

8 シグナルアッセイ(6時間後)

- ⑥ Tripluc® Luciferase assay reagent (Tripluc)の容器を水に漬ける、あるいは室温で放置するなどにより、溶液が完全に室温に戻るよう溶解させる。光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始 30 分前には電源を入れる。
- ⑦ リザーバーに Tripluc を移し、8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに 100 μ l/well ずつ分注する。
- ⑧ Tripluc 添加後、プレートシェーカーを使用して室温 (25 $^{\circ}$ C 前後) で 10 分間攪拌し、細胞を溶解させる。
- ⑨ well 内に大きな気泡等があれば針などで潰し、ルミノメータで Luciferase 活性を測定する。
- ⑩ フィルタ無し、フィルタ有りで各々3秒/well 測定する (アトー社製 Phelios の場合は F0 と F2 を使用) (F1 は使用しない)。測定終了後、フィルタ無し、フィルタ有りの測定値から以下の様にエクセルテンプレートを用い、SLO と SLR の発光値を算出する。

9 データ解析

アトーPhelios の場合:測定が終了した時点で画面には測定値を表示したウィンドウが表示されているのでまずファイルのタブから「名前を付けて保存」を選択し適宜保存する。AB-2350 Phelios という名前のソフトの拡張子.atm のファイルが作成される。次に、ファイルのタブからエクスポートを選択すると F0 および F2 の測定値が 96 ウェルの形にならんだエクセルファイルが作成される。今回のアッセイのデザインにあわせた THP-G8 用のひな形のエクセルファイル(Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 002 20120905)に「データ入力」のシートにフィルタの透過係数と測定値をペーストする。各ウェルの SLR-LA, SLO-LA, nSLO-LA、および IL-8 についての% suppression が算出される。被験物質の濃度が 5 x Cmax 以内の範囲、および 5 x Cmax を超える範囲における% suppression を求める。

Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 002 20120905 の「Result Format 2」シートの SLR-LA を表示した部分#B14-#M21 を平行してアッセイした Data sheet for MITA 149-14 Ver. 002 20120905 の「Result Format 2」シートの SLR-LA を表示した部分#B24-#M31 にペーストする (値で貼り付ける)。その結果、149-14 細胞についての nSLO-LA, nSLG-LA、および IL-8 および IL-1 β についての% suppression があたらしく算出される。被験物質の濃度が 5 x Cmax 以内の範囲、および 5 x Cmax を超える範囲における% suppression を求める。

以上が149-14細胞とTHP-G8細胞のプロトコール上の相違点です。プレートへの細胞

の調製、被験物質の調製、細胞への添加、LPSによる賦活は149-14細胞とのちがいはありません。



MultiReporter Assay System -Tripluc[®] - Calculation Sheet (3色分離用)

(1) SLG、SLO、SLRシフェラーゼ単独のサンプルの測定値を下記にインプットし、各フィルター透過率を算出します。

SLG	測定値				透過率		
	F1	F2	F3	no Filter	T1	T2	T3
sample1					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
sample2					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
sample3					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
				平均	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!

F1:Filter 1測定値
 F2:Filter 2測定値
 F3:Filter 3測定値
 no Filter:Filterなしでの測定値

	T1	T2	T3
SLG	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
SLO	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
SLR	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!

→「data入力」シートのTransmittance DATAにこのデータをコピーしてください。

SLO	F1	F2	F3	no Filter	T1	T2	T3
	sample1					#DIV/O!	#DIV/O!
sample2					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
sample3					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
				平均	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!

SLR	F1	F2	F3	no Filter	T1	T2	T3
	sample1					#DIV/O!	#DIV/O!
sample2					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
sample3					#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!
				平均	#DIV/O!	#DIV/O!	#DIV/O!

(2) 「data入力シート」のFilter 1～3に、サンプルの各フィルター測定値を入力してください。

(3) 「Result Format 1」及び「Result Format 2」にSLG、SLO、SLRの算出結果が表示されます。

MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- Calculation Sheet

Transmittance Data

	SLG	SLO	SLR			
T1				#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
T2				#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
T3				#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!

Filter 1 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 2 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 3 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

分担研究報告書

免疫毒性に関する国際動向調査

分担研究者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、動物実験指標について調査し、比較対照となるデータベースの構築および被験物質の選択理由を明確にすることを目的とした。その結果、バリデーション等を考慮した被験物質選択のためには、既存データベースを利用してその物質毎の免疫毒性情報を整理する必要があると考えられた。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

A. 研究目的

免疫毒性の評価法としては、一般毒性の評価項目¹⁾や医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインの中で²⁻⁴⁾、その項目が定められている。これらを調査し、新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、比較対照となるデータベースの構築および被験物質の選択理由を明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1) 調査対象

以下の書籍・文献を用いて、免疫毒性の評価手法を調査した。

- 1) 医薬品の一般毒性試験ガイドライン^{1,2)}
- 2) 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン³⁾
- 3) ICH 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン⁴⁾
- 4) 毒性情報ガイダンス⁵⁾

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 結果

C-1) 一般毒性

一般毒性試験における標準的毒性評価項目を表1に示す。一般毒性試験の血液学的、剖検、病理学的な解析により、免疫毒性の可能性を評価することができる。

C-2) 免疫毒性試験に関するガイドライン

ICH 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインにおける評価手法を以下に示す。

- 1) T細胞依存性抗体産生 (TDAR) 試験 (*in vivo*)
T細胞依存性抗原 (ヒツジ赤研究) または KLH (keyhole Limpet hemocyanin) による
- 2) イムノフェノタイピング (*in vivo*)
抗体を用いて白血球サブセットの同定
- 3) NK細胞活性検査 (*in vivo*)

イムノフェノタイピングでNK細胞数の変化が見られた場合に実施

- 4) 宿主抵抗性試験 (*in vivo*)
- 5) マクロファージ・好中球機能検査 (*in vivo*)
- 6) 細胞性免疫能の検査 (*in vivo*)

さらに、免疫学的機序による二次的な障害に関する試験として、以下が挙げられた。

- 1) アレルギー誘発能試験
 - 1-1) I型
 - 全身性アナフィラキシー試験
 - 局所性アナフィラキシー試験
 - IgE-ELISA測定
 - 1-2) IV型
 - モルモット皮膚感作性試験
 - 局所リンパ節試験
- 2) 自己免疫誘発能試験
 - 免疫組織化学染色法
 - 膝窩リンパ節測定法

また、*in vitro*試験として、以下が挙げられた。

- 1) 無処置動物の末梢血やB細胞、免疫臓器の細胞を用い、マイトゲン (LPSなど) や同種異系細胞で免疫刺激を行うリンパ球幼若化反応
- 2) 標的細胞と共培養し、標的細胞に対する細胞傷害性を測定する細胞傷害性T細胞反応
- 3) ヒツジ赤血球を抗原とする液性免疫誘導試験
- 4) バイオ医薬品 ヒト細胞を用いた培養系での評価

C-3) 毒性情報ガイダンス

免疫毒性試験として、呼吸器/皮膚感作性項目が挙げられている。しかし、表2および表3の該当データベースのうち、有用性の大きいデータを丹念に拾うことが重要と考えられた。

表1. 一般毒性試験における標準的毒性評価項目¹⁾

パラメーター	検査項目
血液学	総白血球数および白血球型別絶対数
血液生化学	グロブリン濃度およびA/G比
剖検	リンパ系器官/組織
臓器重量	胸腺、脾臓
病理組織学	胸腺、脾臓、所属リンパ節および1つ以上の他のリンパ節、骨髄、パイエル板、BALT (気管支関連リンパ節)、NALT (鼻咽頭関連リンパ節)

表 2 国内主要毒性情報源の GHS健康有害性項目における有用性

主要情報源	GHS健康有害性項目									
	急性毒性	皮膚腐食/ 刺激性	眼刺激性	呼吸器/ 皮膚感作性	生殖細胞 変異原性	発がん性	生殖毒性	特定標的 臓器(単回)	特定標的 臓器(反復)	吸入性呼吸 器有害性
1) 既存化学物質毒性データベース	○	×	×	×	○	×	○	△	○	×
2) 環境リスク評価	◎	○	○	×	○	◎	◎	○	◎	×
3) 化学物質ファクトシート	×	×	×	×	△	△	△	×	△	×
4) 初期リスク評価書	◎	○	○	○	◎	◎	◎	○	◎	×
5) 有害性評価書	◎	○	○	○	◎	◎	◎	○	◎	×
6) ハザード評価シート	◎	○	○	○	○	○	○	○	○	×
7) 詳細リスク評価書	◎	○	○	△	◎	◎	◎	○	◎	×
8) SIAP日本語版	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×
9) 食品健康影響評価	×	×	×	×	○	○	○	×	○	×
10) 農業抄録	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	△	◎	×
11) 農業安全性情報	◎	○	○	○	○	○	○	△	○	×

概要 ◎：有用性大(十分な情報があり、当該項目における GHS分類への利用可能)
 ○：有用性中(関連情報があり、当該項目における GHS分類への利用可能)
 △：有用性小(関連情報はあるが、当該項目における GHS分類利用には不十分)
 ×：有用性なし(関連情報は記載されていない)

引用文献：毒性情報収集ガイダンス⁵⁾

表 3 海外主要毒性情報源の GHS健康有害性項目における有用性

主要情報源	GHS健康有害性項目									
	急性毒性	皮膚腐食/ 刺激性	眼刺激性	呼吸器/ 皮膚感作性	生殖細胞 変異原性	発がん性	生殖毒性	特定標的 臓器(単回)	特定標的 臓器(反復)	吸入性呼吸 器有害性
1) ACGIH	○	○	○	○	○	◎	○	◎	◎	×
2) ATSDR	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
3) CICAD	○	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
4) DFGOT	○	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
5) EHC	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	○
6) EU RAR	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
7) HSDB	◎	○	○	×	△	△	△	△	△	×
8) HSFS	×	△	△	×	×	△	×	△	△	×
9) IARC	×	×	×	×	◎	◎	△	×	×	×
10) ICSC	×	○	○	○	×	△	△	○	○	○
11) IRIS	○	×	×	×	○	◎	○	○	○	×
12) IUCLID	○	○	○	○	○	△	△	×	×	×
13) JECFA	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
14) JMPR	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
15) NTP RoC	×	×	×	×	△	◎	×	×	×	×
16) PATTY	◎	○	○	○	○	◎	○	○	○	×
17) PECAR	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
18) PSAR	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×
19) RTECS	◎	×	×	×	△	×	×	△	△	×
20) SIDS	◎	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	×

概要 ◎：有用性大(十分な情報があり、当該項目における GHS分類への利用可能)
 ○：有用性中(関連情報があり、当該項目における GHS分類への利用可能)
 △：有用性小(関連情報はあるが、当該項目における GHS分類利用には不十分)
 ×：有用性なし(関連情報は記載されていない)

引用文献：毒性情報収集ガイダンス⁵⁾

D. 考察

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、比較対照として用いるデータとして、動物実験代替法の開発が進んでいる遅延型（IV型）アレルギー試験を除くとすれば、即時型（I型）あるいは一次的な障害をターゲットとして考えた。しかし、呼吸器感作性に関する情報は、ヒトおよび動物知見ともに極めて少ないかった⁵⁾。

これらに代わるもの、あるいはその作用機構を調べるため、既存の*in vivo*免疫毒性試験の情報を十分に把握する必要がある。

バリデーション等を考慮した被験物質選択のためには、既存データベースを利用してその物質毎の免疫毒性情報を整理する必要があると考えた。

E. 結論

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、動物実験指標について調査し、比較対照となるデータベースの構築および被験物質の選択理由を明確にすることを目的とした。現状ではバリデーション等の被験物質選択のためには、既存データベースを

利用してその物質毎の免疫毒性情報を整理する必要があると判断した。

F. 参考文献

- 1) 東 泰孝：免疫毒性、日本比較薬理学・毒性学会編、新獣医毒性学、近代出版、東京（2012）
- 2) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会編：反復投与毒性試験、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2010、pp. 17-24、薬事日報社、東京（2010）
- 3) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会編：免疫毒性試験、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2010、pp. 95-102、薬事日報社、東京（2010）
- 4) 厚生労働省医薬食品局：医薬品の演繹毒性試験に関するガイドライン、平成 18 年 4 月 18 日薬食審査発第 0418001 号
- 5) 森田 健、城内 博：毒性情報収集ガイドダンス、pp. 5-65、化学工業日報社、東京（2008）

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島肇：平成21年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し(第4報)－細胞毒性試験法の検討－、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 43(5), 473-482 (2012)
- 2) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (6), COSME TECH JAPAN, 2(4) : 59-63 (2012)
- 3) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (7), COSME TECH JAPAN, 2(5) : 51-54 (2012)
- 4) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (8), COSME TECH JAPAN, 2(6) : 60-63 (2012)
- 5) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (9), COSME TECH JAPAN, 2(7) : 55-58 (2012)
- 6) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (10), COSME TECH JAPAN, 2(8) : 50-53 (2012)
- 7) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (11), COSME TECH JAPAN, 2(9) : 43-48 (2012)
- 8) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (12), COSME TECH JAPAN, 2(10) : 48-51 (2012)
- 9) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (13), COSME TECH JAPAN, 2(11) : 44-48 (2012)
- 10) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (14), COSME TECH JAPAN, 2(12) : 39-42 (2012)
- 11) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (15), COSME TECH JAPAN, 3(1) : 68-72 (2013)
- 12) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (16), COSME TECH JAPAN, 3(2) : 51-57(2013)
- 13) Kojima, H.: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM Contributions and Future Plans, ALTEX Proceeding, 1/12, Proceedings of WC8 (2012)
- 14) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H.: Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation., J Appl Toxicol. (2012)
- 15) Seto Y, Hosoi K, Takagi H, Nakamura K, Kojima H., Yamada S, Onoue S.: Exploratory and regulatory assessments on photosafety of new drug entities., Curr Drug Saf. 7(2):140-8 (2012)
- 16) Stokes W, McFarland R, Kulpa-Eddy J, Gatewood D, Levis R, Halder M, Pulle G, Kojima H., Casey W, Gaydamaka A, Miller T, Brown K, Lewis C, Chapsal JM, Bruckner L, Gairola S, Kamphuis E,

Rupprecht CE, Wunderli P, McElhinney L, De Mattia F, Gamoh K, Hill R, Reed D, Doelling V, Johnson N, Allen D, Rinckel L, Jones B.: Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: state of the science and planning the way forward. *Biologicals*. 40(5):369-81(2012)

- 17) 小島 肇、西川秋佳：日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成23年度報告書、AATEX-JaCVAM1(1), 88-103 (2012)

2. 学会発表

- 1) 山本直樹、平野耕治、山下宏美、加藤義直、佐藤淳、水谷宏、中村政志、原和宏、宇佐美雅仁、谷川篤宏、堀口正之、谷口孝喜、小島肇：不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法に関する研究日本組織培養学会 第85回大会、京都大学、京都 (2012.5)
- 2) 小島 肇：動物実験代替法の国際的理解、日本実験動物科学・技術 九州2012、別府国際コンベンションセンター、大分 (2012.5)
- 3) 小島 肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧品安全性評価における代替法、未来へのバイオ技術勉強会 月例会、(一財)バイオインダストリー協会、東京 (2012.5)
- 4) 尾上 誠良、細井 一弘、若栗 忍、岩瀬 裕美子、山本 敏誠、松岡 奈央子、中村 和希、戸田 嗣人、高木 広憲、大崎 尚人、松本 康浩、川上 哲、世戸 孝樹、加藤 尚視、山田 静雄、大野 泰雄、小島 肇：ROS アッセイ多施設バリデーション：物性からの光毒性リスク予測を目指して、日本薬学学会第27年会、神戸国際会議場、兵庫 (2012.5)
- 5) Kojima, H. : Session: Regulatory Acceptance of Alternative Carcinogenicity tests (セッション：発癌性試験代替法の行政的な受入れ) OECD Activities on the Cell Transformation Assays, World Congress on in Vitro Biology, 2012, Bellevue, Washington, USA (2012.6)
- 6) Kojima, H., Tanaka, N., Oshimura, M., Saito, K., Saito, F. and Imatanaka, N. : New Research Projects in Japan for Alternative to Repeated Dose Oral Toxicity Studies, EUROTOX 2012, Stockholm, Sweden (2012.6)
- 7) 小島 肇：シンポジウム：in vitro 毒性試験法の探索毒性試験への展開、in vitro 探索毒性試験の展望、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 8) 山口宏之、小島 肇、竹澤俊明：コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト

- 角膜上皮組織シート：化学物質の眼刺激性評価指標としての経皮電気抵抗値の重要性、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 9) 松本康浩、尾上誠良、細井一弘、若栗忍、岩瀬裕美子、山本敏誠、松岡奈央子、中村和希、戸田嗣人、高木広憲、大崎尚人、川上哲、世戸孝樹、加藤尚視、山田静雄、大野泰雄、小島肇：光安全性評価のためのROSアッセイ多施設バリデーション、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 10) 内野正、竹澤俊明、山下邦彦、小島肇、清水久美子、宮永裕子、五十嵐良明、西村哲司：ビトリゲルチャンバーを培養担体とする皮膚感作性試験代替モデルを構成する細胞のサイトカイン産生能について、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 11) 六川潤美、榊原隆史、伊藤浩太、河村公太郎、古川正敏、藤平司朗、市戸等、並木正人、平賀武夫、小島肇、松浦正男：眼刺激性評価のための牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法(BCOP法)、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 12) 小島肇：皮膚刺激性評価法の最新動向、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、タワーホール船堀、東京(2012.7)
- 13) 伊藤浩太、榊原隆史、六川潤美、平賀武夫、小島肇、松浦正男：牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP法)、第32回比較眼科学会年次大会、名古屋国際会議場(2012.7)
- 14) 小島肇：皮膚感作性試験代替法における最新動向、Workshop on the Adverse Outcome Pathways for skin sensitization assay,京都教育会館(2012.9)
- 15) Kojima, H., Tanaka, N., Oshimura, M., Saito, K., Saito, F. and Imatanaka, N. : Japanese New Project" ARCH-Tox" for the future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assay for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 1st annual meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT), ベセスダ、米国(2012.9)
- 16) Yoshifumi Uno for JaCVAM Comet Assay International Validation Project Team : Update of the Status of the JaCVAM Organized International *In Vivo* Comet Assay Validation Study 2012 Genetic Toxicology Association (GTA) meeting, John M. Clayton Hall Conference Center, University of Delaware, Newark, DE (2012.10)
- 17) Kojima, H.: Historical background on the Japanese Validation Study, International Workshop on the HET-CAM Assay, ベルリン、ドイツ(2012.10)
- 18) 小島肇：テストガイドラインの現状、三次元生体組織構築公開シンポジウム、化学会館ホール、東京(2012.11)
- 19) 小島肇：今後の化学物質等の安全性評価の方法はどうか、第16回コロイド・界面技術者フォーラム、KKR江の島ニュー向洋、神奈川(2012.11)
- 20) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、松本和美、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、今村匡志、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、荻原庸介、前田晃央、成見香瑞範、寺島ゆかり、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、涌生ゆみ、川迫一史、佐野正樹、大橋信之、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与による肝臓小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 21) 大山ワカ子、成見香瑞範、岡田恵美子、藤石洋平、高柳智美、堀妃佐子、松村奨士、池田直弘、夏目匡克、田中仁、高島理恵、松本浩孝、須井哉、浅野哲秀、森田健、小島肇、本間正充、濱田修一、林真：反復投与による消化管小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 22) 小島肇：化粧品の安全性を考える、「化粧学のスズメ」、東京農業大学世田谷キャンパス(2012.12)
- 23) 小島肇：25周年記念講演「日本動物実験代替法学会バリデーション委員会とJaCVAM」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス (2012.12)
- 24) 山口 宏之、小島肇、竹澤 俊明：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した眼刺激性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 25) 内野 正、清水久美子、竹澤俊明、山下邦彦、小島肇、五十嵐良明、秋山卓美：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した皮膚感作性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾

- 大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 26) 小島 肇、安中 希、土屋成一朗、吉武裕一郎、許 睿、鈴木 克、嶋谷 亘、梶田明美、中村 牧、渡辺美香、中嶋圓、坂本興嗣、竹田竜嗣、久間將義、池田英史、稲垣愛美、棟近由記美、山本 裕、笠原利彦、福田隆之、仲原 聡、渡辺真一、倉田隼人、篠田伸介、加藤雅一：培養角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法共同研究、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 27) 木村 裕、渡辺 美香、斎藤 るみ子、鈴木紀之、岩城 知子、金子 愛、高田 めぐみ、田中 裕美、渡辺 文、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験-Phase I, Phase II aの結果ならびに今後の展望-、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 28) 簾内 桃子、福田 隆之、池田 英史、鄭 美淑、大森 崇、田中 裕美、山影 康次、萩野 滋延、小島 肇：SIRC-CVS試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究 (I)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 29) 岩瀬 裕美子、山本 敏誠、若栗 忍、尾上誠良、世戸 孝樹、大崎 尚人、高木 広憲、戸田 嗣人、中村 和希、松本 康浩、川上 哲、細井 一弘、小島 肇：医薬品の光安全性評価のためのReactive Oxygen Species (ROS)アッセイ-JaCVAM多施設バリデーション研究-、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 30) 榊原 隆史、六川 潤美、伊藤 浩太、河村 公太郎、古川 正敏、藤平司郎、市戸等、並木正人、平賀武夫、小島肇、松浦正男：眼刺激性評価のための角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 31) 小島 肇：iPS細胞を用いた安全性評価試験が行政的に受け入れられるために、日本学術会議薬学委員会シンポジウム 「iPS細胞研究の創薬への応用」、日本学術会議講堂、東京(2013.1)
- 32) 古川 正敏、六川 潤美、榊原 隆史、伊藤 浩太、藤平 司郎、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：眼刺激性評価のための角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法) - 病理組織学的検査を中心に - 、第29回日本毒性病理学会総会および学術集会、つくばフロンティアセンター(2013.1)
- 33) 小島 肇：最近の動物実験代替法の開発状況、革新的な医療機器の開発と動物実験代替法の最前線、富士ソフトアキバプラザ 5階 富士ソフトアキバホール、東京(2013.2)
- 34) H Kojima, N Annaka, S Tsuchiya, Y Yoshitake, R Xu, M Suzuki, W Shimatani, A Kajita, M Nakamura, M Watanabe, M Nakajima, K Sakamoto, R Takeda, M Hisama, H Ikeda, M Inagaki, Y Munechika, Y Yamamoto, T Kasahara, T Fukuda, S Nakahara, S Watanabe, H Kurata, S Shinoda, M Katoh : Collaboration study on eye irritation alternative method with human corneal model; LabCyte CORNEA-MODEL24, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 35) W Casey, P Ceger, J Strickland, L Rinckel, E Grignard, Susanne Bremer, H Kojima, SY Han, W Stokes: Regulatory Acceptance of the BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 36) J Kulpa-Eddy, R McFarland, G Srinivas, A Walker, M Halder, H Kojima, K Brown, H Draayer, R Sebring, V Doelling, B Jones, N Johnson, L Rinckel, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods for Veterinary *Leptospira* Vaccine Potency Testing, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 37) T Toda, S Onoue, Y Seto, H Takagi, N Osaki, S Kawakami, Y Matsumoto, Y Iwase, T Yamamoto, S Wakuri, K Hosoi, K Nakamura, and H Kojima : Intra- and inter-laboratory validation study on reactive oxygen species (ROS) assay for photosafety evaluation of pharmaceuticals, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 38) 小島 肇：動物モデルの必要性、日本薬学会第 133年会、横浜(2013.3)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析，精度管理

分担研究者 近江谷克裕
(独)産業技術総合研究所

研究要旨

Multi-ImmunoTox assay (MITA) による免疫毒性評価法のラボ間バリデーション試験に参加、再現性を評価した。一方、MITA法の信頼性の確保(精度管理)のため、測定時に用いるルミノメーター機種間の測定結果変動の補正法を検討した。さらに毒性評価発光細胞の維持管理を行うため、レポータ遺伝子群を人工染色体に導入したコントロール発光細胞の樹立を目指しレポータ発光遺伝子群の人工染色体ベクター化を開始した。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

A. 研究目的

我々はこれまでに多色発光タンパク質による新たな *in vitro* 免疫毒性評価試験法、いわゆる Multi-ImmunoTox assay (MITA) を確立し各種毒性評価発光細胞を樹立した¹⁾。現在、これらの細胞群を用いた化学物質の免疫毒性評価法の確立を目指している。そこで本研究では、化学物質の免疫毒性評価のためのMITA法のOECDガイドライン化を視野に、ラボ間バリデーション試験の実施とMITA法の精度管理に必要な周辺技術の開発を目的とした。

より具体的には、東北大学病院で樹立されたJurkat細胞におけるINF- γ 、IL-2、G3PDHプロモータ活性を測定する細胞株2H4及びTHP-1細胞におけるIL-8、IL-1 β 、G3PDHプロモータ活性を定量化できる細胞株6C12をモデル細胞としてバリデーション試験を実施、ガイドライン化するための手法の最適化を目指す。また、MITA法の精度管理として、ルミノメーターの機種間測定結果変動の補正法の開発及び人工染色体を用いた標準発光細胞の構築

を目指した。

B. 研究方法

B-1) プレバリデーション試験

東北大学で樹立した細胞株2H4 (Jurkat細胞におけるINF- γ 、IL-2、G3PDHプロモータ活性を測定) 及び細胞株6C12 (THP-1細胞におけるIL-8、IL-1 β 、G3PDHプロモータ活性を測定) を用いて数種類の化学物質を評価する。具体的な試験法を以下に示す。

1) 細胞株2H4、6C12を用いた化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法についてはMulti-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール平成24年11月13日ver. 001.1準ずる。

2) 試験化学物質としてはデキサメサゾン (DEX) 及び再クロスポリンA(CyA)とし、濃度はDEXの場合100ng/mL-1mg/mL、

CyAの場合、30pg/mL-1 μ g/mLとして、測定装置としてアトー社製Pheriosを用いた。B-2) ルミノメーターの機種間測定結果変動の補正法

ルミノメーター用多色標準発光プレートの試作を検討した。

B-3) 人工染色体を用いたコントロール発光細胞の作成

IL-8転写調節領域(約5.0kb)の橙色発光ルシフェラーゼ遺伝子を加えたものを人工染色体ベクターに搭載する。

1) pYM626-4からSalIとNotIでhIL-8 SLOカセットを切り出し、クローニングベクターに導入してphIL-8 SLOを構築する。

2) 人工染色体ベクターを保持したCHO細胞に1)で構築したpMGP4 Neo hIL-8 SLO #20をトランスフェクション(invitrogen, Lipofectamine2000)する。

2) トランスフェクション6時間後に培地を交換し、トランスフェクション24時間後に細胞を継代。トランスフェクション48時間後に薬剤選択(Geneticin, 500 μ g/mL)を開始する。

3) 薬剤選択耐性クローンを取得し、ゲノムPCRで人工染色体ベクター上の目的部位にモニターカセットが導入できていることを確認する。

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 結果

C-1) プレバリデーション試験

細胞株2H4、6C12を用いた化学物質の免疫毒性試験法は初めに東北大学病院にて手技の確認を行ってから産総研内で実験を行った。

細胞株2H4の結果を図1、2で示す。当初、東北大学のデータと同様な結果は得られず、特に緑色ルシフェラーゼの発光量は十分ではなかったが、抑制率を見る限りはほぼ同様な結果が得られている。さらに数回実験を繰り返した結果、東北大病院と発光量を含めて同様な結果が得られた。

細胞株6C12の結果を図3、4で示す。当初ばらつきがみられたが、回数を経るご

とにばらつきは減少、東北大病院と同様な結果が得られた。2つの細胞株の応答性を確認、また、再現性の高い手法である点も確認した。

C-2) ルミノメーターの機種間測定結果変動の補正法

これまでLEDを用いた発光プレートは単色光であり、ルミノメーターの受光部分の性能確認、精度管理は可能であったが、多色発光では色分離を行うフィルターの活用が必須であるため、単色光のLEDでは十分な精度管理は難しい。そこで、3色の発光ルシフェラーゼ標品を作り、これらを用いることで精度管理が可能である。しかしながら、ルシフェラーゼ標品では供給が難しく、日々装置の校正をすることは容易ではない。そこで、図5にあるような3色のLEDを用いた発光プレートの試作を、アトー社と検討した。現在、試作中であり、次年度以降は多色発光標準プレートを用いて計測の精度管理を行う予定である。

C-3) 人工染色体を用いたコントロール発光細胞の作成

発光細胞自体の精度管理を行うためレポータ遺伝子を安定に発現させることが可能な人工染色体に発光遺伝子を挿入したコントロール発光細胞の作製を目指す。まずはIL-8プロモータ領域5kbpと橙色発光ルシフェラーゼ遺伝子が挿入されているpYM626-4からSalIとNotIでhIL-8 SLOカセットを切り出し、クローニングベクターに導入してphIL-8 SLOを構築した(図6)。phIL-8 SLOは、ScaI、KpnI/NdeI、SfiI、SnaBIでそれぞれ消化し、電気泳動によりバンドパターンを確認(図7)し、phIL-8 SLO #1を得た。hIL-8 SLO #1を人工染色体ベクター導入用ベクターpMGP4 Neoに導入し、pMGP4 Neo hIL-8 SLOを構築した。pMGP4 Neo hIL-8 SLOは、EcoRI、NcoIでそれぞれ消化し、電気泳動パターンを確認(図7)し、pMGP4 Neo hIL-8 SLO #20を得た。

人工染色体ベクターを保持したCHO細胞に構築したpMGP4 Neo hIL-8 SLO #20をトランスフェクションした。トランスフェクション6時間後に培地を交換し、トランスフェクション24時間後に細胞を継代した。

トランスフェクション48時間後に薬剤選択 (Geneticin, 500 μ g/mL) を開始した。薬剤選択耐性クローンを取得し、ゲノムPCRで人工染色体ベクター上の目的部位にモニターカセットが導入できていることを確認した。さらに2カ所のPCRを行い、すべて陽性のクローンのFISH解析を行った結果 (図

8)、hIL-8モニターカセット搭載人工染色体ベクターを保持するCHO細胞 (クローン番号:hIL-8 SLO/MGP CHO #6) を取得した。来年度以降、THP-1細胞に導入し標準発光細胞として機能するか検証する。

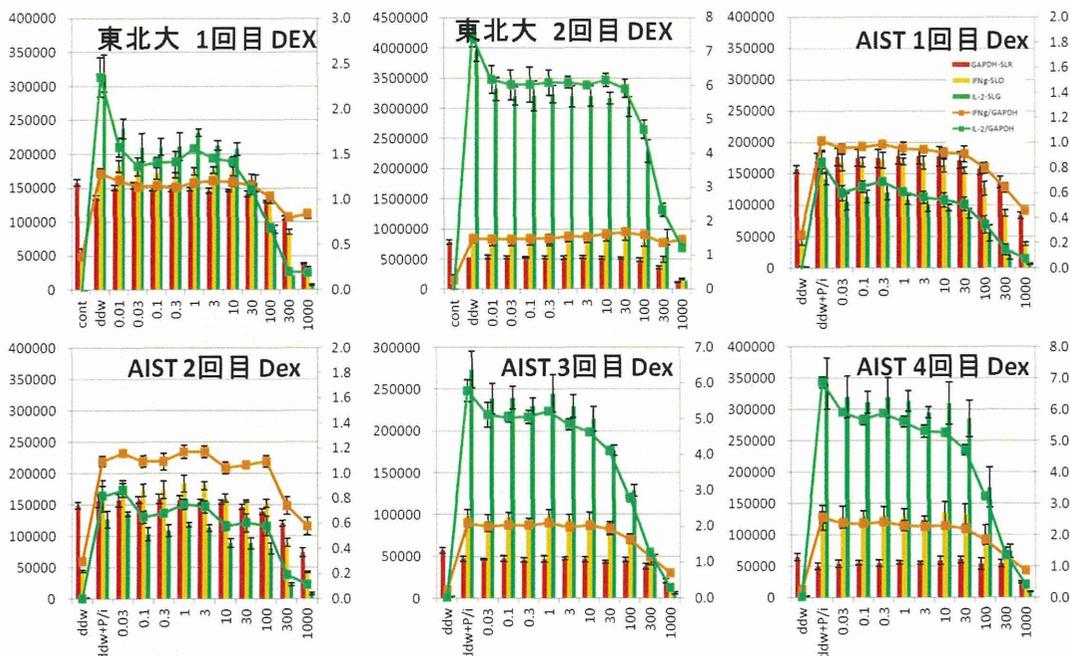


図1 細胞株 2H4 における DXE 刺激に対する細胞応答性

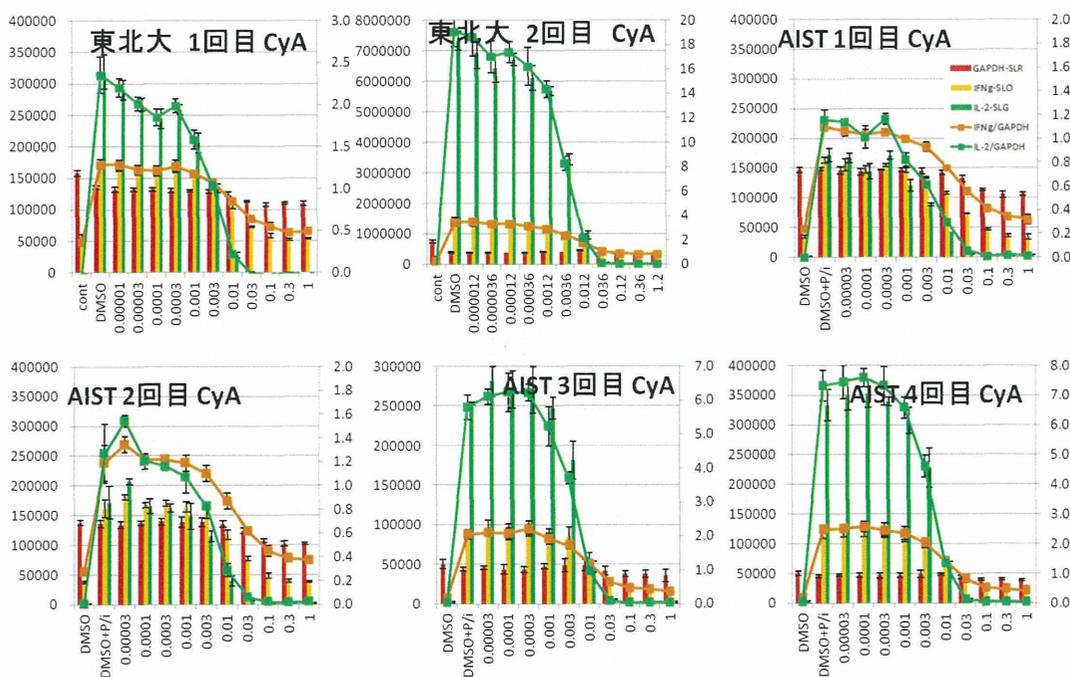


図2 細胞株 2H4 における CyA 刺激に対する細胞応答性

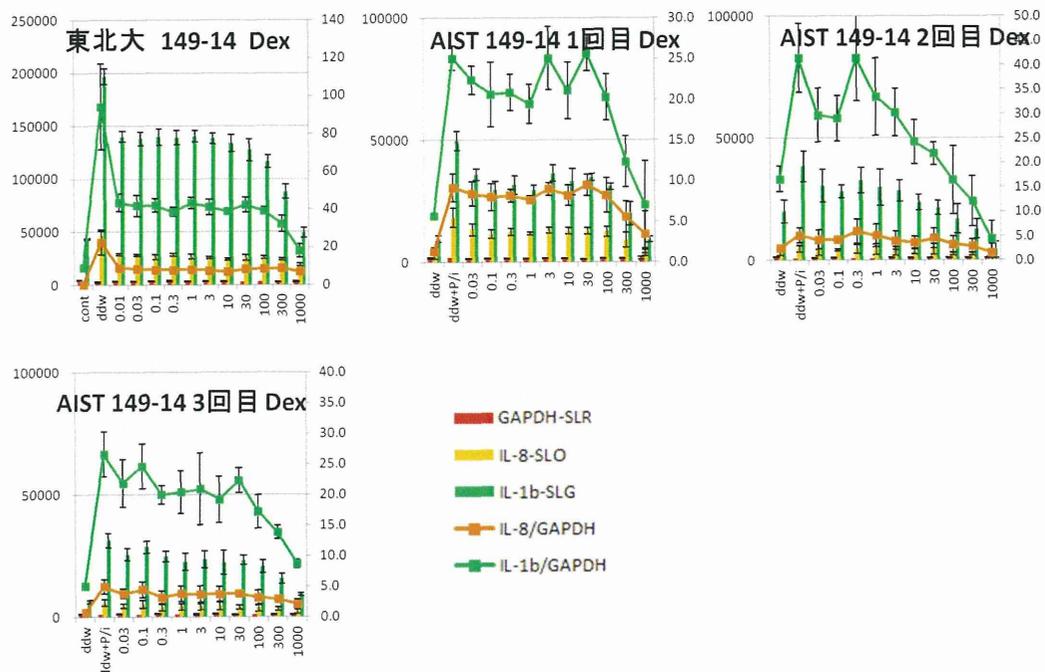


図3 細胞株 6C12 における DXE 刺激に対する細胞応答性

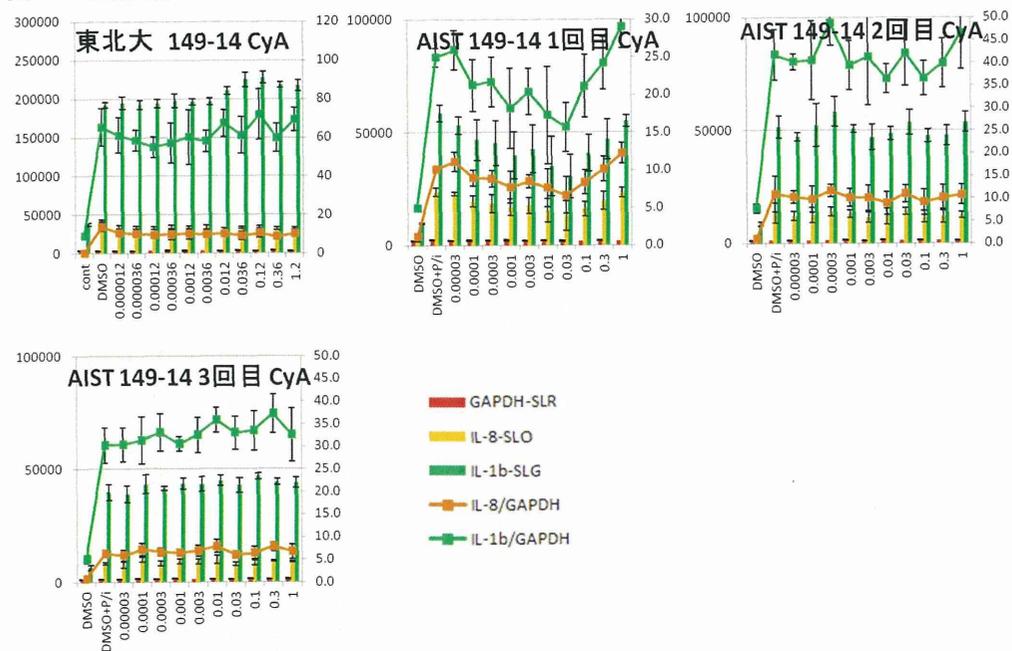


図4 細胞株 6C12 における CyA 刺激に対する細胞応答性

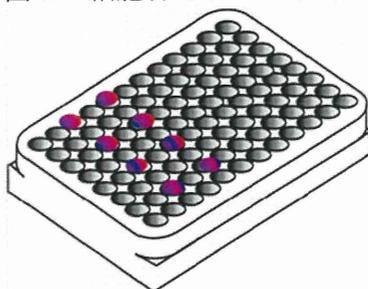


図5 3色のLEDを用いた発光プレートの概要

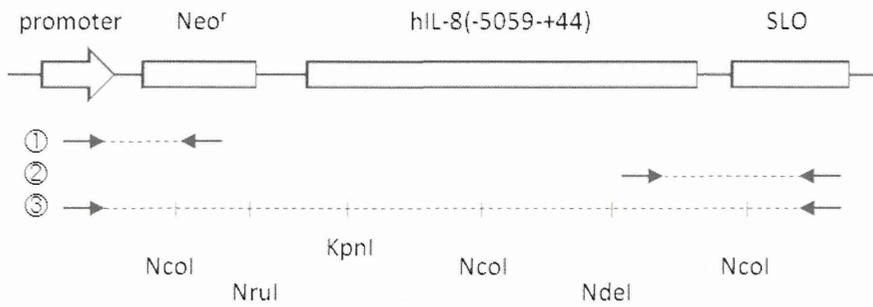


図6 phIL-8 SLO の遺伝子マップ

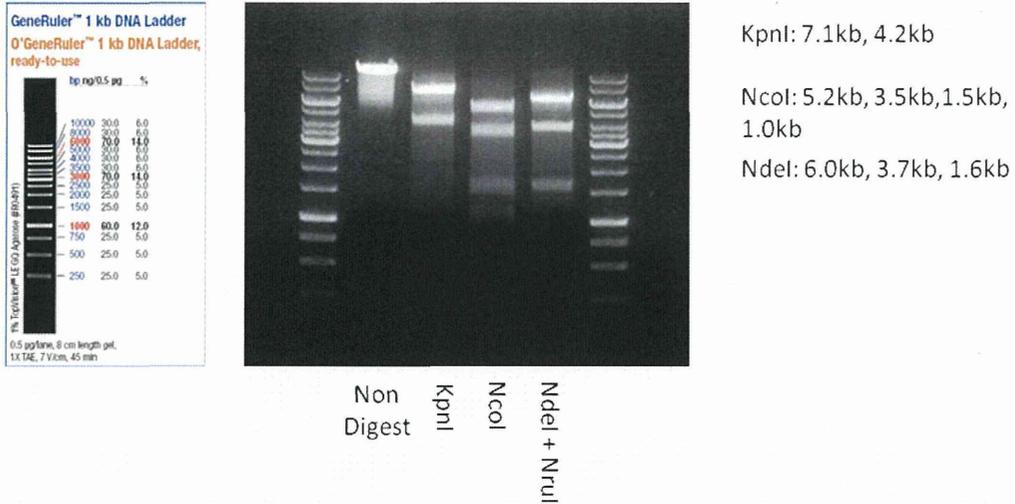


図7 phIL-8 SLO の遺伝子の制限酵素切断によるフラグメント解析

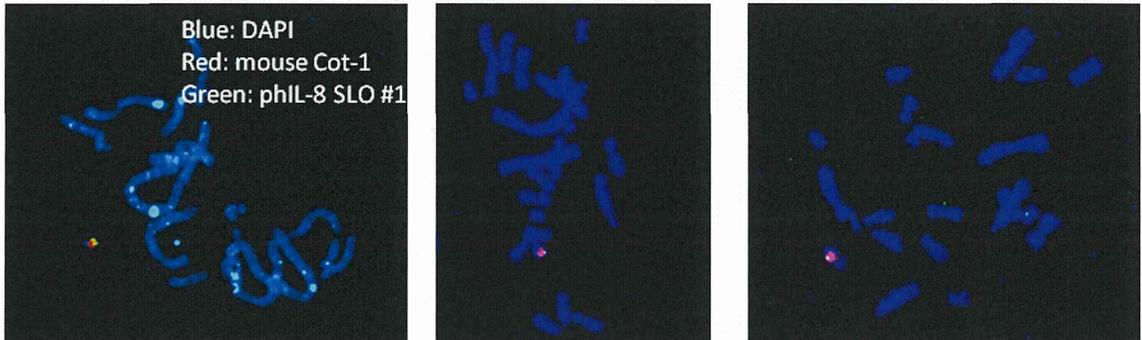


図8 hIL-8 モニターカセット搭載人工染色体ベクターを保持する CHO 細胞の FISH 解析

D. 考察

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、ラボ間プレバリデーション試験の実施と精度管理法の開発を行った。東北大学病院で樹立された立した細胞株2H4 Jurkat細胞及び細胞株6C12 THP-1細胞を元に確立された実験手法を産業技術総合研究所に技術移転、プレバリデーション試験を行った結果、再現性の高い手法であることを確認した。今後、各種化学物質に対する毒性試験を実施する予定

である。

MITA 法の精度管理は 2 つのアプローチで達成することとした。第一のアプローチは発光測定装置ルミノメーターの精度管理であり、このための多色発光標準プレートの試作を実施中である。一方、発光細胞自身の発光の減弱等の細胞自体の管理を達成するため、挿入された遺伝子の発現が一定となるコントロール発光細胞を構築することを計画、人工染色体に IL-8 プロモータでドライブされる発光遺