

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）  
免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ向けての検討  
平成29年度分担研究報告書

国際バリデーシヨンの施行

分担研究者 小島 肇  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

新たな*in vitro*免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）の一つであるIL-2レポーターアッセイを、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）の試験法ガイドライン（Test Guideline：TG）としての公定化するため、国際バリデーシヨンを施行した。本年度に実施された施設間再現性を検証するためのバリデーシヨン研究（phase II）の結果に対し、昨年度同様、国内外の専門家を招聘して意見を求めた。その結果、phase IIバリデーシヨン研究が適切に実施されたことを確認できた。

キーワード：免疫毒性、バリデーシヨン研究、OECD

研究協力者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

相場節也 東北大学医学系研究科・医学部・皮膚科学分野教授

木村 裕 東北大学医学系研究科・医学部・皮膚科学分野助教

足利太可雄 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 安全性予測評価部主任研究員

B．研究方法

B-1. 国際的な専門家との意見交換

B-1-1. 第3回対面会議

本年度に実施されたMITAに関する国際バリデーシヨン結果を検証するため、平成29年11月に国際バリデーシヨン第3回実行委員会の会議を企画した。

B-1-2. 電話会議

Phase II 終了後の平成30年3月および4月に電話会議を開催し、データについて議論した。

B-2. バリデーシヨン研究の支援

B-2-1. バリデーシヨン被験物質の送付

IL-2レポーターアッセイのバリデーシヨン研究Phase II（以下、Phase II と記す）にて、施設間再現性を求めるために選ばれた20物質を、コード化して各施設に送付した。

被験物質は、昨年度開催された第2回会議にて、より広範な物質を用いて施設間再現性を評価するために選択された。

A．研究目的

相場らにより、新たに開発された*in vitro*免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）の一つであるIL-2レポーターアッセイを、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）の試験法ガイドライン（Test Guideline：TG）としての公定化するため、国際バリデーシヨン研究を施行する。

## B-2-2. バリデーション結果の記録確認

Phase II で用いられた各施設の記録用紙およびデータを回収し、バリデーションが適切に実施されたかを確認した。

## C. 結果

### C-1. 国際的な専門家との意見交換

#### C-1-1. 第3回対面会議

国際バリデーション研究における第3回対面会議には、免疫毒性およびその試験法に関する専門家として、海外から Dr. Emanuel Corsini (Milan Univ.)、Dr. Erwin L. Roggen (3Rs Management and Consulting ApS) および Dr. Dori Germolec (NTP/NIEHS) を、国内からは、日本免疫毒性学会の推薦者である井上智彰博士(中外製薬)を外部専門家として招聘し、研究班の班員を含む表1に示すメンバーにて2日間掛けて、MITA バリデーション結果の確認、判別式の選択を含む試験法プロトコルの改訂などについて討論した。実験の結果、実験開始前に定めた判別式では施設間再現性を満たせないことが判明し、新たな判別式の設定について議論した。会議中、よい判別式を見出せず、継続審議となり、被験物質名も開示できなかった。会議の議事概要を添付文書1に示す。

#### C-1-2. 電話会議

平成30年3月30日に開催された電話会議では、代表研究者の相場より、統計学的な処理とともに、閾値を設けた新判定基準が明示された。この基準に従えば、施設内および施設間再現性は80%という事前の設定基準を満たすと説明された。本提案に国内外のメンバーが同意し、実験の終了が同意された。

以上の議論の末、本バリデーション研究は適切に実施されたことを確認できた。さらに、新判別基準を含むプロトコルの改訂にも合意が得られた。会議で合意された提案事項を添付文書2に示す。

平成30年4月10日は開示された被験物質情報をもとに予測性の議論を行った。ヒトおよび動物実験の免疫毒性結果を明確にする必要が確認されたが、予測性に関する議論は進まなかった。添付文書3に示す。

### C-2. バリデーション研究の支援

#### C-2-1. バリデーション被験物質の送付

Phase II にて、施設間再現性を求めるために実行委員会で選ばれた25物質のうち、バランスと入手しやすさを考慮して20物質を再選定し、コード化してリード施設を含む参加4施設に送付した。実験の終了まで、被験物質に関するトラブルは生じなかった。平成30年3月30日に開催された電話会議にて、実験の終了に合意が得られたことから、Phase I およびPhase IIのコード番号が3月末に開示された。表2および表3にそれぞれのPhaseの被験物質名およびコード番号を示す。

#### C-2-2. バリデーション結果の記録確認

Phase II 終了後に回収した記録用紙の一覧を表4に示した。施設によって一部不備はあったが、GLP (Good Laboratory Procedure) の精神に則り、適切に実験が実施され、その記録が残されていることを確認した。

## D. 考察

*in vitro*免疫毒性評価試験法(MITA)の一つであるIL-2アッセイの施設内および施設間再現性の確認を目的としたバリデーション研究が施行され、その目的を達した。ただし、その予測性については、バリデーションに用いた物質のヒトや動物における免疫毒性が明確ではなく、正確に求められていない。バリデーション報告書の完成に向けての継続審議となっている。

## E. 結論

相場らにより、新たに開発されたMITAの一つで

あるIL-2レポーターアッセイの公定化を目指すため、国際的なバリデーション研究が施行された。このバリデーションの客観性を確保するため、被験物質のコード化および配布、実験記録の回収および確認を担当し、適切な実験が実施されていることを確認でき、分担研究者としての役割を遂行できた。

#### F. 添付文書

- 1) Minutes of MITA at 3rd meeting on November 18 & 19, 2017
- 2) Teleconference summary on March 30<sup>th</sup>, 2018
- 3) Minutes MITA validation study on April 10<sup>th</sup>, 2018

表1 . MITA第3回国際バリデーション対面会議の主な参加者リスト

No.	Name	Affiliation	Country
1	Emanuela Corsini	Universit.AN` degli Studi di Milano	Italy
2	Erwin L. Roggen	3Rs Management and Consulting ApS	Denmark
3	Dori Germolec	NIH/NIEHS	USA
4	Tomoaki Inoue	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	Japan
5	Setsuya Aiba	Tohoku University Graduate School of Medicine	Japan
6	Yutaka Kimura	Tohoku University Graduate School of Medicine	Japan
7	YoshihiroNakajima	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Japan
8	Rie Yasuno	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Japan
9	Kohji Yamakage	Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute	Japan
10	Takashi Omori	Kobe University	Japan
11	Hajime Kojima	JaCVAM, National Institute of Health Sciences	Japan
12	Takao Ashikaga	JaCVAM, National Institute of Health Sciences	Japan
13	Steven Venti	Translator	Japan

表 2 . Phase I 被験物質とコード番号

No.	Chemical	CASRN	State	LabA	LabB	LabC	LabD
				TOHOKU univ.	AIST- TSUKUBA	FDSC	AIST- SHIKOKU
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	Liquid ( L )	MIA003A	MIB014A	MIC027A	MID036A
				MIA004B	MIB017B	MIC026B	MID033B
				MIA007C	MIB016C	MIC023C	MID034C
2	Hydrocortisone (for Cell Culture)	50-23-7	Solid ( S )	MIA005A	MIB017A	MIC029A	MID038A
				MIA007B	MIB019B	MIC028B	MID035B
				MIA009C	MIB018C	MIC025C	MID037C
3	Lead(II) acetate trihydrate ( <b>Deleterious substances</b> )	6080-56- 4	S	MIA007A	MIB018A	MIC021A	MID310A
				MIA008B	MIB011B	MIC210B	MID037B
				MIA001C	MIB110C	MIC027C	MID038C
4	Zinc dimethyl- dithiocarbamate (DMDTC)	137-30-4	S	MIA009A	MIB110A	MIC023A	MID037A
				MIA010B	MIB013B	MIC027B	MID039B
				MIA003C	MIB017C	MIC029C	MID310C
5	Nickel ( II) sulfate hexahydrate	10101-9 7-0	s	MIA001A	MIB012A	MIC025A	MID034A
				MIA002B	MIB015B	MIC024B	MID031B
				MIA005C	MIB014C	MIC021C	MID032C

表 3 . Phase II 被験物質とコード番号

No.	Chemical	CASRN	State	LabA	LabB	LabC	LabD
				TOHOKU univ.	AIST- TSUKUBA	FDSC	AIST- SHIKOKU
1	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	Solid ( S )	MIA401	MIB515	MIC618	MID702
2	Benzo(a)pyrene	50-32-8	S	MIA413	MIB516	MIC601	MID703
3	Cadmium chloride	10108-64-2	S	MIA403	MIB502	MIC602	MID714
4	Dibromoacetic acid	631-64-1	S	MIA406	MIB518	MIC610	MID720
5	Diethylstilbestol	56-53-1	S	MIA420	MIB509	MIC611	MID711
6	Diphenylhydantoin	630-93-3	S	MIA412	MIB510	MIC615	MID704
7	Ethylene dibromide	106-93-4	Liquid ( L )	MIA407	MIB507	MIC605	MID705
8	Glycidol	556-52-5	L	MIA408	MIB505	MIC607	MID712
9	Indomethacin	53-86-1	S	MIA409	MIB508	MIC609	MID715
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	S	MIA411	MIB517	MIC612	MID707
11	Nitrobenzene	98-95-3	L	MIA402	MIB519	MIC603	MID701
12	Urethane, Ethyl carbamate	51-79-6	S	MIA415	MIB520	MIC604	MID719
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	L	MIA404	MIB506	MIC613	MID713
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	S	MIA414	MIB514	MIC614	MID718
15	Dichloroacetic acid	79-43-6	L	MIA416	MIB511	MIC606	MID716
16	Toluene	108-88-3	L	MIA417	MIB512	MIC616	MID706
17	Acetonitril	75-05-8	L	MIA405	MIB501	MIC617	MID708
18	Mannitol	69-65-8	S	MIA418	MIB503	MIC619	MID717
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	S	MIA419	MIB504	MIC608	MID709
20	o-Benzyl-p-chorolophenol	120-32-1	S	MIA410	MIB513	MIC620	MID710

表4 . 記録用紙の確認一覧

項目	LabB (AIST, Tsukuba)	LabC (FDSC)	LabD (AIST, Shikoku)
Weighing records		○	○
Cell culture records	○ 3sets 2017.05.02 2017.05.19 2017.06.12	○ 3sets 2017.05.29 2017.07.03 2017.07.31	○ 3sets 2017.05.08 2017.06.06 2017.07.03
Solubility check records	○ per each samples	○ per each tests	○ per each samples
1 Test date	2017.5.19.	2017.06.30	2017.05.22
Test samples No. (repeat No.)	1-5(1)	6,4,6,7(1)	2,7,8,12(1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
2 Test date	2017.5.31	2017.07.06	2017.05.23
Test samples No.	1,3-5(2),2(re1)	4,6,7(2)	14,16,17,19,20,01(1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
3 Test date	2017.6.8	2017.07.07	2017.05.29
Test samples No.	1,3-5(3),2(2)	4,6,7(3)	3,4,10,11(1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
4 Test date	2017.6.12	2017.07.13	2017.05.30
Test samples No.	2(3),9(re1)	1,3,5,8(1)	5,6,9,13,15,18(1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
5 Test date	2017.6.5	2017.07.14	2017.06.12
Test samples No.	6-10(1)	1,3,5,8(2),9,10(1)	5,6,9,13,15,18(re1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
6 Test date	2017.6.6	2017.07.18	2017.06.19
Test samples No.	8(re1),7-10(2)	1,3,5,8(3),9,10(2)	3,4,10,11(re1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
7 Test date	2017.6.9	2017.07.21	2017.06.20
Test samples No.	6(2),7-10(3)	9,10(3),11-14(1)	2,7,8,12(2)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
8 Test date	2017.6.14	2017.07.24	2017.06.26
Test samples No.	11-15(3)	11,12,14(2),13(re1),15,18(1)	14,16,17,19,20,01(re1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
9 Test date	2017.6.21	2017.07.27	2017.06.27
Test samples No.	11-15(2)	11,12,14(3),13(2)	5,6,10,11,3,4 (2)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
10 Test date	2017.6.22	2017.07.28	2017.07.03
Test samples No.	11-15,15(3),14(re2),	2(re1),13(3),15,18(2),18,20(1)	16,17,19,20,15,18 (2)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
11 Test date	2017.6.29	2017.08.03	2017.07.04
Test samples No.	4,14(3)	15,16(3),17,19(1),18,20(2)	1,9,13,14 (2)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
12 Test date	2017.6.28	2017.08.04	2017.07.10
Test samples No.	16-20(3)	1,3(4),2(3),19(2),18,20(3)	17,19,7,3 (3)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
13 Test date	2017.7.7	2017.08.07	2017.07.11
Test samples No.	16-20(2)	2(4),17(2),19(3)	2,8,12,18,14,20 (3)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
14 Test date	2017.7.11	2017.08.08	2017.07.18
Test samples No.	16-20(3)	5,8,10(4),17(3)	1,4,5,6,10,11 (3)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
15 Test date		2017.08.14	2017.07.24
Test samples No.		11(4)	6,13,15,18(3),3,19(4)
Others records		○	○
Datasheets		○	○
16 Test date			2017.07.25
Test samples No.			10,13,14,9,4(4)
Others records			○

## G. 研究発表

### G-1) 論文発表

1. Narita K, Vo PTH, Yamamoto K, Kojima H, Itagaki H: Preventing false-negatives in the in vitro skin sensitization testing of acid anhydrides using interleukin-8 release assays, Toxicol In Vitro, 2017 Aug;42:69-75.
2. Akagi T, Nagura M, Hiura A, Kojima H, Akashi M: Construction of Three-Dimensional Dermo-Epidermal Skin Equivalents Using Cell Coating Technology and Their Utilization as Alternative Skin for Permeation Studies and Skin Irritation Tests, Tissue Eng Part A, 2017 Jun;23(11-12):481-490.
3. Arakawa H, Kamioka H, Jomura T, Koyama S, Idota Y, Yano K, Kojima H, Ogihara T: Preliminary Evaluation of Three-Dimensional Primary Human Hepatocyte Culture System for Assay of Drug-Metabolizing Enzyme-Inducing Potential. Biol Pharm Bull, 2017;40(7):967-974.
4. Ogihara T, Arakawa H, Jomura T, Idota Y, Koyama S, Yano K, Kojima H: Utility of human hepatocyte spheroids without feeder cells for evaluation of hepatotoxicity. J Toxicol Sci, 2017;42(4):499-507.
5. 小島 肇: 化粧品・医薬部外品の安全性評価のための動物実験代替法開発の現状と課題, フレグランスジャーナル, 2017-7, 12-16.
6. 諫田泰成, 中村和昭, 山崎大樹, 片岡健, 青井貴之, 中川誠人, 藤井万紀子, 阿久津英憲, 末盛博文, 浅香 勲, 中村幸夫, 小島 肇, 関野祐子, 古江 - 楠田美保: 「細胞培養における基本原則」の提案, Tiss. Cult. Res, 2017, Commun.36, 13-19.
7. 小島 肇: 医薬品食品領域での動物愛護管理法の現在と未来, NPO 動物実験関係者連絡協議会 第5回シンポジウム 報告書「動物愛護管理法」の過去・現在・未来, 2017, 15-20.
8. 小島 肇: 動物実験代替法開発の現状と今後の課題, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2017, 48 (9), 600-607.
9. 井上治久, 小島 肇, 澤田光平, 谷憲三郎, 山本恵司, 畠賢一郎: 再生医療技術を用いた創薬支援ツールの意義と展望, 再生医療, 2017, 16(3), 9-16.
10. 小島 肇: 化学物質の安全性評価に利用されるインビトロアッセイ (in vitro 試験) 法, 生物工学会誌, 2017, 95, 455-460.
11. Kojima H, Katoh M: In Vitro Skin Irritation Assay with the LabCyte EPI-MODEL, Part 1 Skin Irritation: Alternatives for Dermal Toxicity Testing, Springer, Switzerland, 2017, 73-80.
12. Kojima H, Hosoi K, Onoue S: Reactive Oxygen Species Assay for Evaluating Phototoxicity Potential, Part IV UV-Induced Effects (Phototoxicity and Photoallergy): Alternatives for Dermal Toxicity Testing, Springer, Switzerland, 2017, 477-482.
13. Kojima H: In Vitro Evaluation for Skin Toxicity, Skin Penetration and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical compounds, Springer, 2017, 297-304.
14. Kojima H: Related Topics: Safety Evaluation and Alternatives to Animal Testing for Skin Toxicity, Skin Penetration and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical compounds. Springer, 2017, 305-311.



15. Miyazaki H, Yamashita K, Uchino T, Takezawa T, Kojima H: Development of a Novel in Vitro Skin Sensitization Test Method using a Collagen Vitrigel Membrane Chamber, AATEX, 2017, 22(2), 141-154.
16. 小島 肇, 西川秋佳: 日本動物実験代替法評価センター平成 28 年度報告. AATEX-JaCVAM. 2017, 6(1), 51-55.
17. Casati S, Aschberger K, Barroso J, Casey W, Delgado I, Kim TS, Kleinstreuer N, Kojima H, Lee JK, Lowit A, Park HK, Régimbald-Krnel MJ, Strickland J, Whelan M, Yang Y, Zuang V: Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. Arch Toxicol. 2018 Feb;92(2):611-617.
18. Kojima H: New trends on alternative to animal testings in Japan. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2018;151(2):52-55.
19. Tsukumo H, Matsunari N, Yamashita K, Kojima H, Itagaki H: Lipopolysaccharide interferes with the use of the human Cell Line Activation Test to determine the allergic potential of proteins. J Pharmacol Toxicol Methods. 2018 Feb 10;92:34-42.
20. Koyama S, Arakawa H, Itoh M, Masuda N, Yano K, Kojima H, Ogihara T: Evaluation of the metabolic capability of primary human hepatocytes in three-dimensional cultures on microstructural plates. Biopharm Drug Dispos. 2018 Feb 22.
21. Daniel AB, Strickland J, Allen D, Casati S, Zuang V, Barroso J, Whelan M, Régimbald-Krnel MJ, Kojima H, Nishikawa A, Park HK, Lee JK, Kim TS, Delgado I, Rios L, Yang Y, Wang G, Kleinstreuer N: International regulatory requirements for skin sensitization testing. Regul Toxicol Pharmacol. 2018 Mar 5. pii: S0273-2300(18)30066-7.
22. Narita K, Ishii Y, Vo PTH, Nakagawa F, Ogata S, Yamashita K, Kojima H, Itagaki H.: Improvement of human cell line activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results. J Toxicol Sci. 2018;43(3):229-240
- G-2) 学会発表
1. Kojima H: The application of in vitro skin absorption test in the safety assessment of cosmetic and medical, 7th Conference of Alternative Methods (2017.4) (Guangzhou, China)
  2. 小島 肇: 試験法開発における Good Cell Culture Practice (GCCP)の重要性, 日本組織培養学会第 90 回大会 (2017.6-7) (岡山)
  3. 平松範子, 加藤義直, 佐藤淳, 谷川篤宏, 平野耕治, 堀口正之, 小島 肇, 山本直樹: 不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY1) を用いて作製した三次元角膜再構築モデルの眼刺激性試験代替法に関する研究, 日本組織培養学会第 90 回大会 (2017.6-7) (岡山)
  4. 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の動向, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム (2017.7) (東京)
  5. 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の動向, ライフサイエンス法令セミナー (第 3 回) (2017.7) (京都)
  6. Kojima H: AOPs are development by Japan in the OECD process, 2017 The 3rd International Conference on Toxicity Testing Alternative & Translational Toxicology (2017.7) (Nanjing, China)
  7. 小野 敦, 渡辺真一, 菅原経継, 若林晃次, 田原 宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 草苺 啓, 黒川嘉彦, 寒水孝司, 中山拓人, 草生 武, 河上強志, 小島幸一, 小島 肇, Jon RICHMOND, Nicole KLEINSTREUER, Bae-Hwa KIM, 山本裕介, 藤田正晴, 笠原利彦: 新規 in chemico 皮膚感作性試験 ADRA 法の多施設バリデーション試験: 第 1 報, 第 44 回 日本毒性学会学術年会 (2017.7) (横浜)
  8. 古川正敏, 伊藤浩太, 榊原隆史, 越田美,

- 奥村宗平, 立野沙香, 河村公太郎, 松浦正男, 小島肇: ウシ摘出角膜を用いる眼刺激性試験 (BCOP 試験) における PAS 染色の有用性, 第 44 回 日本毒性学会学術年会 (2017.7)(横浜)
9. Sakai Y, Kojima H: Latest activities and future directions of JSAAE for 3R, 14th Annual Meeting of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments (KSAAE) (2017.8) (Seoul, Korea)
  10. Kojima H: Revision of Judgment Criteria for Poisonous and Deleterious Substances -Utilizing knowledge of effective alternatives to animal testing-, NC3R, Toward global elimination of the acute toxicity 'six-pack' (2017.8) (Seattle, WA, USA)
  11. Kojima H, Nishikawa A: JaCVAM update, 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences (WC10) (2017.8) (Seattle, WA, USA)
  12. Sakai Y, Kojima H: Latest activities and future directions of JSAAE for Asian cooperation toward 3Rs, 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences (WC10) (2017.8) (Seattle, WA, USA)
  13. Naoki Yamamoto, Noriko Hiramatsu, Yoshinao Kato, Hajime Kojima: Development of the in vitro assay for evaluating week eye irritation 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences (WC10) (2017.8) (Seattle, WA, USA)
  14. 小島 肇: Adverse Outcome Pathway の基礎, 現状と動向, 日本保健物理学会専門研究会「低線量・低線量率リスク推定法専門研究会」, 電力中央研究所 (2017.9) (東京)
  15. Kojima H: The status of cosmetic safety regulation in Japan, 2017 China Cosmetics(Baiyun) International Summit Forum (2017.9) (Guangzhou, China)
  16. 小島 肇: 国際環境における化粧品の安全性評価の動向, 第 7 回 JC/OEM セミナー (2017.10)(東京)
  17. 小島 肇: 化粧品の国内外規制動向と安全性のリスク評価, 第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017 (2017.10)(東京)
  18. 小島 肇, 黒澤 努, 鈴木 真, 武吉正博, 諫田泰成, 竹内小苗, 佐久間めぐみ, 中村 牧, 寒水孝司: 日本動物実験代替法学会 国際交流委員会報告, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  19. 小野 敦, 渡辺真一, 菅原経継, 若林晃次, 田原 宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 草苺 啓, 黒川嘉彦, 寒水孝司, 中山拓人, 草生 武, 河上強志, 小島幸一, 小島 肇, Jon RICHMOND, Nicole KLEINSTREUER, Bae-Hwa KIM, 山本裕介, 藤田正晴, 笠原利彦: 新規 in chemico 皮膚感作性試験 ADRA 法の多施設バリデーション試験: 第 2 報, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  20. 古川正敏, 榊原隆史, 伊藤浩太, 松浦正男, 小島 肇: ウシ摘出角膜を用いる眼刺激性試験 (BCOP 試験) における病理組織学的検査を用いた弱刺激性物質判定の検討, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  21. 謝丹, 九十九英恵, 山下邦彦, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギー性を評価試する in vitro 試験法の開発, I. 偽陽性評価の原因究明, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  22. 九十九英恵, 謝丹, 山下邦彦, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギー性を評価試する in vitro 試験法の開発, II. 試薬中の LPS の影響除外に関する検討, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  23. 平松範子, 山本直樹, 加藤義直, 佐藤 淳, 磯谷澄都, 今泉和良, 谷川篤宏, 平野耕治, 堀口正之, 小島 肇: 不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY1) を用いて作製した三次元角膜構築モデルの眼刺激性試験代替法に関する研究, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  24. 小島 肇, 森 梓, 小林真弓, 篠田伸介, 萩原沙織, 山本裕介, 笠原利彦, 山口典子, 佐藤亮佑, 福田隆之, アミシアレク サンドラワタル, 加藤雅一, 真下奈々, 大森崇: LabCyteEPI-Model24 皮膚腐食性試験バリデーション研究, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11)(東京)
  25. 藤田 正晴, 山本 裕介, 渡辺 真一, 菅原 経継, 若林 晃次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一, 草苺 啓, 黒川 嘉彦, 河上 強志, 小島 幸一, 小島 肇, 小野 敦,

- 笠原 利彦：新規 in chemico 皮膚感作性試験 ADRA 法に使用する Cys 誘導体試験薬 (NAC)の酸化原因および防止策の検討, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
26. 木村 裕, 安野理恵, 渡辺美香, 小林美和子, 岩城友子, 藤村千恵, 近江谷克裕, 山影康次, 中島芳浩, 小林眞弓, 大森 崇, 小島 肇, 相場節也: Multi-immuno Tox Assay (MITA): データセットの作成およびバリデーション研究の結果, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
27. 木村 裕, 渡辺美香, 鈴木紀之, 岩城友子, 山影康次, 斎藤幸一, 藤村千鶴, 近江谷克裕, 中島芳浩, 大森 崇, 小島 肇, 相場節也: DMSO を用いない in vitro 感作性試験, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
28. 成田和人, 石井悠貴, 小島 肇, 板垣宏: 皮膚感作性試験 h-CLAT の偽陰性評価改善に関する検討 (第二報), 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
29. 洪水麻衣, 三田地隆史, 目崎美紀, 丸山諒, 小島 肇, 板垣 宏: in vitro 皮膚感作性試験における NLRP3 インフラマソームの影響, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
30. 三田地隆史, 目崎美紀, 洪水麻衣, 丸山諒, 小島 肇, 板垣 宏: in vitro 皮膚感作性試験 h - CLAT における CD86, CD54 の発現変動の検討, 日本動物実験代替法学会第 30 回大会 (2017.11) (東京)
31. 小島 肇: 動物実験における代替法の重要性, 産総研 平成 29 年度 動物実験に関する教育訓練講演 (2017.12) (つくば)
32. 小島 肇: OECD における試験法標準化のための戦略, 口頭, 第 3 回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム「レギュラトリーサイエンス研究のグローバル展開」(2018.2) (東京)
33. Kojima H, Furukawa M, Itoh K, Sakakibara T, Matsuura M: An Approach for Assessing Mild Irritants with the Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, 57th Annual meeting of Society of Toxicology (2018.3) (San Antonio, USA)
34. Ono A, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Richmond J, Kleinstreuer N, Bae-Hwa K, Yamamoto Y, Fujita M, Kasahara T: A Multi-Centre Validation Study of Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): A Novel In Chemico Alternative Test Method for Skin Sensitization, 57th Annual meeting of Society of Toxicology, (2018.3) (San Antonio, USA)
35. 村上將登, 赤木隆美, 小島 肇, 明石 満: LbL 3D Skin モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の国際標準化に向けて, 第 17 回日本再生医療学会総会 (2018.3) (横浜)

#### G. 知的所有権の取得状況

H - 1) 特許取得

特になし

H - 2) 実用新案登録

特になし

H - 3) その他

特になし

添付資料 1

**MITA**

November 18 & 19, 2017

Participants:

Corsini, E., Roggen, E., Germolec, D, Inoue, T. Aiba, S., Kimura, Y., Yamakage, K., Watanabe, M., Kobayashi Mayumi., Yasuno, R., Omori, T., Nakajima, Y., Kojima, H., Mori, A., Kobayashi Miwako, Ashikaga, T., Venti, S.

Aiba:	Presentation on validation study
Roggen:	Use the expression “up to” to avoid giving the impression that the lab should just keep conducting tests until they get a valid result.
Aiba:	I think 5 is the most we need.
Kojima:	The participating laboratories agreed on this criteria at a correlation meeting, but I failed to distribute the revised criteria. Changes made after last February’s meeting are shown in red in the protocol.
Aiba and Kobayashi:	Unfortunately, the between laboratory reproducibility was 65% with 20 coded chemicals, which did not satisfy the 80% success criteria of the Phase 2 study.
Roggen:	We should avoid using the mean of three data. According to the approved TG, we should use 2 out of 3 data points (mode).
Aiba:	We request a reanalysis from the biostatistics group.
Omori and Kobayashi:	In that case, the between laboratory reproducibility using the mode was 60%.
Aiba:	We have data for 60 chemicals that we can use to establish a cutoff value. Once we determine how we want to modify the judgment criteria, we will hold a teleconference to reach a consensus, after which we can finalize the Phase 2 study.
Kojima:	I feel the experiment is successful, and I would like to determine today whether additional testing is necessary.
Germolec:	We need to see how concordant the results are after the new criteria is determined.
Roggen:	Why is Lab C chemical 3 Exp. 3 judged S? There is no trend.
Aiba:	There is a slight trend in points 6, 7, and 8.
Germolec:	No, I don’t think you can call that a trend.
Roggen:	Comparing this with your criteria, I don’t think you can say there is a statistically significant trend here.
Germolec:	I think that chemical 4 shows a small but significant trend, but chemical 3 does not exhibit a trend.
Roggen:	You should be able to calculate a statistical significance for a trend. Usually 0.05. The point is to distinguish whether or not the changes are real or coincidental. I suggested that the definition should include “a statistically significant trend across three points or more.”
Aiba:	I think a proper cutoff value will solve this problem. Yes, we can calculate the trend, but it is difficult to discern trends in this kind of data.
Roggen:	If you calculate a SD for the negative control especially, you could establish a cutoff for deciding whether a result shows significant modulation or not.
Aiba:	That is a good point. Now, we only show the control as a red line, but if we look at the variation of the control, we will find a good cutoff value. A proper cutoff value

	will help clarify trends.
Roggen:	Yes, it helps you to see clearly whether you are inside or outside the range of ordinary variation.
Corsini:	In vivo, the dose could result in a bifurcated result that shows both suppression and augmentation.
Germolec:	We can say that such drugs “modulate” the immune system.
Aiba:	For such drugs, what happens when one lab predicts a chemical to cause suppression and two different labs reports modulation. Would that be considered concordant?
Corsini:	No, you can only say there is modulation.
Germolec:	If we can come up with a cutoff value, then I think we can agree that trends do not have to be dependent on statistically significant points.
Aiba:	(See revisions to the judgment criteria.)
Inoue:	Will the cutoff value be calculated from a specific control or from all control data?
Mori:	All of the control data will be used, but I have to think of a way to do that.
Ashikaga:	The cutoff point is not always determined statistically. Sometimes it is just someone’s idea.
Germolec:	Yes, sometimes people use an arbitrary value just to make a comparison to see how accuracy changes.
Kojima:	After a cutoff is determined, we will have a teleconference in early February, and we hope to achieve an 80% concordance. Consensus of the VMT will be an important step as we move to peer review and submission to OECD experts.
Germolec:	I think we can all agree at this time that no additional experiments are needed, but a final determination will depend on the effect of determining a cutoff value.
Kojima:	Because we have used only one cell type for this testing, the development of an AOP for immunotoxicity is necessary.
Corsini:	Yes, it would be very helpful if Dr. Aiba can come up with an AOP.
Aiba:	This is the final year of our funding from the government, so we have to plan how to move forward. I would be interested in hearing your frank opinion of the usefulness of this test method. Obviously we want to have it adopted as a test guideline. It might take another two years to complete a validation study, so I want to know if you think it is worth pursuing.
Germolec:	The more tools you have, the more accurate results you can achieve, and I think this is an excellent approach.
Corsini:	I would like to see it put together in an integrated approach for both T-cells and other cells but that might be difficult.
Germolec:	You have a lot of data for many chemicals tested by three methods, so I think you have a good basis for making your grant presentation.
Roggen:	I agree that the approach is promising and worth pursuing.

## Agenda on Telconferene on March 29<sup>th</sup>, 2018

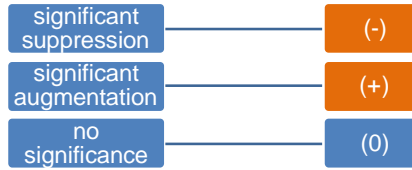
- The change in criteria of MITA
- The results of Phase I and Phase II based on the criteria 4.
- The application of the threshold of the maximum % suppression and the change of criteria from 4 to 5.
  - The distribution of the maximum % suppression values of chemicals with significant effects and those without significant effects.
  - The threshold values of the maximum % suppression
  - The distribution of the maximum % suppression values of chemicals with significant effects and those without significant effects.
  - The maximum % augmentation of DMSO
  - The threshold values of the maximum % augmentation
- The results of Phase I and Phase II studies based on the criteria 5.
- Summary

# Criteria (1)

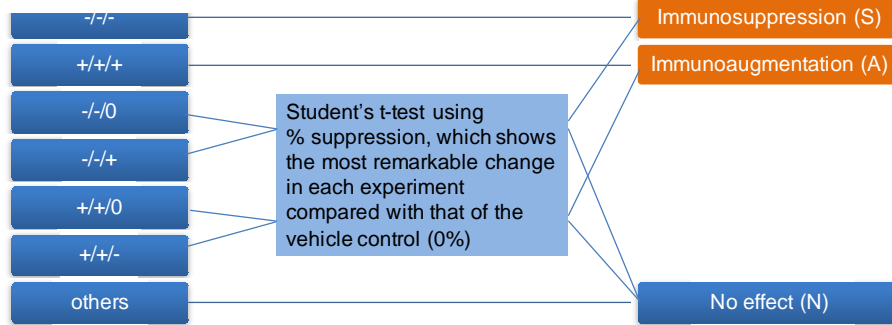
Three independent experiments for each drug.

In each experiment:

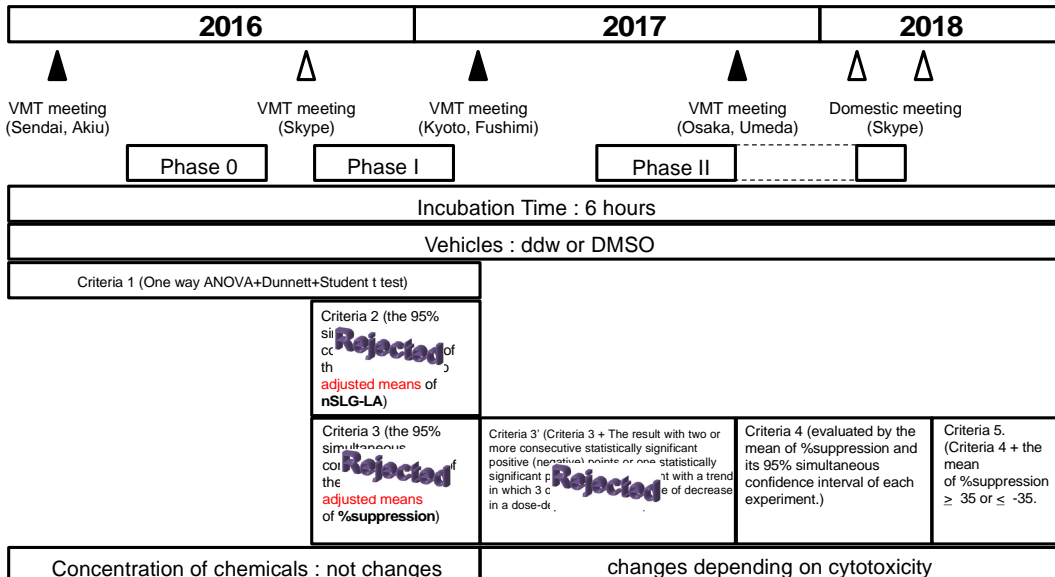
a one-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test compared with the value for stimulation without chemicals in the concentration at which I.I.-SLR-LA is greater than or equal to 0.05



Combination of result of three independent experiments



## The change in criteria of MITA



## Criteria 5

### 11-1 Acceptance criteria

The following acceptance criteria should be satisfied when using the Multi-ImmunoTox Assay method.

If Fold induction of nSLO-LA of PMA/Ionomycin wells without chemicals ( $=(\text{nSLO-LA of \#2H4 cells treated with PMA/Ionomycin}) / (\text{nSLO-LA of non-treated \#2H4 cells})$ ) demonstrate less than 3.0, the results obtained from the plate containing the control wells should be rejected.

### 11-2 Criterion

The experiments are repeated until two consistent positive (negative) results or two consistent “no effect results” are obtained. . When two consistent results are obtained, the chemicals are judged as the obtained consistent results.

Identification of immunotoxicant is evaluated by the mean of %suppression and its 95% simultaneous confidence interval.

In each experiment, when the chemicals clear the following 3 criteria, they are judged as suppressive or stimulatory. Otherwise, they are judged as no effect chemicals.

1. The mean of %suppression is  $\geq 35$  (suppressive) or  $\leq -35$  (stimulatory) with statistical significance. The statistical significance is judged by its 95% confidence interval.
2. The result shows two or more consecutive statistically significant positive (negative) data or one statistically significant positive (negative) data with a trend in which at least 3 consecutive data increase (decrease) in a dose dependent manner. In the latter case, the trend can cross 0, as long as only one data point shows the opposite effect without statistical significance.
3. The results are judged using only data obtained in the concentration at which I.I.-SLR-LA is  $\geq 0.05$



## Criteria 5 (Phase I)

Criteria5		AIST-Tsukuba	FDSC	AIST-Takamatsu
1	solubility	500mg/ml(DMS)	500mg/ml(DMS)	500mg/ml(DMS)
	1st round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	2nd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	3rd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
2	solubility	125mg/ml(DMS)	125mg/ml(DMS)	125mg/ml(DMS)
	1st round	S : SAS	S : SSS	S : NSS
	2nd round	N : NNN	S : SSS	S : SSN
	3rd round	N : NNN	S : SSN	N : NNS
3	solubility	100mg/ml(ddd)	25mg/ml(ddd)	100mg/ml(ddd)
	1st round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	2nd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	3rd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
4	solubility	100mg/ml(ddd)	100mg/ml(ddd)	100mg/ml(ddd)
	1st round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	2nd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
	3rd round	S : SSS	S : SSS	S : SSS
5	solubility	62.5mg/ml(DMS)	15.625mg/ml(DMS)	62.5mg/ml(DMS)
	1st round	N : NNN	N : NNN	N : NNA
	2nd round	N : NNN	S : SSN	N : NNN
	3rd round	N : NSN	N : NNN	N : NNN
Within		80%	80%	80%
Between		80%		

## Summary

- Various criteria have been proposed. Finally, based on the comparison with other in vitro tests, we added the threshold to determine suppression or augmentation.
- Based on the data set made by the lead laboratory, the following condition was added to the criteria. The mean of %suppression is  $\geq 35$  (suppressive) or  $\leq -35$  (stimulatory) with statistical significance. The statistical significance is judged by its 95% confidence interval.
- According to Criteria 5, the within and between laboratory reproducibility of the Phase I study were 80% and the between laboratory reproducibility of the Phase II study was 80%.

**Minutes**  
**MITA validation study**

A call of validated data discussion for the MITA validation management team was held on April 10, 2018.

**Participating:**

- Setsuya Aiba; Tohoku Univ.
- Yutaka Kimura; Tohoku Univ.
- Tomoaki Inoe, Chugai pharm.
- Emanuela Corsini, Mila Univ.
- Dori Germolec, NIEHS
- Hajime Kojima; JaCVAM
- Takao Ashikaga; JaCVAM
- Takashi Omori; Kobe Univ.

1. Opening: Dr. Aiba introduced the validated results and found good reliability in the IL-2 validation study. However, predictive capacity is not calculated, and false chemicals are not fixed, because the information of tested chemical on immunotoxicity is insufficient.

2. Discussion: Emanuel talked about several options that can explain false positive/false negative, including:

- **chemical not targeting T cells (i.e. nitrobenzene);**
- **animals vs humans (i.e. no human data available for 2,4-diaminotoluene, or at least I could not find, clearly immunosuppressive in animals);**
- **lack metabolic activation (i.e. 2,4-diaminotoluene, ethylene dibromide. Even if benzopyrene was correctly identified);**
- **true false negative (i.e. cadmium) in the assay**
- **there are evidences of T cell toxicity for dichloroacetic acid and immunotoxicity in humans, thus it should not be considered a negative compound**
- **benzyl-chlorophenol is a possible sensitizer, I could not find data on its immunotoxicity or lack of immunotoxicity.**
- **finally, chemical identity and water stability**

Tomoaki mentioned data on unusual clinical T cell activity should be referred.

Dori promised to summarize the systemic review of the chemicals used the validation study with her colleagues.

We have to collect the database on in vivo and human data of the chemicals to obtain predictive capacity.

3. Next Steps:

- a. We continue to discuss evidences of immunotoxicants for predictive capacity.
- b. Hajime expects Dr. Alba's team will make a draft validation report in three months. Based on this draft report, he hopes to do more discussion in the next F2F meeting, August.
- c. Hajime proposed the next F2F meeting in the 20<sup>th</sup> week of August. However, Dori is not acceptable. She will propose the fine schedule soon.
- d. In the F2F meeting, all the members will check the new protocol for the IL-8 antagonist assay and select candidate chemicals for the validation study.