

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 (NaBrO_3), Nickel (II) sulfate (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 CoCl_2 , 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

資料 2.

Data sheet for MITA Ver.006 20150109

①Data 入力シート

MultiReporter Assay System - Tissue™ - Calculation Sheet

For TGCHAC-A4

Transmittance Data

SLG	SLR	#VALUE!	#VALUE!
T1		#VALUE!	#VALUE!
T2			

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												

For THP-G8

Transmittance Data

SLO	SLR	#VALUE!	#VALUE!
T1		#VALUE!	#VALUE!
T2			

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												

②Result Format 2 シート

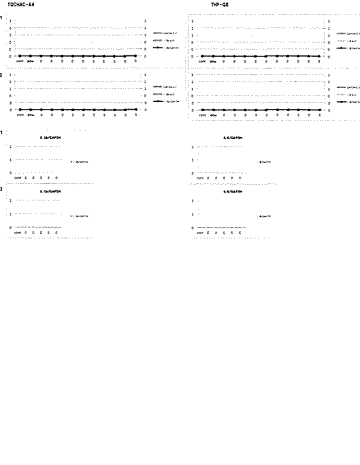
MultiReporter Assay System - Tissue™ - Calculation Sheet

For TGCHAC-A4

Filter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41												
42												
43												
44												
45												
46												
47												
48												
49												
50												

For THP-G8

Filter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41												
42												
43												
44												
45												
46												
47												
48												
49												
50												



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
総合分担研究報告書

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 Molecular Screening and Toxicogenomics 会議

平成 25 年 5 月、平成 26 年 6 月にいずれもパリ（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。ICAPO（International Council on Animal Protection）から提案のあった呼吸器系の感作性（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 2 月にパリ、同年 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)に関するフォーマットについての議論および事例研究が紹介された。

B-3. 39th ESAC (EURL ECVAM Scientific Advisory Committee) 会議

平成 26 年 3 月にイスプラ(イタリア)にて開催された ESAC 会議にて、議題の一つである *in vitro* 皮膚感作性試験 h-CLAT(human Cell Line Activation Test)に関する議論に参加した。

B-4.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¹⁾

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

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。

C-3. 39th ESAC 会議

ESAC 会議において、h-CLAT の第三者評価における二つの大きな問題点について議論された。

第一に、4 施設が 15 物質を用いて 3 回実験を行った結果をもとに検討された施設間再現性である。バリデーション報告書によると 4 施設の内、3 施設が目標値である 85% に達せず、この方法の再現性に疑念が持たれた。本会議の中で、15 物質中 4 物質は予測性が悪いと言われている難水溶性物質を含んでおり、陰性を示す 2 物質を除いて解析すると平均の施設内再現性が 85% となると私から説明した。この解釈から、施設内再現性の悪さを補うものではないが、適用限界を明確にすることで本件を解決できる可能性を示唆した。

次に、予測性について議論された。バリデーションで用いられた 24 物質 (54 データ/施設: 施設内再現性結果も含めるため) を UN GHS の 3 分類に分けて解析すると予測性は 58% と低かった。しかし、100 物質を用いた文献値では 72% と報告されている。この差が何に起因するか資料をもとに私から説明した。主に、被験物質のバランスの相違 (文献では GHS 分類 1A:1B:表示なしが約 1:1.5:1 であるが、バリデーションでは 1:1:1 の物質) および難水溶性物質が文献では 4 物質 (4%) しかなかったが、バリデーションでは 4 物質 (施設内再現性の検討に使われていたため、データ数としては 12 : 22%) もあったことによると説明し、参加者の合意を得た。今後、難水溶性物質を適用限界として定め、本試験の評価が報告書にまとめられることになった。

C-4. 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) , 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
- 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) 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 24 年度報告書. AATEX-JaCVAM, 3(1), pp.46-53(2014)

- 3) Kojima H.: Update from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). Altern Lab Anim. 2013;41(6):435-41.
- 4) 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
- 5) 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-JaCVAM, 1(1), pp.88-103(2012)

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
なし

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
総合分担研究報告書

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、試験法の再現性を評価、試験法の最適化に貢献した。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、人工染色体を用いたMITA法を構築することを目的に、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 β 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。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、施設内、施設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 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4、IL-1 β 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。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) 施設内バリデーション試験

東北大学病院で樹立された INF- γ 、IL-2、G3PDH プロモータ活性を同時に測定可能な Jurkat 細胞由来株 2H4、IL-8 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、及び IL-1 β と G3PDH プロモータ活性を定量化できる THP-1 細胞由来株 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 2H4 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) 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。

3) 試験化学物質としてはリポポリサッカライド(LPS)、デキサメサゾン (DEX)、サイクロスポリンA(CyA)を3つの細胞株すべてで実施、応答性を確認する。細胞株2H4では塩化コバルト、硫酸化ニッケル、イソホロンジイソシアネート (IPDI)、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT)を用いて、細胞株TGCHAC-A4、THP-G8では臭素酸ナトリウム、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)を用いて再現性を評価した。すべての実験では発光測定装置はアトー社製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及びその活用を検討した。

B-3) 人工染色体を用いた安定毒性評価発光細胞の構築と機能解析

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。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, 500µg/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。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。

4) 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-4) 3色発光レポーター発現用PACベクター

pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1β-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/hEF1α-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IL1βプロモータ領域(約5kb)をIn-Fusion反応で導入し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1β-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-hIL1b-SLG-ins2からAscI/SalI処理で切り出したPhiC31-attB-hIL1b-SLG-PEE-insを導入、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-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) 施設内バリデーション試験

東北大学病院で樹立されたINF-γ, IL-2, G3PDHプロモータ活性を同時に測定可能なJurkat細胞由来株2H4、IL-8とG3PDHプロモ

ータ活性を定量化できるTHP-1細胞由来株TGCHAC-A4、及びIL-1 β とG3PDHプロモータ活性を定量化できるTHP-1細胞由来株THP-G8による免疫毒性評価試験法を始めはプレバリデーション試験によって技術移転を確認、その後複数の化合物に関して施設内再現性を評価した。

1) Jurkat細胞由来株2H4を用いた免疫毒性評価法のプレバリデーションとして、DEX及びCyAによるIL-2及びINF γ のプロモータ活性の変動を確認した(図1、2)。当初、リードラボである東北大学病院の結果を再現できなかった。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の結果が得られている。さらに数回実験を繰り返した結果、東北大学病院と発光量を含めて同様な結果が得られた。これによって試験法の技術移転は十分であると判断した。

2) Jurkat細胞由来株2H4を用いた免疫毒性評価法の施設内再現性を塩化コバルト、硫酸化ニッケル、イソホロンジイソシアネート(IPDI)、2-メルカプトベンゾチアゾール(2-MBT)により検討した(図3、4)。4つの化合物で3回の繰り返し実験では、同じ傾向を示し高い施設内再現性を示すことが明らかになった。

3) 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、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を検証した。図5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 β 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6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 β で3つの結果が一致、IL-8では傾向は同様であるものの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。東北大学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) 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7にあるような3色のLEDを用いた発光プレートをアトー社と試作した。多色発光標準プレートは赤、緑、青色の発光を絶対フォトン数で直線的に光を発することからルミノメーターの精度管理が可能になる。施設内、施設間再現性を確保する上で有効である。

C-3) 人工染色体を用いた安定毒性評価発光細胞の機能解析

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を作製、評価を実施した。

1) 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9)。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9)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9)し、pMGP4 Neo hIL-8 SLO #20を得た。

2) 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

オン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10)、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。

3) 同様な方法で、phIL8 promoter-SLOにhEF1 α -SLR2を挿入したベクターを構築、人工染色体に移し替え、それをCHO細胞に導入後、核接合によりTHP-1細胞由来株THPE8-1を樹立した (図11)。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12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結果と同レベルの活性に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13)。現在、継代培養による活性の変動を確認し細胞の安定性を検証中である。

C-4) 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 β -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 α -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 β プロモータ領域 (約5kb) をIn-Fusion反応で導入し、pIDTS-PhiC31-attB-Hyg-WPEE-hIL1 β -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 β -SLG-ins2からAscI/SalI処理で切り出したPhiC31-attB-hIL1 β -SLG-PEE-insを導入、図14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 β -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。

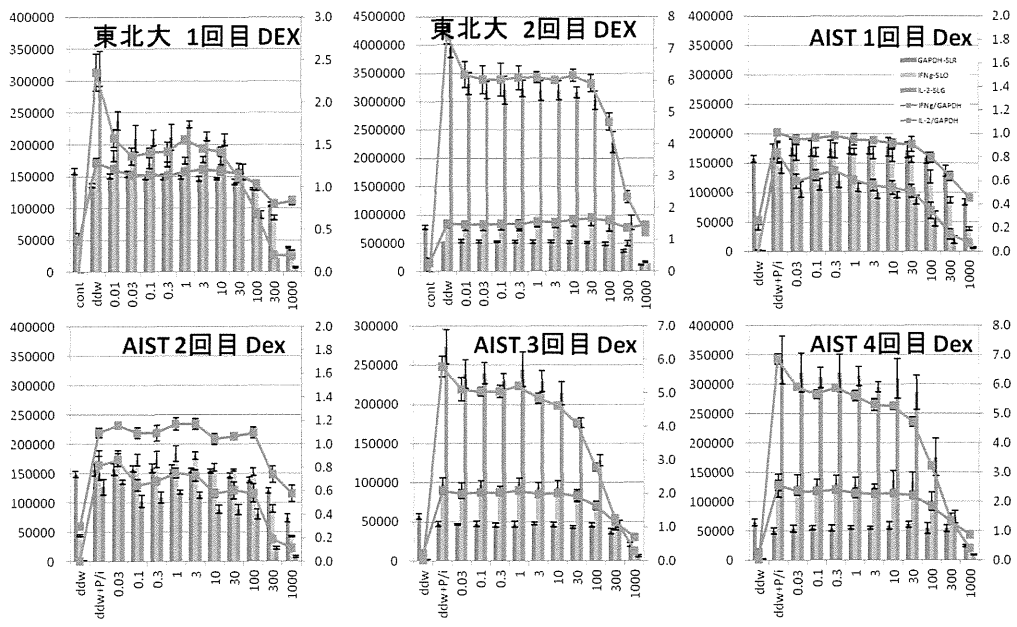


図1 Jurkat 細胞由来株 2H4 におけるデキサメサゾン刺激に対する細胞応答性。INF- γ (橙色), IL-2 (緑色), G3PDH(赤色)のパープロモータ活性を示す。

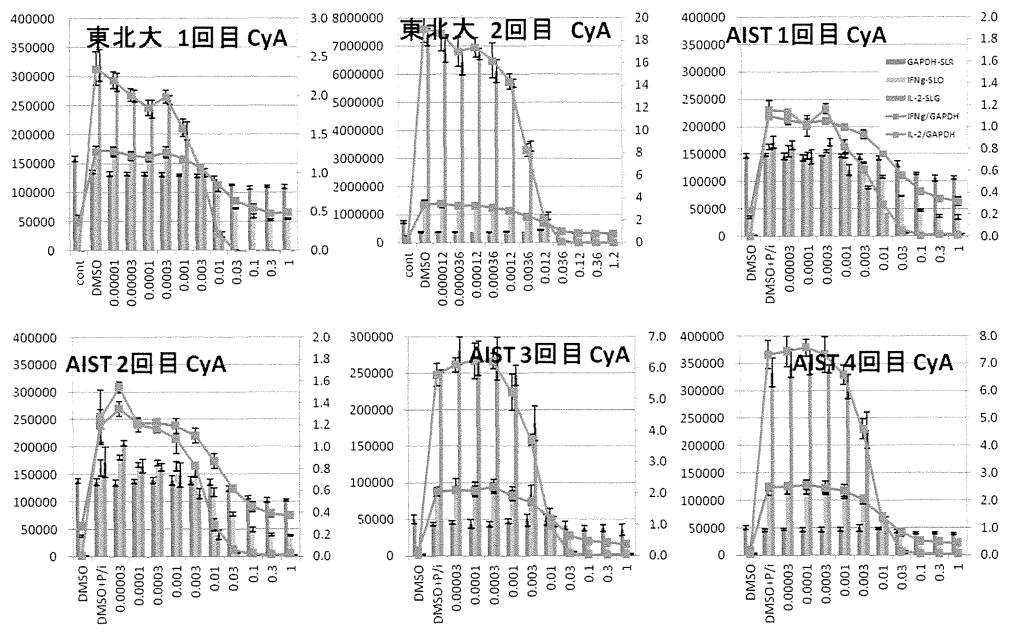


図2 Jurkat 細胞由来株 2H4 における CyA 刺激に対する細胞応答性。INF- γ (橙色), IL-2 (緑色), G3PDH(赤色)のパープロモータ活性を示す。

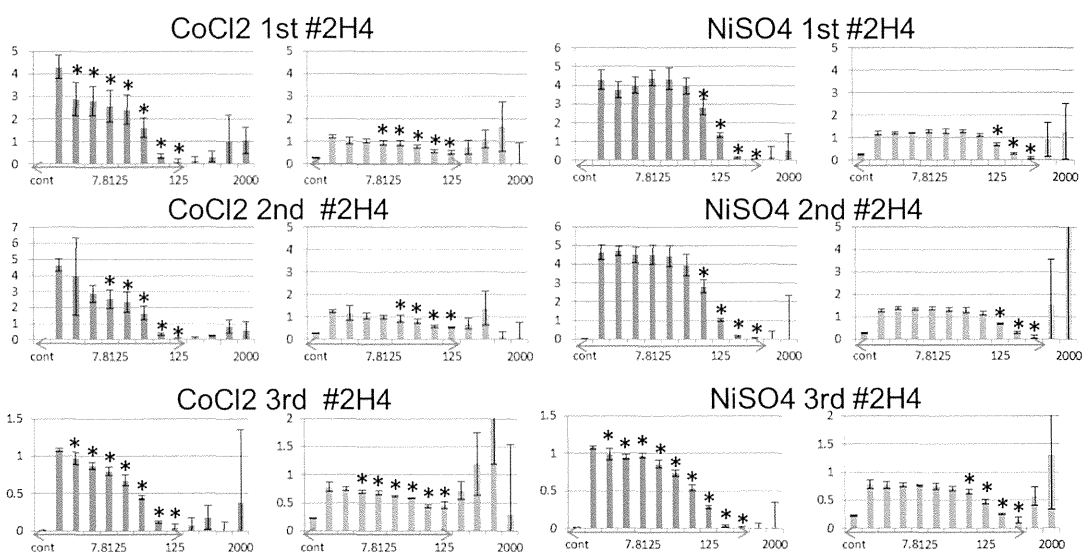


図3 Jurkat細胞由来株2H4における塩化コバルト、硫酸化ニッケルに対する細胞応答性。G3PDHのプロモータ活性でノーマライズしたIL-2（緑色）、INF- γ （橙色）プロモータ活を示す。

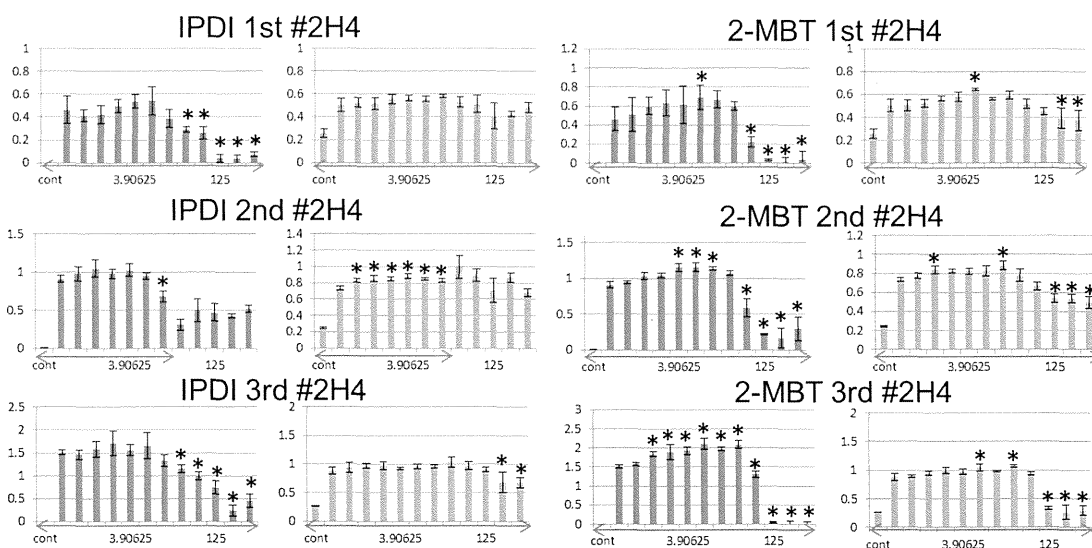


図4 Jurkat細胞由来株2H4におけるIPDI、2-MBTに対する細胞応答性。G3PDHのプロモータ活性でノーマライズしたIL-2（緑色）、INF- γ （橙色）プロモータ活性を示す。

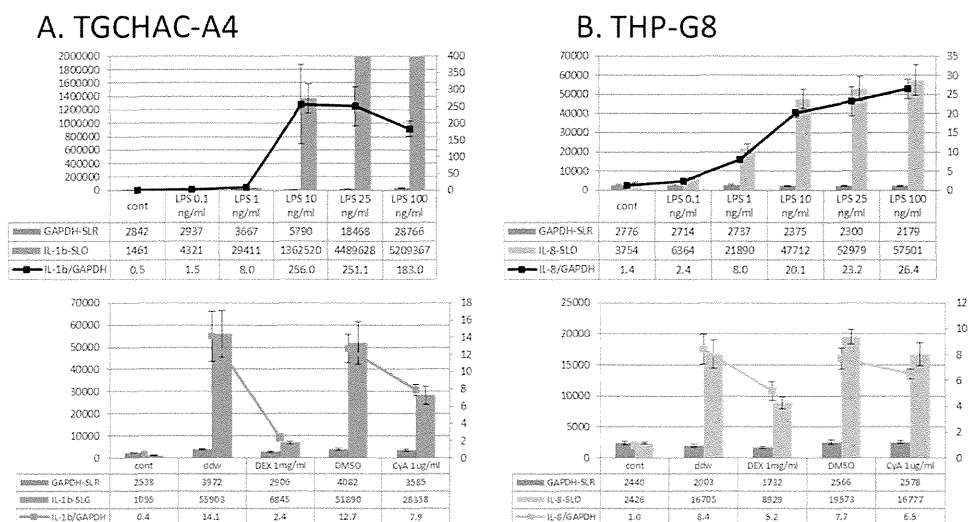


図5 THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4 (A)、THP-G8 (B) における LPS、DEX、CyA 刺激に対する細胞応答性

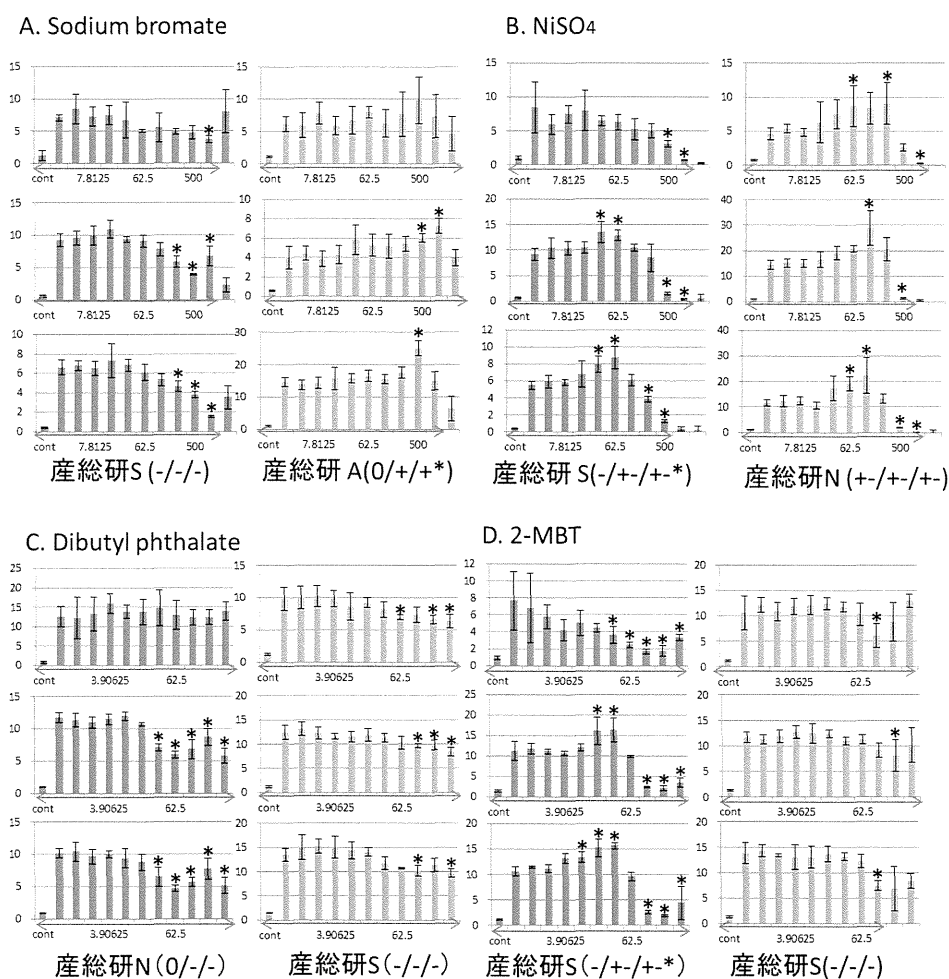


図6 THP-1 細胞由来株 TGCHAC-A4、THP-G8 における臭素酸ナトリウム (A)、硫酸化ニッケル (B)、ジブチルフタル酸 (C)、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT) (D) 刺激に対する細胞応答性。緑色のバーが IL-1 β 、黄色のバーが IL-8 を示す。

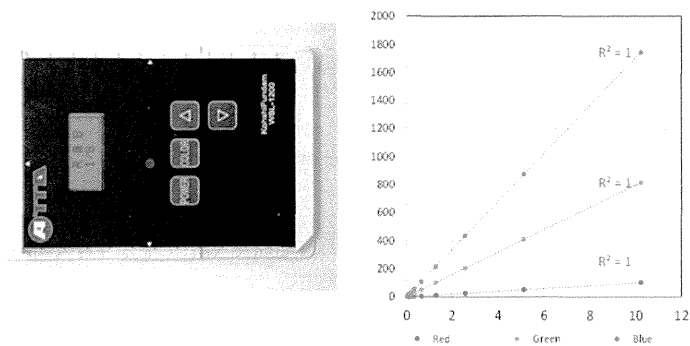


図7 3色標準発光プレート試作機及び3色発光の直線性

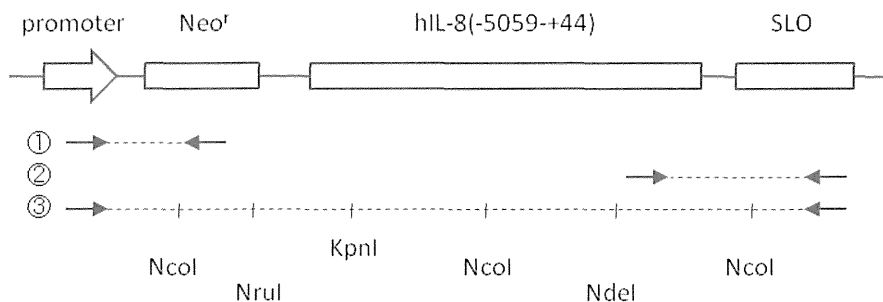


図8 phIL-8 SLO の遺伝子マップ

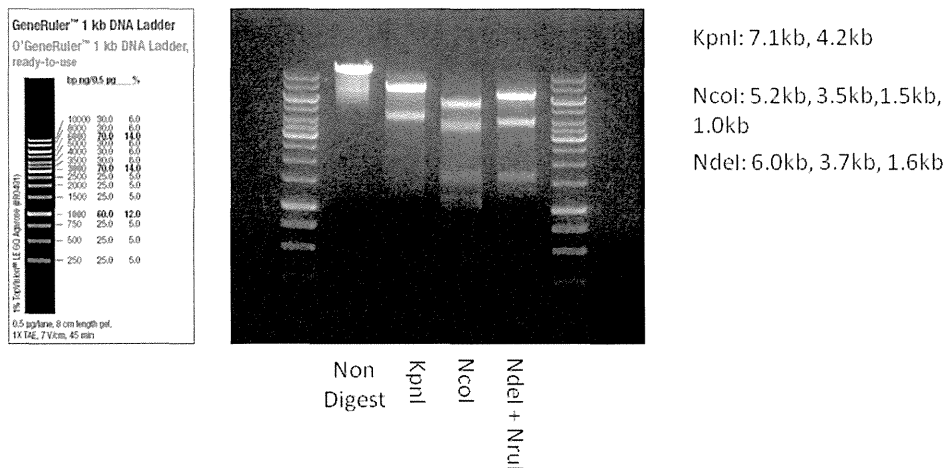


図9 phIL-8 SLO の遺伝子の制限酵素切断によるフラグメント解析

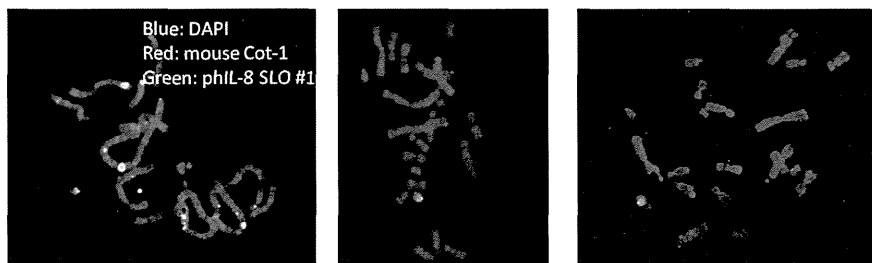


図10 hIL-8 モニターカセット搭載人工染色体ベクターを保持する CHO 細胞の FISH 解析

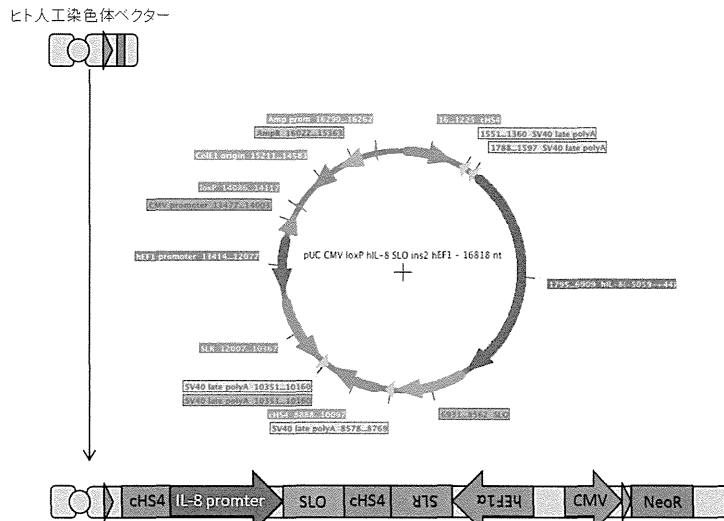


図 1 1 hIL8 promoter-SLO/hEF1 α -SLR の人工染色体ベクターの遺伝子マップ

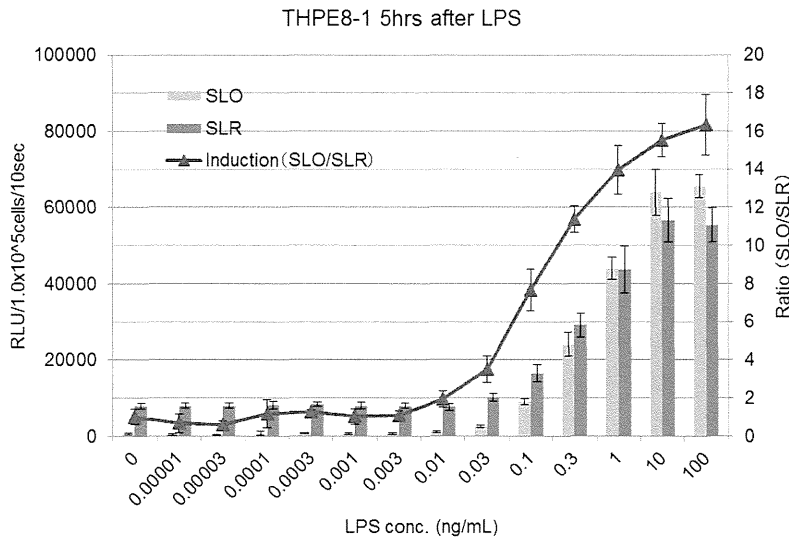


図 1 2 hIL8 promoter-SLO/hEF1 α -SLR 人工染色体導入安定毒性評価細胞の LPS 刺激に対する IL-8 活性の変動

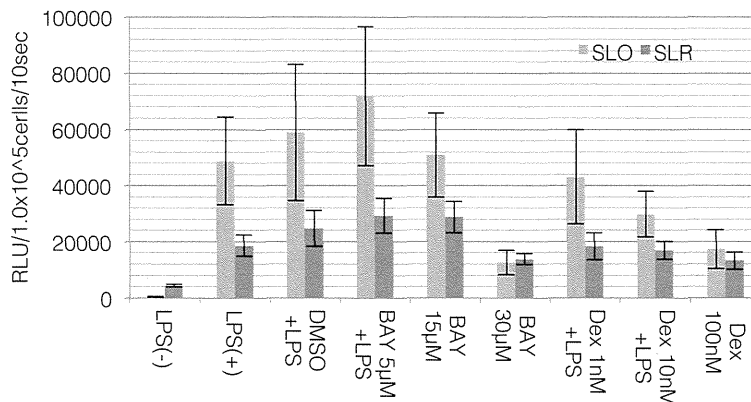


図 1 3 hIL8 promoter-SLO/hEF1 α -SLR 人工染色体導入安定毒性評価細胞の LPS 刺激に対する DEX 及び BAY11-7082 の IL-8 遺伝子発現の抑制効果

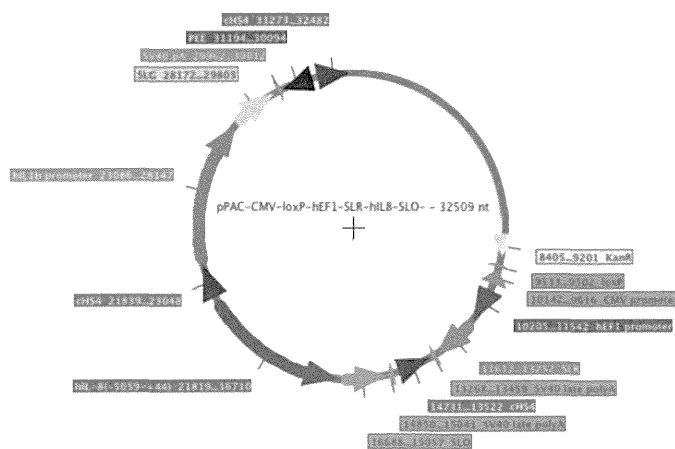


図 1 4 3 色発光遺伝子 pPAC-CMV-loxP-hEF1-SLR-hIL8-SLO-hIL1 β -SLG-PEE-ins3 の遺伝子マップ

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。東北大学病院で樹立された Jurkat 細胞由来株 2H4、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。それぞれ 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。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る。企業と協力して試作した多色発光標準プレートをルミノメーターの校正に用いることで信頼の高いデータを得ることが可能となった。最終的にはプロトコールに記載することで発光測定の精度管理を行うことを提案する。第二のアプローチは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、phIL8 promoter-SLO/hEF1 α -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 (THP-G8 に相当) 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 β 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り、人工染色体を用いた MITA 法を構築する予定である。

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発光測定装置ルミノメーターを多色発光標準プレートで校正することで発光測定の精度管理が行えることを明らかにした。また、人工染色体に導入した MITA 法の開発に向け、2 色発光細胞を構築、検証を開始した。また 3 色発光ベクターを構築した。

F. 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 Ca²⁺ 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.* 133(10):2407-15, 2013
- 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* 2013, 28(1):38-43
- 5) Yamada Y, Nishide SY, Nakajima Y, Watanabe T, Ohmiya Y, Honma KI, Honma S: Monitoring circadian time in rat plasma using a secreted *Cypridina* luciferase reporter. *Analytical Biochemistry* 2013, 439(2):80-7
- 6) Kwon HJ, Ohmiya Y: Metabolomic analysis of differential changes in metabolites during ATP oscillations in chondrogenesis. *Biomed Res Int. Biomed Res Int.* 2013;2013:213972. doi: 10.1155/2013/213972. Epub 2013
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
総合分担研究報告書

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、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性を確認するため、3種類の細胞（Jurkat細胞に導入した安定細胞株#2H4、THP-1細胞に導入した安定細胞株THP-G1βおよびTHP-G8）を用いて、4種のレポーター遺伝子（IL-2, IFN-γ, IL-1β, IL-8）の反応性を14物質について確認した。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-1βレポーター細胞（TGCHAC-A4細胞）の技術移転性の検討実験を行った。他施設と同様の結果が得られ、技術移転は良好であり、施設内再現性についても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-γ, G3PDH の各プロモーター活性および THP-1 細胞における IL-1β, 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。この評価系の有用性と試験プロトコルの妥当性を検討するために、施設内および技術移転性、施設内および施設間再現性を調べる目的で 14 物質について MITA を実施した。また、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 細胞の技術移転性の確認を行った。また、同様の実験を 3 施設で行っていることから、施設間再現性については、東北大が総括し評価した。

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-γ, 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細胞に導入して

作製した安定細胞株#2H4を用いた。また、発光色の異なるルシフェラーゼ遺伝子をIL-1β, 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細胞に導入して作製した安定細胞株THP-G1β（#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を用いた。このうち、THP-G1β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-G1βの内標の代用とした。また、THP-G1βの代替細胞として新たに開発した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

技術移転性の確認として以下の4物質を用いた。

- ① Cobalt chloride (CoCl₂)
- ② Nickel chloride (NiCl₂)
- ③ Isophorone diisocyanate
- ④ 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)

施設内および施設間再現性の確認として以下の10物質を用いた

- ① Benzethonium chloride
- ② Dibutyl phthalate
- ③ Chlorpromazine hydrochloride
- ④ Dapsone
- ⑤ Acetaminophen
- ⑥ Ethanol
- ⑦ Sodium bromate
- ⑧ 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Nitrofurazone)
- ⑨ Aluminium(III) chloride hexahydrate
- ⑩ 4-Nitroanilin (p-Nitroanilin)

TGCHAC-A4細胞の技術移転性の確認として以下の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) 技術移転性

4物質の結果の一部を図2に示した。発光量については処理日による変動が認められるものの、ほぼ同様の反応性を示し、施設内再現性は良好であると考えられた。一方、3色発光細胞である#2H4細胞は他の施設と

同様の反応性を示したが、2色発光細胞であるTHP-G1β細胞およびTHP-G8細胞は施設間で若干バラツキのある結果となった。

C-2) 施設内および施設間再現性

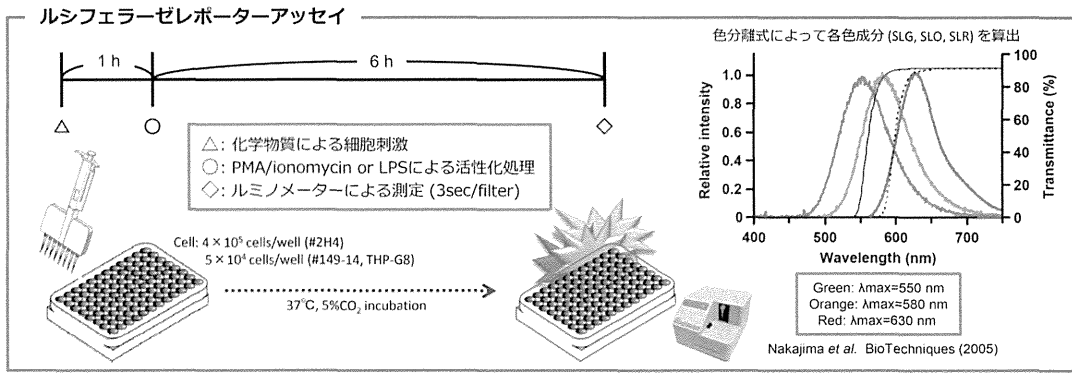
技術移転性をさらに確認するとともに、施設内および施設間再現性を確認するために、10物質について3回の繰り返し実験を行った。明らかに異常と考えられる結果ではなかったが、全体の用量反応性を見ると、一部の濃度で値が上下する特異な反応性が散見された (図3)。その原因として、不活化剤添加時に使用している8連マイクロピペットによる連続分注の影響が考えられたことから、同じプレートで8連マイクロピペットを用いて、上半分は細胞賦活化試薬を連続して10μLずつ分注・添加し、下半分は細胞賦活化試薬を1回毎に10μLを吸引、分注により添加し、その反応性を比較した。その結果、単独分注した場合には異常な低下は認められなかったが、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4)。

細胞賦活化試薬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行ったが、10物質の結果は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。1回目の実験結果を代表例として図5に示した。施設間再現性については、東北大で確認した。

C-3) 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、施設内再現性は非常に良好であった (図8)。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

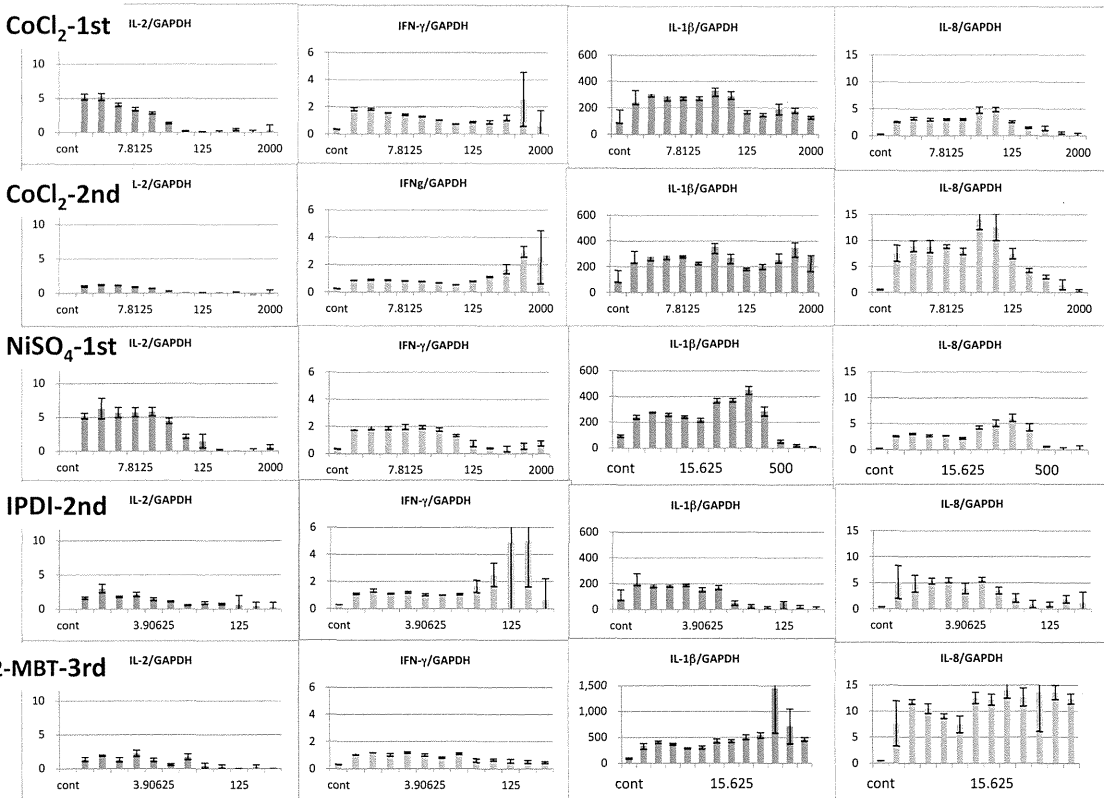


図2 #2H4 (IL-2、INF- γ)、THP-G1 β (IL-1 β) および THP-G8 (IL-8) の技術移転性結果

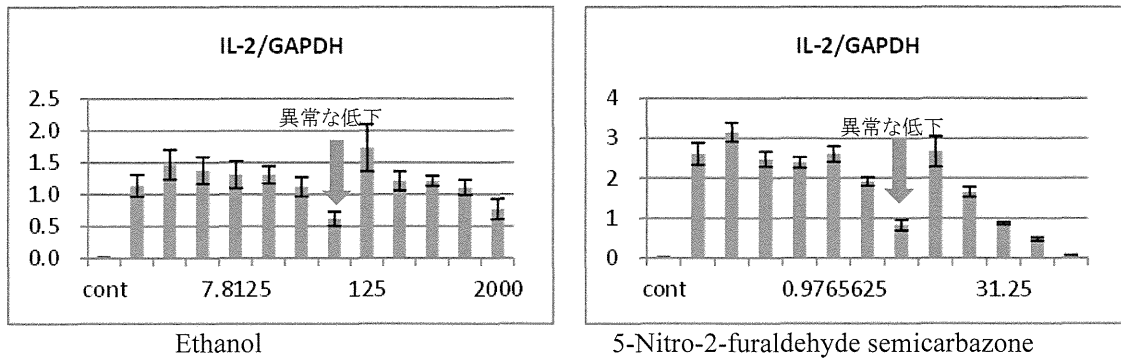
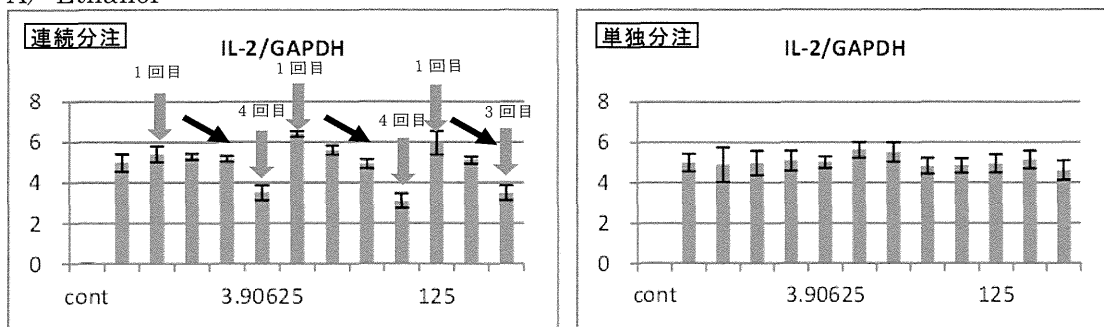


図3 MITAにおける濃度に依存しない反応性の例

A) Ethanol



B) 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone

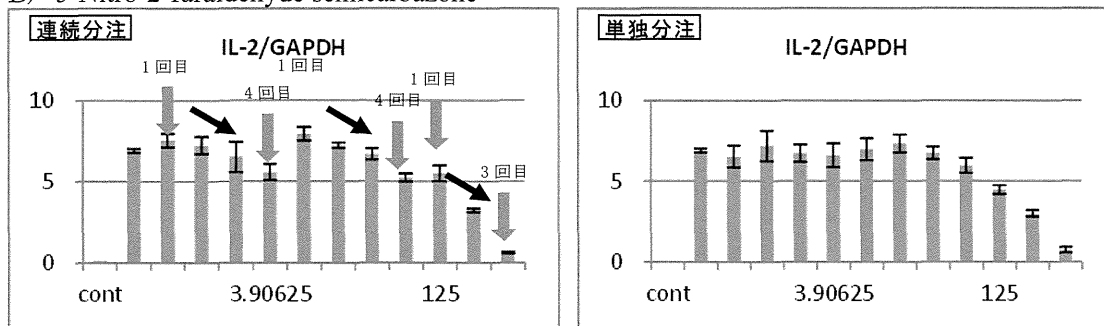


図4 細胞賦活化剤の添加方法（連続分注と単独分注）の検討結果