

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化
(H30-化学-一般-001)

分担研究報告書

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

研究分担者 中島芳浩

産業技術総合研究所 健康医工学研究部門

研究要旨

IL-2 プロモーター活性を緑色発光ルシフェラーゼ、IFN γ プロモーター活性を橙色発光ルシフェラーゼおよび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 GAPDH 活性を赤色ルシフェラーゼでモニターするヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞 (2H4 細胞) を用いた化学物質免疫毒性評価系 IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) の Phase 0 および Phase I バリデーション試験を実施した。

A. 研究目的

環境中に存在する何万という化学物質のなかには、免疫系を標的として健康被害を及ぼすものが多数存在する。したがって、免疫毒性は、消費者、生産者はもとより公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。当該研究では、免疫毒性に影響を及ぼす化学物質を簡便に評価するための発光レポーターを利用した *in vitro* 免疫毒性評価試験法を構築、本試験法のガイドライン化を目指し、昨年度までに化学物質免疫毒性評価系 Multi-ImmunoToxicity assay (MITA) として、ヒト単球由来 THP-1 細胞 (TGCHAC-A4 細胞) を用いた系に加えてヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞 (2H4 細胞) を用いた試験系の検討を行ってきた。今年度は、細胞増殖と IL-2 転写活性化を評価指標とするため、試験に供する細胞密度を下げ、化学物質の細胞への処理時間を延長した試験を IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) として新たに行い、更に鋭敏で正確な免疫毒性評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

B-1) 使用した細胞

IL-2、IFN γ と GAPDH プロモーターにそれぞれ緑色発光ルシフェラーゼ遺伝子 (SLG)、橙色発光ルシフェラーゼ遺伝子 (SLO)、赤色発光ルシフェラーゼ遺伝子 (SLR) を連結したレポーターベクターをヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞の染色体に導入した 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

試験化学物質として Phase 0 では 3 物質 (Bleomycin、Dexamethasone、6-Thioguanine)、Phase I では 1 セット 5 種類のコード化した被験物質 3 セットを用いた。

B-3) 実験方法

化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法については IL-2 Luc leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) protocol ver. 001.3 に準ずる。

発光測定装置はアトー社製フェリオス (AB-2350) を用いた。

バリデーション試験では、1 被験物質につき 2 回以上、判定が決定できるまで試験を行った。Phase I では 5 種類のコード化した試験化学物質を 1 セットとし、合計 3 セットを用いて試験を行った。1 セットに含まれる 5 物質すべての判定が決定した後に次のセットを用いて試験を行った。試験成立条件、判定基準等は以下の通りである。

○試験成立条件

PMA/Ionomycin で刺激した細胞の IFN γ -SLO/GAPDH-SLR (nIFNLA) を未処理細胞の nIFNLA を割った値 (Fold Induction) が 3.0 を下回る試験については結果を採用しない。

○データ採用条件

Inh-GAPLA が 0.05 以上の濃度のみを判定に使用する。

1 回目の実験で GAPDH-SLR の阻害指標

(被験物質処理細胞のGAPDH-SLR/未処理細胞のGAPDH-SLR ; Inh-GAPLA)が0.05以下となる濃度があった場合は、2回目以降濃度を下げた試験を行う。また1回目の実験において被験物質の最小濃度でInh-GAPLAが0.7未満で、かつ高い濃度で有意な減少が見られなかった場合は2回目以降の実験は最小濃度の4倍を最高濃度として行う。

○判定条件

以下の4つの基準を満たす場合をLeukocyte toxicとし、それ以外をNon-leukocyte toxicとする。2回一致した結果が得られたとき、その結果を当該物質の評価として扱う。

1. %suppressionの平均値が-35%以下でかつ、同時に95%信頼区間を用いた判定で濃度0と有意差が認められる場合に有意(統計学的有意)とする。
2. 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。もしくは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)。
3. GAPLAの最小値(Min Inh-GAPLA)が0.7未満である。
4. ただし、%suppressionの平均値が35%から-35%の間にあり、かつMin Inh-GAPLAが0.7から1.0の間にある被験物質については、当該物質が水に不溶であればindeterminateとし、可溶性物質の場合はNon-leukocyte toxicとする。

(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

Phase 0では技術移転の確認のため、コード化を行わない3物質Bleomycin、Dexamethasone、6-Thioguanineについて試験を行った。試験の結果を図1に、判定基準に基づいて判定した結果を表1に示す

Phase Iでは施設内再現性、施設間再現性および試験の正確性を検討する目的で、コード化された5物質を1セットとする群が3セット配布された。1物質につき判定を決定できるまで、2回以上の実験を実施した。結果を図2に示す。提案された判定基準に基づいて各物質を評価した結果を表2に示した。

D. 考察

Phase 0 studyにおいて技術移転を確認できた。引き続き行ったPhase I studyでは施設内再現性および施設間再現性の確認のため

に、コード化した5物質を1セットとし、3セットについて実験した。

当施設では5物質のうち3物質がLeukocyte toxic、残り2物質がNon-leukocyte toxicと判定され、3セットすべてにおいて一致していた。すなわち施設内再現性は100%(5/5)である。バリデーション試験の試験実施施設である3施設(産総研健康医工学研究部門、産総研細胞分子工学研究部門、東北大学皮膚科)の結果を比較した。3セットとも5物質中5物質の判定が一致しており(15/15)、3施設とも施設内再現性は100%で、かつ施設間再現性もまた100%であった。以上の結果から、IL-2 Luc LTT assayは施設内および施設間再現性が非常に高いことが明らかとなった。またPhase 0およびPhase Iで試験したすべての物質について2回の試験で判定が一致し、3回目の試験を行うことなく評価が決定できたことも再現性の高さを示しているものと考えられる。

E. 結論

IL-2転写誘導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バリデーション試験に参加した。Phase 0 studyの結果を元にPhase I studyへ進むこととし、Phase I studyではコード化した5物質を1セットとして、3セットについて試験を実施した。得られた結果を比較して施設内および施設間再現性を検討したところ、どちらも100%という大変良好な結果が得られた。この結果はIL-2 Luc LTT assayの再現性が非常に高く、免疫毒性評価法として有望であることを示唆している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., et al. An international validation study of the IL-2 Luc assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for reference data for immunotoxic chemicals. *Toxicol in Vitro*, 2020: 66: 104832

Suzuki, S., Ohta, K., Nakajima, Y., et al. Meganuclease-Based Artificial Transcription Factors. *ACS Synth Biol*, 2020: 9: 2679-2691

Suyama, A., Murotomi, K., Arai, S., et al. Brain degeneration suspected of hepatic enc

ephalopathy associated with early nonalcoholic steatohepatitis in TSOD mice. *Kyusyu J Exp Animals*, 2020: 36: 13-22

Hashimoto, M., Yokota, A., Kajimoto, K., et al. Highly sensitive and rapid quantitative detection of *Plasmodium falciparum* using a flow cytometer. *Microorganisms*, 2020: 8: 1769

中島芳浩、人工染色体ベクターを用いた発光安定細胞の樹立と利用、*細胞*、2020: 52: 416-419

2. 学会発表

木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林美和子、岩城 知子、藤村 千鶴、近江谷

克裕、山影 康次、中島 芳浩、真下 奈々、岡山 昂祐、高木 佑実、大森 崇、小島肇、相場 節也 Multi-ImmunoTox Assay (MITA) : IL-1 Luc assay バリデーション試験の結果 (ポスター) 日本動物実験代替法学会 第33回大会 Web開催 (2020.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

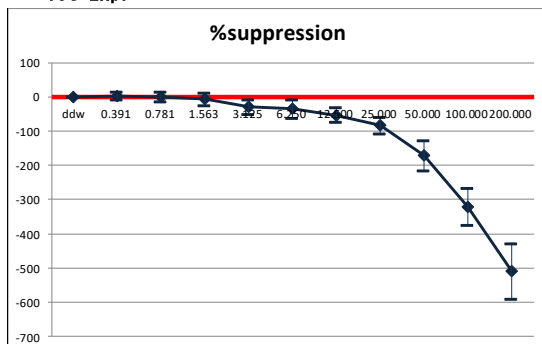
1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

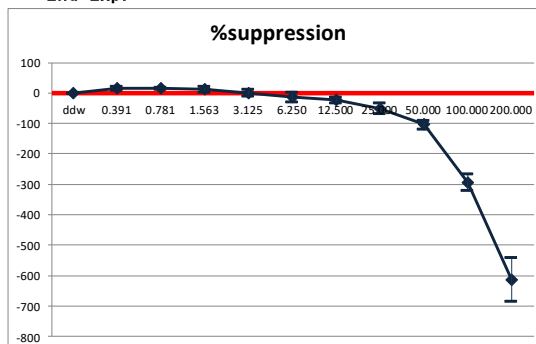
3. その他
該当なし

<Bleomycin>

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

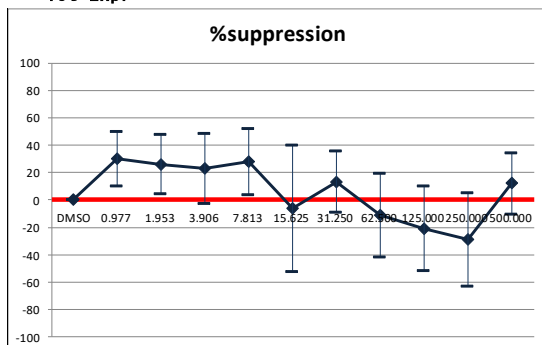
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	1.669	-10.363	13.702
0.781	-0.125	-13.598	13.349
1.563	-6.269	-24.707	12.169
3.125	-29.241	-50.507	-7.976
6.250	-35.305	-61.669	-8.941
12.500	-53.774	-74.675	-32.873
25.000	-84.135	-107.065	-61.205
50.000	-171.951	-215.117	-128.785
100.000	-321.245	-374.900	-267.589
200.000	-509.976	-591.155	-428.797

2nd Exp.

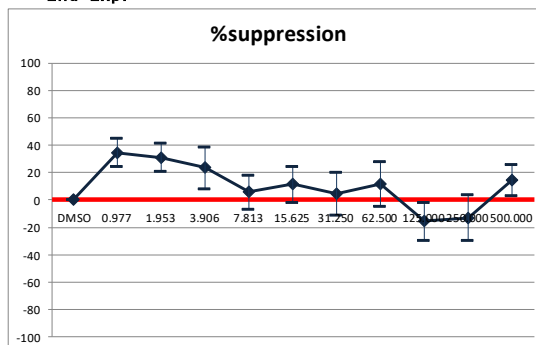
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	16.069	8.634	23.505
0.781	15.574	11.439	19.709
1.563	12.646	3.427	21.866
3.125	0.668	-11.392	12.729
6.250	-13.470	-30.394	3.454
12.500	-23.643	-33.618	-13.668
25.000	-50.288	-67.492	-33.084
50.000	-103.790	-119.397	-88.184
100.000	-292.910	-319.179	-266.640
200.000	-612.774	-685.164	-540.383

<Dexamethasone>

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.977	29.956	10.176	49.736
1.953	26.113	4.688	47.538
3.906	22.926	-2.847	48.700
7.813	28.130	3.798	52.462
15.625	-6.055	-52.248	40.137
31.250	13.429	-8.785	35.643
62.500	-10.928	-41.452	19.596
125.000	-20.698	-51.356	9.960
250.000	-28.856	-63.150	5.439
500.000	12.174	-10.289	34.636

2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.977	34.447	24.154	44.740
1.953	31.087	20.922	41.252
3.906	23.425	8.452	38.398
7.813	5.739	-6.508	17.986
15.625	11.328	-2.076	24.732
31.250	4.550	-11.351	20.451
62.500	11.666	-4.343	27.675
125.000	-15.560	-29.378	-1.742
250.000	-13.082	-29.821	3.658
500.000	14.498	3.341	25.655

<6-Thioguanine>

図 1

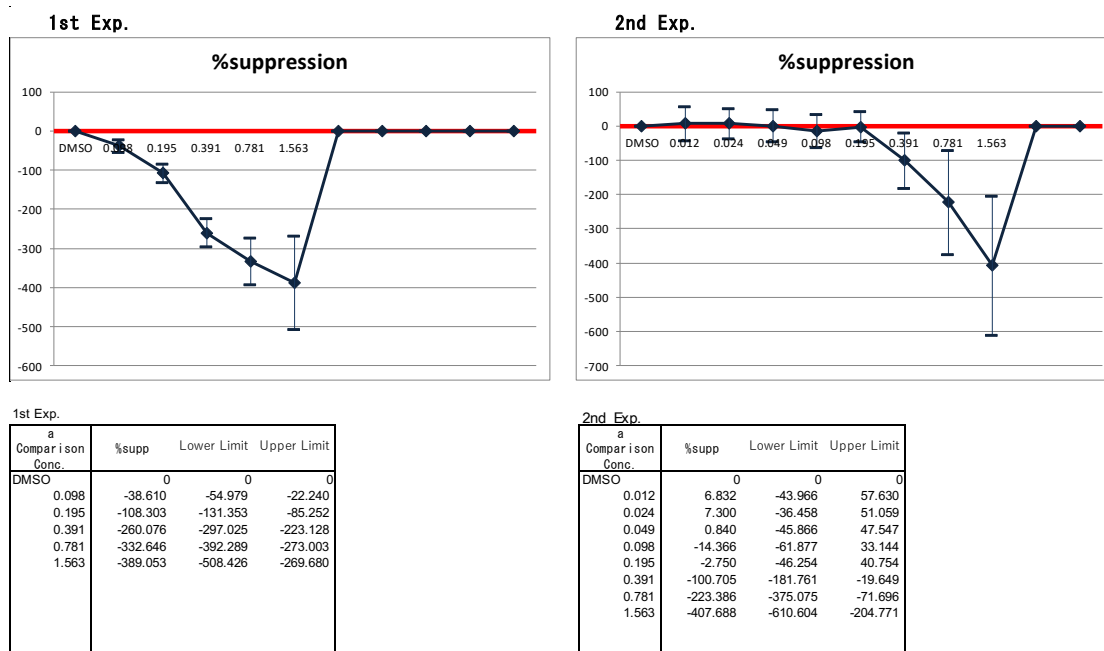


図 1 2H4 細胞株における各試験化学物質に対する細胞応答性. (Phase 0)

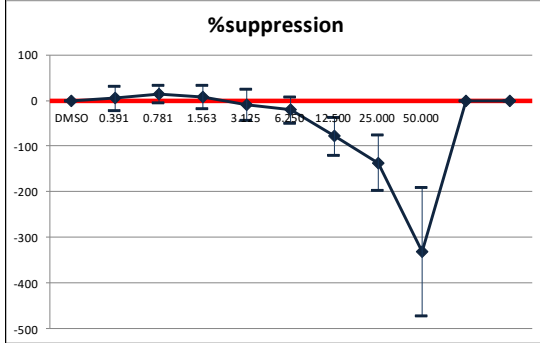
表 1. 試験化学物質の評価 (Phase 0)

物質名	試験		判定
	1	2	
Bleomycin	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
Dexamethasone	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
6-Thioguanine	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic

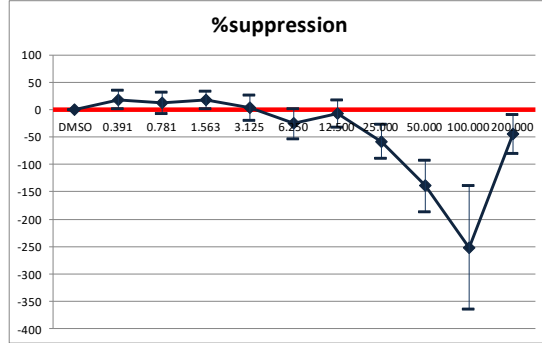
< Set 1: MLC701 >

図 2.

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

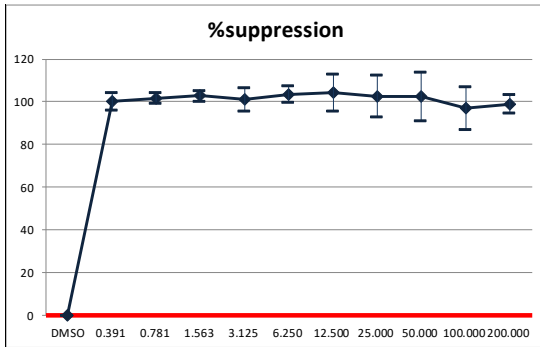
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	4.539	-21.236	30.315
0.781	14.265	-4.868	33.398
1.563	6.884	-18.968	32.735
3.125	-9.435	-43.663	24.794
6.250	-21.020	-49.666	7.625
12.500	-78.399	-119.919	-36.879
25.000	-136.234	-195.959	-76.509
50.000	-330.524	-471.415	-189.633

2nd Exp.

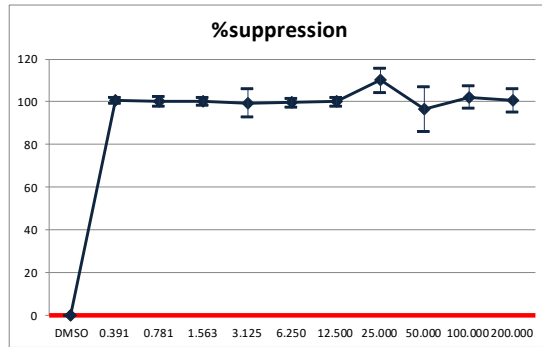
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	17.817	0.872	34.761
0.781	12.688	-6.408	31.784
1.563	17.566	1.376	33.755
3.125	2.904	-19.909	25.718
6.250	-25.666	-53.090	1.757
12.500	-7.385	-32.171	17.401
25.000	-58.180	-89.019	-27.341
50.000	-139.159	-186.397	-91.922
100.000	-251.283	-363.980	-138.586
200.000	-44.083	-79.376	-8.789

< Set 1: MLC702 >

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	100.219	96.188	104.249
0.781	101.601	99.068	104.134
1.563	102.767	100.119	105.415
3.125	101.311	95.831	106.791
6.250	103.510	99.609	107.411
12.500	104.410	95.792	113.028
25.000	102.690	93.049	112.331
50.000	102.526	91.005	114.047
100.000	97.090	87.085	107.095
200.000	99.042	94.796	103.287

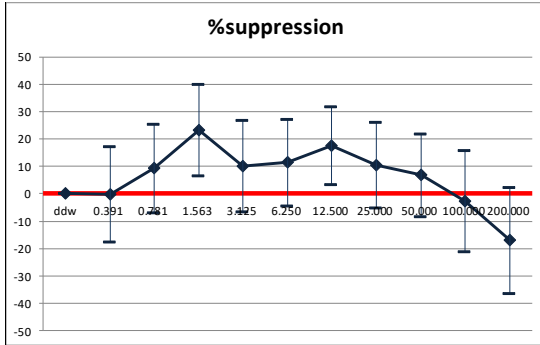
2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	100.492	99.166	101.817
0.781	100.154	98.043	102.265
1.563	100.132	98.223	102.040
3.125	99.314	92.708	105.920
6.250	99.549	97.684	101.415
12.500	100.008	97.903	102.114
25.000	110.119	104.388	115.849
50.000	96.635	86.164	107.107
100.000	102.179	96.796	107.562
200.000	100.863	95.364	106.362

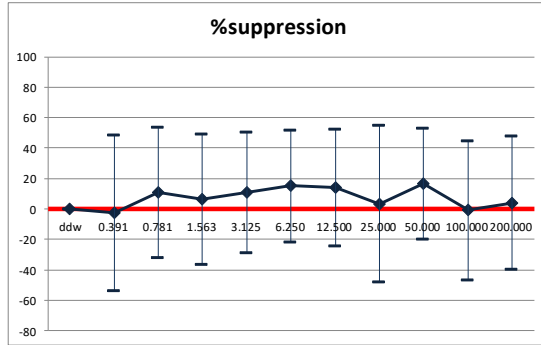
< Set 1: MLC703 >

图 2.

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

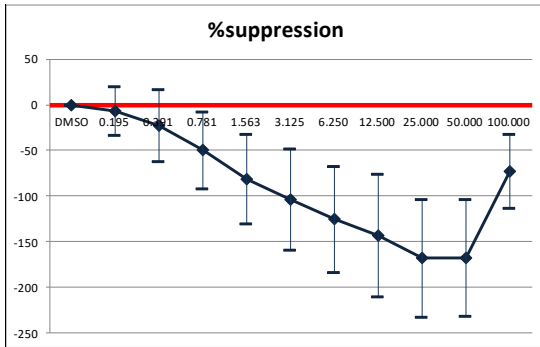
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	-0.226	-17.523	17.070
0.781	9.360	-6.794	25.514
1.563	23.123	6.483	39.763
3.125	10.216	-6.520	26.952
6.250	11.461	-4.282	27.203
12.500	17.475	3.338	31.613
25.000	10.423	-5.267	26.114
50.000	6.756	-8.195	21.707
100.000	-2.752	-21.148	15.643
200.000	-16.955	-36.324	2.415

2nd Exp.

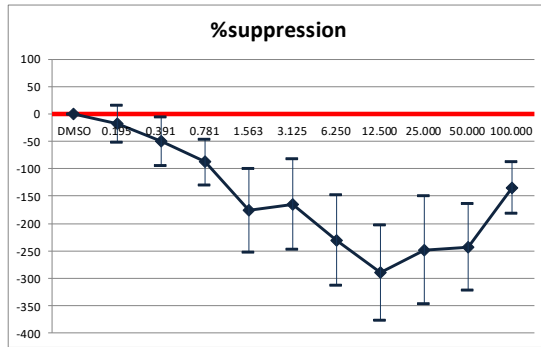
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	-2.444	-53.563	48.675
0.781	10.699	-32.088	53.485
1.563	6.681	-36.173	49.535
3.125	11.000	-28.572	50.571
6.250	15.115	-21.613	51.844
12.500	14.084	-24.176	52.344
25.000	3.339	-48.108	54.786
50.000	16.664	-19.908	53.235
100.000	-0.829	-46.342	44.684
200.000	4.164	-39.682	48.011

< Set 1: MLC704 >

1st Exp.



2nd Exp.

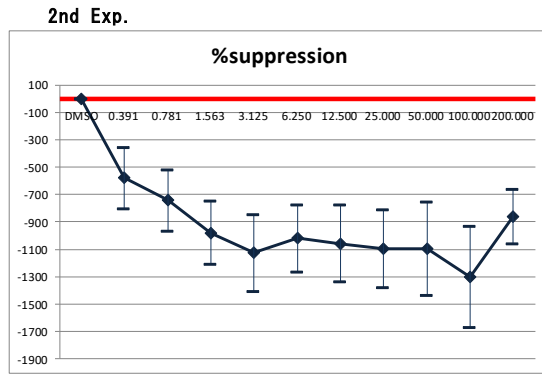
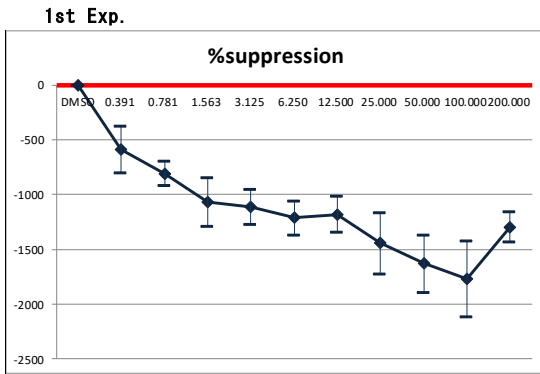


1st Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.195	-6.924	-33.848	20.000
0.391	-22.677	-62.065	16.710
0.781	-49.849	-92.244	-7.454
1.563	-81.353	-130.797	-31.909
3.125	-103.434	-158.987	-47.881
6.250	-125.252	-183.458	-67.047
12.500	-142.943	-209.919	-75.967
25.000	-168.117	-232.791	-103.443
50.000	-167.892	-231.893	-103.892
100.000	-72.845	-113.460	-32.231

2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.195	-17.571	-51.702	16.560
0.391	-49.561	-93.925	-5.196
0.781	-87.690	-129.697	-45.682
1.563	-175.887	-252.120	-99.655
3.125	-164.812	-247.394	-82.231
6.250	-230.584	-312.984	-148.183
12.500	-288.958	-375.774	-202.142
25.000	-248.386	-346.994	-149.778
50.000	-243.103	-321.923	-164.282
100.000	-134.258	-181.801	-86.716



1st Exp.

a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.391	-591.316	-803.959	-378.673
	0.781	-808.281	-921.637	-694.925
	1.563	-1065.762	-1286.225	-845.299
	3.125	-1113.441	-1276.727	-950.155
	6.250	-1212.643	-1370.052	-1055.234
	12.500	-1180.816	-1345.185	-1016.447
	25.000	-1445.069	-1721.367	-1168.770
	50.000	-1629.354	-1891.461	-1367.247
	100.000	-1772.712	-2118.018	-1427.406
	200.000	-1296.563	-1435.947	-1157.178

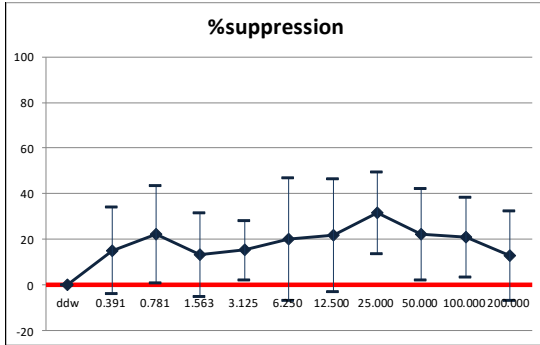
2nd Exp.

a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.391	-579.554	-801.137	-357.971
	0.781	-743.351	-966.961	-519.741
	1.563	-981.119	-1211.213	-751.026
	3.125	-1126.850	-1406.542	-847.159
	6.250	-1019.168	-1265.596	-772.740
	12.500	-1058.563	-1339.534	-777.593
	25.000	-1096.568	-1378.982	-814.155
	50.000	-1095.029	-1433.480	-756.577
	100.000	-1301.985	-1673.895	-930.076
	200.000	-860.912	-1059.885	-661.939

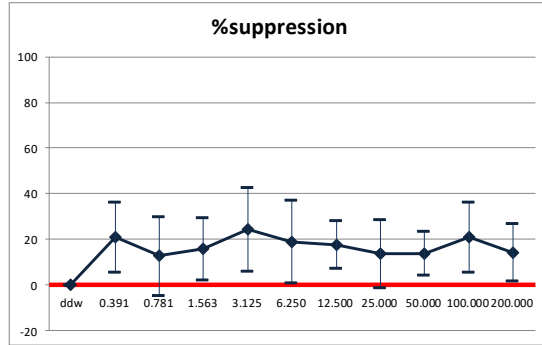
< Set 2: MLC801 >

☒ 2.

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

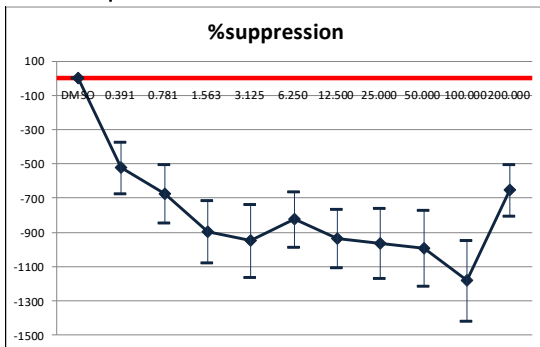
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	15.251	-3.894	34.395
0.781	22.328	1.138	43.518
1.563	13.448	-4.811	31.708
3.125	15.283	2.205	28.361
6.250	20.173	-6.789	47.136
12.500	21.956	-2.684	46.606
25.000	31.588	13.753	49.423
50.000	22.478	2.439	42.516
100.000	21.118	3.603	38.633
200.000	12.936	-6.675	32.547

2nd Exp.

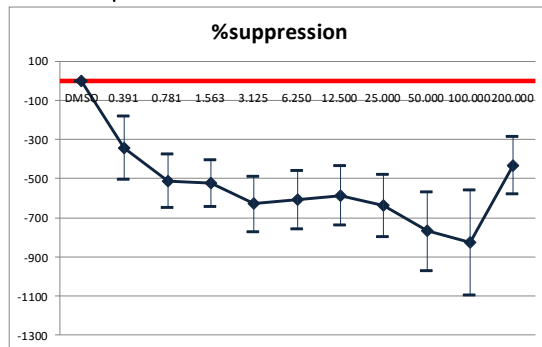
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	20.971	5.603	36.338
0.781	12.830	-4.397	30.057
1.563	15.909	2.396	29.423
3.125	24.458	6.298	42.618
6.250	19.031	0.999	37.063
12.500	17.748	7.340	28.155
25.000	13.817	-0.978	28.612
50.000	13.810	4.194	23.427
100.000	21.134	5.802	36.467
200.000	14.354	1.763	26.925

< Set 2: MLC802 >

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	-522.128	-673.243	-371.013
0.781	-673.500	-843.731	-503.270
1.563	-895.308	-1078.038	-712.579
3.125	-948.511	-1161.858	-735.164
6.250	-823.912	-984.740	-663.084
12.500	-934.966	-1105.655	-764.276
25.000	-964.407	-1167.281	-761.534
50.000	-992.312	-1213.511	-771.112
100.000	-1182.001	-1416.979	-947.022
200.000	-654.759	-806.645	-502.873

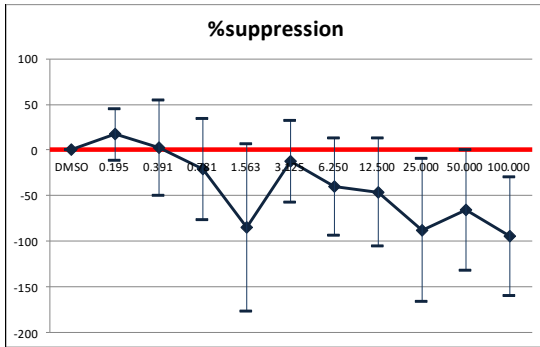
2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	-342.542	-505.477	-179.607
0.781	-511.308	-647.983	-374.633
1.563	-523.595	-644.638	-402.552
3.125	-628.640	-769.461	-487.818
6.250	-608.948	-758.592	-459.304
12.500	-585.457	-736.701	-434.212
25.000	-637.471	-797.894	-477.048
50.000	-769.213	-970.472	-567.954
100.000	-825.864	-1095.220	-556.507
200.000	-432.490	-578.426	-286.554

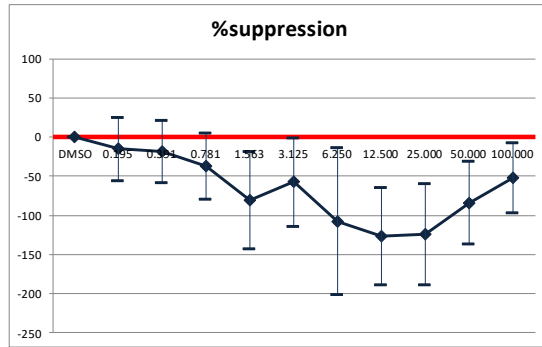
< Set 2: MLC803 >

☒ 2.

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

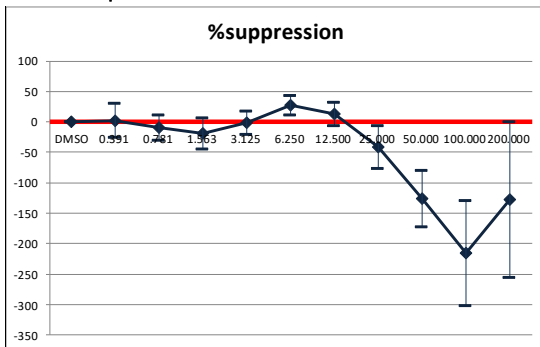
a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.195	17.205	-11.020	45.429
	0.391	2.543	-49.333	54.419
	0.781	-20.852	-76.446	34.741
	1.563	-84.602	-175.916	6.713
	3.125	-12.704	-57.494	32.087
	6.250	-39.725	-92.679	13.228
	12.500	-45.876	-104.765	13.013
	25.000	-87.467	-166.030	-8.904
	50.000	-65.536	-131.786	0.714
	100.000	-94.359	-159.245	-29.473

2nd Exp.

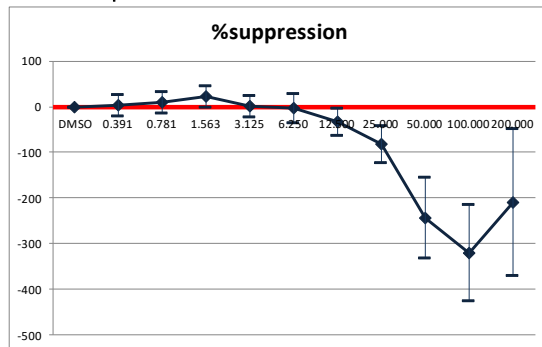
a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.195	-15.119	-55.737	25.499
	0.391	-18.779	-58.547	20.990
	0.781	-37.221	-78.939	4.497
	1.563	-80.823	-142.811	-18.834
	3.125	-57.350	-113.657	-1.042
	6.250	-107.433	-201.008	-13.857
	12.500	-126.472	-188.937	-64.007
	25.000	-124.501	-189.095	-59.908
	50.000	-83.976	-136.645	-31.308
	100.000	-51.927	-96.513	-7.341

< Set 2: MLC804 >

1st Exp.



2nd Exp.



1st Exp.

a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.391	2.456	-25.565	30.477
	0.781	-9.656	-30.380	11.069
	1.563	-18.666	-44.267	6.936
	3.125	-1.605	-20.399	17.189
	6.250	27.256	11.617	42.894
	12.500	12.386	-6.791	31.564
	25.000	-41.452	-76.396	-6.509
	50.000	-126.287	-172.908	-79.667
	100.000	-215.631	-301.969	-129.292
	200.000	-127.454	-255.923	1.014

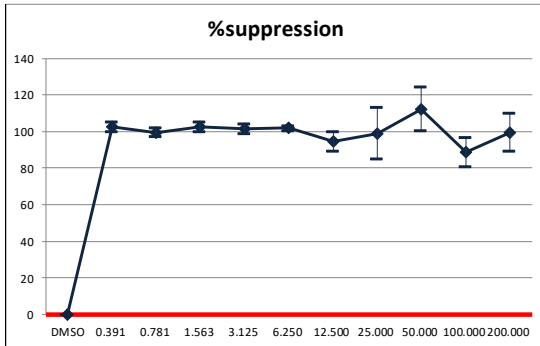
2nd Exp.

a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
	DMSO	0	0	0
	0.391	3.284	-21.151	27.719
	0.781	9.280	-13.587	32.148
	1.563	22.500	0.045	44.955
	3.125	1.042	-21.909	23.994
	6.250	-2.734	-34.692	29.225
	12.500	-32.515	-62.328	-2.702
	25.000	-81.286	-121.610	-40.963
	50.000	-242.732	-331.388	-154.076
	100.000	-320.004	-425.635	-214.372
	200.000	-208.666	-370.003	-47.328

< Set 2: MLC805 >

☒ 2.

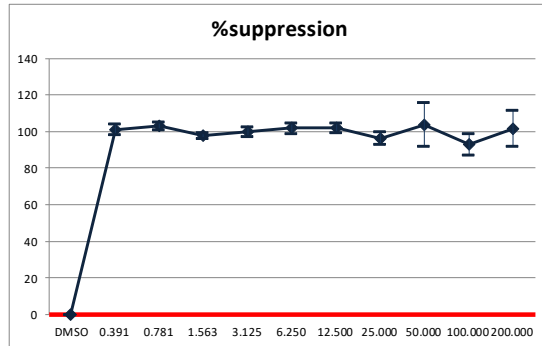
1st Exp.



1st Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
Comparison Conc.	0	0	0
DMSO			
0.391	102.568	100.021	105.115
0.781	99.466	97.155	101.777
1.563	102.644	99.844	105.444
3.125	101.554	98.803	104.304
6.250	101.795	100.602	102.989
12.500	94.361	89.029	99.693
25.000	98.997	84.792	113.203
50.000	112.304	100.316	124.292
100.000	88.661	80.516	96.806
200.000	99.531	89.218	109.843

2nd Exp.

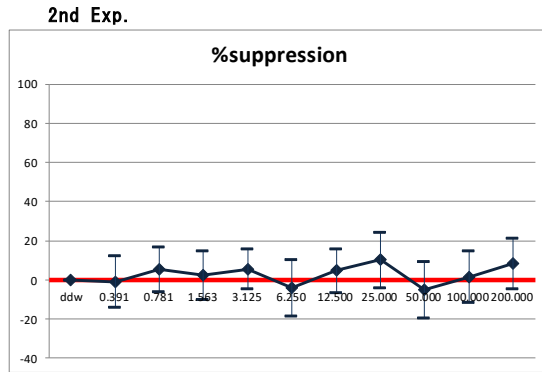
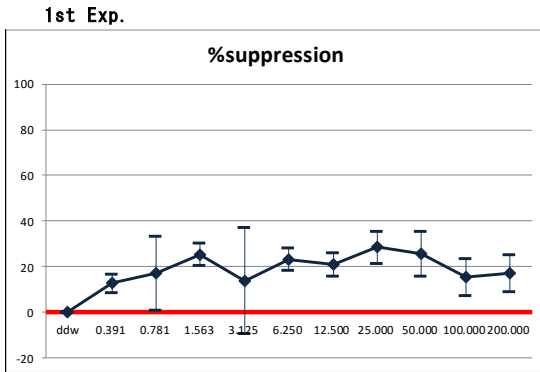


2nd Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
Comparison Conc.	0	0	0
DMSO			
0.391	100.980	98.027	103.933
0.781	103.048	101.078	105.017
1.563	97.579	96.065	99.094
3.125	99.992	97.337	102.646
6.250	101.843	98.844	104.842
12.500	101.890	99.197	104.584
25.000	96.289	92.728	99.849
50.000	103.805	91.727	115.882
100.000	92.798	86.959	98.636
200.000	101.719	91.719	111.720

< Set 3: MLC901 >

☒ 2.



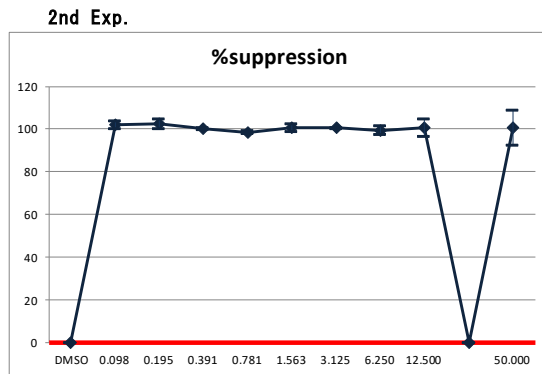
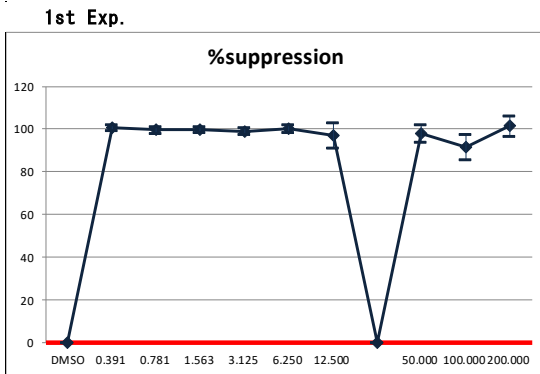
1st Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	12.739	8.538	16.939
0.781	17.278	1.186	33.369
1.563	25.364	20.496	30.232
3.125	13.924	-9.356	37.204
6.250	23.291	18.460	28.122
12.500	20.883	15.809	25.958
25.000	28.586	21.605	35.567
50.000	25.734	15.941	35.526
100.000	15.421	7.224	23.618
200.000	17.145	9.155	25.134

2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw	0	0	0
0.391	-0.916	-13.952	12.121
0.781	5.539	-5.848	16.926
1.563	2.584	-9.791	14.958
3.125	5.592	-4.762	15.946
6.250	-3.913	-18.363	10.538
12.500	4.725	-6.504	15.953
25.000	10.143	-4.120	24.407
50.000	-4.963	-19.495	9.570
100.000	1.476	-11.757	14.709
200.000	8.285	-4.785	21.356

< Set 3: MLC902 >



1st Exp.

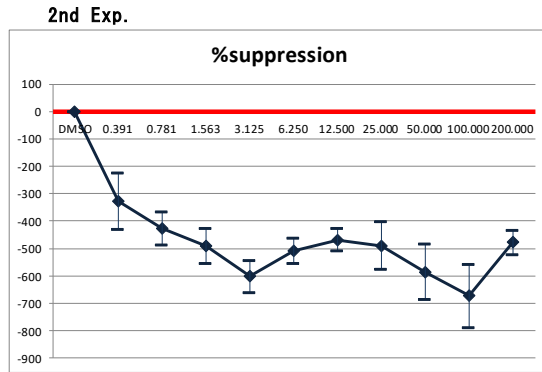
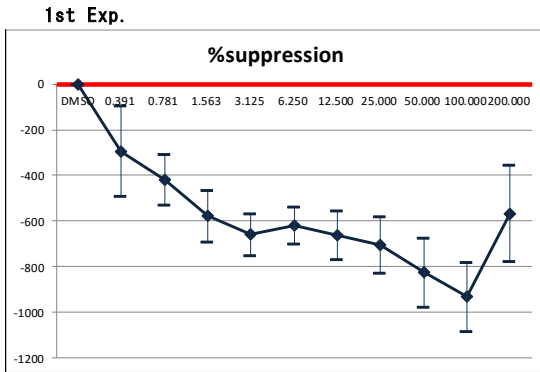
a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	100.794	99.392	102.196
0.781	99.641	97.950	101.333
1.563	99.830	98.314	101.345
3.125	98.919	97.340	100.498
6.250	100.138	98.238	102.038
12.500	97.024	90.895	103.154
50.000	97.840	93.832	101.848
100.000	91.560	85.474	97.646
200.000	101.445	96.655	106.236

2nd Exp.

a Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.098	102.006	100.213	103.800
0.195	102.445	100.049	104.842
0.391	100.214	99.612	100.817
0.781	98.573	98.039	99.106
1.563	100.660	98.930	102.389
3.125	100.438	100.113	100.763
6.250	99.427	97.485	101.370
12.500	100.593	96.371	104.815
50.000	100.748	92.504	108.993

< Set 3: MLC903 >

☒ 2.



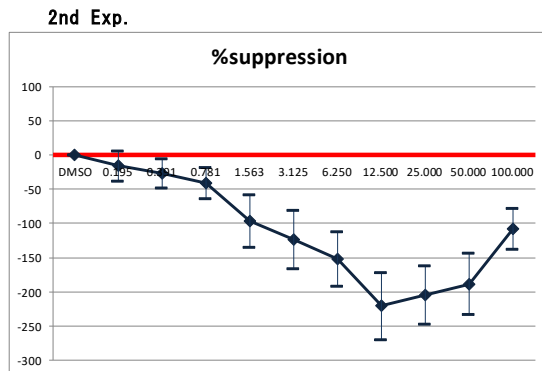
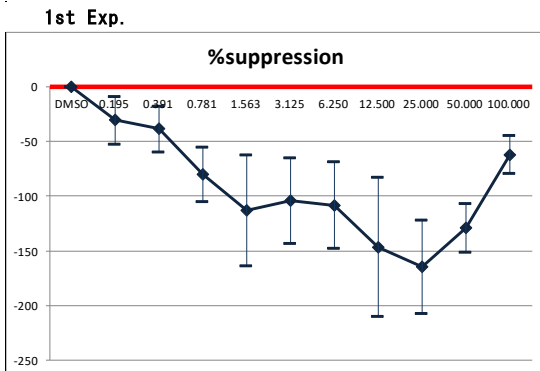
1st Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	-293.575	-491.156	-95.994
0.781	-418.695	-530.528	-306.862
1.563	-578.598	-693.066	-464.131
3.125	-659.385	-750.326	-568.444
6.250	-620.895	-702.452	-539.339
12.500	-660.576	-766.556	-554.597
25.000	-704.482	-829.001	-579.963
50.000	-825.795	-976.117	-675.473
100.000	-931.385	-1083.212	-779.559
200.000	-567.330	-777.591	-357.068

2nd Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.391	-325.988	-429.198	-222.778
0.781	-427.516	-488.198	-366.835
1.563	-491.856	-556.201	-427.510
3.125	-601.623	-660.458	-542.788
6.250	-508.298	-554.826	-461.770
12.500	-468.171	-510.101	-426.241
25.000	-490.211	-577.646	-402.775
50.000	-585.974	-687.307	-484.641
100.000	-672.665	-787.758	-557.573
200.000	-476.758	-521.345	-432.171

< Set 3: MLC904 >



1st Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.195	-30.859	-52.405	-9.314
0.391	-38.797	-59.628	-17.965
0.781	-80.158	-105.374	-54.943
1.563	-113.298	-163.695	-62.901
3.125	-104.260	-143.032	-65.487
6.250	-108.252	-147.595	-68.910
12.500	-146.608	-210.151	-83.065
25.000	-164.137	-206.703	-121.570
50.000	-129.182	-151.110	-107.254
100.000	-62.227	-79.752	-44.703

2nd Exp.

a	%supp	Lower Limit	Upper Limit
DMSO	0	0	0
0.195	-16.030	-38.027	5.967
0.391	-27.282	-48.668	-5.896
0.781	-41.366	-64.401	-18.330
1.563	-96.447	-134.337	-58.557
3.125	-123.673	-165.940	-81.407
6.250	-151.635	-191.423	-111.848
12.500	-220.521	-269.739	-171.303
25.000	-204.351	-247.239	-161.463
50.000	-188.498	-233.041	-143.955
100.000	-108.154	-137.569	-78.740

< Set 3: MLC905 >

図 2.

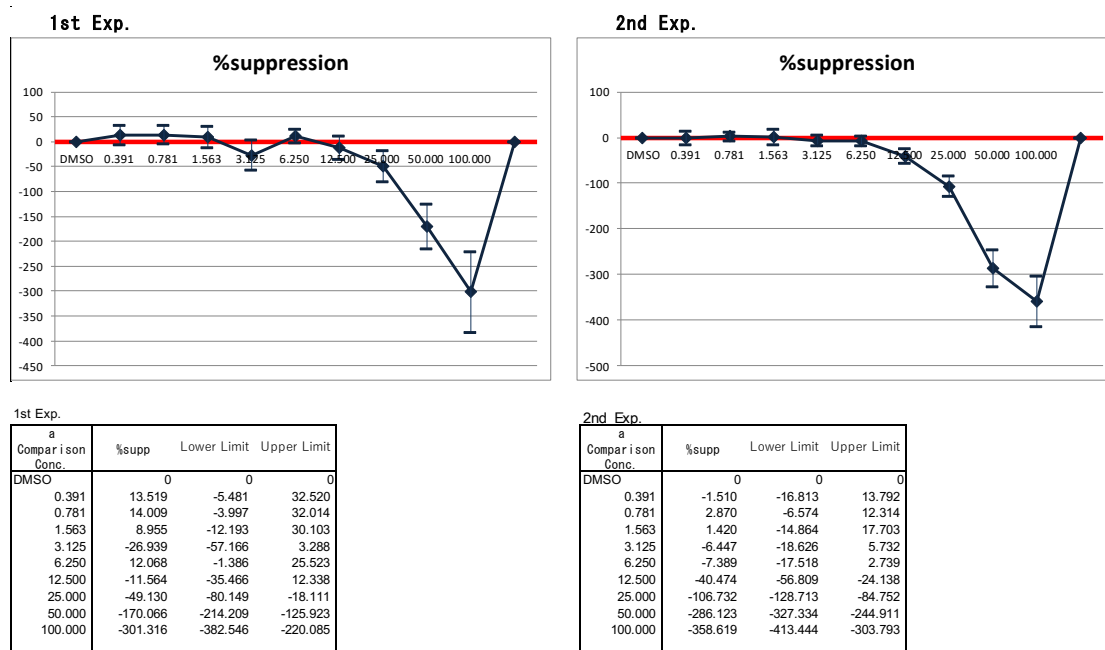


図 2. 2H4 細胞株における各試験化学物質に対する細胞応答性. (Phase I)

表 2. 試験化学物質の評価 (Phase I)

Set	コード番号	試験		判定
		1	2	
Set 1	MLC701	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC702	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
	MLC703	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
	MLC704	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC705	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
Set 2	MLC801	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
	MLC802	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC803	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC804	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC805	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
Set 3	MLC901	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
	MLC902	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic	Non-leukocyte toxic
	MLC903	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC904	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic
	MLC905	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic	Leukocyte toxic