

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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-ImmunoTox assayによる解析，Validation

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試験を実施した。H27年度はバリデーション参加3施設における技術移転性の確認を目的とした施設間差比較試験（Phase0）を実施し、国際バリデーション実行委員会の承認を得た。H28年度は、コード化された5被験物質のPhase1 study（施設内、施設間再現性試験）を、続いてH29年度はコード化された20物質においてPhase2 study（施設間再現性試験）を実施した。またその間、統計解析手法の改良も進め、最終的な評価基準において、Phase1、2のいずれにおいても、施設内、施設間再現性がstudy planの基準となる80%を超える良好な結果を得た。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

A．研究目的

多色発光タンパク質の技術を利用した化学物質の免疫毒性多項目評価システム（Multi-ImmunoTox assay; MITA）は、Jurkat細胞における INF- 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 の各種毒性評価発光細胞を利用した評価システムである。本研究では MITA 法の OECD テストガイドライン化を目指し

て、MITA を構成する 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テストを実施し、本評価システムの有用性と試験プロトコルの妥当性について検証した。

B．研究方法

試験には、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 を用いた。96 ウェルプレートに播種した

#2H4細胞に、段階希釈した被験物質を加え、37℃、5%CO₂下で培養した。1時間後、賦活化剤としてPMAとIonomycinを添加し、6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを混合し、多色発光検出用の光学フィルターを有したルミノメーターで発光量を計測した。IL2プロモータ活性の指標となる緑色発光値 (SLG-luciferase activity (SLG-LA))は、内在性コントロールであるG3PDHプロモータ活性の指標となる赤色発光値(SLR-luciferase activity (SLR-LA))で除することにより、各ウェルの細胞数や細胞生存率を補正した normalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)で算出した。さらに、薬物添加によるIL2プロモータ活性の抑制率(%suppression)を以下の計算式で算出した。

$$\% \text{ suppression} = (1 - (\text{薬物存在下での nSLG-LA}) / (\text{薬物非存在下での nSLG-LA})) \times 100$$

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の詳細については Multi-Immuno Tox Assay protocol に準じて進めた。また、バリデーション試験には、我々(産総研つくば)を含め、食薬センター、産総研高松の3施設が参画した。

Phase0 study (H27年度)

まずは、3施設における技術移転性を確認するために、プレバリデーションテスト (phase0) を実施した。国際バリデーション実行委員会にて選定した5化学物質について、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.1E に準じて実施した。

Phase1 study (H28年度)

施設内、および施設間再現性確認のために、国際バリデーション実行委員会にて選定されたコード化された5化学物質を、各物質3回繰り返し1セットの試験を3セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.5E に準じて実施した。

Phase2 study (H29年度)

施設間再現性確認のために、国際バリデーション実行委員会にて選定されたコード化された20化学物質を、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.009.1E に準じて実施した。

各バリデーションテストの結果については、それぞれ国際バリデーション実行委員会会議において、評価判定基準 (Acceptance criterion) の最適化や試験プロトコルの改訂などの検討を含め検証を行った。

(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

Phase0 study (H27年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定した 2-Aminoanthracene, Citral, Chloroquine, Dexamethasone, Methylmercuric chloride の5化学物質について、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験結果を図1に示す。3回繰り返し試験において、各物質とも再現性の高いデータを得ることができ、またリードラボを含む4施設の結果の比較においても各物質に対する反応は同様のパターンを示した。一方で、PMA/Io に対する反応性に違いが確認され、試験プロトコル及び、acceptance criterion の改定を行った。国際バリデーション会議において、これらの結果を検証し、技術移転性の問題なしと判断し、次年度のPhase1試験実施を決定した。

Phase1 study (H28年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定したコード化された5化学物質について各物質3回1セットからなる試験を3セット行った。各物質の計測結果および%suppressionを図2に示す。また、図3に criterion1、2、3の評価結果を示す。Phase1試験の結果、Chemical No. 1, 3, 4 においては、いずれも「Immunosuppress (IL-

2プロモータ活性抑制)」の結果を示し、良好な施設内再現性が確認された(図3)。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。Chemical No.5においては、いずれのクライテリアでも「Immunoaugmentation(IL2発現亢進)」と「No effect」の評価に分かれた(図3)。一方で、nSLG-LAのグラフ(図2)は計9回の試行において、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、現 criterionでの評価が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、他施設がImmunosuppressの評価に対し、当グループの結果はクライテリア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。施設内再現性は得られており、他施設と比較しても、nSLG-LAの濃度依存的傾向もほぼ同様であった。唯一、高濃度域での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。

最終的に、criterion1において、各施設の施設内再現性が93%、施設間再現性が80%と、ともに80%以上というstudy planの基準を満たしたことからcriterion1を採用しPhase2試験を行う方針とした。また、判定において濃度依存性を考慮すべきとの意見を踏まえ、criterion3を濃度依存的な抑制または亢進反応に対する基準を加えたcriterion3'に改定し、Phase II試験において使用することとした。

Phase2 study (H29年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定したコード化された20化学物質について各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。各物質の計測結果および%suppressionを図4に示す。また、図5にcriterion5の評価結果を示す。

いずれの物質においても、3回試行の結果、nSLG-LA及び%suppressionの濃度依存的変動のグラフに一致した傾向が見られ、施設内において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、最終的に設定されたCriterion5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、評価が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、異なる評価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。

D. 考察

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試験を実施し、良好な施設内再現性、および施設間再現性を示す結果が得られた。

本試験では、適切な評価基準を設定するために、クライテリアの最適化を重ね、最終的にCriterion5を設定した。Phase2試験の結果においては、当初、Phase2 studyで設定したCriterion3'で施設間再現性を評価したところ65%(13/20)で、再設定したCriterion4においても65%(13/20)であった。しかしながら3施設の結果と比較すると、各物質における濃度依存的%suppressionの変動には同様のパターンが確認され、評価結果ほどの差異があるように見えなかった。そこで、東北大学で作成されたMITA data setを参考とし%suppressionの閾値を±35%と設定したCriterion5を設定し再評価したところ施設間再現性が80%(16/20)であった。またPhase1の結果を再評価したところ施設間、施設内再現性ともに80%(4/5)で、Phase2の結果とともにstudy planの基準を満たす結果となった。Criteria5では、

Phase1試験で、施設間で評価の分かれたNo.5物質は、全施設「No effect」の評価で一致した。No.2物質に関しては、他施設との評価は異なるままであったが、リードラボである東北大学結果とは一致した。Criteria5は国際バリデーション実行委員に承認された。

E. 結論

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試験（Phase0, 1, 2）を実施した。試験プロトコルの改定やAcceptance criterionの最適化を重ね、各試験において、study planの80%基準を満たす良好な施設内および施設間再現性が確認された。

F. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許

特願 2016-048403 / PCT/JP2017/009467

図1 phase0 試験結果

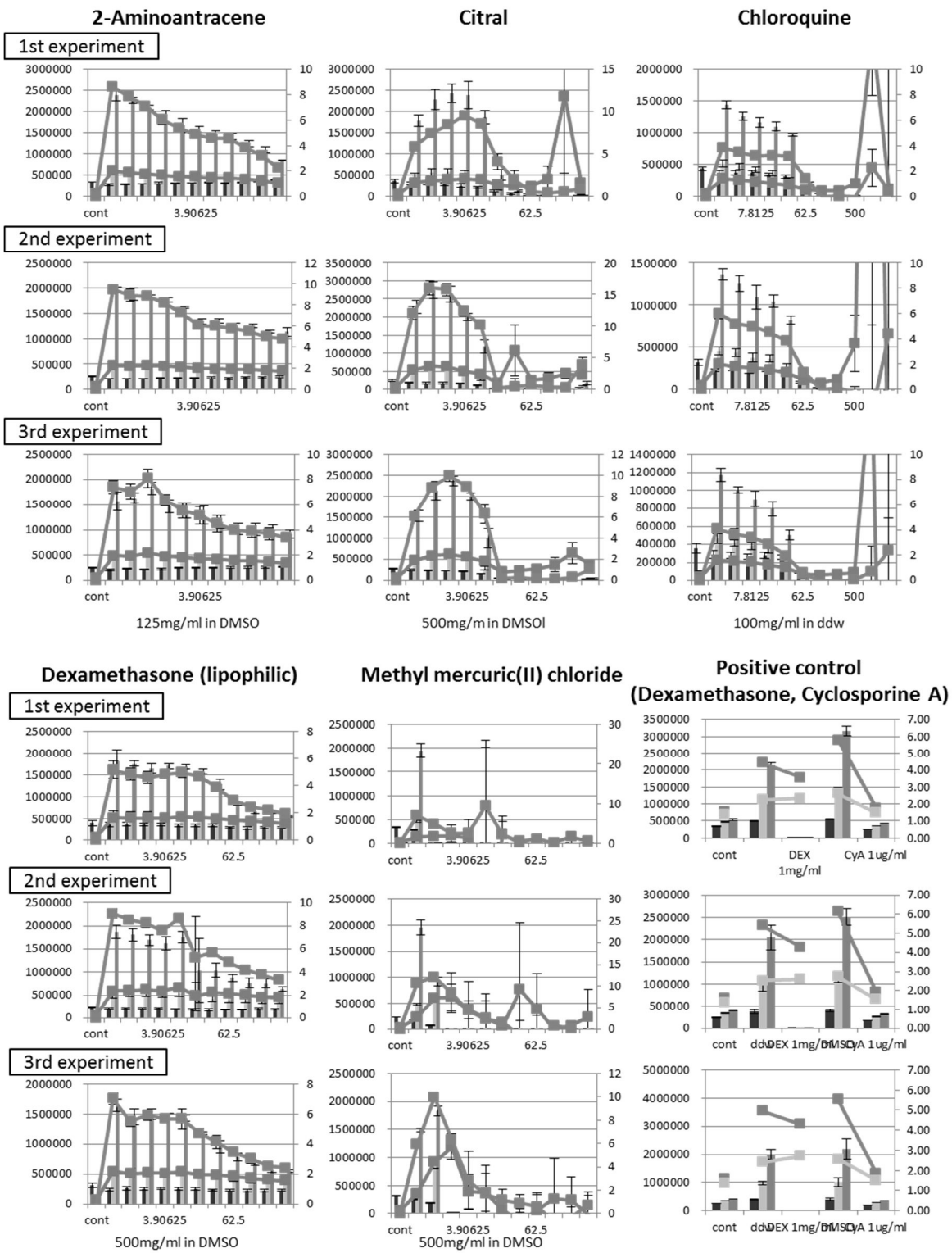
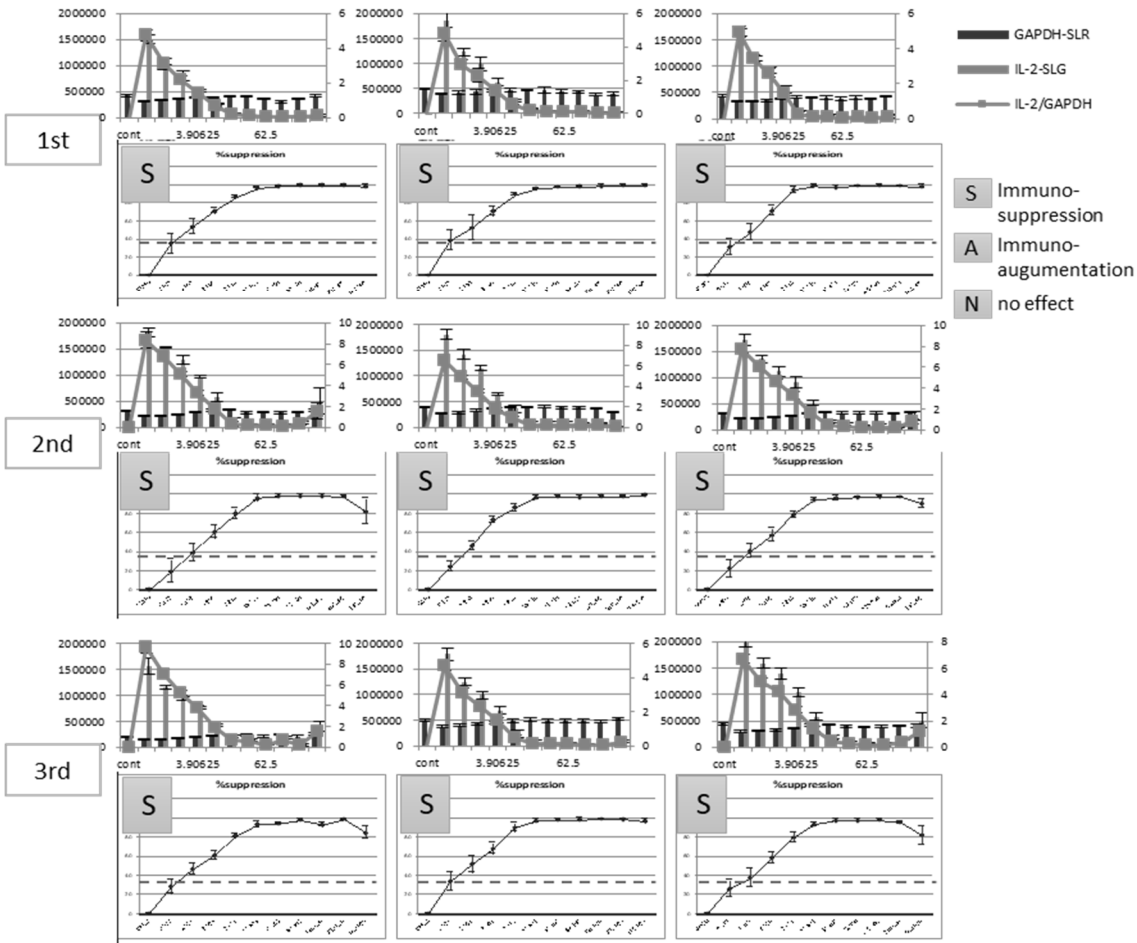


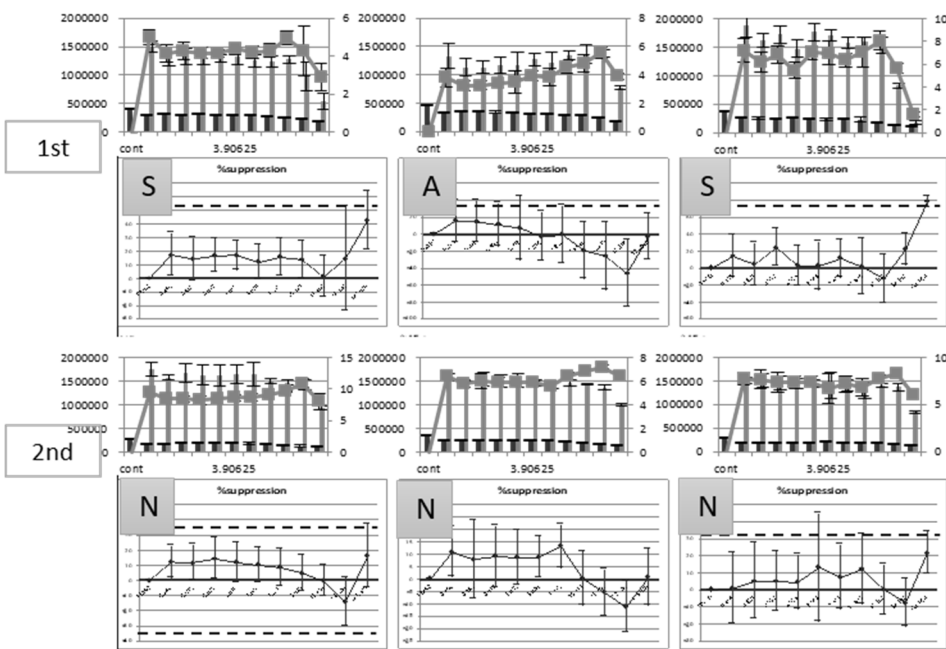
図2 phase1 試験結果

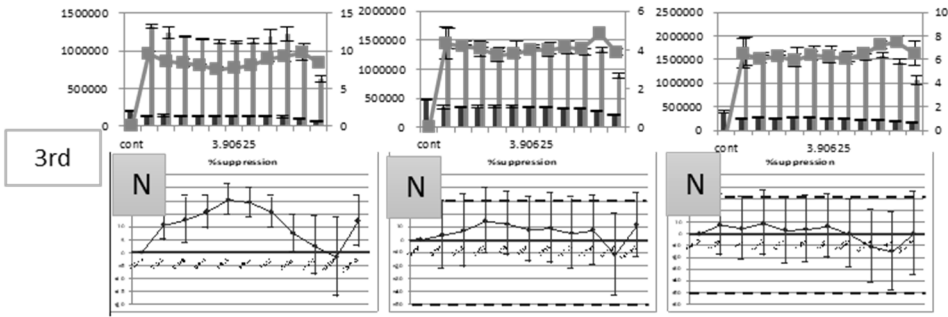
(図には、試験終了後に開示された被験物質名を表記した。また Phase2 試験において最終的に設定されたクライテリア 5 での評価結果を示した。)

1, Dibutyl phthalate

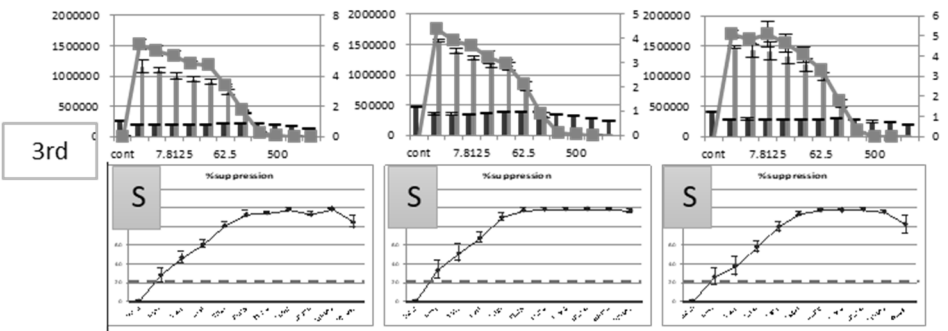
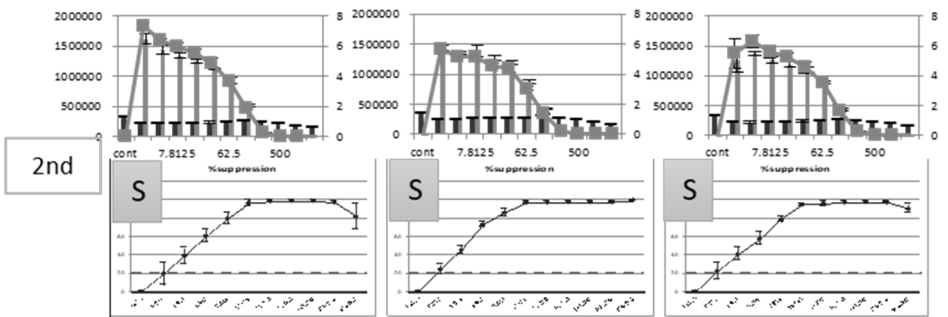
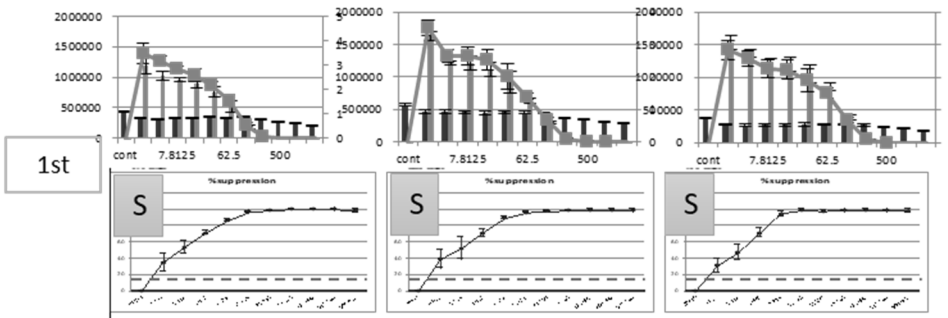


2, Hydrocortisone

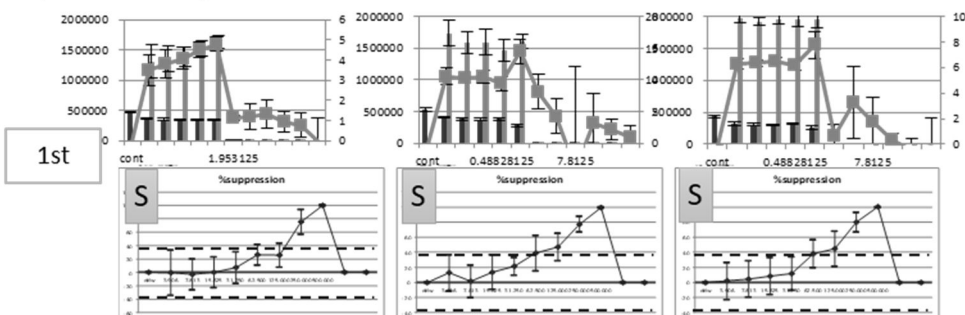


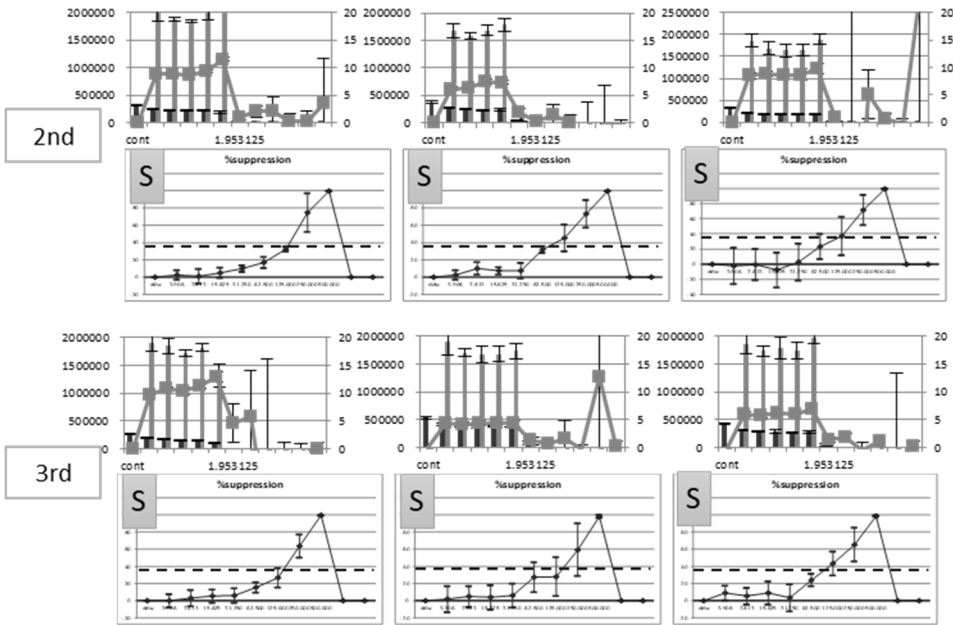


3, Lead(II) acetate trihydrate



4, Zinc dimethyldithiocarbamate





5, Nickel(II) sulfate hexahydrate

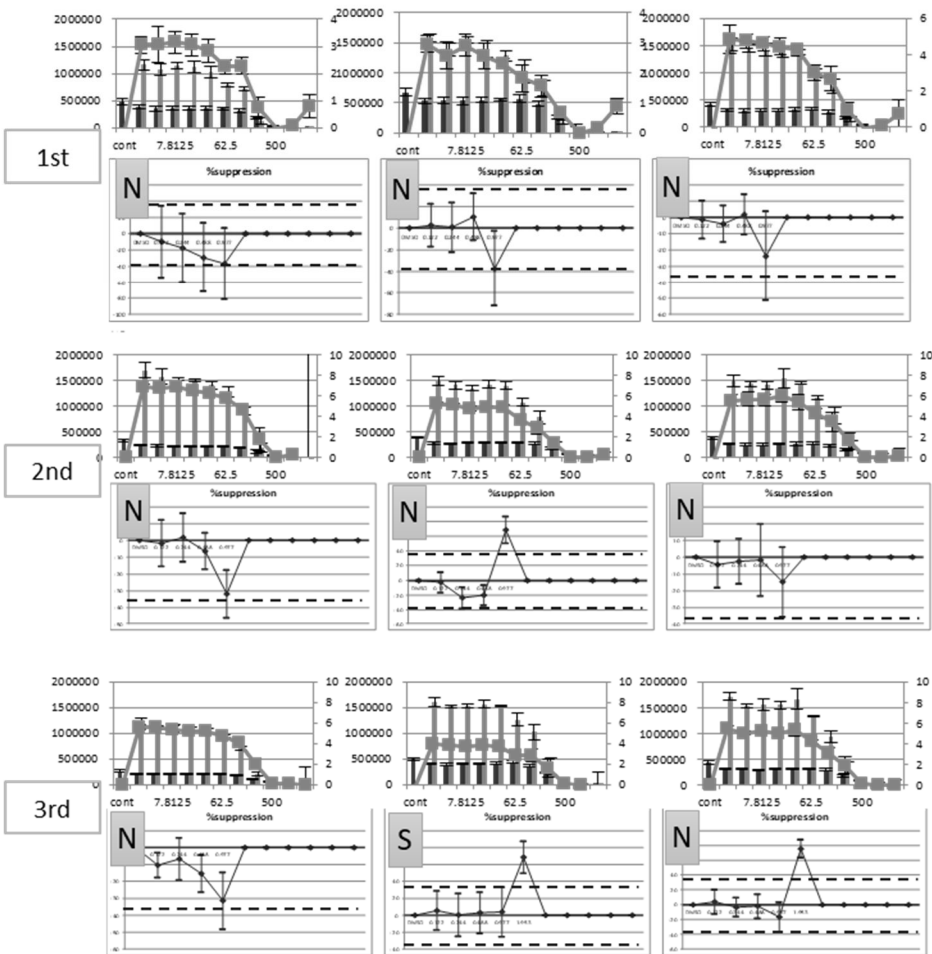


図3 criterion1,2,3による phase1 試験評価結果

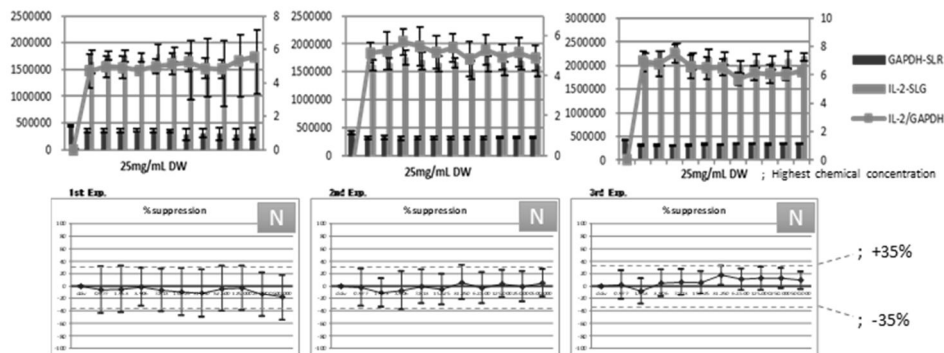
		Criterion1	Criterion 2	Criterion 3
Chemical 1 ; Dibutyl phthalate	Exp.1	S (-/-/ -)	S	S
	2	S (-/-/ -)	S	S
	3	S (-/-/ -)	S	S
Chemical 2 ; Hydrocortisone	Exp.1	N (-/+/-)	S	S
	2	N (±/±/0)	A and S	S
	3	N (-/0/0)	S	A and S
Chemical 3 ; Lead(III) acetate trihydrate	Exp.1	S (-/-/ -)	S	S
	2	S (-/-/ -)	S	S
	3	S (-/-/±)	S	S
Chemical 4 ; Nickel sulfate hexahydrate	Exp.1	S (-/-/ -)	S	S
	2	S (-/-/ -)	S	S
	3	S (-/-/ -)	S	S
Chemical 5 ; Zinc dimethyldithiocarbamate	Exp.1	A (0/+/+)	A	A
	2	N (+/-/0)	N	N
	3	N (+/-/±)	A	N

S ; immunosuppression
A ; immunoaugmentation
N ; No effect

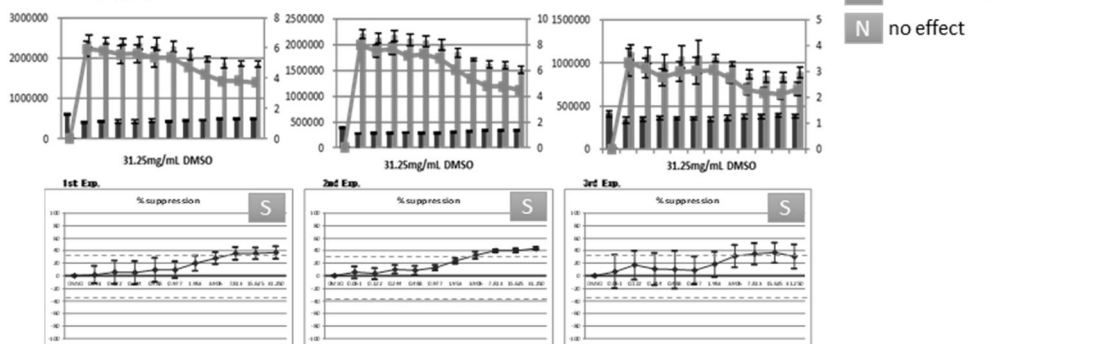
図4 phase2 試験結果

(図には、試験終了後に開示された被験物質名を表記した。また Phase2 試験において最終的に設定されたクライテリア 5 での評価結果を示した。)

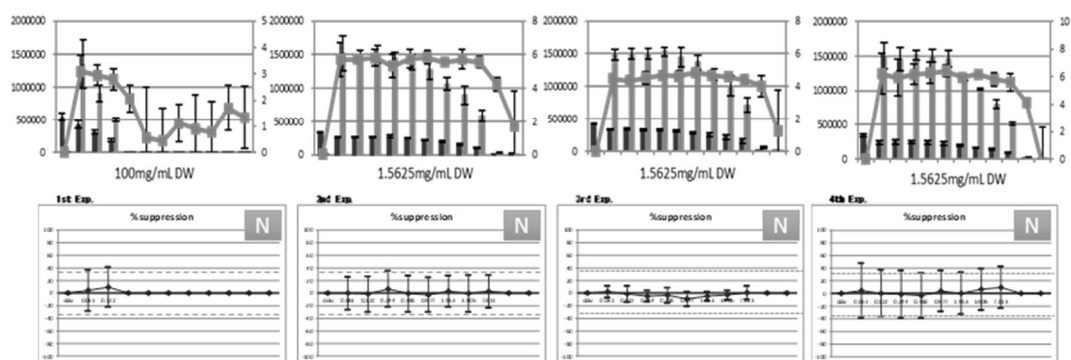
1, 2,4-Diaminotoluene



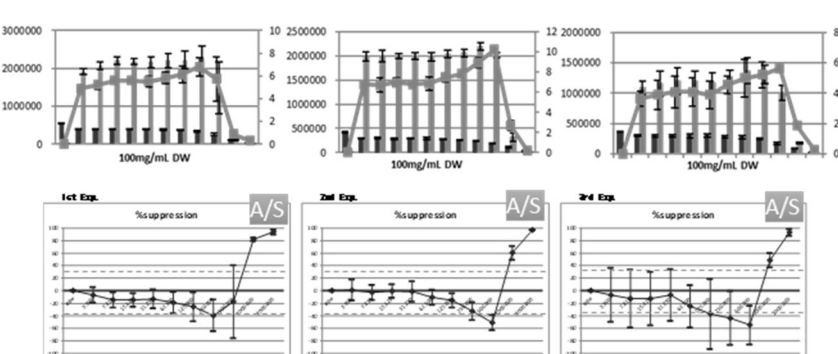
2, Benzo(a)pyrene



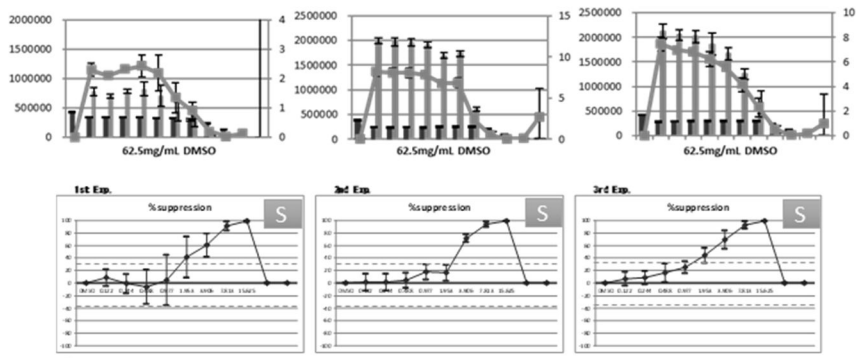
3, Cadmium chloride



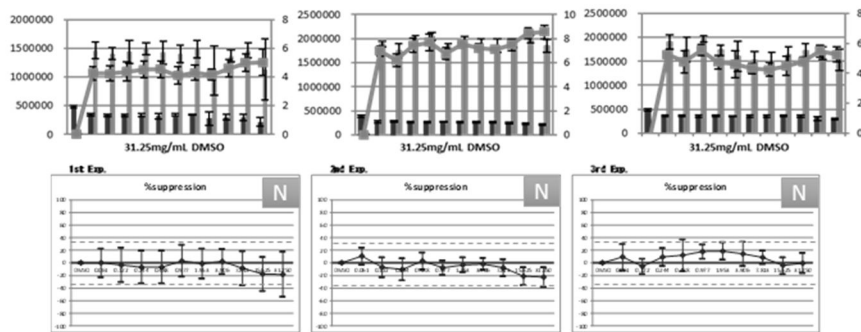
4, Dibromoacetic acid



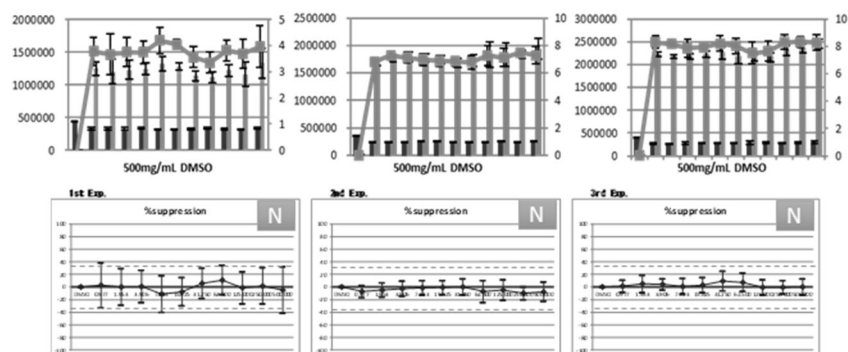
5, Diethylstilbestol



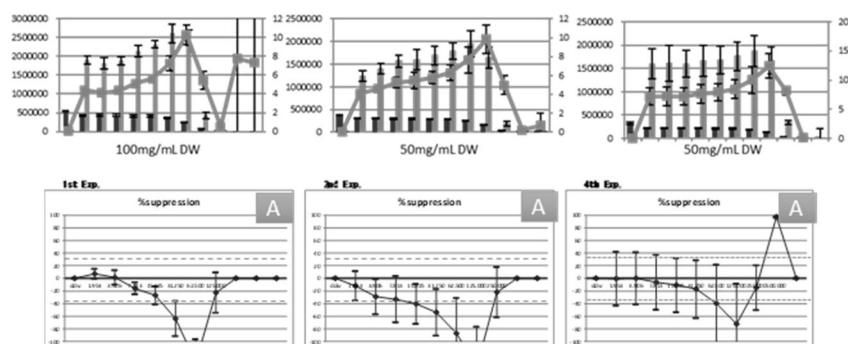
6, Diphenylhydantoin



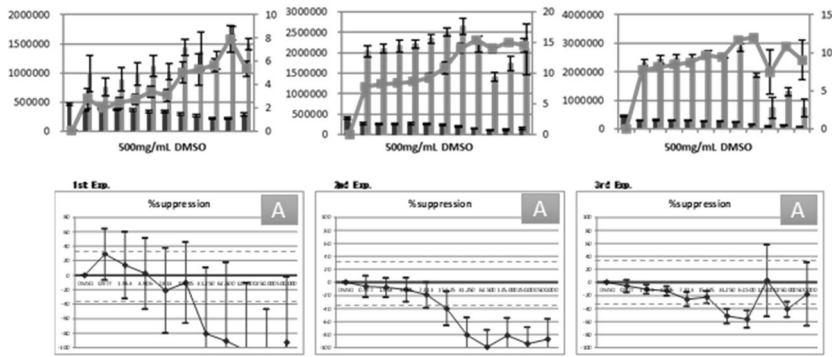
7, Ethylene dibromide



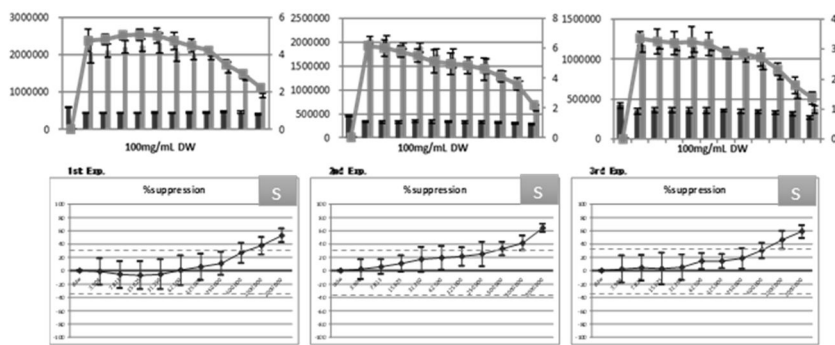
8, Glycidol



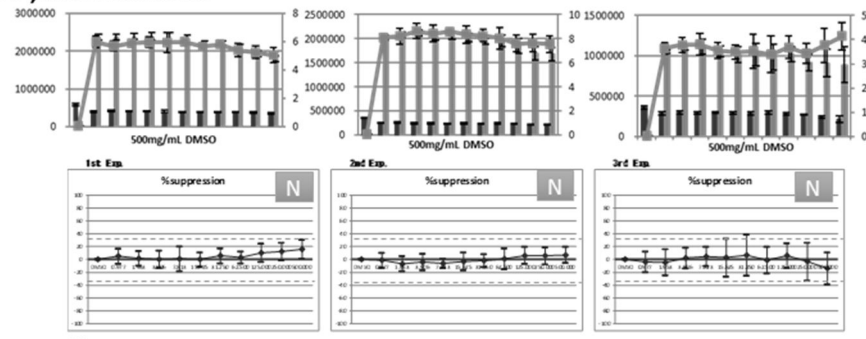
9, Indomethacin



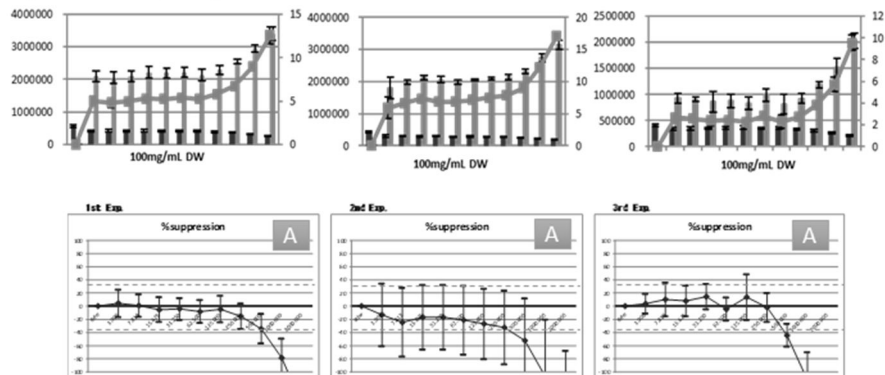
10, Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)



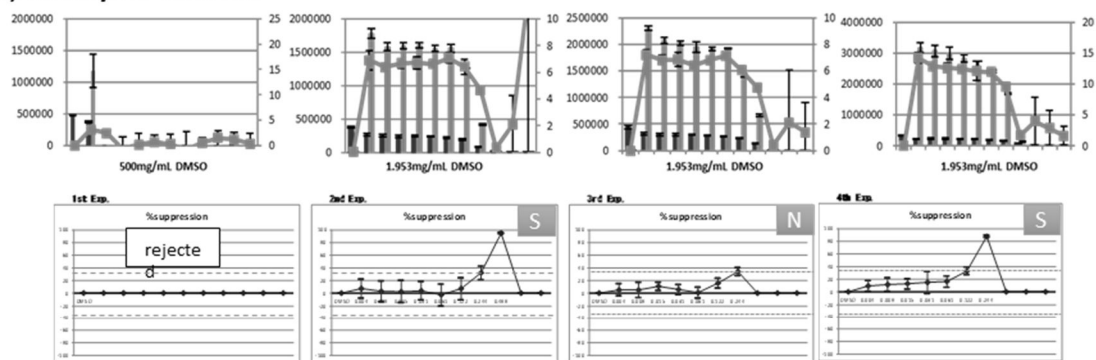
11, Nitrobenzene



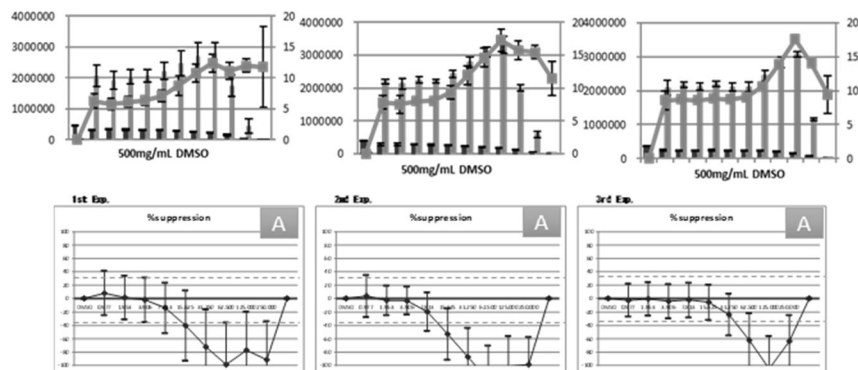
12, Urethane, Ethyl carbamate



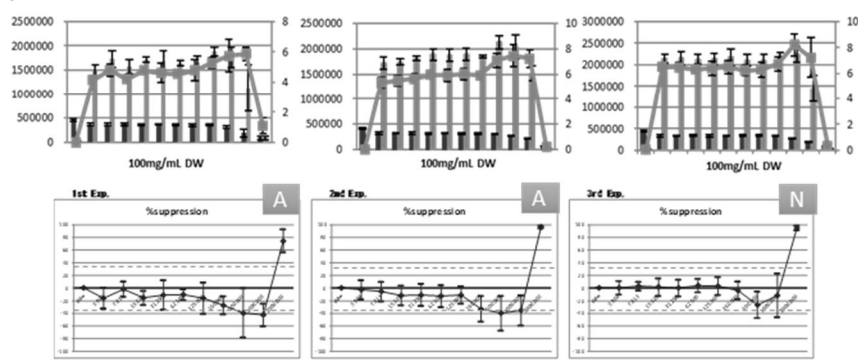
13, Tributyltin chloride



14, Perfluorooctanoic acid



15, Dichloroacetic acid



16, Toluene

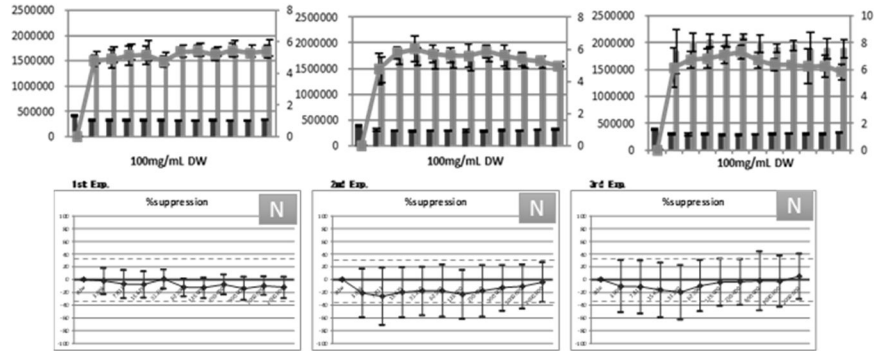


図5 Criteria5における phase2 試験評価結果

	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-chorolophenol	S : SSS

S ; immunosuppression

A ; immunoaugmentation

N ; No effec