

20142800/B

厚生労働科学研究費補助金

化学リスク研究事業

多色発光細胞を用いた high-throughput
免疫毒性評価試験法の開発

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成27(2015)年 5月

様式A (10)

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

平成 27 年 5 月 30 日

厚生労働大臣

(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

住 所 〒989-3201宮城県仙台市青葉区
国見ヶ丘2-25-2

フリカヅナ アイバ セツヤ
研究者 氏 名 相場 節也 
(所属研究機関) 東北大学

平成 24 年度から実施した厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リス 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発
(H24-化学-一般-001)

国庫補助金精算所要額 : 金 61,347,000 円也 (うち間接経費 14,157,000 円)

厚生労働科学研究費補助金

化学リスク研究事業

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発-----	4
相場 節也	
(資料) 1. Multi-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール	
平成 27 年 1 月 9 日 ver. 005.0J	
2. Data sheet for MITA Ver.006 20150109	
II. 分担研究報告	
1. 免疫毒性に関する国際動向調査 -----	82
小島 肇	
2. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, 精度管理 -----	85
近江谷 克裕	
3. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析 -----	96
山影 康次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	106
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	109

Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, *et al.* (2014) Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol in Vitro* 28:759-68.

Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, *et al.* (2013) In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape stripping. *J Invest Dermatol* 133:2407-15.

Onami K, Kimura Y, Ito Y, *et al.* (2014) Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* 134:1951-60.

Watanabe M, Kurai J, Tomita K, *et al.* (2014) Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *J Asthma* 51:595-602.

Watanabe M, Noma H, Kurai J, *et al.* (2015) Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposure to Asian desert Dusts and its association with interleukin-8. *BioMed Res International* in press.

Yasunaga M, Murotomi K, Abe H, *et al.* (2015) Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3. *J Biotechnol* 194:115-23.

Yasunaga M, Nakajima Y, Ohmiya Y (2014) Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution. *Analytical and bioanalytical chemistry* 406:5735-42.

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）
（総合）研究報告書

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

研究代表者 相場 節也
東北大学病院皮膚科教授

研究要旨

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価可能なルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系では T 細胞における IL-2 と IFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞における IL-1 β と IL-8 の転写に至るシグナル伝達経路への化学物質の影響を多面的に評価することができる。まず種々の機序の明らかな免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤の T 細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果と一致していた。また 40 種類の化学物質を評価したところ、鉛の免疫抑制作用、リチウム、水銀による免疫増強作用を検出できることも明らかとなった。さらに世界に先駆けて、人工染色体を用いた IL-1 β レポーター細胞を樹立し、MITA 構成細胞の長期安定性を確保した。施設内、施設間再現性も検討し、IL-2 と IFN- γ レポーター細胞に関しては既に良好な結果が得られている。以上の結果より、MITA が化学物質の免疫毒性を自然免疫と獲得免疫の両面から評価できる新しい high-throughput 手法となりうることが明らかとなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

小島 肇・国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部・室長

近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル部門・部門

山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所代替法試験部・部長

影響を及ぼしうる。したがって、免疫系機能におけるそれら外因性化学物質の毒性効果として定義される免疫毒性は、公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。現在、化学物質の免疫毒性の評価は種々の動物実験に依っており、免疫抑制と刺激性を評価するいくつかのアッセイ法が提案されている。しかし、動物実験には費用面、倫理面の問題、また結果をヒトに反映できるかという問題が存在する。したがって、実験動物の使用を減らすために代替実験法を促進、評価し、可能であれば動物試験に置き換えることがヨーロッパの政策となっている。

2003 年に European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)により開催されたワークショップで、最新の in vitro 免疫毒性評価系が

A. 研究目的

研究背景：

環境汚染物質、食物添加物、薬剤に属する化学物質の多くは免疫系を標的とし、その結果、アレルギー、自己免疫疾患、発癌その他人体の健康に悪

報告された。regular 28-day general toxicity tests で有用な情報が得られていたため、このワークショップでは段階状の取り組みが提案された。つまり、免疫毒性のプレスクリーニングは骨髄抑制の評価から開始する。骨髄を損傷または破壊する物質は免疫毒性効果を持つと考えられる。骨髄毒性を持たない物質については human whole-blood cytokine release assay (HWBCRA), lymphocyte proliferation assay, mixed lymphocyte reaction, natural killer cell assay, T cell-dependent antibody response, dendritic cell maturation, fluorescent cell chip などのさまざまな方法で免疫毒性を検証された。しかし、これらのなかで正式なプレバリデーションが行われたのは HWBCRA のみである。

Langezaal ら(Langezaal *et al.*, 2001; Langezaal *et al.*, 2002)により報告された HWBCRA の原理は human whole-blood method for pyrogen testing に基づいている。その方法はヒトの全血を lipopolysaccharide (LPS) または staphylococcal enterotoxin B (SEB) で刺激し、単球細胞が産生する IL-1 β 、Th2 リンパ球が産生する IL-4 を測定するものである。Langezaal らはヒト全血を 40 時間、免疫毒性物質または非免疫毒性物質で処理したのち LPS または SEB で刺激し上清中のそれぞれ IL-1 β 、IL-4 を定量し、免疫毒性力価を評価するため IC50 (50%抑制する濃度)、SC₄ (4 倍刺激される濃度) を算出した。ECVAM ワークショップではこの方法の利点として、①ヒトと動物との種差を考慮しなくてこと、②ヒトの初代細胞を使用していること。③手技が簡便であること、④費用がかからず、短時間でできることを挙げている。個人間の白血球数と刺激への反応の違いが HWBCRA における重大な懸念となっている。凍結保存されたヒト全血を使用することによりこの問題は解決するものの、この方法は数多くの化学物質を評価する high-throughput アッセイには向かないものである。

我々は、平成18-22年NEDO「高機能簡易型有害性評価手法の開発」プロジェクトにおいて、産業総合研究所が開発した 3 色発光細胞の技術を応用し、Jurkat細胞における INF- γ 、IL-2、G3PDH プロモーター活性、THP-1 細胞における IL-8、IL-1 β 、G3PDH プロモーター活性を high throughput に評価できる長期細胞株を樹立し、化学物質の免疫毒性評価システム (Multi-ImmunoTox assay ; MITA) を構築し国内外の特許を取得している。このシステムを用いると、

化学物質のヒトT細胞における INF- γ 、IL-2 転写活性、ヒト単球細胞における IL-8、IL-1 β 転写活性をわずか2種類の細胞を用いて 6 時間で評価でき、また、96-multiwell plate を用いた多検体処理、自動測定が可能である。

目的 :

平成 24 年度

① MITA の化学物質免疫毒性評価の妥当性の検討
MITA においては、我々が樹立した IL-2、INF- γ 、IL-1 β 、IL-8 プロモーターに誘導されるルシフェラーゼ遺伝子を導入した 3 つの安定レポーター細胞株を用いる。#2H4 細胞は 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)、INF- 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)、G3PDH 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 Jurkat T 細胞株に導入したものである。THP-G1 β 細胞は IL-1 β プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を THP-1 単球細胞株に導入したものであり、THP-G8 細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を THP-1 単球細胞株に導入したものである。(図 1) そこで、これらを用いて 3 つの代表的免疫抑制剤 dexamethasone (Dex), cyclosporine A (CyA), Tacrolimus (Tac) が phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomyin (Io) の混合物(PMA/Io)に刺激された#2H4 細胞、または lipopolysaccharide (LPS)に刺激された THP-G1 β 細胞、THP-G8 細胞のルシフェラーゼ活性に与える影響を調べ、これら薬剤の既知の免疫薬理作用と比較する。

② MITA と定量的 real-time PCR による mRNA 発現測定との関連の検討

3 種の免疫毒性評価細胞のルシフェラーゼ活性と、Jurkat 細胞、THP-1 細胞における mRNA の発現とを比較した。すなわち、これら 3 種類の評価細胞と Jurkat 細胞、THP-1 細胞を未刺激、免疫抑制剤存在下に PMA/Io または LPS で刺激し、評価細胞のルシフェラーゼ活性と Jurkat 細胞、THP-1 細胞 mRNA 発現と関連を検討する。

③ ヒト whole blood cytokine release assay (WBCRA) の代替法としての MITA の可能性の検討

同様に、3 種の免疫毒性評価細胞のルシフェラーゼ活性と、未刺激、免疫抑制剤存在下に PMA/Io または LPS で刺激されたヒト全血細胞における

mRNA の発現との相関も比較する。

平成 24 年度から 25 年度にかけて

④ MITA のプロトコルの確立、MITA の適用限界の決定

免疫薬理作用の明らかな免疫調節性薬剤と対照として免疫薬理作用の想定されていない薬剤を MITA を用いて評価することにより、MITA のプロトコルの確立、MITA で評価可能な免疫薬理作用を明らかにする。

平成 25 年度から 26 年度にかけて

⑤ MITA の data set の作成

Wagnerら(Wagner *et al.*, 2006)がFluorescence Cell Chip assay (FCCA) に関する論文中で検討した46 化学物質に関して MITA による評価をおこない MITA の data set を作成する。

⑥ MITA と Fluorescent cell chip assay (FCCA) との比較

MITA と FCCA により同一化合物を評価することにより、両者の相違を明らかにする。

⑦ 施設間再現性試験を行うことによる MITA の多施設への技術移転性の検証

東北大皮膚科および本研究に参加している産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所の3 施設で10 種類の化学物質について施設間再現性試験を施行する。

⑧ MITA の改良 (1) IL-8 Luc assay との組み合わせ

近年、免疫反応は大きく自然免疫と獲得免疫から構築されていることが報告され、免疫毒性もその両者の観点から評価することが求められている。実際、化学物質による自己免疫発症などに関しても自然免疫の重要性が明らかにされている(Pollard and Kono, 2013)。MITA 同様の high throughput 免疫毒性試験である FCCA は自然免疫を評価できないが、MITA では化学物質の自然免疫系への影響が評価可能である。しかし、LPS 刺激による IL-8 発現は、代表的なハプテンである 2-mercaptobenzothiazole、CoCl₂、NiCl₂ により予想外に抑制された。一方、LPS 非存在下に化学物質による THP-G8 細胞の IL-8 レポーター活性を評価する IL-8 Luc assay は、感作性試験法として、既にその迅速性、精度、感度、特異度、施設間再現性が validation により評価され現在 OECD に SPSF を提出している。そこで、感作性物質を含めた幅広い化学物質の免疫毒性評価系の構築には、MITA と IL-8 Luc assay の組み合わせを検討する。

⑨ MITA の改良 (2) 人工染色体を用いた新規 IL-1 β レポーター細胞の樹立

MITA を種々化学物質で評価するなか、THP-G1b

細胞の以下のような問題点が明らかになった。1) 細胞増殖が遅く、解析に必要な細胞数を確保するのに時間を要する。2) LPS で刺激後に SLR-LA が負になってしまう。

そこで、上記の問題点を克服するために、人工染色体技術(Hoshiya *et al.*, 2009) を応用して、新たに IL-1 β レポーター細胞樹立を試みる。作成された際には、その増殖曲線、化学物質反応性などを THP-G1b 細胞と比較する。

⑩ MITA の応用

MITA は、化学物質の免疫毒性評価以外にも様々な有用性が考えられる。そのなかで、

- 1) 水質汚染評価
- 2) PM2.5 評価
- 3) 抗 TNF- α 抗体製剤の血中 TNF- α 活性評価を検討する。

B. 研究方法

試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone (Dapsone), Sulfasalazine, Colchicine, Chloroquine, Minocycline, Nicotinamide, Acetaminophen, Digoxin, Warfarin, Cimetidine, Levamisole, Isoniazid, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin(Io), Lipopolysaccharides from *E. coli* 026:B6 (LPS), 2,4-Diaminotoluene, 2-Aminoanthracene, 2-Mercaptobenzothiazole, Amphoterycine B, Benzethonium chloride, Chlorpromazine, Cisplatin, Dibenzo[a,i]pyrene, Dibutyl phthalate, Diethanolamine, Lead acetate, Nitrofurazone, Pentamidine isethionate, p-Nitroaniline, Pyrimethamine, Ribavirin, Sodium bromate, Triethanolamine, Actinomycin D, Cobalt chloride, Dimethyl sulfoxide, Histamine, Hydrocortisone, Isophorone diisocyanate, Mitomycin C は Sigma-Aldrich から購入した。Aluminum chloride, Ethanol, Magnesium sulfate, Methanol, Nickel sulfate, Sodium lauryl sulfate, Lithium carbonate, Mercuric chloride は和光純薬から購入した。Hydrogen peroxide は三徳化学工業から購入した。Deoxyspergualin は医薬品卸業から購入した。

Jurkat T 細胞由来 #2H4 細胞における IL-2, IFN- γ , G3PDH プロモーターアッセイおよび THP-1 単球細胞由来 THP-G1 β 細胞、THP-G8 細胞における IL-1 β , IL-8, G3PDH プロモーターアッセイ (図 1)

ヒト T リンパ芽球性白血病由来細胞株である Jurkat 細胞株とヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1(ATCC) は

Antibiotic-Antimycotic(Invitrogen), 10% ウシ胎児血清(Biological Industries)を加えたRPMI-1640(Gibco)にて37°C、5%CO₂下で培養した。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)、G3PDH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)はSuperFect(Qiagen)を用いJurkat細胞に導入し、#2H4細胞を樹立した(Saito *et al.*, 2011)。IL-1 β プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子、G3PDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子をNucleofector II(Amaxa)を用い THP-1細胞に導入しTHP-G1 β 細胞を樹立し、IL-8プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子、G3PDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を同様にTHP-1細胞に導入しTHP-G8細胞を樹立した(Takahashi *et al.*, 2011)。1ウェル当たり 2×10^5 個の# 2H4細胞または1ウェル当たり 5×10^4 個のTHP-G1 β 細胞、またはTHP-G8細胞を黒色の96-well プレート(Greiner bio-one)にまき、薬剤を加え、37°C、5%CO₂下で1時間培養した。つづいて# 2H4細胞については25nM PMAと1 μ M Ioの混合物(PMA/Io)、THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPS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を検出した。(SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA))細胞数の違い、または各種の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。以下のよう

$$\%suppression = \frac{\text{薬剤存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA}}{\text{薬剤非存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA}} \times 100$$

に%suppression抑制率を計算した。

MITAによる免疫毒性評価法(図2)

各実験において得られた結果は、一元配置分散分析を行い、その後 Dunnett 検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を3回繰り返し検討すると、3回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。

そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3回の繰り返し実験の結果のなかから%suppressionの絶対値(免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる)が最も大きい値を選び Student's t-test を行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした。

Human whole-blood cytokine mRNA expression test (HWBCMET)

Langezaalら(Langezaal *et al.*, 2001; Langezaal *et al.*, 2002)により報告されたHWBCRAは、40時間の培養とELISAによるサイトカインの定量がいつ用であるが、この方法は結果が得られるまでに3日以上の日数を要することと少数の検体に対応しづらい欠点を有していた。そこで、サイトカインを定量するかわりに、mRNAの定量を行うことで現法の欠点を補うことを目指した。健常人からwhole blood(WB)をヘパリン採血(ノボヘパリン17.1IU/血液ml, 持田製薬)した。RPMI1640で3倍希釈し、2mlずつ分注、これを1 μ g/ml Dex、10 μ g/ml CyAまたは10ng/ml TACで前処理し、37°Cで1時間培養した。その後、PMA/IoまたはLPSで刺激し37°Cで6時間培養した。QIAamp Blood Mini Kit(Qiagen)を用いて含まれる赤血球を溶血した後、RNAを分離し定量的 RT-PCR分析で解析した。遺伝子発現はG3PDH発現で標準化した(Human whole-blood cytokine mRNA expression test: HWBCMET)。また各個人についてそれぞれの薬剤による%suppressionをプロットした。%suppressionは薬剤存在下の標準化されたmRNA発現 \div 薬剤非存在下の標準化されたmRNA発現 \times 100を算出した。

Jurkat細胞、THP-1細胞におけるmRNA発現

3×10^6 細胞のJurkat細胞またはTHP-1細胞を薬剤で1時間前処理し、その後、それぞれPMA/Ioまたは100 ng/ml LPSで刺激し37°Cで6時間培養した。Isogen(Nippon gene)を用いてtotal RNAを抽出した。

定量的 RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) (Takara Bio Inc)を用いてtotal RNAから相補的DNA(cDNA)を合成した。Mx3000p QPCR System (Stratagene)を用いて定量 RT-PCRを行った。プライマーについて、それぞれの遺伝子情報はGenBankより入手し、Primer Express 1.0 (Applied Biosystems)を用いて設計、SIGMA GENOSYSにて合成した。cDNA 10ng、フォワードおよびリバースプライマー 400nM、TaqMan probe 60nM、ROX 30nM、Brilliant II Fast QPCR Master Mix (Stratagene)を含む反応液を、95°Cで2分間反応させたのち、95°C、5秒間、60°C、

20秒間の反応を45サイクル行った。恒常的に発現するG3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta \Delta Ct$ 法で各遺伝子発現の解析を行った。

MITAによる免疫抑制剤評価

免疫薬理作用の明らかな免疫抑制剤9剤、薬理学的に免疫抑制剤には分類されていないが臨床的に免疫調節作用を有することが知られている薬剤5剤、免疫調節作用の知られていない薬剤3剤に関して上記の方法でMITAを施行し、MITAのプロトコルの確立、判定基準、適用限界を決定する。

MITAによる化学物質免疫毒性評価

WagnerらがFluorescent Cell Chip assay (FCC)において検討した46種類の化学物質(Wagner *et al.*, 2006)に関してMITAを行う。この46種類の化学物質は、すでに、過去の報告をもとにin vivo, in vitroにおいて免疫毒性が報告されていない化学物質(N), 免疫抑制の報告のある化学物質(IT-1), アレルギー, 自己免疫などを誘発する可能性のある化学物質(IT-2), in vivoにおける影響は明らかではないが、何らかの免疫関連パラメーターを変動させる化学物質(M)などに分類されている。そこで、これらの化学物質をMITAで評価し、既知の免疫毒性をMITAが正確に評価できるか否かを明らかにする。

(倫理面への配慮)

健常人からの採血に際しては、研究内容、採血における危険性、得られた検査結果により本人の人権が損なわれることのないこと、得られた検査結果は、守秘され、個人のプライバシーを侵害する可能性がないこと、研究に協力することに同意した後も、いつでも自由に辞退できること、この研究によって生じる知的財産権は被験者には帰属しないことについて説明し、本人より同意書を取得している。

C. 研究結果 平成 24 年度

① MITAの化学物質免疫毒性評価の妥当性の検討

1) レポーター細胞株#2H4、THP-G1b、THP-G8は、それぞれPMO/Io、LPS刺激によりSLG-LA、SLO-LAを増強する。(図2)

はじめに#2H4細胞を、PMA/Io、THP-G1b細胞、

THP-G8細胞をLPSで刺激し、時間をおいてSLG-LA、SLO-LA、SLR-LAを測定した。PMA/Io刺激により、T細胞のIL-2プロモーター活性、IFN- γ プロモーター活性に相当する#2H4細胞のSLG-LAとSLO-LGは4時間後より有意に増強した。一方、G3PDHプロモーター活性に相当するSLR-LAは抑制された。同様にLPS刺激により、IL-1 β プロモーター活性に相当するTHP-G1b細胞のSLG-LA、IL-8プロモーター活性に相当するTHP-G8細胞のSLO-LAは2時間後より有意に増強した。両細胞ともに、SLR-LAには変化が認められなかった。図2に#2H4細胞のnSLG-LAとnSLO-LA、THP-G1b細胞のnSLG-LA、THP-G8細胞のnSLO-LAに関して経時変化を示した。具体的には、#2H4細胞に関してはPMA/Io刺激5時間から12時間後にかけて、nSLG-LA、nSLO-LA両者の有意かつ時間依存的の増強が認められた。一方、THP-G1b細胞に関しては、LPS刺激4時間から24時間後にかけてnSLG-LAの有意かつ時間依存的の増強が認められ、THP-G8細胞に関しては、LPS刺激4時間から24時間後にかけてnSLO-LAの有意な増強が認められ、その最大の誘導は5時間後に見られた。

PMA/Io刺激された#2H4細胞とLPS刺激されたTHP-G1b細胞またはTHP-G8細胞について1ウェル当たりの播種細胞数がSLG-LA、SLO-LA、SLR-LAに及ぼす影響を検討した。これらの細胞株を1ウェル当たり 0.5×10^4 から 1.6×10^6 細胞で播種し、刺激後6時間にルシフェラーゼ活性を測定した。SLG-LA、SLO-LA、SLR-LAの値は1ウェル当たり 1.25×10^4 から 2×10^5 細胞の範囲では刺激の有無に関わりなく細胞数依存的に増加した。したがって、以後の実験では、1ウェル当たりレポーター細胞数を 5×10^4 細胞に固定した。

2) レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果はJurkat細胞、THP-1細胞でのmRNA発現に対する効果と相関する。

次にPMA/IoまたはLPSで刺激された3つのレポーター細胞のnSLG-LAまたはnSLO-LAに対する3種類の免疫抑制剤、Dex、CyA、Tacの効果は、同様に刺激されたレポーター細胞の由来細胞であるJurkat細胞またはTHP-1細胞におけるmRNAの発現の変化と相関するかどうかを検討した。Dex、CyA、Tacの存在下に#2H4細胞をPMA/Ioで刺激すると、DexはnSLG-LAを低濃度で強力に抑制したが、nSLO-LAに対する効果は300 $\mu\text{g/ml}$ 以上という高濃度で始めて観察され、しかも抑制の程度も弱かった。一方、CyAとTacはnSLG-LAとnSLO-LAの両方を低濃度で強力に抑制した。一方、Dex、CyA、Tacの存在下にTHP-G1b細胞をLPSで刺激すると、DexのみがnSLG-LAを有意に抑制した。同様に、

Dex、CyA、Tacの存在下にTHP-G8細胞をLPSで刺激すると、DexのみがnSLG-LAを有意に抑制した(図3)。

一方、Dex、CyA、Tacの存在下にJurkat細胞をPMA/Ioで刺激し、IL-2とIFN- γ のmRNA発現を調べると、DexはIL-2のmRNA発現のみを抑制し、CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現を抑制した。3剤の存在下にTHP-1細胞をLPSですると、DexのみがIL-1 β とIL-8のmRNA発現を有意に抑制し、CyAやTacでは抑制されなかった(図4)。これらの結果は、3つのレポーター細胞に認められる抑制効果が、Jurkat細胞やTHP-1細胞におけるmRNA発現への効果と相関していることを示している。

3) レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果は、PMA/IoまたはLPSで刺激されたヒト whole blood の mRNA 発現に対する効果と相関する。 Human whole-blood cytokine mRNA expression test (HWBCMET)

WBをPMA/Ioで刺激し、免疫抑制剤のIL-2とIFN- γ のmRNA発現に及ぼす影響を調べたところ、DexはIL-2とIFN- γ のmRNA発現を中程度に抑制した(図5)。一方CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現をほぼ完全に抑制した。また3剤の存在下にWBをLPSで刺激したところ、DexのみがIL-1 β とIL-8のmRNA発現を抑制し、CyAやTacでは抑制されずCyAではむしろ増強が認められた。これらの結果は、3つのレポーター細胞に認められる抑制効果が、PMA/IoやLPSで刺激されたWBのmRNA発現への効果と相関していることを示している。

また、原法である human whole-blood cytokine release assay (HWBCRA) (Langezaal *et al.*, 2001; Langezaal *et al.*, 2002)では40時間培養しELISAによるサイトカイン量の測定をおこなっているが、本研究では効率化をめざして6時間培養ののち定量的RT-PCR分析でサイトカインmRNA量を測定する方法へと変更した Human whole-blood cytokine mRNA expression test (HWBCMET)。得られた結果はELISAでおこなった報告とほぼ同様の傾向が認められ、WBCRAの評価時間の短縮化と少数検体への対応が可能となった。

4) MITAにより解析したDex、キナーゼ阻害剤、フォスファターゼ阻害剤の効果(図3, Table 1) Dex, CyA, Tacに関しては、上述のとおりであるが、Rapamycin (RPM)に関しては、免疫抑制作用を見いだせなかった。

5) MITAにより解析した免疫抑制剤(プリンまたはピリミジン合成阻害剤)の効果(図6)

これらの結果を踏まえ、他の免疫抑制または調整剤をMITAにて解析した。プリン合成阻害剤であるAzathioprineやMethotrexateは#2H4細胞やTHP-G1b、THP-G8のルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった。一方、ピリミジン合成阻害剤であるLeflunomideは#2H4細胞のSLG-LA、THP-G1bのSLG-LAを有意に抑制した。

6) MITAにより解析した免疫調整剤の効果(図7)

一方、Sulfasalazineは#2H4細胞のSLG-LA、SLO-LAやTHP-G1bのSLG-LA、THP-G8のSLO-LAを顕著に抑制した。Chloroquineは#2H4細胞のSLG-LA、SLO-LAのみを抑制した。Colchicineは、逆にTHP-G1bのSLG-LA、THP-G8のSLO-LAを有意に増強した。

7) MITAにより解析した免疫調節作用の知られていない薬剤の効果(図8)

WarfarinやCimetidineは#2H4細胞のSLG-LA、SLO-LAやTHP-G1b、THP-G8のルシフェラーゼ活性に影響を及ぼさなかった。一方、Acetaminophenは#2H4細胞のSLG-LA、SLO-LAやTHP-G1b、THP-G8のルシフェラーゼ活性を有意に増強させた。

8) 各種薬剤の免疫毒性評価まとめ(表1)

薬物が投与された際、時に組織中の薬物濃度が最高血中濃度Cmax($\mu\text{g/ml}$)よりも高くなることが知られている(Kiang *et al.*, 2012; Wiskirchen *et al.*, 2011)。そこで生体内でT細胞やマクロファージが暴露しうる最高の薬物濃度をCmaxの5倍の濃度(5x Cmax)と想定し、各薬剤の5x Cmax以下の薬物濃度での%suppressionおよび5x Cmaxを超える薬物濃度での%suppressionを算出し表にまとめた。(図9)%suppressionが60%未満および%suppressionが180%以上(プロモーター活性が上昇するもの)のセルはそれぞれ青色、オレンジ色で示した。5x Cmax以下の薬物濃度では、DexはIL-1 β とIL-8のプロモーター活性を抑制し、CyAとTacはIL-2とIFN- γ のプロモーター活性を抑制し、LefはIL-2とIL-1 β のプロモーター活性を抑制した。免疫調整剤に関しては、SulfasalazineはIFN- γ 、IL-1 β 、IL-8のプロモーター活性を抑制し、NicotinamideはIL-1 β とIL-8のプロモーター活性を抑制した。一方、colchicineはIL-1 β プロモーター活性を上昇させた。5x Cmax以下の薬物濃度では、免疫調節作用の知られていない薬剤についてはどの薬剤もT細胞、単球のサイトカインプロモーター活性に影響を与えな

かった。

9) プロトコールの確立

MITAにより17種類の薬剤を評価する中で、添付の資料にあるMITAのプロトコールver 2を作成した(資料1)。特に、プロトコールの作成に際しては、3回の繰り返し実験から得られる結果をどのようにMITAによる化学物質の免疫毒性評価に用いるかに留意した。まず、各実験において得られた結果は、一元配置分散分析を行い、その後Dunnett検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を3回繰り返し検討すると、3回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3回の繰り返し実験の結果のなかから%suppressionの絶対値(免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる)が最も大きい値を選びStudent's t-testを行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした(図9)。

10) 新しく作成したプロトコールと判定基準に基づいた各種薬剤の免疫毒性評価(表2)

そこで新たに作成したMITAのプロトコールと判定基準に基づいて、17種類の薬剤を再評価した。そのために、各薬剤に関してさらに1回実験を追加した。

11) 多面的な免疫毒性メカニズムの中で、MITAが評価できる免疫反応の特定

今回得られたMITAによる薬剤の免疫調節作用とそれぞれの薬剤の文献的に報告されている免疫調節作用((Allison, 2000)を比較検討した。その結果、MITAは、サイトカインの発現調節に直接作用する薬剤の免疫抑制作用は適切に評価できるが、免疫担当細胞の代謝、細胞増殖に作用し二次的にサイトカイン発現を抑制する薬剤の作用は評価できないことが明らかとなった。したがって現時点では、MITAによる化学物質の免疫毒性評価には、代謝、細胞増殖に対する影響を検出できる評価系、具体的には28日間反復投与毒性試験などとの組み合わせが必要となる。しかし今回の検討で、CP、AZ、MPA、MZR、MTXなどの薬剤がMITAのいずれかのレポーター活性を逆に増強する特性を共有していることが明らかとなり、今後、この特性を利用してMITAによる代謝、細胞増殖に作用する免疫抑制剤の免疫毒性評価の可能性を検討する予定である。現在、これら薬剤のMITAによる評価を経時的に行い、CyAやTacなどのサイトカイン発現に直接作用する薬剤、また、免疫増強作用のある薬剤などとの相違を検討している。

12) 多数の免疫毒性物質を評価することにより明らかになったMITAの特性(表3)

平成25年度、26年度にかけてWagnerら(Wagner *et al.*, 2006)がFluorescent Cell Chip assay (FCCA)に関する論文の中で検討した46化学物質中の40化学物質に関してMITAによる評価をおこなった。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などが評価できることを明らかにした。すなわちLead acetateの免疫抑制作用がIL-2、IFN- γ のレポーター活性により、lithium carbonate、mercuric chlorideによる免疫増強、自己免疫誘導作用が、IFN- γ のレポーター活性を指標に評価できる可能性が示された。

13) MITAとFluorescent cell chip assay (FCCA)との比較(表3)

MITA、FCCAともにDex、CyA、Tac、Dapsone、鉛の免疫抑制作用、水銀による免疫増強作用(IFN- γ 転写活性増強)を適確に評価できた。一方、ニッケル、コバルトなど2価イオンにはT細胞活性化に必須な転写因子であるNFATの上流に位置するCa²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channelを抑制する作用が存在することが良く知られているが(Saito *et al.*, 2011)、MITAは両金属の抑制作用を検出できたが、報告によればFCCAは検出できない。

14) 施設間比較試験を行うことにより、MITAの多施設への技術移転性を検証する(表4、表5)

東北大皮膚科および本研究に参加している産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所の3施設で10種類の化学物質について施設間比較試験を施行した。これに先立ち技術移転が確実に行われているかを確認する目的で4種類の薬剤に関して各施設で試験を施行した(表4)。#2H4細胞については3施設でほぼ同等の結果が得られたが、THP-G1bおよびTHP-G8に関しては再現性がとぼしかった。そこで、さらに技術の共有化をはかった後、さらに10種類の化学物質について施設間試験をおこない、表5に示すような結果を得た。全体として80%の一致率が得られた。

15) MITAの改良-IL-8 Luc assayとの組み合わせ(表5)

近年、免疫反応は大きく自然免疫と獲得免疫から構築されていることが報告され、免疫毒性も

その両者の観点から評価することが求められている。実際、化学物質による自己免疫発症などに関しても自然免疫の重要性が明らかにされている(Pollard and Kono, 2013)。MITA同様のhigh through-put免疫毒性試験であるFCCAは、T細胞のサイトカイン発現のみを検討する試験系で、自然免疫を評価できないが、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響が評価可能である。しかし、LPS刺激によるIL-8発現は、代表的なハプテンであるCoCl₂、NiCl₂により予想外に抑制されることが明らかとなったため、我々が開発した感作性試験法IL-8 Luc assayとの併用を検討した。IL-8 Luc assayは、LPS非存在下に化学物質によるTHP-G8細胞におけるIL-8レポーター活性の変化を評価する試験法で、感作性試験として、その精度、感度、特異度、施設間再現性、high throughput性が国際validationにより認められ、現在OECDにSPSFを提出している。そこで、今後は、これまでのMITAに加えて、LPS刺激非存在下におけるTHP-G8細胞を用いた評価系 (IL-8 Luc assay)も加えたMITA + IL-8 Luc assayより感作性物質を含めた幅広い化学物質の免疫毒性評価系を構築する。

1 6) MITAの改良-人工染色体を用いた新規IL-1βレポーター細胞の樹立

①THP-G1b細胞の問題点

MITAを種々化学物質で評価するなか、THP-G1b細胞の以下のような問題点が明らかになった。1) 細胞増殖が遅く、解析に必要な細胞数を確保するのに時間を要する。2) LPSで刺激後にSLR-LAの値が負になってしまい、その結果nSLG-LAを計算できない。

②人工染色体技術を用いた新規IL-1βレポーター細胞の樹立 (図10)

上記の問題点を克服するために、人工染色体技術(Hoshiya *et al.*, 2009)を応用して、新たにIL-1βレポーター細胞樹立を試みた。その結果、数種類のクローンが樹立でき、その代表的なクローンのLPSに対する反応性を図に示した(図10)。いずれのクローンもLPS刺激によりSLG-LAの値を顕著に増加させるが、多くの細胞で、THP-G1b同様にSLG-LAが負の値になってしまった。その中で、唯一TGCHAC-A4細胞のみが、10 ng/mlの濃度のLPSでSLG-LAの値が負にならずSLG-LAが正の値として計算できた。そこで以後の実験ではTGCHAC-A4細胞を用いることとした。

③TGCHAC-A4細胞の増殖曲線 (図11)

THP-G1b細胞のもう一つの問題点は増殖速度が遅い点にあったので、TGCHAC-A4細胞の増殖曲線

をTHP-G1b細胞の増殖曲線と比較した。その結果、図9に示す様にTGCHAC-A4細胞の増殖が極めて良好なことが確認できた。

④TGCHAC-A4細胞とTHP-G1b細胞との同等性 (図12)

これまでMITAにおいては、THP-G1b細胞のLPS刺激後のSLG-LAが負になってしまうためTHP-G8細胞のSLG-LAを使用して各種パラメーターを作成していた。同様の事をおこなうとTHP-G1b細胞とTGCHAC-A4細胞のLPS刺激に対するDex, CyAの抑制効果が同等に評価できることが明らかになった。更に、その結果は、TGCHAC-A4細胞のSLG-LAを用いても得られた。従って、TGCHAC-A4細胞は反応性においても、これまでMITAに用いられていたTHP-G1b細胞と同等であることが明らかになった。

⑤TGCHAC-A4細胞の技術移転 (図13, 図14)

TGCHAC-A4細胞が多施設でも同様にMITAの評価細胞として使用できるかを検証した。まずLPSの濃度と反応性を検討したところ、いずれの施設においても10 ng/mlまでの濃度ではSLR-LAが正の値を示しnSLG-LAを正の値として評価することができた。ただし、25 ng/mlの濃度では、東北大学においてのみSLG-LAが負になってしまった(図13)。

さらに、DexとCyAの影響を検討したところ、どの施設においてもDexによる顕著な抑制とCyAによる軽度の抑制が検出できた(図14)。

1 7) MITAによるアルキル化剤、プリンまたはピリミジン合成阻害剤の評価

これまでの研究で、MITAでは、サイトカインの発現調節に直接作用する薬剤の免疫抑制作用は適切に評価できるが、T細胞の代謝、細胞増殖に作用する免疫抑制剤の作用は評価できないことが明らかとなった。しかし詳細に検討すると、CP、AZ、MPA、MZR、MTXなどの薬剤が、MITAのいずれかのレポーター活性を逆に増強する特性を共有していること、さらにその作用がPMA/Io刺激前に24時間培養を行う事により顕著になることを見いだした。このような作用はDexやCyAには認められなかった(図15、16)。また、その機序を明らかにする目的で、Jurkat細胞を1日または3日間培養し、その培養上清により#2H4細胞のレポーター活性が阻害されるか否かを検討したところ、有意に抑制されることが明らかとなった。さらに3日間の培養した際の培養上清は、1日培養した際の培養上清に比べより強い抑制が認められた(図17)。一方、Jurkat細胞をMTX, CP, MZR存在下で2日間の培養

した際の培養上清は、薬剤非存在下に培養した際の培養上清に比べレポーター活性を阻害しなかった(図18、19、20)。そこで、Jurkat細胞の培養上清にはIL-2、IFN- γ の発現を抑制するなんらかの因子が存在し、それをアルキル化剤、プリン合成阻害剤、プリン、ピリミジン合成阻害剤が阻害し見かけ上レポーター活性の増強が見られるという可能性を考えた。Jurkat細胞をMTXで刺激し12時間後、定量的 RT-PCRにより遺伝子発現量を解析したところ、予想に反し、IL-10、TGF- β の発現が上昇し、これらの因子とは別の経路で作用していることが明らかになった(図21、22、23)。今後、さらにこの上清がレポーター活性を抑制するメカニズム、薬剤がその抑制を救済するメカニズムを解明することにより、これらの薬剤の免疫抑制能を検出できる可能性が示唆された。

18) THP-G8を用いた抗TNF- α 抗体治療中患者の血清中のTNF- α 中和活性の定量化

抗TNF- α 抗体製剤(ATA)は関節性リウマチ、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患や乾癬などの多くの免疫の関与する慢性炎症性疾患に対する治療の主流となっている。しかし、10年を超える臨床現場での使用の中でいくつかの問題点が明らかになってきた。1)反応性の個人差。2)効果の2次無効。3)全身性の感染症や投与時反応などの副作用。4)治療費用である。MITAで使用しているIL-8レポーター細胞であるTHP-G8細胞はTNF- α に反応し濃度依存性にIL-8レポーター活性を上昇させた。またその上昇はATA(infliximab、adalimumab、golimumab)の前処理によりATAの濃度依存性に抑制された。

THP-G8細胞を用いATAで治療中の乾癬患者の血清中の抗TNF- α 中和活性を定量的に評価することを目的に以下の試験をおこなった。

方法：THP-G8細胞を段階希釈した健常人または患者の血清の前処理後に10 ng/mLのヒトリコンビナントTNF- α を加え、6時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。以下の式により血清中の抗TNF- α 中和活性の指標となる%suppressionを計算した。 $\% \text{ suppression} = (1 - \text{血清存在下のTNF-}\alpha \text{ 添加後のnSLO-LA} / \text{血清非存在下のTNF-}\alpha \text{ 添加後のnSLO-LA}) \times 100$ 。乾癬患者血清の%suppressionとATA療法によるPsoriasis Area and Severity Index (PASI)スコアの改善率との相関を検討した。

結果：健常人の血清はTNF- α に誘導されたnSLO-LAに影響を与えなかった。1または2週間前にATAを投与された患者の血清はTNF- α に誘導されたnSLO-LAを有意に抑制した。ATA投与1週間後

に採血された血清は投与2週間後に採血された血清と比べより強くnSLO-LAを抑制した。25人の乾癬患者において、PASIスコアの改善率と%suppressionの間に有意な相関が認められた(図24、 $p=5.61 \times 10^{-5}$)。このことからTHP-G8細胞が個々の患者におけるATA療法の治療効果と相関する血清中の抗TNF- α 中和活性を評価する有用な試験系であることが示唆された。

19) THP-G8を用いた環境水汚染評価

環境水、飲料水、さらに特殊な例では人工透析用の水には本来、細菌および細菌由来毒素の混入は許されない。しかしながら環境水中の微生物由来毒素をハイスループットに検出する方法は確立されていない。MITAで使用しているIL-8レポーター細胞であるTHP-G8細胞はLPSをはじめとするToll様受容体アゴニスト添加によりIL-8レポーター活性を上昇させた。この細胞を用い、環境水中の微生物由来毒素を広範にスクリーニングする評価系の構築を目指した。

研究の方法

(1)リムルス試験：

採取した水を121 $^{\circ}\text{C}$ 、2気圧下に20分、オートクレーブ処理したのち、エンドトキシンプリー水で1000倍希釈しToxin SensorTM Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GeneScript)を用い測定した。

(2)ルシフェラーゼアッセイ：

THP-G8細胞/100 μl を96-wellプレートに播種し、採取した水を121 $^{\circ}\text{C}$ 、2気圧下に20分、オートクレーブ処理したものを10 μl 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下で6時間インキュベートしたのちルシフェラーゼ活性を測定した。

結果：

TLR1、2、4、5、6、NLR1、2アゴニストの添加によりTHP-G8細胞のIL-8レポーター活性の上昇が認められた。

LPS(E.coli 026:B6)を添加することによりIL-8レポーター活性の上昇が濃度依存性に認められ、その感度は1 ng/mlで10 endotoxin unit(EU)/mlに相当した。

仙台周辺の環境水(ダム、河川水等)を測定したところ上流から下流にいくに従いIL-8レポーター活性の上昇が認められた。フィリピンのマニラ周辺の環境水についても同様の傾向が認められた。

仙台およびマニラ周辺の環境水について、リムルス試験での測定値とTHP-G8でのIL-8レポーター活性を比較したところ、完全には相関せずエンドトキシン以外の免疫攪乱物質が関与しその活性を評価できる可能性が示唆された。

仙台およびマニラ周辺の環境水、感作性物質、LPSについて、TLR4のアнтаゴニストであるPolymyxinBまたはN-acetylcysteineで前処理し

たのち IL-8 レポーター活性を測定し%suppressionを算出した(図25)。これらの数値を指標とし被験物質を分類することができ、今後阻害剤を併用することにより、環境水を定性、定量的に評価できる可能性が示唆された。

D. 考察

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8転写に至るシグナル伝達経路への化学物質の影響を評価することができる。まず種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞やマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果とほぼ一致していた。またこの薬剤を用いた検討により、MITAが化学物質の免疫毒性作用の標的細胞がT細胞かマクロファージ/樹状細胞かを容易に同定できることも明らかとなった。

最近、共同研究者の鳥取大学分子制御内科学分野 渡部仁成講師らは、THP-G8細胞を用いて、実際に日本に飛来してくるPM2.5や黄砂と中国の黄土高原の砂との生物学的活性の相違を容易に検出できることを明らかにした(Watanabe *et al.*, 2014)。また、この研究では、PM2.5の喘息、鼻炎などの誘発には、単なる粒子量ではなく、その生物学的活性すなわちTHP-G8レポーター活性が相関することを明らかにした。今後THP-G8細胞のPM2.5の健康被害予測への応用が期待されている。又、共同研究者の東北大学病院皮膚科 木村裕助教は、同じくTHP-G8細胞が河川などの環境水の汚染をリムルステストなど既存の方法よりも簡便に評価できることを平成26年日本代替法学会総会で報告した。さらにTHP-G8細胞を用いた感作性予測試験法 IL-8 Luc assayは現在OECDにSPSFを提出している。このように、MITAを構成するTHP-G8細胞の安定性ならびに化学物質評価における有用性が漸次明らかになってきている。

また、今年度の研究では、研究期間中に明らかになったIL-1 β レポーター細胞THP-G1bの脆弱性を克服する目的で、あらたにTGCHAC-4A細胞を樹立した。この細胞は、人工染色体上にIL-1 β レポーター遺伝子が搭載されている世界で初めてのレポーター細胞である。樹立後、SLR-LAの陰性化などの問題を克服し、またTHP-G1bとの同等性比較試験なども行い、今後THP-G1b細胞に代わるMITAのあらたなIL-1 β レポーター細胞と

し使用していく予定である。

現在までに40化学物質のMITAによる評価が完了した。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などが評価できることを明らかになった。また同じくhigh throughputの免疫毒性試験法であるFCCAと異なり、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響も評価できる。ただし予想外に、現行のMITAのプロトコールでは、化学物質処理後にLPS刺激を加えるため、多くのハプテンでIL-8プロモーター活性が抑制される。しかし、MITAとIL-8 Luc assayを組み合わせることにより、感作性物質を含めてより幅広く化学物質の免疫毒性を評価することが可能となる。

しかし、その一方、現時点ではMITAのみでは代謝、細胞増殖を介して免疫抑制を誘導する薬剤の評価は行えない。そのため、MITAによる免疫毒性評価は、28日間反復投与毒性試験などの組み合わせが必要であるが、今後はMITAのプロトコールの変更(24時間の前培養)などにより、これら化学物質の免疫毒性評価の可能性も見いだせた。

最後に、3施設の再現性比較試験では、2H4に関しては施設内、施設間再現性とも良好であったが、新たなレポーター細胞が加わったこともありTGCHAC-A4およびTHP-G8細胞に関しては、いまだ満足のいく結果は得られていない。しかし、今後プロトコールの更なる簡略化、試験細胞の培養方法、刺激に用いるLPS濃度などを検討することで良好な再現性が得られるよう検討を続けている。

E. 結論

3年間の研究を通して、我々が開発したMulti-ImmunoTox assay (MITA)の免疫系に作用する薬剤、化学物質スクリーニングにおける有用性が明らかとなった。特にMITAは、自然免疫、獲得免疫に属するマクロファージ、T細胞機能の両者を評価できるという特性を有している。この特性を用いて、代表的な免疫抑制剤であるCyA、TAC、Dexの作用機序の違いも明らかにすることができた。また、薬剤以外にも重金属の免疫抑制作用あるいは免疫賦活作用、活性酸素による免疫抑制作用など幅広く検出できることも確認した。施設内再現性、施設間再現性も検討し、両者とも70%以上の値が得られている。さらにMITAの特色として、そのhigh throughputな作業行程が挙げられる。化

学物質、細胞の調整、化学物質と細胞の反応、ルシフェラーゼの定量を約 10 時間で完了でき、またルシフェラーゼ活性定量行程は全て自動化されている。また本研究では、日本で開発された人工染色体技術を応用し、世界初のルシフェラーゼ人工染色体を含むレポーター細胞を樹立した。今後は、感作性試験法同様に、免疫毒性の adverse outcome pathway に則った検査法の確立を行う予定である。

F. 健康危険情報

健康人における採血において問題は生じなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe M, Noma H, Kurai J, Sano H, Saito R, Abe S, Kimura Y, Aiba S, Oshimura M, Yamasaki A, Shimizu E. Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposure to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *BioMed Res International*, in press, 2015.
2. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, and Tomita H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. *Glia*. 63:257-70, 2015.
3. Watanabe M, Kurai J, Tomita K, Sano H, Abe S, Saito R, Minato S, Igishi T, Burioka N, Sako T, et al. Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *J Asthma*. 51:595-602, 2014.
4. Tsujita-Inoue K, Hirota M, Ashikaga T, Atobe T, Kouzuki H, and Aiba S. Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays. *Toxicol in Vitro* 28:626-39, 2014
5. Onami K, Kimura Y, Ito Y, Yamauchi T, Yamasaki K, and Aiba S. Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J Invest Dermatol*. 134:1951-60, 2014
6. Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, and Mizuno K. Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion. *Mol Biol Cell*. 25:828-40, 2014.
7. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, and Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cell Dev*. 23:717-28, 2014.
8. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushi-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, and Aiba S. Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes. *J Immunol*. 193:5140-8, 2014.
9. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, and Aiba S. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol in Vitro* 28:759-68, 2014.
10. Watabe A, Sugawara T, Kikuchi K, Yamasaki K, Sakai S, and Aiba S. Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci*. 272:177-82, 013;.
11. Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, Ohmiya Y,

Fujimura T, Yamasaki K, and Aiba S. In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape stripping. *J Invest Dermatol.* 133:2407-15, 2013

12. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, and Muta T. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity.* 38:450-60, 2013.
13. Hirota M, Kouzuki H, Ashikaga T, Sono S, Tsujita K, Sasa H, and Aiba S. Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol in Vitro* 27:1233-46, 2013
14. Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, Yamada T, Kimura Y, Aiba S, Toyozumi T, Watanabe M, Ohta R, Tanaka N, et al. Assessment of technical protocols for novel embryonic stem cell tests with molecular markers (Hand1- and Cmyc-ESTs): a preliminary cross-laboratory performance analysis. *J Toxicol Sci* 37:845-51, 2012.

2. 学会発表

Yutaka Kimura, Toshiya Takahashi, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : The relative activity of anti-TNF- α agents, Etanercept, Infliximab, Adalimumab and Golimumab, evaluated by a stable IL-8 reporter cell line, THP-G8 : 3rd World Psoriasis & Psoriatic Arthritis Conference 2012, Stockholm, Sweden (2012.6)

Yutaka Kimura, Yoshihiro Ohmiya, Setsuya Aiba Multicolor luciferase reporter gene assay system for IL-1 β , 2, 8 and IFN- γ presents a novel tool to evaluate immunological effects of drugs and their efficacy European Society for Dermatological Research, Venice, Italy (2012.9)

木村裕 シンポジウム1【皮膚科学の最前線：免疫が介在する皮膚疾患を解く】接触皮膚炎を解く、第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会、札幌 (2012.9)

木村 裕、渡辺 美香、齋藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、金子 愛、高田 めぐみ、田中 裕美、渡辺 文、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲徳、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験-Phase I, Phase IIaの結果ならびに今後の展望-. 日本動物実験代替法学会 第25回大会 (東京) 2012年12月

Yutaka Kimura, Ryoko Shimada-Omori, Toshiya Takahashi, Kenichiro Tsuchiyama, Yoshiyuki Kusakari, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : A novel interleukin (IL)-8 reporter cell line, THP-G8, can evaluate anti-tumor necrosis factor (TNF)- α neutralizing activity of patient's sera and predict drug effectiveness during anti-TNF- α antibody therapy : International Investigative Dermatology, Edinburgh, Great Britain (2013.5)

Yutaka Kimura, Ryoko Shimada-Omori, Toshiya Takahashi, Kenichiro Tsuchiyama, Yoshiyuki Kusakari, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : A novel interleukin (IL)-8 reporter cell line, THP-G8, can evaluate anti-tumor necrosis factor (TNF)- α neutralizing activity of patient's sera and predict drug effectiveness during anti-TNF- α antibody therapy : Psoriasis 2013, 4th Congress of the psoriasis international network, Paris, France (2013.7)

木村 裕、藤村 千鶴、近江谷 克裕、相場 節也：免疫毒性評価系としてのMulti-Immuno Tox Assay (MITA)の有効性評価. 日本動物実験代替法学会 第26回大会 (京都) 2013年12月

木村 裕、藤村 千鶴、渡辺 美香、齋藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲徳、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製. 日本動物実験代替法学会 第26回大会 (京都) 2013年12月

Kaoru Onami, Yutaka Kimura, Yumiko Ito, Takeshi Yamauchi, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. Society for Investigative Dermatology 73rd Annual Meeting, Albuquerque, United States of America (2014.5)

相場 節也、木村 裕、藤村 千鶴：IL-8 Luc assay ワークショップ「日本発の動物実験代替法の現状」

(東京) 2014年8月

Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Miho Higuchi, Mika Watanabe, Kohji Yamakage, Yoshihiro Ohmiya, Hajime Kojima, Setsuya Aiba : Evaluation of the Multi-ImmunoTox assay (MITA) composed of 3 human cytokine reporter cell lines by examining the immunological effects of drugs. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Setsuya Aiba : A dataset on 99 chemicals tested by IL-8 Luc assay. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Mika Watanabe, Noriyuki Suzuki, Tomoko Iwaki, Kohji Yamakage, Koichi Saito, Yoshihiro Nakajima, Chizu Fujimura, Aoi Maruya, Yoshihiro Ohmiya, Takashi Omori, Shojiro Yamazaki, Hajime Kojima, Noriho Tanaka, Setsuya Aiba : An inter-laboratory validation study of IL-8 Luc assay using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、藤村 千鶴、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也 : IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

木村 裕、藤村 千鶴、Socorro P. Lupisan、相場 節也 : IL-8レポーター細胞を用いた微生物毒素簡易定量法の開発. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願2010-151362; PCT/JP2011/65090

表 1. MITA による薬剤の免疫薬理作用解析結果

作用機序		Cmax	IL-2		IFN-γ		IL-1β		IL-8	
			<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax
免疫抑制剤										
1) 遺伝子発現調節	Dexamethasone	50-500ng/ml	62/82	8/17	83/105	47/89	50/35	10/10	58/34	31/30
2) キナーゼ、ファスファターゼ阻害薬	Cyclosporin A	3μg/ml	9/0	-/-	12/17	-/-	118/82	-/-	114/61	-/-
	Tacrolimus (FK506)	20ng/ml	1/0	1/0	23/16	23/16	131/121	131/169	53/71	53/137
	Rapamycin	89.1ng/ml	133/165	133/165	167/89	167/89	107/184	158/184	74/143	130/143
3) アルキル化剤	Cyclophosphamide	20μg/ml	119/94	119/113	124/116	149/176	128/73	128/176	128/72	131/242
	Azathioprine	73.7ng/ml	92/115	81/78	127/109	135/146	117/157	117/196	109/142	90/224
4) プリン合成阻害	Mycophenolic acid	25μg/ml	133/251	-/-	164/270	-/-	133/463	-/-	189/489	-/-
	Mizoribine	380ng/ml	106/114	129/142	107/116	116/121	105/162	128/312	88/140	129/295
5) ピリミジン合成阻害	Leflunomide	41.5μg/ml	25/1	3/-	91/62	48/-	23/11	3/-	66/193	66/-
6) 核酸合成阻害	Methotrexate	320ng/ml	116/86	118/86	119/130	119/133	138/90	138/77	158/74	158/66
7) Unkown	Deoxyspergualin (Gusperimus)	5μg/ml	107/87	110/76	104/104	105/106	109/67	109/67	113/65	113/65

作用機序		Cmax	IL-2		IFN-γ		IL-1β		IL-8	
			<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax
免疫調節剤										
	Dapsone	2μg/ml	81/118	16/13	118/106	63/80	104/71	25/40	92/76	49/44
	Sulfasalazine	12.19μg/ml	147/83	57/55	0/7	0/5	15/25	0/11	5/4	0/1
	Colchicine	5.64ng/ml	126/120	133/221	117/146	203/837	196/450	207/659	154/155	154/432
	Chloroquine	553ng/ml	74/77	0/0	82/80	13/13	92/73	35/0	85/66	85/0
	Minocycline	2μg/ml	61/87	17/1	76/82	31/12	84/81	71/33	81/84	81/30
	Nicotinamide	268μg/ml	146/81	201/192	116/86	126/234	2/80	1/0	9/67	2/0
免疫調節作用の報告のない薬剤										
	Acetaminophen	2.6μg/ml	105/116	182/380	86/106	285/375	107/127	318/485	107/134	205/589
	Digoxin	2.3ng/ml	89/107	6/1	91/108	27/27	115/80	611/80	110/74	186/74
	Warfarin	685ng/ml	106/127	156/166	104/122	110/134	93/76	71/76	85/63	82/63
	Cimetidine	2.3μg/ml	125/122	139/155	112/116	125/139	112/69	122/69	109/62	134/62
	Levamisol	119ng/ml	77/113	20/13	91/106	75/82	106/91	33/32	91/109	53/28
	Isoniazid	8μg/ml	84/92	29/34	92/111	92/136	116/80	122/42	107/71	64/42

表 2. 改訂プロトコール、判定基準に基づく MITA による薬剤の免疫薬理作用解析結果

Principal mechanism of action		Cmax	IL-2				IFN- γ				IL-1 β				IL-8			
			<=5 x Cmax	>5 x Cmax	<=5 x Cmax	>5 x Cmax	<=5 x Cmax	>5 x Cmax	<=5 x Cmax	>5 x Cmax	<=5 x Cmax	>5 x Cmax						
Immunosuppressing drugs																		
Regulation of gene expression	Dexamethasone (Dex)	88ng/ml	-/-	S	-/-	S	-/0/0	N	-/+/-	N	-/-	S	-/-	S	-/-0*	S	-/-	S
Kinase and phosphatase inhibitors	Cyclosporin A (CyA)	2144 μ g/ml	-/-	S	ND/ND/ND		-/-	S	ND/ND/ND		0/0/0	N	ND/ND/ND		0/-/0	N	ND/ND/ND	
	Tacrolimus (Tac)	44.6ng/ml	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	+/0/0	N	0/+/0	N	-/0/0	N	0/+/0	N
	Rapamycin (RPM)	4.0ng/ml	0/+/+*	A	0/+/+*	A	0/-/0	N	0/0/0	N	0/0/0	N	+/+/+	A	0/0/0	N	0/0/0	N
Alkylation	Cyclophosphamide (CP)	6.36 μ g/ml	+/0/-	N	0/0/-	N	+/0/-	N	+/+/+	A	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N	0/+/-	N
Inhibition of de novo purine synthesis	Azathioprine (AZ)	73.7ng/ml	0/0/0	N	0/-/0	N	0/0/0	N	+/+/+	A	0/0/0	N	+/-/+*	A	0/0/0	N	+/-/0	N
	Mycophenolic acid (MPA)	34.0 μ g/ml	+/+/+	A	ND/ND/ND		+/+/+	A	ND/ND/ND		0/0/+	N	ND/ND/ND		0/0/0	N	ND/ND/ND	
	Mizoribine (MZR)	9.6 μ g/ml	+/+/-	N	+/+/0	N	+/+/-	N	+/0/+	N	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A
Inhibition of pyrimidine and purine synthesis	Methotrexate (MTX)	162.2ng/ml	+/0/+	N	+/0/+*	A	0/+/+*	A	0/+/+*	A	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N	0/0/-	N
Off-label immunosuppressing drugs																		
	Sulfasalazine (SASP)	15.6 μ g/ml	+/-/0	N	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S
	Colchicine	5.64ng/ml	0/0/0	N	+/+/+	A	0/+/0	N	+/+/+	A	+/0/+*	A	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A
	Chloroquine (CQ)	555ng/ml	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	N	-/-/0	S	0/0/0	N	-/-/0	S	0/0/0	N	-/-/0	S
	Minocycline (MC)	4.8 μ g/ml	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	0/0/0	N	0/0/0	N	0/0/0	N	0/0/+	N
	Nicotinamide (NA)	22.4-26.3 μ g/ml	+/-/+	N	+/+/+	A	0/+/+	N	+/+/+	A	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S	-/-/0	S
Non-immunomodulatory drugs																		
	Acetaminophen (AA)	9.4 μ g/ml	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A	+/0/0	N	+/+/+	A
	Digoxin	2.92ng/ml	-/0/-	N	-/-/0	S	0/0/-	N	-/-/0	S	0/0/0	N	+/0/0	N	0/0/0	N	+/0/0	N
	Warfarin	685 μ g/ml	+/+/+	A	ND/ND/ND		0/+/+	N	ND/ND/ND		-/0/-*	S	ND/ND/ND		-/0/-*	S	ND/ND/ND	

表 3. MITA による化学物質免疫毒性評価

Chemicals	IL-2	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	報告されている免疫作用	分類				
2,4-Diaminotoluene	+/-/-	N	+/+/+	A	+/-/-	N	0/-/-*	S	抗体産生↓, NK↑	M
2-Aminoanthracene	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	+/0/+	N	抗体産生↓, NK↓, DTH↓	U
2-Mercaptobenzothiazole	+/-/+	N	-/-/+	N	0/+/0	N	-/-/-	S	感作性	IT-2
Acetaminophen	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	肝障害	U
Actinomycin D	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/+	N	-/-/-	S	免疫抑制	IT-1
Aluminum chloride	-/-/-	S	-/-/-	S	+/-/+	N	+/-/+	N	喘息	U
Amphoterycin B	-/-/-	S	-/-/-	S	+/0/+*	A	+/0/+*	A	サイトカイン産生↑	U
Benzethonium chloride	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/0/-	N	感作性	IT-2
Chlorpromazine	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	NK↑, 光感作性	M
Cisplatin	-/-/-	S	-/-/-	S	+/+/0	N	-/-/+	N	アナフィラキシー, DTH↓, LLNA+	IT-2
Cobalt chloride	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	感作性	IT-2
Cyclophosphamide	+/0/-	N	+/+/+	A	0/0/-	N	0/+/-	N	感作性	IT-1
Cyclosporine A	-/-/-	S	-/-/-	S	0/0/0	N	0/0/0	N	免疫抑制	IT-1
Dapsone	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	免疫抑制	IT-1
Dexamethasone	-/-/-	S	-/+/-	N	-/-/-	S	-/-/-	S	免疫抑制	IT-1
Dibenzopyrene	-/-/-	S	-/-/0*	S	0/+/+	N	-/0/-	N		U
Diethanolamin	-/-/-	S	-/-/+	N	0/-/0	N	-/+/+	N	喘息, 感作性, 抗体産生↓, NK↓, CSM↓	IT-2
Dimethyl sulfoxide	+/+/+	A	+/+/+	A	-/0/-*	S	-/-/-	S		U
Ethanol	0/-/-	N	0/0/0	N	0/-/0	N	0/-/0	N	NK↓	M
FK 506	-/-/-	S	-/-/-	S	+/+/+	A	+/+/0	N	免疫抑制	IT-1
Histamine	-/-/-	S	+/+/+	A	-/+/-	N	-/-/-	S	免疫調製	M
Hydrocortisone	-/-/-	S	+/+/+	A	-/-/-	S	-/-/-	S	免疫抑制	IT-1
Hydrogen peroxide	-/-/-	S	-/-/-	S	-/0/0	N	-/0/0	N	酸化ストレス	M
Isoniazid	-/-/-	S	-/+/0	N	+/-/-	N	-/-/-	S	CSM↑, cytotoxicity↑, Ig↓	M
Isophorone diisocyanate	-/-/-	S	+/-/+	N	-/-/-	S	-/-/-	S	感作性	IT-2
Lead(II) acetate	-/-/-	S	-/-/-	S	+/0/+	N	0/-/-	N	免疫抑制	M
Lithium carbonate	-/-/-	S	+/+/+	A	-/-/-	S	-/-/-	S	免疫増強	M
Magnesium sulfate	-/-/0	N	-/+/+	N	-/-/0*	S	-/0/-	N		N
Mercuric chloride	-/0/0	N	+/+/+	A	-/-/-	S	-/-/-	S	感作性, アレルギー反応, 自己免疫	IT-2
Methanol	-/+/-	N	-/+/-	N	0/-/0	N	+/-/-	N	NK↓	M
Mitomycin C	-/-/-	S	+/-/-	N	+/0/-	N	+/0/-	N	感作性, 免疫複合体病	IT-2
Nickel sulfate	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	感作性	IT-2
Nitrofurazone	-/-/-	S	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	感作性	U
Pentamidine isethionate	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	肺炎	U
p-Nitroaniline	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/-	S		U
Pyrimethamine	-/-/-	S	0/-/-	N	+/0/0	N	0/0/0	N	cytotoxicity↓, CSM↓, NK↑, 抗体産生↑, Ig↓	M
Ribavirin	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	+/0/0	N	抗体産生↓, Ig↓, 感作性	M
Sodium bromate	-/-/-	S	+/-/0	N	-/-/+	N	-/0/+	N	Ig↑	N
Sodium dodecyl sulfate	+/-/+	N	+/-/+	N	0/-/+	N	0/+/+	N	非感作性刺激物質	N
Triethanolamine	-/-/-	S	-/-/-	S	-/-/0	N	-/+/+	N	感作性	U