

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

Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、T細胞および単球のサイトカイン転写調節に及ぼす化学物質の影響をレポーター遺伝子の発光を利用して評価する免疫毒性評価試験法である。本研究では、MITAを構成する2つの試験系に関するバリデーション試験を実施した。

- 1) ヒト単球由来 THP-1 細胞における IL-1 β 転写活性抑制を指標とした評価系「IL-1 Luc assay」のバリデーション試験 (Phase0, Phase1, Phase2) を実施した。
- 2) ヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞における IL-2 転写活性抑制および細胞増殖を指標とした評価系「IL-2 Luc LTT assay」のバリデーション試験 (Phase0, Phase1) を実施した。

A. 研究目的

多色発光タンパク質の技術を利用した化学物質の免疫毒性多項目評価システム (Multi-Immuno Tox assay ; MITA) は、Jurkat 細胞における INF- γ 、IL-2、G3PDH プロモーター活性を測定する細胞株 2H4 及び THP-1 細胞における IL-8 と G3PDH プロモーター活性を定量化できる細胞株 THP-G8、IL-1 β と G3PDH プロモーター活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4 の各種毒性評価発光細胞を利用した評価システムである。本研究では MITA 法の OECD テストガイドライン化を目指して、MITA を構成する IL-1 β 転写活性抑制を指標とした IL-1 Luc assay および IL-2 転写活性抑制および細胞増殖を指標とした IL-2 Luc LTT assay の国際バリデーションテストを実施し、本評価システムの有用性と試験プロトコルの妥当性について検証した。

B. 研究方法

B-1) IL-1 β Luc assay

IL-1 β 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 β) 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.007E (Phase0)、Ver.008E (Phase1) および Ver.009E (Phase2) 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。
Phase0 試験；試験には 3 化学物質 (Dapsone, Diethanolamine, p-Nitroaniline) を供試し、各物質 3 回 \times 2 セットの試験を行った。
Phase1 試験；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 5 種類のコード化した被験物質を供試した。各物質 1 セットにつき 2 回の同一結果を得られるまで試験を繰り返し被験物質を判定、これを 3 セット実施した。
Phase2 試験；国際バリデーション実行委員会にて選定された 20 種類のコード化し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被験物質を判定した。

B-2) IL-2 Luc LTT assay

IL-2 と IFN- γ 、および内部標準としての G3PDH プロモーターにそれぞれ SLG、SL0 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は

IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) protocol ver. 001.2 (Phase0) および ver. 001.3 (Phase1) に準ずる。

Phase0試験；試験化学物質として3化学物質（Bleomycin、Dexamethasone、6-Thioguanine）を供試した。

Phase1試験；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5種類のコード化された被験物質を供試した。各物質1セットにつき2回の同一結果を得られるまで試験を繰り返し被験物質を判定、これを3セット実施した。

（倫理面への配慮）

倫理的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) IL-1 β Luc assay

Phase0試験；

被験3物質の試験結果を図1に示す。これらの結果を、リードラボの東北大学及びバリデーション実施施設である食薬センター、産総研高松と比較検証したところ、良好な施設内、施設間再現性が確認されたことから、つづいてPhase1試験を実施した。

Phase1試験；

コード化された5種類の化学物質（5物質 \times 3セット分の15被験試薬）の試験結果および判定結果を図2および表1に示す。Multi-Immuno Tox Assay protocol 案 Ver.008 E の判定基準に準じ、%suppressionの $\pm 20\%$ を基準として被験試薬の効果を判定した。各試薬の判定を得るまで、それぞれ2~4回の実験を繰り返した。3セット目（MIB601~605）の2nd experienceでは、LPSによる誘導の基準となるFInSLG-LA $\Rightarrow 5\%$ を満たさなかったため、判定対象外とした。

Phase2試験；

コード化された20種類の化学物質の試験結果（図3）および判定結果（表2）を示す。得られた試験結果のうち、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とした。

C-2) IL-2 Luc LTT assay

Phase0試験；

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をクリアしたのに関して、IL-2活性抑制（%suppression）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。

Phase1試験；

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5に、各物質の判定結果を表4に示す。Phase1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

D-1) IL-1 β Luc assay

Phase1試験では、コード化された15被験試薬（5物質 \times 3）の試験を実施した。5物質全てにおいて、3セットで同一の判定結果となり、良好な施設内再現性を確認した。一方、各セットにおける1st~4th experienceを確認すると、3つの被験試薬（MIB503、MIB601、MIB602）において、N:No effectとS;suppressionの両判定があった。MIB601に関しては、「N、S、N」で最終的にNo effect判定であったが、2nd exp.のsuppression判定も+20%ラインを僅かに上回る微妙なものであった。MIB503、602においては、被験試薬の毒性が強く、細胞のI. I. -SLR-LAが0.5を下回る直前の非常に狭い濃度範囲において明らかなIL1- β の転写活性抑制反応が出ている。しかし、反応が計測できる濃度が1点のみであったため判断基準となる「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か、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」に合致せず、No effectの判定となっている。これらの結果から、プロトコルの改善や判定基準の再検証を進めることにより、より正確性、再現性を向上した試験法の確立が見込まれる。

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しても各機関の% 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、当施設の結果では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。

D-2) IL-2 Luc LTT assay

Phase 0 studyにおいて、コントロールとなる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た。施設内及び施設間での高い再現性が確認され、本assay系の技術移転に問題ないことを確認した。

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 I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に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

E-1) IL-1 β Luc assay

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 β 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(Phase0およびPhase1)を実施した。

Phase0試験において技術移転性を確認し、Phase1試験においては5物質 \times 3セットからなる試験を実施し、5物質とも一致する良好な施設内再現性(100%)を確認した。引き続き行ったPhase2試験では、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、高い施設間再現性が確認された。

E-2) IL-2 Luc LTT assay

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 I studyへ進むこととし、Phase I 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

Mitani Y., Yasuno R., Futahashi R., et al. Luciferase gene of a Caribbean fireworm (Syllidae) from Puerto Rico. *Scientific reports* 2019: 9, 1

Gabriel GV., Yasuno R., Mitani Y., et al. Novel application of *Macrolampis* sp2 firefly luciferase for intracellular pH-biosensing in mammalian cells. *Photo. Sci.* 2019: 18: 1212

Mitani Y., Yasuno R., Isaka M., et al. Novel gene encoding a unique luciferase from the fireworm *Odontsyllis undecimdonta*. *Scientific reports*, 2018: 8: 1

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

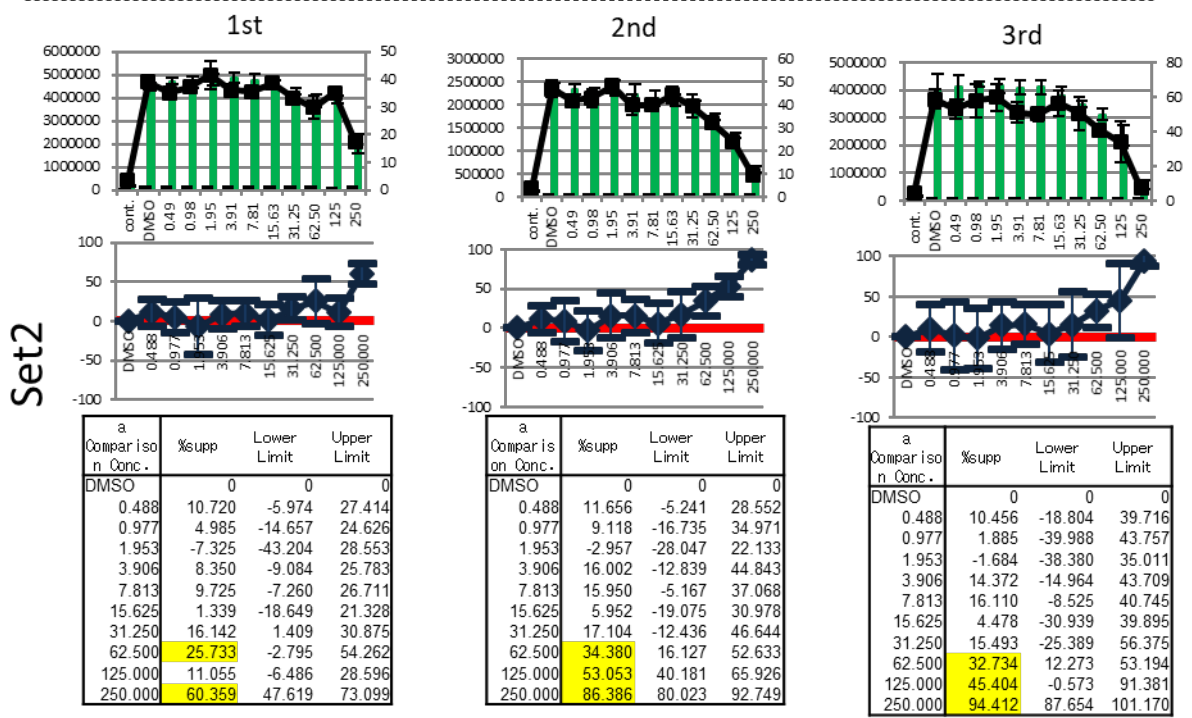
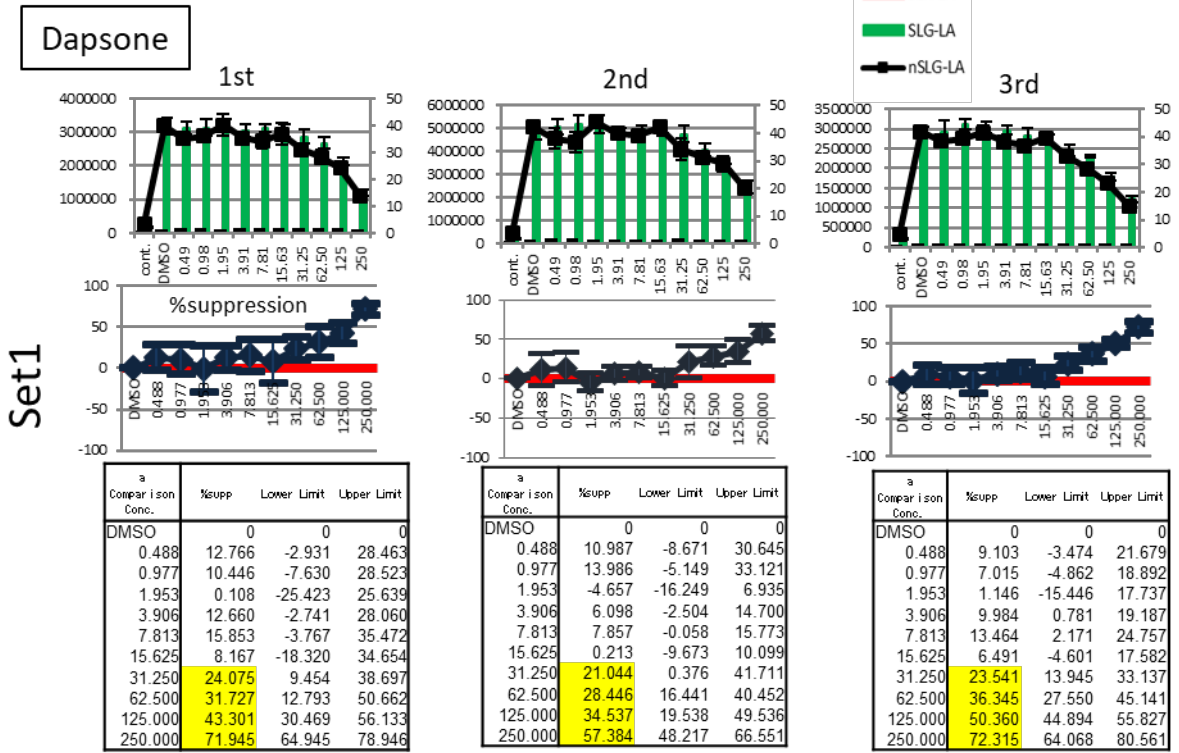
要な文献に基づく化学物質免疫毒性分類の試み、第32回日本動物実験代替法学会

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。)

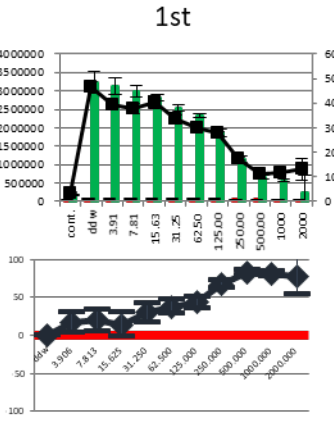
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図1 Phase0試験；被験物質に対する細胞応答性

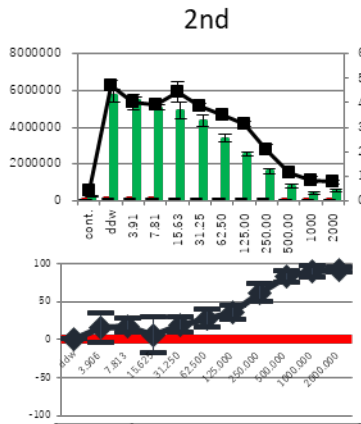


Diethanolamine

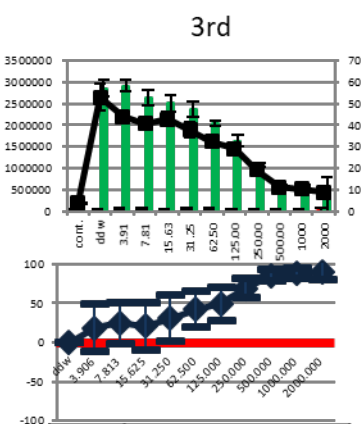
Set1



Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	16.742	2.625	30.859
7.813	19.913	5.486	34.341
15.625	13.951	-1.942	29.844
31.250	30.121	17.365	42.878
62.500	37.856	28.414	47.298
125.000	43.514	35.839	51.189
250.000	67.038	61.992	72.085
500.000	82.566	79.532	85.600
1000.000	80.310	76.854	83.766
2000.000	77.715	53.745	101.685

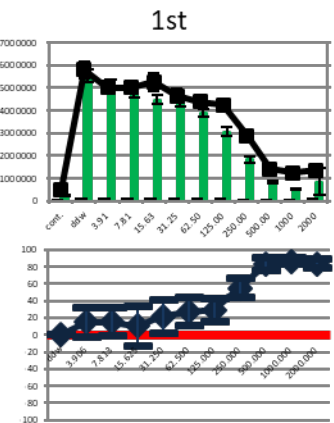


Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	15.172	-4.209	34.552
7.813	18.301	8.661	27.941
15.625	5.784	-17.706	29.273
31.250	19.166	9.130	29.203
62.500	27.619	15.752	39.487
125.000	35.686	26.430	44.942
250.000	60.780	48.771	72.789
500.000	82.616	75.430	89.802
1000.000	89.817	82.264	97.370
2000.000	91.768	88.124	95.412

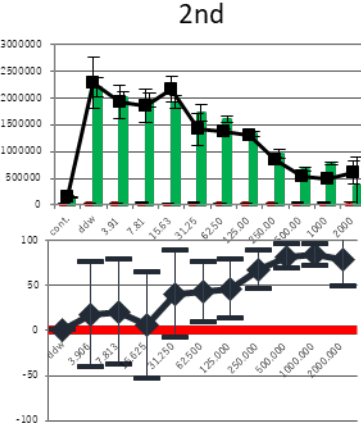


Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	18.503	-11.460	48.466
7.813	25.188	-0.750	51.125
15.625	20.828	-9.481	51.138
31.250	31.076	1.579	60.572
62.500	42.312	19.905	64.718
125.000	49.220	27.869	70.571
250.000	68.960	56.470	81.450
500.000	85.493	78.273	92.713
1000.000	87.601	81.134	94.068
2000.000	90.509	79.604	101.414

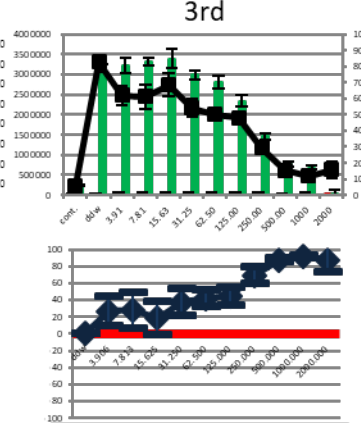
Set2



Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	14.738	-2.275	31.751
7.813	14.942	-1.529	31.412
15.625	10.340	-13.239	33.919
31.250	21.864	2.572	41.157
62.500	26.921	10.414	43.429
125.000	29.143	15.428	42.858
250.000	54.824	43.826	65.822
500.000	82.590	74.934	90.247
1000.000	86.157	82.457	89.856
2000.000	83.646	78.581	88.710



Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	17.399	-40.836	75.633
7.813	20.550	-37.480	78.580
15.625	5.631	-53.501	64.763
31.250	40.875	-7.613	89.364
62.500	42.873	9.079	76.668
125.000	46.592	13.904	79.280
250.000	67.695	46.137	89.253
500.000	82.055	68.539	95.571
1000.000	84.096	71.922	96.271
2000.000	78.745	49.404	108.086



Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
3.906	26.922	9.815	44.030
7.813	27.890	7.342	48.438
15.625	18.377	-1.737	38.491
31.250	37.156	21.379	52.933
62.500	42.265	32.923	51.607
125.000	44.883	34.551	55.215
250.000	69.451	59.762	79.139
500.000	87.404	84.899	89.910
1000.000	92.219	90.730	93.708
2000.000	87.267	73.464	101.069

p-Nitroaniline

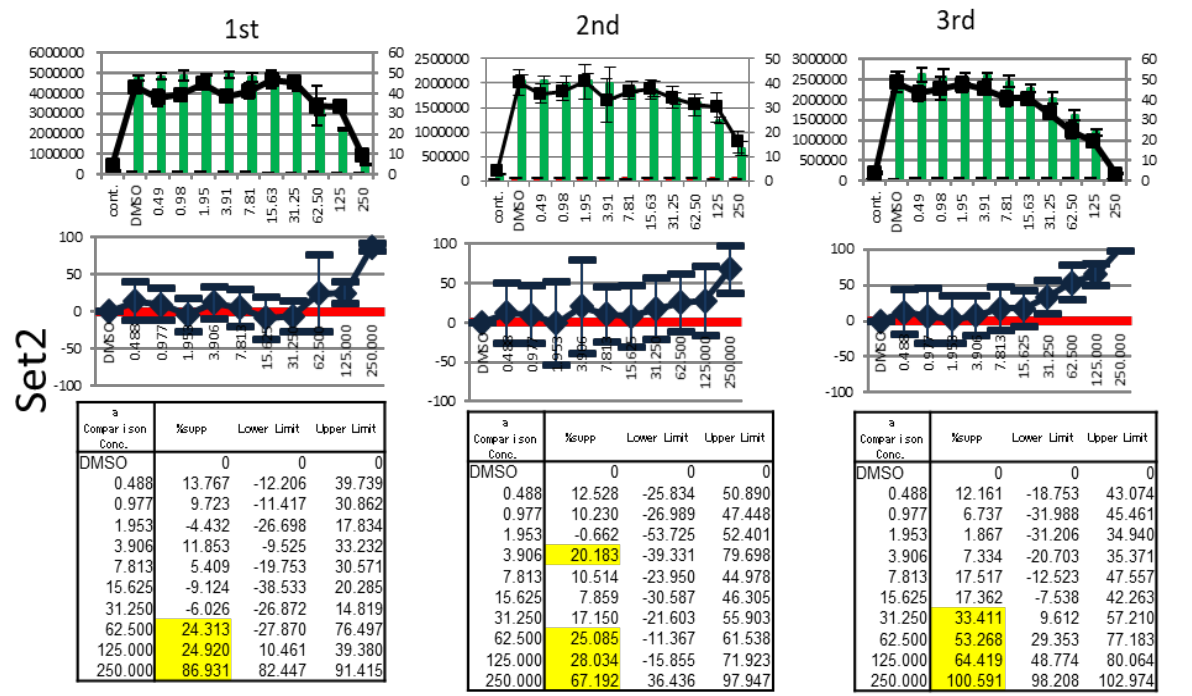
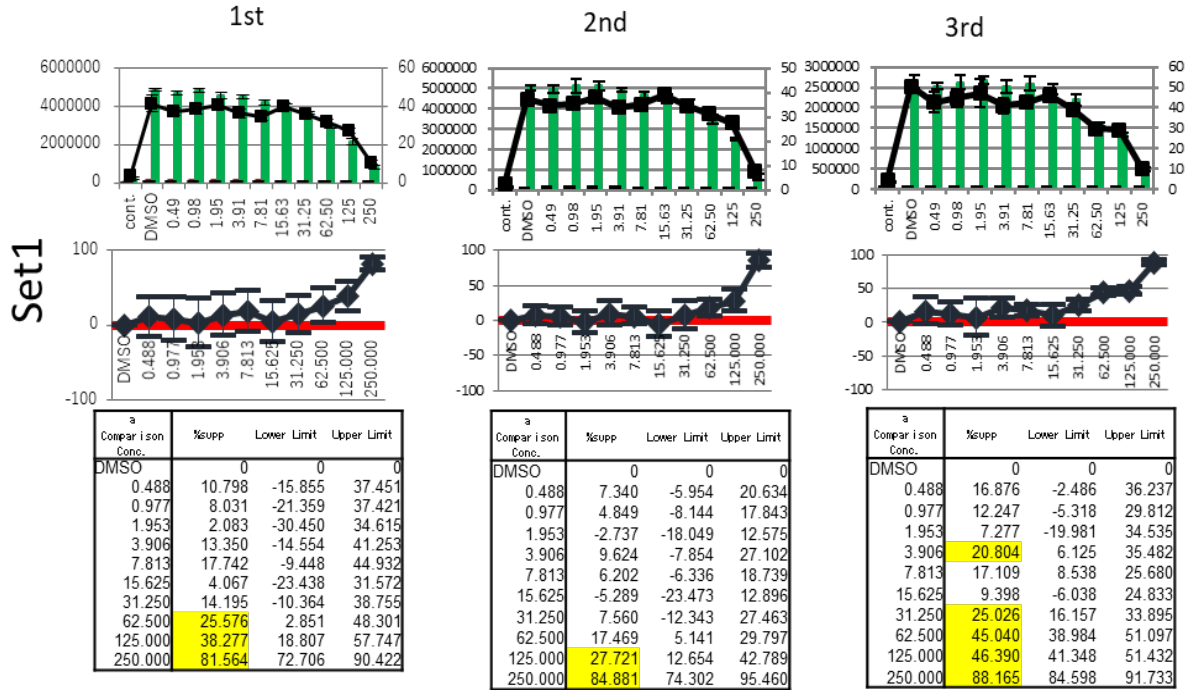
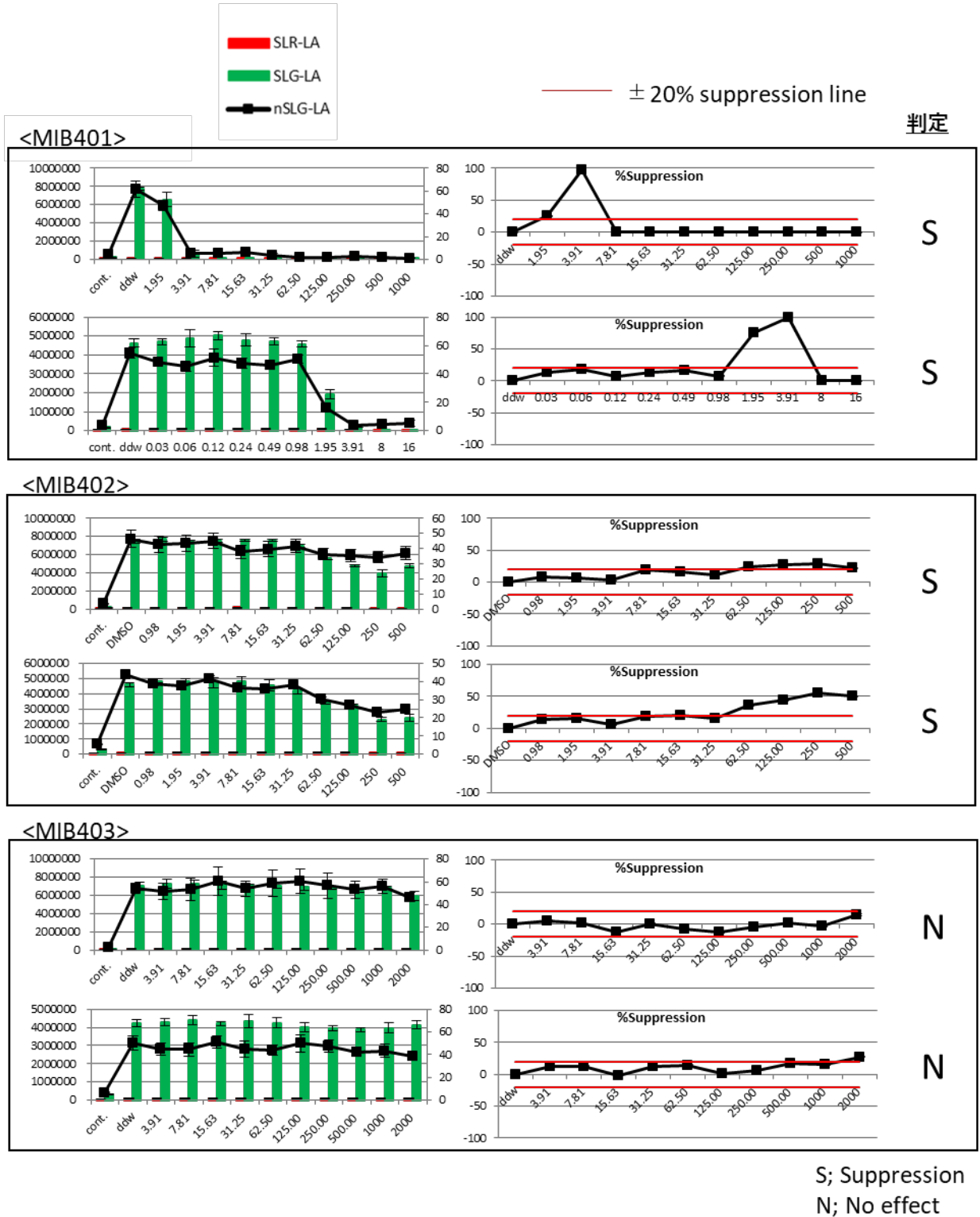
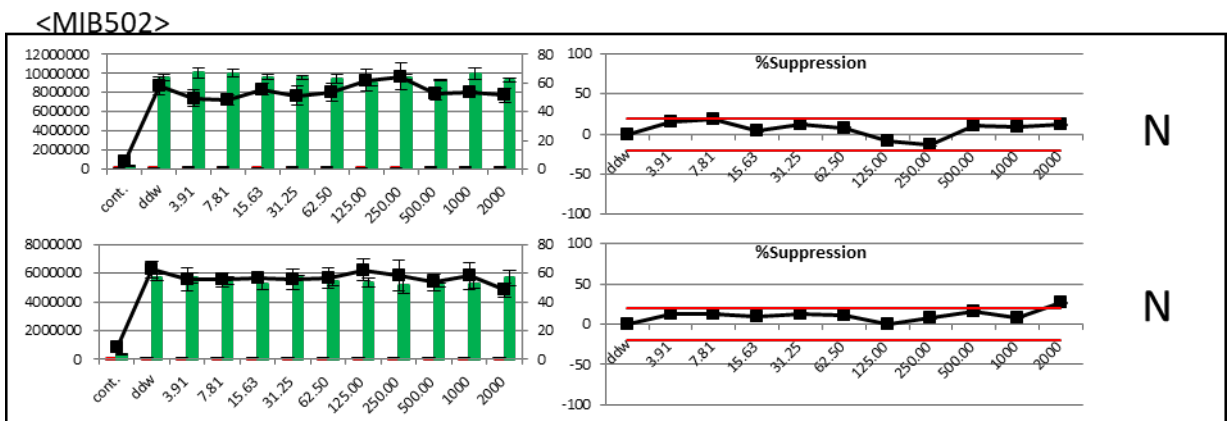
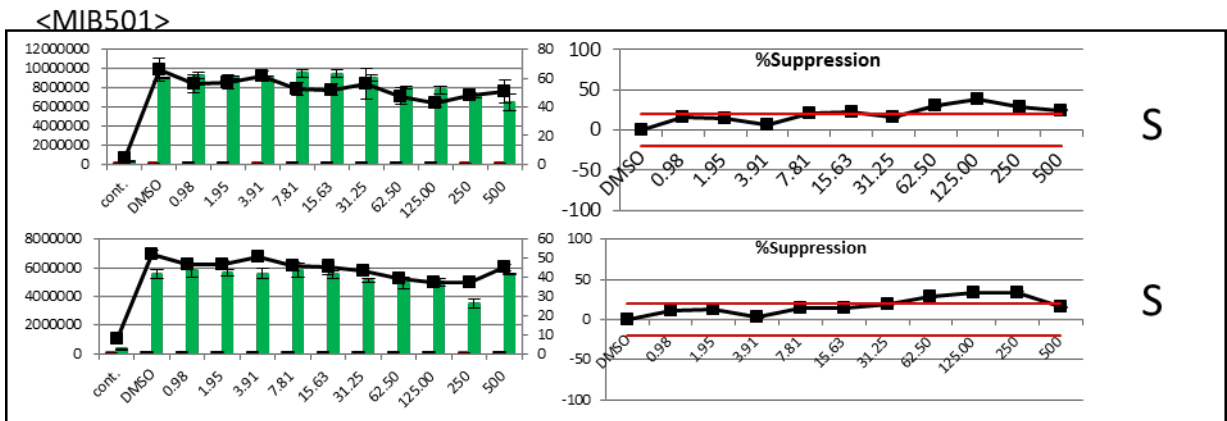
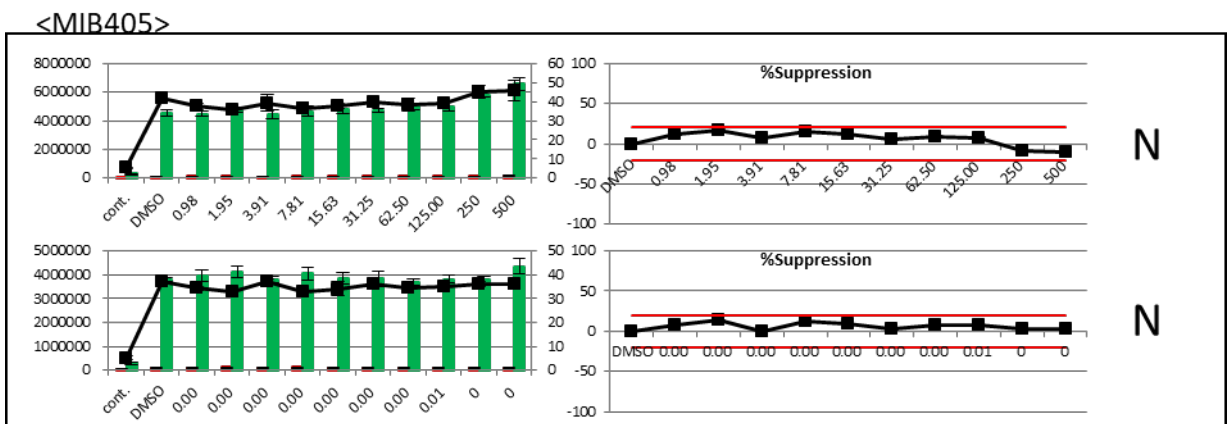
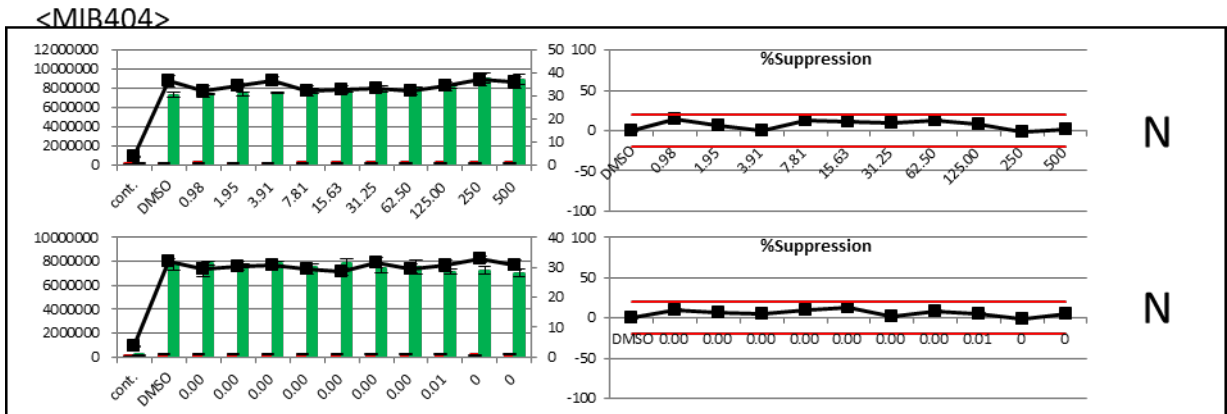
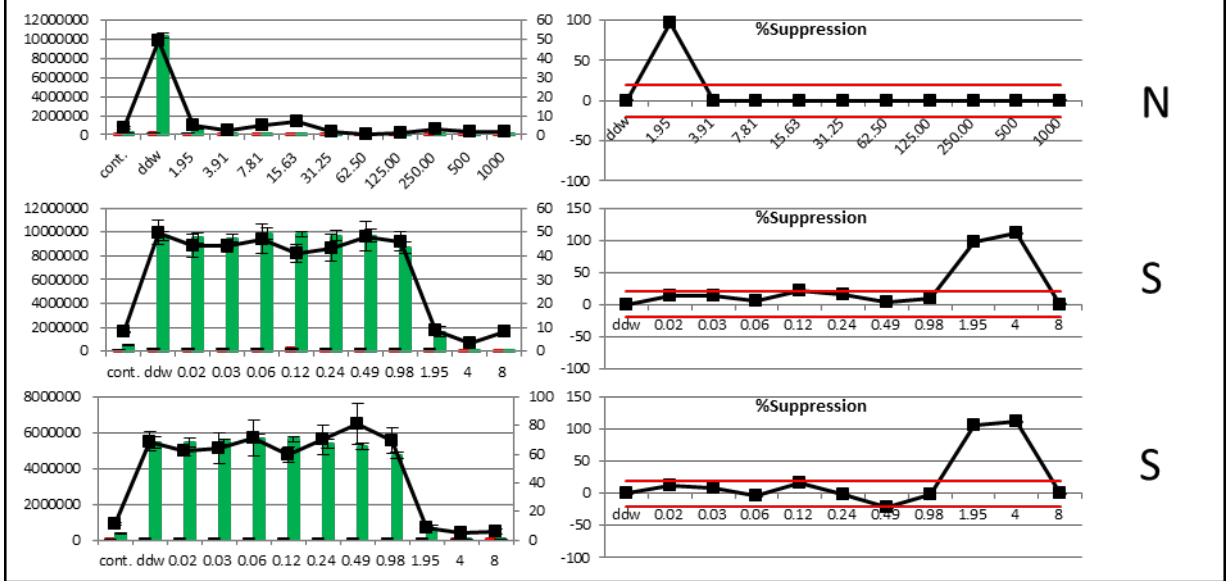


図2 Phase1試験；被験物質に対する細胞応答性

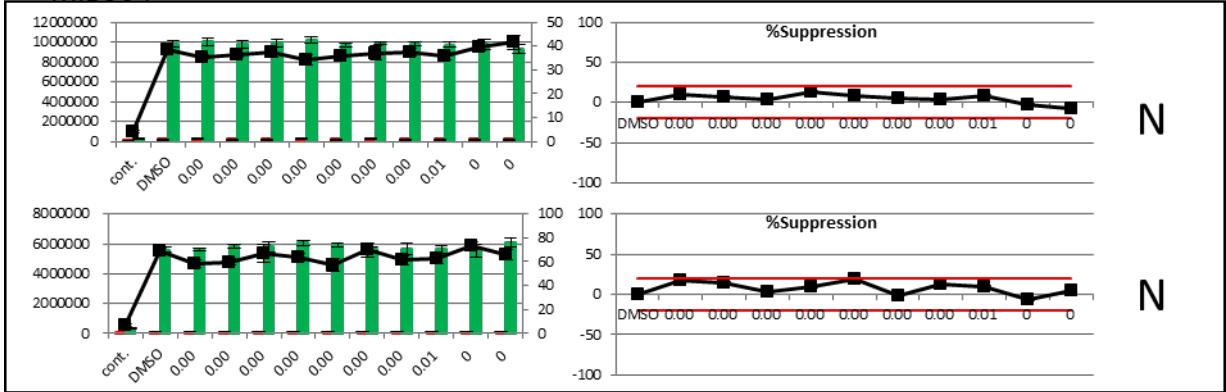




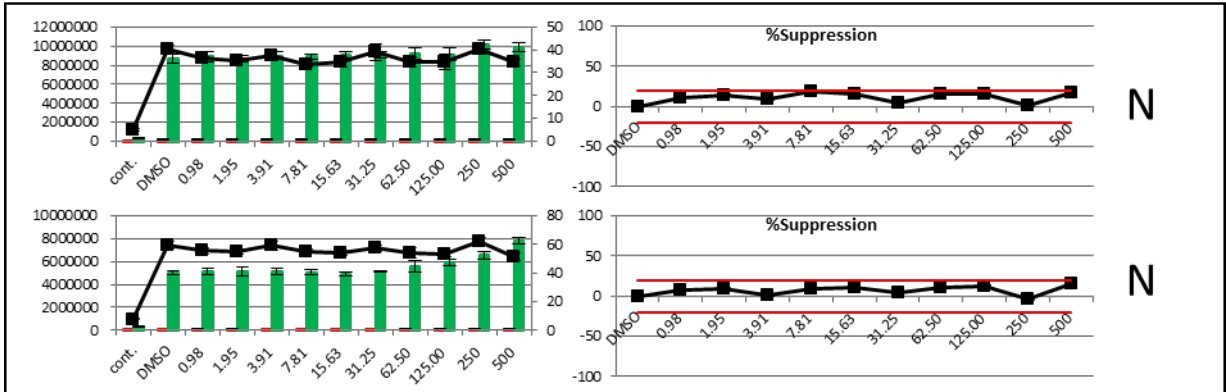
<MIB503>



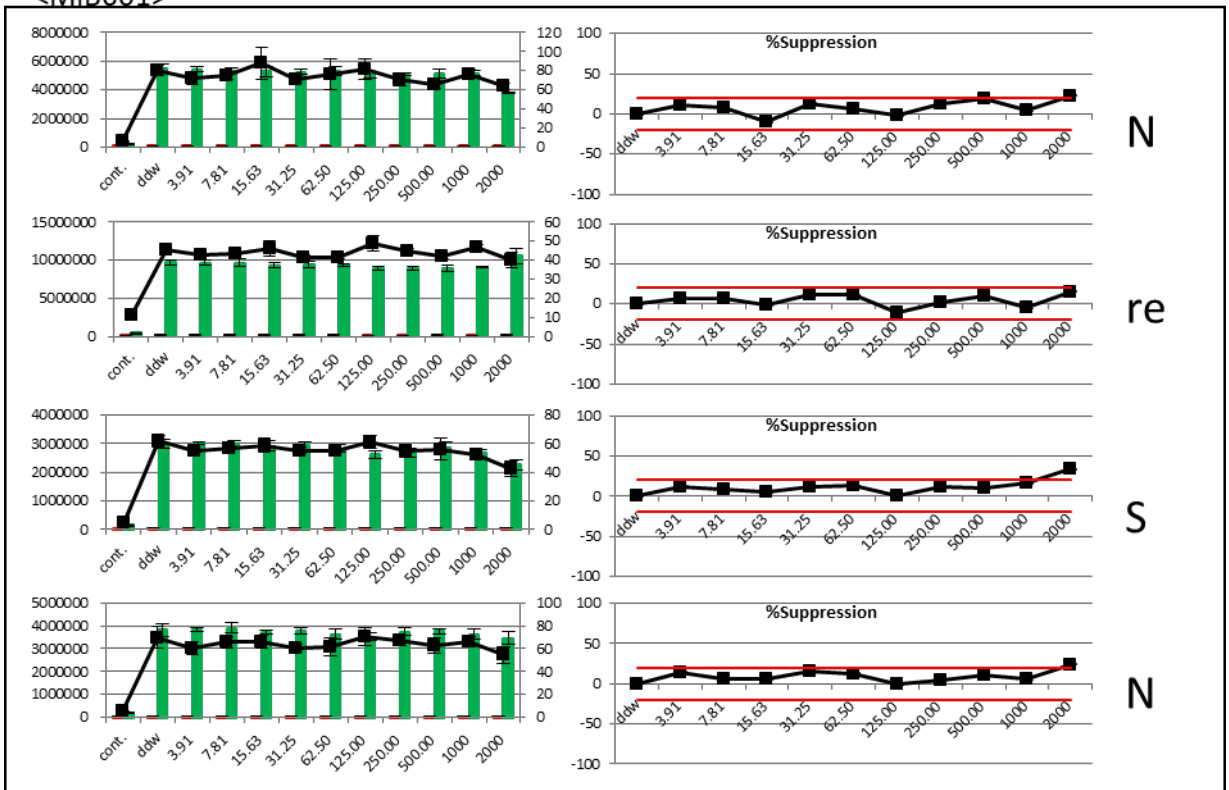
<MIB504>



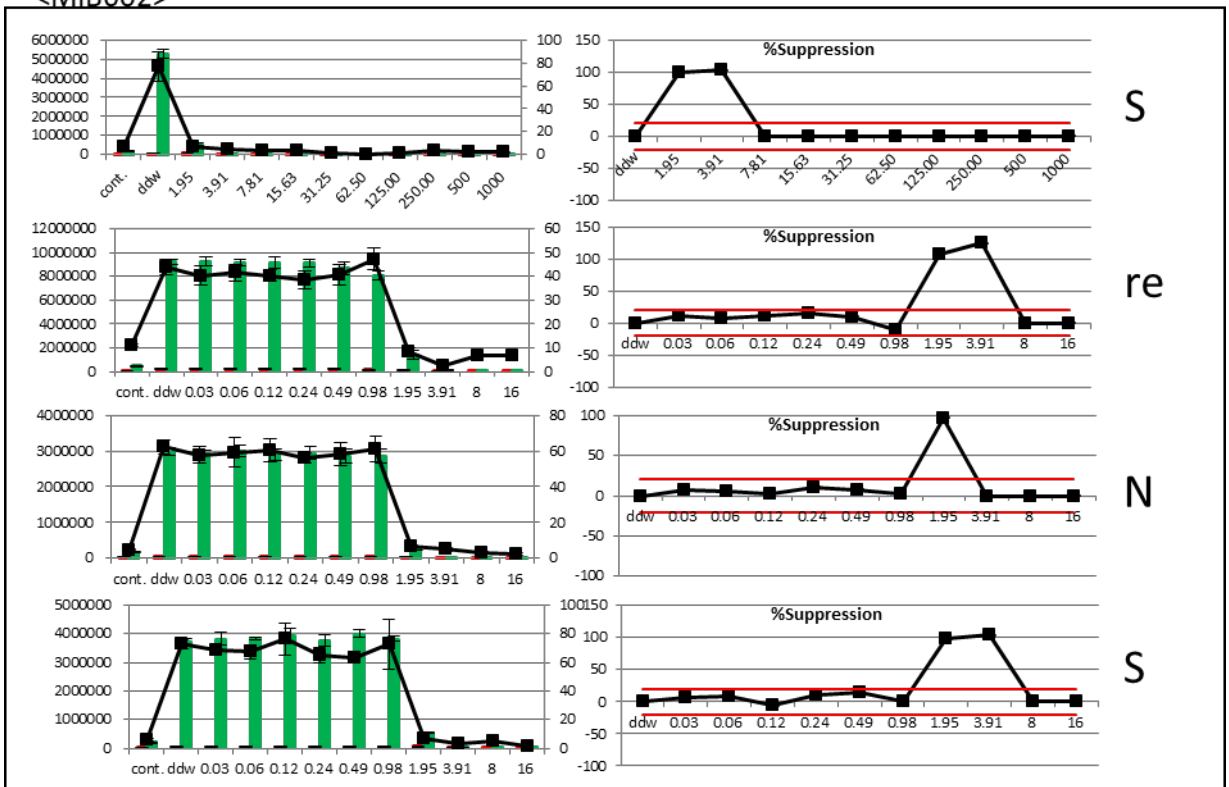
<MIB505>



<MIB601>

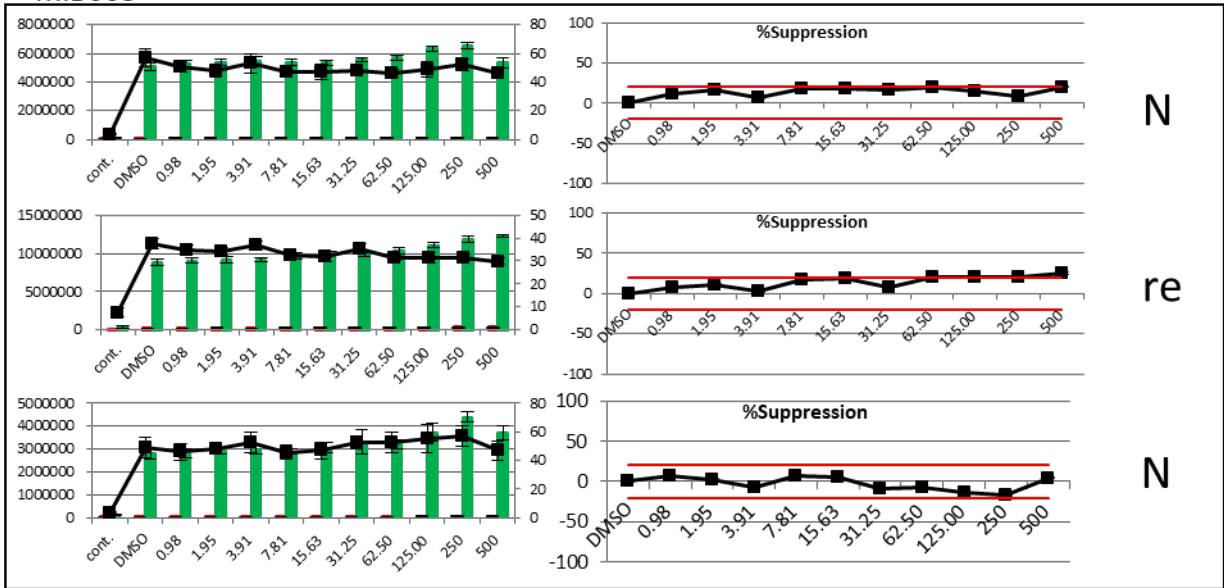


<MIB602>

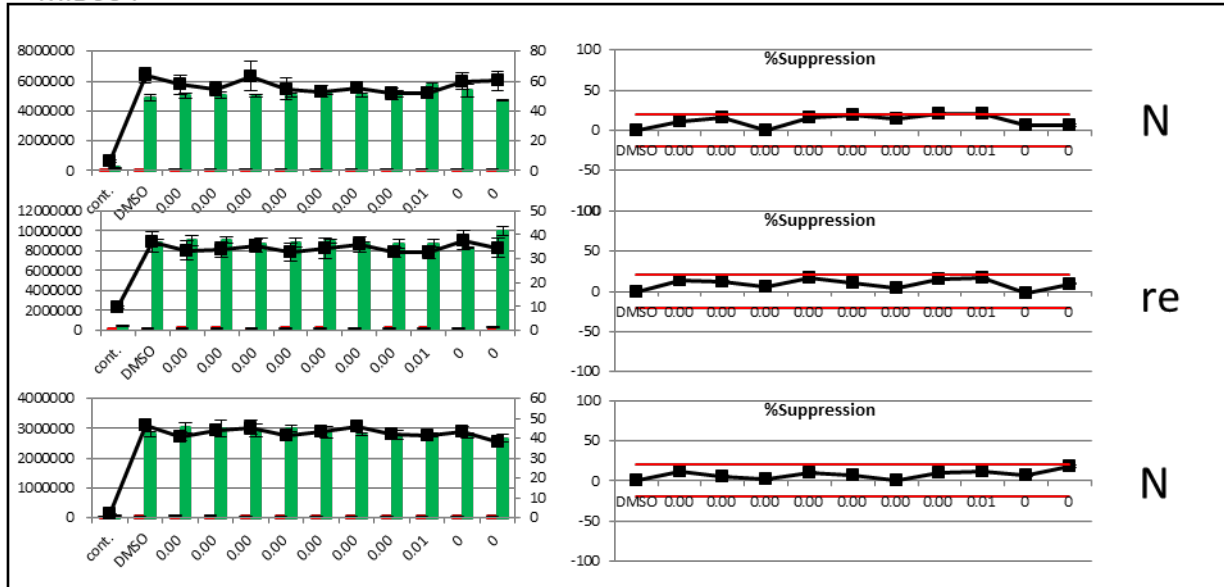


Re: rejected
 (FinSLG-LAが<5のため、判定基準を満たしていない)

<MIB603>



<MIB604>



<MIB605>

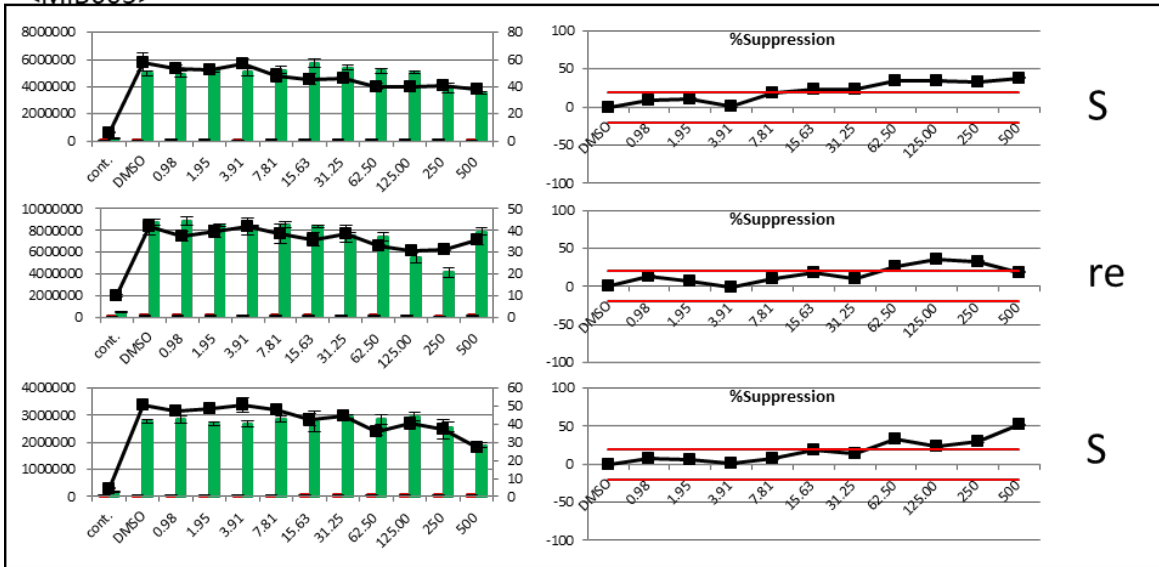
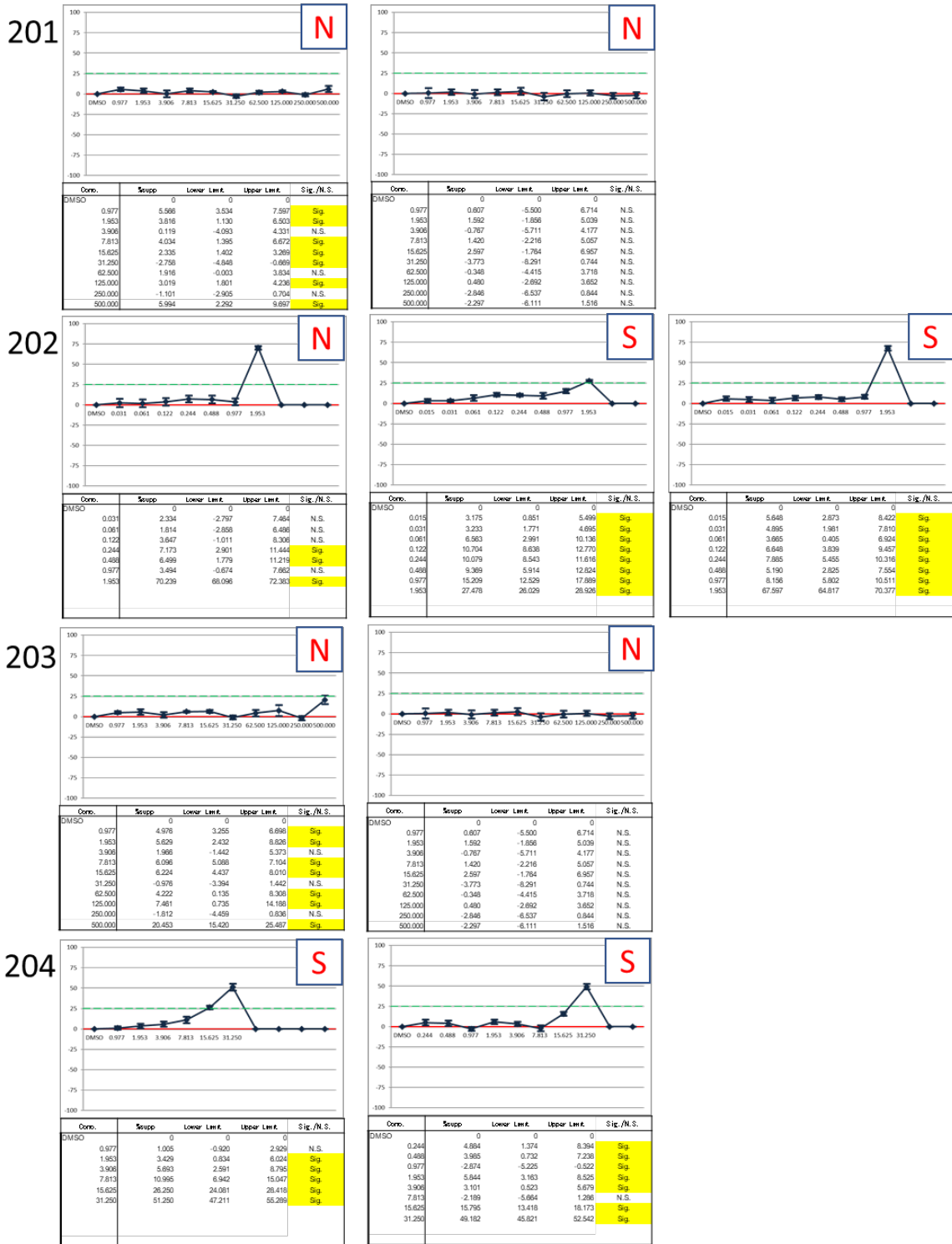


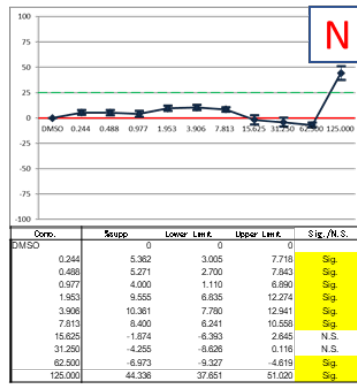
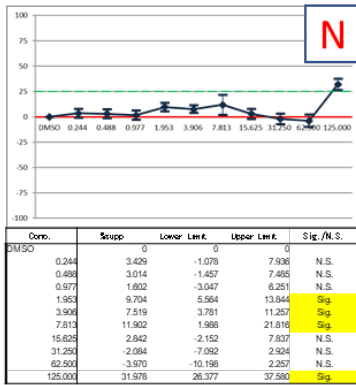
表1 Phase1試験判定結果

MIB	1 st	2 nd	3 rd	4 th	判定
401	S	S	-	-	S
503	N	S	S	-	S
602	S	re	N	S	S
402	S	S	-	-	S
501	S	S	-	-	S
605	S	re	S	-	S
403	N	N	-	-	N
502	N	N	-	-	N
601	N	re	S	N	N
404	N	N	-	-	N
505	N	N	-	-	N
603	N	re	N	-	N
405	N	N	-	-	N
504	N	N	-	-	N
604	N	re	N	-	N

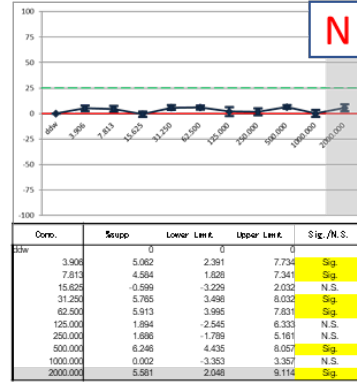
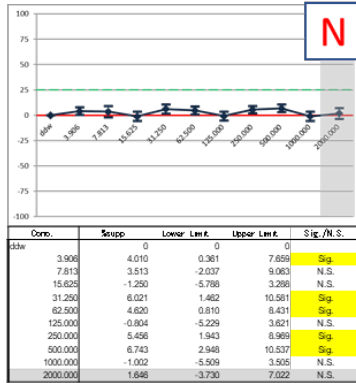
図3 Phase2試験；各被験試薬の解析結果



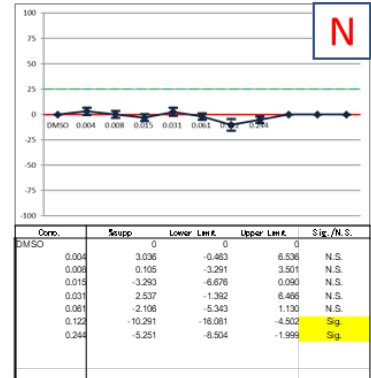
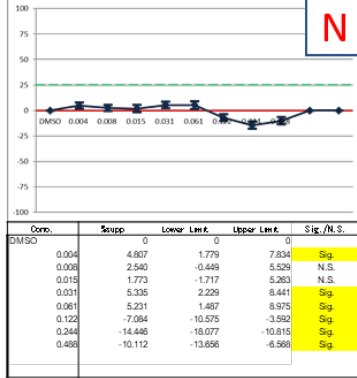
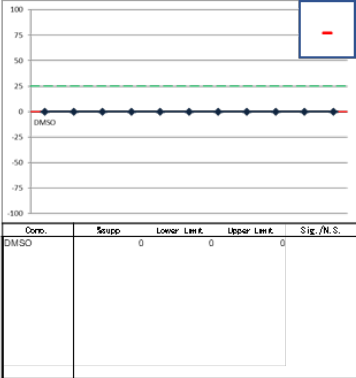
205



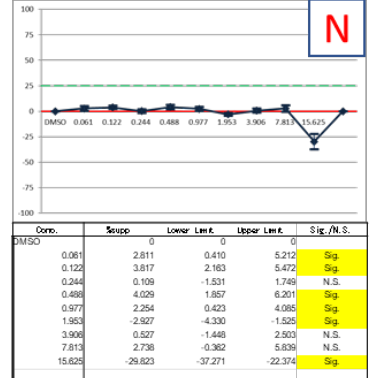
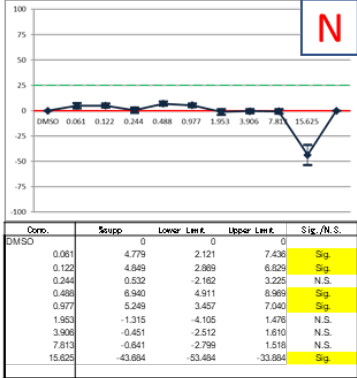
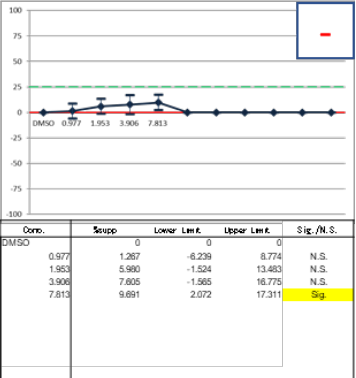
206



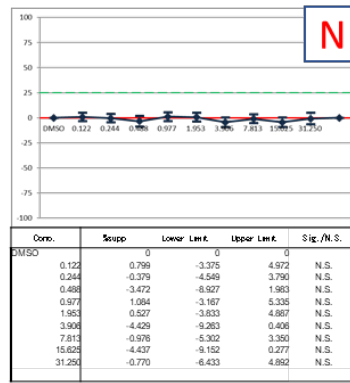
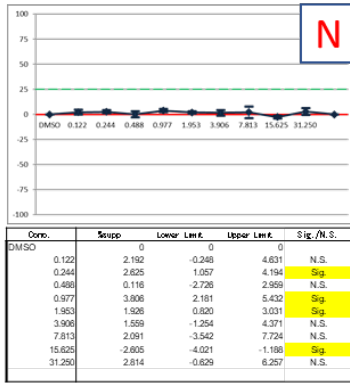
208



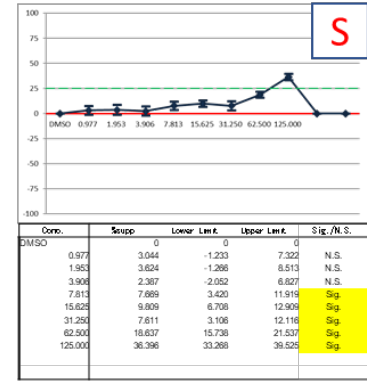
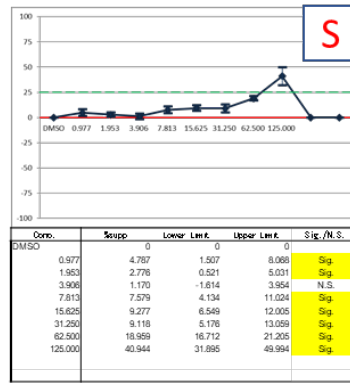
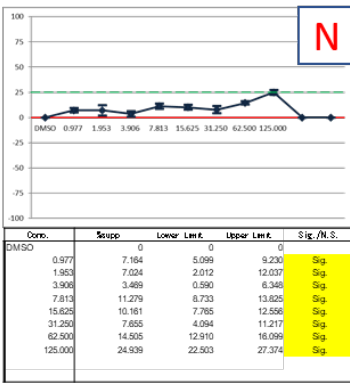
210



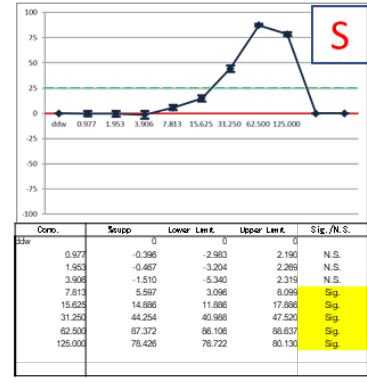
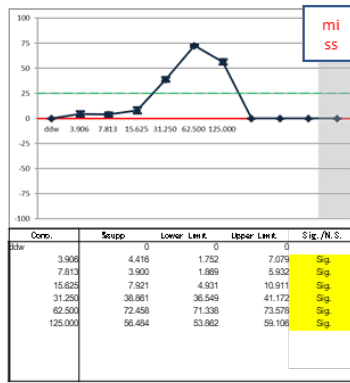
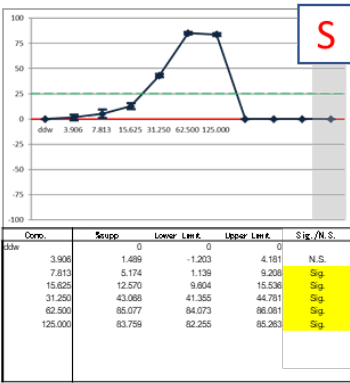
211



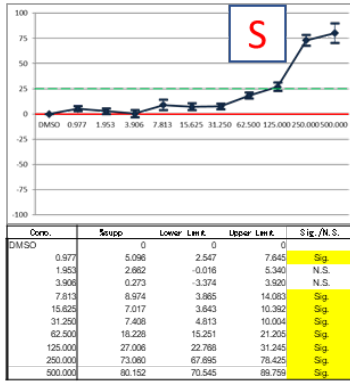
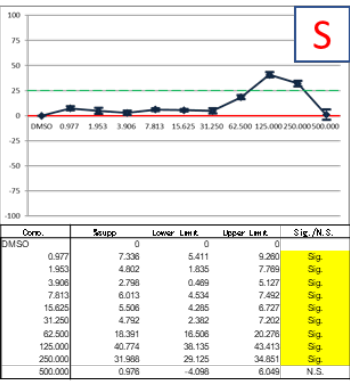
214



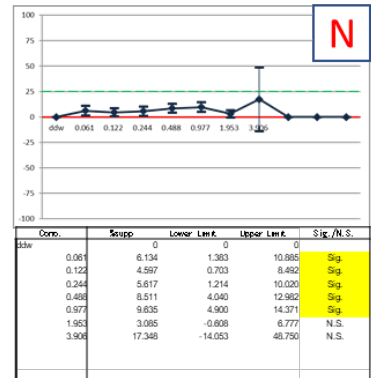
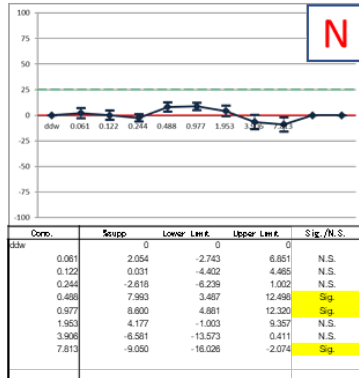
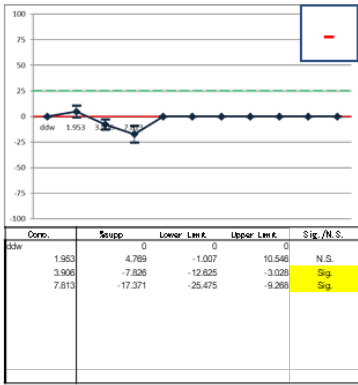
216



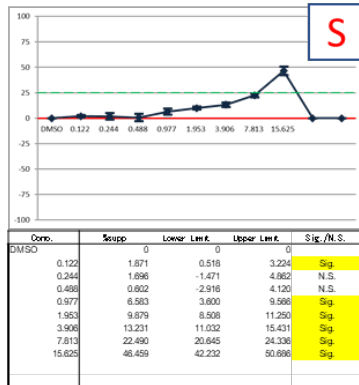
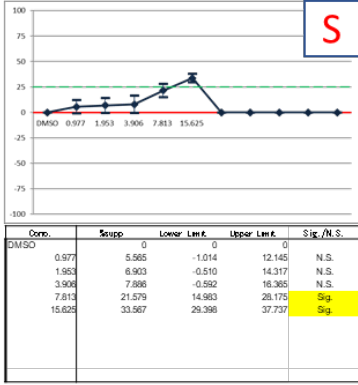
217



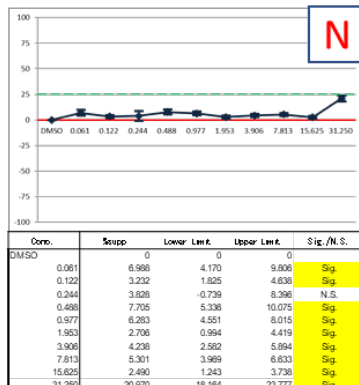
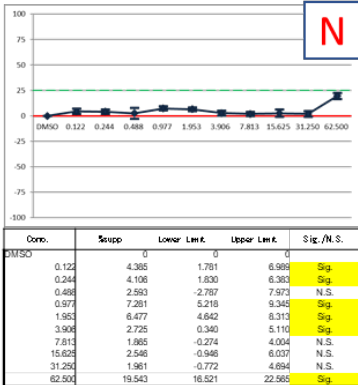
218



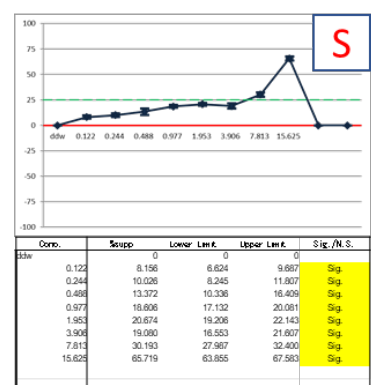
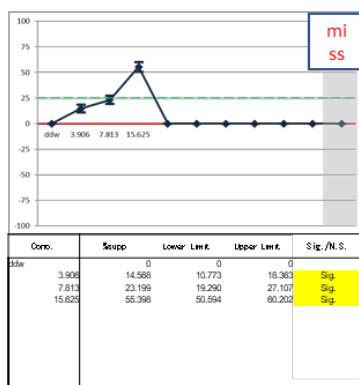
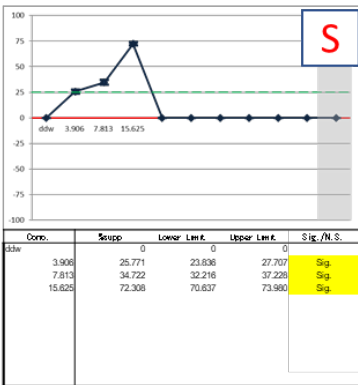
219



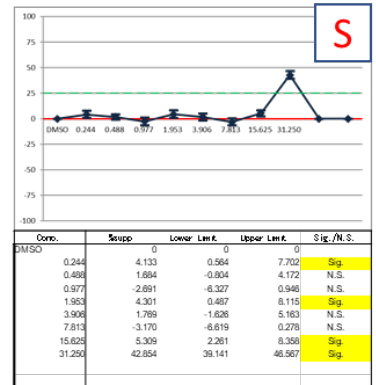
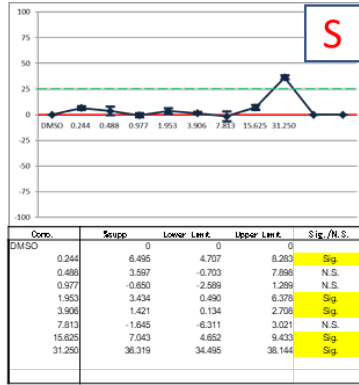
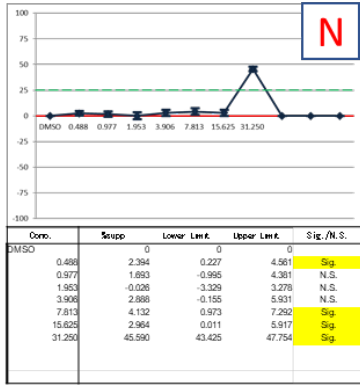
220



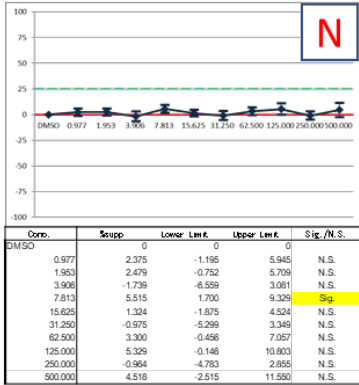
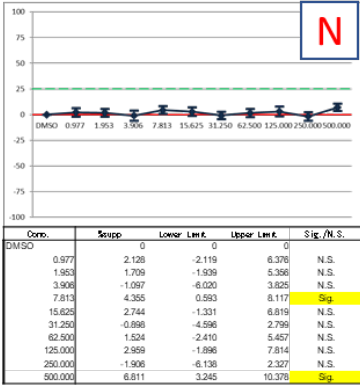
221



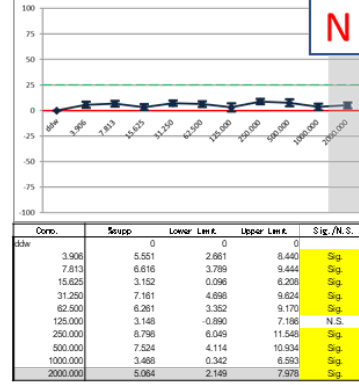
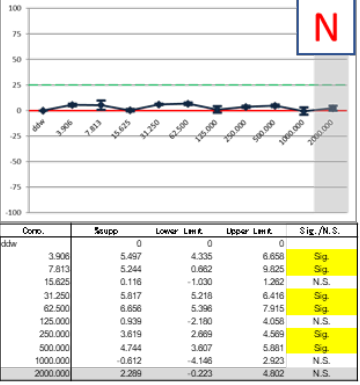
222



223



224



227

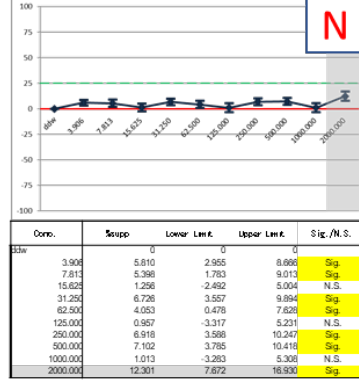
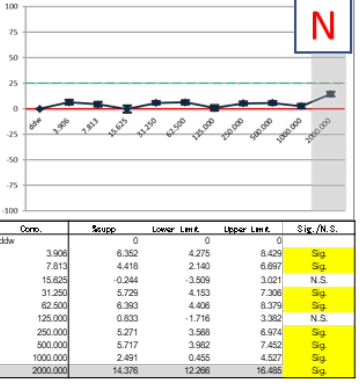


表2 Phase2 試験 ; 評価結果

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

S; Suppression

N; Non-suppression

表 3、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4、Phase1被験物質の試験結果

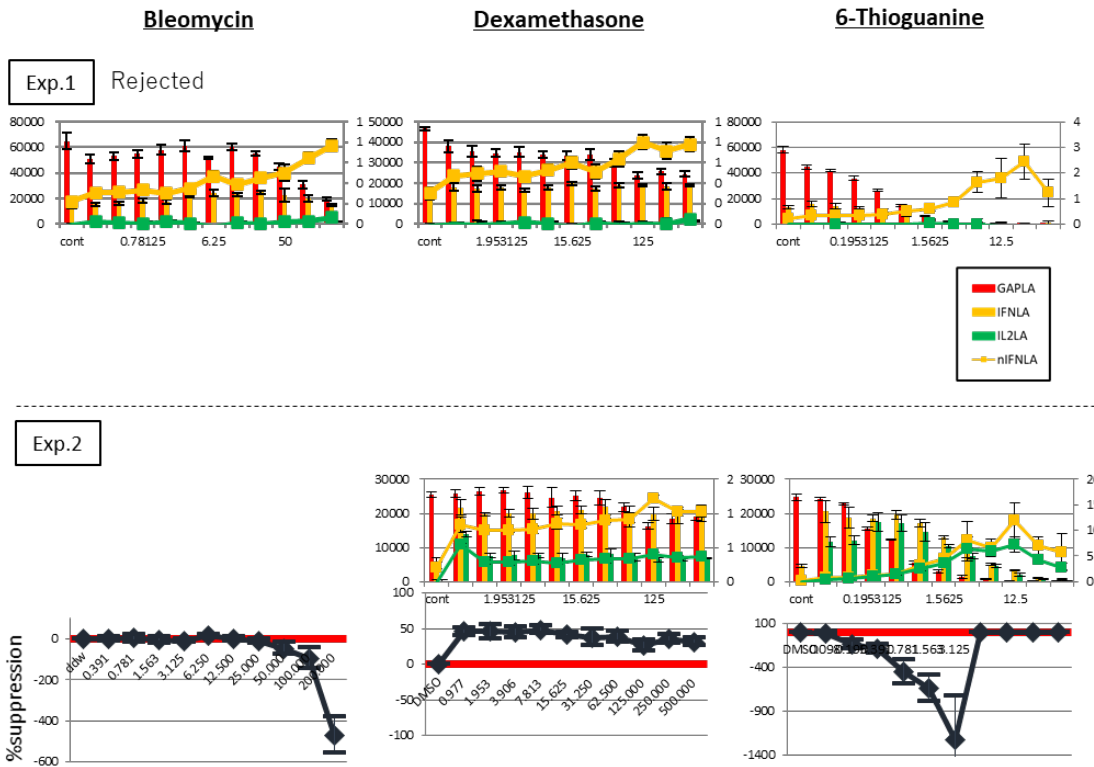


図4、Phase1被験物質の試験結果

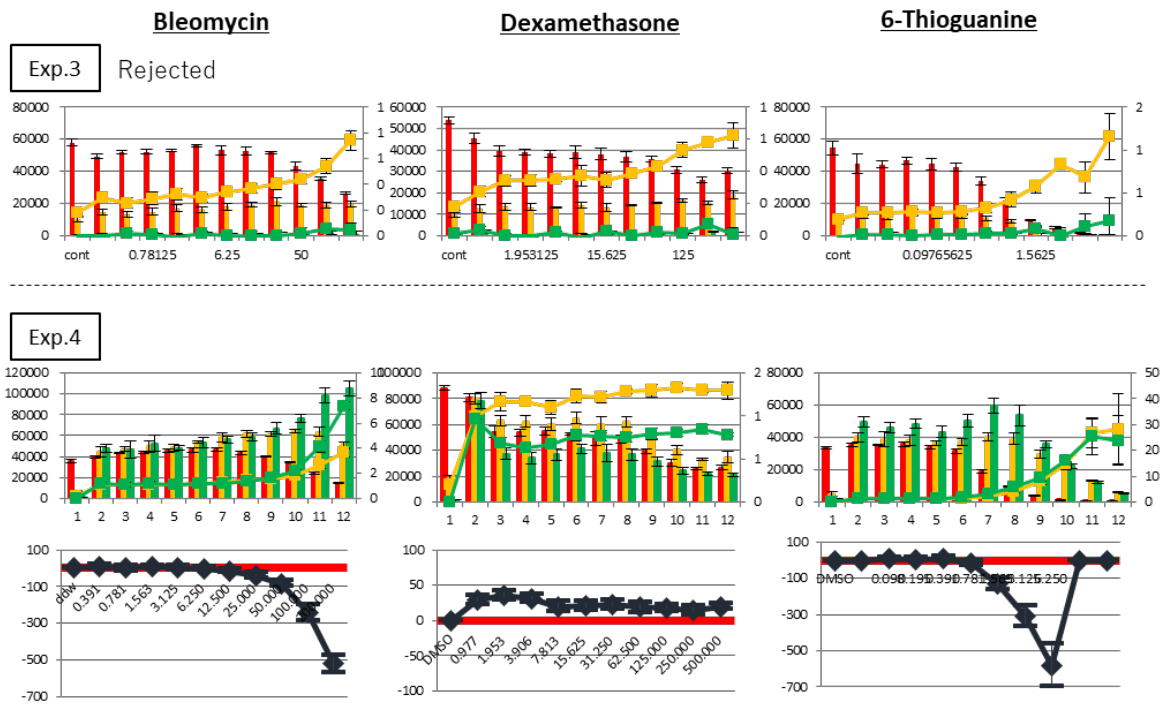
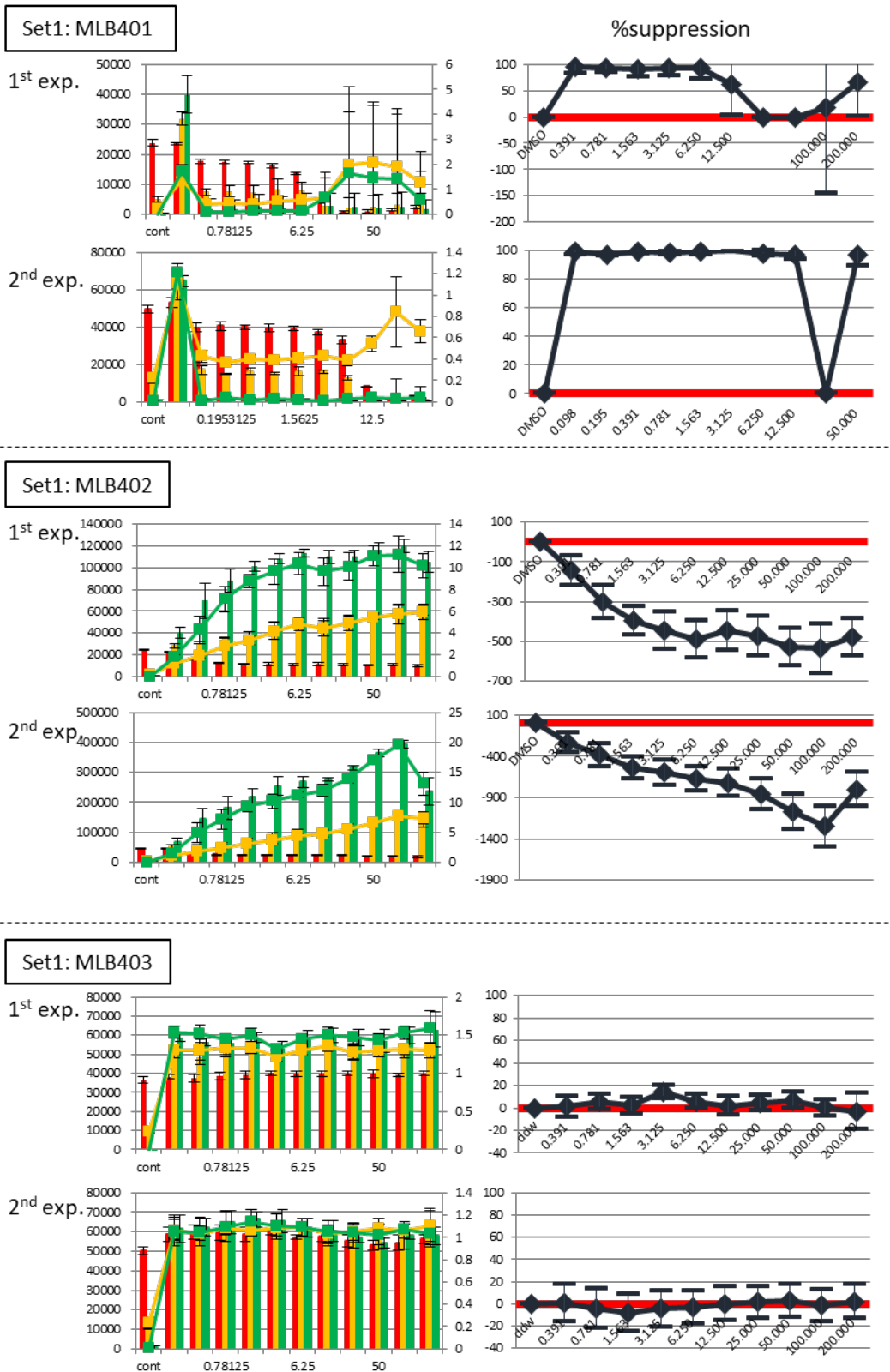


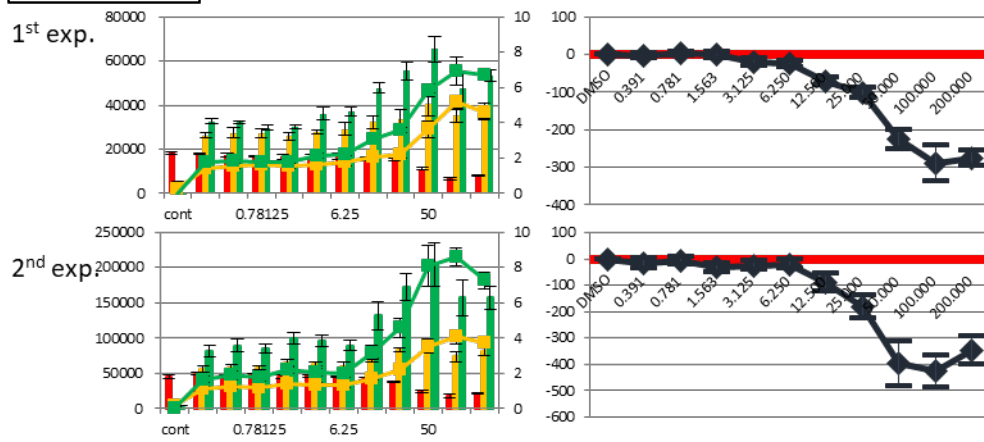
表4、Phase1被験物質の判定結果

		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

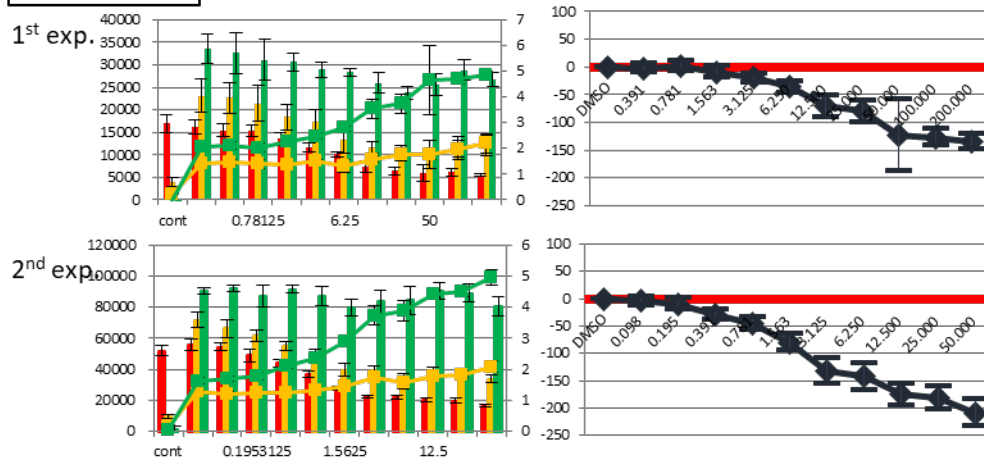
図 5、Phase1被験物質の試験結果



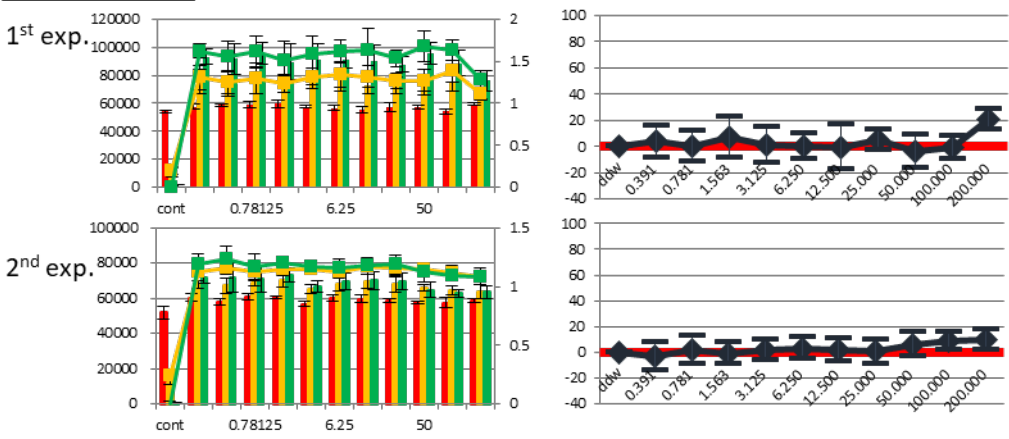
Set1: MLB404



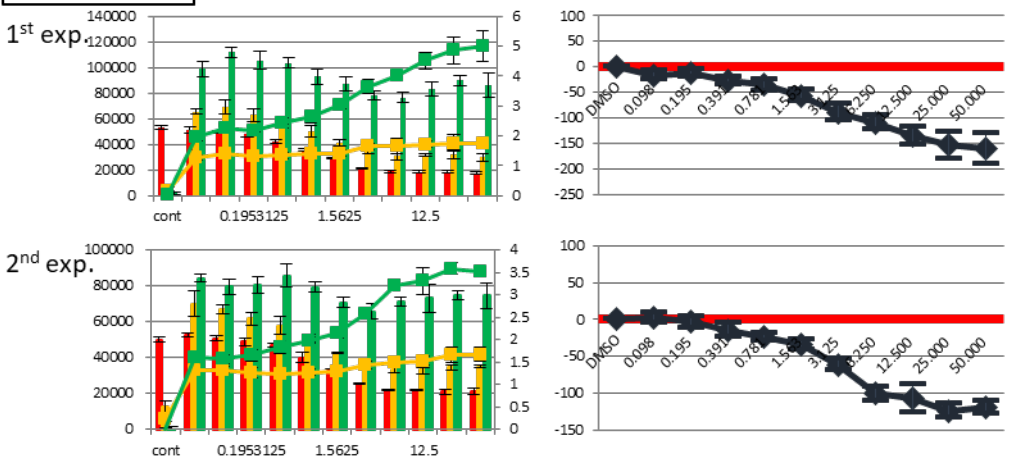
Set1: MLB405



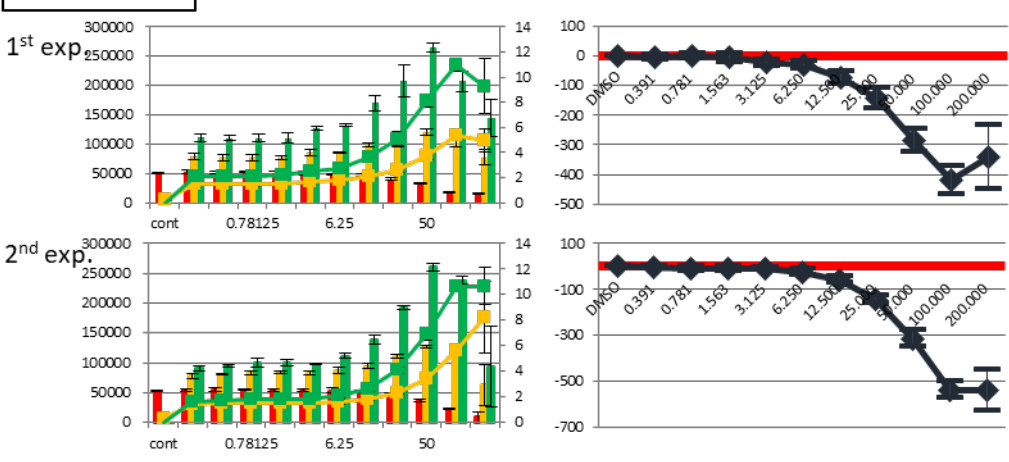
Set2: MLB501



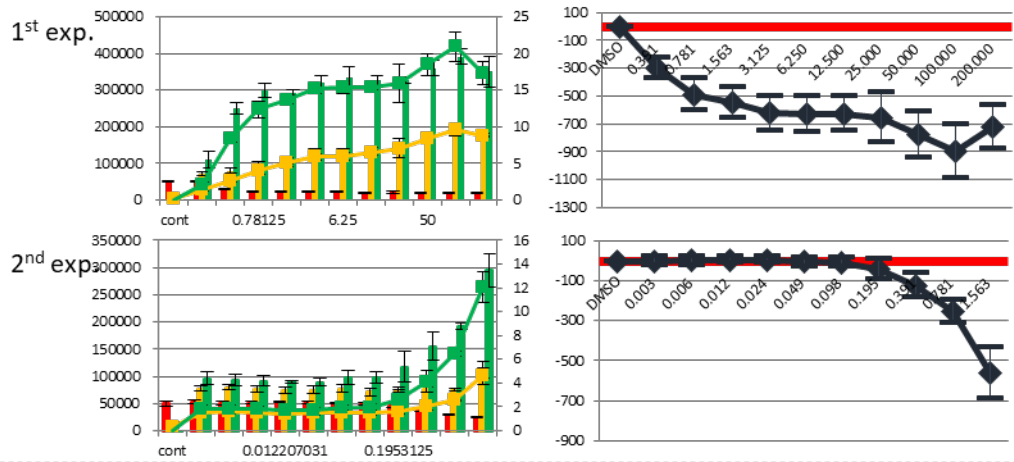
Set2: MLB502



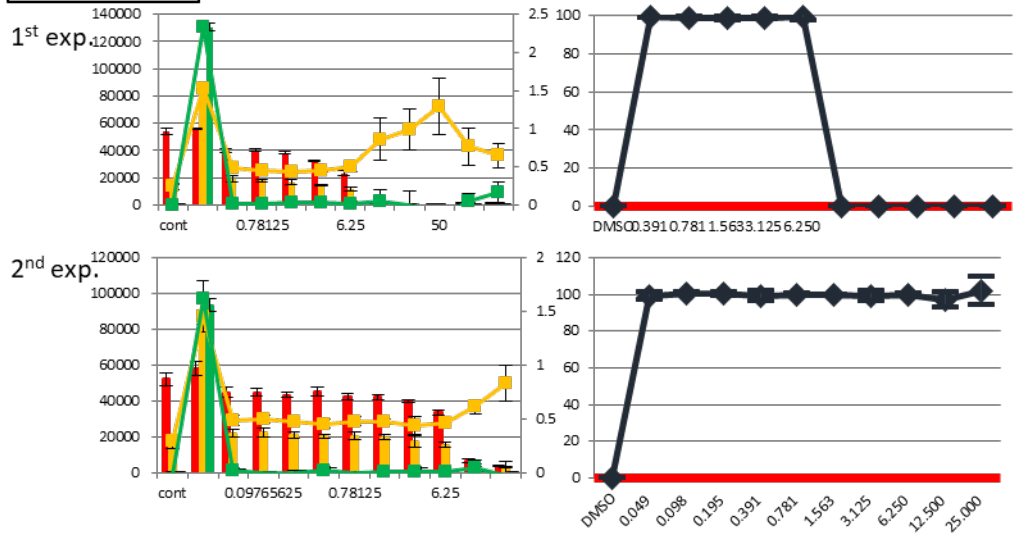
Set2: MLB503



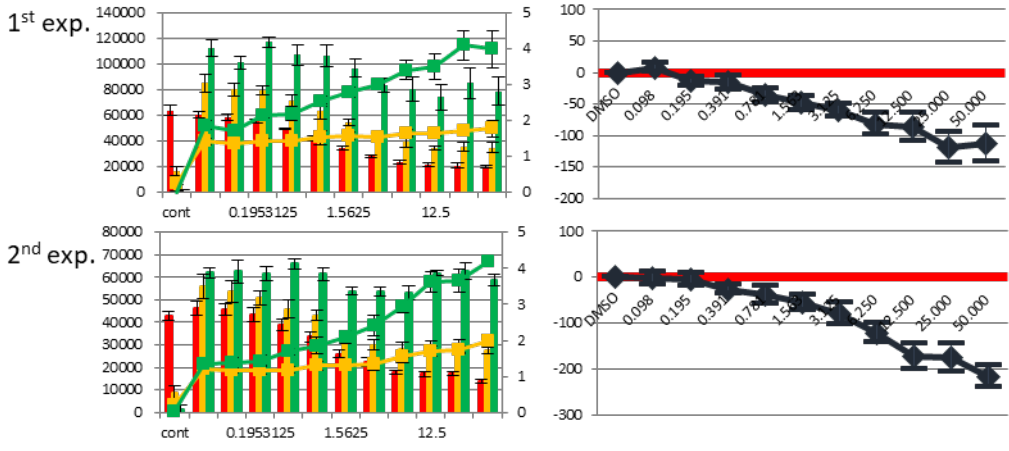
Set2: MLB504



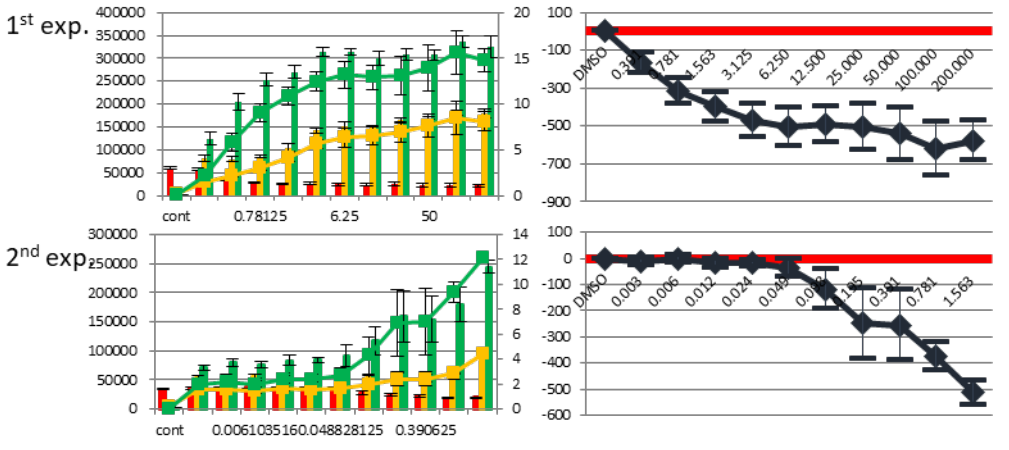
Set2: MLB505



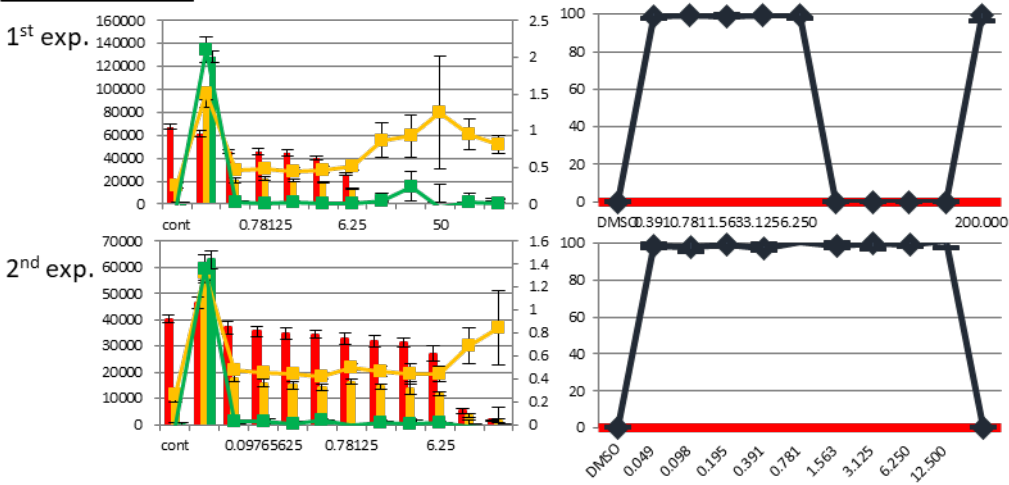
Set3: MLB601



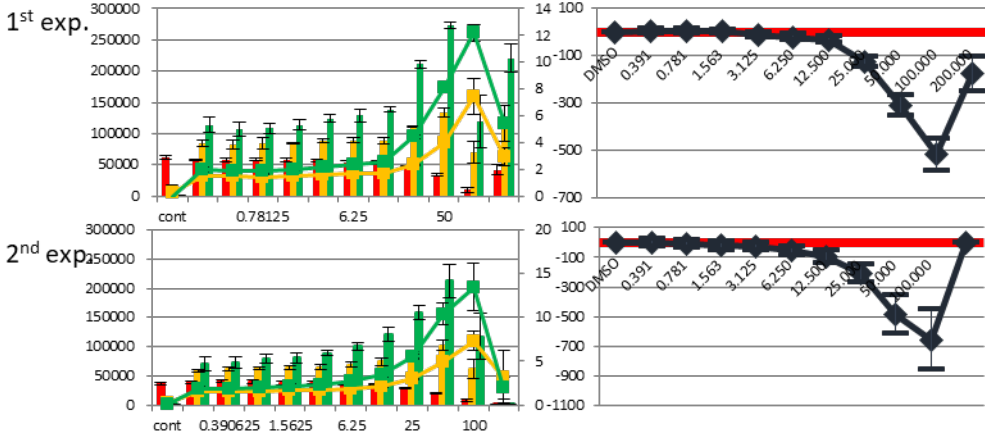
Set3: MLB602



Set3: MLB603



Set3: MLB604



Set3: MLB605

