

伝子ベクターを挿入、CHO細胞への導入に成功した。今後、THP細胞に導入しコントロール発光細胞とする予定である。

#### E. 結論

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、MITA法のバリデーション試験の準備段階を終了した。一方、MITA法の精度管理のための多色発光標準プレートの試作、及びコントロール発光細胞の開発に着手した。

#### F. 参考文献

- 1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S: An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.*, 124, 359-69, 2011

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Noguchi T, Ikeda M, Ohmiya Y, Nakajima Y: A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands. *PLoS One.*, 7(5):e37093, 2012
- 2) Kwon HJ, Ohmiya Y, Yasuda K: Dual-color system for simultaneously monitoring intracellular  $Ca^{2+}$  and ATP dynamics. *Anal Biochem.* 27;430 (1):45-47, 2012
- 3) Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, Ohmiya Y, Fujimura T, Yamasaki K, Aiba S: In Vivo Imaging Demonstrates ATP Release from Murine Keratinocytes and Its Involvement in Cutaneous Inflammation after Tape Stripping. *J Invest Dermatol* in press
- 4) Wu C, Wang KY, Guo X, Sato M, Ozaki M, Shimajiri S, Ohmiya Y, Sasaguri Y: Rapid methods of detecting the target molecule in immunohistology using a bioluminescence probe. *Luminescence* in press

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）  
多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析

分担研究者 山影 康次・斉藤るみ子

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

化学物質の免疫毒性の評価法であるMulti-ImmunoTox assay (MITA) を用いて、技術移転性および本法の有用性を検討した。プロモーターと発光遺伝子を繋いだベクターを導入した2種類の細胞株、#149-14および#THP-G8、を2種類の代表的な免疫抑制剤 (Dexamethasone、Cyclosporin A) で処理し、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8の発現量を調べた。その結果、IL-8については2剤ともに抑制作用は認められず、IL-1 $\beta$ についてはCyclosporin Aで抑制作用が認められなかった以外は、すべて抑制作用が認められた。この結果は、3回の反復試験で再現性が得られたほか、他の2施設においても同様の結果が得られたことから、技術移転性は良好であり、4種類の遺伝子発現量を指標とする本法は免疫毒性の評価法として有用であると考えられた。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

A. 研究目的

化学物質の免疫毒性の評価法として開発された Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、Jurkat 細胞における IL-2、IFN- $\gamma$ 、G3PDH の各プロモーター活性および THP-1 細胞における IL-1 $\beta$ 、IL-8、G3PDH の各プロモーター活性を定量化できる安定細胞株を用いた評価系である。平成 24 年度は、本法の技術移転確認、および代表的な免疫抑制剤を用いて本法が免疫毒性を正確に評価できるか否かを検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

B-1) MITAに用いた細胞

緑、橙、赤色の発光色の異なるルシフェラーゼ遺伝子をIL-2、IFN- $\gamma$ 、G3PDHの各プロモーター領域に繋いだベクター（それぞれ緑、橙、赤色）をJurkat細胞に導入した

安定細胞株#2H4、および発光色の異なるルシフェラーゼ遺伝子をIL-1 $\beta$ 、IL-8、G3PDHの各プロモーター領域に繋いだベクター（それぞれ緑、橙、赤色）をTHP-1細胞に導入した安定細胞株#149-14を使用した。このうち、#149-14の内標であるG3PDHが機能していないことから、IL-8、G3PDHの各プロモーター領域にそれぞれ橙、赤色のルシフェラーゼ遺伝子を繋いだベクターをTHP-1細胞に導入した安定細胞株#THP-G8を同条件で処理して、内標の代用とした。いずれの細胞株も、東北大学皮膚科より供与されたものを用いた。

B-2) 使用した化学物質

副腎皮質製剤で抗炎症作用、抗免疫抑制作用などを持つDexamethasone、およびカルシニューリンを介した細胞内情報伝達を阻害することによりIL-2やIFN- $\gamma$ などのサイトカインの産生を抑制する作用のあるCyclosporin Aの2種類の免疫抑制剤を用い

た。

### B-3) 実験方法

各細胞を96wellプレートに播種し、各種濃度で化学物質を添加した。添加濃度は、最高血中濃度 (Cmax) の100倍濃度から3倍希釈による10段階希釈で行った。1時間後にPMA/ionomycin (#2H4細胞) もしくはLPS (#149-14細胞、#THP-G8細胞) による活性化処理を行い、6時間後に各色ルシフェラーゼ活性を測定し、色分離式により各プロモーター活性を算出した (図1参照)。

## C. 結果

### C-1) #2H4細胞における反応性

Dexamethasoneを作用させた場合、IL-2のプロモーター活性は濃度依存的に抑制され、Cmax100倍濃度である1000  $\mu\text{g/ml}$ でほぼ完全に活性が抑制された。一方、IFN- $\gamma$ のプロモーター活性は300-1000  $\mu\text{g/ml}$ 付近で抑制されたが、その抑制作用はIL-2プロモーターより弱かった。

Cyclosporin Aを作用させた場合、IL-2のプロモーター活性は、Cmax0.03倍である0.0001  $\mu\text{g/ml}$ か濃度依存的に活性が抑制され、0.03  $\mu\text{g/ml}$ でほぼ完全に抑制された。一方、IFN- $\gamma$ のプロモーター活性は、0.03

$\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で抑制された。

3回の反復試験を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られた。また、その結果は東北大・産総研の各施設との試験結果とほぼ同様であった。食薬センターにおける代表的な結果を図2、図3に示した。

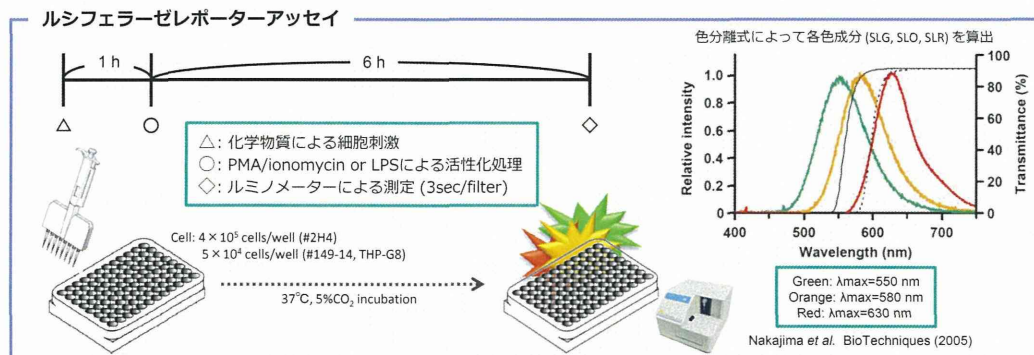
### C-2) #149-14細胞における反応性

#149-14細胞の内標であるG3PDHが機能していないことから、#THP-G8細胞を同条件で処理して、内標 (G3PDH) の代用とした。

Dexamethasoneを作用させた場合、IL-1 $\beta$ のプロモーター活性はCmax3倍である30  $\mu\text{g/ml}$ から序々に抑制された。一方、IL-8のプロモーター活性に変化は見られなかった。

Cyclosporin Aを作用させた場合、IL-1 $\beta$ およびIL-8の各プロモーター活性にはいづれも変化が認められなかった。

3回の反復試験を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られた。また、その結果は東北大・産総研の各施設との試験結果とほぼ同様であった。食薬センターにおける代表的な結果を図4、図5に示した。



### プレートデザイン (96-well)

cont	被験物質Aの溶液のみ	0.003 x Cmax	0.01x Cmax	0.03x Cmax	0.1x Cmax	0.3x Cmax	1x Cmax	3x Cmax	10x Cmax	30x Cmax	100x Cmax
被験物質A (1/3希釈、10段階、n=4)											
cont	被験物質Bの溶液のみ	0.003 x Cmax	0.01x Cmax	0.03x Cmax	0.1x Cmax	0.3x Cmax	1x Cmax	3x Cmax	10x Cmax	30x Cmax	100x Cmax
被験物質B (1/3希釈、10段階、n=4)											

図1. 実験手順

図2. #2H4細胞におけるDexamethasone処理による反応性

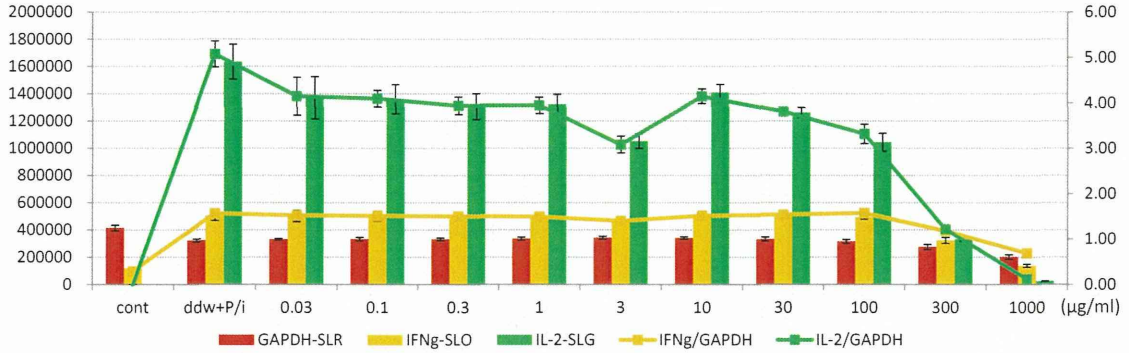


図3. #2H4細胞におけるCyclosporin A処理による反応性

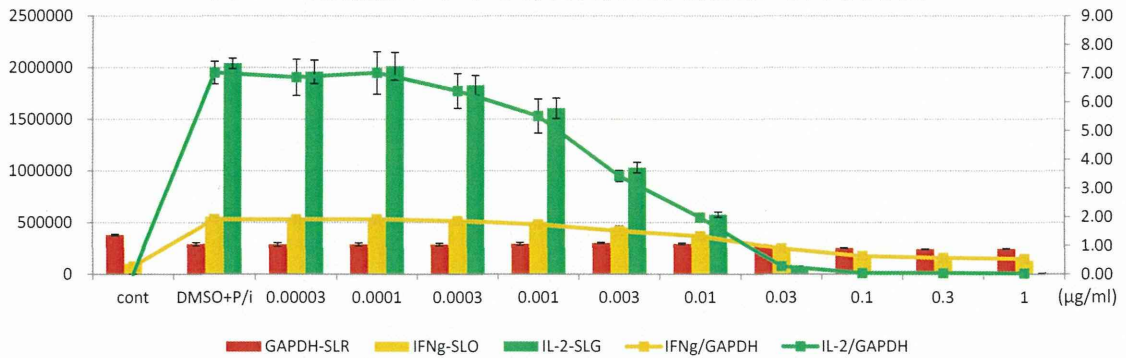


図4. #149-14細胞におけるDexamethasone処理による反応性 (G3PDHの値は#THP-G8細胞を使用)

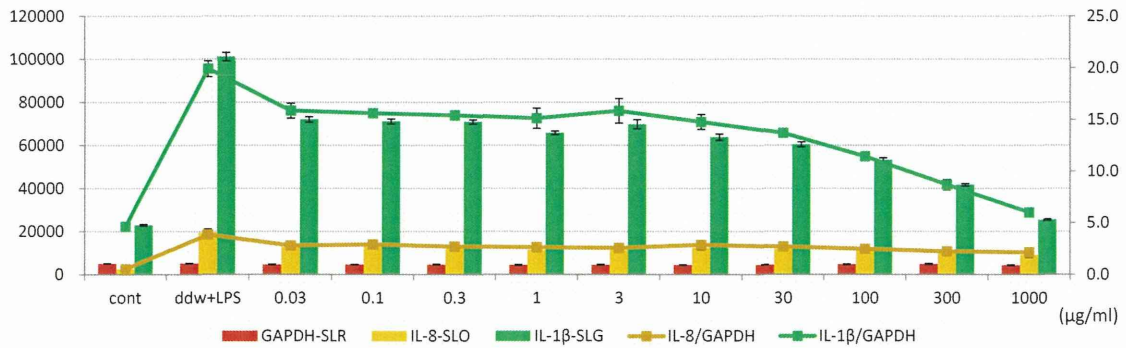
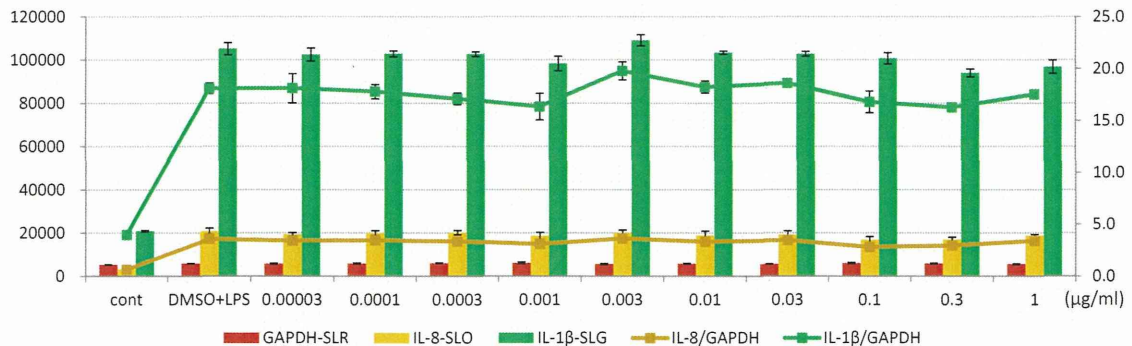


図5. #149-14細胞におけるCyclosporin A処理による反応性 (G3PDHの値は#THP-G8細胞を使用)



#### D. 考察

Dexamethasone、Cyclosporin Aの2種類の代表的な免疫抑制剤を使用してMITAの技術移転確認および有用性を検討した結果、3回の反復試験で再現性が確認され、なおかつ他の施設においても同様の結果が得られた。したがって、技術移転性は良好であり、本法は免疫毒性物質の評価系として有用であると考えられた。しかしながら、#149-14細胞については、内標であるG3PDHの発現が機能していないことや細胞増殖が非常に遅いことなど、多数の化学物質を試験するうえで解決すべき重要な課題であると考えられる。また、今年度は代表的な免疫抑制剤による試験を実施したが、今後はさらに多くの化学物質について複数施設で検討し、多くの知見を積み上げる必要があると考えられる。

#### E. 結論

化学物質の免疫毒性の評価法であるMulti-ImmunoTox assay (MITA) を用いて、技術移転性および本法の有用性を検討した。代表的な免疫抑制剤を用いてその反応性を調べたところ、反復試験および各施設において同様の結果が得られたことから、技術移転性および本法の有用性が確認された。

#### F. 参考文献

なし

#### G. 研究発表

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

