

201329007A

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成26(2014)年 5月

様式A(8)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 26 年 5 月 30 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

住 所 〒989-3201宮城県仙台市青葉区
国見ヶ丘2-25-2
フリカナ アイバ セツヤ
研究者氏名 相場 節也 印
(所属研究機関 東北大学)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発
(H24-化学一般-001)

国庫補助金精算所要額 : 金 21,500,000 円也 (うち間接経費 4,961,000 円)

目 次

I. 総括研究報告	
多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発-----	3
相場 節也	
(資料) 1. Multi-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール 20130819 Ver.002.0J	
2. Data sheet for MITA #2H4 Ver.004 20131106、 Data sheet for MITA THP-G1b THP-G8 Ver.004 20131106	
II. 分担研究報告	
1. 免疫毒性に関する国際動向調査 -----	74
小島 肇	
2. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, 精度管理 -----	104
近江谷 克裕	
3. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析 -----	110
山影 康次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	117
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	118

H24-化学-一般-001 厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）
研究成果（見込み）の概要

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

研究代表者 相場 節也
東北大学病院皮膚科教授

研究要旨

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に至るシグナル伝達経路への薬剤の影響を評価することができる。種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果と一致していた。以上より、この系がT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫抑制効果を簡便に評価することができ、様々な薬剤の未知の免疫学的効果を検出しその作用機序を明らかにするための新しいhigh-throughput手法となりうることが明らかとなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

小島 肇・国立医薬品食品衛生研究所安全性生物
試験研究センター薬理部・室長
近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメデ
ィカル部門・部門
山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所代
替法試験部・部長

A. 研究目的

研究背景：

環境汚染物質、農薬、食品添加物、薬剤などの化学物質の多くが、免疫抑制、アレルギー、自己免疫疾患など免疫系を標的とした健康被害及ぼすこ

とはよく知られている。したがって、免疫機能に影響をおよぼす化学物質の有害作用として定義される免疫毒性は、消費者、生産者はもとより公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。しかし、これまで化学物質の免疫毒性評価に関する国際的ガイドラインは数少なく、感作性など一部を除けば OECD test guideline にも取りあげられていない。ところが、近年免疫毒性評価の重要性が広く認識されるようになり、2012年WHOから化学物質の免疫毒性評価に関わるガイダンスが公表された。現在、化学物質の免疫毒性評価は動物実験を用いる方法がゴールドスタンダードであるが、ヒトと動物との種差、また動物実験を行う際の費用、倫理面など多くの課題を有している。

そこで、2003年に European Centre for the

Validation of Alternative Methods (ECVAM)により開催されたワークショップで、最新の *in vitro* 免疫毒性評価系が総括された(Gennari *et al.*, 2005)。通常の 28 日間反復投与毒性試験からも免疫毒性に関連して有用な情報が得られるため、このワークショップでは Tiered approach(段階的取り組み法)が提案された。つまり、一般に骨髄抑制作用のある物質は免疫毒性効果を持つと考えられるため、プレスクリーニングとして、28 日間反復投与毒性試験における化学物質の骨髄抑制作用を評価する(Tier 1)。骨髄毒性を持たない物質に関しては、リンパ球毒性試験が行われ(Tier 2)、その後免疫担当細胞の増殖、サイトカイン産生能、細胞障害活性など機能面に対する作用を評価(Tier 3)する。2003 年のワークショップでは、免疫担当細胞の *in vitro* 機能検査法として、human whole-blood cytokine release assay (HWBCRA), lymphocyte proliferation assay, mixed lymphocyte reaction, natural killer cell assay, T cell-dependent antibody response, dendritic cell maturation, fluorescent cell chip など様々な方法が検証された。しかし、これらのなかで HWBCRA のみが正式なプレバリデーションにより検討された。

Langezaal ら(Langezaal *et al.*, 2002)により報告された HWBCRA の原理は human whole-blood method for pyrogen testing に基づいている。この方法はヒトの全血を化学物質で処理後、lipopolysaccharide (LPS) または staphylococcal enterotoxin B (SEB) で刺激し、単球細胞が産生する IL-1 β 、Th2 リンパ球が産生する IL-4 を測定し、化学物質のこれらサイトカイン産生に及ぼす影響を評価するものである。ECVAM ワorkshop ではこの方法の利点として、①ヒトと動物との種差を考慮しなくて良いこと、②ヒトの初代細胞を使用していること。③手技が簡便であること、④費用がかからず、短時間でできることを挙げている。しかし、ヒト初代細胞を用いるため反応の個人差、数多くの化学物質を評価する high-throughput アッセイに応用しにくいなどの問題点がある。

本研究では、化学物質の免疫毒性を評価する high-throughput スクリーニングシステムを確立するため、IL-2、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-8 プロモーターに制御されるルシフェラーゼ遺伝子を導入した 3 つの安定レポーター細胞株を使用した。#2H4 細胞は、IL-2 プロモーターに制御された緑色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLG、IFN- γ プロモーターに制御された橙色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLO、G3PDH プロモーターに制御された赤色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLR を Jurkat T 細胞株に導入樹立した。THP-G1b 細胞は IL-1 β プロモーターに制

御された SLG、G3PDH プロモーターに制御された SLR を THP-1 単球細胞株に導入し、THP-G8 細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO、G3PDH プロモーターに制御された SLR を THP-1 細胞株に導入し樹立した。(図 1) そこで、これらを用いて化学物質の免疫毒性評価を行う多面的免疫毒性評価系(Multi-Immuno Toxicity Test: MITA)を構築した(図 1)。

目的：

研究の最終目標は、この 3 種類のレポーター細胞を用いて化学物質免疫毒性の high through-put 評価系を確立することであるが、具体的な目標としては以下の 5 点を掲げた。

- 1) MITA が化学物質の免疫毒性を適切に評価できるか否かの検証
- 2) MITA が化学物質の免疫毒性を評価する際の再現性、精度、感度、特異度、簡便性、迅速性などを考慮した最適なプロトコールを作成する。
- 3) 多面的な免疫毒性メカニズムの中で MITA が評価できる免疫反応を特定する。
- 4) 多数の免疫毒性物質を評価することにより MITA の特性を明らかにする。
- 5) 施設間比較試験を行うことにより MITA の他施設への技術移転性を検証する。

年度別目標：

平成 25 年度：免疫毒性メカニズムが明らかでない免疫調節性薬剤、対照として免疫調節作用の想定されていない薬剤を用いて、MITA のプロトコールの確立、MITA で評価可能、評価不能な免疫薬理作用を明らかにする。また同時に、MITA に用いられるレポーター細胞の母細胞を用いて、同様の刺激を加えた後の mRNA 発現を定量し MITA による評価との相関性を検討する。同様に、HWBCRA による評価との比較を行う。

平成 26 年度：Wagner ら(Wagner *et al.*, 2006)が論文中で用いている免疫毒性化学物質を評価し、MITA の特性を明らかにする。また、前年度の研究で明らかになった MITA で評価できない免疫薬理作用に対する対応策を検討する。

B. 研究方法

試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone, Sulfasalazine, Colchicine, Chloroquine, Minocycline, Nicotinamide, Acetaminophen, Digoxin, Warfarin, Cimetidine,

Levamisol, Isoniazid, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin(Io), Lipopolysaccharides from *E. coli* 026:B6 (LPS) はSigma-Aldrichから購入した。Deoxyspergualinは医薬品卸業から購入した。

Jurkat T細胞由来#2H4細胞を用いたIL-2, IFN- γ , G3PDHレポーターアッセイおよびTHP-1 単球細胞由来THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞を用いたIL-1 β , IL-8, G3PDHレポーターアッセイ

ヒトTリンパ芽球性白血病由来細胞株であるJurkat細胞株とヒト急性単球性白血病由来細胞株であるTHP-1(ATCC)は、10%ウシ胎児血清(Biological Industries)を加えたRPMI-1640(Gibco)にて37°C、5%CO₂下で培養した。#2H4細胞は、IL-2プロモーターに制御されたSLG、IFN- γ プロモーターに制御されたSLO、G3PDHプロモーターに制御されたSLRをJurkat細胞に導入し樹立した(Saito *et al.*, 2011)。THP-G1 β 細胞はIL-1 β プロモーターに制御されたSLG、G3PDHプロモーターに制御されたSLRを、またTHP-G8細胞はIL-8プロモーターに制御されたSLO、G3PDHプロモーターに制御されたSLRをTHP-1細胞に導入し樹立した(Takahashi *et al.*, 2011)。1ウェル当たり2 \times 10⁵個の#2H4細胞または1ウェル当たり5 \times 10⁴個のTHP-G1 β 細胞、もしくはTHP-G8細胞を黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)に播種し、種々の薬剤、化学物質を加え、37°C、5%CO₂下で1時間培養した。続いて#2H4細胞については25nM PMAと1 μ M Ioの混合物(PMA/Io)、THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPSで刺激し37°C、5%CO₂下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を混合し、室温で10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量を検出した。(以下、SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA)と記述) 細胞数の違い、または各種の刺激後の生存率の違いを勘案しSLG-LA、SLO-LAをSLR-LAで除することにより、それぞれnormalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)、normalized SLO-luciferase activity(nSLO-LA)を算出した。また、以下のように%suppression抑制率を計算した。

%suppression =

(1 - 薬剤存在下のnSLG-LAまたはnSLO-LA/薬剤非存在下のnSLG-LAまたはnSLO-LA) x 100

Whole blood cytokine release assay (WBCRA)

Whole blood cytokine release assayはThurm and Halseyによるプロトコール(Thurm and Halsey, 2005)にのっとり行った。6人の健康人から採取した(ノボヘパリン17.1IU/血液ml, 持田製薬) 10mlの全血(whole blood:WB)を20mlのRPMI1640培地(Gibco)で希釈し1サンプルあたり2mlずつ分注した。これを1 μ g/ml Dex、10 μ g/ml CyAまたは10ng/ml TACで前処理し、37°Cで1時間培養した。その後、1 μ M PMAと25nM ionomycinの混合物(PMA/Io)または100 ng/ml LPSで刺激し37°Cで6時間培養した。QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen)を用いて含まれる赤血球を溶血しTotal RNAを抽出した。

Jurkat細胞、THP-1細胞におけるmRNA発現

3 \times 10⁶細胞のJurkat細胞またはTHP-1細胞を薬剤で1時間前処理し、その後、それぞれPMA/IoまたはLPSで刺激し37°Cで6時間培養後、Isogen (Nippon gene)を用いてtotal RNAを抽出した。

定量的 RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) (Takara Bio Inc)を用いてtotal RNAから相補的DNA(cDNA)を合成した。Mx3000p QPCR System (Stratagene)を用いて定量RT-PCRを行った。プライマーについて、それぞれの遺伝子情報はGenBankより入手し、Primer Express 1.0 (Applied Biosystems)を用いて設計、SIGMA GENOSYSにて合成した。cDNA 10ng、フォワードおよびリバースプライマー 400nM、TaqMan probe 60nM、ROX 30nM、Brilliant II Fast QPCR Master Mix (Stratagene)を含む反応液を、95°Cで2分間反応させたのち、95°C、5秒間、60°C、20秒間の反応を45サイクル行った。恒常的に発現するG3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct法で各遺伝子発現の解析を行った。

(倫理面への配慮)

健康人からの採血に際しては、研究内容、採血における危険性、得られた検査結果により本人の人権が損なわれることのないこと、得られた検査結果は守秘され個人のプライバシーを侵害する可能性がないこと、研究に協力することに同意した後も、いつでも自由に辞退できること、この研究によって生じる知的財産権は被験者には帰属しないことについて説明し、本人より同意書を取得している。また、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認も得ている。

C. 研究結果

1)から5)の研究目標にそって研究を遂行した。

主に平成24年度に関しては1)と2)を、平成25年度に関して3)、4)、5)を行った。1)、2)の成果に関しては、Evaluation of the Multi-ImmunoTox assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugsのtitleでToxicol In Vitroに掲載された(Kimura *et al.*, 2014)。

1) MITAにより得られる免疫毒性の妥当性の検証

3つのレポーター細胞株である#2H4、THP-G1b、THP-G8は刺激によりSLG-LAやSLO-LAの上昇が認められる。

はじめに#2H4細胞をPMA/Ioで、THP-G1b細胞、THP-G8細胞をLPSで刺激し、経時的にSLG-LA、SLO-LA、SLR-LAを測定した。その結果、#2H4細胞がPMA/Io刺激により、それぞれIL-2プロモーター活性、IFN- γ プロモーター活性に相当するSLG(IL2)-LAとSLO(IFN)-LGを4時間後より有意に増強させることを認めた。同様に、LPS刺激により、THP-G1b細胞、THP-G8細胞がIL-1 β プロモーター活性に相当するSLG(IL1)-LA、IL-8プロモーター活性に相当するSLO(IL8)-LAを2時間後より有意に増強させることを認めた(図2)。

レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果はJurkat細胞、THP-1細胞でのmRNA発現に対する効果と相関する。

次に、3種類の免疫抑制剤dexamethosone (Dex)、cyclosporin A (CyA)、tacrolimus (Tac)のMITAレポーター活性に対する効果が、同様に刺激されたMITAレポーター細胞の母細胞であるJurkat細胞、THP-1細胞におけるmRNA発現と相関するかを検討した。#2H4細胞に対して、DexはnSLG(IL2)-LAのみを有意に抑制し、CyAとTacはnSLG(IL2)-LAとnSLO(IFN)-LAの両方を抑制した(図3)。一方、THP-G1b細胞、THP-G8細胞に関しては、Dexのみ明らかな抑制効果を示した。Jurkat細胞のmRNA発現に対して、DexはIL-2のmRNA発現のみを抑制し、CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現を抑制した。THP-1細胞に対しては、DexのみでIL-1 β とIL-8のmRNA発現の有意な抑制が観察された(図4)。この結果は、MITAによるレポーター活性が母細胞におけるmRNA発現変動を正確に反映していることを示している。

レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果は、PMA/IoまたはLPSで刺激されたwhole bloodのmRNA発現に対する効果と相関する。

MITAとHWBCRAとの相関を検討するに先立ち、本研究では、評価時間の短縮化と少数検体への対

応を考慮し、原法であるhuman whole-blood cytokine release assay (HWBCRA)で行われる培養24時間後のサイトカインの定量に替えて、培養6時間後のmRNA定量を行うことにした(huan whole-blood cytokine mRNA expression test: HWBCMET)。まずDex, CyA, Tacに関して、文献的に得られるHWBCRAによるそれら薬剤の評価(Langezaal *et al.*, 2002)と我々が行ったHWBCMETによる評価を比較したところ、ほぼ完全に一致することが確認された(図5)。

そこで次に、HWBCMETとMITAとの相関を検討した。HWBCMETでは、DexはIL-2とIFN- γ のmRNA発現を中程度抑制し、CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現をほぼ完全に抑制した。またDexがIL-1 β とIL-8のmRNA発現を抑制したのに対し、CyAやTacでは抑制が認められなかった。これらの結果は、MITAによる3剤の免疫抑制効果の評価とほぼ完全に一致していた。

以上の結果より、MITAによる免疫抑制剤の評価の妥当性が検証された。

2) MITAが化学物質の免疫毒性を評価する際の再現性、精度、感度、特異度、簡便性、迅速性などを考慮した最適なプロトコールを作成する。

具体的には、機序の明らかな免疫抑制剤9剤、薬理的に免疫抑制剤には分類されていないが臨床的に免疫調節作用を有することが知られている薬剤5剤、免疫調節作用の知られていない薬剤3剤に関してMITAを施行した。

薬剤濃度の決定

薬物が投与された際、胆汁やある種の組織では薬物濃度が最高血中濃度Cmax($\mu\text{g/ml}$)よりも高くなることが知られている。そこで本研究では、生体内でT細胞やマクロファージが暴露しうる最高の薬物濃度をCmaxの5倍(5xCmax)と想定し、各薬剤の5xCmax以下の薬物濃度での%suppressionおよび5xCmaxを超える薬物濃度での%suppressionを測定し、以下に述べる統計的解析を加えた。

MITAにより解析したDex, キナーゼ阻害剤、フォスファターゼ阻害剤の効果(図3, Table 1) Dex, CyA, Tacに関しては、上述のとおりであるが、Rapamycin (RPM)に関しては、免疫抑制作用を見いだせなかった。

MITAにより解析した免疫抑制剤(アルキル化剤、プリンまたはピリミジン合成阻害剤)の効果(Table 1)

MITAでは、いずれの遺伝子に関してもアルキル

化剤であるcyclophosphamide (CP)、プリン合成阻害剤であるAzathioprine (AX)、Mycophenolic acid (MPA)、Mizoribine (MZR)、プリン、ピリミジン合成阻害剤Methotrexate (MTX) によるレポーター活性の抑制は見いだせなかった。しかし、興味深いことに、これらの薬剤はMITAの幾つかの遺伝子のレポーター活性を増強した。この結果については、若干の考察を加え、後述する。Jurkat細胞を1日または3日間培養した際の培養上清により#2H4細胞のレポーター活性が阻害されることがわかった(図6)。3日間の培養した際の培養上清は、1日培養した際の培養上清に比べより抑制が認められた。Jurkat細胞の培養上清にはIL-2, IFN- γ の発現を抑制するなんらかの因子が存在し、それをアルキル化剤、プリン合成阻害剤、プリン、ピリミジン合成阻害剤が阻害し見かけ上レポーター活性の増強が見られるという可能性が考えられた。このことを利用しこれらの薬剤の免疫抑制能の検出が可能か今後検討する。

MITAにより解析した免疫調製剤の効果 (図7, Table 1)

本研究では、薬剤として免疫抑制剤としては分類されていないが、免疫や炎症反応制御の目的で実際に臨床使用されている薬剤に関してもその効果をMITAにより検討した。Sulfasalazine (SASP)、Chloroquine (CQ) には、T細胞、単球のいずれの遺伝子のレポーター活性にも抑制効果が認められた。一方、Minocycline (MC)では主にT細胞サイトカインのレポーター活性に、Nicotinamide (NA) に関しては単球サイトカインのレポーター活性に抑制効果が認められた。一方、ColchicineではIL-1 β レポーター活性がむしろ増強した。

MITAにより解析した免疫調節作用の知られていない薬剤の効果 (図8, Table 1)

予想外に、acetaminophen (AA)によるIL-2, IFN- γ , IL-8レポーター活性の増強、digoxinによるIL-2, IFN- γ レポーター活性の抑制、WarfarinによるIL-2レポーター活性増強とIL-1 β レポーター活性抑制効果が認められた。予想外の結果ではあったが、これらの結果はLangezaalら(Langezaal *et al.*, 2002)のHWBCRAにおいても確認されている。

プロトコールの確立

MITAにより17種類の薬剤を評価する中で、添付の資料にあるMITAのプロトコールver 2を作成した(資料1)。特に、プロトコールの作成に際しては、3回の繰り返し実験から得られる結果をどのようにMITAによる化学物質の免疫毒性評価に用いるかに留意した。まず、各実験において得られた結

果は、一元配置分散分析を行い、その後Dunnett検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を3回繰り返し検討すると、3回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3回の繰り返し実験の結果のなかから%suppressionの絶対値(免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる)が最も大きい値を選びStudent's t-testを行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした。

3) 多面的な免疫毒性メカニズムの中で、MITAが評価できる免疫反応を特定する。

今回得られたMITAによる薬剤の免疫調節作用とそれぞれの薬剤の文献的に報告されている免疫調節作用(Allison, 2000)を比較検討した。その結果、MITAは、サイトカインの発現調節に直接作用する薬剤の免疫抑制作用は適切に評価できるが、免疫担当細胞の代謝、細胞増殖に作用し二次的にサイトカイン発現を抑制する薬剤の作用は評価できないことが明らかとなった。したがって現時点では、MITAによる化学物質の免疫毒性評価には、代謝、細胞増殖に対する影響を検出できる評価系、具体的には28日間反復投与毒性試験などの組み合わせが必要となる。しかし今回の検討で、CP、AZ、MPA、MZR、MTXなどの薬剤がMITAのいずれかのレポーター活性を逆に増強する特性を共有していることが明らかとなり、今後、この特性を利用してMITAによる代謝、細胞増殖に作用する免疫抑制剤の免疫毒性評価の可能性を検討する予定である。現在、これら薬剤のMITAによる評価を経時的に行い、CyAやTacなどのサイトカイン発現に直接作用する薬剤、また、免疫増強作用のある薬剤などとの相違を検討している。

4) 多数の免疫毒性物質を評価することにより、MITAの特性を明らかにする。

現時点で、Wagnerら(Wagner *et al.*, 2006)がFluorescence Cell Chipに関する論文中で検討した46化学物質中の39化学物質に関してMITAによる評価が終了している。現在、残りの化学物質について評価を行いながら、得られた結果の妥当性を過去の文献と対比し検討している。免疫抑制剤に関しては、上述した通りである。感作性物質に関しては、PMA/I α , LPSの刺激を加えるMITAでは正確には判定できない感作性物質があり、刺激を加えないIL-8 Luc assay(Takahashi *et al.*, 2011)との併用の必要性が示唆された。Lead acetateの免疫抑制作用がIL-2, IFN- γ のレポーター活性により、lithium carbonate, mercuric chlorideによる免疫増強、自己

免疫誘導作用が、IFN- γ のレポーター活性を指標に評価できる可能性が示された。

5) 施設間比較試験を行うことにより、MITAの多施設への技術移転性を検証する。

東北大皮膚科および本研究に参加している産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所の3施設で10種類の化学物質について施設間比較試験を施行した。これに先立ち技術移転が確実に行われているかを確認する目的で4種類の薬剤に関して各施設で試験を施行した (Table 3-1)。#2H4細胞については3施設でほぼ同等の結果が得られたため、引き続き10種類の化学物質について施設間試験をおこない、Table 3-2に示すように、全体として0.73の一致率を得た。グラフの傾向は同様にみえるが、統計処理により算出された結果がそれを反映していないことから、今後、判定基準を更に検討する。(統計解析の妥当性を統計学者に相談することも含む)

D. 考察

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した (Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8転写に至るシグナル伝達経路への薬剤の影響を評価することができる。種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞やマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果とほぼ一致していた。また今回の薬剤を用いた検討により、MITAが薬剤の免疫毒性作用の標的細胞を容易に同定することも明らかとなった。しかし、その一方、現時点ではMITAのみでは免疫担当細胞の代謝、細胞増殖を抑制して免疫抑制を誘導する薬剤の評価が行えないことが明らかとなった。そのため、MITAによる免疫毒性評価は、28日間反復投与毒性試験などとの組み合わせが必要であるが、今後はMITAのプロトコールの変更ないしは別なin vitro評価系との組み合わせによりin vitroの評価系のみで免疫毒性の評価が行えるよう検討していく。

文献

Allison AC (2000) Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 47:63-83.

Gennari A, Ban M, Braun A, Casati S, Corsini E, Dastyh J, *et al.* (2005) The Use of In Vitro

Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *J Immunotoxicol* 2:61-83.

Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Aiba S.(2014) Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol In Vitro* 28:759-768.

Langezaal I, Hoffmann S, Hartung T, Coecke S (2002) Evaluation and prevalidation of an immunotoxicity test based on human whole-blood cytokine release. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 30:581-95.

Saito R, Hirakawa S, Ohara H, Yasuda M, Yamazaki T, Nishii S, *et al.* (2011) Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254:245-55.

Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, *et al.* (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124:359-69.

Thurm CW, Halsey JF (2005) Measurement of cytokine production using whole blood. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit 7 18B.

Wagner W, Walczak-Drzewiecka A, Slusarczyk A, Biecek P, Rychlewski L, Dastyh J (2006) Fluorescent Cell Chip a new in vitro approach for immunotoxicity screening. *Toxicol Lett* 162:55-70.

E. 結論

1. 平成25年度：免疫毒性メカニズムが明らかな免疫調節性薬剤、対照として免疫調節作用の想定されていない薬剤を用いて、MITAのプロトコルの確立、MITAで評価可能、評価不能な免疫薬理作用を明らかにすることができた。また同時に、MITAに用いられるレポーター細胞の母細胞やHWBCRAのmRNA発現を解析することによりMITA評価の妥当性も確認できた。
2. 平成26年度：Wagnerら(Wagner *et al.*, 2006)が論文中で用いている免疫毒性化学物質の評価を行い、MITAの特性を明らかにし、施設間の再現性も確認した。

F. 健康危険情報

特に報告すべき内容は存在しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirota M, Kouzuki H, Ashikaga T, Sono S, Tsujita K, Sasa H, *et al.* (2013) Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol In Vitro* 27:1233-46.
2. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, *et al.* (2013) Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.*
3. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, *et al.* (2013) Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* 38:450-60.
4. Sugawara T, Kikuchi K, Tagami H, Aiba S, Sakai S (2012) Decreased lactate and

potassium levels in natural moisturizing factor from the stratum corneum of mild atopic dermatitis patients are involved with the reduced hydration state. *J Dermatol Sci* 66:154-9.

5. Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, Yamada T, Kimura Y, Aiba S, *et al.* (2012) Assessment of technical protocols for novel embryonic stem cell tests with molecular markers (Hand1- and Cmya1-ESTs): a preliminary cross-laboratory performance analysis. *J Toxicol Sci* 37:845-51.
6. Watabe A, Sugawara T, Kikuchi K, Yamasaki K, Sakai S, Aiba S (2013) Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci* 72:177-82.

2. 学会発表

木村 裕、藤村 千鶴、近江谷 克裕、相場 節也：免疫毒性評価系としてのMulti-Immuno Tox Assay (MITA)の有用性評価. 日本動物実験代替法学会 第26回大会（京都）2013年12月

Yutaka Kimura, Yoshihiro Ohmiya, Setsuya Aiba Multicolor luciferase reporter gene assay system for IL-1 β , 2, 8 and IFN- γ presents a novel tool to evaluate immunological effects of drugs and their efficacy European Society for Dermatological Research, Venice, Italy (2012.9)

木村裕 シンポジウム1【皮膚科学の最前線：免疫が介在する皮膚疾患を解く】接触皮膚炎を解く、第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会、札幌（2012.9）

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特願2010-151362; PCT/JP2011/65090

I. 研究打ち合わせ会議

1. 平成24年度第一回班会議：
日時：平成24年5月11日（金） 13:00～16:00
（東京）
2. Multi-ImmunoTox assay 技術説明会

日時：平成24年8月29日（水） 10:00～17:00
（仙台）

3. 平成24年度第二回班会議：

日時：平成25年1月25日（金） 13:30～16:00
（東京）

4. 平成25年度第一回班会議：

日時：平成25年6月28日（金） 13:30～6月28
日（土） 9:00～12:00 （仙台）

5. 平成25年度第二回班会議：

日時：平成25年10月25日（金） 10:00～12:00
（東京）

図1 Multi-ImmunoTox Assay (MITA)

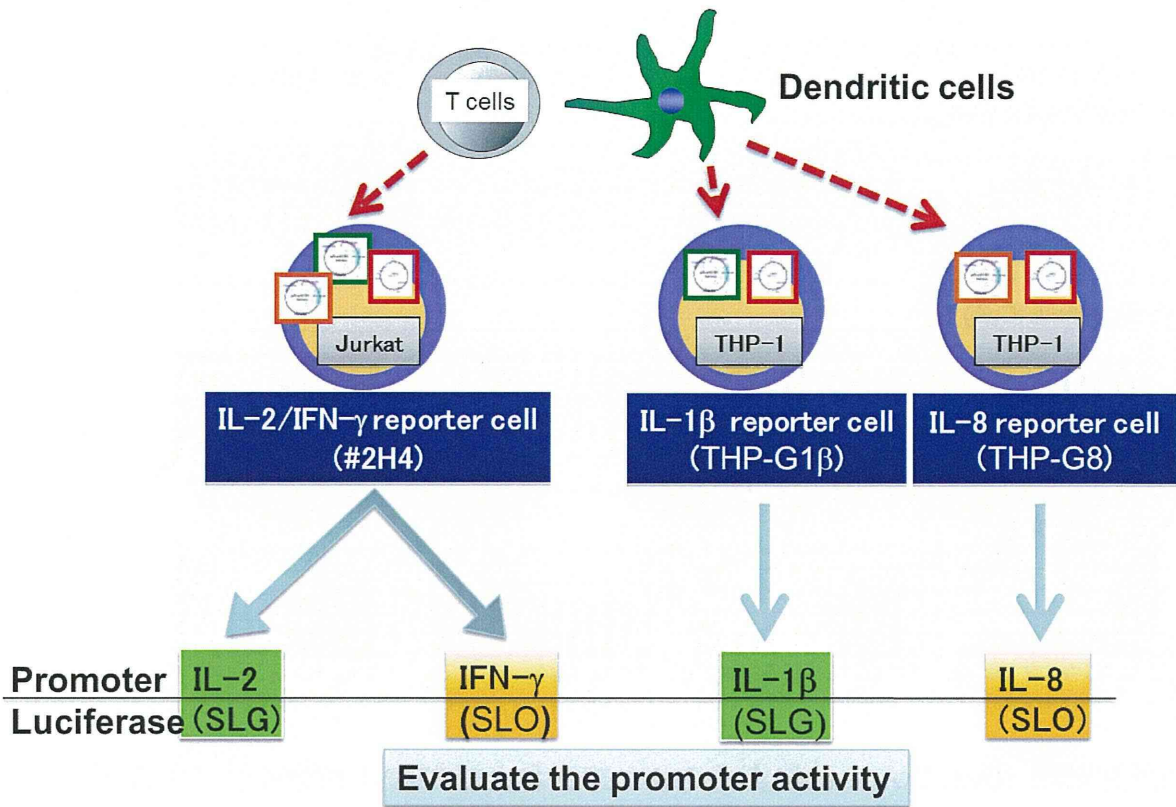


図2. 各種レポーター細胞の反応性の時間経過

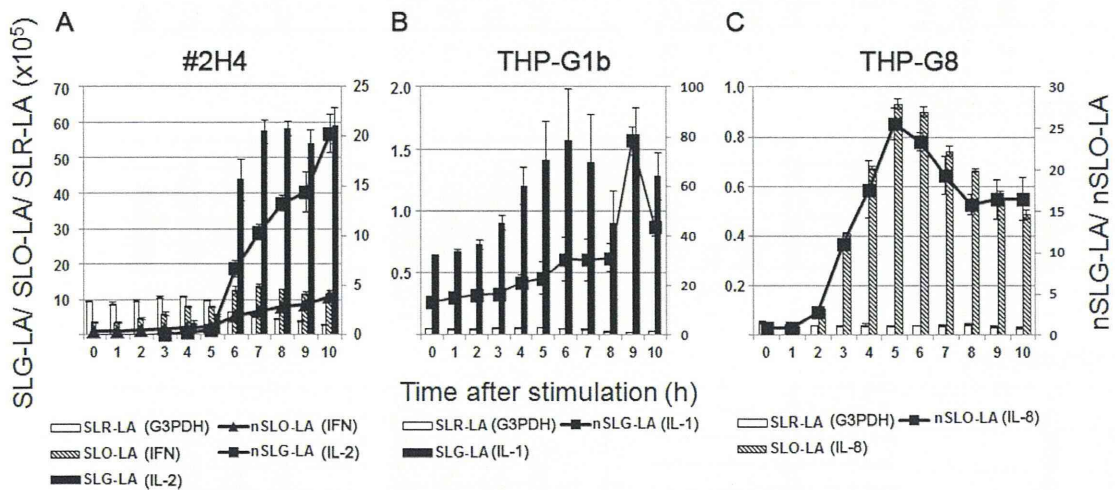


図 3. 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac) の MITA による免疫毒性評価

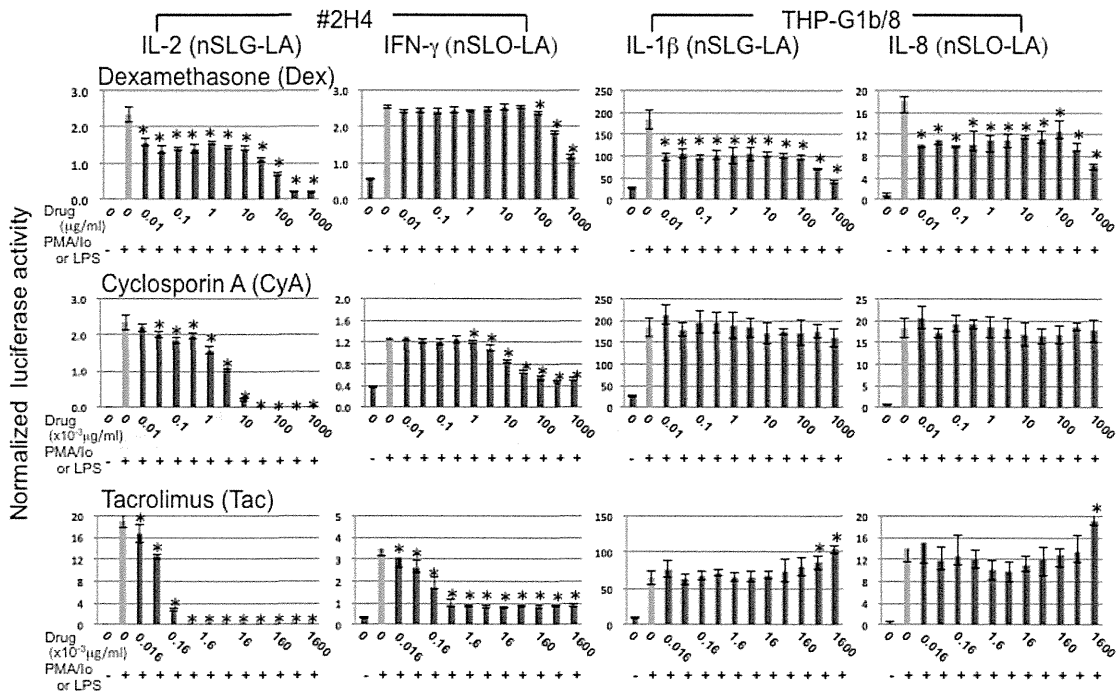


図 4. 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac) による Jurkat 細胞および THP-1 細胞のサイトカイン mRNA 発現制御 (quantitative real-time PCR)

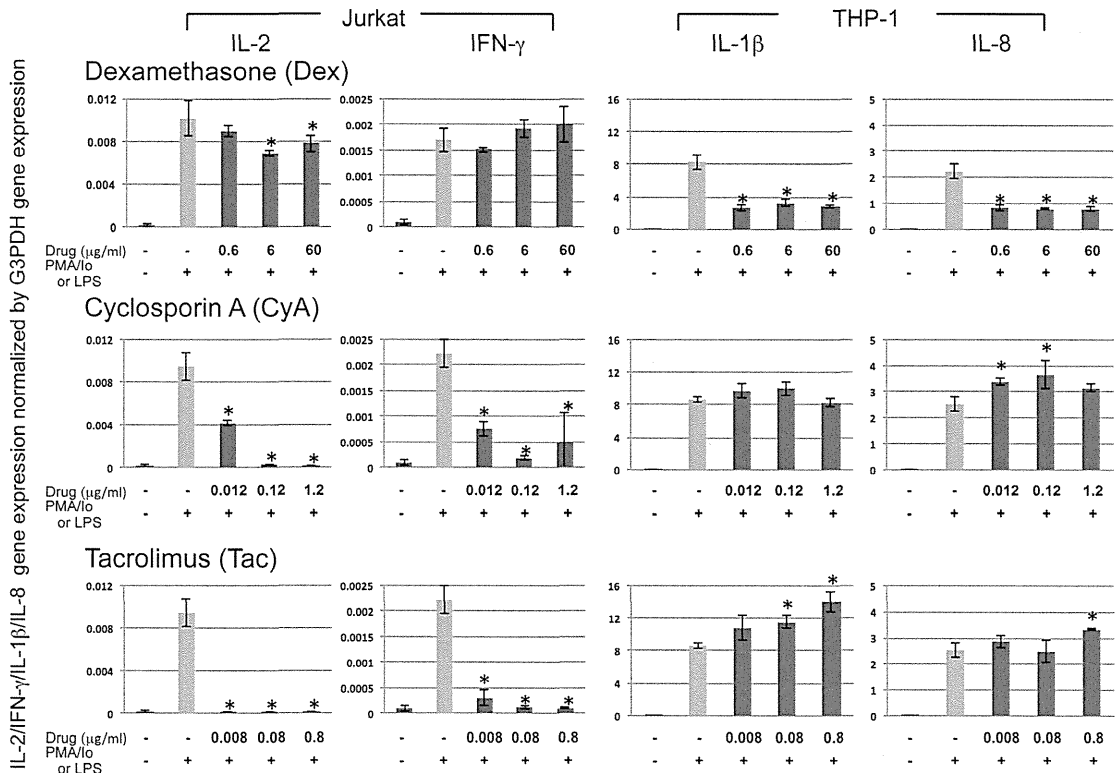


図5. 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac)の whole blood cytokine mRNA expression test (WBCRET)による免疫毒性評価

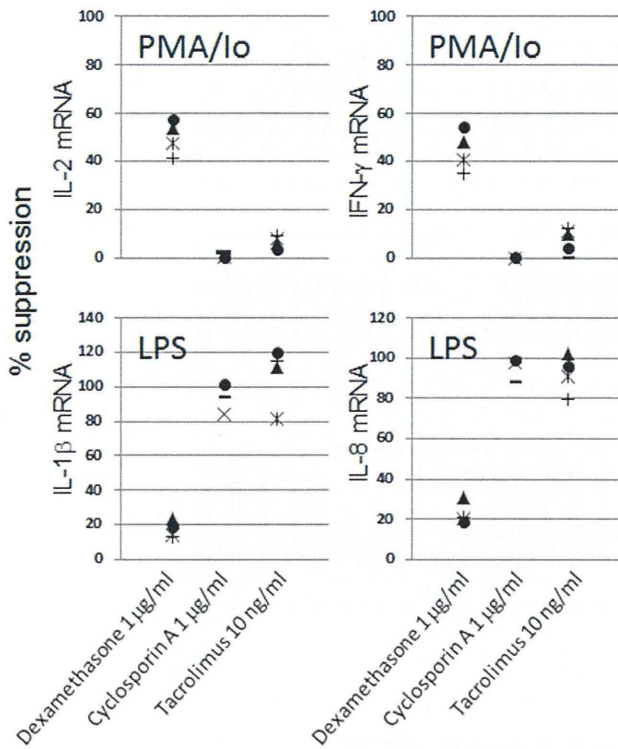


図6. Jurkat 細胞培養上清による#2H4 細胞のレポーター活性の抑制

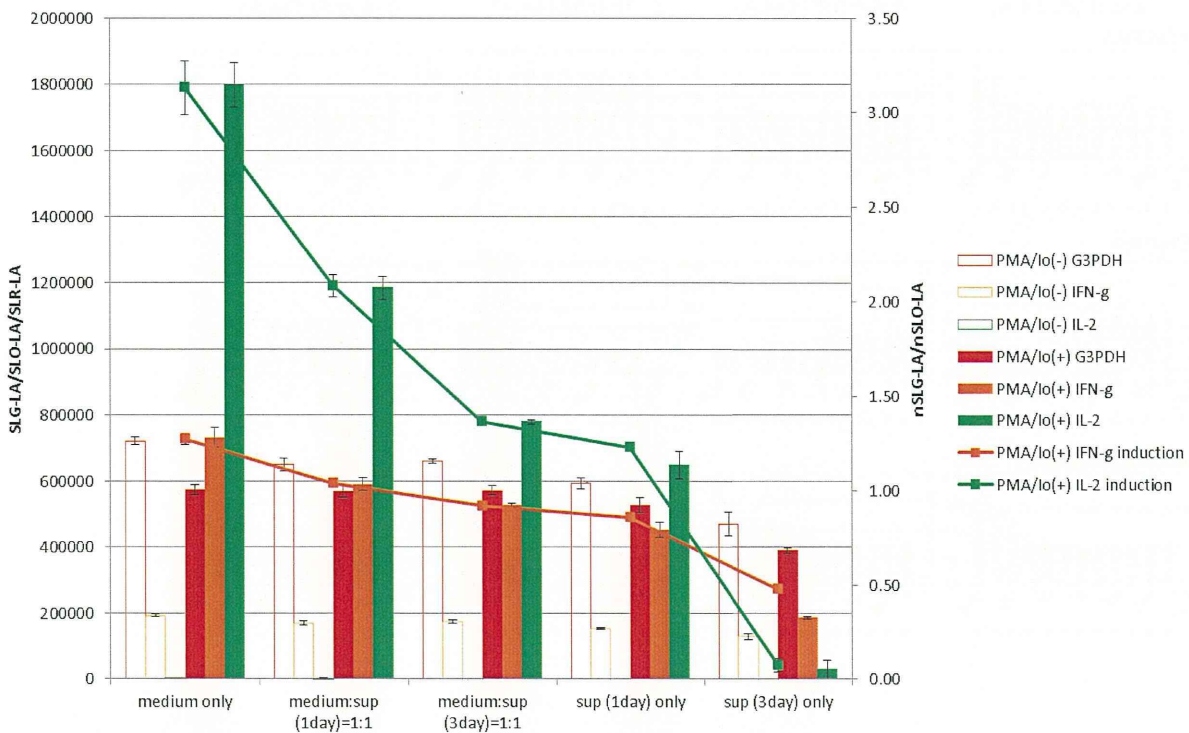


図 7. 免疫調節剤 (SASP, CQ, colchicine) の MITA による免疫毒性評価

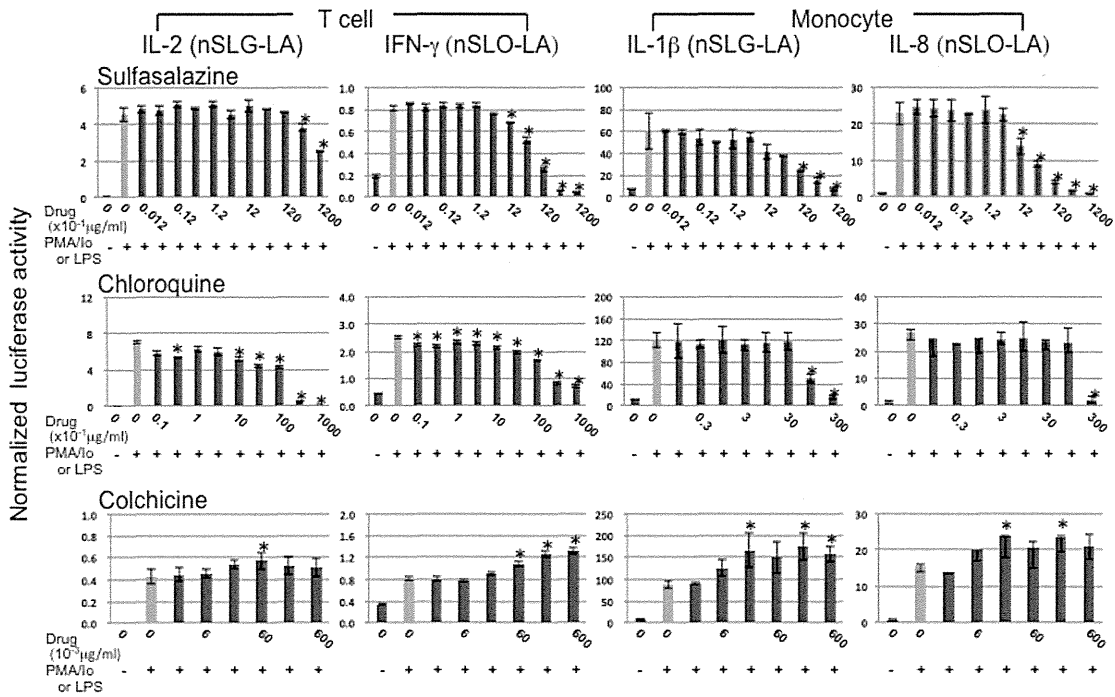
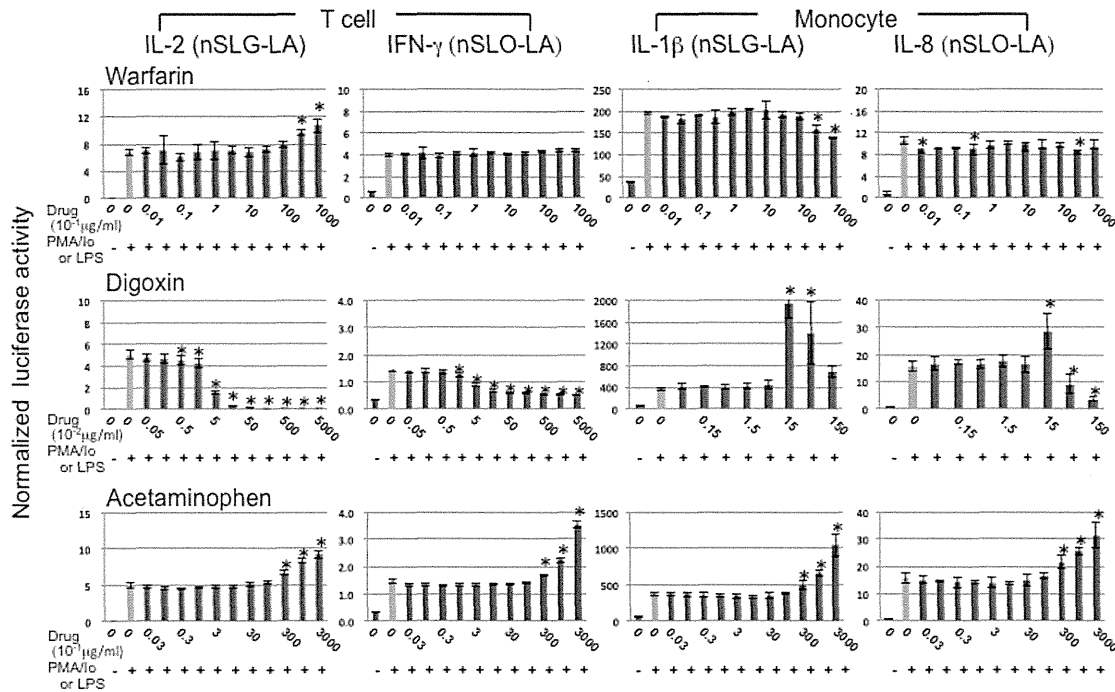


図 8. Warfarin, Digoxin, Acetaminophen の MITA による免疫毒性評価



図の説明

図 1 . MITA の構成するレポーター細胞

図 2 . 各種レポーター細胞の反応性の時間経過

#2H4 cells (2×10^5 cells/100 μ l/well) (A) in 96-well black plates were stimulated with PMA/Io, while THP-G1b (B) or THP-G8 cells (5×10^4 cells/100 μ l/well) (C) were treated with LPS. Then, SLG-LA, SLO-LA, and SLR-LA were measured after stimulation by using a microplate-type luminometer with a multi-color detection system. To rule out the variation of cell number or cell viability after chemical treatment, normalized SLG luciferase activity (nSLG-LA) or SLO luciferase activity (nSLO-LA) was obtained by dividing SLG-LA or SLO-LA with SLR-LA. Data represent means \pm SD ($n = 4$). SLG-LA (IL-2), SLO-LA (IFN- γ), and SLR-LA (G3PDH) in A, SLG-LA (IL-1 β) and SLR-LA (G3PDH) in B, and SLO-LA (IL-8) and SLR-LA (G3PDH) in C.

図 3 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac) の MITA による免疫毒性評価

#2H4 cells, THP-G1b cells, or THP-G8 cells were pretreated with the indicated concentrations of drugs for 1 h and then stimulated with PMA/Io or LPS for 6 h. Luciferase activity was determined by using a

microplate-type luminometer with a multi-color detection system. IL-2 and IFN- γ promoter activities are represented as nSLG-LA and nSLO-LA of #2H4 cells, respectively. IL-1 β and IL-8 promoter activities are represented as nSLG-LA of THP-G1b and nSLO-LA of THP-G8 cells, respectively. Data represent means \pm SD ($n = 4$). * means statistical significance ($p < 0.05$). Gray bars indicate the value for stimulation without drugs. These results are representative of three independent experiments.

図 4 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac) による Jurkat 細胞および THP-1 細胞のサイトカイン mRNA 発現制御 (quantitative real-time PCR)

Jurkat cells or THP-1 cells (3×10^6 cells/well) in 6-well plates were pretreated with different concentrations of drugs for 1 h, followed by stimulation with PMA/Io or LPS for 6 h, respectively. Then, mRNA expression of the indicated genes was analyzed by qPCR. The gene expressions were normalized by G3PDH gene expression. Data represent means \pm SD ($n = 3$). * means statistical significance ($p < 0.05$). Gray bars indicate the value for stimulation without drugs.

図 5 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac) の whole blood cytokine mRNA expression test (WBCRET) による免疫毒性評価 Whole blood cells (WBC) from 6 healthy volunteers were collected using sodium heparin anti-coagulant and then diluted 1:2 with RPMI 1640 medium. Two ml of aliquots was either untreated or treated with 1 μ g/ml of Dex, or 1 μ g/ml of CyA or 10 ng/ml of Tac for 1h. Then the WBC were stimulated with PMA/IO or LPS for 6 h at 37°C. The mRNA expression of indicated genes was analyzed by qPCR. The gene expressions were normalized by G3PDH gene expression. Percent suppression was calculated by (1 - the normalized mRNA expression of the drug-treated WBC/the normalized mRNA expression of the non-treated WBC) x100. The percent suppression of drugs in each individual is plotted. Each symbol indicates a different individual.

図 6 . Jurkat 細胞培養上清による #2H4 細胞のレポーター活性の抑制
2x10⁵ cells #2H4 cells were resuspended with culture medium, 1day or 3day culture supernatant of Jurkat cells or 1:1 mixture of the medium and the supernatant, and stimulated with PMA/IO. Then, SLG-LA, SLO-LA, and SLR-LA were measured 6

hours after stimulation by using a microplate-type luminometer with a multi-color detection system.

図 7 . 免疫調節剤 (SASP, CQ, colchicine) の MITA による免疫毒性評価
#2H4 cells, THP-G1b cells, or THP-G8 cells were pretreated with the indicated concentrations of drugs for 1 h and then stimulated with PMA/IO or LPS for 6 h. Luciferase activity was determined by using a microplate-type luminometer with a multi-color detection system. Data represent means +/- SD (*n* = 4). * means statistical significance (*p* < 0.05). Gray bars indicate the value for stimulation without drugs. These results are representative of three independent experiments.

図 8 . Warfarin, Digoxin, Acetaminophe の MITA による免疫毒性評価 #2H4 cells, THP-G1b cells, or THP-G8 cells were pretreated with the indicated concentrations of drugs for 1 h and then stimulated with PMA/IO or LPS for 6 h. Luciferase activity was determined by using a microplate-type luminometer with a multi-color detection system. Data represent means +/- SD (*n* = 4). * means statistical significance (*p* < 0.05). Gray bars indicate the value for stimulation without drugs. These results are

representative of three independent experiments.

Table 1. Summary of MITA for 9 immunosuppressive drugs, 5 off-label immunosuppressive drugs, and 3 non-immunomodulatory drugs.

Principal mechanism of action		Cmax	IL-2		IFN- γ		IL-1 β		IL-8										
			≤ 5 x Cmax	> 5 x Cmax	≤ 5 x Cmax	> 5 x Cmax	≤ 5 x Cmax	> 5 x Cmax	≤ 5 x Cmax	> 5 x Cmax									
Immunosuppressing drugs																			
Regulation of gene expression	Dexamethasone (Dex)	88ng/ml	-/-	S	-/-	S	-/0/0	N	-/+	N	-/-	S	-/-	S	-/0*	S	-/-	S	
Kinase and phosphatase inhibitors	Cyclosporin A (CyA)	2144 μ g/ml	-/-	S	ND/ND/ND	-/-	S	ND/ND/ND	0/0/0	N	ND/ND/ND	0/0/0	N	ND/ND/ND	0/0/0	N	ND/ND/ND	0/0/0	N
	Tacrolimus (Tac)	44.6ng/ml	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	+/0/0	N	0/+/0	N	-/0/0*	S	0/+/0	N	
	Rapamycin (RPM)	4.0ng/ml	0/+/*	A	0/+/*	A	0/0/0	N	0/0/0	N	0/0/0	N	+/+/+	A	0/0/0	N	0/0/0	N	
Alkylation	Cyclophosphamide (CP)	6.36 μ g/ml	+/0/-	N	0/0/-	N	+/0/-	N	+/+/+	A	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N	0/+/-	N	
Inhibition of de novo purine synthesis	Azathioprine (AZ)	73.7ng/ml	0/0/0	N	0/-/-	N	0/0/0	N	+/+/+	A	0/0/0	N	-/+/*	A	0/0/0	N	+/-/-	N	
	Mycophenolic acid (MPA)	34.0 μ g/ml	+/+/+	A	ND/ND/ND		+/+/+	A	ND/ND/ND		0/0/+	N	ND/ND/ND		0/0/0	N	ND/ND/ND		
	Mizoribine (MZR)	9.6 μ g/ml	+/+/-	N	+/+/0	N	+/+/-	N	+/0/+	N	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	
Inhibition of pyrimidine and purine synthesis	Methotrexate (MTX)	162.2ng/ml	+/0/+	N	+/0/+*	A	0/+/*	A	0/+/*	A	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N	
Off-label immunosuppressing drugs																			
	Sulfasalazine (SASP)	15.6 μ g/ml	+/-	N	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	
	Colchicine	5.64ng/ml	0/0/0	N	+/+/+	A	0/+/0	N	+/+/+	A	+/0/+*	A	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A	
	Chloroquine (CQ)	555ng/ml	-/-	S	-/-	S	-/0	N	-/-	S	0/0/0	N	-/-	S	0/0/0	N	-/-	S	
	Minocycline (MC)	4.8 μ g/ml	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	0/0/0	N	0/0/0	N	0/0/0	N	0/0/+	N	
	Nicotinamide (NA)	22.4-26.3 μ g/ml	+/-/+	N	+/+/+	A	0/+/+	N	+/+/+	A	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	
Non-immunomodulatory drugs																			
	Acetaminophen (AA)	9.4 μ g/ml	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A	
	Digoxin	2.92ng/ml	-/0/-	N	-/-	S	0/0/-	N	-/-	S	0/0/0	N	+/0/0	N	0/0/0	N	+/0/0	N	
	Warfarin	685 μ g/ml	+/+/+	A	ND/ND/ND		0/+/+	N	ND/ND/ND		-/0/*	S	ND/ND/ND		-/0*	S	ND/ND/ND		

- and + mean significant suppression and augmentation by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test compared with the control group, respectively. 0 means no significant change.

* means statistical significance by Student's t test

S, A, and N indicate immunosuppression, immunostimulation, and no effects in final judgment, respectively.

Table 2. MITAによるWagner化学物質の評価

Chemicals	IL-2		IFN- γ		IL-1 β		IL-8		報告されている免疫作用
2,4-Diaminotoluene	+/-	N	+/+/+	A	+/-	N	0/-*	S	抗体産生 \downarrow , NK \uparrow
2-Aminoanthracene	-/-	S	-/-	S	-/-	S	+0/+	N	抗体産生 \downarrow , NK \downarrow , DTH \downarrow
2-Mercaptobenzothiazole	+/-+	N	-/-+	N	0/+0	N	-/-	S	感作性
Acetaminophen	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	
Aluminum chloride	-/-	S	-/-	S	+/-+	N	+/-+	N	喘息
Amphoterycin B	-/-	S	-/-	S	+0/+*	A	+0/+*	A	サイトカイン産生 \uparrow
Benzethonium chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-0/-	N	感作性
Chlorpromazine	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	NK \uparrow , 光感作性
Cisplatin	-/-	S	-/-	S	+/+0	N	-/+	N	アナフィラキシー, DTH \downarrow , LLNA+
Cobalt chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感作性
Cyclophosphamide	+0/-	N	+/+/+	A	0/0/-	N	0/+/-	N	感作性
Cyclosporine A	-/-	S	-/-	S	0/0/0	N	0/-0	N	免疫抑制
Dapsone	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Dexamethasone	-/-	S	-/+/-	N	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Diethanolamin	-/-	S	-/+	N	0/-0	N	-/+	N	喘息, 感作性, 抗体産生 \downarrow , NK \downarrow , CSM \downarrow
Ethanol	0/-	N	0/0/0	N	0/-0	N	0/-0	N	
FK 506	-/-	S	-/-	S	+/+/+	A	-/+0	N	免疫抑制
Hydrocortisone	-/-	S	+/+/+	A	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Hydrogen peroxide	-/-	S	-/-	S	-0/0	N	-0/0	N	酸化ストレス
Isoniazid	-/-	S	-/+0	N	+/-	N	-/-	S	CSM \uparrow , cytotoxicity \uparrow , Ig \downarrow
Isophorone diisocyanate	-/-	S	+/-+	N	-/-	S	-/-	S	感作性
Lead(II) acetate	-/-	S	-/-	S	+0/+	N	0/-	N	免疫抑制
Lithium carbonate	-/-	S	+/+/+	A	-/-	S	-/-	S	免疫増強
Magnesium sulfate	-/-0	N	-/++	N	-/-0*	S	-0/-	N	
Mercuric chloride	-0/0	N	+/+/+	A	-/-	S	-/-	S	感作性, アレルギー反応, 自己免疫
Methanol	-/+/-	N	-/+/-	N	0/-0	N	+/-	N	NK \downarrow
Mitomycin C	-/-	S	+/-	N	+0/-	N	+0/-	N	感作性, 免疫複合体病
Nickel sulfate	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感作性
Nitrofurazone	-/-	S	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	感作性
p-Nitroaniline	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	cytotoxicity \downarrow , CSM \downarrow , NK \uparrow , 抗体産生 \uparrow , Ig \downarrow
Sodium bromate	-/-	S	-/+0	N	-/+	N	-0/+	N	Ig \uparrow
Triethanolamine	-/-	S	-/-	S	-/-0	N	-/+	N	感作性

- and + mean significant suppression and augmentation by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test compared with the control group, respectively. 0 means no significant change.

* means statistical significance by Student's t test

S, A, and N indicate immunosuppression, immunostimulation, and no effects in final judgment, respectively.