

(H27-化学一般-006)) 厚生労働科学研究費補助金(化学リスク研究事業)
(総括)研究報告書

免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoToxicity assayの国際validationへ向けての検討

研究代表者 相場 節也
東北大学病院皮膚科

研究要旨

今年度は、1) IL-2 転写活性障害と IL-8 転写活性障害の2つを key event とする AOP の改良、2) OECD 試験法ガイドライン化に向けての国際バリデーション研究、3) 統計解析手法の開発、4) バリデーション実行委員会の管理を主な目的として研究を行った。その結果、まず1) AOP1 (IL-2 転写活性調節異常を KE とする T 細胞分化異常誘導)の改良をおこなった。それと並行して、2) IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞の分化異常誘導化学物質評価系の Phase 0 study を年度前半に実施し、年度後半では国際バリデーション実行委員会の承認を得た後に Phase 1 study(施設内、施設間再現性確認試験)を実施した。またその中で、3) 統計解析手法の改良も行った。特に重点的に取り組んだバリデーション試験 Phase 0 study では、3 施設において5種類のコード化した被験物質を1セット3回からなる試験を1セット実施し施設間再現性を評価し 80%以上の結果を得た。その結果を国際バリデーション実行委員会にて検討し、Phase 1 study に進んだ。Phase 1 study においては、3 施設において5種類のコード化した被験物質を1セット3回からなる試験を3セット繰り返すことにより施設内再現性ならびに施設間再現性確認試験を行った。その結果、施設内再現性 87%、施設間再現性 90%と良好な結果が得られた。さらに、これらの結果をもとに2017 年2月3日から5日までの三日間、国内外からの免疫毒性専門家からなる国際バリデーション実行委員会を京都にて開催し、Phase I study の施設内、施設間施設内再現性確認試験結果があらかじめ設定していた目標を上まわっていたことが確認され、Phase II study の開始が承認された。また試験法の OECD 試験法ガイドライン化に向けての今後の道筋、また試験法の科学的意義、有用性、また作成した AOP の改良などについても議論された。

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・第二室長

近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル部門・研究部門長
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

中島 芳浩・産業技術総合研究所・健康工学研究
部門・研究グループ長
大森 崇・神戸大学医学部附属病院・臨床研究推
進センター、生物統計学・特命教授
木村 裕・東北大学病院・皮膚科・助教

A. 研究目的

研究背景：

環境汚染物質、食品添加物、薬剤などの化学物質のなかには免疫系を標的とし、アレルギー、自己免疫疾患、免疫抑制に基づく易感染性、発癌などの健康被害を及ぼすものが少なくない。したがって、外因性化学物質の生体免疫機能へ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。しかし現在存在している化学物質の免疫毒性評価系は、極めて多岐にわたる免疫反応に対する化学物質の影響を評価するには不十分であり、さらにその多くが動物実験に依存している。いうまでもなく動物実験には、得られた結果からどこまでヒトに対する影響を類推できるかという科学的問題に加えて費用面、倫理面など多くの問題が存在する。したがって、これらの問題を解決するためには多面的免疫反応を動物実験を用いずに評価する試験系の開発が不可欠である。

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-ImmunoToxicity assay; MITA)を構築し国内外の特許を取得している。MITAを用いるとヒトT細胞におけるIL-2とINF- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に關与するシグナル伝達経路への化学物質の影響を定量的に評価することができる。平成24年度から平成26年度の3年間にわたる厚生労働科学研究費補助金事業「多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発」において、我々はまず

作用機序の明らかな種々の免疫抑制剤をMITAを用いて評価するなかで、化学物質毒性評価におけるMITAのプロトコールを作成し、そのプロトコールを用いた薬剤の免疫毒性評価を行った。その結果、代表的な免疫抑制剤であるデキサメサゾン(Dex)、サイクロスポリン(CyA)、タクロリムス(Tac)のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する薬理効果をMITAが予測できることを明らかにした[1]。さらに、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。

平成27年度には、更に評価化学物質を増やし合計60化学物質からなるdata setを構築した。そのなかで、皮膚感作性物質の多くがLPSで刺激したTHP-G8細胞のIL-8転写活性を抑制することを見だし、従来のMITAでは単球/樹状細胞に抑制的に作用する免疫抑制物質と皮膚感作性物質を区別できない事を明らかにした。そこで従来法のMITAに、これまで我々が進めてきた皮膚感作性物質試験法であるIL-8 Luc assayを加えたmodified MITAを構築し、現在までに24物質のdata setを作成した。その結果、化学物質が大きくIL-2レポーター活性抑制物質、IL-8 Luc assay陽性物質、IL-8 Luc assay陰性でLPS刺激下のIL-1 β /IL-8レポーター活性抑制物質、その他(IL-2あるいはIL-1 β レポーター活性増強物質)の4群に分けられることが明らかとなった。次いで、この結果をもとにIL-2転写活性抑制とIL-8転写活性増強の2つをkey eventとするadverse outcome pathway(AOP)を作成した。前者では、dimethylthiocarbamate(DTC)のNF- κ B抑制、AG-018986のp38 MAPK抑制、メチル水銀(CH₃HgCl)のERK1/2抑制、Propanil(3,4-dichloropropionanilide(DCPA)のSTIM1、CRACを介したNFAT抑制、鉛のcalmodulinを介したNFAT抑制を組み込んだAOPが作成できた。また後者では、diesel exhaust particle(DEP)、フォルマリン、PM2.5さらには界面活性剤によるIL-8転写活性亢進作用とadverse outcomeとしての気道刺激性を組み込んだAOPを作成した。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INF- 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を明らかにした。

計画全体の目的：

図1に示すように、本研究では以下の4項目を目的として研究を計画した。

- 1) 自己免疫、免疫抑制、アレルギー (Th1/Th2 不均衡) の3つの adverse outcome (AO) に関して、それらを惹起することが確認されている化学物質各4種類を選び AOP を作成する。
- 2) 作成された AOP を基にして、その中から抽出された Key events (KEs) を網羅し、そのなかで MITA が評価可能な項目を実験的に明らかにする。
- 3) プロトコルを変更し、MITA により細胞周期に作用する免疫抑制剤、感作性物質なども評価可能とする。
- 4) MITA の data set の拡充と施設内、施設間再現性を改善し国際的 validation を実施し OECD テストガイドライン化をめざす。

2016 年度の目的：

MITA の最適化と data set の構築

MITA の問題点を明らかにして、MITA を免疫毒性評価により適した評価系に修正する。

MITA に適した免疫毒性評価系の探索

MITA のパラメーターを key event とする AOP の作成

AOP に基づく化学物質評価

IL-2 転写活性抑制試験に関する技術移転性確認

MITA を用いた免疫毒性評価系国際化へ向けての kick-off meeting の開催

2017 年度の目的：

自己免疫、免疫抑制、アレルギーなどに関する AOP の作成

AOP に基づく評価方法の決定

Multi-ImmunoToxicity assay (MITA) の data set の拡充と施設内、施設間再現性を改善し国際的 validation を目指す。

国際的 validation チームの運営

2018 年度の目的：

AOP の改良と the Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics (EAGMST) への承認に向けての対応

IL-2 転写活性抑制を key event とする T 細胞分化異常誘導評価系およびのデータベース構築

IL-2 転写活性抑制を key event とする T 細胞分化異常誘導評価系の Phase II 試験
IL-8 転写活性増強を指標とした気道刺激性物質評価系のデータベース構築

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 , GAPDH プロモーターアッセイおよび THP-1 単球細胞由来 TGCHAC-A4 細胞、THP-G8 細胞における IL-1 β , IL-8, GAPDH プロモーターアッセイ (図2)

IL-2 および IFN- γ プロモーター活性の測定には、ヒト T リンパ芽球性白血病由来細胞株 Jurkat に IL-2 プロモーターに制御された SLGLシフェラーゼ遺伝子 (緑色に発色) IFN- γ プロモーター

に制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子（橙色に発色）、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子（赤色に発色）を導入した#2H4細胞を用いた[2]。またIL-1 β プロモーター活性の測定には、ヒト急性単球性白血病由来細胞株THP-1に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、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTGCHAC-A4細胞を、IL-8プロモーター活性の測定には、THP-1に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およびGAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTHP-G8細胞を用いた[3]。なおTGCHAC-A4細胞の樹立には人工染色体技術[4]を用い細胞の安定性を確保した。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TGCHAC-A4細胞またはTHP-G8細胞を黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)に播種し、薬剤を加え、37℃、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)、TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPSで刺激し37℃、5%CO₂下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を混合し、室温で10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量 (SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA)) を検出した。また細胞数の違いや各種刺激後の生存率の違いを勘案しSLG-LA、SLO-LAをSLR-LAで除することによりそれぞれ normalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA), normalized SLO-luciferase activity(nSLO-LA)を算出した。さらに以下の式に%suppression抑制率を計算した。

% suppression = (1-薬物存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA/薬物非存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA) X 100

MITAによる免疫毒性評価法（図3）

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。

Phase 0 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した2-Aminoanthracene, Citral, Chloroquine, Dexamethasone, Methyl mercuric chlorideについて参加3施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松においてMulti-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.1Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。

Phase 1 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した5化学物質をコード化し、参加3施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松においてMulti-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.5Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を3セット行った。

国際バリデーション実行委員会

平成28年度第1回：2016年9月13日23：30より国際バリデーション実行委員会会議をスカイプにて行った。（参加者：小島肇、相場節也、木村裕、大森崇、Emanuela Corsini、Erwin L. Roggen、Dori Germolec、Tomoaki Inoue）

平成28年度第2回：2017年2月3-5日、京都にて第2回国際バリデーション実行委員会会議を行った。（参加予定者：小島肇、S.Venti、相場節也、木村裕、大森崇、小林真弓、森梓、安野理恵、山影康次、渡辺美香、小林美和子、中島芳浩、Emanuela Corsini、Erwin L. Roggen、Dori Germolec、Tomoaki Inoue）

（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

MITAのパラメーターをkey eventとするAOPの作成

1) IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP の作成

IL-2 レポーター活性が、MITA で評価可能な T 細胞関連因子の中では最も多くの化学物質で抑制されること、また多くの化学物質で IFN- γ レポーター活性と相関が認められることより IL-2 レポーター活性を KE とした AOP を構築することとした。IL-2 はおもに Th1 細胞が分泌するサイトカインであるが、T 細胞の増殖に必須なばかりでなく、IL-12R β 2、IL-4R α 4、gp130 などの発現を介して Th1、Th2 細胞、Treg 細胞の分化に不可欠なサイトカインである。また一方で、Th17 細胞の分化を抑制することにより不必要な自己免疫反応や炎症反応の発症を制御する[5] [6]。そこで化学物質の免疫毒性の指標として、IL-2 の転写制御を評価することは極めて重要な意味を有していると考え、IL-2 転写活性抑制を KE とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP を作成することとした。本年度は、IL-2 の転写に影響を及ぼす化学物質とその分子メカニズムが記載されている論文を渉猟し表 1 を作成した。(表 1) さらに表 1 をもとに、IL-2 転写活性抑制 (図 4) ならびに増強 (図 5) を key event とした T 細胞分化異常誘導の AOP を充実させた。

IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞の分化異常誘導化学物質評価系の validation 試験作成した IL-2 転写活性障害を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP に基づき、MITA を構成する 2H4 細胞を用いた IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞分化異常誘導化学物質評価

系の validation 試験を以下の方法で実施した。

1) Phase 0 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した 2-Aminoanthracene, Citral, Chloroquine, Dexamethasone, Methyl mercuric chloride について参加 3 施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松において Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.1E にのっとり各物質について 3 回 1 セットからなる試験を 1 セット行い評価した。リードラボを含む 4 施設のデータを解析したところ 5 化学物質に対する反応は同様のパターンを示した (図 6)。しかしながら賦活剤である PMA/Io に対する反応性に違いがみられ、特に施設間試験に初めて参加した施設で反応が低くなる傾向が認められたため以下のようにプロトコールを変更した。

- ・ PMA/Io および選択抗生剤であるハイグロマイシンの調製方法を変更した。
 - ・ 細胞を調製する際の遠心速度を変更した。
- このプロトコールの変更の結果前述の施設でも反応性が認められるようになった。(図 7)
- その他、参加施設および神戸大学とプロトコールを検討し以下の変更を行った。
- ・ acceptance criterion を nSL0-LA>1.5 とした。
 - ・ 化学物質が揮発性を持つことを想定しインキュベート中にプレート上面をシールで覆うこととした。
 - ・ また、統計学的見地から繰り返し実験から得られる測定値を用いて実験間の違いを調整する新しい判定方法が提案され (クライテリア 2 と 3)、validation 試験施行中は従来のクライテリア (クライテリア 1) と併用し最終的にいずれかに決定することとした。(図 8、9)

2) Phase 1 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した 5 化学物質についてコード化し、参加 3 施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松において Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.5E にのっとり各物質 3 回 1 セットからなる試験を 3 セット行い施設内、施設間再現性を評価した。(図 10、図 11)

国際バリデーション実行委員会

一日目

Date : February 4, 2017, 10:00 - 17:00

Venue : Nayamachi community hall

(http://nayamachi.or.jp/community_hall/)

Participants: Corsini, E., Roggen, E.,

Germolec, D, Inoue, T., Aiba, S.,

Kimura, Y., Yamakage, K., Watanabe, M.,

Kobayashi M., Yasuno, R., Omori, T.,

Nakajima, Y., Kojima, H., Mori, A.,

Kobayashi, M., Venti, S.

Phase I の結果は下図のようになりクライテリア 1 において各施設の施設内再現性、施設間再現性ともに 80%以上という基準を満たしたことからクライテリア 1 を採用し Phase II 試験を行う方針とした。

Criteria	施設内再現性			施設間再現性 (Based on Majority)
	産総研つくば	食薬センター	産総研高松	
1	4/5	5/5	5/5	4/5
2	3/5	4/5	5/5	4/5
3	3/5	4/5	4/5	4/5

また、結果をもとにして以下のようにプロトコールの変更が提案された。

- ・ acceptance criteria を FInSL0-LA 3 とする。
- ・ 化学物質が ddw または DMSO に溶解するかを決定する際に遠心しペレットが生じないことを確認する。
- ・ 2, 3 回目のアッセイでは、1 回目のアッセイで I.I.-SLR-LA が 0.05 を初めて下回る濃度の 2 倍の濃度から公比 2 で希釈した濃度を使用する。
- ・ 1 回目のアッセイで I.I.-SLR-LA 0.05 を満たす濃度が 4 点未満のときは上記の濃度を用いて再度 1 回目としてアッセイを行う。
- ・ Rogen 博士より、この試験法のクライテリアにおいて用量依存性が考慮されていないとの指摘がなされ、再度クライテリアを見直す

ことが提案された。

18:00 施設間試験実施者が退席したのち Phase I で使用した化学物質・コードを開示した。

二日目

Date : February 5, 2017, 10:00 - 12:00

Venue : Nayamachi community hall

(http://nayamachi.or.jp/community_hall/)

Participants: Corsini, E., Rogen, E., Germolec, D.,

Inoue, T., Aiba, S., Kimura, Y., Omori, T.,

Mori, A., Kobayashi, M., Kojima, H., Venti, S.

前日の会議で Rogen 博士より指摘をもとに相場、大森により「%suppression を使用した Dunnet 試験で、2 濃度以上連続した正の統計的に有意な点が存在、または 3 濃度以上で正での増加を伴う正の統計的に有意な点が存在すれば

Immunosuppression, 2 濃度以上連続した負の統計的に有意な点が存在、または 3 濃度以上で負での減少を伴う負の統計的に有意な点が存在すれば Immunoaugmentation と判定する」というクライテリアが提案された。(クライテリア 3')

正負ともに条件を満たす場合には

Immunosuppression / Immunoaugmentation と判定する。

その際、個々のアッセイごとのグラフも参考として提示する。

Phase I のデータにクライテリア 3' を適応した結果は下図であり、各施設の施設内再現性、施設間再現性ともに 80%以上という基準を満たし Phase II のクライテリアとして承認された。

Criteria	施設内再現性			施設間再現性 (Based on Majority)
	産総研つくば	食薬センター	産総研高松	
3'	4/5	5/5	4/5	4/5

各クライテリアごとの施設内再現性、施設間再現性の詳細は表 2 に記載した。

さらに、NTP、IMMTOX、150ct2005.xls の ActivityCategory_ImmuneTest の項目 (positive/negative) を参照とし以下の基準を踏まえ Phase II の化学物質 (20+α) を選定した。

- positive : negative が 13 : 7 になるように。(Phase I の 4 : 1 と合わせ 17 : 8 となるように)
- 国内入手が可能である。
- リードラボでアッセイを行っていない。

E. 結論

IL-2 転写活性障害を key event とした T 細胞分化異常誘導の AOP を更に充実させた。国際的視点からの IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞の分化異常誘導化学物質評価系試験法を検討した。

IL-2 転写活性障害を指標とした T 細胞の分化異常誘導化学物質評価系の phase 0, Phase 1 validation 試験により施設内、施設間再現性を確認した。

また、種々のクライテリアを統計学的に検討し、MITA におけるクライテリアが決定した。さらに、Phase II study に用いる被検物質を決定した。

引用文献

1. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, 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: 759-768, 2014.
2. Saito R, Hirakawa S, Ohara H, Yasuda M, Yamazaki T, Nishii S, et al.: Nickel

differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. Toxicol Appl Pharmacol 254: 245-255, 2011.

3. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, et al.: An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 124: 359-369, 2011.
4. Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, et al.: Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. Biochem Biophys Res Commun 321: 280-290, 2004.
5. Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. J Allergy Clin Immunol 123: 758-762, 2009.
6. Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ: Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. Nat Immunol 12: 551-559, 2011.

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす可能性のある事象に関する情報は得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi, M., Kitahata, H., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M., 2016b. Numerical and comparative three-dimensional structural analysis of peripheral nerve fibres in epidermis of patients with atopic dermatitis.

- Br J Dermatol 174, 191-194.
2. Oeda, S., Hirota, M., Nishida, H., Ashikaga, T., Sasa, H., Aiba, S., Tokura, Y., Kouzuki, H., 2016. Development of an in vitro photosensitization test based on changes of cell-surface thiols and amines as biomarkers: the photo-SH/NH(2) test. J Toxicol Sci 41, 129-142.
 3. Tsutsumi, M., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M., 2016a. Abnormal Morphology of Blood Vessels in Erythematous Skin From Atopic Dermatitis Patients. Am J Dermatopathol 38, 363-364.
 4. Inoue, M., Kikuchi, K., Watabe, A., Yamasaki, K., Aiba, S., 2016. The spectrophotometrical analysis of rhododendrol-induced leucoderma using a novel multispectral camera. Br J Dermatol 175, 334-339.
 5. Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Nishikawa, R., Nishigori, C., Aiba, S., 2016. Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line. Br J Dermatol 175, 979-987.
 6. Hidaka, T., Ogawa, E., Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., Aiba, S., Nakayama, K., Okuyama, R., Yamamoto, M., 2017. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. Nat Immunol 18, 64-73.
- 2 . 学会発表**
1. 相場節也：皮膚感作性および免疫毒性の adverse outcome pathway (AOP). 日本薬物動態学会第31回年会（松本）2016年10月13日
 2. 木村裕、相場節也：試験法ワークショップ「IL-2転写活性抑制をkey eventとするT細胞分化異常誘導に関するAOP」第23回日本免疫毒性学会学術年会（北九州）2016年9月7日
- H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**
1. 特許取得
なし
 - 2 . 実用新案登録
なし
 - 3 . その他
なし

図 1. 研究計画

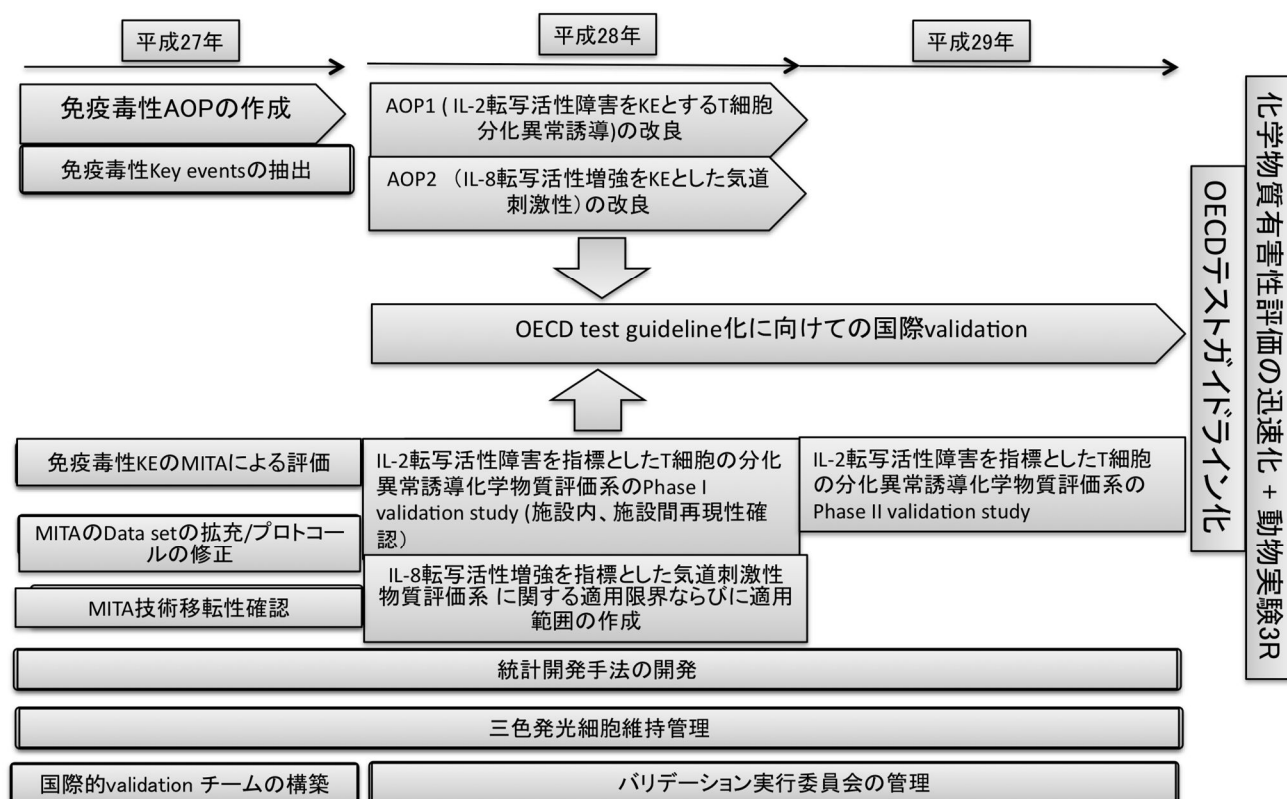


図 2 . Multi-ImmunoTox assay (MITA)

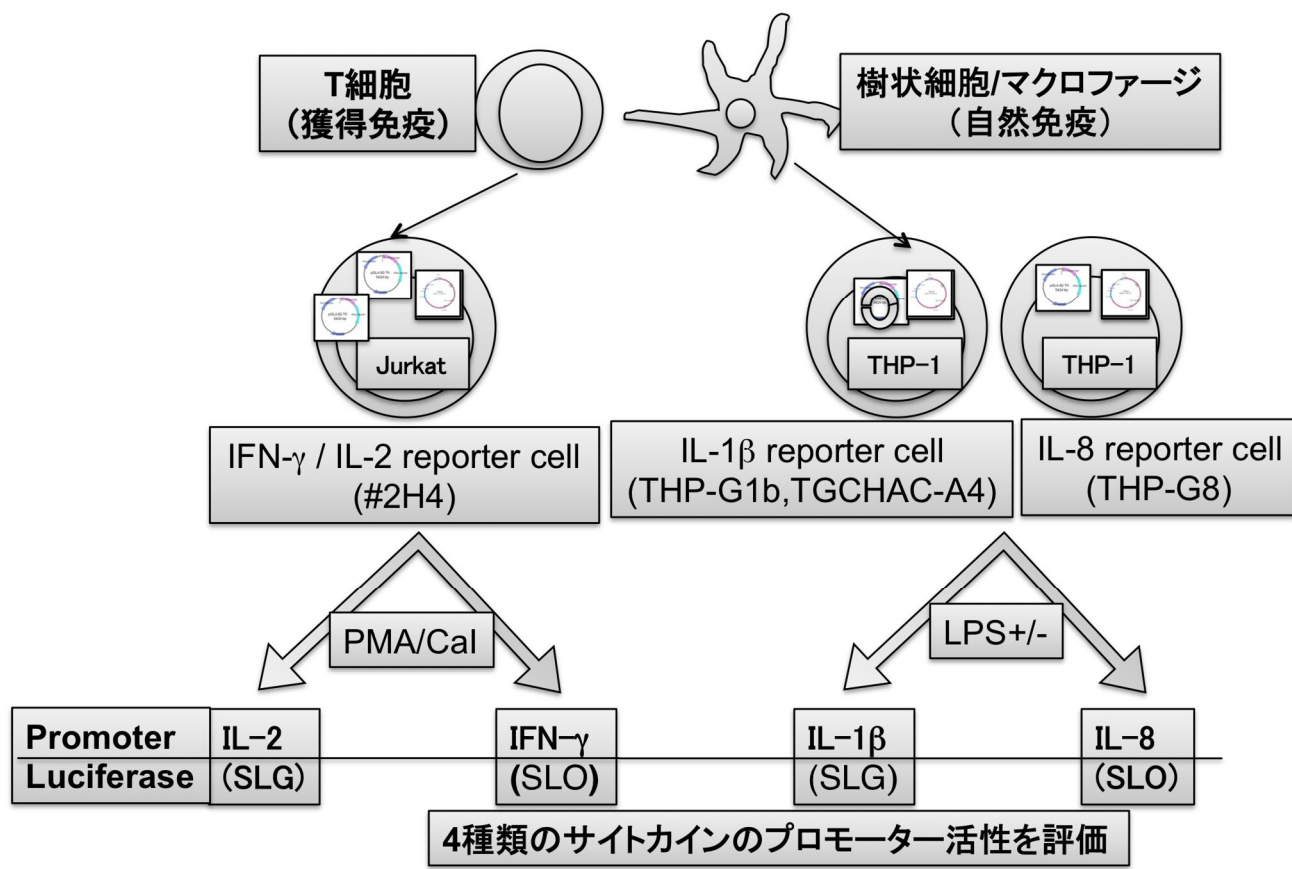


図3. MITA 判定方法

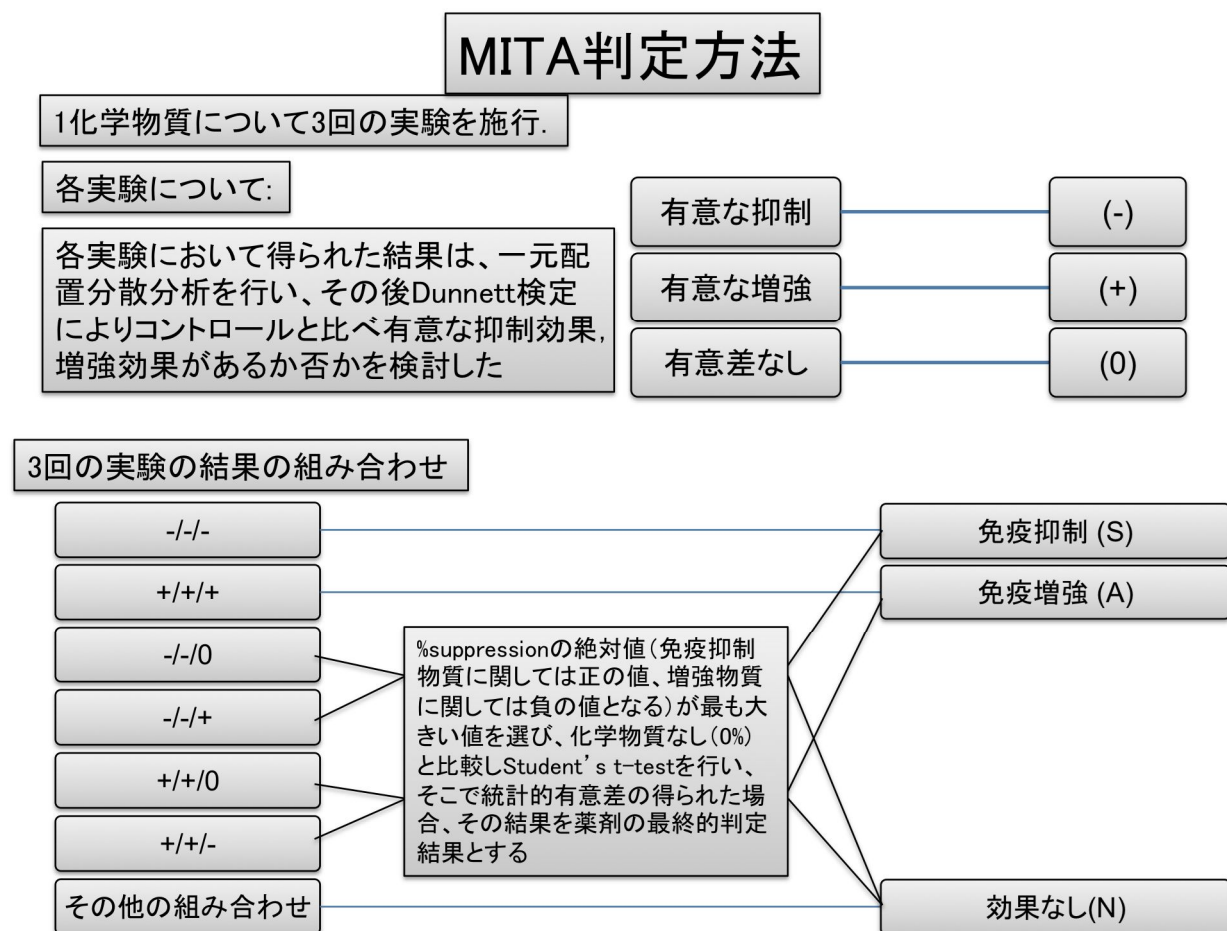


図4 . IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

AOP for dysregulation of Th subset differentiation triggered by disrupted IL-2 transcription

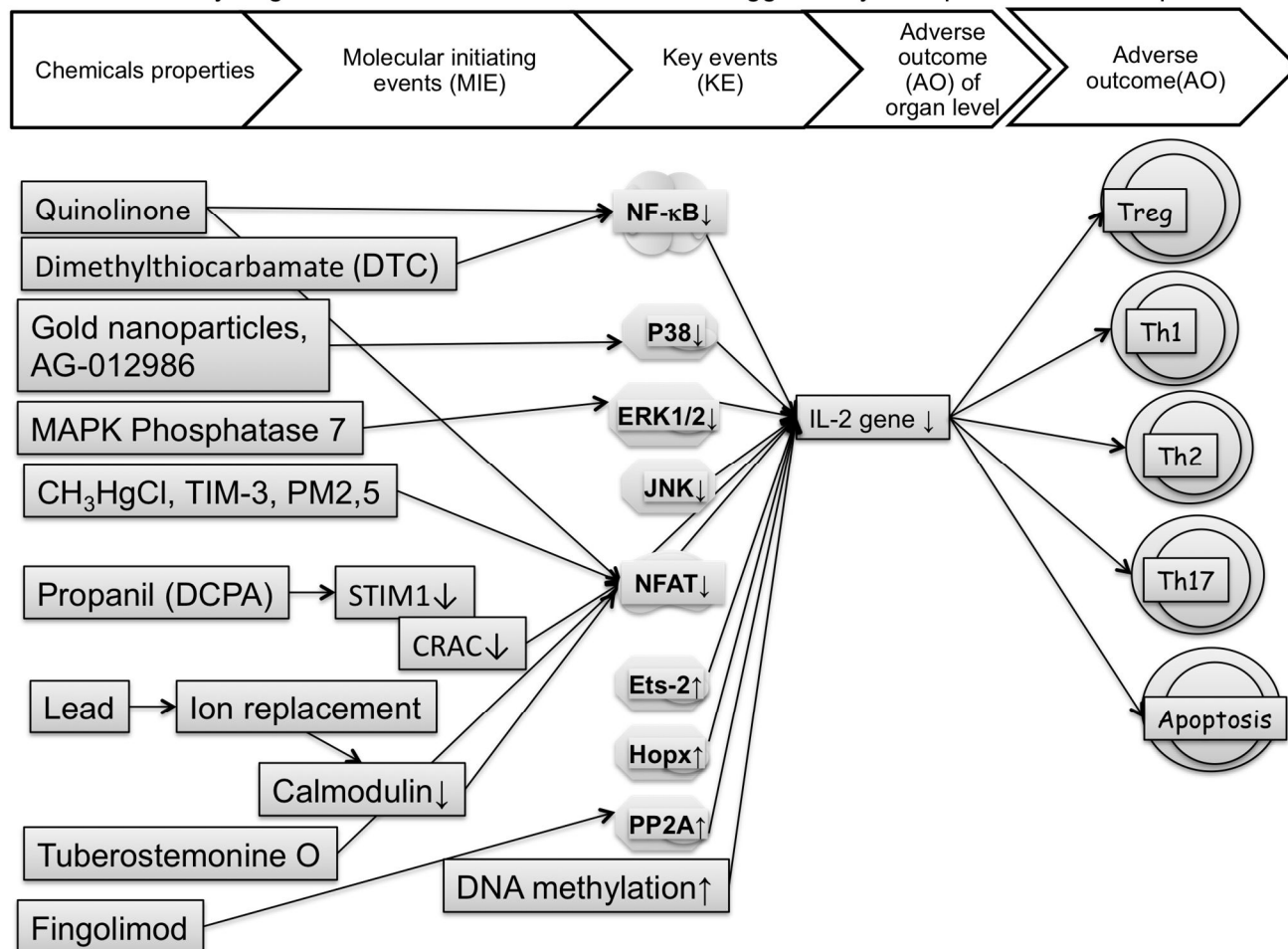


図 5 . IL-2 転写活性増強を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

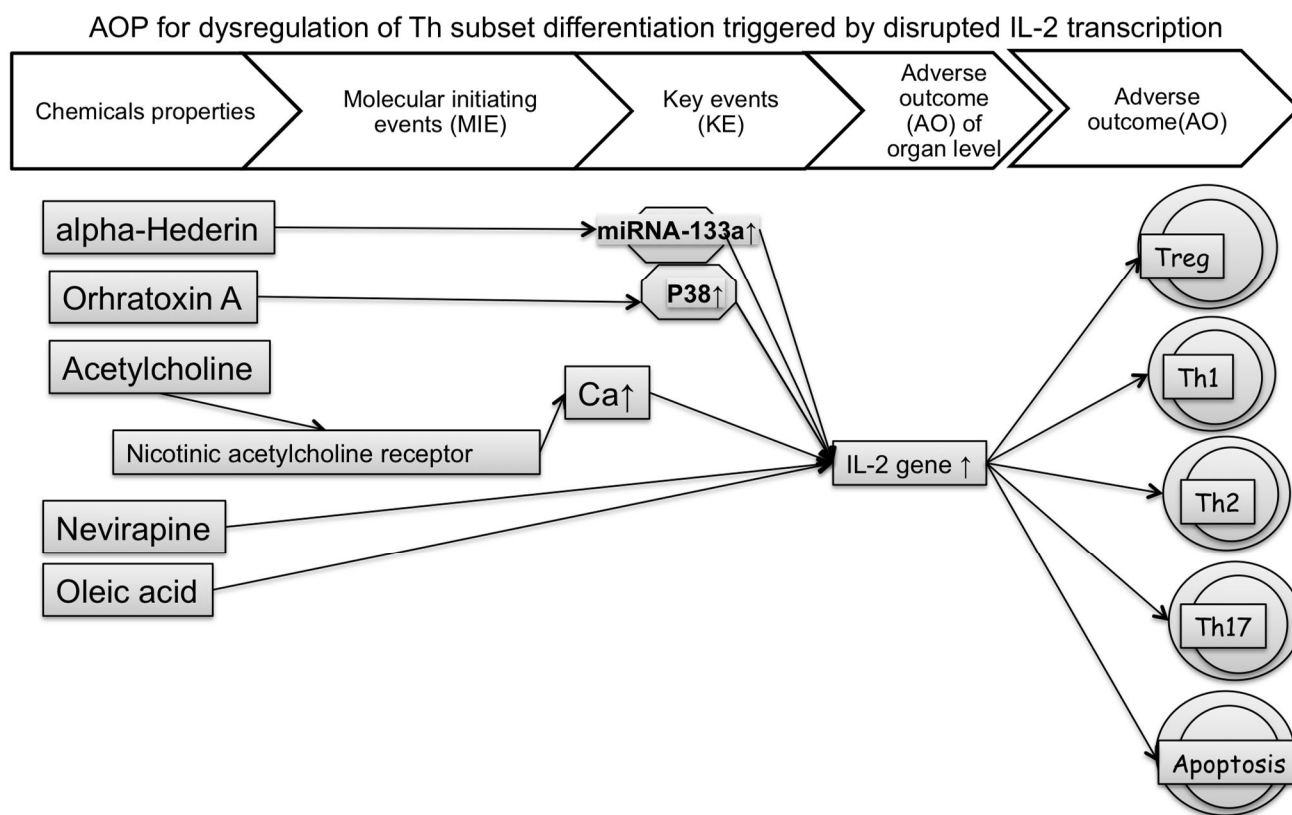


図6 MITA Phase 0 結果

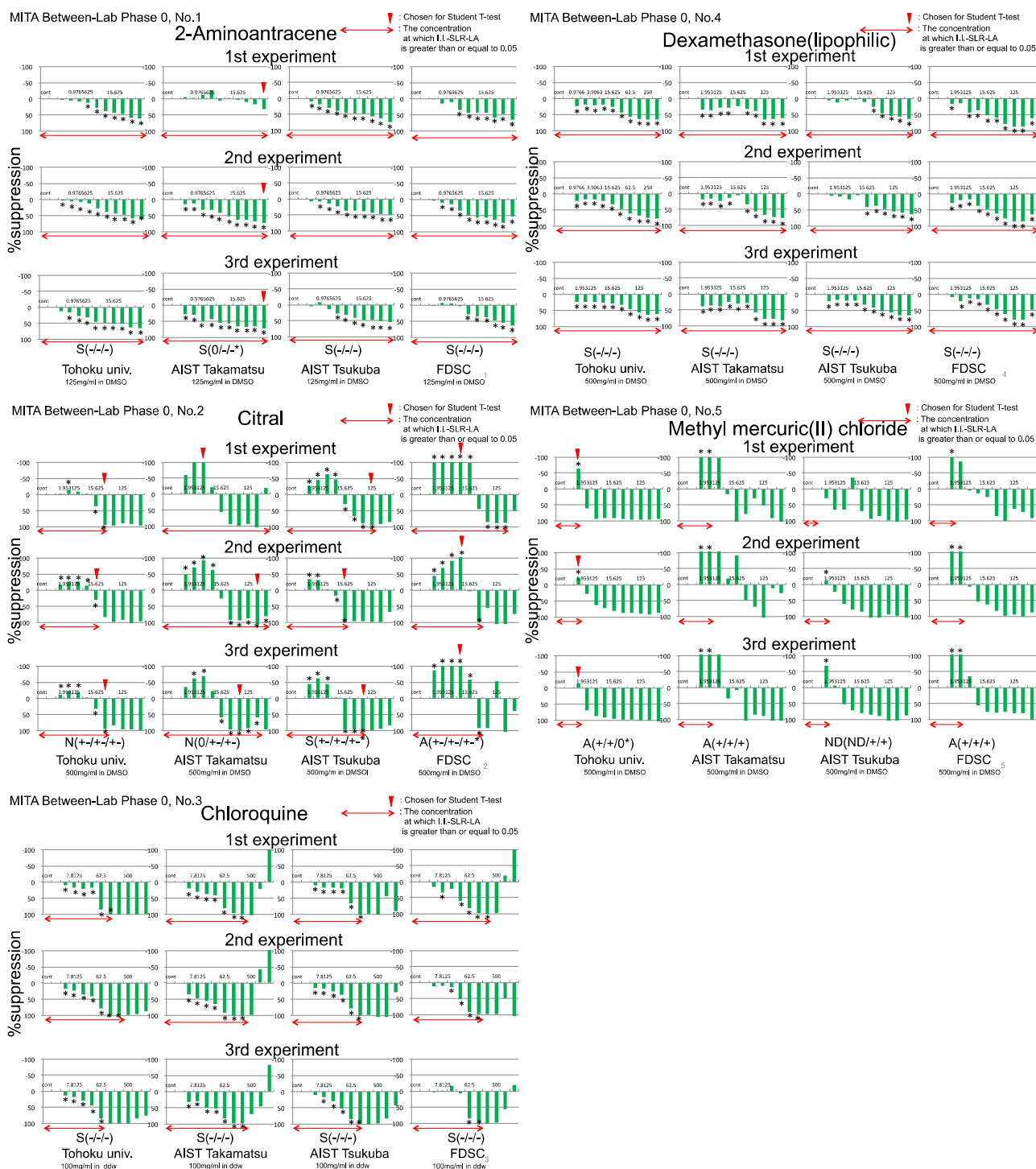


図7 PMA/I α およびハイグロマイシン調製方法、細胞培養時の遠心速度変更後の 2H4 細胞の反応性

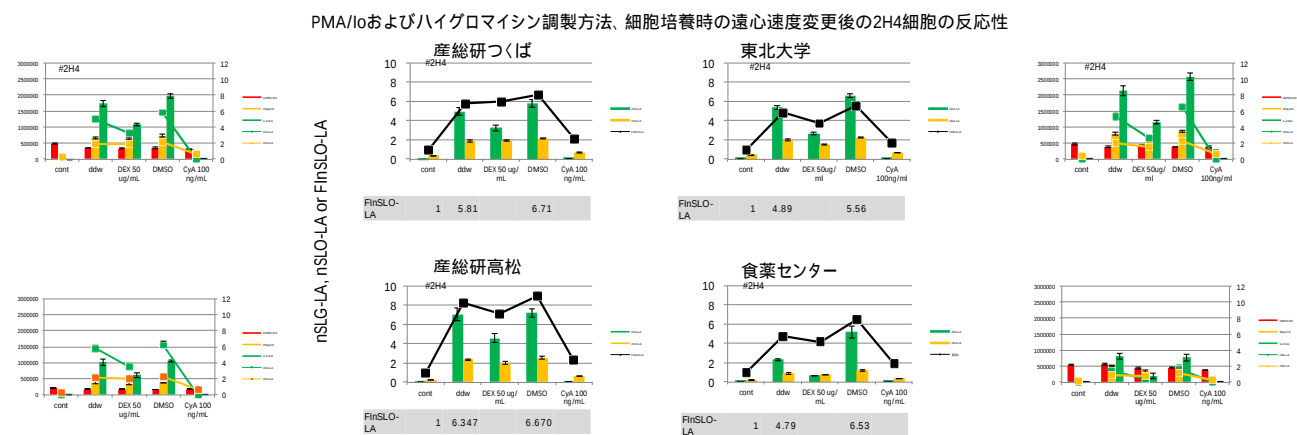


図8 MITA 判定方法（クライテリア2）

MITA判定方法(クライテリア2)

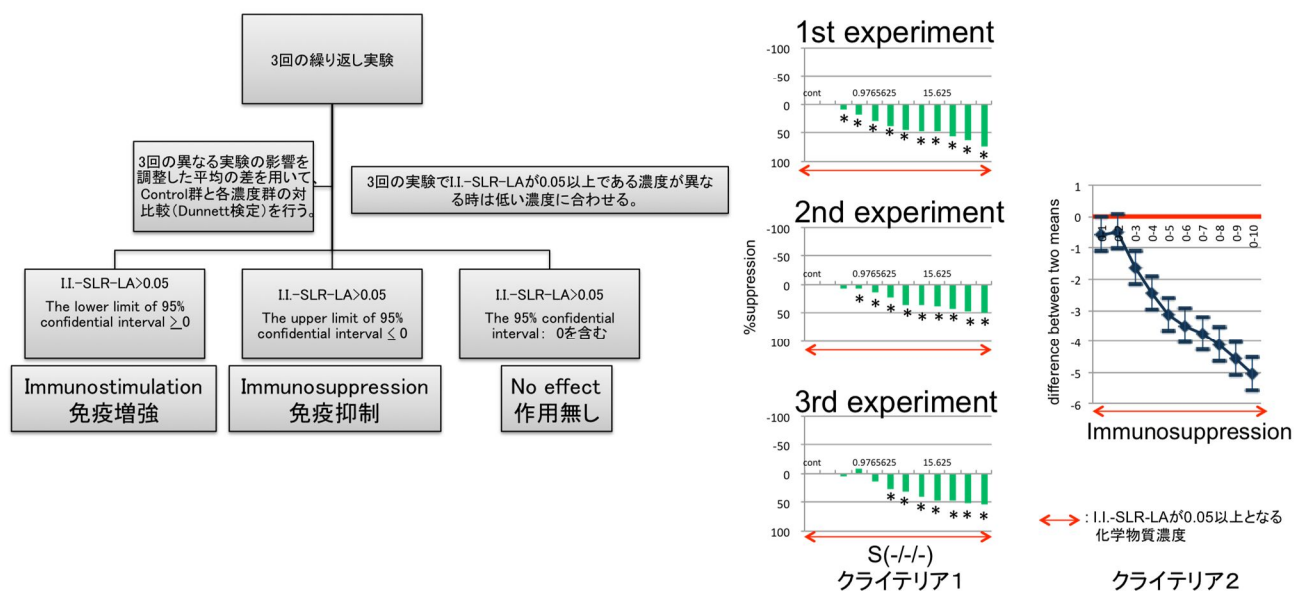


図9 MITA 判定方法 (クライテリア3)

MITA判定方法(クライテリア3)

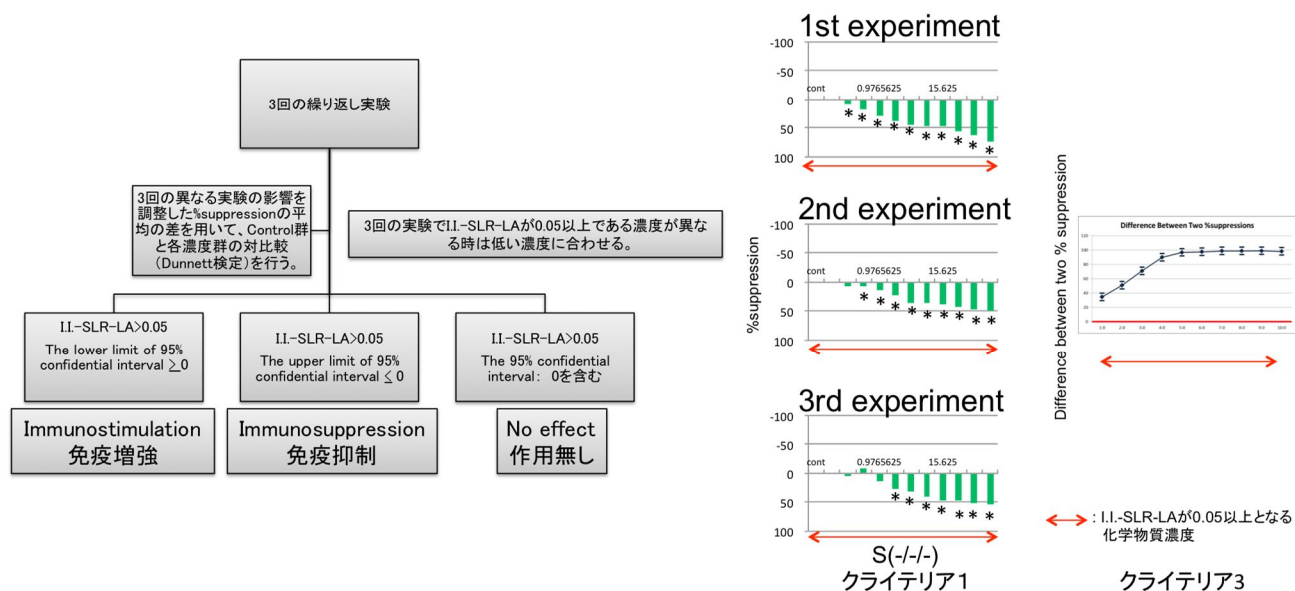


図 1 0 新しいクライテリア (クライテリア 2) による Phase 0 の結果

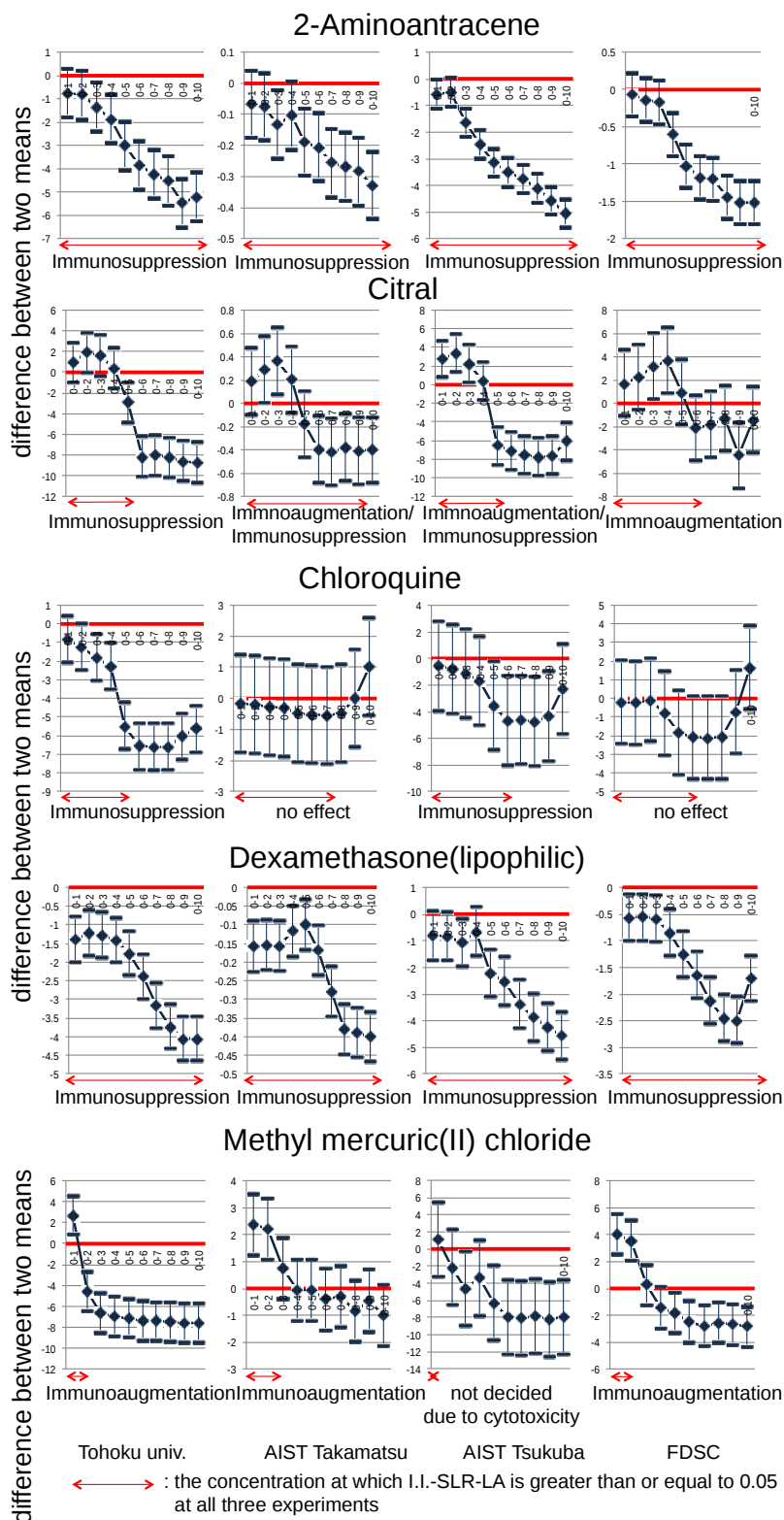
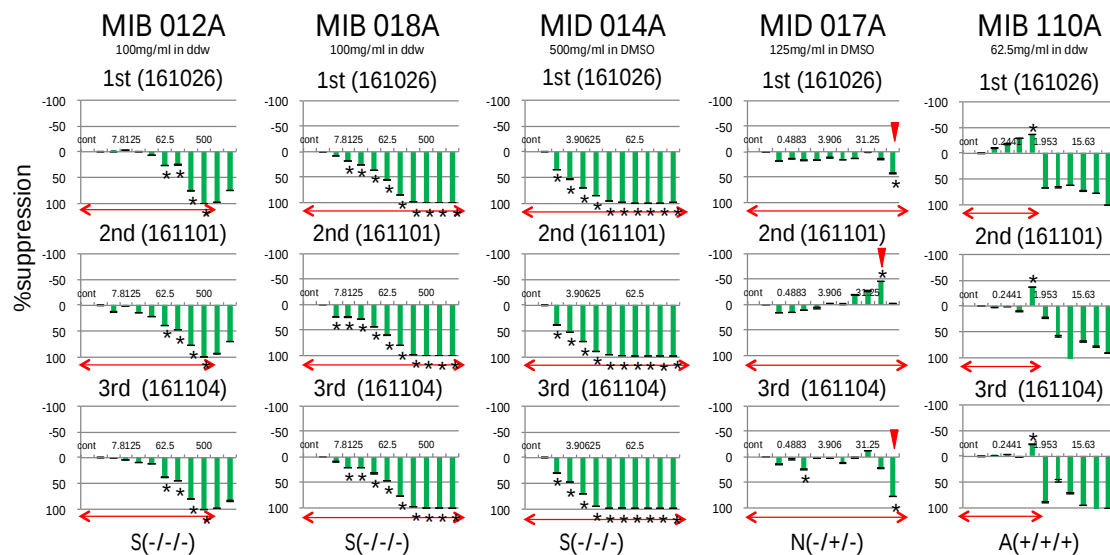


図 1 1 MITA 施設間試験 Phase I 結果

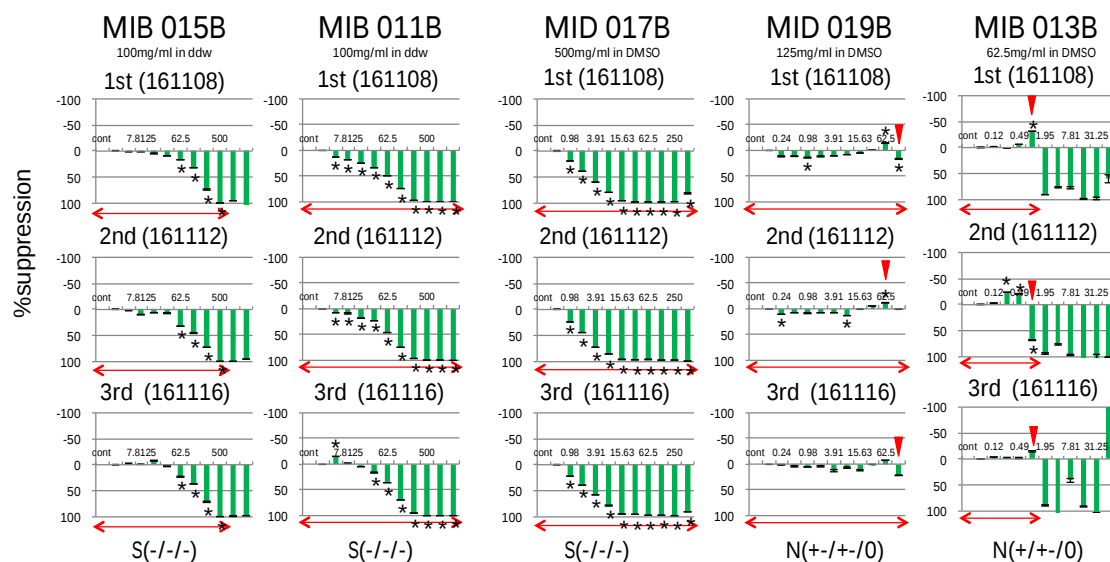
(クライテリア 1)

産総研つくば

1 セット目



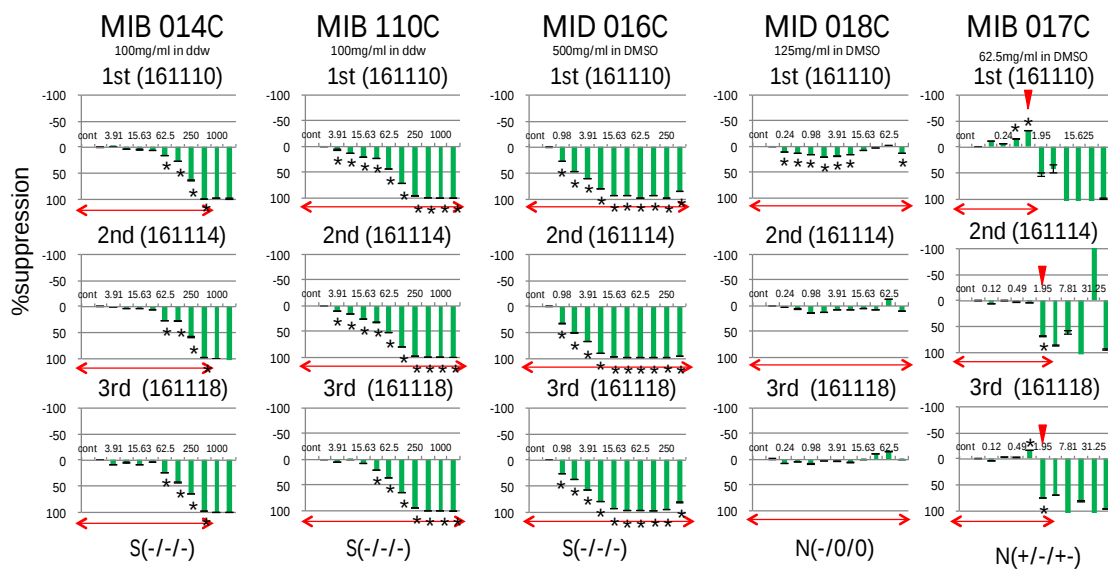
2 セット目



次ページに続く

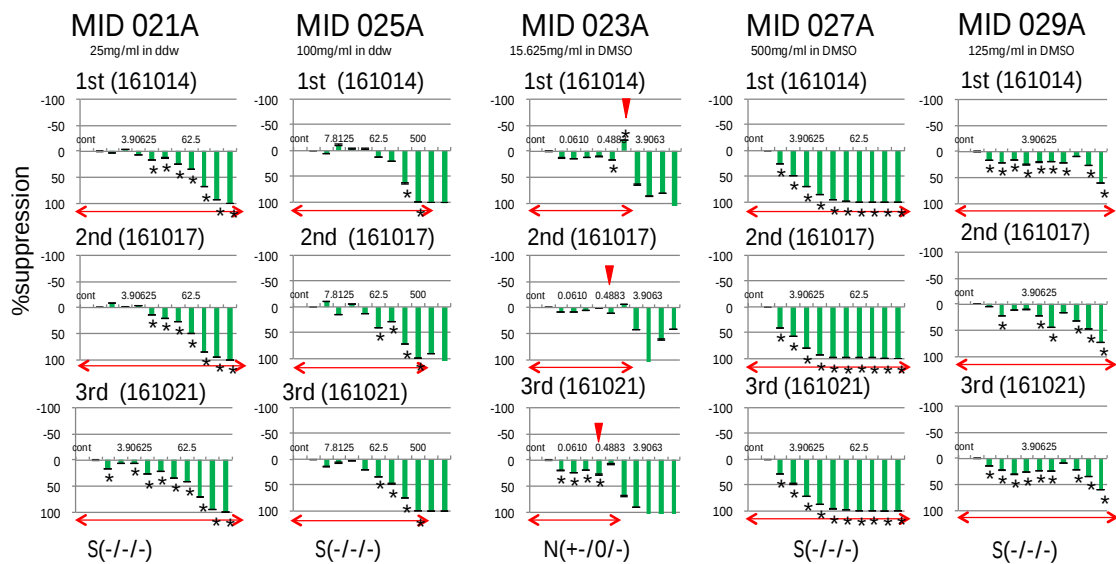
前ページより続く

3 セット目



食薬センター

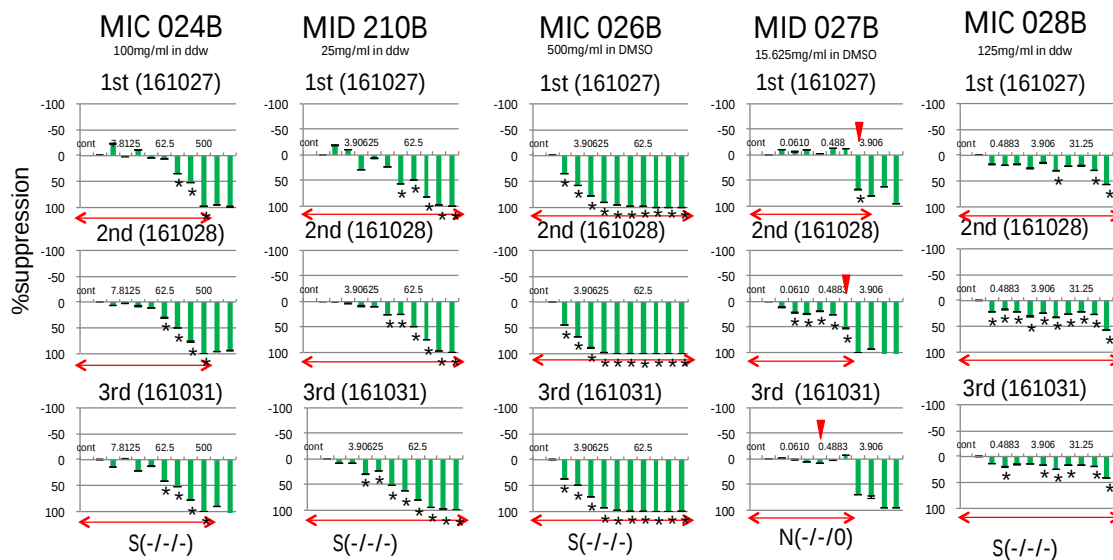
1 セット目



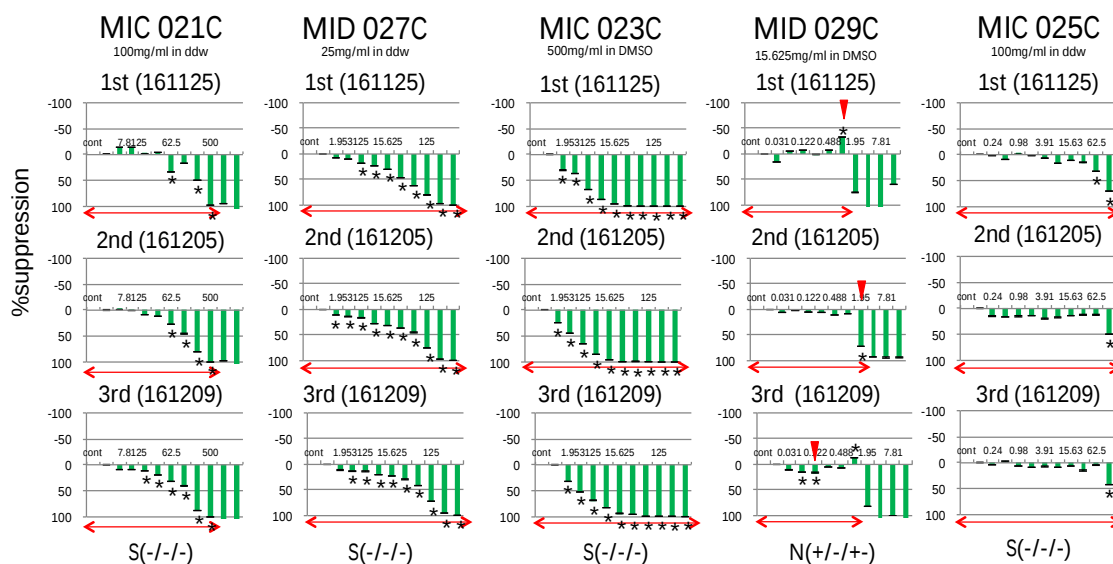
次ページに続く

前ページより続く

2 セット目



3 セット目

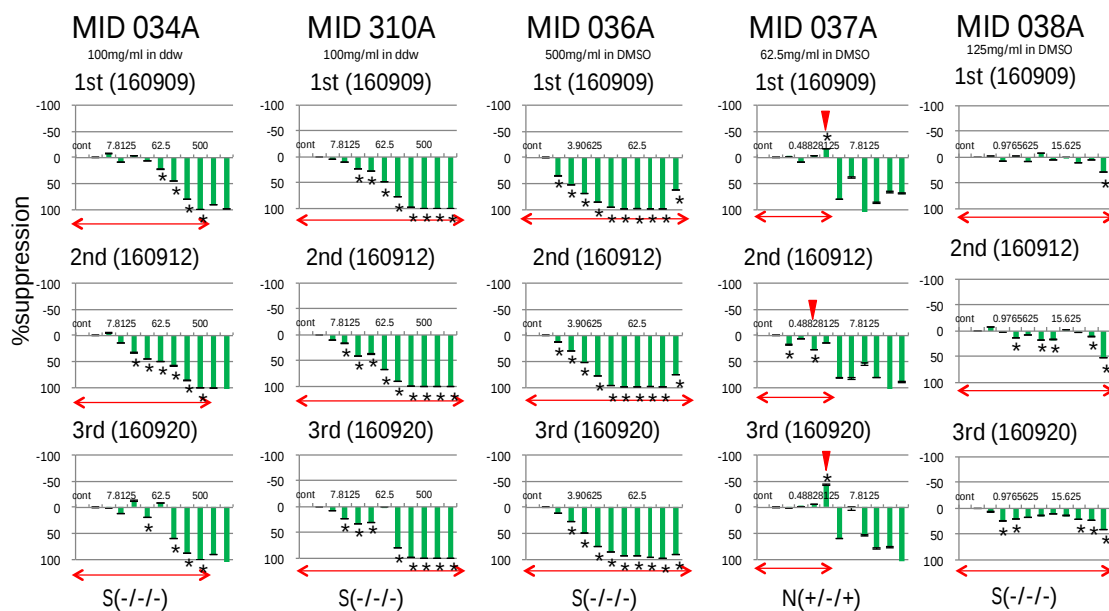


次ページに続く

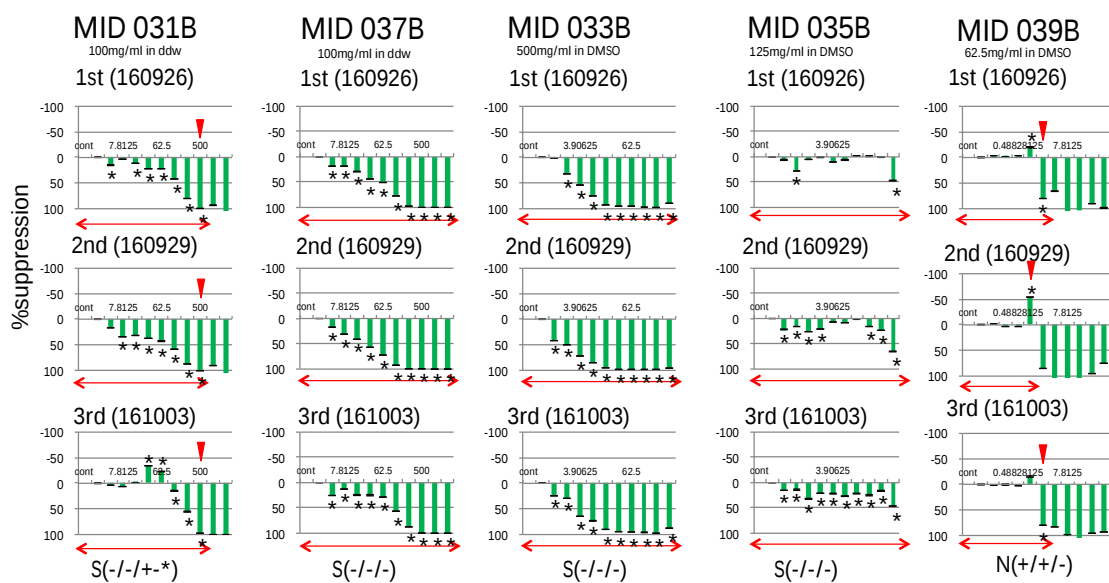
前ページより続く

産総研高松

1 セット目



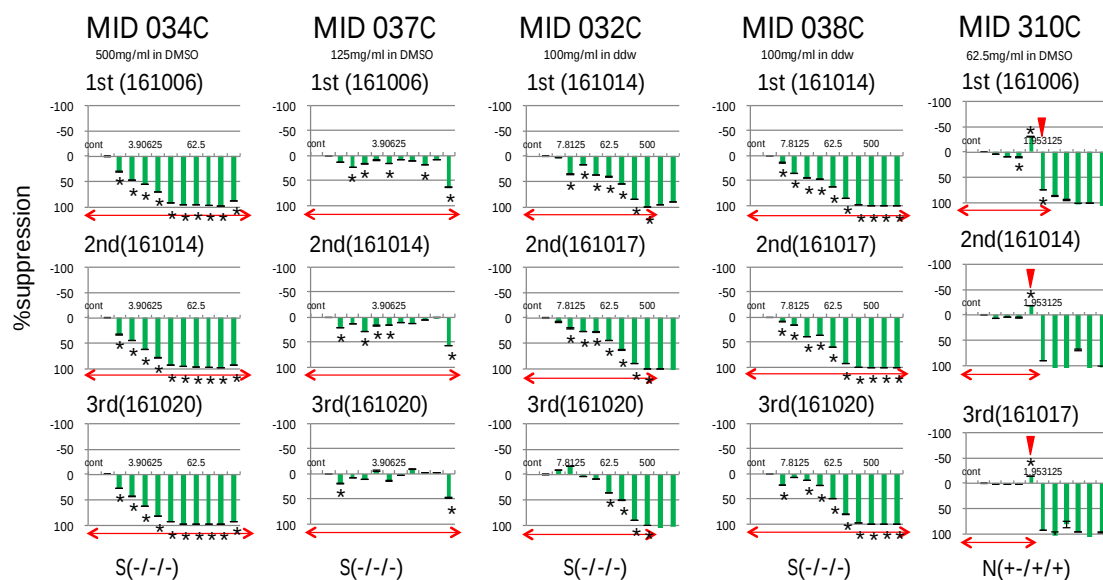
2 セット目



次ページに続く

前ページより続く

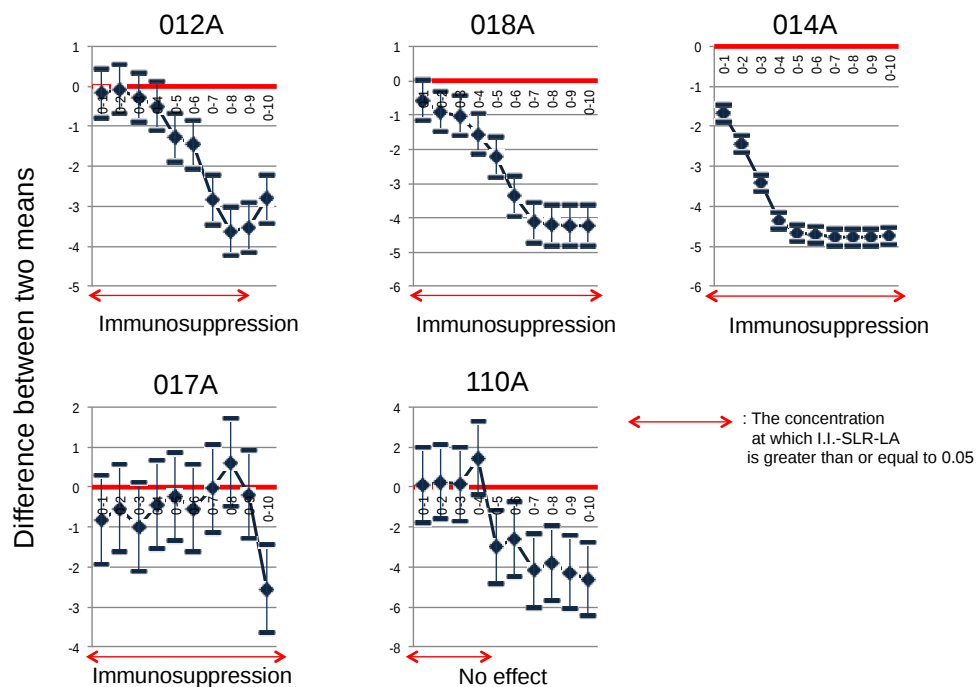
3 セット目



(クライテリア 2)

産総研つくば

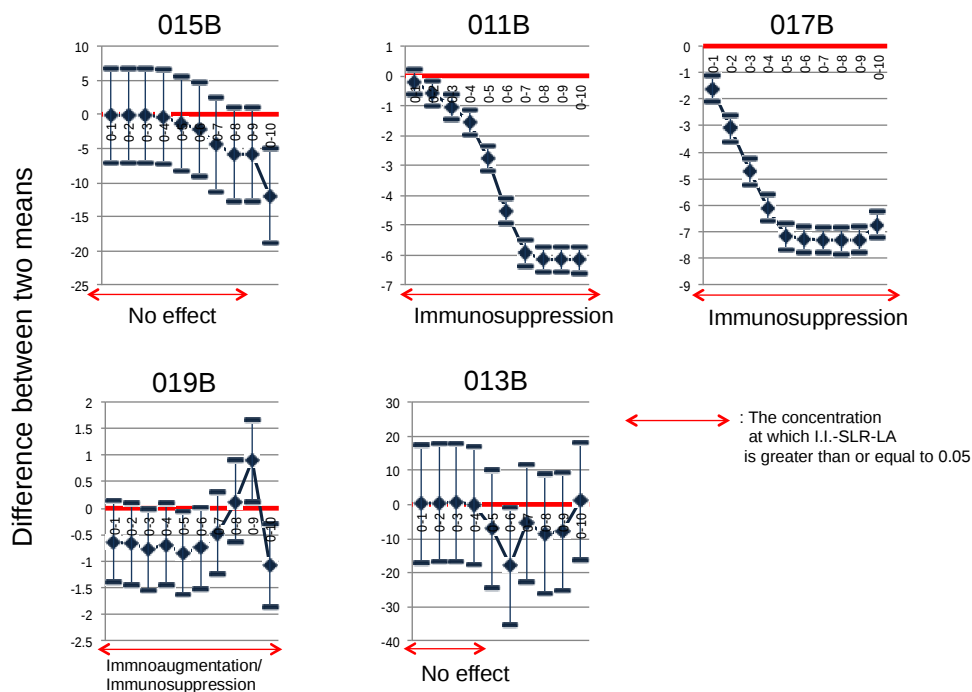
1 セット目



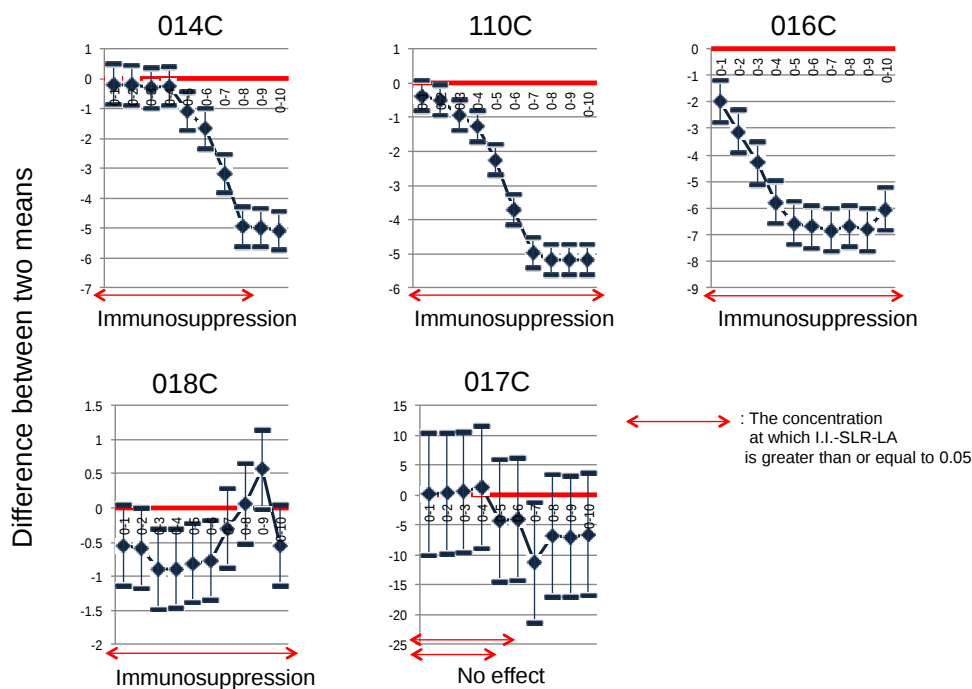
次ページに続く

前ページより続く

2 セット目



3 セット目

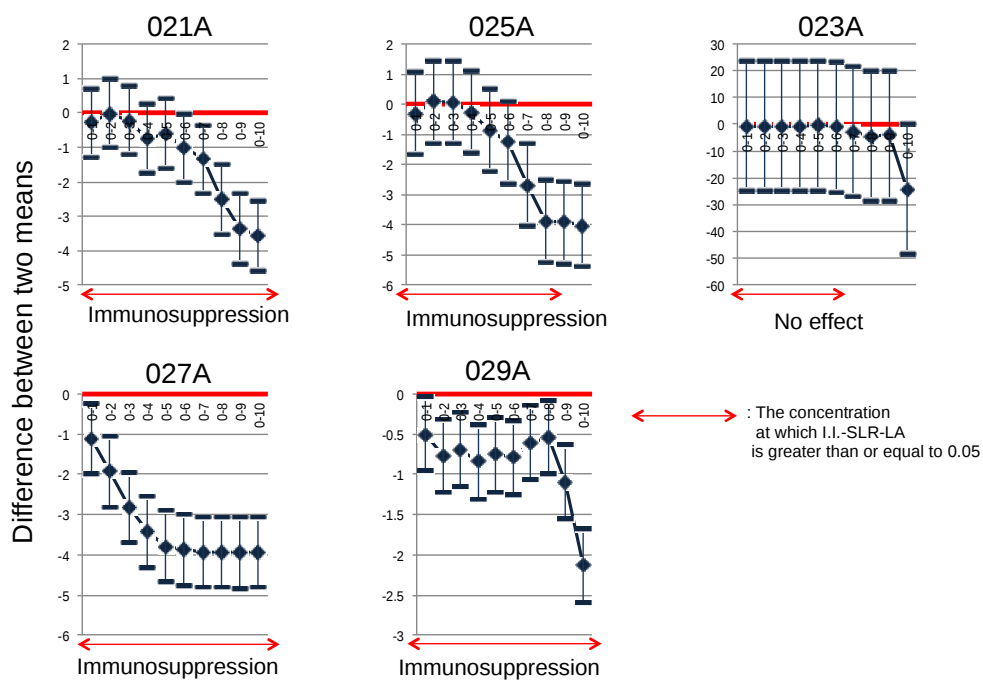


次ページに続く

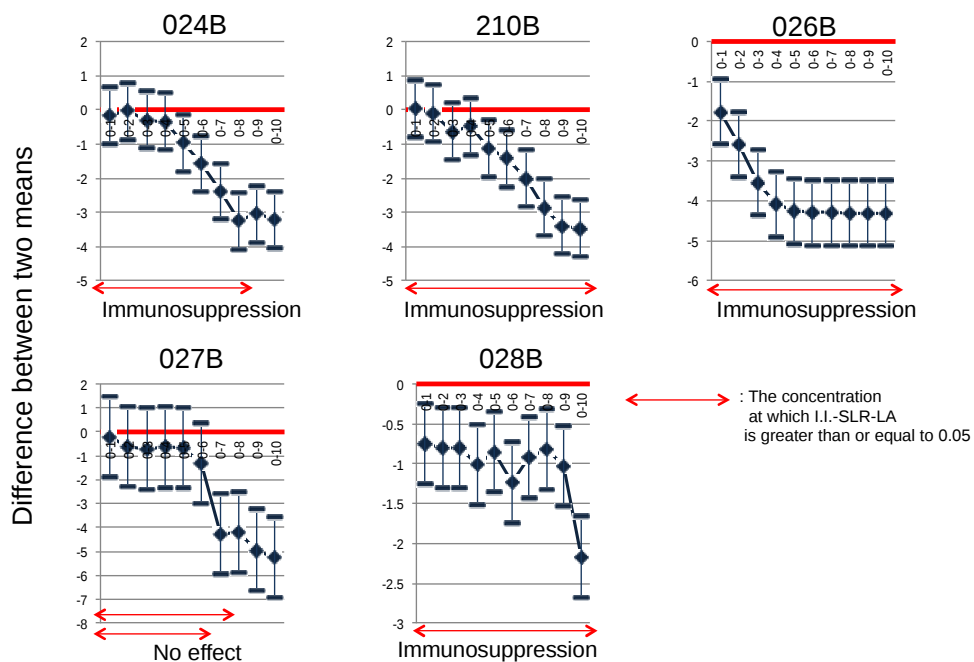
前ページより続く

食薬センター

1 セット目



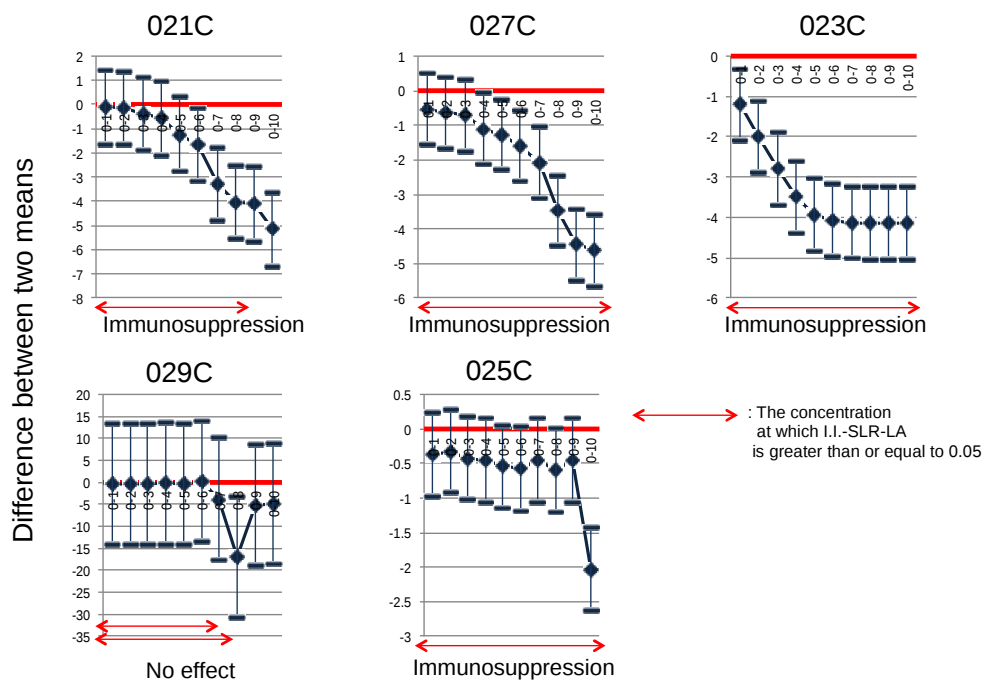
2 セット目



次ページに続く

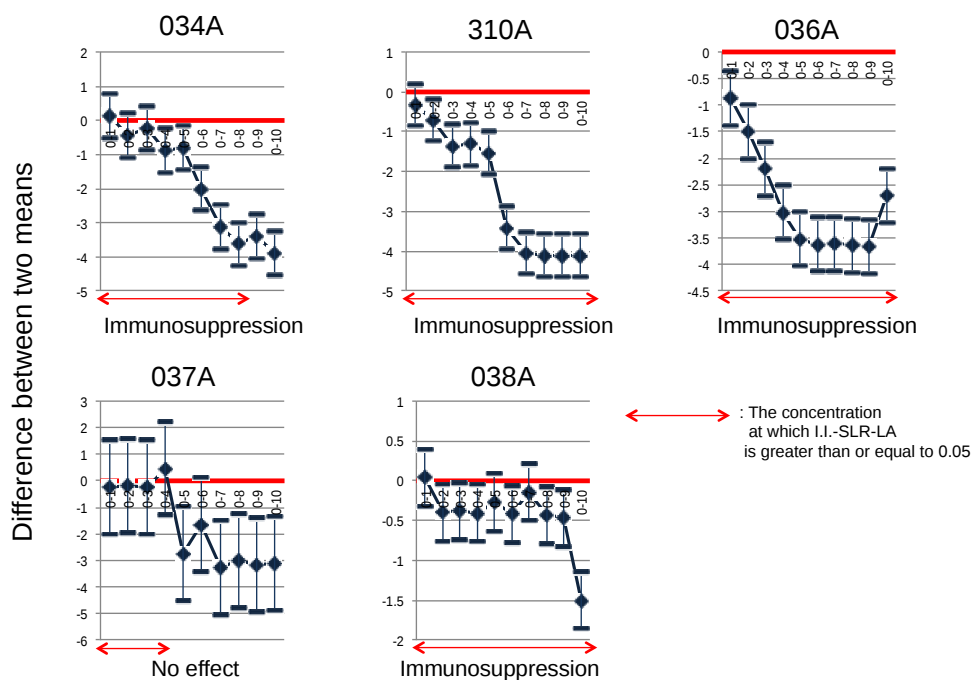
前ページより続く

3 セット目



産総研高松

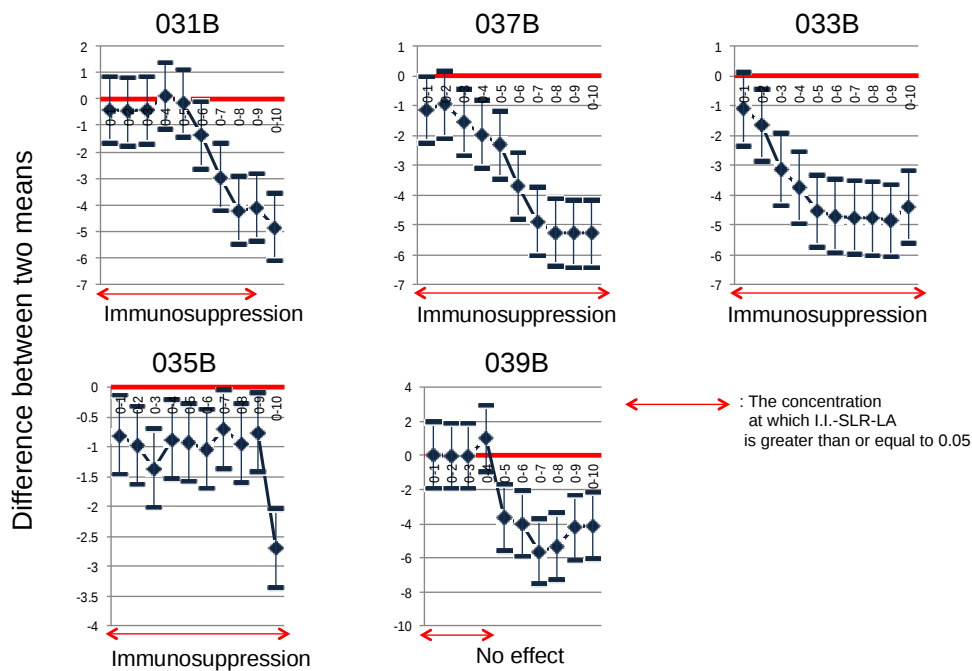
1 セット目



次ページに続く

前ページより続く

2 セット目



3 セット目

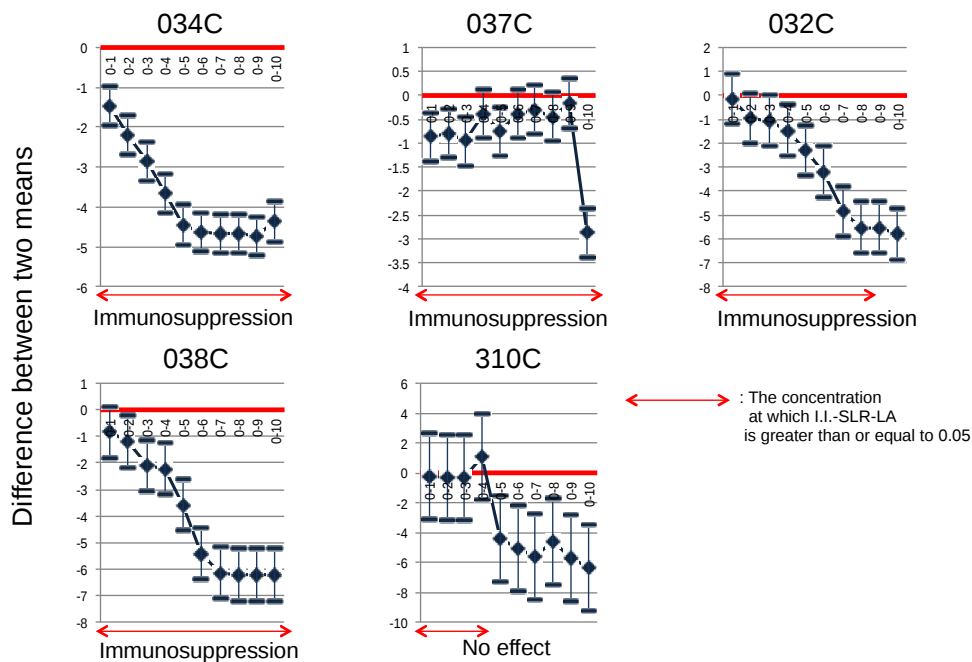
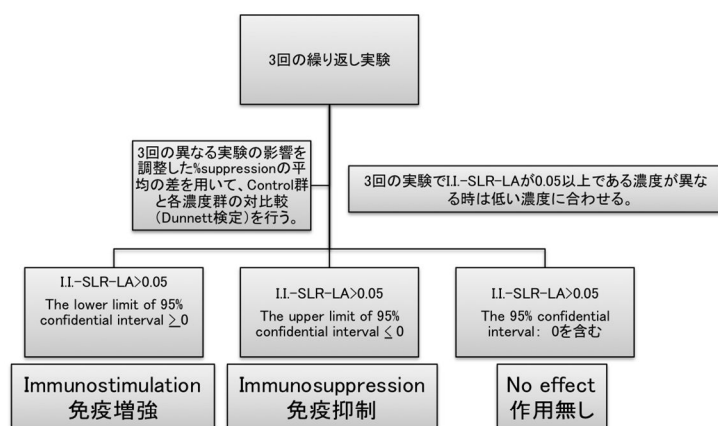


図 1 2 MITA 判定方法 (クライテリア 3 ')

MITA判定方法(クライテリア3')



更に免疫増強、抑制の判定に際しては、2濃度以上連続した正の統計的に有意な値が存在するか、または3濃度以上で用量依存性を示す正の値が存在し、さらに少なくとも1濃度で正の統計的有意を示す場合のみImmunosuppression、2濃度以上連続した負の統計的に有意な値が存在するか、または3濃度以上で用量依存性を示す負の値が存在し、さらに少なくとも1濃度で負の統計的有意を示す場合のみImmunoaugmentationと判定する

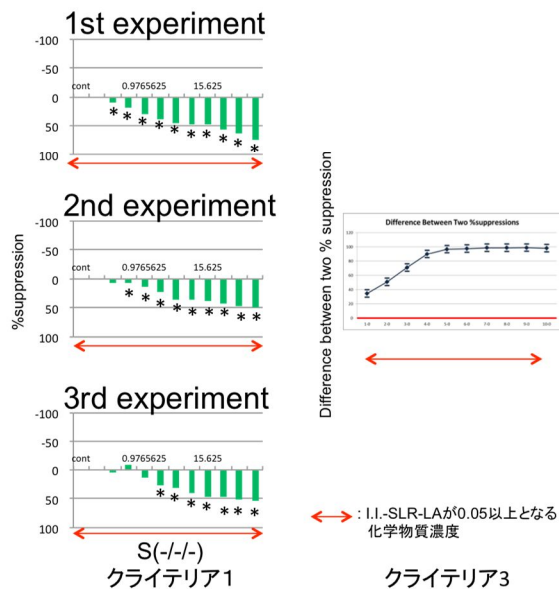


表 1 IL-2 の転写、産生に関する化学物質、シグナル伝達物質についての最近の報告

Chemical	Biochemical pathway	Action to IL-2 production	Animal	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Reference
Acetylcholine	Nicotinic acetylcholine receptor, Ca channel	positive	Human	cell line	Mashimo et al. Life Sci. 2016
Nevirapine		positive	Rat	<i>in vivo</i>	Bekker et al. Adv Pharmacol Sci. 2016
Oleic acid		positive	Human	PBL	Passos et al. Lipids Health Dis. 2016
–	Ets-2	negative	Human	PBMC	Panagoulas et al. J Biol Chem. 2016
Quinolinone	NF- κ B, NFAT	negative	Human	cell line	Kwak et al. Bioorg Med Chem. 2016
Ochratoxin A	MAPK	positive	Human	cell line	Darif et al. J. Toxicol Sci. 2016
–	Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP)	positive	Human	PBL	Karampetsou et al. J Immunol. 2016
–	Let-7i	positive	Human	PBL	Zhang et al. Sci Rep. 2016
–	4-1BB	positive	Mice		Barsoumian et al. PLoS One. 2016
–	Itk	positive	Mice		Gomez-Rodriguez et al. Nat Commun. 2016
alpha-Hederin	miRNA-133a	positive	Rat		Ebrahimi et al. Drug Dev Res. 2016
–	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase	positive	Human	cell line	Faris et al. Lipids. 2016
–	CD147, PMCA4	negative	Human	cell line	Supper et al. J Immunol. 2016
Astaxanthin		positive	Mice		Lin et al. Int J Mol Sci. 2015
Fingolimod	PP2A, IL-33	negative	Mice		Ottenlanger et al. Eur J Immunol. 2016
TIM-3	NFAT	negative	Human	cell line	Tomkowicz et al. PLoS One. 2015
–	Homeodomain Only Protein (Hopx)	negative	Mice		Jones et al. J Immunol. 2015
–	Eos	positive	Mice		Rieder et al. J Immunol. 2015
Silver nanoparticles, Gold nanoparticles	MAPK	negative	Human	cell line	Parnsamut et al. Genet Mol Res. 2015
–	4-1BB	positive	Mice		Oh et al. PLoS One. 2015
Interferon beta	cAMP responsive element modulator	negative	Mice		Otero et al. J Immunol. 2015
–	Cdk5	positive	Mice		Lam et al. Cell Cycle. 2015
T cell activation inhibitor, mitochondrial		negative	Mice		Vogel et al. J Immunol. 2015
MAPK Phosphatase 7	ERK	negative	Mice		Zhang et al. J. Immunol. 2015
–	ATG5	positive	Mice		Liu et al. Microbes Infect. 2015
–	G α s/cAMP Signaling	positive	Human	cell line, PBL	Hynes et al. J Mol Signal. 2015
–	DNA methylation	negative	Cat		Miller et al. J. Immunol. 2015
Tuberostemonine O		negative	Mice		Jung Jang et al. Chem Biodivers. 2014
–	miRNA-155	positive	Human		Lashine et al. Lupus. 2015
IL-33		positive	Mice		Matta et al. J Immunol. 2014
PM2.5	Oral1, CaN-NFAT	negative	Human	cell line	Tong et al. Arch Environ Contam Toxicol. 2015

表 2 MITA 施設間試験 Phase I 結果

Phase I結果(クライテリア1)

		産総研つくば	食薬センター	産総研高松
化学物質1	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	3rd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
化学物質2	1st round	N(+/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	N(+/-+/0)	S(-/-)	S(-/-)
	3rd round	N(-/0/0)	S(-/-)	S(-/-)
化学物質3	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	3rd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
化学物質4	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-+*)
	3rd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
化学物質5	1st round	A(+/+)	N(+/-0/-)	N(+/-+)
	2nd round	N(+/-/0)	N(-/-0)	N(+/-/-)
	3rd round	N(+/-+/-)	N(+/-+/-)	N(+/-+/-)

Within-Laboratory Reproducibility		
	AlST-Tsukuba	80% (4/5)
	FDSC	100% (5/5)
	AlST-Takamatsu	100% (5/5)
	Average	93%
Between-Laboratory Reproducibility		
		91% ((9+6+9+9+8)/45)

Phase I結果(クライテリア2)

		産総研つくば	食薬センター	産総研高松
化学物質1	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質2	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunoaug./supp.	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質3	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質4	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	No effect	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質5	1st round	No effect	No effect	No effect
	2nd round	No effect	No effect	No effect
	3rd round	No effect	No effect	No effect

Within-Laboratory Reproducibility	
AIST-Tsukuba	60% (3/5)
FDSC	100% (5/5)
AIST-Takamatsu	100% (5/5)
Average	87%
Between-Laboratory Reproducibility	
96% ((9+8+9+8+9)/45)	

Phase I結果(クライテリア3)

		産総研つくば	食薬センター	産総研高松
化学物質1	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質2	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunoaug./supp.	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質3	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質4	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質5	1st round	Immunoaugmentation	Immunosuppression	No effect
	2nd round	No effect	No effect	Immunoaugmentation
	3rd round	No effect	No effect	Immunoaugmentation

Within-Laboratory Reproducibility	
AIST-Tsukuba	60% (3/5)
FDSC	80% (4/5)
AIST-Takamatsu	80% (4/5)
Average	73%
Between-Laboratory Reproducibility	
78% (9+8+9+9+0)/45)	

Phase I結果(クライテリア3')

		産総研つくば	食薬センター	産総研高松
化学物質1	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質2	1st round	No effect	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	No effect	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	No effect
化学物質3	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質4	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
化学物質5	1st round	No effect	No effect	No effect
	2nd round	No effect	No effect	No effect
	3rd round	No effect	No effect	No effect

Within-Laboratory Reproducibility	
AlST-Tsukuba	80% (4/5)
FDSC	80% (4/5)
AlST-Takamatsu	80% (4/5)
Average	80%
Between-Laboratory Reproducibility	
	80% (9+0+9+9+9)/45)