

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27年度～平成29年度 総合研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成 30 ( 2018 ) 年 5 月

## 目 次

I . 総合研究報告書	
免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ向けての検討 相場節也（東北大学病院・皮膚科・教授）	3
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 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）	35
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，validation 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）	55
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 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）	69
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 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）	89
5 . 免疫毒性評価試験法Multi-ImmunoTox assayの国際validationへ向けての検討：Multi-ImmunoTox assayにおけるデータ解析方法の検討 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）	123
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 木村 裕（東北大学病院・皮膚科・助教）	138
III . その他	
資料 Appendix 1 IL-2の転写、產生に関与する化学物質、シグナル伝達物質についての文献情報	204
資料 Appendix 2 Phase 1 validation studyの結果	211
資料 Appendix 3 Phase 2 validation studyの結果	219
IV . 研究成果の刊行に関する一覧表	229

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

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

研究代表者 相場 節也 東北大学病院皮膚科教授

## 研究要旨

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

平成 27 年度は、Multi-ImmunoTox assay (MITA)を用いて更に data set の拡充をはかり合計で 60 化学物質からなる data set を構築した。そのなかで、皮膚感作性物質の多くが LPS で刺激した THP-G8 細胞の IL-8 転写活性を抑制することを見いだし、従来の MITA では単球/樹状細胞に抑制的に作用する免疫抑制物質と皮膚感作性物質を区別できない事が明らかとなつた。そこで従来法の MITA に、これまで我々が進めてきた皮膚感作性物質試験法である IL-8 Luc assay を加えた modified MITA (mMITA)を構築した。そこで平成 29 年度までに、免疫抑制剤、免疫毒性が明らかな化学物質を含む 60 種類の化学物質を Multi-ImmunoTox assay (MITA)を用いて評価し、MITA の data set を構築した。その中で、PMA/Io 刺激存在下の IL-2, IFN- $\gamma$  転写活性抑制と LPS 存在下の IL-1 $\beta$ 、IL-8 転写活性抑制のみを評価する従来の MITA に加えて、皮膚感作性試験である IL-8 Luc assay を組み合わせることで化学物質の免疫毒性がより正確に評価できることを見いだした。具体的には、化学物質の IL-2、IL-8 転写活性を抑制する最低濃度 (Lowest observed effect level ; LOEL)および IL-8 Luc assay の結果を組み合わせることで MITA により免疫毒性化学物質が 6 種類のクラスターに分類できることを明らかにした。それらの Cluster は以下の様な特徴を有していた。Cluster 1: IL-8 転写活性のみ抑制物質、Cluster 2: IL-2 転写活性抑制、感作性物質、Cluster 3: 感作性物質、Cluster 4: 陰性物質、Cluster 5: IL-2, IL-8 転写活性抑制物質、Cluster 6: IL-2 転写活性のみ抑制物質 2) OECD テストガイドライン化に向けての IL-2 転写活性抑制評価試験の国際バリデーション Phase 1, Phase 2 を行った。

### 2) AOP の作成 :

平成 27 年度から 28 年度にかけて、IL-2 転写活性抑制と IL-8 転写活性増強の 2 つを key event とする adverse outcome pathway (AOP)を作成した。前者では、dimethylthiocarbamate (DTC) の NF- $\kappa$ B 抑制、AG-018986 の p38 MAPK 抑制、メチル水銀( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ )の ERK1/2 抑制、Propanil (3,4-dichloropropionanilide (DCPA) の STIM1、CRAC を介した NFAT 抑制、鉛の calmodulin を介した NFAT 抑制を組み込んだ AOP が作成できた。また後者では、diesel exhaust particle (DEP)、フォルマリン、PM2.5 さらには界面活性剤による IL-8 転写活性亢進作用と adverse outcome としての気道刺激性を組み込んだ AOP を作成した。IL-2 転写活性抑制と IL-8 転写活性抑制の 2 つを key event とする AOP を作成した。

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

平成 28 年 9 月 13 日に国内外から免疫毒性の専門家を交えた免疫毒性評価系国際化へ向けての kick-off meeting を仙台にて開催し、MITA の科学的意義、作成した AOP の改良、試験法プロトコルの妥当性などについて議論した。その後、まず IL-2 レポーター活性抑制物質評価にかかる技術移転性確認を目的とした 3 施設での施設間差比較試験(Phase 0)を実施した。平成 28 年度後半に行つた国際バリデーション実行委員会の承認を得た後に Phase 1 study(施設内、施設間再現性確認試験)を実

施した。平成 29 年 2 月 3-5 日、京都にて開催された第 2 回国際バリデーション実行委員会会議にて Phase I の結果が了承され、Phase II 試験を実施した。Phase II の結果は、平成 29 年 11 月 18-19 日、大阪にて開催された第 3 回国際バリデーション実行委員会会議および平成 30 年 3 月 29 日に Skype にて行われた国際バリデーション実行委員会会議にて検討された。その間、統計解析手法の改良も行われ、最終的に Phase I、II のいずれの結果も施設間再現性、施設内再現性が study plan に記載された基準 80% を上まわった。

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

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名
小島 肇・国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・第二室長
近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究部門長
山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所・研究開発部・部長
中島 芳浩・産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長
大森 崇・神戸大学医学部附属病院・臨床研究推進センター・特命教授
木村 裕・東北大学病院・皮膚科・助教

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て評価する試験系の開発が不可欠である。

我々は、平成18-22年NEDO「高機能簡易型有害性評価手法の開発」プロジェクトにおいて、産業総合研究所が開発した3色発光細胞の技術を応用し、Jurkat細胞におけるINF- $\gamma$ 、IL-2、G3PDHプロモーター活性、THP-1細胞におけるIL-8、IL-1 $\beta$ 、G3PDHプロモーター活性をhigh throughputに評価できる長期細胞株を樹立し、化学物質の免疫毒性多項目評価システム(Multi-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- $\gamma$ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 $\beta$ とIL-8の転写に関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)、サイクロスルホリン(CyA)、タクロリムス(Tac)のT細胞とマクロファ

## 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

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のみによる分類では、免疫抑制物質中に感作性物質が含まれてしまうことが明らかとなり皮膚感作性試験法IL-8 Luc assayとMITAを組み合わせたmodified MITAを構築し、IL-8 Luc assayの評価結果もdata setに追加した。また、そのdata setを基に化学物質のclusteringを行い、化学物質が免疫毒性のprofileの違いにより6つのグループに分類できることを示した。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評価系およびデータベース構築 (研究代表ならびに分担者(木村))
- 4) 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

#### 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

L-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, Levamizol, Isoniazid, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin(Io), Lipopolysaccharides from E. coli 026:B6 (LPS), 2,4-Diaminotoluene, 2-Aminoanthracene, 2-Mercaptobenzothiazole, Amphotericine 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- $\gamma$ , GAPDHプロモーターAssayおよびTHP-1 単球細胞由来TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞におけるIL-1 $\beta$ , IL-8, GAPDHプロモーターAssay(図2)

IL-2およびIFN- $\gamma$ プロモーター活性の測定には、ヒトリンパ芽球性白血病由来細胞株JurkatにIL-2プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子(緑色に発色)、IFN- $\gamma$ プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子(橙色に発色)、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子(赤色に発色)を導入した#2H4細胞を用いた[2]。またIL-1 $\beta$ プロモーター活性の測定には、ヒト急性単球性白血病由来細胞株THP-1にIL-1 $\beta$ プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子、GAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTGCHAC-A4細胞を、IL-8プロモーター活性の測定には、THP-1にIL-8プロモーターに制御されたSLOルシフェラーゼ遺伝子およびGAPDHプロモーターに制御されたSLRルシフェラーゼ遺伝子を導入したTHP-G8細胞を用いた[3]。なおTGCHAC-A4細胞の樹立には人工染色体技術[4]を用い細胞の安定性を確保した。1ウェル当たり $2 \times 10^5$ 個の#2H4細胞または1ウェル当たり $5 \times 10^4$ 個のTGCHAC-A4細胞またはTHP-G8細胞を黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)に播種し、薬剤を加え、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で1時間培養した。つづいて#2H4細胞については25nM PMAと1 $\mu$ M Ioの混合物(PMA/Io)、TGCHAC-A4細胞、THP-G8細胞については100ng/ml LPSで刺激し37°C、5%CO<sub>2</sub>下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent(TOYOBO)を混合し、室温で10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性

を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量(SLG-luciferase activity(SLG-LA)、SLO-luciferase activity(SLO-LA)、SLR-luciferase activity(SLR-LA))を検出した。また細胞数の違いや各種刺激後の生存率の違いを勘案しSLG-LA、SLO-LAをSLR-LAで除することによりそれぞれnormalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)、normalized SLO-luciferase activity(nSLO-LA)を算出した。さらに以下の式に% suppression抑制率を計算した。

$$\% \text{ suppression} = (1 - \frac{\text{nSLG-LA}}{\text{nSLO-LA}}) \times 100$$

### MITAによる免疫毒性評価法

各実験において得られた結果は、一元配置分散分析を行い、その後 Dunnett 検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を3回繰り返し検討すると、3回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3回の繰り返し実験の結果のなかから% suppression の絶対値(免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる)が最も大きい値を選び Student's t-testを行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした(図3)。

### Phase 0 study

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

### Phase 1 study

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

行った。

### Phase 2 study

国際バリデーション実行委員会にて選定した20化学物質をコード化し、参加3施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松においてMulti-ImmunoTox Assay protocol Ver.009.1Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。

### 国際バリデーション実行委員会

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

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

平成29年度第3回：2017年11月18-19日、大阪にて第3回国際バリデーション実行委員会会議を行った。(参加者：小島肇、足利太可雄、S.Venti、相場節也、木村裕、大森崇、小林眞弓、安野理恵、山影康次、渡辺美香、小林美和子、中島芳浩、Emanuela Corsini、Erwin L. Roggen、Dori Germolec、Tomoaki Inoue)

平成29年度第4回：2018年3月29日20:00より国際バリデーション実行委員会会議をスカイプにて行った。(参加者：小島肇、足利太可雄、相場節也、木村裕、Emanuela Corsini、Erwin L. Roggen、Dori Germolec、Tomoaki Inoue)

### (倫理面への配慮)

健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- $\gamma$ 、IL-1、IL-8 の転写抑制活性に作用を及ぼす最低濃度 (Lowest observed effect level; LOEL)を決定した。WHO Guidance の Case-Studies に含まれる化学物質に関しては、MITA は鉛の免疫抑制、水銀による IFN- $\gamma$ レポーター活性増強作用を、また DEP、FA の Th1 サイトカインである IL-2 レポーター活性抑制作用を検出できた。

#### 2) MITA の問題点

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

#### 3) Modified MITA の構築 (Table 2)

そこで従来の MITA に、すでに OECD テストガイドライン(442E)に承認されている IL-8 Luc assay を組み合わせることにした(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 の結果とは相關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 の相關

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

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

### 5) IL-2、IFN- レポーター活性LOELの相関

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

### 6) MITAによる免疫毒性化学物質のclustering

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

## MITAのパラメーターをkey eventとする AOPの作成

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

IL-2 レポーター活性が、MITA で評価可能な T 細胞関連因子の中では最も多くの化学物質で抑制されること、また多くの化学物質で IFN- $\gamma$  レポーター活性と相関が認められることより IL-2 レポーター活性を KE とした AOP を構築することとした。IL-2 はおもに Th1 細胞が分泌するサイトカインであるが、T 細胞の増殖に必須なばかりでなく、IL-12R $\beta$ 2、IL-4Ra4、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的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涉猟し、570 の化学物質に関して Appendix Table 1 を作成した。さらに Appendix Table 1 をもとに、IL-2 転写活性抑制(図 8 )ならびに増強(図 9 )を key event とした T 細胞分化異常誘導の AOP を充実させた。

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

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

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

作成したIL-2転写活性障害をkey eventとしたT細胞分化異常誘導に関するAOPに基づき、MITAを

構成する2H4細胞を用いたIL-2転写活性障害を指標としたT細胞分化異常誘導化学物質評価系のvalidation試験を以下の方法で実施した。1) Phase 0 study

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

- PMA/Ioおよび選択抗生剤であるハイグロマインシンの調製方法を変更した。
- 細胞を調製する際の遠心速度を変更した。

このプロトコールの変更の結果前述の施設でも反応性が認められるようになった。

その他、参加施設および神戸大学とプロトコールを検討し以下の変更を行った。

- acceptance criterionをnSL0-LA>3とした。
- 化学物質が揮発性を持つことを想定しインキュベート中にプレート上面をシールで覆うこととした。
- 新しいクライテリア（クライテリア2、3）
- として、繰り返し実験から得られる測定値を用いて実験間の違いを調整する新しい判定方法が提案され従来のクライテリア（クライテリア1）と並存されることとした。  
(図11, 12)

## 2) Phase 1 study (Appendix 1)

国際バリデーション実行委員会にて選定した5化学物質についてコード化し、参加3施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松においてMulti-ImmunoTox Assay protocol Ver.008.5Eにのっとり各物質3回1セットからなる試験を3セ

ット行い施設内、施設間再現性を評価した。

クライテリア1では施設内再現性が93%，施設間再現性が80%、クライテリア2では施設内再現性が80%，施設間再現性が80%、クライテリア3では施設内再現性が73%，施設間再現性が80%であった。クライテリア1において各施設の施設内再現性、施設間再現性ともに80%以上というstudy planの基準を満たしたことからクライテリア1を採用しPhase II試験を行う方針とした。しかし、判定において濃度依存性を考慮すべきとの意見を踏まえクライテリア3を下記のように改訂しPhase II試験において使用することとした。

「%suppressionを使用したDunnet試験で、2濃度以上連続した正の統計的に有意な点が存在、または3濃度以上で正での増加を伴う正の統計的に有意な点が存在すればImmunosuppression, 2濃度以上連続した負の統計的に有意な点が存在、または3濃度以上で負での減少を伴う負の統計的に有意な点が存在すればImmunoaugmentationと判定する。それ以外の結果をNo effectとする。」(クライテリア3')(図13)

## 3) Phase 2 study (Appendix 2)

国際バリデーション実行委員会にて選定した20化学物質をコード化し、参加3施設、産総研つくば、食薬センター、産総研高松においてMulti-ImmunoTox Assay protocol Ver.009.1Eにのっとり各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行い施設間再現性を評価した。

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

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

Phase 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

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

また、今年度は、MITAとIL-8 Luc assayを組み合わせたmMITAを構築した。MITA、IL-8 Luc assayいずれも反応時間が短く、さらにluciferase assayを用いる評価系であり、mMITAもhigh throughput assayに適している。したがって、現在、社会に存在する数万ともよばれる化学物質の免疫毒性を評価するの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。まだ、評価委員から最終コメントを頂いていないが、少なくとも施設内、施設間再現性に関しては、不足のない結果であった。

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

### E. 結論

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

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

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

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

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

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

### 引用文献

- [1] Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi

- T, Aiba S: Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol In Vitro* 28: 759-768, 2014.
- [2] Saito R, Hirakawa S, Ohara H, Yasuda M, Yamazaki T, Nishii S, et al.: Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254: 245-255, 2011.
- [3] Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, et al.: An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124: 359-369, 2011.
- [4] Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, et al.: Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 280-290, 2004.
- [5] Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123: 758-762, 2009.
- [6] Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ: Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 12: 551-559, 2011.
- 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

## 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

- of Muse Cells for Regenerative Medicine of Skin: Procedures to Reconstitute Skin with Muse Cell-Derived Keratinocytes, Fibroblasts, and Melanocytes. *J Invest Dermatol* 2017. 137, 2639-2642.
8. Fujimura, T., Kakizaki, A., Furudate, S., Kambayashi, Y., Aiba, S. Tumor-associated macrophages in skin: How to treat their heterogeneity and plasticity. *J Dermatol Sci* 2016. 83, 167-173.
  9. Tsutsumi, M., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M. Abnormal Morphology of Blood Vessels in Erythematous Skin From Atopic Dermatitis Patients. *Am J Dermatopathol* , 2016. 38, 363-364.
  10. Tsutsumi, M., Kitahata, H., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Aiba, S., Nagayama, M., Denda, M. Numerical and comparative three-dimensional structural analysis of peripheral nerve fibres in epidermis of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* , 2016. 174, 191-194.
  11. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Kakizaki, A., Hidaka, T., Asano, M., Aiba, S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol* 2016. 25, 397-399.
  12. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Kakizaki, A., Furudate, S., Aiba, S. RANKL expression is a useful marker for differentiation of pagetoid squamous cell carcinoma in situ from extramammary Paget disease. *J Cutan Pathol* , 2016. 43, 772-775.
  13. Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Nishikawa, R., Nishigori, C., Aiba, S. Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line. *Br J Dermatol* 2016. 175, 979-987.
  14. Oeda, S., Hirota, M., Nishida, H., Ashikaga, T., Sasa, H., Aiba, S., Tokura, Y., Kouzuki, H. Development of an in vitro photosensitization test based on changes of cell-surface thiols and amines as biomarkers: the photo-SH/NH(2) test. *J Toxicol Sci* 2016. 41, 129-142.
  15. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 2015. 29, 1816-1830.
  16. Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol* 2015. 135, 2884-2887.
  17. Kambayashi, Y., Fujimura, T., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A., Aiba, S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand

- on Dermal Macrophages. *J Invest Dermatol* 2015;135, 2547-2550.
18. Watanabe, M., Kurai, J., Minato, S., Noma, H., Sano, H., Saito, R., Aiba, S., Oshimura, M., Hatakeyama, K., Yamasaki, A., Shimizu, E. Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan. *J Med Invest* 2015; 62, 145-148.
19. Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E. Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8. *Int J Environ Res Public Health*, 2015; 12, 14229-14243.
20. Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Saito, R., Abe, S., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Yamasaki, A., Shimizu, E. Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *Biomed Res Int*, 2015; 2015, 583293.
21. Yu, Z., Ono, C., Aiba, S., Kikuchi, Y., Sora, I., Matsuoka, H., Tomita, H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. *Glia*, 2015; 63, 257-270.
- the results of validation studies. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 2) Aiba S. et al. A novel *in vitro* assay for sensitizers in purely aqueous system: the modified IL-8 Luc assay using X-VIVO<sup>TM</sup> 15 as a solvent. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 3)木村裕他 : Multi-ImmunoTox Assay (MITA) データセットの作成およびバリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第30回大会 (東京) 2017年11月
- 4)相場節也他 : DMSOを用いない*in vitro*感作性試験 日本動物実験代替法学会 第30回大会 (東京) 2017年11月
- 5)相場節也 : 学会賞受賞講演 IL-8 Luc assay (OECD TG 442E)の開発 日本動物実験代替法学会 第30回大会 (東京) 2017年11月
- 6)相場節也 : 細胞表面SH基修飾を指標とした免疫感作性評価. 日本薬物動態学会第31回年会 (松本) 2016年10月13日
- 7)木村裕、相場節也: 試験法ワークショップ「IL-2転写活性抑制をkey eventとするT細胞分化異常誘導に関するAOP」第23回日本免疫毒性学会学術年会 (北九州) 2016年9月
- 8) Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Aiba, S. An interleukin-8 reporter cell line, THP-G8, can evaluate anti-TNF- $\alpha$  neutralizing activity of patients' sera and predict drug effectiveness during anti-TNF- $\alpha$  antibody therapy. 23rd World Congress of Dermatology. Vancouver, Canada June 2015,
- 9)相場節也 : 皮膚感作性および免疫毒性のadverse outcome pathway (AOP). 日本動物実

## 2 . 学会発表

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

## H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

特願2010-151362; PCT/JP2011/65090

### 3. その他

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

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

図1. 研究計画



図2 . Multi-ImmunoTox assay (MITA)

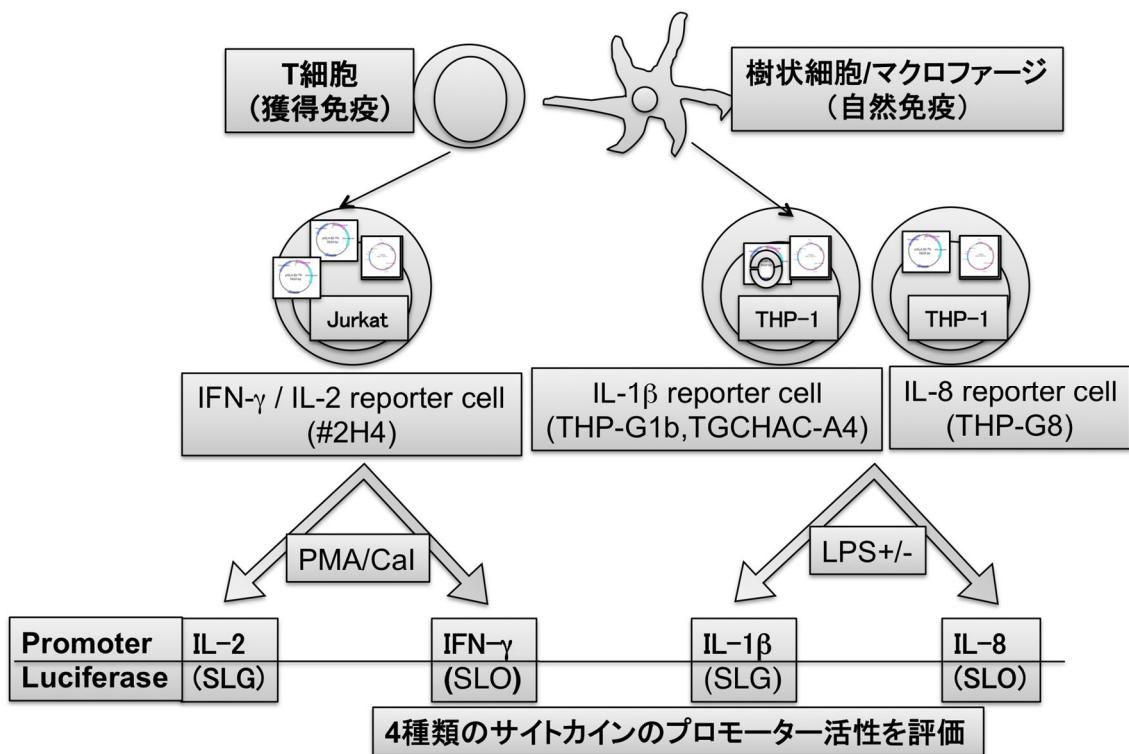


図3 . MITA の判定基準 (Criteria 1)

### Criteria 1

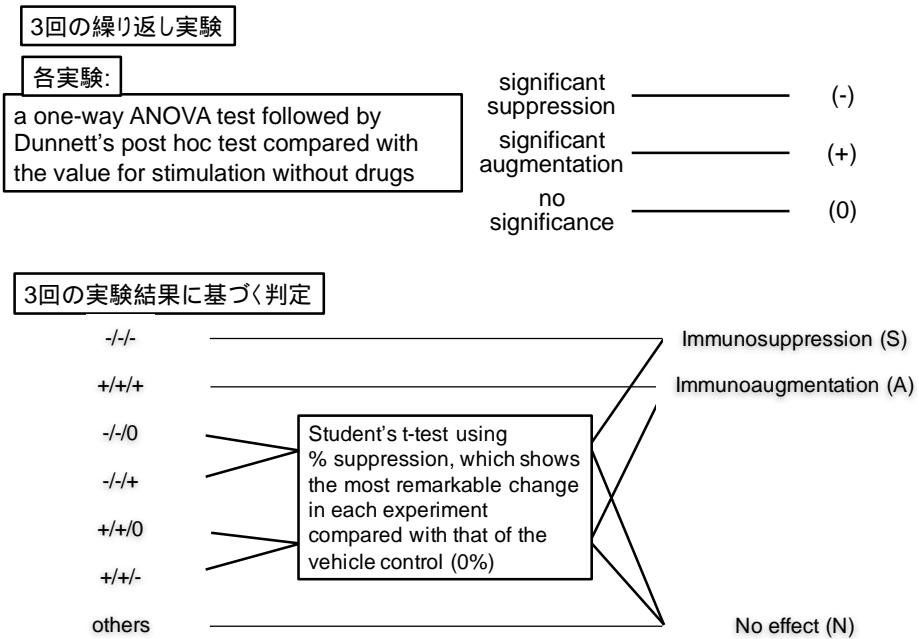


図4 . MITA パラメータの LOEL 値の相関

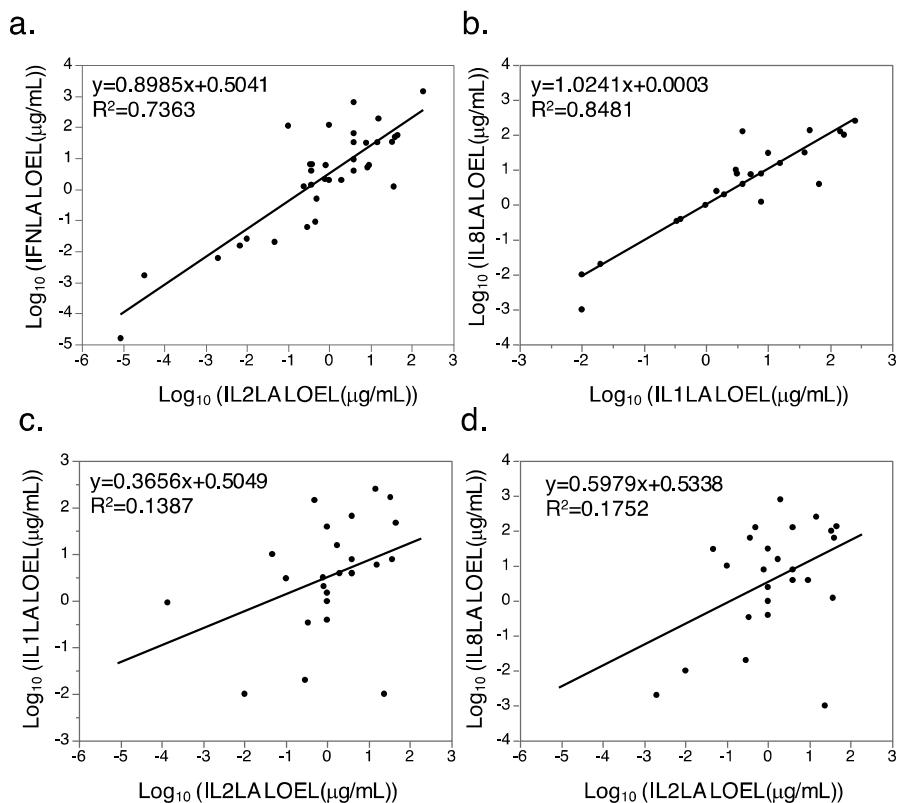


図5. 60化学物質のhierarchical clustering

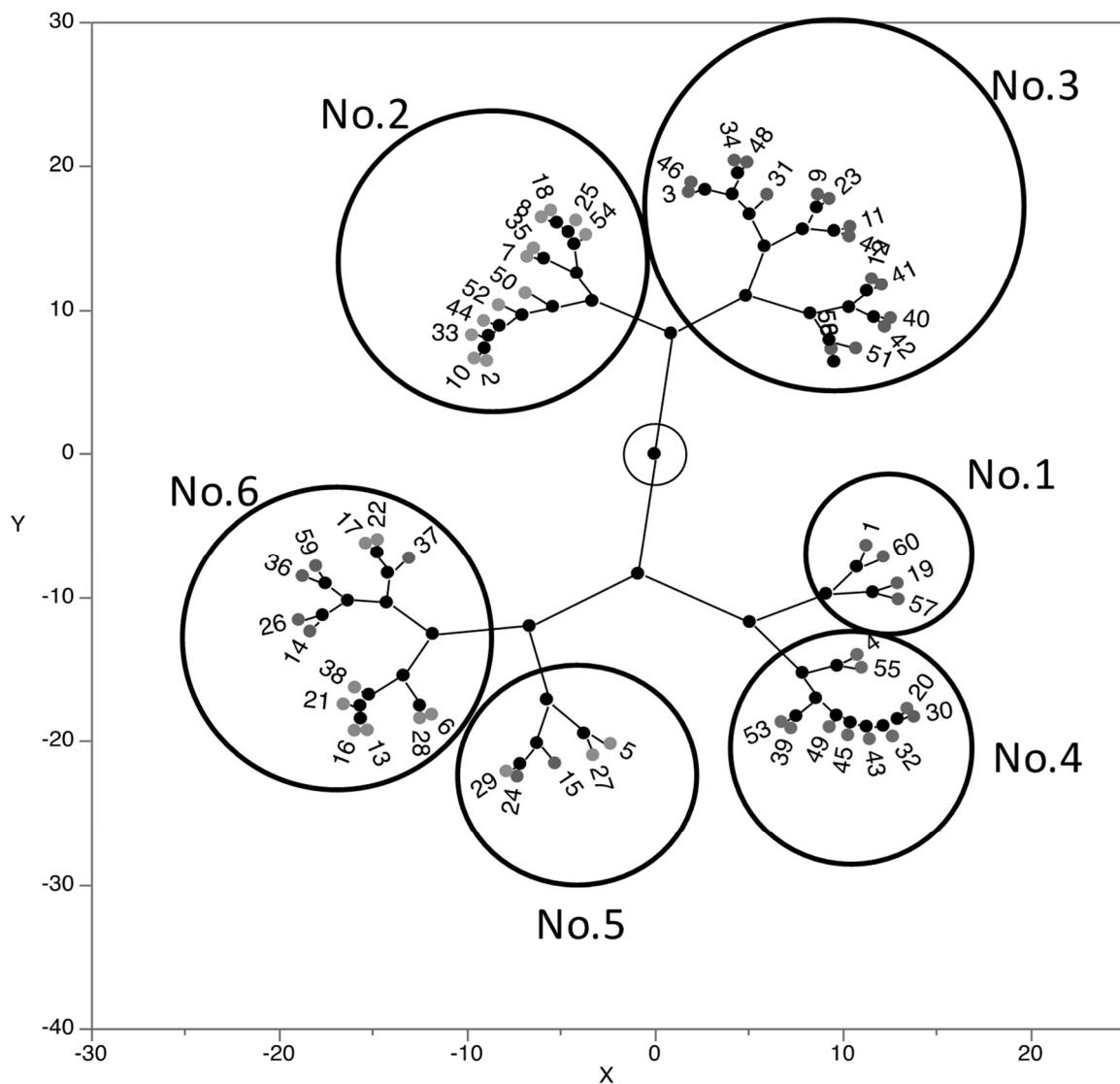


図6. 60化学物質のK-means clustering

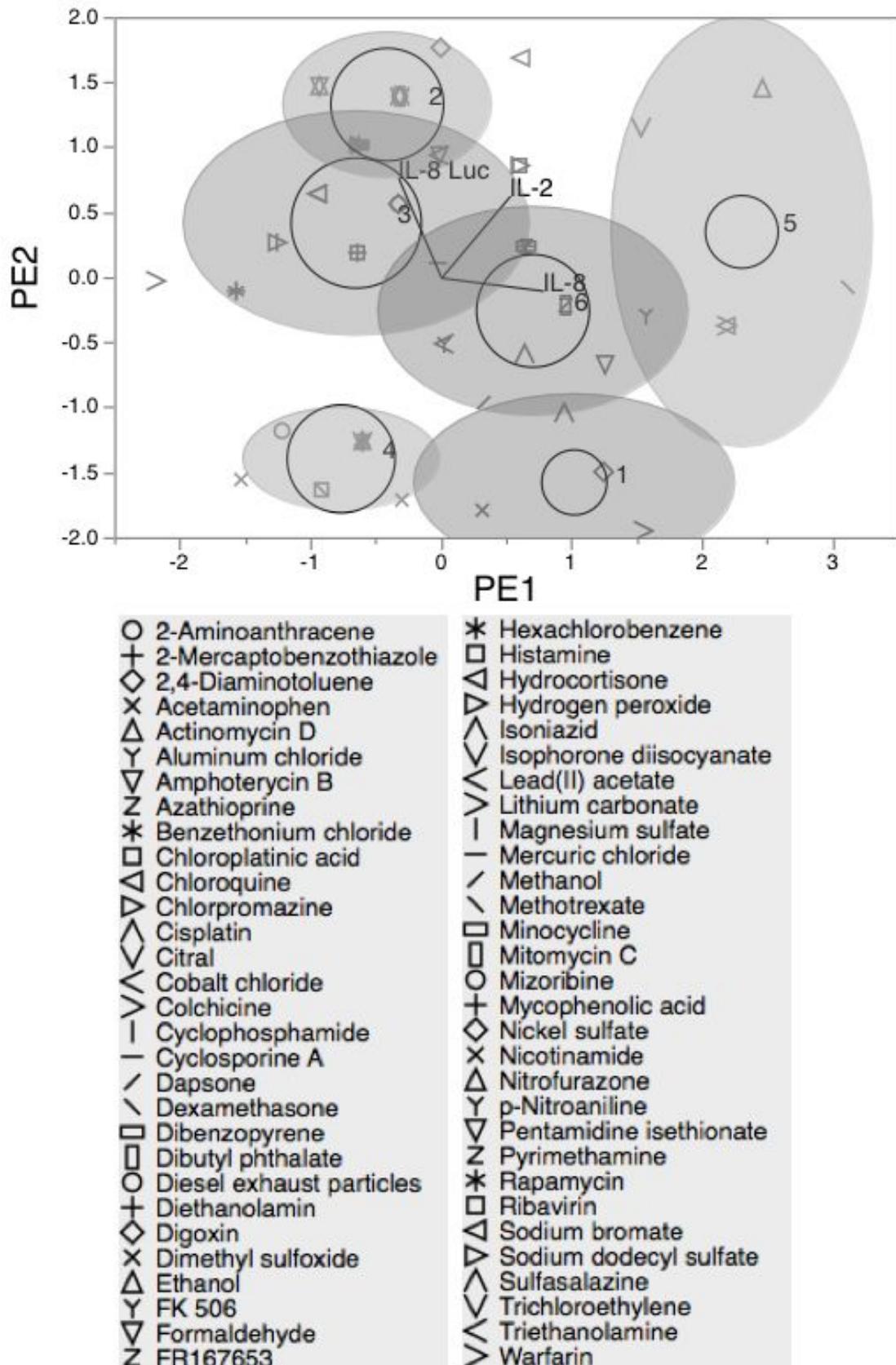


図7. 各clusterの免疫otoxicity profile

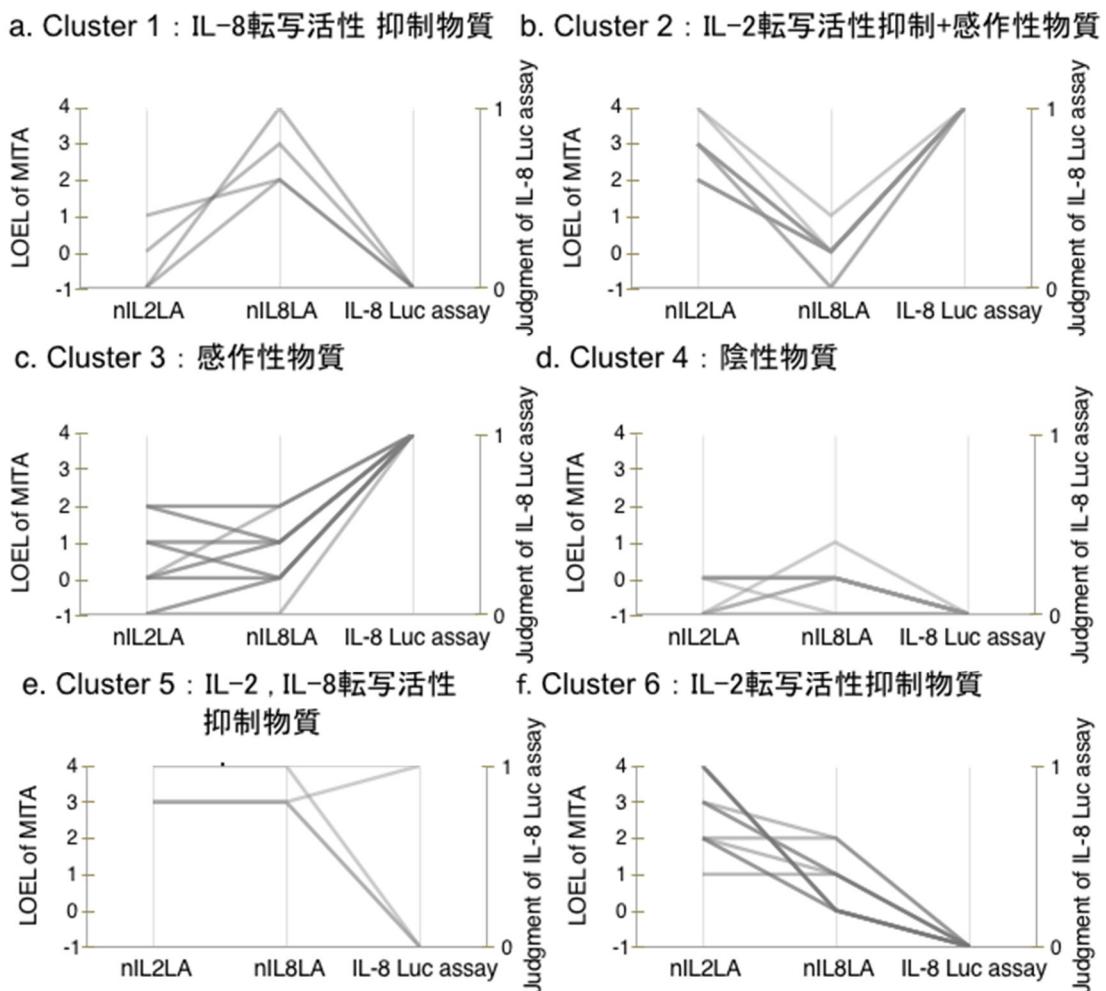


図8 . IL-2 転写活性抑制を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

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

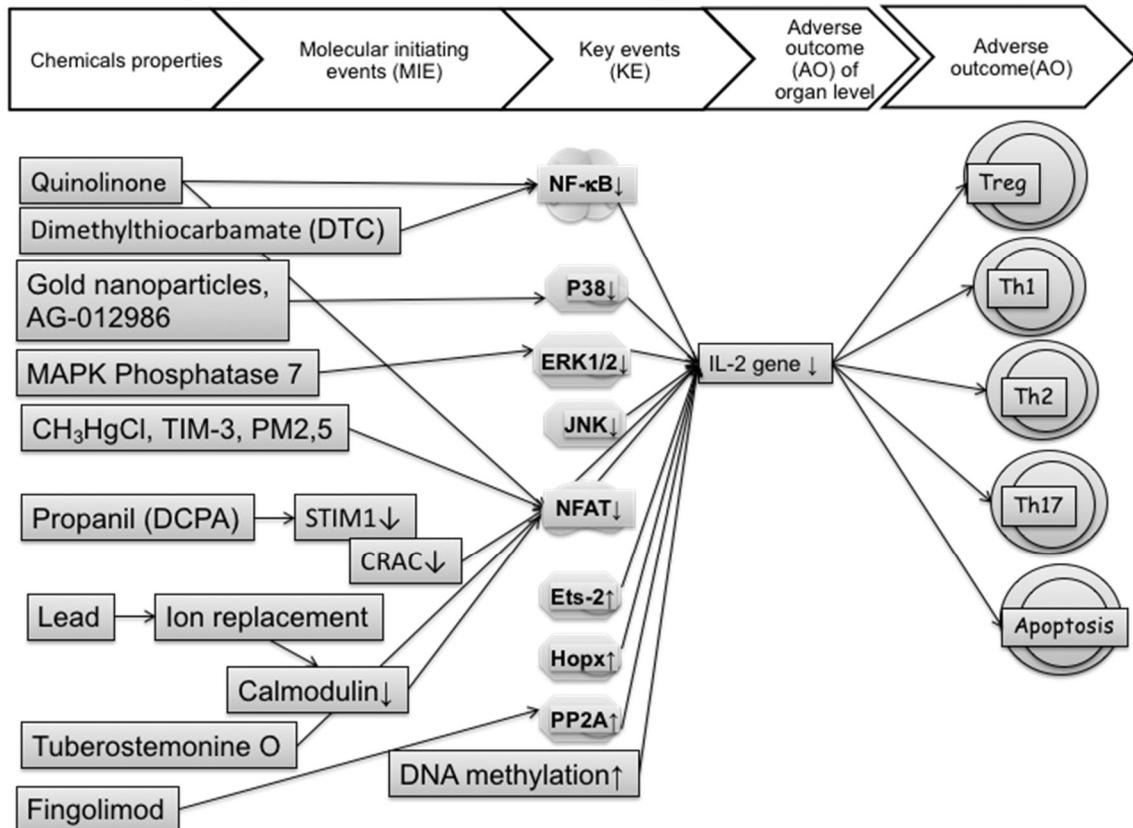


図9 . IL-2 転写活性増強を key event とした T 細胞分化異常誘導に関する AOP

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

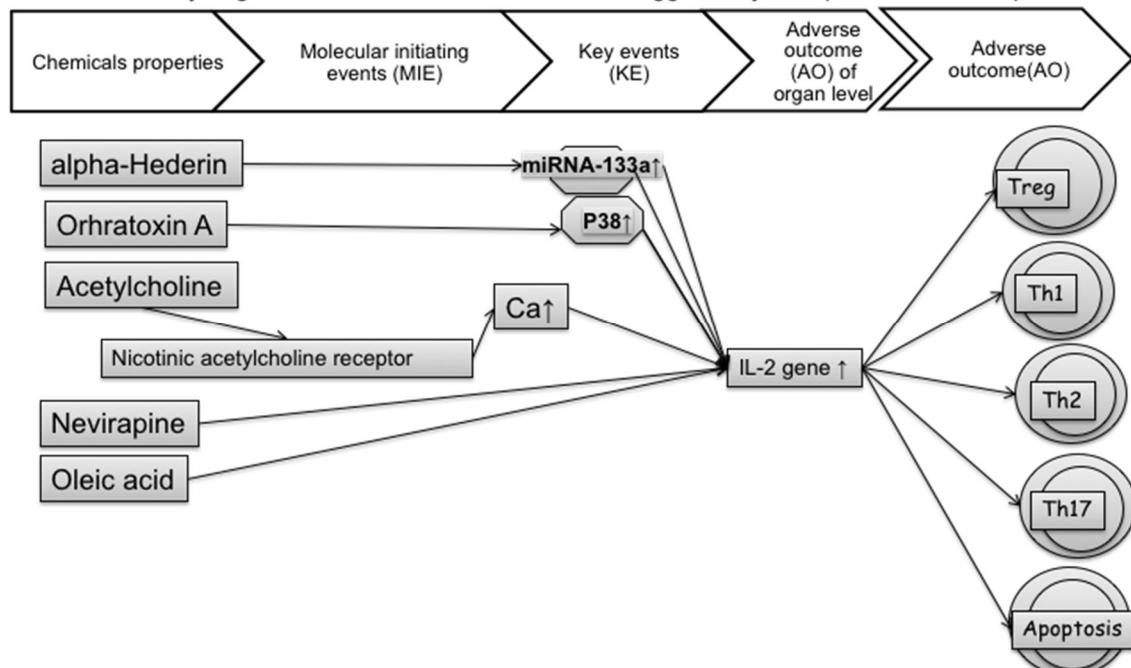


図 10. IL-8 転写活性増強を key event とした気道刺激性 AOP

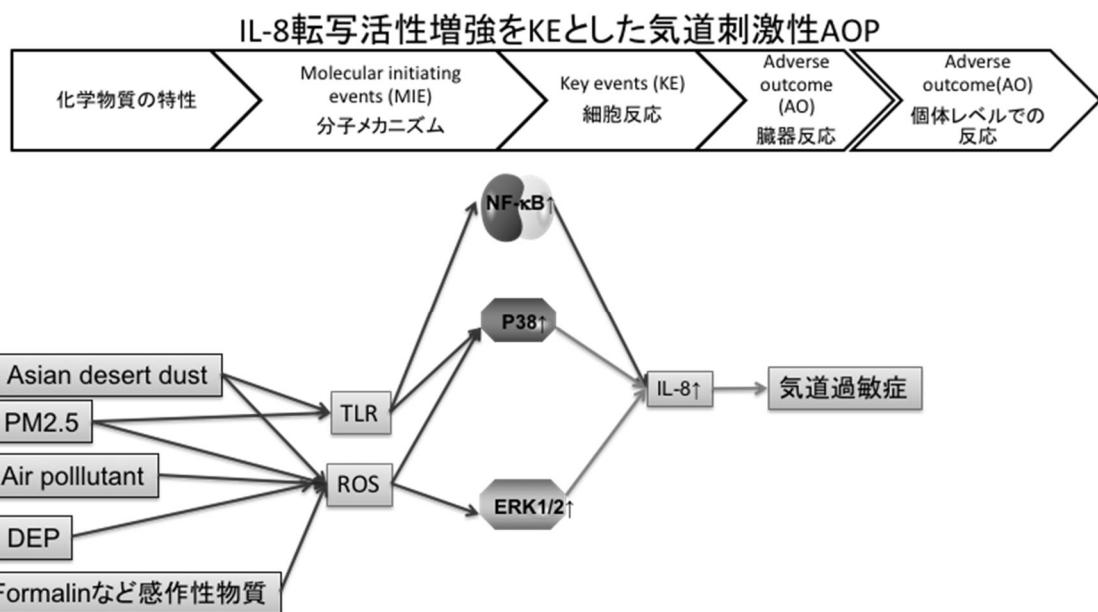


図 11 . MITA の判定基準 (Criteria 2)

## Criteria 2

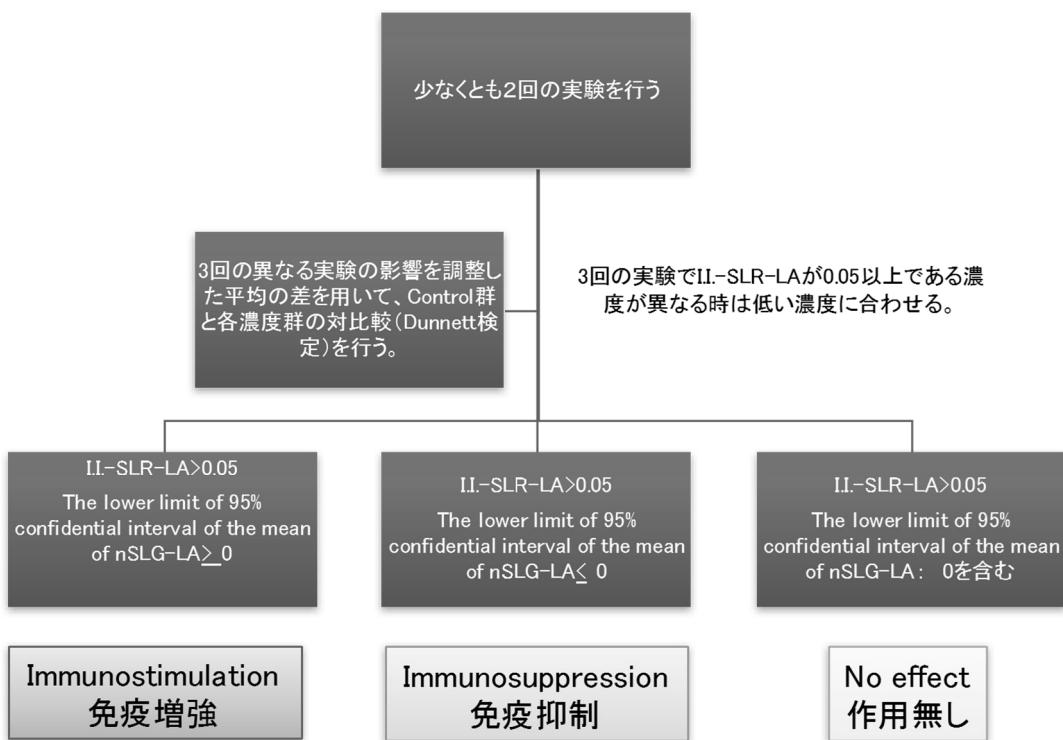


図 12 . MITA の判定基準 (Criteria 3)

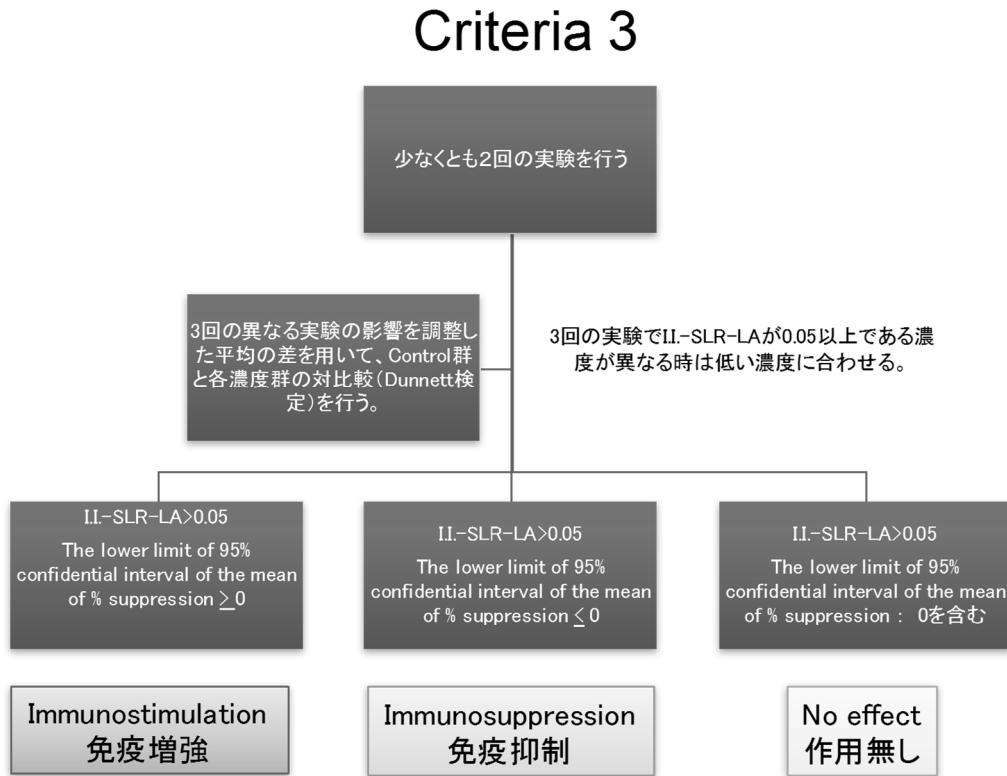
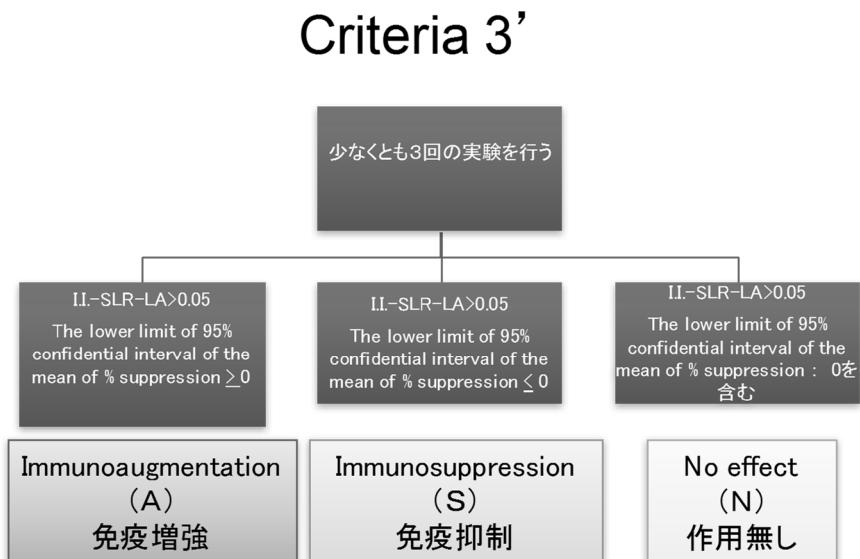


図 13 . MITA の判定基準 (Criteria 3')



なお、免疫増強、抑制の判定に際しては、2濃度以上連続した正の統計的に有意な値が存在するか、または3濃度以上正の値で用量依存性を示し、さらに少なくとも1濃度で正の統計的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 14 . MITA の判定基準 (Criteria 4)

## Criteria 4

### 11-1 Acceptance criteria

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

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

### 11-2 Criterion

Conduct three independent experiments for each chemical.

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

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

1. The result shows two or more consecutive statistically significant positive (negative) data or one statistically significant positive (negative) data with a trend in which at least 3 consecutive data increase (decrease) in a dose dependent manner. In the latter case, the trend can cross 0, as long as the data comprising the trend are not statistically significant in the opposite effect.
2. The results are judged using only data obtained in the concentration at which I.I.-SLR-LA is  $\geq 0.05$

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

図 15 . MITA の判定基準 (Criteria 5 )

## Criteria 5

### 11-1 Acceptance criteria

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

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

### 11-2 Criterion

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

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

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

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

Table 1.6 0 化学物質の MITA による免疫毒性評価

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

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

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

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

No	Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		IL-8 Luc
		Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ 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 isethionate	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 particulate	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 sulfate	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	Amphotericin B	S	0.78	S	2.08	A	3.13	A	7.82	P
51	Colchicine	A	0.29	A	0.06	A	0.02	A	20.00	P
35	Nitrofurazone	S	0.37	A	3.91	A	62.50	A	62.50	P
4	Acetaminophen	A	33.33	A	33.33	A	166.67	A	100.00	N
	AFC, antibody forming cell; CSM, cell surface marker; NK, natural killer cell activity, LOEL : Lowest Observed Effect Level									

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

No	Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		IL-8 Luc
		Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ g/mL)	Judge
21	FK 506	S	0.00	S	0.00	A	0.48	N		N
13	Cyclosporine A	S	0.00	S	0.00	N		N		N
5	Actinomycin D	S	0.00	S	0.01	N		S	0.00	P
52	Digoxin	S	0.01	S	0.02	N		N		P
15	Dexamethasone	S	0.01	N		S	0.01	S	0.01	N
16	Dibenzopyrene	S	0.01	S	0.03	N		N	0.00	N
38	Pyrimethamine	S	0.04	N		N		N		N
50	Chloroquine	S	0.05	S	0.02	S	10.00	S	30.00	P
10	Cisplatin	S	0.24	S	1.22	N		N		P
24	Hydrocortisone	S	0.34	A	6.27	S	0.34	S	0.34	N
33	Mitomycin C	S	0.36	N		N		N		P
44	Citral	S	0.36	S	1.37	N		N		P
35	Nitrofurazone	S	0.37	A	3.91	A		A	62.50	P
22	FR167653	S	0.49	S	0.49	S	145.83	S	125.00	N
7	Amphotericin 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 isethionate	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	Diethanolamine	S	9.12	N		N		N		P
34	Nickel sulfate	S	14.32	S	32.55	S	250.00	S	250.00	P
59	Sulfasalazine	S	36.00	S	1.20	S	7.80	S	1.20	N

48	Diesel exhaust partic	S	39.07	A	47.53	N		S	62.50	P
14	Dapsone	S	45.01	S	55.14	S	46.88	S	134.75	N
40	Sodium bromate	S	125.00	N		N		N		P
42	Triethanolamine	S	187.50	S	1416.67	N		N		P
31	Mercuric chloride	N		A	3.91	S	1.95	S	1.95	P
46	Chloroplatinic acid	N		N		N		S	15.63	P
3	2-Mercaptobenzothia	N		N		N		S	125.00	P
12	Cyclophosphamide	N		A	168.00	N		N		P
30	Magnesium sulfate	N		N		S	15.63	N		P
41	Sodium dodecyl sulf	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=<LOEL<1.0	
2	S : 1.0=<LOEL<10	
1	S : 10=<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 ( $\mu$ g/mL)	Judge	LOEL ( $\mu$ 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 chloride	S	1.95	N		P	2			
9	2-Aminoanthracene	S	0.81	N		P	2			
10	Amphotericin 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				Based on Majority
				Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordanace	
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 Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	53-86-1	A : NAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A
10	Nitrobenzene	98-95-3	S : SSN	S : SSS	N : ANN	S : SSS	0	S
11	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	Perfluoroctanoic 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				
1	Dibuty phthalate	84-74-2	S : SSS	solubility	500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)		500mg/ml(DMSO)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS			
				2nd 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)			
				1st round	S : SAS	N	S : SSS	S	S : NSS			
				2nd round	N : NNN		S : SSS		S : SSN			
3	Lead(II) acetate	6080-56-4	S : SSS	solubility	100mg/ml(ddw)		25mg/ml(ddw)		100mg/ml(ddw)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS			
				2nd 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)			
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS			
				2nd round	S : SSS		S : SSS		S : SSS			
5	Dimethyldithiocarbamate	137-30-4	N : SNN	solubility	62.5mg/ml(DMSO)			62.5mg/ml(DMSO)				
				1st round	N : NNN	N	N : NNN	N	N : NNA			
				2nd round	N : NNN		S : SSN		N : NNN			
3rd round				N : NSN		N : NNN		N : NNN				
Within				80%		80%		80%				
Accuracy					100%		80%		80%			
Between				80%					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

国際バリデーションの施行  
総括研究報告書

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、国際バリデーション研究を施行した。昨年度に実施された施設内再現性を検証するためのバリデーション研究（phase I）および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ョン研究（phase II）の結果に対し、国内外の専門家を招聘して意見を求めた。その結果、すべてのバリデーショ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、バリデーション研究、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

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）として公定化するため、国際バリデーション研究を施行する。

B. 研究方法

B-1. 國際的な専門家との意見交換

平成28年1月国際バリデーションのキックオフ実行委員会会議を企画した。プロトコルを確認し、Phase 0およびphase Iの被験物質を選定した。

Phase 0終了後の平成28年9月に電話会議を開催し、Phase Iの開始について議論した。

28年度に実施されたMITAに関するphase I結果を検証するため、平成29年2月に国際バリデーション第2回実行委員会の会議を企画した。

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

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. バリデーション研究の支援

B-2-1. バリデーション研究の被験物質選択

キックオフ会議において、Phase 0として、トレ

ーニングに用いる被験物質およびPhase Iにて施設内再現性に用いる5被験物質、およびPhase IIにて施設間再現性を求めるために用いた20物質を、コード化して各施設に送付した。

#### B-1-2. バリデーション結果の記録確認

Phase I および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. 國際的な専門家との意見交換

国際バリデーション研究の実行委員会には、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 ( NIH/NIEHS ) を、国内からは、日本免疫毒性学会の推薦者である井上智彰博士（中外製薬）を外部専門家として招聘し、研究班の班員を含む表1に示すメンバーにて、判別式の選択を含む試験法プロトコルの改訂、被験物質選択、MITAバリデーション結果の確認などについて討論した。Phase IIまでの結果から、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た。平成30年3月の電話会議まで、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。これを受け、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、被験物質名を開示した。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および動物の免疫毒性に関する関わりが明確ではなく、正確に求められていない。

#### 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 0として、トレーニングに用いた5被験物質

を表2に示した。

バリデーション研究Phase I として施設内再現性を評価するための被験物質5物質を、15物質(5物質×3セット)にコード化してリード施設を含む参加4施設に送付した。Phase II では、施設間再現性を求めるために、実行委員会は25物質を選択した。これらの中から、バランスや入手しやすさを考慮して用いた20物質を選抜し、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3および表4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 I 終了後に回収した記録用紙の一覧を表5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。

Phase II 終了後に回収した記録用紙の一覧を表6に示した。施設によって一部不備はあったが、GLP 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アッセイバリデーション研究において、新判定基準を用いることにより、施設内および施設間再現性を満たし、その目的を達した。ただ、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における免疫毒性に関する関わりが明確ではなく、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。

表1 . MITA国際バリデーション実行委員会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	Yoshihiro Nakajima	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 0 トレーニング用物質

Chemical	CAS No.	MW	Physical state	MITA IL-2 result
2-Aminoanthracene	613-13-8	193.24	Solid	S(-/-/-)
CH <sub>3</sub> HgCl	115-09-3	251.08	Solid	+-
Chloroquine diphosphate salt	50-63-5	515.86	Solid	S(-/-/-)
Citral	5392-40-5	152.23	Liquid	S(+/-+/-+-* )
Dexamethasone	50-02-2	392.46	Solid	S(-/-/-)

表3. Phase I 被験物質とコード番号

No.	Chemical	CASRN	State	LabA	LabB	LabC	LabD
				TOHOKU unv.	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4 . Phase II 被験物質とコード番号

No.	Chemical	CASRN	State	LabA TOHOKU unv.	LabB AIST- TSUKUBA	LabC	LabD 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	Dichloracetic 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5 . Phase I記録用紙確認リスト

		LabB (AIST-TSUKUBA)						LabC (FDSC)			LabD (AIST-TAKAMATSU)				LabA (TOHOKU univ.)				
		Code	try1	try2	exp1	exp2	exp3	Code	exp1	exp2	exp3	Code	exp1	exp2	exp3				
setA	1	MIB014A	×	×	○	○	○	MIC027A	○	○	○	MID036A	○	○	×	○	MIA003A		
	2	MIB017A	×	×	○	○	○	MIC029A	○	○	○	MID038A	○	○	×	○	MIA005A		
	3	MIB018A	×	×	○	○	○	MIC021A	○	○	○	MID310A	○	○	×	○	MIA007A		
	4	MIB110A	×	×	○	○	○	MIC023A	○	○	○	MID037A	○	○	×	○	MIA009A		
	5	MIB012A	×	×	○	○	○	MIC025A	○	○	○	MID034A	○	○	×	○	MIA001A		
setB	1	MIB017B				○	○	○	MIC026B	○	○	○	MID033B	×	○	○	○	MIA004B	
	2	MIB019B				○	○	○	MIC028B	○	○	○	MID035B	×	○	○	○	MIA007B	
	3	MIB011B				○	○	○	MIC210B	○	○	○	MID037B	×	○	○	○	MIA008B	
	4	MIB013B				○	○	○	MIC027B	○	○	○	MID039B	×	○	○	○	MIA010B	
	5	MIB015B				○	○	○	MIC024B	○	○	○	MID031B	×	○	○	○	MIA002B	
setC	1	MIB016C				○	○	○	MIC023C	○	○	○	MID034C	×	○	○	○	MIA007C	
	2	MI0018C				○	○	○	MIC025C	○	○	○	MID037C	○	○	×	○	MIA009C	
	3	MIB110C				○	○	○	MIC027C	○	○	○	MID038C	○	○	×	○	MIA001C	
	4	MIB017C				○	○	○	MIC029C	○	○	○	MID310C	○	○	○			MIA003C
	5	MIB014C				○	○	○	MIC021C	○	○	○	MID032C	×	○	○	○	MIA005C	

	○	passed	×	failed		needless	
--	---	--------	---	--------	--	----------	--

表6. Phase II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	2017.06.22
Test samples No. (repeat No.)	1-5(1)	6,4,6,7(L)	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)	14,16,17,18,20,01(2)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
3 Test date	2017.6.8	2017.07.07	2017.05.23
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),5(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.	6(re1),7-10(2)	1,3,5,8(3),9,10(2)	3,4,10,13(re1)
Others records	○	○	○
Datasheets	○	○	○
7 Test date	2017.6.5	2017.07.21	2017.06.28
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(1)	11,12,14(2),13(re1),15,15(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.	11-13,15(3)14(re2),	2(re1),13(3),15,16(2),18,20(1)	16,17,18,20,15,18 (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)	13,14(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)	5,6,10(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)	9,13,15,18(3),3,19(4)
Others records		○	○
Datasheets		○	○
16 Test date			2017.07.25
Test samples No.			10,13,14,9,4(4)
Others records			○

## F. 研究発表

- 1) Speit G, Kojima H, Burlinson B, Collins AR, Kasper P, Plappert-Helbig U, Uno Y, Vasquez M, Beevers C, De Boeck M, Escobar PA, Kitamoto S, Pant K, Pfuhler S, Tanaka J, Levy DD : Critical issues with the in vivo comet assay: A report of the comet assay working group in the 6th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015 May 1;783:6-12
- 2) 小島 肇 : 化粧品原料に対する安全性規制の世界動向, Cosmetic Stage, 9(4), 1-9 (2015)
- 3) 小島 肇 : 化粧品等の接触皮膚炎を起こす物質を評価するための動物実験代替法について, アレルギーの臨床 , 35(5)471 , 36-40 (2015)
- 4) Kojima H, Kasamatsu T: Regulatory science - JEMS symposium in 2014. Genes and Environment. 2015; 37:12
- 5) 小島 肇 : 経皮吸収型製剤開発における基礎と実務への応用, 情報機構, 71-83 (2015)
- 6) 小島 肇 : 昨今の皮膚毒性評価法の動向, 谷本学校毒性質問箱 , 17 , 8-14 (2015)
- 7) 小島 肇 : 動物実験代替法の変遷と最新動向, 日本香粧品学会誌 創立 40 周年記念 , 39 , 72-75 (2015)
- 8) Sewell F, Ragan I, Marcylo T, Anderson B, Braun A, Casey W, Dennison N, Griffiths D, Guest R, Holmes T, van Huygevoort T, Indans I, Kenny T, Kojima H, Lee K, Prieto P, Smith P, Smedley J, Stokes WS, Wnorowski G, Horgan G: A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of 'evident toxicity' as an endpoint: Towards adoption of the fixed concentration procedure, Regul Toxicol Pharmacol. 2015;73(3):770-779.
- 9) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Beevers C, De Boeck M, Burlinson B, Hobbs CA, Kitamoto S, Kraynak AR, McNamee J, Nakagawa Y, Pant K, Plappert-Helbig U, Priestley C, Takasawa H, Wada K, Wirnitzer U, Asano N, Escobar PA, Lovell D, Morita T, Nakajima M, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015; Jul;786-788, 45-76
- 10) Morita T, Uno Y, Honma M, Kojima H, Hayashi M, Tice RR, Corvi R, Schechtman L: The JaCVAM international validation study on the in vivo comet assay: Selection of test chemicals, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015; Jul;786-788, 14-44
- 11) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Burlinson B, Escobar PA, Kraynak AR, Nakagawa Y, Nakajima M, Pant K, Asano N, Lovell D, Morita T, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015; Jul;786-788, 3-13
- 12) Uno Y, Kojima H, Hayashi M: The JaCVAM-organized international validation

- study of the in vivo rodent alkaline comet assay, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015; Jul;786-788, 2
- 13) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, J Appl Toxicol. 2015; Oct 15.
- 14) 小島 肇: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM)の紹介並びに我が国における動物実験代替法の現状, LABIO62, 42-44 (2015)
- 15) Kojima H: The use of 3-D models as alternatives to animal testing. Altern Lab Anim. 2015 Sep;43(4): P40-3.
- 16) 小島 肇, 西川秋佳: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM)平成 26 年度報告, AATEX-JaCVAM, 4(1), 30-38 (2015)
- 17) 小島 肇: 機能性化粧品素材, シーエム シー出版, 62-69 (2016)
- 18) 小島 肇: VICH セッション 5 所感, JVPA Digest 55, 19 (2016)
- 19) 小島 肇: 日本で開発または評価された OECD テストガイドライン, 生物化学的測定研究会年報, 20 (2016)
- 20) 小島 肇: 日本で開発または評価された OECD テストガイドライン, 生物化学的測定研究会年報, 20 (2016)
- 21) Yamamoto N, Kato Y, Sato A, Hiramatsu N, Yamashita H, Ohkuma M, Miyachi E, Horiguchi M, Hirano K, Kojima H: Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods, In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal.2016; Aug;52(7):742-8
- 22) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, J Appl Toxicol. 2016 Aug;36(8):1025-37.
- 23) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第 17 回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト, 89-108 (2016)
- 24) Uchino T, Kuroda Y, Ishida S, Yamashita K, Miyazaki H, Oshikata A, Shimizu K, Kojima H, Takezawa T, Akiyama T, Ikarashi Y: Increase of  $\beta$ 2-integrin on adhesion of THP-1 cells to collagen vitrigel membrane, Biosci Biotechnol Biochem. 2016; Jul 4:1-6
- 25) Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, Cirit M, Daneshian, Fitzpatrick S, Frey O, Gaertner C, Giese C, Griffith L, Hartung T, Heringa MB, Hoeng J, Jong WH, Kojima H, Kuehnle J, Leist M, Luch A, Maschmeyer I, Sakharov D, Sips AJAM, Steger-Hartmann T, Tagle DA, Tonevitsky A, Tralau T, Tsyb S, Stolpe A, Vandebriel R, Vulto P, Wang J, Wiest J, Rodenburg M, Roth A: Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. ALTEX. 2016; 33(3):272-321
- 26) Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, Kojima H, Li J, Lim CH, Moura W, Nishikawa A, Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V.: International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods, Advance in Experimental Medicine and Biology. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing, Springer, 2016; 343-386.
- 27) Kojima H, Safety Assessment of Cosmetic Ingredients, COSMETIC SCIENCE AND

- TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Elsevier 2017; 793-803
- 28) 小島 肇: 医薬品に係わる新添加物の安全性評価, 月刊ファームステージ, 16(6), 1 (2016)
  - 29) 小島 肇: 皮膚細胞を用いた最新の *in vitro* 皮膚安全性評価研究, 月刊コスメティックステージ, 12, 1-4 (2016)
  - 30) 小島 肇, 西川秋佳: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成 27 年度報告書. AATEX-JaCVAM, ,5(1), 45-56 (2016)
  - 31) 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.
  - 32) 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.
  - 33) 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.
  - 34) 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.
  - 35) 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.
  - 36) 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.
  - 37) 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.
  - 38) 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リーサイエンス, 2017, 48 (9), 600-607.
  - 39) 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.
  - 40) 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.
  - 41) 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.
  - 42) 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.
  - 43) Kojima H: *In Vitro Evaluation for Skin Toxicity, Skin Penetration and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical compounds*, Springer, 2017, 297-304.
  - 44) 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.
  - 45) 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.
  - 46) 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.
  - 47) 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.

- 48) Kojima H: New trends on alternative to animal testings in Japan. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2018;151(2):52-55.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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
- 3 ) 小島 肇: 動物実験代替法についての各国の動向および最新研究, 2015 年日中化粧品国際交流協会年度交流イベント(2015.6)(東京)
- 4 ) 小島 肇: 日本で開発または評価された OECD テストガイドライン, 生物化学的測定研究会 第 20 回学術集会(2015.6)(東京)
- 5 ) 細井一弘、小島 肇: シンポジウム 6 トランスレーションに有用な試験系構築の基本的考え方 : ROS アッセイを例にして, 第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6)(金沢)
- 6 ) Kojima H, Kleinstreuer N, Schaeffer MW, Kim TS, Chen W, Sozu T, Watanabe M, Niitsma T, Yamashita K, Miyazaki H, Fukuda T, Yamaguchi N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T: 眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT のバリデーション研究, 第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6)(金沢)
- 7 ) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: 高感度な in vitro 眼刺激性試験法 Vitrigel-EIT の予測性評価, 第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6)(金沢)
- 8 ) 伊藤浩太, 柚原隆史, 越田 美, 奥村宗平, 中山拓生, 平賀 武夫, 小島 肇, 松浦正男: 牛角膜を用いた混濁度度および透過性試験法(BCOP 法)による GHS 分類 2 B 物質の測定結果, 第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6)(金沢)
- 9 ) 小島 肇, 西川秋佳: JaCVAM update(日本動物実験代替法評価センター)進捗, International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) Coordination meeting (2015.6)(韓国・済州島)

## F-2) 学会発表

- 1 ) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明:  
Vitrigel-Eye Irritancy Test (EIT) method:  
Assessment of predictive performance  
using 118 test chemicals, 日本組織培養学会 第 88 回大会(2015.5)(広島)
- 2 ) Kojima H, Kleinstreuer N, Schaeffer MW, Kim TS, Chen W, Sozu T, Watanabe M, Niitsma T, Yamashita K, Miyazaki H, Fukuda T, Yamaguchi N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T: Validation study of Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) method, II International Conference of Alternatives to Animal Experimentation (2015.5) (Lisbon, Portugal)

- 10) 小島 肇: JaCVAM activities update(日本動物実験代替法評価センター)活動報告, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (2015.6)(韓国・済州島)
- 11) 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の最新動向, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第10回教育セミナー (2015.7)(東京)
- 12) 小島 肇: 国立衛研の立場, 第3期 日本化学工業協会 LRI 研究報告会 (2015.8)(東京)
- 13) Kojima H : New SPSF for OECD Test guideline on the in vitro skin sensitization assay , 12th Annual meeting of Korean Society for Alternative to Animal Experiments (2015.8)(韓国・ソウル)
- 14) Kojima H : The JaCVAM/OECD activities on the comet assay , 11th International Workshop of Comet assay Workshop (2015.9)(Antwerp, Belgium)
- 15) Kojima H : Development and validation of alternative to animal testing , ITRI seminar (2015.9)(Shinchiku, Taiwan)
- 16) Kojima H : The Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2016 , 16th Annual Congress of European Society of Alternatives to Animal Testing (2015.9)(Linz, Austria)
- 17) Kojima H, Oshimura M, and Imatanaka N: Update for Japanese Project “ARCH-Tox” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 4th annual meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2015.10)(EPA, NC, U.S.A.)
- 18) 小島 肇: シンポジウム7: 経済産業省プロジェクト「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発: ARCH-Tox」の計画概要, 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 19) 中山 拓人, 寒水 孝司, 山口 宏之, 竹澤 俊明, 小島 肇: Vitrigel-EIT ( Eye Irritancy Test ) 法による眼刺激性の判定法の提案, 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 20) 古川 正敏, 榊原 隆史, 伊藤 浩太, 佐々木 啓, 越田 美, 奥村 宗平, 河村 公太郎, 松浦 正男, 小島 肇: 牛摘出角膜を用いた混濁度及び透過性試験法 ( BCOP法: 眼刺激性代替法試験) における角膜の病理所見による弱刺激性物質の評価について, 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12)(横浜)
- 21) 加藤 義直, 山本 直樹, 佐藤 淳, 中田 悟, 小島 肇: 不死化ヒト角膜細胞株 ( iHCE-NY ) を用いた三次元角膜再構築モデルにおける 眼刺激性評価方法の検討 ~後培養による回復性の評価~, 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12)(横浜)
- 22) 内野 正, 宮崎 洋, 山下 邦彦, 小島 肇, 竹澤 俊明, 秋山 卓美, 五十嵐 良明: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法 ( Vitrigel-SST法 ) の室内再現性, 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 23) 宮崎 洋, 山下 邦彦, 内野 正, 竹澤 俊明, 小島 肇: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法

- (Vitrigel-SST法)による感作性物質の評価(第2報), 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 24) 成田 和人, Vo Thihong Phuc, 中川 史子, 小島 肇, 板垣 宏: 皮膚感作性試験の偽陰性評価解消に向けた検討: 無水フタル酸に対する LP 溶媒暴露法, 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 25) 九十九 英恵, 松成 夏美, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギー性を評価する in vitro 試験法の開発, 日本動物実験代替法学会 第28回大会(2015.12)(横浜)
- 26) 小島 肇: OECDで検討されてきた in vitro スクリーニング法, 環境ホルモン学会 第18回研究発表会(2015.12)(栃木)
- 27) Furukawa M, Sakakibara T, Ito K, Sasaki S, Koshita M, Okumura S, Kawamura K, Matsuura M, Kojima H: Histopathological Findings on the Cornea in the Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP Test) for Alternative to Eye Irritation Test, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U.S.A.)
- 28) Narita K, Vo P.T, Nakagawa F, Kojima H, Itagakai H: Reducing False Negatives of Chemicals in the in vitro Skin Sensitization Test, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U.S.A.)
- 29) Tsukumo H, Matsunari N, Sugiyama M, Toyoda A, Kojima H, Itagakai H: Development of an in vitro test for Allergenic Potency of Proteins, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U.S.A.)
- 30) Kojima H: View and suggestion about how to promote progress and cooperation in Asia, 2016 上海化粧品科学フォーラム(2016.4) (Shanghai, China)
- 31) 小島 肇: 国際機関で承認されている in vitro 試験法, 日本組織培養学会 第89回大会(2016.5)(大阪)
- 32) 山本直樹, 平松範子, 加藤義直, 佐藤 淳, 中田 悟, 松井優子, 真野陽介, 原 和宏, 増薦夕紀子, 中村政志, 小島 肇: ヒト不死化角膜上皮細胞を用いた三次元角膜モデルの有用性, 日本組織培養学会 第89回大会(2016.5)(大阪)
- 33) 小島 肇: 医薬品に係わる新添加剤の安全性評価における諸課題, 第43回日本毒性学会学術年会(2016.6)(名古屋)
- 34) 小島 肇: 経済産業省プロジェクト「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発: Arch-Tox」の計画概要, 第43回日本毒性学会学術年会(2016.6)(名古屋)
- 35) 伊藤浩太, 榊原隆史, 古川正敏, 奥村宗平, 越田 美, 川村公太郎, 松浦正男, 小島 肇: 牛摘出角膜を用いた混濁度及び透過性試験(BCOP法: 眼刺激性代替法試験)における角膜病理学的検査により弱刺激性物質の評価, 第43回日本毒性学会学術年会(2016.6)(名古屋)
- 36) Kojima H: Japanese activities for alternative to animal testing around the world, 6th Workshop & Training of Alternative Methods (2016.6) (Guangzhou, China)
- 37) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第17回日本毒性学

- 会生涯教育講習会テキスト(2016.7)(名古屋)
- (2016.11)(福岡)
- 45) 小島 肇: JaCVAM における 3Rs 原則と動物実験代替法, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 46) 萩原沙織, 篠田伸介, 仲原 聰, 小島 肇, 大森 崇, 遠藤麻衣, 佐竹真悠子, 池田英史, 西浦英樹, 笠原利彦, 山本祐介, 加藤雅一, 菅原 桂: 培養角膜上皮モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験の多施設バリデーション研究, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 47) 加藤義直, 山本直樹, 佐藤 淳, 中田 悟, 小島 肇: 不死化ヒト角膜細胞株 (iHCE-NY)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 ~再構築ヒト角膜様上皮 (RhCE) 試験法用性能標準の 30 物質 (TG492PS) に対する回復性を取り入れた予測性~, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 48) 藤田正晴, 笠原利彦, 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, 高橋寛明, 黒川嘉彦, 小野 敦, 小島 肇: Cys および Lys 誘導体を用いた皮膚感作性試験代替法 (ADRA 法) のバリデーション研究のための技術移転結果報告, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 49) 松成夏美, 九十九英恵, 謝 丹, 岡 朱音, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギー性を評価する in vitro 試験法の開発, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 50) 内野 正, 宮崎 洋, 山 邦彦, 竹澤俊明, 小島 肇, 秋山卓美, 五十嵐良明:

- 改良型コラーゲンピトリゲル膜チャンバーでの THP-1 細胞の細胞接着性及びサイトカイン産生量 ,日本動物実験代替法学会第 29 回大会 ( 2016.11 )( 福岡 )
- 51) VO P.T.H, Narita K, Nakagawa F, Kojima H, Itagaki H: Reducing false negative results in an in vitro skin sensitization test: The human cell line activation test ,日本動物実験代替法学会第 29 回大会( 2016.11 ) ( 福岡 )
- 52) Kojima H: Guidance on use of alternative methods for testing in the safety assessment of cosmetics and quasi-drug , Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (Asian Congress) 2016, (2016.11) (Karatsu, Saga)
- 53) 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 法人動物実験関係者連絡協議会 第 5 回シンポジウム 「動物愛護管理法」の過去・現在・未来 ( 2016.12 )( 東京 )
- 54) Furukawa, M., Sakakibara, T., Kouta I., Kawamura, K., Matsuura,M., Kojima, H.: Special stain for detection of corneal histopathological changes in BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) assay, 56th Annual meeting of Society of Toxicology, March 12-16, Baltimore USA
- 55) 小島 肇: 日本における動物実験代替法研究の胎動, シンポジウム「日本における動物実験代替法の新たなる技術展開」,第 90 回日本薬理学会年会 ( 2017.3 ) ( 長崎 )
- 56) 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)
- 57) 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 )
- 58) 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 )
- 59) 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 )
- 60) 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 )
- 61) 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)
- 62) 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, 草劔啓, 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 )
- 63) 古川正敏, 伊藤浩太, 楠原隆史, 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)
- 64 ) 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)
- 65 ) 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)
- 66 ) Kojima H, Nishikawa A: JaCVAM update, 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences (WC10) (2017.8) (Seattle, WA, USA)
- 67 ) 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)
- 68 ) Naoki Yamamoto, Noriko Hiramatsu, Yoshinao Kato, Hajime Kojima: Development of the in vitro assay for evaluating weak eye irritation 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences (WC10) (2017.8) (Seattle, WA, USA)
- 69 ) 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)
- 70 ) Kojima H: The status of cosmetic safety regulation in Japan, 2017 China Cosmetics(Baiyun) International Summit Forum (2017.9) (Guangzhou, China)
- 71 ) 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)
- 72 ) 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)
- 73 ) 小島 肇, 黒澤 努, 鈴木 真, 武吉正博, 謙田泰成, 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)
- 74 ) 小野 敦, 渡辺真一, 菅原経継, 若林晃次, 田原 宿, 堀江宣行, 藤本恵一, 草薙啓, 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)
- 75 ) 古川正敏, 横原隆史, 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)
- 76 ) 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)

- 77) 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)
- 78) 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)
- 79) 小島 肇, 森 梓, 小林眞弓, 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)
- 80) 藤田 正晴, 山本 裕介, 渡辺 真一, 菅 原 紹継, 若林 晃次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一, 草薙 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)
- 81) 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)
- 82) 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)
- 83) 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)
- 84) 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)
- 85) 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)
- 86) 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)
- 87) 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)
- 88) 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 (2017/3) (San Antonio, USA)
- 89 ) 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, (2017/3) (San Antonio, USA)
- 90 ) 村上将登, 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**

- G - 1 ) 特許取得  
特になし
- G - 2 ) 実用新案登録  
特になし
- G - 3 ) その他  
特になし

# 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

## 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 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試験を実施した。H27年度はバリデーション参加3施設における技術移転性の確認を目的とした施設間差比較試験(Phase0)を実施し、国際バリデーション実行委員会の承認を得た。H28年度は、コード化された5被験物質のPhase1 study(施設内、施設間再現性試験)を、続いてH29年度はコード化された20物質においてPhase2 study(施設間再現性試験)を実施した。またその間、統計解析手法の改良も進め、最終的な評価基準において、Phase1、2のいずれにおいても、施設内、施設間再現性がstudy planの基準となる80%を超える良好な結果を得た。

キーワード：免疫毒性、動物実験代替法、*in vitro*

#### A. 研究目的

多色発光タンパク質の技術を利用した化学物質の免疫毒性多項目評価システム(Multi-ImmunoTox assay; MITA)は、Jurkat細胞におけるINF- $\gamma$ 、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の各種毒性評価発光細胞を利用した評価システムである。本研究ではMITA法のOECDテストガイドライン化を目指し

て、MITAを構成する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テストを実施し、本評価システムの有用性と試験プロトコルの妥当性について検証した。

#### B. 研究方法

試験には、IL-2とIFN- $\gamma$ 、G3PDHプロモータにそれぞれSLG、SL0およびSLRJレ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を用いた。96ウェルプレートに播種した

#2H4細胞に、段階希釈した被験物質を加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。1時間後、賦活化剤としてPMAとIonomycinを添加し、6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを混合し、多色発光検出用の光学フィルターを有したルミノメーターで発光量を計測した。IL2プロモータ活性の指標となる緑色発光値(SLG-luciferase activity(SLG-LA))は、内在性コントロールであるG3PDHプロモータ活性の指標となる赤色発光値(SLR-luciferase activity(SLR-LA))で除することにより、各ウェルの細胞数や細胞生存率を補正したnormalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)で算出した。さらに、薬物添加によるIL2プロモータ活性の抑制率(% suppression)を以下の計算式で算出した。

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

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の詳細についてはMulti-Immuno Tox Assay protocolに準じて進めた。また、バリデーション試験には、我々(産総研つくば)を含め、食薬センター、産総研高松の3施設が参画した。

#### Phase0 study (H27年度)

まずは、3施設において技術移転性を確認するために、プレバリデーションテスト(phase0)を実施した。国際バリデーション実行委員会にて選定した5化学物質について、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.1Eに準じて実施した。

#### Phase1 study (H28年度)

施設内、および施設間再現性確認のために、国際バリデーション実行委員会にて選定されたコード化された5化学物質を、各物質3回繰り返し1セットの試験を3セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.008.5Eに準じて実施した。

#### Phase2 study (H29年度)

施設間再現性確認のために、国際バリデーション実行委員会にて選定されたコード化された20化学物質を、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験は、Multi-Immuno Tox Assay protocol Ver.009.1Eに準じて実施した。

各バリデーションテストの結果については、それぞれ国際バリデーション実行委員会会議において、評価判定基準(Acceptance criterion)の最適化や試験プロトコルの改訂などの検討を含め検証を行った。

#### (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

#### Phase0 study (H27年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定した2-Aminoantracene, Citral, Chloroquine, Dexamethasone, Methyl mercuric chlorideの5化学物質について、各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。試験結果を図1に示す。3回繰り返し試験において、各物質とも再現性の高いデータを得ることができ、またリードラボを含む4施設の結果の比較においても各物質に対する反応は同様のパターンを示した。一方で、PMA/Ioに対する反応性に違いが確認され、試験プロトコル及びacceptance criterionの改定を行った。国際バリデーション会議において、これらの結果を検証し、技術移転性の問題なしと判断し、次年度のPhase1試験実施を決定した。

#### Phase1 study (H28年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定したコード化された5化学物質について各物質3回1セットからなる試験を3セット行った。各物質の計測結果および%suppressionを図2に示す。また、図3にcriterion1、2、3の評価結果を示す。Phase1試験の結果、Chemical No. 1, 3, 4においては、いずれも「Immunosuppress( IL-

2プロモータ活性抑制)」の結果を示し、良好な施設内再現性が確認された(図3)。また他参加施設においても同様の結果が得られ、施設間の再現性も確認された。Chemical No.5においては、いずれのクライテリアでも「Immunoaugmentation(IL2発現亢進)」と「No effect」の評価に分かれた(図3)。一方で、nSLG-LAのグラフ(図2)は計9回の試行において、類似した傾向を示していることから、評価のバラつきが実験手技や装置等の不具合が原因とは推定しがたく、現criterionでの評価が難しい被験物質であると考えられる。実際、他施設においてもNo.5は suppress, augmentation, no effectと評価が分かれるものであった。

No.2 物質においては、他施設が Immunosuppressの評価に対し、当グループの結果はクライテリアによって異なるものの、他施設と評価が完全には一致しなかった。施設内再現性は得られており、他施設と比較しても、nSLG-LAの濃度依存的傾向もほぼ同様であった。唯一、高濃度域でのSLG-LAの発光値が他施設では大きく減少しているのに対して、当グループでは僅かにしか減少していなかった。

最終的に、criterion1において、各施設の施設内再現性が93%、施設間再現性が80%と、ともに80%以上というstudy planの基準を満たしたことからcriterion1を採用しPhase2試験を行う方針とした。また、判定において濃度依存性を考慮すべきとの意見を踏まえ、criterion3を濃度依存的な抑制または亢進反応に対する基準を加えたcriterion3'に改定し、Phase II試験において使用することとした。

#### Phase2 study (H29年度)

国際バリデーション実行委員会にて選定したコード化された20化学物質について各物質3回繰り返し1セットの試験を1セット行った。各物質の計測結果および%suppressionを図4に示す。また、図5にcriterion5の評価結果を示す。

いずれの物質においても、3回試行の結果、nSLG-LA及び%suppressionの濃度依存的変動のグラフに一致した傾向が見られ、施設内において安定した実験手技をもって試験

を実施できたもの思われる。これらの結果をもって、最終的に設定されたCriterion5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」と分かれしており、評価が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、異なる評価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。

#### D. 考察

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試験を実施し、良好な施設内再現性、および施設間再現性を示す結果が得られた。

本試験では、適切な評価基準を設定するために、クライテリアの最適化を重ね、最終的にCriterion5を設定した。Phase2試験の結果においては、当初、Phase2 studyで設定したCriterion3'で施設間再現性を評価したところ65%(13/20)で、再設定したCriterion4においても65%(13/20)であった。しかしながら3施設の結果と比較すると、各物質における濃度依存的 %suppressionの変動には同様のパターンが確認され、評価結果ほどの差異があるよう見えなかった。そこで、東北大学で作成された MITA data set を参考とし %suppressionの閾値を ± 35%と設定したCriterion5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。またPhase1の結果を再評価したところ施設間、施設内再現性ともに80%(4/5)で、Phase2の結果とともにstudy planの基準を満たす結果となった。Criteria5では、

Phase1試験で、施設間で評価の分かれたNo.5物質は、全施設「No effect」の評価で一致した。No.2物質に関しては、他施設との評価は異なるままであったが、リードラボである東北大学結果とは一致した。Criteria5は国際バリデーション実行委員に承認された。

#### E. 結論

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試験(Phase0, 1, 2)を実施した。試験プロトコルの改定やAcceptance criterionの最適化を重ね、各試験において、study planの80%基準を満たす良好な施設内および施設間再現性が確認された。

#### F. 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.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特許  
特願 2016-048403 / PCT/JP2017/009467

図1 phase0 試験結果

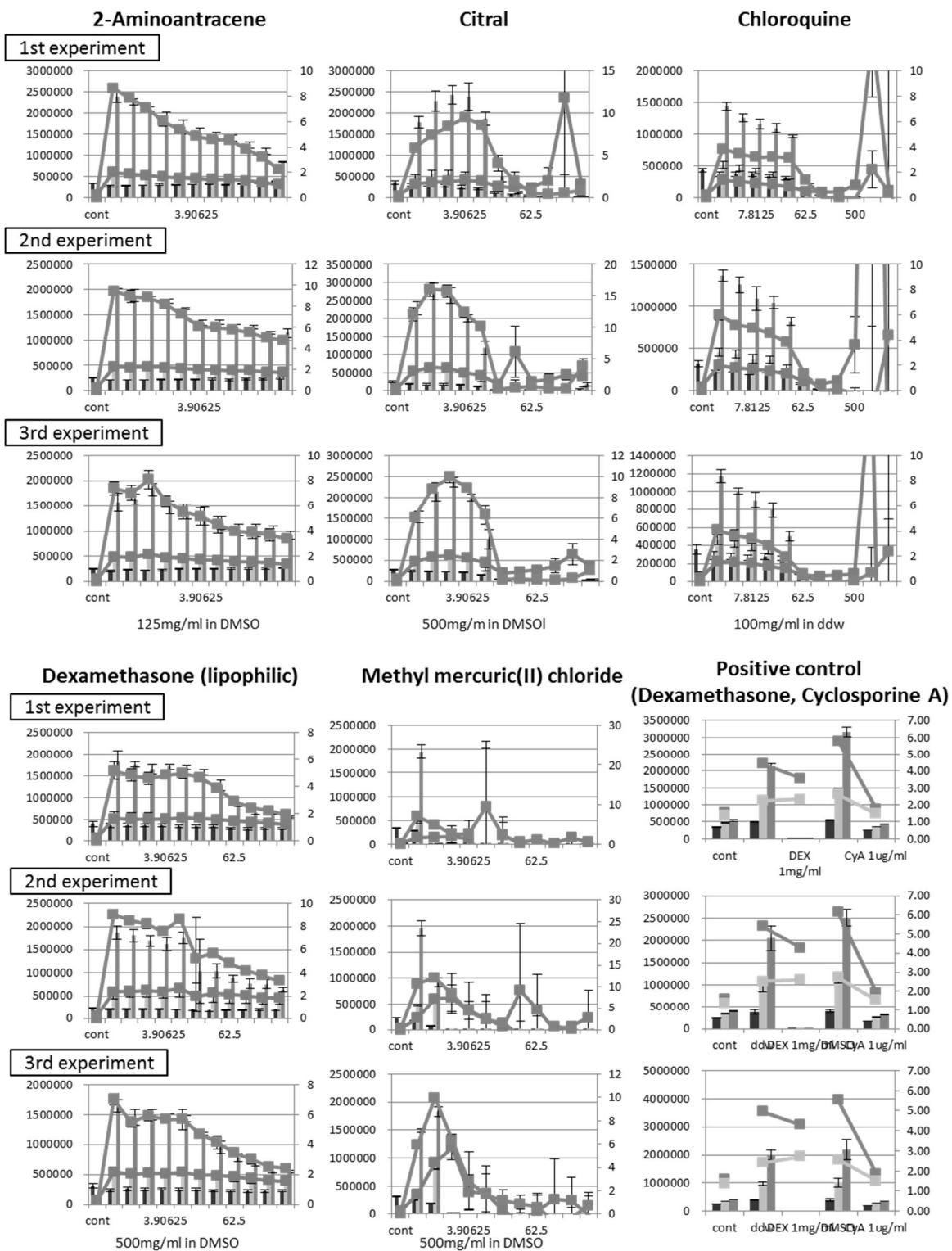
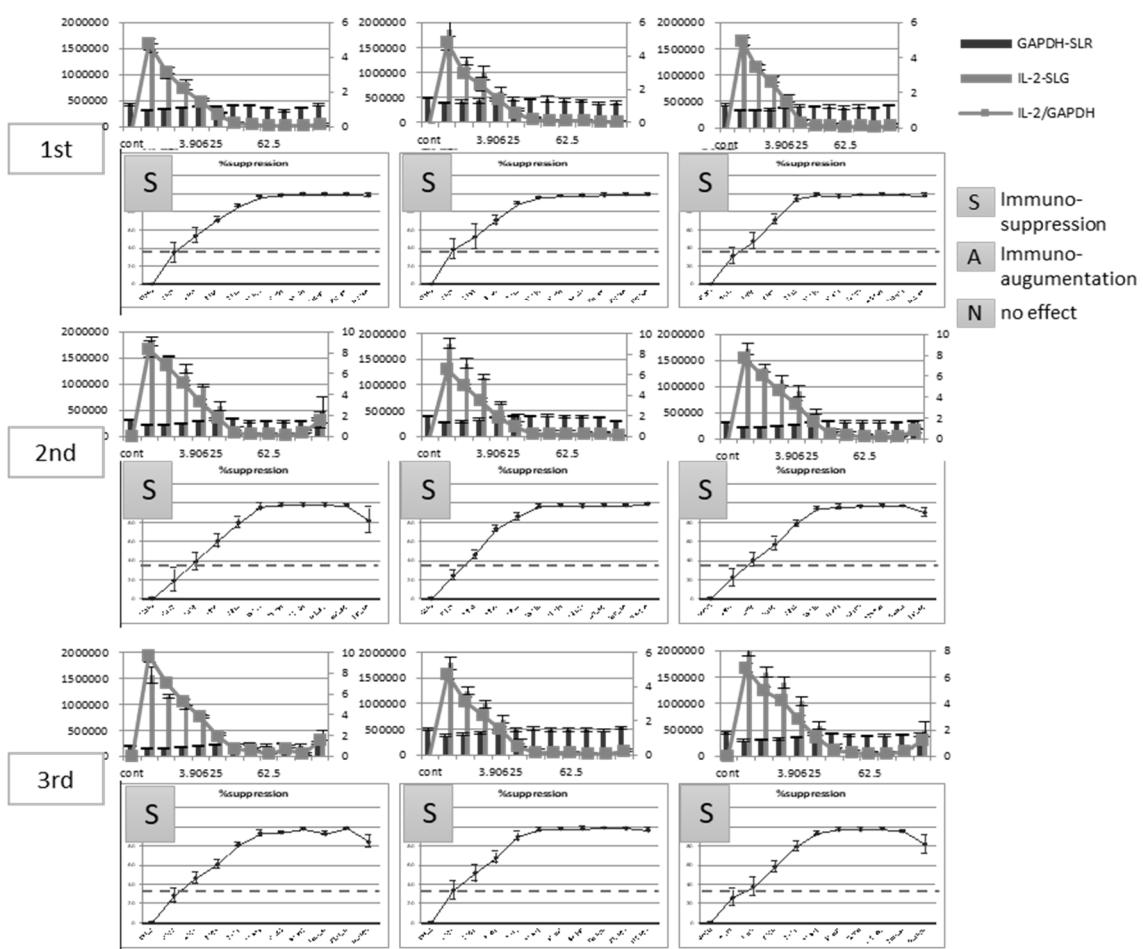


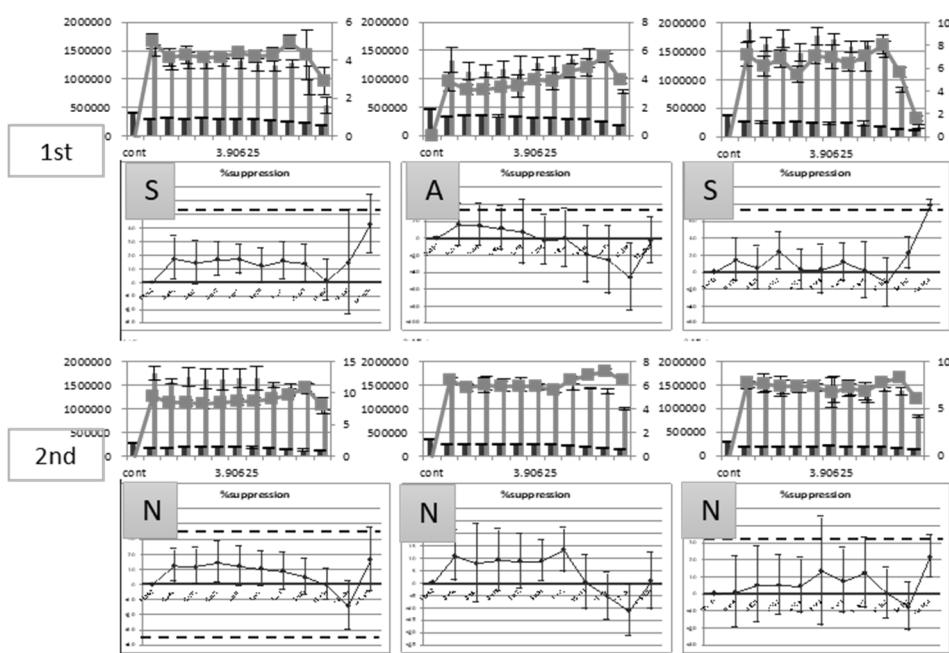
図2 phase1 試験結果

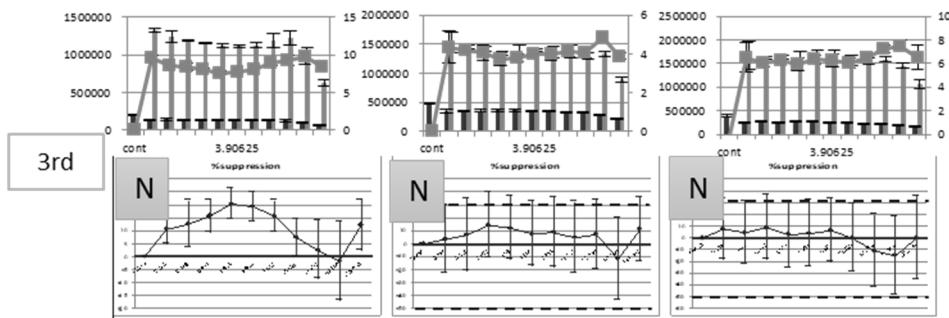
(図には、試験終了後に開示された被験物質名を表記した。またPhase2試験において最終的に設定されたクライテリア5での評価結果を示した。)

### 1, Dibutyl phthalate

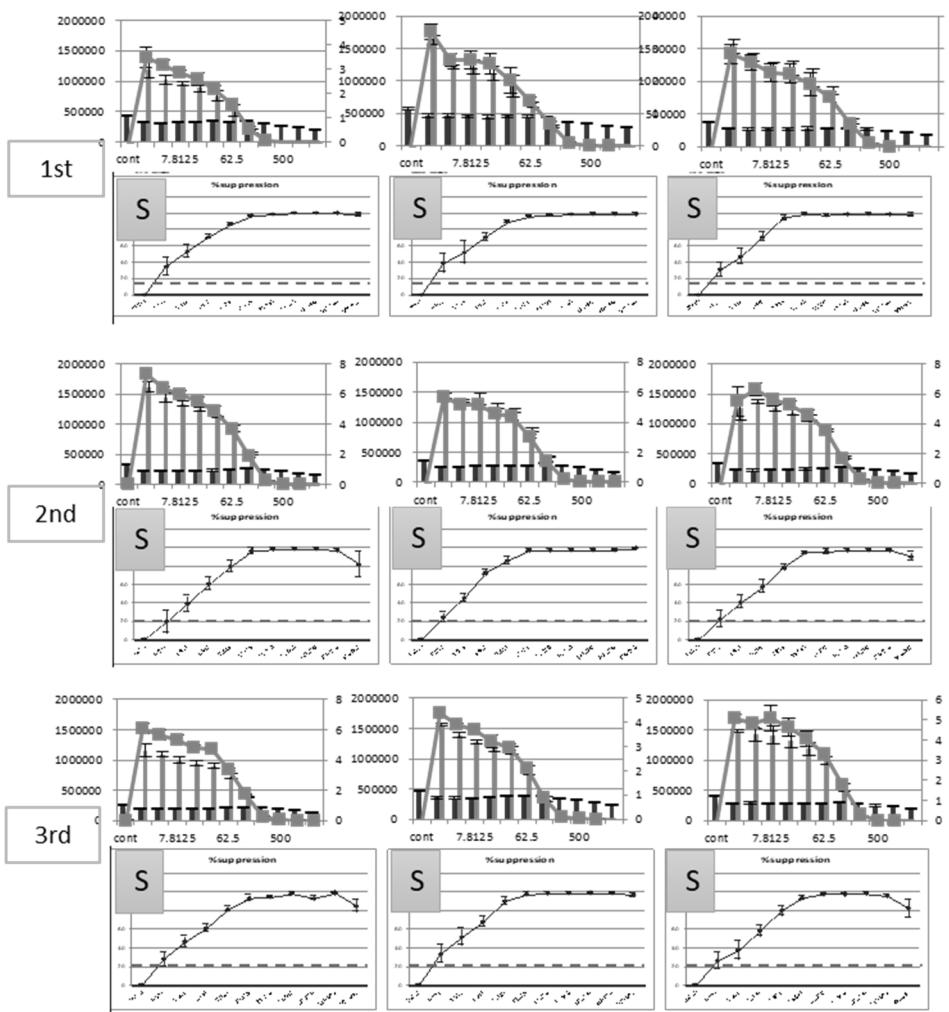


### 2, Hydrocortisone

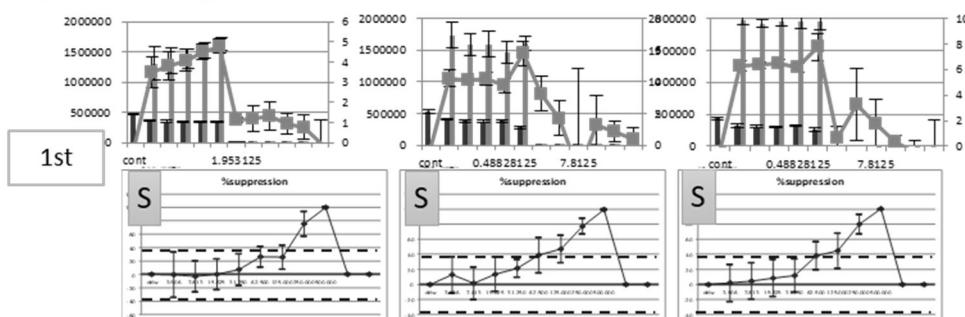


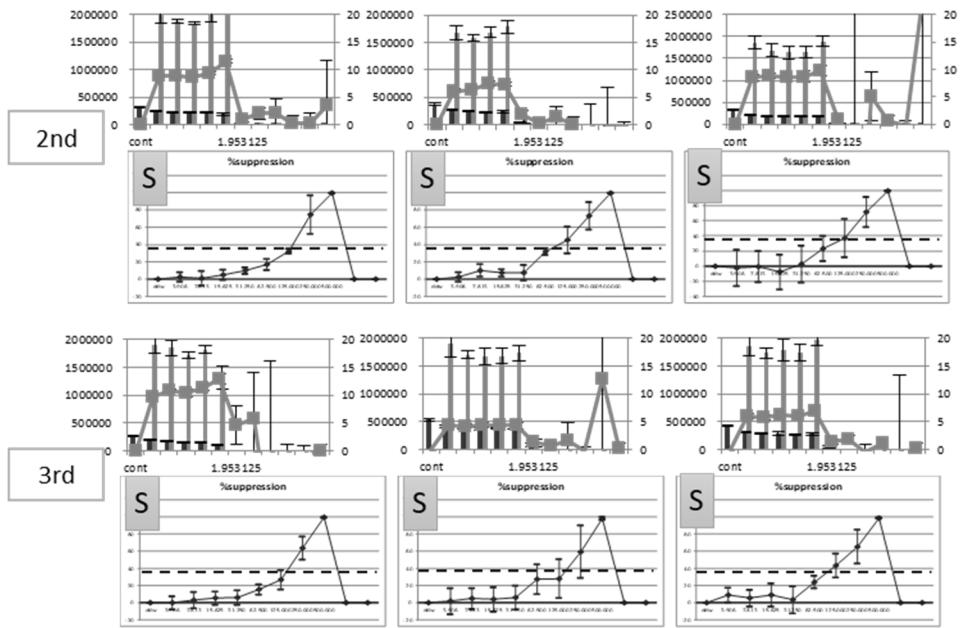


### - 3, Lead(II) acetate trihydrate



#### - 4, Zinc dimethyldithiocarbamate





### 5, Nickel(II) sulfate hexahydrate

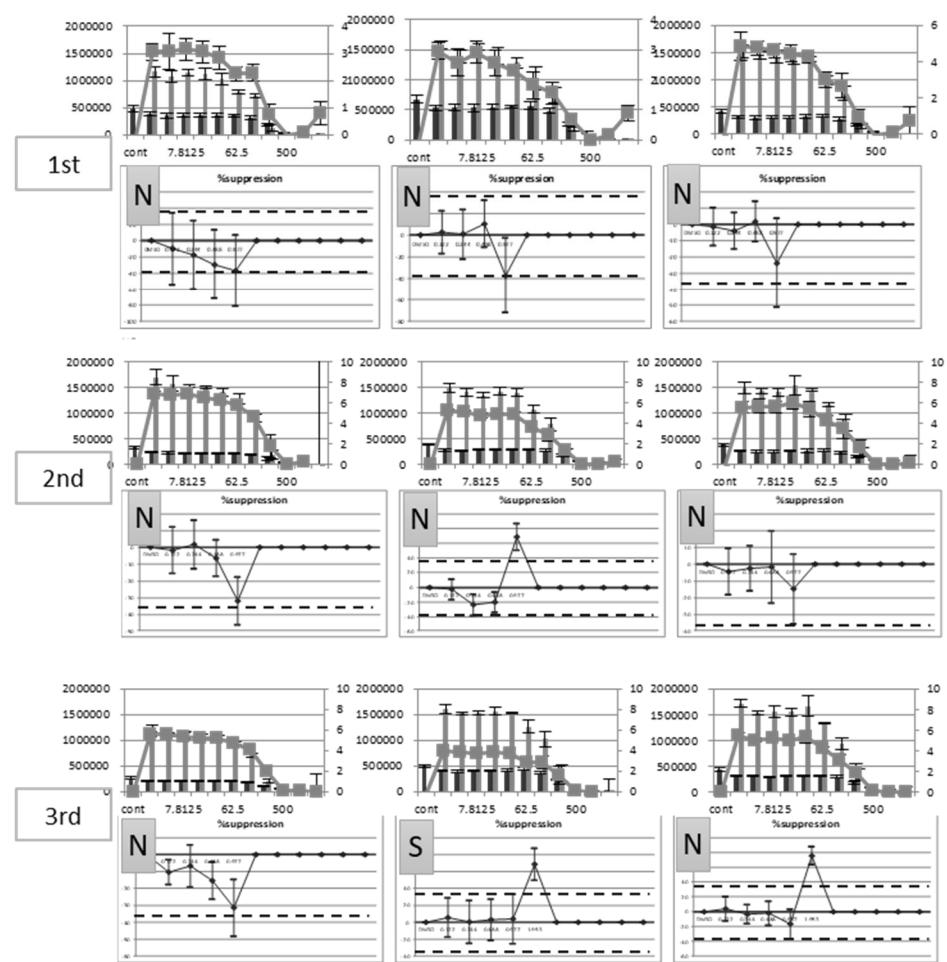


図3 criterion1,2,3によるphase1試験評価結果

		Criterion1	Criterion2	Criterion3
Chemical 1 ; Dibutyl phthalate	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/-)	S	S
Chemical 2 ; Hydrocortisone	Exp.1	N (-/+/-)	S	S
	2	N ( ±/±/0)	A and S	S
	3	N (-/0/0)	S	A and S
Chemical 3 ; Lead(III) acetate trihydrate	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/±)	S	S
Chemical 4 ; Nickel sulfate hexahydrate	Exp.1	S (-/-/-)	S	S
	2	S (-/-/-)	S	S
	3	S (-/-/-)	S	S
Chemical 5 ; Zinc dimethyldithiocarbamate	Exp.1	A ( 0/+/-)	A	A
	2	N ( +/±/0)	N	N
	3	N ( +/-/±)	A	N

S ; immunosuppression

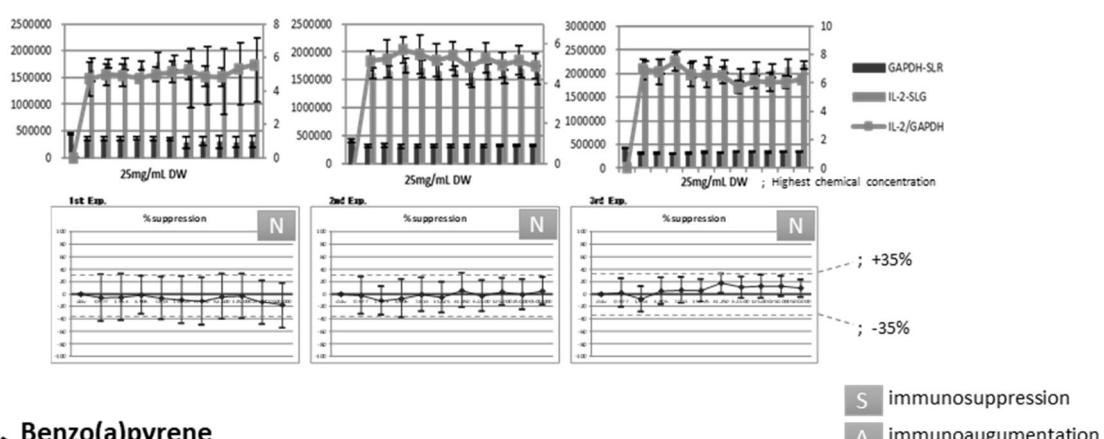
A ; immunoaugmentation

N ; No effec

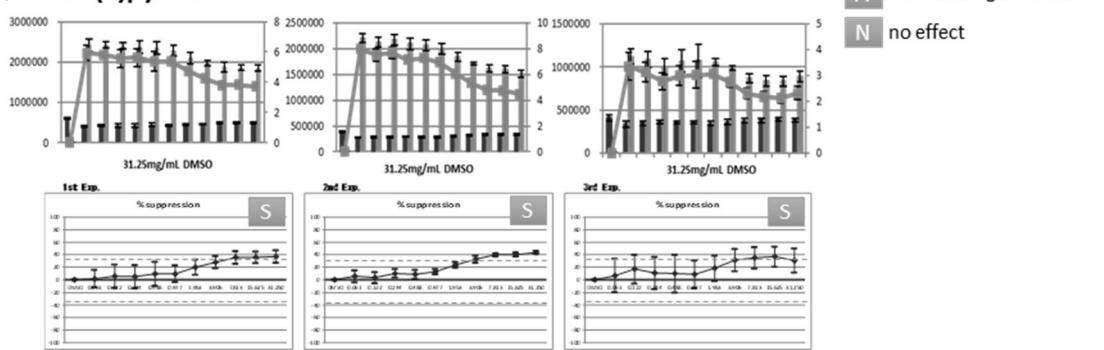
図4 phase2 試験結果

(図には、試験終了後に開示された被験物質名を表記した。また Phase2 試験において最終的に設定されたクライテリア 5 での評価結果を示した。)

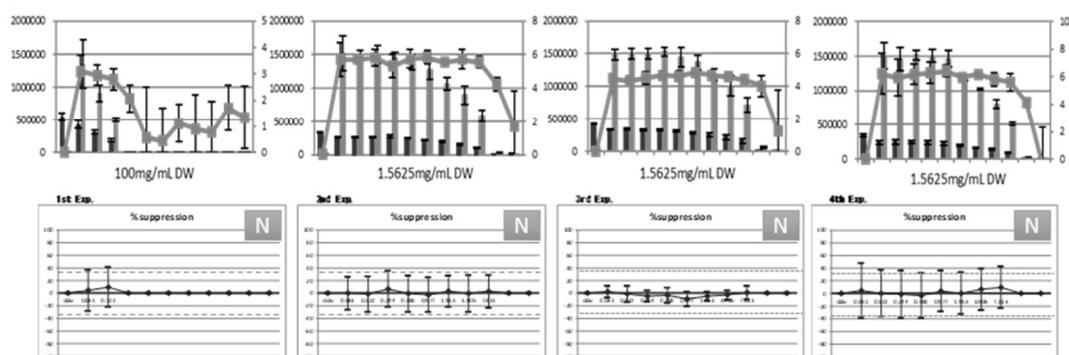
### 1、2,4-Diaminotoluene



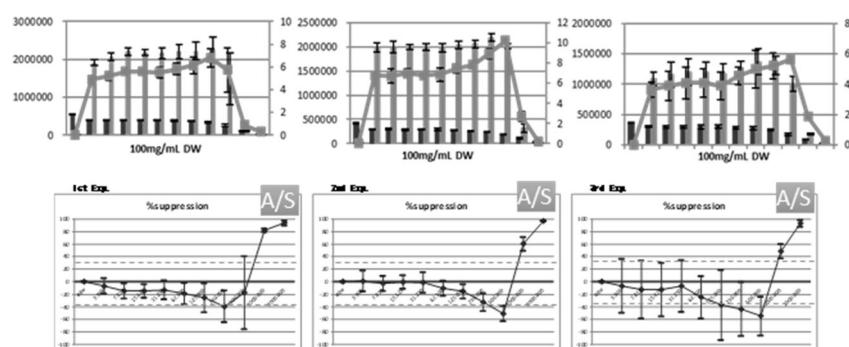
### 2、Benzo(a)pyrene



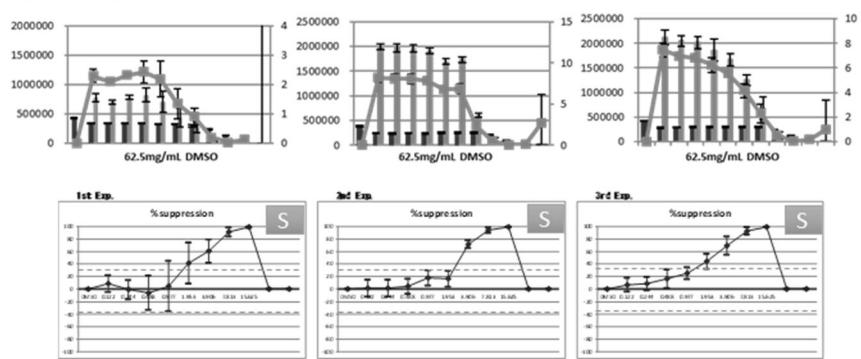
### 3、Cadmium chloride



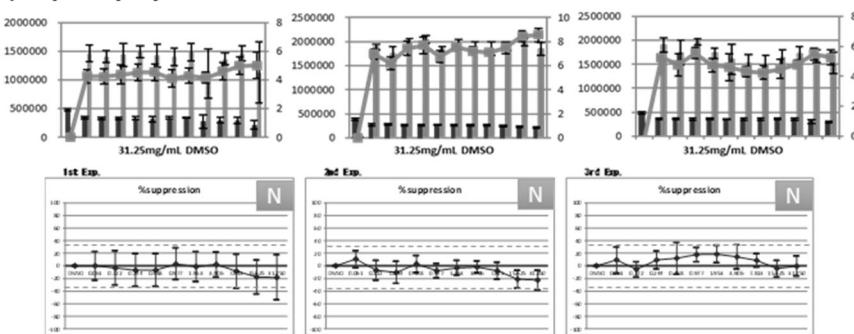
### 4、Dibromoacetic acid



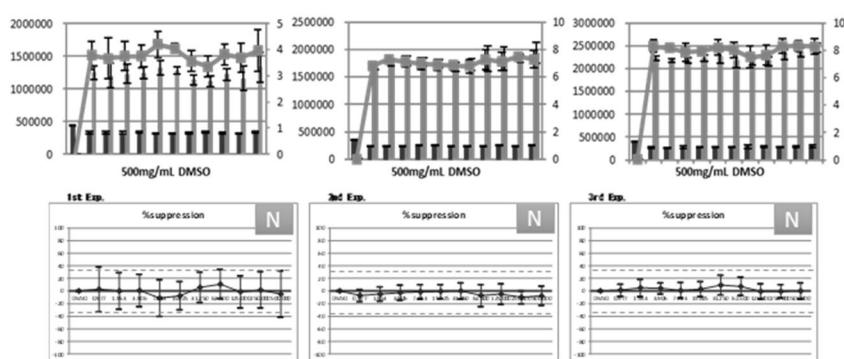
## 5, Diethylstilbestol



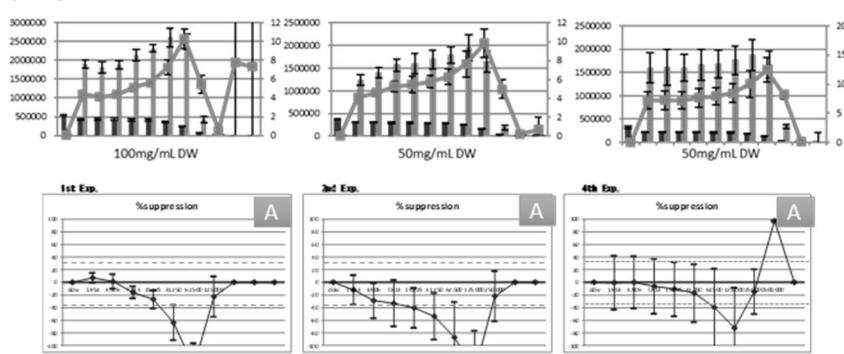
## 6, Diphenylhydantoin



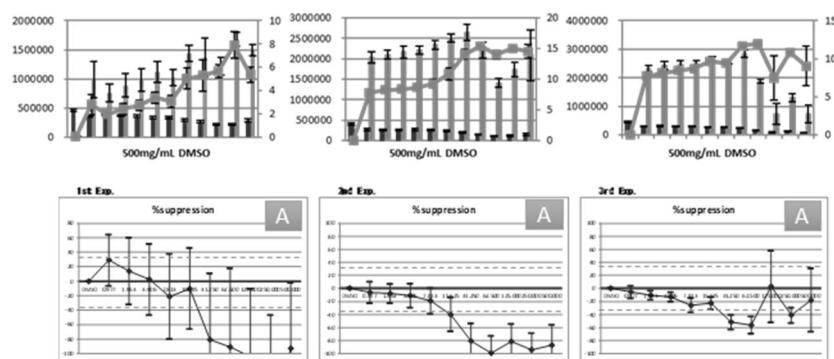
## 7, Ethylene dibromide



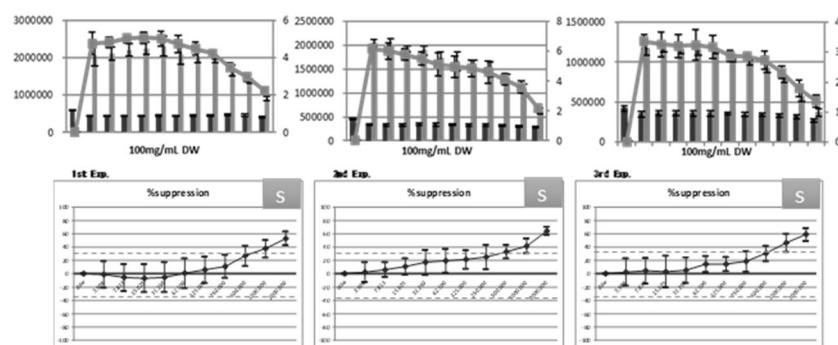
## 8, Glycidol



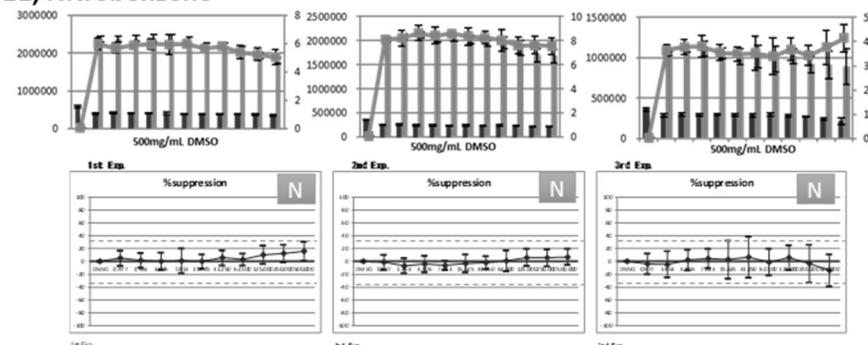
## 9, Indomethacin



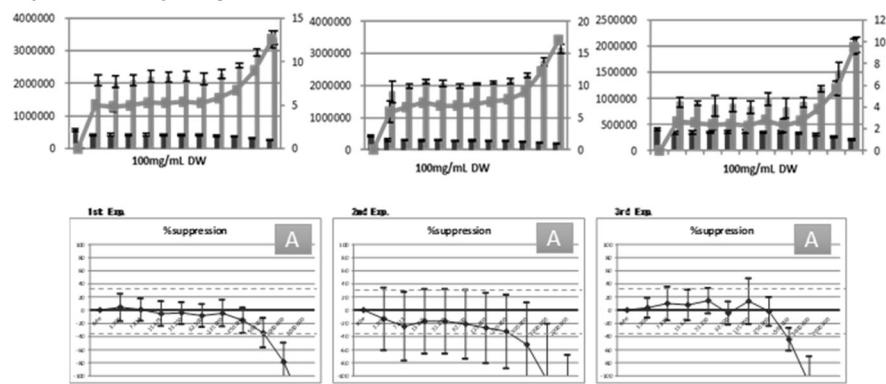
## 10, Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)



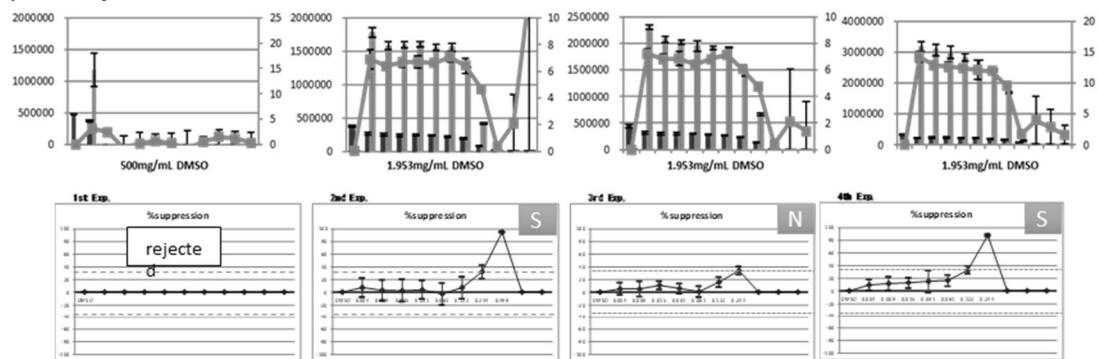
## 11, Nitrobenzene



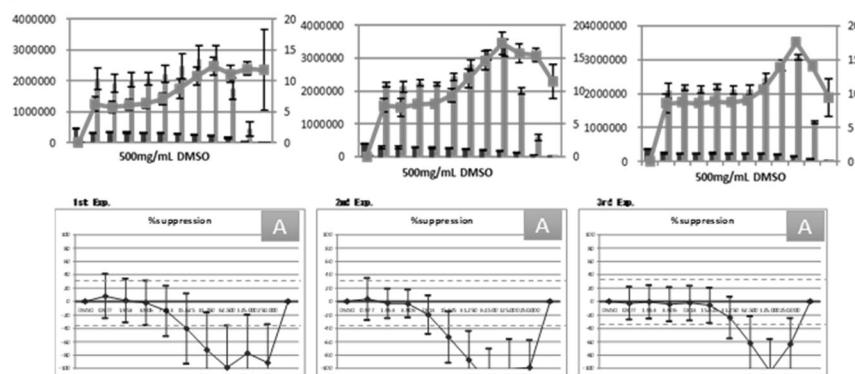
## 12, Urethane, Ethyl carbamate



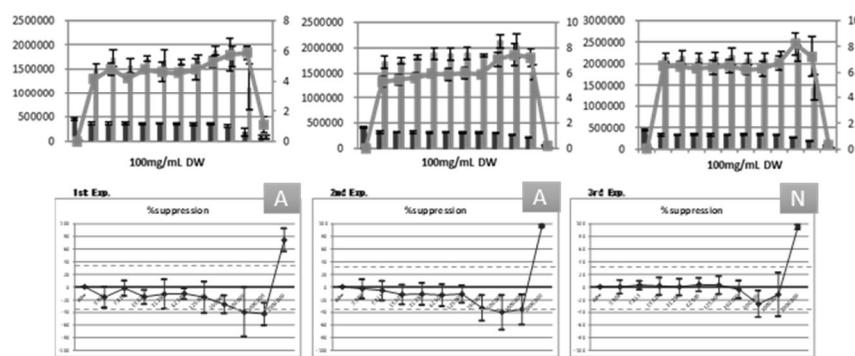
### 13, Tributyltin chloride



### 14, Perfluorooctanoic acid



### 15, Dichloracetic acid



### 16, Toluene

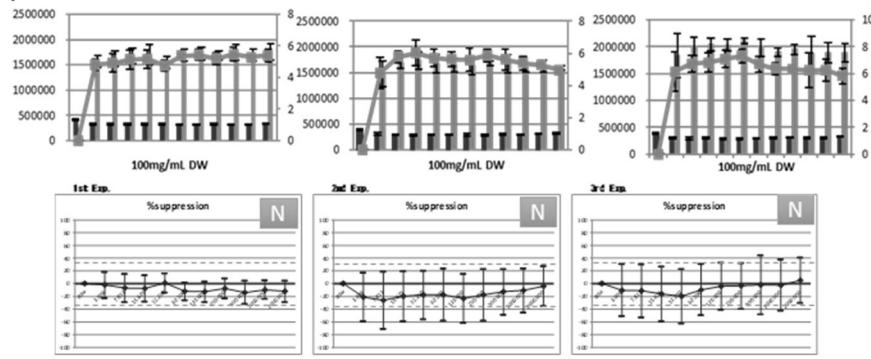


図5 Criteria5におけるphase2試験評価結果

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	Dichloracetic acid	A : AAN
16	Toluene	N : NNN
17	Acetonitril	N : NNN
18	Mannitol	N : NAN
19	Vanadium pentoxide	N : NAN
20	o-Benzyl-p-chorophenol	S : SSS

S ; immunosuppression

A ; immunoaugmentation

N ; No effec

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

化学物質のMITAによる解析, validation  
総括研究報告書

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できる化学物質の免疫毒性評価試験法である。これまでに得られた知見から、相場らはIL-2転写調節障害をkey eventとするT細胞分化異常誘導とIL-8転写活性更新をkey eventとした気道刺激性に関わるadverse outcome pathway ( AOP ) を作成した。このような背景のもと、IL-2レポーター活性を指標とする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、バリデーション試験が開始された。我々は、試験施設としてMITAのIL-2レポーターアッセイの実施を担当し、技術移転性 ( Phase 0 ) 施設内・施設間再現性 ( Phase I ) 施設間再現性 ( Phase II ) の評価に必要な実験を行った。

初年度はPhase 0として5物質の実験を実施し、良好な技術移転性を確認した。2年目は、Phase 1としてコード化した5物質を用いて施設内再現性および施設間再現性を検討した。その結果、暫定的ではあるが80%以上の再現性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物質の実験を行い、施設間比較を行うとともに、得られた結果をリードラボ（東北大）と比較することにより正確性を評価した。

その結果、80%以上の再現性を達成するためには、判定法の改良が求められることから、%suppressionの閾値を設定した判定基準5を設定した。この基準を採用した結果、施設内再現性はいずれの施設も80%、施設間再現性は80%、正確性は85%以上となり、いずれもstudy planにおける基準を満たし、国際バリデーション試験を終了した。

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・施設間再現性

A . 研究目的

MITA の開発者である相場らは、IL-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、技術移転性、施設内再現性、施設間再現性を検証するための実験を行った。

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

技術移転性を確認するPhase 0 studyでは、5物質(2-aminoanthraece、chloroquine、citral、dexamethasone、methylmercury(II) chloride)を用いた。

施設内および施設間再現性を確認するPhase I studyでは、国立医薬品食品衛生研究所でコード化して送付された5種類の化学物質を1セットとする3セット(Aセット、Bセット、Cセット)を用いた(表1)。

施設間再現性を確認するために実施したPhase II studyでは、コード化して送付された20物質(コード番号:MIC601~MIC620)を用いた(表2)。

## B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコルに準じて行った。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<sup>5</sup>細胞/well、50 µL/well)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(37°C、5%CO<sub>2</sub>)後にTripluc luciferase assay reagent(TOYOB0)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ラウンド)が得られるまで異なる日による実験を繰り返した。

なお、Phase毎に結果を確認し、必要があればプロトコルの変更を実施した。判定基準の変更も行われ、最終的に%suppression

の閾値を±35%と設定した以下の判定方法が採用された。

### <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(1.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

Phase 0ではコード化せずに5物質の実験(1ラウンド、すなわち1物質につき3回実施)を行い、その結果をリードラボである東北大へ送付した。3施設の結果を比較し、技術移転性を確認し、コード化物質での実験を開始した。

Phase Iでは施設内再現性を確認するために、コード化されている5物質を1セットとし3セット、すなわち1セット計15回の実験を3回実施した(図1~3)。また、判定基準5による物質毎の結果(1ラウンド3実験、3ラウンド)を図4~8に示した。5物質中3物質はすべての実験で同じ判定となり完全な施設内再現性が得られた。2物質は、3実験のうち1実験で異なる結果が得られ、同じ判定となった2実験の判定を最終判定とした。その結果、hydrocortisoneでは3ラウンドの判定が一致し、施設内再現性のある結果が得られた(図5)。一方、zinc dimethyl dithiocarbamateでは、3ラウンド中1ラウンドの判定が一致せず、施設内再現性が得られなかった(図8)。

Phase IIにおける施設内再現性は3施設ともに80%、施設間再現性は80%であった(表3)。

Phase IIでは施設間再現性を確認するために、コード化した20物質の実験を行った(図9)。

判定基準5を採用した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我々の正確性は85% (17/20) であった(表4)。

#### D. 考察

Phase Iでは、1物質について3実験(1ラウンド)を3回の計9実験の結果が得られ、それが5物質分の計45実験の結果が得られた。

MITAの開発者である相場らは、実験毎に統計処理し、3実験の結果が異なる場合にはさらに統計処理を利用して判定する方法(判定基準1)を採用していた。それに対して、統計の専門家から3実験の違いを調整して判定する2つの方法(判定基準2:平均の差を用いる方法、判定基準3: %suppressionの平均の差を用いる方法)が提案されたことから、Phase Iの結果について比較検討が行われた。その結果、採用する判定方法によって再現性の達成率が異なるが、判定基準1で3試験施設ともに80%以上の再現性を達成した。

しかしながら、マネージメントチームの専門家から濃度依存性を考慮した判定が必要との意見を受け、%suppressionの基準に濃度依存性を考慮した判定法(判定基準3')を提案しPhase Iの結果をその方法で再評価した。その結果、施設内再現性および施設間再現性ともに80%となったことから、Phase II studyではこの判定法を採用することとなった。

Phase IIで実施した20物質について判定基準3'による判定を行った結果、80%以上の施設間再現性が得られなかった。この結果についてマネージメントチームの専門家を交えて議論し、判定基準の再検討が行われた。その結果、判定基準3'にさらに%suppressionの閾値( $\pm 35\%$ )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。

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%と判定基準の変更による影響は許容範囲内であった。

免疫毒性に関するin vivoのデータは少し示したないことから、バリデーション試験結果の正確性については、リードラボの結果との一致率により判定した。その結果、Phase Iでは80~100%、Phase IIでは85~95%となり、良好な結果が得られたが、今後さらにin vivoの既存データの精査が必要である。

#### E. 結論

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のために、試験施設として国際バリデーション試験に参加し、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、この評価系の国際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 Fujimura<sup>1</sup>, 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. 10<sup>th</sup> 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<sup>1</sup>、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 真弓、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 I ) に使用した化学物質

No.	Chemical	Cas.no.	State	Code No.
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	Liquid	MIC027A
				MIC026B
				MIC023C
2	Hydrocortisone (for Cell Culture)	50-23-7	Solid	MIC029A
				MIC028B
				MIC025C
3	Lead(II) acetate trihydrate ( Deleterious substances )	6080-56-4	Solid	MIC021A
				MIC210B
				MIC027C
6	Nickel ( II ) sulfate hexahydrate	10101-97-0	Solid	MIC025A
				MIC024B
				MIC021C
5	Zinc dimethyldithiocarbamate (DMDTC)	137-30-4	Solid	MIC023A
				MIC027B
				MIC029C

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 ) 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	Dichloracetic 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3 MITA ( IL-2 レポーター活性試験 ) のバリデーション試験 ( Phase I ) の結果

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)		
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	S
				2nd 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)		
				1st round	S : SAS	N	S : SSS	S	S : NSS	S	S
				2nd round	N : NNN		S : SSS		S : SSN		
3	Lead(II) acetate	6080-56-4	S : SSS	solubility	100mg/ml(ddw)		25mg/ml(ddw)		100mg/ml(ddw)		
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	S
				2nd 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)		
				1st round	S : SSS	S	S : SSS	S	S : SSS	S	S
				2nd round	S : SSS		S : SSS		S : SSS		
5	Dimethyldithiocarbamate	137-30-4	N : SNN	solubility	62.5mg/ml(DMSO)			62.5mg/ml(DMSO)			
				1st round	N : NNN	N	N : NNN	N	N : NNA	N	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%						

表4 MITA ( IL-2 レポーター活性試験 ) のバリデーション試験 ( Phase II。; ) の結果

No	Chemical	Cas.no.	Lead Labo	Phase II Results					Based on Majority
				Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordance		
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	Indometacin	53-86-1	A : NAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	S : SSN	S : SSS	N : ANN	S : SSS	0	S	
11	Nitrobenzene	98-95-3	N : NNN	N : NNN	S : SSS	N : NNN	0	N	
12	Jrethane, Ethyl carbamate	51-79-6	A : AAA	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	S : SSS	S : SNS	S : SSS	S : SSS	1	S	
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	A : AAN	A : AAA	A : AAA	A : AAA	1	A	
15	Dichloroacetic acid	79-43-6	S : SSS	A : AAN	S : SSS	S : SSN	0	S	
16	Toluene	108-88-3	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : NNN	1	N	
17	Acetonitrile	75-05-8	N : NNN	N : NNN	N : NNN	N : ANN	1	N	
18	Mannitol	69-65-8	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : NNN	1	N	
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	N : NNN	N : NAN	N : NNN	N : ANN	1	N	
20	o-Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	S : SSS	S : SSS	S : SSS	S : SSS	1	S	
Accuracy				90%	85%	95%	95%		
							Between	80%	

図1 コード化5物質(Aセット)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

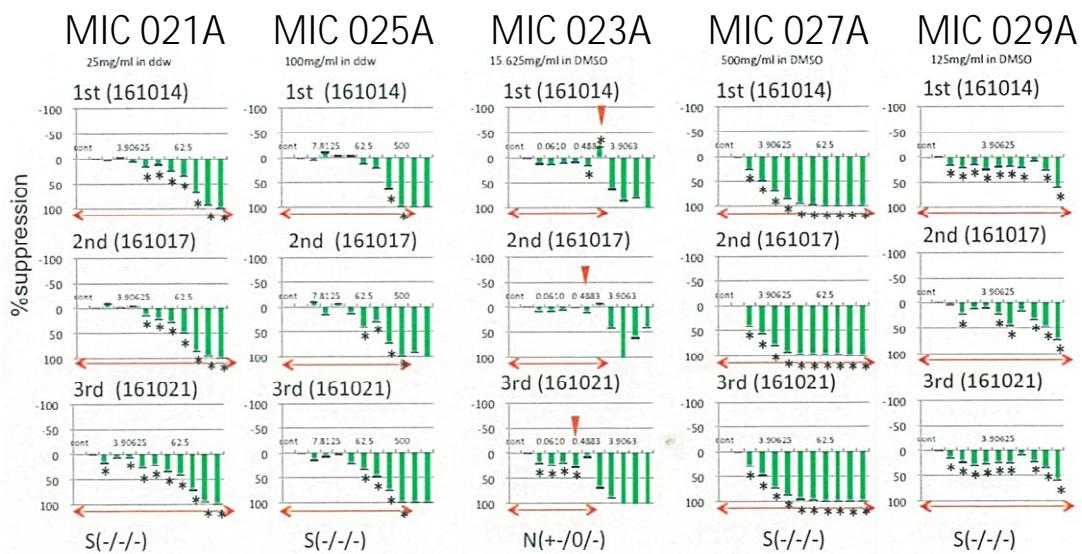


図2 コード化5物質(Bセット)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

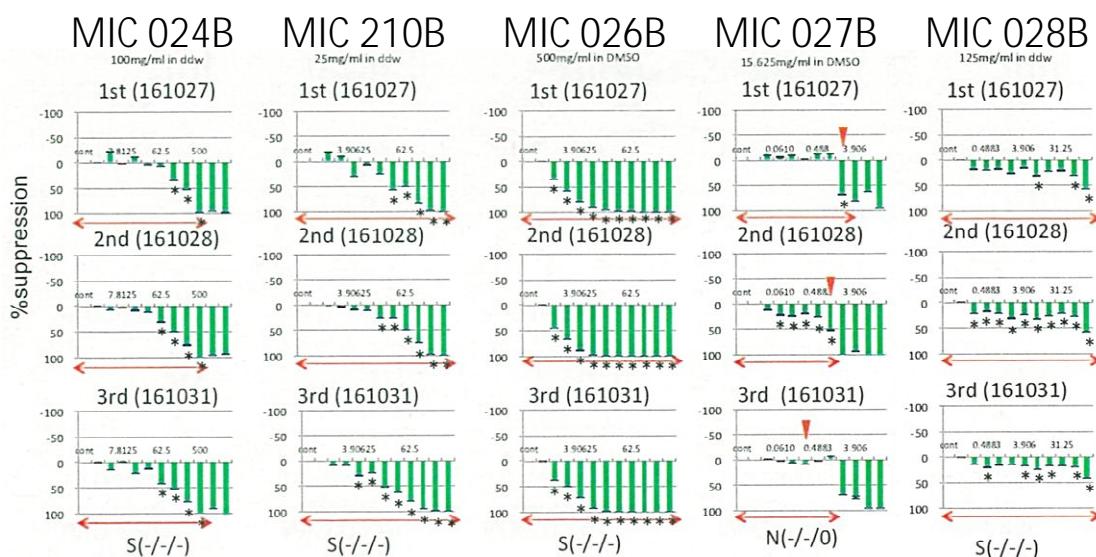


図3 コード化5物質(Cセット)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

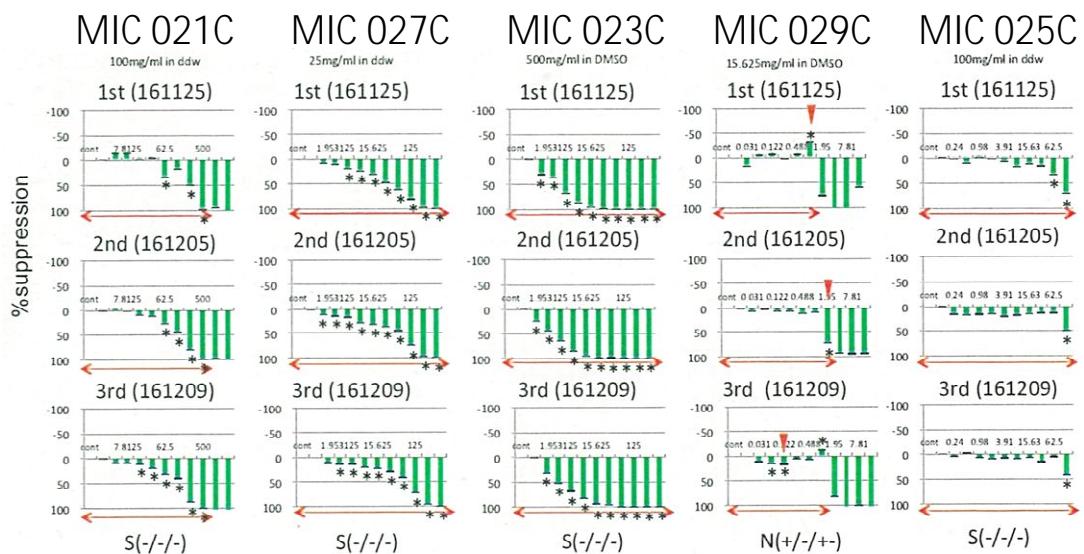


図4 コード化物質(dibutyl phthalate)の施設内再現性(Phase I)の結果

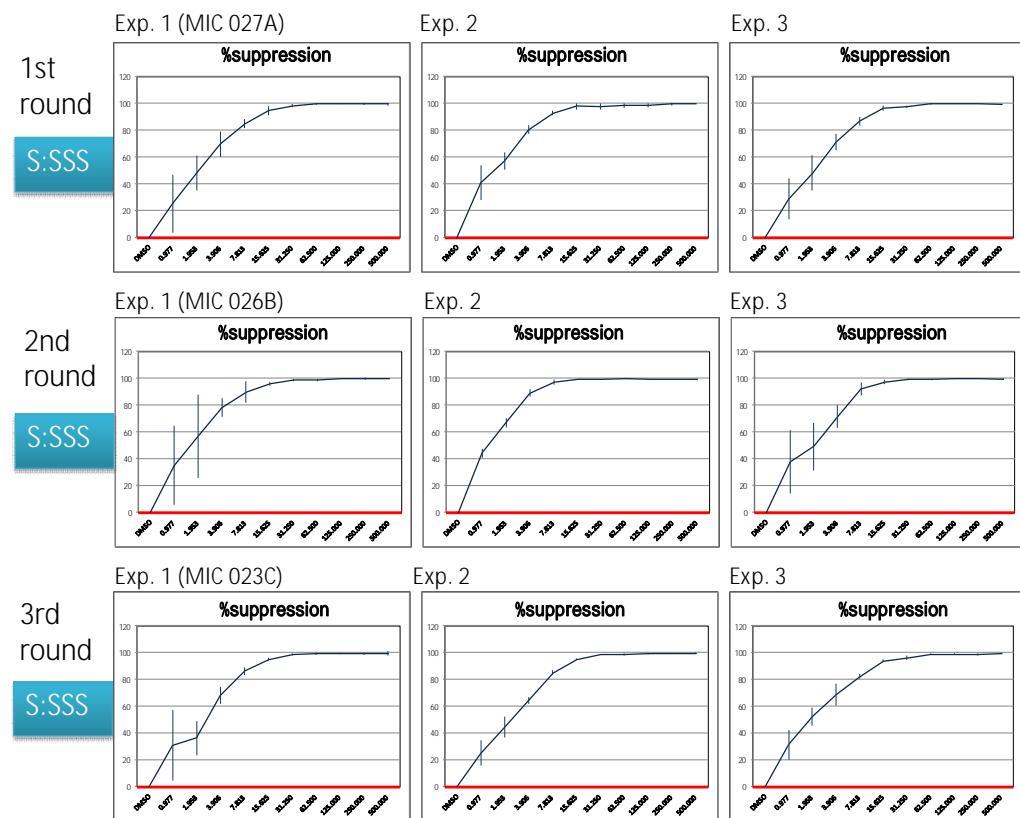


図5 コード化物質 (hydrocortisone) の施設内再現性 (Phase I) の結果

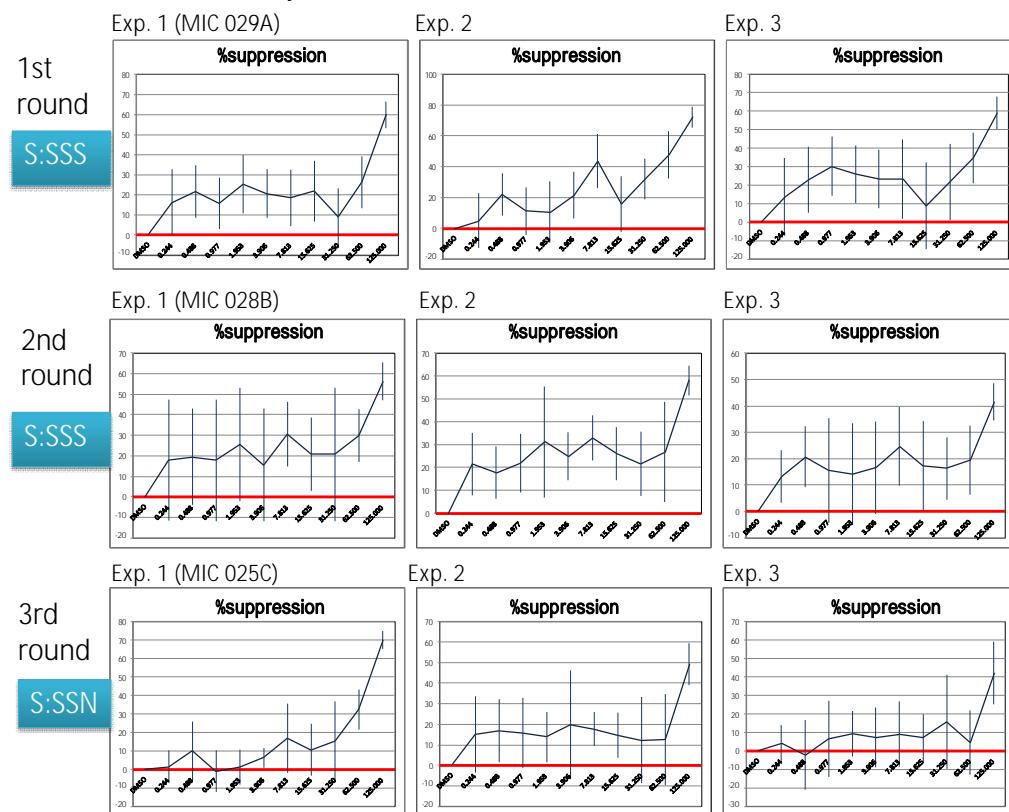


図6 コード化物質 (lead (II) acetate trihydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

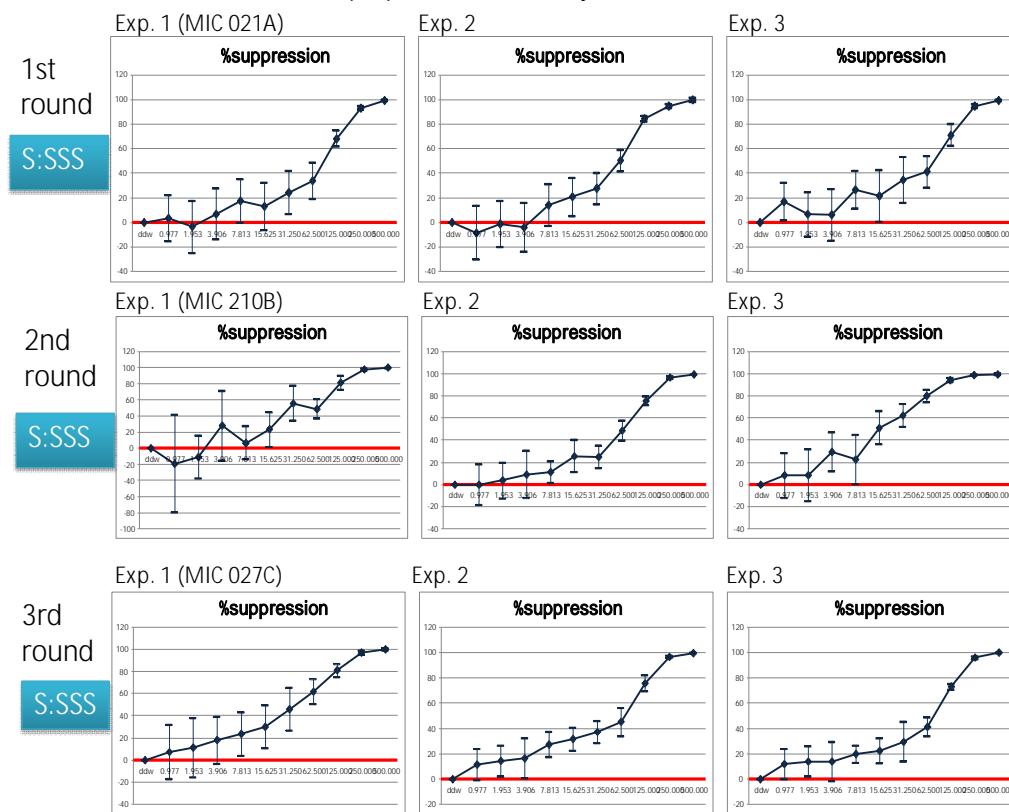


図7 コード化物質 (nickel (II) sulfate hexahydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

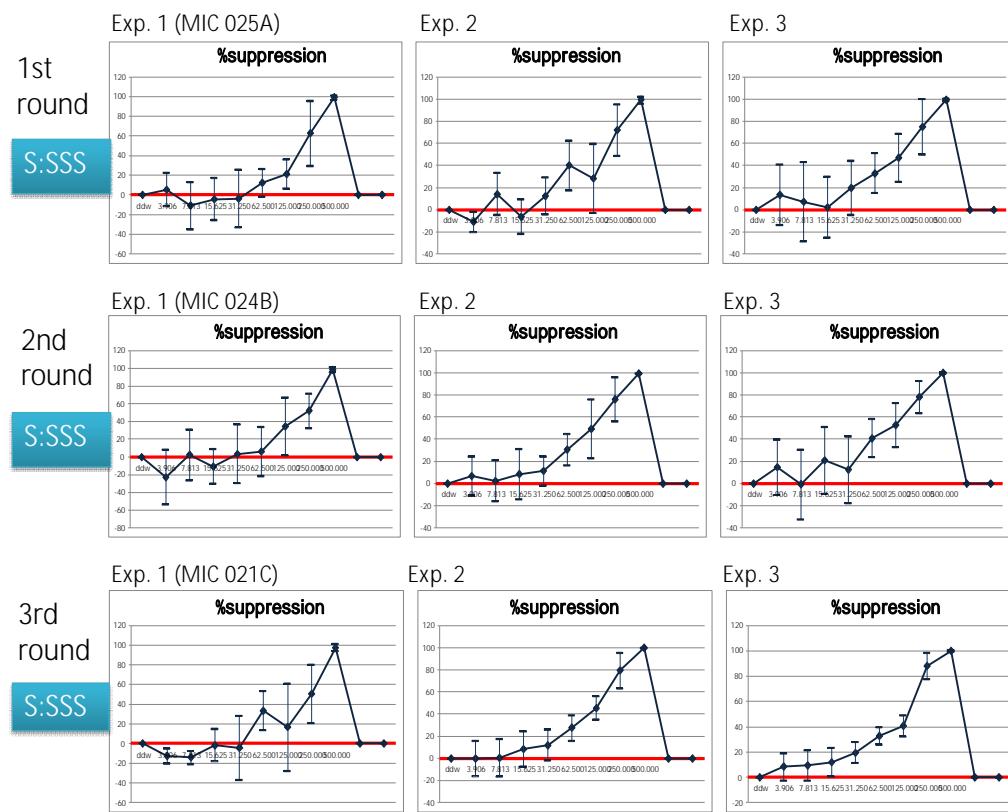


図8 コード化物質 (zinc dimethylidithiocarbamate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

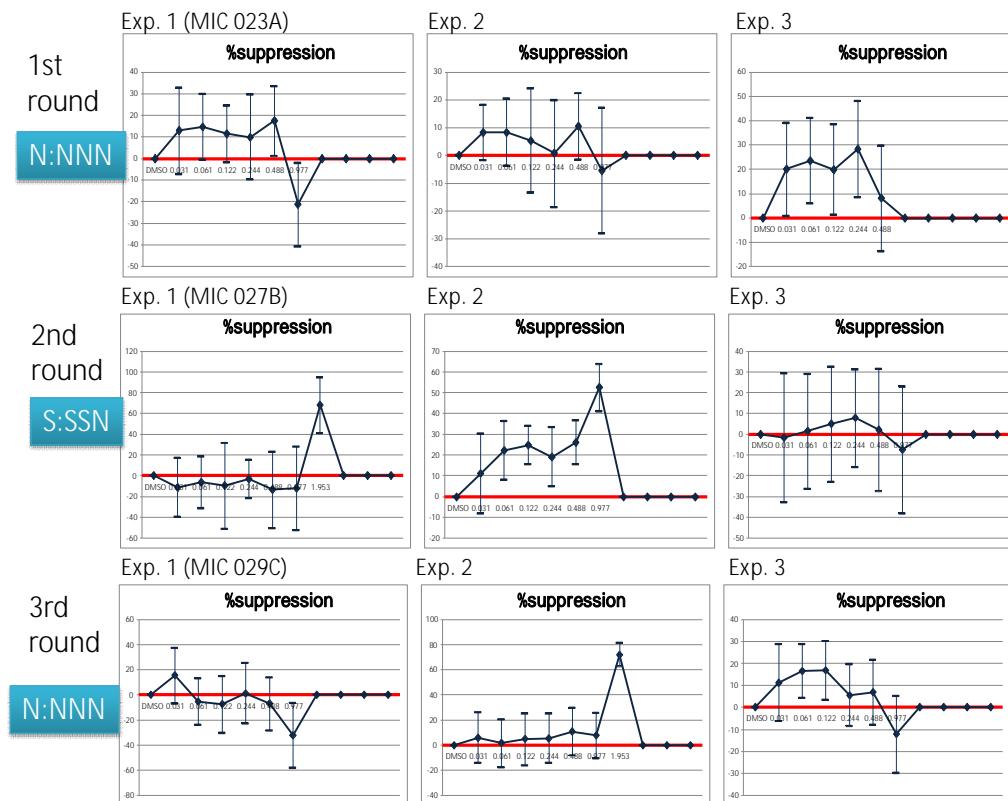
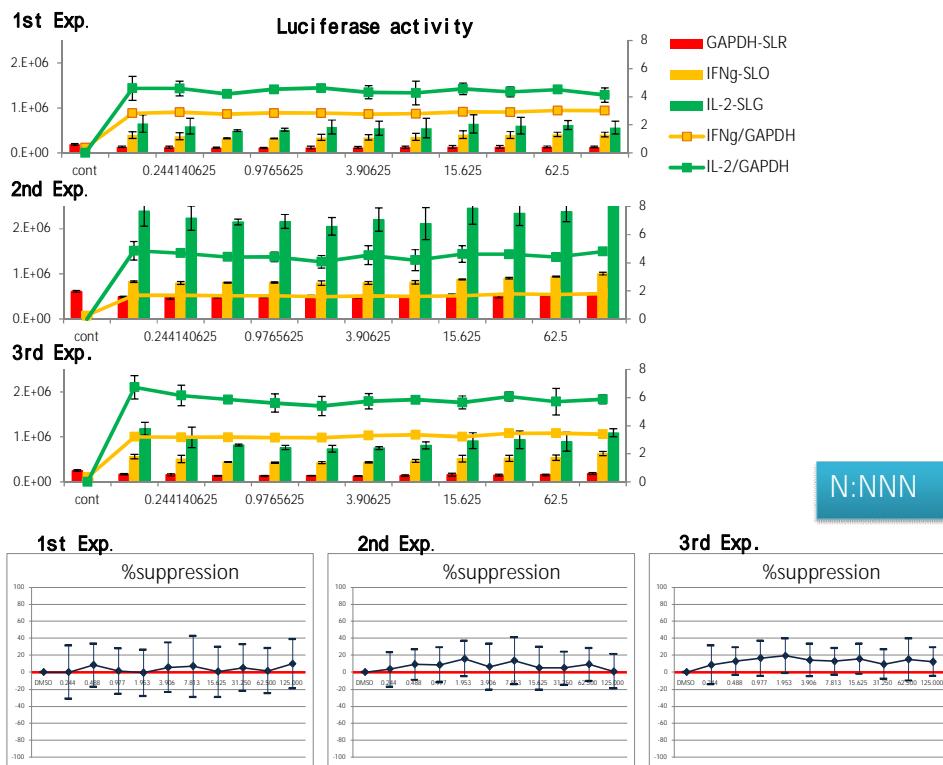


図9 コード化20物質のIL-2レポーター活性試験(Phase II)の結果

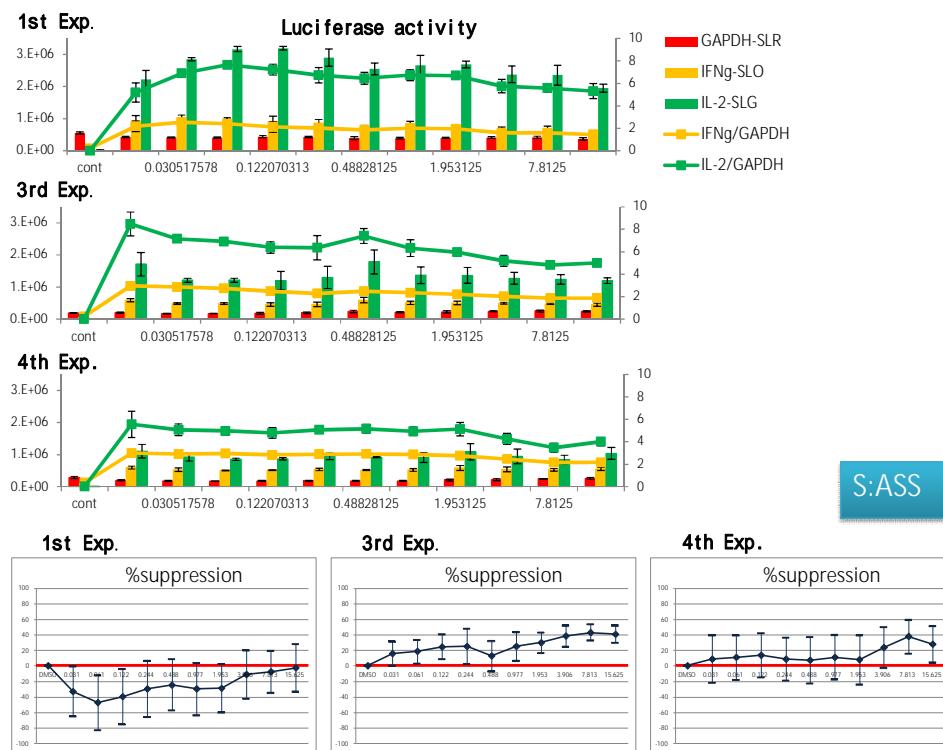
No.1 <2,4-Diaminotoluene, Code No.:MIC618>

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

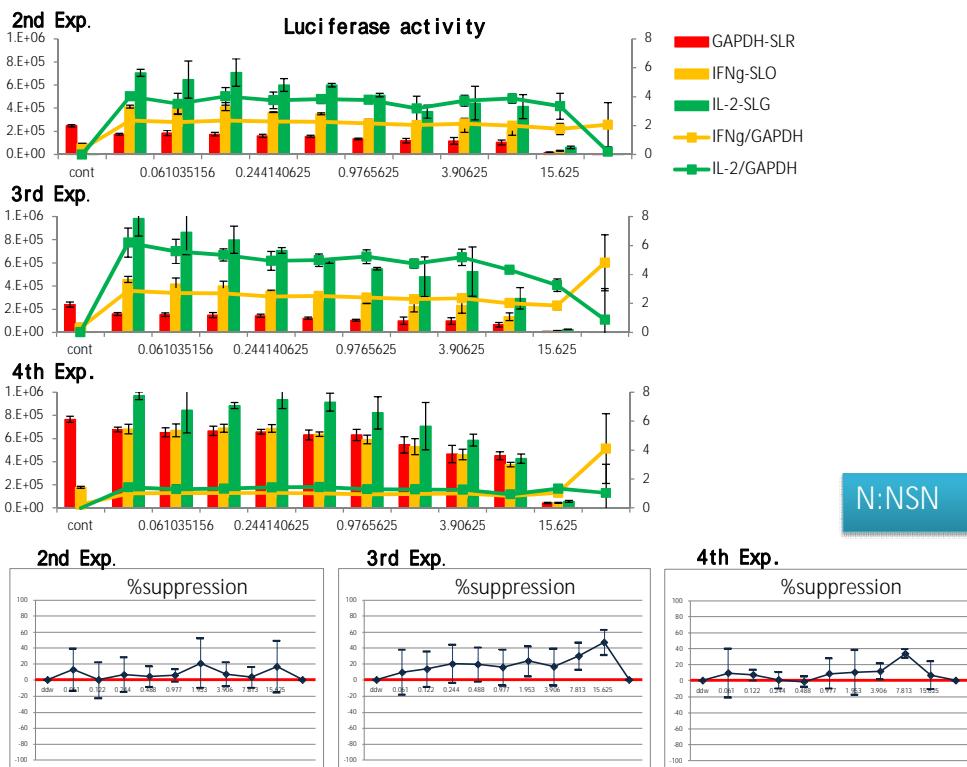


No.2 <Benzo(a)pyrene, Code No.:MIC601>

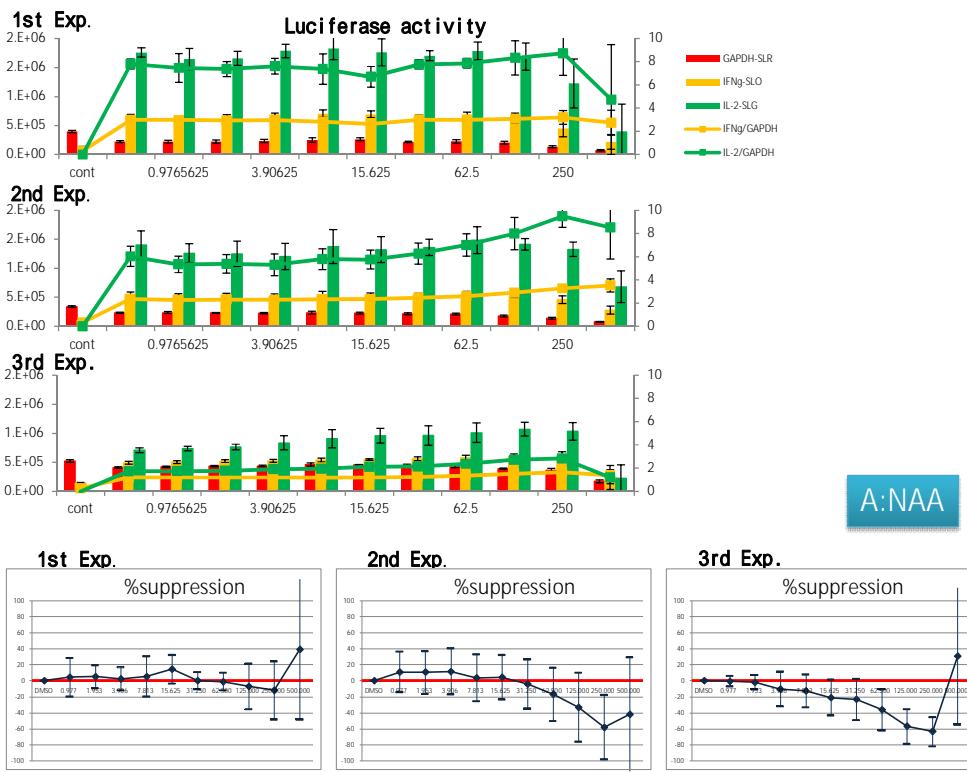
(The maximum concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



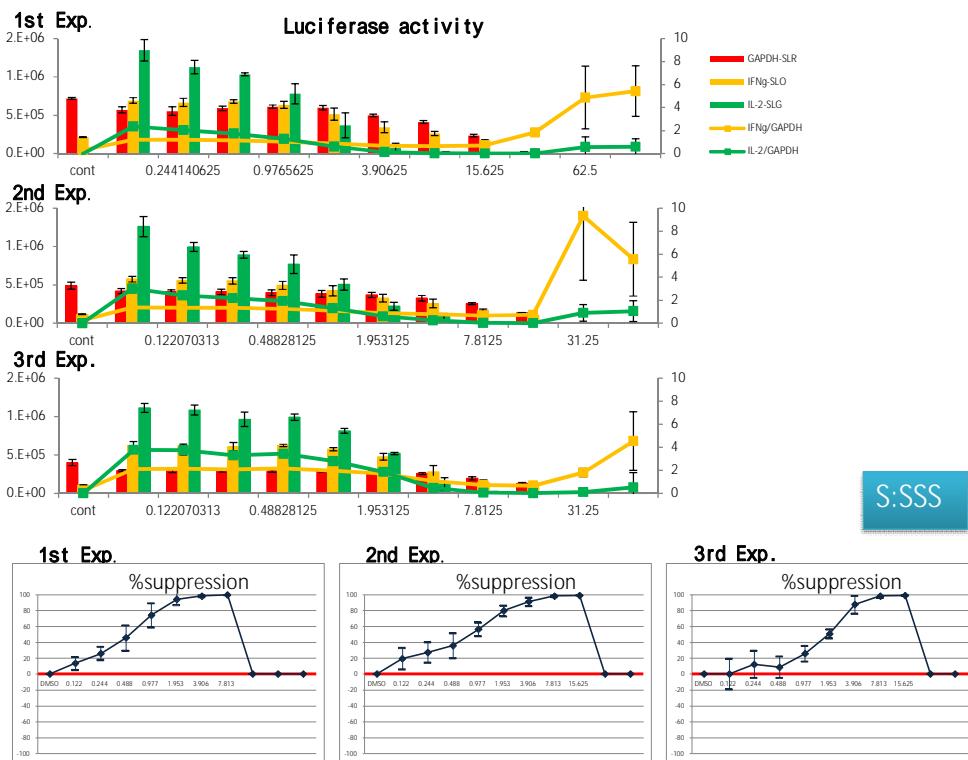
**No.3 < Cadmium chloride, Code No.:MIC602>**  
 (Final concentration: 31.25 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



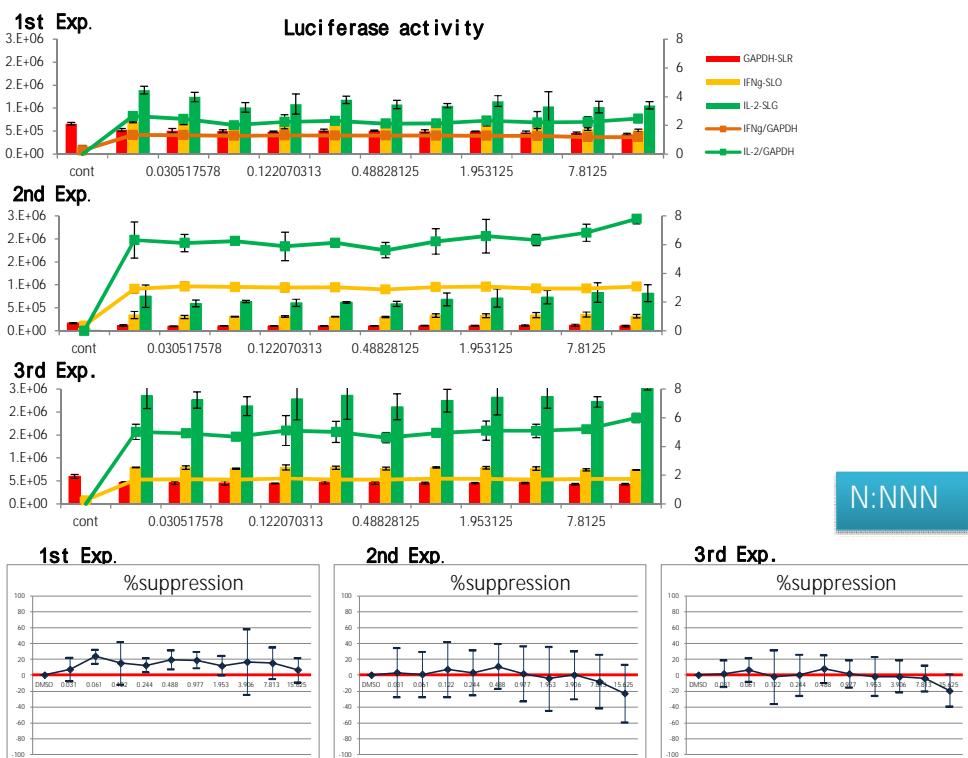
**No.4 < Dibromoacetic acid, Code No.:MIC610>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



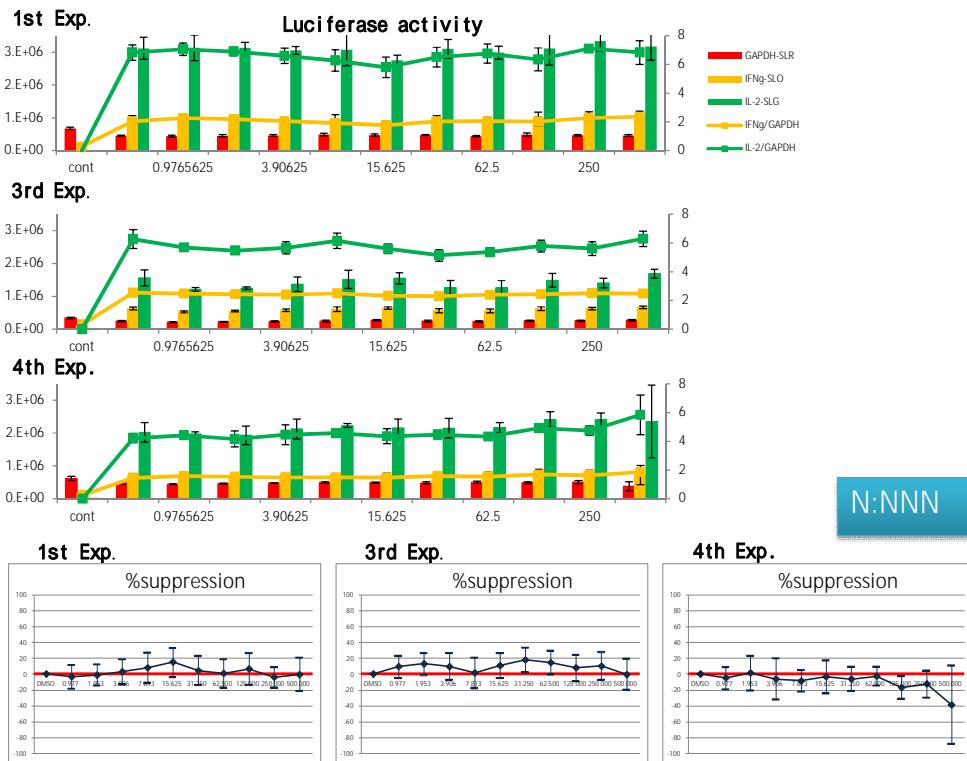
**No.5 <Diethylstilbestol, Code No.:MIC611>**  
(Final concentration: 125 or 62.5 µg/ml, Vehicle: DMSO)



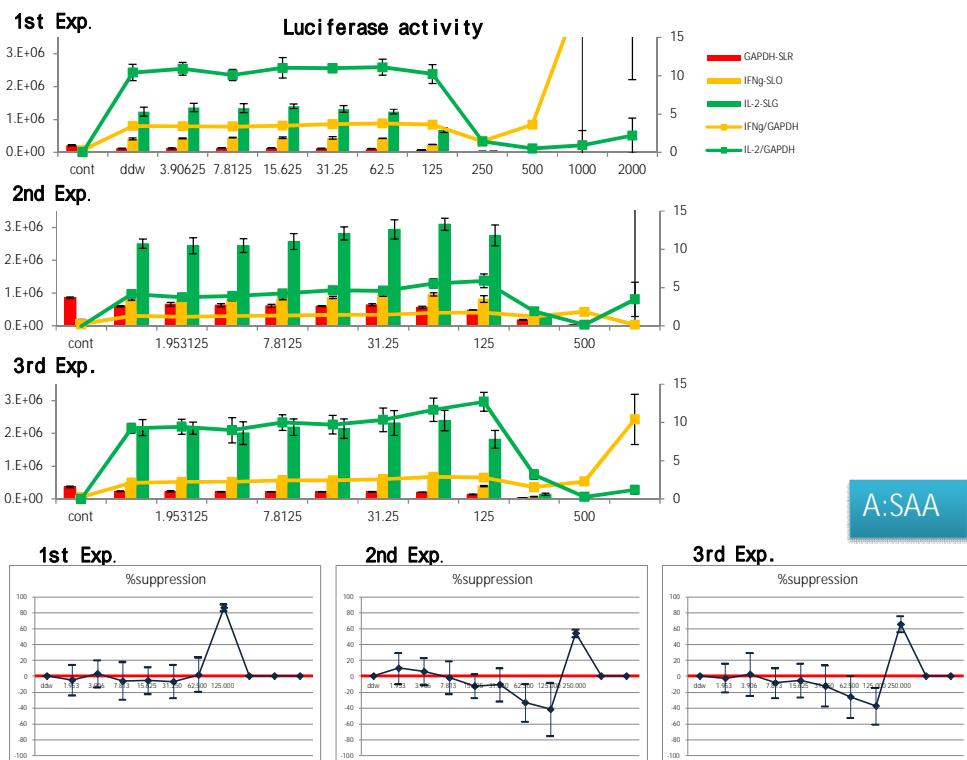
**No.6 <Diphenylhydantoin, Code No.:MIC615>**  
(Final concentration: 15.6 µg/ml, Vehicle: DMSO)



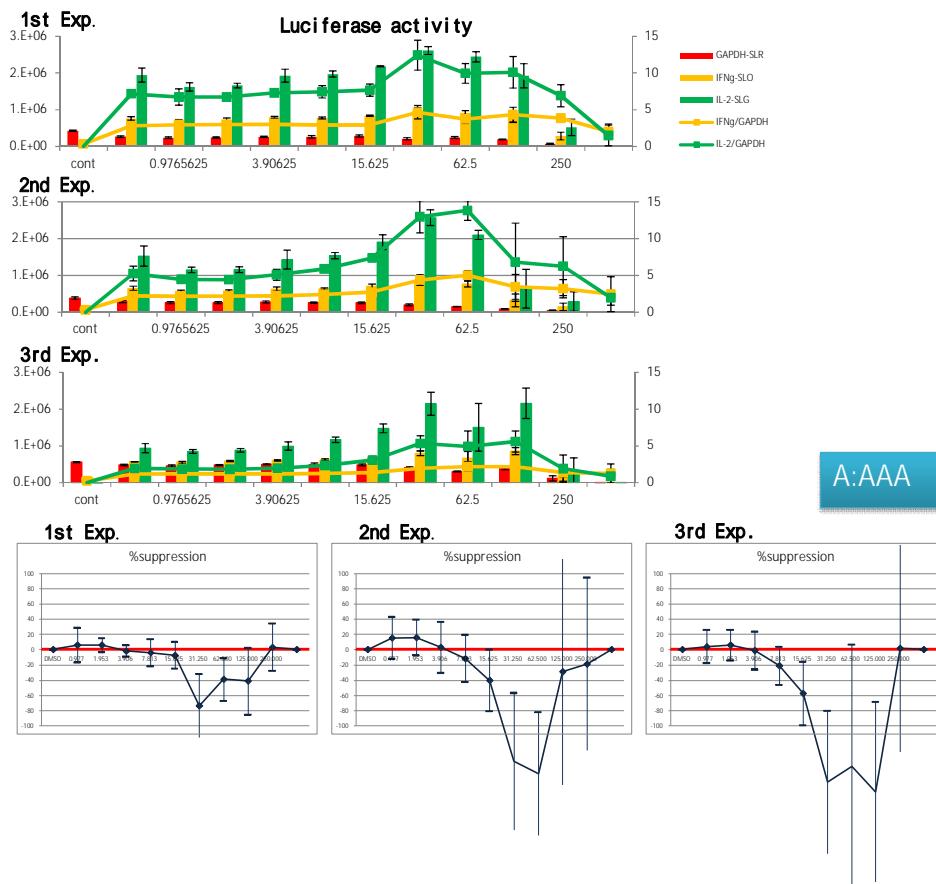
**No.7 <Ethylene dibromide, Code No.:MIC605>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



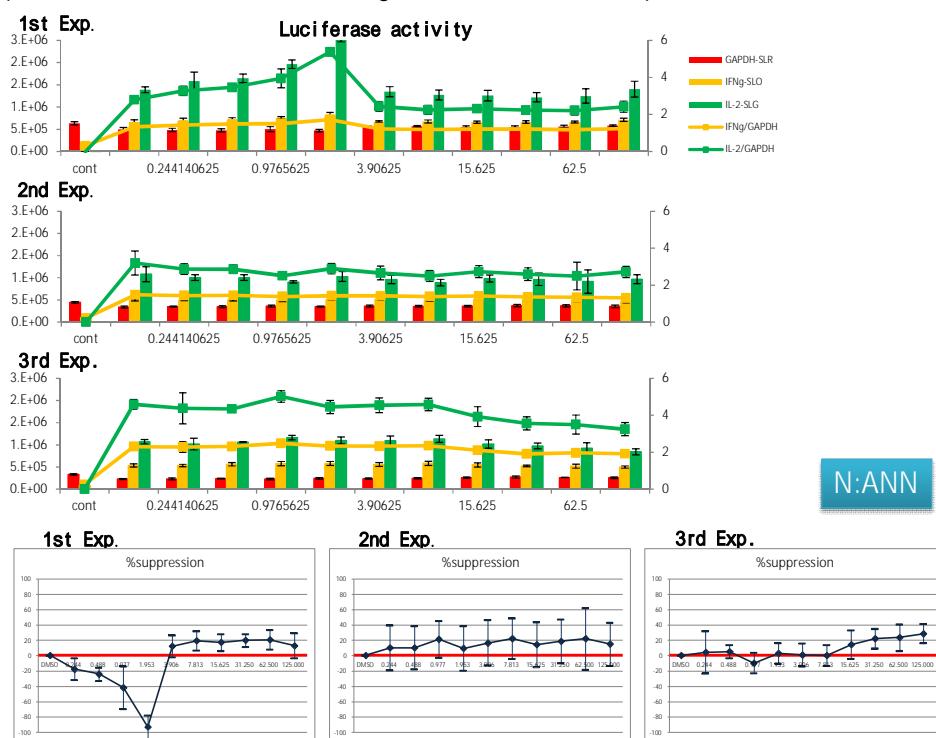
**No.8 <Glycidol, Code No.:MIC607>**  
 (Final concentration: 1000 or 1000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



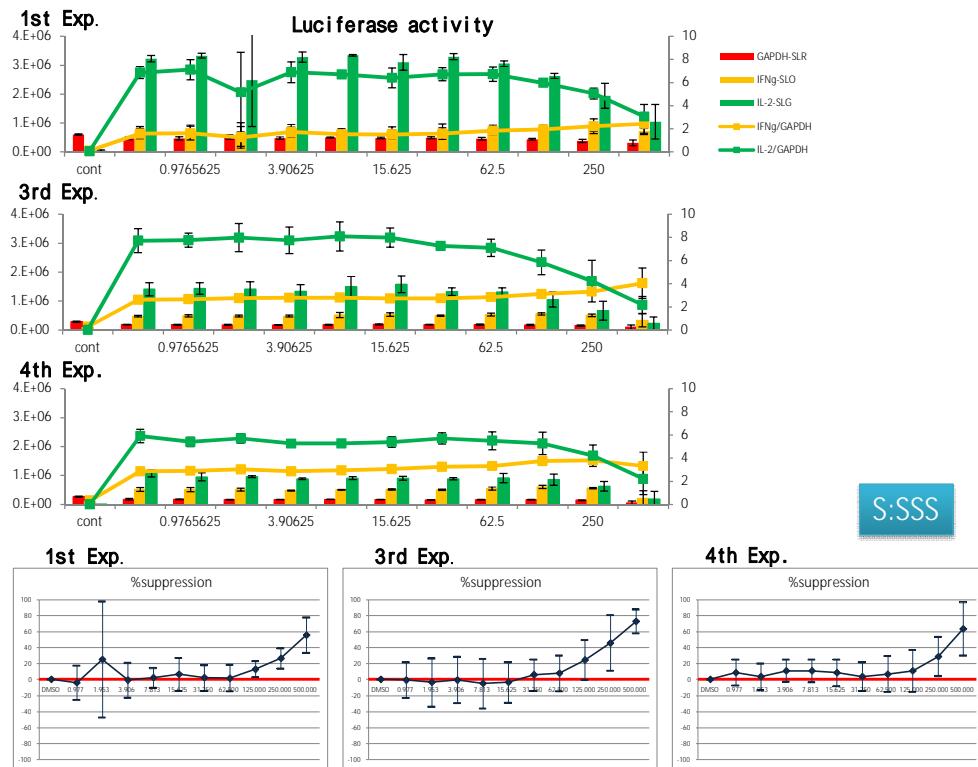
**No.9 <Indomethacin, Code No.:MIC609>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



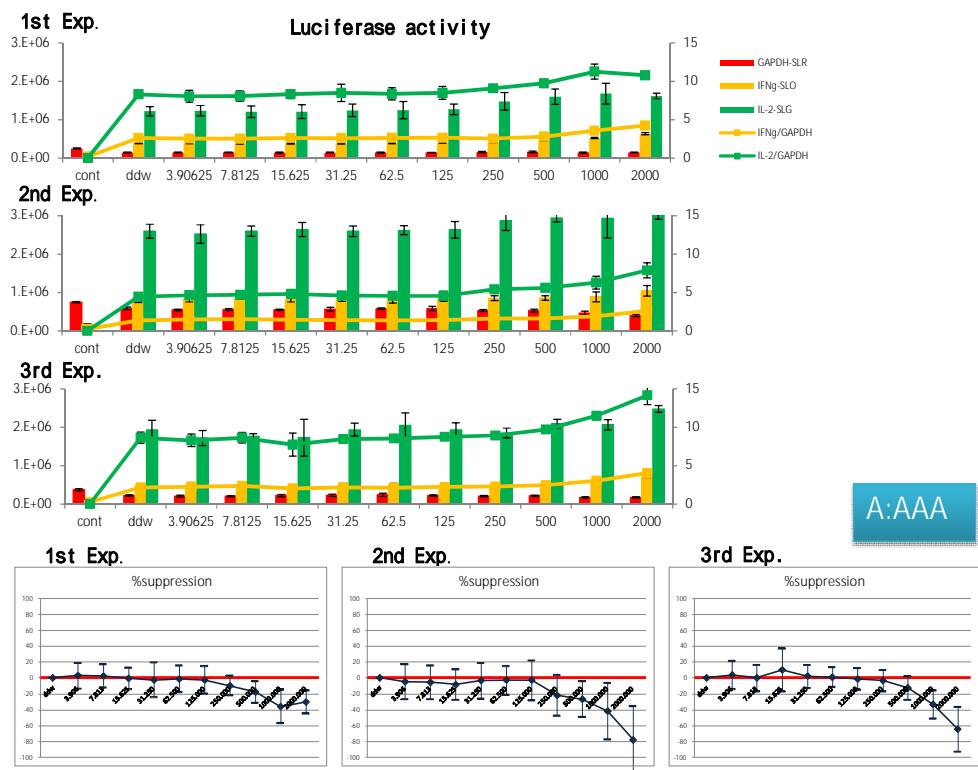
**No.10 < Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid), Code No.:MIC612>**  
 (Final concentration: 125 µg/ml, Vehicle: DMSO)



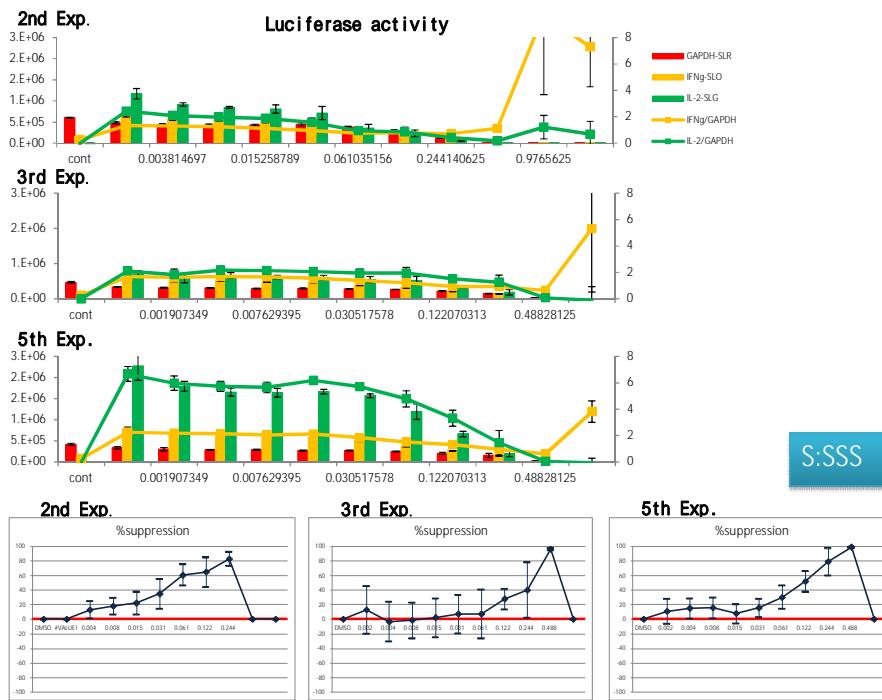
**No.11 <Nitrobenzene, Code No.:MIC603>**  
(Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



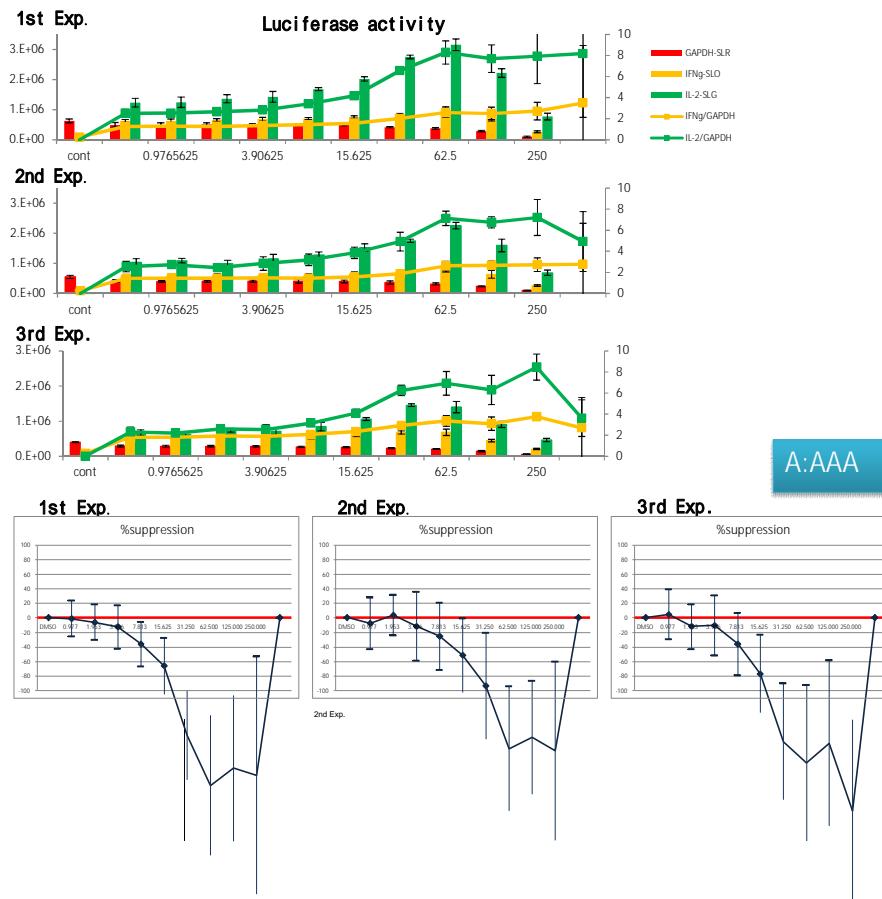
**No.12 <Urethane, Ethyl carbamate, Code No.:MIC604>**  
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



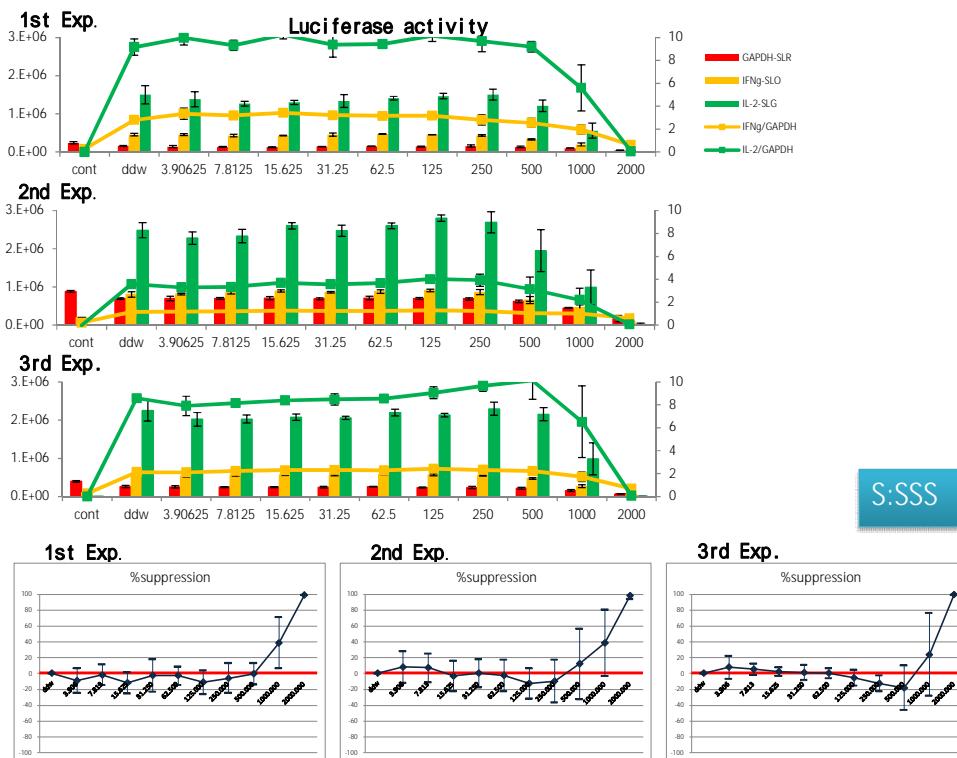
**No.13 <Tributyltin chloride, Code No.:MIC613>**  
 (Final concentration: 1.95 or 0.977 µg/ml, Vehicle: DMSO)



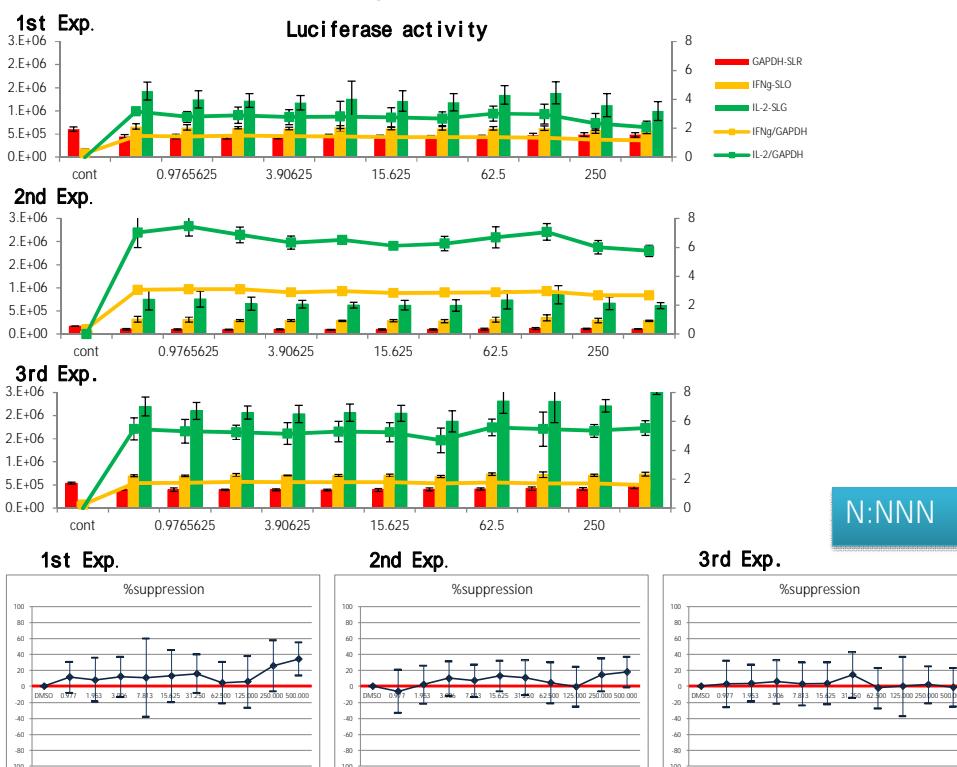
**No.14 <Perfluorooctanoic acid, Code No.:MIC614>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



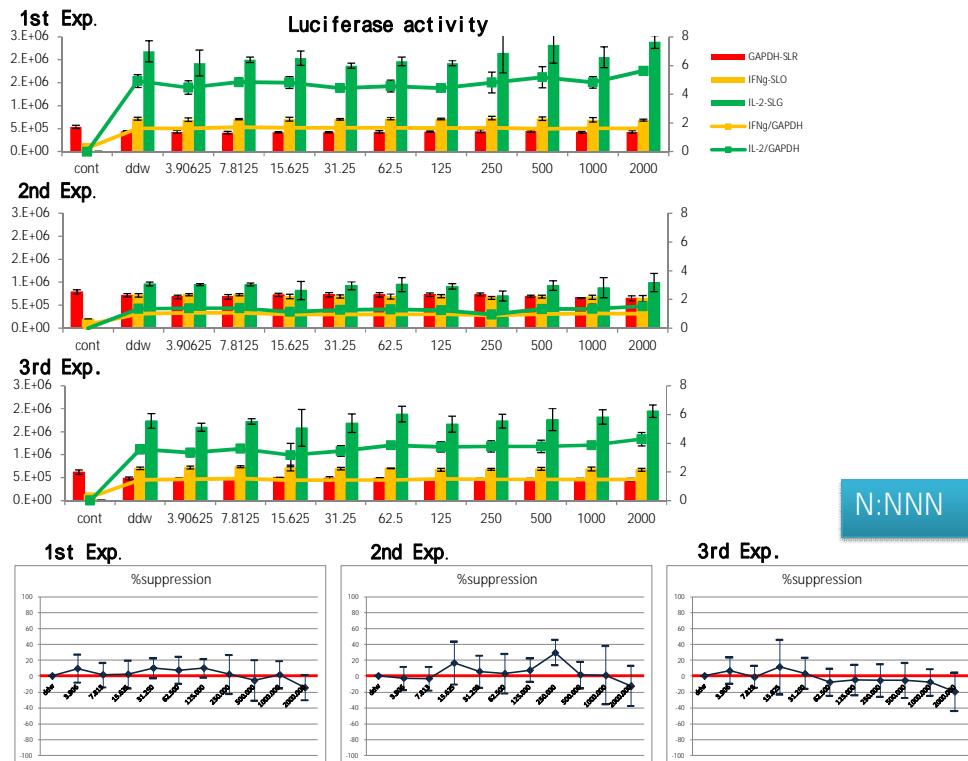
**No.15 < Dichloracetic acid, Code No.:MIC606>**  
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



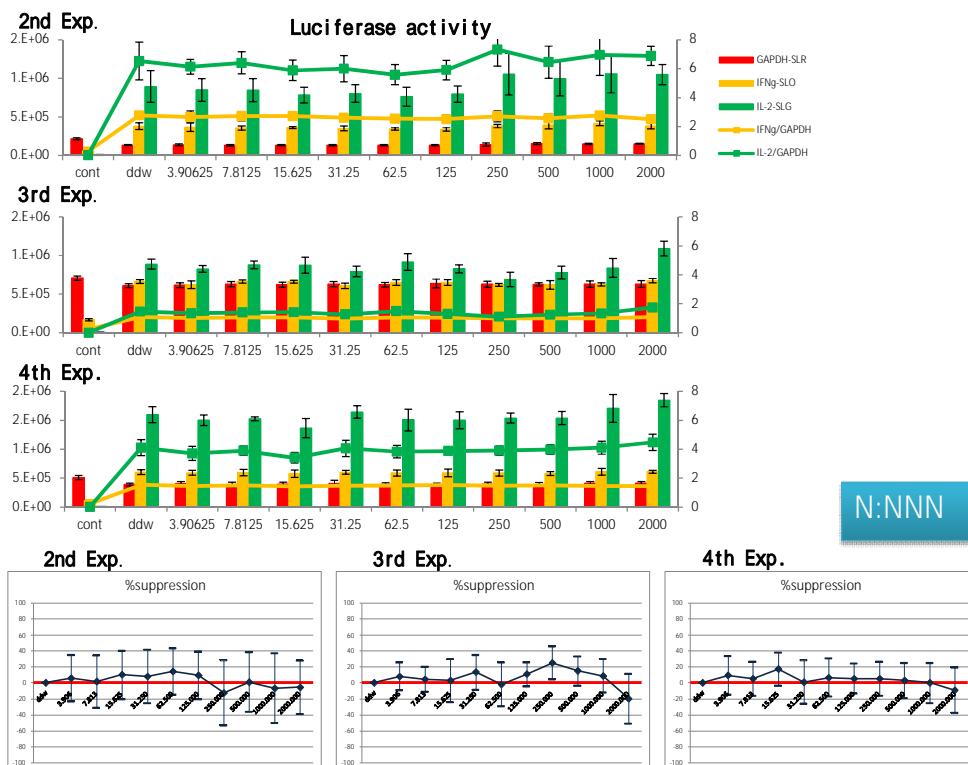
**No.16 < Toluene, Code No.:MIC616>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



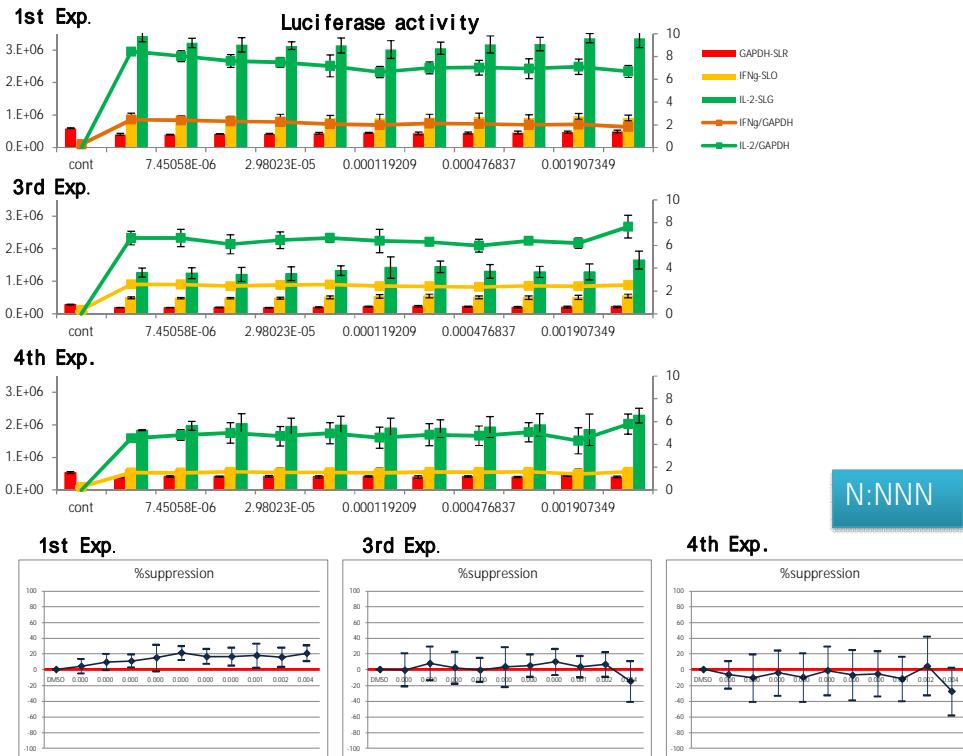
**No.17 <Acetonitril, Code No.:MIC617>**  
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



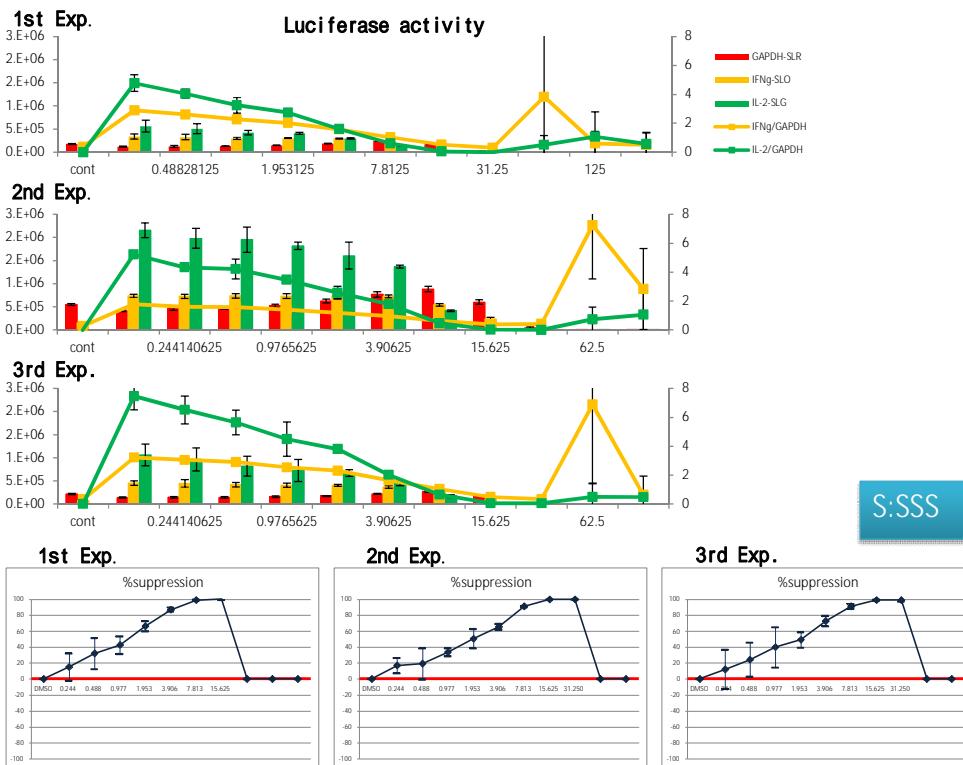
**No.18 <Mannitol, Code No.:MIC619>**  
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



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



No.20 < $\alpha$ -Benzyl-p-chlorophenol, 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

化学物質のMITAによる解析, validation  
総括研究報告書

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

Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、IL-2プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼ、INF $\gamma$ 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) を用いた化学物質の免疫毒性評価試験法である。これまでに得られた知見から、相場らはIL-2転写調節障害をkey eventとするT細胞分化異常誘導とIL-8転写活性更新をkey eventとした気道刺激性に関するadverse outcome pathway (AOP) を作成した。このような背景のもと、IL-2レポーター活性を指標とするT細胞分化異常誘導化学物質のスクリーニング法のOECDテストガイドライン化を目指し、バリデーション試験が開始された。我々は、平成28年度より試験実施施設としてMITAのIL-2レポーターアッセイの実施を担当し、施設内・施設間再現性 (Phase I)、施設間再現性 (Phase II) に必要な実験を行った。

初年後はPhase 1としてコード化した5物質を用いて施設内再現性および施設間再現性を検討した。その結果、暫定的ではあるが80%以上の再現性が得られたことから、Phase IIとしてコード化した20物質を用いて施設間再現性を確認し、さらにリードラボ（東北大）との比較による正確性を検討した。

Phase IIの結果をもとに、閾値を設定した判定基準5を採用することによって、施設内再現性はいずれの施設も80%、施設間再現性は80%、正確性は85%以上となり、いずれもstudy planにおける基準を満たし、国際バリデーション試験を終了した。

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・施設間再現性、正確性

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-ImmunoToxicity Assay, MITA) を構築、本試験法の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、試験実施施設[産業技術総合研究所（健康工学研究部門）、産業技術総合研究所（バイオメディカル研究部門）、食品薬品安全センター 秦野研究所]として参加し、技術移転性、施設内再現性、施設間再現性を検証するための実験を行った。

B. 研究方法

B-1) 使用した細胞

MITAバリデーション試験には、IL-2、IFN $\gamma$ とG3PDHプロモーターにそれぞれSLG（緑色）、SLO（橙色）およびSLR（赤色）ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現ベクターをヒ

トT細胞由来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。

### B-2) 使用した化学物質

技術移転の確認のためのPhase 0 studyでは、2-aminoanthracece、chloroquine、citraI、dexamethasone、methylmercury(II) chlorideを用いた。

Phase I study以降、被験物質は国立医薬品食品衛生研究所においてコード化された後に送付された。施設内および施設間再現性を確認するPhase I studyでは、5種類の化学物質を1セットとし、セットA、セットB、セットCの計3セットを用いた（表1）。

続いて施設間再現性を確認するためのPhase II studyでは、20物質（コード番号：MID701～MID720）を用いて試験を実施した（表2）。

### B-3) 実験方法

IL-2レポーター活性試験は、MITAプロトコルに従って行った。概要は以下の通りである。

被験物質は蒸留水に25 mg/mLで可溶の場合は蒸留水に、不溶の場合はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。物質の溶解性は≥20,000xgで5分間遠心分離を行い、沈殿の有無で判定した。被験物質の原液はそれぞれ100 mg/mL（蒸留水）、500 mg/mL(DMSO)を最高濃度とした。調整した被験物質原液を溶媒を用いて公比2で段階希釈して10濃度の希釈液を調整した後、さらに培地で希釈（蒸留水は25倍、DMSOは10倍希釈の後さらに50倍）した。96wellプレートに1 wellあたり $2 \times 10^5$ cells、液量50 μLとなるよう播種した#2H4細胞に、希釈した被験物質を1 wellあたり50 μLずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>環境下で1時間保温した。溶媒の最終濃度は蒸留水が2 % (v/v)、DMSOが0.1 % (v/v)である。

処理1時間後にIL-2、IFN γ 誘導のためPMA/Ionomycin溶液を1 wellあたり10 μL添加し、さらに37°C、5% CO<sub>2</sub>環境下で6時間保温した。最終濃度はそれぞれPMA1 μM、Ionomycin25 nMである。

PMA/Ionomycin添加6時間後にTripluciferase assay reagent (TOYOB0, MRA-301)を1 wellあたり0.1mL加えて10分間室温で振盪した後、アト一社製フェリオ

ス(AB-2350)を用いて発光を測定した。測定結果から、各色ルシフェラーゼの活性すなわちIL-2、IFN γ、G3PDHプロモーター活性を算出した。各被験物質について試験成立条件を満たす3回分の結果が得られるまで、独立した実験を繰り返し行った。

#### 〈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

Phase 0ではコード化を行わない5物質に対して各3回ずつの実験を行い、その結果をリードラボである東北大へ送付した。バリデーション試験の試験実施施設である3施設（産総研健康工学研究部門、産総研バイオメディカル研究部門、秦野研究所）の結果を比較検討した。その結果、技術移転性を確認し、コード化物質での試験を実施することとした。

Phase I studyでは施設内再現性の確認を主目的とした。コード化された5物質を1セットとする群が3セット配布され、1セットにつき計15回の実験を実施した。1セットの実験がすべて終了した後に次のセットの実験を行うことで、セット毎の実験の独立性を担保した。セット毎の実験結果を図1～3に示した。また、判定基準5による物質毎の結果を図4～8に示した。5物質中3物質はすべての実験で同じ判定となり、良好な施設内再現性が得られた。判定基準5では、判定に必要な3実験のうち2実験で判定が同一であれば、その2実験の判定がその物質の判定となる。そのため、Hydrocortisoneでは、

セットによって判定が分かれ、施設内再現性が得られなかつた（表3、図5）。一方、Nickel (II) sulfate hexahydrateでは施設内再現性のある結果となつた（表3、図7）。

Phase I studyにおける施設内再現性は3試験施設ともに80%、施設間再現性は80%であつた（表3）。

Phase II studyでは施設間再現性を確認するため、コード化した20物質について試験を実施した。結果は図9に示した。各実施施設の結果を取りまとめたものが表4である。

判定基準5を採用した20物質の判定は、以下の通りであつた。

IL-2転写活性作用影響無(N) : 9物質

IL-2転写活性抑制作用有(S) : 6物質

IL-2転写活性刺激作用有(A) : 5物質

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との比較による当施設の正確性は95%（19/20）であり（表4）、全体でも85%以上であつた。概ねすべての施設で結果が一致した。

#### D. 考察

Phase I studyでは施設内再現性および施設間再現性を確認するために、コード化した5物質を1セットとし、3セットの合計15物質について3回の繰り返し実験を行つた。バリデーション試験の試験実施施設である3施設（産総研健康工学研究部門、産総研バイオメディカル研究部門、秦野研究所）の結果は東北大および統計処理を担当する神戸大で集計され、解析された。

判定基準は、MITAプロトコルver. 008. 5Eに記載された基準（判定基準1, 2）以外に、1物質について3回実施される結果を合わせて判定する基準も提案されており（判定基準3）、これらの判定基準の妥当性についても検討が行われた。結果として、判定基準3に濃度依存性を加味した判定基準3'における施設内再現性は80-100%、施設間再現性は80%となり、良好な結果が得られた。

続いてPhase II studyとして施設間再現性の確認のため、コード化した20物質について同様に試験を行つたところ、良好な施設間再現性が得られなかつた。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を踏まえ、IL-2転写活性作用影響無(N)の判定方法を変更

した判定基準4を検討したが、施設間再現性は55%となり、結果は改善しなかつた。

以上の結果を考慮の上、%suppressionの閾値を設定した判定基準5を採用したところ、Phase II study で試験を行つた20物質について80%の施設間再現性を達成することができた。なお、判定基準5を適用した場合のPhase I studyの5物質3セットの施設間再現性、施設内再現性ともに80%であった。

今回の判定基準3'から5への変更により、統計学的には有意と判定されるが、生物学的には然程意味を持たない測定誤差や手技の微妙な揺れ程度の差が判定に影響を及ぼすことを防ぎ、明らかな差（閾値）以上を生物学的有意とすることによってより正確な判定が行うことができる。

この変更によって、いくつかの物質については判定結果が変わることとなつた。これらの物質はどれもIL-2転写活性抑制あるいは刺激作用が小さく、最大でも10-20%程度であった。30%を超えるような比較的大きな作用を持つ物質に関しては、判定結果は変わらず同一であった。

当施設とリードラボの結果を比較したところ、Phase I study については Hydrocortisoneが、Phase II studyについては Dibromoacetic acidの結果が不一致であった。Hydrocortisoneについては他施設の結果を見ても当施設と同様にIL-2転写活性抑制作用有(S)か影響無(N)に判定されることから、判定基準に近い程度の比較的穏和な抑制作用を持つ物質であるのかもしれない。Dibromoacetic acidについては、リードラボも含めると4施設全てにおいて判定結果が異なつていた。従つてこの不一致は人為的操作に起因するとは考え難く、Dibromoacetic acidの持つ性質による可能性がある。

#### E. 結論

IL-2転写誘導抑制を指標とした免疫毒性評価試験法のOECDテストガイドライン化を目的として、試験実施施設として国際バリデーション試験に参加した。80%以上の施設内再現性、施設間再現性および正確性が得られるMITAプロトコルを確立した。これについて、この評価系の国際バリデーション試験を終了した。

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 Fujimura, 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. 10<sup>th</sup>

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、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 I study) に使用した化学物質

No.	Chemical	CAS No.	State	Code No.
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	Liquid	MID036A
				MID033B
				MID034C
2	Hydrocortisone	50-23-7	Solid	MID038A
				MID035B
				MID037C
3	Lead(II) acetate trihydrate	6080-56-4	Solid	MID310A
				MID037B
				MID038C
4	Zinc dimethyldithiocarbamate	137-30-4	Solid	MID037A
				MID039B
				MID310C
5	Nickel (II) sulfate hexahydrate	10101-97-0	Solid	MID034A
				MID031B
				MID032C

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) に使用した化学物質

No.	Chemical	CAS No.	State	Code No.
1	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	Solid	MID702
2	Benzo(a)pyrene	50-32-8	Solid	MID703
3	Cadmium chloride	10108-64-2	Solid	MID714
4	Dibromoacetic acid	631-64-1	Solid	MID720
5	Diethylstilbestrol	56-53-1	Solid	MID711
6	Diphenylhydantoin	630-93-3	Solid	MID704
7	Ethylene dibromide	106-93-4	Liquid	MID705
8	Glycidol	556-52-5	Liquid	MID712
9	Indomethacin	53-86-1	Solid	MID715
10	Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid)	54-85-3	Solid	MID707
11	Nitrobenzene	98-95-3	Liquid	MID701
12	Urethane, Ethyl carbamate	51-79-6	Solid	MID719
13	Tributyltin chloride	1461-22-9	Liquid	MID713
14	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	Solid	MID718
15	Dichloracetic acid	79-43-6	Liquid	MID716
16	Toluene	108-88-3	Liquid	MID706
17	Acetonitril	75-05-8	Liquid	MID708
18	Mannitol	69-65-8	Solid	MID717
19	Vanadium pentoxide	1314-62-1	Solid	MID709
20	o-Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	Solid	MID710

表3 MITA (IL-2 レポーター活性試験) のバリデーション試験 (Phase I study) の結果

No.	Chemical	CAS No.	Lead Labo	Round	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	Based on Majority			
1	Dibutyl phthalate	84-74-2	S:SSS	1st	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S			
				2nd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
				3rd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
2	Hydrocortisone	50-23-7	N:SNN	1st	S:SAS	S:SSS	S:NSS	S			
				2nd	N:NNN	S:SSS	S:SSN				
				3rd	N:NNN	S:SSN	N:NNS				
3	Lead(II) acetate trihydrate	6080-56-4	S:SSS	1st	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S			
				2nd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
				3rd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
4	Zinc dimethyldithiocarbamate	137-30-4	S:SSS	1st	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S			
				2nd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
				3rd	S:SSS	S:SSS	S:SSS				
5	Nickel (II) sulfate hexahydrate	10101-97-0	N:SNN	1st	N:NNN	N:NNN	N:NNA	N			
				2nd	N:NNN	S:SSN	N:NNN				
				3rd	N:NSN	N:NNN	N:NNN				
				Within	80%	80%	80%				
				Accuracy	100%	80%	80%	80%			
				Between	80%						

表4 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	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	Concordance	Based on Majority
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	Urethane, carbamate	Ethyl 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	Dichloracetic 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	Acetonitril	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%

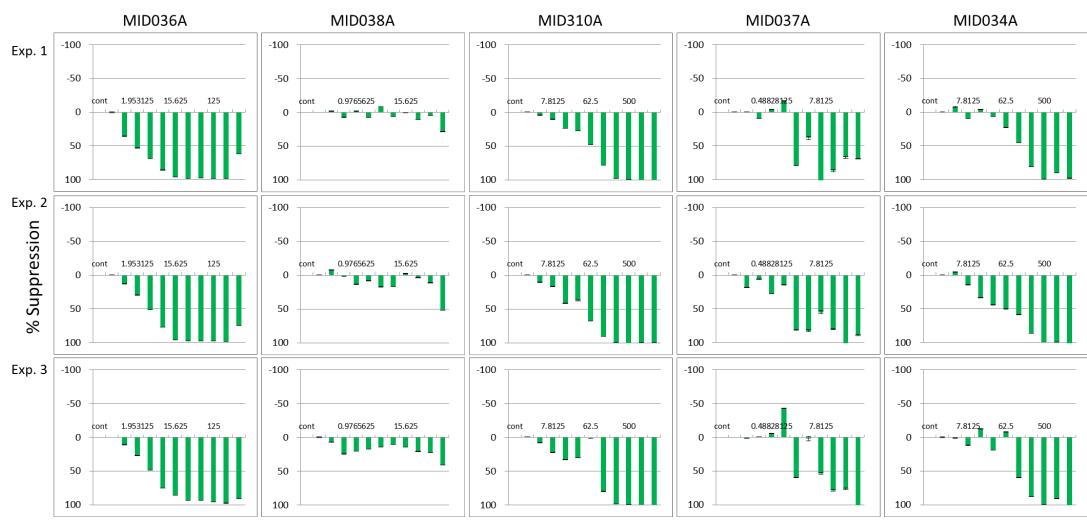


図1 コード化5物質(セットA)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

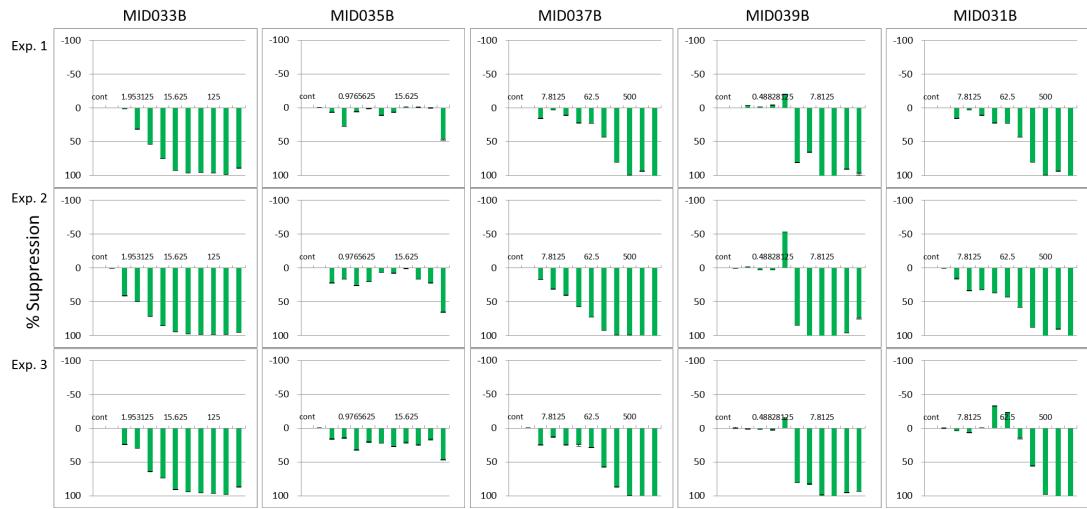


図2 コード化5物質(セットB)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

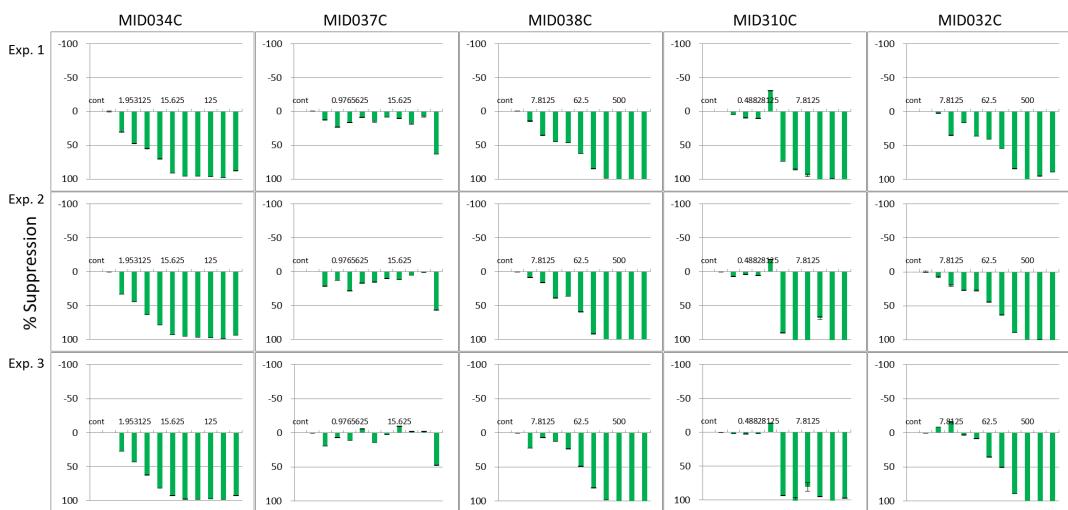


図3 コード化5物質(セットC)のIL-2レポーター活性試験(Phase I)の結果

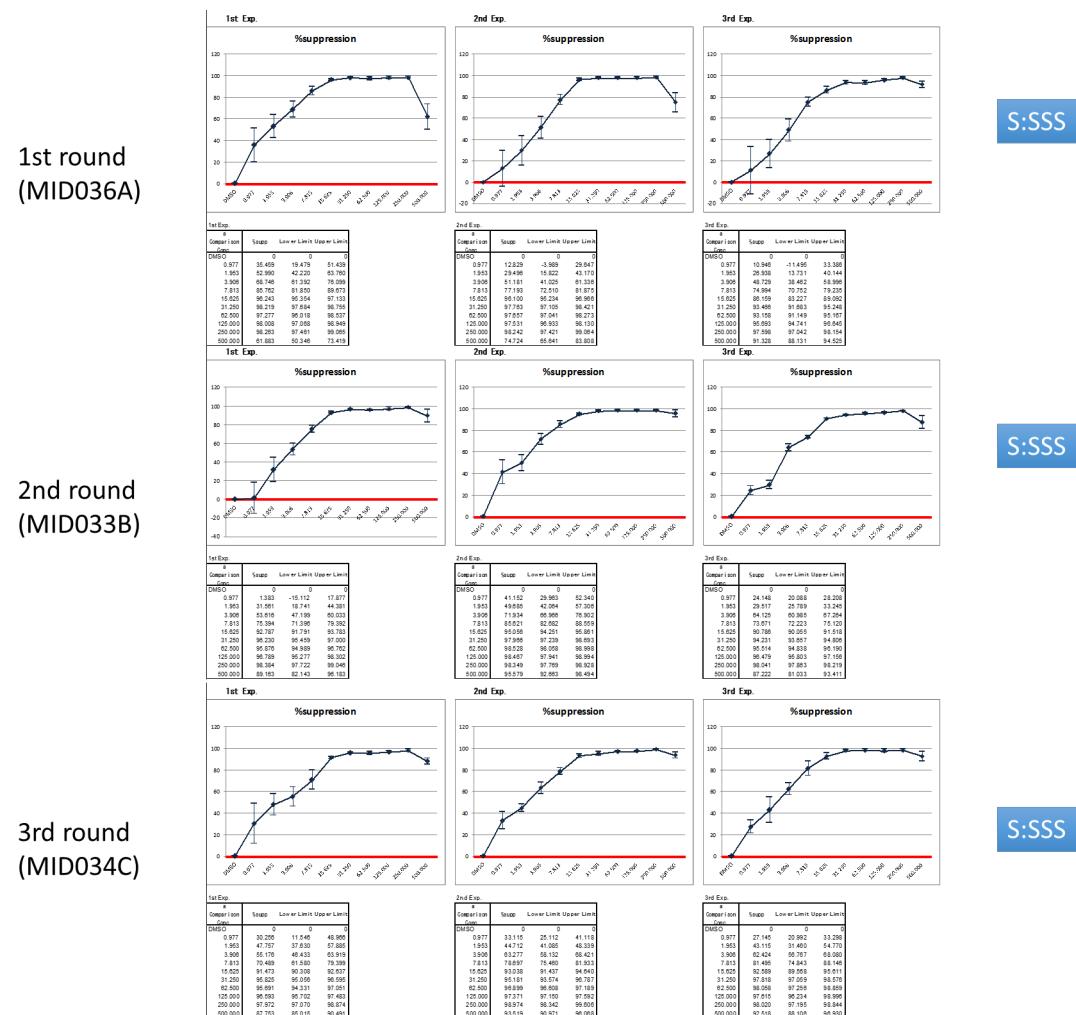


図4 コード化物質(Dibutyl phthalate)の施設内再現性(Phase I)の結果

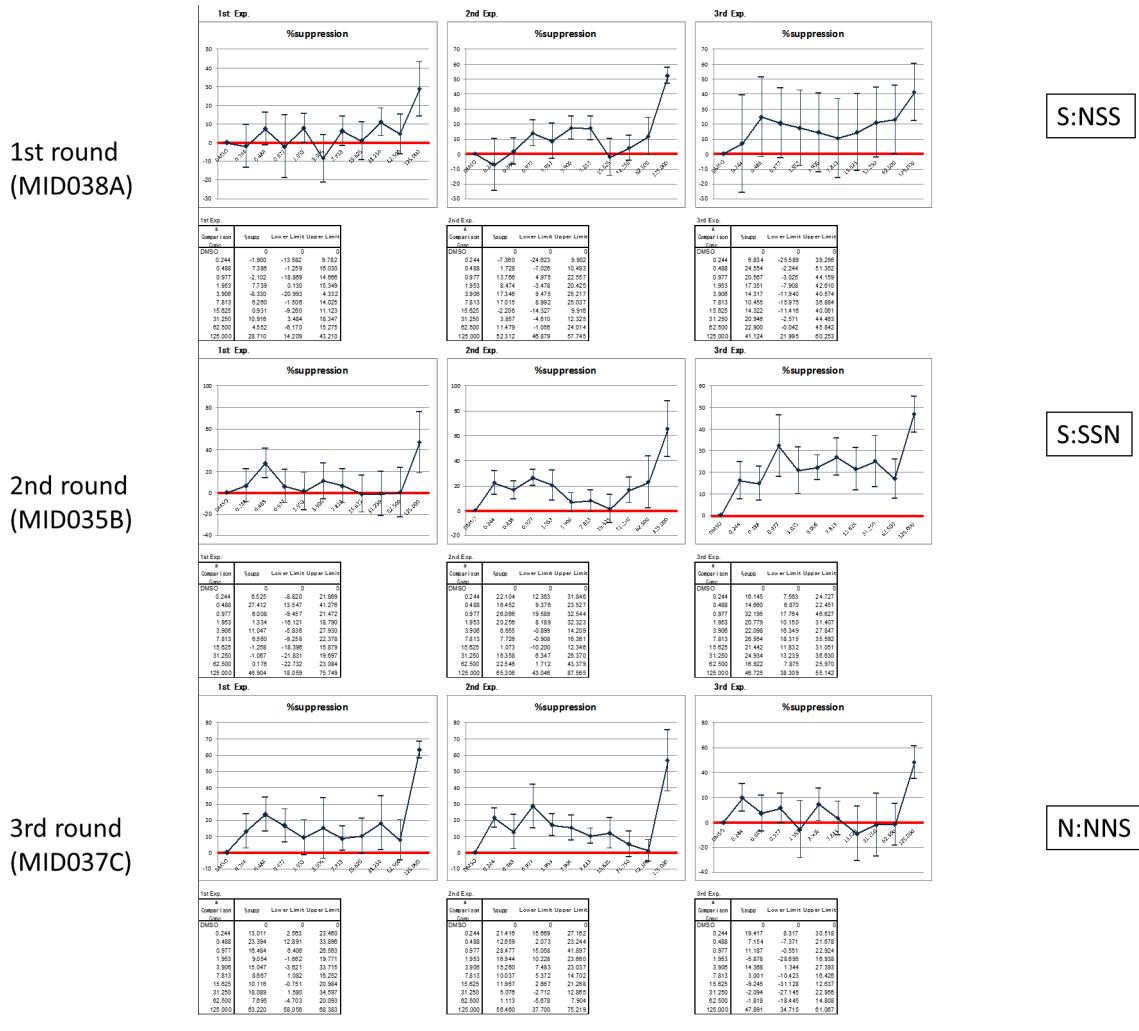


図5 コード化物質 (Hydrocortisone) の施設内再現性 (Phase I) の結果

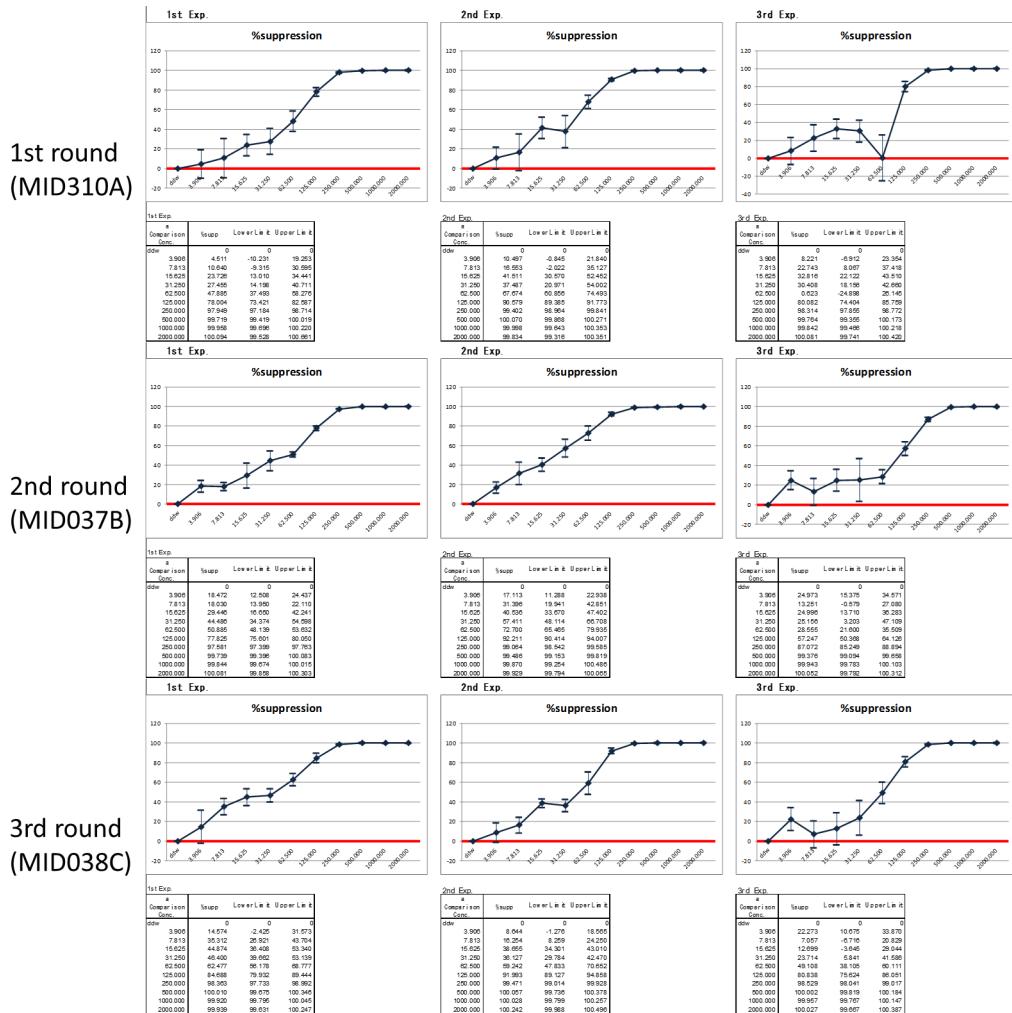


図6 コード化物質 (Lead (II) acetate trihydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

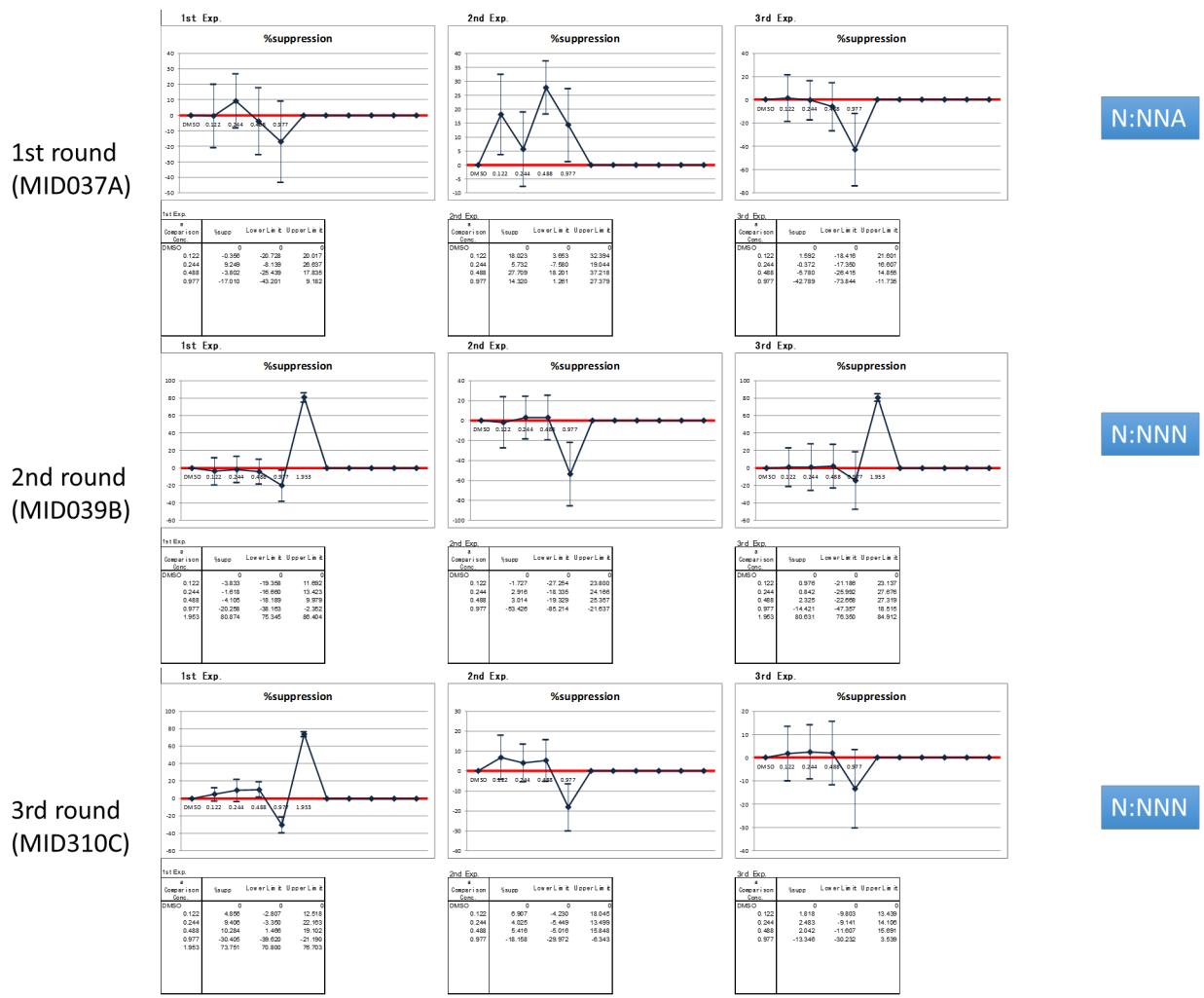


図 7 コード化物質 (Zinc dimethyldithiocarbamate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

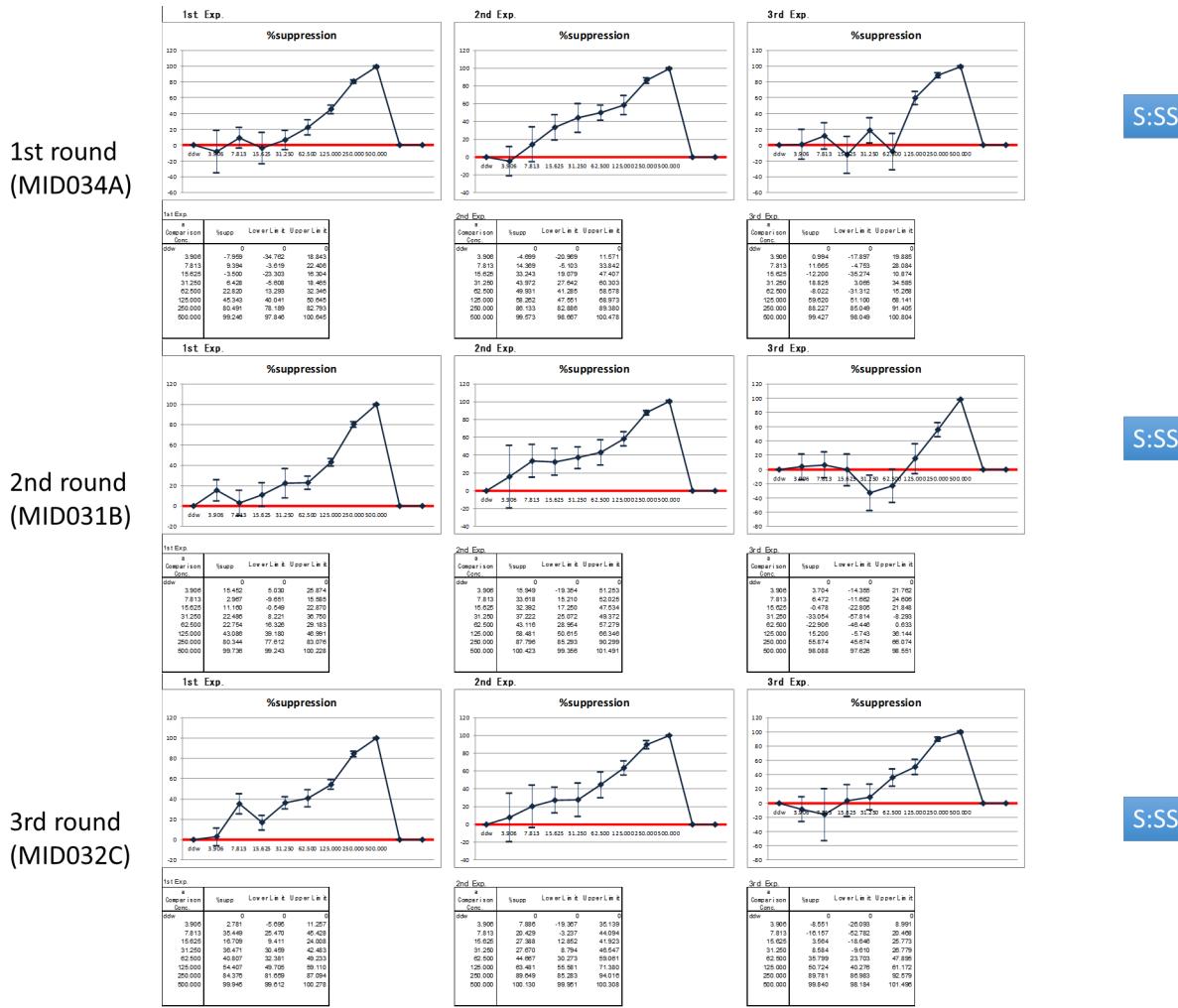


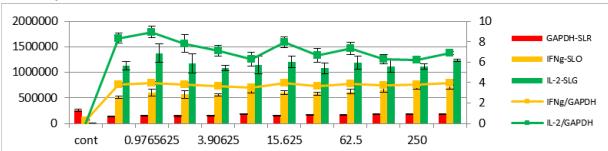
図8 コード化物質 (Nickel (II) sulfate hexahydrate) の施設内再現性 (Phase I) の結果

## コード化 20 物質の IL-2 レポーター活性試験 (Phase II) の結果

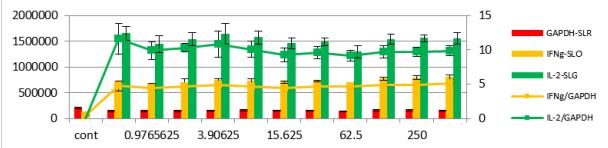
### No. 1 <2,4-Diaminotoluene, Code No.: MID702>

(The maximum concentration: 500 µg/ml, Vehicle: Distilled water)

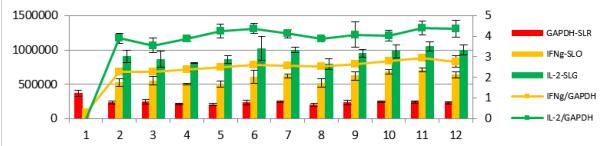
1st Exp



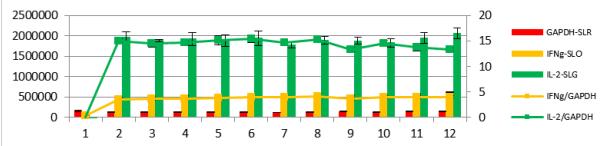
2nd Exp



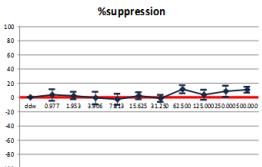
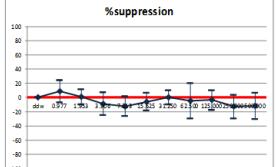
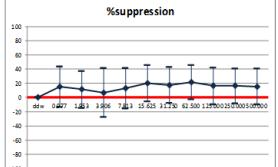
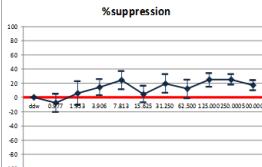
3rd Exp



4th Exp



1st Exp.



%suppression

1st Exp.

2nd Exp.

3rd Exp.

4th Exp.

Comparison Code

Supp LowerLimit UpperLimit

0.977 -7.29 0.00 -7.29

0.977 -0.47 0.00 -0.47

0.977 8.952 0.00 8.952

0.977 3.70 0.00 3.70

1.953 -22.41 0.00 -22.41

1.953 -2.00 0.00 -2.00

1.953 -0.560 0.00 -0.560

1.953 2.00 0.00 2.00

3.906 -10.25 0.00 -10.25

3.906 -0.578 0.00 -0.578

3.906 0.00 0.00 0.00

3.906 -0.570 0.00 -0.570

7.813 5.69 0.00 5.69

7.813 0.00 0.00 0.00

7.813 8.952 0.00 8.952

7.813 3.70 0.00 3.70

15.625 24.07 0.00 24.07

15.625 -0.564 0.00 -0.564

15.625 -0.564 0.00 -0.564

15.625 2.00 0.00 2.00

31.250 19.83 0.00 19.83

31.250 0.00 0.00 0.00

31.250 0.00 0.00 0.00

31.250 0.00 0.00 0.00

62.5 24.07 0.00 24.07

62.5 -0.564 0.00 -0.564

62.5 -0.564 0.00 -0.564

62.5 2.00 0.00 2.00

125.000 24.69 0.00 24.69

125.000 -0.564 0.00 -0.564

125.000 -0.564 0.00 -0.564

125.000 2.00 0.00 2.00

250.000 25.44 0.00 25.44

250.000 -0.564 0.00 -0.564

250.000 -0.564 0.00 -0.564

250.000 2.00 0.00 2.00

500.000 17.52 0.00 17.52

500.000 -0.564 0.00 -0.564

500.000 -0.564 0.00 -0.564

500.000 2.00 0.00 2.00

1000.000 21.04 0.00 21.04

1000.000 -0.564 0.00 -0.564

1000.000 -0.564 0.00 -0.564

1000.000 2.00 0.00 2.00

2000.000 11.76 0.00 11.76

2000.000 -0.564 0.00 -0.564

2000.000 -0.564 0.00 -0.564

2000.000 2.00 0.00 2.00

4000.000 11.76 0.00 11.76

4000.000 -0.564 0.00 -0.564

4000.000 -0.564 0.00 -0.564

4000.000 2.00 0.00 2.00

8000.000 11.76 0.00 11.76

8000.000 -0.564 0.00 -0.564

8000.000 -0.564 0.00 -0.564

8000.000 2.00 0.00 2.00

16000.000 11.76 0.00 11.76

16000.000 -0.564 0.00 -0.564

16000.000 -0.564 0.00 -0.564

16000.000 2.00 0.00 2.00

32000.000 11.76 0.00 11.76

32000.000 -0.564 0.00 -0.564

32000.000 -0.564 0.00 -0.564

32000.000 2.00 0.00 2.00

64000.000 11.76 0.00 11.76

64000.000 -0.564 0.00 -0.564

64000.000 -0.564 0.00 -0.564

64000.000 2.00 0.00 2.00

128000.000 11.76 0.00 11.76

128000.000 -0.564 0.00 -0.564

128000.000 -0.564 0.00 -0.564

128000.000 2.00 0.00 2.00

256000.000 11.76 0.00 11.76

256000.000 -0.564 0.00 -0.564

256000.000 -0.564 0.00 -0.564

256000.000 2.00 0.00 2.00

512000.000 11.76 0.00 11.76

512000.000 -0.564 0.00 -0.564

512000.000 -0.564 0.00 -0.564

512000.000 2.00 0.00 2.00

1024000.000 11.76 0.00 11.76

1024000.000 -0.564 0.00 -0.564

1024000.000 -0.564 0.00 -0.564

1024000.000 2.00 0.00 2.00

2048000.000 11.76 0.00 11.76

2048000.000 -0.564 0.00 -0.564

2048000.000 -0.564 0.00 -0.564

2048000.000 2.00 0.00 2.00

4096000.000 11.76 0.00 11.76

4096000.000 -0.564 0.00 -0.564

4096000.000 -0.564 0.00 -0.564

4096000.000 2.00 0.00 2.00

8192000.000 11.76 0.00 11.76

8192000.000 -0.564 0.00 -0.564

8192000.000 -0.564 0.00 -0.564

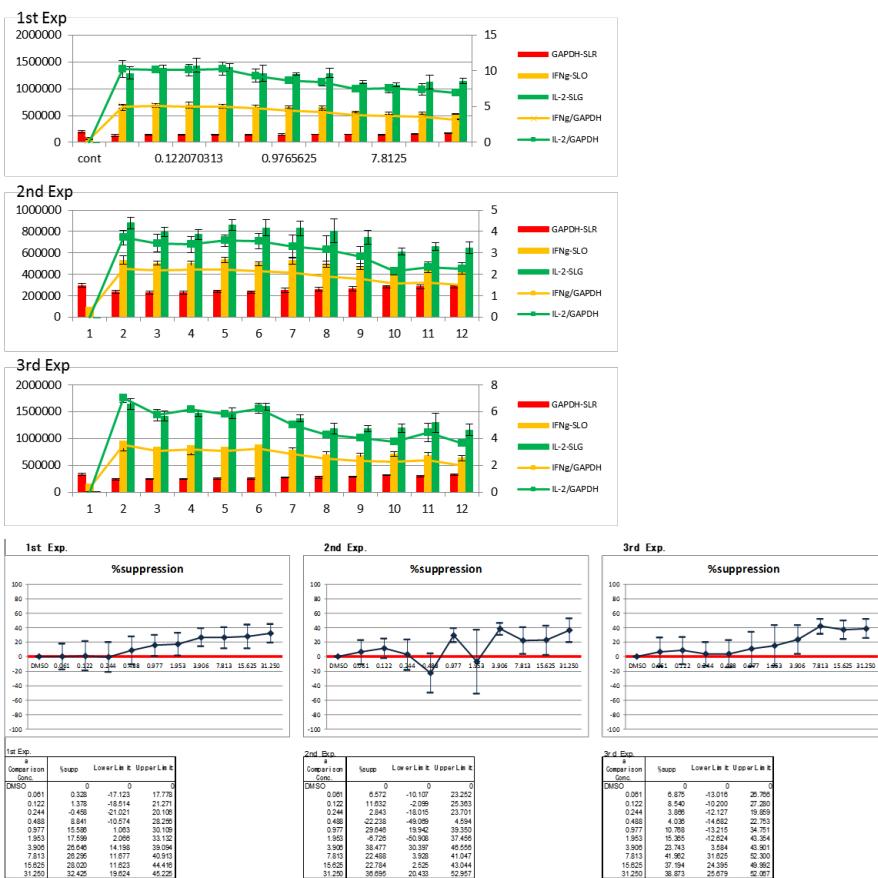
8192000.000 2.00 0.00 2.00

16384000.000 11.76 0.00 11.76

16384000.

**No. 2 <Benzo (a) pyrene, Code No. :MID703>**

(The maximum concentration: 31.25 µg/ml, Vehicle: DMSO)



S:NSS

### No. 3 < Cadmium chloride, Code No. :MID714>

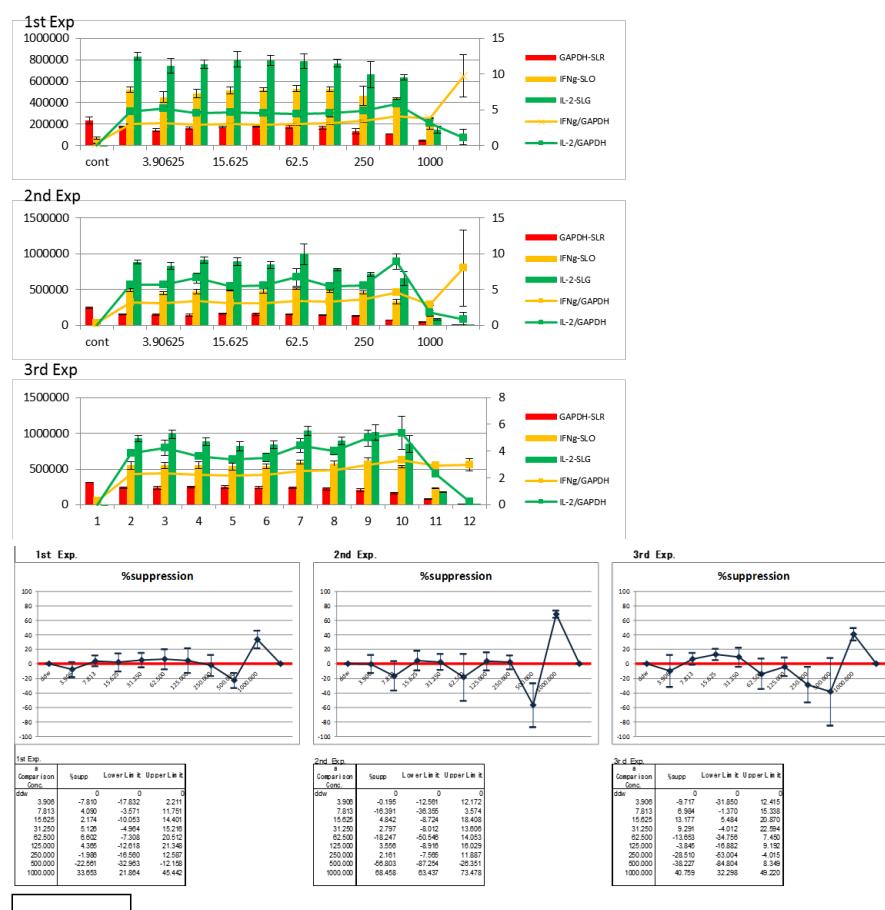
(Final concentration: 1st Exp: 2000 µg/ml, 2-4th Exp: 31.25 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



N:NNN

**No. 4 <Dibromoacetic acid, Code No.:MID720>**

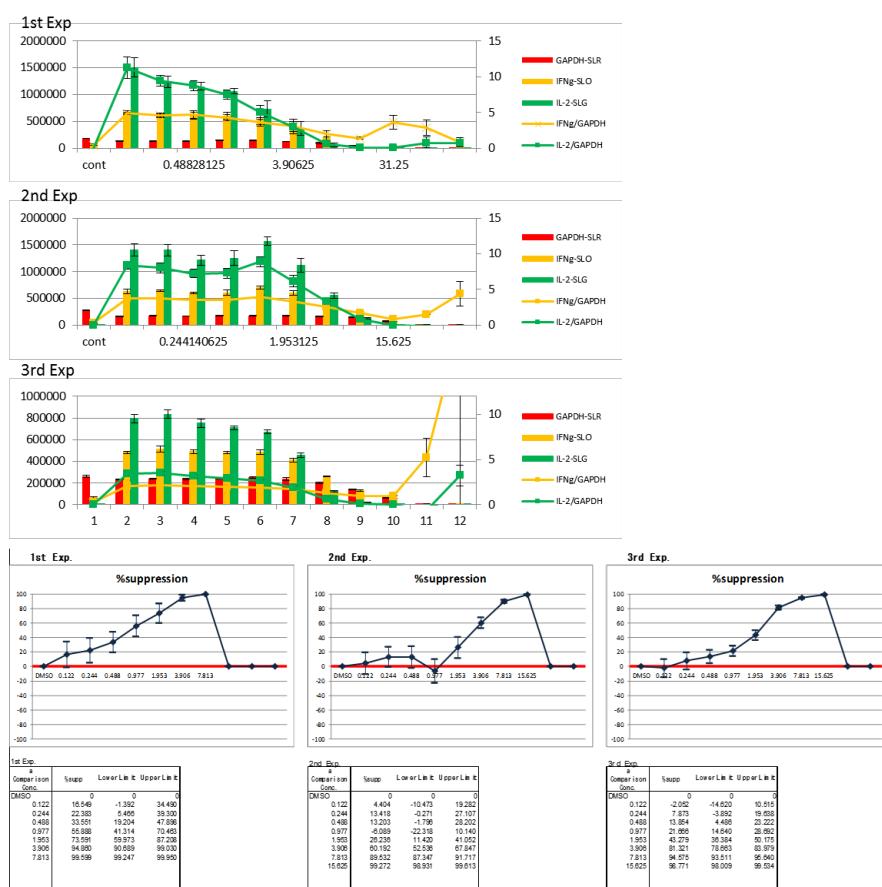
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:NAN

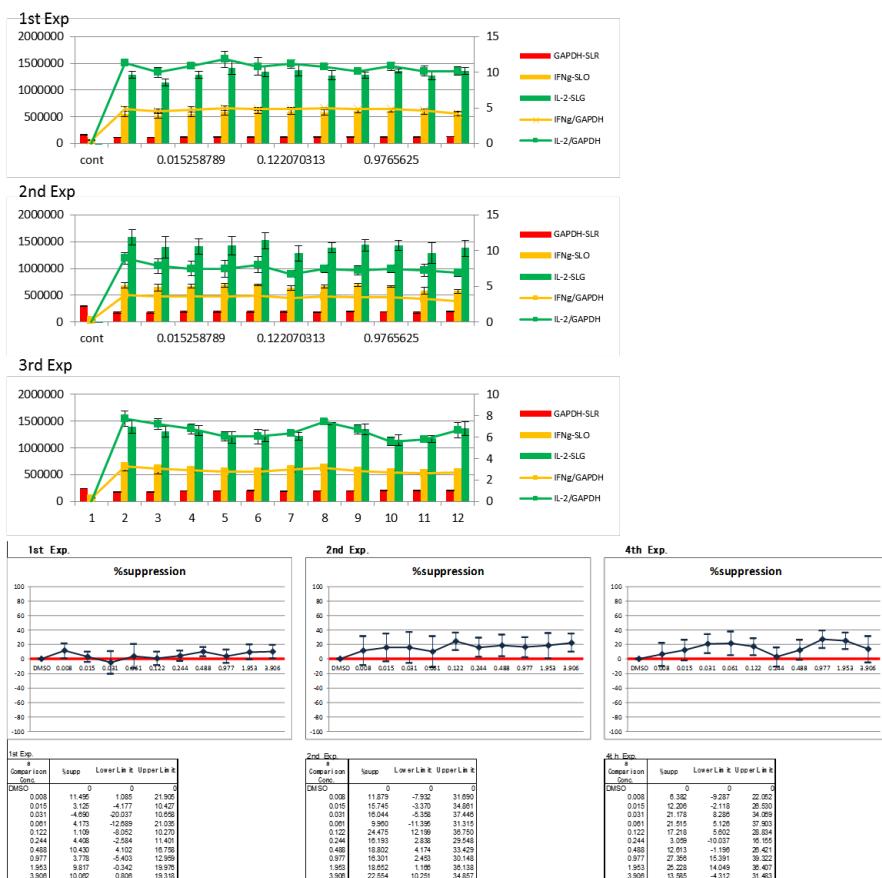
## No. 5 <Diethylstilbestol, Code No.:MID711>

(Final concentration: 1st Exp: 125 µg/ml, 2-4th Exp: 62.5 µg/ml, Vehicle: DMSO)



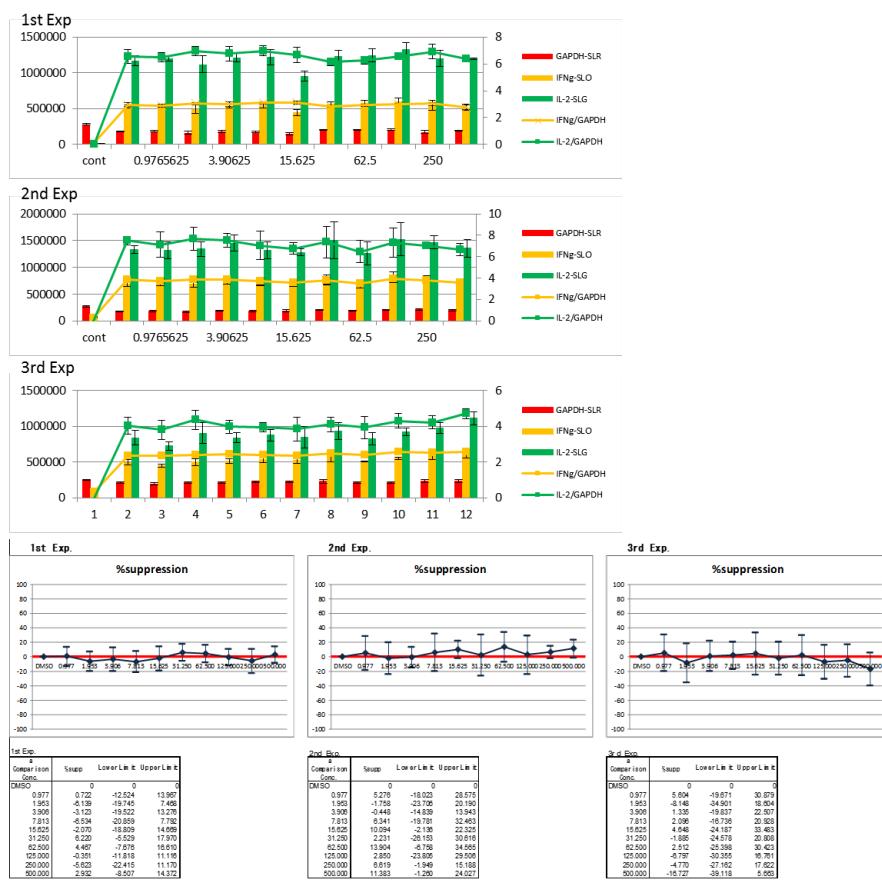
S:SSS

**No. 6 <Diphenylhydantoin, Code No.:MID704>**  
 (Final concentration: 3.9 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:NNN

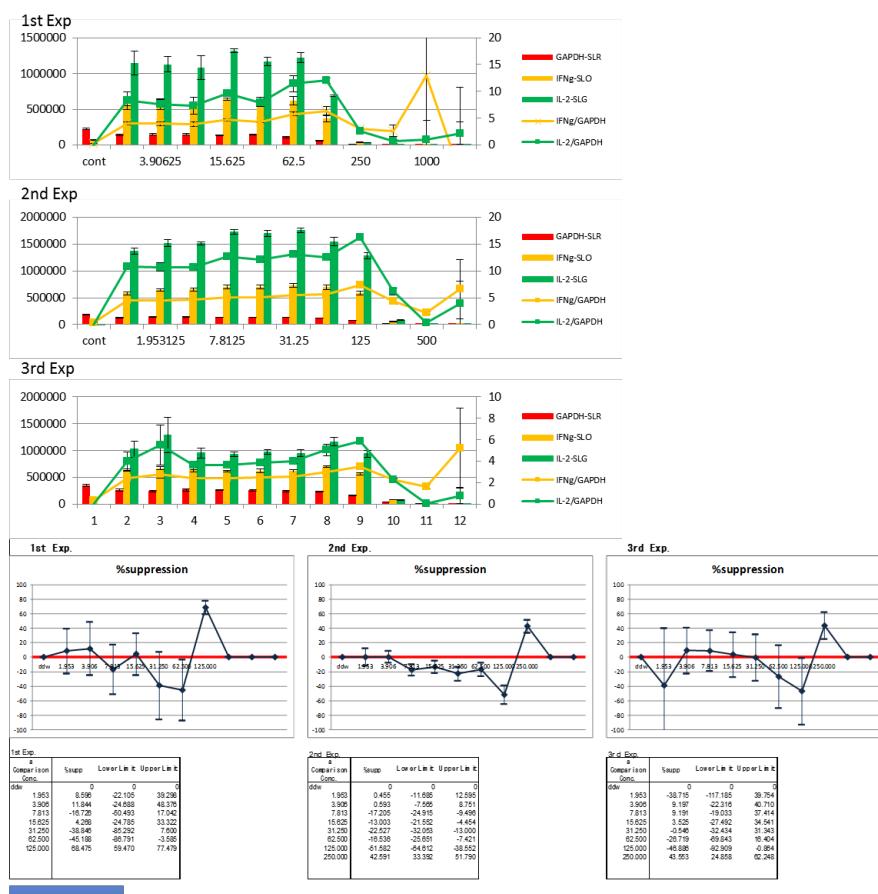
**No. 7 <Ethylene dibromide, Code No.: MID705>**  
 (Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:NNN

## No. 8 <Glycidol, Code No. :MID712>

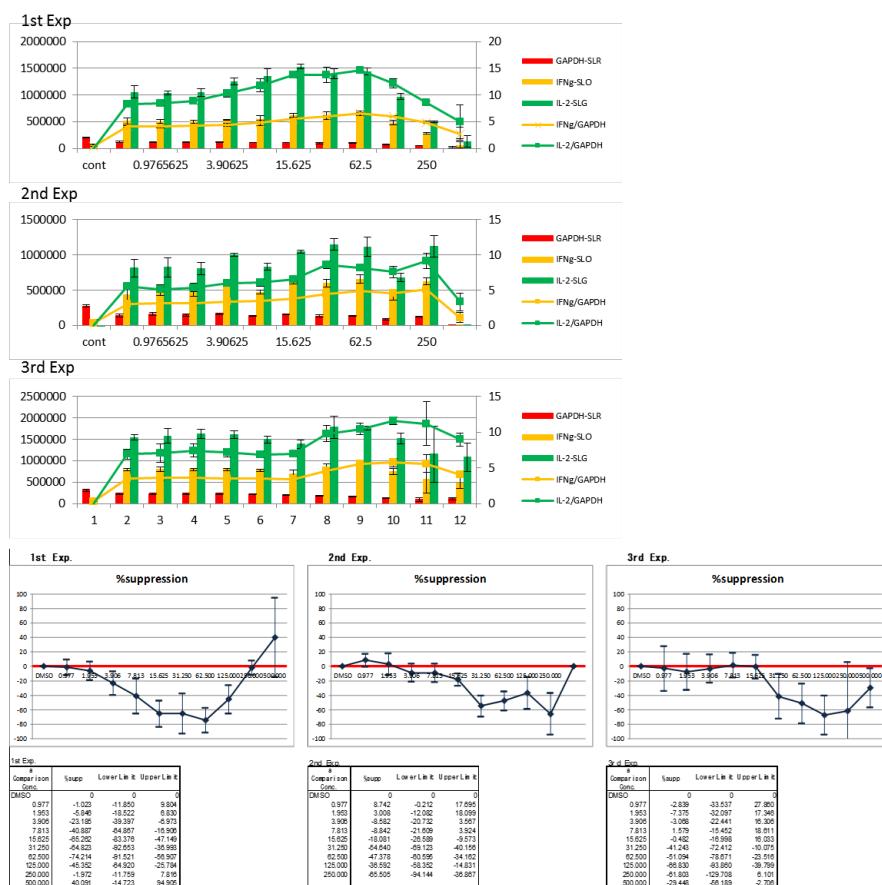
(Final concentration: 2000 or 1000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



A:AAA

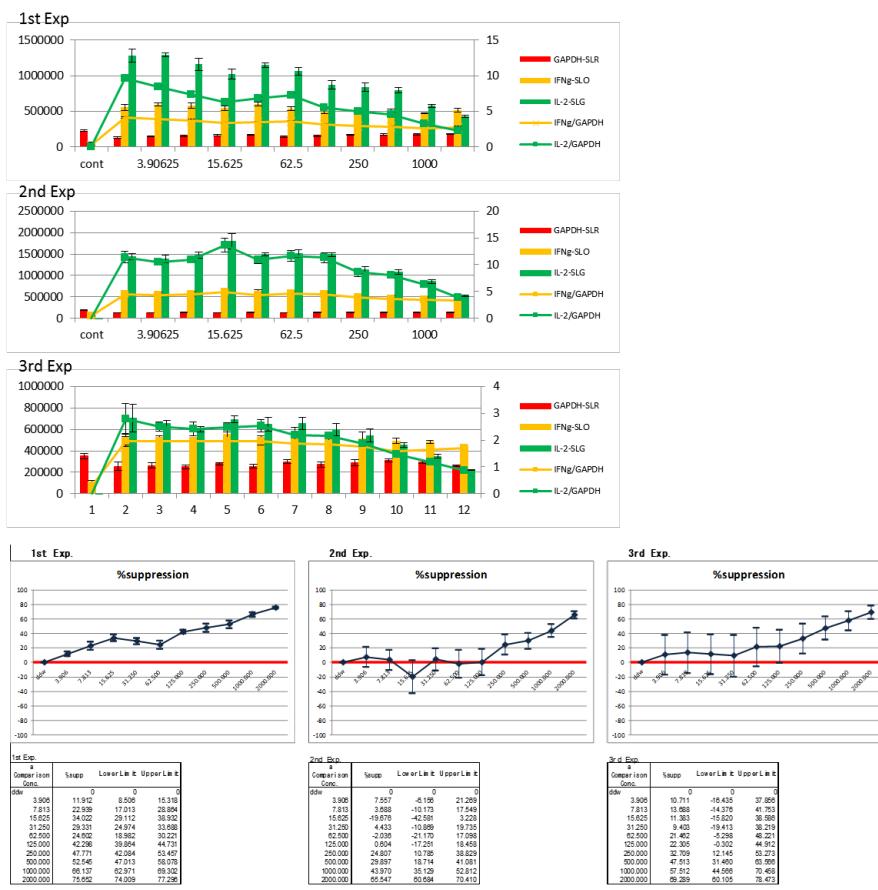
**No. 9 <Indomethacin, Code No. :MID715>**

(Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



A:AAA

**No. 10 < Isonicotinic Acid Hydrazide (Isoniazid), Code No. :MID707>**  
 (Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



S:SSS

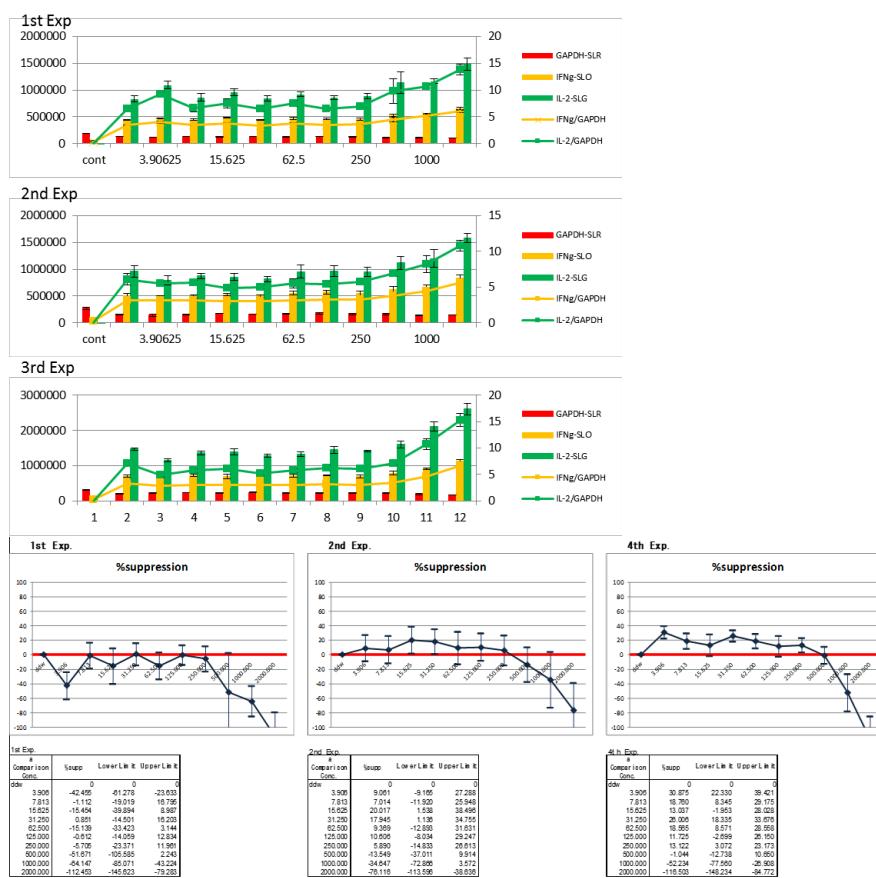
## No. 11 <Nitrobenzene, Code No. :MID701>

(Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



## No. 12 <Urethane, Ethyl carbamate, Code No.:MID719>

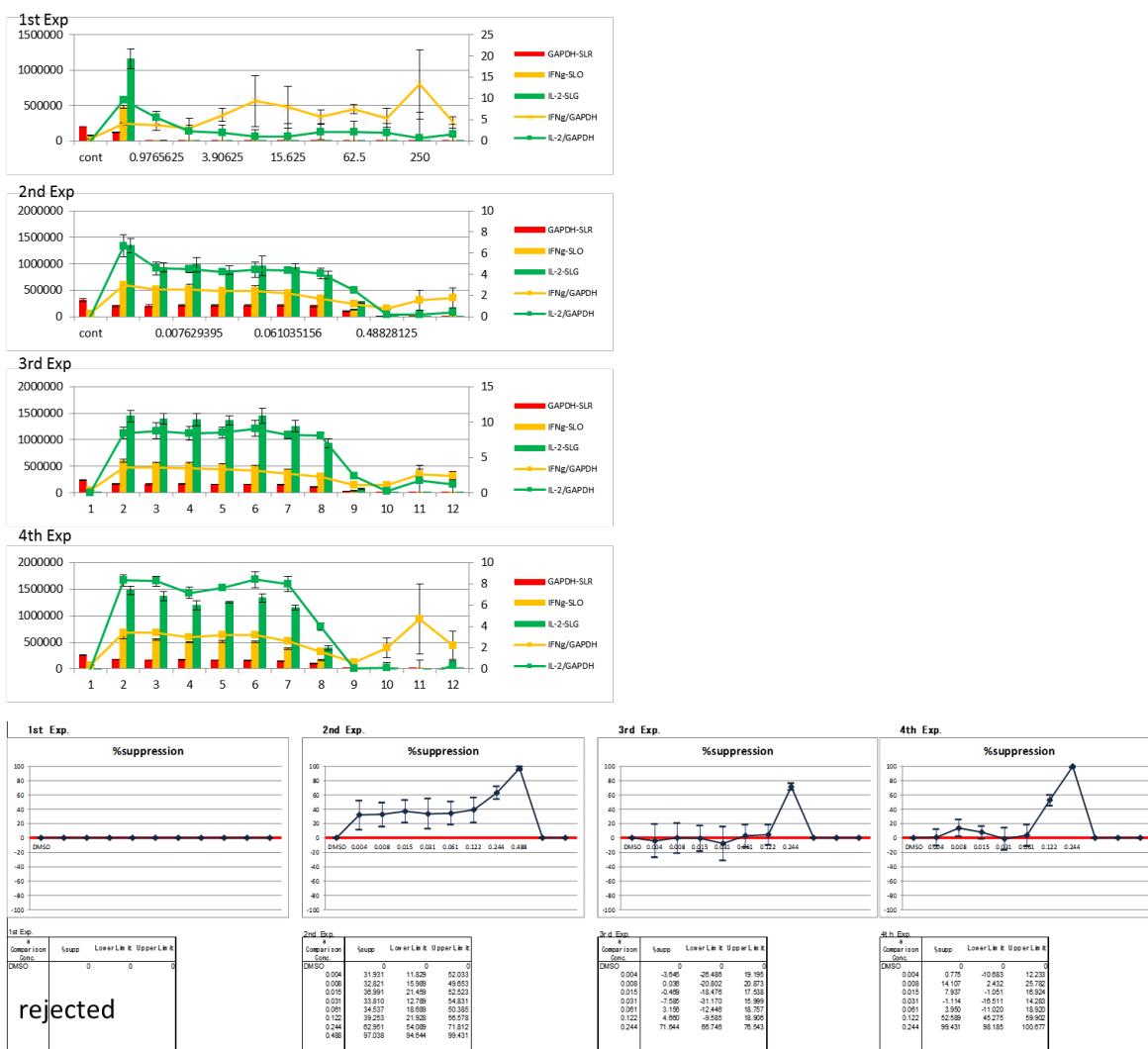
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



A:AAA

**No. 13 <Tributyltin chloride, Code No. :MID713>**

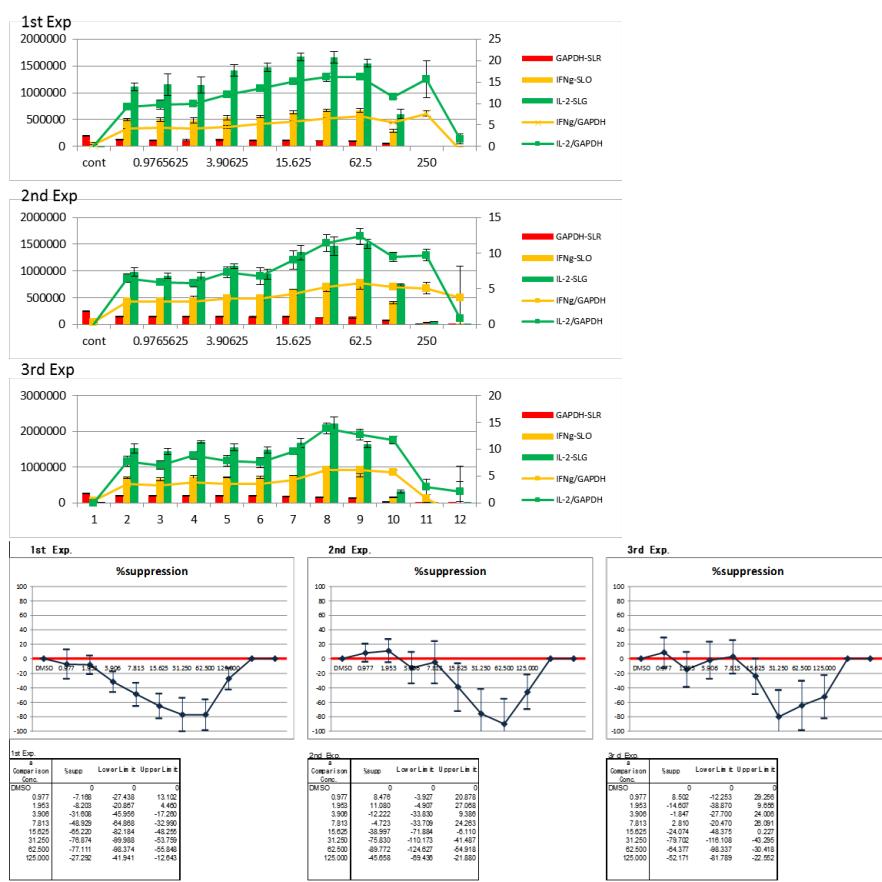
(Final concentration: 1st Exp: 500 µg/ml, 2-4th Exp: 1.9 µg/ml, Vehicle: DMSO)



S:SSS

**No. 14 <Perfluorooctanoic acid, Code No.:MID718>**

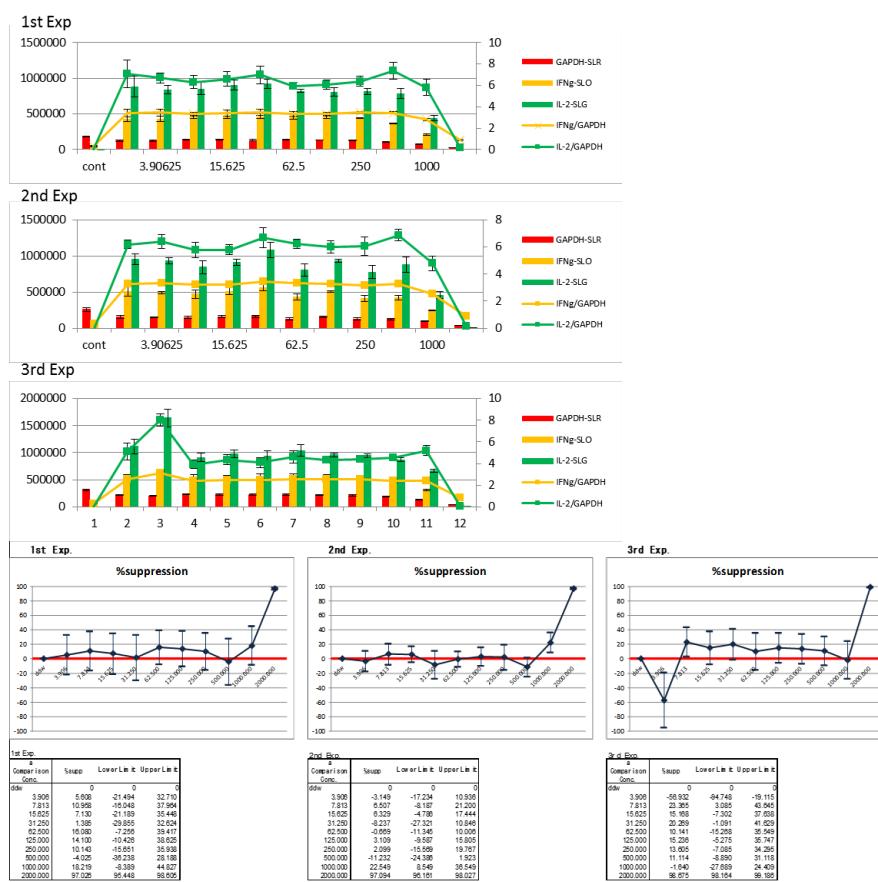
(Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



A:AAA

**No. 15 < Dichloracetic acid, Code No. :MID716>**

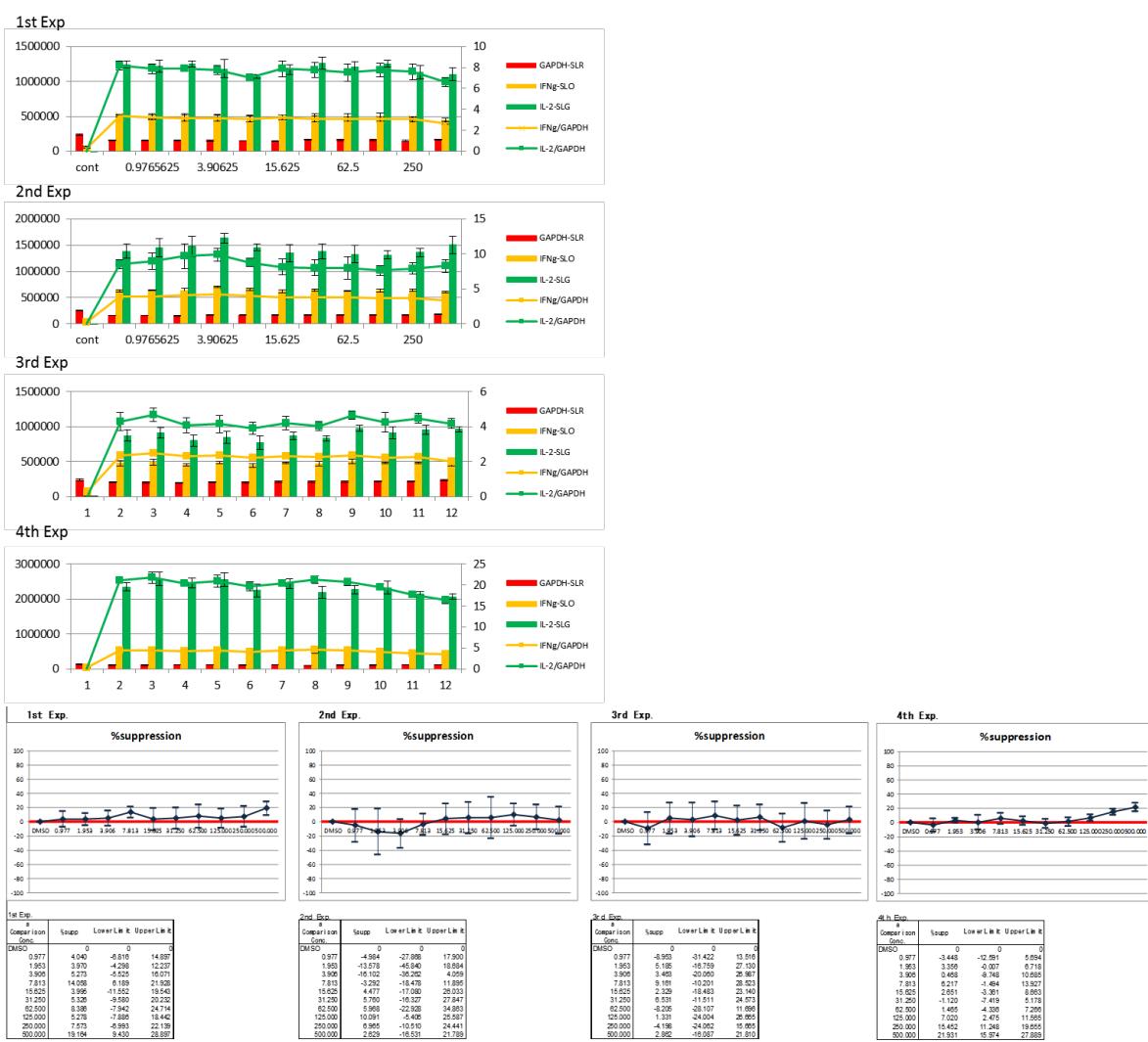
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



S:SSN

**No. 16 <Toluene, Code No. :MID706>**

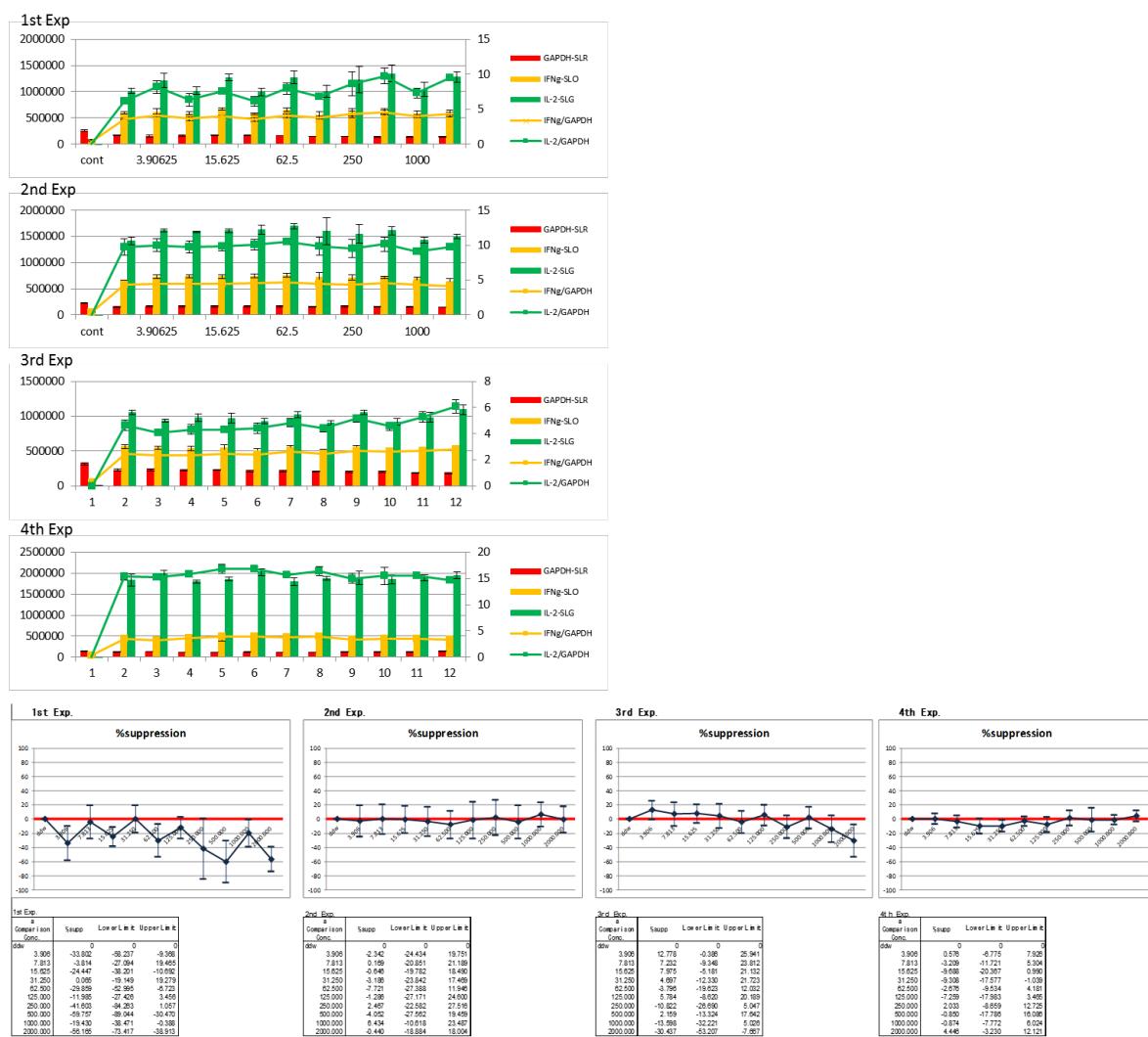
(Final concentration: 500 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:NNN

**No. 17 <Acetonitril, Code No.:MID708>**

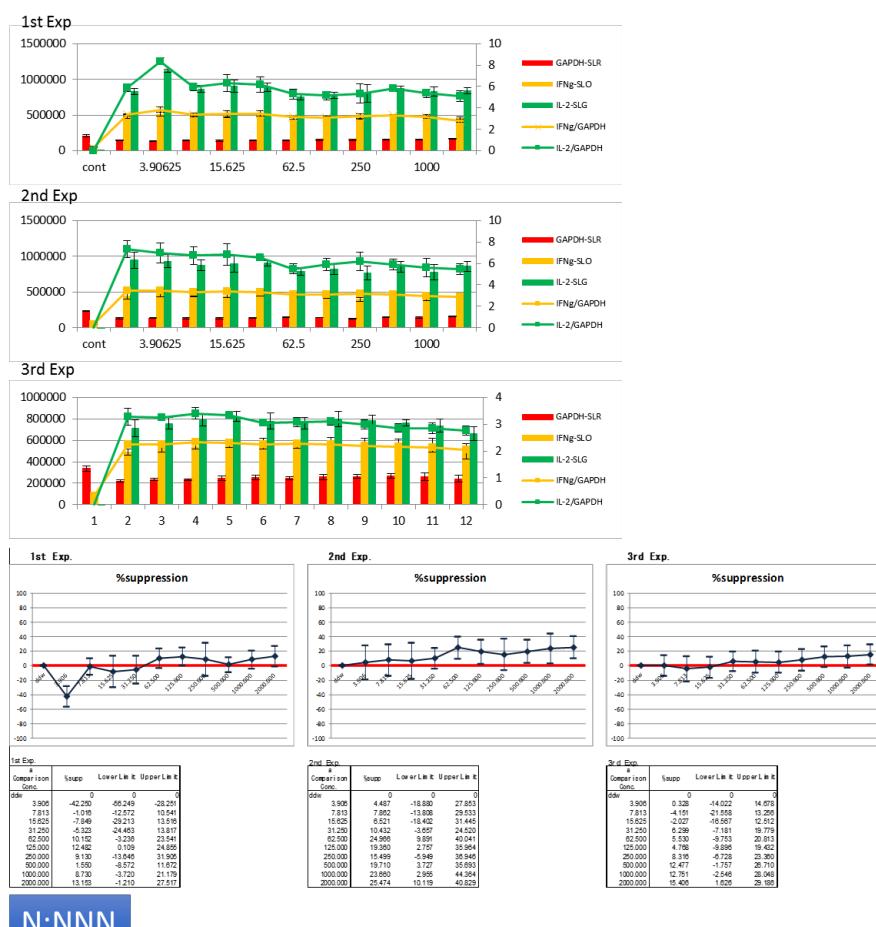
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



N:ANN

**No. 18 <Mannitol, Code No. :MID717>**

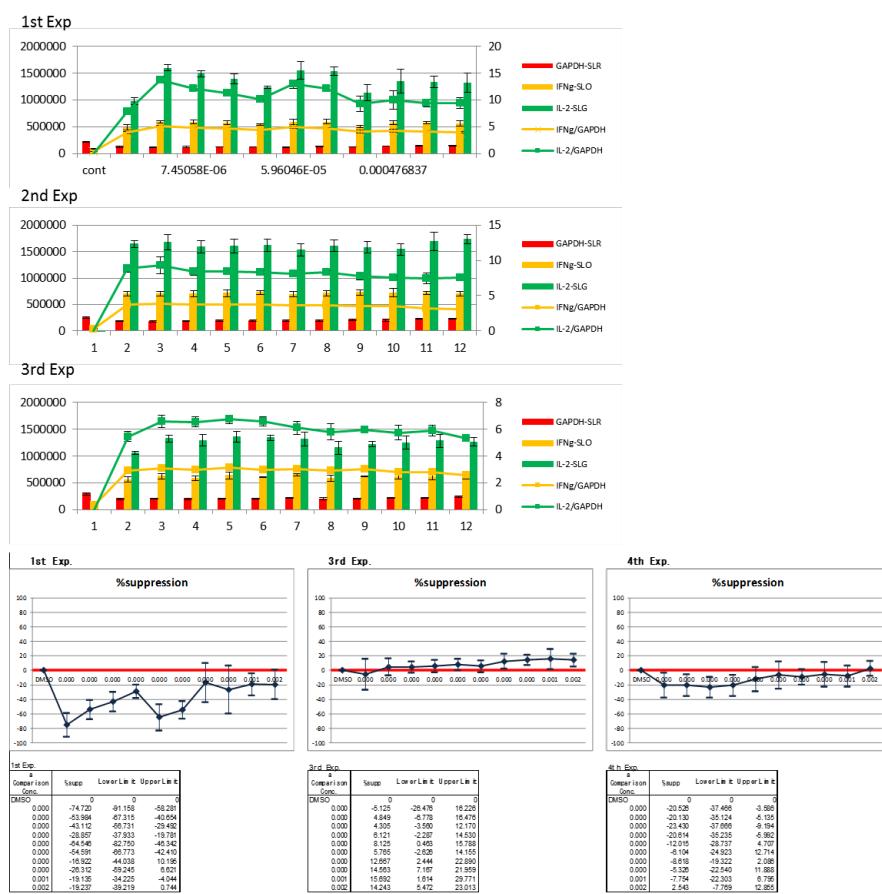
(Final concentration: 2000 µg/ml, Vehicle: Distilled water)



N:NNN

**No. 19 <Vanadium pentoxide, Code No. :MID709>**

(Final concentration: 0.0019 µg/ml, Vehicle: DMSO)



N:ANN

**No. 20 <math>\alpha\text{-Benzyl-p-chlorophenol, Code No.:MID710>**

(Final concentration: 1st Exp: 500 <math>\mu\text{g/ml}, 2-4th Exp: 62.5 <math>\mu\text{g/ml}, Vehicle: DMSO)



# 厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク事業）

## （総合）研究報告書

### Multi-ImmunoTox Assay(MITA)における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。バリデーション研究を行うにあたり、マイクロソフト社の Excel で作成するデータシートに平均値の比の 95%信頼区間を実装する必要があった。その際に、Excel で利用できる関数が適用できず近似式が必要となった。また、バリデーション研究を行う時点では、MITA の判定方法が十分には確立しておらず、判定に関する方針には 3 つの候補が考えられた。

**[方法]** Excel 上のデータシートに導入する平均値の比の信頼区間の検討として、これまでに実施された計 4168 の実データを用い、山内の近似式による 97.5%点と比の 95%信頼区間の下限の値を統計解析ソフト R で算出したこれらの値と比較することを行った。

MITA の 3 つの判定方法に関して、以下の方法 から方法 について検討を行った。方法 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 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 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 %換算した値を用いる方法である。MITA のバリデーション研究により得られた実データを用いて、施設内および施設間再現性の検討を行った。また、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]** 平均値の比の信頼区間の検討に用いた実データにおける小数自由度の範囲は 3~6 であり、この範囲においてパーセント点も 95%区間の下限も R と山内の近似のどちらもほぼ同様な値を取っていることがわかった。

判定方法に関する実データに基づく検討では、施設間再現性の結果はどの方法も同じであった。施設内再現性は、要約結果だけを比べると方法 が方法 、 に比べて若干優れているように思われるが、濃度反応関係を見る限り、方法 が優れているということではなさそうであった。

判定方法に関するシミュレーションに基づく検討では、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 、 では誤判定は約 5%程度だが、方法 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 は他の 2 方法に比べて謝る確率が高かった。

**[結論]** 平均値の比の信頼区間を Excel で算出するには、Excel の t 分布のパーセント点を計算する関数である t.inv 関数を用いるのではなく、山内の近似式である(1)式によってパーセント点を計算し、平均値

の比の 95%信頼区間を得ればよい。

MITA による化学物質の評価のために検討した 3 種類の判定方法については、方法 が、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。しかし、実データに基づく検討からは検討した判定方法にはまだ検討の余地がある。

#### 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。MITA のバリデーション研究の開始時点において、方針の異なる 3 種類の判定方法の候補の可能性が考えられた。

バリデーション研究では、各試験実施設から MITA によって被験物質を適用した際のデータを収集するために、マイクロソフト社の Excel でデータシートを作成する必要があった。このデータシートに MITA のデータを入力すると、試験の成立条件が判定され、個々の判定結果を得られるようになることが望ましい。判定には平均値の比の 95%信頼区間を計算する必要があり、多くの統計パッケージがこの計算を行うが、Excel にはこの機能がないため、関数を組み合わせる必要があった。特に比の信頼区間を作成する際に Excel に実装されている t.inv 関数がうまく利用できないため、初年度である 2016 年度は、山内の近似式として知られている近似式に基づく構成方法の実装可能性について検討を行うことを目的に研究を行った。

MITA のバリデーション研究が進み、各施設設から得られたデータを用いて、データ解析を行う際には、研究者の間で議論された方針を解析方法として定式化し、実装させる必要があった。2017

年度は、3 種類の方針に基づいた判定方法の定式化と実際のデータに適用した結果を報告することを目的に研究を行った。

さらに、それぞれの判定方法について、統計学的視点に基づき、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という視点で評価するために、2018 年度は 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うことを目的に研究を行った。

#### B . 研究方法

##### B.1. 平均値の比の信頼区間の構成方法の検討 検討に用いたデータ

検討には、MITA のバリデーション研究のデータが得られていなかったために、IL-8 Luc assay のバリデーション研究を通して得られた 379 実験分データを用いた。この試験は 0 濃度と 11 の濃度の試験からなるため、計 4168 のパーセントが得られることになる。

##### 山内の近似式

自由度  $v$  の  $t$  分布の 97.5% 点を  $t_{0.975}(v)$  とすると、山内の近似式は  $t_{0.975}(v)$  を

$$t_{0.975}(v) \approx u + \frac{y_1(u)}{v} + \frac{y_2(u)}{v^2} + \Lambda + \frac{y_3(u)}{v^3} \quad (1)$$

で近似する。ただし  $y_1(u) = (u^3 + u)/4$ ,  
 $y_2(u) = (5u^5 + 16u^3 + 3u)/96$ ,  
 $y_3(u) = (3u^7 + 19u^5 + 17u^3 - 15u)/384$ ,  
 $y_4(u) = (79u^9 + 776u^7 + 1482u^5 - 1920u^3 - 945u)/92160$ ,

$$y_5(u) = (27u^{11} + 339u^9 + 930u^7 - 1782u^5 - 756u^3 + 17955u) / 368640,$$

u=1.96である。<sup>3)</sup>

### パーセント点と95%信頼区間の下限の比較

1468の比のデータについて、上記の式で得られる山内の近似式により算出される97.5%点の値と95%信頼区間の下限の値を、統計解析ソフトであるRで計算されるそれぞれの値と比較した。

## B.2. MITA の判定方法に関する検討

### 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。

### バリデーション研究で検討した3種類の方法について

バリデーション研究において検討をおこなった3種類の判定方法(方法A、方法B、方法C)について以下にまとめる。

方法A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あと、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B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つとしてすることで、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Cは、方法A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C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Aとは異なる。%換算した値の利用は、実験施設ごとで測定に用いる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期待されている。

### 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,...,10)の第k番目の繰り返しの測定値をそれぞれSLG<sub>ijk</sub>、SLO<sub>ijk</sub>、SLR<sub>ijk</sub>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。

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

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

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

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

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

I.I.SLR<sub>j</sub> = ( $\overline{SLR_{ij}}$ ) / ( $\overline{SLR_{i0}}$ )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<sub>ijk</sub>はSLG<sub>ijk</sub>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<sub>ij</sub>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<sub>j</sub> ≥ 0.05 (j=0,...,J)をみたす濃度のnSLG<sub>ijk</sub>を以降のデータ解析に採用する。nSLG<sub>ijk</sub>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、immumoaugmentation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immumoaugmentation、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%で行うことによって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<sub>j</sub> ≥ 0.05 (j=0,...,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<sub>min</sub>とする。この方法ではjの範囲を1からJ<sub>min</sub>となるnSLG<sub>ijk</sub>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<sub>ijk</sub>の平均の差の推定値は $\hat{\beta}_j$  (j=1,..., J<sub>min</sub>)として得ることができる。有意水準5%の両側

Dunnett検定は、 $\beta_j$ 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immumoaugmentation、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、Conc.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( GLM )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、 $\beta_j^*$  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。

## バリデーション研究のデザイン

バリデーション研究は、MITA の施設内及び施設間再現性を評価するために行われた。この研究では食品薬品安全性センター ( FDSC )、産業技術総合研究所つくば本部 ( AIST-Tsukuba )、産業技術総合研究所四国センター ( AIST-Takamatsu ) の 3 施設が試験実施施設として参加し、5 種類のブラインド化された化学物質分の試験が 3 セット ( 1<sup>st</sup> round、2<sup>nd</sup> round、3<sup>rd</sup> round ) 行われた。

## シミュレーション

シミュレーションは、nSLG<sub>ijk</sub> 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  $i$  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 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  $^2$  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 $E[nSLGi] = 5 + i$
B	直線的にゆるやかに毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + i + 0.3 \text{ 濃度}$
C	曲線的にゆるやかに毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + i + 0.002 \text{ 濃度}^2$
D	曲線的に強く毒性が増加 $E[nSLGi] = 5 + i + 0.05 \text{ 濃度}^2$

$E[nSLGi]$  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  
 $i_1 = 0, i_2 = 1, i_3 = 2 \text{ } \mu$   
 $i_1 = 0, i_2 = 50, i_3 = 100 \text{ } \mu$  と設定し、

繰り返し誤差の標準偏差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。

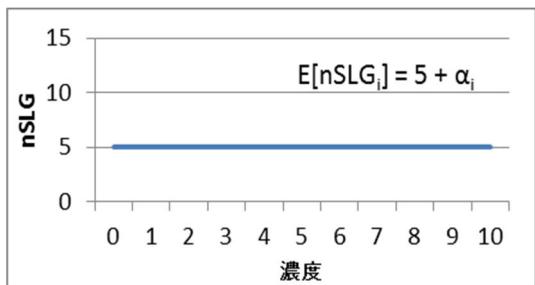


図 1 . パターン A

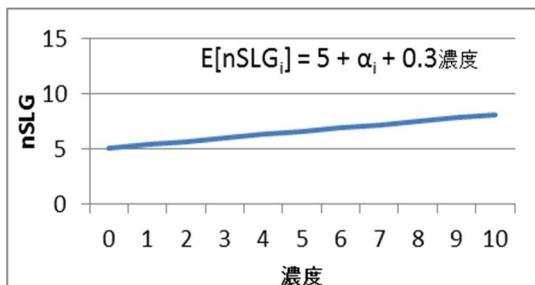


図 2 . パターン B

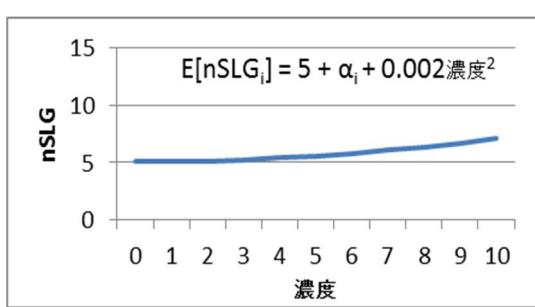


図 3 . パターン C

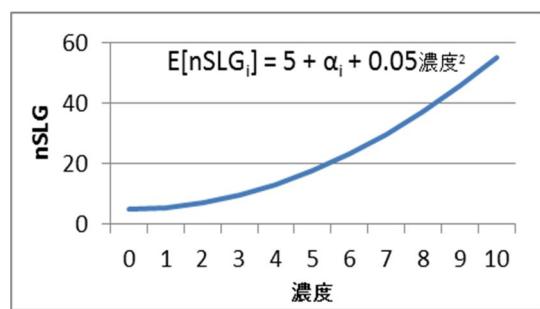


図 4 . パターン D

## C . 研究結果

### C.1. 平均値の比の信頼区間の構成方法の検討

#### 小数自由度の要約

検討に用いた 1468 の比のデータについての要約統計量を表 2 に示す。

表 2 小数自由度の要約統計量

サイズ(n)	平均値	標準偏差	最小値	中央値	最大値
4169	4.49	1.12	3.00	4.58	6.00

自由度の範囲は 3 ~ 6 の範囲にあることがわかる。

#### 97.5%点の比較結果

検討に用いた 1468 の比のデータについて R により得られる 97.5%を横軸に、山内の近似式により得られる 97.5%を縦軸にした散布図を図 5 に示す。

## C.2. MITA の判定方法に関する検討

### バリデーション研究により得られた実データに基づく検討結果

バリデーション研究により得られた実データを用いて、方法 A から方法 C のそれぞれで検討した結果を以下の別紙付録図 A1、別紙付録表 A1 から A3 に示す。

(図 A1 は別紙に示す)

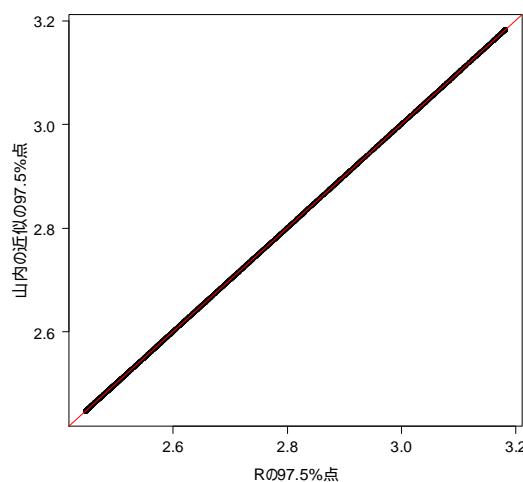


図 5 R と山内の近似の 97.5% 点

### 95%信頼区間の下限の比較結果

検討に用いた 1468 の比のデータについて R により得られる 95%信頼区間の下限を横軸に、山内の近似式により得られる 95%信頼区間の下限を縦軸にとった散布図を図 6 に示す。図において点線で示した参照線は、それぞれ 1 の値のところであり、これは 95%信頼区間の下限を用いたときの統計的有意差の基準となる値である。

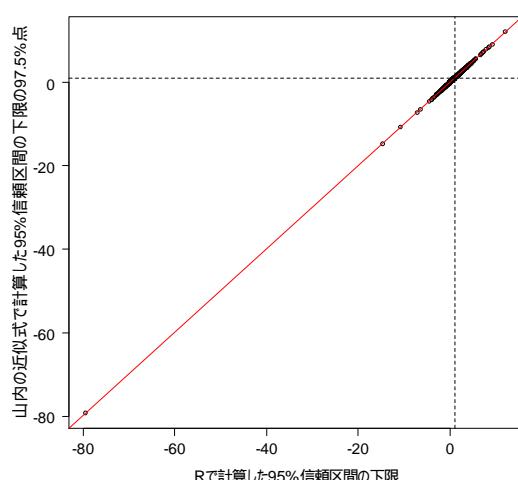


図 6 R と山内の近似の 95%信頼区間の下限

図 A1 は、各施設の各物質ごとに判定で用いている濃度反応関係を描いている。Criteria1、Criteria2、Criteria3 はそれぞれ方法 A、方法 B、方法 C に対応している。方法 A は 3 回の実験の一つ一つについて判定がなされるために、3 つの濃度反応曲線を描いた。一方、方法 B、方法 C は 3 回の実験を統合したデータセットを作成し、解析を行うために濃度反応曲線は 1 つとなる。

(表 A1 は別紙に示す)

表 A1 の S、A、N は、3 回の独立した実験結果をもってそれぞれ「Immunosuppression」、「Immunoaugmentation」、「No effect」の最終判定結果を示す。また 3 回の独立した実験結果は括弧の中に左から順に示す。

また、表 A1 の赤色と青色で色をつけた部分は 3 回の独立した実験結果をもってそれぞれ「Immunosuppression」、「No effect」と施設内で判定が一致したことを示す。

(表 A2 は別紙に示す)

表 A2 中の赤色と緑色で色をつけた部分は 3 セットの実験結果をもってそれぞれ「Immunosuppression」、「Immunoaugmentation」

と施設内で判定が一致したことを示す。

(表 A3 は別紙に示す)

表 A3 中の赤色で色をつけた部分は 3 セットの実験結果をもって「Immunosuppression」と施設内で判定が一致したことを示す。

実験間差	誤差	判定	方法 (%)	方法 (%)	方法 (%)
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	33.26	0	0
		Immunoaugmentation	49.34	99.57	99.35
		No effect	17.40	0.43	0.65
$2 = 1$	$= 0.8$	Immunosuppression	12.68	1.43	1.24
		Immunoaugmentation	6.12	5.46	5.43
		No effect	81.20	93.11	93.33
$3 = 2$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	49.12	99.57	1.90
		No effect	50.88	0.43	98.10
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0	1.58	0.03
		Immunoaugmentation	0	4.98	0.10
		No effect	100	93.44	99.87

### シミュレーションによる検討結果

表 1 で示した各毒性パターンにおいて  $i$  と  $\sigma$  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 3~6 に示す。

表 3 . パターン A の判定結果

実験間差	誤差	判定	方法 (%)	方法 (%)	方法 (%)
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	8.90	2.55	2.22
		Immunoaugmentation	9.26	2.76	2.53
		No effect	81.84	94.69	95.25
$2 = 1$	$= 0.8$	Immunosuppression	7.88	2.39	2.11
		Immunoaugmentation	9.69	2.39	2.29
		No effect	82.43	95.22	95.6
$3 = 2$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	2.41	0.04
		Immunoaugmentation	0	2.65	0.06
		No effect	100	94.94	99.9
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0	2.46	0.08
		Immunoaugmentation	0	2.62	0.04
		No effect	100	94.92	99.88
$2 = 50$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	2.46	0.08
		Immunoaugmentation	0	2.62	0.04
		No effect	100	94.92	99.88
$3 = 100$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	2.46	0.08
		Immunoaugmentation	0	2.62	0.04
		No effect	100	94.92	99.88

表 4 . パターン B の判定結果

実験間差	誤差	判定	方法 (%)	方法 (%)	方法 (%)
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	100	100	100
		No effect	0	0	0
$2 = 1$	$= 0.8$	Immunosuppression	0.47	0	0
		Immunoaugmentation	99.06	99.97	99.99
		No effect	0.47	0.03	0.01
$3 = 2$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	100	100	0
		No effect	0	0	100
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	100	100	0
		No effect	0	0	100
$2 = 50$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	98.81	99.99	2.42
		No effect	1.19	0.01	97.58
$3 = 100$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	98.81	99.99	2.42
		No effect	1.19	0.01	97.58

表 5 . パターン C の判定結果

表 6 . パターン D の判定結果

実験間差	誤差	判定	方法 (%)	方法 (%)	方法 (%)
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0.05	0	0
		Immunoaugmentation	99.95	100	100
		No effect	0	0	0
$2 = 1$	$= 0.8$	Immunosuppression	1.13	0	0
		Immunoaugmentation	98.68	99.81	99.95
		No effect	0.19	0.19	0.05
$3 = 2$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	99.96	100	0
		No effect	0.04	0	100
$1 = 0$	$= 0.08$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	99.96	100	0
		No effect	0.04	0	100
$2 = 50$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	98.83	99.65	0.07
		No effect	1.17	0.35	99.93
$3 = 100$	$= 0.8$	Immunosuppression	0	0	0
		Immunoaugmentation	98.83	99.65	0.07
		No effect	1.17	0.35	99.93

### D . 考察

#### D.1. 平均値の比の信頼区間の構成方法の検討

表 2 によると、比に関する 1468 のデータの自由度の中央値は 4.58 である。この値を用いて Excel2010 の t.inv 関数で、97.5%点を計算するとエラーもなく 2.776445 という値が返される。しかし、この値は自由度を 4 として t.inv 関数で計算しても同じ値である 2.776445 が返されてしまう。一方、R のパーセント点を計算する関数 qt を用いた場合、自由度が 4.58 の場合には 2.643129 が、自由度が 4 の場合には 2.776445 が返され、小数自由度に対して適切な値を返していることがわかる。

図 5 よりパーセント点は R と山内の近似のどちらもほぼ同様な値を取っていることがわかる。また、図 6 より 95%区間の下限も R と山内の近似のどちらもほぼ同様な値を取っていることがわかる。よって、山内の近似式は統計解析ソフト R を用いて解析するのと同様の結果を得ることができることがわかった。

よって、Excel でデータシートを構築する場合には、Excel の t 分布のパーセント点を計算関数である t.inv 関数を用いるのではなく、山内の近似式である(1)式によって計算し、比の 95% 信頼区間を得ればよい。この結果を今後 modified MITA のバリデーション研究で行う際に作成するデータシートを反映させることにする。

Excel は広く普及しているソフトウェアである。R はフリーのソフトウェアであるという利点があるものの、実験実施者にとって統計ソフトは馴染みがあるソフトウェアではないため、R での解析を実験実施者に求めるべきではないであろう。また、Excel の t.inv 関数の問題は Excel のバージョンが更新されることで問題は解消されるかもしれない。しかしながら、どのような実験施設も常に最新の Excel を有し、利用しているとは考えにくい。

## D.2. MITA の判定方法に関する検討

### バリデーション研究により得られた実データに基づく検討結果

図 A1 からは 3 回の実験で濃度反応関係が異なっても、併合すると濃度反応関係は施設内、施設間ともに似た曲線になっていることがわかる。このことより、MITA は 3 回の実験によって判定するという開発の方針は支持できると言えるであろう。

表 1～3 から施設内再現性については、方法 は 3/5 となる物質はなかったが、施設間再現性はいずれの方法も 3/5 であったことがわかる。被験物質 1、3、4 はいずれの方法でも判定結果が同じであり、被験物質 2 と 5 の判定が異なっており、これら 2 物質の結果の詳細が必要である。

これらの 2 つの物質について図 A1 の特に方法 に着目すると濃度反応関係は試験間によって大きく異なっているとは言えず、判定結果の違いは、判定方法に起因する微細な部分であると考えた方

がよいと考えられる。

方法 は、独立した 3 回の実験の判定結果が異なる場合に行う t 検定において、異なる濃度の値を用いてしまう可能性に対する懸念など、最終判定に至るまでの複雑さある。また、方法 、方法 では Dunnett 検定において濃度 0 群に対してある 1 点の濃度で有意な差があれば immunosuppression もしくは immunoaugmentation と判定されるため、用量依存性を考慮すべきかもしれない。

### シミュレーションによる検討結果

#### 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 、 では誤判定は約 5% 程度だが、方法 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 3）。方法 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。

### シミュレーションによる検討結果

#### 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 、 、 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っ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 と方法 に違いはなかったが、方法 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 4、5、6 それぞれの上 2 段）。実験間差や誤差が小さくても、方

法<sub>1</sub>は方法<sub>2</sub>、<sub>3</sub>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<sub>1</sub>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う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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>では応答が0から1の範囲に収まる%supp<sub>ij</sub>に基づき計算していることによる。%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期待されている。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う。方法<sub>1</sub>は%supp<sub>ij</sub>を用いて判定を行う解析に、線形モデルを想定しているので、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<sub>ijk</sub>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<sub>1</sub>よりも方法<sub>2</sub>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**

シミュレーションによる検討において、作成したデータは、方法<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>は応答が0から1の範囲に収まる%supp<sub>ij</sub>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。

また、シミュレーションによる検討で発生させたデータは、実際に実験により得られるSLG<sub>ijk</sub>、SLO<sub>ijk</sub>、SLR<sub>ijk</sub>では無く、これからから計算されるnSLG<sub>ijk</sub>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<sub>ij</sub>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<sub>ijk</sub>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<sub>1</sub>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。実データに基づく検討の考察として記載したように、どの判定方法においても、判定結果の再現性を保つための改良が必要である。特に濃度反応関係の組み入れた判定方法が必要であろう。MITAに詳しい毒性家とのさらなる意見交換が必要である。

MITAは3回の独立した実験結果に基づき判定を行う試験法として提案された。本検討では検討した判定方法は3回の異なる実験結果が得られたことを前提として検討を行ってきた。しかし、他のin vitro毒性試験では、2回の判定結果が同じであった場合、3回目の実験を行わずに2回の判定結果に従うことが多い。このような判定についての検討は行えなかった。

### **E. 結論**

MITA のように、化学物質の評価に必要な平均値の比の 95%信頼区間を Excel で作成するデータシート上で行うには、Excel の t 分布のパーセント点を計算する関数である t.inv 関数を用いるのではなく、山内の近似式である(1)式によってパーセント点を計算し、平均値の比の 95%信頼区間を得ればよい。

MITA の判定方法の検討として検討した 3 種類の方法の間では、統計学的な観点からは、方法が第一種の過誤を 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。しかし、実データの検討からはいずれの方法も判定結果を再現することが難しいため、濃度反応関係を考慮した判定が必要となる。

謝辞：本検討を進めるにあたり解析のためのデータシートの作成とデータの整理を協力してくれた同志社大学の丸谷あおいさん、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

なし。

#### G . 研究発表

Kimura Y., Yasuno R., Watanabe M., Kobayashi M., Iwaki T., Fujimura C., Ohmiya Y., Yamakage K., Nakajima Y., Kobayashi M., Omori T.,

Kojima H. and Aiba S. (2017). Multi-Immuno Tox Assa (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 22 (Supplement), 60.

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### 参考文献

- 1) Fieller, E. C. (1944). A fundamental formula in the statistics of biological assays and some applications. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 17, 117–123.
- 2) 永田靖. 統計的方法のしくみ-正しく理解するための 30 の急所-. 日科技連出版社, 1996.
- 3) 芳賀敏郎、橋本茂司 . 統計解析プログラムの基礎 . 日科技連出版社, 1980.
- 4) Littell, R. C., Stroup, W. W., Freund, R. J. SAS for linear models. SAS, 2002.
- 5) 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.

## Multi-ImmunoTox Assay(MITA)バリデーション研究のデータ解析方法の検討 別紙

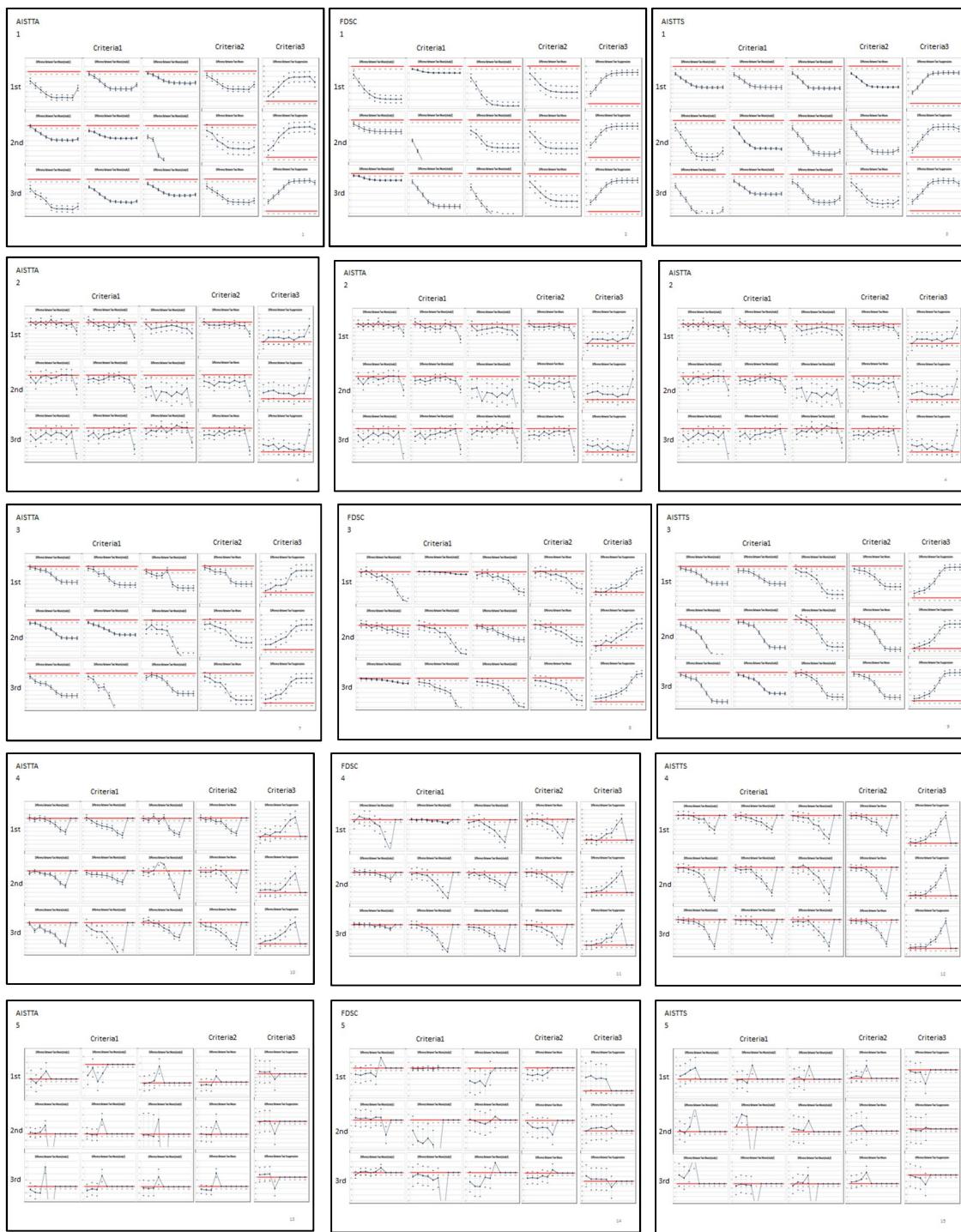


図 A1 各判定方法と濃度反応関係

表 A1 方法 の 3 施設の結果

Chemical		Within		
		4/5	5/5	5/5
	AIST-Tsukuba	FDSC	AIST-Takamatsu	
1	solubility	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)
	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
2	solubility	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)
	1st round	N(-+/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	N(+/-+/-0)	S(-/-)	S(-/-)
3	solubility	100mg/ml(ddw)	25mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)
	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-+ -)	S(-/-)	S(-/-)
4	solubility	100mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)
	1st round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
	2nd round	S(-/-)	S(-/-)	S(-/+ -)
5	solubility	62.5mg/ml(DMSO)	15.625mg/ml(DMSO)	62.5mg/ml(DMSO)
	1st round	A(0/++)	N(+/-0/-)	N(0/-+)
	2nd round	N(+/-+/-0)	N(-/-0)	N(+/-+/-)
	3rd round	N(+/-+ -)	N(+/-+ -)	N(+/-+/-)

3/5

表 A2 . 方法 の 3 施設の結果

Chemical		Within			3/5
		AIST-Tsukuba	FDSC	AIST-Takamatsu	
1	solubility	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)	4/5
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
2	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	5/5
	solubility	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)	
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
3	2nd round	Immunoaug./supp.	Immunosuppression	Immunosuppression	3/5
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
	solubility	100mg/ml(ddw)	25mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)	
4	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	4/5
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
	3rd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression	
5	solubility	62.5mg/ml(DMSO)	15.625mg/ml(DMSO)	62.5mg/ml(DMSO)	3/5
	1st round	Immunoaugmentation	Immunosuppression	Immunoaugmentation	
	2nd round	No effect	Immunosuppression	Immunoaugmentation	
	3rd round	Immunoaugmentation	No effect	Immunoaugmentation	

表 A3 . 方法 の結果

Chemical		Within		
		3/5	4/5	5/5
	AIST-Tsukuba	FDSC	AIST-Takamatsu	
1	solubility	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)	500mg/ml(DMSO)
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
2	solubility	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)	125mg/ml(DMSO)
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
3	solubility	100mg/ml(ddw)	25mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
4	solubility	100mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)	100mg/ml(ddw)
	1st round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
	2nd round	Immunosuppression	Immunosuppression	Immunosuppression
5	solubility	62.5mg/ml(DMSO)	15.625mg/ml(DMSO)	62.5mg/ml(DMSO)
	1st round	Immunoaugmentation	Immunosuppression	No effect
	2nd round	No effect	No effect	Immunoaugmentation
	3rd round	No effect	No effect	Immunoaugmentation

3/5

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MITA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）について現時点で得られたdata setおよび相場によるIL-2転写活性抑制を中心とした免疫毒性AOPをもとに国際バリデーション用の試験法プロトコール、データシート、記録用紙を作成した。施設間試験の実施者に対し試験法の説明会を実施し技術移転を図った。国際バリデーションに先立ち技術移転性を確認するため5物質でのトレーニング(Phase 0)を行い、そこで明らかになった問題点を検討し試験法プロトコールを改良、データシート、記録用紙を作成しPhase I試験を行った。

その後の国際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考とし%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、技術移転性、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- $\gamma$ プロモーター活性の測定を行った。ヒトTRIンパ芽球性白血病由来細胞株JurkatにIL-2プロモーターに制御されたSLGルシフェラーゼ遺伝子（緑色に発色）IFN- $\gamma$

プロモーターに制御されたSL0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 $2 \times 10^5$ 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%CO<sub>2</sub>下で1時間培養した。つづいて25nM PMAと1μM Ioの混合物(PMA/Io)で刺激し37℃、5%CO<sub>2</sub>下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent (TOYOB0)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、SL0、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)、SL0-luciferase activity (SL0-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、SL0-LAをSLR-LAで除することによりそれぞれnormalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)、normalized SL0-luciferase activity(nSL0-LA)を算出した。さらに以下の式に%suppression抑制率を計算した。

$$\% \text{ suppression} = (1 - \frac{\text{nSLG-LA} \text{ または } \text{nSL0-LA}}{\text{薬物非存在下でのnSLG-LA} \text{ または } \text{nSL0-LA}}) \times 100$$

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<sup>1</sup>。（クライテリア1）

## C. 結果

### C-1. 試験法プロトコール、データシート、記録用紙の作成

現時点で得られたdata setおよび相場によるIL-2転写活性抑制を中心とした免疫毒性AOPを参考とし、IL-2、IFN-γレポーター細胞である#2H4細胞を用いた試験法プロトコール、Multi-ImmunoTox Assay protocol ver. 008.1Eを作成し、国際バリデーションに向け英訳した。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. 006を作成した。さらに参加施設用の記録用紙を作成し各施設に配布した。

### C-2. 試験法の説明会を実施

初めて MITA を行う参加施設の実施者を対象とし当研究室にて説明会を2015年8月と2016年2月の計2回開催した。当研究室において参加者の手技によりPMA/Ioに対する#2H4細胞の反応および陽性コントロール化学物質による抑制が認められることを確認した。

### C-3. Phase 0 試験の実施

MITA の国際バリデーション Phase I 試験に先立ち技術移転性を確認するため Phase 0 試験用に以下の化学物質を参加 3 施設に送付した。(2-Aminoanthracene, CH<sub>3</sub>HgCl, Chloroquine diphosphate salt, Citral, Dexamethasone)これらの化学物質を 3 回ずつアッセイする Phase 0 試験を実施した。

### C-4. 国際バリデーションPhase I試験用試験法プロトコール、データシート、記録用紙の作成

Phase 0 試験で明らかになった問題点を検討しプロトコールを変更した。その変更を反映した試験法プロトコール、Multi-Immuno Tox Assay protocol ver. 008.5Eを作成した。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. 007.2を作成した。さらに参加施設用の記録用紙を作成し各施設に配布し、国際バリデーションPhase I 試験を行なった。

### C-5. 国際バリデーションPhase II用の試験法プロトコール、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 II用の試験法プロトコール、Multi-Immuno Tox Assay protocol ver. 009.1Eを作成した。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-Immuno Tox Assay Datasheet for #2H4 cells Ve

r. 008.2を作成した。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。

### C-6. 国際バリデーションPhase II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±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の実施者に対し試験法の説明会を実施し技術移転を図った。Phase 0, 国際バリデーションPhase I、Phase II用の試験法プロトコール、データシート、記録用紙を作成した。

国際バリデーションの結果に基づき%suppressionの閾値を±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-Immuno Tox Assay protocol ver. 011E(最終プロトコール案)
- 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 ) Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E. Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12, 14229-14243.
- 2 ) Watanabe, M., Noma, H., Kurai, J., Sano, H., Saito, R., Abe, S., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Yamasaki, A., Shimizu, E. Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with

interleukin-8. *Biomed Res Int.* 2015 ; 583293.

- 3 ) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y. Aiba, S. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro.* 2015; 29, 1816-1830.
  - 4 ) Kimura Y, Shimada-Omori R, Takahashi T, Tsuchiyama K, Kusakari Y, Yamasaki K, Nishikawa R, Nishigori C, Aiba S., Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line. *Br J Dermatol* 175, 979-987, 2016.
  - 5 ) 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
  - 6 ) 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. 学会発表
- 1 ) Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Aiba, S. An interleukin-8 reporter cell line, THP-G8, can evaluate anti-TNF-a neutralizing activity of patients' sera and predict drug effectiveness during anti-TNF-a

- antibody therapy. 23rd World Congress of Dermatology, (2015, 6) (Vancouver, Canada)
- 2 ) 木村裕 : IL-8 Luc assayバリデーション試験. 日本動物実験代替法学会第28回大会(横浜)2015年12月
- 3 ) 木村裕、相場節也 : 試験法ワークシヨップ「IL-2転写活性抑制をkey eventとするT細胞分化異常誘導に関するAOP」第23回日本免疫毒性学会学術年会(北九州)2016年9月7日
- 4 ) Kimura Y. et al. Multi-ImmunoTox Assay (MITA): the creation of its data set and the results of validation studies. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 5 ) Aiba S. et al. A novel *in vitro* assay for sensitizers in purely aqueous system: the modified IL-8 Luc assay using X-VIVO™ 15 as a solvent. 10<sup>th</sup> World Congress Alternatives and Animal Use in the Life Science. Seattle, Washington, USA August 20-24, 2017
- 6 ) Kimura Y. et al. Dimethyl sulfoxide is not necessary to dissolve most sensitizers for their *in vitro* stimulation of dendritic cells. 47<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research Meeting. Salzburg, Austria, September 27-30, 2017
- 7 ) 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
- 8 ) 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. 011E

May. 10th, 2018

Department of Dermatology, Tohoku University Graduate School of Medicine

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

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

添付文書 1

D. 考察 .....	140
G. 研究発表 .....	141
1. Introduction.....	147
2. Materials .....	148
2-1 Cells.....	148
2-2 Reagents and equipment .....	148
2-2-1 For maintenance of the #2H4 cells .....	148
2-2-2 For chemical exposure, stimulation and solvents .....	148
2-2-3 For measurement of the luciferase activity.....	148
2-2-4 Expendable supplies .....	148
2-2-5 Equipment for measurement of luciferase activity .....	149
2-2-6 Others .....	149
2-3 Culture medium .....	150
2-3-1 A medium: for maintenance of #2H4 cells (500 mL, stored at 2-8°C) .....	150
2-3-2 B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2-8°C) .....	150
2-3-3 C medium: for thawing #2H4 cells (30 mL, stored at 2-8°C) .....	150
2-4 Preparation of the stimulant of #2H4.....	151
2-4-1 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) .....	151
2-4-2 Ionomycin .....	151
3. Cell culture .....	152
3-1 Thawing of #2H4 cells.....	152
3-2 Maintenance of #2H4 cells.....	152
4. Preparation of cells for assay.....	153
5. Preparation of chemicals and cell treatment with chemicals.....	154
5-1 Dissolution by vehicle (cf. Figure 3) .....	154

<b>5-2 When the chemical is prepared in distilled water .....</b>	<b>157</b>
5-2-1 Arrangement of chemicals and vehicle .....	157
5-2-2 Serial dilution.....	157
5-2-3 2 step dilution.....	158
<b>5-3 When the chemical is prepared as a DMSO solution.....</b>	<b>160</b>
5-3-1 Arrangement of chemicals and vehicle.....	160
5-3-2 Serial dilution.....	160
5-3-3 Dilution of DMSO solution with the B medium .....	161
5-3-4 2 step dilution.....	162
<b>6. Preparation of the stimulant (PMA/ionomycin) and addition to #2H4</b>	<b>164</b>
<b>6-1 Material.....</b>	<b>164</b>
<b>6-2 Preparation of 100 µM PMA .....</b>	<b>164</b>
<b>6-3 Preparation of control and x10 PMA/ionomycin solution.....</b>	<b>164</b>
<b>6-4 Addition of PMA/ionomycin to #2H4.....</b>	<b>165</b>
<b>7. Control.....</b>	<b>166</b>
<b>7-1 Preparing control chemical (dexamethasone, cyclosporine A) .....</b>	<b>166</b>
7-1-1 Preparing dexamethasone stock .....	166
7-1-2 Preparing cyclosporine A stock.....	166
<b>7-2 Preparation of cells for assay .....</b>	<b>167</b>
<b>7-3 Arrangement of chemicals and vehicle .....</b>	<b>168</b>
<b>7-4 Dilution with the B medium.....</b>	<b>168</b>
<b>7-5 2 step dilution .....</b>	<b>169</b>
<b>7-6 Addition of PMA/ionomycin to #2H4.....</b>	<b>171</b>
<b>8. Calculation of the transmittance factors .....</b>	<b>173</b>
<b>8-1 Reagents .....</b>	<b>173</b>

8-2 Preparation of luminescence reaction solution.....	173
8-3 Bioluminescence measurement .....	174
9. Measurement.....	177
10. Data analysis.....	180
11. Criteria .....	180
11-1 Acceptance criteria .....	180
11-2 Criterion.....	180
12. Update record .....	182
Appendix 1 Principle of measurement of luciferase activity .....	184
Appendix 2 Validation of reagents and equipment.....	186

## 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 $\gamma$  and G3PDH promoters, respectively, for the Multi-Immuno Tox Assay.

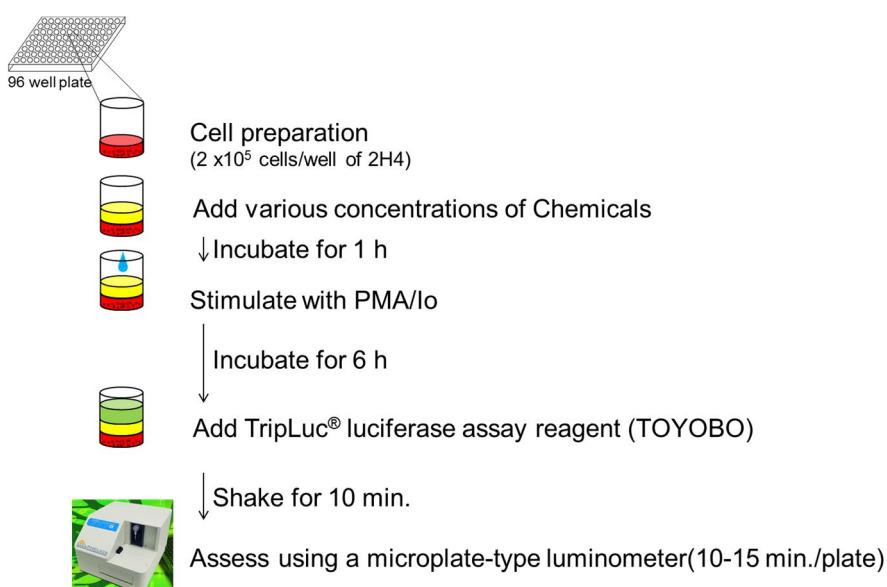
(Kimura Y. et al. Evaluation of the Multi-Immuno Tox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs *Toxicol in Vitro*, 28, 759-768, 2014)

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 <sup>9</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>8</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>7</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>6</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>5</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>4</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>3</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>2</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A/2 <sup>1</sup> $\mu\text{g}/\text{ml}$	A $\mu\text{g}/\text{ml}$
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

PMA/Io or LPS



## 2. Materials

### 2-1 Cells

- #2H4 (IL2-SLG、IFN $\gamma$ -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 $\gamma$  reporter cell line, #2H4, that harbors the SLG, SLO and SLR luciferase genes under the control of the IL-2, IFN $\gamma$  and GAPDH promoters, respectively, was established by Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO Co. Ltd.

(Saito R. et al. Nickel differentially regulates NFAT and NF- $\kappa$ 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<sup>®</sup> 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  $\mu$  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)

## 添付文書 1

- 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 µL)
- Plate shaker (for 96 well plate)
- CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Water bath
- Cell counter: hemocytometer, trypan blue

添付文書 1

**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 μg/mL	7.5 μL
G418	Nacalai Tesque #16513-84	50 mg/mL	300 μg/mL	3 mL
HygromycinB	Invitrogen #10687-010	50 mg/mL	200 μg/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

添付文書 1

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  $\mu$ L, dispend at 5  $\mu$ 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		
Ethanol	Wako #057-00456	2 mM	1 $\mu$ M

Dissolve 1mg Ionomycin using ethanol 669.3  $\mu$ L, dispend at 30  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> incubator (for culture).

Thaw frozen cells (2x10<sup>6</sup> 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% CO<sub>2</sub>.

#### 3-2 Maintenance of #2H4 cells

Pre-warm the A medium in a T-75 Flask at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> 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 3x10<sup>5</sup>/mL and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

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 ( $2.0 \times 10^7$  cells for two chemicals are required, but to have some leeway,  $3.0 \times 10^7$  cells for two chemicals should be prepared), centrifuge the tube at  $120-350 \times g$ , 5 min. Resuspend in pre-warmed the B medium at a cell density of  $4 \times 10^6/mL$ . Transfer the cell suspension to a reservoir, and add 50  $\mu L$  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 2)

Figure 2

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

**5. Preparation of chemicals and cell treatment with chemicals**

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

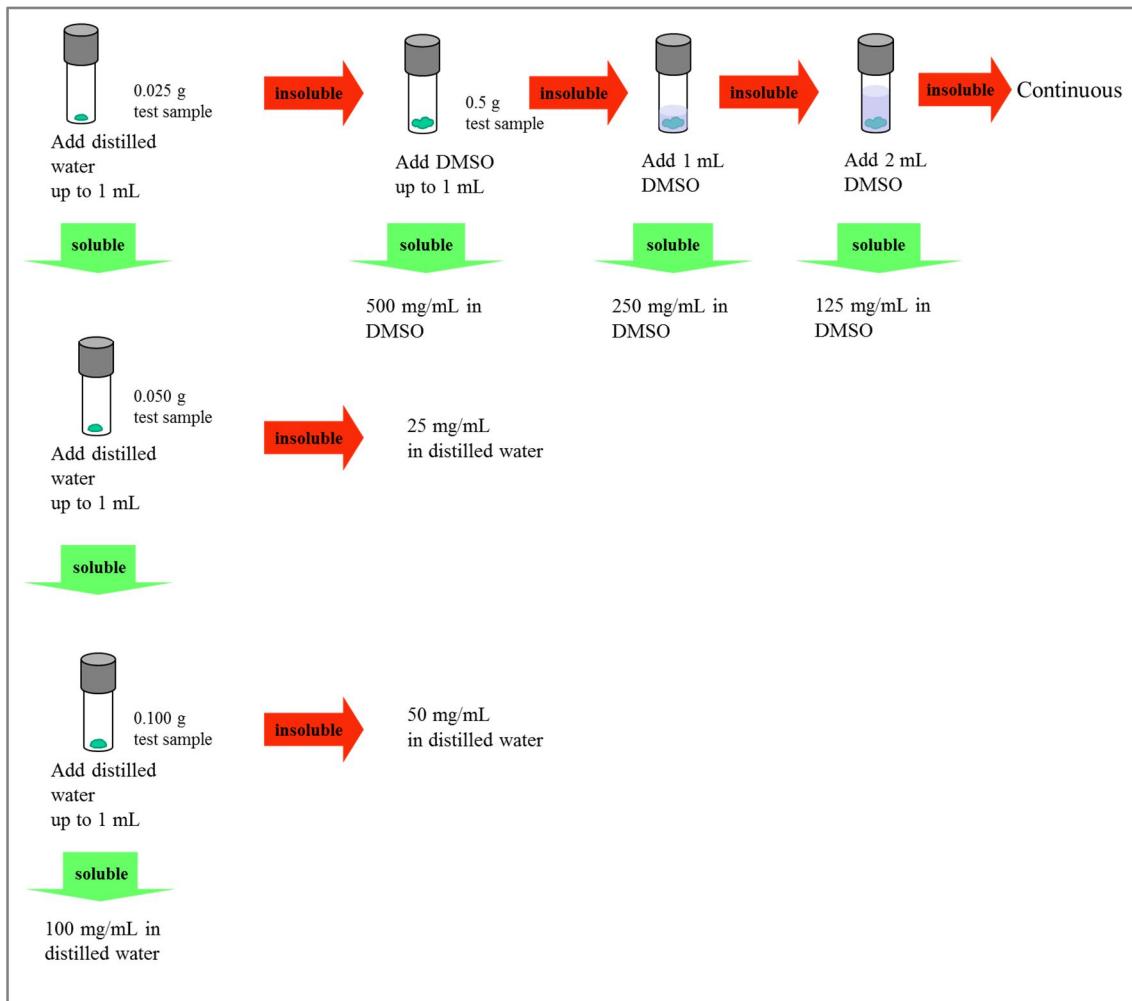
Dissolve the chemical first in distilled water. Namely, weigh 0.025 g of the test chemical in a volumetric flask and add distilled water up to 1 mL. If the chemical is soluble at 25 mg/mL, weigh 0.050 g of the test chemical in a volumetric flask and add distilled water up to 1 mL. If the chemical is 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 (1<sup>st</sup> 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 to fourth experiment (2<sup>nd</sup> to 4<sup>rd</sup> experiment), determine the minimum concentration at which I.I.-SLR-LA (mentioned later in 10) became lower than 0.05 in the 1<sup>st</sup> 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 1<sup>st</sup> experiment, conduct 10 serial dilutions at a common ratio of 2 from the highest concentration in the 1<sup>st</sup> experiment.

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

## 添付文書 1

than 0.05 is 1.95 µg/ml. The highest concentration of the chemical to examine is the concentration one step (2-times) higher than 1.95 µg/ml, which is 3.91 µg/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 1<sup>st</sup> experiment, namely 125 µg/ml.

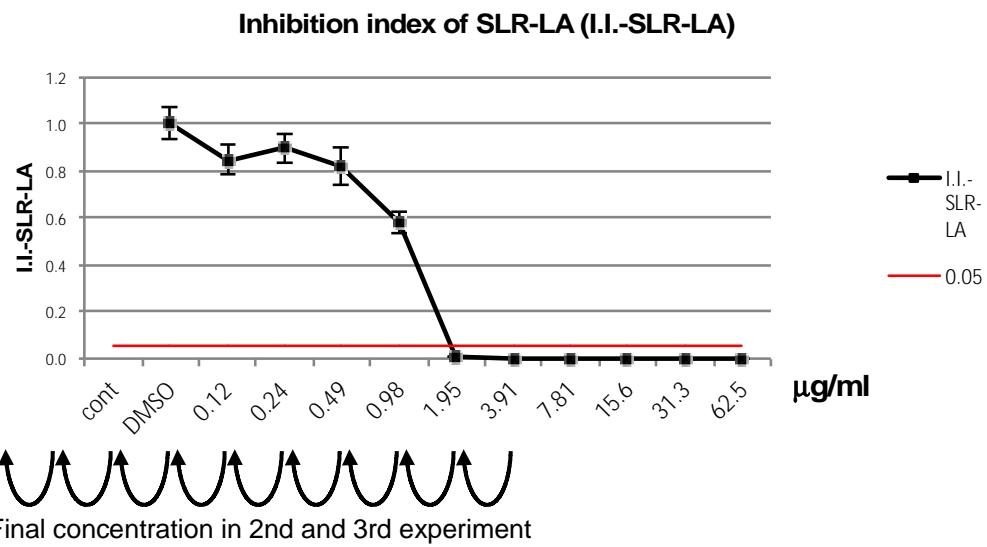


Figure 3.

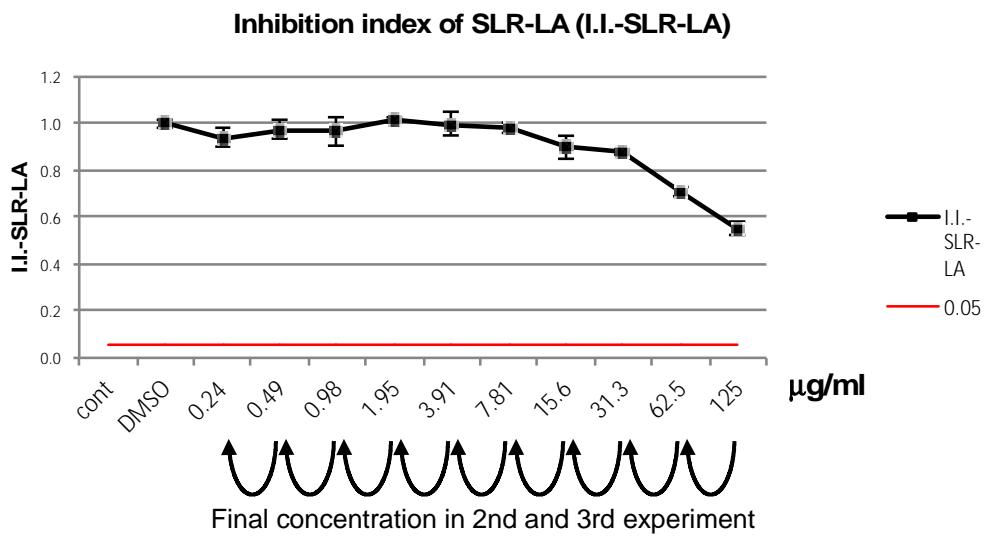


Figure 4

## 添付文書 1

### 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  $\mu$ L of the 100 mg/mL distilled water solution of the chemical to well #A12, and 50  $\mu$ L 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  $\mu$ L to the next (left) well. (cf. Figure 4)

Figure 4

The diagram illustrates the serial dilution process across two 96-well plates. The top plate shows the initial setup: wells A1-A11 contain distilled water (50  $\mu$ L), and well A12 contains a 100 mg/mL chemical solution in distilled water (100  $\mu$ L). Arrows indicate the transfer of 50  $\mu$ L from A11 to A10, A10 to A9, and so on down to A3. The bottom plate shows the resulting concentrations after each dilution step:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 100 mg/mL in distilled water 100 $\mu$ L										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2-fold dilution : transfer 50  $\mu$ L (pipetman, yellow tip)

↓

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 50 $\mu$ L	Distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 0.2 mg/mL in distilled water 100 $\mu$ L	Chemical 0.4 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 0.8 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 1.6 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 3.1 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 6.3 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 13 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 25 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 50 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 100 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

## 添付文書 1

### 5-2-3 2 step dilution

Add 20  $\mu$ L of the diluted chemical to 480  $\mu$ L of the B medium prepared in the assay block. And add 50  $\mu$ L 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<sub>2</sub> incubator for 1 hour (37°C, CO<sub>2</sub>, 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 50 $\mu$ L	Distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 0.2 mg/mL in distilled water 100 $\mu$ L	Chemical 0.4 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 0.8 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 1.6 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 3.1 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 6.3 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 13 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 25 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 50 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L	Chemical 100 mg/mL in distilled water 50 $\mu$ L
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

20 $\mu$ L

Assay Block	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 480 $\mu$ L											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

添付文書 1

Figure 6

- 50uL

Figure 7 Final constituents of each well of the plate

## 添付文書 1

### 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% 50µL	Chemical 500 mg/mL in DMSO 100µL										
B	B medium 90µL											
C												
D												
E												
F												
G												
H												

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

↓

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

## 添付文書 1

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

Dilute 10 µL of the DMSO solution of the chemical in wells #A1-#A12 with 90 µL 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% 50µL	DMSO 100% 50µL	Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 100µL	Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 16 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 31 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 63 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 125 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 250 mg/mL in DMSO 50µL	Chemical 500 mg/mL in DMSO 50µL
B	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL	B medium 90µL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

↓

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

## 添付文書 1

### 5-3-4 2 step dilution

Add 10  $\mu$ L of the diluted chemical to 490  $\mu$ L of the B medium prepared in the assay block. And add 50  $\mu$ L 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<sub>2</sub> incubator for 1 hour (37°C, CO<sub>2</sub>, 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 $\mu$ L	DMSO 100% 40 $\mu$ L	Chemical 1.0 mg/mL in DMSO 90 $\mu$ L	Chemical 2.0 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 3.9 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 7.8 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 16 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 31 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 63 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 125 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 250 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L	Chemical 500 mg/mL in DMSO 40 $\mu$ L
B	Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 0 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 0.10 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 0.20 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 0.39 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 0.78 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 1.6 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 3.1 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 6.3 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 12.5 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 25 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L	Chemical 50 mg/mL DMSO 10% in B medium 100 $\mu$ L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

10 $\mu$ L

Assay Block	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 490 $\mu$ L											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

添付文書 1

Figure 11

Figure 12 Final constituents of each well of the plate

## 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 µM PMA

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

2 mM PMA	B medium	Total	final concentration
5 µL	95 µL	100 µL	100 µM

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

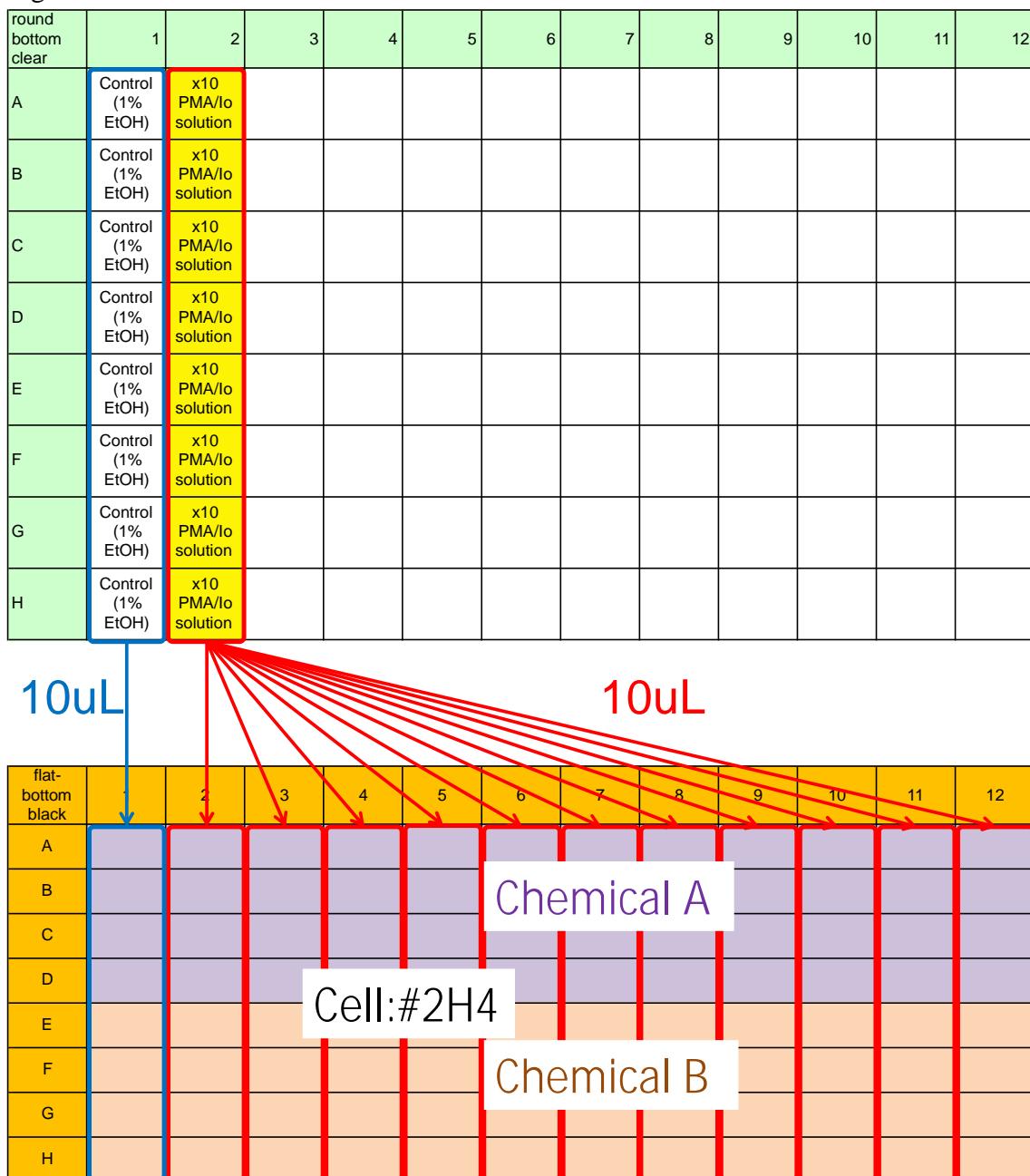
Dilute ethanol, 2 mM ionomycin and 100 µM PMA with the B medium to prepare control or x10 PMA/ionomycin solution. Add the control to well #A1-#H1 of the 96 well clear plate (round bottom), and add x10 PMA/ionomycin solution to wells #A2-#H2 of the 96 well clear plate (round bottom).

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

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

One hour after the addition of chemicals, add 10  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub> incubator for 6 hour (37°C, CO<sub>2</sub>, 5%). (cf. Figure 13)

Figure 13



## 添付文書 1

### 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, dispend 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, dispend 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 ( $5.0 \times 10^6$  cells are required, but to have some leeway,  $7.5 \times 10^6$  cells should be prepared), centrifuge the tube at  $120-350 \times g$ , 5 min. Resuspend in pre-warmed the B medium at a cell density of  $4 \times 10^6$ /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 <sup>5</sup> B medium 50µL											
B	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50µL											
C	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50µL											
D	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50µL											
E												
F												
G												
H												

## 添付文書 1

### 7-3 Arrangement of chemicals and vehicle

Add DMSO 50  $\mu\text{L}$  to #A4, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cyclosporine A stock 50  $\mu\text{l}$  to #A5, distilled water 50  $\mu\text{l}$  to #B1 and #B2, 2.5 mg/ml dexamethasone stock 50  $\mu\text{l}$  to #B3 and the B medium 180  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$	CyA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock 50 $\mu\text{L}$							
B	Distilled water 50 $\mu\text{L}$	Distilled water 50 $\mu\text{L}$	DEX 2.5 mg/mL stock 50 $\mu\text{L}$	B medium 180 $\mu\text{L}$	B medium 180 $\mu\text{L}$							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

↓

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

## 添付文書 1

### 7-5 2 step dilution

Add 20  $\mu\text{L}$  of the diluted chemical or vehicle to 480  $\mu\text{L}$  (1-3 lanes) or 980  $\mu\text{L}$  (4-5 lanes) of the B medium prepared in the assay block. And add 50  $\mu\text{L}$  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 CO<sub>2</sub> incubator for 1 hour (37°C, CO<sub>2</sub>, 5%). (cf. Figure 16-18)

Figure 16

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				DMSO 30 $\mu\text{L}$	CyA 100 ug/mL stock 30 $\mu\text{L}$							
B	Distilled water 50 $\mu\text{L}$	Distilled water 50 $\mu\text{L}$	DEX 2.5 mg/mL stock 50 $\mu\text{L}$	DMSO 10% in B medium 200 $\mu\text{L}$	CyA 10 ug/mL DMSO 10% in B medium 200 $\mu\text{L}$							
C												
D												
E												
F												
G												
H					20 $\mu\text{L}$							

Assay Block	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 480 $\mu\text{L}$	B medium 480 $\mu\text{L}$	B medium 480 $\mu\text{L}$	B medium 980 $\mu\text{L}$	B medium 980 $\mu\text{L}$							
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

添付文書 1

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												
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												

## 添付文書 1

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

One hour after the addition of dexamethasone and cyclosporine A, add 10 µL 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 CO<sub>2</sub> incubator for 6 hour (37°C, CO<sub>2</sub>, 5%). (cf. Figure 19)

添付文書 1

Figure 19

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
B	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
C	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
D	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
E	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
F	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
G	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										
H	Control (1% EtOH)	x10 PMA/lo solution										

10uL                    10uL

flat-bottom black			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												

## 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 µL of 100 mM Tris-HCl (pH8.0) contains 10 % glycerol to each tube of lyophilized reference sample to dissolve the enzymes, divide into 10 µL 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 µL 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.

添付文書 1

Figure 22

<b>Measurement without Filter</b>												
	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												

<b>Measurement with Filter 1</b>												
	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												

<b>Measurement with Filter 2</b>												
	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,

添付文書 1

$$\text{Transmittance factors } (\kappa G_{R56}) = \frac{1269550+1257268+1289562}{3757015+3716611+3810382} = 0.338$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa O_{R56}) = \frac{808550+813160+754174}{1202691+1210208+1122295} = 0.672$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa R_{R56}) = \frac{2193723+1968240+1853873}{2465453+2207572+2077689} = 0.891$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa G_{R60}) = \frac{236478+234079+240876}{3757015+3716611+3810382} = 0.06$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa O_{R60}) = \frac{235121+235878+217432}{1202691+1210208+1122295} = 0.195$$

$$\text{Transmittance factors } (\kappa R_{R60}) = \frac{1585258+1420099+1339265}{2465453+2207572+2077689} = 0.644$$

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						
Transmittance Data						
4		SLG	SLO	SLR		
5	F0	1	1	1		
6	F1	$\kappa G_{R56}$	$\kappa O_{R56}$	$\kappa R_{R56}$		
7	F2	$\kappa G_{R60}$	$\kappa O_{R60}$	$\kappa R_{R60}$		
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 µL 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.

1<sup>st</sup>. 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: (YYYY/MM/DD)					Operator:
Code	Chemical 1		Dissolution	Chemical 1	mg/ml in
	Chemical 2			Chemical 2	
Molecular weight	Chemical 1				
	Chemical 2				
Comment:					

添付文書 1

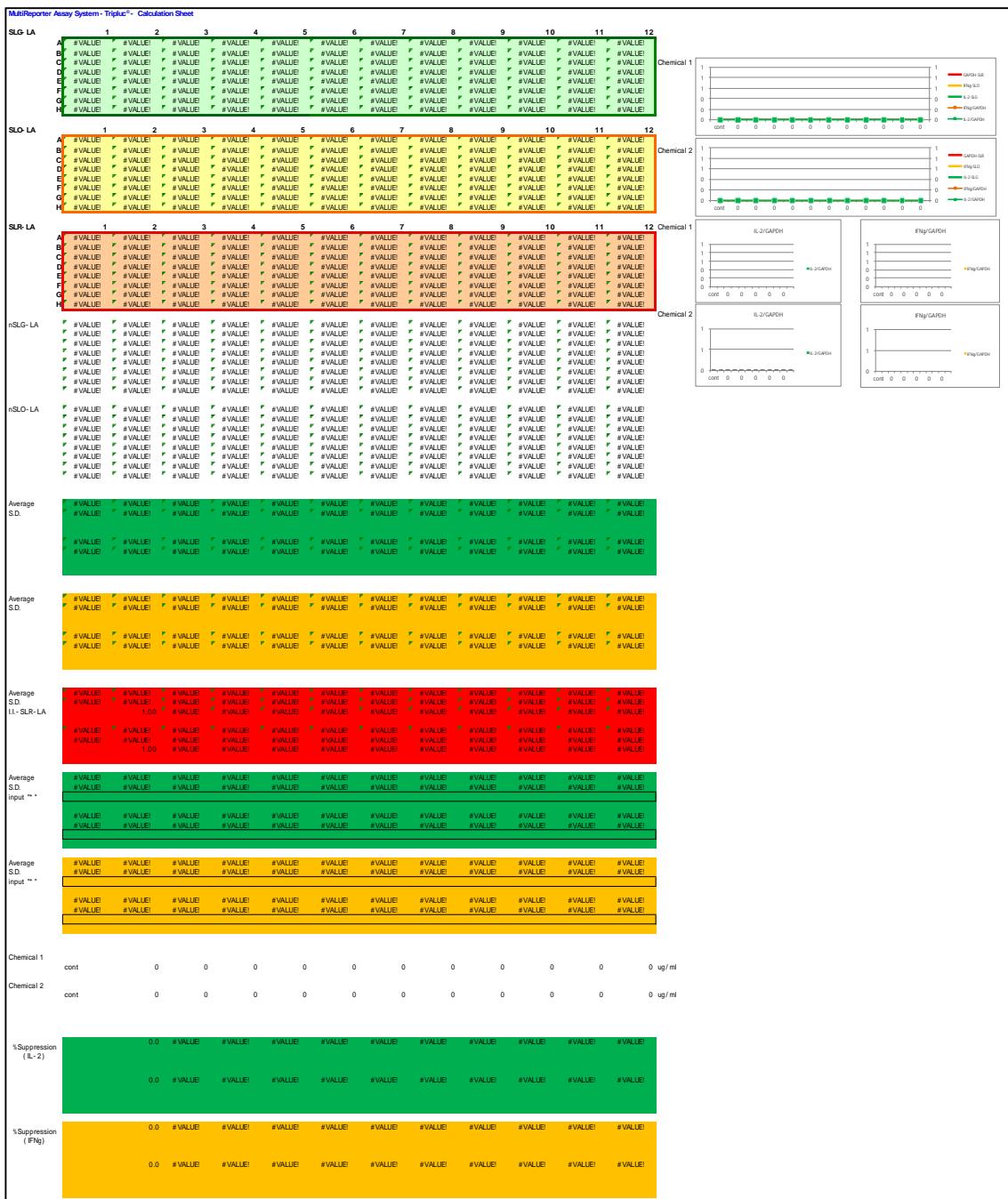
2<sup>nd</sup>. Copy the results of the F0, F1 and F2 measurements (values are expressed as counts) and paste them into the appropriate area in the “Data Input” sheet of the data sheet shown below. In addition, input the transmittance factors calculated in "§5. Calculation of the transmittance factors"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

Figure 25 “Data Input” sheet of the data sheet

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  $\pm$  SD of SLG-LA, the mean  $\pm$  SD of SLO-LA, the mean  $\pm$  SD of SLR-LA % suppression and graphs will automatically appear on the “Result Format” sheet of the data sheet.

添付文書 1

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- $\gamma$  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  
 $= (\text{SLR-LA of } \#2\text{H}4 \text{ treated with chemicals}) / (\text{SLR-LA of untreated } \#2\text{H}4)$
- % suppression : The effect of chemicals on IL-2 or IFN- $\gamma$  promoter  
 $= (1 - (\text{nSLG-LA or nSLO-LA of } \#2\text{H}4 \text{ treated with chemicals})) / (\text{nSLG-LA or nSLO-LA of non-treated } \#2\text{H}4) \times 100$

## 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  
 $(= (\text{nSLO-LA of } \#2\text{H}4 \text{ cells treated with PMA/Ionomycin}) / (\text{nSLO-LA of non-treated } \#2\text{H}4 \text{ cells}))$  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  $I.I.-SLR-LA >= 0.05$  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

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 添

## 添付文書 1

95% simultaneous confidence interval.

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

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

**12. Update record**

Ver. 0011.0E 2018.5.10

Change the criteria

Ver. 0010.0E 2018.1.15 distribution

Change the criteria

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

#### 添付文書 1

Ver. 004.1J 2014.12.10 distribution

Change the cellar 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 ( $\text{NaBrO}_3$ ), Nickel (II) sulfate ( $\text{NiSO}_4$ ), Dibutyl phthalate (DP), 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT))

Change THP-G1b cells to TGCHAC-A4 cells

Change cell number of THP-G8 and TGCHAC-A4  $5 \times 10^4/\text{well}$  to  $1 \times 10^5/\text{well}$

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:  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ , 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 ( $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ ), SLO ( $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$ ) and SLR ( $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$ ), 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	$\kappa G_{R56}$	The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLG / the intensity of SLG without filter (all optical)
	Filter 2 transmittance factor	$\kappa G_{R60}$	The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLG / the intensity of SLG without filter (all optical)
SLO	Filter 1 transmittance factor	$\kappa O_{R56}$	The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLO / the intensity of SLO without filter (all optical)
	Filter 2 transmittance factor	$\kappa O_{R60}$	The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLO / the intensity of SLO without filter (all optical)
SLR	Filter 1 transmittance factor	$\kappa R_{R56}$	The intensity of 560 nm LP (Filter 1) transmitted SLR / the intensity of SLR without filter (all optical)
	Filter 2 transmittance factor	$\kappa R_{R60}$	The intensity of 600 nm LP (Filter 2) transmitted SLR / the intensity of SLR without filter (all optical)

## 添付文書 1

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	Con c.	Final conc. in medium	Require d 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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  L in a tube) and label them as SLG1/1, SLO1/1 and SLR1/1. Keep the reference samples on

## 添付文書 1

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 µL 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 1/16	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 1/16	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 1/16	SLR 1/16	SLR 1/16	SLR 1/16	SLR 1/64	SLR 1/64	SLR 1/64
G												
H												

Transfer 100 µL 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													
4													
5													
6													
7													
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	Filter 1 Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19	A												
20	B												
21	C												
22	D												
23	E												
24	F												
25	G												
26	H												
27													
28	Filter 2 Data	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
29	A												
30	B												
31	C												
32	D												
33	E												
34	F												
35	G												
36	H												
37													
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,

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

L12367 by Hamamatsu Photonics (Shizuoka, Japan)

### 5-2-2 Data collection (an example using TRIANT® 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).

添付文書 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%).

## 添付文書 2

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

## Face Sheet

# Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells

Ver. 008.2

Laboratory		Round	
------------	--	-------	--

**Exp.**      **1st exp.**      (Highest soluble conc. In the next exp.s      mg/ml

<b>Date:</b> (YYYY/MM/DD)		<b>Operator:</b>	
------------------------------	--	------------------	--

Code	Dissolution	mg/ml in
------	-------------	----------

**FInSLO-LA** ##### #VALUE! the number of concentration which satisfy I.I.-SLR-LA>=0.05 #####

### **Comment:**

添付文書 2

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

Data Input Sheet

MultiReporter Assay System -Tripluc® - Calculation Sheet

Transmittance Data															
	SLG	SLO	SLR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T0				1	1	1						#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	
T1												#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	
T2												#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	

Filter 0 Data															A	B	C	D	E	F	G	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12										

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

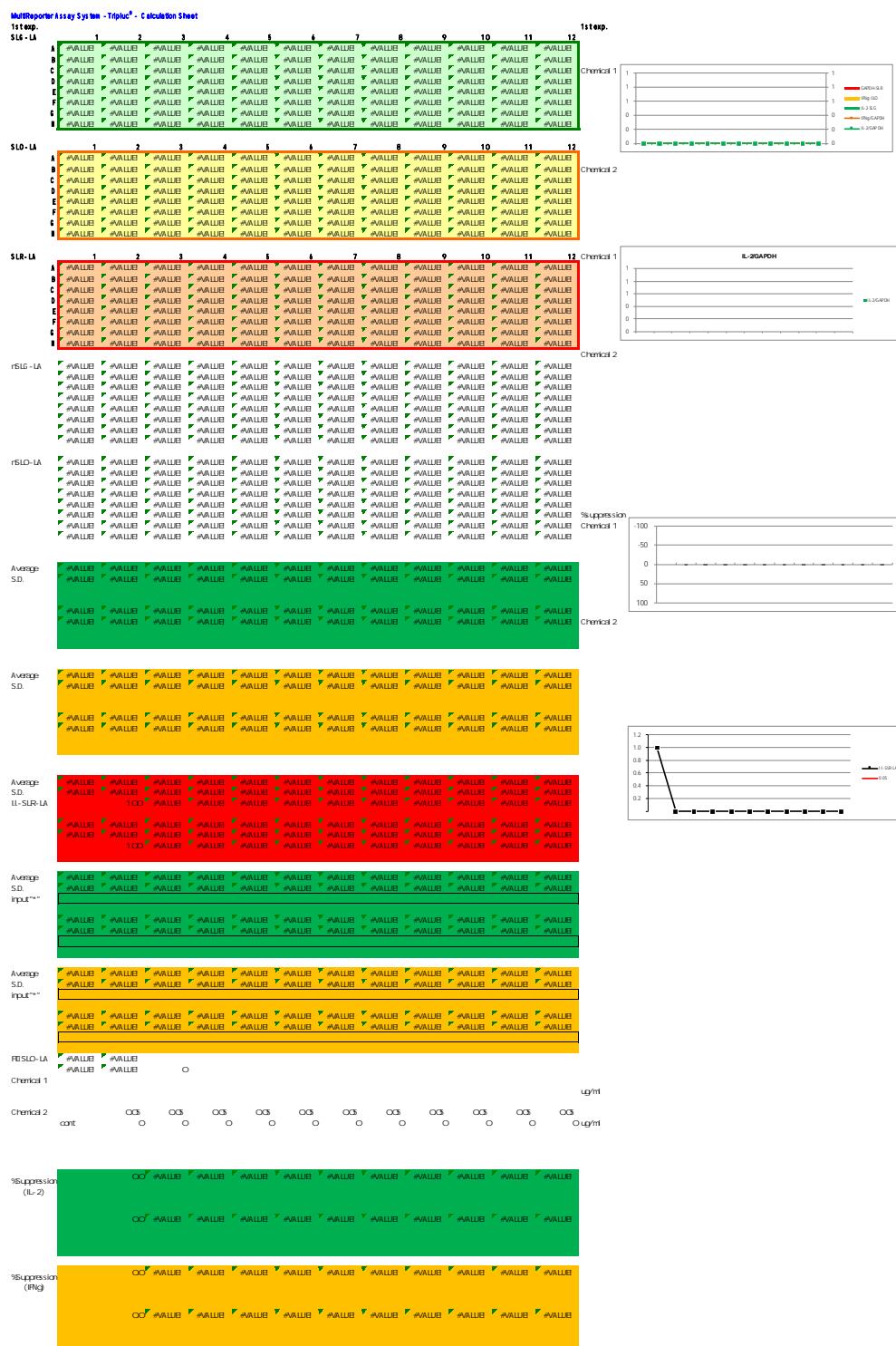
  

Filter 2 Data															A	B	C	D	E	F	G	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12										

## 添付文書 2

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

## Result Format Sheet

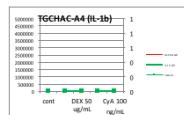
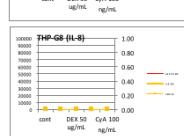
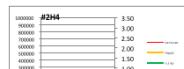


添付文書 2

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

## Control Sheet

MultiReporter Assay System -Tripluc® - Calculation Sheet



抑制率 (%)	0	0 #VALUE!	0 #VALUE!
IL-1b 抑制率 (%)	0	0 #VALUE!	0 #VALUE!

<b>IFN-γ</b> <b>抑制率 (%)</b>	0	0	#VALUE!	0	#VALUE!
<b>IL-8</b> <b>抑制率 (%)</b>	0	0	#VALUE!	0	#VALUE!

## 添付文書 2

### 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 FInSL0-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

## 添付文書 3

## 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 \_\_\_\_\_ 溫度( ) \_\_\_\_\_  
 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. / /						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						

添付文書 3

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

### 添付文書 3

#### 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 細胞滋生(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の遠沈管に加える  
(細胞液0.5 mL×C培地 9 mL=計9.5 mL)  
 適心して細胞を集め(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に細胞を懸滴してT-75 Flaskで培養を  
開始する(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)。  
□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 選択抗生剤での培養開始(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。  
 細胞滋生して3日~4日後に、選択抗生剤を入れた培養(#2H4用A培地)を開始する。  
フラスコ中の細胞塊を滅菌ビペットでピッティングしてほぐし、細胞数を計測する。  
( + ) / × = × 10<sup>6</sup>/mL-A液

□ 必要細胞量を取り、適心して細胞を集め(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15 mLに×10<sup>6</sup>/mLで細胞を懸滴してT-75 Flaskで培養する。  
※ 繼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滅菌ビペットでピ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3×10<sup>6</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。  
( + ) / × = × 10<sup>6</sup>/mL-A液

□ 必要細胞量を取り、適心して細胞を集め(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15 mLに×10<sup>6</sup>/mLで細胞を懸滴してT-75 Flaskで培養する。  
※ 繼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滅菌ビペットでピ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3×10<sup>6</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。  
( + ) / × = × 10<sup>6</sup>/mL-A液

□ 必要細胞量を取り、適心して細胞を集め(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15 mLに×10<sup>6</sup>/mLで細胞を懸滴してT-75 Flaskで培養する。  
※ 繼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滅菌ビペットでピ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2×10<sup>6</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。  
( + ) / × = × 10<sup>6</sup>/mL-A液

□ 必要細胞量を取り、適心して細胞を集め(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15 mLに×10<sup>6</sup>/mLで細胞を懸滴してT-75 Flaskで培養する。  
※ 繼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: \_\_\_\_\_

添付文書 3

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 × 2.0×10<sup>7</sup> cells/枚 × 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 \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ mL  
cells/mL \_\_\_\_\_ mL

実験当日細胞濃度 \_\_\_\_\_ cells/mL -

遠心した細胞数 \_\_\_\_\_ cells<sup>-1</sup> を \_\_\_\_\_ mLを採取

再懸濁した培地量 \_\_\_\_\_ mL(<sup>\*</sup>の細胞数 ÷ (4×10<sup>6</sup>))

それぞれのプレートに50 μL /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 μL/wellで分注 ( \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_ )

### 添付文書3

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)



### 添付文書3

#### 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 $\leq$ 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 50µL	被試験試薬水溶液 100µL										
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。

アッセイプロックに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、搅拌して混合する。

□

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、搅拌して混合する。

□

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チャンネルピベ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)搅拌し、  
細胞を溶解させる。

搅拌中温度  
( °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(アート社製Pheliosの場合F0、F1、F2を使用)。

測定時間  
( : )

測定中温度  
( °C)

### 添付文書3

#### 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 パリデーション研究

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、IL-6-SLR-LA $\leq$ 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)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 100μL											
B	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チャンネルピベットマンを使用して下のB培地90 μLにうつし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□無□												

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 ( : )

プレートをシールし、プレートシェーカーを使用し、搅拌して混合する。 □

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

添加時間 □ ( : )

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。

プレートをシールし、プレートシェーカーを使用し、搅拌して混合する。

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チャンネルピベ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)搅拌し、  
細胞を溶解させる。 □ 搅拌中温度 ( °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F0、F1、F2を使用)。 □ 測定時間 ( : )

測定中温度 ( °C )

### 添付文書3

#### 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  $\mu$ L (#A4)、100  $\mu$ g/mL cyclosporine A stock 50  $\mu$ L (#A5)、Distilled water 50  $\mu$ L (#B1、#B2)、2.5 mg/mL dexamethasone stock 50  $\mu$ L (#B3)、B培地 180  $\mu$ 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 $\mu$ L	CyA 100 $\mu$ g/mL ストック 50 $\mu$ L							
B	Distilled water 50 $\mu$ L	Distilled water 50 $\mu$ L	DEX 2.5 mg/mL ストック 50 $\mu$ L	B培地 180 $\mu$ L	B培地 180 $\mu$ L							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

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

アッセイブロックの#A1~#A3にB培地480  $\mu$ L、#A1~#A3にB培地980  $\mu$ Lを分注し、上図の希釈液を20  $\mu$ L添加して混合し、50  $\mu$ L/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、搅拌して混合する。

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  $\mu$ M溶液を作製する。(2 mM PMA 5  $\mu$ L + B培地 95  $\mu$ 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 $\mu$ M PMA	Ethanol	Total
Control	995 $\mu$ L	-	5 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	
x10 PMA/ionomycin solution	2382 $\mu$ L	12 $\mu$ L	6 $\mu$ L	-	2400 $\mu$ L

コントロール溶液を#A1~#D1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2~#D5に10  $\mu$ L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、搅拌して混合する。

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<sup>®</sup> Luciferase assay reagentを溶解させる。

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

添加時間  
( : )

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピベ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  $\mu$ 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 °C)で10分間(30分間まで可)搅拌し、細胞を溶解させる。

搅拌中温度  
( °C)

ルミノーメータで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)

添付文書 3

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、產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	in vitro/in vivo	in vivo effects	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	Fc $\epsilon$ Ri, MAPK, mast cell	positive	mice	bone marrow		Salomon 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- $\Theta$ , 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	Quinolinone	NF- $\kappa$ B, NFAT	negative	Human	cell line		Kwak et al. Bioorg Med Chem. 2016		
28	Ochratoxin A	MAPK	positive	Human	cell line		Danif et al. J. Toxicol Sci. 2016		
29	-	Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP)	positive	Human	PBL		Karampetou 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	TIM-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	Siver nanoparticles, Gold nanoparticles	MAPK	negative	Human	cell line		Parnasutti 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	-	Gas/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	Tuberostemonine 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. 201		
54		Ets-1	positive	Human	PBL		Tsao et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2013		
55	Ganoderma lucidum		positive	Human	PBMC		Habijanic 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. 20		
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>		Sakthivel et al. Asian Pac J Cancer Prev. 201		
62		Ndfip1	negative	Mice			Ramos-Hernández 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)		positive	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	Benz[a]pyrene	Nrf2 pathway	negative	Human	cell line		Murugaiyan et al. Toxicol Appl Pharmacol 20		
68	Aflatoxin B1		negative	Avian			Chen et al. Res Vet Sci 2013		
69	H1N1 influenza		positive	Human			Weaver et al. PLoS One 2013		
70		PKCa PKC $\beta$	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 Polyguan	positive	Mice			Kobayashi et al. J Immunol 2013		
73		MCP1P1, (ARE-independent)	negative	Human, Mice			Li et al. PLoS One 2012		
74		microRNA-9/Blimp-1	positive(microRN)	Human	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	Animals	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- $\beta$		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(microRNAs)				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, $\alpha$ -hexylcinnamaldehyde, nickel sulfate, SDS, PABA, potassium bichromate, trimellitic anhydride, phthalic anhydride, sodium hexachloroplatinate		positive(DNCB, DNFB, Oxazolone, Eugenol, $\alpha$ -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					
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					
98		Ligation of the CD2 co-stimulatory receptor	positive	mice, human			Pratheeshkumar et al. Immunopharmacol Immuno 2012		
99	NK026680		negative	rat			Cheadle et al. Gene Ther 2012		
100		IRF-4, c-Rel	positive	Human, M cell line			Shibasaki et al. Transpl Immunol 2012		
101		Histone 3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase	negative	mice			Shindo et al. Cytokine 2011		
102	Selenium		positive	chicken			Wakabayashi et al. J Biol Chem 2011		
103	Ethanol		negative	Human	PBMC, cell line		Peng et al. Biol Trace Elem Res 2011		
104	Plasmodium berghei ANKA		positive	mice			Ghare et al. Alcohol Clin Exp Res 2011		
105	vanadium		negative	Broiler			Sarfo et al. Malar J 2011		
106	live or inactivated NDV		negative	chicken			Deng et al. Biol Trace Elem Res 2011		
107		Runx1	negative	Mice			Balenovic et al. Acta Vet Hung 2011		
108		Dictyostelium differentiation-inducing factors	positive	human	cell line		Wong et al. J Biol Chem 2011		
109	Dynorphin A (1-17)		negative				Takahashi et al. Life Sci 2011		
110	iron, retinol		positive	human			Gein et al. Bull Exp Biol Med 2010		
111		microRNA-181c	negative	Human	PBMC, cell line		Sun et al. Asia Pac J Clin Nutr 2010		
112		delta-like ligand 4 (DII4)	negative	Mice			Xue et al. Mol Immunol 2011		
113		TGM2 gene SNP rs4811528		human			Jang et al. J Immunol 2010		
114	hepatitis C virus non-enveloped capsid-p38 kinase		positive	human	PBMC, cell line		Bradford et al. J Neuroimmunol 2011		
115	Molybdenum		negative	Broiler			Serti et al. Cell Mol Life Sci 2011		
116	Iupane-triterpene glycosides from Acanthopanax koreanum		positive				Xiao et al. Biol Trace Elem Res 2011		
117	oxazolone		positive	mice			Nhiem et al. Biorg Med Chem Lett 2010		
118	Cyclosporine A		negative	human	whole blood		Ahlfor et al. Scand J Immunol 2010		
119	Enzymatic Extract from Ecklonia cava	NF- $\kappa$ B	positive	mice			Brandt et al. Cytometry A 2010		
120	Decalepis hamiltonii Wight and Arn		negative	mice, hum	cell line, PBMC		Ahn et al. Mar Biotechnol 2011		
121	Coenzyme Q10		negative	Human	PBMC		Ashalaitha et al. J Ethnopharmacol 2010		
122	TRAF6, TGF- $\beta$		positive (TRAF6)	mice			Bessler et al. J Nutr Sci Vitaminol 2010		
123	ciprofloxacin	mitochondrial respiratory complex I	negative	human			Cejas et al. Blood 2010		
124	$\alpha$ lpha <sub>2</sub> (OH)2D3		negative	Human	cell line		Kaminski et al. J Immunol 2010		
125	actinomycin D		negative	Human	cell line		Matilainen et al. J Steroid Biochem Mol Biol 2010		
126	Galphai2		positive	mice			Matilainen et al. J Steroid Biochem Mol Biol 2010		
127	zinc		positive	mice, hum	cell line, PBMC		Won et al. Biochem Biophys Res Commun 2010		
128	Anti-IL-6 receptor antibody		negative	mice			Kaltenberg et al. Eur J Immunol 2010		
129	TOM1L		positive	Human	cell line		Yoshida et al. Eur J Pharmacol 2010		
130	Nodosin		negative	mice			Elmarghani et al. Mediators Inflamm 2009		
131	Silymarin		negative	mice			Li et al. Am J Chin Med 2010		
132	microRNA-146a		negative	human	PBL		Gharagozli et al. Pharmacol Res 2010		
133	CD27		positive	mice			Curiale et al. Blood 2010		
134	ATP, P2X7 receptor, FAK, p38		positive	human	cell line		Peperzak et al. J Clin Invest 2010		
135	Liver Stage Antigen-1 (LSA-1) formulated with AS01 or AS02		positive	human			Yu et al. Am J Physiol Cell Physiol 2010		
136	undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobuty PPAR $\gamma$		negative	Human	cell line		Cummings et al. Vaccine 2010		
137	PTPN22		negative	human			Spelman et al. International immunopharmacol 2010		
138	CD44		positive	Human, Mice			Chuang et al. Genes and immunity 2009		
139	Dictyostelium-derived factors (DIFs)		negative	Human	cell line		Bollyky et al. J Immunol 2009		
140	PD-1		negative	mice			Takahashi et al. Life Sci 2009		
141	4-1BB		positive	human			Chikuma et al. J Immunol 2009		
142	Fluorine		negative	chicken			Kassu et al. Clin Immunol 2009		
143	ZEB1		negative	Mice	cell line		Chen et al. Biol Trace Elem Res 2009		
144	HIV Gag p24		positive	Human			Wang et al. Int Immunopharmacol 2009		
145	CCR5		positive	mice			Ndongala et al. Clin Immunol 2009		
146	melatonin receptor		positive	Human	cell line, PBMC		Camargo et al. J Immunol 2009		
147	T-bet, IL-12, IFN- $\alpha$		positive (IFN- $\alpha$ )	Human	PBMC		Lardone et al. Cell Mol Life Sci 2009		
148	andrographolide		negative	Human	cell line		Davis et al. J Immunol 2008		
149	xanthohumol		positive	mice	cell line		Carrette et al. Eur J Pharmacol 2009		
150	Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin		positive	Human, Mice			Choi et al. Int Immunopharmacol 2009		
151	Blimp-1		negative	mice			Su et al. World J Gastroenterol 2008		
152	BACH2		positive	Human			Wang et al. J Immunol 2008		
153	Flubendazole®, CGP 20376		positive	human			Lesniowski et al. Leukemia 2008		
154	TSST-1	HDAC	negative	mice			Saunders et al. Parasitol Res 2008		
155	Lipopolysaccharide, hypoxia/ischemia		positive	rat	microglia in neonatal brain		Kamebani et al. Immunol Lett 2008		
156	2-arachidonyl glycerol		negative	Human	cell line		Girard et al. Neuroreport 2008		
157	PTPN22 R620W		positive	human			Rockwell et al. Biochem Pharmacol 2008		
158	Gastrin, secretin, GIP, VIP		positive/negative	Human	PBMC		Lefvert et al. J Neuroimmunol 2008		
159	Boerhaavia diffusa		positive	mice			Abdalla et al. Iran J Immunol 2008		
160	querceitin		negative	mice			Manu et al. J Exp Ther Oncol 2008		
							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	paeonol		positive	mice			Sun et al. Eur J Pharmacol 2008
163	TGF- $\beta$		negative	Human	PBMC		Das et al. J Immunol 2008
164	IKK $\gamma$ (NEMO)		positive	Human	cell line		Shifera et al. Mol Immunol 2008
165	NPs6 (photodynamic therapy)	GADD-45 $\alpha$ 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 2007
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	ganoferic acid Me		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/CREM		negative	mice			Bodor et al. Eur J Immunol 2007
177	NF-ATc2 (the calcineurin-dependent transcription factor)		positive	human			Kytaris et al. J Immunol 2007
178	IL-4, IL-7, IL-12, IL-21, STAT5, STAT4, STAT16		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			Okwaki et al. J Immunol 2006
190	a-tocopherol		positive (low dose)	mice	splenocyte		Hsieh et al. Nutrition 2006
191	mercuric chloride		negative	mice			Santarelli et al. Int Immunopharmacol 2006
192	Comiphora mukul (medicinal plant)		negative	human, mice			Manjula et al. Int Immunopharmacol 2006
193	couguulin-H (Withanolide, naturally occurring steroid 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- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)		positive				Sakurai et al. FEBS Lett 2005
200	RelA, T-bet		positive (RelA)/n	mice			Hwang et al. J Exp Med 2005
201	CC-4047 (Actimid, Celgene, Immunomodulatory drugs (IMIDs))	AP-1	positive	Human			Payvandi et al. J Interferon Cytokine Res 2005
202	Vilon, Epithalon, Cortagen (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-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- $b$ ]pyridine (PMI)		Negative	mice			Yun et al. Toxicology 2006
206	simian immunodeficiency virus	MAP kinase	positive	human			Muckenfuss et al. Mol Immunol 2006
207	Kruppel-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 OCILRP2/Cir $\alpha$ and its ligand NKRPF1 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-aminoimidazole-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 2005
213	histone H3 acetylation		positive	mice			Wang et al. Biochem Biophys Res Commun 2005
214	Systemic lupus erythematosus serum IgG	CREM, CaMKIV	negative	human			Juang et al. J Clin Invest 2005
215	Anthrax lethal toxin	MAPK I	negative	human	cell line		Fang et al. J Immunol 2005
216	Signals from CD28		positive	mice			Thomas et al. J Immunol 2005
217	IFN- $\gamma$		negative	mice		CTL I	Hidalgo et al. Am J Transplant 2005
218	Splice Variant of the TCR $\zeta$ mRNA 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- $\kappa$ B/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling ↓ Smad3	negative	human			Nishiyama et al. Int Immunopharmacol 2005
221	TGF- $\beta$ 1		negative	mice			McKarns et al. J Immunol 2005
222	CD40/CD40L interaction		positive	mice			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- $\beta$	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	human	cell line		Yu et al. Acta Biochim Biophys Sin 2004
230	Caspase		positive	rat			Falk et al. J Immunol 2004
231	catecholamine		negative	human	cell line		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		Veilopoulou et al. Neuroimmunomodulation 2004
238	Phosphorylated Protein Kinase A-RII $\beta$		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 Infec

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 Proliferat	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 ( <i>Panax quinquefolium</i> )		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, mielle cell			Oukka et al. J Exp Med 2004		
248	Cimetidine		positive	human	lesional skin of viral warts		Mitsubishi 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 Cbeta I		positive	human	cell line		Dreikhausen et al. Int Immunol 2003		
252	IKK $\gamma$ /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 ↓	Concanavalin A Babu et al. Food Chem Toxicol 2003		
255	high flaxseed diet (rich in α-linolenic acid)		no change	Rat	spleen cell				
256	sesquiterpene lactone (traditional medicine)		negative	human	whole blood		Humar et al. Biochem Pharmacol 2003		
257							type 1 diabetes Ozer et al. J Pediatr Endocrinol Metab 2003		
258	YM-54843 (Pyrazole Derivative)		negative	human	cell line		Ishikawa et al. J Immunol 2003		
259	c-Rel		positive	mice			Rao et al. J Immunol 2003		
260	SS-A/Ro52		positive	human	cell line	Sjögren's syndr	Ishii 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 (melator)	human	PBMC		Carrillo-Vico et al. Faseb J 2003		
264	filariasis		positive	human	serum		el-Sharkawy et al. J Egypt Soc Parasitol 2000		
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 Comm 2001		
270	E55+ murine leukemia retrovirus		negative	mice			Erflefaei 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	She	c-Rel	positive	human	cell line		Iwashima et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2004		
274	NFAT		positive	human			Oum et al. Mol Cells 2002		
275	Vomitoxin (deoxynivalenol)	NRE-A ↓	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	condyoma acuminata		negative	human	PBMC		Liu et al. J Tongji Med Univ 2001		
287	Caspase, Calcineurin		positive	human	cell line		Mukerjee et al. Biochem Biophys Res Comm 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), ne	Human	PBMC		Ehret et al. Eur J Immunol 2001		
294	tyrosine kinase inhibitor XR774		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 NY 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, M	cell line		Oh et al. J Immunol 2001		
306	dehydروپروپندرون (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 <i>Borrelia burgdorferi</i> and the agent of human granulocytic ehrlichiosis		negative	mice			Zeidner et al. Parasit Immunol 2000		
312	IL-18		positive	human			David et al. Aids 2000		
313	Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)		positive	mice	cell line		Wermerkirchen et al. Life Sci 2000		
314	C/EBP $\beta$		negative	Human, Mice			Berberich-Siebelt et al. Eur J Immunol 2000		
315	N-acetylsphingosine		positive	rat			Pahlavani et al. Immunopharmacology 2000		
316	Viscum album extract		positive	human	PBMC		Kovacs et al. Biomed Pharmacother 2000		
317	TGF-β1		positive (low dose 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 <sup>SNFT</sup> 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	Immunotoxicology	
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 (Y) (HMG(Y)) family		positive	human	cell line, PBMC	T Cell Proliferation	Himes et al. J Immunol 2000		
325	VIP, PACAP (neuropeptides)	c-Jun ↓, JunB ↑	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	IκB		negative	human	cell line		Khoshsan et al. J Immunol 1999		
333	Jak3		positive	mice			Thomis et al. J Immunol 1999		
334	nitol (A novel sesterpenoid)		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 kinase	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		Nicastri et al. Aids 1999		
341	HIV		negative	human	PBMC		Hong et al. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 19:		
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 1999		
349	Soluble Allo-MHC Class I Antigen		negative	rat			Geissler et al. Transplant Proc 1999		
350	IL-1b, TGF-β		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-depenyl (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		Tatla et al. Free Radic Biol Med 1999		
359	RORγt		negative	human			He Immunity 1998		
360	Transforming Growth Factor-β 1 (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	Tpl-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	Nf-2-a (zinc finger protein)		negative	mice			Pucci et al. Int Immunol 1998		
367	surfactant-associated protein D (SP-D)		negative	human	PBMC		Boron 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			Nebi et al. J Immunol 1998		
371			negative	mice	T cells with CD4-CD8- (double		Liang et al. J Biomed Sci 1998		
372	V7 (CD101) Ligation		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				Assemannacher 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 (secretory)	mice			Stoffel et al. Eur J Immunol 1998		
379	Delta-opioid receptors (DOR1)		positive	human	cell line		Hedin 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 dose)	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 week)	mice			Wang et al. Immunopharmacol Immunotoxicology		

No	Chemical	Biochemical pathway	Action to IL-2 production	Animals	in vitro/in vivo	in vivo effects	Reference
401	lipid emulsion (intralipid)		negative	human	CBMC		Sirota et al. Acta Paediatr 1997
402	thalidomide		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 (hIgG)		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	human	PBMC		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 Ed 1996
416	High Mobility Group Protein I(Y)		positive	human	cell line		Himes et al. Immunity 1996
417	c-rel		positive	human	cell line		Shapiro et al. J Exp Med 1996
418	catalytic domain of pp56(ck)		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 I, IFN- $\gamma$ ↓	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		Lilic et al. Clin Exp Immunol 1996
426	HTLV-I 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		Borrон et al. Am J Respir Cell Mol Biol 1996
429	Nitrix 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 I	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	17 β-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	reactiveoxygen 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 (deoxynivalenol) 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 / negativ	human	cell line		Ueda et al. Int Immunol 1995
454	cAMP	NF-AT I	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 I	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-Flohé et al. Biofactors 1995
463	gold salts		negative	human	serum		Lewandowics 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, IFNa		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			Lacour 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	nymphal Ixodes ricinus ticks		positive	mice			Mbow et al. Cell Immunol 1994
478	glycosphingolipids		positive	mice	cell line		Montero et al. Transplant Proc 1994
479	okadaic acid		positive	mice	spleen cell		Falk et al. Lymphokine Cytokine Res 1994
480	eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E)		positive	mice			Barve et al. J Immunol 1994

No	Chemical	Biochemical pathway	Action to IL-2 production	Animals	in vitro/in vivo	in vivo effects	Reference		
481	human beta 2-microglobulin		negative	mice	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	mice	spleen cell		Czamy et al, Arch Immunol Ther Exp 1994		
484	cyclosporine		negative	human			Salom et al, Transplantation 1993		
485	Ly-6A/E		negative	mice			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	mice	thymocyte		Daculsi et al, Immunol Lett 1993		
490	5-lipoxygenase (5-LO) inhibitor, A-63162		negative	human	PBMC		Alluru et al, J Leukoc Biol 1993		
491	Treponema pallidum		negative	rabbit	PBMC		Podwinska et al, FEMS Immunol Med Microbiol 1993		
492	42.000MW ERK and a 100.000MW protein vasoactive intestinal peptide (VIP)		positive	human	cell line		Song et al, Immunology 1993		
493	Pentoxifylline		negative	mice			Sun et al, J Neuroimmunol 1993		
495	vasoactive intestinal peptide (VIP)		negative	mice			Ganea et al, J Neuroimmunol 1993		
496	substance P and related tachykinins		positive	mice			Rameshwar et al, J Immunol 1993		
497	Schistosoma mansoni		positive	mice			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		Paliogianni et al, J Clin Invest 1993		
502	antigen 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 <sup>+</sup> channel blocker, charybdotoxin (ChTX)		negative	human	PBMC		Freedman et al, J Immunol 1992		
507	IL-4 in schistosomiasis mansoni		positive	mice			Yamashita et al, J Immunol 1992		
508	p21 ras		positive	mice	cell line		Rayter et al, EMBO J 1992		
509	interactions between LFA-1/ICAM-1		positive	mice			Reginald et al, Immunol Lett 1992		
510	factor VIII concentrates		negative				Wadhwa et al, Br J Haematol 1992		
511	trypanosomiasis		negative	mice	spleen cell	restored by N-a	Calabresi et al, Int J Immunopharmacol 1992		
512	benzene via drinking water		negative	mice	spleen cell num	fan et al, Nihon Ika Daigaku Zasshi 1992			
513	FK506 and rapamycin		negative				Hanke et al, Lymphokine Cytokine Res 1992		
514	Trypanosoma cruzi		negative	mice			Soong et al, J Immunol 1992		
515	Ly-6A/E		positive	mice	cell line		Codias et al, J Immunol 1992		
516	B7		positive	human	cell line		Norton et al, J Immunol 1992		
517	streptozotocin		negative	mice		diabetes	Burkart et al, Int J Immunopharmacol 1992		
518	thymopentin (TP5)		positive	mice			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	mice			Henderson et al, J Immunol 1992		
525	Cyclosporin A, FK506		negative	mice			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	mice	cell line		O'Neill et al, J Immunol 1992		
528	Human choriongonadotropin (hCG) and placental lactogen (hPL)		negative	human	PBMC		Schafer et al, J Perinat Med 1992		
529	Prostaglandin E2 (PGE2)		negative	mice			Marcinkiewicz et al, Folia Histochim Cytopathol Williams et al, Science 1991		
530	Zinc Finger Protein		negative				Granelli-Piperno et al, J Immunol 1991		
531	NF-κB B, AP-1, AP-3, OCT-1, and NF-AT			human					
532	Diltiazem		positive	mice		Decreases Host	Meldrum et al, J Surg Res 1991		
533	Schistosoma mansoni infection		no change	mice			Henderson et al, J Immunol 1992		
534	Dihydrotestosterone		no change	mice			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, Mice			Henderson et al, Immunology 1991		
537	Cycloheximide		positive	mice	cell line		Zubriga et al, J Immunol 1991		
538	IL-4		positive	mice			Tanaka et al, J Immunol 1991		
539	Trypanosoma cruzi infection		negative	mice			Nabors et al, J Immunol 1991		
540	calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP)		negative (VIP), n	mice	spleen cell		Boudard et al, J Neurosci Res 1991		
541	Schistosomiasis		negative	mice			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	isoprinosine		positive	mice	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	mice			Codias et al, J Immunol 1990		
548	Schistosomiasis		negative	mice			Fidel et al, J Immunol 1990		
549	N-alpha-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK, chymotryptic-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	mice			Randok et al, Embryo 1990		
552	CD4/L3T4		negative	mice			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	mice	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-γamma 2)		positive	human	UCBL		Ben-Hur et al, Immunopharmacol Immunotoxicol Tompkins et al, Immunol Lett 1990		
558	trauma-induced glycopptide		negative	human	PBMC		Rasanan et al, Photodermatol 1989		
559	Cyclosporin A		negative	mice			Shibuya et al, Nucleic Acids Res 1989		
560	protein kinase C		negative	human	tonsillar lymphocytes		Szamel et al, J Immunol 1989		
561	alpha-thioglycerol		positive	mice	cell line		Kubbies et al, Lymphokine Res 1990		
562	Beta-endorphin		positive	mice	cell line		Bessler et al, Immunopharmacology 1990		
563	cis-urocanic acid (cis-UCA)		negative	human	PBMC				
564	NF-κB, tax-1		positive	human, m	cell line				
565	polyunsaturated fatty acids (palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (cis-18:2), linolenic acid (trans-18:2), and arachidonic acid (20:4))	protein kinase C	positive	human	PBMC				
566	IL-6 IL-1		positive	mice			Holsti et al, J Immunol 1989		
567	CD45R		positive	human	thymocyte		Deans et al, J Immunol 1989		
568	Unsaturated fatty acid (oleic acid)		negative	mice			Yang et al, Immunology 1989		
569	Ultraviolet radiation		negative	mice			Araneo et al, J Immunol 1989		
570	IL-2		negative	human	PBMC		Kradin et al, J Clin Immunol 1989		

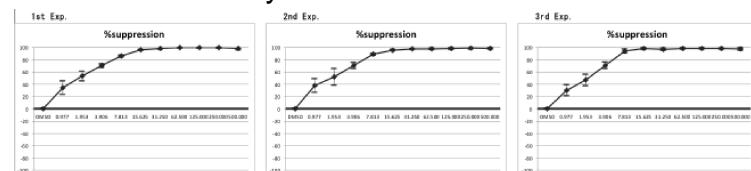
## Appendix 2. Phase I validation study の結果

Phase I

No.1 Dibutyl phthalate

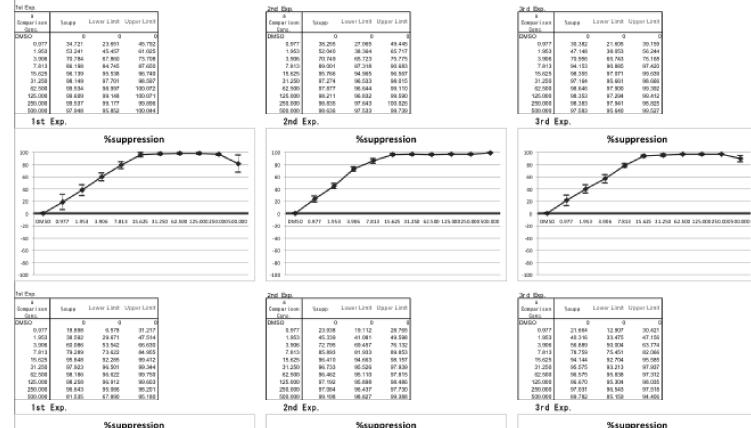
Lab. B

1st round



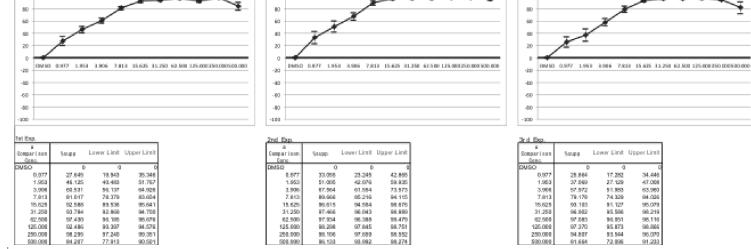
S:SSS

2nd round



S:SSS

3rd round



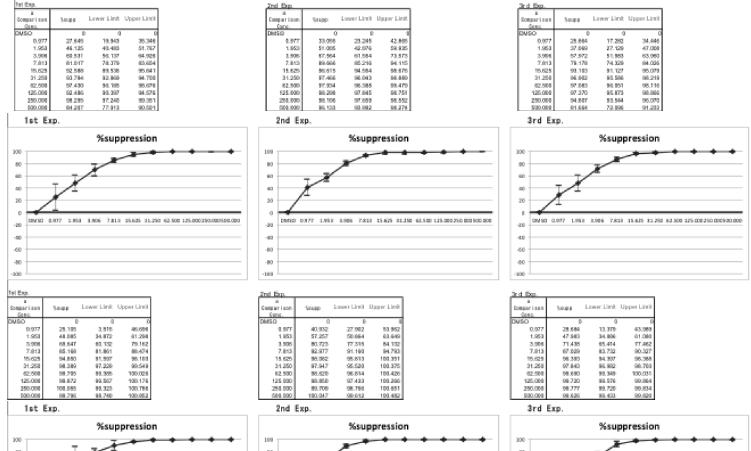
S:SSS

Phase I

No.1 Dibutyl phthalate

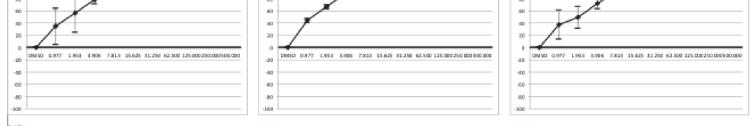
Lab. C

1st round



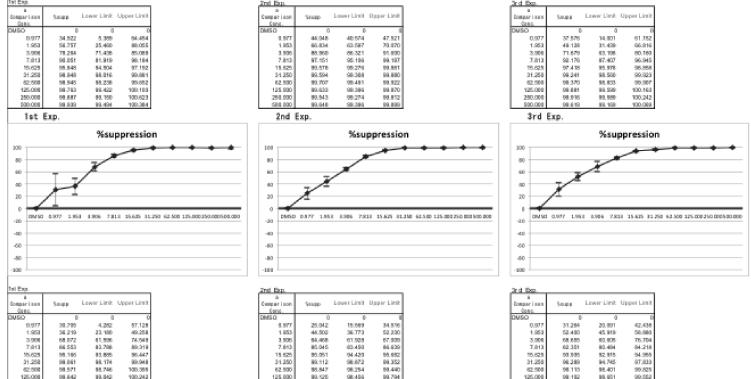
S:SSS

2nd round



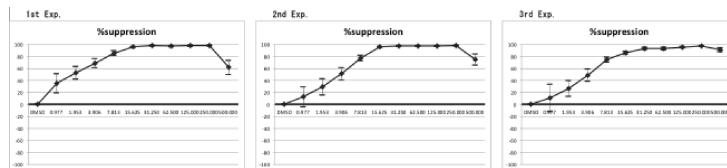
S:SSS

3rd round



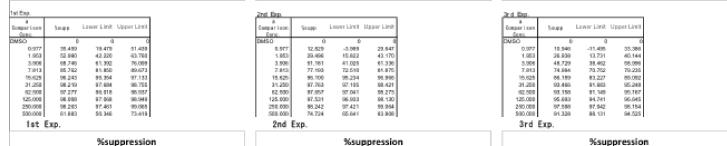
S:SSS

Phase I  
No.1 Dibutyl phthalate  
Lab. D  
1st round



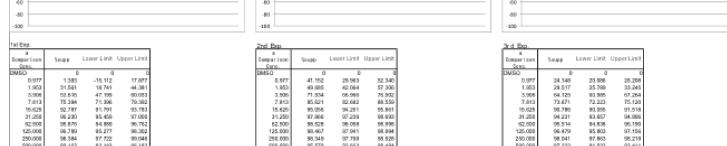
S:SSS

## 1st round



S.SSS

## 2nd round



S:SSS

### 3rd round



Phase I  
No.2 Hydrocortisone water  
soluble  
Lab. B 1st round



S:SAS

## 1st round



2nd round



N·NNN

2nd round



N:NNN

3rd round

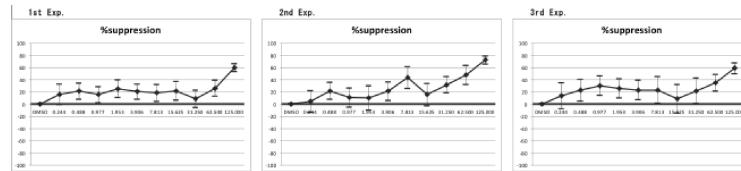


212

Phase I

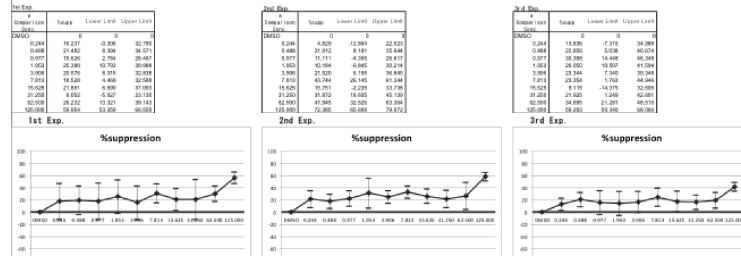
No.2 Hydrocortisone water soluble

Lab. C 1st round



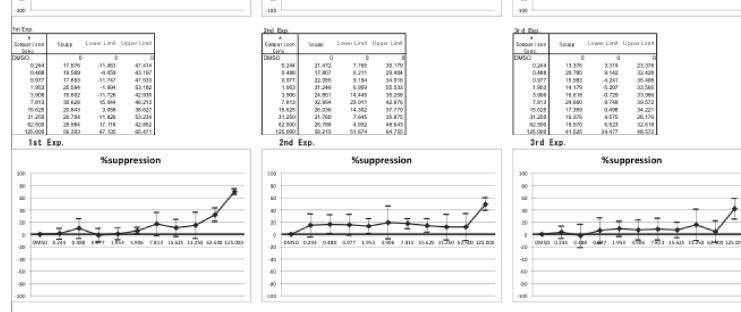
S:SSS

2nd round



S:SSS

3rd round

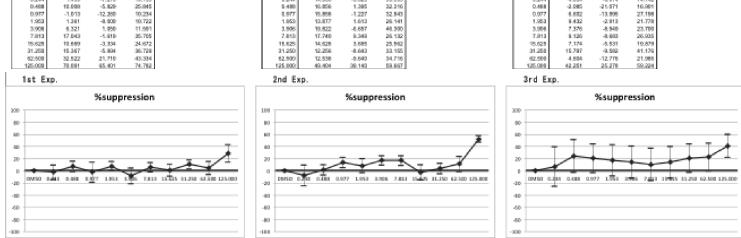


S:SSN

Phase I

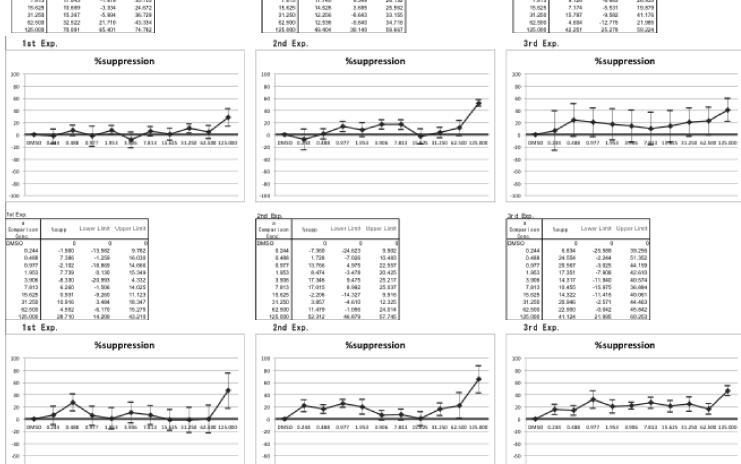
No.2 Hydrocortisone water soluble

Lab. D 1st round



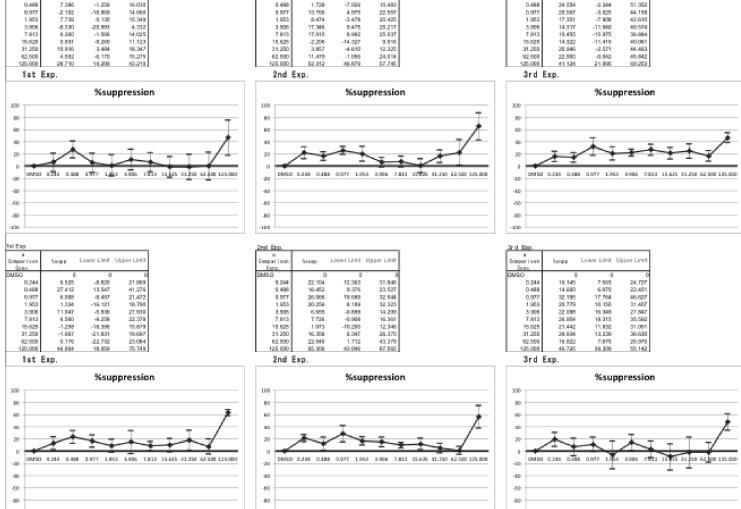
S:NSS

2nd round

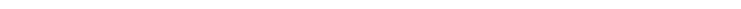
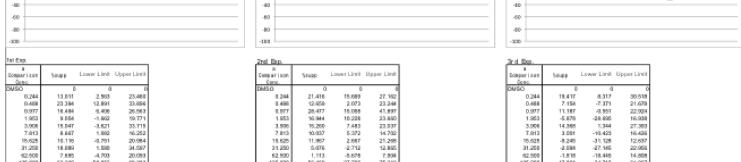


S:SSN

3rd round



N:NNN



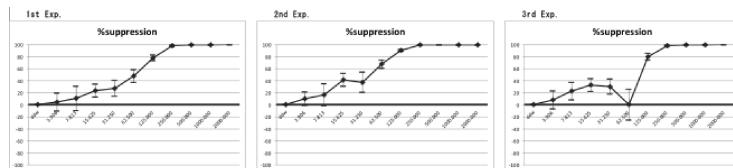


## Phase I

### No.3 Lead(II)acetate

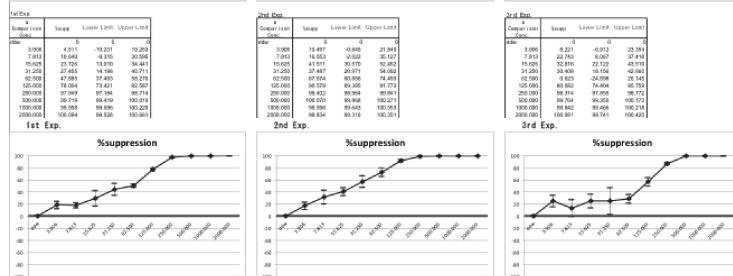
Lab. D

## 1st round



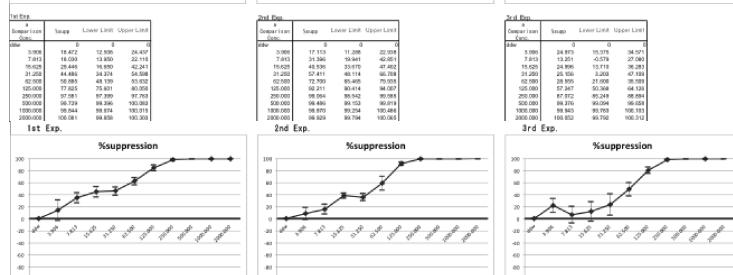
S:SSS

2nd round



S:SSS

### 3rd round



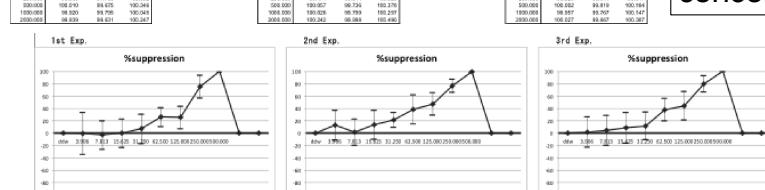
S:SSN

## Phase I

No.4 Nickel sulfate hexahydrate

Lab. B

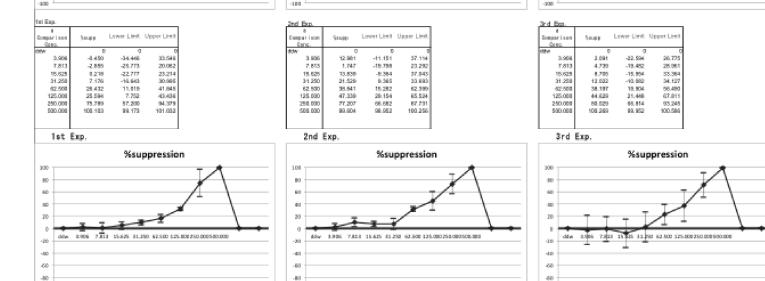
## 1st round



## concordance

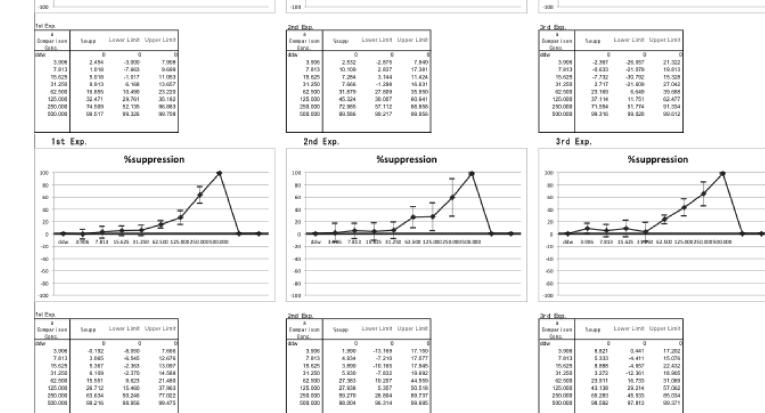
5.333

2nd round



5. CCC

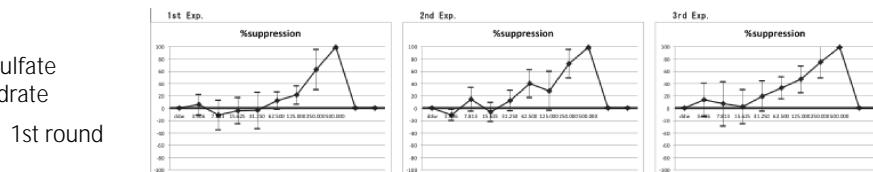
### 3rd round



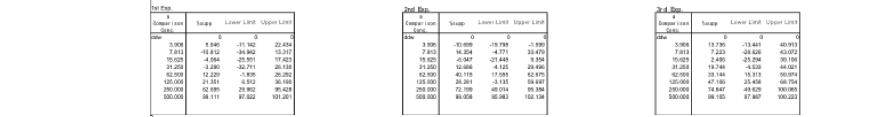
## Phase I

No.4 Nickel sulfate hexahydrate

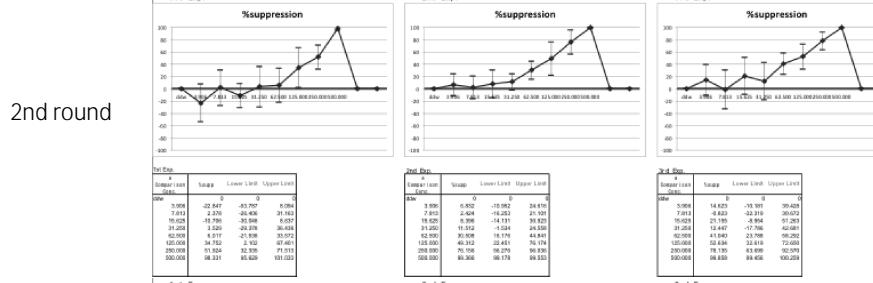
Lab. C 1st round



S:SSS



S:SSS

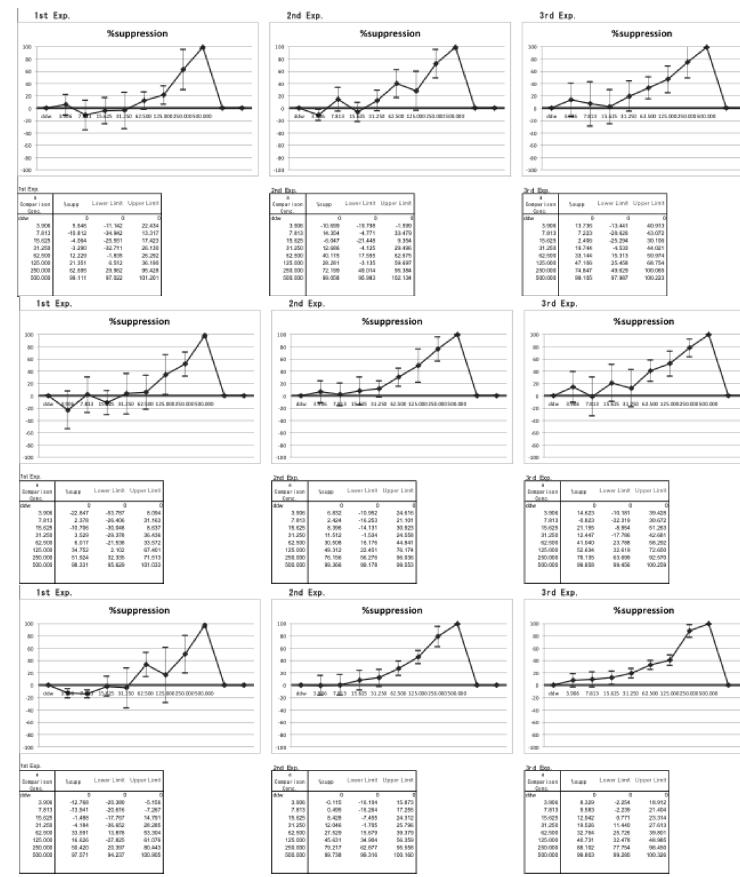


S:SSN

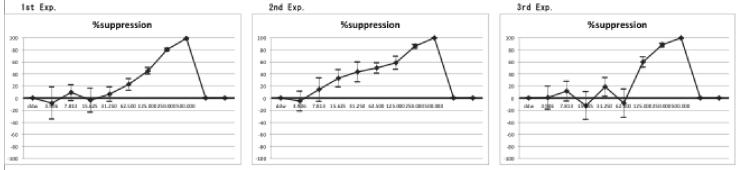
## Phase I

No.4 Nickel sulfate hexahydrate

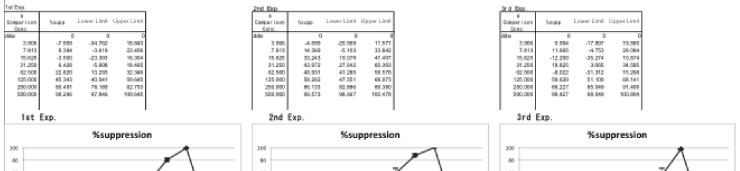
Lab. D 1st round



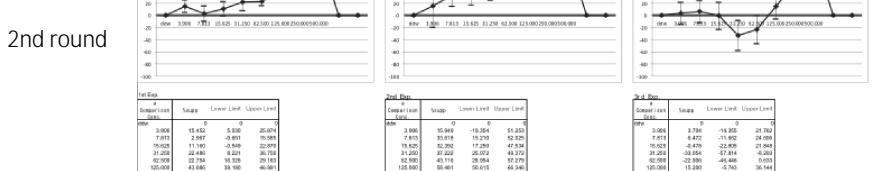
S:SSS



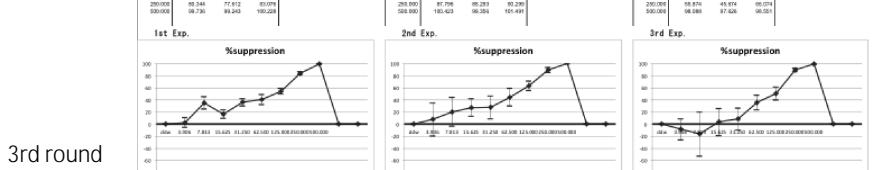
S:SSN



S:SSS



S:SSN



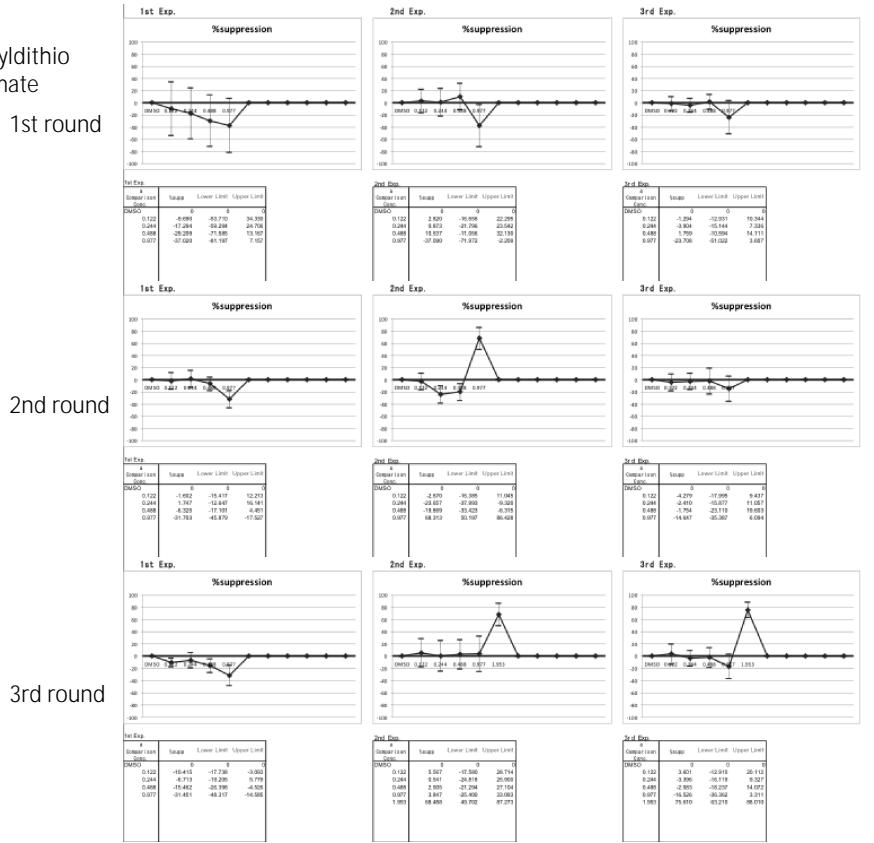
S:SSN

concordance

Phase I

No.5 Dimethyldithio  
-carbamate

Lab. B 1st round



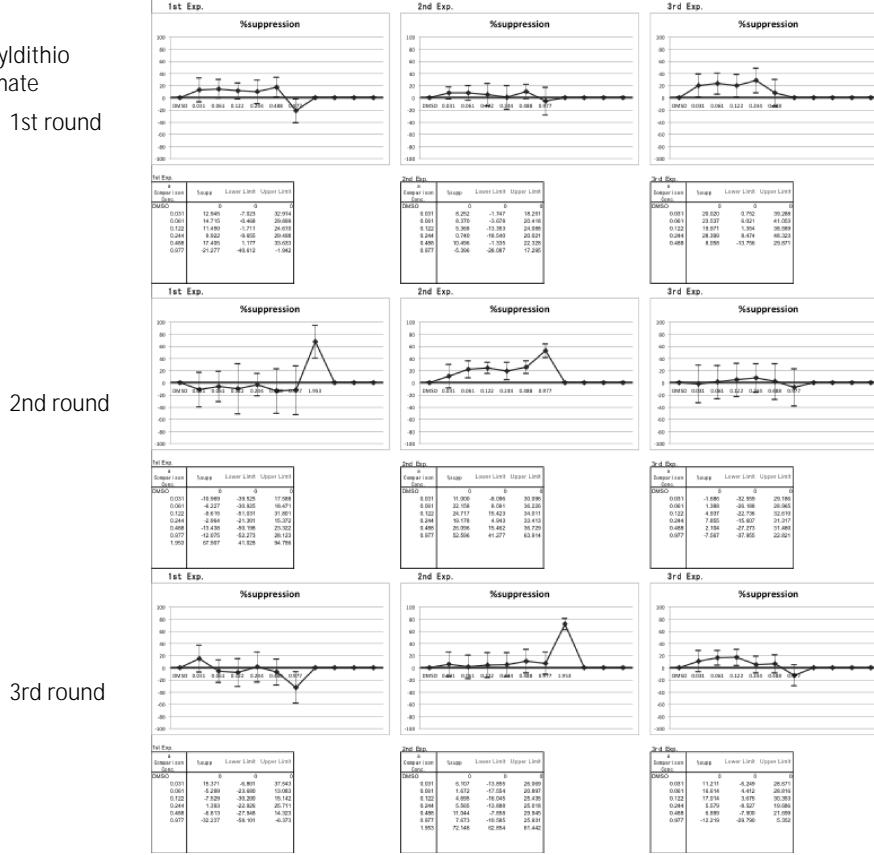
2nd round

3rd round

Phase I

No.5 Dimethyldithio  
-carbamate

Lab. C 1st round



2nd round

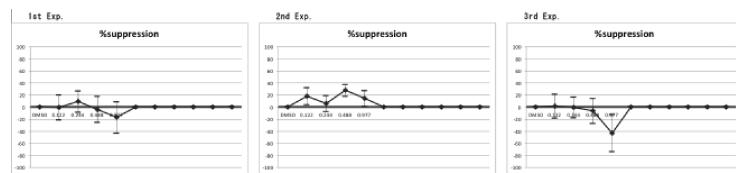
3rd round

Phase I

No.5 Dimethyldithio  
-carbamate

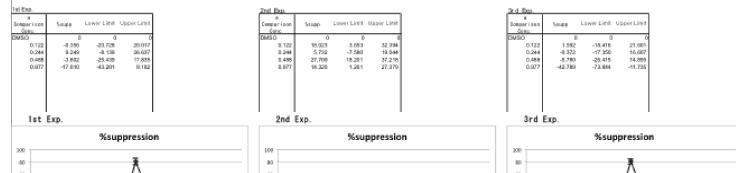
Lab. D

1st round



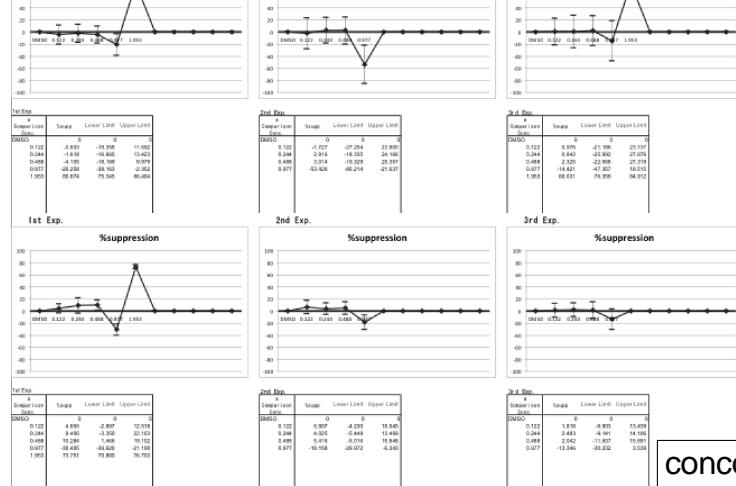
N:NNA

2nd round



N:NNN

3rd round

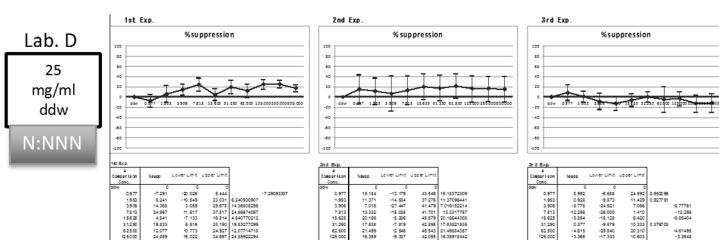
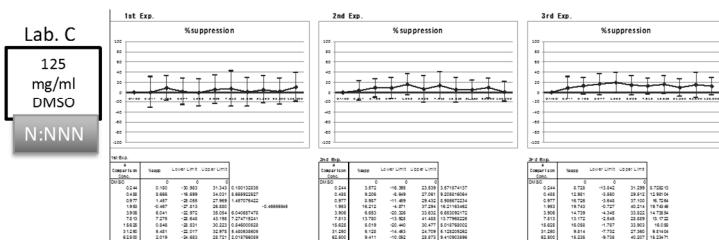
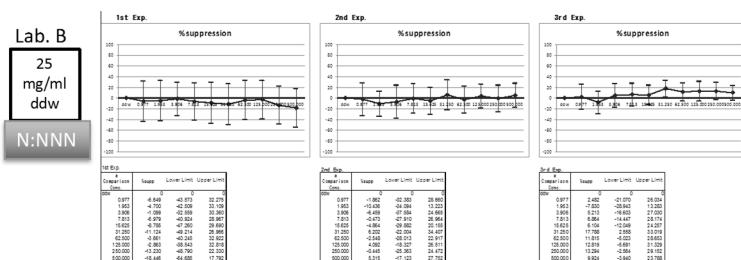


N:NNN

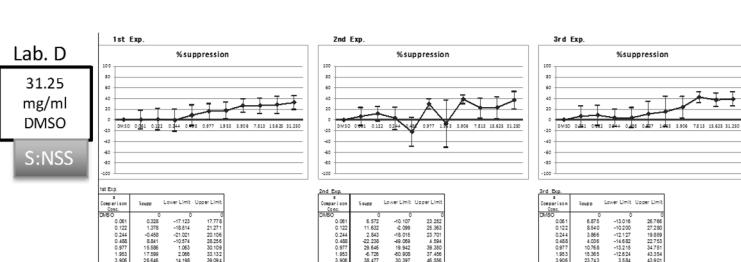
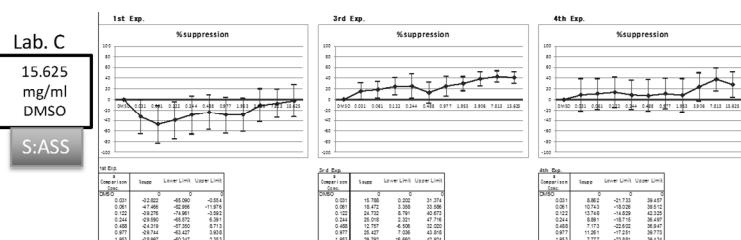
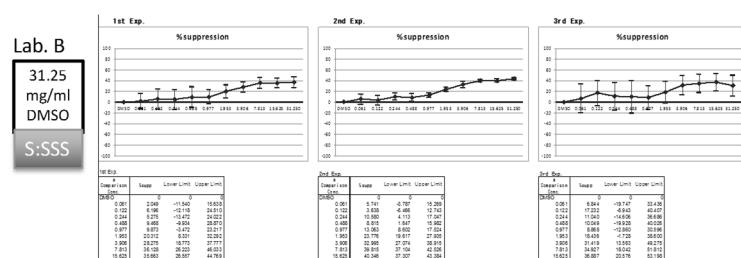
concordance

### Appendix 3. Phase 2 validation study の結果

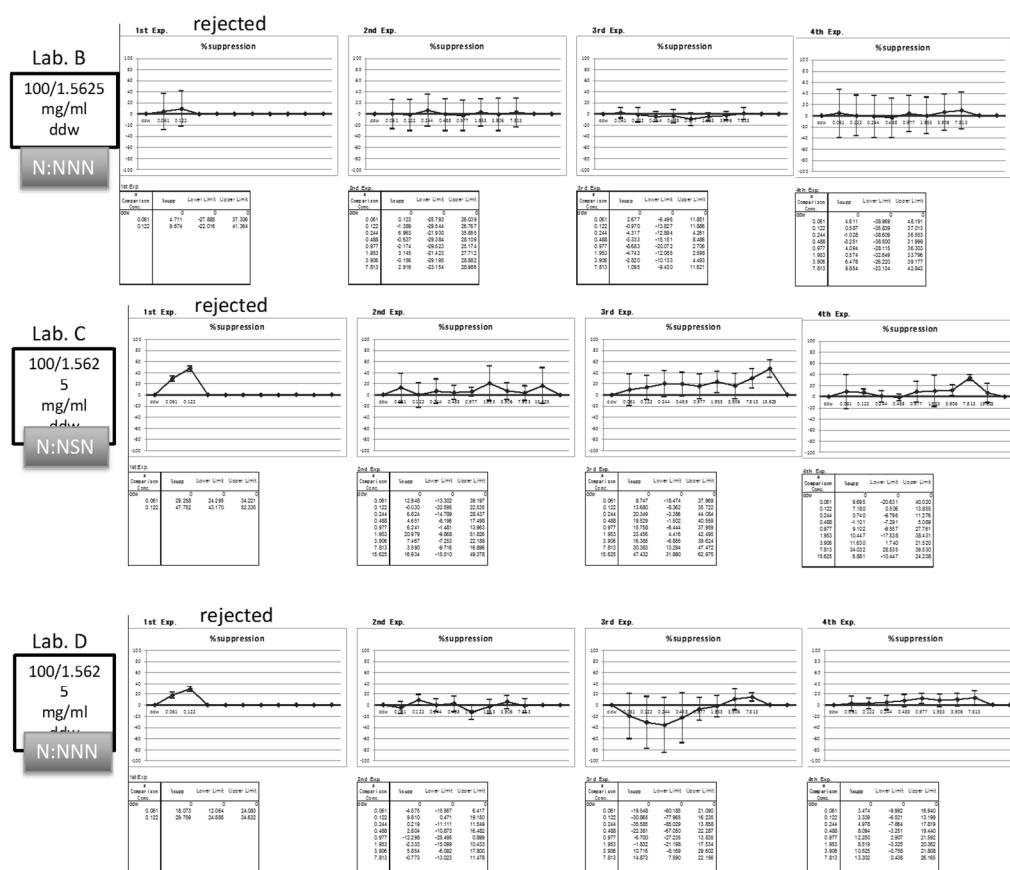
Phase II Chem.1



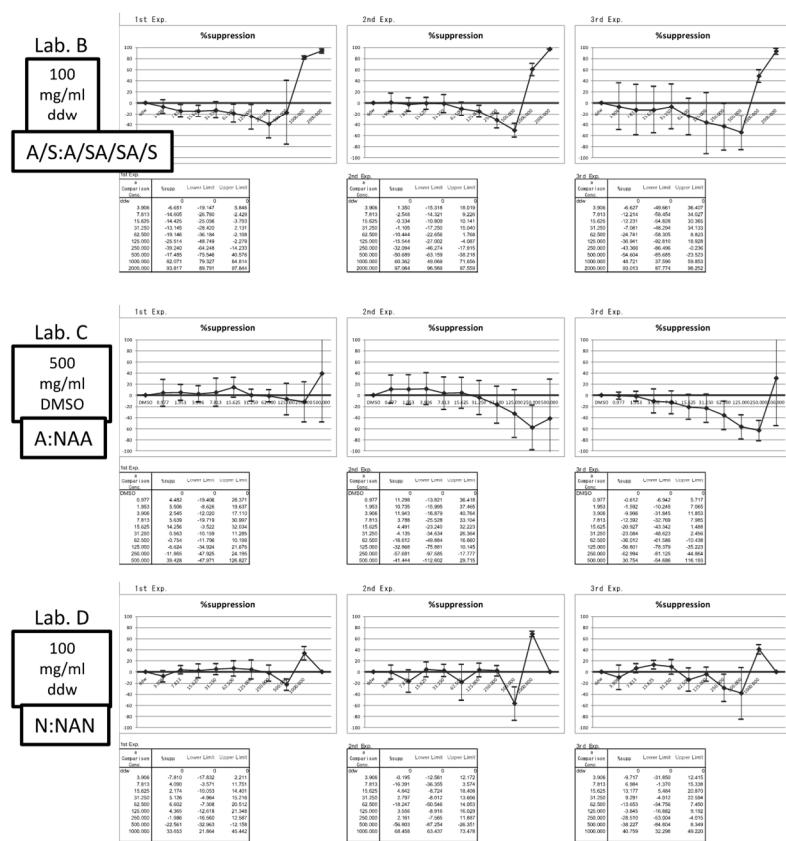
Phase II Chem.?



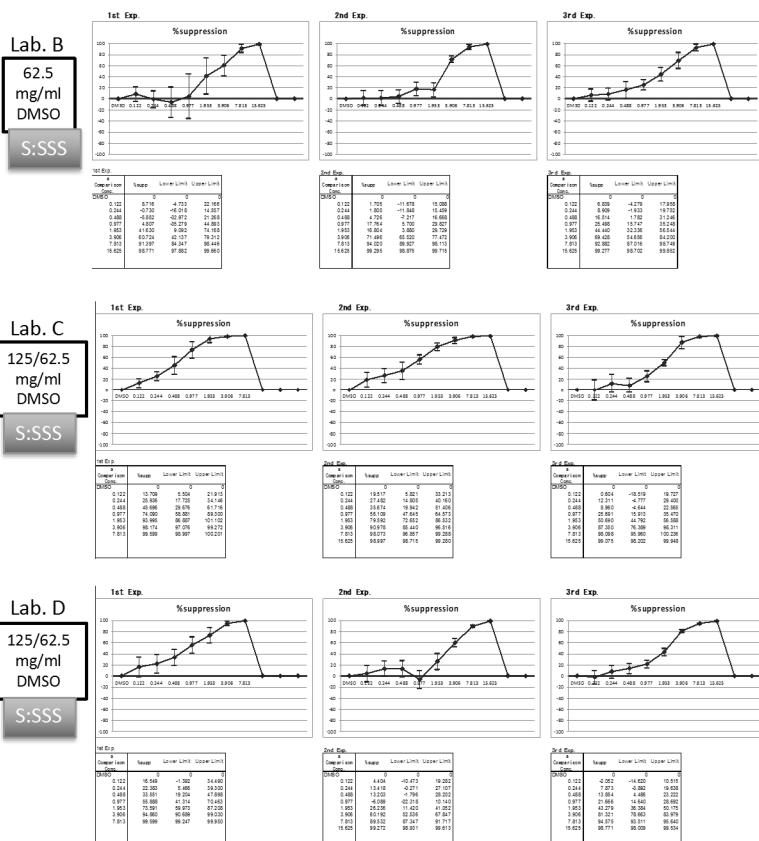
Phase II Chem.3



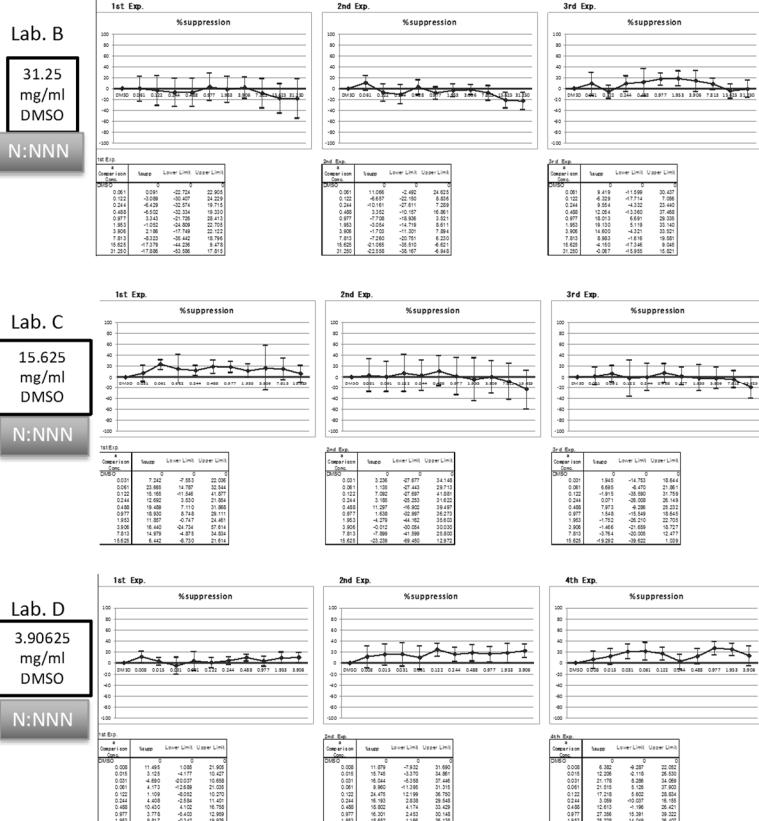
Phase II Chem.4



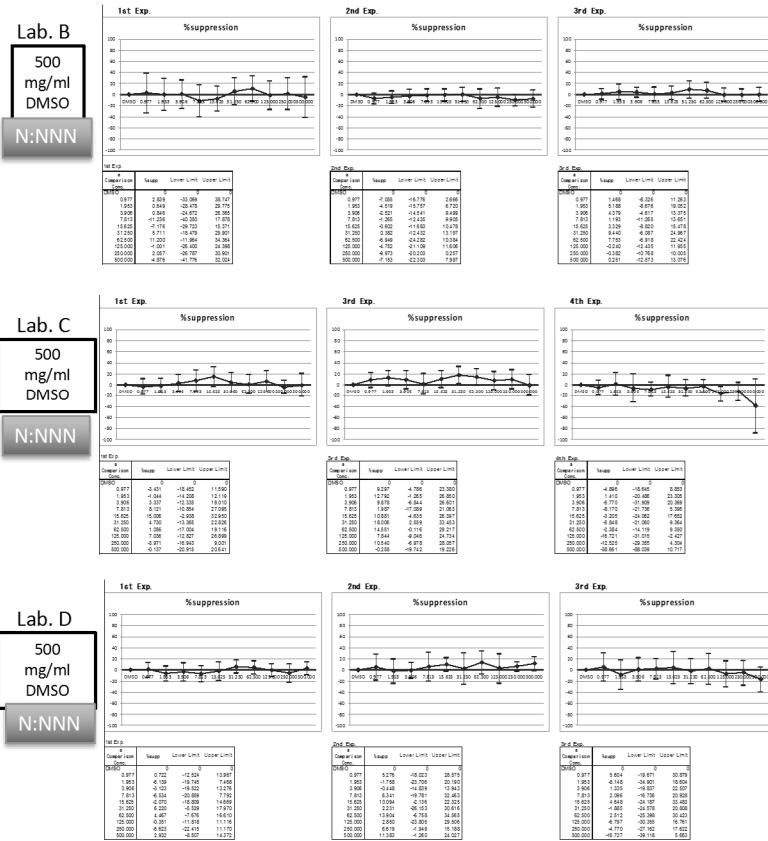
## Phase II Chem.5



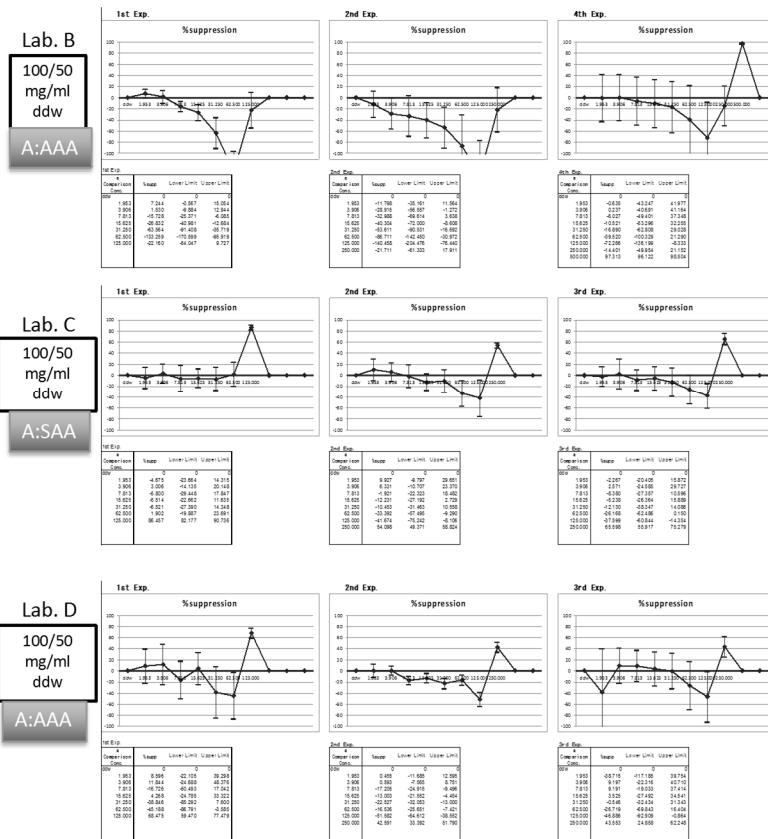
## Phase II Chem.6



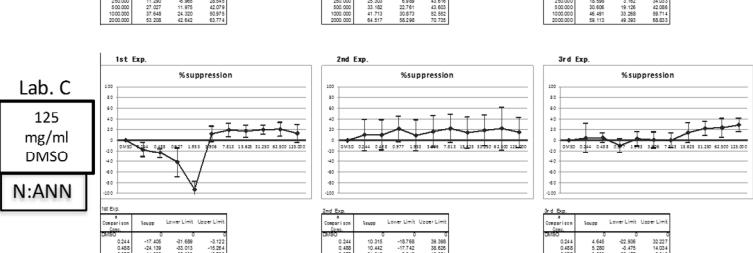
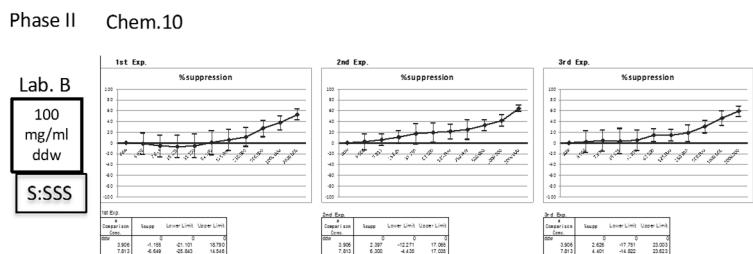
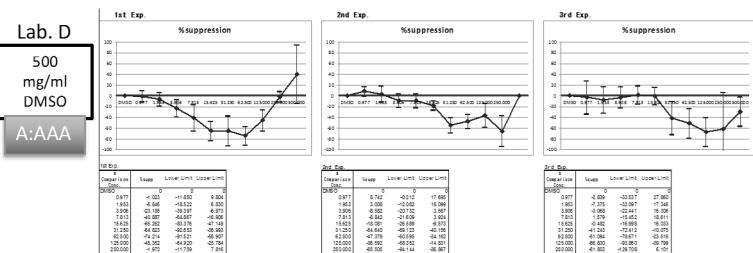
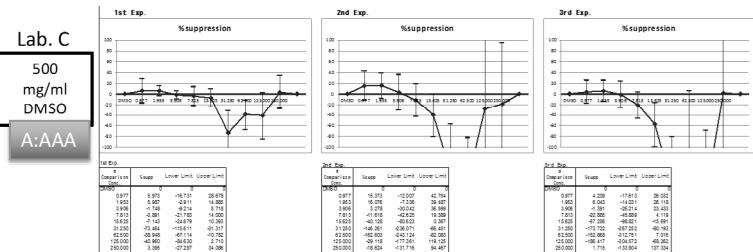
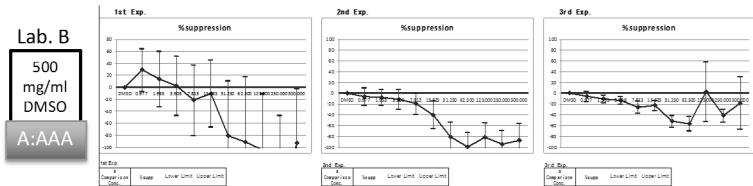
## Phase II Chem.7



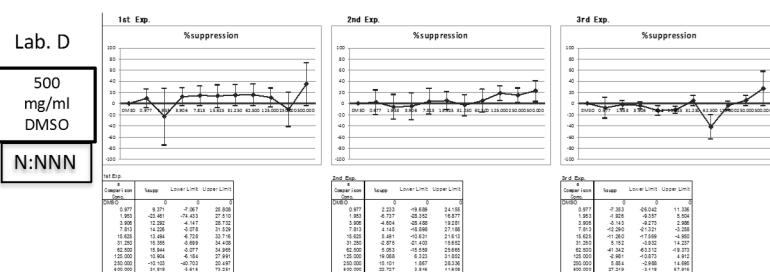
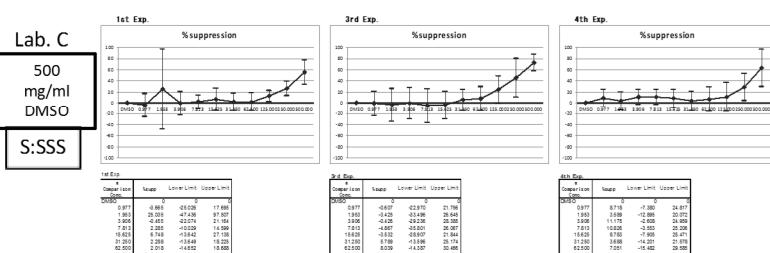
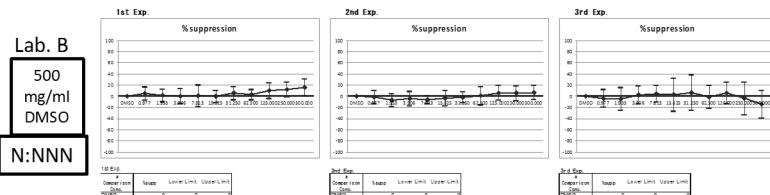
## Phase II Chem.8



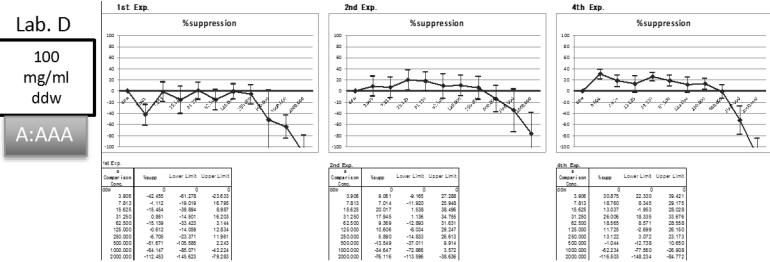
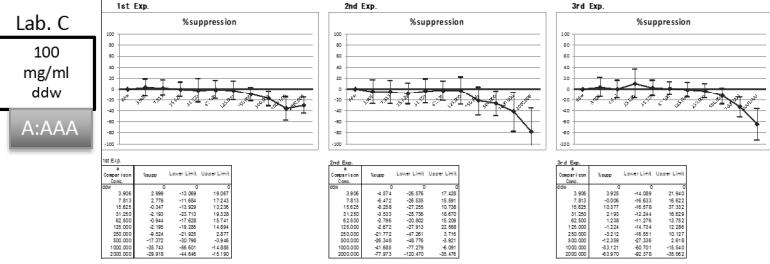
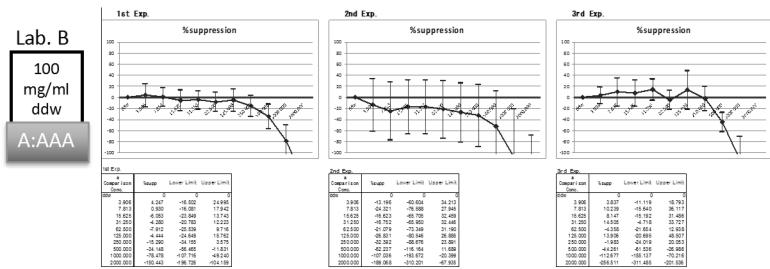
Phase II Chem.9



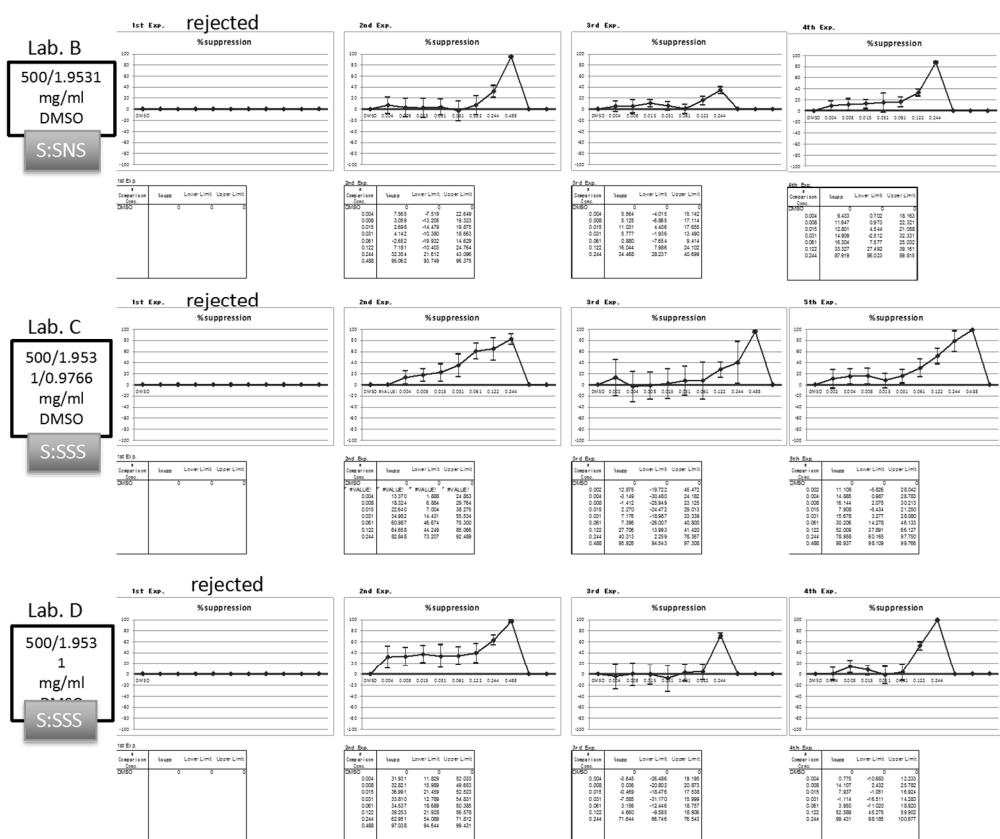
## Phase II Chem.11



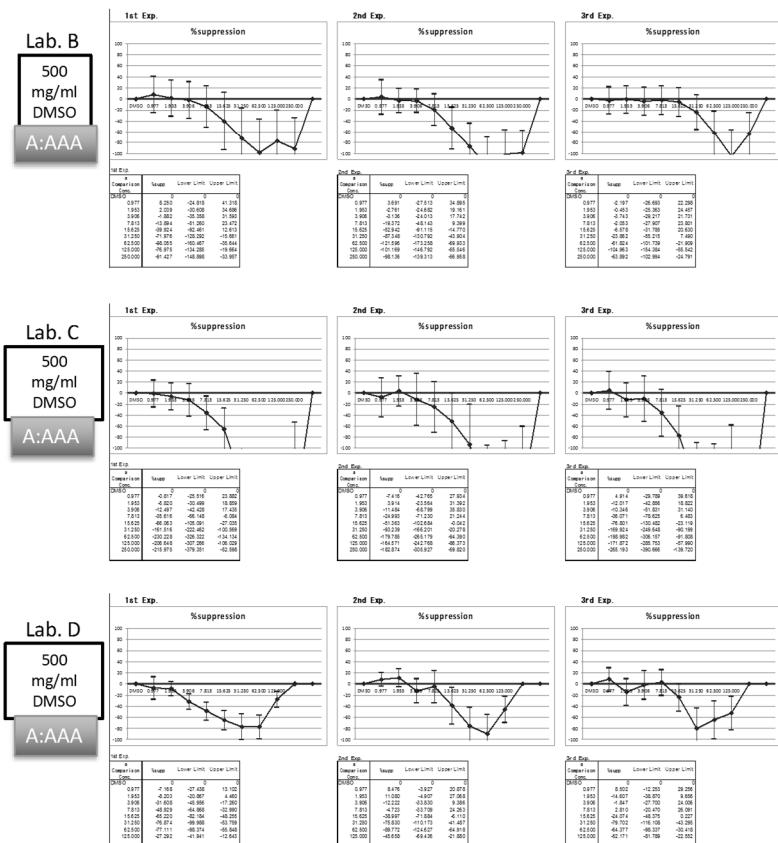
## Phase II Chem.12



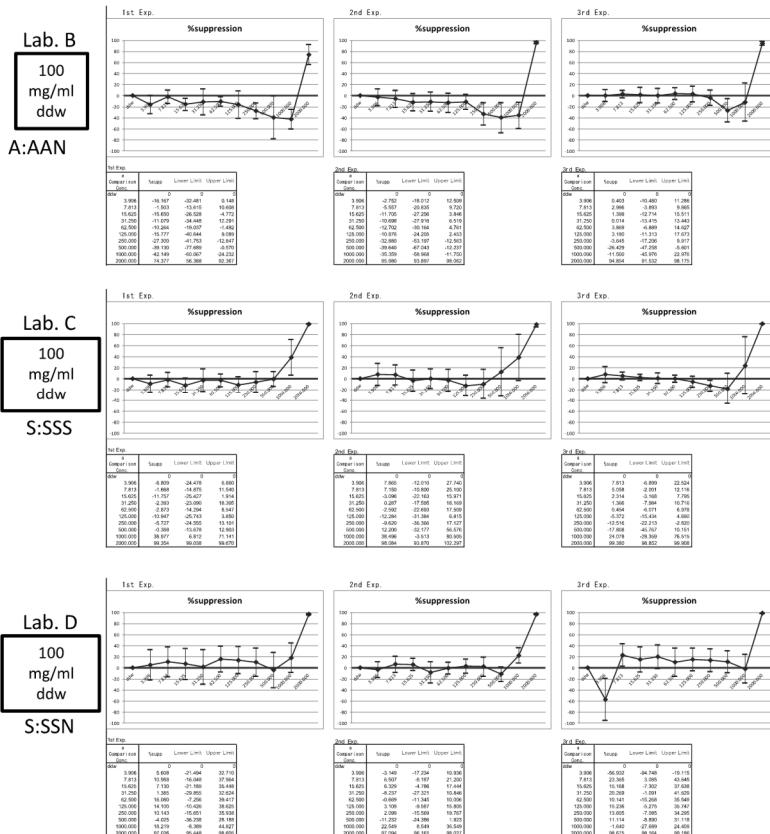
## Phase II Chem.13



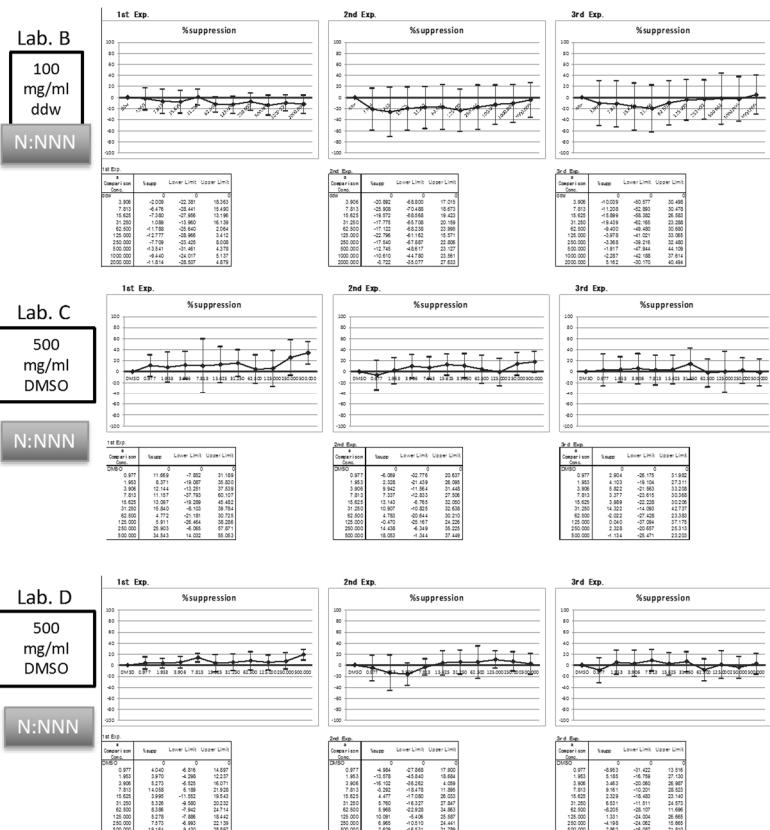
## Phase II Chem.14



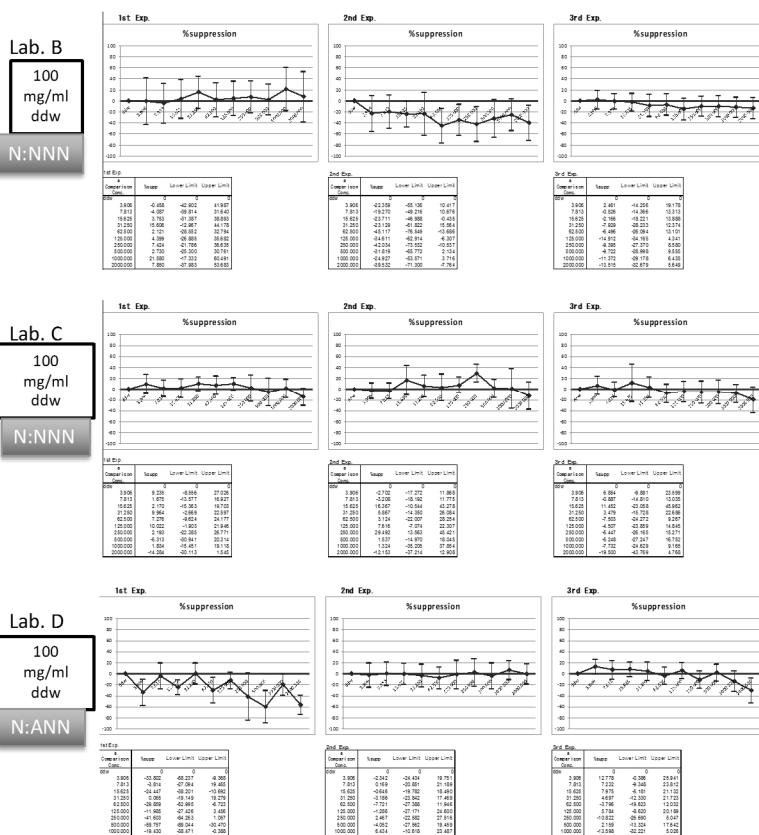
## Phase II Chem.15



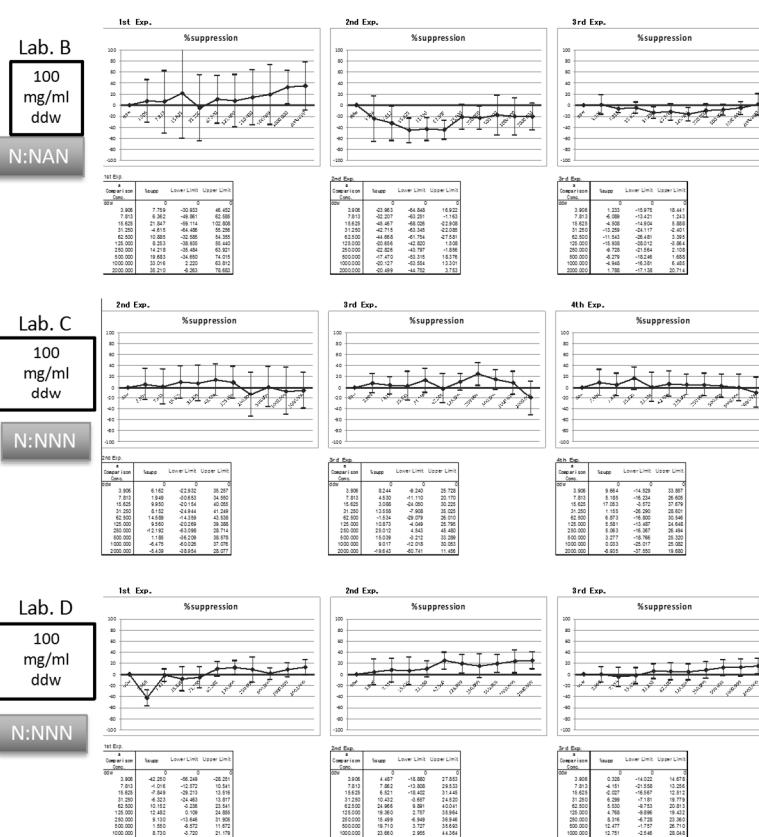
## Phase II Chem.16



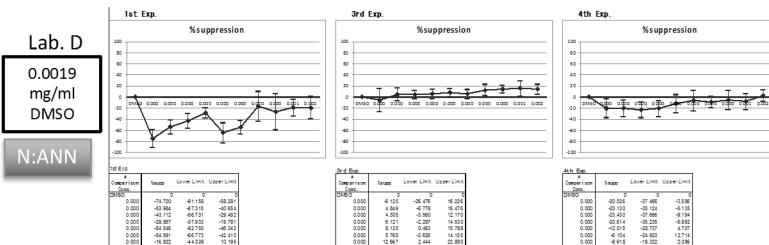
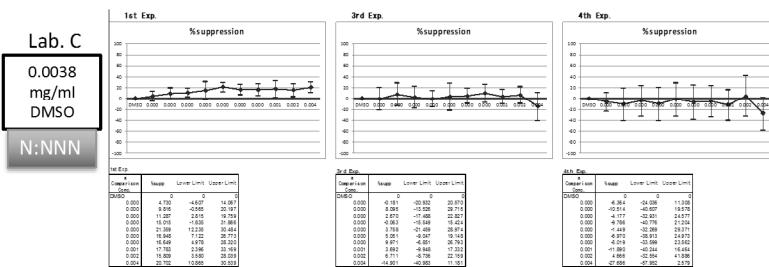
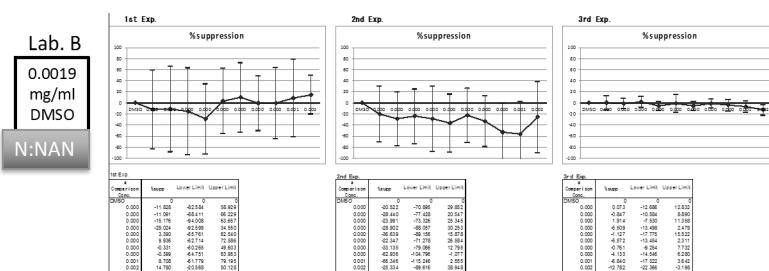
Phase II Chem.17



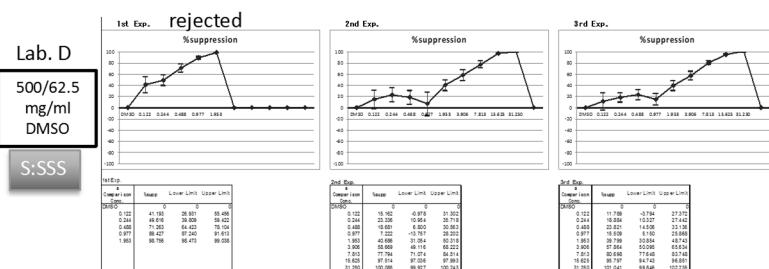
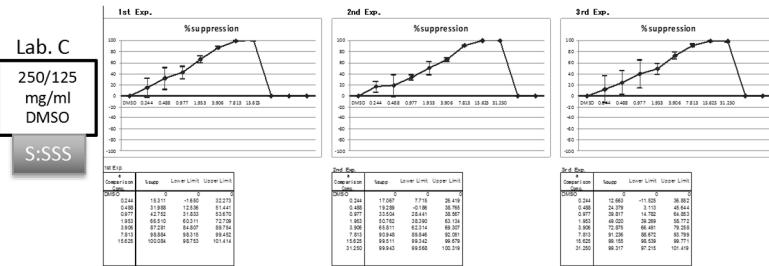
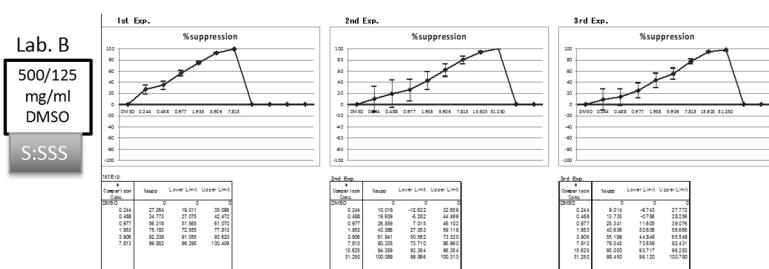
Phase II Chem.18



Phase II Chem.19



Phase II Chem 20



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 L-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., Ogawa, 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
Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Nishikawa, R., Nishigori, C., <u>Aiba, S.</u>	Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumor necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line.	Br J Dermato	175	979-987	2016

Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S.	Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization.	Toxicol In Vitro	29	1816-1830	2015
Watanabe, M., Nomura, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshima, M., Shimizu, E.	Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8.	Int J Environ Res Public Health	12 3	14229-14243	2015