

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390197

研究課題名（和文）環境ナノ粒子が高感受性呼吸器疾患に及ぼす悪影響

研究課題名（英文）Studies for the adverse effects of environmental nanoparticles on sensitive pulmonary diseases

研究代表者

井上 健一郎（INOUE KEN-ICHIRO）

北里大学薬学部教授

研究者番号：20373219

研究成果の概要（和文）：大気浮遊粒子状物質の健康影響は疫学的にも実験的にも、炎症性呼吸器疾患を有する集団に発現しやすい（高感受性呼吸器疾患）。本研究では、新たな大気汚染のリスク物質である環境ナノ粒子曝露がこれら高感受性呼吸器疾患（気管支喘息、COPD）に与える影響を、申請者の共同研究機関である国立環境研究所に設置されている「ナノ粒子リッチディーゼル排気（NR-DE）曝露チャンバー」及び同施設から捕集・抽出した「ディーゼルナノ粒子（NR-DEP）」を用いて *in vivo*、*in vitro* で実験的に検討し、その（悪）影響メカニズムを解明することを目的とした。研究成果として、肺気腫に及ぼすナノ粒子の影響に関する研究では、DE 曝露チャンバーを用いて、同曝露によるエラスターゼ誘発肺気腫へ及ぼす影響を検討したところ、気管支肺胞洗浄液中細胞所見、肺での炎症性サイトカイン発現ともに悪化・増強は認めなかった。一方、喘息に及ぼす NR-DE 慢性曝露の *in vivo* 影響に関する研究では、アレルギー性肺炎は特に高濃度 NR-DE 群でコントロールエア群と比較して増強傾向を認めた。また、その内在メカニズムとして肺における酸化ストレス関連分子の産生・発現増強の寄与が示唆された。*in vitro* 研究では、マウスから分離・分化培養した樹状様細胞に NR-DEP を曝露したところ、細胞表面上の抗原提示に関わる分子（CD86 等）の発現が概ね濃度依存的に増強することが明らかとなった

研究成果の概要（英文）：In reality, we inhale suspended DEP and/or nanoparticles in ambient air. Nevertheless, assessment of the impact of inhalation/intratracheal exposure to diesel engine-derived nanoparticles, a more realistic exposure, on the lung inflammation model has never been conducted. Furthermore, as far as we know, no study has examined the dose-dependent effects of inhaled nanoparticles on predisposed subjects. The present study investigated the impact of pulmonary exposure to diesel-engine-derived nanoparticles on emphysematous lung injury and allergic airway inflammation and dissolved its underlying mechanisms. In the first experiments, CBNP of 14 nm significantly induced acute lung inflammation in non-elicited subjects, and aggravated PPE-elicited airway neutrophilic inflammation at an early stage, which was concomitant with the enhanced lung expression of proinflammatory cytokines. In the next experiments, high concentration of NR-DE significantly deteriorated OVA-induced eosinophilic airway inflammation. On the other hand, DE gas did not influence PPE-induced pulmonary inflammation with emphysema. In *in vitro* experiments, NR-DEP significantly enhanced mucin-1 expression on BEAS-2B cells and surface expression of CD86 on mouse-derived splenocytes and dendritic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,500,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,500,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,330,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：環境保健

1. 研究開始当初の背景

吸入されたナノ粒子は肺胞領域に沈着しやすい。粒径が小さなナノ粒子は、重量当りの表面積が著しく大きくなるため、ナノ粒子表面に付着している化学物質等可溶性物質の体内吸収が促進される可能性があるだけでなく、ナノ粒子自体が肺胞壁を通過して血液循環系に移行する可能性も考えられるため、これまで問題とされてきた粒子径 2.5 μm 以下の粒子状物質、PM2.5にも増して呼吸器・循環器系への単独悪影響が危惧されてきた。一方、既に呼吸器・循環器系に疾患を有している状態（急性肺損傷、気管支喘息、肺線維症、全身性炎症反応症候群、等）へのナノ粒子の増悪影響については、主として申請者らのグループにより、先導的に行われてきた。しかし、上記ナノ粒子は、ナノ材料として用いられているカーボン粒子やラテックス粒子等を用いた、“モデルナノ粒子”であり大気中の“環境ナノ粒子”ではない。すなわち、自動車等の移動発生源由来の“環境ナノ粒子”の生体影響評価に関しては、曝露施設がないことからこれまで行われていなかった。世界中で激増している「肺気腫」「気管支喘息」といった呼吸器疾患は、PMに対して高感受性であることが疫学的にも実験的にも示唆されてきた。しかし“環境ナノ粒子”が、上記PMに対する「高感受性呼吸器疾患」に及ぼす増悪影響に関する実験的研究は全く存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、新たな大気汚染のリスク物質である環境ナノ粒子曝露が高感受性呼吸器疾患（主として気管支喘息、COPD）に与える影響を、申請者の共同研究機関である国立環境研究所に設置されている「ナノ粒子リッチディーゼル排気（NR-DE）曝露チャンバー」及び同施設から捕集・抽出した「ディーゼル

ナノ粒子（NR-DEP）」を用いて *in vivo*、*in vitro* で実験的に検討し、その（悪）影響メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

[1] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子の経気道(*in vivo*)曝露がエラストーゼ誘起肺気腫に及ぼす影響評価：曝露チャンバーより採取した環境ナノ粒子を、正常マウス及び肺気腫マウスへ経気道曝露した際の各病態に及ぼす影響を気管支肺胞洗浄液(BAL)、肺病理組織、呼吸機能、肺内サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、KC、MCP-1、RANTES、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17、IL-23、IL-25、IL-27、IFN- γ 、TGF- β 1、MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP、等）濃度等のパラメーターから検討した。また影響を認めた際は、細胞シグナル関連分子への影響についても掘り下げて検討した。

[2] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子の経気道(*in vivo*)曝露が気管支喘息に及ぼす悪影響評価：環境ナノ粒子を経気道曝露する系により、*in vivo*での環境ナノ粒子の同病態への増悪影響をBAL、肺病理組織、呼吸機能、肺内サイトカイン（NF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、IL-27、IL-33、IFN- γ 、TGF- β 1、IL-33、eotaxin、TARC、MDC、KC、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES等）濃度、特異的抗体価（IgE、IgG1、IgG2a）等のパラメーターから検討した。また影響を認めた際は、細胞シグナル関連分子への影響についても掘り下げて検討した。

[3] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子曝露による *in vitro*での影響評価：肺気腫においては肺胞マクロファージが、気管支喘息においては樹状細胞やリンパ球がエフェクター細胞としてその病態に寄与する。また、吸入異物にとって気道上皮は、呼吸器における

最初の物理化学的接点である。そこでこれら（肺胞マクロファージ、樹状細胞、リンパ球、気道上皮細胞、等）複数の細胞培養系に、曝露チャンバーより採取した環境ナノ粒子を *in vitro* で曝露することにより各細胞に及ぼす影響を各細胞の増殖能、傷害（逸脱酵素やアポトーシスの誘導、等）や活性化（液性因子産生、表面マーカー発現、遺伝子発現変化、等）等の指標から検討した。また影響を認めた際は、細胞シグナル関連分子

(SOCS(Suppressors of Cytokine Signaling)-3, STAT-6, GATA-3, c-Maf, NF- κ B, Nrf2, NF-AT, ROR γ t, PI3K, JAK-STAT pathway, MAPK (Ras-ERK, p38) pathway, Smad, DOCK2, Rac, Runx, STAT-4, T-bet, STAT-3, Foxp3 等) への影響についても掘り下げて検討した。

[4] 曝露チャンバー排出環境ナノ粒子吸入曝露が高感受性呼吸器疾患モデルに及ぼす増悪影響評価：国立環境研究所内のディーゼルエンジン由来環境ナノ曝露チャンバーを用いて環境ナノ粒子の亜急性及び慢性吸入曝露が、正常マウスのみならず、高感受性呼吸器疾患マウスに与える影響を検討した。検討項目に関しては[1][2]に順った。

4. 研究成果

[1] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子の経気道(*in vivo*)曝露がエラストーゼ誘起肺気腫に及ぼす影響評価：最初に、粒径の異なるカーボンブラックナノ粒子 (CBNP) を用いて、エラストーゼ誘発肺気腫へ及ぼす影響を検討したところ、14nm の大きさの CBNP

(50 μ g) が同病態 (好中球性気道炎症、肺における炎症性サイトカイン発現) を有意に増悪させた (Figure 1: **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** 誌に掲載)。次に行った、肺気腫に及ぼす捕集ナノ粒子の影響に関する研究では、vehicle、NR-DEP、エラストーゼ、NR-DEP + エラストーゼ をそれぞれマウスに単回気管内投与したところ、エラストーゼ投与群で認められた気腫性炎症は NR-DEP + エラストーゼ群において気管支肺胞洗浄液中細胞所見、肺での炎症性サイトカイン発現ともに顕著な悪化・増強は認めなかった (論文作成中)。

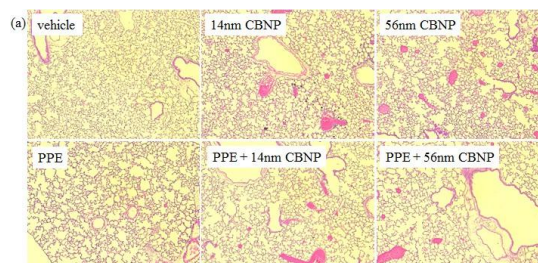
[2] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子の経気道(*in vivo*)曝露が気管支喘息に及ぼす悪影響評価：喘息に及ぼす捕集ナノ粒子の *in vivo* 影響に関する研究では、vehicle、NR-DEP、抗原(OVA)、NR-DEP + OVA をそれぞれマウスに反復気管内投与したところ、抗原投与群で認められたアレルギー性気道炎症は NP + OVA 群において気管支肺胞洗浄液中細胞所見、肺での炎症性サイトカイン発現ともに顕著な悪化・増強は認めなかった (Figure 2)。

[3] ディーゼルエンジン由来環境ナノ粒子曝露による *in vitro* での影響評価：*in vitro* 研究では、気道上皮細胞株に上記ナノ粒子を曝露したところ、気道上皮細胞よりのムチンの発現が概ね濃度依存的に増強することが明らかとなった (論文投稿中)。また、マウスから分離した脾細胞に NR-DEP を曝露したところ、脾細胞表面上の抗原提示に関わる分子 (CD86 等) の発現と炎症性サイトカイン (IL-17、IL-18、ROR- γ 等) 産生が概ね濃度依存的に増強することが明らかとなった

(Figure 3: **Immunopharmacology and Immunotoxicology** 誌、**Journal of Immunotoxicology** 誌、**Journal of Toxicological Sciences** 誌に掲載)。一方、マウスから分離・分化培養した樹状様細胞に NR-DEP を曝露したところ、細胞表面上の抗原提示に関わる分子 (CD86 等) の発現が概ね濃度依存的に増強することが明らかとなった (Figure 4:論文作成中)。

[4] 曝露チャンバー排出環境ナノ粒子吸入曝露が高感受性呼吸器疾患モデルに及ぼす増悪影響評価：喘息に及ぼす NR-DE 慢性曝露の *in vivo* 影響に関する研究では、アレルギー性肺炎は特に高濃度 NR-DE 群で (D2・D3) コントロールエア群と比較して増強傾向を認めた。また、そのメカニズムに肺における酸化ストレス関連分子の産生・発現増強の寄与が示唆された (Figure 5: 論文投稿中)。一方、肺気腫に及ぼすナノ粒子の影響に関する研究では、DE 曝露チャンバーを用いて、同曝露によるエラストーゼ誘発肺気腫へ及ぼす影響を検討したところ、気管支肺胞洗浄液中細胞所見、肺での炎症性サイトカイン発現ともに顕著な悪化・増強は認めなかった (論文作成中)。

Figure 1:肺病理組織像 (a) 及び気道浸潤白血球数 (カーボンナノ粒子による肺気腫への影響 : b)



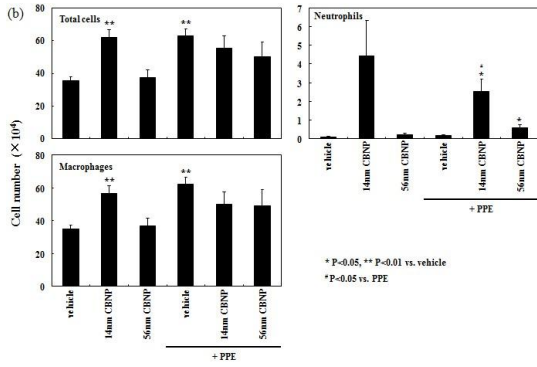


Figure 2: NR-DEP 曝露によるマウスアレルギー性気道炎症への影響;気道浸潤白血球数 (a) および各種サイトカイン、抗体価の変化 (b) *P < 0.05 vs. vehicle、** P < 0.01 vs. vehicle、# P < 0.05 vs. NR-DEP

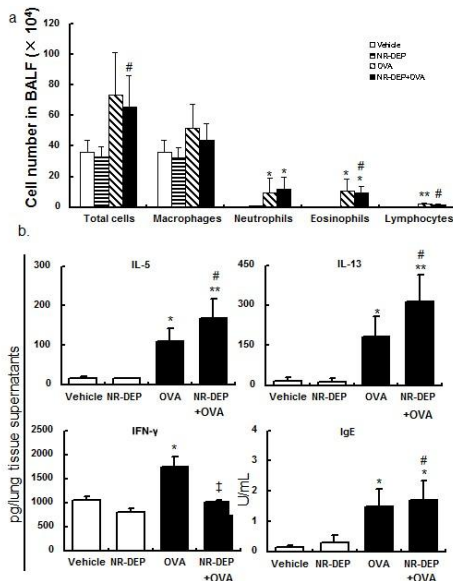


Figure 3: NR-DEP 曝露によるマウス脾細胞中炎症性サイトカイン (IL-18) 産生 (a) および *in vitro* における mucin-1 産生 (b) *P < 0.05 vs. vehicle、** P < 0.01 vs. vehicle

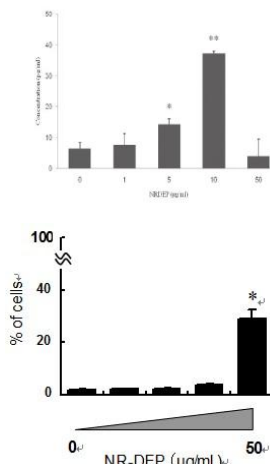


Figure 4:脾細胞表面上の抗原提示に関わる分子 (CD86 等) の発現 *P < 0.05 vs. vehicle、** P < 0.01 vs. vehicle

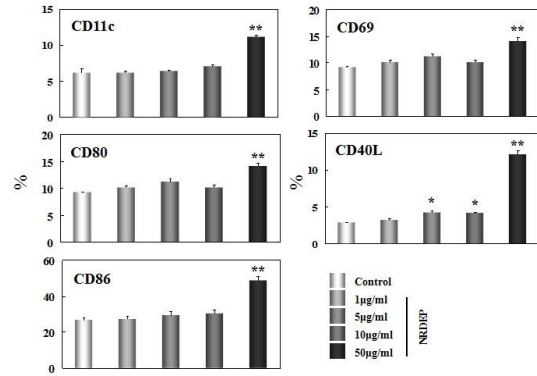


Figure 5: NR-DE 曝露によるマウスアレルギー性気道炎症への影響;気道浸潤白血球数 (a)、肺組織像 (b) 各種サイトカイン、抗体価の変化 (c) 酸化ストレスの影響 (d) *P < 0.05 vs. corresponding vehicle、** P < 0.01 vs. corresponding vehicle、# P < 0.05 vs. CA-OVA、## P < 0.01 vs. CA-OVA、†† P < 0.01 vs. D2-OVA

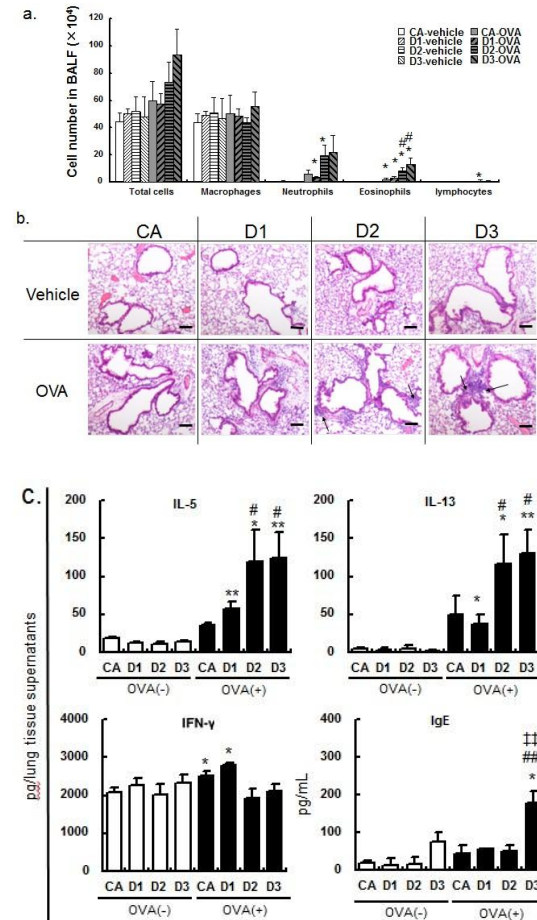
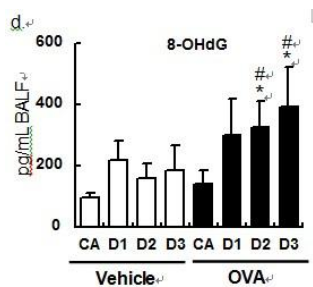


Figure 6: NR-DEP 曝露によるマウス脾細胞中炎症性サイトカイン (IL-18) 産生 (a) および *in vitro* における mucin-1 産生 (b) *P < 0.05 vs. vehicle、** P < 0.01 vs. vehicle



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 11 件)

1) Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, Takamiya R, Fujishima S, Takano H, Ishizaka A. Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. *Exp Biol Med* 236: 315-324, 2011. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427237>

2) Inoue K, Yanagisawa R, Koike E, Nakamura R, Ichinose T, Tasaka S, Kiyono M, Takano H. Effects of carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysematous lung injury in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108: 234-240, 2011. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266011>

3) Inoue K, Fujitani Y, Kiyono M, Hirano S, Takano H. In vitro effects of nanoparticle-rich diesel exhaust particles on splenic mononuclear cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33: 519-524, 2011. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21231886>

4) Nakamura R, Inoue K, Fujitani Y, Kiyono M, Hirano S, Takano H. Effects of nanoparticles on IL-17 production in vitro. *J Immunotoxicol* 9: 72-76, 2012. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22299717>

5) Nakamura R, Inoue K, Fujitani Y, Kiyono M, Hirano S, Takano H. In vitro study of the nanoparticle-rich diesel exhaust particles on IL-18 production in splenocytes. *J Toxicol Sci* 36: 823-827, 2012. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129746>

6) Inoue K, Takano H. Effects of nanoparticles on lung damage in human. *Eur Respir J* 35: 224-225, 2010. (letter: 査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044466>

7) Inoue K, Takano H. Adjuvantcity of nanoparticles on Th immunity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106: 445, 2010. (letter: 査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569252>

8) Inoue K, Takano H. The effects of nanoparticles on airway allergy in mice. *Eur Respir J* 37: 1300-1301, 2011. (letter: 査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532026>

9) Inoue K, Takano H. Aggravating impact of nanoparticles on immune-mediated pulmonary inflammation. *The ScientificWorld J* 11: 382-390, 2011. (総説: 査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336454>

10) Inoue K, Takano H. Biology of diesel exhaust particles on allergic pulmonary inflammation. *Yakugaku Zasshi* 131: 367-371, 2011. (総説: 査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372531>

11) Inoue K. Promoting effects of nanoparticles/materials on sensitive lung inflammatory disease. *Environ Health Preven Med* 16: 139-143, 2011. (総説: 査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1) 井上健一郎: ナノ粒子が呼吸器系に及ぼす増悪影響に関する研究 (日本衛生学会奨励賞受賞講演) 第 80 回日本衛生学会 2010 年 5 月 10 日 仙台

2) 井上健一郎: ナノ粒子による肺炎促進作用 第 51 回大気環境学会 (分科会シンポジウム) 2010 年 9 月 8 日 大阪

3) 田中満崇, 井上健一郎, 清野正子, 中村亮介, 曾根有香, 高野裕久: ナノ粒子リッチなディーゼル排気 (NR-DE) の吸入曝露によるマウスアレルギー性気道炎症の修飾 第 23 回アレルギー学会春季大会 2011 年 5 月 幕張

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 健一郎 (INOUE KEN-ICHIRO)

北里大学薬学部教授

研究者番号：20373219

(2)研究分担者

曾根有香 (SONE YUKA)

北里大学薬学部助教

研究者番号：60550035

(3)連携研究者

()

研究者番号：