

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による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に関する研究

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
	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所
	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所
	栞形 麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所

### 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（24ヶ月）における免疫制御システムへの影響評価について、*in vivo*での解析を実施した。さらに、*in vitro*でのRAW264.7細胞およびNIH3T3細胞を用いた実験系ならびにNF- $\kappa$ B1遺伝子欠損マウスを用いたMWCNT-7による慢性腹膜炎モデルを用いた*in vivo*の実験を実施した。Taquan処理されたMWCNT-7の長期曝露によってBALF細胞数あるいはAM分画が増加する可能性が示された。加えて、MWCNT-7の長期曝露によって全身のマクロファージの分化に影響を受ける可能性が示された。一方で、MWCNT-7の直接の刺激に対してマクロファージからのMMP-12を介した線維芽細胞の活性化機構が存在し、マクロファージのNF- $\kappa$ Bを介した活性化とMMP-12による線維化の制御機序が明らかになった。

## A. 研究目的

ナノマテリアルの暴露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸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暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。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、暴露から24ヶ月後の解析を実施した。

## B. 方法

### ・マウス

12週齢のC57BL/6 (B6) (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 (24ヶ月間) において適切に屠殺後解析を行った。また、MWCNT-7の腹腔内投与に関しては、B6マウス、WTマウスあるいはNF- $\kappa$ B1 遺伝子欠損 (KO) (Jackson Lab) 雄マウス (8週齢) に 100  $\mu$ L の生理食塩水に懸濁した MWCNT-7 (1 または 10  $\mu$ g/マウス) を腹腔内投与した。腹腔内投与 8ヶ月～10ヶ月後に適切に解析を実施した。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として国立医薬品食品衛生研究所ならびに徳島大学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  $\mu$ m メッシュ濾過処理) された MWCNT-7 (0, 3.0, 6.0 mg/m<sup>3</sup> 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。腹腔内投与実験にも Taquann 処理された MWCNT-7 (PEG 懸濁) を十分に分散、攪拌した後に、19ゲージ針/1mL 注射器 (テルモ) を用いて腹腔内投与を実施

した。

・フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄液 (BALF) 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、遠心し、組織保存液 (MACS<sup>®</sup> Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec) に浸漬した。また、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。その後、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。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PerCP-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7, APC-Alexa Fluor 700) された各種表面マーカー CD3, CD19, CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD54, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色ならびに 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 処理、0.9%-formalin-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。頸部リンパ節に関しても、染色後固定した (未解析)。

。

・PEC 採取および病理組織解析

MWCNT-7 の腹腔内投与実験において、1 mL の PBS を腹腔内に注射し、洗浄液を回収後、遠心分離により PEC を

採取し、遺伝子解析に用いた。腹腔内の臓器、横隔膜、後腹膜を採取後、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィンブロックの作成、スライド標本作成を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいはアザン染色を実施した。アザン染色標本を用いて、肝組織の被膜の線維化を Adobe Photoshop Element 2020 による解析を行なった。肝臓被膜の 10 定点における線維領域長を測定することによって線維化の程度を評価した。

・培養細胞を用いた実験

マウス単球細胞株 RAW264.7、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 を培養系に用いた。培養系で Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT) を 0~125 ng/ml の濃度で刺激した。細胞数、細胞の大きさ、MMP-12 mRNA の発現、線維芽細胞関連因子の mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した。

・定量化 RT-PCR 法

培養細胞あるいは PEC の、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。

MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',  
reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',  
TGF-β1: forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', and  
reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGGTCAG-3';

Col1A2: forward, 5'-CCAAGGGTAACAGTGGTGAA-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3';  
 Col3A: forward, 5'-AACGGAGCTCCTGGCCCCAT-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3';  
 Col IV: forward, 5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3' and reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3';  
 mSMA-F: GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA  
 mSMA-R: ACTGGGACGACATGGAAAAG  
 β-actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。  
 なお、BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した(未解析)。

### C. 研究結果

#### MWCNT-7の吸入暴露実験

Taquann処理したMWCNT-7の24ヶ月の吸入暴露(図1)による肺の免疫系を探索するために肺胞洗浄液(BALF)中の細胞(BALF細胞)数を検討したところ、低濃度及び高濃度暴露群ともに対照群に比較して有意に細胞数が増加していることが判明し、濃度依存的な増加が認められた(図2A)。また、BALF細胞の直径を細胞自動計測器で計測すると、対照群の細胞の直径に比較して、低濃度ならびに高濃度のMWCNT-7の曝露によって有意に小さくなっていた(図2B)。

続いて、各種標識抗体を用いてフロー

サイトメータによってBALF細胞の表面マーカーの解析を実施した。図3のようなフローサイトメータによるGating strategyにて各細胞分画の検討を進めた。BALF細胞中の血球系細胞(CD45.2<sup>+</sup>)の割合は、高濃度のMWCNT-7曝露で対照群に比較して有意に上昇していた(図4A)。BALF細胞中の肺胞マクロファージ(AM: alveolar macrophage)、単球(Mo: monocyte)、好酸球(Eo: eosinophil)の分画に関しては、高濃度MEWCNT-7曝露群で対照群に比較して、有意に増加していた(図4B)。Moに関してはMWCNT-7の曝露で変化は見られなかった(図4B)。Eoに関しては、高濃度のMWCNT-7曝露にて対照群よりも有意に低下していた(図4B)。F4/80<sup>+</sup>のAMの割合に関しても、高濃度MEWCNT-7曝露群で有意に増加していた(図4B)。また、CD11b+AMに関しても、高濃度MEWCNT-7曝露群で有意に増加していた(図4C)。

F4/80<sup>+</sup>AMにおけるM1/M2マクロファージ分化を検討するためにM1マクロファージマーカーの一つであるCD192、M2マクロファージのマーカーであるCD206を用いて、フローサイトメータにて各分画を解析したところ(図5A)、MWCNT-7の吸入暴露による変化は観察されなかった(図5B, C)。また、F4/80<sup>+</sup>AMにおけるCD54(ICAM-1)ならびにCD163(Scavengdr receptor)の発現について検討したところ、MWCNT-7の吸入暴露による影響は確認できなかった。

た (図 5 D)。

MWCNT-7の吸入暴露による全身的な免疫系への影響を検討するために、脾臓における免疫担当細胞分画をフローサイトメータにて解析したところ (図 6 A)、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ならびにCD19<sup>+</sup>B細胞の分画に各群で影響は認められなかった (図 6 B)。さらに、T細胞の活性化マーカーであるCD44/CD62Lを用いて、ナイーブT細胞 (CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>)、エフェクターT細胞 (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup>)、セントラルメモリーT細胞 (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup>) 分画について検討すると、各群で有意な差は観察されなかった (図 6 C)。

さらに、頸部リンパ節におけるCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞およびCD19<sup>+</sup>B細胞の割合に関しても、MWCNT-7の吸入暴露による変化は観察されなかった (図 7 A)。T細胞分画に関しても各群で有意な差は生じていなかった (図 7 B)。

脾臓と頸部リンパ節におけるマクロファージ分画についてフローサイトメータで解析を進めると (図8A)、脾臓ではF4/80+マクロファージの割合に各群で変化は観察されなかったが、CD192+M1型マクロファージの割合がMWCNT-7の吸入暴露 (低濃度群、高濃度群) によって、有意に低下することが明らかになり、CD206<sup>+</sup>M2型マクロファージには影響は見られなかった (図 8 B)。頸部リンパ節では、高濃度MWCNT-7暴露によってF4/80+マクロファージ分画が有意に増

加するとともに、CD206+M2型マクロファージ分画がMWCNT-7暴露によって、対照群に比較した有意に減少することが判明した (図 8 C)。

#### MMP-12を介した慢性炎症

R1年度までの研究 (R1年度本報告書) ならびに以前のMWCNT-7の吸入実験研究 (今井田班ならびに相磯班研究、PLoS One 2018) において、AMにおけるMMP-12を介した慢性炎症および線維化の役割が明らかになっていることから、*in vitro*において、マウスマクロファージ細胞株であるRAW267.4細胞にTaquann処理MWCNT-7を添加することによってMMP-12 mRNA発現が上昇するかどうかについて検討すると、MWCNT-7添加後 2 4 時間でのMMP-12 mRNA発現が有意に上昇することを定量RT-PCR法にて確認された (図 9 A)。また、MWCNT-7を処理されたRAW267.4細胞の培養上清を線維芽細胞株であるNIH-3T3細胞の増殖を上昇させることが分かり、線維化に関わる遺伝子群のmRNA発現を有意に上げることも明らかになった (図 9 B, C)。さらに、RAW267.4細胞におけるMMP-12 mRNA発現がNF-κBシグナルを介しているかどうかを確認するために、NF-κB阻害剤を用いると、MWCNT-7によるMMP-12 mRNA発現は有意に抑制されることが明らかになった (図 9 D)。

MWCNT-7 暴露による線維化はMWCNT-7の腹腔内投与後8ヶ月以降に観察されることが報告 (R25年度本事業

今井田班報告書) されていることから、MWCNT-7による慢性炎症ならびに線維化がマクロファージのNF- $\kappa$ B-MMP-12基軸を介している反応であるのか否かを*in vivo*で検討するために、NF- $\kappa$ B1遺伝子欠損(NF- $\kappa$ B1KO)マウスにMWCNT-7を腹腔内投与し、8ヶ月後に病理組織学的解析ならびに腹腔マクロファージのMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法による解析を加えた。WTマウスにMWCNT-7を腹腔投与すると肝表面など腹腔内に線維化を伴う慢性腹膜炎が誘導できる(図10A)。NF- $\kappa$ B1KOマウスへのMWCNT-7投与では、対照群(WT)に比較して、組織学的(アザン染色)に線維化の程度が有意に低下していることが判明した(図10B)。さらに、WTへのMWCNT-7の腹腔内暴露によって腹腔マクロファージを含む腹腔滲出細胞(PEC)におけるMMP-12 mRNA発現は有意に上昇するのに対して、NF- $\kappa$ B1KOマウスではMMP-12 mRNA発現は有意に抑制されていることが明らかになった(図10C)。

#### D. 考察

MWCNT-7の長期吸入暴露実験(24ヶ月)において、BALF細胞の細胞数が増加し、細胞直径は低下していた。このことは、12ヶ月間の暴露実験と同様の結果であった(R1本事業報告書)。一方で、12ヶ月暴露時点ではAM分画は対照群よりも少なくなっていたが、24ヶ月暴露

ではAM分画の割合は高濃度吸入群で対照群よりも高い値を示していた。このことは対照群のAM分画の加齢的变化ならびに高濃度MWCNT-7暴露によるAMへの影響が考えられた。しかし、M1/M2分化、CD54ならびにCD163を指標にした活性化に関しては、MWCNT-7暴露による影響は確認できなかった。全身の免疫系への影響として、T細胞ならびにB細胞の分画への影響は認められなかったが、脾臓のM1マクロファージへの分化抑制及び頸部リンパ節でのM2マクロファージへの分化抑制が確認された。12ヶ月暴露では見られなかったナノマテリアルの長期暴露の影響は、24ヶ月暴露によって現れた。BALF細胞の各種遺伝子発現に関しては未解析であり、今後検討する予定である。

今年度はナノマテリアルの免疫システムへの慢性影響を検討する目的で、細胞株を用いた*in vitro*の実験系および免疫システムへの影響の分子機構を明らかにする*in vivo*の実験系を立ち上げた。以前にMWCNT-7の吸入暴露後の長期観察で、肺マクロファージにおけるMMP-12の重要性が明らかにされた(PLoS One 2018)。MWCNT-7のマクロファージへの直接の影響を探るために、RAW264.7細胞を用いて検討したところ、MMP-12 mRNA発現が上昇し、その培養上清によってNIH3T3細胞における線維化が促進されたことから、*in vivo*で確認されているMWCNT-7と線維化の関係

を *in vitro* で再現できる実験系であると  
考えられる。また、MWCNT-7 誘導性の  
線維化を伴った慢性腹膜炎は、ナノマ  
テリアル毒性における発癌機構を探る研  
究過程で明らかにされてきた。今回は、  
*in vitro* で観察された NF- $\kappa$ B-MMP-12 を  
介したマクロファージの線維化誘導能  
を NF- $\kappa$ B1KO マウスを用いて明らかに  
することが可能となった。これまで、ナ  
ノマテリアルに対してマクロファージ  
の貪食、活性化、細胞死に関して多くの  
報告や議論がなされてきた。一方で、慢  
性炎症あるいは慢性毒性の観点から病  
理的なアプローチができない状況で  
あった。本研究では *in vitro* と *in vivo* の  
実験系を効率的に組み合わせてナノマ  
テリアルに対する免疫制御機構を明ら  
かにできる可能性が示された。

## E. 結論

1. MWCNT-7の24ヶ月の長期暴露によっ  
てBALF細胞数あるいはAM分画が増  
加する可能性が示された。
2. MWCNT-7の長期暴露によって全身の  
マクロファージの分化に影響を受け  
る可能性が示された。
3. 細胞株を用いた検討で、MWCNT-7の  
直接の刺激に対してマクロファージ  
からのMMP-12を介した線維芽細胞  
の活性化機構の存在が示された。
4. MWCNT-7による線維化を伴う慢性炎  
症にはマクロファージのNF- $\kappa$ Bを介  
した活性化とMMP-12による線維化

の制御機構が明らかにされた。

5.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Sato M, Arakaki R, Tawara H,  
Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation  
of Autoimmune Lesions is Independent  
of Antibiotic Treatment in NOD mice.  
Int J Mol Sci, 2021, 22,3239. doi:  
10.3390/ijms22063239.
2. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A,  
Fujimori S, Ushio A, Yamashita F,  
Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M,  
Awasthi P, Takada T, Takahama Y.  
Thymoproteasome hardwires TCR  
repertoire of CD8+ T cells with cortical  
positive selection independent of  
negative selection. J Exp Med. 2021,  
218(4):e20201904. doi:  
10.1084/jem.20201904.
3. Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M,  
Arakakai R, Ishimaru N, Matsushita K.  
Chemokines upregulated in epithelial  
cells control senescence-associated T  
cell accumulation in salivary glands of  
aged and Sjögren's syndrome model  
mice. Int J Mol Sci. 2021, 22:2302. doi:  
10.3390/ijms22052302.
4. Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai  
H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama

- K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit. J Cell Sci. 2020, 133(18): jcs251314. doi: 10.1242/jcs.251314.
5. Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. Oral Dis. 2020, doi: 10.1111/odi.13351.
6. 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学 改訂第 7 版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
7. 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71(5): 476-747, 2020 ISSN 0370-9531

#### 学会発表

1. 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾 綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
2. 石丸直澄 口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第 109 回日本病理学会総会シンポジウム 2020.7.1-31 (ウェブ)
3. 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群の標的臓器における IL-33 の役割 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第 109 回日本病理学会総会 口演 2020.7.1-31 (ウェブ)
5. 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、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における肺病変の解析 ポスター発表 第 62 回歯科基礎医学会学会学術大会 2020.9.11-10.9 (ウェブ)
6. 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第 62 回歯科基礎医学会学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」2020.9.11-10.9 (ウェブ)
7. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究所周ウェブ講演会 2021.1.28 (ウェブ)

#### 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

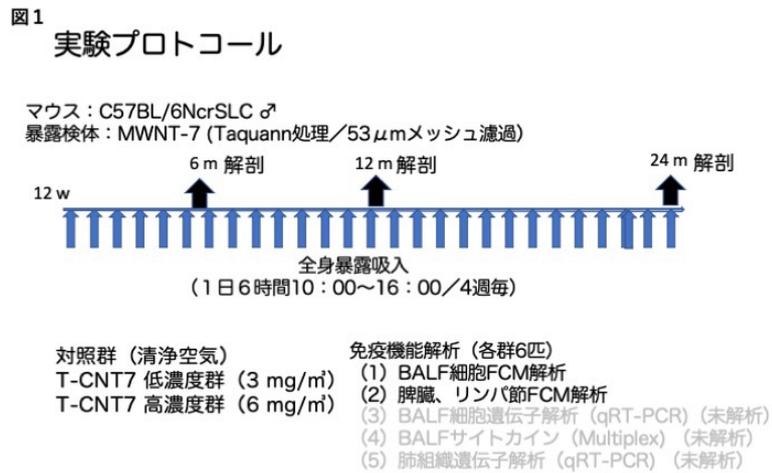


図1 MWCNT-7の長期吸入暴露(24ヶ月)実験  
4週毎にTaquann処理したMWCNT-7を全身吸入装置にて暴露した。BALF細胞及び脾臓、頸部リンパ節細胞を用いたフローサイトメータ(FCM)解析を実施した。その他の解析は現在進めている。

図 2

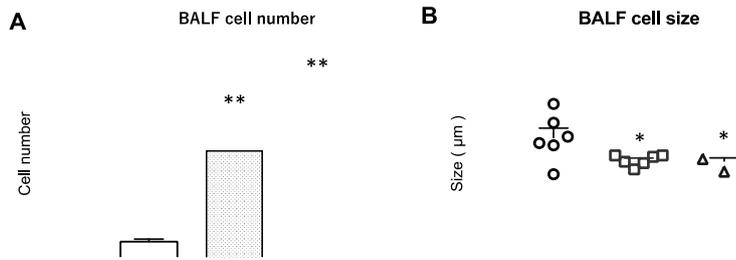


図 2 MWCNT-7の長期吸入暴露（24ヶ月）によるBALF細胞の変化  
A: BALF細胞の生細胞数を計測した。結果(number)=平均値±SD (n=6/group)  
B: BALF細胞の直径。結果(μm)=平均値±SD (n=6/group) \*p < 0.05, \*\*p < 0.0001

図 3

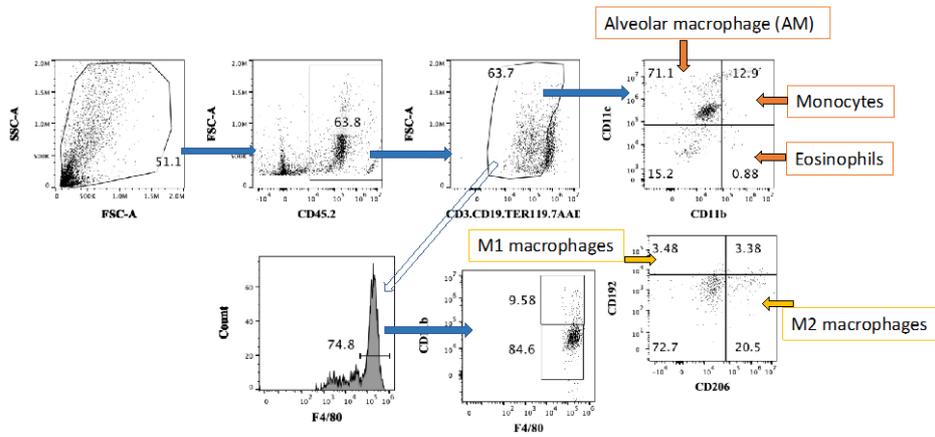


図 3 BALF細胞を用いたGating strategy

採取されたBALF細胞を用いて、各種標識抗体による反応、洗浄、固定後にフローサイトメータによる解析を実施した。SSC/FSC分画にてdebrisなどを除去し、CD45.2陽性血球細胞分画におけるCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>でゲートをかかけた後に、CD11c/CD11bで展開してAM、Mo、Eo分画とした。さらに、AM分画をCD192 (M1マクロファージ)、CD206 (M2マクロファージ)を検出した。一方で、F4/80ならびにCD11bを用いたAM分画を確認した。

図 4

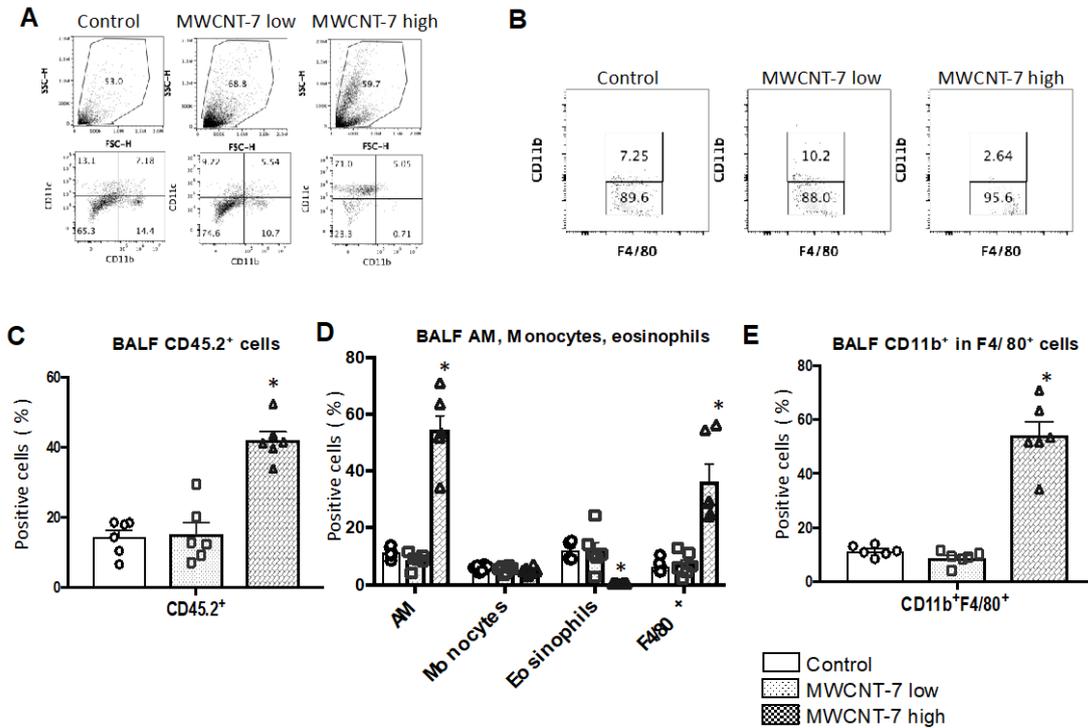


図 4 MWCNT-7長期吸入暴に夜BALF細胞における免疫細胞分画

A : BALF細胞における各種免疫細胞分画 SSC/FSC分画およびCD11b/CD11c分画

B : BALF細胞中のAM分画 (F4/80/CD11b)

C : BALF細胞中も血球系細胞分画 (CD45.2<sup>+</sup>)

D : BALF細胞中のAM、Mo、EoおよびF4/80<sup>+</sup>AM分画

E : BALF細胞中のCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>AM分画

結果 (%) = 平均値 ± SD (n=6/group)、\*p < 0.0001

図 5

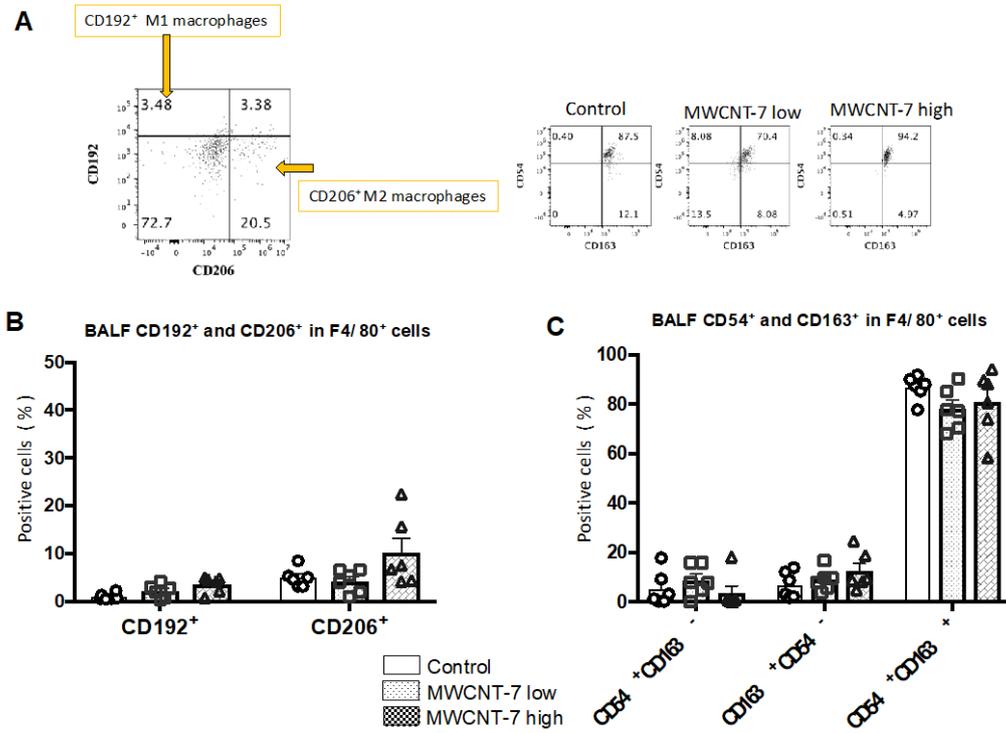


図5 MWCNT-7長期吸入暴露によるAMにおけるM1/M2分化およびCD54/CD163発現  
 A: BALF細胞を用いたF4/80<sup>+</sup>AMにおけるCD192/CD206分画およびCD54/CD163分画  
 B: AMのM1/M2分化 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 /group)  
 C: AMにおけるCD54<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup>、CD54<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup>およびCD54<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>分画  
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 /group)

図 6

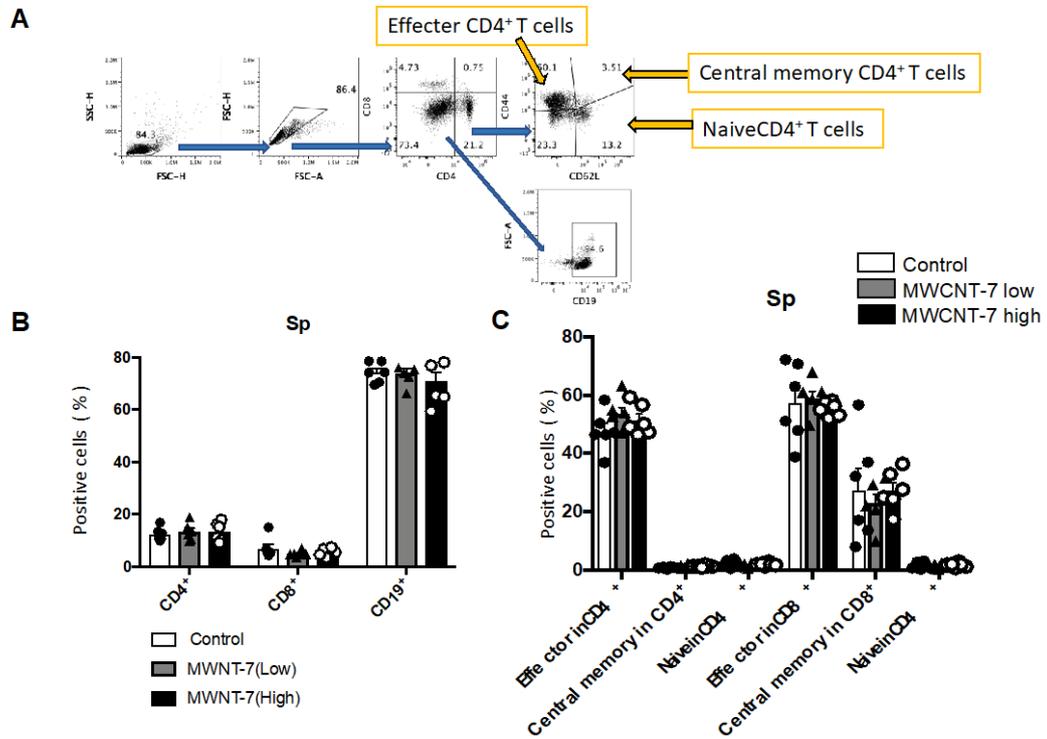


図 6 MWCNT-7長期吸入暴露による脾臓 (Spleen: Sp) におけるT及びB細胞分画への影響  
 A : 脾細胞を用いた各種T細胞分画のフローサイトメータ解析によるGating strategy  
 B : SpにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>B細胞分画 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 / group)  
 C : SpでのCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞における各分画 (Naive, Effector, Central memory) 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 / group)

図 7

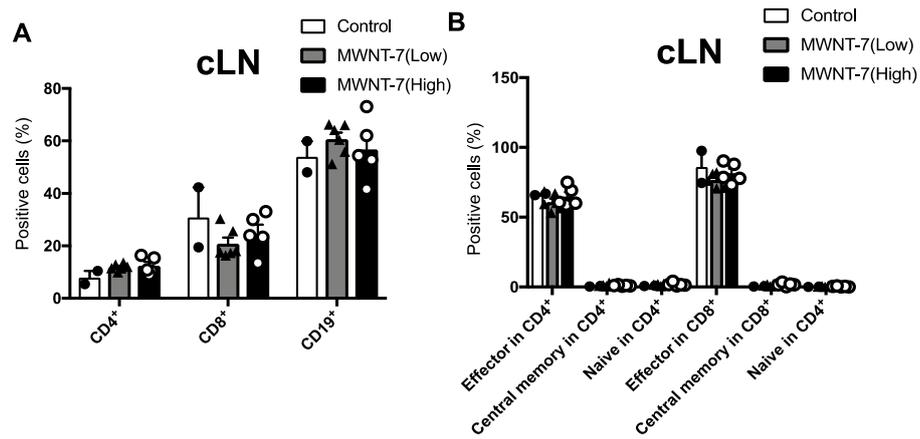


図 6 MWCNT-7長期吸入暴露による頸部リンパ節（cervical lymph node: cLN）におけるT及びB細胞分画への影響

A：cLNにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>B細胞分画 結果（%）=平均値±SD (n=6/group)

C：cLNでのCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞における各分画（Naive, Effector, Central memory）

結果（%）=平均値±SD (n=6/group)

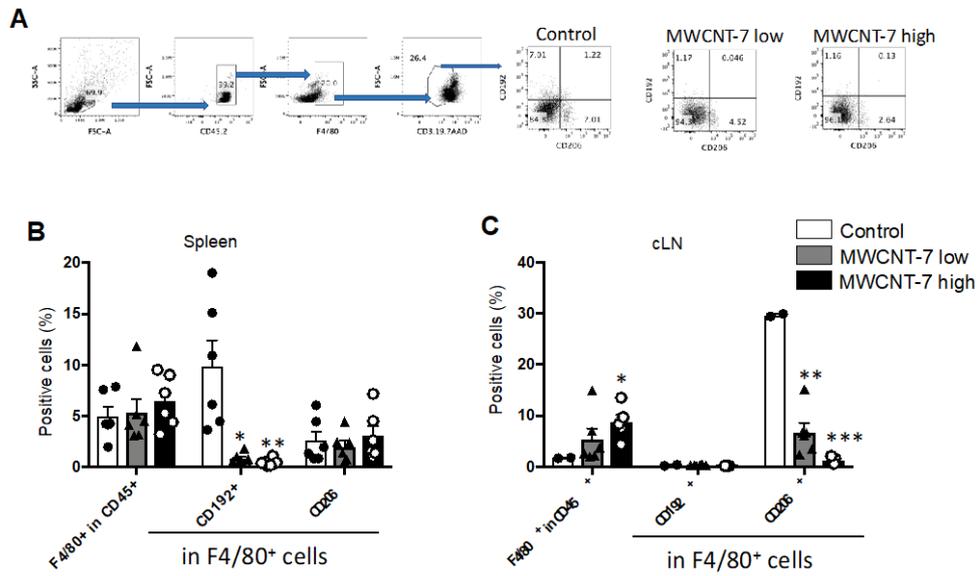


図8 MWCNT-7長期吸入暴露による脾臓ならびに頸部リンパ節におけるマクロファージ分化  
 A：脾細胞及び頸部リンパ節細胞を用いたマクロファージ分画のフローサイトメータ解析  
 B：SpにおけるF4/80<sup>+</sup>マクロファージにおけるCD192<sup>+</sup>(M1)及びCD206<sup>+</sup>(M2)分画  
 C：cLNにおけるF4/80<sup>+</sup>マクロファージにおけるCD192<sup>+</sup>(M1)及びCD206<sup>+</sup>(M2)分画  
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 2 ~ 6 / group)、\*p < 0.01, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.001

図 9

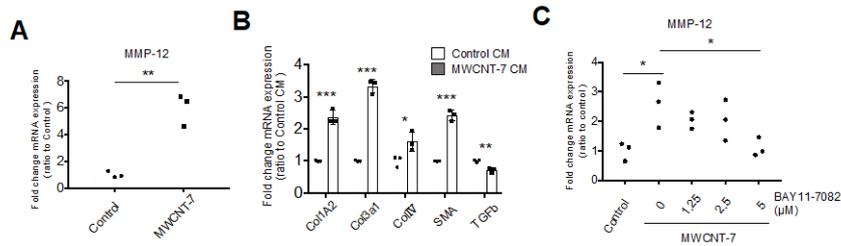


図 9 RAW264.7細胞へのMWCNT-7曝露によるMMP-12ならびにNF-κBの関与  
 RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収した。  
 A：MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), \*\*\*p < 0.005  
 B：MWCNT-7処理したRAW264.7細胞培養上清(CM)を用いたNIH3T3細胞の線維化関連遺伝子mRNA発現の変化。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005  
 C：RAW264.7細胞におけるMWCNT-7曝露によるMMP-12mRNA発現へのNF-κB阻害剤(BAY11-7082; 0~5 μM)の影響。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), \*p < 0.05

図 10

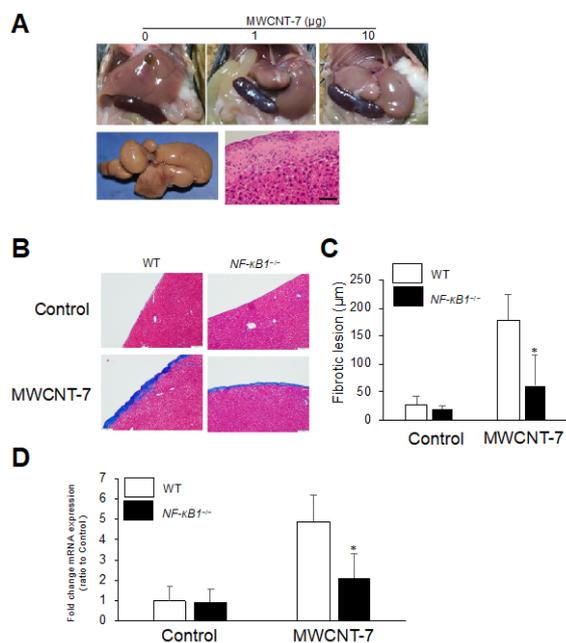


図 10 MWCNT-7の腹腔曝露（8ヶ月）による線維化におけるMMP-12ならびにNF-κBの関与  
**A**：C57BL/6J雄（8週齢）にTaquan処理したMWCNT-7を腹腔内投与（0, 1, 10 µg/マウス）10ヶ月後に解析した。上段は10 µg投与マウスの腹腔臓器の肉眼写真。下段は肝臓の肉眼写真ならびにHE染色像（スケールバー：100µm）を示す。

**B**：WTおよびNF-κB 1KO雄マウス（8週齢）にTaquan処理したMWCNT-7を腹腔内投与（0, 10 µg/マウス）10ヶ月後に解析した。肝組織を用いたAZAN染色像を示す（スケールバー：200µm）。

**C**：AZAN染色した肝組織を用いて線維化領域を定量解析を行なった。結果 (µm<sup>2</sup>)=平均値±SD (n=4/group)。\*p < 0.05

**D**：PECにおけるMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて解析した。結果 (対照群に対する相対値)=平均値±SD (n=4/group), \*p < 0.05