

# 免疫毒性予測評価のための多色発光細胞株の樹立 およびその試験法

齋藤るみ子<sup>1,2</sup>, 木村 裕<sup>2</sup>, 相場節也<sup>2</sup>

## Evaluation system of immunotoxicity using multi-color light emitting cells

Rumiko SAITO<sup>1,2</sup>, Yutaka KIMURA<sup>2</sup>, Setsuya AIBA<sup>2</sup>

### 緒言

生体は経皮，経口，および経気道など様々な経路で体外から侵入してくる多くの化学物質に常に曝されている。科学技術や産業の進歩により，新規化学物質は，今後さらに増加し，様々な用途で使用されていくと考えられる。そのため，我々はこれらのリスクを有害性と曝露量から評価する必要がある。

また近年，化学物質は様々な製品などを通じて国際的に流通しており，各国の行政によって，その使用に関する規制がなされている。近年の国際的な規制の一つとして，欧州において平成18年12月採択，平成19年6月より施行された「化学物質の登録，評価，認可及び制限に関する規則(REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)」がある。REACHは既存，新規を問わず，化学物質全般について新たな登録制度を設けた点で，従来の規制枠組みとは異なる。また，政府が実施していた化学物質のリスク評価を事業者へ義務付け，リスク評価の観点から化学物質管理の推進や流通経路を通じた取り扱いに関する情報の伝達を強化し，製品中の化学物質に対する対策を講じるといった新しい考え方が盛り込まれている。この考え方はアメリカやカナダ，韓国などの諸外国にも拡がり，結果として各国の化学物質管理関連法規が改正された。我が国も例外ではなく，化学物質規制関連法の代表格である「化学物質の審査及

び製造等の規制に関する法律(略称: 化審法)」が，REACH規制内容と同様な内容で平成21年5月に一部改正，平成22年および平成23年に施行されている。このように，化学物質をより安全に，そしてより有効に使用していくという潮流は国際的なものとなってきている。

しかしながら，リスクを評価すべき化学物質は技術や産業の発展とともに，膨大な数に上っている。化学物質として知られているものは，1,000万以上もの種類があり，天然化学物質だけでなく，合成化学物質も多い。これら膨大な数の化学物質を一元的に評価，管理するというのは現時点において非常に困難なことから，迅速な評価のための行政制度および技術的システムを構築することが求められている。

このような化学物質の中には，免疫毒性を引き起こす要因の一つとなり得る物質がある。昭和大学名誉教授 吉田武美博士は，免疫毒性とは，皮膚，気道などから取り込まれた化学物質により免疫系のホメオスタシスに異常が生じ，その結果人体に何らかの障害が生じることと定義している。表1<sup>1)</sup>に免疫毒性の分類と代表的な免疫毒性物質を示した。

これまでの免疫毒性評価は，Gell and Coombsの分類<sup>2)</sup>に基づく古典的免疫学を基盤とし，主として実験動物，または実験動物から採材した培養細胞を用いて行われてきた。そのため，結果の取得には多大な時間と費用を必要とする。その上，膨大な数の化学物質を全て評価することは，これまでの方法では不可能に近い。そのため，一部の医薬品や化粧品を除いて，ほとんどの化学物質は免

1 代替法試験部細胞発がん研究室

2 東北大学大学院医学系研究科皮膚科学分野

表1 免疫毒性物質の分類と代表的な免疫毒性物質

免疫毒性の種類	化学物質・環境汚染物質
免疫抑制	ハロゲン化芳香族炭化水素類: 四塩化ダイオキシシ (TCD), 四塩化ジベンゾ-p-ジオキシシ (TCDO), ポリ臭化ビフェニル (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類: 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: 水銀, カドミウム, バナジウム, スズ, 鉛 酸化性ガス: 二酸化窒素, オゾン
自己免疫 劇症肝炎 ループス型腎炎 強皮症様疾患	水銀, カドミウム 塩化ビニルモノマー, シリカ
アレルギー	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, 即時型過敏症 (I~III型反応) 無水トリメリト酸, 無水フタル酸, ジイソシネアート類 綿, 木材, 穀物, タンパク質製剤等粉塵
遅延型過敏症 (IV型反応)	ディーゼル排気微粒子 重金属: 白金, ニッケル, クロム, コバルト, 水銀 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, ジブチルスクアラート (SADBE), ジフェンシブロン (DPCP)

文献1より引用, 一部改変

疫毒性を評価されることなく市場に流通している。現在, 化学物質によるアレルギー性接触皮膚炎, 喘息, アレルギー性鼻炎, アトピー性皮膚炎の増加や膠原病様症状の誘発など, 免疫毒性が原因と考えられる障害は後を絶たない。

われわれは, 2006~2010年度まで行われた(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO: New Energy and Industrial Technology Development Organization) 受託事業「高機能簡易型有害性評価手法の開発」において, これまで主として行われてきた実験動物を用いた免疫毒性評価手法に代わり, 化学物質の免疫毒性発現機序の分子レベルでの解析に基づく, 培養細胞を用いた高機能かつハイスループット型の新たな免疫毒性評価法の樹立を目標に研究を行ってきた。本稿ではその一部を紹介したい。

### 本研究で注目した免疫反応

免疫反応には, T細胞, B細胞, NK細胞, 樹状細胞, マクロファージ, 肥満細胞, 上皮細胞など種々の細胞が関与する。本研究においては, そ

れらの細胞の中でも, 免疫反応成立の根幹を担う3種類の細胞に着目して免疫毒性予測試験法を開発した。それらは①外界と接し化学物質に直接曝露される上皮細胞, ②免疫の司令塔である樹状細胞, ③樹状細胞から刺激を受けてTh1, Th2, Th17や制御性T細胞(Treg)など異なる機能を担う細胞に分化し, 種々の免疫疾患のエフェクターもしくは調節を行うT細胞である(図1)。

化学物質が免疫毒性を発揮する分子レベルのメカニズムは, 大きく二つに分類される。一つは, 主として医薬品等の限られた化学物質が免疫担当細胞の受容体や細胞内のシグナル伝達物質などに特異的に作用し, その細胞の機能を変化させて免疫毒性を誘発する「特異的作用」である。もう一つは, 化学物質が細胞を構成するDNAやタンパク質, 膜脂質など生体構成分子を修飾することにより誘導される細胞ストレス反応を介して免疫関連細胞へ影響を及ぼし, 免疫毒性を誘発する「非特異的作用」である。前者による免疫毒性解析には, 標的となっている分子それぞれに対応した評価系が必要となるため, 本研究においては後者の細胞

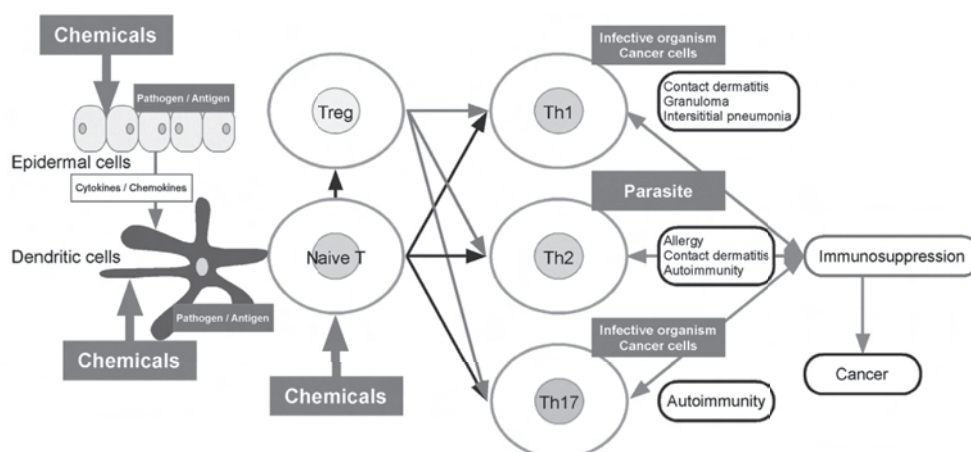


図1 細胞レベルでの化学物質による免疫毒性発症メカニズム

表2 免疫毒性評価遺伝子のまとめ

Cell	RefSeq	Gene Symbol	Description
MoDC	NM_000575	IL-1 $\alpha$	Interleukin 1, alpha
	NM_000576	IL-1 $\beta$	Interleukin 1, beta
	NM_000584	IL-8	Interleukin 8
	NM_005746	NAMPT (PBEF1)	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
	NM_002133	HMOX1 (HO-1)	Heme oxygenase (decycling) 1
Keratinocyte	NM_000576	IL-1 $\beta$	Interleukin 1, beta
	NM_000600	IL-6	Interleukin 6 (Interferon, beta2)
	NM_000584	IL-8 (CXCL8)	Interleukin 8
	NM_002133	HMOX1 (HO-1)	Heme oxygenase (decycling) 1
	NM_000594	TNF (TNF- $\alpha$ )	Tumor necrosis factor
T cell (Down-regulate)	NM_000619	IFN- $\gamma$	Interferon, gamma
	NM_000586	IL-2	Interleukin 2
	NM_000589	IL-4	Interleukin 4
	NM_000879	IL-5	Interleukin 5

ストレス反応を介して生じる免疫毒性を対象に評価系を構築することを試みた。

## 免疫毒性評価細胞の樹立と測定方法

### 1) 評価遺伝子候補の選択

はじめに、化学物質の刺激によって変動する遺伝子の候補の選定を行った。検討には、市販の正常ヒト表皮角化細胞(上皮細胞)、もしくはヒト末梢血から分離した細胞(樹状細胞およびT細胞)を使用し、代表的な免疫毒性物質である2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)、ニッケル化合物(NiCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>)など計5種類の物質で刺激した。刺激後、直ちにtotal RNA等各種サンプルを回収し、遺伝子発現の変動をDNAマイクロアレ

イで網羅的に解析した。得られた結果から、定量PCRやタンパク質アレイによる確認を行い、再現性が取れた標的遺伝子候補の中から、さらにバイオインフォマティクスや文献情報等による検討を行い、免疫毒性評価遺伝子を選定した。選定した評価遺伝子を表2に示した。本研究で選定した遺伝子は、複数の化学物質による刺激で共通の遺伝子変動が誘導され、さらにはバイオインフォマティクスに基づく検討により、免疫反応に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの結果は、免疫毒性を有する個々の化学物質が、免疫担当細胞を化学物質固有の伝達経路で刺激し、全く異なった免疫関連遺伝子の発現変動を誘導するのではなく、異なった化学物質でもいくつかの共通

した免疫関連遺伝子の発現を誘導することを示唆している。この結果は、膨大な数の化学物質に由来する免疫毒性を比較的限られた指標で評価できる可能性を示している。

## 2) 多色発光ルシフェラーゼアッセイ系の樹立

次に、選定した複数の評価遺伝子に対して、発現調整を解析できる免疫毒性評価細胞の作製を行った。実際には、免疫毒性評価遺伝子の転写領域の下流に各色ルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミド(発光プローブ)を作製し、これらのプラスミドを上皮細胞、樹状細胞、T細胞の長期培養細胞株であるHaCaT(ヒト上皮角化細胞株: 非腫瘍形成性)、U937(マクロファージ細胞株: 性質が樹状細胞と類似しており、その代用として用いられることが多い)、THP-1(ヒト単球性白血球細胞株: 樹状細胞様の感作性応答を示す)やJurkat(ヒトT細胞性白血球細胞株)に導入することにより安定細胞株を樹立した。

本研究では、培養細胞1種類につき、免疫毒性評価遺伝子1~2種類とデータ標準化のための内部標準遺伝子であるG3PDHもしくはThymidine kinase(TK)の各プロモーター領域を持つプラスミドを導入してレポーターアッセイ系を構築した。今回、主として用いたMultiReporter Assay System -Tripluc®-(東洋紡績, 大阪)に含まれる緑色(最大発光波長 $\lambda_{max}$ = 550 nm)、橙色( $\lambda_{max}$ = 580 nm)、赤色( $\lambda_{max}$ = 630 nm)の各色発光ルシフェラーゼは全てD-ルシフェリンを基質とし、色分離測定によって一度の測定で最大3種類までのレポーター酵素の活性を測定することが可能である<sup>3,4)</sup>。樹状細胞と表皮細胞のいずれにおいても評価遺伝子であるHMOX1が入る組み合わせについては、転写領域をクローニングしてルシフェラーゼ遺伝子(luc2)発現ベクター pGL4.17(Promega, Madison, USA)に当該領域を挿入した。また、内部標準化遺伝子としてTK遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼ(hRluc)発現ベクターpGL4.82(Promega)に挿入し、宿主細胞に導入した。

### 2-1) 発光プローブ基本ベクターの作製

免疫毒性評価細胞の樹立にあたり、発光プローブ遺伝子を評価対象となる培養細胞に安定導入するため、3色の発光プローブ遺伝子(緑:

SLG, オレンジ: SLO, 赤: SLR)に、それぞれ hygromycin, neomycin(G418)および puromycin の各選択剤に対する耐性遺伝子マーカーを含む遺伝子配列カセットを導入した。この際、哺乳類由来細胞において安定発現させる目的で、SV40プロモーターおよびHSVtK polyA配列を同時にベクターに挿入し、発光プローブ基本ベクターを構築した。さらに、挿入された薬剤耐性遺伝子のタンパク質への翻訳効率を高めるため、薬剤耐性遺伝子オープンリーディングフレームの開始メチオニンの上流にコザック配列を導入した。

### 2-2) プロモーター領域のクローニング

各遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行うに当たり、各免疫毒性評価遺伝子の転写開始点をmRNA転写開始点データベースDBTSS(<http://dbtss.hgc.jp/>)を用いて検索した。続いて、ヒト由来ゲノムDNAから各免疫毒性評価遺伝子のプロモーター領域をPCRでクローニングし、目的領域を取得した。次いで、クローニングした各遺伝子のプロモーター領域を、先に構築した各ベクターにライゲーションした。構築した各プラスミドは、挿入部位の5'および3'領域のシーケンス解析を行い、目的配列の挿入を確認した。

### 2-3) 遺伝子導入および多色発光安定細胞株の樹立

構築した発光プラスミドを宿主細胞へ導入し、安定細胞株を樹立した。本項では一例として、Jurkat#2H4について述べる。

ヒトT細胞由来の多色発光安定細胞株では、宿主細胞としてヒトT細胞株Jurkat(ATCC, Manassas, USA)を使用した。Jurkat細胞への遺伝子導入には、リポフェクション法を用いた。宿主細胞へは、最初に内部標準であるG3PDHプロモーター-SLRを導入した。導入後、一次選択として選択剤存在のもと、1週間培養を行った。続く二次選択として、一次選択培養で生存した細胞を96ウェル細胞培養用プレートに1ウェルあたり1 cellもしくは100 cellsで播種し、選択剤存在のもと、2週間培養した。二次選択培養後、シグナル強度および陽性化学物質(PMAおよびionomycin)処理によるシグナル誘導の2点から良好なラインの選択を行って1色安定細胞株を樹立した。その後、IFN- $\gamma$ プロモーター-SLO, IL-2プロモーター-SLGを同様の手

表3 樹立した発光安定細胞株

Host cell line	Colors	Normalization gene	Target gene 1	Target gene 2	Established cell lines
Jurkat	1 color	G3PDH-SLR	-	-	#14D1
	2 color	G3PDH-SLR	IL-4-SLG	-	#4A4
		G3PDH-SLR	IFN- $\gamma$ -SLO	-	#2B12
	3 color	G3PDH-SLR	IL-4-SLG	IFN- $\gamma$ -SLO	#10C6
		G3PDH-SLR	IL-2-SLG	IFN- $\gamma$ -SLO	#2H4
U937	1 color	G3PDH-SLR	-	-	#UGA12
	2 color	G3PDH-SLR	IL-1 $\beta$ -SLG	-	#6c12
	3 color	G3PDH-SLR	IL-1 $\beta$ -SLG	IL8-SLO	#6c12
	1 color	TK-hRluc	-	-	#UR2
	2 color	TK-hRluc	HMOX1-luc2	-	#UR2H4117
THP-1	1 color	G3PDH-SLR	-	-	#TGC17
	2 color	G3PDH-SLR	IL-1 $\beta$ -SLG	-	#TGC17bA16, 19
		G3PDH-SLR	IL-8-SLO	-	#THP-G8
3 color	G3PDH-SLR	IL-1 $\beta$ -SLG	IL8-SLO	#THP-G18	
HaCaT	1 color	TK-hRluc	-	-	-
	2 color	TK-hRluc	HMOX1-luc2	-	#HR38H6

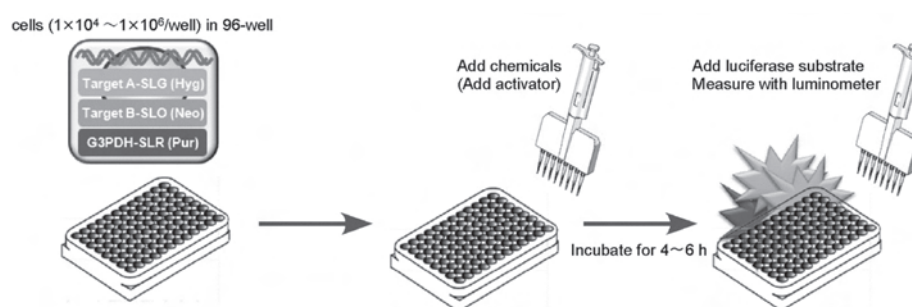


図2 測定方法

順で宿主細胞に導入し、最終的に3色安定細胞株 Jurkat#2H4 を樹立した。

このようにして樹立した各種安定細胞株は、両鎖解析によるシーケンス解析を行い、各プラスミドがゲノムDNAに挿入されていることを確認した。これまで樹立した細胞の一覧は表3の通りである。

#### 2-4) 測定方法

実験の概略を図2に示した。試験前々日もしくは前日に継代および培地交換した各種細胞を、1ウェルあたり  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L となるように、各種選択抗生剤、抗菌剤を除いた培地を使用して、96ウェル黒色プレートに播種する。次いで各種化学物質溶液を各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>の条件で4~6時間程度イ

ンキュベートする。ただし、化学物質を添加して1時間後、Jurkat#2H4については抗原刺激としてPMAとionomycinによる活性化処理が、U937#6c12についてはLPSによる活性化処理が、それぞれ必要である。インキュベート終了後、Tripluc<sup>®</sup> Luciferase Assay Reagent(東洋紡績)など、D-ルシフェリンを基質とする発光試薬をウェルに添加し、Phelios(アトー、東京)などのルミノメーターを用いて発光量を測定する。このように、本測定系は処理から測定まで半日程度で終了することが可能なため、将来的にハイスループット化が期待できる。また、本システムに使用したベクターに含まれる各色ルシフェラーゼは、前述の通りその発光色を問わずD-ルシフェリンを発

表4 IL-8 Luc assayで定義したパラメーター

略語	パラメーター定義
SLO-LA	SLOルシフェラーゼ活性
SLR-LA	SLRルシフェラーゼ活性
nSLO-LA	SLO-LA / SLR-LA (SLO-LA 値を SLR-LA 値で除した値 = 内標で補正した値)
II-SLR-LA	化学物質処理有の SLR-LA / 化学物質処理無の SLR-LA (化学物質処理の有無による SLO-LA の変化)
FInSLO-LA	化学物質添加時の SLO-LA / 無添加時の SLO-LA (化学物質処理の有無による nSLO-LA の変化)
II (Inhibitory Index)	NAC存在下の FInSLO-LA / NAC非存在下の FInSLO-LA (NACの有無による FInSLO-LA の変化)

光基質として利用するため、1回の操作で複数の発光を測定できるが、光学フィルターを装着したルミノメーターの使用が必要である。

### 多色発光安定細胞株を利用した免疫毒性評価システムの構築

#### 1) 感作性試験代替法; THP-G8安定細胞株<sup>5)</sup>

免疫毒性の1種である感作性を評価する感作性試験代替法は、接触皮膚炎感作相におけるハプテンの免疫系に及ぼす作用メカニズムに基づいて開発されている。感作相におけるハプテンは、その親電子性物質としての特性から、①抗原提示細胞表面の主要組織適合性(MHC)抗原上の自己ペプチドと反応し、T細胞により認識される抗原決定基(エピトープ)を形成、②活性酸素の産生や、樹状細胞表面のチオール基と反応し当該細胞を活性化、③樹状細胞や表皮細胞を刺激してアデノシン三リン酸(ATP)などの免疫応答を誘導するシグナルを放出させることが知られている。

現在、感作性試験代替法として、ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) により direct peptide reactivity assay (DPRA)<sup>6)</sup> や human cell line activation test (h-CLAT)<sup>7,8)</sup> および myeloid U937 skin sensitization test (MUSST)<sup>9,10)</sup> のプレバリデーションが行われているが、いずれも正確性、簡便性、迅速性などの観点から問題点を残しているとされる<sup>11)</sup>。そのような中で、最近新たにハプテンと非感作性物質とを区別する分子マーカーとして、IL-8が多くの研究者により注目されている<sup>10,12,13)</sup>。そこで、IL-8プロモーター

活性の測定が可能な THP-G8安定細胞株を用いて、感作性試験代替法の可能性を検討した。

解析方法は IL-8 評価細胞の応答性の検討で確立した方法に従い、まず額田ら<sup>13)</sup>の報告にある15種類のハプテンと、7種類の非感作性物質に関して THP-1#THP-G8の応答性を検討した。表4に、検討に際して設定したパラメーターの一覧を示した。

その結果、化学物質を添加して6時間後、代表的なハプテンの一種である DNCB やニッケル化合物 (NiSO<sub>4</sub>) において SLO-LA の有意な上昇が認められた。また、定量 PCR での結果も同様であり、いずれの反応も濃度依存的であることが示された。

またこれまでの研究により、われわれは感作性物質による樹状細胞の成熟化は、抗酸化剤の一種である N-acetylcysteine (NAC) によって抑制されることを既に報告した<sup>14,15)</sup>。一般的に樹状細胞に化学物質刺激を与えると、共刺激分子の発現上昇やサイトカインの産生が誘導されるが、そのシグナルとして p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の活性化(リン酸化)が必要である。そこで、化学物質がヒト樹状細胞に対して p38MAPK の上流シグナルとされる細胞内酸化ストレスを誘導するかについて、細胞内グルタチオン比 (GSH: 還元型 / GSSG: 非還元型) を測定することにより検討した。その結果、感作性物質では GSH/GSSG 値は低下し、かつ p38MAPK のリン酸化を確認できたが、非感作性物質では細胞内グルタチオン比の変動、およびリン酸化については確認されず、その反応は長期継代培養細胞株である THP-1 においても同様に認められた。グ

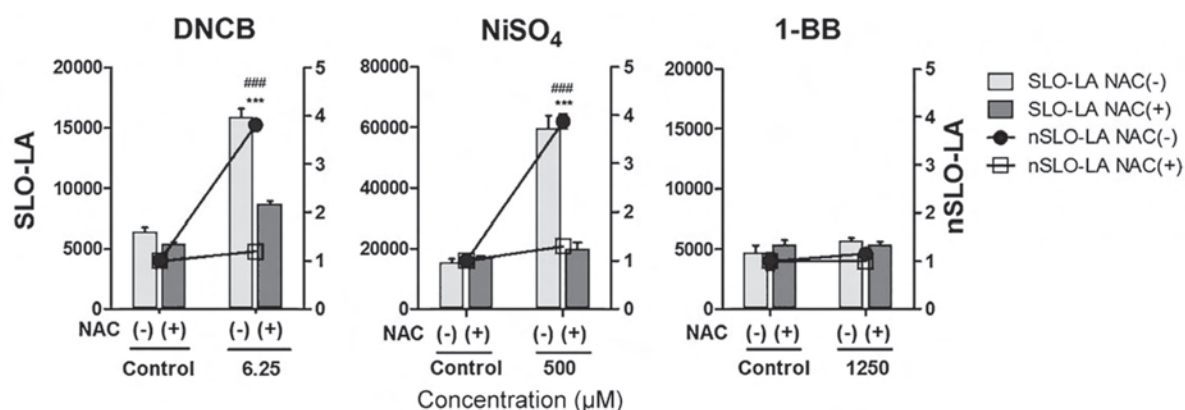


図3 IL-8 Luc assayにおける感作性物質と非感作性物質の違い(文献5より引用、一部改変)

THP-1#THP-G8に対し、各種化学物質刺激30分前にNACを添加した(+). 続いて、感作性物質(DNCB, NiSO<sub>4</sub>)および非感作性物質(1-BB; 1-bromobutane)で6時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した.

\*\*\*(NAC非存在下の1要因によるone-way ANOVA):  $p < 0.001$

###(NAC非存在下, 存在下の2要因によるtwo-way ANOVA):  $p < 0.001$

ルタチオンはNACから合成され、NACの添加により細胞内グルタチオンの比率を上げると、活性酸素の発生が抑制されることは既に知られている<sup>16)</sup>. また、IL-8の産生にはp38MAPKの関与が必要であるという報告もなされていることから<sup>17)</sup>, THP-1#THP-G8においても、感作性物質および非感作性物質刺激によるルシフェラーゼ活性が、NACの添加により変化するのではないかという仮説を立てた. そこで、化学物質刺激30分前にNACを加えたところ、SLO-LAの上昇は感作性物質で有意に抑制されるが、非感作性物質では抑制されないことが判明した(図3).

そこで、われわれはECVAMが提案した感作性試験代替法正確性評価のための化学物質リスト<sup>18)</sup>にある16物質を本方法で検討したところ、10種の感作性物質のうち8物質を、4種の非感作性物質のうち4物質の感作性を正しく判定することができた. 本方法は、短時間で多検体を処理することが可能であり、感作性試験代替法としての有用性が示唆されたことから、本方法を「IL-8 Luc assay」と呼称し、現在OECDテストガイドライン(TG)化を視野に入れ、複数機関によるバリデーションを行っている.

## 2) 多面的免疫毒性評価システム;

### Multi-ImmunoTox assay

複雑な免疫系におよぼす化学物質の毒性評価には、可能な限り多面的な解析が求められることから、われわれは先に樹立した免疫毒性評価細胞

Jukat#2H4およびU937#6c12を併用して、多面的な免疫毒性評価の構築を試みた.

### 2-1) IL-2/IFN- $\gamma$ レポーター細胞(Jurkat#2H4)と IL-1 $\beta$ /IL-8レポーター細胞(U937#6c12)に導入した免疫毒性評価遺伝子の特徴

T細胞での毒性評価遺伝子として選択したIL-2およびIFN- $\gamma$ は以下のような特徴を持つ. IL-2は抗原やマイトジェン刺激されたTh1細胞やNK細胞等から産生される. T細胞においてIL-2は抗原受容体を介する主要シグナルに加え、CD28等の副受容体からの副シグナルが入って初めて産生される機構を持ち、活性化T細胞増殖因子であるとともにNK細胞の増殖・分化および活性化にも重要な役割を果たす<sup>19)</sup>. また、IFN- $\gamma$ は活性化シグナル刺激を受けたNK細胞やT細胞から一過性に産生され、ほぼ全ての免疫応答や炎症応答に関与する多指向性のサイトカインであり、T細胞やB細胞、NK細胞など様々な細胞の活性化や増殖、分化に関与している<sup>20)</sup>. このようにIL-2およびIFN- $\gamma$ は、免疫系には必須のサイトカインである.

また、樹状細胞での評価遺伝子として選択したIL-1 $\beta$ は炎症性サイトカインの一つであり、単球やマクロファージから産生される<sup>21)</sup>. そのシグナルを受けてIL-2、IL-3やIL-6などのサイトカインが産生され、B細胞やT細胞における炎症反応が誘導される. IL-8もIL-1 $\beta$ の刺激を受けて各種細胞から産生されるケモカインの一つであり、炎症反応のメディエーターとして、免疫関連

表5 多面的免疫毒性評価 (Multi-ImmunoTox assay) で定義したパラメーター

略語	パラメーター定義
SLG (SLO) -LA	SLG (SLO) ルシフェラーゼ活性
SLR-LA	SLR ルシフェラーゼ活性
nSLG (nSLO) -LA	SLG (SLO) -LA / SLR-LA (SLG-LA (SLO-LA) 値を SLR-LA 値で除した値 = 内標で補正した値)
FInSLG (FInSLO) -LA	活性化処理有の nSLG (nSLO) -LA / PMA/Ionomycin 処理無の nSLG (nSLO) -LA (活性化処理の有無による nSLG (nSLO) -LA の変化)
SLG (SLO) 抑制率 (%)	(1 - 化学物質処理有の FInSLG (SLO) -LA / 化学物質処理無の FInSLG (SLO) -LA) × 100 (化学物質処理の有無による FInSLG (SLO) -LA の変化)

細胞に対する様々な活性が報告されている<sup>22)</sup>。

免疫学的にも非常に重要な役割を果たすこれらの標的遺伝子のプロモーター領域を組み込んだ各色発光プラスミドを長期培養細胞株 Jurkat および U937 に導入し、それぞれ Jurkat#2H4 と U937#6c12 の多色安定細胞株を得た。

### 2-2) 多面的免疫毒性評価

評価に先立ち、THP-1#THP-G8 と同様にパラメーターの定義を設定した。Jurkat#2H4 では、PMA/ionomycin による活性化処理前後、U937#6c12 では LPS による活性化処理前後で、FInSLG-LA および FInSLO-LA を求め、それぞれに対して化学物質処理前後の抑制率 (%) を計算した。免疫抑制の程度を、抑制率を指標として Null (N);  $+5 < x \leq 5$ , Weak (W);  $5 < x \leq 25$ , Moderate (W);  $25 < x \leq 75$ , Strong (S);  $x < 75$  と定義した。また、化学物質により免疫系が賦活化した場合、つまり FInSLG-LA もしくは FInSLO-LA が 1.05 より大きくなる場合には Augmentation (A) と定義した。定義したパラメーターを表5に示した。

前述の通り設定した評価基準に基づき、Jurkat#2H4 および U937#6c12 を用いて 21 種類の化学物質を評価した (表6)。その結果、本方法により医薬品や環境化学物質など、多くの化学物質の免疫作用を評価することができた。加えて、SLG-LA 抑制率ないし SLO-LA 抑制率により、免疫抑制の「質」まで評価できる可能性が示唆された。実際、臨床治療に用いられている免疫抑制剤について、T細胞から産生されるサイトカインの抑制効果を比較したところ、Cyclosporin A の抑制効果が強度に、抗炎症剤の Dexamethasone、抗がん剤の Mitomycin C および Methotrexate が

中程度に分類された。この結果は、われわれがヒト末梢血から分離・精製した T細胞を用いて検討した結果と概ね一致していた<sup>23)</sup>。一方で、免疫反応を Th2 優位に導くことが知られている医薬品および環境化学物質では<sup>23,24)</sup>、比較的高い抑制率が得られた。図4に示すように、作用機序が既知である免疫毒性物質のパターンと比較することにより、新規の化学物質の免疫毒性作用を推測できる可能性が示唆された。加えて、われわれは Jurkat#2H4 を使用し、ニッケルによる T細胞からのサイトカイン産生の抑制作用を新たに見出した<sup>25)</sup>。このように、これら評価細胞を使用することにより、様々な免疫毒性作用を解析する手がかりが得られることが示唆された。

### まとめと今後の展望について

化学物質に対する免疫毒性の評価は、医薬品、化粧品などの開発分野以外では、現在まであまり顧みられてこなかった。その免疫毒性評価方法の多くは、動物実験に依存したもので、現時点では数万とも言われる化学物質のハザードを免疫毒性の観点から適切かつ迅速に評価できるスクリーニング方法は存在しない。近年、化学物質の免疫毒性発生機序の分子レベルの知見に基づく、培養細胞を用いた高機能かつハイスループットな新規評価方法が注目されており、本安定細胞株はその方法を提供できるものである。

本研究においては、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得る遺伝子をトキシコゲノミクス的手法により抽出し、免疫毒性評価遺伝子として樹状細胞では IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 など5遺伝子、表皮細胞では Heme oxygenase 1 (HMOX1) など5遺伝子、T細胞では IL-2 や



表6 多面的免疫毒性評価 (Multi-ImmunoTox assay) による免疫毒性物質の評価

分類	化学物質	Jurkat#2H4			U937#6c12		
		IL-2 抑制率	IFN- $\gamma$ 抑制率	免疫抑制 (IL-2/IFN- $\gamma$ )	IL-1 $\beta$ 抑制率	IL-8 抑制率	免疫抑制 (IL-1 $\beta$ /IL-8)
サイトカイン	IL-10	27	15	M/W	+10	12	A/W
	IL-4	28	22	M/W	3	13	N/W
	IFN- $\gamma$	14	+14	W/A	34	3	M/M
	IP-10	22	11	W/W	+15	+9	A/A
医薬品	Dexamethasone	41	11	M/W	23	53	W/M
	Cyclosporin A	100	65	S/M	+12	+28	A/A
	Mitomycin C	46	0	M/N	3	+59	N/A
	Vitamin D3	+1	8	N/W	+78	+243	A/A
	Azathioprine	22	17	W/W	5	+20	N/A
	Cyclophosphamide	15	5	W/N	+2	+20	N/A
	Methotrexate	47	34	M/M	+5	+20	N/A
	Mizoribine	8	13	W/W	+4	8	N/W
環境化学物質	NiCl <sub>2</sub>	75	65	S/M	26	+61	M/A
	Formaldehyde	45	+1	M/N	+67	+154	A/A
	Diesel exhaust particles (DEP)	67	18	M/M	+59	19	A/W
金属	BaCl <sub>2</sub>	94	49	S/M	40	28	M/M
	MnCl <sub>2</sub>	92	10	S/W	4	+118	N/A
	ZnCl <sub>2</sub>	82	34	S/M	13	+207	W/A
	FeCl <sub>2</sub>	92	51	S/M	3	+35	N/A
その他	Trimellitic anhydride	+82	+18	A/A	+1	+10	N/A
	Dinitrochlorobenzene (DNCB)	+100	+39	A/A	23	13	W/W

免疫抑制: Null (N); +5 < x ≤ 5, Weak (W); 5 < x ≤ 25, Moderate (M); 25 < x ≤ 75, Strong (S); x < 75, Augmentation (A); +5 < x

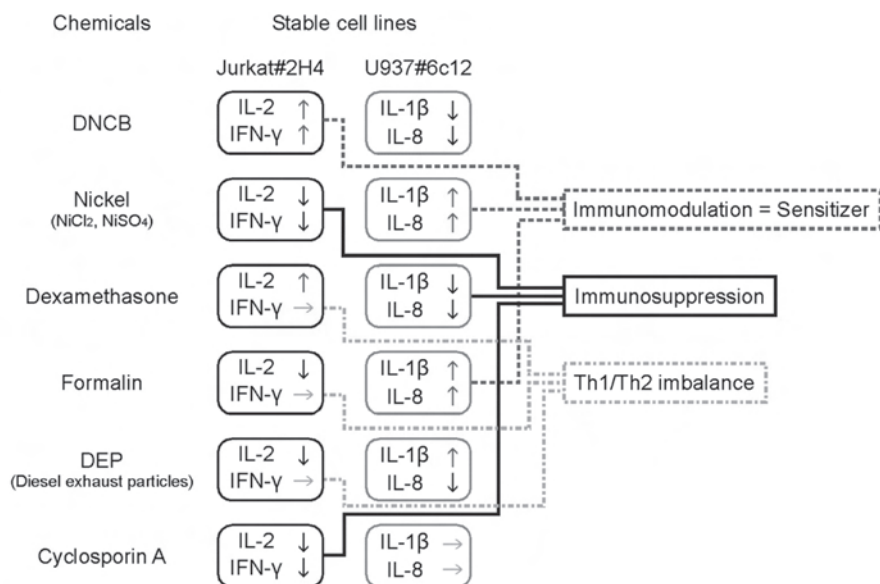


図4 Jurkat#2H4とU937#6c12を用いた多面的免疫毒性評価 (Multi-ImmunoTox assay)

各遺伝子に示される矢印は発現の変動を示す。

IFN- $\gamma$  など4遺伝子を同定した。それらのうち、HMOX1, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-8 などについては、免疫毒性評価のための多色発光安定細胞株を樹立した。IL-8レポーター細胞 (THP-1#THP-G8)を用いたIL-8 Luc assayは感受性試験代替法としての有用性が明らかとなり、今後多施設でのバリデーションを経てOECD TG化を目指す予定である。一方、IL-2/IFN- $\gamma$ レポーター細胞(Jurkat#2H4)およびIL-8/IL-1 $\beta$ レポーター細胞(U937#6c12)を用いるMulti-ImmunoTox assayは、免疫毒性を多面的に評価できる可能性があり、実用化に向けて更なる検討を重ねていく予定である。以上の樹立細胞および免疫毒性評価系は国内・国際特許が既に認められている(発明名称;多色発光を用いた免疫毒性評価システム,国内出願番号;特願2010-151362,国際出願番号;PCT/JP2011/065090)。本稿では割愛したが、ストレスセンサーともいわれるHMOX1レポーター細胞(#HR38H6)を用いたHMOX1 assayは、活性酸素産生酸化還元バランス,小胞体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あると考えられる。

本研究で用いた多色発光システムは、内部標準とは別に2つのレポーターまでが評価でき、2種類の標的遺伝子を全く同じタイミング,かつ厳密に同条件で比較することができるものであり、多くの化学物質を迅速に、多方面から解析する点において大きな利点になると考えられる。宿主細胞や標的遺伝子の組み合わせによって、様々な免疫系の特徴を持ち合わせた複数パターンの安定細胞株の樹立が可能になり、特徴の異なる複数の安定細胞株を樹立することができた。また、本プロジェクトにおいては、鳥取大学の押村光雄教授や大林徹也准教授らが研究を進めてきたヒト人工染色体(HAC: Human Artificial Chromosome)ベクターを用いての多色発光安定細胞株を樹立する系も既に成功している(データ未発表)。HACベクターは細胞中で単一コピーの自律的な染色体として機能するベクターであり、遺伝子の導入サイズに制限がない。加えてランダムインテグレーションによる宿主ゲノムの破壊がなく、本来の遺伝子発現が損なわれないという利点を有し、評価系

に適した安定発現株を取得できる可能性がある。このHACベクターを利用した多色発光安定細胞株については、現在詳細な実験条件等について検討を行っている。

このように、種々の免疫系の特徴を持つ複数の安定細胞株を用いた化学物質の免疫毒性の検出系は、総合的なリスク評価において、非常に有用であることが示唆される。本研究は、化学物質のリスク評価のための新たな検出方法として寄与するものであり、今後、免疫毒性分野における化学物質の新規毒性評価方法についての更なる研究の発展が期待される。

### 謝辞

本研究は、2006~2010年度NEDO受託事業「高機能型有害性簡易手法の開発」(食品薬品安全センター秦野研究所 田中 憲穂PL)の一部として行われました。ここに関係各位に対し、心より厚く御礼申し上げます。

### 文献

- 1) 大沢基保:トキシコロジーフォーラム. 8: 684, 1986
- 2) Gell PGH, Coombs RRA eds: Clinical Aspects of Immunology 1st ed. Oxford. UK: Blackwell, 1963
- 3) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, et al.: Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques*. 2005; **38**: 891-894
- 4) Noguchi T, Ikeda M, Ohmiya Y, et al.: Simultaneous monitoring of independent gene expression patterns in two types of cocultured fibroblasts with different color-emitting luciferases. *BMC Biotechnol*. 2008; **8**: 40
- 5) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, et al.: An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci*. 2011; **124**: 359-369
- 6) Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, et al.: Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci*. 2007; **97**: 417-427
- 7) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, et al.: Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro*. 2006; **20**: 767-773

- 8) Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, et al.: Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro*. 2006; **20**: 774-784
- 9) Ade N, Martinozzi-Teissier S, Pallardy M, et al.: Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J Immunotoxicol*. 2006; **3**: 189-197
- 10) Python F, Goebel C, Aeby P: Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; **220**: 113-124
- 11) Maxwell G, Aeby P, Ashikaga T, et al.: Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *ALTEX*. 2011; **28**: 50-55
- 12) Toebak MJ, Pohlmann PR, Sampat-Sardjoepersad SC, et al.: CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol In Vitro*. 2006; **20**: 117-124
- 13) Nukada Y, Miyazawa M, Kosaka N, et al.: Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *J Toxicol Sci*. 2008; **33**: 175-185
- 14) Mizuashi M, Ohtani T, Nakagawa S, et al.: Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2005; **124**: 579-586
- 15) Kagatani S, Sasaki Y, Hirota M, et al.: Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2010; **130**: 175-183
- 16) Dent G, Rabe KF, Magnussen H: Augmentation of human neutrophil and alveolar macrophage LTB4 production by N-acetylcysteine: role of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*. 1997; **122**: 758-764
- 17) Megherbi R, Kiorpelidou E, Foster B, et al.: Role of protein haptentation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; **238**: 120-132
- 18) Casati S, Aeby P, Kimber I, et al.: Selection of chemicals for the development and evaluation of in vitro methods for skin sensitisation testing. *Altern Lab Anim*. 2009; **37**: 305-312
- 19) Boyman O, Sprent J: The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012; **12**: 180-190
- 20) Billiau A, Matthys P: Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; **20**: 97-113
- 21) Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA: Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012; **13**: 333-342
- 22) Thelen M: Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2001; **2**: 129-134
- 23) Ohtani T, Nakagawa S, Kurosawa M, et al.: Cellular basis of the role of diesel exhaust particles in inducing Th2-dominant response. *J Immunol*. 2005; **174**: 2412-2419
- 24) Sasaki Y, Ohtani T, Ito Y, et al.: Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; **148**: 239-250
- 25) Saito R, Hirakawa S, Ohara H, et al.: Nickel differentially regulates NFAT and NF- $\kappa$ B activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; **254**: 245-255