

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-ImmunoToxicity assayの国際validationへ向けての検討
分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoToxicity assayによる解析，精度管理

分担研究者 近江谷克裕
(国)産業技術総合研究所

研究要旨

IL-2転写活性抑制を指標としたT細胞の分化異常誘導化学物質評価系の国際バリデーションPhase 1試験（施設内、施設間再現性試験）を実施した。コード化された5物質において、1セット3回からなる試験を3回繰り返し行った。その結果、施設内および施設間再現性ととも、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

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 プロモーター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 プロモーター活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4、IL-1 と G3PDH プロモーター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、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 Phase1 試験を実施し、5 種類のコード化された被験物質の評価を行い、施設内及び施設間再現性について確認した。

B．研究方法

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プロモーターにそれぞれ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 案 Ver.008.5E Sep. 14th, 2016に準ずる。

試験には、国際バリデーション実行委員会にて選定された5種類のコード化した被験

物質およびコントロール物質

(dexamethason, cyclosporineA)を供試した。各物質1セット3回からなる試験を3回繰り返り、IL-2レポーター活性抑制の有無を評価した。

(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

コード化された5種類の化学物質に対し、1セット3回からなる試験を3回繰り返り行った。計測結果およびCriteria2の評価結果を化学物質ごとにChemical 1~5として図1に示す。また、Criteria1, 2, 3におけるIL2抑制効果の評価結果を図2に示した。

D. 考察

昨年度のIL-2プロモーター活性評価系のプレバリデーション試験(phase0)の結果、技術移転性に問題なしとして、今年度、バリデーションPhase1試験の実施に至った。Phase1試験の結果、Chemical No. 1, 3, 4においては、いずれも「Immunosuppress (IL-2プロモーター活性抑制)」の結果を示し(図2)、良好な施設内再現性が確認された。また他参加施設においても同様の結果が得られ、施設間の再現性も確認された。次にChemical No.5においては、いずれのcriteriaでも「Immunoaugmentation (IL2発現亢進)」と「No effect」の評価に分かれた(図2)。一方で、SLG-LAやnSLG-LAの数値グラフ(図1)は計9回の試行において、濃度依存的に類似した傾向を示していることから、評価のバラつきが実験手技や装置等の不具合が原因とは推定しがたく、Criteriaによる評価が非常に難しい被験物質であると考えられる。実際、他施設においてもNo.5化学物質はsuppress, augmentation, no effectと評価が分かれるものであった。

No.2物質においては、他の参加施設がCriteria1, 2, 3のいずれにおいてもImmunosuppressionの評価に対し、当グルー

プの結果はCriteriaによって異なるものの、他施設と評価が完全には一致しなかった。図1の計測結果を確認すると、発光値計測の結果およびCriteria2のグラフ傾向では施設内再現は得られているように見える。一方、他施設の計測結果(data not shown)と比較すると、全体的なSLG-LAやnSLG-LAの濃度依存的傾向はほぼ同様であった。唯一、高濃度域(特に最高濃度125mg/ml)でのSLG-LAの発光値が他施設では大きく減少しているのに対して、当グループでは僅かにしか減少していなかった。そこで現在、被験物質の溶解性や発光検出器の制度に関して再検証を進めている。

最終的には施設内および施設間において、良好な再現性データを得ることができ、来年度のPhase2試験の実施が決定されるに至った。また、Phase1試験を通じて、細胞の生育ステージによる反応性の違い等が確認されるようになり、来年度以降の試験プロトコルの最適化に反映する。

E. 結論

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Phase1試験を終了し、施設内、施設間再現性を確認した。また、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, Omiya 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

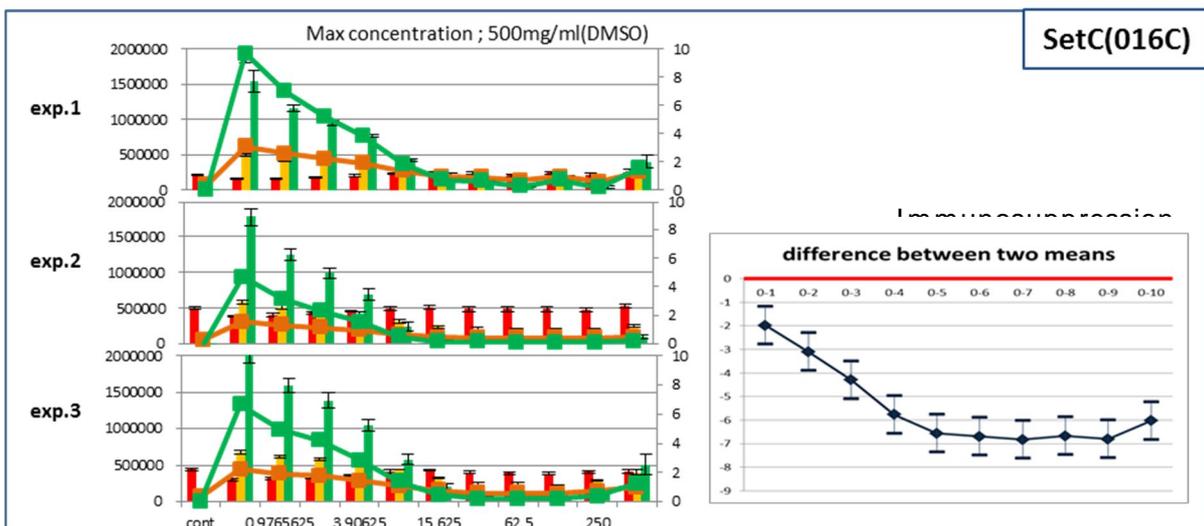
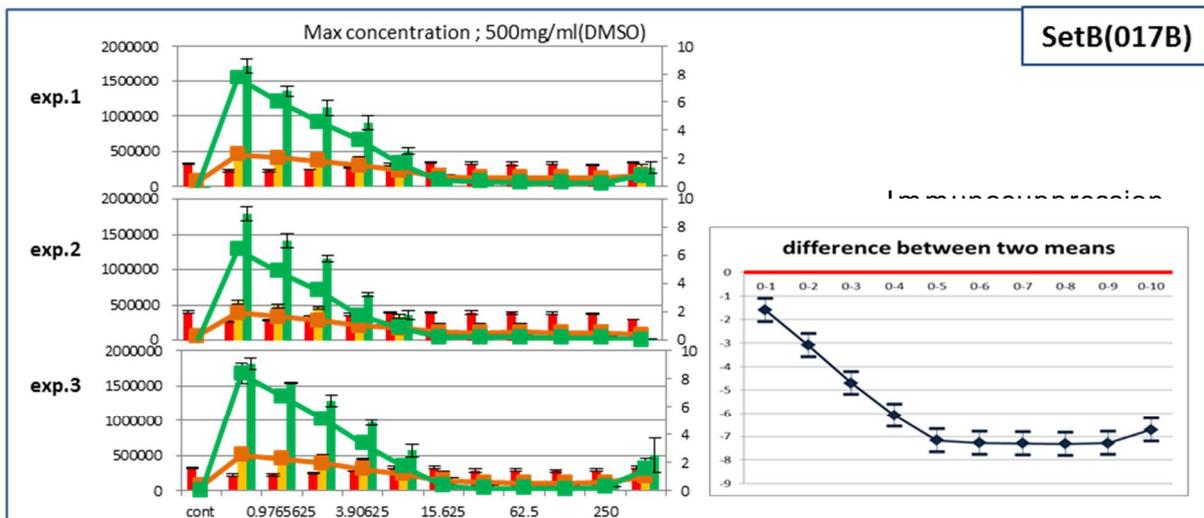
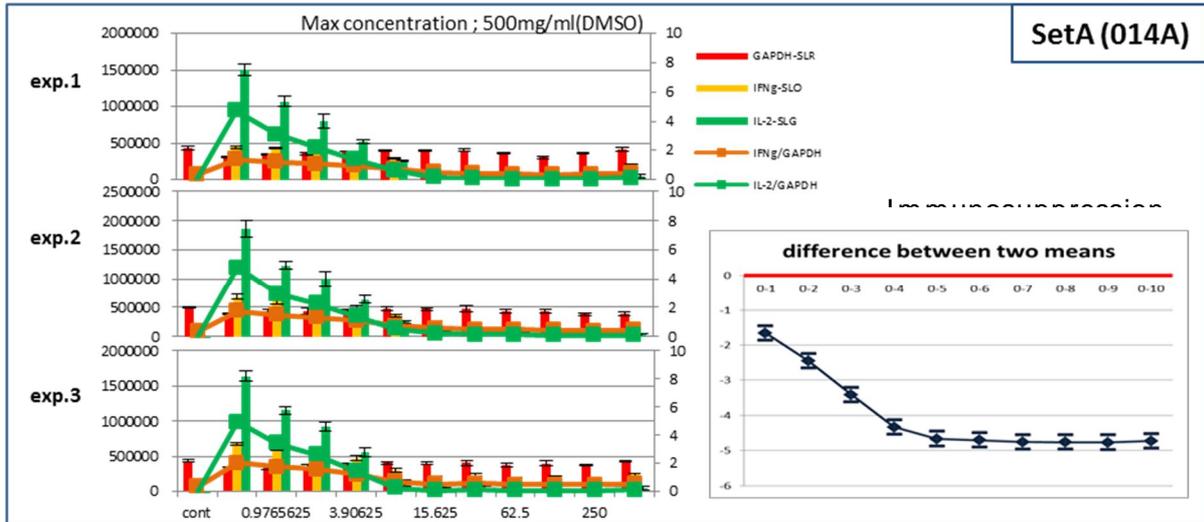
G. 研究発表

学会発表

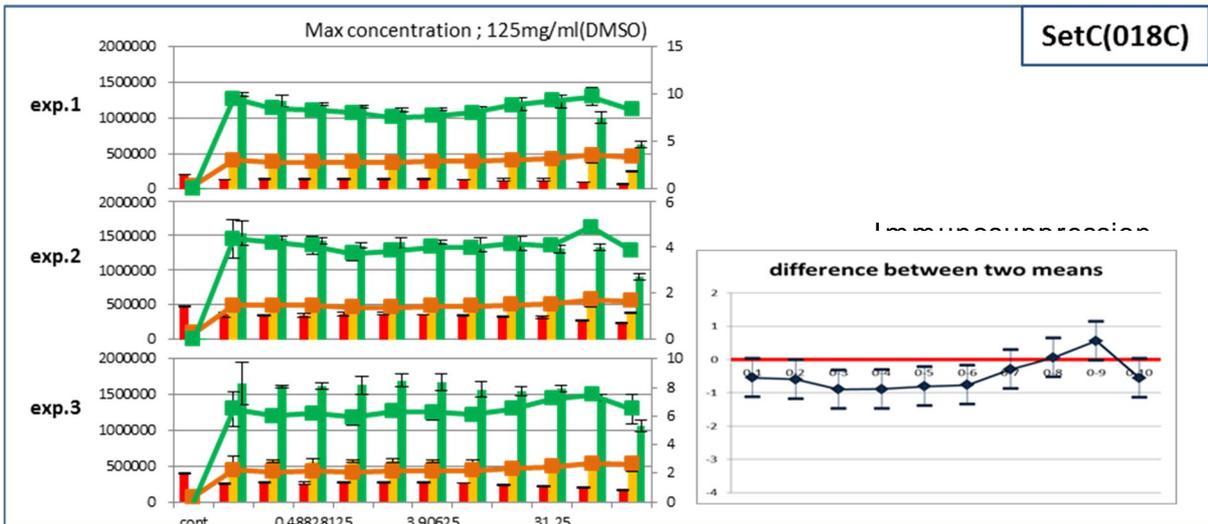
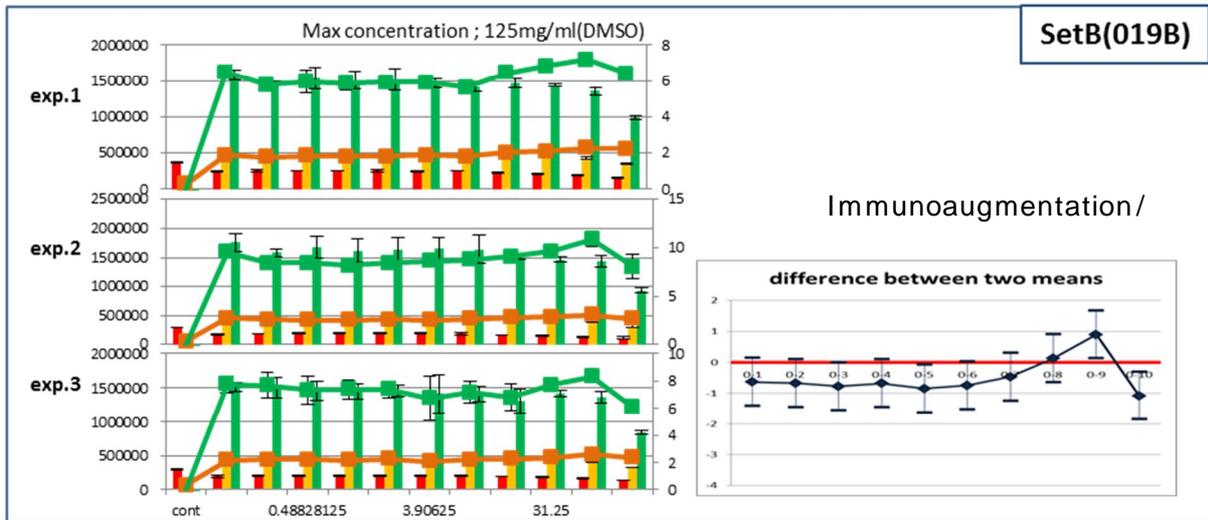
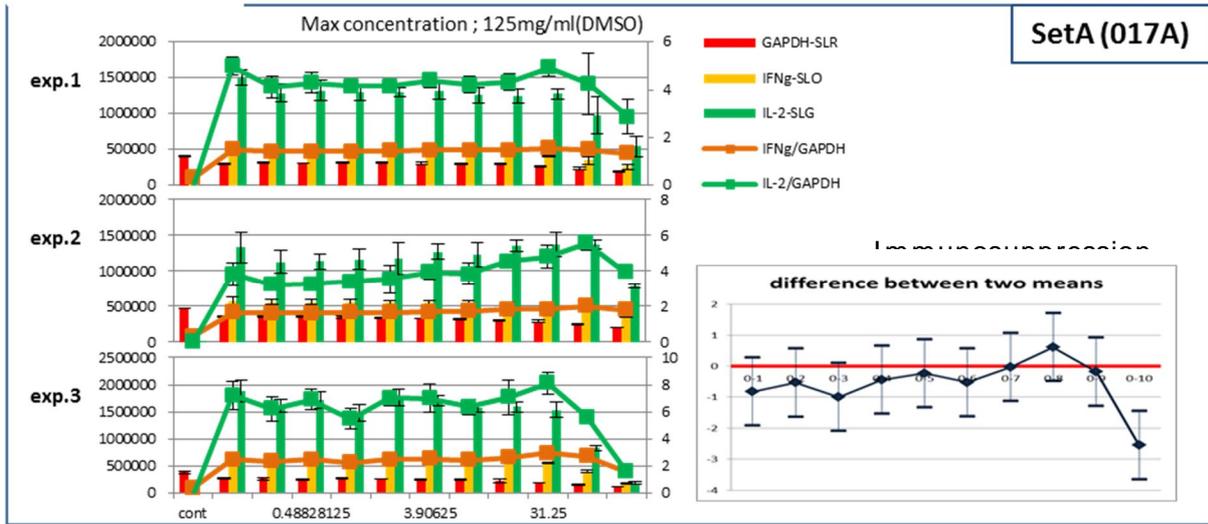
Rie Yasuno, Tadashi Nishida, Yoshihiro Ohmiya: Dual secreted and non-secreted luciferase assay system for assessment of human interleukin-2. *International Symposium on Biolumi. & Chemilumi.* Tsukuba, Japan (May, 2016)

図 1 Chemical No.1~5 の phase1 試験結果

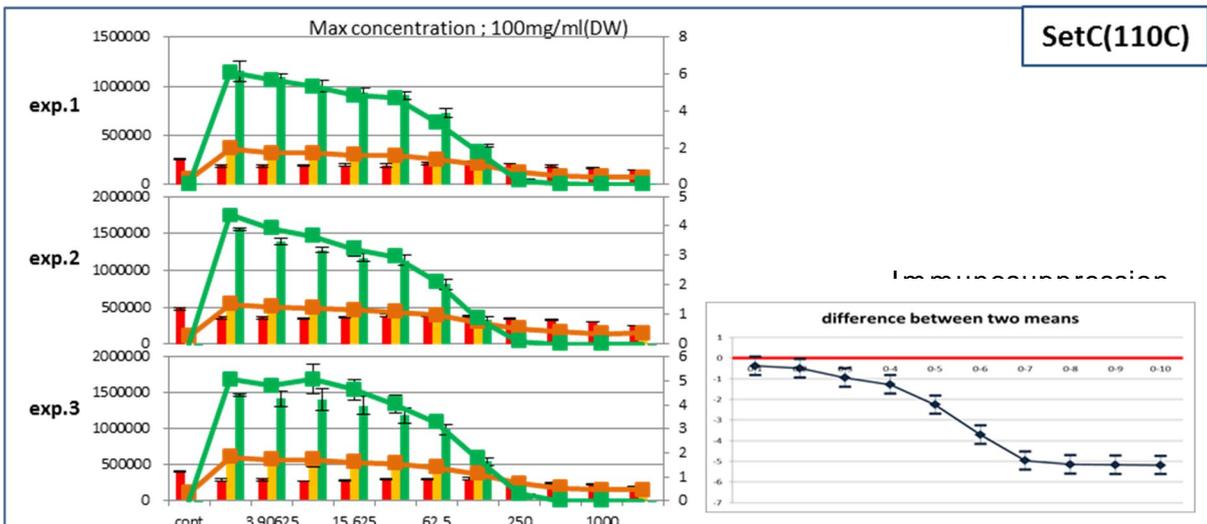
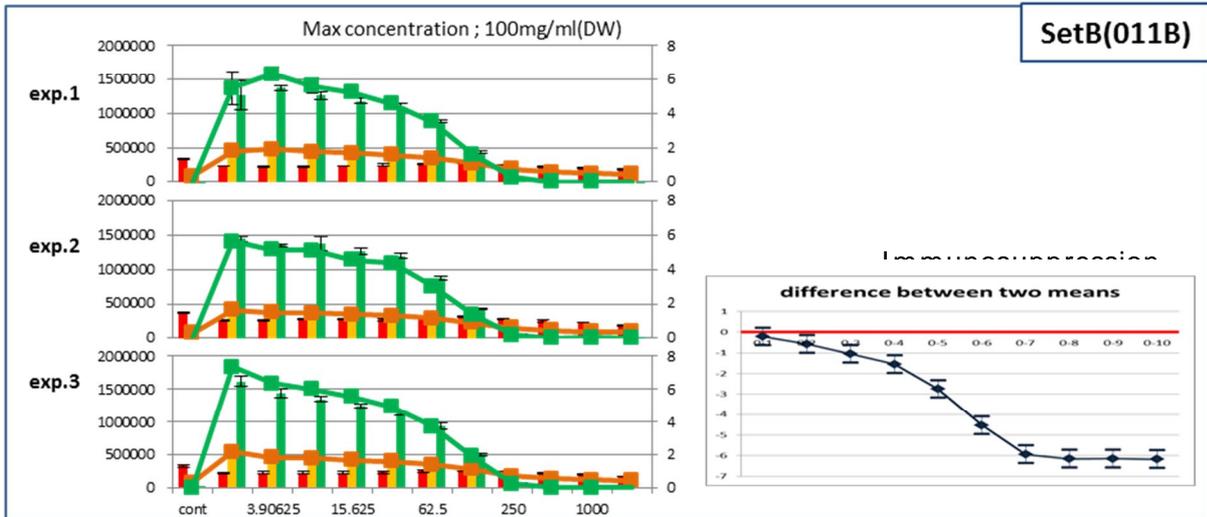
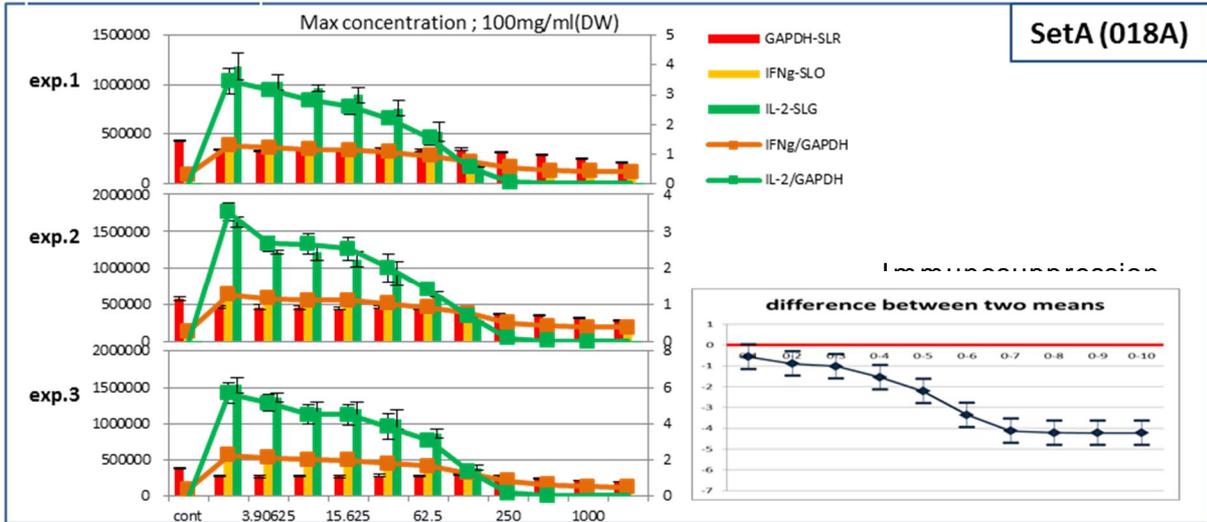
Chemical No.1



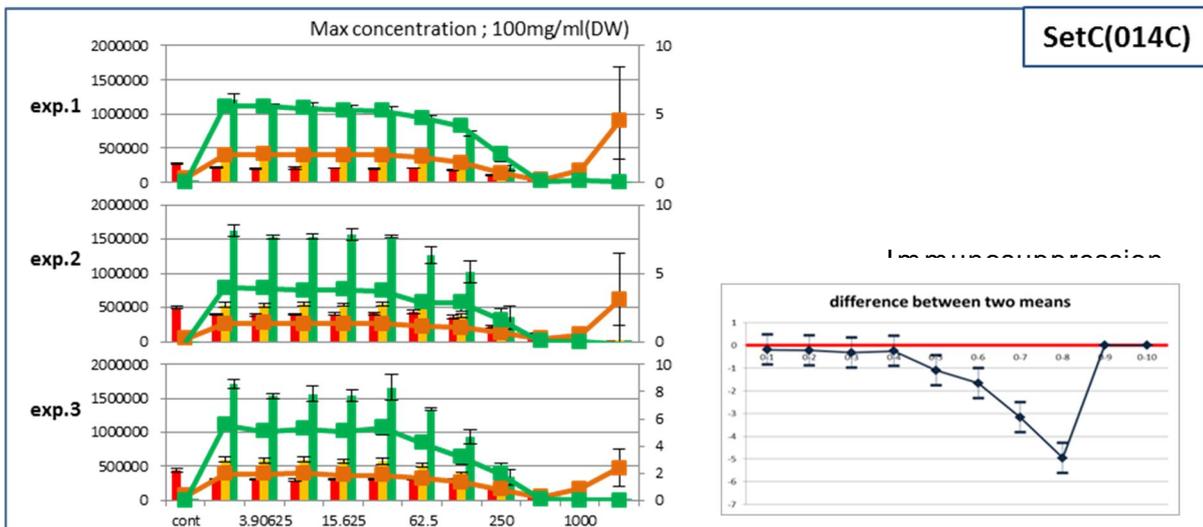
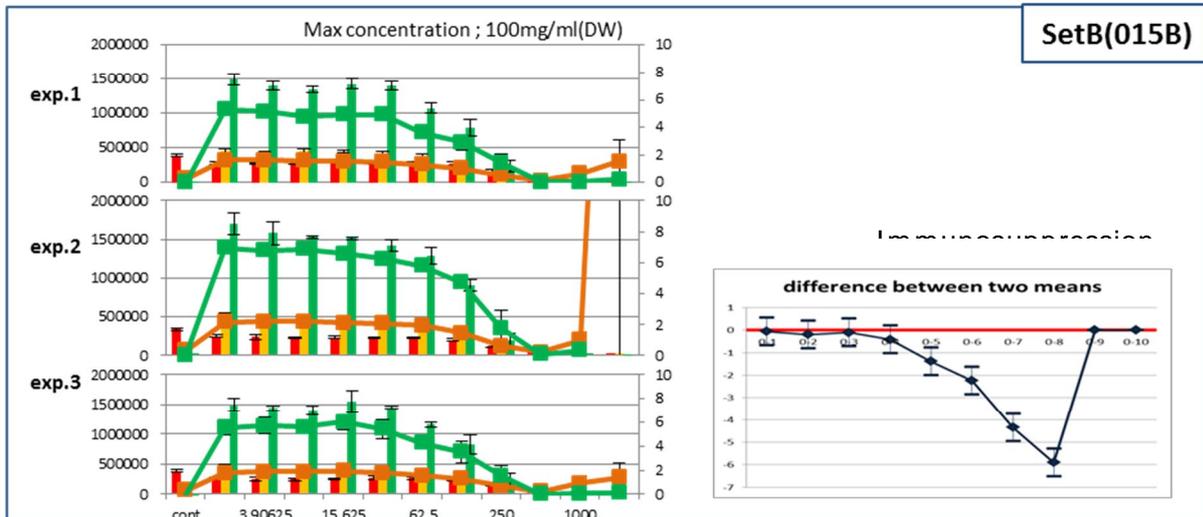
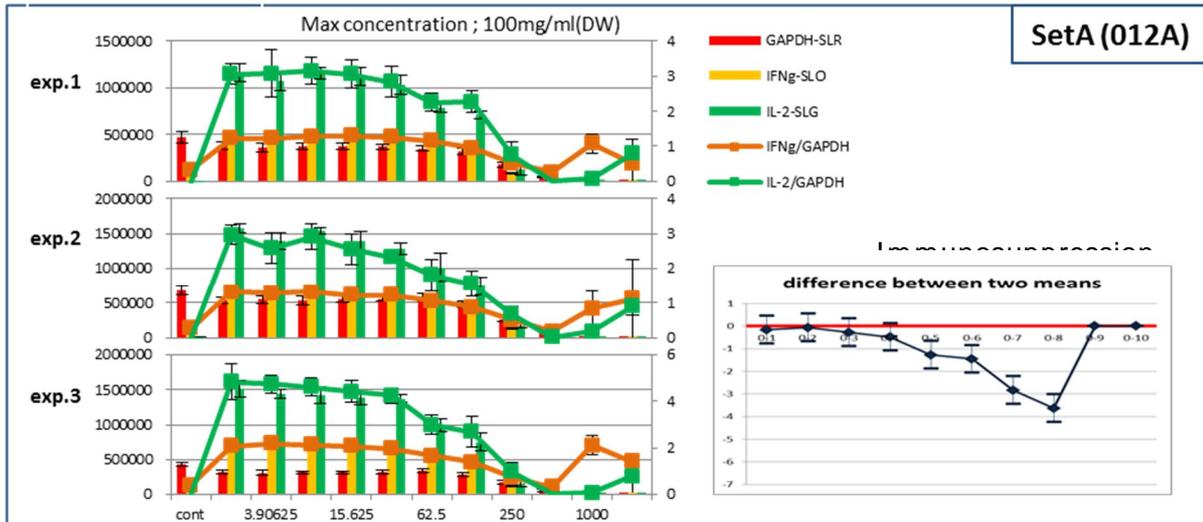
Chemical No.2



Chemical No.3



Chemical No.4



Chemical No.5

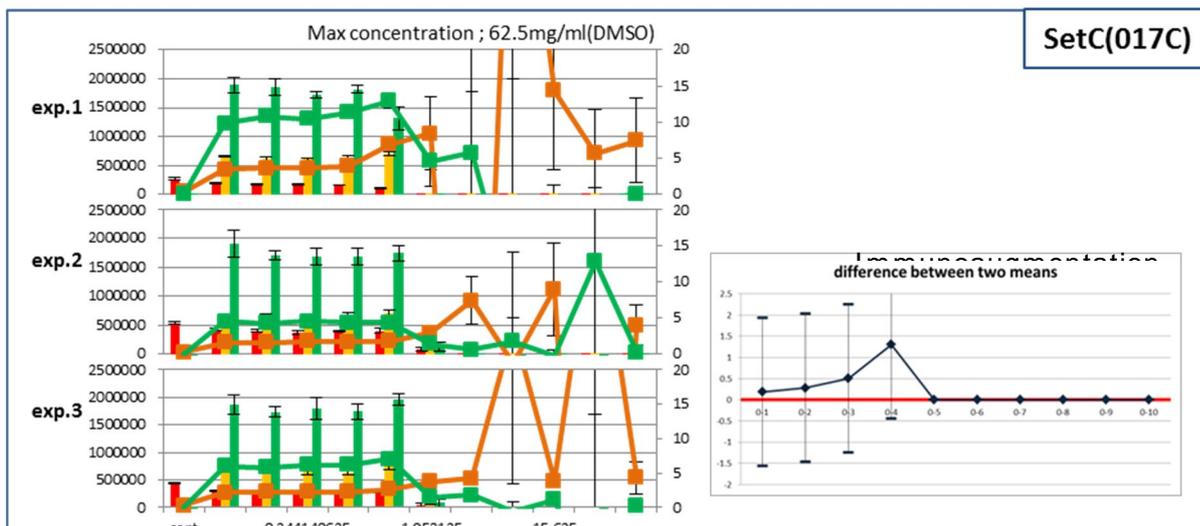
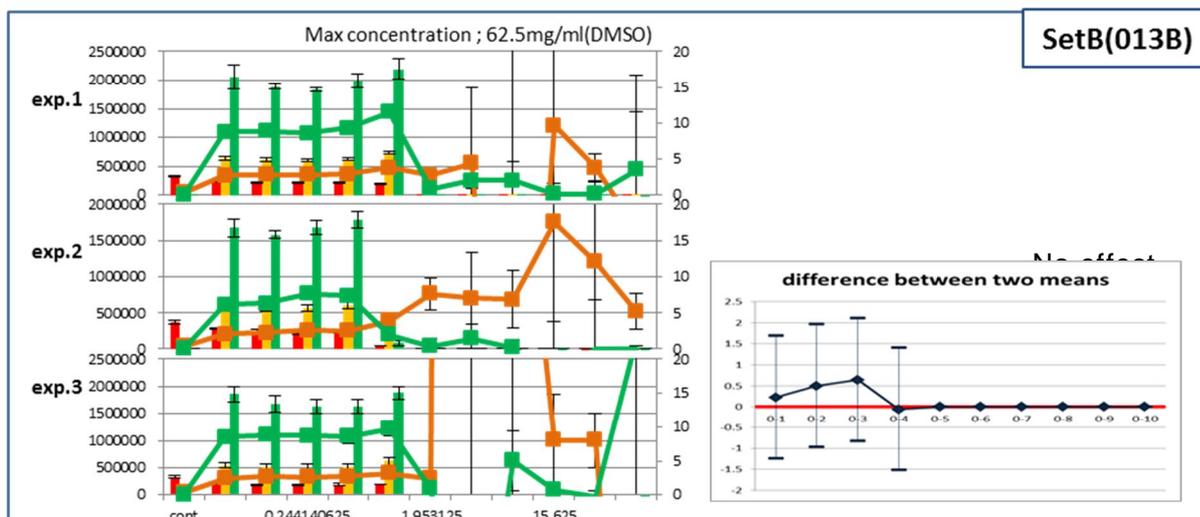
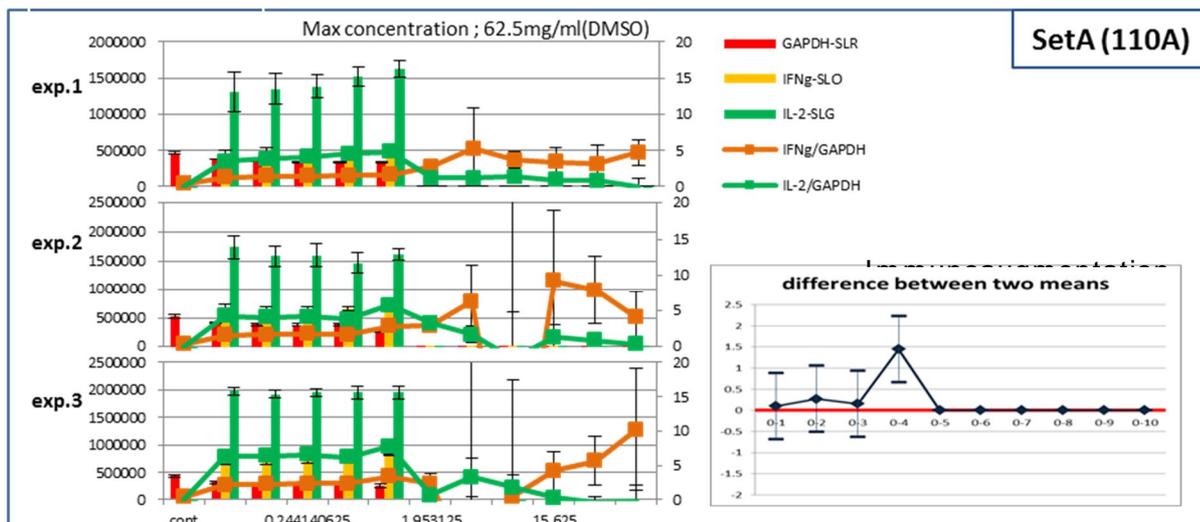


図2 各 Criteria における評価結果

		Criterion1	Criterion2	Criterion3
Chemical1	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/-)	S	S
Chemical2	Exp.1	N (-/+/-)	S	S
	2	N (±/±/0)	A and S	S
	3	N (-/0/0)	S	A and S
Chemical3	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/±)	S	S
Chemical4	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/-)	S	S
Chemical5	Exp.1	A (0/+/+)	A	A
	2	N (+/±/0)	N	N
	3	N (+/-/±)	A	N

S ; immunosuppression

A ; immunoaugmentation

N ; No effect

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-ImmunoToxicity assayの国際validationへ向けての検討
分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoToxicity assay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) は、T細胞、マクロファージのサイトカイン転写調節に及ぼす化学物質の影響をレポーター遺伝子の発光を利用して評価できる化学物質の免疫毒性評価試験法である。これまでに得られた知見から、相場らはIL-2転写調節障害をkey eventとするT細胞分化異常誘導とIL-8転写活性更新をkey eventとした気道刺激性に関わるadverse outcome pathway (AOP)を作成した。このような背景のもと、IL-2レポーター活性を指標とするT細胞分化異常誘導化学物質のスクリーニング法の確立を目指し、バリデーション試験が開始された。我々は、試験施設としてMITAのIL-2レポーターアッセイを実施し、Phase 0として良好な技術移転性を確認した。今年度は、Phase 1としてコード化した5種類の化学物質を用いて施設内再現性および施設間再現性を検討し、良好な結果（施設内再現性：87%、施設間再現性：90%）が得られた。

キーワード：IL-2 レポーター活性、技術移転性、施設間・施設内再現性

A. 研究目的

化学物質の免疫毒性評価試験法であるMulti-ImmunoToxicity assay (MITA)および皮膚感作性試験法であるIL-8 Luc assayに関するこれまでの研究成果から、化学物質が3群に分けられることが明らかとなった。

これらの結果をもとに、相場らはIL-2転写調節障害をkey eventとするT細胞分化異常誘導とIL-8転写活性更新をkey eventとした気道刺激性に関わるAOPを作成した。IL-8 Luc assayについては、バリデーション試験が終了し、ガイドライン化が進められている。そこで、AOPを作成したIL-2レポーター活性抑制ないし増強化学物質のスクリーニング法の確立を目指し、バリデーション試験が開始され、昨年度は最初のステップとして、3施設[秦野研究所、産業技術総合研究所(バイオメディカル研究部門、つくばセンター)、(産業技術総合研究所高松研究所(健康工学研究部門、四国センター)]による技術移転性の確認を行った。

今年度は、良好な技術移転性の結果を踏まえ、施設内再現性および施設間再現性を確認するため、コード化化学物質を用いたPhase 1を実施した。

B. 研究方法

B-1) 用いた細胞

IL-2レポーター活性試験には、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（T細胞由来）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

コード化された化学物質が国立医薬品食品衛生研究所から送付され、全部で5種類の化学物質を1セットとする3セット（Aセット：21A、23A、25A、27A、29A、Bセット：24B、25B、26B、27B、210B、Cセット：21C、23C、25C、27C、29C）を受領した。

B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコールに準じて行った。概要としては、#2H4細胞を96 wellプレートに播種(2×10⁵細胞/ウェル)し、適切な溶媒(蒸留水またはジメチルスルホキシド)に溶解または懸濁した化学物質原液を調製し、さらに溶媒で段階希釈(公比2)して、10濃度を調製した。それらを培地に加えた処理液を調製し、細胞懸濁液と等量(50 μL/ウェル)を、細胞を播種した各ウェルに添加して処理を行った(溶媒の最終濃度:蒸留水は2 vol%,ジメチルスルホキシドは0.1 vol%)。処理開始1時間後にPMA/ionomycinによる活性化処理を行い、6時間処理(37℃、5%CO₂)後にTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を用いて各色ルシフェラーゼ活性をPherios(アトー社製)で測定し、IL-2プロモーター活性を算出した。実験は各物質について3回実験を繰り返し、1セットの実験終了後に次のセットの物質の実験を行った。

結果として、1物質あたり、3回の実験結果を評価単位として、それを3回(3セット)繰り返した。発光量の測定結果については、指定のデータファイル(エクセルシート)に入力し、リードラボである東北大へ送付した。

C. 結果

コード化されている5物質(1セット)の実験を3回繰り返したが、各セットの実験結果を図1~3に示した。プロトコールでは、1物質につき3回の実験を繰り返し、各実験についてIL-2レポーター活性が統計学的に抑制された場合をimmunosuppression、増強された場合をimmunoaugmentation、それ以外を無作用と判定し、その結果をもとにその物質の判定を行った。1セット目(Aセット)の5物質については、23Aを除く4物質のそれぞれ3回の実験結果はすべて一致し、すべてimmunosuppressionとなった(図1)。また、25Aおよび23Aでは高濃度において細胞毒性が認められ、2ないし4濃度のデータについては評価から除外する結果となった。このように、1セット目の結果については、実験間に良好な再現性が得られた。

同じ5物質の結果ではあるが、コード化されているため、セット間のデータ比較がで

きないが、2セット目(Bセット)の結果においても、27Bを除く4物質の3回の実験結果はすべて一致し、すべてimmunosuppressionとなった(図2)。また、セット1の結果と同様に2物質(24Bおよび27B)では細胞毒性のため、2ないし4濃度のデータについては評価から除外する結果となった。

3セット目(Cセット)も同様の結果が得られた(図3)。

D. 考察

施設内再現性および施設間再現性を確認するために、コード化した5物質を1セットとし、3セットの合計15物質について3回の繰り返し実験を行った、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、つくばセンター、四国センター)の結果がリードラボである東北大に集められ、東北大および統計処理を担当する神戸大で比較検討された。

判定基準は、MITAプロトコールに記載されている基準(図1~3の結果)以外に、1物質について3回実施される結果を合わせて判定する方法も提案されており、それらについても検討が行われた。結果として、もっとも良い結果となった判定法における施設内再現性は87%、施設間再現性は90%となり、良好な結果が得られた。

良好なこの結果を我々の結果にフィードバックして考えた場合、繰り返した3回の実験結果を各セットの結果間で比較すると、コード化しているにも関わらず、同一の物質であることが予測できるほど類似の結果が得られていることが分かる。すなわち、結果がばらついた23A、27B、29Cは同一物質であり、細胞毒性の認められた25A、24B、21C、3回ともに強い反応が認められた27A、26B、23C、抑制物質ではあるが、その反応が弱い29A、28B、25C、比較的濃度依存性の明確な21A、210B、27Cがそれぞれ同一物質と予測された。コード化されていることから、このような予測に意味は無いが、3回の繰り返し実験および3セットの繰り返し実験においても非常に再現性の高い反応性を示す試験系であることが示唆され、良好な施設内および施設間再現性を指示する結果であると考えられた。

E. 結論

コード化した5物質について、3回の結果を比較し、良好な施設内再現性が得られていることを確認した。また、これらの結果を試験施設である他の2施設の結果と比較することにより、良好な施設間再現性が得られたことを確認した。

なし

G. 研究発表

なし

F. 参考文献

図1 コード化5物質 (Aセット) の IL-2 レポーター活性試験の結果

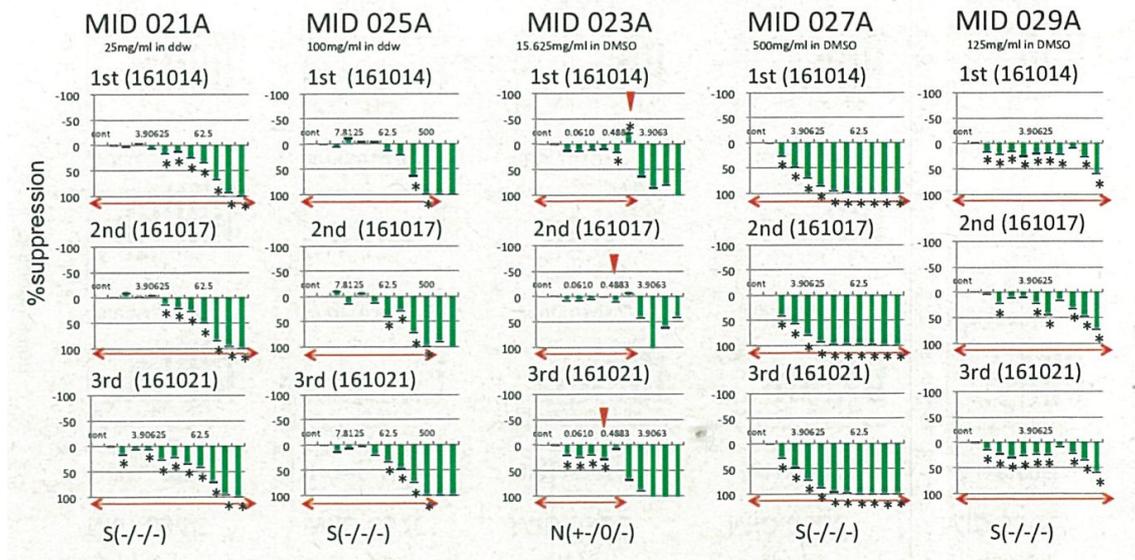


図2 コード化5物質 (Bセット) の IL-2 レポーター活性試験の結果

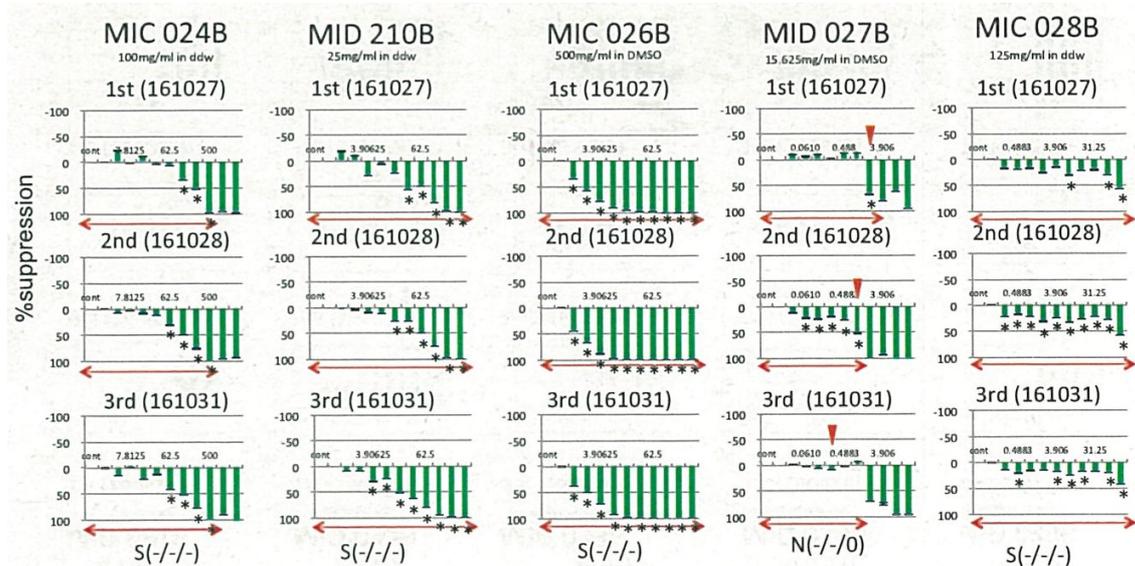
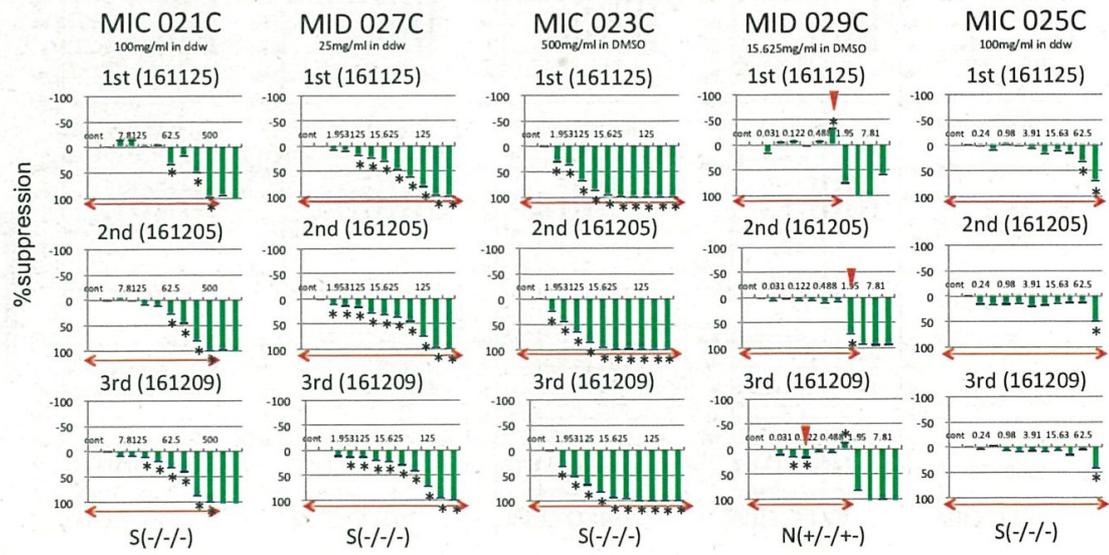


図3 コード化5物質(Cセット)のIL-2レポーター活性試験の結果



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Multi-ImmunoToxicity assayによる解析, validation

分担研究者 中島芳浩
産業技術総合研究所 健康工学研究部門

研究要旨

IL-2プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼ、INF γ プロモーター活性を橙色ルシフェラーゼ、さらに両プロモーター活性を補正するための内部標準プロモーターG3PDH活性を赤色ルシフェラーゼでモニターするJurkat細胞（2H4細胞）を用いた化学物質免疫毒性評価系Multi-ImmunoToxicity assay (MITA)のPhaseIバリデーション試験を実施し、良好な施設内および施設間再現性を得た。

A. 研究目的

環境中に存在する何万という化学物質のなかには、免疫系を標的として健康被害を及ぼすものが多数存在する。したがって、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。当該研究では、免疫毒性に影響を及ぼす化学物質を簡便に評価するための発光レポーターを利用した invitro 免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoToxicity assay）を構築、本試験法のガイドライン化を目指し、本年度は5種類のコード化した被験物質を用いた1セット3回からなる試験を3回繰り返すPhaseIバリデーション試験を実施した。

B. 研究方法

IL-2、IFN γ とG3PDHプロモーターにそれぞれ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 Ver.008.5E 20160914に準ずる。

試験化学物質としてコード化した5物質3組を供試し、発光測定装置はアトー社製Pheliosを用いた。

（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. 研究結果

MITAバリデーション試験 phaseIとして、コード化した5物質3組（Set A、B、C）に対し#2H4細胞株を用いた試験を実施した。各物質に対し3回繰り返し試験を行った。図1にSet A、図2にSet B、図3にSet Cの結果を示す。提案された3種類のcriteriaを用いて各物質を評価した結果を表1に示した。これらの判定結果は他実施施設（食品薬品安全センター、産総研つくばセンター）による結果とも5物質中4物質が一致した。また、施設内再現性についても良好な結果を示した。

現在、リードラボである東北大にて、正確性、施設間および施設内再現性の向上を目的としてプロトコルの改善が検討されている。今年度のPhaseIバリデーション試験の結果をもとに、次年度以降はPhaseIIバリデーション試験に進む予定である

D. 考察

PhaseIバリデーション試験の結果、criteriaによって判定が異なる場合もあるが、概ね再現性良く免疫抑制物質を識別できた。

来年度以降はバリデーション試験を進めていく予定であるが、被験物質の溶解性の判定が各施設で一致しないといった細かな問題についての改善が必要となった。これらの問題を解消し、なおかつ正確性や再現性について一層の向上を図るため試験プロトコルおよびcriteriaの最適化が求められている。今後は改訂したプロトコルに基づいてPhaseIIバリデーション試験へと進み、本試験のガイドライン化を目指す予定である。

E. 結論

5種類のコード化した被験物質を用いた1

セット3回からなる試験を3回繰り返すPhaseIバリデーション試験を実施、良好な施設内および施設間再現性を得た。また、再現性や精度を高めるための実験操作等の改善点を抽出し、PhaseIIバリデーション試験における諸条件の改善のための情報を提供した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

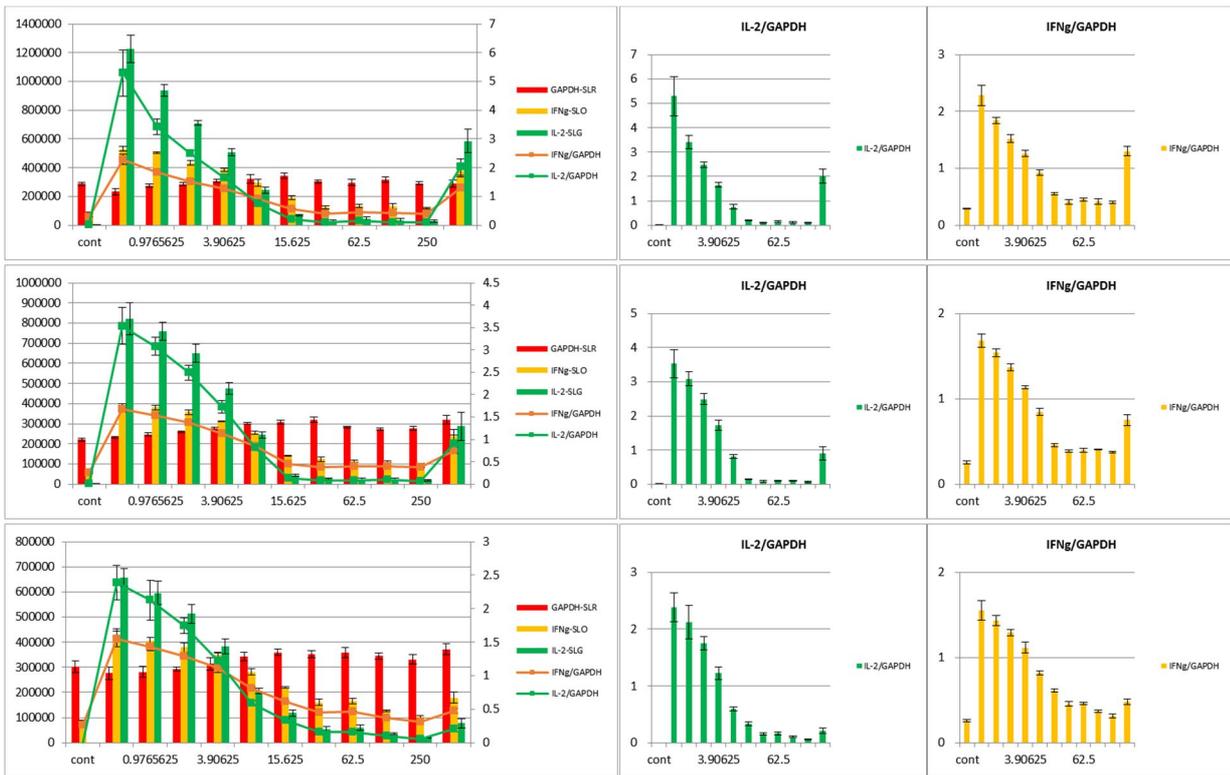
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

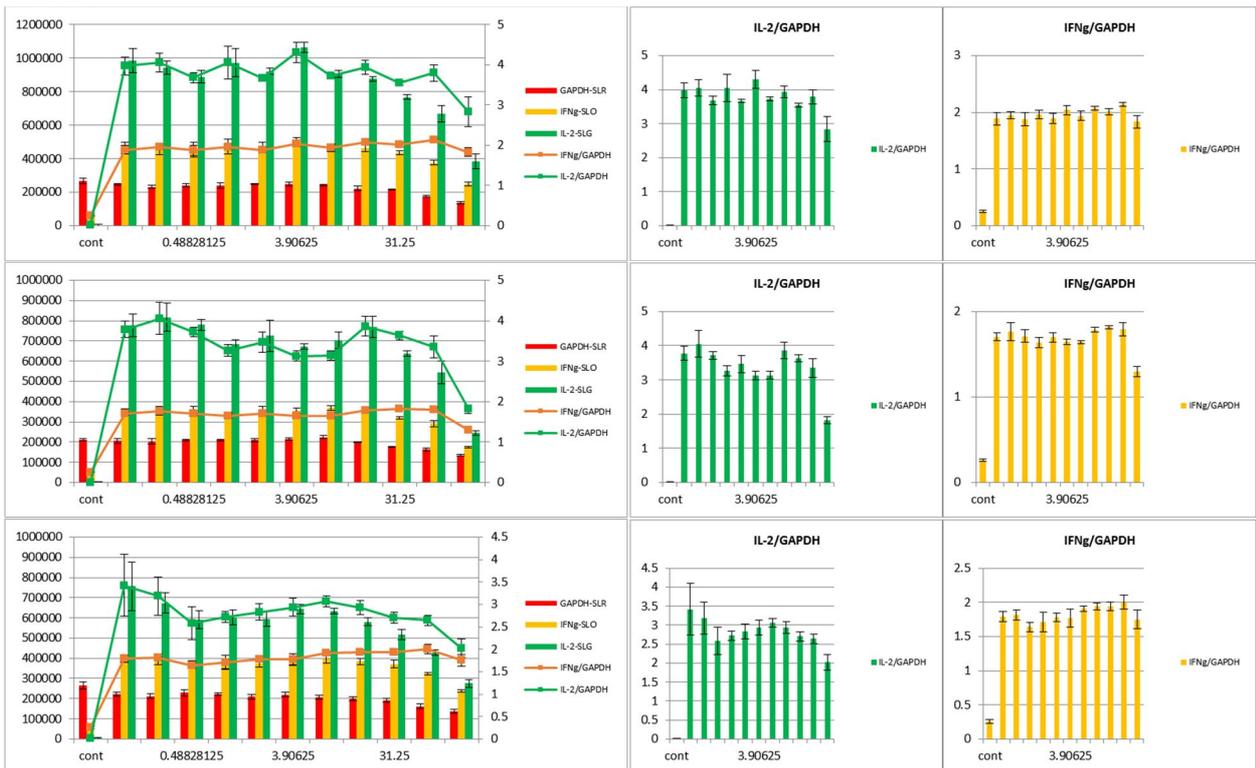
該当なし

図1 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。(Set A)

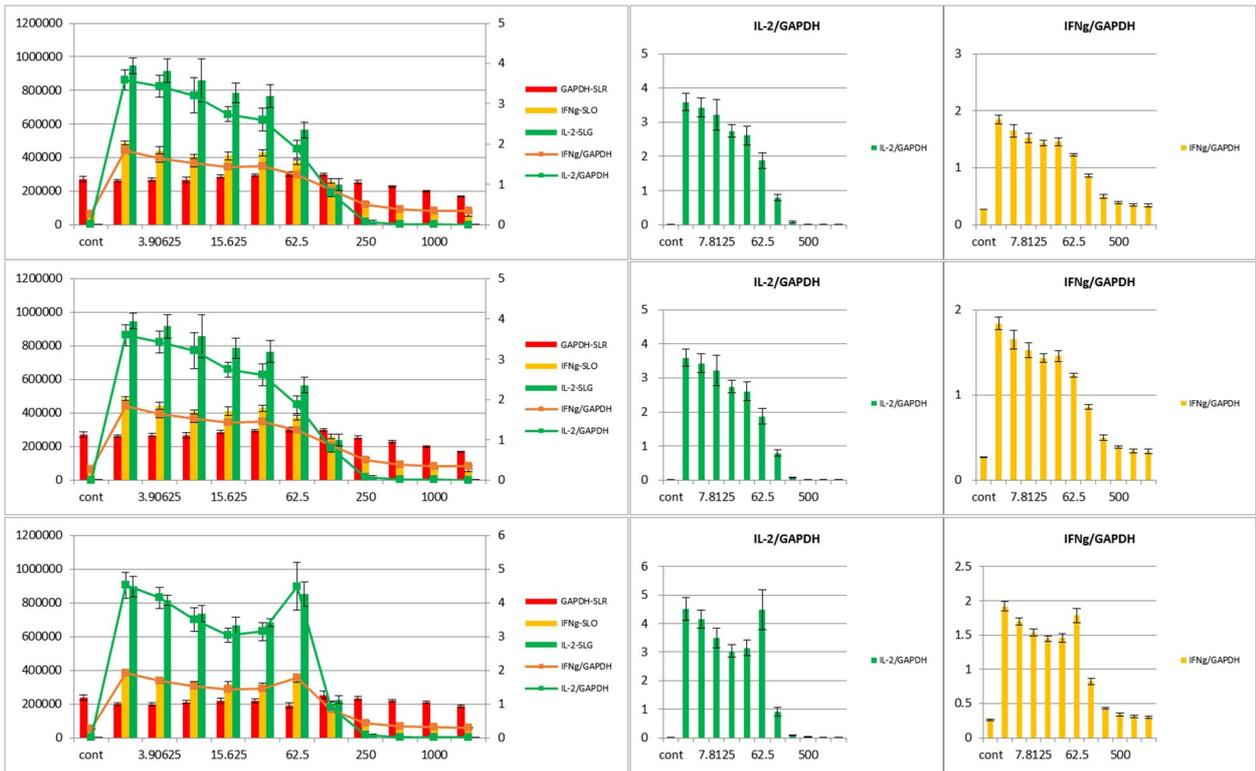
< 036A >



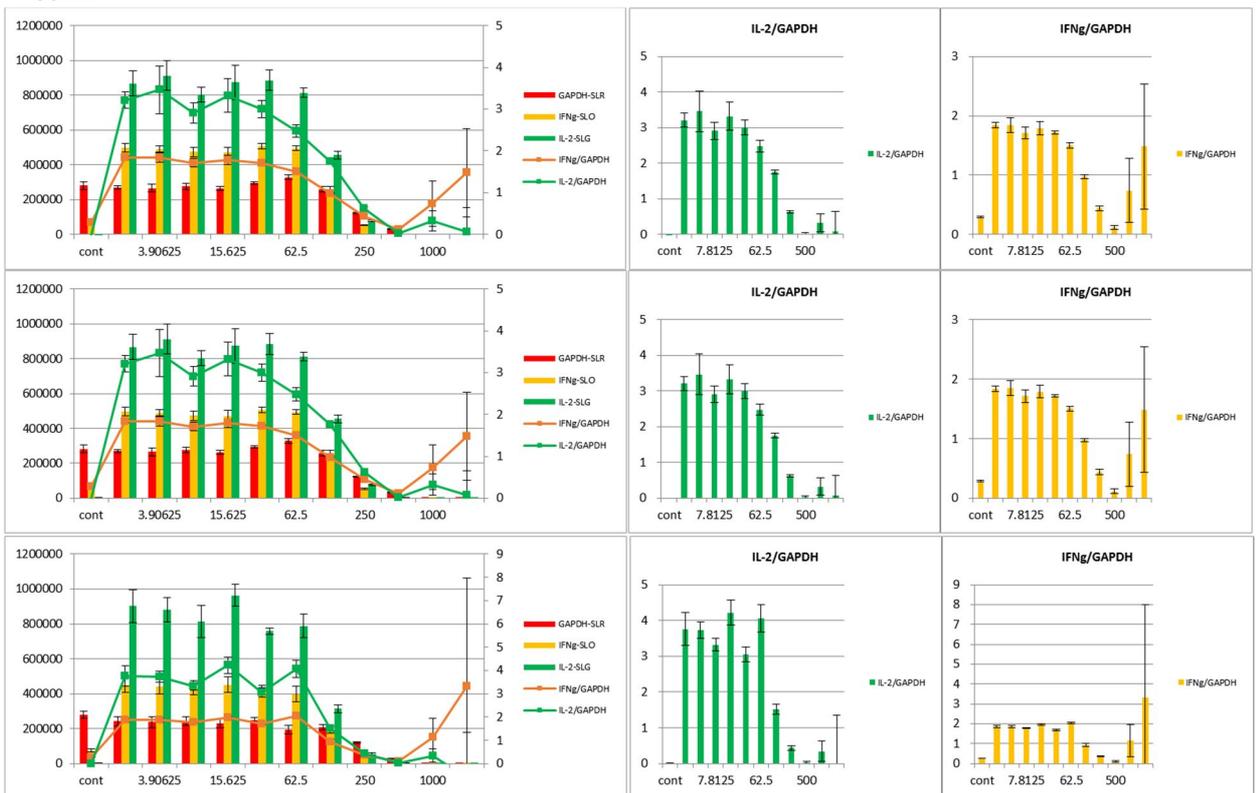
< 038A >



< 310A >



< 034A >



< 037A >

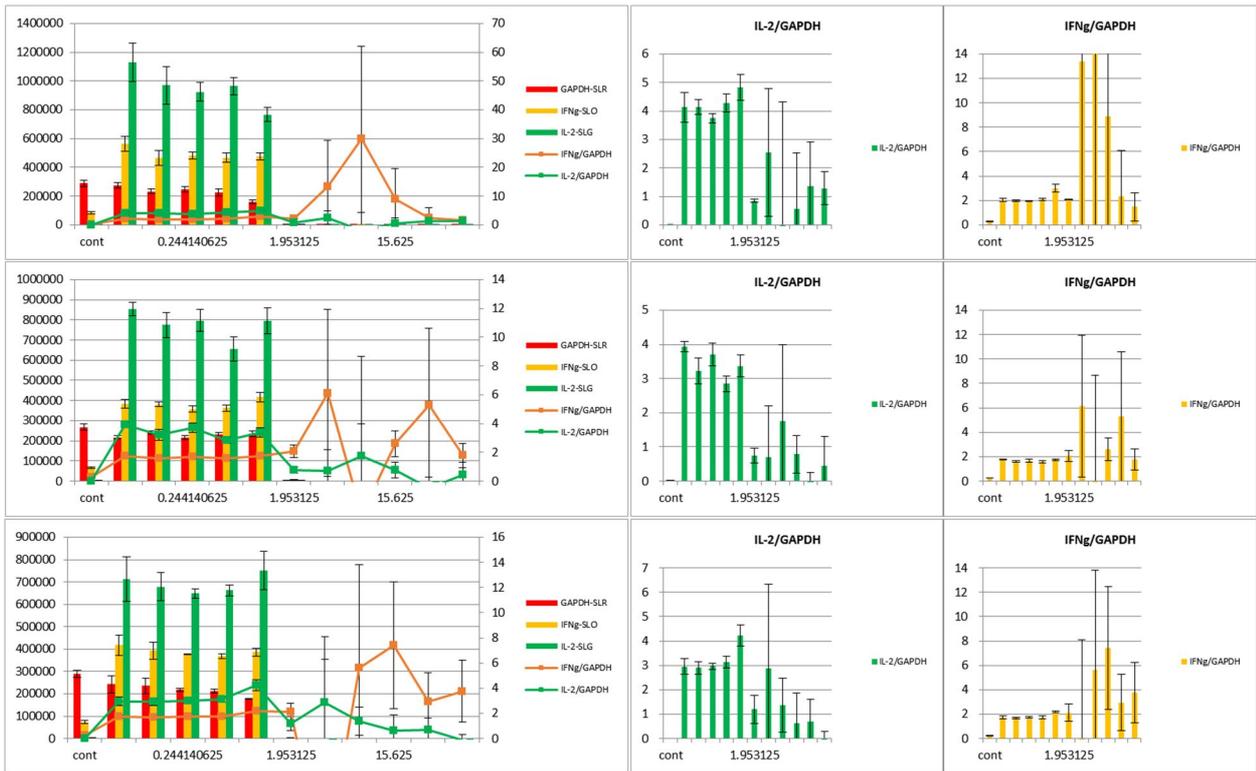
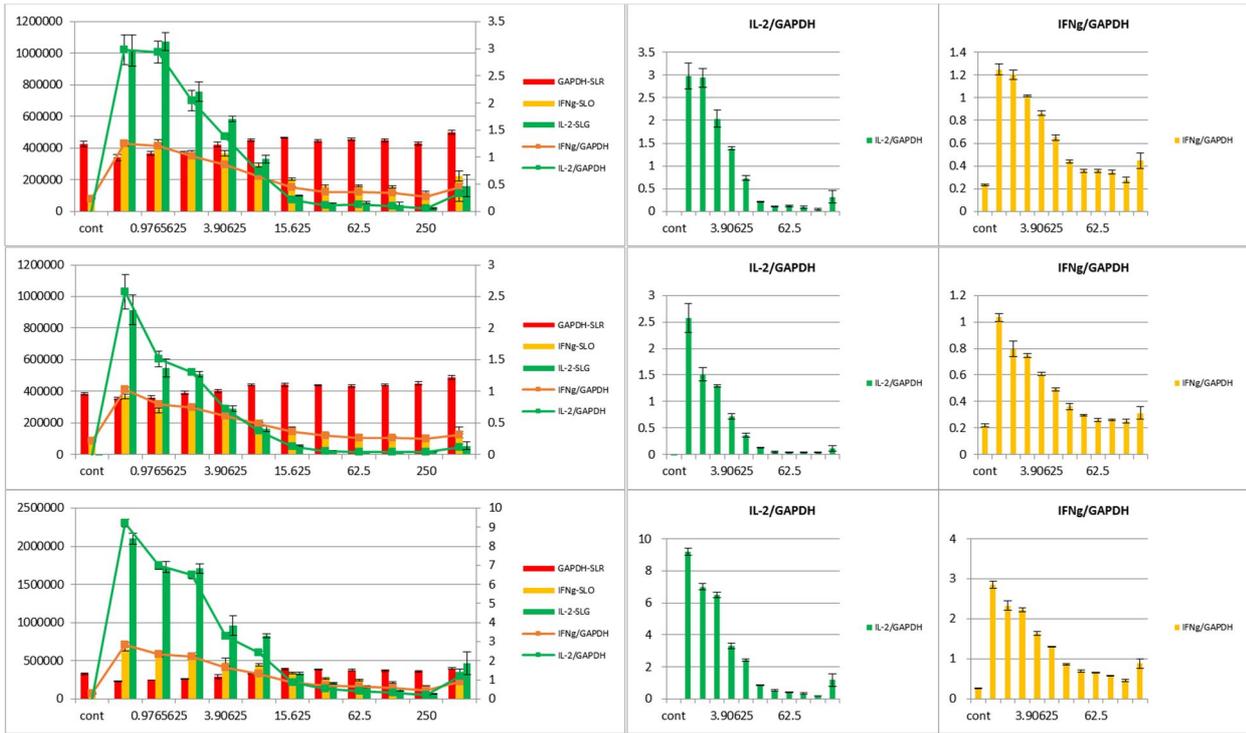
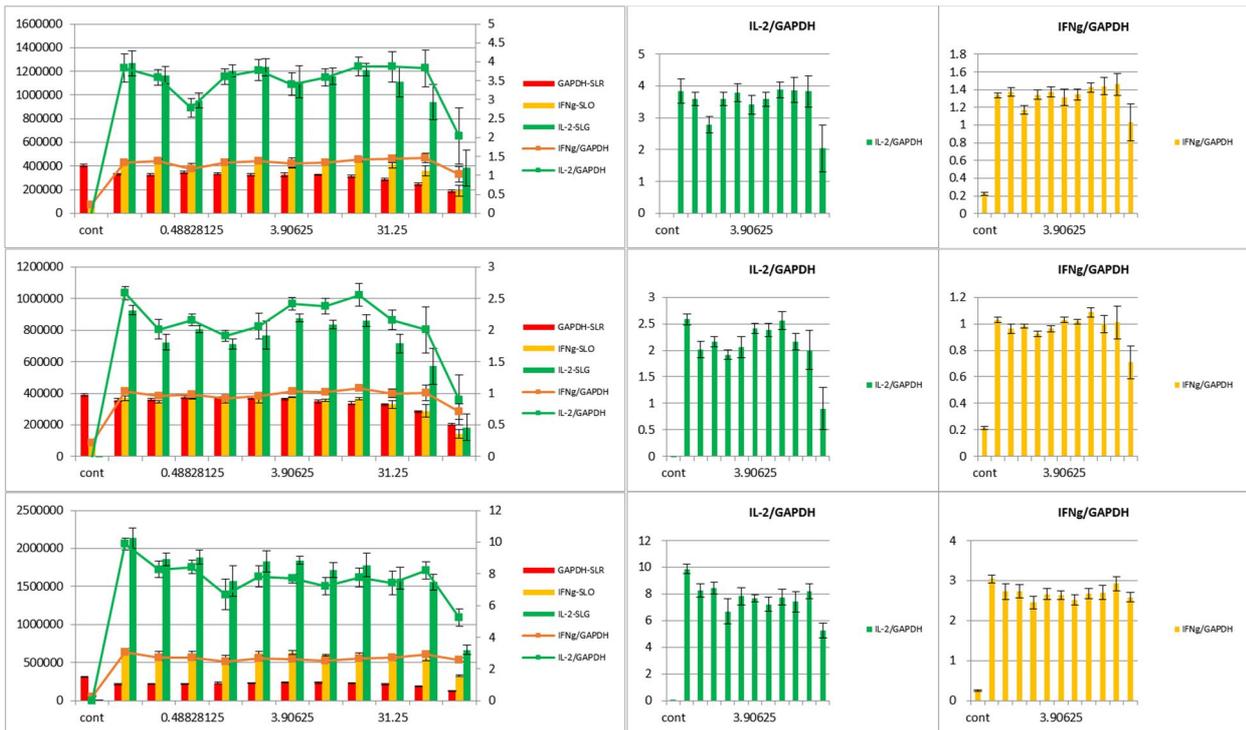


図2 Jurkat 細胞由来株#2H4 における各試験化学物質に対する細胞応答性。(Set B)

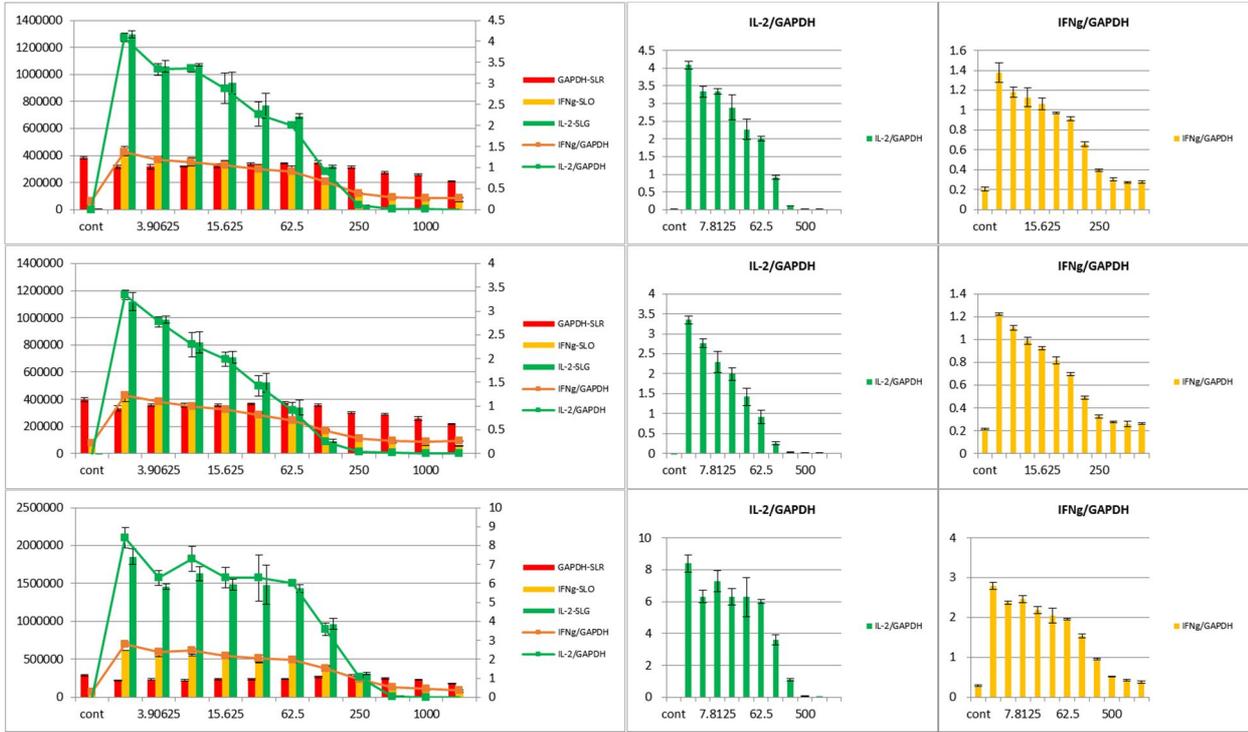
< 033B >



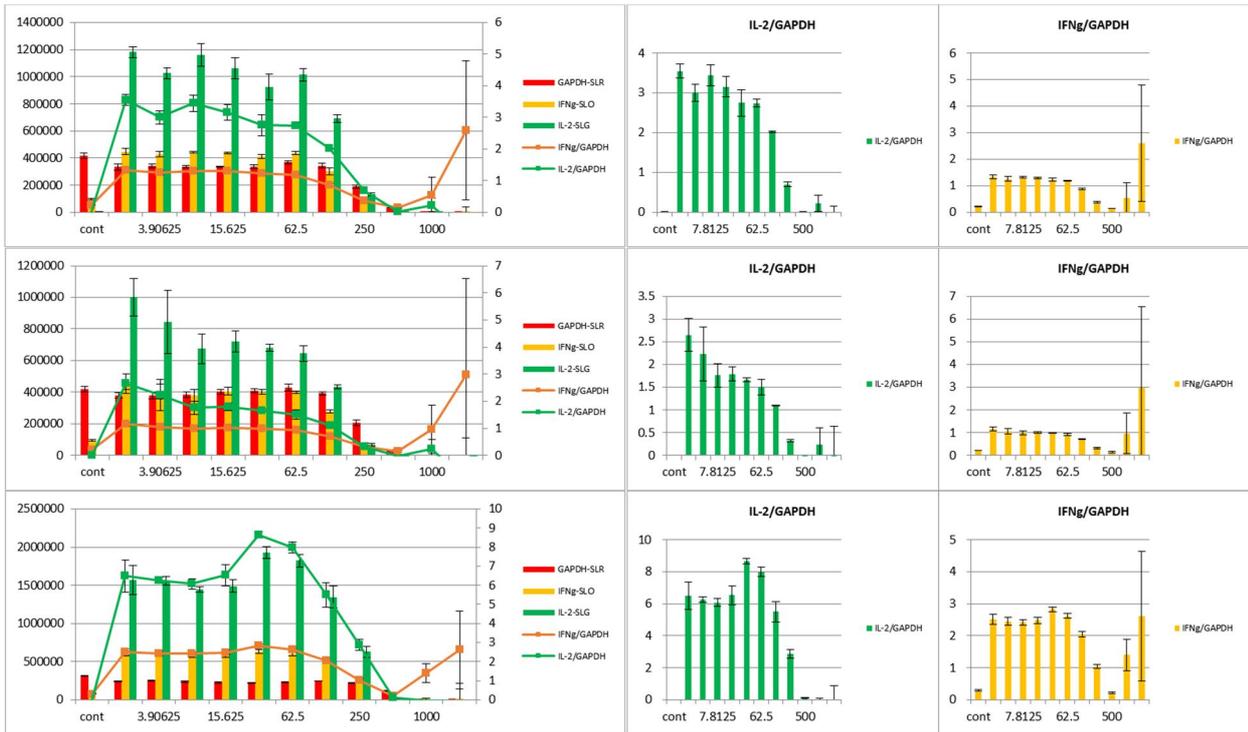
< 035B >



< 037B >



< 031B >



< 039B >

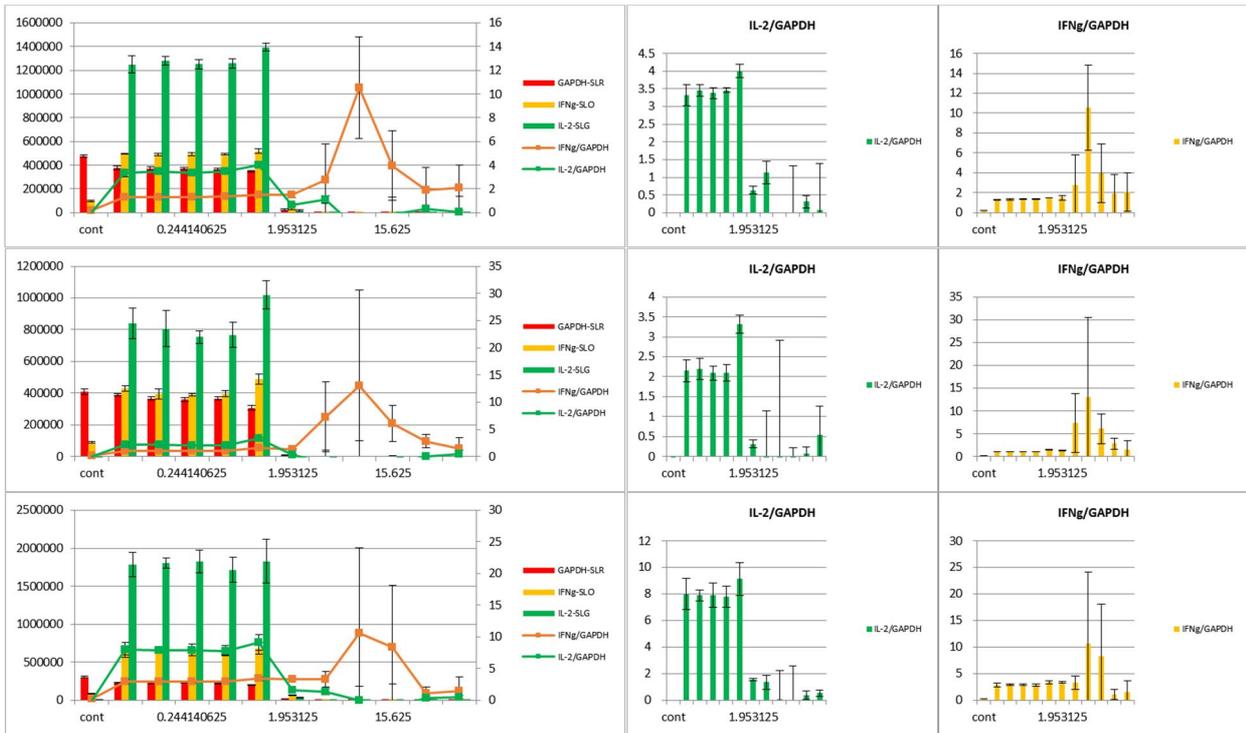
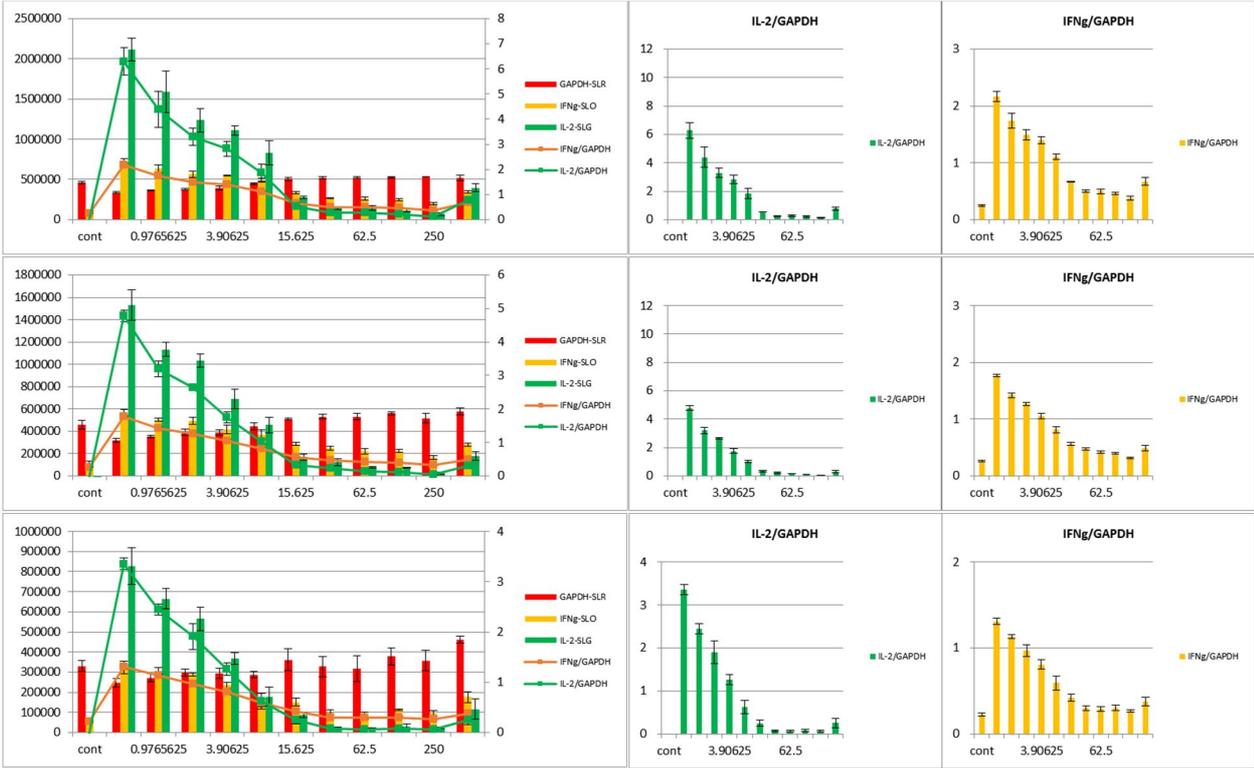
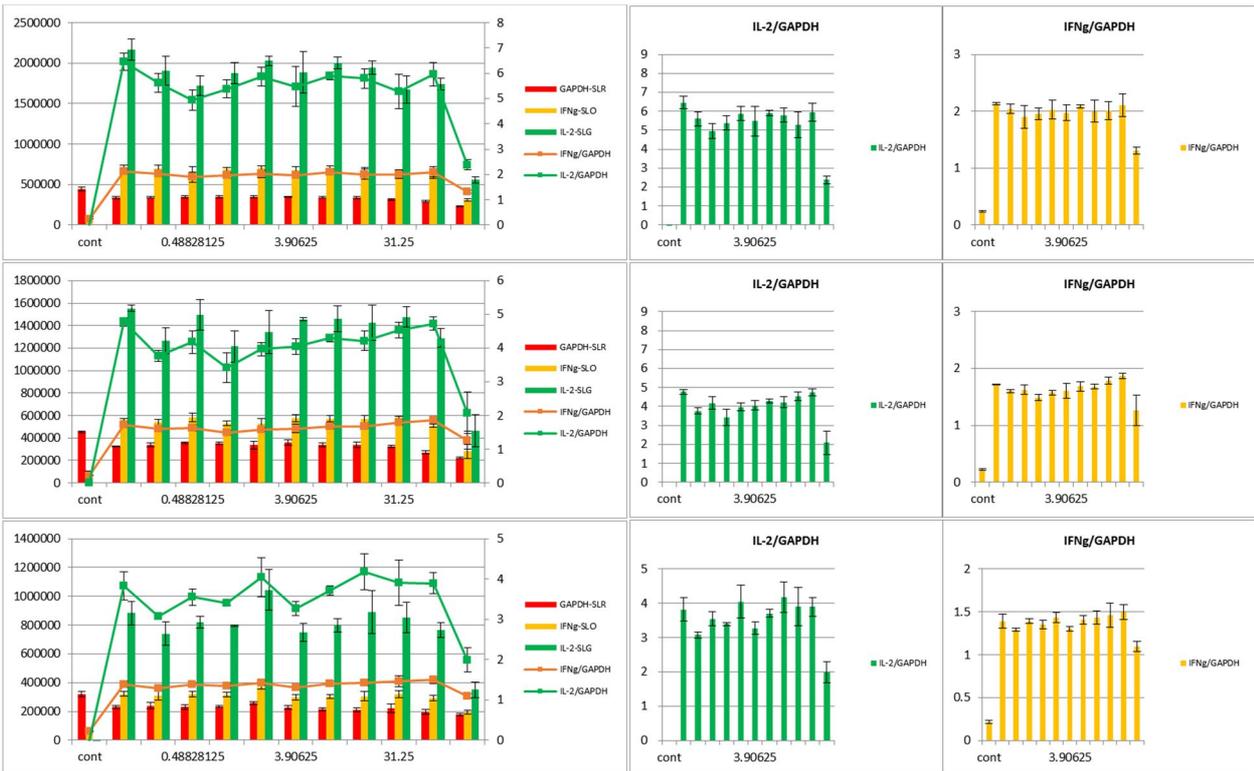


図3 Jurkat 細胞由来株#2H4 における各試験化学物質に対する細胞応答性。(Set C)

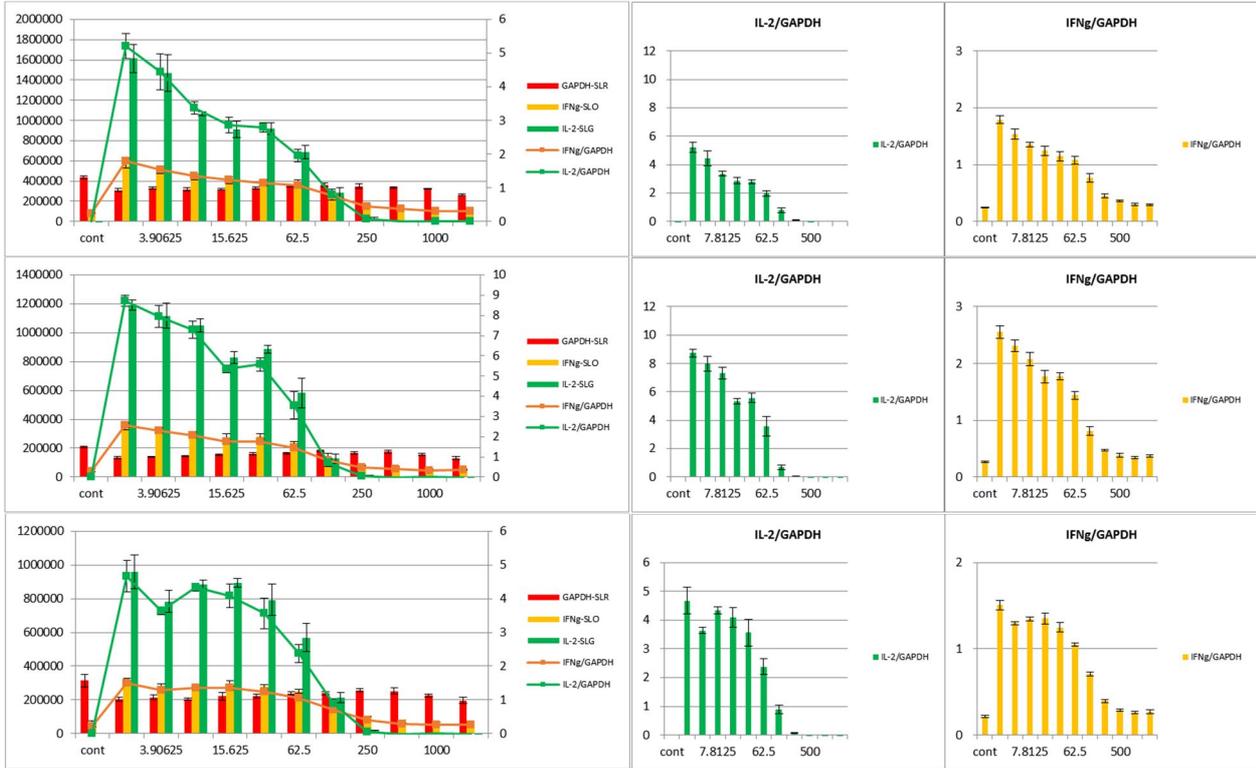
< 034C >



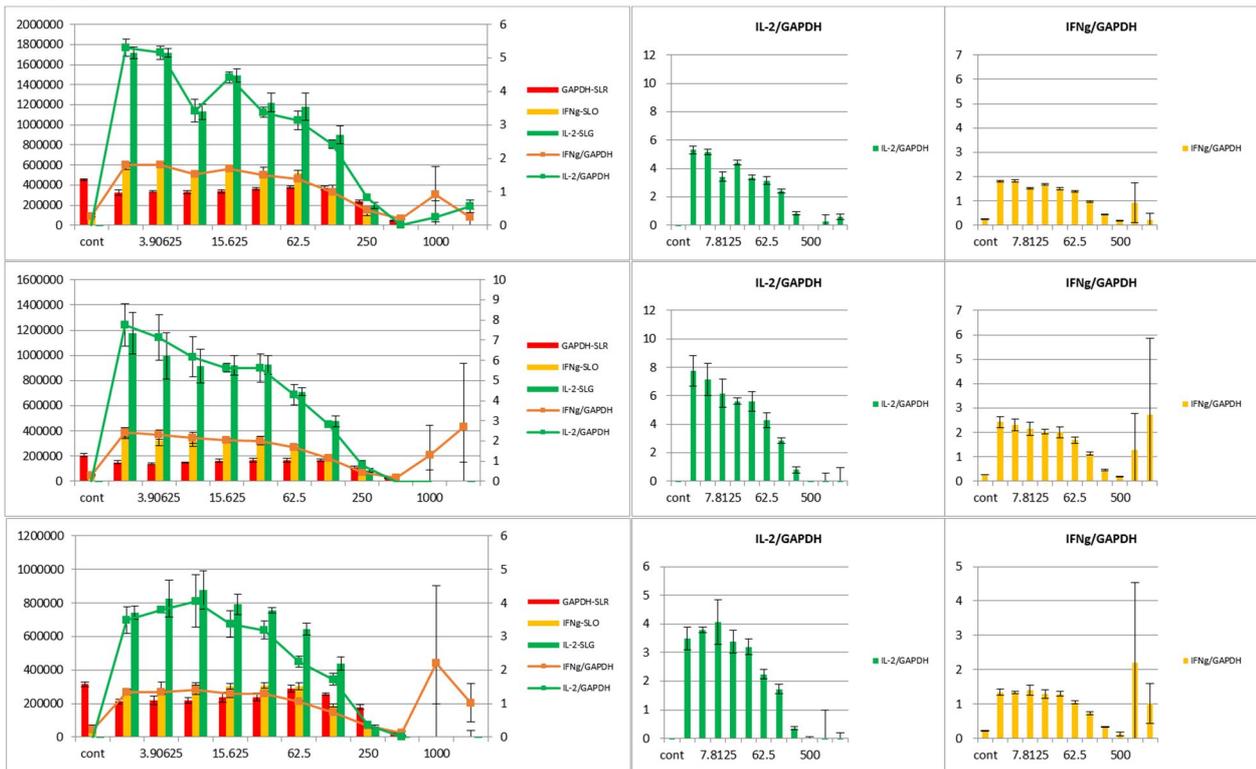
< 037C >



< 038C >



< 032C >



< 310C >

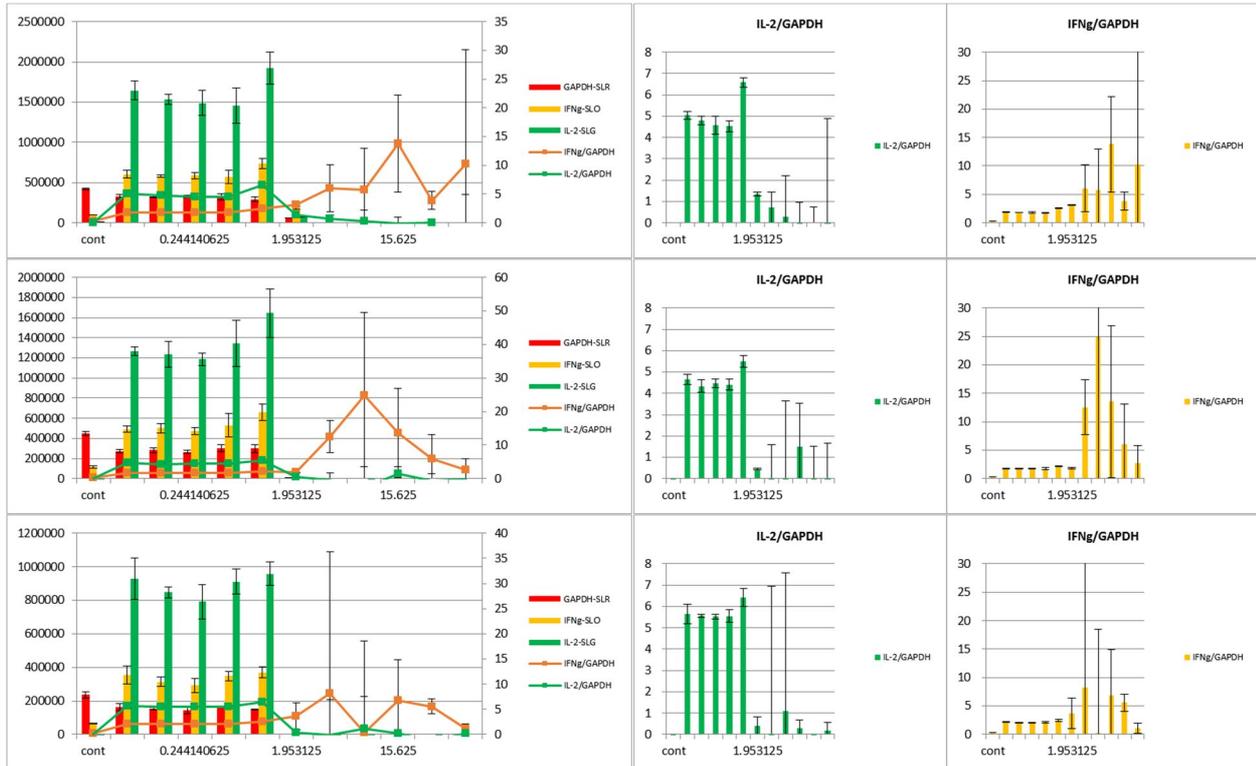


表 1. 5 物質の各 criteria における評価

物質	コード番号	Criterion 1	Criterion 2	Criterion 3
1	036A	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	033B	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	034C	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
2	038A	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	035B	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	037C	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
3	310A	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	037B	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	038C	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
4	034A	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
	031B	S (-/-/+)	Immunosuppression	Immunosuppression
	032C	S (-/-/-)	Immunosuppression	Immunosuppression
5	037A	N (0/-/+)	Immunoaugmentation	No effect
	039B	N (+-/+/)	Immunoaugmentation	Immunoaugmentation
	310C	N (+-/+/)	Immunoaugmentation	Immunoaugmentation