

B. 研究方法

B-1 ホルムアルデヒド

被験物質をホルムアルデヒド (formaldehyde: 分子量: 30.03、CAS No.: 50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号: 064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度37.3% [メタノール7.4%含有、ギ酸含量0.04%以下]、和光純薬工業) を使用した。雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に1群8匹、4用量 (0、0.1、0.3、1.0 ppm) にて (暴露開始時8週齢)、22時間/日×28日間反復全身吸入暴露 (午後0時から翌日10時まで暴露) を実施し、その際の肺について、電子顕微鏡を用いた高精度な解析を検討した。解剖は、暴露28日目の10時30分より開始し、1匹あたり5分間でサンプリングをおこなった。マウスは、吸入暴露用のステンレス製金網ケージにて個別飼育し、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間点灯 (8:00~20:00) の環境下で、固形飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) と水道水 (フィルターろ過した後、紫外線照射) を自由に摂取させて吸入暴露を実施した。一般状態の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を、馴化期間 (2週間) 中は週1回、暴露期間中は週2回、測定した。12週齢の C57BL/6J 雄マウスの解剖に際しては、ネプタール (製品名: ソムノペンチル、製造元: 共立製薬株式会社) の15倍希釈液 (生理食塩水、用事調整) を10 ml/kg の投与容量にて腹腔内投与することによる麻酔下で、腋窩動静脈の切断により放血致死させた。採取臓器は、肺、肝、腎、脾、脳、心及び胸腺とし、肝、腎、脾、脳及び心について重量を測定した。病理組織学検索用に採取した肝、腎、脾、脳、心及び胸腺は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後薄切により得た標本について、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、形態学的変化を光学顕微鏡により検査した。

1 TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM

試料の作製・検索方法を確立

肺については、放血死させて開胸した動物の甲状腺の下端で気管を切断し、直ちに固定液を高さ20cmの落下圧で気管の断端から左右の肺内に2%パラホルムアルデヒドにグルタルアルデヒドを0.5%添加した固定液を注入し、生理的に肺が拡張した時と同様になる状態で固定した。肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った。固定した肺はショ糖を3%添加したリン酸緩衝液を交換しながら1週間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して 4°C で2ヶ月間保存した。左肺の全割組織を細気管支主幹に沿って1mm幅で長さ12mmに切り出し、1%オスミウム酸で後固定、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。エポキシ樹脂包埋ブロックを $3.5 \times 10\text{mm}$ にトリミングし、Nanotome Thick ダイヤモンドナイフで肺全割組織のセミシン切片を厚さ $1\mu\text{m}$ で切削。トルイジンブルーで染色してセミシン標本作製した (図ホルムアルデヒド・1-2)。光学顕微鏡下で肺全体の組織の保存性の良否の確認を行い、その部位を顕微鏡下で切り出してエポキシ樹脂に再包埋、超薄切、ウラン・鉛の二重染色を施してTEMによる観察を行って、今回確立したTEM試料作製、検索方法での超微細形態構造の保存状態を確認した。その概要を図ホルムアルデヒド・3に示した。

2 極低濃度ホルムアルデヒドに28日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

TEMによる検索はJEM 1400 (日本電子) を用いて加速電圧80~100kVで行った。気道系 (肺内気管支から1ポイント、細気管支から2ポイント、終末細気管支から1ポイント) から計4ポイント、肺実質系では呼吸細気管支遠位端を中心とした細葉中心領域から1ポイントとした (図ホルムアルデヒド・4)。本研究では極低濃度ホルマリン暴露によるシックハウスを想定していることから、気道

系と肺実質領域で毒性影響を受けやすい領域として知られている細葉中心領域を重点的に検索した。これら4ポイントを観察することで、肺の気道系と実質系の全般にわたる高精度な形態学的検索を行った。動物の体重、摂餌量及び臓器重量の統計処理については、溶媒群と投与群間の有意差の検定をStudentのt検定によりおこないP値が0.05未満の場合を有意と判定した。

B・2 キシレン

被験物質をキシレン (Xylene; 分子量: 106.17、CAS No.: 1330-20-7) とし、試薬として α -体、 m -及び p -体の混合キシレン (カタログ番号: 244-00081、キシレンの α -、 m -、 p -体及びエチルベンゼンの含有量 (絶対純度%) はそれぞれ23.1%、38.0%、16.8%及び13.2%、和光純薬工業) を使用した。

雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)に1群8匹、4用量 (0、0.2、0.7、2.0 ppm) にて(暴露開始時8週齢)、22時間/日×28日間反復全身吸入暴露(午後0時から翌日10時まで暴露)を実施し、その際の肺について、電子顕微鏡を用いた高精度な解析を検討した。解剖は、暴露28日目の10時30分より開始し、1匹あたり5分間でサンプリングをおこなった。マウスは、吸入暴露用のステンレス製金網ケージにて個別飼育し、室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間点灯 (8:00～20:00) の環境下で、固形飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) と水道水(フィルターろ過した後、紫外線照射)を自由に摂取させて吸入暴露を実施した。一般状態の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を、馴化期間 (2週間) 中は週1回、暴露期間中は週2回、測定した。12週齢のC57BL/6J雄マウスの解剖に際しては、ネプタール (製品名: ソムノペンチル、製造元: 共立製薬株式会社) の15倍希釈液 (生理食塩水、用事調整) を10 ml/kgの投与容量にて腹腔内投与することによ

る麻酔下で、腋窩動静脈の切断により放血致死させた。採取臓器は、肺、肝、腎、脾、脳、心及び胸腺とし、肝、腎、脾、脳及び心について重量を測定した。病理組織学検索用に採取した肝、腎、脾、脳、心及び胸腺は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後薄切により得た標本について、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、形態学的変化を光学顕微鏡により検査した。

1 TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM試料の作製

肺については、放血死させて開胸した動物の甲狀腺の下端で気管を切断し、直ちに固定液を高さ20cmの落下圧で気管の断端から左右の肺内に2%パラホルムアルデヒドにグルタルアルデヒドを0.5%添加した固定液を注入し、生理的に肺が拡張した時と同様になる状態で固定した。肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った。固定した肺はショ糖を3%添加したリン酸緩衝液を交換しながら1週間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して4℃で5ヶ月間保存した。左肺の全割組織を細気管支主幹に沿って1mm幅で長さ12mmに切り出し、1%オスミウム酸で後固定、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。エポキシ樹脂包埋ブロックを $3.5\times 10\text{mm}$ にトリミングし、Nanotome Thickダイヤモンドナイフで肺全割組織のセミシン切片を厚さ $1\mu\text{m}$ で切削。トルイジンブルーで染色してセミシン標本作製した (図ホルムアルデヒド・1-2と同様)。光学顕微鏡下で肺全体の組織の保存性の良否の確認を行い、その部位を顕微鏡下で切り出してエポキシ樹脂に再包埋、超薄切、ウラン・鉛の二重染色を施してTEMによる観察を行って、今回確立したTEM試料作製、検索方法での超微細形態構造の保存状態を確認した (概要は図ホルムアルデヒド・3と同様)。

2 極低濃度キシレンに28日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

TEMによる検索はJEM 1400 (日本電子) を用いて加速電圧80~100kVで行った。TEM検索部位として、肺の全割セミシン切片から線毛上皮が主に分布する細気管支主幹から1ポイント、非線毛細胞 (クララ細胞) などが主として分布する気道末端部から1ポイントを選定した (図キシレン・1)。

動物の体重、摂餌量及び臓器重量の統計処理については、溶媒群と投与群の間の有意差の検定をStudentのt検定によりおこないP値が0.05未満の場合を有意と判定した。

B-3 パラジクロロベンゼン

被験物質をパラジクロロベンゼン (paradichlorobenzene; 分子量: 147, CAS No.: 106-46-7) とし、試薬としてパラジクロロベンゼン (カタログ番号: 047-01315、特級(99.9%)、和光純薬工業) を使用した。雄性C57BL/6Jマウス (日本チャールスリバー) に1群8匹、4用量 (0, 0.04, 0.12, 0.40 ppm) にて (暴露開始時8週齢)、22時間/日×28日間反復全身吸入暴露 (午後0時から翌日10時まで暴露) を実施し、その際の肺について、電子顕微鏡を用いた高精度な解析を検討した。解剖は、暴露28日目の10時30分より開始し、1匹あたり5分間でサンプリングをおこなった。マウスは、吸入暴露用のステンレス製金網ケージにて個別飼育し、室温24±1℃、湿度55±5%、12時間点灯 (8:00~20:00) の環境下で、固形飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) と水道水 (フィルターろ過した後、紫外線照射) を自由に摂取させて吸入暴露を実施した。一般状態の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を、馴化期間 (2週間) 中は週1回、暴露期間中は週2回、測定した。12週齢のC57BL/6J雄マウスの解剖に際しては、ネンブタール (製品名: ソムノペンチル、製

造元: 共立製薬株式会社) の15倍希釈液 (生理食塩水、用事調整) を10 ml/kgの投与容量にて腹腔内投与することによる麻酔下で、腋窩動静脈の切断により放血致死させた。採取臓器は、肺、肝、腎、脾、脳、心及び胸腺とし、肝、腎、脾、脳及び心について重量を測定した。病理組織学検索用に採取した肝、腎、脾、脳、心及び胸腺は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後薄切により得た標本について、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、形態学的変化を光学顕微鏡により検査した。

1 TEMによる肺毒性の検索を可能とする、試料の作製

肺については、放血死させて開胸した動物の甲状腺の下端で気管を切断し、直ちに固定液を高さ20cmの落下圧で気管の断端から左右の肺内に2%パラホルムアルデヒドにグルタルアルデヒドを0.5%添加した固定液を注入し、生理的に肺が拡張した時と同様になる状態で固定した。肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った。固定した肺はショ糖を3%添加したリン酸緩衝液を交換しながら1週間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して4℃で2ヶ月間保存した。左肺の全割組織を細気管支主幹に沿って1mm幅で長さ12mmに切り出し、1%オスミウム酸で後固定、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。エポキシ樹脂包埋ブロックを3.5×10mmにトリミングし、Nanotome Thick ダイヤモンドナイフで肺全割組織のセミシン切片を厚さ1μmで切削。トルイジンブルーで染色してセミシン標本を作製した (図ホルムアルデヒド・1-2と同様)。

C. 研究結果

C-1 ホルムアルデヒド

1 極低濃度のホルムアルデヒドを22時間/日×28日間反復吸入暴露試験

暴露期間中、全ての暴露群において一般状態の変化は認められなかった。暴露期間中の体重及び摂餌量についてそれぞれ表ホルムアルデヒド・1及び表ホルムアルデヒド・2に示す。体重は対照群と比較し、1 ppm 投与群（高用量群）において暴露14、18及び25日目に、また0.3 ppm 投与群において暴露14日目に一過性に、有意に減少したが、暴露最終日である28日目にはいずれの暴露群でも有意な差は認められなかった。摂餌量は、対照群と比較し、1 ppm 投与群（高用量群）において暴露7、11、18及び21日目に、また0.3 ppm 投与群において暴露4日目に一過性に、有意に減少したが、暴露最終日である28日目にはいずれの暴露群でも有意な差は認められなかった。各臓器の絶対・相対重量を表ホルムアルデヒド・3に示す。全ての暴露群について対照群と比較し、有意な差は認められなかった。病理組織学的検査結果を表ホルムアルデヒド・4に示す。検索した肺、脳、肝、腎、脾及び心臓にはホルムアルデヒドの暴露の影響は認められなかった。

2 超微細形態学的検索の為の確認

図ホルムアルデヒド・5に本分担研究で電顕検索用に固定した肺組織から光顕用スクリーニングサンプルとして作製したヘマトキシリン・エオジン染色標本の高倍率撮影写真、図ホルムアルデヒド・6に常法により作製した肺の病理組織標本の高倍率撮影写真を示した。

図ホルムアルデヒド・5では図ホルムアルデヒド・6に比べて線毛上皮細胞、クララ細胞、Ⅱ型肺胞上皮細胞などの肺の各組織が瑞々しい状態で良く保存されており、アーティファクトはほとんど見られなかった。本分担研究で作製した肺の光顕用スクリーニングサンプルは全て図ホルムアルデヒド・3に示した固定による修飾はなく、良質な状態であった。このことから、今回確立した肺組織

の固定方法を採用することによって高品質の電顕用サンプルを安定して得ることが出来た。図ホルムアルデヒド・7に1.0 ppm 暴露群の肺、図ホルムアルデヒド・8に対照群の肺を示した。1.0 ppm 暴露群では細気管支上皮が対照群よりも幾分扁平となっている。この程度の変化は病理組織学的には一般に毒性変化として取り上げるものではないが、TEM による超微細形態検索候補と考えた。

3 低濃度のホルムアルデヒドのマウスの肺に及ぼす超微細形態影響の検索

① TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM試料の作製・検索方法を確立

光顕によるセミシン切片的観察で、肺組織は全体が良好な状態で保存され、固定不良を呈する箇所は認められなかった。電顕による観察でも、細気管支、肺泡領域、肺胸膜とも超微細構造が良く保たれていることが確認された(図ホルムアルデヒド・9—14)。今回、検討したマウスの肺の固定方法は、多くの動物を解剖する毒性試験で時間のかかる灌流固定を行わずに電顕レベルでの肺組織の検索に耐え得る固定を可能にすることが示された。また、通常のパラフィン包埋標本に匹敵する大きさのセミシン切片を作製することで、光顕で検索部位を確認しながら電顕検索を行うことが可能となり、シックハウスなど極低濃度の化学物質の毒性、病態検索みならず粒子状ナノマテリアルの毒性検索でも有用なツールになると考える。このように、極めて大きな効果が期待される反面、試料を包埋したエポキシ樹脂ブロックから肺全断面のセミシン切片（厚さ1 μm）を作製する際に、肺内の気管支、肺胞管、肺泡までを連続して光学顕微鏡で検索できるように薄切面を削り出す工程は技術的に極めて難しい超精密工程であり、この超精密削り出し工程にかなりの時間を要した。また、肺内の気道のなかで上皮下に軟骨が存在する肺内気管支に相当する部位は

肺門付近の極めて短い領域に存在することが判明した。作製したTEM試料には切出し位置の僅かな違いで肺内気管支（気管支軟膏が存在する）が含まれていなかった動物もあった。

② 極低濃度ホルムアルデヒドに28日間暴露したマウス肺の超微細形態学的（TEM）検索

光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて極低濃度ホルムアルデヒドを28日間吸入暴露したマウスの肺を詳細に検索した結果、極低濃度ホルムアルデヒドの暴露による形態学的変化は認められなかった。（図ホルムアルデヒド・15－20）

C・2 キシレン

1 極低濃度キシレンを22時間/28日間反復吸入暴露したマウスの病理組織学的検査

一般状態、体重及び摂餌量：暴露期間中、全ての暴露群において一般状態の変化は認められなかった。暴露期間中の体重推移を表キシレン・1に、摂餌量の推移を表キシレン・2に示した。体重、摂餌量とも全てので対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

臓器重量：各臓器の絶対・相対重量を表キシレン・3に示した。各臓器とも全ての暴露群で対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

病理組織学的検査：病理組織学的検査結果を表キシレン・4に示した。検索した肺、脳、肝、腎、脾及び心臓にはキシレン暴露の影響は認められなかった（図キシレン・2－5）。

なお、肺の病理組織学的検査は切り出し位置を確定次第実施する。

2 極低濃度キシレンを22時間/28日間反復吸入暴露したマウスの肺のTEMによる検索

光学顕微鏡による観察では投与群の動物の細気管支の線毛細胞と気道終末部のクララ細胞には形態学的に対照群と差を認め無かったが、TEM検索で、極低濃度キシレン暴露群の動物の気道終末部の非線毛細胞（クララ細胞）などに分

泌顆粒の増加を示唆する所見が認められた（図キシレン・6－12）。現在のところ、細胞のオルガネラレベルでの暴露の影響を正確に評価するには正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動に関する知見が不足しており、本分担研究で観察された上記の所見が極低濃度キシレン暴露の影響か否かの判定は出来なかった。

C・3 パラジクロロベンゼン

1 極低濃度のパラジクロロベンゼンを22時間/日×28日間反復吸入暴露したマウスの病理組織学的検査

パラジクロロベンゼンの暴露は設定通りに行われた。チャンバー内の実測暴露濃度を表パラジクロロベンゼン・1に示した。

動物の飼育状態には各群とも異常は認められず、体重、摂餌量にもパラジクロロベンゼン暴露の影響は認められなかった。

体重推移を表パラジクロロベンゼン・2に、摂餌量推移を表パラジクロロベンゼン・3に、臓器重量を表パラジクロロベンゼン・4に示した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓について病理組織標本を作製して組織学的検査を行った。その結果、各臓器ともパラジクロロベンゼン暴露の影響は認められなかった。病理組織検査の結果を表パラジクロロベンゼン・5に示した。肺の病理組織学的検査はエポキシ樹脂包埋組織した高用量群のセミシン標本で診断を行ったが、異常所見は認められなかった。脳と肝臓の組織写真をそれぞれ図パラジクロロベンゼン・1と図パラジクロロベンゼン・2に示した。

TEM検索に向けて肺の採材・固定、エポキシ樹脂で包埋を行った。

D. 結論

光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて極低濃度ホルムアルデヒドを28日間吸入暴露した

マウスの肺を詳細に検索した結果、ホルムアルデヒドによる毒性影響は認められなかった。しかし、キシレンを吸入暴露した結果、TEMによる検索では気道終末部の上皮細胞に細胞オルガネラレベルでの形態学的変化が起きている可能性が示されたが、細胞のオルガネラレベルでの暴露の影響を正確に評価するには正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動に関する知見が不足しており、本分担研究では観察された所見が極低濃度キシレン暴露の影響か否かの判定は出来なかった。なお、ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼンを、それぞれ極低濃度で28日間全身吸入暴露した結果、動物の体重や臓器重量、主要臓器の病理組織学的検査では極低濃度の暴露の影響は認められなかった。

本分担研究で開発したTEMによる肺毒性の検索を可能とするTEM試料の作製・検索方法は、シックハウスなど極低濃度の化学物質により引き起こされる病態を捉えるのに有用なツールとして期待されるが、TEMによる詳細検索で肺に対する揮発性化学物質の極低濃度暴露の影響を検出するには、正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動幅に関する知見を蓄積する必要がある。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagano, K, Gotoh, K, Kasai, T, Aiso, S, Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N, Eitaki, Y, Yamada, K, Arito, H and Fukushima, S: Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats, *Journal of Occupational Health*, 2011,

53: 51-63.

Nagano, K, Nishizawa, T, Eitaki, Y, Ohnishi, M., Noguchi, T, Arito, H and Fukushima, S: Pulmonary Toxicity in Mice by 2- and 13-week Inhalation Exposures to Indium-tin Oxide and Indium Oxide Aerosols, *Journal of Occupational Health*, 2011, 53, 234-239.

Ohnishi M., Umeda Y, Katagiri T, Kasai T, Ikawa N, Nishizawa T, Fukushima S. Inhalation carcinogenicity of 1,1,1-trichloroethane in rats and mice. *Inhalation Toxicology* 25: 298-306, 2013.

Ohnishi M., Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 8: 30, 2013.

2. 学会発表

大西誠、笠井辰也、山本正弘、齋藤美恵子、福島昭治
多層カーボンナノチューブの新しい分析法の提案：マーカーを用いた肺中多層カーボンナノチューブの微量定量法の開発 第86回日本産業衛生学会(2013年5月)(松山).

笠井辰也、片桐卓、大西誠、斎藤新、後藤薫、平井繁之、晴佐久満、西沢共司、福島昭治

多層カーボンナノチューブのラットにおける
13週間全身吸入曝露試験：曝露環境（エアロ
ゾル濃度、濃度制御、粒度分布m形態観察）第
86回日本産業衛生学会(2013年5月)(松山).

加納浩和、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、
大西誠、松本道治、福島昭治

3-アミノフェノールのラット及びマウスへの
経口投与による発がん性と慢性毒性第 86 回
日本産業衛生学会(2013 年 5 月)(松山).

妹尾英樹、加納浩和、鈴木正明、大西誠、
笠井辰也、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、
福島昭治

ナノマテリアルの生体影響評価における気管
内投与法の有用性と活用方法 第 28 回発癌病
理研究会(2013 年 8 月)(沖縄).

G. 知的財産権の出願・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

動物、TEM 検索臓器、固定液

動物：C57BL/6J マウス、雄 12 週齢、肺

TEM 検索臓器：肺

固定液：2%パラホルムアルデヒド溶液 + グルタルアルデヒドを 0.5%添加

Buffer：インスタント磷酸緩衝液 4（三菱メディエンス（株）、1/15 mol/L、pH 7.2）

肺の固定手順

- 気管を甲状腺の下端で切断、断端から固定液を肺内に注入
- 両肺を肺門部で気管支から切断
- 左肺、右肺とも固定液に浸漬（肺は液面に浮いた状態）
- 真空デシケータで陰圧(0.05～0.06MPa)にして、肺胞内の残存空気を脱気
- 常圧に戻して放置 →肺は固定瓶の底に沈降

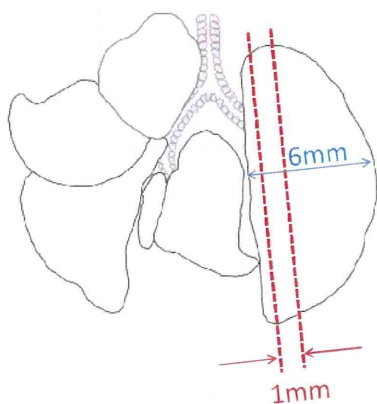


真空デシケーター

固定液のリンス、保存

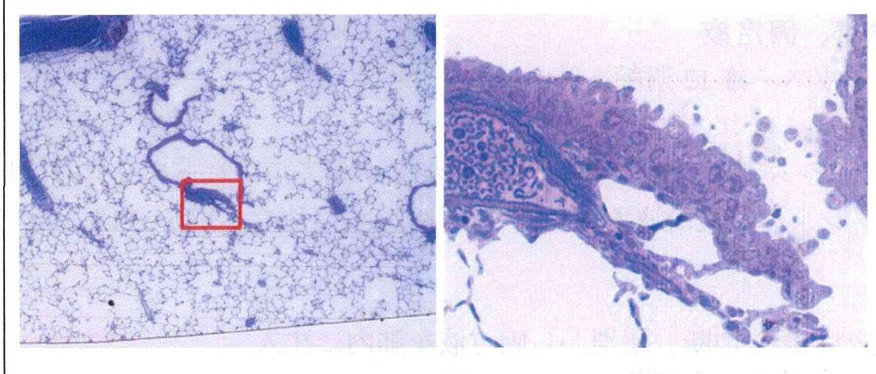
- 浸漬固定 1 日
- ショ糖を 3%添加した磷酸緩衝液を交換しながら 1 週間リンス
- その後、磷酸緩衝液に浸漬して 4℃で 2 ヶ月間保存

肺組織の切り出し



- 左肺を固定後、細気管支主幹に沿って全割組織を切り出す。
- 切り出した組織片をウルトラミクロトームで薄切可能な大きさにトリミング（長辺が 12mm 以内）

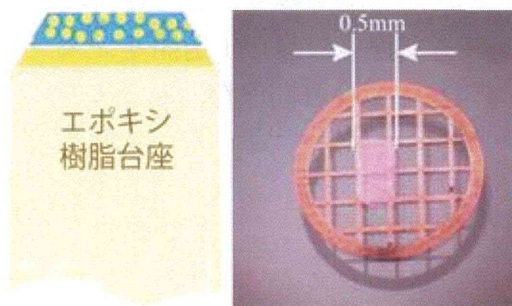
図ホルムアルデヒド・1 TEM 検索を目的とした肺組織の固定と切り出し



エポキシ樹脂包埋・セミン切片



実体顕微鏡で確認しながら、セミン切片の目的とする視野の部分に、
エポキシ樹脂の台座を接着
→ 目的の視野をスライドガラスから剥ぎ取る



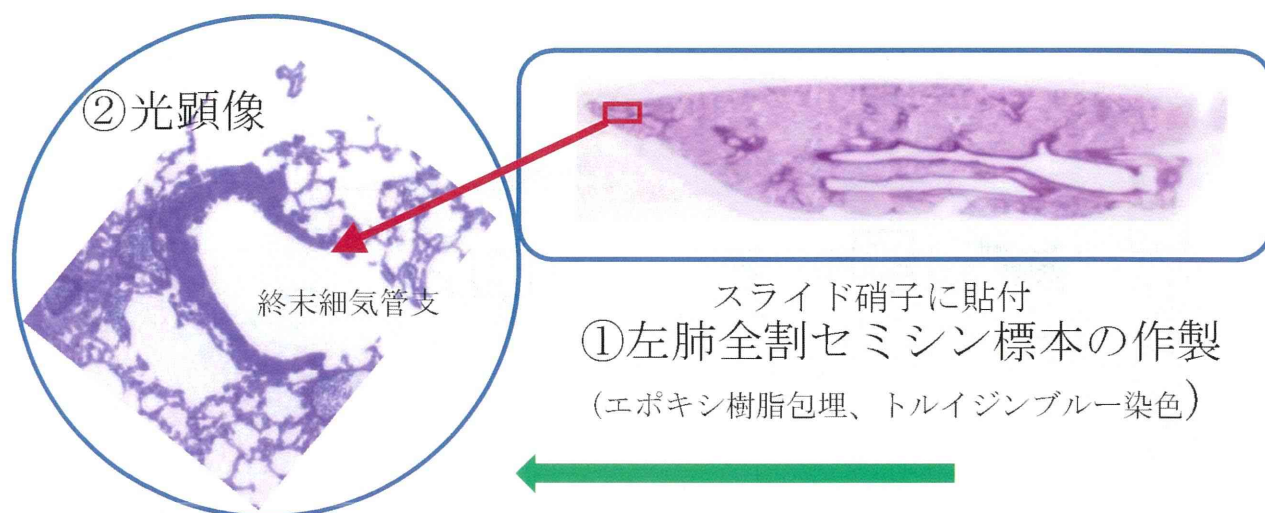
実体顕微鏡下で、目的の視野をメッシュの枠目に合わせてトリミング



試料完成

超薄切切片をメッシュに貼付

図ホルムアルデヒド・2 TEM 試料作製法



② 光顕観察で

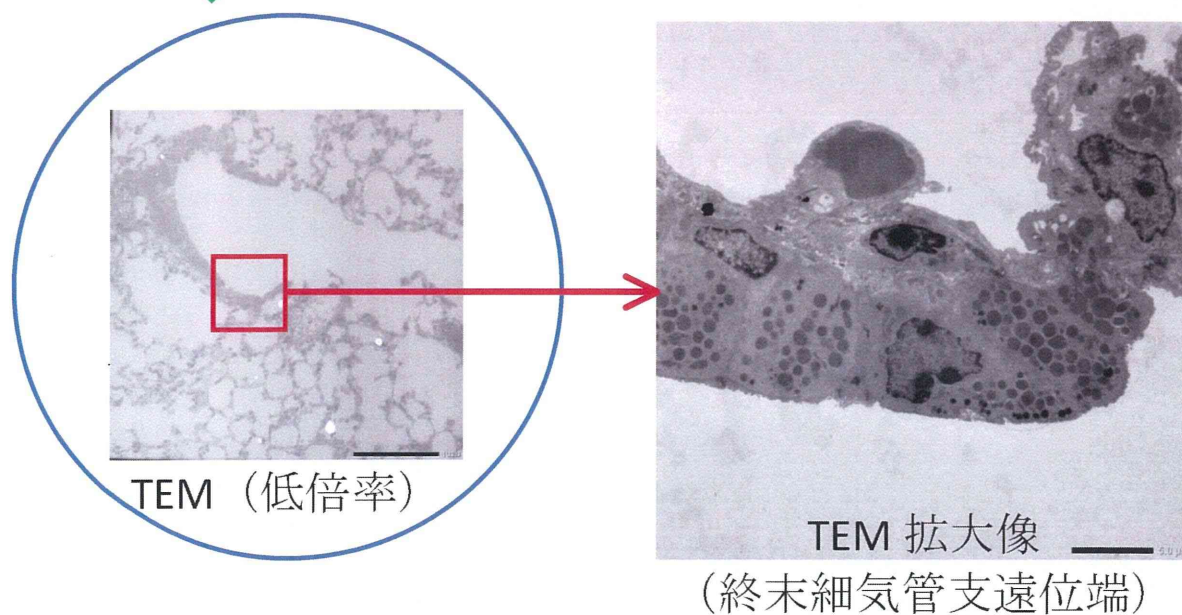
ターゲット部位を選定、切り出し、
スライドガラスから剥ぎ取る



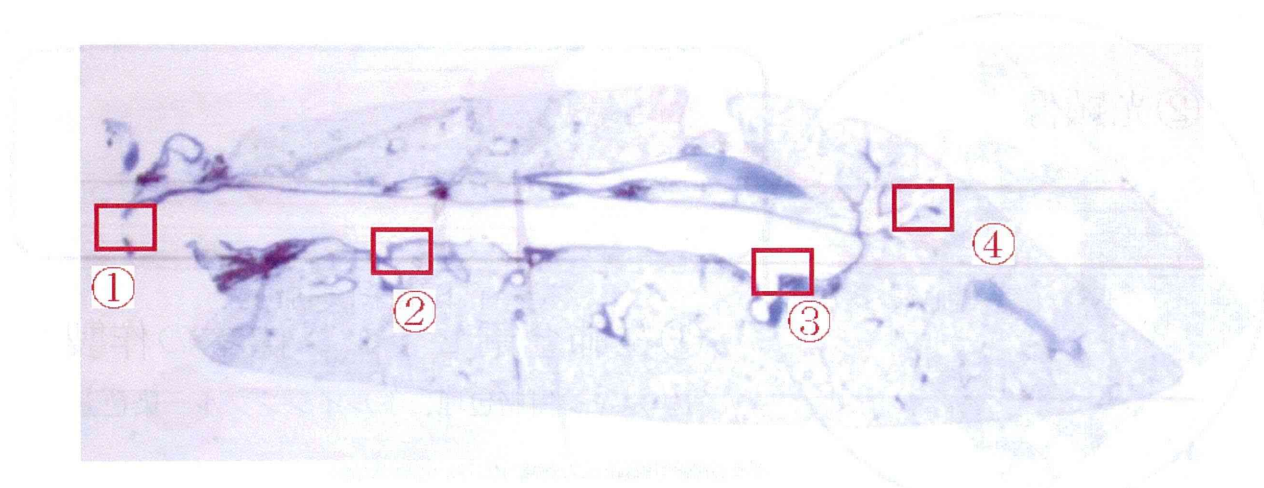
③ エポキシ樹脂で再包埋、 超薄切切片の作製

TEM 観察

・・・光顕で観察した切片②そのものを TEM で観察 (左下円内赤枠)
肺の全割標本を光顕で観察、任意の部位を切り出して、
超微細形態観察を行うことが可能となった (網羅的電顕検索法)

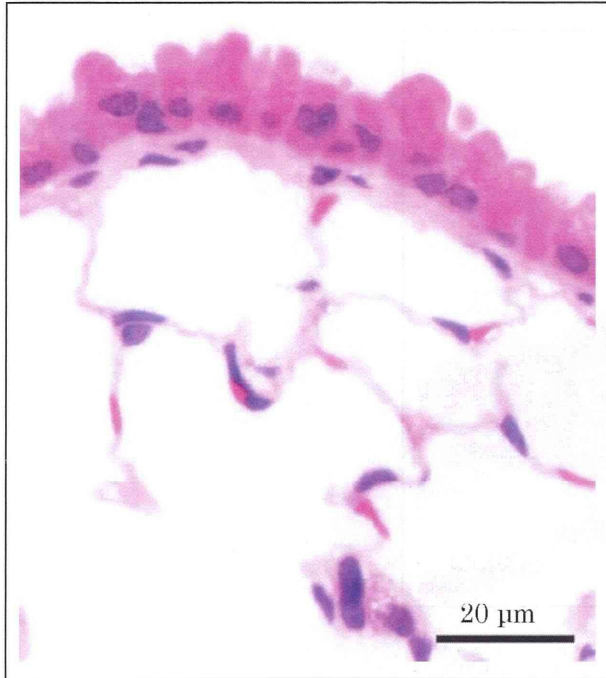


図ホルムアルデヒド・3 TEM による肺毒性の検索を目的とした試料作製方法



図ホルムアルデヒド・4 低濃度のホルムアルデヒドのマウスの肺に及ぼす超微細形態影響の検索
TEM 検索ポイント

①：肺内気管支、②、③：細気管支、④：終末細気管支と細葉中心領域



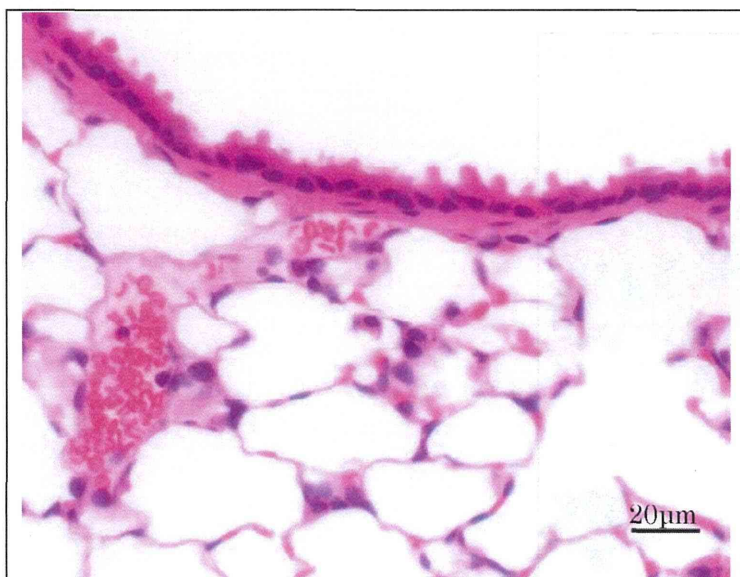
図ホルムアルデヒド・5 本分担研究、対照群の肺、光顕用スクリーニングサンプル
ヘマトキシリン・エオジン染色



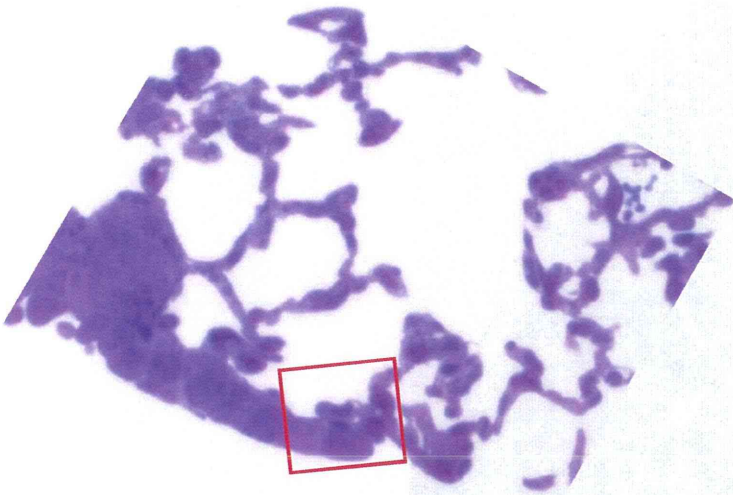
図ホルムアルデヒド・6 常法により作製した対照群の肺の病理組織標本、
ヘマトキシリン・エオジン染色



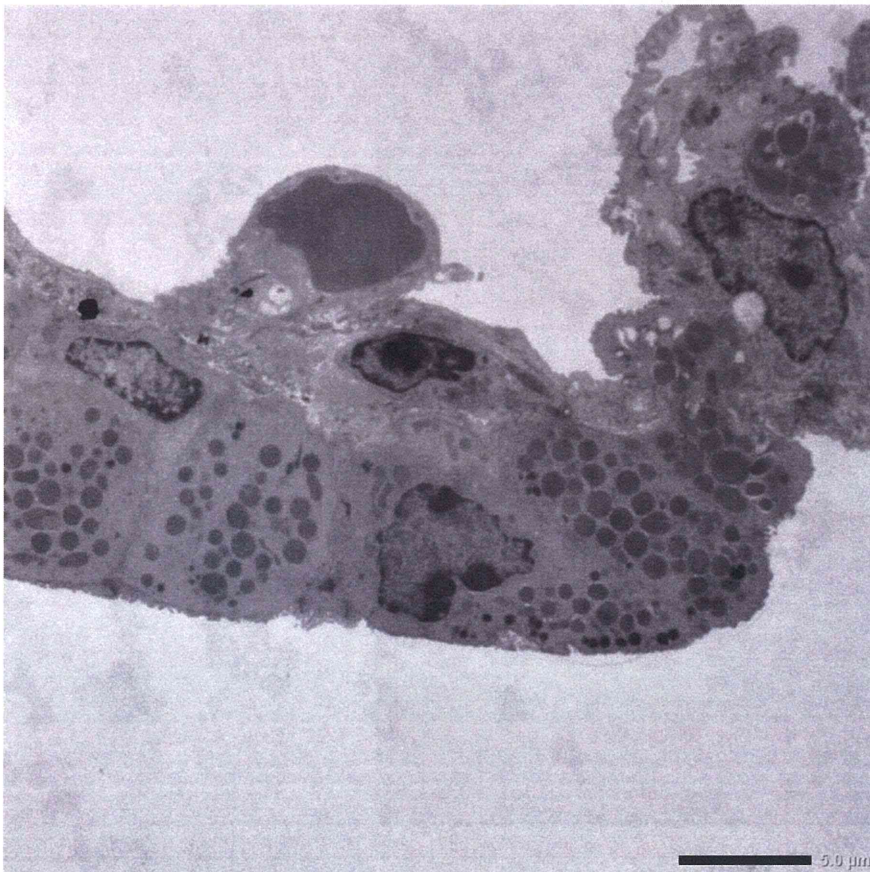
図ホルムアルデヒド・7 肺、ヘマトキシリン・エオジン染色
ホルムアルデヒド 1.0ppm 暴露群



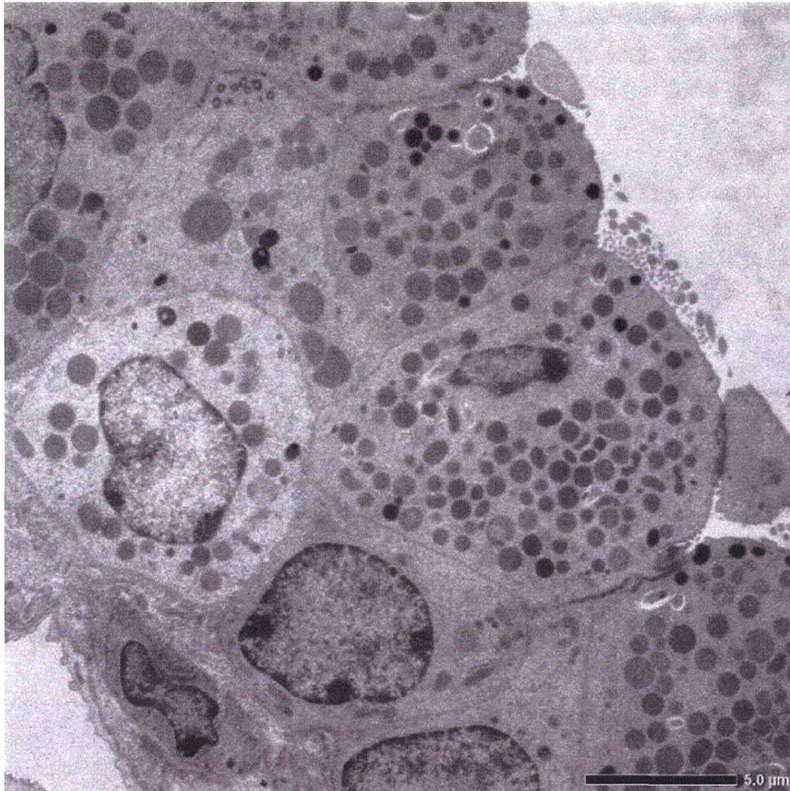
図ホルムアルデヒド・8 肺、ヘマトキシリン・エオジン染色
対照群



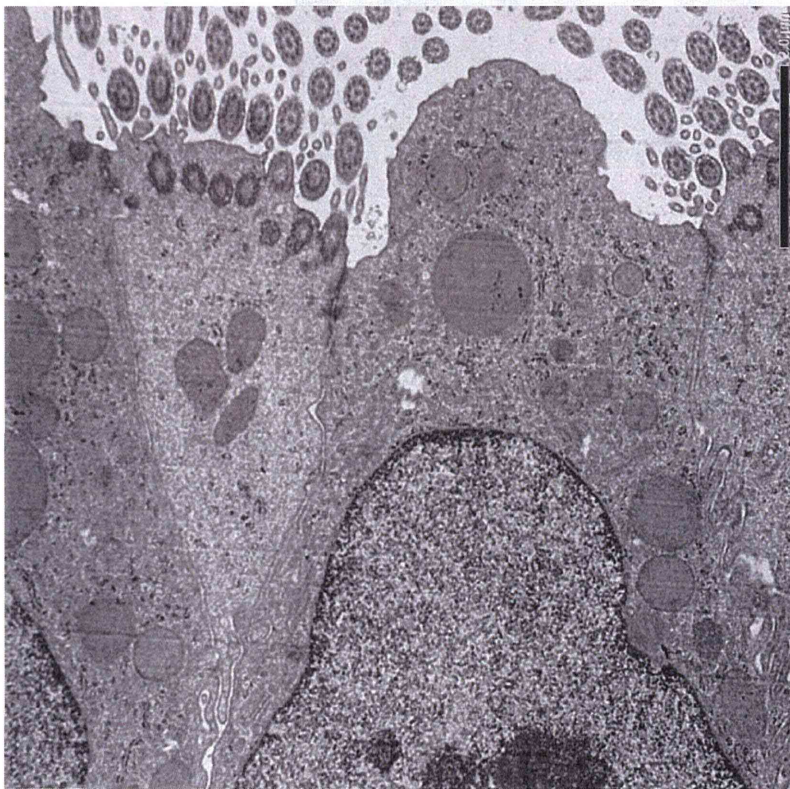
図ホルムアルデヒド・9 TEMによる肺毒性の検索を可能とする試料の作製・検索方法の確立
セミシン標本（トルイジンブルー染色）からTEM検索部位（赤枠内）を切り出した切片、
これをエポキシ樹脂に包埋、超薄切して試料を作製して、図ホルムアルデヒド・10のTEM
写真を撮影した。



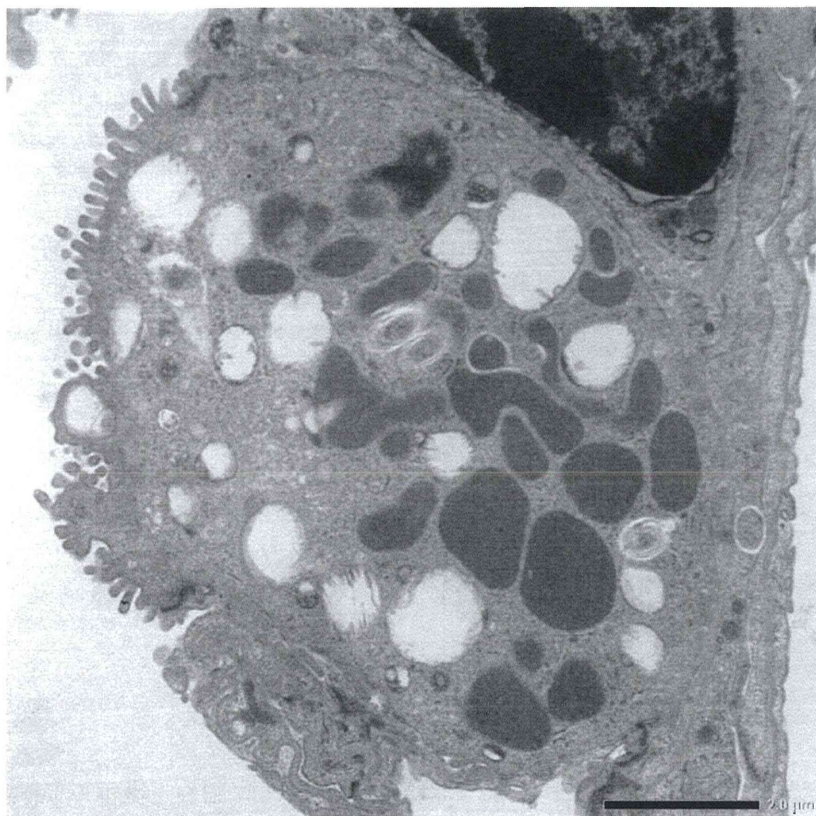
図ホルムアルデヒド・10 TEMによる肺毒性の検索を可能とする試料の作製・検索方法の確立
終末細気管支遠位端（図ホルムアルデヒド・9の赤枠内）のTEM観察像、正常マウス



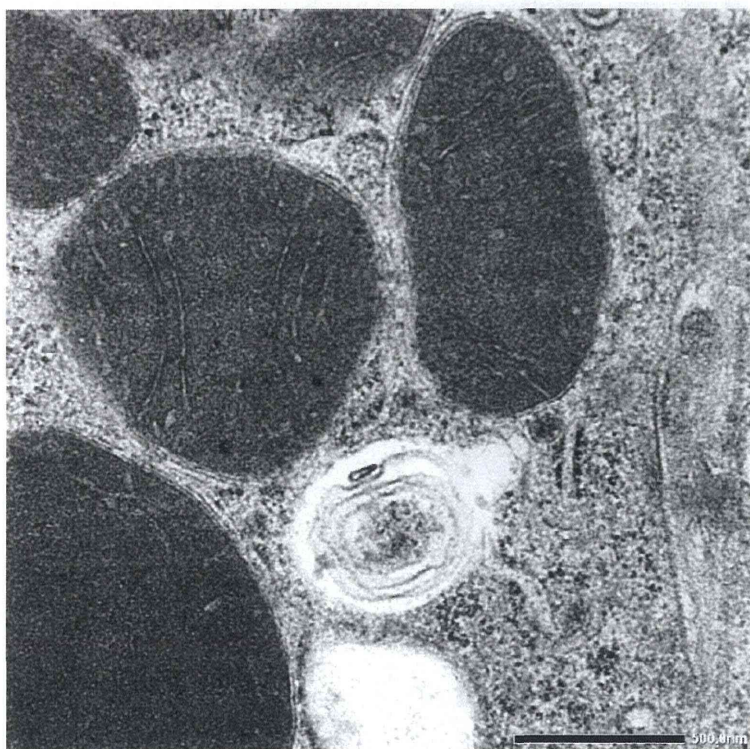
図ホルムアルデヒド・11 TEMによる肺毒性の検索を可能とする試料の作製・検索方法の確立
終末細気管支：ほとんどが無線毛細胞（クララ細胞）、正常マウス



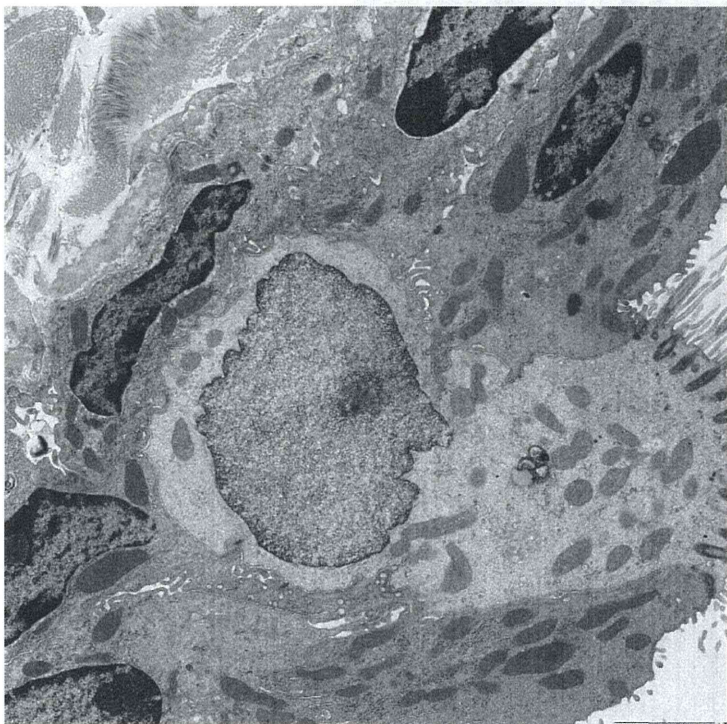
図ホルムアルデヒド・12 TEMによる肺毒性の検索を可能とする試料の作製・検索方法の確立
線毛上皮細胞とクララ細胞、正常マウス



図ホルムアルデヒド・13 TEMによる肺毒性の検索を可能とする、試料の作製・検索方法の確立
Ⅱ型肺胞上皮細胞、正常マウス

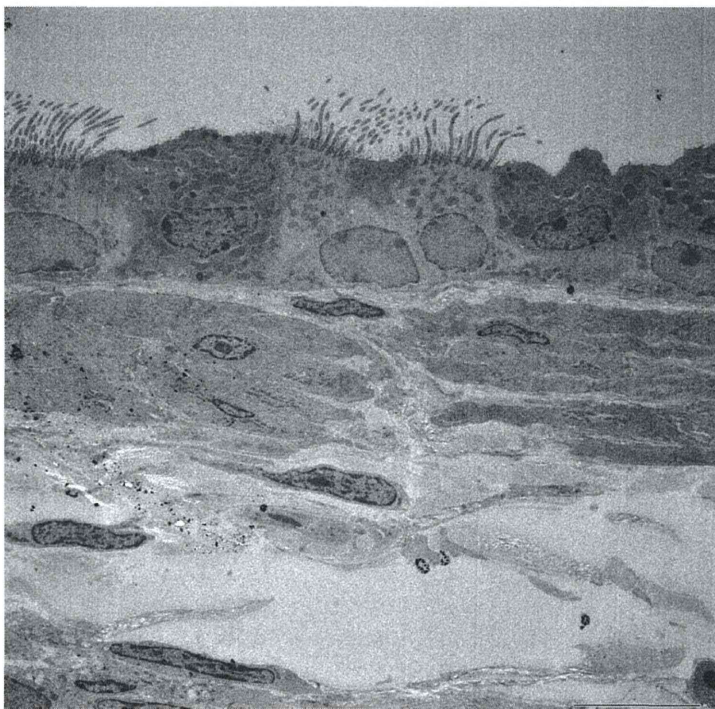


図ホルムアルデヒド・14 図ホルムアルデヒド・13の一部を拡大、ミトコンドリアとラメラボディー



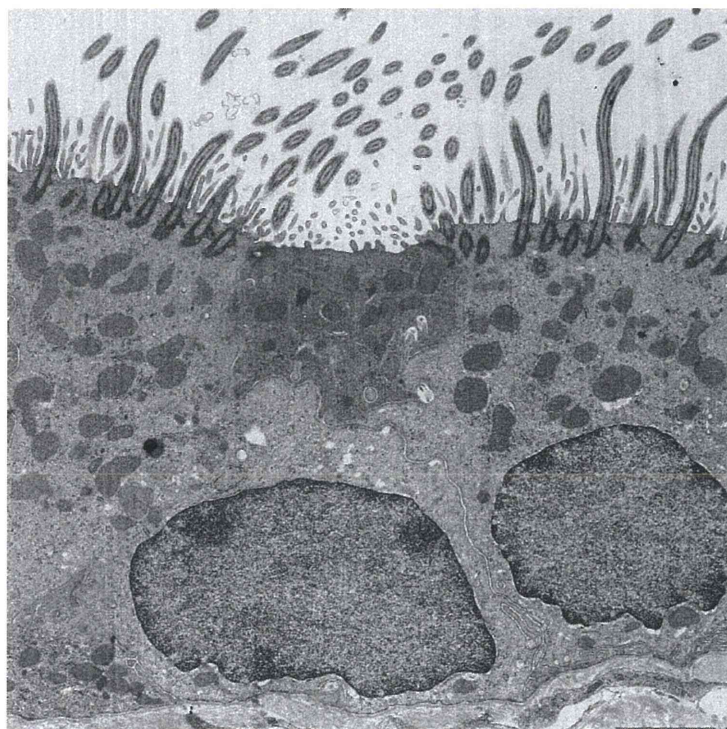
図ホルムアルデヒド・15 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

検索ポイント① 気管支上皮 (線毛上皮細胞、クララ細胞)、1.0 ppm 暴露群



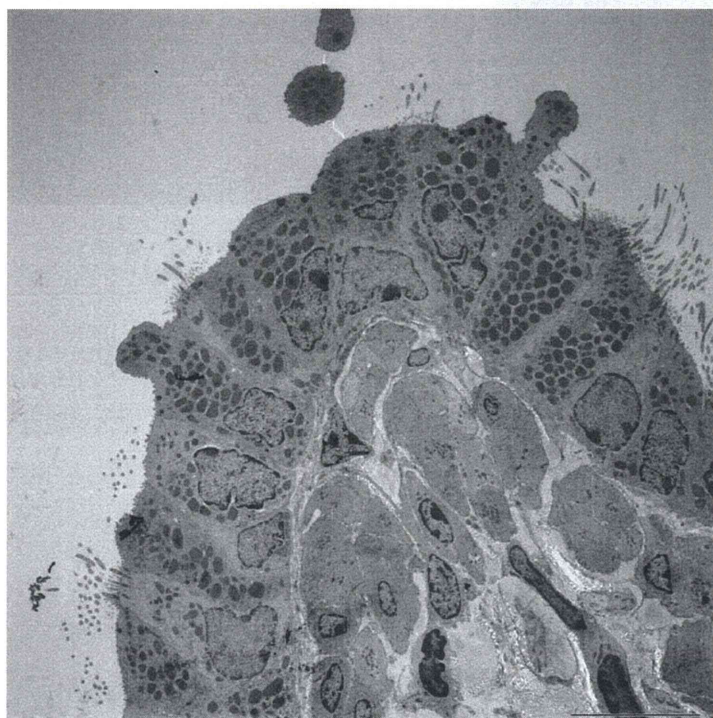
図ホルムアルデヒド・16 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

検索ポイント② 細気管支上皮 (線毛上皮細胞、クララ細胞)、1.0 ppm 暴露群



図ホルムアルデヒド・17 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

検索ポイント② 細気管支上皮 (線毛上皮細胞)、1.0 ppm 暴露群



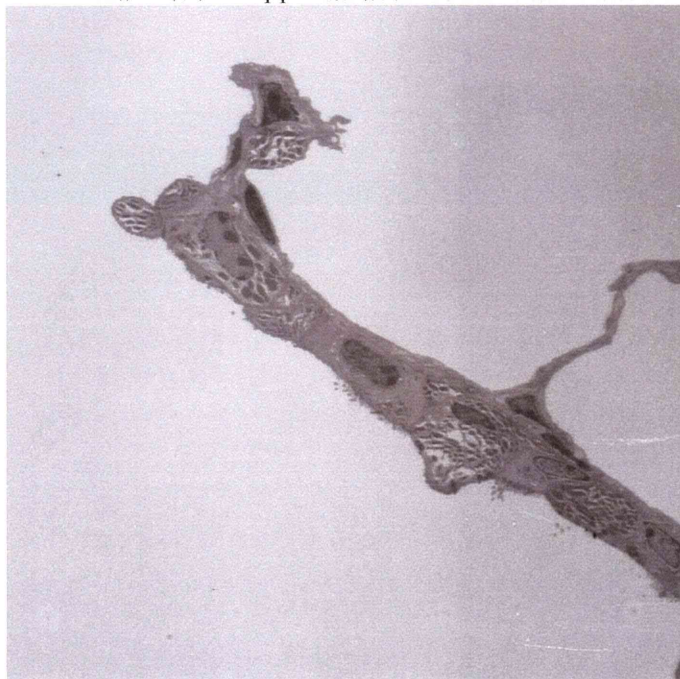
図ホルムアルデヒド・18 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

検索ポイント③ 細気管支上皮(線毛細胞、クララ細胞)、1.0 ppm 暴露群



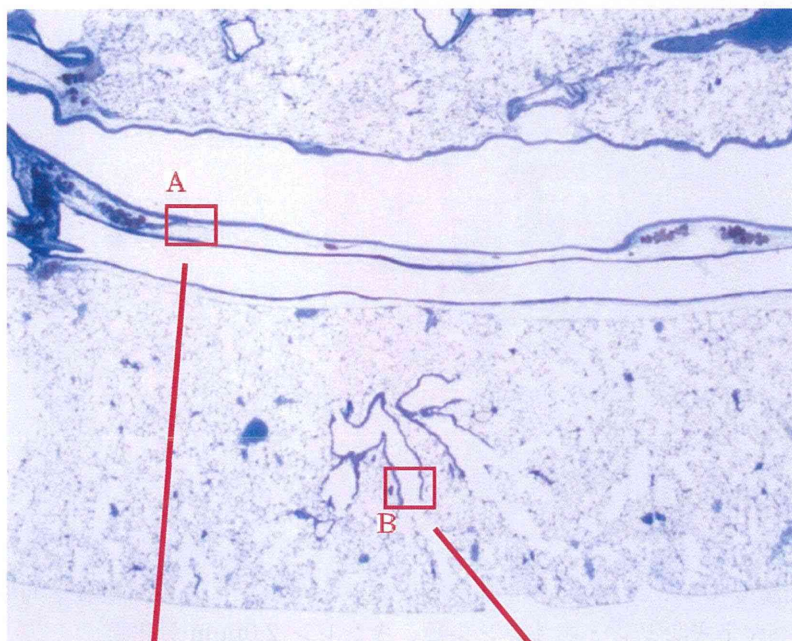
図ホルムアルデヒド-19 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

検索ポイント④ 終末細気管支、細葉中心領域の肺胞上皮 (Ⅱ型細胞、Ⅰ型細胞) と毛細血管、1.0 ppm 暴露群

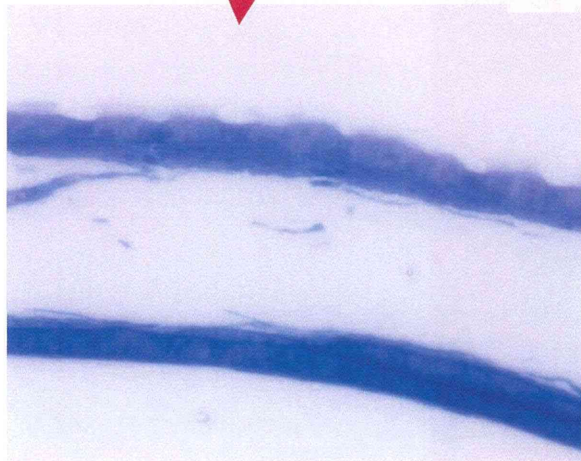


図ホルムアルデヒド-20 極低濃度ホルムアルデヒドに 28 日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

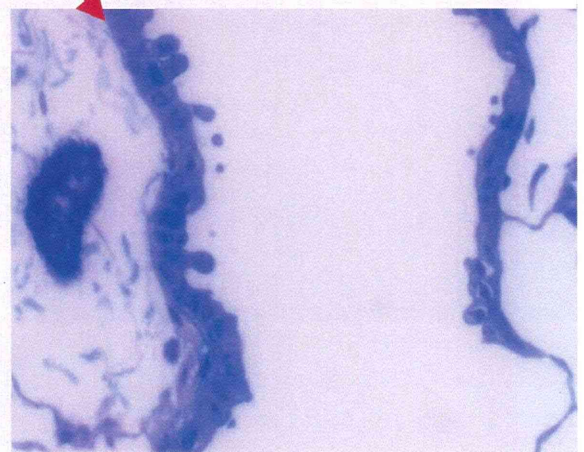
検索ポイント④ 終末細気管支上皮遠位端 (クララ細胞、線毛細胞)、1.0 ppm 暴露群



キシレン 2.0 ppm 暴露群の肺のセミシン切片 (k042-301)



A: 細気管主幹で主に線毛細胞を TEM で検索



B: 気道終末部で低分化気道上皮とクララ細胞や立方形の幼若な上皮細胞を TEM で検索

図キシレン・1 TEM による肺の検索部位