

令和5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、新たなカーボンナノチューブであるNT-7の単回曝露後12ヶ月での解析を実施した。NT-7の単回長期曝露でのBALF細胞中の肺胞マクロファージ数は増加し、M1およびM2のマクロファージの分化マーカーの発現は低下し、身分化マクロファージ・単球が増加していた。BALF細胞および肺組織における*Mmp12* mRNA発現はNT-7の長期曝露によって増加した。今年度の実験の結果から、NT-7の長期曝露によって肺胞マクロファージの分化異常が生じる可能性が示され、従来検討されてきたMWCNT-7の長期曝露との類似性が示された。骨髄由来マクロファージを用いて*in vitro*でのNT-7とMWCNT-7の反応性に違いが見られたこと、前年度のNT-7の短期曝露実験の結果を考慮すると、両者のナノマテリアルで初期の反応性に違いがあるものと考えられる。

## 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。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、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。

今年度は昨年度に実施したカーボンナノチューブNT-7の短期暴露に引き続いて暴露後12ヶ月での長期暴露による肺免疫の変化について検討を加えた。さらに、*in vitro*でのNT-7およびMWCNT-7の比較検討を行った。

## 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 6 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 12 ヶ月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

雄マウス(C57BL/6、7 週齢)の大腿骨より骨髓細胞を採取し、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。マウス骨髓由来マクロファージ(Mouse bone marrow-derived macrophage: MBDM)への Taquann 処理 MWCNT-7 (T-CNT: 0~125 ng/ml)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'-AACTGTGGCACCGTGCAGTC-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'。

### <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 長期暴露実験

12 週齢雄 B6 マウスに NT-7 を単回吸入暴露した後、12 ヶ月にてサンプルを採取した(図 1)。BALF 細胞中の F4/80<sup>+</sup>肺胞マクロファージの割合は対象群に比較して高濃度群で優位に上昇していた(図 2A, B)。M1 および M2 マクロファージへの分化マーカー(CD192, CD206, CD54, CD163)についてフローサイトメーターにて検討すると、CD192、CD206、CD163 分子の表面発現は NT-7 の暴露によって低下することがわかった(図 3 ~ 6)。CD54 の発現は優位な変化は認められなかった(図 7)。

頸部リンパ節ならびに脾臓におけるマクロファージの割合、細胞数に関して、暴露による変化は認められなかった(図 8)。さらに、M1/M2 マーカーの発現に関しても NT-7 の長期暴露で変化は観察されなかった(図 9、10)。

BALF 細胞における *Icam1* (CD54)、*Timd4*(*Tim4*) および *Mmp12* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現に関しては長期暴露による変化は認められなかったが、*Mmp12* mRNA 発現は NT-7 の暴露濃度依

存的に有意に上昇することが明らかになった(図 1 1)。

肺組織における *Mmp12* ならびに *Adgre1* (*F4/80*) mRNA 発現は NT-7 の長期暴露で有意に上昇していたが、*CD54* mRNA に関しては変化が認められなかった(図 1 2)。

脾臓における CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD19<sup>+</sup>B 細胞の割合、細胞数に関して、NT-7 の長期暴露による変化は認められなかった(図 1 3)。頸部リンパ節における T 細胞分画、B 細胞の割合および細胞数に関しても NT-7 暴露による変化は観察されなかった(図 1 4)。さらに、脾臓ならびの頸部リンパ節での CD4<sup>+</sup>細胞ならびに CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化状態 (effector marker: CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup>)を検討すると、NT-7 の長期暴露による変化は認められなかった(図 1 5)。

### マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験系

マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT ならびに NT-7 を添加刺激し、*Mmp12*、*Icam1*、*Tim4* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Mmp12* mRNA 発現は T-CNT にて有意に上昇するが、NT-7 の添加では変化が認められなかった(図 1 6)。また、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現は T-CNT の刺激で低下する一方で、NT-7 の添加では変化が確認されなかった(図 1 6)。

## D. 考察

R5年度の研究では、NT-7の単回吸入長期暴露によって肺胞マクロファージの割合ならびに細胞数は有意に増加しており、M1/M2 への分化に至らない未分化なマクロ

ファージあるいは単球の分画の増加が認められた。R4 年度までに NT-7 吸入暴露後の肺胞マクロファージは減少し、経時的 28 日までに回復することが判明していた。この後 12 ヶ月まで漸増していたものと考えられる。従来用いられた MWCNT-7 の長期暴露においても未分化分画のマクロファージ・単球が増加していた点は共通の現象である。

NT-7 の長期暴露での肺組織および BALF 細胞における指標マーカーとして、CD54、Tim4 あるいは MMP12 を検討したところ、*Mmp12* mRNA の濃度依存的な上昇が確認された。これまでに、肺胞マクロファージにおけるカーボンナノチューブの反応として MMP-12 が注目されてきたが、NT-7 の長期暴露においても MMP-12 が有用な毒性マーカーになりうる可能性が高い。一方で、*in vitro* の実験系では NT-7 の反応性と T-CNT の反応性が異なっていた。さらに、NT-7 の短期暴露実では肺胞マクロファージの M2 への分化が亢進している点と T-CNT の短期暴露では M1 への分化にシフトしている点から両者のナノマテリアルに対する反応性の違いがある可能が考えられる。

同種の炭素からなるカーボンナノチューブであるが、製造過程、濾過状態、マテリアル長など性状が異なっているものと推測される。性状の異なるカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性の違いはナノマテリアルの大きさ、分散性などで大きく異なる可能性が考えられる。ナノマテリアルの毒性評価指標として最終的には *in vivo* の実験系が極めて有用であるが、*in vitro* での簡便性のある実験系も併用しながら検討を進める必要がある。

## E. 結論

・NT-7 吸入長期暴露後の BALF 中の肺胞マクロファージは増加した。

・NT-7 吸入長期暴露によって、肺胞マクロファージは未分化な分画が増加した。

・NT-7 吸入長期暴露によって、肺組織および BALF 細胞における *Mmp12* mRNA 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. Tawara H, Tsunematsu T, Kitajima S, Nagao R, Matsuzawa S, Otsuka K, Ushio A, Ishimaru N. The non-canonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 706:149741, 2024.
2. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 12:617-639, 2023.
3. Jin S, Tsunematsu T, Horiguchi T, Mouri Y, Shao W, Miyoshi K, Mizusawa N, Hagita H, Sarubo M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Kitajima S, Ozaki K, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Involvement of the PTUB1-YAP1 axis in driving

- malignant behaviors in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12:22156-22169, 2023.
4. Sugimoto A, Iwata K, Kurogoshi R, Tanaka M, Nakashima Y, Yamakawa Y, Oishi A, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwamoto T. C-terminus of PIRZO1 governs Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 682:39-45, 2023.
  5. Ishimaru N, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. *Annals of Work Exposures and Health* 67(Supplement 1) i74, 2023.
  6. Sato-Fukuba M, Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N\*. CD4<sup>+</sup> T-cell-dependent differentiation of CD23<sup>+</sup> follicular B cells contributes to the pulmonary pathology in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Front Immunol.* 14:1217492, 2023.
  7. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoshi 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.
  8. 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.* 12:8510-8525, 2023.
  9. 石丸直澄 :シェーグレン症候群疾患モデルからのトランスレーショナル研究 *炎症と免疫* 31(3):35-39, 2023.
  10. 石丸直澄 :臓器間ネットワークと自己免疫疾患 *臨床免疫・アレルギー科* 80(3):311-316, 2023.
- ## 2. 学会発表
1. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、新垣理恵子、永尾瑠佳、佐藤真美、牛尾綾、青田桂子、石丸直澄、安友康二 CD153-CD30 相互反応を介したシェーグレン症候群の病態形成機構の解明 第 112 回日本病理学会総会 2023.4 山口
  2. 常松貴明、俵宏彰、佐藤真美、福田一稀、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 DNA 損傷シグナルによって誘導されるがん細胞の新たな機能とその分子機構 第 112 回日本病理学会総会 2023 年 4 月 15 日 下関
  3. 大塚邦紘、石丸直澄、安友康二 CD153+ CD4+ T cell によるシェーグレン症候群の新たな発症機序の解明 第 5 回 口腔医科学フロンティア研究会 2023.4 新潟
  4. Naozumi Ishimaru. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference

- 2023 Invitation Lecture, 2023.5.15, Manchester, UK.
5. 石丸直澄 膠原病における唾液腺病変とその成立機序～シェーグレン症候群の病理～ 第40回膠原病臨床病理研究会 東京 2023年6月23日
  6. 常松貴明、石丸直澄 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明、第40回分子病理研究会 2023年7月14日 札幌
  7. 俵宏彰、常松貴明、永尾瑠佳、松鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin-Survivin 相互作用は頭頸部扁平上皮癌の代謝を制御する 第34回日本臨床口腔病理学会総会 2023年8月 大阪
  8. 常松貴明、石丸直澄 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明 2023年度徳島大学先端酵素学研究所シンポジウム 2023年9月14日、徳島
  9. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、牛尾綾、福場-佐藤真美、俵宏彰、永尾瑠佳、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル解析を基盤としたシェーグレン症候群の発症機序の解明 第65回歯科基礎医学会学術大会 2023.9 東京
  10. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、牛尾綾、永尾瑠佳、青田桂子、石丸直澄、安友康二 シングルセル解析を基盤としたシェーグレン症候群の発症機序の解明 第31回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2023.9 静岡
  11. 松澤鎮史、牛尾綾、永尾瑠佳、大塚邦紘、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群と胸腺における T細胞の分化・成熟の関連についての検討 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
  12. 永尾瑠佳、山本安希子、大塚邦紘、牛尾綾、福場真美、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄 Trat1 を起点としたシェーグレン症候群の発症機序の解析 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
  13. 石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルを基盤としたトランスレーショナルリサーチ～SS 発症における臓器間コミュニケーションの分子機序～ 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
  14. 俵宏彰、常松貴明、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非依存的な Borealin-Survivin 相互作用がもたらす新たな機能 第65回歯科基礎医学会学術大会 2023年9月 東京
  15. 俵宏彰、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 口腔扁平上皮癌における Survivin の核内蓄積がもたらす新たな機能 第59回日本口腔組織培養学会 2023年11月 栃木
  16. 常松貴明、俵宏彰、石丸直澄、DNA 損傷シグナルによってがん細胞が獲得する新たな機能 第59回日本口腔組織培養学会総会・学術大会、2023年11月25日 栃木
  17. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ushio A, Ishimaru N, Yasutomo K. CD153+ CD4+ T cells and CD30+ cells exacerbate the autoimmune pathology in salivary glands of Sjögren's syndrome. 第52回日本免疫学会学術集会 千葉 2024.1
  18. Ruka Nagao, Akiko Yamamoto, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Mami Fukuba, Hiroaki Tawara, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. Analysis of the suppression mechanism for activated T cells via co-inhibitory receptors in Sjögren's syndrome. 第52回日本免疫学会学術集会 2024年1月 千葉
  19. Takaaki Tsunematsu, Ruka Nagao, Shigefumi Matsuzawa, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Naozumi Ishimaru The

- molecular mechanism of “Cancer cell cannibalism” and its significance in cancer progression 第 52 回日本免疫学会総会・学術集会 2024 年 1 月 19 日、幕張
20. Shigefumi Matsuzawa, Aya Ushio, Ruka Nagao, Hiroaki Tawara, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. Investigation of the relationship between T cell differentiation and maturation and autophagy in the thymus. 第 5 2 回日本免疫学会学術集会 2024 年 1 月 千葉
21. 永尾瑠佳、山本安希子、牛尾綾、大塚邦紘、松澤鎮史、常松貴明、石丸直澄  
Analysis of the role of co-inhibitory receptors on T cells to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. 第 113 回日本病理学会総会 2024 年 3 月 名古屋
22. Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
23. Hiroaki Tawara, Takaaki Tsunematsu, Ruka Nagao, Sigefumi Matsuzawa, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Naozumi Ishimaru. Borealin-Survivin complex directly regulates keratinocyte differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
24. Shigefumi Matsuzawa, Aya Ushio, Ruka Nagao, Hiroaki Tawara, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. The relationship between autophagy in the neonatal thymus and Sjogren syndrome. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
25. 常松貴明、吉川治孝、永尾瑠佳、松澤鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 がん特殊化リボソームの同定と機能解析 第 113 回日本病理学会総会、2024 年 3 月 28 日 名古屋
26. 石丸直澄 免疫難病の新たな病態と治療戦略～シェーグレン症候群の病理～ 四国歯学会 特別講演 2024 年 3 月 20 日 徳島

## 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

## Experimental protocol

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

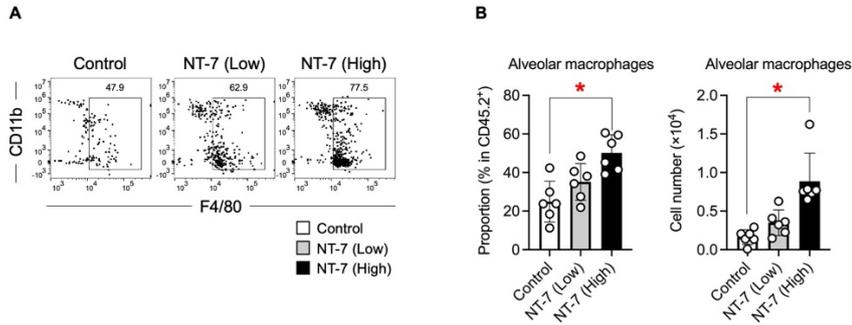


対照群 (清浄空気)  
 NT-7 低濃度群 (2.7 mg/m<sup>3</sup>)  
 NT-7 高濃度群 (5.2 mg/m<sup>3</sup>)

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

The proportion and number of alveolar macrophages were increased by long-term exposure to NT-7



Flowcytometric analysis was performed by using BALF. Each panels were gated on CD45.2<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup>. F4/80<sup>+</sup> cells were defined as alveolar macrophages (AM).  
 The proportion and number of AMs were significantly increased in NT-7 highly exposure, compared to Control (B).

图 3

**M1 and M2 polarization of AMs was changed by NT-7 exposure**

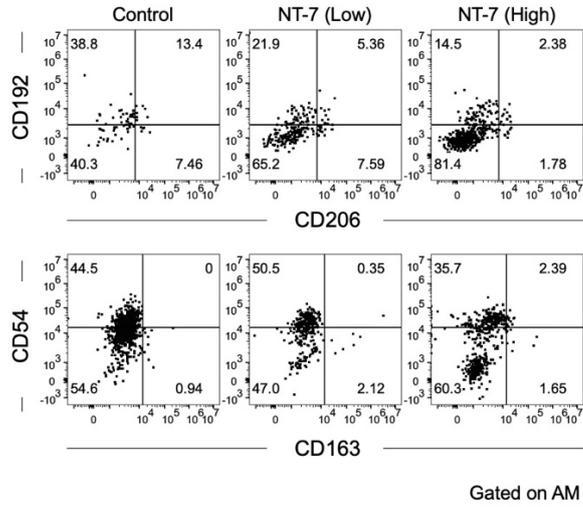
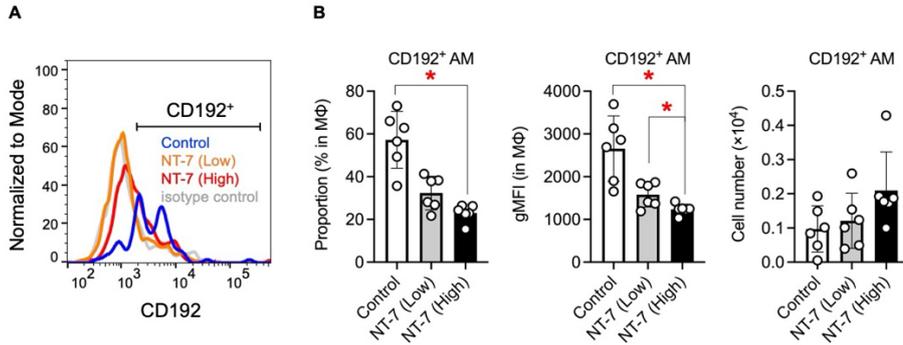


图 4

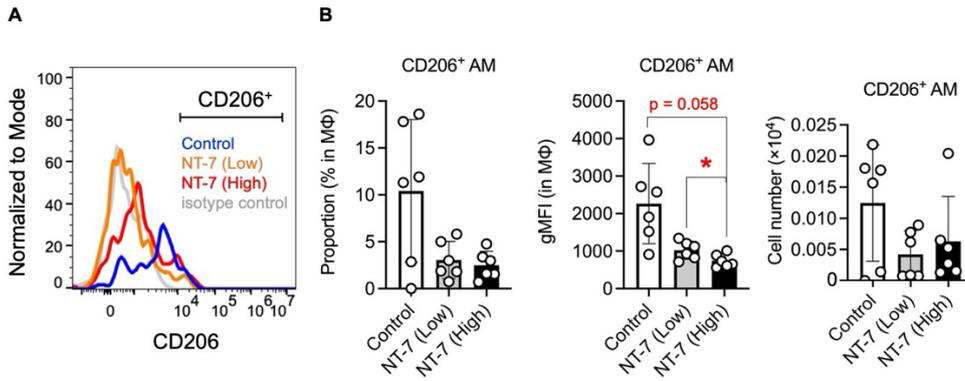
**The proportion and gMFI of CD192<sup>+</sup> AMs were decreased by NT-7 exposure**



CD192 expression level in F4/80<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> cells from BALF (A).  
The proportion of CD192 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control (B).  
The gMFI of CD192 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control and low exposure (B).  
(CD192: CCR2)

图 5

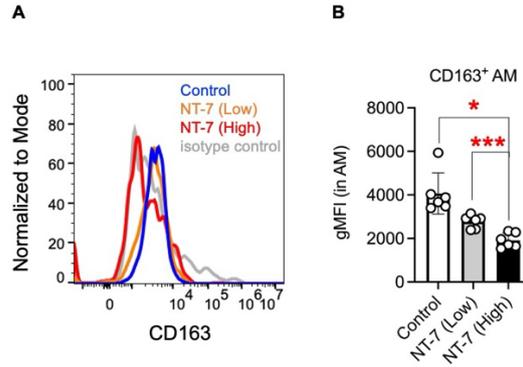
The proportion and gMFI of CD206<sup>+</sup> AMs were decreased by NT-7 exposure



CD206 expression level in F4/80<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> cells from BALF (A).  
The gMFI of CD206 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to low exposure (B).

图 6

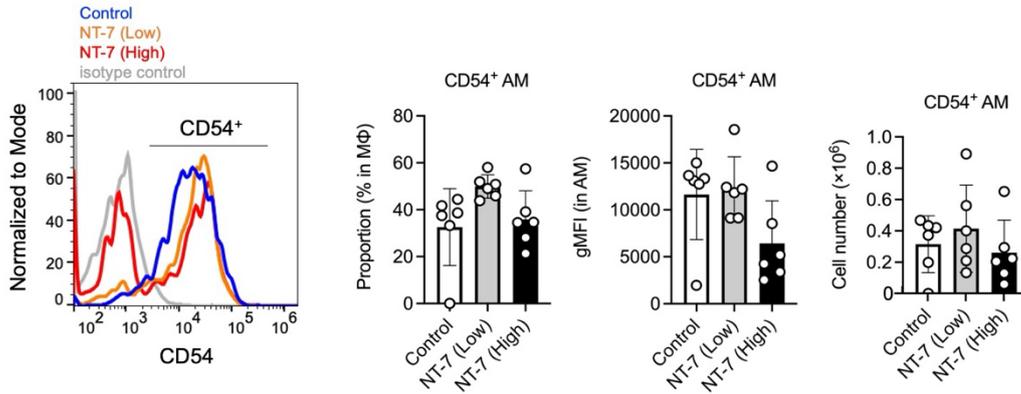
The gMFI of CD163 in AMs were decreased by NT-7 exposure



CD163 expression level in F4/80<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> cells from BALF (A).  
The gMFI of CD163 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control and low exposure (B).

图 7

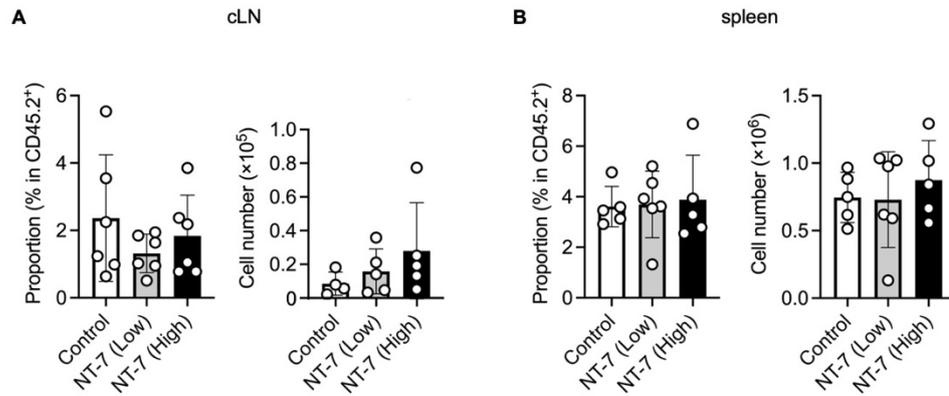
**CD54<sup>+</sup> AMs were not changed by NT-7 exposure**



CD54 expression level in F4/80<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD3ε<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> cells from BALF (A).  
 The proportion, gMFI of CD54 on AMs were not changed between each condition (B).  
 The cell number CD54<sup>+</sup> AMs were not changed between each condition (B).

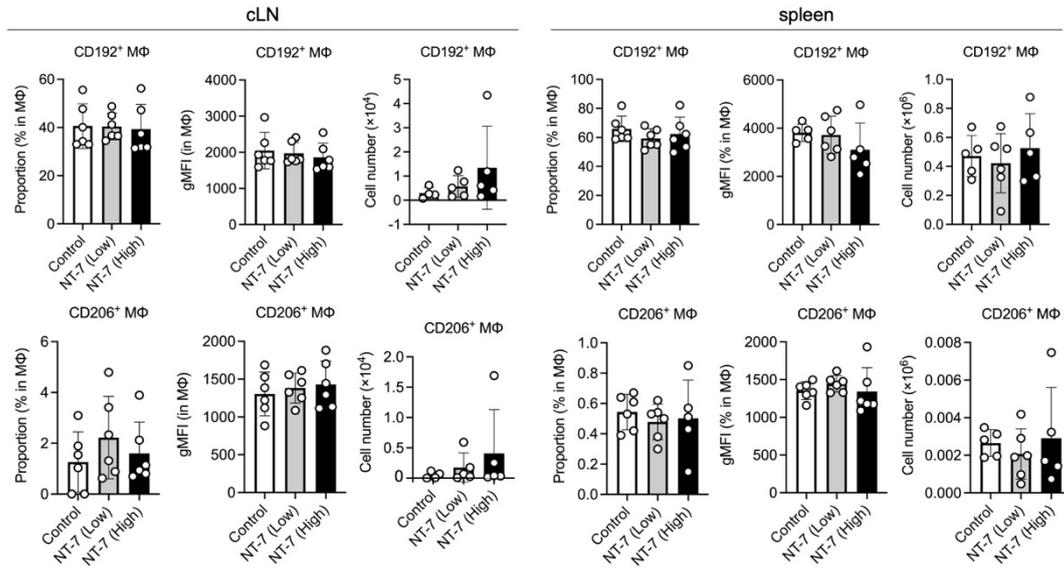
图 8

**The proportion and number of macrophages in cLN and spleen were not changed by NT-7 exposure**

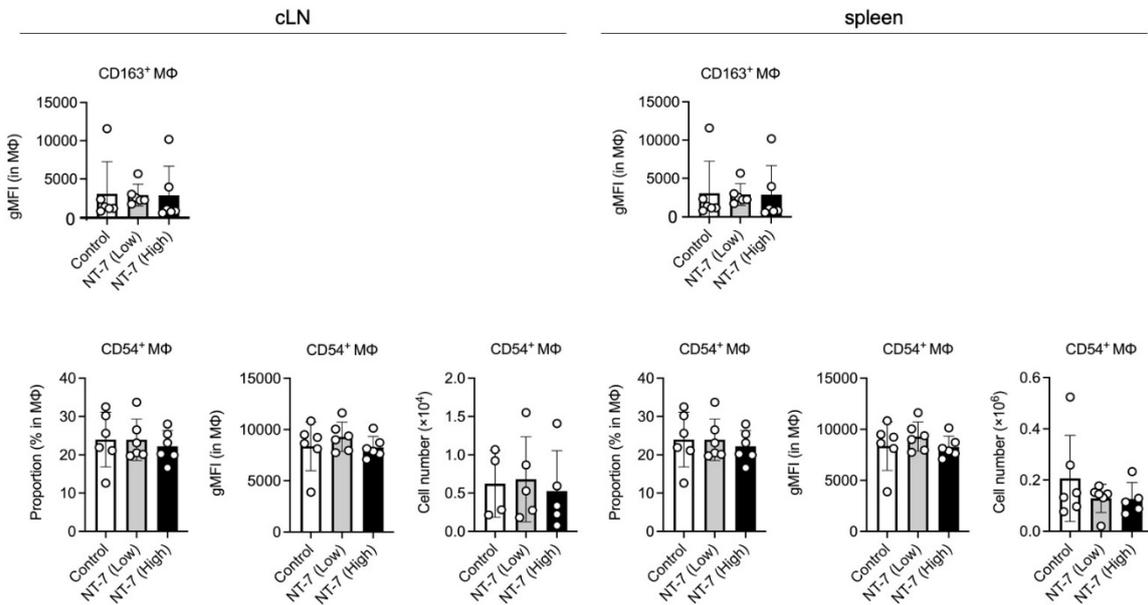


The proportion and cell number of macrophages from cLNs (A) and spleen (B) were not changed between each condition.

**Figure 9 CD192<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> macrophages in lymphoid tissues were not changed by NT-7 exposure**

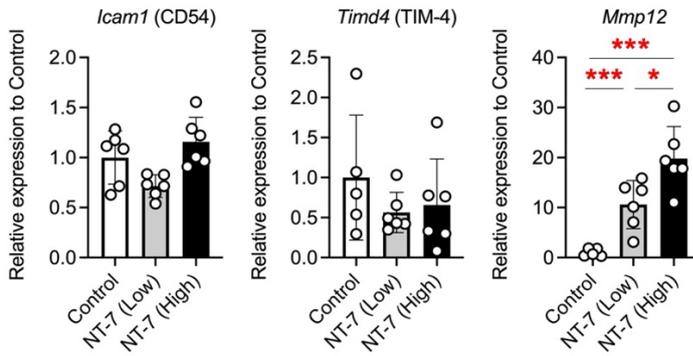


**Figure 10 CD163<sup>+</sup> and CD54<sup>+</sup> macrophages in lymphoid tissue were not changed by NT-7 exposure**



1 1

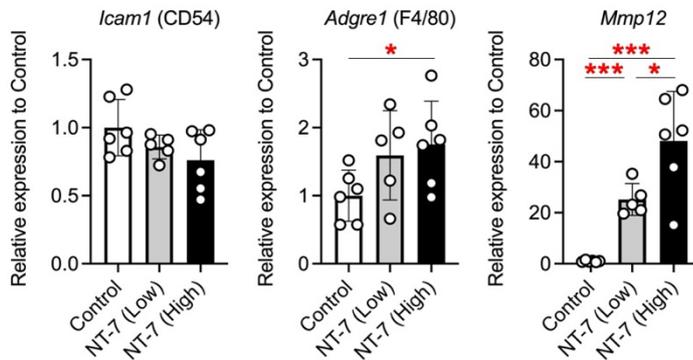
**Mmp12 mRNA expression in BALF was upregulated by NT-7 exposure**



qPCR was performed by using BALF.  
 The gene expression levels of *Mmp12* was significantly upregulated by NT-7 low and high exposure.  
 The gene expression levels of *Icam1* and *Timd4* were not changed between each condition.

1 2

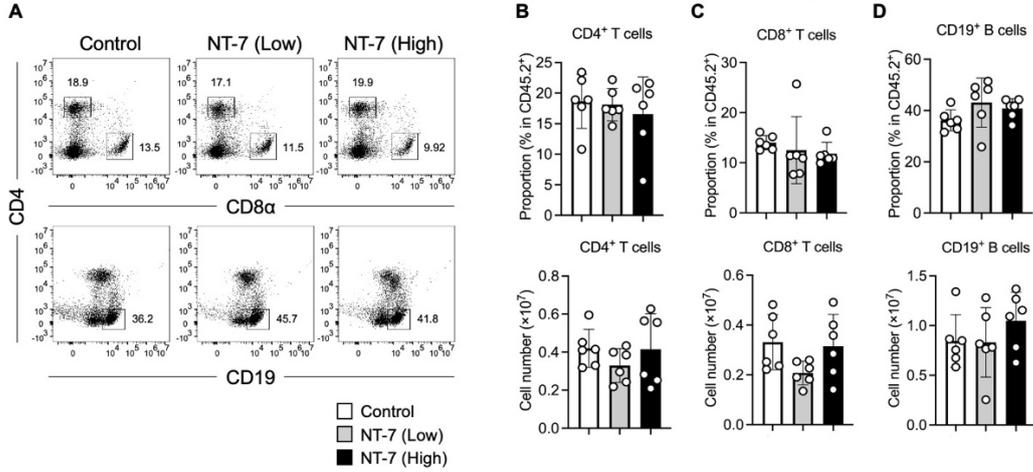
**Mmp12 mRNA expression of lung tissue was upregulated by NT-7 exposure**



qPCR was performed by using whole Lung tissue.  
 The gene expression levels of *Mmp12* was significantly upregulated by NT-7 low and high exposure.  
 The gene expression levels of *Adgre1* was significantly upregulated by NT-7 high exposure.  
 The gene expression levels of *Icam1* was not changed between each condition.

13

**T and B cell subsets in spleen were not changed by long-term exposure to NT-7.**

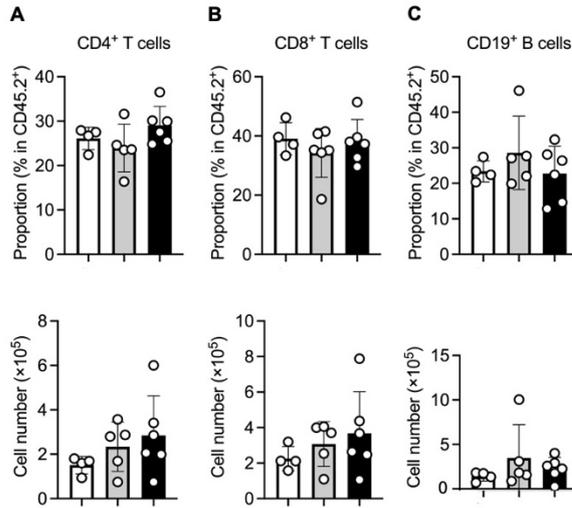


(A) Flow cytometric analysis by using spleen. Each panels were gated on CD45.2<sup>+</sup>.

The proportion and number of CD4<sup>+</sup> T cells (B), CD8<sup>+</sup> T cells (C) and CD19<sup>+</sup> B cells (D) from spleen.

14

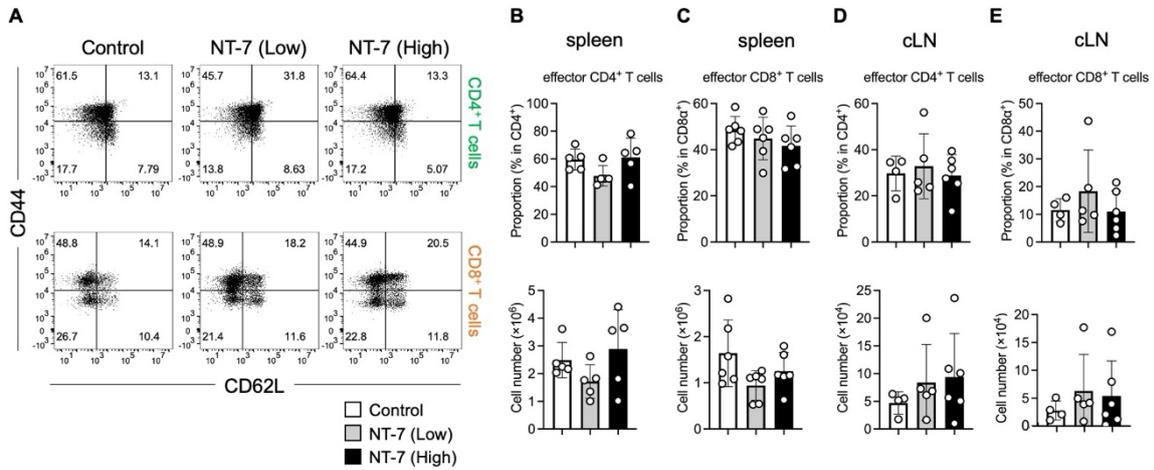
**T and B cell subsets in cLNs were not changed by long-term exposure to NT-7**



The proportion and number of CD4<sup>+</sup> T cells (A), CD8<sup>+</sup> T cells (B) and CD19<sup>+</sup> B cells (C) from cLNs.

图 1 5

The proportions and numbers of effector T cells were not changed by long-term exposure to NT-7.



Flowcytometric analysis by using spleen. Each panels were gated on CD4<sup>+</sup> (upper) and CD8<sup>+</sup> (lower). CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> T cells were defined as effector T cells (A). The proportion and number of effector CD4<sup>+</sup> T cells (A), effector CD8<sup>+</sup> T cells (B) in spleen, and effector CD4<sup>+</sup> T cells (C), effector CD8<sup>+</sup> T cells (D) in cLNs.

图 1 6

In vitro reaction of bone marrow-derived macrophages to MWCNT-7 (T-CNT) and NT-7

