

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790164

研究課題名（和文）金属酸化物ナノ粒子のアレルギー性気管支喘息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 metal oxide nanoparticles on allergic asthma

研究代表者

水谷 暢明（MIZUTANI NOBUAKI）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90340447

研究成果の概要（和文）：金属酸化物ナノ粒子は、その特徴的な形状や性状から健康や環境への影響が懸念されている。本研究では、酸化亜鉛ナノ粒子と抗原の曝露がマウスアレルギー性気管支喘息に与える影響を検討した。その結果、酸化亜鉛ナノ粒子と抗原の曝露による気道閉塞の明らかな上昇が、抗原もしくは酸化亜鉛ナノ粒子単独曝露群と比較して認められた。さらに、肺への炎症細胞浸潤（特に好酸球）および IgE の上昇が観察された。これらの結果より、酸化亜鉛ナノ粒子はアレルギー性気管支喘息を増悪化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The development of nano-technology has increased opportunities to be exposed engineered nanomaterials in the environment. In this study, we examined whether sensitization by the combination of ZnO nanoparticles as metal oxide nanoparticles with ovalbumin (OVA) promotes allergic asthmatic responses. In the ZnO+OVA group, the fourth antigen challenge caused not only early- but also late-phase increases in airway resistance, although these responses were not observed in the ZnO or OVA group. Sensitization with ZnO and OVA promoted airway inflammation such as infiltration by eosinophils and antigen-specific IgE production. In conclusion, these results suggest that exposure to ZnO and antigen can exacerbate allergic asthmatic responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：金属酸化物ナノ粒子、酸化亜鉛、アレルギー、喘息

1. 研究開始当初の背景

金属酸化物ナノ粒子は、一般に酸化亜鉛、酸化チタン、酸化セリウム、酸化アルミニウム、酸化鉄などが知られており、自動車、エレクトロニクス、パーソナルケア用品、日用品などの様々な分野で、複合材料、触媒、コーティング、塗料、日焼け止めなどとして使用されている。今後、世界市場における金属酸化物ナノ粒子製品の売り上げは、軍事、医療といった新しい分野でも急拡大し、2017年には1,400万ドルに達すると見られている(Future Markets Inc 市場調査レポート2010)。一方、種々なナノ粒子はその特徴的な粒子形状と粒子サイズ、さらにはナノ粒子表面の物質や官能基などに起因して個々に異なった細胞毒性を有すると考えられている。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(循環器や免疫系などに異常を起こす可能性)が危惧されている。今後、金属酸化物ナノ粒子を含む種々なナノ粒子の用途開発が進むにつれ、様々な形態で生活に浸透していくと予測され、これらナノ粒子の個別の安全性や毒性について十分な知識を持つておく必要がある。

アレルギー性気管支喘息は、血中の抗原特異的IgEの上昇を特徴とする慢性炎症性疾患であり、その病態は、呼吸困難、喘鳴、咳および痰を主症状とする。吸入により気道粘膜に付着した抗原が、マクロファージなどの貪食細胞によって抗原提示を受け、これをT細胞が認識することによりTh2サイトカインであるIL-4などを産生し、これがB細胞に作用してIgE抗体が産生される。IgE抗体は肥満細胞膜上に結合し、再度侵入してきた抗原とIgEが結合することによりヒスタミンなどのメディエーターが放出され、これらが組織を攻撃する。実際に喘息患者に抗原惹起を行うと、30分以内に誘発される即時性喘息反応が認められる。また、抗原に繰り返し曝露されることにより慢性・重症化した患者では、Th2細胞や好酸球などの種々炎症細胞が関与すると考えられる遅発性喘息反応、気道過敏性、さらには気道リモデリング(杯細胞過形成および肺線維化)が認められる。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、今後金属酸化物ナノ粒子もアレルギー性喘息の発症

に影響を与える可能性が考えられる。

2. 研究の目的

金属酸化物ナノ粒子曝露のアレルギー性気管支喘息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。研究代表者は、これまでにヒトに類似した臨床症状を示すマウス実験的アレルギー性気管支喘息モデルを開発してきた。本モデルは、二相性喘息反応および気道リモデリングを示す。また、本モデルに多層カーボンナノチューブを気管内曝露すると、喘息症状が増悪化されることを明らかとしてきた。今後、カーボンナノチューブのみならず金属酸化物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金属酸化物ナノ粒子に曝露される機会が増加することが予想され、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。したがって、本研究ではマウス実験的アレルギー性気管支喘息モデルを用いて、金属酸化物ナノ粒子である酸化亜鉛(ZnO)がアレルギー性気管支喘息症状に与える影響について調べる。

3. 研究の方法

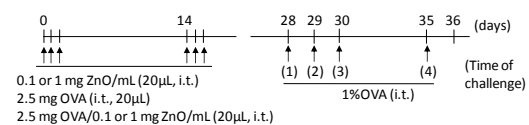


Fig. 1 Experimental study protocol.

感作および惹起方法は、Fig. 1に示す。Ovalbumin (OVA)溶液にZnOを加え、それを繰り返し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ZnO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時間後に認められる喘息反応(二相性喘息反応のピーク)の程度はOVAもしくはZnO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(H&E)が観察された(Fig. 5)。OVA+ZnOで感作したマウスでは血中の抗体価(IgE)の上昇が認められた(Fig. 4)。さら

には、気道リモデリングである杯細胞の過形成 (PAS) が OVA+ZnO 群において明らかに認められた (Fig. 5)。

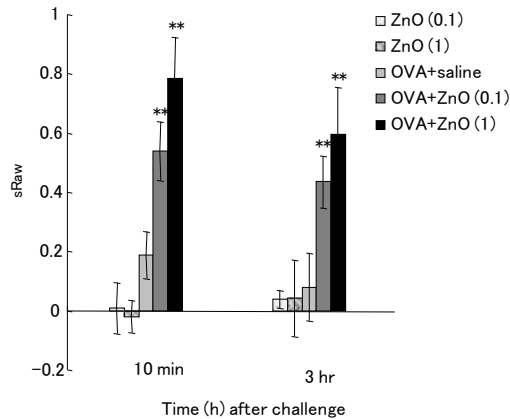


Fig. 2 Effect of ZnO on biphasic asthmatic response induced by the 4th antigen challenge in mice.

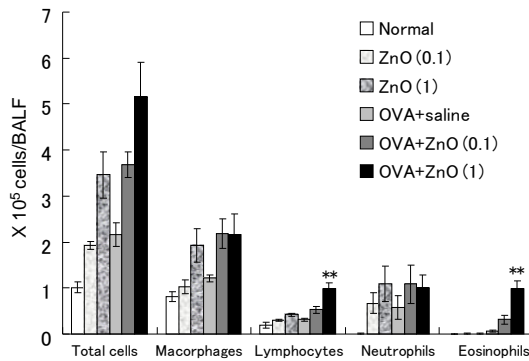


Fig. 3 Effect of ZnO on inflammatory cells in BALF after the 4th antigen challenge in mice.

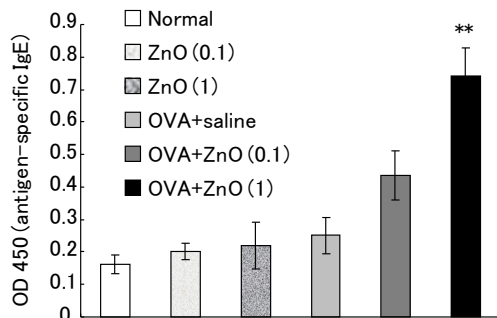


Fig. 4 Effect of ZnO on the increases of antigen-specific IgE at the 4th antigen challenge in mice.

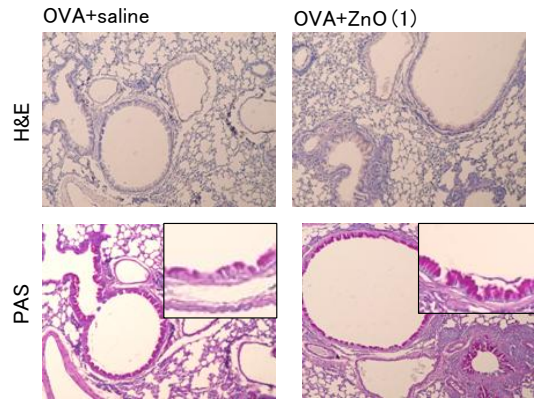


Fig. 5 Effect of ZnO on inflammation (H&E) and goblet cell hyperplasia in the lungs at the 4th challenge in mice.

以上の成績より、酸化亜鉛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 9 件)

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.* 35: 2133-2140 (2012).

Mizutani N, Goshima H, Nabe T, Yoshino S. Complement C3a-induced IL-17 plays a critical role in an IgE-mediated late-phase asthmatic response and airway hyperresponsiveness via neutrophilic inflammation in mice. *J Immunol.* 188:5694-705 (2012).

Nabe T, Ikedo A, Hosokawa F, Kishima M, Fujii M, Mizutani N, Yoshino S, Ishihara K, Akiba S, Chaplin DD. Regulatory role of antigen-induced interleukin-10, produced by CD4(+) T cells, in airway neutrophilia in a murine model for asthma. *Eur J Pharmacol.* 29:154-62 (2012).

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 Letter*. 141:235-45 (2012).

Mizutani N, Nabe T, Shimazu M, Yoshino S, Kohno S. Effect of Ganoderma lucidum on pollen-induced biphasic nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis. *Phytother Res*. 26:325-32 (2012).

Nabe T, Morishita T, Matsuya K, Ikedo A, Fujii M, Mizutani N, Yoshino S. Complete dependence on CD4⁺ cells in late asthmatic response, but limited contribution of the cells to airway remodeling in sensitized mice. *J Pharmacol Sci*. 116:373-83 (2011).

Nabe T, Hosokawa F, Matsuya K, Morishita T, Ikedo A, Fujii M, Mizutani N, Yoshino S, Chaplin DD. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life Sci*. 88:1127-35 (2011)

Koobkokkrud T, Kadotani T, Hutamekalin P, Mizutani N, Yoshino S. Arthrogenicity of type II collagen monoclonal antibodies associated with complement activation and antigen affinity. *J Inflamm (Lond)*. 8:31 (2011).

Nabe T, Kuriyama Y, Mizutani N, Shibayama S, Hiromoto A, Fujii M, Tanaka K, Kohno S. Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves allergic nasal blockage in guinea pigs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 95:27-34 (2011).

[学会発表] (計 13 件)

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. 日本薬学会 第 132 年会 2012 3 月 28 日 (札幌)

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 徳島 平成 24 年 6 月 29 日 (徳島)

奈邊 健、赤水希衣、藤田真理維、中川知美、塩江真代、藤井正徳、水谷暢明、吉野 伸、David D. Chaplin. 反復抗原惹起による喘息反応における好塩基球および肥満細胞の関与に関する検討. 第 121 回日本薬理学会 近畿支部会 平成 24 年 6 月 29 日 (徳島)

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気道リ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 2012 年 11 月 29 日 (大阪)

吉野伸、水谷暢明、庵森靖弘、鳥井栄貴. モノクローナル抗体 Fab フラグメントによる喘息反応の抗原特異的制御. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 11 月 29 日 (大阪)

鳥井栄貴、水谷暢明、堀端真次、八巻耕也、奈邊 健、吉野 伸. 抗卵白アルブミン IgG1 モノクローナル抗体 Fab フラグメントによるアレルギー性気管支喘息のアレルゲン特異的制御に関する研究. 日本薬学会 第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 (静岡)

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る気道リモデリングに関する研究. 日本薬学会 第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 (静岡)

角谷 龍哉、Thongchai Koobkokkrud、八巻 耕也、水谷 暢明、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. 日本薬学会 第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 (静岡)

堀端真次、鳥井栄貴、八巻耕也、水谷暢明、吉野 伸. 抗卵白アルブミン IgG1 モノクローナル抗体 Fab フラグメントによる抗体依存性関節炎の抑制. 第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 (静岡)

森下豊子、池堂 歩、藤井正徳、水谷暢明、吉野 伸、奈邊 健. 遅発性喘息反応を呈するマウスモデルにおける気道リモデリングの解析. 第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 (静岡)

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遅発性喘息反応における IL-17 の役割. 第 120 回 日本薬理学会支近畿部会 2011 年 11 月 11 日 (京都)

奈邊 健, 池堂 歩, 藤井正徳, 石原慶一, 秋葉 聡, 水谷暢明, 吉野 伸, David D. Chaplin, Casey T. Weaver. マウス喘息における抗原誘導性 CD4⁺ T 細胞由来 IL-10 の好中球性気道炎症に対する調節的役割. 第 120 回 日本薬理学会支近畿部会 2011 年 11 月 11 日 (京都)

奈邊 健, 池堂 歩, 藤井正徳, 石原慶一, 秋葉 聡, 水谷暢明, 吉野 伸, David D. Chaplin, Casey T. Weaver. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 10 日 (東京)

[その他]

ホームページ等

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・薬学部・講師

研究者番号：90340447