

36	Pentamidine isethionate	S	3.91	S	32.55	S	3.91	S	3.91	N	
25	Hydrogen peroxide	S	7.82	S	31.25	N		N		S	0.01
54	Minocycline	S	8.33	S	5.00	N		N			
23	Histamine	S	9.12	A	5.86	N		S	3.91	S	0.06
18	Diethanolamin	S	9.12	N		N		N			
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	S	0.00
59	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	S	7.80	S	1.20		
48	Diesel exhaust particles	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	S	0.05
14	Dapsone	S	45.01	S	55.14	S	46.88	S	134.75	N	
40	Sodium bromate	S	125.00	N		N		N			
42	Triethanolamine	S	187.50	S	1416.67	N		N			
1	2,4-Diaminotoluene	N		A	62.50	N		S	0.98	N	
3	2-Mercaptobenzothiazole	N		N		N		S	125.00	S	0.20
12	Cyclophosphamide	N		A	168.00	N		N			
20	Ethanol	N		N		N		N			
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		S	0.00
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	S	0.00
32	Methanol	N		N		N		N			
41	Sodium dodecyl sulfate	N		N		N		N			
43	Hexachlorobenzene	N		N		N		N			
45	Trichloroethylene	N		N		N		N			
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	S	0.00
49	Azathioprine	N		A	40.01	A	9.23	N			
55	Mizoribine	N		N		A	5.20	A	7.45		
58	Rapamycin	A	0.00	N		A	0.91	N			
57	Nicotinamide	A	0.10	A	110.03	S	3.00	S	10.00		
51	Colchicine	A	0.29	A	0.06	A	0.02	A	20.00		
56	Mycophenolic acid	A	0.38	A	6.24	N		N			
53	Methotrexate	A	0.45	A	0.09	N		N			
19	Dimethyl sulfoxide	A	3.91	A	625.00	S	66.41	S	3.91	N	
39	Ribavirin	A	15.63	A	187.50	A	5.86	N			
60	Warfarin	A	23.33	N		S	30.00	S	0.00		
4	Acetaminophen	A	33.33	A	33.33	A	166.67	A	100.00		

Table 5. Modified MITA (IL-8 Luc assay)

No	Chemicals	IL-2		IFN- γ		IL-1 β		IL-8		IL-8 Luc assay	
		Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge	LOEL
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	S	0.00005
47	Formaldehyde	S	1.71	N		S	15.63	S	15.63	S	0.00044
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	S	0.00052
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		S	0.00200
44	Citral	S	0.36	S	1.37	N		N		S	0.00252
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	S	0.00449
25	Hydrogen peroxide	S	7.82	S	31.25	N		N		S	0.00508
11	Cobalt chloride	S	3.91	S	9.12	S	3.91	S	125.00	S	0.00572
27	Isophorone diisocyanat	S	0.98	N		S	0.98	S	0.98	S	0.03317
2	2-Aminoanthracene	S	0.81	S	5.86	S	2.03	N		S	0.04000
5	Actinomycin D	S	0.00	S	0.01	N		S	0.00	S	0.04588
48	Diesel exhaust particles	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	S	0.05320
23	Histamine	S	9.12	A	5.86	N		S	3.91	S	0.05833
3	2-Mercaptobenzothiazol	N		N		N		S	125.00	S	0.19907
29	Lithium carbonate	S	0.98	A	116.67	S	0.39	S	0.39	S	0.25024
41	Sodium dodecyl sulfate	N		N		N		N		S	9.80000

Table 6. ECVAM 感作性試験開発用試験薬の IL-1 β および IL-8 レポーター細胞による評価

Chemicals	IL-8 Luc assay			IL-1b reporter assay		
	1st	2nd	Judgment	1st	2nd	Judgment
Oxazolone	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
4-NBB	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
Glyoxal	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
2-MBT	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
DNCB	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
MDGN	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
Cinnamal	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
TMTD	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
PPD	P	P	Sensitizer	N	N	Non-sensitizer
Isoeugenol	P	P	Sensitizer	N	N	Non-sensitizer
Eugenol	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
Cinnamic alcohol	P	P	Sensitizer	P	P	Sensitizer
Glycerol	N	N	Non-sensitizer	N	N	Non-sensitizer
Salicylic acid	N	N	Non-sensitizer	N	N	Non-sensitizer
Lactic acid	N	N	Non-sensitizer	N	N	Non-sensitizer
SLS	P	P	Sensitizer	N	N	Non-sensitizer

図 1. 研究計画

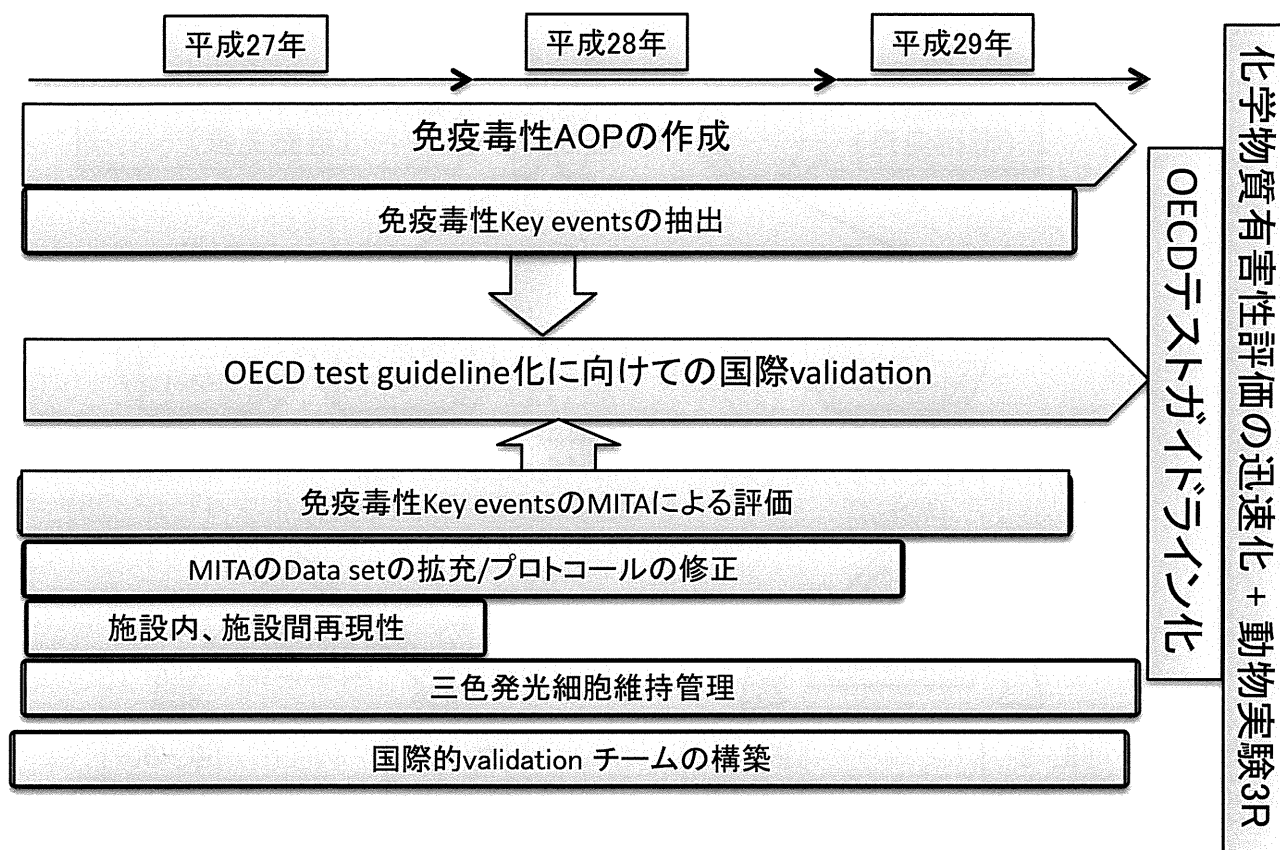


図 2. Multi-ImmunoTox assay (MITA)

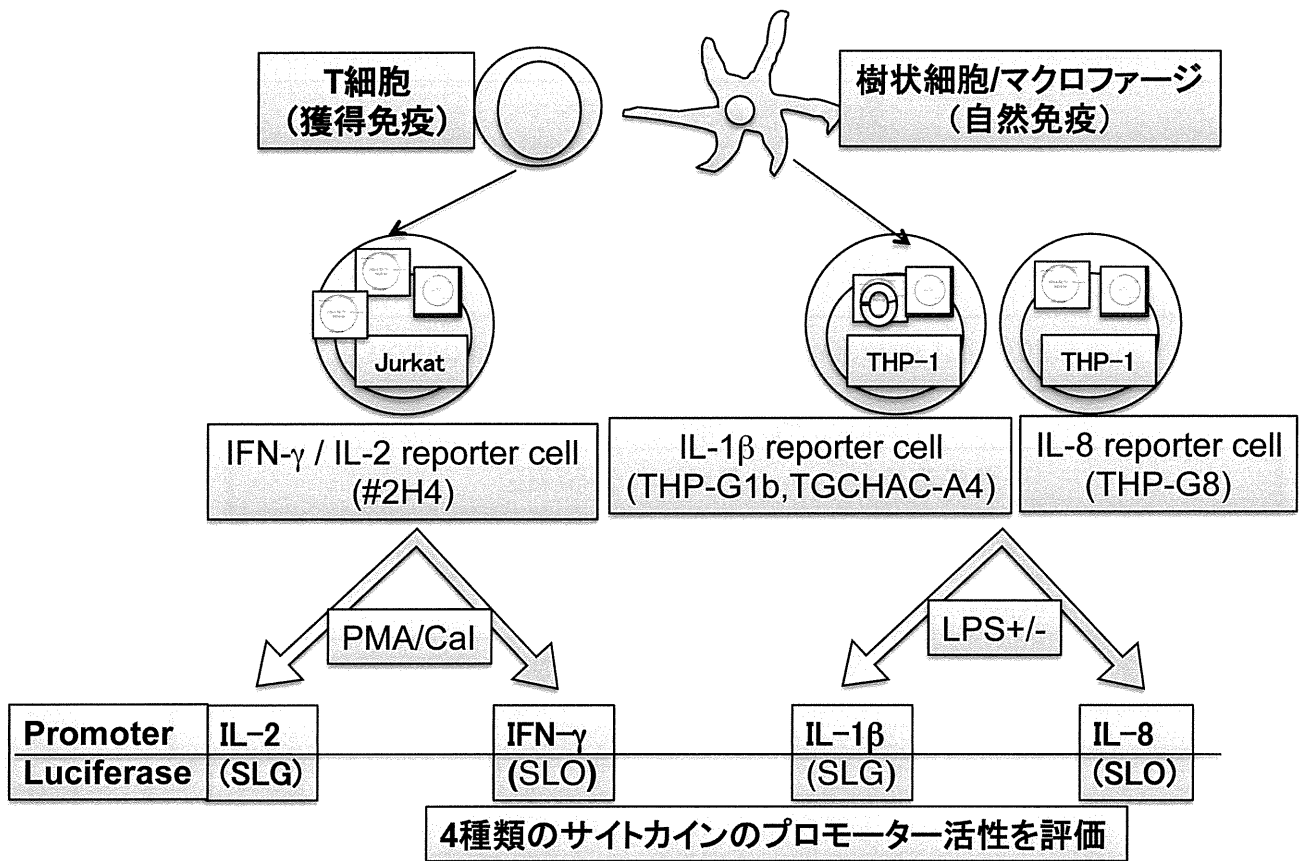


図 3. MITA 判定方法

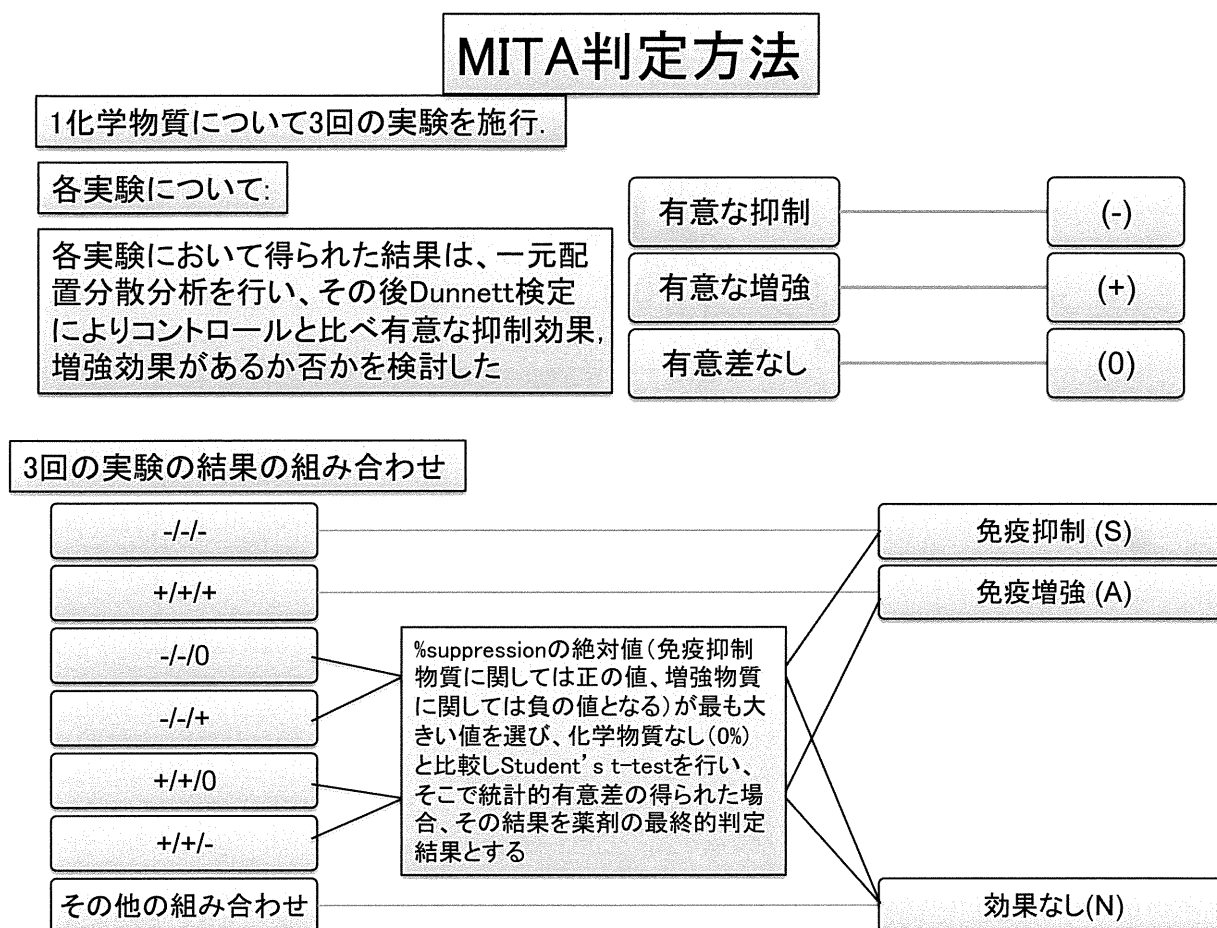


図4. IL-2 reporter activityとIFN- γ reporter activityとの相関

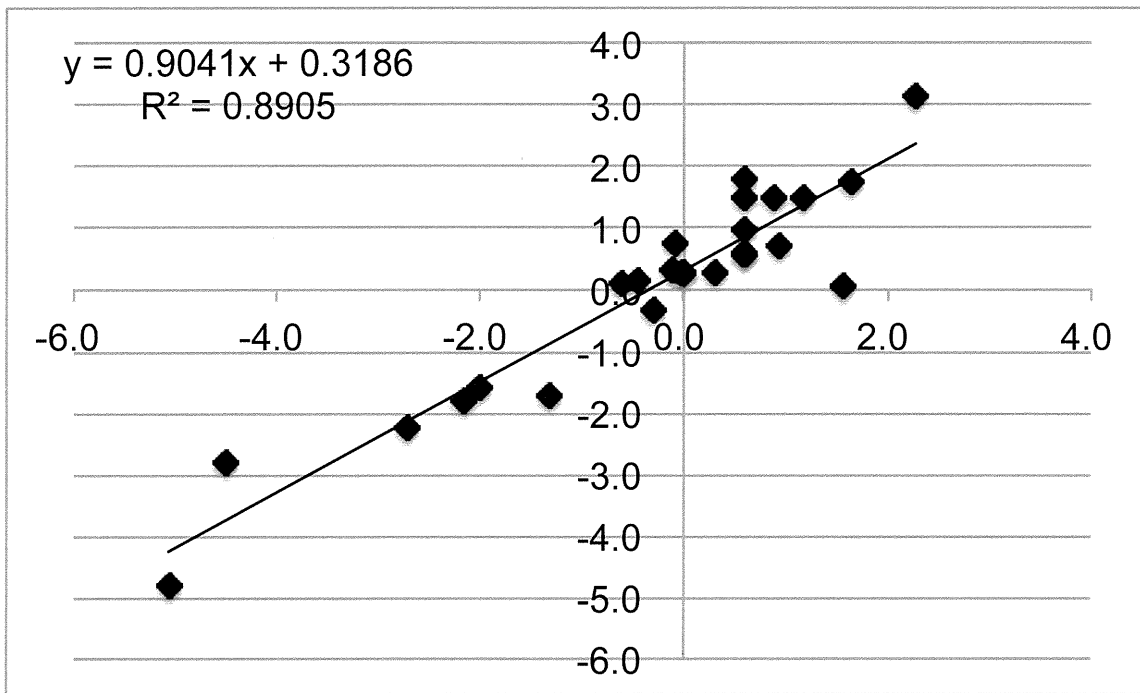


図5. IL-2 転写活性抑制を KE とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP

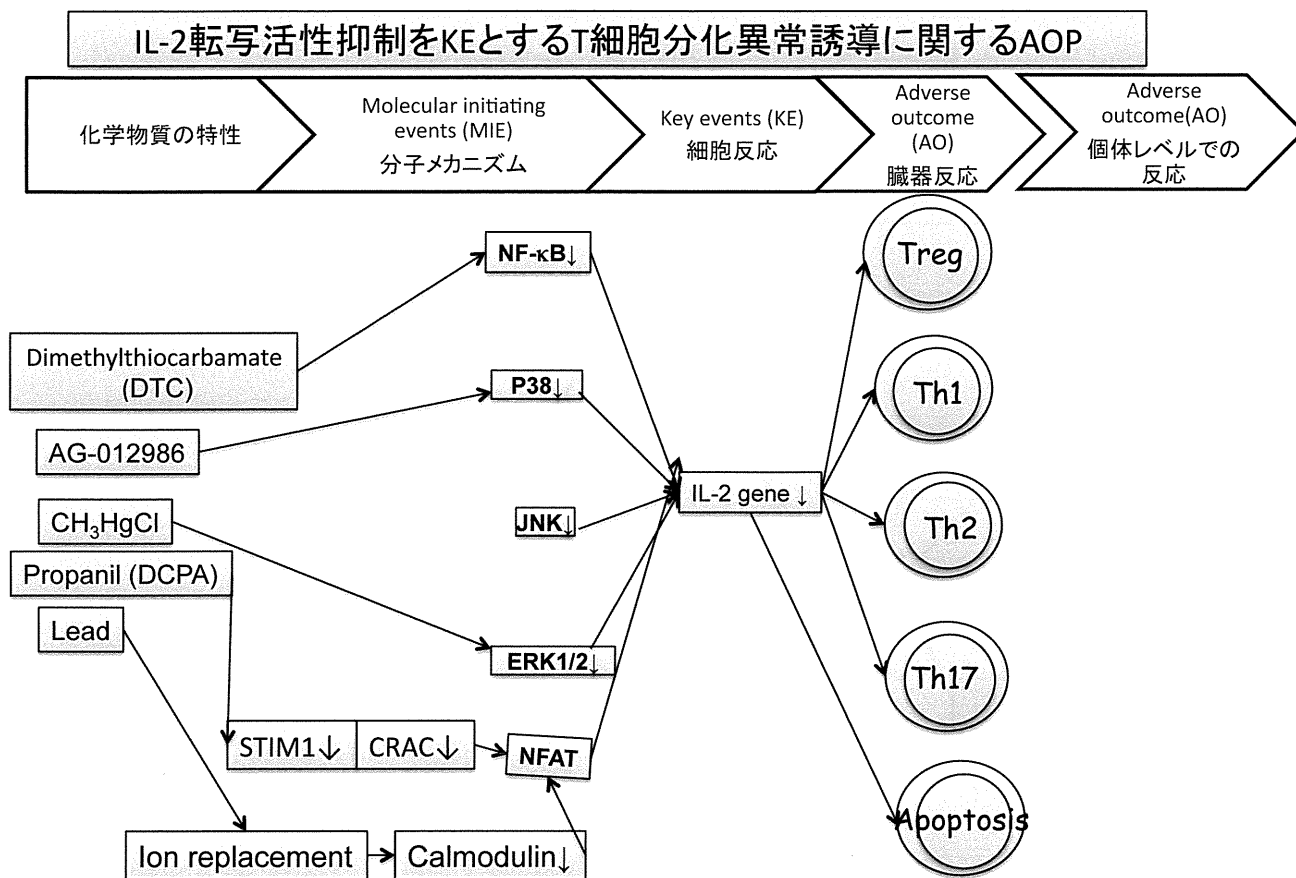


図6. IL-8 転写活性増強を KE として気道刺激性 AOP

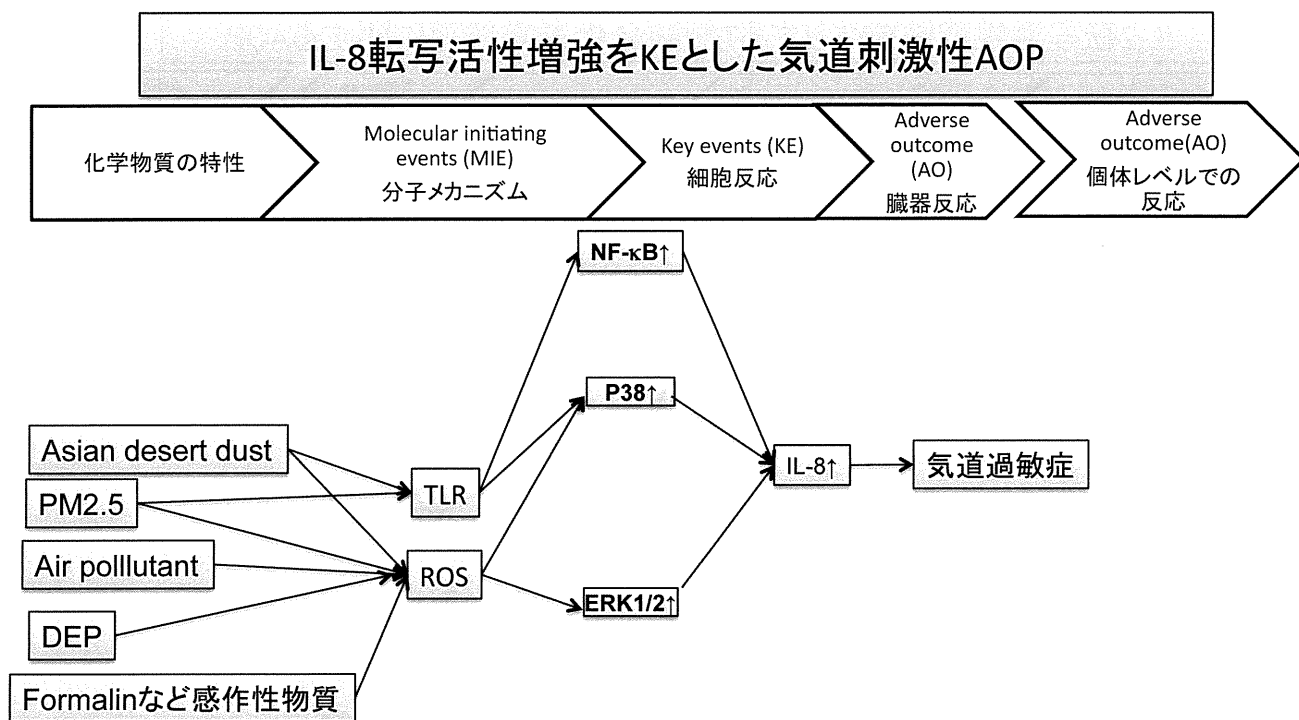


図7 MITA を用いた免疫毒性物質の分類

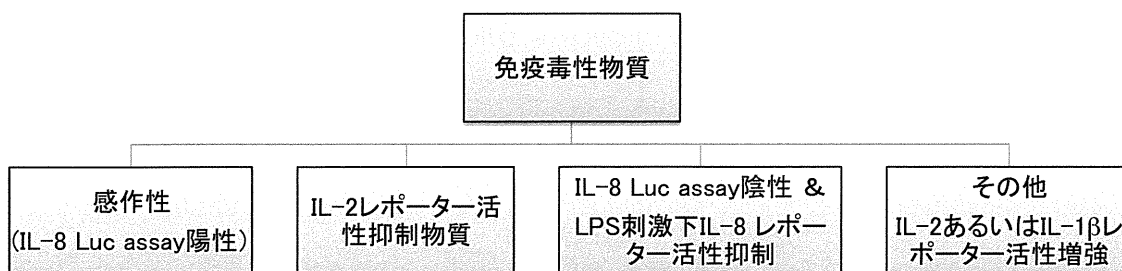
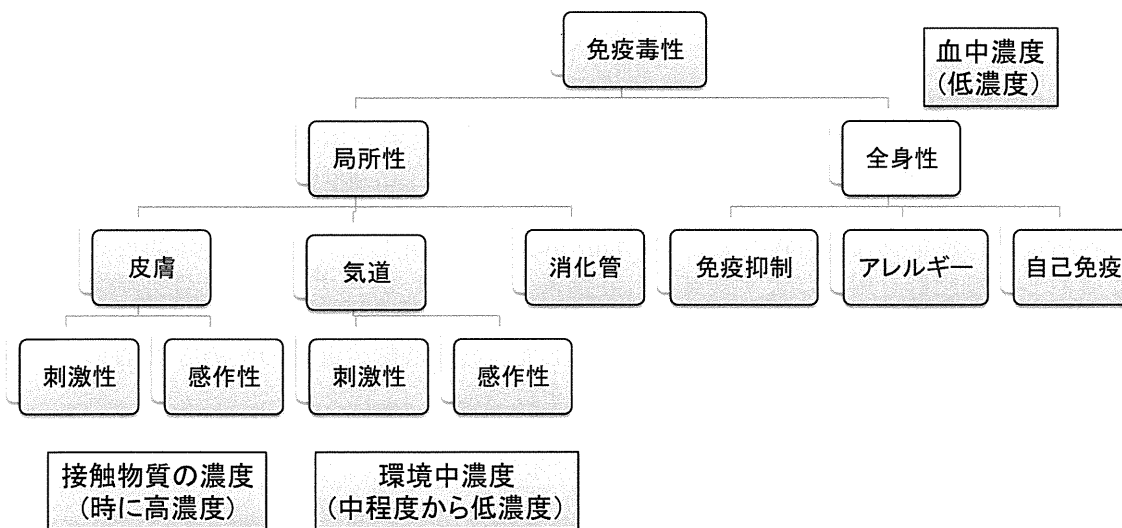


図8. 免疫毒性の発症部位と化学物質の曝露濃度



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

多色発光タンパク質を用いたMulti-ImmunoTox assay (MITA) だけでは、皮膚感作性物質の多くがLPSで刺激したTHP-G8細胞のIL-8転写活性を抑制し、単球/樹状細胞に抑制的に作用する免疫抑制物質と皮膚感作性物質を区別できないことが明らかとなった。そこで従来法のMITAに、開発を進めていた皮膚感作性物質試験法であるIL-8 Luc assayを加えたmodified MITAを開発、バリデーションに進むためのプロトコルの最適化を行うための5物質のIL-8 Luc assayを実施した。また、免疫毒性試験系として、MITAのIL-2 レポーター活性抑制評価系のバリデーション試験を行うための最初の段階である技術移転性を確認するために、5物質のIL-2レポーター活性抑制作用を調べた。

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¹⁾。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- 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。本年度は、IL-8 Luc assay の結果を含む Modified MITA の data set を構築するために 5 物質に関して IL-8 Luc assay を実施した。また、免疫毒性の評価系として IL-2 レポーター活性抑制評価系のバリデーション試験の最初のステップとして、技術移転性確認のため 5 物質の試験を行った。

B. 研究方法

B-1) IL-8 Luc assay

IL-8とG3PDHプロモータにそれぞれSLRおよびSLOルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターをTHP-1細胞に導入した2色発光細胞株THP-G8を用いて試験を行った。

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IL-8 Luc assay protocol Ver. 020E

20150703に準ずる。

試験化学物質として2,4-Diaminotoluene, 2-Aminoanthracene, Dapsone, Dibutyl phthalate, Isoniazidの5物質を供試し、発光測定装置はアトー社製Pheliosを用いた。

B-1) IL2レポーター活性抑制物質評価のためのMITA assay

IL-2とIFN- γ 、G3PDHプロモータにそれぞれSLG、SLOおよびSLRルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターをJurkat細胞に導入した3色発光細胞株#2H4を用いて試験を行った。

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 protocol Case Ver. 008.1E 20160202に準ずる。

試験化学物質として、2-Aminoanthracene, Citral, Chloroquine, Dexamethasone, Methyl mercuric(II) chlorideの5物質とを供試した。

(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) IL-8 Luc assay

a) 試験開始当初、リードラボである東北大で出された発光値と比べ、約50~60%と低く、反応性の低さが懸念された。そのため、新たに東北大から分与された細胞株を用いて試験を実施したところ反応性の向上が確認され、試験に用いた細胞（当研究機関において凍結保存した株）自体の反応性が落ちている可能性が示唆された。そこで改めて、東北大からの分与株を用いて試験を実施し、その結果（図1）と各Criteriaにおける評価（図2）を示す。

b) 28年度より予定しているMITAバリデーション試験 phaseIの実施に向け、#2H4細胞株を用いた技術移転性の確認試験を実施した。各物質に対し3回繰り返し試験を行った結果を図3に示す。現在、リードラボである東北大にて、試験参加各施設の結果をもって評価、考察を進めている。

D. 考察

従来のMITAでは一部の感作性物質がIL-8レポーター活性抑制作用を示し、一方、デキサメサドンなどの免疫抑制剤との区別ができないため、IL-8プロモータ活性測定系を加えたmodified MITAを構築することは本年度の免疫毒性物質の評価においては重要である。そこで、modified MITAのdata setを構築するために、MITAのdata setから選択した5物質についてIL-8 Luc assayを実施した。その結果、criteriaによって、結果が異なる場合もあるが、概ね再現性良く免疫抑制物質と感作性物質との識別が可能となった。

さらに、今年度の技術移転性結果をもとに、次年度以降は免疫毒性試験のIL-2プロモータ活性評価系のバリデーション試験を行うため、プレバリデーション試験を5つの試験物質について行った。最終的には再現性の高いデータを得ることができたが、細胞を活性化する処理によるバラツキの問題や細胞の維持管理に関する問題点が浮き彫りになった。来年度以降、これらバラツキの問題を解消し、試験プロトコルの最適化が重要な課題となった。今後、プロトコルの最適化と共に精度管理に関する研究を行う予定である。

E. 結論

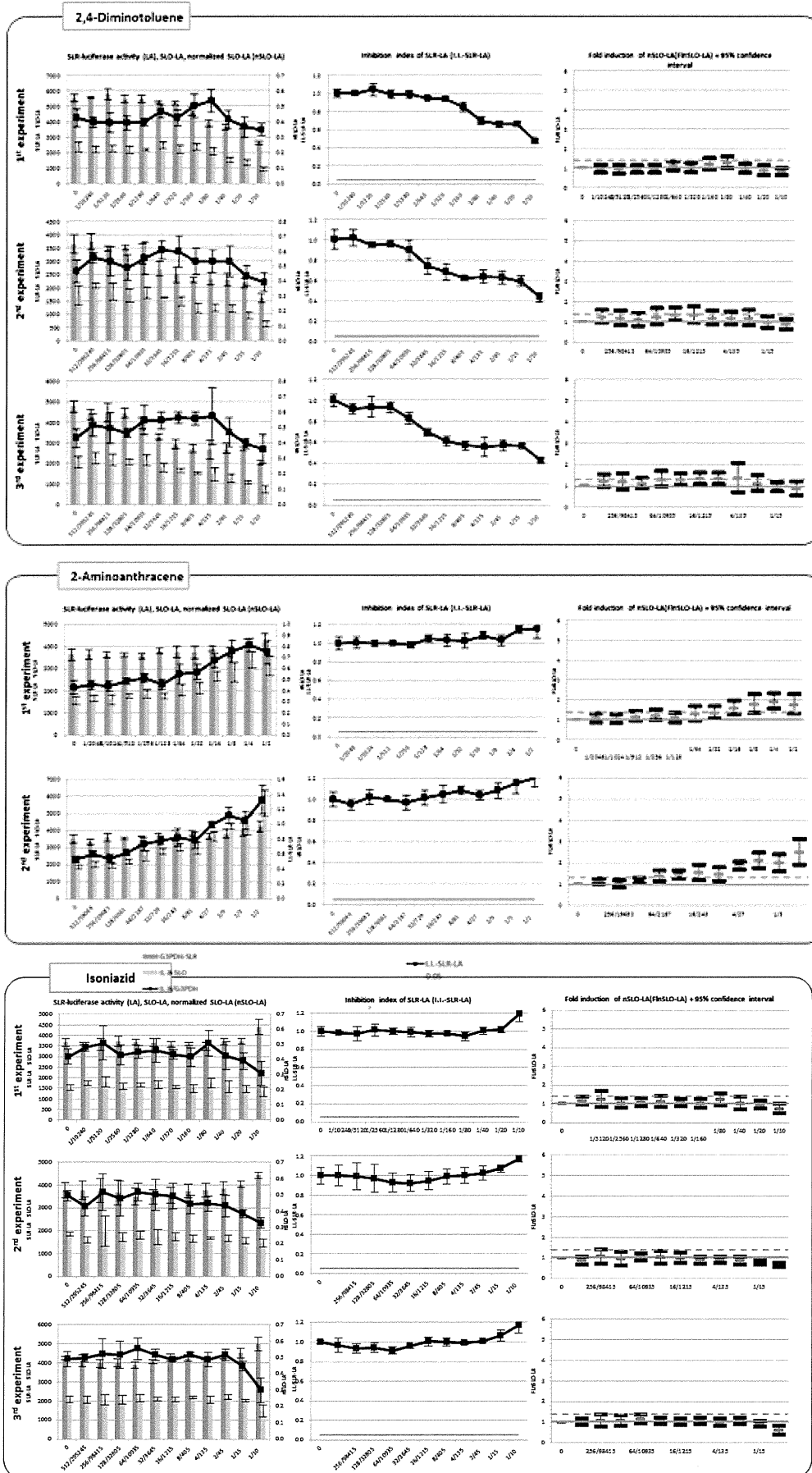
MITAのdata setの構築に協力し、AOP作成に貢献した。また、免疫毒性試験のIL-2プロモータ活性評価系のバリデーション試験に進むための技術移転性の確認実験を終了、プロトコルの最適化のための課題を見出した。

F. 参考文献

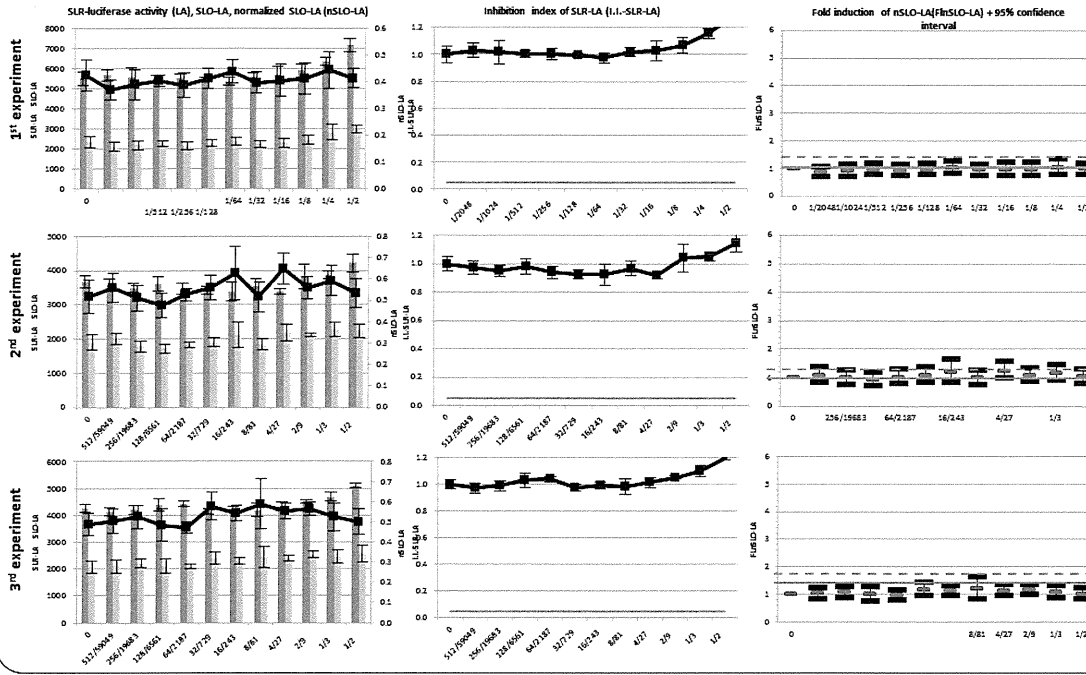
- 1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S: An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci., 124, 359-69, 2011

G. 研究発表

図1 Modified MITAによるIL-8 Luc assayの結果



Dapson



Dibutyl phthalate

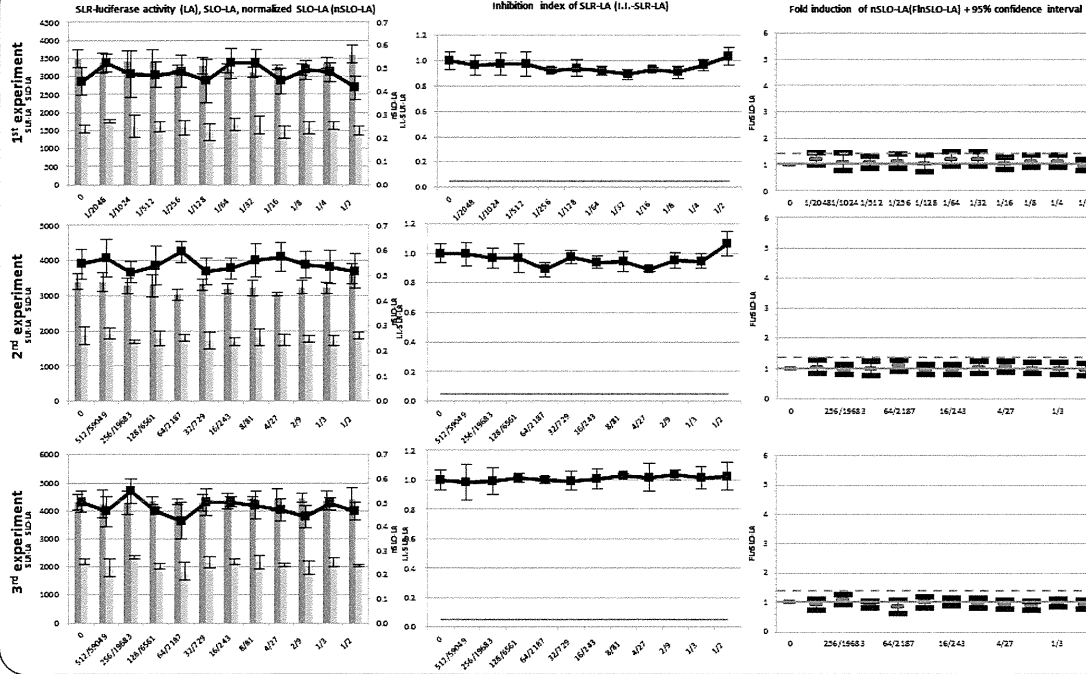


図2 Modified MITA による IL-8 Luc assay の各 criteria における評価

	1st	2nd	3rd	4th	Judge	
Criteria 1	2,4-Diaminotoluene	N	N	N	-	Non-sensitizer
	2-Aminoanthracene	P	P	-	-	sensitizer
	Dapson	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Dibutyl phthalate	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Isoniazid	N	N	N	-	Non-sensitizer
	1st	2nd	3rd	4th	Judge	
Criteria 2	2,4-Diaminotoluene	N	P	P	-	sensitizer
	2-Aminoanthracene	P	P	-	-	sensitizer
	Dapson	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Dibutyl phthalate	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Isoniazid	N	N	N	-	Non-sensitizer
	1st	2nd	3rd	4th	Judge	
Criteria 3	2,4-Diaminotoluene	N	N	N	-	Non-sensitizer
	2-Aminoanthracene	P	P	-	-	sensitizer
	Dapson	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Dibutyl phthalate	N	N	N	-	Non-sensitizer
	Isoniazid	N	N	N	-	Non-sensitizer

N;Negative, P;Positive

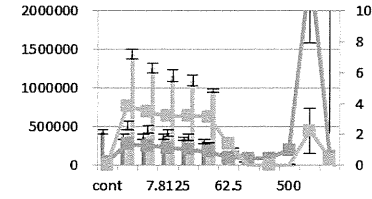
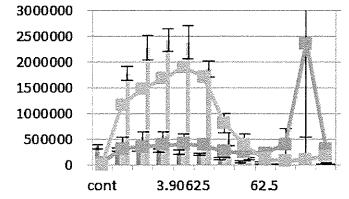
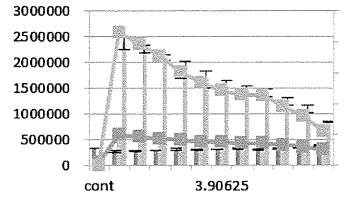
図3 Jurkat 細胞由来株#2H4 における各試験化学物質に対する細胞応答性。

2-Aminoanthracene

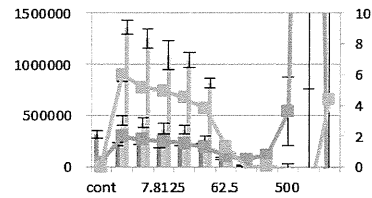
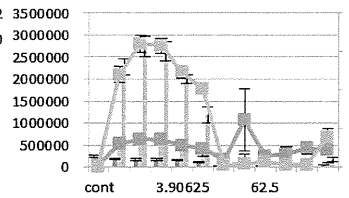
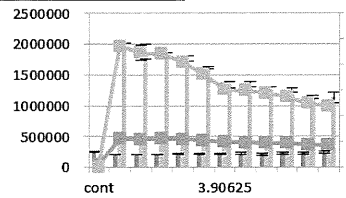
Citral

Chloroquine

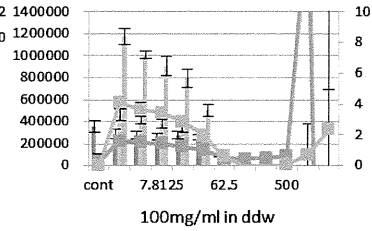
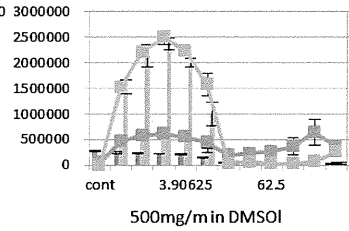
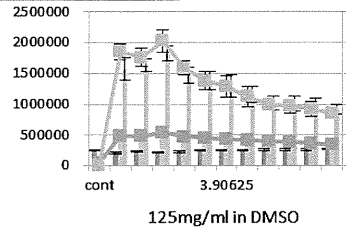
1st experiment



2nd experiment



3rd experiment



125mg/ml in DMSO

500mg/ml in DMSO

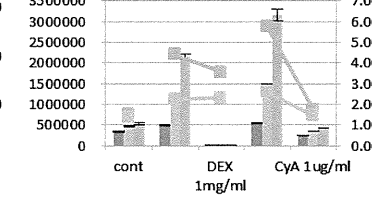
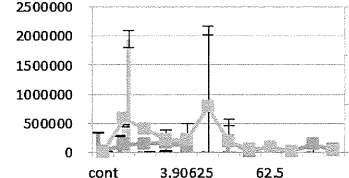
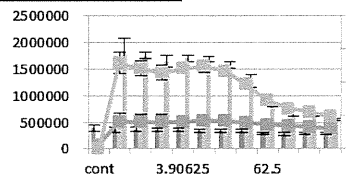
100mg/ml in ddw

Dexamethasone (lipophilic)

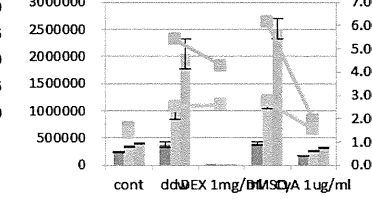
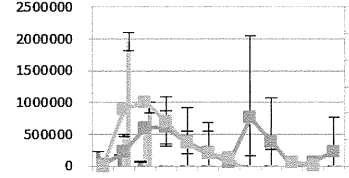
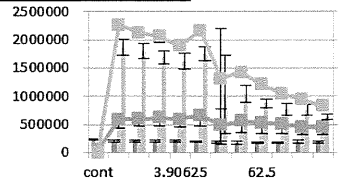
Methyl mercuric(II) chloride

Positive control (Dexamethasone, Cyclosporine A)

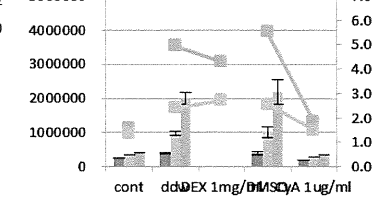
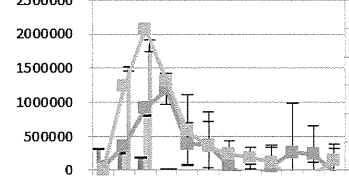
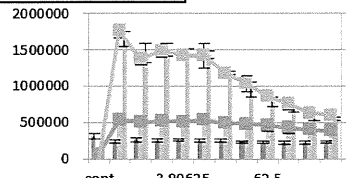
1st experiment



2nd experiment



3rd experiment



500mg/ml in DMSO

500mg/ml in DMSO

100mg/ml in ddw

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）
免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ向けての検討
分担研究報告書

化学物質のMITAによる解析, validation

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) では、皮膚感作性物質の多くがLPSで刺激したTHP-G8細胞のIL-8転写活性を抑制し、単球/樹状細胞に抑制的に作用する免疫抑制物質と皮膚感作性物質を区別できないことが明らかとなった。そこで従来法のMITAに、これまで我々が進めてきた皮膚感作性物質試験法であるIL-8 Luc assayを加えたmodified MITAを構築するために、5物質のIL-8 Luc assayを実施した。また、免疫毒性試験系として、MITAのIL-2レポーター活性抑制評価系のバリデーション試験を行うための最初の段階である技術移転性を確認するために、5物質のIL-2レポーター活性抑制作用を調べた。

キーワード：IL-8 Luc assay、IL-2レポーター活性抑制、技術移転性

A. 研究目的

免疫毒性評価試験法であるMulti-ImmunoToxicity assay (MITA)のdata set (60 化学物質)を構築した結果、MITAのプロトコールでハプテンを評価するとCoCl₂、NiCl₂、isophorone diisocyanateなどの感作性物質がIL-8レポーター活性抑制作用を示し、免疫抑制剤と区別できないことが明らかとなった。真の免疫抑制剤と感作性物質を区別して評価するために、MITAと感作性物質評価系との組み合わせが不可欠であることから、感作性物質の評価系であるIL-8 Luc assayの結果を含むModified MITAのdata setを構築するために5物質に関してIL-8 Luc assayを実施した。また、免疫毒性の評価系としてIL-2レポーター活性抑制評価系のバリデーション試験の最初のステップとして、技術移転性確認のため5物質の試験を行った。

B. 研究方法

B-1) 用いた細胞

IL-8 Luc assayには、IL-8およびG3PDH

の各プロモーター領域にそれぞれ橙および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。

IL-2レポーター活性抑制試験には、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細胞に導入した安定細胞株#2H4を使用した。

B-2) 使用した化学物質

IL-8 Luc assayには、isophorone diisocyanate、pentamidine isethionate salt、4-nitroaniline、magnesium sulfate heptahydrate、lithium carbonateの5物質を用いた。

IL-2レポーター活性抑制試験の技術移転性には、2-aminoanthracene、chloroquine、citral、dexamethasone、methylmercury(II) chlorideを用いた。

B-3) 実験方法

IL-8 Luc assay については、バリデーション試験で実施した方法に従った。すなわち、 1×10^6 /mLに調整した THP-G8細胞の50 μ Lを96 wellプレートに播種し、X-VIVO™に溶解した原液または懸濁液を遠心した原液とそれを希釈した各濃度の化学物質溶液50 μ Lを添加し、16時間処理(37°C、5%CO₂)した。処理終了後、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、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。

IL-2レポーター活性抑制試験は、MITAプロトコルに準じて行った。概要としては、#2H4細胞を96 wellプレートに播種し、各種濃度の化学物質を添加した。1時間後にPMA/ionomycin (#2H4細胞)による活性化処理を行い、6時間処理(37°C、5%CO₂)後にTripluc luciferase assay reagentを用いて各色ルシフェラーゼ活性をPheriosで測定し、IL-2プロモーター活性を算出した。

C. 結果

C-1) IL-8 Luc assay

実施した5物質の結果を図1に示した。化学物質処理群のG3PDHプロモーター活性(SLR-LA)を陰性対照のその活性で割った阻害指数(I. I. -SLR-LA)が0.05以上で、標準化した(G3PDHプロモーター活性で割った)IL-8プロモーター活性(SLO-LA)を化学物質処理群と陰性対照群とで比較したfold induction (FIInSLO-LA)が1.4以上でかつ、その95%信頼限界の下限が1.0以上の場合を陽性とし、2回以上陽性結果が得られた場合を感作性有りとして判定した。

試験した5物質中、pentamidine isethionate saltと4-nitroanilineは非感作性物質と判定され、残りの3物質は感作性物質と判定された。

C-2) IL-2レポーター活性抑制試験の技術移転性

5物質の実験を3回繰り返し、その結果を東北大へ送付した。バリデーション試験の試験実施施設である3施設(秦野研究所、産総研バイオメディカル研究部門、産総研健康工学研究部門)の結果を東北大で比較検討している。

D. 考察

MITA data setの解析の結果、MITAではCoCl₂、NiCl₂、isophorone diisocyanateなどの感作性物質がIL-8レポーター活性抑制作用を示し、Dex、hydrocortisoneあるいはFR167653 (p38 mitogen activated kinase (MAPK)阻害剤)などの免疫抑制剤との区別ができないことが明らかとなった。この問題点を解決するために、IL-8プロモーター活性測定系を加えたmodified MITAを構築することは免疫毒性物質の評価において重要であると考えられる。そこで、modified MITAのdata setを構築するために、MITAのdata setから選択した5物質についてIL-8 Luc assayを実施した。これにより免疫抑制物質と感作性物質との識別が可能となった。

また、今年度の技術移転性結果をもとに、次年度以降は免疫毒性試験のIL-2プロモーター活性評価系のバリデーション試験を継続する予定である。

E. 結論

MITAのdata set (60化学物質)を構築に協力し、AOP作成に貢献した。また、免疫毒性試験のIL-2プロモーター活性評価系のバリデーション試験の最初のステップである技術移転性の確認実験を終了した。

F. 参考文献

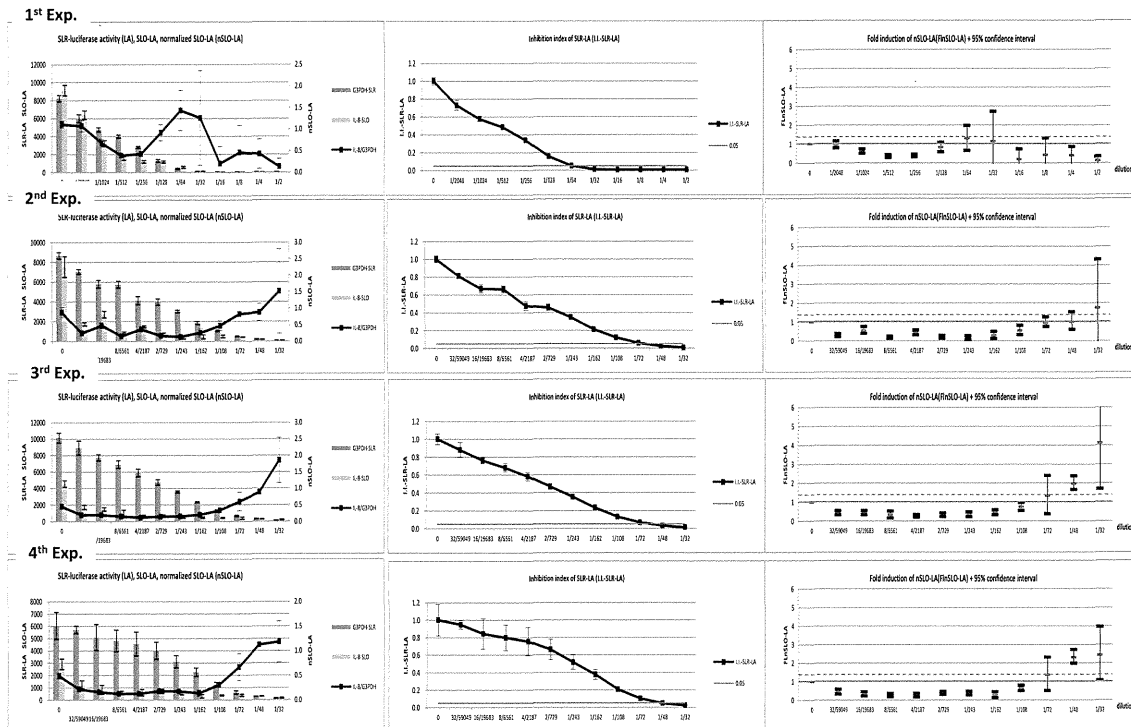
なし

G. 研究発表

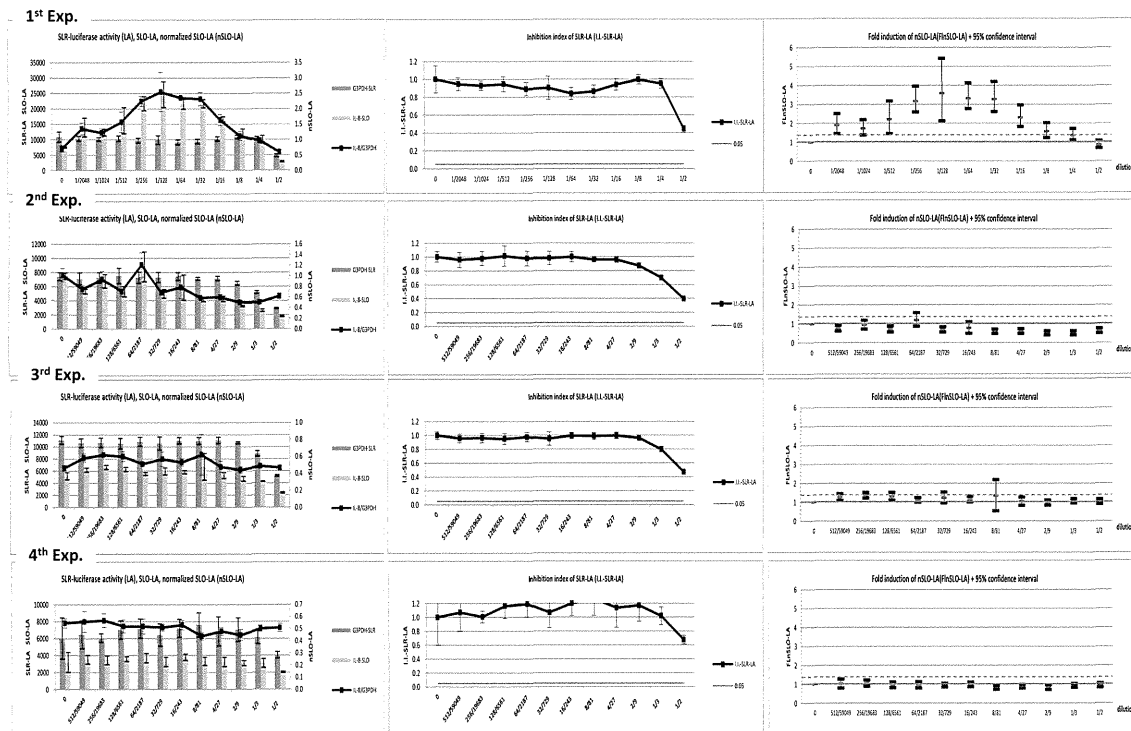
なし

図1 Modified MITAによるdata set構築のためのIL-8 Luc assayの結果

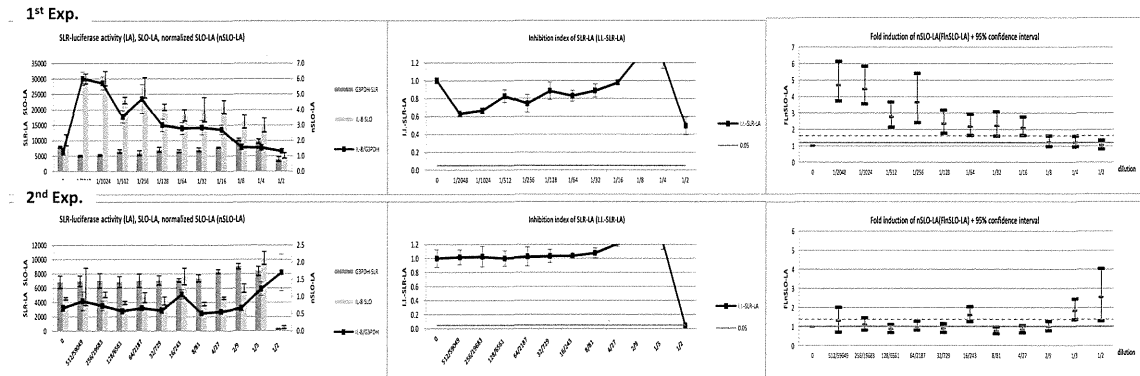
<Pentamidine isethionate salt>



<4-Nitroaniline>



<Isophorone diisocyanate>



<Magnesium sulfate heptahydrate>

