

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590129

研究課題名（和文） ナノ粒子の経口免疫寛容に与える影響に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the effect of nanoparticles on oral tolerance

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：ナノ粒子酸化亜鉛の経口免疫寛容に与える影響について検討した。実験動物としてマウスを、また抗原として卵白アルブミン(OVA)を用い、経口免疫寛容は OVA を抗原免疫前に投与し、Th1、Th2、Th3 免疫応答を抗体およびサイトカインを指標に測定した。その結果、酸化亜鉛は Th2 および Th3 経口免疫寛容には影響を与えなかったが、Th1 経口免疫寛容に対しては阻害傾向を示した。酸化亜鉛のようなナノ粒子は Th1 免疫寛容系に影響を及ぼす可能性があるため、さらに詳細に検討する必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：免疫薬理学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ナノ粒子、経口免疫寛容、Th1、Th2、Th3、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) ナノ粒子は非常に細かい粒子状物質であり、ナノテクノロジーの根幹を支えている。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ことが予想されているため、ヒトをはじめとする動物に対する暴露影響が危惧されている。たとえば、人工炭素分子であるフラーレンと呼ばれるナノ粒子存在下ではミジンコや魚は致命的障害を受けることが報告されている。

(2) 経口免疫寛容とは抗原を前もって摂取しておくこと、その後抗原が生体内に侵入しても侵入抗原に対する免疫応答が抑制される現象で、本抑制には腸管免疫系が重要な役割を果たしている。経口免疫寛容は食物アレルギー発症の阻止などに働いていると考えられている。

(3) したがって、ナノ粒子暴露によって腸管免疫系は影響を受け、その結果経口免疫寛容は阻害される可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) 高用量および低用量経口免疫寛容の誘導によって抑制される T 細胞増殖反応および抗原特異的 IgG 抗体産生に及ぼすナノ粒子の影響について検討する。
- (2) ナノ粒子の経口免疫寛容に与える影響のメカニズムを明らかにするため、Th1 (IgG2a および IFN- γ 産生)、Th2 (IgE/ IgG1 および IL-4/IL-5 産生)ならびに Th3(TGF- β 産生)免疫応答を測定する。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物：Th1、Th2 および Th3 の免疫応答をすべて比較的強く誘導可能な DBA/1J マウスを用いた。
- (2) 免疫：免疫抗原としては卵白アルブミン(OVA)、アジュバントとしては complete Freund' s adjuvant (CFA)あるいは水酸化アルミニウムゲルを用いた。
- (3) 経口免疫寛容の誘導：低用量経口免疫寛容を誘導するため、0.1mg の OVA を同抗原での免疫前1日1回5日間、経口投与用のゾンデを用いて投与した。高用量経口免疫寛容は20あるいは200mg の OVA を同様に投与することによって誘導した。
- (4) ナノ粒子の投与：ナノ粒子として酸化亜鉛を Tween20 に懸濁し、免疫前あるいは免疫後に一定期間(1、2、4、8、16週間)1日1回経口的に投与した。
- (5) 抗体測定：免疫後21日に血清中の OVA 特異的 IgE、IgG2a、IgG1、IgM、IgA 抗体を ELISA 法によって測定した。
- (6) T 細胞増殖反応測定：OVA に対する T 細胞増殖反応を測定するため、ナノ粒子によって曝露された OVA 免疫マウスの脾臓から T 細胞を分離し、同系マウスの放射線処理した抗原提示細胞および OVA とともに 72 時間培養した。培養終了前6時間に 3H-thymidine を添加し、本放射性物質の細胞内取り込みを測定した。
- (7) 細胞培養液中の IFN- γ (Th1)、IL-4、IL-5(Th2)、TGF- β (Th3)をサンドイッチ ELISA 法によって測定した。

4. 研究成果

- (1) 酸化亜鉛の高用量経口免疫寛容に与える影響：高用量の OVA 経口によって抑制される抗原特異的 T 細胞増殖反応や IgG 抗体産生、Th1(IgG2a、IFN- γ)、Th2(IgE、IL-4、IL-5)、Th3(TGF- β)免疫応答に対して酸化亜鉛は影響を与えなかった。

- (2) 酸化亜鉛は低用量経口免疫による Th2 および Th3 免疫応答抑制に対しても有意な影響を示さなかった。しかし、Th1 応答抑制に対しては阻害傾向を示した。

- (3) これらの実験結果から、ナノ粒子酸化亜鉛暴露によって高用量免疫寛容(Th1、Th2、Th3 免疫反応抑制)に著明な影響は与えないと思われるが、本ナノ粒子物質は低用量経口免疫寛容によって抑制される Th2 および Th3 応答に対しては影響を及ぼさないものの、Th1 免疫抑制に対しては阻害的に働く可能性を否定できないと思われる。Th1 免疫応答の破綻によって発症する疾患として関節リウマチなどの疾患が知られているが、これらの疾患の発症および病態の進行に対して、酸化亜鉛のようなナノ粒子は影響を及ぼす可能性があり、今後さらに詳細に検討する必要がある。

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) Feng, H., Yamaki, K., Yoshino, S.: Inhibition of the antigen-induced activation of RBL cells by sinomenine. *Int. Immunopharmacol.*, 8:502-507, 2008. 査読：有
- (2) Mizutani, N., Nabe, T., Fujii, M., Yoshino, S., Kohno, S.: Involvement of peroxynitrite in pollen-induced nasal blockage in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, 582:139-144, 2008. 査読：有
- (3) Noya, Y., Mikami, Y., Taneda, S., Mori, Y., Yoshino, S., Kohno, S.: Improvement of an efficient separation method for chemicals in diesel exhaust particles: analysis for nitrophenols. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 15:318-321, 2008. 査読：有
- (4) Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Yoshino, S., Yoshikawa, T.: Antioxidative role of interleukin-6 in septic lung injury in mice. *Int. J. Immunopathol.*, 21:501-508, 2008. 査読：有
- (5) Feng, H., Yamaki, K., Takano, H., Inoue, K., Yoshino, S.: Effect of sinomenine on collagen-induced arthritis in mice. *Autoimmunity*, 40:532-539, 2007. 査読：有
- (6) Yamaki, K., Taneda, S., Inoue, K.,

- Takano, H., Yoshino, S.: Enhancement of allergic responses in vivo and in vitro by butylated hydroxytoluene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 223:164-172, 2007. 査読：有
- (7) Yamaki, K., Li, X., Takano, H., Yoshino, S.: Difference in preventive effects between the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram and anti-arthritic drugs on antigen-induced arthritis in mice. *Immunol. Invest.*, 36:131-145, 2007. 査読：有
- (8) Mizutani, N., Nabe, T., Ohtani, Y., Fujii, M., Yoshino, S., Kohno, S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons aggravate antigen-induced nasal blockage in experimental allergic rhinitis. *J. Pharmacol. Sci.*, 105:291-297, 2007. 査読：有
- (9) Arimoto, T., Takano, H., Inoue, K., Yanagisawa, R., Yoshino, S., Yoshikawa, T.: Pulmonary exposure to diesel exhaust particle components enhances circulatory chemokines during lung inflammation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 20:197-201, 2007. 査読：有
- (10) Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Yoshino, S., Yoshikawa, T.: Role of interleukin-6 in toll-like receptor 4 and 2 expressions induced by lipopolysaccharide in the lung. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 29:63-68, 2007. 査読：有
- (11) Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Yoshino, S., Yoshikawa, T.: Effects of nanoparticles on lung physiology in the presence or absence of antigen. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 20:737-744, 2007. 査読：有
- (12) Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Shimada, A., Yoshino, S., Yoshikawa, T.: Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 29:403-412, 2007. 査読：有
- [学会発表] (計 26 件)
- (1) 水谷暢明、奈邊 健、藤井正徳、吉野 伸、河野茂勝。モルモットアレルギー性鼻炎モデルの鼻閉の発症における peroxynitrite の関与。第 128 回 日本薬学会 2008 年 3 月 27 日。 横浜。
- (2) 種田 晋二、李 春梅、野矢 洋一、関興一、大倉 一枝、八巻 耕也、吉野 伸、鈴木 明。ラット摘出血管標本を用いたアセチルコリンによる血管弛緩作用に及ぼす炭素ナノ粒子の影響の検討。第 128 回 日本薬学会 2008 年 3 月 27 日。 横浜。
- (3) 八巻 耕也、吉野 伸。I 型アレルギー反応のブチルヒドロキシトルエン (BHT) による増強。日本薬学会 2008 年 3 月 27 日。 横浜。
- (4) 笹原 真利子、蔵元 裕信、八巻 耕也、水谷 暢明、吉野 伸。マウス抗体依存性関節炎に対する抗原特異的抗体 Fab フラグメントの効果。日本薬学会 2008 年 3 月 27 日。 横浜。
- (5) 齊藤貴之、八巻耕也、水谷暢明、吉野伸。自己免疫性関節炎における抗 II 型コラーゲン抗体の役割。日本薬学会 2008 年 3 月 28 日。 横浜。
- (6) 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。
- (7) 齋藤貴之、ピライワンワディー フタメカリン、八巻 耕也、水谷 暢明、寺戸国昭、吉野 伸。4 および 5 抗コラーゲン抗体カクテルによって誘導される関節炎の比較：エピトープの重要性。第 29 回 日本炎症・再生医学会。2008 年 7 月 8 日。 東京。
- (8) 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。
- (9) 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 12 日。 東京。
- (10) 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。 神戸。
- (11) Pilaiwanwadee Hutamekalin, Takayuki Saito, Kouya Yamaki, Nobuaki Mizutani, Kuniaki Terato, Shin Yoshino. Induction of severe arthritis in mice by a new 5-clone cocktail of anti-type II collagen monoclonal antibodies. 第 58 回 日本薬学会近畿支部総会・大会。

- 2008年10月25日。神戸。
- (12)八巻耕也、吉野 伸。添加物 ETBE が肥満細胞の活性化に与える影響。第114回日本薬理学会近畿部会。2008年11月14日。神戸。
- (13)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29日。東京。
- (14)吉野 伸、八巻 耕也。ナノ粒子を多く含んだディーゼル排気曝露における循環器影響の検討。第127回日本薬学会。2007年3月28日。富山。
- (15)八巻 耕也、吉野 伸。好塩基球性白血球細胞株 RBL2H3 の IgE 刺激による脱顆粒反応に対する抗酸化剤 BHT (ブチルヒドロキシトルエン) の促進作用。第127回日本薬学会。2007年3月28日。富山。
- (16)木下 美津子、八巻 耕也、吉野 伸。抗スギ花粉モノクローナル抗体によるアレルギー誘導に関する研究。第127回日本薬学会。2007年3月28日。富山。
- (17)川畑 大輔、八巻 耕也、吉野 伸。抗卵白アルブミン (OVA) IgE mAb Fab fragment による OVA 誘導型アレルギー反応の抑制。第127回日本薬学会。2007年3月28日。富山。
- (18)笹原 真利子、蔵本 裕信、八巻 耕也、吉野 伸。
- (19)抗体依存性関節炎はその Fab フラグメントにより抑制される。第127回日本薬学会。2007年3月28日。富山。
- (20)齋藤 貴之、松尾 健二、八巻 耕也、吉野 伸。抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体依存性関節炎モデルの作製。第111回日本薬理学会近畿支部会。2007年6月15日。名古屋。
- (21)八巻 耕也、吉野 伸。In vivo および In vitro の IgE 依存的なアレルギー反応に対する BHT (ブチルヒドロキシトルエン) の促進作用。第14回日本免疫毒性学会学術大会。2007年9月21日。神戸。
- (22)齋藤 貴之、八巻 耕也、吉野 伸。抗体依存性関節炎モデルにおける抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体の役割。第14回日本免疫毒性学会学術大会。2007年9月21日。神戸。
- (23)笹原 真利子、蔵本 裕信、八巻 耕也、吉野 伸。抗原特異的抗体 Fab フラグメントによる抗体依存性関節炎の制御。第110回日本薬理学会近畿支部会。2007年11月10日。京都。
- (24)吉野 伸、水谷 暢明、他。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暴露の影響。第112回日本薬理学会近畿部会。2007年11月16日。大阪。

- (25)Saito T., Yamaki K., Yoshino S.。Role of newly established anti-type II collagen (CII) monoclonal antibodies (mAbs) in induction of arthritis in mice。第37回日本免疫学会学術大会。2007年11月22日。東京。
- (26)Sasahara M., Yamaki K., Yoshino S.。Suppression of antibody-dependent arthritis in mice by antibody-derived Fab fragments。第36回日本免疫学会学術大会。2007年12月12日。東京。

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏名：吉野 伸 (YOSHINO SHIN)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00260729