

標準操作手順書 (Local lymph node assay-BrdU 法)

Local lymph node assay (LLNA) は初回抗原刺激によるリンパ球の増殖反応を指標とする化学物質の感作性をスクリーニング手法(感作性試験)の一つであり、従来の手法に比べ短期間に化学物質のアレルギー性を検出することが可能となる。

本手順書は Bromodeoxyuridine (BrdU)を使用する Non-RI LLNA 法 (BrdU 法) の手順について記載する。

以下に標準的な実験プロトコールを示す。

1. 動物

1.1 使用動物

通常は未妊娠あるいは未経産の 8 週令から 12 週令雌 CBA/JN (日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

1.2 動物種選択の理由

CBA/JN は ICCVAM peer review report 及び OECD TG429 において推奨されている CBA/J の亜系統であるため。

1.3 検疫・馴化・群分け

動物は入荷後、5 日間以上期間検疫・馴化を行い、期間中順調に発育し健全と確認されたマウスを用いて、群分けを行う。

1.4 動物の識別

動物は油性インキによる尾へのマーキング等の適切な方法による識別を行う。

2. 飼育管理及び飼育環境

温湿度は 21 ± 3 、30-70%、明暗サイクルは 12 時間ごと(明:12 時間、暗:12 時間)とする。給餌及び給水は自由摂取とする。

3 群構成

基本的な群構成として、被験物質群に低用量、中用量及び高用量を設け、媒体対照群及び陽性対照群を設ける。

4. 調製

4.1 媒体

アセトンとオリーブ油を 4:1 (v/v)の割合で混和したものとアセトン-オリーブ油混液(AOO)が媒体としては最も適している。

その他に、優先順位としてジメチルホルムアミド(DMF)、メチルエチルケトン(MEK)、プロピレングリコール(PG)及びジメチルスルホキシド(DMSO)等の有機溶媒を用いることができるが、溶媒の選択は予備実験を実施し最も高濃度で溶解或いは良好に懸濁可能なものを選択する。

4.2 被験物質及び陽性対照物質

調製濃度は溶解性を基準に適切な媒体を選択し、可能な限り高濃度での実験を行うことが望ましい。被験物質及び陽性対照物質の調製は上記媒体を用いて所定の濃度(0.1%, 1%, 10%, 50%等)に調製する。

陽性対照物質としては 50% α -hexylcinnamic aldehyde (HCA)、10% Isoeugenol、1% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)等を用いることができる。

4.3 BrdU

BrdU (Nacalai tesque 製等)は注射用生理食塩液(大塚製薬工場製等)を用いて 10mg/ml になるように調製し、完全に溶解した後、濾過滅菌を行う。使用当日に調製することが望ましいが、事前に調製する場合には、調製物を使用日まで-20 以下で凍結保存し、投与日に解凍して使用する。

5. 感 作

5.1 感作手順

- 1) 保定者は、薬指と小指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し(気道は必ず確保する)、耳介を広げて保定する。

図(マウス保定)

- 2) 実験者は、マイクロピペッターを用いて耳介にそれぞれ 25 μ L ずつ塗布する。
- 3) 塗布量は 25 μ L と少量であるが、流れ落ちないように注意し、数回に分けて塗布を行う。尚、保定及び投与は一人で行うことも可能である。

5.2 投与回数及び時刻

毎日、ほぼ一定の時刻に 1 日 1 回、3 日間反復適用する。

6. BrdU の投与

注射針と注射筒(テルモ株式会社等)を用いて 0.5 mL/匹を最終感作の約 48 時間後に 1 回腹腔内投与する。

図(被験物質投与)

7. 耳介リンパ節の採取

- 7.1 BrdU 投与の約 24 時間後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後、仰臥位にし下顎から頸部まで 70%エタノールで消毒する。
- 7.2 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下まで露出させる。
- 7.3 耳の直下に耳介リンパ節があるので注意深く探し、採取する。

図(リンパの位置)

- 7.4 耳介リンパ節には余分な脂肪組織がつかないように丁寧に取り除く。
- 7.5 採取した耳介リンパ節における BrdU 取り込み量を後日測定する場合は、重量測定後各個体毎の耳介リンパ節を識別した後、-20 以下で凍結保存する。

8. BrdU 取り込み量の測定

8.1 材料及び使用機器

- ペレットペッスル付 1.5 mL チューブ (下図参照)
Pestles & Tubes (BEL-ART PRODUCTS Cat No. 19923-0000)

図 (ペレットペッスル付チューブ)

- ナイロンメッシュ (セルストレーナ、ファルコン #REF352350 (70 μ m, 225 メッシュ))
- 20 mL プラスチック容器
- 50 mL 遠心管
- 96 well ELISA 用マイクロプレート
- 蒸留水
- 生理食塩液
- 測定キット (Roche Applied Science 社製 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)、Cat No. 11647229001)
- 遠心機(300 × G 程度でマイクロプレートの遠心操作が可能なもの。)
- マイクロプレートリーダー (370-492nm 或いは 450nm-650nm の測定が可能なもの)

8.2 試薬の調製

1) Anti-BrdU-POD 液

Anti-BrdU -POD stock solution (Anti-BrdU-POD (バイアル)に 1.1 mL の蒸留

水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜる)を Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

2) Washing solution 液

Washing buffer concentrate を蒸留水で 10 倍希釈する。

3) 1M 硫酸 (反応停止液を使用する場合)

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。

8.3 前処理 (細胞浮遊液の調製)

- 1) カップに生理食塩液を 15 mL 用意する。
- 2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに 300-500 μ L 生理食塩液を入れペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させる。
- 3) 50 mL のチューブにナイロンメッシュを取り付け、懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用いて使い残りの生理食塩液で洗いこむ。

*上記の方法の他、2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させることも出来る。但し細胞懸濁液の最終容量は 15 mL となるようにする。

8.4 測定準備及び測定

- 1) 細胞浮遊液を均一に分散させた後 96 well プレートに 100 μ L 分注する (N=3)。
- 2) 分注したプレートを 300 \times G、10 min 遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。
*この際、全量の 3/4 程度を吸引する。全量近くを吸引すると細胞も同時に吸引され、バラツキの原因となる。
- 4) 温風式乾燥機で 20 min 乾燥させる (乾燥中はマイクロプレートのふたはかぶせない)。

写真 (実施例)

- 5) マイクロプレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、Fix Denat (測定キットに含まれる)を 200 μ L 添加し 30 min 静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上で水分を取る。
- 7) Anti-BrdU-POD 液を 100 μ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 9) Washing solution 液を 200 μ L 添加し、プレートの中でピペッティング後(10 回/well)、液を捨てる操作を 3 回繰り返す。
- 10) Washing solution 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 11) TMB 発色基質を 100 μ L 添加し暗所(机の引出し等)に入れ、15 min 放置す

る。

* 反応時間は 5-30 分の間で適当な時間に設定可能であるが、十分に呈色反応が進行する時間に設定する。

- 12) 放置後、マイクロプレートリーダーで 370nm を測定波長、492nm を参照波長として 2 波長測定を行う。

* マイクロプレートリーダーのフィルターの関係等で 490 nm を測定波長とする場合は反応停止液 (1M 硫酸) を 1 ウェル当たり 2 μ L 添加した後、650 nm を参照波長として 2 波長測定を行う。

8.5 測定に用いなかった試料の保管

- 1) 細胞懸濁液はそのまま冷所にて 24 時間は保存、再測定が可能である。

9 結果の評価

各個体の BrdU 測定値の平均値を算出した後、陰性対照群の平均値を算出する。各個体の BrdU 測定値の平均値を陰性対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index、SI) を算出した後、各用量群の平均 SI 値及びその標準偏差及び標準誤差を算出し、被験物質投与群の SI 値の平均値が 2 を超える場合を陽性と判定する。

参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicology Letters 119, 203-208