

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 β 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 II 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、昨年度までにPhase 0として既知の3物質について試験を実施して技術移転性を確認した後、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組を供試して施設内再現性および施設間再現性について検討してきた。本年度は引き続きPhase IIバリデーション試験として、コード化した試験化学物質20種類を供試し、施設間再現性等についてさらに検討した。

B．研究方法

B-1) 使用した細胞

IL-1 β 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 IIでは1セット20種類のコード化した被験物質1セットを

用いた。物質名とCAS番号およびコード番号の対応を表1に示す。

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、被験物質調整及び添加方法、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. 009E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 IIバリデーション試験では、1セット20種類のコード化した試験化学物質1セットを用いて1被験物質につき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4つの基準を満たす場合をSuppression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(I.I.-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25%以上でかつ、同時に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。もしくは統計学的有意

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）。

- 被験物質濃度2000 µg/mLの結果は除外する。

（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、配慮すべき問題はない。

C．研究結果

Phase IIでは施設間再現性および試験の正確性を検討する目的で、コード化された20物質を1セットとする群が1セット配布された。1物質につき判定を決定できるまで、2回から4回の実験を実施した。結果を図1に示す。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2に示した。

D．考察

Phase II studyでは施設間再現性等の確認のために、コード化した20物質1セットについて実験を行った。

当施設では、20物質のうち10物質がSuppression、残り10物質がNo effectと判定された。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、東北大学皮膚科）の結果を比較したところ、20物質中16物質で判定が一致しており（16/20）、施設間再現性は80%であった。

また、昨年度行ったPhase I studyの結果を今回と同じ判定基準を用いて改めて再判定した。Phase I studyは、コード化された5物質を1組とする群が3組配布され、1組毎に実験を行ったものである。その結果、施設内再現性は100%（5/5）であり、施設間再現性もまた100%（5/5）となった。

以上の結果、Phase IおよびIIを通して新しい判定基準を適用することにより、施設間ならびに施設内再現性が80%以上に向上した。

Phase II studyにおいて判定が一致しなかった4物質には、全濃度で10～20%程度のSuppressionが見られるものが2物質含まれている。このような物質の場合は、偶発的に1点の濃度で25%を超えていて濃度依存性があるように見えることがあるが、試験1

回目と2回目ではピークとなる濃度が異なる等濃度依存性に違いが見られる。このような擬陽性の可能性がある物質データの取り扱いには注意が必要かもしれない。

E．結論

IL-1β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。Phase I studyの結果を元に判定基準の見直しを行い、新たに提案された基準を用いて判定を行うこととした。Phase II studyではコード化した20物質について試験を実施した。得られた結果を比較して施設間再現性を検討したところ、80%という良好な結果が得られた。また、同判定基準を適用してPhase I studyの結果を再判定したところ、施設内再現性、施設間再現性ともに100%となり、特に再現性に関して非常に良好な系を構築できた。

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、真下奈々、高木佑実、大森崇、足利太可雄、小島肇、相場節也、Multi-ImmunoTox Assay (MITA)の予測性評価に必要な文献に基づく化学物質免疫毒性分類の試み、第32回日本動物実験代替法学会

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

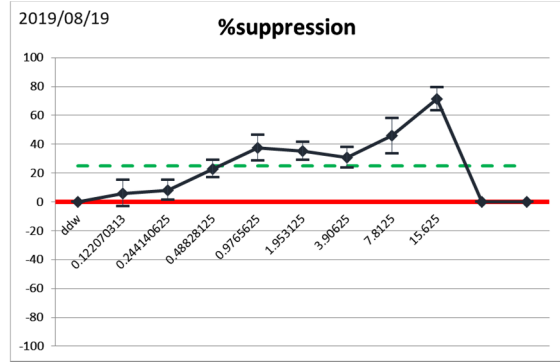
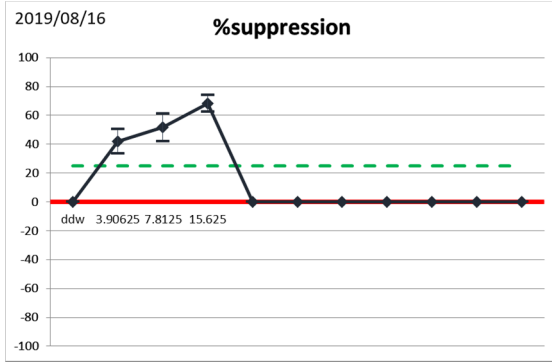
該当なし

表 1 . 試験化学物質名と CAS 番号およびコード番号との対応.

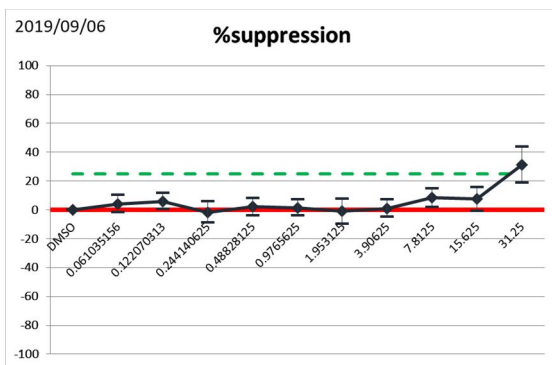
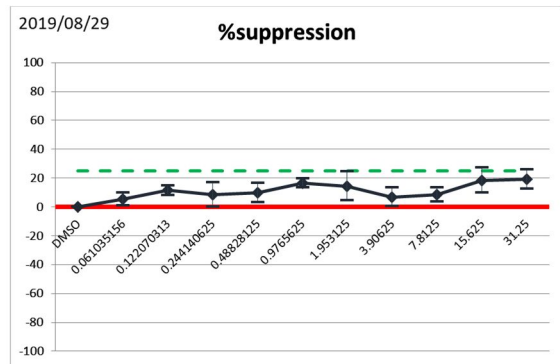
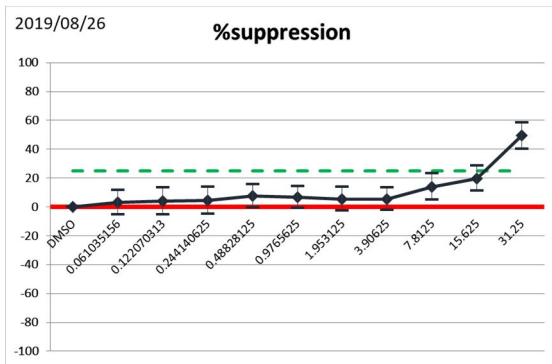
化学物質名	CAS No.	コード番号
Cadmium Chloride	10108-64-2	MTC305
5,5-Diphenylhydantoin Sodium salt	630-93-3	MTC301
Indomethacin	53-86-1	MTC318
Pentachlorophenol	87-86-5	MTC307
Urethane	51-79-6	MTC302
Tributyltin Chloride	1461-22-9	MTC312
Perfluorooctanoic Acid	335-67-1	MTC303
Hydroquinone	123-31-9	MTC322
Bis(4-aminophenyl) Sulfone	80-08-0	MTC313
Ethanol	64-17-5	MTC317
5-Nitro-2-furaldehyde Semicarbazone	59-87-0	MTC324
Trichloroethylene	79-01-6	MTC309
Zinc Dimethyldithiocarbamate	137-30-4	MTC316
Citral	5392-40-5	MTC315
t- Butylhydroquinone	1948-33-0	MTC323
Bisphenol A	80-05-7	MTC314
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	128-37-0	MTC306
Nonylphenol	84852-15-3	MTC311
Sodium Chloride	7758-19-2	MTC304
D(-)-Mannitol	69-65-8	MTC327

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.

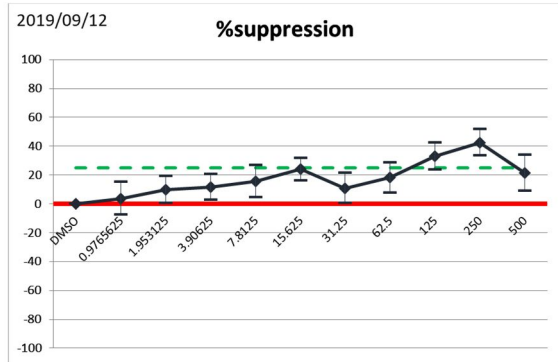
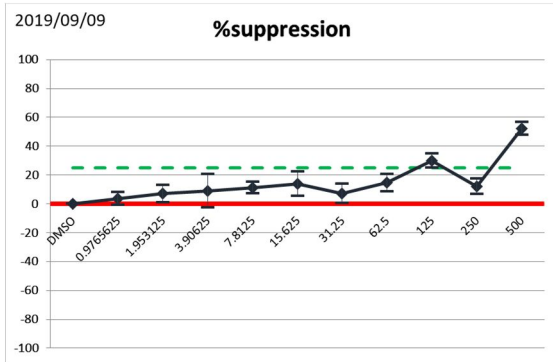
<MTC305>



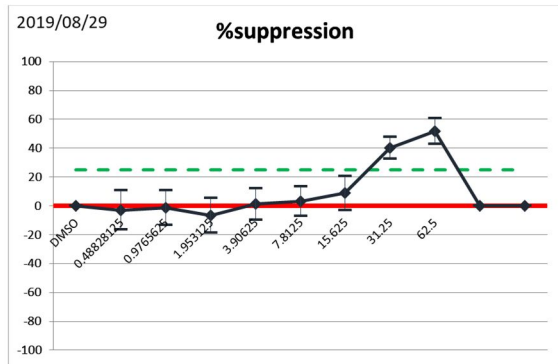
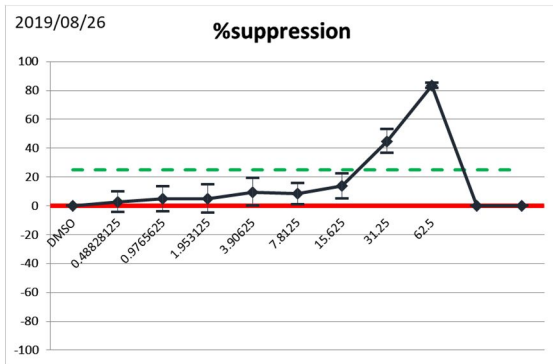
<MTC301>



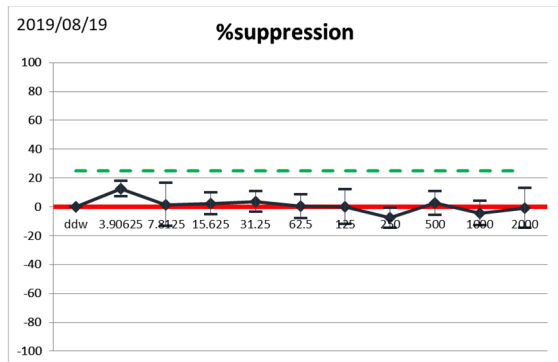
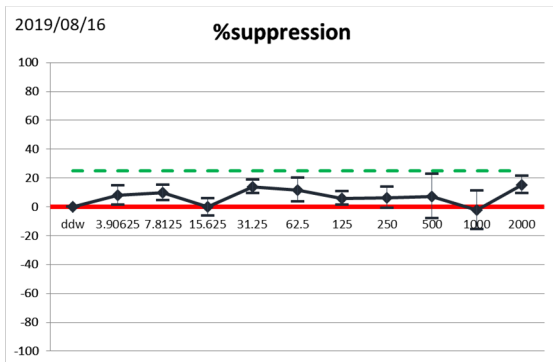
<MTC318>



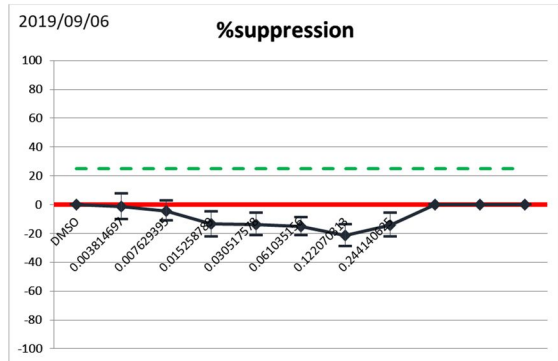
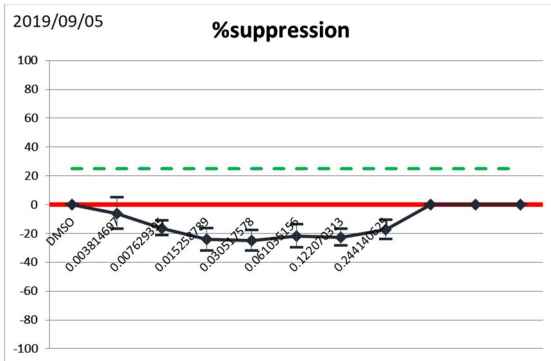
<MTC307>



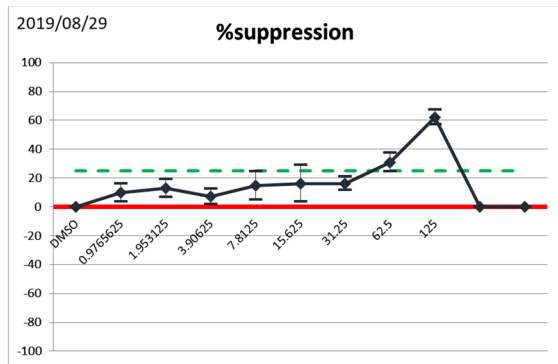
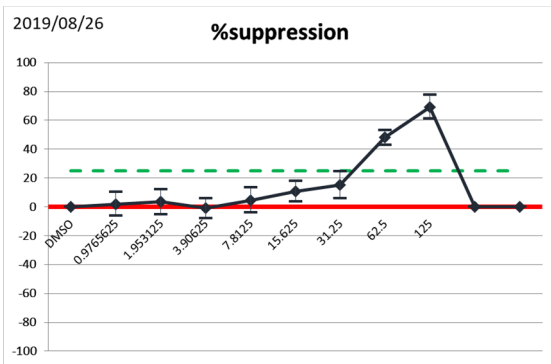
<MTC302>



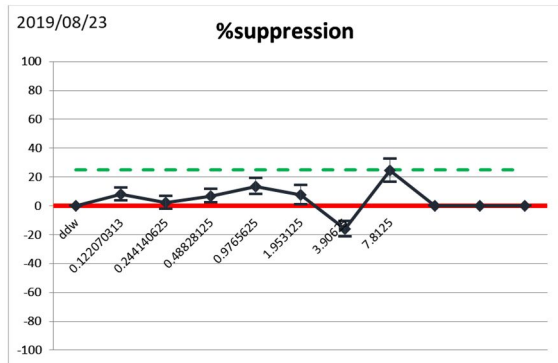
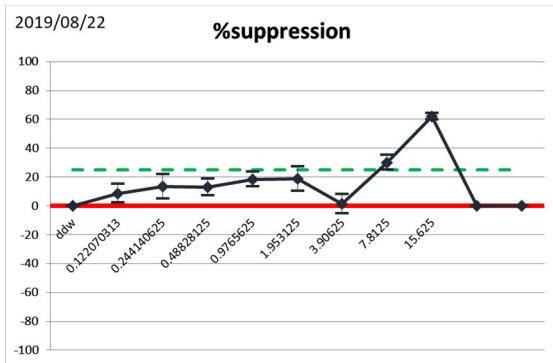
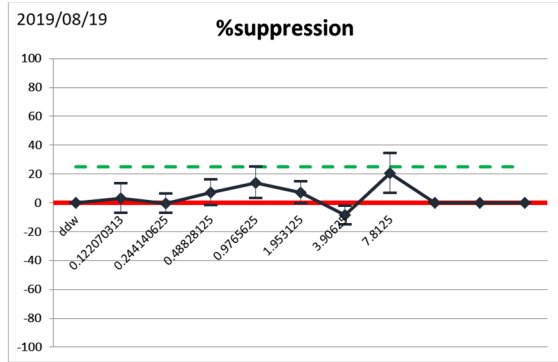
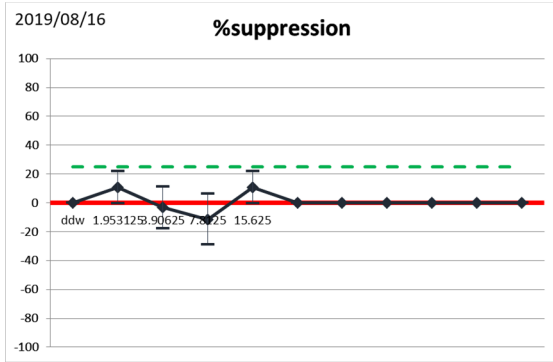
<MTC312>



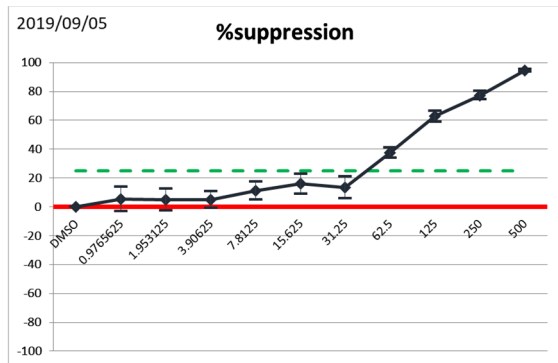
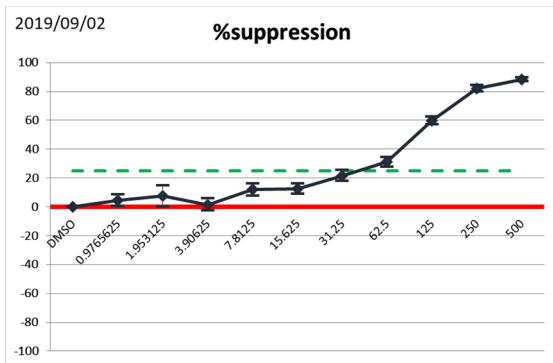
<MTC303>



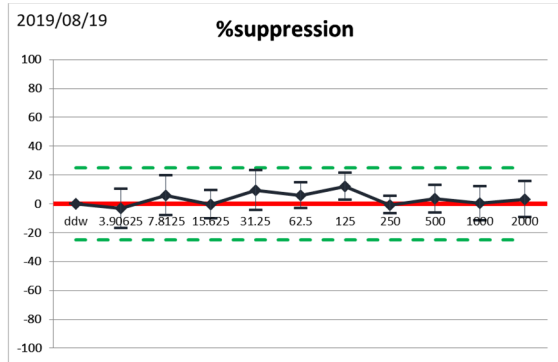
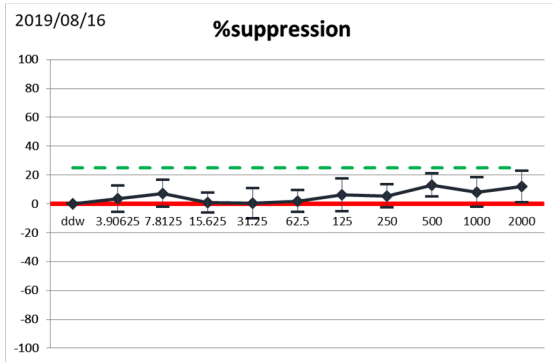
<MTC322>



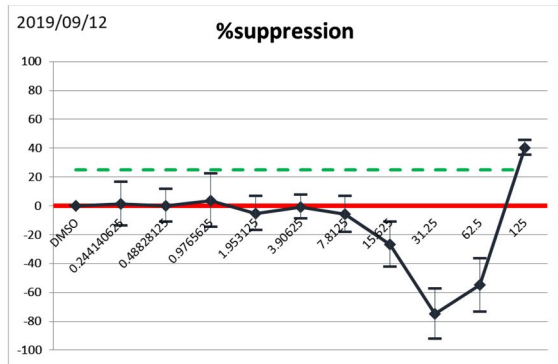
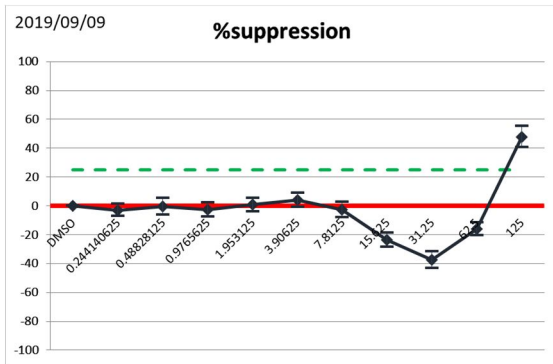
<MTC313>



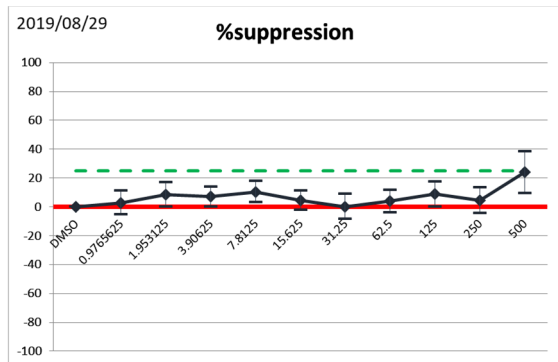
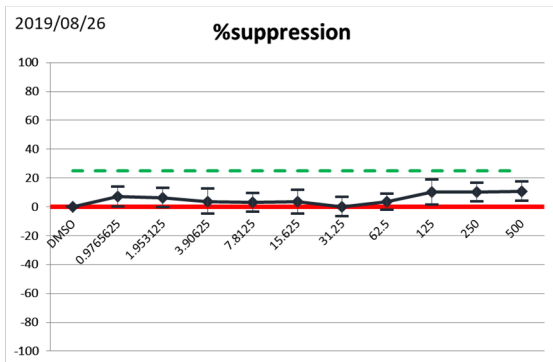
<MTC317>



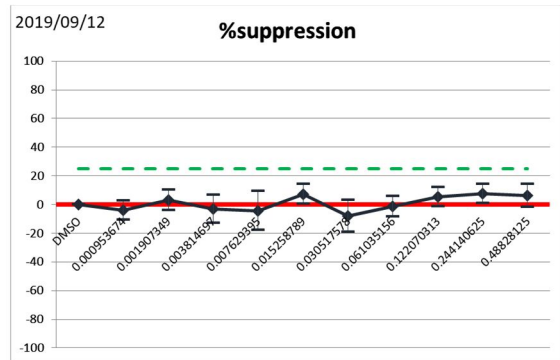
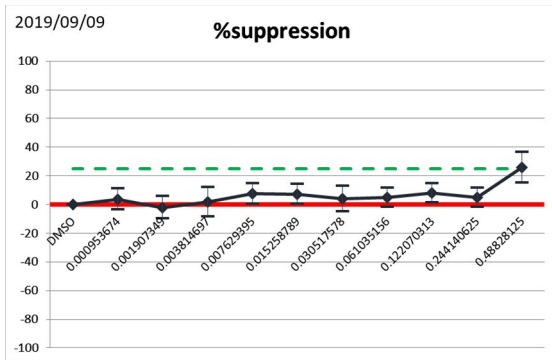
<MTC324>



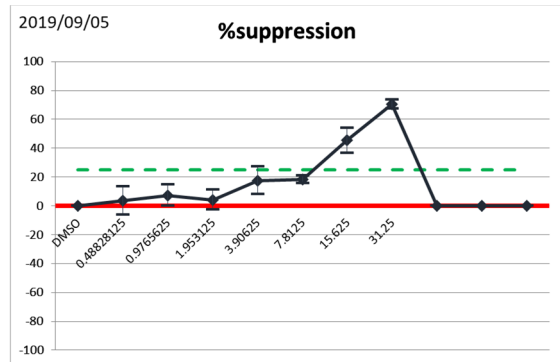
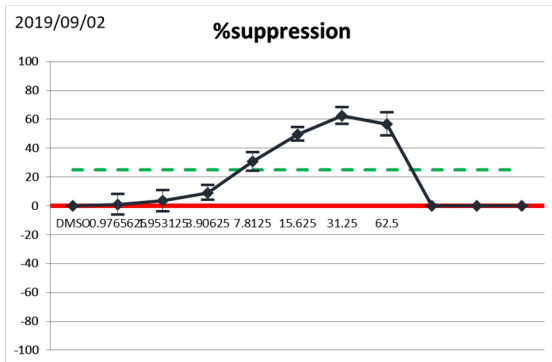
<MTC309>



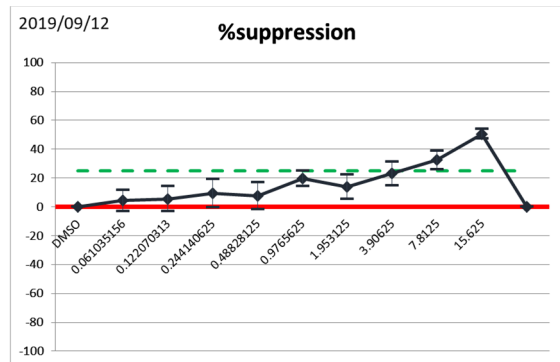
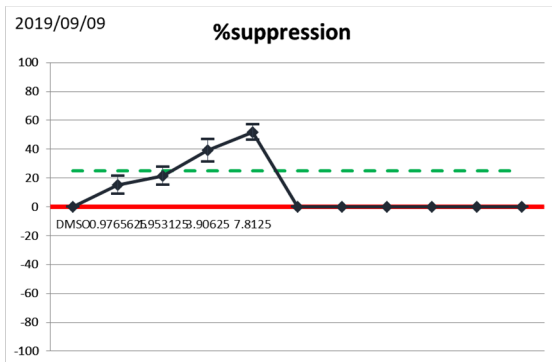
<MTC316>



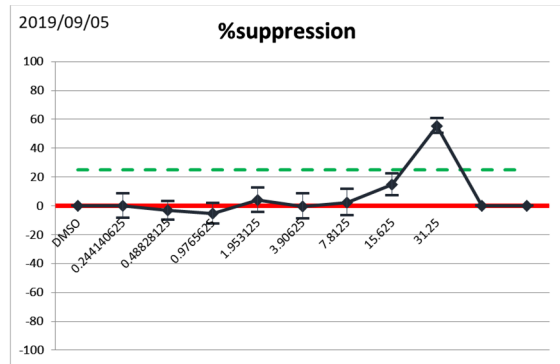
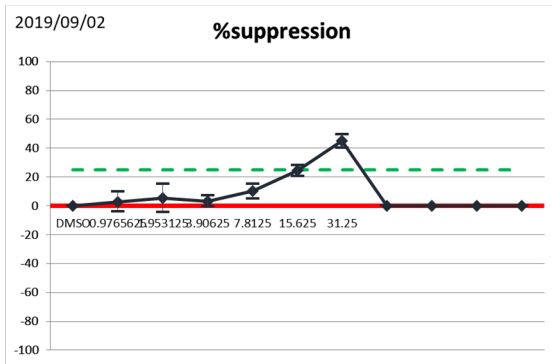
<MTC315>



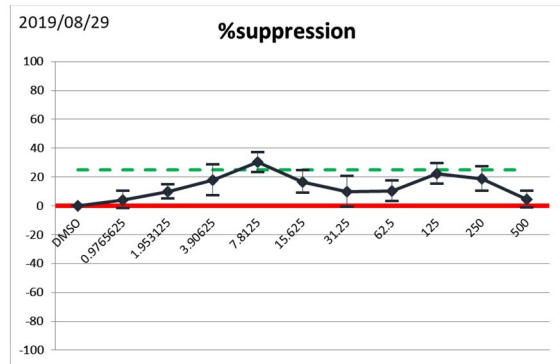
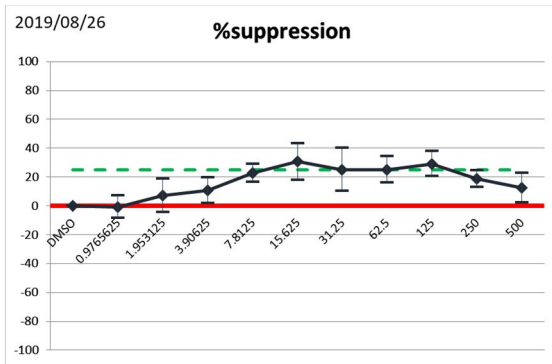
<MTC323>



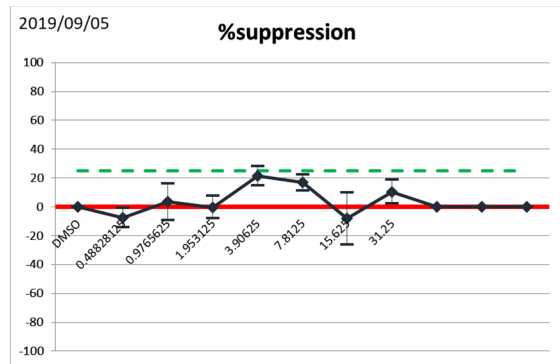
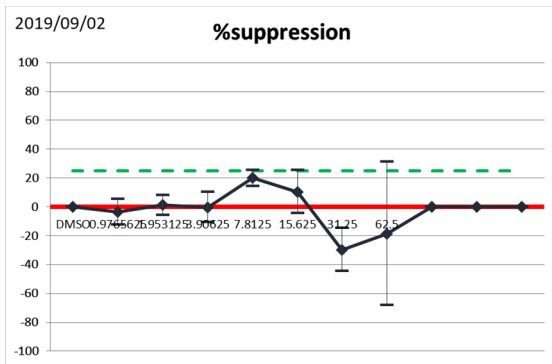
<MTC314>



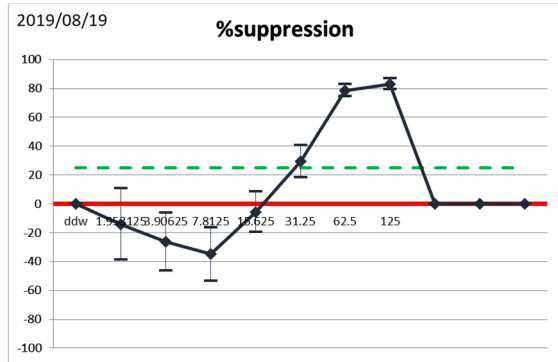
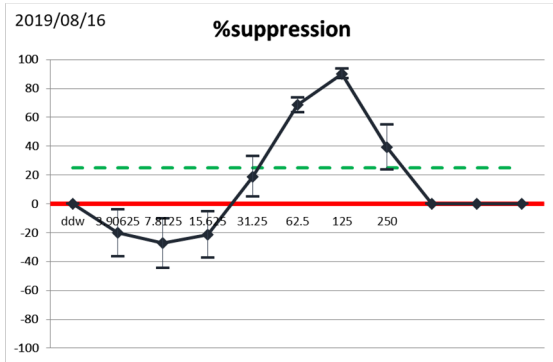
<MTC306>



<MTC311>



<MTC304>



<MTC327>

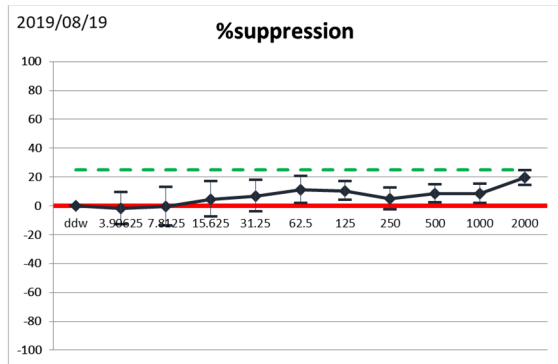
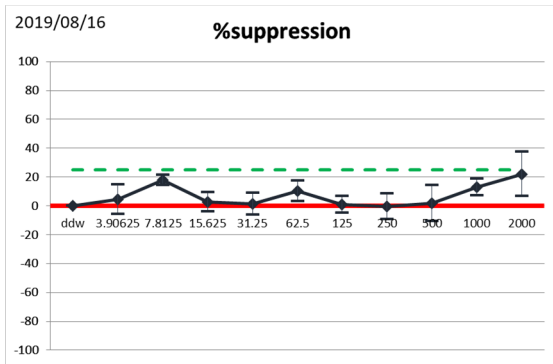


表 2 . 試験化学物質の評価

コード番号	試験回数				判定
	1	2	3	4	
MTC305	S	S			S
MTC301	S	N	N		N
MTC318	S	S			S
MTC307	S	S			S
MTC302	N	N			N
MTC312	R	N	N		N
MTC303	S	S			S
MTC322	R	N	S	N	N
MTC313	S	S			S
MTC317	N	N			N
MTC324	N	N			N
MTC309	N	N			N
MTC316	N	N			N
MTC315	S	S			S
MTC323	S	S			S
MTC314	S	S			S
MTC306	S	S			S
MTC311	N	N			N
MTC304	S	S			S
MTC327	N	N			N

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