

令和4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：ナノマテリアル慢性曝露における免疫応答に関する研究

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	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	牛尾 綾	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	大塚 邦紘	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	木野 倫子	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	
	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。本年度の研究は、昨年度に実施した新たなカーボンナノチューブであるNT-7の単回暴露実験のサンプルを用いて詳細な解析を実施した。NT-7の単回暴露でのBALF細胞中のマクロファージの動態はM2型マクロファージへの分化が促進しており、MWCNT-7の暴露による変化と類似していたが、CD54あるいはMMP-12などマーカー分子の発現に関しては、MWCNT-7の暴露で見られた大きな変化ではなかった。さらに、*in vitro*でマウス骨髄由来マクロファージを用いてNT-7の反応性を検討すると、MWCNT-7で確認された細胞死、MMP-12発現の亢進は認められなかった。一方で、Taquan処理されたMWCNT-7の腹腔内投与による長期暴露での腹腔マクロファージと線維化のメカニズムに関して、マクロファージ細胞株、線維芽細胞株を用いた*in vitro*ならびにNF- κ B1遺伝子ノックアウトマウスを用いた *in vivo*での実験結果からNF- κ B-MMP-12経路を介して線維化が亢進することが明らかになった。今年度の研究では、NT-7の単回吸入暴露による肺免疫への影響はMWCNT-7吸入暴露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7暴露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。

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の、長期間の全身暴露による免疫系システムへの影響に関して不明な点が多い。本研究では、ナノマテリアルの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(図1)。

今年度は昨年度に実施したカーボンナノチューブNT-7の短期暴露による肺免疫の変化について引き続き検討を加えた。加えて、MWCNTの*in vitro*および*in vivo*での線維化の分子機構についてNF- κ Bの活性化を中心に検討を進めた。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

NT-7 短期暴露実験:12 週齢の C57BL/6 (B6) (雄)を用い、各群 5 匹ずつで NT-7 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、暴露後 0、7、14 および 28 日後において適切に屠殺後解析を行った。

・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、1 ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に 1 ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心し、組織保存液(MACS® Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec)に浸漬した。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、染色後固定した上で解析した。

・*In vitro* 実験系

マウス単球細胞株 RAW264.7 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。マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞を RAW264.7 細胞への T-CNT 処理培養上清を用いて検討した。また、マウス骨髄由来マクロファージ(MBDM)の作成に関しては、雄マウス(C57BL/6、7 週齢)の大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント M-CFS (100 ng/mL)添加培地にて 7 日間培養することで成熟マクロファージに分化させた。MBDM への T-CNT ならびに NT-7(0~250 ng/ml)の添加による反応が検討された。

・定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞、肺組織、培養系の細胞からの RNA 抽出に関して通法に従い全 RNA を抽

出後、逆転写反応によりcDNAを得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。

MMP12; (f) 5'-
TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', (r) 5'-
GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',
ICAM-1 (CD54); (f) 5'-
AACTGTGGCACCCTGCAGTC-3', (r) 5'-
AGGGTGAGGTCCTTGCCTACTTG-3'
Tim4; (f) 5'-
GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-
GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3' β-actin;
forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3',
and reverse, 5'-
CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

・MWCNT の腹腔内投与実験:雄 B6 マウス (10 週齢)に腹腔内に 0、1、10 μg (1 匹あたりの Taquann 処理済みの MWCNT を投与し、6~12 ヶ月にて肝臓、脾臓、腹腔内滲出細胞を用いて病理学および免疫学的検討を実施した。さらに、NF-κB1 遺伝子欠損マウスを用いてMWCNTの腹腔内投与実験を実施した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

NT-7 短期暴露実験

12 週齢雄 B6 マウスに NT-7 を単回吸入暴

露した後、1、7、14、28 日にてサンプルを採取した(図 2)。BALF 細胞中の肺胞マクロファージ分画について M1/M2 分化パターンをフローサイトメータにて解析した。暴露後 0 週、1 週では対象群と暴露群との間に大きな差は認められないが、暴露後 2 週での CD206 陽性 (M2 型)マクロファージの割合が低濃度暴露群で有意に上昇していた(図 3)。暴露後 4 週では対象群と暴露群で M1 型ならびに M2 型マクロファージの割合は変化はなかった(図 3)。

肺組織における MMP-12mRNA 遺伝子ならびに CD54 mRNA 遺伝子発現に関して、NT-7 暴露 0 週(直後)では、MMP-12 mRNA 発現が対象群に比較して低濃度群ならびに高濃度群で有意に増加していた。暴露 1 週でもこの有意な増加が確認された(図 4)。暴露後 2 週でのサンプルに関しては mRNA の精製ができなかった。暴露後 4 週では、低濃度暴露群で MMP-12 mRNA 発現が対象群に比較して有意に増加していた(図 4)。一方、CD54 mRNA の発現に関しては、暴露後 0、1、4 週(2 週サンプル不備)での変化は認められなかった(図 4)。

BALF 細胞を用いたマーカー遺伝子発現に関しては、NT-7 暴露直後に CD54 mRNA 発現が低濃度群ならびに高濃度群で上昇しているが有意な変化ではなかった(図 5)。4 週での CD54 mRNA 発現の変化は認められなかった(図 5)。MMP-12 mRNA 発現に関しては、暴露直後には変化は見られないが、暴露後 4 週の高濃度群で発現上昇が認められるが有意な差ではなかった。さらに、CNT の受容体の一つとされる Tim4 mRNA 発現に関して検討したところ、暴露後 1 週での低濃度群で上昇していたが有意な差ではなかった(図 5)。今回の BALF 細胞を用い

た定量 RT-PCR による遺伝子発現検討では、各サンプルの状態、RNA 精製に不備があったものと考えられ、データが正しく取得できなかった可能性がある。

NF- κ B 活性を介した MMP-12 の発現調節と CNT との関与

Taquann 処理をした MWCNT (T-CNT) をマウスの腹腔内投与による免疫学的変化の検討に関して、昨年度までに報告した内容に加え、NF- κ B 遺伝子ノックアウトマウスを用いた内容をまとめると、T-CNT の腹腔内投与後 8 ヶ月以降に効率的に腹膜での線維化が亢進し、慢性腹膜炎の病態を呈していた (図 6)。また、その変化は NF- κ BKO マウスへの腹腔内投与では線維化の程度は有意に軽減され、けーとなる MMP-12 mRNA 発現も有意に低下していた (図 6)。

さらに、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験で、T-CNT の添加によって NF- κ Bp65 の核内以降が Western blot 法あるいは蛍光染色法にて確認された (図 7 A, B)。加えて、NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7082) の添加により T-CNT によって上昇した MMP-12 mRNA 発現が低下することが判明した (図 7 C)。また、T-CNT で刺激された RAW264.7 細胞の培養上清 (Conditioned medium: CM) をマウス線維芽細胞 (NIH-3T3) に添加培養することによって、線維芽細胞の増殖 (線維化) のマーカー遺伝子に関して、定量 RT-PCR で検討すると、Col1a2、Col3a1、Col4a1 ならびに Acta2 mRNA が有意に上昇していた (図 7 D)。

マウス骨髄由来マクロファージを用いた

実験系

マウス骨髄細胞を用いて *in vitro* にてマクロファージへの分化を試みた。M-CSF を添加した培地にて 7 日間培養すると、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージへの分化が確認された (図 8)。マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT を添加刺激すると、MMP12 mRNA 発現は T-CNT 濃度依存的に上昇した (図 9)。さらに、NT-7 の添加による MBDM の変化を検討すると、T-CNT で観察された細胞傷害は確認されなかった (図 9)。

D. 考察

NT-7 吸入暴露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。この現象は MWCNT-7 の吸入暴露でも同様であった。また、NT-7 吸入暴露によって BALF 中の単球および未分化マクロファージが増加することがわかった。NT-7 吸入暴露によって、肺マクロファージは M2 マクロファージへの分化が認められた。MWCNT-7 の吸入暴露では M1 型への分化が目立っていた点と相違している。NT-7 吸入暴露によって、肺組織における MMP-12 mRNA 発現上昇が確認されたが、BALF 細胞では MWCNT-7 との違いがある可能性が示された。BMDM を用いた *in vitro* の実験系はナノマテリアルに対するマクロファージの直接の反応を検証する上で極めて有用である。一方で、MWCNT-7 の腹腔内投与による慢性腹膜炎のモデルでは腹腔内マクロファージの NF- κ B の活性化を介して MMP-12 の発現が調節されており、線維化の MMP-12 を介した分子メカニズムが存在する可能性が示されたが、TGF- β などの線維化に関与する分子との関連性は不明である。

E. 結論

- ・NT-7 吸入暴露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復し、BALF 中の単球および未分化マクロファージが増加した。
- ・NT-7 吸入暴露によって、肺胞マクロファージは M2 マクロファージへの分化が認められ、CD54 陽性肺胞マクロファージが増加していた。
- ・NT-7 吸入暴露によって、肺組織における MMP12mRNA 発現上昇が確認された
- ・BMDM を用いた *in vitro* の実験系で MWCNT-7 と NT-7 の反応性の違いが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoushi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T. Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression *Biochem Biophys Res Commun.* 650:47-54, 2023
2. Shao W, Tsunematsu T, Umeda M, Tawara H, Fujiwara N, Mouri Y, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Cancer cell-derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 00:1-16, 2023
3. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Nagao R, Tanaka H, Tamura K, Kawahito Y, Ostuka K, Ushio A, Tsunematsu T, Ishimaru N. Disturbed natural killer cell homeostasis in the salivary gland enhances autoimmune pathology via IFN- γ in a mouse model of primary Sjogren's syndrome. *Front Med.* 9:1036787, 2022
4. Nagatomo R, Kaneko H, Kamatsuki S, Ichimura-Shimaizu M, Ishimaru N, Tsuneyama K, Inoue K. Short-chain fatty acid profiling in biological samples from a mouse model of Sjogren's syndrome based on derivatized LC-MS/MS assay. *J Chromat B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1210, 123432, 2022
5. Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 192:1559-1572, 2022
6. Otsuka K, Sato M, Tsunematsu T, Ishimaru N. Virus Infections Play Crucial Roles in the Pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Viruses.* 14:1474, 2022
7. Horii Y, Iniwa T, Onitsuka M, Tsukimoto J, Tanaka Y, Ike H, Fukushi Y, Ando H, Takeuchi Y, Nishioka SI, Tsuji D, Ikuo M, Yamazaki N, Takiguchi Y, Ishimaru N, Ito K. Reversal neuroinflammation in novel GS model mice by single i.c.v. administration of CHO-derived rhCTSA precursor protein. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 25:297-310, 2022
8. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Maenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, Okazaki T. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and

- anti-cancer immunity. *Immunity*. 55:912-24, 2022
9. 大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群の病理診断 診断病理39 (4) 255-261,2022
 10. 大塚邦紘、常松貴明、牛尾綾、佐藤真美、石丸直澄 カラー図説:シェーグレン症候群の病理 日本臨床80(10),1538-1543,2022
- ## 2. 学会発表
1. Naozumi Ishimaru, Kazuki Fukuda, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka: Exposure to carbon nanotubes sustains chronic inflammation by macrophage activation via MMP-12. 第111回日本病理学会総会 (2022.4.14-16、神戸市)
 2. 佐藤真美、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疾患モデルにおける肺病変発症への CCL6 の役割第111回日本病理学会総会 (2022年4月14日、神戸市)
 3. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、新垣理恵子、佐藤真美、福田一稀、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現するT細胞集団の解析第111回日本病理学会総会 (2022年4月15日、神戸市)
 4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔扁平上皮癌における Borealin の高発現をもたらす Survivin 安定化機構の解明 第111回日本病理学会総会 (2022年4月16日、神戸市)
 5. 田村海、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス鼻腔組織の病態解析 第111回日本病理学会総会(2022年4月16日、神戸市)
 6. 佐藤真美、牛尾綾、福田一稀、俵宏彰、大塚邦紘、常松貴明、新垣理恵子、石丸直澄 Extraglandular lesions in Sjogren's syndrome model mice 第20回国免疫フォーラム (2022年6月11日、オンライン 香川大学)
 7. 常松貴明、石丸直澄 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の新たな機能 第39回分子病理研究会 内灘かほくシンポジウム (2022年7月8~9日、石川県河北郡)
 8. 佐藤真美、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス肺病変におけるケモカインの機能分析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 9. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、佐藤真美、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現するT細胞集団の解析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 10. 田村海、川人祐樹、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける鼻腔組織の病態解析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 11. 川人祐樹、田村海、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスである NFS/sld マウスの変異遺伝子 *Mucin19* の発現解析と病態との関連性 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 12. 石丸直澄 唾液腺免疫難病研究の最前線 第33回日本臨床口腔病理学会学術大会シンポジウム (2022年9月23日、札幌市)
 13. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、新垣理恵子、佐藤真美、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq とマルチプレックス Spatial 解析を基盤としたシェーグレン症候群の標的臓器微小環境変化の解明 第33回日本臨床口腔病理学会学術大会 (2022年9月23日、札幌市)
 14. 三好 瑞希, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内美絵, 加守 虹穂, 福池 凜, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 先天代謝異常症ガラクトシアリドーシスに対するより効果的な遺伝子治療薬開発 (第95回日本生化学会大会, 2022年11月千葉)
 15. Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru Cell Cycle machinery unravels the molecular mechanism of Cancer cell cannibalism (第

- 45 回日本分子生物学学会年会、2022 年 12 月 千葉)
16. 俵 宏彰, 常松 貴明, 永尾 瑠佳, 佐藤 真美, 大塚 邦紘, 石丸 直澄 : がんにおける染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現をもたらす新たな機能 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 17. 三好 瑞希, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内 美絵, 加守 虹穂, 福池 凜, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 : 効率的治療を目的としたリソソーム性ノイラミニダーゼ 1 欠損症に対する AAV5 遺伝子治療 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 18. 福池 凜, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内 美絵, 加守 虹穂, 三好 瑞希, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 : AAVPHP.eB ベクターの脳室内単回投与による NEU1 欠損症に対する遺伝子治療 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 19. Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka and Naozumi Ishimaru: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 20. KAWAHITO Yuki, Kai Tamura, Mami Satoh, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Role of Mucin 19 in Pathogenesis of a Mouse Model for Sjögren's Syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 21. Kai Tamura, KAWAHITO Yuki, Mami Satoh, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Pathological analysis of nasal tissue in a murine model of Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 22. Kunihiro Otsuka, Shin-ichi Tsukumo, Rieko Arakaki, Mami Satoh, Hdeo Yagita, Naozumi Ishimaru and Koji Yasutomo : CD153⁺ CD4⁺ T cells exacerbate the autoimmune pathology via the interaction with CD30⁺ cells in salivary glands in Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 23. Mami Satoh, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Th2 response enhances the differentiation into follicular B cells to progress the pulmonary autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 24. 俵 宏彰, 常松 貴明, 永尾 瑠佳, 福田 一稀, 佐藤 真美, 大塚 邦紘, 牛尾 綾, 石丸 直澄 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現をもたらす新たな役割 (第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会, 2022 年 12 月 鹿児島)
 25. 常松 貴明, 俵 宏彰, 石丸 直澄 : HPV 陽性癌における新規脱ユビキチン化酵素複合体の分子機構の解明 (第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 2022 年 12 月 鹿児島)

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 (出願中)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

図 1

ナノマテリアルの免疫系への慢性影響

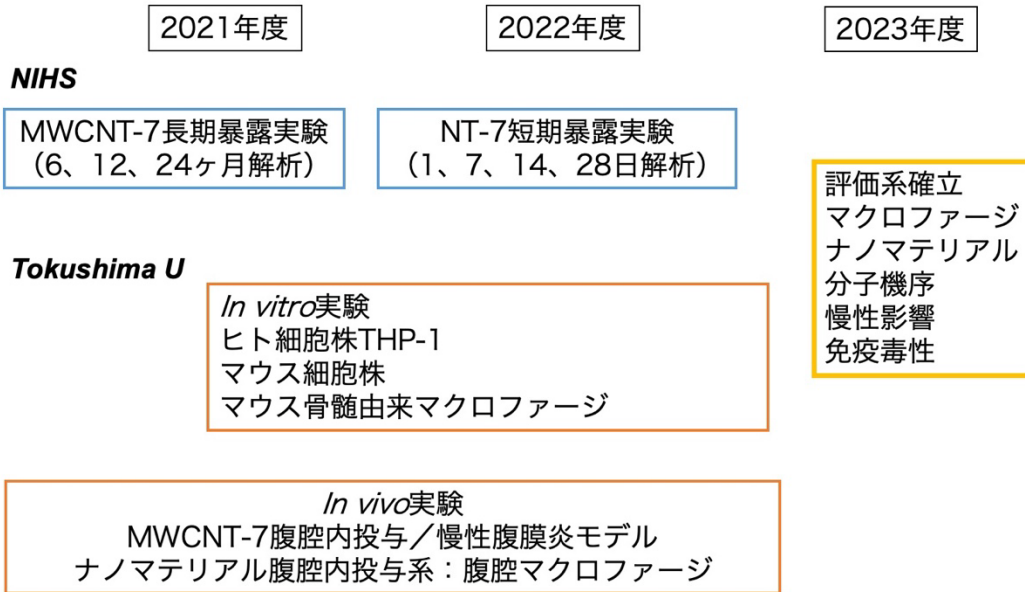
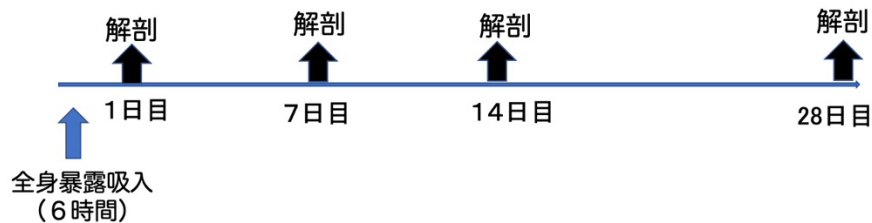


図 2

Experimental protocol

2021~2022

マウス: C57BL/6NcrSLC ♂
暴露検体: NT-7 (Taquann処理)



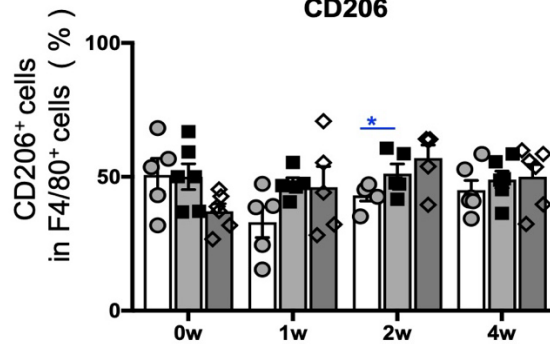
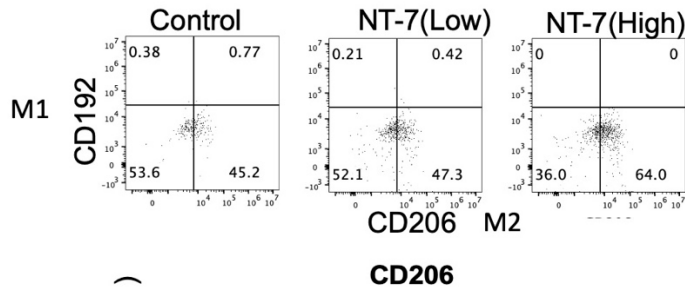
対照群 (清浄空気)
NT-7 低濃度群 (2.7 mg/m³)
NT-7 高濃度群 (5.2 mg/m³)

免疫機能解析 (各群5~6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

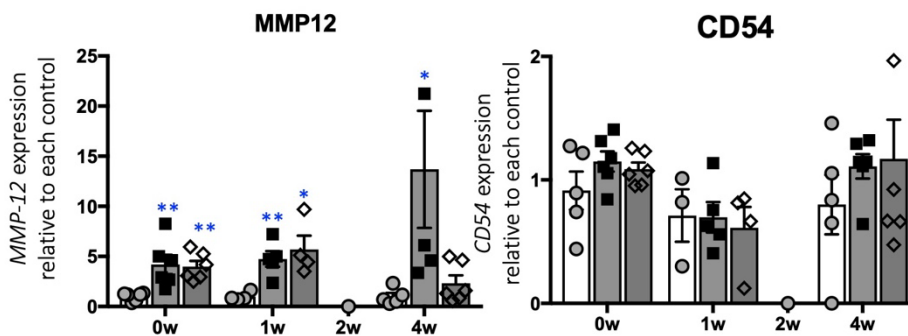
図 3 Differentiation into M2 macrophage by NT-7 exposure

BALF CD206⁺ MΦs 2w



暴露後2週間でM2 MΦへのシフト

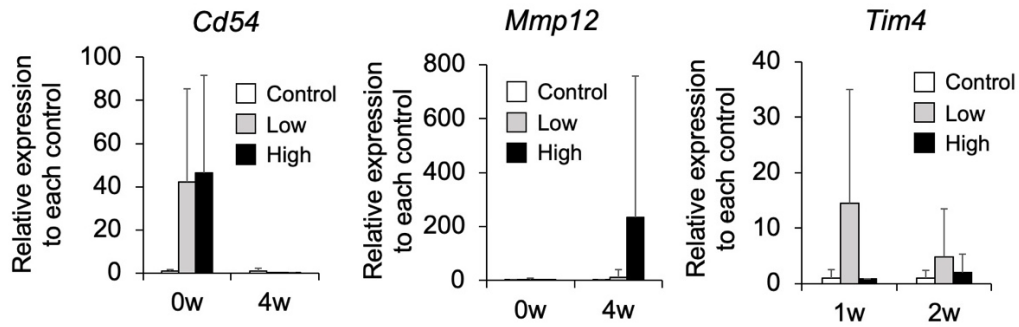
図 4 MMP12 and CD54 mRNA expression of lung tissues from NT-7-exposure mice



肺組織におけるMMP12 mRNAは暴露によって上昇

図 5

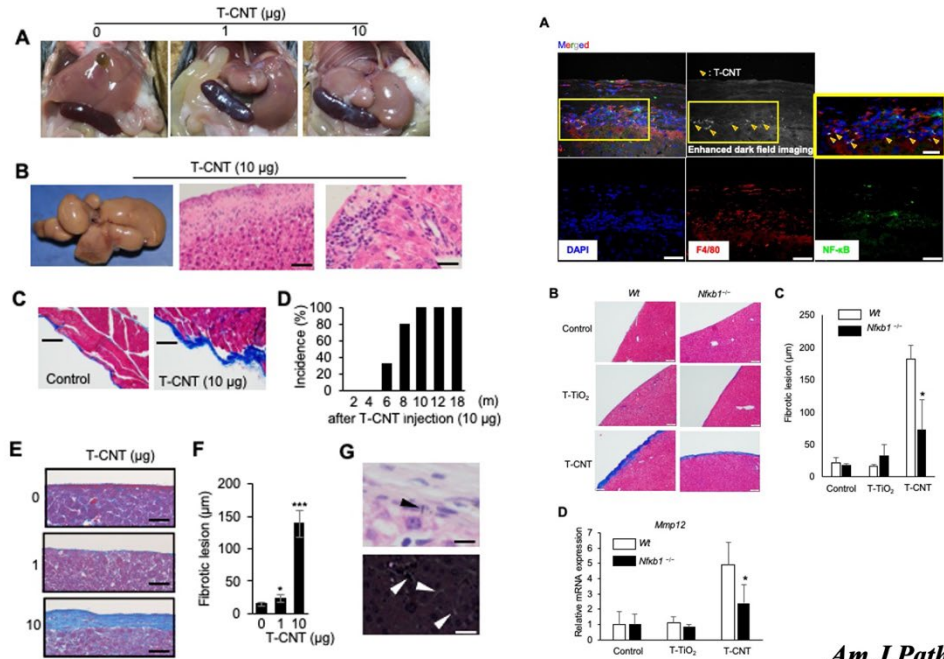
MMP12, CD54, and Tim mRNA expression of BALF cells from NT-7-exposure mice



MWCNT-7との違い？

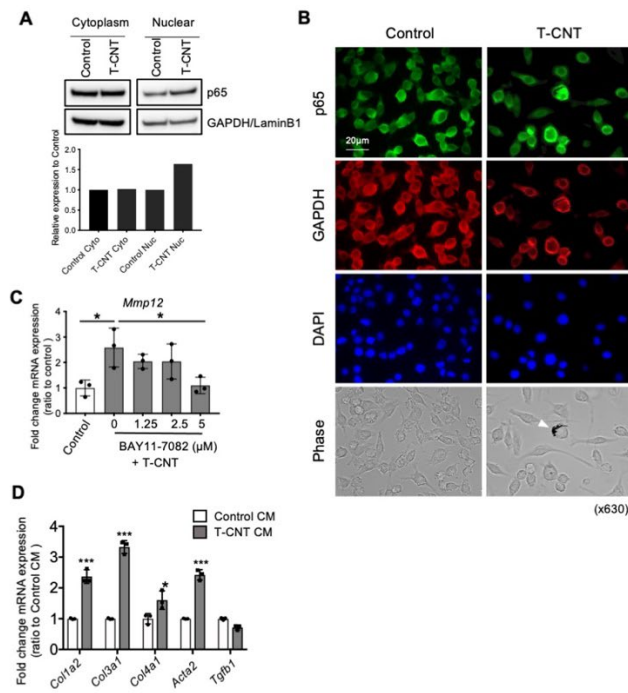
図 6

Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis



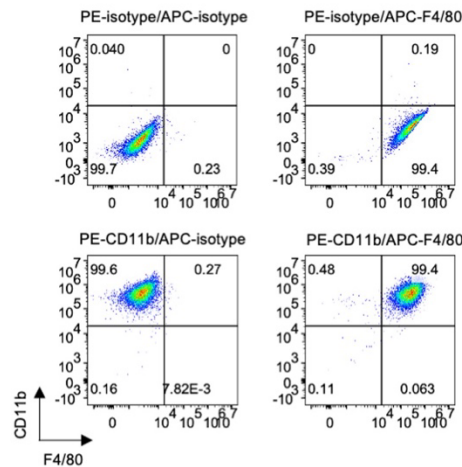
Am J Pathol 2022

7 *In vitro* culture of RAW264.7 cells with T-CNTs



Am J Pathol 2022

8 MMP12 mRNA expression of bone marrow-derived macrophages stimulated with T-CNT



Bone marrow cells were collected from femurs and tibiae of male C57BL/6J mice (7-week old). Obtained whole BM cells were cultured in petri dishes with RPMI-1640 containing 10% FBS, 20 mM HEPES, 1m M non-essential amino acids and recombinant M-CSF (100 ng/mL) for 7 days. Attached cells were used as bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

図9 骨髄細胞由来マクロファージを用いた*In vitro*実験

