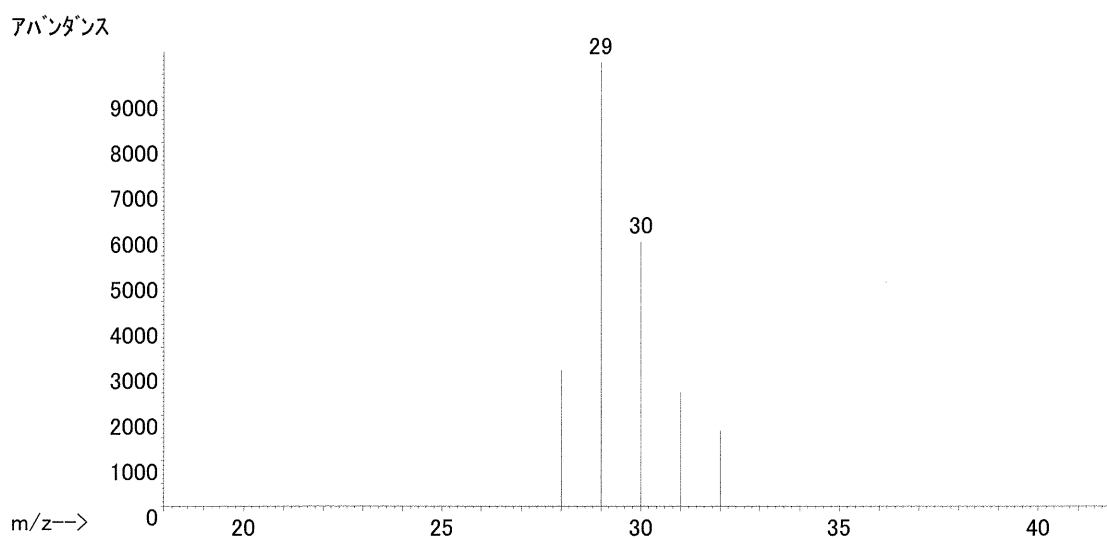


被験物質のマススペクトル

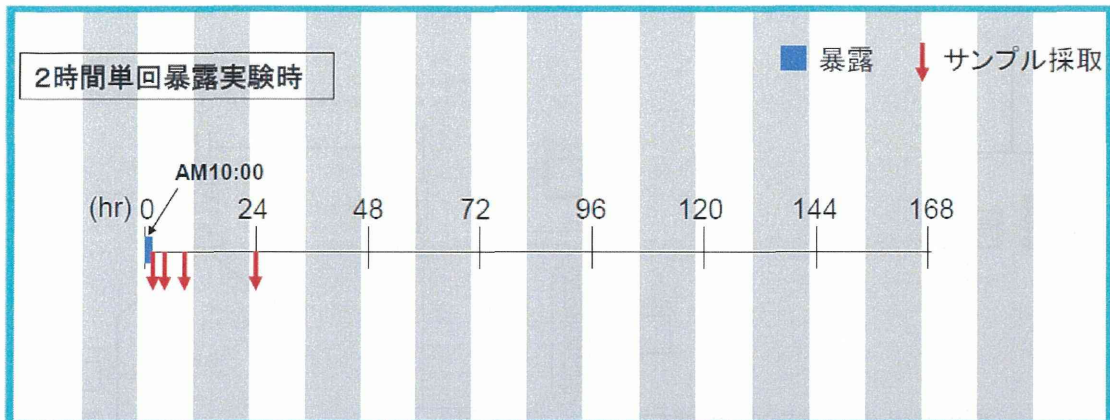


ホルムアルデヒドのマススペクトル

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



暴露2、4、8、24時間後に観測 [刻：12時、14時、18時、10時]

図2 試験スケジュール (2時間/日、単回暴露)

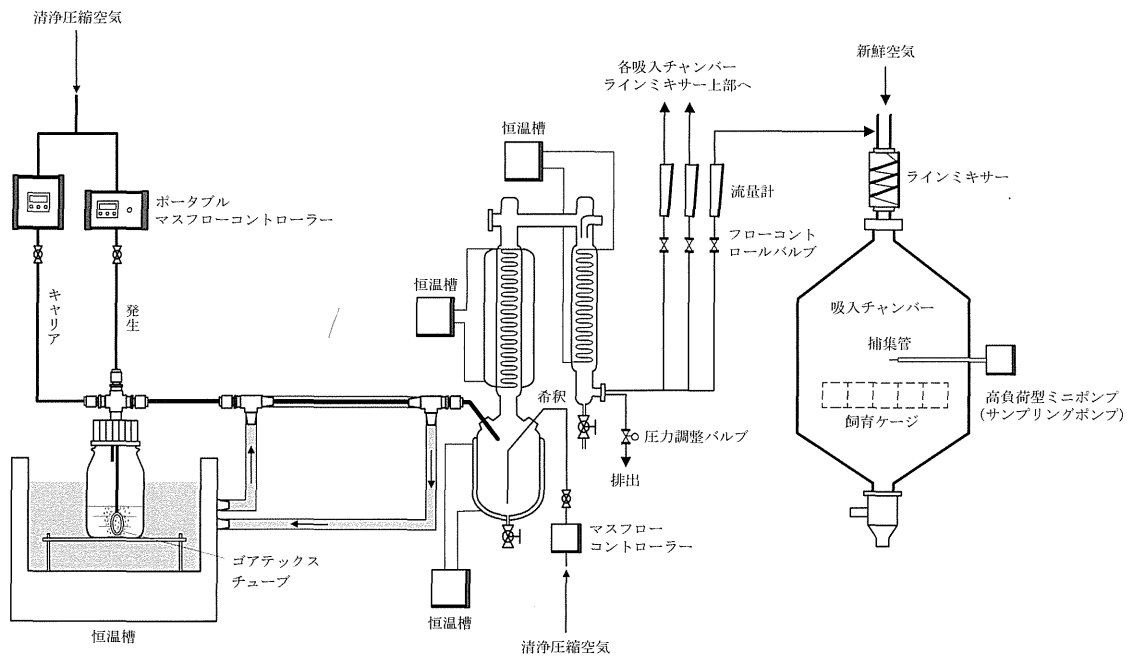


図3 吸入装置のシステム

別紙-1

検査成績書

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 御中

2015年4月21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.	ECR1935	
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)	37.1%(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°C)	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)	7.0%(mass/mass)	5.0~10.0%(mass/mass)
検査年月日	2015/01/19	

判定	合格	検査責任者	吉田雄一
----	----	-------	------

(1/1)

成績書発行番号

S392727

委託研究報告書

Ⅱ. アセトアルデヒドのマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(2時間/日、単回暴露)

試験番号：0865

CAS No. 75-07-0

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アセトアルデヒドを C57BL/6J 雄マウスに 2 時間/日、単回全身暴露（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。投与濃度は、0.03、0.10 及び 0.30 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。投与終了時、並びに投与開始後 4 時間目、8 時間目及び 24 時間目に各群 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、目標投与濃度 0.03、0.10 及び 0.30 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差は、それぞれ 0.0311 ± 0.0003 ppm、 0.105 ± 0.003 ppm 及び 0.312 ± 0.005 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

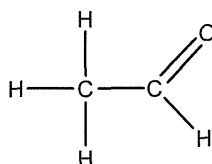
1-1 被験物質の性状等

1-1-1 名称等

名 称 : アセトアルデヒド
 別 名 : 酢酸アルデヒド
 CAS No. : 75-07-0

1-1-2 構造式及び分子量

構 造 式 :



分 子 量 : 44.05

アセトアルデヒド

1-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 刺激臭のある無色気体
 沸 点 : 20.2℃
 蒸 気 圧 : 101kPa(20℃)
 比 重 : 0.7839(16℃)

1-2 アセトアルデヒド

1-2-1 アセトアルデヒド原液

名 称 : アセトアルデヒド
 製 造 元 : シグマ-アルドリッチ
 カタログ番号 : 00071
 ロット番号 : STBD7279V
 純 度 : 99.9%
 詳細は別紙-1参照

1-2-2 アセトアルデヒド標準ガス

名 称 : アセトアルデヒド標準ガス
 製 造 元 : 高千穂化学工業株式会社
 容器番号 : CQB13320
 ボンベ濃度 : 50.6 ppm
 標準ガス製造 : 11-2-1のアセトアルデヒド原液を用いて製造された。
 容器種類、材質 : 47L (アルミニウム)
 充 填 量 : 11.8MPa
 詳細は別紙-2参照

1-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、GC/MS (日立製作所 M-80B) を用いて定性した。その結果、

アセトアルデヒドに相当するイオンピークを確認した（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 : 52匹

1-4-3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後10週齢 2015年4月16日生まれ
投与開始時週齢 : 生後12週齢
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室に移動し、1週間の馴化を行った。

検疫期間 : 7日間（2015年6月25日～2015年7月 1日）

馴化期間 : 7日間（2015年7月 2日～2015年7月 8日）

2. 試験方法

2-1 投与

2-1-1 投与経路

投与経路は全身吸入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）

投与は単回2時間暴露（午前10時から午後0時）とした。

2-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.03、0.10及び0.30 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、全身吸入暴露とした。

投与濃度はアセトアルデヒドの室内濃度指針値である0.03 ppmを考慮して、最高投与濃度を0.30 ppmとし、以下0.10、0.03 ppmの3段階の濃度（公比約3）を設定した。

2-1-6 アセトアルデヒド暴露に関する国立医薬品食品衛生研究所での経緯

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 毒性部では、アセトアルデヒドを正確にマウスに暴露するために、2種類の吸入チャンバーを用いてチャンバー内アセトアルデヒドの濃度検討を行った。

発生方法については、アセトアルデヒド(99%、MERCK) 0.3%希釈液を用いたバブリングによる発生装置内タンクのガス濃度は100ppm以上を示し、0.1%に希釈倍率を上げて、この濃度は100ppm以上を示し、ホルムアルデヒドと異なりアセトアルデヒドは揮発性が高く、希釈倍率を上げてアセトアルデヒドガス濃度を低下させることができないことが考えられた。バブリング法では低濃度が得られないため、標準ガスボンベを用いる方法を採用することとし、ガスの供給システムを変更、ガスボンベ用のマスフローコントローラー及び流量計を新たに設置、ボンベガスを希釈することで所定の濃度の暴露が可能となった。高千穂商事から購入した標準ガス濃度は104ppmであった。このガスをチャンバー内の総換気空気650L/分により希釈した。0.3 ppm濃度を目標に標準ガス1.9L/分をチャンバー内に送気、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(理研計器)による濃度測定を試みた。高濃度群のモニター値は 0.091 ± 0.011 ppm (平均値±標準偏差)を示した。

2回目に行った濃度測定試験では、設定濃度0.3ppmに対し標準ガスを1.87L/分流した高濃度群の捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, ジーエルサイエンス)測定による濃度は0.237 ppmと21.2%低く、設定濃度0.03 ppmに対し標準ガスを0.19L/分流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.027 ppmと8.3%低く、設定濃度0.1ppmに対し標準ガスを0.63 L/分流した中間濃度群は0.094 ppmと6%低かった。高濃度群のモニター値は 0.126 ± 0.009 ppm (平均値±標準偏差)と捕集管測定値0.237 ppmとの濃度差が大きかった。

3回目の濃度測定時において2.37 L/分に増やして流した高濃度群の捕集管測定による濃度は0.286 ppmと4.7%低く、設定濃度0.03 ppmに対し標準ガスを0.21L/分流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.026 ppmと13.3%低く、設定濃度0.1ppmに対し標準ガスを0.67 L/分流した中間濃度群は0.089 ppmと11%低かった。チャンバー内濃度の安定性を高感度ホルムアルデヒドガスモニターで測定したところ 0.185 ± 0.018 ppm (平均値±標準偏差)であり、捕集管値0.286 ppmとの濃度差が大きかった。

4回目の濃度測定試験では、設定濃度0.3ppmに対し標準ガスを2.5L/分流した高濃度群の捕集管測定による濃度は0.323 ppmと7.2%高く、設定濃度0.03 ppmに対し標準ガスを0.25L/分流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.033 ppmと8.3%高く、設定濃度0.1ppmに対し標準ガスを0.76 L/分流した中間濃度群は0.106 ppmと6%高かった。高濃度群のモニター

値は 0.093 ± 0.019 ppm(平均値±標準偏差)であり、捕集管値0.323 ppmとの濃度差が大きかった。4回行った高感度ホルムアルデヒドガスモニターの測定結果は、安定性を確認するには使用が可能であるような数値の推移を示すが、捕集管値と比べかなり低い濃度を示していた。本機器は、アセトアルデヒドに対し反応性が悪く信頼性は低いと考えられた。

本試験において4回目の濃度試験データを基に、0.03ppmでは0.23L/分、0.1ppmでは0.72L/分、0.3ppmでは2.33L/分に流量を補正し標準ガスを流入させ、得られた捕集管測定濃度は0.028、0.094、0.277ppmであり、6.5~8.7%ほど低い目標値に近い一定濃度を安定的に保持し、動物に暴露することができた。また対照群チャンバー内濃度は 0.0020 ± 0.0013 ppm($3.75 \pm 2.19 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値±標準偏差)、室内濃度は 0.0040 ± 0.0024 ppm($6.83 \pm 4.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値±標準偏差)と低濃度群の0.028 ppmと比し低い濃度であり、一般環境大気濃度0.23~7.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値2.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (環境省、2003)と動物室内は同等であり、一般家庭の室内空気中で検出される平均濃度17ppb (国土交通省、2003)を下回り、実験に影響はないものと考えられた。

2-1-7 被験物質の暴露方法 (暴露濃度 0ppm、0.03 ppm、0.10 ppm、0.30 ppm)

アセトアルデヒド標準ガスをフローコントロールバルブと流量計を用いて圧力と流量を調整し、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、実験を行った。(概略図を図3に示す)

2-1-8 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-溶媒抽出法により測定した。すなわち、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 S10L(カタログ番号: 505361-U スペルコ社)を吸入チャンバー内に挿入し、2時間、吸入チャンバー内のアセトアルデヒドを捕集した。捕集管で捕集したアセトアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、アセトアルデヒド 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、そのアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HP LC分析用 和光純薬工業株式会社)10mL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1mL/min、カラムはL-column ODS(4.6mm ϕ × 150mm、粒径: 5 μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10 μL とした。

また、検量線はアセトアルデヒドの量を換算したアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品アセトアルデヒド-DNPH(カタログ番号: 4M7340-U スペルコ社)を用い、0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線を作成した。

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、投与終了時、投与開始後4時間目、8時間目及び24時間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	投与終了時解剖	3 匹 (1001~1003)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1004~1006)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1007~1009)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1010~1012)
1	0.03 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1101~1103)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1104~1106)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1107~1109)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1110~1112)
2	0.10 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1201~1203)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1204~1206)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1207~1209)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1210~1212)
3	0.30 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1301~1303)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1304~1306)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1307~1309)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1310~1312)

2-2-2 群分け及び個体識別方法

群分けは、投与前日に行った。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。

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（518 室）、馴化期間及び投与期間中は吸入試験室（516 室）で動物を飼育した。投与は吸入試験室の吸入チャンバーを使用した。

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時間別平均値を表 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 ; 22±2℃
 吸入チャンバー内 ; 20~24℃ <22.4~22.7℃>
 湿度 : 検疫室 ; 55±15%
 吸入チャンバー内 ; 30~70% <53.1~56.9%>
 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<12.0~12.1 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 :
 飼育期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)
 投与 ; 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、被験物質投与中を除いて、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、被験物質投与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)、検疫終了日及び群分け時に行った。

< 投与及び飼育期間 >

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)、検疫終了日及び群分け時に体重

を測定した。
 <投与及び飼育期間>
 解剖時に測定した。

2-3-3 試料の採取と検査

解剖時期: 動物は投与終了時、投与開始4時間目、8時間目及び24時間目に解剖した。
 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 チューブを並べる

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った。

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った。

(2) 採取手順

1) 肝の摘出

トレイと生理食塩水（以下、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にした。
- 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

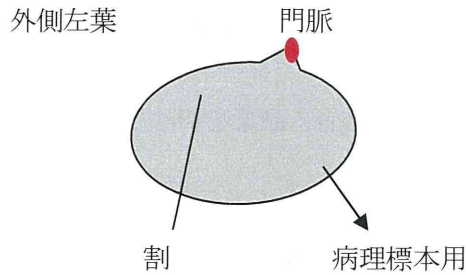
各解剖の開始・終了時間を記録した。

- 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ヵ所（A）、右側の葉を2ヵ所（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RN Alater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。）
- 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℃の冷蔵庫に保管した。

<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アレイ用サンプル採取した。その部分を避けて 3ヵ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。
- 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、よく水気をふき取った。

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℃の冷蔵庫に保管した。

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。

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いた

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。

⇒作業員Bに渡した。

② 小脳の分離「作業員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つまみ、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。

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、生食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。全てを移し終え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℃の冷蔵庫に保管した。

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った。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った。

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）に終わらせた。

8) 試料の処理

肝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、サンプル重量を測定し、-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。）

使用した器具及び試薬類

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。

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℃で保存した。

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