

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390188
 研究課題名（和文） 高感受性要因に配慮したナノマテリアルの健康影響評価とメカニズムの解明に関する研究
 研究課題名（英文） Studies on the evaluation and mechanisms of health effects of nanomaterials with special emphasis on the sensitivity
 研究代表者
 高野 裕久 (TAKANO HIROHISA)
 独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・領域長
 研究者番号：60281698

研究成果の概要：ナノマテリアルの健康影響、特に高感受性集団に対する健康影響は未だ明らかにされていなかった。本研究では、物性や形状、大きさの異なる数種類のナノマテリアルの影響を、その単独毒性のみならず、高感受性要因に着目して動物個体レベル (*in vivo*) で検討した。1) アレルゲンによるアレルギー性喘息の病態は各種ナノマテリアルにより有意に増悪した。2) 細菌毒素による炎症性の肺傷害及び3) 血液凝固異常も、各種ナノマテリアルにより有意に増悪した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：ナノマテリアル、影響評価、メカニズム解明、アレルギー性気管支喘息、感染性肺傷害、凝固・線溶系異常

1. 研究開始当初の背景

医学、工学、薬学を含む多分野においてナノテクノロジーは応用され、ナノメートルサイズのナノチューブやナノ粒子等の新素材が意図的に大量生産されている。ナノテクノロジーに関連する素材（ナノマテリアル）は、表面積の加増、触媒・酵素活性の上昇、伝導性・磁性・固性の増強、溶解・吸収・透過性の向上、紫外線の吸収、抗菌作用等を目的に創出され、化粧品、歯磨き、抗菌加工品、トナー、インク、塗料、携帯電話等の一般生

活関連製品や、半導体、センサー、ディスプレイ、データ蓄積機器等の一般家電製品にも広く使用されるようになってきているため、人体への曝露機会が急増している。ナノマテリアルは、呼吸器、消化器、皮膚・粘膜を介し人体に曝露される可能性がある。加えて、ナノマテリアルは、吸収性や透過性の向上を目的として作製されている場合も多く、曝露臓器・系統からの容易な吸収による体内侵入と、その後の全身循環系や免疫系等への影響惹起の可能性を否定できない。また、ナノマ

テリアルは上述のように種々の活性が高い場合が多いこと、既報告上、物質が微小であればあるほど生体毒性を發揮する活性酸素・フリーラジカルの生成が多いことなどから、体内に侵入したナノマテリアルの生体影響は、粗大なマテリアルのそれより、はるかに強い可能性も危惧される。

一方、ナノメートルサイズの物質の生体影響に関しては、大気中の浮遊微小粒子状物質に関わる評価研究が先行している。その結果として、微小粒子の生体影響には、それを受けやすい「高感受性群」が存在することが報告されている。それらの「高感受性群」には呼吸器疾患、免疫・アレルギー疾患、循環器疾患等が列挙される。大気中の微小粒子の報告例からも、上述のナノマテリアルの曝露様式や特性からも、呼吸器、免疫・アレルギー系等とそれらに関連する疾患は、ナノマテリアルの健康影響に対する「高感受性群」である可能性が強く想定される。

しかし、当研究計画が実施されるまでは、高感受性要因に配慮したナノマテリアルの健康影響評価はほとんど行われておらず、増悪メカニズムの解明は進んでいなかった。

2. 研究の目的

(1) 「アレルギー性気管支喘息」、「感染性肺傷害」、「凝固・線溶系異常」に種々のナノマテリアルの経気道曝露が与える影響を明らかにすることを目的とした。また、(2) 繊維状・針状物質であるナノチューブが及ぼす健康影響についても明らかにすることを目的とした。一方、(3) 組成の異なる種々のナノマテリアルを複数のサイズで用意し、検討対象物質とすることにより、ナノマテリアルのサイズ、形状、組成と、健康影響の種別や強度との相関性についても検討した。

以上、本研究では、hazard identification と hazard characterization として、ナノマテリアルの健康影響の可能性とそのメカニズムの解明を目的とし、今後の exposure assessment、risk calculation、risk management の必要性を評価する礎とすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 「アレルギー性気管支喘息」への影響

マウスにアレルギー、ナノマテリアルを反復経気道投与し、最終投与 24 時間後に喘息に及ぼす同マテリアルの影響を、気管支肺胞洗浄液の細胞プロファイル、病理組織、血清中アレルギー特異的抗体価、肺ホモジネート上清のサイトカイン・ケモカイン量で検討した。

(2) 「感染性肺傷害」への影響

マウスに細菌毒素、ナノマテリアルを単回経気道投与し、24 時間後に感染性肺傷害に及

ぼす同マテリアルの影響を、気管支肺胞洗浄液の細胞プロファイル、血管透過性 (BALF へのタンパク漏出)、病理組織、肺ホモジネート上清のサイトカイン・ケモカイン量等で検討した。また、細胞レベルでのメカニズム解明を目的として、同マウスより分離した肺胞マクロファージへ *in vitro* で細菌毒素、ナノマテリアルを曝露させ、24 時間後に同細胞から遊離した炎症性サイトカインを測定した。

(3) 「凝固・線溶系異常」への影響

マウスに細菌毒素、ナノマテリアルを単回経気道投与し、24 時間後に血液凝固線溶系に及ぼす同マテリアルの影響を、血漿中フィブリノーゲン、活性化プロテイン C 量等凝固線溶系パラメーターを測定し検討した。また、細胞レベルでのメカニズム解明を目的として、同マウスより分離した末梢血単核球へ *in vitro* で細菌毒素、ナノマテリアルを曝露させ、24 時間後に同細胞から遊離した炎症性サイトカインを測定した。

4. 研究成果

酸化チタン、酸化亜鉛、ラテックス、カーボン等のナノ粒子 (2-3 種類の粒径を用いることを基本とした。) やカーボンナノチューブ等のナノチューブを対象とした。各々の結果の詳細は後掲の発表論文にあるが、ここでは、その代表として、カーボンナノチューブに係る成果の一部を記す。

(1) 「アレルギー性気管支喘息」への影響 : vehicle (コントロール)、カーボンナノチューブ (CNT)、アレルギー (チキン卵白アルブミン : OVA)、CNT + OVA をそれぞれマウスに反復気管内投与したところ、OVA 投与群で認められたアレルギー性気道、肺炎症、及び気道での杯細胞過形成は CNT + OVA 群において有意に増悪した (図 1 & 2)。

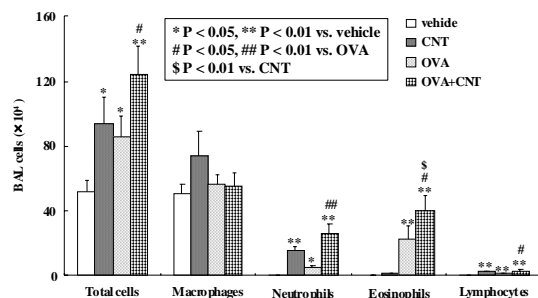


図 1 BAL プロフィール

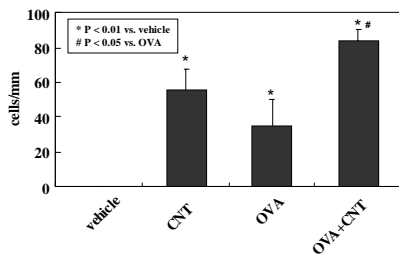
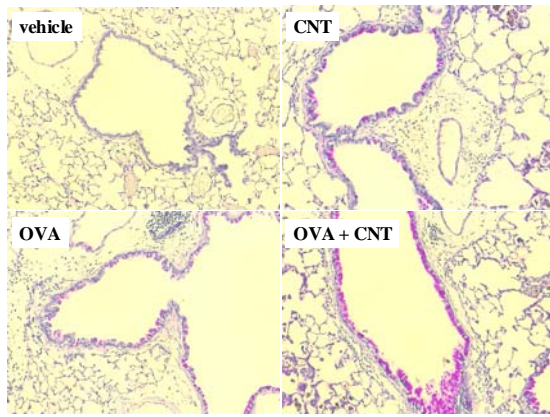


図2 ムチン産生 (PAS 染色像)

(2) 「感染性肺傷害」への影響: vehicle (コントロール)、2種類のカーボンナノチューブ(CNT)、細菌毒素(エンドトキシン: LPS)、CNT + LPS をそれぞれマウスに単回気管内投与したところ、LPS 投与群で認められた気道及び肺炎症、血管透過性亢進、肺中サイトカイン発現量は CNT + LPS 群において有意に増悪/増強した (図 3-5)。

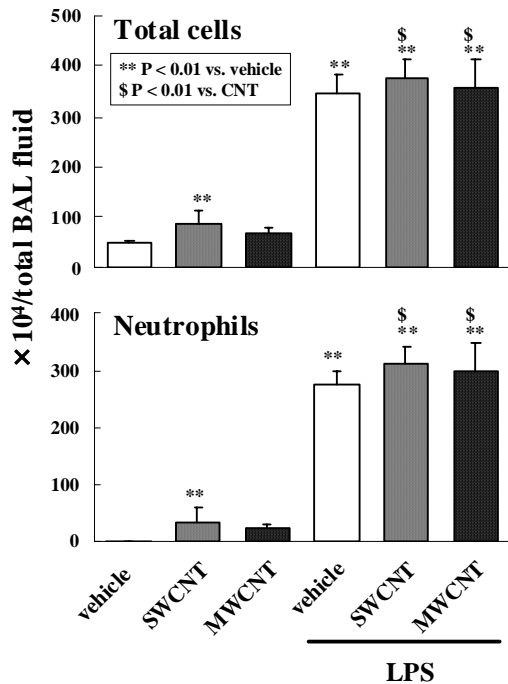


図3 BALF 中総細胞及び好中球浸潤

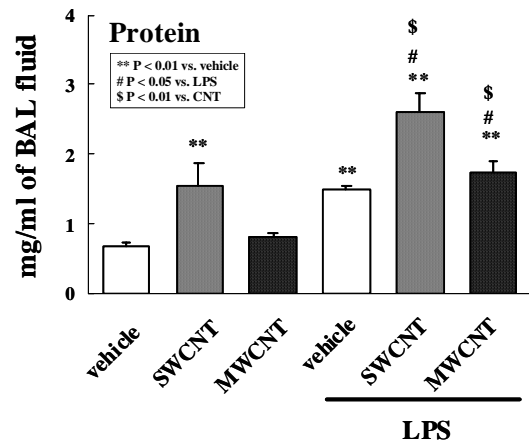


図4 BALF 中タンパク量

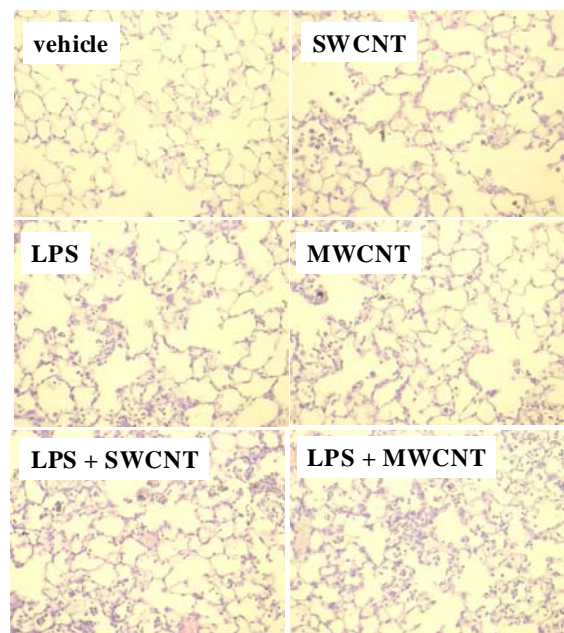


図5 肺病理組織像 (H&E)

(3) 「凝固・線溶系異常」への影響: vehicle (コントロール)、2種類のCNT、LPS、CNT + LPS をそれぞれマウスに単回気管内投与したところ、LPS 投与群で認められた血中フィブリノーゲン量の上昇は、CNT + LPS 群において有意に増強した (図 6)。更に、LPS 投与で認められた活性化プロテインCの低下は、CNT + LPS 群でより増強された (図 7)。また、in vitro での局所 (肺胞) 及び血中単核球への CNT 曝露による検討で、特に末梢血単核球において、CNT 及び LPS 曝露と比較して CNT + LPS 曝露で有意な炎症性サイトカイン・ケモカインタンパク量の上昇を認めた (図 8)。

以上、CNT の例に代表されるように、ある種のナノマテリアルは、それ単独での影響が大きくない量においても、アレルゲンや細菌

毒素による病態を顕著に増悪した。これは、高感受性群を念頭に置いたナノマテリアルの exposure assessment、risk calculation、risk management の必要性を示唆するものと考えられた。なお、ナノ粒子に関しては、総じて、より小さいもので影響が強い場合が多いようにみうけられたが、影響と粒径の逆相関は必ずしも一定ではなかった。また、ナノ粒子のみならずナノチューブについても高感受性群の増悪影響は観察された。

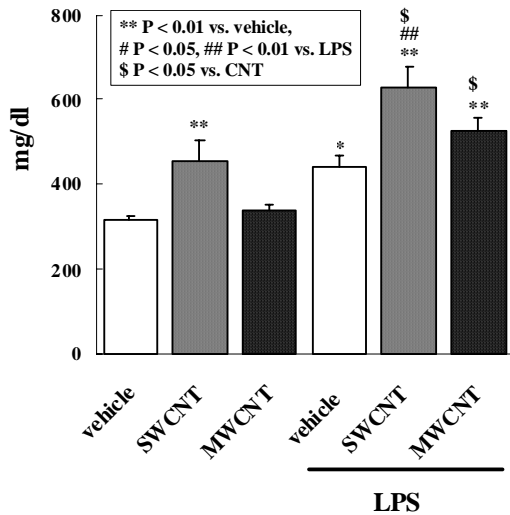


図 6. 血中フィブリノーゲン量

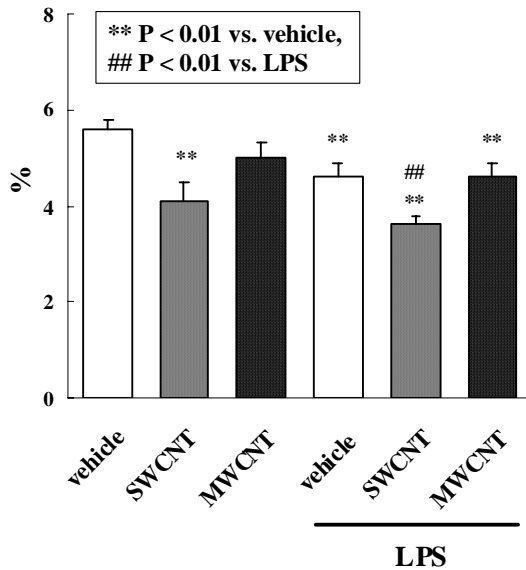


図 7. 血中活性化プロテイン量

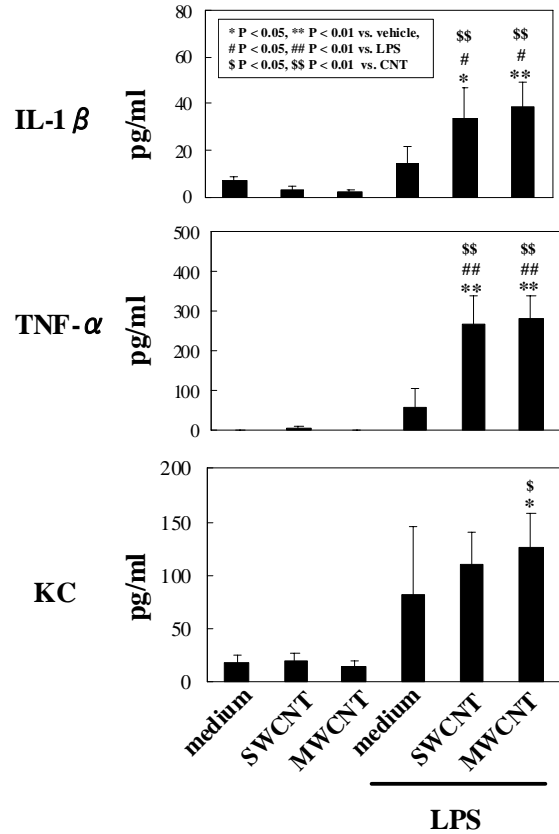


図 8. 末梢血単核球培養上清におけるサイトカイン・ケモカインタンパク量

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 Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Nishikawa M, Hirano S, Takano H: Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol* (in press) (査読あり)
- ② Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Yoshikawa T: Airborne particles in pulmonary diseases. *Curr Respir Med Rev* (in press, review: 査読あり)
- ③ Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Koike E, Shimada A: Size effects of latex nanomaterials on lung inflammation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 234: 68-76, 2009 (査読あり)
- ④ 高野裕久: 環境化学物質によるアレルギー

一疾患の増悪 医学のあゆみ 228:
763-768, 2009 (総説、査読なし)

- ⑤ Inoue K, Takano H, Ohnuki M, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Mizushima K, Yoshikawa T: Size effects of nanomaterials on lung inflammation and coagulatory disturbance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21 (1): 197-206, 2008 (査読あり)
- ⑥ Inoue K, Takano H, Koike E, Yanagisawa R, Sakurai M, Tasaka S, Ishizaka A, Shimada A: Effects of pulmonary exposure to carbon nanotubes on lung and systemic inflammation with coagulatory disturbance induced by lipopolysaccharide in mice. *Exp Biol Med* 233: 1583-1590, 2008 (査読あり)
- ⑦ Koike E, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Sakurai M, Aoyagi H, Shinohara R, Kobayashi T: Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles increases the number of antigen-presenting cells in murine lung. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21 (1) 35-42, 2008 (査読あり)
- ⑧ 高野裕久: 環境汚染物質によるアレルギー疾患の増悪—ディーゼル排気微粒子と喘息の関連を中心に—. *資源環境技術* 44 (5): 50-53, 2008 (総説、査読なし)
- ⑨ Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T: Effects of nanoparticles on lung physiology in the presence or absence of antigen. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20 (4): 737-744, 2007 (査読あり)
- ⑩ Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sakurai M, Yoshikawa T: Effects of nano particles on cytokine expression in murine lung in the absence or presence of allergen. *Arch Toxicol* 80: 614-619, 2006 (査読あり)
- ⑪ Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, Yoshikawa T: Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice. *Environ Health Persp* 114: 1325-1330, 2006 (査読あり)

- ⑫ 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 吉川敏一: ナノ粒子のアレルギー性気道炎症への影響 アレルギーの臨床 26: 810-815, 2006 (総説、査読なし)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 高野裕久. 大気環境と健康. 第 38 回大気汚染公害認定研究会. 2009 年 2 月 8 日. 守口 (特別講演)
- ② 高野裕久. 環境要因によるアレルギー疾患の増悪と予防. 渋谷区アレルギー疾患予防教室. 2008 年 11 月 10 日. 東京
- ③ 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 小池英子. ナノ粒子が呼吸器・血管系の脆弱状態に及ぼす複合影響. 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会. 2008 年 9 月 11 日. 東京 (シンポジウム)
- ④ 高野裕久. 大気環境と健康. 独立行政法人環境再生保全機構 平成 20 年度保健指導研修. 2008 年 10 月 15 日. 東京
- ⑤ 高野裕久. 大気環境と健康. 独立行政法人環境再生保全機構 平成 20 年度保健指導研修. 2008 年 9 月 10 日. 大阪
- ⑥ 高野裕久. 環境要因と体質医学. 第 58 回日本体質医学会総会. 2008 年 9 月 27-28 日. 京都 (教育講演)
- ⑦ 高野裕久. 環境汚染物質による生活習慣病、生活環境病の増悪とその予防—ディーゼル排気微粒子を中心に—. 平成 19 年度北陸大学学術フロンティア年次研究集会. 2008 年 3 月 12 日. 金沢 (教育講演)
- ⑧ 高野裕久. 浮遊粒子状物質による健康影響と包括的遺伝子解析—ディーゼル排気微粒子・黄砂を対象に—. 日米医学協力研究会環境ゲノミクス・疾病専門部会平成 19 年度研究発表会. 2008 年 2 月 12 日. 東京
- ⑨ 高野裕久. 大気環境と健康. 独立行政法人環境再生保全機構 平成 19 年度保健指導研修. 2007 年 9 月 11 日. 大阪
- ⑩ 高野裕久. 大気環境と健康. 独立行政法人環境再生保全機構 平成 19 年度保健指導研修. 2007 年 10 月 10 日. 東京
- ⑪ 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井

美穂、市瀬孝道、定金香里、吉川敏一。
ナノ粒子が呼吸器疾患に与える相乗影
響。第 14 回日本免疫毒性学会学術大会。
2007 年 9 月 20-21。神戸

- ⑫ 高野裕久。ディーゼル排ガス成分と生
活習慣病、生活環境病。第 34 回日本ト
キシコロジー学会。2007 年 6 月 27-29
日。東京（シンポジウム）
- ⑬ 高野裕久。住環境要因と疾患。第 5 回
住居医学講演会。2007 年 2 月 5 日。奈良
（招待講演）
- ⑭ 高野裕久。大気環境と健康。独立行政
法人環境再生保全機構 平成 18 年度保
健指導研修。2006 年 9 月 13 日。大阪
- ⑮ 高野裕久。大気環境と健康。独立行政
法人環境再生保全機構 平成 18 年度保
健指導研修。2006 年 10 月 5 日。東京
- ⑯ 井上健一郎、高野裕久、柳澤利枝、桜井美
穂、市瀬孝道、定金香里、吉川敏一。ナノ
粒子の経気道曝露によるアレルギー性
気道炎症への影響。第 47 回大気環境学
会年会。2006 年 9 月 20-22 日。東京
- ⑰ 井上健一郎、高野裕久、柳澤利枝、市瀬孝
道、定金香里、吉川敏一。ナノ粒子の経気
道曝露は抗原誘発アレルギー性気道炎
症を増悪する。第 46 回日本呼吸器学会
学術講演会。2006 年 6 月 1-3 日。東京
- ⑱ 井上健一郎、高野裕久、柳澤利枝、桜井美
穂、市瀬孝道、定金香里、吉川敏一。ナノ
粒子のアレルギー性気道炎症への影響
第 2 報。第 18 回日本アレルギー学会春
季臨床大会。2006 年 5 月 30-31 日。東京
- ⑲ 高野裕久。ナノ粒子・ナノマテリアルの
健康影響。第 33 回日本トキシコロジー
学会学術年会。2006 年 7 月 5 日。名古屋
（シンポジウム）
- ⑳ 高野裕久。炎症と環境因子。第 13 回日
本免疫毒性学会学術大会。2006 年 9 月
14 日。倉敷（招聘講演）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 裕久 (TAKANO HIOHISA)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研
究領域・領域長
研究者番号：60281698

(2) 研究分担者

井上 健一郎 (INOUE KENICHIROU)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研
究領域・室長
研究者番号：20373219

柳澤 利枝 (YANAGISAWA RIE)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研
究領域・研究員
研究者番号：70391167

(3) 連携研究者

該当なし