

ヒトTh2細胞からのIL-4産生を指標に 呼吸器感作性を評価する共培養系の開発

善本 隆之・片平 泰弘・戸田 翔太・溝口 出

東京医科大学・医学総合研究所・免疫制御研究部門

呼吸器感作性試験法の確立は社会的にも急務とされている

呼吸器において免疫系を介した喘息等の症状を誘発する物質は、呼吸器感作性物質として知られており、いったん感作が成立すると生涯にわたり回避する以外の対策が困難であることから、労働衛生のみならず社会全体にとって深刻な健康問題となっている。

しかしながら、その毒性発現メカニズムは不明な点が多く、標準化された試験法も確立されていないため、呼吸器感作性物質を評価可能な試験法の開発が求められている。

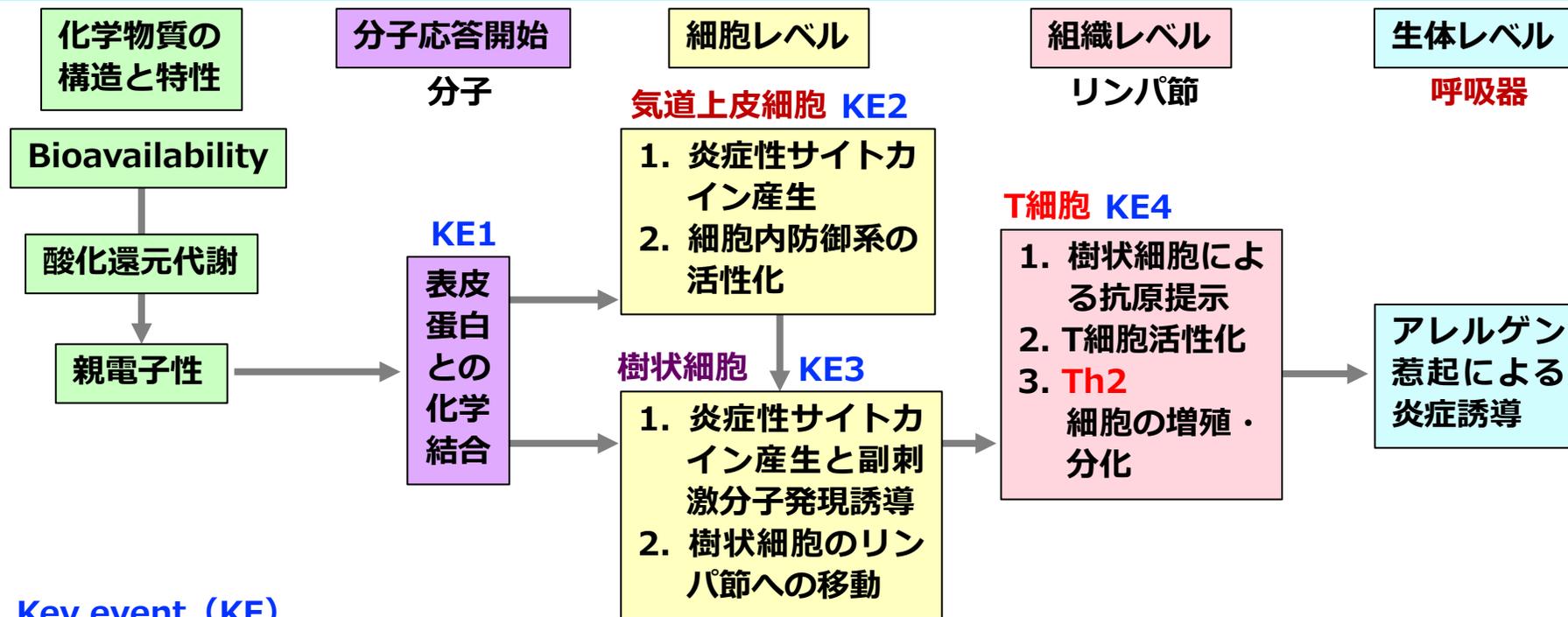
GHS危険有害性表示



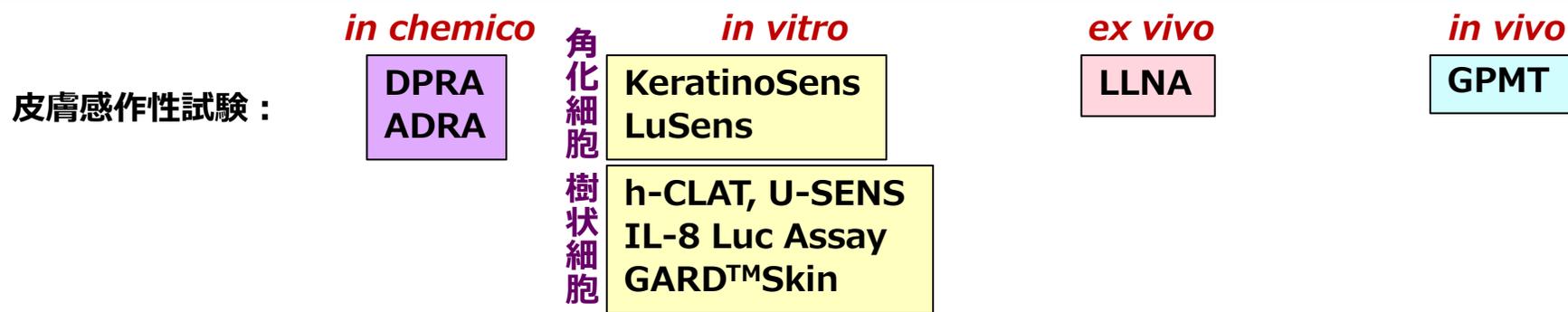
呼吸器感作性試験法開発の世界的重要性は増している

- 化学物質の吸入曝露による健康影響が懸念されている一方、現在のOECDガイドラインであるin vivo吸入曝露試験は多大な費用と時間が課題とされており、毒性発現機構に基づいた効率的で精度の高いin vitro試験法の開発が強く望まれている。
- 特に化学物質の吸入曝露によりアレルギー性喘息を生じる呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、その重要性から米国よりin vitro呼吸器感作性試験開発を念頭に置いたDetailed Review Paper (DRP)作成の作業計画が2022年秋にOECDに提案され、2023年4月のWNT (World Party of the National Coordinators for the Test Guidelines Program) において承認された。
- 日本においても今年度よりin vitro呼吸器感作性試験のOECDテストガイドライン化を目指した厚生労働科学研究が開始されるなど、試験法開発が行われている。
- 呼吸器感作性試験開発に関する日本の研究動向を整理するとともに、関係者の意見をとりまとめ、DRPを介して的確に世界に発信するために、国立医薬品食品衛生研究所・JaCVAM運営委員会を中心に呼吸器感作性試験資料編纂委員会の設置を提案する。

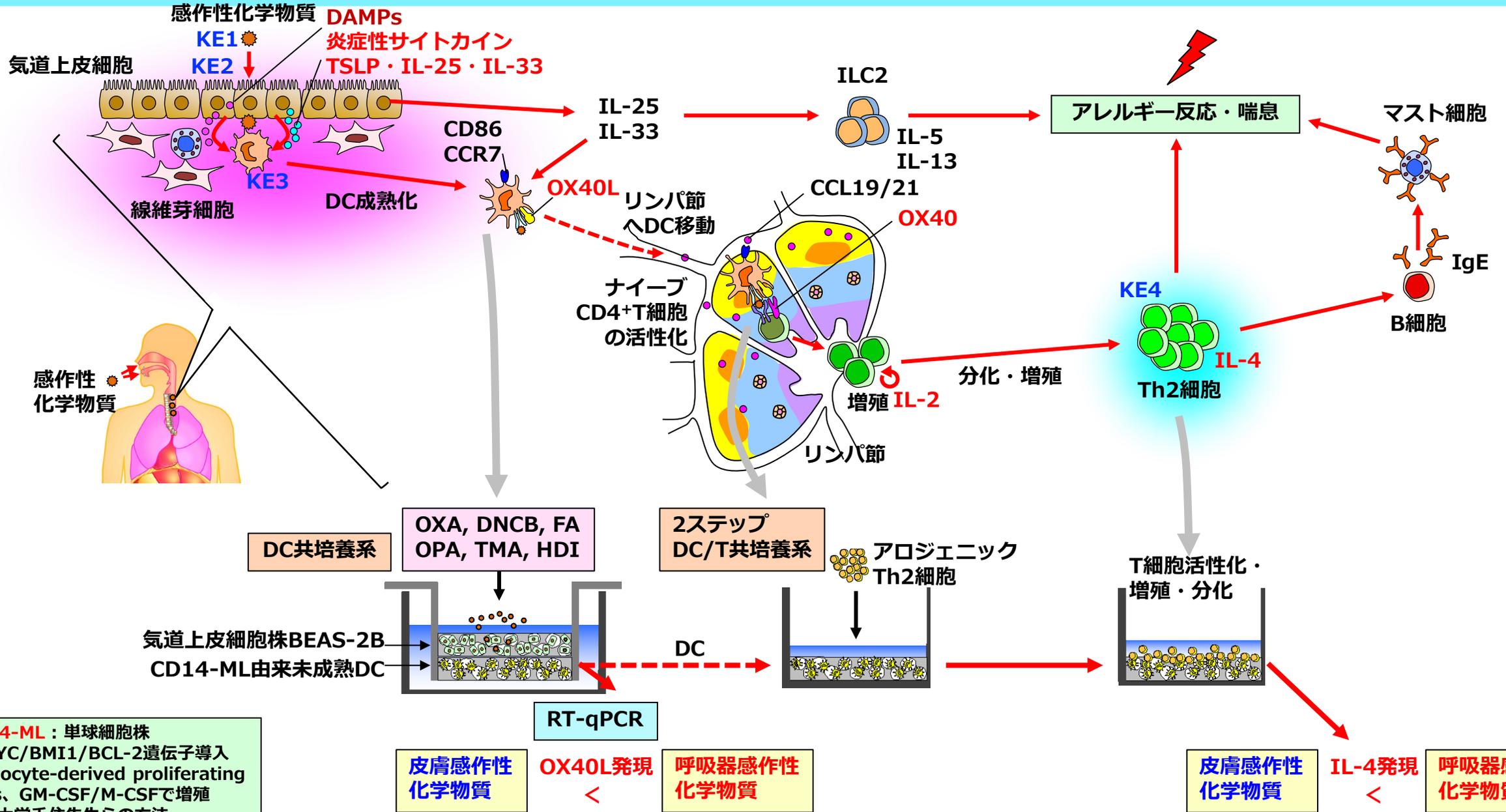
感作性化学物質による呼吸器アレルギー発症までの有害性発現経路AOPと各試験法



Key event (KE)



DC共培養系で刺激したDCでCD4⁺T細胞を活性化する2ステップDC/T細胞共培養系によりT細胞でのTh2分化誘導因子であるIL-4発現増強を指標にした皮膚と呼吸器感作性化学物質の識別



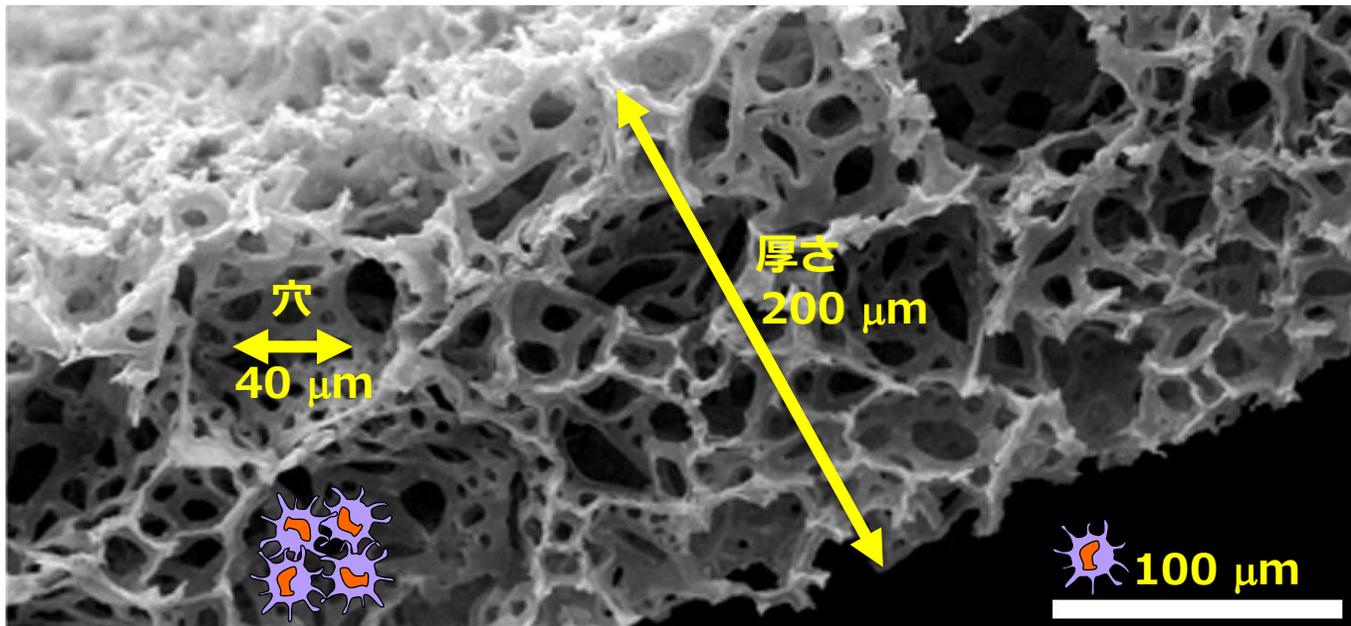
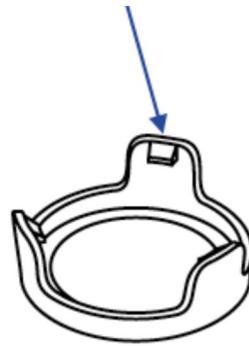
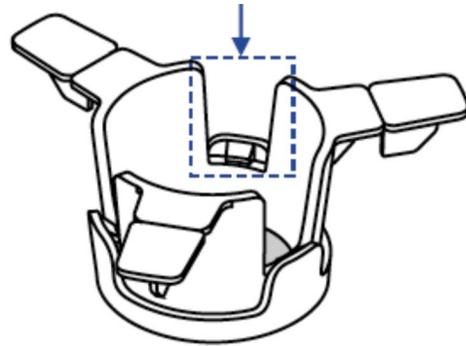
Mizoguchi et al. Front. Immunol. 2017

Mizoguchi et al. ALTEX 2023

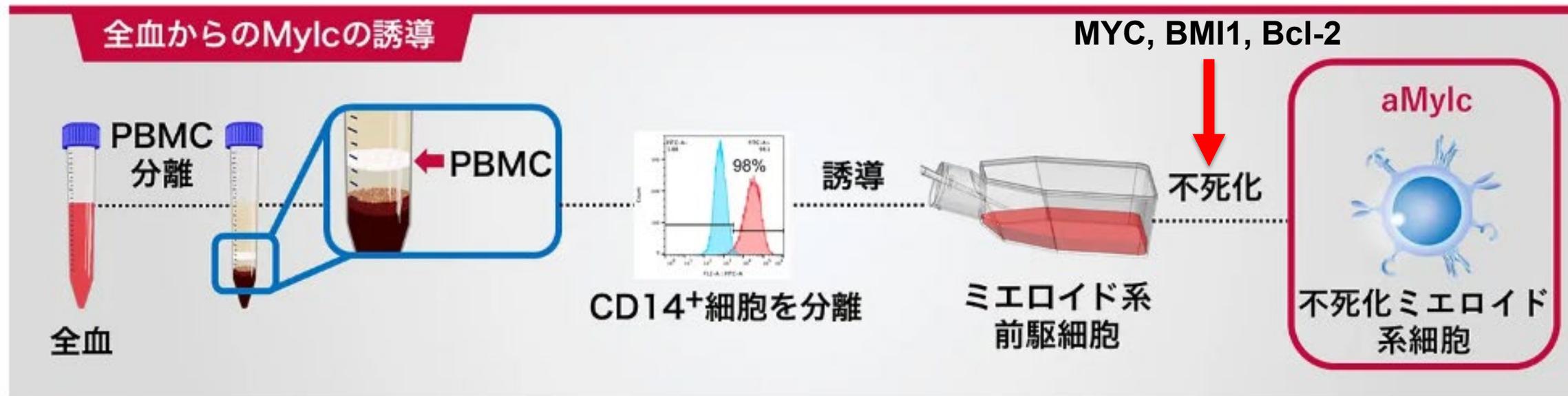
Alvetex® Scaffold (ポリスチレン性の多孔質足場材) :
Scaffold膜の無菌的脱着可能 → 生体内の3次元的な細胞間相互作用を反映

Reinnervate Ltd.

インサートの窓 インサート底のホック



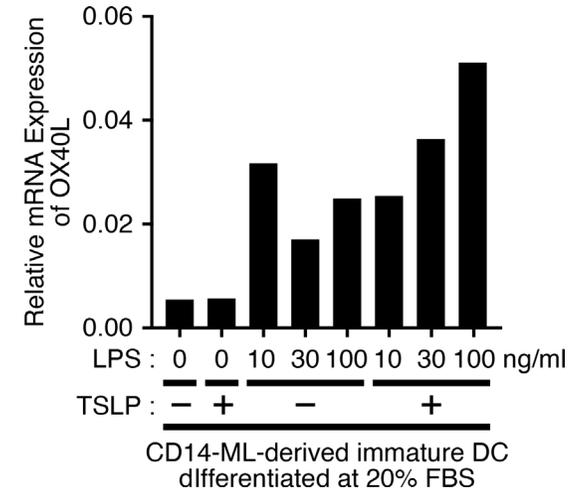
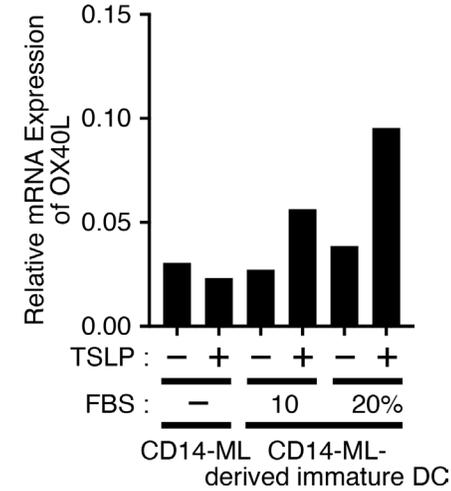
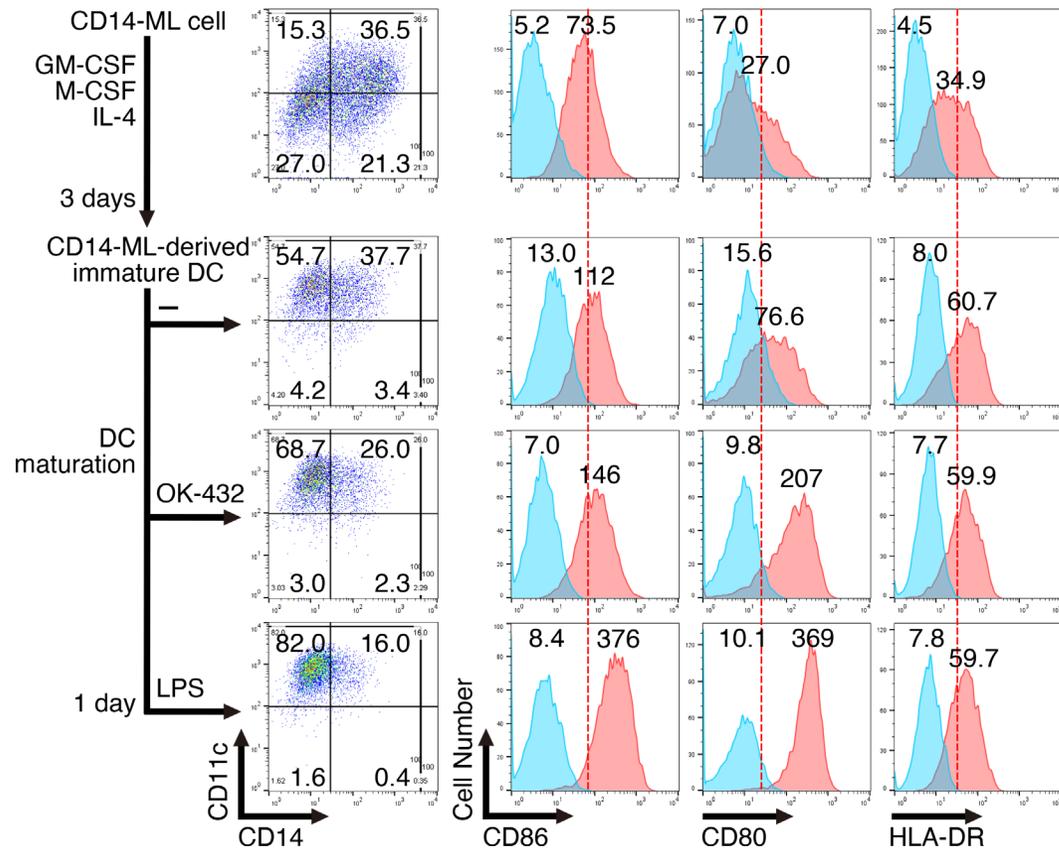
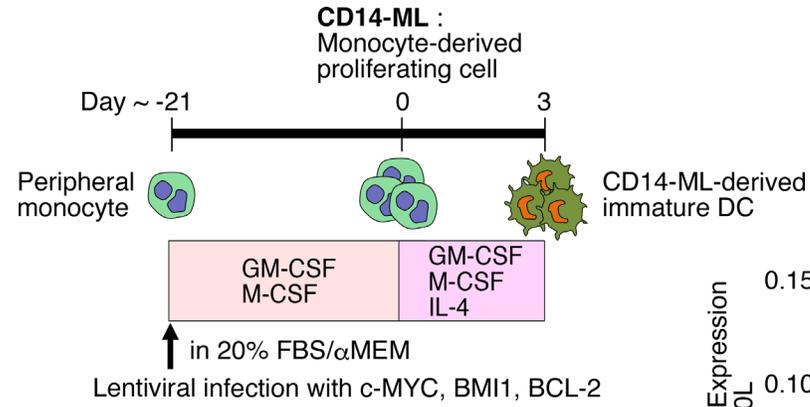
ヒトPBMC由来単球細胞株CD14-ML (aMylc)



血液中の末梢血単核細胞(PBMC)から分化誘導したMylc細胞はaMylcと言い、上記の様に誘導します。

CD14-ML : ヒト単球に細胞周期や生存に関わる遺伝子 (c-MYC, BMI1, BCL-2) を導入した増殖性のヒト単球細胞株 (by 熊本大学・千住先生/西村先生・MiCAN)

CD14-MLの作製方法 :
熊本大学千住先生らの方法
Haruta et al. Human Immunol. 2013
Imamura et al. PLoS One 2016



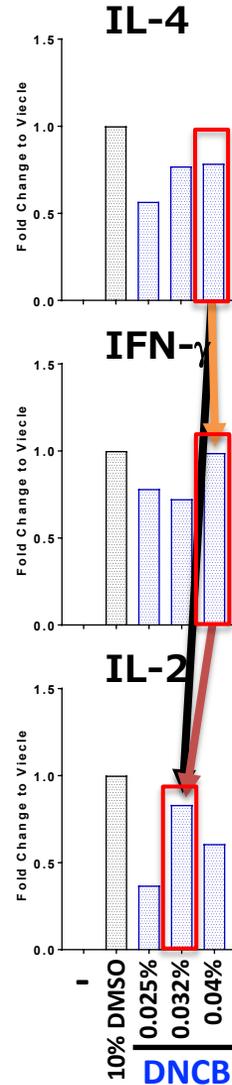
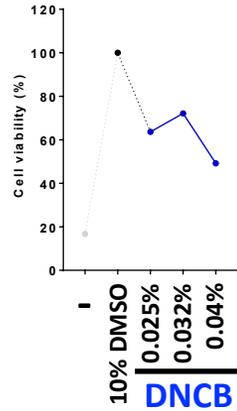
今回の試験 (DC/Tsens) に用いた皮膚(10)、呼吸器(9)感作性化学物質

	非感作性化学物質	皮膚感作性化学物質	呼吸器感作性化学物質
1	4-Aminobenzoic acid	1,4-Benzoquinone (BQ)	Chloramine T (Ch-T)
2	α -Isomethylionone	4-Nitrobenzylbromide (NBB)	Trimellitic anhydride (TMA)
3	Benzyl benzoate	2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	Hexahydro phthalic anhydride (HHPA)
4	n-Hexane	Oxazolone (OXA)	Hexamethylene diisocyanate (HDI)
5	Isopropanol	Formaldehyde (FA)	Ortho-phthaldialdehyde (OPA)
6		2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	Piperazine (PZA)
7		Isoeugeno (IEU)	Toluene diisocyanate (TDI)
8		Eugenol (EU)	Glutaraldehyde (GA)
9		Phenyl benzoate (PB)	Methyltetrahydrophthalic anhydride (MTHPA)
10		Butyl glycidyl ether (BGE)	
11		Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)	

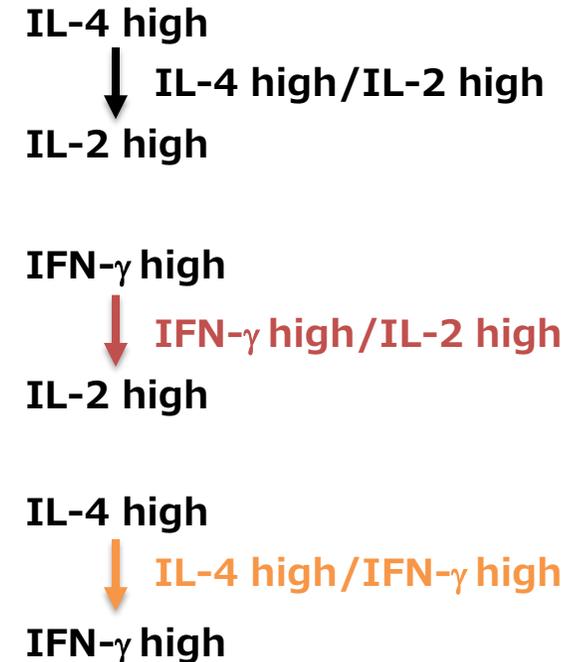
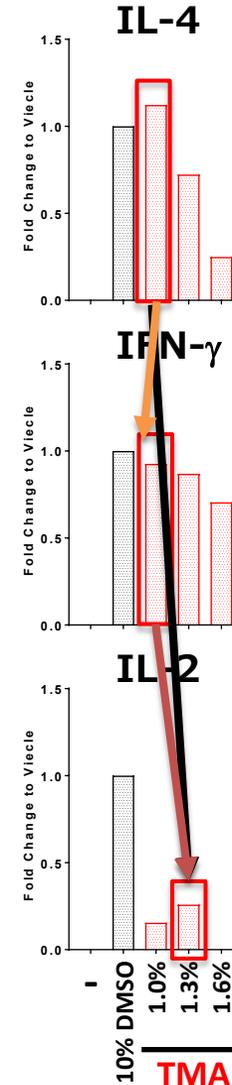
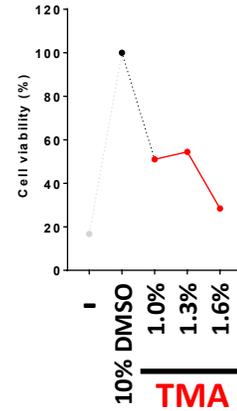
1. **Ponder J**, et al. (2022). "In Litero" Screening: Retrospective Evaluation of Clinical Evidence to Establish a Reference List of Human Chemical Respiratory Sensitizers. *Front Toxicol* 4, 916370.
2. **Sadekar N**, et al. (2021). Identifying a reference list of respiratory sensitizers for the evaluation of novel approaches to study respiratory sensitization. *Crit Rev Toxicol* 51, 792-804.

2ステップDC/T細胞共培養系(DC/Tsens)を用いた 皮膚と呼吸器感作性化学物質識別評価法 1

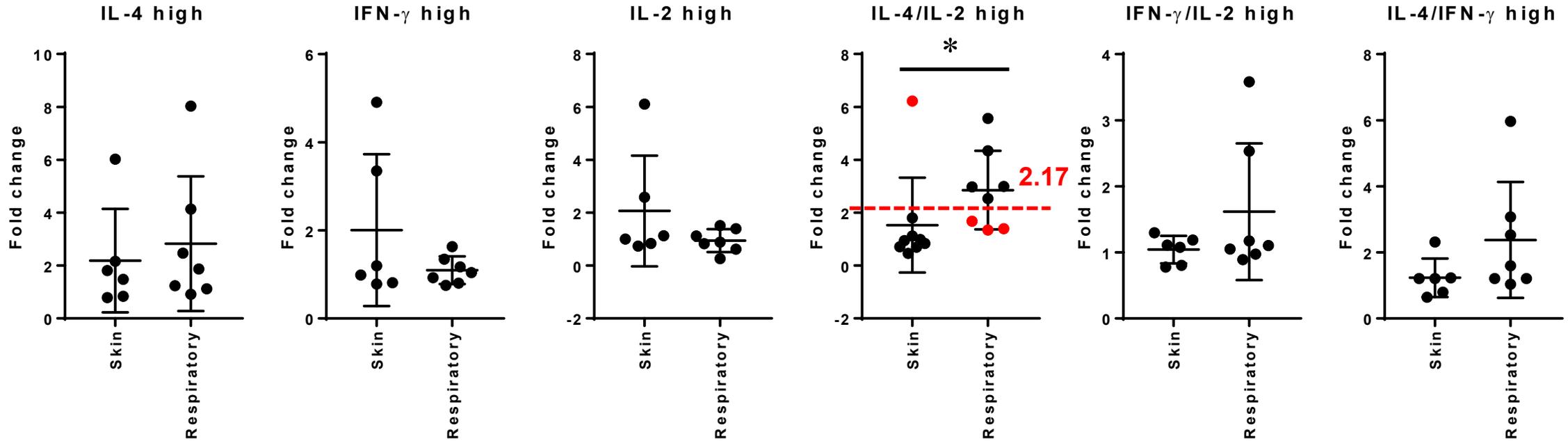
DNCB



TMA



2ステップDC/T細胞共培養系(DC/Tsens)を用いた解析によりIL-2で補正したIL-4産生増強比率で皮膚と呼吸器感作性の識別が可能



評価法計算式

- | | | |
|----|---------------------|---|
| A) | IL-4 | = (IL-4/Living cells) / IL-4 solvent cont |
| B) | IFN- γ | = (IFN- γ /Living cells) / IFN- γ solvent control |
| C) | IL-2 | = (IL-2/Living cells) / IL-2 solvent control |
| D) | IL-4/IL-2 | = A/C |
| E) | IFN- γ /IL-2 | = B/C |
| F) | IL-4/IFN- γ | = A/B |

2ステップDC/T細胞共培養系(DC/Tsens)を用いた 評価法 1 で皮膚と呼吸器感作性化学物質の 識別は可能であるが、感度は低下傾向である

Skin	
OXA	1.27
DNCB	0.94
FA	1.80
BQ	1.44
NBB	0.84
EU	0.99
IEU	6.22
MBT	0.46
BGE	0.70
Respiratory	
Ch-T	2.53
OPA	1.35
TMA	4.34
HDI	2.99
HHPA	1.68
MTHPA	5.56
TDI	1.39

Cut-off value=2.17	Skin (9)	Respiratory (8)	Total
IL-4/IL-2 Negative	8	3	11
IL-4/IL-2 Positive	1	5	6
total	9	8	17

Cut-off value=2.17	Skin (9)	Respiratory (8)	Total
IL-4/IL-2 Negative	87.5	37.5	125
IL-4/IL-2 Positive	12.5	62.5	75
total	100	100	200

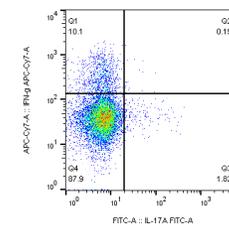
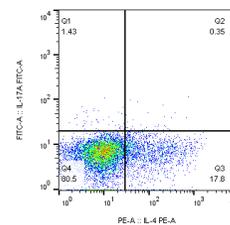
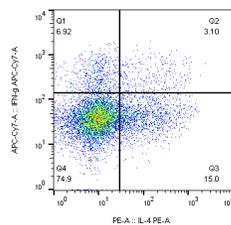
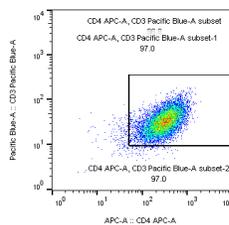
Sensitivity	62.5
Specificity	88.9
Accuracy	76.5
Balanced Accuracy	75.0

評価法 1 による計算法では評価対象物質を増やしたことにより、感度が下がってしまった。特異度は 80%以上であることから明らかに不適切な評価法ではないが、別の評価法も考える必要がある。

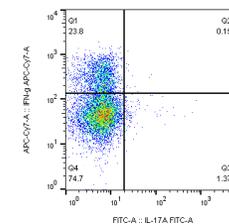
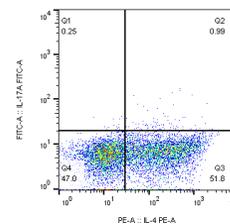
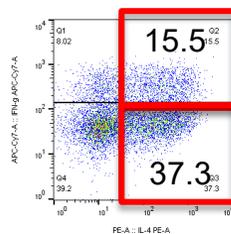
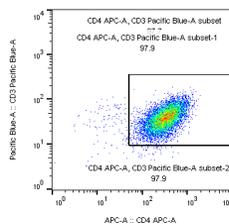
ヒト末梢血由来ナイーブCD4+T細胞をTh2分化条件のもとアロジェニックDCによる頻回刺激で作製したアロ抗原特異的Th2T細胞株の限界希釈により得られたTh2クローンのサイトカイン産生能

限界希釈1回目

Th2 clone #1

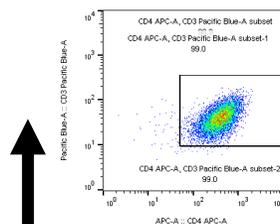


Th2 clone #3



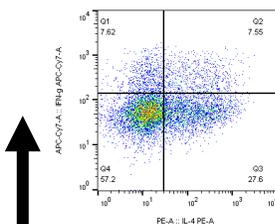
Th2 clone #11

CD3



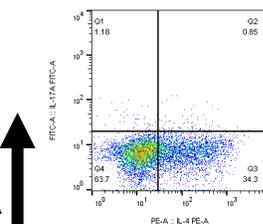
CD4

IFN- γ



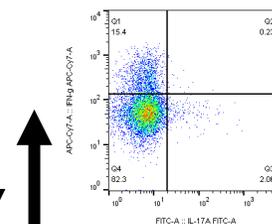
IL-4

IL-17A



IL-4

IFN- γ

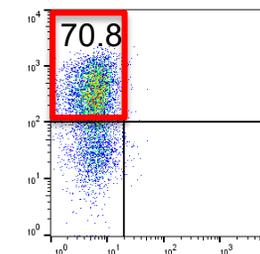
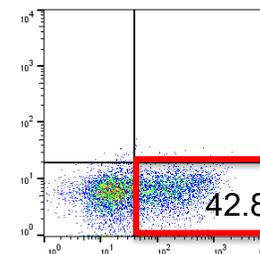
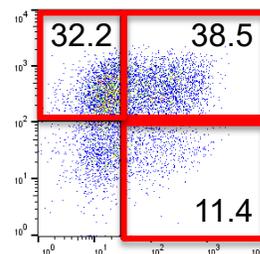
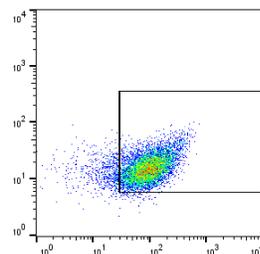


IL-17A

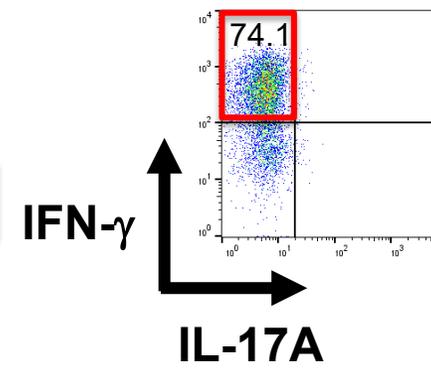
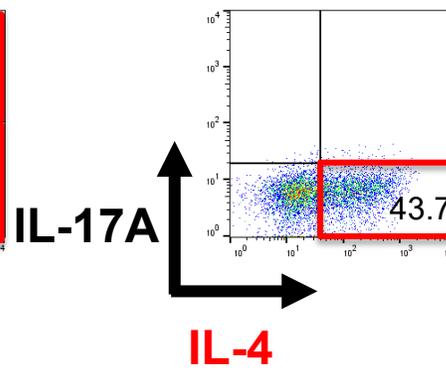
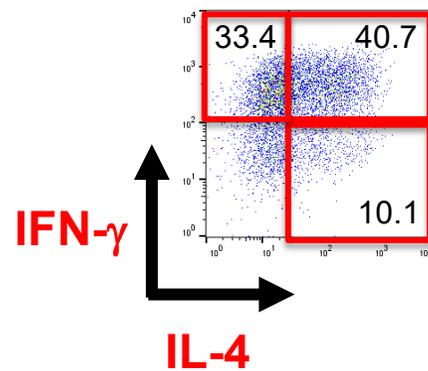
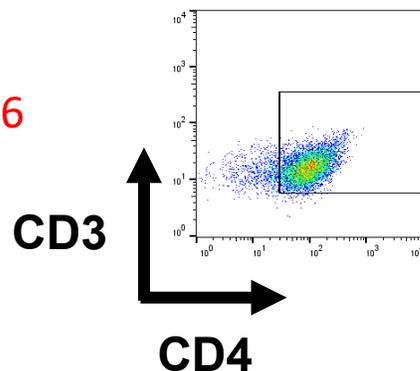
ヒト末梢血由来ナイーブCD4+T細胞をTh2分化条件のもとアロジェニックDCによる頻回刺激で作製したアロ抗原特異的Th2T細胞株の限界希釈により得られたTh2クローンのサイトカイン産生能

限界希釈2回目

Th2 clone #3-3



Th2 clone #3-6



ヒトTh2細胞からのIL-4産生を指標に呼吸器感作性を評価する共培養系の開発： 実験予定

2年目	<ul style="list-style-type: none">• 皮膚感作性物質11種類、呼吸器感作性物質9種類、非感作性物質5種類で、提案者の研究室での施設内バリデーションを行い、必要に応じて、プロトコールや SOP を見直し最適化を行い、本評価法の感度と特異性、予知能力などの特性を明らかにする（分担：片平・溝口）。• 最適な Th2 クローン細胞を作製し、クローン化していないTh2細胞株との反応性の違いを検討する（分担：片平・溝口）。• 2ステップ DC/T 細胞共培養系におけるIL-4産生がOX40L中和抗体で抑制されるか、また、Th2 細胞株のリコンビナントOX40Lの刺激でIL-4が産生されるかについての実験を行う（分担：溝口）。
3年目	<ul style="list-style-type: none">• 本評価法を、研究協力者の石川先生（株式会社 JT）の研究室に技術導入できるように指導し、提案者らの結果が再現できるか検討する（分担：石川・溝口）。• 本評価法の SOPとプロトコールを確立する（分担：溝口、田邊）。

結果のまとめ

- 試験を行った皮膚感作性物質10種類、呼吸器感作性物質9種類において評価法1では、ELISAでのIL-4/IL-2産生を指標に感度62.5%、特異度88.9%、正確度76.5%で呼吸気感作性物質を区別することができたが、感度、正確度が低下してしまった。
- 評価法1での細胞生存率の基準を20%以上に設定していたが、化学物質の4段階濃度全てにおける細胞生存率が40%以下を採用しない基準を設ける。
- 今後すべての物質を試験する必要があるが、DC/Tsensで得られた結果とDCsensで得られた結果が一致していることがわかった。このことから間接的ではあるが、OX40Lの発現とIL-4の発現の相関性が示唆された。