

# LLNA-BrdU 法実験 SOP

(Version 1.01)

改訂 070826

以下に、LLNA-BrdU 法バリデーション研究における、2 被験物質を単位とした実験の標準作業手順を示す。

被験物質数や動物数が変わるときは、この手順での関連部分を変更して適用する。

## §0 実験前の機器・器具の準備

表 1 に示す実験機器・器具、試薬を用意する。

## §1 マウス入荷のための準備

LLNA-BrdU バリ実行委と事前に協議・決定した入荷予定日までに、37 匹の CBA/JNCrlj 雌マウスを入荷して馴化が開始できるように、自施設の規準に従った準備を行う。

馴化終了までに、4 匹同時飼育が可能なケージを 9 個準備し、それぞれのケージに以下の内容を表記しておく。

第 1 群：「A00」

第 2 群：「陽性対照」

第 3 群：「溶媒」

第 4 群：「被験物質 Y 低濃度」

第 5 群：「被験物質 Y 中濃度」

第 6 群：「被験物質 Y 高濃度」

第 7 群：「被験物質 X 低濃度」

第 8 群：「被験物質 X 中濃度」

第 9 群：「被験物質 X 高濃度」

ここで被験物質の「X」あるいは「Y」という記号は配布された試料の記号のことである。データの記入ミスを防ぐために、群番号は原則としてこの順にする。実験は 3 回実施するので、実験番号「1」「2」「3」も表記しておく。

## §2 入荷、馴化、群分け

37 匹のマウスが入荷されたら、施設の規準に従って直ちに馴化を開始する。馴化期間は 5 日以上 16 日以内とする。

馴化の後、耳介の損傷等の異常が認められない 36 匹を、乱数等を用いてランダムに 4 匹ずつの 9 群に分け、§ 1 で準備したケージに入れる。異常が認められないマウスが 36 匹に満たない場合

は、群番号の大きい順に 1 群 3 匹とする。群に含めないマウスは適切な安楽致死法を用いて殺処分する。

マウスは、油性インキによる尾へのマーキング等に夜ケージ内の個体識別及びケージカード等によるケージの識別によって、群番号と群内の各個体が識別出来るように配慮する。

マウスは、入荷から本実験終了までの期間中、室温 22℃ (±3℃)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させる。この飼育条件に逸脱が生じた場合は、その内容を記録しておくこと。

### § 3 機器・器具、試薬、試験液の確認と保管

LLNA-BrdU バリ実行委から試料がとどいたら、送付されている内容表と内容物が一致していることを確認する。

試験液 (AOO、陽性対照、溶媒、被験物質 Y 低濃度、被験物質 Y 中濃度、被験物質 Y 高濃度、被験物質 X 低濃度、被験物質 X 中濃度、被験物質 X 高濃度) に、それぞれ対応する群番号 1~9 を記入し、試験管立て等に順に並べ、速やかに冷蔵保管、すなわち 0℃~10℃ (より望ましくは 2℃~8℃) に維持して保管する。BrdU 溶液は-20℃以下で凍結保存する。実験の際にはこれを取り出して使用する。BrdU は投与前に溶解して用いるが、析出が認められる場合は約 37℃のウォーターバス等で加温し完全に溶解した後に投与する。

試験液の内の AOO は Acetone/olive oil (4:1 v/v) であり、陽性対照は Hexylcinnamaldehyde (HCA、CAS No: 101-86-0) の 50%AOO 溶液である。

### § 4 試験液の調製

陽性対照物質及び AOO は調製物として事務局から送付される。試験物質は事務局にによって各試験機関に割り付けられた物質が、予めバイアル瓶に秤量・分注されたものが送付される。各試験機関は事務局からの指示に従い、所定量の媒体をバイアル瓶に添加し、試験液を調製する。調製は投与当日に行うこととする。

### § 5 感作操作 (第 1,2,3 日目の操作)

- 5.1) 試験液を取り出し、指示書が添付されている場合は指示 (たとえば、投与前の加温あるいは超音波処理など) にしたがって、前処理を行う。
- 5.2) 第 1 日目の投与前にマウスの体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位 : 0.1g)。
- 5.3) 気道を確保する状態で、親指と人差し指で頭部を保定し、リングピンセット等を用いて耳介を保定し、(図 1 参照) マイクロピペッターを用いて試験液を両耳介に塗布する。リングピンセットは試験物質毎に準備或いは媒体を用いて十分に洗浄した後に使用しても良いが、その場合は必ず低濃度群から高濃度群の順に投与を行うこととする。塗布量はそれぞれの耳介に 25µL と少量であるが、流れ落ちないように注意し、少量ずつ数回に分けて塗布を行う。



図1 マウスの保定と耳介の保持

- 5.4) 第1群の試験液塗布の開始時刻および第9群の試験液塗布の終了時刻を記録し、終了後に残った試料を速やかに冷蔵保管する。
- 5.4) この塗布を、1日1回、連続3日間、ほぼ同じ時刻に行う。
- 5.5) 操作中には、動物を注意深く観察し、異常所見が認められた場合は、その所見を所定用紙に記録する。

#### §6 BrdU 溶液の調製

BrdU 溶液は投与前日に Bromodeoxyuridine を 10mg/mL となるように生理食塩液に溶解して調製し、BrdU 溶液はろ過フィルター(MILLEX®-HV、MILLIPORE 等)で濾過滅菌した後、投与前日まで-20℃以下のフリーザーで凍結保存する。

#### §7 BrdU の投与 (第5日目の操作)

最終感作の約48時間後に、注射針と注射筒を用いて、各マウスに BrdU 溶液 0.5 mL を1回腹腔内投与する。BrdU 溶液は事前に溶解し室温に戻しておく。その際、析出がみられる場合は約37℃のウォーターバス等で加温し、析出物を完全に溶解した後に使用する。

#### §8 耳介リンパ節の採取

- 8.1) マウスの体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位: 0.1g)。
- 8.2) BrdU 投与の約24時間後に、マウスを頸椎脱臼 (またはエーテル過麻酔等) によって安楽死させる。
- 8.3) マウスを仰臥位にして下顎から頸部までを、70%エタノールで消毒する。
- 8.4) 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、耳介下までを露出させる。
- 8.5) 耳の直下の耳介リンパ節を採取する。リンパ節は左右それぞれに1~2個あるので見落とさないように注意する。(図2を参照)

Figure 1: Lateral Dissection

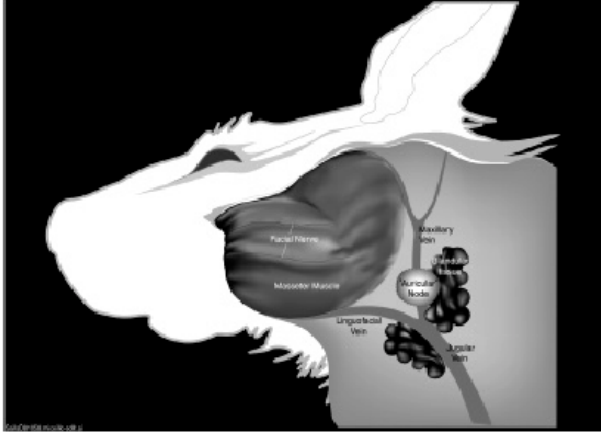


Figure 2: Ventral Dissection

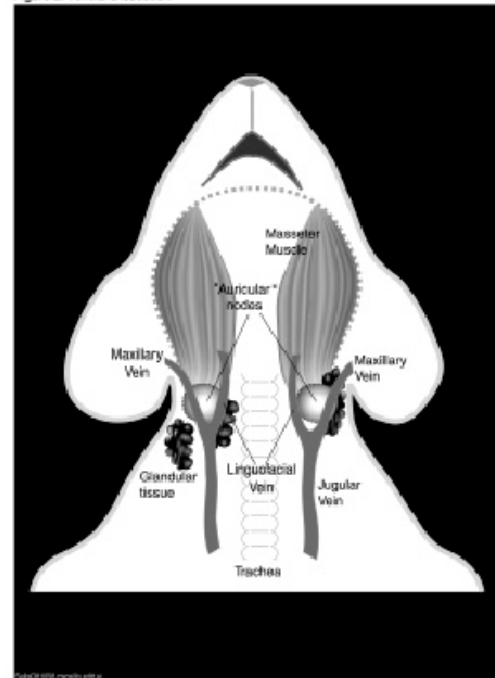


図2 耳介リンパ節の解剖学的位地

8.6) 耳介リンパ節から余分な脂肪組織を丁寧に取り除き、重量を測定した後、1.5 mL チューブに1個体分ずつ入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下のフリーザー中で凍結保存する。

## § 9 BrdU 取り込み量の測定

### 9.1) キット試薬の調製

#### 1) Anti-BrdU-POD 液

1 バイアルの Anti-BrdU-POD に 1.1 mL の蒸留水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜ、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

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。市販の 1M 硫酸を用いても良い。

### 9.2) 細胞浮遊液の調製

1) プラスチック容器に生理食塩液を 15 mL 用意する。(生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、変更することが出来るが、陰性対照ウェルの吸光度が 0.1-0.2 となる条件を採用する。ここでは 15 ml にメスアップする場合の手順について記載する。)

2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに、300  $\mu\text{L}$  程度の生理食塩液を加え、ペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させ、浮遊液を作る。

3) 50 mL 遠心管にナイロンメッシュを取り付けて懸濁液を濾した後、パストゥールピペット等を用い、残りの生理食塩液で 1.5 mL チューブを洗いこみ、最終容量 15 mL の細胞浮遊液を作る。

注1：2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・懸濁させてもよいが、その場合も細胞浮遊液の最終容量は15 mLとなるようにする。

注2：リンパ節は、採取後凍結保存して2週間以内に解凍して測定を実施する。

### 9.3) 測定準備及び測定

- 1) 各個体の細胞浮遊液はボルテックスミキサーで数秒間攪拌し、均一に分散させた後、直ちに96穴プレート中の3穴に、それぞれ100  $\mu$ Lを分注する。さらにプレート毎に3ウェルに生理食塩液のみを加え、以下同様の処理を行い、Blankとする。
- 2) 分注の終わったプレートを300 $\times$ Gで、10分間遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。その際、細胞まで吸引しないために、吸引量を全量の3/4程度とする。
- 4) 蓋をかぶせない状態で、温風式乾燥機等でプレートを水分が完全に無くなるまで十分に乾燥させる。
- 5) プレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、送られたキットに含まれている Fix Denat 200  $\mu$ L 添加し、30分間静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い Fix Denat を十分に除去する。
- 7) プレートに Anti-BrdU-POD 液を 100  $\mu$ 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タッピングを行い Anti-BrdU-POD 液を十分に除去する。
- 9) Washing solution を 200  $\mu$ L 添加し、プレートの中でピペッティングを、1穴当たり10回行い、タッピングにより液を捨てる操作を3回繰り返す。
- 10) キットに含まれる TMB 発色基質を 100  $\mu$ L 添加し、机の引出し等の暗所に入れ、15分間放置する。
- 11) 放置後、マイクロプレートリーダーで、測定波長を 370nm、参照波長を 492nm とした2波長測定を行い、プレート毎に Blank ウェルの平均吸光度を全測定値から差し引いた後、測定波長の吸光度から参照波長の吸光度を差し引いた数値を試料吸光度（試料吸光度 = (測定波長吸光度 370nm - Blank 吸光度 370nm) - (参照波長吸光度 492nm - Blank 吸光度 492nm)）とする。フィルターの関係等で 450 nm を測定波長とする場合は、1M 硫酸の反応停止液を1穴当たり 25 $\mu$ L 添加した後、690 nm を参照波長として2波長測定を行う（試料吸光度 = (測定波長吸光度 450nm - Blank 吸光度 450nm) - (参照波長吸光度 690nm - Blank 吸光度 690nm)）。なお、使用機器の関係で所定の波長が使用できない場合は指定された波長に最も近いものを用いることとし、使用した波長の記録を残す。

注：本実験時には原則として1枚目のプレート第1群（AOO）及び第2群（陽性対照）を割り付け、2枚目のプレートに第3群（溶媒）とその他の群を割り付けることとする。3物質以上の実験を行う場合は3物質目を1枚目のプレートに割り付けることとする。この場合には、1枚目のプレートにも第3群（溶媒）を同時に割り付けることとする。なお、3回繰り返し実験の測定は同時には行わず、独立して3回実施することとする。

### 9.4) 測定に用いなかった細胞浮遊液の保管

測定に用いなかった細胞浮遊液は24時間冷蔵保管する。24時間以内であれば再測定を行って

差し支えない。

### 9.5)実験の成立条件

プレート毎に陰性対照ウェルの吸光度が0.1-0.2の範囲にあることを実験の成立条件とする。AOO群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定を行う。なお、予め数段階の希釈懸濁液（15ml 懸濁液を生理食塩液で2倍、3倍等に希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用することとする。

### § 10 データの入力及び担当者への送付

1日目および6日目の体重測定値、リンパ節重量測定値、吸光度を所定のエクセルファイルに記入し、データ管理解析担当者（寒水孝司「sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp」）に送付する。

GLP 準拠で指定されているデータは紙ベースのコピーで、「〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科 J6 寒水孝司」宛に送付する。

### § 11 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

表1 実験機器・器具、試薬リスト

本実験には以下の機器・器具、試薬を使用する。実行委からの送付物以外は自施設で準備する。

実行委からの送付物

ペレットペッスル付 1.5 mL チューブ*	120 本	BEL-ART PRODUCTS	Pestles & Tubes、Cat No. 19923-0000)
ナイロンメッシュ*	120 個	FALCON	セルストーナ、Cat No.REF352350
20 mL プラスチック容器*	120 本	アシスト	No.60.9922.113
50 mL 遠心管	120 本	FALCON	セルストレーナーと合うものであれば可
96 well ELISA 用マイクロプレート (96 穴プレート)	10 枚	コーニング	3585 細胞培養用であれば特に指定はしない。
蒸留水	1 本	株式会社 大塚製薬工場	抗体調製用 滅菌済みのもの
生理食塩液	8 本	株式会社 大塚製薬工場	Cas.No. 03-172703-B、500mL
測定キット	1 セット	Roche Applied Science	Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric)抗 BrdU 抗体、FIX DENAT 液、洗浄液、発色基質が含まれ

			る
BrdU (5-Bromo-2'deoxyuridine)	1本	ナカライテスク株式会社	05650-11 (1g)
濾過滅菌用フィルター	5個	ミリポア	MILLEX-HV