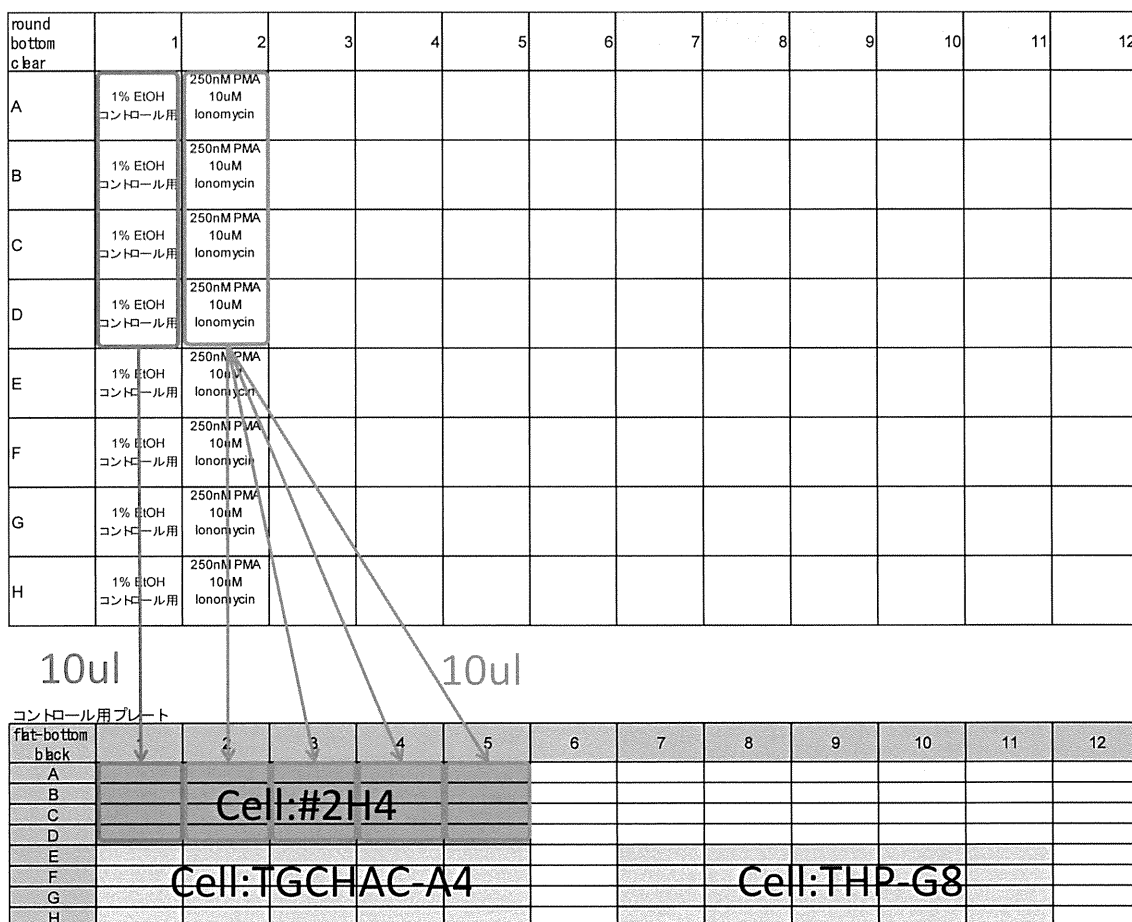


### 8-7 細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の#2H4 細胞への添加

DEX または CyA を添加した 1 時間後、PMA/ionomycin による細胞賦活化処理を行う。0.5~10 µl の 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、**6-4** で 96 well plate (U 底) に分注した Control 溶液 (Ethanol 溶媒コントロール) もしくは PMA/ionomycin を 10 µl/well ずつそれぞれ#A1-#H1 もしくは#B1-#H12 の細胞に添加する (図 20)。添加の際にはチップの先を培地につけて確実に添加する。チップは 1 回添加する毎に交換する。

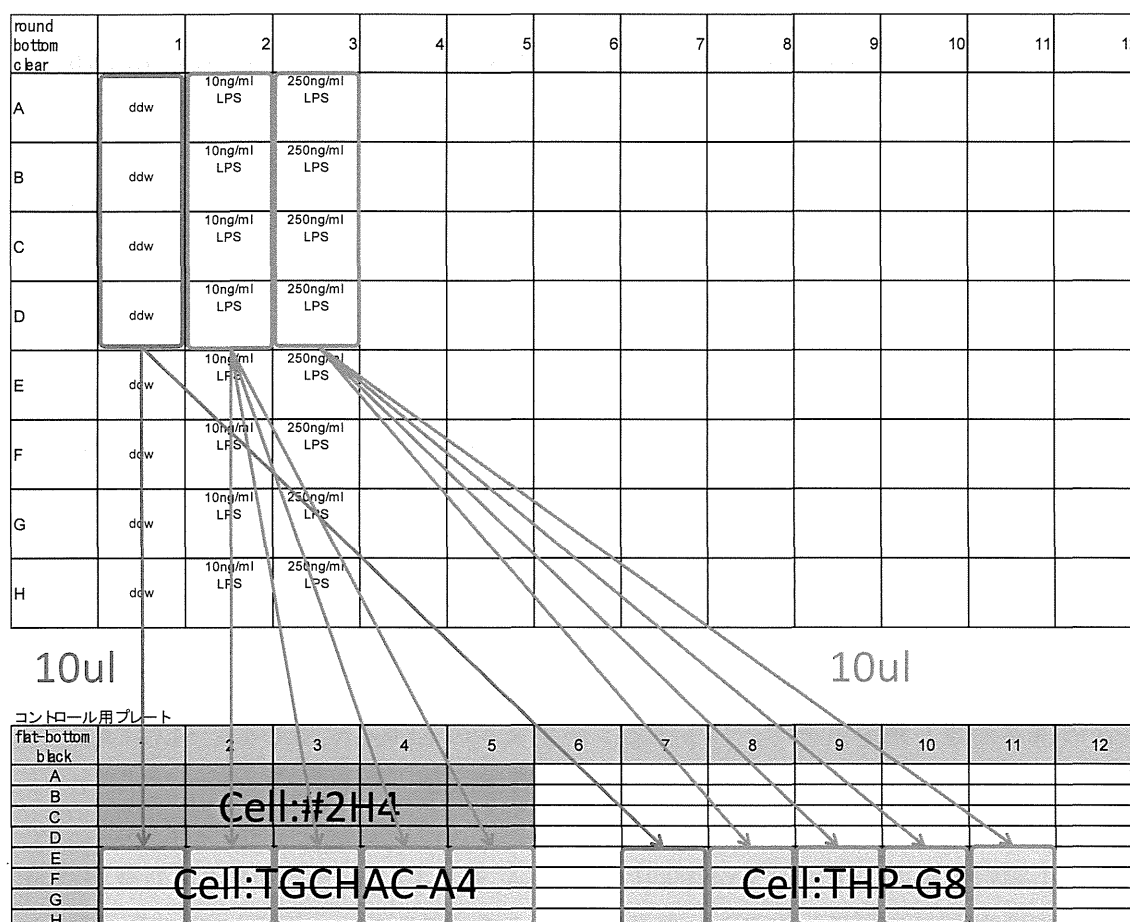
図 20



### 8-8 細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, TGCHAC-A4 細胞への添加

続いて、LPS による細胞賦活化処理を行う。0.5~10 μl の 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、7-2-1, 7-2-2 で 96 well plate (U 底) に分注した Control 溶液 (Distilled water) もしくは LPS を 10 μl/well ずつそれぞれ #E1-#H1, #E7-#H7 もしくは #E2-#H5 (10ng/ml), #E8-#H11 (250ng/ml) の細胞に添加する (図 21)。添加の際にはチップの先を培地につけて確実に添加する。チップは 1 回添加する毎に交換する。終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、6 時間反応させる。

図 21



## 9 シグナルアッセイ(6 時間後)

- ① 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 (25 °C前後) に戻るように溶解させる。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。
- ② 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 µl/well ずつ分注する。
- ③ Tripluc 添加後、プレートシェーカーを使用して室温 (25 °C前後) で 10 分間攪拌し、細胞を溶解させる。
- ④ 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。
- ⑤ 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: #2H4 細胞とコントロールプレートは F0 と F1 と F2 を使用、THP-G8 細胞、TGCHAC-A4 細胞は F0 と F2 を使用)。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、SLG と SLO と SLR の発光値を算出する。

## 10 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, F1 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ひな形のエクセルファイル(Data sheet for MITA #2H4 Ver. 004.0 20141112, Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 006.0 20150109)の「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, SLG-LA, nSLO-LA, nSLG-LA、および% suppression が算出される。

THP-1 細胞由来の TGCHAC-A4 細胞は SLG-LA, SLR-LA のうち SLR-LA の発現が弱く単独では生存率の評価、SLG-LA のノーマライズができない。同時にアッセイした THP-G8 細胞の SLR-LA を代わりに使用する。

データの解析については生存率(I.I.-SLR-LA)が 0.05 以上の範囲において、各濃度毎に PMA/Io 単独、LPS 単独と比べ、サイトカインプロモーター活性が抑制されているかまたは亢進されているか 5%の有意水準で One way anova→Dunnett 検定をおこない判定する (+: immunostimulation, -: immunosuppression, 0: non-significant change, +と-が混在するものは+と記載する)。同じ化学物質について 3 回アッセイを行い 3 回

とも結果が一致したものはその結果をもって最終結果とする (S : immunosuppressive drug, A : immunostimulatory drug, N : not effective drug)。-または+が 2 回含まれる際にはそれぞれのアッセイでもっともコントロール値より離れた%suppression の値 (+については、濃度依存性が+側、-側のどちらか片方で認められる際には濃度依存性が認められる濃度でもっともコントロール値より離れた%suppression の値、+側、-側の両方に濃度依存性が認められる際、または両方に濃度依存性が認められない際にはすべての濃度でもっともコントロール値より離れた%suppression の値) で Student-t 検定を行い、5%の有意水準で有意なものはその結果を最終結果 (S : immunosuppressive drug, A : immunostimulatory drug) とし、有意でなかったものは N : not effective drug とする。

判定に使用するパラメーター

SLG-luciferase activity (SLG-LA) : SLG のルシフェラーゼ活性  
(IL-2 または IL-1 $\beta$ プロモーターの下流で発現)

SLO-luciferase activity (SLO-LA) : SLO のルシフェラーゼ活性  
(IFN- $\gamma$ または IL-8 プロモーターの下流で発現)

SLR-luciferase activity (SLR-LA) : SLR のルシフェラーゼ活性  
(G3PDH プロモーターの下流で発現)

Normalized SLG-LA (nSLG-LA) : SLG-LA / SLR-LA  
(SLG-LA の値を SLR-LA の値で標準化した値)

Normalized SLO-LA (nSLO-LA) : SLO-LA / SLR-LA  
(SLO-LA の値を SLR-LA の値で標準化した値)

Inhibition index of SLR-LA (I.I.-SLR-LA) :  
化学物質添加時の SLR-LA / 無添加時の SLR-LA  
(化学物質処理の有無による SLR-LA の変化)

% suppression :  
(1-薬剤処理後のレポーター細胞の nSLG-LA または nSLO-LA  $\div$   
薬剤処理で処理されていないレポーター細胞の nSLG-LA または nSLO-LA)

x 100

## 11. 変更履歴

Ver. 005.0J 2015.1.9 配布

TGCHAC-A4 の nSLG-LA を算出する際に THP-G8 の SLR-LA を使うよう変更

Ver. 004.1J 2014.12.10 配布

継代時の細胞密度を変更

図 16, 17 を修正

Ver. 004.0J 2014.11.17 配布

産総研筑波、食薬センター、東北大学施設間試験用（化学物質 Sodium Bromate ( $\text{NaBrO}_3$ ), Nickel (II) sulfate ( $\text{NiSO}_4$ ), Dibutyl phthalate (DP), 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT))

THP-G1b 細胞を TGCHAC-A4 細胞に変更

THP-G8 と TGCHAC-A4 の細胞数を  $5 \times 10^4/\text{well}$  から  $1 \times 10^5/\text{well}$  に変更

化学物質の濃度を 11 段階から 10 段階に変更

LPS 最終濃度を変更 (THP-G8 : 25 ng/ml, TGCHAC-A4 : 1 ng/ml)

LPS 添加方法を変更 (2  $\mu\text{l}/\text{well}$  で添付→10  $\mu\text{l}/\text{well}$  で添付)

判定基準を変更

Ver. 002.0J 2013.08.19 配布

産総研筑波、食薬センター施設間試験用（化学物質  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ , Isophorone diisocyanate, 2-Mercaptobenzothiazole)

公比を 3 から 2 に変更

LPS の濃度を 100ng/ml から 25ng/ml に変更

コントロール(dexamethasone)についての記載を追加

THP-G8 についての付記を削除

Ver. 001.1J 2012.11.13 配布

THP-G8 の使用方法を付記として記載

Ver. 001J 2012.11.09 配布



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

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、OECD（Organisation for Economic Co-operation and Development）にて検討が進んでいる AOP（Adverse Outcome Pathway）や IATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment)に関する情報を収集した。AOP に関係する会議では、日本からも事例研究として、鉛の免疫抑制を提案した。IATA 会議では、資生堂および花王が *in vitro* 試験の組合せに関する事例研究を報告した。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、AOP、IATA

A. 研究目的

免疫毒性試験に関する試験法開発は、昨今、皮膚感作性試験が中心である。本年度も引き続き、本件に関する国際会議に参加し、情報を収集するとともに、国際動向の把握に務めた。

B. 研究方法

B-1. OECD Organisation for Economic Co-operation and Development) Molecular Screening and Toxicogenomics 会議

平成 26 年 6 月にパリ（フランス）にて開催された OECD Molecular Screening and Toxicogenomics 会議にて、本グループで検討が進んでいる種々の毒性試験における有害性機構（AOP：Adverse Outcome Pathway）の説明を受けた。昨年提案された ICAPO (International Council on Animal Protection) の呼吸器系の感作性 (respiratory sensitization) に関する AOP に関しては私が review を担当することになった。

B-2. OECD skin sensitization expert 会議

平成 26 年 11 月にミラノ（イタリア）にて開催された OECD skin sensitization expert 会議にて、*in vitro* 皮膚感作性試験の組み合わせ IATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment)に関するフォーラムについての議論および事例研究が紹介された。

B-3.免疫毒性に関する試験法ガイドライン

OECD にて検討されている皮膚感作性試験法のガイドラインの進捗を確認した。

C. 結果

C-1. OECD Molecular Screening and Toxicogenomics 会議<sup>1)</sup>

ICAPO から提案された respiratory sensitization の AOP に関しては、資料がまだ準備されておらず、進展がなかった。

日本から事例研究として、鉛の免疫抑制の作成を提案し、了承された。ただ、委員からは金属でなく、化学物質の事例研究を希望する意見もあった。

### C-2. OECD skin sensitization expert 会議

IATA の基本的な枠組みを図 1 に示す。会議では、ガイダンスの構成について議論がなされた。EU の JRC (Joint Research Center) が報告書のフォーマットを更新し、個々の情報源をまとめることになった。予測性評価に適用される仮設モデルの組み込みや定量性の検証のため、多くの委員に宿題が課せられた。事例研究では以下のような試験法の組合せ評価についての例が示された。

- 1) Shiseido の ANN モデル (強度予測)
- 2) Kao の battery, tiered モデル (UN GHS : United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals 分類)
- 3) P&G の Bayesian network モデル (カテゴリー予測)
- 4) Givaudan/RIVM の tiered モデル (陽性/陰性)
- 5) Unilever の数理 QRA モデル (強度予測)
- 6) BASF の多数決モデル (陽性/陰性)
- 7) Dupon の conceptual モデル (UN GHS 分類から強度予測)
- 8) Givaudan の battery モデル (強度予測)
- 9) L'Oreal のモデル (強度予測?)

今後 IATA におけるこれらの事例の位置づけについて議論が行われる予定である。

タ)

証拠の重み付けまたは目的に合った決定基準 (integrated testing strategies : ITS や Sequential Testing Strategies: STS) を適用する

既存情報が不十分な場合、試験を行わないであるいは in vitro のどんな追加情報が必要で、集めるべきかを考察する

証拠の重み付けまたは目的に合った決定基準 (ITS や STS) を適用する

既存情報が不十分な場合、どんな動物実験 (例えば、単群局所リンパ節試験、リンパ節試験 (LLNA) など) の追加情報が必要で、集めるべきかを考察する

最終的な結論 (リスク評価の曝露データなど) をだすまでに、証拠の重み付けまたは目的に合った決定基準 (ITS や STS) を適用する  
 図 1. 皮膚感作性 IATA の一般的な枠組み<sup>2)</sup>

### C-3. 免疫毒性に関する試験法ガイドライン

OECD では皮膚感作性試験のガイドラインとして、ペプチド結合性試験 (DPRA : Direct Peptide Reactivity Assay) , ARE ルシフェラーゼ試験 (ARE-Nrf2 luciferase test method) および h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の 3 試験法が作業計画に載っている。これらの中で、ペプチド結合性試験および ARE ルシフェラーゼ試験が、平成 27 年 2 月 5 日付けで試験法ガイドライン TG442C および TG442D として承認された。また、相場らが開発した IL-8 Luc アッセイのプロジェクト)

問題の明確化 : (行政的な) 必要性、情報/要因の定義 (例 : 有害性の同定、有害性の特徴、曝露の考察など) が求められる既存の制約を満たすことを明らかにする

既存情報の収集および評価する (in vivo, In vitro, QSAR, 読みとり法、化学物質の分類データ)



エクト申請書 (SPSF : Standard Project Submission Form)が平成 26 年 11 月に日本から提出された。

#### D. 考察

皮膚感作性を含む免疫毒性に関しては、OECD において皮膚感作性に関する AOP が開発され、IATA が検討されるなどの種々の取り組みがなされている分野である。本情報を今後の試験法ガイドラインおよび AOP の開発に生かしていきたいと考えている。

#### E. 結論

新たな *in vitro* 免疫毒性評価試験法開発に当たり、検討が進んでいる免疫毒性試験に関する AOP や IATA に関する情報を収集し、国際動向の把握に務めた。

#### F. 引用文献

- 1) SUMMARY REPORT OF THE 7TH MEETING OF THE EXTENDED ADVISORY GROUP ON MOLECULAR SCREENING AND TOXICOGENOMICS (2014)
- 2) Guidance document on the evaluation and application of Intergrated Approaches to testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation (2015)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

- 1) 小島肇夫, 西川秋佳 : 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成 25 年度報告書. AATEX-JaCVAM, 3(2), pp.115-123(2014)
2. 口頭発表
  - 1) 小島 肇: OECD テストガイドラインナショナルコーディネーター会合報告, JEMS/MMS 研究会第 64 回定例会 (2014.6) (熱海, 静岡)
  - 2) Kojima H, Nishikawa A: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Update, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
  - 3) 小島 肇 : Cases of OECD Guideline development by JaCVAM, 11th Annual meeting of KSAAE (2014.11) (清州, 韓国)
  - 4) 小島 肇, 西川秋佳 : JaCVAM の昨今活動とその将来, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)

#### 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

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，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施設内、施設間バリデーション試験に参加、昨年より化合物数を増やし試験法の再現性を評価した。一方、毒性評価発光細胞の維持管理を行うためには人工染色体に導入したレポータ発光遺伝子群が有効であることからIL8とEF-1プロモータを人工染色体ベクター化、THP-1細胞へ導入し安定毒性評価細胞を構築した。併せて本毒性評価細胞に化学物質を加え、化学物質応答性など機能評価を行った。さらにIL8とEF-1プロモータに加えIL1 $\beta$ プロモータを加えた3色発光人工染色体ベクターを構築した。

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<sup>1)</sup>。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- $\gamma$ 、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 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4、IL-1 $\beta$  と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 THP-G8 をモデル細胞として施設内、施設間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。なお、昨年までに Wagner' s の 10 化合物の評価に関して細胞株 2H4 において施設間、施設内再現性は十分に確保されていることが明らかになった。よって、本年度は細胞株 TGCHAC-A4、THP-G8 についての施設内、施設間再現性を検討した。また、MITA 法の精度管理として、人工染色体を用いた安定発光細胞の構築を目指した。

B. 研究方法

B-1) バリデーション試験

東北大学病院で樹立された THP-1 細胞における IL-8 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4、及び IL-1 $\beta$  と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 THP-G8 のバリデーション試験を実施する。具体的な試験法を以下に示す。

1) 細胞株 TGCHAC-A4、THP-G8 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 20141117 Ver. 004J に準ずる。

2) 試験化学物質としてはリポポリサッカリド (LPS)、デキサメサゾン (DEX)、サイクロスポリン A (CyA)、臭素酸ナトリウム、硫酸化ニッケル、ジブチルフタル酸、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT) とし、発光測定装置はトー社製 Pherios を用いた。

#### B-2) 人工染色体を用いた安定毒性評価発光細胞の機能解析

昨年度作成した IL-8 プロモータ (約 5.0 kb) + 橙色発光ルシフェラーゼ (SLO) 遺伝子、EF-1 プロモータ (コントロール) + 赤色発光ルシフェラーゼ (SLR) 遺伝子 (hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR) としたベクターを構築、これを人工染色体ベクターに挿入、THP-1 細胞へ導入し安定毒性評価細胞を構築する。本細胞の評価として LPS や LPS に対する Dex 及び BAY11-7082 の抑制効果を検討した。

#### B-3) 3色発光レポータ発現用 PAC ベクター

##### pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3 の構築

1) 人工合成遺伝子 pIDTS-MCS を XbaI 処理し、NheI/SpeI 処理して切り出した遺伝子発現安定化配列を導入し、pIDTS-MCS-ins を構築した。pIDTS-MCS-ins を KpnI/XhoI 処理し、KpnI/SalI 処理で切り出した B-2) で作成した 2 遺伝子レポーターカセット (hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR) を導入する。

2) 上記で作成した PAC ベクターを ClaI/Avr II 処理し、pIDTS-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2 から ClaI/Avr II 処理で切り出した CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2 フラグメントを導入し、pPAC-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2 を構築する。緑色発光ルシフェラーゼ (SLG) 遺伝子及び遺伝子発現安定化配列を有するベクターに、PCR で増幅した IL1 $\beta$  プロモータ領域 (約 5 kb) を In-Fusion 反応で導入し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1 $\beta$ -SLG-ins2 を構築する。

3) pPAC-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2

を AscI/SalI 処理し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1 $\beta$ -SLG-ins2 から AscI/SalI 処理で切り出した PhiC31-attB-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3 を導入、3 色発光レポータ発現用 PAC ベクター pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3 を構築する。

(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) 施設内・施設間バリデーション試験

昨年までに Jurkat 細胞由来株 2H4、THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、THP-G8 を用いた化学物質の免疫毒性試験法を Wagner' s の 14 化合物に関して施設内再現性として 3 回の繰り返し試験を実施、Jurkat 細胞由来株 2H4 に関しては施設内、施設間に高い再現性を有することを明らかにした。しかしながら、THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、THP-G8 に関しては施設内再現性が十分でなかったことから、本年度は、3 つの化合物リポポリサッカリド (LPS)、デキサメサゾン (DEX)、サイクロスポリン A (CyA) において、細胞の応答性の検証を、4 つの化合物 (臭素酸ナトリウム、硫酸化ニッケル、ジブチルフタル酸、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT) について施設内再現性、施設間再現性を検証した。

1) 図 1 は THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、THP-G8 における LPS、DXE、CyA 刺激に対する細胞応答性を示したものである。LPS によって IL-8、IL-1 $\beta$  の発現量が誘導されることが、また、LPS の発現誘導の効果が DXE、CyA 刺激に抑制されることが示され、従来の結果を再現できることが明らかになった。図 2 は 4 つの化合物に対する細胞応答性を示したものである。臭素酸ナトリウムでは IL-1 $\beta$  で 3 つの結果が一致、IL-8 では傾向は同様であるが 2 つで結果が一致した。硫酸化ニッケル、ジブチルフタル酸 2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT) はともに高い一致を示した。これによって THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、

THP-G8が施設内で高い再現性を示す評価細胞である点が明らかになった。東北大病院がリードラボとして施設間再現性について検討している。

### C-2) 人工染色体を用いた安定毒性評価発光細胞の機能解析

昨年度に構築したphIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR2ベクターを人工染色体に挿入し、それをCHO細胞に導入後、核接合法によりTHP-1細胞由来株THPE8-1を樹立した(図3)。樹立された人工染色体を用いた安定毒性評価細胞の特性を調べるため、LPS刺激による応答性を検証した。その結果、図4にあるようにLPSの濃度依存的にIL-8の活性が増加し、1ng/mlレベルで、これまで報告された程度の活性費となることが明らかになった。また、本細胞ではLPS刺激に対するDEX及びBAY11-7082のIL-8遺伝子発現の抑制効果を検証できることが明らかになった(図5)

### C-3) 3色発光レポーター発現用PACベクター

#### pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3の構築

1) 人工合成遺伝子pIDTS-MCSをXbaI処理し、NheI/SpeI処理して切り出した遺伝子発現

安定化配列を導入し、pIDTS-MCS-insを構築した。pIDTS-MCS-insをKpnI/XhoI処理し、KpnI/SalI処理で切り出した。昨年度作成した2遺伝子レポーターカセット(hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR)に導入した。

2) 上記で作成したPACベクターをClaI/Avr II処理し、pIDTS-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2からClaI/Avr II処理で切り出したCMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2フラグメントを導入し、pPAC-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2を構築した。緑色発光ルシフェラーゼ(SLG)遺伝子及び遺伝子発現安定化配列を有するベクターに、PCRで増幅したIL1 $\beta$ プロモータ領域(約5kb)をIn-Fusion反応で導入し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1 $\beta$ -SLG-ins2を構築した。

3) pPAC-CMV-loxP-hIL8-SLO-hEF1-SLR-ins2をAscI/SalI処理し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1 $\beta$ -SLG-ins2からAscI/SalI処理で切り出したPhiC31-attB-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-insを導入、図6に示される3色発光レポーター発現用PACベクターpPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3を構築、遺伝子配列を確認した。次年度以降人工染色体に導入し安定発光細胞の構築を行う。

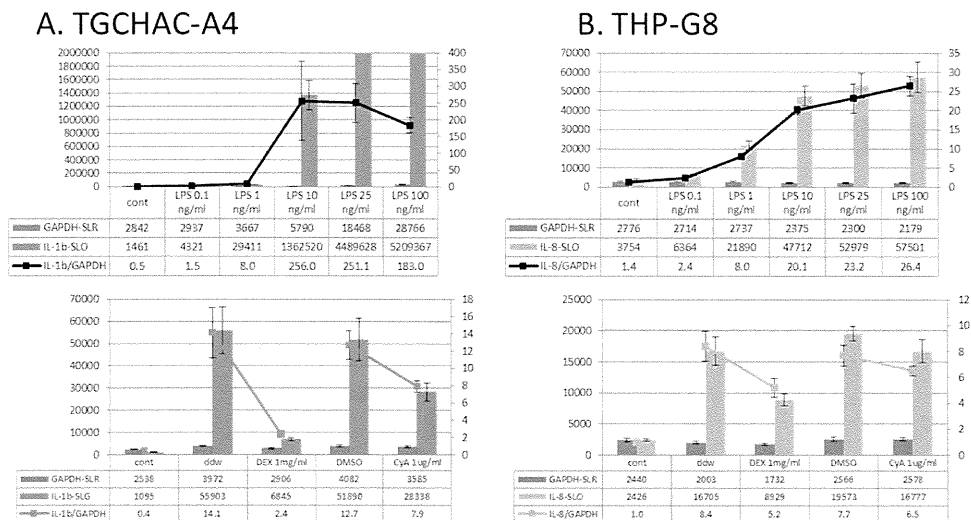
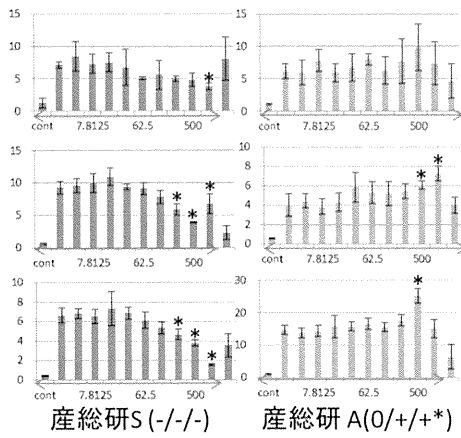
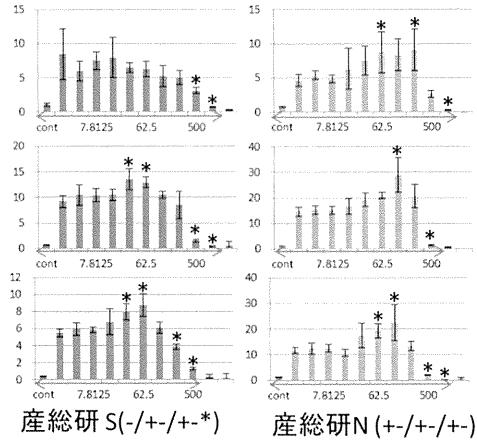


図1 THP-1細胞由来株TGCHAC-A4(A)、THP-G8(B)におけるLPS、DEX、CyA刺激に対する細胞応答性

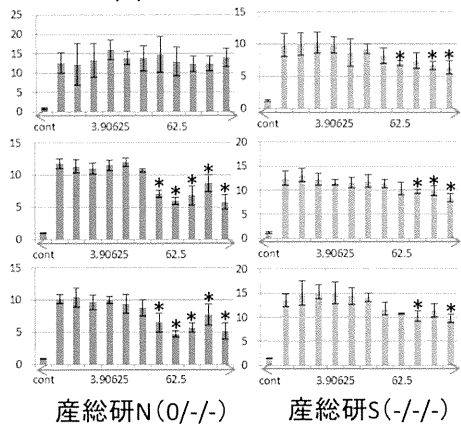
A. Sodium bromate



B. NiSO<sub>4</sub>



C. Dibutyl phthalate



D. 2-MBT

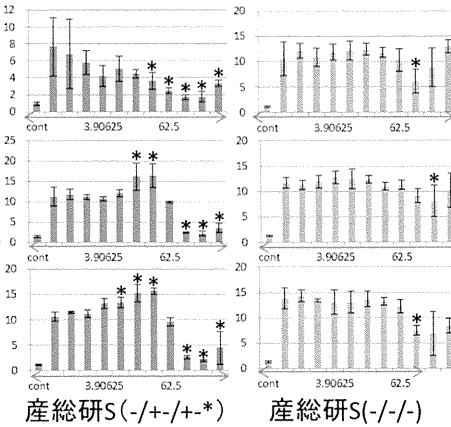


図2 THP-1細胞由来株TGCHAC-A4、THP-G8における臭素酸ナトリウム(A)、硫酸化ニッケル(B)、ジブチルフタール酸(C)、2-メルカプトベンゾチアゾール(2-MBT)(D)刺激に対する細胞応答性。緑色のバーがIL-1 $\beta$ 、黄色のバーがIL-8を示す。

ヒト人工染色体ベクター

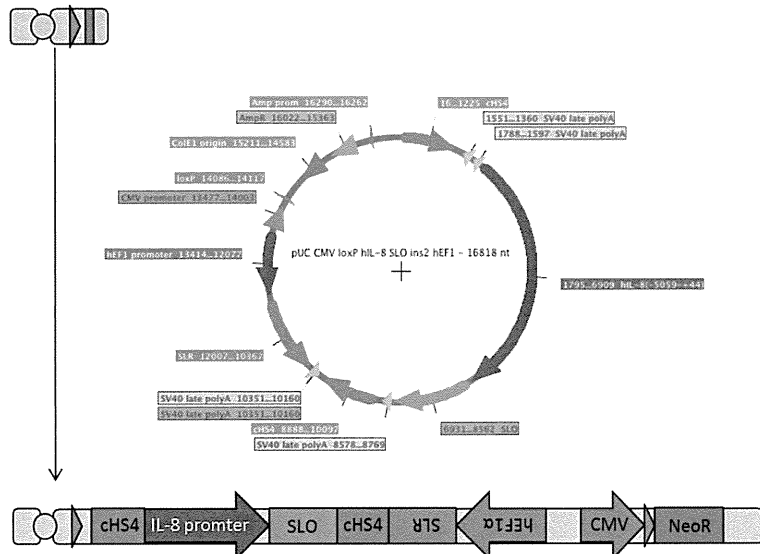


図3 hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLRの人工染色体ベクターの遺伝子マップ

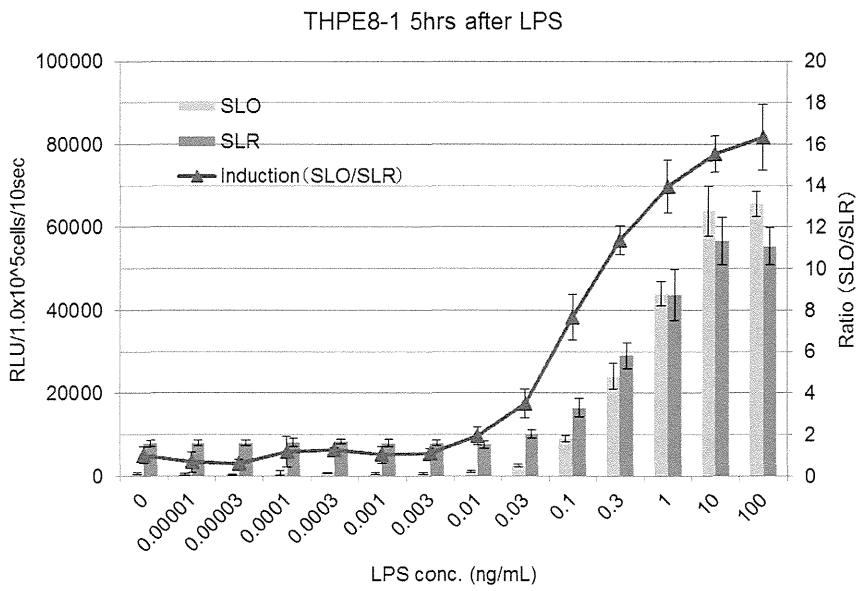


図 4 hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR 人工染色体導入安定毒性評価細胞の LPS 刺激に対する IL-8 活性の変動

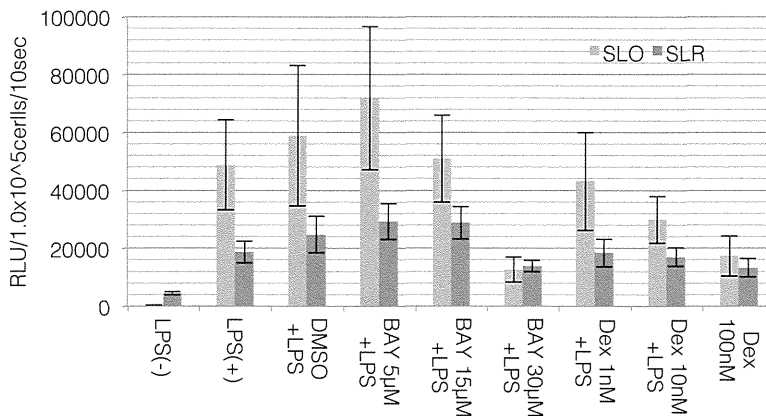


図 5 hIL8 promoter-SLO/hEF1 $\alpha$ -SLR 人工染色体導入安定毒性評価細胞の LPS 刺激に対する DEX 及び BAY11-7082 の IL-8 遺伝子発現の抑制効果

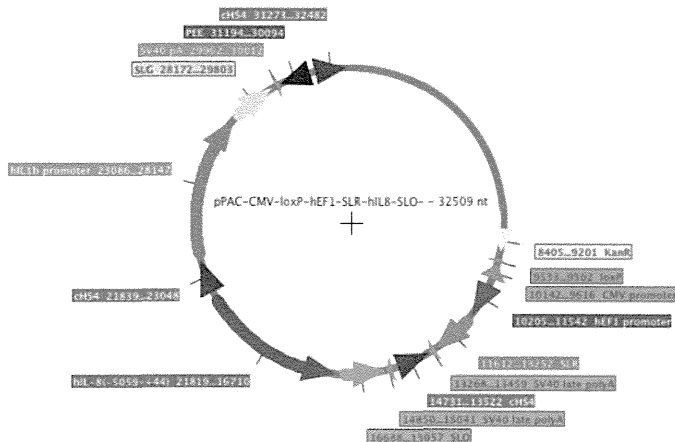


図 6 3色発光遺伝子 pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 $\beta$ -SLG-PEE-ins3 の遺伝子マップ

#### D. 考察

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法開発に当たり、施設内、施設間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。昨年度、東北大学病院で樹立されたJurkat細胞由来株2H4の検証が完了したことから本年度は検証が不十分な結果となったTHP-1細胞由来株TGCHAC-A4、THP-G8についての施設内再現性を検討した。4つの化合物で検証したところ、概ね良好な施設内再現性を示すことが明らかとなった。

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。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人工染色体コントロール発光細胞を構築することを計画、昨年度に構築したpIL8 promoter-SLO/ hEF1 $\alpha$ -SLR2ベクターを人工染色体に挿入し、それをCHO細胞に導入後、THP-1細胞由来株THPE8-1を樹立した。LPSやLPSに対する阻害剤の効果を検証することで、これまで構築した細胞と同様の毒性評価可能な細胞であることが明らかとなった。現在、コントロール発光細胞として有効か、長期培養などによる効果を検証中である。一方、IL-8と同時にIL-1 $\beta$ の遺伝子発現を同時に検証可能な3色発光細胞の樹立に向けたPACベクターの構築に成功した。今後、人工染色体に導入、安定細胞株を樹立する予定である。

#### 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施設内、施設

間再現性の評価を終了した。一方、MITA法の精度管理のため人工染色体に導入したコントロール発光細胞の開発に成功した。

#### 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) Kwon HJ, Kurono S, Kaneko Y, Ohmiya Y, Yasuda K: Analysis of proteins showing differential changes during ATP oscillations in chondrogenesis. *Cell Biochem Funct.* 2014, 32(5):429-37
- 2) Yasunaga M, Nakajima Y, Ohmiya Y: Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution. *Anal Bioanal Chem.* 2014, 406; 5735-5742
- 3) Yasunaga M, Murotomi K, Abe H, Yamazaki T, Nishii S, Ohbayashi T, Oshimura M, Noguchi T, Ohmiya Y, Nakajima Y, : Highly sensitive luciferase assay using a potent destabilization sequence of calpain 3.

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

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

Multi-ImmunoTox assay (MITA) による免疫毒性評価法のバリデーション試験を実施するにあたり、良好な技術移転性、施設内再現性および施設間再現性が確認されたが、我々の結果に特異な反応を示す傾向が認められたことから、その原因を検討するとともに7物質について再試験を行った。また、ヒト人工染色体ベクター (HAC) を用いて新たに樹立されたIL-1 $\beta$  レポーター細胞 (TGCHAC-A4細胞) の技術移転性の検討実験を行い、良好な結果が得られた。

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。施設内および施設間再現性を調べる目的で昨年度実施した 10 物質の結果を検討したところ、強い毒性 (G3PDH の低発現) を示す濃度範囲以外で濃度依存性を逸脱するような結果が散見され。そこで、H26 年度は、その原因を検討し、7 物質について再試験を行った。また、THP-G1 $\beta$  細胞の問題点を解決するためにヒト人工染色体ベクターに IL-1 $\beta$  レポーター遺伝子を導入した TGCHAC-A4 細胞の技術移転性の確認を行った。

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 $\beta$ , G3PDHの各プロモーター領域に繋いだベクター（それぞれ緑、赤色）をTHP-1細胞に導入した安定細胞株THP-G1 $\beta$  (#149-14)、および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を使用した。このうち、THP-G1 $\beta$ の内標であるG3PDHが機能していないことから、THP-G8を同条件で処理して得られたG3PDHの結果を、THP-G1 $\beta$ の内標の代用とした。また、新たに開発したTHP-G1 $\beta$ としてTGCHAC-A4を用いた。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

昨年実施した10物質のうち、以下の7物質について再試験を行った。

- ① Dapsone
- ② Acetaminophen
- ③ Ethanol
- ④ Sodium bromate
- ⑤ 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Nitrofurazone)
- ⑥ Aluminium(III) chloride hexahydrate
- ⑦ 4-Nitroanilin(p-Nitroanilin)



TGCHAC-A4細胞の技術移転性については、以下の7物質を用いた。

- ① Lipopolysaccharides from *E. coli* 026:B6 (LPS)
- ② Dexamethasone (DEX)
- ③ Cyclosporin A (CyA)
- ④ Sodium bromate
- ⑤ Nickel sulfate
- ⑥ Dibutyl phthalate
- ⑦ 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)

### B-3) 実験方法

基本的には、Multi-Immuno Tox Assay バリレーションプロトコール平成24年11月13日 ver. 001.1準じて実験を行った。概要としては、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 (THP-G1β細胞、THP-G8細胞) による活性化処理を行い、6時間後に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、各色ルシフェラーゼ活性をPherios (アトー社製) で測定し、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) H25年度実施した7物質の再試験

昨年実施した10物質の結果では、図2の代表例 (Ethanol および 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone) で示したように、一部の濃度で値が上下する特異な反応性が散見された。その原因として、不活化剤添加時に使用している8連のマイクロピペットによる連続分注の影響が考えられたことから、同じプレートで8連マイ

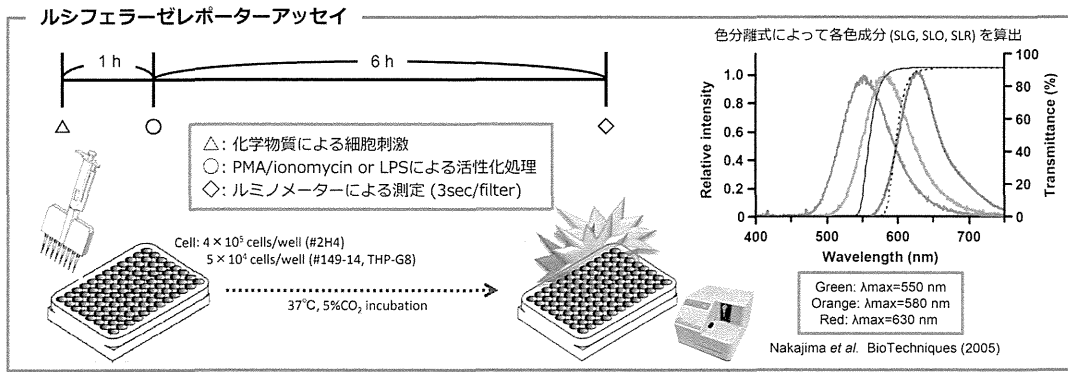
クロピペットを用いて、上半分は細胞賦活化試薬を連続して10 μLずつ分注・添加し、下半分は細胞賦活化試薬を1回毎に10 μLを吸引、分注により添加し、その反応性を比較した。その結果、単独分注した場合には異常な低下は認められなかったが、連続分注した場合、分注回数が増えると値が低下する傾向が再現された (図3)。

細胞賦活化剤の添加方法を単独添加に変更し、H25年度に実施した7物質について再試験を実施した。1物質につき3回の繰り返し実験を同日以外で実施した結果を図4、5に示した。4種類のレポーター遺伝子について、3回の繰り返し実験を行ったが、7物質すべてほぼ同様の反応性を示し、施設内再現性は良好であった。施設間再現性については、東北大で確認した。

### C-2) TGCHAC-A4の技術移転性

ヒト人工染色体ベクターにIL-1βレポーター遺伝子を導入したTGCHAC-A4細胞のLPSに対する反応性をTHP-G8細胞のそれと同時に確認した。その結果、両細胞ともに綺麗な濃度依存性を示した (図6)。さらに、DexとCyAの影響を検討したところ、Dexによる顕著な抑制とCyAによる軽度の抑制が認められ、良好な反応性が確認された (図7)。

そこで、さらに4物質 (Sodium bromate、Nickel sulfate、Dibutyl phthalate、2-MBT) について、3回の繰り返し実験を行った。その結果、4物質すべて類似の用量反応性を示し、良好な施設内再現性は良好であった。施設間再現性については、東北大で確認した。



プレートデザイン (96-well)

cont	被験物質A の溶媒 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 の溶媒 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 MITAの試験法概要

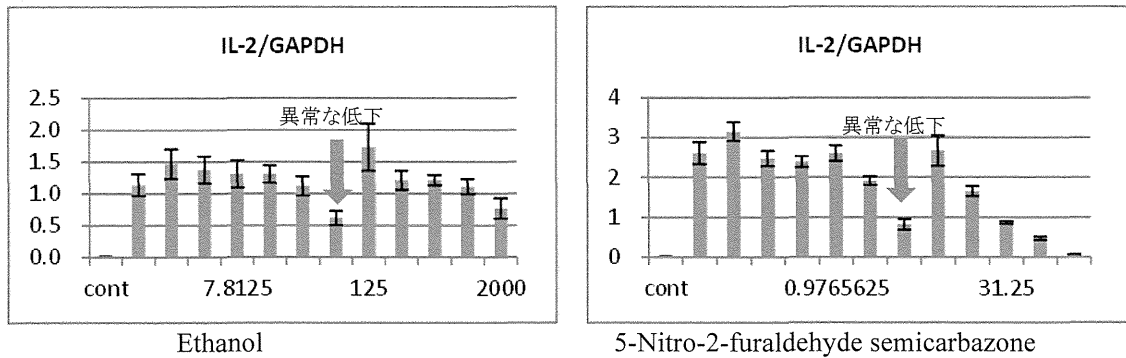
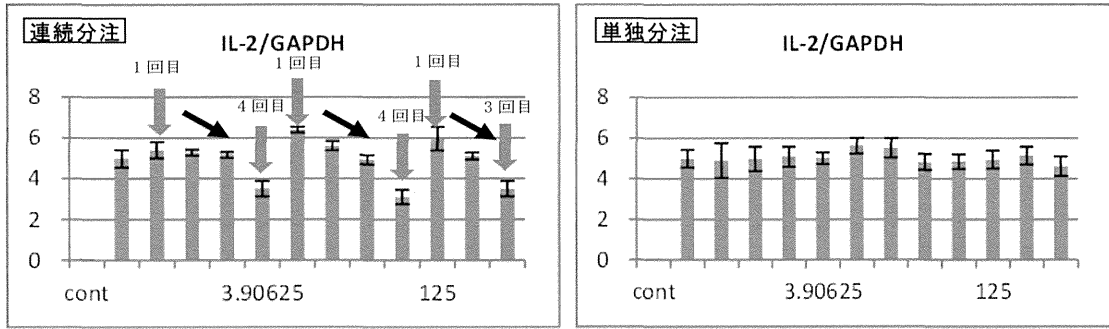


図2 MITAにおける濃度に依存しない反応性の例

A) Ethanol



B) 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone

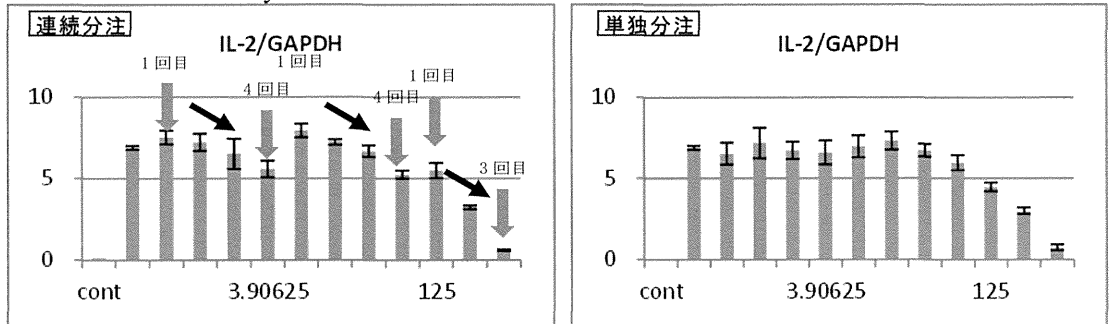


図3 細胞賦活化剤の添加方法（連続分注と単独分注）の検討結果

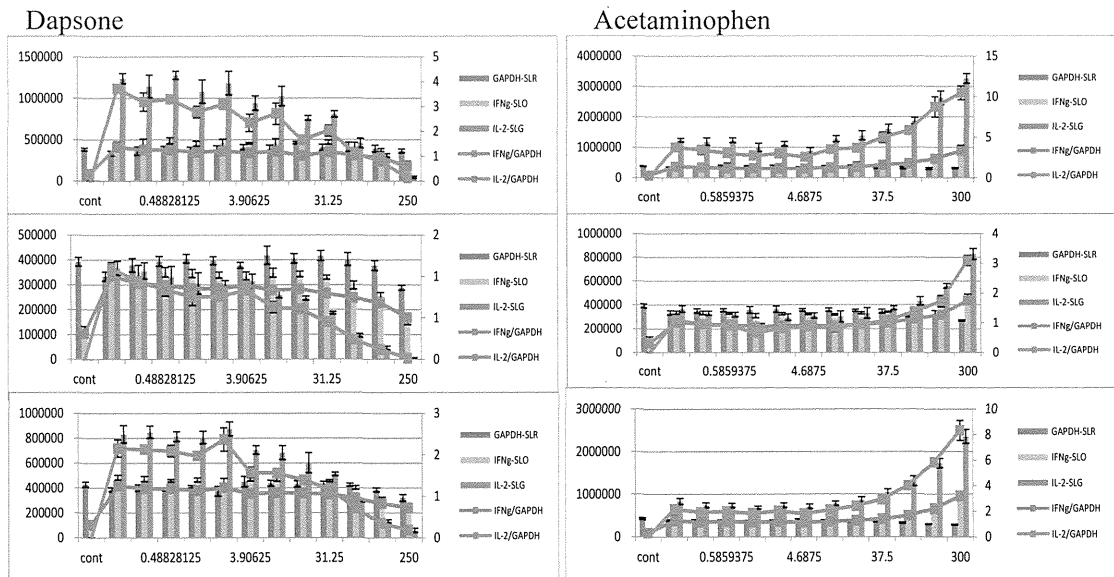
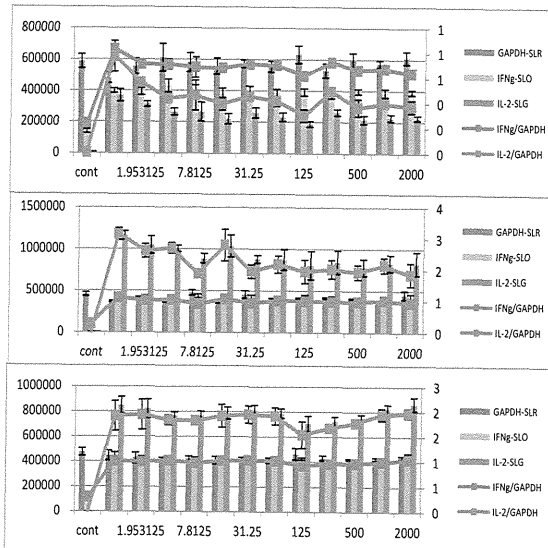
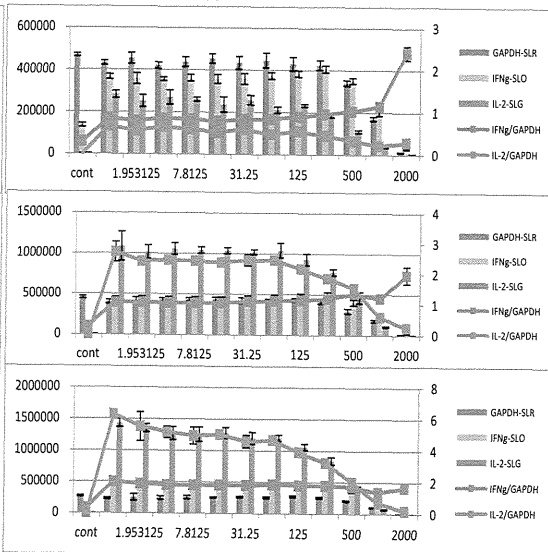


図4 #2H4細胞（IL-2およびIFN- $\gamma$ ）を用いた7物質の施設内再現性

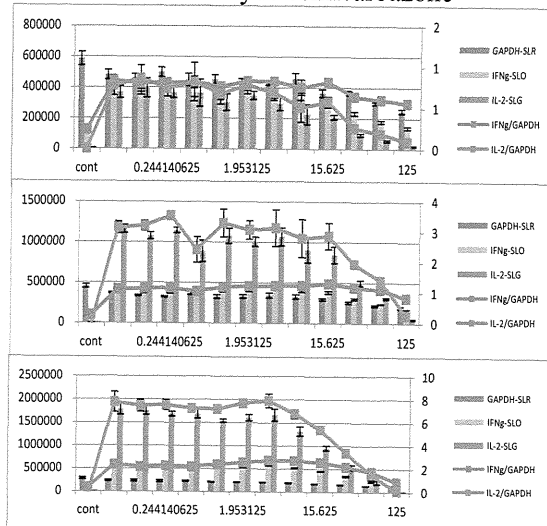
### Ethanol



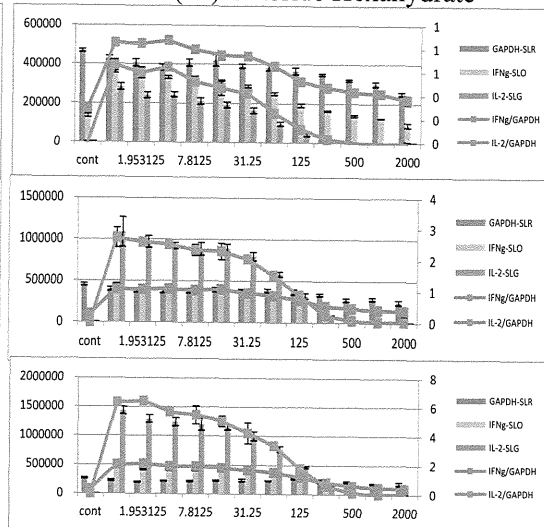
### Sodium bromate



### 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone



### Aluminium(III) Chloride Hexahydrate



### 4-Nitroaniline

