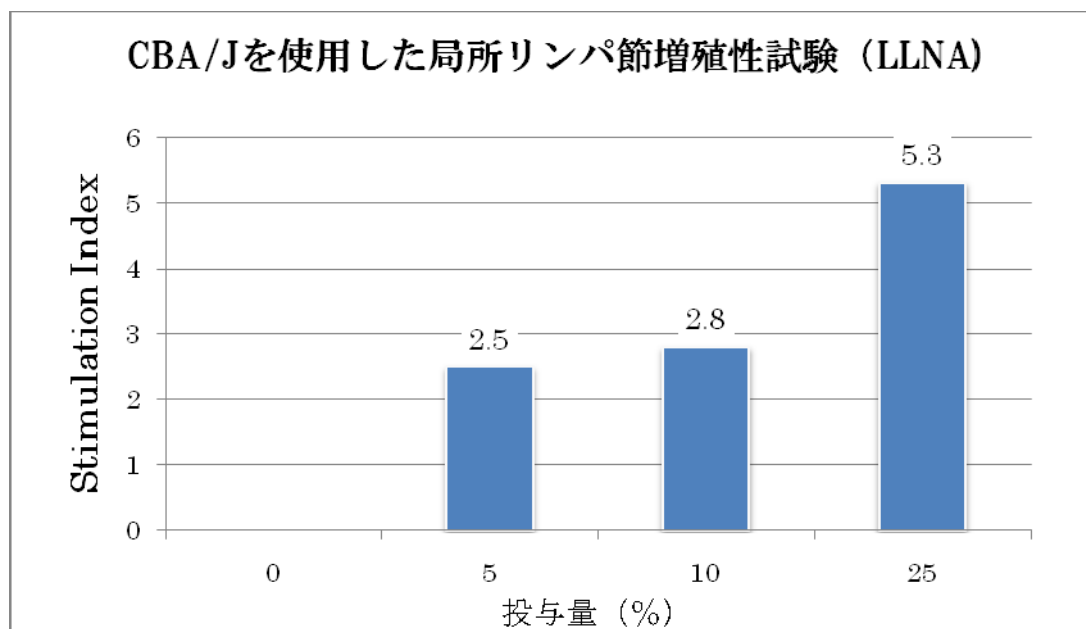


CBA/J を使用した局所リンパ節増殖性試験 (LLNA)



被験物質: α -Hexylcinnamaldehyde

希釈溶液: アセトン・オリーブオイル (4:1 v/v, AOO)

Stimulation Index 値 = 各被験物質投与群の放射能活性 (DPM/マウス) 平均値 / 対照群の放射能活性平均値

データ提供: 財団法人残留農薬研究所

本データはお客様のご厚意によりご提供頂きました。



1. 試験方法

1.1. 被験物質

α -Hexylcinnamaldehyde (和光純薬工業株式会社, HCA)

1.2. 試験動物

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社厚木飼育センター(神奈川県)で生産された近交系 SPF マウス (JAX[®]Mice Strain CBA/J) の雌動物を用いた。7 週齢にて入荷し, 9 日間試験環境に馴化させた。

この系統マウスは局所リンパ節増殖性試験に汎用されており, 接触性過敏症に対する感受性が高いことも確認されている。

1.3. 入荷時の動物の週齢, 数および体重範囲

入荷時週齢(体重範囲): 7 週齢(18~23 g), 入荷数: 40 匹

1.4. 検疫および馴化

馴化期間は入荷後 9 日間とした。

1.5. 動物の群分け

投与開始日に動物の体重を測定し, 体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に配分した。

1.6. 投与液の調製

被験物質は純度換算して秤量した。投与当日に必要な量の被験物質を用量ごとに量り取り, アセトン (和光純薬工業株式会社, 大阪府)・オリーブオイル (和光純薬工業株式会社) (4:1 v/v, AOO) で定容して被験物質投与液を調製した。調製にあたってはマグネチックスターラーで混合して溶解した。

1.7. 試験群の設定および使用動物数

使用動物数は各投与量毎 (0, 5, 10, 25%) に5匹を使用した。

1.8. 試験スケジュール

陽性対照物質を 3 日間(試験 1~3 日)にわたって, 両耳後方に開放経皮投与した。すなわち, 各濃度の陽性対照物質の投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち, ピペットを用いて左右の耳介後方に 25 μ L ずつ経皮投与を行った。試験 6 日に 20 μ Ci の放射性 ³H-Methyl Thymidine (1 Ci/mL リン酸緩衝液, 株式会社パーキンエルマージャパン, 東京都)を尾静脈に投与した。放射性 ³H-Methyl Thymidine の投与 5 時間後にエーテルの麻酔下にて動物を安楽殺した後, 耳介リンパ節を採取し, その重量を測定した。重量測定後, 細胞浮遊液を調製した。

1.9. 細胞懸濁液の調製

リン酸緩衝液 (PBS) に浸水したリンパ節をナイロンメッシュ (70 μ m メッシュ) 上で搗りつぶし, 単細胞懸濁液を得た。次に細胞懸濁液を PBS にて 2 回洗浄し, 洗浄後 5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁させた後, 冷蔵庫 (5 $^{\circ}$ C) にて約 18 時間静置した。翌日 (約 18 時間後), 遠心分離後に沈渣を 1 mL の 5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁した。

1.10. リンパ球細胞増殖活性測定

5%トリクロロ酢酸溶液に懸濁した 1 mL のリンパ球細胞懸濁液に 9 mL の液体シンチレーターを加えて混和した後,

液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, 株式会社アロカ, 東京都) にて ^3H -methyl thymidine の放射エネルギーを測定した。DPM (disintegrations per minute) で表された個体ごとの放射エネルギーをリンパ球細胞増殖活性とした。

1.11. 試験結果の評価

リンパ球細胞増殖活性について SI 値 (Stimulation Index) を次式にて被験物質投与群の用量群ごとに求めた。

SI 値 = 各被験物質投与群の放射エネルギー (DPM/マウス) 平均値 / 対照群の放射エネルギー平均値

2. 試験結果

2.1. 臨床症状および体重 (Table 1および2)

試験期間を通じて、全ての動物において臨床症状は認められなかった。

被験物質投与に起因すると考えられる体重減少は認められなかった。

Table 1 Clinical observation - Incidence of signs in female mice

Clinical signs	Vehicle used in this study	AOO			
	Dose (%)	0	5	10	25
	Number of animals examined	5	5	5	5
No abnormalities detected		5	5	5	5

AOO: Acetone olive oil (v/v, 4:1).

Table 2 Body weight - Group mean values in female mice

Vehicle used in this study	Dose (%)	Body weight (g) :		
			Before administration	At sacrifice
AOO (Acetone olive oil)	0	Mean	20.6	20.8
		S.D.	1.3	1.1
		N	5	5
	5	Mean	20.5	20.9
		S.D.	0.9	1.4
		N	5	5
	10	Mean	20.4	22.0
		S.D.	1.3	1.1
		N	5	5
	25	Mean	20.4	21.3
		S.D.	1.5	0.0
		N	5	5

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Data from the vehicle control and test substance treated groups were statistically analyzed by

Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

2.2. リンパ節重量およびリンパ球細胞増殖活性測定 (Table 3)

リンパ節重量では、試験に用いた溶媒のAOO投与群で溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。

リンパ球細胞増殖活性測定では、試験に用いた溶媒のAOO投与群で溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。SI値についてもAOO投与群で5.3と増加していた。

Table 3 Lymph node weight and cellular proliferation in female mice

Vehicle used in this study	Dose (%)		Lymph node weight(mg)	Cellular proliferation	Stimulation Index ^{a)}
AOO (Acetone olive oil)	0	Mean	6.1	713	N/A
		S.D.	0.0	0	
		N	5	5	
	5	Mean	7.5	1766	2.5
		S.D.	0.0	0	
		N	5	5	
	10	Mean	6.5	1998	2.8
		S.D.	0.0	0	
		N	5	5	
	25	Mean	9.4 **	3807 **	5.3
		S.D.	0.0	0	
		N	5	5	

DPM: Disintegrations per minute.

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

DMF: Dimethylformamide.

PG: Propylene glycol.

N/A: Not applicable.

^{a)} Ratio of the mean of the cellular proliferation of the treatment group to that of the vehicle control group.

Data from the vehicle control and test substance treated groups were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

(局所リンパ節増殖性試験 (LLNA) における CBA/JNCr1j との比較)

CBA/JNCr1jを使用し、同試験条件にて実施した結果を以下に示す。上記のCBA/Jの試験結果と同様に、リンパ節重量では、試験に用いた溶媒のAOO投与群で溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。

リンパ球細胞増殖活性測定では、試験に用いた溶媒のAOO投与群で溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。SI値についてもAOO投与群でそれぞれ13.8と増加していた。

Reference data Lymph node weight and cellular proliferation in "CBA/JNCr1j" female mice

Vehicle used in this study	Dose (%)		Lymph node weight(mg)	Cellular proliferation	Stimulation Index ^{a)}
AOO (Acetone olive oil)	0	Mean	4.7	468	N/A
		S.D.	0.9	95	
		N	5	5	
	5	Mean	6.6	1397	3.0
		S.D.	0.9	294	
		N	5	5	
	10	Mean	8.2	2111	4.5
		S.D.	2.1	545	
		N	5	5	
	25	Mean	8.3	6466	13.8
		S.D.	1.8	2349	
		N	5	5	