

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和5年度 分担研究報告書

化学物質の呼吸器感作性試験法の開発

研究分担者 善本 隆之

東京医科大学 医学総合研究所 免疫制御研究部門 教授

研究要旨

呼吸器感作性を評価するシステムを構築することは世界的にも急務となっており、私たちはこれまでの研究の蓄積から、新たに低分子化学物質の呼吸器感作性を評価できる *in vitro* 評価系、特に AOP の KE3 に相当する評価系の構築を目指してきた。今回、皮膚感作性として知られている 11 種類、呼吸器感作性として知られている 9 種類の物質を用いて評価系として機能し得るかを試みたところ、定量 RT-PCR での CD80 または CD86 の発現を指標に呼吸器感作性物質の感作性の有無を評価できるだけでなく、さらには TNFSF4 (OX40L) の発現を指標に皮膚感作性と呼吸器感作性を識別可能なカットオフ値を推定し、感度 88.89%、特異度 90.09%、正確度 90%、バランス正確度 89.9% の評価系として機能し得ることがわかった。また、今回の結果から、まだ呼吸器感作性を有することが知られていない低分子化学物質の潜在性を見出す可能性も示唆された。

A. 研究目的

これまでに皮膚感作に関しては LLNA などの *in vivo* 評価系や、また動物実験代替法として、有害発現経路 (AOP) のそれぞれの key event (KE) にあたる DPRA (または ADRA)、KeratinSens、h-CLAT などの *in vitro* 評価系など OECD のテストガイドラインとして確率されている。しかし、工業用塗料や樹脂などの製造に使用される低分子化学物質は呼吸器感作性を引き起こすことが臨床的知見によって多くの報告が存在しているにも関わらず、依然として適切な *in vivo* 評価系も、また動物実験代替法も全く確立されていないのが現状である。そこで、呼吸器感作性を評価するシステムを構築することは世界的にも急務となっており、私たちはこれまでの研究の蓄積から新たに低分子化学物質の呼吸器感作性を評価できる

in vitro 評価系、特に AOP の KE3 に相当する評価系の構築を目指してきた。そして、その評価系の構築にある程度の目途がついたので、今回、皮膚感作性として知られている 11 種類、呼吸器感作性として知られている 9 種類の物質を用いて評価系として機能し得るかを試みた。

B. 研究方法

まず、気道上皮細胞株 (BEAS-2B) と単球由来細胞株 (CD14-ML) から樹状細胞株 (CD14-MLDC) への分化を Alvetex scaffold 上で 3 次元培養を 2 日間それぞれ別々に行い、その後それぞれの scaffold を気道上皮細胞 (BEAS-2B) を上側、樹状細胞株 (CD14-MLD) を下側にして重ね合わせ気道上皮の構造を *in vitro* で模式的に構築し一晩培養した。3 日目にすべての培養

上清を一度取り除き、上方から 10% DMSO in 10% FBS/MEM で溶解した感作性低分子化学物質を濃度 2 倍の範囲内で 4 段階の濃度でそれぞれ 25 μ L ずつ添加した。添加後 20 分静置し、2.5 mL の medium を加え、8 時間そのまま 37°C で培養する。8 時間培養後、樹状細胞株 (CD14-MLDC) の scaffold のみ回収し、樹状細胞株 (CD14-MLDC) から RNA を抽出し、定量 RT-PCR でマーカーの発現量を検出した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

皮膚感作性物質 11 種類、呼吸器感作性物質 9 種類について、私たちが今回考案した 3 次元共培養系を用いて *in vitro* 感作性試験を行い、定量 PCR で樹状細胞株 (CD14-MLDC) での HPRT、CD80、CD86、TNFSF4 (OX40L)、CRLF2 (TSLPR)、IL7R、IL17RB、ST2 の発現を検出した (表 1a, b)。それぞれの低分子化学物質を濃度 2 倍の範囲内で 4 段階の濃度で樹状細胞株 (CD14-MLDC) を刺激した時に、感作の判断基準を CD80 および CD86 の発現量が溶媒コントロールでの刺激に比べて相対比 1 以上になる濃度が存在することとした (表 1a, b, 図 1)。CD80 または CD86 のどちらかの値が 1 以上ときに他の遺伝子 TNFSF4 (OX40L)、CRLF2 (TSLPR)、IL7R、IL17RB、ST2 の発現を比較した (図 2)。その結果 TNFSF4 (OX40L) の発現において皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質と相対定量での閾値を 2.57 と設定すると、『皮膚感作性物質 < 2.57 < 呼吸感作性物質』として区別可能であり (図 2)、感度 88.89%、特異度 90.09%、正確度 90%、バランス正確度 89.9% で皮膚、呼吸器感作性物質を高確率で識別可能である (表 2, 3)。また、

TNFSF4 (OX40L) の値を CD80、CD86 の値で補正した場合も同様の結果が得られた (表 2, 3, 図 2)。いずれの場合においても皮膚感作性と考えられている Isoeugenol が呼吸器感作性、呼吸器感作性と考えられている TDI が皮膚感作性と判定される結果となった (表 3)。また、今回、皮膚感作性物質として構造異性体の関係である Eugenol (EU) と Isoeugenol (IEU) を用いたところ、TNFSF4 (OX40L) 発現量に差が見られた (表 1a, b, 図 3)。

D. 考察

呼吸器感作を引き起こす低分子化学物質は 1970 年代から 1980 年代にかけて、強度、弾性、耐久性などに優れているため断熱材や接着剤などポリウレタンの原料として使用されるイソシアネートを含む物質が喘息などの呼吸器系のアレルギーを引き起こす物質として臨床的な問題として数多く報告された。また同様に塗料や接着剤などのエポキシ樹脂の原料として使用される酸無水物も同様に呼吸器疾患を引き起こす物質として報告された。

これら呼吸器に影響を及ぼすと考えられる化学物質の感作性試験法が開発されてこなかった理由として、第一に呼吸器感作物質が水と激しく反応し、分解されやすいこと、さらに、皮膚と異なり呼吸器系への暴露を再現することが困難であることが考えられる。今回、私たちはこれまでに発表した論文において皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を区別可能な *in vitro* 評価系を構築しており、その系を用いて代表的な皮膚感作性物質 11 種類と呼吸器感作性物質 9 種類を評価した。

まず、皮膚感作性および呼吸器感作性物質のいずれの物質においても CD80 または CD86 のどちらか一方が 1 以上であること、

つまり感作性があることを前提として、かつ5種類のマーカー遺伝子の発現を調べたところ TNFSF4 (OX40L) において CD80、CD86 の発現で補正する前においては 10%DMSO/10%FBS/MEM コントロールでの発現量に対しては皮膚感作性物質 < 2.57 < 呼吸器感作性物質であり、また CD80、CD86 の発現で補正 TNFSF4 (OX40L) を CD80、CD86 の発現量で割った後においてはそれぞれ、皮膚感作性物質 < 1.92 < 呼吸器感作性物質、皮膚感作性物質 < 2.15 < 呼吸器感作性物質で区別され、感度 88.89%、特異度 90.09%の結果が得られた。

今回、化学物質の溶解に使用した溶媒は最初に DMSO で溶解したのちに、10%FBS/MEM で10分の1以下に希釈して20分反応させたが、特に呼吸器感作性物質に関しては 10%FBS/MEM で10分の1以下に希釈時に析出しやすいものや、加水分解されていると考えられるものなど、比較的高濃度で反応させないと感作性を示さないものなどが多かった。特にイソシアネート類は MDI においては 10% DMSO/10% FBS/MEM の希釈時に完全に不溶性になってしまい、TDI においては TNFSF4 (OX40L) の発現上昇が認められなかった。そこで溶媒を例えば脱水処理した DMSO や Acetone/Olive Oil (AOO) を用いるなど、さらなる工夫が必要あると考えられる。

また、皮膚感作性物質として知られている Eugenol の構造異性体である Isoeugenol も皮膚感作性物質として考えられているが、今回、この *in vitro* 試験法の結果から呼吸器感作性を有している可能性が示唆された。この結果から物質の化学構造からおおよその感作性を推測できる可能性があることも示唆している。

今後は、私たちが今回開発した技術を別

のラボに技術移転し、今回得られた結果を再現できるようにしていく予定である。

E. 結論

今回私たちが開発した新規 *in vitro* 代替法によって、これまでに皆無であった呼吸器感作性を検出できる実験系が構築できた。さらに、感度、特異度から皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を高確率で識別可能あることが示唆された。また、これまで、皮膚感作性物質と考えられていた物質に、新たに呼吸器感作の誘導能を検出できる可能性も示唆された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Tanabe I, Yoshida K, Ishikawa S, Ishimori K, Hashizume T, Yoshimot I, Ashikaga T. Development of an *in vitro* sensitization test using a coculture system of human bronchial epithelium. *Altern Lab Anim.* 2023 Nov;51(6):387-400. doi:10.1177/02611929231204823.E pub 2023 Oct 5.
2. Sakamoto E, Katahira Y, Watanabe A, Furusaka Y, Sekine A, Yamagishi M, Sonoda J, Miyakawa S, Inoue S, Hasegawa H, Yo K, Yamaji F, Toyoda T, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Chemical- and Drug-Induced Allergic, Inflammatory, and Autoimmune Diseases via Haptenation. *Biology (Basel).* 2023 Jan 12;12(1):123. doi: 10.3390/biology12010123.
3. Mizoguchi I, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Watanabe A, Furusaka Y, Irie A, Senju S, Nishimura Y, Mizukami S,

Hirayama K, Nakamura S, Eto K, Hasegawa H, and Yoshimoto T. A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells. ALTEX. 2023 40(2):204-216. doi: 10.14573/altex.2111181. Epub 2022 Feb 24.

F.2 学会発表

1. 溝口出、片平泰弘、長谷川英哲、渡邊有麻、関根碧水、園田寿樹心、山岸美宇、善本隆之：呼吸器と皮膚感作性物質の識別を可能にする Th2 細胞株を応用した改良版 2 ステップ DC/T 共培養系の開発、第 36 回日本動物実験代替法学会 (2023) 11 月 27-29 日、千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

Skin sensitizers (11 test chemicals)	Chemical dose (%)	CD80	Chemical dose (%)	CD86	Chemical dose (%)	TNFSF4	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose (%)	CRLF2	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)	0.032	1.23	0.032	1.16	0.040	1.31	1.06	1.13	0.040	1.47	1.20	1.27
1,4-Benzquinone (BQ)	0.025	1.28	0.025	1.15	0.032	1.33	1.04	1.16	0.040	2.19	1.71	1.91
4-Nitrobenzylbromide (NBB)	0.040	1.44	0.050	1.42	0.080	2.46	1.71	1.73	0.050	6.19	4.29	4.35
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	0.40	1.16	0.32	0.74	0.32	1.04	0.90	1.40	0.32	3.05	2.64	4.14
Isoeugenol (IEU)	0.80	2.62	0.80	1.20	1.6	15.89	6.06	13.27	0.80	7.06	2.69	5.90
Eugenol (EU)	0.50	2.00	0.50	1.19	1.0	2.23	1.12	1.88	0.64	4.89	2.45	4.11
Phenyl benzoate (PB)	0.32	1.87	0.32	0.88	0.32	1.82	0.97	2.07	0.32	1.54	0.82	1.75
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)	2.0	0.95	2.0	1.17	2.0	1.79	1.88	1.53	2.0	3.86	4.06	3.29
Butyl Glycidyl Ether (BGE)	0.080	1.93	0.080	1.36	0.13	1.88	0.97	1.39	0.10	2.20	1.14	1.62
Oxazolone (OXA)	0.80	1.56	1.0	1.35	0.80	2.04	1.31	1.52	1.0	4.89	3.14	3.63
Foramide (FA)	0.080	1.59	0.080	1.34	0.10	1.97	1.24	1.47	0.080	1.52	0.96	1.13
Skin sensitizers (11 test chemicals)												
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)	0.050	1.39	1.13	1.20	0.032	1.07	0.87	0.92	0.050	2.38	1.93	2.04
1,4-Benzquinone (BQ)	0.032	1.09	0.85	0.95	0.050	1.47	1.15	1.28	0.032	3.41	2.66	2.97
4-Nitrobenzylbromide (NBB)	0.050	1.21	0.84	0.85	0.050	3.05	2.11	2.14	0.040	18.13	12.55	12.73
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	0.32	1.43	1.24	1.95	0.32	1.52	1.31	2.06	0.25	1.11	0.96	1.51
Isoeugenol (IEU)	0.80	3.10	1.18	2.58	1.6	1.60	0.61	1.34	1.3	0.99	0.38	0.83
Eugenol (EU)	0.80	2.11	1.06	1.78	1.0	1.28	0.64	1.08	0.80	1.54	0.77	1.29
Phenyl benzoate (PB)	0.25	2.01	1.08	2.30	0.25	1.26	0.67	1.43	0.25	0.76	0.41	0.87
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)	2.0	0.68	0.71	0.58	2.0	1.04	1.09	0.88	1.6	0.67	0.70	0.57
Butyl Glycidyl Ether (BGE)	0.080	2.91	1.51	2.14	0.16	0.89	0.46	0.66	0.13	0.61	0.32	0.45
Oxazolone (OXA)	0.64	1.13	0.73	0.84	1.0	2.00	1.28	1.48	0.80	2.75	1.77	2.04
Foramide (FA)	0.10	0.44	0.28	0.33	0.10	1.32	0.83	0.99	0.064	1.42	0.89	1.06

表 1a. 皮膚感作性物質 (11 種類) で刺激時に、溶媒コントール (10% DMSO) 刺激時の各遺伝子の発現を 1 としたときの 7 種類の遺伝子の相対的遺伝子遺伝子発現。青字の部分は TNFSF4, CRLF2, IL7R, IL17RB, ST2 の 5 種類遺伝子をさらに CD80, CD86 の値で補正したときの値。

Respiratory sensitizers (9 test chemicals)		Chemical dose (%)	CD80	Chemical dose (%)	CD86	Chemical dose (%)	TNFSF4	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose (%)	CRLF2	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
Trimellitic anhydride (TMA)	1.0	2.08	1.6	1.22	1.6	12.20	5.87	10.00	1.6	2.16	1.04	1.77	
Hexamethylene diisocyanate (HDI)	1.3	1.65	1.3	1.56	1.3	5.04	3.05	3.23	1.6	9.48	5.75	6.08	
Chloramine T (Ch-T)	0.80	1.44	0.80	1.39	0.80	3.56	2.46	2.55	0.80	4.00	2.77	2.87	
Piperazine anhydride (PZA)	1.3	1.65	1.3	1.69	1.0	4.06	2.46	2.39	1.0	4.03	2.45	2.38	
Hexahydro phthalic anhydride (HHPA)	1.3	1.37	1.6	1.04	2.0	2.68	1.96	2.57	1.6	1.04	0.76	1.00	
Toluene diisocyanate (TDI)	1.0	1.58	2.0	1.31	2.0	1.10	0.70	0.84	2.0	2.17	1.38	1.66	
Glutaraldehyde (GA)	0.10	0.66	0.13	1.21	0.10	2.71	4.14	2.23	0.10	2.97	4.53	2.45	
Methyltetrahydrophthalic anhydride (MTHPA)	2.5	1.28	4.0	0.91	4.0	14.03	10.93	15.45	2.5	2.73	2.13	3.01	
Ortho-phthalaldehyde (OPA)	0.20	1.62	0.25	1.47	0.25	4.00	2.46	2.71	0.16	4.69	2.89	3.18	
Respiratory sensitizers (9 test chemicals)													
	Chemical dose (%)	IL7R	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose (%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose (%)	ST2	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)	
Trimellitic anhydride (TMA)	1.6	2.06	0.99	1.69	1.0	1.66	0.80	1.36	1.6	4.71	2.26	3.86	
Hexamethylene diisocyanate (HDI)	1.6	1.31	0.79	0.84	1.6	0.93	0.56	0.59	1.6	5.72	3.47	3.67	
Chloramine T (Ch-T)	0.80	2.43	1.68	1.74	0.80	1.66	1.15	1.19	0.80	5.28	3.66	3.78	
Piperazine anhydride (PZA)	1.3	2.85	1.73	1.68	1.3	1.92	1.16	1.13	1.3	30.27	18.38	17.88	
Hexahydro phthalic anhydride (HHPA)	1.6	1.34	0.98	1.28	1.6	1.01	0.74	0.97	2.0	2.04	1.49	1.96	
Toluene diisocyanate (TDI)	2.0	1.48	0.94	1.13	1.0	1.66	1.05	1.27	2.0	1.41	0.90	1.08	
Glutaraldehyde (GA)	0.10	0.46	0.70	0.38	0.13	1.01	1.55	0.84	0.20	0.95	1.45	0.78	
Methyltetrahydrophthalic anhydride (MTHPA)	3.2	4.66	3.63	5.13	3.2	1.56	1.21	1.72	2.5	1.59	1.24	1.75	
Ortho-phthalaldehyde (OPA)	0.25	1.27	0.78	0.86	0.20	1.97	1.21	1.34	0.25	2.55	1.57	1.73	

表 1b. 呼吸器感作性物質 (9 種類) で刺激時に、溶媒コントロール (10% DMSO) 刺激時の各遺伝子の発現を 1 としたときの 7 種類の遺伝子の相対的遺伝子遺伝子発現。青字の部分は TNFSF4, CRLF2, IL7R, IL17RB, ST2 の 5 種類遺伝子をさらに CD80, CD86 の値で補正したときの値。

Raw data

Cut-off value 2.57	Skin (11)	Respiratory (9)	Total
TNFSF4 (OX40L) Negative	10	1	11
TNFSF4 (OX40L) Positive	1	8	9
total	11	9	20

Sensitivity (%)	88.89
Specificity (%)	90.91
Accuracy (%)	90.00
Balanced Accuracy (%)	89.90

Normalized by CD80

Cut-off value 1.92 (normalized by CD80)	Skin (11)	Respiratory (9)	Total
TNFSF4 (OX40L) Negative	10	1	11
TNFSF4 (OX40L) Positive	1	8	9
total	11	9	20

Sensitivity (%)	88.89
Specificity (%)	90.91
Accuracy (%)	90.00
Balanced Accuracy (%)	89.90

Normalized by CD86

Cut-off value 2.15 (normalized by CD86)	Skin (11)	Respiratory (9)	Total
TNFSF4 (OX40L) Negative	10	1	11
TNFSF4 (OX40L) Positive	1	8	9
total	11	9	20

Sensitivity (%)	88.89
Specificity (%)	90.91
Accuracy (%)	90.00
Balanced Accuracy (%)	89.90

表2. 表1a、1bの結果をもとにTNFSF4 (OX40L) のROC曲線を描き、カットオフ値を決定した。 TNFSF4 (OX40L) のカットオフ値から皮膚感作性と呼吸器感作性を判別でき、その時の感度、特異度、正確度、バランス正確度を算出した。

	Chemical dose (%)	TNFSF4	Judgement Cut-off value 2.57	TNFSF4 (Normalized by CD80)	Judgement Cut-off value 1.92	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Judgement Cut-off value 2.15
Skin sensitizers (11 test chemicals)							
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)	0.040	1.31	N	1.06	N	1.13	N
1,4-Benzoquinone (BQ)	0.032	1.33	N	1.04	N	1.16	N
4-Nitrobenzylbromide (NBB)	0.080	2.46	N	1.71	N	1.73	N
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	0.32	1.04	N	0.90	N	1.40	N
Isoeugenol (IEU)	1.6	15.89	P	6.06	P	13.27	P
Eugenol (EU)	1.0	2.23	N	1.12	N	1.88	N
Phenyl benzoate (PB)	0.32	1.82	N	0.97	N	2.07	N
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)	2.0	1.79	N	1.88	N	1.53	N
Butyl Glycidyl Ether (BGE)	0.13	1.88	N	0.97	N	1.39	N
Oxazolone (OXA)	0.80	2.04	N	1.31	N	1.52	N
Foramide (FA)	0.10	1.97	N	1.24	N	1.47	N
Respiratory sensitizers (9 test chemicals)							
Trimellitic anhydride (TMA)	1.6	12.20	P	5.87	P	10.00	P
Hexamethylene diisocyanate (HDI)	1.3	5.04	P	3.05	P	3.23	P
Chloramine T (Ch-T)	0.80	3.56	P	2.46	P	2.55	P
Piperazine anhydride (PZA)	1.0	4.06	P	2.46	P	2.39	P
Hexahydro phthalic anhydride (HHPA)	2.0	2.68	P	1.96	P	2.57	P
Toluene diisocyanate (TDI)	2.0	1.10	N	0.70	N	0.84	N
Glutaraldehyde (GA)	0.10	2.71	P	4.14	P	2.23	P
Methyltetrahydrophthalic anhydride (MTHPA)	4.0	14.03	P	10.93	P	15.45	P
Ortho-phthaldialdehyde (OPA)	0.25	4.00	P	2.46	P	2.71	P

表 3. これまでの結果に基づいてそれぞれの感作性物質を TNFSF4 (OX40L) の値からカットオフ値より値が低ければ N (Negative)、高ければ P (Positive)として判定した。

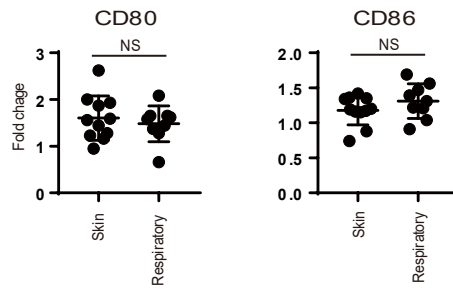


図 1. 皮膚感作性物質 11 種類と呼吸器感作性物質 9 種類で刺激した後の CD14-MLDC でのコントロール溶媒を 1 とした時の CD80 と CD86 の発現量。

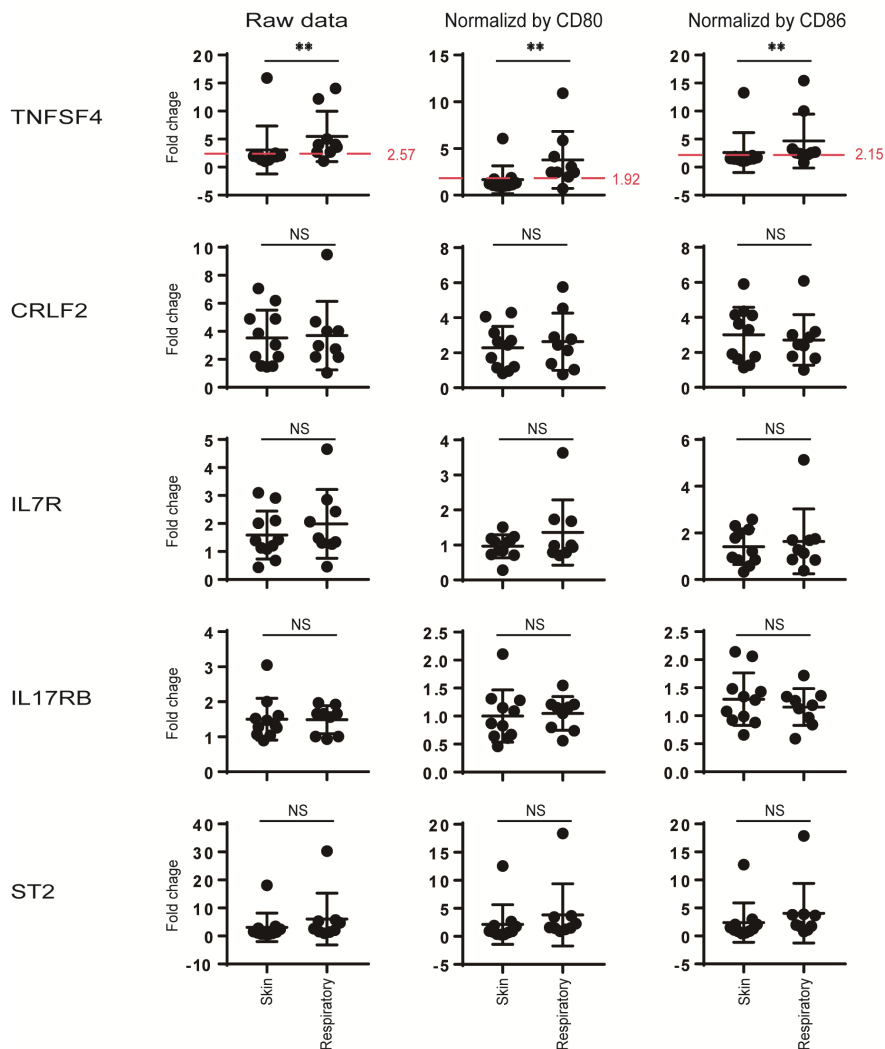


図 2. 皮膚感作性物質 11 種類と呼吸器感作性物質 9 種類で刺激した後の CD14-MLDC でのコントロール溶媒を 1 とした時の TNFSF4、CRLF2、IL7R、IL17RB、ST2 の発現量。 **P<0.01

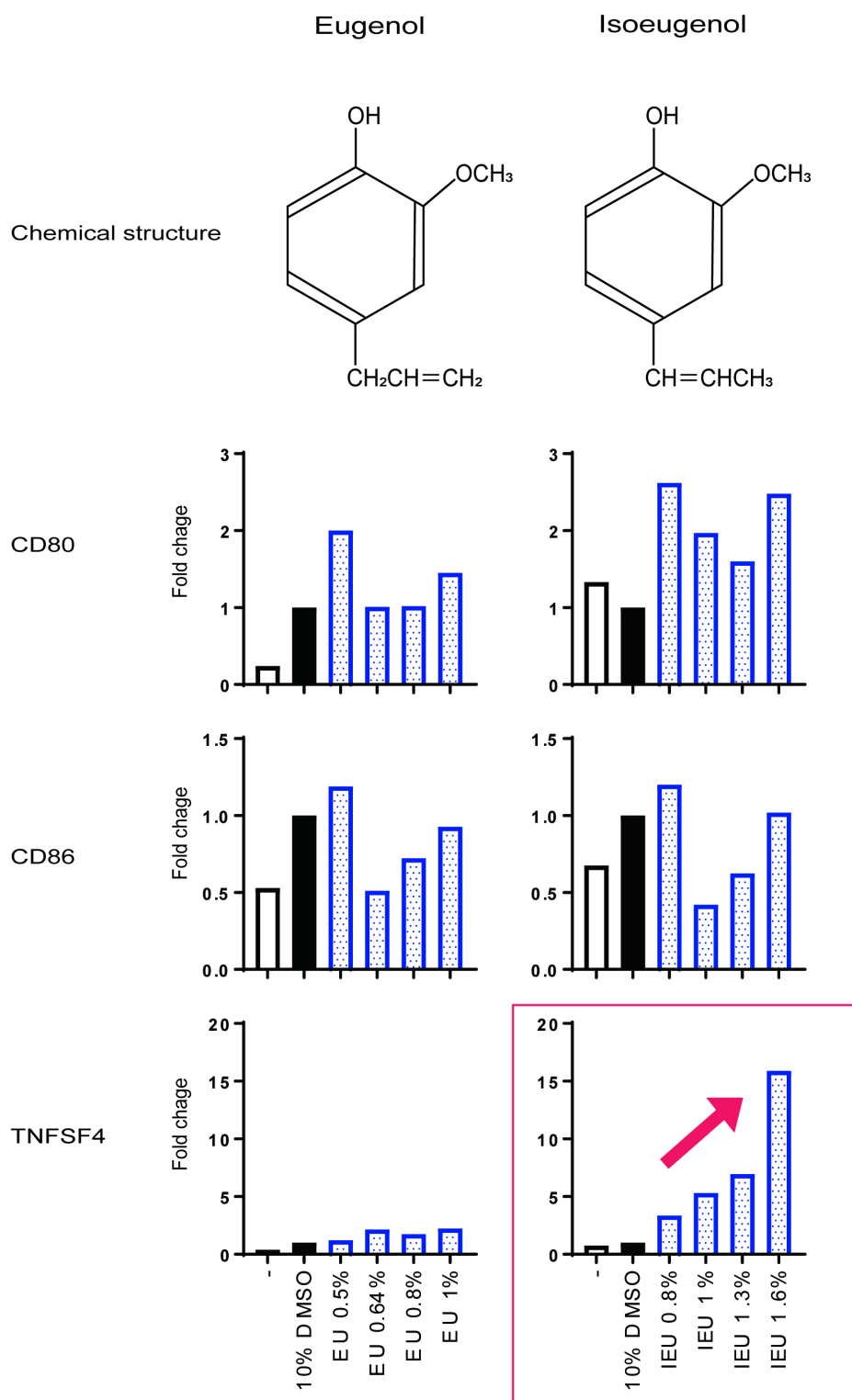


図 3. 皮膚感作性物質として認知されている Eugenol (EU) と Isoeugenol (IEU) の構造式とそれぞれの物質で刺激した後の CD14-MLDC でのコントロール溶媒を 1 とした時の TNFSF4 の発現量の違い。