

( 具体的かつ詳細に記入すること )

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 細胞分子工学研究部門

#### 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、昨年度実施した Phase1 試験 ( 施設内再現性 ) に引き続き、コード化された 20 化学物質を用いて Phase2 試験を実施し、施設間再現性を確認した。

#### A . 研究目的

東北大学を中心に開発された 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 Phase2 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.009E 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。Phase2 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 20 種類のコード化された被験物質を供試した。各物質において 2 回の同一結果を得られるまで試験を繰り返して被験物質を判定した。

( 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

コード化された 20 種類の化学物質の試験結果 ( 図 1 ) および判定結果 ( 表 1 ) を示す。得られた試験結果のうち、Multi-Immuno

Tox Assay protocol 案 Ver.009E の Acceptance criterion をクリアしたのに関して、判定基準に準じ “suppression” または “non-suppression” の判定を行った。各被験試薬に対して、同一結果が 2 回得られた時点で最終判定とした。Acceptance criterion をクリアしなかった結果に関しては判定不可(表 1)とした。

#### D . 考察

昨年度実施した Phase1(施設内再現性)に引き続き、Phase2(施設間再現性)試験をコード化された 20 被験試薬を対して実施した。得られた判定結果を、他のバリデーション実施機関の結果を比較したところ、20 被験物質中 16 物質で結果が一致し(80%一致)良好な施設間再現性が確認された。結果が一致しなかった物質に関する各機関の%suppressionカーブを比較すると、ほぼ同様の傾向が見られた。例えば MIB202 に関して、他の 2 機関が Non-suppression に対し、我々の結果では Suppression 判定であったが、東北大学の試験結果を比較すると、被験物質の濃度 1.953mg/ml においてのみ%suppression 25%を超える positive を示し、それより低濃度域では Non-suppression という結果が一致している。際どいところで「positive を含む 3 点の連続的上昇」有無の判断が分かれ、Criteria に準じた判定では異なる結果となったものの、実際の試験結果はほぼ同一であった。一方、産総研四国では被験物質の希釈率が高く、1.953mg/ml 未満の濃度で判定を行っており、同じ希釈率で判断した場合、同様の試験結果が得られる可能性もある。Phase2 試

験では、参画施設間の再現性は非常によく一致しており、不一致だった物質に関しては判断基準の境界のもの、または希釈濃度の違いによるものがほとんどであった。

#### 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 (Phase2) を実施した。バリデーション参加の 3 機関の結果を検討した結果、80% の物質で同一の結果が得られ、施設間再現性が確認された。

#### F . 健康危険情報 該当なし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yutaka Kimura, Rie Yasuno, Mika Watanabe, Miwako Kobayashi, Tomoko Iwaki, Chizu Fujimura, Yoshihiro Ohmiya, Kohji Yamakage, Yoshihiro Nakajima, Mayumi Kobayashi, Nana Mashimo, Yumi Takagi, Takashi Omori, Emanuela Corsini, Dori Germolec, Tomoaki Inoue, Erwin L. Rogen, Hajime Kojima, Setsuya Aiba: An international validation study of the IL-2L2L2 assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for referenced data for immunotoxic chemicals. Toxicology in Vitro 66(2020)

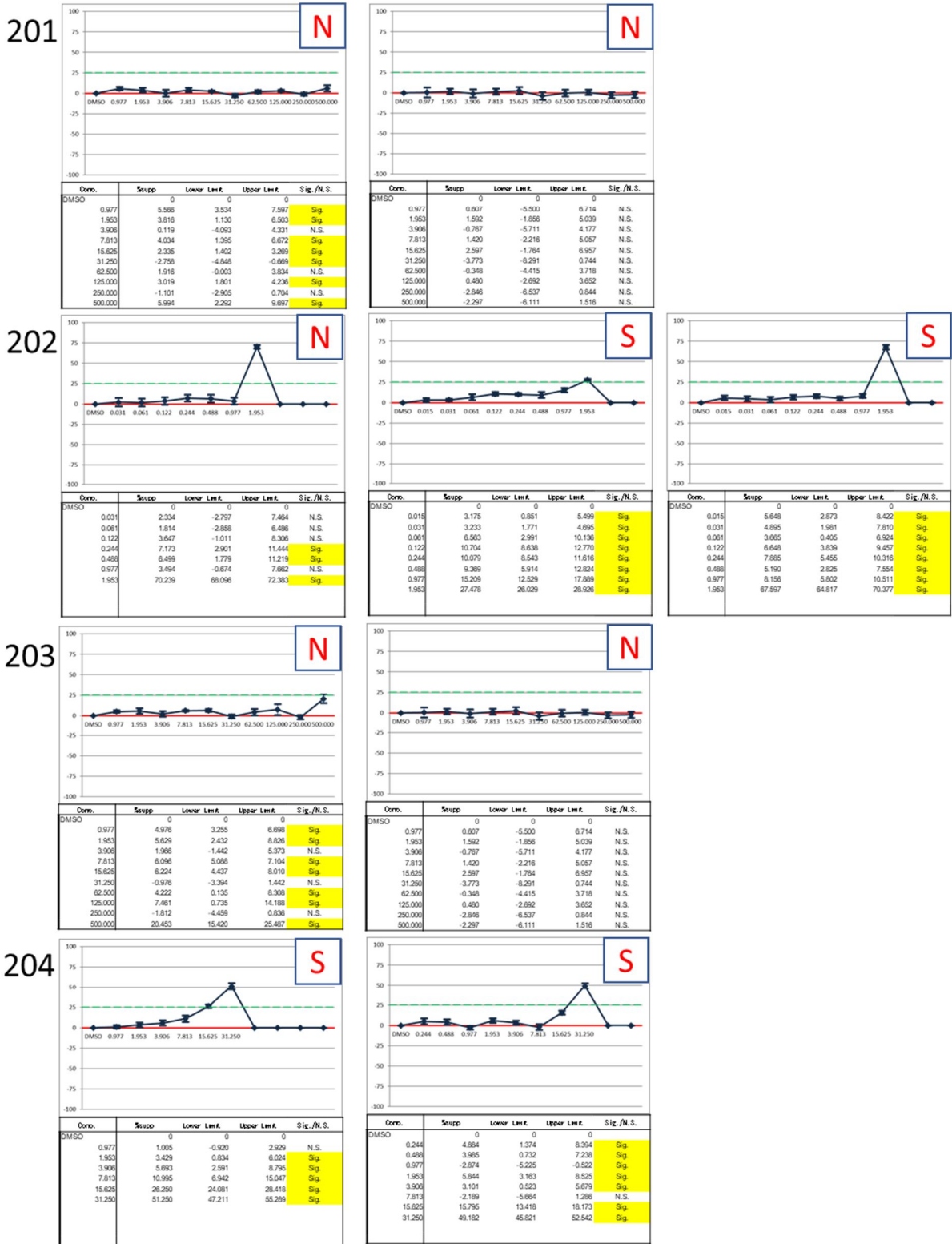
##### 2. 学会発表

1) 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、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 日本動物実験代替法学会 第 32 回大会 つくば (2019.11)

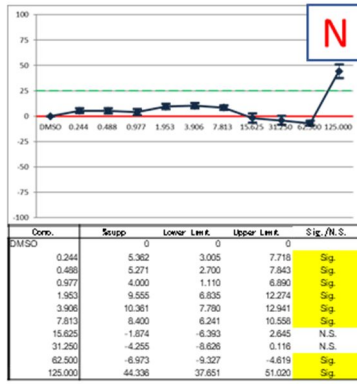
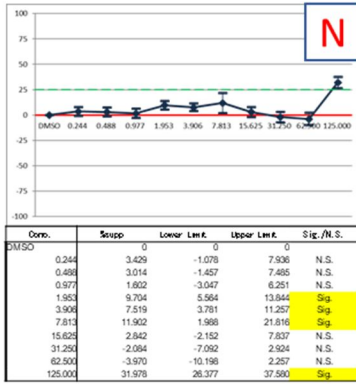
#### H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

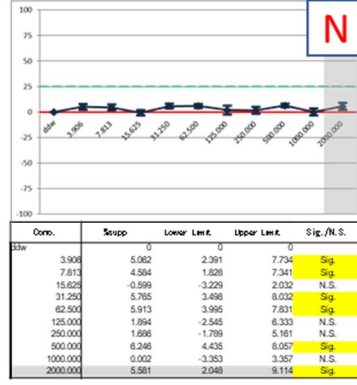
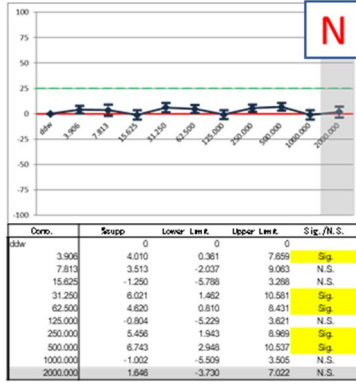
図1 Phase2試験；各被験試薬の解析結果



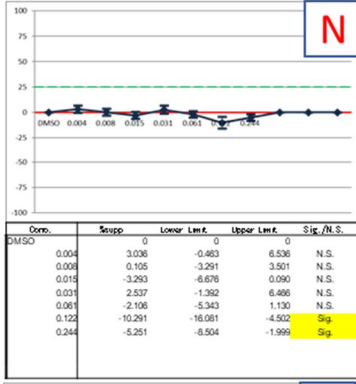
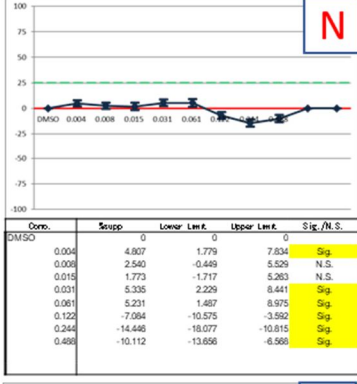
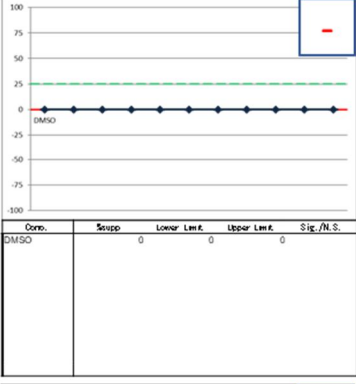
205



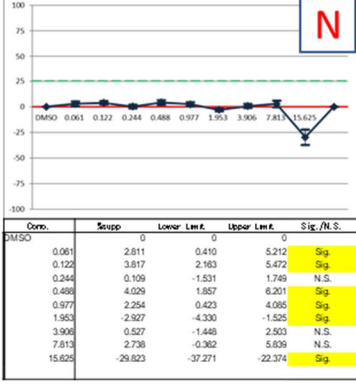
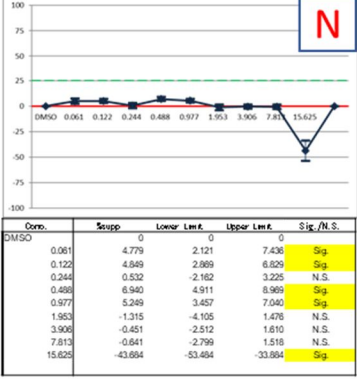
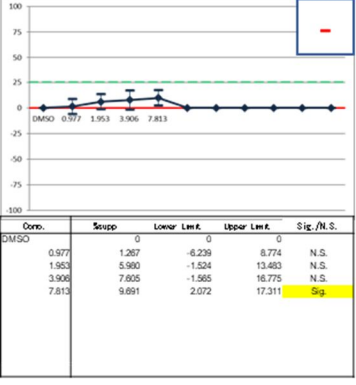
206



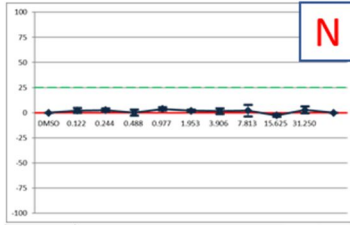
208



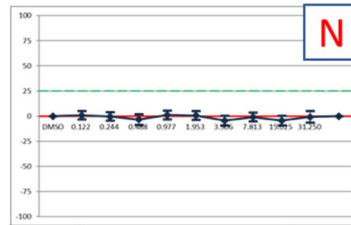
210



211

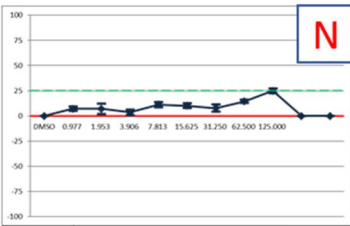


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.122	2.152	-0.268	4.631	Sig.
0.244	2.625	1.057	4.194	Sig.
0.488	0.116	-2.726	2.959	N.S.
0.977	3.806	2.181	5.432	Sig.
1.953	1.926	0.880	3.001	Sig.
3.906	1.559	-1.254	4.371	N.S.
7.813	2.091	-3.542	7.724	N.S.
15.625	-2.605	-4.021	-1.186	Sig.
31.250	2.814	-0.629	6.257	N.S.

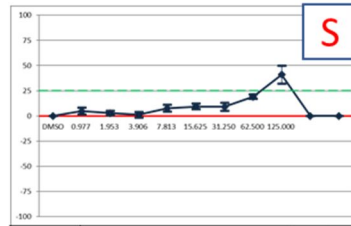


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.122	0.799	-3.375	4.972	N.S.
0.244	-0.379	-4.549	3.790	N.S.
0.488	-3.472	-8.927	1.963	N.S.
0.977	1.064	-3.167	5.335	N.S.
1.953	0.527	-3.833	4.867	N.S.
3.906	-4.429	-9.203	0.406	N.S.
7.813	-0.978	-5.302	3.350	N.S.
15.625	-4.437	-9.152	0.277	N.S.
31.250	-0.770	-6.433	4.892	N.S.

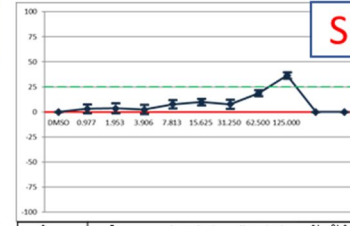
214



Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	7.164	5.099	9.230	Sig.
1.953	7.024	2.012	12.037	Sig.
3.906	3.469	0.590	6.346	Sig.
7.813	11.279	8.733	13.826	Sig.
15.625	10.161	7.785	12.556	Sig.
31.250	7.655	4.094	11.217	Sig.
62.500	14.505	12.910	16.099	Sig.
125.000	24.939	22.503	27.374	Sig.

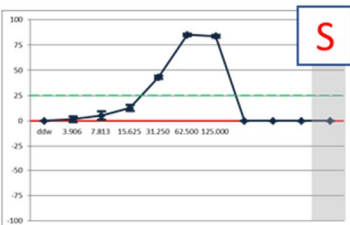


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	4.787	1.507	8.068	Sig.
1.953	2.776	0.521	5.031	Sig.
3.906	1.170	-1.614	3.954	N.S.
7.813	7.579	4.154	11.024	Sig.
15.625	9.277	6.549	12.005	Sig.
31.250	9.118	5.178	13.059	Sig.
62.500	18.959	16.712	21.205	Sig.
125.000	40.944	31.895	49.994	Sig.

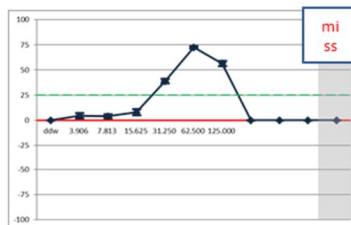


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	3.044	-1.233	7.322	N.S.
1.953	3.624	-1.266	8.513	N.S.
3.906	2.307	-2.052	6.937	N.S.
7.813	7.669	3.420	11.915	Sig.
15.625	9.809	6.708	12.909	Sig.
31.250	7.611	3.106	12.116	Sig.
62.500	18.637	15.738	21.537	Sig.
125.000	36.396	33.268	39.525	Sig.

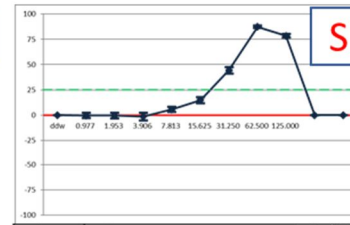
216



Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
3.906	1.499	-1.203	4.181	N.S.
7.813	5.174	1.139	9.208	Sig.
15.625	12.570	9.604	15.536	Sig.
31.250	43.069	41.355	44.781	Sig.
62.500	85.077	84.073	86.081	Sig.
125.000	83.759	82.255	85.263	Sig.

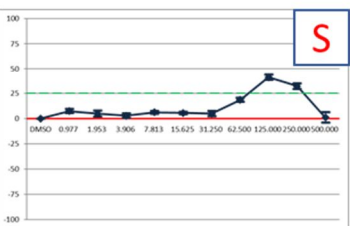


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
3.906	4.416	1.732	7.079	Sig.
7.813	3.900	1.869	5.932	Sig.
15.625	7.921	4.931	10.911	Sig.
31.250	36.961	36.549	41.172	Sig.
62.500	72.458	71.336	73.579	Sig.
125.000	66.484	53.882	58.106	Sig.

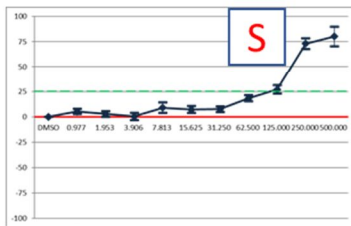


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	-0.396	-2.963	2.190	N.S.
1.953	-0.467	-3.204	2.269	N.S.
3.906	-1.510	-5.340	2.319	N.S.
7.813	6.997	3.096	8.096	Sig.
15.625	14.886	11.886	17.886	Sig.
31.250	44.254	40.968	47.520	Sig.
62.500	87.372	86.106	88.637	Sig.
125.000	78.426	76.722	80.130	Sig.

217

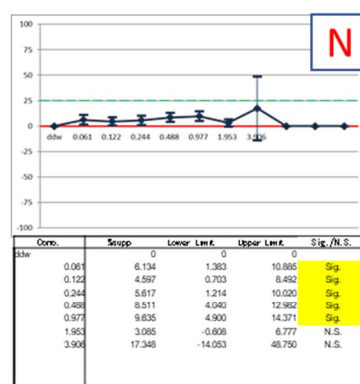
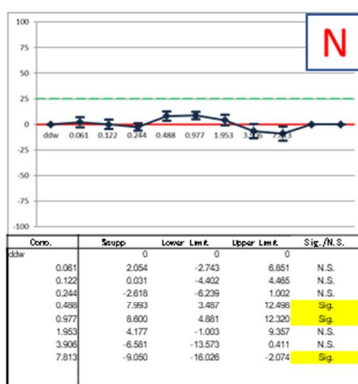
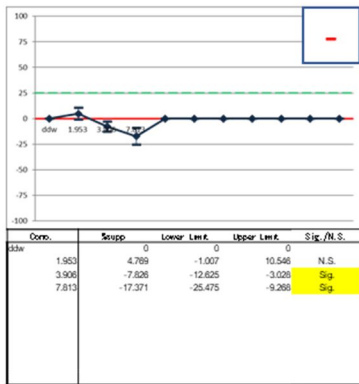


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	7.336	5.411	9.260	Sig.
1.953	4.602	1.835	7.769	Sig.
3.906	2.796	0.469	5.127	Sig.
7.813	6.013	4.534	7.492	Sig.
15.625	5.506	4.285	6.727	Sig.
31.250	4.792	2.382	7.202	Sig.
62.500	18.391	16.506	20.276	Sig.
125.000	40.774	38.135	43.413	Sig.
250.000	31.966	29.125	34.851	Sig.
500.000	0.976	-4.098	6.049	N.S.

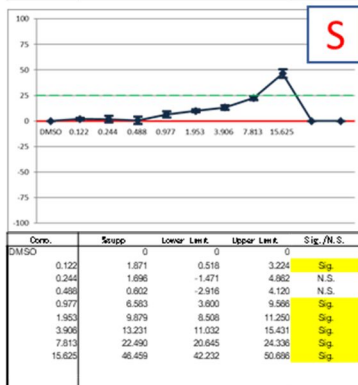
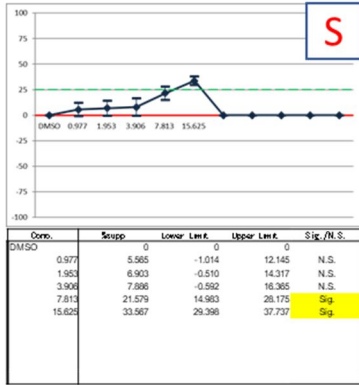


Concn.	Susp.	Lower Limt.	Upper Limt.	Sig./N.S.
DMSO	0	0	0	N.S.
0.977	5.096	2.547	7.645	Sig.
1.953	2.862	-0.018	5.340	N.S.
3.906	0.273	-3.374	3.900	N.S.
7.813	6.974	3.865	14.083	Sig.
15.625	7.017	3.643	10.392	Sig.
31.250	7.408	4.813	10.004	Sig.
62.500	18.228	15.251	21.205	Sig.
125.000	27.006	22.768	31.245	Sig.
250.000	73.060	67.695	78.425	Sig.
500.000	60.152	70.545	68.758	Sig.

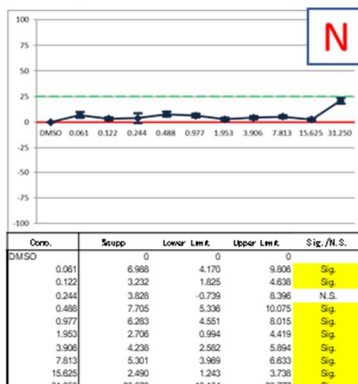
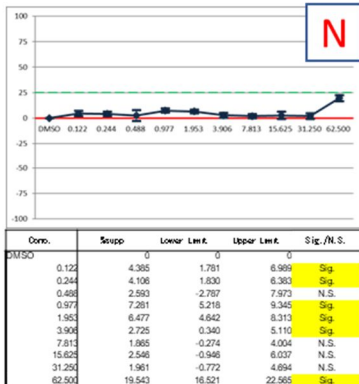
218



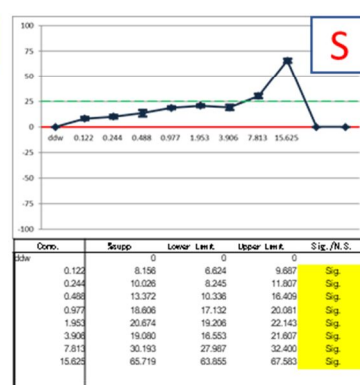
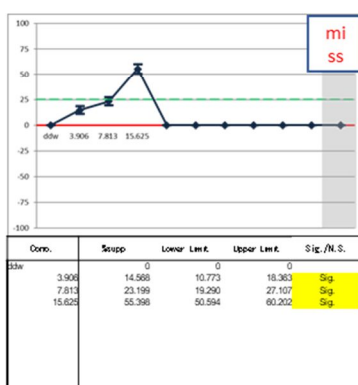
219



220

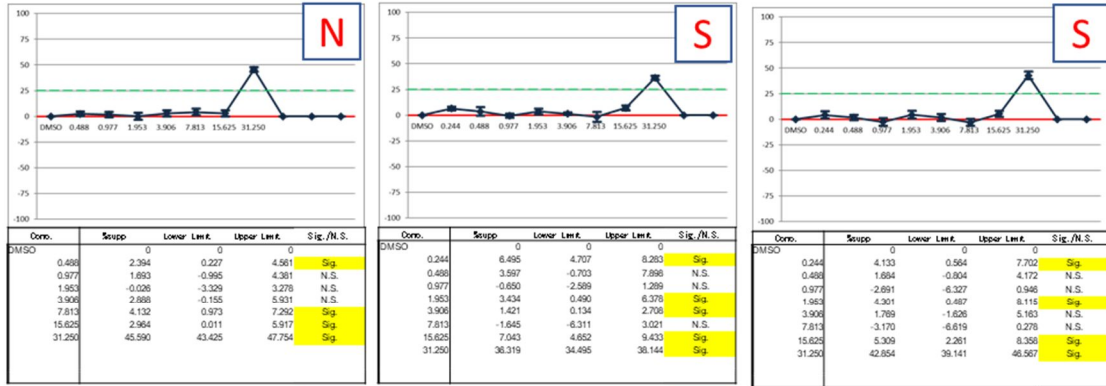


221

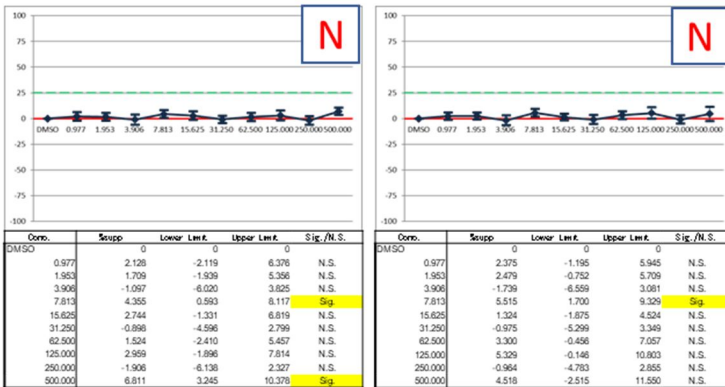




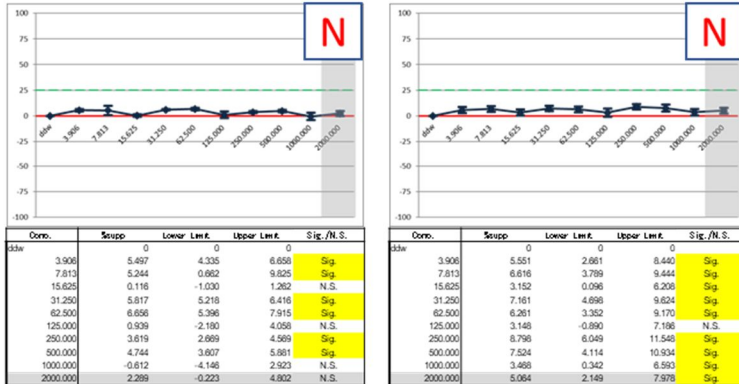
222



223



224



227

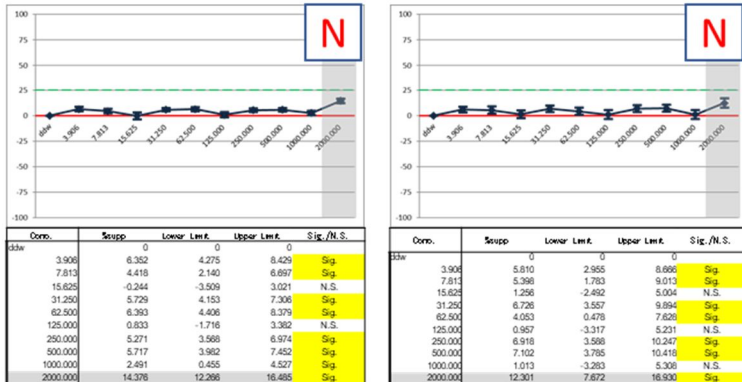


表 1 Phase2 試験；評価結果

MIB	1st	2nd	3rd	Judge
201	N	N	-	<b>N</b>
202	N	S	S	<b>S</b>
203	N	N	-	<b>N</b>
204	S	S	-	<b>S</b>
205	N	N	-	<b>N</b>
206	N	N	-	<b>N</b>
208	- 判断不可	N	N	<b>N</b>
210	- 判断不可	N	N	<b>N</b>
211	N	N	-	<b>N</b>
214	N	S	S	<b>S</b>
216	S	miss 希釈を間違えた	S	<b>S</b>
217	S	S	-	<b>S</b>
218	- 判断不可	N	N	<b>N</b>
219	S	S	-	<b>S</b>
220	N	N	-	<b>N</b>
221	S	miss 希釈を間違えた	S	<b>S</b>
222	N	S	S	<b>S</b>
223	N	N	-	<b>N</b>
224	N	N	-	<b>N</b>
227	N	N	-	<b>N</b>

S; Suppression

N; Non-suppression