

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 総括・分担研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成30(2018)年 5月

目 次

| | |
|--|-----|
| I . 総括研究年度終了報告 | |
| 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ向けての 検討 | 3 |
| 相場節也 (東北大学病院・皮膚科・教授) | |
| II . 分担研究年度終了報告 | |
| 1 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ 向けての検討：国際バリデーションの施行 | 29 |
| 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) | |
| 2 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ 向けての検討：化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析， 精度管理 | 48 |
| 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) | |
| 3 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ 向けての検討：化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析， validation | 55 |
| 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) | |
| 4 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ 向けての検討：化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析， validation | 70 |
| 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) | |
| 5 . 免疫毒性評価試験法 Multi-ImmunoTox assay の国際 validation へ 向けての検討：統計学的視点に基づく Multi-ImmunoTox assay の データ解析方法の検討 | 83 |
| 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) | |
| 6 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ 向けての検討：化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析、 validation、プロトコール作成 | 90 |
| 木村 裕 (東北大学病院・皮膚科・助教) | |
| III . その他 | |
| 資料 Appendix 1. IL-2の転写、産生に関する化学物質、 シグナル伝達物質についての文献情報 | 154 |
| 資料 Appendix 2. Phase 2 validation studyの結果 | 161 |
| IV . 研究成果の刊行に関する一覧表 | 171 |

(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)
研究成果の概要

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

研究要旨

本研究においては、1) 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 α 刺激存在下のIL-2、IFN- γ 転写活性抑制とLPS存在下のIL-1、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は以下のよう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。3) 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。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IFN- γ 、IL-2、G3PDHプロモーター活性、THP-1細胞におけるIL-8、IL-1 β 、G3PDHプロモーター活性をhigh throughputに評価できる長期細胞株を樹立し、化学物質の免疫毒性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- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に關与するシグナル伝達経路への化学物質の影響を定量的に評価することができる。平成24年度から平成26年度の3年間にわたる厚生労働科学研究費補助金事業「多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発」において、我々はまず作用機序の明らかな種々の免疫抑制剤をMITAを用いて評価するなかで、化学物質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, Amphoterycin B, Benzethonium chloride, Chlorpromazine, Cisplatin, Dibenzo[a,i]pyrene, Dibutyl phthalate, Diethanolamine, Lead acetate, Nitrofurazone, Pentamidine isethionate, p-Nitroaniline, Pyrimethamine, Ribavirin, Sodium bromate, Triethanolamine, Actinomycin D, Cobalt chloride, Dimethyl sulfoxide, Histamine, Hydrocortisone, Isophorone diisocyanate, Mitomycin CはSigma-Aldrichから購入した。Aluminum chloride, Ethanol, Magnesium sulfate, Methanol, Nickel sulfate, Sodium lauryl sulfate,

Lithium carbonate, Mercuric chlorideは和光純薬から購入した。Hydrogen peroxideは三徳化学工業から購入した。Deoxyspergualinは医薬品卸業から購入した。

Jurkat T細胞由来#2H4細胞におけるIL-2, IFN- γ , GAPDHプロモーターアッセイおよびTHP-1 単球細胞由来TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞におけるIL-1 β , IL-8, GAPDHプロモーターアッセイ(図2)

IL-2およびIFN- γ プロモーター活性の測定には、ヒトTリンパ芽球性白血病由来細胞株JurkatにIL-2プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子(緑色に発色) IFN- γ プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子(橙色に発色) GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子(赤色に発色)を導入した#2H4細胞を用いた[2]。またIL-1 β プロモーター活性の測定には、ヒト急性単球性白血病由来細胞株THP-1にIL-1 β プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTGCHAC-A4細胞を、IL-8プロモーター活性の測定には、THP-1にIL-8プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子およびGAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTHP-G8細胞を用いた[3]。なおTGCHAC-A4細胞の樹立には人工染色体技術[4]を用い細胞の安定性を確保した。1ウェル当たり 2×10^5 個の#2H4細胞または1ウェル当たり 5×10^4 個のTGCHAC-A4細胞またはTHP-G8細胞を黒色の96-well プレート(Greiner bio-one)に播種し、薬剤を加え、37、5%CO₂下で1時間培養した。つづいて#2H4細胞については25nM PMAと1 μ M Ioの混合物(PMA/Io)、TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPSで刺激し37、5%CO₂下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を混合し、室温で10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量(SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA))を検出した。また細

胞数の違いや各種刺激後の生存率の違いを勘案しSLG-LA、SLO-LAをSLR-LAで除することによりそれぞれ normalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA), normalized SLO-luciferase activity(nSLO-LA)を算出した。さらに以下の式に%suppression抑制率を計算した。

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

MITAによる免疫毒性評価法

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 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-Immuno Tox 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)

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

C. 研究結果

MITAの最適化と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- γ 、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- γ 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CoCl₂、NiCl₂、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- γ 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- γ 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- γ 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 つのグループに、また IL-8 Luc assay による判定結果により 2 つのグループに分類し 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 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- γ レポーター活性と相関が認められることより IL-2 レポーター活性を KE とした AOP を構築することとした。IL-2 はおもに Th1 細胞が分泌するサイトカインであるが、T 細胞の増殖に必須なばかりでなく、IL-12R β 2、IL-4R α 4、gp130 などの発現を介して Th1、Th2 細胞、Treg 細胞の分化に不可欠なサイトカインである。また一方で、Th17 細胞の分化を抑制することにより不必要な自己免疫反応や炎症反応の発症を制御する [5] [6]。そこで化学物質の免疫毒性の指標として、IL-2 の転写制御を評価することは極めて重要な意味を有している。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。

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。その中で今年度は Phase 2 study を行った。

1) 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-Immuno Tox 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' (図10)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11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12)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 I, 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

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。

E. 結論

MITAにより60種類の化学物質を評価しdata set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 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。

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.

2. 学会発表

- 1) Kimura Y. et al. Dimethyl sulfoxide is not necessary to dissolve most sensitizers for their *in vitro* stimulation of dendritic cells. 47th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. Salzburg, Austria, September 27-30, 2017
- 2) Kimura Y. et al. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. 10th World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 3) 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. 10th World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

(予定を含む。)

1. 特許取得
特願2010-151362; PCT/JP2011/65090
2. 実用新案登録
なし
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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

図 1. 研究計画



図 2 . Multi-Immuno Tox assay (MITA)

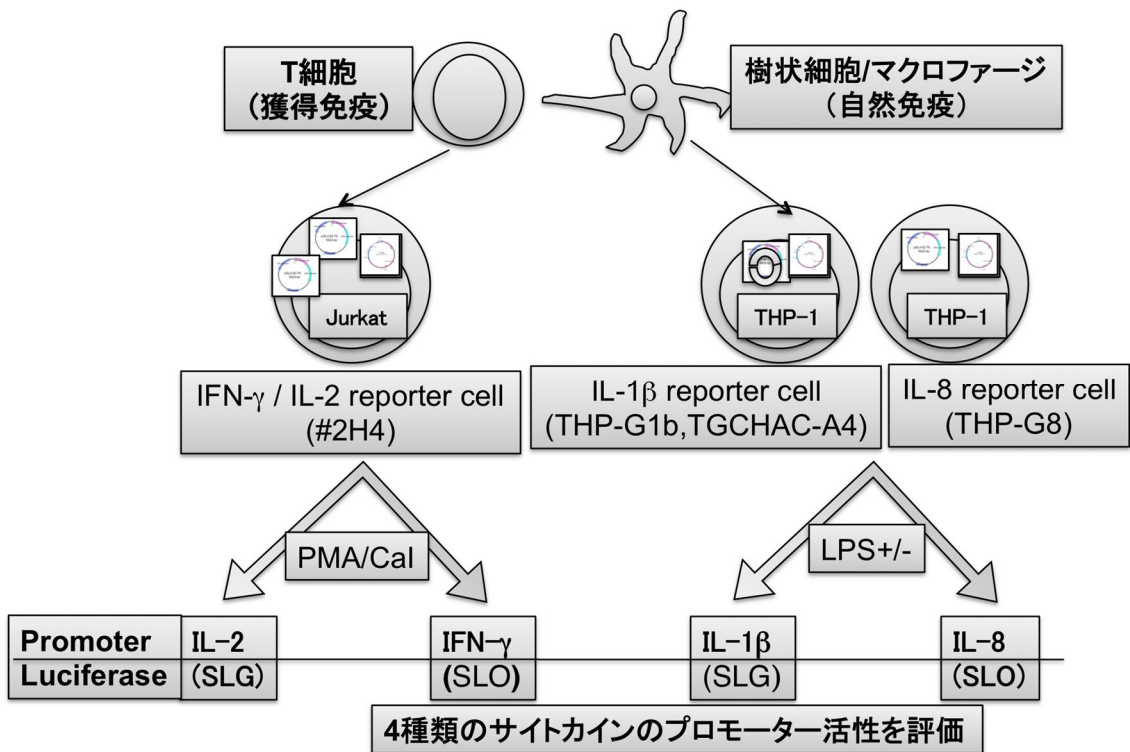


図3 . MITA の判定基準 (Criteria 1)

Criteria 1

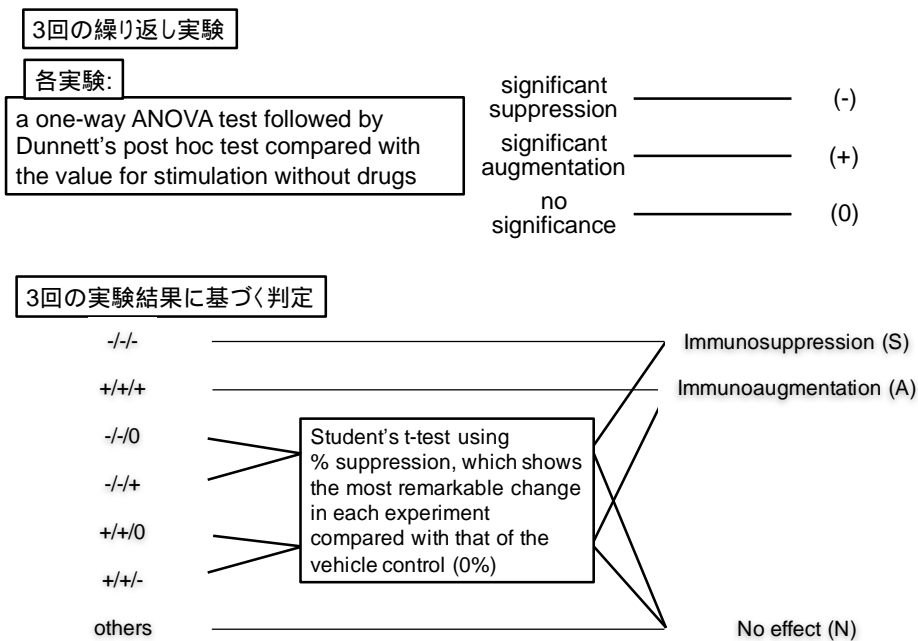


図4. MITA パラメータの LOEL 値の相関

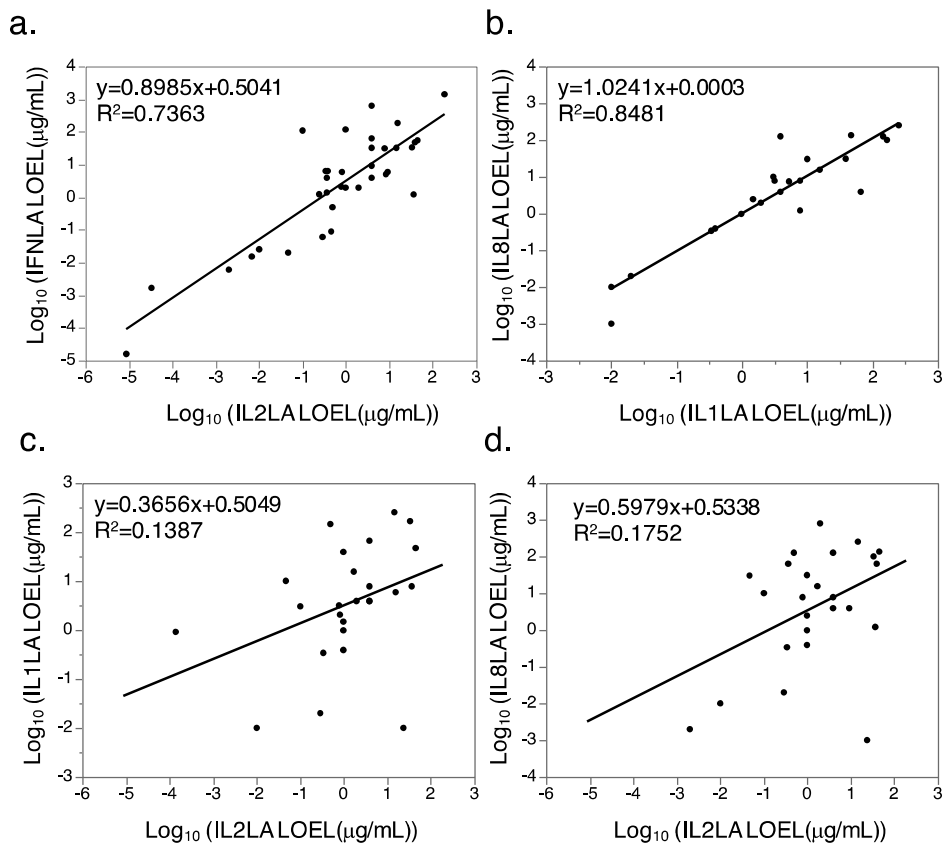


図 5. 60 化学物質の hierarchical clustering

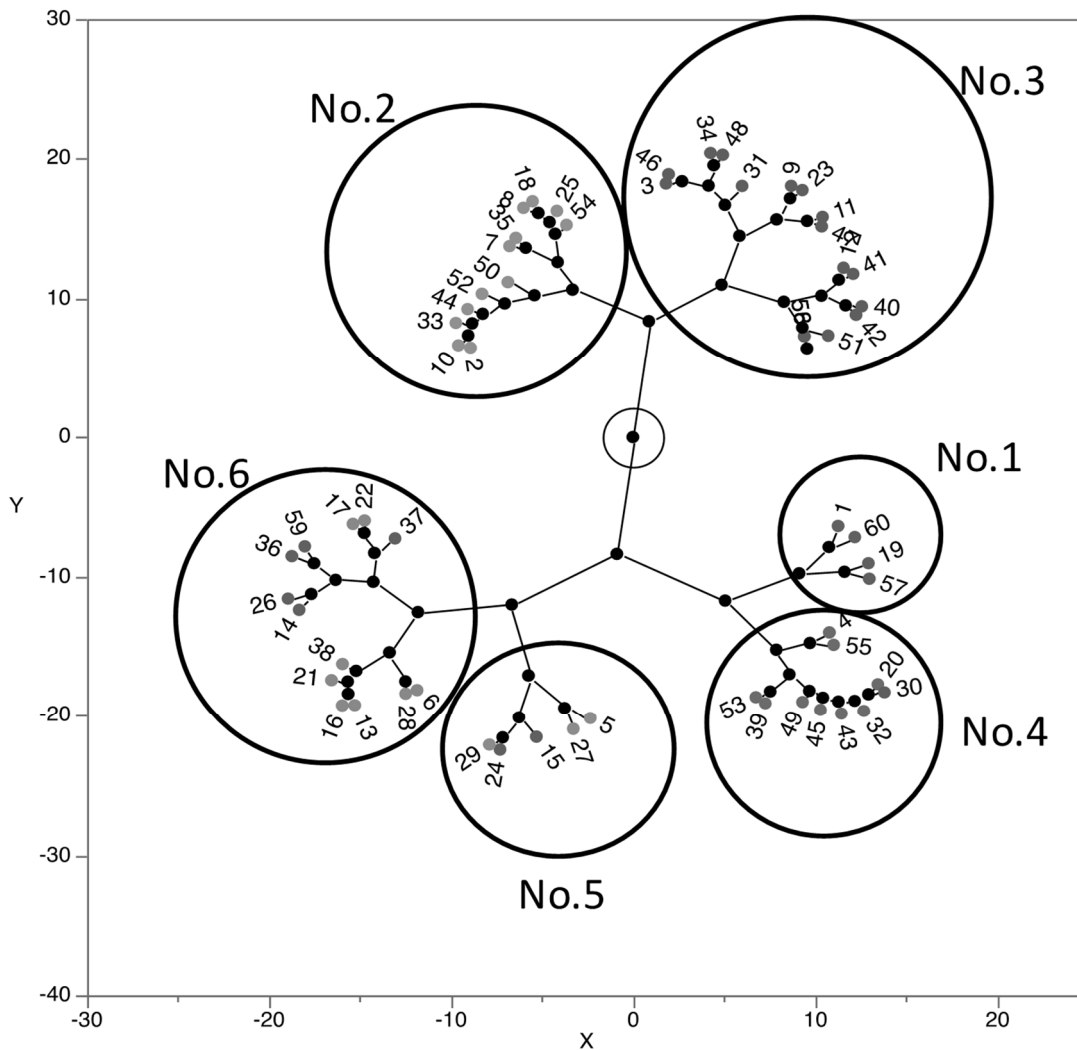
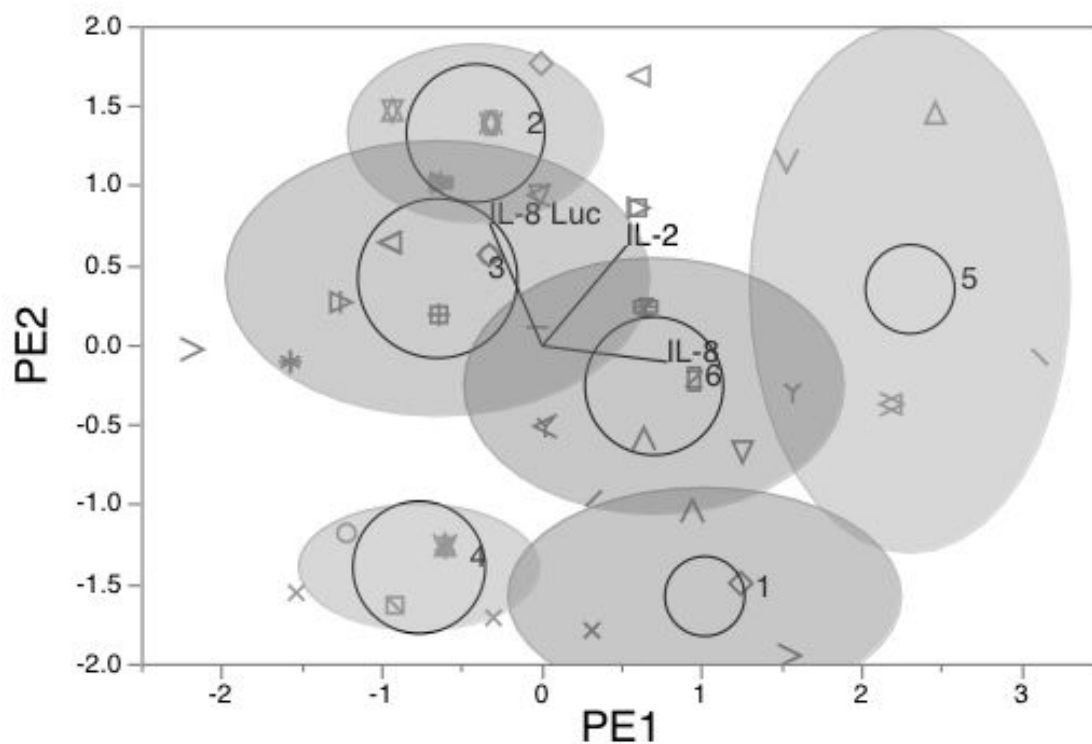


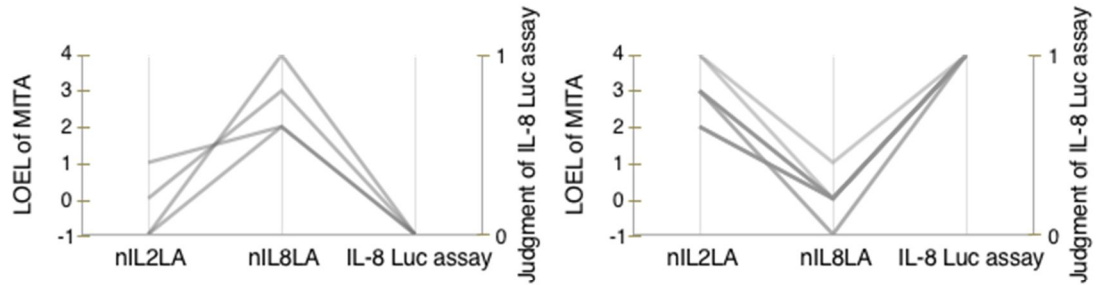
図 6. 60 化学物質の K-means clustering



| | | | |
|---|--------------------------|---|-------------------------|
| ○ | 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 |

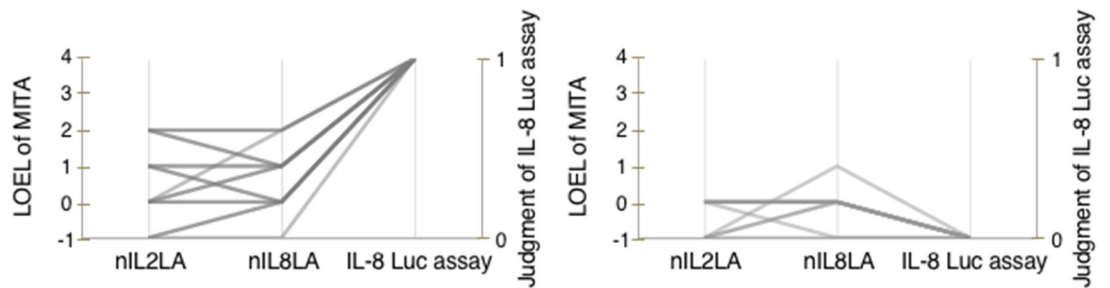
図7. 各 cluster の免疫毒性 profile

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

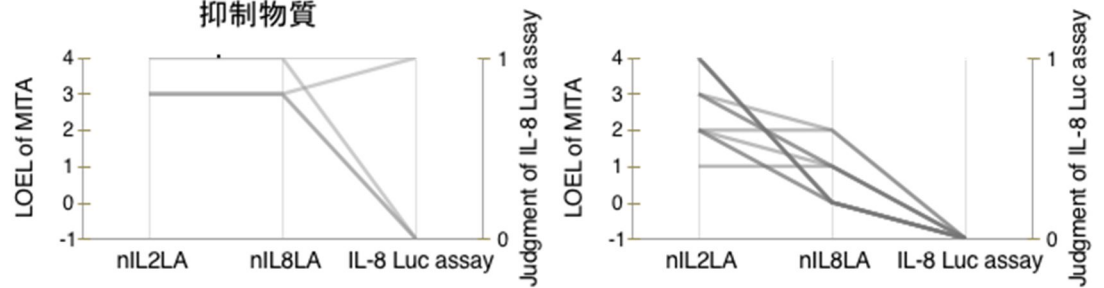


図 8 . IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

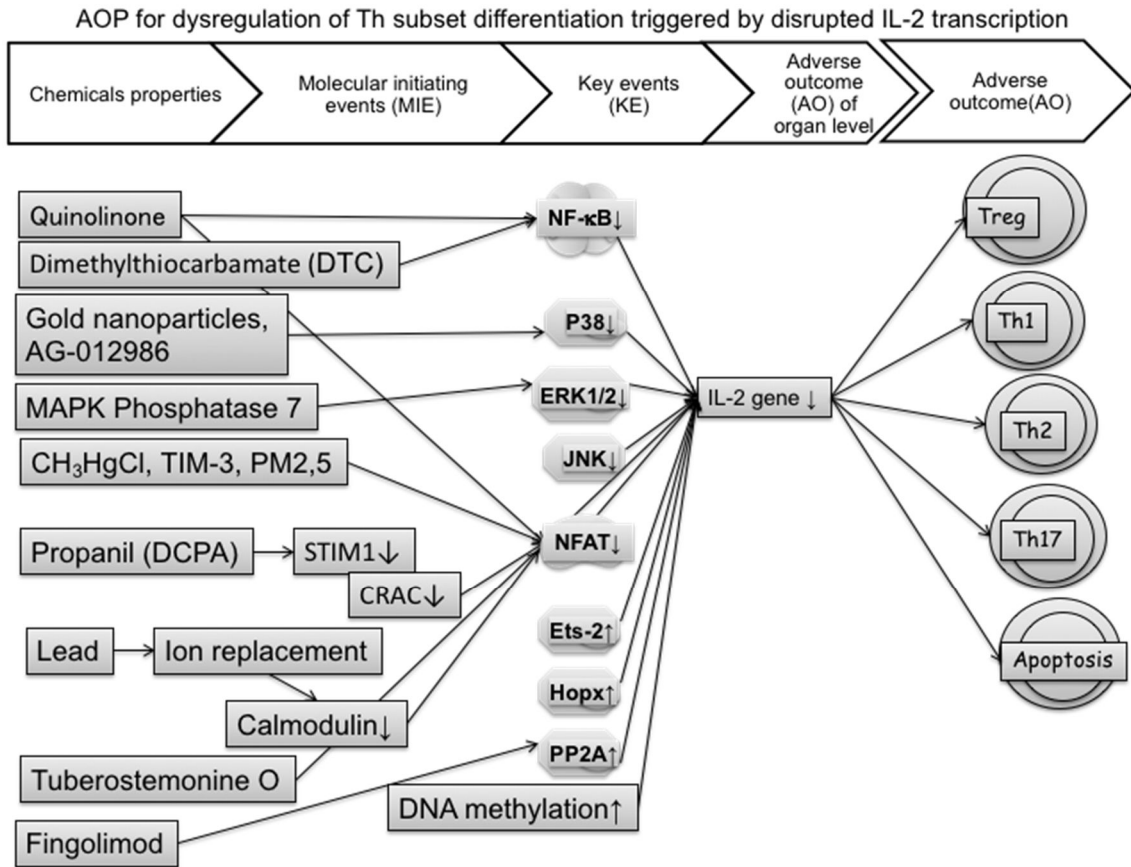


図 9 . IL-2 転写活性増強を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

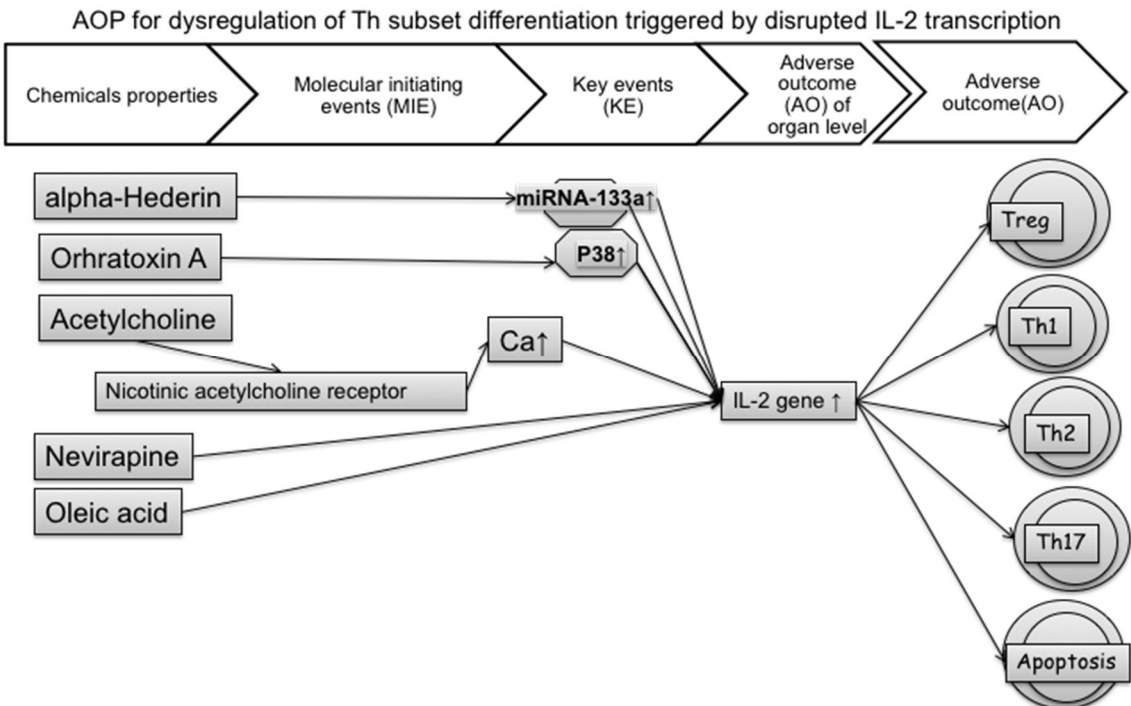
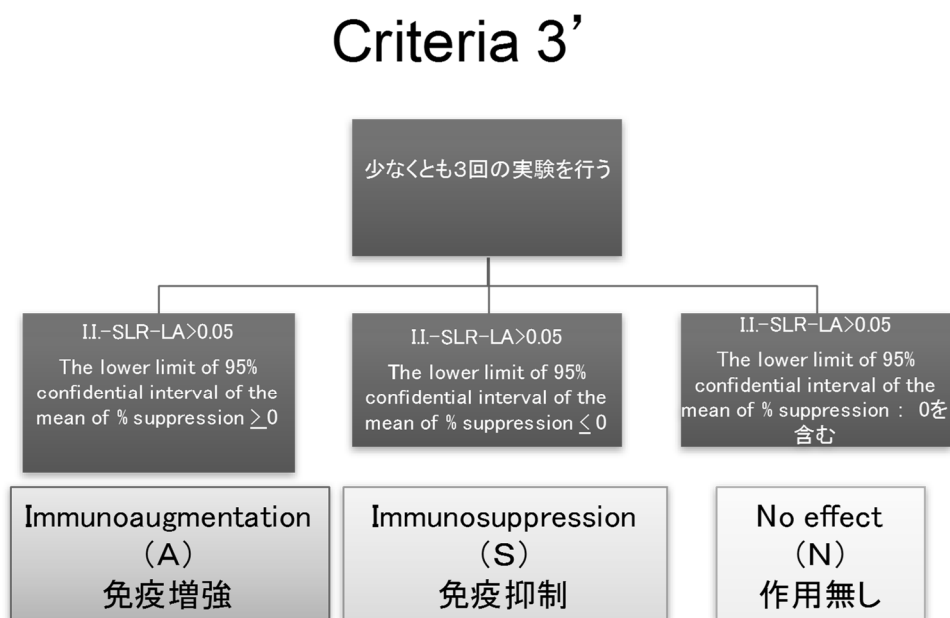


図 10. MITA の判定基準 (Criteria 3')



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濃度で負の統計的有意を示す場合のみImmunoaugmentationと判定する

図 11 . 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 ≥ 0.05

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

図 12 . 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 ≥ 35 (suppressive) or ≤ -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 ≥ 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- γ | | IL-1 β | | 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- γ | | IL-1 β | | IL-8 | | IL-8 Luc |
|----|--------------------------|-------|--------------------|---------------|--------------------|--------------|--------------------|-------|--------------------|----------|
| | | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ 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- γ | | IL-1 β | | IL-8 | | IL-8 Luc |
|----|-------------------------|-------|--------------------|---------------|--------------------|--------------|--------------------|-------|--------------------|----------|
| | | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ g/mL) | Judge | LOEL (μ 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 isethion | 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 particulate | 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-Mercaptobenzothiazole | 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 sulfate | 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 | Diethylstilbestrol | 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 Hydrazone (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% | | 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 | 500mg/ml(DMSO) | | 500mg/ml(DMSO) | | 500mg/ml(DMSO) | | S |
| | | | | 1st round | S : SSS | S | S : SSS | S | S : SSS | S | |
| | | | | 2nd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| | | | | 3rd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| 2 | Hydrocortisone water soluble | 50-23-7 | N : SNN | solubility | 125mg/ml(DMSO) | | 125mg/ml(DMSO) | | 125mg/ml(DMSO) | | S |
| | | | | 1st round | S : SAS | N | S : SSS | S | S : NSS | S | |
| | | | | 2nd round | N : NNN | | S : SSS | | S : SSN | | |
| | | | | 3rd round | N : NNN | | S : SSN | | N : NNS | | |
| 3 | Lead(II) acetate | 6080-56-4 | S : SSS | solubility | 100mg/ml(ddw) | | 25mg/ml(ddw) | | 100mg/ml(ddw) | | S |
| | | | | 1st round | S : SSS | S | S : SSS | S | S : SSS | S | |
| | | | | 2nd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| | | | | 3rd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| 4 | Nickel sulfate hexahydrate | 10101-97-0 | S : SSS | solubility | 100mg/ml(ddw) | | 100mg/ml(ddw) | | 100mg/ml(ddw) | | S |
| | | | | 1st round | S : SSS | S | S : SSS | S | S : SSS | S | |
| | | | | 2nd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| | | | | 3rd round | S : SSS | | S : SSS | | S : SSS | | |
| 5 | Dimethyldithiocarbamate | 137-30-4 | N : SNN | solubility | 62.5mg/ml(DMSO) | | | | 62.5mg/ml(DMSO) | | N |
| | | | | 1st round | N : NNN | N | N : NNN | N | N : NNA | N | |
| | | | | 2nd round | N : NNN | | S : SSN | | N : NNN | | |
| | | | | 3rd round | N : NSN | | N : NNN | | N : NNN | | |
| Within | | | | 80% | | 80% | | 80% | | | |
| Accuracy | | | | | 100% | | 80% | | 80% | 80% | |
| Between | | | | 80% | | | | | | | |

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)を外務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 30th, 2018
- 3) Minutes MITA validation study on April 10th, 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 (Deleterious substances) | 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 29th, 2018

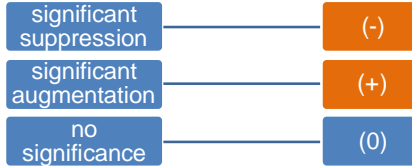
- The change in criteria of MITA
- The results of Phase I and Phase II based on the criteria 4.
- The application of the threshold of the maximum % suppression and the change of criteria from 4 to 5.
 - The distribution of the maximum % suppression values of chemicals with significant effects and those 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)

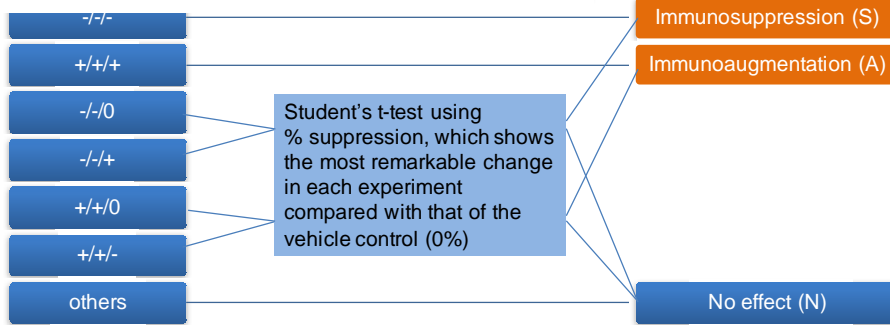
Three independent experiments for each drug.

In each experiment:

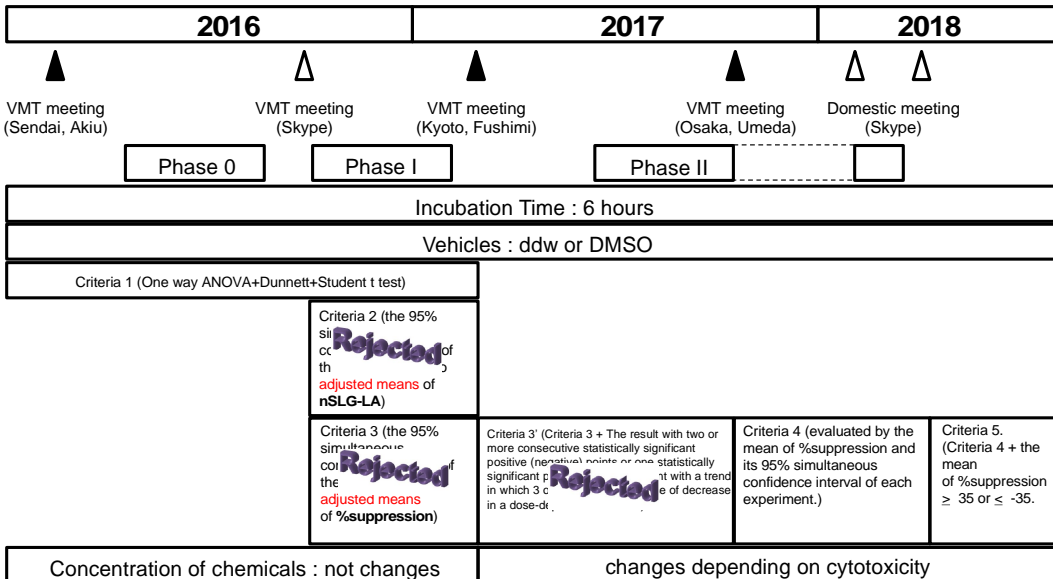
a one-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test compared with the value for stimulation without chemicals in the concentration at which I.I.-SLR-LA is greater than or equal to 0.05



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 ≥ 35 (suppressive) or ≤ -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 ≥ 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 ≥ 35 (suppressive) or ≤ -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 20th 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.

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析，精度管理

分担研究者 近江谷克裕

(国)産業技術総合研究所

研究要旨

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国際バリデーションPhase 2試験（施設間再現性試験）を実施した。コード化された20物質において、1セット3回からなる試験を実施し、その結果、バリデーション参加3施設間での良好な施設間再現性が確認された。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

A．研究目的

我々はこれまでに多色発光タンパク質による新たな *in vitro* 免疫毒性評価試験法、いわゆる Multi-ImmunoTox assay (MITA) を確立し各種毒性評価発光細胞を樹立した。現在、これらの細胞群を用いた化学物質の免疫毒性評価法の確立を目指している。そこで本研究では、化学物質免疫毒性評価のための MITA 法の OECD ガイドライン化を視野に入れたバリデーション試験の実施を目的とする。

具体的には、東北大学で樹立された Jurkat 細胞における IFN- γ 、IL-2、G3PDH プロモータ活性を測定する細胞株 2H4 及び THP-1 細胞における IL-8 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 TGCHAC-A4、IL-1 と G3PDH プロモータ活性を定量化できる細胞株 THP-G8 をモデル細胞として施設内、施設間バリデーション試験を実施し、

ガイドライン化するための手法の最適化を目指す。プロジェクト1,2年目では、免疫毒性の評価系として#2H4 細胞株を用いた IL-2 プロモータ活性抑制評価系のプレバリデーション（技術移転性の確認）およびコード化された5物質を用いたバリデーション Phase1 試験（施設内再現性及び施設間再現性）において良好な結果を得た。本年度は、次のステップとして、バリデーション Phase2 試験を実施し、20種類のコード化された被験物質の評価を行い、施設間再現性について検証を行う。

B．研究方法

IL2レポーター活性抑制物質評価のための MITA assay

IL-2とIFN- γ 、G3PDHプロモータにそれぞれSLG、SLOおよびSLRルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターをJurkat細胞に導入

した3色発光細胞株#2H4を用いて試験を行った。化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法についてはMulti-Immuno Tox Assay protocol Ver.009.1Eに準ずる。試験には、国際バリデーション実行委員会にて選定された20種類のコード化した被験物質を供試した。各物質1セット3回からなる試験を実施し、IL-2レポーター活性抑制の有無を評価した。他のバリデーション参加施設（食品薬品安全センター、産総研四国センター）の評価結果と比較し、施設間再現性について検証した。（倫理面への配慮）

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 研究結果

コード化された20種類の化学物質に対し、3回繰り返し試験を実施した。各化学物質の計測結果および%suppressionを図1に示す。また、Criteria5におけるIL2抑制効果の評価結果を図2に示した。Criteria5に基づいた評価において、20物質中5物質においてimmunosuppression（IL-2プロモータ活性抑制）、5物質においてimmunoaugmentation（IL2発現亢進）、1物質においてimmunosuppression/ immunoaugmentation、9物質において無作用の結果となった。これらの結果を、他の参加2施設の結果と比較すると、80%（16/20）の施設間再現性が確認された。またリードラボである東北大の結果との比較においても、80%（based on majority）の一致率が確認された。

D. 考察

Phase2試験では、各被験物質で3回1セットの試験を実施した。いずれの物質においても、3試行の結果において、SLG-LAやnSLG-LA及び%suppressionの濃度依存的変動に一致した傾向が見られ、安定した実験手技をもって試験を実施できたものと思われる。これらの結果をもって、Criteria5に基づいた被験物質の評価を行い、他の参加2施設の結果と比較したところ、産総研つくばの結果は18物質において、3施設評価結果のMajorityと一致した。不一致であった4、Dibromoacetic acidは、リードラボを含め、各施設の評価が「S, A/S, A, N」と分かれ

ており、Criteriaによる評価が非常に難しい被験物質であると考えられる。またもう一つの不一致物質であるDibromoacetic acidは、他施設の結果がimmunosuppressionであるのに対して、immunoaugmentationであった。%suppressionのグラフを3施設で比較すると全体的な傾向は一致しており、高濃度域でのIL-2プロモータ活性抑制作用も確認されるが他の施設に比べて反応が弱く、評価が異なる結果となったようである。

最終的に、20被験物質中16物質で3施設の結果が一致し、80%の良好な施設間再現性が確認された。

E. 結論

免疫毒性試験のIL-2プロモータ活性評価系のバリデーションPhase2試験を終了し、他の2試験施設の結果と比較することにより良好な施設間再現性を確認した。

G. 研究発表

Yasuno R., Mitani Y., Ohmiya Y., 2017. Effects of N-Glycosylation Deletions on Cypridina Luciferase Activity. Photochem Photobiol. 94, 338-342.

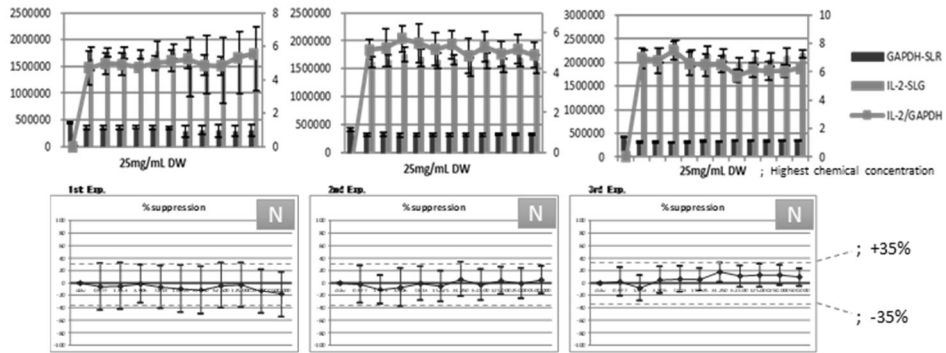
H. 知的財産権の出願・登録状況

特許

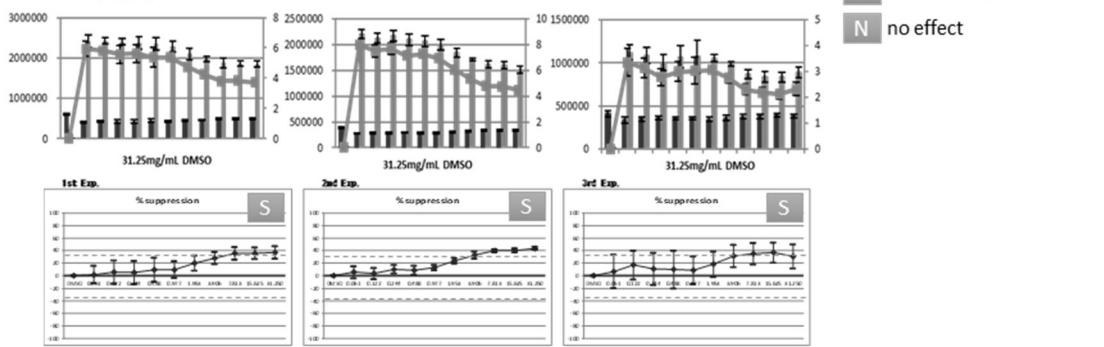
特願 2016-048403 / PCT/JP2017/009467

図 1 phase2 試験結果

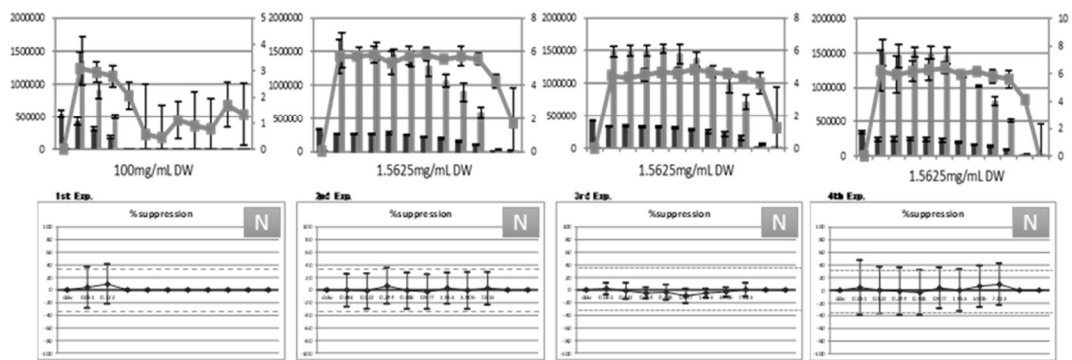
1、2,4-Diaminotoluene



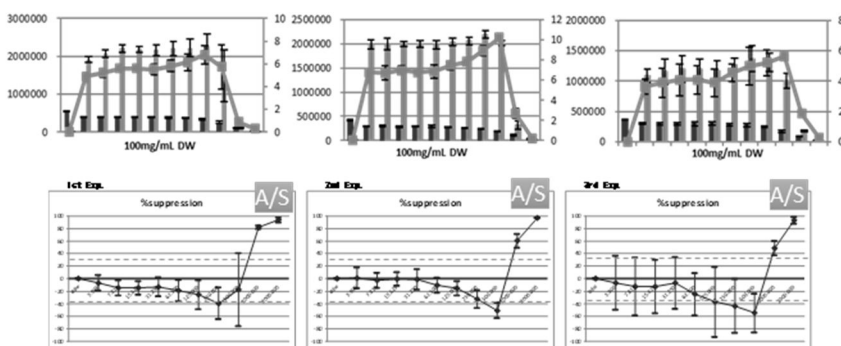
2、Benzo(a)pyrene



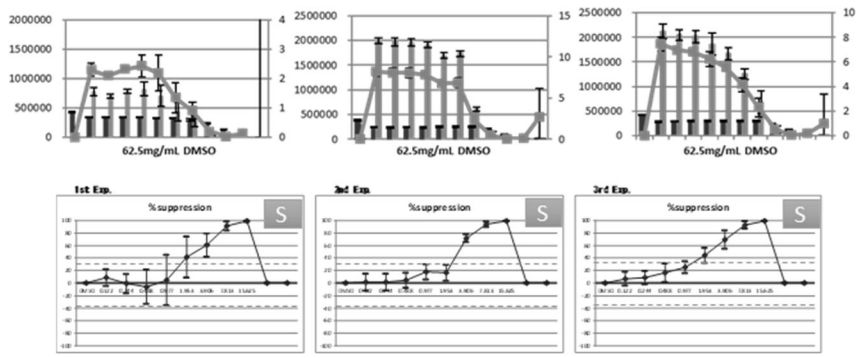
3、Cadmium chloride



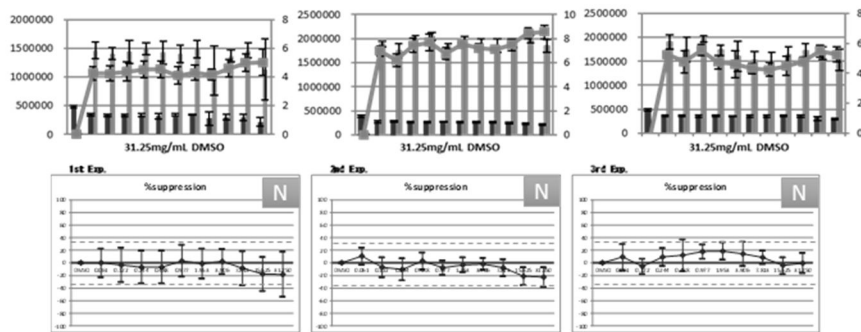
4、Dibromoacetic acid



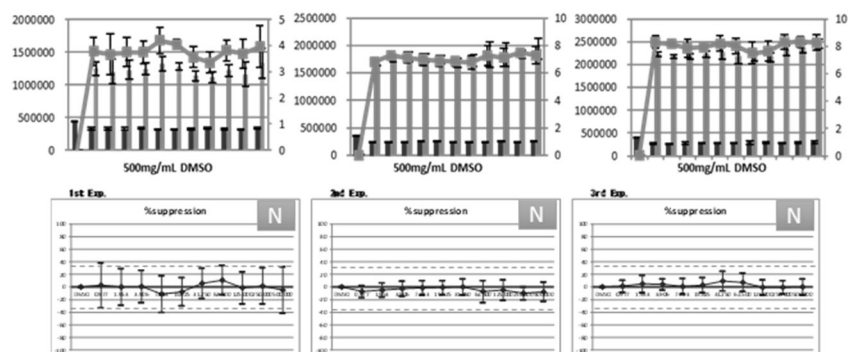
5, Diethylstilbestol



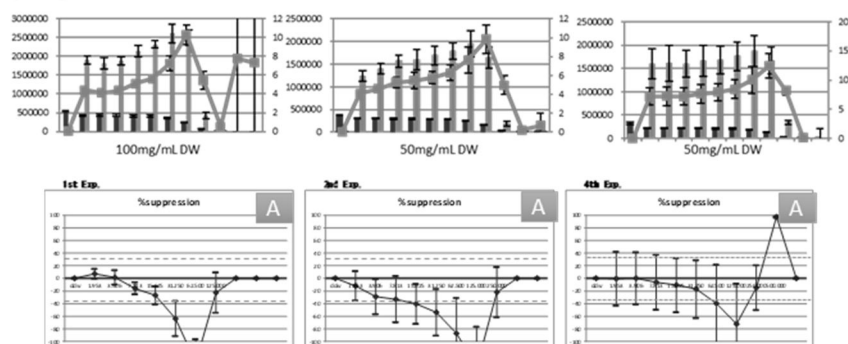
6, Diphenylhydantoin



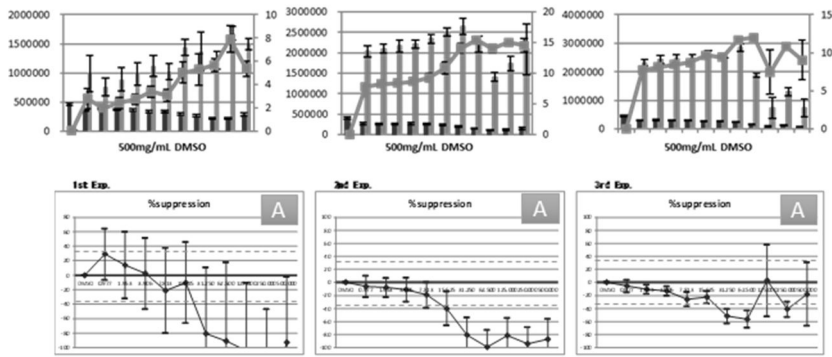
7, Ethylene dibromide



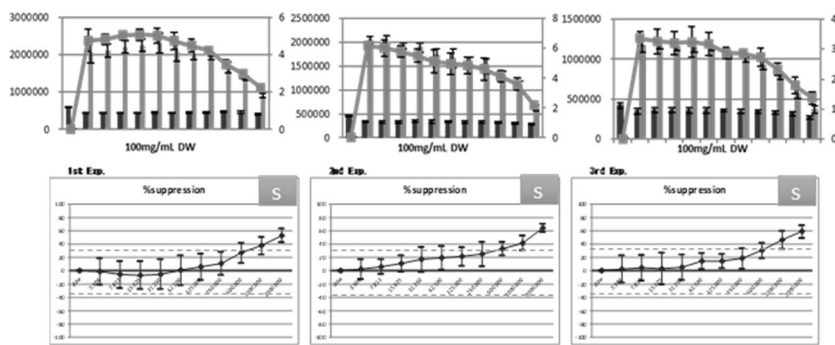
8, Glycidol



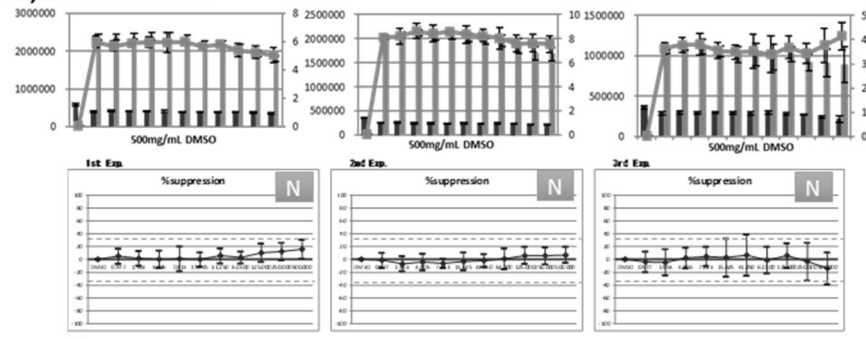
9, Indomethacin



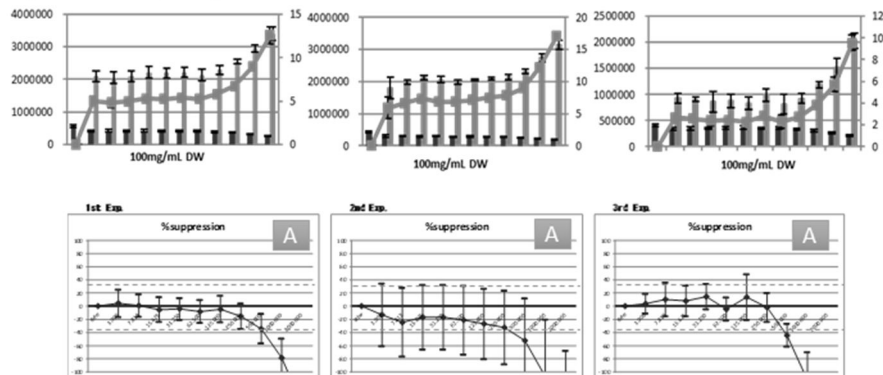
10, Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)



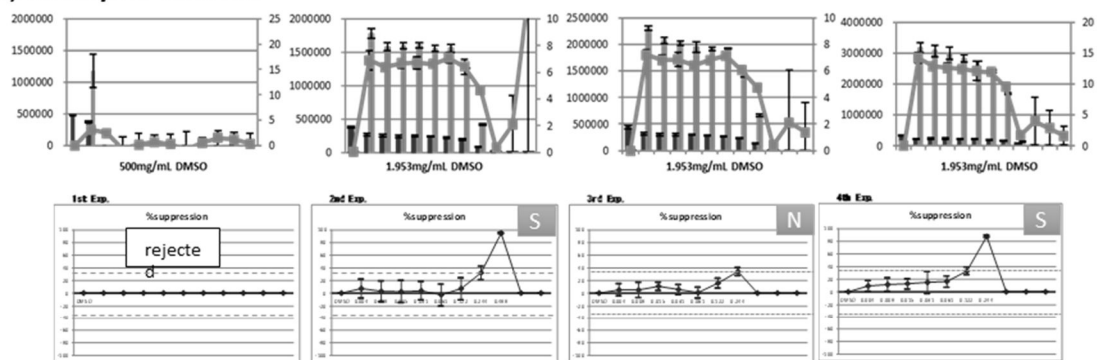
11, Nitrobenzene



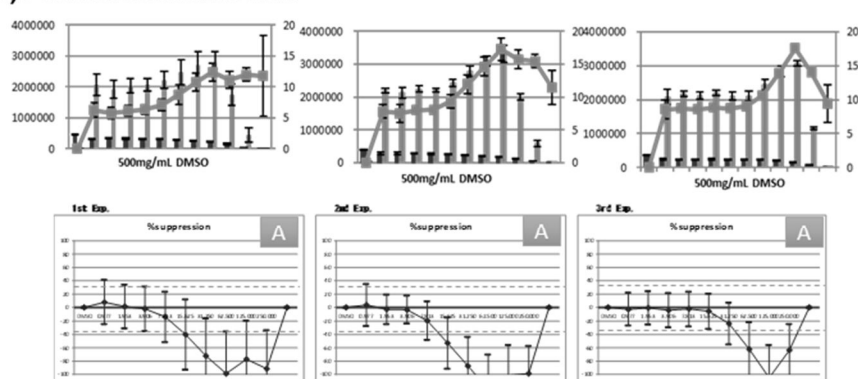
12, Urethane, Ethyl carbamate



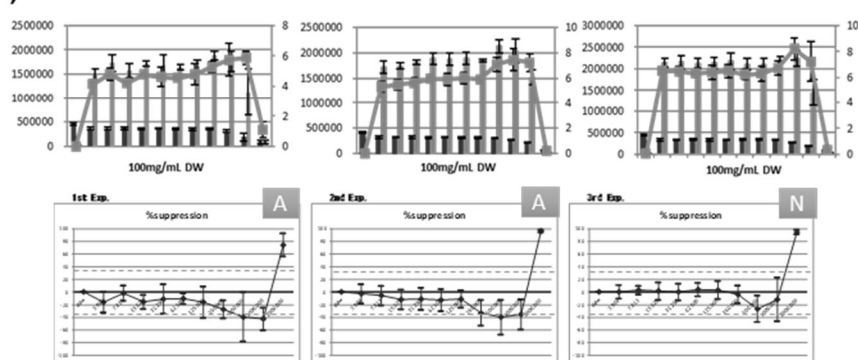
13, Tributyltin chloride



14, Perfluorooctanoic acid



15, Dichloroacetic acid



16, Toluene

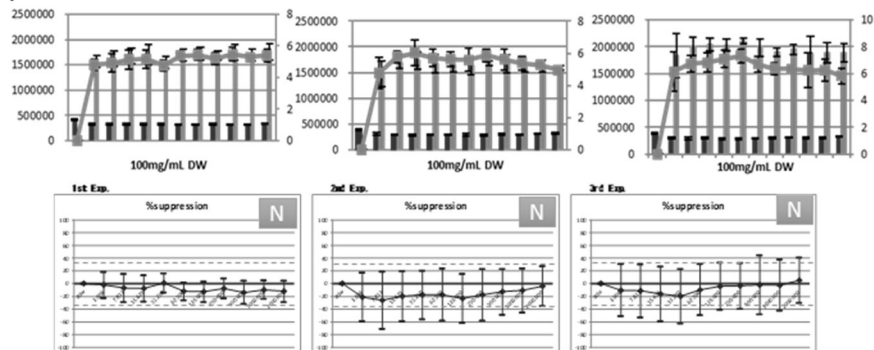


図2 Criteria5 における評価結果

| | Chemical | Result |
|----|---|-----------------|
| 1 | 2,4-Diaminotoluene | N : NNN |
| 2 | Benzo(a)pyrene | S : SSS |
| 3 | Cadmium chloride | N : NNN |
| 4 | Dibromoacetic acid | A/S : A/SA/SA/S |
| 5 | Diethylstilbestol | S : SSS |
| 6 | Diphenylhydantoin | N : NNN |
| 7 | Ethylene dibromide | N : NNN |
| 8 | Glycidol | A : AAA |
| 9 | Indomethacin | A : AAA |
| 10 | Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid) | S : SSS |
| 11 | Nitrobenzene | N : NNN |
| 12 | Urethane, Ethyl carbamate | A : AAA |
| 13 | Tributyltin chloride | S : SNS |
| 14 | Perfluorooctanoic acid | A : AAA |
| 15 | Dichloroacetic acid | A : AAN |
| 16 | Toluene | N : NNN |
| 17 | Acetonitril | N : NNN |
| 18 | Mannitol | N : NAN |
| 19 | Vanadium pentoxide | N : NAN |
| 20 | o-Benzyl-p-chorolophenol | S : SSS |

S ; immunosuppression

A ; immunoaugmentation

N ; No effect

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
H29年度分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, validation

分担研究者 山影康次
一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、T細胞、マクロファージのサイトカイン転写調節に及ぼす化学物質の影響をレポーター遺伝子の発光を利用して評価する化学物質の免疫毒性評価試験法である。昨年度は、IL-2転写活性障害を指標とするT細胞分化異常誘導化学物質評価系の確立を目指し、コード化した化学物質を用いて施設内再現性および施設間再現性が良好であることを確認した。今年度は、プロトコル (Ver.009.1E) に従ってコード化した20物質について、3回の繰り返しを1セットとした実験を行い、3施設の結果比較による施設間再現性とリードラボ (東北大) との比較による正確性を検討した。その結果、閾値を設定した判定基準5を採用することによって、施設間再現性は80% (16/20)、当該施設における正確性は85% (17/20) となり、いずれもstudy planにおける基準を満たした。

キーワード：IL-2 レポーター活性、バリデーション試験、施設内再現性、正確性

A. 研究目的

MITAの開発者である相場らは、L-2 転写調節障害を key event とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP を作成した。それに基づき、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 OECD テストガイドライン化を目指し、国際バリデーション試験が開始された。

我々は、試験施設[秦野研究所、産業技術総合研究所（バイオメディカル研究部門）、産業技術総合研究所（健康工学研究部門）]として参加し、昨年度までに良好な技術移転性および施設内再現性が確認された。

今年度は、施設間再現性と正確性を確認するために、国際バリデーション実行委員会が選定した 20 化学物質（コード化物質）を用いて Phase II study を実施した。

B. 研究方法

B-1) 使用した細胞

IL-2レポーター活性試験には、緑、橙、赤色の発光色の異なるルシフェラーゼ遺伝

子をIL-2, IFN- γ , G3PDHの各プロモーター領域に繋いだベクター（それぞれ緑、橙、赤色）をJurkat細胞（T細胞由来）に導入した安定細胞株#2H4を使用した。

B-2) 使用した化学物質

コード化された20種類の化学物質（コード番号：MIC601～MIC620）が国立医薬品食品衛生研究所から送付され、それらを試験に使用した。化学物質情報を表1に示した。

B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコル (Ver.009.1E) に準じて行った。概要は以下の通りである。

#2H4細胞を96 wellプレートに播種（ 2×10^5 細胞/ウェル、50 μ L/ウェル）した。また、適切な溶媒（蒸留水に25 mg/mLで溶解する場合は蒸留水を使用し、不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）を使用）に溶解した化学物質原液を調製（可溶の場合の溶解最高濃度は、蒸留水では100 mg/mL、DMSOでは500 mg/mLとした）し、さらに溶媒

で段階希釈(公比2)して10濃度を調製した。なお、溶解性は、15,000 rpmで5分間遠心し、沈澱の有無を確認することにより判定した。

溶媒に溶解した化学物質調製液を培地に添加(蒸留水の場合は25倍希釈、DMSOの場合は10倍希釈後さらに50倍希釈)して2倍濃度の処理液を調製し、その50 µLを細胞懸濁液(50 µL)が入っている各ウェルに添加して処理した(溶媒の最終濃度:蒸留水は2 vol%, DMSOは0.1 vol%)。処理開始1時間後にPMA/ionomycinによる活性化処理を行い、6時間処理(37 °C、5%CO₂)後にTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を用いて各色ルシフェラーゼ活性を発光測定装置(AB-2350 フェリオス、アトー社製)で測定し、IL-2プロモーター活性を算出した。各物質について、試験成立条件を満たした3回の実験結果(1セット)が得られるまで異なる日による実験を繰り返した。

なお、すべての実験が終了したのち、判定基準を再検討(判定基準4)するために、6物質について追加実験を各1回行ったが、以下の最終的判定(判定基準5)には、追加実験のデータは使用しなかった。

<判定基準5>

以下の3つの基準を満たす場合を陽性(suppressiveまたはstimulatory)とし、それ以外を陰性と判定する。

- SLR-LAの阻害指標(I.I.-SLR-LA)が0.05以上の濃度のみを判定に使用する。
- %suppressionの平均値が35%以上(suppressive)か-35%以下(stimulatory)でかつ、同時95%信頼区間を用いた判定で有意(統計学的有意)である。
- 統計学的有意となる連続した2つ以上の濃度が得られるか、統計学的有意となる濃度は1つであるが、すくなくとも連続した3濃度で濃度依存性を示す(この場合、統計学的有意を示さなければ、0を挟んでもよい)。

C. 結果

コード化した20物質の1セットの実験結果を図1に示した。

MITAプロトコル(Ver.009.1E)に従って、判定(判定基準3')した結果、施設間再現性が良好でなかったことから、判定基準4を設定し、以下の6物質について追加実験を

実施し、再検等した。

Diphenylhydantoin (MIC615)
Ethylene dibromide (MIC605)
Toluene (MIC616)
Acetonitril (MIC617)
Mannitol (MIC619)
Vanadium pentoxide (MIC608)

しかしながら、追加データを考慮した判定基準4においても施設間再現性の改善は認められなかった。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%と設定した判定基準5を設定し再評価した。その結果、20物質の判定は、以下の通りであった。

IL-2転写活性作用影響無: 9物質

IL-2転写活性抑制作用有: 6物質

IL-2転写活性刺激作用有: 5物質

判定基準の変更により判定が変わった物質は、cadmium chlorideとisonicotinic acid hydrazideの2物質で、いずれもIL-2転写活性抑制作用有が影響無となった。

判定基準5による施設間再現性は80%(16/20)、リードラボである東北大学の結果比較による正確性は85%(17/20)であった(表2)。

D. 考察

Phase Iにおいて良好な結果(施設内再現性:87%、施設間再現性:90%)が得られたことから、Phase IIとして施設間再現性を確認するために、コード化した20物質について3回の繰り返し実験(1セット)を行なったが、良好な施設間再現性が得られなかった。すでにガイドライン化された皮膚感作性試験ガイドラインであるIL-8 Luc assayと同様の判定基準4を検討したが、結果の改善は認められなかった。

これらの結果を踏まえ、%suppressionの閾値を設定した判定基準5を採用したところ、80%の施設間再現性を達成することができた。

今回の判定基準3'から5への変更は、微妙な差が統計学的には有意と判定されるが、その中でも明らかな差(閾値)以上を生物学的有意とする基準変更である。

この変更によって、20物質中2物質の結果が変わることとなったが、3試験施設の中では判定結果が変わった物質数は最も少なか

った。これは、我々の結果の多くはこの変更によって影響されない明らかな反応が得られていたことを示している。

また、この変更によるPhase Iの結果を確認したところ、施設内再現性は3試験施設とも80%、施設間再現性は80%、正確性は80～100%となり、判定基準の変更による影響は許容範囲内であった。

リードラボとの比較では3物質の結果が不一致であったが、そのうち、dibromoacetic acidは3試験施設のいずれも結果が一致せず、化学物質の特性と考えられた。残り2物質のisonicotinic acid hydrazideとnitrobenzeneは他の2試験施設と結果が一致しなかった。Isonicotinic acid hydrazideについては、選択した溶媒と最終濃度が異なっていることから、溶解性の判断が異なったことにより、処理濃度が低く設定されたことが原因である可能性が示唆された。溶媒に対する溶解性は遠心による沈澱物の有無を目視によって判断していることから、施設間差が生じた可能性が考えられる。一方、nitrobenzeneについては、溶媒および最高処理濃度も同一であり、結果が不一致となった原因は不明であるが、我々の3回の結果はいずれも濃度依存的な抑制(suppression)反応を示し、再現性のある結果であった。

E. 結論

試験施設としてコード化した20物質のIL-2レポーター活性試験を実施した。3試験施設から提出された結果をもとに良好な施設間再現性が得られる判定基準を確定し、

80%以上の施設内再現性および施設間再現性が得られるMITAプロトコルを確定することができた。これにより、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バリデーション試験は終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) Yutaka Kimura, Rie Yasuno, Mika Watanabe, Miwako Kobayashi, Tomoko Iwaki, Chizu Fujimura¹, Yoshihiro Ohmiya, Kohji Yamakage, Yoshihiro Nakajima, Mayumi Kobayashi, Takashi Omori, Hajime Kojima and Setsuya Aiba. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. 10th World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017

2) 木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴¹、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-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

表 1 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase II study) に使用した化学物質

| No. | Chemical | Cas.no. | State | Code No. |
|-----|--|------------|--------|----------|
| 1 | 2,4-Diaminotoluene | 95-80-7 | Solid | MIC618 |
| 2 | Benzo(a)pyrene | 50-32-8 | Solid | MIC601 |
| 3 | Cadmium chloride | 10108-64-2 | Solid | MIC602 |
| 4 | Dibromoacetic acid | 631-64-1 | Solid | MIC610 |
| 5 | Diethylstilbestol | 56-53-1 | Solid | MIC611 |
| 6 | Diphenylhydantoin | 630-93-3 | Solid | MIC615 |
| 7 | Ethylene dibromide | 106-93-4 | Liquid | MIC605 |
| 8 | Glycidol | 556-52-5 | Liquid | MIC607 |
| 9 | Indomethacin | 53-86-1 | Solid | MIC609 |
| 10 | Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid) | 54-85-3 | Solid | MIC612 |
| 11 | Nitrobenzene | 98-95-3 | Liquid | MIC603 |
| 12 | Urethane, Ethyl carbamate | 51-79-6 | Solid | MIC604 |
| 13 | Tributyltin chloride | 1461-22-9 | Liquid | MIC613 |
| 14 | Perfluorooctanoic acid | 335-67-1 | Solid | MIC614 |
| 15 | Dichloroacetic acid | 79-43-6 | Liquid | MIC606 |
| 16 | Toluene | 108-88-3 | Liquid | MIC616 |
| 17 | Acetonitril | 75-05-8 | Liquid | MIC617 |
| 18 | Mannitol | 69-65-8 | Solid | MIC619 |
| 19 | Vanadium pentoxide | 1314-62-1 | Solid | MIC608 |
| 20 | o-Benzyl-p-chorolophenol | 120-32-1 | Solid | MIC620 |

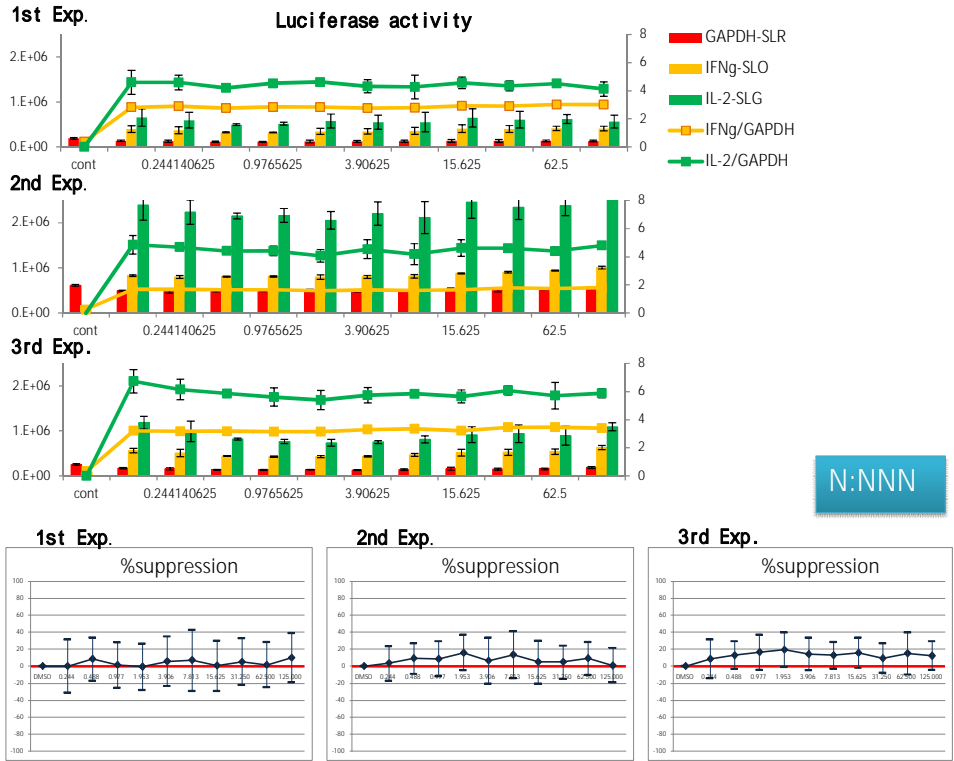
表2 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase II study) の結果

| 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-Benzy-p-chlorophenol | 120-32-1 | S : SSS | S : SSS | S : SSS | S : SSS | 1 | S |
| Accuracy | | | | 90% | 85% | 95% | | 95% |
| | | | | | | | Between 80% | |

図1 コード化 20 物質の IL-2 レポーター活性および%suppression

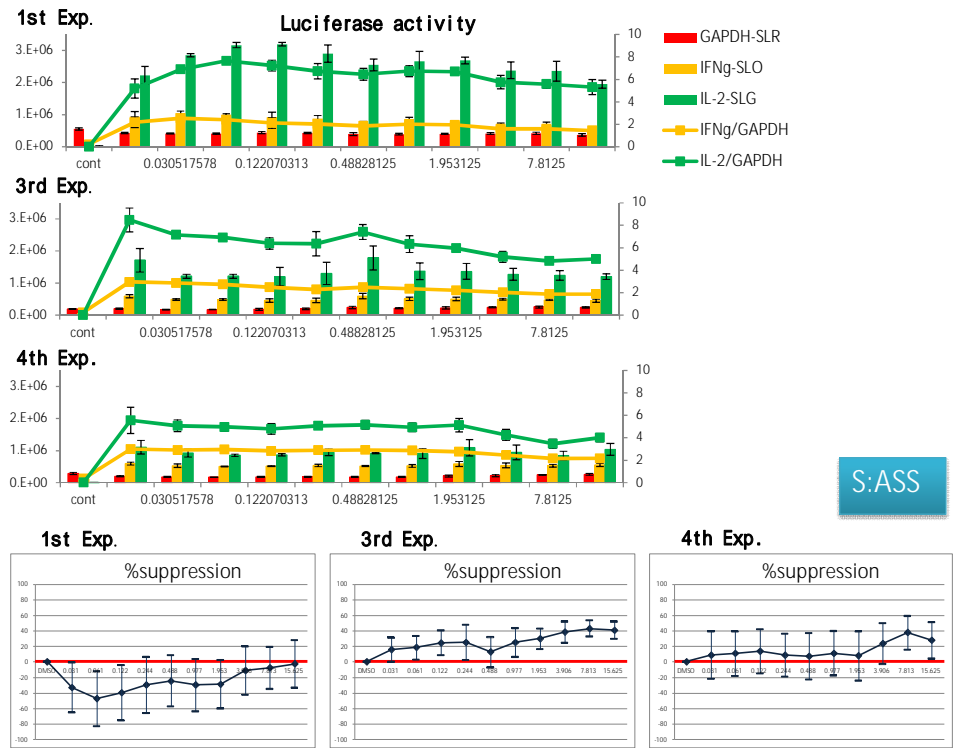
No.1 <2,4-Diaminotoluene, Code No.:MIC618>

(The maximum concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)

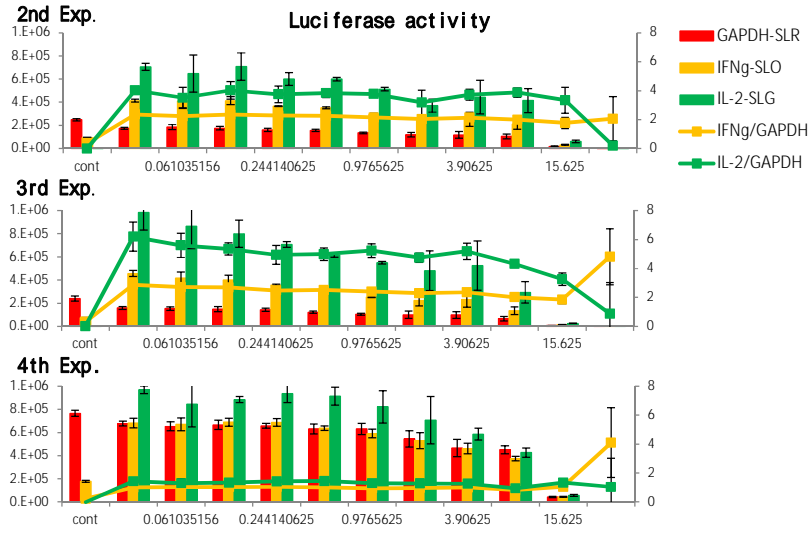


No.2 <Benzo(a)pyrene, Code No.:MIC601>

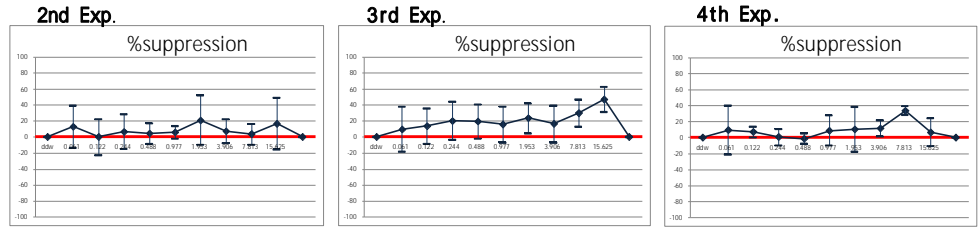
(The maximum concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



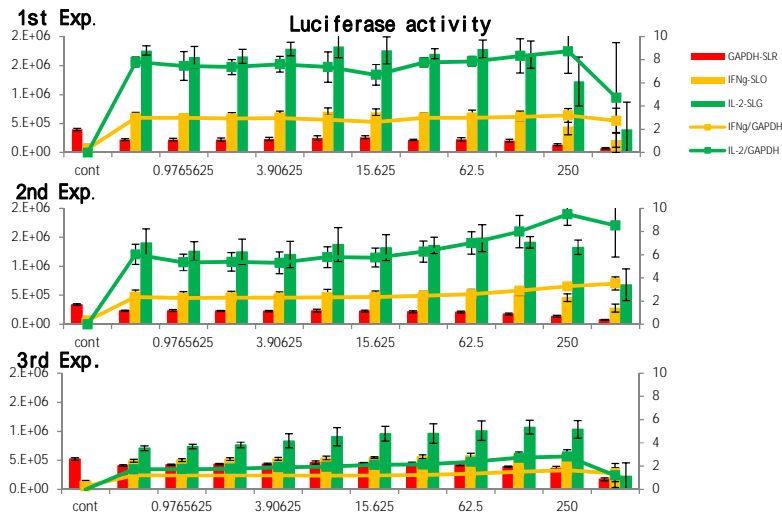
No.3 <Cadmium chloride, Code No.:MIC602>
 (Final concentration: 31.25 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



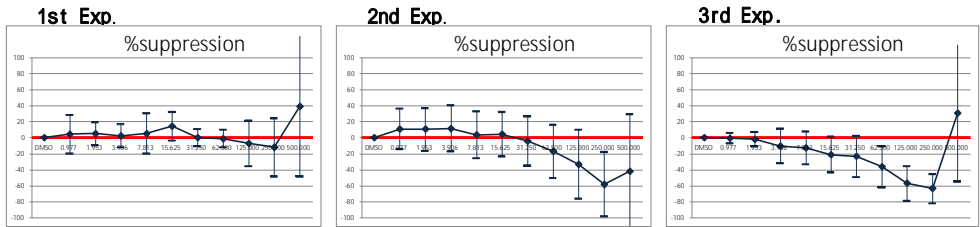
N: NSN



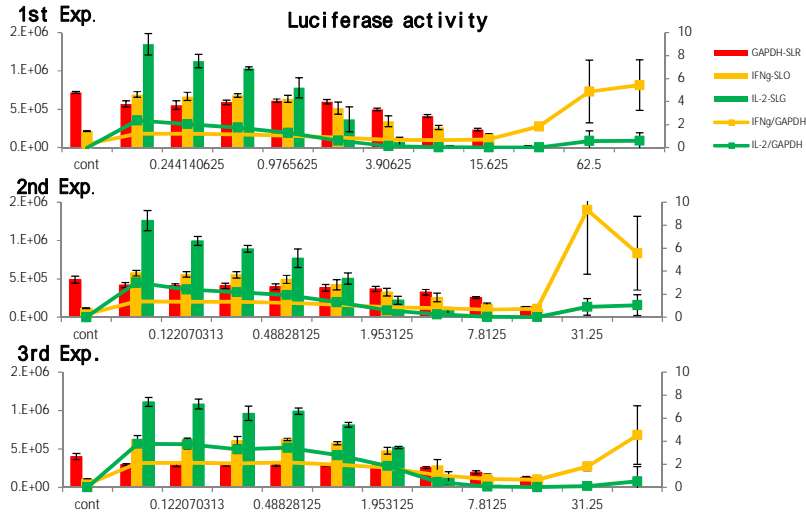
No.4 <Dibromoacetic acid, Code No.:MIC610>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



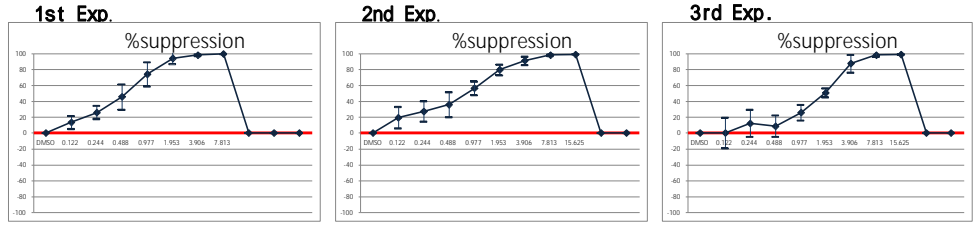
A: NAA



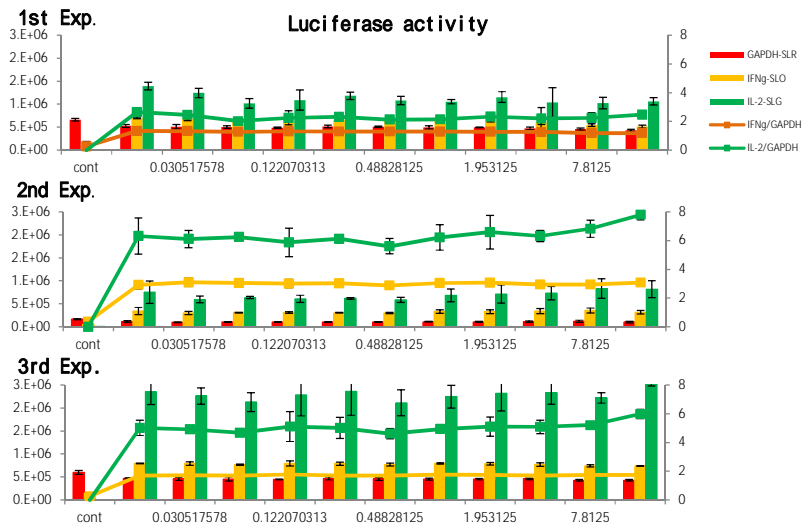
No.5 <Diethylstilbestol, Code No.:MIC611>
 (Final concentration: 125 or 62.5 µg/ml, Vehicle: DMSO)



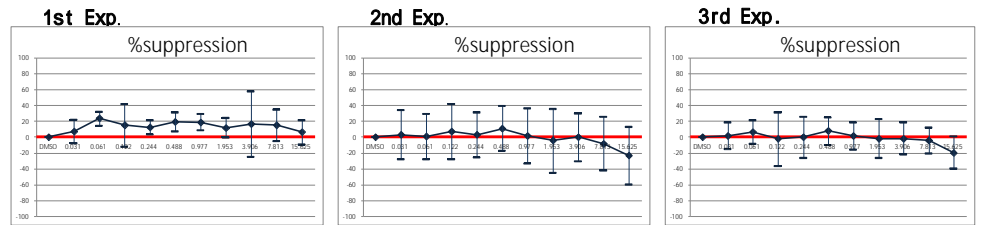
S:SSS



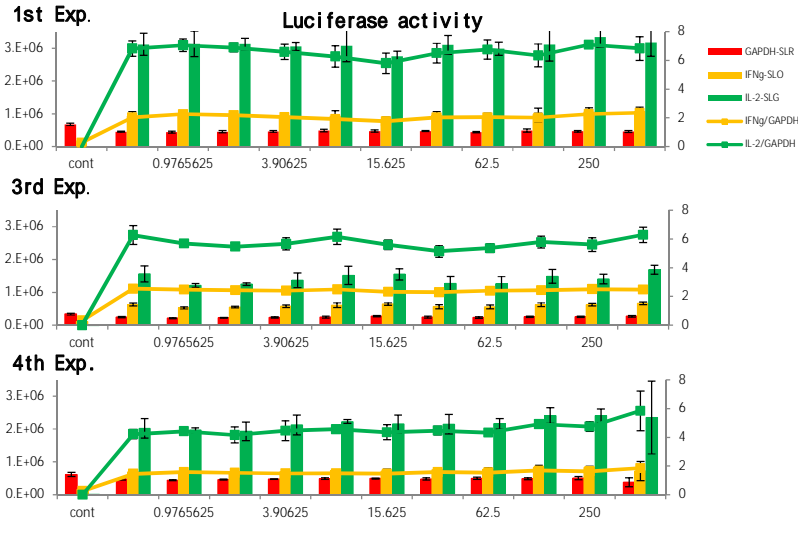
No.6 <Diphenylhydantoin, Code No.:MIC615>
 (Final concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



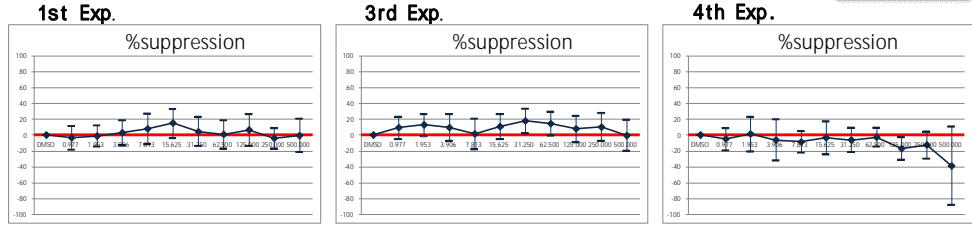
N:NNN



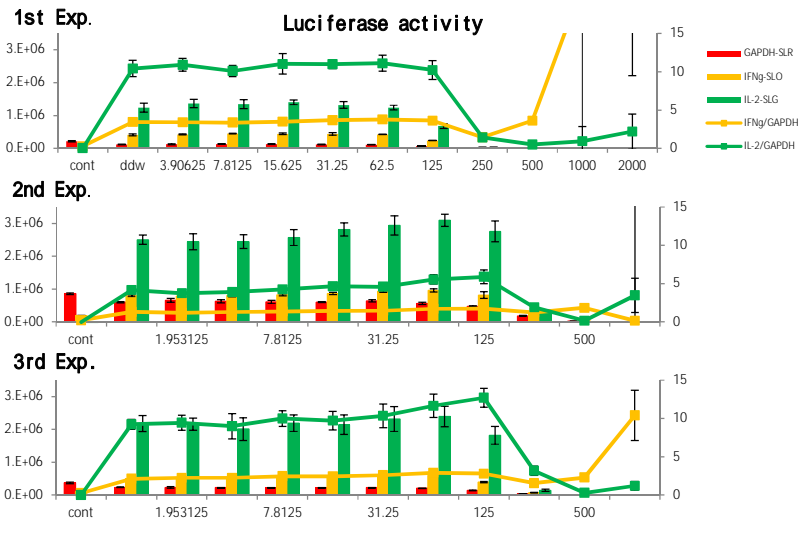
No.7 <Ethylene dibromide, Code No.:MIC605>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



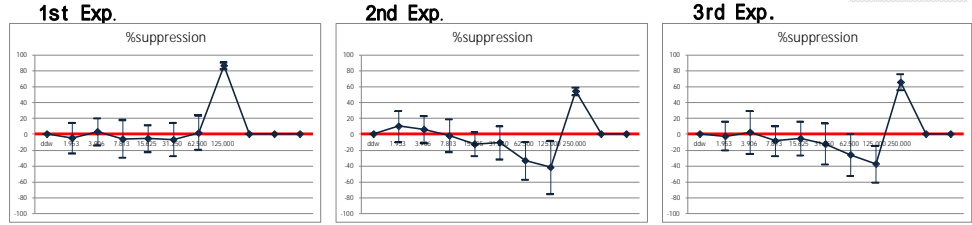
N:NNN



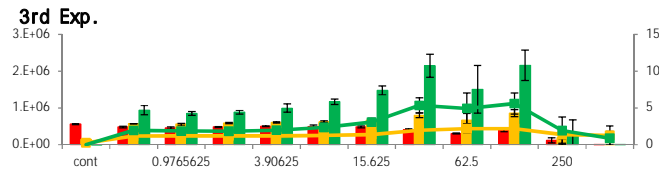
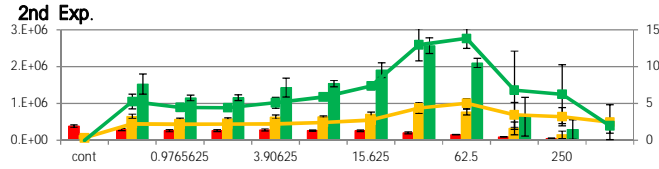
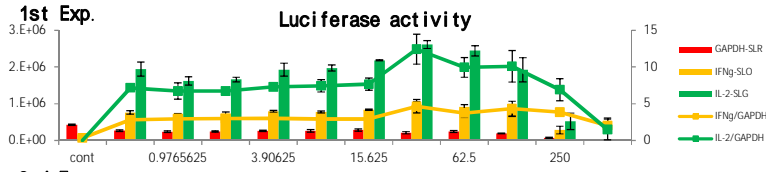
No.8 <Glycidol, Code No.:MIC607>
 (Final concentration: 1000 or 1000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



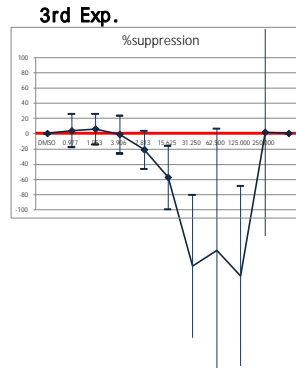
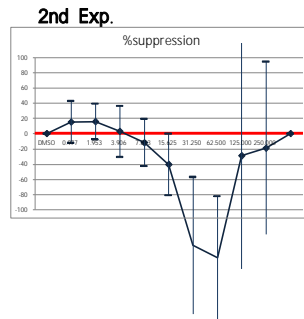
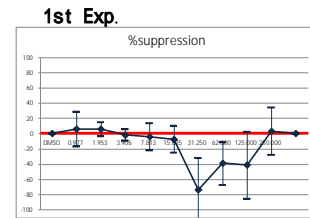
A:SAA



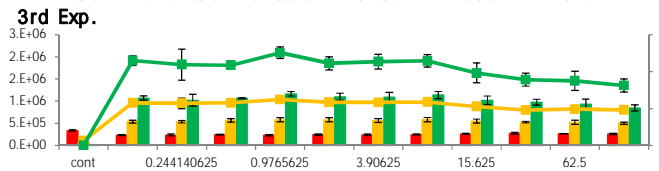
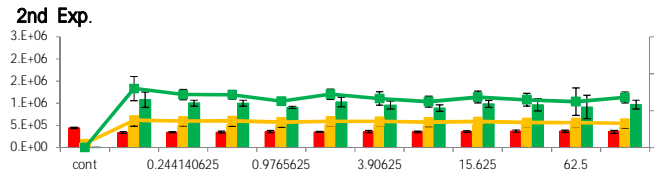
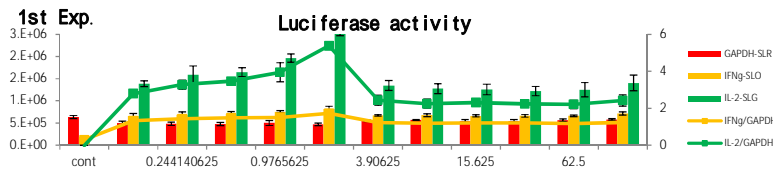
No.9 <Indomethacin, Code No.:MIC609>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



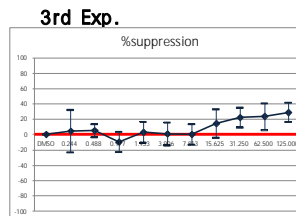
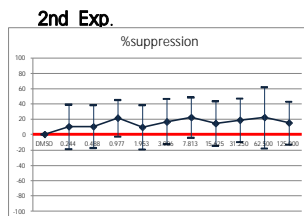
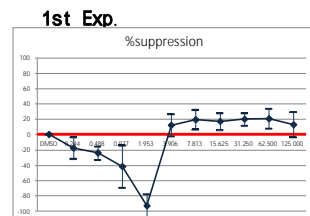
A:AAA



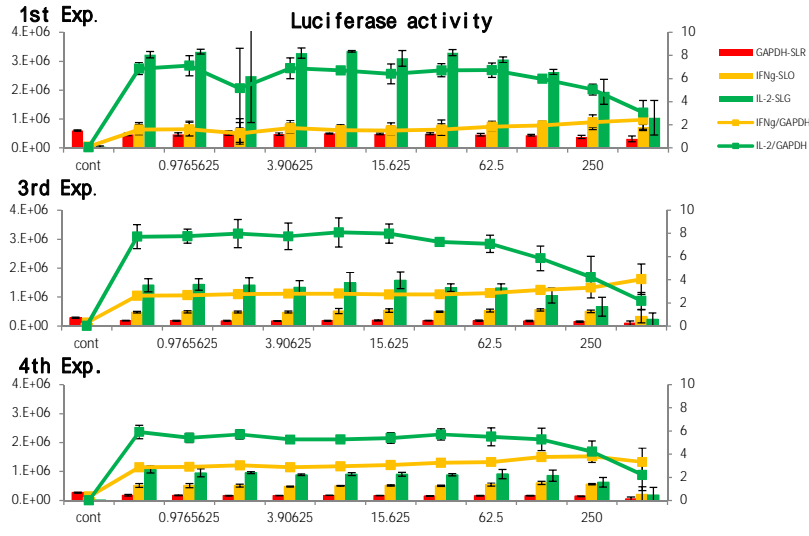
No.10 <Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid), Code No.:MIC612>
 (Final concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)



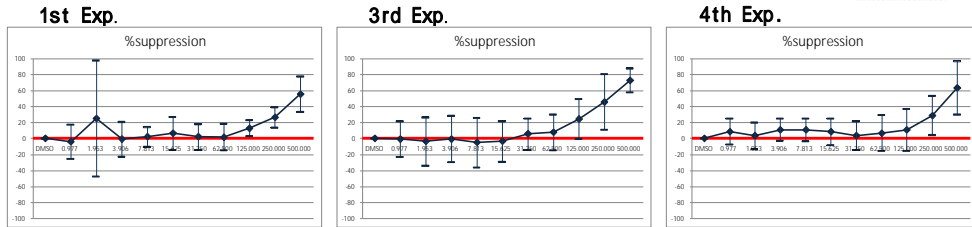
N:ANN



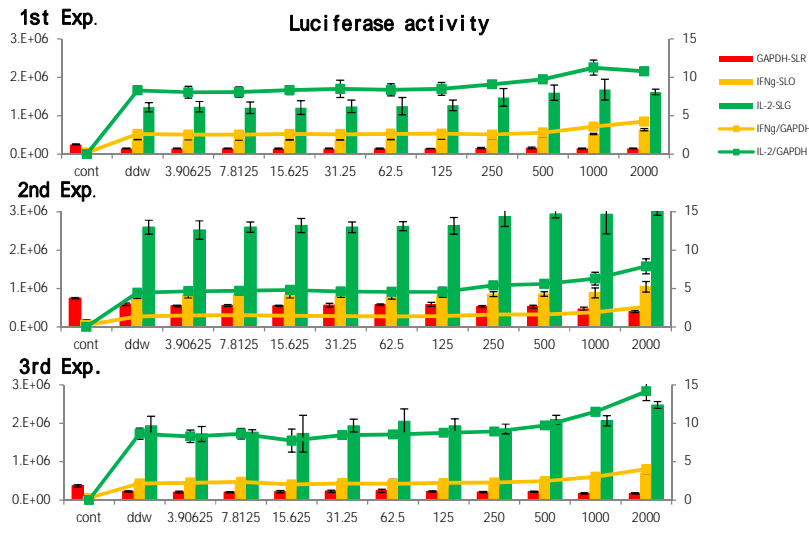
No.11 <Nitrobenzene, Code No.:MIC603>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



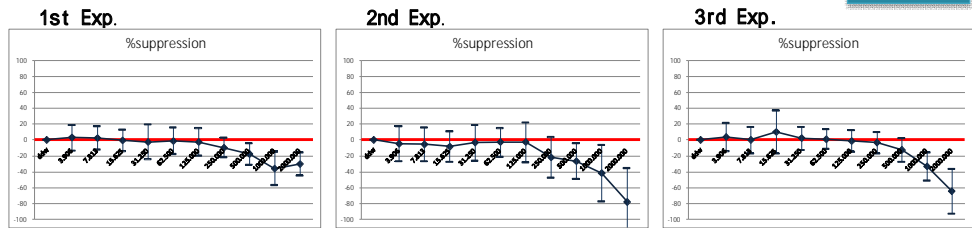
S:SSS



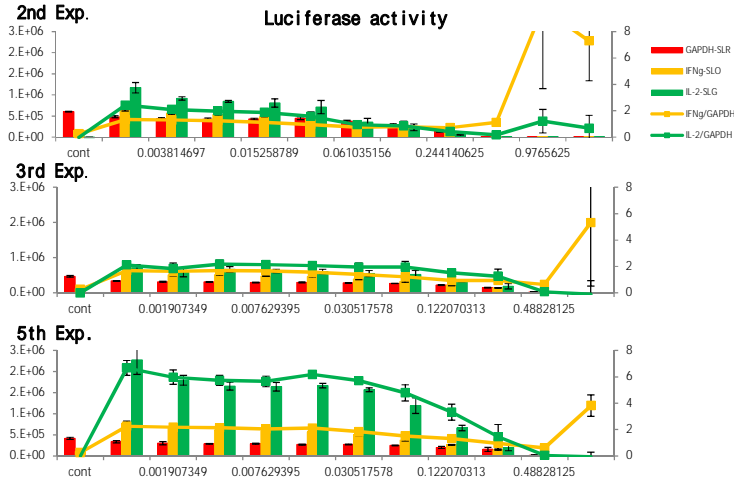
No.12 <Urethane, Ethyl carbamate, Code No.:MIC604>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



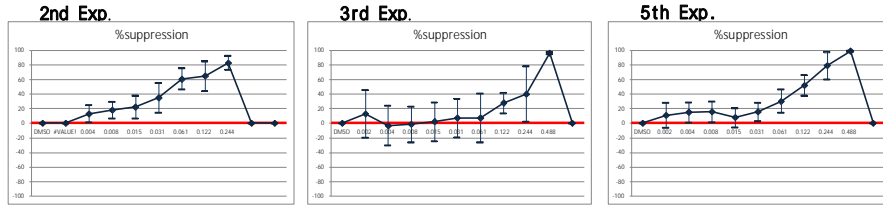
A:AAA



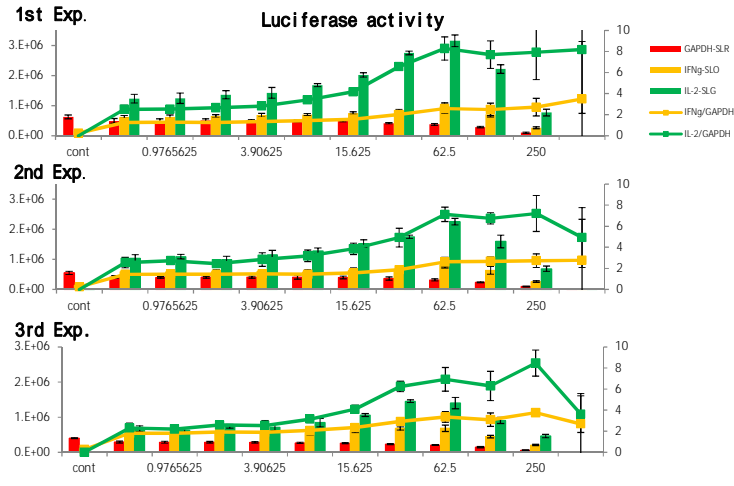
No.13 <Tributyltin chloride, Code No.:MIC613>
 (Final concentration: 1.95 or 0.977 µg/ml, Vehicle: DMSO)



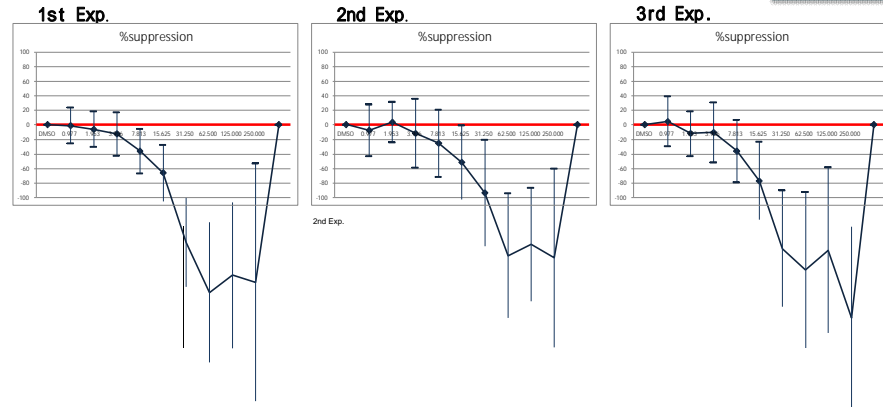
S:SSS



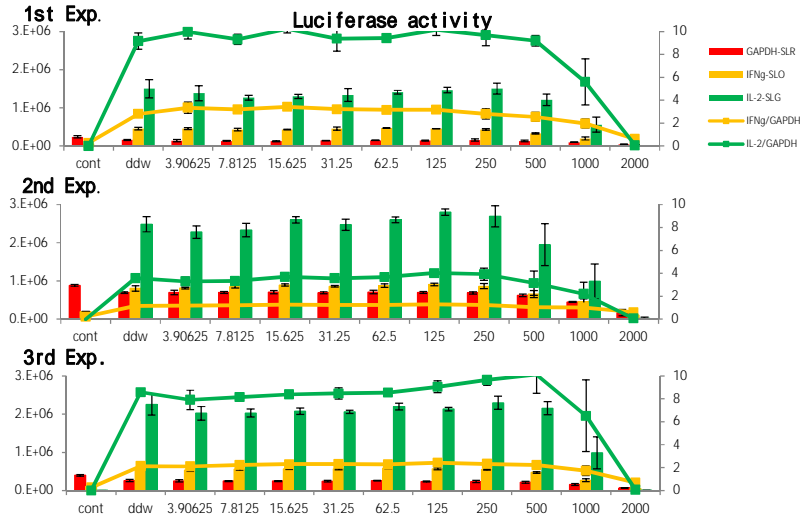
No.14 <Perfluorooctanoic acid, Code No.:MIC614>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



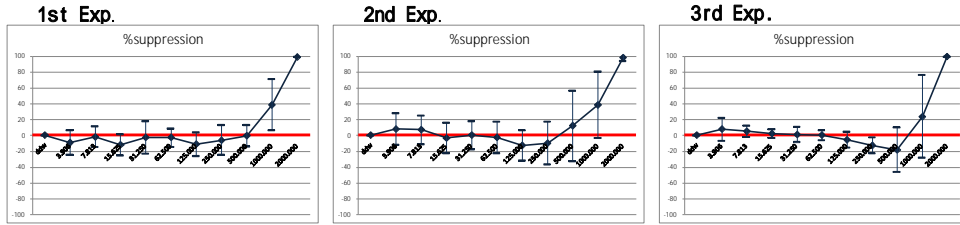
A:AAA



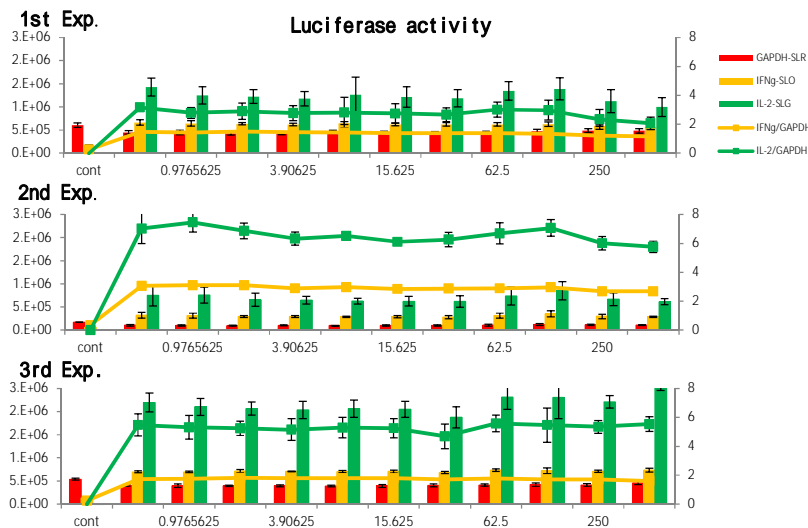
No.15 <Dichloroacetic acid, Code No.:MIC606>
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



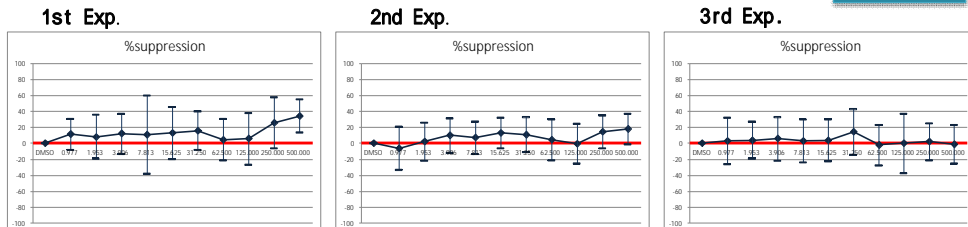
S:SSS



No.16 <Toluene, Code No.:MIC616>
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)

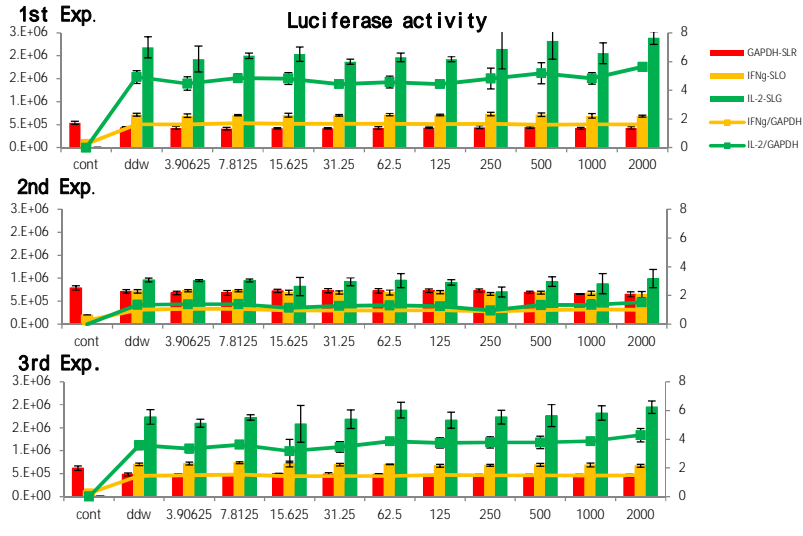


N:NNN

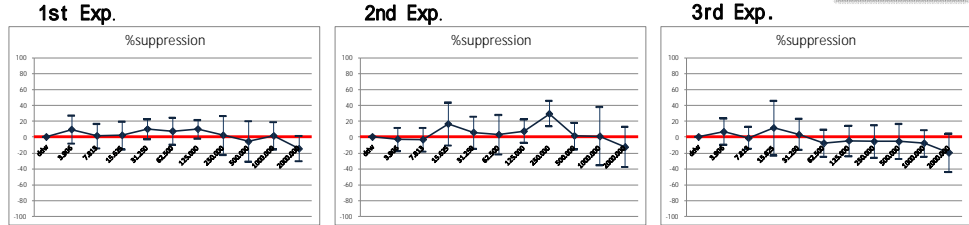


No.17 <Acetonitril, Code No.:MIC617>

(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)

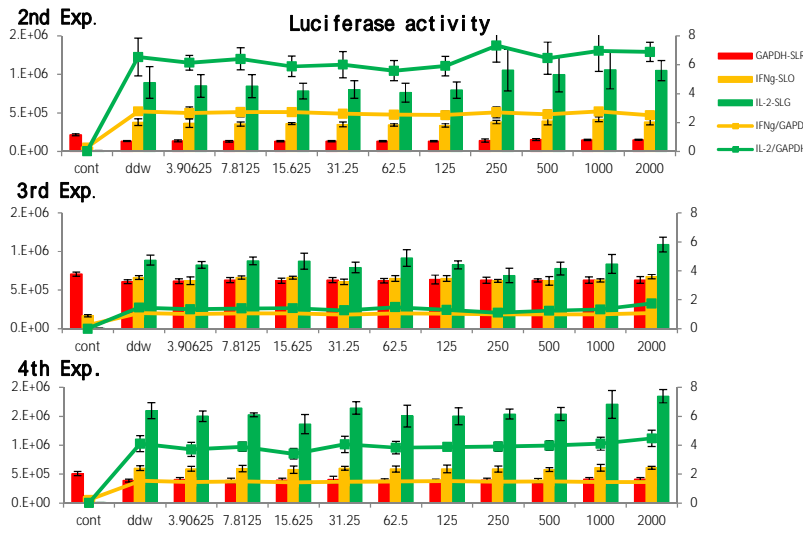


N:NNN

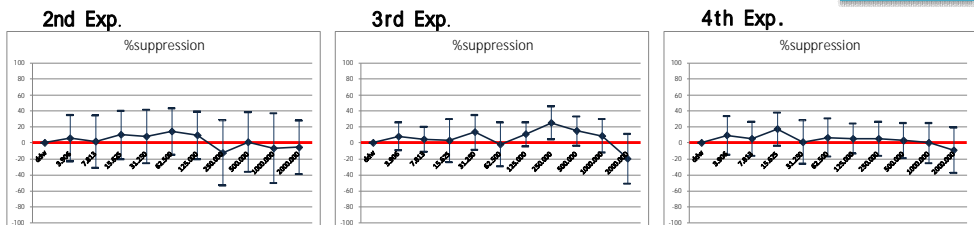


No.18 <Mannitol, Code No.:MIC619>

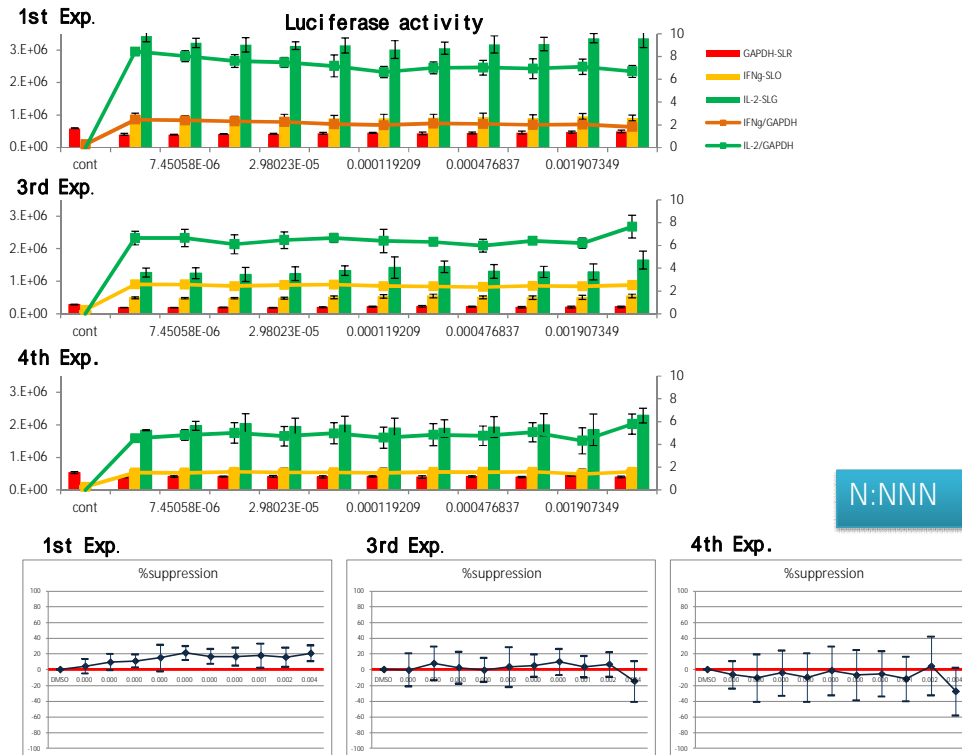
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



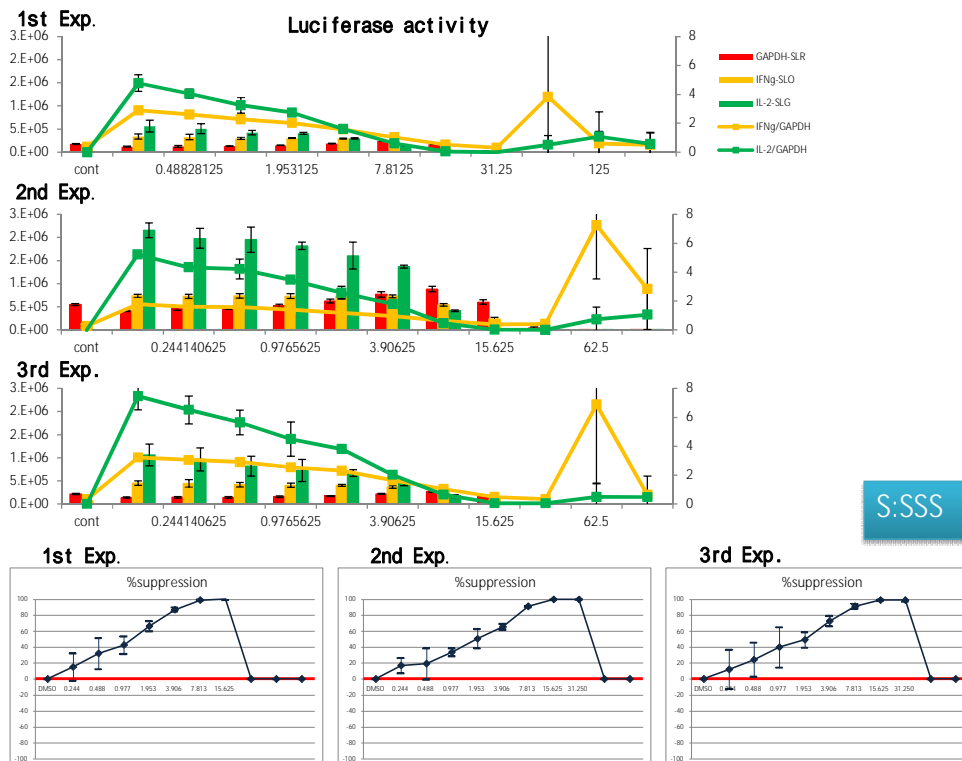
N:NNN



No.19 <Vanadium pentoxide, Code No.:MIC608>
 (Final concentration: 0.0038 µg/ml, Vehicle: DMSO)



No.20 <o-Benzyl-p-chorolophenol, Code No.:MIC620>
 (Final concentration: 250 or 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, validation

分担研究者 中島芳浩
産業技術総合研究所 健康工学研究部門

研究要旨

IL-2プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼ、INF γ プロモーター活性を橙色ルシフェラーゼ、さらに両プロモーター活性を補正するための内部標準プロモーターG3PDH活性を赤色ルシフェラーゼでモニターするJurkat細胞（#2H4細胞）を用いた化学物質免疫毒性評価系Multi-ImmunoTox assay (MITA)のPhaseIIバリデーション試験を実施し、良好な施設内および施設間再現性を得た。

A. 研究目的

環境中に存在する何万という化学物質のなかには、免疫系を標的として健康被害を及ぼすものが多数存在する。したがって、免疫毒性は、消費者、生産者はもとより公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。当該研究では、免疫毒性に影響を及ぼす化学物質を簡便に評価するための発光レポーターを利用した *in vitro* 免疫毒性評価試験法 (Multi-ImmunoTox assay) を構築、本試験法のガイドライン化を目指し、本年度は 20 種類のコード化した被験物質を用いた 1 セット 3 回から 5 回行う試験を PhaseII バリデーション試験として実施した。

B. 研究方法

IL-2、IFN γ とG3PDHプロモーターにそれぞれSLG、SLOおよびSLRルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターをJurkat細胞に導入した3色発光細胞株#2H4を用いて試験を行った。

化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法については Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.010E 20180115に準ずる。

試験化学物質としてコード化した20物質を供試し、発光測定装置はアトー社製フェリオス(AB-2350)を用いた。

（倫理面への配慮）

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 研究結果

MITAバリデーション試験 PhaseIIとして、コード化した20物質に対し#2H4細胞株を用いた試験を実施した。各物質に対し3回から5回繰り返し試験を行った。図1に結果を示す。提案されたcriteriaを用いて各物質を評価したところ、これらの判定結果は他実施施設(食品薬品安全センター、産総研つくばセンター)による結果とも概ね一致した。

D. 考察

PhaseIIバリデーション試験の結果に最終的に提案されたcriteria 5を適用することにより、良好な施設間再現性を得た。本試験方により、免疫抑制物質を正確かつ感度良く識別できる可能性が示唆された。

E. 結論

20種類のコード化した被験物質を用いた

1セット3回から5回の試験を繰り返す
PhaseIIバリデーション試験を実施、80%の
施設間再現性を得た。また、再現性や精度
を高めるための実験操作等の改善点を抽出
し、PhaseIIバリデーション試験における諸
条件の改善のための情報およびサポートデ
ータを提供した。

F．健康危険情報

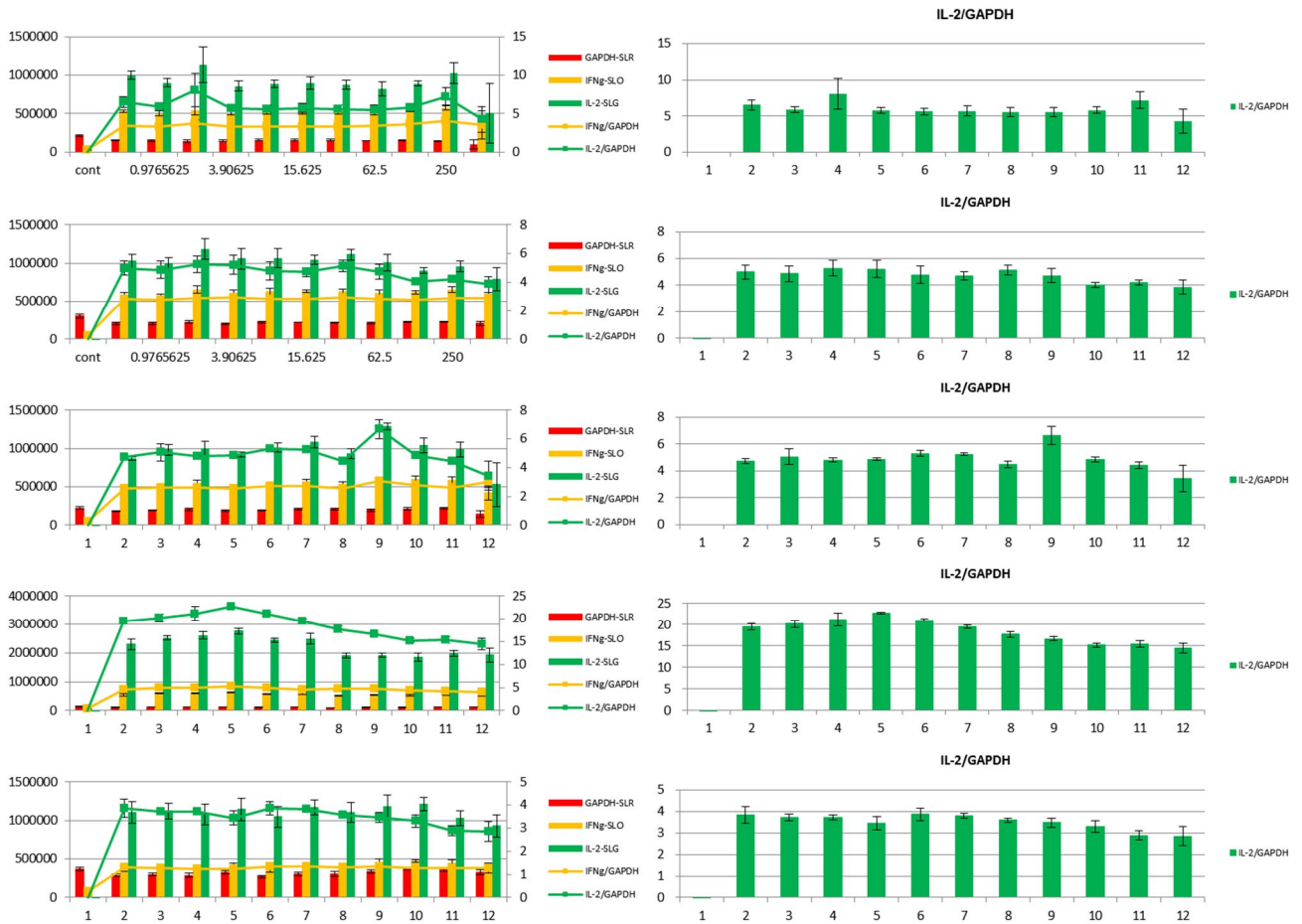
該当なし

G．研究発表
該当なし

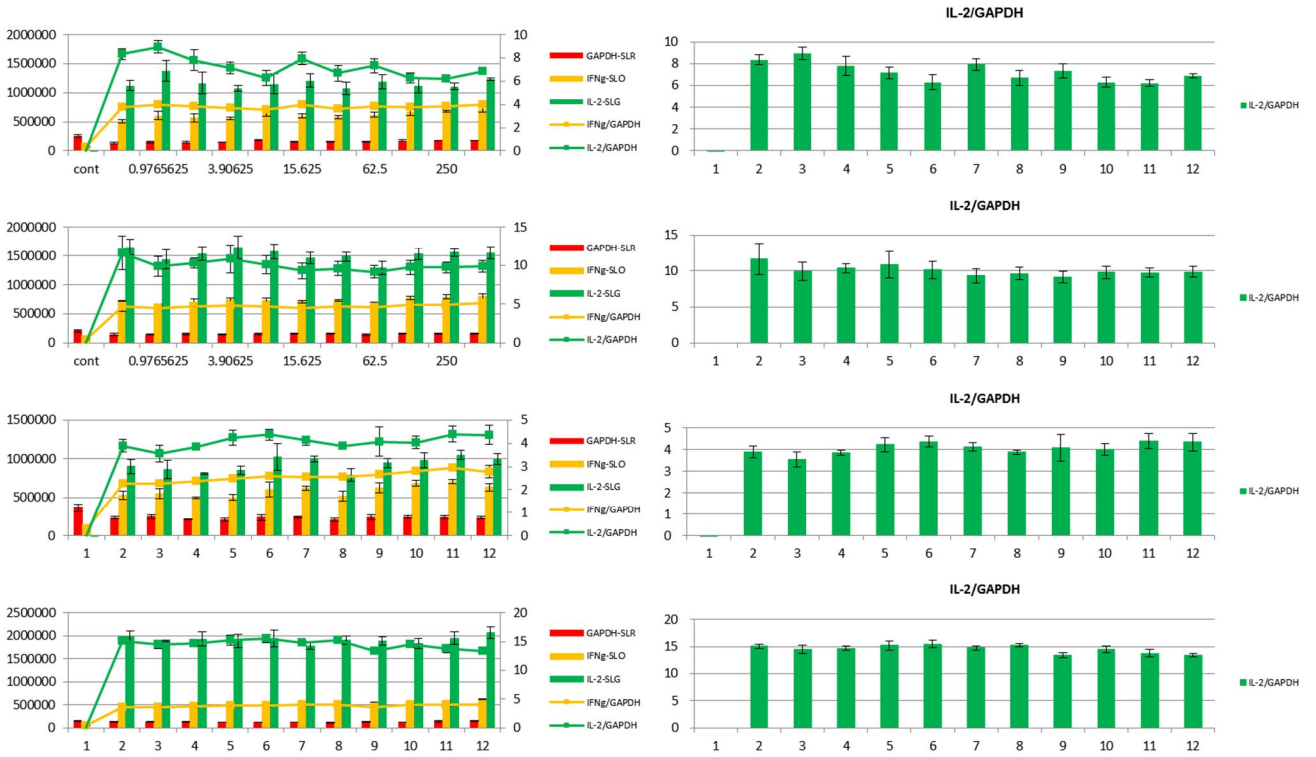
H．知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図1 Jurkat 細胞由来株#2H4 における各試験化学物質に対する細胞応答性。

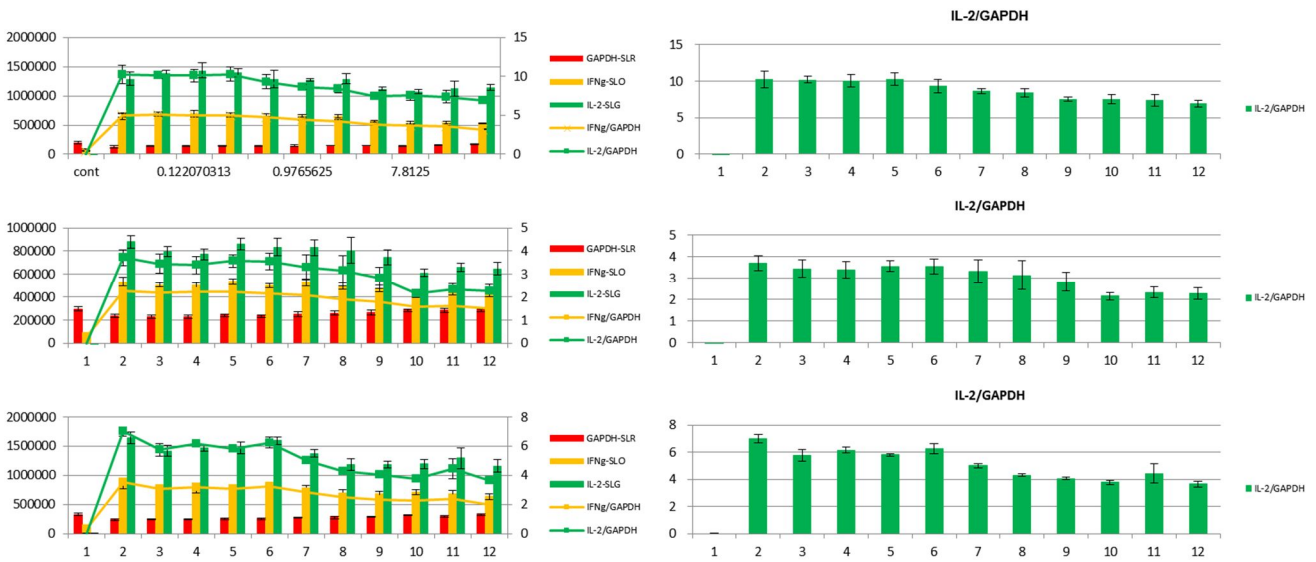
< MID701 >



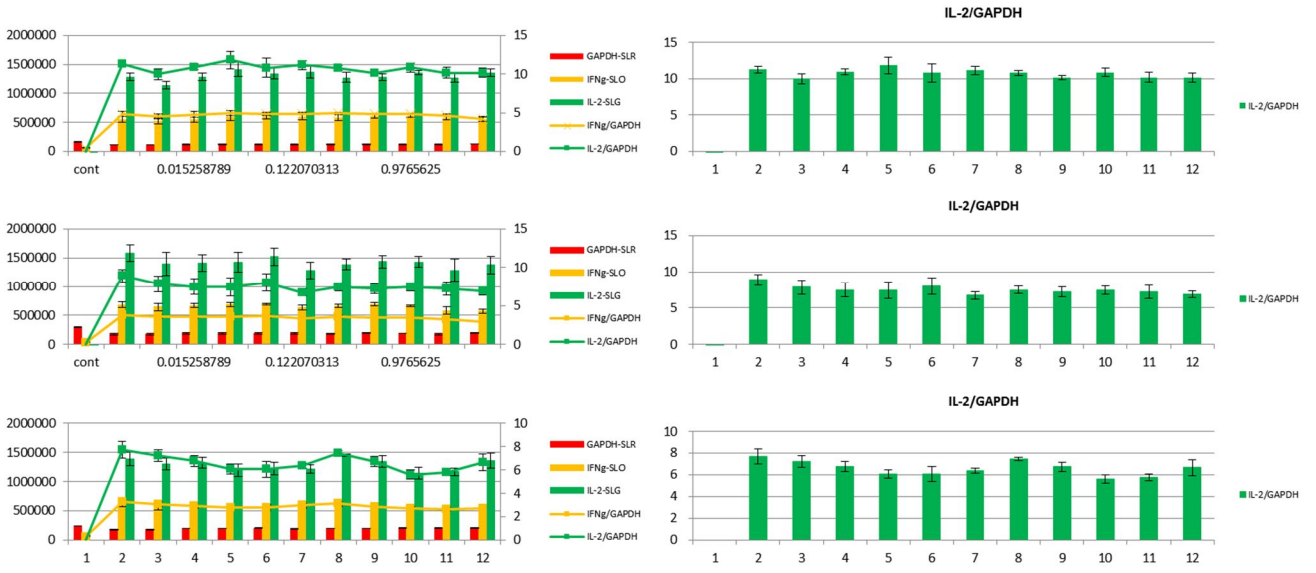
< MID702 >



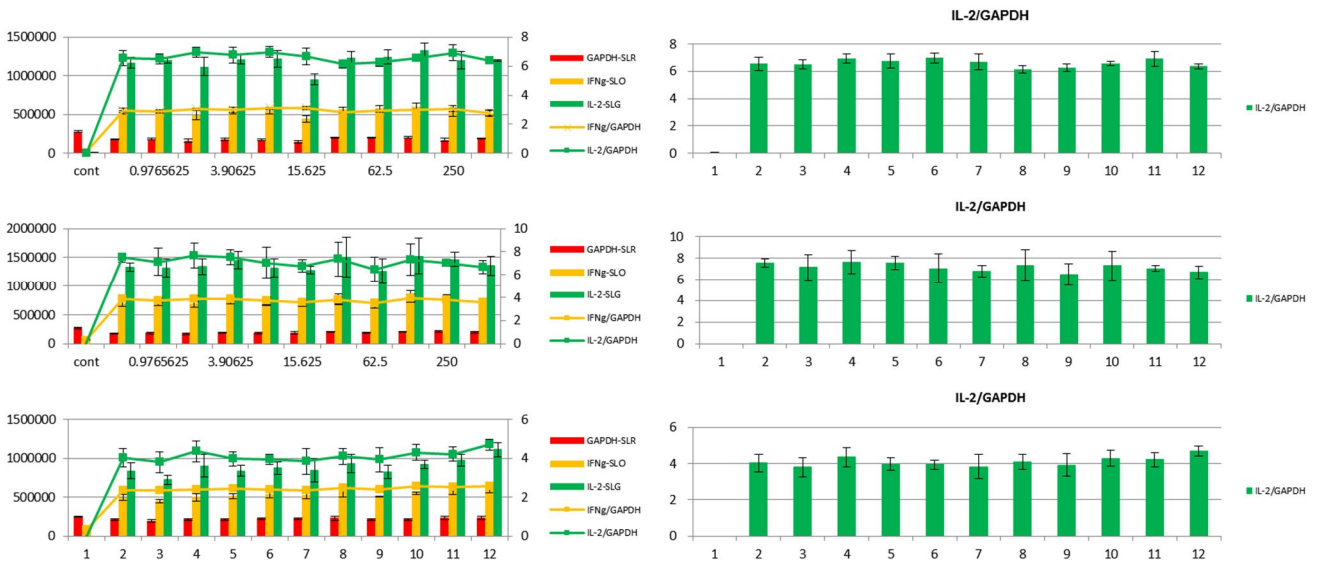
< MID703 >



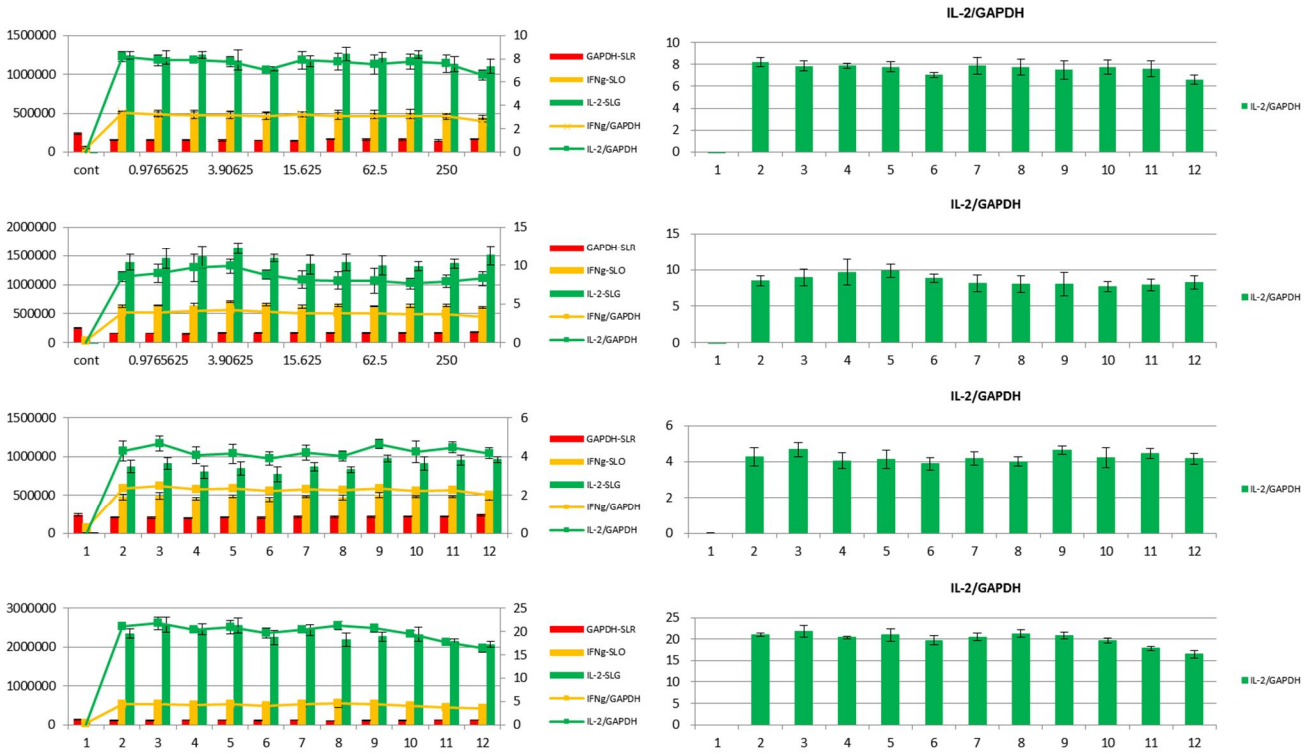
< MID704 >



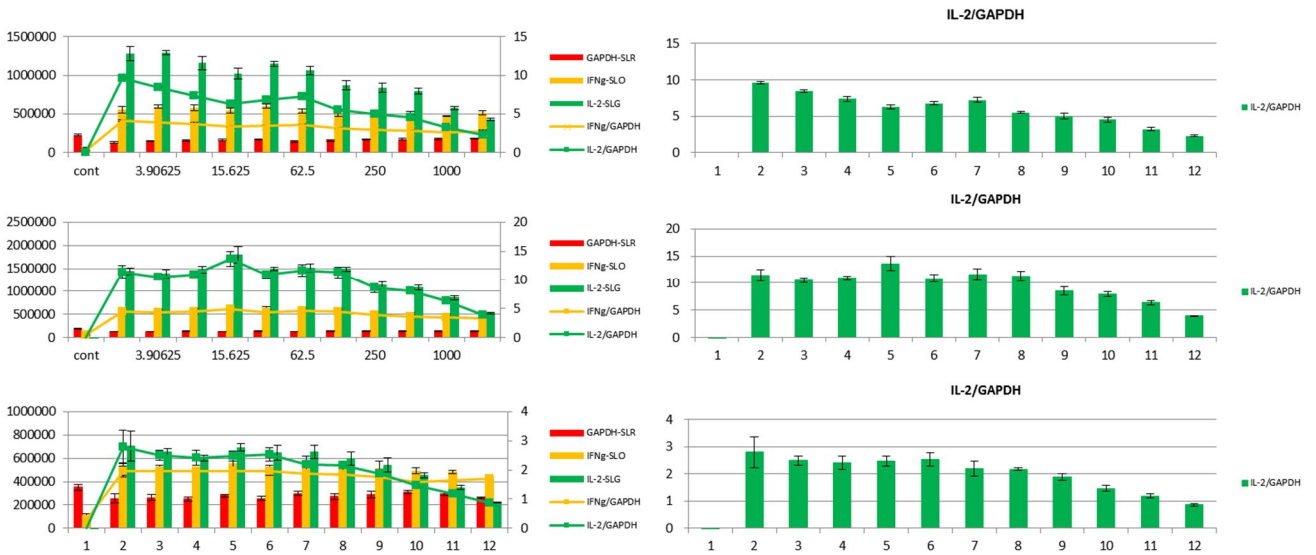
< MID705 >



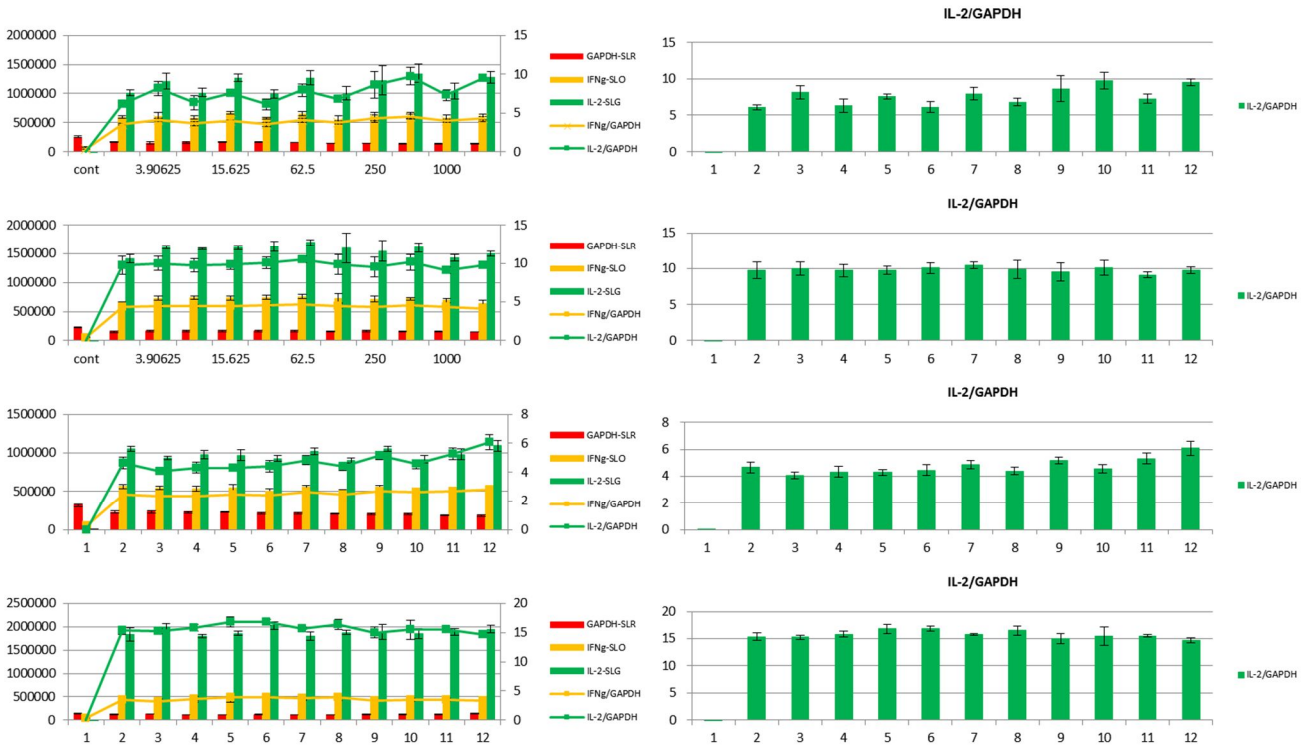
< MID706 >



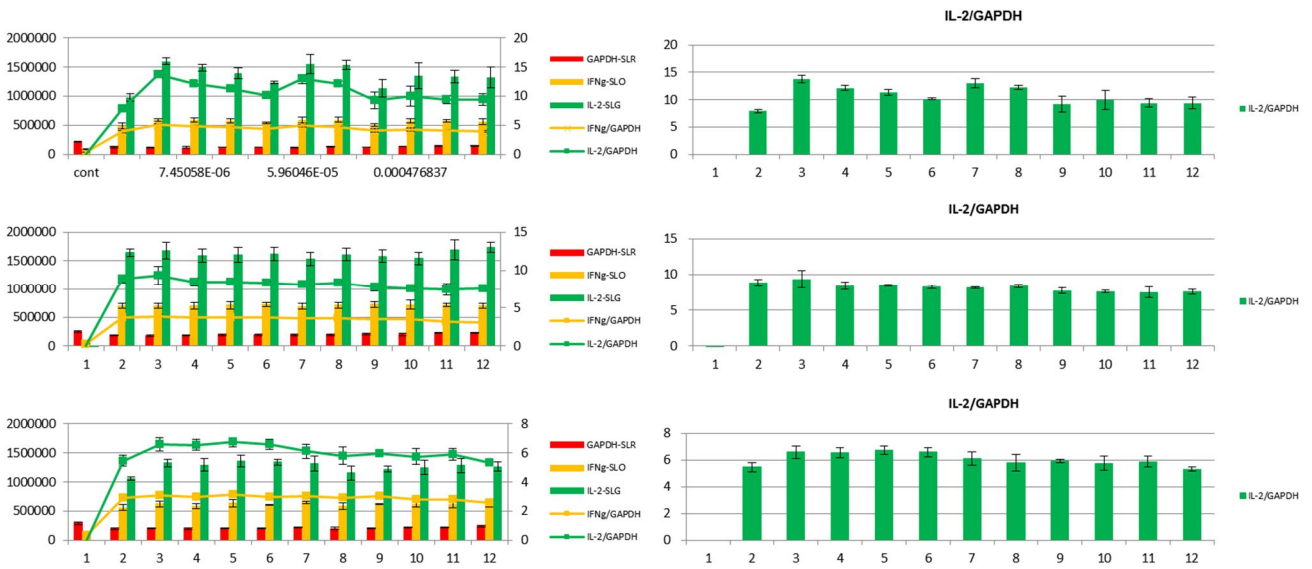
< MID707 >



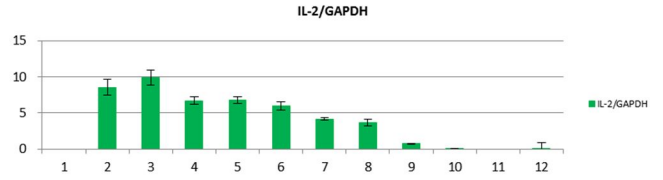
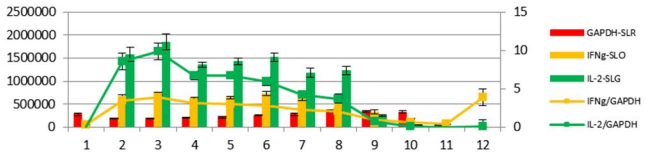
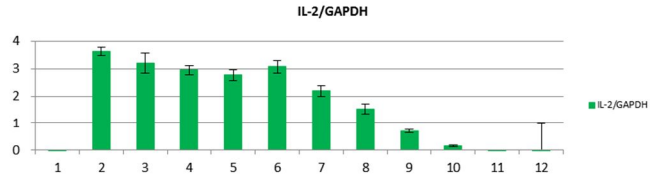
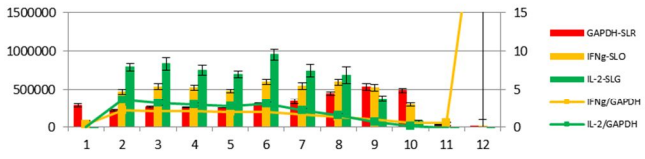
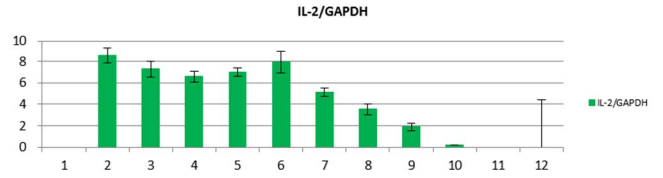
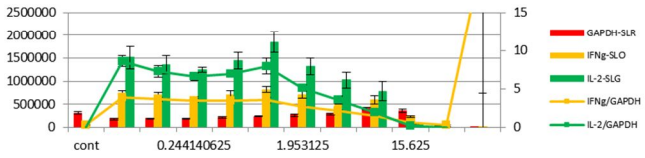
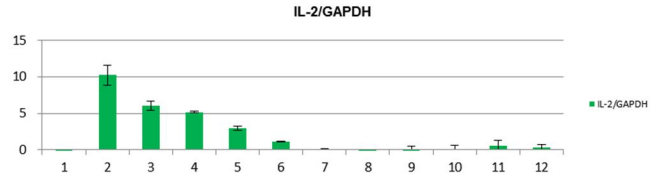
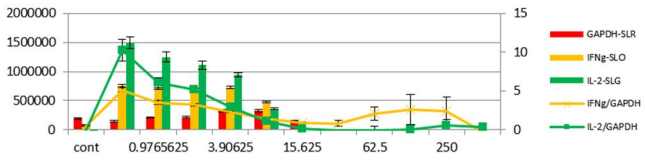
< MID708 >



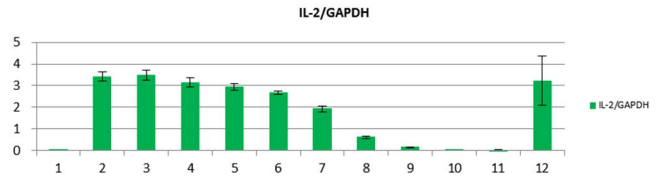
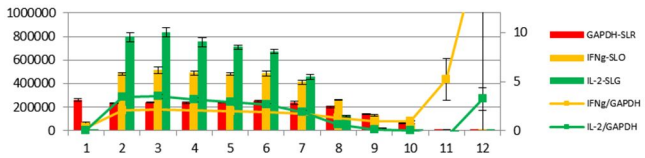
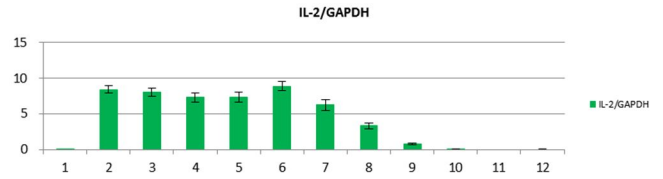
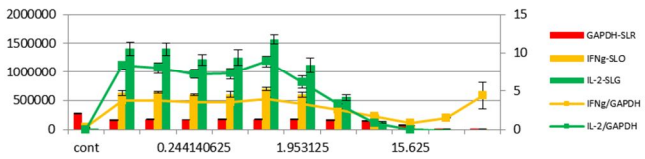
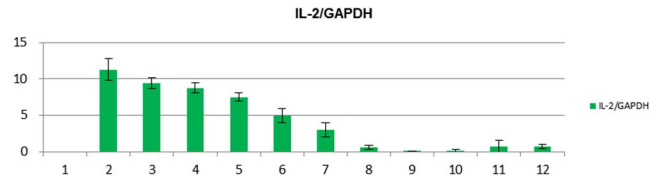
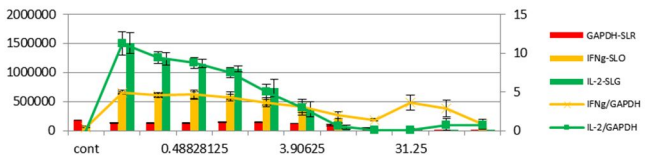
< MID709 >



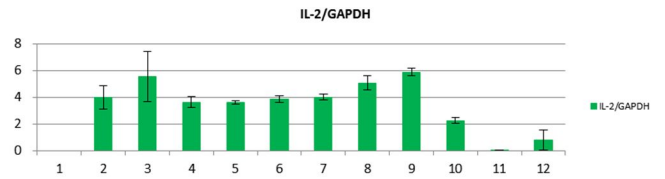
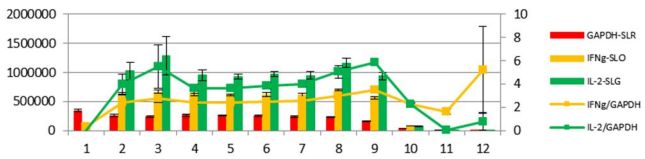
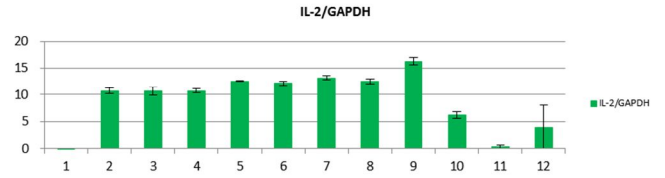
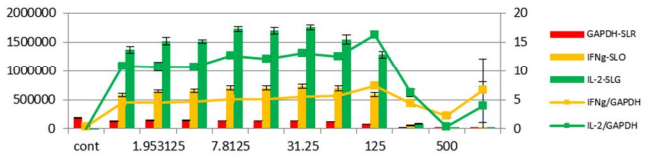
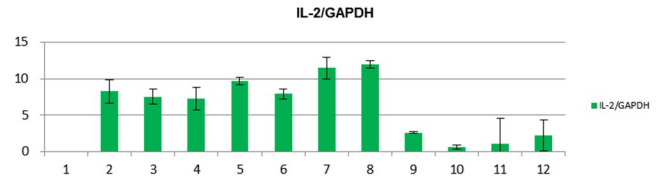
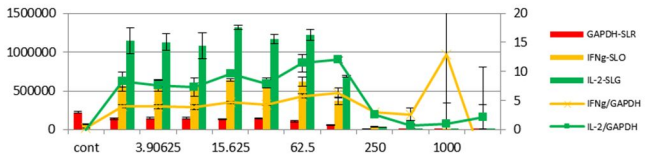
< MID710 >



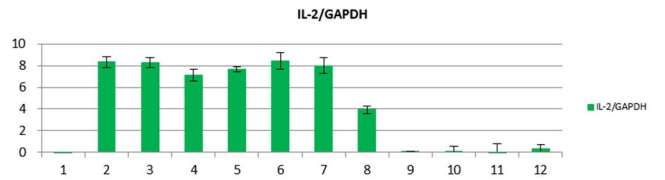
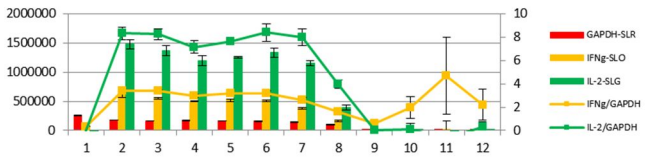
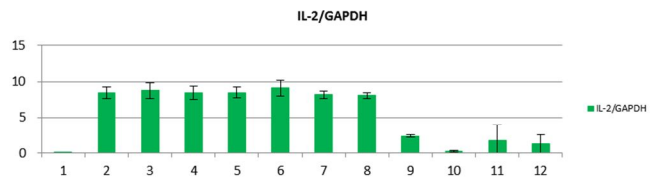
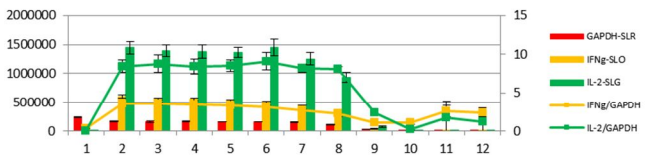
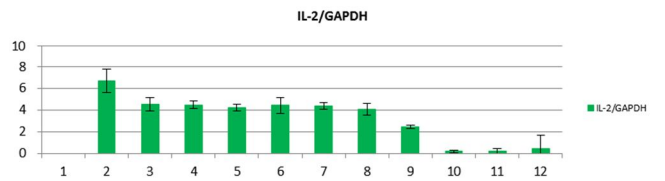
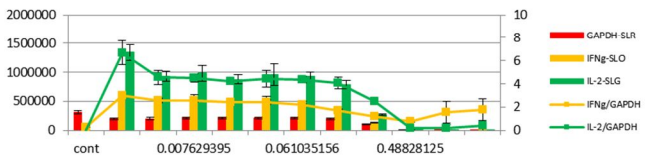
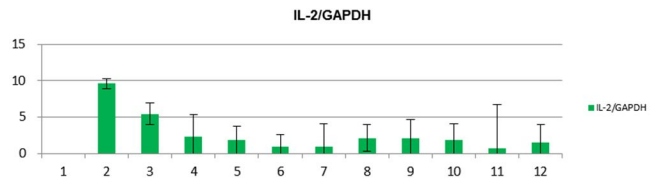
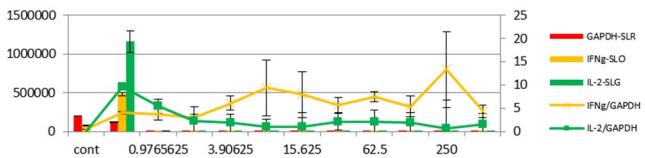
< MID711 >



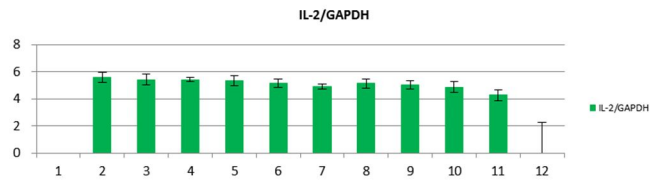
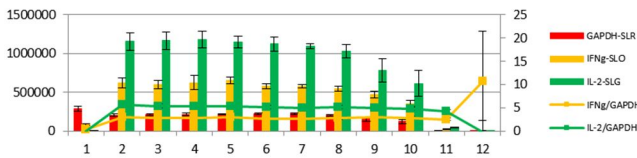
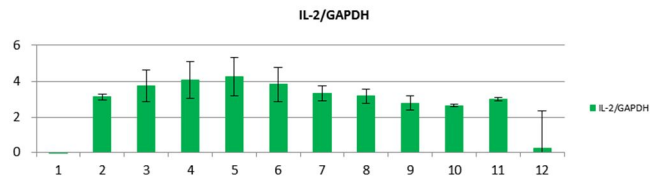
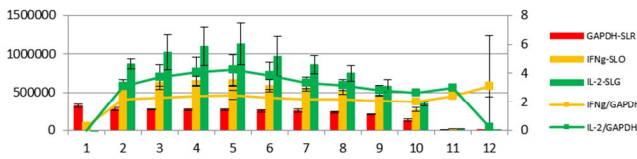
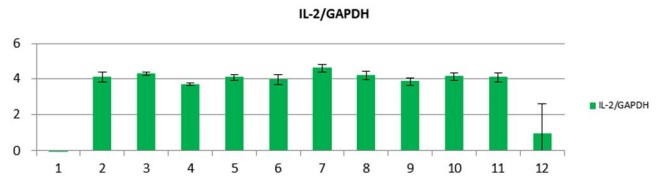
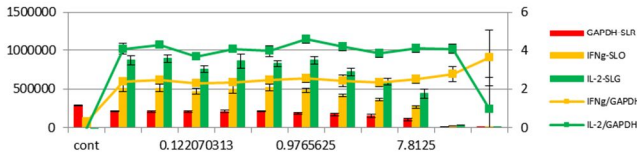
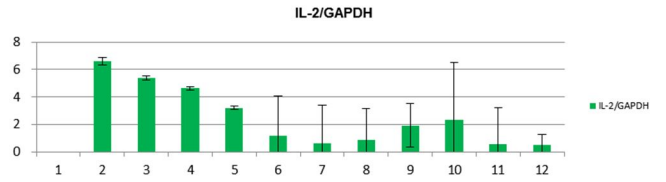
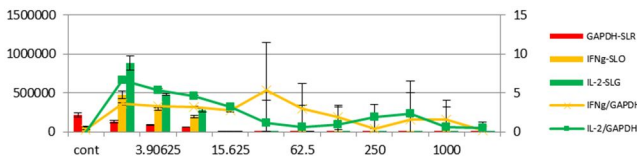
< MID712 >



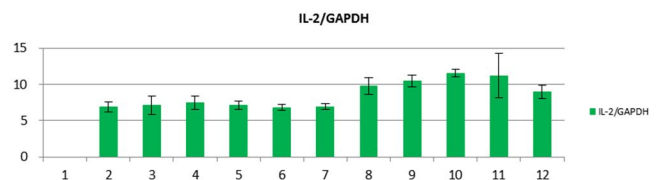
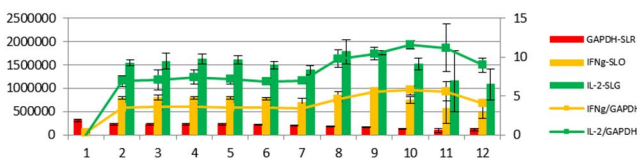
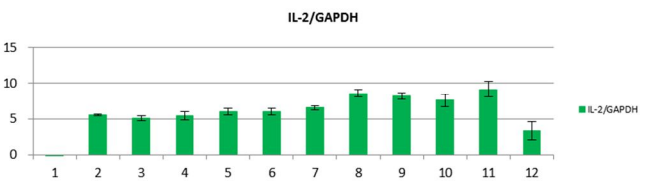
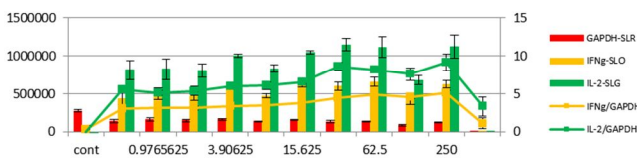
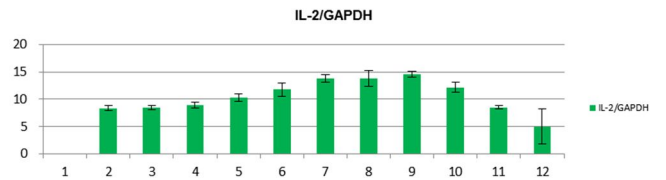
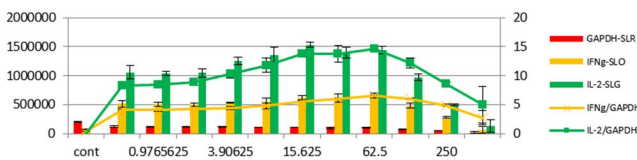
< MID713 >



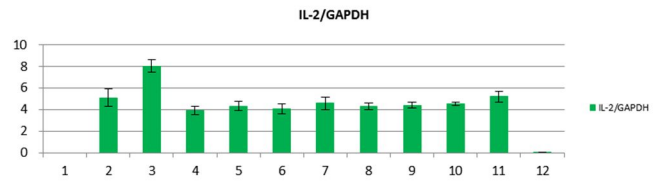
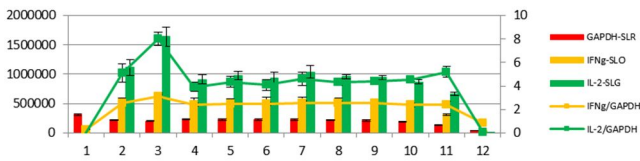
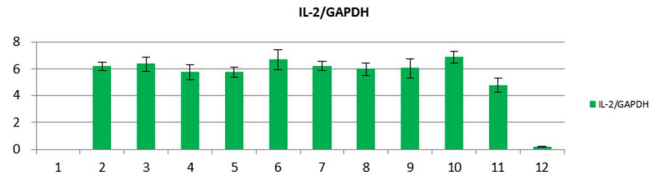
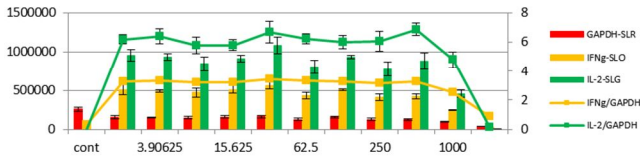
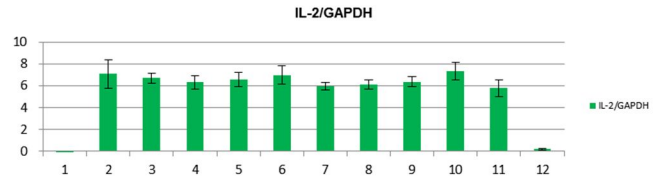
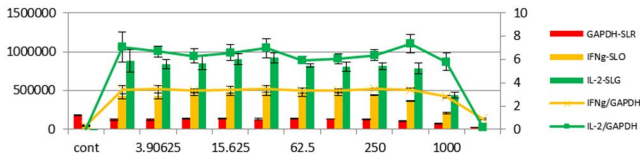
< MID714 >



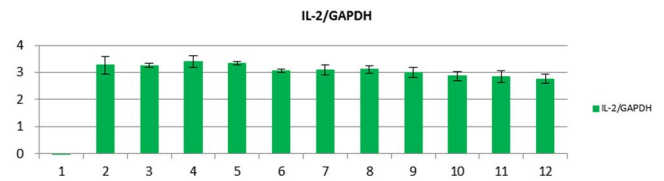
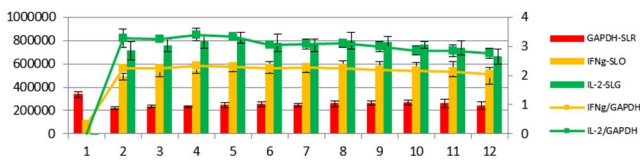
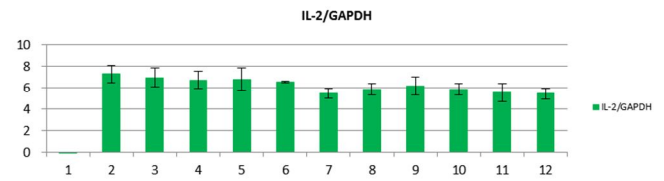
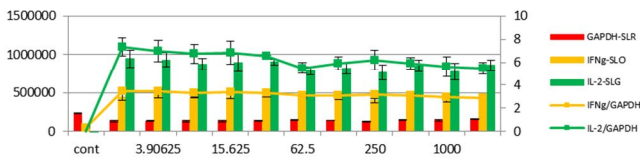
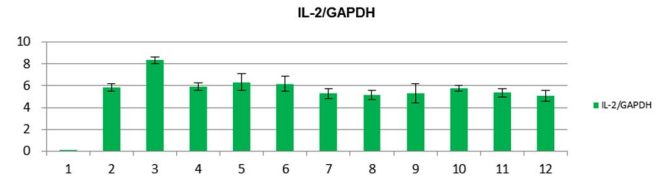
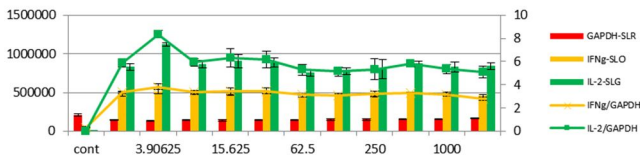
< MID715 >



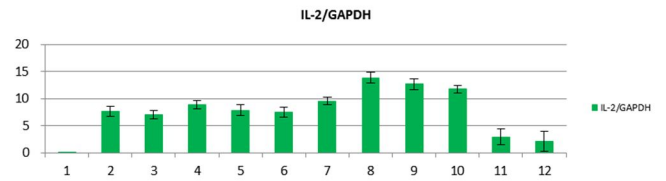
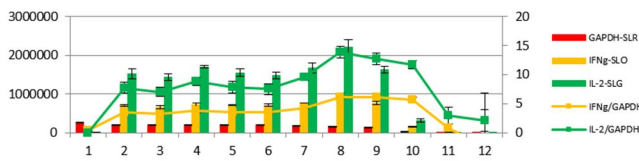
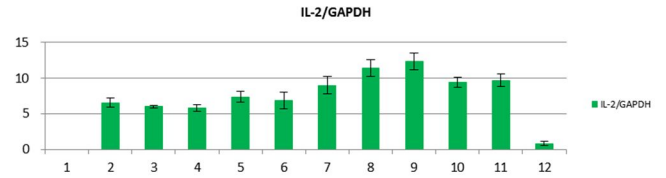
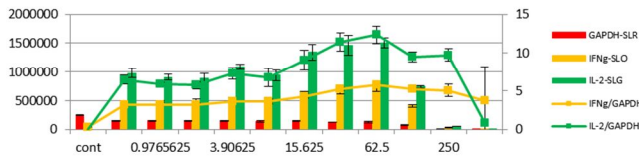
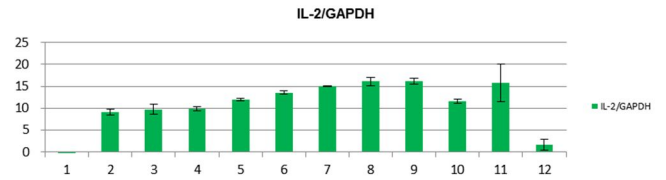
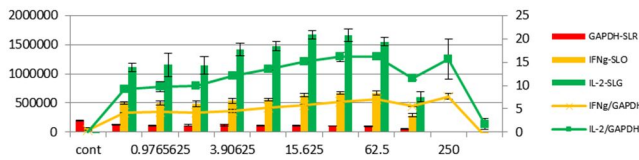
< MID716 >



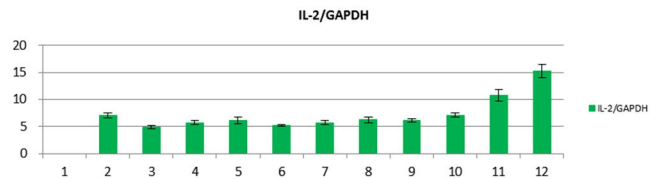
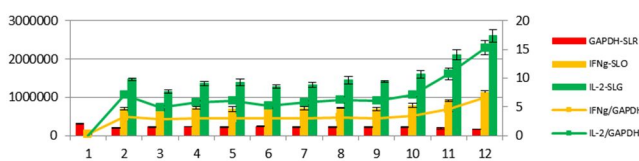
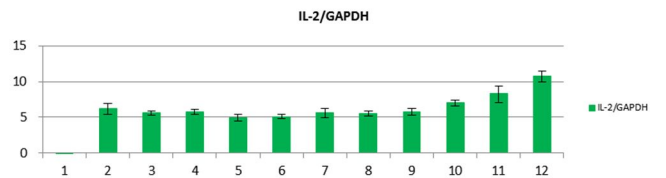
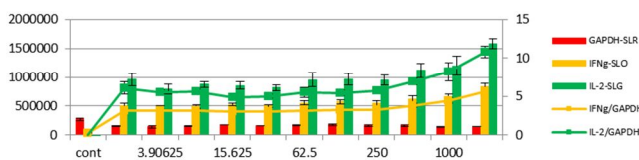
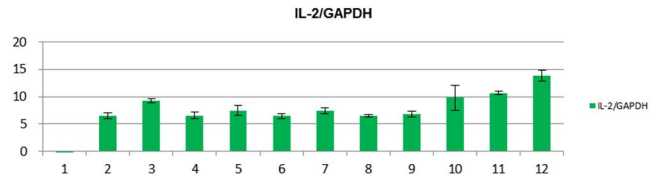
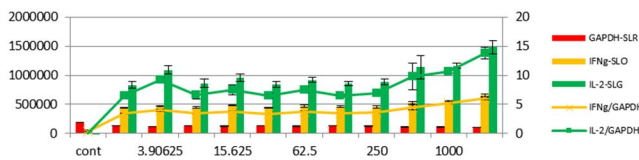
< MID717 >



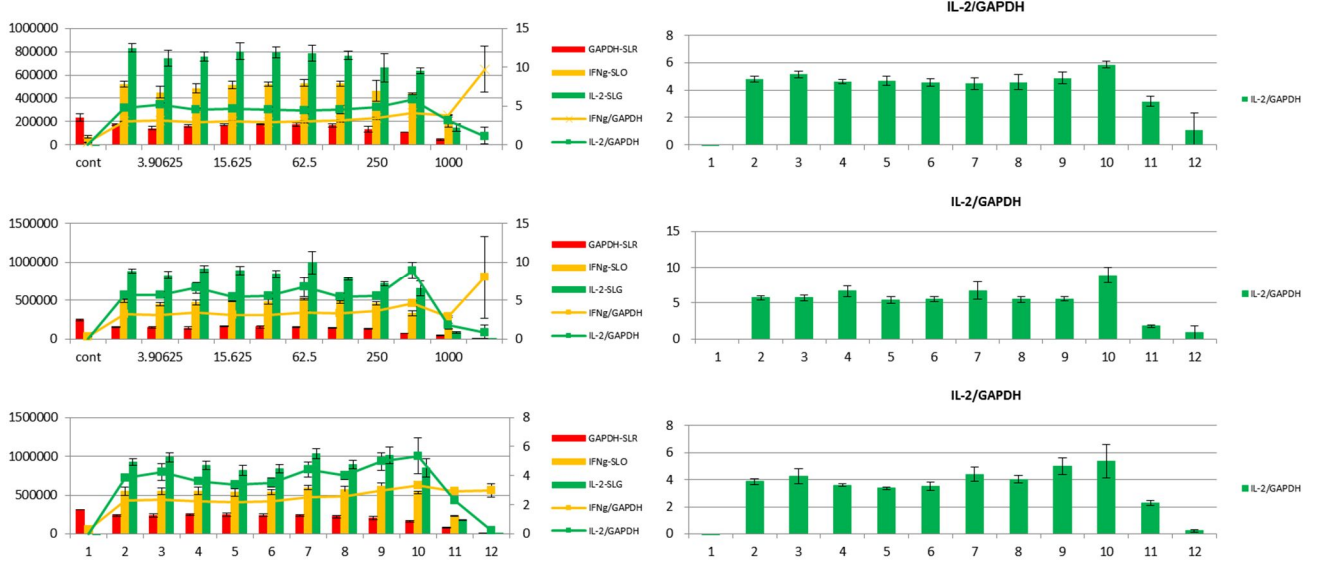
< MID718 >



< MID719 >



< MID720 >



平成 29 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク事業）

分担研究報告書

統計学的視点に基づく Multi-ImmunoTox Assay のデータ解析方法の 検討

分担研究者：大森崇

研究要旨

[背景と目的] Multi-ImmunoTox Assay(以下、MITA)は、化学物質がヒトの免疫系に与える影響を *in vitro* で評価することを目標とする試験法である。バリデーションにおける phase1 研究では MITA の判定方法が十分には確立していないため、3 種類の判定方法の候補（方法 1、方法 2、方法 3）が提案され、適用された。しかし、これら 3 種類の統計学的な性能評価は行われていなかったため、本年度の課題として、3 種類の判定方法についてシミュレーションに基づく性能評価を行った。

[方法] 方法 1 は個々の実験で判定を行い、独立した 3 回の実験の判定結果をもって最終判定を行う方法である。方法 2 は、独立した 3 回の実験から得られた測定値を統合したデータセットを作成し、このデータセットに基づきデータ解析を行った結果から最終判定を行う方法である。方法 3 は、方法 1 と同様に 3 回の実験を統合し、最終判定を行う方法であるが、方法 2 のように測定値を使うのではなく、得られる測定値を%換算した値を用いる方法である。いくつかの毒性パターンを想定して、シミュレーションによりこれら 3 種類の判定方法の性能評価を行った。

[結果] 実験間差や各濃度における繰り返しの誤差によらず、毒性がないパターンに対して、方法 1、2 では誤判定は約 5%程度だが、方法 3 では約 18%が誤判定であった。毒性があるパターンに対して、方法 3 は他の 2 方法に比べて謝る確率が高かった。

[結論] 統計学的な観点においては、方法 3 は、第一種の過誤を 5%に抑えることができ、他の 2 つの方法に比べて、様々な毒性パターンに対する高い検出力を有する方法である。

A. 研究目的

Multi-ImmunoTox Assay(以下、MITA)は、化学物質がヒトの免疫系に与える影響を *in vitro* で評価することを目標とする試験法である。MITA では、ある化学物質の IL2 の発現を評価は独立した 3 回の実験から得られる測定値を用いて行われ、immunosuppression、immunoaugmentation、no effect のいずれかの判定がされることが求められている。しかし、その判定方法が十分には確立し

ていなかったため、MITA のバリデーションにおける phase1 研究では、研究に入る前に 3 種類の判定方法により、データ解析が行われた。個々の判定の統計学的視点に基づく性能の良し悪しは、毒性がないものを誤って毒性ありとしてしまう確率がどの程度か、毒性があるものを正しく毒性ありと判定できる確率はどのくらいであるのかを知ることによって評価可能である。しかし、これまでこれら 3 種類の判定方法統計学的な性能評価は行われてい

なかった。

本報告では、提案された 3 種類の判定方法について、シミュレーションに基づく性能評価を行った結果をする。

B. 研究方法

MITA のデータの特徴

MITA では、独立に実施された 3 回の実験の結果を用いて判定には濃度 0(DMSO)群と各濃度群との対比較により、最終的な判定を行う。1 回の実験には、96 穴プレートが用いられ、Control 群に加え、濃度 0(DMSO)、濃度 1~濃度 10 までの計 12 段階の濃度群の測定値が得られる。個々の濃度群では 4 回の繰り返しがある。

Phase1 研究で検討した 3 種類の方法について

Phase1 研究において検討をおこなった 3 種類の判定方法（方法、方法、方法）についてまとめる。

方法は個々の実験で判定を行い、3 回の実験の判定結果をもって最終判定を行う方法である。3 回の実験それぞれにおいて、濃度 0 群と各濃度群の間に何らかの統計的に有意な違いがみられるかどうかを判定した後、それら 3 回の判定結果をまとめることで濃度 0 群に対する化学物質の影響を評価する。

それに対して方法は、独立した 3 回の実験で構成されている試験法の特徴を重視し、3 回の実験から得られた測定値を統合したデータセットを作成し、このデータセットに基づきデータ解析を行った結果から最終判定を行う方法である。それぞれの実験の違いは、データセットに含める変数の 1 つとすることで、データ解析では実験間の影響の調整を行ったうえで判定を行う。

また、方法は、方法と同様に 3 回の実験を統合し、最終判定を行う方法であるが、方法の

ように測定値を使うのではなく、得られる測定値を%換算した値を用いてデータ解析し、判定を行う点で方法とは異なる。

各実験から得られる測定値について

MITA では、内部標準プロモーターである SLR、INF- プロモーターである SLO、IL-2 プロモーターである SLG が導入された細胞を使い、その発光の度合いで免疫の活性の程度が測定される。1 回の実験において、96 穴プレートの各セルから SLG-LA (SLG ルシフェラーゼ活性)、SLO-LA (SLO ルシフェラーゼ活性)、SLR-LA (SLR ルシフェラーゼ活性) の 3 種類の発光に関する測定値が得られる。化学物質の評価において、第 i 番目の実験 ($i=1,2,3$) の第 j 番目の濃度 ($j=0,1,2,\dots,10$) の第 k 番目の繰り返しの測定値をそれぞれ SLG_{ijk} 、 SLO_{ijk} 、 SLR_{ijk} とする。

これらの測定値を用いて、判定のために以下の 4 種類の値が必要となる。

$$I.I.SLR_{ij} = (\overline{SLR_{ij}}) / (\overline{SLR_{i0}}),$$

$$nSLG_{ijk} = SLG_{ijk} / SLR_{ijk},$$

$$\%supp_{ij} = \left\{ 1 - \frac{(\overline{nSLG_{ij}})}{(\overline{nSLG_{i0}})} \right\} \times 100,$$

$$\text{ただし、} \overline{SLG_{ij}} = \sum_{k=1}^4 SLG_{ijk} / 4,$$

$$\overline{SLR_{ij}} = \sum_{k=1}^4 SLR_{ijk} / 4 \text{ である。}$$

$I.I.SLR_{ij} = (\overline{SLR_{ij}}) / (\overline{SLR_{i0}})$ は細胞の状態が正常かどうかを判断するための指標である。 $nSLG_{ijk}$ は SLG_{ijk} をプレート内の各セルにおいて標準化した値である。また、 $\%supp_{ij}$ は各濃度での 4 回の繰り返しの平均値を使って算出され、各濃度での免疫毒性の程度を%換算した値である。

方法

方法は個々の実験で判定を行い、3 回の実験の判定結果をもって最終判定を行う方法である。

各実験において、 $I.I.SLR_{ij} \geq 0.05$ ($j=0, \dots, J$)をみ
たす濃度の $nSLG_{ijk}$ を以降のデータ解析に採用す
る。 $nSLG_{ijk}$ を用いて、いずれかの濃度群の間に
差があるかどうかを知るために有意水準 5%で
1way ANOVA を行う。この検定の帰無仮説は、「第
i 番目の変数におけるすべての濃度群における
nSLG の母平均は等しい」である。その結果、統
計的に有意な差がみられた場合は、濃度 0 群と各
濃度群の対比較である両側 Dunnett 検定を有意水
準 5%で行う。この検定の帰無仮説は「第 i 番目の
実験における濃度 0 群と第 j 濃度群のそれぞれにお
ける nSLG の母平均は等しい」である。

1way ANOVA と Dunnett 検定の結果に基づい
て、まず個々の実験の判定を suppression(-)、
augmentation(+), no effect(0)のいずれかとする。
3 回の実験の判定結果が 3 回とも suppression(-)
もしくは augmentation(+)で一致した場合は、最
終判定はそれぞれ immunosuppression、
immunoaugmentation となる。

3 回の実験の判定結果が一致しなかった場合は、
それぞれの実験で、絶対値が最大となる
 $\max_{0 \leq j \leq 10} |\%supp_{ij}|$ の値を算出し、それら 3 つの値
を用いて両側 t 検定を有意水準 5%で行う。この検
定の帰無仮説は「 $\max_{0 \leq j \leq 10} |\%supp_{ij}|$ の母平均は 0
である」である。負の方向に統計的に有意差があ
れば immunosuppression、正の方向に統計的に有
意差があれば immunoaugmentation、統計的に有
意差がなければ no effect と最終判定を行う。

方法

方法 は、方法 のように単純に 3 回の実験の
測定値から得られる結果を併合するのではなく、3
回の異なる実験の影響を調整した nSLG の平均の
差を用いて、濃度 0 群と各濃度群の対比較である

両側 Dunnett 検定を有意水準 5%で行うことで最
終判定を行う方法である。この検定の帰無仮説は
「第 i 番目の実験における濃度 0 群と第 j 濃度群の
それぞれにおける nSLG の母平均は等しい」であ
る。

3 回の独立した実験における $I.I.SLR_{ij} \geq 0.05$
($j=0, \dots, J$)をみたす濃度を算出し、3 回の実験のう
ち最も小さい濃度を J_{\min} とする。この方法では j
の範囲を 1 から J_{\min} となる $nSLG_{ijk}$ を用いる。

3 回の異なる実験の影響を調整した Dunnett 検
定は、一般線形モデル (GLM) を用いて計算する
ことができる。モデルを

$$nSLG_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

とすると、独立した 3 回の実験の影響を調整した
 $nSLG_{ijk}$ の平均の差の推定値は $\hat{\beta}_j$ ($j=1, \dots, J_{\min}$)と
して得ることができる。有意水準 5%の両側

Dunnett 検定は、 β_j に対して上記の GLM モデル
の誤差の自由度を伴う両側 Dunnett の棄却限界値
を利用して構成された同時 95%信頼区間用いて判
定を行うことが可能である。この同時 95%信頼区
間の下限が 0 より大きな場合に
immunoaugmentation、上限が 0 より小さい場合
は immunosuppression、同時信頼区間が 0 を含ん
でいる場合は no effect と最終判定を行う。

方法

方法 は、3 回の異なる実験の影響を調整した
 $\%supp_j$ の平均値の差を用いて、濃度 0 群と各濃
度群の対比較である両側 Dunnett 検定を有意水準
5%で行うことで最終判定を行う方法である。この
検定の帰無仮説は「第 i 番目の実験における濃度 0
群と第 j 濃度群のそれぞれにおける $\%supp_j$ の母
平均は等しい」である。方法 と同様に、一般線
形モデルを用いて計算することができる。

モデルを

$$\%supp_{.ij} = \mu^* + \alpha_i^* + \beta_j^* + \varepsilon_{ij}^*$$

とすると、独立した 3 回の実験の影響を調整した

$\%supp_j$ の平均の差の推定値は $\hat{\beta}_j^*$ ($j=1, \dots, J_{\min}$)

として得ることができる。有意水準 5% の両側

Dunnett 検定は、 β_j^* に対して上記のモデルの誤差

の自由度を伴う両側 Dunnett の棄却限界値を利用して構成された同時 95% 信頼区間を用いて判定を行うことが可能である。この同時 95% 信頼区間の下限が 0 より大きな場合に immunoaugmentation、上限が 0 より小さい場合は immunosuppression、同時信頼区間が 0 を含んでいる場合は no effect と最終判定を行う。

シミュレーション

シミュレーションは、 $nSLG_{ijk}$ に対して、免疫毒性を示さないパターンと、化学物質の濃度が増加するにつれて Immunoaugmentation としての毒性の傾向を示す 3 種類のパターンの計 4 パターンの期待値に、乱数による誤差を加えたデータに基づき行った。検討した 4 パターンをそれぞれパターン A、B、C、D とする。

それぞれの毒性パターンの期待値は、3 回の独立した実験間差である α_i と、各濃度における 4 回の繰り返しの誤差（以下、繰り返し誤差）の標準偏差 σ がそれぞれ小さい場合と大きい場合を想定し、方法 ~ で免疫毒性判定にどのような違いが生じるのかを検討した。シミュレーション回数はそれぞれのパターンに対して 10,000 回行った。誤差には平均 0、分散 σ^2 の正規分布に従う乱数を用いた。検討したパターン A からパターン D の詳細と期待値を表 1 に示す。

解析には、統計解析ソフト SAS ver. 9.4 (SAS Institute Inc., NC) を用いた。

表 1. 検討した毒性パターンとその期待値

| パターン | 期待値のモデル |
|------|---|
| A | 毒性を示さない $E[nSLGi] = 5 + \alpha_i$ |
| B | 直線的にゆるやかに毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + \alpha_i + 0.3 \text{濃度}$ |
| C | 曲線的にゆるやかに毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + \alpha_i + 0.002 \text{濃度}^2$ |
| D | 曲線的に強く毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + \alpha_i + 0.05 \text{濃度}^2$ |

$E[nSLGi]$ は期待値を示す。各パターンそれぞれについて、実験間差が小さい場合と大きい場合をそれぞれ

$$\alpha_i = 0, \quad \sigma = 1, \quad \sigma = 2$$

$$\alpha_i = 0, \quad \sigma = 50, \quad \sigma = 100$$

と設定し、繰り返し誤差の標準偏差 σ が小さい場合と大きい場合をそれぞれ「 $\sigma = 0.08$ 」「 $\sigma = 0.8$ 」として検討した。繰り返し誤差の標準偏差の値は、実際の MITA のデータを参考に設定した。

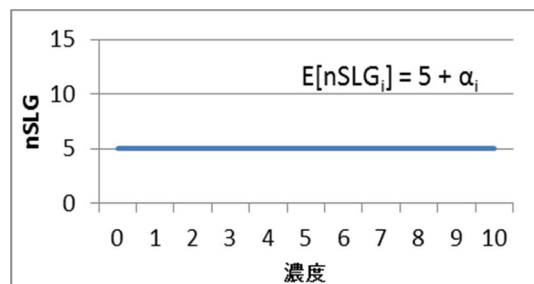


図 1. パターン A

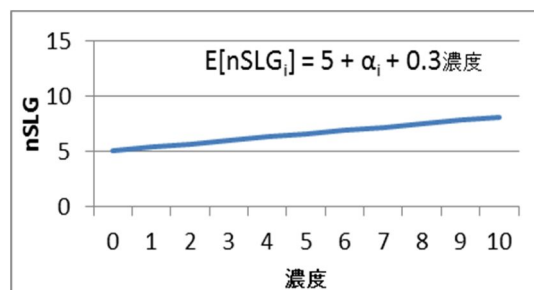


図 2. パターン B

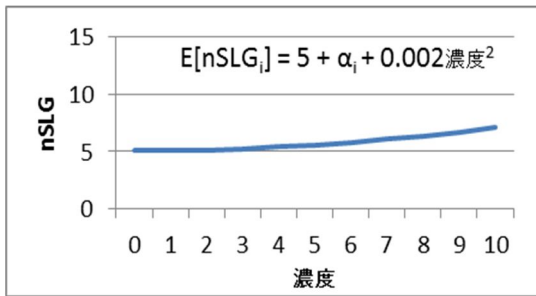


図 3 . パターン C

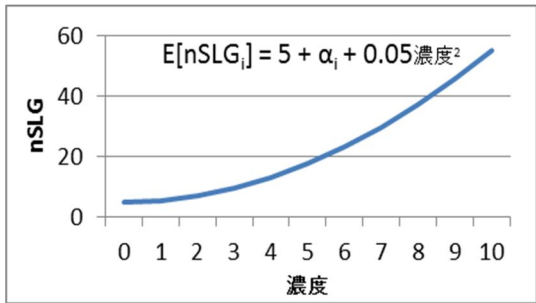


図 4 . パターン D

C . 研究結果

表 1 で示した各毒性パターンにおいて α_i と σ_i の大きさの設定を変え、10000 回ずつ実施したシミュレーションによる各方法での判定結果を、毒性パターンごとに割合でまとめた結果を表 2~5 に示す。

表 2 . パターン A の判定結果

| 実験間差 | 誤差 | 判定 | 方法 (%) | 方法 (%) | 方法 (%) |
|------------------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 8.90 | 2.55 | 2.22 |
| | | Immunoaugmentation | 9.26 | 2.76 | 2.53 |
| | | No effect | 81.84 | 94.69 | 95.25 |
| $\alpha_2 = 1$ | = 0.8 | Immunosuppression | 7.88 | 2.39 | 2.11 |
| | | Immunoaugmentation | 9.69 | 2.39 | 2.29 |
| | | No effect | 82.43 | 95.22 | 95.6 |
| $\alpha_3 = 2$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 2.41 | 0.04 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 2.65 | 0.06 |
| | | No effect | 100 | 94.94 | 99.9 |
| $\alpha_2 = 50$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0 | 2.46 | 0.08 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 2.62 | 0.04 |
| | | No effect | 100 | 94.92 | 99.88 |
| $\alpha_3 = 100$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 2.41 | 0.04 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 2.65 | 0.06 |
| | | No effect | 100 | 94.94 | 99.9 |

表 3 . パターン B の判定結果

| 実験間差 | 誤差 | 判定 | 方法 (%) | 方法 (%) | 方法 (%) |
|------------------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 100 | 100 | 100 |
| | | No effect | 0 | 0 | 0 |
| $\alpha_2 = 1$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0.47 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 99.06 | 99.97 | 99.99 |
| | | No effect | 0.47 | 0.03 | 0.01 |
| $\alpha_3 = 2$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 100 | 100 | 0 |
| | | No effect | 0 | 0 | 100 |
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 100 | 100 | 0 |
| | | No effect | 0 | 0 | 100 |
| $\alpha_2 = 50$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 98.81 | 99.99 | 2.42 |
| | | No effect | 1.19 | 0.01 | 97.58 |
| $\alpha_3 = 100$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 98.81 | 99.99 | 2.42 |
| | | No effect | 1.19 | 0.01 | 97.58 |

表 4 . パターン C の判定結果

| 実験間差 | 誤差 | 判定 | 方法 (%) | 方法 (%) | 方法 (%) |
|------------------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 33.26 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 49.34 | 99.57 | 99.35 |
| | | No effect | 17.40 | 0.43 | 0.65 |
| $\alpha_2 = 1$ | = 0.8 | Immunosuppression | 12.68 | 1.43 | 1.24 |
| | | Immunoaugmentation | 6.12 | 5.46 | 5.43 |
| | | No effect | 81.20 | 93.11 | 93.33 |
| $\alpha_3 = 2$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 49.12 | 99.57 | 1.90 |
| | | No effect | 50.88 | 0.43 | 98.10 |
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0 | 1.58 | 0.03 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 4.98 | 0.10 |
| | | No effect | 100 | 93.44 | 99.87 |
| $\alpha_2 = 50$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 1.58 | 0.03 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 4.98 | 0.10 |
| | | No effect | 100 | 93.44 | 99.87 |
| $\alpha_3 = 100$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 1.58 | 0.03 |
| | | Immunoaugmentation | 0 | 4.98 | 0.10 |
| | | No effect | 100 | 93.44 | 99.87 |

表 5 . パターン D の判定結果

| 実験間差 | 誤差 | 判定 | 方法 (%) | 方法 (%) | 方法 (%) |
|------------------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0.05 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 99.95 | 100 | 100 |
| | | No effect | 0 | 0 | 0 |
| $\alpha_2 = 1$ | = 0.8 | Immunosuppression | 1.13 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 98.68 | 99.81 | 99.95 |
| | | No effect | 0.19 | 0.19 | 0.05 |
| $\alpha_3 = 2$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 99.96 | 100 | 0 |
| | | No effect | 0.04 | 0 | 100 |
| $\alpha_1 = 0$ | = 0.08 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 99.96 | 100 | 0 |
| | | No effect | 0.04 | 0 | 100 |
| $\alpha_2 = 50$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 98.83 | 99.65 | 0.07 |
| | | No effect | 1.17 | 0.35 | 99.93 |
| $\alpha_3 = 100$ | = 0.8 | Immunosuppression | 0 | 0 | 0 |
| | | Immunoaugmentation | 98.83 | 99.65 | 0.07 |
| | | No effect | 1.17 | 0.35 | 99.93 |

D . 考察

毒性がない物質を誤って毒性ありと判定してしまう確率（第一種の過誤）

3 回の実験間差や各濃度における繰り返しの誤差によらず、毒性がないパターン A の場合は No effect と判定されることが望ましい。方法 1、2 では誤判定は約 5%程度だが、方法 3 では約 18%が誤判定であり、第一種の過誤確率が高いことがわかる（表 2）。方法 3 は 2 段階の判定としているため

に、検定を複数回行っていることにより、検定の多重性が生じた結果といえる。

濃度の増加に伴い毒性が明確になる物質を正しく検出できる確率（検出力）

実験間差が小さい場合、パターン B とパターン D の結果は、方法 1、2、3 のすべての方法において、毒性ありである Immunoaugmentation と判定されており、いずれの方法でも高い検出力を保持して判定できていることが分かった。パターン C においては、検出力の高さの視点からは方法 1 と方法 2 に違いはなかったが、方法 3 においては正しく Immunoaugmentation と判定できる割合は他の 2 方法に比べて小さかった（表 3、4、5 それぞれの上 2 段）。実験間差や誤差が小さくても、方法 3 は方法 1、2 に比べて検出力が低く、適切に判定できないことを示している。このことは、方法 3 において判定を行う際、3 回の各実験における個々の判定結果が一致せず suppression 側に偏った傾向にあれば、最終判定を行う際に Immunosuppression と判定されやすくなってしまふことが要因ではないかと考えられる。

次に実験間のばらつきが大きい場合に注目すると、パターン B、C、D のいずれの場合も、方法 3 を用いた時の判定結果がほぼ No effect となってしまうことがわかる（表 3、4、5 それぞれの下 2 段）。これは、方法 3 では応答が 0 から 1 の範囲に収まる $\%supp_j$ に基づき計算していることによる。 $\%supp_j$ の換算した値の利用は、実験施設ごとに測定機械が異なることによって生じる測定値のスケールの大きさの違いの影響を排除することができると思われる。しかし、この換算の定義より、常に各実験の濃度 0 群の値が常に 0% となる一方で、何らかの原因で実験間差が生じた場合に化学物質の濃度が増加するに従い実験間のばらつきは大きくなってしまふ。方法 3 は $\%supp_j$ を用いて判定を

行う解析に、線形モデルを想定しているため、この状況でモデルが適切とはいえない。この現象は実験間差が大きい場合に特に顕著になるであろう。シミュレーションで設定した実験間差の大きな状況は誤差の標準偏差と比べてもはるかに大きく、現実の実験では生じることがないような大きさであるものの、 $nSLG_{ijk}$ の実験間差が濃度によらず一定の大きさで生じるような場合には、方法 1 よりも方法 2 の方がより精度よく判定を行うことができるといえる。

本研究の限界

本研究の弱点は、シミュレーションで用いたデータは、方法 3 で使用したモデルと同じモデルを用いて発生させており、このことによって方法 3 の判定結果が他の方法よりも有利であることである。しかし、上記に示したように方法 3 は応答が 0 から 1 の範囲に収まる $\%supp_j$ に対して線形モデルを想定しており、想定するモデルの仮定は適切ではないであろう。

検討したシミュレーションで発生させたデータは、実際に実験により得られる SLG_{ijk} 、 SLO_{ijk} 、 SLR_{ijk} では無く、これから計算される $nSLG_{ijk}$ に基づいている。このため、本検討のシミュレーションには、I.I.SLR_{ij} に基づく判定が行っているわけではない。しかしながら、 $nSLG_{ijk}$ に基づくデータで検討を行うことにより、判定方法間の本質的な特徴を知ることができているといえる。

検討した判定方法が実際に毒性の判定に用いることができるかどうかは別の問題である。方法 3 は検出力が高い方法であることが本検討のシミュレーションにより明らかになったが、統計的検定のみに基づく判定のみで判定することが、毒性の判定として適切であるかどうかは別の問題である。毒性判定として実用化するためには、この分野の

毒性家との議論を必要とする。

なし。

E . 結論

MITA による化学物質の評価のために判定方法の候補となる 3 種類の方法の統計的性能をシミュレーションにより評価した。統計学的な観点においては、方法 1 は、第一種の過誤を 5%に抑えることができ、他の 2 つの方法に比べて、様々な毒性パターンに対する高い検出力を有する方法である。

謝辞：本検討を進めるにあたり解析の多くの部分に協力してくれた神戸大学医学研究科の小林真弓氏に感謝いたします。

F . 健康危険情報

G . 研究発表

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし。

参考文献

- 1) Littell, R. C., Stroup, W. W., Freund, R. J. SAS for linear models. SAS, 2002.
- 2) 永田靖、吉田道弘. 統計的多重比較の基礎. サイエンティスト社, 1997.

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
分担研究報告書

化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析、validation、プロトコール作成

分担研究者 木村 裕
東北大学病院皮膚科

研究要旨

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」にて開発した新たな *in vitro* 免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）について平成28年度に実施されたPhase Iバリデーション後の国際VMTミーティング会議（京都）で検討された結果を反映した試験法プロトコール(Multi-ImmunoTox Assay protocol ver. 009.1E)およびデータシート(Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 008.2)を作成しPhase II試験を行った。その結果について国際VMTミーティング会議(大阪)での意見、東北大学での解析を参照とし%suppressionの閾値を±35%としたクライテリアを設定した。

キーワード：試験法プロトコール、バリデーション

A．研究目的

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」にて開発した新たな *in vitro* 免疫毒性評価試験法（Multi-ImmunoTox assay：MITA）の OECD（Organisation for Economic Co-operation and Development）における試験法ガイドライン（Test Guideline：TG）化を目的とし、試験法プロトコールを作成し国際バリデーションを行う。

B．研究方法

以下の方法によりIL-2およびIFN- γ プロモーター活性の測定を行った。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- γ プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子（橙色に発色）、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子（赤色に発色）を導入した#2H4細胞を1ウェル当たり 2×10^5 個、黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)に播種し化学物質を加え、37℃、5%CO₂下で1時間培養した。つづいて25nM PMAと1 μ M I α の混合物(PMA/I α)で刺激し37℃、5%CO₂下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質である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。

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

C. 結果

- 1) 国際バリデーションPhase 2用の試験法プロトコル、データシート、記録用紙の作成
平成28年度に実施されたPhase Iバリデーション後の国際VMTミーティング会議 (H29. 2月、京都) で検討された結果を反映した国際バリデーションPhase 2用の試験法プロトコル、Multi-ImmunoTox Assay protocol ver. 009.1Eを作成した (添付文書1)。データ入力、結果表示用にエクセルファイルをベースとしたdata sheet、Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 008.2を作成した (添付文書2)。さらに参加施設用の記録用紙、Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1を作成した (添付文書3)。
- 2) 国際バリデーションPhase 2の結果の解析および新クライテリアの設定
国際バリデーションPhase 2の結果について国際VMTミーティング会議(大阪)での意見、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 $\pm 35\%$ と設定したクライテリア(クライテリア5)を設定した。クライテリア5を用いて国際バリデーションPhase 2の結果を再評価したところ施設間再現性が80%(16/20)であった。2018年3月29日に開催された国際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。

D. 考察

クライテリア5による評価では、施設内、施設間再現性についてPhase I、Phase II共にstudy planに記載された基準を満たした。今後、試験に使用された被験物質について *in vitro*, *in vivo* のデータを集積しMITAアッセイの予測性について検討する。

E. 結論

国際バリデーションPhase IIに向けて試験法プロトコル、データシート、記録用紙を作成した。また、その結果に基づき%suppressionの閾値を $\pm 35\%$ とした新しいクライテリアを設定した。

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.

F. 添付文書

- 1) Multi-ImmunoTox Assay protocol ver. 009.1E
- 2) Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 008.2
- 3) Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H. and 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

2. 学会発表

- 1) Kimura Y. et al. Dimethyl sulfoxide is not necessary to dissolve most sensitizers for their *in vitro* stimulation of dendritic cells. 47th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. Salzburg, Austria, September 27-30, 2017
- 2) Kimura Y. et al. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. 10th World Congress Alternatives and Animal

Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017

- 3) Aiba S. et al. A novel *in vitro* assay for sensitizers in purely aqueous system: the modified IL-8 Luc assay using X-VIVOTM 15 as a solvent. 10th World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 4) 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
- 5) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Multi-ImmunoTox Assay protocol ver. 009.1E

May. 8th, 2017

Department of Dermatology, Tohoku University Graduate School of Medicine

Yutaka Kimura, M.D., Ph.D.

Setsuya Aiba, M.D., Ph.D.

| | |
|---|------------|
| 1. Introduction | 97 |
| 2. Materials | 98 |
| 2-1 Cells | 98 |
| 2-2 Reagents and equipment | 98 |
| 2-2-1 For maintenance of the #2H4 cells | 98 |
| 2-2-2 For chemical exposure, stimulation and solvents | 98 |
| 2-2-3 For measurement of the luciferase activity..... | 98 |
| 2-2-4 Expendable supplies | 98 |
| 2-2-5 Equipment for measurement of luciferase activity | 99 |
| 2-2-6 Others | 99 |
| 2-3 Culture medium | 100 |
| 2-3-1 A medium: for maintenance of #2H4 cells (500 mL, stored at 2-8°C) 100 | |
| 2-3-2 B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2-8°C)..... | 100 |
| 2-3-3 C medium: for thawing #2H4 cells (30 mL, stored at 2-8°C) | 100 |
| 2-4 Preparation of the stimulant of #2H4 | 101 |
| 2-4-1 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | 101 |
| 2-4-2 Ionomycin..... | 101 |
| 3. Cell culture | 102 |
| 3-1 Thawing of #2H4 cells | 102 |
| 3-2 Maintenance of #2H4 cells | 102 |
| 4. Preparation of cells for assay | 103 |
| 5. Preparation of chemicals and cell treatment with chemicals | 104 |
| 5-1 Dissolution by vehicle (cf. Figure 3) | 104 |
| 5-2 When the chemical is prepared in distilled water | 107 |
| 5-2-1 Arrangement of chemicals and vehicle..... | 107 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5-2-2 | Serial dilution..... | 107 |
| 5-2-3 | 2 step dilution..... | 108 |
| 5-3 | When the chemical is prepared as a DMSO solution..... | 110 |
| 5-3-1 | Arrangement of chemicals and vehicle..... | 110 |
| 5-3-2 | Serial dilution..... | 110 |
| 5-3-3 | Dilution of DMSO solution with the B medium..... | 111 |
| 5-3-4 | 2 step dilution..... | 112 |
| 6. | Preparation of the stimulant (PMA/ionomycin) and addition to #2H4 | 114 |
| 6-1 | Material..... | 114 |
| 6-2 | Preparation of 100 μ M PMA | 114 |
| 6-3 | Preparation of control and x10 PMA/ionomycin solution..... | 114 |
| 6-4 | Addition of PMA/ionomycin to #2H4..... | 115 |
| 7. | Control..... | 116 |
| 7-1 | Preparing control chemical (dexamethasone, cyclosporine A)..... | 116 |
| 7-1-1 | Preparing dexamethasone stock..... | 116 |
| 7-1-2 | Preparing cyclosporine A stock..... | 116 |
| 7-2 | Preparation of cells for assay | 117 |
| 7-3 | Arrangement of chemicals and vehicle | 118 |
| 7-4 | Dilution with the B medium..... | 118 |
| 7-5 | 2 step dilution | 119 |
| 7-6 | Addition of PMA/ionomycin to #2H4..... | 121 |
| 8. | Calculation of the transmittance factors | 123 |
| 8-1 | Reagents..... | 123 |
| 8-2 | Preparation of luminescence reaction solution..... | 123 |
| 8-3 | Bioluminescence measurement | 124 |

| | |
|---|------------|
| 9. Measurement..... | 127 |
| 10. Data analysis..... | 130 |
| 11. Criteria | 130 |
| 11-1 Acceptance criteria | 130 |
| 11-2 Criterion..... | 130 |
| 12. Update record | 132 |
| Appendix 1 Principle of measurement of luciferase activity | 134 |
| Appendix 2 Validation of reagents and equipment..... | 136 |

1. Introduction

This protocol describes how to maintain the cells, how to prepare the test chemicals, and how to measure the luciferase activity of #2H4 cells transfected with 3 luciferase genes, stable luciferase green (SLG), stable luciferase orange (SLO) and stable luciferase red (SLR), under the control of IL-2, IFN γ and G3PDH promoters, respectively, for the Multi-Immuno Tox Assay.

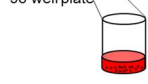
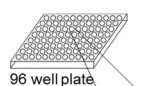
(Kimura Y. et al. Evaluation of the Multi-Immuno Tox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs *Toxicol in Vitro*, 28, 759-768, 2014)

Figure 1

Assay design (2 chemicals per one plate)

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| A | cont (distilled water or DMSO) | PMA/I o only | A/2 ⁹ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ⁸ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ⁷ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ⁶ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ⁵ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ⁴ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ³ $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ² $\mu\text{g/ml}$ | A/2 ¹ $\mu\text{g/ml}$ | A $\mu\text{g/ml}$ |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | cont (distilled water or DMSO) | PMA/I o only | B/2 ⁹ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ⁸ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ⁷ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ⁶ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ⁵ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ⁴ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ³ $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ² $\mu\text{g/ml}$ | B/2 ¹ $\mu\text{g/ml}$ | B $\mu\text{g/ml}$ |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

 PMA/Io or LPS



Cell preparation
(2×10^5 cells/well of 2H4)



Add various concentrations of Chemicals

↓ Incubate for 1 h



Stimulate with PMA/Io

↓ Incubate for 6 h



Add TripLuc[®] luciferase assay reagent (TOYOBO)

↓ Shake for 10 min.



Assess using a microplate-type luminometer(10-15 min./plate)

2. Materials

2-1 Cells

- #2H4 (IL2-SLG、IFN γ -SLO、G3PDH-SLR)

The human acute T lymphoblastic leukemia cell line Jurkat was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). A Jurkat-derived IL-2 and IFN γ reporter cell line, #2H4, that harbors the SLG, SLO and SLR luciferase genes under the control of the IL-2, IFN γ and GAPDH promoters, respectively, was established by Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO Co. Ltd.

(Saito R. et al. Nickel differentially regulates NFAT and NF- κ B activation in T cell signaling *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 245–255, 2011)

2-2 Reagents and equipment

2-2-1 For maintenance of the #2H4 cells

- RPMI-1640 (GIBCO Cat#11875-093, 500 mL)
- FBS (Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004)
- Antibiotic-Antimycotic (GIBCO Cat#15240-062)
- HygromycinB (CAS:31282-04-9, Invitrogen Cat#10687-010)
- G418 (CAS:108321-42-2, Nacalai Tesque Cat#16513-84)
- Puromycin (CAS:58-58-2, InvivoGen Cat#ant-pr-1)

2-2-2 For chemical exposure, stimulation and solvents

- Ionomycin (CAS:56092-82-1, Sigma Cat#I0634)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (CAS:16561-29-8, Sigma Cat#P8139)
- Ethanol (e.g., Wako Cat#057-00456)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (CAS:67-68-5, Sigma Cat#D5879)
- Distilled water (GIBCO Cat#10977-015)

2-2-3 For measurement of the luciferase activity

- Tripluc[®] Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)

2-2-4 Expendable supplies

- T-75 flask tissue culture treated (e.g., Corning Cat#353136)
- 96 well μ clear black plate (flat-bottom, for measurement of the luciferase activity, e.g. Greiner Bio-one Cat#655090)
- 96 well clear plate (round-bottom, for preparation of chemicals and stimulants)

- 96 well assay block, 2 mL (e.g., Costar Cat#3960)
- Seal for 96 well plate (e.g., Perkin Elmer TopSeal-A PLUS Cat#6050185, EXCEL Scientific SealMate Cat#SM-KIT-SP)
- Reservoir
- Pipette

2-2-5 Equipment for measurement of luciferase activity

- Measuring device: a microplate-type luminometer with a multi-color detection system that can accept two optical filter
e.g. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)
- Optical filter: 560 nm long-pass filter and 600 nm long-pass filter
- Measuring time: set at 1 ~ 5 sec/well measuring time

2-2-6 Others

- Pipetman
- 8 channel or 12 channel pipetman (optimized for 10~100 μ L)
- Plate shaker (for 96 well plate)
- CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)
- Water bath
- Cell counter: hemocytometer, trypan blue

2-3 Culture medium

2-3-1A medium: for maintenance of #2H4 cells (500 mL, stored at 2-8°C)

| Reagent | Company | Concentration | Final concentration in medium | Required amount |
|------------------------|---|---------------|-------------------------------|-----------------|
| RPMI-1640 | GIBCO #11875-093 | - | - | 440 mL |
| FBS | Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004 | - | 10 % | 50 mL |
| Antibiotic-Antimycotic | GIBCO #15240-062 | 100× | 1× | 5 mL |
| Puromycin | InvivoGen # ant-pr-1 | 10 mg/mL | 0.15 μ g/mL | 7.5 μ L |
| G418 | Nacalai Tesque #16513-84 | 50 mg/mL | 300 μ g/mL | 3 mL |
| HygromycinB | Invitrogen #10687-010 | 50 mg/mL | 200 μ g/mL | 2 mL |

2-3-2 B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2-8°C)

| Reagent | Company | Concentration | Final concentration in medium | Required amount |
|-----------|---|---------------|-------------------------------|-----------------|
| RPMI-1640 | GIBCO #11875-093 | - | - | 27 mL |
| FBS | Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004 | - | 10 % | 3 mL |

2-3-3 C medium: for thawing #2H4 cells (30 mL, stored at 2-8°C)

| Reagent | Company | Concentration | Final concentration in medium | Required amount |
|------------------------|---|---------------|-------------------------------|-----------------|
| RPMI-1640 | GIBCO #11875-093 | - | - | 26.7 mL |
| FBS | Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004 | - | 10 % | 3 mL |
| Antibiotic-Antimycotic | GIBCO #15240-062 | 100× | 1× | 0.3 mL |

2-4 Preparation of the stimulant of #2H4

2-4-1 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

| Reagent | Company | Concentration of the stock solution | Final concentration |
|---------------------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------------|
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | Sigma #P8139 | 2 mM | 25 nM |
| DMSO | Sigma #D5789 | | |

Dissolve 1 mg PMA using DMSO 811 μ L, dispense at 5 μ L/tube and store at freezer at -30°C . Use these stocks within 6 month after dissolution.

2-4-2 Ionomycin

| Reagent | Company | Concentration of the stock solution | Final concentration |
|-----------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|
| Ionomycin | Sigma # I0634 | 2 mM | 1 μ M |
| Ethanol | Wako #057-00456 | | |

Dissolve 1mg Ionomycin using ethanol 669.3 μ L, dispense at 30 μ L/tube and store at freezer at -30°C . Use these stocks within 6 month after dissolution.

3. Cell culture

3-1 Thawing of #2H4 cells

Pre-warm 9 mL of C medium in a 15 mL polypropylene conical tube in a 37°C water bath (for centrifugation) and 15 mL of C medium in a T-75 Flask at 37°C in a 5% CO₂ incubator (for culture).

Thaw frozen cells (2×10^6 cells / 0.5 mL of freezing medium) in a 37°C water bath, then add to a 15 mL polypropylene conical tube containing 9 mL of pre-warmed C medium. Centrifuge the tube at 120-350 x g at room temperature for 5 min, discard the supernatant, and resuspend in 15 mL of pre-warmed C medium in a T-75 Flask. Cells are incubated at 37°C, 5% CO₂.

3-2 Maintenance of #2H4 cells

Pre-warm the A medium in a T-75 Flask at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The culture medium should be changed to the A medium 3 or 4 days after thawing. At that time, count the number of cells, centrifuge the tube at 120-350 x g at room temperature for 5 min, discard the supernatant, and resuspend in pre-warmed the A medium in a T-75 Flask. Cells are passaged at 3×10^5 /mL and incubated at 37°C, 5% CO₂.

The interval between subcultures should be 3~4 days. Cells can be used between one and six weeks after thawing.

4. Preparation of cells for assay

A cell passage should be done 2-4 days before the assay.

Use cells between 1 and 6 weeks after thawing.

Pre-warm the B medium in a 37°C water bath. Count the number of cells and collect the number of cells needed (2.0×10^7 cells for two chemicals are required, but to have some leeway, 3.0×10^7 cells for two chemicals should be prepared), centrifuge the tube at 120-350 x g, 5 min. Resuspend in pre-warmed the B medium at a cell density of $4 \times 10^6/\text{mL}$. Transfer the cell suspension to a reservoir, and add 50 μL of cell suspension to each well of a 96 well $\mu\text{clear black plate}$ (flat bottom) using an 8 channel or 12 channel pipetman. (cf. Figure 2)

Figure 2

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| B | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| C | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| D | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| E | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| F | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| G | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |
| H | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL |

5. Preparation of chemicals and cell treatment with chemicals

5-1 Dissolution by vehicle (cf. Figure 3)

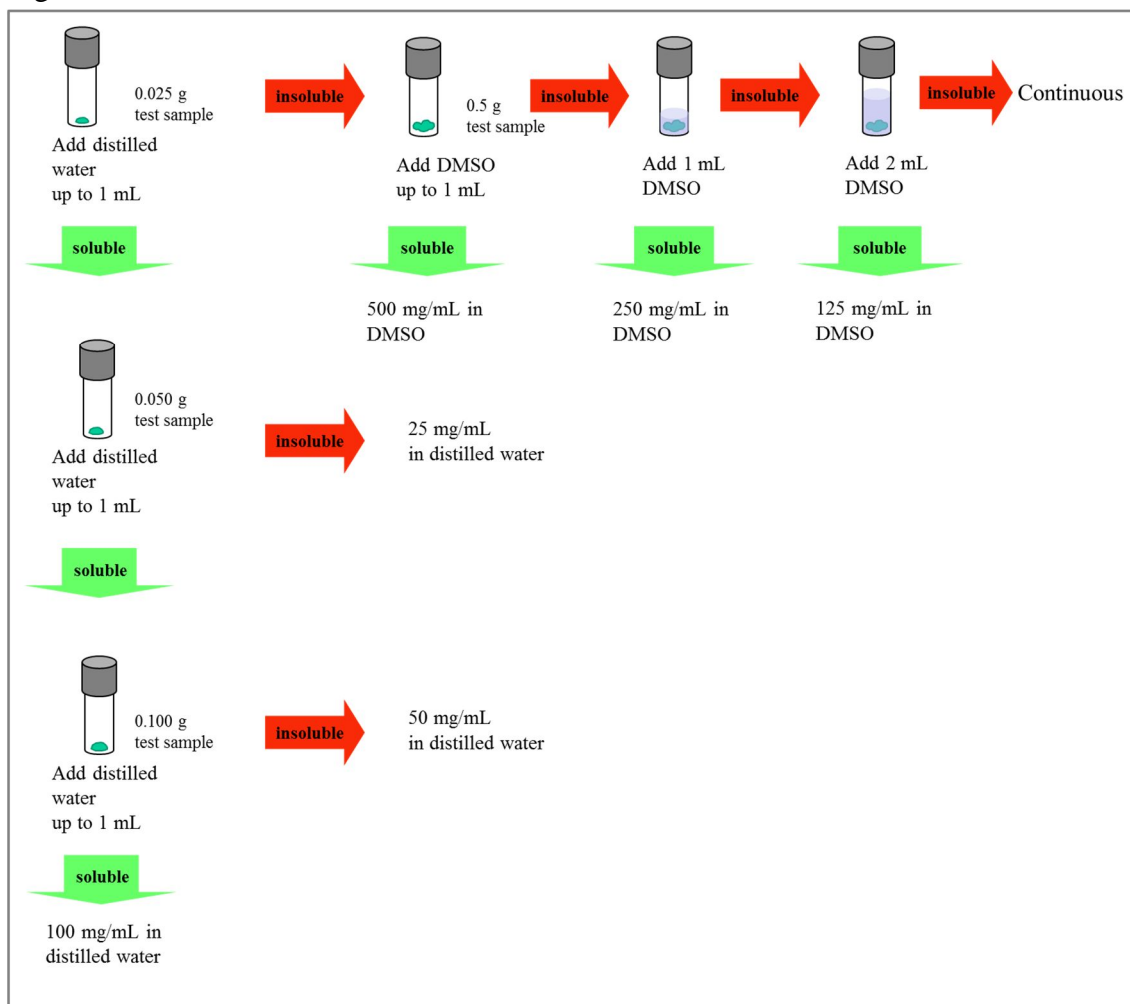
Dissolve the chemical first in distilled water. Namely, weigh 0.025 g of the test chemical in a volumetric flask and add distilled water up to 1 mL. If the chemical is soluble at 25 mg/mL, weigh 0.050 g of the test chemical in a volumetric flask and add distilled water up to 1 mL. If the chemical is not soluble at 50 mg/mL, 25 mg/mL is the highest soluble concentration. If the chemical is soluble at 50 mg/mL, weigh 0.100 g of the test chemical in a volumetric flask and add distilled water up to 1 mL. If the chemical is not soluble at 100 mg/mL, 50 mg/mL is the highest soluble concentration. If the chemical is soluble at 100 mg/mL, 100 mg/mL is the highest soluble concentration.

If the chemical is not soluble in water, the chemical should be dissolved in DMSO at 500 mg/mL. Namely, weigh 0.5 g of the test chemical in volumetric flask and add DMSO up to 1 mL.

If the chemical is not soluble at 500 mg/mL, the highest soluble concentration should be determined by diluting the solution from 500 mg/mL at a common ratio of two (250 mg/mL → 125 mg/mL → continued if needed) with DMSO.

Sonication and vortex may be used if needed , and attempt to dissolve the chemical for at least 5 minutes. Being soluble should be confirmed by centrifugation at 15,000 rpm ($\approx 20,000 \times g$) for 5 min and absence of precipitation. The chemical should be used within 4 hours after being dissolved in distilled water or DMSO.

Figure 3



In the first experiment (1st experiment), when the chemical is prepared in distilled water, conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration using distilled water. When the chemical is prepared as a DMSO solution, conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration using DMSO.

In the second or third experiment (2nd or 3rd experiment), determine the minimum concentration at which I.I.-SLR-LA (mentioned later in **10**) became lower than 0.05 in the 1st experiment, use the concentration one step (2-times) higher than this determined concentration as the highest concentration of the chemical to examine, and conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration. If I.I.-SLR-LA did not become lower than 0.05 or became lower than 0.05 at the highest concentration in the 1st experiment, conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration in the 1st experiment.

For example, in Figure 3 below, the minimum concentration at which I.I.-SLR-LA became lower

than 0.05 is 1.95 $\mu\text{g/ml}$. The highest concentration of the chemical to examine is the concentration one step (2-times) higher than 1.95 $\mu\text{g/ml}$, which is 3.91 $\mu\text{g/ml}$.

In Figure 4 below, I.I.-SLR-LA did not become lower than 0.05. In such a case, the highest concentration of the chemical to examine is the highest concentration in the 1st experiment, namely 125 $\mu\text{g/ml}$.

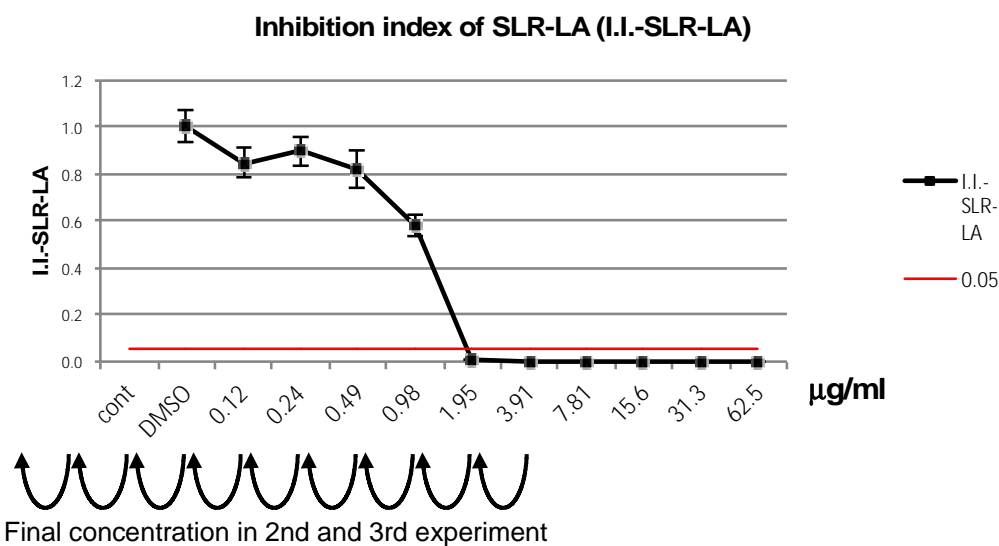


Figure 3.

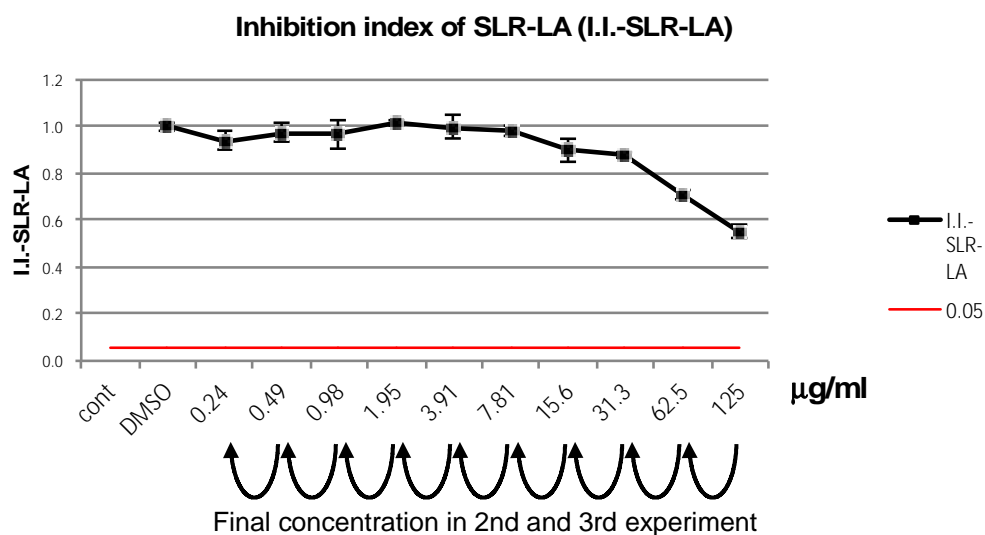


Figure 4

5-2 When the chemical is prepared in distilled water

If the chemical is prepared at a lower concentration, use the prepared concentration instead of the 100 mg/mL distilled water solution.

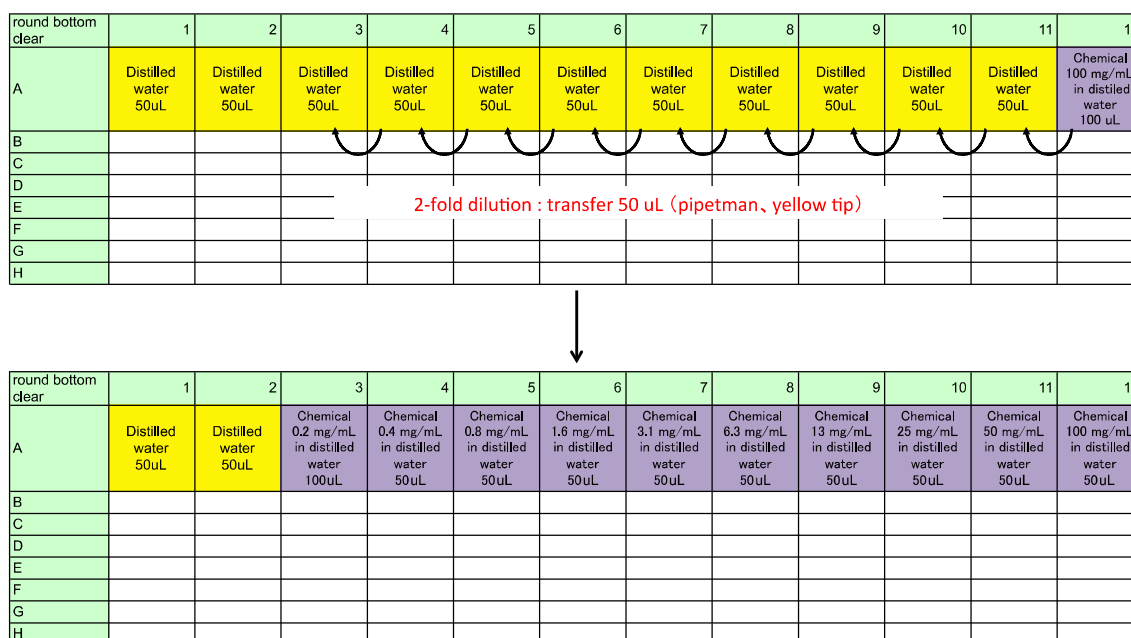
5-2-1 Arrangement of chemicals and vehicle

Add 100 μL of the 100 mg/mL distilled water solution of the chemical to well #A12, and 50 μL of the distilled water to wells #A1-#A11 of the 96 well clear plate (round bottom).

5-2-2 Serial dilution

Conduct 9 serial dilutions at a common ratio of 2 as indicated in Figure 4 from well #A11 to well #A3. Transfer 50 μL to the next (left) well. (cf. Figure 4)

Figure 4



5-2-3 2 step dilution

Add 20 μL of the diluted chemical to 480 μL of the B medium prepared in the assay block. And add 50 μL to #2H4 in a 96 well plate using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Seal the plate, shake the plate with a plateshaker and incubate in a CO_2 incubator for 1 hour (37°C , CO_2 , 5%) (cf. Figure 5-7).

Figure 5

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|----------------------|---|--|--|--|--|--|---|---|---|--|
| A | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Chemical 0.2 mg/mL in distilled water 100uL | Chemical 0.4 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 0.8 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 1.6 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 3.1 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 6.3 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 13 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 25 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 50 mg/mL in distilled water 50uL | Chemical 100 mg/mL in distilled water 50uL |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| Assay Block | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| A | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

5-3 When the chemical is prepared as a DMSO solution

If the chemical is prepared at a lower concentration, use the prepared concentration instead of 500 mg/mL DMSO solution.

5-3-1 Arrangement of chemicals and vehicle

Add 100 µL of the 500 mg/mL DMSO solution of the chemical to well #A12, 50 µL of DMSO to wells #A1-#A11, and 90 µL of the B medium to wells #B1-#B12 of the 96 well clear plate (round bottom)

5-3-2 Serial dilution

Conduct 9 serial dilutions at a common ratio of 2 as indicated in Figure 8 from well #A11 to well #A3. Transfer 50 µL to the next (left) well. (cf. Figure 8)

Figure 8

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| A | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | Chemical 500 mg/mL in DMSO 100uL |
| B | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

2-fold dilution : transfer 50 uL (pipetman, yellow tip)

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------|----------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A | DMSO 100% 50uL | DMSO 100% 50uL | Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 100uL | Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 16 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 31 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 63 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 125 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 250 mg/mL in DMSO 50uL | Chemical 500 mg/mL in DMSO 50uL |
| B | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL | B medium 90uL |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

5-3-3 Dilution of DMSO solution with the B medium

Dilute 10 μ L of the DMSO solution of the chemical in wells #A1-#A12 with 90 μ L of the B medium using an 8-12 channel pipetman. (cf. Figure 9)

Figure 9

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|----------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| A | DMSO 100% 50 μ L | DMSO 100% 50 μ L | Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 100 μ L | Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 16 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 31 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 63 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 125 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 250 mg/mL in DMSO 50 μ L | Chemical 500 mg/mL in DMSO 50 μ L |
| B | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L | B medium 90 μ L |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

10 μ L

↓

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|---|---|--|--|--|--|---|---|---|--|--|--|
| A | DMSO 100% 40 μ L | DMSO 100% 40 μ L | Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 90 μ L | Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 16 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 31 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 63 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 125 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 250 mg/mL in DMSO 40 μ L | Chemical 500 mg/mL in DMSO 40 μ L |
| B | Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 0.10 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 0.20 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 0.39 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 0.78 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 1.6 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 3.1 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 6.3 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 12.5 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 25 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L | Chemical 50 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μ L |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

5-3-4 2 step dilution

Add 10 μL of the diluted chemical to 490 μL of the B medium prepared in the assay block. And add 50 μL to #2H4 in a 96 well plate using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Manipulate the procedures from 5-3-3 to 5-3-4 as quickly as you can, and do not leave a long time at step after 5-3-3 or Figure 10. Seal the plate, shake the plate with a plateshaker and incubate in a CO_2 incubator for 1 hour (37°C , CO_2 , 5%) (cf. Figure 10-12).

Figure 10

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|---|---|--|--|--|--|---|---|---|--|--|--|
| A | DMSO 100% 40 μL | DMSO 100% 40 μL | Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 90 μL | Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 16 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 31 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 63 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 125 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 250 mg/mL in DMSO 40 μL | Chemical 500 mg/mL in DMSO 40 μL |
| B | Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 0.10 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 0.20 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 0.39 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 0.78 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 1.6 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 3.1 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 6.3 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 12.5 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 25 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL | Chemical 50 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 μL |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| Assay Block | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL | B medium 490 μL |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

10 μL

6. Preparation of the stimulant (PMA/ionomycin) and addition to #2H4

6-1 Material

- 2 mM PMA stock
- 2 mM Ionomycin stock
- B medium
- Ethanol

6-2 Preparation of 100 μ M PMA

Dilute 2 mM PMA stock with the B medium as follows (20 times, final concentration is 100 μ M).

| 2 mM PMA | B medium | Total | final concentration |
|-----------|------------|-------------|---------------------|
| 5 μ L | 95 μ L | 100 μ L | 100 μ M |

6-3 Preparation of control and x10 PMA/ionomycin solution

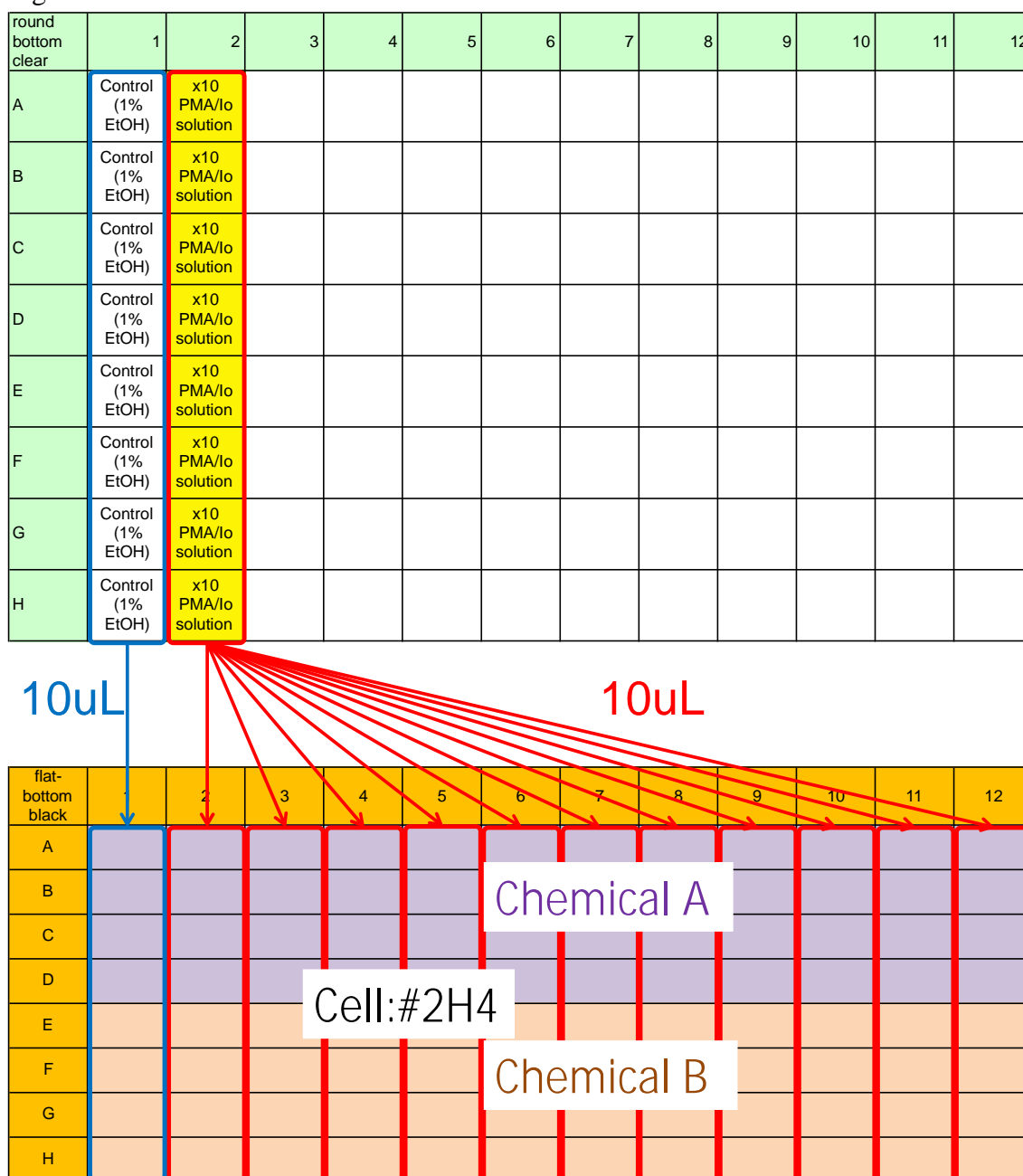
Dilute ethanol, 2 mM ionomycin and 100 μ M PMA with the B medium to prepare control or x10 PMA/ionomycin solution. Add the control to well #A1-#H1 of the 96 well clear plate (round bottom), and add x10 PMA/ionomycin solution to wells #A2-#H2 of the 96 well clear plate (round bottom).

| | B medium | 2 mM Ionomycin | 100 μ M PMA | Ethanol | Total |
|----------------------------|--------------|----------------|-----------------|-----------|--------------|
| Control | 995 μ L | - | | 5 μ L | 1000 μ L |
| x10 PMA/ionomycin solution | 2382 μ L | 12 μ L | 6 μ L | - | 2400 μ L |

6-4 Addition of PMA/ionomycin to #2H4

One hour after the addition of chemicals, add 10 μ L of control or PMA/ionomycin solution to the cells (#A1-#H1 or #A2-#H12, respectively) using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Make sure that the apex of the tip is dipped into the medium. Change tips every line you add. Seal the plate, shake the plate with a plateshaker and incubate in a CO₂ incubator for 6 hour (37°C, CO₂, 5%). (cf. Figure 13)

Figure 13



7. Control

7-1 Preparing control chemical (dexamethasone, cyclosporine A)

7-1-1 Preparing dexamethasone stock

| Reagent | Company | Concentration of the stock solution | Preparing concentration | Final concentration |
|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Dexamethasone-water soluble | Sigma #D2915-100MG | 2.5 mg/mL | 2.5 mg/mL | 50 µg/mL |
| Distilled water | GIBCO Cat#10977-015 | | | |

Dissolve 100 mg of Dexamethasone-water soluble with distilled water 40 mL, dispense at 50 µL/tube and store a freezer at -30°C.

7-1-2 Preparing cyclosporine A stock

| Reagent | Company | Concentration of the stock solution | Preparing concentration | Final concentration |
|----------------|------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Cyclosporine A | Sigma #C1832-5MG | 100 µg/mL | 100 µg/mL | 100 µg/mL |
| DMSO | Sigma #D5789 | | | |

Dissolve 5 mg of cyclosporine A with DMSO 50 mL, dispense at 50 µL/tube and store a freezer at -30°C.

7-2 Preparation of cells for assay

A cell passage should be done 2-4 days before the assay.

Use cells between 1 and 6 weeks after thawing.

Pre-warm the B medium in a 37°C water bath. Count the number of cells and collect the number of cells needed (5.0×10^6 cells are required, but to have some leeway, 7.5×10^6 cells should be prepared), centrifuge the tube at 120-350 x g, 5 min. Resuspend in pre-warmed the B medium at a cell density of $4 \times 10^6/\text{mL}$. Transfer the cell suspension to a reservoir, and add 50 μL of cell suspension to each well of a 96 well μclear black plate (flat bottom) using an 8 channel or 12 channel pipetman. (cf. Figure 14)

Figure 14

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| B | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| C | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| D | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

7-3 Arrangement of chemicals and vehicle

Add DMSO 50 μ L to #A4, 100 μ g/mL cyclosporine A stock 50 μ L to #A5, distilled water 50 μ L to #B1 and #B2, 2.5 mg/ml dexamethasone stock 50 μ L to #B3 and the B medium 180 μ L to #B4 and #B5 of the 96 well clear plate (round bottom). (cf. Figure 15)

7-4 Dilution with the B medium

Dilute DMSO in #A4 and cyclosporine A DMSO solution in #A5 by adding 20 μ L to the B medium in #B4 and #B5, respectively. (cf. Figure 15)

Figure 15

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | DMSO 50 μ L | CyA 100 μ g/mL stock 50 μ L | | | | | | | |
| B | Distilled water 50 μ L | Distilled water 50 μ L | DEX 2.5 mg/mL stock 50 μ L | B medium 180 μ L | B medium 180 μ L | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

↓

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | DMSO 30 μ L | CyA 100 μ g/mL stock 30 μ L | | | | | | | |
| B | Distilled water 50 μ L | Distilled water 50 μ L | DEX 2.5 mg/mL stock 50 μ L | DMSO 10% in B medium 200 μ L | CyA 10 μ g/mL DMSO 10% in B medium 200 μ L | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

7-5 2 step dilution

Add 20 μL of the diluted chemical or vehicle to 480 μL (1-3 lanes) or 980 μL (4-5 lanes) of the B medium prepared in the assay block. And add 50 μL to #2H4 in a 96 well plate using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Manipulate the procedures from 7-4 to 7-5 as quickly as you can, and do not leave a long time at step after 7-4 or Figure 16. Seal the plate, shake the plate with a plateshaker and incubate in a CO₂ incubator for 1 hour (37°C, CO₂, 5%). (cf. Figure 16-18)

Figure 16

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|--|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | DMSO 30uL | CyA 100 ug/mL stock 30uL | | | | | | | |
| B | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | DEX 2.5 mg/mL stock 50uL | DMSO 10% in B medium 200uL | CyA 10 ug/mL DMSO 10% in B medium 200 uL | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

20uL

| Assay Block | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 480uL | B medium 980uL | B medium 980uL | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figure 17

| Assay Block | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | B medium 500uL | B medium 500uL | DEX 100 ug/mL B medium 500uL | DMSO 0.2% B medium 1000uL | CyA 200 ng/mL DMSO 0.2% B medium 1000uL | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

50uL

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| B | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| C | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| D | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | #2H4 2x10 ⁵ B medium 50uL | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

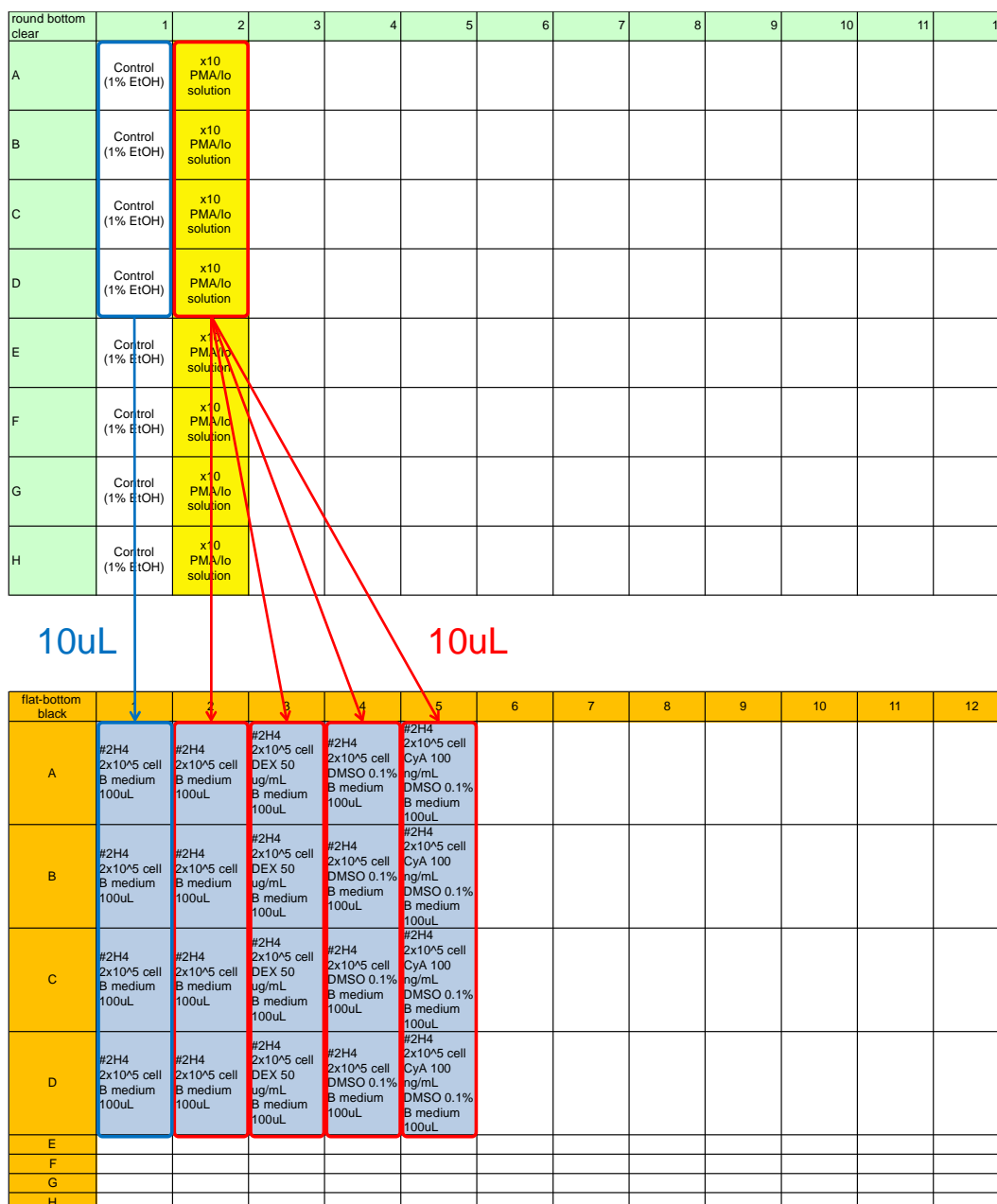
Figure 18 Final constituents of each well of the plate

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|---|---|--|--|--|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 50 ug/mL B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell CyA 100 ng/mL DMSO 0.1% B medium 100uL | | | | | | | |
| B | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 50 ug/mL B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell CyA 100 ng/mL DMSO 0.1% B medium 100uL | | | | | | | |
| C | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 50 ug/mL B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell CyA 100 ng/mL DMSO 0.1% B medium 100uL | | | | | | | |
| D | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 50 ug/mL B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100uL | #2H4 2x10 ⁵ cell CyA 100 ng/mL DMSO 0.1% B medium 100uL | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

7-6 Addition of PMA/ionomycin to #2H4

One hour after the addition of dexamethasone and cyclosporine A, add 10 μ L of control or PMA/ionomycin solution prepared in §6-3 to the cells (#A1-#D1 or #A2-#D5, respectively) using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Make sure that the apex of the tip is dipped into the medium. Change tips every line you add. Seal the plate, shake the plate with a plateshaker and incubate in a CO₂ incubator for 6 hour (37°C, CO₂, 5%). (cf. Figure 19)

Figure 19



8. Calculation of the transmittance factors

Color discrimination in multi-color reporter assays is generally achieved using detectors (luminometer and plate reader) equipped with optical filters, such as sharp-cut (long-pass) filters and band-pass filters. The transmittance factors of these filters for each bio-luminescence signal color must be calibrated prior to all experiments by following the protocols below.

8-1 Reagents

- Single reference samples:

Lyophilized luciferase enzyme reagent for stable luciferase green (SLG)

Lyophilized luciferase enzyme reagent for stable luciferase orange (SLO)

Lyophilized luciferase enzyme reagent for stable luciferase red (SLR)

- Assay reagent:

Tripluc[®] Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)

- B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2- 8°C)

| Reagent | Company | Conc. | Final conc. in medium | Required amount |
|-----------|---|-------|-----------------------|-----------------|
| RPMI-1640 | GIBCO #11875-093 | - | - | 27 mL |
| FBS | Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004 | - | 10 % | 3 mL |

8-2 Preparation of luminescence reaction solution

Thaw Tripluc[®] Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature either in a water bath or at ambient air temperature. Power on the luminometer 30 min before starting the measurement to allow the photomultiplier to stabilize.

Add 200 μ L of 100 mM Tris-HCl (pH8.0) contains 10 % glycerol to each tube of lyophilized reference sample to dissolve the enzymes, divide into 10 μ L aliquots in 1.5 mL disposable tubes and store in a freezer at -80°C. The stored frozen solution of the reference samples can be used for up to 6 months.

Add 1 mL of the B medium to each tube of frozen reference sample (10 μ L sample per tube). Keep the reference samples on ice to prevent deactivation.

8-3 Bioluminescence measurement

Transfer 100 μL of the diluted reference samples to a black 96 well plate (flat bottom) as shown below.

Figure 20

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | SLG 100 μL | SLG 100 μL | SLG 100 μL | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | SLO 100 μL | SLO 100 μL | SLO 100 μL | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | SLR 100 μL | SLR 100 μL | SLR 100 μL | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Transfer 100 μL of pre-warmed Tripluc to each well of the plate containing the reference sample using a pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) using a plate shaker. Remove bubbles in the solutions in wells if they appear. Place the plate in the luminometer to measure the luciferase activity.

Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1, F2) of the optical filters. An example of the raw output data is shown below.

Figure 22

| Measurement without Filter | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 3757015 | 3716611 | 3810382 | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | 1202691 | 1210208 | 1122295 | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | 2465453 | 2207572 | 2077689 | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| Measurement with Filter 1 | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 1269950 | 1257268 | 1289562 | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | 808550 | 813160 | 754174 | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | 2193723 | 1968240 | 1853873 | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| Measurement with Filter 2 | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | 236478 | 234079 | 240876 | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | 235121 | 235878 | 217432 | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | 1585258 | 1420099 | 1339265 | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Six transmittance factors of the optical filters were calculated as follow:

$$\text{Transmittance factor } (\kappa G_{R56}) = \frac{\#B1 \text{ of F1} + \#B2 \text{ of F1} + \#B3 \text{ of F1}}{\#B1 \text{ of F0} + \#B2 \text{ of F0} + \#B3 \text{ of F0}}$$

$$\text{Transmittance factor } (\kappa O_{R56}) = \frac{\#D1 \text{ of F1} + \#D2 \text{ of F1} + \#D3 \text{ of F1}}{\#D1 \text{ of F0} + \#D2 \text{ of F0} + \#D3 \text{ of F0}}$$

$$\text{Transmittance factor } (\kappa R_{R56}) = \frac{\#F1 \text{ of F1} + \#F2 \text{ of F1} + \#F3 \text{ of F1}}{\#F1 \text{ of F0} + \#F2 \text{ of F0} + \#F3 \text{ of F0}}$$

$$\text{Transmittance factor } (\kappa G_{R60}) = \frac{\#B1 \text{ of F2} + \#B2 \text{ of F2} + \#B3 \text{ of F2}}{\#B1 \text{ of F0} + \#B2 \text{ of F0} + \#B3 \text{ of F0}}$$

$$\text{Transmittance factor } (\kappa O_{R60}) = \frac{\#D1 \text{ of F2} + \#D2 \text{ of F2} + \#D3 \text{ of F2}}{\#D1 \text{ of F0} + \#D2 \text{ of F0} + \#D3 \text{ of F0}}$$

$$\text{Transmittance factor } (\kappa R_{R60}) = \frac{\#F1 \text{ of F2} + \#F2 \text{ of F2} + \#F3 \text{ of F2}}{\#F1 \text{ of F0} + \#F2 \text{ of F0} + \#F3 \text{ of F0}}$$

In the case shown above,

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{GR56}) = \frac{1269550+1257268+1289562}{3757015+3716611+3810382} = 0.338$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{OR56}) = \frac{808550+813160+754174}{1202691+1210208+1122295} = 0.672$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{RR56}) = \frac{2193723+1968240+1853873}{2465453+2207572+2077689} = 0.891$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{GR60}) = \frac{236478+234079+240876}{3757015+3716611+3810382} = 0.06$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{OR60}) = \frac{235121+235878+217432}{1202691+1210208+1122295} = 0.195$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa_{RR60}) = \frac{1585258+1420099+1339265}{2465453+2207572+2077689} = 0.644$$

Calculated transmittance factors are used for all the measurements executed using the same luminometer.

Input the transmittance factors to #C6-#E7 of the “Data Input” sheet of the Data sheet as follow.

Figure 23

| | A | B | C | D | E | F |
|---|--|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| 1 | MultiReporter Assay System –Tripluc®– Calculation Sheet | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | Transmittance Data | | | | |
| 4 | | | SLG | SLO | SLR | |
| 5 | | F0 | 1 | 1 | 1 | |
| 6 | | F1 | κ_{GR56} | κ_{OR56} | κ_{RR56} | |
| 7 | | F2 | κ_{GR60} | κ_{OR60} | κ_{RR60} | |
| 8 | | | | | | |

9. Measurement

Please refer Appendix 1 for the principle of measurement of luciferase activity.

Thaw Tripluc[®] Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature either in a water bath or at ambient air temperature. Power on the luminometer 30 min before starting the measurement to allow the photomultiplier to stabilize.

Transfer 100 μ L of pre-warmed Tripluc from the reservoir to each well of the plate containing the reference sample using an 8 channel or 12 channel pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) on a plate shaker. Remove bubbles in the solutions in the wells if they appear. Place the plate in the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence of (F0) and presence (F1, F2) of the optical filters.

1st. Add the information regarding the name of laboratory, the round of experiments if multiple experimental sets are performed, the experiment number, date, the operator, chemical codes, dissolved in distilled water or DMSO, the prepared concentration, molecular weight of the chemicals and comments if any to Face Sheet of the data sheet.

Figure 24 “Face Sheet” of the data sheet

| Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells | | | | | |
|---|-------------------|--|--------------------|-------------------|--|
| Ver. 005.2 | | | | | |
| Laboratory | | | | Round | |
| Exp. | | | | | |
| Date: <small>(YYYY/MM/DD)</small> | | | Operator: | | |
| Code | Chemical 1 | | Dissolution | Chemical 1 | |
| | Chemical 2 | | | Chemical 2 | |
| Molecular weight | Chemical 1 | | mg/ml in | | |
| | Chemical 2 | | | | |
| Comment: | | | | | |

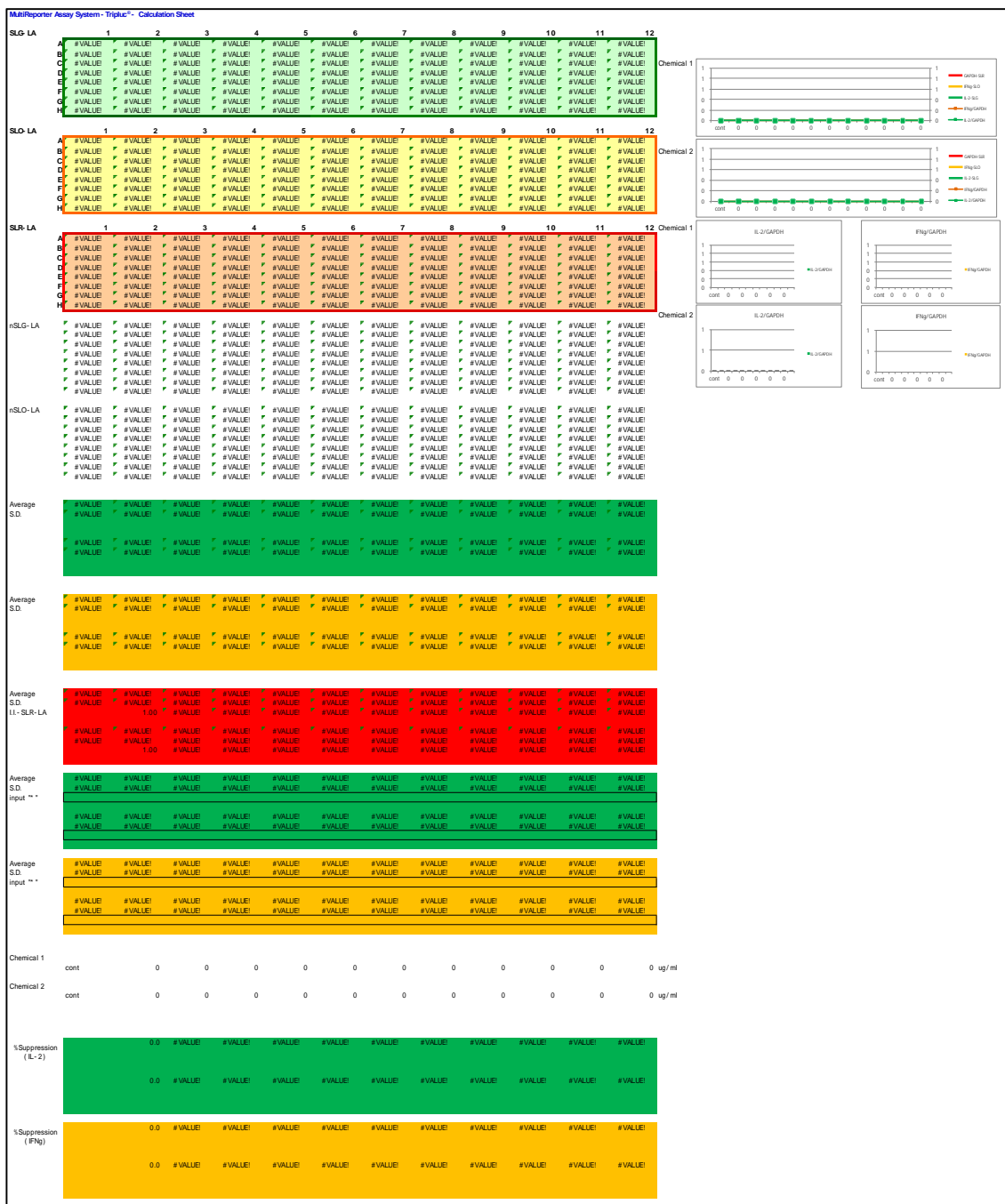
2nd. Copy the results of the F0, F1 and F2 measurements (values are expressed as counts) and paste them into the appropriate area in the “Data Input” sheet of the data sheet shown below. In addition, input the transmittance factors calculated in "§5. Calculation of the transmittance factors" to #C6-#E7 of the “Data Input” sheet.

Figure 25 “Data Input” sheet of the data sheet

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|----|---|--------------------|-----|-----|-----|---|---------|---------|---------|---|----|----|----|---|
| 1 | MultiReporter Assay System - Tripluc [®] - Calculation Sheet | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | Transmittance Data | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | SLG | SLO | SLR | | | | | | | | | |
| 5 | | T0 | 1 | 1 | 1 | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 6 | | T1 | | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 7 | | T2 | | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Filter 0 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| 10 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | Filter 1 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| 20 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 27 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 | Filter 2 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| 30 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 31 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 32 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 33 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 34 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 36 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 37 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 38 | | | | | | | | | | | | | | |

Next, the calculated results for the parameters of the Multi-Immuno Tox assay for each concentration, e.g., SLG-LA, SLO-LA, SLR-LA, nSLG-LA, nSLO-LA, the mean ± SD of SLG-LA, the mean ± SD of SLO-LA, the mean ± SD of SLR-LA %suppression and graphs will automatically appear on the “Result Format” sheet of the data sheet.

Figure 26 “Result Format” sheet of the data sheet



10. Data analysis

Definition of the parameters used in the Multi-Immuno Tox assay

- SLG-luciferase activity (SLG-LA) : Luciferase activity of stable luciferase green
(Under the control of IL-2 promoter)
- SLO-luciferase activity (SLO-LA) : Luciferase activity of stable luciferase orange
(Under the control of IFN- γ promoter)
- SLR-luciferase activity (SLR-LA) : Luciferase activity of stable luciferase red
(Under the control of G3PDH promoter)
- Normalized SLG-LA (nSLG-LA) : $=(\text{SLG-LA})/(\text{SLR-LA})$
- Normalized SLO-LA (nSLO-LA) : $=(\text{SLO-LA})/(\text{SLR-LA})$
- Inhibition index of SLR-LA (I.I.-SLR-LA) : The cytotoxic effect of chemicals
 $=(\text{SLR-LA of \#2H4 treated with chemicals})/(\text{SLR-LA of untreated \#2H4})$
- %suppression : The effect of chemicals on IL-2 or IFN- γ promoter
 $=(1-(\text{nSLG-LA or nSLO-LA of \#2H4 treated with chemicals})/(\text{nSLG-LA or nSLO-LA of non-treated \#2H4})) \times 100$

11. Criteria

11-1 Acceptance criteria

The following acceptance criteria should be satisfied when using the Multi-Immuno Tox 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.
- If the number of concentration which satisfy $\text{I.I.-SLR-LA} \geq 0.05$ is less than 4, the results should be rejected, and the following experiments should be done using the concentration described in **5-1**.

11-2 Criterion

Conduct three independent experiments for each chemical.

Identification of immunotoxicant is evaluated by the 95% simultaneous confidence interval of the difference of two adjusted means of %suppression between a concentration group of a tested chemical and the control group, which is based on the

Dunnett's test adjusted three independent experiments and can be calculated by the framework of the general linear model.

For the concentration at which I.I.-SLR-LA is greater than or equal to 0.05 at all three experiments, :

The result with two or more consecutive statistically significant positive (negative) points or one or more statistically significant positive (negative) point as well as a trend in which 3 or more points above (below) the red line are increasing (decreasing) is regarded as immunosuppression (immunoaugmentation). The result simultaneously satisfies the two conditions is regarded as immunosuppression / immunoaugmentation. Other result is regarded as no effect.

In the second experiment, If the number of concentration which satisfy I.I.-SLR-LA \geq 0.05 is less than 6, determine the minimum concentration at which I.I.-SLR-LA became lower than 0.05 in the second experiment, use the concentration one step (2-times) higher than this determined concentration as the highest concentration of the chemical to examine, and conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration in the following experiments.

If the number of concentration which satisfy I.I.-SLR-LA \geq 0.05 in common by 3 experiments is less than 6, conduct 4th or 5th experiment.

If there are plural combinations of at least 6 concentrations which satisfy I.I.-SLR-LA \geq 0.05, adopt the combination with higher concentration.

12. Update record

Ver. 009.1E 2017.5.8 distribution

Change the criteria

Ver. 009.0E 2017.4.7 distribution

Change the preparation of chemicals

Change the acceptance criteria

Change the criteria

Ver. 008.5E 2016.9.14 distribution

Change the criteria

Ver. 008.4E 2016.9.9 distribution

Change the criteria

Ver. 008.3E 2016.8.1 distribution

Correction of the preparation of PMA and ionomycin

Change the preparation of PMA and ionomycin

Change the preparation of controls

Addition of Acceptance criteria

Ver. 008.1E 2016.2.2 distribution

Changes after the VMT meeting

Ver. 008.0E 2016.1.19

Translation to English

Addition of appendix

Ver. 006.0J 2015.8.17

Change the preparation of chemicals (same method to the IL-8 Luc assay)

Delete the alteration in Ver. 005.0J

Ver. 005.0J 2015.1.9 distribution

Change to use SLR-LA of THP-G8 at the calculation of nSLG-LA of TGCHAC-A4

Ver. 004.1J 2014.12.10 distribution

Change the cellular concentration at cell passage

Modify figure 16, 17

Ver. 004.0J 2014.11.17 distribution

For the validation study at AIST, FDSC and Tohoku university (chemicals: Sodium Bromate (NaBrO₃), Nickel (II) sulfate (NiSO₄), Dibutyl phthalate (DP),

2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT))

Change THP-G1b cells to TGCHAC-A4 cells

Change cell number of THP-G8 and TGCHAC-A4 5x10⁴/well to 1x10⁵/well

Change concentration of chemicals 11 steps to 10 steps

Change final concentration of LPS (THP-G8 : 25 ng/mL, TGCHAC-A4 : 1 ng/mL)

Change the way of addition of LPS (2 mL/well to 10 mL/well)

Change the criteria

Ver. 002.0J 2013.08.19 distribution

For the validation study at AIST and FDSC (chemicals: CoCl₂, NiSO₄, Isophorone diisocyanate, 2-Mercaptobenzothiazole)

Change the common ratio 3 to 2

Change the concentration of LPS 100 ng/mL to 25 ng/mL

Add description about the control (dexamethasone)

Delete the appendix about THP-G8 cell

Ver. 001.1J 2012. Nov. 13 distribution

Add the appendix about THP-G8 cell

Ver. 001J 2012. Nov. 09 distribution

Appendix 1 Principle of measurement of luciferase activity

MultiReporter Assay System -Tripluc- can be used with a microplate-type luminometer with a multi-color detection system, which can equip two optical filters (e.g. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). The optical filters used in measurement are a 560 nm long-pass filter and a 600 nm long-pass filter.

(1) Measurement of three-color luciferase with two optical filters.

This is an example using Phelios AB-2350 (ATTO). This luminometer equips a 560 nm long-pass filter (560 nm LP, Filter 1) and a 600 nm long pass filter (600 nm LP, Filter 2) for optical isolation.

First, using luciferase enzyme reagent of SLG ($\lambda_{\max} = 550$ nm), SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) and SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm), measure i) the intensity of light without filter (all optical), ii) the intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted light iii) the intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted light, and calculate the coefficient factor listed below.

| Coefficient factor | | Abbreviation | Definition |
|--------------------|-------------------------------|-----------------|---|
| SLG | Filter 1 transmittance factor | κ_{GR56} | The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLG / the intensity of SLG without filter (all optical) |
| | Filter 2 transmittance factor | κ_{GR60} | The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLG / the intensity of SLG without filter (all optical) |
| SLO | Filter 1 transmittance factor | κ_{OR56} | The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLO / the intensity of SLO without filter (all optical) |
| | Filter 2 transmittance factor | κ_{OR60} | The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLO / the intensity of SLO without filter (all optical) |
| SLR | Filter 1 transmittance factor | κ_{RR56} | The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLR / the intensity of SLR without filter (all optical) |
| | Filter 2 transmittance factor | κ_{RR60} | The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLR / the intensity of SLR without filter (all optical) |

When the intensity of SLG, SLO and SLR in test sample are defined as G, O and R, respectively, i) the intensity of light without filter (all optical): F0, ii) the intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted light and iii) the intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted light are described as below.

$$F0=G+O+R$$

$$F1=\kappa G_{R56} \times G + \kappa O_{R56} \times O + \kappa R_{R56} \times R$$

$$F2=\kappa G_{R60} \times G + \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

These formulas can be rephrased as follows

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{R56} & \kappa O_{R56} & \kappa R_{R56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

Then using calculated coefficient factors and measured F0, F1 and F2, you can calculate G, O and R-value as follows.

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{R56} & \kappa O_{R56} & \kappa R_{R56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix}$$

This calculation can be performed using the functions "MINVERSE" and "MMULT" in Microsoft Excel. These calculations are integrated in the Data Sheet.

Appendix 2 Validation of reagents and equipment

5-1 Measurement of transmittance of optical filter for multicolor measurement

For color discriminations in the multi-color reporter assay, detectors (luminometer and plate reader) are usually equipped with optical filters, such as sharp-cut (long-pass) filters and band-pass filters. The transmittance factors of these filters for each bioluminescence signal color have to be calibrated prior to all experiments by following the protocols below.

5-1-1 Reagents

- Single reference samples:

Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLG

Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLO

Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLR

- Assay reagent:

Tripluc[®] Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)

- B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2 – 8°C)

| Reagent | Company | Conc. | Final conc. in medium | Required amount |
|-----------|---|-------|-----------------------|-----------------|
| RPMI-1640 | GIBCO #11875-093 | - | - | 27 mL |
| FBS | Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004 | - | 10 % | 3 mL |

5-1-2 Calibration

5-1-2-1 Preparation of luminescence reaction solution

Thaw Tripluc[®] Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature by bathing in water or ambient air. Start the luminometer 30 min before starting the measurement for stabilization of the photomultiplier.

Add 200 μ L of 100 mM Tris-HCl (pH8.0) contains 10% glycerol to each tube of the lyophilized reference samples to dissolve the enzymes, followed by separating them into 1.5 mL disposable tubes at 10 μ L each and storing in a freezer at -80°C. The stored frozen solution of the reference samples can be used for one half year.

Add 1 mL of the B medium to each tube of the frozen reference sample (10 μ L in a tube) and label them as SLG1/1, SLO1/1 and SLR1/1. Keep the reference samples on

ice to prevent deactivation.

Prepare dilution series of the single reference samples of SLG, SLO and SLR as follows. Dilute 0.3 mL of each 1/1 solution with 0.9 mL of the B medium to make SLG1/4, SLO1/4 and SLR1/4. In the same manner, prepare 1/16 and 1/64 solution of each. Keep diluted reference samples on ice.

5-1-2-2 Bioluminescence measurement

Transfer 100 μ L of the diluted reference samples to a black 96 well plate (flat bottom) as shown below.

Figure 27

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | SLG 1/1 | SLG 1/1 | SLG 1/1 | SLG 1/4 | SLG 1/4 | SLG 1/4 | SLG 1/16 | SLG 1/16 | SLG 1/16 | SLG 1/64 | SLG 1/64 | SLG 1/64 |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | SLO 1/1 | SLO 1/1 | SLO 1/1 | SLO 1/4 | SLO 1/4 | SLO 1/4 | SLO 1/16 | SLO 1/16 | SLO 1/16 | SLO 1/64 | SLO 1/64 | SLO 1/64 |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | SLR 1/1 | SLR 1/1 | SLR 1/1 | SLR 1/4 | SLR 1/4 | SLR 1/4 | SLR 1/16 | SLR 1/16 | SLR 1/16 | SLR 1/64 | SLR 1/64 | SLR 1/64 |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Transfer 100 μ L of pre-warmed Tripluc to each well containing the reference samples of the plate using a pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) with a plate shaker. Remove bubbles on the solutions in wells if they appear. Place the plate into the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1, F2) of the optical filters.

Copy the results of the F0, F1 and F2 measurement (values are expressed as counts) and paste it to the appropriate area in the “Data Input” sheet of the data sheet for data analyses shown below.

Figure 28

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|----|---|--------------------|-----|-----|-----|---|---------|---------|---------|---|---|----|----|----|
| 1 | MultiReporter Assay System -Tripluc®- Calculation Sheet | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | Transmittance Data | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | SLG | SLO | SLR | | | | | | | | | |
| 5 | | T0 | 1 | 1 | 1 | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 6 | | T1 | | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 7 | | T2 | | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Filter 0 Data | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 10 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | Filter 1 Data | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 20 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 27 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 | Filter 2 Data | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 30 | A | | | | | | | | | | | | | |
| 31 | B | | | | | | | | | | | | | |
| 32 | C | | | | | | | | | | | | | |
| 33 | D | | | | | | | | | | | | | |
| 34 | E | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | F | | | | | | | | | | | | | |
| 36 | G | | | | | | | | | | | | | |
| 37 | H | | | | | | | | | | | | | |
| 38 | | | | | | | | | | | | | | |

Record all the results for quality control.

5-2 Quality control of equipment

In order to confirm the detector stability as the quality control, the reference luciferase sample, optical property, the protocol described here should be performed at the beginning of the experiments every day.

5-2-1 Light source

LED Plate: Reference LED light source plates equipped with stabilized red, green, and blue LEDs are commercially available. For example,

TRIAN® (wSL-0001) by ATTO (Tokyo, Japan)

L12367 by Hamamatsu Photonics (Shizuoka, Japan)

5-2-2 Data collection (an example using TRIAN® by ATTO)

- 1) Start luminometer 30 min before starting the measurement for stabilization of the photomultiplier.
- 2) Start LED plate and select “PMT” mode.
- 3) Select three-color (BRG) mode and adjust light intensity to 1/10 (10E-1).

- 4) Place the LED plate into the luminometer. Light intensity is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F2) of the optical filter.
- 5) Blue, green, and red LEDs are located at the position of #F6, #E6, and #D6, respectively. Copy the collected data of each position to the appropriate area on Sheet “LED” in the excel file of the data sheet.
- 6) Check the photo-detector performance by comparing with old data of the LED plate. For quality control purpose, every collected data should be recorded.
- 7) LED plate data typically fluctuates up to 1.5% (). Disagreement to the old data should be less than $3 \times$ (= 4.5%).

Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 008.2

Data Input Sheet

MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- Calculation Sheet

Transmittance Data

| | SLG | SLO | SLR | |
|----|-----|-----|-----|-------------------------|
| T0 | 1 | 1 | 1 | #VALUE! #VALUE! #VALUE! |
| T1 | | | | #VALUE! #VALUE! #VALUE! |
| T2 | | | | #VALUE! #VALUE! #VALUE! |

Filter 0 Data

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Filter 1 Data

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Filter 2 Data

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 008.2

Update Record Sheet

| | |
|-------------|--|
| 2017年5月8日 | Ver.008.2 判定を追加 |
| 2017年4月19日 | Ver.008.1 6回のアッセイを1シートにまとめる |
| 2017年4月11日 | Ver.008 phase 2用 |
| 2016年9月16日 | Ver.007.2 FaceSheet#F23の数式を修正 |
| 2016年9月14日 | Ver.007.1 FlnSL0-LAが算出されるよう変更 %suppressionのグラフを追加 |
| 2016年7月21日 | Ver.007 phase 1用 |
| 2016年2月2日 | Ver.006 phase 0用 |
| 2015年11月17日 | Ver.005.2 FaceSheetを追加 EC30、Lowest-Observed-Effect Level (LOEL)、Max %suppression、Min %suppressionが算出されるように改変 |
| 2014年11月26日 | Ver.005.1 コントロール用のシートを修正 |
| 2014年11月17日 | Ver.005 Multi-Immuno Tox Assayバリデーションプロトコール20141117 Ver.004J案の変更に合わせ、コントロール等のプレート配置を変更 %suppressionのグラフを削除 |
| 2013年11月6日 | Ver.004 統計処理用のシートを追加 Result Format2シートの化学物質の濃度表示を修正（公比2になるように） |
| 未配布 | Ver.003.1 グラフの大きさを縮小（パワーポイントにコピーペーストしやすくするため） |
| 2013年9月19日 | Ver.003 コントロール用のシートを追加（dexamethasone, cyclosporin A） |
| 2012年11月13日 | Ver.002.1 %Suppressionのグラフを追加 |
| 2012年8月31日 | Ver.002 抑制率の計算方法を変更（バックグラウンドの値を引き算する方法） |
| 2012年8月28日 | Ver.001 |

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1
試薬管理シート

実験名 MITA バリデーション研究

被試験試薬コード _____

被試験試薬管理

受領日 _____ 年 _____ 月 _____ 日 受領者氏名 _____

保管場所 _____ 温度() _____

備考 _____

受領量(容器込) _____ g

| 月 日 | 使用量(g) | 残存量(g) | 実験担当者名 | 備考 | Exp. No. | 溶解性検討 |
|--------|--------|--------|--------|----|----------|-------|
| H. / / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |
| / | | | | | | |

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

試験者シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 _____

施設名 _____

実験責任者名 _____

実験担当者名 _____

実験担当者名 _____

実験担当者名 _____

実験担当者名 _____

試験物質コード

| | |
|-------|----------|
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |
| _____ | _____ 回目 |

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

細胞継代シート

3-1 #2H4培養方法

3-1-1 細胞養生 (P1)

- あらかじめ、#2H4用C培地15 mLを37°C恒温槽で温めておく(培養用)。
- 凍結細胞を37°C恒温槽で融解し、#2H4用C培地9 mLを入れておいた15 mLの遠心管に加える(細胞液0.5 mL+C培地 9 mL=計9.5 mL)
- 遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。
- 上清を吸引除去し、先に温めておいた#2H4用C培地15 mLに細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養を開始する(37°C, 5%CO₂)。
- 上記より一部細胞浮遊液を採取し、培養開始時の細胞生存率を計測する。(計算)

生細胞数:
死細胞数:

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

3-1-2 選択抗生物質での培養開始 (P2)

- あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。
- 細胞養生して3日~4日後に、選択抗生物質を入れた培養(#2H4用A培地)を開始する。フラスコ中の細胞塊を減菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。
- (+) / x = × 10³/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた#2H4用A培地15mLに3 × 10⁷/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。
- ※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: _____ mL

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

3-1-3 通常の継代培養 (P3以降)

P-

- あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。
- フラスコ中の細胞塊を減菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は3 × 10⁷/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- (+) / x = × 10⁷/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 × 10⁷/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。
- ※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: _____ mL

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

P-

- あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。
- フラスコ中の細胞塊を減菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は3 × 10⁷/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- (+) / x = × 10⁷/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 × 10⁷/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。
- ※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: _____ mL

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

P-

- あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。
- フラスコ中の細胞塊を減菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は2 × 10⁷/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- (+) / x = × 10⁷/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 × 10⁷/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。
- ※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: _____ mL

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

P-

- あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。
- フラスコ中の細胞塊を減菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は2 × 10⁷/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- (+) / x = × 10⁷/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 × 10⁷/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。
- ※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: _____ mL

実施日: _____ 年 月 日, 実施者: _____

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

細胞調整シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 _____

施設名 _____

細胞調製

室温 _____

予定プレート数 _____ 枚 x 2.0×10^7 cells/枚 x 1.5 = _____ cells (必要細胞数)

細胞調製(試験物質用)

細胞蘇生年月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

前回継代年月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

前回継代時
細胞濃度・培養液量 _____ cells/mL X _____ mL

実験当日細胞濃度 _____ cells/mL -

遠心した細胞数 _____ cells^{*1} を _____ mLを採取再懸濁した培地量 _____ mL(^{*1}の細胞数 ÷ (4×10^6))それぞれのプレートに50 μ L /wellで分注 _____ (:)

細胞調製(コントロール(dexamethasone, cyclosporine A)用)

上で調製した細胞を別のプレートの#A1-#D5に50 μ L/wellで分注 _____ (:)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

被試験試薬の調製 シート

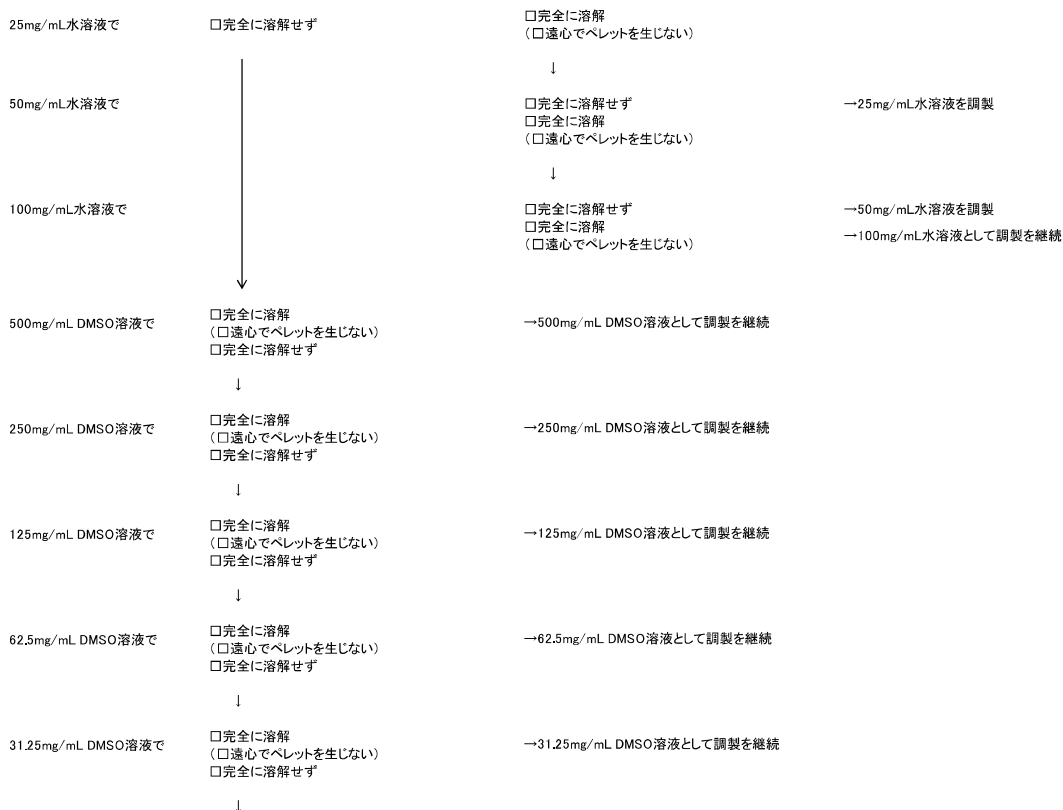
実験名 MITA バリデーション研究

実験日 _____

施設名 _____

被試験試薬コード _____ 回目 _____

被試験試薬の調製① (溶媒への溶解)



Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

被試験試薬の調製 (DW)シート

実験名 MITA バリデーション研究 _____

実験日 _____

施設名 _____

被試験試薬コード _____ 1 2 3 4 5 6 _____ 回目

Distilled water溶液に調製された場合

1st experimentまたは2nd experimentより決定された調整濃度
(最終濃度が、IL-SLR-LA ≤ 0.05となる最も低い濃度の1段階高い(2倍の)濃度になるように設定、
その50倍の濃度のDistilled water溶液を調整する。データシートのface sheetに算出されます) _____ mg/mL

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 _____ mgをDistilled waterに溶解し _____ mLとする。 → _____ mg/mL
さらにDistilled waterで _____ 倍希釈する → _____ mg/mL

調製時間
(:)

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDistilled water、被試験試薬Distilled water溶液を分注する。

| 丸底・透明 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| A | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | Distilled water 50uL | 被試験試薬 水溶液 100uL |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

well#A11から#A3までDistilled waterで公比2で段階希釈を9段階おこなう。

アッセイブロックにB培地480 μLを分注し、上図の希釈液を20 μL添加して25倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。

添加時間
(:)

プレートをシールし、プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

2 mM PMAストックをB培地で20倍希釈し100 μM溶液を作製する。(2 mM PMA 5 μL + B培地 95 μL)

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を作製する。

| | B medium | 2 mM Ionomycin | 100 μM PMA | Ethanol | Total |
|----------------------------|----------|----------------|------------|---------|---------|
| Control | 995 μL | - | | 5 μL | 1000 μL |
| x10 PMA/ionomycin solution | 2382 μL | 12 μL | 6 μL | - | 2400 μL |

コントロール溶液を#A1-#H1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#H12に10 μLずつ分注する。

添加時間
(:)

プレートをシールし、プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定 (被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30分前には電源を入れる。

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して、
反応終了後のアッセイプレートに100 μL/wellずつ分注する。

添加時間
(:)

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)撹拌し、
細胞を溶解させる。

撹拌中温度
(°C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。)

フィルタ無し、フィルタ有りで各々3秒/well測定する(アトー社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。

測定時間
(:)

測定中温度
(°C)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

被試験試薬の調製 (DMSO)シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 _____

施設名 _____

被試験試薬コード _____ 1 2 3 4 5 6 回目

DMSO溶液に調製された場合

1st experimentまたは2nd experimentより決定された調整濃度
(最終濃度が、II-SLR-LA ≤ 0.05となる最も低い濃度の1段階高い(2倍の)濃度になるように設定、
その1000倍の濃度のDMSO溶液を調整する。データシートのface sheetに算出されます) _____mg/mL

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 _____mgをDMSOに溶解し _____mLとする。 → _____mg/mL
さらにDMSOで _____倍希釈する → _____mg/ml

調製時間
(:)

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDMSO、B培地、被試験試薬DMSO溶液を分注する。

| 丸底・透明 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|
| A | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | DMSO 50μL | 被試験試薬 DMSO溶液 100μL |
| B | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL | B培地 90μL |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

well#A11から#A3までDMSOで公比2で段階希釈を9段階おこなう。

段階希釈した被試験試薬DMSO溶液 10 μLを8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して下のB培地90 μLにうつつ10倍に希釈する。

希釈した段階での沈殿の有無、性状

| #B1 | #B2 | #B3 | #B4 | #B5 | #B6 | #B7 | #B8 | #B9 | #B10 | #B11 | #B12 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 | 有口無口 |

沈殿の性状 (例: 粉状、泥状、膜状、ミセル様)

アッセイブロックにB培地490 μLを分注し、上図の希釈液を10 μL添加して50倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。

添加時間
(:)

プレートをしールし、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

2 mM PMAストックをB培地で20倍希釈し100 μM溶液を作製する。(2 mM PMA 5 μL + B培地 95 μL)

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を作製する。

| | B medium | 2 mM Ionomycin | 100 μM PMA | Ethanol | Total |
|----------------------------|----------|----------------|------------|---------|---------|
| Control | 995 μL | - | | 5 μL | 1000 μL |
| x10 PMA/ionomycin solution | 2382 μL | 12 μL | 6 μL | - | 2400 μL |

コントロール溶液を#A1-#H1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#H12に10 μLずつ分注する。

添加時間
(:)

プレートをしールし、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30 分前には電源を入れる。

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに100 μL/wellずつ分注する。

添加時間
(:)

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、細胞を溶解させる。

攪拌中温度
(°C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。) フィルタ無し、フィルタ有りで各々3 秒/well測定する(アト-社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。

測定時間
(:)
測定中温度
(°C)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1

被試験試薬の調製 (コントロール) シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 _____

施設名 _____

被試験試薬コード _____ 回目

コントロールの調製と細胞への処理

dexamethasone, cyclosporine Aの調製

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDMSO 50 μ L (#A4)、100 μ g/mL cyclosporine A stock 50 μ L (#A5)、Distilled water 50 μ L (#B1、#B2)、2.5 mg/mL dexamethasone stock 50 μ L (#B3)、B培地 180 μ L (#B4、#B5)を分注する。

添加時間
(:)

| 丸底・透明 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|--|--------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | DMSO 50 μ L | CyA 100 μ g/mL ストック 50 μ L | | | | | | | |
| B | Distilled water 50 μ L | Distilled water 50 μ L | DEX 2.5 mg/mL ストック 50 μ L | B培地 180 μ L | B培地 180 μ L | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

#A4のDMSOと#A5のcyclosporine A DMSO溶液 20 μ Lを下のB培地180 μ Lにうつつし10倍に希釈する。

アッセイブロックの#A1-#A3にB培地480 μ L、#A1-#A3にB培地980 μ Lを分注し、上図の希釈液を20 μ L添加して混合し、50 μ L/wellずつ細胞に添加する。

添加時間
(:)

プレートをしールし、プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

2 mM PMAストックをB培地で20倍希釈し100 μ M溶液を作製する。(2 mM PMA 5 μ L + B培地 95 μ L)

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を作製する。

| | B medium | 2 mM Ionomycin | 100 μ M PMA | Ethanol | Total |
|-----------------------------------|--------------|-------------------|--------------------|-----------|--------------|
| Control | 995 μ L | - | | 5 μ L | 1000 μ L |
| x10 PMA/ ionomycin solution | 2382 μ L | 12 μ L | 6 μ L | - | 2400 μ L |

コントロール溶液を#A1-#D1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#D5に10 μ Lずつ分注する。

添加時間
(:)

プレートをしールし、プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定(コントロール)

Tripluc[®] Luciferase assay reagentを溶解させる。

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30分前には電源を入れる。

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに100 μ L/wellずつ分注する。

添加時間
(:)

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 $^{\circ}$ C)で10分間(30分間まで可)撹拌し、細胞を溶解させる。

撹拌中温度
($^{\circ}$ C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31 $^{\circ}$ Cであることを確認する。) フィルタ無し、フィルタ有りで各々3秒/well測定する(アト-社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。

測定時間
(:)
測定中温度
($^{\circ}$ C)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 003.1
更新履歴シート

Ver. 003.1J 2017年04月xx日配布

Ver. 003J 2017年04月xx日配布

Ver. 002J 2016年07月21日配布

Ver. 001J 2016年02月02日配布

Appendix 1. IL-2 の転写、産生に関する化学物質、シグナル伝達物質についての文献情報

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | <i>in vitro/ in vivo</i> | <i>in vivo effects</i> | Reference |
|----|--|--|---------------------------|-------------|--------------------------|------------------------|--|
| 1 | DMSO | | negative | human | PBMC | | de Abreu Costa et al. Molecules 2017 |
| 2 | | Prox1 | negative | human | PBMC | | Zhang et al. Oncotarget 2017 |
| 3 | | PTEN | negative | mice | | | Kim et al. J Exp Med 2017 |
| 4 | Lysophosphatidylserine | LPS3/GPR174 | negative | mice | | | Shinjo et al. Biochem Biophys Res Commun 2017 |
| 5 | - | DOCK8, STAT5, actin dynamics, immune synapse, Treg | positive | mice | <i>in vivo</i> | | Janssen et al. JCI Insight 2017 |
| 6 | - | DOCK8, STAT5, Treg | positive | mice | <i>in vivo</i> | | Singh et al. JCI Insight 2017 |
| 7 | - | IFNGR1, CD4 T-cell | positive | Human | <i>in vivo</i> | | Khanolkar et al. J Allergy Clin Immunol 2017 |
| 8 | Zoledronic acid | NFAT, Treg, calcium signaling | negative | | | | Sarhan et al. Oncoimmunology 2017 |
| 9 | IL-33, IgE | FcεRI, MAPK, mast cell | positive | mice | bone marrow | | Salamon et al. Clin Exp Allergy 2017 |
| 10 | extracts from Magnoliae Flos | | negative | human | cell line | | Nguyen et al. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2017 |
| 11 | | AhR | positive | mice | | | Ehrlich et al. Eur. J. Immunol 2017 |
| 12 | | DNA-PKcs, calcineurin, NFAT | positive | human | PBMC, cell line | | Wiese et al. PLoS One 2017 |
| 13 | | PKC-θ, effector T-cells | positive | mice | | | Alharshawi et al. Sci Rep 2017 |
| 14 | | IL-23 | negative | human, mice | | | Dai et al. J. Immunol 2017 |
| 15 | | MTOM (adjuvant) | positive | mice | | | Yu et al. Front Immunol 2017 |
| 16 | Recombinant AlaDH | | positive | human | | | Movahedi et al. Iran J Med Sci 2017 |
| 17 | | miR-200a-3p, CtBP2 Complex | positive | mice | | | Katsuyama J Immunol 2017 |
| 18 | | | negative | human | PBMC | | Zhou et al. Medicine (Baltimore) 2017 |
| 19 | Bryoria sp. (Lichen-Forming Fungus) Extracts | | negative | mice | | | Hwang et al. J Microbiol Biotechnol 2017 |
| 20 | Tricholoma populinum Lange | | negative | human | cell line | | Merdivan et al. Z Naturforsch C 2017 |
| 21 | Ctr18, Ctry68, Ctry2908 | | negative | human | PBMC | | Ding et al. Peptides 2017 |
| 22 | | Microvesicles released by apoptotic human neutrophils | negative | human | | | Shen et al. Eur J Immunol 2017 |
| 23 | Acetylcholine | Nicotinic acetylcholine receptor, Ca channel | positive | Human | cell line | | Mashimo et al. Life Sci. 2016 |
| 24 | Nevirapine | | positive | Rat | <i>in vivo</i> | | Bekker et al. Adv Pharmacol Sci. 2016 |
| 25 | Oleic acid | | positive | Human | PBL | | Passos et al. Lipids Health Dis. 2016 |
| 26 | - | Ets-2 | negative | Human | PBMC | | Panagoulas et al. J Biol Chem. 2016 |
| 27 | Quinolone | NF-kB, NFAT | negative | Human | cell line | | Kwak et al. Bioorg Med Chem. 2016 |
| 28 | Ochratoxin A | MAPK | positive | Human | cell line | | Darif et al. J. Toxicol Sci. 2016 |
| 29 | - | Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP) | positive | Human | PBL | | Karampetsou et al. J Immunol. 2016 |
| 30 | - | Let-7i | positive | Human | PBL | | Zhang et al. Sci Rep. 2016 |
| 31 | - | 4-1BB | positive | Mice | | | Barsoumian et al. PLoS One. 2016 |
| 32 | - | Itk | positive | Mice | | | Gomez-Rodriguez et al. Nat Commun. 2016 |
| 33 | alpha-Hederin | miRNA-133a | positive | Rat | | | Ebrahimi et al. Drug Dev Res. 2016 |
| 34 | - | Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase | positive | Human | cell line | | Faris et al. Lipids. 2016 |
| 35 | - | CD147, PMCA4 | negative | Human | cell line | | Supper et al. J Immunol. 2016 |
| 36 | Astaxanthin | | positive | Mice | | | Lin et al. Int J Mol Sci. 2015 |
| 37 | Fingolimod | PP2A, IL-33 | negative | Mice | | | Ottenlinger et al. Eur J Immunol. 2016 |
| 38 | TIIM-3 | NFAT | negative | Human | cell line | | Tomkowicz et al. PLoS One. 2015 |
| 39 | - | Homeodomain Only Protein (Hopx) | negative | Mice | | | Jones et al. J Immunol. 2015 |
| 40 | - | Eos | positive | Mice | | | Rieder et al. J Immunol. 2015 |
| 41 | Silver nanoparticles, Gold nanoparticles | MAPK | negative | Human | cell line | | Pansamut et al. Genet Mol Res. 2015 |
| 42 | - | 4-1BB | positive | Mice | | | Oh et al. PLoS One. 2015 |
| 43 | Interferon beta | cAMP responsive element modulator | negative | Mice | | | Otero et al. J Immunol. 2015 |
| 44 | - | Cdk5 | positive | Mice | | | Lam et al. Cell Cycle. 2015 |
| 45 | T cell activation inhibitor, mitochondrial | | negative | Mice | | | Vogel et al. J Immunol. 2015 |
| 46 | MAPK Phosphatase 7 | ERK | negative | Mice | | | Zhang et al. J. Immunol. 2015 |
| 47 | - | ATG5 | positive | Mice | | | Liu et al. Microbes Infect. 2015 |
| 48 | - | Gαs/cAMP Signaling | positive | Human | cell line, PBL | | Hynes et al. J Mol Signal. 2015 |
| 49 | - | DNA methylation | negative | Cat | | | Miller et al. J. Immunol. 2015 |
| 50 | Tuberoestemonine O | | negative | Mice | | | Jung Jang et al. Chem Biodivers. 2014 |
| 51 | - | miRNA-155 | positive | Human | | | Lashine et al. Lupus. 2015 |
| 52 | IL-33 | | positive | Mice | | | Matta et al. J Immunol. 2014 |
| 53 | PM2.5 | Orai1, CaN-NFAT | negative | Human | cell line | | Tong et al. Arch Environ Contam Toxicol. 2011 |
| 54 | | Ets-1 | positive | Human | PBL | | Tsao et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 |
| 55 | Ganoderma lucidum | | positive | Human | PBMC | | Habjanic et al. New Biotech. 2015 |
| 56 | perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) | | negative | Human | cell line, PBL | | Midgett et al. J Appl Toxicol. 2015 |
| 57 | aflatoxin B1 | | negative | Avian | <i>in vivo</i> | | He et al. Biol Trace Elem Res. 2014 |
| 58 | | Ikaros | negative | Mice | | | O'Brien et al. J Immunol. 2014 |
| 59 | anti-TNF antibodies | | negative | Human | <i>in vivo</i> | | Katz et al. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2014 |
| 60 | Delphinidin | NFAT, Store-operated calcium entry | positive | Human | cell line | | Jara et al. Cell Biochem Biophys. 2014 |
| 61 | Acacia ferruginea | | positive | Mice | <i>in vivo</i> | | Sakhthivel et al. Asian Pac J Cancer Prev. 2011 |
| 62 | | Ndfip1 | negative | Mice | | | Ramos-Hernandez et al. J. Immunol. 2013 |
| 63 | Diphenyl Phosphine Oxide-1 | Kv1.3 Potassium Channel | negative | Human | cell line | | Zhao et al. PLoS One. 2013 |
| 64 | TGN1412 (CD28 agonistic mAb) | | negative | Human | PBMC | | Eastwood et al. Br J Clin Pharmacol. 2013 |
| 65 | | CD39/Adenosine Pathway | negative | Human | PBL | | Jenabian et al. PLoS Pathog 2013 |
| 66 | Vitamin D3 | | negative | Human | PBL | | Czifra et al. Rheumatol Int 2014 |
| 67 | Benzo[a]pyrene | Nrf2 pathway | negative | Human | cell line | | Murugaiyan et al. Toxicol Appl Pharmacol 2013 |
| 68 | Aflatoxin B1 | | negative | Avian | | | Chen et al. Res Vet Sci 2013 |
| 69 | H1N1 influenza | | positive | Human | | | Weaver et al. PLoS One 2013 |
| 70 | | PKCα PKCβ | positive | mice | | | Lutz-Nicoladoni et al. Immunol Lett 2013 |
| 71 | | SF2/ASF | positive | Human | | | Moulton et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2013 |
| 72 | | Oligodeoxynucleotides Expressing Polyguanine | positive | Mice | | | Kobayashi et al. J Immunol 2013 |
| 73 | | MCPIP1, (ARE-independent) | negative | Human, Mice | | | Li et al. PLoS One 2012 |
| 74 | | microRNA-9/Blimp-1 | positive | Human, Mice | PBL | | Seddiki et al. Eur J Immunol 2012 |
| 75 | Zinc | | positive | mice | cell line | | Daaboul et al. Metallomics 2012 |
| 76 | Cimetidine | | positive | mice | | | Jafarzadeh et al. J Immunotoxicol 2013 |
| 77 | | CaMK4 | negative | Human, Mice | | | Koga et al. J Immunol 2012 |
| 78 | | GB Virus C Envelope Protein E2 | negative | Human | cell line | | Bhattarai et al. J Immunol 2012 |
| 79 | Cyclophosphamide | | negative | mice | | | Lee et al. Inflamm Res 2012 |

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|---|--|---|-------------|-----------------------------|-----------------|---|
| 80 | | SJSZ glycoprotein (38 kDa) | positive | mice | | | Lee et al. Inflamm Res 2012 |
| 81 | | CD40-CD154 Signaling | positive | mice | | | Cuss et al. J Immunol 2012 |
| 82 | TGF-β | | negative | | | | Das et al. Mucosal Immunol 2013 |
| 83 | Zearalenone | | positive | chicken | | | Wang et al. ScientificWorldJournal 2012 |
| 84 | ulinastatin, docetaxel | | positive | mice | primary xenografts | | Zhong et al. Cancer Biother Radiopharm 2012 |
| 85 | | miR-9/Blimp-1 | positive(microRN | human | | | Thiele et al. Eur J Immunol 2012 |
| 86 | | DNAM-1 | positive | mice | | | Welch et al. Virology 2012 |
| 87 | | SJSZ glycoprotein (38 kDa) | positive | mice | | | Lee et al. Int Immunopharmacol 2012 |
| 88 | diosgenin | | negative | rat | brain | | Ho et al. Chin J Physiol 2012 |
| 89 | lipoteichoic acid | | positive | human | PBMC | | Mat et al. Int Immunopharmacol 2012 |
| 90 | heparin-binding hemagglutinin (HBHA) | | positive | human | PBMC | | Loxton et al. Clin Vaccine Immunol 2012 |
| 91 | | IL-21 | negative | Mice | | | Attridge et al. Blood 2012 |
| 92 | Streptavidin | | negative | Human | PBMC | | Yomogida et al. Cytokine 2012 |
| 93 | Manganese | | negative | cock | | | Liu et al. Biol Trace Elem Res 2012 |
| 94 | DNCB, DNFB, Oxazolone, Eugenol, α-hexylcinnamaldehyde, nickel sulfate, SDS, PABA, potassium bichromate, trimellitic anhydride, phthalic anhydride, sodium hexachloroplatinate | | positive(DNCB, DNFB, Oxazolone, Eugenol, α-hexylcinnamaldehyde, nickel sulfate, SDS, PABA), negative(potassium bichromate, trimellitic anhydride, phthalic anhydride, sodium hexachloroplatinate) | mice | | | Goutet et al. Toxicol Appl Pharmacol 2012 |
| 95 | | CREMa | negative | mice | | | Lippe et al. J Mol Cell Biol 2012 |
| 96 | oxazolone, DNCB, PPD, cobalt chloride, isoeugenol, 2-MBT, Citral, Hexyl cinnamic aldehyde, Eugenol, Phenyl benzoate, Imidazolidinyl urea, ethylene glycol dimethacrylate, xylene, nickel chloride | | positive | mice | | | Jung et al. Toxicol Lett 2012 |
| 97 | Vernonia cinerea L. vernolide-A | | positive | mice | | | Pratheeshkumar et al. Immunopharmacol Im |
| 98 | | Ligation of the CD2 co-stimulatory receptor | positive | mice, human | | | Cheadle et al. Gene Ther 2012 |
| 99 | NK02680 | | negative | rat | | | Shibasaki et al. Transpl Immunol 2012 |
| 100 | | IRF-4, c-Rel | positive | Human, M | cell line | | Shindo et al. Cytokine 2011 |
| 101 | | Histone 3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase | negative | mice | | | Wakabayashi et al. J Biol Chem 2011 |
| 102 | Selenium | | positive | chicken | | | Peng et al. Biol Trace Elem Res 2011 |
| 103 | Ethanol | | negative | Human | PBMC, cell line | | Ghare et al. Alcohol Clin Exp Res 2011 |
| 104 | Plasmodium berghei ANKA | | positive | mice | | | Sarlo et al. Malar J 2011 |
| 105 | vanadium | | negative | Broiler | | | Deng et al. Biol Trace Elem Res 2011 |
| 106 | live or inactivated NDV | | negative | chicken | | | Balenović et al. Acta Vet Hung 2011 |
| 107 | | Runx1 | negative | Mice | | | Wong et al. J Biol Chem 2011 |
| 108 | | Dictyostelium differentiation-inducing factors | positive | human | cell line | | Takahashi et al. Life Sci 2011 |
| 109 | Dynorphin A (1-17) | | negative | | | | Gein et al. Bull Exp Biol Med 2010 |
| 110 | iron, retinol | | positive | human | | | Sun et al. Asia Pac J Clin Nutr 2010 |
| 111 | | microRNA-181c | negative | Human | PBMC, cell line | | Xue et al. Mol Immunol 2011 |
| 112 | | delta-like ligand 4 (Dll4) | negative | Mice | | | Jang et al. J Immunol 2010 |
| 113 | | TGM2 gene SNP rs4811528 | | human | | | Bradford et al. J Neuroimmunol 2011 |
| 114 | hepatitis C virus non-enveloped capsid-1 | p38 kinase | positive | human | PBMC, cell line | | Serti et al. Cell Mol Life Sci 2011 |
| 115 | Molybdenum | | negative | Broiler | | | Xiao et al. Biol Trace Elem Res 2011 |
| 116 | lupane-triterpene glycosides from Acanthopanax koreanum | | positive | | | | Nhiem et al. Bioorg Med Chem Lett 2010 |
| 117 | oxazolone | | positive | mice | | | Ahlfors et al. Scand J Immunol 2010 |
| 118 | Cyclosporine A | | negative | human | whole blood | | Brandt et al. Cytometry A 2010 |
| 119 | Enzymatic Extract from Ecklonia cava | NF-κB | positive | mice | | | Ahn et al. Mar Biotechnol 2011 |
| 120 | Decalepis hamiltonii Wight and Arn | | negative | mice, hum | cell line, PBMC | | Ashalatha et al. J Ethnopharmacol 2010 |
| 121 | Coenzyme Q10 | | negative | Human | PBMC | | Bessler et al. J Nutr Sci Vitaminol 2010 |
| 122 | TRAF6, TGF-β | | positive (TRAF6) | mice | | | Cejas et al. Blood 2010 |
| 123 | ciprofloxacin | mitochondrial respiratory complex I | negative | human | | | Kaminski et al. J Immunol 2010 |
| 124 | 1α,25(OH)2D3 | | negative | Human | cell line | | Mattilainen et al. J Steroid Biochem Mol Biol |
| 125 | actinomycin D | | negative | Human | cell line | | Mattilainen et al. J Steroid Biochem Mol Biol |
| 126 | Galpha12 | | positive | mice | | | Won et al. Biochem Biophys Res Commun 2 |
| 127 | zinc | | positive | mice, hum | cell line, PBMC | | Kallenberg et al. Eur J Immunol 2010 |
| 128 | Anti-IL-6 receptor antibody | | negative | mice | | | Yoshida et al. Eur J Pharmacol 2010 |
| 129 | TOM1L | | positive | Human | cell line | | Elmarghani et al. Mediators Inflamm 2009 |
| 130 | Nodosin | | negative | mice | | | Li et al. Am J Chin Med 2010 |
| 131 | Silymarin | | negative | mice | | | Gharagozloo et al. Pharmacol Res 2010 |
| 132 | microRNA-146a | | negative | human | PBL | | Curtale et al. Blood 2010 |
| 133 | CD27 | | positive | mice | | | Peperzak et al. J Clin Invest 2010 |
| 134 | ATP, P2X7 receptor, FAK, p38 | | positive | human | cell line | | Yu et al. Am J Physiol Cell Physiol 2010 |
| 135 | Liver Stage Antigen-1 (LSA-1) formulated with AS01 or AS02 | | positive | human | | | Cummings et al. Vaccine 2010 |
| 136 | undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobuty | PPAR γ | negative | Human | cell line | | Spelman et al. International immunopharmac |
| 137 | PTPN22 | | negative | human | | | Chuang et al. Genes and immunity 2009 |
| 138 | CD44 | | positive | Human, Mice | | | Bollyky et al. J Immunol 2009 |
| 139 | Dictyostelium-derived factors (DIFs) | | negative | Human | cell line | | Takahashi et al. Life Sci 2009 |
| 140 | PD-1 | | negative | mice | | | Chikuma et al. J Immunol 2009 |
| 141 | 4-1BB | | positive | human | | | Kassu et al. Clin Immunol 2009 |
| 142 | Fluorine | | negative | chicken | | | Chen et al. Biol Trace Elem Res 2009 |
| 143 | ZEB1 | | negative | Mice | cell line | | Wang et al. Int Immunol 2009 |
| 144 | HIV Gag p24 | | positive | Human | | | Ndongala et al. Clin Immunol 2009 |
| 145 | CCR5 | | positive | mice | | | Camargo et al. J Immunol 2009 |
| 146 | melatonin receptor | | positive | Human | cell line, PBMC | | Lardone et al. Cell Mol Life Sci 2009 |
| 147 | T-βet, IL-12, IFN-α | | positive (IFN-α), | human | PBMC | | Davis et al. J Immunol 2008 |
| 148 | andrographolide | | negative | Human | cell line | | Carretta et al. Eur J Pharmacol 2009 |
| 149 | xanthohumol | | positive | mice | cell line | | Choi et al. Int Immunopharmacol 2009 |
| 150 | Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin | | positive | Human, Mice | | | Su et al. World J Gastroenterol 2008 |
| 151 | Blimp-1 | | negative | mice | | | Wang et al. J Immunol 2008 |
| 152 | BACH2 | | positive | Human | | | Lesniewski et al. Leukemia 2008 |
| 153 | Flubendazole®, CGP 20376 | | positive | human | | | Saunders et al. Parasitol Res 2008 |
| 154 | TSST-1 | HDAC | negative | mice | | | Kameltani et al. Immunol Lett 2008 |
| 155 | Lipopolysaccharide, hypoxia/ischemia | | positive | rat | microglia in neonatal brain | | Girard et al. Neuroreport 2008 |
| 156 | 2-arachidonol glycerol | | negative | Human | cell line | | Rockwell et al. Biochem Pharmacol 2008 |
| 157 | PTPN22 R620W | | positive | human | | | LeVert et al. J Neuroimmunol 2008 |
| 158 | Gastrin, secretin, GIP, VIP | | positive/negative | human | PBMC | | Abdalla et al. Iran J Immunol 2008 |
| 159 | Boerhaavia diffusa | | positive | mice | | | Manu et al. J Exp Ther Oncol 2008 |
| 160 | quercetin | | negative | mice | | | Yu et al. Biochem Pharmacol 2008 |

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|--|---|---------------------------------|-------------|-------------------|--|---|
| 161 | Protein-bound polysaccharide K | | positive | mice | | | Asai et al. Cancer Immunol Immunother 2001 |
| 162 | paconol | | positive | mice | | | Sun et al. Eur J Pharmacol 2008 |
| 163 | TGF-β | | negative | Human | PBMC | | Das et al. J Immunol 2008 |
| 164 | IKK γ (NEMO) | | positive | Human | cell line | | Shifera et al. Mol Immunol 2008 |
| 165 | NP66 (photodynamic therapy) | GADD-45 α VEGF | positive | | | | Ohtani et al. Int J Oncol 2008 |
| 166 | SNPs upstream of the minimal promoter | | positive | mice | | | del Rio et al. Genes Immun 2008 |
| 167 | Amentoflavone | | positive | mice | | | Guruvayoorappan et al. J Exp Ther Oncol 2008 |
| 168 | Nitric oxide | | positive | mice | | | Niedbala et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 |
| 169 | FR235222 (HDAC inhibitor) | | negative | human | cell line | | Matsuoka et al. Int Immunopharmacol 2007 |
| 170 | histone deacetylase | HDAC4/N-CoR complex | positive | human | cell line | | Matsuoka et al. Biochem Pharmacol 2007 |
| 171 | hexosamine biosynthesis pathway | | negative | human | cell line | | Huang et al. Cell Immunol 2007 |
| 172 | NF90 | | positive | mice | | | Shi et al. J Exp Med 2007 |
| 173 | β-galactosidase | | positive | mice | | | Wang et al. Int Immunopharmacol 2007 |
| 174 | zymosan (particulate yeast preparation) | Syk-dependent ERK activation | positive | mice | | | Slack et al. Eur J Immunol 2007 |
| 175 | Ku80, Ku70, NF90 | | positive (Ku80, N | human | cell line | | Shi et al. Nucleic Acids Res 2007 |
| 176 | ICER/OREM | | negative | mice | | | Bodor et al. Eur J Immunol 2007 |
| 177 | NF-AT2 (the calcineurin-dependent transcription factor) | | positive | human | | | Kytaridis et al. J Immunol 2007 |
| 178 | IL-4, IL-7, IL-12, IL-27, STAT5, STAT4, STAT6 | | negative | mice | | | Villarino et al. J Exp Med 2007 |
| 179 | Blimp-1 | | negative | mice | | | Gong et al. J Immunol 2007 |
| 180 | NAB2 | | positive | mice | | | Collins et al. J Immunol 2006 |
| 181 | AMP-activated protein kinase (AMPK) | | negative | human | cell line | | Jhun et al. Biochem Biophys Res Commun 2006 |
| 182 | protein kinase D2 (PKD2)(serine/threonine kinase) | | negative | human, Mice | cell line | | Irie et al. Int Immunol 2006 |
| 183 | Sodium arsenite | | negative | mice | | | Conde et al. Arch Toxicol 2007 |
| 184 | sulforaphane (a Naturally Occurring Isothiocyanate from Broccoli) | | positive | mice | | | Thejass et al. Immunopharmacol Immunotoxicol 2007 |
| 185 | Soluble Mouse B7-H3 | | negative | mice | | | Xu et al. Cell Mol Immunol 2006 |
| 186 | Protein Kinase C, Ras-ERK Pathway | | positive | mice | | | Hickman et al. J Immunol 2006 |
| 187 | Monoclonal anti-double-stranded DNA antibodies cross-react with phosphoglycerate kinase 1 | | negative | human | cell line | | Luan et al. Clin Immunol 2006 |
| 188 | B7-H4 (B7- family member) | | negative | Human | PBMC | | Mao et al. Acta Pharmacol Sin 2006 |
| 189 | IL-27 (IL-6/IL-12 family cytokine) | SOCS3 | negative | mice | | | Owaki et al. J Immunol 2006 |
| 190 | α-tocopherol | | positive (low doses) | mice | splenocyte | | Hsieh et al. Nutrition 2006 |
| 191 | mercuric chloride | | negative | mice | | | Santarelli et al. Int Immunopharmacol 2006 |
| 192 | Commiphora mukul (medicinal plant) | | negative | human, mice | | | Manjula et al. Int Immunopharmacol 2006 |
| 193 | coagulin-11 (Withanolide, naturally occurring steroidal lactones) | | negative | human | | | Mesaik et al. Mol Immunol 2006 |
| 194 | IL-27 (IL-6/IL-12 family cytokine) | | negative | mice | | | Villarino et al. J Immunol 2006 |
| 195 | Low Molecular Weight Thiols | | positive | mice | | | Hadzic et al. J Immunol 2005 |
| 196 | Wiskott-Aldrich syndrome protein | | positive | mice | | | Cianferoni et al. J Allergy Clin Immunol 2005 |
| 197 | HIV-2-Gag-p26 | | positive | human | | | Alatrakchi et al. Aids 2006 |
| 198 | Chlamydia trachomatis | | negative | Human | | | Wang et al. Clin Exp Immunol 2005 |
| 199 | transforming growth factor-β-activated kinase 1 (TAK1) | | positive | | | | Sakurai et al. FEBS Lett 2005 |
| 200 | RelA, I-κB | | positive (RelA)/negative (I-κB) | mice | | | Hwang et al. J Exp Med 2005 |
| 201 | CC-1047 (Actimid, Celgene, Immunomodulatory drugs (IMiDs)) | AP-1 | positive | Human | | | Payvandi et al. J Interferon Cytokine Res 2005 |
| 202 | Vilon, Epithalon, Ortagen (synthetic peptides) | | positive | rat | | | Kazakova et al. Bull Exp Biol Med 2005 |
| 203 | Protein phosphatase 2A (PP2A) | | negative | Human | | | Katsiari et al. J Clin Invest 2005 |
| 204 | SOCS2 | | positive | Human | | | Tannahill et al. Mol Cell Biol 2005 |
| 205 | 2-aminor-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) | | Negative | mice | | | Yun et al. Toxicology 2006 |
| 206 | simian immunodeficiency virus | MAP kinase | positive | human | | | Muckenfuss et al. Mol Immunol 2006 |
| 207 | Krüppel-like factor 2 (zinc finger transcription factor) | | positive | | | | Wu et al. J Immunol 2005 |
| 208 | Melatonin | | positive | human | cell line | | Lardone et al. J Cell Physiol 2006 |
| 209 | C-type lectin OCLRP2/Clr-g and its ligand NKRPF costimulate | | positive | mice | | | Tian et al. Cell Immunol 2005 |
| 210 | Dendritic cell (DC)-specific intercellular cell adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN) | | positive | human | cell line, PBMC | | Martinez et al. Int Immunol 2005 |
| 211 | Andrographolide (main labdane diterpene present in Andrographis paniculata) | | negative | mice | | | Burgos et al. Planta Med 2005 |
| 212 | 5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR)(the dephosphorylated form of AICA ribotide (also termed "ZMP"), an intermediate of purine biosynthesis) | GSK-3 phosphorylation ↓, NF-AT activation ↓ | negative | Human | cell line | | Jhun et al. Biochem Biophys Res Commun 2006 |
| 213 | histone H3 acetylation | | positive | mice | | | Wang et al. Biochem Biophys Res Commun 2006 |
| 214 | Systemic lupus erythematosus serum IgG | CREM, CaMKIV | negative | human | | | Juang et al. J Clin Invest 2005 |
| 215 | Anthrax lethal toxin | MAPK 1 | negative | human | cell line | | Fang et al. J Immunol 2005 |
| 216 | Signals from CD28 | | positive | mice | | | Thomas et al. J Immunol 2005 |
| 217 | IFN-γ | | negative | mice | | CTL 1 | Hidalgo et al. Am J Transplant 2005 |
| 218 | Splice Variant of the TCR γ cRNA Lacking Exon 7 | | negative | human | cell line | | Tsuzaka et al. J Immunol 2005 |
| 219 | adenosine A2A receptor | | negative | mice | | reduced CD4 Th1 and CD8 Tc1 cell expansion to alloantigen, reduced antigen-specific CD4 Th1 cell numbers | Erdmann et al. Blood 2005 |
| 220 | Cyclosporin A | NF-κB/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling ↓ | negative | human | | | Nishiyama et al. Int Immunopharmacol 2005 |
| 221 | TGF-β1 | Smad3 | negative | mice | | | McKarns et al. J Immunol 2005 |
| 222 | CD40/CD40L interaction | | positive | mice | | Treg 1 | Guiducci et al. Eur J Immunol 2005 |
| 223 | CD45 signals outside of lipid rafts | | positive | mice | cell line | | Zhang et al. J Immunol, 2005 |
| 224 | Arginine methylation, protein arginine methyltransferases | | positive | human | cell line | | Richard et al. Biochem J 2005 |
| 225 | Tristetraprolin | | negative | Human, Mice | | | Ogilvie et al. J Immunol 2005 |
| 226 | CD28 | PI3K | positive | mice | | | Sanchez-Lockhart et al. |
| 227 | IFN-β | CD28/CTLA-4-mediated pathway | negative | human | | | Espejo et al. Mult Scler 2004 |
| 228 | Docosahexaenoic Acid (DHA) | | negative | mice | | | Fan et al. J Immunol 2004 |
| 229 | low-density shock waves (LDSWs) | | positive | | | | Yu et al. Acta Biochim Biophys Sin 2004 |
| 230 | Caspase | | positive | human | cell line | | Falk et al. J Immunol 2004 |
| 231 | catecholamine | | negative | rat | | | Peng et al. Acta Pharmacol Sin 2004 |
| 232 | TNF Receptor Type-2 (p75) | | positive | mice | | | Kim et al. J Immunol 2004 |
| 233 | IL-15 | | positive | Human, Mice | | | Feau et al. Blood 2005 |
| 234 | Ceramide | | negative | human | cell line | | Abboushi et al. J Immunol 2005 |
| 235 | Trypanosoma cruzi membrane mucin AgC10 | | negative | mice | | | Alcaide et al. Int Immunol 2004 |
| 236 | Wiskott-Aldrich Syndrome Protein | | positive | mice | | | Cannon et al. J Immunol 2004 |
| 237 | p38 MAPK | | negative | human | PBMC | | Veipoulou et al. Neuroimmunomodulation 2004 |
| 238 | Phosphorylated Protein Kinase A-R1β | | negative | human | cell line, PBMC | | Elliott et al. J Immunol 2004 |
| 239 | Mercury, Lead, Cadmium | | positive (Cadmium) | human | cell line | | Colombo et al. Clin Immunol 2004 |
| 240 | killed Salmonella enteritidis vaccine | | positive | chicken | | | Okamura et al. Comp Immunol Microbiol Infect 2004 |

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|---|--|---------------------------|-------------|--------------------------|---|--|
| 241 | Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) | | negative | human | PBMC | | Sundrud et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 |
| 242 | acetylcholine | | positive | rat | | | Qui et al. Lymphology 2004 |
| 243 | Carbon Monoxide | | negative | human | PBMC | T Cell Proliferation | Pae et al. J Immunol 2004 |
| 244 | Immunophilin ligand (cyclosporin A, FK506 and rapamycin) | | negative | rat | astrocyte | | Gabryel et al. Pol J Pharmacol 2004 |
| 245 | North American ginseng (Panax quinquefolium) | | positive | mice | | | Wang et al. Int Immunopharmacol 2004 |
| 246 | retinoic acid | | positive | human | PBMC | | Engedal et al. Int Immunol 2004 |
| 247 | Schnurri-3 (zinc finger transcription factor recognition component, KRC) | | positive | human, mice | cell line | | Oukka et al. J Exp Med 2004 |
| 248 | Cimetidine | | positive | human | lesional skin of | viral warts | Mitsuishi et al. Eur J Dermatol 2003 |
| 249 | Experimental Respiratory Syncytial Virus Infection | | positive | mice | | | Chang et al. J Immunol 2004 |
| 250 | Vaccinia Virus-Infected Cells | NF-90 translocation | positive | human | cell line | | Langland et al. J Interferon Cytokine Res 2004 |
| 251 | Protein kinase Cbeta1 | | positive | human | cell line | | Dreikhausen et al. Int Immunol 2003 |
| 252 | IKK γ /NEMO | | positive | human | cell line | | He et al. Eur J Immunol 2003 |
| 253 | CD28, ICOS | | positive | human | PBMC | | Parry et al. J Immunol 2003 |
| 254 | Sodium arsenite | | negative | human | PBMC | proliferation of PHA-activated T cells | Babu et al. Food Chem Toxicol 2003 |
| 255 | high flaxseed diet (rich in α -linolenic acid) | | no change | Rat | spleen cell | Concanavalin A | |
| 256 | sesquiterpene lactone (traditional medicine) | | negative | human | whole blood | | Humar et al. Biochem Pharmacol 2003 |
| 257 | | | | | | type 1 diabetes | |
| 258 | YM-58483 (Pyrazole Derivative) | | negative | human | cell line | | Ozer et al. J Pediatr Endocrinol Metab 2003 |
| 259 | c-Rel | | positive | mice | | | Ishikawa et al. J Immunol 2003 |
| 260 | SS-A/Ro52 | | positive | human | cell line | Sjogren's syndrome | Rao et al. J Immunol 2003 |
| 261 | cAMP response element modulator (CREM) | | negative | human | PBMC | | Tenbrock et al. J Immunol 2003 |
| 262 | Extracellular ATP | | positive | mice | antigen-specific T cells | | Langston et al. J Immunol 2003 |
| 263 | melatonin, PGE2 | | positive (melatonin) | human | PBMC | | Carrillo-Vico et al. Faseb J 2003 |
| 264 | filariasis | | positive | human | serum | | el-Sharkawy et al. J Egypt Soc Parasitol 2003 |
| 265 | Bovine Leukemia Virus | | negative | Cow | CD4+ T Cells | | Amills et al. Virology 2002 |
| 266 | Retinoic Acid | | positive | human | PBMC | | Ertesvag et al. J Immunol 2002 |
| 267 | cAMP response element modulator (CREM) | | negative | human | PBMC | | Tenbrock et al. J Immunol 2002 |
| 268 | interferon alpha-2b | | positive | human | serum | | Mazur et al. Med Sci Monit 2001 |
| 269 | DOCK2 | | positive | human | cell line | | Nishihara et al. Biochem Biophys Res Commun 2001 |
| 270 | E55 μ murine leukemia retrovirus | | negative | mice | | | Erefaei et al. Virology 2002 |
| 271 | fibroblast growth factor receptor 1 upon its engagement by CD56 | | positive | human | cell line | | Kos et al. Immunol Cell Biol 2002 |
| 272 | FR900482, FK317 | | positive (FR900482) | human | cell line | Vascular Leak | Beckerbauer et al. Chem Biol 2002 |
| 273 | Shc | c-Rel | positive | human | cell line | | Iwashima et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 |
| 274 | NFAT | | positive | human | | | Oum et al. Mol Cells 2002 |
| 275 | Vomitinon (deoxyvalenol) | NRE-A 1 | positive | mice | cell line | | Yang et al. Toxicology 2002 |
| 276 | IL-1b | | positive | human | cell line | | Rodriguez-Juan et al. Tissue Cell 2001 |
| 277 | cannabinol | | positive | mice | cell line | | Jan et al. Mol Pharmacol 2002 |
| 278 | IL-4 | PPAR γ , 12/15-Lipoxygenase Ligands | negative | human | PBMC | | Yang et al. J Biol Chem 2002 |
| 279 | CD3 ζ Signaling and CD28 Costimulation | | positive | human | cell line | | Hombach et al. J Immunol 2001 |
| 280 | HIV protease inhibitor | | negative | human | | | Lucia et al. AIDS 2001 |
| 281 | Antithrombin III | | negative | human, rat | | | Zuo et al. Transpl Immunol 2001 |
| 282 | LFA-1 | | positive | mice | | | Abraham et al. J Immunol 2001 |
| 283 | calpain (calcium-activated neutral proteinase) | | negative | human | PBMC | | Schaecher et al. J Neuroimmunol 2001 |
| 284 | Vitamin E | | positive | mice | | | Adolfsson et al. J Immunol 2001 |
| 285 | Glucocorticoid, Cyclosporine | IkBa | negative | human | PBMC | | Briggs et al. J Clin Pharmacol 1999 |
| 286 | condyloma acuminata | | negative | human | PBMC | | Liu et al. J Tongji Med Univ 2001 |
| 287 | Caspase, Caloinerin | | positive | human | cell line | | Mukerjee et al. Biochem Biophys Res Commun 2001 |
| 288 | C3-like chimeric toxin, Clostridium difficile toxin B | | negative | mice | | | Dreikhausen et al. Eur J Immunol 2001 |
| 289 | estrogen | | positive | mice | | | Karpuzoglu-Sahin et al. Cytokine 2001 |
| 290 | Ly49A | | negative | mice | cell line | | Roger et al. J Immunol 2001 |
| 291 | Microcystin | | negative | mice | | down-regulation of lymphocyte functions | Yea et al. Toxicol Lett 2001 |
| 292 | Protein Kinase A, Protein Kinase A RI beta Subunit | | positive | Human | PBMC | | Khan et al. J Immunol 2001 |
| 293 | Tat, repressor complex containing NF-IL6, JunB, c-Fos and Fra-1 | | positive (Tat), negative | Human | PBMC | | Ehret et al. Eur J Immunol 2001 |
| 294 | tyrosine kinase inhibitor KR774 | | negative | human | cell line, PBMC | | Sadeghi et al. Int Immunopharmacol 2001 |
| 295 | zeta chain | | positive | Human | PBMC | | Frydecka et al. Br J Cancer 2001 |
| 296 | Ortho-b-Hydroxy-Ethyl Rutosides (HR) | | positive | human | serum | | de Schenquer et al. Arch Med Res 2001 |
| 297 | Protein Kinase C- θ | Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB) | positive | Human | PBMC | | Solomou et al. J Immunol 2001 |
| 298 | Antibodies recognizing CD24 leucine-alanine-proline (LAP) epitope | | positive | human | | | Salamone et al. J Leukoc Biol 2001 |
| 299 | Akt | | positive | mice | | | Kane et al. Nat Immunol 2001 |
| 300 | Melatonin | | positive | human | cell line | | Guerrero et al. Ann N Y Acad Sci 2000 |
| 301 | IL-5 | | negative | Rat | | | He et al. Transplant Proc 2001 |
| 302 | Tat | | negative | human | cell line | | Gonzalez et al. J Immunol 2001 |
| 303 | paracoccidioidomycosis | | negative | human | PBMC | | Benard et al. Cytokine 2001 |
| 304 | exogenous corticosterone or restraint stress | | negative | mice | | | Pruett et al. J Toxicol Environ Health A 2001 |
| 305 | Eukaryotic translation initiation factor (eIF)-6 | | positive | Human, Mice | cell line | | Oh et al. J Immunol 2001 |
| 306 | dehydroepiandrosterone (DHEA) | | positive | human | spleen cell | | Young et al. Clin Exp Immunol 2001 |
| 307 | HBeAg | | positive | human | serum | | Bozkaya et al. Hepatogastroenterology 2000 |
| 308 | Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b | | positive | human | cell line | | Kanda et al. J Immunol 2001 |
| 309 | Ah receptor | | positive | mice | | | Jeon et al. J Immunol 2000 |
| 310 | Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus | | positive | mice | | | Chang et al. Virology 2000 |
| 311 | Coinfection with Barroelja burgdorferi and the agent of human granulocytic ehrlichiosis | | negative | mice | | | Zeidner et al. Parasite Immunol 2000 |
| 312 | IL-18 | | positive | human | | | David et al. Aids 2000 |
| 313 | Adrenocorticotrophic hormone (ATCH) | | positive | mice | cell line | | Wermerskirchen et al. Life Sci 2000 |
| 314 | C/EBPb | | negative | Human, Mice | | | Berberich-Siebert et al. Eur J Immunol 2000 |
| 315 | N-acetylspingosine | | positive | rat | | | Pahlavani et al. Immunopharmacology 2000 |
| 316 | Viscum album extract | | positive | human | PBMC | | Kovacs et al. Biomed Pharmacother 2000 |
| 317 | TGF- β 1 | | positive (low doses) | mice | | | McKarns et al. Immunopharmacology 2000 |
| 318 | cigarette smoke extracts | | negative | human | PBMC | | Ouyang et al. J Allergy Clin Immunol 2000 |
| 319 | Novel Basic Leucine Zipper p21 ^{SVP} Protein | | negative | human | cell line | | Iacobelli et al. J Immunol 2000 |
| 320 | CD28, LFA-1 | | positive | human | | | Geginat et al. Eur J Immunol 2000 |

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|--|---|---------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------|--|
| 321 | Garlic Extracts | | positive | Rat | | Proliferation of | Colic et al. Immunopharmacol Immunotoxicol |
| 322 | Nodularin (cyclic peptide produced by cyanobacteria) | | negative | mice | | | Yea et al. Toxicol Lett 2000 |
| 323 | Vav1 | | positive | human | | | Hofmann et al. Oncogene 2000 |
| 324 | high-mobility group I(Y) (HMGI(Y)) family | | positive | human | cell line, PBMC | T Cell Proliferat | Himes et al. J Immunol 2000 |
| 325 | VIP, PACAP (neuropeptides) | c-Jun 1, JunB 1 | negative | mice | | | Wang et al. J Neuroimmunol 2000 |
| 326 | Nitric oxide | Zinc Finger Transcription Factors Sp1, EGR-1 | negative | mice | | | Berendji et al. Mol Med 1999 |
| 327 | Thalidomide | | positive | human | | | Shannon et al. Immunopharmacology 2000 |
| 328 | CD28 | | positive | human | | | Appleman et al. J Immunol 2000 |
| 329 | Filgrastim | | negative | human | | | Hartung et al. J Hematother Stem Cell Res 1 |
| 330 | isoproterenol | | negative | human | | | Aihara et al. Biol Cell 1999 |
| 331 | SLP-76 Cooperativity with FYB/FYN-T | | positive | human | cell line | | Geng et al. J Immunol 1999 |
| 332 | Ikb | | negative | human | cell line | | Khoshnan et al. J Immunol 1999 |
| 333 | Jak3 | | positive | mice | | | Thomis et al. J Immunol 1999 |
| 334 | nitiof (A novel sesterterpenoid) | | positive | human | cell line | | Kawahara et al. Chem Pharm Bull 1999 |
| 335 | MuLV-Induced Lymphoma | | negative | mice | | | Beaty et al. Virology 1999 |
| 336 | satratoxins and other macrocyclic trichothecenes | | positive | mice | cell line | | Lee et al. J Toxicol Environ Health A 1999 |
| 337 | ADP-Ribosylation of Rho by C3 Ribosyltransferase | | negative | human | cell line | | Angkachatchai et al. J Immunol 1999 |
| 338 | IL-1 | p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kin | positive | mice | cell line | | Matthews et al. Cytokine 1999 |
| 339 | measles infection | | negative | human | PBMC | | Vinante et al. Haematologica 1999 |
| 340 | HIV-exposed seronegative subjects | | negative | human | PBMC | | Nicastrì et al. Aids 1999 |
| 341 | HIV | | negative | human | PBMC | | Hong et al. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 199 |
| 342 | morphine | | negative | rat | | | Gomez-Flores et al. J Interferon Cytokine Re |
| 343 | Tec kinase | | positive | human | cell line | | Yang et al. Eur J Immunol 1999 |
| 344 | Recombinant Hepatitis C Virus Antigen | | negative | human | | | Eckels et al. Hum Immunol 1999 |
| 345 | Prostaglandin E2 | | negative | rat | | | Choudhry et al. Immunol Lett 1999 |
| 346 | Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1) | | positive | human | cell line | | Byrd et al. J Immunol 1999 |
| 347 | p-bromophenacyl bromide and arachidonyl trifluoromethyl ketone (Phospholipase A2 inhibitors) | | negative | mice | spleen cell | | Ouyang et al. Arch Toxicol 1999 |
| 348 | Histamine | protein kinase A | negative | mice | spleen cell | | Poluektova et al. Immunopharmacology 199 |
| 349 | Soluble Allo-MHC Class I Antigen | | negative | rat | | | Geissler et al. Transplant Proc 1999 |
| 350 | IL-1b, TGF-b | | positive | mice | cell line | | Siese et al. Scand J Immunol 1999 |
| 351 | Ebola Virus Infection | | positive | human | | | Villinger et al. J Infect Dis 1999 |
| 352 | CD4 | | negative | mice | | | Bonnard et al. J Immunol 1999 |
| 353 | Protein Kinase C-θ | | positive | human | cell line | | Ghaffari-Tabrizi et al. Eur J Immunol 1999 |
| 354 | Propanil | | negative | mice | cell line | | Zhao et al. Toxicol Appl Pharmacol 1999 |
| 355 | melatonin | | positive | human | PBMC | | Garcia-Maurino et al. J Neuroimmunol 1998 |
| 356 | L-deprenyl (irreversible monoamine oxidase-B inhibitor) | | positive | rat | | accompanies re | Thyagarajan et al. J Neuroimmunol 1998 |
| 357 | galectin-1 | | no change | mice | thymocyte | | |
| 358 | reactive oxygen species (ROS) | | positive | human | PBMC | | Talla et al. Free Radic Biol Med 1999 |
| 359 | RORγt | | negative | human | | | He Immunity 1998 |
| 360 | Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) | | positive | mice | cell line | | Han et al. J Pharmacol Exp Ther 1998 |
| 361 | RE/AP | | positive | human | cell line | | Shapiro et al. J Immunol 1998 |
| 362 | 3BP2 (Syk Kinases-Interacting Protein, SKIPs) | | positive | human | cell line | | Deckert et al. Immunity 1998 |
| 363 | Tp1-2 | | positive | Human, M | cell line | | Tsatsanis et al. Oncogene 1998 |
| 364 | Jun-N-terminal kinases (JNK) | | positive | Human, M | cell line | | Barz et al. J Immunol 1998 |
| 365 | IL-1 receptor-associated protein kinase (IRAK) | | positive | mice | cell line | | Knop et al. Eur J Immunol 1998 |
| 366 | NIF-2-a (zinc finger protein) | | negative | mice | | | Pucci et al. Int Immunol 1998 |
| 367 | surfactant-associated protein D (SP-D) | | negative | human | PBMC | | Borron et al. J Immunol 1998 |
| 368 | Caspase-3-Like Activity | | positive | human | cell line | | Posmantur et al. Exp Cell Res 1998 |
| 369 | ICAM-1 | | positive | human | PBMC | | Labuda et al. Immunology 1998 |
| 370 | Okadaic Acid-Sensitive Serine/Threonine Phosphatases | | positive | Human, Mice | | | Nebl et al. J Immunol 1998 |
| 371 | V7 (CD101) Ligand | | negative | mice | T cells with CD4-CD8- (double | | Liang et al. J Biomed Sci 1998 |
| 372 | Soluble V7 (CD101) Ligand | | negative | human | PBMC | | Soares et al. J Immunol 1998 |
| 373 | Calcineurin | PKC-theta | positive | human | cell line | | Werlen et al. EMBO J 1998 |
| 374 | CD4 mAb | | negative | human | PBMC | | Woods et al. Cell Immunol 1998 |
| 375 | staphylococcal enterotoxin B | | positive | Human, M | PBMC, LPMC | | Assenmacher et al. Eur J Immunol 1998 |
| 376 | CD2 | | positive | Human, M | PBMC, LPMC | | Gonsky et al. J Immunol 1998 |
| 377 | ZEB | | negative | mice | cell line | | Yasui et al. J Immunol 1998 |
| 378 | acid sphingomyelinase | | positive (secretor) | mice | | | Stoffel et al. Eur J Immunol 1998 |
| 379 | Delta-opioid receptors (DOR1) | | positive | human | cell line | | Hedim et al. J Immunol 1997 |
| 380 | gp41 Envelope Protein of Human Immunodeficiency Virus | IL-10 ↑ | negative | human | PBMC | | Barcova et al. J Infect Dis 1998 |
| 381 | LFA-1 | | positive | mice | | | Zuckerman et al. J Immunol 1998 |
| 382 | Ly6C | | negative | mice | | | Yamanouchi et al. Eur J Immunol 1998 |
| 383 | OBF-1 (OCA-B, Bob-1) | | no change | mice | | | Sauter et al. Immunobiology 1997 |
| 384 | Vomitoxin (Deoxynivalenol) | | positive | mice | cell line | | Li et al. Toxicol Appl Pharmacol 1997 |
| 385 | Perillic Acid | | negative | Human | cell line, PBMC | | Schulz et al. Biochem Biophys Res Commun |
| 386 | caloric restriction | | positive | | | | Pahlavani et al. Front Biosci 1998 |
| 387 | Somatostatin | | positive | human | cell line | | Cardoso et al. J Cell Biochem 1998 |
| 388 | CD55 (the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored) | | positive | human | cell line | | Tosello et al. J Inflamm 1998 |
| 389 | human chorionic gonadotropin (hCG) | | positive (low dos | human | PBMC | | Komorowski et al. Immunol Lett 1997 |
| 390 | Rap1 | | negative | human | cell line | | Boussiotis et al. Science 1997 |
| 391 | Lck SH2 Phosphotyrosine Binding Site | | positive | | | | Lewis et al. J Immunol 1997 |
| 392 | Lck | | positive | | | | Chung et al. J Immunol 1997 |
| 393 | Cot | | positive | human | cell line | | Ballester et al. J Immunol 1997 |
| 394 | GABP | c-Raf | positive | | | | Avots et al. Mol Cell Biol 1997 |
| 395 | Melatonin | | positive | human | PBMC | | Garcia-Maurino et al. J Immunol 1997 |
| 396 | Morphine | | negative | mice | | | Roy et al. Cell Immunol 1997 |
| 397 | CD28 | CD28RE and NF-IL-2B AP-1 Sites | positive | human | cell line | | Shapiro et al. Mol Cell Biol 1997 |
| 398 | Splenopentin analogs | | positive | human | PBMC | | Biswas et al. Int J Immunopharmacol 1997 |
| 399 | SB203580 (p38 MAP kinase inhibitor) | | negative | human | PBMC | | Ward et al. Biochem Soc Trans 1997 |
| 400 | Phytolacca acinosa polysaccharides I | | positive (once a | mice | | | Wang et al. Immunopharmacol Immunotoxicol |

| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|---|--|---------------------------|-------------|-------------------|-----------------|---|
| 401 | lipid emulsion (intralipid) | | negative | human | CBMC | | Sirota et al. Acta Paediatr 1997 |
| 402 | thaliomide | | positive | human | PBMC | | Shannon et al. Immunopharmacology 1997 |
| 403 | nitric oxide | | negative | mice | | | Taylor-Robinson et al. Immunol Cell Biol 1997 |
| 404 | Semliki Forest virus (SFV-A7) and bacterial lipopolysaccharide (LPS) | | positive | mice | | | Yang et al. Scand J Immunol 1997 |
| 405 | human pooled g-globulin for intravenous use (hIVIG) | | negative | human | PBMC | | Modiano et al. Clin Immunol Immunopathol 1997 |
| 406 | immunoglobulin | | negative | human | PBMC | | Nachbaur et al. Immunology 1997 |
| 407 | Copper | | positive | human | cell line | | Hopkins et al. J Nutr 1997 |
| 408 | anti-CD26 antibodies | DP IV/CD26 | positive | | | | Reinhold et al. Adv Exp Med Biol 1997 |
| 409 | luteinizing hormone alpha-subunit | | no change | human | PBMC | | Komorowski et al. Cytobios 1997 |
| 410 | Beryllium | | positive | human | BAL cell | | Tinkle et al. J Immunol 1997 |
| 411 | catalytic subunit C alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase | | positive | mice | cell line | | Sugiyama et al. J Immunol 1997 |
| 412 | leflunomide | | negative | | | | Cao et al. Transplant Proc 1996 |
| 413 | titanium, cobalt, and chromium | | negative | human | PBMC | | Wang et al. J Biomed Mater Res 1996 |
| 414 | 12-O-TETRADECANOYL PHORBOL-13-ACETATE, OKADAIC ACID | | negative | bovine | | | Grove et al. Cytokine 1996 |
| 415 | Dexamethasone | | negative | human | CBMC, PBMC | | Bessler et al. Arch Dis Child Fetal Neonatal 1996 |
| 416 | High Mobility Group Protein (Y) | | positive | human | cell line | | Himes et al. Immunity 1996 |
| 417 | c-rel | | positive | human | cell line | | Snapiro et al. J Exp Med 1996 |
| 418 | catalytic domain of pp56(lck) | | positive | human | cell line | | Carrera et al. J Immunol 1996 |
| 419 | BCG vaccination | | positive | human | | | Ferreira et al. Tuber Lung Dis 1996 |
| 420 | Phosphorylation of each of the distal three tyrosines of the CD28 cytoplasmic tail | | positive | human | cell line | | Teng et al. Tissue Antigens 1996 |
| 421 | Ixodes ricinus Ticks, Tick Salivary Gland Extracts | | positive | mice | | | Ganapamo et al. Scand J Immunol 1996 |
| 422 | Histamine | reactive oxygen metabolites ↓, IFN-g ↓ | negative | human | | | Houze et al. Cell Biol Int 1996 |
| 423 | Tricyclic antidepressants | | negative | human | PBMC | | Xia et al. Immunopharmacology 1996 |
| 424 | Pityrosporum ovale | | negative | human | PBMC | | Neuber et al. Arch Dermatol Res 1996 |
| 425 | candidiasis | | negative | human | PBMC | | Liic et al. Clin Exp Immunol 1996 |
| 426 | HTLV-1 Tax | NF-AT complex | positive | human | cell line | | Good et al. Embo J 1996 |
| 427 | Sublethal levels of oxidative stress | c-jun ↑ | negative | human | cell line | | Beiqing et al. J Immunol 1996 |
| 428 | surfactant-associated protein A (SP-A) | | negative | human | cell line, PBMC | | Borron et al. Am J Respir Cell Mol Biol 1996 |
| 429 | Nitric Oxide | | no change | mice | | | Marcinkiewicz et al. J Immunol 1996 |
| 430 | Elevated glucose levels | | negative | human | PBMC | | Reinhold et al. Horm Metab Res 1996 |
| 431 | Vav and SLP-76 | | positive | human | cell line | | Wu et al. Immunity 1996 |
| 432 | Vomitoxin | | positive | mice | | | Ouyang et al. Toxicol Appl Pharmacol 1996 |
| 433 | Cannabinoid | | negative | mice | cell line | | Condie et al. J Biol Chem 1996 |
| 434 | S-Oxalylglutathione | | negative | bovine | cell line | | Grove et al. Exp Cell Res 1996 |
| 435 | S-Oxalin, N-Acetyl-S-oxalylcysteamine | | negative | bovine | cell line | | Grove et al. Biochem Biophys Res Commun 1996 |
| 436 | Trichostatin A (a potent inhibitor of mammalian histone deacetylase) | | negative | human | cell line | | Takahashi et al. J Antibiot 1996 |
| 437 | pertussis toxin and PGE2 | | negative | mice | cell line | | McCarthy et al. Biochem Soc Trans 1996 |
| 438 | MEK1, ERK1, ERK2 | | positive | human, mice | cell line | | Whitehurst et al. J Immunol 1996 |
| 439 | CREB | | positive | mice | | | Barton et al. CREB IL-2 1996 |
| 440 | lymphocytic choriomeningitis virus | | positive | mice | | | Cousens et al. J Immunol 1995 |
| 441 | cAMP | NF-AT ↓ | negative | mice | cell line | | Tsuruta et al. J Allergy Clin Immunol 1995 |
| 442 | Friend Immunosuppressive virus-2 (FIS-2) | | negative | mice | | induces a Th1 | Faxvaag et al. Clin Exp Immunol 1995 |
| 443 | Prostaglandin E2 | | negative | Human | | | Katamura et al. J Immunol 1995 |
| 444 | 17β-oestradiol | | negative | Human | | | Evagelatou et al. Endocrine 1995 |
| 445 | Thalidomide | | positive | human | PBMC | | Shannon et al. Immunopharmacology 1995 |
| 446 | CD44 | | positive | mice | | | Sommer et al. Int Immunol 1995 |
| 447 | Chloroquine | | negative | Human | | | Landewe et al. Clin Exp Immunol 1995 |
| 448 | syphilis | | positive(primary) | human | PBMC | | Podwinska et al. FEMS Immunol Med Microbiol 1995 |
| 449 | reactive oxygen production by 5-lipoxygenase | | positive | human | PBMC | | Los et al. EMBO J 1995 |
| 450 | Prothymosin alpha 1 | | positive | human | PBMC | | Eckert et al. Int J Immunopharmacol 1995 |
| 451 | vomitoxin (deoxyvalenol) and cycloheximide | | positive | mice | | | Azcona-Olivera et al. Food Chem Toxicol 1995 |
| 452 | cationic staphylococcal proteins | | positive | human | PBMC | | Jahreis et al. Clin Exp Immunol 1995 |
| 453 | wortmannin (PI3K inhibitor) | | positive / negative | human | cell line | | Ueda et al. Int Immunol 1995 |
| 454 | cAMP | NF-AT ↓ | negative | mice | cell line | | Tsuruta et al. J Immunol 1995 |
| 455 | Indomethacin | | positive | human | PBMC | | Tsuboi et al. Cytokine 1995 |
| 456 | Herpesvirus Saimiri | | positive | human | cell line | | Chou et al. Virology 1995 |
| 457 | WIN 61058 and WIN 53071 | NF-AT ↓ | negative | human | cell line | | Baine et al. J Immunol 1995 |
| 458 | glycyrrhizin | | positive | mice | | | Zhang et al. Cell Immunol 1995 |
| 459 | ETS1 | | negative | human | cell line | | Romano-Spica et al. J Immunol 1995 |
| 460 | dehydroepiandrosterone | | positive | human | PBMC | | Suzuki et al. Clin Exp Immunol 1995 |
| 461 | Helicobacter pylori | | positive | human | PBMC | | Fan et al. Mediators Inflamm 1995 |
| 462 | IL-1 | | positive | mice | | | Brigelius-Flohe et al. Biofactors 1995 |
| 463 | gold salts | | negative | human | serum | | Lewandowicz et al. Arch Immunol Ther Exp 1995 |
| 464 | Morphine | | negative | | | | Roy et al. Adv Exp Med Biol 1995 |
| 465 | Octamer factors | | positive | human, mice | cell line | | Pfeuffer et al. J Immunol 1994 |
| 466 | thymic shared antigen-I(TSA-I) | | negative | mice | | | Kosugi et al. Int Immunol 1994 |
| 467 | SK&F 96365 | | negative | human | cell line | | Chung et al. Br J Pharmacol 1994 |
| 468 | c-fos | | positive | mice | | | Ochi et al. J Immunol 1994 |
| 469 | vasoactive intestinal peptide (VIP) | | negative | mice | thymocyte | | Xin et al. J Neuroimmunol 1994 |
| 470 | IL-1, IFNα | | positive | human | cell line | | Holan et al. Cell Immunol 1994 |
| 471 | c-Jun | | positive | human | cell line | | Petrak et al. J Immunol 1994 |
| 472 | Multiple glycosylphosphatidylinositol-anchored Ly-6 molecules and transmembrane Ly-6E | | negative | mice | cell line | | Fleming et al. J Immunol 1994 |
| 473 | Immunization with irradiated Plasmodium berghei sporozoites | | positive | mice | | | White et al. Parasite Immunol 1994 |
| 474 | cAMP | | negative | mice | | | Laour et al. Int Immunol 1994 |
| 475 | inositol phosphate release | | positive | human | PBMC | | Bryan et al. Cell Immunol 1994 |
| 476 | TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1 (TGF-β1) | | negative | human | PBMC | | Reinhold et al. Cytokine 1994 |
| 477 | nympal Ixodes ricinus ticks | | positive | mice | | | Mbow et al. Cell Immunol 1994 |
| 478 | glycosphingolipids | | | | | | Montero et al. Transplant Proc 1994 |
| 479 | okadaic acid | | positive | mice | cell line | | Falk et al. Lymphokine Cytokine Res 1994 |
| 480 | eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) | | positive | mice | spleen cell | | Barve et al. J Immunol 1994 |

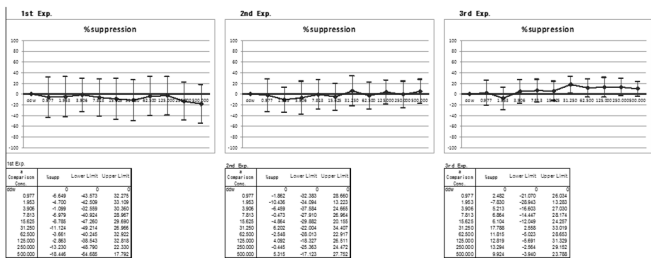
| No | Chemical | Biochemical pathway | Action to IL-2 production | Animal | in vitro/ in vivo | in vivo effects | Reference |
|-----|--|---------------------|---------------------------|--------------|-----------------------|---------------------------------|--|
| 481 | human beta 2-microglobulin | | negative | mouse | cell line | | Claesson et al. Immunol Lett 1994 |
| 482 | cimetidine | | positive | Rat | spleen cell | | Ding et al. J Tongji Med Univ 1994 |
| 483 | outer membrane proteins (OMP) from Shigella | | positive | mouse | spleen cell | | Czarny et al. Arch Immunol Ther Exp 1994 |
| 484 | cyclosporine | | negative | human | | | Salom et al. Transplantation 1993 |
| 485 | Ly-6A/E | | negative | mouse | | | Codias et al. J Immunol 1993 |
| 486 | thyrotropin (TSH) | | positive | human | PBMC | | Komorowski et al. Horm Metab Res 1993 |
| 487 | IL-4 | | negative | human | PBMC etc. | | Colquhoun et al. J Surg Res 1993 |
| 488 | Trichinella spiralis infection | | positive | rat | milk cell | | Na et al. J Reprod Immunol 1993 |
| 489 | prostaglandin E2 (PGE2) | | negative | mouse | thymocyte | | Daculsi et al. Immunol Lett 1993 |
| 490 | 5-lipoxygenase (5-LO) inhibitor, A-63162 | | negative | human | PBMC | | Aturu et al. J Leukoc Biol 1993 |
| 491 | Treponema pallidum | | negative | rabbit | PBMC | | Podwinska et al. FEMS Immunol Med Microb |
| 492 | 42,000MW ERK and a 100,000MW protein | | positive | human | cell line | | Song et al. Immunology 1993 |
| 493 | vasoactive intestinal peptide (VIP) | | negative | mouse | | | Sun et al. J Neuroimmunol 1993 |
| 494 | Pentoxifylline | | negative | human | PBMC | | Thanhauser et al. Immunology 1993 |
| 495 | vasoactive intestinal peptide (VIP) | | negative | mouse | | | Ganea et al. J Neuroimmunol 1993 |
| 496 | substance P and related tachykinins | | positive | mouse | | | Rameshwar et al. J Immunol 1993 |
| 497 | Schistosoma mansoni | | positive | mouse | | | Keisari et al. Immunobiology 1993 |
| 498 | Dipeptidyl peptidase IV (CD26) | | positive | human | PBMC | | Reinhold et al. Immunobiology 1993 |
| 499 | IL-10 | | negative | human | PBMC | | de Waal Malefyt et al. J Immunol 1993 |
| 500 | c-fos synthesis and increased Fos content of AP-1 | | positive | human | PBMC | | Hughes et al. J Immunol 1993 |
| 501 | glucocorticoid | AP-1 ↓, NF-AT ↓ | negative | human | PBMC | | Palogianni et al. J Clin Invest 1993 |
| 502 | antigens extracted from Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) | | positive | human | PBMC | | Kubota et al. J Dermatol 1993 |
| 503 | D. pteronyssinus | | positive | human | PBMC | | McHugh et al. Clin Exp Allergy 1993 |
| 504 | IL-1a, IL-1b, IFN-a, TNF-a, IFN-b, TNF-b | | positive, negative | human | cell line | | Holan et al. Folia Biol 1993 |
| 505 | rolipram, a PDE-IV inhibitor, and CI-930, a PDE-III inhibitor | | no change | human | cell line | | Lewis et al. Agents Actions 1993 |
| 506 | the K+ channel blocker, charybdotoxin (ChTX) | | negative | human | PBMC | | Freedman et al. J Immunol 1992 |
| 507 | IL-4 in schistosomiasis mansoni | | positive | mouse | | | Yamashita et al. J Immunol 1992 |
| 508 | p21 ras | | positive | mouse | cell line | | Rayler et al. EMBO J 1992 |
| 509 | interactions between LFA-1/ICAM-1 | | positive | mouse | | | Reginald et al. Immunol Lett 1992 |
| 510 | factor VIII concentrates | | negative | mouse | | | Wadhwa et al. Br J Haematol 1992 |
| 511 | trypanosomiasis | | negative | mouse | spleen cell | restored by N-a spleen cell num | Calabresi et al. Int J Immunopharmacol 1992 |
| 512 | benzene via drinking water | | negative | mouse | | | Fan et al. Nihon Ika Daigaku Zasshi 1992 |
| 513 | FK506 and rapamycin | | negative | mouse | | | Hanke et al. Lymphokine Cytokine Res 1992 |
| 514 | Trypanosoma cruzi | | negative | mouse | | | Soong et al. J Immunol 1992 |
| 515 | Ly-6A/E | | positive | mouse | cell line | | Codias et al. J Immunol 1992 |
| 516 | B7 | | positive | human | cell line | | Norton et al. J Immunol 1992 |
| 517 | streptozotocin | | negative | mouse | | diabetes | Burkart et al. Int J Immunopharmacol 1992 |
| 518 | thymopentin (TP5) | | positive | mouse | | | Cillari et al. Int J Immunopharmacol 1992 |
| 519 | Theileria parva | | positive | | cell line | | Heussler et al. J Immunol 1992 |
| 520 | Substance P | | positive | human | cell line, PBMC | | Calvo et al. J Immunol 1992 |
| 521 | Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents | | negative | human | PBMC | | Anastassiou et al. J Immunol 1992 |
| 522 | cyclosporine-A | | negative | human | cell line | | Williams et al. J Immunol 1992 |
| 523 | surface sulphhydryl groups | | no change | human | PBMC | | Smith et al. Clin Exp Immunol 1992 |
| 524 | Schistosoma mansoni infection | | positive | mouse | | | Henderson et al. J Immunol 1992 |
| 525 | Cyclosporin A, FK506 | | negative | mouse | | | Mouzaki et al. Cytokine 1992 |
| 526 | IL-10 | | negative | human | PBMC | | Taga et al. J Immunol 1992 |
| 527 | The binding subunit of pertussis toxin | | negative | mouse | cell line | | O'Neill et al. J Immunol 1992 |
| 528 | Human chorionadotropin (hCG) and placental lactogen (hPL) | | negative | human | PBMC | | Schafer et al. J Perinat Med 1992 |
| 529 | Prostaglandin E2 (PGE2) | | negative | mouse | | | Marcinkiewicz et al. Folia Histochem Cytobio |
| 530 | Zinc Finger Protein | | negative | | | | Williams et al. Science 1991 |
| 531 | NF-kappa B, AP-1, AP-3, OCT-1, and NF-AT | | | human | | | Granelli-Piperno et al. J Immunol 1991 |
| 532 | Diltiazem | | positive | mouse | | Decreases Host | Meldrum et al. J Surg Res 1991 |
| 533 | Schistosoma mansoni infection | | no change | mouse | | | Henderson et al. J Immunol 1992 |
| 534 | Dihydrotestosterone | | no change | mouse | | | Araneo et al. Blood 1991 |
| 535 | Onchocerca volvulus infection | | negative | chimpanzee | | | Soboslay et al. J Immunol 1991 |
| 536 | FK-506, cyclosporin A, rapamycin | | negative | Human, Mouse | | | Henderson et al. Immunology 1991 |
| 537 | Cycloheximide | | positive | mouse | cell line | | Zubiaga et al. J Immunol 1991 |
| 538 | IL-4 | | positive | mouse | | | Tanaka et al. J Immunol 1991 |
| 539 | Trypanosoma cruzi infection | | negative | mouse | | | Nabors et al. J Immunol 1991 |
| 540 | calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) | | negative (VIP), n | mouse | spleen cell | | Boudard et al. J Neurosci Res 1991 |
| 541 | Schistosomiasis | | negative | mouse | | | Fidel et al. J Immunol 1991 |
| 542 | alpha 2-HS-glycoprotein | | negative | human | PBMC | | Jakab et al. Acta Physiol Hung 1991 |
| 543 | Schistosomiasis japonica | | negative | human | PBMC | | Li et al. J Tongji Med Univ 1991 |
| 544 | Intravesical BCG therapy | | no change | human | PBMC | | Hermann et al. Scand J Urol Nephrol 1991 |
| 545 | isopropinosine | | positive | mouse | spleen cell | | Milano et al. Int J Immunopharmacol 1991 |
| 546 | IL-1 | | positive | human | cell line | | Yagisawa et al. Immunology 1990 |
| 547 | Ly-6A/E | | negative | mouse | | | Codias et al. J Immunol 1990 |
| 548 | Schistosomiasis | | negative | mouse | | | Fidel et al. J Immunol 1990 |
| 549 | N-alpha-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK, chymotrypsin-type protease inhibitor) | | negative | human | cell line | | Auberger et al. Immunology 1990 |
| 550 | platelet-activating factor (PAF) | | positive | rat | spleen cell | | Pignol et al. J Immunol 1990 |
| 551 | Cyclosporin A | | negative | mouse | | | Randok et al. Embo j 1990 |
| 552 | CD4/L3T4 | | negative | mouse | | | Tamura et al. J Immunol 1990 |
| 553 | Monoclonal antibody specific for bovine CD 5 antigen | | positive | bovine | | | Letesson et al. Vet Immunol Immunopathol 1 |
| 554 | IL-1 | Protein kinase C | positive | mouse | cell line | | Macchia et al. Mol Cell Biol 1990 |
| 555 | local BCG immunotherapy | | positive | human | urine | | Bohle et al. Cytokine 1990 |
| 556 | CD1 | | positive | human | cell line | | Theodorou et al. J Immunol 1990 |
| 557 | thymic humoral factor (THF-gamma 2) | | positive | human | UCBL | | Ben-Hur et al. Immunopharmacol Immunotox |
| 558 | trauma-induced glycopeptide | | negative | human | PBMC | | Tompkins et al. Immunol Lett 1990 |
| 559 | Cyclosporin A | | negative | mouse | | | Kasaian et al. J Immunol 1990 |
| 560 | protein kinase C | | negative | human | tonsillar lymphocytes | | Ohmura et al. Int Immunol 1990 |
| 561 | alpha-thioglycerol | | positive | mouse | cell line | | Kubbles et al. Lymphokine Res 1990 |
| 562 | Beta-endorphin | | positive | mouse | cell line | | Bessler et al. Immunopharmacology 1990 |
| 563 | cis-urocanic acid (cis-UCA) | | negative | human | PBMC | | Rasanen et al. Photodermatol 1989 |
| 564 | NF-kB, tax-1 | | positive | human, mouse | cell line | | Shibuya et al. Nucleic Acids Res 1989 |
| 565 | polyunsaturated fatty acids (palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (cis-18:2), linoleic acid (trans-18:2), and arachidonic acid (20:4)) | protein kinase C | positive | human | PBMC | | Szamel et al. J Immunol 1989 |
| 566 | IL-6 IL-1 | | positive | mouse | | | Holsti et al. J Immunol 1989 |
| 567 | CD45R | | positive | human | thymocyte | | Deans et al. J Immunol 1989 |
| 568 | Unsaturated fatty acid (oleic acid) | | negative | mouse | | | Yang et al. Immunology 1989 |
| 569 | Ultraviolet radiation | | negative | mouse | | | Araneo et al. J Immunol 1989 |
| 570 | IL-2 | | negative | human | PBMC | | Kradin et al. J Clin Immunol 1989 |

Appendix 2.Phase 2 validation studyの結果

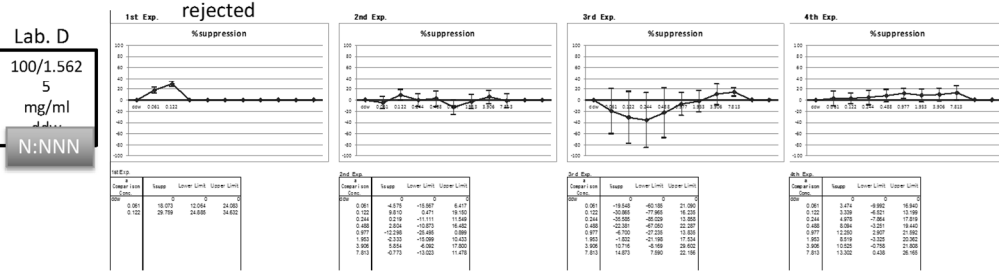
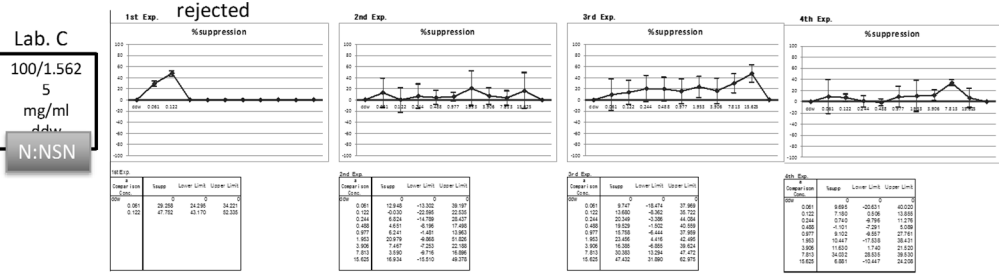
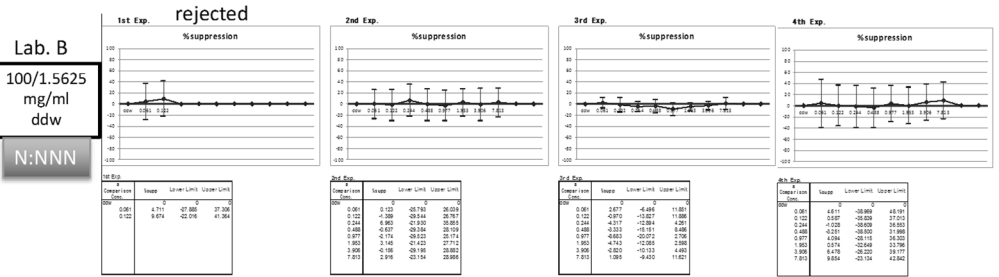
Phase II Chem.1

Lab. B

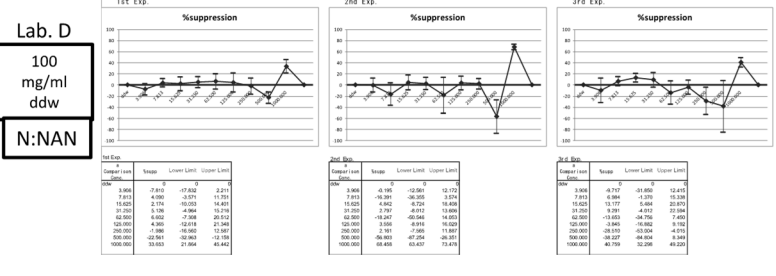
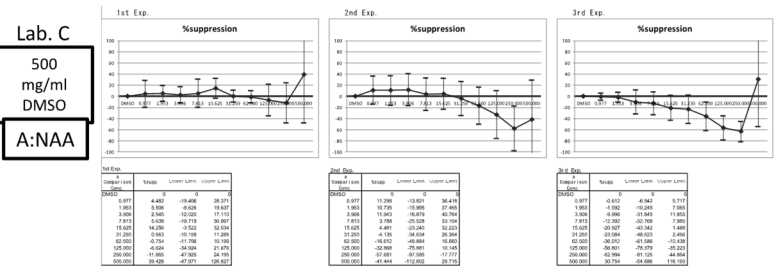
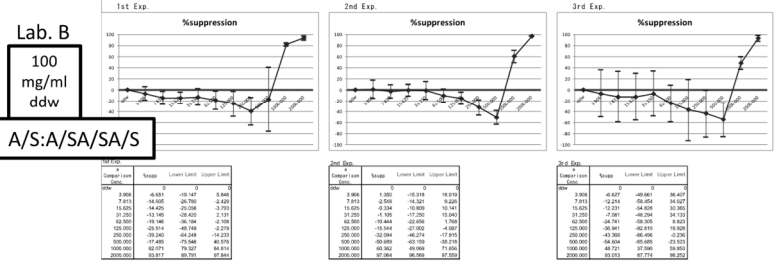
25 mg/ml ddw
N:NNN



Phase II Chem.3



Phase II Chem.4

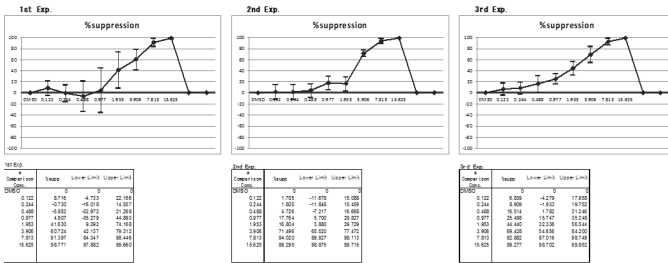


Phase II Chem.5

Lab. B

62.5 mg/ml DMSO

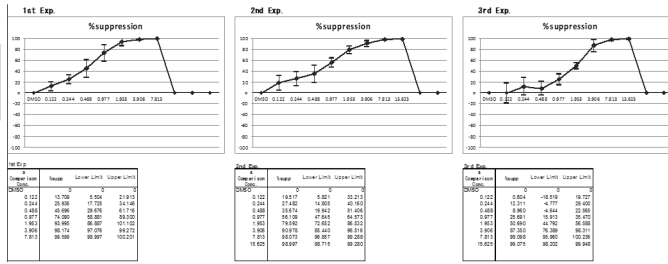
S:SSS



Lab. C

125/62.5 mg/ml DMSO

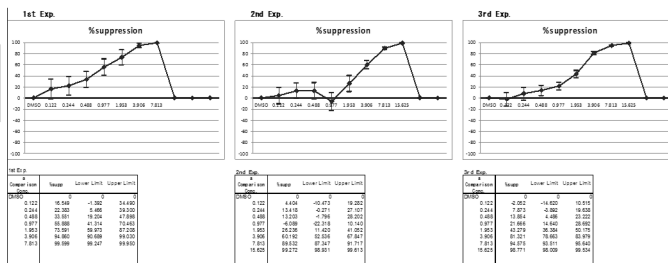
S:SSS



Lab. D

125/62.5 mg/ml DMSO

S:SSS

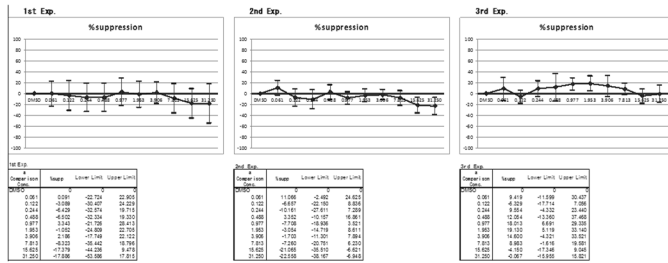


Phase II Chem.6

Lab. B

31.25 mg/ml DMSO

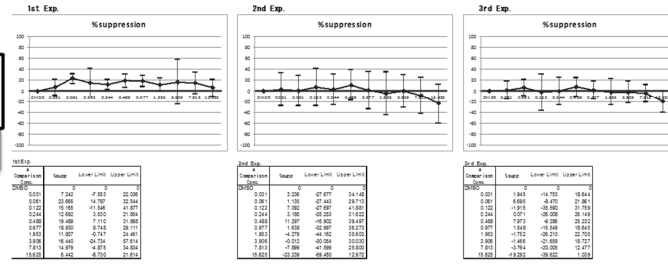
N:NNN



Lab. C

15.625 mg/ml DMSO

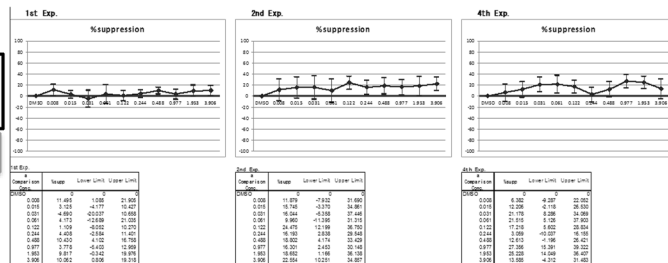
N:NNN



Lab. D

3.90625 mg/ml DMSO

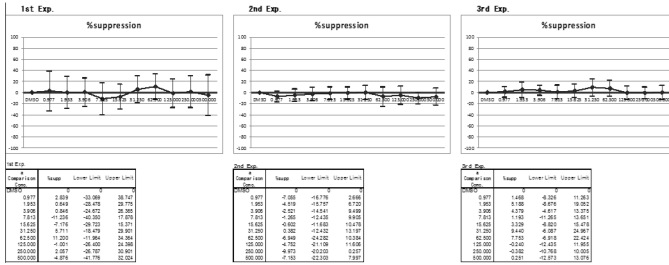
N:NNN



Phase II Chem.7

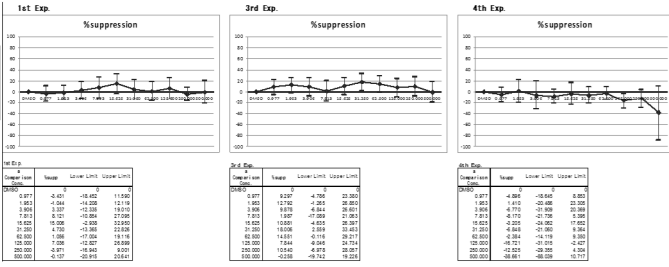
Lab. B

500 mg/ml
N:NNN



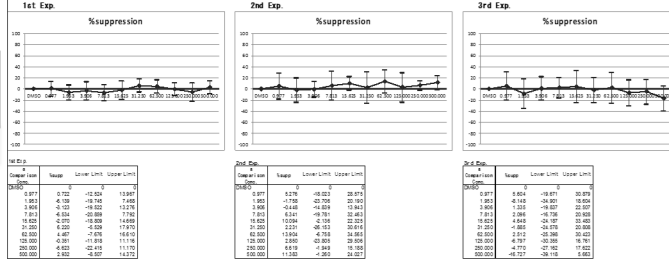
Lab. C

500 mg/ml
DMSO
N:NNN



Lab. D

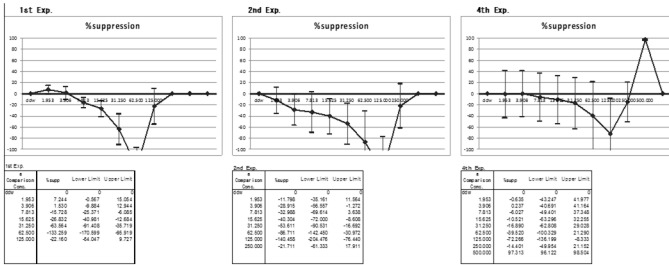
500 mg/ml
DMSO
N:NNN



Phase II Chem.8

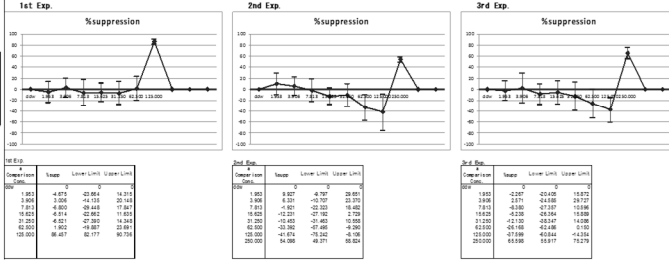
Lab. B

100/50 mg/ml
ddw
A:AAA



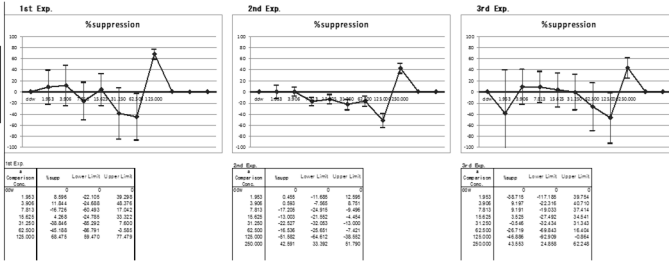
Lab. C

100/50 mg/ml
ddw
A:AAA



Lab. D

100/50 mg/ml
ddw
A:AAA

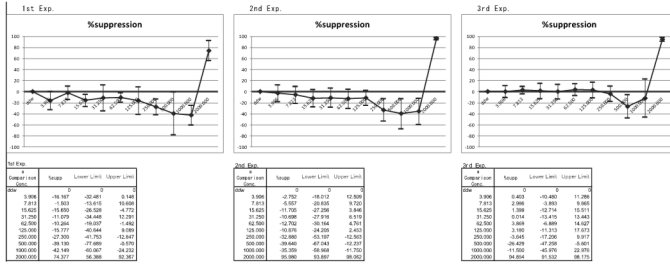


Phase II Chem.15

Lab. B

100 mg/ml ddw

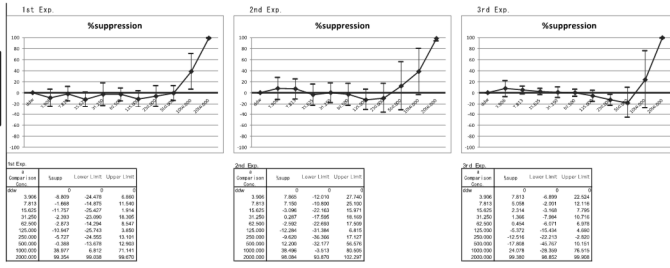
A:AAN



Lab. C

100 mg/ml ddw

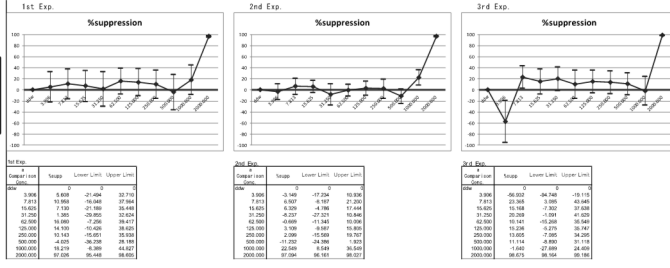
S:SSS



Lab. D

100 mg/ml ddw

S:SSN

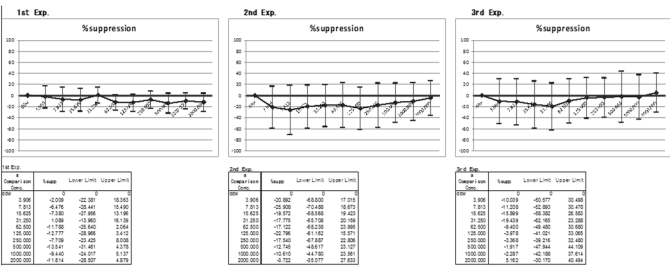


Phase II Chem.16

Lab. B

100 mg/ml ddw

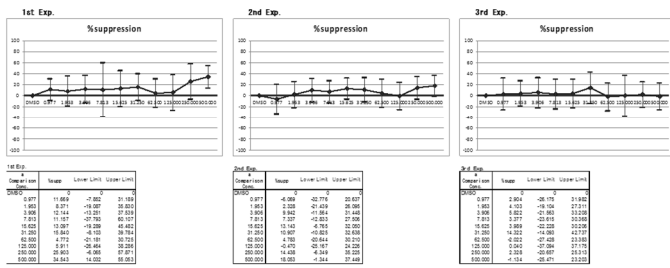
N:NNN



Lab. C

500 mg/ml DMSO

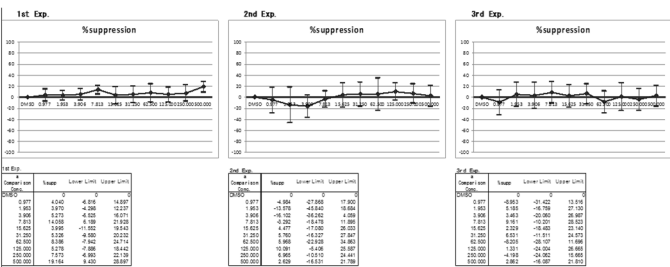
N:NNN



Lab. D

500 mg/ml DMSO

N:NNN

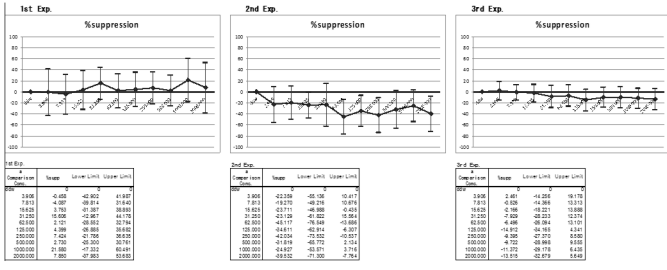


Phase II Chem.17

Lab. B

100 mg/ml ddd

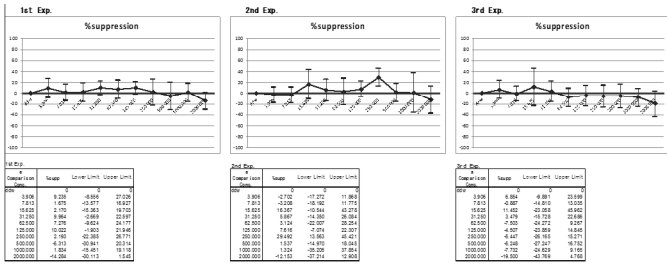
N:NNN



Lab. C

100 mg/ml ddd

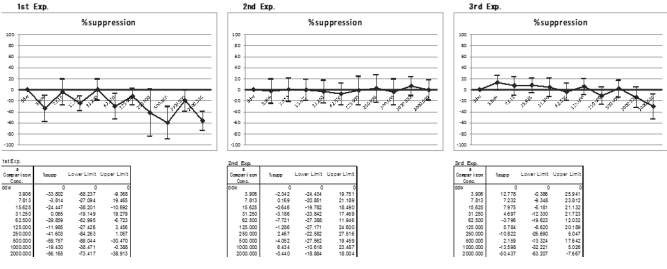
N:NNN



Lab. D

100 mg/ml ddd

N:ANN

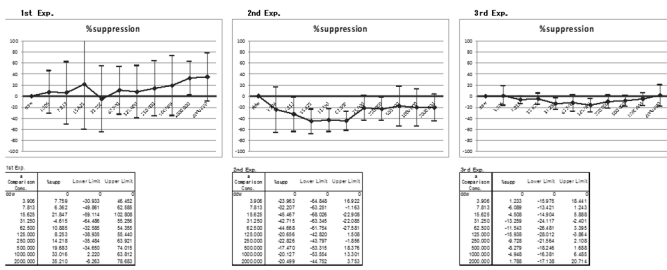


Phase II Chem.18

Lab. B

100 mg/ml ddd

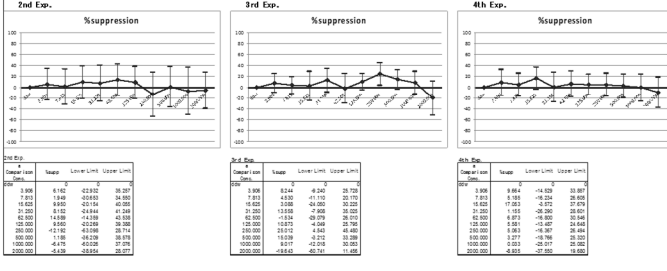
N:NN



Lab. C

100 mg/ml ddd

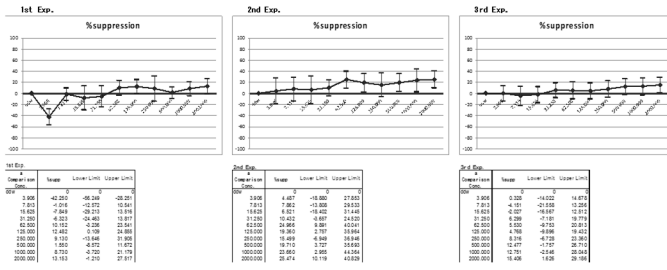
N:NNN



Lab. D

100 mg/ml ddd

N:NNN

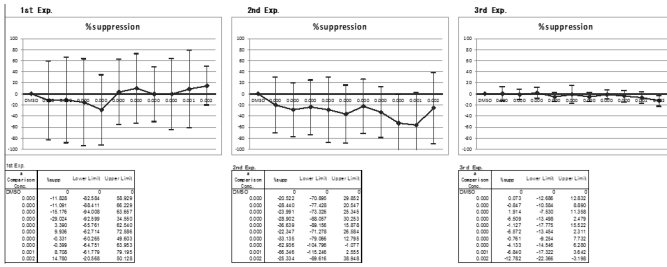


Phase II Chem.19

Lab. B

0.0019 mg/ml DMSO

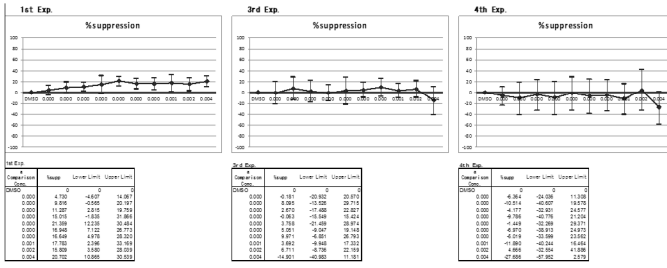
N:N:AN



Lab. C

0.0038 mg/ml DMSO

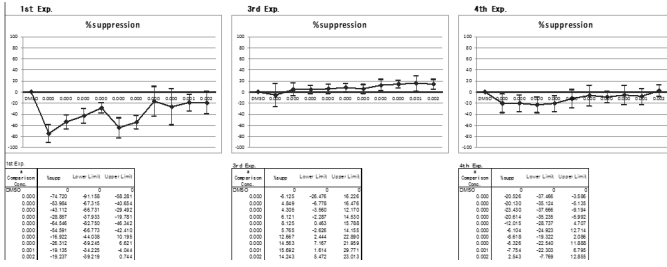
N:NNN



Lab. D

0.0019 mg/ml DMSO

N:ANN

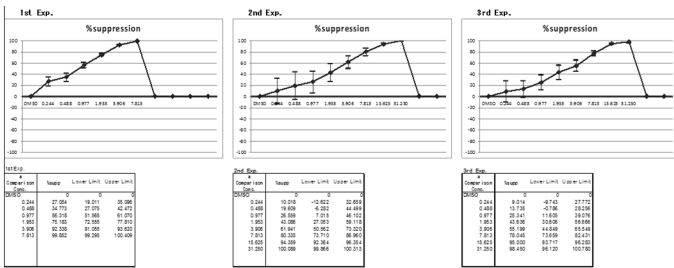


Phase II Chem.20

Lab. B

500/125 mg/ml DMSO

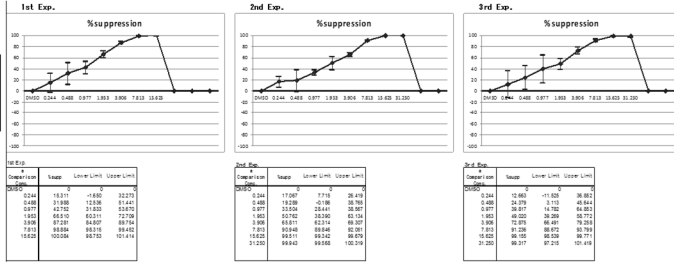
S:SSS



Lab. C

250/125 mg/ml DMSO

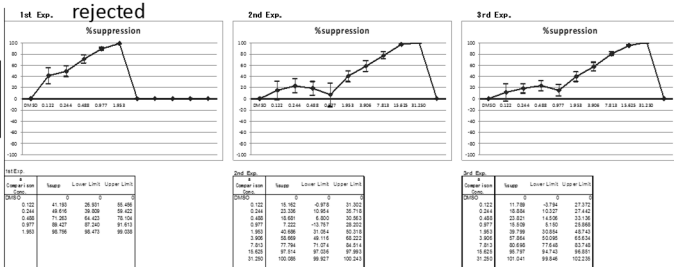
S:SSS



Lab. D

500/62.5 mg/ml DMSO

S:SSS



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-------------------|----------|---------|------|
| Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., <u>Aiba, S.</u> | 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 | | |
| <u>Aiba, S.</u> , Kimura, Y. | In vitro test methods to evaluate the effects of chemicals on innate and adaptive immune responses. | Curr Opin Toxicol | 5 | 6-12 | 2017 |
| Hidaka, T., Ogasawara, E., Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., <u>Aiba, S.</u> , 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 | 18 | 64-73 | 2017 |
| Asano, M., Yamasaki, K., Yamachi, T., Terui, T., <u>Aiba, S.</u> | Epidermal iron metabolism for iron salvage. | J Dermatol Sci | 87 | 101-109 | 2017 |
| Fujimura, T., Kamabayashi, Y., Furudate, S., Kakizaki, A., Hidaka, T., <u>Aiba, S.</u> | 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 | 176 | 387-394 | 2017 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------|-----|-----------|------|
| 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 | 86 | 198-205 | 2017 |
| 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 | 137 | 2639-2642 | 2017 |