

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 31 年度分担研究報告書  
分担研究報告書

分担研究報告書  
免疫毒性評価試験法 Multi-ImmunoToxicity assay の判定アルゴリズムの検討  
研究分担者 大森崇  
神戸大学医学研究科 生物統計学分野

## 研究要旨

**[背景と目的]** Multi-Immuno Tox Assay(以下、MITA)は、化学物質がヒトの免疫系に与える影響を評価することを目標とする *in vitro* で試験法である。現在、バリデーション研究が実施されている IL-2 Luc アッセイ及び IL-1 $\beta$  Luc アッセイの免疫毒性判定の方法は、過去の研究に基づき経験的に設定されているが、判定方法は複雑である。将来、これらのアッセイが広く利用されるようにするために自動的に判定できるアルゴリズムが提示されることが望ましい。IL-1 $\beta$  Luc アッセイのバリデーション研究が進むにつれ、IL-1 $\beta$  Luc アッセイの判定方法が新たに設定されたため、新たな判定アルゴリズムを作成することを目的とする。

**[方法]** バリデーション研究を通して提案された判定方法について、アルゴリズムを作成し、統計解析ソフトにアルゴリズムを実装し適用した。

**[結果]** 2 つ前からの濃度における反応の指標とその 95%信頼区間、カットオフ値を用いて 5 つのステップからなる判定アルゴリズムを開発した。バリデーション研究で実施された実際のデータにアルゴリズムを適用し、判定結果が含まれる図を描き判定を確認した。

**[結論]** これまで濃度反応関係の図を参照しながら基準に照らし合わせていた判定について、判定ルールを実装可能なアルゴリズムを開発できた。このアルゴリズムをデータシート上で実装することが今後の課題である。

## A. 研究目的

Multi-Immuno Tox Assay(以下、MITA)は、化学物質が免疫系に与える影響を簡便に評価するための光レポーターを利用した *in vitro* 免疫毒性評価試験法である。現在、IL-2 Luc アッセイ及び IL-1 $\beta$  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) としての公定化を目指し、バリデーション研究が施行されている。

IL-1 $\beta$  Luc アッセイでは、特定の化学物質の発現を評価は独立した 3 回の実験から得られる測定値を用いて行われ、最終的には immunosuppression、no effect のいずれかの判定がされる。バリデーション研究を行う中で、このアッセイに関する実験方法だけでなく、判定方法についても検討が行われてきた。これまでに、

- ・ 特定のある一濃度で発現が生じることがあるため、濃度別の統計的有意性のみで判定を行うと高感度になりすぎる

- ・濃度依存性のある程度考慮したい
  - ・他の試験法の判定で行われてきたように 3 回の試験の判定は独立に行うことが望ましい
  - ・特定の濃度以上は判定を行わない
- という意見を出し合い判定方法が決定された。

IL-1 $\beta$  Luc アッセイでは、測定値から各濃度別に計算される%suppression という指標についてその点推定値と 95%信頼区間とともに、カットオフ値と呼ばれる参照線を引いた図から読み取り判定を行う。このような判定は、濃度に対するその反応の図を必ず確認することになるという利点があるが、基準が複雑で誤りを犯しやすいという欠点も有する。

昨年度、判定アルゴリズムを報告したが、IL-1 $\beta$  Luc アッセイのバリデーション研究が進行するに伴い、IL-1 $\beta$  Luc アッセイに対する判定方法は先行してバリデーション研究が実施された IL-2 Luc アッセイとは別の判定方法を採用することが必要となった。本報告では IL-1 $\beta$  Luc アッセイに対する判定方法の説明とその判定を自動的に行うアルゴリズムを開発することを目的として行った検討について記載する。

## B. 研究方法

### IL-1 $\beta$ Luc アッセイのデータの特徴

IL-1 $\beta$  Luc アッセイでは、独立に実施された 3 回の試験が行われる。個々の試験は濃度 0(DMSO)群と各濃度群との対比較により、判定を行う。1 回の試験には、96 穴プレートが用いられ、溶媒を用いた濃度 0 と濃度 1～濃度 10 までの計 11 段階の濃度群の測定値が得られる。個々の濃度群では 4 回の繰り返しがある。これらの測定値から、濃度ごとに、濃度 0 に対する被験物質の抑制割合を示す%suppression という 1 つの要約指標を計算できる。測定値に繰り返しがあるため、誤差的な変動を考慮して 95%信頼区間を構成できる。

### 各実験から得られる測定値と指標について

1 回の実験において、96 穴プレートの各セルから SLG-LA (SLG ルシフェラーゼ活性)、SLO-LA (SLO ルシフェラーゼ活性)、SLR-LA (SLR ルシフェラーゼ活性) の 3 種類の発光に関する測定値が得られる。化学物質の評価において、第  $i$  番目の濃度 ( $i=0,1,2,\dots,10$ ) の第  $j$  番目の繰り返しの測定値をそれぞれ SLG-LA $_{ij}$ 、SLO-LA $_{ij}$ 、SLR-LA $_{ij}$  とする。

これらの測定値を用いて、判定のための指標が得られる。

$$\begin{aligned} \text{I.I. SLR-LA}_i &= (\overline{\text{SLR-LA}}_i) / (\overline{\text{SLR-LA}}_0), \\ \text{nSLG-LA}_{ij} &= \text{SLG-LA}_{ij} / \text{SLR-LA}_{ij}, \\ \% \text{suppression}_i &= \left\{ 1 - \left( \overline{\text{nSLG-LA}}_i \right) / \left( \overline{\text{nSLG-LA}}_0 \right) \right\} \times 100, \end{aligned}$$

ただし、

$$\begin{aligned} \overline{\text{SLG-LA}}_i &= \sum_{j=1}^{n_i} \text{SLG-LA}_{ij} / n_i, \\ \overline{\text{SLR-LA}}_i &= \sum_{j=1}^{n_i} \text{SLR-LA}_{ij} / n_i \end{aligned}$$

であり、 $n_i$  は第  $i$  濃度の繰り返し数であり実質 4 である。

%suppression $_i$  は、第  $i$  濃度での免疫毒性の程度を%換算した値である。この指標は基本的には平均値の比であるため、デルタ法を用いてその 95%信頼区間を構成することができる。

I.I. SLR-LA $_i$  は細胞の状態が正常かどうかを判断するための指標である。

### IL-1 $\beta$ Luc アッセイの実験ごとの判定

アッセイの最終的な判定は各実験の判定である「Suppression」が「No effect」に基づき行われる。各実験の免疫毒性ありの判定は以下の 3 つの基準をすべて満たした場合からなる。

1. ある濃度の%suppression の値がカットオフ値上限以上でかつ 95%信頼区間の下限が 0 よりも大きい、もしくは ある濃度の%suppression がカットオフ値下限以下で 95%信頼区間の上限が 0 よりも小さい。(1)

2. (1)に対して

隣り合ういずれかの 2 濃度で 95%信頼区間の下限が 0 より大きくそれぞれの%suppression の値がカットオフの上限より大きくなるか、95%信頼区間の上限が 0 より小さくそれぞれの%suppression の値がカットオフの上限より小さくとなる。(2-1)

または、ある 1 濃度で 95%信頼区間の下限が 0 より大きくなる場合にその濃度を含めた続く 3 濃度の%suppression の値が増加傾向を示すか、95%信頼区間の上限が 0 より小さくなる場合にその濃度を含めた続く 3 濃度の%suppression の値が減少傾向を示す。ただし、この場合、%suppression の値が 0 をまたいでよいのは 1 濃度のみであり、0 をまたいだ濃度の 95%信頼区間の上限が 0 以下にならないもしくは下限が 0 以上にならない。(2-2)

3. I.I.-SLR-LA が 0.05 以上となる濃度が判定では有効となる濃度である。

### 本研究の検討

本研究では上記の判定アルゴリズムを導出して、統計ソフト SAS に実装した。

### C . 研究結果

#### 判定アルゴリズム

基準(3)に対して有効な濃度の測定値を用いることにする。

基準(2-2)では、続く 3 濃度の%suppression の値の大小関係が必要となるため、同時に 3 濃度を比べる必要がある。第  $i$  濃度の%suppression である  $\%suppression_i$  に対して、1 つ前の濃度の値を  $\%suppression_i^{(-1)}$ 、2 つ前の濃度の値を

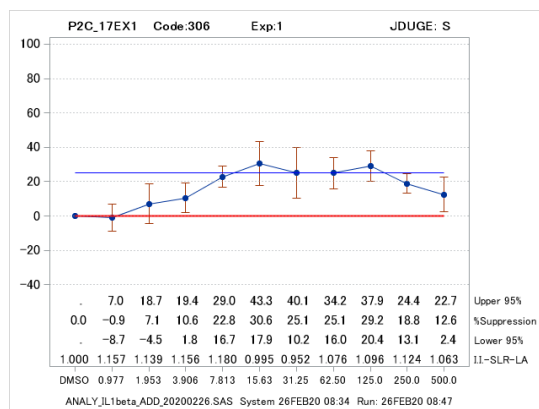
$\%suppression_i^{(-2)}$  とする。

基準(2.1)では、隣り合う 2 つの%suppression の 95% 信頼区間の比較を行うことになる。 $\%suppression_i$  の 95%信頼区間の下限を  $Lower_i$ 、上限を  $Upper_i$  とし、これらの 95%信頼区間に対して、一つ前の濃度の下限を  $Lower_i^{(-1)}$ 、上限を  $Upper_i^{(-1)}$ 、2 つ前の濃度の下限を  $Lower_i^{(-2)}$ 、上限を  $Upper_i^{(-2)}$  とする。

また、カットオフ値の上限 (Suppression に関する) を  $Cut^{(S)}$  とする。

#### Step 1

濃度が 2000 を超えるデータを除外する。



全ての濃度の I.I.SLR-LA $_i$  < 0.05 となる  $\%suppression_i$  を欠測とする。

#### Step 2

以下の条件を満たした場合に新しい変数 TwoSig-S $_i$  を 1、そうでない場合は 0 とする。

$Lower_i^{(-1)} > 0$  かつ  $Lower_i > 0$

#### Step 3

以下の条件を満たした場合に新しい変数 Trend-S $_i$  を 1、そうでない場合は 0 とする。

$\%suppression_i^{(-1)} > 0$  かつ  $\%suppression_i > 0$   
 かつ  
 $\%suppression_i^{(-2)} < \%suppression_i^{(-1)}$   
 かつ  
 $\%suppression_i^{(-1)} < \%suppression_i$

かつ  
 $Upper_i^{(-2)} > 0$

**Step 4**

以下の条件を満たした場合に新しい変数 IndConc-S<sub>i</sub> を 1、そうでない場合は 0 とする。

{TwoSig-S<sub>i</sub> = 1 かつ %suppression<sub>i</sub> > Cut<sup>(S)</sup>  
 かつ %suppression<sub>i</sub><sup>(-1)</sup> > Cut<sup>(S)</sup>}

または

{Trend-S<sub>i</sub> = 1 かつ Lower<sub>i</sub> > 0  
 かつ %suppression<sub>i</sub> > Cut<sup>(S)</sup>}

**Step 5**

いずれかの濃度で IndConc-S<sub>i</sub> = 1 の場合に  
 それ以外の場合には No effect とする。

**判定アルゴリズムの実装**

IL-1β Luc アッセイのバリデーション研究では、最終的に、カットオフ値は 25 とし、検討を行った。このバリデーション研究で行われたいくつかの実験データについて濃度と %suppression とその 95% 信頼区間の図とともに上記の判定アルゴリズムによる結果を出力できるように作成した図を図 1 と図 2 に示す。図中の S が Suppression、N が No effect を示しており、図 1 が Suppression の例、図 2 が No effect の例である。

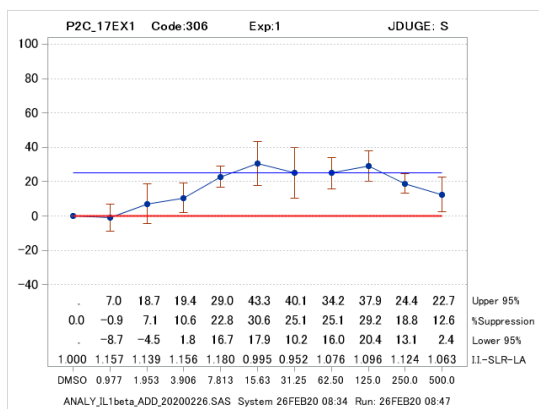


図 1a Suppression と判定される例

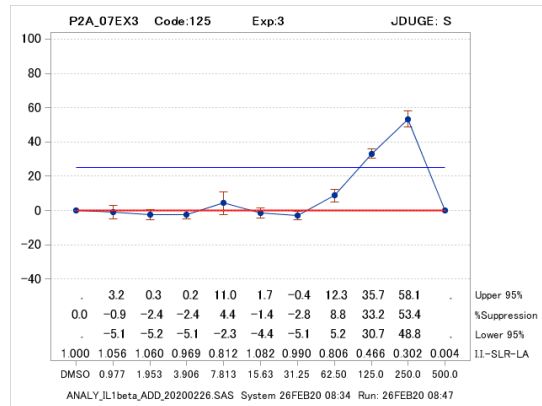


図 1b Suppression と判定される例

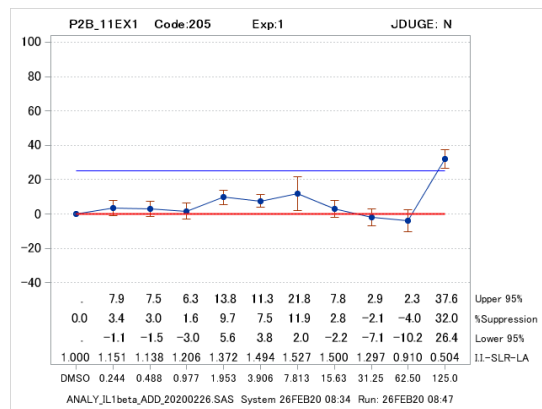


図 2b No effect と判定される例

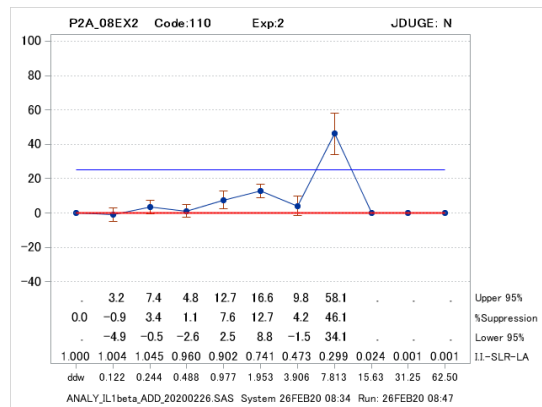


図 2b No effect と判定される例

**D. 考察**

MITA の IL-2 Luc アッセイはすでにバリデーションが終了しており、IL-1β Luc アッセイの施設内お

よび施設間再現のバリデーション研究が終了したところである。これまで、アッセイの免疫毒性の判定は%suppression の濃度反応曲線のグラフから読み取ることで行われている。図1と図2に示す4つのグラフから瞬時に Suppression であるか No effect であるかを判断することは難しい。現在は、図を描くことで複数の目でチェックを行いながらバリデーション研究を行っているが、判定結果を誤る可能性が否定できない。

これらのアッセイが広く利用できるようになる際には、本研究で検討したアルゴリズムをデータシートに組み込むことで、これまで費やされてきた多くの負担を減らすことができるであろう。

#### **F . 健康危険情報**

なし。

#### **G . 研究発表**

Kimura Y, Yasuno R, Watanabe M, Kobayashi

M, Iwaki T, Fujimura C, Ohmiya Y, Yamakage K, Nakajima Y, Kobayashi M, Mashimo N, Takagi Y, Omori T, Corsini E, Germolec D, Inoue T, Rogen EL, Kojima H, Aiba S. An international validation study of the IL-2 Luc assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for reference data for immunotoxic chemicals. *Toxicol In Vitro*. 2020. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104832.

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

#### **参考文献**

1) Delwiche, L. D. and Slaughter, J. S. The little SAS book a primer 5<sup>th</sup> ed. SAS, 2012.