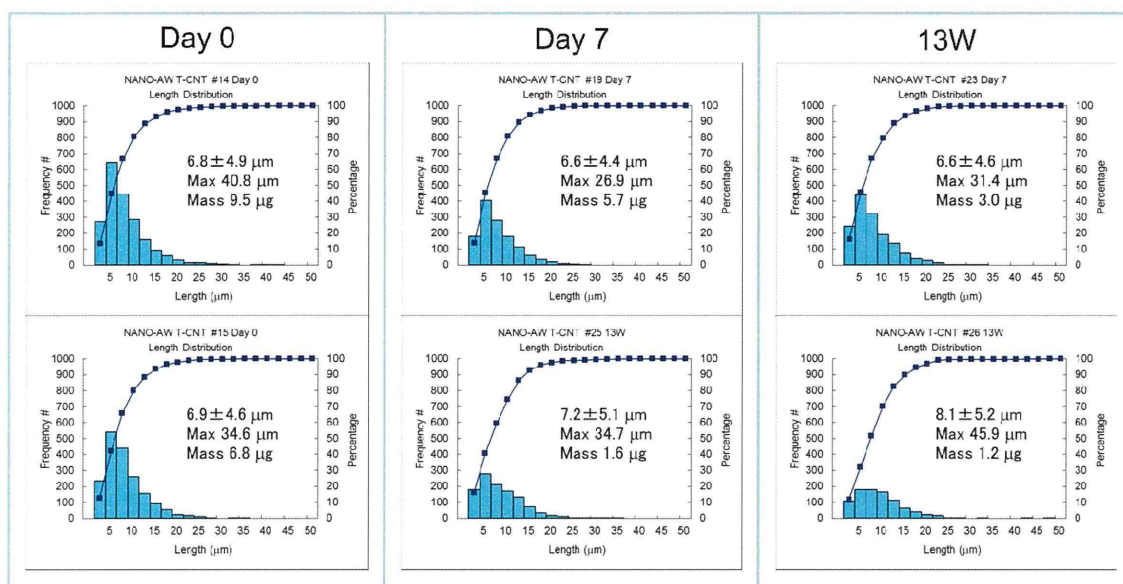


	Day0	Day7	13W
T-CNT	9.5 µg	5.7 µg	1.6 µg
	6.8 µg	3.0 µg	1.2 µg
<b>Mean</b>	<b>8.2 µg</b>	<b>4.4 µg</b>	<b>1.4 µg</b>
U-CNT	3.8 µg	1.0 µg	1.3 µg
	4.8 µg	2.1 µg	1.0 µg
<b>Mean</b>	<b>4.3 µg</b>	<b>1.6 µg</b>	<b>1.2 µg</b>

図7 肺負荷量とその経時的推移

MWCNT の肺負荷量の平均値は、T-CNT 群では Day0、Day7 及び 13W においてそれぞれ、8.2 µg/動物、4.4 µg/動物、1.4 µg/動物、U-CNT 群では 4.3 µg/動物、1.6 µg/動物、1.2 µg/動物であった。Day0 における肺負荷量は、T-CNT が U-CNT の約 2 倍の値であった。13W の値を漸近線として減衰曲線を計算すると、T-CNT、U-CNT 共に半減期は約 7 日であった。

## A T-CNT の繊維長分布



## B U-CNT の繊維長分布

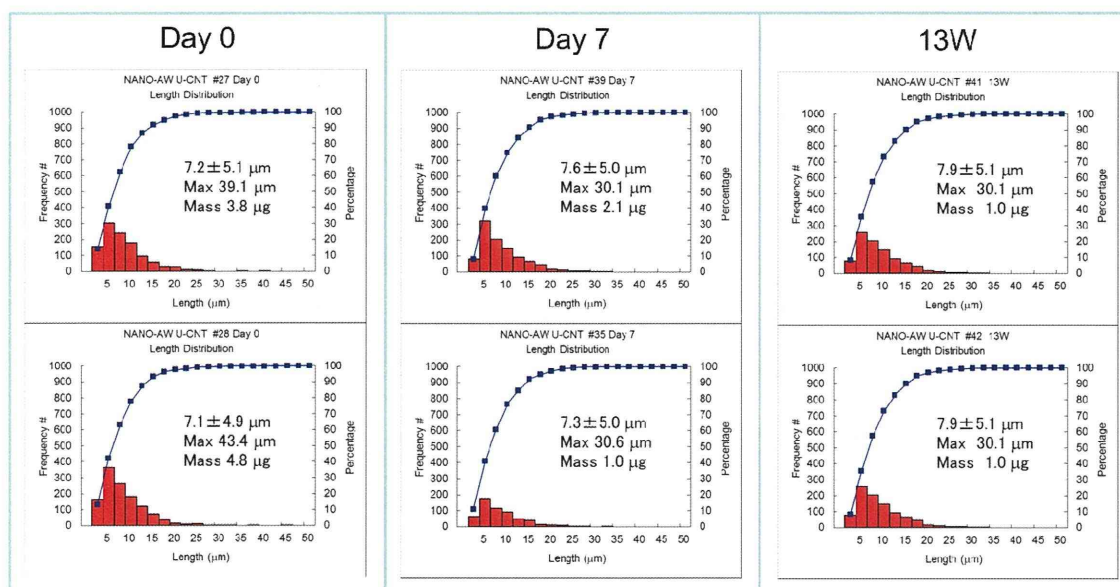
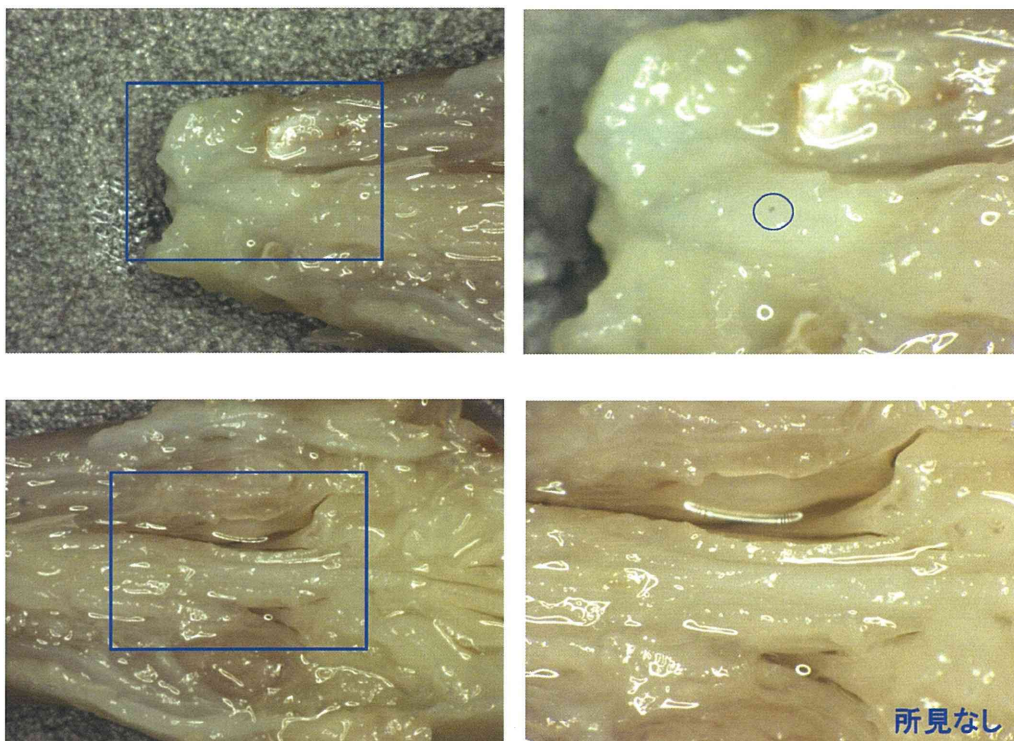


図 8 肺から回収した MWCNT の繊維長分布

(A) T-CNT、(B) U-CNT。繊維長の平均値は約 8 μm、最大値は共に約 40 μm であり、T-CNT と U-CNT の間に差異は認められなかった。肺に沈着した繊維長の分布は暴露直後から 13 週後まで経時的変化はみられなかった。

#15 【T-CNT Day0 鼻腔】



#29 【U-CNT Day0 鼻腔】

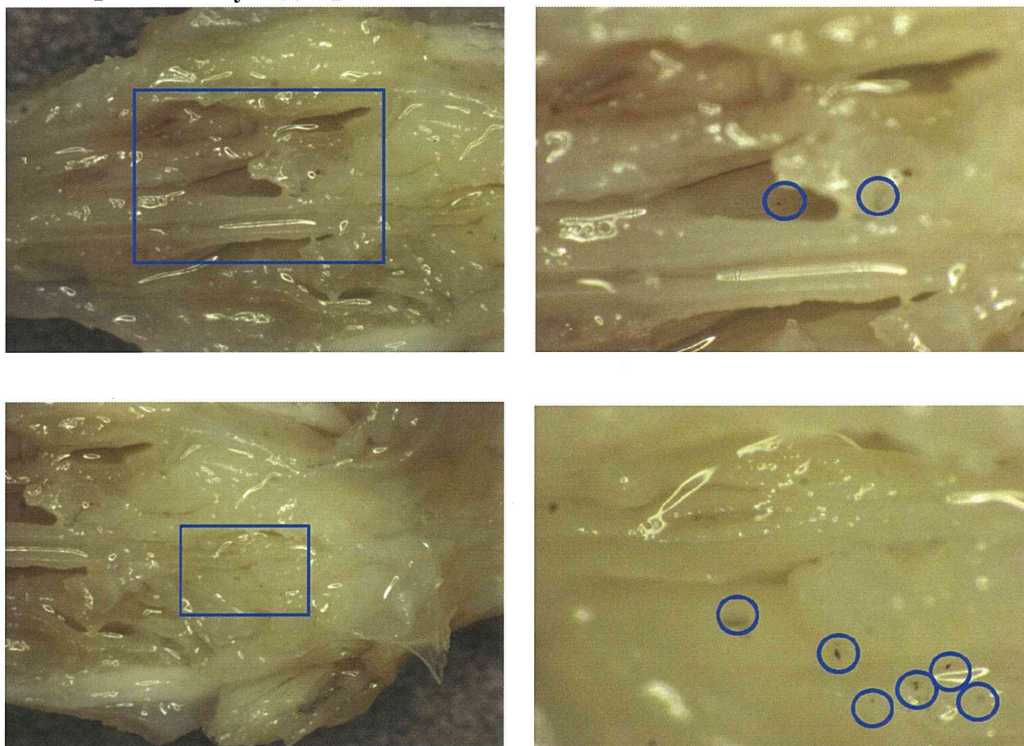


図9 鼻腔内のMWCNT沈着の様子

U-CNT と T-CNT を暴露した動物の暴露終了直後の鼻腔内を観察した（VHX, Keyence, 50 倍、100 倍）。U-CNT 暴露動物では、鼻腔粘膜に黒色の凝集体/凝固体の沈着が多く観察された。

平成27年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

-全身暴露吸入による毒性評価研究-

分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究」

研究分担者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長
	山田 耕一	徳島大学大学院医歯薬学研究部 大学院生
	新垣理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授

## 研究要旨

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本研究では、多層化カーボンナノチューブ（MWCNT）の吸入暴露による免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。Taquan 法処理による MWCNT（T-CNT）を用いて、全身吸入暴露装置による吸入を行った。正常 C57BL/6 マウスに低濃度、高濃度の T-CNT の暴露を実施し、暴露後 1、6、12 ヶ月までの肺組織での免疫細胞の動態、全身の免疫担当細胞の分画、各種遺伝子発現に関して検討を加えた。その結果、T-CNT 暴露マウスでは、気管支周囲あるいは肺胞内でのマクロファージの集簇に加え、肉芽腫様病変が観察された。T-CNT の暴露により M2 主体である肺胞内マクロファージの分化に異常が見られた。さらに、マクロファージ関連遺伝子の発現は T-CNT 暴露後 12 ヶ月で肺組織とともに脾臓でも変化していた。したがって、T-CNT の吸入暴露後の晩発性の影響が肺胞マクロファージの分化とともに、全身のマクロファージを主体とした免疫システムに影響を及ぼす可能性が示された。

## A. 研究目的

ナノマテリアルの暴露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸入による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られているが、長期暴露による肺を含めた全身の免疫システムへの影響については知られていない。さらに、カーボンナノチューブの吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。これまでに報告されてきた *in vivo* の研究は暴露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの暴露から慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。

本研究では、カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫システムへの影響を長期間観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価することを目的としている。平成26年度報告書ではT-CNT暴露後1ヶ月での変化を記載したが、今年度は暴露後6ヶ月および12ヶ月での長期観察を実施した。

## B. 方法

### ・マウス

2ヶ月齢のC57BL/6（雌）を用い、各群10匹ずつで多層化カーボンナノチューブを吸入暴露装置（国立医薬品食品衛生研究所）により吸入を実施し、吸入後、1ヶ月（平成26年度報告済み）、6ヶ月、12ヶ月で適切に屠殺後解析を行った。マウスを用

いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

### ・T-CNT

多層化カーボンナノチューブはMWNT-7（三井物産）を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により Taquann 処理された MWCNT（T-CNT）を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエアア吸入とした。低濃度群は  $1 \text{ mg/m}^3$ 、1日2時間（週1回×5）の計10時間吸入した。高濃度群は  $2 \text{ mg/m}^3$ 、1日2時間（週1回×5）の計10時間の吸入とする。

### ・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓からガラスホモジナイザーを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針（SR-OT1851C, TERUMO）を留置し、1mlのシリンジ（SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO）に1mlのPBSを流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー（CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44、CD62L）に対する抗体にて染色、

0.5%-PFA-PBS で固定後に、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

・病理組織解析

全身臓器を 10%中性緩衝ホルマリンに浸漬、パラフィン包埋後、4 $\mu$ m に薄切した標本をヘマトキシリン・エオジン溶液で染色した。

・共焦点顕微鏡解析

各群の肺組織の凍結切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドにて固定、正常血清によるブロッキング後、Alexa-488 標識抗 F4/80 抗体、Alexa-568 標識 CD206 抗体にて反応させた。洗浄後、DAPI にて核染色を行い、封入した。解析は LMS5 Pascal Confocal Laser-scanning (Carl Zeiss)にて行った。

・定量化 RT-PCR 法

肺、脾臓からトライゾールを用いて通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。F4/80 ; forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTC CAGTC-3', reverse, 5'-GCAAGGAG GACAGAGTTTATCGTG-3', MCP-1; forward, 5'-CTGGATCGGAACCAAA TGAG-3', reverse, 5'-TGAGGTGGTT GTGGAAAAGG -3', CCR2; forward, 5'-CCATGCAAGTTCAGCTGCCT-3', reverse, 5'-TGCCGTGGATGAACTGA

GG-3', iNOS; forward, 5'-CTGCAGCA CTTGGATCAGGAACCTG-3', reverse, 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3', CD206; forward, 5'-GTACC TCACAGGATTAACCAGTTC-3', reverse, 5'-CAGGGTTTAGTGACACA CAGCTC-3', Arginase-1; forward, 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3', reverse, 5'-CAGATATGCAGGGAGTC ACC-3',  $\beta$ -actin; forward, 5'-GTGGGCCCGCTCTAGGCACCA-3', reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGT TCAGGGGG-3'

## C. 研究結果

### T-CNT吸引暴露による体重の変化

T-CNTの吸引暴露による体重の変化を図1に示す。低濃度群、高濃度群ともに対照群との有意な変化は認められなかった。

### 吸引暴露後の肺における病理組織

暴露後6ヶ月では、マクロファージの集簇像、肉芽腫様病変が低濃度群、高濃度群で散在性に見られた (図2)。

暴露後12ヶ月では、肉芽腫様病変が目立った (図3)。特に、高濃度群では肉芽腫様病変は高率に観察された (図3)。

その他の全身臓器において、T-CNT吸入暴露による影響は観察されなかった。

### T-CNT暴露による脾細胞及び肺胞マクロファージの変化

T-CNT吸入暴露6ヶ月および12ヶ月での

脾臓での免疫細胞分画への影響を確認したところ、CD8<sup>+</sup>T細胞、B細胞には変化は見られなかった(図4A)。暴露後12ヶ月での脾臓における高濃度暴露群のF4/80<sup>+</sup>マクロファージの割合は対象群に比較して減少していた(図4A)。また、肺胞洗浄(BALF)中の免疫細胞では、T-CNT暴露後6ヶ月にてCD8<sup>+</sup>T細胞が増加し、B細胞の割合はT-CNT暴露によって12ヶ月まで影響は観察されなかった(図4B)。

一方で、F4/80<sup>+</sup>マクロファージは暴露後6ヶ月では各群に変化はなかったが(図4B)。12ヶ月後ではF4/80<sup>+</sup>マクロファージは加齢変化として減少する中で、高濃度暴露群で有意に増加していた(図4B)。さらに、正常な肺胞マクロファージのマーカーとして知られているF4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>分画は加齢的に減少する一方で、T-CNT暴露によって12ヶ月後では高濃度群で有意に増加することがわかった(図5)。加えて、通常観察されないF4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>分画が高濃度のT-CNT暴露群で12ヶ月後に有意に増加することが明らかとなった(図5)。また、暴露後12ヶ月におけるF4/80<sup>+</sup>でのM1マクロファージ(CD192<sup>+</sup>)あるいはM2マクロファージ(CD206<sup>+</sup>)への分化を確認すると、BALF中のCD192及びCD206の発現パターンは脾臓やリンパ節での発現と大きく異なり、CD206<sup>+</sup>CD192<sup>low</sup>の分画が見られ、T-CNTの高濃度暴露群でCD206<sup>+</sup>マクロファージが有意に減少していた(図6)。一方で、脾臓、リンパ節においてM1/M2マクロファージへの分化のシスト

にT-CNT暴露の影響は確認されなかった(図6)。

実際に肺組織の凍結標本を用い、CD206及びF4/80を発現するマクロファージを共焦点顕微鏡にて解析すると、高濃度T-CNT暴露群でCD206陽性マクロファージの集簇が観察された(図7)。

#### マクロファージ関連遺伝子の発現

肺組織におけるT-CNT暴露による各種マクロファージ関連遺伝子発現への影響を確認するために、定量RT-PCR法にて検討した。

T-CNTの暴露6か月、12か月で肺組織でのF4/80 mRNA発現、MCP-1mRNA発現には影響は見られなかった(図8)。暴露後6か月においてCCR2 mRNA発現が上昇していた(図8)。iNOS mRNA発現に関しては6か月、12か月ともにT-CNT暴露によって上昇傾向にあった(図8)。さらに、CD206 mRNA発現は暴露6か月で上昇していたが、12か月では変化が見られなかった(図8)。Arg1 mRNAの発現はT-CNT暴露で変化は認められなかった(図8)。

脾臓における各種マクロファージ関連遺伝子発現に関しては暴露後6ヶ月では、各遺伝子発現のT-CNT暴露による大きな影響は認められなかったが(図9)、暴露後12ヶ月でF4/80 mRNA、MCP-1 mRNA、CCR2 mRNA、Arginase-1 mRNAの発現がT-CNT暴露により低下することが明らかになった(図9)。また、iNOS mRNAに関してはT-CNT暴露によって発現の亢進が

確認された (図9)。

#### D. 考察

本年度の研究では正常 B6 雌マウスに T-CNT を吸入暴露することによる免疫システムへの影響を 12 ヶ月まで長期観察を行った。吸入後 1 ヶ月では、肺組織において気管支上皮の軽度の変性及び肺泡マクロファージの集簇が見られた (平成 26 年度報告済み)。一方、T-CNT 暴露後 6 及び 12 ヶ月ではマクロファージの集簇に加え、肉芽腫様病変が見られた。

肺胞洗浄液より採取した単核球の解析では、暴露後 6 ヶ月と 12 ヶ月で、加齢変化によるマクロファージ数の低下が観察される中で、F4/80+マクロファージの割合は T-CNT の暴露によって上昇していたことから、長期に渡って T-CNT 暴露に対する反応が持続しているものと考えられる。

また、肺泡マクロファージは F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup> を示すことが知られ、加齢的に減少する一方で、T-CNT 暴露によってその分画は増加することが判明し、さらに、F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup> を示す異常なマクロファージが増加することも明らかになった。加えて、M1 及び M2 マクロファージ分化パターンを CD192 および CD206 を用いて検討すると、脾臓やリンパ節での M1/M2 パターンと異なり、肺胞内では CD206<sup>+</sup>CD192<sup>low</sup> を示すマクロファージ分画が多く存在し、T-CNT 暴露後 12 ヶ月で、CD206<sup>+</sup>マクロファージは減少していることがわかった。

T-CNT 暴露後 1 ヶ月では肺におけるマクロファージ関連の遺伝子発現が高濃度群で上昇していたが、M1 あるいは M2 マクロファージの明瞭な分化が確認できなかった (平成 26 年度報告済み)。暴露 6 ヶ月、12 ヶ月で幾つかの遺伝子は変化が見られたが、暴露後長期においても明確な分化パターンは認められなかった。今後、サイトカイン遺伝子、ケモカイン遺伝子などについても解析を進める予定である。

脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子の発現は加齢変化とともに、T-CNT 暴露による影響が明確に現れていたことから、吸入暴露による慢性的な影響は全身のマクロファージの分化、機能に大きく関与していることが明らかになった。今回の研究は一定期間に T-CNT を吸引暴露した後の長期観察であるので、T-CNT の全身免疫システムへの影響をさらに検討する必要がある。

これまで、ナノマテリアルの吸入暴露に関しては肺の変化が報告されてきたが、免疫システム全体への影響に関してはほとんど知られていなかった。本研究では、均一な吸入暴露を可能とした Taqaunn 法による処理により、肺組織に一定量が暴露できるようになった。また、吸入装置に関しても、研究協力者の開発した自動吸入装置を用いることにより、従来のスプレー式の噴霧暴露に比較して、実験精度が高くなっているものと考えられる。従来知られていなかったナノマテリアルの慢性的な影響を考慮する上で、今後さらに検討を要す



るものと考えられた。

## E. 結論

1. C57BL/6マウスへのT-CNT吸入暴露により、暴露後6ヶ月、12ヶ月では気管支、肺胞内にマクロファージの集簇に加え、肉芽腫様の病変が観察された。
2. 暴露後12ヶ月で肺胞内に集簇していたマクロファージの多くはCD206<sup>+</sup>CD192<sup>low</sup>を示すユニークな分化を示しており、T-CNTの暴露により大きな影響は見られなかったが、CD206<sup>+</sup>マクロファージはT-CNT暴露により減少していた。
3. T-CNT暴露後12ヶ月での肺組織でのiNOSなどのマクロファージ関連遺伝子の発現亢進が見られたとともに、脾臓での変化が目立った。
4. T-CNTの吸入暴露後の晩発性の影響が全身のマクロファージを主体とした免疫システムに影響を及ぼす可能性が示された。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Qi G, Kudo Y, Tang B, Liu T, Jin S, Liu J, Zuo X, Mi S, Shao W, Ma X, Tsunematsu T, Ishimaru N, Zeng S, Tatsuka M, Shimamoto F. PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 doi: 10.18632/oncotarget.7712. [Epub ahead of print]
2. Yamada A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 22(7):2195-2205
3. Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanisms of nickel allergy. *Int J Mol Sci*. 2016 17(2): e202
4. Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in Ma macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 2016 96(4):468-480
5. Tsunematsu T, Arakaki R, Yamada A, Ishimaru N, Kudo Y. The non-canonical role of Aurora-A in DNA replication. *Front Oncol* 2015 96(4):468-480
6. Yamada A, Ushio A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Impaired Expansion of Regulatory T Cells in A Neonatal

- Thymectomy-Induced Autoimmune Mouse Model. *Am J Pathol* 2015 185(11):2886-2897
7. Yamano T, Nedjic J, Hinteberger M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M, Brors B, Kyewski B, Klein L. Intrathymic B cell licensing for Aire expression and T cell tolerance induction. *Immunity* 2015 42(6):1048-61.
  8. Sano T, Iwashita M, Nagayasu S, Yamashita A, Shinjo T, Hashikata A, Asano T, Kushiyama A, Ishimaru N, Takahama Y, Nishimura F. Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL19-CCR7 signaling. *Obesity* 2015 23(7):1460-71.
  9. Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N, Funaki M. Possible involvement of palmitate in pathogenesis of periodontitis. *J Cell Physiol.* 2015 230: 2981-89.
  10. Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto KI, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn.* 2015 244(3):488-496.
  11. Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A, Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N. Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2015 185(1):151-161.
2. 学会発表
- (1) 新垣理恵子、常松貴明、山本安希子、工藤保誠、菅野純、石丸直澄 自己免疫疾患モデルマウスを利用した多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第104回日本病理学会総会 2015.4.30 (名古屋)
  - (2) 牛尾綾、新垣理恵子、近藤智之、鯨岡聡子、常松貴明、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 Analysis of macrophages in the pathogenesis of a murine for Sjögren's syndrome 第104回日本病理学会総会 2015.5.1 (名古屋)
  - (3) 近藤智之、常松貴明、鯨岡聡子、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍増殖制御機構の解明 第104回日本病理学会総会 2015.5.2 (名古屋)

(4) 石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルを用いた病態機序に関する多角的研究 第24回日本シェーグレン症候群学会総会 シェーグレン症候群学会賞受賞講演 2015.9.18 東京

(5) Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. 7<sup>th</sup> Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology Oct 17, 2015, Taipei

(6) Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Autoimmunity~Sjögren's Syndrome~ Academy of Immunology and Microbiology Series Seminar Special Symposium Oct 28, 2015, Pohang, Korea

(7) Kurosawa M, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Migratory activity of memory T cells in *aly/aly* mice. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.18 (札幌)

(8) Arakaki R, Kurosawa M, Otsuka K, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Analysis of function of macrophages in murine models of Sjögren's syndrome. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.19 (札幌)

(9) Saito M, Arakaki R, Otsuka K, Yamada K, Kudo Y, Ishimaru N. Biological effect of multi-walled carbon

nanotubes on immune system. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.18 (札幌)

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1

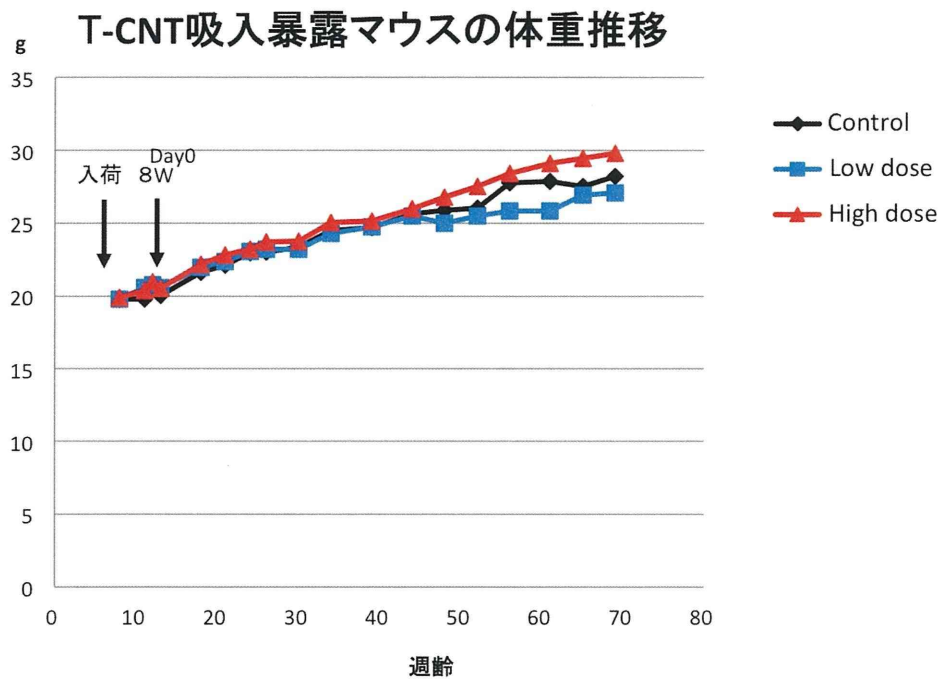


図1.T-CNT吸入暴露による体重の変化  
8週齢雌C57/BL6マウスに低濃度群は $1\text{mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間吸入した。高濃度群は $2\text{mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間の吸入とする。吸入暴露後1、6および12ヶ月にて解析を行った(各群N=6~9)。毎週体重を測定した。

図2

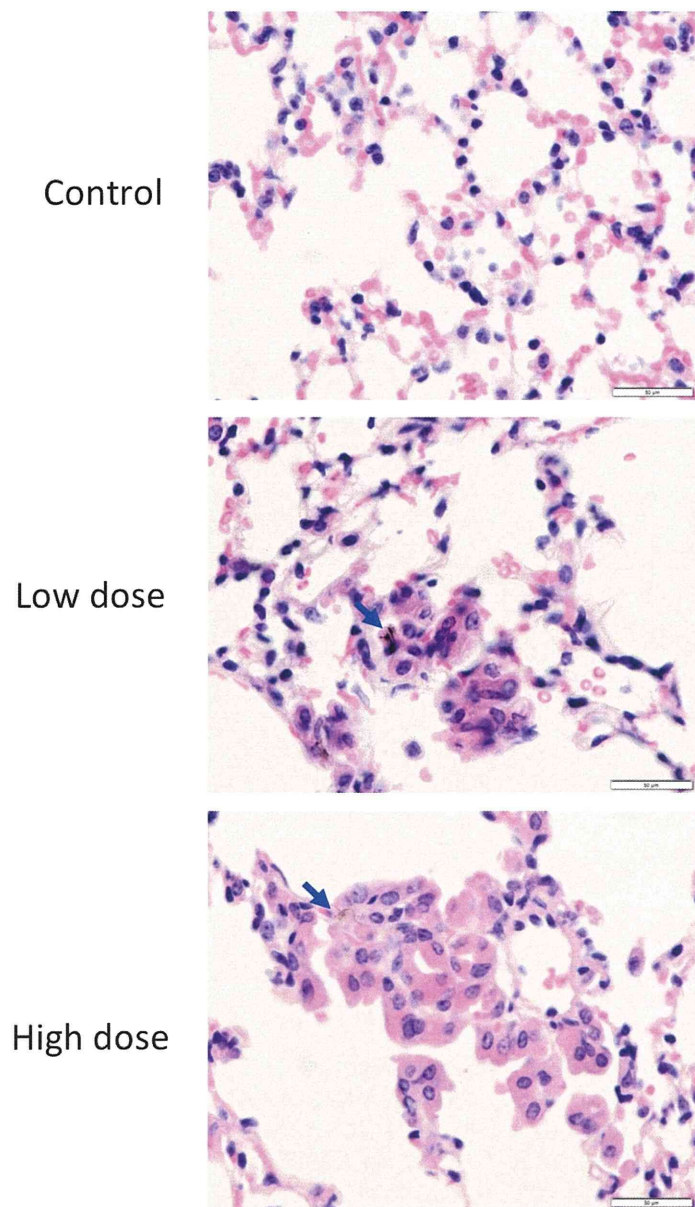


図2. T-CNT吸入暴露後6ヶ月後の肺の病理組織像。各群の代表的な病理組織写真(H&E染色)を示す。矢印はカーボン繊維を示す。

図3

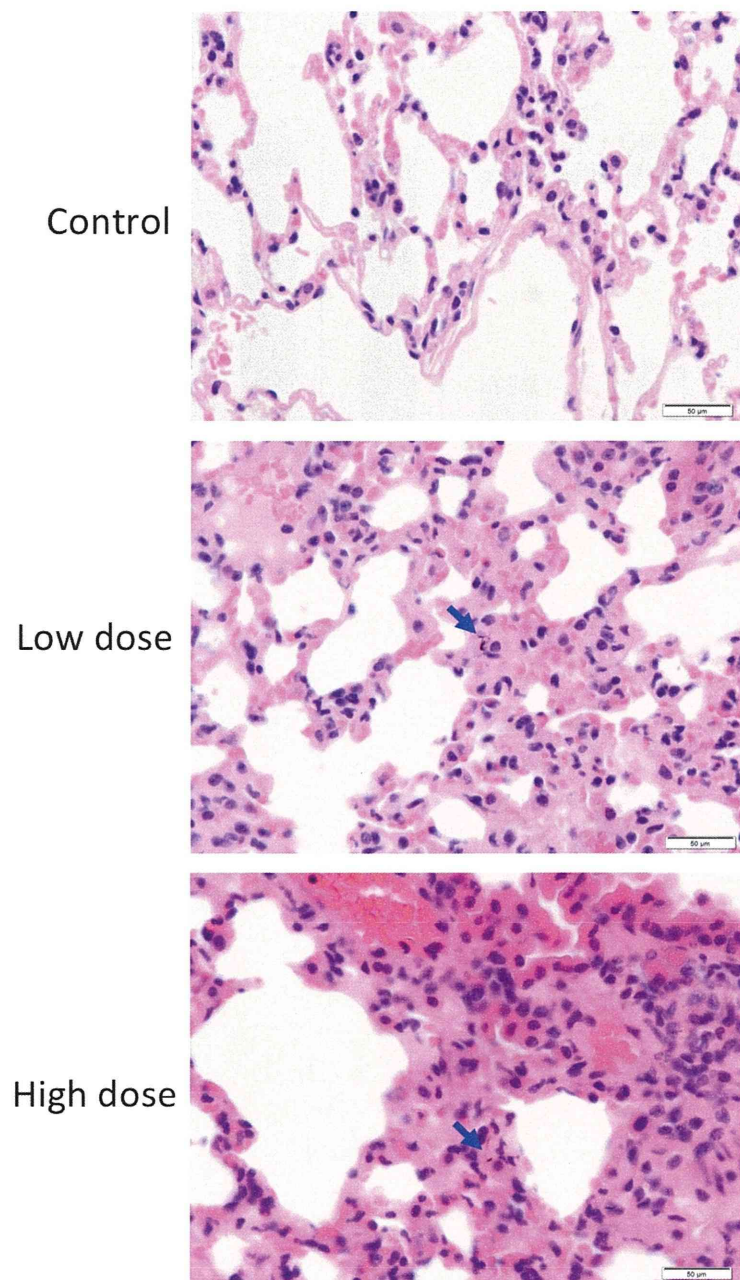


図2. T-CNT吸入暴露後12ヶ月後の肺の病理組織像。各群の代表的な病理組織写真(H&E染色)を示す。矢印はカーボン繊維を示す。

図4

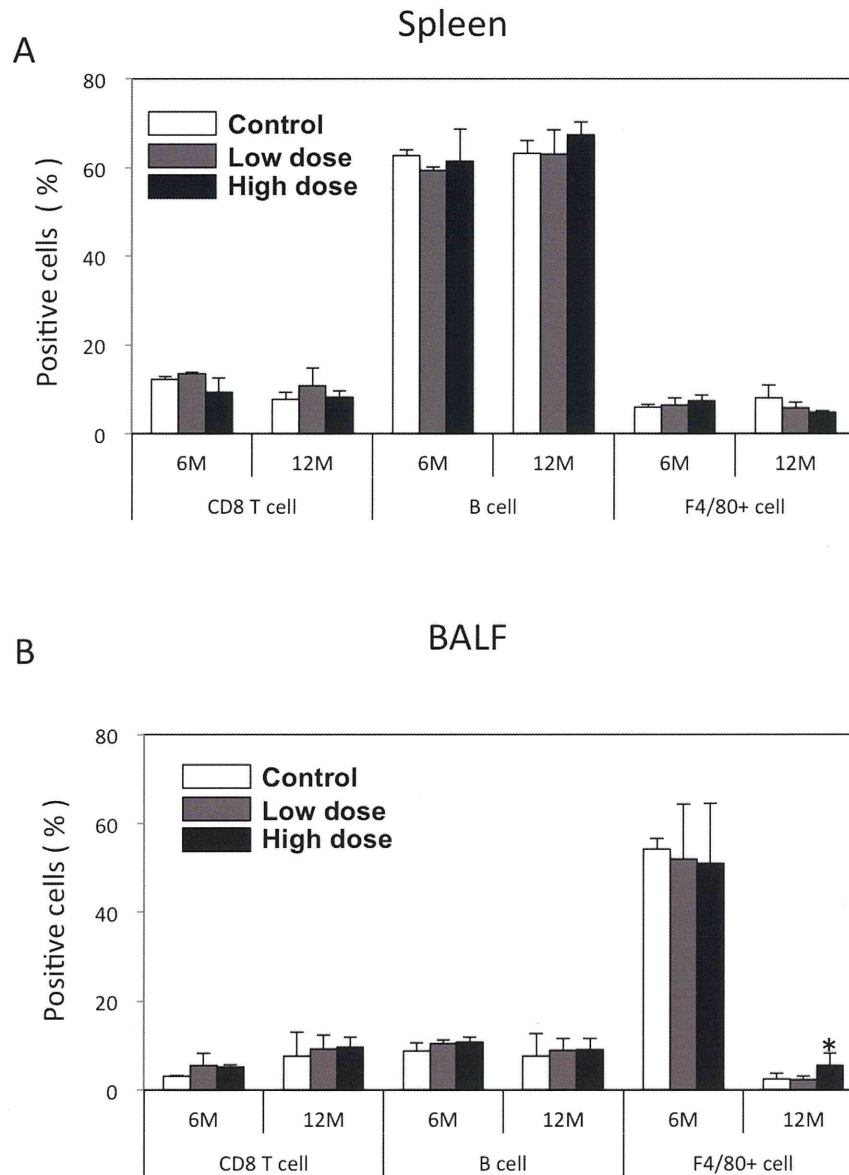


図4. T-CNT吸入暴露後の脾臓(A)、気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar lavage fluid: BALF)(B)における免疫細胞分画  
 吸入暴露後6ヶ月および12ヶ月での脾臓、BALFにおけるT細胞、B細胞、マクロファージの割合をフローサイトメーターにて解析した。データは各群の平均値±SDを示す。\*p<0.05

図5

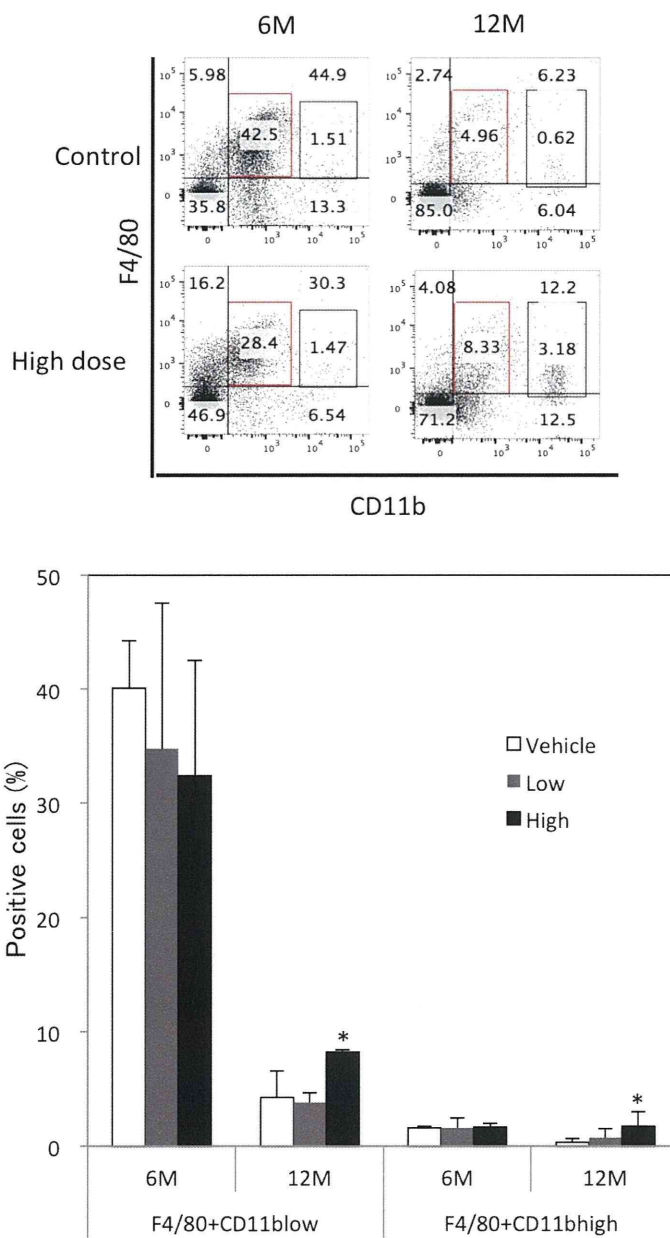


図5. T-CNT吸入暴露後のBALF中のマクロファージの変化  
BALFマクロファージのF4/80とCD11bの発現をフローサイトメーターにて解析した。上段はControl及びHigh dose群の代表的な発現パターンを示す。下段はF4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>及びF4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>分画の割合を示す。データは各群の平均±SDを示す。\*p<0.05



図6

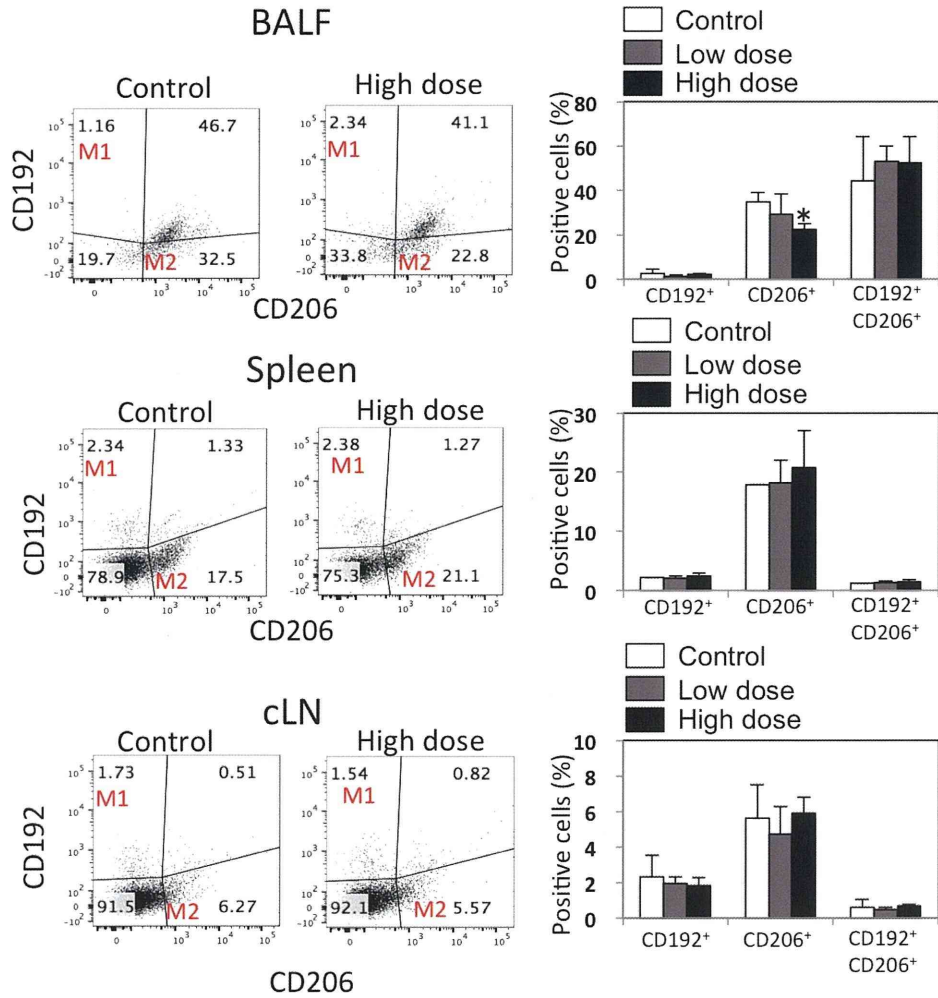


図6. BALF、脾臓、リンパ節でのT-CNT吸入暴露(12ヶ月)によるM1/M2マクロファージ分化への影響

F4/80<sup>+</sup>におけるCD192及びCD206の発現をフローサイトメーターにて解析した。左欄それぞれの群の代表的な発現パターンを示す。中欄にM1/M2比を各群の平均±SDで示す。右欄にM1、M2、CD206<sup>+</sup>CD192<sup>+</sup>分画の割合を各群の平均値±SDで表す。

図7

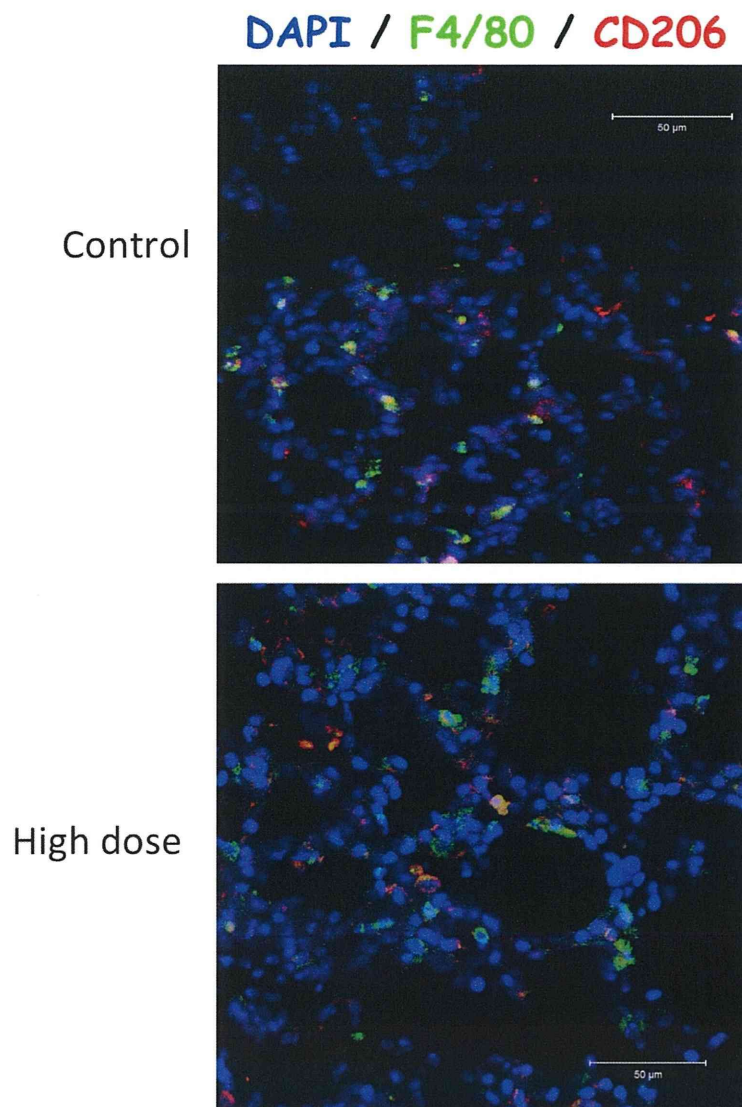


図7. T-CNT吸入暴露後12ヶ月での肺組織におけるマクロファージ Alexa-488標識F4/80及びAlexa-568標識CD206抗体を用い、凍結肺切片の染色後、共焦点顕微鏡にて解析した。各群の代表的な写真を示す。核はDAPIにて染色した。

8

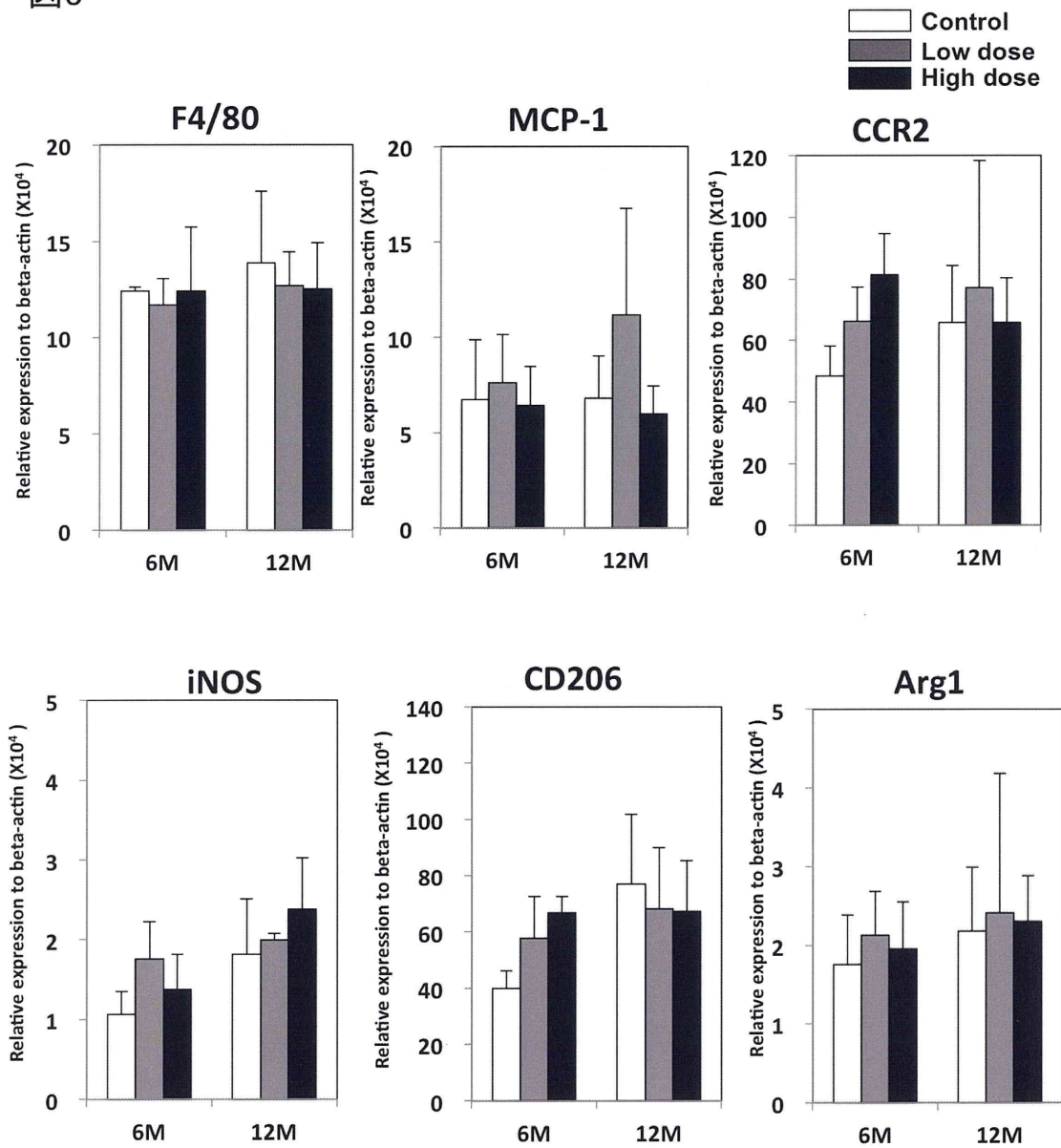


図10. 肺におけるマクロファージ関連遺伝子の発現  
 肺組織における各種遺伝子発現をq-RT-PCR法にて定量化した。データはβ-actin mRNAに対する相対的発現値を各群での平均±SDで示す。

図9

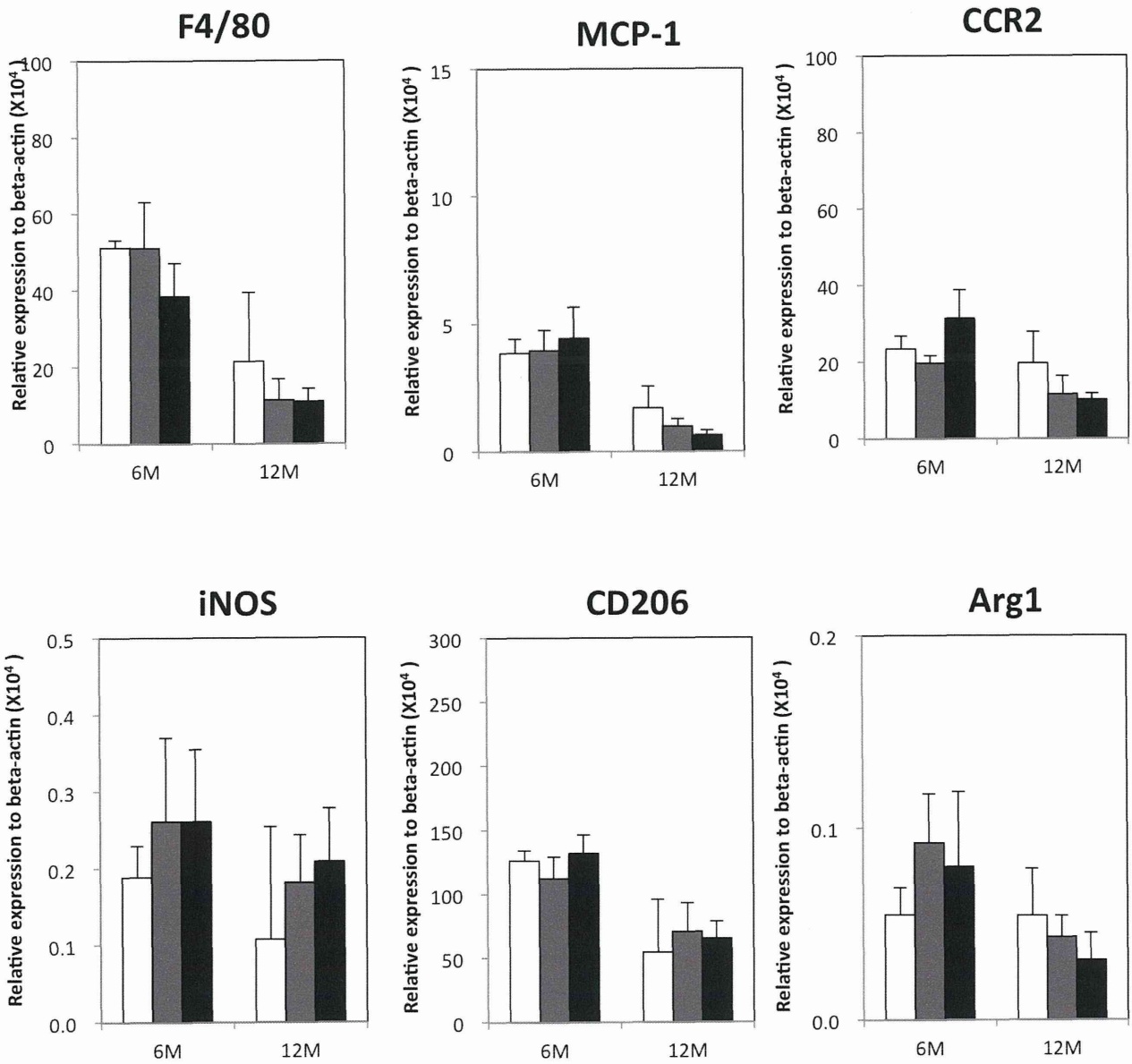


図9. 脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子の発現  
 脾臓組織における各種遺伝子発現をq-RT-PCR法にて定量化した。データはβ-actin mRNA  
 に対する相対的発現値を各群での平均±SDで示す。