

201428001A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相場 節也


平成27（2015）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 27 年 5 月 14 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 セツキ
研究者氏名 相場 節也 
(所属研究機関 東北大学)

平成 26 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 18,300,000 円也(うち間接経費 4,223,000 円)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成27(2015)年 5月

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-----	4
相場 節也	
(資料) 1. Multi-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール	
平成 27 年 1 月 9 日 ver. 005.0J	
2. Data sheet for MITA Ver.006 20150109	
II. 分担研究報告	
1. 免疫毒性に関する国際動向調査 -----	66
小島 肇	
2. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, 精度管理 -----	69
近江谷 克裕	
3. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析 -----	75
山影 康次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	85
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	87
Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, <i>et al.</i> (2014) Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. <i>Toxicol in Vitro</i> 28:759-68.	
Onami K, Kimura Y, Ito Y, <i>et al.</i> (2014) Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. <i>J Invest Dermatol</i> 134:1951-60.	
Watanabe M, Kurai J, Tomita K, <i>et al.</i> (2014) Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. <i>The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma</i> 51:595-602.	
Watanabe M, Noma H, Kurai J, <i>et al.</i> (2015) Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposure to Asian desert Dusts and its association with interleukin-8. <i>BioMed Res International</i> in press.	
Yasunaga M, Murotomi K, Abe H, <i>et al.</i> (2015) Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3. <i>J Biotechnol</i> 194:115-23.	
Yasunaga M, Nakajima Y, Ohmiya Y (2014) Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> 406:5735-42.	

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）
（総括）研究報告書

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可能なルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した (Multi-ImmunoToxicity 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化学物質の影響を多面的に評価することができる。まず種々の機序の明らかな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。また 40 種類の化学物質を評価したところ、鉛の免疫抑制作用、リチウム、水銀による免疫増強作用を検出できることも明らかとなった。さらに世界に先駆けて、人工染色体を用いた IL-1 β レポーター細胞を樹立し、MITA 構成細胞の長期安定性を確保した。施設内、施設間再現性も検討し、IL-2 と IFN- γ レポーター細胞に関しては既に良好な結果が得られている。以上の結果より、MITA が化学物質の免疫毒性を自然免疫と獲得免疫の両面から評価できる新しい 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

環境汚染物質、農薬、食品添加物、薬剤などの化学物質が、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て健康被害を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こなかった。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

A. 研究目的
研究背景：

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。

そこで本研究では、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(#2H4, THP-G1b, THP-G8)を使用した化学物質免疫毒性評価系(Multi-ImmunoToxicity assay; MITA)の構築をめざした。#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細胞株に導入し樹立した。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。これまでの2年間の研究の結果、以下の点が明らかになった。

1) MITAと定量的real-time PCRによるmRNA発現測定との相関

MITAを構成するレポーター細胞作成に使用した Jurkat細胞、THP-1細胞をそれぞれ、PMA/CaI, LPSで刺激し、それらの細胞における IL-2, IFN- γ mRNA、IL-1 β 、IL-8mRNA 発現に及ぼす Dex、CyA、Tacの影響を定量的 real-time PCRで測定した。得られた結果を、MITAによる薬剤評価と比較したところ極めて良好な相関関係が確認できた。

2) ヒト whole blood cytokine release assay (WBCRA)の代替法としてのMITAの可能性の検討

WBCRAとMITAとの相関に関しては、まず、従来法の欠点であるサイトカインの蛋白定量を mRNA 定量に変更することを検討した。その結果、6時間の反応時間で回収された RNA を用いた real-time PCRにより従来法と同等の結果が得られ、WBCRAの評価時間の短縮化と少数検体への対応が可能となった。さらに、WBCRAにより評価した DEX, CyA, Tacのヒト末梢血細胞の IL-2、IFN- γ mRNA、IL-1 β 、IL-8mRNA 発現に対する調節作用は、MITAにより評価した結果と一致した。

3) 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の作成

薬理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により免疫薬理作用を解析し、文献的に報告されている作用と比較しMITA評価の妥当性を検証した。

4) 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、MITAのプロトコール ver 2を作成した。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。

5) 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の特定

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との組み合わせが必要となる。

6) 施設間比較試験を行うことによるMITAの多施設への技術移転性の検証

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種類の医薬品について施設間比較試験を施行した。4種類の薬剤に関して試験が完了し、2-MBTを除いて3施設でほぼ同等の結果が得られている。

目的:

以上の成果をふまえて、本年度の研究目標としては以下の5点を掲げた。

- 1) MITAのdata setの拡充
- 2) 評価細胞の安定性の確保
- 3) 施設間再現性の検証

B. 研究方法

1) 試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone (Dapsone), 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), 2,4-Diaminotoluene, 2-Aminoanthracene, 2-Mercaptobenzothiazole, Amphoterycine B, Benzethonium chloride, Chlorpromazine, Cisplatin, Dibenz[a,i]pyrene, Dibutyl phthalate, Diethanolamine, Lead acetate, Nitrofurazone, Pentamidine isethionate, p-Nitroaniline, Pyrimethamine, Ribavirin, Sodium bromate, Triethanolamine, Actinomycin D, Cobalt chloride, Dimethyl sulfoxide, Histamine, Hydrocortisone, Isophorone diisocyanate, Mitomycin C は Sigma-Aldrichから購入した。Aluminum chloride, Ethanol, Magnesium sulfate, Methanol, Nickel sulfate, Sodium lauryl sulfate, Lithium carbonate, Mercuric chloride は和光純薬から購入した。Hydrogen peroxide は三徳化学工業から購入した。Deoxyspergualinは医薬品卸業から購入した。

2) 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-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、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) (図1)。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-G1b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-G1b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

4) 免疫毒性評価法 (図2)

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) Jurkat、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。

4) 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。

MITAによる化学物質免疫毒性評価

WagnerらがFluorescent Cell Chip assay (FCC)において検討した46種類の化学物質 (Wagner *et al.*, 2006)に関してMITAを行う。この46種類の化学物質は、すでに、過去の報告をもとにin vivo, in vitroにおいて免疫毒性が報告されていない化学物質(N)、免疫抑制の報告のある化学物質(IT-1)、アレルギー、自己免疫などを誘発する可能性のある化学物質(IT-2)、in vivoにおける影響は明らかではないが、何らかの免疫関連パラメーターを変動させる化学物質(M)などに分類されている。そこで、これらの化学物質をMITAで評価し、既知の免疫毒性をMITAが正確に評価できるか否かを明らかにする。

5) 施設内、施設間再現性

産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所、東北大皮膚科の3施設で4種類の薬剤に関して施設間施設間再現性試験をおこない問題点を明らかにした。その検討結果をふまえて、さらに10種類の化学物質について施設間再現性試験を施行した。

(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、26年度に関しては2)、3)、4)、5)を行った。1)、2)の成果に関しては、東北大皮膚科木村裕が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のdata setの拡充 (Table 1)

平成25年度に引き続き26年度もWagnerら(Wagner *et al.*, 2006)がFluorescent Cell Chip assay (FCCA)に関する論文中で検討した46化学物質に関してMITAによる評価をおこないMITAのdata setを作成した。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などがMITAにより評価できることを明らかにした。すなわち鉛の免疫抑制作用がIL-2, IFN- γ のレポーター活性により、リチウム、水銀による免疫増強、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。

2) MITAとFluorescent cell chip assay (FCCA)との比較 (Table 2)

MITA、FCCAともにDex, CyA, Tac, Dapsone、鉛の免疫抑制作用と水銀による免疫増強作用(IFN- γ 転写活性増強)を適確に評価できた。一方、ニッケル、コバルトなど2価イオンにはT細胞活性化に必須な転写因子であるNFATの上流に位置するCa²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channelを抑制する作用が存在することが良く知られているが(Saito *et al.*, 2011)、MITAは両金属の抑制作用を検出できたのに対し、FCCAは検出できなかった。

3) 施設間再現性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 (Table 3-1 and 3-2)

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再現性試験を施行した。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施設間で88%の施設間再現性が確認できた。一方、THP-G1bおよびTHP-G8細胞の再現性は乏しかった。そこで、試験方法の施設間での共有化を再度図った後、10種類の化学物質について施設間再現性試験をおこない#2H4細胞に関しては85%、THP-G1b細胞とTHP-G8細胞に関してはそれぞれ70%、50%の一致率を認めた(Table 4-2)。またTHP-G1b細胞に代えて、TGCHAC-A4細胞を用いて行った試験では、東北大学と食薬センター間での一致率の改善を認めた。

4) MITAの改良

4-1) IL-8 Luc assayとの組み合わせ

近年、免疫反応は大きく自然免疫と獲得免疫

から構築されていることが報告され、免疫毒性もその両者の観点から評価することが求められている。実際、化学物質による自己免疫発症などに関しても自然免疫の重要性が明らかにされている(Pollard and Kono, 2013)。MITA同様のhigh through-put免疫毒性試験であるFCCAは自然免疫を評価できないが、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響が評価可能である。しかし、LPS刺激によるIL-8発現は、代表的なハプテンである2-mercaptobenzothiazole、CoCl₂、NiCl₂により予想外に抑制された。一方、LPS非存在下に化学物質によるTHP-G8細胞のIL-8レポーター活性を評価するIL-8 Luc assayは、感作性試験法として、既にその迅速性、精度、感度、特異度、施設間再現性がvalidationにより評価され現在OECDにSPSFを提出している。そこで、感作性物質を含めた幅広い化学物質の免疫毒性評価系の構築には、MITAとIL-8 Luc assayの両者の組み合わせが必要となる。

4-2) 人工染色体を用いた新規IL-1 β レポーター細胞の樹立

①THP-G1b細胞の問題点

MITAを種々化学物質で評価するなか、THP-G1b細胞の以下のような問題点が明らかになった。1)細胞増殖が遅く、解析に必要な細胞数を確保するのに時間を要する。2) LPSで刺激後にSLG-LAが負になってしまう。

②人工染色体技術を用いた新規IL-1 β レポーター細胞の樹立(図3)

上記の問題点を克服するために、人工染色体技術(Hoshiya *et al.*, 2009)を応用して、新たにIL-1 β レポーター細胞樹立を試みた。その結果、数種類のクローンを樹立することができた。その代表的なクローンのLPSに対する反応性を図に示した(図8)。いずれのクローンもLPS刺激によりSLG-LAを顕著に増加させるが、多くの細胞で、THP-G1b同様にSLG-LAが負の値になってしまった。その中で、唯一TGCHAC-A4細胞のみが、10 ng/mlの濃度のLPSでSLG-LAの値が負にならずSLG-LAが正の値として計算できた。そこで以後の実験ではTGCHAC-A4細胞を用いることとした。

③TGCHAC-A4細胞の増殖曲線(図4)

THP-G1b細胞のもう一つの問題点は増殖速度が遅い点にあったので、TGCHAC-A4細胞の増殖曲線をTHP-G1b細胞の増殖曲線と比較した。その結果、図9に示す様にTGCHAC-A4細胞の増殖が極めて良好なことが確認できた。

④TGCHAC-A4細胞とTHP-G1b細胞との同等性(図5)

これまでMITAにおいては、THP-G1b細胞のLPS刺激後のSLG-LAが負になってしまうためTHP-G8細胞のSLG-LAを使用してnSLG-LAを算出していた。同様の事をおこなうと、TGCHAC-A4細胞のLPS刺激に対するDex、CyAの抑制効果がTHP-G1b細胞と同等に評価できることが明らかになった。更に、その結果は、TGCHAC-A4細胞のSLG-LAを用いても得られた。従って、TGCHAC-A4細胞は反応性においても、これまでMITAに用いられていたTHP-G1b細胞と同等であることが確認された。

⑤TGCHAC-A4細胞の技術移転(図6, 図7)

TGCHAC-A4細胞が多施設でも同様にMITAの評価細胞として使用できるかを検証した。まずLPSの濃度と反応性を検討したところ、いずれの施設においても10 ng/mlまでの濃度ではSLG-LAが正の値を示しnSLG-LAを正の値として評価することができた。ただし、25 ng/mlの濃度では、東北大学においてのみSLG-LAが負になってしまった(図6)。

さらに、DexとCyAの影響を検討したところ、どの施設においてもDexによる顕著な抑制とCyAによる軽度の抑制が検出できた(図7)。

7) MITAによるアルキル化剤、プリンまたはピリミジン合成阻害剤の評価(図8, 図9)

昨年までの研究で、MITAでは、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、T細胞の代謝、細胞増殖に作用する免疫抑制剤の作用は評価できないことが明らかとなった。しかし詳細に検討すると、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、さらにその作用がPMA/Io刺激前に24時間培養を行う事でより顕著になることを見いだした。このような作用はDexやCyAには認められなかった。

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化学物質の影響を評価することができる。まず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

この薬剤を用いた検討により、MITAが化学物質の免疫毒性作用の標的細胞がT細胞かマクロファージ/樹状細胞かを容易に同定できることも明らかとなった。

最近、共同研究者の鳥取大学分子制御内科学分野 渡部仁成講師らは、THP-G8細胞を用いて、実際に日本に飛来してくるPM2.5や黄砂と中国の黄土高原の砂との生物学的活性の相違を容易に検出できることを明らかにした(Watanabe *et al.*, 2014)。また、この研究では、PM2.5の喘息、鼻炎などの誘発には、単なる粒子量ではなく、その生物学的活性すなわちTHP-G8レポーター活性が相関することを明らかにした。今後THP-G8細胞のPM2.5の健康被害予測への応用が期待されている。又、共同研究者の東北大学病院皮膚科 木村裕助教は、同じくTHP-G8細胞が河川などの環境水の汚染をリムルテストなど既存の方法よりも簡便に評価できることを平成26年日本代替法学会総会で報告した。さらにTHP-G8細胞を用いた感作性予測試験法 IL-8 Luc assayは現在OECDにSPSFを提出している。このように、MITAを構成するTHP-G8細胞の安定性ならびに化学物質評価における有用性が漸次明らかになってきている。

また、今年度の研究では、研究期間中に明らかになったIL-1 β レポーター細胞THP-G1bの脆弱性を克服する目的で、あらたにTGCHAC-4A細胞を樹立した。この細胞は、人工染色体上にIL-1 β レポーター遺伝子が搭載されている世界で初めてのレポーター細胞である。樹立後、SLR-LAの陰性化などの問題を克服し、またTHP-G1bとの同等性比較試験なども行い、今後THP-G1b細胞に代わるMITAのあらたなIL-1 β レポーター細胞として使用していく予定である。

現在までに40化学物質のMITAによる評価が完了した。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などが評価できることを明らかになった。また同じくhigh throughputの免疫毒性試験法であるFCCAと異なり、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響も評価できる。ただし予想外に、現行のMITAのプロトコールでは、化学物質処理後にLPS刺激を加えるため、多くのハプテンでIL-8プロモーター活性が抑制される。しかし、MITAとIL-8 Luc assayを組み合わせることにより、感作性物質を含めてより幅広く化学物質の免疫毒性を評価することが可能となる。

しかし、その一方、現時点ではMITAのみでは代謝、細胞増殖を介して免疫抑制を誘導する薬剤の評価は行えない。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(24時間の前培養)などにより、これら化学物質の免疫毒性評価の可能性も見いだせた。

最後に、3施設の再現性比較試験では、2H4に関しては施設内、施設間再現性とも良好であったが、新たなレポーター細胞が加わったこともありTGCHAC-A4およびTHP-G8細胞に関しては、いまだ満足いく結果は得られていない。しかし、今後プロトコールの更なる簡略化、試験細胞の培養方法、刺激に用いるLPS濃度などを検討することで良好な再現性が得られるよう検討を続けている。

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, Dastych 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.

Hoshiya H, Kazuki Y, Abe S, *et al.* (2009) A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol therapy* 17:309-17.

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.

Pollard KM, Kono DH (2013) Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity. *BMC medicine* 11:100.

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, Dastyk J (2006) Fluorescent Cell Chip a new in vitro approach for immunotoxicity screening. *Toxicol Lett* 162:55-70.

Watanabe M, Kurai J, Tomita K, *et al.* (2014) Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 51:595-602.

E. 結論

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可能な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)。本研究により、この評価系を用いることで、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化学物質の影響を多面的に評価することができることが明らかとなった。あらたに世界に先駆けて、人工染色体を用いたIL-1 β レポーター細胞を樹立し、MITA構成細胞の長期安定性を確保した。施設間再現性も検討し、IL-2とIFN- γ レポーター細胞に関しては既に良好な結果が得られている。以上の研究より、MITAが化学物質の免疫毒性を自然免疫と獲得免疫の両面から評価できる新しいhigh-throughput手法となりうることを明らかにした。

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. Watanabe M, Noma H, Kurai J, Sano H, Saito R, Abe S, Kimura Y, Aiba S, Oshimura M, Yamasaki A, Shimizu E. Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposure to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *BioMed Res International*, in press, 2015.
2. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, and Tomita H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. *Glia*. 63:257-70, 2015.
3. Watanabe M, Kurai J, Tomita K, Sano H, Abe S, Saito R, Minato S, Igishi T, Burioka N, Sako T, *et al.* Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *J Asthma*. 51:595-602, 2014.
4. Tsujita-Inoue K, Hirota M, Ashikaga T, Atobe T, Kouzuki H, and Aiba S. Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays. *Toxicol in*

- Vitro* 28:626-39, 2014
5. Onami K, Kimura Y, Ito Y, Yamauchi T, Yamasaki K, and Aiba S. Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J Invest Dermatol.* 134:1951-60, 2014
 6. Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, and Mizuno K. Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion. *Mol Biol Cell.* 25:828-40, 2014.
 7. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, and Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cell Dev.* 23:717-28, 2014.
 8. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushi-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, and Aiba S. Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 193:5140-8, 2014.
 9. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, and Aiba S. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol in Vitro* 28:759-68, 2014.
 10. Watabe A, Sugawara T, Kikuchi K, Yamasaki K, Sakai S, and Aiba S. Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci.* 272:177-82, 013;.
 11. Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, Ohmiya Y, Fujimura T, Yamasaki K, and Aiba S. In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape stripping. *J Invest Dermatol.* 133:2407-15, 2013
 12. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, and Muta T. 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, 2013.
 13. Hirota M, Kouzuki H, Ashikaga T, Sono S, Tsujita K, Sasa H, and Aiba S. 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, 2013
 14. Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, Yamada T, Kimura Y, Aiba S, Toyozumi T, Watanabe M, Ohta R, Tanaka N, et al. 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, 2012.
2. 学会発表
Kaoru Onami, Yutaka Kimura, Yumiko Ito, Takeshi Yamauchi, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. Society for Investigative Dermatology 73rd Annual Meeting, Albuquerque, United State of America (2014.5)
- 相場 節也、木村 裕、藤村 千鶴 : IL-8 Luc assay ワークショップ「日本発の動物実験代替法の現状」(東京) 2014年8月

Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Miho Higuchi, Mika Watanabe, Kohji Yamakage, Yoshihiro Ohmiya, Hajime Kojima, Setsuya Aiba : Evaluation of the Multi-ImmunoTox assay (MITA) composed of 3 human cytokine reporter cell lines by examining the immunological effects of drugs. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Setsuya Aiba : A dataset on 99 chemicals tested by IL-8 Luc assay. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Mika Watanabe, Noriyuki Suzuki, Tomoko Iwaki, Kohji Yamakage, Koichi Saito, Yoshihiro Nakajima, Chizu Fujimura, Aoi Maruya, Yoshihiro Ohmiya, Takashi Omori, Shojiro Yamazaki, Hajime Kojima, Norihiro Tanaka, Setsuya Aiba : An inter-laboratory validation study of IL-8 Luc assay using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、藤村 千鶴、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲徳、相場 節也 : IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

木村 裕、藤村 千鶴、Socorro P. Lupisan、相場 節

也:IL-8レポーター細胞を用いた微生物毒素簡易定量法の開発. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

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-ImmunoToxicity assay (MITA)の構成と各種パラメーター

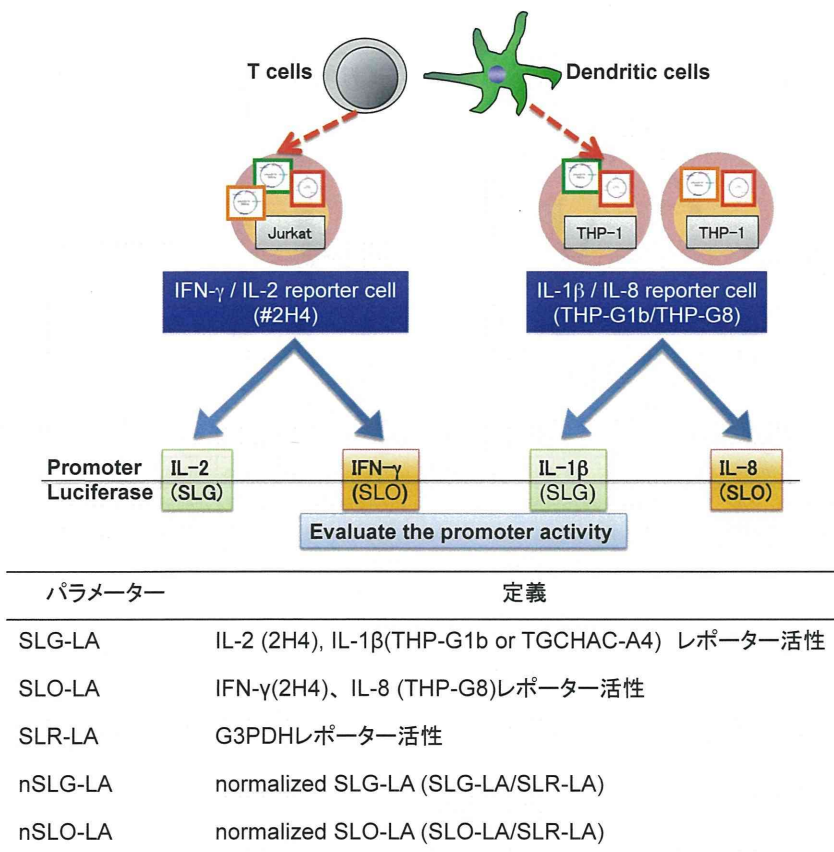
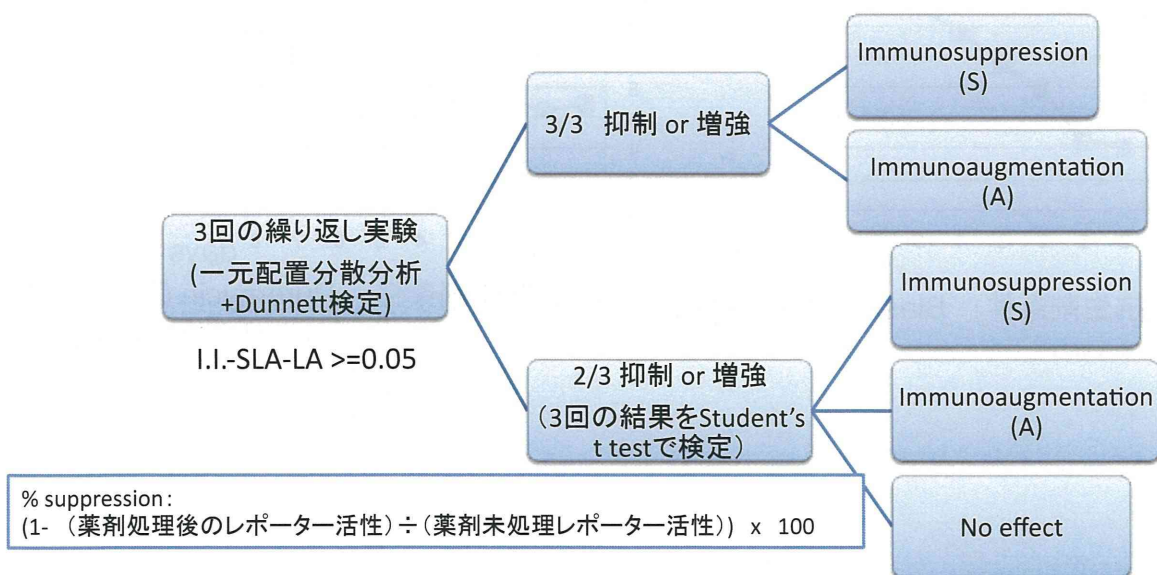


図 2. MITA による免疫毒性判定基準



各実験において得られた結果に関して一元配置分散分析, Dunnett検定を行い有意な抑制効果, 増強効果があるか否かを検討する. 3回の結果が一致していた際には, その結果を最終判定結果とする.

3回の実験結果が一致していなかった場合は, 3回の繰り返し実験の結果の中から%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判定結果とする.

図 3. 人工染色体を用いて作成した新規 IL-1 β レポーター細胞

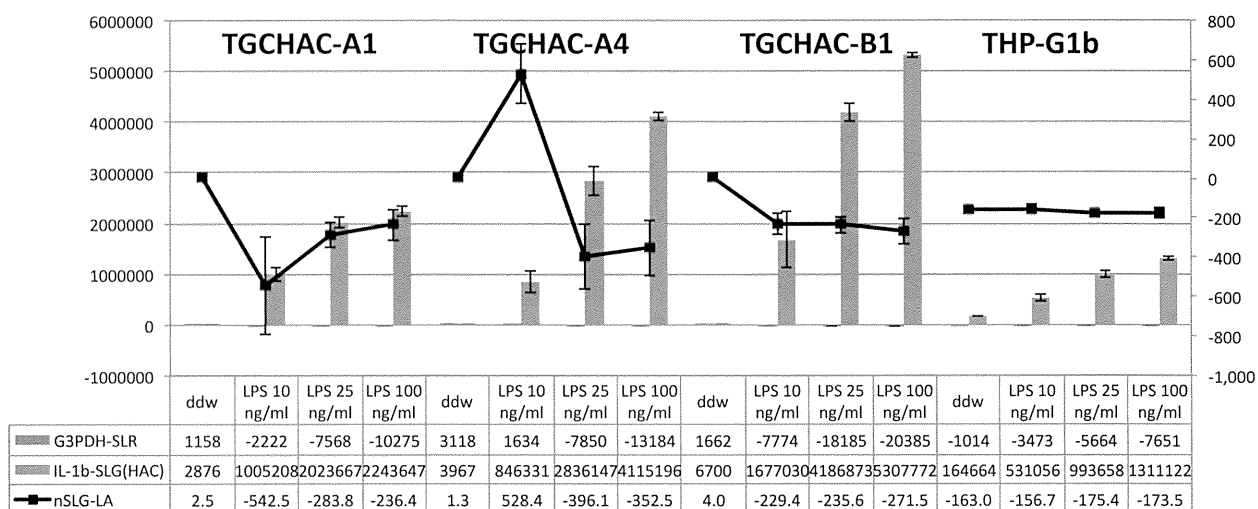


図 4. 新しく樹立した IL-1 β レポーター細胞 TGCHAC-4A と THP-G1 b の増殖速度の違い

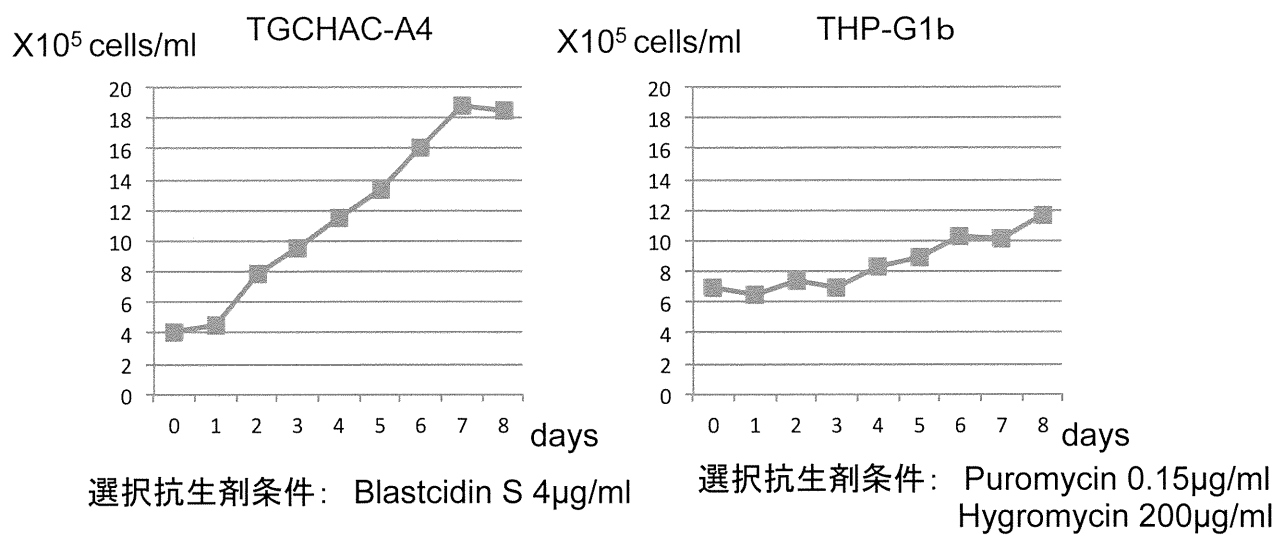


図 5. TGCHAC-A4 細胞の THP-G1b 細胞の同等性の証明

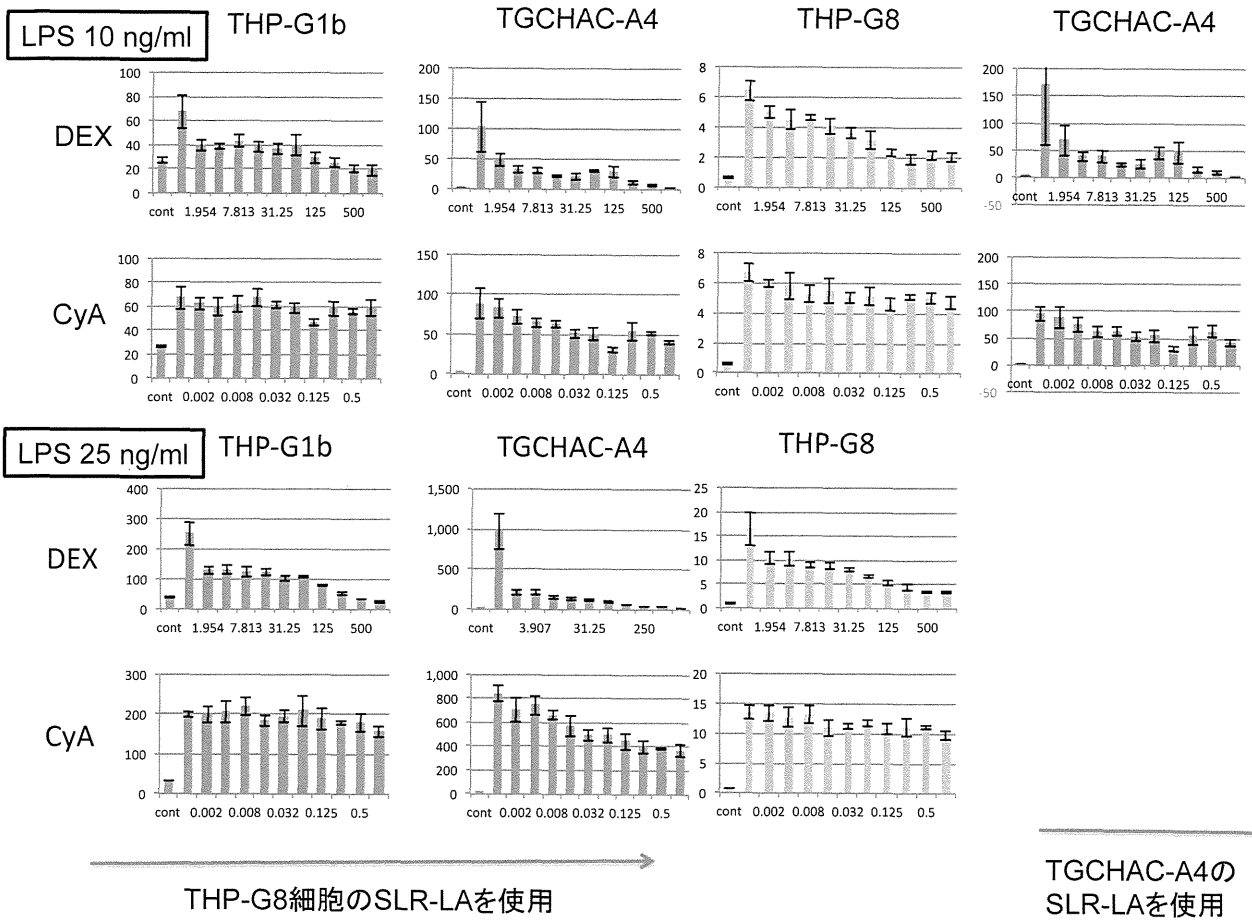
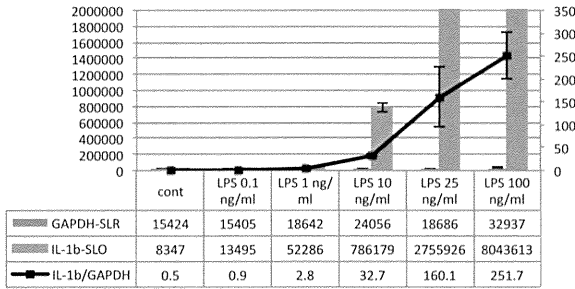


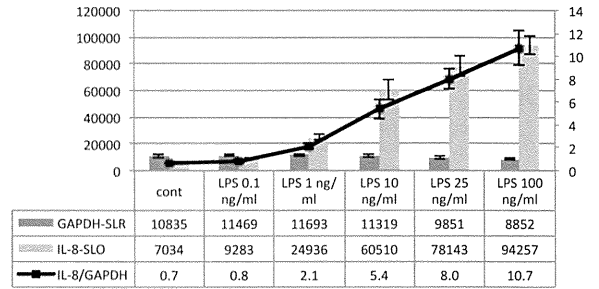
図 6. TGCHAC-A4 細胞の施設間差試験 (LPS)

食薬センター

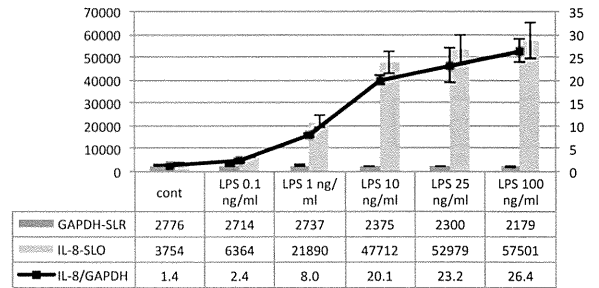
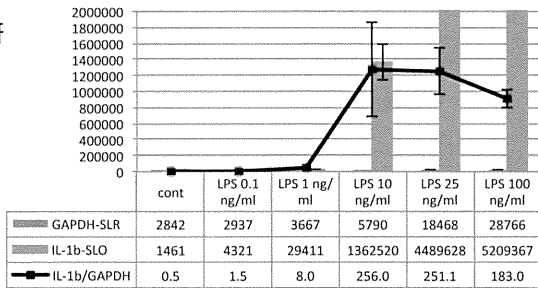
TGCHAC-A4



THP-G8



産総研



東北大

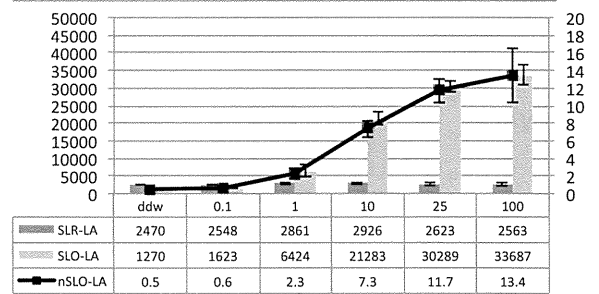
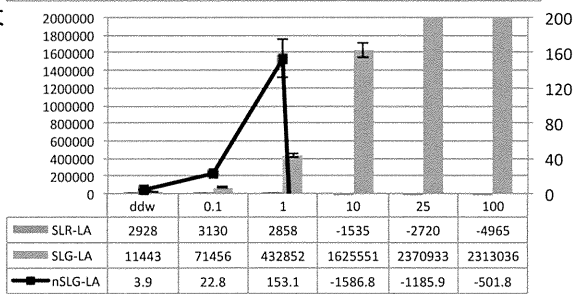
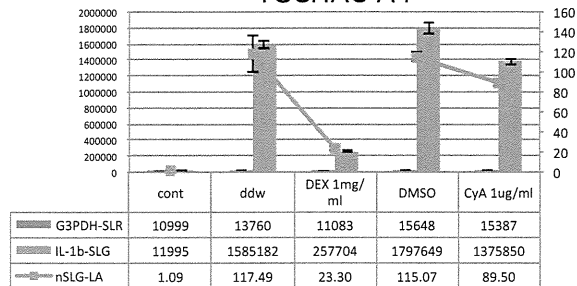


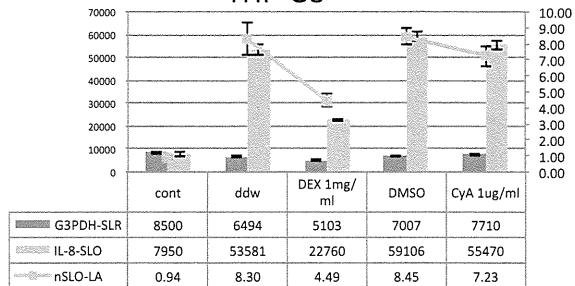
図 7. TGCHAC-4A 細胞の施設間差試験 (Dex and CyA)

食薬センター

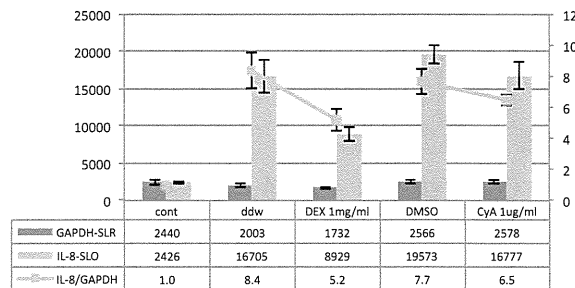
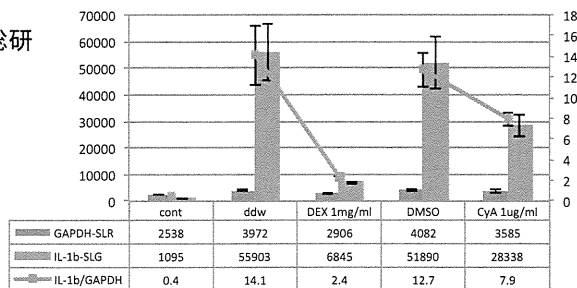
TGCHAC-A4



THP-G8



産総研



東北大

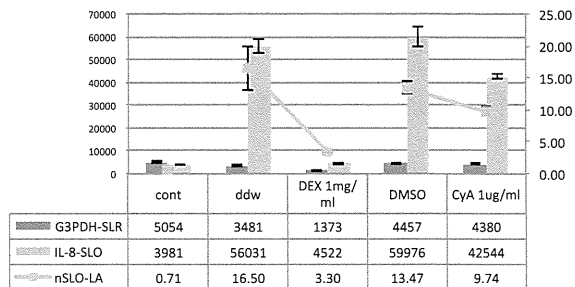
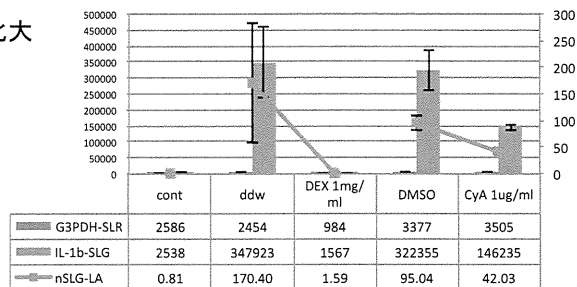


図 8. Cyclosporin A, Methotrexate の作用に与える 24 時間前培養の影響

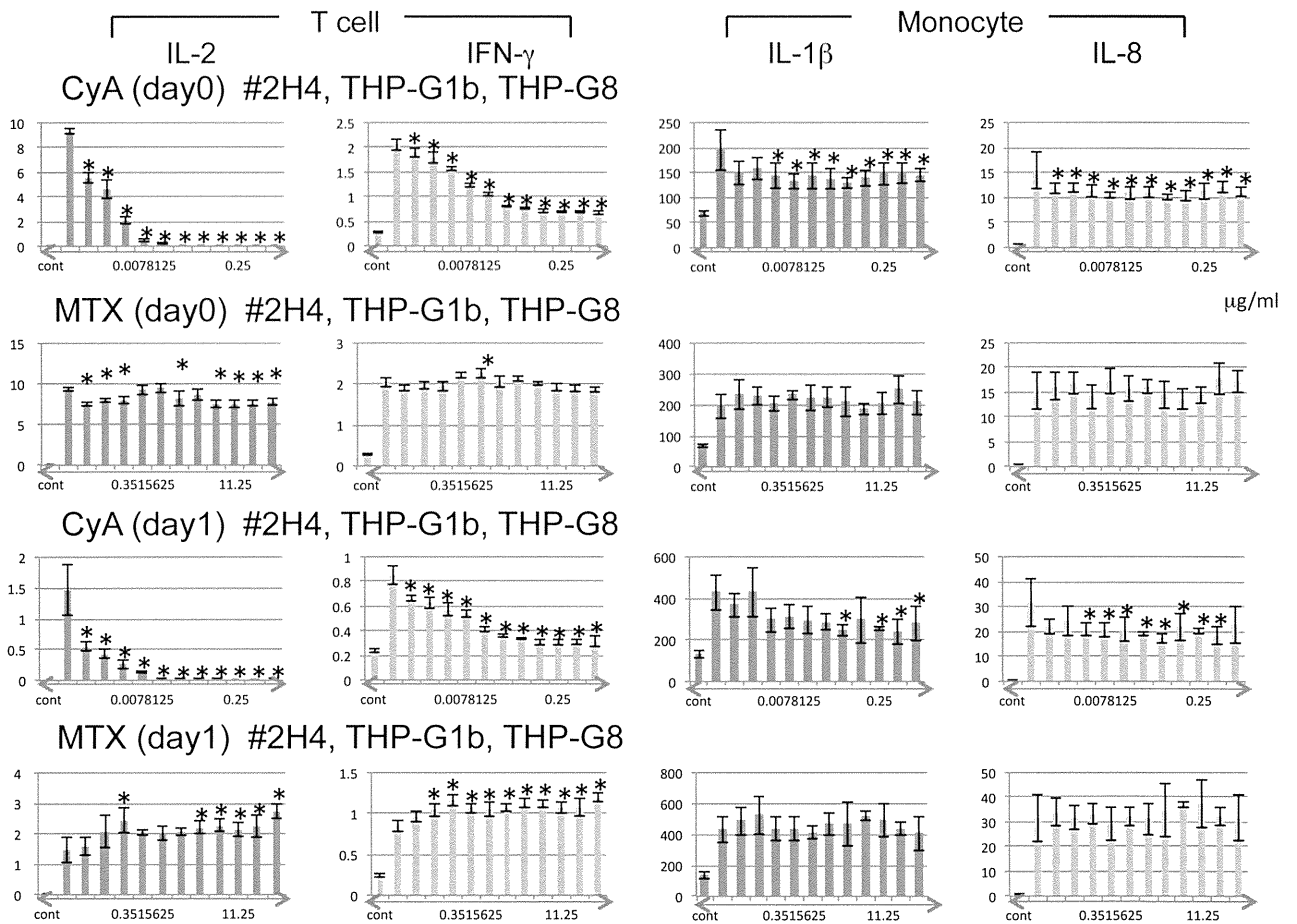


図 9. Cyclophosphamide, Mizoribin の作用に与える 24 時間前培養の影響

