

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）

分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・医療薬学研究科 教授

研究協力者： 吉田 裕樹 九州保健福祉大学大学院・医療薬学研究科 講師

研究協力者： 明石 敏 九州保健福祉大学大学院・医療薬学研究科 教授

研究要旨

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) およびチタン酸カリウム (TISMO) について、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて感染病態を指標に影響評価を行った。両サンプルを複数回曝露（感染 5,3,1 日前）後、RSV をマウスに感染させた。MWNT-7 曝露マウスの感染 1 日後の肺病理組織像では、低用量から著しい単核球の浸潤が認められた。また、肺胞洗浄液中の IL-6 および TNF- α レベルの上昇や *in vitro* でのマクロファージ様細胞からの TNF- α 産生亢進も確認された。MWNT-7 は感染初期にマクロファージなど初期免疫応答細胞に強く作用することが明らかとなった。一方、TISMO 曝露マウスでは、感染 5 日後の肺胞洗浄液中の CCL5 レベルの上昇や肺組織への軽度な単核球の浸潤や細胞壁肥厚が認められた。TISMO は MWNT-7 より増悪化の程度は弱い、広いエリアで肺炎を増悪化することも明らかとなった。

A. 研究目的

多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) は、その物理的特性から IC 基盤の材料などに汎用されている。その一方でマウス腹腔内投与により中皮腫を誘導するなど、アスベスト様の生物災害を引き起こす危険性が多方面から指摘されている。チタン酸カリウム (TISMO) もプラスチックの補強材や精密フィルターなど工業製品に多用されているが、やはりアスベストに似た針状の構造が健康被害を引き起こす可能性が指摘されている。

本研究では、これらナノマテリアルの免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響を respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行っている。なお、このモデルではマウスにおける RS ウイルス由来の肺炎病態の変動を通じて、酸化チタンナノ粒子の感染免疫系への影響を既に報告している。

今年度は、MWNT-7 の複数回曝露による RS ウイルスの初期感染病態への影響と TISMO の感染影響を検討することを目的とした。

B. 方法

RSV マウス感染実験

高度分散化 MWNT-7 (Taquan サンプル) とチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$, TISMO) を実験に用いた。これらの試料について、秤量後に超音波破砕機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02% Tween 20 -phosphate buffered saline (PBS) に均一懸濁した。ウイルス感染 5、3、1 日前に試料 (0.01 および 0.1 mg/mL) を 50 μ L ずつ BALB/c マウス (雌

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL3 (MIP-1 α) および CCL5 (RANTES) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットシリーズを用いた。サイトカインの定量は、Ready-Set-Go ELISA キット (eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (有) ヴィペック社に委託し、評価は HE 染色下で実施した。

RAW264.7 細胞実験

培養マクロファージ RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/mL/well の濃度で 24well プレートに播種した。1 日培養後、10% FCS 添加 RPMI1640 培地に懸濁・希釈した MWNT-7 を添加した。培養 24 時間後、RS ウイルス A2 株を MOI=1 に 2% FCS 添加 RPMI1640 培地で希釈して感染させた。感染 24 時間後の培養上清中の TNF- α 量を測定した。

(倫理面への配慮)

性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g、筋注) で経鼻投与した。なお、対照には 0.02% Tween 20-PBS を投与した。曝露後、RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1 および 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

(1) MWNT-7 の評価結果

BALF 中の炎症性サイトカインの評価
感染 1 日後の BALF 中の炎症性サイトカイン量を測定した。MWNT-7 低用量曝露 (0.025 mg/kg) から IL-6 および TNF- α レベルが非曝露群と比較して 2-3 倍程度有意に上昇していた。

HE 染色による肺の病理組織評価

RSV 感染 1 日後に摘出した肺の病理組織学的検討を行った。非感染マウスの肺組織では、対照 (非処置) 群と異なり、低用量からび漫性のごく軽度の肥厚と単核球の浸潤が見られた。ウイルス感染マウスでは、肺胞壁の肥厚や肺動脈周囲に単核球の浸潤が認められた。そして MWNT-7 曝露により単核球の浸潤が顕著になり、高用量では著しい肺胞壁の肥厚が認められた。さらにマクロファージに貪食されたカーボン繊維も散見された。

培養マクロファージ細胞への作用

RSウイルス感染RAW264.7細胞において、MWNT-7 添加は0.01 ug/mLからTNF- α の産生を増強し、3 ug/mLにおいては非処置の2.2倍にまで達した。一方、ウイルス非感染細胞ではそのような強い増強効果はなかった。

(2) TISMOの評価結果

ケモカイン産生への影響

RSウイルス感染5日後のBALF中のCCL5産生量を検討した。TISMO曝露群(0.025および0.25 mg/kg)では、上昇傾向が認められた。

HE染色による肺の病理組織評価

非感染マウスにおいて、0.25 mg/kgでは肺胞壁など構造に著変はないが、TISMOを貪食したマクロファージが認められた。一方、感染マウスでは、0.025 mg/kg曝露により、すべての個体で単核球の浸潤により軽度に肥厚した肺胞壁などが見られた。さらに0.25 mg/kgでは、軽度ではあるがより肥厚した肺胞壁や肺動脈周囲に中程度の単核球の浸潤が認められた。

D. 考察

RSウイルス感染1日後は、ウイルス学的にエクリプスと呼ばれ、ウイルス粒子が生産されていない。そのため、正常マウスと病理学的な差異はあまり見られないと考えていた。しかし、実際には部分的に軽度な肺胞壁の肥厚と肺動脈周囲に単核球の浸潤が認められた。そしてMWNT-7を複数回曝露することにより、この感染初期からマクロファージによるカーボンの貪食が見られるなど、感染ピ

ーク時(5日後)より明確な影響が確認できた。さらに炎症性サイトカイン、特にTNF- α の産生上昇も顕著であり、このモデルにおける標的細胞としてはマクロファージの可能性が非常に高まった。

これらの結果を受けて、培養マクロファージ細胞RAW264.7細胞を用いた*in vitro*でTNF- α の産生影響を検討した。MWNT-7低濃度(0.01 ug/mL)から産生増強効果があり、本試験系がナノマテリアルの影響評価系としての有用な可能性が示された。なお肺病理組織学的な検討から、感染マウスではマクロファージの貪食能が亢進しているような結果が観察され、*in vitro*の試験系で検討可能か進める予定である。

TISMOはその特徴的な針状の構造から、カーボンナノチューブより増悪化能が高いと当初予想された。しかし、実際には、肺炎の強度は高くなかった。その一方で、評価した各個体で肺組織の広いエリアでの増強効果が見られ、本物質の分散のし易さが感染影響に強く反映している可能性が示された。今後、感染初期応答などを検討していく。

E. 結論

1. MWNT-7曝露マウスでは、RSウイルス感染初期応答に影響し病態を増悪化した。
2. RAW264.7細胞におけるMWNT-7の感染応答が*in vivo*の結果を反映していた。
3. チタン酸カリウムは炎症増悪化の程度は強くないが、比較的広い肺組織のエリアに影響していた。

F.健康危険情報

なし

(2015.9.14) (Port, Portugal), poster P08-20

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurokawa, M., Wadhvani, A., Kai, H., Hidaka, M., Yoshida, H., Sugita, C., Watanabe, W., Matsuno, K., Hagiwara, A. Activation of Cellular Immunity in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Mice by the Oral Administration of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Phytother. Res.* (2016) DOI: 10.1002/ptr.5580.

2. 学会発表

橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、宮内亜宜、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子のRSウイルス感染への影響、第63回日本ウイルス学会学術集会、2015.11.20, 福岡、ポスター P1-G-091

橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、宮内亜宜、黒原俊典、坂田健太郎、重黒木公也、広瀬明彦、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子曝のRSウイルス肺炎への影響 第32回日本薬学会九州支部会、2015.11.29, 延岡、口頭 2B-04

Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko

Kurokawa, Wataru Watanabe. : Effects of multi-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice EUROTOX2015,

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

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）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる

評価手法の開発研究

分担研究課題名：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
研究協力者：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部主任研究官
研究協力者：新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教
研究協力者：斎藤 雅子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教

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）の長期におけ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。正常 C57BL/6 マウスへの MWCNT とともに TLR のリガンドである Zynosan を投与することにより、MWCNT に曝露された腹腔 M2 マクロファージの TLR シグナルを検討したところ、MWCNT は TLR シグナルを増強する可能性が示された。一方で、自己免疫疾患モデル MRL/lpr マウスへの MWCNT を腹腔内に投与することにより、慢性的な腹膜炎の状態が継続していることがわかり、腹腔内のマクロファージは M2 マクロファージが中心で、各種サイトカインの産生亢進、自己抗体の産生亢進が認められた。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝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引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。さらに、カーボンナノチューブの吸入曝露により、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曝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* の研究は曝露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの曝露から慢性的な免

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投与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年度までに正常C57BL/6マウスへのTaquan処理されたMWCNT (T-CNT) の腹腔内投与により、M2マクロファージの集簇が亢進することが判明した。また、MRL/lprマウスへのT-CNT腹腔内投与により各臓器の炎症病変の増悪傾向が認められた。平成27年度はT-CNTとともに、Zymosanを腹腔内投与することによる、腹腔マクロファージのTLRシグナルを検討した。さらに、MRL/lprマウスへのT-CNT投与による病態増悪機序の解明を目指した。

B. 方法

マウス

8週齢の雌C57BL/6マウス(各群7匹)に腹腔内にT-CNTとZymosanを投与後、3日、30日及び60日にて解析した。また6週齢のMRL/lpr(雌)(チャールスリバー)を用い、各群10匹ずつで多層化カーボンナノチューブを腹腔内に投与し、投与後6ヶ月で解析した。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。

MWCNT

多層化カーボンナノチューブはMWCNT-7(保土ヶ谷化学)を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官によりTaquan処理されたMWCNT(T-CNT)を供与された。溶媒として0.1%Tween80/生理食塩水が用いられ、1 μ gおよび10 μ gのMWCNTが腹腔内に注射された。

フローサイトメトリー解析

MWCNTの投与マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、腹腔内滲出細胞から単核球を採取し、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、Gr-1)に対する抗体にて染色後、解析装置(FACSCant BD Biosciences)にてそれらの発現を経時的に検討した。

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 μ 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。

腹腔滲出細胞の解析

マウスの腹腔内を5mlのPBSで洗浄し、採取した滲出細胞を用いて、フローサイトメトリー解析を行った。さらに、滲出細胞(5×10^5)を96穴プレートにてLipopolysaccharide(LPS;0-10 μ g/ml)を用いて24時間培養後、培養上清中の各種サイトカイン、ケモカインに関してマルチプレックスキット(Mouse Cytokine 20-Plex Panel, Invitrogen)にて定量化した。

定量化 RT-PCR 法

PEC 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。
IL-10; F-GCTCTTACTGACTGGCATGAG, R-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
TGF- β ; F-CCACCTGCAAGACCATC GAC, R-CTGGCGAGCCTTAGTTT GGAC, CCL17; F-AGACATCTGAGG ACTGCTCCA, R-AGGCTTCAAGAC CTCTCAAGG, CCL22; F-AGGTCCC TATGGTGCCAATGT, R-CGGCAGG ATTTTGAGGTCCA

ELISA 法

血清を用いて、リウマチ因子 (RF)、IgA、IgG1、IgG2b、IgM、IgE を ELISA 法にて定量化した。測定にはレビス リウマチ因子 IgG 型-マウス ELISA KIT (シバヤギ)を用いた。各イムノグロブリンサブセットの検出には、HRP 標識された二次抗体を用い、通法に従って定量化した。

C. 研究結果

B6マウスへのT-CNT及びZymosan腹腔投与

8週齢メスB6マウスにT-CNT (10 μ g) あるいはZymosan (5mg) を下記の群で腹腔内投与した。1) 対照群、2) T-CNT投与群、3) Zymosan投与群、4) T-CNT+Zymosan投与群を作成した (各群6~8匹)。投与後、3日、30日、60日にて解析した。

腹腔滲出細胞 (PEC) 中の全細胞数、CD4⁺T細胞数、CD19⁺B細胞数、CD8⁺T細胞数、

Siglec F⁺好酸球、CD11b⁺F4/80⁻Gr-1⁺好中球、CD11b⁺F4/80⁺Gr-1⁻M1マクロファージ、CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺M2マクロファージ細胞数に関して、フローサイトメーターにて検討した。

腹腔内投与3日目においては、全細胞数、CD4⁺T細胞数、CD19⁺B細胞数、CD8⁺T細胞数、Siglec F⁺好酸球、CD11b⁺F4/80⁻Gr-1⁺好中球の細胞数が対象群及びT-CNT投与群に比較してZymosan投与群が増加し、T-CNT+Zymosan投与群ではさらに増加していた (図1)。一方で、M1及びM1マクロファージ数はZymosan投与群よりもT-CNT投与群の方が増加していた (図1)。

腹腔内投与後30日、60日でもそれぞれの群との比較にでは3日目と同様の結果であった (図2、3)。さらに、腹腔内投与後3日目、30日目及び60日目の結果を比較すると、全細胞数、CD4⁺T細胞数、CD19⁺B細胞数、CD8⁺T細胞数、Siglec F⁺好酸球、CD11b⁺F4/80⁻Gr-1⁺好中球、M1マクロファージ数は経時的に減少していく一方で (図4、5)、M2マクロファージ数はT-CNT投与群あるいはT-CNT+Zymosan投与群で経時的に増加することが明らかとなった (図4、5)。

MRL/lprマウスへのT-CNT投与によるPECに対する影響

昨年度の研究内容と同様に、8週齢雌MRL/lprマウスに0、1、10 μ g量のMWCNTを腹腔内投与後6ヶ月にて解析を行った。T-CNT投与による腹腔内の病理学的所見に関しては、平成26年度の研究報告書に記載済みである。

T-CNT腹腔内投与各群における脾臓細胞数、腸間膜リンパ節細胞数、PEC数に関し

て、脾細胞はT-CNT投与により増加傾向が見られた(図6)。腸間膜リンパ節細胞数では変化は認められず、PEC数はT-CNT投与により対照群に比較して有意に増加していた(図6)。CD4⁺T細胞に関しては、脾臓、リンパ節では割合、細胞数ともに変化は見られず、PECにおいて細胞数がT-CNT投与により増加していた(図7、8)。増加したCD4⁺T細胞はCD44^{high}CD62L⁻を示すメモリー型へとシフトしていた(図9)。CD8⁺T細胞では、PECでの割合がT-CNT投与により低下していたが(図10)、活性化マーカーには変化は見られなかった(図11)。

また、B細胞に関しては、T-CNT投与により脾臓でのB細胞数の増加が見られ、PEC中のB細胞数も増加していた(図12、13)。

PEC中のM1マクロファージは高濃度T-CNT投与で対照群に比較して、有意に低下している一方で(図14)、M2マクロファージに関しては、T-CNT投与により対照群に比較して、割合、細胞数ともに有意に増加し、濃度依存性も確認された(図14)。

PECの各種サイトカイン、ケモカインのmRNA発現を検討すると、IL-10、TGF- β 、CCL17、CCL22がT-CNT投与により対照群に比較して有意に発現増加することが明らかとなった(図15)。さらに、T-CNT投与によるPECの機能を検討するために、PECを24時間in vitroにてLipopolysaccharide (LPS)を用いて刺激後、培養上清中に各種サイトカインをマルチプレックス法にて定量化すると、昨年報告した結果と同様に、IL-10、IL-6、IL-12、MIP1 α 、TNF α 、MCP1においてT-CNT投与群で有意に産生亢進が確認された(図16)。

加えて、昨年度に報告したT-CNT投与に

よるリウマチ因子(RF)を確認したところ、高濃度群の投与で、投与2ヶ月、4ヶ月、5ヶ月で有意に上昇しており、昨年度の結果とほぼ同様に傾向が認められた(図17)。さらに、T-CNT投与後5ヶ月での血清中の各イムノグロブリンサブセット(IgM、IgG2a、IgG1、IgA、IgE)に関して、検討したところT-CNT投与の影響は確認できなかった(図18)。

D. 考察

昨年度までの研究で、正常B6マウスへのMWCNT腹腔内投与による長期暴露によって、腹膜および腹腔臓器表層部に反応性の変化が観察され、慢性の腹膜炎が持続することが明らかにされた。また、MRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与により、強い腹膜炎が惹起され、全身の自己免疫性病変は増悪することが判明した。今年度は、これらの結果を踏まえ、B6マウスにMWCNTと共にZymosanを投与することにより、PEC中のマクロファージにおけるTLRシグナルに焦点を当てた研究を進めた。さらに、MRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与による自己免疫病変への影響をさらに詳細に検討した。

B6マウスへのMWCNT及びZymosan投与では、投与後3日の初期の段階では、ZymosanによるPEC中の各免疫細胞の増加に加えてMWCNTにより、その影響は増強されることが判明し、経時的に観察すると、投与後60日では各免疫細胞が減少する一方で、M2マクロファージの細胞数がMWCNTのみあるいはMXCNT+Zymosan投与群で増加することが明らかになった。したがって、PEC中ではMWCNTの暴露で

M2 マクロファージが活性化することが判明し、その活性化シグナルは TLR との協調作用がある可能性が示された。

MRL/*lpr* マウスの自己免疫病変への MWCNT 投与による影響は、PEC 中の細胞分画では B6 マウスでの実験と同様に M2 マクロファージに細胞数が増加することに加えて、B 細胞数も増加していた。自己免疫病変を反映する自己抗体 RF の産生に関しては、昨年度の結果と同様に MWCNT 投与によりその抗体価は有意に上昇していた。今後、B 細胞系及び抗体産生への影響を検討する必要がある。

また、来年度の検討課題として、MWCNT に加えてチタンに関する検討を加える予定である。

E. 結論

1. B6 マウスへの MWCNT 及び Zymosan 投与では、初期に両者の相乗効果として PEC 中の各免疫細胞数が増加していた。
2. B6 マウスへの投与実験において、MWCNT 及び Zymosan 投与後 60 日で、M2 マクロファージの細胞数が増加していた。
3. B6 マウスへの MWCNT の腹腔内暴露ではマクロファージの TLR シグナルと協調作用が存在する可能性が示された。
4. MRL/*lpr* マウスへの MWCNT 腹腔内投与により PEC 中の M1 マクロファージ数、B 細胞数が増加することが判明した。
5. MRL/*lpr* マウスへの MWCNT 暴露により PEC の各種サイトカイン、ケモカインの産生亢進が確認された。
6. リウマチ因子は MWCNT 暴露により上昇することが確認された。

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: Doi:10.3389/fonc.2015.00187
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. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central 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. 7th 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

3 days after injection

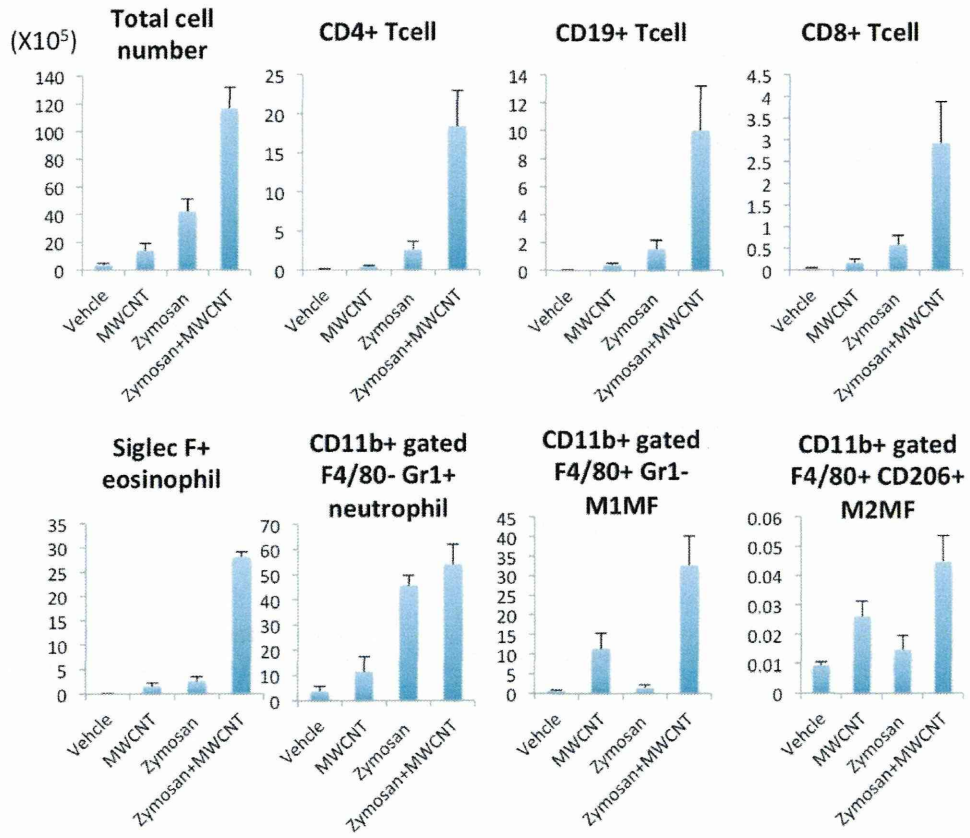


図1 T-CNT及びZymosanの腹腔内投与によるPEC中の免疫細胞分画
T-CNT及びZymosanを腹腔内に投与後3日目のPECをフローサイトメーターにて解析した。

図2

30 days after injection

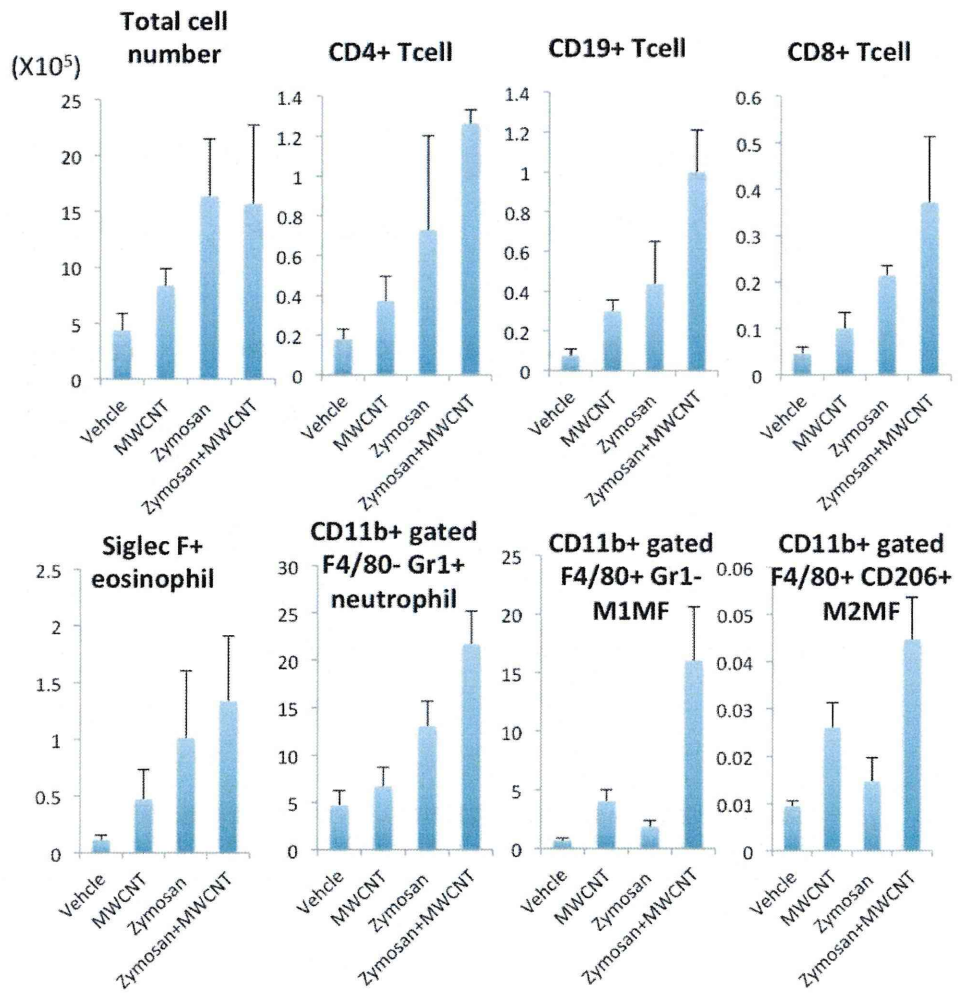


図2 T-CNT及びZymosanの腹腔内投与によるPEC中の免疫細胞分画
T-CNT及びZymosanを腹腔内に投与30日目のPECをフローサイトメーターにて解析した。

図3

60 days after injection

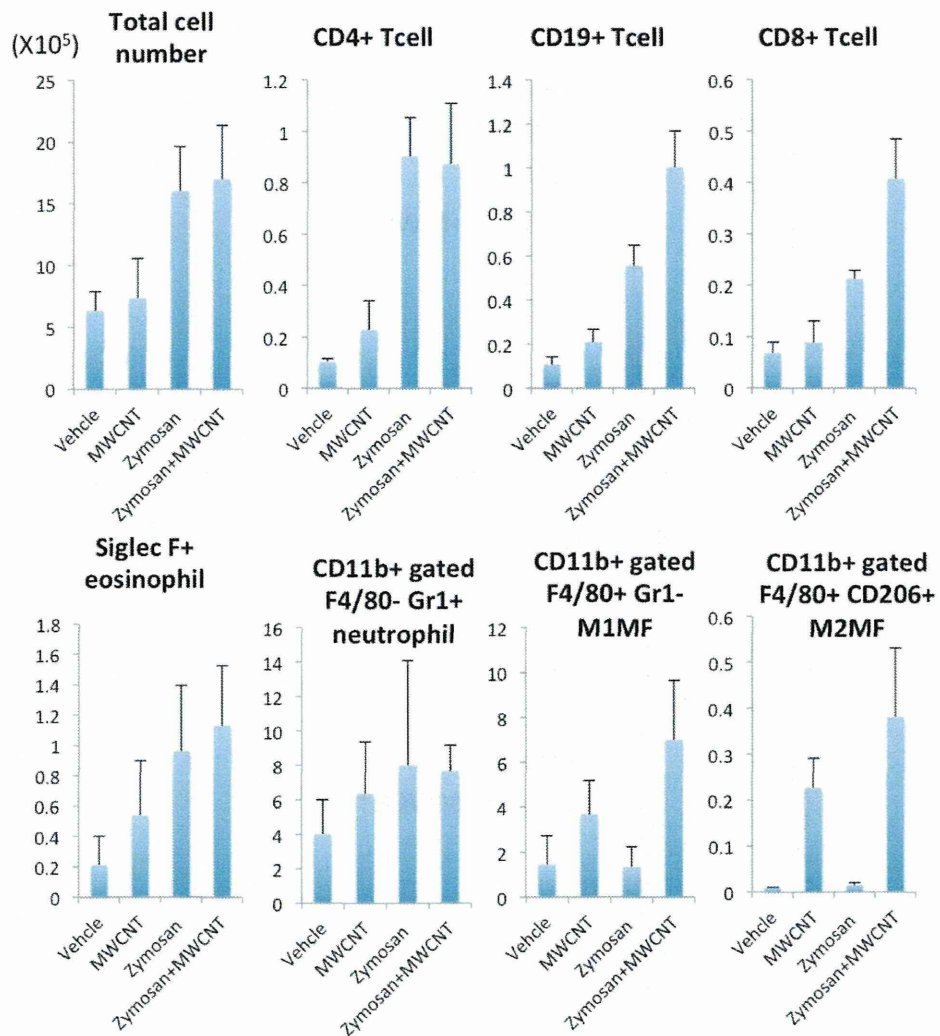
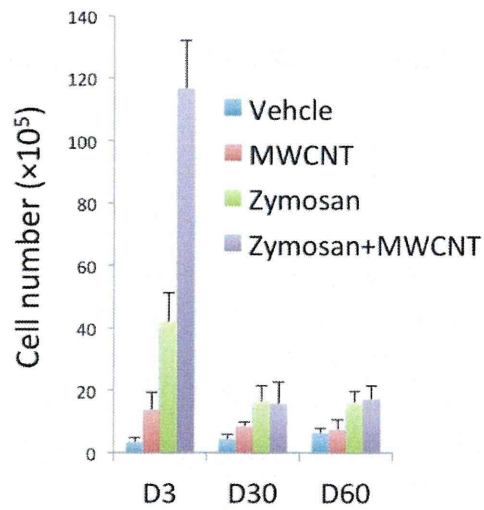
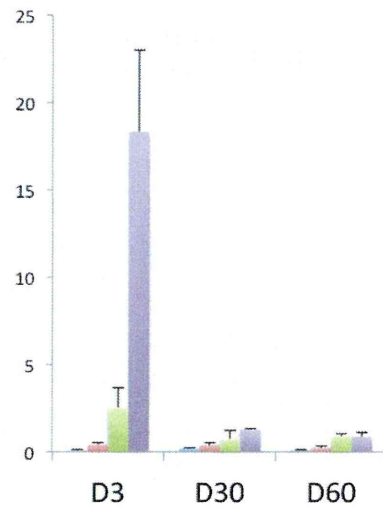


図3 T-CNT及びZymosanの腹腔内投与によるPEC中の免疫細胞分画
T-CNT及びZymosanを腹腔内に投与60日目のPECをフローサイトメーターにて解析した。

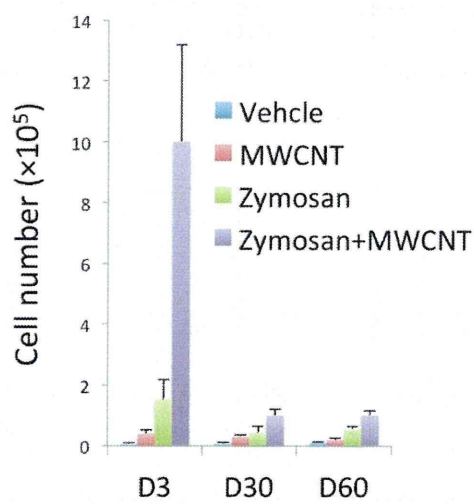
図4 Total cell number



CD4⁺ T cell



CD19⁺ B cell



CD8⁺ T cell

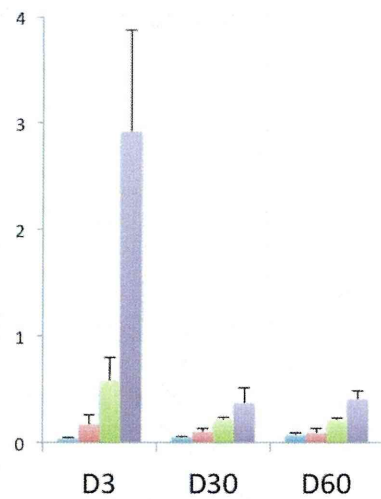


図4 T-CNT及びZymosanの腹腔内投与によるPEC中のT、B細胞分画
T-CNT及びZymosanを腹腔内に投与3、30、60日目のPECをフローサイトメーターにて解析した。

図5

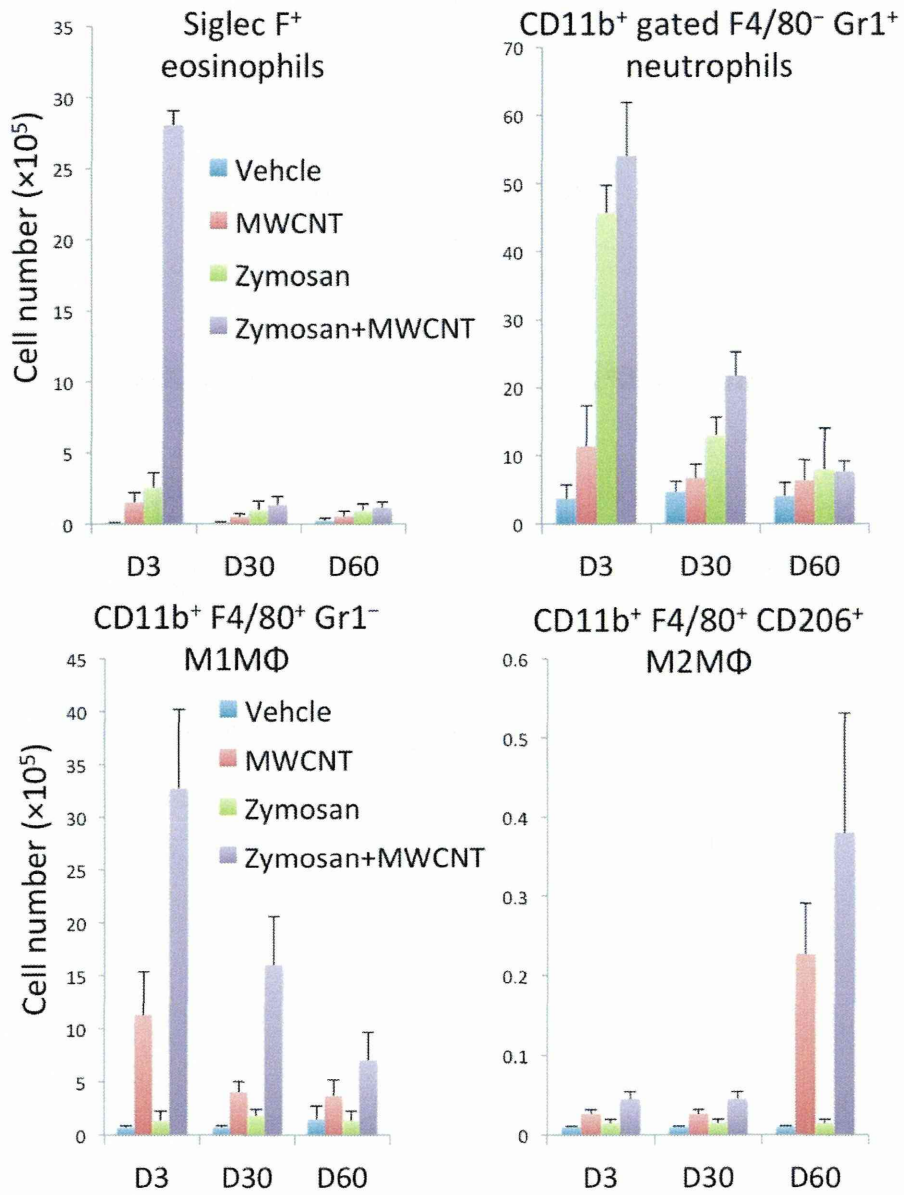


図5 T-CNT及びZymosanの腹腔内投与によるPEC中のT、B細胞分画
T-CNT及びZymosanを腹腔内に投与3、30、60日目のPECをフローサイトメーターにて解析した。

図6

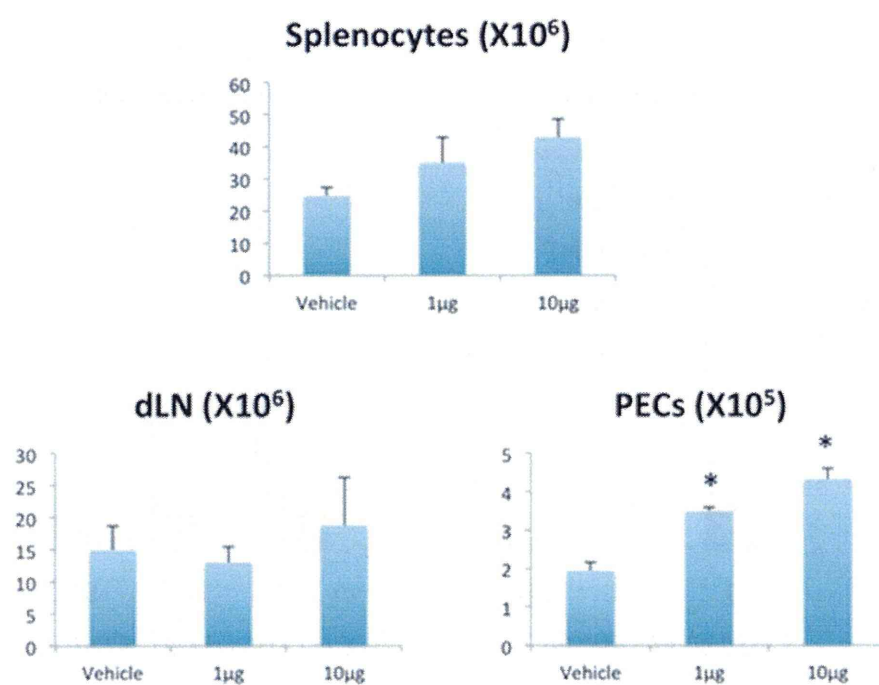


図6 MRL/lprマウスへのMWCNT投与による脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収し細胞数を検討した。

図7

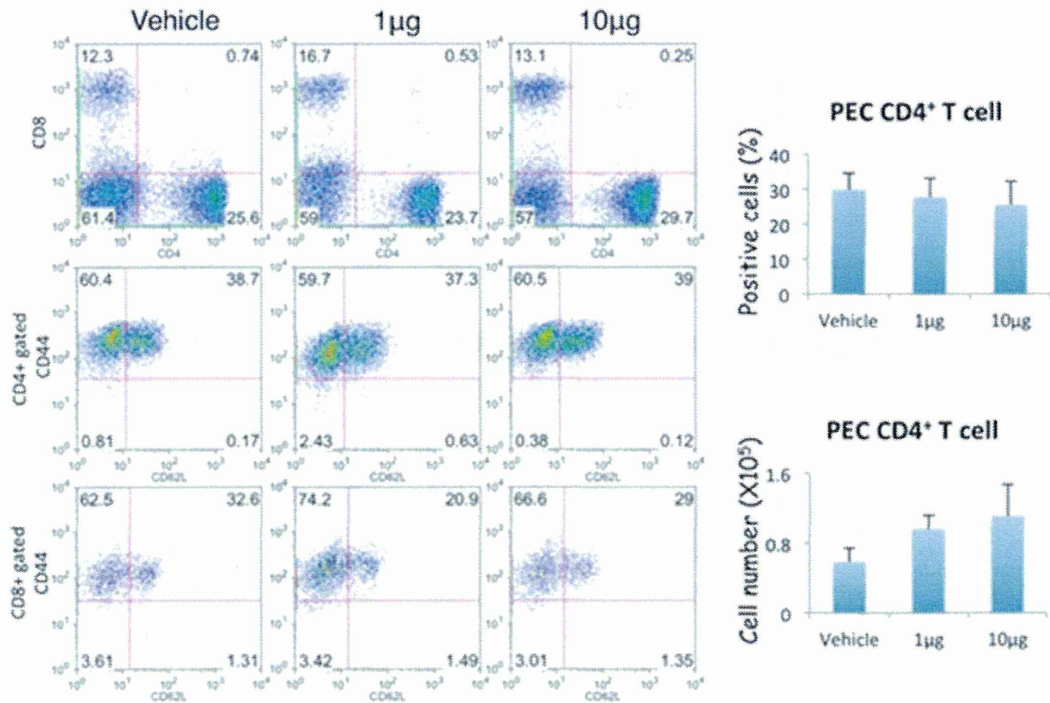


図7 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD4-PE-Cy7, CD8-APC, CD62L-FITC, CD44-PE)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析した。

8

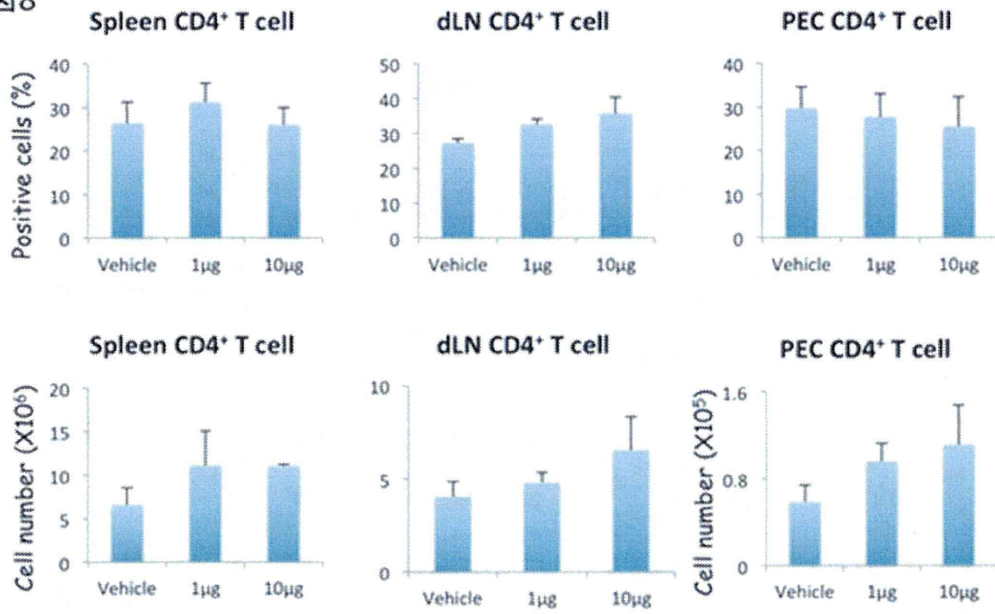


図8 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD4-PE-Cy7, CD62L-FITC, CD44-PE)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析後のCD4⁺T細胞の割合と細胞数を示す。

9

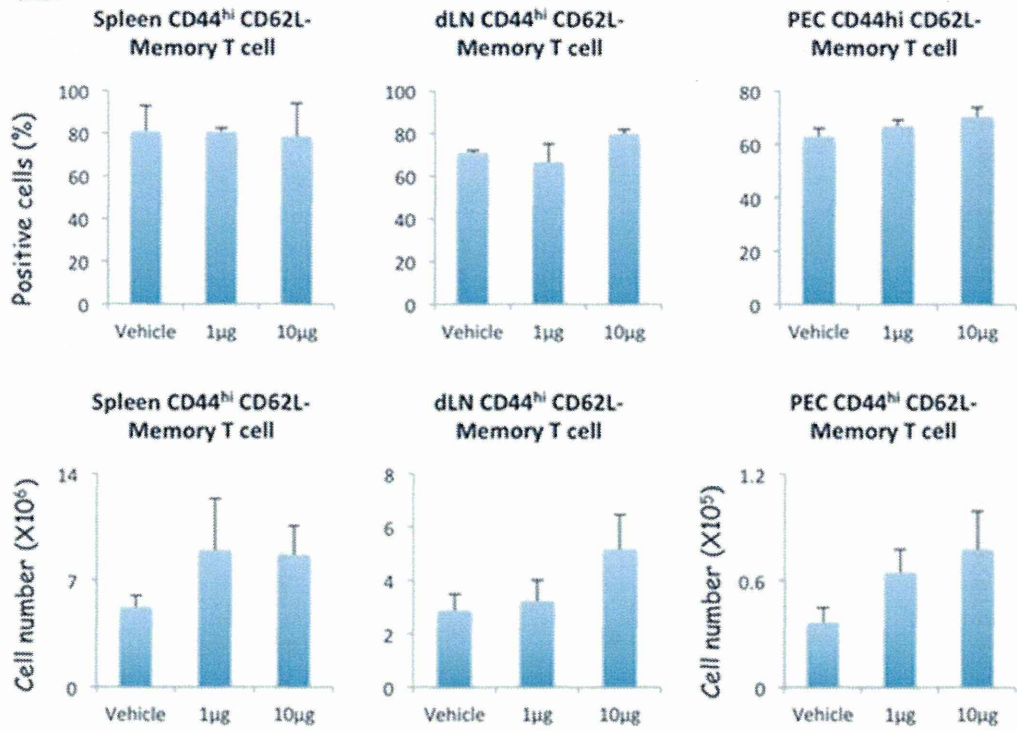


図9 MWCNT投与でマウス(MRL/lpr)の脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD4-PE-Cy7, CD62L-FITC, CD44-PE)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析後のMemory CD4⁺T細胞の割合と細胞数を示す。