

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

化学物質のMITAによる解析, validation
総括研究報告書

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評価系のOECDテストガイドライン化を目指し、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の実施を担当し、技術移転性 (Phase 0)、施設内・施設間再現性 (Phase I)、施設間再現性 (Phase II) の評価に必要な実験を行った。

初年度はPhase 0として5物質の実験を実施し、良好な技術移転性を確認した。2年目は、Phase 1としてコード化した5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た。その結果、暫定的ではあるが80%以上の再現性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物質の実験を行い、施設間比較を行うとともに、得られた結果をリードラボ（東北大）と比較することにより正確性を評価した。

その結果、80%以上の再現性を達成するためには、判定法の改良が求められたことから、%suppressionの閾値を設定した判定基準5を設定した。この基準を採用した結果、施設内再現性はいずれの施設も80%、施設間再現性は80%、正確性は85%以上となり、いずれもstudy planにおける基準を満たし、国際バリデーション試験を終了した。

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・施設間再現性

A. 研究目的

MITAの開発者である相場らは、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、技術移転性、施設内再現性、施設間再現性を検証するための実験を行った。

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

技術移転性を確認するPhase 0 studyでは、5物質（2-aminoanthracene、chloroquine、citral、dexamethasone、methylmercury(II) chloride）を用いた。

施設内および施設間再現性を確認するPhase I studyでは、国立医薬品食品衛生研究所でコード化して送付された5種類の化学物質を1セットとする3セット（Aセット、Bセット、Cセット）を用いた（表1）。

施設間再現性を確認するために実施したPhase II studyでは、コード化して送付された20物質（コード番号：MIC601～MIC620）を用いた（表2）。

B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコルに準じて行った。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 μ Lを細胞懸濁液（50 μ L）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（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ラウンド）が得られるまで異なる日による実験を繰り返した。

なお、Phase毎に結果を確認し、必要があればプロトコルの変更を実施した。判定基準の変更も行われ、最終的に%suppression

の閾値を $\pm 35\%$ と設定した以下の判定方法が採用された。

<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（I.I.-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

Phase 0ではコード化せずに5物質の実験（1ラウンド、すなわち1物質につき3回実施）を行い、その結果をリードラボである東北大へ送付した。3施設の結果を比較し、技術移転性を確認し、コード化物質での実験を開始した。

Phase Iでは施設内再現性を確認するために、コード化されている5物質を1セットとし3セット、すなわち1セット計15回の実験を3回実施した（図1～3）。また、判定基準5による物質毎の結果（1ラウンド3実験、3ラウンド）を図4～8に示した。5物質中3物質はすべての実験で同じ判定となり完全な施設内再現性が得られた。2物質は、3実験のうち1実験で異なる結果が得られ、同じ判定となった2実験の判定を最終判定とした。その結果、hydrocortisoneでは3ラウンドの判定が一致し、施設内再現性のある結果が得られた（図5）。一方、zinc dimethyldithiocarbamateでは、3ラウンド中1ラウンドの判定が一致せず、施設内再現性が得られなかった（図8）。

Phase Iにおける施設内再現性は3施設ともに80%、施設間再現性は80%であった（表3）。

Phase IIでは施設間再現性を確認するために、コード化した20物質の実験を行った（図9）。

判定基準5を採用した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我々の正確性は85% (17/20) であった (表4)。

D. 考察

Phase Iでは、1物質について3実験 (1ラウンド) を3回の計9実験の結果が得られ、それが5物質分の計45実験の結果が得られた。

MITAの開発者である相場らは、実験毎に統計処理し、3実験の結果が異なる場合にはさらに統計処理を利用して判定する方法 (判定基準1) を採用していた。それに対して、統計の専門家から3実験の違いを調整して判定する2つの方法 (判定基準2：平均の差を用いる方法、判定基準3：%suppressionの平均の差を用いる方法) が提案されたことから、Phase Iの結果について比較検討が行われた。その結果、採用する判定方法によって再現性の達成率が異なるが、判定基準1で3試験施設ともに80%以上の再現性を達成した。

しかしながら、マネジメントチームの専門家から濃度依存性を考慮した判定が必要との意見を受け、%suppressionの基準に濃度依存性を考慮した判定法 (判定基準3') を提案しPhase Iの結果をその方法で再評価した。その結果、施設内再現性および施設間再現性ともに80%となったことから、Phase II studyではこの判定法を採用することとなった。

Phase IIで実施した20物質について判定基準3' による判定を行った結果、80%以上の施設間再現性が得られなかった。この結果についてマネジメントチームの専門家を交えて議論し、判定基準の再検討が行われた。その結果、判定基準3' にさらに%suppressionの閾値 (±35%) 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。

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%と判定基準の変更による影響は許容範囲内であった。

免疫毒性に関するin vivoのデータは少に示したくないことから、バリデーション試験結果の正確性については、リードラボの結果との一致率により判定した。その結果、Phase Iでは80~100%、Phase IIでは85~95%となり、良好な結果が得られたが、今後さらにin vivoの既存データの精査が必要である。

E. 結論

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のために、試験施設として国際バリデーション試験に参加し、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、この評価系の国際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 I) に使用した化学物質

No.	Chemical	Cas.no.	State	Code No.
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	Liquid	MIC027A
				MIC026B
				MIC023C
2	Hydrocortisone (for Cell Culture)	50-23-7	Solid	MIC029A
				MIC028B
				MIC025C
3	Lead(II) acetate trihydrate (Deleterious substances)	6080-56-4	Solid	MIC021A
				MIC210B
				MIC027C
6	Nickel (II) sulfate hexahydrate	10101-97-0	Solid	MIC025A
				MIC024B
				MIC021C
5	Zinc dimethyldithiocarbamate (DMDTC)	137-30-4	Solid	MIC023A
				MIC027B
				MIC029C

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

No	Chemical	Cas.no.	Lead Labo	Phase I				Based on Majority				
				AIST-Tsukuba	Majority	FDSC	Majority		AIST-Takamatsu	Majority		
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	S : SSS	solubility	500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)		S	
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S		
				2nd round	S : SSS		S : SSS		S : SSS			
2	Hydrocortisone water soluble	50-23-7	N : SNN	solubility	125mg/ml(DMSO)		125mg/ml(DMSO)		125mg/ml(DMSO)		S	
				1st round	S : SAS	N	S : SSS	S	S : NSS	S		
				2nd round	N : NNN		S : SSS		S : SSN			
3	Lead(II) acetate	6080-56-4	S : SSS	solubility	100mg/ml(ddd)		25mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)		S	
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S		
				2nd round	S : SSS		S : SSS		S : SSS			
4	Nickel sulfate hexahydrate	10101-97-0	S : SSS	solubility	100mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)		S	
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S		
				2nd round	S : SSS		S : SSS		S : SSS			
5	Dimethyldithiocarbamate	137-30-4	N : SNN	solubility	62.5mg/ml(DMSO)				62.5mg/ml(DMSO)		N	
				1st round	N : NNN	N	N : NNN	N	N : NNA	N		
				2nd round	N : NNN		S : SSN		N : NNN			
				Within	80%		80%		80%			
				Accuracy		100%		80%		80%		80%
				Between	80%							

表4 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase II。 ;) 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	Diethylstilbestrol	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 Hydrizide (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-Benzytp-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5物質 (Aセット) の IL-2 レポーター活性試験 (Phase I) の結果

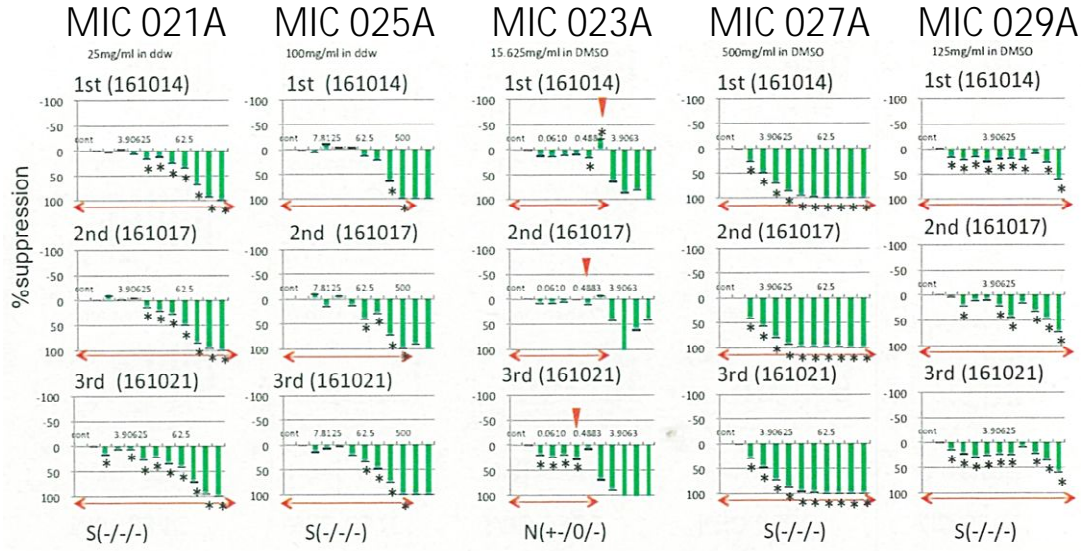


図2 コード化5物質 (Bセット) の IL-2 レポーター活性試験 (Phase I) の結果

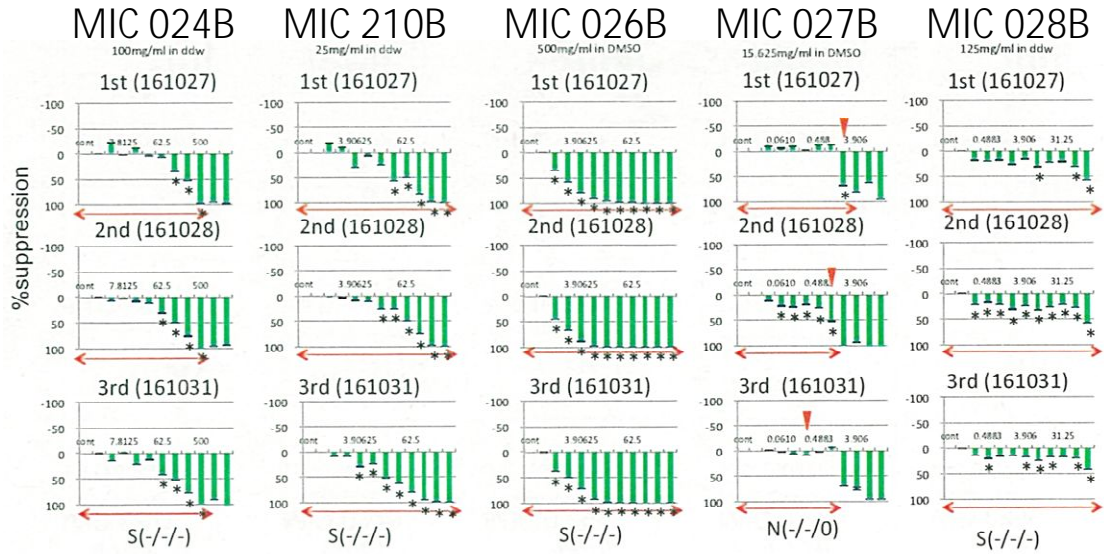


図3 コード化5物質（Cセット）のIL-2レポーター活性試験（Phase I）の結果

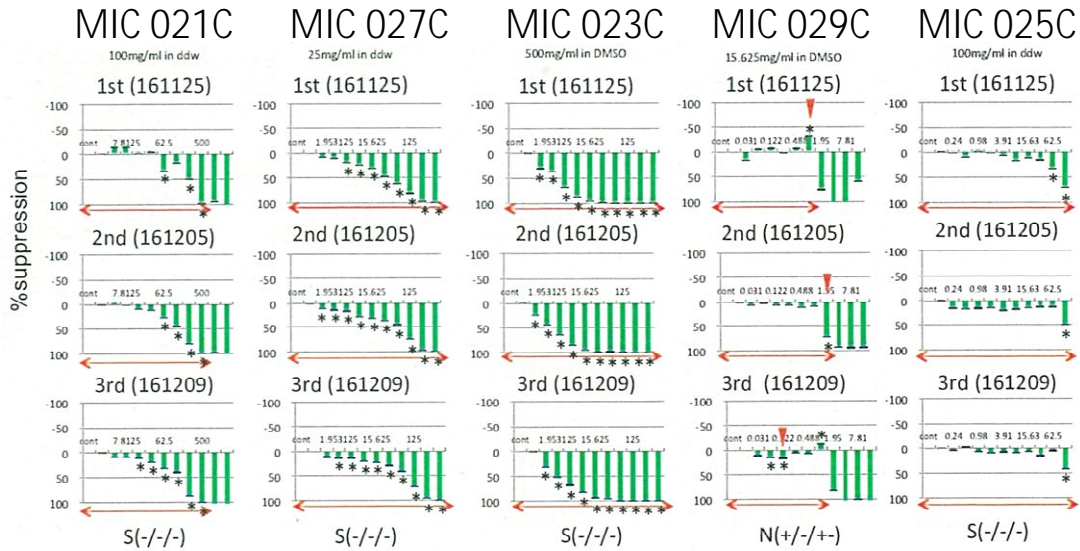


図4 コード化物質（dibutyl phthalate）の施設内再現性（Phase I）の結果

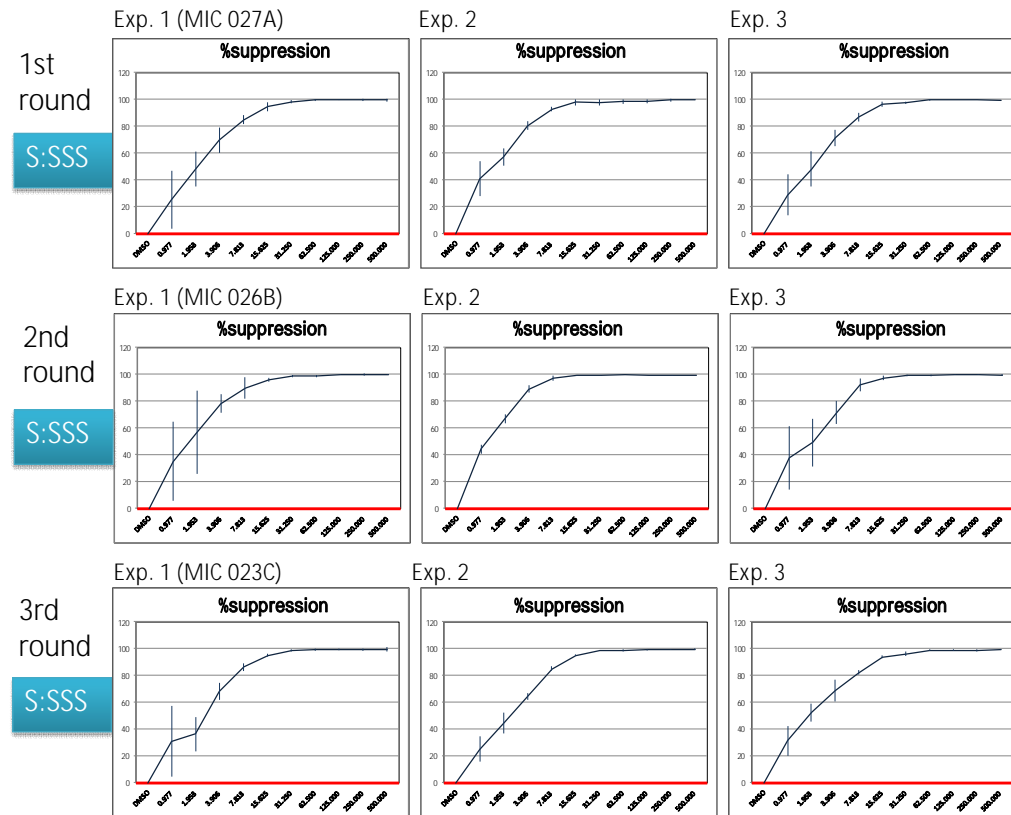


図5 コード化物質 (hydrocortisone) の施設内再現性 (Phase I) の結果

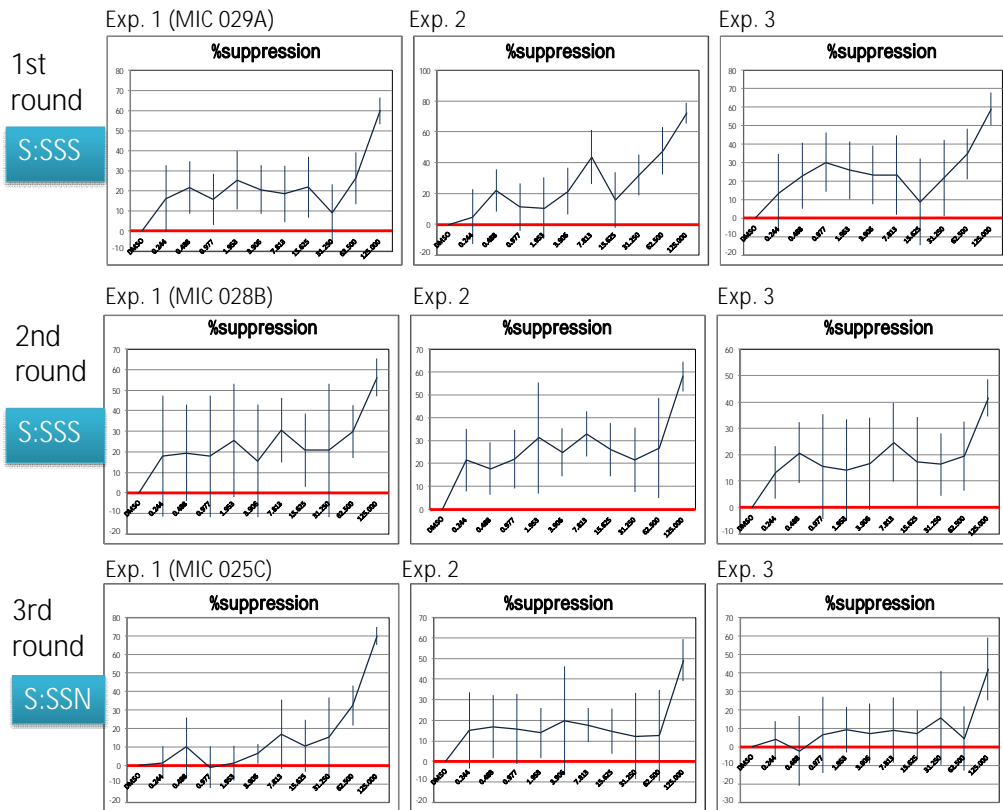


図6 コード化物質 (lead (II) acetate trihydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

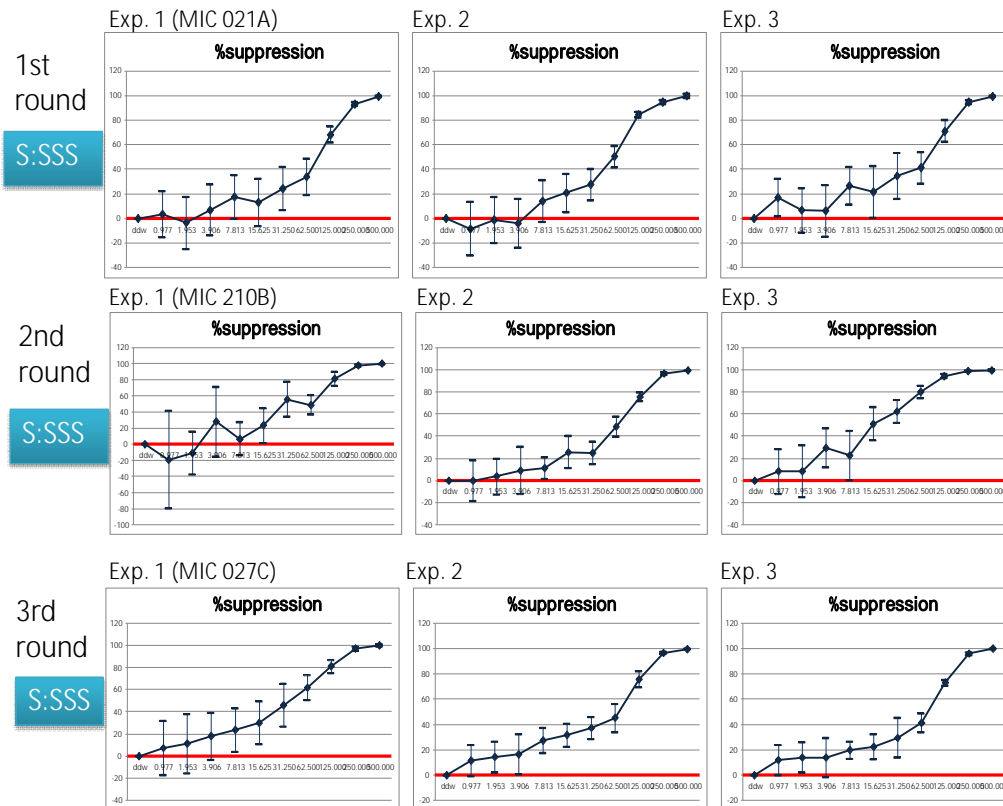


図7 コード物質 (nickel (II) sulfate hexahydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

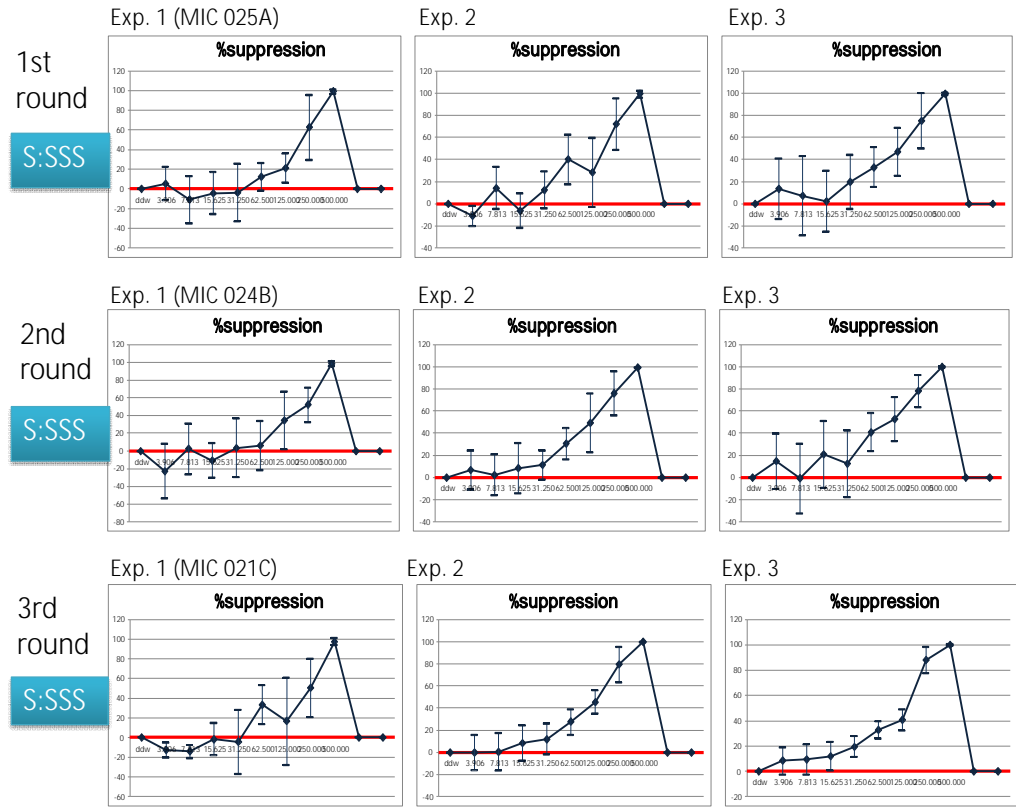


図8 コード物質 (zinc dimethyldithiocarbamate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

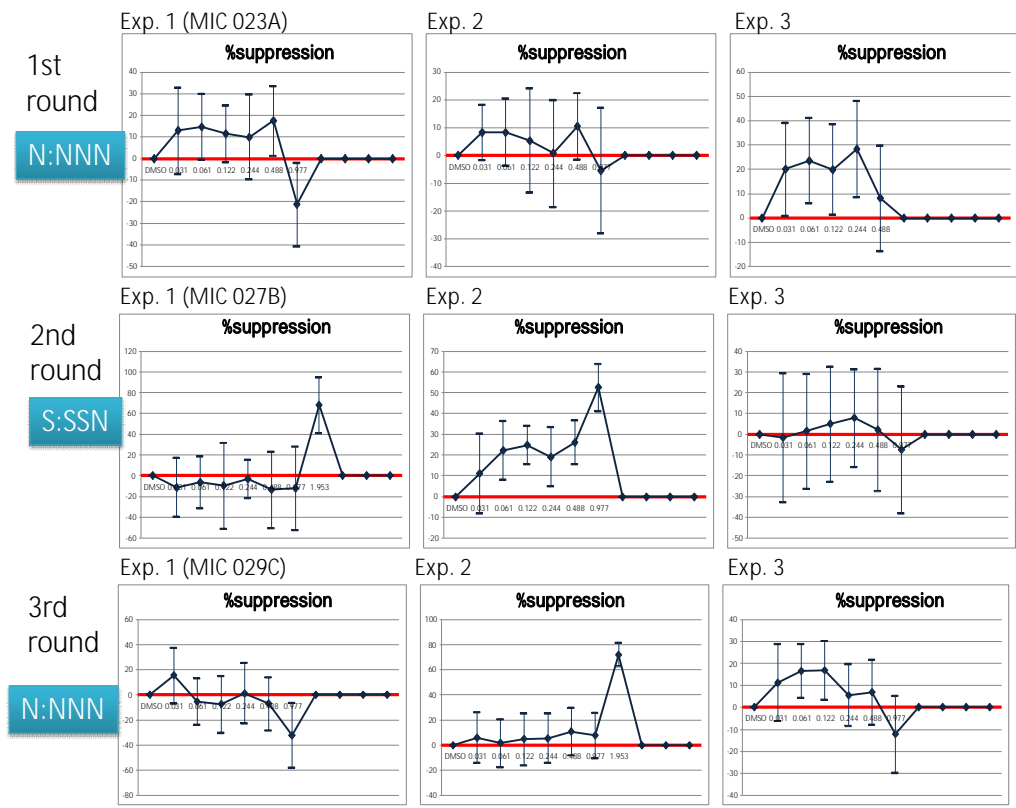
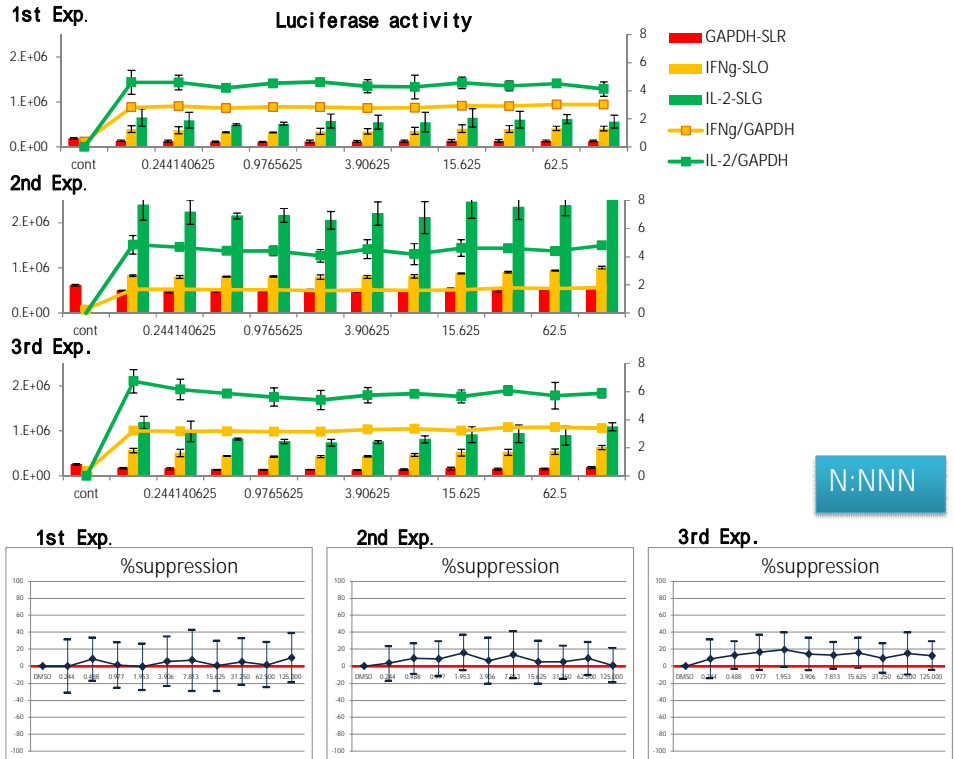


図9 コード化20物質のIL-2レポーター活性試験 (Phase II) の結果

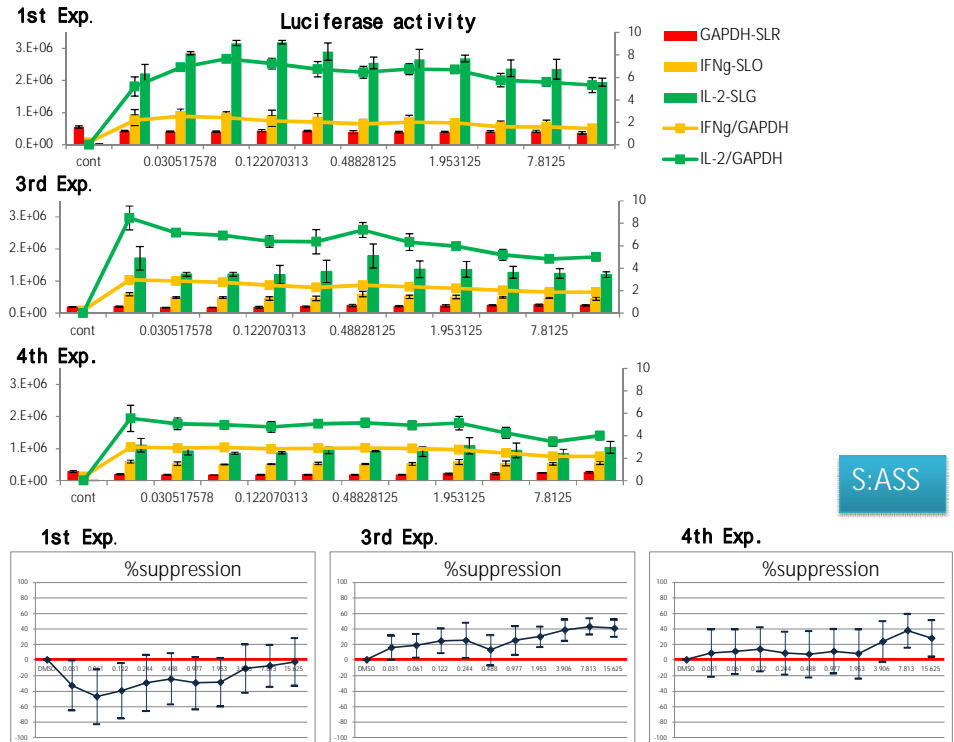
No.1 <2,4-Diaminotoluene, Code No.:MIC618>

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

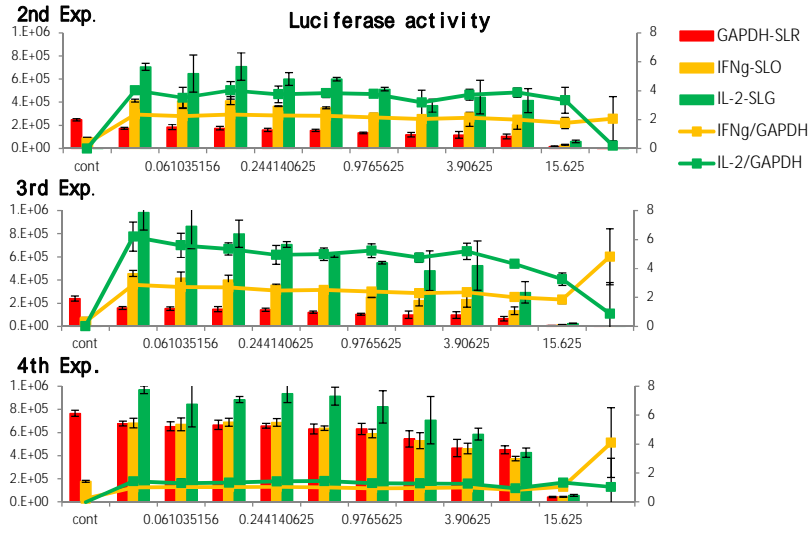


No.2 <Benzo(a)pyrene, Code No.:MIC601>

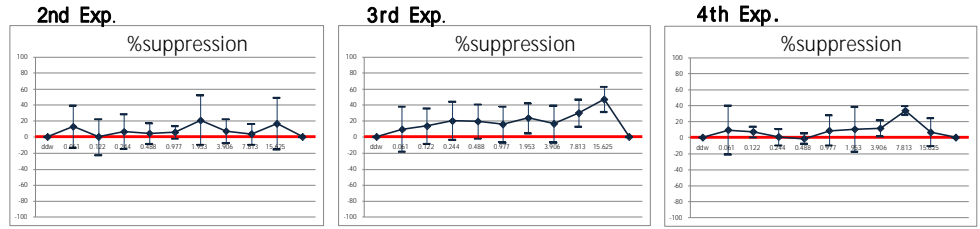
(The maximum concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



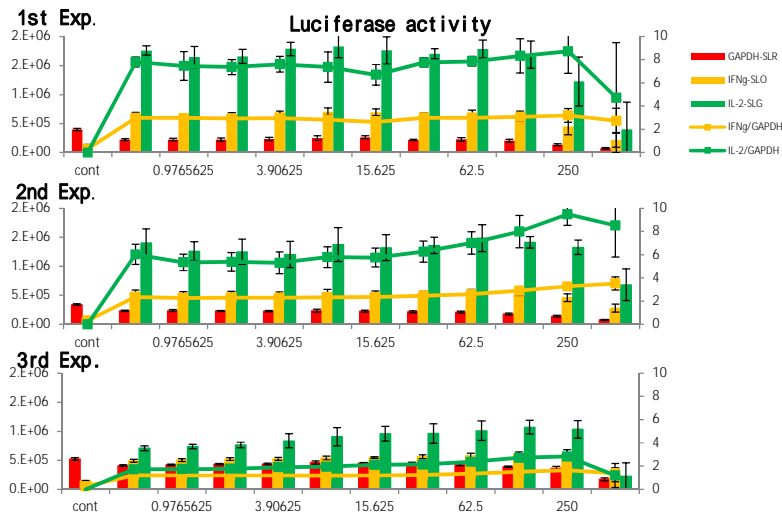
No.3 <Cadmium chloride, Code No.:MIC602>
 (Final concentration: 31.25 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



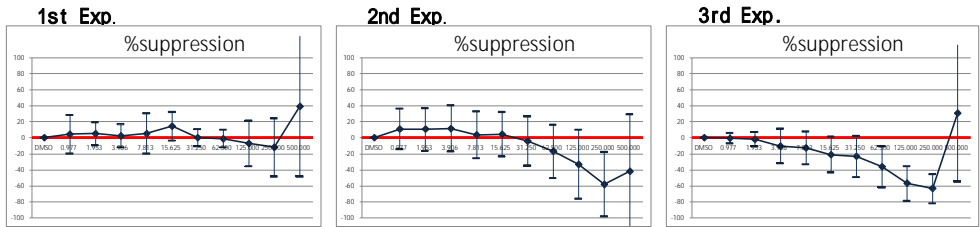
N: NSN



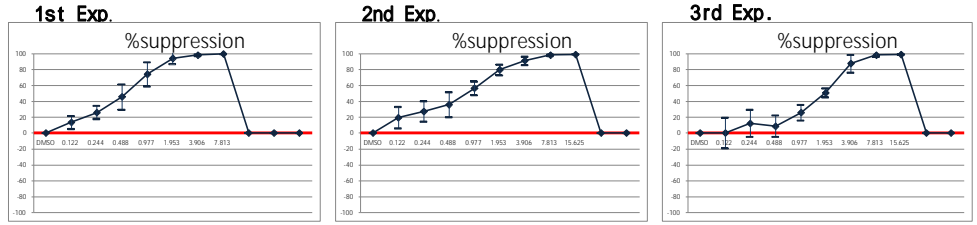
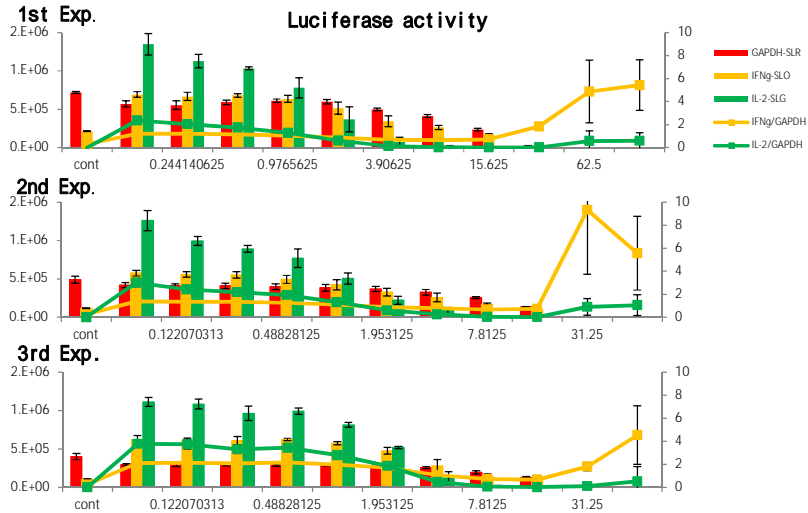
No.4 <Dibromoacetic acid, Code No.:MIC610>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



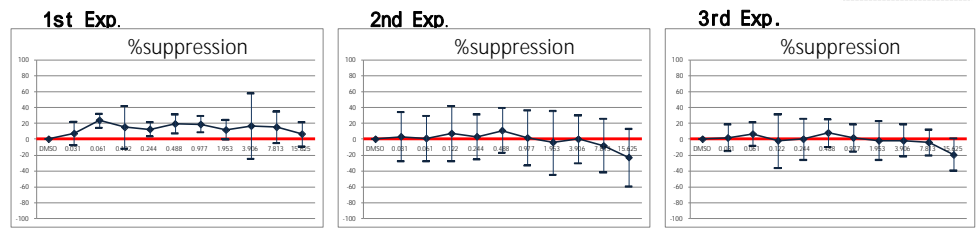
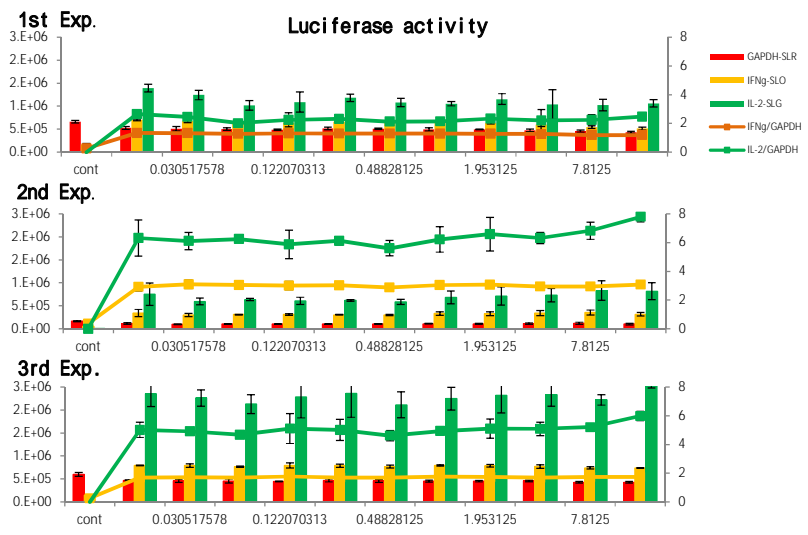
A: NAA



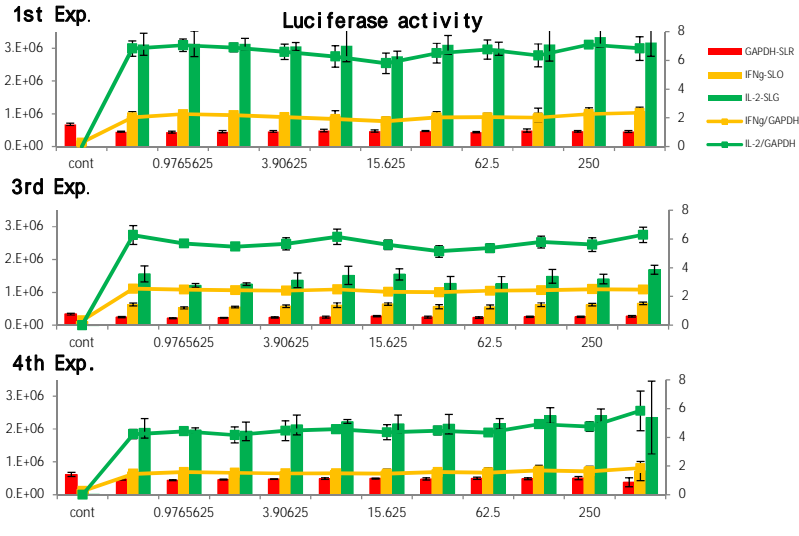
No.5 <Diethylstilbestol, Code No.:MIC611>
 (Final concentration: 125 or 62.5 µg/ml, Vehicle: DMSO)



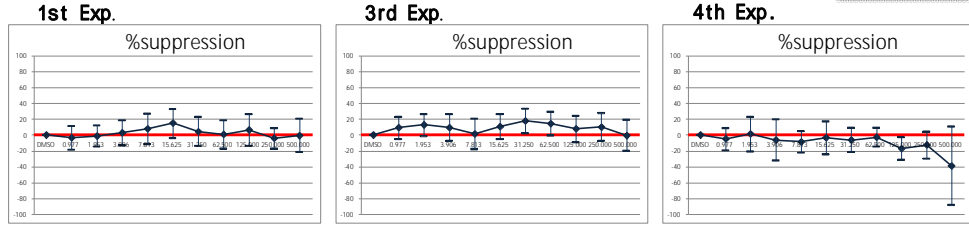
No.6 <Diphenylhydantoin, Code No.:MIC615>
 (Final concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



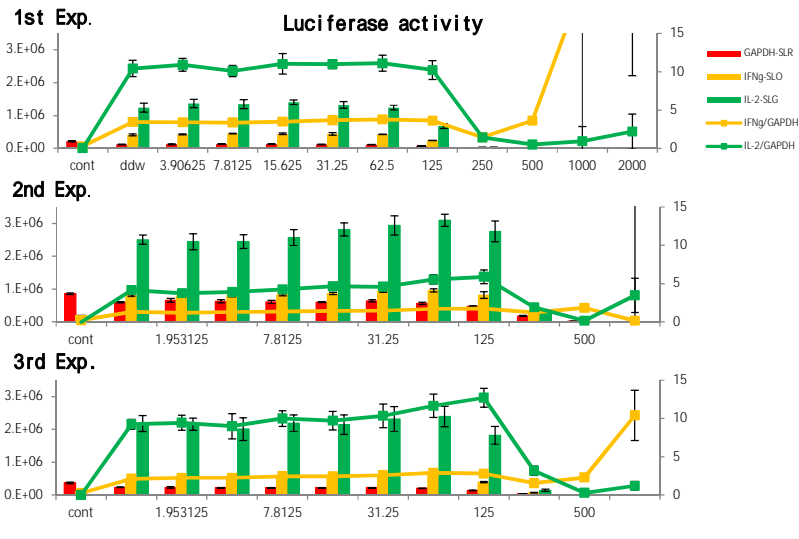
No.7 <Ethylene dibromide, Code No.:MIC605>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



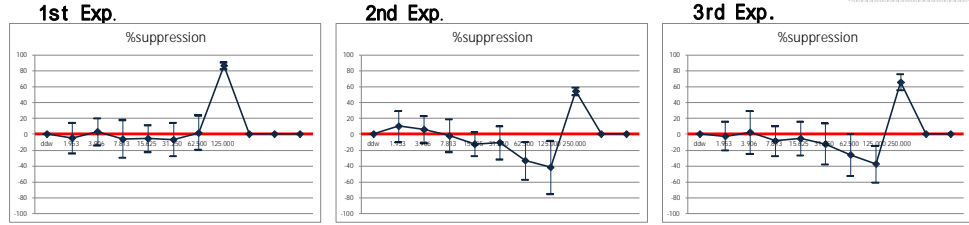
N:NNN



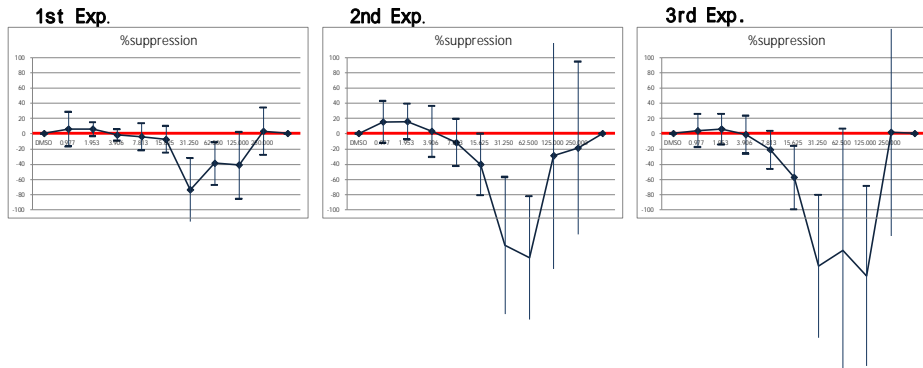
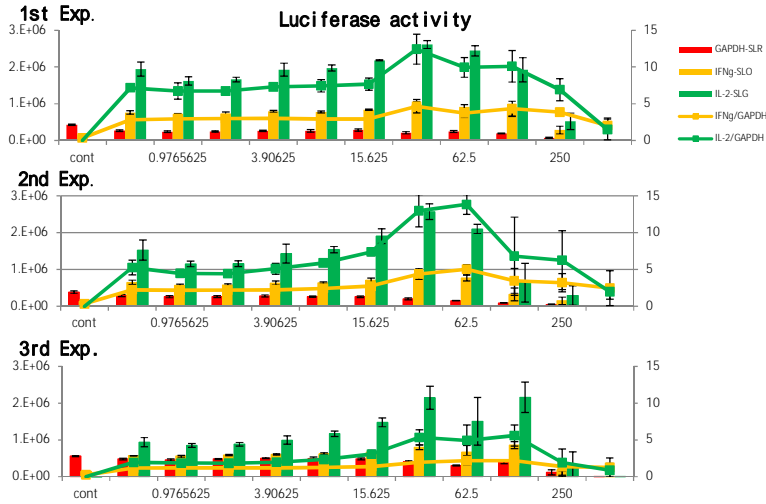
No.8 <Glycidol, Code No.:MIC607>
 (Final concentration: 1000 or 1000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



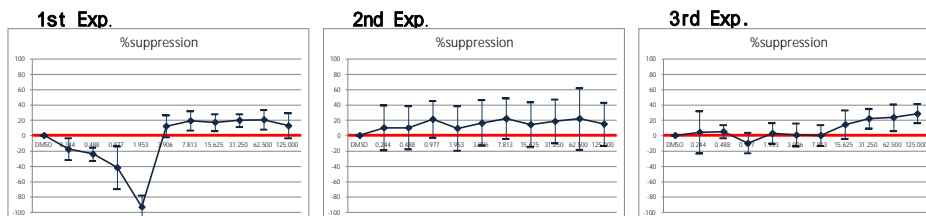
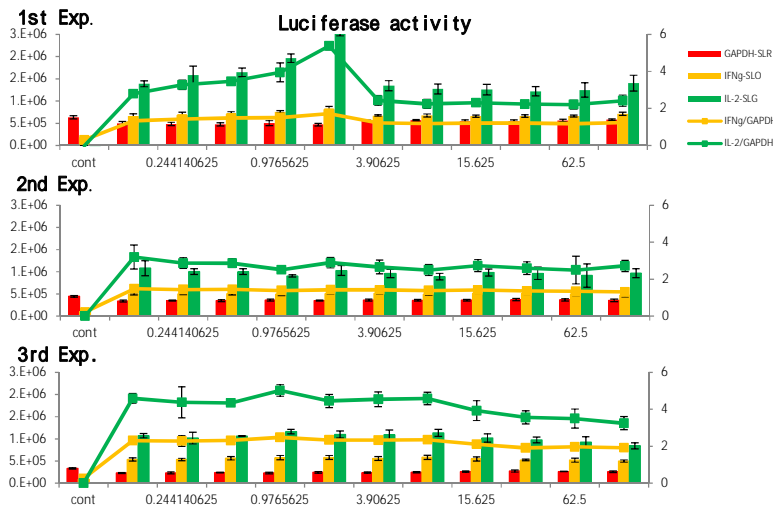
A:SAA



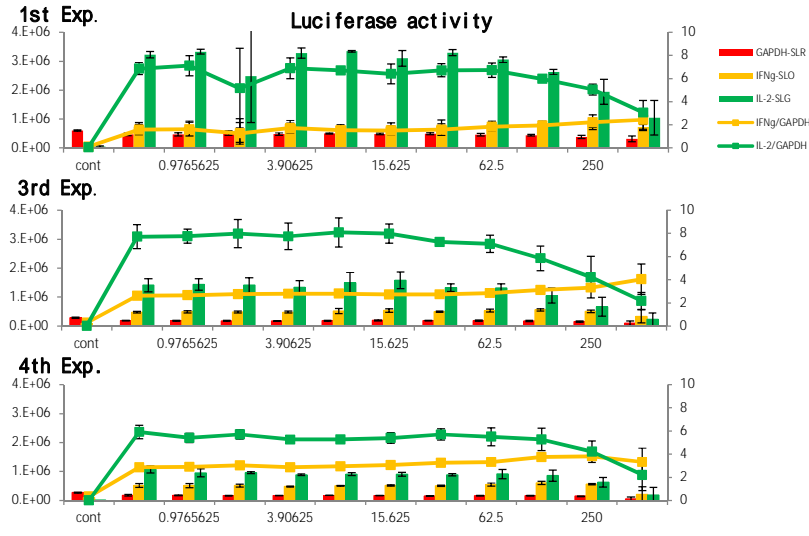
No.9 <Indomethacin, Code No.:MIC609>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



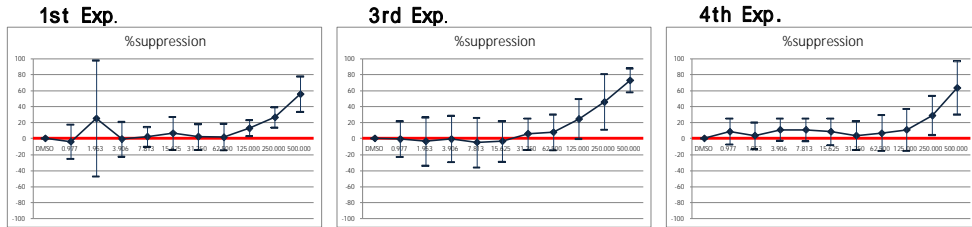
No.10 <Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid), Code No.:MIC612>
 (Final concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)



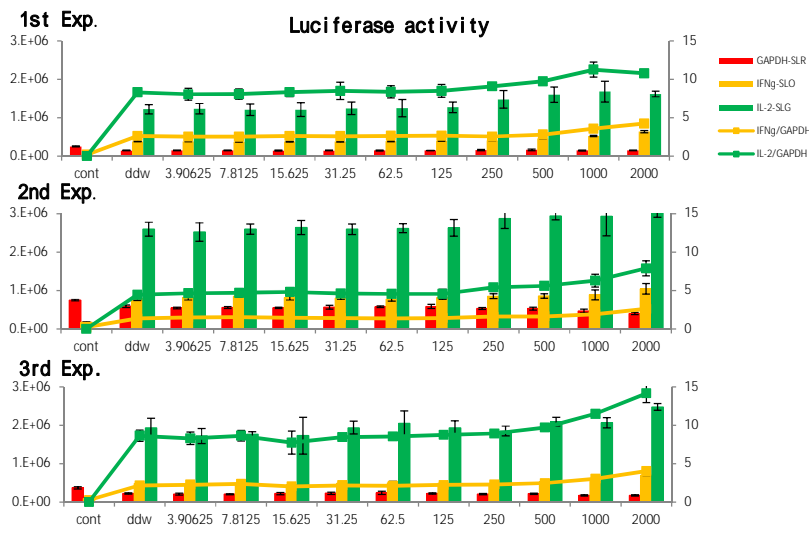
No.11 <Nitrobenzene, Code No.:MIC603>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



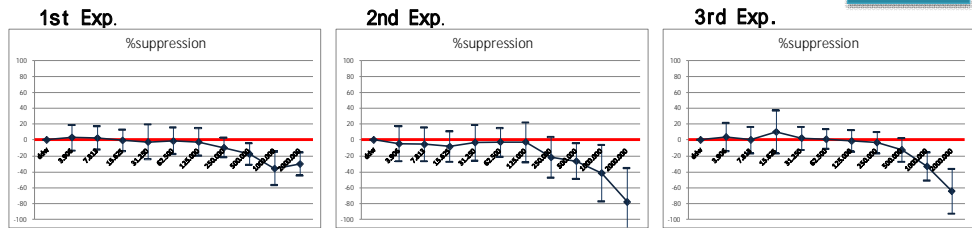
S:SSS



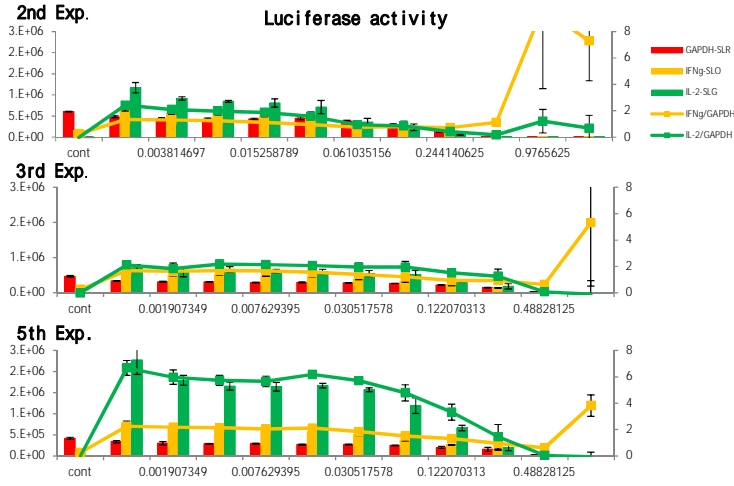
No.12 <Urethane, Ethyl carbamate, Code No.:MIC604>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



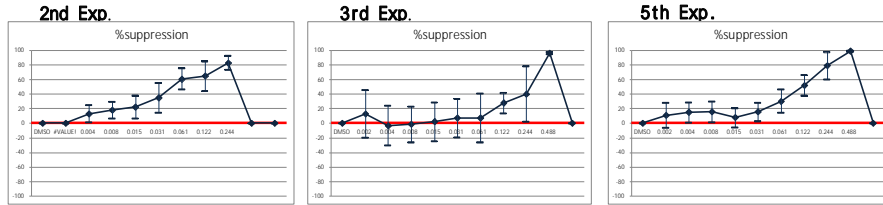
A:AAA



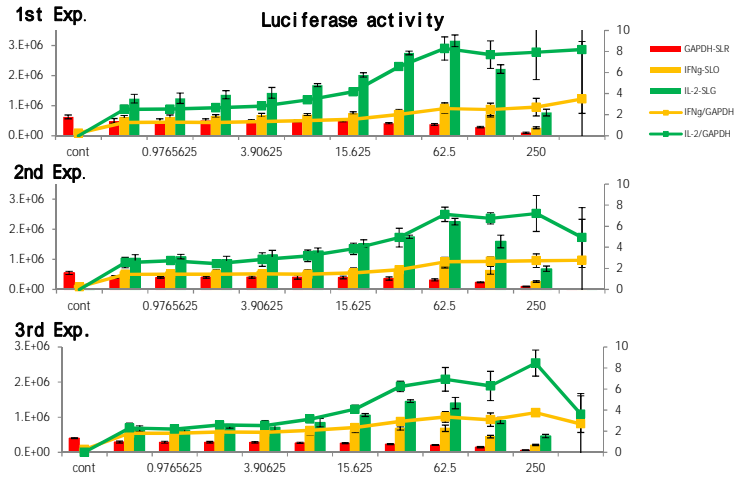
No.13 <Tributyltin chloride, Code No.:MIC613>
 (Final concentration: 1.95 or 0.977 µg/ml, Vehicle: DMSO)



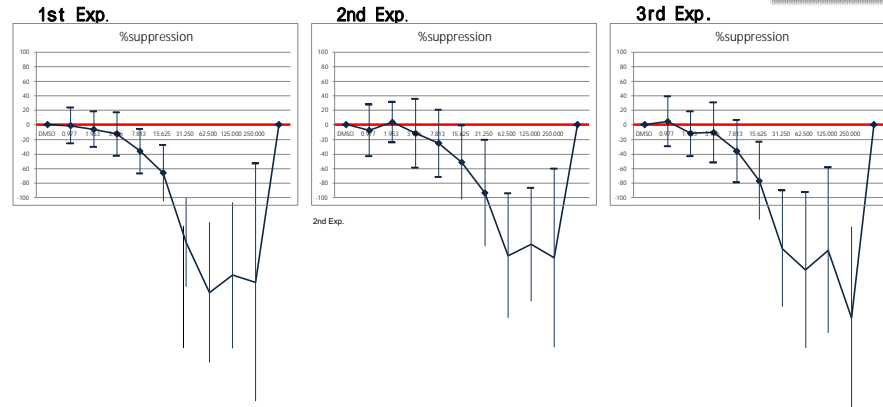
S:SSS



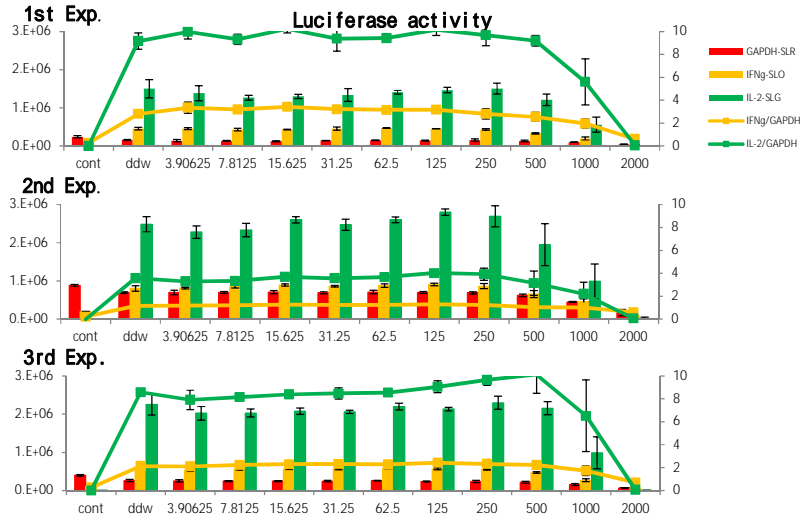
No.14 <Perfluorooctanoic acid, Code No.:MIC614>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



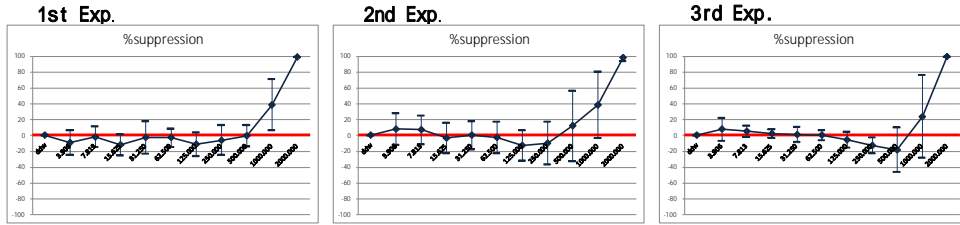
A:AAA



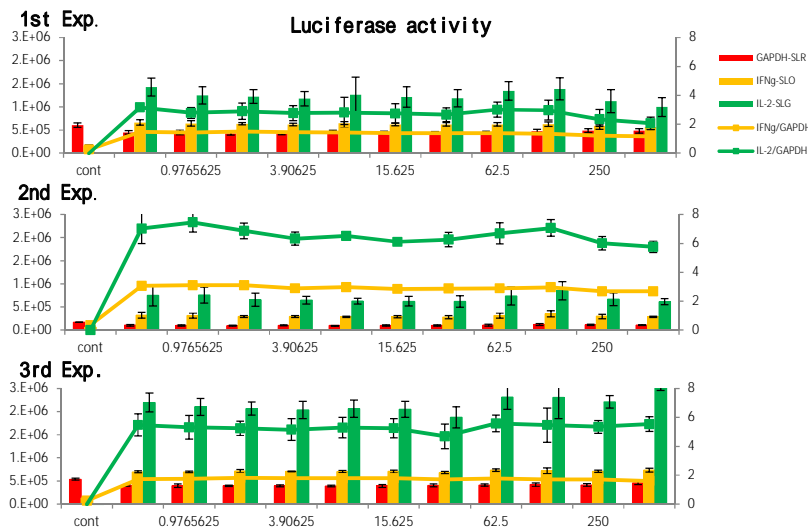
No.15 <Dichloroacetic acid, Code No.:MIC606>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



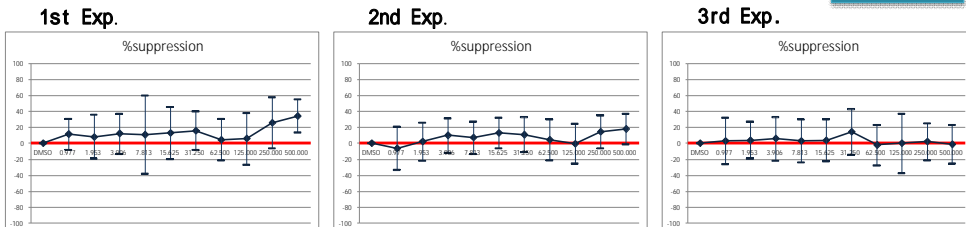
S:SSS



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

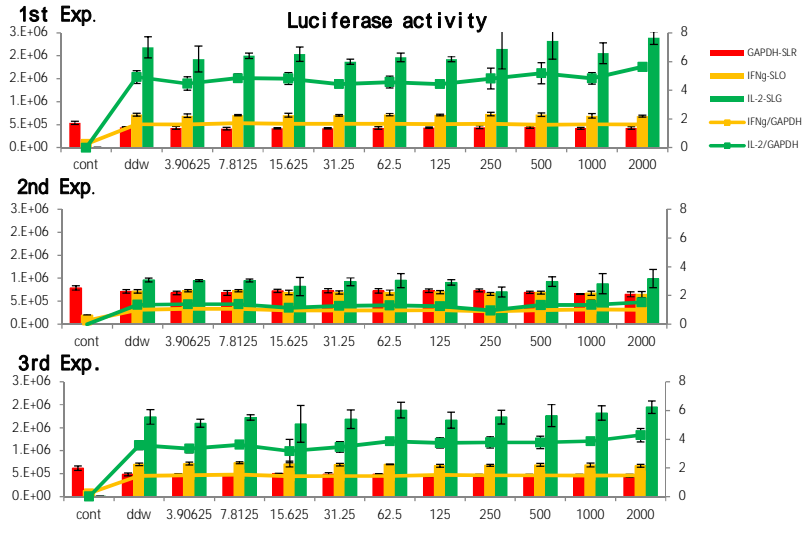


N:NNN

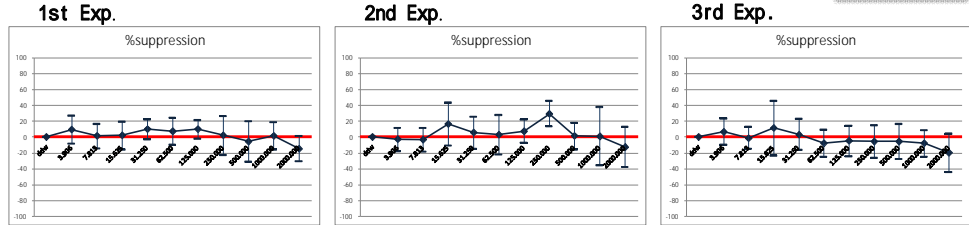


No.17 <Acetonitril, Code No.:MIC617>

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

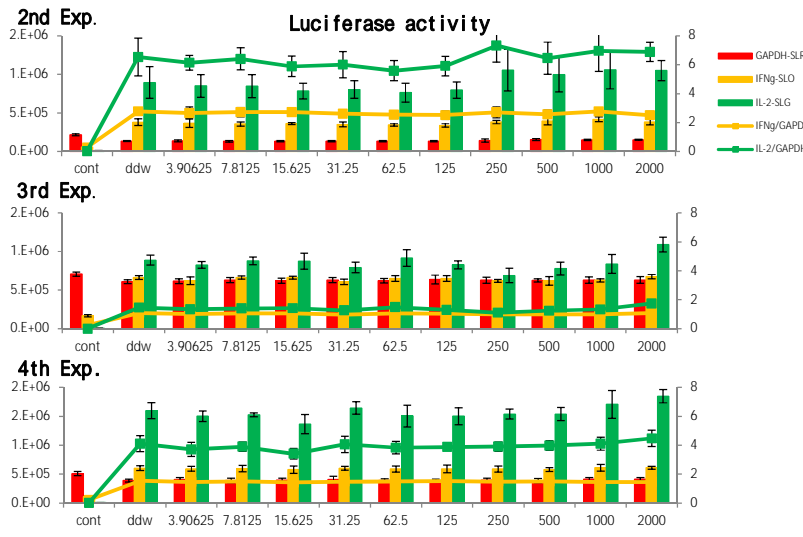


N:NNN

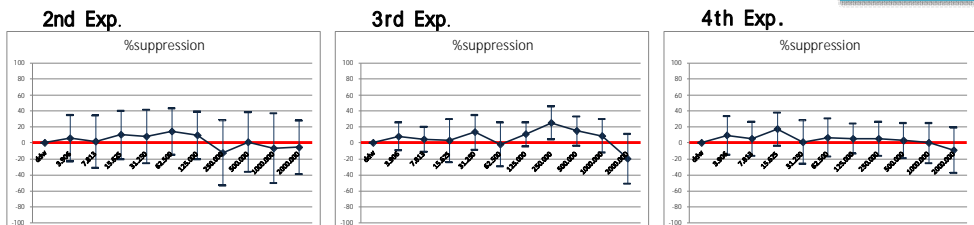


No.18 <Mannitol, Code No.:MIC619>

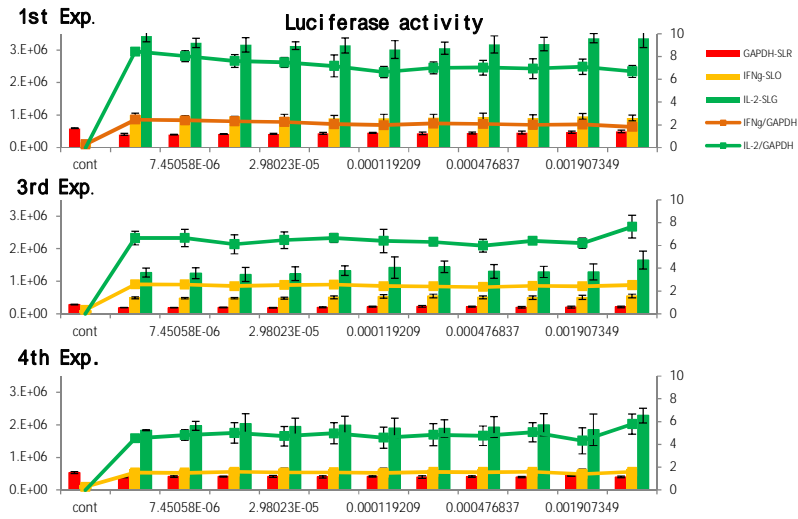
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



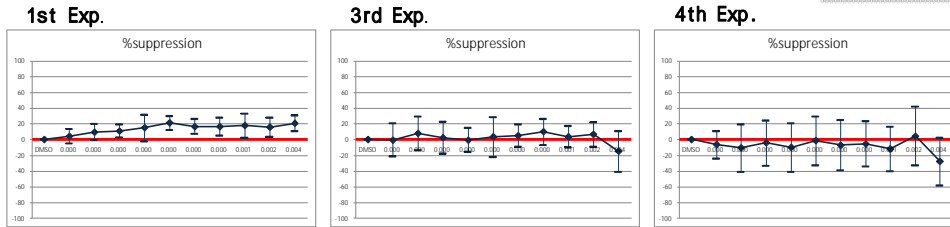
N:NNN



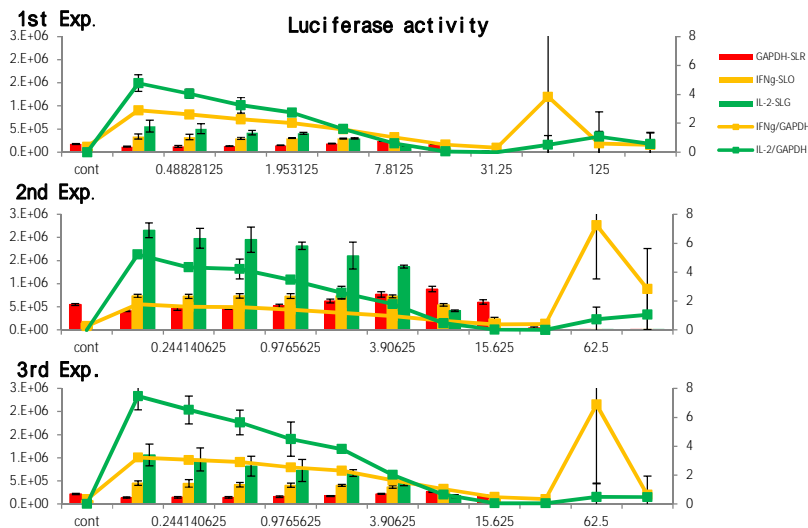
No.19 <Vanadium pentoxide, Code No.:MIC608>
 (Final concentration: 0.0038 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:NNN



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



S:SSS

