

(H27-化学-一般-006) 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
総括・分担研究年度終了報告書

免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoToxicity assayの国際validationへ向けての検討

研究代表者 相場 節也
東北大学病院皮膚科

研究要旨

今年度は、Multi-ImmunoToxicity assay (MITA)を用いて更に data set の拡充をはかり合計で 60 化学物質からなる data set を構築した。そのなかで、皮膚感作性物質の多くが LPS で刺激した THP-G8 細胞の IL-8 転写活性を抑制することを見いだし、従来の MITA では単球/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事が明らかとなった。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 を構築し、現在までに 24 物質の data set を作成した。その結果、化学物質が大きく IL-2 レポーター活性抑制物質、IL-8 Luc assay 陽性物質、IL-8 Luc assay 陰性で LPS 刺激下の IL-1 β /IL-8 レポーター活性抑制物質、その他 (IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質) の 4 群に分けられることが明らかとなった。次いで、この結果をもとに IL-2 転写活性抑制と IL-8 転写活性増強の 2 つを key event とする adverse outcome pathway (AOP)を作成した。前者では、dimethylthiocarbamate (DTC)の NF- κ B 抑制、AG-018986 の p38 MAPK 抑制、メチル水銀 (CH₃HgCl) の ERK1/2 抑制、Propanil (3,4-dichloropropionanilide (DCPA) の STIM1、CRAC を介した NFAT 抑制、鉛の calmodulin を介した NFAT 抑制を組み込んだ AOP が作成できた。また後者では、diesel exhaust particle (DEP)、フォルマリン、PM2.5 さらには界面活性剤による IL-8 転写活性亢進作用と adverse outcome としての気道刺激性を組み込んだ AOP を作成した。さらにこれらの結果をもとに、1月26日から28日までの三日間の予定で、国内外から免疫毒性の専門家を招き免疫毒性評価系国際化へ向けての kick-off meeting を仙台にて開催する。そこで、MITA の科学的意義、作成した AOP の改良、試験法プロトコルの妥当性などについて議論する予定である。さらに現在、IL-2 レポーター活性抑制物質評価にかかわる技術移転性確認を目的とした 3 施設での施設間差比較試験を実施中である。

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
大森 崇・神戸大学医学部附属病院・臨床研究推
進センター、生物統計学第二室長

A. 研究目的

研究背景：

環境汚染物質、食品添加物、薬剤などの化学物質のなかには免疫系を標的とし、アレルギー、自己免疫疾患、発癌などの健康被害を及ぼすものが少なくない。したがって、外因性化学物質の生体免疫機能への毒性効果として定義される免疫毒性は、公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。しかし現在存在している化学物質の免疫毒性評価系は、極めて多岐にわたる免疫反応に対する化学物質の影響を評価するには不十分であり、さらにその多くが動物実験に依存している。いうまでもなく動物実験には、得られた結果からどこまでヒトに対する影響を類推できるかという科学的問題に加えて費用面、倫理面など多くの問題が存在する。したがって、これらの問題を解決するためには多面的免疫反応を動物実験を用いずに評価する試験系の開発が不可欠である。

我々は、平成18-22年NEDO「高機能簡易型有害性評価手法の開発」プロジェクトにおいて、産業総合研究所が開発した3色発光細胞の技術を応用し、Jurkat細胞におけるINF- γ 、IL-2、G3PDHプロモーター活性、THP-1細胞におけるIL-8、IL-1 β 、G3PDHプロモーター活性をhigh throughputに評価できる長期細胞株を樹立し、化学物質の免疫毒性評価システム(Multi-ImmunoTox assay; MITA)を構築し国内外の特許を取得している。MITAを用いるとヒトT細胞におけるIL-2とINF- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に關与するシグナル伝達経路への化学物質の影響を定量的に評価することができる。平成24年度から平成26年度の3年間にわたる厚生労働科学研究費補助金事業「多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発」において、我々はまず作用機序の明らかな種々の免

疫抑制剤をMITAを用いて評価するなかで、化学物質毒性評価におけるMITAのプロトコールを作成し、そのプロトコールを用いた薬剤の免疫毒性評価を行った。その結果、代表的な免疫抑制剤であるデキサメサゾン(Dex)、サイクロスポリン(CyA)、タクロリムス(Tac)のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する薬理効果をMITAが予測できることを明らかにした(Kimura et al., 2014)。さらに、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INF- 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を明らかにした。

計画全体の目的：

図1に示すように、本研究では以下の4項目を目的として研究を計画した。

- 1) 自己免疫、免疫抑制、アレルギー(Th1/Th2不均衡)の3つのadverse outcome(AO)に関して、それらを惹起することが確認されている化学物質各4種類を選びAOPを作成する。
- 2) 作成されたAOPを基にして、その中から抽出されたKey events(KEs)を網羅し、そのなかでMITAが評価可能な項目を実験的に明らかにする。
- 3) プロトコールを変更し、MITAにより細胞周期に作用する免疫抑制剤、感作性物質なども評価可能とする。
- 4) MITAのdata setの拡充と施設内、施設間再現性を改善し国際的validationを実施しOECDテストガイドライン化をめざす。

2016年度の目的：

2016年度は、特に以下の6項目を研究目的とした。

MITAの最適化とdata setの構築

MITAの問題点を明らかにして、MITAを免疫毒性

評価により適した評価系に修正する。

MITA に適した免疫毒性評価系の探索

**MITA のパラメーターを key event とする AOP
の作成**

AOPに基づく化学物質評価

**IL-2転写活性抑制試験に関する技術移転性
確認**

**MITA を用いた免疫毒性評価系国際化へ向け
ての kick-off meeting の開催**

B . 研究方法

試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone (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, Dibenzo[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。

Jurkat T細胞由来#2H4細胞におけるIL-2, IFN- γ , GAPDHプロモーターアッセイおよびTHP-1 単球細胞由来TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞におけるIL-1 β , IL-8, GAPDHプロモーターアッセイ(図2)

IL-2およびIFN- γ プロモーター活性の測定には、ヒトTリンパ芽球性白血病由来細胞株JurkatにIL-2プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子(緑色に発色)、IFN- γ プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子(橙色

に発色)、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子(赤色に発色)を導入した#2H4細胞を用いた(Saito et al., 2011)。またIL-1 β プロモーター活性の測定には、ヒト急性単球性白血病由来細胞株THP-1にIL-1 β プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTGCHAC-A4細胞を、IL-8プロモーター活性の測定には、THP-1にIL-8プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子およびGAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTHP-G8細胞を用いた(Takahashi et al., 2011b)。なおTGCHAC-A4細胞の樹立には人工染色体技術(Katoh et al., 2004)を用い細胞の安定性を確保した。1ウェル当たり 2×10^5 個の#2H4細胞または1ウェル当たり 5×10^4 個のTGCHAC-A4細胞またはTHP-G8細胞を黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)に播種し、薬剤を加え、37、5%CO₂下で1時間培養した。つづいて#2H4細胞については25nM PMAと1 μ M Ioの混合物(PMA/Io)、TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPSで刺激し37、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(SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA))を検出した。また細胞数の違いや各種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。さらに以下の式に%suppression抑制率を計算した。
% suppression = (1-薬物存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA/薬物非存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA) X 100

MITAによる免疫毒性評価法 (図3)

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。

Jurkat細胞、THP-1細胞におけるmRNA発現

3×10^6 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/I α または100 ng/ml LPSで刺激し37℃で6時間培養した。Isogen (Nippon gene)を用いてtotal RNAを抽出した。

定量的 RT-PCR

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

MITAのdata setの拡充

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)および免疫毒性が知られている化学物

質14種類(WHO免疫毒性ガイドランスのcase studiesで検討されている物質を含む))に関してMITAを行いdata setを拡充した。この60種類の化学物質は、既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。

IL-8 Luc assayを組み込んだmodified MITAのdata setの作成

IL-8 Luc assayは、感作性物質が単球細胞に作用した際のIL-8 mRNA発現増強をTHP-G8細胞を用いて評価する試験法で、現在皮膚感作性試験法として国際validationが行われている。具体的には、化学物質をTHP-G8細胞に作用させてその16時間後のIL-8 promoter活性をluminometerにて定量する。すでにプロトコール、陽性、陰性の判定基準も確立している。これまでに改良が加えられ、精度、感度などいずれも80%をこえる評価系である(Takahashi et al., 2011b) (Kimura et al., 2015)。今回は、MITAのdata setの中に含まれる化学物質をIL-8 Luc assayのプロトコールに則り評価した。

(倫理面への配慮)

健常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。

C. 研究結果

MITAの最適化とdata setの構築

1) MITA data setの拡充 (Table 1)

これまでに作成されていたMITA data setの不確定な部分を補い、更にWHOから提出された

Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals の Case-Studies にて検討されている化学物質、喘息などのアレルギー疾患との関与が想定されている diesel exhaust particles (DEP)、ホルマリン (FA)、dibutyl phthalate を加えた 60 化学物質からなる data set を作成した。WHO Guidance の Case-Studies に含まれる化学物質に関しては、MITA は鉛の免疫抑制、水銀による IFN- γ レポーター活性増強作用を、また DEP、FA の Th1 サイトカインである IL-2 レポーター活性抑制作用を検出できた。

2) MITA の問題点

MITA data set (Table 1) から明らかな様に、MITA では CoCl_2 、 NiCl_2 、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できない。そこで MITA を有効に活用するためには、感作性物質評価系との組み合わせが不可欠である。

3) Modified MITA の構築

そこで従来の MITA に、更に LPS 刺激を加えない IL-1 β 、IL-8 プロモーター活性測定系を加えた modified MITA を構築することにした。特に IL-8 に関しては、すでに OECD test guideline 化をめざして validation が進んでいる感作性試験法、IL-8 Luc assay をそのプロトコール、陽性陰性判定基準も含めて取り込むことにし Table 2 を作成した。IL-1 β に関しては、必要に応じて適宜加えることとし、IL-8 Luc assay にほぼ準じたプロトコールを想定して現在試験物質の数を増やしている。

4) Modified MITA による免疫抑制物質と感作性物質の識別

Table 2 を用いて IL-8 レポーター活性抑制物質物質を選び出すと (Table 3)、その中に IL-8 Luc assay で感作性と評価される物質と非感作性と評価される物質が含まれることが分かる。すなわち、IL-8 Luc assay を加えることにより、Dex、hydrocortisone、FR167653 などの免疫抑制物質と感作性物質との識別が可能となる。

MITA に適した免疫毒性評価系の探索

Modified MITA の data set の構築により、免疫毒性物質が IL-2 レポーター活性抑制物質、感作性物質、IL-8 Luc assay 陰性かつ LPS 刺激下 IL-8 レポーター活性抑制物質、その他 (IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質など) 4 種類に大きく分類できることが明らかとなった。

1-1) IL-2 レポーター活性抑制物質の分類

Table 2 を用いて、化学物質を IL-2 レポーター活性抑制強度 (LOEL (lowest observed effect level) を指標とする) をもとに分類すると (Table 4)、化学物質が IL-2 レポーター活性抑制 LOEL により大きく 1 群 LOEL < 0.1、2 群 LOEL < 1.0、3 群 LOEL < 10、4 群 LOEL < 100、5 群 LOEL < 1000、6 群抑制なし、7 群 IL-2 レポーター活性増強に分類できた。そのなかで、代表的な免疫抑制剤 Dex、CyA、Tac、SLE の治療薬である chloroquine は 1 群、hydrocortisone は 2 群、2 価の金属は 3 群ないし 4 群に属していた。

1-2) IL-2 レポーター活性と IFN- γ レポーター活性との相関

IL-2 と IFN- γ は、いずれも Th1 サイトカインとして良く知られている。そこで Table 2 を用いて IL-2 と IFN- γ レポーター活性の相関を検討した。IL-2 レポーター活性が抑制された 41 化学物質のうち 12 化学物質に関しては、IFN- γ レポーター活性の抑制は認められなかったが、残りの 29 化学物質に関しては図 4 に示す様に IL-2 レポーター活性と IFN- γ レポーター活性との間に強い正の相関が認められた。また IL-2 レポーター活性が抑制されない化学物質には IFN- γ レポーター活性を抑制する物質は含まれなかった。一方、9 個の IL-2 レポーター活性増強物質の中には 7 個の IFN- γ レポーター活性増強物質が含まれ、IFN- γ レポーター活性抑制物質は含まれていなかった。したがって、modified MITA における T 細胞関連パラメーターとしては IL-2 レポーター活性のみで十分であると思われる。

2-1) IL-8 Luc assay による化学物質分類

すでに我々は IL-8 Luc assay が皮膚感作性物質の評価系として有用であることを報告している (Kimura et al., 2015; Takahashi et al., 2011a)。しかし、Table 2 をあらためて IL-8 Luc assay の LOEL をもとに分類すると (Table 5)、感作性

物質以外に hydrogen peroxide、diesel exhaust particles (DEP) など reactive oxygen species 産生物質、sodium lauryl sulfate (SDS) などの界面活性剤も IL-8 Luc assay で陽性と判断されることが明らかとなった。既に感作性物質の評価系としては、これらの物質は applicability domain からはずしている。

2-2) PM2.5 の IL-8 Luc assay を用いた気道刺激性評価

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 細胞を用いると、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。さらに渡部らは (Watanabe et al., 2015)、鳥根県松江市の小学生約 400 人を対象に 2012 年と 2013 年の 2 年間、日々の peak expiratory flow (PEF) の変化と大気中の PM2.5 の量およびその THP-G8 細胞を用いた IL-8 レポーター活性を対比した。その結果、大気中の PM2.5 の絶対量ではなくて IL-8 レポーター活性が PEF の悪化と相関があることを報告した。また最近、Corsini ら (Corsini et al., 2013) は PM2.5 の炎症惹起活性の指標として THP-1 細胞からの IL-8 産生が気道上皮の IL-8 産生よりも鋭敏であることを報告している。

一方、これまでの研究で、THP-G8 細胞は lipopolysaccharide (LPS) を始めとした種々の Toll-like receptors (TLR 1, 2, 4, 5, 6) および NLR 1, 2 アゴニストに反応し IL-8 レポーター活性を増強すること、したがって IL-8 Luc assay は化学物質のみならず種々の微生物由来毒素の評価系としても応用が可能であることを明らかにしている。

3) IL-8 Luc assay 陰性で IL-8 レポーター活性を抑制する化学物質

Table 5 を参照すると IL-8 レポーター活性抑制物質のなかに IL-8 Luc assay 陰性の化学物質が含まれていることがわかる。この中には p38 MAPK 阻害剤である FR167653 や Dex が含まれて

いることから推測できるよう p38 MAPK や NF- κ B 阻害作用のある物質が含まれていることが予想される。

4) その他 (IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質)

上記 1) 1) 2) 3) の分類に含まれない化学物質の中に、IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質が含まれていた。

MITAのパラメーターをkey eventとするAOPの作成

上記評価系に関連して AOP を作成した。

1) IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP の作成

IL-2 レポーター活性が、MITA で評価可能な T 細胞関連因子の中では最も多くの化学物質で抑制されること、また多くの化学物質で IFN- γ レポーター活性と相関が認められることより IL-2 レポーター活性を KE とした AOP を構築することとした。IL-2 はおもに Th1 細胞が分泌するサイトカインであるが、T 細胞の増殖に必須なばかりでなく、IL-12R β 2、IL-4R α 4、gp130 などの発現を介して Th1、Th2 細胞、Treg 細胞の分化に不可欠なサイトカインである。また一方で、Th17 細胞の分化を抑制することにより不必要な自己免疫反応や炎症反応の発症を制御する (Letourneau et al., 2009) (Liao et al., 2011)。そこで化学物質の免疫毒性の指標として、IL-2 の転写制御を評価することは極めて重要な意味を有していると考え、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 を作成することとした。具体的には、文献的に IL-2 の転写活性に影響を及ぼす化学物質を検索し、dimethylthiocarbamate (DTC) (Pyatt et al., 1998)、AG-018986 (Lee and Jessen, 2012)、メチル水銀 (CH₃HgCl) (Colombo et al., 2004)、Propanil (3,4-dichloropropionanilide (DCPA) (Lewis et al., 2013) (Salazar et al., 2008)、鉛 (Colombo et al., 2004) が IL-2 の転写抑制活性を有することを見いだした。またそのメカニズムとして、DTC は NF- κ B 抑制、AG-018986 は p38 MAPK 抑制、CH₃HgCl は ERK1/2 抑制、DCPA は STIM1、CRAC を介した NFAT 抑制、鉛は calmodulin を介した NFAT 抑制が報告さ

れていることから、図 5 に示す AOP を作成した。しかし IL-2 欠損マウスが多臓器に重篤な自己免疫疾患を発症することは良く知られているものの、現時点では個々の化学物質による IL-2 転写活性、分泌抑制がどのような免疫異常を臓器レベル、個体レベルで引き起こしているのかは明らかにされていない。

2) IL-8 転写活性抑制を key event とした化学物質気道刺激性の AOP 作成

IL-8 Luc assay が、感作性物質のみではなく DEP、ホルマリン、PM2.5、界面活性剤さらには微生物由来毒素などにも幅広く反応することを利用し、IL-8 転写活性亢進作用を中心とした気道刺激性 AOP を作成した(図 6)。特に、PM2.5 や黄砂のように大気中の化学物質のみならず微生物毒素などもその表面に吸着されている可能性がある物質の評価には有用性が期待できる。しかしこの AOP も IL-2 転写活性抑制を中心とした免疫毒性 AOP と同様に個々の化学物質による IL-8 転写活性、分泌亢進がどのようにして気道過敏に繋がるのかはまだ明らかになっていない。

3) IL-8 レポーター細胞と IL-1 β レポーター細胞の組み合わせ

IL-8 Luc assay のみでは、感作性物質と界面活性剤、ROS 刺激を識別できないため IL-1 β レポーター細胞との組み合わせを検討した。感作性物質 12 種類と界面活性剤を含む非感作性物質 4 種類で両細胞を刺激したところ、THP-G8 細胞は感作性物質と界面活性剤両者に反応してレポーター活性を増強するが、TGCHAC-A4 細胞は感作性物質には反応するが界面活性剤には反応しないことが明らかになった(Table 6)。

AOPに基づく化学物質評価

1) IL-2 転写活性抑制を中心とした免疫毒性 AOP に基づく化学物質評価

既に鉛に関しては、IL-2 レポーター活性を抑制することを明らかにしているため、その他の化学物質に関して IL-2 レポーター活性への影響を検討した。その結果、2H4 細胞を用いて更に propnail (DCPA) およびメチル水銀の IL-2 転写活性に対する影響を検出できることを明らかにし

た。

2) IL-8 転写活性亢進を中心とした免疫毒性 AOP に基づく化学物質評価

既にホルマリン、DEP などに関しては検討済みである。また黄砂、PM2.5 に関しては渡部らの報告が存在する。

IL-2 転写活性抑制試験に関する技術移転性確認

MITA を構成する 2H4 細胞を用いた化学物質の IL-2 転写活性抑制評価に関する技術移転性確認の目的で、現在東北大、産総研、食薬センターの 3 施設で 5 化学物質を用いた施設間差比較試験を施行中である。

MITA を用いた免疫毒性評価系国際化へ向けての kick-off meeting

平成 28 年度以降 MITA に関するバリデーションを実施するにあたり、その国際的公定化の道筋を明確にすることを目的に、平成 28 年 1 月に国際バリデーションのキックオフ会議を企画している。同会議においては、免疫毒性およびその試験法に関する専門家として海外から Dr. Emanuel Corsini (Milan Univ.) および Dr. Erwin L. Roggen (3Rs Management and Consulting ApS) を、国内から景山茂樹氏 (富士フィルム) および日本免疫毒性学会からの推薦者を外部専門家として招聘し、研究班の班員とともに 3 日間の予定で MITA の科学的意義、作成した AOP の改良、試験法プロトコルの妥当性などについて討論する予定である。さらに外部専門家の意見をもとに、平成 28 年度以降に実施するバリデーション計画を立案する。

D. 考察

以上の結果から、免疫毒性物質が図 7 に示す様に、modified MITA を用いて IL-2 レポーター活性抑制物質、感作性物質、IL-8 Luc assay 陰性かつ LPS 刺激下 IL-8 レポーター活性抑制物質、その他 (IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質など) 4 種類に分類できることが明らかとなった。

化学物質による免疫毒性はおおきく全身性の免疫毒性と局所性の免疫毒性に分類される。局所性の免疫毒性は、おもに皮膚、気道上皮における刺激性と感作性が、一方全身性免疫毒性は、血中に存在する化学物質による毒性が想定される。化学物質が免疫毒性をどこで発揮するかにより、予想される曝露濃度が大きく異なってくる。皮膚では時に高濃度の化学物質に曝露されることもありえる。一方気道上皮は皮膚と比べればかなり低い濃度の曝露が、また血中はそれらよりさらに低濃度曝露が想定される (図7)。そこで化学物質の免疫毒性を評価するうえでは、化学物質が何らかの免疫学的作用を発揮する上での最低能渡 (Lowest observed effect level)を明らかにすることが不可欠である。

そこで今年度、我々はdata setをもとにIL-2レポーター活性抑制を指標に、化学物質の分類を試みた。LOELをもとにとりあえず1群 LOEL<0.1、2群LOEL<1.0、3群LOEL<10、4群LOEL<100、5群LOWEL<1000、6群抑制なし、7群IL-2レポーター活性増強の7群に分類した。その分類では、予想どおり、Dex、CyA、Tac、chloroquine (SLE治療薬)など強力な免疫抑制剤は1群に含まれ、作用の弱いhydrocortisonelは2群に含まれていた。その他、1群、2群にはactinomycin D、cisplatin、mytomyacin Cなどの潜在的に免疫抑制作用を有していることが予想される抗がん剤やdibenzopyreneなどの発がん物質も含まれていた。一方これらの薬剤以外に、1群にはpyrimethamineやdigoxinなども含まれていた。Pyrimethamineに関しては、他の1群に含まれる化学物質に比べ抑制効果は弱く、またdigoxinに関しては、LOELの値が通常投与量における到達血中濃度よりもはるかに高値であった。

また本年度の研究により、modified MITAにより評価できる免疫毒性に関するkey eventが少なくとも2項目見いだせ、これをもとに2種類のAOPを作成することができた。いずれのAOPもまだ不完全なものではあるが、次年度以降これらを更に充実させるとともにIL-2転写抑制に関してはvalidationを実施する予定である。

E. 結論

IL-8 Luc assay を組み込んだ modified MITA の構築と data set の作成

従来法の MITA の問題点を改善する目的で、MITA と皮膚感作性試験法 IL-8 Luc assay を組み合わせた modified IL-8 Luc assay を構築し data set を作成した。

化学物質の modified MITA を指標とした免疫毒性別の分類

作成した data set から、化学物質が 1) IL-2 転写活性抑制物質、2) IL-8 Luc assay 陽性物質、3) IL-8 Luc assay 陰性、LPS 刺激後の IL-8 転写活性抑制物質、および 4) その他 (IL-2 あるいは IL-1 β レポーター活性増強物質) の 4 群に分類できることが明らかとなった。

AOP の作成

IL-2 転写活性抑制、IL-8 転写活性亢進のそれぞれを key event とした T 細胞分化異常誘導および気道刺激性に関する AOP を作成した。

国際的視点からの試験法の検討

国際的 validation management 委員会を組織し、MITA の科学的意義、作成した AOP の改良、試験法プロトコルの妥当性などに関して意見を求め試験法の改良に繋げる。

引用文献

1. Colombo, M., Hamelin, C., Kouassi, E., Fournier, M., Bernier, J., 2004. Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells. Clin Immunol 111, 311-322.
2. Corsini, E., Budello, S., Marabini, L., Galbiati, V., Piazzalunga, A., Barbieri, P., Cozzutto, S., Marinovich, M., Pitea, D., Galli, C.L., 2013. Comparison of wood smoke PM2.5 obtained from the combustion of FIR and beech pellets on inflammation and DNA damage in A549 and THP-1 human cell lines. Arch Toxicol 87, 2187-2199.
3. Katoh, M., Ayabe, F., Norikane, S., Okada, T., Masumoto, H., Horike, S., Shirayoshi, Y.,

- Oshimura, M., 2004. Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 280-290.
4. 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.
 5. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, S., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* in press.
 6. Lee, D.U., Jessen, B., 2012. Off-target immune cell toxicity caused by AG-012986, a pan-CDK inhibitor, is associated with inhibition of p38 MAPK phosphorylation. *J Biochem Mol Toxicol* 26, 101-108.
 7. Letourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., Boyman, O., 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123, 758-762.
 8. Lewis, T.L., Holaskova, I., Barnett, J.B., 2013. The toxicity of the N-hydroxy and 6-hydroxy metabolites of 3,4-dichloropropionanilide does not depend on calcium release-activated calcium channel inhibition. *Toxicol Sci* 131, 395-405.
 9. Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Li, P., Leonard, W.J., 2011. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 12, 551-559.
 10. Pyatt, D.W., Gruntmeir, J., Stillman, W.S., Irons, R.D., 1998. Dimethyldithiocarbamate inhibits in vitro activation of primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicology* 128, 83-90.
 11. Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., Yasuda, M., Yamazaki, T., Nishii, S., Aiba, S., 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254, 245-255.
 12. Salazar, K.D., Ustyugova, I.V., Brundage, K.M., Barnett, J.B., Schafer, R., 2008. A review of the immunotoxicity of the pesticide 3,4-dichloropropionanilide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11, 630-645.
 13. Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., Aiba, S., 2011a. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124, 359-369.
 14. Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., Aiba, S., 2011b. 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, 359-369.
 15. 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.
 16. Watanabe, M., Kurai, J., Tomita, K., Sano, H., Abe, S., Saito, R., Minato, S., Igishi, T., Burioka, N., Sako, T., Yasuda, K., Mikami, M., Kurita, S., Tokuyasu, H., Ueda, Y., Konishi, T., Yamasaki, A., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E., 2014. Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian

dust particles collected in western Japan. *J Asthma* 51, 595-602.

17. Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Saito, R., Abe, S., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Yamasaki, A., Shimizu, E., 2015. 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol.* 2015; 135, 2884-2887.
2. Kakizaki, A., Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Kawano, M., Ogasawara, K., Aiba, S. Comparison of CD163+ Macrophages and CD206+ Cells in Lesional Skin of CD30+ Lymphoproliferative Disorders of Lymphomatoid Papulosis and Primary Cutaneous Anaplastic Large-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol.* 2015; 95, 600-602.
3. Kambayashi, Y., Fujimura, T., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages. *J Invest Dermatol.* 2015; 135, 2547-2550.
4. Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E. Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12, 14229-14243.
5. 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 exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *Biomed Res Int.* 2015 ; 583293.
6. Tsutsumi, M., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M., 2015a. Abnormal Morphology of Blood Vessels in Erythematous Skin From Atopic Dermatitis Patients. *Am J Dermatopathol*, in press
7. Tsutsumi, M., Kitahata, H., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M. Numerical and comparative three-dimensional structural analysis of peripheral nerve fibres in epidermis of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2015, in press.
8. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y. Aiba, S. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro.* 2015; 29, 1816-1830.
9. Watanabe, M., Kurai, J., Minato, S., Noma, H., Sano, H., Saito, R., Aiba, S., Oshimura, M., Hatakeyama, K., Yamasaki, A., Shimizu, E. Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan. *J Med Invest.* 2015; 62, 145-148.
10. Ohmiya, Y. Simultaneous multicolor luciferase reporter assays for monitoring of multiple genes expressions. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2015; 18, 937-945.
11. Yasunaga, M., Murotomi, K., Abe, H., Yamazaki, T., Nishii, S., Ohbayashi, T., Oshimura, M., Noguchi, T., Niwa, K., Ohmiya, Y., Nakajima, Y. Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3. *J Biotechnol.* 2015; 194, 115-123.
12. Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju Y, Makita Y, Yoshida Y, and Horie M, Intracellular

accumulation of indium ions released from nanoparticles induces oxidative stress, proinflammatory response and DNA damage. *J. Biochem., in press.*

13. Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, and Honma K. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 2015; 42, 2678-2689.
14. Umeno A, Takashima M, Murotomi K, Nakajima Y, Koike T, Matsuo T, and Yoshida Y. Radical-scavenging activity and antioxidative effect of olive leaf components oleuropein and hydroxytyrosol compared with those of homovanillic alcohol. *J. Oleo Sci.* 2015; 64, 793-800.
15. Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Koike T, Matsuno T, Abe H, Yoshida Y, and Nakajima Y. Oleuropein-rich diet attenuates hyperglycemia and impaired glucose tolerance in type 2 diabetes model mouse. *J. Agric. Food. Chem.* 2015; 63, 6715-6722.
16. Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju Y, Makita Y, Yoshida Y, and Horie M. *In vitro* evaluation of the cellular influence of indium tin oxide nanoparticles using the human lung epithelial cell line A549. *Metallomics.* 2015; 7, 816-827.
17. Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Abe H, Yoshida Y, and Nakajima Y. Switching from singlet-oxygen-mediated oxidation to free-radical-mediated oxidation in the pathogenesis of type 2 diabetes in model mouse. *Free Radic. Res.* 2015; 49, 133-138.
18. Yasunaga M, Murotomi K, Abe H, Yamazaki T, Nishii S, Ohbayashi T, Oshimura M, Noguchi T, Niwa K, Ohmiya Y, and Nakajima Y. Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3. *J. Biotechnol.*, 2015; 194, 115-123.

2. 学会発表

相場節也：皮膚感作性および免疫毒性のadverse outcome pathway (AOP). 日本動物実験代替法学会 第28回大会(横浜) 2015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

