

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」 事後評価分科会説明資料

5. プロジェクトの詳細説明

5.1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発の成果

(3)免疫毒性予測試験法の開発

事業原簿の章立て

- 2.4.1 背景と目標
 - 2.4.2 最終目標に対する達成度
 - 2.4.3 進捗状況と成果
 - ①免疫毒性評価遺伝子の選定
 - ②発光プローブの作成
 - ③発光細胞の開発、免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認
 - ③-1 遺伝子導入ならびに免疫毒性評価細胞の樹立
 - ③-2 樹立した評価細胞の性状解析
 - ③-3 評価細胞の応答性の確認
 - ③-3-1～6 各種評価細胞の応答性の検討
 - ④免疫毒性評価システムの構築
 - ④-1 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ④-2 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
 - ④-3 細胞ストレス評価システム
 - ④-4 まとめ
 - ⑤複数施設での施設間差検討試験
- 結論

本日の発表内容

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ①接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ②多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

免疫毒性物質とその分類

公開

免疫毒性分類	化学薬品、環境汚染物質
免疫抑制	ハロゲン化芳香族炭化水素類: TCD, TCDO, PBB, ヘキサクロロベンゼン 芳香族炭化水素類: ベンゼン 多環芳香族炭化水素族: ベンゾピレン, ジメチルベンズアントラセン アミン類: ベンジン, N-ジメチルニトロサミン 重金属化合物: Hg, Cd, バナジウム, アルキルスズ, Pb 酸化性ガス: 二酸化窒素, オゾン その他: パラチオン
自己免疫 劇症肝炎 ループス型腎炎 強皮症様疾患	Hg, Cd 塩化ビニルモノマー, シリカ
アレルギー 即時型過敏症 (I ~ III型反応) 遅延型過敏症 (IV型反応)	ベリリウム ホルムアルデヒド プラスチックゴム原材料: エチレンジアミン, 無水トリメリト酸, 無水フタル酸, ジイソシネアート(TDI, MDI) 綿・木材・穀物・タンパク質製剤等粉じん ディーゼル排気微粒子 重金属: Pt, Ni, Cr, Co, Hg ジニトロクロロベンゼン, オキサゾロン, パラフェニレンジアミン, SADBE, DPCP

(平成18年厚生労働省医薬食品局)

標準的毒性試験

パラメータ	特定の項目
血液学的検査	総白血球数及び白血球型別絶対数
血液生化学的検査	グロブリン量及びA/G比
剖検	免疫系器官／組織
臓器重量	胸腺, 脾臓 (オプションとして, リンパ節)
病理組織学的検査	胸腺, 脾臓, リンパ節 (所属リンパ節及び1箇所以上の他のリンパ節), 骨髄, パイエル板

免疫毒性試験

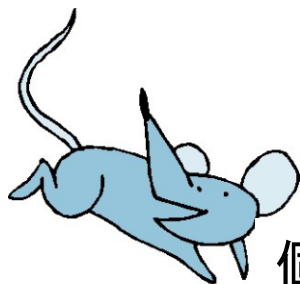
T細胞依存性抗体産生 (TDAR)
免疫フェノタイピング
ナチュラルキラー細胞活性検査
宿主抵抗性試験
マクロファージ／好中球機能
細胞性免疫の機能検査

問題点

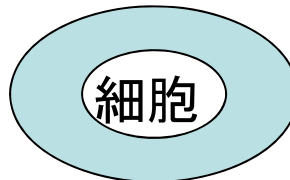
- 1) 多数の動物を使用する (3Rs).
- 2) High throughput化しにくい.
- 3) 最近の免疫学, アレルギー学の進歩を反映していない.

免疫毒性評価法の流れ

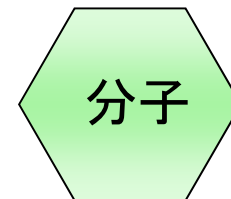
公開



個体



細胞



分子

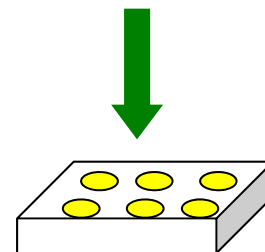
Gell and Coombs classification

- I型過敏症
(IgE Ab and mast cells)
- II型過敏症
抗体依存性細胞障害
- III型過敏症
免疫複合体
- IV型過敏症
遅延型過敏症(接触皮膚炎)

細胞レベルでの免疫反応の解析

- I. 免疫賦活 (アジュバント活性)
 - 1) 樹状細胞の活性化
 - 2) IL-12, IL-23, IL-27の産生
- II. アレルギー反応誘発
(Th1/Th2 imbalance or Th17)
 - 1) T細胞からのサイトカイン産生
(IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-22)
 - 2) 制御性T細胞
(IL-10, TGF- β)
- III. 免疫抑制
 - 1) T細胞の増殖反応
 - 2) 樹状細胞、T細胞のアポトーシス
- IV. 自己免疫
 - 1) 制御性T細胞の機能、数的変化
 - 2) B細胞のクラススイッチ

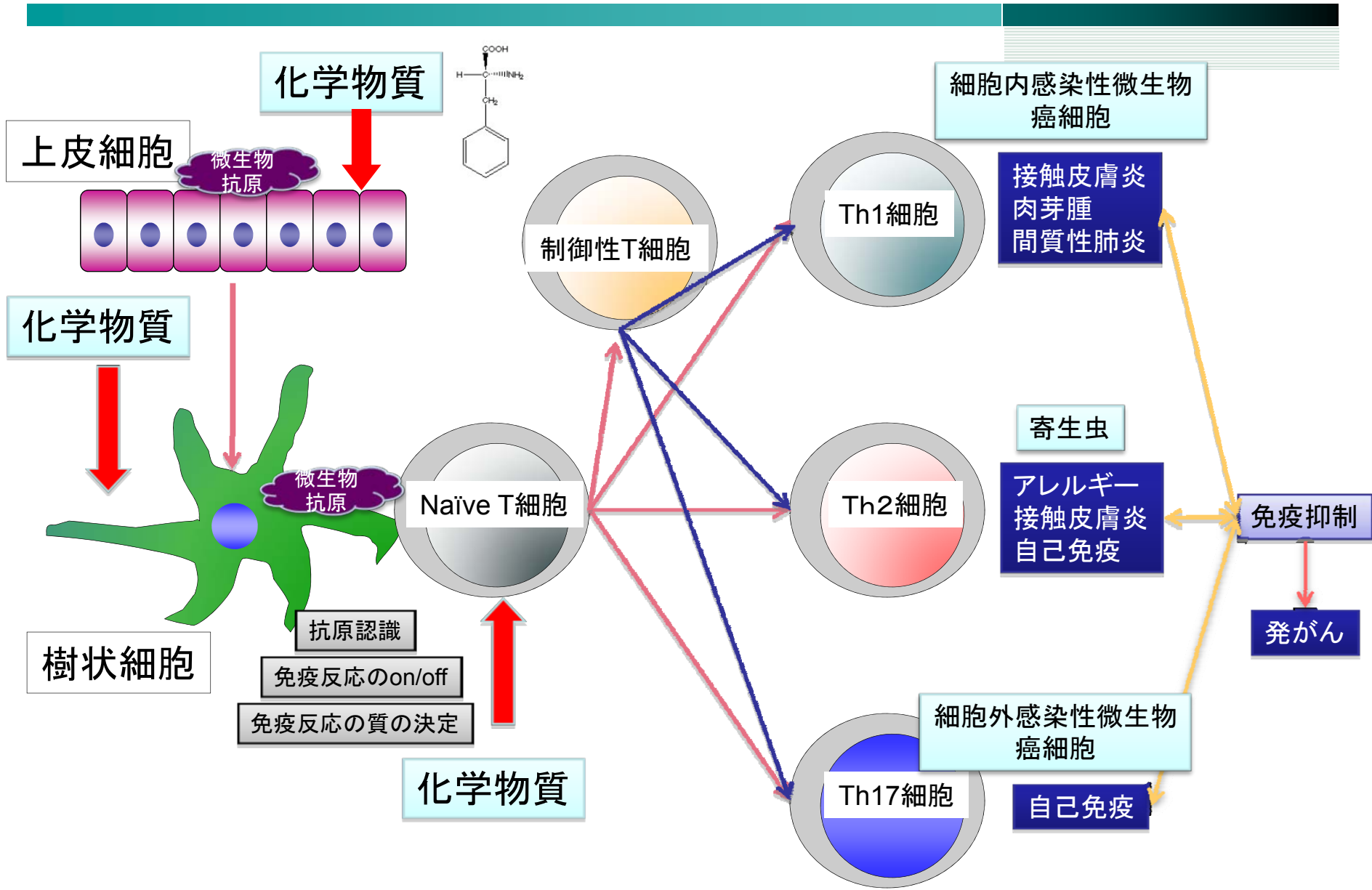
- ROS or Redox
- 転写因子
- リン酸化



High throughput
評価系の樹立

化学物質による免疫毒性発症メカニズム（細胞レベル）

公開



化学物質による免疫毒性発症メカニズム (分子レベル)

公開

免疫毒性物質

I. 非特異的作用

II. 特異的作用

細胞ストレス応答
(DNA障害、小胞体ストレス、
脂質膜障害、酸化ストレス、
danger signal)

受容体、シグナル伝達物質など
に対する化学物質固有の作用

非転写

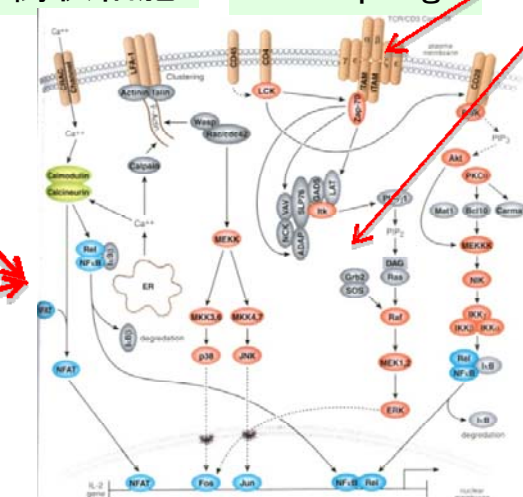
NF-κB
MAPK
(p38, JNK, ERK)
PI3-kinase

転写

ストレス応答蛋白

第2相解毒化酵素
Anti-oxidant protein
Heat shock protein
Scavenger receptor
Chaperon protein
Proteasome protein
Transcription regulators
GADD45

T cell B cell NK cell
樹状細胞 macrophage



T cell
IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, STAT
chemokines, Tbet, GATA3

樹状細胞
IL-1β, TNF-α, IL-10, IL-12

上皮細胞
IL-18, chemokines, TSLP

接触皮膚炎
アレルギー性疾患
自己免疫疾患
悪性腫瘍

Kultz D: Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response.
Annu Rev Physiol 67: 225-57, 2005

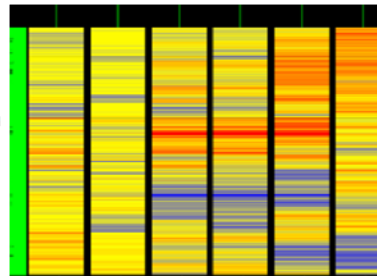
代表的な免疫毒性化学物質

- Diesel exhaust particles (DEP)
- DNCB (Dinitrochlorobenzene)
- Formaldehyde
- HgCl₂
- NiCl₂

上皮

樹状細胞
マクロファージ

T細胞

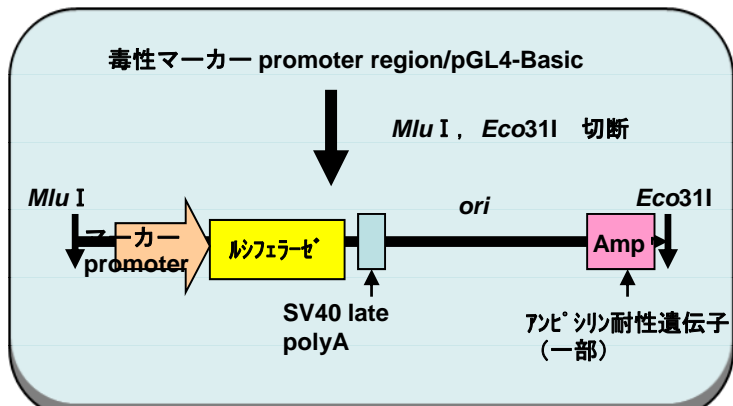


免疫毒性評価遺伝子の決定

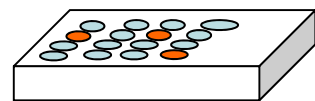
発光ベクターの作成

発光細胞の樹立

High throughput システムの構築



- マクロファージ (樹状細胞の代用)
- 上皮細胞
- T細胞



研究に用いた免疫毒性化学物質

公開

免疫毒性化学物質	免疫毒性
Diesel exhaust particles (DEP)	Th1/Th2 不均衡、アレルギー性疾患
Dinitrochlorobenzene (DNCB)	代表的な接触皮膚炎惹起物質
Formaldehyde	Th1/Th2 不均衡、アレルギー性疾患、sick house syndrome
HgCl ₂	自己免疫性疾患
NiCl ₂	代表的な接触皮膚炎惹起物質、金属アレルギー

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

免疫毒性評価遺伝子の選定

公開

細胞と刺激

- * MoDC, T細胞; 末梢血から比重遠心法等を用いて各画分を分離
MoDCについてはIL-4, GM-CSFを添加して6日間培養の後に使用
- * NHEK; 倉敷紡績株式会社/凍結NHEKを使用
- * 刺激方法; 種々の化学物質を培養液に添加、細胞とともに30分もしくは6時間反応
T細胞についてはCD3/CD28 Expanderを添加して活性化と増殖を誘導

刺激物質

- * 化学物質.
 - DEP: Diesel exhaust particles: 喘息、鼻炎、アトピー性皮膚炎と関連
 - DNCB (Dinitrochlorobenzen): 代表的接触皮膚炎誘導物質
 - Formalin: DEPと同様に喘息、鼻炎との関連性、sick house syndromeの原因
 - HgCl₂: 自己免疫疾患との関連性
 - NiCl₂: 金属アレルギーを引き起こす代表的金属, 接触皮膚炎誘導物質

遺伝子発現解析

- * RNA抽出; RNeasy Mini Kit (QIAGEN)使用、発現解析サンプルとして用いる
- * 発現解析; Human Genome U133 Plus2.0 GeneChip (Affymetrix) を使用
増幅はOne-Cycle Target Labeling and Control Reagent (Affymetrix) を使用
GeneSpring7.3.1 (Agilent Technologies) 使用
- * Validation; Real-time PCR

免疫毒性評価遺伝子

Fold change of gene express > 2 or <1/2
paired *t*-test $p < 0.05$ in three independent experiments (Immune-related genes)

化学物質処理により変動した免疫関連遺伝子

公開

	DNCB	Formalin	NiCl ₂	DEP	HgCl ₂
樹状細胞	31	37	52	13	13
表皮細胞	3	11	0	7	3
T細胞 (発現増加)	53	8	6	12	0
T細胞 (発現減少)	104	19	7	17	2

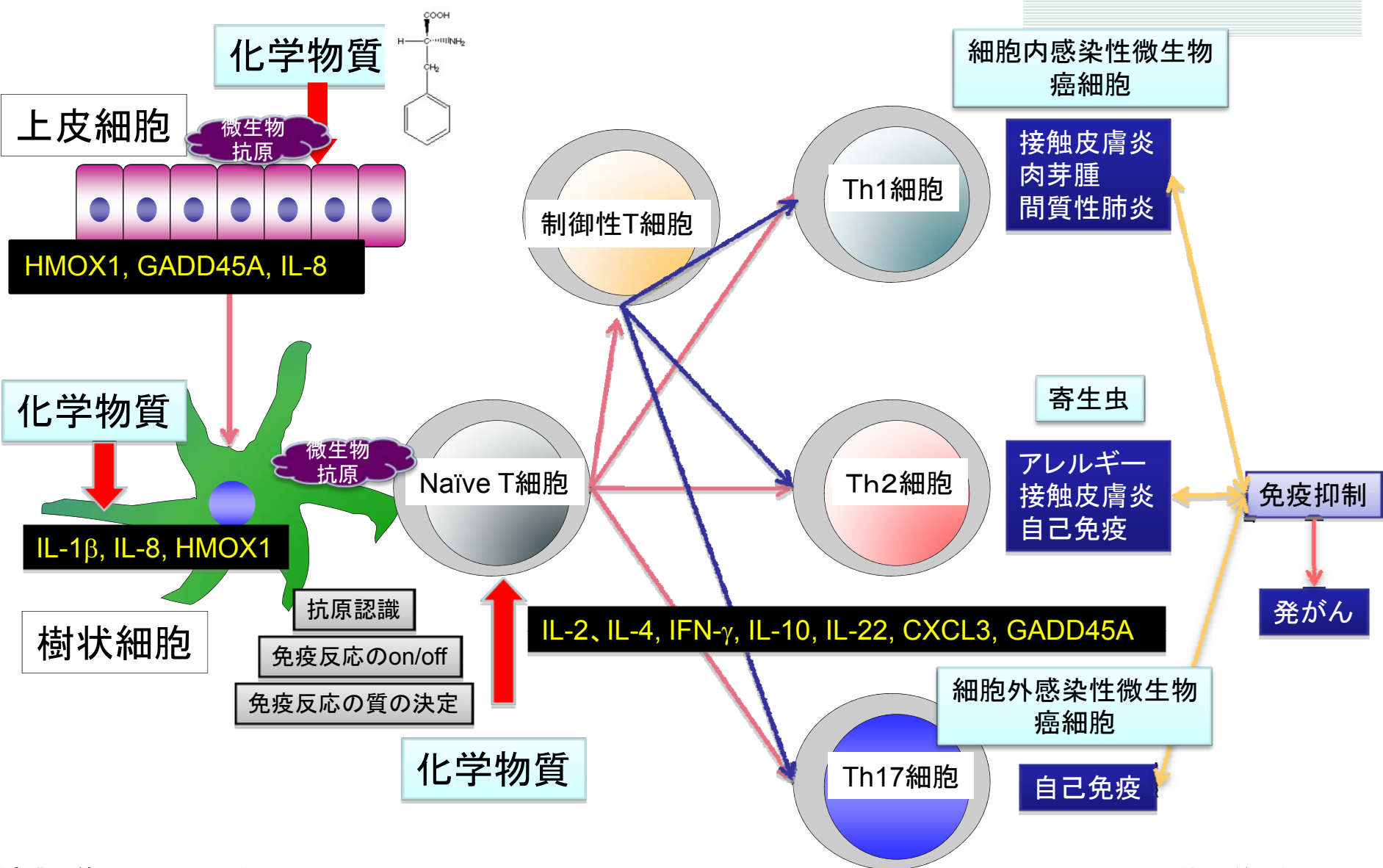
免疫毒性評価遺伝子のまとめ

公開

	5 chemicals	4 chemicals	3 chemicals	2 chemicals
樹状細胞	IL-8	C5AR1	CCL3	CCL15, 20, CXCL10
	PBEF1	CXCL3	CXCL2	CD55
		INHBA	HMOX1	FOSL1
		ZEB1	GADD45A	GADD45B
			HSPA4L	SPA1A, 1B1, 1B, CB, D1, E1, H1
			IL-1 β	IL-1 α
			IRAK2	LY9
			IRF1	SLAMF7
			TNF	S100A9
			TNAIP2	SOD2
表皮細胞			TNFSP18	THBS1, TREM1
			IL-8	GAAD45A, HSPA6
			HMOX1	IL-1 β , IL-6, TNF- α
T細胞 (発現増加)			HSP1A	PBEF1
			CXCL3	FAIM3
			GADD45A	HMOX1
				IL-7R
T細胞 (発現減少)	IFN- γ	IL-12 β		TXNIP
	IL-4		CCL17	CCR1
			CCL22	CD80, CTLA4
			IL-5	IL-10, 22
			IL-9	CXCL10, 11
			LIF	INDO
				IRF8
				KLRC4
				TBX21

免疫毒性評価遺伝子

公開

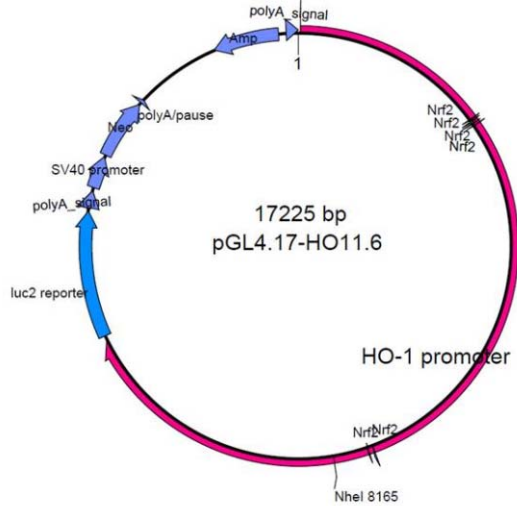


- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成**
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

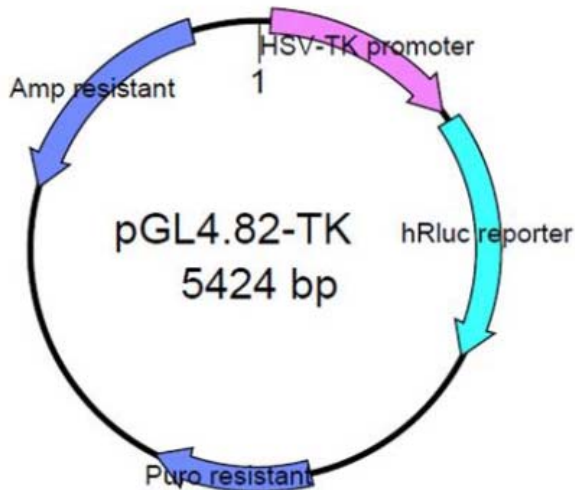
免疫毒性評価細胞作成に用いたプラスミド

公開

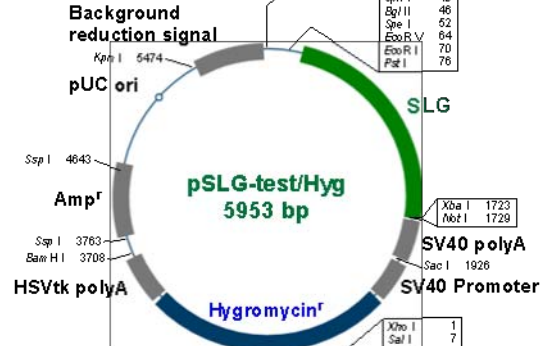
HMOX1発光ベクター



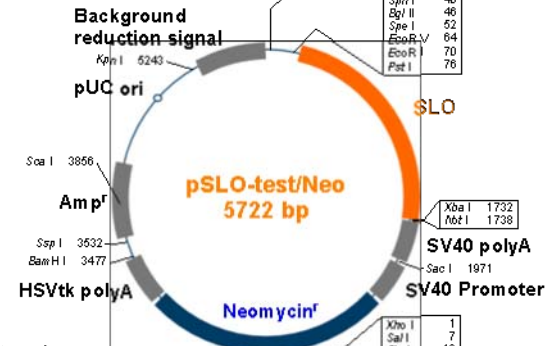
TK発光ベクター



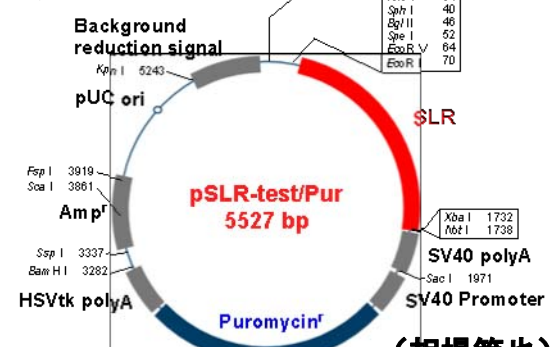
SLG発光ベクター



SLO発光ベクター



SLR発光ベクター

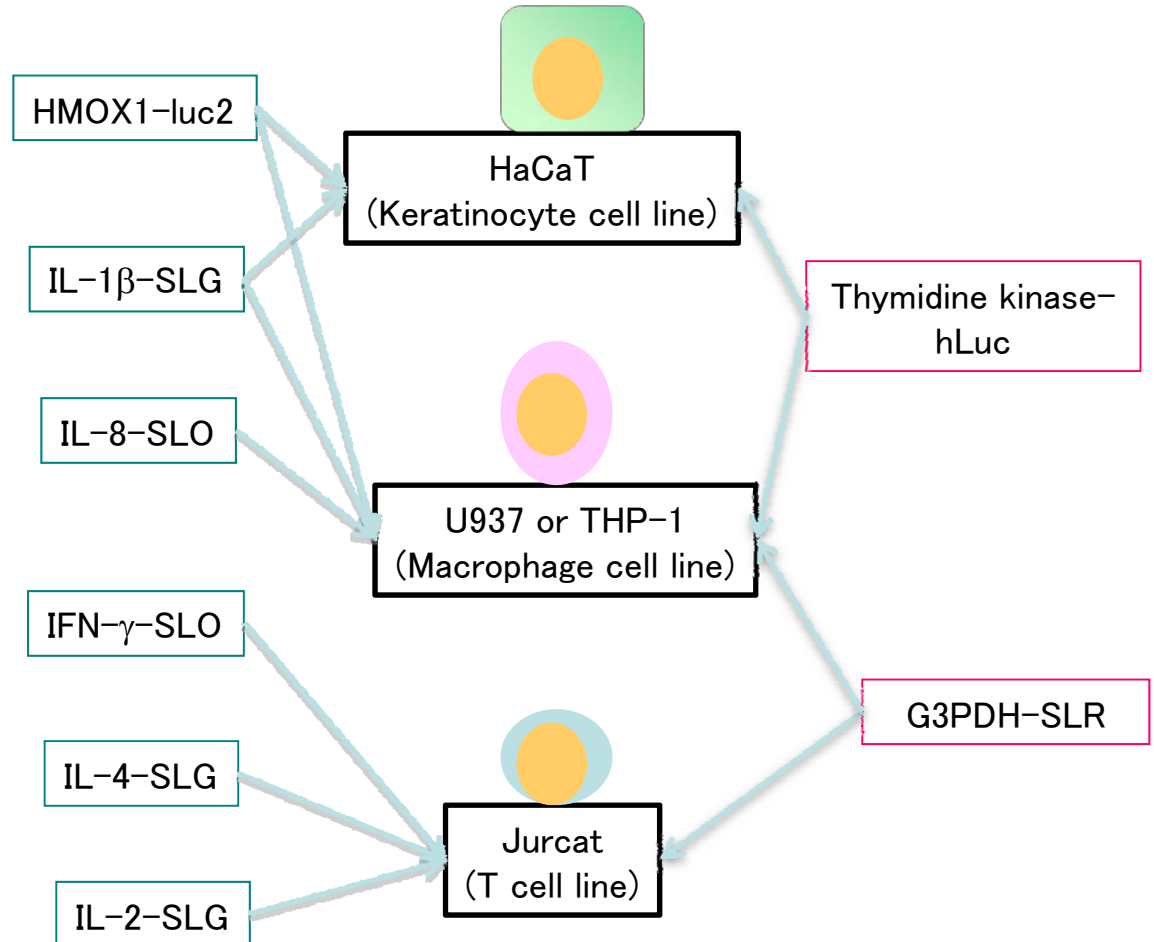


発光プローブならびに発光細胞の開発

公開

候補遺伝子プロモーター下流に luc2, SLG, SLO、また、internal control として thymidine kinase あるいは G3PDH 下流に hLuc, SLR を導入した発光細胞を作成した。

評価遺伝子	プロモーター領域	ルシフェラーゼ
G3PDH	-1373~+128	SLR
IL-2	-3006~+286	SLG
IL-4	-4855~+65	SLG
IFN- γ	-4971~+111	SLO
IL-8	-5059~+144	SLO
IL-1 β	-5006~+56	SLG
HMOX1	-3300~?	luc2
Thymidine kinase	市販	hRLuc



- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

これまでに樹立した主な免疫毒性評価細胞

公開

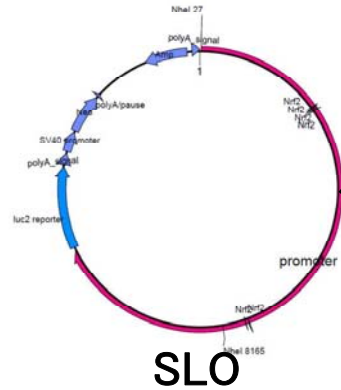
親細胞		導入遺伝子			作製主担当	備考
		SLR	SLG	SLO		
Jurkat細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	TOYOBO、東北大	#14D1
	2色細胞	G3PDH	IL4	-	TOYOBO、東北大	#4A4
		G3PDH	-	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12
	3色細胞	G3PDH	IL4	IFN γ	TOYOBO、東北大	#10C6
		G3PDH	IL2	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12、#2F12、#2H4、#2A12、#2A5、#7C2、#8D5
U937細胞	1色細胞	G3PDH			TOYOBO、AIST	#UGA12、#9A6
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	TOYOBO、AIST	#4D5、#6C12、#7A9
	1色細胞	TK	-	-	東北大	#UR2
	2色細胞	TK	HO-1	-	東北大	#UR2H4117
THP-1細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	AIST、東北大	#TGC17
	1色細胞	G3PDH	-	-	東北大	#TGC17
	2色細胞	G3PDH	IL1 β		東北大	#TGC17bA16.19
	2色細胞	G3PDH		IL8	東北大	#TGC17EA01(THP-G8)
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	東北大	#TGC17bA16EA140-5 (THP-G18)
HaCaT細胞	1色細胞	TK	-	-	東北大	
	2色細胞	TK	HO-1	-	東北大	#HR38H6

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
- ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
- ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

IL-8レポーター細胞 (THP-G8)

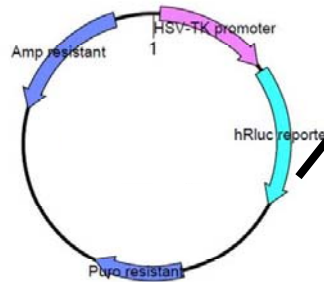
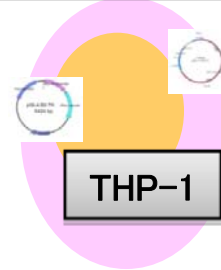
公開

IL-8 promoter



SLO

TGC17EA01
(THP-G8)



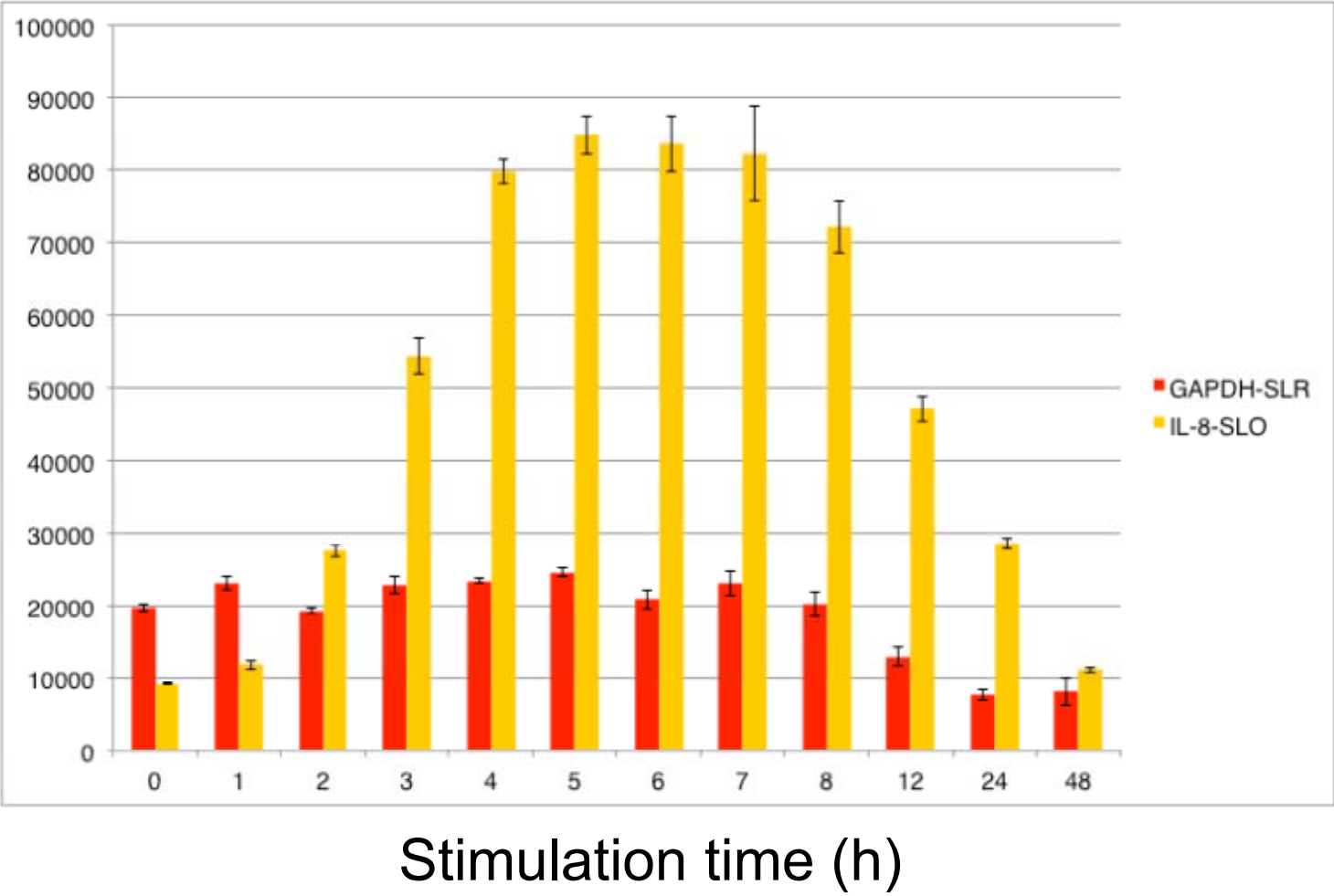
SLR

G3PDH promoter

THP-G8細胞のLPSに対する応答性

公開

SLO-LA (IL-8) & SLR-LA (GAPDH)

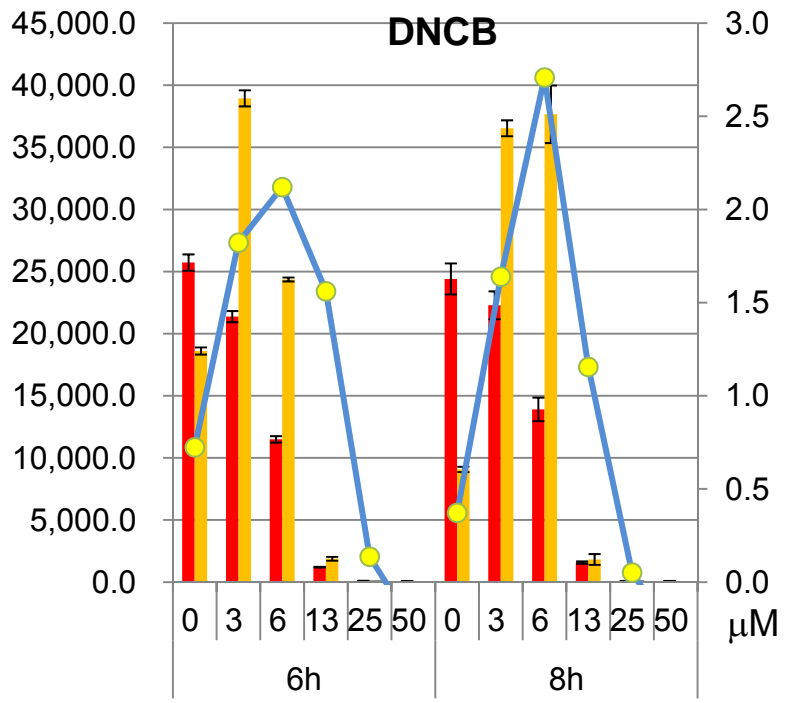
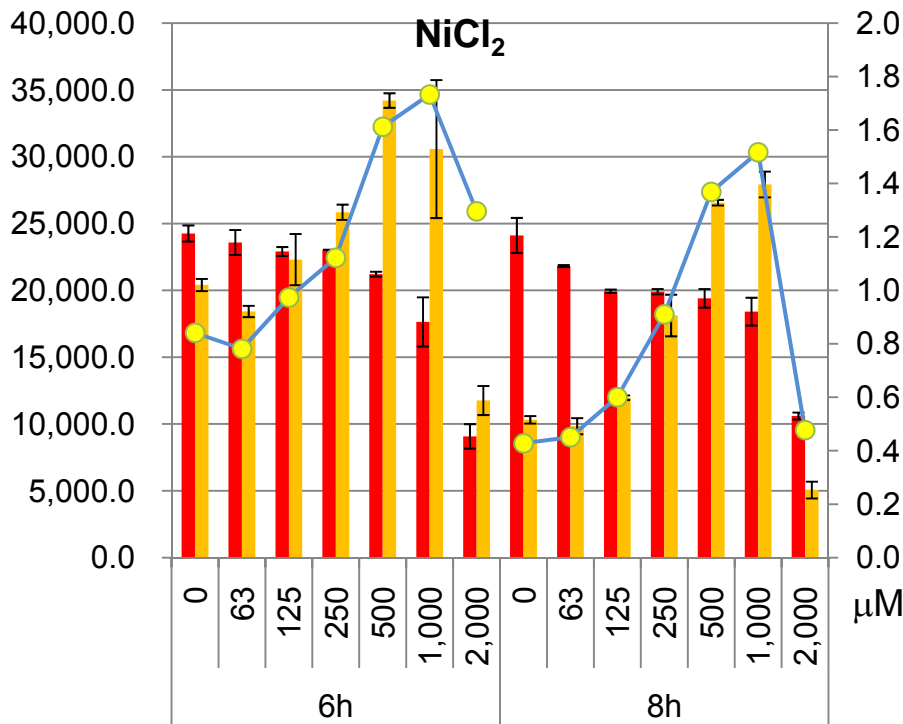


Abbreviation	定義
■ SLR-LA	SLR ルシフェラーゼ活性(GAPDH)
■ SLO-LA	SLO ルシフェラーゼ活性(IL-8)

THP-G8細胞のDNCEBおよびNiCl₂に対する応答性

公開

SLO-LA (IL-8) & SLR-LA (GAPDH)



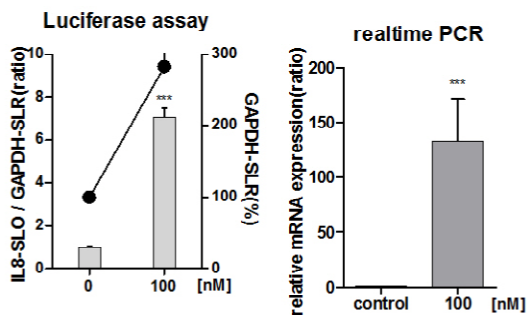
nSLO-LA

Abbreviation	定義
SLR-LA	SLR ルシフェラーゼ活性(GAPDH)
SLO-LA	SLOルシフェラーゼ活性(IL-8)
nSLO-LA	SLO-LA / SLR-LA

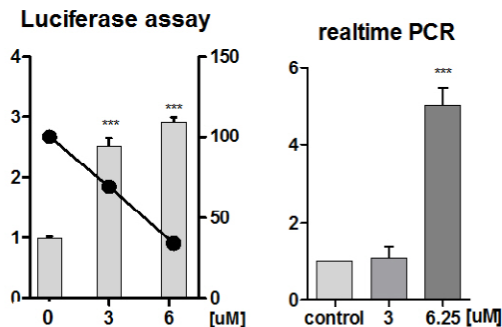
化学物質刺激後のTHP-G8細胞IL-8レポーター活性とIL-8mRNA発現との相関

公開

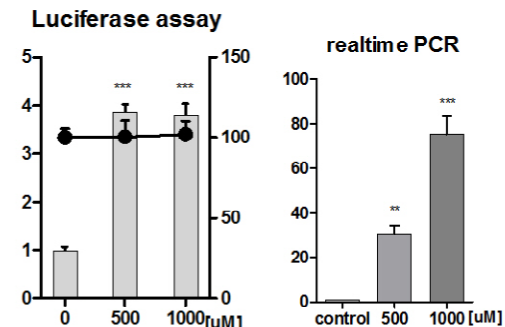
LPS



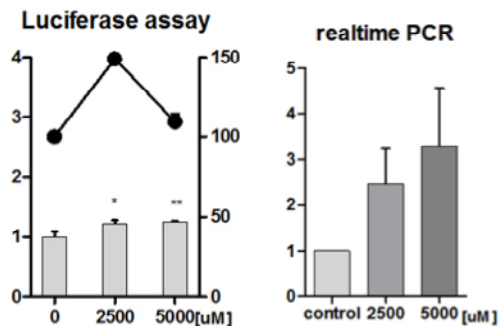
DNCB



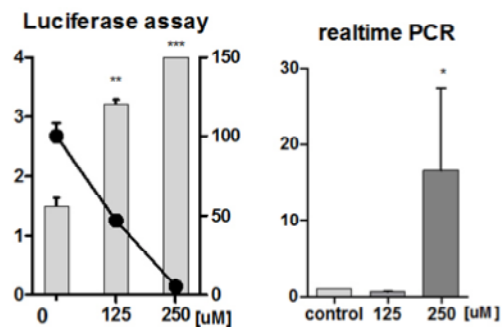
NiSO4



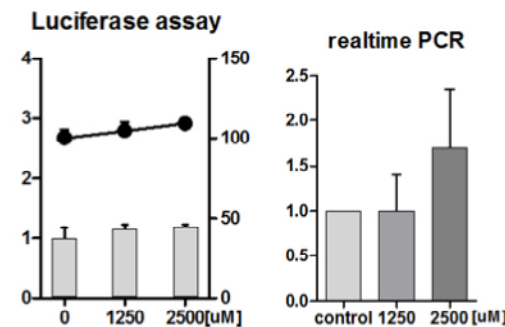
ED



SDS



1-BB



nSLO-LA

IL-8 mRNA

nSLO-LA

IL-8 mRNA

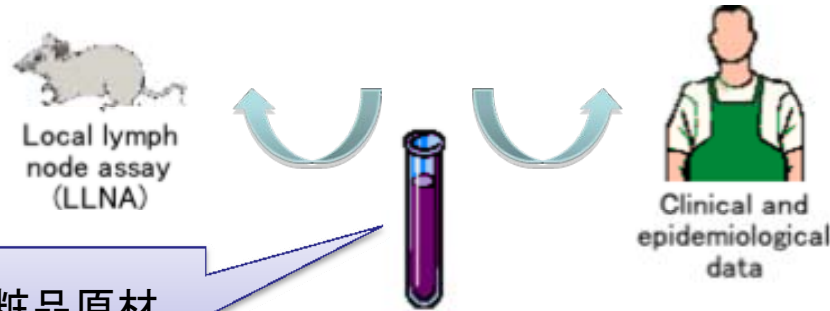
nSLO-LA

IL-8 mRNA

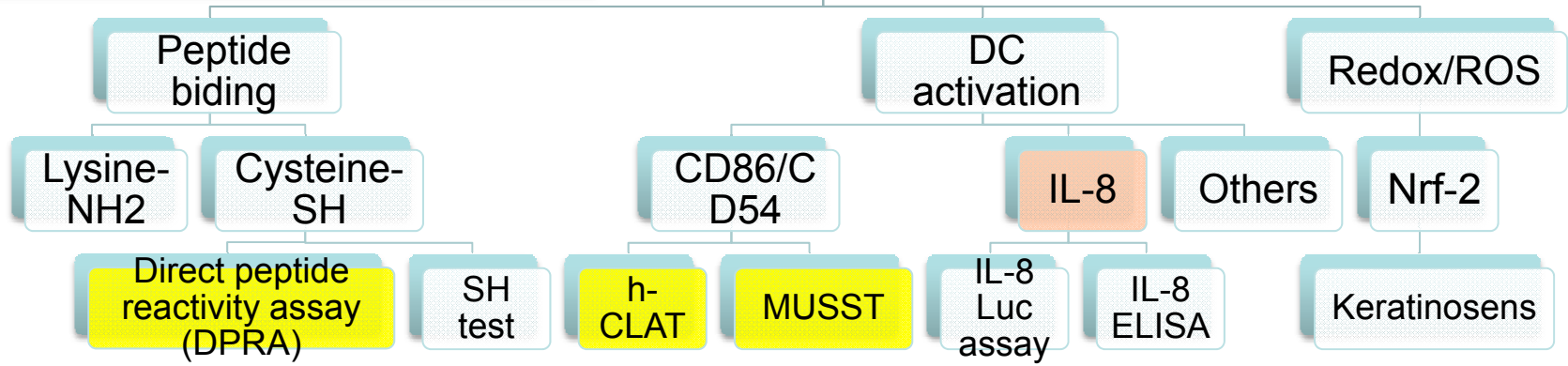
Abbreviation	定義
●	SLR-LA SLR ルシフェラーゼ活性(GAPDH)
○	SLO-LA SLOルシフェラーゼ活性(IL-8)
■	nSLO-LA SLO-LA / SLR-LA

感作性試験代替法の現状

公開



EUによる2013年までの化粧品原材料開発における動物実験廃止の決定



DPRA, h-CLAT, and MUSST are evaluated within Colipa inter laboratory ring trials and accepted by ECVAM for pre-validation. (Maxwell G et al. Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten. 28:50-5, 2010)

Several authors recently have suggested that IL-8 production or mRNA expression by either monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) (Toebak, 2006), U937 cells (Python, 2007), or THP-1 cells (Nukada, 2008) (Mitjans, 2010) (Arkusz, 2010) can provides a promising *in vitro* tool for discrimination between allergens and irritants.

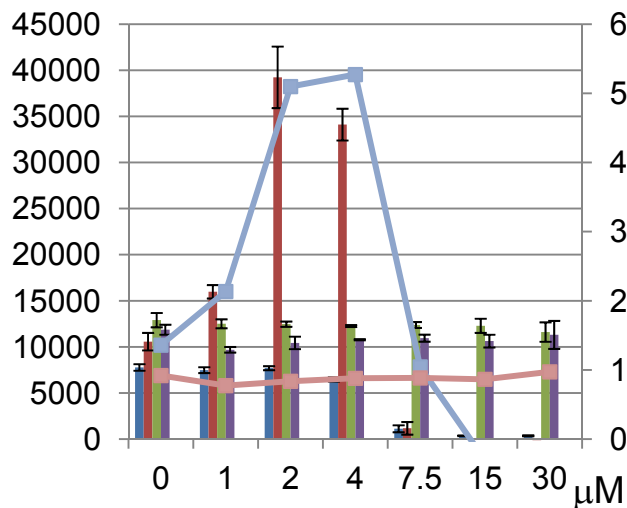
Abbreviation	パラメーターの定義
SLO-LA	SLO luciferase 活性
SLR-LA	SLR luciferase 活性
nSLO-LA	SLO-LA / SLR-LA (SLO-LAの値をSLR-LAの値で標準化した値)
SI-SLR-LA	SLR-LA of THP-G8 treated with chemicals / SLR-LA of non-treated THP-G8 (化学物質処理の有無によるSLR-LAの変化)
FInSLO-LA	nSLO-LA of THP-G8 cells treated with chemicals / nSLO-LA of non-stimulated THP-G8 cells (化学物質処理の有無によるnSLO-LAの変化)
SI	FInSLO-LA of THP-G8 cells stimulated with a chemical and NAC / FInSLO-LA stimulated with the chemical alone (NACの有無によるFInSLO-LAの変化)

THP-G8細胞を用いた感作性試験法のあらまし

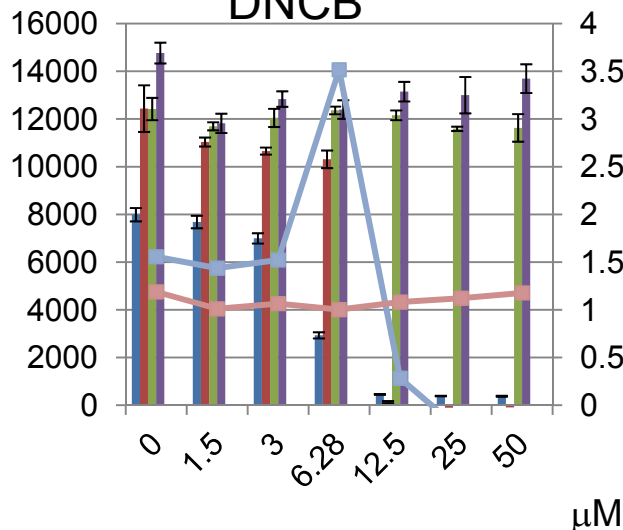
公開

SLO-LA (IL-8) & SLR-LA (GAPDH)

4-NBB



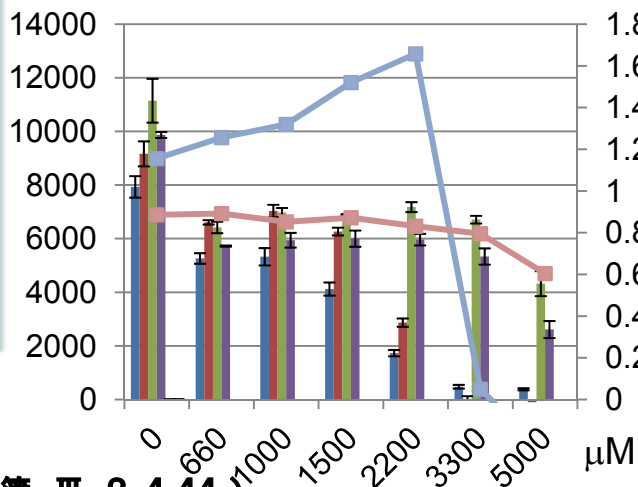
DNCB



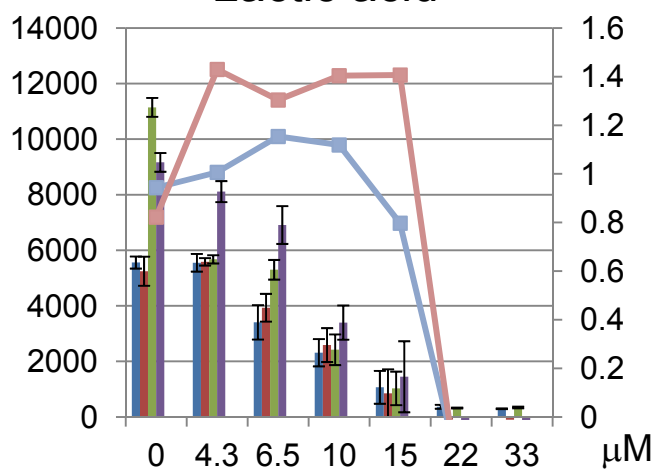
- SLR-LA
- SLO-LA
- SLR-LA (NAC+)
- SLO-LA (NAC-)
- nSLO-LA
- nSLO-LA (NAC+)

nSLO

PPD

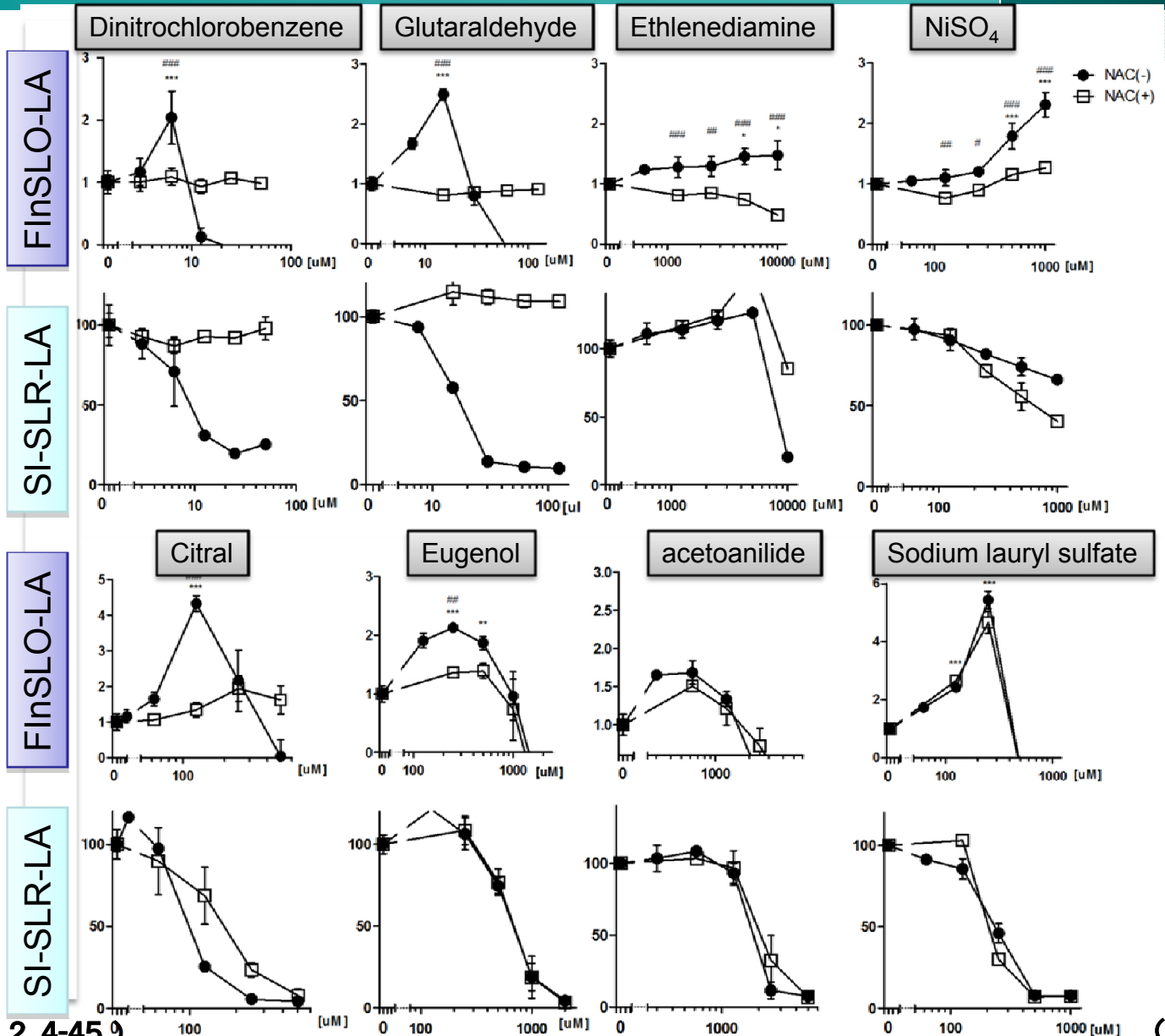


Lactic acid



IL-8 Luc assayの代表的結果

公開



● NAC (-)
 □ NAC (+)

IL-8 Luc assay (Nukadaらの用いた化学物質)

公開

Nukada, Y., et al. *J. Toxicol. Sci.* **33**, 175-85, 2008.

Abbreviation	LLNA	1st*		2nd*		3rd*		Positive number(/3)	Determination
		FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI		
1-Benzoylacetone	extreme	3.0	0.7	2.3	1.0	2.6	0.6	2	allergen
Dinitrochlorobenzene	extreme	3.8	1.0	2.0	0.5	2.4	0.4	3	allergen
Glutaraldehyde	strong	1.7	0.6	2.2	0.3	2.5	0.4	3	allergen
Benzoyl peroxide	strong	1.5	0.6	1.7	0.7	1.4	0.7	3	allergen
Phthalic anhydride	strong	1.9	0.5	2.6	0.4	1.9	0.5	3	allergen
2-Mercaptobenzothiazole	moderate	1.4	0.7	3.4	0.3	1.6	0.7	3	allergen
Ethylenediamine	moderate	1.3	0.6	1.3	0.5	1.5	0.6	1	non-allergen
Methyl-2-nonynoate	moderate	1.5	0.6	1.4	0.7	1.3	0.7	2	allergen
NiSO4	moderate	3.3	0.7	3.9	0.4	2.3	0.5	3	allergen
Diethyl maleate	moderate	1.7	0.6	1.2	0.8	1.7	0.7	2	allergen
Hexylcinnamaldehyde	weak	2.1	0.7	2.0	0.8	1.7	0.8	3	allergen
Citral	weak	1.7	0.8	2.3	0.4	1.4	0.6	3	allergen
Eugenol	weak	2.1	0.7	2.4	0.6	2.3	0.7	3	allergen
Geraniol	weak	1.6	0.5	1.7	0.5	1.7	0.7	3	allergen
Aniline	weak	1.2	0.8	1.2	0.6	1.0	0.9	0	non-allergen
1-Bromobutane	non-allergen	1.4	0.7	1.2	0.9	1.3	0.8	1	non-allergen
Diethyl phthalate	non-allergen	1.8	0.9	2.2	0.6	1.5	1.1	1	non-allergen
Benzalkonium chloride	non-allergen	2.7	0.7	2.5	1.1	1.4	1.0	1	non-allergen
Vanillin	non-allergen	2.8	0.8	4.2	0.5	1.9	0.9	2	allergen
2-Hydroxypropyl methacrylate	non-allergen	1.5	0.8	1.6	0.6	1.6	0.8	1	non-allergen
Acetoanisole	non-allergen	1.7	0.9	1.8	0.8	1.8	1.0	1	non-allergen
6-Methylcoumarin	non-allergen	1.2	1.1	1.2	0.9	1.3	0.9	0	non-allergen

*FInSLO-LA:

+ = FInSLO ≥ 1.4; - = FInSLO-LA < 1.4

SI:

+ = SI ≤ 0.8; - = SI > 0.8

IL-8 Luc assayにおけるアレルゲンの判定基準
 独立した3回の実験において2回以上で以下の値を満たした時に感作性物質 (Allergen) と判定する.

- 1) $FInSLO-LA \geq 1.4$
- 2) $SI \leq 0.8$
- 3) $SI-SLR-LA \geq 0.2$

LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
Allergen	13	1	15
Non-allergen	2	6	7
Total	15	7	22

IL-8 Luc assay	
False negative	13
False positive	14
Sensitivity	87
Specificity	86
Accuracy	86

IL-8 Luc assay (ECVAM & Colipa が提案した化学物質)

公開

Casati, S., et al. *Altern. Lab. Anim.* **37**, 305-12, 2009.

Abbreviation	LLNA	1st*		2nd*		3rd*		Positive number(/3)	Determination
		FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI		
Oxazolone	extreme	1	1	1	1			0	non-allergen
4-Nitrobenzylbromide	extreme	3.9	0.27	4.4	0.21			2	allergen
Dinitrochlorobenzene	strong	2.3	0.44	1.8	0.53			2	allergen
Methyldibromoglutaronitrile	strong	1.6	0.65	2.7	0.50			2	allergen
Glyoxal	strong	1.7	0.77	1.4	0.78			2	allergen
2-Mercaptobenzothiazole	moderate	1.9	0.70	1.9	0.72			2	allergen
Cinnamal	moderate	2.0	0.54	2.7	0.44			2	irritant
Tetramethyl thiuram disulphide	moderate	1.7	0.63	3.6	0.44			2	allergen
Paraphenylenediamine	moderate	1.5	0.66	1.5	0.80			2	allergen
Isoeugenol	moderate	1.8	0.79	1.8	0.86	1.55	1.04	1	non-allergen
Eugenol	weak	2.1	0.64	1.7	0.77			2	allergen
Cinnamic alcohol	weak	2.1	0.47	2.3	0.76			2	allergen
Glycerol	non-allergen	1.5	0.82	1.4	0.83			0	non-allergen
Salicylic acid	non-allergen	1.3	1.27	1.1	1			0	non-allergen
Lactic acid	non-allergen	1.2	0.82	1.1	1.32			0	non-allergen
Sodium lauryl sulphate	non-allergen	3.1	0.88	3.7	1.6			0	non-allergen

*FInSLO-LA:

+ = FInSLO >= 1.4; - = FInSLO-LA < 1.4

SI:

+ = SI <= 0.8; - = SI > 0.8

IL-8 Luc assay (Casatiらの提案した化学物質) まとめ

公開

LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
Allergen	10	0	10
Non-allergen	2	4	6
Total	12	4	16

IL-8 Luc assay	
False negative	17
False positive	0
Sensitivity	83
Specificity	100
Accuracy	88

IL-8 Luc assay (用いた全化学物質)まとめと他のassay方法との比較

公開

LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
Allergen	20	1	10
Non-allergen	4	10	6
Total	24	11	35

	IL-8 Luc assay	h-CLAT ¹⁾	Keratinosens ²⁾
False negative	17	13	11
False positive	9	25	20
Sensitivity	83	88	88
Specificity	90	75	79
Accuracy	86	84	85
Incubation time	6 hr	24 hr	48 hr

1) Ashikaga T et al. ATLA 38:2 275, 2010

2) Emter R et al. Toxicol Appl Phramacol 245: 281, 2010

- 1) IL-8 Luc assayは、他の代表的な感作性試験代替法と遜色の無い感度、特異度、正確性を有している。
- 2) IL-8 Luc assayは、mRNA発現を評価する手法であり、タンパク発現を評価する他の手法と異なり化学物質処理に要する時間はわずか6時間と極めて短時間である。
- 3) 化学物質処理後、96 multiwell plateをルミノメーターにセットすれば、それ以降の処理は一切器械が行うため、人手がかからず、その上human errorを最小限に減らすことが可能な方法である。

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

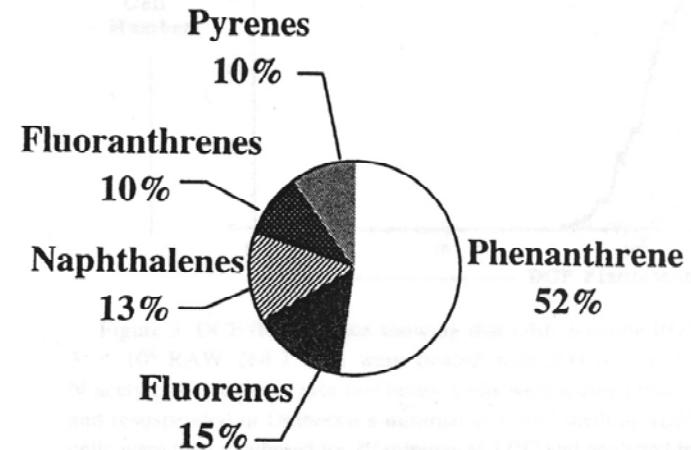


Figure 1. Chemical composition of DEP. The major active constituents of DEP are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Ann Allergy Asthma Immunology 1999; 83: 624-629.

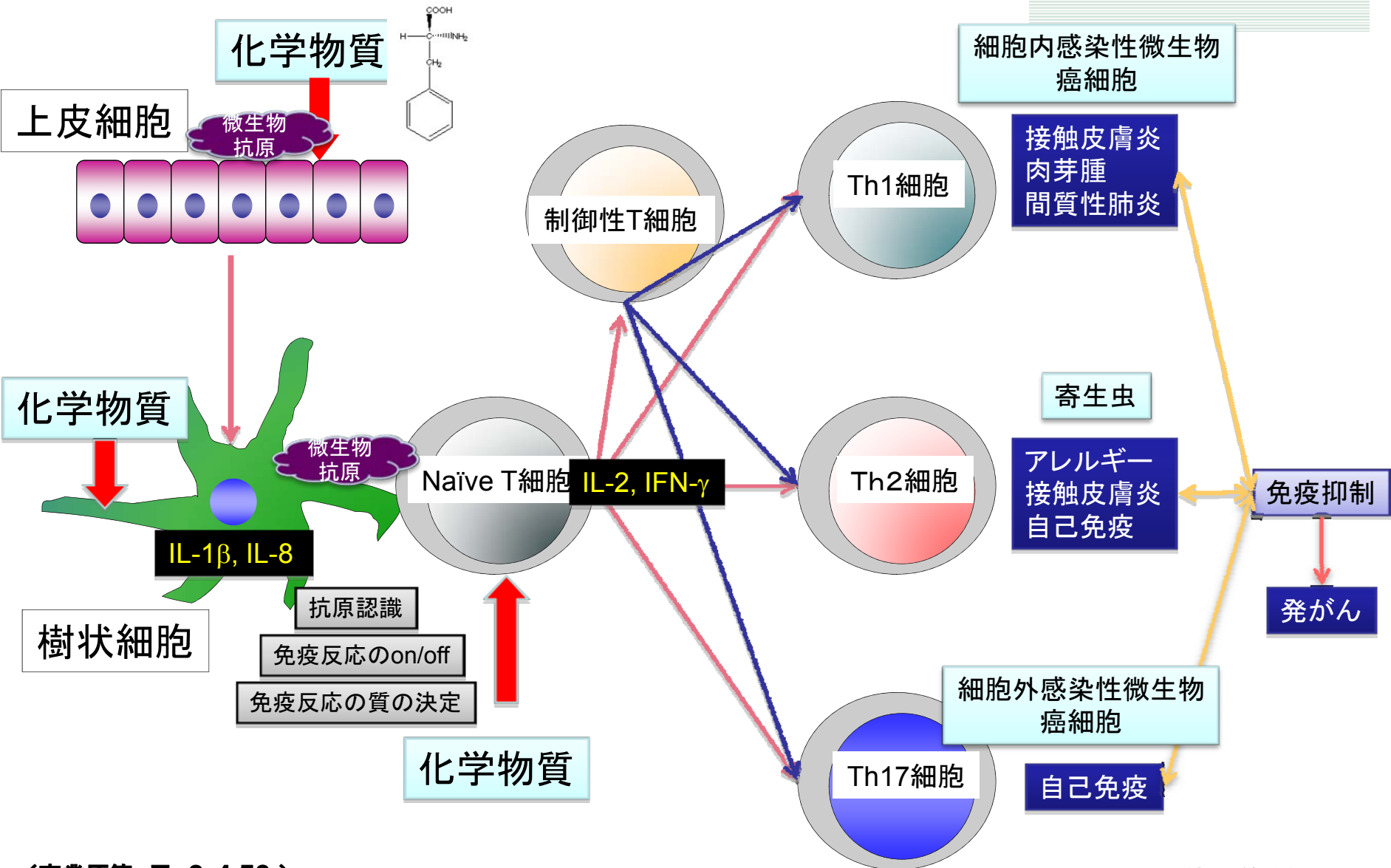
ディーゼル排気微粒子は、450種以上の有機化合物を含み、polycyclic aromatic hydrocarbones (PAH), halogenated aromatic hydrocarbones (HAH), redox-active quinonesなどの、生体異物 (xenobiotics)から構成されている。

最近、疫学的に、アレルギー性鼻炎、喘息などのアトピー性疾患有病率の増加の原因の一つとして、環境中のディーゼル排気微粒子の増加が注目されている(1-4)。

1. Ishizaki T et al. Ann Allergy 1987, 2. Corbo G M et al. J Allergy Clin Immunol 1993, 3. Nitta H et al. Arch Environ Health 1993, 4. English P et al. Environ Health Persp 1999: 107: 761-767.

多面的免疫毒性評価 Multi-ImmunoTox assay

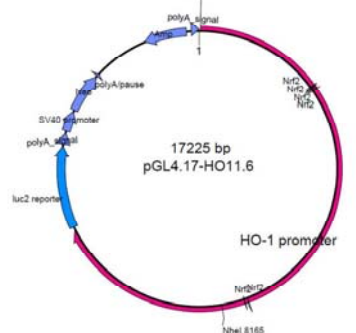
公開



IFN- γ 、IL-2レポーター細胞株の樹立

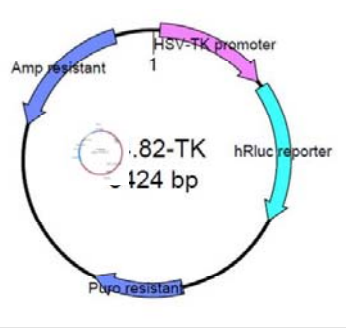
公開

IFN- γ promoter



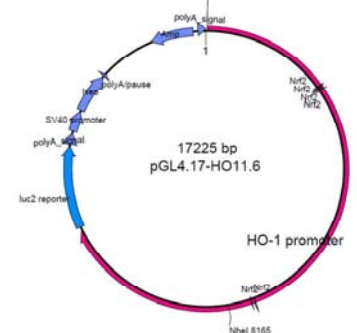
SLO

G3PDH promoter

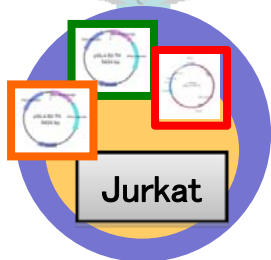
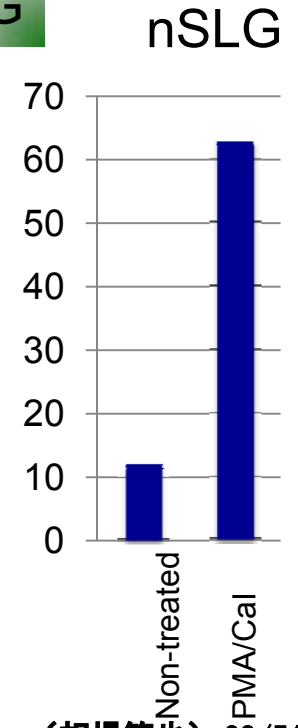
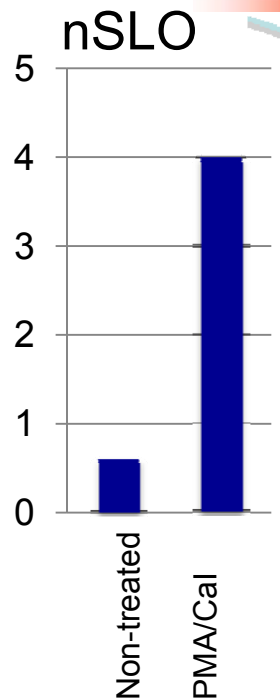


SLR

IL-2 promoter



SLG

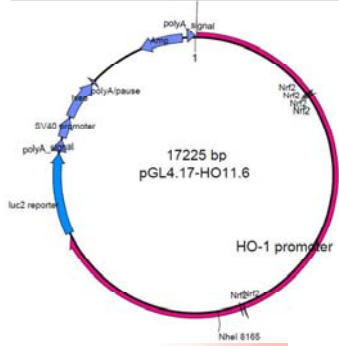


IFN- γ /IL-2レポーター細胞 (#2H4)

IL-1 β 、IL-8レポーター細胞株の樹立

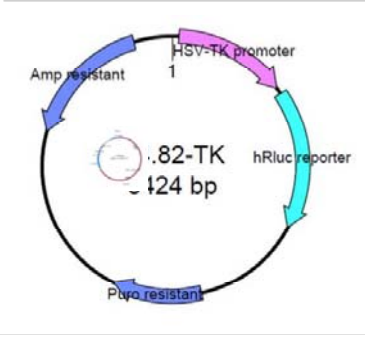
公開

IL-1 β promoter



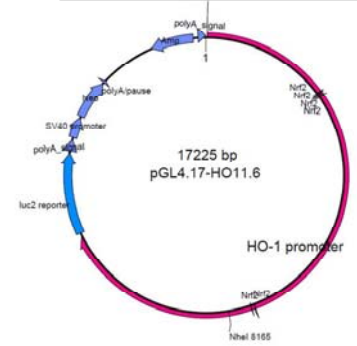
SLO

G3PDH promoter



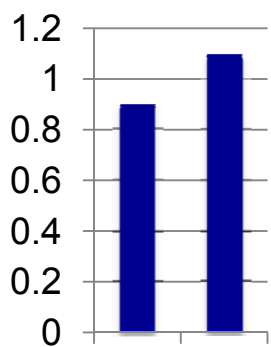
SLR

IL-8 promoter

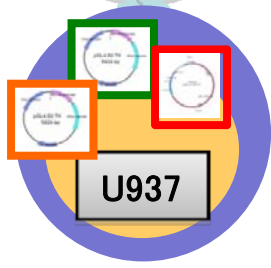
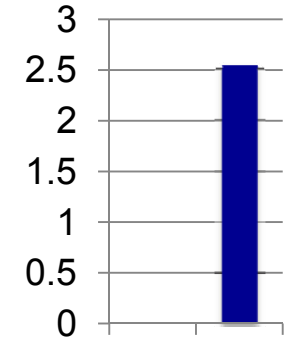


SLG

nSLO



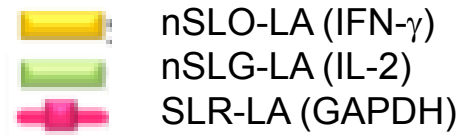
nSLG



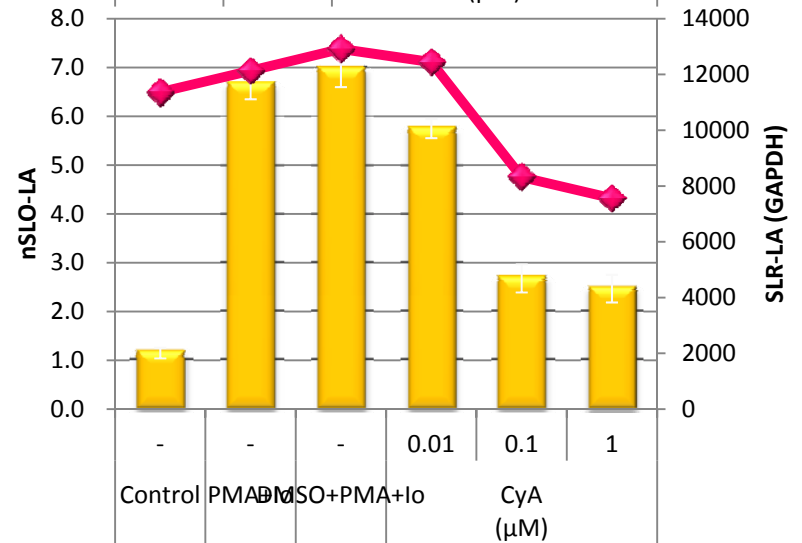
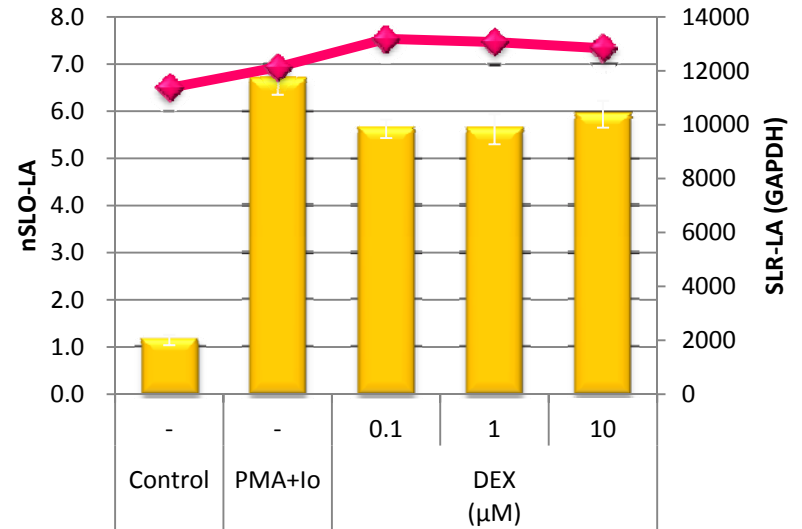
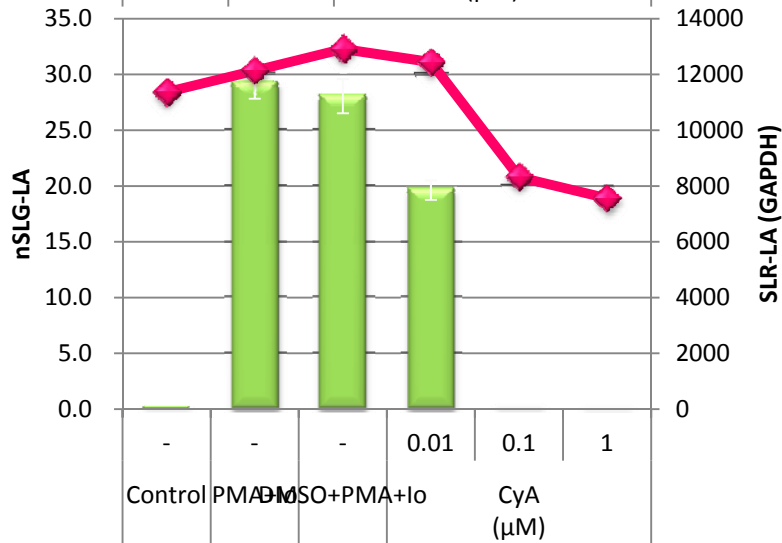
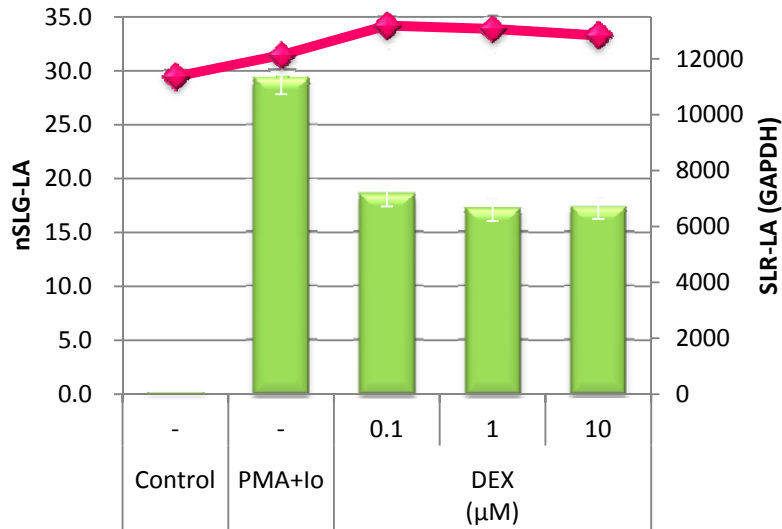
U937

IL-1 β /IL-8レポーター細胞 (#6C12)

#2H4を用いた免疫調節性薬剤の評価 Dex and CyA



公開

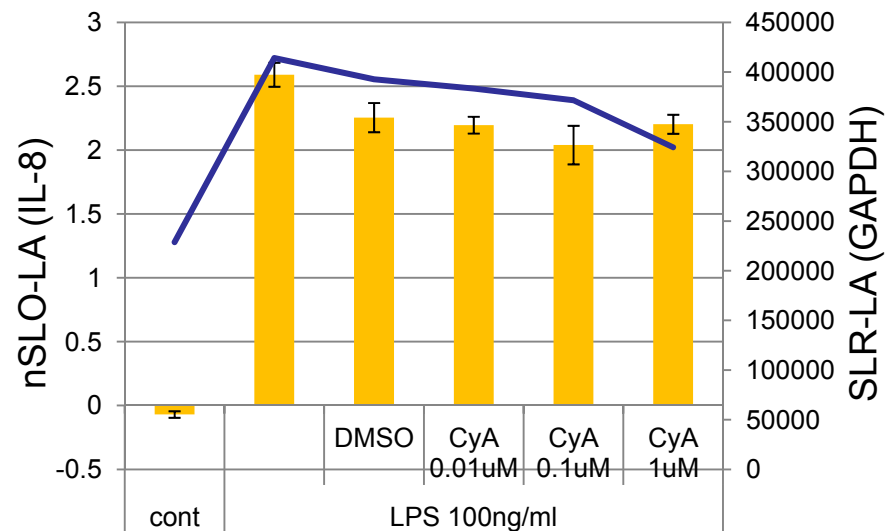
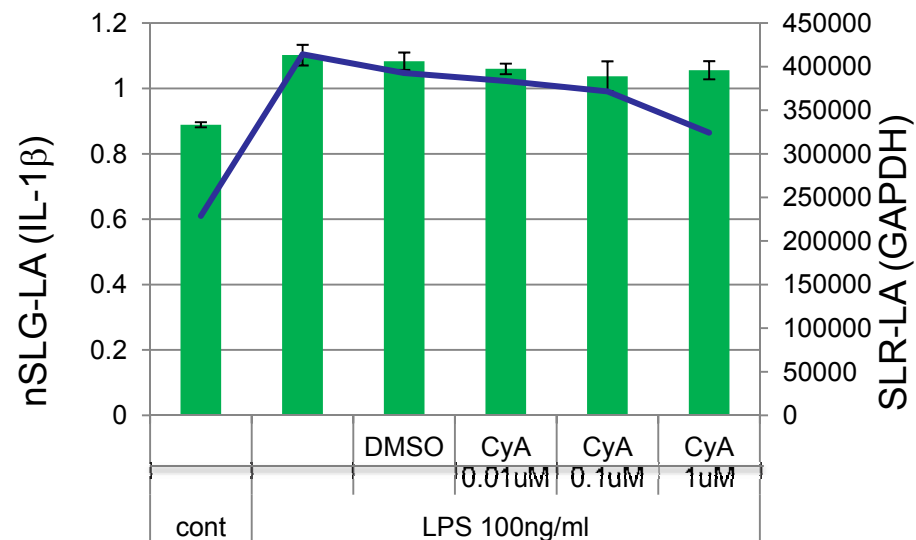
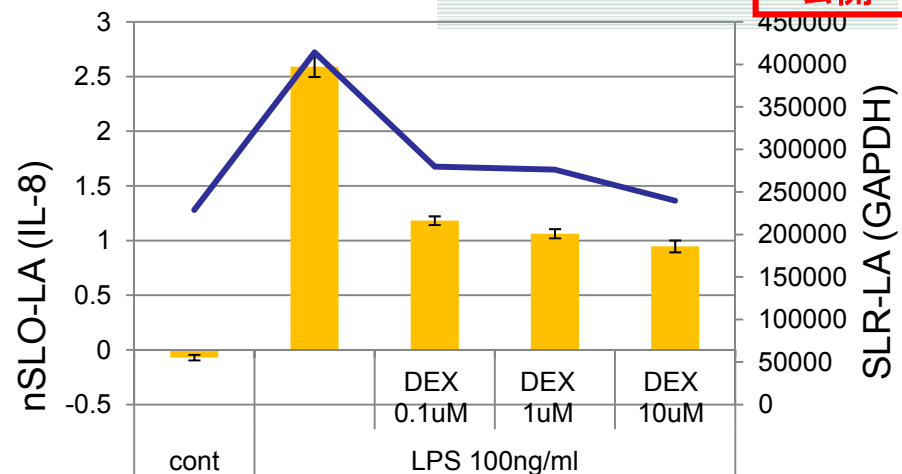
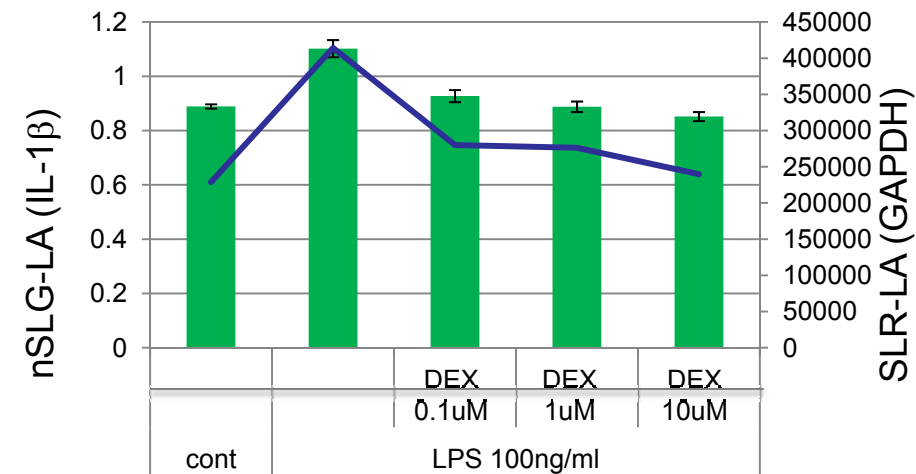


#6C12を用いた免疫調節性薬剤の評価

Dex and CyA

- nSLO-LA (IL-8)
- nSLG-LA (IL-1 β)
- SLR-LA (GAPDH)

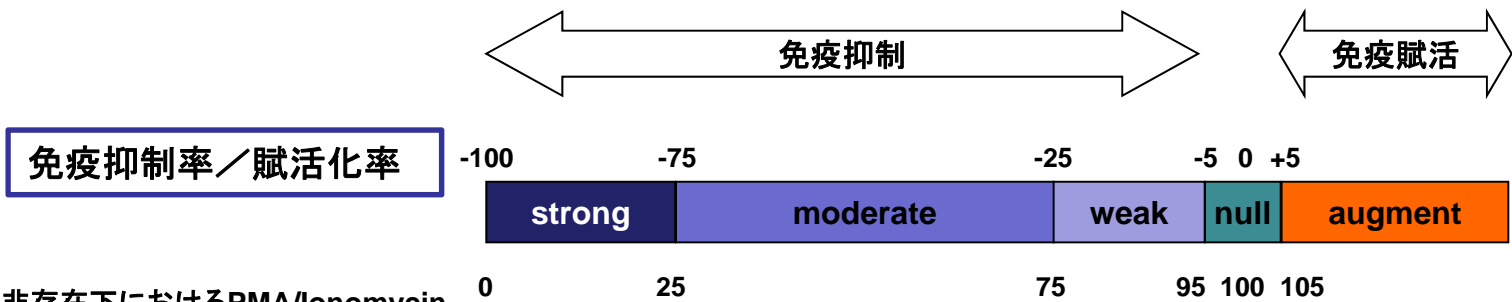
公開



免疫毒性評価パラメーター(#2H4 and #6C12)

公開

PMA/Io刺激#2H4細胞, LPS刺激#6C12細胞に種々の化学物質を添加し、培養6時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、以下の基準で各サイトカインに対するルシフェラーゼ活性の変化を評価する。



化学物質非存在下におけるPMA/Ionomycin刺激あるいはLPS刺激による誘導率を100とした場合の化学物質存在下における同処理後の相対発現率

Abbreviation	パラメーターの定義
SLO(G)-LA	SLO(G) luciferase 活性 (IFN- γ or IL-8 (IL-2 or IL-1 β))
SLR-LA	SLR luciferase 活性(G3PDH)
nSLO(G)-LA	SLO(G)-LA / SLR-LA (SLO(G)-LAの値をSLR-LAの値で補正した値)
FlnSLO(G)-LA	nSLO(G)-LA of PMA/Io-stimulated #2H4 cells or LSP-stimulated #6C12 cells / nSLO(G)-LA of non-stimulated #2H4 cells or #6C12 cells (PMA/IoあるいはLPS処理の有無によるnSLO(G)-LAの変化)
SLO(G)抑制率	(1-FlnSLO(G)-LA of #2H4 cells or #6C12 treated with chemicals / FlnSLO(G)-LA of #2H4 cells or #6C12 without chemical treatment) x 100% (化学物質処理の有無によるFlnSLO(G)-LAの変化)

#2H4と#6C12を組み合わせた多面的免疫毒性評価

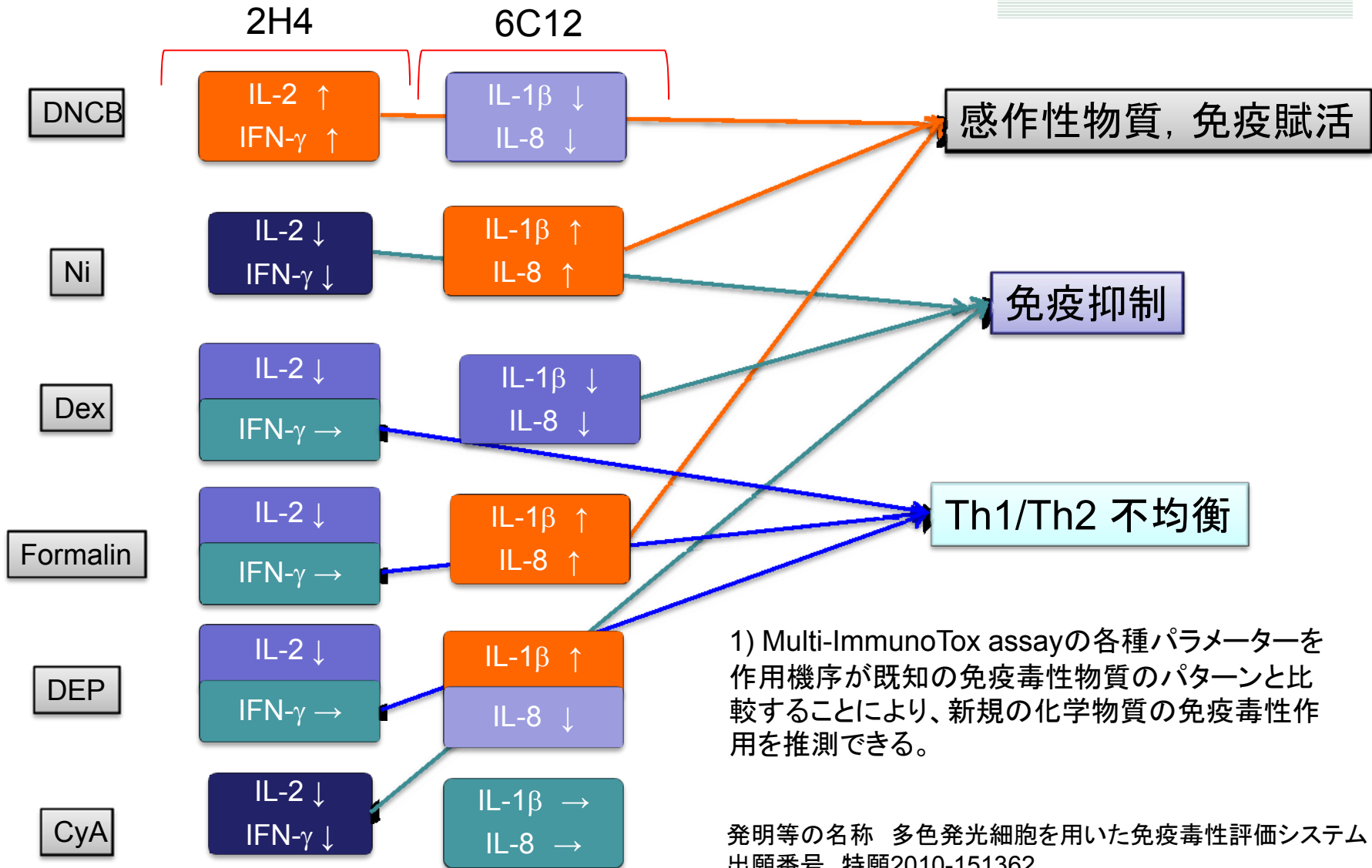
Multi-ImmunoTox assay

公開

Classification	Chemicals	IL-2 抑制率	INF- γ 抑制率	抑制効果	IL-2抑制率 /INF- γ 抑制率	IL-1 β 抑制率	IL-8 抑制率	抑制効果	IL-1 β 抑制率 /IL-8抑制率
Cytokines	IL-10	27	15	M/W	1.8	+10	12	A/W	
	IL-4	28	22	M/W	1.3	3	13	N/W	0.23
	INF- γ	14	+14	W/A		34	38	M/M	0.89
	IP-10	22	11	W/W	2.0	+15	+9	A/A	
Drugs	Dexamethasone	41	11	M/W	2.7	23	53	W/M	0.43
	Cyclosporine	100	65	S/M	1.5	+12	+28	A/A	
	Mitomycin C	46	0	M/N	>>1	3	+59	N/A	
	Vitamin D ₃	+1	8	N/W		+78	+243	A/A	
	Azathioprine	22	17	W/W	1.3	5	+20	N/A	
	Cyclophosphamide	15	5	W/N	3.0	+2	+20	N/A	
	Methotrexate	47	34	M/M	1.4	+5	+20	N/A	
Pollutions	Mizoribine	8	13	W/W	0.6	+4	8	N/W	
	NiCl ₂	75	65	S/M	1.2	26	+61	M/A	
	Formaldehyde	45	+1	M/N	>>1	+67	+154	A/A	
	DEP	67	18	M/M	3.7	+59	19	A/W	
Metals	BaCl ₂	94	49	S/M	1.9	40	29	M/M	1.4
	MnCl ₂	92	10	S/W	9.3	4	+118	N/A	
	ZnCl ₂	82	34	S/M	2.4	13	+207	W/A	
	FeCl ₃	92	51	S/M	1.8	3	+35	N/A	
Others	Trimellic anhydrate	+28	+16	A/A		+1	+10	N/A	
	DNCB	+100	+39	A/A		23	13	W/W	1.8

免疫抑制効果 : **Augmentation** ; >+5, **Null** ; <+5~<=5, **Weak** ; >5~<=25, **Moderate** ; >25~<=75, **Strong** ; >75

DEP: Diesel exhaust particles, DNCB: Dinitrochlorobenzene



発明等の名称 多色発光細胞を用いた免疫毒性評価システム
出願番号 特願2010-151362

- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

施設間差試験 (THP-G8 & #2H4)

東北大学, 東洋紡績, 産業技術総合研究所, 食品薬品安全センター-秦野研究所, 住友化学

公開

#2H4

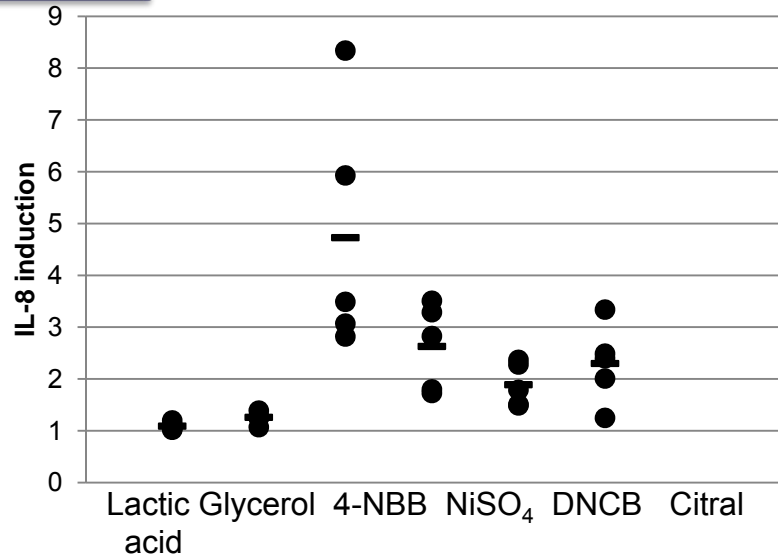
	IL-2					IFN- γ				
	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E
① NiCl ₂ (1 mM)	-95	-95	-87	-91	-86	-73	-91	-73	-85	-64
② Dexamethasone (10 μ M)	-26	-23	-22	-26	-23	-4	-3	-2	-11	-3
③ Cyclosporin A (1 μ M)	-98	-98	-97	-99	-99	-62	-77	-75	-88	-75
④ Methotrexate hydrate (100 μ M)	-4	-8	-24	+20	+9	0	-1	-10	+12	+12

	$x < -75$	strong
	$-75 \leq x < -25$	moderate
	$-25 \leq x < -5$	weak
	$-5 \leq x < +5$	non
	$+5 < x$	augment

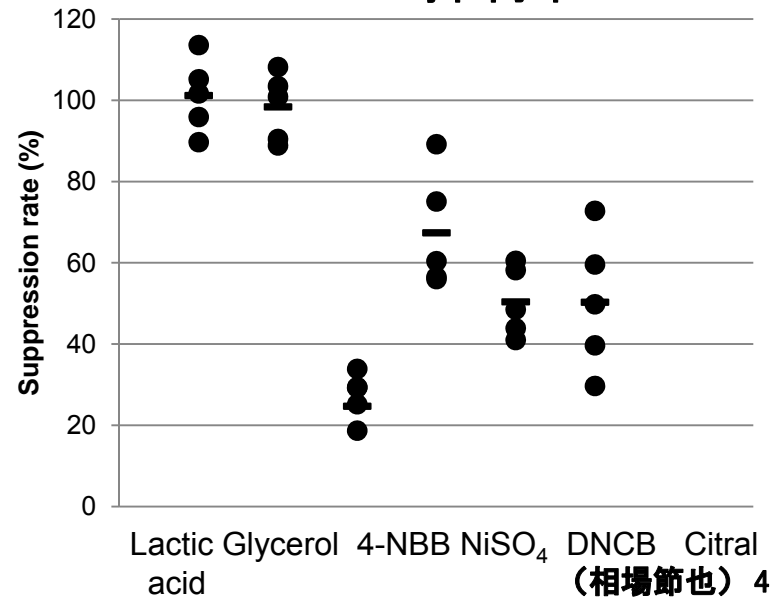
各施設: 3回の反復実験結果を示す。
※Lab. Dのみ1回の実験結果

THP-G8

IL-8誘導率



NAC抑制率



- 1) 背景
- 2) 免疫毒性評価遺伝子の選定
- 3) 発光プローブの作成
- 4) 免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認、免疫毒性評価システムの構築
 - ① 接触皮膚炎感作性試験法代替法 (IL-8 Luc assay)
 - ② 多面的免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay)
- 5) 複数施設での施設間差検討試験
- 6) まとめと最終目標に対する達成度

1. 化学物質が免疫系に有害作用を及ぼした際の指標となりうる遺伝子をtoxicogenomicsにより抽出し、免疫毒性評価遺伝子として樹状細胞、表皮細胞、T細胞に関して各5遺伝子を同定した。
2. それらのうち、HMOX1、IFN- γ 、IL-4、IL-2、IL-1 β 、IL-8遺伝子に関してレポーター細胞を樹立した。
3. IL-8 レポーター細胞を用いたIL-8 Luc assayは、接触皮膚炎感作性試験代替法としての有用性が示唆され、今後、多施設でのvalidationを経てOECD test guideline化を目指す予定である。
4. 一方、IL-2/IFN- γ レポーター細胞#2H4とIL-1 β /IL-8レポーター細胞#6C12を用いる Multi-ImmunoTox assayは免疫毒性を多面的に評価できる検査法として有用性が想定され、国内特許(特願2010-151362)、国際特許(PCT/JP2011/65090)の出願を行っている。今後、実用化に向けてさらに技術移転の可能性、施設間差の比較、validationなどを重ねていく予定である。
5. ストレスセンサーとも言われるHMOX1レポーター細胞を用いたHMOX1 assayは、活性酸素産生、酸化還元バランス、ER ストレスなど細胞にストレスを与える化学物質のスクリーニング系としての有用性が示唆された。

以上、化学物質であふれる現代社会において、化学物質の免疫毒性を科学的根拠に基づき評価する新たな方法を確立することができた。一方、これらの技術の実用化に向けての更なる研究と検討の必要性が明らかとなった。

対外発表

公開

学会発表	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	総数
国内発表	4	6	4	8	6	28
国外発表	1	5	4	5	2	17

論文発表	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	総数
邦文(原著)	0	0	0	0	0	0	0
邦文(総説)	3	2	1	0	0	0	6
英文(原著)	1	2	3	8	4	3	21
英文 (review)	0	3	0	0	0	0	3
著書	0	2	0	0	0	0	2

特許: 1 (多色発光細胞を用いた免疫毒性評価システム)
特願: 2010-151362, PCT/JP2011/65090

1. COLIPA の招請を受け、8月21日、カナダ モントリオールにて開催されるCOLIPA主催TASK FORCE SKIN TORELANCE会議にてIL-8 Luc assayに関して発表予定である。
2. IL-8 Luc assayに関しては、本試験の国際化に向けて更なるvalidation試験が今年度METIのフォローアップ事業に採択されている。

最終目標に対する達成度

公開

研究開発課題	最終目標(平成22年度末)	最終目標の達成状況	達成度
C 免疫毒性予測試験法の開発	<p>遺伝子導入技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で免疫毒性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコルを取りまとめる。</p>	<p>[上皮細胞(HaCat)] 同定したマーカー遺伝子3種のうち、2種(hemeoxygenase-1、IL-1b)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロールGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる2色安定発光細胞株(HR38H6、KIL01)を樹立し、その内HR38H6を用いて酸化ストレス、ERストレス、重金属刺激など幅広いストレスを検出できるハイスループット評価系を構築した。</p> <p>[マクロファージ系細胞(U937)] 同定したマーカー遺伝子17種のうち、3種(IL-8、IL-1b、hemeoxygenase-1)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロールG3PDH遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる2色安定発光細胞株(UR2H4114、UIL01、THP-G8)を樹立した。また、マーカー遺伝子2種と内在性コントロールG3PDH遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる3色安定発光細胞株(6C12)も樹立した。その内、THP-G8に関しては、これを用いた皮膚感作性試験代替法を開発した。また、6C12を用いては、単球、樹状細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。</p> <p>[T細胞(Jurkat)] 同定したマーカー遺伝子10種のうち、3種(IL-2、IL-4、IFN-g)について、そのうち2つの遺伝子の組み合わせと内在性コントロールG3PDH遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる3色安定発光細胞株(10C6、2H4)を樹立した。その内、2H4を用いては、T細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。また、6C12と2H4を組みあわせることにより、多様な免疫毒性を評価できるシステムを構築した。</p> <p>[標準的な試験プロトコル] THP-G8を用いた皮膚感作性試験代替法および6C12と2H4を用いた免疫毒性評価系に関しては、標準的な試験プロトコルを作製して複数施設での試験法の安定性を検討した。</p>	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p>