

## 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 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590125

研究課題名（和文） ナノサイズ酸化亜鉛と酸化チタンの自己免疫疾患に与える影響およびそのメカニズム

研究課題名（英文） Effect of nano-sized zinc oxide and titanium oxide on autoimmune diseases and its mechanisms

研究代表者

吉野 伸 (YOSHINO SHIN)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00260729

研究成果の概要（和文）：ナノサイズ酸化亜鉛および酸化チタンの自己免疫疾患に対する影響について検討した。自己免疫疾患モデルとしてマウス膠原関節炎（CIA）を用い、酸化亜鉛および酸化チタンは種々の用量、投与期間によってその暴露影響について検討した。その結果、これらナノマテリアルの CIA に対する有意な影響はみられなかった。しかし、これら暴露群においては Th2 サイトカイン産生の増加が明らかになった。したがって、ナノマテリアルは Th2 依存性アレルギー疾患に影響を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The effect of nano-sized zinc oxide and titanium oxide on autoimmune diseases was investigated. Collagen-induced arthritis (CIA) in mice was used as a model of autoimmune diseases and various doses of these nanomaterials were administered. As a result, both nano-sized materials failed to influence CIA. However, the materials appeared to increase the production of Th2 cytokines, suggesting that they might affect Th2-dependent allergic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫毒性

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ナノ粒子、酸化亜鉛、酸化チタン、自己免疫、サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーは情報、通信、バイオ、医療等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 (Lehn J.M., Science, 295:2400, 2002)。このテクノロジーの根幹を支えているのが、いわゆるナノ粒子と呼ばれる非常に細か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ているため、水および土壌などの環境中に排出された場合、食物連鎖等を介するヒトへの影響が危惧されている。たとえば、ナノ粒子は単細胞によって取り込まれ、

食物連鎖によってミジンコ、魚および動物の器官に蓄積されることから、ヒトもまたナノ粒子によって影響を受ける可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

ナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響およびそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。研究代表者はこれまで自己免疫疾患の発症メカニズムに関する研究を行ってきた。また、ディーゼル排気微粒子等の大気汚染物質によって Th1・Th2 免疫系および自己免疫疾患は影響を受けることを見出した。今後、ナノ粒子の生産増加に伴い、ヒトはナノ粒子によって暴露される機会が増大すると予想され、自己免疫系は影響を受ける可能性がある。したがって、本研究では自己免疫疾患の動物モデルを用い、これら疾患モデルに影響を及ぼし得るナノ粒子の暴露条件 (ナノ粒子の種類、粒径、暴露量、暴露期間) について詳細に検討し、さらに自己免疫疾患には種々の免疫担当細胞によって産生されるサイトカインが重要な役割を果たしていることから、ナノ粒子のサイトカイン産生に与える影響について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

自己免疫疾患モデルとして、自己抗体が重要な役割を果たしているコラーゲン関節炎 (マウスモデル) と自己反応性 T 細胞が関与しているアジュバント関節炎 (ラットモデル) とを用い、これらの自己免疫性関節炎の発症およびその重症度に与えるナノサイズの酸化亜鉛および酸化チタンの影響について臨床的 (肉眼的点数法)、病理組織学的 (H & E 染色)、免疫組織学的に検討した。また、これらナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響は、その粒子径 (酸化亜鉛: 15、60 nm および酸化チタン: 1、5、50 nm)、暴露量 (1、10、100 mg/kg) および暴露期間 (1、2、4、8、16 週間) によって異なる可能性があるため、これらについて調べた。さらに、抗 II 型コラーゲン抗体 (ELISA 法による IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b)、T 細胞増殖反応 (3H-thymidine の細胞内取り込み法)、自己免疫疾患において重要な役割を果たしている T 細胞によって発現される CD3、CD4、CD8 等 (フローサイトメトリー法)、さらに Th1、Th2、Th17 細胞、制御性 T 細胞によってそれぞれ産生される IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17、TGF- $\beta$ 、マクロファージによる TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等 (炎症性サイトカイン) をサンドイッチ ELISA 法によって測定し、これらナノ粒子の自己免疫性関節炎に与える影響のメ

カニズムについて検討した。また、同時にこれらナノマテリアルのうち、酸化亜鉛のアジュバント作用について検討した。方法としては、抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、DBA マウスを 0.1mg OVA を PBS に溶解し、腹腔内注射した。酸化亜鉛のアジュバント作用を調べるため、0.1mg OVA と酸化亜鉛 (0.3、1、3mg) を併用投与した。ポジティブコントロールとして OVA とアルミニウムアジュバント (Alum) を併用投与した (day 0)。Day 21 に血清中の抗 OVA IgG、IgG1、IgG2a、IgE を ELISA で測定した。また、脾臓細胞を OVA とともに培養し、上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-17 を ELISA で測定した。

## 4. 研究成果

(1) 酸化亜鉛および酸化チタンのコラーゲン関節炎 (CIA) およびアジュバント関節炎に与える影響: 用いた最大の暴露量でのみ CIA の発症率および重症度は有意に低下した。本ナノマテリアルの暴露期間が長いほど、この低下は著明であった。病理組織学的にも関節炎の抑制がみられた。しかし、マウスの体重も減少していたため、これらナノマテリアルの毒性の影響も考えられた。アジュバント関節炎を用いた場合も同様の結果であった。

(2) 酸化亜鉛および酸化チタン暴露動物における抗体産生に対する影響: 用いた暴露量によって抗 II 型コラーゲン抗体 IgG、IgG2a、IgG2b 産生は有意な影響を受けなかった。しかし、Th2 細胞依存性の IgG1 産生の増強がみられた。

(3) 酸化亜鉛および酸化チタン暴露動物における T 細胞抗原発現に対する効果: T 細胞による CD3、CD4、CD8 発現はこれらナノマテリアル暴露によって有意な影響を受けなかった。

(4) 酸化亜鉛および酸化チタン暴露動物におけるサイトカイン産生に対する効果: Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生はこれらナノマテリアル暴露によって影響を受けなかった。また、炎症性サイトカインである TNF- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 産生に対しても有意な効果はみられなかった。しかし、酸化亜鉛暴露動物における IL-4、IL-5、IL-17 産生は有意ではなかったが増強傾向がみられた。これらの結果は、ナノサイズ酸化亜鉛は Th2 反応を増強するアジュバント作用を有する可能性を示唆するものである。

(5) 酸化亜鉛のアジュバント作用: 酸化亜鉛暴露動物において抗 OVA IgG、IgG1、IgE 産生の有意な増加がみられた。しかし、IgG2a

産生は影響を受けなかった (図 1)。また、脾臓細胞によって産生される IL-4、IL-5、IL-17 レベルは対照と比較し高かった。しかし、IFN- $\gamma$ 産生は本暴露によって有意な影響を受けなかった (図 2)。

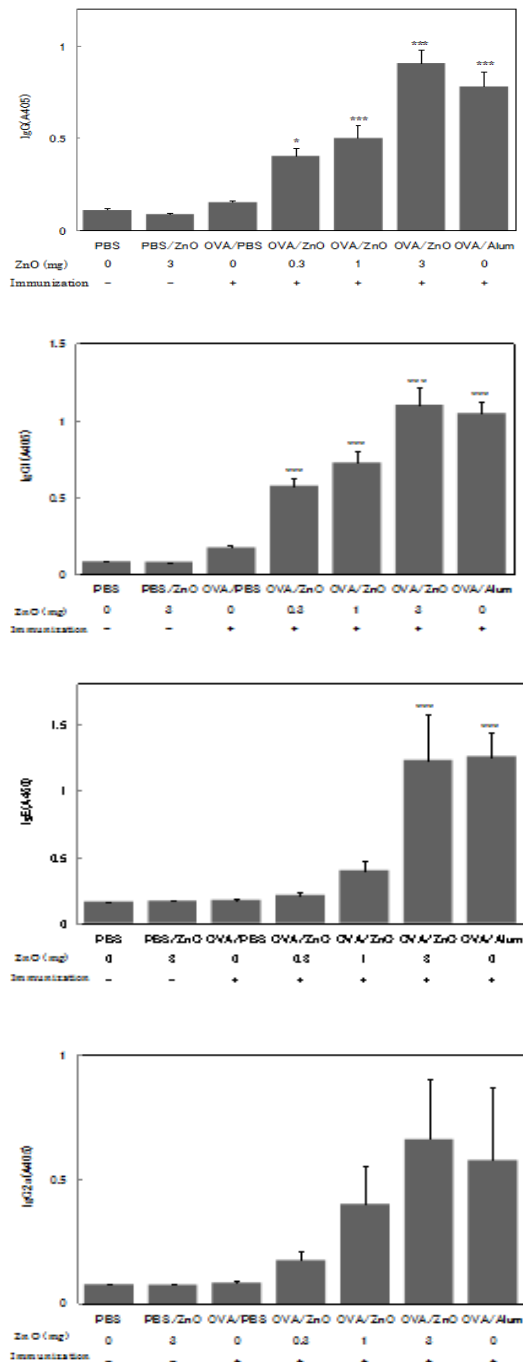


図 1 ナノサイズ酸化亜鉛の抗 OVA IgG、IgG1、IgE、IgG2a 抗体産生に与える影響

本ナノ粒子は、比較的選択的に Th2 免疫系 (IgG1、IgE 産生) に対し促進作用を有すると思われる。Th1 免疫系 (IgG2a 産生) に対してはその作用は弱いと考えられる。

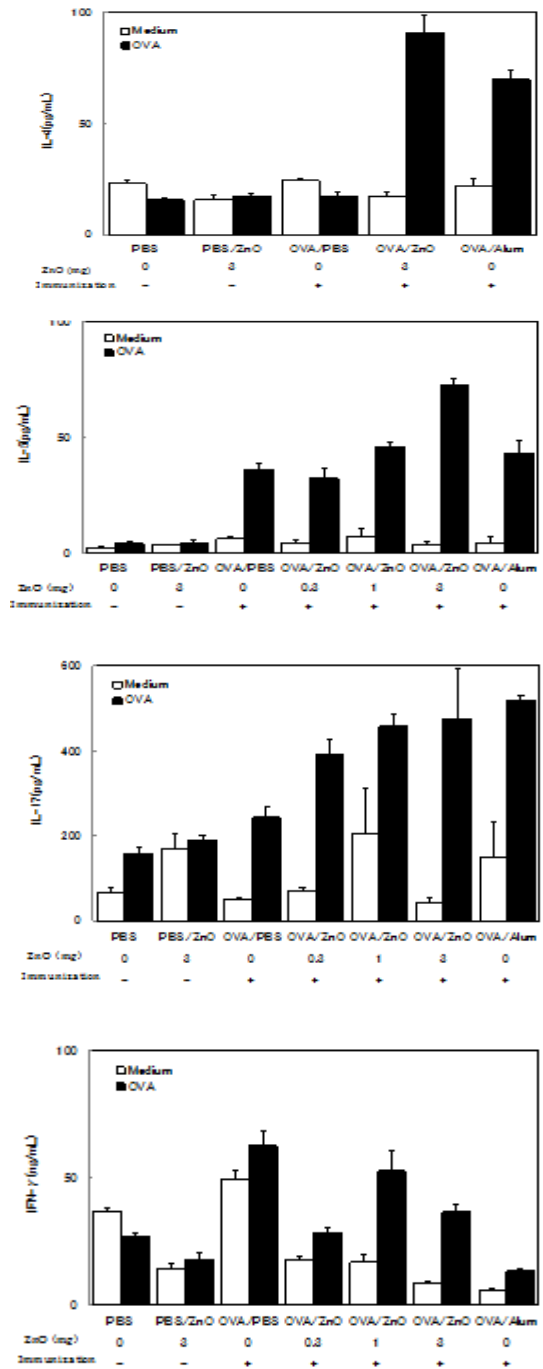


図 2 ナノサイズ酸化亜鉛の脾臓細胞における IL-4、IL-5、IL-17、IFN- $\gamma$ 産生に与える影響

本ナノ粒子は、Th2 (IL-4、IL-5) および Th17 (IL-17) サイトカイン産生に対する促進作用を示すと考えられる。一方、Th1 (IFN- $\gamma$ ) サイトカイン産生に対してはほとんど影響を示さないと思われる。

以上から、ナノサイズの酸化亜鉛および酸化チタン暴露によってコラーゲン関節炎は有意な影響をほとんど受けないと思われる。そ

の理由として、本実験結果に示されているように、これらナノマテリアルはTh1よりもTh2免疫系に対して促進的に作用するため、少なくとも部分的にTh1反応が関与していると考えられる本自己免疫疾患モデルは影響を受けなかったと思われる。今後、ナノ粒子のアレルギー反応およびアレルギー疾患に与える影響について詳細に検討する必要がある。また、予期せず、用いたナノサイズ酸化亜鉛暴露マウスにおいてIL-17産生の増強が観察された。したがって、ナノ粒子のTh17免疫系に与える影響についても詳細に検討する必要があると思われる。

#### 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 12 件)

- ① Mizutani, N., Nabe, T., Yoshino, S. : Exposure to multiwalled carbon nanotubes and allergen promotes early- and late-phase increases in airway resistance in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, in press, 2012. 査読有  
DOI:<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.112-00357>
- ② Nabe, T., Ikedo, A., Hosokawa, F., Kishima, M., Fujii, M., Mizutani, N., Yoshino, S., Ishihara, K., Akiba, S., Chaplin, D.D. : Regulatory role of antigen-induced interleukin-10, produced by CD4(+) T cells, in airway neutrophilia in a murine model for asthma. *Eur. J. Pharmacol.*, 677:154-162, 2012. 査読有  
DOI:10.1016/j.ejphar.2011.12.020.  
Epub 2011 Dec 23
- ③ Mizutani, N., Goshima, H., Nabe, T., Yoshino, S. : Establishment and characterization of a murine model for allergic asthma using allergen-specific IgE monoclonal antibody to study pathological roles of IgE. *Immunol. Lett.*, 141:235-245, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.imlet.2011.10.010.  
Epub 2011 Oct 20.
- ④ Matsumura, M., Takasu, N., Nagata, M., Nakamura, K., Kawai, M., Yoshino, S. : Effect of ultrafine zinc oxide (ZnO) nanoparticles on induction of oral tolerance in mice. *J. Immunotoxicol.*, 7:232-237, 2010. 査読有  
DOI: 10.3109/1547691X.2010.487879
- ⑤ Matsumura, M., Nagata, M., Nakamura,

K., Kawai, M., Baba, T., Yamaki, K., Yoshino, S. : Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 32:56-62, 2010. 査読有

DOI: 10.3109/08923970903124627

[学会発表] (計 9 件)

- ① 水谷暢明、奈邊 健、吉野 伸 : IL-17による好中球浸潤の抗原特異的IgEモノクローナル抗体により誘導された遅発性喘息反応における役割。第132回日本薬学会年会。2012年3月30日。札幌
- ② 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された喘息反応におけるIL-33の役割。第121回日本薬理学会近畿支部会。2012年6月29日。徳島。
- ③ 水谷暢明、奈邊 健、吉野 伸 : 抗原IgEモノクローナル抗体により誘導された気道モデリングにおけるIL-33の役割。第62回日本アレルギー学会秋季学術大会。2011年11月30日。大阪。

[その他]

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉野 伸 (YOSHINO SHIN)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00260729

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし