

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-ImmunoTox assay）国際標準化へ向けた評価法の検討

研究分担者 安野 理恵

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

研究要旨

THP-1 細胞における IL-1 転写活性抑制を指標とした化学物質免疫毒性評価系のバリデーション試験を実施した。今年度は、まず 3 化学物質を用いて Phase0 試験を実施し、技術移転性を確認した。つづいて、コード化された 5 物質において Phase1 試験（施設内再現性確認試験）を実施した。

A．研究目的

東北大学らによって開発された Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、多色発光タンパク質による *in vitro* 免疫毒性評価試験法で、各種の毒性評価発光細胞によって構成される。本研究では、化学物質の免疫毒性評価のための MITA 試験法確立と OECD ガイドライン化を目指してバリデーション試験を実施する。MITA の構成要素の一つである TGCHAC-4A (THP-G1) 細胞は、THP-1 細胞において IL-1 転写活性を定量化する。本年度は TGCHAC-4A 細胞を用いた試験法の確立を目指し、バリデーションの技術移転性の確認 (Phase0) および Phase1 試験の実施を目的とする。

B．研究方法

IL-1 と内部標準としての G3PDH プロモーターに SLG および SLR ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ繋いだ人工染色体発現ベクターを THP-1 細胞に導入した 2 色発光細胞株 TGCHAC-4A (THP-G1) 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、試験結果の判定基準等については Multi-Immuno Tox Assay protocol 案 Ver.007E (Phase0) および Ver.008E (Phase1) に準ずる。発光の計測には、多検体発光測定装置 Phelios (ATTO 社) を用いた。

Phase0 試験; 試験には 3 化学物質 (Dapsone, Diethanolamine, p-Nitroaniline) を供試し、各物質 3 回×2 セットの試験を行った。

Phase1 試験; 試験には、国際バリデーション実行委員会にて選定された 5 種類のコード化した被験物質を供試した。各物質 1 セットにつき 2 回の同一結果を得られるまで試験を繰り返し被験物質を判定、これを 3 セット実施した。

(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 試験 ; 被験 3 物質の試験結果を図 1 に示す。これらの結果を、リードラボの東北大学及びバリデーション実施施設である食薬センター、産総研高松と比較検証したところ、良好な施設内、施設間再現性が確認されたことから、つづいて Phase1 試験を実施した。

Phase1 試験 ;

コード化された 5 種類の化学物質 (5 物質 × 3 セット分の 15 被験試薬) の試験結果および判定結果を図 2 に示す。Multi-Immuno Tox Assay protocol 案 Ver.008 E の判定基準に準じ、%suppression の ± 20% を基準として被験試薬の効果を判定した。各試薬の判定を得るまで、それぞれ 2 ~ 4 回の実験を繰り返した。3 セット目 (MIB601~605) の 2nd experience では、LPS による誘導の基準となる FlnSLG-LA=>5% を満たさなかったため、判定対象外とした。

D . 考察

Phase1 試験では、コード化された 15 被験試薬 (5 物質 × 3) の試験を実施した。5 物質全てにおいて、3 セットで同一の判定結果となり、良好な施設内再現性を確認した。一方、各セットにおける 1st~4th experience を確認すると、3 つの被験試薬 (MIB503、MIB601、MIB602) において、N:No effect と S ; suppression の両判定があった。MIB601 に関しては、「N、S、N」で最終的に No effect 判定であったが、2nd exp. の suppression 判定も +20% ラインを僅かに上回る微妙なものであった。MIB503、602 においては、被験試薬の毒性が強く、細胞の I.I.-SLR-LA が 0.5 を下回る直前の非常に狭い濃度範囲において明らかな IL1- の転

写活性抑制反応が出ている。しかし、反応が計測できる濃度が 1 点のみであったため判断基準となる「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」に合致せず、No effect の判定となっている。これらの結果から、プロトコルの改善や判定基準の再検証を進めることにより、より正確性、再現性を向上した試験法の確立が見込まれる

E . 結論

免疫毒性評価試験法 (Multi-ImmunoTox assay) の国際標準化を目指し、TGCHAC-4A 細胞を用いた THP-G1 転写発現抑制を指標とした評価試験のバリデーション試験 (Phase0 および Phase1) を実施した。Phase0 試験において技術移転性を確認し、Phase1 試験において 5 物質 × 3 セットからなる試験を実施した。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

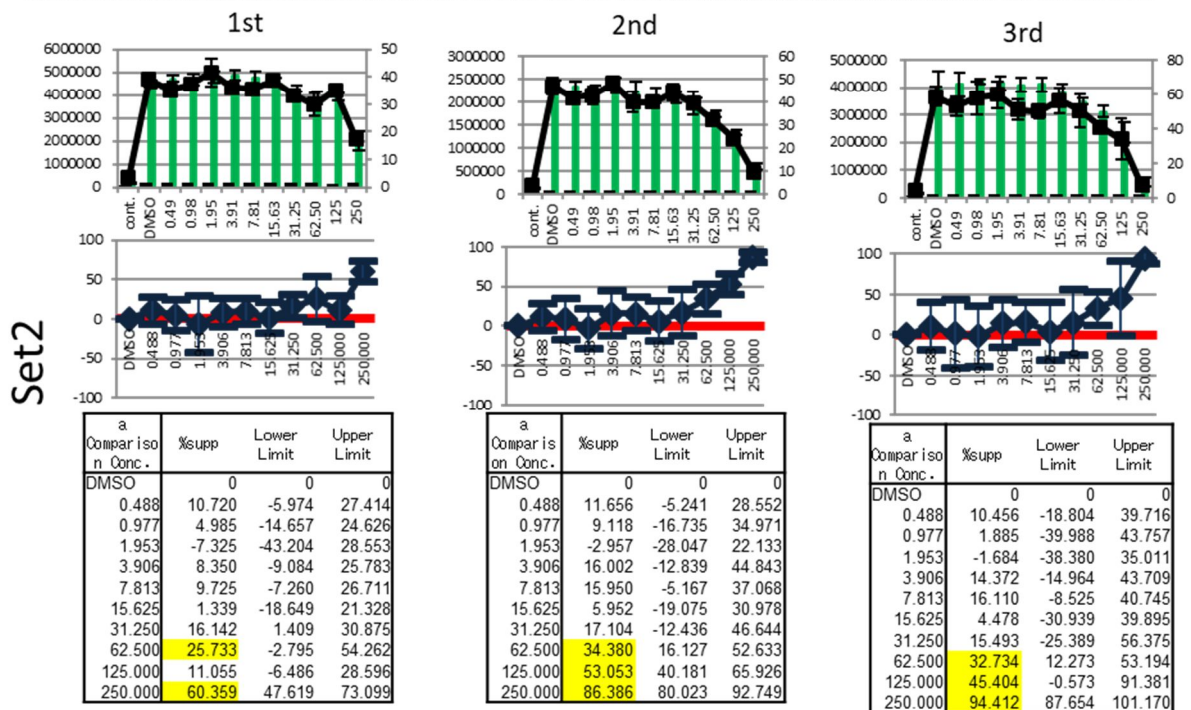
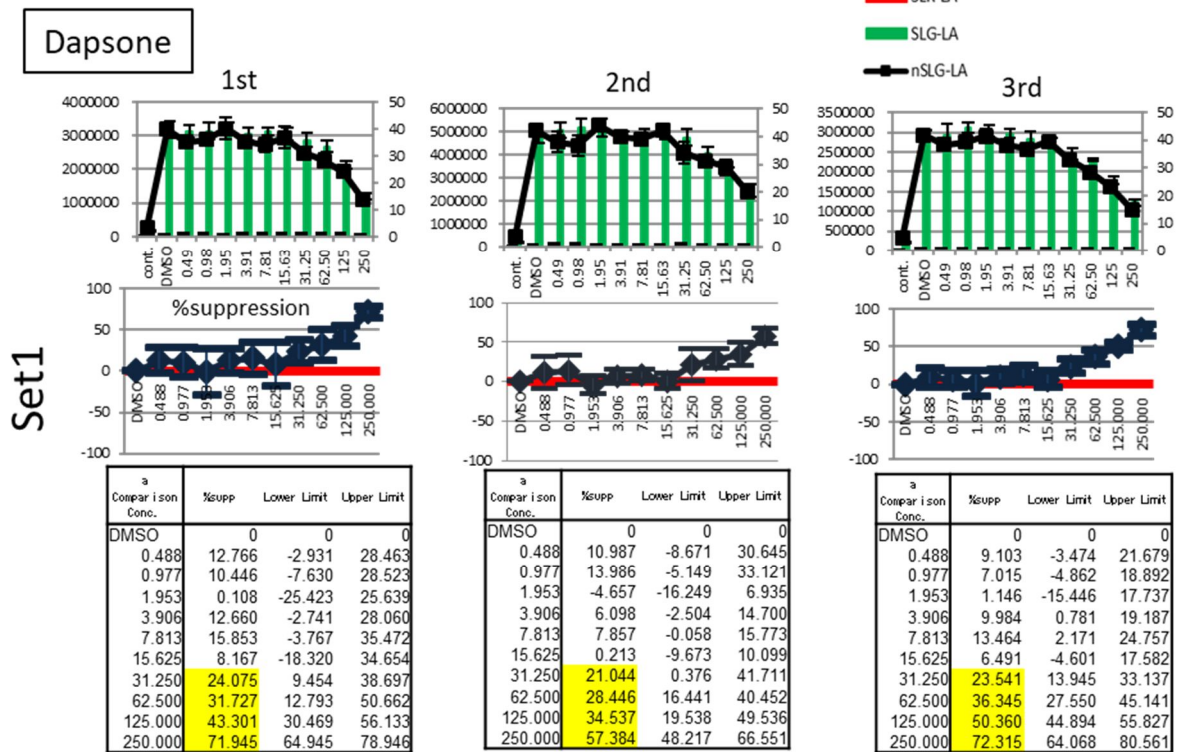
該当なし

2. 学会発表

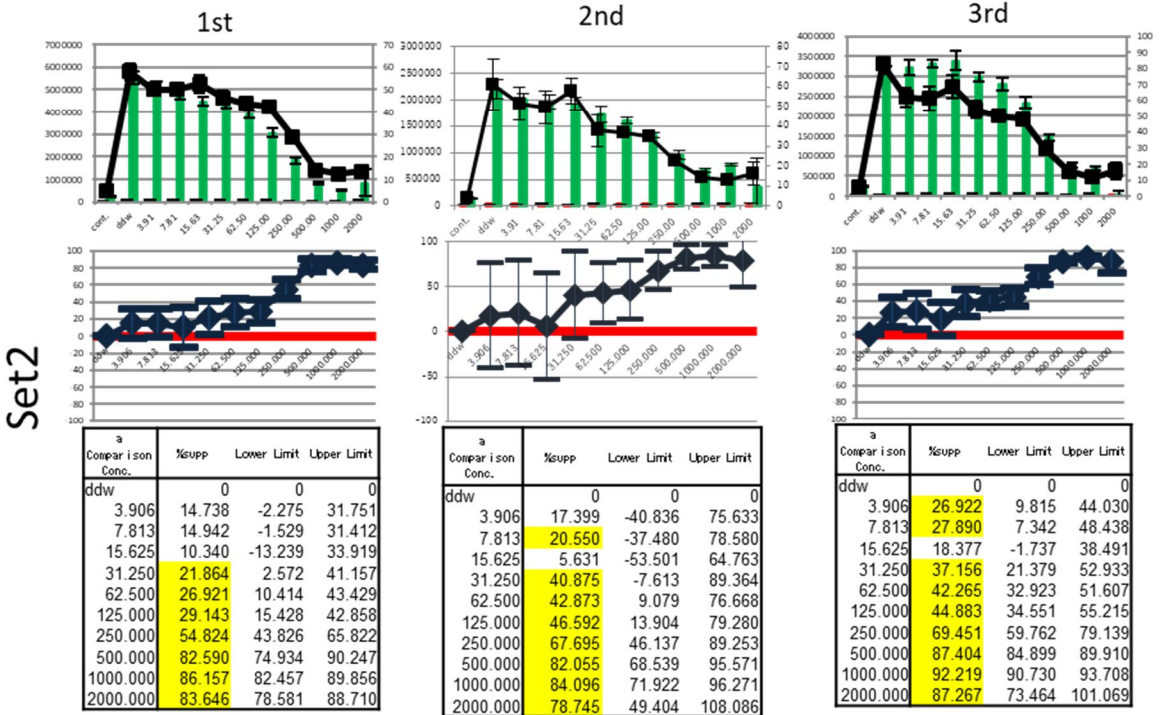
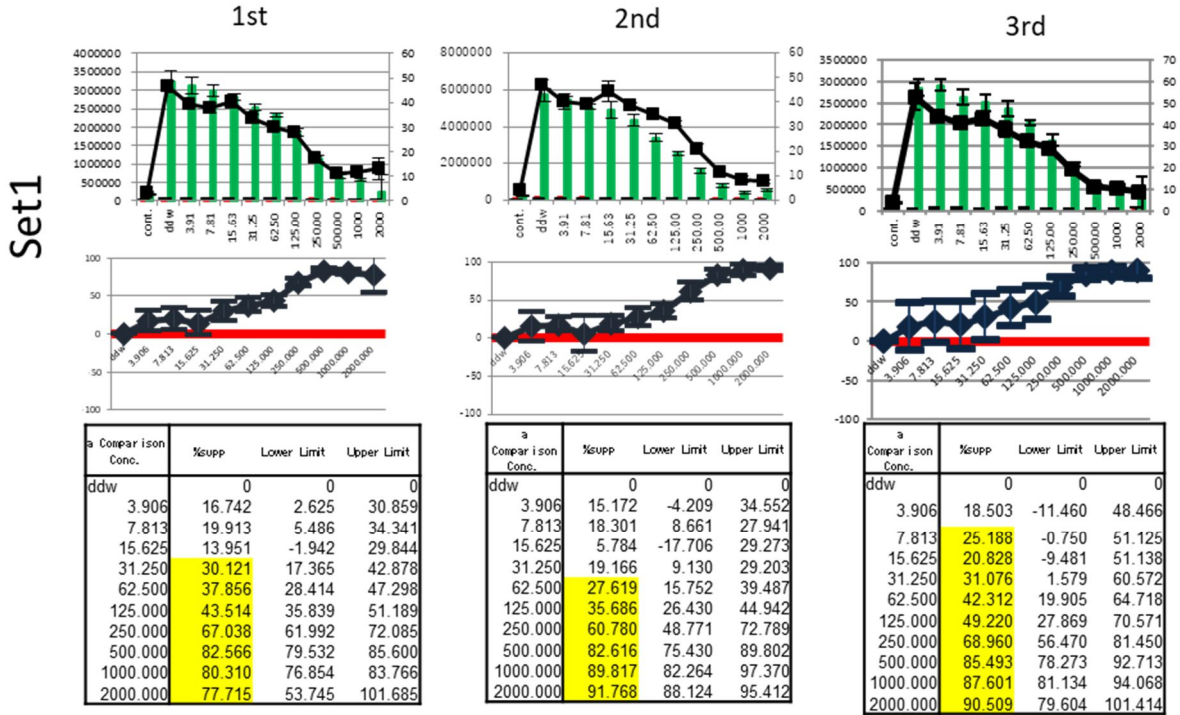
木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 眞弓、大森 崇、足利 太可雄、小島 肇、相場 節也 : Multi-ImmunoTox Assay (MITA) バリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第 31 回大会 (熊本) 2018 年 11 月

	該当なし
H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)	3.その他
1. 特許取得	該当なし
該当なし	
2. 実用新案登録	

図1 Phase0試験；被験物質に対する細胞応答性



Diethanolamine

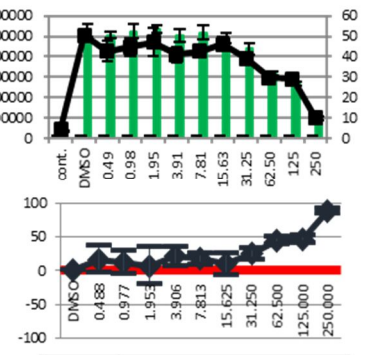
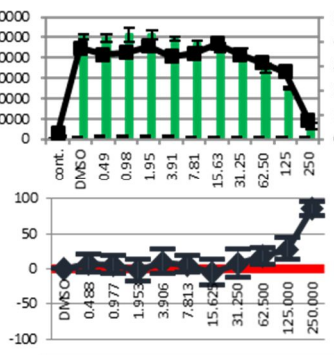
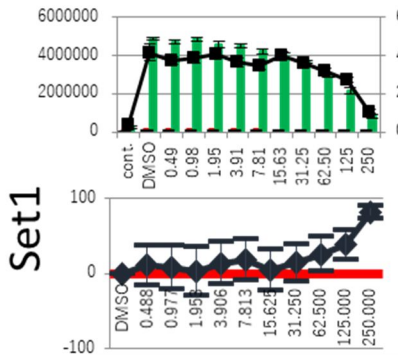


p-Nitroaniline

1st

2nd

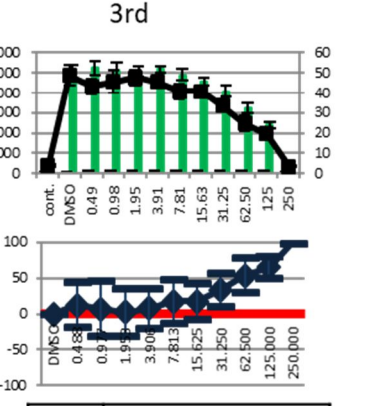
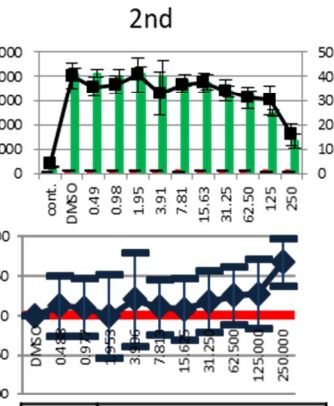
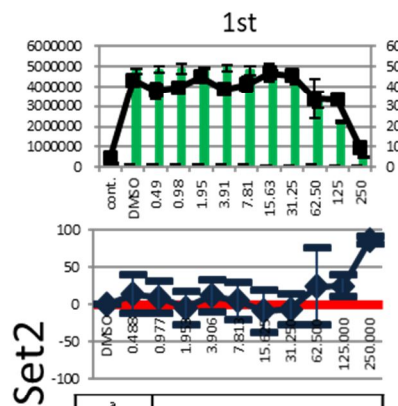
3rd



Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	10.798	-15.855	37.451
0.977	8.031	-21.359	37.421
1.953	2.083	-30.450	34.615
3.906	13.350	-14.554	41.253
7.813	17.742	-9.448	44.932
15.625	4.067	-23.438	31.572
31.250	14.195	-10.364	38.755
62.500	25.576	2.851	48.301
125.000	38.277	18.807	57.747
250.000	81.564	72.706	90.422

Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	7.340	-5.954	20.634
0.977	4.849	-8.144	17.843
1.953	-2.737	-18.049	12.575
3.906	9.624	-7.854	27.102
7.813	6.202	-6.336	18.739
15.625	-5.289	-23.473	12.896
31.250	7.560	-12.343	27.463
62.500	17.469	5.141	29.797
125.000	27.721	12.654	42.789
250.000	84.881	74.302	95.460

Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	16.876	-2.486	36.237
0.977	12.247	-5.318	29.812
1.953	7.277	-19.981	34.535
3.906	20.804	6.125	35.482
7.813	17.109	8.538	25.680
15.625	9.398	-6.038	24.833
31.250	25.026	16.157	33.895
62.500	45.040	38.984	51.097
125.000	64.390	41.348	51.432
250.000	88.165	84.598	91.733

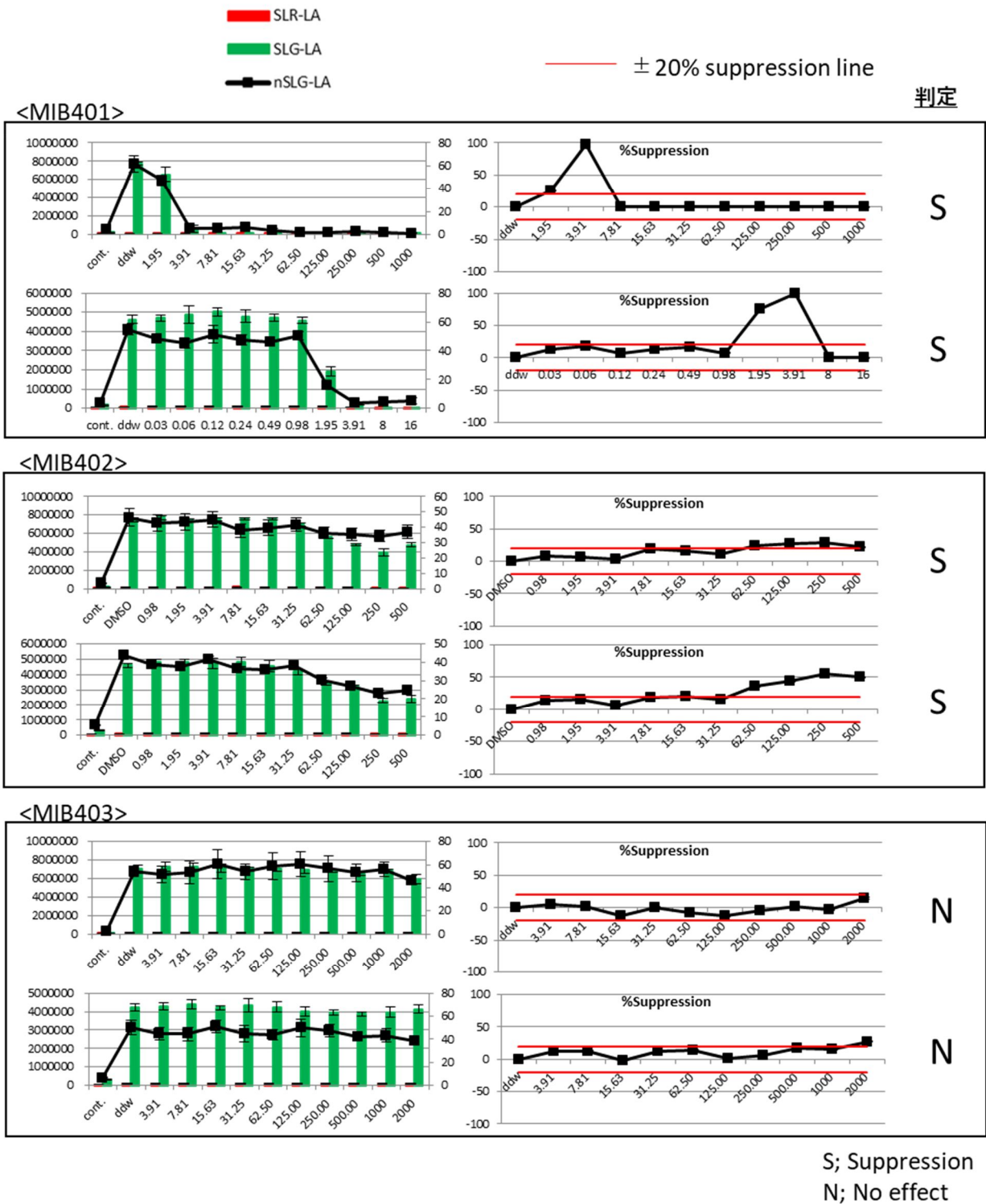


Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	13.767	-12.206	39.739
0.977	9.723	-11.417	30.862
1.953	-4.432	-26.698	17.834
3.906	11.853	-9.525	33.232
7.813	5.409	-19.753	30.571
15.625	-9.124	-38.533	20.285
31.250	-6.026	-26.872	14.819
62.500	24.313	-27.870	76.497
125.000	24.920	10.461	39.380
250.000	86.931	82.447	91.415

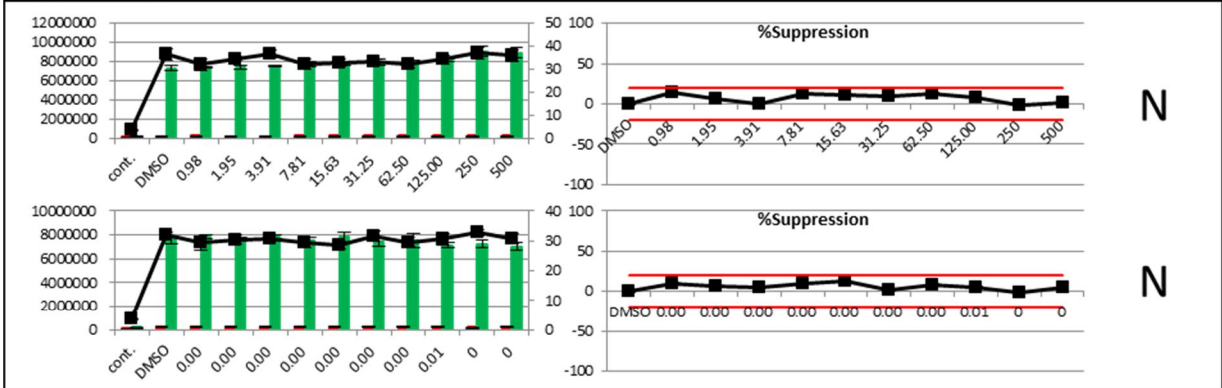
Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	12.528	-25.834	50.890
0.977	10.230	-26.989	47.448
1.953	-0.662	-53.725	52.401
3.906	20.183	-39.331	79.698
7.813	10.514	-23.950	44.978
15.625	7.859	-30.587	46.305
31.250	17.150	-21.603	55.903
62.500	25.085	-11.367	61.538
125.000	28.034	-15.855	71.923
250.000	67.192	36.436	97.947

Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.488	12.161	-18.753	43.074
0.977	6.737	-31.988	45.461
1.953	1.867	-31.206	34.940
3.906	7.334	-20.703	35.371
7.813	17.517	-12.523	47.557
15.625	17.362	-7.538	42.263
31.250	33.411	9.612	57.210
62.500	53.268	29.353	77.183
125.000	64.419	48.774	80.064
250.000	100.591	98.208	102.974

図2 Phase1試験；被験物質に対する細胞応答性



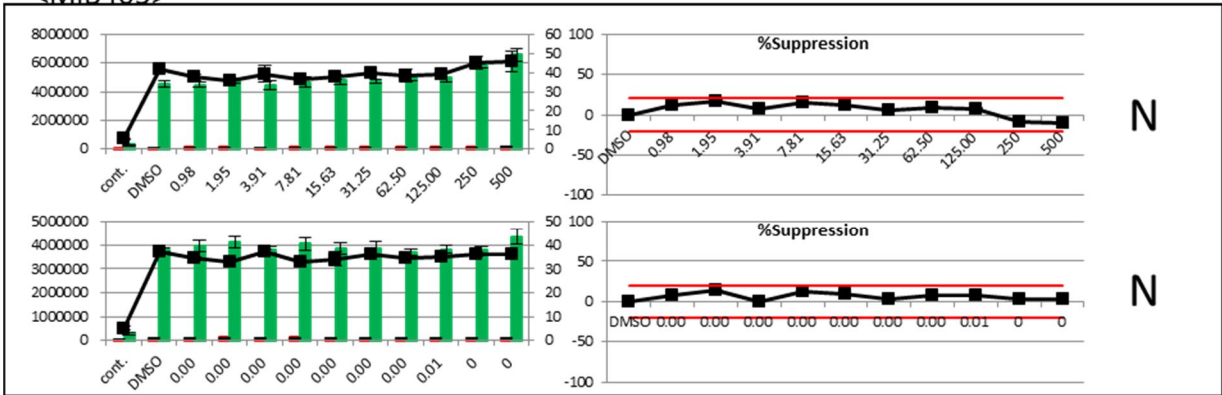
<MIB404>



N

N

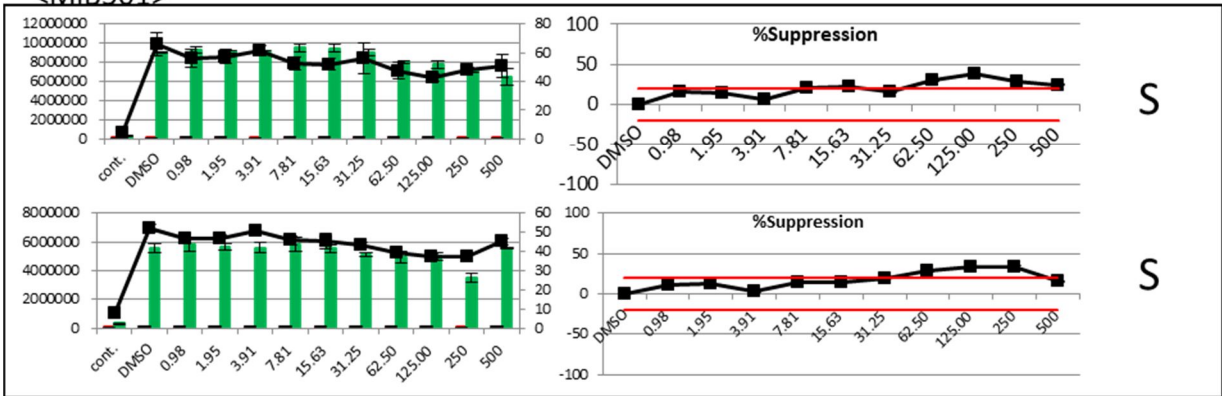
<MIB405>



N

N

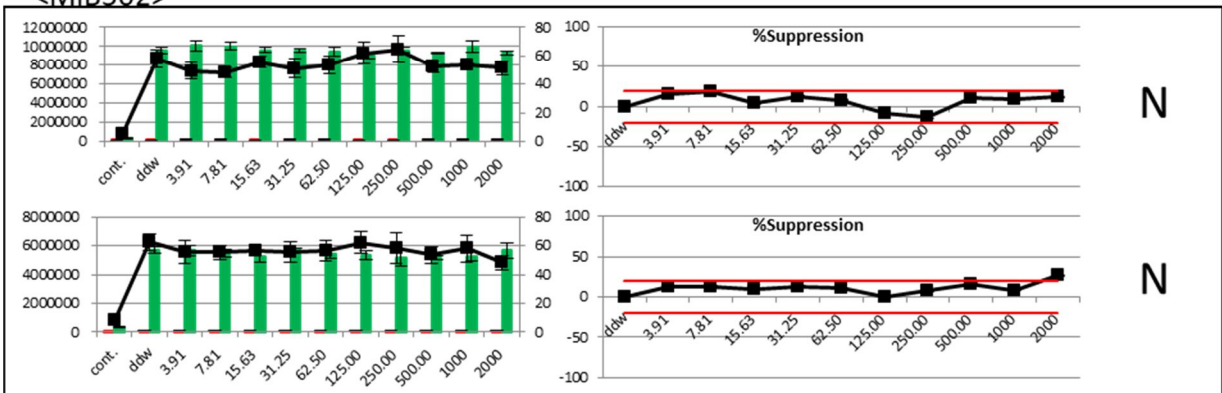
<MIB501>



S

S

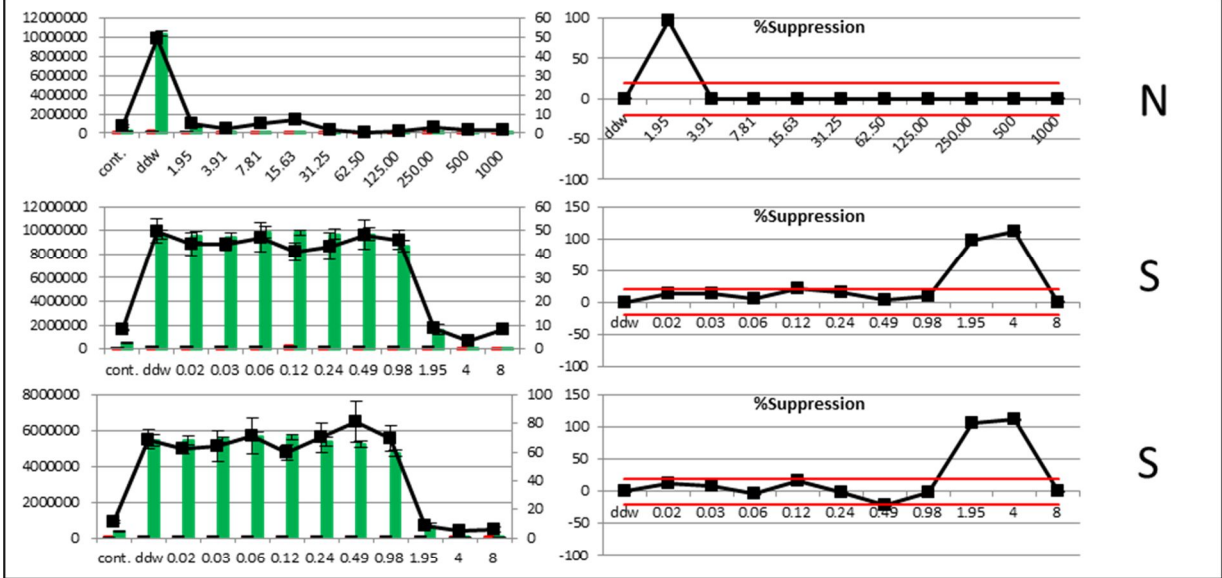
<MIB502>



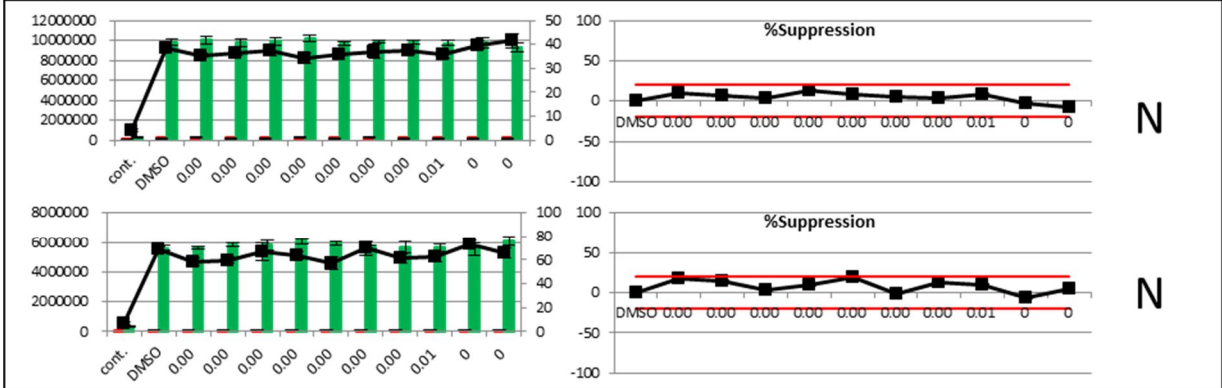
N

N

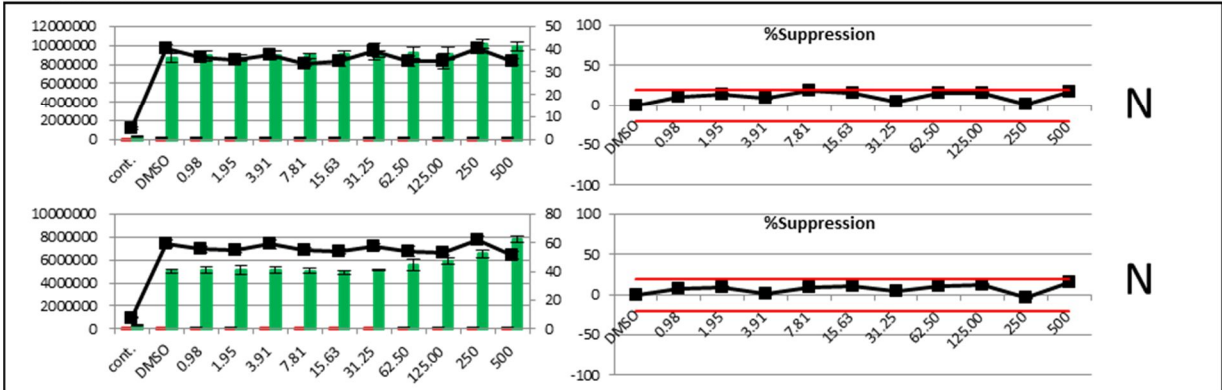
<MIB503>



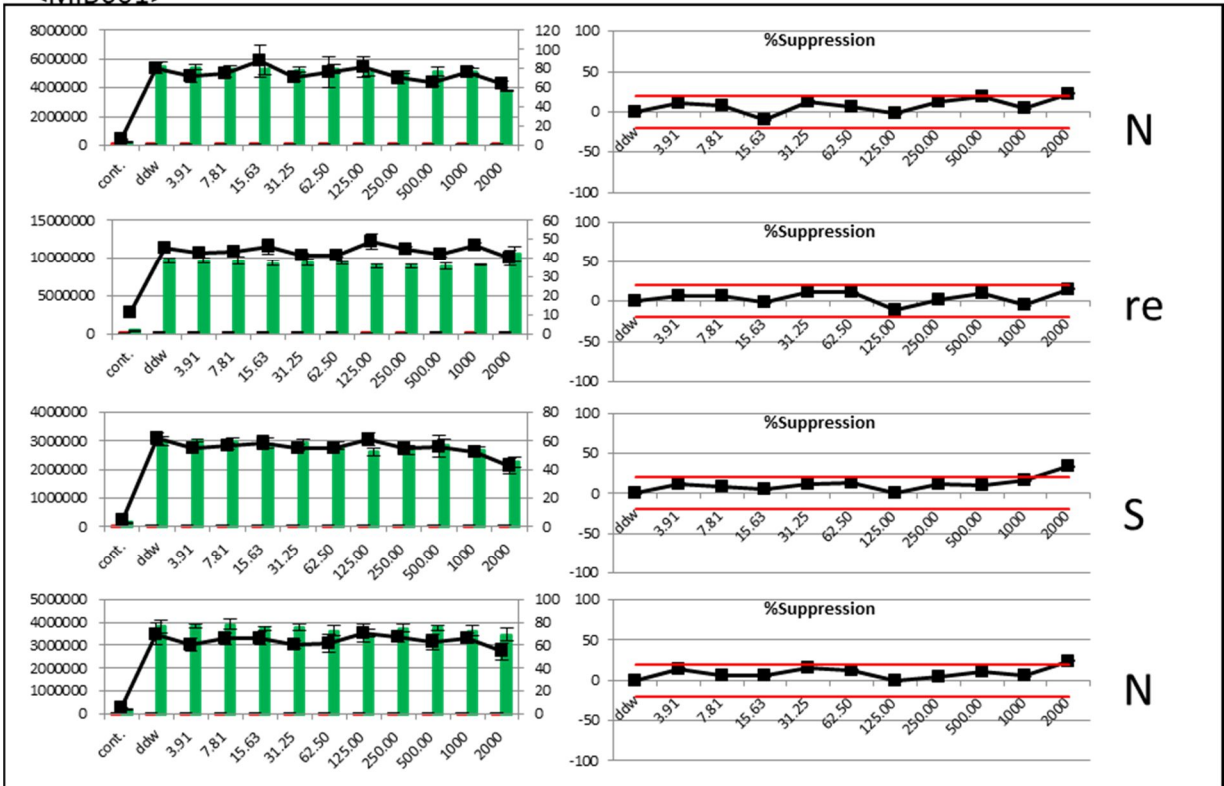
<MIB504>



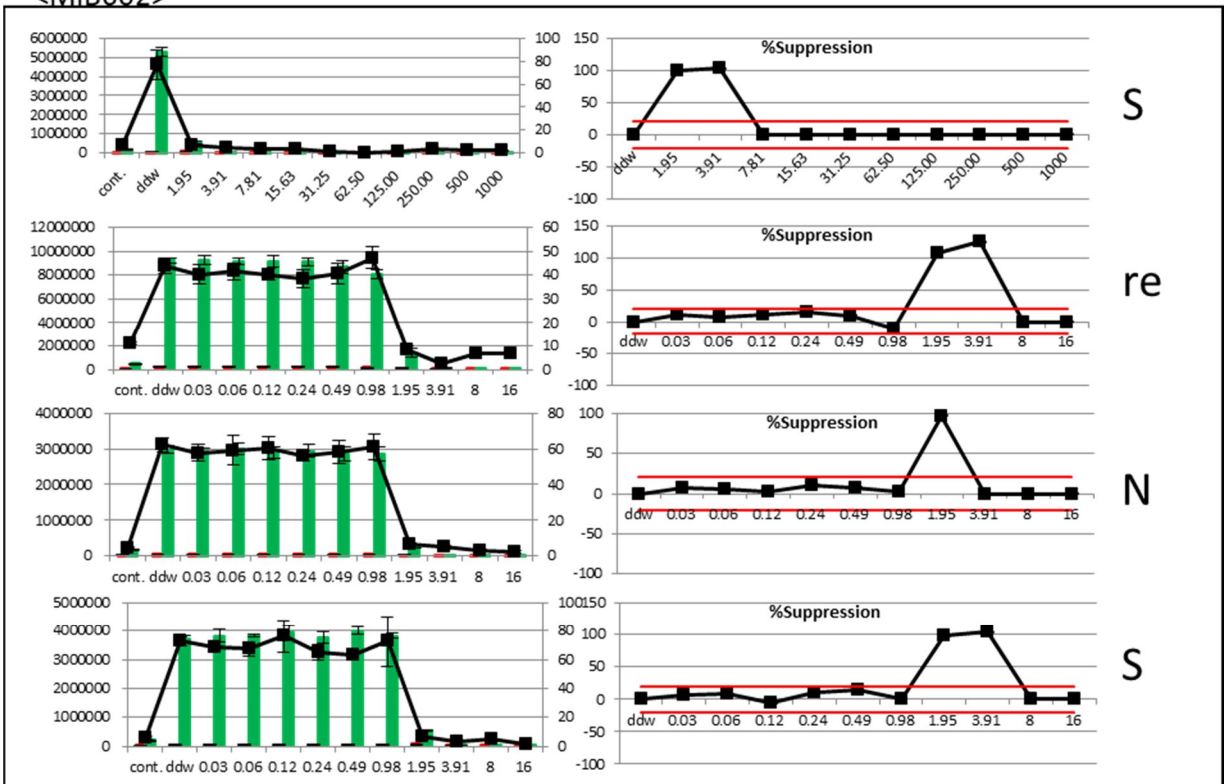
<MIB505>



<MIB601>

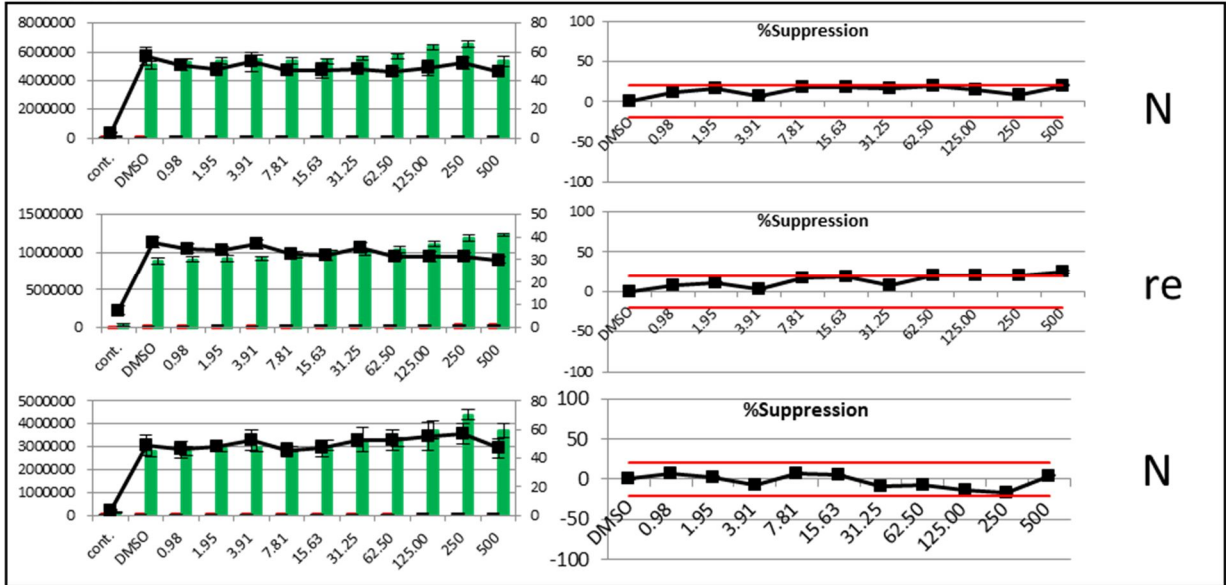


<MIB602>

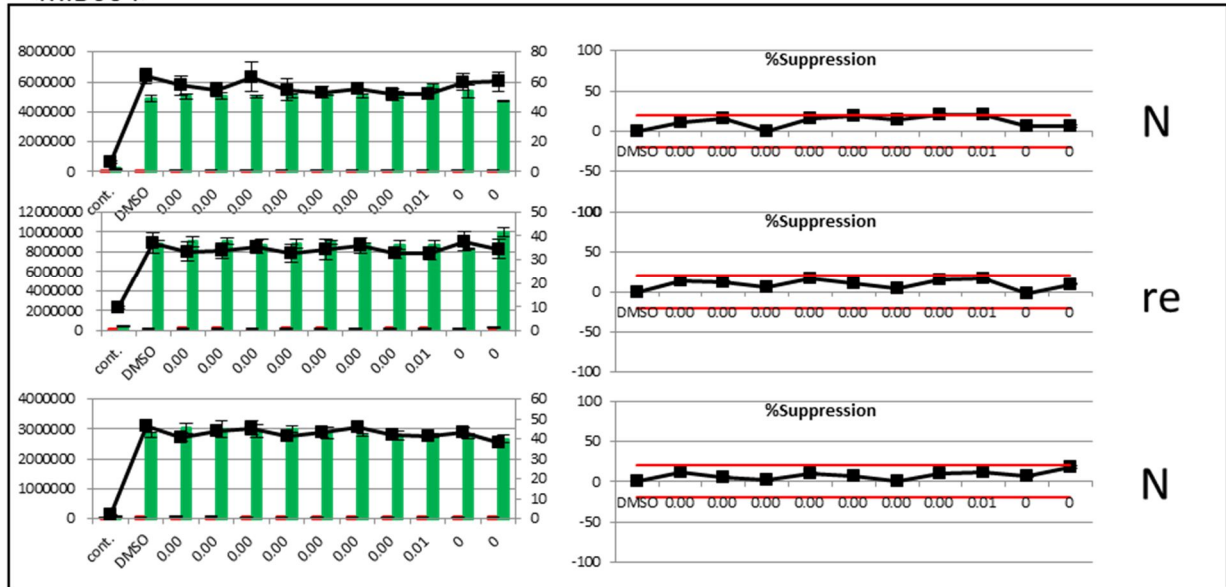


Re: rejected
 (FinSLG-LAが<5のため、判定基準を満たしていない)

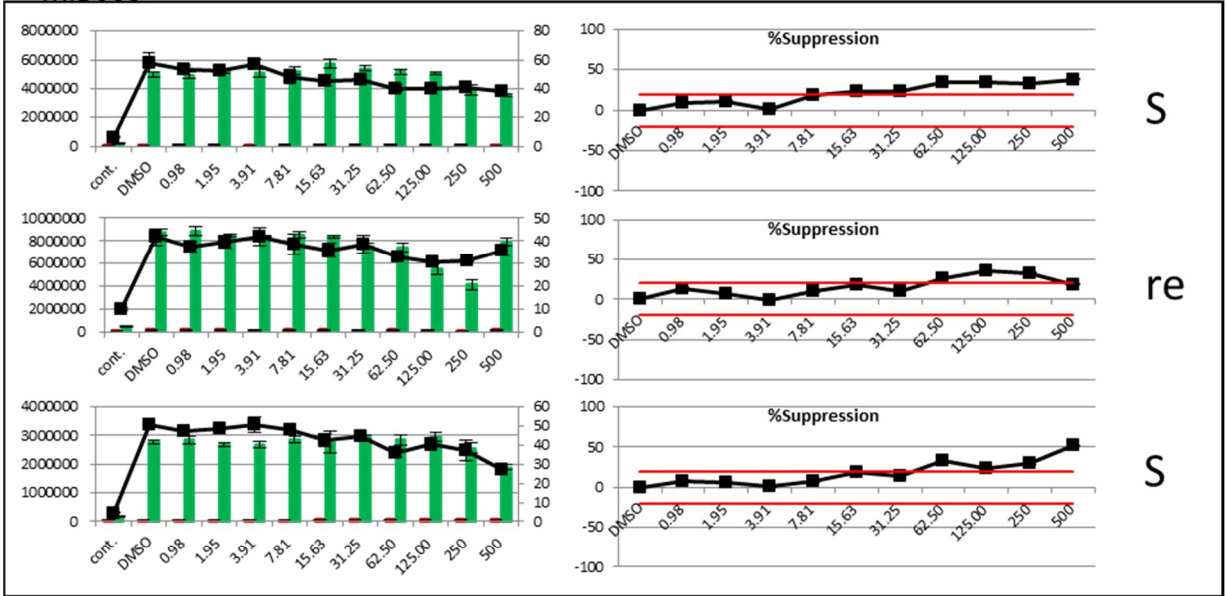
<MIB603>



<MIB604>



<MIB605>



Phase I 試験判定結果

MIB	1 st	2 nd	3 rd	4 th	判定
401	S	S	-	-	S
503	N	S	S	-	S
602	S	re	N	S	S
402	S	S	-	-	S
501	S	S	-	-	S
605	S	re	S	-	S
403	N	N	-	-	N
502	N	N	-	-	N
601	N	re	S	N	N
404	N	N	-	-	N
505	N	N	-	-	N
603	N	re	N	-	N
405	N	N	-	-	N
504	N	N	-	-	N
604	N	re	N	-	N