

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
H29年度分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox 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する化学物質の免疫毒性評価試験法である。昨年度は、IL-2転写活性障害を指標とするT細胞分化異常誘導化学物質評価系の確立を目指し、コード化した化学物質を用いて施設内再現性および施設間再現性が良好であることを確認した。今年度は、プロトコル (Ver.009.1E) に従ってコード化した20物質について、3回の繰り返しを1セットとした実験を行い、3施設の結果比較による施設間再現性とリードラボ (東北大) との比較による正確性を検討した。その結果、閾値を設定した判定基準5を採用することによって、施設間再現性は80% (16/20)、当該施設における正確性は85% (17/20) となり、いずれもstudy planにおける基準を満たした。

キーワード：IL-2 レポーター活性、バリデーション試験、施設内再現性、正確性

A. 研究目的

MITAの開発者である相場らは、L-2 転写調節障害を key event とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP を作成した。それに基づき、MITA を構成する 2H4 細胞を用いた IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞分化異常誘導化学物質評価系の OECD テストガイドライン化を目指し、国際バリデーション試験が開始された。

我々は、試験施設[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）、産業技術総合研究所（健康工学研究部門）]として参加し、昨年度までに良好な技術移転性および施設内再現性が確認された。

今年度は、施設間再現性と正確性を確認するために、国際バリデーション実行委員会が選定した 20 化学物質（コード化物質）を用いて Phase II study を実施した。

B. 研究方法

B-1) 使用した細胞

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20種類の化学物質（コード番号：MIC601～MIC620）が国立医薬品食品衛生研究所から送付され、それらを試験に使用した。化学物質情報を表1に示した。

B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコル (Ver.009.1E) に準じて行った。概要は以下の通りである。

#2H4細胞を96 wellプレートに播種（ 2×10^5 細胞/ウェル、50 μ L/ウェル）した。また、適切な溶媒（蒸留水に25 mg/mLで溶解する場合は蒸留水を使用し、不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）を使用）に溶解した化学物質原液を調製（可溶の場合の溶解最高濃度は、蒸留水では100 mg/mL、DMSOでは500 mg/mLとした）し、さらに溶媒

で段階希釈(公比2)して10濃度を調製した。なお、溶解性は、15,000 rpmで5分間遠心し、沈澱の有無を確認することにより判定した。

溶媒に溶解した化学物質調製液を培地に添加(蒸留水の場合は25倍希釈、DMSOの場合は10倍希釈後さらに50倍希釈)して2倍濃度の処理液を調製し、その50 µLを細胞懸濁液(50 µL)が入っている各ウェルに添加して処理した(溶媒の最終濃度:蒸留水は2 vol%, DMSO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 °C、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発光測定装置(AB-2350 フェリオス、アトー社製)で測定し、IL-2プロモーター活性を算出した。各物質について、試験成立条件を満たした3回の実験結果(1セット)が得られるまで異なる日による実験を繰り返した。

なお、すべての実験が終了したのち、判定基準を再検討(判定基準4)するために、6物質について追加実験を各1回行ったが、以下の最終的判定(判定基準5)には、追加実験のデータは使用しなかった。

<判定基準5>

以下の3つの基準を満たす場合を陽性(suppressiveまたはstimulatory)とし、それ以外を陰性と判定する。

- SLR-LAの阻害指標(ILI-SLR-LA)が0.05以上の濃度のみを判定に使用する。
- %suppressionの平均値が35%以上(suppressive)か-35%以下(stimulatory)でかつ、同時95%信頼区間を用いた判定で有意(統計学的有意)である。
- 統計学的有意となる連続した2つ以上の濃度が得られるか、統計学的有意となる濃度は1つであるが、すくなくとも連続した3濃度で濃度依存性を示す(この場合、統計学的有意を示さなければ、0を挟んでもよい)。

C. 結果

コード化した20物質の1セットの実験結果を図1に示した。

MITAプロトコル(Ver.009.1E)に従って、判定(判定基準3')した結果、施設間再現性が良好でなかったことから、判定基準4を設定し、以下の6物質について追加実験を

実施し、再検等した。

Diphenylhydantoin (MIC615)
Ethylene dibromide (MIC605)
Toluene (MIC616)
Acetonitril (MIC617)
Mannitol (MIC619)
Vanadium pentoxide (MIC608)

しかしながら、追加データを考慮した判定基準4においても施設間再現性の改善は認められなかった。そこで、東北大学で作成されたMITA data setの各化学物質における%suppressionの最大値、最小値を参考とし%suppressionの閾値を±35%と設定した判定基準5を設定し再評価した。その結果、20物質の判定は、以下の通りであった。

IL-2転写活性作用影響無: 9物質

IL-2転写活性抑制作用有: 6物質

IL-2転写活性刺激作用有: 5物質

判定基準の変更により判定が変わった物質は、cadmium chlorideとisonicotinic acid hydrazideの2物質で、いずれもIL-2転写活性抑制作用有が影響無となった。

判定基準5による施設間再現性は80%(16/20)、リードラボである東北大学の結果比較による正確性は85%(17/20)であった(表2)。

D. 考察

Phase Iにおいて良好な結果(施設内再現性:87%、施設間再現性:90%)が得られたことから、Phase IIとして施設間再現性を確認するために、コード化した20物質について3回の繰り返し実験(1セット)を行なったが、良好な施設間再現性が得られなかった。すでにガイドライン化された皮膚感作性試験ガイドラインであるIL-8 Luc assayと同様の判定基準4を検討したが、結果の改善は認められなかった。

これらの結果を踏まえ、%suppressionの閾値を設定した判定基準5を採用したところ、80%の施設間再現性を達成することができた。

今回の判定基準3'から5への変更は、微妙な差が統計学的には有意と判定されるが、その中でも明らかな差(閾値)以上を生物学的有意とする基準変更である。

この変更によって、20物質中2物質の結果が変わることとなったが、3試験施設の中では判定結果が変わった物質数は最も少なか

った。これは、我々の結果の多くはこの変更によって影響されない明らかな反応が得られていたことを示している。

また、この変更によるPhase Iの結果を確認したところ、施設内再現性は3試験施設とも80%、施設間再現性は80%、正確性は80～100%となり、判定基準の変更による影響は許容範囲内であった。

リードラボとの比較では3物質の結果が不一致であったが、そのうち、dibromoacetic acidは3試験施設のいずれも結果が一致せず、化学物質の特性と考えられた。残り2物質のisonicotinic acid hydrazideとnitrobenzeneは他の2試験施設と結果が一致しなかった。Isonicotinic acid hydrazideについては、選択した溶媒と最終濃度が異なっていることから、溶解性の判断が異なったことにより、処理濃度が低く設定されたことが原因である可能性が示唆された。溶媒に対する溶解性は遠心による沈澱物の有無を目視によって判断していることから、施設間差が生じた可能性が考えられる。一方、nitrobenzeneについては、溶媒および最高処理濃度も同一であり、結果が不一致となった原因は不明であるが、我々の3回の結果はいずれも濃度依存的な抑制(suppression)反応を示し、再現性のある結果であった。

E. 結論

試験施設としてコード化した20物質のIL-2レポーター活性試験を実施した。3試験施設から提出された結果をもとに良好な施設間再現性が得られる判定基準を確定し、

80%以上の施設内再現性および施設間再現性が得られるMITAプロトコルを確定することができた。これにより、IL-2転写活性障害を指標としたT細胞分化異常誘導化学物質評価系のバリデーション試験は終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) Yutaka Kimura, Rie Yasuno, Mika Watanabe, Miwako Kobayashi, Tomoko Iwaki, Chizu Fujimura¹, Yoshihiro Ohmiya, Kohji Yamakage, Yoshihiro Nakajima, Mayumi Kobayashi, Takashi Omori, Hajime Kojima and Setsuya Aiba. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. 10th World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017

2) 木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴¹、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 眞弓、大森 崇、小島 肇、相場 節也：Multi-ImmunoTox Assay (MITA) データセットの作成およびバリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第30回大会(東京) 2017年11月

表 1 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase II study) に使用した化学物質

No.	Chemical	Cas.no.	State	Code No.
1	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	Solid	MIC618
2	Benzo(a)pyrene	50-32-8	Solid	MIC601
3	Cadmium chloride	10108-64-2	Solid	MIC602
4	Dibromoacetic acid	631-64-1	Solid	MIC610
5	Diethylstilbestol	56-53-1	Solid	MIC611
6	Diphenylhydantoin	630-93-3	Solid	MIC615
7	Ethylene dibromide	106-93-4	Liquid	MIC605
8	Glycidol	556-52-5	Liquid	MIC607
9	Indomethacin	53-86-1	Solid	MIC609
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	Solid	MIC612
11	Nitrobenzene	98-95-3	Liquid	MIC603
12	Urethane, Ethyl carbamate	51-79-6	Solid	MIC604
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	Liquid	MIC613
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	Solid	MIC614
15	Dichloroacetic acid	79-43-6	Liquid	MIC606
16	Toluene	108-88-3	Liquid	MIC616
17	Acetonitril	75-05-8	Liquid	MIC617
18	Mannitol	69-65-8	Solid	MIC619
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	Solid	MIC608
20	o-Benzyl-p-chorolophenol	120-32-1	Solid	MIC620

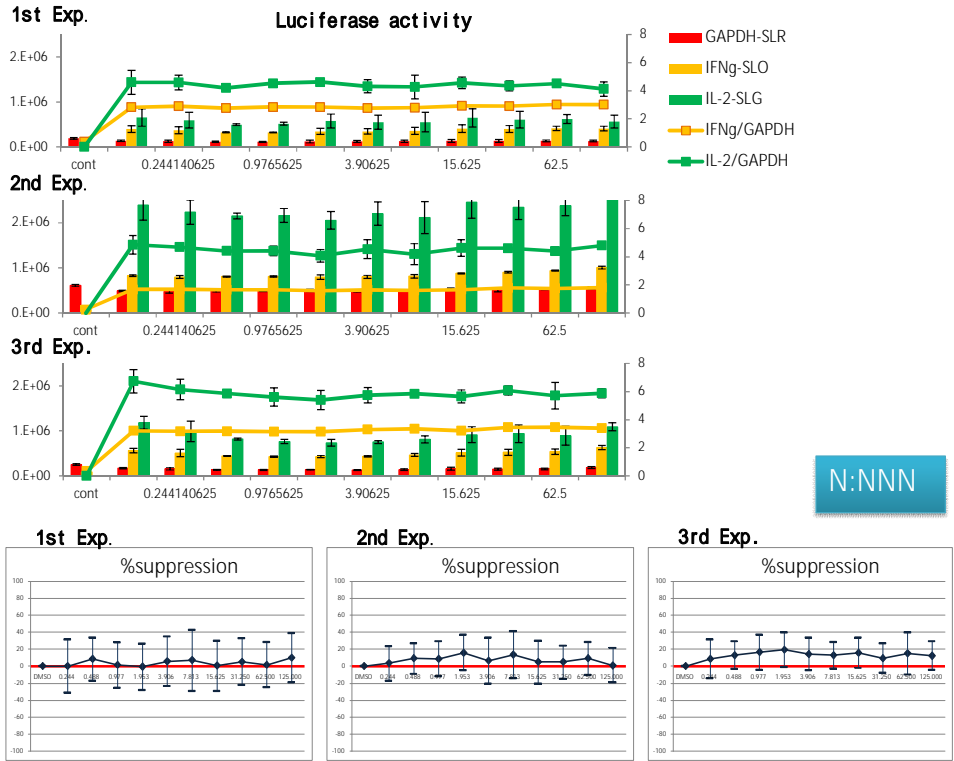
表2 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase II study) の結果

No	Chemical	Cas.no.	Lead Labo	Phase II Results			concordance	Based on Majority
				Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)		
1	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N
2	Benzo(a)pyrene	50-32-8	S : SNS	S : SSS	S : ASS	S : NSS	1	S
3	Cadmium chloride	10108-64-2	N : SNN	N : NNN	N : NSN	N : NNN	1	N
4	Dibromoacetic acid	631-64-1	S : SSA	A/S : A/SA/SA/S	A : NAA	N : NAN	0	A?
5	Diethylstilbestol	56-53-1	S : SSS	S : SSS	S : SSS	S : SSS	1	S
6	Diphenylhydantoin	630-93-3	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N
7	Ethylene dibromide	106-93-4	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N
8	Glycidol	556-52-5	A : AA/SA	A : AAA	A : SAA	A : AAA	1	A
9	Indomethacin	53-86-1	A : NAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	S : SSN	S : SSS	N : ANN	S : SSS	0	S
11	Nitrobenzene	98-95-3	N : NNN	N : NNN	S : SSS	N : NNN	0	N
12	Jrethane, Ethyl carbamate	51-79-6	A : AAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	S : SSS	S : SNS	S : SSS	S : SSS	1	S
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	A : AAN	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A
15	Dichloroacetic acid	79-43-6	S : SSS	A : AAN	S : SSS	S : SSN	0	S
16	Toluene	108-88-3	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N
17	Acetonitrile	75-05-8	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : ANN	1	N
18	Mannitol	69-65-8	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : NNN	1	N
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : ANN	1	N
20	o-Benzy-p-chlorophenol	120-32-1	S : SSS	S : SSS	S : SSS	S : SSS	1	S
Accuracy				90%	85%	95%		95%
							Between 80%	

図1 コード化 20 物質の IL-2 レポーター活性および%suppression

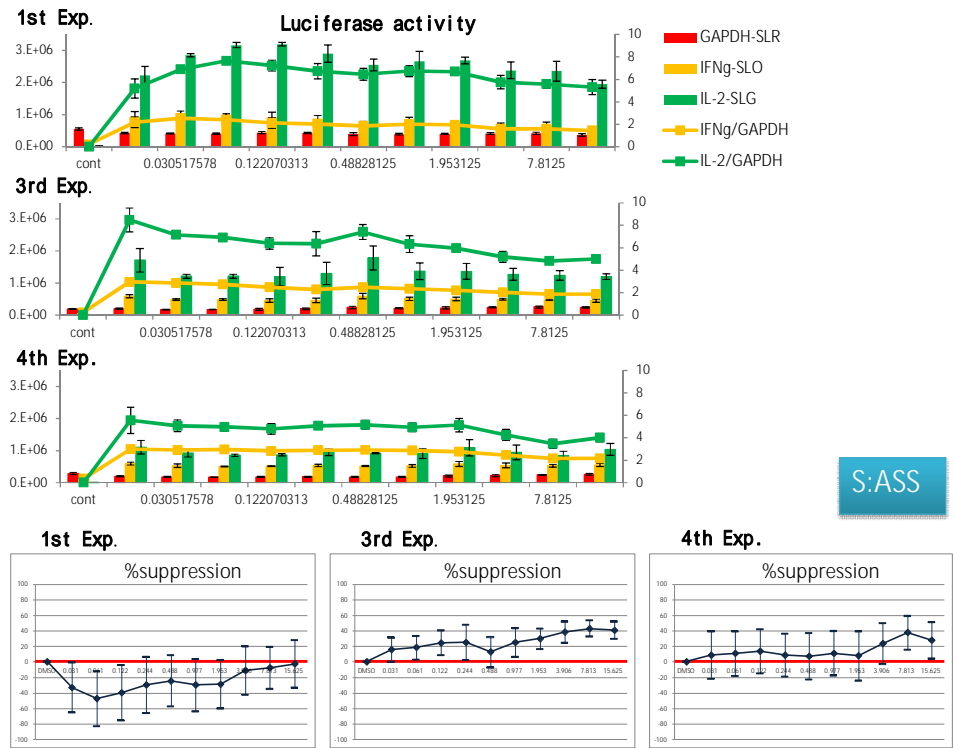
No.1 <2,4-Diaminotoluene, Code No.:MIC618>

(The maximum concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)

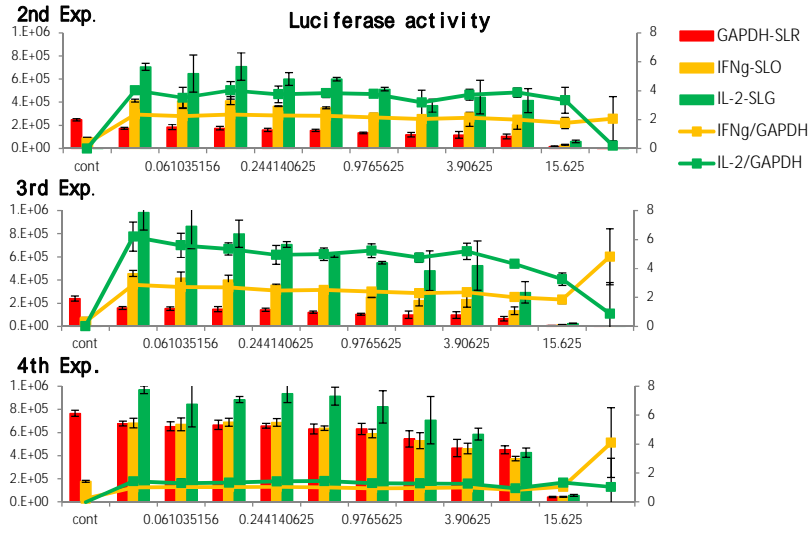


No.2 <Benzo(a)pyrene, Code No.:MIC601>

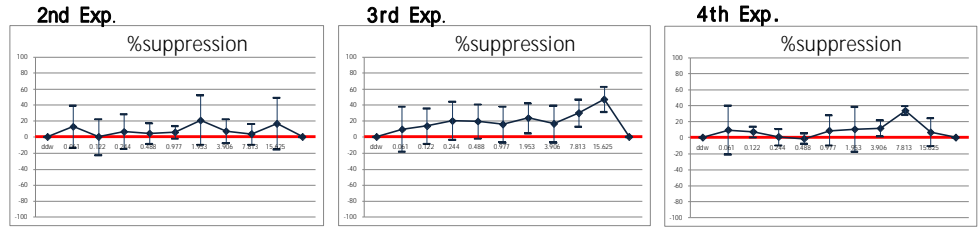
(The maximum concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



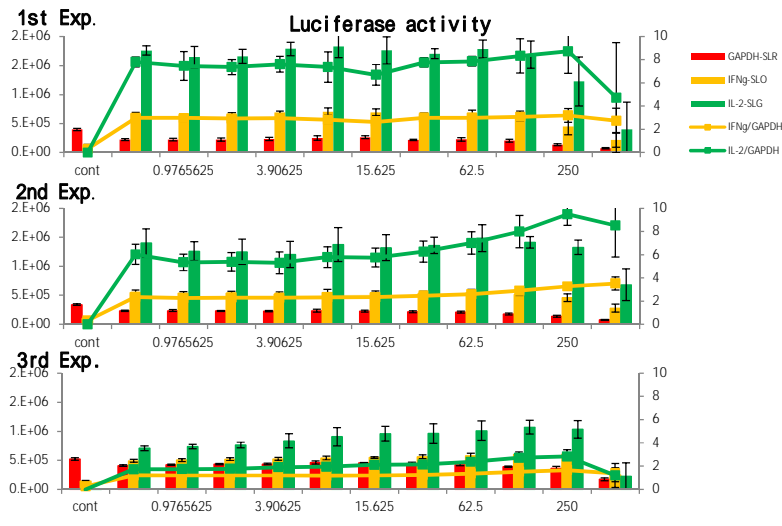
No.3 <Cadmium chloride, Code No.:MIC602>
 (Final concentration: 31.25 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



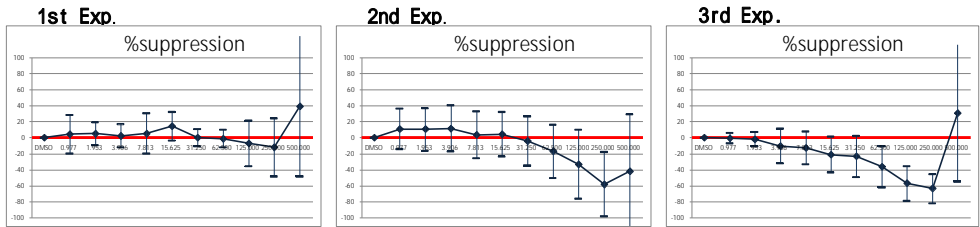
N: NSN



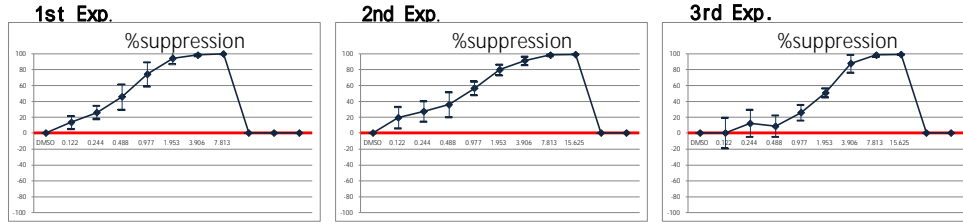
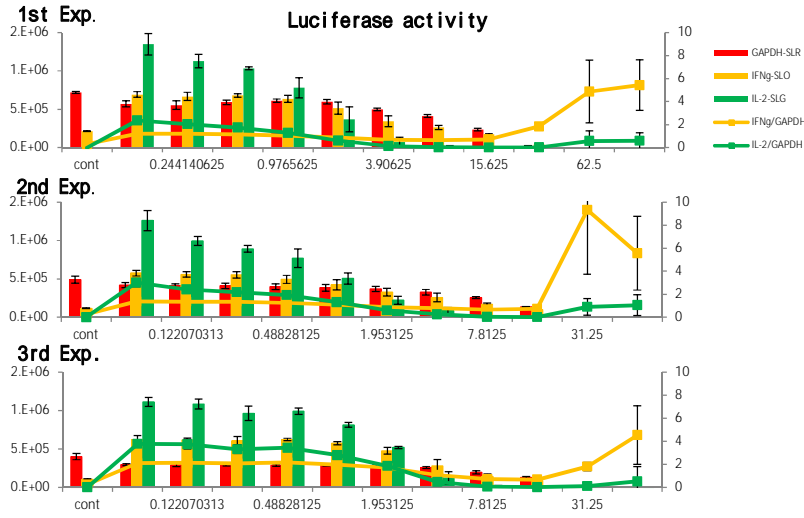
No.4 <Dibromoacetic acid, Code No.:MIC610>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



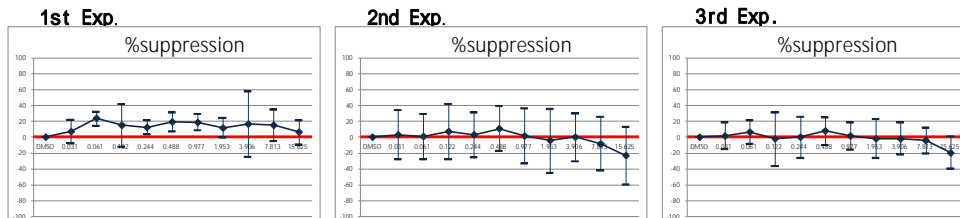
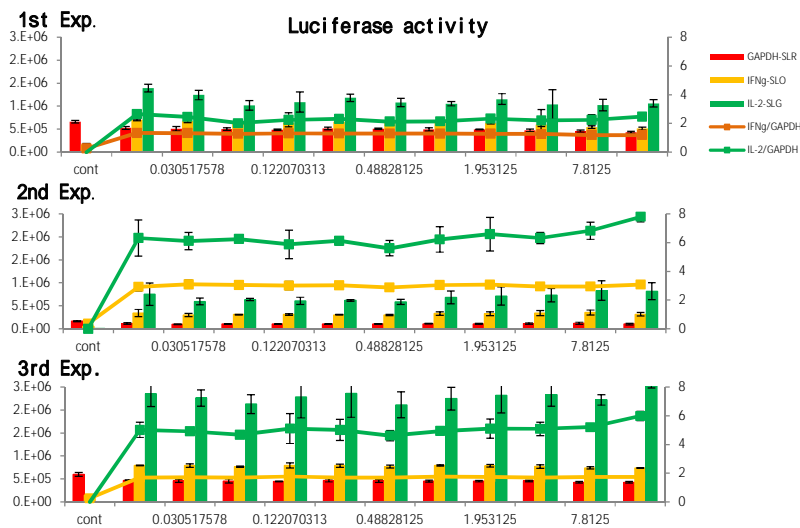
A: NAA



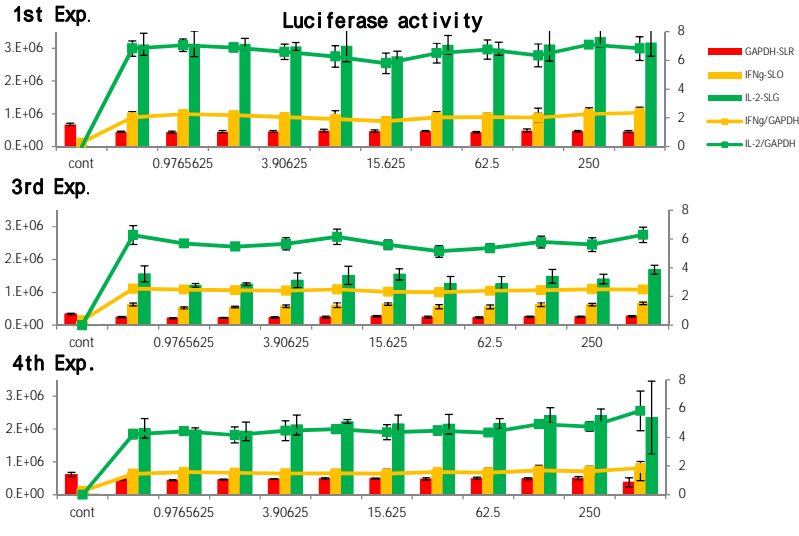
No.5 <Diethylstilbestol, Code No.:MIC611>
 (Final concentration: 125 or 62.5 µg/ml, Vehicle: DMSO)



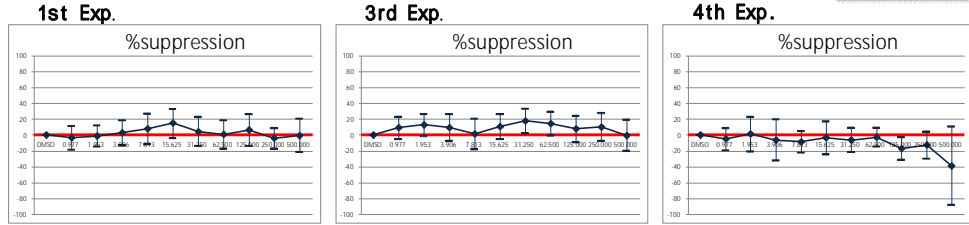
No.6 <Diphenylhydantoin, Code No.:MIC615>
 (Final concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



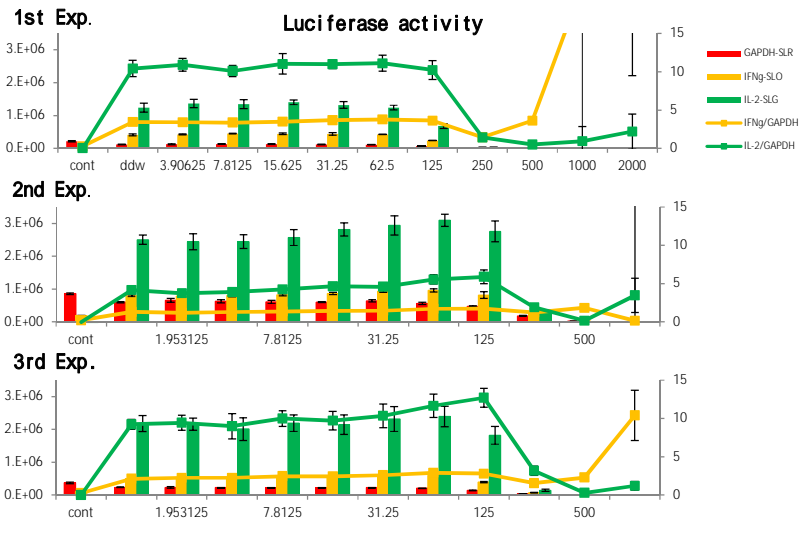
No.7 <Ethylene dibromide, Code No.:MIC605>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



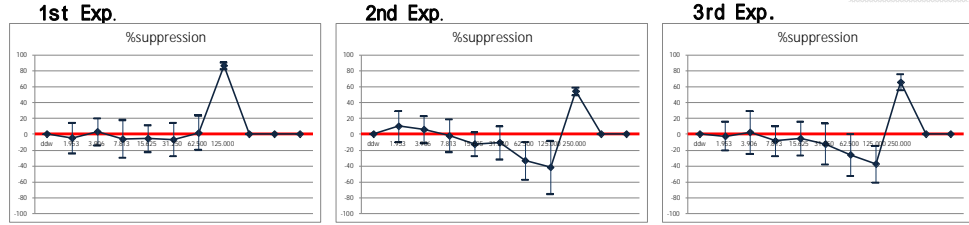
N:NNN



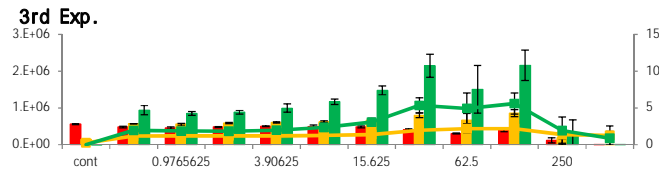
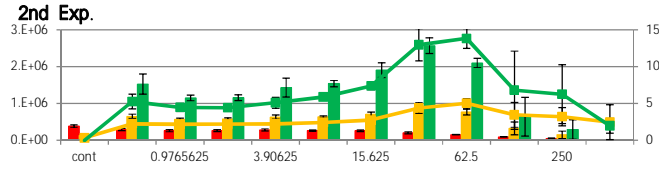
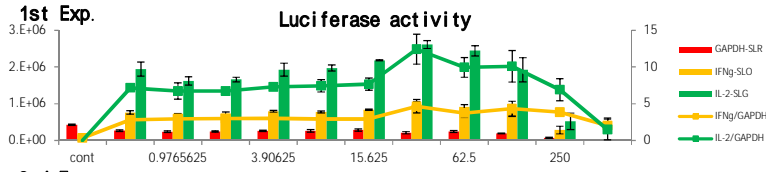
No.8 <Glycidol, Code No.:MIC607>
 (Final concentration: 1000 or 1000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



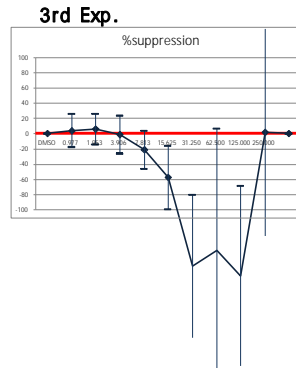
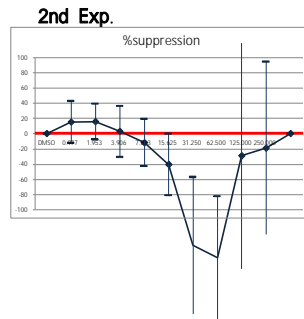
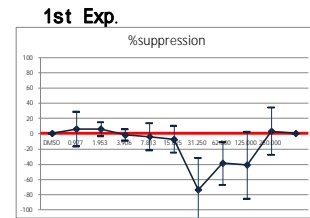
A:SA



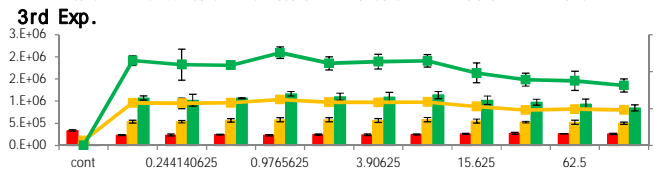
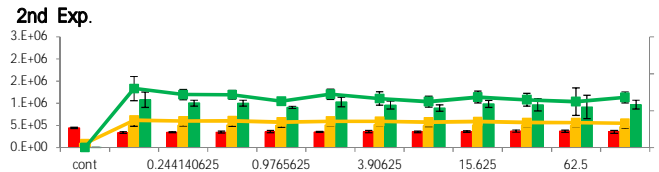
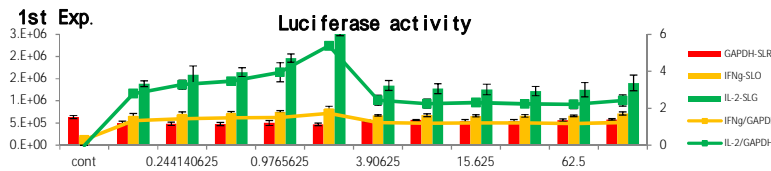
No.9 <Indomethacin, Code No.:MIC609>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



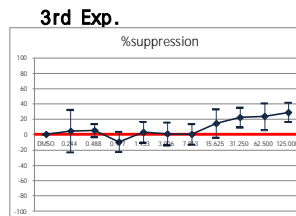
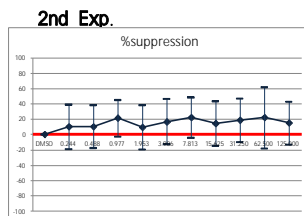
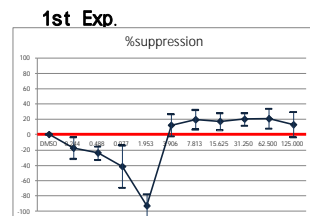
A:AAA



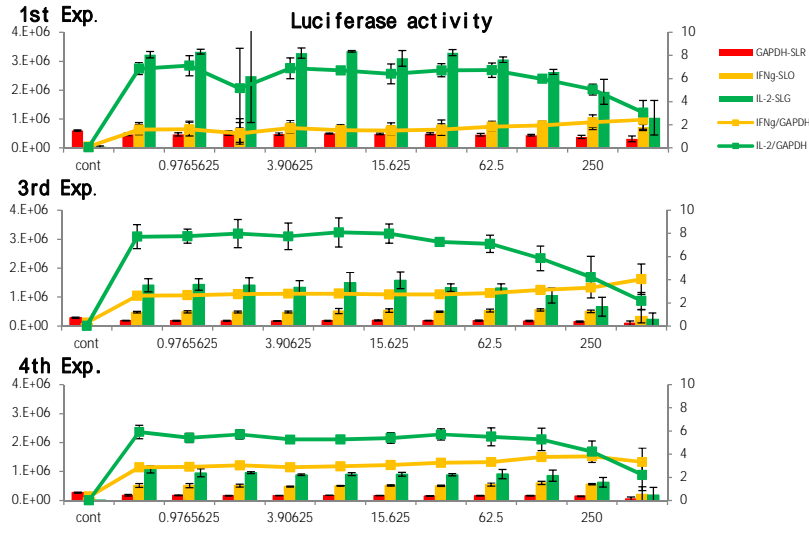
No.10 <Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid), Code No.:MIC612>
 (Final concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)



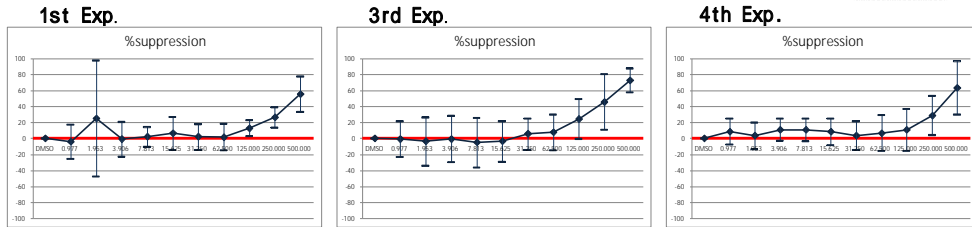
N:ANN



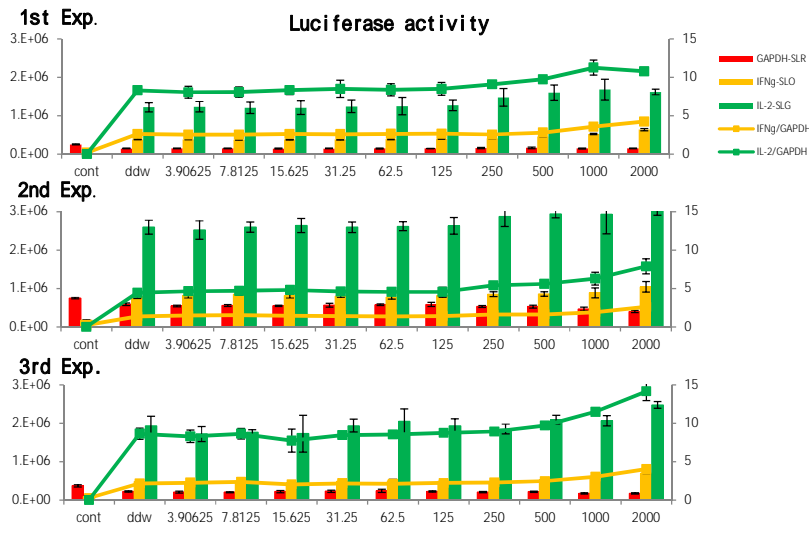
No.11 <Nitrobenzene, Code No.:MIC603>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



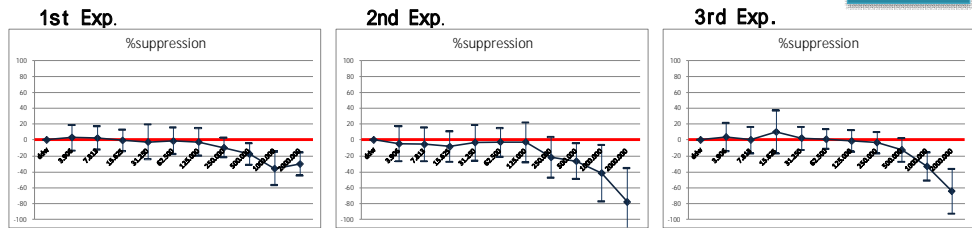
S:SSS



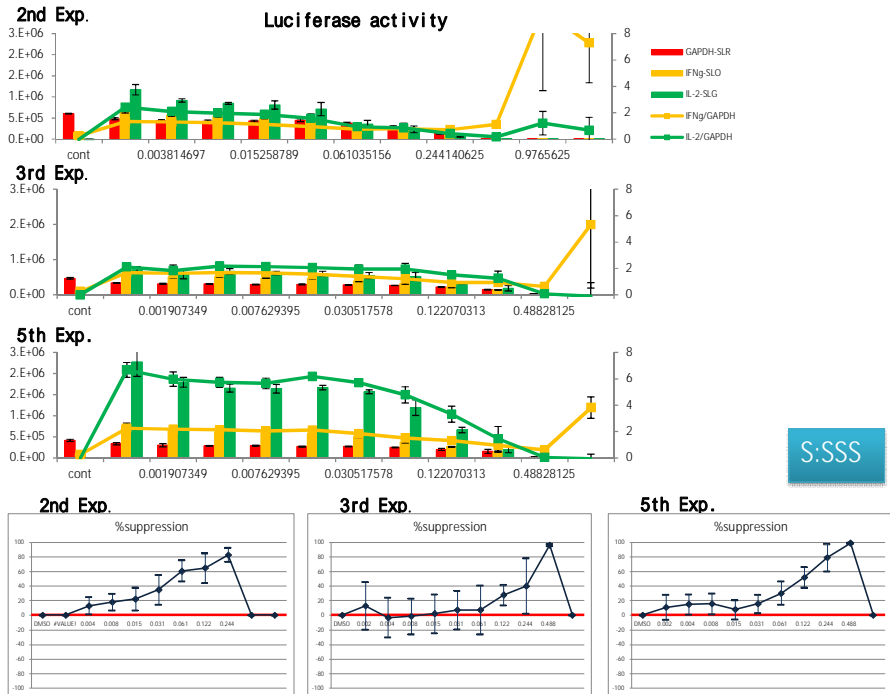
No.12 <Urethane, Ethyl carbamate, Code No.:MIC604>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



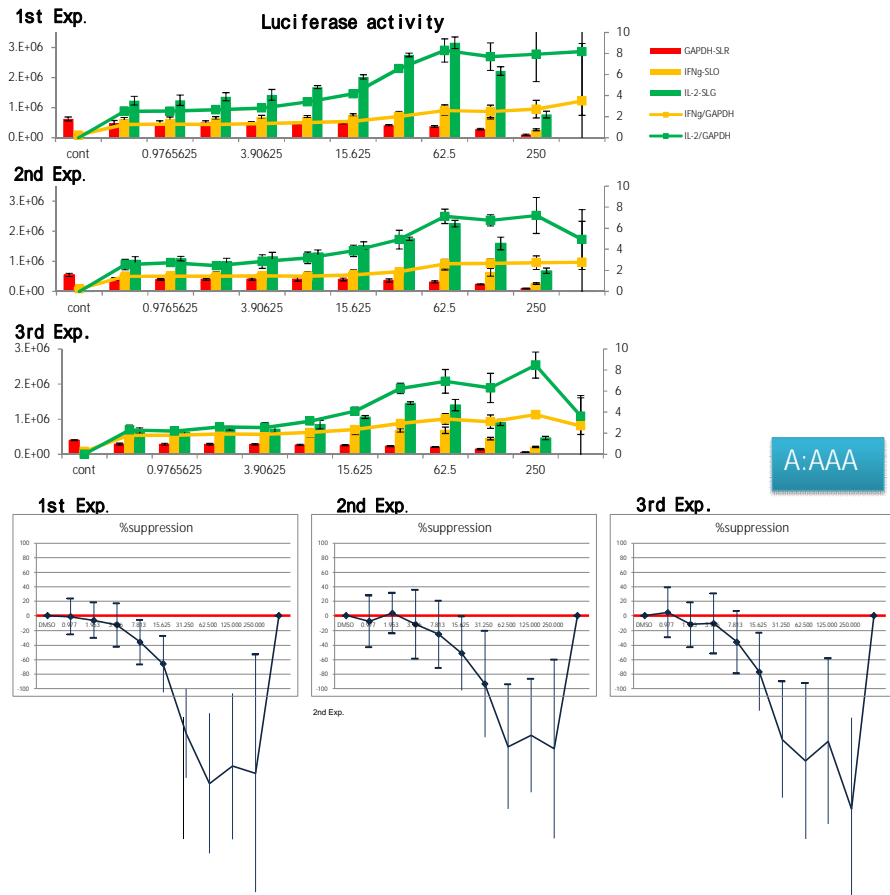
A:AAA



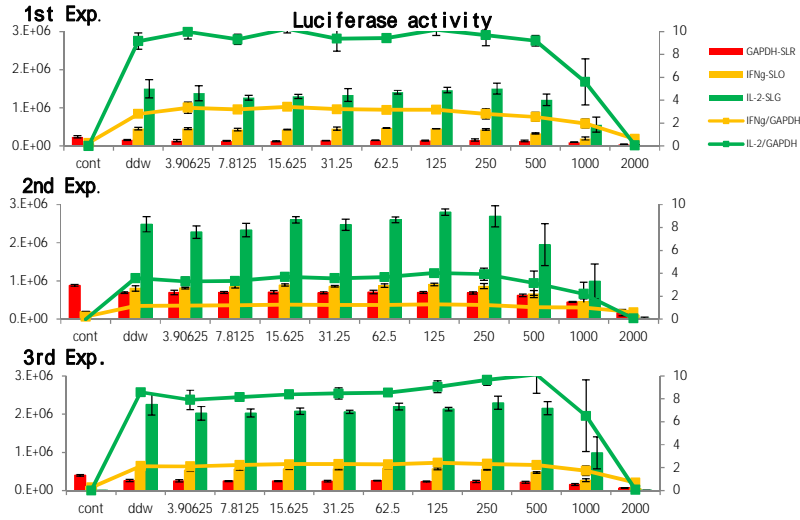
No.13 <Tributyltin chloride, Code No.:MIC613>
 (Final concentration: 1.95 or 0.977 µg/ml, Vehicle: DMSO)



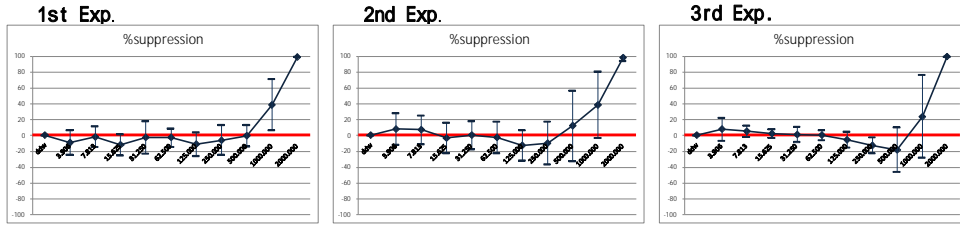
No.14 <Perfluorooctanoic acid, Code No.:MIC614>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



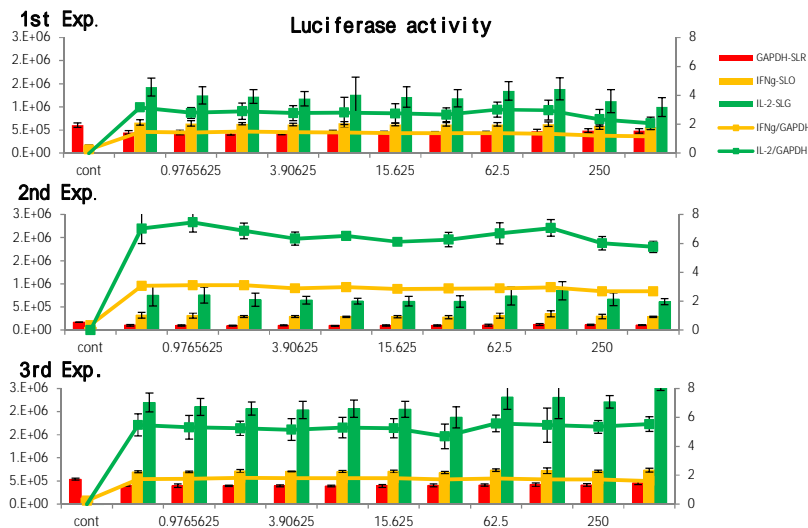
No.15 <Dichloroacetic acid, Code No.:MIC606>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



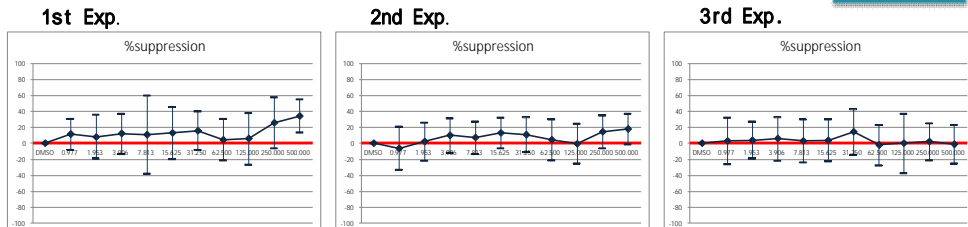
S:SSS



No.16 <Toluene, Code No.:MIC616>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)

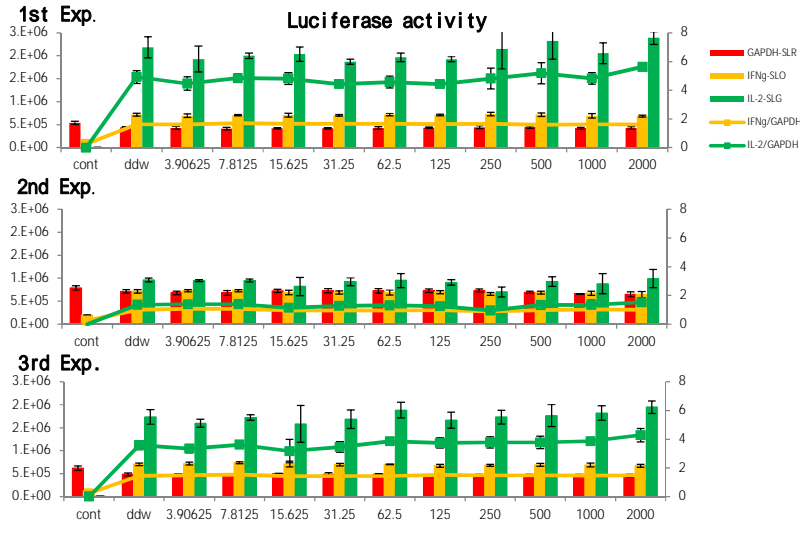


N:NNN

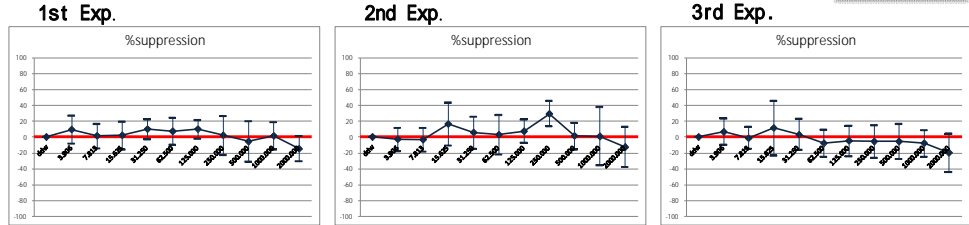


No.17 <Acetonitril, Code No.:MIC617>

(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)

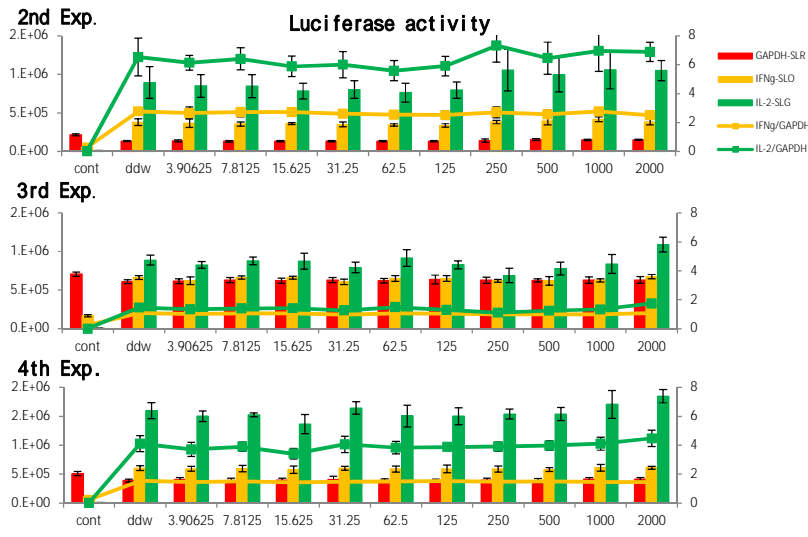


N:NNN

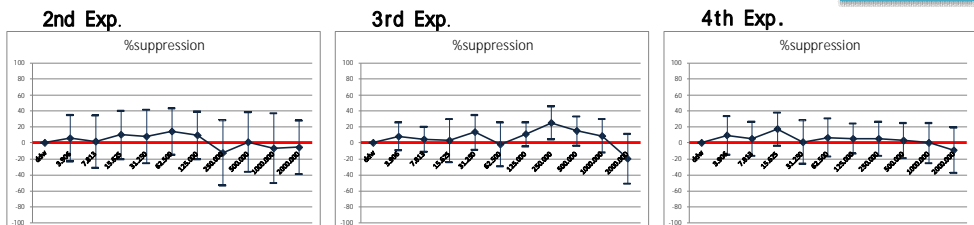


No.18 <Mannitol, Code No.:MIC619>

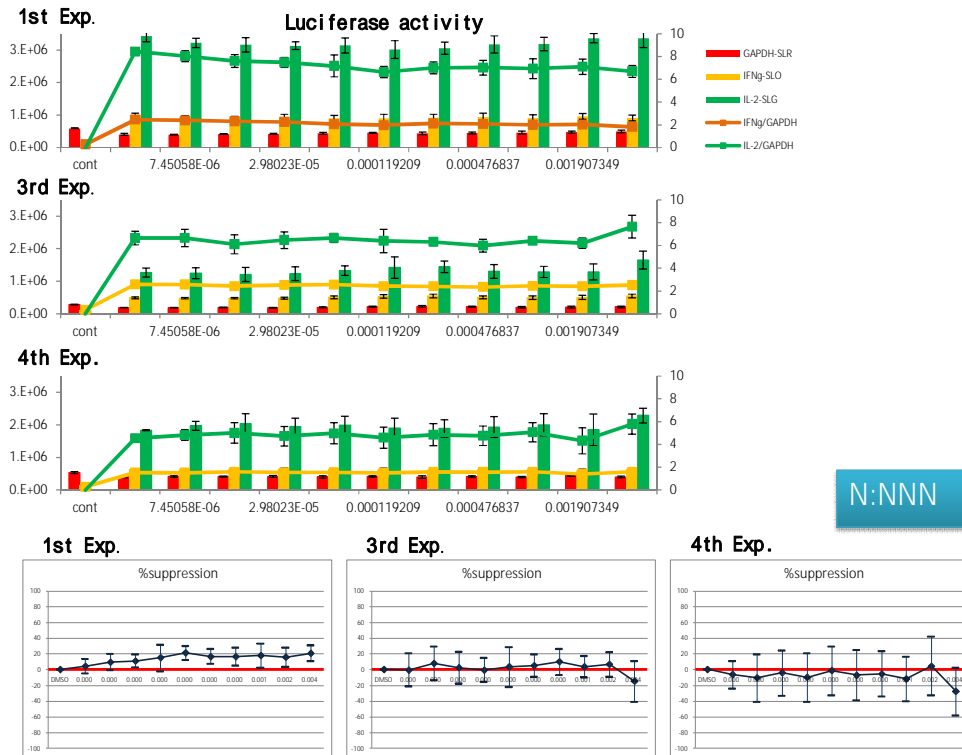
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



N:NNN



No.19 <Vanadium pentoxide, Code No.:MIC608>
 (Final concentration: 0.0038 µg/ml, Vehicle: DMSO)



No.20 <o-Benzyl-p-chorolophenol, Code No.:MIC620>
 (Final concentration: 250 or 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)

