシステム

別紙-1

検査成績書

日本バイオアッセイ研究センター 御中

2013年4月11日
和光純薬工業株式会社

Code No.047-01315
p-ジクロロベンゼン



規格ノ等級	和光特級	
Lot No.	WEP0371	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	白色の結晶	白色の結晶
エタノール溶状	透明	試験適合(透明)
水分	0.0%	0.1%以下
含量(毛管カラムGC)	99.9%	98.0%以上
検査年月日	2012/03/02	

判定	合格	検査責任者	上田恵美
----	----	-------	------

(1/1)

成績書発行番号

9999197

委託研究報告書

VI. 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

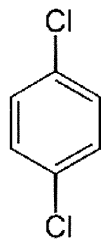
1-1-1 名称等

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。