

(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)  
(総合) 研究報告書

免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox 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教授

## 研究要旨

### 1) modified Multi-ImmunoTox assay (mMITA)の構築とそれを用いた免疫毒性物質の clustering:

平成 27 年度は、Multi-ImmunoTox assay (MITA)を用いて更に data set の拡充をはかり合計で 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いだし、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が明らかとなった。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 (mMITA)を構築した。そこで平成 29 年度までに、免疫抑制剤、免疫毒性が明らかな化学物質を含む 60 種類の化学物質を Multi-ImmunoTox assay (MITA)を用いて評価し、MITA の data set を構築した。その中で、PMA/I $\alpha$  刺激存在下の IL-2、IFN- $\gamma$  転写活性抑制と LPS 存在下の IL-1 $\beta$ 、IL-8 転写活性抑制のみを評価する従来の MITA に加えて、皮膚感作性試験である IL-8 Luc assay を組み合わせることで化学物質の免疫毒性がより正確に評価できることを見いだした。具体的には、化学物質の IL-2、IL-8 転写活性を抑制する最低濃度 (Lowest observed effect level ; LOEL)および IL-8 Luc assay の結果を組み合わせることで MITA により免疫毒性化学物質が 6 種類のクラスターに分類できることを明らかにした。それらの Cluster は以下の様な特徴を有していた。Cluster 1; IL-8 転写活性のみ抑制物質、Cluster 2: IL-2 転写活性抑制、感作性物質、Cluster 3: 感作性物質、Cluster 4: 陰性物質、Cluster 5: IL-2、IL-8 転写活性抑制物質、Cluster 6: IL-2 転写活性のみ抑制物質 2) OECD テストガイドライン化に向けての IL-2 転写活性抑制評価試験の国際バリデーション Phase 1, Phase 2 を行った。

### 2) AOP の作成 :

平成 27 年度から 28 年度にかけて、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- $\kappa$ B 抑制、AG-018986 の p38 MAPK 抑制、メチル水銀(CH<sub>3</sub>HgCl)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。IL-2 転写活性抑制と IL-8 転写活性抑制の 2 つを key event とする AOP を作成した。

### 3) IL-2 レポーター活性抑制物質評価法の国際 validation

平成 28 年 9 月 13 日に国内外から免疫毒性の専門家を交えた免疫毒性評価系国際化へ向けての kick-off meeting を仙台にて開催し、MITA の科学的意義、作成した AOP の改良、試験法プロトコルの妥当性などについて議論した。その後、まず IL-2 レポーター活性抑制物質評価にかかわる技術移転性確認を目的とした 3 施設での施設間差比較試験(Phase 0)を実施した。平成 28 年度後半に行った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。平成 29 年 2 月 3-5 日、京都にて開催された第 2 回国際バリデーション実行委員会会議にて Phase 1 の結果が了承され、Phase II 試験を実施した。Phase II の結果は、平成 29 年 11 月 18-19 日、大阪にて開催された第 3 回国際バリデーション実行委員会会議および平成 30 年 3 月 29 日に Skype にて行われた国際バリデーション実行委員会会議にて検討された。その間、統計解析手法の改良も行われ、最終的に Phase I、II のいずれの結果も施設間再現性、施設内再現性が study plan に記載された基準 80% を上まわった。

4) 皮膚感作性試験法 IL-8 Luc assay が OECD テストガイドライン(442E) に承認された。

**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・安全性予測評価部・第二室長

近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究部門長

山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所・研究開発部・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・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法は、極めて多岐にわたる免疫反応に及ぼす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岐にわたる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-、IL-2、G3PDHプロモーター活性、THP-1細胞におけるIL-8、IL-1、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多項目評価システム(Multi-ImmunoTox assay; MITA)を構築し国内外の特許を取得している。MITAを用いるとヒトT細胞におけるIL-2とIFN-、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1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、化学物質免疫毒性評価における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。

そこで平成27年度以降は、合計60化学物質からなるdata setを作成した。また、MITAによる化学物質の免疫毒性を評価するなかで、MITAのみよる分類では、免疫抑制物質中に感作性物質が含まれてしまうことが明らかとなり皮膚感作性試験法 IL-8 Luc assayとMITAを組み合わせたmodified MITAを構築し、IL-8 Luc assayの評価結果もdata setに追加した。また、そのdata setを基に化学物質のclusteringを行い、化学物質が免疫毒性のprofileの違いにより6つのグループに分類できることを示した。さらに、研究期間中にIL-8 Luc assayをOECDテストガイドライン化することができた。一方、MITAのIL-2転写活性抑制物質評価系に関しては、現在までに国際validation phase 1 and 2が終了している。

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) MITAの最適化とdata setの構築
- 2) MITAのパラメーターをkey eventとするAOPの作成
- 3) 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
- 4) MITAのテストガイドライン化

2015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

2016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-ImmunoTox 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

IL-8 Luc assayのOECDテストガイドライン化

2017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（研究代表ならびに分担者（木村）

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 2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  
IL-8 Luc assayのOECDテストガイドライン化

## 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, Amphotericin B, Benzethonium chloride, Chlorpromazine, Cisplatin, Dibenz[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- $\gamma$ , 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 $\beta$ , IL-8, GAPDHプロモーターアッセイ(図2)

IL-2およびIFN- $\gamma$ 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SLGルシフェラーゼ遺伝子(緑色に発色) IFN- $\gamma$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $2 \times 10^5$ 個の#2H4細胞または1ウェル当たり $5 \times 10^4$ 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%CO<sub>2</sub>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 $\mu$ 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%CO<sub>2</sub>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。

$$\% \text{ suppression} = (1 - \text{薬物存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA} / \text{薬物非存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA}) \times 100$$

## MITAによる免疫毒性評価法

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3)。

## 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-ImmunoTox 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-ImmunoTox 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。

## Phase 2 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した20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-ImmunoTox Assay protocol Ver.009.1E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。

## 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。(参加者：小島肇、S.Venti、相場節也、木村裕、大森崇、小林眞弓、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)

平成29年度第3回：2017年11月18-19日、大阪にて第3回国際バリデーション実行委員会会議を行った。(参加者：小島肇、足利太可雄、S.Venti、相場節也、木村裕、大森崇、小林眞弓、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)

平成29年度第4回：2018年3月29日20：00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、足利太可雄、相場節也、木村裕、Emanuela Corsini、Erwin L. Roggen、Dori Germolec、Tomoaki Inoue)

### (倫理面への配慮)

健康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の最適化とdata setの構築ならびに免疫毒性化学物質のClustering

#### 1) MITA data setの構築 (Table 1)

これまでに作成されていた MITA data set の不確定な部分を補い、更に WHO から提出された Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals の Case-Studies にて検討されている化学物質、喘息などのアレルギー疾患との関与が想定されている diesel exhaust particles (DEP)、ホルマリン (FA)、dibutyl phthalate を加えた 60 化学物質からなる data set を作成した。その際に、それぞれの化学物質の IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-8 の転写抑制活性に作用を及ぼす最低濃度 (Lowest observed effect level; LOEL) を決定した。WHO Guidance の Case-Studies に含まれる化学物質に関しては、MITA は鉛の免疫抑制、水銀による IFN- $\gamma$  レポーター活性増強作用を、また DEP、FA の Th1 サイトカインである IL-2 レポーター活性抑制作用を検出できた。

#### 2) MITA の問題点

MITA data set (Table 1) から明らかな様に、MITA では  $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、isophorone diisocyanate などの感作性物質が IL-8 レポーター活性抑制作用を示し、Dex、hydrocortisone あるいは FR167653 (p38 mitogen activated kinase (MAPK) 阻害剤) などの免疫抑制剤との区別できない。そこで MITA を有効に活用するためには、感作性物質評価系との組み合わせが不可欠である。

#### 3) Modified MITA の構築 (Table 2)

そこで従来の MITA に、すでに OECD テストガイドライン(442E)に承認されている IL-8 Luc assay を組み合わせることとした (Table 1)。さらに、Table 1 を IL-8 レポーター活性抑制 LOEL 順に並べ替えると (Table 2)、IL-8 レポーター活性抑制と IL-8 Luc assay の結果とは相関がないことが明らかとなった。しかし、IL-8 Luc assay を加えることにより、IL-8 レポーター活性抑制を示す Dex、hydrocortisone、FR167653 などの免疫抑制物質と感作性物質との識別が可能となった。

#### 4) IL-1、IL-8 レポーター活性 LOEL の相関

次に、Table 2 を基にして、化学物質の IL-1、IL-8 レポーター活性に対する LOEL 値の相関を

検討した。図4に示す様に、両者の間には統計的に極めて有為な相関が認められた ( $R^2=0.8481$ )。しかし、いずれも IL-2 の LOEL との相関は認められなかった。

#### 5) IL-2、IFN- レポーター活性LOELの相関

次に、Table 1をIL-2レポーター活性抑制LOEL順に並べ替え(Table 3)、更にそれを基に化学物質のIL-2、IFN- レポーター活性に対するLOEL値の相関を検討した。具体的には、IL-2、IFN- レポーター活性に対する判定が異なる化学物質を除き相関を調べると、図4に示す様に、両者の間には統計的に極めて有為な相関が認められた ( $R^2=0.7363$ )。

#### 6)MITAによる免疫毒性化学物質のclustering

次に、化学物質をIL-2とIL-8の転写抑制活性に作用を及ぼすLOELをもとに6つのグループ(4群LOEL<0.1 µg/ml、3群LOEL<1.0 µg/ml、2群LOEL<10 µg/ml、1群LOEL<1000 µg/ml、0群LOWEL無し、-1群増強)に、またIL-8 Luc assayによる判定結果により2つのグループ(1群感作性あり、2群感作性無し)に分類しheat mapを作成した (Table 4 と Table 5)。それらをもとにまずhierarchical clusteringを施行したところ、化学物質が最大6つのクラスターに分けられることが明らかになった (図5)。次いで K-means clusteringを行ったところ(図6)、cubic clustering criterion 1.74、silhouette score 0.450で6つのクラスターに分類できた。興味深いことに、いずれのclustering方法でも60種類の化学物質がほぼ同様に含まれる6個のクラスターに分類され、それぞれのクラスターは以下の特徴を有していた：Cluster 1: IL-8転写活性のみ抑制物質、Cluster 2: IL-2転写活性抑制、感作性物質、Cluster 3: 感作性物質、Cluster 4: 陰性物質、Cluster 5: IL-2、IL-8転写活性抑制物質、Cluster 6: IL-2転写活性のみ抑制物質 (図7)。

### 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- $\gamma$ 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 $\beta$ 2、IL-4R $\alpha$ 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。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、570 の化学物質に関して Appendix Table 1 を作成した。さらに Appendix Table 1 をもとに、IL-2 転写活性抑制 (図8)ならびに増強(図9)を key event とした T細胞分化異常誘導の AOP を充実させた。

#### 2) IL-8 転写活性抑制を key event とした化学物質気道刺激性の AOP 作成

IL-8 Luc assay が、感作性物質のみではなく DEP、ホルマリン、PM2.5、界面活性剤さらには微生物由来毒素などにも幅広く反応することを利用し、IL-8 転写活性亢進作用を中心とした気道刺激性 AOP を作成した(図10)。特に、PM2.5 や黄砂のように大気中の化学物質のみならず微生物毒素などもその表面に吸着されている可能性がある物質の評価には有用性が期待できる。しかしこの AOP も IL-2 転写活性抑制を中心とした免疫毒性 AOP と同様に個々の化学物質による IL-8 転写活性、分泌亢進がどのようにして気道過敏に繋がるのかはまだ明らかになっていない。

IL-2転写活性抑制を指標としたT細胞分化異常誘導化学物質評価系のvalidation試験

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

#### 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-ImmunoTox 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。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。

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>3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。
- ・ 新しいクライテリア(クライテリア2、3)
- ・ として、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従来のクライテリア(クライテリア1)と並存させることとした。(図11, 12)

#### 2) Phase 1 study (Appendix 1)

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-ImmunoTox 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。

クライテリア1では施設内再現性が93%、施設間再現性が80%、クライテリア2では施設内再現性が80%、施設間再現性が80%、クライテリア3では施設内再現性が73%、施設間再現性が80%であった。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study planの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。しかし、判定において濃度依存性を考慮すべきとの意見を踏まえクライテリア3を下記のように改訂しPhase II試験において使用することとした。

「%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Immuno-suppression, 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Immuno-augmentationと判定する。それ以外の結果をNo effectとする。」(クライテリア3') (図13)

#### 3) Phase 2 study (Appendix 2)

国際バリデーション実行委員会にて選定した20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-ImmunoTox Assay protocol Ver.009.1Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行い施設間再現性を評価した。

結果はクライテリア3'で施設間再現性が65%(13/20)であり、再度クライテリアについて再検討し、各々のアッセイにおいて%suppressionをベースとし95%信頼区間を表記したグラフを用い図14に示すようなクライテリア(クライテリア4)を設定し再評価したところ施設間再現性が65%(13/20)であった。そこで東北大学で作成されたMITA data setの各化学物質における%suppressionの最大値、最小値を参考とし%suppressionの閾値を±35%と設定したクライテリア(クライテリア5、図15)を設定し再評価したところ施設間再現性が80%(16/20)であった。(Table 6)またクライテリア5を用いPhase Iの結果を再評価したところ施設間再現性、施設内再現性ともに80%(4/5)で(Table 7)Phase II



の結果とともにstudy planに記載された基準を満たした。2018年3月29日に開催されたスカイプ会議でクライテリア5は国際バリデーション実行委員に承認された。

Phase 1, IIの結果についてリードラボである東北大学の結果との一致率を検討したところそれぞれ80%、95%(Based on Majority)であった。(Table 6, 7)

#### IL-8 Luc assayのOECDテストガイドライン化

MITAを構成するIL-8 Luc assayに関しては、2015年10月15、16日(パリOECD本部)、2016年11月2、3日(パリOECD本部)、2016年12月12日(電話会議)、2017年3月3日(電話会議)に開催されたMeeting of the Expert Group on Skin Sensitisationに参加し、IL-8 Luc assayの性能、validation studyの結果等を説明し、2017年10月にOECD テストガイドライン 442Eとして承認された。

#### D. 考察

本年度、これまで継続して開発してきたMITAを構成する細胞であるTHP-G8細胞を用いた皮膚感作性試験法がOECD test guidelineに承認された。細胞を用いる感作性試験は、IL-8 Luc assay以外にもh-CLATやU-SENSが存在するが、IL-8 Luc assayのみがflow cytometryを用いず、luciferase assayにより感作性の有無を判定する。Luciferase assayはflow cytometryに比較して測定を自動化することが容易で、実際にIL-8 Luc assayも細胞に化学物質を添加した後は、完全に自動化されている。また、細胞と化学物質との反応時間も短く、さらに本試験を開始する前に必要となる細胞毒性濃度を決定するプロセスも不要である。したがって、IL-8 Luc assayはもっともhigh throughput assayに適した試験法で、今後の活用が期待される。

また、今年度は、MITAとIL-8 Luc assayを組み合わせたmMITAを構築した。MITA、IL-8 Luc assayいずれも反応時間が短く、さらにluciferase assayを用いる評価系であり、mMITAもhigh throughput assayに適している。したがって、現在、社会に存在する数万ともよばれる化学物質の免疫毒性を評価するには最適の評価系である。

一方、本年度、mMITAにより化学物質が6つのクラスターに分類できることを明らかにした。複雑な免疫反応を考えると、免疫毒性が幾つのパラメータで正しく分類できるかは今後の課題であるが、化学物質の免疫毒性評価の方向性を示せた結果と考えている。

IL-2レポーター活性抑制物質評価系のvalidationを行い、Phase 1、Phase 2を終了した。また、評価委員から最終コメントを頂いていないが、少なくとも施設内、施設間再現性に関しては、不足のない結果であった。

AOPに関しては、IL-2転写活性抑制、IL-8 転写活性亢進のそれぞれをkey eventとしたT細胞分化異常誘導および気道刺激性に関するAOPを作成したが、今後はmMITAをtest guideline化する際に必要となる、多項目免疫毒性評価に対応したAOPの作成が課題である。

#### E. 結論

MITAにより60種類の化学物質を評価しdatasetを構築した。また、それに基づき、化学物質が6種類の異なった免疫毒性プロフィールを有するclusterに分類できることを明らかにした。

MITAのパラメーターであるIL-2転写活性抑制、IL-8転写活性抑制をkey eventとするAOPを作成した。

の作成

IL-2転写活性抑制を指標としたT細胞分化異常誘導化学物質評価系のPhase 1およびPhase 2 validation試験を実施した。

皮膚感作性試験法IL-8 Luc assayをOECDテストガイドライン化した。

IL-2転写活性抑制をkey eventとしたT細胞分化異常誘導のAOPを作成した。

IL-2転写活性抑制、IL-8 転写活性亢進のそれぞれをkey eventとしたT細胞分化異常誘導および気道刺激性に関するAOPを作成した。

#### 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. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., Aiba, S. Profiling the immunotoxicity of

chemicals based on in vitro evaluation by a combination of the Multi-ImmunoTox assay and the IL-8 Luc assay. *Arch Toxicol* in press.

2. Aiba, S., Kimura, Y. In vitro test methods to evaluate the effects of chemicals on innate and adaptive immune responses. *Curr Opin Toxicol* 2017 5:6-12

3. Hidaka, T., Ogawa, E., Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., Aiba, S., Nakayama, K., Okuyama, R., Yamamoto, M., The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol* 2017. 18, 64-73.

4. Asano, M., Yamasaki, K., Yamauchi, T., Terui, T., Aiba, S., Epidermal iron metabolism for iron salvage. *J Dermatol Sci* 2017. 87, 101-109.

5. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Kakizaki, A., Hidaka, T., Aiba, S. Possible mechanisms of the crosstalk between Langerhans cells and regulatory T cells in extramammary Paget disease by receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand/RANK pathways. *Br J Dermatol* 2017. 176, 387-394.

6. Yamauchi, T., Yamasaki, K., Tsuchiyama, K., Koike, S., Aiba, S. A quantitative analysis of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells in human adipose tissue and efficacy of melanocytes induction. *J Dermatol Sci*, 2017. 86, 198-205.

7. Yamauchi, T., Yamasaki, K., Tsuchiyama, K., Koike, S., Aiba, S. The Potential

- of Muse Cells for Regenerative Medicine of Skin: Procedures to Reconstitute Skin with Muse Cell-Derived Keratinocytes, Fibroblasts, and Melanocytes. *J Invest Dermatol* 2017. 137, 2639-2642.
8. Fujimura, T., Kakizaki, A., Furudate, S., Kambayashi, Y., Aiba, S. Tumor-associated macrophages in skin: How to treat their heterogeneity and plasticity. *J Dermatol Sci* 2016. 83, 167-173.
  9. Tsutsumi, M., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M. Abnormal Morphology of Blood Vessels in Erythematous Skin From Atopic Dermatitis Patients. *Am J Dermatopathol* , 2016. 38, 363-364.
  10. Tsutsumi, M., Kitahata, H., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M. Numerical and comparative three-dimensional structural analysis of peripheral nerve fibres in epidermis of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2016. 174, 191-194.
  11. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Kakizaki, A., Hidaka, T., Asano, M., Aiba, S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol* 2016. 25, 397-399.
  12. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Kakizaki, A., Furudate, S., Aiba, S. RANKL expression is a useful marker for differentiation of pagetoid squamous cell carcinoma in situ from extramammary Paget disease. *J Cutan Pathol*, 2016. 43, 772-775.
  13. Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Nishikawa, R., Nishigori, C., Aiba, S. 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* 2016. 175, 979-987.
  14. Oeda, S., Hirota, M., Nishida, H., Ashikaga, T., Sasa, H., Aiba, S., Tokura, Y., Kouzuki, H. 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* 2016. 41, 129-142.
  15. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 2015. 29, 1816-1830.
  16. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol* 2015.135, 2884-2887.
  17. Kambayashi, Y., Fujimura, T., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand

- on Dermal Macrophages. J Invest Dermatol 2015.135, 2547-2550.
18. Watanabe, M., Kurai, J., Minato, S., Noma, H., Sano, H., Saito, R., Aiba, S., Oshimura, M., Hatakeyama, K., Yamasaki, A., Shimizu, E. Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan. J Med Invest 2015. 62, 145-148.
  19. Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E. Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8. Int J Environ Res Public Health, 2015. 12, 14229-14243.
  20. 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 exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. Biomed Res Int, 2015. 2015, 583293.
  21. Yu, Z., Ono, C., Aiba, S., Kikuchi, Y., Sora, I., Matsuoka, H., Tomita, H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. Glia, 2015. 63, 257-270.
- the results of validation studies. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 2) Aiba S. et al. A novel in vitro assay for sensitizers in purely aqueous system: the modified IL-8 Luc assay using X-VIVO™ 15 as a solvent. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
  - 3)木村裕他: Multi-ImmunoTox 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 (東京) 2017年11月
  - 4)相場節也他: 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 (東京) 2017年11月
  - 5)相場節也: 学会賞受賞講演 IL-8 Luc assay (OECD TG 442E)の開発 日本動物実験代替法学会 第30回大会 (東京) 2017年11月
  - 6)相場節也: 細胞表面SH基修飾を指標とした免疫感作性評価. 日本薬物動態学会第31回年会 (松本) 2016年10月13日
  - 7)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
  - 8) Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Aiba, S. An interleukin-8 reporter cell line, THP-G8, can evaluate anti-TNF- $\alpha$  neutralizing activity of patients' sera and predict drug effectiveness during anti-TNF- $\alpha$  antibody therapy. 23rd World Congress of Dermatology. Vancouver, Canada June 2015,
  - 9)相場節也: 皮膚感作性および免疫毒性の adverse outcome pathway (AOP). 日本動物実

## 2. 学会発表

- 1) Kimura Y. et al. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and

## **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

### **3. その他**

2017年10月9日IL-8 Luc assayがOECD テストガイドラインに承認された。(442E)

2017年10月12日に動物実験代替法学会賞を受賞 (IL-8 Luc assay (OECD TG442E)の開発)

図 1. 研究計画



図 2 . Multi-ImmunoTox assay (MITA)

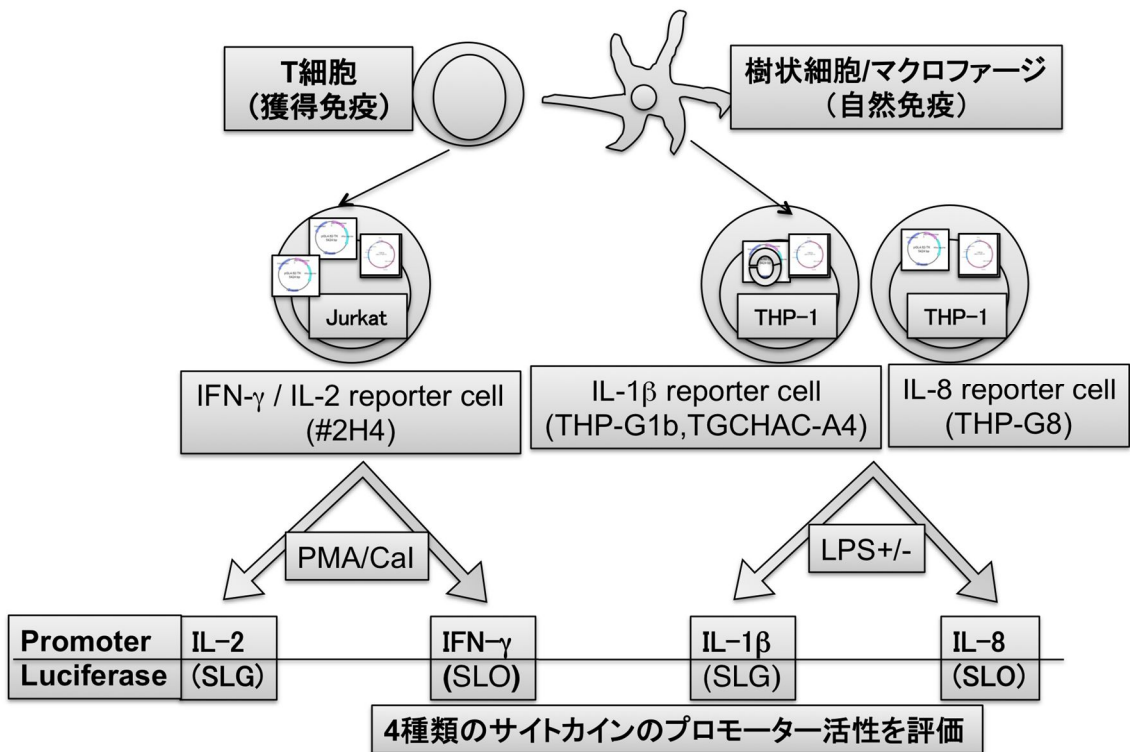


図 3 . MITA の判定基準 (Criteria 1)

### Criteria 1

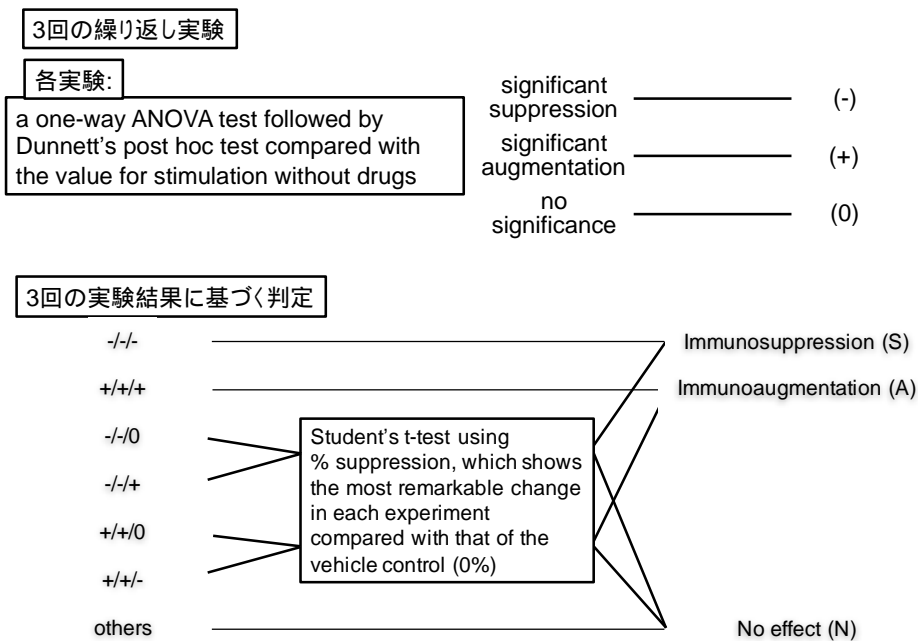


図 4. MITA パラメータの LOEL 値の相関

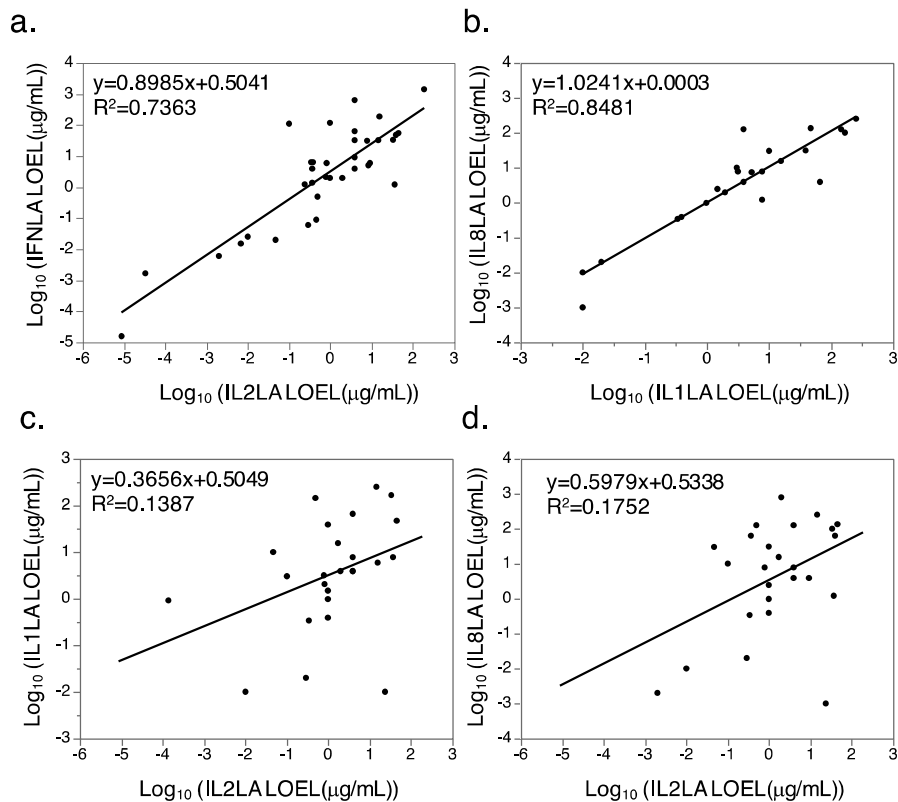


図 5. 60 化学物質の hierarchical clustering

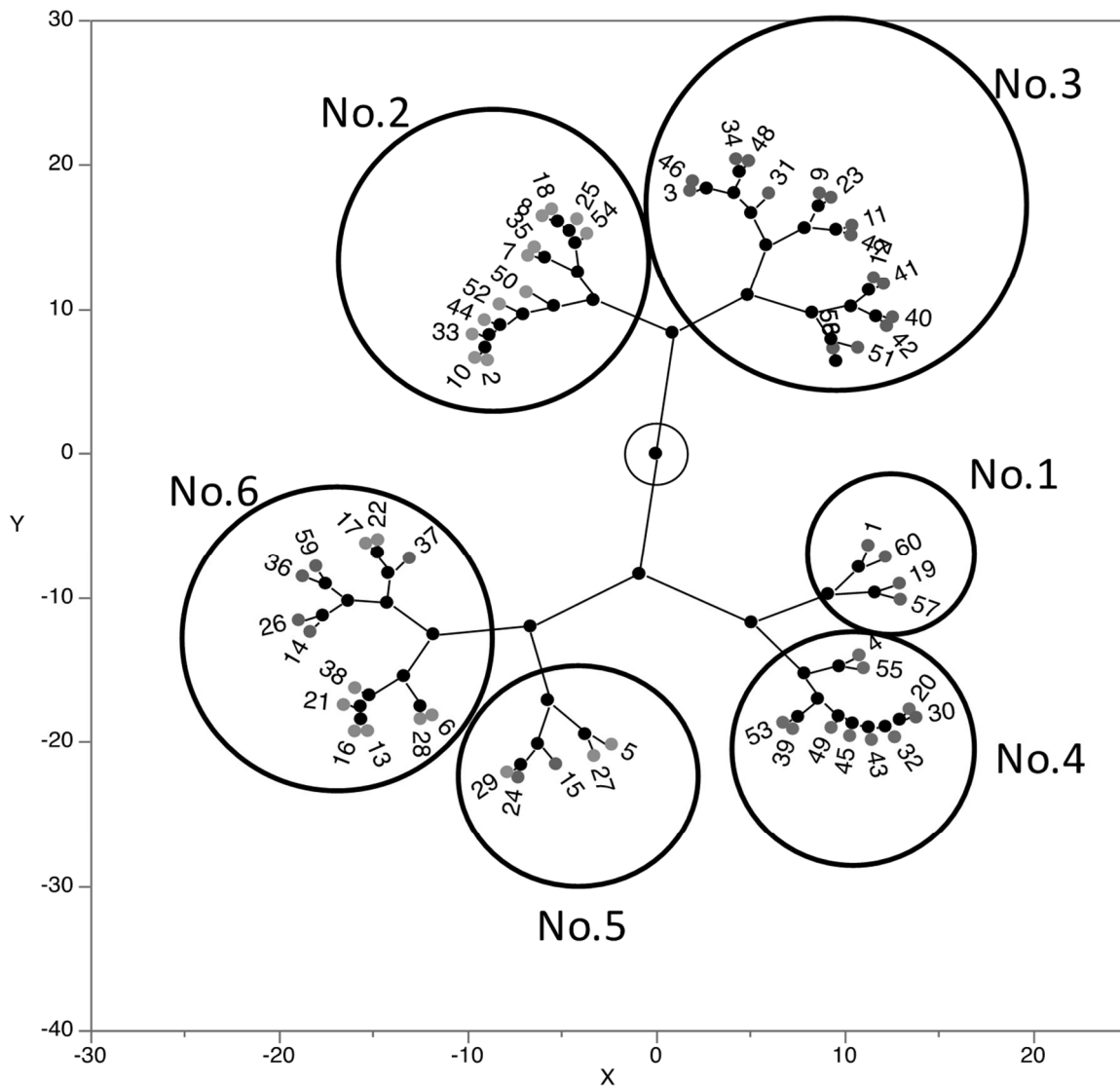
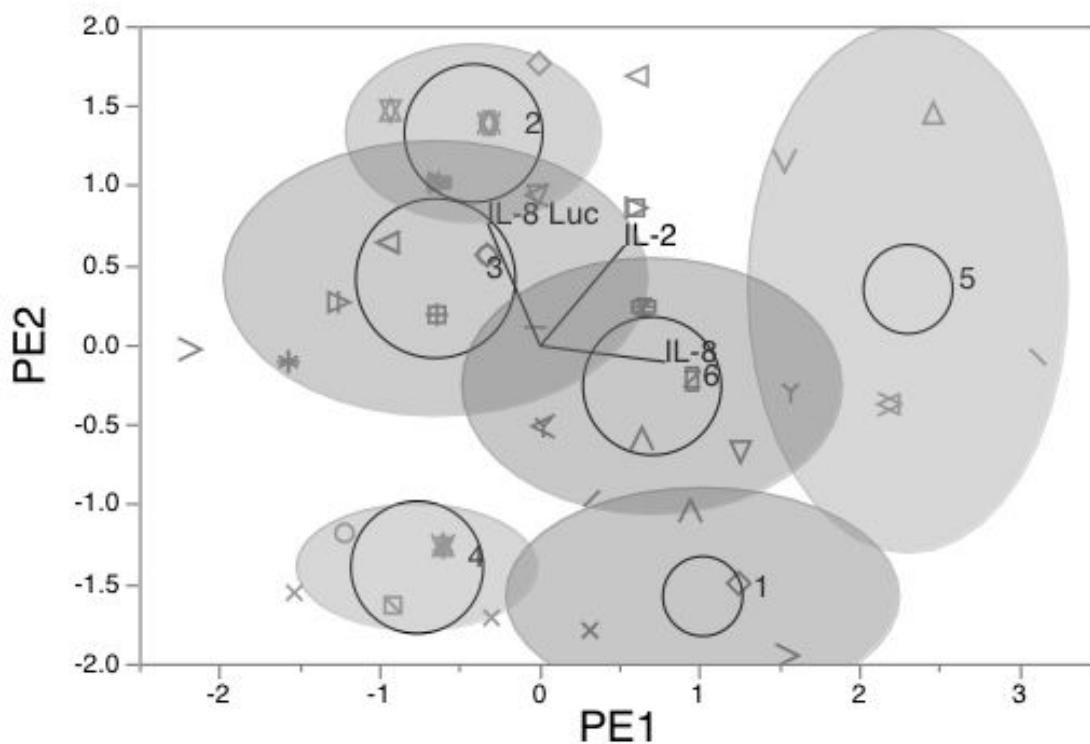




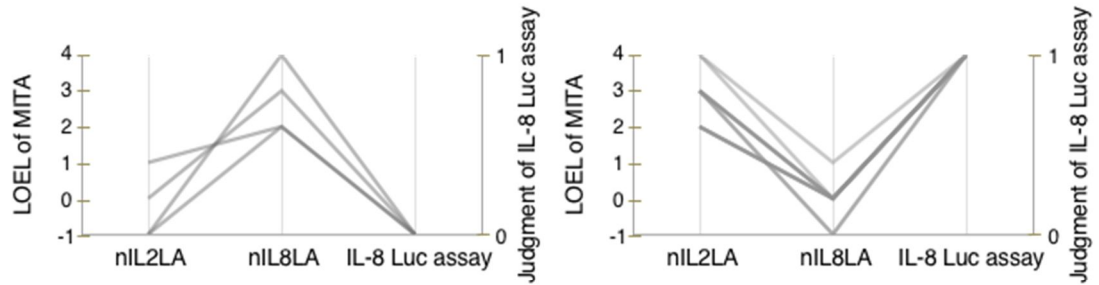
図 6. 60 化学物質の K-means clustering



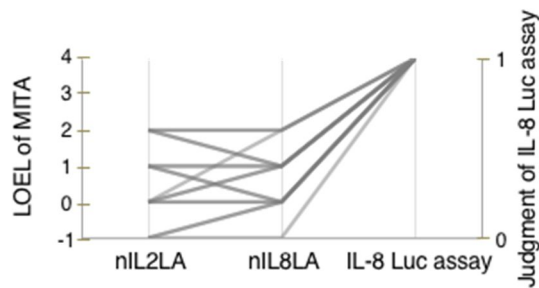
○	2-Aminoanthracene	*	Hexachlorobenzene
+	2-Mercaptobenzothiazole	□	Histamine
◇	2,4-Diaminotoluene	△	Hydrocortisone
x	Acetaminophen	▽	Hydrogen peroxide
△	Actinomycin D	∇	Isoniazid
Y	Aluminum chloride	∧	Isophorone diisocyanate
▽	Amphoterycin B	∨	Lead(II) acetate
Z	Azathioprine	∩	Lithium carbonate
*	Benzethonium chloride	∪	Magnesium sulfate
□	Chloroplatinic acid	∩	Mercuric chloride
△	Chloroquine	∪	Methanol
▽	Chlorpromazine	∩	Methotrexate
◇	Cisplatin	□	Minocycline
∧	Citral	○	Mitomycin C
∨	Cobalt chloride	+	Mizoribine
∩	Colchicine	◇	Mycophenolic acid
∪	Cyclophosphamide	x	Nickel sulfate
∩	Cyclosporine A	△	Nicotinamide
∪	Dapsone	▽	Nitrofurazone
∩	Dexamethasone	Y	p-Nitroaniline
□	Dibenzopyrene	∇	Pentamidine isethionate
◇	Dibutyl phthalate	Z	Pyrimethamine
○	Diesel exhaust particles	*	Rapamycin
+	Diethanolamin	□	Ribavirin
◇	Digoxin	△	Sodium bromate
x	Dimethyl sulfoxide	▽	Sodium dodecyl sulfate
△	Ethanol	∇	Sulfasalazine
Y	FK 506	∧	Trichloroethylene
▽	Formaldehyde	∨	Triethanolamine
Z	FR167653	∩	Warfarin

図7. 各 cluster の免疫毒性 profile

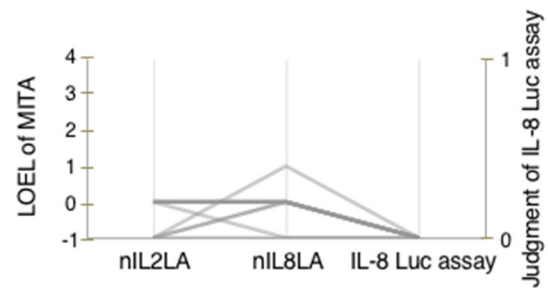
a. Cluster 1 : IL-8転写活性 抑制物質    b. Cluster 2 : IL-2転写活性抑制+感作性物質



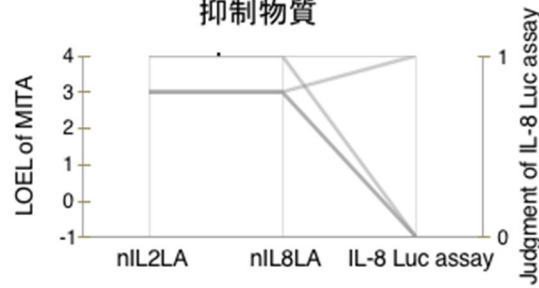
c. Cluster 3 : 感作性物質



d. Cluster 4 : 陰性物質



e. Cluster 5 : IL-2, IL-8転写活性抑制物質



f. Cluster 6 : IL-2転写活性抑制物質

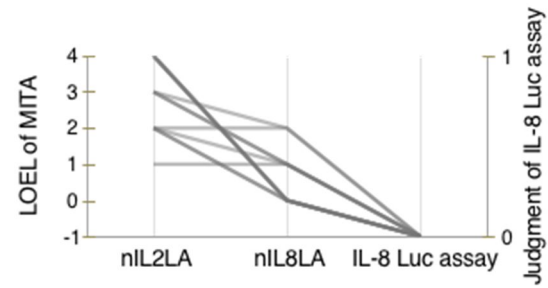


図 8 . IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

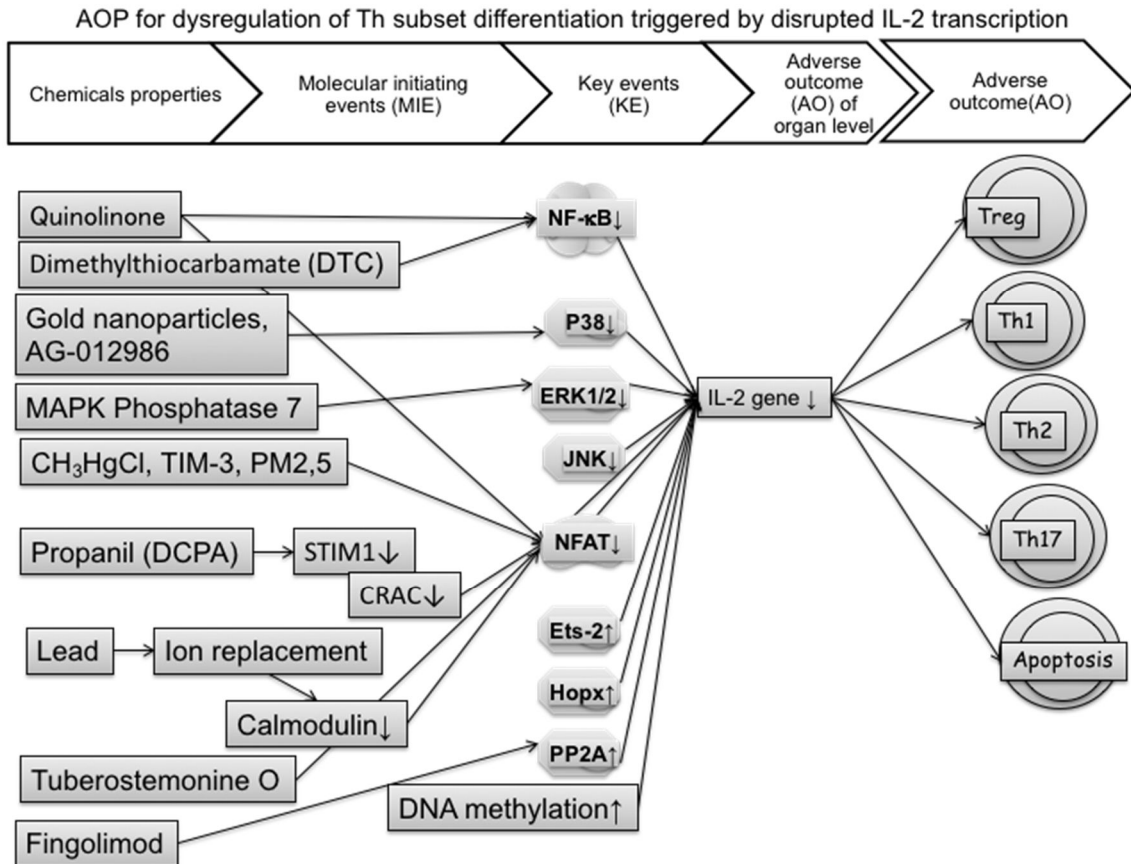


図 9 . IL-2 転写活性増強を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

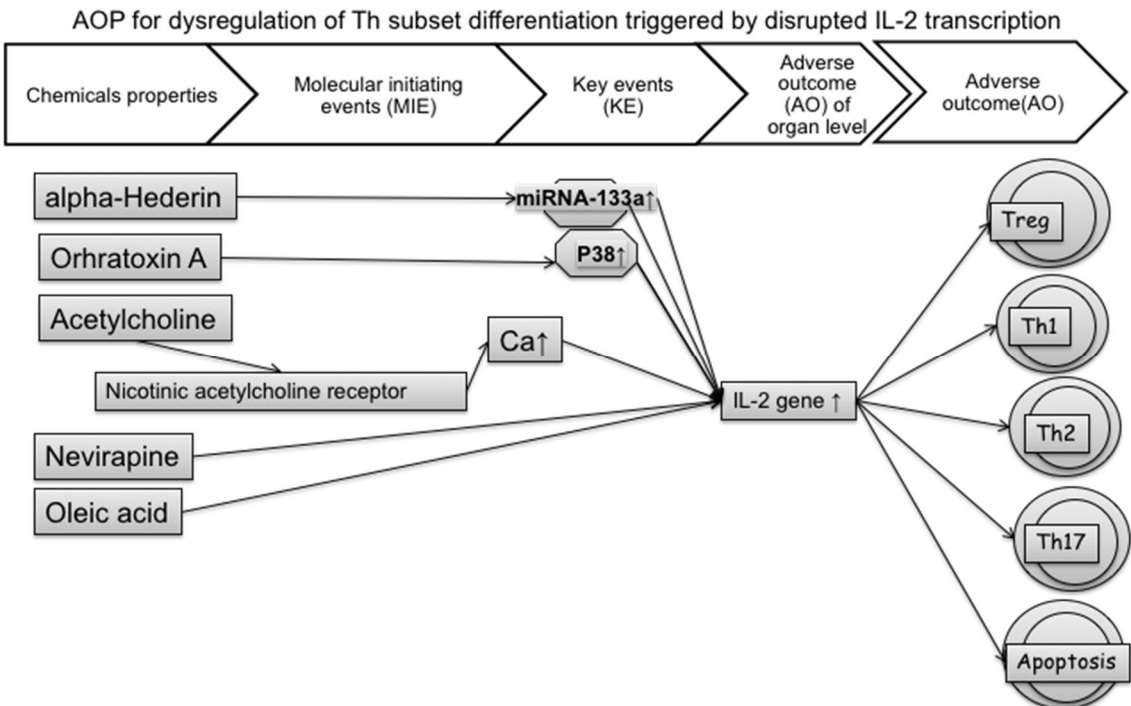


図 10. IL-8 転写活性増強を key event とした気道刺激性 AOP

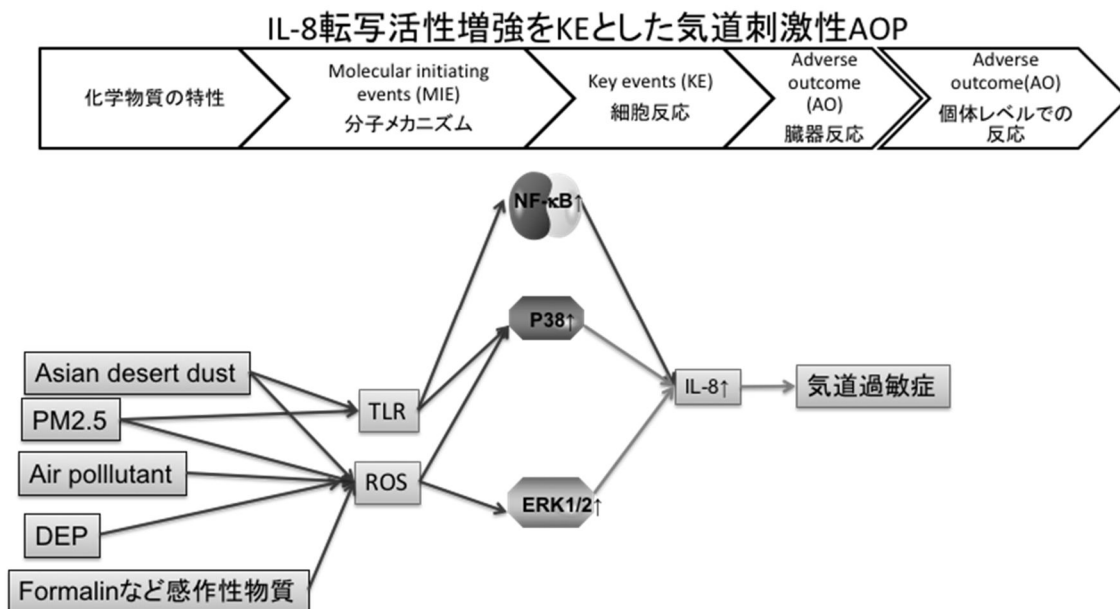


図 11 . MITA の判定基準 (Criteria 2)

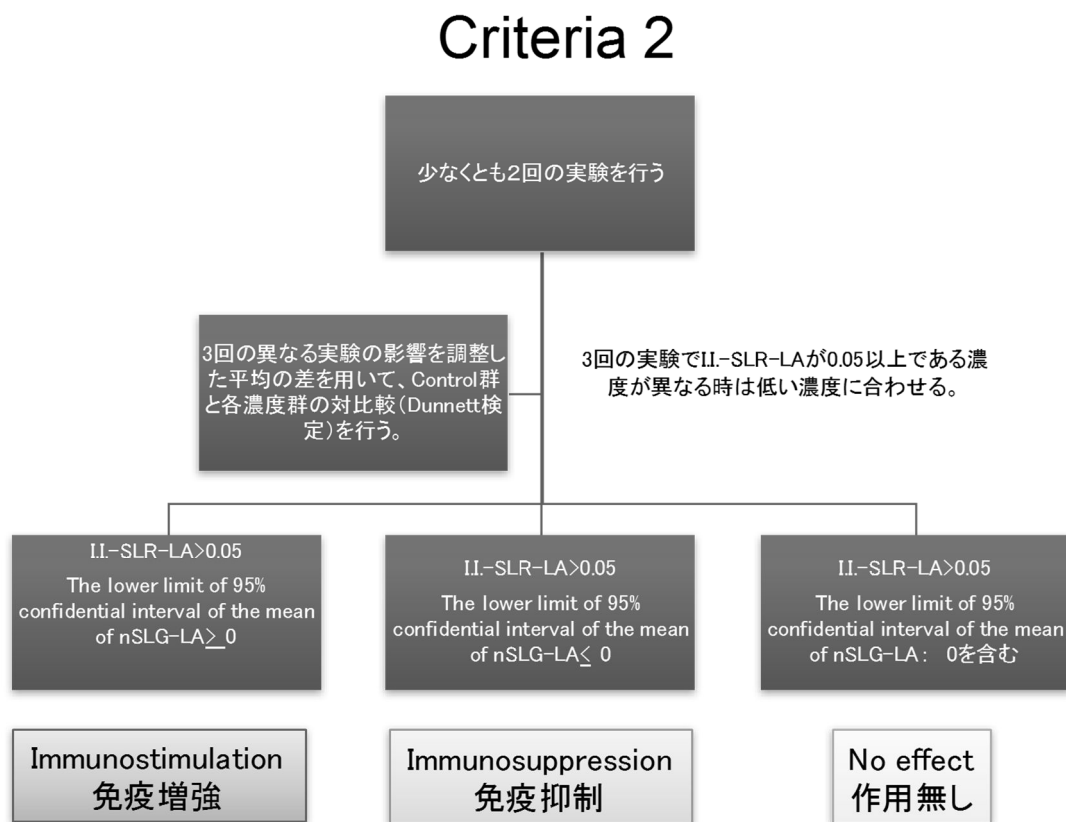


図 12 . MITA の判定基準 (Criteria 3)

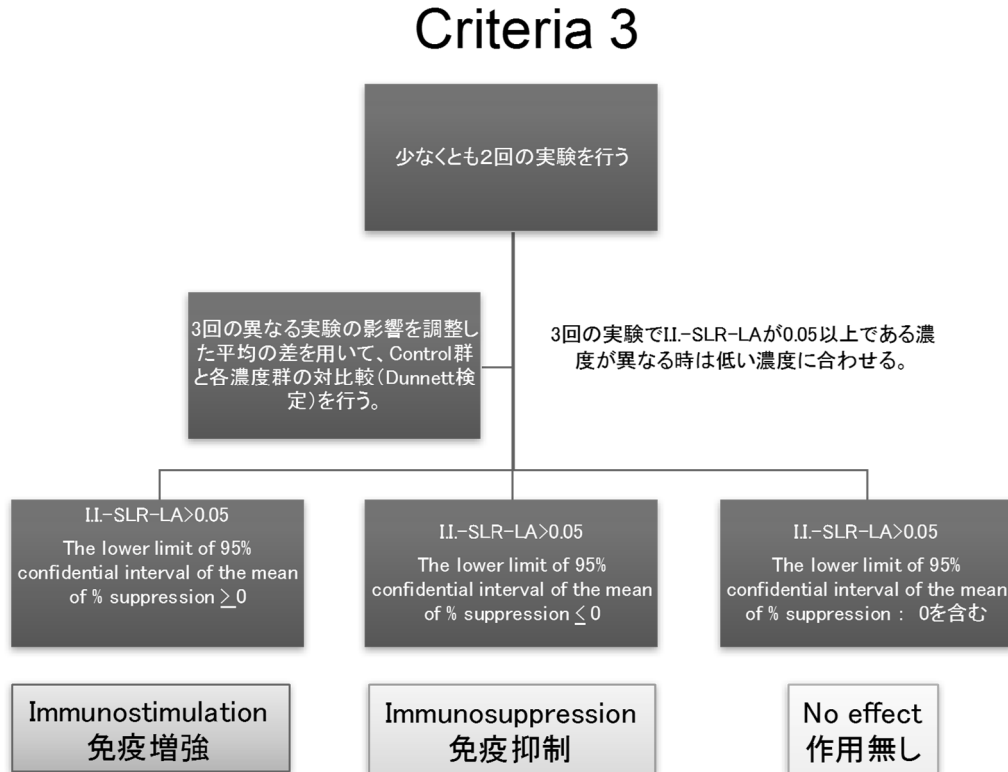
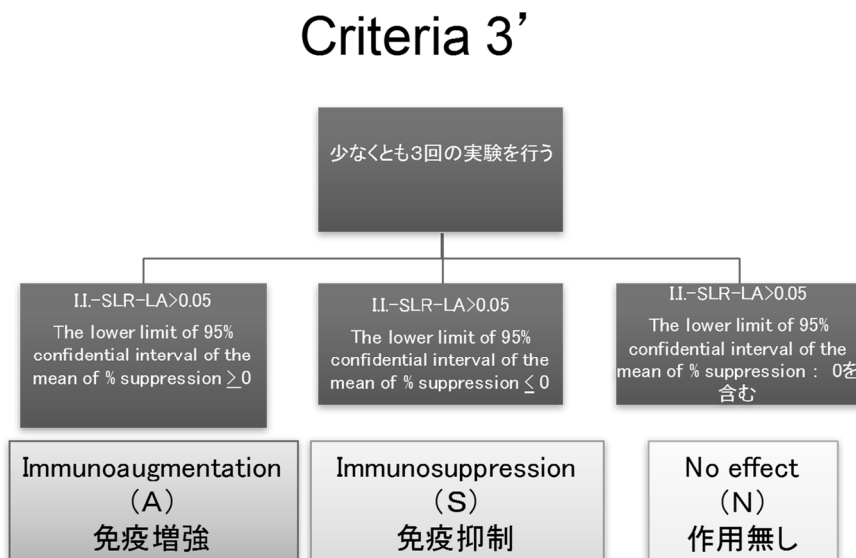


図 13 . MITA の判定基準 (Criteria 3')



なお、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濃度以上正の値で用量依存性を示し、さらに少なくとも1濃度で正の統計的に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濃度以上の負の値で用量依存性を示し、さらに少なくとも1濃度で負の統計的に有意を示す場合のみImmunoaugmentationと判定する

## 図 14 . MITA の判定基準 (Criteria 4)

### Criteria 4

#### 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 (=nSLO-LA of #2H4 cells treated with PMA/Ionomycin) / (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

Conduct three independent experiments for each chemical.

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

In each experiment, when the chemicals clear the following 2 criteria, they are judged as suppressive or stimulatory. Otherwise, they are judged as no effect chemicals.

1. 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 the data comprising the trend are not statistically significant in the opposite effect.
2. The results are judged using only data obtained in the concentration at which I.I.-SLR-LA is  $\geq 0.05$

The experiments are repeated until two consistent results are obtained. Then, the chemicals are classified by the consistent results.

## 図 15 . MITA の判定基準 (Criteria 5)

### 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 (=nSLO-LA of #2H4 cells treated with PMA/Ionomycin) / (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  $\geq 0.05$

Table 1.6 0 化学物質の MITA による免疫毒性評価

No	Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		IL-8 Luc
		Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge	LOEL	Judge
1	2,4-Diaminotoluene	N		A	62.50	N		S	0.98	N
2	2-Aminoanthracene	S	0.81	S	5.86	S	2.03	N		S
3	2-Mercaptobenzothiazole	N		N		N		S	125.00	S
4	Acetaminophen	A	33.33	A	33.33	A	166.67	A	100.00	N
5	Actinomycin D	S	0.00	S	0.01	N		S	0.00	S
6	Aluminum chloride	S	3.91	S	62.50	N		N		N
7	Amphoterycin B	S	0.78	S	2.08	A	3.13	A	7.82	S
8	Benzethonium chloride	S	1.95	S	1.95	S	3.91	N		S
9	Chlorpromazine	S	3.91	S	3.91	S	7.81	S	7.81	S
10	Cisplatin	S	0.24	S	1.22	N		N		S
11	Cobalt chloride	S	3.91	S	9.12	S	3.91	S	125.00	S
12	Cyclophosphamide	N		A	168.00	N		N		S
13	Cyclosporine A	S	0.00	S	0.00	N		N		N
14	Dapsone	S	45.01	S	55.14	S	46.88	S	134.75	N
15	Dexamethasone	S	0.01	N		S	0.01	S	0.01	N
16	Dibenzopyrene	S	0.01	S	0.03	N		N	0.00	N
17	Dibutyl phthalate	S	0.98	S	1.95	S	39.07	S	31.25	N
18	Diethanolamin	S	9.12	N		N		N		S
19	Dimethyl sulfoxide	A	3.91	A	625.00	S	66.41	S	3.91	N
20	Ethanol	N		N		N		N		N
21	FK 506	S	0.00	S	0.00	A		N		N
22	FR167653	S	0.49	S	0.49	S	145.83	S	125.00	N
23	Histamine	S	9.12	A	5.86	N		S	3.91	S
24	Hydrocortisone	S	0.34	A	6.27	S	0.34	S	0.34	N
25	Hydrogen peroxide	S	7.82	S	31.25	N		N		S
26	Isoniazid	S	1.97	N		N		S	800.00	N
27	Isophorone diisocyanate	S	0.98	N		S	0.98	S	0.98	S
28	Lead(II) acetate	S	3.91	S	3.91	N		N		N
29	Lithium carbonate	S	0.98	A	116.67	S	0.39	S	0.39	S
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		S
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	S
32	Methanol	N		N		N		N		N
33	Mitomycin C	S	0.36	N		N		N		S
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	S

35	Nitrofurazone	S	0.37	A	3.91	A		A	62.50	S
36	Pentamidine isethionate	S	3.91	S	32.55	S	3.91	S	3.91	N
37	p-Nitroaniline	S	0.98	S	1.95	S	1.47	S	2.45	N
38	Pyrimethamine	S	0.04	N		N		N		N
39	Ribavirin	A	15.63	A	187.50	A	5.86	N		N
40	Sodium bromate	S	125.00	N		N		N		S
41	Sodium dodecyl sulfate	N		N		N		N		S
42	Triethanolamine	S	187.50	S	1416.67	N		N		S
43	Hexachlorobenzene	N		N		N		N		N
44	Citral	S	0.36	S	1.37	N		N		S
45	Trichloroethylene	N		N		N		N		N
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	S
47	Formaldehyde	S	1.71	N		S	15.63	S	15.63	S
48	Diesel exhaust particles	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	S
49	Azathioprine	N		A	40.01	A	9.23	N		N
50	Chloroquine	S	0.05	S	0.02	S	10.00	S	30.00	S
51	Colchicine	A	0.29	A	0.06	A	0.02	A	20.00	S
52	Digoxin	S	0.01	S	0.02	N		N		S
53	Methotrexate	A	0.45	A	0.09	N		N		N
54	Minocycline	S	8.33	S	5.00	N		N		S
55	Mizoribine	N		N		A	5.20	A	7.45	N
56	Mycophenolic acid	A	0.38	A	6.24	N		N		S
57	Nicotinamide	A	0.10	A	110.03	S	3.00	S	10.00	N
58	Rapamycin	A	0.00	N		A	0.91	N		S
59	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	S	7.80	S	1.20	N
60	Warfarin	A	23.33	N		S	30.00	S	0.00	N

AFC, antibody forming cell; CSM, cell surface marker; NK, natural killer cell activity.



Table 2. 60 化学物質の MITA による免疫毒性評価 (IL-8 転写抑制 LOEL によりソート)

No	Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		IL-8 Luc
		Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge
60	Warfarin	A	23.33	N		S	30.00	S	0.00	N
5	Actinomycin D	S	0.00	S	0.01	N		S	0.00	P
15	Dexamethasone	S	0.01	N		S	0.01	S	0.01	N
24	Hydrocortisone	S	0.34	A	6.27	S	0.34	S	0.34	N
29	Lithium carbonate	S	0.98	A	116.67	S	0.39	S	0.39	P
1	2,4-Diaminotoluene	N		A	62.50	N		S	0.98	N
27	Isophorone diisocyanate	S	0.98	N		S	0.98	S	0.98	P
59	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	S	7.80	S	1.20	N
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	P
37	p-Nitroaniline	S	0.98	S	1.95	S	1.47	S	2.45	N
19	Dimethyl sulfoxide	A	3.91	A	625.00	S	66.41	S	3.91	N
23	Histamine	S	9.12	A	5.86	N		S	3.91	P
36	Pentamidine isethionide	S	3.91	S	32.55	S	3.91	S	3.91	N
9	Chlorpromazine	S	3.91	S	3.91	S	7.81	S	7.81	P
57	Nicotinamide	A	0.10	A	110.03	S	3.00	S	10.00	N
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	P
47	Formaldehyde	S	1.71	N		S	15.63	S	15.63	P
50	Chloroquine	S	0.05	S	0.02	S	10.00	S	30.00	P
17	Dibutyl phthalate	S	0.98	S	1.95	S	39.07	S	31.25	N
48	Diesel exhaust particles	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	P
3	2-Mercaptobenzothiazole	N		N		N		S	125.00	P
11	Cobalt chloride	S	3.91	S	9.12	S	3.91	S	125.00	P
22	FR167653	S	0.49	S	0.49	S	145.83	S	125.00	N
14	Dapsone	S	45.01	S	55.14	S	46.88	S	134.75	N
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	P
26	Isoniazid	S	1.97	N		N		S	800.00	N
16	Dibenzopyrene	S	0.01	S	0.03	N		N		N
2	2-Aminoanthracene	S	0.81	S	5.86	S	2.03	N		P
6	Aluminum chloride	S	3.91	S	62.50	N		N		N
8	Benzethonium chloride	S	1.95	S	1.95	S	3.91	N		P
10	Cisplatin	S	0.24	S	1.22	N		N		P
12	Cyclophosphamide	N		A	168.00	N		N		P
13	Cyclosporine A	S	0.00	S	0.00	N		N		N
18	Diethanolamin	S	9.12	N		N		N		P

20	Ethanol	N		N		N		N		N
21	FK 506	S	0.00	S	0.00	A	0.48	N		N
25	Hydrogen peroxide	S	7.82	S	31.25	N		N		P
28	Lead(II) acetate	S	3.91	S	3.91	N		N		N
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		P
32	Methanol	N		N		N		N		N
33	Mitomycin C	S	0.36	N		N		N		P
38	Pyrimethamine	S	0.04	N		N		N		N
39	Ribavirin	A	15.63	A	187.50	A	5.86	N		N
40	Sodium bromate	S	125.00	N		N		N		P
41	Sodium dodecyl sulf:	N		N		N		N		P
42	Triethanolamine	S	187.50	S	1416.67	N		N		P
43	Hexachlorobenzene	N		N		N		N		N
44	Citral	S	0.36	S	1.37	N		N		P
45	Trichloroethylene	N		N		N		N		N
49	Azathioprine	N		A	40.01	A	9.23	N		N
52	Digoxin	S	0.01	S	0.02	N		N		P
53	Methotrexate	A	0.45	A	0.09	N		N		N
54	Minocycline	S	8.33	S	5.00	N		N		P
56	Mycophenolic acid	A	0.38	A	6.24	N		N		P
58	Rapamycin	A	0.00	N		A	0.91	N		P
55	Mizoribine	N		N		A	5.20	A	7.45	N
7	Amphoterycin B	S	0.78	S	2.08	A	3.13	A	7.82	P
51	Colchicine	A	0.29	A	0.06	A	0.02	A	20.00	P
35	Nitrofurazone	S	0.37	A	3.91	A	62.50	A	62.50	P
4	Acetaminophen	A	33.33	A	33.33	A	166.67	A	100.00	N
	AFC, antibody forming cell; CSM, cell surface marker; NK, natural killer cell activity, LOEL : Lowest Observed Effect Level									

Table 3. 60 化学物質の MITA による免疫毒性評価 (IL-2 転写抑制 LOEL によりソート)

No	Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		IL-8 Luc
		Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge
21	FK 506	S	0.00	S	0.00	A	0.48	N		N
13	Cyclosporine A	S	0.00	S	0.00	N		N		N
5	Actinomycin D	S	0.00	S	0.01	N		S	0.00	P
52	Digoxin	S	0.01	S	0.02	N		N		P
15	Dexamethasone	S	0.01	N		S	0.01	S	0.01	N
16	Dibenzopyrene	S	0.01	S	0.03	N		N	0.00	N
38	Pyrimethamine	S	0.04	N		N		N		N
50	Chloroquine	S	0.05	S	0.02	S	10.00	S	30.00	P
10	Cisplatin	S	0.24	S	1.22	N		N		P
24	Hydrocortisone	S	0.34	A	6.27	S	0.34	S	0.34	N
33	Mitomycin C	S	0.36	N		N		N		P
44	Citral	S	0.36	S	1.37	N		N		P
35	Nitrofurazone	S	0.37	A	3.91	A		A	62.50	P
22	FR167653	S	0.49	S	0.49	S	145.83	S	125.00	N
7	Amphoterycin B	S	0.78	S	2.08	A	3.13	A	7.82	P
2	2-Aminoanthracene	S	0.81	S	5.86	S	2.03	N		P
29	Lithium carbonate	S	0.98	A	116.67	S	0.39	S	0.39	P
27	Isophorone diisocyanate	S	0.98	N		S	0.98	S	0.98	P
37	p-Nitroaniline	S	0.98	S	1.95	S	1.47	S	2.45	N
17	Dibutyl phthalate	S	0.98	S	1.95	S	39.07	S	31.25	N
47	Formaldehyde	S	1.71	N		S	15.63	S	15.63	P
8	Benzethonium chloride	S	1.95	S	1.95	S	3.91	N		P
26	Isoniazid	S	1.97	N		N		S	800.00	N
9	Chlorpromazine	S	3.91	S	3.91	S	7.81	S	7.81	P
11	Cobalt chloride	S	3.91	S	9.12	S	3.91	S	125.00	P
36	Pentamidine isethionium	S	3.91	S	32.55	S	3.91	S	3.91	N
6	Aluminum chloride	S	3.91	S	62.50	N		N		N
28	Lead(II) acetate	S	3.91	S	3.91	N		N		N
25	Hydrogen peroxide	S	7.82	S	31.25	N		N		P
54	Minocycline	S	8.33	S	5.00	N		N		P
23	Histamine	S	9.12	A	5.86	N		S	3.91	P
18	Diethanolamin	S	9.12	N		N		N		P
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	P
59	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	S	7.80	S	1.20	N

48	Diesel exhaust partic	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	P
14	Dapsone	S	45.01	S	55.14	S	46.88	S	134.75	N
40	Sodium bromate	S	125.00	N		N		N		P
42	Triethanolamine	S	187.50	S	1416.67	N		N		P
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	P
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	P
3	2-Mercaptobenzothia	N		N		N		S	125.00	P
12	Cyclophosphamide	N		A	168.00	N		N		P
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		P
41	Sodium dodecyl sulfat	N		N		N		N		P
1	2,4-Diaminotoluene	N		A	62.50	N		S	0.98	N
20	Ethanol	N		N		N		N		N
32	Methanol	N		N		N		N		N
43	Hexachlorobenzene	N		N		N		N		N
45	Trichloroethylene	N		N		N		N		N
49	Azathioprine	N		A	40.01	A	9.23	N		N
55	Mizoribine	N		N		A	5.20	A	7.45	N
58	Rapamycin	A	0.00	N		A	0.91	N		P
57	Nicotinamide	A	0.10	A	110.03	S	3.00	S	10.00	N
51	Colchicine	A	0.29	A	0.06	A	0.02	A	20.00	P
56	Mycophenolic acid	A	0.38	A	6.24	N		N		P
53	Methotrexate	A	0.45	A	0.09	N		N		N
19	Dimethyl sulfoxide	A	3.91	A	625.00	S	66.41	S	3.91	N
39	Ribavirin	A	15.63	A	187.50	A	5.86	N		N
60	Warfarin	A	23.33	N		S	30.00	S	0.00	N
4	Acetaminophen	A	33.33	A	33.33	A	166.67	A	100.00	N
AFC, antibody forming cell; CSM, cell surface marker; NK, natural killer cell activity, LOEL : Lowest Observed Effect Level										

Table 4. 化学物質の LOEL ならびに IL-8 Luc assay に基づく分類

Group	MITA	IL-8 Luc
4	S : LOEL<0.1	
3	S : 0.1= $\leq$ LOEL<1.0	
2	S : 1.0= $\leq$ LOEL<10	
1	S : 10= $\leq$ LOEL<1000	S
0	N	N
-1	A	

S : Suppression, A : Augmentation, N : No effect, P : Positive, N : Negative

Table 5. 化学物質の IL-2、IL-8 転写抑制 LOEL ならびに IL-8 Luc assay に基づく分類と heat map.

No	Chemicals	IL2LA		IL8LA		IL-8 Luc		IL2LA	IL8LA	IL-8 Luc
		Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge	LOEL ( $\mu\text{g/mL}$ )	Judge	Cluster			
1	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	N	1			
2	Warfarin	A	23.33	S	0.00	N	1			
3	Dimethyl sulfoxide	A	3.91	S	3.91	N	1			
4	2,4-Diaminotoluene	N		S	0.98	N	1			
5	Diethanolamin	S	9.12	N		P	2			
6	Minocycline	S	8.33	N		P	2			
7	Hydrogen peroxide	S	7.82	N		P	2			
8	Benzethonium chloridk	S	1.95	N		P	2			
9	2-Aminoanthracene	S	0.81	N		P	2			
10	Amphoterycin B	S	0.78	A	7.82	P	2			
11	Nitrofurazone	S	0.37	A	62.50	P	2			
12	Citral	S	0.36	N		P	2			
13	Mitomycin C	S	0.36	N		P	2			
14	Cisplatin	S	0.24	N		P	2			
15	Chloroquine	S	0.05	S	30.00	P	2			
16	Digoxin	S	0.01	N		P	2			
17	Triethanolamine	S	187.50	N		P	3			
18	Sodium bromate	S	125.00	N		P	3			
19	Diesel exhaust particle	S	39.07	S	62.50	P	3			
20	Nickel sulfate	S	14.32	S	250.00	P	3			
21	Histamine	S	9.12	S	3.91	P	3			
22	Chlorpromazine	S	3.91	S	7.81	P	3			
23	Cobalt chloride	S	3.91	S	125.00	P	3			
24	Formaldehyde	S	1.71	S	15.63	P	3			
25	Mycophenolic acid	A	0.38	N		P	3			
26	Colchicine	A	0.29	A	0.02	P	3			
27	Rapamycin	A	0.00	N		P	3			
28	2-Mercaptobenzothiaz	N		S	125.00	P	3			
29	Cyclophosphamide	N		N		P	3			
30	Mercuric chloride	N		S	1.95	P	3			
31	Sodium dodecyl sulfat	N		N		P	3			
32	Chloroplatinic acid	N		S	15.63	P	3			
33	Acetaminophen	A	33.33	A	100.00	N	4			
34	Ribavirin	A	15.63	N		N	4			

35	Methotrexate	A	0.45	N		N	4
36	Nicotinamide	A	0.10	S	10.00	N	4
37	Ethanol	N		N		N	4
38	Magnesium sulfate	N		N		N	4
39	Methanol	N		N		N	4
40	Hexachlorobenzene	N		N		N	4
41	Trichloroethylene	N		N		N	4
42	Azathioprine	N		N		N	4
43	Mizoribine	N		A	7.45	N	4
44	Isophorone diisocyanate	S	0.98	S	0.98	P	5
45	Lithium carbonate	S	0.98	S	0.39	N	5
46	Hydrocortisone	S	0.34	S	0.34	N	5
47	Dexamethasone	S	0.01	S	0.01	N	5
48	Actinomycin D	S	0.00	S	0.00	P	5
49	Dapsone	S	45.01	S	134.75	N	6
50	Aluminum chloride	S	3.91	N		N	6
51	Lead(II) acetate	S	3.91	N		N	6
52	Pentamidine isethionate	S	3.91	S	3.91	N	6
53	Isoniazid	S	1.97	S	800.00	N	6
54	Dibutyl phthalate	S	0.98	S	31.25	N	6
55	p-Nitroaniline	S	0.98	S	2.45	N	6
56	FR167653	S	0.49	S	125.00	N	6
57	Pyrimethamine	S	0.04	N		N	6
58	Dibenzopyrene	S	0.01	N		N	6
59	Cyclosporine A	S	0.00	N		N	6
60	FK 506	S	0.00	N		N	6

Table 6. Phase II studyの結果 (Criteria 5)

No	Chemical	Cas.no.	Lead Labo	Phase II Results				concordance	Based on Majority
				Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)			
1	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N	
2	Benzo(a)pyrene	50-32-8	S : SNS	S : SSS	S : ASS	S : NSS	1	S	
3	Cadmium chloride	10108-64-2	N : SNN	N : NNN	N : NSN	N : NNN	1	N	
4	Dibromoacetic acid	631-64-1	S : SSA	A/S : A/SA/SA/S	A : NAA	N : NAN	0	A?	
5	Diethylstilbestol	56-53-1	S : SSS	S : SSS	S : SSS	S : SSS	1	S	
6	Diphenylhydantoin	630-93-3	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N	
7	Ethylene dibromide	106-93-4	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N	
8	Glycidol	556-52-5	A : AA/SA	A : AAA	A : SAA	A : AAA	1	A	
9	Indomethacin	53-86-1	A : NAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	S : SSN	S : SSS	N : ANN	S : SSS	0	S	
11	Nitrobenzene	98-95-3	N : NNN	N : NNN	S : SSS	N : NNN	0	N	
12	Jrethane, Ethyl carbamate	51-79-6	A : AAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	S : SSS	S : SNS	S : SSS	S : SSS	1	S	
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	A : AAN	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
15	Dichloroacetic acid	79-43-6	S : SSS	A : AAN	S : SSS	S : SSN	0	S	
16	Toluene	108-88-3	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N	
17	Acetonitrile	75-05-8	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : ANN	1	N	
18	Mannitol	69-65-8	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : NNN	1	N	
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : ANN	1	N	
20	o-Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	S : SSS	S : SSS	S : SSS	S : SSS	1	S	
Accuracy				90%	85%	95%	Between 80%		

Table 7. Phase I studyの結果 (Criteria 5)

No	Chemical	Cas.no.	Phase I							Based on Majority	
			Lead Labo	AIST-Tsukuba	Majority	FDSC	Majority	AIST-Takamatsu	Majority		
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	S : SSS	solubility							S
				500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	
2	Hydrocortisone water soluble	50-23-7	N : SNN	solubility							S
				125mg/ml(DMSO)		125mg/ml(DMSO)		125mg/ml(DMSO)			
				1st round	S : SAS	N	S : SSS	S	S : NSS	S	
3	Lead(II) acetate	6080-56-4	S : SSS	solubility							S
				100mg/ml(ddd)		25mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	
4	Nickel sulfate hexahydrate	10101-97-0	S : SSS	solubility							S
				100mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)		100mg/ml(ddd)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	
5	Dimethyldithiocarbamate	137-30-4	N : SNN	solubility							N
				62.5mg/ml(DMSO)		62.5mg/ml(DMSO)		62.5mg/ml(DMSO)			
				1st round	N : NNN	N	N : NNN	N	N : NNA	N	
				Within		80%		80%			
				Accuracy		100%		80%		80%	
				Between		80%					