

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 7 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

本研究では、化学物質の呼吸器感作性を評価する試験法の開発を目的に、ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞（DC）の scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系（DCsens）を構築し、DC での Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 Ligand（OX40L、別名 TNFSF4）などの mRNA 発現増強を指標に、そのプロトコルの確立と施設内と施設間の再現性と技術移転性について検討を行った。プロトコルの精密化や最適化のための測定条件を再検討したところ、化学物質の数を増していくと TNFSF4 だけの指標では、呼吸器と皮膚感作性の識別が難しくなった。そこで、さらに Th2 分化に関わる Conventional DC2（cDC2）への分化誘導に関わる分子や cDC2 のマーカー分子などを用いて指標分子の探索を行い、これら複数の指標を用いると呼吸器感作性の識別が可能である可能性が示された。

A. 研究目的

皮膚感作性試験法は、既に複数の動物実験代替法が OECD のテストガイドラインになっているが、より重篤な副作用を誘発する呼吸器感作性を評価する試験法は、未だに確立されていない。本研究は、我々が開発したヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞（DC）の多孔質のポリスチレン製 scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系（DCsens）を用いて、DC での Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 Ligand（OX40L、別名 TNFSF4）などの mRNA 発現増強を指標に、呼吸器と皮膚感作性を識別する *in vitro* 試験法の開発が目的である。本年度は、そのプロトコルの確立と施設内と施設間の再現性と技術移転性について検討を行

った。

B. 研究方法

まず、BEAS-2B と CD14-ML から IL-4 で分化誘導した未成熟 DC を用いて、別々の Alvetex® scaffold で 3 次元培養を 48 時間行い、その後、BEAS-2B の scaffold を上側に、未成熟 DC の scaffold を下側にして重ね、トランスウェルインサートの底に装着し、さらに培養した。24 時間後、培養上清を一度取り除き、上方から 10% DMSO+10% FBS/MEM で溶解した化学物質を 2 倍の範囲内で 4 段階希釈した濃度、または、0.8 倍希釈した 3 濃度を、それぞれ 5 μ L ずつ 5 箇所、合計 25 μ L を添加した。その後 20 分間静置し、2.5 mL の medium を加えそのまま 37°C で培養した。6 時間培養後、DC の

scaffold のみを回収し、RNA を抽出し、RT-qPCR で指標分子の mRNA 発現量を定量した。HPRT mRNA 発現が、10% DMSO の溶媒のみに対して 1/10 以上のサンプルを使用した。指標分子としては、TNFSF4 の他に、上皮細胞由来サイトカイン TSLP や IL-25、IL-33 の受容体サブユニットや Th2 細胞の分化誘導に関与する Conventional DC2 (cDC2) への分化誘導に関わる分子や cDC2 のマーカー分子など、約 20 種類の分子について、代表的な 10 個の皮膚感作性化学物質と 8 個の呼吸器感作性物質、5 個の非感作性物質を用いて検討した。細胞生存率は、WST-8 アッセイを用いても検討した。

C. 研究結果

まず、プロトコルの精密化や最適化のため測定条件の再検討を行った。当初の方法では、細胞生存率を RT-qPCR で得たハウスキーピング遺伝子 HPRT の発現量で評価し、10% DMSO の溶媒のみに対して、その HPRT の発現量が 1/10 以下に下がるサンプルは除外するとしていた。細胞生存率は、通常、WST-8 アッセイなどの細胞内の脱水素酵素の還元能を測定する生細胞数測定キットで測定する場合が多く、通常、75% の細胞生存率を示すサンプルの濃度 CV75% を基準にする場合が多い。HPRT の発現量が 1/10 以下になるサンプル濃度で WST-8 アッセイを行うと、細胞生存率がかなり下がることがわかった。そこで、HPRT の発現量が 1/4 以下に下がるサンプルは除外すると基準を変えると、WST-8 アッセイでの細胞生存率が上昇したが、TNFSF4 だけを指標にすると呼吸器と皮膚感作性化学物質の識別が難しくなった。

そこで、次に、TNFSF4 の他に指標となる良いマーカーがないかと Th2 分化誘導に

関わる分子や cDC2 への分化誘導や cDC2 のマーカー分子などについて、RT-qPCR 解析を行った (図 1, 2)。その結果、単独の指標だけで呼吸器と皮膚を識別可能な分子は見つからなかった。そこで、複数の分子を指標に用いて両者を識別できないかと検討すると、TNFSF4 と CRLP2 (TSLP 受容体のサブユニットの 1 つ)、IL-7R α (TSLP 受容体のサブユニットのもう 1 つ)、ST2 (IL-33 受容体サブユニットの 1 つ)、TIM-1 (Th2 反応の誘導に関与)、CD1A (ランゲルハンス細胞で発現)、FCER1A (IgE 受容体のサブユニットの 1 つ)、CLEC10A (Th2 分化に関与する C 型レクチン受容体)、NOTCH2 (cDC2 細胞への分化誘導に関与) の 9 種類の分子が候補分子となった。例えば、その内、TNFSF4 と ST2、CD1A、NOTCH2 の 4 種類の複数分子を指標とすると、感度、特異性、正確性ともに 80% 以上となり、両者の識別が可能である可能性が示された (図 3, 4)。

技術移転性に関しては、施設 A には、ほぼ技術移転が完了し、さらに、もう 1 施設 B への技術移転を行っている。

D. 考察

今年度は、プロトコルの精密化や最適化のための測定条件を再検討すると、TNFSF4 発現増強の指標だけでは呼吸器と皮膚感作性の識別ができなくなった。そこで、さらに約 20 種類のマーカーを用いて検討すると、単独マーカーでの識別は不可であったが、9 種類の候補分子の内、例えば 4 種類の複数分子を指標にすると、両者の識別が可能となった。この内、NOTCH2 は、Th2 分化に関与する cDC2 細胞への分化誘導に関与し、約半分近い呼吸器感作性化学物質で陽性と判定された。一方、DECTIN2 (C 型レクチン受容体で Th17 分化誘導に関与)

は、皮膚感作化学物質で高い傾向で、呼吸器と非感作性化学物質では、殆ど上昇が見られず、指標の一つになる可能性もあると考えられる。

HDI が偽陰性なのは、TDI と同様にジイソシアネートで、水と急速に反応し分解されるためと考えられる。EU と IEU が、CD80 の他、CRLP2 や IL-7R α 、TIM-1 の発現で偽陽性であった。今回の 23 個の化学物質の内、これら 2 個の化学物質のみがプロハプテンで、そのためか、気管支上皮細胞を用いると、特に強い反応が誘導されているようにも見えるが、その理由は不明である。これらのプロハプテンを除くと、使えるマーカーも増えてくるので、今後の評価系の最適化の検討課題の一つと考えている。

呼吸器感作性発症の機序は複雑であるため、その評価法も簡単ではなく、現在、複数の方法を組み合わせて総合的に評価する IATA の開発も進められている。今回、イソプロパノール (IP) が、擬陽性になってしまったが、IATA を用いて、まず h-CLAT など皮膚感作性の有無で判定すれば、このような問題も減り予測性が高くなることが期待される。

理想的には、陽性と陰性サンプルのいわゆる S/N 比が高く、それぞれのマーカーで陽性になる化学物質も複数あり、それらがオーバーラップしていた方が、より確からしいと考えられる。今後、WST-8 アッセイでの細胞生存率 CV%を基に評価法を改善し最適化し、再現性と予測性の高い評価法の開発を目指して、さらに、検討を進めていく予定である。

E. 結論

今年度は、DCsens のプロトコルの精密化や最適化のため測定条件の再検討を行い、

プロトコルの改善を試みた。その結果、合計 23 個の化学物質を用いて検討した結果、TNFSF4 などの単独のマーカー分子では呼吸器と皮膚感作性が識別できなくなったが、TNFSF4 の他に、ST2、CD1A、NOTCH2 などの複数の分子と組み合わせると、両者の識別が可能である可能性が示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2 学会発表

1. Yoshimoto T. Predictive potential of chemical respiratory sensitization using DC coculture (DCsens) and two-step DC/T cell coculture (DC/Tsens) systems. RIFM Respiratory Research Workshop: Future Forward (2025.7.15-16) Mahwah, NJ, USA
2. 溝口 出：呼吸器感作性化学物質の正確な予測評価を可能にする 3 次共培養系の開発、第 32 回日本免疫毒性学会学術年会 (2025.9.4-5) 岐阜
3. 善本隆之、戸田翔太、片平泰弘、山口夏輝、堀尾江里、宮川聡美、五十嵐美樹、曲 寧、溝口 出：ヒト免疫細胞株の培養系を用いた免疫毒性評価法のための動物実験代替法の開発、BioJAPAN (2025.9.8-10) 横浜
4. 戸田翔太、溝口 出、山口夏輝、堀尾江里、宮川聡美、片平泰弘、五十嵐美樹、曲 寧、黒田悦史、足利太可雄、善本隆之：ナノ粒子の免疫毒性評価に応用可能なヒト肺泡マクロファージ様細胞株の開発、第 38 回日本動物実験代替法学会 (2025.11.1-3) 横浜
5. Ashikaga T, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Development of integrated approaches to testing and assessment for respiratory

sensitization based on the AOP. International Conference on Stem Cell and Organoid Biology (ICSCOB-25) (2025.11.25-26) Oslo, Norway

6. Toda S, Mizoguchi I, Katahira Y, Yamaguchi N, Horio E, Miyakawa S, Qu N, Kuroda E, Ashikaga S, Yoshimoto T. Development of human alveolar macrophage model cell lines for the assessment of immunotoxicity of nanoparticles. 2026SOT (The SOT 65th Annual Meeting) (2026.3.22-25) San Diego, CA, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明の名称：ナノ粒子の免疫毒性の評価方法、免疫毒性抑制物質のスクリーニング方法、および生体投与用組成物の製造方法

発明者：善本隆之、溝口 出、戸田翔太

出願人：学校法人 東京医科大学

出願日：2025 年 7 月 28 日

出願番号：特願 2025-125310

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図 1. DCsens を用いた 23 種類の化学物質による呼吸器感作性を識別する候補マーカー分子の mRNA 発現変動 (その 1)

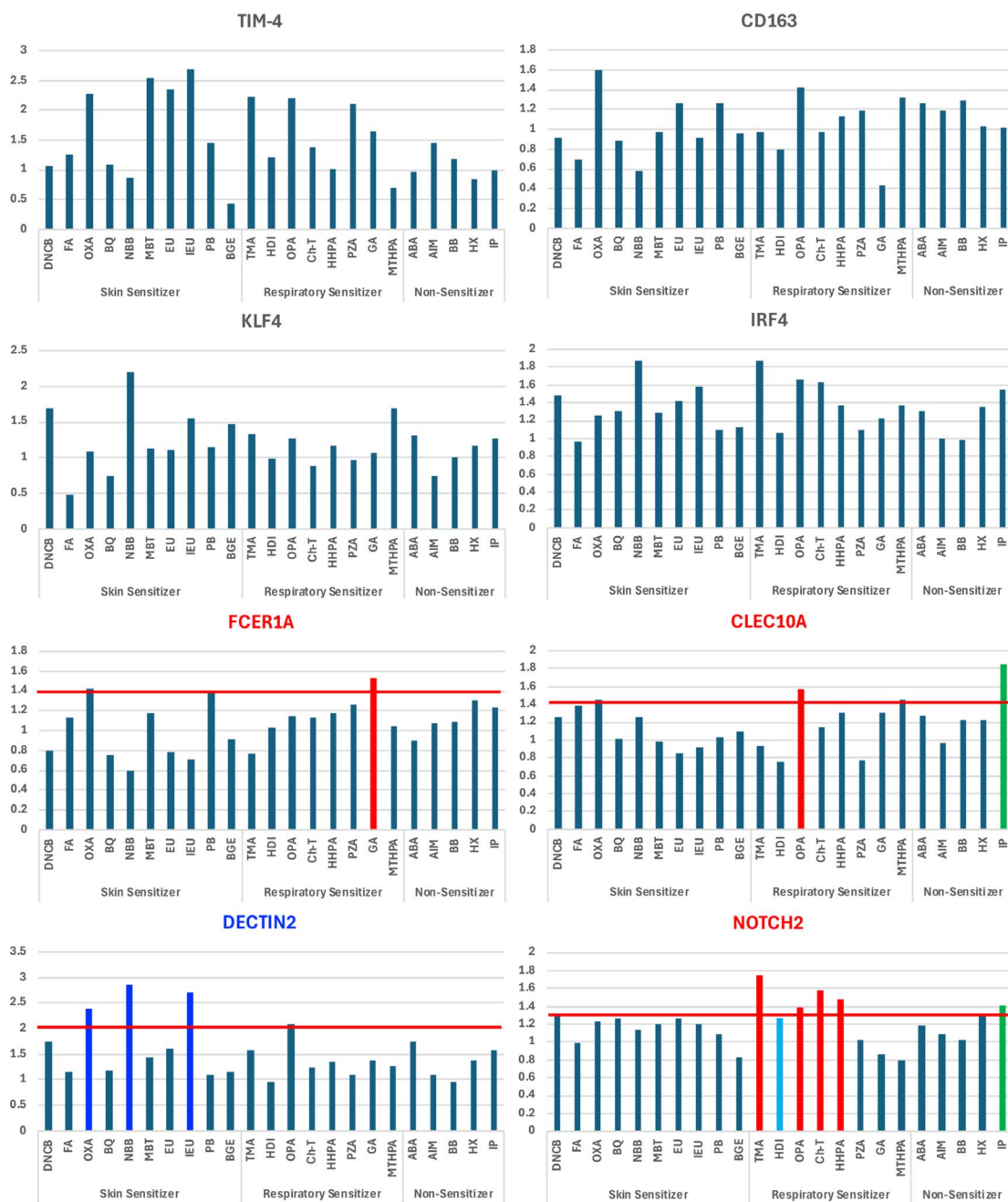


図 2. DCsens を用いた 23 種類の化学物質による呼吸器感作性を識別する候補マーカー分子の mRNA 発現変動 (その 2)

	Chemicals	Marker Molecule				Jugement
		TNFSF4	ST2	CD1A	NOTCH2	
Skin Sensitizer	DNCB	1.7	5.2	1.04	1.3	Netative
	FA	1.49	2.07	1.04	0.99	Netative
	OXA	1.33	2.25	1.04	1.23	Netative
	BQ	0.69	3.84	0.93	1.26	Netative
	NBB	0.84	4.67	1.2	1.13	Netative
	MBT	1.47	5.27	0.92	1.2	Netative
	EU	1.31	2.42	0.91	1.27	Netative
	IEU	0.62	1.71	0.8	1.2	Netative
	PB	2.07	1.28	1.17	1.09	Netative
	BGE	0.88	0.64	1.54	0.83	Netative
Respiratory Sensitizer	TMA	1.81	3.66	0.91	1.75	Positive
	HDI	0.83	1.29	1.41	1.27	Netative
	OPA	0.73	2.63	0.9	1.39	Positive
	Ch-T	1.15	1.99	0.74	1.58	Positive
	HHPA	1.26	2.04	1.34	1.48	Positive
	PZA	1	17.4	1.18	1.02	Positive
	GA	2.63	3.48	0.86	0.86	Positive
	MTHPA	1.15	1.02	1.97	0.79	Positive
Non-Sensitizer	ABA	1.32	3.19	1.03	1.18	Netative
	AIM	1.04	2.19	0.72	1.09	Netative
	BB	1.03	1.04	0.94	1.03	Netative
	HX	1.06	1.76	1.55	1.32	Netative
	IP	1.05	1.97	1.82	1.41	Positive

図 3. DCsens を用いた TNFSF4 と ST2、CD1A、NOTCH2 の 4 種類のマーカーの mRNA 発現変動とその判定

	Non-Resp	Resp	Sum		
Negative	14	1	15	Sensitivity	87.50%
Positive	1	7	8	Specificity	93.33%
Sum	15	8	23	Accuracy	91.30%

図 4. DCsens による TNFSF4 と ST2、CD1A、NOTCH2 の 4 種類のマーカーを指標に用いた予測性