

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）
化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づくMulti-ImmunoTox assay
（MITA）による予測性試験法の確立と国際標準化
平成30年度分担研究報告書

免疫毒性データの集積、国際標準化へ向けてのvalidation試験の計画、国際会議の企画、進行

分担研究者 小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部 室長

研究要旨

*in vitro*免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）であるIL-2 Lucアッセイ及びIL-1 Lucアッセイを、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）の試験法ガイドライン（Test Guideline：TG）としての公定化するため、国際バリデーション研究を施行した。本年度は、IL-2 Lucアッセイのバリデーション報告書を作成するとともに、IL-1 Lucアッセイの施設内再現性を検証するため、バリデーション研究（phase I）を実施した。その結果、一施設が目標値である80%を達成できず、プロトコルの見直し及び再試験の追加が必要となった。

研究協力者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

相場節也 東北大学医学系研究科・医学部・皮膚科学分野教授

木村 裕 東北大学医学系研究科・医学部・皮膚科学分野助教

足利太可雄 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部主任研究員

A．研究目的

相場らにより、新たに開発された *in vitro* 免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）である IL-2 Luc アッセイ及び IL-1 β Luc アッセイを、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）の試験法ガイドライン（Test Guideline：TG）としての公定化するため、国際バリデーション研究を施行する。

B．研究方法

B-1. バリデーション研究の支援

B-1-1. IL-2 Lucアッセイのバリデーション研究の報告書作成

免疫毒性データを集積し、IL-2 Luc assay(国際バリデーション研究 phase I、IIが既に終了)の最終結果の報告書を作成する。

B-1.2. IL-1 β Lucアッセイバリデーション計画の作成

IL-1 β Lucアッセイのバリデーション研究の計画をバリデーション実行委員会のメンバーに対面会議にて、提示した。

B-1.3. IL-1 β Lucアッセイバリデーション被験物質の送付

IL-1 β Lucアッセイのバリデーション研究Phase I（以下、Phase I と記す）にて、施設内再現性を求めるために選ばれた5物質の3セット分をコード化し、合計15物質を各施設に送付した。

被験物質は、以下に示す対面会議にて、より広

範な物質を用いて施設内再現性を評価するために選択された。

B-1-4. IL-1βLucアッセイバリデーション結果の記録確認

Phase I で用いられた各施設の記録用紙及びデータを回収し、バリデーション研究が適切に実施されたかを確認した。

B-2. 国際的な専門家との意見交換

本年度に実施されたMITAに関する国際バリデーション結果を検証するため、2018年10月4-6日、神戸にて対面会議を企画した。

C. 結果

C-1. バリデーション研究の支援

C-1-1. IL-2 Lucアッセイのバリデーション研究の報告書作成

バリデーション実行員であるDr. Dori Germolec (NTP/NIEHS) の協力を得て、免疫毒性のヒト及び動物実験データを集積し、相場らに提供した。相場らがまとめたIL-2 Luc アッセイの最終結果の報告書を確認し、被験物質の配布、コード化及び質の確保に関する部分を加筆・修正した。

C-1.2. IL-1β Lucアッセイバリデーション計画の作成

対面会議にて、添付資料1に示すバリデーション計画が承認された。

C-1.3. IL-1β Lucアッセイバリデーション被験物質の送付

Phase I にて、施設内再現性を求めるために実行委員会で選ばれた5物質3セットの15物質を選定し、コード化してリード施設を含む参加4施設に送付した。表1に被験物質のコード番号を示す。

実験の終了まで、被験物質に関するトラブルは生じなかった。平成31年4月5日及び5月2日に開催された参加施設との電話会議にて、一施設が目標値である80%を達成できず、プロトコルの見直し及び再試験の追加が必要であるとの見解で合意を

得た。

C-1-4. IL-1β Lucアッセイバリデーション結果の記録確認

Phase I 終了後に回収した記録用紙の一覧を表2に示した。施設によって一部不備はあったが、GLP (Good Laboratory Procedure) の精神に則り、適切に実験が実施され、その記録が残されていることを確認した。

C-2. 国際的な専門家との意見交換

国際バリデーション研究における対面会議には、免疫毒性及びその試験法に関する専門家として、海外から Dr. Emanuel Corsini (Milan Univ.)、 Dr. Erwin L. Roggen (3Rs Management and Consulting ApS) 及び Dr. Dori Germolec を、国内からは、日本免疫毒性学会の推薦者である井上智彰博士(中外製薬)を外部専門家として招聘し、研究班の班員を含む表3に示すメンバーにて2日間掛けて、IL-2 Luc アッセイバリデーション報告書内容の確認、IL-1β Luc アッセイのプロトコルの改訂、予備試験結果の確認及びバリデーション被験物質の選定などについて討論した。会議の議事概要を添付文書2に示す。

D. 考察

MITAの一つであるIL-2 Lucアッセイのバリデーション報告書を作成し、次の段階として、国際的なindependent peer review (第三者評価) に送ることができた。なお、この第三者評価は、別途研究班で実施されている。

一方、MITAのもう一つの試験法であるIL-1βLucアッセイの計画書を作成し、Phase Iとして施設内再現性の確認を目的としたバリデーション研究が施行された。次年度、追加実験結果と合わせ、Phase 1試験の結果をバリデーション実行委員会にて評価し、今後の対応を決定する予定である。

E. 結論

相場らにより、新たに開発されたMITAであるIL-2 Luc アッセイ及びIL-1 β Lucアッセイの公定化を目指すため、国際的なバリデーション研究を施行した。IL-2 Lucアッセイについては、バリデーション報告書を完成できた。IL-1 β Lucアッセイについては、このバリデーションの施設内再現性を確保するため、被験物質5点をコード化し、配布、実験記録の回収及び確認を担当し、適切な実験が実施されていることを確認できた。ただし、一施設が目標値である80%を達成できず、プロトコルの見直し及び再試験の追加が必要となった。

F. 添付文書

- 1) Study plan for the validation trial on multicolor reporter assay using THP-G1b (TGCHAC-A4) (IL-1 β Luc assay) as a test evaluating the immunotoxic potential of chemicals
- 2) Minutes of MITA at 5th meeting in October, 2018

表 1 . Phase I 被験物質とコード番号

LabA Tohoku							LabB AIST tsukuba							LabC AIST shikoku						
setNo.	code No.	1回 目	2回 目	3回 目	4回目	judge	setNo.	code No.	1回目	2回目	3回 目	4回 目	judge	setNo.	code No.	1回 目	2回 目	3回 目	4回 目	judge
Set1	MITA103	S	S			S	Set1	MITB402	S	S			S	Set1	MITC704	S	S	S		S
Set2	MITA203	S	S			S	Set2	MITB501	S	S			S	Set2	MITC803	S	S			S
Set3	MITA304	S	S			S	Set3	MITB605	S	S			S	Set3	MITC902	S	S			S
Set1	MITA101	A	N	A		A	Set1	MITB404	N	N			N	Set1	MITC701	N	A	A		A
Set2	MITA205	S	N	A	N	N	Set2	MITB505	N	N			N	Set2	MITC802	N	A	N		N
Set3	MITA305	S/A	N	N		N	Set3	MITB603	N	N			N	Set3	MITC905	S	A	A		A
Set1	MITA104	N	S	S		S	Set1	MITB403	N	N			N	Set1	MITC705	N	N			N
Set2	MITA202	S	S			S	Set2	MITB502	N	N			N	Set2	MITC805	S	S			S
Set3	MITA303	N	N			N	Set3	MITB601	N	S	N		N	Set3	MITC901	S	S			S
Set1	MITA105	S	S			S	Set1	MITB401	S	S			S	Set1	MITC702	S	S			S
Set2	MITA204	S	S			S	Set2	MITB503	N	S	S		S	Set2	MITC801	S	S			S
Set3	MITA301	S	S			S	Set3	MITB602	S	N	S		S	Set3	MITC904	S	S			S
Set1	MITA102	A	S	N	N	N	Set1	MITB405	N	N			N	Set1	MITC703	S	S			S
Set2	MITA201	N	N			N	Set2	MITB504	N	N			N	Set2	MITC804	N	N			N
Set3	MITA302	N	S	N		N	Set3	MITB604	N	N			N	Set3	MITC903	N	N			N

表2 . Phase I 記録用紙の一覧表

MITA (P1) 資料確認記録		2019年3月19日											
setNo.	資料名	東北大学 (LabA)				AISTつくば (LabB)				AIST西宮 (LabC)			
		資料有無	77/8No.	最終更新日	備考	資料有無	77/8No.	最終更新日	備考	資料有無	77/8No.	最終更新日	備考
set1	①試薬管理 (5物質)	○	35			○	19			○	1		
	②高解性試験 (5物質)	○	36			○	20			○	2		
	③細胞培養記録	○	37			○	21	A-1-3,B-1,2		○	3		1,2
set1-1 実験記録	④実験担当者・試験物質コード	○	38			○	22			○	4		
	⑤細胞培養	○	38			○	22			○	4		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	38			○	22			○	4		
set1-2 実験記録	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	38			○	22	5物質		○	4		5物質
	④実験担当者・試験物質コード	○	39			○	23			○	5		
	⑤細胞培養	○	39			○	23			○	5		
set1-3 実験記録	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	39			○	23			○	5		
	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	39			○	23	5物質		○	5		5物質
	④実験担当者・試験物質コード	○	40			-	-			○	6		
set1-4 実験記録	⑤細胞培養	○	40			-	-			○	6		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	40			-	-			○	6		
	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	40			-	-			○	6		4物質
set1-5 実験記録	④実験担当者・試験物質コード	○	41			-	-			-	-		
	⑤細胞培養	○	41			-	-			-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	41			-	-			-	-		
set1-6 実験記録	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	41			-	-			-	-		
	④実験担当者・試験物質コード	○	42			-	-			-	-		
	⑤細胞培養	○	42			-	-			-	-		
set1-7 実験記録	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	42			-	-			-	-		
	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	42			-	-			-	-		
	④実験担当者・試験物質コード	○	43			-	-			-	-		
set1-8 実験記録	⑤細胞培養	○	43			-	-			-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	43			-	-			-	-		
	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	43			-	-			-	-		
set1-9 実験記録	④実験担当者・試験物質コード	○	44			-	-			-	-		
	⑤細胞培養	○	44			-	-			-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	44			-	-			-	-		
set1-10 実験記録	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	44			-	-			-	-		
	④実験担当者・試験物質コード	○	45			-	-			-	-		
	⑤細胞培養	○	45			-	-			-	-		
set1-11 実験記録	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	45			-	-			-	-		
	⑦被試験薬の調製 (DW, DWSO)	○	45			-	-			-	-		
	④実験担当者・試験物質コード	○	45			-	-			-	-		

setNo.	資料名 参加施設名	東北大学 (LabA)				AISTつくば (LabB)				AIST西国 (LabC)			
		資料名称	FrIDNo.	●標準検定	備考	資料名称	FrIDNo.	●標準検定	備考	資料名称	FrIDNo.	●標準検定	備考
set2	①試薬管理 (5物質)	○	46			○	24			○	7		
	②溶解性試験 (5物質)	○	47			○	24			○	8		
	③細胞培養記録	○	48				21			○	9		
set2-1	④実験担当者・試験物質コード	○	49			○	26			○	10		
	⑤細胞調整	○	49			○	26			○	10		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	49			○	26			○	10		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	49			○	26	5物質		○	10	5物質	
set2-2	④実験担当者・試験物質コード	○	50			○	27			○	11		
	⑤細胞調整	○	50			○	27			○	11		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	50			○	27			○	11		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	50			○	27	5物質		○	11	5物質	
set2-3	④実験担当者・試験物質コード	○	51			○	28			○	12		
	⑤細胞調整	○	51			○	28			○	12		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	51			○	28			○	12		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	51			○	28	1物質		○	12	2物質	
set2-4	④実験担当者・試験物質コード	○	52			-	-			-	-		
	⑤細胞調整	○	52			-	-			-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	52			-	-			-	-		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	52			-	-			-	-		
set2-5	④実験担当者・試験物質コード	○	53			-	-			-	-		
	⑤細胞調整	○	53			-	-			-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	53			-	-			-	-		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	53			-	-			-	-		
set3	①試薬管理 (5物質)	○	54			○	29			○	13		
	②溶解性試験 (5物質)	○	55			○	30			○	14		
	③細胞培養記録	○	56			○	21			○	15		
set3-1	④実験担当者・試験物質コード	○	57			○	31			○	16		
	⑤細胞調整	○	57			○	31			○	16		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	57			○	31			○	16		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	57			○	31	5物質		○	16		
set3-2	④実験担当者・試験物質コード	○	58			○	32			○	17		
	⑤細胞調整	○	58			○	32			○	17		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	58			○	32	5物質		○	17		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	58			○	32			○	17		
set3-2 (再試験)	④実験担当者・試験物質コード		-			○	33	set3-2の		-	-		
	⑤細胞調整		-			○	33	やり直し		-	-		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理		-			○	33			-	-		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)		-			○	33	5物質		-	-		
set3-3	④実験担当者・試験物質コード	○	59			○	34			○	18		
	⑤細胞調整	○	59			○	34			○	18		
	⑥コントロールの調製と細胞への処理	○	59			○	34			○	18		
	⑦被試験試薬の調整 (DW, DWSO)	○	59			○	34	2物質		○	18	2物質	

表3 . 2018年度 MITA国際バリデーション対面会議の主な参加者リスト

No.	Name	Affiliation	Country
1	Emanuela Corsini	Universit.AN` degli Studi di Milano	Italy
2	Erwin L. Roggen	3Rs Management and Consulting ApS	Denmark
3	Dori Germolec	NIH/NIEHS	USA
4	Tomoaki Inoue	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	Japan
5	Setsuya Aiba	Tohoku University Graduate School of Medicine	Japan
6	Yutaka Kimura	Tohoku University Graduate School of Medicine	Japan
7	Yoshihiro Nakajima	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Japan
8	Rie Yasuno	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Japan
9	Kohji Yamakage	Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute	Japan
10	Takashi Omori	Kobe University	Japan
11	Hajime Kojima	JaCVAM, National Institute of Health Sciences	Japan
12	Takao Ashikaga	JaCVAM, National Institute of Health Sciences	Japan
13	Steven Venti	Translator	Japan

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 小島 肇: 皮膚・粘膜毒性, トキシコロジー第3版, 朝倉書店, 279-286.
2. 小島 肇: 動物実験代替法, トキシコロジー第3版, 朝倉書店, 320-325.
3. 小島 肇: 創薬のための細胞利用技術の最新動向と市場, 第1章 利用できる細胞の種類, 細胞ソース, 第1節 in vitro 実験の重要性と培養細胞の選択方法, (株)シーエムシー・リサーチ, 3-6.
4. Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H, Kasahara T: Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay, J Appl Toxicol. 2018 Sep 16. doi: 10.1002/jat.3707.
5. 中村和昭, 諫田泰成, 山崎大樹, 片岡 健, 青井貴之, 中川誠人, 藤井万紀子, 阿久津英憲, 末盛博文, 浅香 勲, 中村幸夫, 小島 肇, 伊藤弓弦, 関野祐子, 古江 - 楠田美保: 「培養細胞の観察の基本原則」の提案, 組織培養研究, 2018; 37(2), 123-131.
6. 小島 肇: 化学物質や医薬品などの安全性評価に用いる動物実験代替法の技術開発の現状と展望, イルシー Japan, 2018;136, 23-31.
7. Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Iwaki T,

- Yamakage K, Saito K, Nakajima Y, Fujimura C, Ohmiya Y, Omori T, Kojima H, Aiba S: The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA), *J Toxicol Sci.* 2018; 43(12):741-749. doi: 10.2131/jts.43.741.
8. Mitachi T, Kouzui M, Maruyama R, Yamashita K, Ogata S, Kojima H, Itagaki H: Some non-sensitizers upregulate CD54 expression by activation of the NLRP3 inflammasome in THP-1 cells. *J Toxicol Sci.* 2019;44(3):213-224. doi: 10.2131/jts.44.213.
 9. 小島 肇: 化学物質の毒性評価方法の現状と今後, 化学物質と環境, エコケミストリー研究会, 2019;154, 1-3.
- G-2. 学会発表
1. New trend on alternative to animal testing in Japan, Kojima H, OpenTox 2018, 2018/5/24, 国内.
 2. Alternative Test Methods Developed in Japan and South Korea for Regulatory Use, Kojima H, 8th Conference of Alternative Methods, 2018/6/12, 国外.
 3. In vitroモデルの創薬開発への活用, 小島 肇, 日本組織培養学会第91回大会, 2018/6/16, 国内.
 4. Recent Activities for safety assessment, Kojima H, International Symposium on Cosmetic Regulation, 2018/7/13, 国内.
 5. 教育講演: ガイドライン化を目指したin vitro試験系導入の具体的な留意点, 小島 肇, 第45回日本毒性学会学術年会, 2018/7/20, 国内.
 6. 皮膚・粘膜毒性、光毒性、代替試験法, 小島 肇, 第21回日本毒性学会基礎教育講習会, 2018/8/7, 国内.
 7. New Approach on Alternative to Animal Test Methods in JaCVAM and Japanese projects, , Kojima H, The 15th Annual meeting of Korean Society of Alternative to Animal Experiments, 2018/8/24, 国外.
 8. Introduction and research status of AAT in JaCVAM, Kojima H, The 2nd International Conference on Cosmetics Alternative Methods in NIFDC, 2018/9/20, 国外.
 9. New methods validation and AAT regulatory acceptance in Japan, Kojima H, The 2nd International Conference on Cosmetics Alternative Methods in NIFDC, 2018/9/21, 国外.
 10. Japanese Strategy on Alternative to Animal Test Methods for Systemic Toxicology, Kojima H, 20th International Congress on In Vitro Toxicology, 2018/10/16, 国外.
 11. h-CLAT における NLRP3 インフラマソームの影響, 丸山 諒, 洪水麻衣, 三田地隆史, 小島 肇, 板垣 宏, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会, 2018/11/24, 国内.
 12. タンパク質のアレルギー性を評価する in vitro 試験法の開発 試薬中 LPS の影響除外に関する検討(第 1 報), 小林(九十九)英恵, 生地加奈実, 山下邦彦, 小島 肇, 板垣 宏, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会, 2018/11/24, 国内.
 13. タンパク質のアレルギー性を評価する in vitro 試験法の開発 薬中 LPS の影響除外に関する検討(第 2 報), 生地加奈実, 小林英恵, 山下邦彦, 小島 肇, 板垣 宏, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会, 2018/11/24, 国内.
 14. Multi-Immuno Tox Assay (MITA) : バリデーション研究の結果, 木村 裕, 安野理恵, 渡辺美香, 小林美和子, 岩城知子,

- 藤村千鶴, 近江谷克裕, 山影康次, 中島芳浩, 小林眞弓, 大森 崇, 足利太可雄, 小島 肇, 相場節也, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会, 2018/11/24, 国内.
15. OECD AOPプロジェクト, 小島 肇, 第一回医薬品毒性機序研究会, 2019/1/10, 国内.
16. 毒性評価系の国際標準化に向けた戦略, 小島 肇, 毒性評価研究会, 2019/1/31, 国内.
17. ヒト健康影響を予測するための非動物実験の開発動向, 小島 肇, Translational and Regulatory Science Symposium, 2019/2/7, 国内.
18. 国際情勢から見た幹細胞ベースの毒性試験について, 小島 肇, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム scChemRISK, 2019/2/15, 国内.
19. AOP (Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ, 山田隆志, 足利太可雄, 小島 肇, 広瀬明彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019/3/23, 国内

H. 知的所有権の取得状況

H - 1) 特許取得

特になし

H - 2) 実用新案登録

特になし

H - 3) その他

特になし