

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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 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-ImmunoTox assay (MITA)のPhase II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 *in vitro* 免疫毒性評価試験法 (Multi-ImmunoTox assay) を構築、本試験法のガイドライン化を目指し、本年度は 20 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 5 回行う試験を Phase II バリデーション試験として実施した。

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.010E 20180115に準ずる。

試験化学物質としてコード化した20物質を供試し、発光測定装置はアトー社製フェリオス(AB-2350)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 Phase IIとして、コード化した20物質に対し#2H4細胞株を用いた試験を実施した。各物質に対し3回から5回繰り返し試験を行った。図1に結果を示す。提案されたcriteriaを用いて各物質を評価したところ、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)による結果とも概ね一致した。

D. 考察

Phase IIバリデーション試験の結果に最終的に提案されたcriteria 5を適用することにより、良好な施設間再現性を得た。本試験方により、免疫抑制物質を正確かつ感度良く識別できる可能性が示唆された。

E. 結論

20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5回の試験を繰り返すPhaseIIバリデーション試験を実施、80%の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およびサポートデータを提供した。

F．健康危険情報

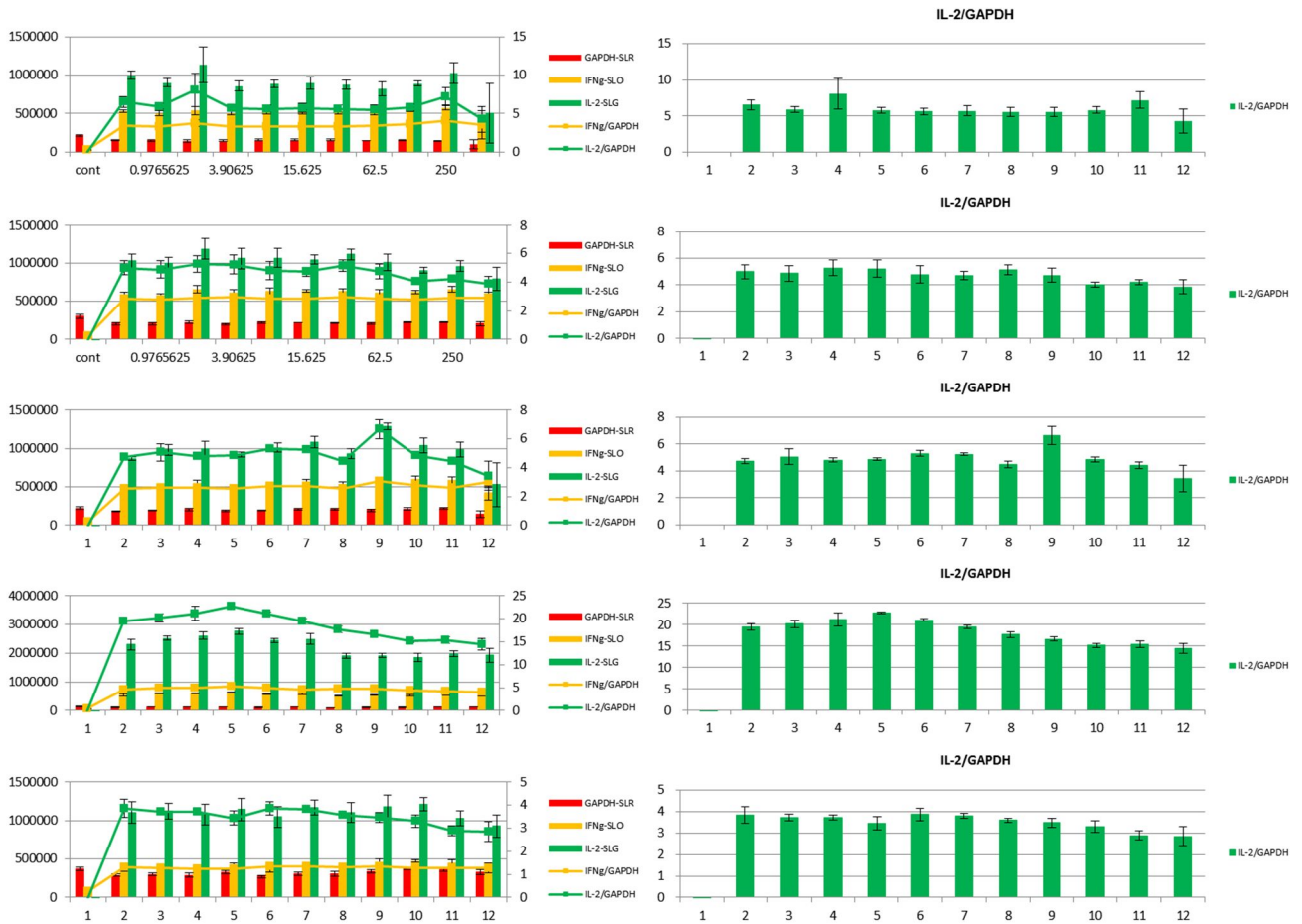
該当なし

G．研究発表
該当なし

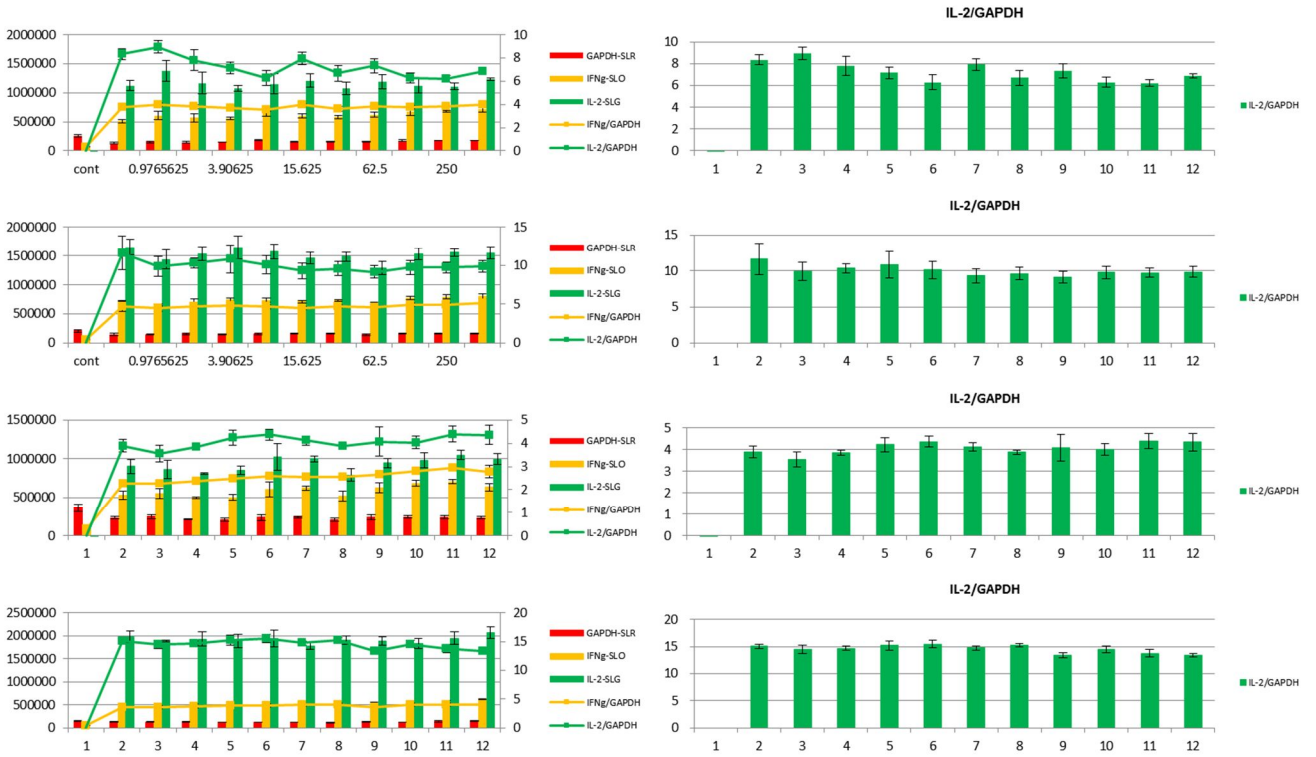
H．知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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。

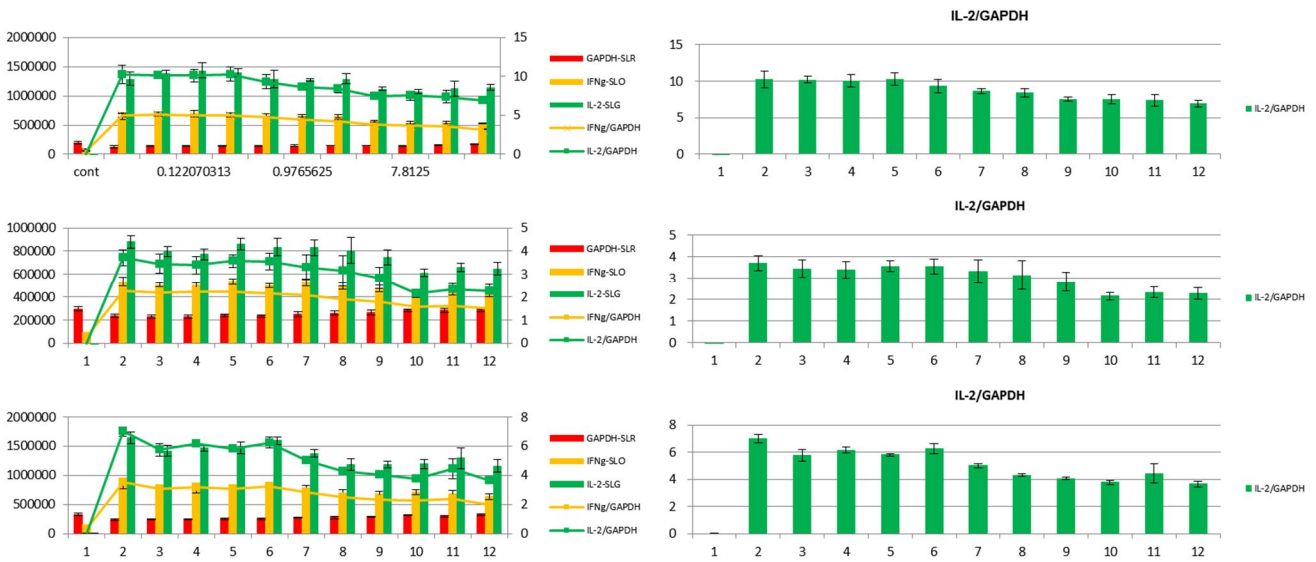
< MID701 >



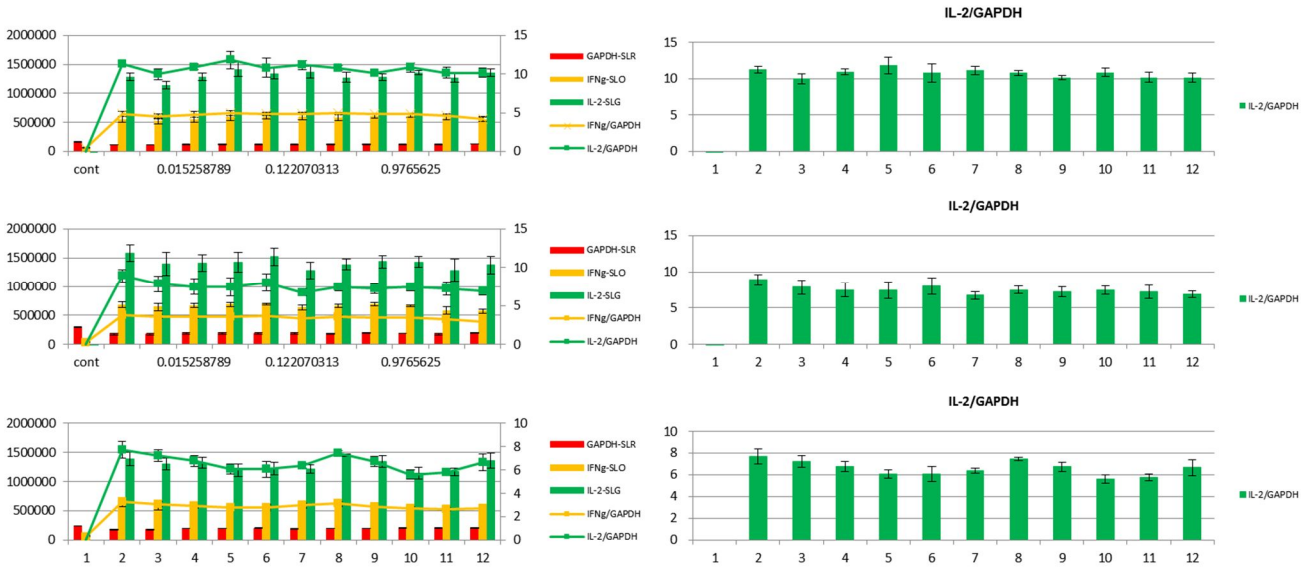
< MID702 >



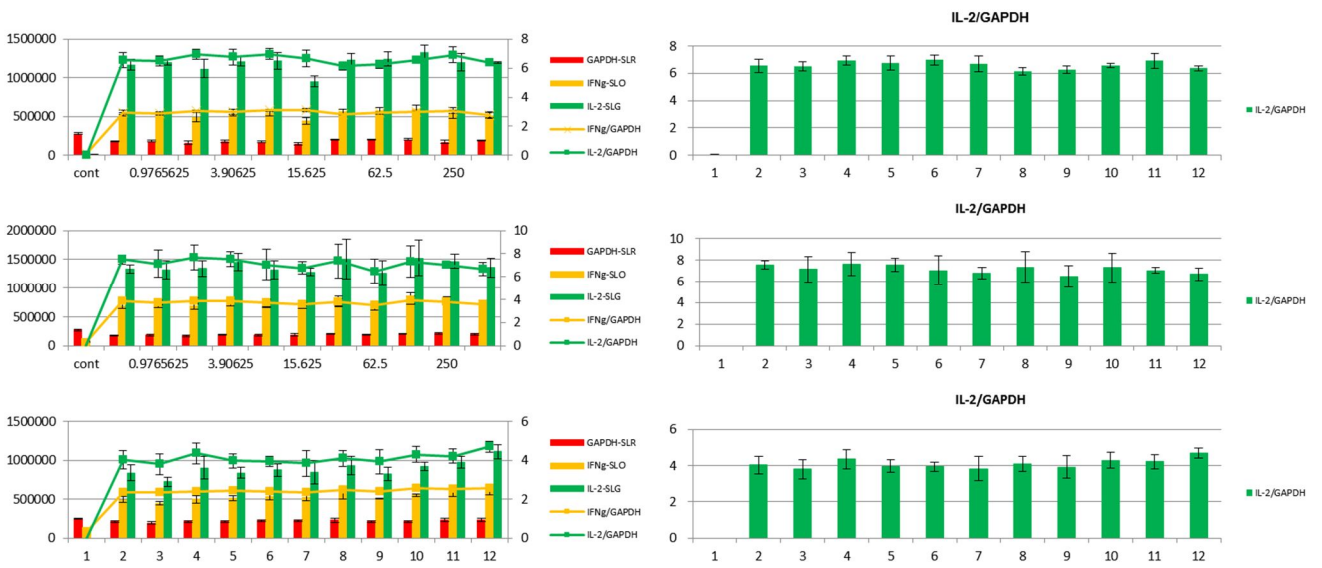
< MID703 >



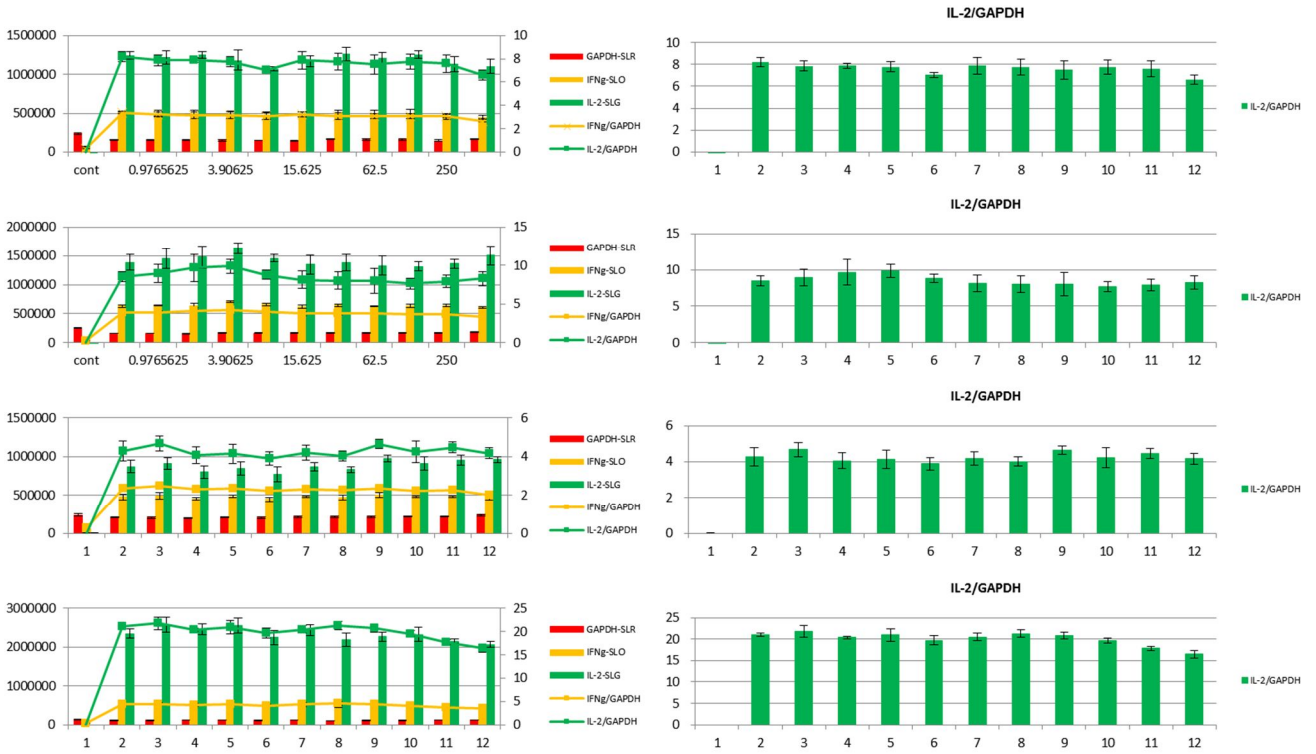
< MID704 >



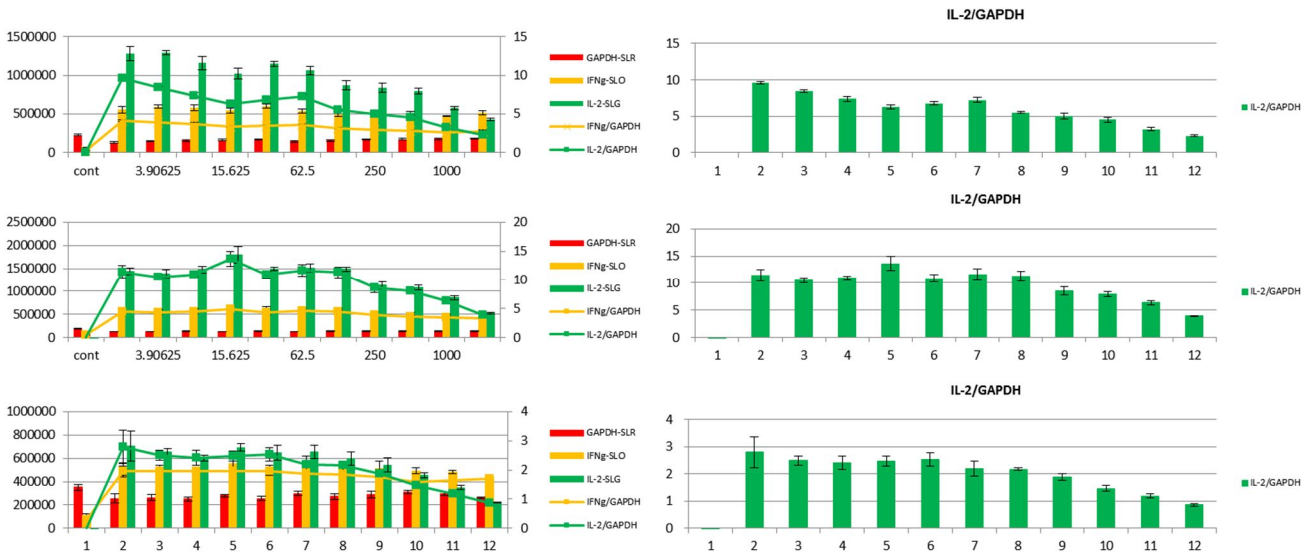
< MID705 >



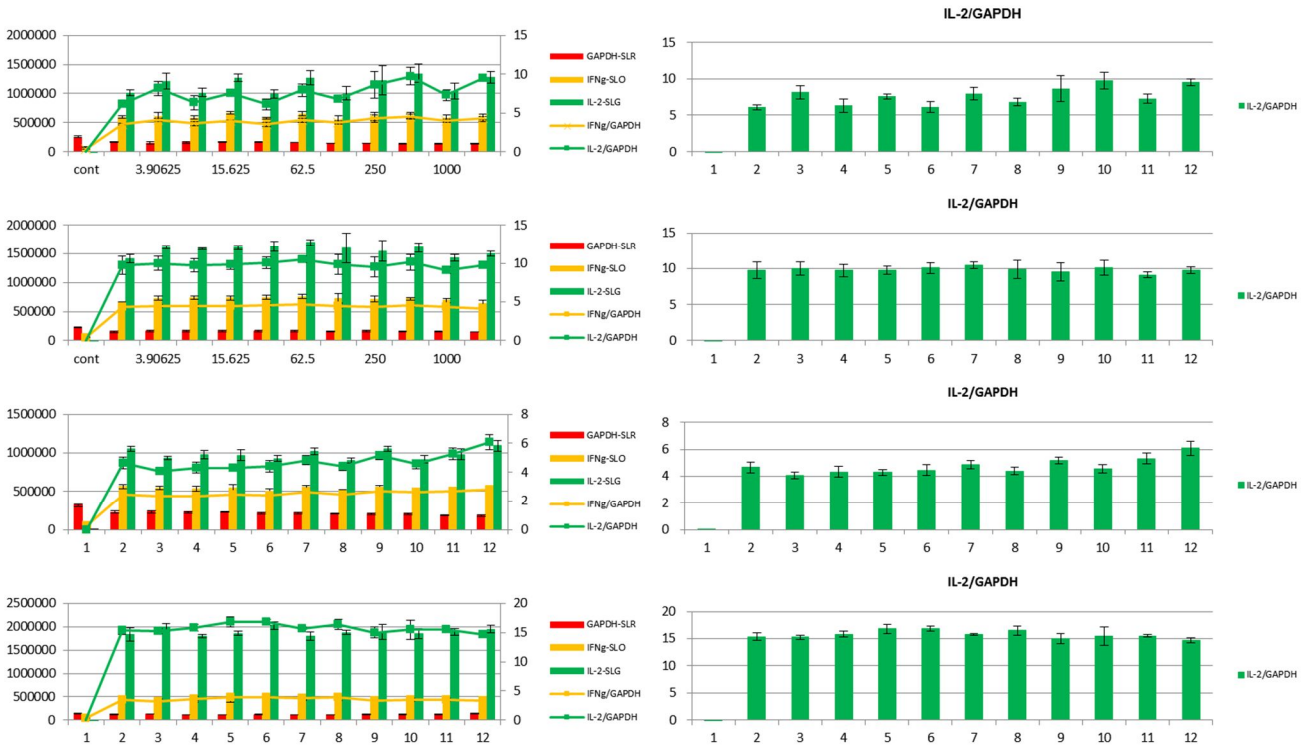
< MID706 >



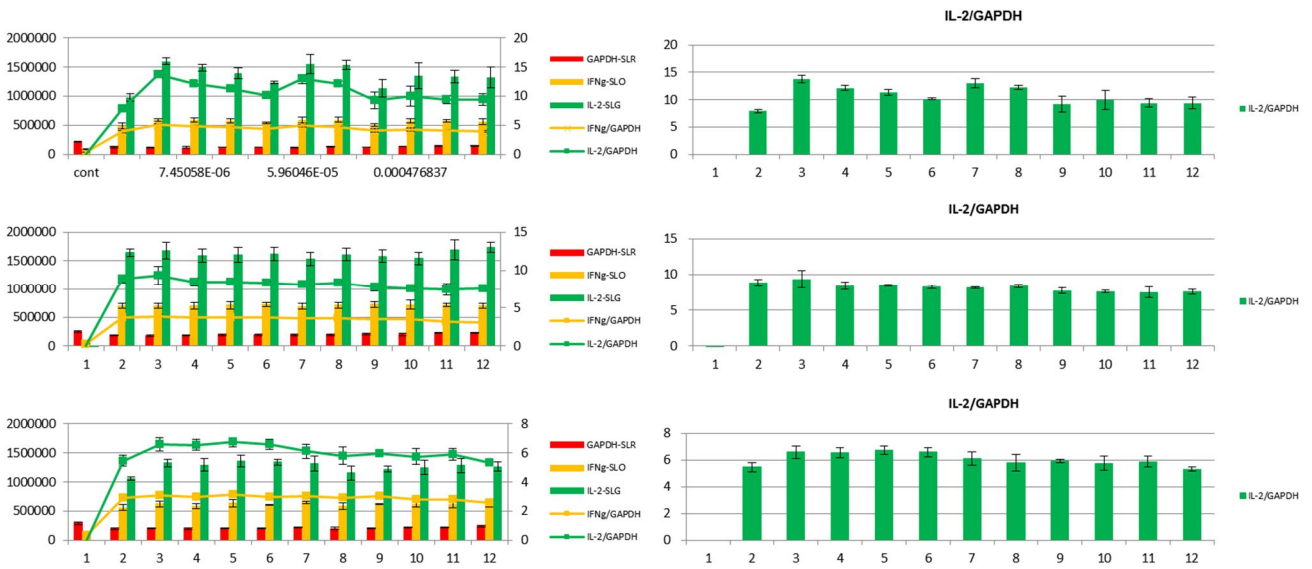
< MID707 >



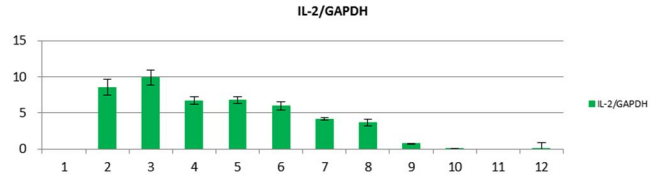
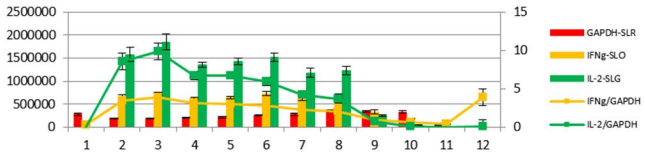
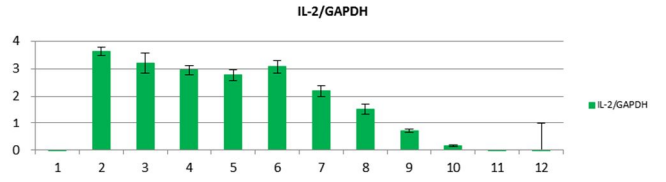
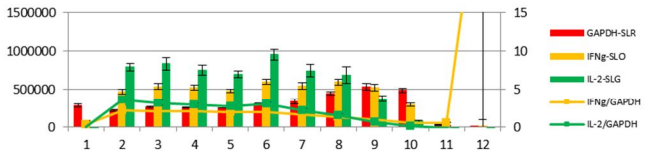
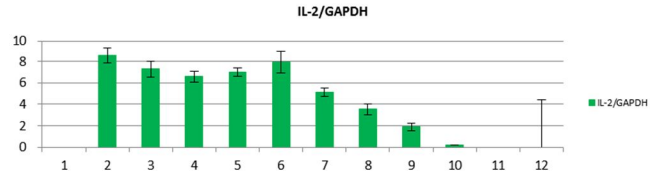
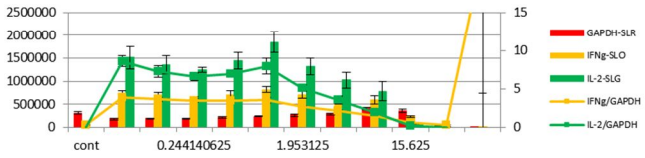
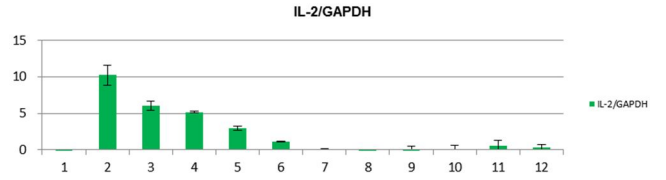
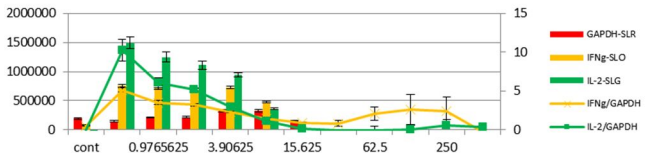
< MID708 >



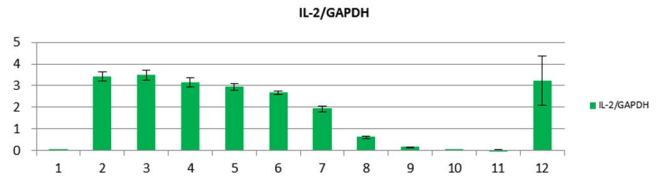
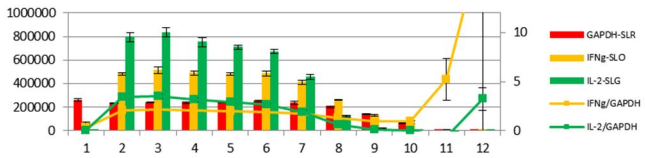
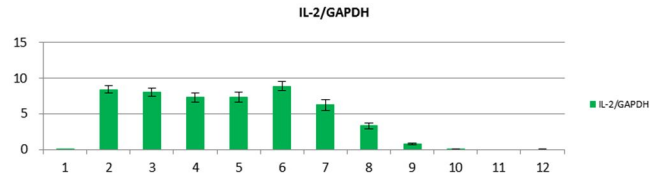
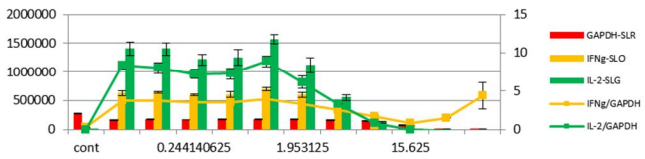
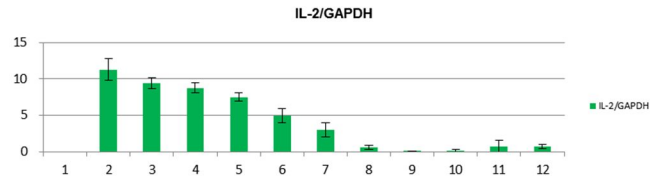
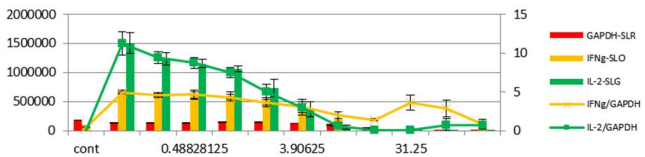
< MID709 >



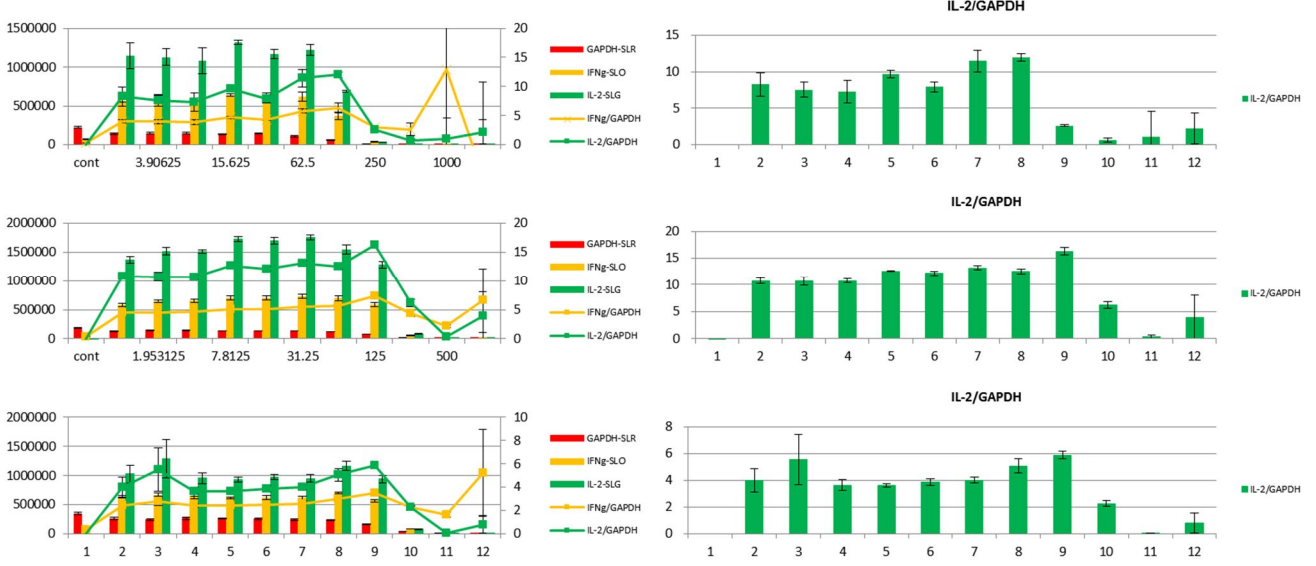
< MID710 >



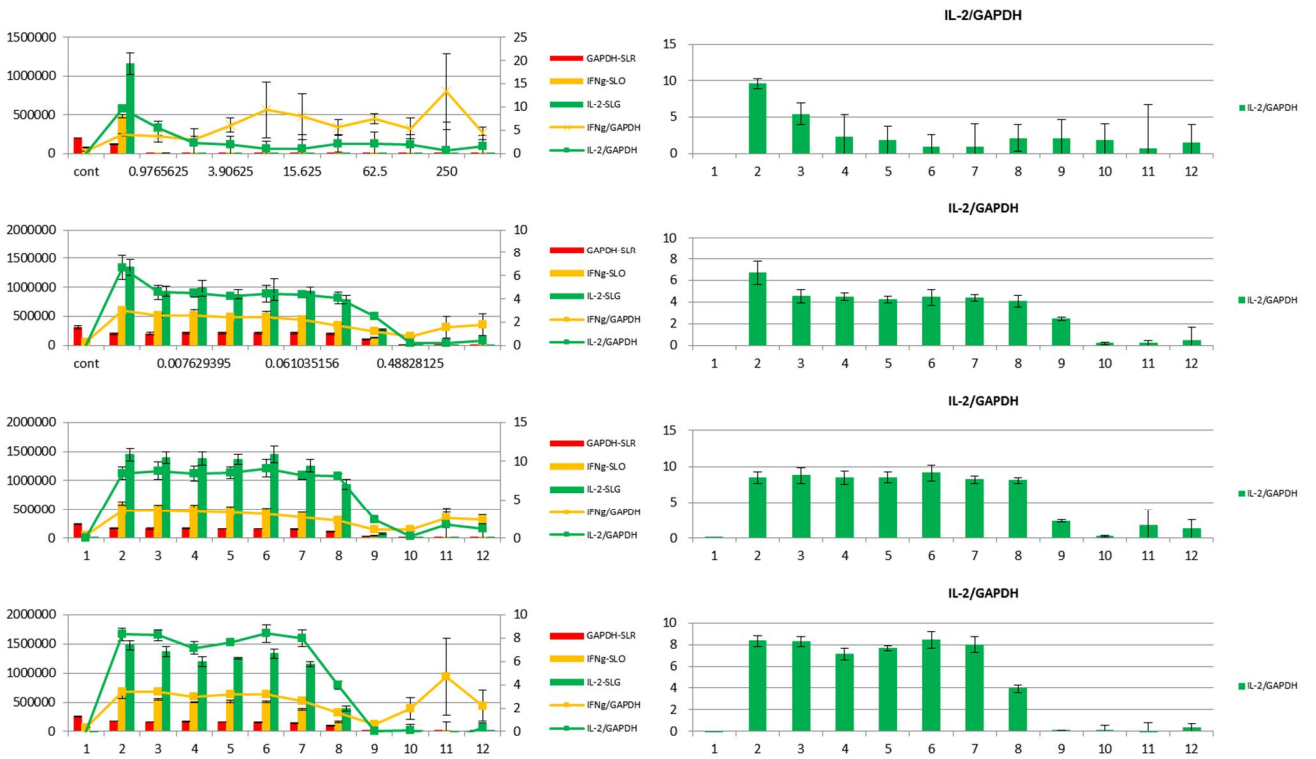
< MID711 >



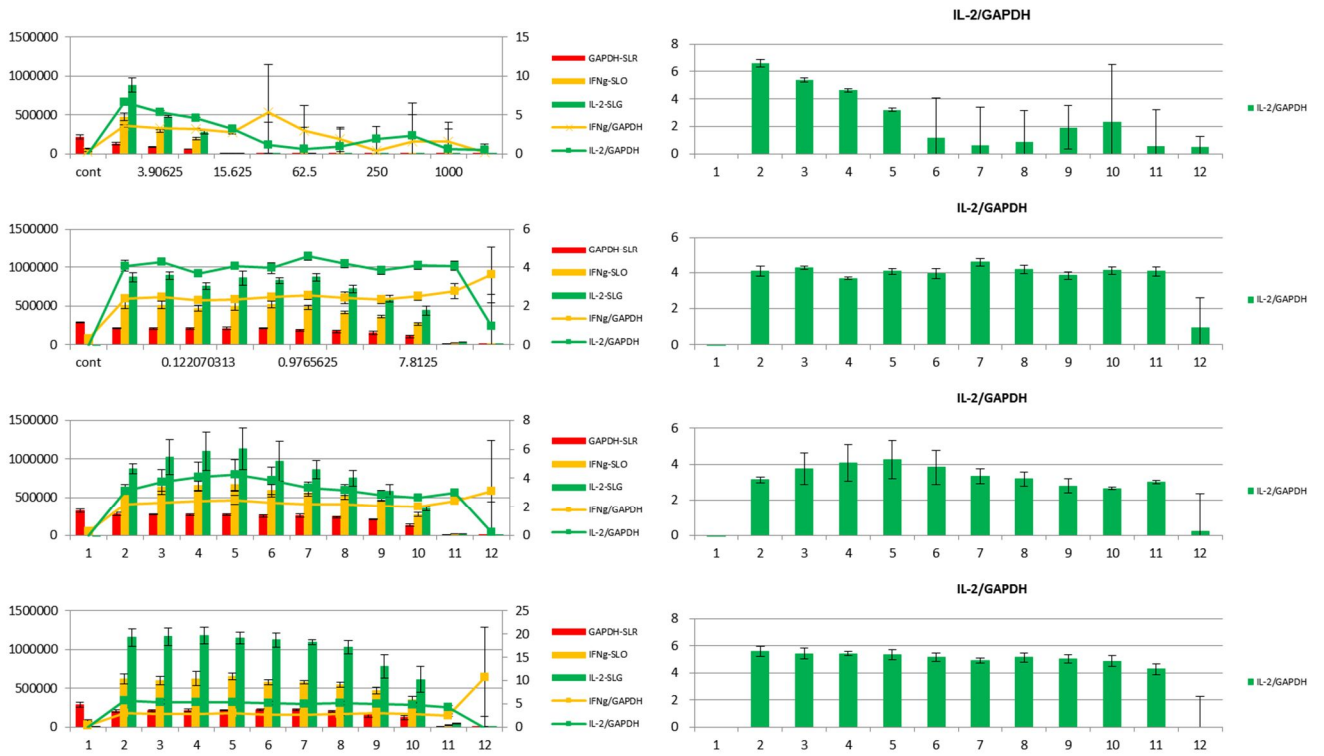
< MID712 >



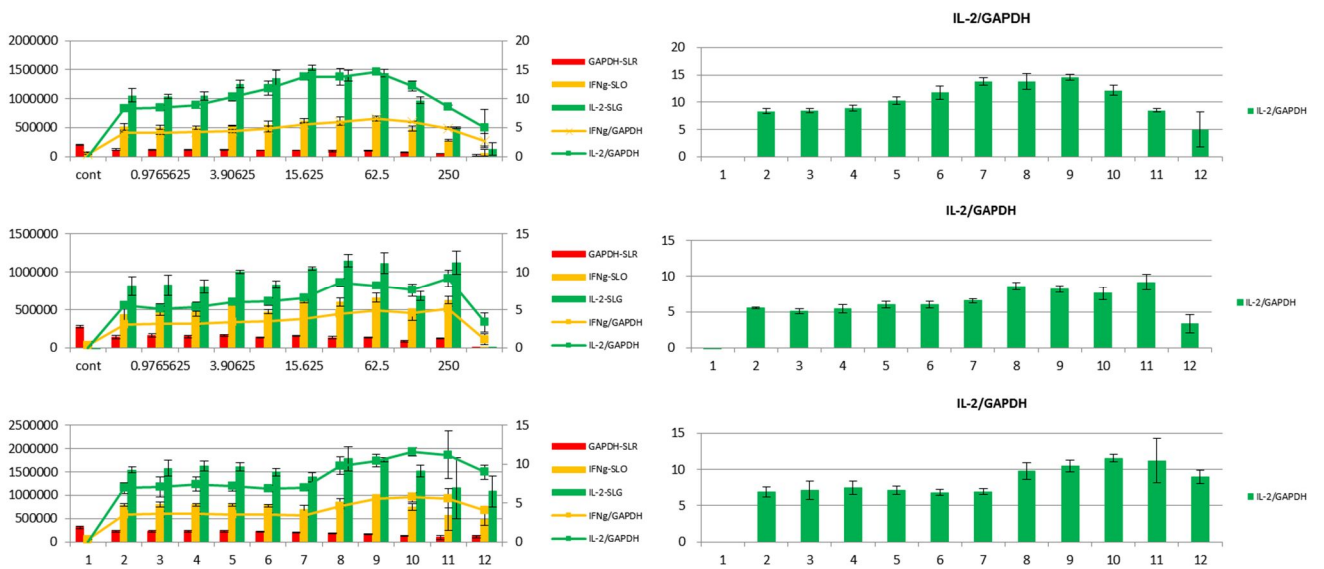
< MID713 >



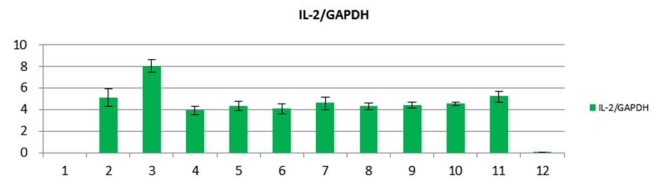
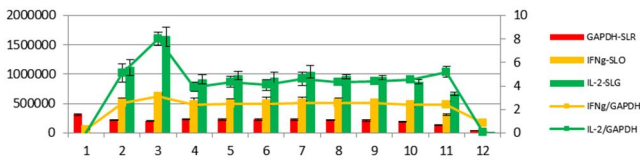
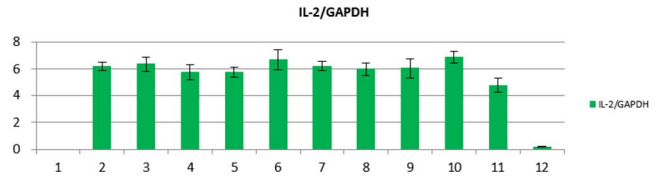
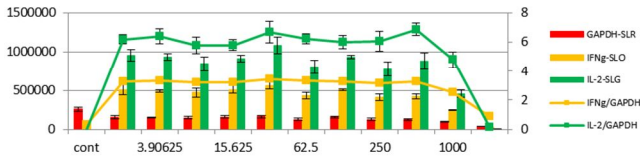
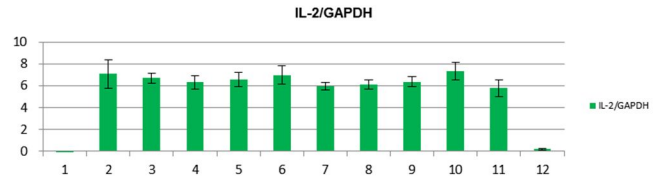
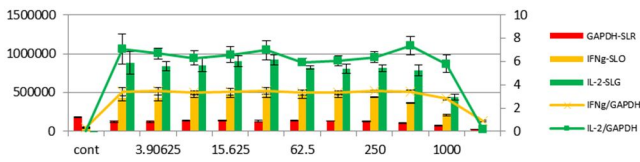
< MID714 >



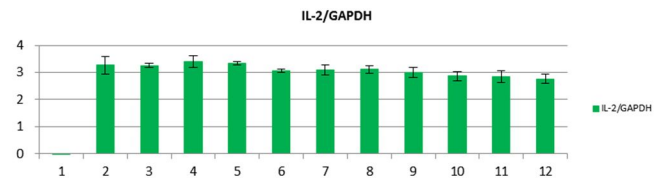
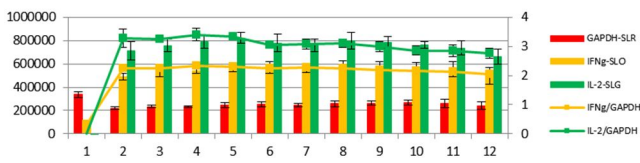
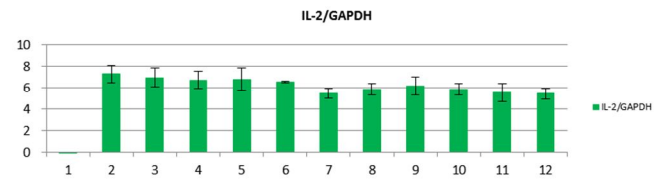
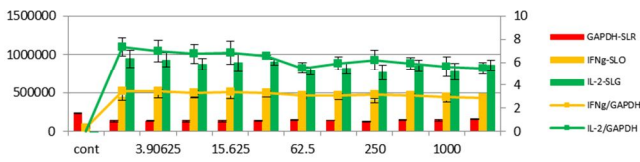
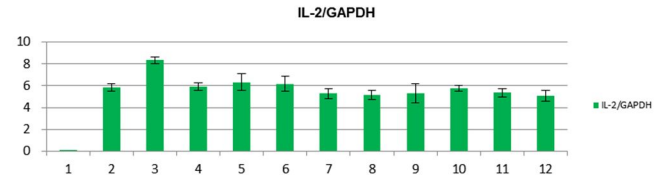
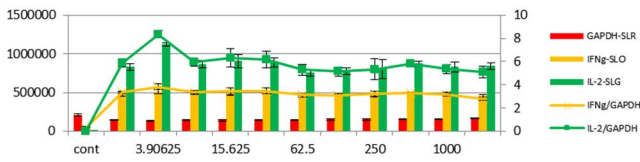
< MID715 >



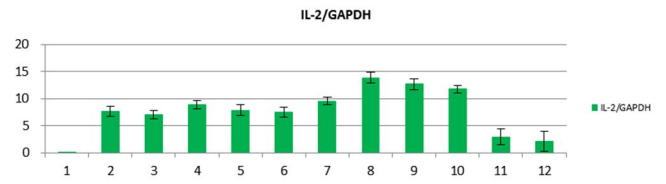
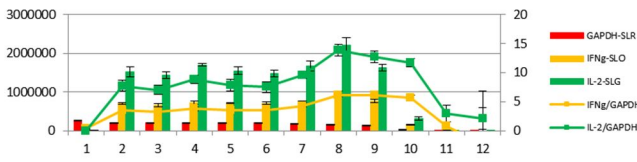
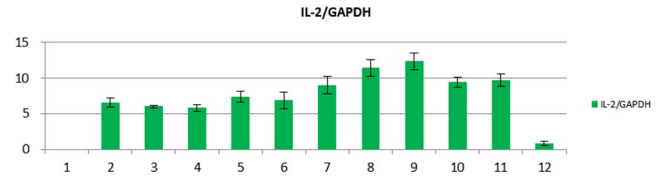
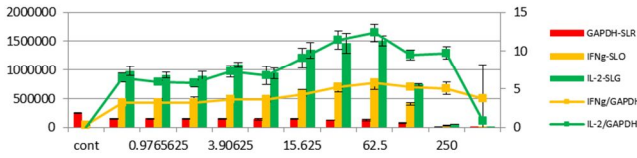
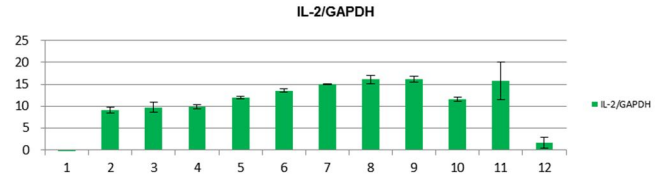
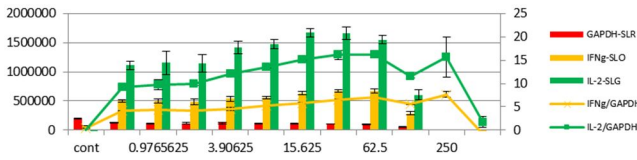
< MID716 >



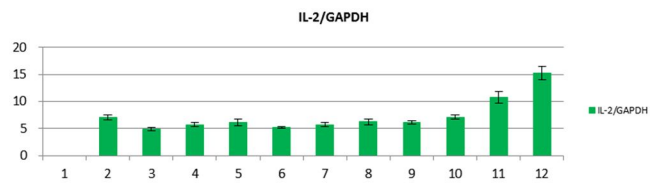
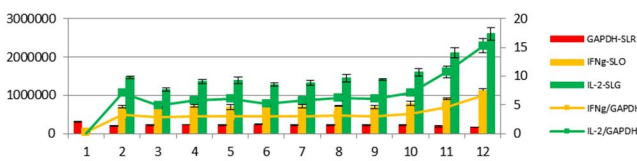
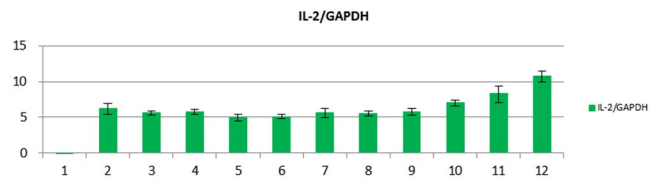
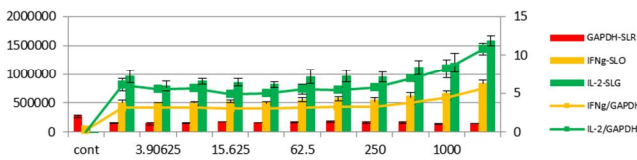
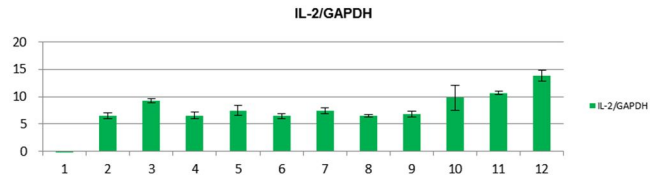
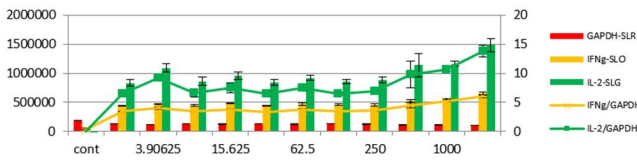
< MID717 >



< MID718 >



< MID719 >



< MID720 >

