

(厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業))

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 (H30-化学-一般-001)

分担研究報告書

免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoToxicity assayの国際validationへ向けての検討

研究分担者 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-1 プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼおよび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ヒト単球由来 THP-1 細胞 (TGCHAC-A4 細胞) を用いた化学物質免疫毒性評価系 Multi-ImmunoToxicity assay (MITA) の Phase I バリデーション試験を実施した。

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-ImmunoToxicity assay) を構築、本試験法のガイドライン化を目指し、本年度はバリデーション試験に先立ち、Phase 0 として既知の 3 物質について試験を実施し、技術移転性を確認した。続いて Phase I バリデーション試験として、1 組 5 種類のコード化した試験化学物質 3 組を供試した。

B. 研究方法

B-1) 使用した細胞

IL-1 と G3PDH プロモーターにそれぞれ SLG、SLR ルシフェラーゼ遺伝子をつないで人工染色体発現ベクターにノックインし、ヒト単球由来細胞株 THP-1 に導入した 2 色発光細胞株 THP-G1b (TGCHAC-A4) を用いて試験を行った。

B-2) 使用した化学物質

試験化学物質として Phase 0 では 3 物質

(Dapsone, Diethanolamine, p-Nitroaniline) を用いた。

Phase I では 1 セット 5 種類のコード化した被験物質 3 セットを用いた。

B-3) 実験方法

化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調製及び添加方法、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 for THP-G1b (TGCHAC-A4) Ver.008.1E に準ずる。

発光測定装置はアトー社製フェリオス (AB-2350) を用いた。

Phase 0 では 3 物質 (Dapsone, Diethanolamine, p-Nitroaniline) を 1 セットとし、それぞれ 3 回ずつ 2 セットの試験を行った。続いて行った Phase I バリデーション試験では、1 セット 5 種類のコード化した試験化学物質 3 セットを用いて 1 セットにつき 2 回以上、判定が決定できるまで試験を行った。判定基準は以下の通りである。

以下の 3 つの基準を満たす場合を Suppression または Augmentation とし、それ以外を No effect とする。2 回一致した結果が得られたとき、その結果を当該物質の評価として扱う。

- SLR-LA の阻害指標 (IL-SLR-LA) が

0.05以上の濃度のみを判定に使用する。I.I.-SLR-LAが0.05以上の濃度が6点より少ない場合は、以下の条件を満たす場合のみ判定を採用し、他は続いて濃度を下げた試験を行う。

- %suppressionの平均値が20%以上(Suppression)か-20%以下(Augmentation)でかつ、同時95%信頼区間を用いた判定で濃度0と有意差が認められる場合に有意(統計学的有意)とする。
- 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)。

(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

Phase 0ではコード化を行わない3物質に対して各3回ずつの実験を2セット行った。バリデーション試験の試験実施施設である3施設(産総研健康工学研究部門、産総研バイオメディカル研究部門、東北大医学部皮膚科)の結果を比較検討した。その結果、良好な施設間再現性が得られ、技術移転性を確認できたことから、Phase I試験を実施することとした。

Phase Iでは施設内再現性の確認を行う目的で、コード化された5物質を1セットとする群が3セット配布された。1物質につき2回もしくは3回の実験を実施した。1セットの実験がすべて終了した後に次のセットの実験を行うことで、セット毎の実験の独立性を担保した。図1にSet 1、図2にSet 2、図3にSet 3の結果を示す。提案された判定基準に基づいて各物質を評価した結果を表1に示した。

D. 考察

Phase I studyでは施設内再現性および施設間再現性を確認するために、コード化した5物質を1セットとし、3セットの合計15物質について実験を行った。

当施設では、5物質のうち2物質については3セットとも一致した判定が得られた。一方、3物質は3セット中2セットについては判定が一致したが、1セットのみ異なる判定と

なった。

概ね再現性は良好とってよいが、プロトコルを改善すればガイドライン化可能なレベルにまで正確性や施設間および施設内再現性を向上できるかもしれない。

E. 結論

IL-1 転写誘導抑制を指標とした免疫毒性評価試験法のOECDテストガイドライン化を目的として、試験実施施設としてバリデーション試験に参加した。まずPhase 0として3物質の試験を行い、技術移転性について確認した。次に5種類のコード化した被験物質を用いた1セット2回以上の試験を繰り返すPhase Iバリデーション試験を実施した。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、Phase I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

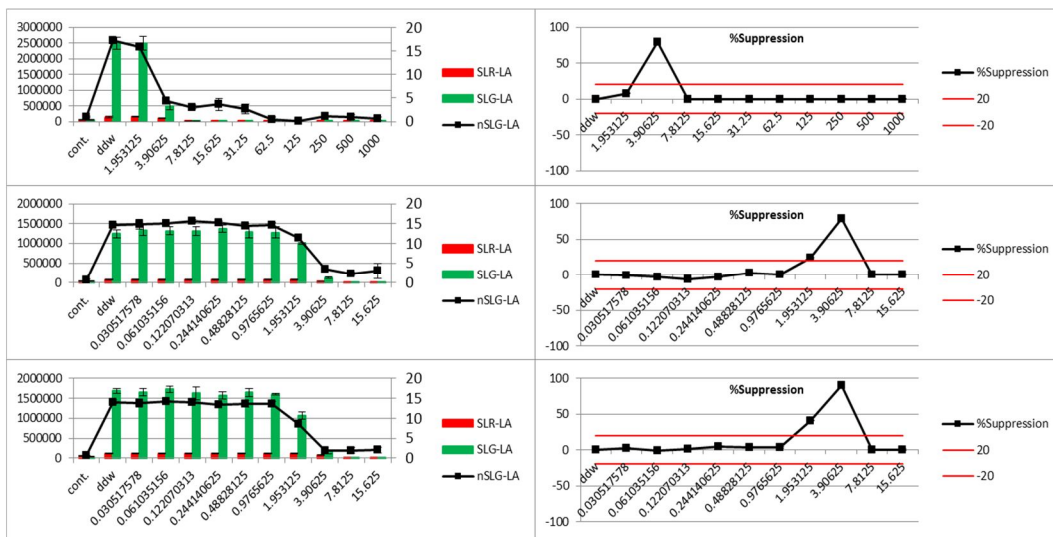
1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

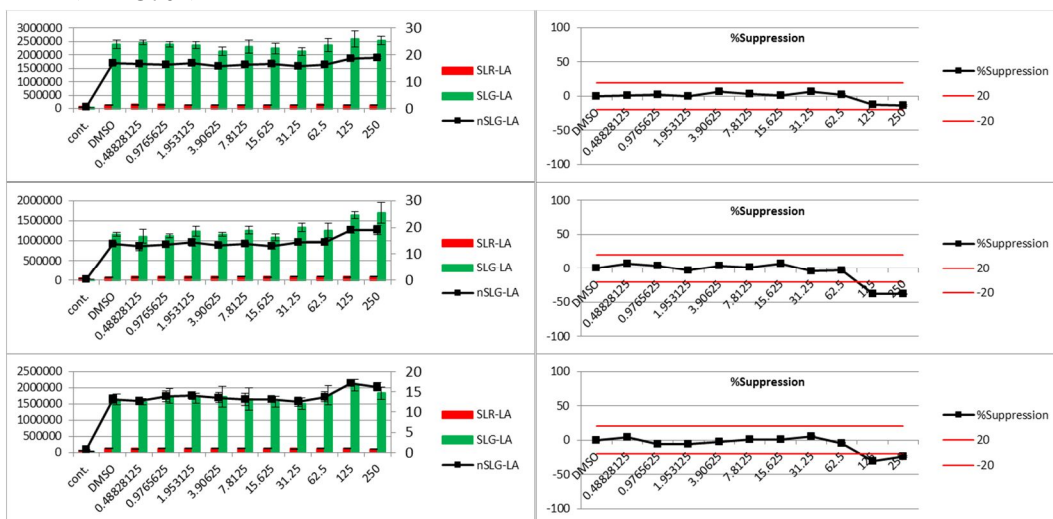
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図 1 THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞株における各試験化学物質に対する細胞応答性(Set 1).

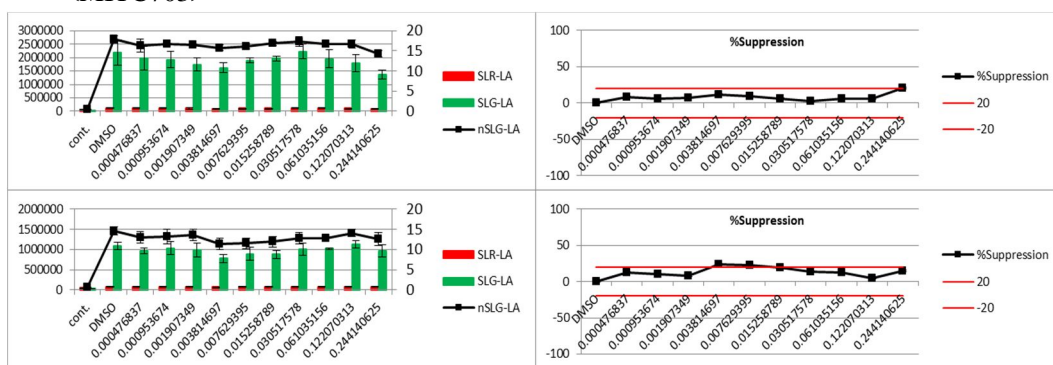
<MITC701>



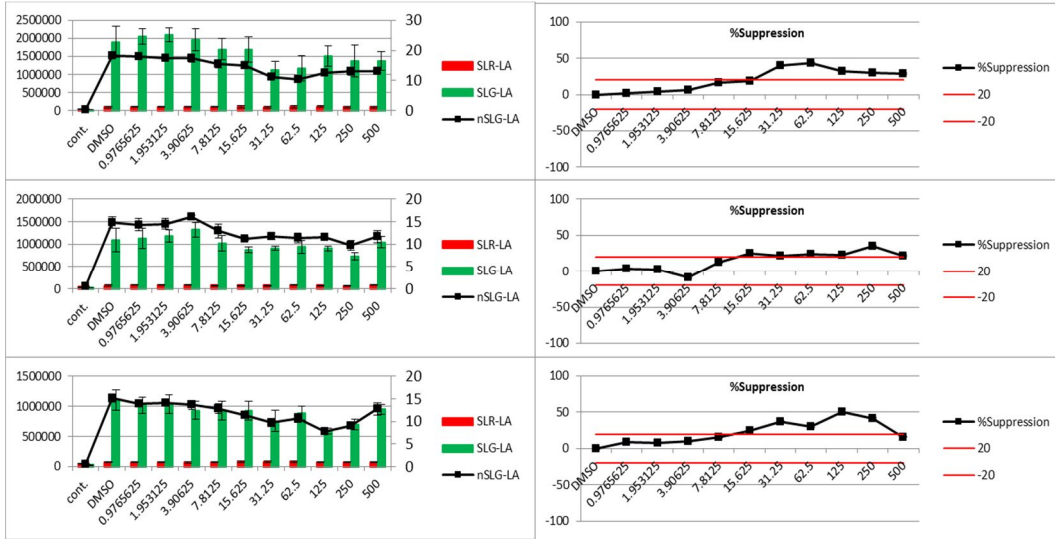
<MITC702>



<MITC703>



<MITC704>



<MITC705>

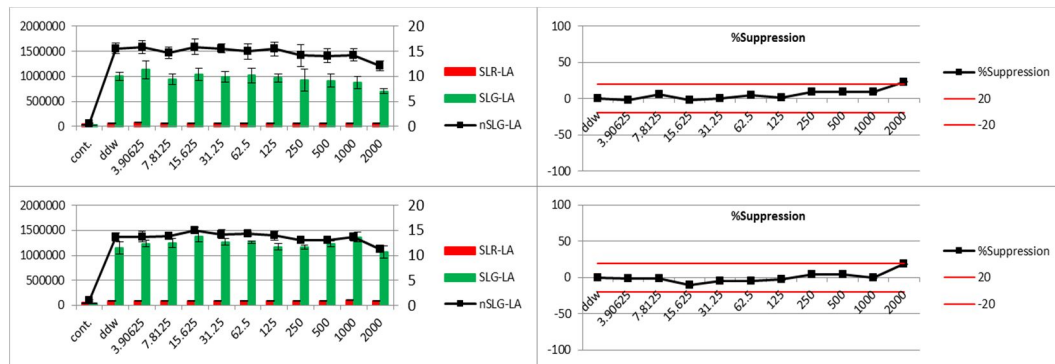
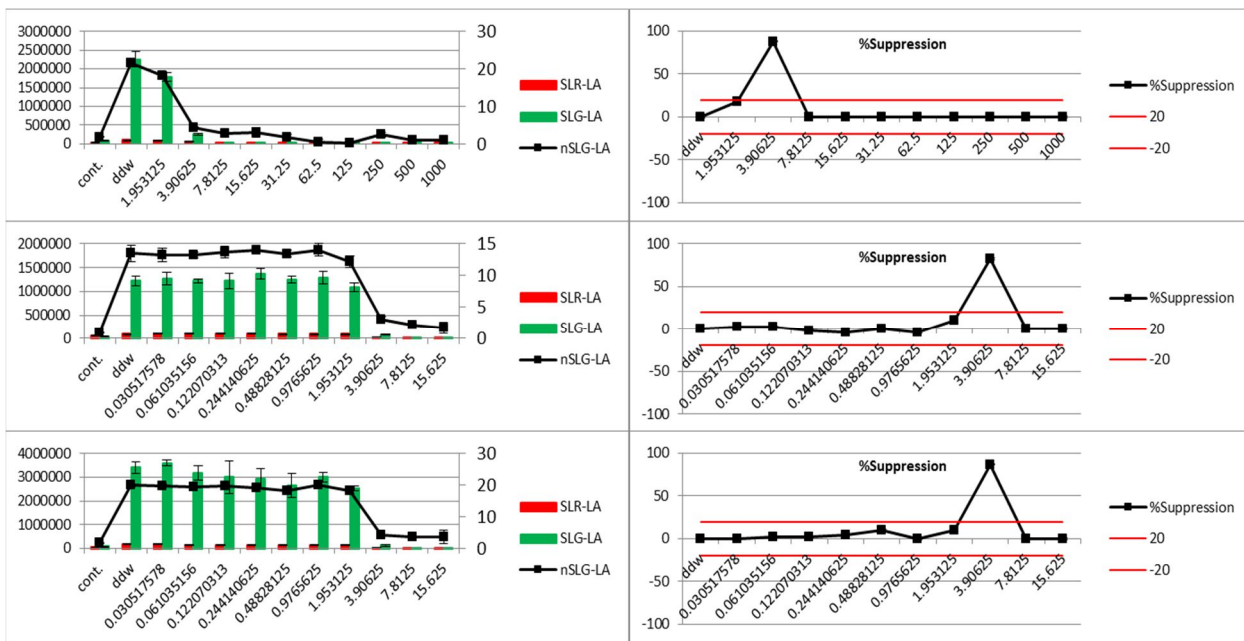
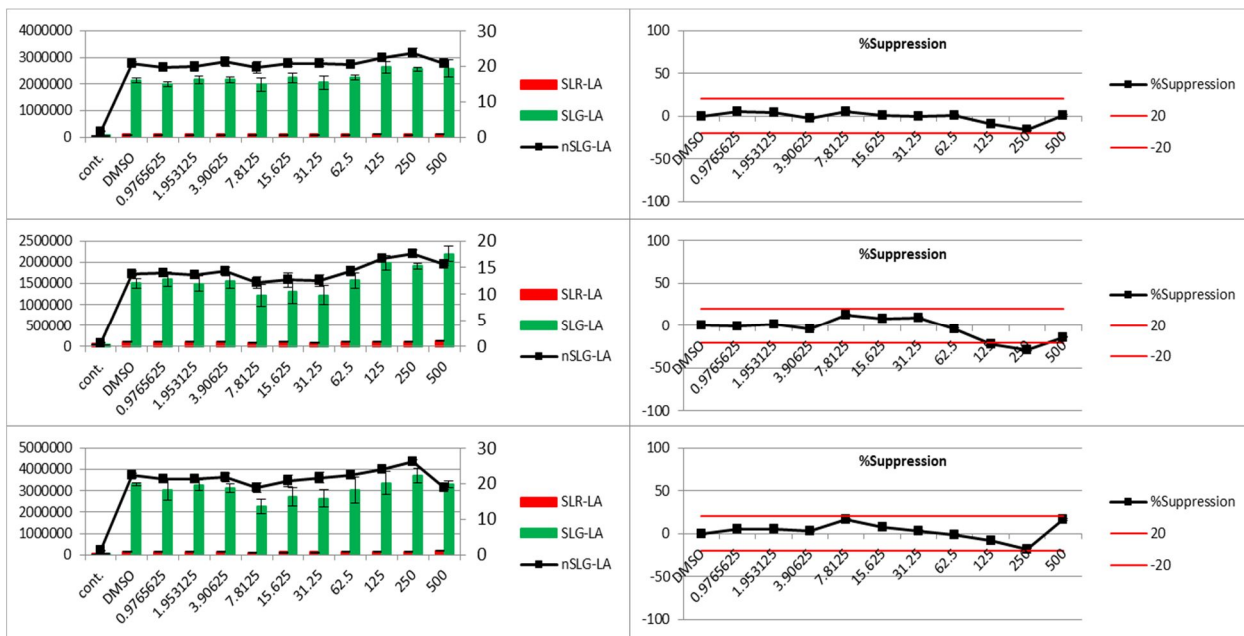


図2 THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞株における各試験化学物質に対する細胞応答性(Set 2).

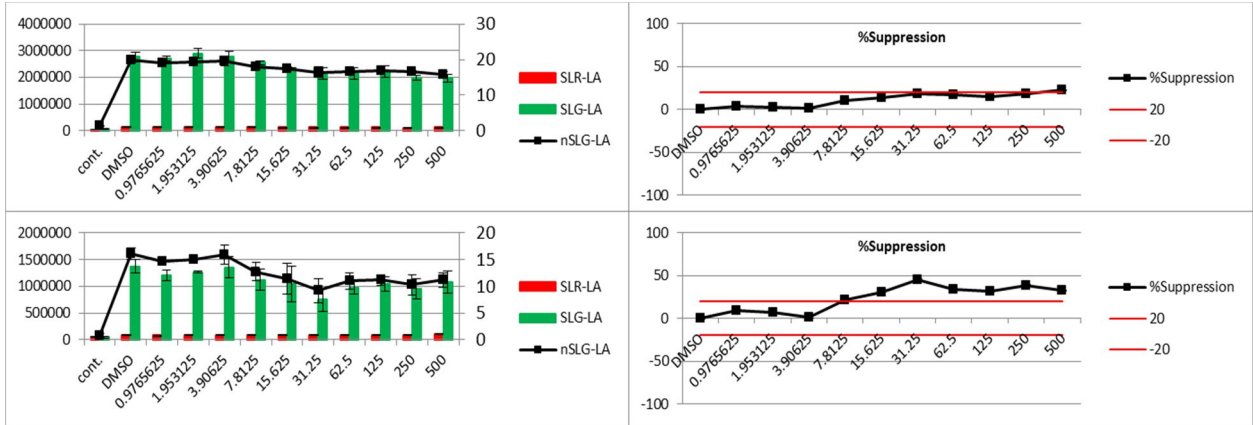
<MITC801>



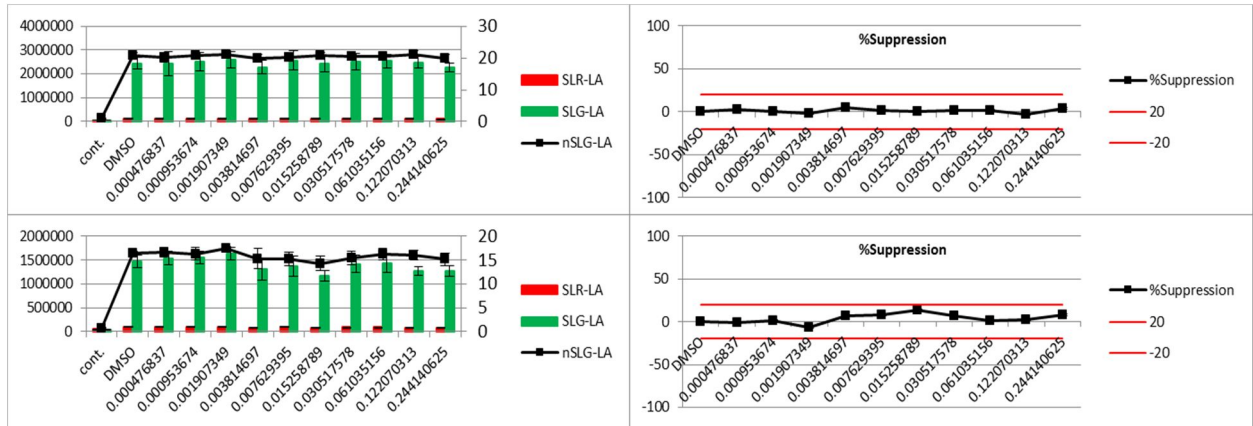
<MITC802>



<MITC803>



<MITC804>



<MITC805>

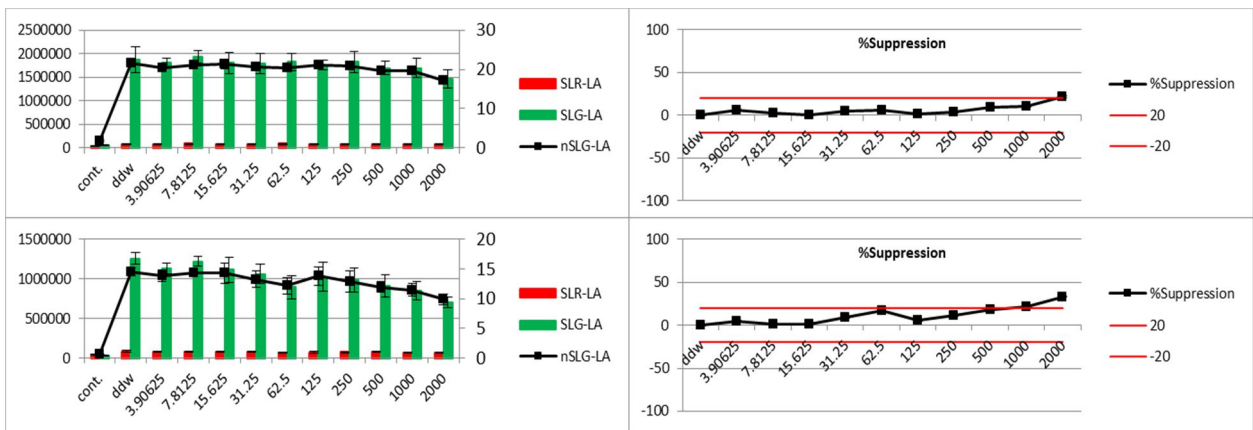
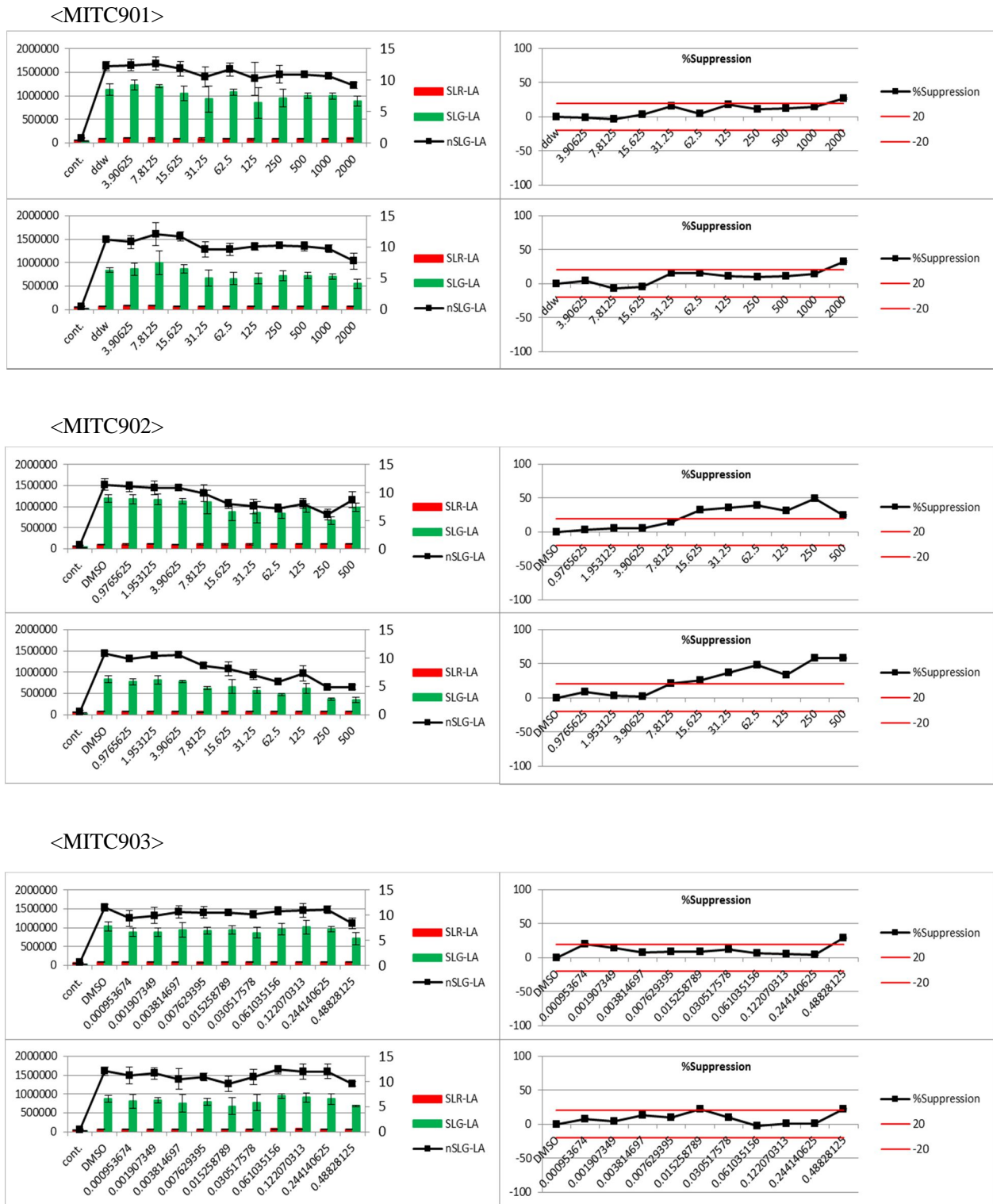
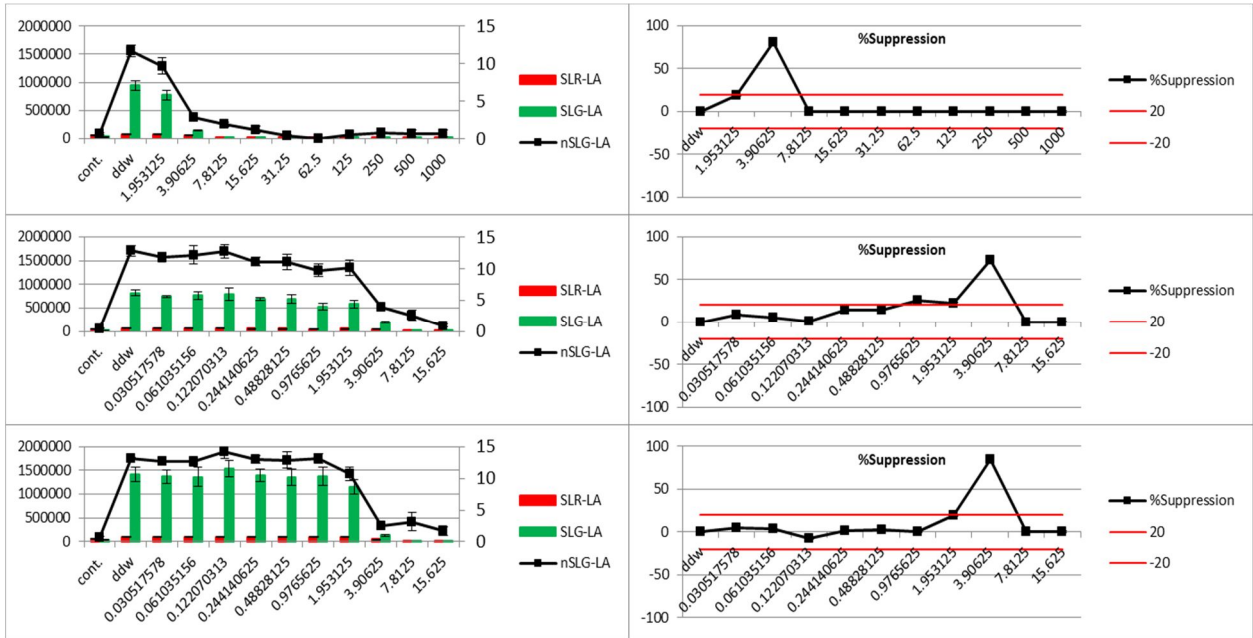


図3 THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞株における各試験化学物質に対する細胞応答性(Set 3).



<MITC904>



<MITC905>

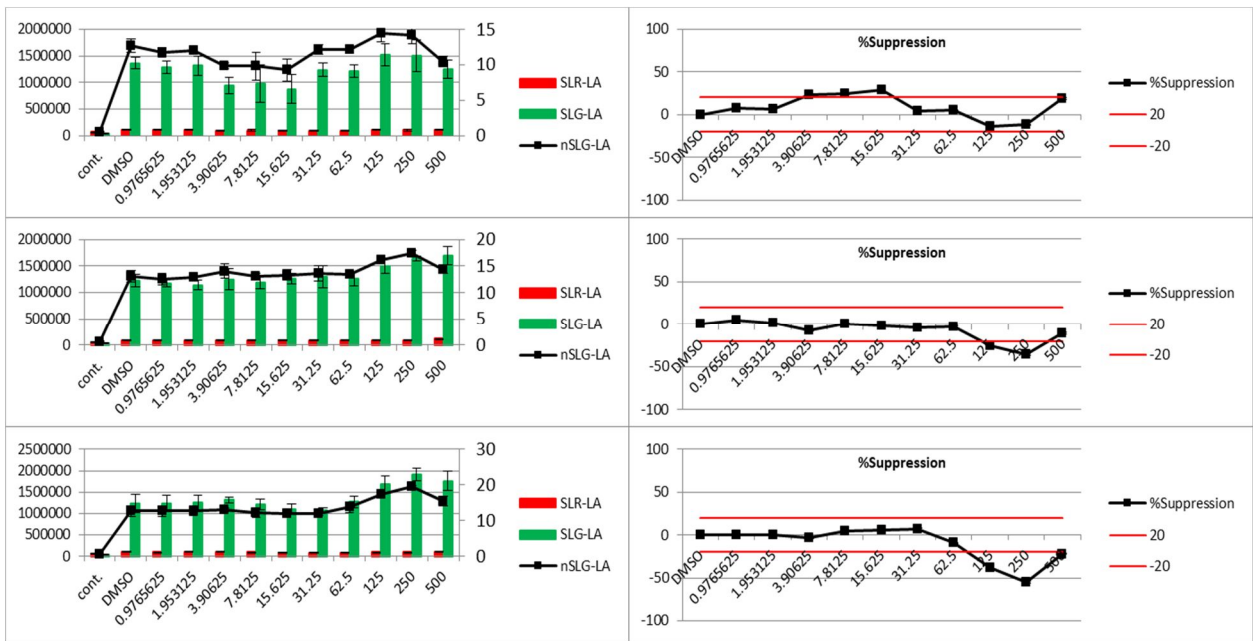


表 1 各被験物質に対する評価.

Chemicals	Code No.	Test			Judge
		1 st	2 nd	3 rd	
1	MITC701	N	A	A	A
	MITC802	N	A	N	N
	MITC905	S	A	A	A
2	MITC702	R	S	S	S
	MITC801	R	S	S	S
	MITC904	R	S	S	S
3	MITC703	S	S		S
	MITC804	N	N		N
	MITC903	N	N		N
4	MITC704	S	S	S	S
	MITC803	S	S		S
	MITC902	S	S		S
5	MITC705	N	N		N
	MITC805	S	S		S
	MITC901	S	S		S

A; Augmentation, S; Suppression, N; No Effect, R; Reject.