

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
(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細胞分化異常誘導化学物質評価系の国際バリデーションPhase 2試験（施設間再現性試験）を実施した。コード化された20物質において、1セット3回からなる試験を実施し、その結果、バリデーション参加3施設間での良好な施設間再現性が確認された。

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。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入れたバリデーション試験の実施を目的とする。

具体的には、東北大学で樹立された Jurkat 細胞における IFN- 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 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し、

ガイドライン化するための手法の最適化を目指す。プロジェクト1,2年目では、免疫毒性の評価系として#2H4 細胞株を用いた IL-2 プロモーター活性抑制評価系のプレバリデーション（技術移転性の確認）およびコード化された5物質を用いたバリデーション Phase1 試験（施設内再現性及び施設間再現性）において良好な結果を得た。本年度は、次のステップとして、バリデーション Phase2 試験を実施し、20種類のコード化された被験物質の評価を行い、施設間再現性について検証を行う。

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.009.1E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20種類のコード化した被験物質を供試した。各物質1セット3回からなる試験を実施し、IL-2レポーター活性抑制の有無を評価した。他のバリデーション参加施設（食品薬品安全センター、産総研四国センター）の評価結果と比較し、施設間再現性について検証した。（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. 研究結果

コード化された20種類の化学物質に対し、3回繰り返し試験を実施した。各化学物質の計測結果および%suppressionを図1に示す。また、Criteria5におけるIL2抑制効果の評価結果を図2に示した。Criteria5に基づいた評価において、20物質中5物質においてimmunosuppression（IL-2プロモータ活性抑制）、5物質においてimmunoaugmentation（IL2発現亢進）、1物質においてimmunosuppression/ immunoaugmentation、9物質において無作用の結果となった。これらの結果を、他の参加2施設の結果と比較すると、80%（16/20）の施設間再現性が確認された。またリードラボである東北大の結果との比較においても、80%（based on majority）の一致率が確認された。

D. 考察

Phase2試験では、各被験物質で3回1セットの試験を実施した。いずれの物質においても、3試行の結果において、SLG-LAやnSLG-LA及び%suppressionの濃度依存的変動に一致した傾向が見られ、安定した実験手技をもって試験を実施できたものと思われる。これらの結果をもって、Criteria5に基づいた被験物質の評価を行い、他の参加2施設の結果と比較したところ、産総研つくばの結果は18物質において、3施設評価結果のMajorityと一致した。不一致であった4、Dibromoacetic acidは、リードラボを含め、各施設の評価が「S, A/S, A, N」と分かれ

ており、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。またもう一つの不一致物質であるDibromoacetic acidは、他施設の結果がimmunosuppressionであるのに対して、immunoaugmentationであった。%suppressionのグラフを3施設で比較すると全体的な傾向は一致しており、高濃度域でのIL-2プロモータ活性抑制作用も確認されるが他の施設に比べて反応が弱く、評価が異なる結果となったようである。

最終的に、20被験物質中16物質で3施設の結果が一致し、80%の良好な施設間再現性が確認された。

E. 結論

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Phase2試験を終了し、他の2試験施設の結果と比較することにより良好な施設間再現性を確認した。

G. 研究発表

Yasuno R., Mitani Y., Ohmiya Y., 2017. Effects of N-Glycosylation Deletions on Cypridina Luciferase Activity. Photochem Photobiol. 94, 338-342.

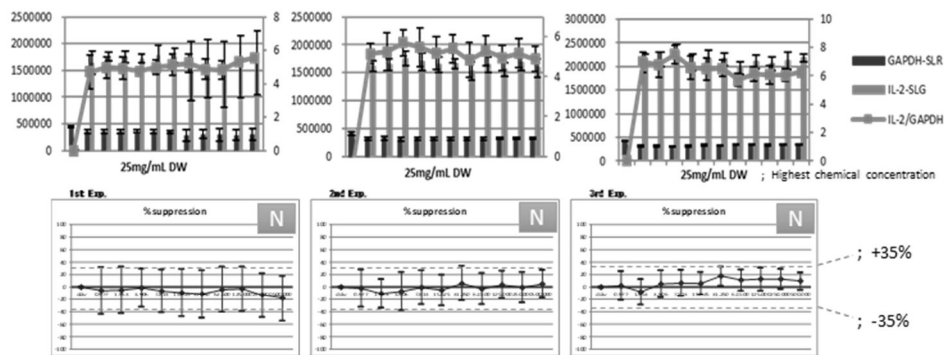
H. 知的財産権の出願・登録状況

特許

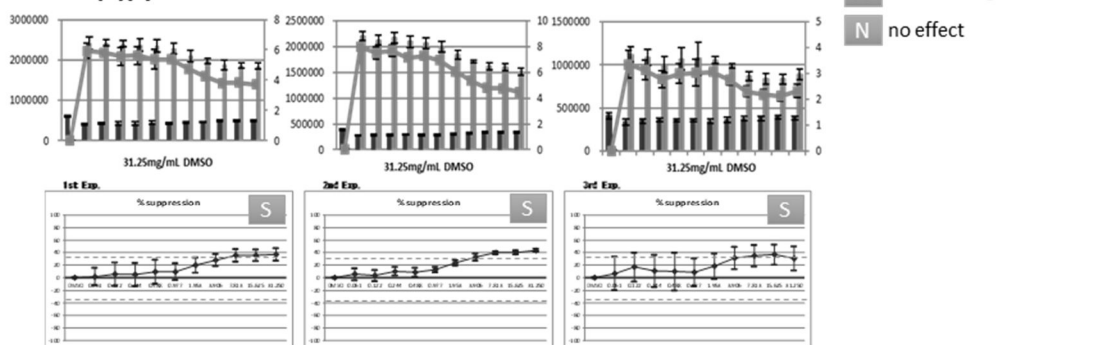
特願 2016-048403 / PCT/JP2017/009467

図 1 phase2 試験結果

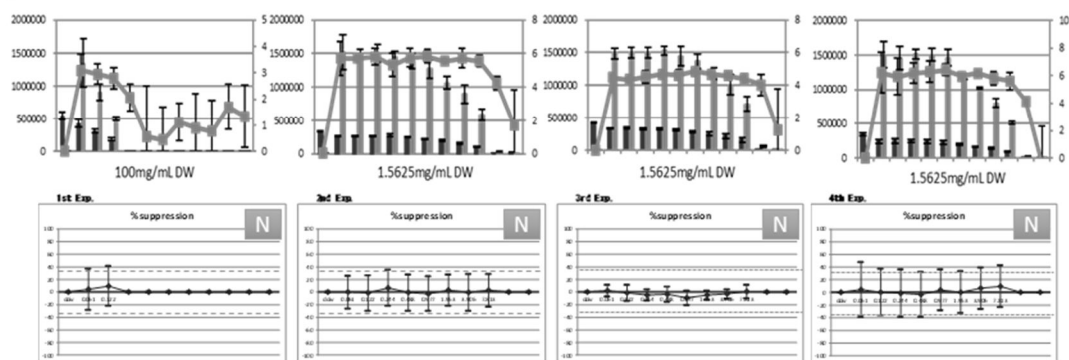
1、2,4-Diaminotoluene



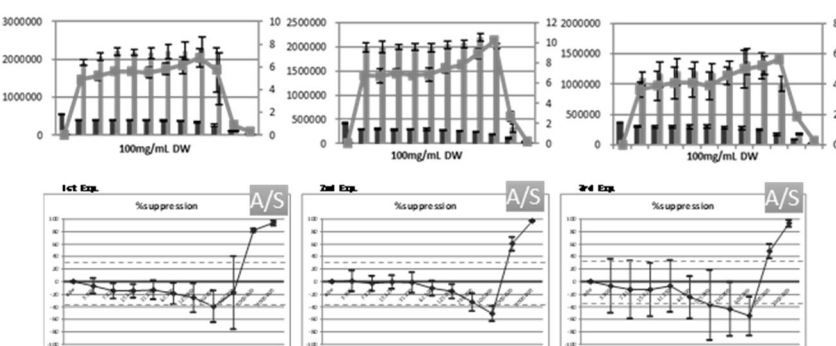
2、Benzo(a)pyrene



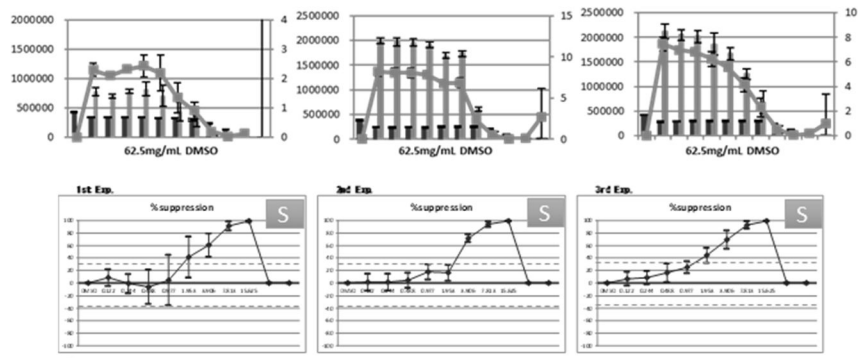
3、Cadmium chloride



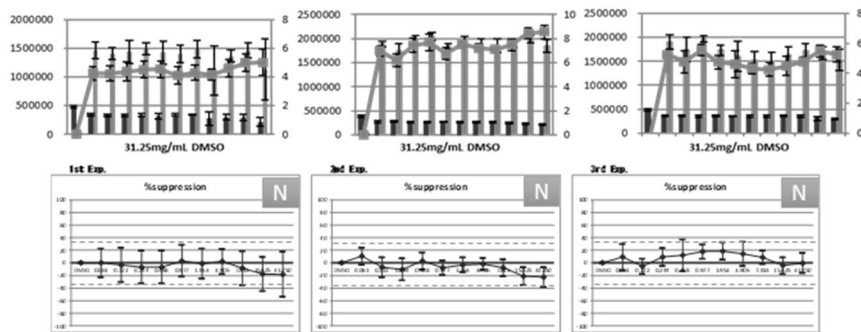
4、Dibromoacetic acid



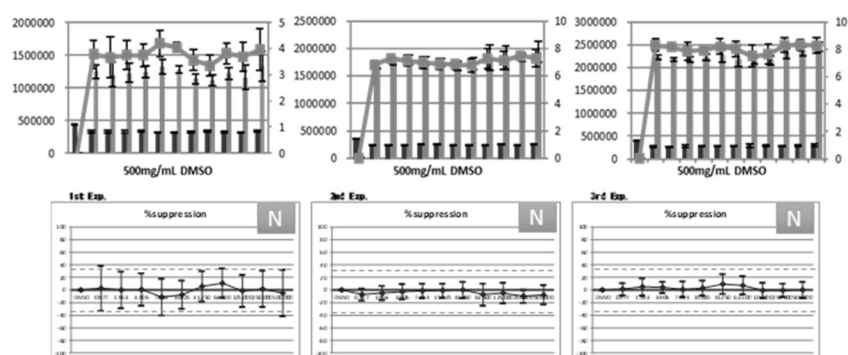
5, Diethylstilbestol



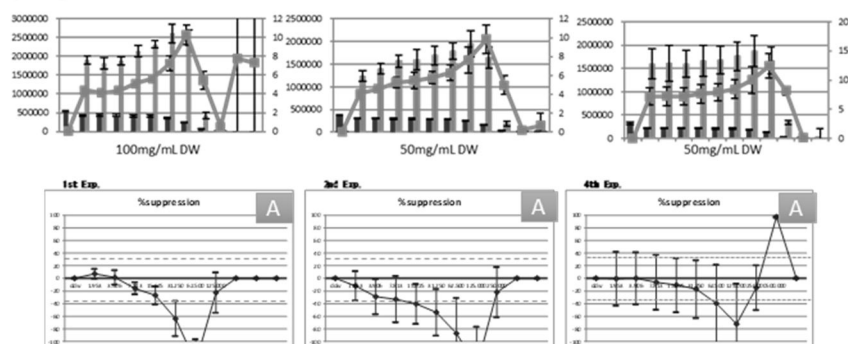
6, Diphenylhydantoin



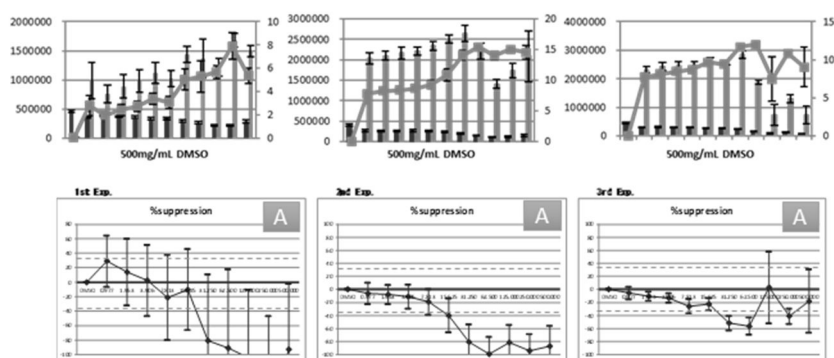
7, Ethylene dibromide



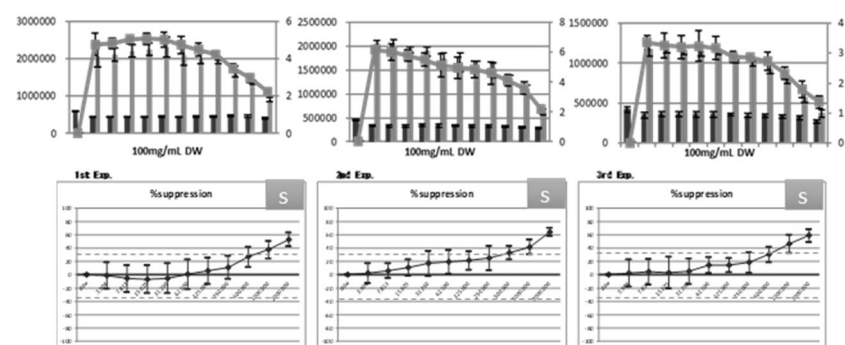
8, Glycidol



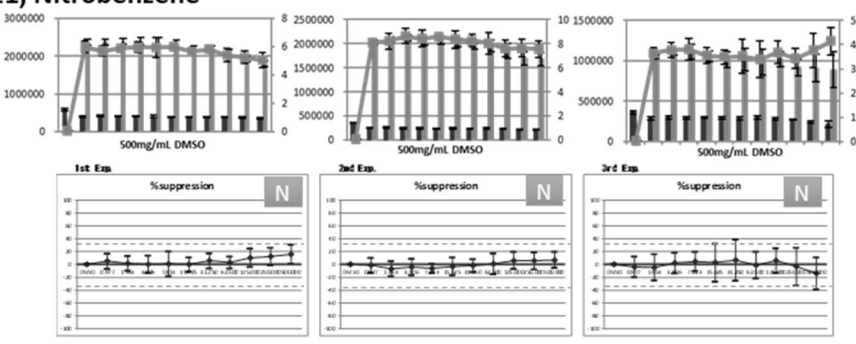
9, Indomethacin



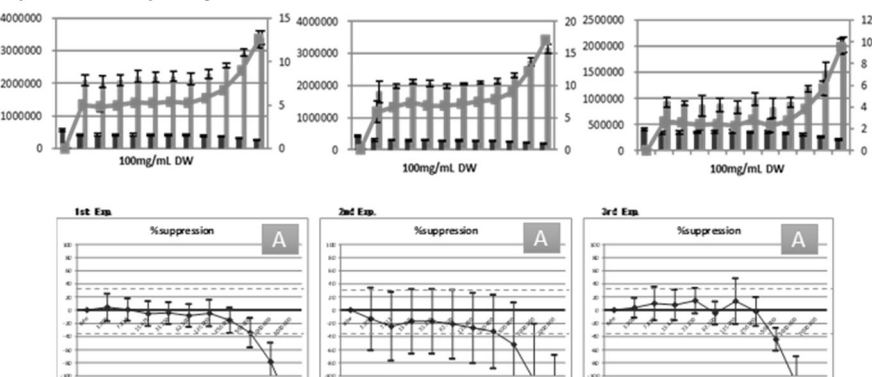
10, Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)



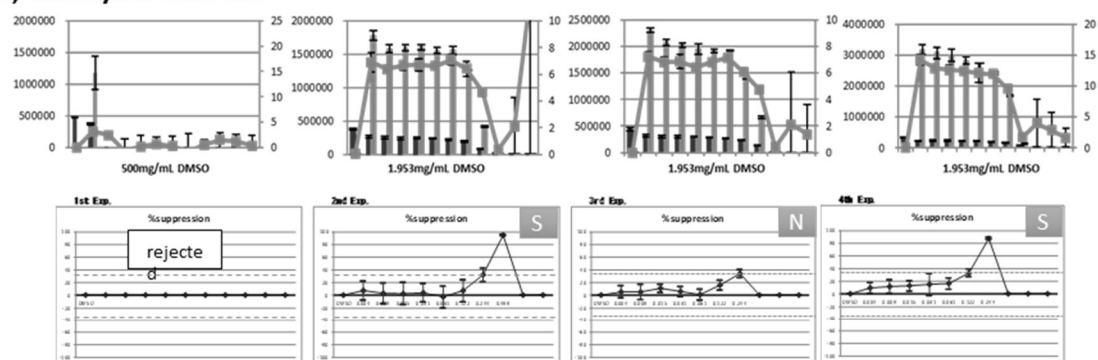
11, Nitrobenzene



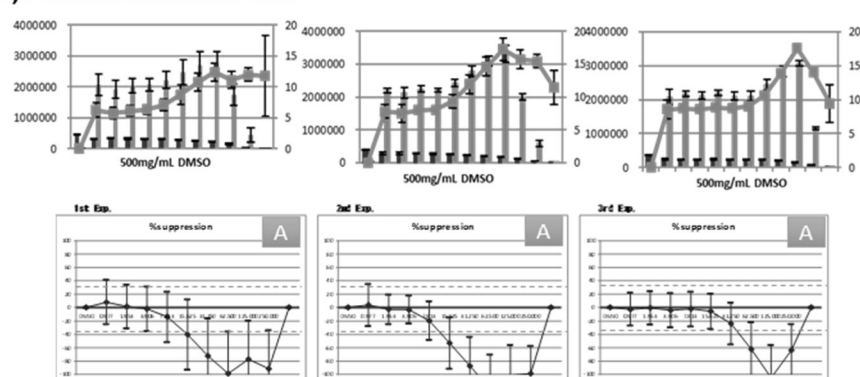
12, Urethane, Ethyl carbamate



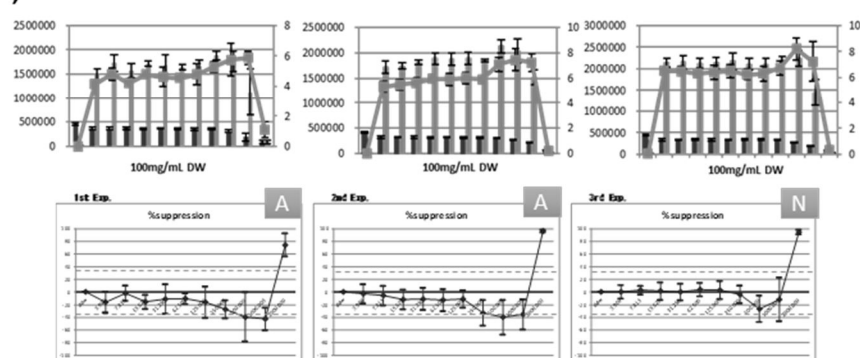
13, Tributyltin chloride



14, Perfluorooctanoic acid



15, Dichloroacetic acid



16, Toluene

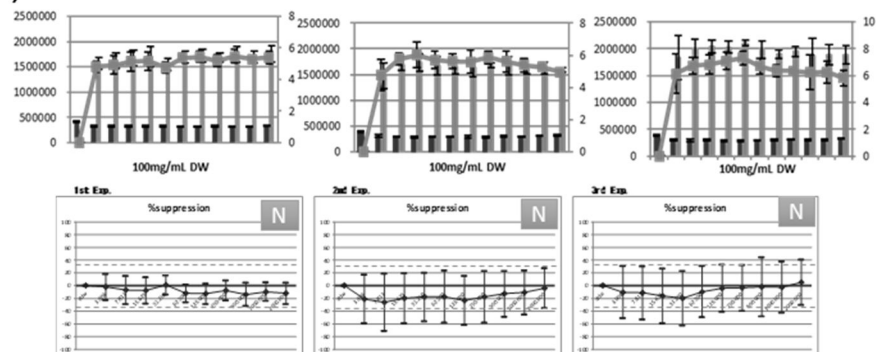


図2 Criteria5 における評価結果

Chemical		Result
1	2,4-Diaminotoluene	N : NNN
2	Benzo(a)pyrene	S : SSS
3	Cadmium chloride	N : NNN
4	Dibromoacetic acid	A/S : A/SA/SA/S
5	Diethylstilbestol	S : SSS
6	Diphenylhydantoin	N : NNN
7	Ethylene dibromide	N : NNN
8	Glycidol	A : AAA
9	Indomethacin	A : AAA
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	S : SSS
11	Nitrobenzene	N : NNN
12	Urethane, Ethyl carbamate	A : AAA
13	Tributyltin chloride	S : SNS
14	Perfluorooctanoic acid	A : AAA
15	Dichloroacetic acid	A : AAN
16	Toluene	N : NNN
17	Acetonitril	N : NNN
18	Mannitol	N : NAN
19	Vanadium pentoxide	N : NAN
20	o-Benzyl-p-chlorophenol	S : SSS

S ; immunosuppression

A ; immunoaugmentation

N ; No effect