

平成 29～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: 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
	牛尾 綾	徳島大学大学院医歯薬学研究部 元助教
	大塚 邦紘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 元大学院生

## 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。本研究では、Taquann 法にて分散処理を施したナノマテリアルを用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、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。平成 29 年度および平成 30 年度には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) および二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の全身吸入曝露を実施した。令和元年度には MWCNT-N の全身吸入曝露を行い、形状の異なる多層カーボンナノチューブの肺免疫への影響を検討した。MWNT-7 の曝露直後には、肺胞マクロファージ分画は大きく減少しその後、経時的に分画の割合が回復してくることが明らかになったが、 $\text{TiO}_2$  あるいは MWCNT-N の吸入曝露ではそのような反応は見られなかった。さらに、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。MWNT-7 曝露では肺胞マクロファージのスカベンジャー受容体、線維化に關与する MMP12、修復に關与するサイトカインあるいは酸化ストレス関連因子の発現が上昇することが明らかになったが、 $\text{TiO}_2$  ならびに MWCNT-N の曝露ではそれらの因子の発現の変動は少なかった。以上のことから、ナノマテリアルの性状および形状によって、肺胞マクロファージを中心とした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 (NM) 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 29 年度の分担研究では、分散処理を施した多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、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。

平成 30 年度の分担研究では、分散処理を施した多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) ならび

に二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) を用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、0、1、2、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、ナノマテリアルの暴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、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に検討を加えた。

令和 1 年度の分担研究では、MWCNT-N を用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、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、ナノマテリアルの暴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、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に解析を実施した。

## B. 研究方法

### 平成 29 年度

#### マウス

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 5 匹ずつ (5×3×4=60 匹) 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 (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。

#### ・ T-CNT7

多層化カーボンナノチューブは MWNT-7 (三井) 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) 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。低濃度群は 1 mg /

m<sup>3</sup>、1 日 2 時間 (週 1 回×5) の計 10 時間吸入した。高濃度群は 2 mg / m<sup>3</sup>、1 日 2 時間 (週 1 回×5) の計 10 時間の吸入とした。

#### ・ 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。

#### ・ 定量化 RT-PCR 法

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。CD204, forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3', and reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3'; MARCO: forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; CD36: forward, 5'-TGGCCTTACTTGGGATTGG-3', and reverse, 5'-CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3'; SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3';

F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; CD68: forward, 5'-TCTTGGGAACACTACACGTGGGC-3', and reverse, 5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'; iNOS: forward, 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' and reverse, 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'; MMP-12: forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3' and reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3';  $\beta$ -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 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。各サンプルから  $5\ \mu\text{L}$  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、IL-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- $\gamma$ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, FGF basic で実施した。

### 平成 30 年度

#### ・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-TiO<sub>2</sub>) 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、ナノ材料の暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施した。

#### ・MWNT-7, TiO<sub>2</sub> (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/m<sup>3</sup>; 2hr/day/week, 5 週間) AMT-600 (T-TiO<sub>2</sub>, 30mg/m<sup>3</sup>; 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。

#### ・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。

#### ・定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNAlater 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',  $\beta$ -actin;  
 forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and  
 reverse,  
 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

## 令和1年度

### ・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/m<sup>3</sup> 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。

### ・定量化 RT-PCR 法

BALF細胞および肺組織の一部をRNAlater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'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; Cox2, forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCCTGGT-3', and reverse, 5'-GTTTCAGCCTGGCAAAGTCTTT-3';  $\beta$ -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。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- $\gamma$ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic である。

### C. 研究結果

#### 平成 29 年度

正常 C57BL/6 雄 (12 週齢) マウスに MWNT-7 (対照群、低濃度群、高濃度群) を全身吸入装置にて、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (H29 図 1)。各群は 5 匹ずつとした。

H29 図 2 に示すように、MWNT-7 暴露後 0 週、CD11c および CD11b を用い、肺胞洗浄液中 (BALF) の免疫細胞 (肺胞マクロファージ: CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>、単球: CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>、好酸球: CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) をフローサイトメーターにて解析すると、肺胞マクロファージが減少することが明らかになった。一方で、単球、好酸球に関しては MWNT-7 暴露によって割合が増加していた。さらに、肺胞マクロファージを CD11b および F4/80 にて展開すると、MWNT-7 暴露によって割合が減少することがわかった (H29 図 2、H29 図 3A)。暴露後 0 週では、BALF 中の生細胞の割合は減少することがわかった (H29 図 3A)。この時点では、肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトに大きな偏りは観察されなかった (H29 図 3A)。

暴露後 1 週では、BALF 中の生細胞の割合に変化は見られなくなり (H29 図 3B)、高濃度暴露群で肺胞マクロファージが有意に減少している (H29 図 2、図 3B)。単球、好酸球に関しては、高濃度群で有意に増加した (H29 図 3B)。また、肺胞マクロファージは高濃度暴露群で M1 へのシフトが見られた (H29 図 3B)。

暴露後 4 週では、1 週後と同様に、肺胞マクロファージ数は高濃度群で有意に減少していた (H29 図 2、

図 4A)。また、単球、好酸球に関しても、高濃度暴露群で有意に増加した状態が続いていた (H29 図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトは明らかではなかった (H29 図 4A)。

暴露後 8 週でも、MWNT-7 の高濃度暴露群で、肺胞マクロファージの減少、好酸球、単球の増加が確認された (H29 図 2、H29 図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 分化は高濃度暴露群で M1 へのシフトが抑制されていた (H29 図 4B)。

MWNT-7 の吸入暴露による常在型肺胞マクロファージの変化を経時的に観察すると、高濃度群では 0 ~ 8 週まで有意に低下していた (H29 図 5A)。好酸球に関しては 0 ~ 8 週後でいずれにおいても対照に比較して、高濃度群で有意に増加していた (H29 図 5B)。経時的には 1 週で増加し、その後 8 週まで徐々に減少することがわかる (H29 図 5B)。単球に関しては、対照群に比較して、低濃度、高濃度ともどの時期においても有意に割合が増加していた (H29 図 6A)。経時的には暴露後 1 週から徐々に低下する傾向にあった (H29 図 6A)。一方、M2 型マクロファージはどの群とも経時的に増加していたが、群間での差は認められなかった (H29 図 6B)。

MWNT-7 暴露による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) の発現の変化をフローサイトメーターにて解析したところ、大きな変化は観察できなかった (H29 図 8)。また、肺組織における各種スカベンジャー受容体、MMP12 などの mRNA 発現を定量 RT-PCR にて解析すると、MWNT-7 暴露後 0 週での CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現の有意な上昇 (H29 図 9A)、1 週では MARCO の mRNA の有意な上昇 (図 9B)、4 週では CD204、iNOS の mRNA の有意な上昇 (図 9C) が観察された。MMP12 mRNA に関しては、どの時期においても低濃度、高濃度のいずれの群も MWNT-7 暴露によって有意に上昇することがわかった。

BALF 中のサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子に関して、マルチプレックス解析を実施すると、4 種類の因子が検出され、VEGF あるいは IL-12 が MWNT-7 吸引暴露によって増加することが判明した (H29 図 10)。

脾臓、頸部リンパ節における B 細胞、CD4T 細胞 CD8T 細胞の割合に関しては、T-CNT7 暴露によってどの時期においても影響は見られなかった (H29 図 11A、H29 図 11B)。さらに、CD4 及び CD8T 細胞における活性化マーカー (CD44/CD62L) を検討したところ、脾臓、頸部リンパ節において、どの時期でも MWNT-7 の暴露で変化は確認されなかった (H29 図 12A、図 12B)。

脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、MWNT-7 暴露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認められなかった (H29 図 13A、H29 図 13B)。さらに、脾臓、頸部リンパ節におけるマクロファージにおける M1/M2 マーカー (CD192/CD206) を検討したところ、脾臓では MWNT-7 暴露で変化は見られなかったが (H29 図 14A)、リンパ節において、暴露後 4 週で、M1 の低下、M2 の上昇が確認された (H29 図 14B)。

BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメータによる解析結果から、細胞の大きさにて評価すると、MWNT-7 暴露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった (H29 図 15A、B、C)。

## 平成 30 年度

正常 C57BL/6 雄 (12 週齢) マウスに MWNT-7 暴露群、TiO<sub>2</sub> 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 (H30 図 1A)。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<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺泡マクロファージ (AM)、好酸球 (E)、単球 (M) に分類した (H30 図 1B)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1 (CD192) 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 (H30 図 1B)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討してみた。通常、肺泡マクロファージは F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> の表現型を示し、前年度までの報告では MWNT-7 の吸入暴露で F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> あるいは CD11b<sup>high</sup> の分画が増加することがわかっている。この分画は M1 マ

クロファージの性格を有していることも知られている。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) が MWNT-7 暴露で低下しており、肺泡マクロファージ (AM) においても MWNT-7 暴露で低下していた (H30 図 2A)。一方で、好酸球、単球は MWNT-7 暴露で増加していた (H30 図 2A)。TiO<sub>2</sub> 暴露では、対照群と変化はなかった (H30 図 2A)。さらに、肺泡マクロファージ表面マーカーで検討すると、MWNT-7 暴露で F4/80<sup>+</sup>肺泡マクロファージあるいは CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>肺泡マクロファージは、対照群あるいは TiO<sub>2</sub> 暴露群に比較して減少するものの、CD206<sup>+</sup> あるいは CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージは逆に増加することがわかった (H30 図 2A)。

肺泡マクロファージのこれらの BALF 細胞の分画の傾向は暴露後 1 週、4 週まで続くが、MWNT-7 暴露後 1 週では肺泡マクロファージ中の CD206<sup>+</sup>マクロファージ (M2) の増加が見られなくなり、暴露後 4 週でも同様であった (H30 図 2B、C)。MWNT-7 暴露後 4 週では好酸球の増加が見られなくなった (図 2C)。暴露後 8 週では、各群で大きな変化が見られなくなったが、MWNT-7 暴露で単球の増加、CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの増加は続いていた (H30 図 2D)。

ナノマテリアル暴露後の経時的変化を検討すると、肺泡マクロファージは対照群で大きな変化はないが、暴露後 8 週でやや減少傾向が見られた (H30 図 3A)。TiO<sub>2</sub> 暴露群では 8 週まで変化は見られなかった (H30 図 3A)。MWCNT-7 暴露群では減少した肺泡マクロファージは 4 週、8 週へと経時的に増加していた (H30 図 3A)。

MWNT-7 暴露で特徴的な好酸球の経時的変化に関しては暴露後 0 週、1 週まで増加し、4 週、8 週で低下し、対照群と差が見られなくなった (H30 図 3B)。単球の変化では MWNT-7 暴露で増加が 4 週まで続き、8 週では低下していた (H30 図 3C)。

肺泡マクロファージの各分画についての経時的変化を検討すると、M2 型肺泡マクロファージは対照群、TiO<sub>2</sub> 暴露群でばらつきはあるものの、8 週まで低い割合を維持していた (H30 図 4B)。さらに、M1 型マクロファージに含まれる CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージに

関しては、TiO<sub>2</sub> 暴露群において暴露後 8 週で低下していることがわかった(H30 図 4B)。また、MWNT-7 暴露群では、暴露後 0 週、1 週と増加した後、4 週、8 週と低下していた(H30 図 4A)。

ナノマテリアルの暴露による変化で、肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体が重要な役割を果たしていることが知られていることから、肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現を検討すると、対照群において暴露直後で 20% 程度が陽性であった発現が 1 週以降はほぼ発現が認められなかった(H30 図 5A)。TiO<sub>2</sub> 暴露群では、暴露直後に対照群よりも高い CD36 発現を示し、1 週後以降で発現は見られなくなった(H30 図 5A)。MWNT-7 暴露においても同様の発現変化が観察された(H30 図 5A)。CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージにおいても CD36 の発現はナノマテリアルの暴露直後で発現が亢進するが、1 週以降ではほぼ発現が見られなくなった(H30 図 5B)。0 週での TiO<sub>2</sub> 暴露群と MWNT-7 暴露では CD36 の発現に差は見られなかった(H30 図 5A, B)。また、スカベンジャー受容体の一つである CD163 の発現に関しても経時的に検討したが、若干の時間的な変化は見られるもののマクロファージの 5% 以下の発現しか見られなかった(H30 図 6A, B)。

ナノマテリアル暴露による BALF 細胞における各種 mRNA 発現に関して定量 RT-PCR にて検討したところ、昨年の MWNT-7 暴露で変動のあった MMP12 遺伝子に関して、対照群、TiO<sub>2</sub> 暴露群では変化は見られなかったが、MWNT-7 暴露群で 0 週および 1 週で発現上昇が観察され、4 週、8 週では発現が低下するものの対照群よりは高い値を維持していた(H30 図 7A)。さらに、スカベンジャー受容体の一つである CD204 においても MWNT-7 曝露によって発現が上昇し、暴露後 1 週では高い発現を示した後、4 週以降で発現低下が見られた(H30 図 7B)。

肺組織における様々な遺伝子の mRNA 発現に関しては、MMP12 mRNA 発現は MWNT-7 暴露後 1 週で高い値を示していた(H30 図 8A)。CD204 mRNA は TiO<sub>2</sub> 曝露後 1 週で上昇し、それ以降は低下していた(H30 図 8B)。MWNT-7 暴露では直後から発

現が増加し、4 週で一旦低下し、8 週で再び上昇していた(H30 図 8B)。

肺組織における GM-CSF mRNA 発現は MWNT-7 暴露後 1 週で上昇していたがその後は低下した(H30 図 9A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(H30 図 9B)。IL-33 mRNA 発現においても、TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇がみとめられた(H30 図 10A)。慢性炎症の線維化に關与する Col IV mRNA はナノマテリアルの暴露で変動は認められなかった(H30 図 10B)。

TIMP-1 mRNA 発現では TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(H30 図 11A)。VEGF mRNA 発現はばらつきはあるものの、大きな変化は認められなかった(H30 図 11B)。

#### 令和 1 年度(H30 年度継続研究)

多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)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(H30 継続 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増加していた(H30 継続 図 1B)。TiO<sub>2</sub> 暴露では直後に IL-4 発現が増加していた(H30 継続 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(H30 継続 図 2A)。TiO<sub>2</sub> 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(H30 継続 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(H30 継続 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(H30 継続 図 2B、有意差なし)また、CD36 mRNA 発現が TiO<sub>2</sub> 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(H30 継続 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 の暴露直後に大きくその発現が上昇することが明らかになった(H30 継続 図 2C)。

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(H30 継続 図 3A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO<sub>2</sub> 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(H30 継続 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(H30 継続 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 TiO<sub>2</sub> ならびに MWNT-7 暴露後、1 週にてその発現が高くなっていった(H30 継続 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(H30 継続 図 3B、有意差あり  $p < 0.05$ )。CD36 mRNA 発現に関しては、TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 暴露後 1 週で、上昇していた(H30 継続 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(H30 継続 図 3B)。

肺組織における iNOS mRNA ならびに Cox2 mRNA 発現では、MWNT-7 の暴露直後に大きく上昇することがわかった(H30 継続 図 3C)。Cox2 mRNA 発現は AMT-600 および MWNT-7 暴露 1 週にて有意に上昇することが判明した(H30 継続 図 3C)。

#### 令和 1 年度

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(R1 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<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>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(R1 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(R1 図 5)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討した(R1 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(R1 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(R1 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(R1 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(R1 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(R1 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)(R1 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)(R1 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 (R1 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 (R1 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 週目の低濃度 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 (R1 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、上昇していた (有意差無し) (R1 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) (R1 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) (R1 図 17)。

#### D. 考察

##### 平成 29 年度

MWNT-7 の吸入暴露により、8 週まで肺胞マクロファージ (CD11b<sup>low</sup>) の割合は有意に減少するのに対し (高濃度群)、好酸球、単球あるいは CD11b<sup>high</sup> マクロファージは増加することがわかった。また、MWNT-7 の吸入暴露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、MWNT-7 暴露により肺組織におけるスカベンジャーレセプターの mRNA 発現の変動が生じる可能性が示されたことから、ナノマテリアルの肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体に関係していることが示唆された。

肺組織における MMP12 の mRNA 発現は MWNT-7 の暴露で有意に増加することが示され

たが、昨年度までの研究 (平成 28 年度今井田班報告済) でも、MWNT-7 の暴露後 1 年経過した時点で MMP12 の発現亢進が持続していたことから、MWNT-7 暴露後、初期から長期に渡って MMP12 の発現が上昇するものと考えられる。さらに、MWNT-7 暴露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子が BALF 中で上昇が確認された。

平成 30 年度の実験では正常 B6 雄マウスに二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) および多層化カーボンナノチューブ (MWNT-7) を Taquann 処理によって分散性を高めた上で、全身吸入暴露装置にて 4 週間にわたって暴露を行なった。暴露後、0 週、1 週、4 週および 8 週における肺を中心とした免疫担当細胞の動態と異なったナノマテリアル吸入暴露による免疫反応の違いを詳細に検討した。

ナノマテリアルの 4 週間の暴露直後 (0 週) では、MWNT-7 の暴露群では BALF 細胞の生存割合が対照群、TiO<sub>2</sub> 暴露群に比較して、有意に低くなっていた。このことは昨年までの研究結果と一致している。TiO<sub>2</sub> 暴露群では形態学的に顆粒状異物を貪食した肺胞マクロファージが多く観察されている (相磯班内データ)。一方で、MWNT-7 は針状あるいは繊維状の形態のナノマテリアルであり、貪食しようとした肺胞マクロファージは細胞死を生じている可能性が考えられた。

その後、MWNT-7 暴露群では BALF 細胞数あるいは肺胞マクロファージ数が回復し、暴露後 8 週ではほぼ対照群、TiO<sub>2</sub> 暴露群と大差はなくなっていた。MWCNT-7 暴露にて細胞死に陥った肺胞マクロファージは肺組織内での恒常性維持あるいは貪食しきれなかったナノマテリアルの処理のために肺胞内で細胞数が増加している可能性が考えられる。組織常在型マクロファージが増加したのかあるいは末梢由来の単球から分化することで細胞数が増加したのかは不明であり、今後の課題である。

多層化カーボンナノチューブの暴露後 1 年での肺胞マクロファージのフェノタイプとして、CD11b<sup>high</sup> F4/80<sup>+</sup>マクロファージが増加し、線維化

に關係する MMP12 を產生することが報告されている (Otsuka et al. *PLoS One*, 2018)。今回の実験においても CD11b<sup>high</sup> 分画を含む CD11b<sup>+</sup>分画が T-CNT7 暴露群で増加していたことから、暴露後早い段階からこのユニークな分画が多層化カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫反応に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、明確な CD11b<sup>high</sup> 分画への変化はさらに加齢的な変化が必要であることが考えられた。

MWNT-7 暴露での変化で重要な所見として、好酸球数の増加である。通常、好酸球はアレルギー反応、寄生虫感染などの免疫反応においてその役割が知られているが、ナノ材料の暴露による好酸球の役割に関してはよく知られていない。IL-13 など好酸球が產生するサイトカインあるいはケモカインなどの產生を検討する必要がある。

TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 の両者ともに暴露後に肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現が亢進していた。このことはナノ材料の形状ならびに性状に関わらずスカベンジャー受容体がナノ材料に対する免疫反応に重要な働きをしていることが示された。

BALF 細胞の遺伝子変化として、MWNT-7 暴露群で MMP12 および CD204 mRNA 発現が上昇していた。MMP12 に関してはこれまでの報告に一致しており、MWNT-7 の暴露によって肺胞マクロファージの產生する MMP12 が肺の線維化病変に関与しているものと考えられる。また、CD204 に関してはスカベンジャー受容体の一つとして知られており、CNT の暴露に関連する分子として注目できる。

肺組織における遺伝子変化に関しては、BALF 細胞と同様に、MMP12 ならびに CD204 mRNA 発現の上昇が見られたが、肺組織への肺胞マクロファージの残存あるいは肺胞マクロファージ以外の間質の細胞の変化が反映されている可能性が考えられた。また、TiO<sub>2</sub> 暴露でも CD204 mRNA の発現上昇が見られたことから、何らかの間質細胞

への影響が考えられた。

肺組織でのサイトカインの変化に関しては、MWNT-7 暴露 1 週間で一過性に GM-CSF ならびに IL-6 mRNA 発現が上昇しているが、BALF 細胞での発現の解析が必要である。また、TiO<sub>2</sub> 暴露と MWNT-7 暴露で IL-33 mRNA 発現が一過性に上昇していることも BALF 細胞での発現の解析が待たれる。TIMP-1 mRNA 発現に関しても両方の材料で一過性に上昇しており、ナノ材料暴露での肺免疫に重要な役割を果たしている可能性が示された。

#### 令和 1 年度

前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<sub>2</sub>) 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。TiO<sub>2</sub> とのナノ材料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、TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> の暴露で違いが生じていた。肺組織においても MWNT-7 と TiO<sub>2</sub> 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、ナノ材料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。

令和元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 Taqquan 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た。

BALF 細胞中の好酸球、単球、肺泡マクロファージあるいは肺泡マクロファージの各分画(F4/80, CD11b<sup>+</sup>F4/40<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>) に関して、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た。

肺泡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、カーボンナノチューブ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た。

カーボンナノチューブの吸入暴露により肺泡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。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 暴露に比較して肺泡傷害は軽度であり、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

### 平成 29 年度

MWNT-7 の吸入暴露によって、肺泡マクロファージは MWNT-7 の処理によって細胞死を介して、細胞数が減少し、その後 M1/M2 分化の不均衡が生じる。また、いくつかの肺泡マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性がある。

### 平成 30 年度

ナノマテリアルの形態あるいは性状によって肺泡マクロファージの処理反応は異なっており、繊維状の多層化カーボンナノチューブは貪食反応が性状に機能できない可能性がある。多層化カーボンナノチューブの暴露直後では肺泡マクロファージ数は減少し、その後細胞数が回復することがわかった。また、多層化カーボンナノチューブの暴露によって好酸球の細胞数が増加することが判明した。ナノマテリアルの吸入暴露によって肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体を介した反応が重要であることが示された。加えて、ナノマテリアルの性状や形態の違いによって、BALF 細胞あるいは肺組織での遺伝子の発現変化が異なっていることがわかった。以上のことから、種々のナノマテリアルの暴露によって肺での免疫機能評価には BALF 細胞の細胞表面マーカーや遺伝子発現の変化の検討が重要であることがわかった。

### 令和 1 年度

MWNT-7 と TiO<sub>2</sub> の全身吸入暴露によって、肺泡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。一方で、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。また、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。一方で、MWCNT-Nの暴露によって、肺胞マクロファージで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。

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。また、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。したがって、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

Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. :Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203

Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N.: NF- $\kappa$ B2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2017 69:2193-2202

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N.: Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune tolerance. *J Clin Cell Immunol*. 2017 8:1000512

Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y.:Essential role of CCL21 in establishment

of central self-tolerance in T cells. *J Exp Med*. 2017 214:1925-1935

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N.: Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. *J Cytokine Biol*. 2017 2:1-5

YoshioHayashi,NaozumiIshimaru.Autoimmunity Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. *Handbook of Immunosenescence* 1-11, 2017

Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y.:Aurora Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 18:199-213

Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M.: Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 41:1172-1181

Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y.: The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10

石丸直澄：口腔免疫とその異常、*CLINICAL CALCIUM* 27(10):21-26, 2018

Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N.:CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren' syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. :Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 2018 13(10):e0205702

Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M.: Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018

Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y.: Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2018 19(5):E1462

石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版 (2018) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 *病理と臨床* 36(6), 580-585, 2018

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研究の最前線 *細胞* 50(10), 528-531, 2018

石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性T細胞 *医学のあゆみ* Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

Yuyama K, Nakamura Y, Yateyama R, Arakaki R, Tsutsui T, Ishimaru N.: Study of the pharmacokinetics of eriodictyol-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 clligenesis 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, 11(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-κB 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

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、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日 (東京)

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日 (東京)

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日 (東京)

石丸直澄: 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～ 第 59 回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジウム 2018 年 9 月 18 日 (松本)

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's Syndrome. 第 46 回日本免疫学会総会 2017 年 12 月 13 日 (仙台)

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第 46 回日本免疫学会総会 2017 年 12 月 13 日 (仙台)

Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo: Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International Sjögren's Syndrome Symposium, Washington DC, April 18-21, 2018

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing resident macrophages enhance autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Masako Saito, Satoko Kujiraoka, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Hidehiro Kishimoto, Naozumi Ishimaru: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Akiko Yamada, Aya Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Jonathan Sprent, and Naozumi Ishimaru: NF- $\kappa$ B Controls the Migratory Activity of Memory T Cells to the Target Tissues in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日 (札幌)

○ 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄：全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺における IL-33 の発現とその役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄：CCL22 産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルにおける Notch シグナルの役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄：DNA ライセンシング因子 CDT1 の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：Emil の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：口腔癌における Periostin スプライシングバリエーションの同定とその役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 第 17 回四国免疫フォーラム、2018 年 6 月 30 日(徳島)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 分子病理学研究会 37 はがくれシンポジウム、2018 年 7 月 7 日(佐賀)

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄：Ascl2 を介した濾胞ヘルパー T 細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 先端歯学スクール、2018 年 8 月 23-24 日(東京)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：Ascl2 を介した濾胞ヘルパー T 細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 第 29 回日本臨床口腔病理学会総会、2018 年 8 月 25-26 日(東京)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：第 60 回歯科基礎医学学会学術大会、2018 年 9 月 5-7 日（福岡）

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：第 27 回日本シェーグレン症候群学会、2018 年 9 月 14-15 日（小倉）

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄：CCL22 産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第 27 回日本シェーグレン症候群学会、2018 年 9 月 14-15 日（小倉）

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat、2018 年 9 月 0-22 日（香川小豆島）

Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki

Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

○ 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会、2018 年 4 月 28 日（東京）

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日（東京）

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第 106 回日本病理学会総会、2018 年 4 月 28 日（東京）

○ 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（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, 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

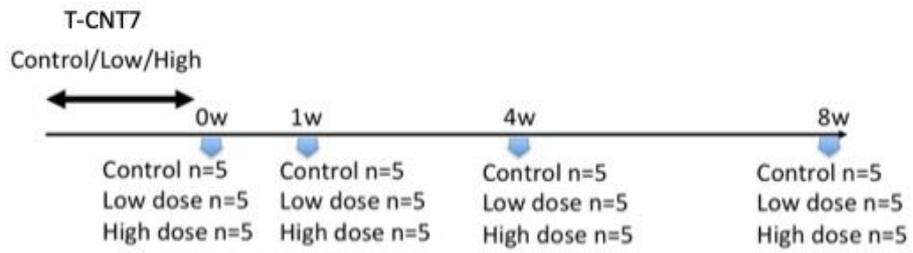
2. 実用新案登録

なし

3. その他

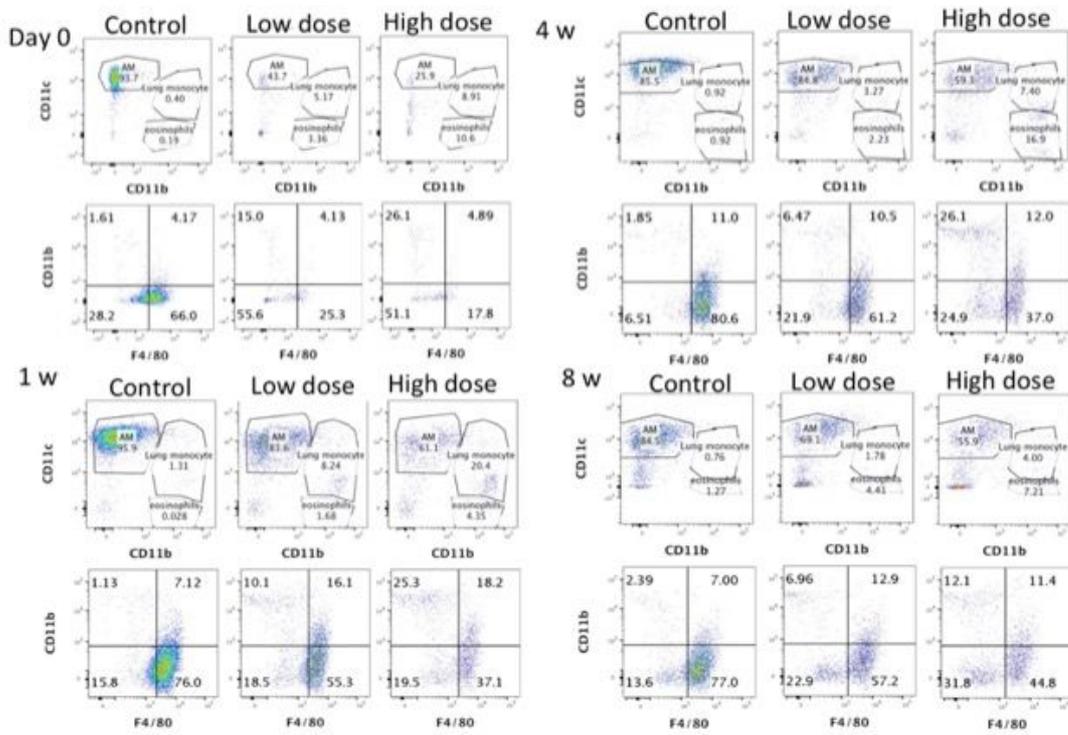
なし

### Experimental Schedule

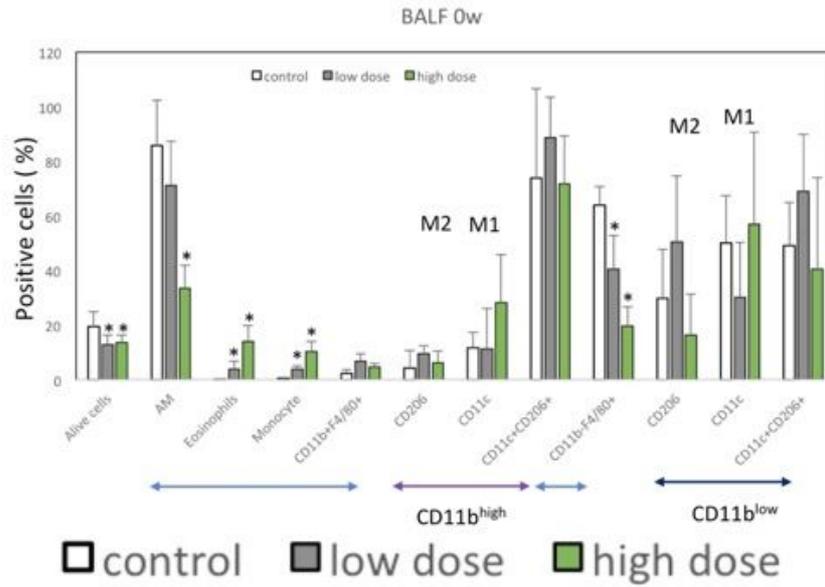


	0w	1w	4w	8w
BALF/FCM	⊙	⊙	⊙	⊙
BALF/Multiplex				⊙
CLN/FCM	○	○	○	○
Spleen/FCM	○	○	○	○
Lung/q-RT-PCR	⊙	⊙	⊙	⊙

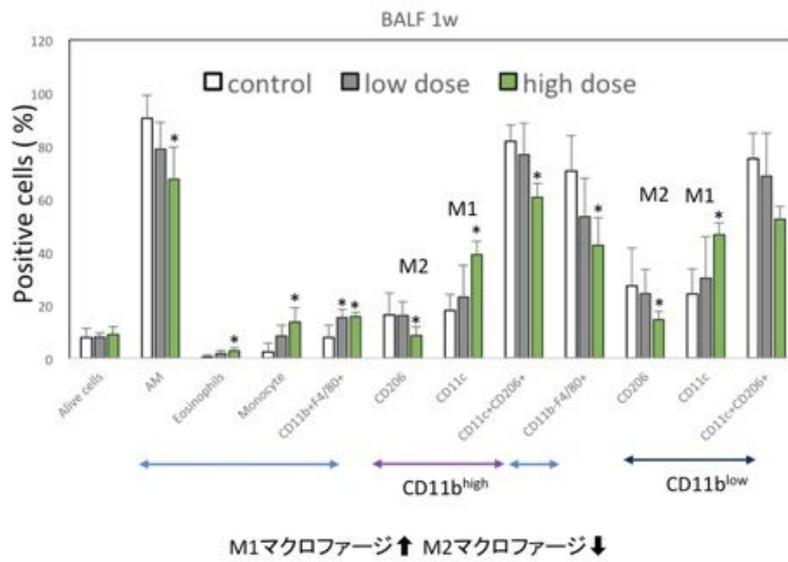
T-CNT7吸入暴露による肺胞洗浄液中の免疫細胞の変化



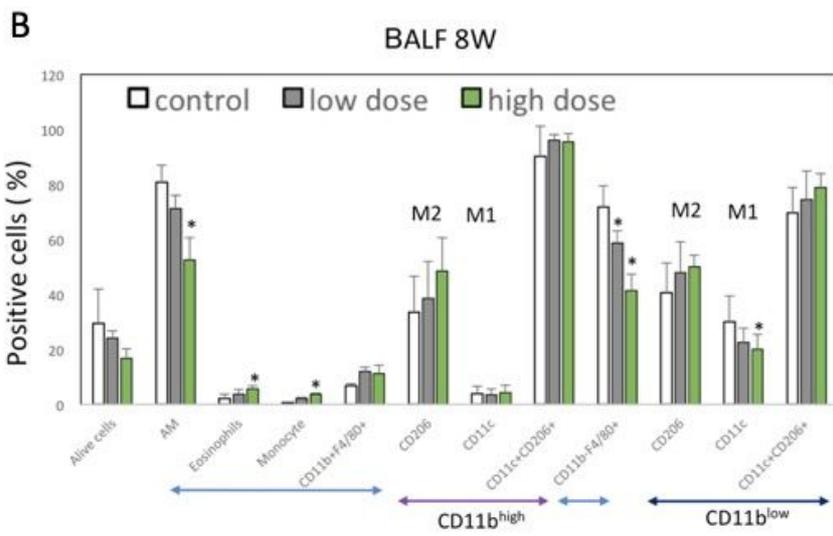
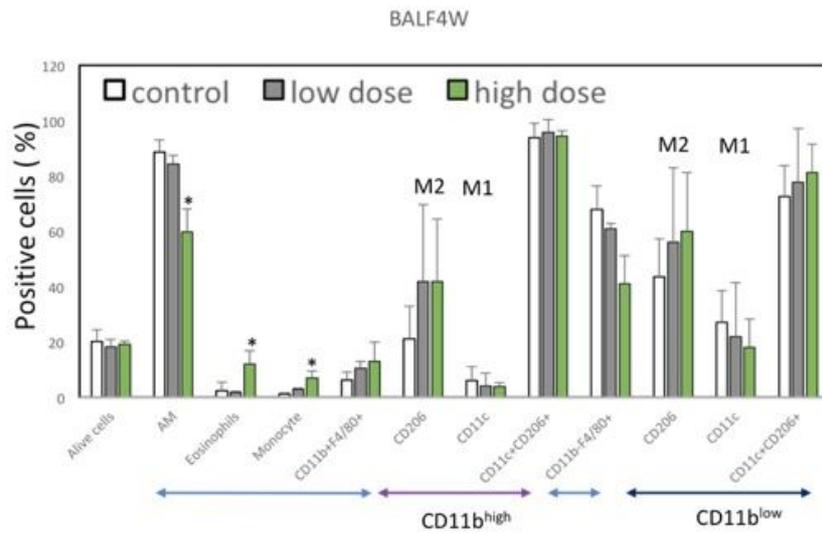
**A** 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



**B** 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する

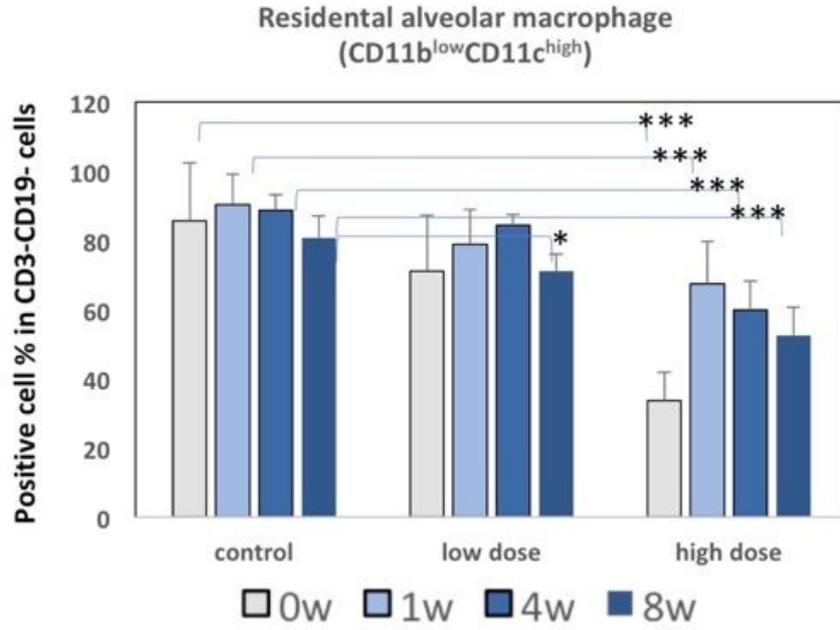


A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



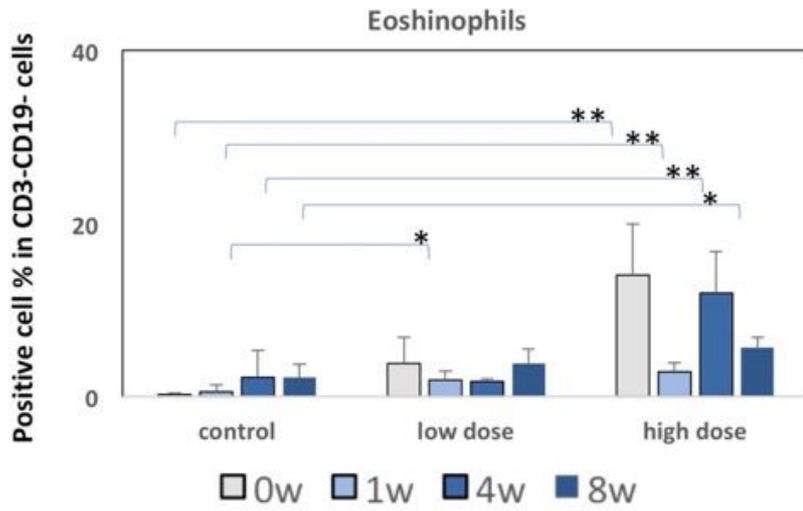
M1マクロファージ↓

A



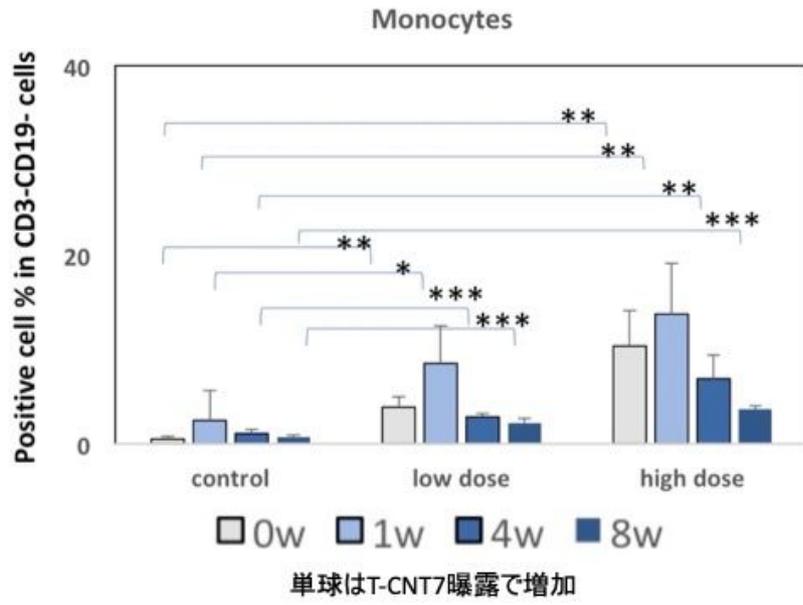
B

暴露後8週まで肺胞マクロファージは減少してま (high dose)

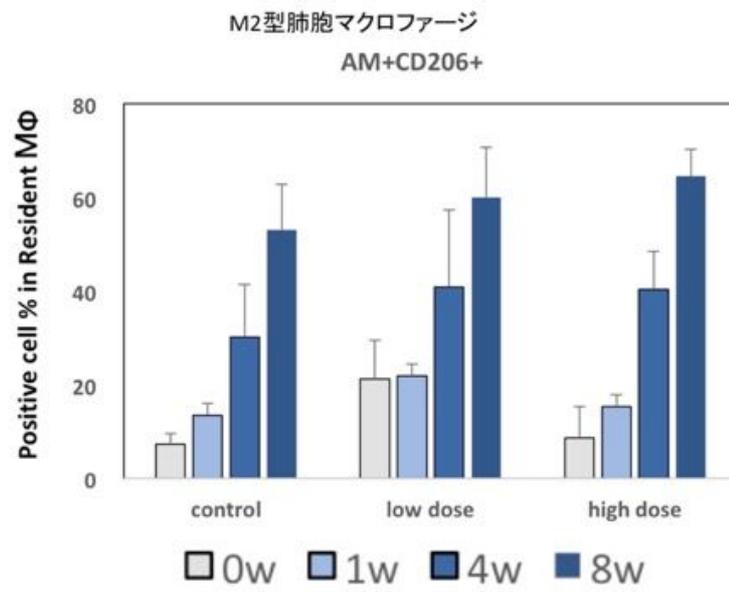


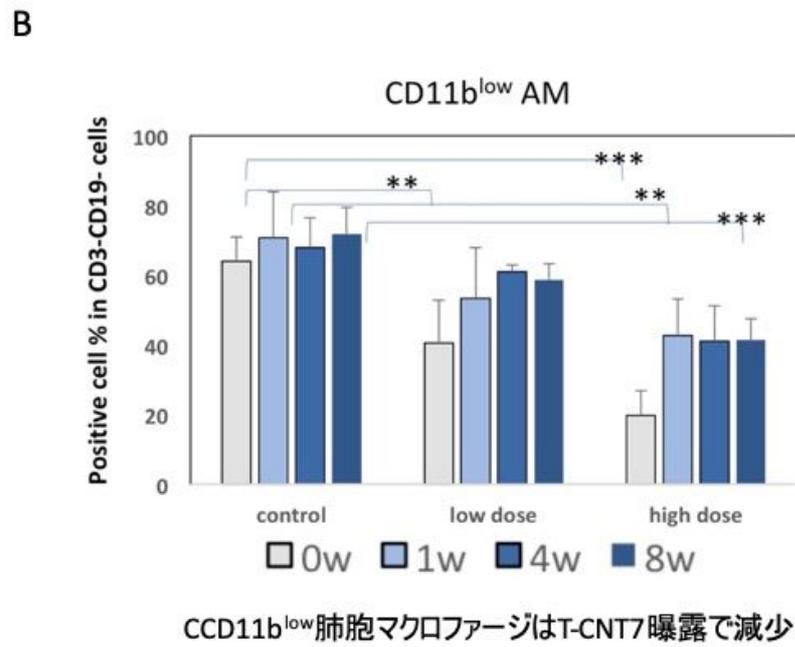
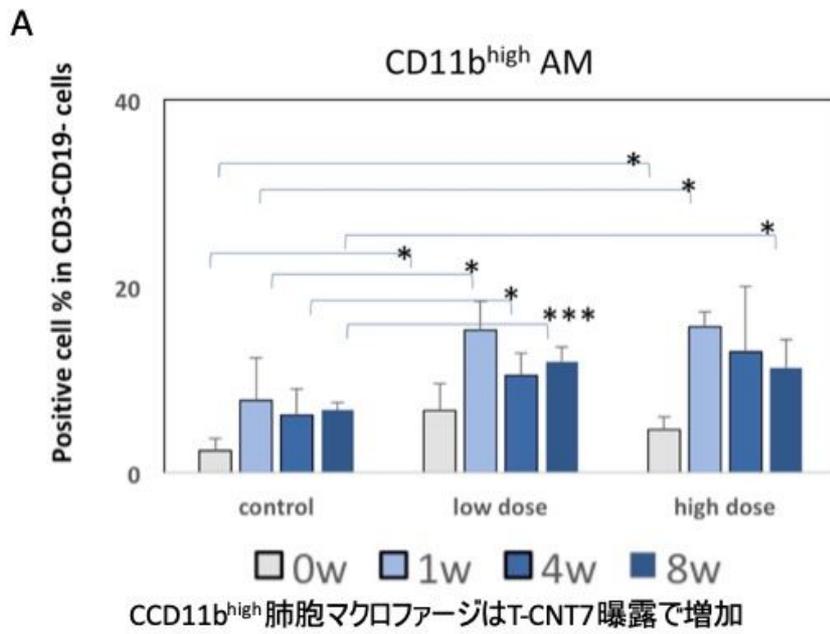
好酸球はT-CNT7曝露で増加

A

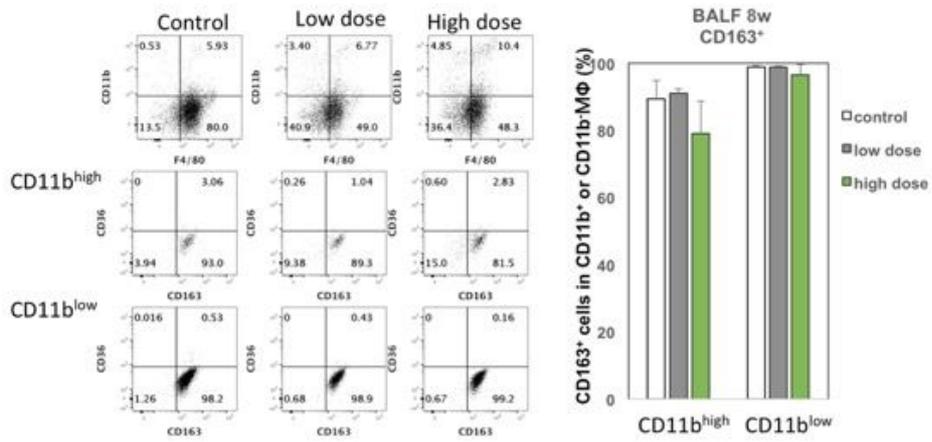


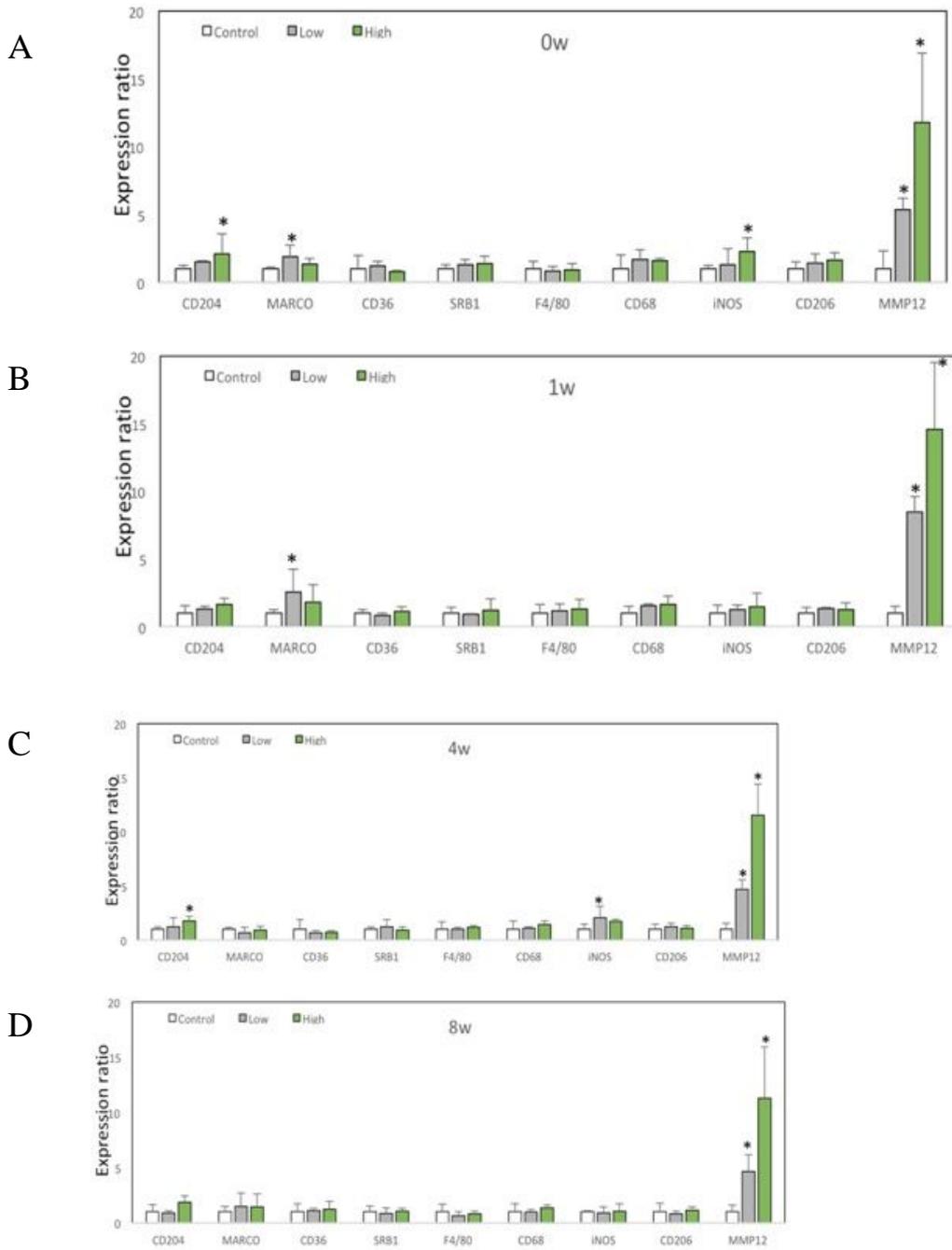
B



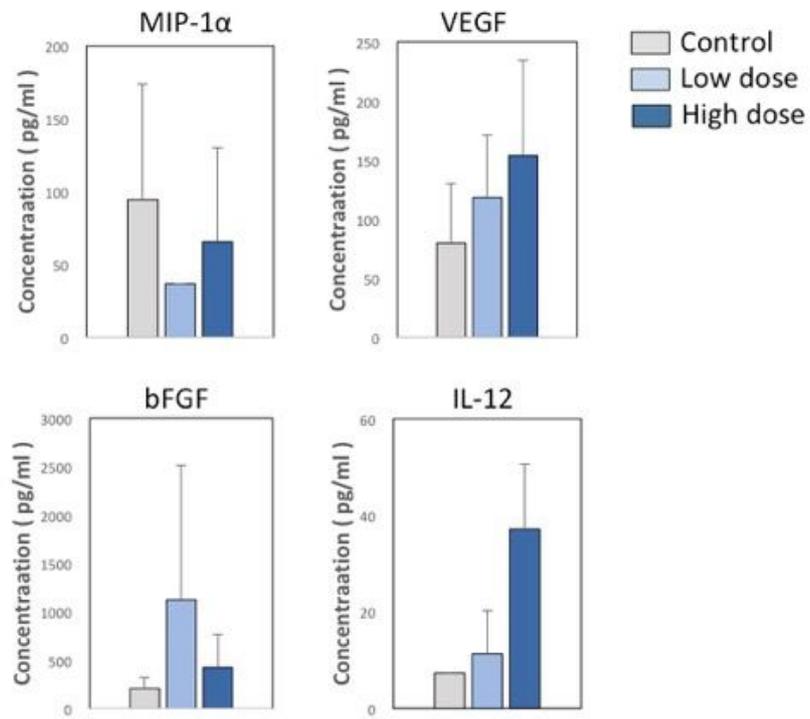


Scavenger receptor on alveolar macrophages

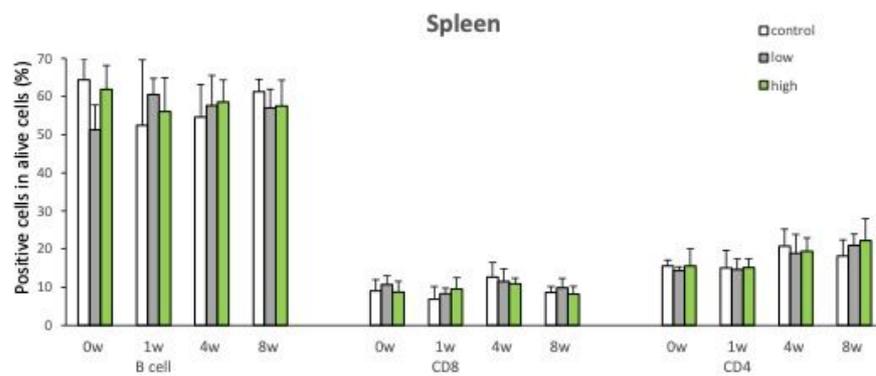




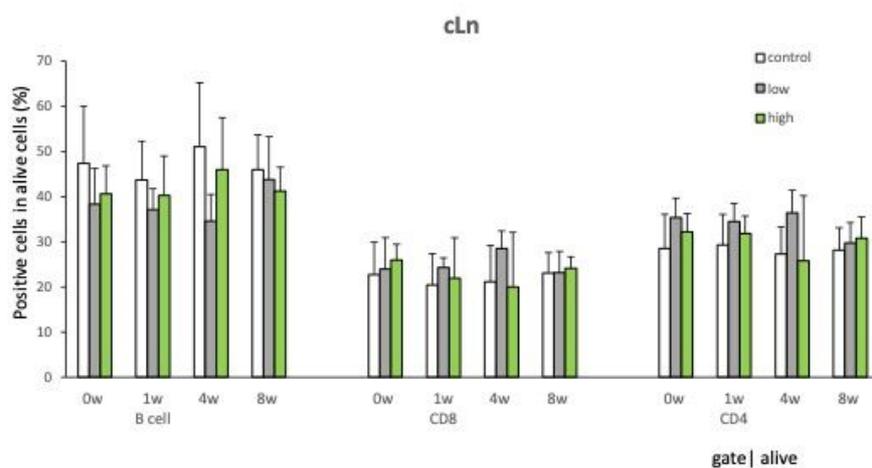
**Levels of Cytokine, Chemokine and Growth Factor in BALF (8w)**



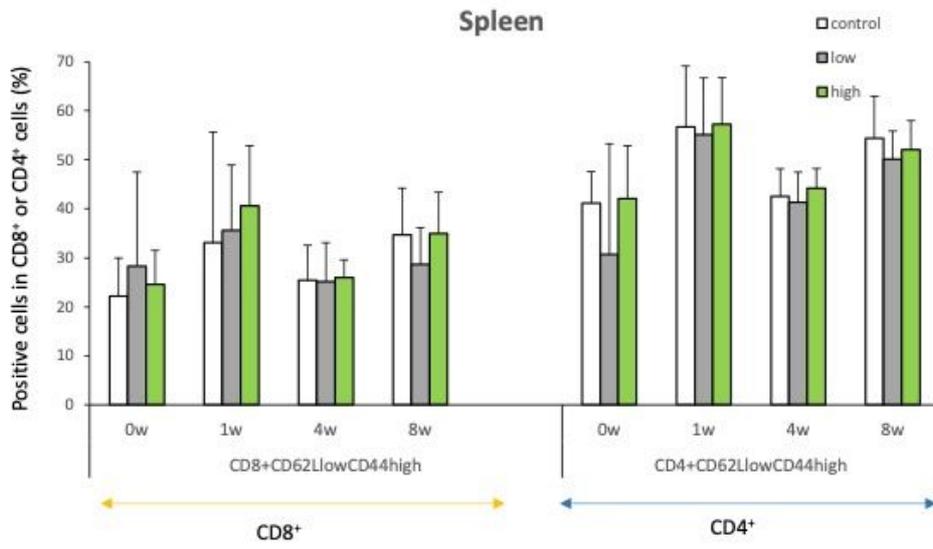
A



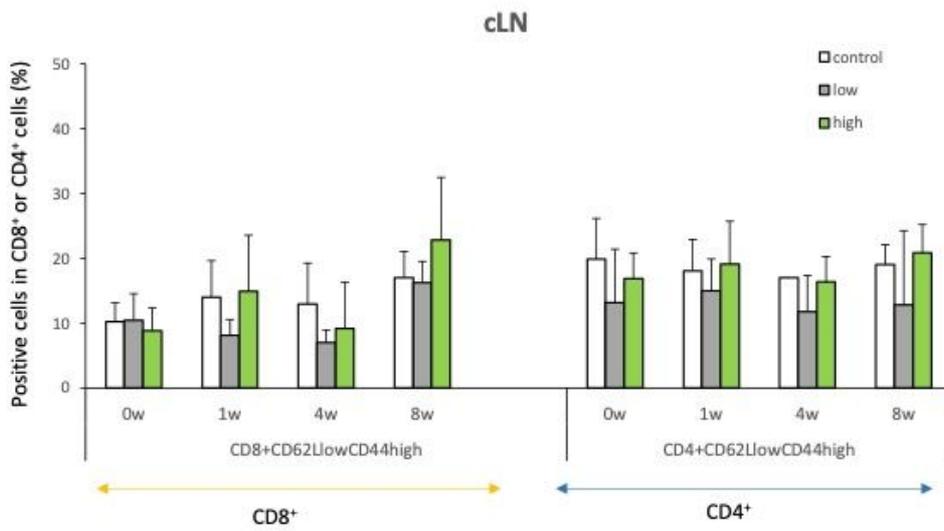
B



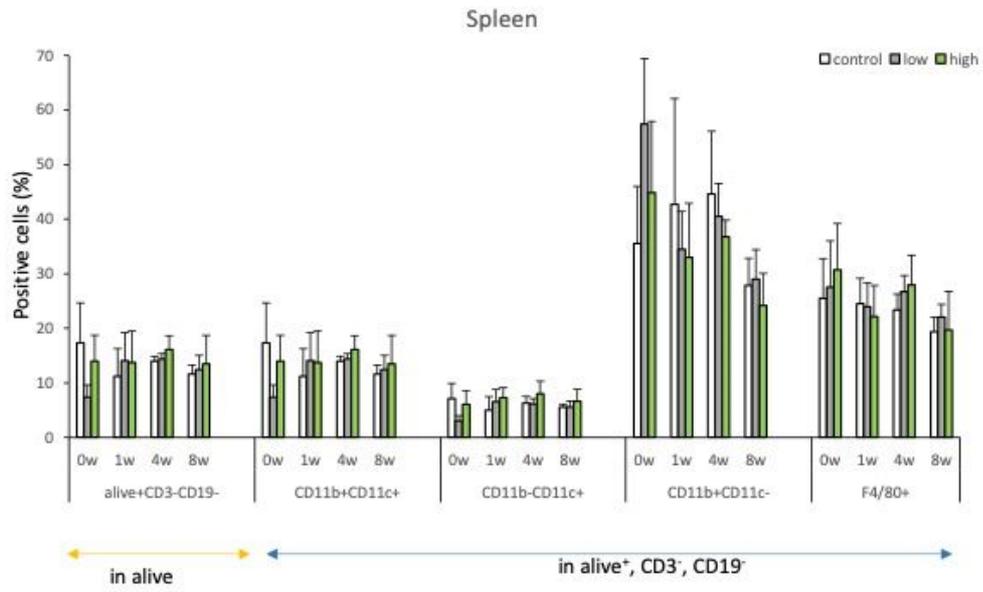
A



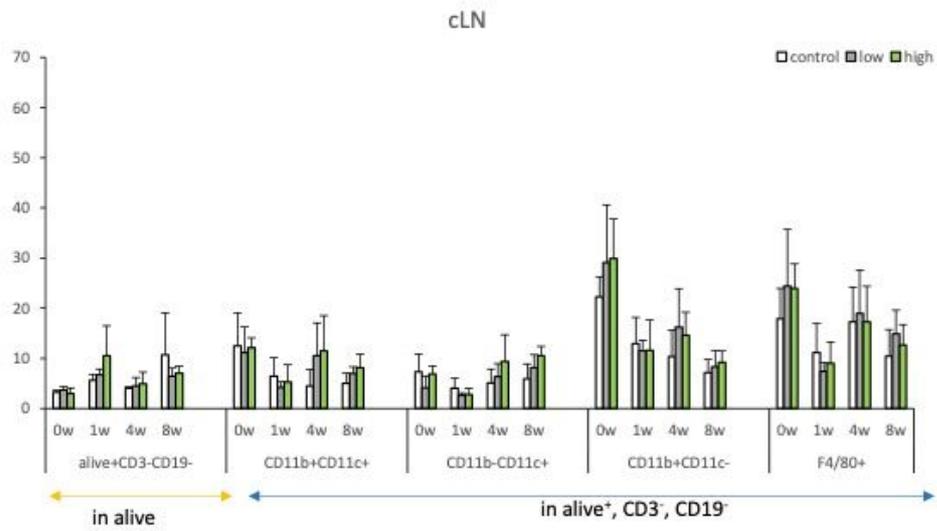
B

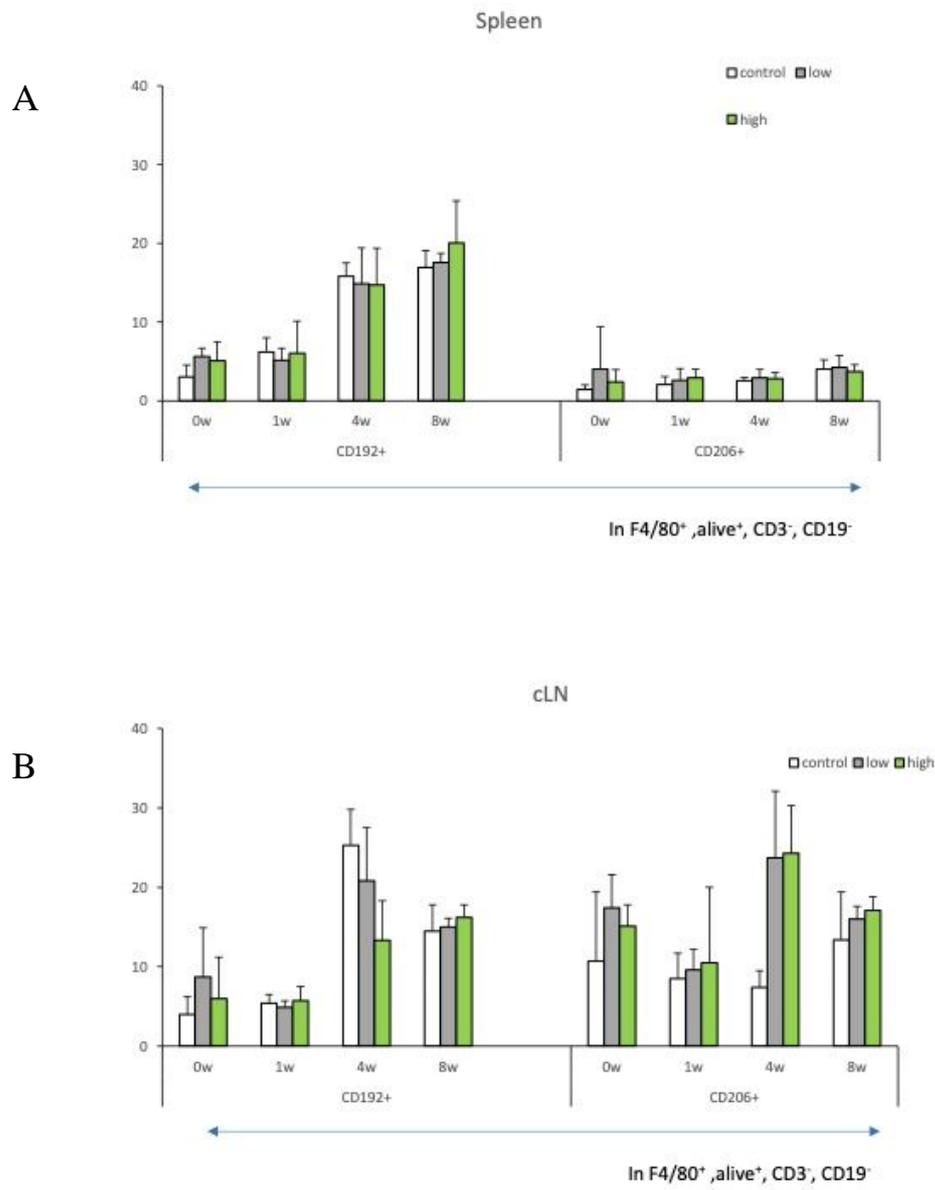


A



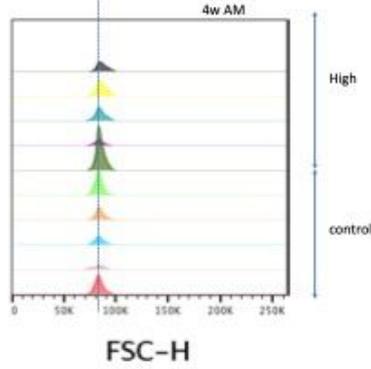
B





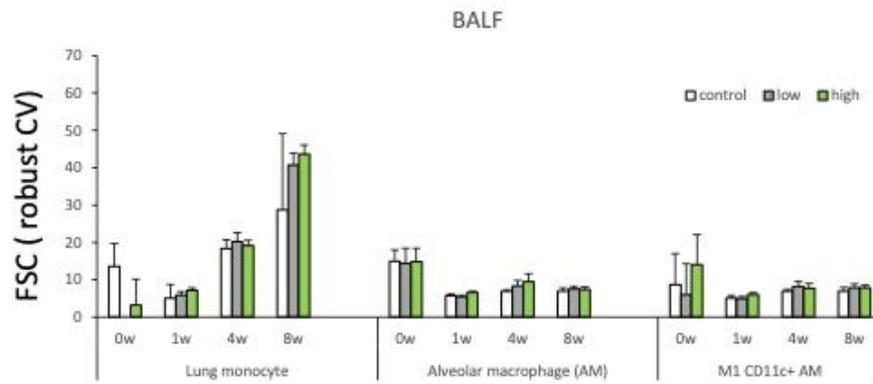
A

Difference of FSC value of BALF in control and high dose treated mice

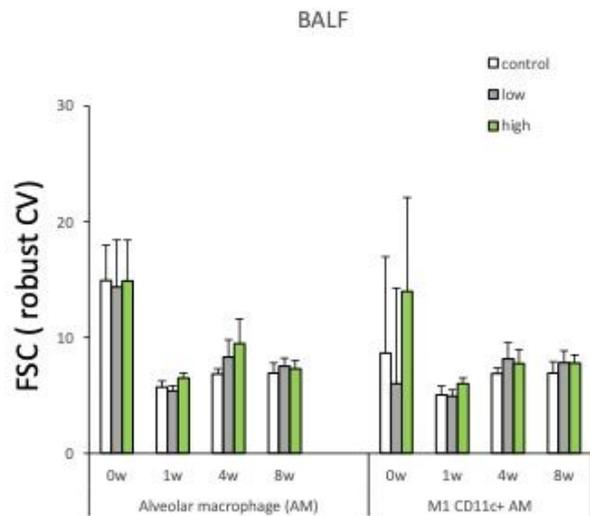


Sample Name	Subst Name	Count
33171_H2c	ant	1157
33169_H2c	ant	1895
33142_H2c	ant	1436
33151_H2c	ant	770
33163_H2c	ant	3915
33155_H2c	ant	2295
33153_H2c	ant	1264
33145_H2c	ant	940
33149_H2c	ant	450
33143_H2c	ant	1914

B

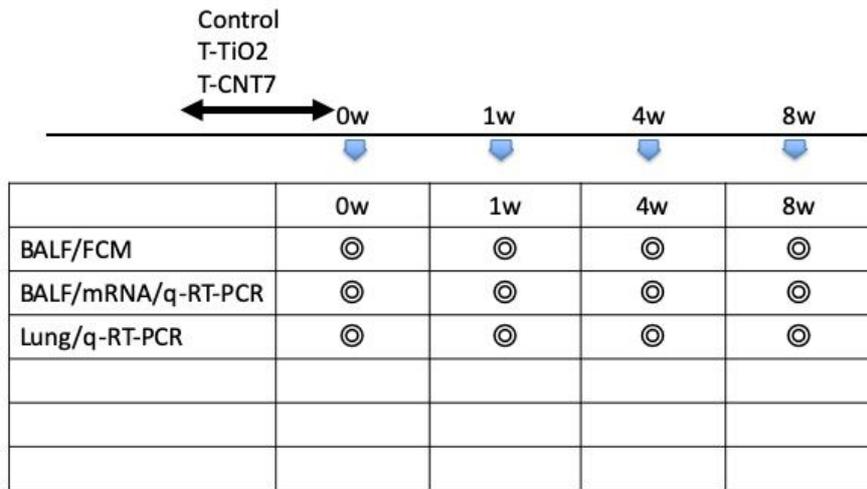


C

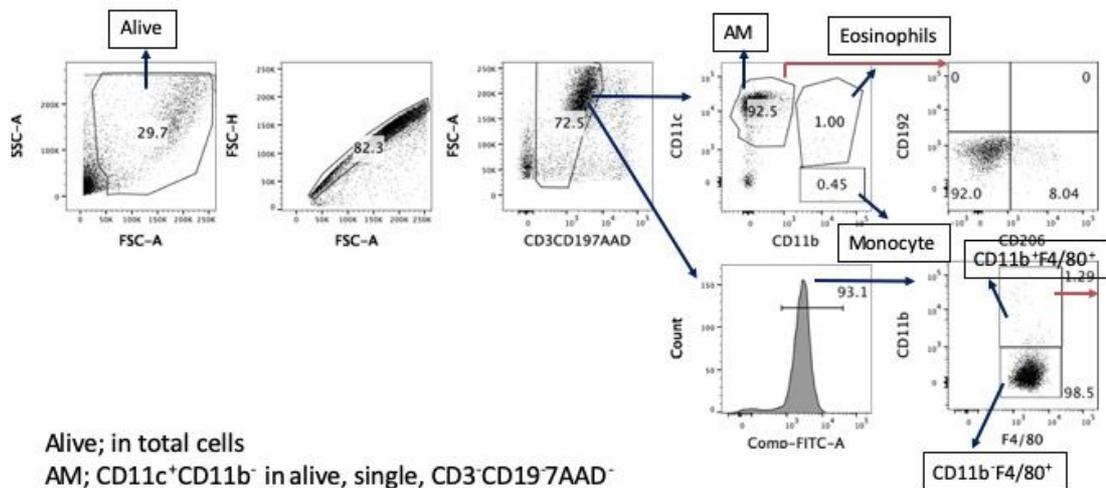


# 図1A 実験計画

H30



# 図1B フローサイトメータ解析 (ゲーティングストラテジー)



Alive; in total cells  
 AM; CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> in alive, single, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>  
 Eosinophils; CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> in alive, single, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>  
 Monocyte; CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> in alive, single, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>  
 F4/80<sup>-</sup>; F4/80<sup>+</sup> in alive, single, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>

図2A BALF中の各細胞分画

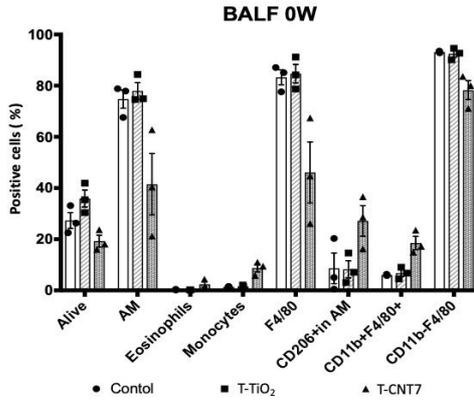


図2B BALF中の各細胞分画

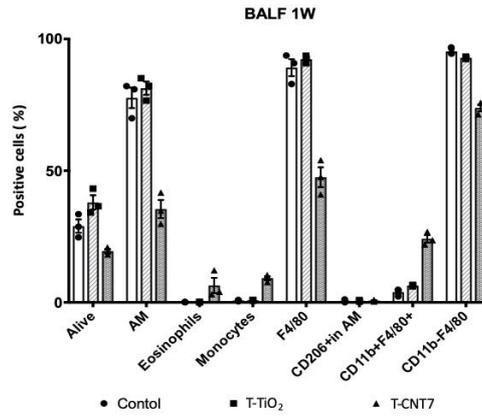


図2C BALF中の各細胞分画

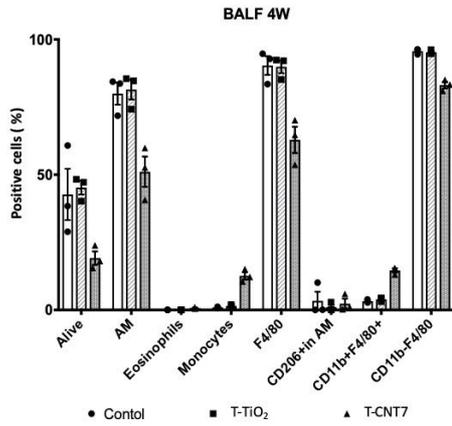


図2D BALF中の各細胞分画

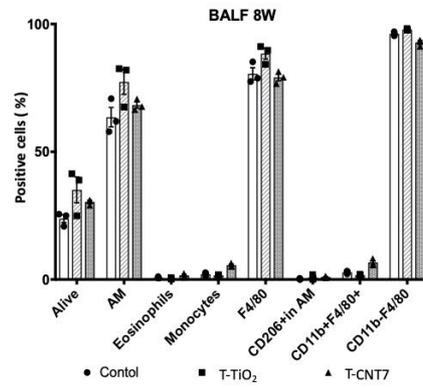


図3A 肺胞マクロファージの経時的変化

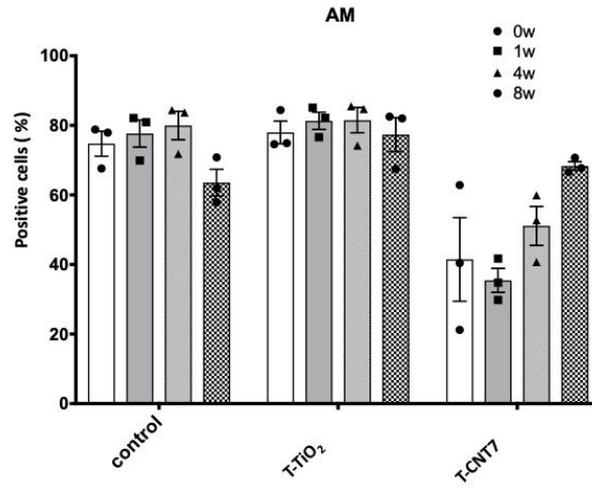


図3B 好酸球の経時的変化

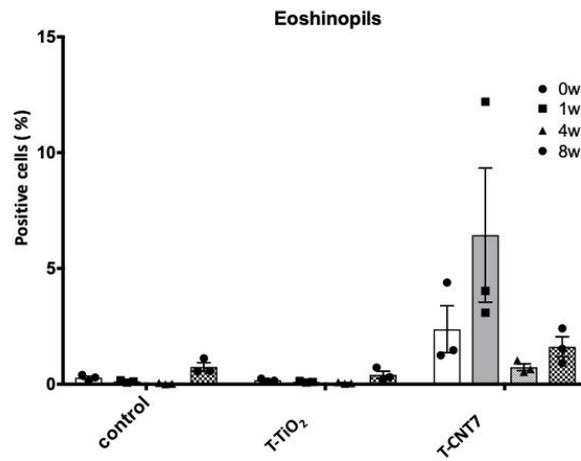


図3C 単球の経時的変化

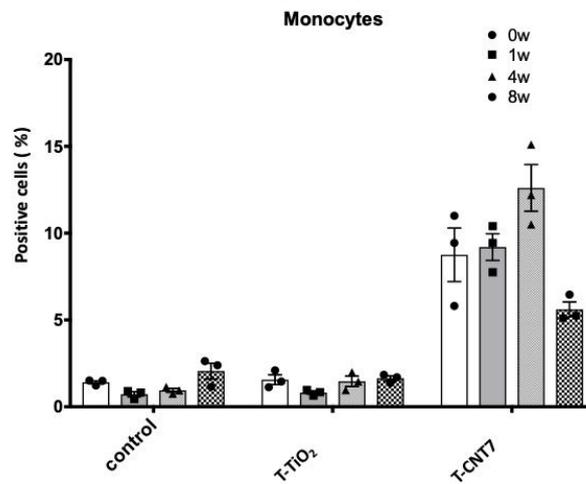


図4A CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>肺胞マクロファージの経時的変化

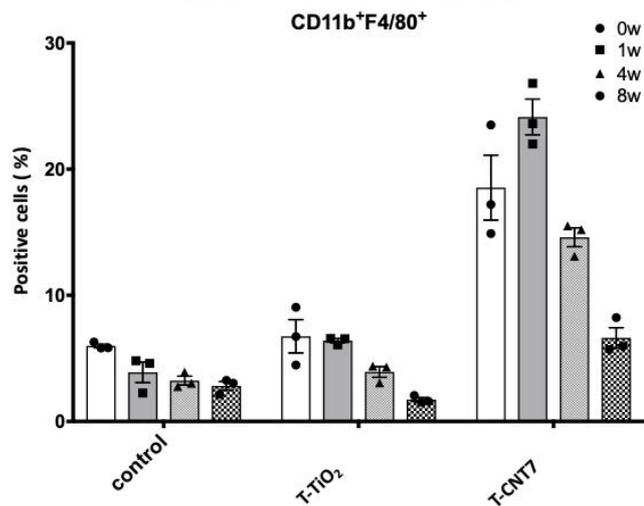


図4B M2型肺胞マクロファージの経時的変化

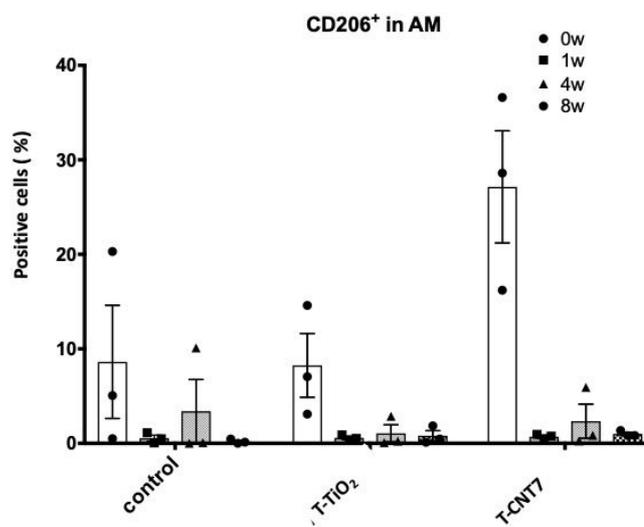


図5A

肺泡マクロファージにおけるCD36の経時的変化

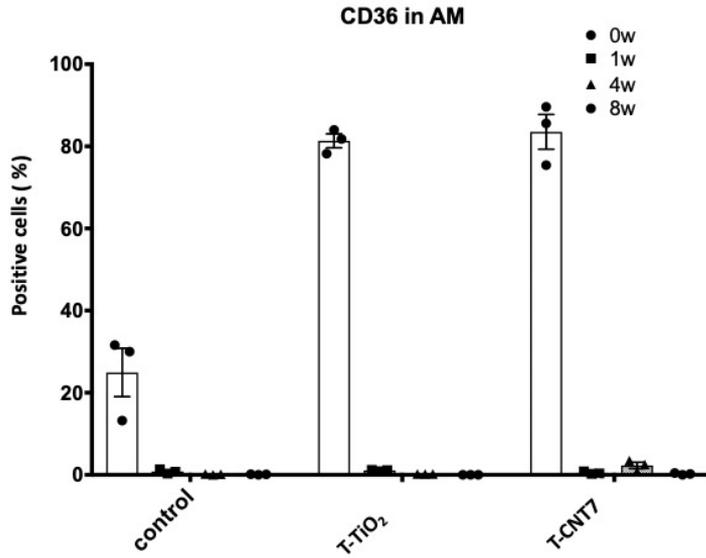


図5B CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>肺泡マクロファージにおけるCD36の経時的変化

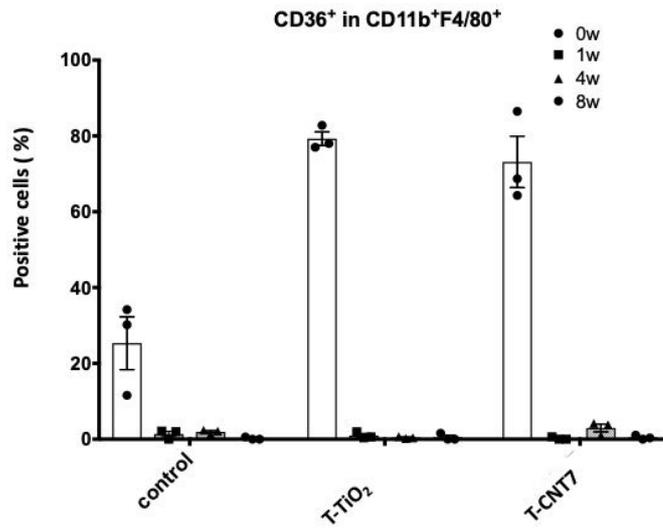


図6A 肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化

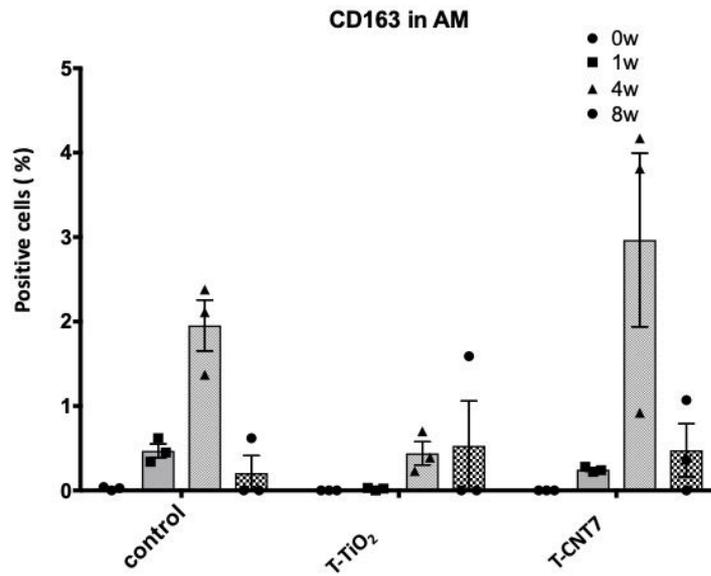
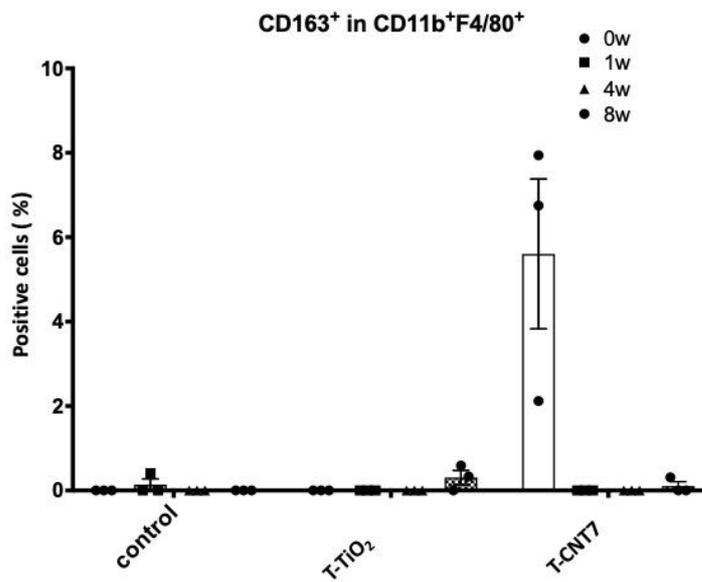


図6B CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化



BALF細胞におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

H30

図7A

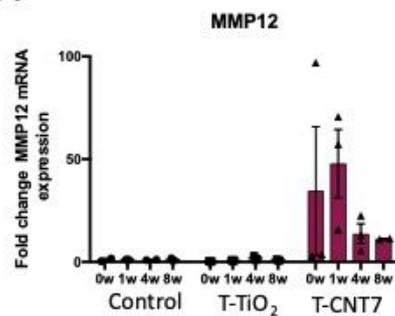
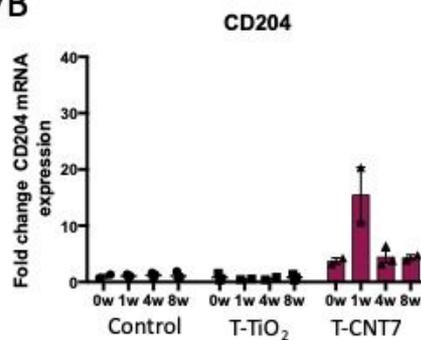
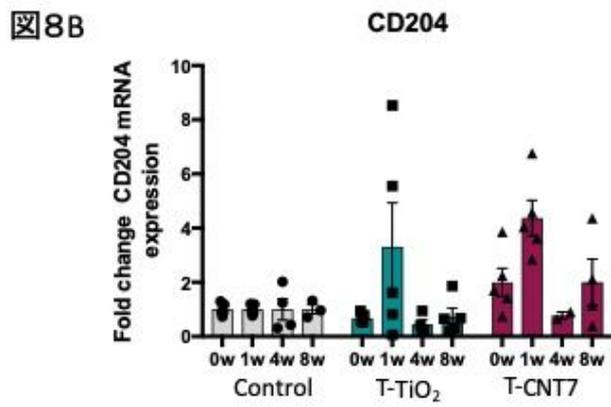
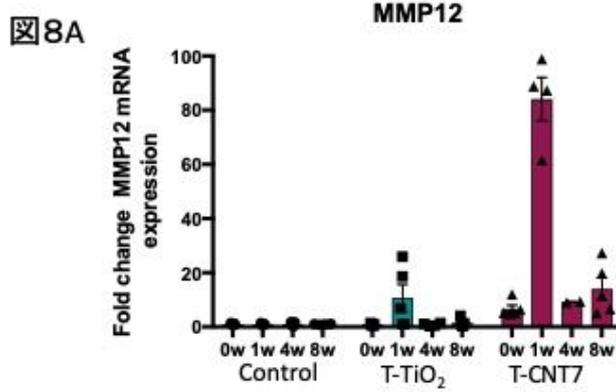


図7B



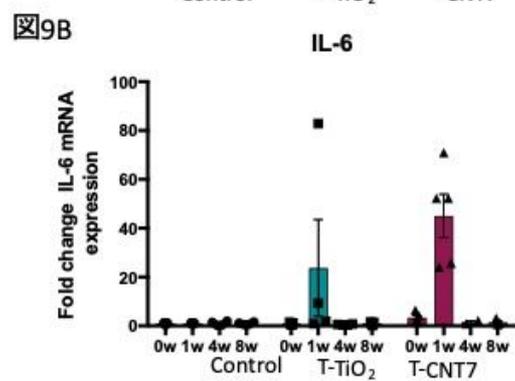
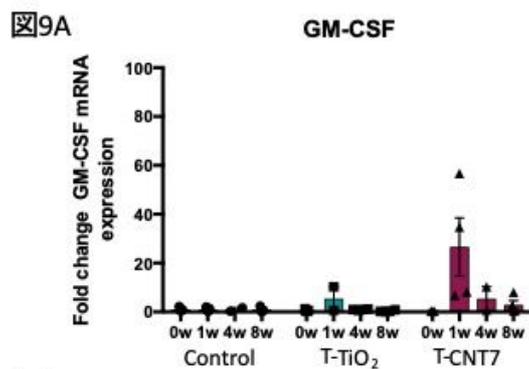
肺組織におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

H30



# 肺組織におけるGM-CSFおよびIL-6 mRNA発現

H30



# 肺組織におけるIL-33およびColIV mRNA発現

H30

図10A

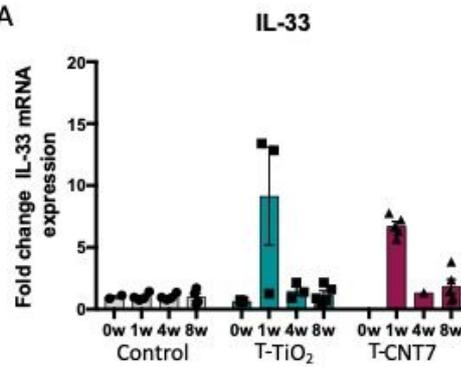
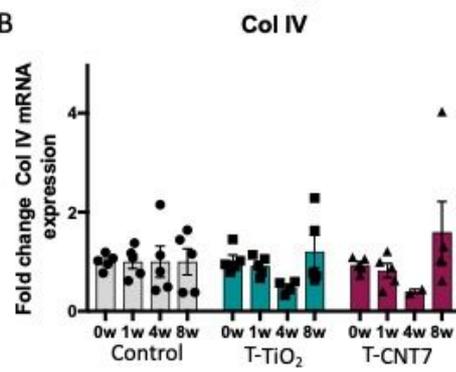


図10B



肺組織におけるTIMP-1およびVEGF mRNA発現

H30

図11A

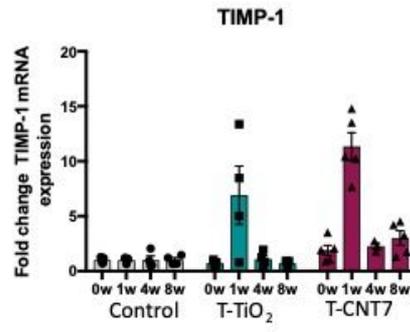


図11B

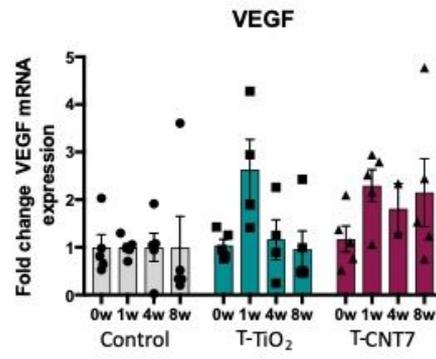


図 1A 実験計画 (H30年度継続実験)

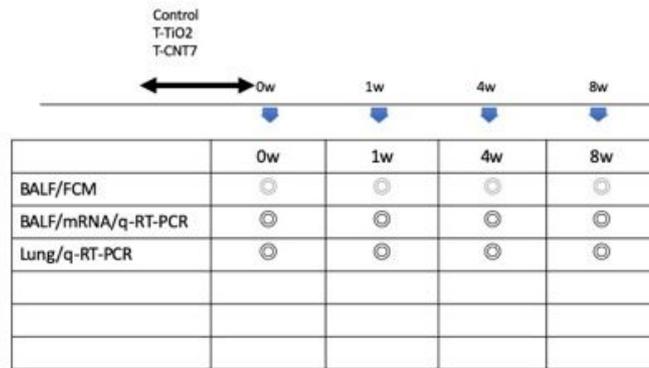
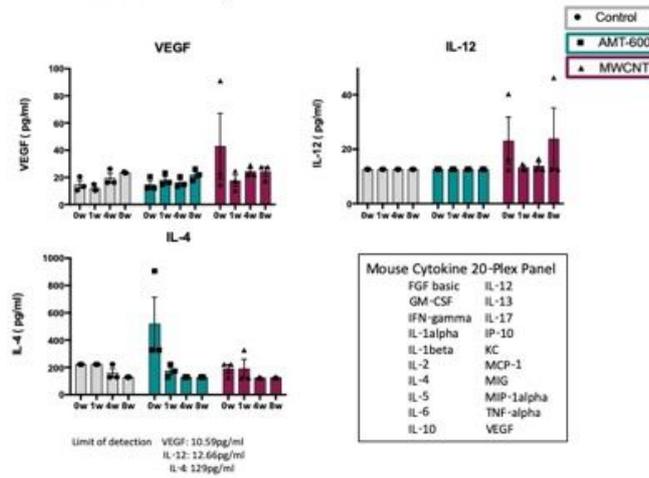


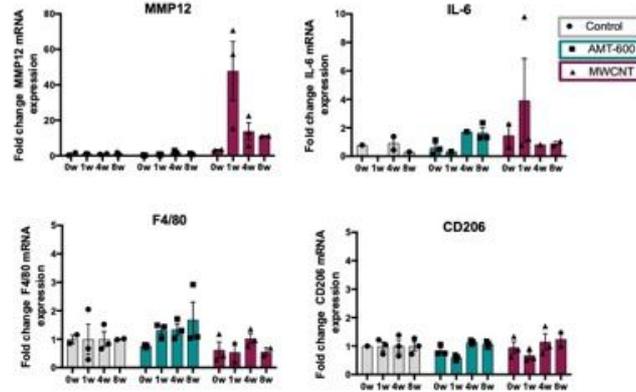
図 1B

Levels of VEGF, IL-12 and IL-4 in BALF

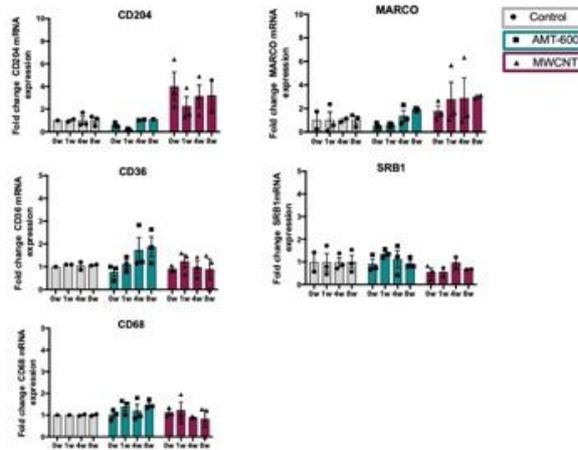


平均 ± 標準偏差にて示す (n=3)。

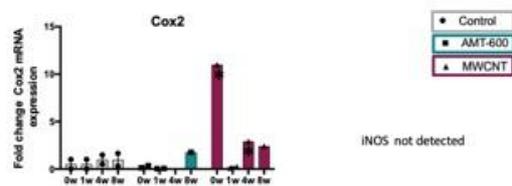
2A Gene expression of MMP12, IL-6 and macrophage marker (F4/80, CD206) in BLAF cells



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)。\* $p < 0.05$

図3A

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

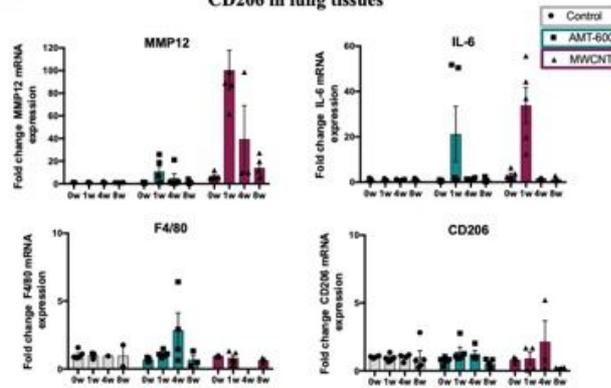


図3B

Gene expression of Scavenger receptors in lung tissues

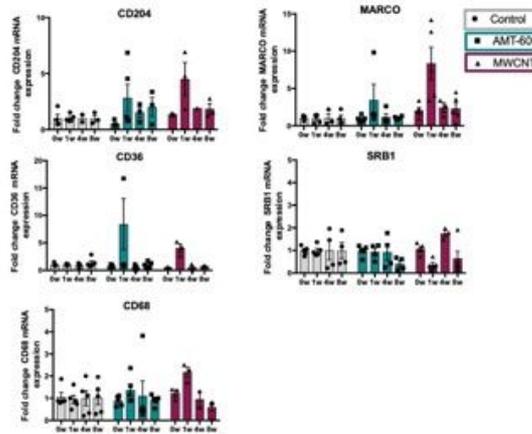
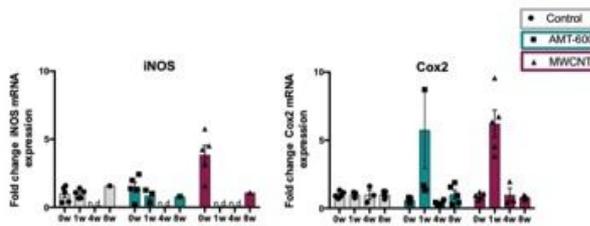


図3C

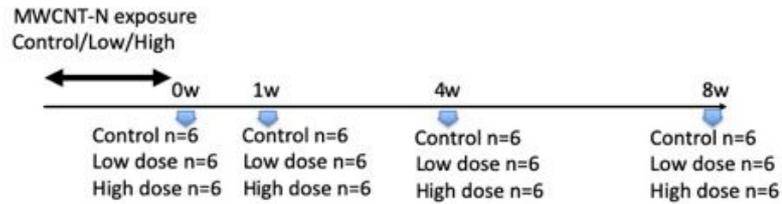
Gene expression of iNOS and Cox2 in lung tissues



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

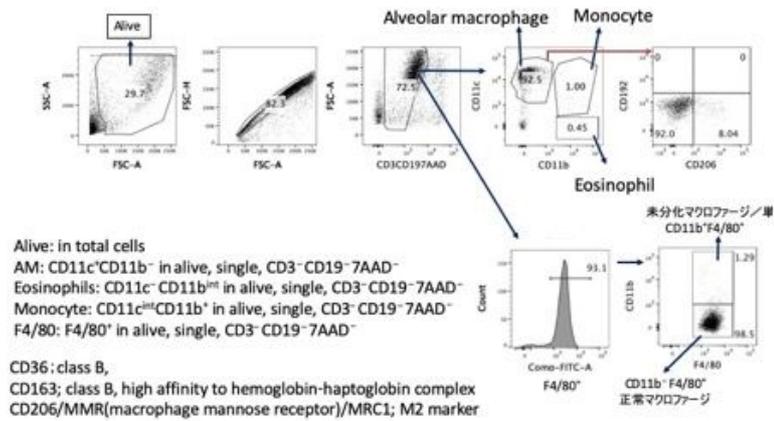


図 6 . MWCNT-N暴露後0～8週目でのBALF細胞分画

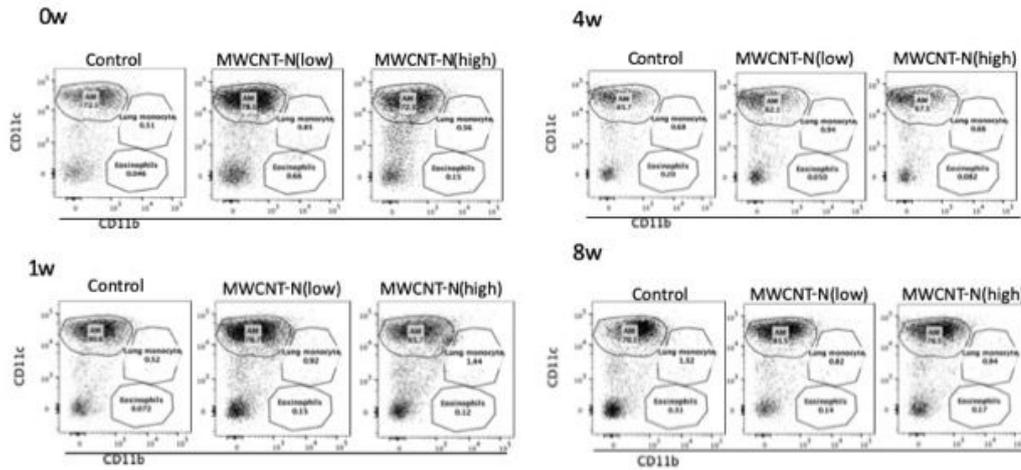
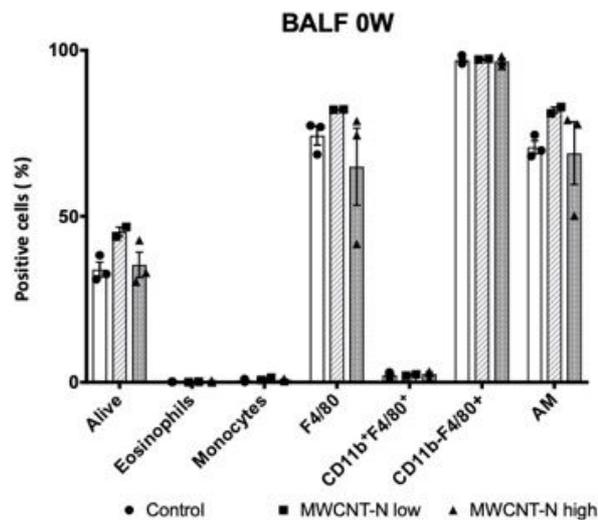


図2に示すようなGating方法にてCD11c/CD11bの展開により、肺胞マクロファージ、単球、好酸球分画の割合を定量化した。図は代表的なデータを示す。

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

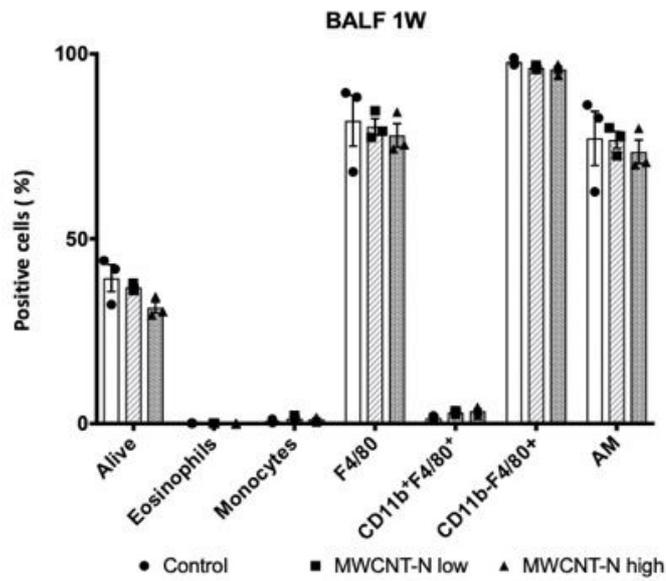
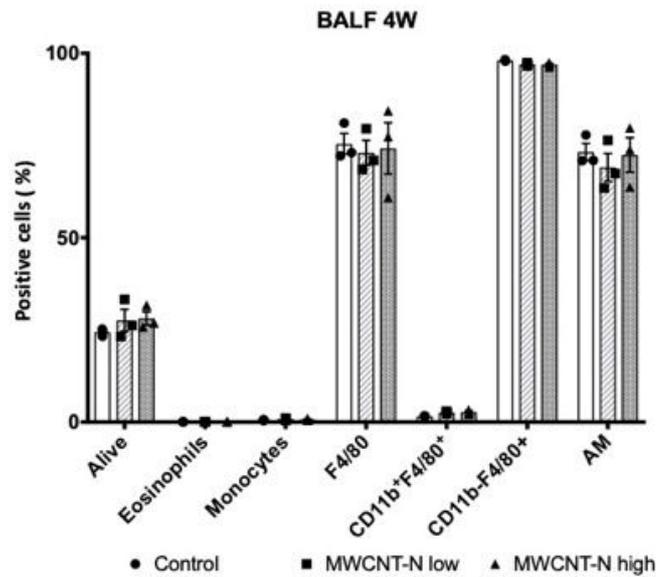


図 9. MWCNT-N暴露後 4 週目でのBALF細胞分画



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

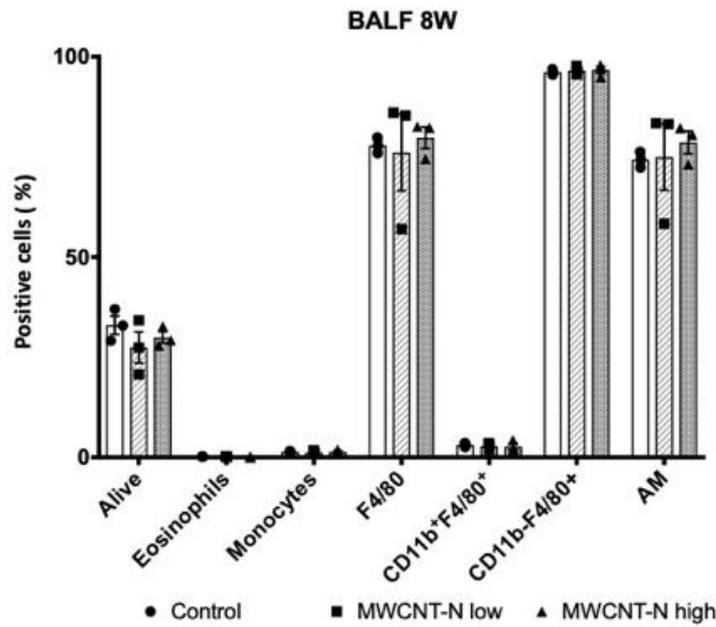
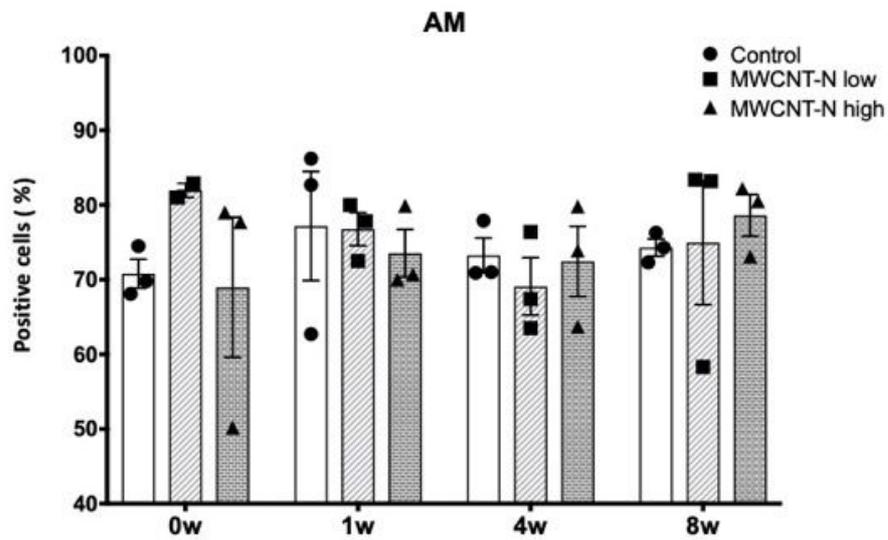
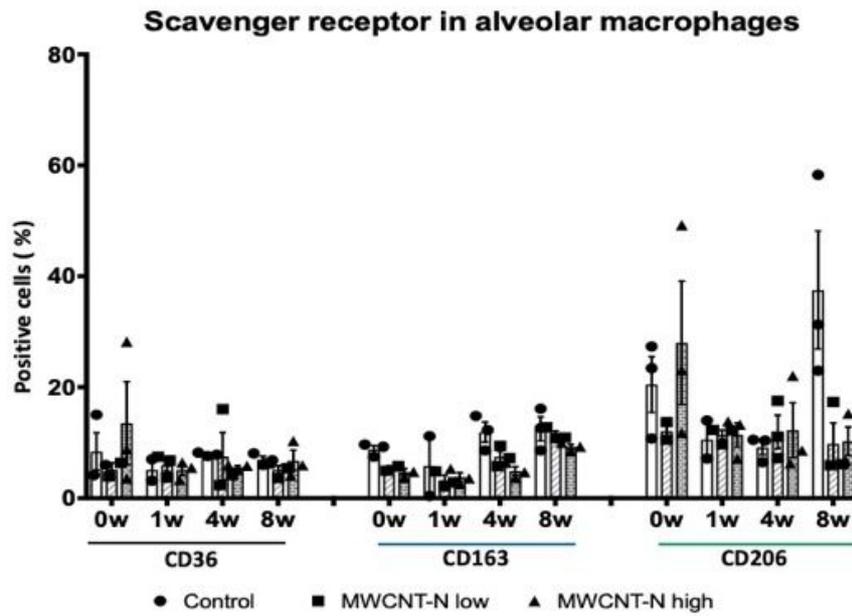


図 1 1. MWCNT-N暴露後の肺胞マクロファージの経時的変化



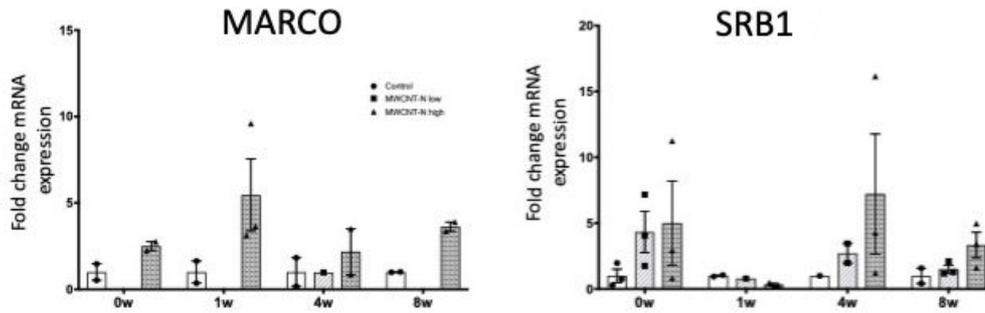
肺胞マクロファージ分画の割合を平均±標準偏差で示す (n=3)。

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



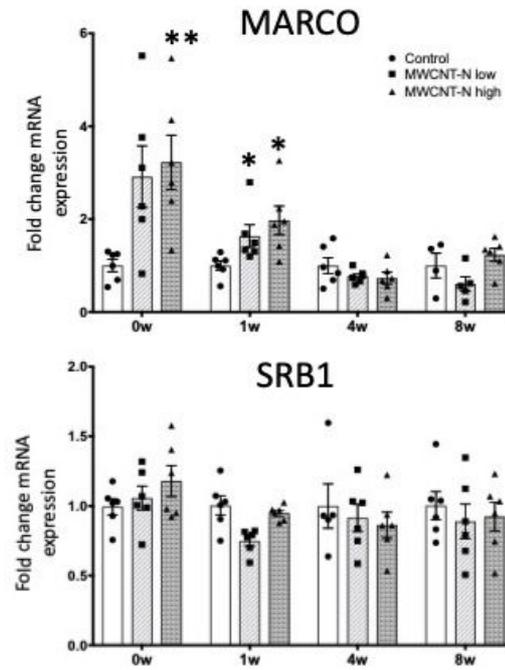
暴露後、0～8週目での肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体（CD36, CD163, CD206）の発現をフローサイトメータにて解析し、それぞれの発現を平均±標準偏差で示す（n=3）。

図 1 3. BALF細胞におけるスカベンジャー受容体



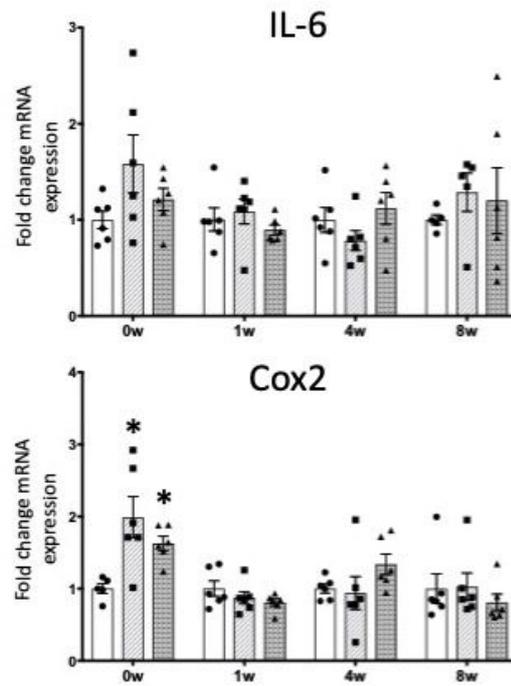
BALF細胞におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。

図 1 4. 肺組織におけるスカベンジャー受容体



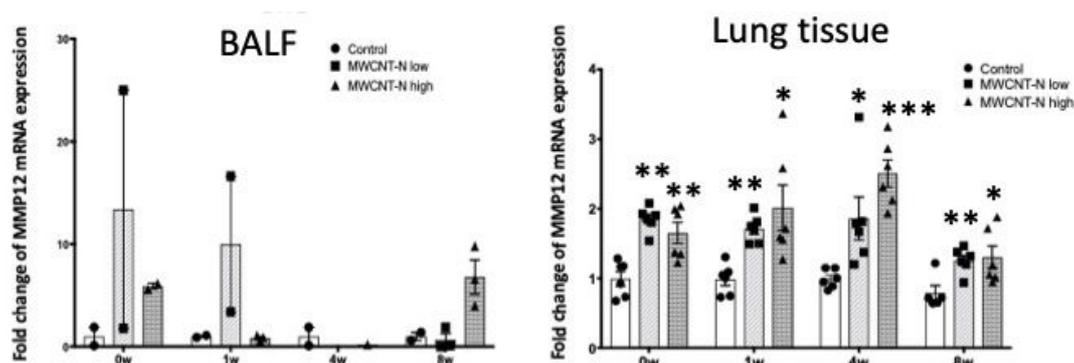
肺組織におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。\*p<0.05, \*\*p<0.005, vs control.

図 1 5 . 肺組織における酸化ストレス関連遺伝子



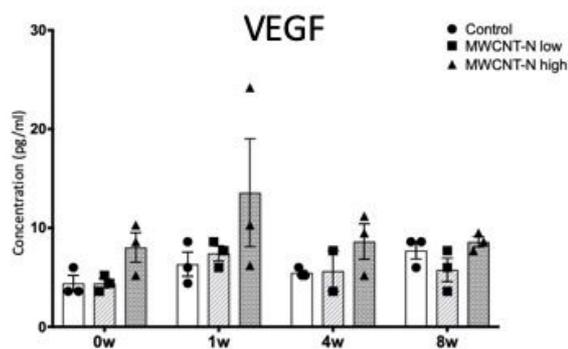
肺組織における酸化ストレス関連遺伝子mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3) 。\*p<0.05, vs control.

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）。