

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871005

研究課題名(和文)カーボンナノチューブの有効利用のためのアレルギー増悪評価系の開発

研究課題名(英文)Evaluation of allergy aggravation effect caused by inhalation of carbonb nanotube

研究代表者

堀江 祐範(Horie, Masanori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究門・研究員

研究者番号：30514591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では適切な条件によるCNTのアレルギー増悪効果を検討した。はじめに毒性が既知の金属酸化物ナノ粒子により評価を行った。これらのナノ粒子をマウスの気管内に投与後、連続してOVAを吸入させたところ、一部で血中のOVA特異的IgEの上昇がみられた。次に、CNTにより同様の評価を行った。その結果、CNTにおいて一部の試料で血中のOVA特異的IgEの上昇がみられた。この時、肺組織内で酸化ストレス関連、炎症関連、アレルギー誘発関連遺伝子の発現上昇が認められた。酸化ストレス関連、炎症関連遺伝子は培養細胞でも発現が上昇した。これらの遺伝子発現評価による、CNTのアレルギー増悪効果の予見可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study I examined allergy aggravation effect of carbon nanotube (CNT) under appropriate conditions. As preliminary examination, allergy aggravation caused by harmful metal oxide nanoparticles such as ZnO were examined. These nanoparticles were injected to mouse lung by pharyngeal aspiration and subsequently, the mouse was continuously exposed to OVA by inhalation. As a result, serum OVA specific IgE level was elevated. Next, we performed similar evaluation about CNT. CNT also showed elevation of OVA specific IgE level in serum. Enhancement of gene expression about oxidative stress, inflammation and allergic reaction was also observed. Gene expression of oxidative stress and inflammation related gene was also increased in culture cells. Evaluation of these gene expression suggests predictability of allergy aggravation effect caused by CNT.

研究分野：毒性学

キーワード：カーボンナノチューブ アレルギー IgE

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ (CNT) は、直径が 1-100nm の範囲にあるナノオブジェクトの一つで、特徴的な物理・化学活性を示し、燃料電池の効率向上効果など工業的に利用価値が高い。その一方で、生物学的な活性も高く、有害性を有する場合がある。本研究の開始当初、CNT の生体影響に関する研究は、細胞試験・動物試験によって進められており、呼吸器への影響が明らかとなりつつあった。しかし、アレルギー増悪効果についての研究報告は皆無であり、ナノ粒子によるアレルギー増悪に対する影響の検討とその評価方法の確立が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では、CNT のアレルギー増悪効果評価系を開発する。近年、CNT の呼吸器に対する影響が明らかになりつつあるが、その一方で、CNT のアレルギー反応に対する影響の知見は皆無である。アレルギーは喘息など時に重篤な症状に陥る重要な疾患である。粒子のアレルギー増悪効果は比表面積に依存することから、CNT はさらに強いアレルギーを引き起こす可能性があるが、CNT のアレルギー性疾患に対する影響評価は、実験方法や感作誘発のための用量も統一されておらず、信頼性高く感作性を評価する手法が確立されていない。そこで本研究では、はじめに動物への気管内注入による CNT のアレルギー増悪効果評価系を確立し、CNT の影響評価を行う。同時に細胞試験および試料のキャラクタリゼーションを行うことで、種々の CNT に対して有効である汎用的なアレルギー影響スクリーニング系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

吸入によるナノ粒子のアレルギー増悪効果は、被験物質 (CNT) をマウスの気管内に投与したのち、卵白アルブミン (OVA) を気中曝露して感作させることで評価する。ナノ粒子を投与後、1~7 日後にかけ、OVA を吸入曝露により投与する。さらに、14~20 日にかけて OVA を追加投与する事で、アレルギー反応を誘発する。この後動物を解剖し、血液、肺組織を回収し、アレルギー感作状態の解析を行う。具体的には、これらの試料について、アレルギー関連マーカー、肺傷害 (炎症) マーカー、酸化ストレス関連マーカーの測定を行い、対照動物とレベルを比較する事で、被験物質のアレルギー増悪効果を総合的に評価する。これらの結果をもとに、肺胞上皮細胞由来培養細胞 (A549) 及びマクロファージ (THP-1) での検討を行い、アレルギー増悪効果を評価するための最適なマーカーを選択する。

4. 研究成果

(1) 金属酸化物ナノ粒子によるアレルギー

増悪効果の検討

マウスを用いた CNT の気管内投与によるアレルギー増悪効果の評価系を確立した。このため、本年度は試料として肺に対する影響が明らかであり、アレルギー増悪効果が期待される水酸化アルミニウムゲル (アラム) および酸化亜鉛 (ZnO) ナノ粒子を用い、実験系の妥当性を検討した。

PBS 中に分散した試料を C57BL/6N マウスに咽頭吸引により肺内に投与した。次に、アレルギー増悪剤として OVA を気中噴霧した。気中噴霧は、途中 1 週間のインターバルを挟んで、1 日おきに 4 回ずつ、合計 8 回行った。この後、解剖を行い血液及び肺組織を採取した。血中の OVA 特異的 IgE を測定したところ、有意な上昇が認められた (図 1)。

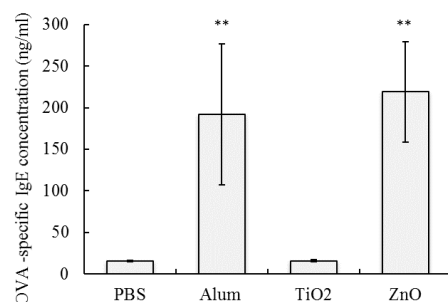


図 1. 金属酸化物ナノ粒子投与による血中 OVA 特異的 IgE 濃度への影響

一方で、アラムまたは PBS を投与した対照群では、血中の OVA 特異的 IgE の上昇は認められなかった。さらに、肺組織における酸化ストレスマーカーとしてヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) および炎症マーカーとして MIP-2 遺伝子の発現を調べたところ、いずれも発現の上昇がみられた。次に、ZnO ナノ粒子を投与後、同様に 1 日おきに OVA の吸入を行い、吸入 1 回、2 回、4 回後にそれぞれ血液を採取し、血中の OVA 特異的 IgE を測定したところ、いずれの時点でも上昇は見られなかった。これらの結果から、吸入によるアレルギー増悪効果の評価のための実験系として、少なくとも 1 日おきに 1 週間のインターバルを挟んで、4 回ずつ、合計 8 回の曝露によって増悪効果が評価可能であることが示された。

さらに、同様の方法で NiO, CuO, MgO, CaCO₃ ナノ粒子についての検討も行ったところ、NiO で特に強いアレルギー増悪効果が認められた。このとき、NiO では分散液中での Ni²⁺ の溶出が認められた。MgO および CaCO₃ ではアレルギー増悪効果は見られなかった。この結果は、おおむね細胞毒性の強さと一致していた。

(2) CNT によるアレルギー増悪効果の検討
金属酸化物ナノ粒子によるアレルギー増悪効果の結果を受け、CNT によるアレルギー増悪効果の検討も行った。4 種類の CNT (合成

に鉄触媒を使用したもの (Fe-C と省略) その精製品 (Fe-P と省略) 合成にニッケルを使用したもの (Ni-C と省略) その精製品 (Ni-P と省略)) を使用した。CNT は疎水的であり、そのままでは水系の分散倍には分散することができない。そこで、これらの CNT について、ウシ血清アルブミン (BSA) を分散剤として、均一な分散液を調製した。調製した各々の分散液を咽頭吸引によって C57BL/6N マウスの肺内に投与した。次に、アレルギーとして OVA をネブライザーによって気中噴霧し、マウスに吸引曝露させた。OVA の吸引は、金属酸化ナノ粒子の場合と同様に、途中 1 週間のインターバルを挟み、1 日おきに 4 回ずつ、計 8 回行った。この後、解剖を行い、血液及び肺組織から mRNA を採取した。血中の OVA 特異的 IgE の濃度を測定した結果、Fe-P で有意な上昇が認められた (図 2)。血中の総 IgE 濃度についても、Fe-C および 1 Fe-P で上昇した。肺組織中の遺伝子発現を見たところ、酸化ストレス応答 TNF- α 、Cxcl2 の発現が上昇した。さらに、TH2 の分化マーカーであるアルギナーゼ 2 (Arg2) 遺伝子の発現が Fe-P において著しく上昇した。肺組織の観察では、CNT 投与群において 21 日後でも肺が黒く着色しており、CNT の残存が示唆された。触媒金属が残存している CNT よりも、精製品で OVA 特異的 IgE 濃度が高かったことは予想外であったが、IgE 上昇には触媒金属は関係がなく、精製によって単位重量当たりの CNT が増加したためと考えた。これらの結果、CNT は種類によってアレルギー増悪効果が認められること、触媒金属の関与は小さいであろうことが示唆された。

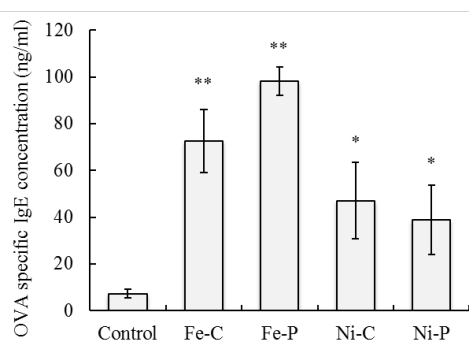


図 2 . CNT 投与による血中 OVA 特異的 IgE 濃度への影響

(3) 培養細胞による CNT の影響検討

動物試験の結果を受け、培養細胞を用いて CNT によるアレルギー増悪効果のメカニズムの解明と、評価指標の設定に取り組んだ。動物試験により、CNT によるアレルギーの増悪効果は吸入による肺への滞留が重要であることが示唆されている。そこで、細胞系として肺由来上皮細胞である A549 細胞および、貪食細胞のモデルとして、ヒト単球由来 THP-1 細胞を用いた。THP-1 細胞については、PMA によりマクロファージ様に分化させたも

のをを用いた。金属酸化ナノ粒子および CNT を被験物質とした動物実験により、血中の OVA 特異的 IgE 抗体が上昇した動物の肺において酸化ストレス負荷と炎症誘発およびアルギナーゼ 1 遺伝子の発現上昇が認められた。アルギナーゼ 1 はアレルギー曝露された肺などの組織で上昇が確認され、Th1/Th2 バランスを Th2 側に傾かせ、アレルギーの増悪に關与する。そこで、金属酸化ナノ粒子および CNT を投与した培養細胞において、酸化ストレス負荷、炎症誘発性、アルギナーゼ 1 遺伝子の発現レベルを評価した。対照として使用した金属酸化ナノ粒子では、動物試験でアレルギーの増強が認められた試料 (NiO および ZnO) については、細胞でも酸化ストレスの付加と炎症誘発 (IL-8 の分泌) が認められた。一方で、CNT については A549 細胞では顕著な影響は認められなかった。一方で、THP-1 細胞では HO-1 遺伝子の発現亢進と若干の IL-8 遺伝子の発現上昇が認められた。しかし、動物実験でアレルギー増悪効果が認められたすべての CNT でこれらの遺伝子発現が上昇するわけではなく、液中の分散状態に依存する可能性が示唆された。さらに、アルギナーゼ遺伝子の発現は、細胞では認められなかった。これらの結果から、細胞による CNT のアレルギー誘発性の予測については HO-1 および IL-8 遺伝子の発現レベルの評価により、ある程度可能であるものの、試験に用いる分散液の分散性等の性状にも留意しなければならないことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

堀江祐範、須藤真弓、田部井美樹、黒田悦史、Pharyngeal aspiration of metal oxide nanoparticles showed potential of allergy aggravation effect to inhaled ovalbumin、Inhalation Toxicology、査読有、Vol.27、2015、pp.181-190
DOI: 10.3109/08958378.2015.1026618

堀江祐範、須藤真弓、田部井美樹、黒田悦史、Metal ion release of manufactured metal oxide nanoparticles is involved in the allergic response to inhaled ovalbumin in mice、Occupational Diseases and Environmental Medicine、査読有、Vol.4、2016、pp. 17-26
DOI: 10.4236/odem.2016.42003

堀江祐範、遠藤茂寿、丸順子、加藤晴久、藤田克英、Pharyngeal aspiration of single-wall carbon nanotubes aggravates allergic reaction to inhaled ovalbumin in mice、Toxicological & Environmental Chemistry、査読有、印刷中

DOI:10.1080/02772248.2016.1147042

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀江 祐範 (HORIE, Masanori)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
健康工学研究部門 主任研究員
研究者番号 : 30514591