

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

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：新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授

研究協力者：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者：桑形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者：横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

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、ナノマテリアルの長期曝露における免疫制御システムへの影響評価について、*in vivo*での解析を中心に実施した。Taquann処理されたMWCNT-7の長期曝露によって常在型の肺胞マクロファージ（CD11b⁻CD11c⁺）は一定の細胞数を保っているものの、未分化な単球細胞あるいは異常マクロファージ分画が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えられた。また、MWCNT-7の長期曝露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12 mRNA発現が亢進しており、MMP12がナノマテリアルの曝露のマーカーの一つとして重要であることが分かった。また、MWCNT-7の長期曝露によってIL-6などの炎症性サイトカインの発現亢進、VEGFなどの再生性増殖因子の発現上昇、スカベンジャー受容体の発現変化などを介して慢性の炎症が肺組織で持続している可能性が示された。したがって、ナノマテリアルの長期曝露で肺胞マクロファージの分布、分化あるいは機能に持続的な影響が及ぶことが示された。

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。一方で、ナノ

マテリアルの暴露による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。また、一定期間のカーボンナノチューブの暴露後の長期観察により肺の線維化ならびに慢性炎症の持続が確認されているもの、長期間の全身暴露による免疫系システムへの影響を観察した研究はない。本研究では、ナノマテリアルの長期暴露による免疫システムへの影響の評価系を確立することならびにナノマテリアル暴露による詳細な免疫反応に関して、マクロファージに焦点を当てて検討を進めた。

今年度はカーボンナノチューブ (MWCNT-7) 長期暴露による肺の免疫系への影響に関して、暴露6カ月ならびに12カ月後の解析を実施した。

B. 方法

・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-7、三井) を全身吸入暴露装置 (Taquann 直噴全身吸入装置、Ver.3.0、国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、4週毎断続的に暴露後、6ヶ月(7回暴露) 及び12ヶ月(14回暴露) において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国立医薬品食品衛生研究所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-7

国立食品衛生研究所にて Taquann 処理 (53 μ m メッシュ濾過処理) された MWCNT-7 (0, 3.0, 6.0 mg/m³ 6hr/D 4週毎) 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、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の単核球 (BALF 細胞) 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 2 回流し込み、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, MARCO, 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。なお、12 ヶ月暴露群の実験では、BALF 細胞、頸部リンパ節、脾臓を臓器保存液 (MACS Tissue Strage Solution) に冷蔵保存、輸送後 48 時間以内に解析に使用した。

・ 定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNA lysis buffer 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 73 00 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', MARCO; forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3', SRB1; forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3', Cox 2; forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCC TGGT-3', and reverse, 5'-GTTCAGCCTGGCAAGTCTTT -3'; MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTT AGT-3', β -actin; forward, 5'-GTGGGCCGC TCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGG TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

C. 研究結果

Taquann処理されたMWCNT-7の長期暴露における肺組織を中心とした免疫システムへの影響を明らかにするために、図1のような実験プロトコールで解析を進めた。各群6匹とし、その中で3匹よりBALF細胞のフローサイトメータ解析、残り3匹のBALF細胞を遺伝子解析(定量RT-PCR)に使用した。肺組織、リンパ節、脾臓に関しては、6匹全てを用いて解析に使用した(図1)。

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(Alveolar macrophage: AM)、好酸球(Eosinophil: Eo)、単球(Monocyte: Mo)に分類した(図2)。また、F4/80とCD11bをマーカーとした分画も検討した(図2)。

6 ヶ月暴露群の解析

6 ヶ月間のMWCNT-7暴露後の、BALF細胞中の肺胞マクロファージ(AM)、単球(Mo)、好酸球(Eo)の割合をフローサイトメータ解析にて検討した。生細胞の割合はMWCNT-7暴露によって増加していた(図1C)。AMの割合はMWCNT-7暴露によって有意に減少していた(図3A, C)。一方で、単球と好酸球の割合は対照群と比較して、MWCNT-7暴露群で有意に低下していた(図3A, C)。また、MWCNT-7暴露

群でCD11b⁻CD11c⁻の未分化な単球分画が多く含まれていることが明らかになった(図3A)。F4/80とCD11bを肺胞マクロファージマーカーとして検討すると、対照群では90%以上がCD11b⁻であるが、MWCNT-7暴露群では、CD11b⁺になっており、より未分化な単球あるいは異常マクロファージ分画が含まれていることが判明した(図3B,C)。

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とMWCNT-7暴露の関係を検討するために、CD163及びMARCOの細胞表面上の発現をフローサイトメータにて解析すると、MWCNT-7暴露群において、対照群に比較して有意に低下していることが分かった(図4A,B)。

BALF細胞におけるMMP12 mRNA発現をqRT-PCR法にて検討すると、MWCNT-7暴露群では対照群に比較して、有意に増加していた(図5A)。さらに、肺組織でのMMP12 mRNA発現を確認すると、BALF細胞での発現パターンと同様にMWCNT-7暴露群で対照群と比較して有意に増加していた(図5B)。

BALF細胞における酸化ストレス関連遺伝子であるCox2 mRNA、スカベンジャー受容体遺伝子であるSRB1及びMARCO mRNA発現を検討すると、数値にばらつきがあり、有意な変化は認められなかった(図6)。

肺組織における各種遺伝子mRNA発現を検討すると、IL-6 mRNA、SRB1 mRNA、MARCO mRNA発現がMWCNT-7暴露で上

昇することが分かった(図7)。

BALF中のサイトカイン産生について、マルチプレックス法にて検討したところ、検出できた3種のサイトカインの中で、VEGFに関して対照群に比較して高濃度のMWCNT-7暴露群で有意に増加していた(図8)。

MWCNT-7暴露による全身の免疫システムへの影響を確認するために、脾臓および頸部リンパ節について検討すると、脾重量にMWCNT-7暴露の影響はなく、脾臓の細胞数、リンパ節の細胞数も変化は認められなかった(図9)。

さらに、脾臓、リンパ節におけるB細胞、T細胞分画を検討した(図10)。また、T細胞の活性化について、CD4ならびにCD8陽性T細胞におけるCD44あるいはCD62Lの細胞表面の発現を用いて検討した(図10)。脾臓、リンパ節のリンパ球分画(CD45.2⁺)、B細胞分画(CD19⁺)、T細胞分画(CD4⁺ならびにCD8⁺) T細胞の活性化分画(CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ならびにCD8⁺CD44^{high}CD62L⁻)に関して、MWCNT-7の暴露による影響は認められなかった(図11)。

12ヶ月暴露群の解析

BALF細胞の細胞数、細胞の直径を自動細胞計測装置で検討したところ、MWCNT-7の暴露によって対照群と比較して有意に増加していることが分かり(図12A)、細胞の直径は、MWCNT-7の暴露によって対照群と比較して有意に低下し

ていることが明らかになった (図 1 2 B)。

BALF 細胞を用いたフローサイトメータ解析では、MWCNT-7 の暴露によって、対照群に比較して FSC (細胞の大きさ) の蛍光強度がより低い分画に集積していることが明らかとなった (図 1 3 A)。このことは図 1 2 での細胞の直径が MWCNT-7 の暴露によって低下していることと一致している。

CD11b/CD11c 分画の展開では、対照群は大部分が AM 分画であるが、MWCNT-7 の暴露では、AM 分画は極端に減少した (図 1 3 A, C)。Mo 及び Eo は対照群に比較して MWCNT-7 暴露群では有意に増加した (図 1 3 A, C)。6 カ月間の暴露実験でも同様に、MWCNT-7 暴露によって CD11c⁻CD11b⁻ の分画への集積が目立つ (図 1 3 A)。F4/80 及び CD11b をマーカーにすると、MWCNT-7 暴露によって CD11b⁺F4/80⁺ の分画が有意に増加していることが分かる (図 1 3 B, C)。

BALF 細胞数に関して検討すると、BALF 細胞中の生細胞数は MWCNT-7 暴露で有意に増加することが判明した (図 1 4 A)。一方で、AM の割合は MWCNT-7 暴露で極端に低下していたが (図 1 3)、実際の細胞数には変化がなく、Mo の細胞数は MWCNT-7 暴露で有意に増加することが分かった (図 1 4)。また、F4/80⁺ の BALF 細胞数も MWCNT-7 暴露で増加することが明らかになった (図 1 4 B)。

BALF 細胞におけるスカベンジャー受容体の発現についてフローサイトメータ解析にて検討すると、6 カ月暴露実験と同様に、MWCNT-7 暴露によって CD163 の発現が対照群に比較して、有意に低下していた (図 1 5)。

BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、MWCNT-7 暴露で対照群に比較して、有意に上昇していた (図 1 6 A)。また、肺組織における MMP12 mRNA 発現に関しても、MWCNT-7 暴露によって対照群に比較して、有意に増加することが分かった (図 1 6)。

BALF 細胞における各種遺伝子 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、高濃度 MWCNT-7 暴露群で MARCO mRNA 発現が対照群に比較して高くなっており、IL-6 mRNA 発現は低濃度 MWCNT-7 暴露群で上昇していたが統計学的な有意差は見られなかった (図 1 7 A)。また、肺組織における各種遺伝子 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、MARCO および IL-6 mRNA 発現は対照群に比較して有意に高くなっていた (図 1 7 B)。

MWCNT-7 暴露による全身免疫システムへの影響を検討するために、脾臓、頸部リンパ節の細胞数を測定すると、脾細胞およびリンパ節細胞ともに MWCNT-7 暴露によって対照群に比較して、有意な変化は認められなかった (図 1 8)。

D. 考察

今年度の研究では、Taquann 処理された

MWCNT-7 の長期全身暴露による肺胞を中心とした免疫担当細胞の動態を 6 ヶ月間あるいは 12 ヶ月間の曝露群に分けて検討した。6 ヶ月、12 ヶ月曝露の両方で、CD11b/CD11c をマーカーとした肺胞マクロファージの割合は、対照群に比較して極端に減少していた。一方で、12 ヶ月での実際の細胞数を計測したデータからは、曝露によって肺胞マクロファージの細胞数は変化がしないものの、単球の細胞数、CD11b⁻CD11c⁻分画の細胞数が極端に増加していた。このことは

MWCNT-7 の長期暴露によって常在型の肺胞マクロファージ (CD11b⁻CD11c⁺) は一定数を保っているものの、未分化な単球細胞が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えられた。さらに、12 ヶ月曝露群で、MWCNT-7 曝露によって、増加している大多数の単球の大きさが対照群の細胞に比較して有意に小型化していることから、より未分化な単球が MWCNT-7 曝露で増加していることを示唆している。

肺胞マクロファージのスカベンジャー受容体の発現に関しては、6 ヶ月、12 ヶ月で MWCNT-7 曝露によって CD163 の発現低下が見られたことから、ナノマテリアルの長期曝露によって肺胞マクロファージの機能異常が生じていることを示唆している。スカベンジャー受容体遺伝子 mRNA 発現に関しては BALF 細胞全体を用いているので、フローサイトメータ解析のデータとの乖離があった。

以前に実施したカーボンナノチューブの期間限定曝露実験から肺胞マクロファージにおける MMP12 mRNA 発現が重要なマーカーになる可能性が示されていることから (*PLoS One* 13:e0205702, 2018)、今回も BALF 細胞ならびに BALF 細胞採取後の肺組織における MMP12 mRNA 発現を検討したところ、6 ヶ月および 12 ヶ月曝露で MWCNT-7 曝露によって BALF 細胞、肺組織の両方で対照群に比較して有意に MMP12 mRNA 発現が高いことが明らかになった。このことは、以前の結果と同様に MMP12 がカーボンナノチューブ曝露のマーカーの一つとして重要であることを示している。BALF 採取後の肺組織においても MMP12 の発現が高かった点に関しては、肺胞マクロファージが残存している可能性あるいは肺の間質に存在する細胞における発現が考えられる。

MMP12 は Macrophage metalloelastase (MME)あるいは Macrophage elasetase とも言われる MMP ファミリーの酵素である。ヒト肺胞マクロファージからクローニングされ (*J Biol Chem* 268:23824-9, 1993)、胎児発生、生殖、組織再生、血液凝固などの生理的現象や癌の浸潤・転移、COPD、静脈瘤、関節リウマチの病態において重要な役割を果たすことが報告されている (*J Clin Invest* 102:1900-10, 1998, *Am J Pathol* 165:1375-83, 2004, *Arthritis Rheum* 50:3112-7, 2004, *Curr Opin Lipidol* 17:705-7, 2006, *Allergol Int* 60:253-8, 2011)。喫煙による肺胞マクロファージの活性化に伴って、

MMP12の発現が上昇することも明らかにされている (*Am J Respir Crit Care Med* 172:1382-92, 2005)。我々の以前の研究においても、カーボンナノチューブの暴露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12の発現が亢進していることが分かっており (*PLoS One* 13:e0205702, 2018)、今回の研究においてもMWCNT-7の長期暴露によって有意にMMP12の発現が上昇していたので、ナノマテリアルを処理するためにこの酵素の発現が上昇する可能性と慢性炎症に伴う組織修復のために発現が上がっている可能性が考えられた。

BALF細胞あるいは肺組織における酸化ストレス関連遺伝子の発現解析では、6ヶ月、12ヶ月でIL-6 mRNA発現がMWCNT-7暴露で上がっており、ナノマテリアルの長期曝露によって、慢性炎症が持続している可能性が示された。

BALF中の各種サイトカイン産生に関しては、今回の実験では6ヶ月曝露群で、MWCNT-7の高濃度曝露でVEGFの産生が対照群に比較して有意に上昇していた。このことは肺胞での組織修復の機転を示唆している。他のサイトカインに関しては検出限界以下であったことから、今後のBALF採取法など改善の余地がある。

E. 結論

1. MWCNT-7の長期暴露によって常在型の肺胞マクロファージ (CD11b⁺CD11c⁺) は一定数を保っているものの、未分化な単球細胞が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えら

れた。

2. MWCNT-7の長期暴露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12 mRNA発現が亢進しており、MMP12がナノマテリアルの暴露のマーカーの一つとして重要であることが分かった。
3. MWCNT-7の長期暴露によって慢性の炎症が肺組織で持続している可能性が示された。

謝辞：

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、木野倫子氏に深く感謝する。

F.健康危険情報

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 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 ossification 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, 94(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胞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

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

図1 実験プロトコール

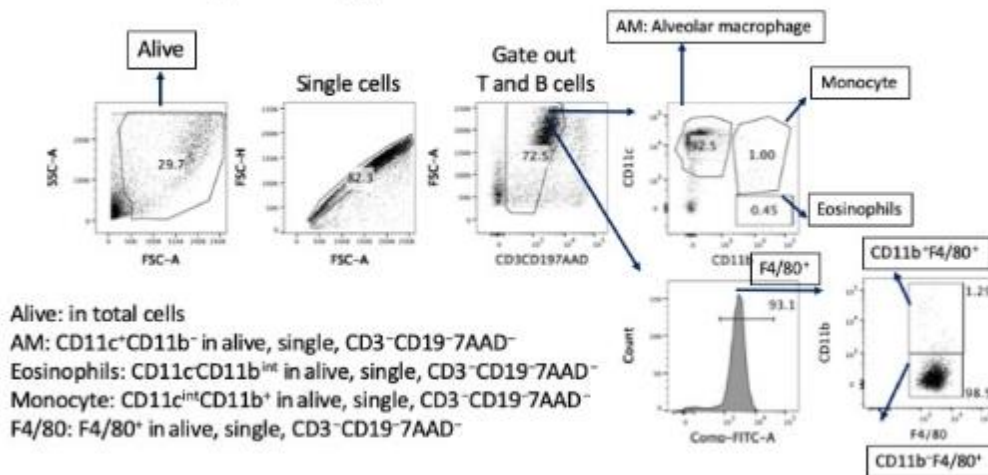
マウス：C57BL/6NcrSLC ♂
 暴露検体：MWNT-7 (Taquann処理/53μmメッシュ濾過)



対照群 (清浄空気)
 T-CNT7 低濃度群 (3 mg/m³)
 T-CNT7 高濃度群 (6 mg/m³)

免疫機能解析 (各群6匹)
 (1) BALF細胞FCM解析
 (2) BALF細胞遺伝子解析 (qRT-PCR)
 (3) BALFサイトカイン (Multiplex)
 (4) 肺組織遺伝子解析 (qRT-PCR)
 (5) 脾臓、リンパ節FCM解析

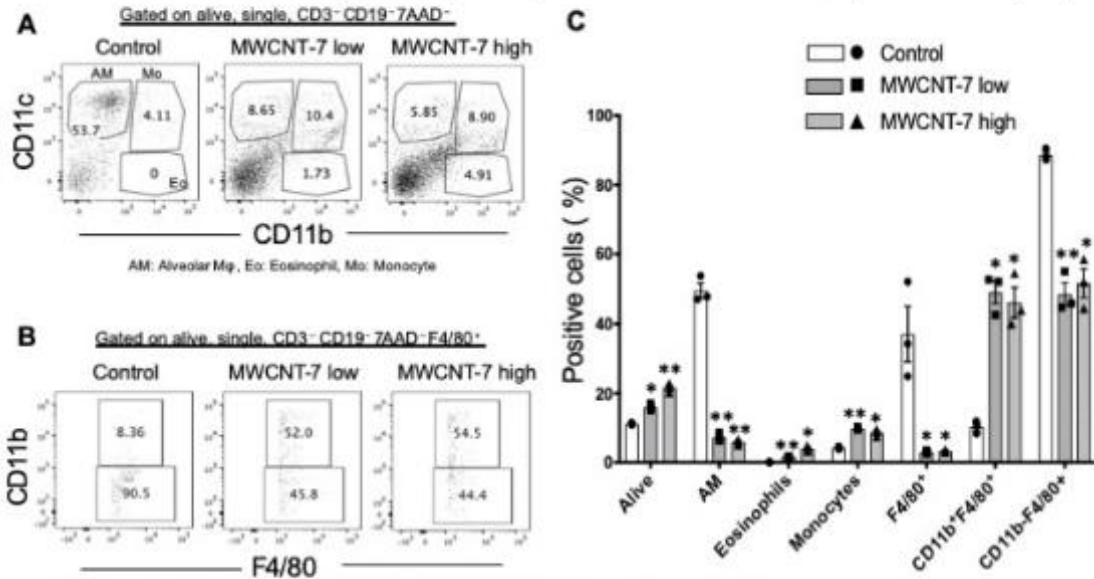
図2 Flow cytometric analysis of BALF cells Gating strategy



(6ヶ月)

図3

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells in MWCNT-7-exposed mice (6M)

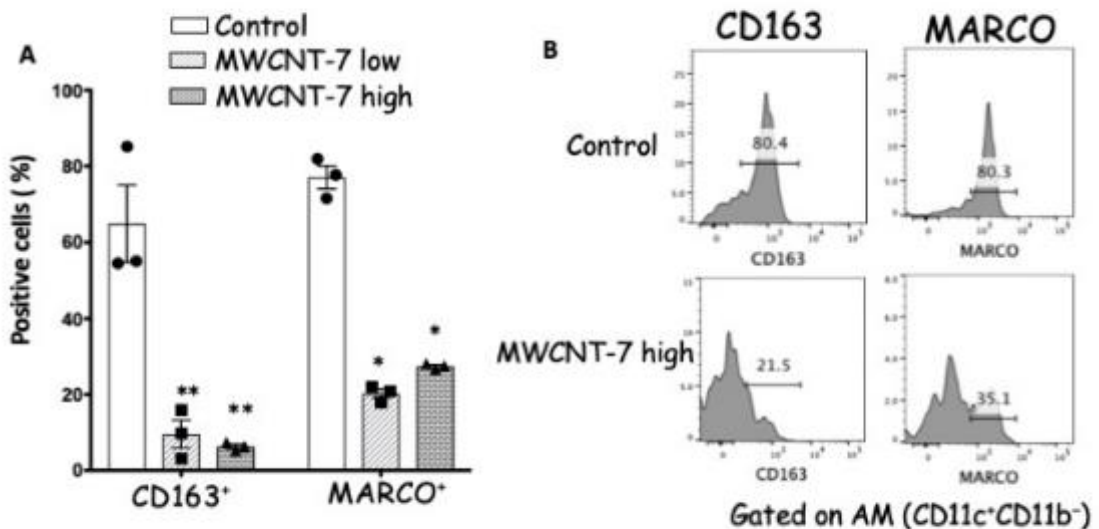


MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスの気管支肺泡洗浄液細胞分画 (フローサイトメータ解析)

A. 肺胞マクロファージ、好酸球および単球分画: MWCNT-7暴露によってAMは有意に減少し、EoおよびMoは有意に増加した。B. 肺胞マクロファージにおけるCD11b発現分画: MWCNT-7暴露によってCD11b⁺F4/80⁺ AMの有意に増加した。C. BALF細胞中の各分画 *p<0.05, **p<0.005 vs control.

(6ヶ月)

図4 Scavenger receptors on alveolar macrophages of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice



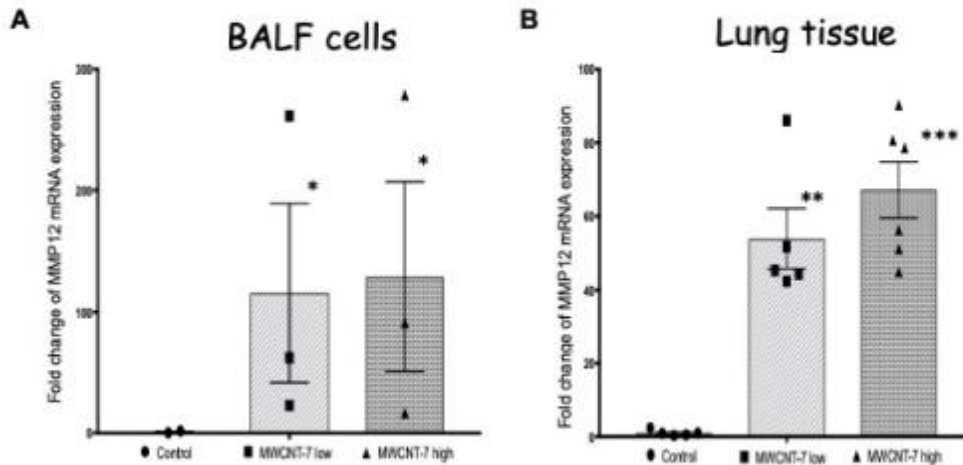
肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現 (フローサイトメータ解析)

MWCNT-7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は抑制される。

CD163: receptor for hemoglobin-haptoglobin complex, MARCO: macrophage receptor with collagenous structure

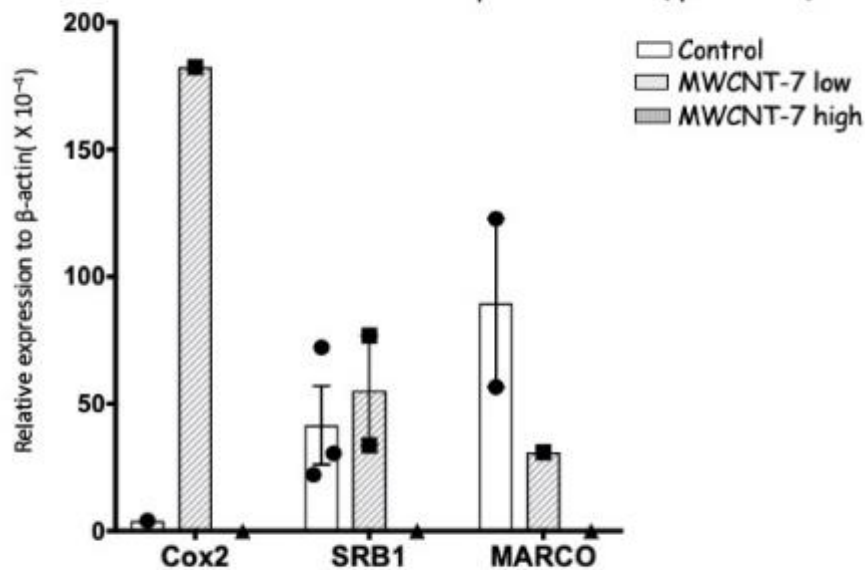
*p<0.05, **p<0.005, vs control

図5 MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice



MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスのBALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現 (Quantitative RT-PCR解析)
A. BALF細胞：MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。B. 肺組織：MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs control.

図6 Cox2, SRB1 and MARCO mRNA expressions of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice (qRT-PCR)^(6ヶ月)



酸化ストレスおよびスカベンジャー受容体遺伝子mRNA発現 (q-RT-PCR法)
Cox2 遺伝子は低濃度暴露で増加していた。スカベンジャー遺伝子のmRNA発現は低下。
高濃度暴露では検出以下であった。

図7 IL-6, Cox2, SRB1 and MARCO mRNA expression of lung (6ヶ月)
tissues in MWCNT-7-exposed mice (qRT-PCR)

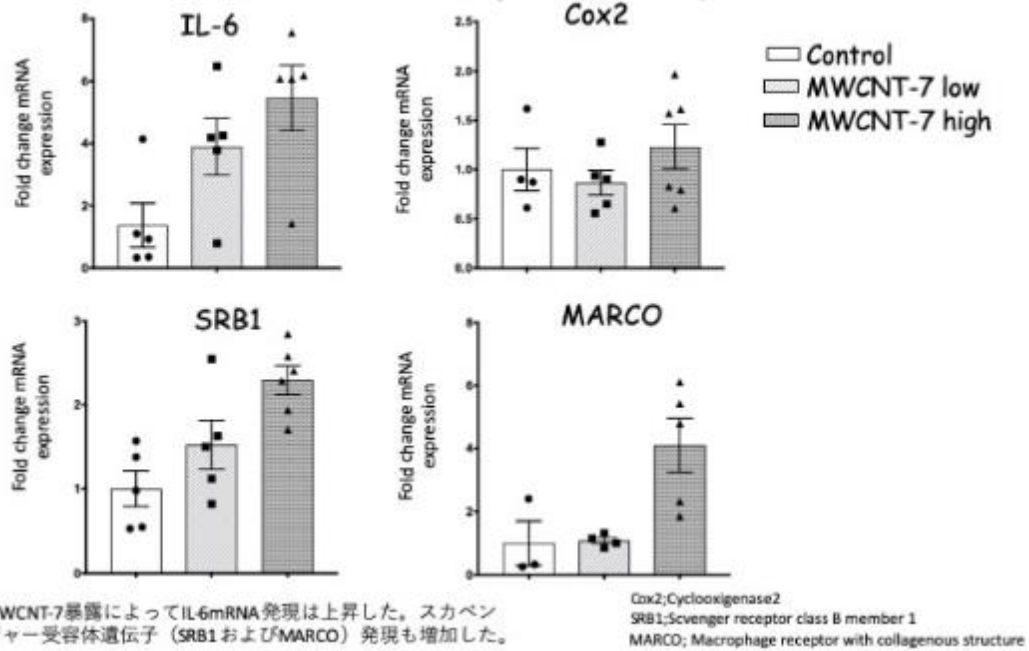
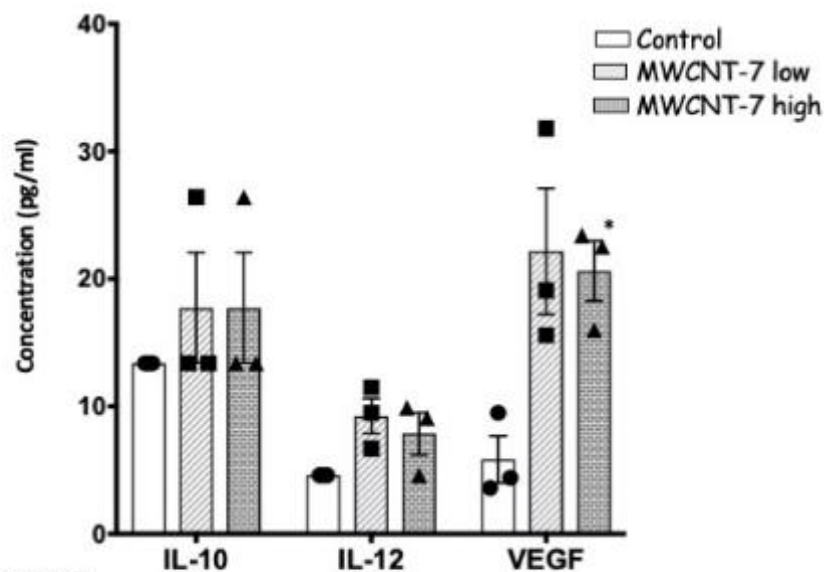


図8

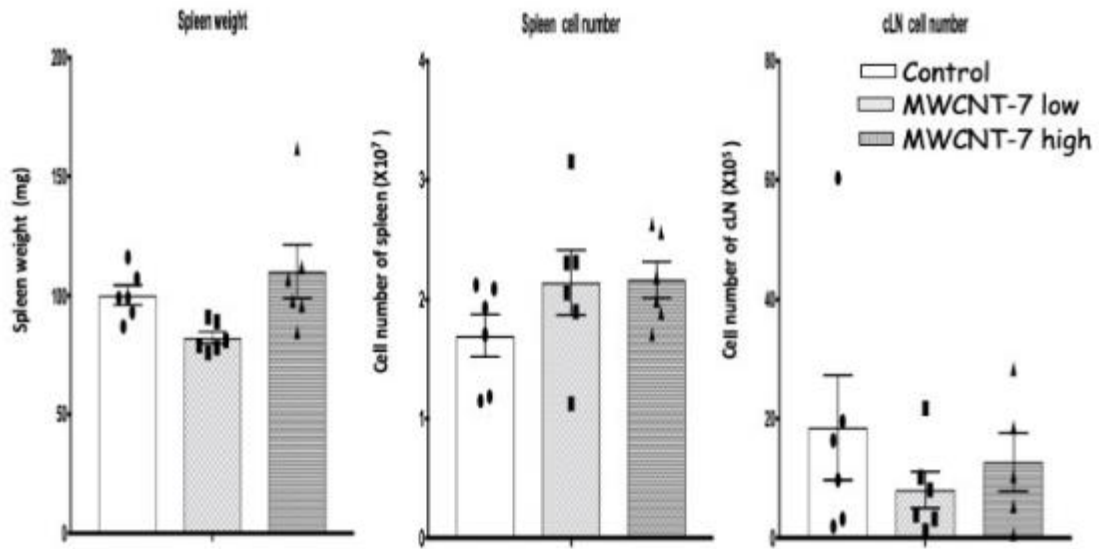
Cytokines in BALF of MWCNT-7-exposed mice (6ヶ月)



BALF中のサイトカイン定量
BALF中の各種サイトカイン (24種類) を Multiplex解析にて濃度を定量化すると、3種類のサイトカインが検出可能でVEGFはMWCNT-7暴露により増加していた。* $p < 0.05$, vs control

(6ヶ月)

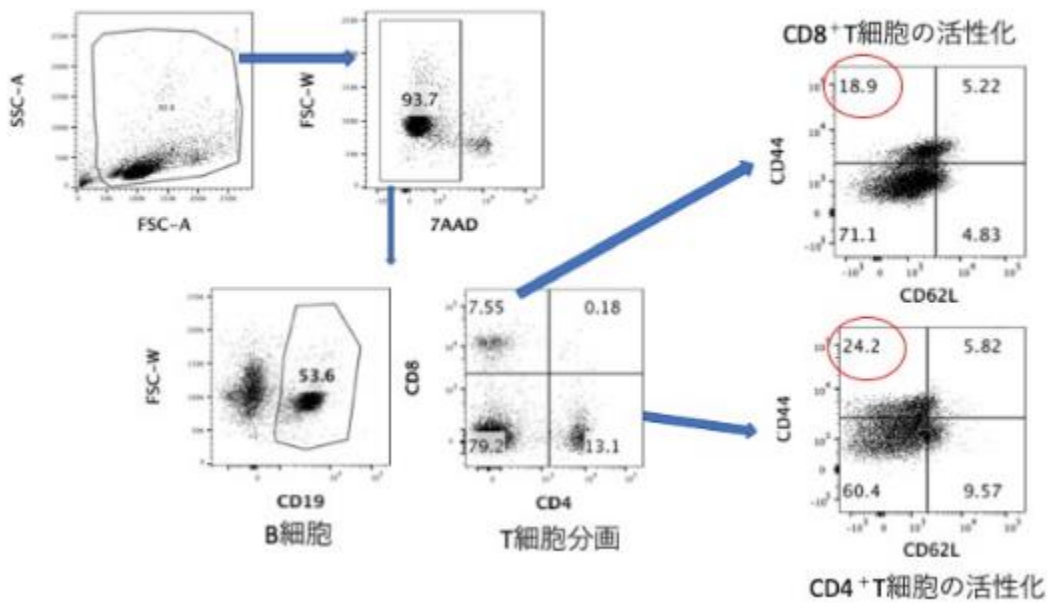
図9 Effect of MWCNT-7 exposure on systemic immune system



脾重量、脾細胞数、頸部リンパ節細胞数ともに、MWCNT-7の暴露で影響は見られない。

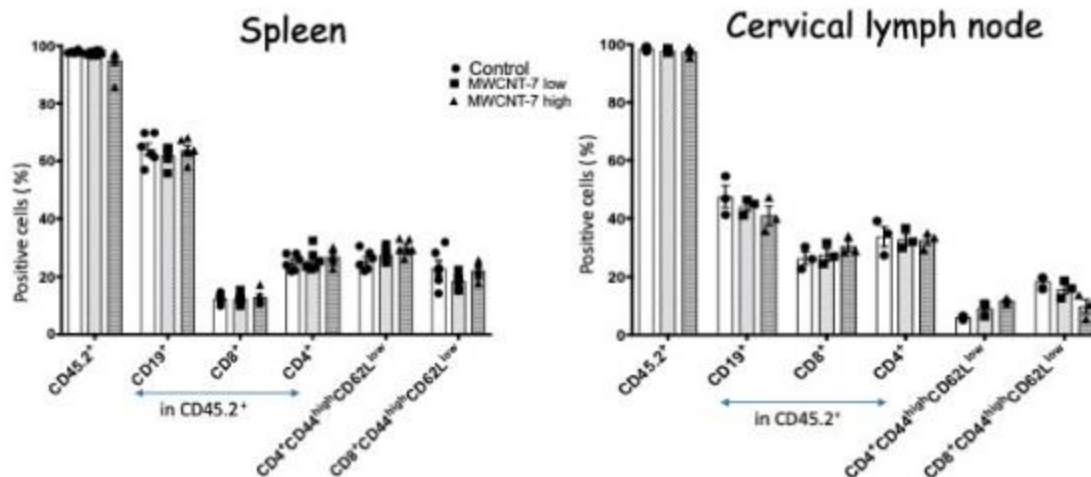
(6ヶ月)

図10 Gating strategy of lymphocytes in spleen and cervical lymph nodes



(6ヶ月)

図11 Effect of MWCNT-7 exposure on T and B cell populations

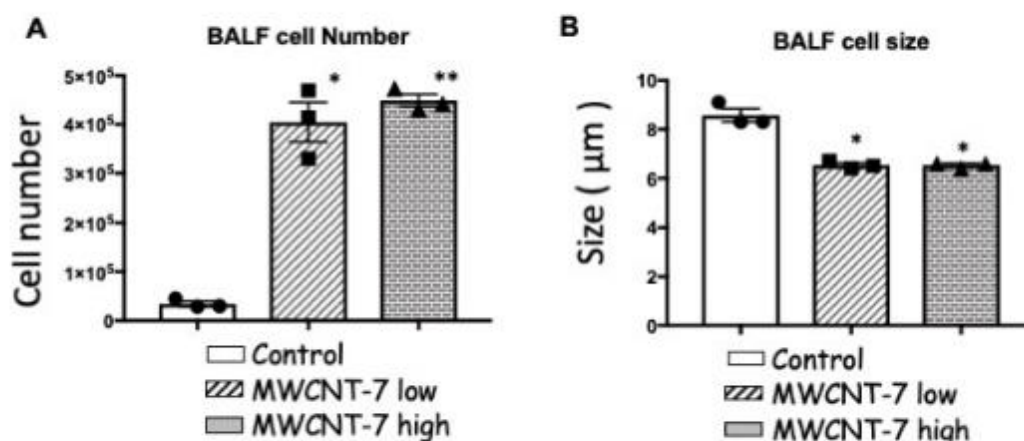


脾臓、頸部リンパ節におけるB細胞およびT細胞分画（フローサイトメータ解析）
MWCNT-7の全身暴露によってT細胞およびB細胞への影響は認められない。
データ = 平均 ± 標準偏差

(12ヶ月)

図12

Effect of MWCNT-7 administration on cell number and size of BALF cells (12m)

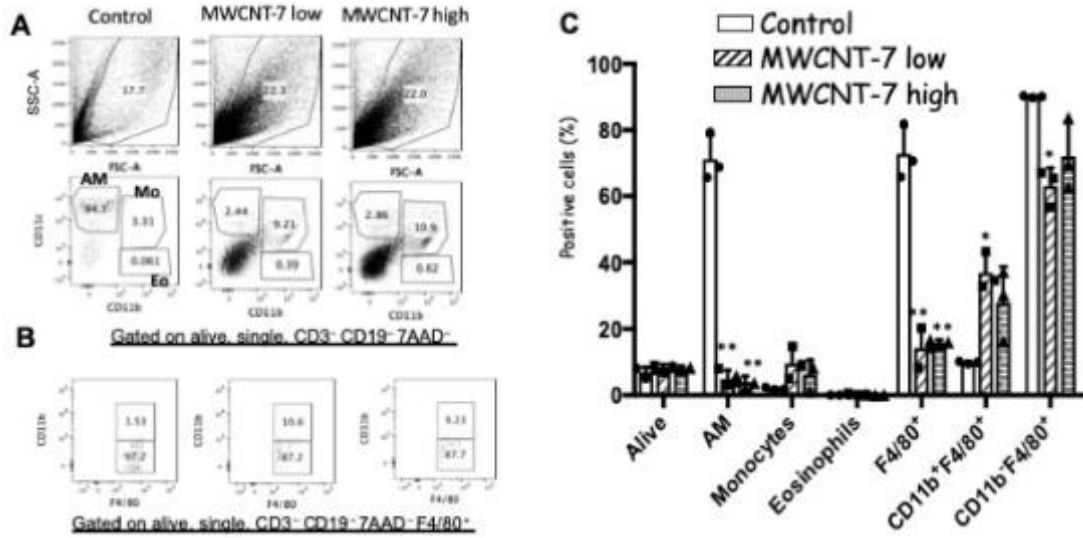


- A. BALF採取後 (1.5mL) の細胞数をカウントした。MWCNT-7暴露でBALF細胞は増加した。データ = 平均 ± 標準偏差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$, vs control
- B. BALF細胞の直径を自動細胞計測装置にて計測した。MWCNT-7暴露でBALF細胞の大きさは小型化した。データ = 平均 ± 標準偏差 * $p < 0.05$, vs control

(12ヶ月)

図 13

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells in MWCNT-7-exposed mice (12m)



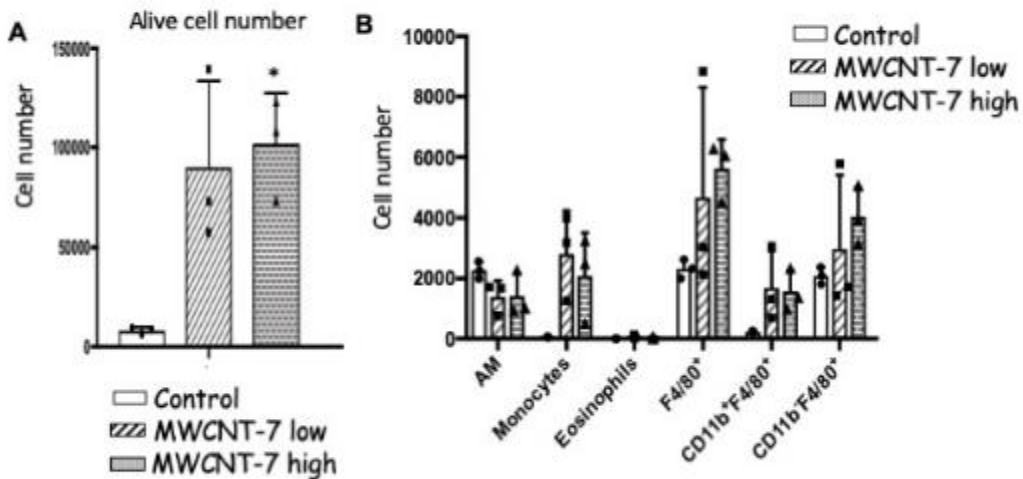
MWCNT-7暴露後12ヶ月でのマウスの気管支肺胞洗浄液細胞分画 (フローサイトメータ解析)

A. 肺胞マクロファージ、好酸球および単球分画: MWCNT-7暴露によってAMは有意に減少し、Moは有意に増加した。B. 肺胞マクロファージにおけるCD11b発現分画: MWCNT-7暴露によってCD11b⁺F4/80⁺ AMの有意に増加した。C. BALF細胞中の各分画 *p<0.05, **p<0.01 vs control.

(12ヶ月)

図 14

Effect of MWCNT-7 exposure on cell numbers of BALF cell subsets (12m)



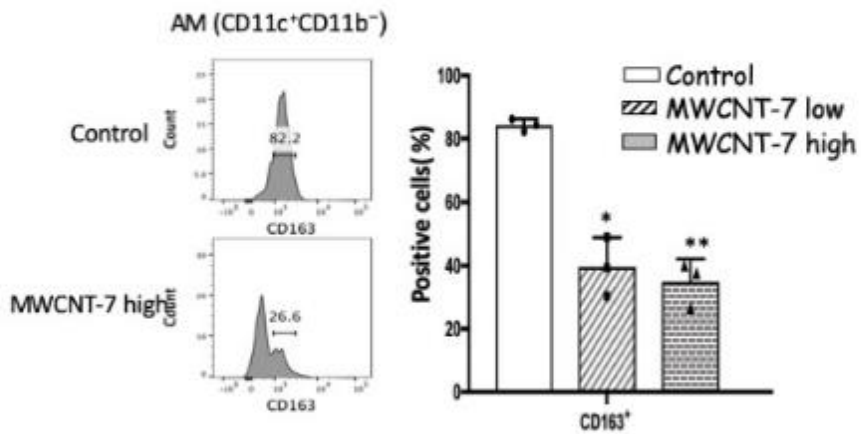
BALF細胞数

A. BALF細胞 (1.5 mL中) の生細胞数 細胞数 = 平均 ± 標準偏差 *p<0.05, vs control

B. BALF細胞中の単球およびマクロファージ分画細胞数 細胞数 = 平均 ± 標準偏差

図15

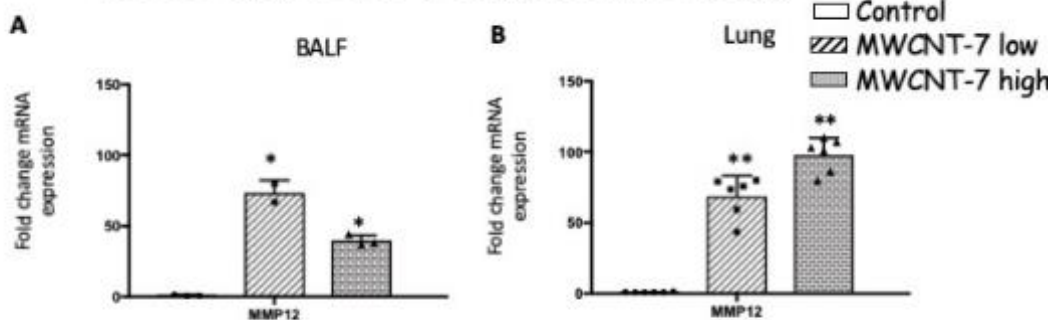
Scavenger receptor CD163 on alveolar macrophages in MWCNT-7-exposure mice (12m)



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 (フローサイトメータ解析)
 MWCNT-7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は抑制される。
 CD163: receptor for hemoglobin-haptoglobin complex
 *p<0.05, **p<0.01, vs control

図16

MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice (12m)

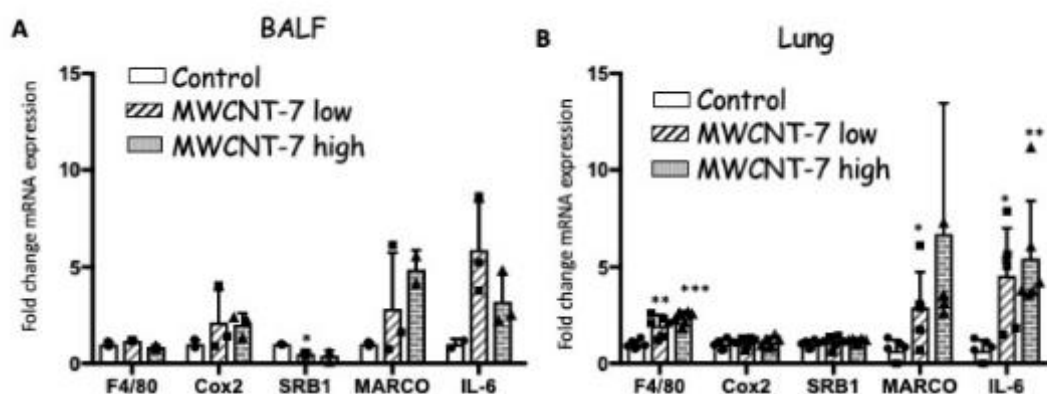


MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスのBALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現 (Quantitative RT-PCR解析)
 A. BALF細胞: MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。B. 肺組織: MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。 *p<0.01, **p<0.0001, vs control.

(12ヶ月)

図 17

F4/80, Cox2, SRB1, MARCO and IL-6 expressions of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice (12m)



各種遺伝子mRNA発現 (Q-RT-PCR法)

A. BALF細胞、B.肺組織

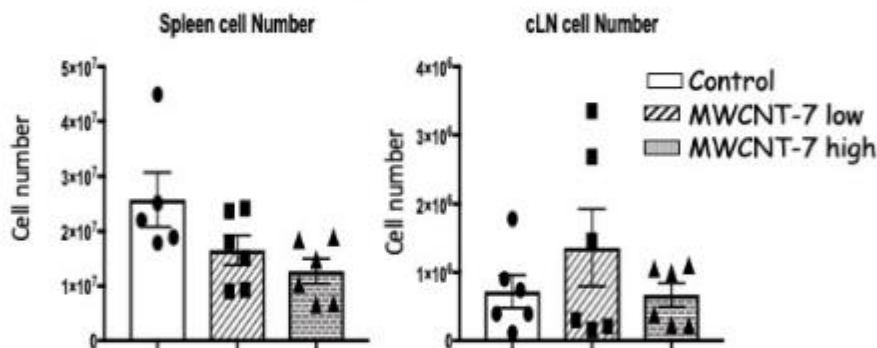
MWCNT-7暴露によってIL-6mRNA発現は上昇した。MARCO発現も増加した。

データ = 平均値 ± 標準偏差 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001

(12ヶ月)

図 18

Number of spleen and cervical lymph node cells in MWCNT-7-exposure mice (12m)



脾臓および頸部リンパ節の細胞数

脾細胞数、頸部リンパ節細胞数ともに、MWCNT-7の暴露で影響は見られない。

データ = 平均値 ± 標準偏差