



第4項
健康への影響

試験ガイドライン No. 444A

In vitro 免疫毒性

IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc
LTT アッセイ

2025 年 6 月 25 日

経済協力開発機構（OECD）
の化学物質の試験に関する
ガイドライン

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

In Vitro 免疫毒性：IL-2 LUC アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイの併用

最初に考慮すべき事項および限界

1. 免疫毒性学とは、薬剤または化学物質への曝露の結果として、免疫系のいずれかの部分に生じる有害作用に関する研究分野であると定義される（Corsini and Roggen, 2009）。免疫毒性学では、免疫系に関する細胞および分子が介在するさまざまな器官および組織に及ぼす有害作用も対象となりうる。免疫系は、一部には、以下の理由から毒性による傷害を受けやすい。1) 活性化、調節、サイレンシング間の繊細なバランスを維持する必要があること。2) 免疫系は、骨髄造血幹細胞由来の細胞再生に依存していること。3) 免疫系では、適応応答の間、細胞増殖による T 細胞および B 細胞のクローン増殖を要件としていること。4) エフェクター、メモリー、ナイーブサブセットなど適切なレベルのリンパ球の維持が必要であること。
2. 薬剤または化学物質による免疫毒性は、免疫反応の調節異常などさまざまな形で現れる可能性があり、その場合、免疫抑制や不適切な免疫刺激につながる事が考えられる。後者には、過剰な免疫刺激、持続的な炎症、過敏症反応、自己免疫疾患を挙げることができる。化学物質に起因する免疫毒性に関しては、その影響は一方のみに留まらなくと考えられ、用量および細胞標的に応じて、同一物質が免疫抑制または免疫刺激をもたらす可能性がある。したがって、免疫毒性物質とは、1 つまたは複数の免疫機能を変化させ、宿主に有害作用をもたらす物質と定義することがより適切であると考えられる。この点で、焦点となるのはその影響の方向性ではなく、影響による結果である。そのため、本試験ガイドライン（TG）では免疫毒性（物質）という用語を用いるが、このことは、OECD 作成の免疫抑制に関する「総説（Detailed Review Paper）」（OECD, 2022）の内容と矛盾しない。
3. 現在、化学物質の免疫毒性の評価は、免疫抑制および感作を特徴付ける動物モデルおよびアッセイに主に依拠している。ただし、動物試験には多くの欠点があり、例えば高額な費用、倫理上の懸念、ヒトの健康に及ぼす影響の予測能のばらつきが挙げられる（Adler et al. 2011）。さらに、現行の *in vivo* モデルからは、データから必ずしも機能的な解明を行えるとは限らない。こうした問題の克服には、免疫毒性を検出する *in vitro* 試験法の開発が必要である。欧州動物実験代替法評価センターが 2003 年に主催したワークショップでは、免疫毒性の評価に関する最新の *in vitro* 系に焦点を当て（Gennari et al. 2005 ; Galbiati et al. 2010 ; Lankveld et al. 2010）、階層的アプローチが提案された。
4. OECD 有害性発現経路（AOP）開発プログラムから、AOP 154「T 細胞依存性抗体反応の減弱に導くカルシニューリン活性の阻害」が 2021 年に承認された（OECD, 2021）。本 AOP は、ストレス要因、すなわちカルシニューリン（CN）阻害剤（CNI）の結合による CN 活性阻害について記述している。CNI は、CN と CNI それぞれのイムノフィリンに結合し、CN の基質である活性化 T 細胞核内因子（NFAT）の核移行を妨げる。

結果として、IL-2、IL-4、その他 T 細胞由来サイトカインプロモーターの特定の部位で結合する、機能性の NFAT とアクチベータータンパク質 1 (AP-1) との複合体の形成が低下するため、これらのサイトカイン産生が抑制される。ヘルパー T 細胞の各サブセットから影響を受けるサイトカインのうち、IL-2 および IL-4 の産生低下から、B 細胞の増殖および分化に負の影響が生じることで、T 細胞依存性抗体反応 (TDAR) は抑制される。

5. IL-2 は、サイトカイン受容体発現の調節を介し、CD4+T 細胞の分化に多面的な作用を発揮する。IL-2 は、IL-12Rβ2 (および IL-12Rβ1) の誘導により Th1 細胞の分化を促進し、IL-4Rα の誘導により Th2 細胞の分化を促進し、gp 130 (および IL-6Rα) の阻害により Th17 細胞の分化を阻害し、IL-2Rα の誘導により Treg 細胞の分化を推進する。IL-2 は、IL-7Rα も強力に抑制することで、細胞生存を正常に促進する生存シグナルおよびメモリー細胞の発生を低下させる (Liao et al., 2011)。そのため、T 細胞による IL-2 放出に影響を及ぼす化学物質は、免疫機能に顕著な影響を及ぼしうると考えられる。

6. IL-2 ルシフェラーゼアッセイ (IL-2 Luc アッセイ) および IL-2 ルシフェラーゼ白血球毒性試験 (IL-2 Luc LTT アッセイ) の両試験法では、2H4 細胞を用い、刺激剤であるホルボール 12-ミリストート 13-アセタート (PMA) およびイオノマイシン (Io) の存在下で、化学物質が IL-2 および IFN-γ のプロモーターに及ぼす影響を特定する (Saito et al., 2011)。Jurkat 細胞由来の 2H4 細胞は、IL-2 プロモーターにより調節される安定化緑色発光ルシフェラーゼ (SLG)、インターフェロン (IFN) -γ プロモーターにより調節される安定化橙色発光ルシフェラーゼ (SLO)、およびグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) プロモーターにより調節される安定化赤色発光ルシフェラーゼ (SLR) を含有する。IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイとも同一の細胞株を使用するが、これら 2 つの試験法は異なる機構により免疫抑制を評価する。言い換えると、IL-2 Luc アッセイは、化学物質が IL-2 産生に及ぼす影響 (Kimura et al., 2020)、すなわち、T 細胞の活性化に対する化学物質の影響を検出でき、一方、IL-2 Luc LTT アッセイは、化学物質の有糸分裂阻害作用を特定でき (Kimura et al., 2021 および Kimura et al., 2023)、すなわち、骨髄毒性を評価できる。

7. IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイのバリデーション試験が、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) により調整された試験実施主導施設、独立した試験実施施設 3 カ所および国際的な専門家メンバー4 名からなるバリデーションマネジメントチーム (VMT) により実施された。IL-2 Luc アッセイのバリデーション試験では、施設内再現性 (80.0%、4/5) および施設間再現性 (80.0%、16/20) に関する許容基準を満たし、80%の許容基準に適合できた (Kimura et al. 2020)。予測度を判定するため、試験実施主導施設は免疫毒性情報を収集し、化学物質について、既報の基準に従って T 細胞などを標的とした免疫毒性化合物に分類することにより参照データを選択した。双方向性の IL-2 Luc アッセイ (すなわち、IL-2 産生の上昇と低下の両方を測定) の予測度は、バリデーション試験報告書 (Kimura et al., 2020) に示されている。これらの結果は、国際的なピアレビュー委員会によりレビューされた。単独の方法での予測能は不十分であったが、IL-2 Luc アッセイを、他の試験法との併用において用いる場合には許容可能である (JaCVAM, 2020)。

8. 同様に、IL-2 Luc LTT アッセイのバリデーション試験では、施設内再現性および施設間再現性に関する許容基準を満たし、80%の許容基準に適合できた (Kimura et al., 2023)。予測度を判定するため、試験実施主導施設は免疫毒性情報を収集し、化学物質について、既報の基準に従って易感染性または癌感受性などの増大に導きうる免疫抑制物質に分類することにより、参照データを構築した。施設内再現性の平均値は、100.0% (15/15) であった。施設間再現性は、92.0% (23/25) であった。IL-2 Luc LTT アッセイの性能について、免疫抑制作用を有する化学物質の分類を参考に判定したところ、第 I 相および第 II 相試験併合データでの感度の平均値は 71.4% (15/21)、特異度の平均値は 100.0% (4/4)、予測値の平均値は 76.0% (19/25) であった (Kimura et al., 2023)。IL-2 Luc LTT アッセイをさらに特徴付けるため、試験実施主導施設は合計 83 種類の被験化合物を評価した。これらの被験化合物は、46 種類の医薬品 (内訳: 抗癌剤 12、有糸分裂阻害作用を有する免疫抑制剤 8、有糸分裂阻害作用のない免疫抑制剤 8、JAK 阻害剤 3、非免疫抑制剤 15) および 37 種類の非医薬品の化学物質 (免疫抑制剤 23、非免疫抑制剤 14) からなっていた。この 23 種類の免疫抑制化学物質のうち、8 種類が有糸分裂阻害特性を有する。医薬品および非医薬品の化学物質の正確な名称、ならびに IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイによるその評価は、既報に示された (Kimura et al., 2021 および Kimura et al., 2023)。その結果から、IL-2 Luc LTT アッセイ単独での免疫抑制作用に関する性能は、感度 35.8% (19/53)、特異度 88.0% (22/25)、予測度 52.6% (41/78) であることが立証された。

(Kimura et al., 2023)。

9. IL-2 Luc LTT アッセイと同様に、IL-2 Luc アッセイ単独での免疫抑制作用に関する性能（IL-2 の産生低下のみ）は、感度 63.0%（34/54）、特異度 58.6%（17/29）、予測度 61.4%（51/83）であることが立証された。これに対し、化学物質について、いずれか一方の試験法が免疫抑制物質と判定した場合に免疫抑制物質と判定する 2 組の試験法の併用を行うと、両試験法併用による免疫抑制作用の性能は、感度 88.7%（47/53）、特異度 53.8%（14/26）、予測度 77.2%（61/79）であった。適用領域の考慮後には、IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイとの併用時の性能は、感度 90.0%（45/50）、特異度 53.8%（14/26）、予測度 77.6%（59/76）であった（Kimura et al., 2023）。単独の方法での予測能は不十分であったが、IL-2 Luc LTT アッセイを、他の試験法との併用において用いる場合には許容可能である（OECD, 2024a）（OECD, 2024b）。

10. 本試験ガイドラインの目的は、易感染性または癌感受性の増大に導きうる化学物質の免疫毒性の可能性を評価する手順について記述することにある。IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイとの併用は、化学物質の免疫毒性の可能性を評価する段階的アプローチである。言い換えると、免疫抑制作用の評価を受ける化学物質は、IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイの両方を用いて試験される。いずれかの試験法で免疫抑制作用ありと判定された場合、その化学物質は、*in vitro* における免疫抑制化学物質と特定される。

具体的な限界

11. 以下の限界に注意すべきである。

- 1) 刺激剤としての PMA/Io は、T 細胞受容体の刺激からホスホリパーゼ C の活性化まで細胞内シグナル伝達現象を迂回するため、IL-2 Luc アッセイまたは IL-2 Luc LTT アッセイいずれか単独では、化学物質がそうしたシグナルに関与する分子に及ぼす作用を評価できない（Ohtsuka et al., 1996）（Ohtsuka et al., 1996）（Kimura et al., 2014; Kimura et al., 2020）。
- 2) Jurkat T 細胞株（2H4 細胞が由来）は、免疫毒性の根底にある分子機構の検査に適していることが立証されている（Shao et al., 2013）が、TCR の刺激との反応において、正常 T 細胞の活性化に関与する複数の重要なタンパク質を欠如していることが考えられ、したがって、そうした重要なタンパク質に作用する化学物質の影響を検出できない可能性がある。
- 3) 2H4 細胞では、化学物質の代謝および活性化に必要な酵素の発現は想定されていないため、代謝活性化を要する化学物質は適用領域外である。
- 4) いずれの試験法も、疎水性の高い物質を試験する場合、浮遊細胞に基づく多くの技法によくみられる限界を共有する。
- 5) ルシフェラーゼに干渉する被験化学物質はその活性/測定に混乱をきたし、発光の明らかな阻害または増大を生じうる（Thorne et al. 2010）。
- 6) 最小影響量（LOEL）が 200 µg/L 以上の化学物質の免疫抑制作用については、IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイのいずれでも、本試験ガイドラインどおり特定することはできない。

12. 定義を付録 I に示す。

試験の原理

13. 本試験ガイドラインでは、連続する 2 つの試験法について記述する。これらの試験法は、化学物質の曝露時間、播種細胞密度および予測モデルを除き同一の試験系を用いており、別々に解釈したデータを作成し、得られた予測値を併用する。

14. IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイでは、ヒト急性 T リンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat を使用する。本細胞株を用いて、東北大学医学部皮膚科教室および東洋紡株式会社敦賀バイオ研究室は、SLG、SLO、SLR ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ IL-2、IFN- γ 、GAPDH プロモーターの制御下で含有する Jurkat 細胞由来の IL-2 レポーター細胞株 2H4 を樹立した (Saito et al., 2011)。試験実施の意志がある試験実施施設は、物質移動合意書 (MTA) への署名により、Biospecimen Laboratories, Inc. (<https://reporter-assay.com/>)

(日本) から遺伝子組換え 2H4 細胞株を入手できる。本細胞株ではルシフェラーゼ遺伝子誘導の定量的測定が可能で、測定は、十分に確立されているルシフェラーゼの発光基質による発光を、免疫毒性化学物質に曝露後の細胞内の IL-2、IFN- γ および GAPDH 遺伝子のプロモーター活性の指標として検出することにより行える。

15. 主に、参考文献 (Kimura et al., 2018) 記載の以下所見に基づき、IL-2 プロモーターにより推進されるルシフェラーゼ活性 (IL2LA) および GAPDH プロモーターにより推進されるルシフェラーゼ活性を使用した。2H4 細胞により検討される化学物質のほとんどは、IL2LA および IFN プロモーターにより推進されるルシフェラーゼ活性 (IFNLA) に、同程度の抑制作用を示した。さらに、これらの化学物質の最小影響量 (LOEL) を IL2LA および IFNLA に及ぼす作用に対しプロットしたところ、両者間に有意な相関が示された。よって、IL2LA のみを使用することとした。

16. 多色発光細胞を用いた本試験系 (Nakajima et al. 2005, Nakajima et al. 2010) は、IL-2 プロモーター遺伝子発現については緑色発光ルシフェラーゼ (SLG : $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$) (Ohmiya et al. 2000)、IFN- γ プロモーター遺伝子発現については橙色発光ルシフェラーゼ (SLO : $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (Viviani et al., 2001)、内部標準プロモーターである GAPDH の遺伝子発現については赤色発光ルシフェラーゼ (SLR : $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (Viviani, et al., 1999) からなる。3 色のルシフェラーゼはホタル D-ルシフェリンとの反応でさまざまな色を発光し、その発光を、2 枚の光学フィルターを用いて本試験法下での混在から発光を分割することにより、ワンステップ反応で同時に測定する (Nakajima et al., 2005) (付録 II 参照)。正確な発光測定に向け、高感度の発光測定器 (例: 付録 II 記載の発光測定専用の発光測定器) を使用すべきである。

IL-2 Luc アッセイ

17. 2H4 細胞を被験化学物質により 1 時間処理後、PMA および Io により 6 時間処理し、続いて IL-2 プロモーター活性を反映した SLG ルシフェラーゼ活性 (SLG-LA)、IFN- γ プロモーター活性を反映した SLO ルシフェラーゼ活性 (SLO-LA)、GAPDH プロモーター活性を反映した SLR ルシフェラーゼ活性 (SLR-LA) を測定する。略語をより理解しやすくするために、SLG-LA、SLO-LA、SLR-LA をそれぞれ IL2LA、IFNLA、GAPLA と称する。IL-2 Luc アッセイにおけるルシフェラーゼ活性に関連する用語の説明を、表 1 に示す。得られた測定値を用いて、標準化した IL2LA (nIL2LA) および IFNLA (nIFNLA) —それぞれ IL2LA および IFNLA の GAPLA に対する比—と、GAPLA 阻害比 (Inh-GAPLA) —被験化学物質で処理した 2H4 細胞の GAPLA を 4 回測定した値の算術平均と、未処理 2H4 細胞の GAPLA の算術平均値との比—を算出し、細胞毒性の指標として使用する。表 1 に示したとおり算出された抑制率は、被験化学物質が IL-2 および IFN- γ プロモーターに及ぼす影響を示す。

表 1. IL-2 Luc アッセイにおけるルシフェラーゼ活性に関連する用語の説明

略語	定義
IL2LA	IL-2 プロモーター活性を反映した SLG ルシフェラーゼ活性
IFNLA	IFN- γ プロモーター活性を反映した SLO ルシフェラーゼ活性
GAPLA	GAPDH プロモーター活性を反映した SLR ルシフェラーゼ活性
nIL2LA	IL2LA / GAPLA
nIFNLA	IFNLA / GAPLA
Inh-GAPLA	化学物質で処理した 2H4 細胞の GAPLA / 未処理細胞の GAPLA
抑制率	$(1 - (\text{化学物質で処理した 2H4 細胞の nIL2LA}) / (\text{未処理 2H4 細胞の nIL2LA})) \times 100$
CV05	Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験化学物質の最低濃度。
Min Inh-GAPLA	各実験の Inh-GAPLA の最小値

18. IL-2 Luc アッセイでは、GAPLA と IL2LA を同時に検討できる。GAPDH の mRNA は、概ね豊富なレベルで普遍的に発現する。GAPDH の mRNA は、その発現がさまざまな時間および実験操作後において一定であるため、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応の内因性対照として複数の実験系で頻回に用いられる (Edwards and Denhardt, 1985; Mori et al., 2008; Winer et al., 1999)。さらに、試験実施主導施設が立証した結果では、Inh-GAPLA の死細胞の検出感度は、ヨウ化プロピジウム (PI) による排除細胞の割合より高く、Inh-GAPLA が 0.05 以上を示した細胞は、PI による排除細胞の 75%超を維持している (Kimura et al., 2015)。したがって、Inh-GAPLA が 0.05 以上である濃度での入手データのみを用いて、結果を評価した。

IL-2 Luc LTT アッセイ

19. 2H4 細胞を被験化学物質により 24 時間処理後、PMA および Io により 6 時間処理し、続いて IL2LA、IFNLA および GAPLA を測定する。表 1 に示すとおり、IL-2 Luc LTT アッセイで使用する用語は、IL-2 Luc アッセイで使用する用語と同一である。

20. IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイは、いずれも GAPDH の mRNA 発現と相関する GAPLA を測定できる。GAPDH の mRNA は、概ね豊富なレベルで普遍的に発現する。GAPDH の mRNA は、その発現がさまざまな時間および実験操作後において一定であるため、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応の内因性対照として複数の実験系で頻回に用いられる (Edwards and Denhardt, 1985; Mori et al., 2008; Winer et al., 1999)。Inh-GAPLA は細胞生存率の優れたマーカーで、ヨウ化プロピジウム (PI) による排除細胞と強い相関があり、0.8 未満の Inh-GAPLA は被験化学物質の細胞毒性を示すことが立証されている (Kimura et al., 2021)。IL-2 Luc アッセイでは、化学物質とのインキュベーション時間が 1 時間のみであることから、細胞数に顕著な変化がないため、GAPLA が細胞生存率のマーカーとなる。IL-2 Luc LTT アッセイでは、2H4 細胞を化学物質と 24 時間処理する。この処理時間は、Jurkat 細胞の倍加時間 (20.7 ± 2.2 時間) よりわずかに長い (Schoene et al., 1999)。2H4 細胞の GAPLA は生細胞数と良好な相関を示すため (Kimura et al., 2015; Takahashi et al., 2011)、IL-2 Luc LTT アッセイの GAPLA は細胞数の変化を反映する。

習熟度の立証

21. 本試験ガイドライン記載の試験法の定常的な使用に先立ち、試験実施施設は、「優良 in vitro 試験法実施基準」に従い、付録 III (IL-2 Luc アッセイについては表 1、IL-2 Luc LTT アッセイについては表 2) 収載の習熟度確認物質を用いて、技術的習熟度を立証すべきである (OECD, 2018)。さらに、試験法の使用者は、反応性のチェックならびに陽性対照および溶剤/溶媒対照による生成データの背景データベースを維持し、ま

た、これらのデータを用いて、試験実施施設における試験法の再現性が経時的に維持されることを確認すべきである。

手順

22. IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイに関する標準操作手順書 (SOP) (JaCVAM, 2020c) (JaCVAM, 2024b) は入手可能であり、本試験を実施する場合に使用すべきである。以下の段落では、本試験法の主要な構成要素および手順について記述する。

IL-2 Luc アッセイ

細胞の調製

23. 受領と同時に 2H4 細胞を増殖させ (2~4 世代継代)、均質な細胞ストックとして凍結保存する。本細胞ストック由来の細胞は、最大 12 世代継代か最大 6 週間まで増殖できる。増殖に用いる培地は、10% ウシ胎児血清 (FBS)、抗生物質/抗真菌剤溶液 (ペニシリン G 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL、およびアムホテリシン B 0.25 µg/mL を 0.85% 生理食塩水に添加) (例: GIBCO カタログ番号 15240-062)、ピューロマイシン (例: CAS 番号 58-58-2) 0.15 µg/mL、G418 (例: CAS 番号 108321-42-2) 300 µg/mL、ならびにハイグロマイシン B (例: CAS 番号 31282-04-9) 200 µg/mL を含有する RPMI-1640 培養液とする。

24. 試験に使用する前に、反応性のチェックを実施することで細胞の適格性を得るべきである。このチェックは、陽性対照であるデキサメタゾン (100 µg/mL) (CAS 番号: 50-02-2、純度 98% 以上) およびシクロスポリン A (100 ng/mL) (CAS 番号: 59865-13-3、純度 95% 以上) を用いて、解凍から 1~2 週間後か 2~4 世代継代後に実施すべきである。デキサメタゾンおよびシクロスポリン A は、抑制率に関し正の反応 (35 以上) をもたらすはずである。本試験法では、反応性のチェックに合格した細胞のみを用いる。

25. 試験に向け、2H4 細胞を $1\sim3 \times 10^5$ cells/mL の密度で播種し、培養フラスコで 72~96 時間前培養する。試験当日、培養フラスコから回収した細胞を、抗生物質不含の 10% FBS 含有 RPMI-1640 により洗浄後、抗生物質不含の 10% FBS 含有 RPMI-1640 4×10^6 cells/mL で再浮遊させる。次に、細胞を 50 µL (2×10^5 cells/ウェル) で 96 ウェル平底黒色プレート (例: Corning Costar カタログ番号 3603) に分注する。

被験化学物質および対照物質の調製

26. 被験化学物質および対照物質は、試験当日に調製する。IL-2 Luc アッセイでは、被験化学物質を蒸留水またはジメチルスルホキシド (DMSO) (ストック溶液) に溶解する。被験化学物質は、まず蒸留水に溶解する。

- 化学物質が 10 mg/mL で可溶な場合、10 mg/mL がストック溶液の濃度である。
- 被験化学物質が蒸留水中 10 mg/mL で可溶でない場合、被験化学物質を DMSO 中 200 mg/mL で溶解する。被験化学物質が 200 mg/mL で可溶でない場合、最高濃度は希釈係数 2 での DMSO による希釈後の最大溶解濃度と判定される (付録 IV の図解を参照)。
- 化学物質が蒸留水に可溶でない場合、DMSO 中で可能な最高濃度を調製する。必要であれば、超音波処理およびボルテックスを使用できる。20,000 xg で 5 分間遠心し、沈殿物がないことにより可溶であることを確認する。被験化学物質は、蒸留水または DMSO に溶解後 4 時間以内に使用すべきである。

27. 最初のテストランは、細胞毒性濃度の判定および化学物質の免疫毒性の可能性に関する検討を目的とする。被験化学物質を蒸留水または DMSO スtock 溶液により段階希釈する場合、希釈係数は 2 (付録 IV 参照) とし、96 ウェル丸底透明プレートを用いる。化学物質が蒸留水で調製されている場合、希釈ストック溶液 20 µL を 96 ウェルアッセイブロック (例: Corning Costar カタログ番号 3960) 中でさらに培地 480 µL で

希釈し、この希釈液 50 μ L を 96 ウェル平底黒色プレートに細胞浮遊液 50 μ L に添加する。化学物質が DMSO で調製されている場合、希釈ストック溶液 10 μ L を 96 ウェル丸底透明プレート中で培地 90 μ L で希釈後、この希釈液 10 μ L を 96 ウェルアッセイブロック中で培地 490 μ L で希釈し、次いで、この希釈液 50 μ L を 96 ウェル平底黒色プレートに細胞浮遊液 50 μ L に添加する。

28. したがって、化学物質が 10 mg/mL の蒸留水溶液として調製された場合、被験化学物質の最終濃度は 0.00039~0.2 mg/mL の範囲であり、また、化学物質が 200 mg/mL の DMSO 溶液として調製された場合、被験化学物質の最終濃度は 0.0039~0.2 mg/mL の範囲である（付録 IV）。

後続のテストラン（すなわち、2 回目および 3 回目のラン）では、蒸留水ストック溶液または DMSO ストック溶液を、1 回目のランの細胞生存率（Cell Viability [CV] 05 : Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験化学物質の最低濃度）の濃度のそれぞれ 100 倍または 2000 倍の濃度で調製する（付録 IV 図 4 参照）。Inh-GAPLA が 1 回目のランにおける任意の濃度で 0.05 未満に低下しない場合、後続のテストランにおけるストック溶液の濃度は 1 回目のランと同一とする。なお、化学物質が最低濃度で 0.7 未満の Inh-GAPLA を示した場合、蒸留水ストック溶液または DMSO ストック溶液を、1 回目のランの最低濃度のそれぞれ 200 倍または 4000 倍の濃度で調製する。

29. 被験化学物質は濃度ごとに、4 ウェルで試験すべきである。次に、これらの試料をプレートシェーカーで混合し、 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $5\pm0.5\%$ CO_2 で 1 時間インキュベートする。

30. 被験化学物質と 1 時間インキュベーション後、細胞を PMA 25 nM および 10^{-6} M により 6 時間刺激する。例えば、PMA/イオノマイシンの 10 倍溶液は、培地を用いて 2 mM PMA DMSO 溶液および 2 mM イオノマイシンエタノール溶液を希釈することで調製し、この PMA/イオノマイシンの 10 倍溶液 10 μ L を被験化学物質含有細胞浮遊液 90 μ L に添加する。続いて、下記段落 35~38 記載のとおり、ルシフェラーゼ活性を測定する。

31. 推奨される陽性対照は、デキサメタゾンおよびシクロスポリン A である。例えば、96 ウェル丸底透明プレート中で 100 mg/mL デキサメタゾン DMSO 溶液 10 μ L、または 100 μ g/mL シクロスポリン A DMSO 溶液 10 μ L を培地 90 μ L に添加し、この希釈液 10 μ L を 96 ウェルアッセイブロック中で培地 490 μ L で希釈し、次いで、この希釈液 50 μ L を 96 ウェル平底黒色プレートに細胞浮遊液 50 μ L に添加する。デキサメタゾンおよびシクロスポリン A の最終濃度は、それぞれ 100 μ g/mL および 100 ng/mL である。陽性対照は濃度ごとに、4 ウェルで試験すべきである。次に、これらの試料をプレートシェーカーで混合し、 37°C 、5% CO_2 で 1 時間インキュベートする。細胞を PMA 25 nM および 10^{-6} M により 6 時間刺激し、次いで、段落 35~38 記載のとおりルシフェラーゼ活性を測定する。

32. 溶剤対照および陰性対照は、2% 蒸留水または 1% DMSO を含有した 10% FBS 含有 RPMI-1640 とする。背景データから、ランにおいて同程度の許容基準を導ける場合、別の適切な陽性対照または陰性対照を使用できる。

33. 揮発性の被験化学物質の蒸発および被験化学物質によるウェル間の交差汚染を回避するため、被験化学物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートを密閉することにより注意を払うべきである。

34. 被験化学物質および溶剤対照では、データ評価および予測モデルを導くには 2~3 回のランが必要である（段落 60 参照）。各ランは、新鮮な被験化学物質ストック溶液および別々に回収された細胞を用いて、別の日に実施する。細胞は同一継代由来でもよい。

ルシフェラーゼ活性の測定

35. 発光の測定には、例えば、Phelios（アトー社、東京）、Tristar 941（ベルトールド社、ドイツ、バート・ヴィルトバート）、または ARVO シリーズ（パーキンエルマー社、米国、マサチューセッツ州ウォルサム）といった光学フィルター搭載の 96 ウェルマイクロプレートルミノメーターを使用する。光学フィルターの例には、シャープカット（ロングパスまたはショートパス）フィルターやバンドパスフィルターが挙げられる。ルミノメーターの適格性を得ることで、発光ダイオード（LED）基準光源による再現性を確保できる

(Yasunaga et al. 2017)。

36. 試験前に、付録 II のとおり、緑色、橙色および赤色の遺伝子組換え発光ルシフェラーゼを用いて、各生物発光シグナルの色を識別する光学フィルターの透過係数を決定すべきである (Niwa et al. 2010)。

37. 予め加温された Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Tripluc) 100 μ L を、化学物質存在下または非存在下、および PMA/lo 存在下または非存在下で処理された細胞浮遊液含有プレートの各ウェルに分注する。プレートを、環境温度約 20°C で 10 分間振とうする。プレートをルミノメーターに静置し、ルシフェラーゼ活性を測定する。光学フィルターの非存在下 (F0) および存在下 (F1、F2) で各 3 秒間生物発光を測定する。例えば、使用するルミノメーターのモデルにもよるが、別の設定を用いる場合にはその正当性を示すべきである。

38. 各濃度のパラメータを測定値から算出する。例えば、IL2LA、GAPLA、nIL2LA、Inh-GAPLA、IL2LA の平均 \pm SD、GAPLA の平均 \pm SD、nIL2LA の平均 \pm SD、Inh-GAPLA の平均 \pm SD、および抑制率については、IL-2 Luc アッセイ用に入手可能なエクセルベースのスプレッドシートを用いる (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm> 参照)。本段落で用いられるパラメータ、すなわち、ルシフェラーゼ活性および抑制に関する指数の定義および算出については、それぞれ付録 I および付録 V に示す。

IL-2 Luc LTT アッセイ

細胞の調製

39. IL-2 Luc LTT アッセイの実施には、2H4 細胞株を使用すべきである。受領と同時に 2H4 細胞を増殖させ (2~4 世代継代)、均質な細胞ストックとして凍結保存する。本細胞ストック由来の細胞は、最大 12 世代継代か最大 6 週間まで増殖できる。増殖に用いる培地は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、抗生物質/抗真菌剤溶液 (ペニシリン G 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL、およびアムホテリシン B 0.25 μ g/mL を 0.85% 生理食塩水に添加) (例: GIBCO カタログ番号 15240-062)、ピューロマイシン (例: CAS 番号 58-58-2) 0.15 μ g/mL、G418 (例: CAS 番号 108321-42-2) 300 μ g/mL、ならびにハイグロマイシン B (例: CAS 番号 31282-04-9) 200 μ g/mL を含有する RPMI-1640 培養液とする。

40. 試験に使用する前に、反応性のチェックを実施することで細胞の適格性を得るべきである。反応性のチェックは、解凍から 1~2 週間後または 2~4 世代継代後、陽性対照である硫酸ブレオマイシン (CAS 番号 9041-93-4) およびミゾリビン (CAS 番号 50924-49-7)、ならびに陰性対照であるシクロスポリン A (CAS 番号 59865-13-3) を用いて実施すべきである。陽性 (有糸分裂阻害性あり) か陰性 (有糸分裂阻害性なし) かを判定する IL-2 Luc LTT アッセイの基準に基づき、硫酸ブレオマイシンおよびミゾリビンは陽性反応、また、シクロスポリンは陰性反応を示すはずである。本試験法では、反応性のチェックに合格した細胞のみを用いる。

41. 試験に向け、2H4 細胞を $1\sim3 \times 10^5$ cells/mL の密度で播種し、培養フラスコで 72~96 時間前培養する。試験当日、培養フラスコから回収した細胞を、抗生物質不含の 10% FBS 含有 RPMI-1640 により洗浄後、抗生物質不含の 10% FBS 含有 RPMI-1640 2×10^5 cells/mL で再浮遊させる。次に、細胞を 50 μ L (1×10^4 cells/ウェル) で 96 ウェル平底黒色プレート (例: Greiner Bio-One 社カタログ番号 655090) に分注する。

被験化学物質および対照物質の調製

42. 被験化学物質および対照物質は、試験当日に調製する。IL-2 Luc LTT アッセイでは、被験化学物質を蒸留水またはジメチルスルホキシド (DMSO) (ストック溶液) に溶解する。被験化学物質は、まず蒸留水に溶解する。

- 化学物質が 10 mg/mL で可溶な場合、10 mg/mL がストック溶液の濃度である。
- 被験化学物質が蒸留水中 10 mg/mL で可溶でない場合、被験化学物質を DMSO 中 200 mg/mL で溶解する。被験化学物質が 200 mg/mL で可溶でない場合、最高濃度は希釈係数 2 での DMSO による希釈後の最大溶解濃度と判定される（付録 IV の図解を参照）。
- 化学物質が蒸留水に可溶でない場合、DMSO 中で可能な最高濃度を調製する。必要であれば、超音波処理およびボルテックスを使用できる。15,000 rpm（約 20,000 ×g）で 5 分間遠心し、沈殿物がないことにより可溶であることを確認する。被験化学物質は、蒸留水または DMSO に溶解後 4 時間以内に使用すべきである。

43. 最初のテストランは、細胞毒性濃度の判定および化学物質の免疫毒性の可能性に関する検討を目的とする。被験化学物質を蒸留水または DMSO ストック溶液により段階希釈する場合、希釈係数は 2（付録 IV 参照）とし、96 ウェル丸底透明プレートを用いる。

- 化学物質が蒸留水で調製されている場合、希釈ストック溶液 20 μ L を 96 ウェルアッセイブロック（例：Corning Costar カタログ番号 3960）中でさらに培地 480 μ L で希釈し、この希釈液 50 μ L を 96 ウェル平底黒色プレートの細胞浮遊液 50 μ L に添加する。
- 化学物質が DMSO で調製されている場合、希釈ストック溶液 10 μ L を 96 ウェル丸底透明プレート中で培地 90 μ L で希釈後、この希釈液 10 μ L を 96 ウェルアッセイブロック中で培地 490 μ L で希釈し、次いで、この希釈液 50 μ L を 96 ウェル平底黒色プレートの細胞浮遊液 50 μ L に添加する。

44. したがって、化学物質が 10 mg/mL の蒸留水溶液として調製された場合、被験化学物質の最終濃度は 0.00039～0.2 mg/mL の範囲であり、また、化学物質が 200 mg/mL の DMSO 溶液として調製された場合、被験化学物質の最終濃度は 0.00039～0.2 mg/mL の範囲である（付録 IV）。

45. 後続のテストラン（すなわち、2 回目および 3 回目のラン）では、蒸留水ストック溶液または DMSO ストック溶液を、1 回目のランの細胞生存率（Cell Viability [CV] 05 : Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験化学物質の最低濃度）の濃度のそれぞれ 100 倍または 2000 倍の濃度で調製する（付録 IV 図 4）。Inh-GAPLA が 1 回目のランにおける任意の濃度で 0.05 未満に低下しない場合、後続のテストランにおけるストック溶液の濃度は 1 回目のランと同一とする。

なお、化学物質が最低濃度で 0.7 未満の Inh-GAPLA を示した場合、蒸留水ストック溶液または DMSO ストック溶液を、1 回目のランの最低濃度のそれぞれ 200 倍または 4000 倍の濃度で調製する。

46. 各被験化学物質は濃度ごとに、4 ウェルで試験すべきである。次に、これらの試料をプレートシェーカーで混合し、 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $5\pm0.5\%$ CO_2 で 24 時間インキュベートする。

47. 被験化学物質と 24 時間インキュベーション後、細胞を PMA 25 nM および 10^{-6} M により 6 時間刺激する。例えば、PMA/イオノマイシンの 10 倍溶液は、培地を用いて 2 mM PMA DMSO 溶液および 2 mM イオノマイシンエタノール溶液を希釈することで調製し、この PMA/イオノマイシンの 10 倍溶液 10 μ L を被験化学物質含有細胞浮遊液 90 μ L に添加する。続いて、段落 52～55 記載のとおり、ルシフェラーゼ活性を測定する。

48. 推奨される陽性対照は、ブレオマイシンである。10 mg/mL の蒸留水溶液をストック溶液として調製する。推奨される陰性対照は、デキサメタゾンである。100 mg/mL の DMSO 溶液をストック溶液として調製する。その後、このストック溶液を段落 46 記載（訳者注：43 又は 45 が正しいと考えられる）のとおり希釈する。次に、これらの試料をプレートシェーカーで混合し、 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $5\pm0.5\%$ CO_2 で 24 時間インキュベートする。細胞を PMA 25 nM および 10^{-6} M により 6 時間刺激し、次いで、段落 52～55 記載のとおりルシフェラーゼ活性を測定する。

49. 溶剤対照および陰性対照は、10% FBS 含有 RPMI-1640 とする。背景データから、同程度の許容基準を導ける場合、別の適切な陽性対照または陰性対照を使用できる。
50. 揮発性の被験化学物質の蒸発および被験化学物質によるウェル間の交差汚染を回避するため、被験化学物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートを密閉することにより注意を払うべきである。
51. 被験化学物質および溶剤対照は、陽性（有糸分裂阻害性あり）または陰性（有糸分裂阻害性なし）の予測を得るために、2〜3 回のランを必要とする。各ランは、新鮮な被験化学物質ストック溶液および別々に回収された細胞を用いて、別の日に実施する。細胞は同一継代由来でもよい。

ルシフェラーゼ活性の測定

52. 発光の測定には、例えば、Phelios（アトー社、東京）、Tristar 941（ベルトールド社、ドイツ、バート・ヴィルトバート）、または ARVO シリーズ（パーキンエルマー社、米国、マサチューセッツ州ウォルサム）といった光学フィルター搭載の 96 ウェルマイクロプレートルミノメーターを使用する。光学フィルターの例には、シャープカット（ロングパスまたはショートパス）フィルターやバンドパスフィルターが挙げられる。ルミノメーターの適格性を得ることで、発光ダイオード（LED）基準光源による再現性を確保できる（Yasunaga, Nakajima and Ohmiya, 2014）。
53. 試験前に、付録II記載のとおり、緑色、橙色および赤色の遺伝子組換え発光ルシフェラーゼを用いて、各生物発光シグナルの色を識別する光学フィルターの透過係数を決定すべきである（Niwa et al., 2010）。
54. 予め加温された Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬（Tripluc）100 μ L を、化学物質存在下または非存在下、および PMA/I α 存在下または非存在下で処理された細胞浮遊液含有プレートの各ウェルに分注する。プレートを、環境温度約 20°C で 10 分間振とうする。プレートをルミノメーターに静置し、ルシフェラーゼ活性を測定する。光学フィルターの非存在下（F0）および存在下（F1、F2）で各 3 秒間生物発光を測定する。例えば、使用するルミノメーターのモデルにもよるが、別の設定を用いる場合にはその正当性を示すべきである。
55. 各濃度のパラメータを測定値から算出する。例えば、IL2LA、GAPLA、nIL2LA、Inh-GAPLA、IL2LA の平均 \pm SD、GAPLA の平均 \pm SD、nIL2LA の平均 \pm SD、Inh-GAPLA の平均 \pm SD、および抑制率については、IL-2 Luc LTT アッセイ用に入手可及なエクセルベースのスプレッドシートを用いる（<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm> 参照）。本段落で用いられるパラメータ、すなわち、ルシフェラーゼ活性および抑制に関する指数の定義および算出については、それぞれ付録Iおよび付録Vに示す。

データおよび報告

データの評価

56. IL-2 Luc アッセイ：IL-2 Luc アッセイにおける免疫抑制の判定基準。各ランにおいて、以下の 3 つの基準をすべて満たした場合、被験化学物質は陽性（免疫抑制性）と判断される。
1. 抑制率の平均値が 35 以上（免疫抑制性）であり、統計学的に有意である。統計学的有意性は、その 95%信頼区間により判断する。
 2. 評価項目が、複数回連続して統計学的に有意な結果（上昇または低下）を示す。あるいは、統計学的に有意な結果（上昇または低下）が1つと、連続3つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、用量依存的な傾向）を伴う。この場合、その傾向はゼロ線と交差しうるが、ゼロ線の反対側にあるデータポイントが逆の影響について統計学的に有意にはならない（基準 2 を示す図は付録V 図1で得られる）。
 3. Inh-GAPLA が 0.05 以上である濃度範囲での入手データのみを用いて、結果を判断している。

それ以外のすべての場合、被験化学物質は陰性（活性なし）と判断される。

57. IL-2 Luc LTT アッセイ：各ランにおいて、Min Inh-GAPLA が 0.7 未満であることに加え、以下の 3 つの基準をすべて満たした場合、被験化学物質は陽性（すなわち、有糸分裂阻害性あり）と判断される。

- (1) 抑制率の平均値が-35 以下（刺激性または有糸分裂阻害性あり）であり、統計学的に有意である。抑制率の 95%信頼区間上限が 0 未満である場合、統計学的に有意であると判断する。
- (2) 評価項目が、複数回連続して統計学的に有意な刺激性ありの結果を示す。あるいは、統計学的に有意な刺激性ありの結果が 1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、用量依存的な傾向）を伴う。この場合、その傾向はゼロ線と交差しうるが、ゼロ線の反対側にあるデータポイントが逆の影響について統計学的に有意にはならない。抑制率の 95%信頼区間上限が 0 未満である場合、統計学的に有意であると判断する。（基準 2 を示す図は付録 V 図 2 で得られる。）
- (3) Inh-GAPLA が 0.05 以上である濃度範囲での入手データのみを用いて、結果を判断している。

それ以外のすべての場合、被験化学物質は陰性（すなわち、有糸分裂阻害性なし）と判断される。

58. 被験化学物質が陰性の結果を示し蒸留水中 10 mg/mL で不溶であった場合、当該被験化学物質は、培地において潜在的な影響を示すのに十分な濃度では溶媒に溶解不能であるため、本試験結果では結論が得られないと判断する（基準 2 を示す図は付録 V 図 3 で得られる）。

予測モデル

59. ランは、一貫した陽性（抑制性）のランが 2 回得られるまで繰り返す。最大 3 回のランが可能である。免疫毒性物質の特定は、IL-2 Luc アッセイでは、阻害率の平均値とその 95%同時信頼区間により評価されるが、IL-2 Luc LTT アッセイでは、これらに加えて Min Inh-GAPLA により評価される。免疫抑制作用の評価を受ける化学物質は、IL-2 Luc アッセイと IL-2 Luc LTT アッセイの両方を用いて試験される。化学物質が IL-2 Luc アッセイで抑制作用あり、または、IL-2 Luc LTT アッセイで有糸分裂阻害作用ありと判定された場合、当該化学物質は、*in vitro* における免疫抑制化学物質と特定される。

許容基準

60. これら 2 つの試験法には、以下の許容基準が適用される。それぞれの一連の実験では、PMA/I α で処理した 2H4 細胞の nIFN α および未処理 2H4 細胞の nIFN α を検討した対照実験を実施しなければならない。PMA/I α オノマイシンで処理した 2H4 細胞の nIFN α の誘導倍率が、未処理 2H4 細胞の nIFN α との比較で 3.0 未満である場合、これらの実験から得られた結果は棄却すべきである。

試験報告書

61. 試験報告書には、試験法ごとに以下の情報を含めるべきである。

被験化学物質

- 単一成分物質：

- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および/またはその他の識別子などの化学的識別情報
- 入手可能な範囲での外観、水への溶解度、分子量、およびその他の関連する物理化学的性状

- 純度、該当する場合で現実的に実行可能であれば不純物の化学的識別情報など
 - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
 - 試験での濃度
 - 保存条件および安定性を可能な範囲で
 - 蒸留水も DMSO も使用しなかった場合、各被験化学物質の溶剤/溶媒選択の正当性
- 多成分物質、UVCB、混合物：
- 入手可能な範囲での、成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、および関連のある物理化学的性状（上記参照）などにより可能な限り特徴付けること
 - 入手可能な範囲での外観、水への溶解度、およびその他の関連する物理化学的性状
 - 組成が既知の混合物/ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または、試験実施に関連するそれ以外の情報
 - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
 - 試験での濃度
 - 入手可能な範囲での保存条件および安定性
 - 蒸留水も DMSO も使用しなかった場合、各被験化学物質の溶剤/溶媒選択の正当性

試験法ごとの対照

- 陽性対照：
- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、および/またはその他の識別子などの化学的識別情報
 - 該当する場合、入手可能な範囲での外観、水への溶解度、分子量、およびその他の関連する物理化学的性状
 - 純度、該当する場合で現実的に実行可能であれば不純物の化学的識別情報など
 - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
 - （蒸留水も DMSO も使用しなかった場合）各被験化学物質の溶剤/溶媒選択の正当性
 - 試験での濃度
 - 入手可能な範囲での保存条件および安定性
 - 該当する場合、許容基準が適切であることを立証した背景陽性対照の結果に関する言及
- 陰性対照：
- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、および/またはその他の識別子などの化学的識別情報
 - 純度、該当する場合で現実的に実行可能であれば不純物の化学的識別情報など
 - 本試験ガイドライン記載以外の別の陰性対照を用いる場合、入手可能な範囲での外観、分子量、およびその他関連する物理化学的性状
 - 入手可能な範囲での保存条件および安定性
 - 各被験化学物質の溶剤選択の正当性

試験法ごとの試験方法の条件

- 試験依頼者、試験実施施設および試験責任者の氏名、名称および住所
- 使用した試験法に関する記述
- 使用した細胞株、その保存条件および供給元（例：入手した施設）
- FBS のロット番号および起源、供給業者名、96 ウェル平底黒色プレートのロット番号、Tripluc 試薬のロット番号
- 試験に用いられた継代数および細胞密度
- 試験実施前の播種に用いた細胞計数法、および均一な細胞数分布の確保に講じた措置
- 使用するルミノメーター（例：モデル）、また、機器の設定、使用するルシフェラーゼ基質、および付録 II 記載の対照試験に基づく適切な発光測定の実証などに関する情報
- 試験法実施に際し試験実施施設が（例えば、習熟度確認物質の試験により）習熟度を立証し、あるいは、試験法に関する経時的な再現性を立証するために用いた手順

試験法ごとの試験手順

- 実施したランの回数
- 被験化学物質の濃度、適用手順、曝露時間（推奨事項と異なる場合）
- 使用した評価判定基準の記述
- 使用した試験許容基準の記述
- 試験手順を変更した場合、その記述。

試験法ごとの結果

- IL2LA、IFNLA および GAPLA の測定結果
- nIL2LA、nIFNLA、Inh-GAPLA および抑制率の算出結果
- 抑制率の 95%信頼区間
- ルシフェラーゼ活性および生存率を誘導する用量反応曲線を描いたグラフ
- 該当する場合、その他関連所見の記述
- 結果の考察
- IL-2 Luc アッセイおよび IL-2 Luc LTT アッセイにより得られた結果の試験法別での考察
- 両試験法の結果を併合した場合の考察

本試験ガイドラインに関する変更

結論

LITERATURE

- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., et al., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 85, 367-485.
- Aiba, S., 2018. Profiling the immunotoxicity of chemicals based on *in vitro* evaluation by a combination of the Multi-ImmunoTox assay and the IL-8 Luc assay. *Arch. Toxicol.* 92(6), 2043-2054.
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., et al. (2005), GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21: 389-395, 10.1152/physiolgenomics.00025.2005
- Corsini, E., Roggen, E.L., 2009a. Immunotoxicology: opportunities for non-animal test development. *Altern. Lab. Anim.* 37(4), 387-97.
- Corsini, E., Mitjans, M., Galbiati, V., et al. (2009b), Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro* 23: 789-796, 10.1016/j.tiv.2009.04.005
- Corsini, E., Roggen, E.L., 2009. Immunotoxicology: opportunities for non-animal test development. *Altern. Lab. Anim.* 37(4), 387-97. (2017), Overview of *in vitro* assessment of immunotoxicity. DOI:10.1016/j.cotox.2017.06.016
- Edwards, D.R., Denhardt, D.T. (1985), A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 157: 127-143.
- Galbiati, V., Mitjans, M. & Corsini, E., 2010. Present and future of *in vitro* immunotoxicology in drug development. *J. Immunotoxicol.* 7(4), 255-267.
- Gennari, A., Ban, M., Braun, A., Casati, S., Corsini, E., Dastych, J., Descotes, J., Hartung, T., Hooghe-Peters, R., House, R., Pallardy, M., Pieters, R., Reid, L., Tryphonas, H., Tschirhart, E., Tuschl, H., Vandebriel, R., Gribaldo, L., 2005. The Use of *In Vitro* Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *J. Immunotoxicol.* 2(2), 61-83.
- JaCVAM (2020b), IL-2 Luc assay peer review report, <https://www.jacvam.jp/list.html>
- JaCVAM (2020c), IL-2 Luc assay protocol, <https://www.jacvam.jp/list.html>
- JaCVAM (2024b), IL-2 Luc LTT protocol (jacvam.jp).
- 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(5), 759-768.
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., et al. (2015), Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29: 1816-1830, 10.1016/j.tiv.2015.07.006
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H.,
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajim, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol in Vitro*. 29, 1816-1830.
- Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., Kobayashi, M., Iwaki, T., Fujimura, C., Ohmiya, Y., Yamakage, K., Nakajima, Y., Kobayashi, M., Mashimo, N., Takagi, Y., Omori, T., Corsini, E., Germolec, D., Inoue, T., Rogen, EL., Kojima, H., Aiba, S., 2020. 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* 66. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104832.
- Kimura, Y., Terui, H., Fujimura, C., et al. (2021), Optimization of the IL-2 Luc assay for immunosuppressive drugs: a novel *in vitro* immunotoxicity test with high sensitivity and predictivity. *Arch Toxicol* 95: 2755-2768, 10.1007/s00204-021-03101-4
- Kimura, Y., Yasuno, R., Iwaki, T., Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajim, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol in Vitro*. 29, 1816-1830.

- Kimura, Y., Yasuno, R., Iwaki, T., et al. (2023), An international validation study of the interleukin-2 luciferase leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) to evaluate potential immunosuppressive chemicals and its performance after use with the interleukin-2 luciferase assay (IL-2 Luc assay). *Toxicol in Vitro* 88: 105535, 10.1016/j.tiv.2022.105535
- Lankveld, D.P., Van Loveren, H., Baken, K.A., Vandebriel, R.J., 2010. *In vitro* testing for direct immunotoxicity: state of the art. *Methods Mol. Biol.* 598, 401-423.
- Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Peng, L., Leonard, W.J. (2011), Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat. Immunol.* 12, 551-559.
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., et al. (2008), Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68: 1555-1560, 10.1002/pros.20815
- Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., et al. (2005), Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891-894, 10.2144/05386ST03.
- Nakajima, Y., Ohmiya, Y., (2010), Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Exp. Opin. Drug Discov.* 5: 835-849, 10.1517/17460441.2010.506213.
- Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V.R., Ohmiya, Y. (2010) Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem. Photobiol.* 86:1046-9.
- OECD (2005), Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34, OECD, Paris, France.
- OECD (2017), Guidance document: Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of In Vitro Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.286. OECD, Paris, France.
- OECD (2021) OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 18, [Adverse Outcome Pathway on inhibition of calcineurin activity leading to impaired T-cell dependent antibody response](#), OECD, Paris, France.
- OECD (2022) Detailed Review Paper: *In vitro* tests addressing immunotoxicity with a focus on immunosuppression, OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.360. OECD, Paris, France.
- OECD (2023) Guidelines for the Testing of Chemicals No.444a, In Vitro Immunotoxicity: IL-2 Luc Assay, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2024a), *Report of the Validation of the IL-2 Luc Leukocyte Toxicity Test (IL-2 Luc LTT) Assay on In Vitro Immuno-Toxicity Testing*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 393, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/3f589500-en>.
- OECD (2024b), *Peer-Review Report of the Validation of the IL-2 Luc Leukocyte Toxicity Test (IL-2 Luc LTT) Assay on In Vitro Immunotoxicity*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 392, OECD Publishing
- Ohmiya, Y., Sumiya, M., Viviani, V.R., Ohba, N. (2000), Comparative aspects of a luciferase molecule from Japanese luminous beetle, *Rhagophthalmus ohbai*. *Sci. Rept. Yokosuka City Mus.* 47:31-38.
- Ohtsuka, T., Jiziro, Y., Satoh, T., (1996), Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinase, protein kinase C, and Ras protein, which is mediated by intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Acta.* 1310: 2223-232. 10.1016/0167-4889(95)00172-7
- Oliveira, J.G., Prados, R.Z., Guedes, A.C., et al. (1999), The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch Dermatol Res* 291: 659-661,
- Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., et al. (2011), Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signalling. *Toxicology and applied pharmacology* 254: 245-255, 10.1016/j.taap.2011.04.017
- Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., Yasuda, M., Yamazaki, T., Nishii, S., Aiba, S., 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254(3), 245-255.
- Shao, J., Katika, MR., Schmeits, PCJ., Mendriksen, PJM., van Lovere, H., Peijnenburg, ACM., Volger, OL.,

- (2013), Toxicogenomics-based identification of mechanisms for direct immunotoxicity. *Toxicol Sci* 135: 328-346. 10.1093/toxsci/kft151
- Schoene NW and Kamara KS. (1999), Population doubling time, phosphatase activity, and hydrogen peroxide generation in Jurkat cells. *Free Rad Biol Med* 27: 364- 369. 10.1016/s0891-5849(99)00074-x.
- Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., et al. (2011), An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological Sciences* 124: 359-369, 10.1093/toxsci/kfr237
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., et al. (1999), Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295,
- Thorne, N., Inglese, J., Auld, D.S. (2010), Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17: 646-657, 10.1016/j.chembiol.2010.05.012
- Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., et al. (2001), Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1286-1291, 10.1006/bbrc.2001.4254
- Viviani, V.R., Bechara, E.J., Ohmiya, Y. (1999), Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271-8279, 10.1021/bi9900830
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., et al. (1999), Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270: 41-49, 10.1006/abio.1999.4085
- Yasunaga, M., Nakajima, Y., et al. (2017), Continuous long-term cytotoxicity monitoring in 3D spheroids of beetle luciferase-expressing hepatocytes by nondestructive bioluminescence measurement. *BMC Biotechnol.* 17: 54, 10.1186/s12896-017-0374-1
- Ohmiya, Y. (2014), Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution. *Anal Bioanal Chem* 406: 5735-5742, 10.1007/s00216-014-7981-7
- Yasunaga, M., et al. (2017), Continuous long-term cytotoxicity monitoring in 3D spheroids of beetle luciferase-expressing hepatocytes by nondestructive bioluminescence measurement. *BMC Biotechnol.* 17: 54, 10.1186/s12896-017-0374-1

付録 I—定義

2H4 : IL-2 Luc アッセイで使用される IL-2 レポーター細胞株。ヒト急性 T リンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat に、SLG、SLO、SLR ルシフェラーゼ遺伝子がそれぞれ IL-2、IFN- γ 、GAPDH プロモーターの制御下で導入されたものである。

正確度 : 試験法の結果と、容認される基準値との間の一致の近さ。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一側面である。この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致度」と同義に用いられる。

AOP (有害性発現経路) : 分子レベルのイニシャルイベントから検討対象の in vivo 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象。

CV05 : Cell Viability (細胞生存率) 05 の略称。化学物質が Inh-GAPLA について 0.05 未満を示す最低濃度。

GAPLA : GAPDH プロモーターにより制御される安定化赤色発光ルシフェラーゼ (SLR : λ_{\max} = 630 nm) のルシフェラーゼ活性であり、細胞生存率および生細胞数を示す。

有害性 : 生命体、系、または (亜) 集団が曝露されると、悪影響を生じる可能性がある物質または状況に固有の性質。

IATA (試験および評価に関する統合的アプローチ) : ある化学物質または化学物質群の有害性特定 (可能性)、有害性の特性評価 (作用強度) および/または安全性評価 (可能性/作用強度および曝露) に使用される体系化されたアプローチであり、本アプローチでは、関連データすべての戦略的な統合および重み付けにより、さらなるターゲット設定の可能性としての有害性、リスクおよび/またはその必要性に関する規制上の意思決定情報を提示することから、試験の実施を最小限に抑えられる。

IFNLA : インターフェロン (IFN) - γ プロモーターにより制御される安定化橙色発光ルシフェラーゼ (SLO : λ_{\max} = 580 nm) のルシフェラーゼ活性。

II-SLR-LA : Inh-GAPLA への言及に関し、バリデーション報告書および過去の公表文献で使用された略語。定義については Inh-GAPLA を参照。

IL-2 (インターロイキン 2) : T リンパ球に由来し、T リンパ球、B リンパ球、単球およびナチュラルキラー細胞の活性化をもたらすサイトカイン。

IL2LA : IL-2 プロモーターにより制御される安定化緑色発光ルシフェラーゼ (SLG : λ_{\max} = 550 nm) のルシフェラーゼ活性。

Inh-GAPLA : GAPLA 阻害比のこと。化学物質で処理した 2H4 細胞の GAPLA を、未処理 2H4 細胞の GAPLA で除することにより得られ、化学物質の細胞毒性を表す。

最小誘導閾値（MIT）：化学物質が陽性の基準を満たす最低濃度。

混合物：互いに反応しない複数の物質からなる混合物または溶液。

単一成分物質：定量的組成によって定義され、1つの主成分を少なくとも80%（w/w）含有する物質。

多成分物質：定量的組成によって定義され、複数の主成分を10%（w/w）以上80%（w/w）未満の濃度で含有する物質。多成分物質は、製造工程の結果生じる。混合物と多成分物質の違いは、混合物が複数の物質を混ぜても化学反応を起こさずに得られることにある。多成分物質は、化学反応の結果生じる。

nIL2LA：GAPDHプロモーター活性（GALPA）を反映したSLRルシフェラーゼ活性により標準化された、IL-2プロモーター活性（IL2LA）を反映したSLGルシフェラーゼ活性。細胞生存率または細胞数を考慮した後のIL-2プロモーター活性を表す。

nSLG-LA：nIL2LAに言及したIL-2 Luc アッセイに関し、過去の公表文献で使用された略語。定義についてはnIL2LAを参照。

nSLO-LA：nIFNLAに言及したIL-2 Luc アッセイに関し、過去の公表文献で使用された略語。定義についてはnIFNLAを参照。

陽性対照：試験系のすべての構成要素を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理したレプリケート。陽性対照反応の経時的なばらつきを評価できるよう確保するには、陽性反応の大きさは過度にすべきではない。

妥当性：試験とその対象となる作用との関係、および、当該試験が特定の目的にとって有意義でかつ有用であるか否かに関する説明。その試験が、対象となる生物学的作用を正しく測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の正確度（一致度）を考慮に入れる。

信頼性：ある試験法が同一プロトコールを用いて実施された場合、試験実施施設内および試験実施施設間で経時的に再現性を示せる程度を表す尺度。施設内および施設間の再現性、ならびに施設内の反復性を算出することで評価される。

感度：試験により正しく分類されるすべての陽性/活性の化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確度を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な考慮事項である。

SLG-LA : IL2LA に言及した IL-2 Luc アッセイに関し、過去の公表文献で使用された略語。定義については IL2LA を参照。

SLO-LA : IFNLA に言及した IL-2 Luc アッセイに関し、過去の公表文献で使用された略語。定義については IFNLA を参照。

SLR-LA : GAPLA に言及した IL-2 Luc アッセイに関し、過去の公表文献で使用された略語。定義については GAPLA を参照。

溶剤/溶媒対照 : 被験化学物質を除く試験系のすべての構成要素を包含するが、使用する溶剤/溶媒は含んでいる未処理試料。同一の溶剤/溶媒中で溶解または安定的に分散した被験化学物質で処理した試料について、ベースラインにおける反応を確立するのに用いられる。同時培地対照を用いた試験の場合、本試料から、溶剤/溶媒と試験系との相互作用の有無も立証される。

特異度 : 試験により正しく分類されるすべての陰性/不活性の化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確度を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な考慮事項である。

物質 : 自然の状態の、または任意の製造過程により得られる化学元素とその化合物。その製品の安定性を保つために必要な添加物や、使用過程由来の不純物はいずれも含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離される可能性のある溶剤はいずれも除く。

被験化学物質 : 「被験化学物質」という用語は、試験の対象物を指す場合に用いられる。

UVCB : 組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料。

妥当な試験法 : 特定の目的に対して十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原理に基づいている試験法。試験法が絶対的な意味で妥当というわけではなく、定義された目的に関してのみ妥当ということである。

付録 II—SLG、SLO、SLR 用光学フィルターのルシフェラーゼ活性測定および透過係数決定の原理

Multi Reporter Assay System-Tripluc は、2 種類以上の光学フィルターを内蔵できるマルチカラー検出システムを備えたマイクロプレート用ルミノメーター（例：Phelios AB-2350 [アトー社]、ARVO [パーキンエルマー社]、Tristar LB941 [ベルトールド社]）と共に使用できる。測定に用いられる光学フィルターの例には、560 nm ロングパスフィルターおよび 600 nm ロングパスフィルターが挙げられる。

(1) 2 枚の光学フィルターによる 3 色ルシフェラーゼの測定

ここでは、Phelios AB-2350（アトー社）の使用例を示す。本ルミノメーターには、光分離用の 560 nm ロングパス（LP）フィルター（560 nm LP、フィルター1）と 600 nm ロングパスフィルター（600 nm LP、フィルター2）が内蔵されている。

まず、SLG（ $\lambda_{\max} = 550$ nm）、SLO（ $\lambda_{\max} = 580$ nm）、SLR（ $\lambda_{\max} = 630$ nm）の遺伝子組換え酵素ルシフェラーゼを用い、i) フィルターなしの光強度（全光）、ii) 560 nm LP（フィルター1）の透過光強度、iii) 600 nm LP（フィルター2）の透過光強度を測定し、下記の透過係数を算出する。

表.ルシフェラーゼアッセイにおけるパラメータの定義

透過係数		略語	定義
SLG	フィルター1 透過係数	K_{GR56}	560 nm LP（フィルター1）を透過した SLG の発光強度/フィルターなしの SLG（全光）の発光強度
	フィルター2 透過係数	K_{GR60}	600 nm LP（フィルター2）を透過した SLG の発光強度/フィルターなしの SLG（全光）の発光強度
SLO	フィルター1 透過係数	K_{OR56}	560 nm LP（フィルター1）を透過した SLO の発光強度/フィルターなしの SLO（全光）の発光強度
	フィルター2 透過係数	K_{OR60}	600 nm LP（フィルター2）を透過した SLO の発光強度/フィルターなしの SLO（全光）の発光強度
SLR	フィルター1 透過係数	K_{RR56}	560 nm LP（フィルター1）を透過した SLR の発光強度/フィルターなしの SLR（全光）の発光強度
	フィルター2 透過係数	K_{RR60}	600 nm LP（フィルター2）を透過した SLR の発光強度/フィルターなしの SLR（全光）の発光強度

試験試料中の SLG、SLO、SLR の発光強度をそれぞれ G、O、R と定義した場合、i) フィルターなし（全光）の発光強度：F0、ii) 560 nm LP（フィルター1）の透過光強度：F1、iii) 600 nm LP（フィルター2）の透過光強度：F2 は以下のとおり記述される。

$$F0 = G + O + R$$

$$F1 = K_{GR56} \times G + K_{OR56} \times O + K_{RR56} \times R$$

$$F2 = K_{GR60} \times G + K_{OR60} \times O + K_{RR60} \times R$$

これらの式は、以下のとおり書き換えることができる。

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

次に、算出された透過係数および測定された F0、F1、F2 を用いて、次のとおり G、O、R の値を算出できる。

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

透過率を決定するための材料および方法

(1) 試薬

・単回精製遺伝子組換え酵素ルシフェラーゼ：

凍結乾燥精製酵素 SLG

凍結乾燥精製酵素 SLO

凍結乾燥精製酵素 SLR

（バリデーション作業に関するこれらの試薬は、Biospecimen Laboratories, Inc. (<https://reporter-assay.com/>)（日本）から、2H4 細胞株と共に入手した）

・アッセイ試薬：

（例えば、東洋紡社製カタログ番号 MRA-301）Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬

・培地：ルシフェラーゼアッセイ用 10% FBS 含有 RPMI-1640（30 mL、2～8°C で保存）

(2) 酵素溶液の調製

凍結乾燥精製酵素ルシフェラーゼを、試験管中で 10%（w/v）グリセロールを補充した 10～100 mM Tris/HCl または HEPES/HCl（pH 7.5～8.0）200 μL の添加により溶解し、この酵素溶液を 10 μL ずつ 1.5 mL の使い捨て試験管に分注し、-80°C の冷凍庫で保存する。凍結酵素溶液は最大 6 ヶ月間使用できる。使用する場合、酵素溶液（酵素希釈液）含有試験管ごとにルシフェラーゼアッセイ用培地（10% FBS 含有 RPMI-1640）1 mL を添加し、失活しないよう氷冷する。

(3) 生物発光測定

Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬（Tripluc）を解凍し、ウォーターバスに入れるか静置により室温を保つ。光電子増倍管が安定できるよう、測定開始 30 分前にルミノメーターの電源を入れる。酵素希釈液 100 μL を 96 ウェル黒色プレート（平底）（SLG 標準試料を #B1、#B2、#B3、SLO 標準試料を #D1、#D2、#D3、SLR 標準試料を #F1、#F2、#F3）に分注する。次に、ピペットを用いて、予め加温された Tripluc 100 μL を酵素希釈液含有プレートの各ウェルに分注する。プレート振とう機を用いて室温（約 25°C）で 10 分間プレートを振とうする。ウェル内の溶液に気泡が出現した場合には除去する。プレートをルミノメーターに静置し、ルシフェラーゼ活性を測定する。光学フィルターの非存在下（F0）および存在下（F1、F2）で各 3 秒間生物発光を測定する。

光学フィルターの透過係数は以下のとおり算出した。

透過係数（SLG（ κG_{R56} ））=（F1 の #B1 + F1 の #B2 + F1 の #B3） / （F0 の #B1 + F0 の #B2 + F0 の #B3）

透過係数（SLO（ κO_{R56} ））=（F1 の #D1 + F1 の #D2 + F1 の #D3） / （F0 の #D1 + F0 の #D2 + F0 の #D3）

透過係数（SLR（ κR_{R56} ））=（F1 の #F1 + F1 の #F2 + F1 の #F3） / （F0 の #F1 + F0 の #F2 + F0 の #F3）

透過係数（SLG（ κG_{R60} ））=（F2 の #B1 + F2 の #B2 + F2 の #B3） / （F0 の #B1 + F0 の #B2 + F0 の #B3）

透過係数 (SLO (k_{OR60})) = (F2 の #D1 + F2 の #D2 + F2 の #D3) / (F0 の #D1 + F0 の #D2 + F0 の #D3)

透過係数 (SLR (k_{R60})) = (F2 の #F1 + F2 の #F2 + F2 の #F3) / (F0 の #F1 + F0 の #F2 + F0 の #F3)

同一のルミノメーターにより実行されたすべての測定には、算出された透過係数が使用される。

機器の品質管理

IL-2 Luc アッセイプロトコール記載の手順を使用すべきである (JaCVAM, 2020c)。

付録 III—習熟度確認物質

表 1 : IL-2 Luc アッセイでの技術的習熟度の立証に推奨される物質

No.	化学物質名	CAS 番号	T 細胞標 的化	物理的状 態	基準範囲 (µg/mL) CV05 ¹	基準範囲 (µg/mL) MIT ²
1	デキサメタゾン	50-02-2	あり	固体	>2000	16-63
2	シクロスポリン	59865-13-3	あり	固体	>1	0.002-0.006
3	酢酸鉛(II)三水和物	6080-56-4	あり	固体	>2000	31-63
4	インドメタシン	53-86-1	あり	固体	500-2000	16-63
5	ペルフルオロオクタン酸	335-67-1	あり	固体	250-1000	8-31
6	塩化トリブチルスズ	1461-22-9	あり	液体	0.5-1.0	0.12-0.24
7	ジメチルジチオカルバミン 酸亜鉛 (DMDTC)	137-30-4	なし	固体	1-4	>2000
8	マンニトール	69-65-8	なし	固体	>2000	>2000
9	アセトニトリル	75-05-8	なし	液体	>2000	>2000

略語：CAS 番号：ケミカル・アブストラクト・サービス登録番号

¹ CV05：化学物質が Inh-GAPLA について 0.05 未満を示す最低濃度。² MIT：化学物質が陽性の基準を満たす最低濃度。

表 2 : IL-2 Luc LTT アッセイでの技術的習熟度の立証に推奨される物質

No.	化学物質名	CAS 番号	T 細胞標 的化	有糸分裂 阻害性	物理的状 態	基準範囲 (µg/mL) CV051	基準範囲 (µg/mL) MIT2
1	ミコフェノール酸	24280-93-1	あり	あり	固体	>200	0.05-2
2	インドメタシン	53-86-1	あり	あり	固体	100->200	6-25
3	5-FU	51-21-8	あり	あり	固体	>100	0.4-1.6
4	コルヒチン	64-86-8	あり	あり	固体	200->200	0.003- 0.012
5	ペルフルオロオクタン酸	335-67-1	あり	あり	固体	100-200	6.3-25
6	エトポシド	33419-42-0	あり	あり	固体	>200	0.4-1.6
7	シクロスポリン A	59865-13-3	あり	なし	固体	>200	>200
8	カルバミン酸メチル	598-55-0	あり	なし	固体	>200	>200
9	ニコチンアミド (NA)	98-92-0	なし	なし	固体	>200	>200

10	ジクロロ酢酸	79-43-6	なし	なし	液体	>200	>200
----	--------	---------	----	----	----	------	------

付録 IV—両試験法における被験化学物質の溶解

図 1 溶媒による溶解

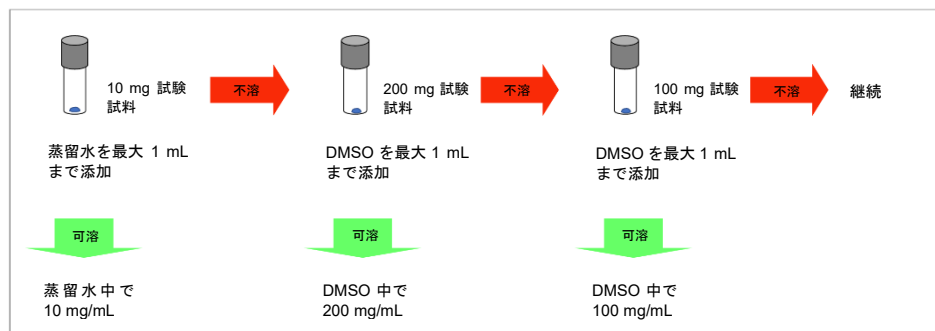


図 2. 化学物質を蒸留水で 10 mg/mL に調製する場合の両試験法における手順の図解

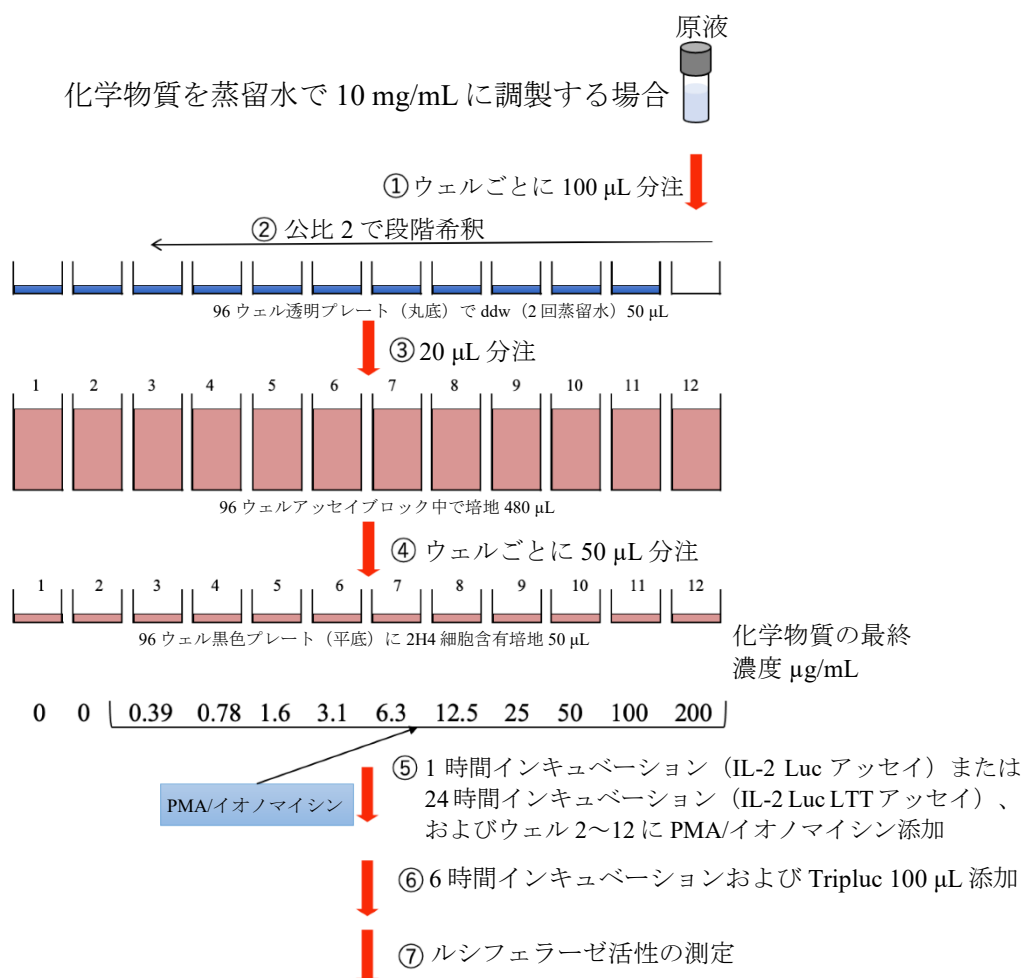


図 3 化学物質を DMSO で 200 mg/mL に調製する場合の両試験法における手順の図解

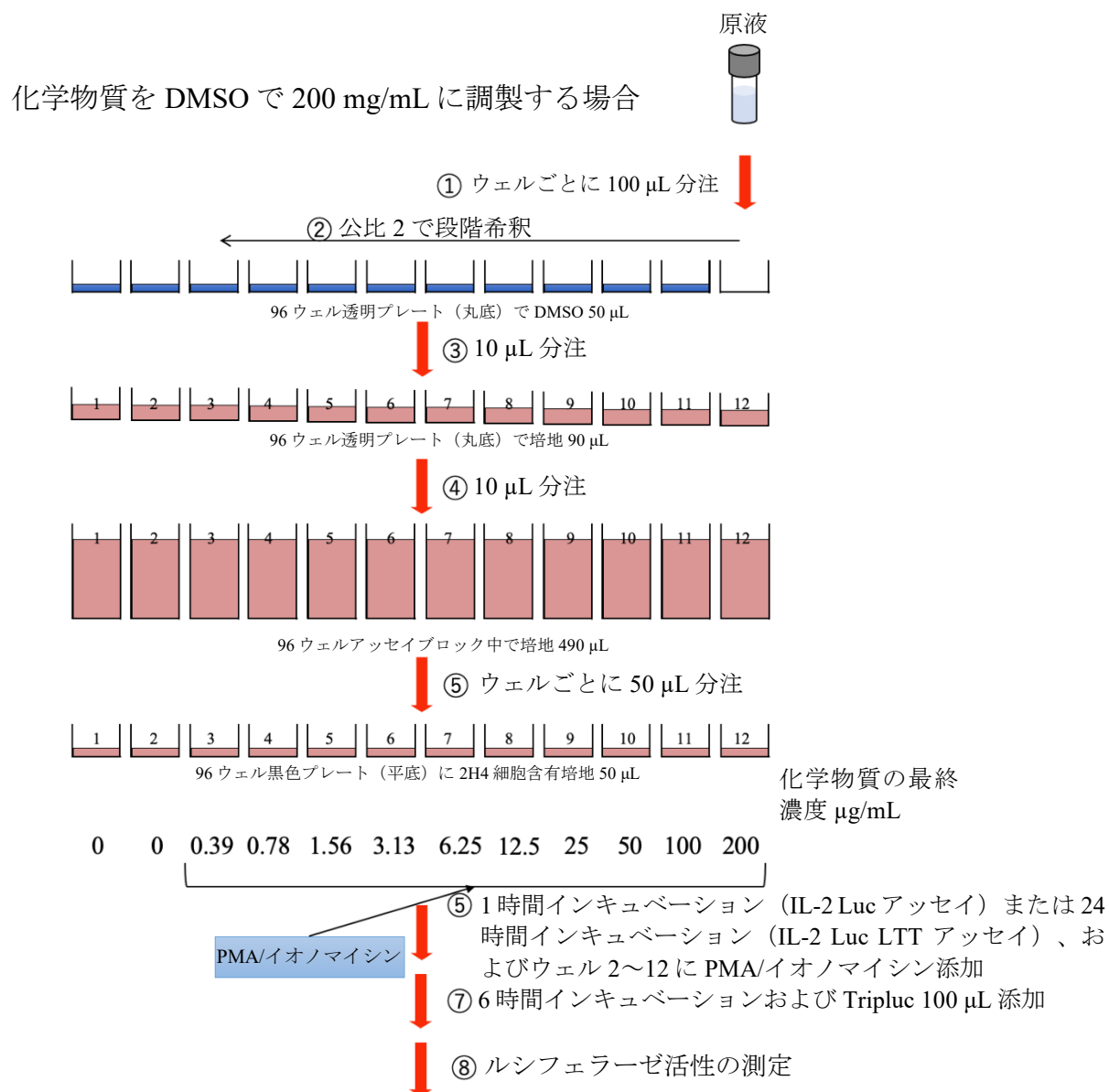
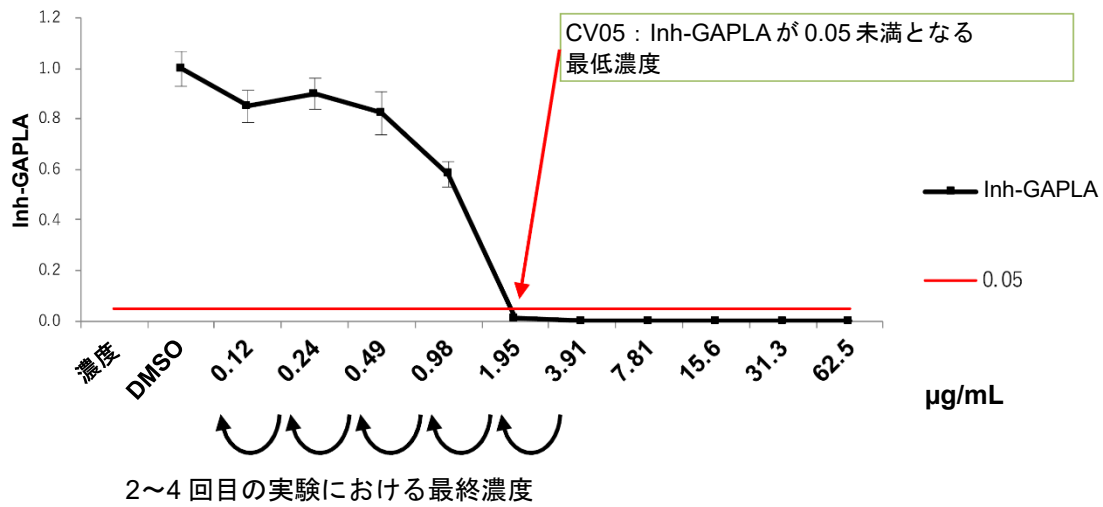


図 4 後続のテストラン（すなわち、2 回目および 3 回目のラン）における被験化学物質の濃度決定



付録 V—抑制に関する指数の算出

IL2LA

i 番目の濃度 (i : 0~10) の j 番目の反復結果 (j : 1~4) を、IL2LA および GAPLA についてそれぞれ測定する。標準化した IL2LA を nIL2LA と称し、以下のとおり定義する。

$$nIL2LA_{ij} = IL2LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

これが、本試験法の基本的な尺度に当たる。

抑制率

抑制率は、0 番目の濃度と比較した i 番目の濃度の反復結果における nIL2LA の平均値に関する指標であり、本試験法の主要な尺度に当たる。抑制率は、以下の式により表せる。

$$\text{抑制率}_i = \left\{ 1 - \frac{\left(\frac{1}{4}\right) \sum_i nIL2LA_{ij}}{\left(\frac{1}{4}\right) \sum_i nIL2LA_{0j}} \right\} \times 100 \quad (1)$$

試験実施主導施設は、±35 の値であれば、被験化学物質に抑制および刺激を有することが示唆されると提唱している。この値は、試験実施主導施設の背景データの調査に基づいている。データマネジメントチームは、現バリデーション試験のすべての段階を通じ、この値の使用に関する追跡調査を行った。

主要な評価項目である抑制率は、式(1)に示すとおり、基本的には 2 つの nIL2LA の算術平均値の比である。i 番目の濃度に関する抑制率の 95%信頼区間 (95% CI) が推定できる。

95% CI 下限が 0 を上回ると、i 番目の濃度での nIL2LA は 0 番目の濃度よりも統計学的に有意に大であると解釈されるのに対し、95% CI 上限が 0 を下回ると、i 番目の濃度での nIL2LA は 0 番目の濃度よりも統計学的に有意に小であると解釈される。

95% CI の構築方法は複数に及ぶ。本試験では、デルタ法として知られる方法を用いた。この 95%信頼区間の定理は、以下の式から得られる。

$$\text{抑制率} \pm 100 \times \left\{ z_{0.975} \times \sqrt{\frac{sd_i^2}{\text{平均値}} + \frac{\text{平均値} \times sd_0^2}{\text{平均値}}} \right\},$$

ここで、平均値_i は i 番目の濃度での nIL2LA の平均値、平均値₀ は 0 番目の濃度での nIL2LA の平均値、sd_i は i 番目の濃度での nIL2LA の標準偏差、sd₀ は 0 番目の濃度での nIL2LA の標準偏差である。Z_{0.975} は、標準正規分布の 97.5 パーセンタイルである。

Inh-GAPLA

Inh-GAPLA は、i 番目の濃度の反復結果における GAPLA の平均値に対する 0 番目の濃度の場合との比であり、以下の式で表される。

$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum \text{GAPLA}_{0j} \right\}$$

GAPLA は nIL2LA の分母であるため、GAPLA の値が極めて小さいと、nIL2LA には大きなばらつきが生じると考えられる。したがって、Inh-GAPLA の値が極めて小さい i 番目の抑制率の値は、低い精度であることが考えられる。

IL-2 Luc アッセイの各実験での「抑制性」または「影響なし」の判断

陽性作用（抑制性か刺激性のいずれか）の判断基準は「データの評価」の項の段落 60 に提示されており、バリデーション報告書の付録 17 から抜粋した以下の図 1 に示す。

段落 60 によれば、実験で次の 3 つの基準すべてを満たす場合に陽性と判断される。

1. 抑制率の平均値が 35 以上（抑制性）であり、統計学的に有意である。統計学的有意性は、その 95%信頼区間により判断する。
2. 評価項目が、複数回連続して統計学的に有意な結果（上昇）を示す。あるいは、統計学的に有意な結果（上昇）が 1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、用量依存的な傾向）を伴う。この場合、その傾向はゼロ線と交差しうるが、ゼロ線の反対側にあるデータポイントが逆の影響について統計学的に有意にはならない。
3. Inh-GAPLA が 0.05 以上である濃度範囲での入手データのみを用いて、結果を判断している。

陽性（抑制性か刺激性のいずれか）と判断される代表的なグラフを以下に示す。

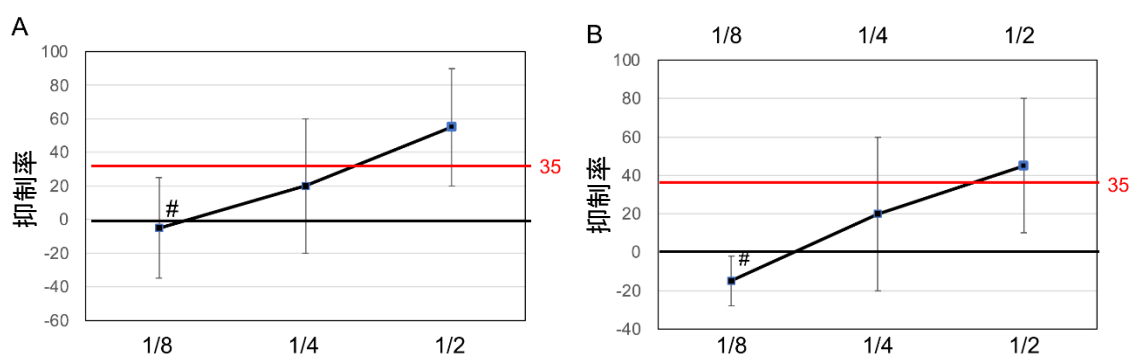


図 1. 陽性のデータポイント（上昇）1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向を示す 2 つのパターン

x 軸は化学物質の濃度を表し、y 軸は抑制率を表す。各プロットは、4 回の測定から得られた抑制率の値とその 95%信頼区間である。赤線は 35 を示す。すべてのグラフは、陽性のデータポイント（上昇または低下）1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、濃度依存的な傾向）を示し、その傾向はゼロ線と交差する。A は反対の反応を示すデータポイント（#）の 95%信頼区間が 0 と交差する

ため、抑制性と判断される。一方、B は反対の反応を示すデータポイント（#）の 95%信頼区間が 0 と交差しなため、影響なしと判断される。

IL-2 Luc LTT アッセイの各実験での「有糸分裂阻害性あり」、「不確定」、または「有糸分裂阻害性なし」の判断

各ランにおいて、Min Inh-GAPLA が 0.7 未満であることに加え、以下の 3 つの基準をすべて満たした場合、被験化学物質は有糸分裂阻害性ありと判断される。それ以外の場合には、暫定的に有糸分裂阻害性なしと判断される。

- (1) 抑制率の平均値が-35 以下（刺激性）であり、統計学的に有意である。抑制率の 95%信頼区間上限が 0 未満である場合、統計学的に有意であると判断する。
- (2) 評価項目が、複数回連続して統計学的に有意な刺激性ありの結果を示す。あるいは、統計学的に有意な刺激性ありの結果が 1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、用量依存的な傾向）を伴う。この場合、その傾向はゼロ線と交差しうるが、ゼロ線の反対側にあるデータポイントが逆の影響について統計学的に有意にはならない。抑制率の 95%信頼区間上限が 0 未満である場合、統計学的に有意であると判断する。
- (3) Inh-GAPLA が 0.05 以上である濃度範囲での入手データのみを用いて、結果を判断している。

以下 2 つの代表的なグラフにおいて、データが統計学的に有意な刺激性ありの結果を 1 つのみと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向を示した場合の判断について説明する。

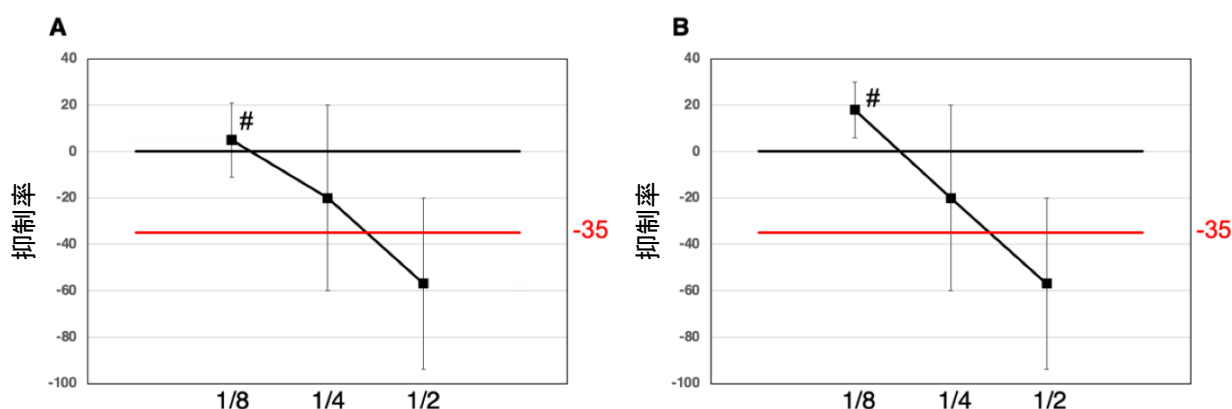


図 2. IL-2 Luc LTT アッセイにおいて、陽性のデータポイント 1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向を示す 2 つのパターン

x 軸は化学物質の濃度を表し、y 軸は抑制率を表す。各プロットは、4 回のテクニカルレプリケートから得られた抑制率の値とその 95%信頼区間である。赤線は-35 を示す。2 つのグラフは、陽性のデータポイント 1 つと、連続 3 つ以上のデータポイントで同一の傾向（すなわち、濃度依存的な傾向）を示し、その傾向はゼロ線と交差する。A は反対の反応を示すデータポイント（#）の 95%信頼区間が 0 と交差するため、陽性と判断される。一方、B は反対の反応を示すデータポイント（#）の 95%信頼区間が 0 と交差しなため、陰性と判断される。

暫定的に有糸分裂阻害性なしと判断される化学物質のうち、統計学的に有意な抑制性のデータポイント（抑制率の平均値が 35 以上）も刺激性のデータポイント（抑制率の平均値が-35 以下）も示さず、Min Inh-GAPLA が 0.7 以上を示し、かつ蒸留水中 10 mg/mL で不溶である化学物質は、培地中での作用を示すのに十分な濃度では溶媒に溶解しない可能性があるため、不確定であると判断される。それ以外の場合には、有糸分裂阻害性なしと判断される。その基準について、図 3 に図示する。

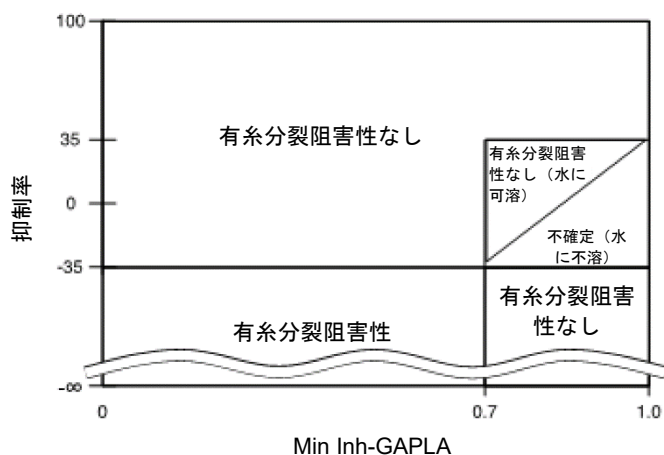


図 3.有糸分裂阻害性あり、有糸分裂阻害性なし、または不確定の判定基準