

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

IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) クライテリアの設定ならびにプロトコールの作成

研究分担者 木村 裕 東北大学病院皮膚科・助教

研究要旨

IL-2 Luc assay を補完する目的で令和2年度より開始された IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) について、当教室で得られたデータを元に設定されたクライテリアに基づいたプロトコールを作成し、そのプロトコールに則り令和2年10月より IL-2 Luc LTT validation 試験 Phase I が実施された。また、神戸大学の協力を得て Phase I 試験で使用するデータシートを作成した。Phase II 試験に先立ち78候補被検物質の判定を行い VMT の chemical selection team にデータを提出し、そのデータをもとに Phase II における20被検物質が決定された。

A. 研究目的

IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) の国際バリデーション試験実施に向け、その際に使用するクライテリアの設定、プロトコールを作成することを目的とした。

B. 研究方法

以下の方法により IL-2 および IFN- γ プロモーター活性の測定を行った。ヒト T リンパ芽球性白血病由来細胞株 Jurkat に IL-2 プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子（緑色に発色）、IFN- γ プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子（橙色に発色）、GAPDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子（赤色に発色）を導入した 2H4 細胞を 1 ウェル当たり 2×10^5 個、黒色の 96-well プレート (Greiner bio-one) に播種し化学物質を加え、37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。つづいて 25nM PMA と 1 μ M Io の混合物 (PMA/Io) で刺激し 37°C、5%CO₂ 下で 6 時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混

合剤である Tripluc luciferase assay reagent (TOYOBO) を混合し、室温で 10 分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLR ルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量 (SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA)) を検出した。また細胞数の違いや各種刺激後の生存率の違いを勘案し SLG-LA、SLO-LA を SLR-LA で除することによりそれぞれ normalized SLG-luciferase activity (nSLG-LA), normalized SLO-luciferase activity (nSLO-LA) を算出した。さらに以下の式に %suppression 抑制率を計算した。

$$\% \text{ suppression} = (1 - \text{薬物存在下での nSLG-LA または nSLO-LA} / \text{薬物非存在下での nSLG-LA または nSLO-LA}) \times 100$$

(倫理面への配慮)

本研究では主に細胞株を使用しており倫

理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1. IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT)試験用プロトコールを作成

当教室で得られたデータを元に設定されVMT会議で承認された以下のようなクライテリアに基づいたプロトコールを作成した(研究代表者_添付資料5)。このプロトコールに則り令和2年10月よりIL-2 Luc LTT validation試験 Phase Iが実施された。

クライテリア

- ・ %suppression \leq -35 かつ Min Inh-GAPLA $<$ 0.7 を満たす被験物質を leukocyte toxicと判定する。
 - ・ -35 \leq %suppression \leq 35 かつ Min Inh-GAPLA \geq 0.7 を満たし distilled water に不溶の被験物質を indeterminate と判定する。
 - ・ それ以外の被験物質を non-leukocyte toxic と判定する。
- #### 2. Phase II試験 7 8 候補被検物質の判定

Phase I 終了後に VMT の chemical selection teamにより選定されたPhase II試験 7 8 候補被検物質についてIL-2 Luc assay、IL-2 Luc LTTの判定結果、入手方法をまとめVMTに提出した。このデータをもとにPhase IIにおける20被検物質が決定された。

3. Phase II試験で使用するデータシート、記録用紙の作成

神戸大学の協力を得てPhase II試験用のデータシートを作成し、参加施設に配布した。(添付資料1)

4. 免疫毒性化学物質のデータベース作成

昨年度まで作成してきた60化学物質による免疫毒性化学物質のデータベース作成を拡充し、97化学物質からなるデータベースを作成した。

D. 考察

クライテリアを適応したPhase I試験試験

では施設内および施設間再現性共に良好な試験結果が得られた。

E. 結論

令和元年度に行われたIL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT)試験への準備としてプロトコール、データシート、記録用紙を作成しPhase I試験が実施された。施設内および施設間再現性共に結果は良好で、Phase II試験が予定されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., et al. 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. Kimura, Y., Fujimura, C., Aiba, S. The modified IL-8 Luc assay, an in vitro skin sensitisation test, can significantly improve the false-negative judgment of lipophilic sensitizers with logKow values $>$ 3.5. *Arch Toxicol*, 2021:95: 749-758
3. Terui, H., Kimura, Y., Fujimura, C., Aiba, S. The IL-1 promoter-driven luciferase reporter cell line THP-G1b can efficiently predict skin-sensitising chemicals. *Arch Toxicol*, 2021: in press

2. 学会発表

1. 木村 裕、藤村 千鶴、相場 節也 IL-8 Luc assay (OECD442E) のクライテリアの変更とLogKowが3.5を超え

- る化学物質における偽陰性率の改善
(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)
2. 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)
3. 木村 裕、藤村 千鶴、相場 節也
IL-8 Luc assay (OECD442E) の改良と
LogKow >3.5物質への対応 (ポスター)
細胞アッセイ研究会 Web開催
(2021.1)
4. 木村 裕、藤村 千鶴、照井仁、相場
節也 新たな皮膚感作性試験法 IL-
1 Luc assayの特性 (ポスター) 細
胞アッセイ研究会 Web開催
(2021.1)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

添付資料 1 : Data sheet for MITA IL-2 Luc LTT Ver. 008. 8

①フェイスシート

Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for 2H4 cells			
			Ver. 008.8
Laboratory		Round	
Exp.		(Highest soluble conc. In the next exp.s mg/ml)	
Date: <small>(YYYY/MM/DD)</small>		Operator:	
Code		Dissolution	mg/ml in
Fold induction of nIFNLA		Rejected	the number of concentration which satisfy Inh-GAPLA>=0.05
Comment:			

②データ入力シート

MultiReporter Assay System -Triplet Calculation Sheet
1st exp.

Transmittance Data			
	SLG	SLO	SLR
T0			#VALUE! #VALUE! #VALUE!
T1			#VALUE! #VALUE! #VALUE!
T2			#VALUE! #VALUE! #VALUE!

Filter 0 Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 1 Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 2 Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

④ グラフシート

