

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 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

IL-2 プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼ、IFN $\gamma$ プロモーター活性を橙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 GAPDH 活性を赤色ルシフェラーゼでモニターするヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞（2H4 細胞）を用いた化学物質免疫毒性評価系 IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) の Phase 0 および Phase I バリデーション試験を実施した。

A. 研究目的

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ヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞（2H4 細胞）は、IL-2 レポーター活性抑制評価系（IL-2 Luc assay）として Validation 試験を実施し OECD ガイドライン化に向けて進行中である。今年度はさらに、IL-2 活性と同時に 2H4 細胞の細胞増殖や代謝活性阻害の指標を追加することで、これまで見逃していた免疫抑制物質を正確に評価できる系として構築された IL-2 Luc leukocyte toxicity test (LTT) の Validation 試験 Phase 0 および Phase 1 を実施する。

B. 研究方法

IL-2 と IFN- $\gamma$ 、および内部標準としての G3PDH プロモーターにそれぞれ SLG、SLO および SLR ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターを Jurkat 細胞に導入した 3 色発光細胞株 2H4 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については IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT)

protocol ver. 001.2 (Phase 0) および ver. 001.3 (Phase 1) 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。

試験化学物質として Phase 0 では 3 物質 (Bleomycin, Dexamethasone, 6-Thioguanine)、Phase I では 1 セット 5 種類のコード化した被験物質 3 セットを供試した。

（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

C-1. Phase 0 ;

Phase 0 study では技術移転の確認のため、Bleomycin, Dexamethasone, 6-Thioguanine の 3 物質について試験を行った。試験の結果を図 1 に、判定結果を表 1 に示す。得られた結果のうち、Acceptance criteria をクリアしたものに関して、IL-2 活性抑制 (%uppression) と細胞増殖 (Inh-GAPLA) 値を基準として、“Leukocyte toxic” または “Non-leukocyte toxic” の判定を行った。各物質において 2 回の同一結果を得られた時点で最終判定とした。Acceptance criteria をクリアしなかった試験結果 (nIFNLA, < 3.0) に関しては判定不可 (reject) とした。

C-2. Phase 1 ;

Phase 1 study では施設内再現性、施設間再現性を検討する目的で、コード化された 5 物質を 1 セットとする 3 セットを供試した。試験結果を図 2 に、各物質の判定結果を表 2 示

す。Phase 1の判定基準では、被験物質が不溶のためにIL-2発現や細胞増殖等に影響が出なかった場合を想定した”Indeterminate”の判定が追加されたが、今回の試験結果で該当する物質はなかった。

#### D. 考察

Phase 0 studyにおいて、3物質の判定結果は3施設間で一致しており、%suppressionの濃度依存的変動も類似の傾向が確認され、技術移転を確認できた。

引き続き行ったPhase 1 studyでは施設内再現性および施設間再現性の確認のために、コード化した5物質を1セットとし、3セットについて実験した。5物質のうち3物質がLeukocyte toxic、残り2物質がNon-leukocyte toxicと判定され、3セットすべてにおいて一致した。またこの結果は、他のバリデーション参加施設（東北大、産総研四国）とも完全に一致するものであり、参加3施設すべてにおいて施設内再現性は100%。また、施設間再現性も100%の結果が得られた。またPhase 0およびPhase 1で試験したすべての物質について、2回の試験で判定が一致し、3回目の試験を行うことなく評価が決定できたことも非常に安定した再現性の高い評価系システムであることを示しているものと考えられる。

MLB401,505,603のの物質に関して、判定は他の施設と一致したものの、高濃度域での%suppression curveの違いが確認された。当被験物質はDMSO溶解性で、細胞添加前にB-mediumで希釈する際、高濃度溶液は粘土状の沈殿物を形成する。そのため、希釈液のピペット吸引が困難で施設間で添加量の差が生じやすいと考えられる。おそらく、当施設では他施設に比べ沈殿物を多く含んで細胞に添加した結果、被験物質の高濃度域での細胞毒性がより顕著となり、細胞生存率が低くなった（=Inh-GAPLA<0.05）と考えられる。

#### E. 結論

IL-2転写誘導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 0 studyの結果を元にPhase 1 studyへ進むこととし、Phase 1 studyではコード化した5物質を1セットとして、3セットについて試験を実施した。得られた結果を比較して施設内および施設間再現性を検討したところ、どちらも100%という大変良好な結果が得られた。この結果はIL-2 Luc LTT assayの再現性が非常に高く、免疫毒性評価法として有望であることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., et al. 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: 66: 104832

##### 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、岡山 昂祐、高木 佑実、大森 崇、小島肇、相場 節也 Multi-ImmunoTox Assay (MITA) : IL-1 Luc assay バリデーション試験の結果 (ポスター) 日本動物実験代替法学会 第33回大会 Web開催 (2020.11)

#### 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

表1、Phase 0 被験物質の判定結果

	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	Judge
Bleomycin	reject	Non	reject	Non	Non
Dexamethasone	reject	Toxic	reject	Toxic	Toxic
6-Thioguanine	reject	Non	reject	Non	Non

Toxic; Leukocyte toxic  
 Non; Non-leukocyte toxic  
 reject; FlnSLO-LA<3.0のため判定基準を満たさず

図1、Phase1被験物質の試験結果

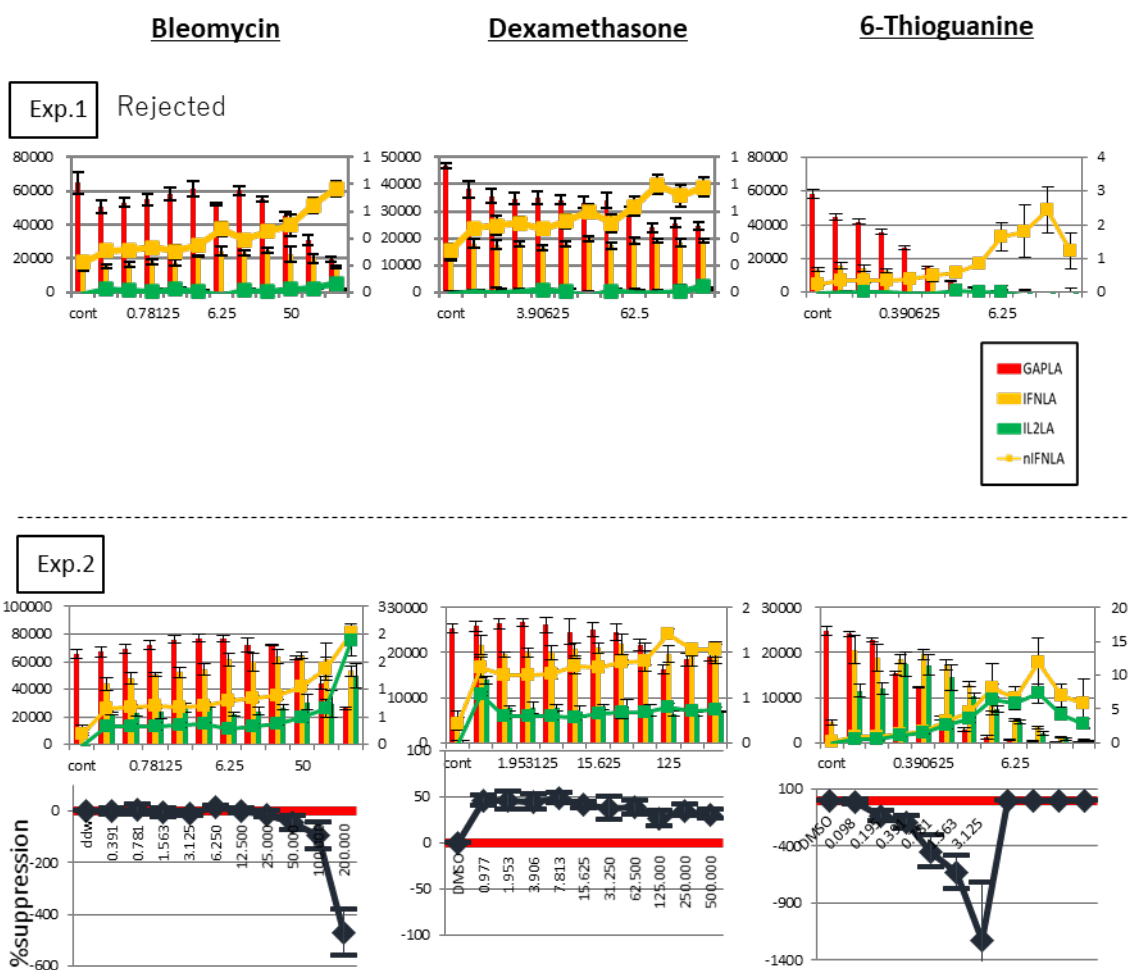


図1、Phase1被験物質の試験結果

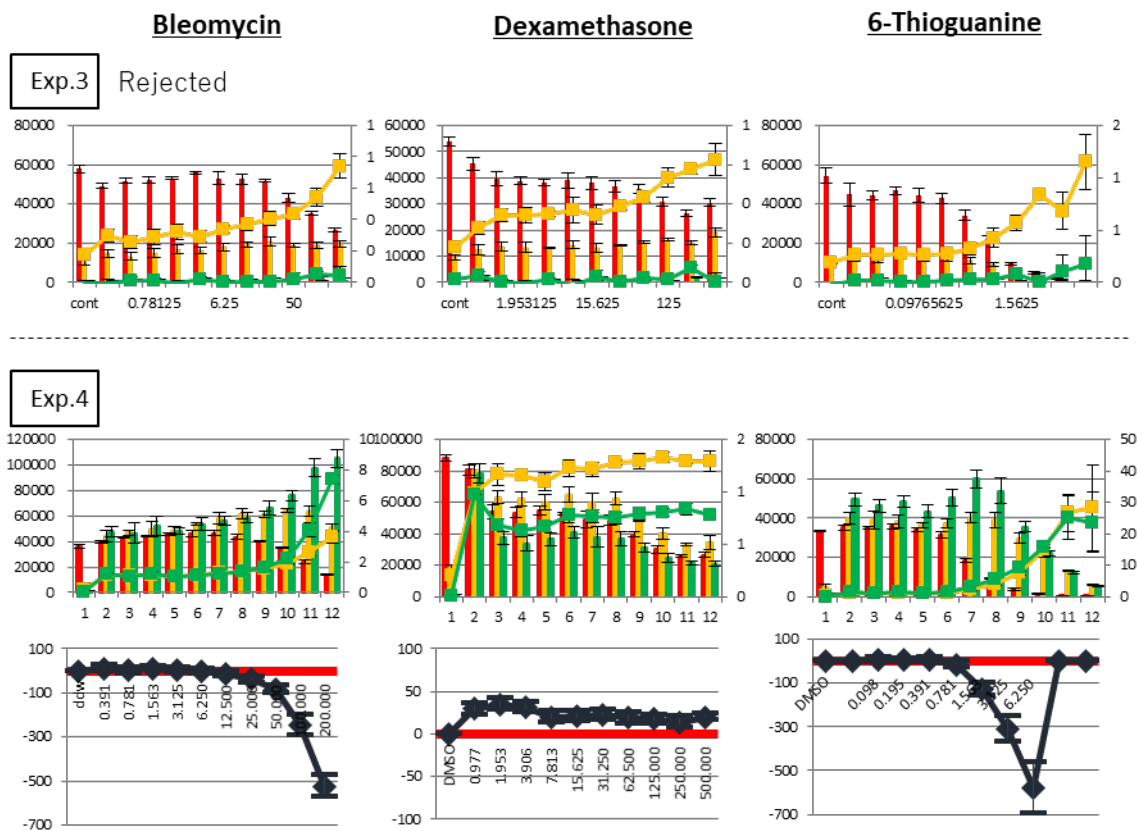
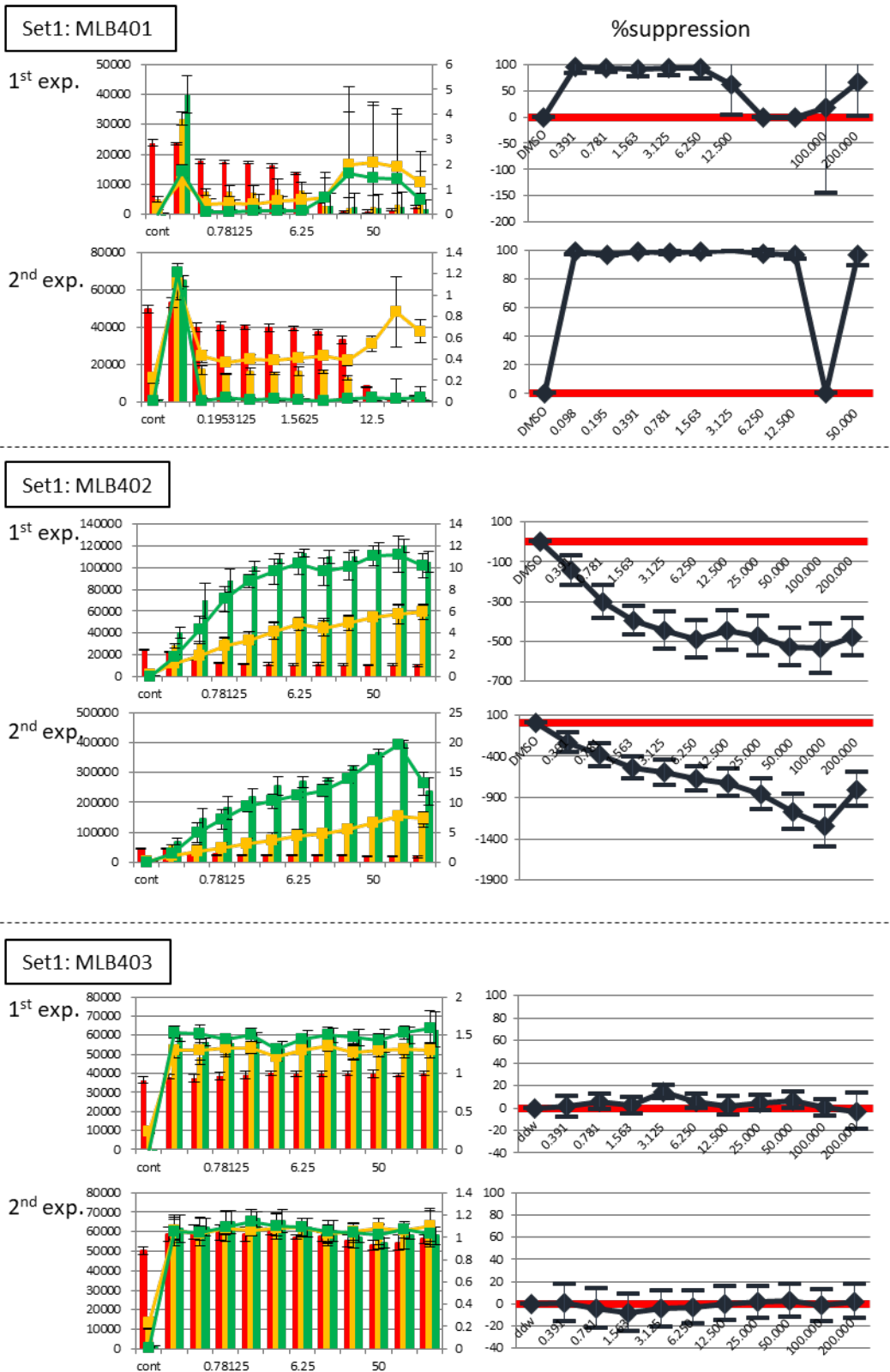


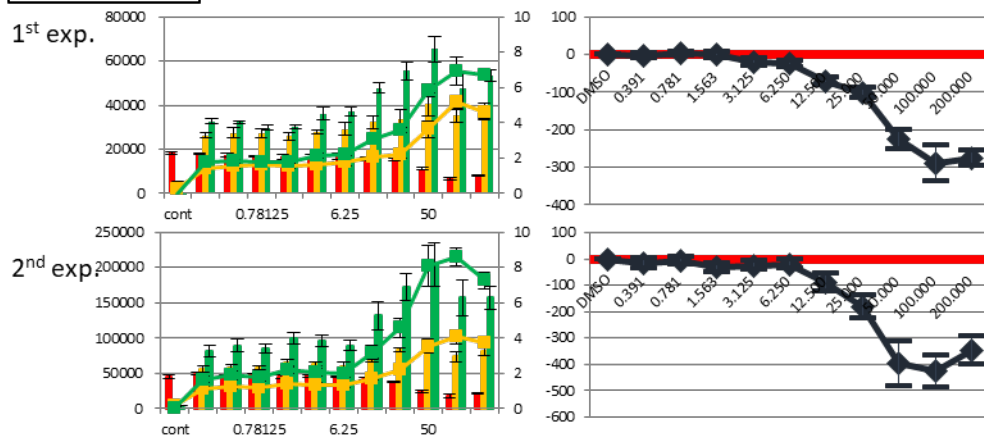
表2、Phase1被験物質の判定結果

		exp.1	exp.2	Judge
set1	MLB401	Non	Non	Non
	MLB402	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB403	Non	Non	Non
	MLB404	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB405	Toxic	Toxic	Toxic
set2	MLB501	Non	Non	Non
	MLB502	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB503	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB504	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB505	Non	Non	Non
set3	MLB601	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB602	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB603	Non	Non	Non
	MLB604	Toxic	Toxic	Toxic
	MLB605	Non	Non	Non

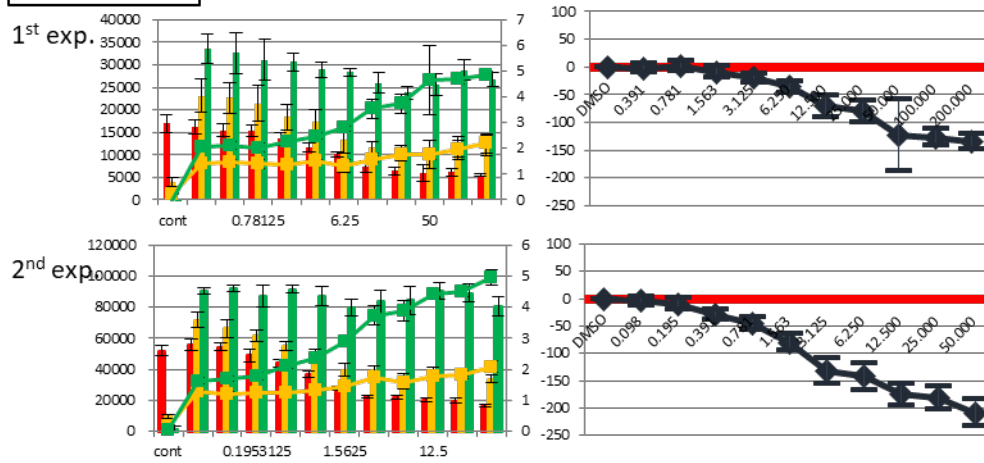
図2、Phase1被験物質の試験結果



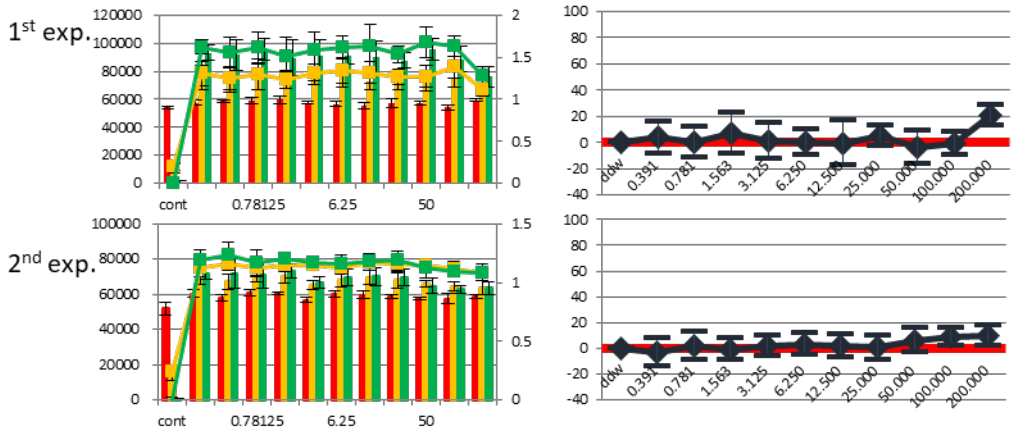
Set1: MLB404



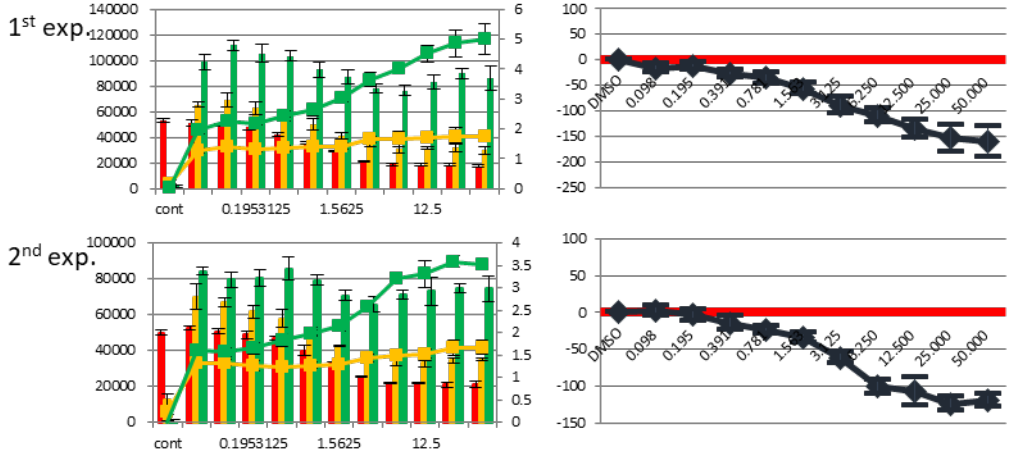
Set1: MLB405



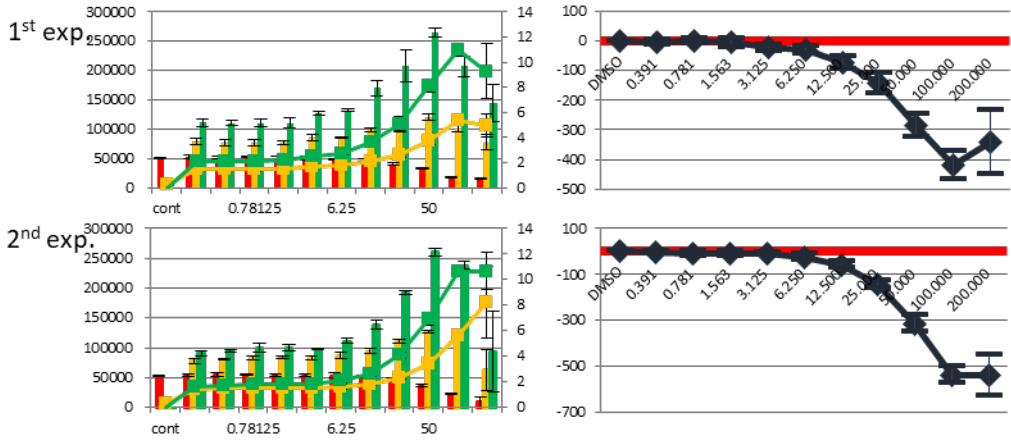
Set2: MLB501



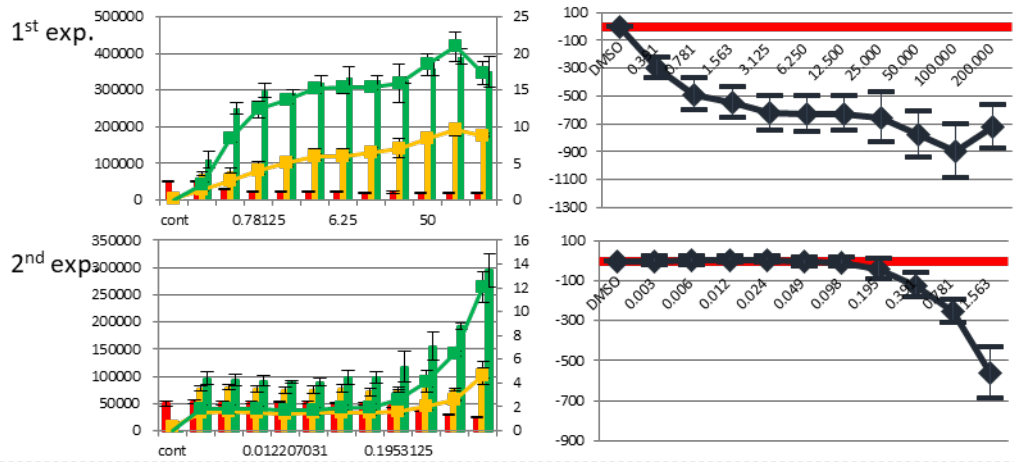
Set2: MLB502



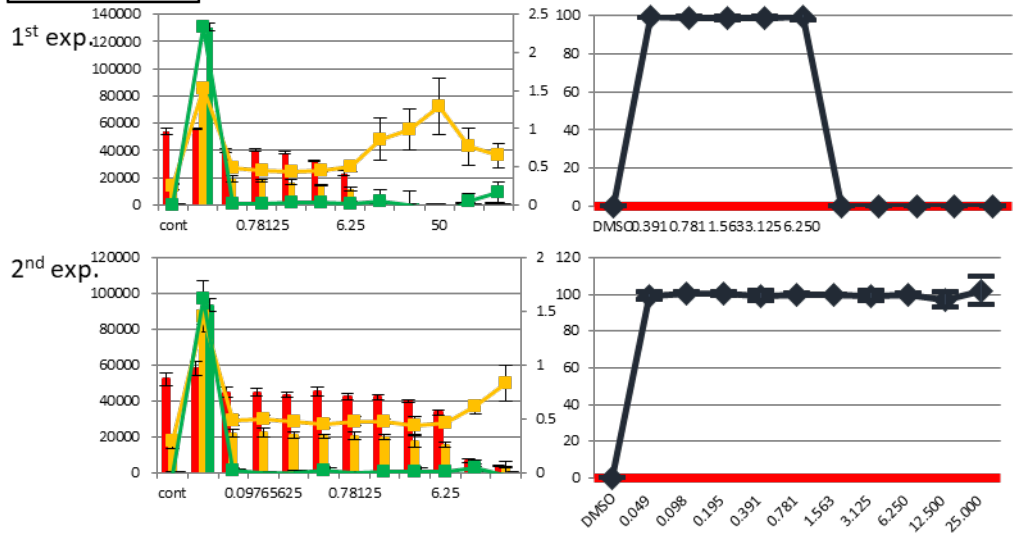
Set2: MLB503



Set2: MLB504

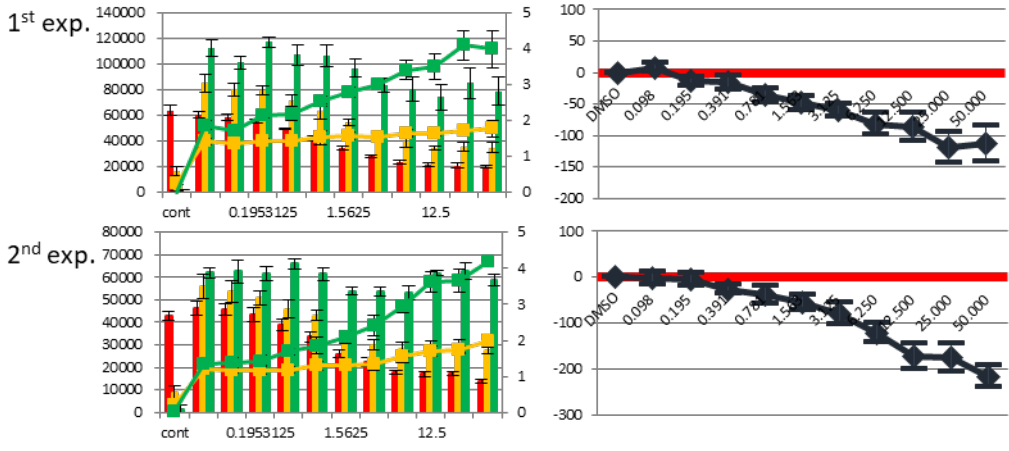


Set2: MLB505

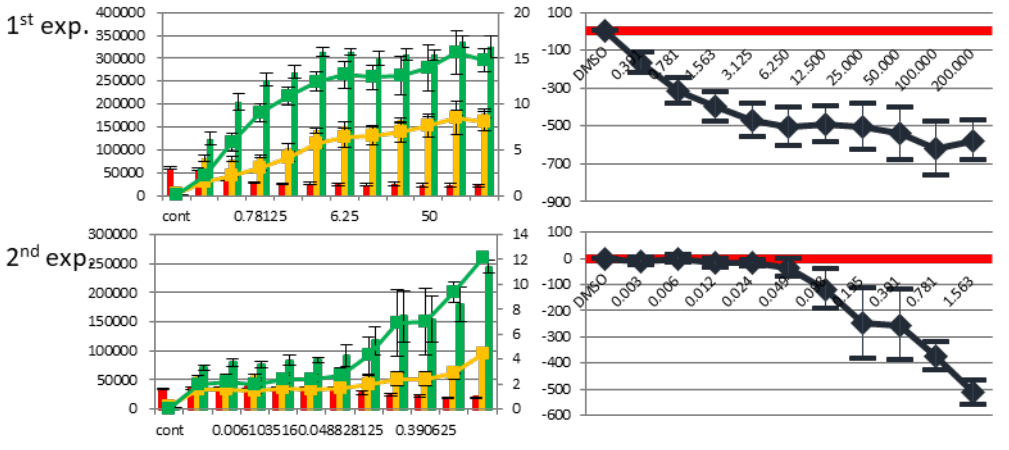




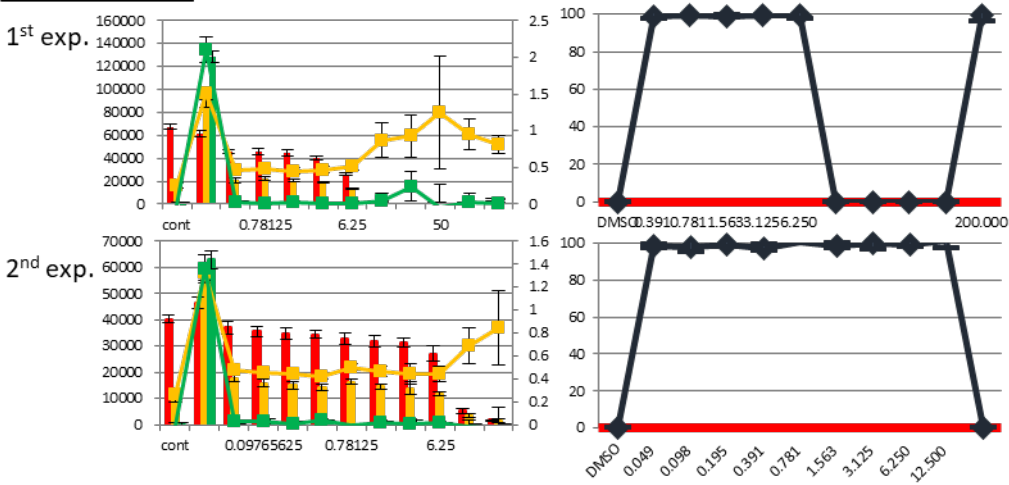
Set3: MLB601



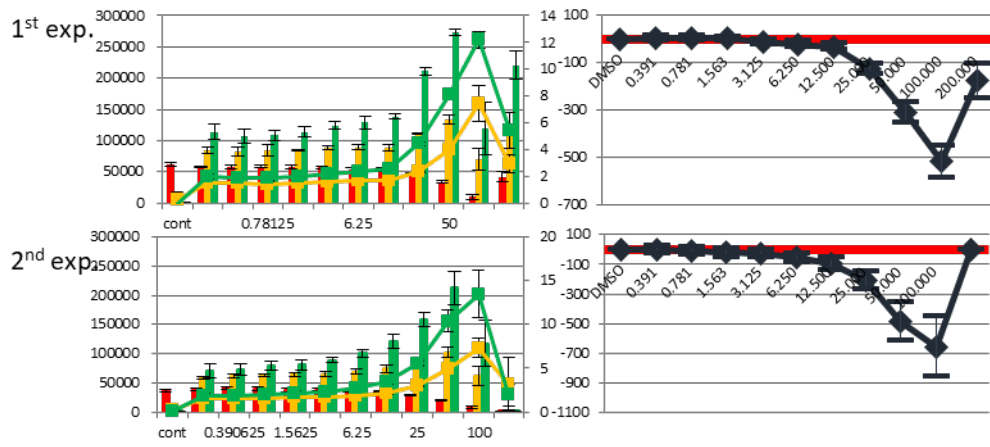
Set3: MLB602



Set3: MLB603



Set3: MLB604



Set3: MLB605

