

(H30-化学—一般-001) 厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）  
総括・分担研究年度終了報告書

化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく  
Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化  
( 30210101 )

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)化学物質の免疫毒性データ収集、2)MITA による免疫毒性 clustering の有用性検討、3)IL-2 Luc assay プロトコールならびにクライテリアの改訂、4)免疫毒性評価基準の検討ならびに validation 試験の predictivity 評価、5)Validation report 作成、6)IL-1 Luc assay プロトコールならびにクライテリアの設定、7)IL-1 Luc assay Phase 0、8)IL-1 Luc assay Phase 1 を行った。その結果、1)に関しては、IL-2 Luc assay の validation に用いた 25 化学物質に関して National Toxicology Program (NTP)の協力を仰ぎ、免疫毒性データベースを構築した。2)に関しては、IL-8 Luc assay と組み合わせた MITA により分類された 6 つの cluster の特性ならびに MITA の適応限界を明らかにした。3)4)に関しては、IL-2 Luc assay のこれまでの結果に基づき、クライテリアの詳細を決定し、それに基づき validation 結果を総括した。5)に関しては、さらにその結果をもとに validation report を作成し、2019 年 2 月 27 日、28 日に OECD テストガイドライン化を目指して peer review 会議を開催した。6)に関しては、IL-1 Luc assay validation 試験に向けてプロトコールとクライテリアを確立した。7) に関しては、Phase 0 試験により IL-1 Luc assay の技術移転性を確認した。8)に関しては、Phase I 試験を終了し、その結果を検討中である。

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・安全性予測評価部・室長
中島 芳浩	・国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長
安野 理恵	・国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
山影 康次	・（一財）食品薬品安全センター・秦野研究所・主任研究員
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・第二室長
木村 裕	・東北大学病院・皮膚科・助教

## A. 研究目的

### 研究背景：

アレルギー、自己免疫、免疫抑制など、人体に有害な影響を及ぼす化学物質による免疫毒性は、消費者、生産者はもとより厚生労働行政にとっても重大な課題となっている。現在、免疫毒性評価のゴールドスタンダードは動物実験であるが、数万ともいわれる化学物質を網羅的に評価、管理するには、*in vitro* high throughput 評価系や *in silico* 評価系の構築が不可欠である。そのためには、化学物質のアレルギー発症、易感染性など個体レベルの免疫毒性データの集積、その分子メカニズムの解析、さらにはそれらに基づいた adverse outcome pathway の作成が不可欠である。

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- $\gamma$ 、IL-2、G3PDHプロモーター活性、THP-1細胞におけるIL-8、IL-1 $\beta$ 、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-ImmunoToxicity assay; MITA)を構築し国内外の特許を取得している。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, 2]。

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[3]。また、MITAによる化学物質の免疫毒性を評価するなかで、MITAのみによる分類では、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[3]。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[4, 5]。

### 計画全体の目的（図1）：

National Toxicology Program (NTP)のDori Germolec 博士とミラノ大学のEmanuela Corsini 博士の協力を仰ぎ、NTPならびにEuropean Centre for Ecotoxicology and Toxicology of ChemicalsのデータベースおよびPubMedを利用した文献検索に基づき個体レベルの免疫毒性の網羅的データベースを構築する。

上記データベースに基づき、我々がこれまでに確立してきた多項目免疫毒性評価系(MITA)(図2)を用いた化学物質の免疫毒性別クラスター分類における各クラスター免疫毒性の特性を明らかにする。

また、既にOECDテストガイドライン(442E)に承認されているIL-8 Luc assayに加え、MITAを構成するIL-2転写活性抑制評価試験(IL-2 Luciferase reporter assay; IL-2 Luc assay)(国際validation phase I, IIが既に終了)とIL-1 $\beta$ 転写活性抑制評価試験(IL-1 luciferase reporter assay; IL-1 Luc assay)の国際validation studyを行い、MITAの多項目免疫毒性評価系としてOECDテストガイドライン化を目指す。

### 2018年度

#### ① 免疫毒性化学物質の *in vivo* 毒性データの構築

- ② MITAによる免疫毒性clusteringの有用性の検討
- ③ IL-2転写活性抑制試験 (IL-2 Luc assay)に関するvalidation 試験の最終評価ならびにOECD提出用validation report作成
- ④ IL-1 $\beta$  転写活性抑制試験 (IL-1 Luc assay) に関する Phase 0 ならびに Phase I validation試験.
- ⑤ MITA を用いた免疫毒性評価系国際化へ向けての国際評価会議のkick-off meeting の開催

## B. 研究方法

### ① 免疫毒性物質データの作成

National Toxicology Program (NTP)のDori Germolec博士とミラノ大学のEmanuela Corsini博士の協力を仰ぎ、NTP ならびに European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals のデータベースおよびPubMedを利用した文献検索に基づき個体レベルの免疫毒性の網羅的データベースを構築する。

### ② MITAによる免疫毒性 clustering の有用性の検討

一方、我々はこれまでに多項目免疫毒性評価系 (MITA)を開発し、そのdata setの作成、有用性の検討、国際標準化へむけてのvalidation等を行ってきた。その中で、60種類の化学物質をMITAの複数項目に関して効果発現最低濃度 (Lowest observed effect level ; LOWEL)を基にクラスター分類することにより、免疫毒性物質が6種類のクラスターに分類できることを明らかにした。そこで、本課題では個体レベルの免疫毒性が明らかな化学物質をMITAによる上記6種類のクラスターに分類し、クラスターごとの個体レベル免疫毒性発現の特性を明らかにする。

### ③ IL-2 Luc assayに関するvalidation 試験の最終評価ならびにOECD提出用validation report作成

既にOECD テストガイドライン(442E)に承認されているIL-8 Luc assayに加え、MITAを構成するIL-2 Luc assay(国際validation phase I, IIが既に終了)の最終結果の総括とvalidation reportを作成する。

### ④ IL-1 Luc assayに関するPhase 0ならびにPhase I validation試験

IL-8 転写活性抑制評価系の国際 validation study を行い、MITA を多項目免疫毒性評価系としてOECD テストガイドライン化を目指す。

### ⑤ MITAを用いた免疫毒性評価系国際化へ向けての国際バリデーション実行委員会

平成30年度：2018年10月4-6日、神戸にて第5回国際バリデーション実行委員会会議を行った。

#### (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

### ① 化学物質の免疫毒性データの作成

IL-2 Luc assay のvalidationに用いた25化学物質に関してNational Toxicology Program (NTP)の協力を仰ぎ、免疫毒性データベースを構築した。個々の化学物質に関する毒性データはAppendix 1(IL-2 Luc assay validation report draft)に記載し、それらを総括したデータを表1にまとめた。表1では、化学物質の毒性データをin vivo、ex vivo、in vitro データの3種類に分類した。具体的には、in vivo データの中には、免疫臓器の重量変化、遅延型過敏症、易感染性、移植腫瘍に対する抵抗性が、ex vivo データには、化学物質を投与された個体から採取した免疫担当細胞を用いてin vitro で化学物質の影響を評価するサイトカイン産生試験、T細胞依存性抗体産生試験 (T-cell dependent antibody response; TDAR)が、in vitro データには、個体から採取した免疫担当細胞に、in vitro で化学物質を加えてそのサイトカイン産生能の変化を評価するサイトカイン産生試験、T細胞の増殖能を評価する細胞増殖試験などを含めた。

### ② MITAによる免疫毒性 clustering の有用性の検討

IL-8 Luc assay と組み合わせたMITAにより化学物質が、大きく6つのclusterに分類できることが示された。その特性と代表的化学物質を表2にした。残念ながら、MITAでは、一部のDNA

合成、細胞増殖抑制機序に基づく免疫毒性物質が評価できないことも明らかになった。

### ③ IL-2 Luc assayプロトコールならびにクライテリアの改訂

国際validation委員会にて、昨年度に策定されたクライテリア5 (図3) を記載した最終プロトコール (Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver. 011E) Appendix 1 (IL-2 Luc assay validation report draft Appendix) を作成した。このクライテリアを用いバリデーション研究を再評価したところPhase Iでは施設間再現性、施設内再現性はそれぞれ80.0 % (4/5)、86.7 % (13/15)であり、Phase IIでは施設間再現性が80.0 % (16/20)と良好な結果が得られた (表3)。

### ④ 免疫毒性評価基準の検討ならびにvalidation試験のpredictivity評価

免疫毒性分野では皮膚感作性試験におけるLLNAのようなゴールドスタンダードが存在せずpredictivity (accuracy)の算出ができない。Validation management team (VMT) のLiaison membersであるGermolec博士らによる化学物質の免疫機能に対する影響をまとめたレポートAppendix 1 (IL-2 Luc assay validation report draft Appendix)をもとに化学物質がTリンパ球をターゲットとするか否かの分類を試みた (表1)。この分類に基づきPhase I, Phase IIを統合した際のpredictivityを66.7 % (16/24) と算出した (表3)。

### ⑤ 60化学物質のIL-2 Luc assayによるpredictivity評価

また、東北大学で検討した60化学物質の解析結果 (表4) では、感度84%, 特異度54%, 精度78%であった。

### ⑥ MITAを用いた免疫毒性評価系国際化へ向けての国際バリデーション実行委員会

平成30年度:2018年10月4-6日、神戸にて第5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、真下奈々、高木佑実、門、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) その際に、lead laboratoryからcriteriaの変更が提案され承認された。

### ⑦ Validation report作成とpeer review 会議の開催

IL-2 Luc assayのOECDガイドライン化を目指しバリデーションレポート (Appendix 1.) を作成した。

### ⑧ IL-1 Luc assayプロトコールならびにクライテリアの設定

昨年度、MITAとIL-8 Luc assayの結果を用い免疫毒性物質を6つのカテゴリーに分類する方法を提案した[3]。既にIL-8 Luc assayは、OECD test guideline (442E)に承認され、またIL-2転写活性抑制評価系は、上述のように国際バリデーションphase I, IIが完了している。MITAのもう一つの構成因子として、THP-1細胞をベースとしたIL-1 $\beta$  レポーター細胞であるTHP-G1b細胞を用いた国際バリデーション試験を開始した。

### ⑨ IL-1 Luc assay Phase 0

国際バリデーション実行委員会にて選定したDapson, Diethanolamine, p-Nitroaniline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 for TGCHAC-A4 ver. 007E (Appendix 3)にのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を2セット行った (図4)。表5に示すように%suppressionの閾値を20%と設定した場合、産総研つくば、産総研高松においてはリードラボと同様の結果が得られた。食薬センターについてはLPSによるFInSLG-LAの数値が得られない、再現性が得られない等の問題が認められた。食薬センターを含めた際の施設間再現性は83.3% (5/6)であった。

食薬センターについてはその後LPSによるFInSLG-LAの数値が得られない原因を検討し、FCSの非動化の方法、細胞へのLPSへの添加方法を再確認しアッセイしたところリードラボと同様の結果を得られた。(図5)

### ⑩ IL-1 Luc assay Phase 1

国際バリデーション実行委員会にて選定した5化学物質をコード化し、参加3施設、東北大学、産総研つくば、産総研高松においてMulti-Immuno Tox Assay protocol for TGCHAC-A4 ver. 008Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を3セット実施した (表6)。次年度、Phase 1試験の結果をValidation management teamにて評価し今後の対応を決定する。

## E. 考察

これまで行ってきたMITAのvalidation試験の内、IL-2 Luc assayのPhase I, Phase II試験が終了した。これらの試験を通して、IL-2 Luc

assayの施設間、施設内再現性が十分にOECDガイドライン化に必要な基準を満たしていることが明らかになった。しかし、これらの試験の予測性を評価する際に大きな壁に突き当たった。

今回の試験では、Phase I、IIあわせて25種類の化学物質を用いたが、これまで研究者が行ってきた感作性試験法と異なり、化学物質の免疫毒性の有無を評価した確立したデータが存在しないことに気がついた。

そこで、本研究課題のもう一つのテーマである化学物質の免疫毒性データの集積をNTPの協力を得て行った。25種類の化学物質の入手可能な免疫毒性データを網羅し、それらを*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*データに分類し、さらにそれらを表1にまとめた。その結果、各化学物質の大凡の免疫毒性profileが俯瞰可能となった。

次に、IL-2 Luc assayは免疫毒性評価のなかでも、T細胞を標的にした免疫毒性を評価する試験であることから、*ex vivo*, *in vitro*のT細胞由来サイトカイン産生能に影響を与える物質ないしは各化学物質のmode of actionにT細胞への作用が明記されている化学物質をPhase I、II試験のpositive物質とした。

その結果、Phase I、IIをまとめたpredictivityは約67%となった。この値は、必ずしも十分な値ではないが、化学物質の免疫毒性の有無が必ずしも明確ではないこと、またT細胞を標的とした免疫毒性にもIL-2転写活性以外を標的とした作用が存在することは容易に想像できるので、免疫毒性評価の一步としては満足すべき値なのかもしれない。

IL-2 Luc assayのpredictivityに関しては、2019年2月27日から28日まで、東京にて開催されたMITAのOECDガイドライン化に向けての国際評価会議にて検討されて修正、さらなる検討の必要な個所が指摘された。次年度に対応予定である。

免疫毒性クラスター解析では、クラスター1, 2, 3, 5, 6が免疫毒性抑制に分類される。各clusterには臨床で使われている薬剤が含まれているため、それらの主作用ないし副作用から、そのclusterに含まれる一般化学物質の毒性が予測できる。Cluster 1に含まれるdiaminotolueneはwarfarinに類似した特性が予想され、比較的安全な化学物質である可能性が考えられる。Cluster 2に分類されるdiethanolaminはminocyclineと、cluster 3に分類されるcobalt chlorideはchlorpromazineと、

Cluster 5に分類されるactinomycin Dはdexamethasoneと、Cluster 6に分類されるFR167653はcyclosporinやFK506と類似した*in vivo*での免疫毒性が予想される。

## E. 結論

1) 25 化学物質に関して National Toxicology Program (NTP) の協力を仰ぎ、免疫毒性データベースを構築した。

2) IL-2 Luc assay に関する validation を終了し、validation report を OECD テストガイドライン化に向けて、peer review 会議に提出した。2019 年 2 月の東京における会議において外部委員により検討され修正点、改善点が示され現在対応中である。

3) IL-1 Luc assay に関する国際的 validation を開始し、Phase 0, Phase I を終了し、validation management team による評価結果をもとに今後の対応を検討する予定である。

## 引用文献

1. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Aiba, S., 2014. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol In Vitro* 28: 759-768.
2. Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., Yasuda, M., Yamazaki, T., Nishii, S., Aiba, S., 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254: 245-255.
3. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., Aiba, S., 2018. 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.* 92: 2043-2054.
4. Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., Aiba, S., 2011. An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol sci* 124: 359-369.
5. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29: 1816-1830.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Casati, S., Aschberger, K., Barroso, J., Casey, W., Delgado, I., Kim, T.S., Kleinstreuer, N., **Kojima, H.**, Lee, J.K., Lowit, A., Park, H.K., Regimbald-Krnel, M.J., Strickland, J., Whelan, M., Yang, Y., Zuang, V., 2018. 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 92, 611-617.
2. Daniel, A.B., Strickland, J., Allen, D., Casati, S., Zuang, V., Barroso, J., Whelan, M., Regimbald-Krnel, M.J., **Kojima, H.**, Nishikawa, A., Park, H.K., Lee, J.K., Kim, T.S., Delgado, I., Rios, L., Yang, Y., Wang, G., Kleinstreuer, N., 2018. International regulatory requirements for skin sensitization testing. Regul Toxicol Pharmacol 95, 52-65.
3. Fujita, M., Yamamoto, Y., Watanabe, S., Sugawara, T., Wakabayashi, K., Tahara, Y., Horie, N., Fujimoto, K., Kusakari, K., Kurokawa, Y., Kawakami, T., Kojima, K., **Kojima, H.**, Ono, A., Katsuoka, Y., Tanabe, H., Yokoyama, H., Kasahara, T., 2018. Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay. J Appl Toxicol.
4. **Kimura, Y.**, Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., **Aiba, S.**, 2018. 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 92, 2043-2054.
5. **Kimura, Y.**, Watanabe, M., Suzuki, N., Iwaki, T., **Yamakage, K.**, Saito, K., **Nakajima, Y.**, Fujimura, C., Ohmiya, Y., **Omori, T.**, **Kojima, H.**, **Aiba, S.**, 2018. The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). J Toxicol Sci 43, 741-749.
6. Koyama, S., Arakawa, H., Itoh, M., Masuda, N., Yano, K., **Kojima, H.**, Ogihara, T., 2018. Evaluation of the metabolic capability of primary human hepatocytes in three-dimensional cultures on microstructural plates. Biopharm Drug Dispos 39, 187-195.
7. Narita, K., Ishii, Y., Vo, P.T.H., Nakagawa, F., Ogata, S., Yamashita, K., **Kojima, H.**, Itagaki, H., 2018. Improvement of human cell line

activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results. J Toxicol Sci 43, 229-240.

8. Tsukumo, H., Matsunari, N., Yamashita, K., **Kojima, H.**, Itagaki, H., 2018. Lipopolysaccharide interferes with the use of the human Cell Line Activation Test to determine the allergic potential of proteins. J Pharmacol Toxicol Methods 92, 34-42.

### 2. 学会発表

木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 眞弓、大森 崇、足利 太可雄、小島 肇、相場 節也：  
Multi-ImmunoTox Assay (MITA)：  
バリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第31回大会（熊本）2018年11月

## 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

表 1. 化学物質の免疫毒性データまとめ

Chemicals	In vivo			Ex vivo			In vitro			Expert opinion	Mode of action
	immune sytem organ weight	DTH	infectio n	tumor	cytokine production	NK activity	TDAR	cytokine production	cell proliferation		
Phase I study											
Dibutyl phthalate	A (spleen)							S (IL-2, 4, IFN-g)(H)		YES	This compound then is proposed to modulate cytokine secretion from both monocytes/macrophages and T cells.
Hydrocortisone	S (thymus) x 2 S (spleen)	S					N	A (IL-1b)(H) x 3 S (IL-1b)		YES	
Lead(II) acetate	A(thymus)	S A	S				S N	S (IFN-g, IL-1b)(H) A (IL-4)(H)	S(H)	YES	
Nicke(II) sulfate	N S (thymus)	S		S		S N	N	A (IL-4, IFN-g)(H) S (IL-2) S (IFN-g)		YES	
dimethyldithiocarbamate (DMDTC)	A x 2							S (IL-1b)	N(H)	NO	
Phase II study											
2,4-diaminotoluene	N (spleen) A (spleen)	A	S	N		S	S	-	-	NO	Disruption of T-cell activities has been associated with B(a)P induced immunotoxic effects (Urso et al. 1986).
Benzo(a)pyrene		N	N		S(IL-2)	N	S x 5 A	A (IL-4)(H) N (IFN $\gamma$ )(H) N (IL-2)(H)	S (H) x 2 S x 6	YES	
Cadmium Chloride	A (spleen) S (spleen)	N			A (IL-2) N (IFN- $\gamma$ )	N	S x 4	S (IL-2, 4, IFN-g) A (IFN-g)(H) S (IL-2, IFN-g) A (IFN-g) S (IL-2) A (IL-2)	S	YES	
Dibromoacetic acid (DBAA)	A (spleen) S (thymus) x 2		N	N		S	N	S (IL-2, 4)	S	YES	Overall, studies suggest that DBAA produces immunotoxic effects through modulation of T-cell mediated cell immunity. T-cell apoptosis, through extrinsic and intrinsic pathways, are proposed to play a role in the mode of action.  DES exposure was associated with down-regulation of gene expression in the TCR complex, and the TCR and CD28 signaling pathways.  DPH treatment can lead to a decrease of suppressor T cells
Diethylstilbestrol (DES)	S (thymus) x 4 A (thymus) x 2 A (spleen)	N S	N(H) A(H)		A (IFN-g) x 3	A(H)	S	A (IL-1) A (IL-2)		YES	
Diphenylhydantoin		S N			A (IL-4) S (IFN- $\gamma$ , IL-2) S (IL-1 $\alpha$ ) N (IL-6, 12)	S A x 2	S	-	-	YES	
Ethylene Dibromide (EDB)	S (thymus) S (spleen) N		N			S	A	-	-	NO	YES

Glycidol	N	A	S	S	S	-	NO	YES	Studies suggest that glycidol modulates B-cell function, and NK cell and macrophage
Indomethacin	N A (spleen)	A		S x 3 A x 1	A (IL-2)(H) A (IFN-g)(H)	A (H) x 4 S A x 3	YES	YES	indomethacin inhibition of prostaglandin synthesis leads to altered T-cell function,
Isonicotinic Acid Hydrazide (IAH)	N x 2				S (IL-2)(H) A (IL-2)(H) S (IL-1)(H)	S (H) x 3 A (H) x 6 A N	YES	YES	
Nitrobenzene	A (spleen) x 3 A (thymus) x 2 S (thymus) x 2 S (spleen) x 2	N S	N	S N	-	-	YES	YES	effects on T-cell function may play a role in increased susceptibility to L. monocytogenes (Burns et al. 1994).
Urethane, Ethyl carbamate	N A (thymus) A (spleen)	S		N (IL-2) S x 4 N x 3	N (IL-2, 4, IFN-g)(H) A (IFN-g)(H) S (IFN-g)(H)	N x 2	YES	NO	
Tributyltin Chloride (TBTC)	S (thymus) x 4 S (spleen) x 3	N S	S x 2	S S	A (INF-g)(H) N (IL-2, 4)(H) S (IFN-g)(H)	S (H) S x 3	YES	YES	
Perfluorooctanoic Acid (PFOA)	S (thymus) x 2 S (spleen) x 2	S(H) N(H)		N (IFN-g)	S (IL-4)(H) N (IL-2)(H)	A (H) S (H) N (H)	YES	YES	Direct modulation of NF-kB has been implicated in modulation of cytokine production and secretion (Corsini et al. 2012).
Dichloroacetic Acid (DCAA)	A(spleen)	N		N (IL-2) A (IFN-γ) x 3 S (IL-4) x 2 S (IL-2)	A (IL-2)(H) A (IL-2, IFN-g)		YES	YES	T-cell activation was one proposed mode of action for DCAA.
Toluene									Toluene also enhanced NF-kB, STAT5, and NF-AT in thymus cells of C3H/HeN mice inhalationally (Liu et al. 2010).
Acetonitrile	S(thymus)			S	-	-	Undetermined	Undetermined	Toluene modulation of IL-2 synthesis, after oral No data were located.
Mannitol						N (H)	NO	NO	
Vanadium Pentoxide o-Benzyl-p-chlorophenol (BCP)	N A (spleen) N A	N x 2			S (IL-2, IFN-g)(H)	S (H)	YES	YES	
			N	N	-	-	NO	NO	



表 2. 化学物質の免疫毒性に基づく分類

Cluster	IL-2転写活性	IL-8転写活性	IL-2 Luc assay	代表的な化学物質
1	N	S	N	Sulfasazine
2	S	N	P	Citral
3	N	N	P	Formaldehyde Cyclophosphamide Mycophenolic acid Rapamycin
4	N	N	N	Acetaminophen Azathioprine Methotrexate Mizoribine
5	S	S	N	Dexamethosone
6	S	N	N	Cyclosporin, FK506

N: No effect, S: Suppression, P: Positive

表 3. IL-2 Luc assay Phase I, Phase II study まとめ

Chemical	CAS	Lab.A	Lab.B	Lab.C	concordance	T cell targeting
Phase I						
Dibutyl phthalate	84-74-2	SSS	SSS	SSS	1	Yes
Hydrocortisone	50-23-7	SNN	SSS	SSN	0	Yes
Lead(II) acetate	6080-56-4	SSS	SSS	SSS	1	Yes
Nickel(II) sulfate	10101-97-0	SSS	SSS	SSS	1	Yes
Zinc dimethyldithiocarbamate (DMDTC)	137-30-4	NNN	NNN	NNN	1	No
Phase II						
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	N	N	N	1	No
Benzo(a)pyrene	50-32-8	S	S	S	1	Yes
Cadmium chloride	10108-64-2	N	N	N	1	Yes
Dibromoacetic acid	631-64-1	A/S	A	N	0	No
Diethylstilbestol	56-53-1	S	S	S	1	Yes
Diphenylhydantoin	630-93-3	N	N	N	1	Yes
Ethylene dibromide	106-93-4	N	N	N	1	Yes
Glycidol	556-52-5	A	A	A	1	Yes
Indomethacin	53-86-1	A	A	A	1	Yes
Isonicotinic Acid Hydrazide	54-85-3	S	N	S	0	Yes
Nitrobenzene	98-95-3	N	S	N	0	Yes
Urethane, Ethyl carbamate	51-79-6	A	A	A	1	No
Tributyltin chloride	1461-22-9	S	S	S	1	Yes
Perfluorooctanoic acid	335-67-1	A	A	A	1	Yes
Dichloroacetic acid	79-43-6	A	S	S	0	Yes
Toluene	108-88-3	N	N	N	1	No
Acetonitril	75-05-8	N	N	N	1	undetermined
Mannitol	69-65-8	N	N	N	1	No

Vanadium pentoxide	1314-62-1	N	N	N	1	Yes
o-Benzyl-p-chorolop henol	120-32-1	S	S	S	1	No
Within-laboratory reproducibilities (%)		80 (4/5)	100 (5/5)	80 (4/5)		
		Average 86.7 (13/15)				
Between-laboratory reproducibilities (%) (Based on majority for Phase I)					80 (20/25)	
Sensitivity (%)		64.7 (11/17)	70.6 (12/17)	70.6 (12/17)		
		Average 68.6 (35/51)				
Specificity (%)		57.1 (4/7)	57.1 (4/7)	71.4 (5/7)		
		Average 61.9 (13/21)				
Accuracy (%)		62.5 (15/24)	66.7 (16/24)	70.8 (17/24)		
		Average 66.7 (48/72)				

S : Immunosuppression, A : Immunoaugmentation, N : No effect,

A/S : Immunoaugmentation/suppression.

T cell targeting と一致する結果を黄色のハイライトで示した。

表4 IL-2 Luc assay data set

Chemical name	Judge	Ave.LOEL(35%)	Ave.LOEL(-35%)	Immunotoxicity in references
FK506	S	0.0002		S
Cyclosporine A	S	0.0041		S
Actinomycin D	S	0.0156		S
Digoxin	S	0.0686		N
Colchicine	S	0.2743		S
FR1667953	S	1.3021		S
Benzethonium chloride	S	1.6276		U
Mercuric chloride	S	1.9531		S
Chlorpromazine	S	1.9531		U
Amphoterycin B	S	2.6042		U
Dibutyl phthalate	S	2.6042		S
2-Aminoanthracene	S	5.8594		U
Formaldehyde	S	7.8125		S
Pyrimethamine	S	7.8125		S
Isophorone diisocyanate	S	15.6250		U
Cisplatin	S	16.9271		S
Cobalt chloride	S	16.9271		S
Chloroquine	S	17.8326		S
Minocycline	S	18.5185		S
Mitomycin C	S	20.0000		S
Hydrogen peroxide	S	23.4375		U
Citral	S	25.0000		U
Dexamethasone	S	41.1692		S
Pentamidine isethionate	S	52.0833		U
Lead(II)acetate	S	57.2917		S
Azathioprine	S	58.4778		S
Diesel exhaust particle	S	62.5000		S
Sodium dodecyl sulfate	S	62.5000		N
Dapsone	S	72.9167		S
Nitrofurazone	S	83.3333		U
p-Nitroaniline	S	83.3333		U
Sulfasalazine	S	92.9444		S
Aluminium chloride	S	104.1667		S
Nickel sulfate	S	104.1667		S
Diethanolamine	S	250.0000		U
Chloroplatinic acid	S	250.0000		U
Sodium bromate	S	500.0000		S
Histamine	S	750.0000		S
Isoniazid	N			N
Triethanolamine	N			U
Magnesium sulfate	N			U
Hydrocortisone	N			S
Rapamycin	N			S
Mizoribine	N			S
Warfarin	N			N
2,4-Diaminotoluene	N			U
Cyclophosphamide	N			S
Dibenzopyrene	N			U
Ethanol	N			N
Hexachlorobenzene	N			S
Lithium carbonate	N			U
Methanol	N			N
Methotrexate	N			S
Dimethyl sulfoxide	N			N
Trichloroethylene	N			U
Mycophenolic acid	A		0.395061728	S
2-Mercaptobenzothiazole	A		16.11328125	N
Ribavirin	A		26.04166667	U
Nicotinamide	A		288.0658436	N
Acetaminophen	A		100	S
S: Suppression; N: No effects on T cells, U: Undetermined				
	U	Unclassified		
	S	Suppression, correctly judged		
	S	Suppression, misjudged		
	N	No effects, correctly judged		
	N	No effects, misjudged		

表 5 IL-1 Luc assay Phase 0 結果

Chemical	Lab.A (Lead Lab)	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordance	Based on Majority
Dapson Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S
Dapson Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S
Diethanolamine Set1	S:SSS	S:SSS	?S/A AS	S:SSS	0	S
Diethanolamine Set2	S:SSS	S:SSS	S:SS S/A	S:SSS	1	S
p-Nitroaniline Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S
p-Nitroaniline Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S

表6 IL-1 Luc assay Phase 1 結果

2019.3.25現在

MITA Phase1

LabA Tohoku							LabB AIST tsukuba							LabC AIST shikoku						
setNo.	code No.	1回目	2回目	3回目	4回目	judge	setNo.	code No.	1回目	2回目	3回目	4回目	judge	setNo.	code No.	1回目	2回目	3回目	4回目	judge
Set1	MITA103	S	S			S	Set1	MITB402	S	S			S	Set1	MITC704	S	S	S		S
Set2	MITA203	S	S			S	Set2	MITB501	S	S			S	Set2	MITC803	S	S			S
Set3	MITA304	S	S			S	Set3	MITB605	S	S			S	Set3	MITC902	S	S			S
Set1	MITA101	A	N	A		A	Set1	MITB404	N	N			N	Set1	MITC701	N	A	A		A
Set2	MITA205	S	N	A	N	N	Set2	MITB505	N	N			N	Set2	MITC802	N	A	N		N
Set3	MITA305	S/A	N	N		N	Set3	MITB603	N	N			N	Set3	MITC905	S	A	A		A
Set1	MITA104	N	S	S		S	Set1	MITB403	N	N			N	Set1	MITC705	N	N			N
Set2	MITA202	S	S			S	Set2	MITB502	N	N			N	Set2	MITC805	S	S			S
Set3	MITA303	N	N			N	Set3	MITB601	N	S	N		N	Set3	MITC901	S	S			S
Set1	MITA105	S	S			S	Set1	MITB401	S	S			S	Set1	MITC702	S	S			S
Set2	MITA204	S	S			S	Set2	MITB503	N	S	S		S	Set2	MITC801	S	S			S
Set3	MITA301	S	S			S	Set3	MITB602	S	N	S		S	Set3	MITC904	S	S			S
Set1	MITA102	A	S	N	N	N	Set1	MITB405	N	N			N	Set1	MITC703	S	S			S
Set2	MITA201	N	N			N	Set2	MITB504	N	N			N	Set2	MITC804	N	N			N
Set3	MITA302	N	S	N		N	Set3	MITB604	N	N			N	Set3	MITC903	N	N			N

図 1. 研究計画

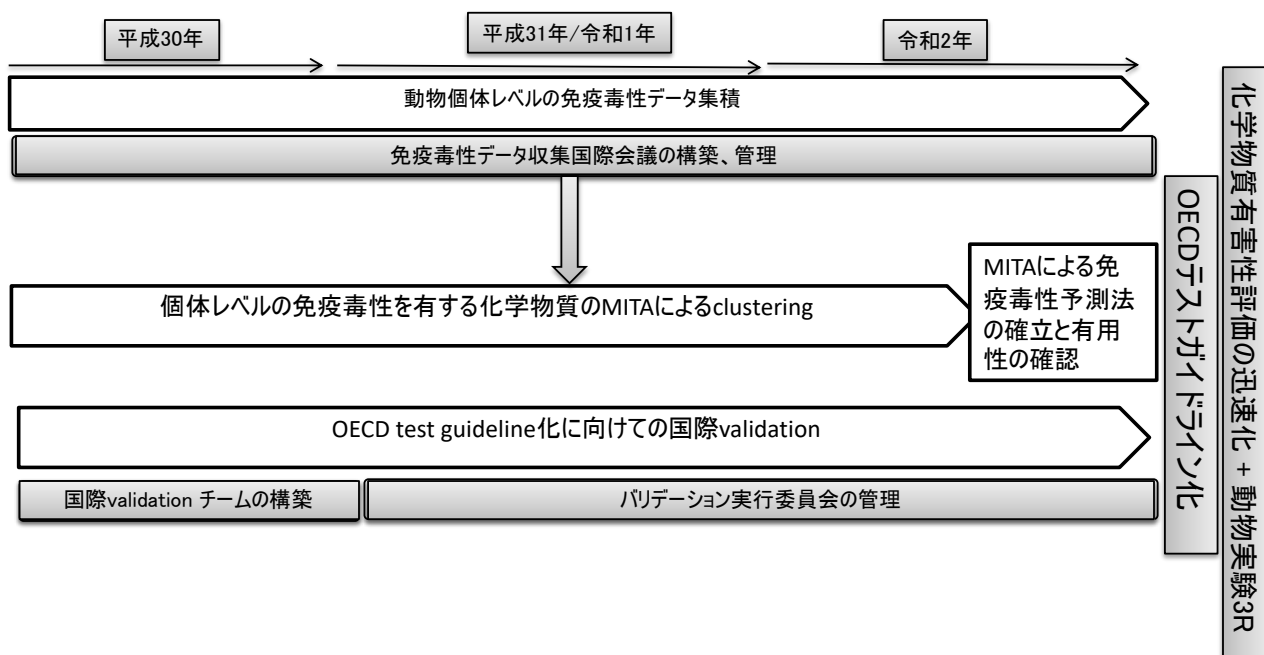


図 2. Multi-ImmunoTox assay (MITA)

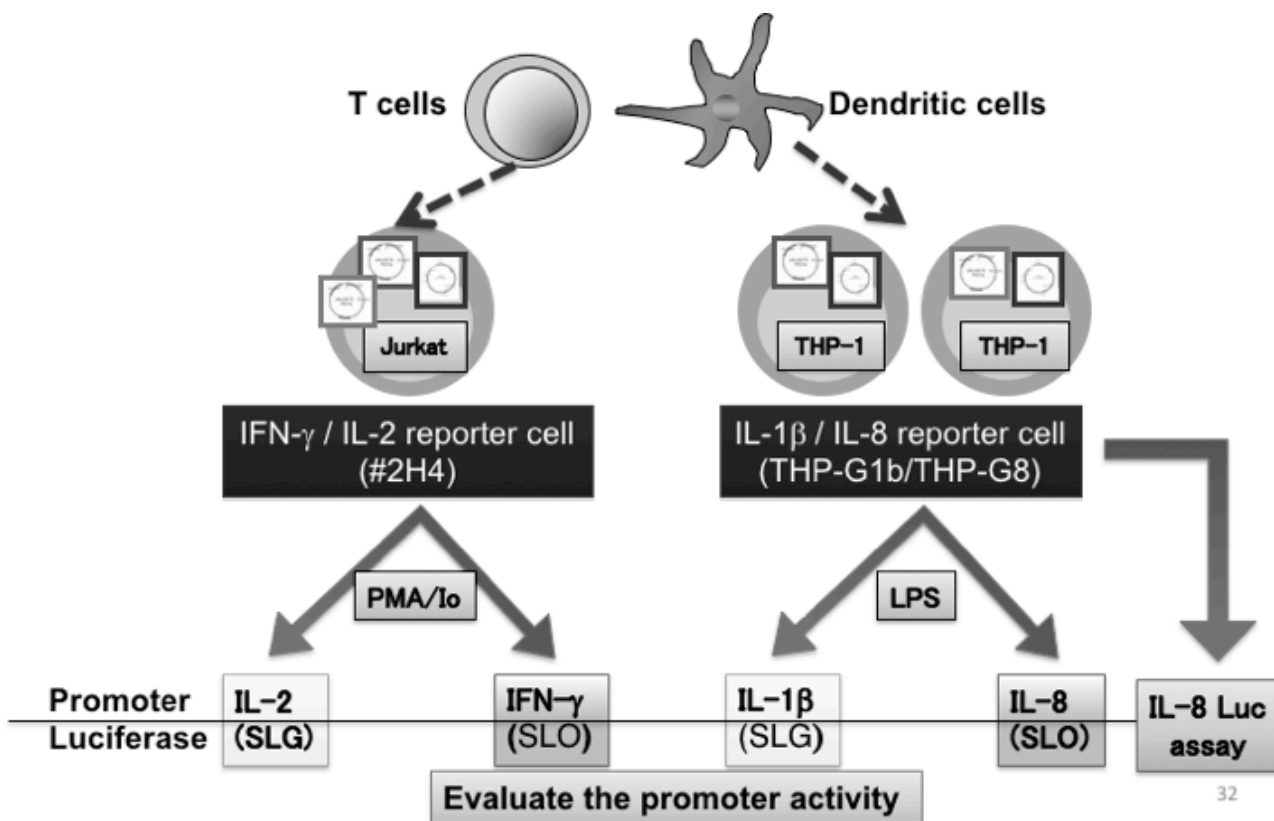


図 3. IL-2 Luc assay 判定基準

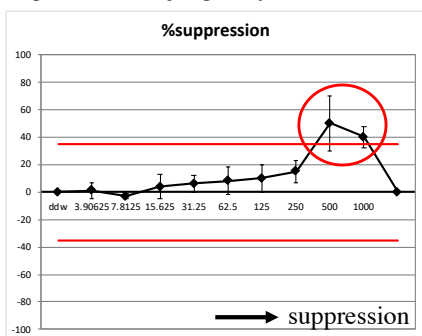
### Criteria 5

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.

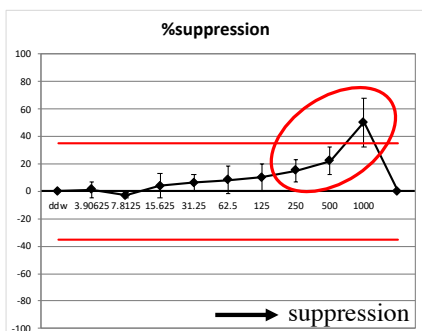
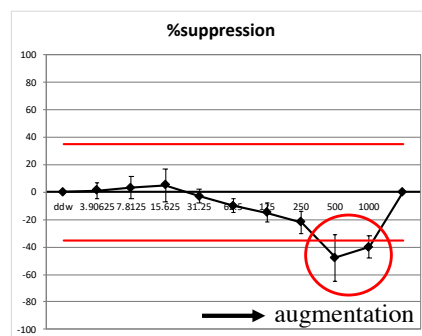
Identification of immunotoxicant is evaluated by the mean of %suppression and its 95% simultaneous confidence interval.

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.

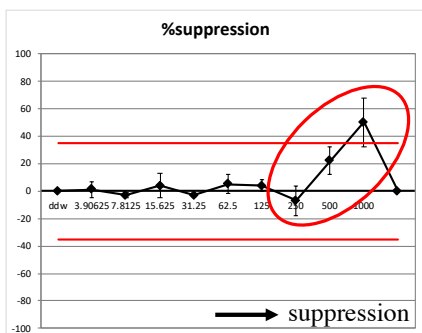
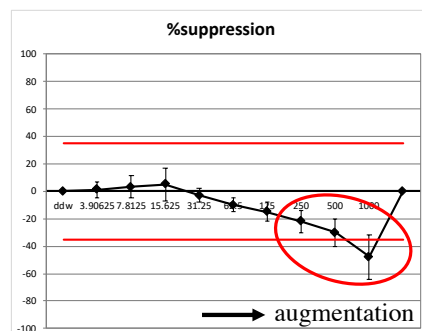
1. The mean of %suppression is  $\geq 35$  (suppressive) or  $\leq -35$  (stimulatory) with statistical significance. The statistical significance is judged by its 95% confidence interval.



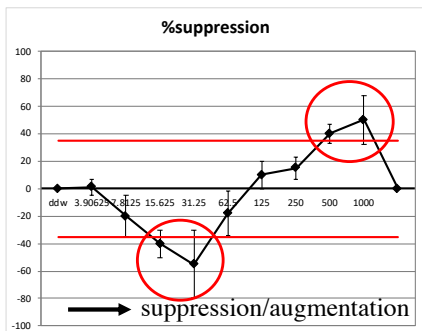
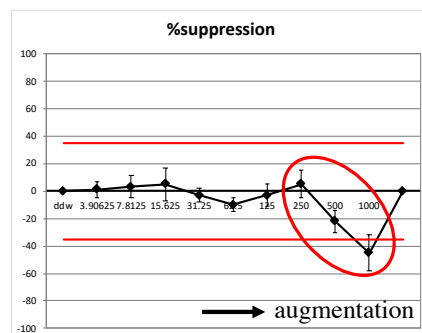
2. The result shows two or more consecutive statistically significant positive (negative) data,



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.



両方の条件を満たす場合は suppression/augmentation と判定する。

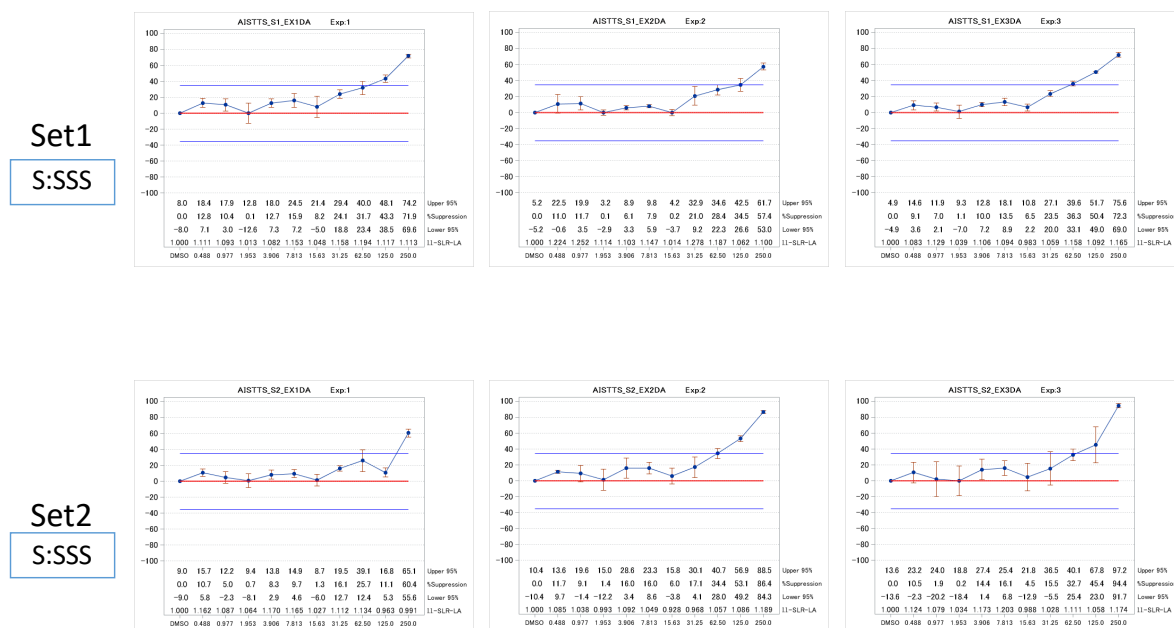
3. The results are judged using only data obtained in the concentration at which I.I.-SLR-LA is  $\geq 0.05$   
(0.05未満の濃度は0と表示される。)



図 4 IL-1 Luc assay Phase 0 グラフ  
Lab.A(Lead Lab) Dapsone



Lab.B(AISTTS) Dapsone

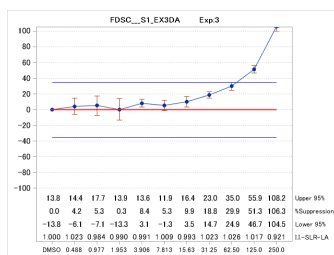
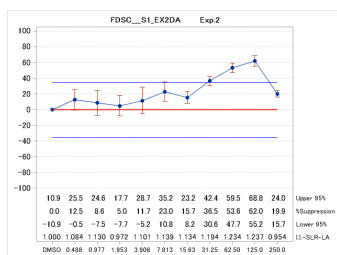
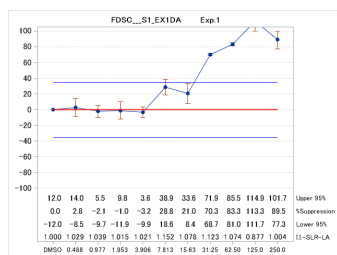


前ページより続く

## Lab.C(FDSC) Dapsone

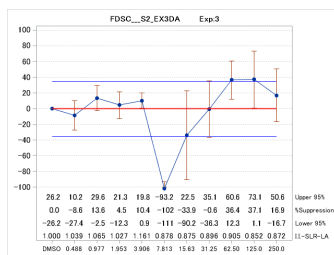
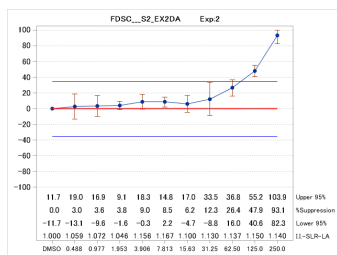
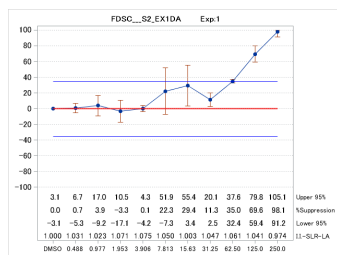
Set1

S:SSS



Set2

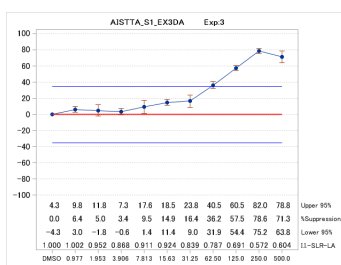
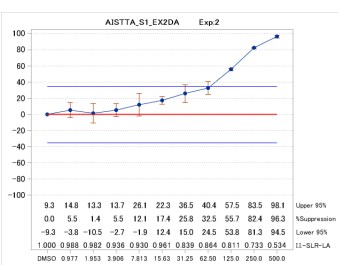
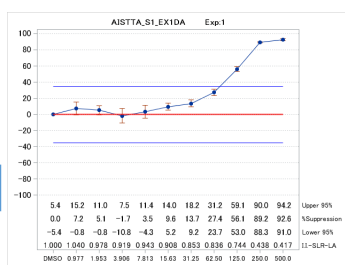
S:SSS



## Lab.D(AIST-Shikoku) Dapsone

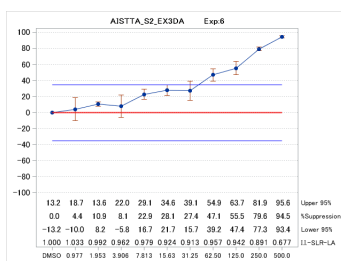
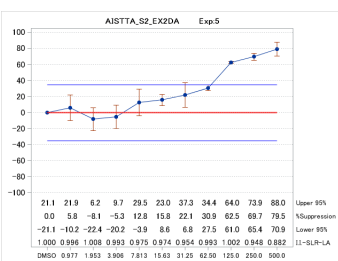
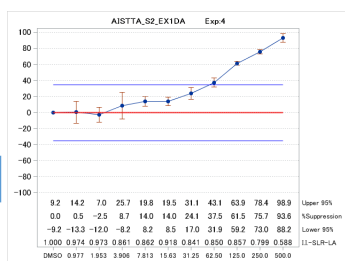
Set1

S:SSS



Set2

S:SSS

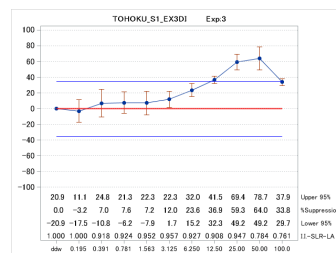
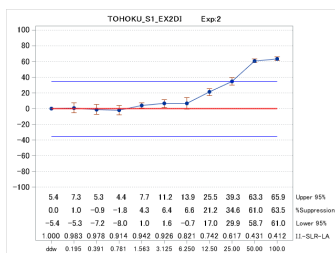
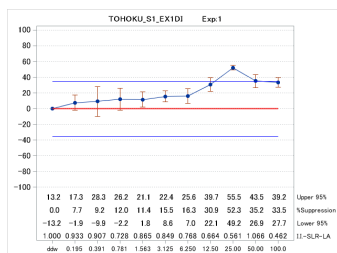


前ページより続く

## Lab.A(Lead Lab) Diethanolamine

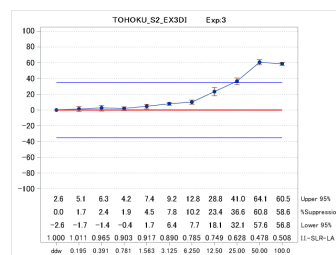
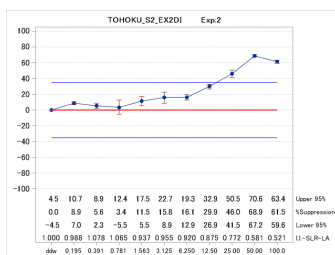
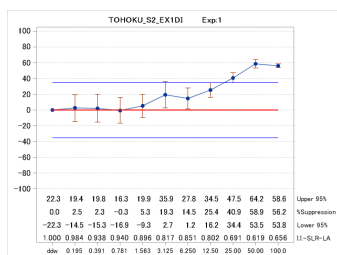
Set1

S:SSS



Set2

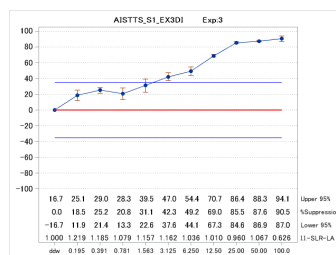
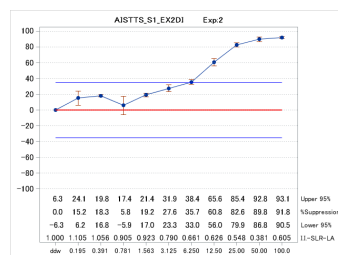
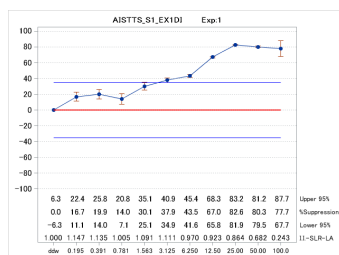
S:SSS



## Lab.B(AISTST) Diethanolamine

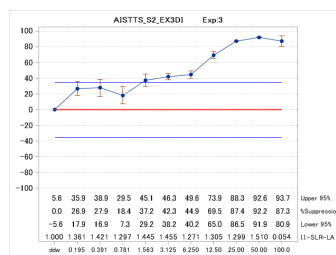
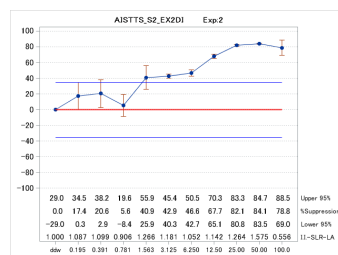
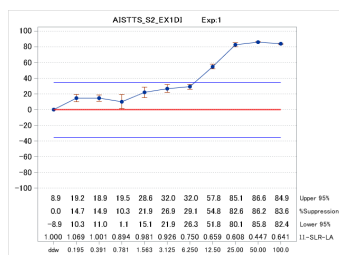
Set1

S:SSS



Set2

S:SSS

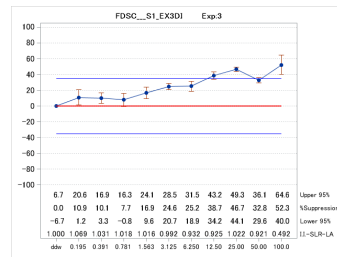
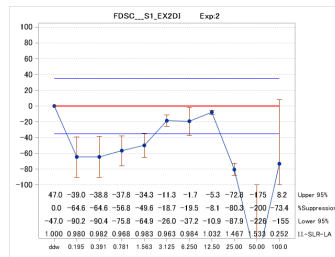
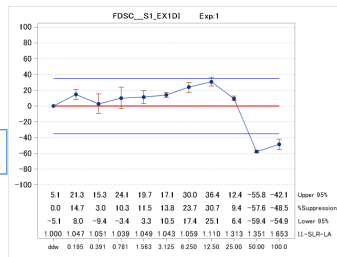


前ページより続く

## Lab.C(FDSC) Diethanolamine

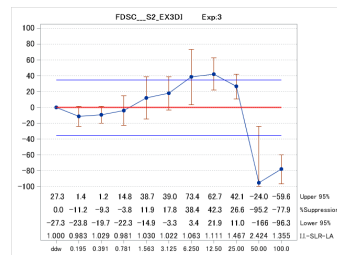
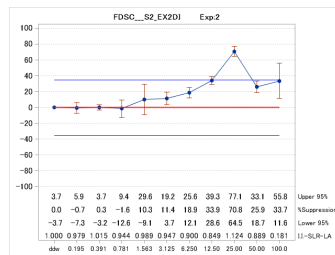
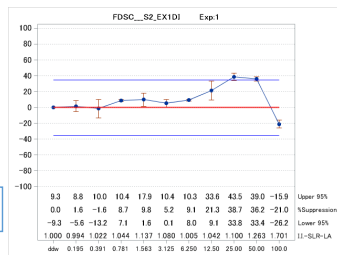
Set1

?S/A AS



Set2

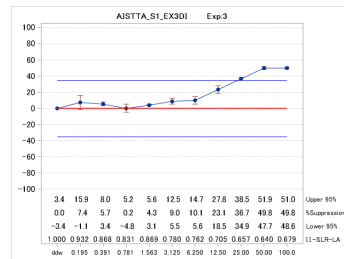
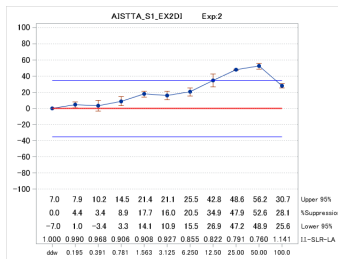
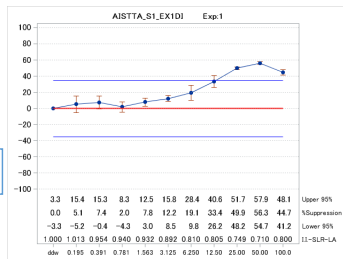
S:SS S/A



## Lab.D(AIST-Shikoku) Diethanolamine

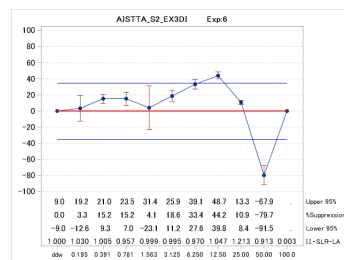
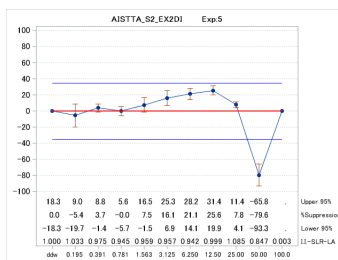
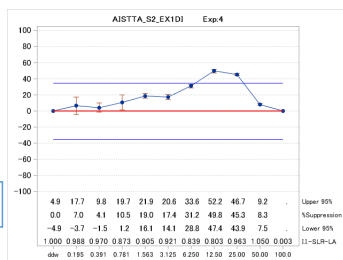
Set1

S:SSS



Set2

S:SSS

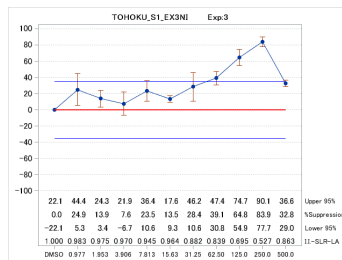
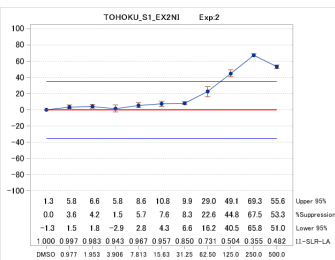
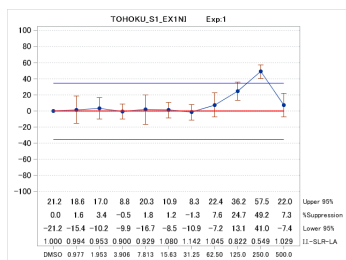


前ページより続く

## Lab.A(Lead Lab) p-Nitroaniline

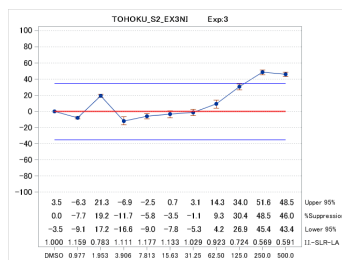
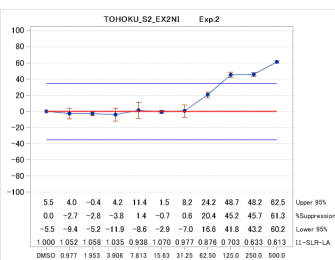
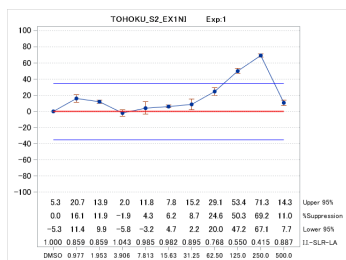
Set1

S:SSS



Set2

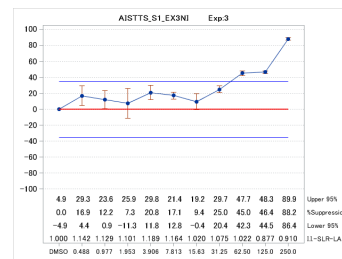
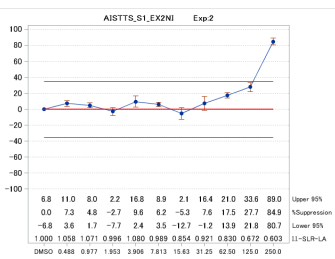
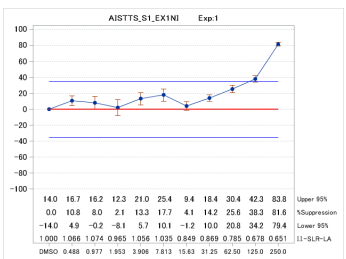
S:SSS



## Lab.B(AISTTS) p-Nitroaniline

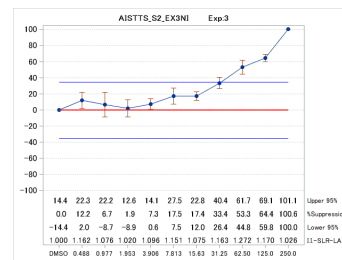
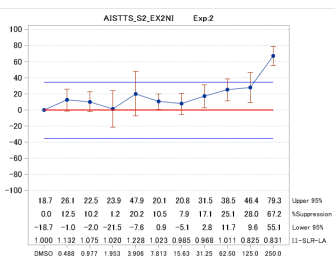
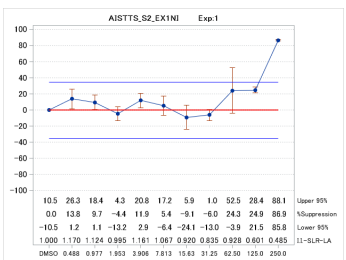
Set1

S:SSS



Set2

S:SSS

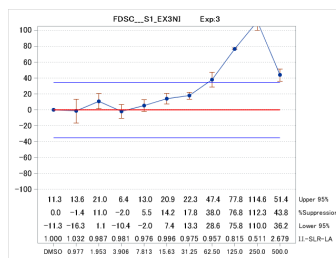
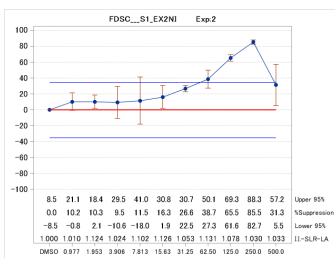
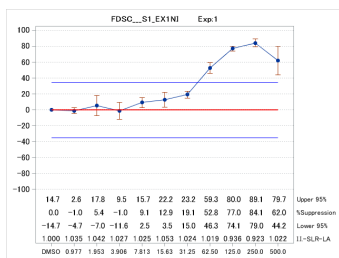


前ページより続く

## Lab.C(FDSC) p-Nitroaniline

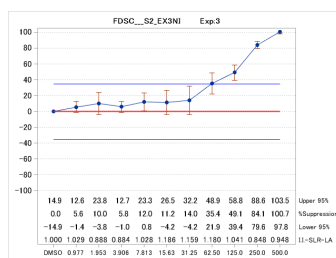
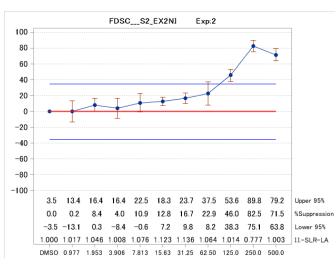
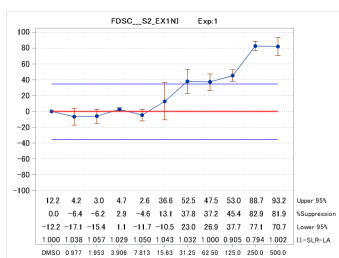
Set1

S:SSS



Set2

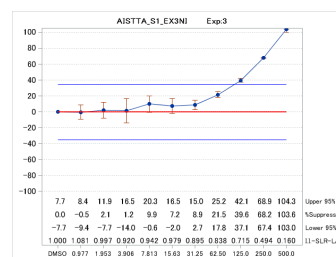
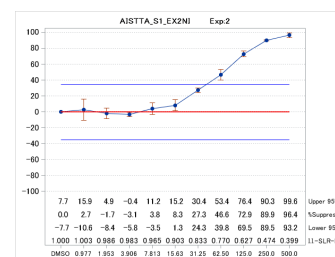
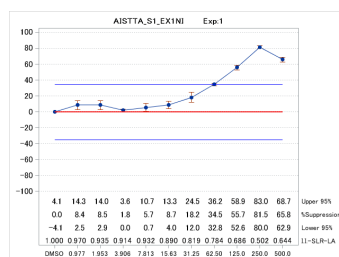
S:SSS



## Lab.D(AIST-Shikoku) p-Nitroaniline

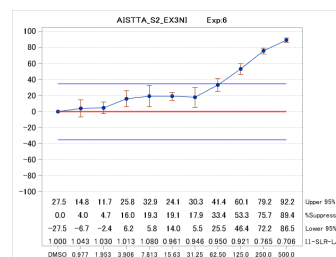
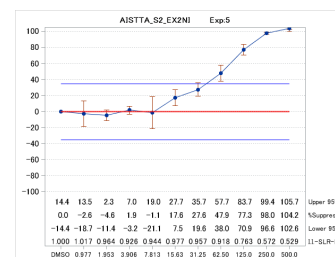
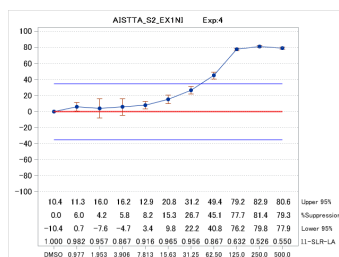
Set1

S:SSS



Set2

S:SSS



# Dapsone

**Tohoku-u.**



# Diethanolamine

**Tohoku-u.**

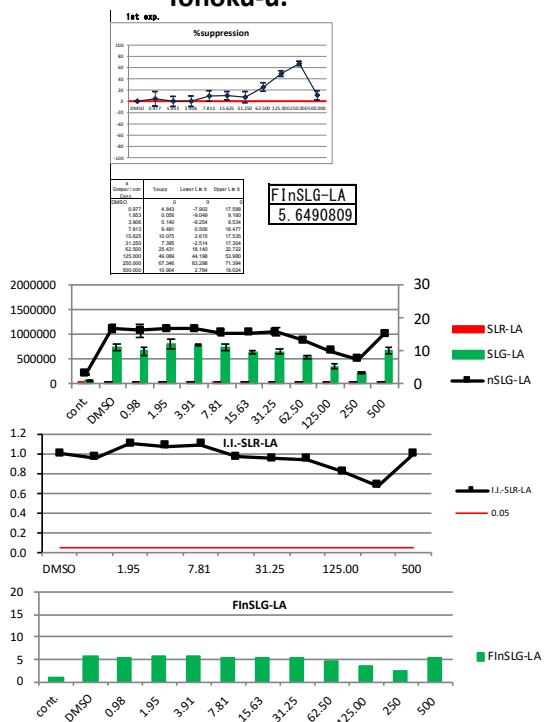


前ページより続く

2018.12.19 FDSC&TU MITA技術確認会

## p-Nitroaniline

Tohoku-u.



FDSC

