

令和元年度 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: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

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

分担研究者 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 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

ナノマテリアルの曝露によるマクロファージを中心とした免疫システムの制御機構は不明な点が多い。今年度は、H30年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO_2)の全身吸入曝露実験の継続解析した結果から、ナノマテリアルの性状の相違によって肺胞マクロファージの関連遺伝子の発現に大きく影響が観察された。加えて、形状の異なった多層化カーボンナノチューブ(MWCNT-N)を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、0、1、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。MWCNT-Nの吸入曝露によって肺胞マクロファージを含むBALF細胞の各分画に大きな影響は観察されなかった。MWCNT-Nの曝露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体あるいはMMP12の発現に変動が見られたが、MWNT-7曝露で観察された変化よりも小さかった。以上のことから、カーボンナノチューブの形状によって、肺の免疫反応は多く異なっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究事業は、工業的ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

平成 30 年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO_2)の全身吸入曝露実験において、BALF内の各種サイトカイン濃度の測定、BALF細胞あるいは肺組織

のスカベンジャー受容体関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子の発現に関して検討を加えた。

令和元年度の分担研究では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブを用い、全身吸入装置により一定期間ナノマテリアルを曝露後、0、1、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。特に、肺胞マクロファージに焦点を当てて、ナノマテリアルの曝露による初期の免疫反応の影響に関して詳細に検討を加えた。

B. 研究方法

平成 30 年度実験の継続研究

・マウス

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 6 匹ずつで多層化カーボンナノチューブ (T-CNT7) あるいは二酸化チタン (T-TiO₂) 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 0 週、1 週、4 週及び 8 週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た。

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80℃ にて保存する。各サンプルから 5µL を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、L-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic。

・MWNT-7, TiO₂ (AMT-600)

多層化カーボンナノチューブは MWNT-7 (保土ヶ谷化学)、二酸化チタンは AMT-600 を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により供与された Taquann 処理 MWNT-7 (T-CNT7、3mg/m³; 2hr/day/week、5 週間) AMT-600 (T-TiO₂、30mg/m³; 2hr/day/week、5 週間) を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。

・定量 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNeasy 液に浸漬し、冷蔵保存した。後日、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。 CD204; forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3', reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3', Col IV; forward, 5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3', reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3', GM-CSF; forward, 5'-CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA-3', reverse, 5'-CAGCTTGTAGGTGGCACACA-3', IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', IL-33; forward, 5'-ATTTCCCCGGCAAAGTTCAG-3', reverse, 5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3', MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', TIMP-1; forward, 5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3', reverse, 5'-AGGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3', VEGF; forward, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3', reverse, 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3', β-actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

令和 1 年度の研究

・マウス

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 6 匹ずつで多層化カーボンナノチューブ (MWCNT-N/30 ナノクラス CNT) 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 0 週、1 週、4 週及び 8 週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た。

・MWCNT-N

国立食品衛生研究所にて Taquann 処理された MWCNT-N (0, 1.0, 3.0 mg/m³ 2hr/D/W×5w Total 10hr) を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。

・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、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、濾過を行った。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 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7) された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

・定量 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNA later に浸漬し、冷蔵保存した。後日、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-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTT-3', MARCO, forward, 5'-

AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; SRB1, forward, 5'-GGCTGCTGTTTCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; Cox2, forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCCTGGT-3', and reverse, 5'-GTTTCAGCCTGGCAAGTCTTT -3'; β -actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80°C にて保存する。各サンプルから 5 μ L を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、L-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic。

C. 研究結果

平成 30 年度の継続研究

多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) および二酸化チタン (TiO₂) の全身吸入暴露による影響に関して、BALF 細胞のフローサイトメータ解析の結果は、すでに報告している (H30 年度報告書) 。今年度はその継続解析として、BALF 中の各種サイトカイン濃度に関して、マルチプレックス解析を実施した (図 1A, 1B) 。 MWNT-7 の暴露によって、直後に VEGF および IL-12 の濃度が上昇していた (有意差無し) 。また、IL-12 に関しては MWNT-7 暴露後 8 週においてもその発現が上昇していた (図 1B) 。 TiO₂ 暴露では直後に IL-4 発現が上昇していた (図 1B) 。また、BALF 細胞における MMP12 mRNA および IL-6 mRNA に関して、MWNT-7 暴露で発現が増加していた (図 2A) 。 TiO₂ 暴露では、MMP12 mRNA、IL-6 mRNA、F4/80 mRNA ならびに CD206 mRNA 発現に変化は見られなかった (図 2A) 。また、MWNT-7 暴露でも、F4/80 mRNA および CD206 mRNA 発現に変化は認められなかった (図 2A) 。

スカベンジャー受容体関連遺伝子の BALF 細胞で発現を定量 PCR にて検討すると、CD204 および MARCO の発現が MWNT-7 暴露で上昇する傾向にあった(図 2B、有意差なし)。また、CD36 mRNA 発現が AMT-600 暴露で暴露後 4 週、8 週で上昇していた(図 2B)。SRB1 ならびに CD68 mRNA 発現はそれぞれの暴露で変化は認められなかった(図 2B)。さらに、酸化ストレス関連遺伝子として、Cox2 mRNA 発現を検討してみると、MWNT-7 の暴露直後と 4 週に発現が上昇することが明らかになった(図 2C、暴露直後は大きく上昇し有意、暴露後 4 週も有意)。さらに、肺組織における各種遺伝子発現を検討すると、MWNT-7 暴露後、1、4 週で MMP12 mRNA 発現が有意に上昇していた(図 3A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO₂ ならびに MWNT-7 暴露後 1 週にて、その発現が上昇することがわかった(図 3A)。F4/80 mRNA および CD206 mRNA 発現に関しては有意な変化は認められなかった(図 3A)。

肺組織でのスカベンジャー受容体関連遺伝子の発現に関しては、CD204 mRNA 発現は AMT-600 ならびに MWNT-7 暴露後、1 週にてその発現が高くなっていた(図 3B、有意差なし)。MARCO mRNA 発現に関しては、MWNT-7 暴露後、1 週での発現が上昇していた(図 3B、有意差あり $p < 0.05$)。CD36 mRNA 発現に関しては、TiO₂ および MWNT-7 暴露後 1 週で、上昇していた(図 3B)。SRB1 および CD68 mRNA 発現に関しては、それぞれの暴露で大きな変化は認められなかった(図 3B)。

肺組織における iNOS mRNA ならびに Cox2 mRNA 発現では、MWNT-7 の暴露直後に iNOS mRNA 発現が大きく上昇することがわかった(図 3C、有意差あり)。Cox2 mRNA 発現は MWNT-7 暴露 1 週にて有意に上昇することが判明した(図 3C)。

R1 年度の研究

正常 C57BL/6 雄(12 週齢)マウスに低濃度 MWCNT-N 暴露群、高濃度 MWCNT-N 暴露群および対照群として、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した(図 4)。各群は 6 匹ずつ

とした。

BALF 細胞のフローサイトメータ解析についてのゲーティングは FSC/SSC から生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、CD3⁻CD19⁻7AAD⁻細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺胞マクロファージ(AM)、好酸球(E)、単球(M)に分類した(図 5)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1(CD163)あるいは M2(CD206)マクロファージサブセットの検出を行った(図 5)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討した(図 5)。BALF 中の各免疫担当細胞についてフローサイトメータによる解析では、暴露直後(0 週)で生細胞(alive)の割合に変化はなく、好酸球、単球、各肺胞マクロファージ分画の割合に有意な影響は観察されなかった(図 6、7)。暴露終了後 1 週でも、それぞれの BALF 分画細胞の割合に変化は見られなかった(図 6、8)。加えて、暴露終了後 4 週および 8 週においても、それぞれの分画に変化は認められなかった(図 6、9、10)。

ナノマテリアル暴露後の経時的変化を検討すると、肺胞マクロファージは対照的群で大きな変化はみられなかった(図 11)。また、肺胞マクロファージにおける各種スカベンジャー受容体(CD36, CD163, CD206)の発現をフローサイトメータ解析にて確認すると、8 週目での対照群が CD206 の発現が高くなっているが(有意差なし)、他の解析週において MWCNT-N 暴露による影響は確認できなかった(図 12)。

さらに、BALF 細胞におけるスカベンジャー受容体(SRB1, MARCO)の mRNA 発現を定量 RT-PCR 解析にて検討したところ、各週にて MARCO の発現が MWCNT-N 暴露にてその発現が上昇していた(有意差無し)(図 13)。また、SRB1 mRNA の発現も 0 週目、4 週目、8 週目にて MWCNT-N 暴露により、発現が上昇していた(有意差無し)(図 13)。肺組織における MARCO あるいは SRB1 mRNA 発現を検討すると、MARCO に関しては 1 週目、2 週目で MWCNT-N 暴露によりその発現が上昇していた(有意差あり：0 週およ

び1週での低濃度、高濃度暴露群)(図14)。SRB1に関しては、各解析週においてMWCNT-N暴露による影響は確認できなかった(図14)。

加えて、酸化ストレス関連遺伝子(IL-6, Cox2)の発現を確認すると、0週目のMWCNT-N暴露にてCox2 mRNA発現が増加していた(有意差あり:低濃度および高濃度暴露群)が、他の解析週ではMWCNT-N暴露の影響は観察できなかった(図15)。

カーボンナノチューブの暴露により、肺胞マクロファージにおけるMMP12の発現が上昇することが知られていることから(Otsuka et al. 2018 PLoS One)、BALF細胞におけるMMP12 mRNAの発現を定量RT-PCRにて検討すると、0週での低濃度MWCNT-N暴露、1週目の低濃度暴露、8週での高濃度暴露において、上昇した(有意差無し)(図16)。また、肺組織のMMP12 mRNA発現を検討すると、全ての解析週において、MWCNT-N暴露によって発現が有意に上昇していることがわかった(有意差あり)(図16)。

BALF中の各種サイトカインをマルチプレックス解析にて検討すると、検出できたサイトカインはVEGFであり、1週目の高濃度MWCNT-N暴露群で上昇していた(有意差無し)(図17)。

D. 考察

昨年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO₂)の全身吸入暴露実験の解析を継続して行った。BALF中の各種サイトカインの濃度に関して、検出できたのがVEGF、IL-12、IL-4であり、MWNT-7暴露にて、その直後にVEGFとIL-12の濃度の上昇があった。TiO₂とのナノマテリアルの性状の相違によってサイトカイン分泌にも影響がでることがわかった。また、BALF細胞におけるMMP12 mRNA発現に関しては、これまでの報告と同様に、MWNT-7の暴露にて大きく上昇することが判明し、逆に、TiO₂暴露ではMMP12 mRNAの発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体遺

伝子あるいはCox2遺伝子の発現にもMWNT-7とTiO₂の暴露で違いが生じていた。肺組織においてもMWNT-7とTiO₂の暴露でそれぞれの遺伝子発現に違いが確認されたことから、ナノマテリアルの性状の違いがマクロファージを中心とした肺免疫の反応性が大きく影響を受けることが判明した。

今年度は昨年度まで使用した多層カーボンナノチューブとは形状の異なるMWCNT-NをTaquan処理後に全身吸入装置を用いて、継続暴露後0週、1週、4週、8週での肺における免疫システムの解析を実施した。BALF細胞のマクロファージを中心にMWCNT-Nの暴露によるその分画、関連分子および遺伝子の発現に関して、免疫学的手法を用いて検討を加えた。

フローサイトメータを用いた細胞分画の解析では、BALF細胞中の生細胞の割合はMWCNT-N暴露では影響が観察されなかった。H29およびH30年度に実施したMWNT-7を用いた暴露実験では、暴露後BALF細胞の生細胞の割合が急激に減少し、その後経時的に増加していたが、MWCNT-N暴露では生細胞の割合に関して、各解析週で暴露による影響は観察されなかった。この所見はMWCNT-NとMWNT-7の形状の相違が起因しているものと考えられる。

BALF細胞中の好酸球、単球、肺胞マクロファージあるいは肺胞マクロファージの各分画(F4/80, CD11b⁺F4/40⁺, CD11b⁻F4/80⁺)に関しても、各解析週でMWCNT-Nの暴露による影響は観察されなかった。このことも、MWNT-7との相違点としてあげられる。

肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現に関しては、細胞表面上の発現には大きな変化は認められなかったが、BALF細胞あるいは肺組織におけるMARCOおよびSRB1 mRNAの発現がMWCNT-N暴露で変化していたことから、カーボンナノマテリアルの処理にスカベンジャー受容体が関与していることが示唆される。

カーボンナノチューブの吸入暴露により肺胞マクロファージあるいはMMP12の発現が上昇することが明らかになっている(Otsuka K, et al., PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702)。今

年度の実験においても、BALF 細胞あるいは肺組織の MMP12 mRNA 発現は MWCNT-N 暴露によって上昇した。一方で、MWNT-7 暴露での BALF 細胞の mRNA 発現は対照群に比較して約 100 倍程度の増加が認められたのに対して、MWCNT-N 暴露では 10 倍程度であることから、ナノマテリアルの形状によって MMP12 の発現自体にも影響があることが明らかになった。

BALF 中のサイトカインの濃度に関しては、アッセイ系での検出限界の問題もあり、今回は VEGF のみの結果となった。MWNT-7 暴露においても VEGF の濃度は高くなっていたので、程度の差はあるものの MWCNT-N 暴露による肺傷害に対する修復の機転が作動しているものと推測できる。

MWCNT-N の吸入暴露によって、MWNT-7 暴露に比較して肺胞傷害は軽度であり、肺のマクロファージを中心とした免疫システムに大きな影響を与えていない可能性が考えられた。

E . 結論

1. MWNT-7 と AMT-600 の全身吸入暴露によって、肺胞マクロファージの関連遺伝子の発現に違いが観察された。
2. MWCNT-N の全身吸入暴露によって、肺胞マクロファージ分画に大きな影響は観察されなかった。
3. MWCNT-N 暴露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現に変化がみられたが、MWNT-7 の暴露に比較して軽度であった。
4. MWCNT-N の暴露によって、肺胞マクロファージに MMP12 の発現が上昇していたが、MWNT-7 の暴露に比較して軽度であった。
5. MWCNT-N の吸入暴露によって酸化ストレスを経由した影響が示唆された。
6. MWCNT-N の暴露による肺胞傷害後に VEGF を介した修復機転が働いている可能性が示された。
7. ナノマテリアルの性状によって暴露後の肺での免疫反応は大きく異なっていることが示され

た。

F . 健康危機情報

なし

G . 研究発表

論文発表

Yuyama K, Nakamura Y, Yateyama R, Arakaki R, Tsutsui T, Ishimaru N. : Study of the pharmacokinetics of riodyctol-6-C-β-d-glucoside, a flavonoid of rooibos (*Aspalathus linearis*) extract, after its oral administration in mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2019, 1137:121881

Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. : Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep*. 2019, 9(1):14762

Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. : Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice. *Aging*. 2019, 1(19):8329-8346

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Sato M, Kisoda S, Shao W, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N. : Ascl2-Regulated Follicular Helper T Cells promote Autoimmunity in a Murine Model for Sjögren's Syndrome. *Am J Pathol*. 2019, 9440(19):30712-6

Arakaki R, Ushio A, Kisoda S, Sato M, Nakamura Y, Yuyama K, Tateyama R, Morishita S, Monoi N, Kudo Y, Ishimaru N. : Novel effects of rooibos extract on tear and saliva secretion mediated by the muscarinic acetylcholine receptor 3 in mice. *J Oral Biosci*. 2019, 61(3):179-182

Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Kudo Y, Ishimaru

N. : A novel method for measuring small amounts of saliva in mice. *Oral Sci Int.* 2019, 16(3):178-180

Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. : Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone.* 2019, 121:29-41

牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 : CCL22 と自己免疫疾患臨床免疫・アレルギー科 71 (5) : 1-7, 2019

石丸直澄、山田安希子 : シェーグレン症候群の病態機序と制御性 T 細胞 医学のあゆみ 268 (13) : 1241-1245, 2019

大塚邦紘、石丸直澄 : シェーグレン症候群における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 臨床免疫・アレルギー科 73: 241-248, 2020

学会発表

○新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 : 多層化カーボンナノチューブ吸入暴露初期の肺マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

松倉春奈、牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 : シェーグレン症候群疾患モデルにおける肺病変の解析 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

牛尾綾、新垣理恵子、佐藤真美、工藤保誠、石丸直澄 : シェーグレン症候群病態形成における CCL22 産生マクロファージの役割、第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

Rieko Arakaki, Mami Sato, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Role of IL-33 and its receptor in pathogenesis of Sjögren's

syndrome, 第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

○Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonary immune cells at the early stage、第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

Aya Ushio, Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Analysis of pulmonary lesions in a murine model of Sjögren's syndrome、第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1A 実験計画 (H30年度継続実験)

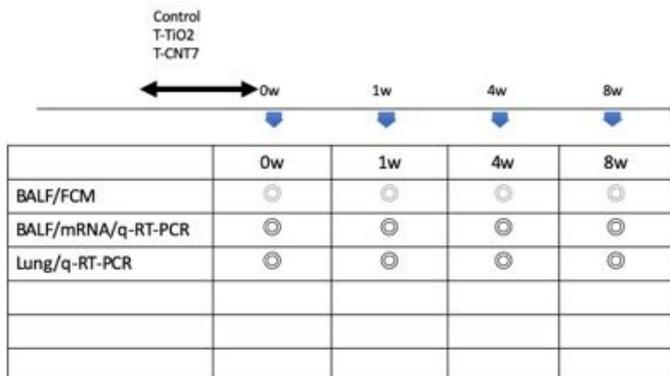
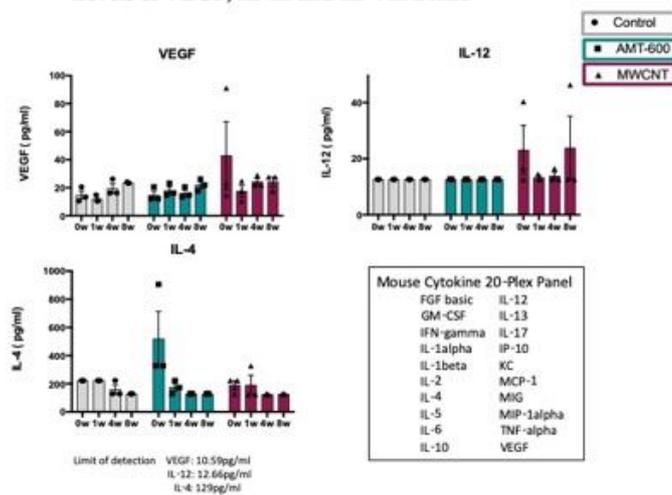


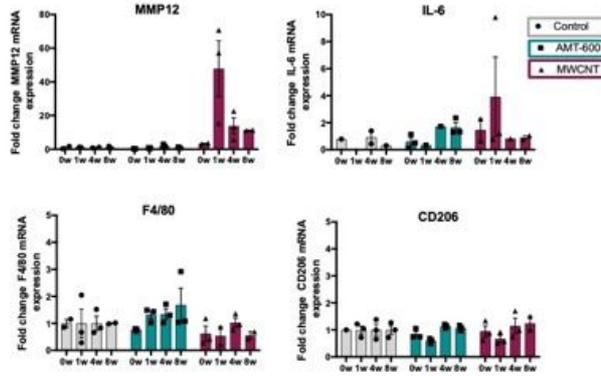
図 1B Levels of VEGF, IL-12 and IL-4 in BALF



平均±標準偏差にて示す (n=3)。

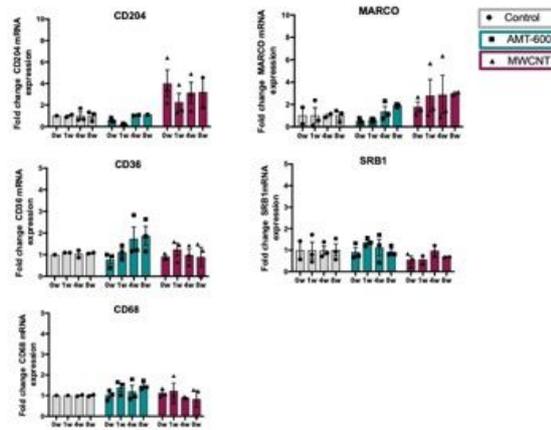
2A

Gene expression of MMP12, IL-6 and macrophage marker (F4/80, CD206) in BLAF cells



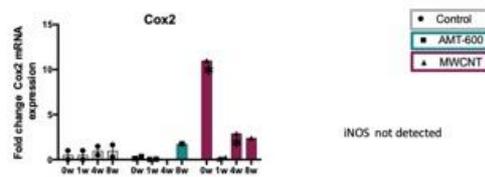
2B

Gene expression of scavenger receptors in BLAF cells



2C

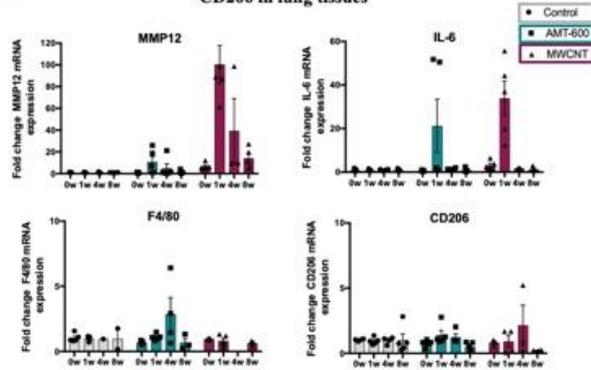
Gene expression of Cox2 in BLAF cells



平均 ± 標準偏差にて示す (n=3)。*p < 0.05

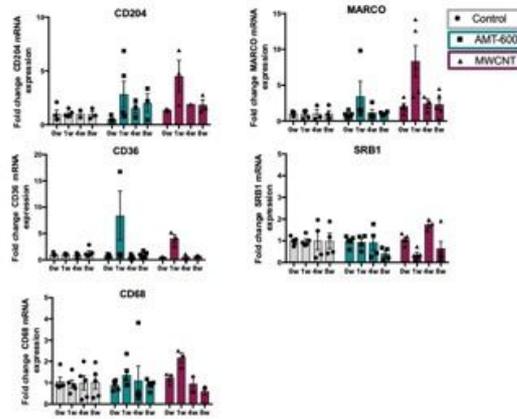
3A

Gene expression of MMP12, IL-6, F4/80 and CD206 in lung tissues



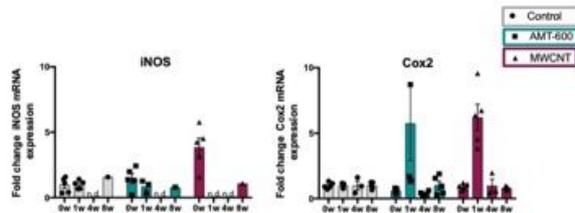
3B

Gene expression of Scavenger receptors in lung tissues



3C

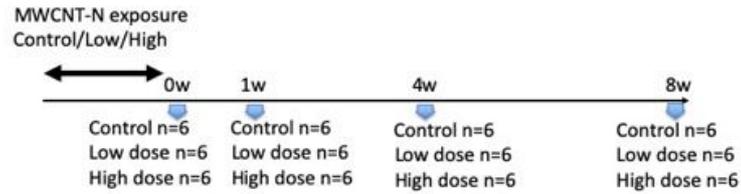
Gene expression of iNOS and Cox2 in lung tissues



平均±標準偏差にて示す (n=3)。

図 4. 実験計画

Experimental Schedule



	0w	1w	4w	8w
BALF/FCM/Cytology (n=3)	○	○	○	○
BALF/PCR (n=3)	○	○	○	○
BALF/Multiplex (n=3)	○	○	○	○
CLN/FCM/PCR (n=6)	○	○	○	○
Spleen/FCM/PCR (n=6)	○	○	○	○
Lung/PCR (n=6)	○	○	○	○

図 5. フローサイトメータ解析

Gating strategy

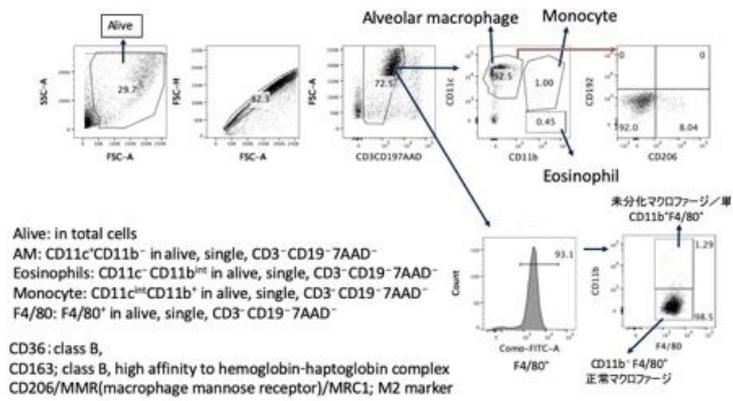


図6. MWCNT-N暴露後0～8週目でのBALF細胞分画

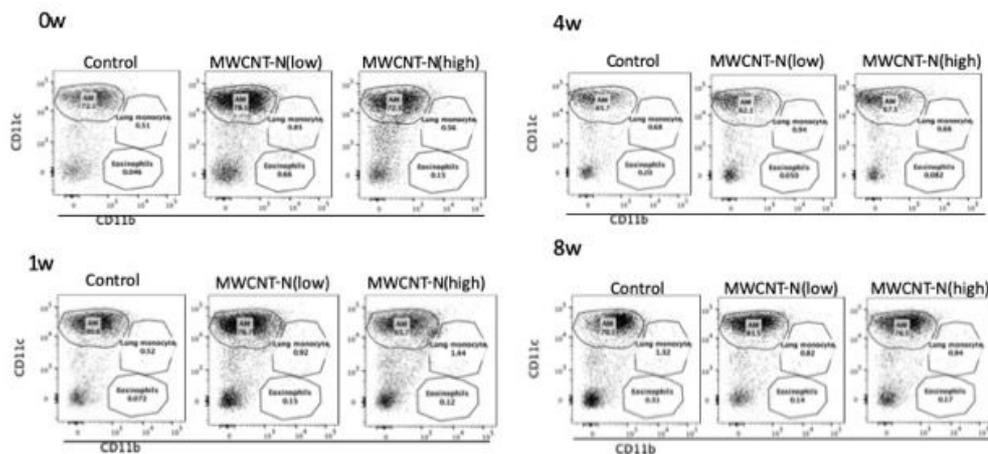
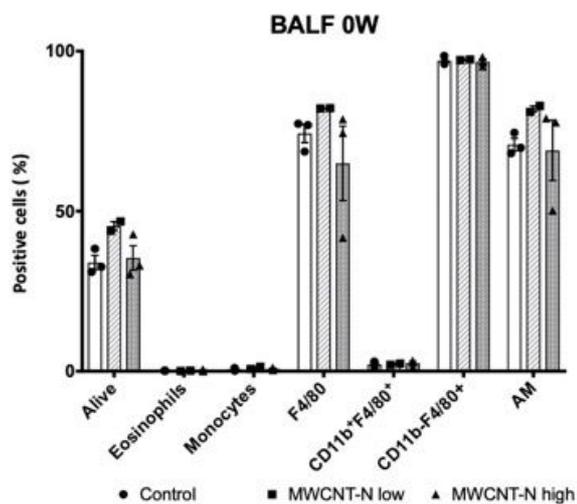


図2に示すようなGating方法にてCD11c/CD11bの展開により、肺胞マクロファージ、単球、好酸球分画の割合を定量化した。図は代表的なデータを示す。

図7. MWCNT-N暴露後0週目でのBALF細胞分画



各分画の割合を平均±標準偏差で示す (N=3)。

図 8 . MWCNT-N暴露後 1 週目でのBALF細胞分画

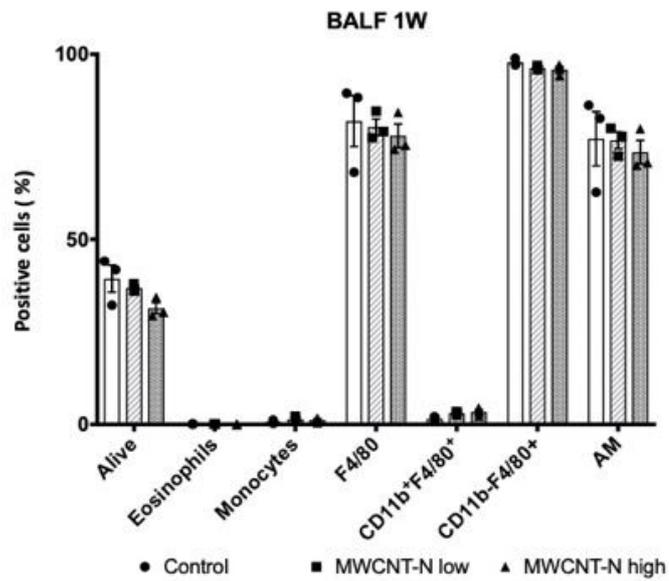
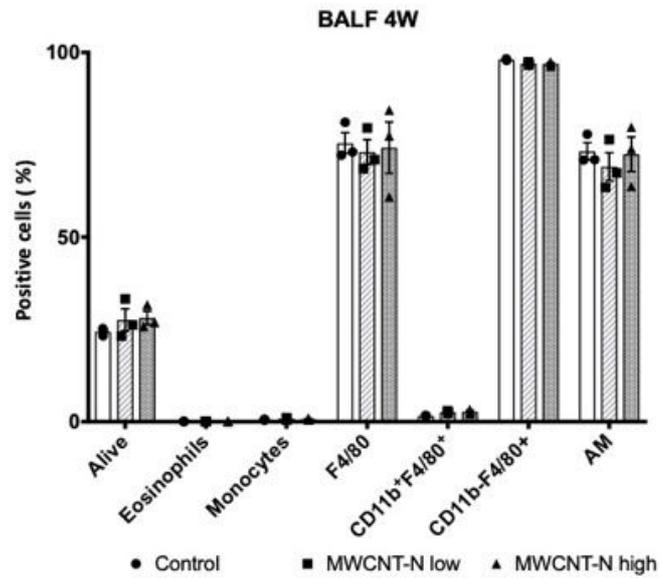


図 9 . MWCNT-N暴露後 4 週目でのBALF細胞分画



各分画の割合を平均±標準偏差で示す (N=3)。

図 1 0. MWCNT-N暴露後 8 週目でのBALF細胞分画

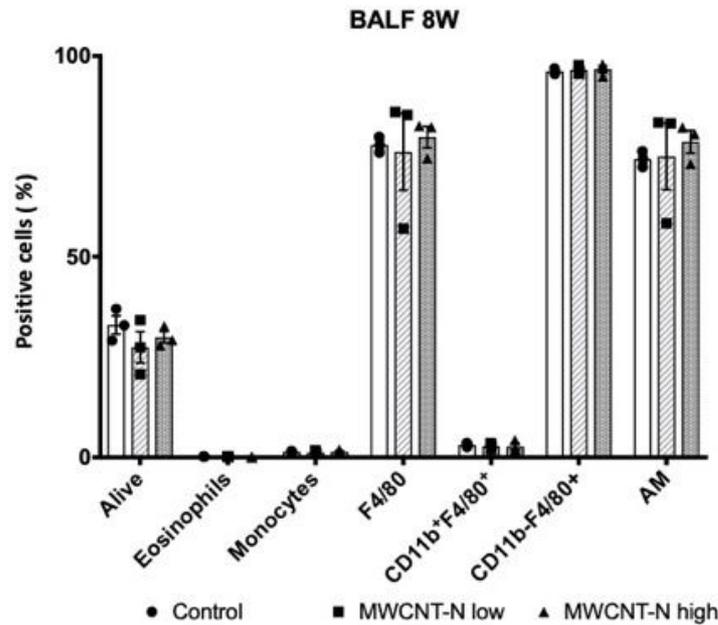
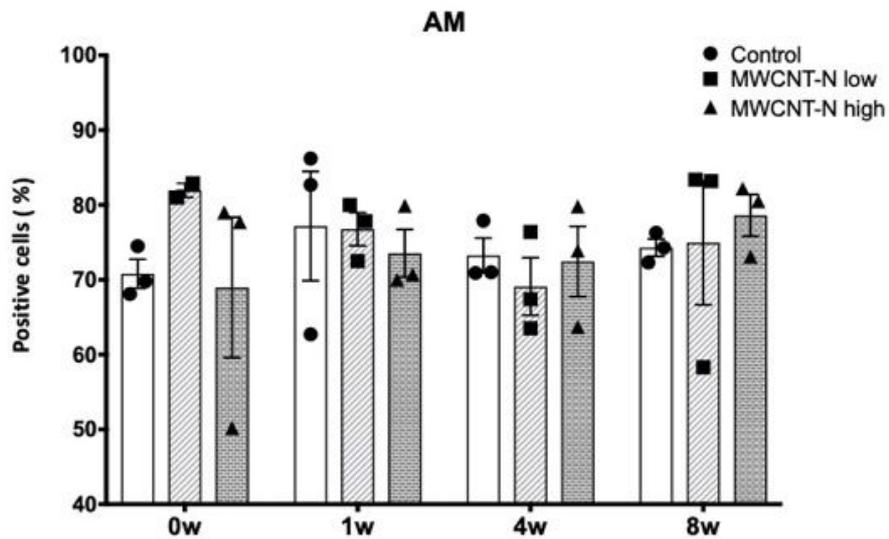
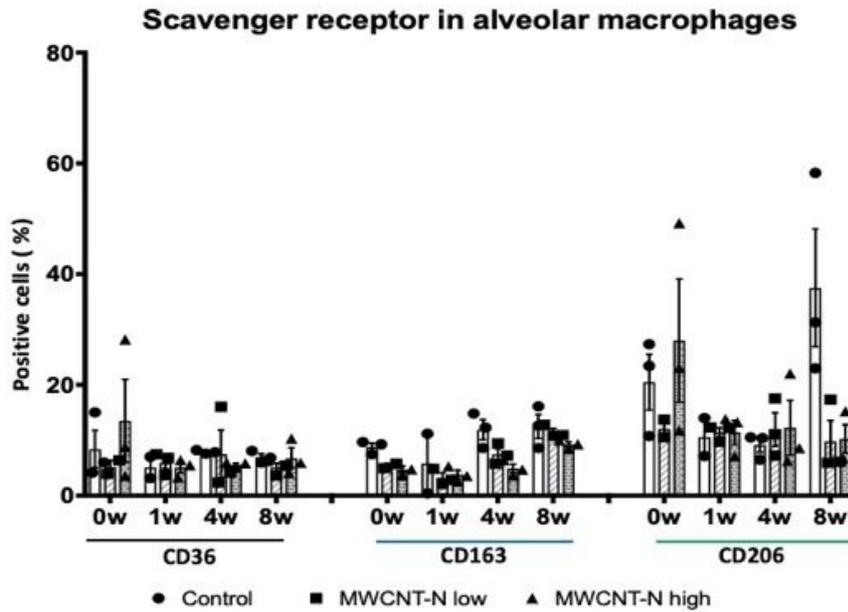


図 1 1. MWCNT-N暴露後の肺胞マクロファージの経時的変化



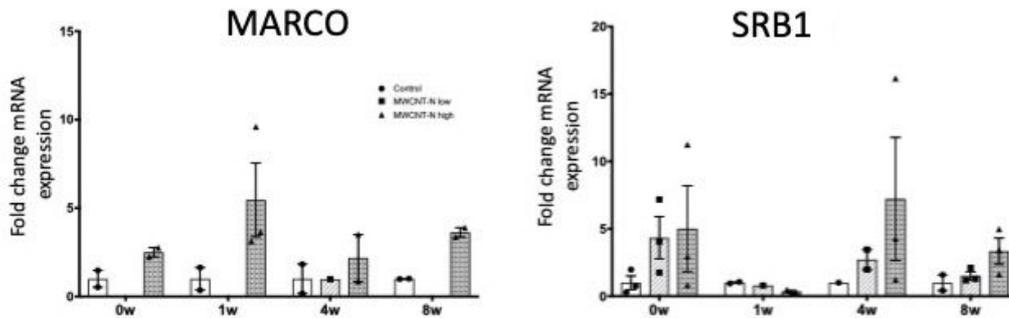
肺胞マクロファージ分画の割合を平均±標準偏差で示す (n=3)。

図 1 2. 肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体



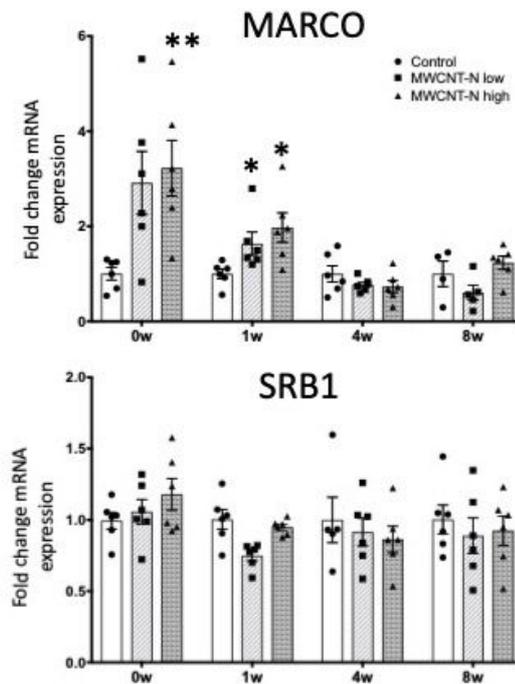
暴露後、0～8週目での肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体（CD36, CD163, CD206）の発現をフローサイトメータにて解析し、それぞれの発現を平均±標準偏差で示す（n=3）。

図 1 3. BALF細胞におけるスカベンジャー受容体



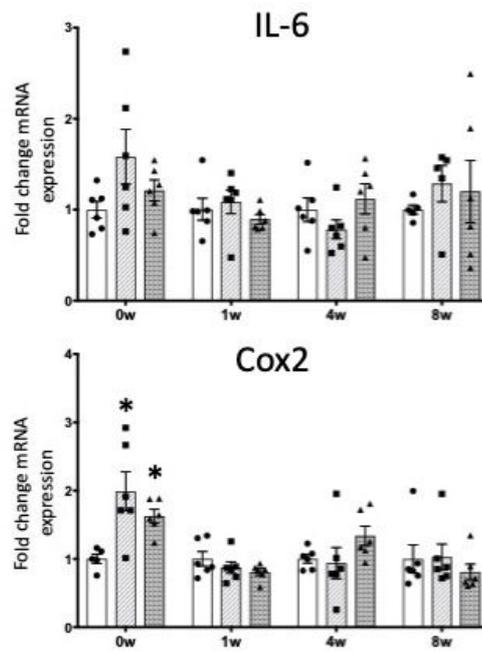
BALF細胞におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。

図 1 4. 肺組織におけるスカベンジャー受容体



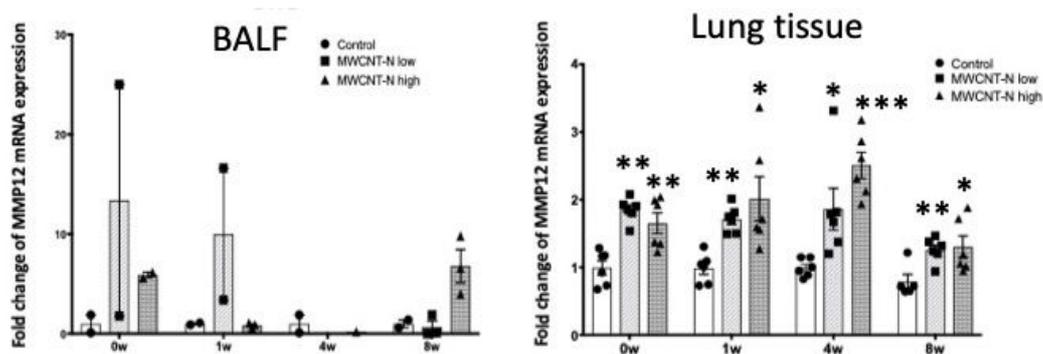
肺組織におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。*p < 0.05, **p < 0.005, vs control.

図 1 5. 肺組織における酸化ストレス関連遺伝子



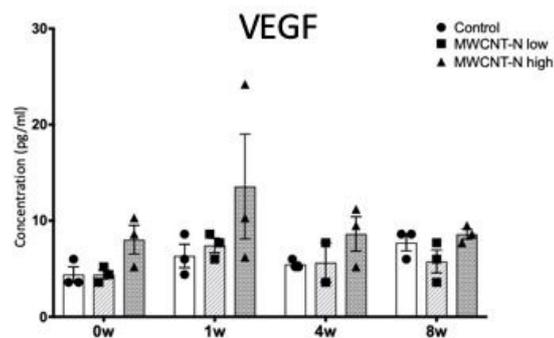
肺組織における酸化ストレス関連遺伝子mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3) 。*p< 0.05, vs control.

図 1 6 . BALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現



BALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す（BALF: n=3, Lung tissue: n=6）。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs control.

図 1 7 . MWCNT-N暴露によるBALF中のVEGF発現



BALF中の各種サイトカイン濃度をマルチプレックス法にて定量化した。平均±標準偏差にて示す（n=3）。