

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790121

研究課題名（和文） ナノ粒子曝露のアレルギー性鼻炎に与える影響

研究課題名（英文） Effect of multiple-walled carbon nanotube on allergic airway diseases

研究代表者

水谷 暢明 (MIZUTANI NOBUAKI)

神戸薬科大学・薬理学研究室・講師

研究者番号：90340447

研究成果の概要（和文）：ナノテクノロジーは豊かな未来社会を担う新技術として期待される一方で、ナノ粒子による健康や環境への影響が懸念されている。また、アレルギー患者の増加は環境汚染と密接な関係があることが指摘されており、今後ナノ粒子の生産増加に伴い、ヒトは大気中、または食事からナノ粒子に曝露される機会が増加することが予想され、鼻粘膜、肺組織さらには体内臓器への蓄積により免疫系の異常などの影響を受ける可能性がある。本研究では、ナノ粒子としてカーボンナノチューブを用いて、アレルギー反応に及ぼす影響を検討した。ナノ粒子を抗原とともにマウスの鼻腔から気管内に投与することにより感作を行い、その後抗原を気管内に繰り返し投与することにより反応を誘起した。その結果、カーボンナノチューブを抗原とともに投与することで感作したマウスでは、抗原もしくはカーボンナノチューブ単独の群と比較して明らかな二相性の気道抵抗の上昇の増悪が認められた。また、肺胞洗浄液中の炎症細胞については、とくに好酸球の上昇がカーボンナノチューブと抗原とで感作したマウスにおいて顕著であった。さらに、抗体産生および病理組織学的評価を行った。その結果、カーボンナノチューブにより IgE、IgG1 および IgG2a のさらなる産生増加が観察され、病理組織学的には、肺への炎症細胞の浸潤の増強も観察された。さらに興味あることに、慢性肺疾患において認められる気道リモデリングの組織学的変化である杯細胞の過形成のさらなる増加が観察された。一方、カーボンナノチューブ単独でも杯細胞の過形成は弱いながらも誘起された。これらの結果より、カーボンナノチューブはアレルギー性気管支喘息症状の全般を増悪させ、さらには強いアジュバント効果を示すことが明らかとなった。本結果は、アレルギー反応の増悪化にナノ粒子が関与する可能性を示唆する興味深い成績であり、本増悪化はナノ粒子が免疫系への異常などを引き起こした結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The development of nano-technology has increased the risk of our exposure to types of particles other than combustion-derived particles in the environment. Carbon nanotubes (CNTs) are being applied in wide-ranging areas from the semiconductor industry and are reportedly increasing in environmental exposure. CNTs possess significant characteristics in size (1-20 nm width, and many microns in length), strength, and surface chemistry. The aim of the present study was therefore to experimentally elucidate whether CNTs exacerbate asthmatic symptoms in mice. BALB/c mice intratracheally sensitized with vehicle, ovalbumine (OVA), CNTs or OVA+CNTs were repeatedly challenged with OVA. Biphasic asthmatic response and goblet cell hyperplasia in the mice sensitized with OVA+CNTs were more severe than those in mice sensitized with OVA. Furthermore, the infiltration of leukocytes (macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils) and the productions of OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a were also aggravated. Taken together, CNT can exacerbate biphasic asthmatic response and goblet cell hyperplasia, at least partly, via the infiltration of leucocytes (macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils) and/or productions of IgE, IgG1 and IgG2a.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学、ナノ粒子、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子について：ナノテクノロジーは、情報、通信、バイオ、医療、エネルギーなどの多くの分野で応用されており、次世代産業の基盤テクノロジーとして大きな期待がもたれている。このテクノロジーの根幹を支えているのが、ナノ粒子と呼ばれる非常に小さな粒子状物質である。今後、急激な需要の高まりからナノ粒子の生産量は飛躍的に増加すると予想されている。一方、ある種のナノ粒子は、その特徴的な粒子形状や粒子サイズに起因していると考えられる細胞毒性を有し、また大気中で拡散・移動性が高いことから呼吸曝露、さらには食物連鎖を介したヒトへの影響が危惧されている。呼吸による鼻粘膜や肺組織さらにはリンパ節への沈着、また食物連鎖を介した体内への蓄積は、循環器や免疫系などに異常を起こす可能性が考えられる。したがって、ナノ粒子の曝露によって様々な影響を受け、健康が害される可能性がある。

アレルギー性鼻炎および喘息について：アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、鼻汁分泌および鼻閉を三主徴とする典型的なI型アレルギー疾患である。実際にアレルギー性鼻炎患者は、スギ、ブタクサなどの花粉をはじめとする抗原に特異的なimmunoglobulin (Ig) E抗体を保有し、これら特異抗原に曝露されると、その約90%が即時性に上記の三主徴を発症する。さらに、抗原に繰り返し曝露されることによって慢性および重症化した患者では、即時性の反応のみならず、遅発性の鼻閉が獲得されることが報告されている。また、気管支喘息は、気道粘膜の慢性炎症性疾患であり可逆性の気道狭窄が生じ、その結果、咳と喘鳴を伴った発作性の呼吸困難を繰り返す病態である。その症状としては、気道平滑筋の収縮、血管透過性亢進による浮腫、白血球の浸潤、杯細胞の過形成、さらには症状の増悪

化に伴い、気管支の線維化が起こる。気管支喘息患者に抗原を吸入させると、30分以内に誘発される即時性喘息反応、および抗原吸入後数時間後に始まり比較的長時間持続する遅発性喘息反応からなる二相性の反応が誘起されることが知られている。遅発性喘息反応は重症喘息患者の特徴的な症状の一つとされている。一方、アレルギー患者の増加は、環境汚染と密接な関係があることが指摘されており、今後ナノ粒子もアレルギー性気管支喘息の発症に対して影響を与える可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ナノテクノロジーは豊かな未来社会を担う新技術として期待される一方で、ナノ粒子による健康や環境への影響が懸念されている。ここでは、ナノ粒子としてカーボンナノチューブを用いて、アレルギー性気管支喘息に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

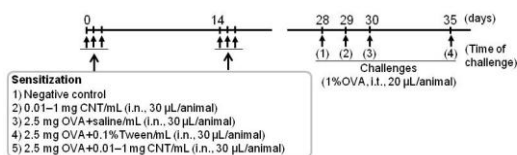


Fig. 1 Experimental study protocol.

CNT, carbon nanotube (multi-walled, 10-15 nm x 0.1-10 µm); i.n., intranasal; i.t., intratracheal.

感作および惹起方法は、Fig. 1に示す。Ovalbumin (OVA)溶液にカーボンナノチューブ(Multiple walled carbonnanotube, CNT)を加え、それを繰り返し鼻腔から気管内に投与することによりマウスを感作した。その後、感作マウスにOVAを気管内に直接4回投与することにより惹起した。抗原惹起4回目の気道抵抗の変動は、覚醒下のマウスを多機能呼吸測定装置 (Pulmos-I, M.I.P.S.) に

より測定した。また、抗原惹起 4 回目の 24 時間後に気管支肺胞洗浄を行うことにより炎症細胞数の変動を測定した。

#### 4. 研究成果

OVA とカーボンナノチューブで感作したマウスの抗原惹起 4 回目において、惹起 10 分および 3 時間後をピークとする二相性の喘息反応が観察され、それらの程度は OVA もしくはカーボンナノチューブの単独で感作した群より明らかに増加していた(Fig. 2)。気管支肺胞洗浄液中には明らかな好酸球の増加(Fig. 3)、さらには肺組織中への炎症細胞の浸潤が観察された (Fig. 5)。OVA-CNT で感作したマウスでは血中の抗体価 (IgE, IgG1 および IgG2a) の上昇が認められた(Fig. 4)。さらには、気道リモデリングの症状である杯細胞の過形成が OVA+CNT 群において明らかに認められた(Fig. 6)。また、CNT 単独の投与においても若干杯細胞の過形成が観察された (Fig. 6)。

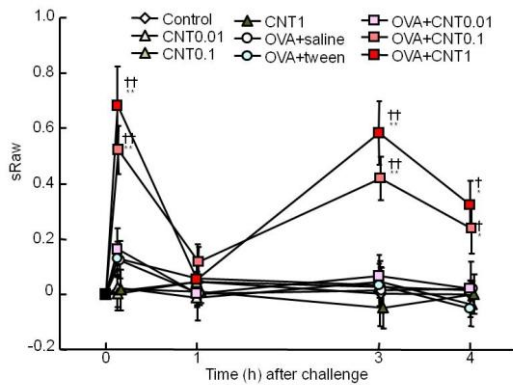


Fig.2 Effect of carbon nanotube on biphasic asthmatic response induced by the 4th antigen challenge in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 4 to 7 animals. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with control group. †p<0.05 and ††p<0.01 compared with the OVA+tween group.

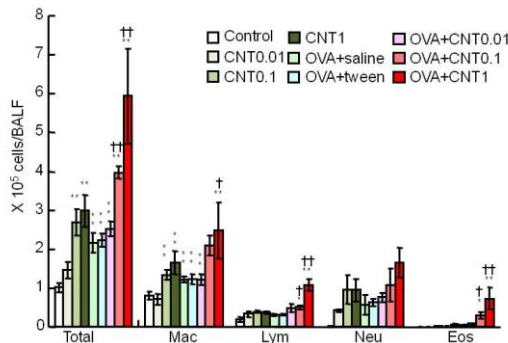


Fig.3 Effect of carbon nanotube on inflammatory cells in BALF after the 4th antigen challenge in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 4 to 7 animals. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with control group. †p<0.05 and ††p<0.01 compared with the OVA+tween group.

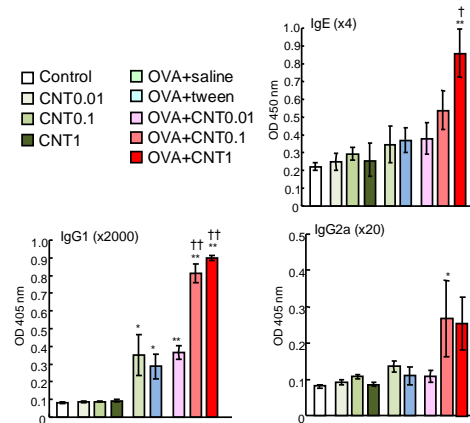


Fig.4 Effect of carbon nanotube on the increases of IgE, IgG1 and IgG2a at the 4th antigen challenge in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 4 to 7 animals. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with control group. †p<0.05 and ††p<0.01 compared with the OVA+tween group.

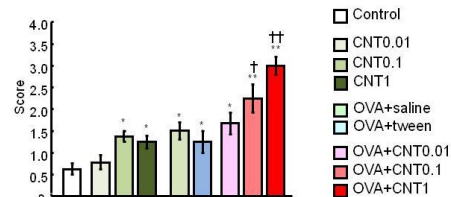
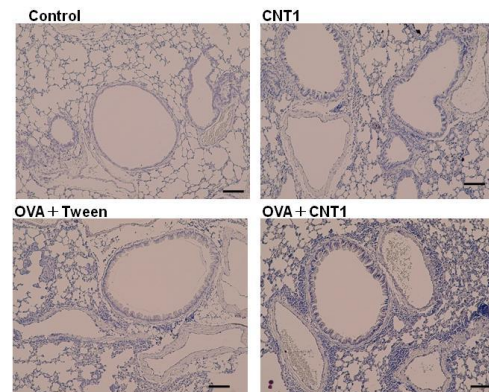
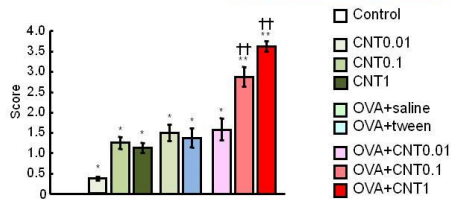
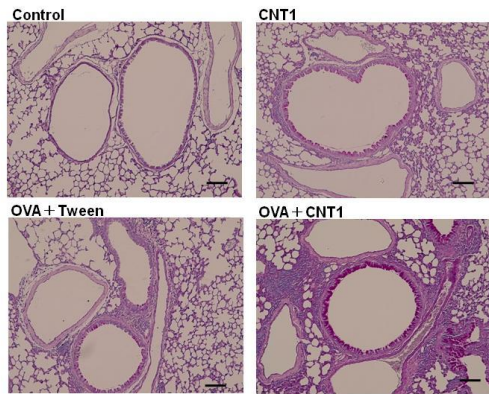


Fig.5 Effect of carbon nanotube on inflammation (H&E) in the lungs of the mice.

Bar shows 100  $\mu$ m. Histological appearance 24 h after the 4th challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 4 to 7 animals. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with control group. †p<0.05 and ††p<0.01 compared with the OVA+tween group.



**Fig.6 Effect of carbon nanotube on goblet cell hyperplasia (PAS) in the lungs of the mice.**

Bar shows 100  $\mu$ m. Histological appearance 24 h after the 4th challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 4 to 7 animals. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared with control group. † $p$ <0.05 and †† $p$ <0.01 compared with the OVA+tween group.

以上の成績より、カーボンナノチューブを抗原とともに肺へ投与することにより感作したマウスにおいて、二相性喘息反応の増悪化ならびに肺への好酸球の浸潤が誘起されることが明らかとなった。また、慢性化において認められる杯細胞の過形成も明らかな増加が観察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

Hutamekalin, P, Takeda K, Tani M, Tsuga Y, N. Ogawa, Mizutani N, and Yoshino S. Effect of the C3a-receptor antagonist SB290157 on anti-OVA polyclonal antibody-induced arthritis. *J Pharmacol Sci* 112; 56-63 (2010)

Mizutani N, Nabe T, Yoshino S. Complement C3a regulates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 183; 4039-4046 (2009)

Mizutani N, Fuchikami J, Takahashi M, Nabe T, Yoshino S, Kohno S. Pulmonary emphysema induced by cigarette smoke solution and lipopolysaccharide in Guinea pigs. *Biol Pharm Bull.* 32; 1559-1564

(2009)

Fujii M, Nakamura T, Fukuno S, Mizutani N, Nabe T, Kohno S. Ethanol aggravates itch-related scratching in hairless mice developing atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* 611; 92-99 (2009)

Ogita-Nakanishi H, Nabe T, Mizutani N, Fujii M, Kohno S. Absence of nasal blockage in a Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis model mouse. *Allergol Int.* 58; 171-178 (2009)

Mizutani N, Fuchikami J, Takahashi M, Nabe T, Yoshino S, Kohno S. Development of cigarette smoke solution- and lipopolysaccharide-induced pulmonary emphysema in guinea pigs. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 135; 25-29 (2010)

Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, Mizutani N, Brand DD, Waritani T, Terato K, Yoshino S. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. *J Immunol Methods.* 343; 49-55 (2009)

Mizutani N, Aoki Y, Nabe T, Ishiwaru M, Yoshino S, Takagaki H, Kohno S. Effect of TA-270, a novel quinolinone derivative, on antigen-induced nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis. *Eur J Pharmacol.* 602; 138-42 (2009)

Nabe T, Kubota K, Mizutani N, Fujii M, Terada T, Takenaka H, Kohno S. Effect of local nasal immunotherapy on nasal blockage in pollen-induced allergic rhinitis of Guinea pigs. *Allergol Int.* 57; 419-27 (2008)

Nabe T, Tsuzuike N, Ohtani Y, Mizutani N, Watanabe S, Fujii M, Yoshimura M, Nagasawa M, Kohno S. Important roles of tachykinins in the development of allergic nasal hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy.* 39; 138-46 (2009)

Mizutani N, Suda M, Ishimura M, Kurokawa S, Nabe T, Kohno S. Effects of KP-496, a novel dual antagonist of leukotriene D4 and thromboxane A2 receptors on nasal blockage in guinea pig models of allergic rhinitis. *Inflamm Res.* 57; 247-51 (2008)

Nagata T, Nabe T, Fujii M, Mizutani N, Kohno S. Effects of multiple dexamethasone treatments on aggravation of allergic conjunctivitis associated with mast cell hyperplasia. Biol Pharm Bull. 31; 464-8 (2008)

Mizutani N, Nabe T, Fujii M, Yoshino S, Kohno S. Involvement of peroxynitrite in pollen-induced nasal blockage in guinea pigs. Eur J Pharmacol. 582; 139-44 (2008)

〔学会発表〕(計 20 件)

Pilaiwanwadee Hutamekalin, Kouya Yamaki, Nobuaki Mizutani, Shin Yoshino. Efficacy of a new 5-clone cocktail of anti-type II collagen monoclonal antibodies in induction of severe arthritis. 第 53 回日本リウマチ学会総会 2009 年 4 月 23 日 東京

水谷暢明、奈邊 健、吉野 伸. ナノ粒子のアレルギー性気管支喘息に及ぼす影響. 第 59 回アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日 秋田

Yasuhiro Ammori, Nobuaki Mizutani, Kouya Yamaki, Shin Yoshino. Antigen-specific suppression of asthmatic responses in mice by pathogenic antibody Fab fragments (Fabs). 第 39 回免疫学会総会 2009 年 12 月 2 日 大阪

HIDAKA Souta , MONZEN Yukari , YAMAKI Kouya , MIZUTANI Nobuaki, YOSHINO Shin. Production of mouse IgG3 monoclonal antibodies (mAbs) to ovalbumin (OVA) and their role in inflammation in vivo and in vitro. 第 39 回免疫学会総会. 2009 年 12 月 2 日 大阪

五島浩文、水谷暢明、奈邊 健、吉野 伸. 抗原特異的 IgE モノクローナル抗体により誘導したマウス喘息モデルにおける complement C3a の役割. 第 116 回 日本薬理学会近畿支部 2009 年 11 月 13 日 滋賀

庵森 靖弘、水谷暢明、鳥井 栄貴、八巻 耕也、奈邊 健、吉野 伸. Fab フラグメントによるアレルギー性気管支喘息の抗原特異的制御に関する研究. 薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28~30 日 岡山

水谷暢明、五島 浩文、奈邊 健、吉野 伸. 抗原特異的 IgE モノクローナル抗体により誘

導した遅発性喘息反応における IgG1 の役割. 薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28~30 日 岡山

五島 浩文、水谷暢明、奈邊 健、吉野 伸. 抗原特異的 IgE モノクローナル抗体により誘導した遅発性喘息反応における complement C3a の役割. 薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28~30 日 岡山

松矢 好生、細川 芙砂、森下 豊子、池堂 歩、藤井 正徳、水谷暢明、吉野 伸、奈邊 健. マウス遅発性喘息反応 (LAR) の発症における肥満細胞、好塩基球および CD4+細胞の関与. 薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28~30 日 岡山

堀端 真次、八巻 耕也、水谷暢明、吉野 伸. 卵白アルブミンに対する種々のアイソタイプのモノクローナル抗体による補体活性化の検討. 薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28~30 日 岡山

日高総太、八巻耕也、水谷暢明、吉野 伸. アレルゲン特異的 IgG3 モノクローナル抗体の樹立及び、そのアレルギー反応における役割. 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 27 日 京都 (国際会館)

五島浩文、水谷暢明、八巻耕也、奈邊 健、河野茂勝、吉野 伸. 抗原特異的 IgE モノクローナル抗体によるアレルギー性気管支喘息誘導に関する研究. 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 27 日 京都 (国際会館)

水谷暢明、奈邊 健、八巻耕也、河野茂勝、吉野 伸. マウス喘息症状における complement C3a の関与についての検討. 日本薬学会 第 129 年会. 2009 年 3 月 27 日. 京都 (国際会館)

Pilaiwanwadee Hutamekalin, Mariko Sasahara, Kouhei Takeda, Mitsuhiro Tani, Yuuko Tsuga, Kouya Yamaki, Nobuaki Mizutani, Shin Yoshino. Role of the C3a receptor antagonist SB290157 on anti-OVA polyclonal antibody-induced arthritis. 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 28 日 京都 (国際会館)

小川直希、八巻耕也、水谷暢明、吉野 伸. 抗原抗体複合体による補体活性化の測定. 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 28 日 京都 (国際会館)

水谷暢明、奈邊 健、八巻耕也、河野茂勝、吉野 伸. マウスを用いた二相性喘息反応に

おける complement C3a の関与についての検討. 第 58 回 日本アレルギー学会. 2008 年 11 月 27・28・29 日. 東京 (東京国際ホーム)

五島 浩文、水谷 暢明、八巻 耕也、奈邊 健、河野 茂勝、吉野 伸. 抗卵白アルブミン IgE モノクローナル抗体を用いた二相性喘息反応の誘導  
. 第 58 回 日本薬学会近畿支部総会・大会  
2008 年 10 月 25 日 (土) 神戸

水谷暢明、奈邊 健、藤井正徳、吉野 伸、平山晃久、河野茂勝. モルモットにおけるアレルギー性鼻炎症状に及ぼす多環芳香族炭化水素の曝露の影響. 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会 2008 年 9 月 11・12 日 東京(タワーホール船橋)

吉野 伸、八巻 耕也、水谷 暢明、Pilaiwanwadee Hutamekalin、笹原 真利子. Fab フラグメントによる抗体依存性関節炎の特異的抑制. 第 29 回 日本炎症・再生医学会. 2008 年 7 月 8 日. 東京

水谷暢明、淵上淳一、高橋真樹、奈邊 健、吉野 伸、河野茂勝. モルモットを用いたタバコ煙溶液およびリポポリサッカライド誘発による肺気腫モデルの作製. 第 113 回 日本薬理学会 近畿部会. 2008 年 6 月 20 日 岡山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.kobepharma-u.ac.jp/guid/guid\\_09d.html](http://www.kobepharma-u.ac.jp/guid/guid_09d.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 暢明 (MIZUTANI NOBUAKI)

神戸薬科大学・薬理学研究室・講師

研究者番号：90340447