

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) を 13 週間全身暴露 (経気道投与) した
雌雄ラットの脾臓を用いた脾臓中サイトカインの mRNA の発現量測定試験

目次

標題-----

試験目的-----

試料提供元-----

試験施設及び試験責任者-----

試験日程-----

試験関係者一覧-----

成果の公表-----

報告書作成者の署名、捺印及び日付-----

試験責任者の署名、捺印及び日付-----

陳述書-----

本文-----

標題：複層カーボンナノチューブ（MWCNT）を 13 週間全身曝露（経気道投与）した雌雄ラットの脾臓を用いた脾臓中サイトカインの mRNA 発現の測定

試験目的

平成23年度の厚生労働省ナノマテリアルの有害性等調査事業として、中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターで実施されたラットを用いた複層カーボンナノチューブ（MWCNT）の13週間全身曝露（経気道投与）試験で採取された脾臓を使用して、脾臓中マクロファージ及びTリンパ球から産生される代表的なサイトカイン類(IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β)のmRNAを測定定量し、その動向を評価することで、MWCNTの吸入曝露による全身影響及び毒性発現機序を解明するためのデータを提供することを目的とした。

試料提供元

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
神奈川県秦野市平沢 2445

試験施設及び試験責任者

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 15 番 1 号
北里大学医学部衛生学
教授 相澤 好治

試験日程

試験開始日 2011年 10月 5日
脾臓入手日 2011年 10月19日, 20日
試験終了予定日 2012年 3月31日

試験関係者一覧


試験責任者 相澤 好治
報告書作成者 木戸 尊將
試験関係者 角田 正史
工藤雄一郎
杉浦由美子

成果の公表

本試験で得られた成果の発表については、日本バイオアッセイ研究センター並びに厚生労働省の承認を受けた後に行う。


報告書作成者の署名、捺印及び日付

北里大学 医学部 衛生学

木戸 尊將 

試験責任者の署名、捺印及び日付

北里大学 医学部 衛生学

教授 相澤好治 

陳 述 書

試験名：複層カーボンナノチューブ（MWCNT）を13週間全身暴露（経気道投与）した雌雄ラットの脾臓を用いた脾臓中サイトカインの mRNA の発現量測定試験

本試験は、試験計画書に基づき、実施された。本報告書はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

北里大学医学部衛生学

試験責任者

相澤好弘



2012年3月16日

本 文

目次

要約	2
. 試験材料	3
-1-1. サイトカインの産生細胞及び機能	3
-1-2. サイトカインの選択理由	3
-1-3. 測定試料	4
. 試験方法	4
-1. cDNA 合成と調整	4
-1-1. 脾臓からのマクロファージと T リンパ球の調整	4
-1-2. cDNA の合成	5
-2. サイトカイン mRNA 発現測定と評価	5
-2-1. mRNA の発現測定	5
-2-2. サイトカインの mRNA 発現評価	6
-3. 数値処理と統計方法	6
-3-1. 数値の取り扱いと表示	6
-3-2. 統計処理	6
. 試験成績	7
-1. 脾臓中マクロファージのサイトカイン(IL-1 β 、 IL-6、 TNF- α 、 IL-10)の発現	7
-2. 脾臓中 T リンパ球のサイトカイン(IL-2, TGF- β)の発現	7
. 試験考察	7
. 参考文献	8

図表

要約

平成23年度の厚生労働省ナノマテリアルの有害性等調査事業として、中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターで実施されたラットを用いた複層カーボンナノチューブ (MWCNT) の13週間全身暴露 (経気道投与) 試験で採取された脾臓を使用して、脾臓中マクロファージ及びTリンパ球から産生されるサイトカイン(IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2, TGF- β)のmRNA発現量を測定し、その動向を評価することで、MWCNTの吸入暴露による全身影響及び毒性発現機序を解明することを目的とした。

MWCNTを全身暴露したラットの脾臓からマクロファージとリンパ球 (Tリンパ球) に分け、Total RNAを抽出し、cDNAを合成した。その後、リアルタイムPCR を用いて、マクロファージについては、IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10、Tリンパ球は、IL-2, TGF- β のmRNAの発現量を測定した。測定後は、群ごとに相対定量の平均値を算出し、一元配置分散分析により群間の比較を行い、post hoc testとしてStudent-Newman-Keuls testを行い、統計学的評価を行った。

マクロファージについては、雄のMWCNT暴露群では、有意水準までは達しなかったものの炎症に関わるサイトカインIL-1 β , IL-6, TNF- α のmRNA発現が対照群よりも高値であった。雌のMWCNT暴露群では、測定した全てのサイトカイン(IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α)のmRNA発現が対照群より高値で、1 mg/m³では、IL-6とIL-10、5 mg/m³では、IL-1 β , IL-6, IL-10が統計学的に有意であった。

Tリンパ球については、雌雄共にTGF- β はMWCNT暴露群で有意水準までは達しなかったものの対照群と比べて低値で、IL-2はMWCNT暴露群で統計学的に有意に低値であった。

以上のことから、MWCNTの13週間暴露によって雌雄差はあるが脾臓マクロファージにおいて炎症性サイトカインのmRNA発現が増大した。脾臓を介して全身または局所的に炎症を起こす可能性が示唆された。Tリンパ球については、雌雄共にMWCNT暴露群全てにおいてIL-2のmRNA発現が有意に低くなり、MWCNTの毒性反応が強く示された。IL-2のmRNA発現が低値であると腫瘍を殺傷するLAK細胞の誘導作用が低くなる。このことからMWCNT暴露により腫瘍に対する抵抗性が低くなる可能性が考えられた。

・ 試験材料

日本バイオアッセイ研究センターで2011年7月20日から2011年10月18日までの期間、0、0.2、1及び5 mg/m³の濃度のMWCNT（保土谷化学工業（株）製、MWNT-7）を全身暴露し、10月19日及び20日に解剖した雌雄F344/DuCrI CrIjラットから摘出した脾臓を試験材料とした。

-1-1. サイトカインの選択理由

MWCNT 暴露による生体影響を検索するために、炎症反応に関係するサイトカイン(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)、腫瘍形成に関係するサイトカイン(IL-2)、免疫調整に関係するサイトカイン(IL-10及びTGF- β)を選択し、測定した。Mitchell et al, (2009)は、MWCNTをマウスに13週間暴露して、脾臓のサイトカインの mRNA 発現量を測定した結果、肺泡マクロファージから放出されたTGF- β が血流を介して脾臓のT細胞の産生を抑制すると述べている。これを検証する意味で、試験計画書に記載したINF- γ からTGF- β に測定サイトカインを変更した。

-1-2. サイトカインの産生細胞及び機能

下記に測定したサイトカイン種とその主な産生細胞及びその主な性質や機能を示した。

サイトカイン種	主な産生細胞	主な性質・機能
インターロイキン1(IL-1 β)	マクロファージ、好中球	リンパ球及びマクロファージの活性化、繊維芽細胞の増殖
インターロイキン6(IL-6)	マクロファージ、Tリンパ球	炎症時の急性期反応物を増やす作用があり、様々な免疫的疾患に関与する
腫瘍壊死因子(TNF- α)	上皮細胞、繊維芽細胞、マクロファージ	炎症性サイトカインの発現を誘導し、腫瘍細胞にアポトーシスやネクローシスを誘導する
インターロイキン10(IL-10)	マクロファージ、Tリンパ球	Th1細胞抑制、Th2細胞活性化作用
インターロイキン2(IL-2)	Tリンパ球	NK細胞の活性化、腫瘍細胞を傷害する能力のあるリンパ球を誘導する(LAK細胞)
トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)	Tリンパ球	免疫制御、増殖抑制、機能発現の抑制

-1-3. 測定試料

抽出したラットの脾臓は、日本バイオアッセイ研究センターで使用した動物番号と対応した番号を付した培養液入り容器に入れ測定に供した。これ以降も使用容器は同様の取扱いをして試験材料間の区別を行った。

日本バイオアッセイ研究センターで使用した各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	10匹 (1001 ~ 1010)	10匹 (2001 ~ 2010)
1	0.2 mg/m ³ 群	10匹 (1101 ~ 1110)	10匹 (2101 ~ 2110)
2	1 mg/m ³ 群	10匹 (1201 ~ 1210)	10匹 (2201 ~ 2210)
3	5 mg/m ³ 群	10匹 (1301 ~ 1310)	10匹 (2301 ~ 2310)

mRNA 測定に使用した試料は、抽出した Total RNA が測定に十分な濃度の個体のみ使用し、群間の個体数を揃えて測定をした。mRNA 測定に使用した動物番号は以下の通りである。

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	6匹 (1002 ~ 1007)	6匹 (2002,2004 ~ 2008)
1	0.2 mg/m ³ 群	6匹 (1101 ~ 1106)	6匹 (2101 ~ 2106)
2	1 mg/m ³ 群	6匹 (1201 ~ 1206)	6匹 (2201 ~ 2206)
3	5 mg/m ³ 群	6匹 (1301 ~ 1306)	6匹 (2301 ~ 2306)

. 試験方法

-1. 試料調整と cDNA 合成

-1-1. 脾臓からのマクロファージと T リンパ球の調整

解剖後、10%fetal bovine serum入りRPMI1640(ME⁺)培養液2mlに採取した脾臓を入れ、40µmセルストレイナーですり潰した。赤血球溶血液1mlを加え遠心分離(800rpm)を行い、細胞の赤血球がなくなるまで繰り返した。培養液10ml中に細胞を懸濁させシャーレに移し、CO₂インキュベーターで2時間静置した。シャーレに付着した細胞をマクロファージ、浮遊細胞をリンパ球とし、チュルク染色溶液中でそれぞれの細胞数を計測し、5×10⁶/2mlに調製した。

その後、マクロファージには最終濃度が100ng/mlとなるようにリポポリサッカライド(LPS)を加えて6時間活性化し、Tリンパ球には最終濃度が1.25µg/mlとなるようにコンカナバリンA(conA)を加えて24時間活性化を行い、両細胞ともCO₂インキュベーター内で各々の時

間活性化させた。活性化終了後はTRIzol試薬(Invitrogen Tokyo, Japan)1mlを細胞に加えて混濁液を-80℃で冷凍保存した。

-1-2. cDNAの合成

TRIzol試薬入り細胞からTotal RNAをフェノール・クロロホルム抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnosticsjapan Tokyo, Japan)を用いて測定対象サイトカインcDNAを合成した。

-2. サイトカイン mRNA 発現測定と評価

-2-1. mRNA の発現測定

測定対象サイトカイン(IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β)の各プライマー及び合成した cDNA をリアルタイム PCR (Light Cycler system 2.0 (Roche Diagnosticsjapan, Tokyo, Japan))にかけ、測定対象サイトカインの mRNA の発現量をマクロファージについては IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 、T リンパ球については IL-2, TGF- β について測定した。プライマーデザイン及びリアルタイム PCR の各種条件は以下のとおりである。

サイトカイン	塩基配列	アニーリング温度()
GAPDH	sense: 5'-AACCTGCCAARTATGATGAC-3' antisense: 5'-TCATACCAGGAAATGAGCTT-3'	(R=AとG) 55 (Tsunoda et al, 2008)
IL-1 β	sense: 5'-ACAAGTGRTATTCTCCATGAGC-3' antisense: 5'-CCACTTTTGSTCTTGACTTCTAT-3'	(R=AとG) 55 (S=CとG) (Nakano et al, 2004)
IL-2	sense: 5'-CTGCAAAGGAAACACAGCAG-3' antisense: 5'-TGGGGAGTTTCAGATTCTTGTAAT-3'	48 (Roche)
IL-6	sense: 5'-CGAGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3' antisense: 5'-CTGGCTGGAAGTCTCTTGCGGAG-3'	60 (You et al, 2011)
IL-10	sense: 5'-GACCAGCTGGACAACATACT-3' antisense: 5'-GAGGGTCTTCAGCTTCTCWC-3'	56 (W=GとA) (Tsunoda et al, 2008)
TNF- α	sense: 5'-CCAGACCCTCACACTCAGATCA-3' antisense: 5'-TCTCCTGGTATGAAATGGCAAA-3'	62 (Laukova et al, 2010)
TGF- β	sense: 5'-GCAACAACGCAATCTATGACA-3' antisense: 5'-CCCTGTATTCCGTCTCCTTG-3'	62 (Laukova et al, 2010)

リアルタイムPCRのThermal cycleの条件は、変性95℃:1分、アニーリング:1分

伸長 72 :5 分行い、Cycles 数は 45 回であった。

-2-2. サイトカインの mRNA 発現評価

ハウスキーピング遺伝子のGAPDHを内部標準として定量し、サンプル量を補正することで各サイトカインの相対発現を定量し、mRNA発現を評価した(Tsunoda et al, 2008)。

サイトカインの mRNA の発現は、Roche のプロトコールに従い calibrator normalized relative ratio(相対定量)を指標として行った。対照サンプル中のハウスキーピング遺伝子 GAPDH の mRNA の初期量に対するサイトカインの mRNA 初期量の比と、暴露サンプルにおける GAPDH の mRNA の初期量に対するサイトカインの初期量の比を求め、定量した。また、初期 mRNA の推定には、目的分子に対する PCR 効率、Crossing point における PCR サイクル数、増幅サイクル数等を考慮して行った。下記に相対定量式を示す。

$$\text{calibrator normalized relative ratio} = \frac{N_0\text{target}(\text{sample})/N_0\text{reference}(\text{sample})}{N_0\text{target}(\text{control})/N_0\text{reference}(\text{control})} = \frac{E_T^{\text{CpT}(S1)-\text{CpT}(S2)}}{E_R^{\text{CpT}(S1)-\text{CpT}(S2)}}$$

N_0 : 初期 mRNA 量

E_T : 目的分子に対する PCR 効率 E_R : リファレンス(ハウスキーピング遺伝子)

C_p 閾値に到達した時の増幅サイクル数 S : サンプル。

-3. 数値処理と統計方法

-3-1. 数値の取り扱いと表示

数値については、小数点以下第 2 位までを表示した。

-3-2. 統計処理

群ごとに相対定量の平均値を算出し、一元配置分散分析で群間の比較を行い、post hoc testとしてStudent-Newman-Keuls testを行った。

． 試験成績

-1. 脾臓中マクロファージのサイトカイン(IL-1 β 、 IL-6、 TNF- α 、 IL-10) の発現

- 雄 -

測定結果を FIGURE 1、 TABLE 1 に示した。

MWCNT 暴露群では、有意水準まで達しなかったものの対照群と比べて炎症に関わるサイトカイン IL-1 β 、 IL-6、 TNF- α の mRNA 発現は高値であった。

- 雌 -

測定結果を FIGURE 2、 TABLE 2 に示した。

雌では、IL-1 β が 5 mg/m³ で対照群比べて有意な高値を示した。IL-6 は、0.2 mg/m³ と 5 mg/m³ が対照群と比べて有意に高く、5 mg/m³ は 0.2 mg/m³ より高かった。IL-10 では、0.2 mg/m³ と 5 mg/m³ が対照群より有意な高値を示した。TNF- α に関しては有意な変化は示さなかった。

-2. 脾臓中 T リンパ球のサイトカイン(IL-2, TGF- β)の発現

- 雄 -

測定結果を FIGURE 3、 TABLE 3 に示した。

雄では、IL-2 が 0.2 mg/m³ 以上の暴露群で対照群より有意な高値を示した。TGF- β は、有意な変化は示さなかった。

- 雌 -

測定結果を FIGURE 4、 TABLE 4 に示した。

雌でも雄と同様、IL-2 が 0.2mg/m³ 以上の暴露群で対照群より有意な高値を示した。TGF- β は、有意な変化は示さなかった。

． 試験考察

脾臓中マクロファージの測定において、対照群と比べて雌の 5 mg/m³ 群で IL-1 β 、 IL-6 の mRNA 発現が有意に高い結果となり、TNF- α は有意性を示さなかったが高値であった。このことから雌では、炎症反応が惹起された可能性が考えられた。一方、雄でも有意水準までは達しなかったものの、対照群と比べて MWCNT 暴露群は炎症に関わるサイトカイン IL-1 β 、 IL-6、 TNF- α の mRNA 発現は高値であった。これらのことから、雌雄差はあるものの MWCNT の 13 週間暴露によってマクロファージの炎症性サイトカインの mRNA 発現が増大したことが示され、免疫応答により全身または局所的に炎症を引き起こす可能性が示唆された。また、マクロファージが局所において MWCNT に暴露されれば同様に炎症反応を起こす可能性も考えられた。IL-10 では、雌雄の感受性に相違があった可能性が考えられた。雌では、5 mg/m³ 群で mRNA 発現が有意に高い結果となったが、雄では特記すべき変化は示さなかった。IL-10 は、炎症反応の抑制に関与することが知られている。雌の高値は、炎症性サイトカイン発現の増大に伴い、対称的に炎症抑制反応が引き起こされ mRNA の発現が増大した可能性がある。雄では、全身もしくは局所の炎症影響が弱かったため、IL-10 は発現しなかったと推察される。

T リンパ球については、雌雄共に全 MWCNT 暴露群で IL-2 の mRNA 発現が有意に低く

なり、MWCNTの毒性影響が強く示された。IL-2のmRNA発現が低い場合、腫瘍となった細胞を傷害するLAK細胞の誘導作用が低くなることが知られている(Yada, J. 2005)。日本バイオアッセイ研究センターでの13週間暴露試験では、病理組織学的検査において肉芽腫が確認されていることから、IL-2が低下しLAK細胞の誘導が低下することで肉芽腫などが発生した可能性が考えられる。TGF- β については個体差が強く現れ雌雄共に有意な変化はみられず、本研究では免疫調整反応にはまだ影響が現われていない可能性が考えられた。

Mitchell et al, (2009)らは、免疫抑制の観点からサイトカインを測定し、肺胞マクロファージによって全身へ影響が起こることを説いている。本研究では、脾臓細胞の炎症系サイトカインを中心にmRNAの発現の評価を行った。その結果、雌雄による感受性の違いや個体差の影響も考えられるが、脾臓中の炎症反応は上昇する可能性が示唆された。つまり本研究から、MWCNT暴露により、肺における肺胞マクロファージの局所反応にとどまらずMWCNTが吸収され、血流に乗り脾臓に達し、脾臓での局所的な毒性を反映している可能性や全身的な免疫反応、あるいは、これらの総和としての毒性影響を考慮することが必要と思われる。脾臓由来のマクロファージによる炎症反応の上昇やTリンパ球の腫瘍に対する抵抗性が減少している可能性がある。

今後は、ELISAによる血中のサイトカイン濃度の測定やp53等のがん抑制遺伝子の動向を視野にいれた探索的研究が必要となるかもしれない。

． 参考文献

- 1 . Laukova M, Vargovic P, Krizanova O, and Kvetnansky R. (2010) : Repeated Stress Down-Regulates β_2 – and α_2c – Adrenergic Receptors and Up – Regulates Gene Expression of IL-6 in the Rat Spleen. Cellular and Molecular Neurobiology 30, 1077-1087.
- 2 . Mitchell L.A, Gao Jun, Vander Wal R, Gigliotti Andrew Burchiel S.W, McDonald J.D. : Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. Toxicological Sciences 100, 203-214.
- 3 . Nakano K, Tsunoda M, Konno N. (2004) Tributyltin(TBT)increases TNF α mRNA expression and induces apoptosis in the murine macrophage cell line in vitro. Environmental Health and Preventive Medicine 9, 266-271.
- 4 . Tsunoda M, Yoshida T, Tsuji M, Zhang Y, Sugaya C, Inoue Y, Miki T, Kudo Y, Satoh T, Aizawa Y. (2008) The effects of dibutyltin (DBT) dichloride on the viability and the productions of tumor necrosis factor α and interleukin-12 in murine macrophage cell Line, J774.1. Bromedical Research on Trace Element 19, 67-71.
- 5 . Yada, J. (2005) : Textbook of Immunology for Medical Student and Physicians. Chugai-Igakusha Tokyo 9th Ed, PP. 276-307.
- 6 . You Z, Luo C, Zhang W, Chen Y, He J, Zhao Q, Zuo R, and Wu Y. (2011) : Pro-and anti inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress : Involvement in depression. Behavioural Brain Research 225, 135-141.

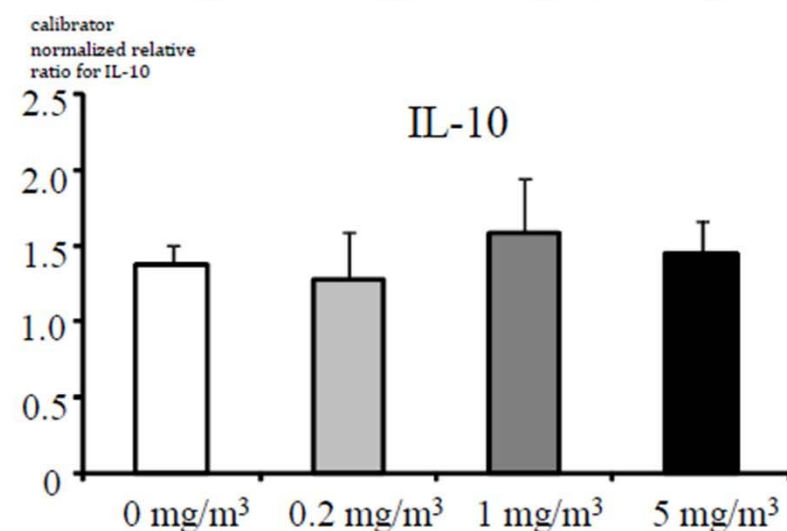
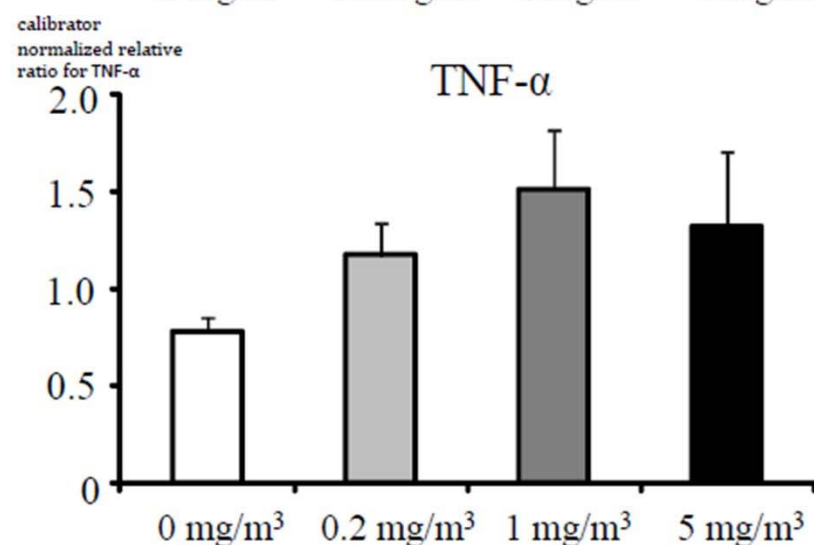
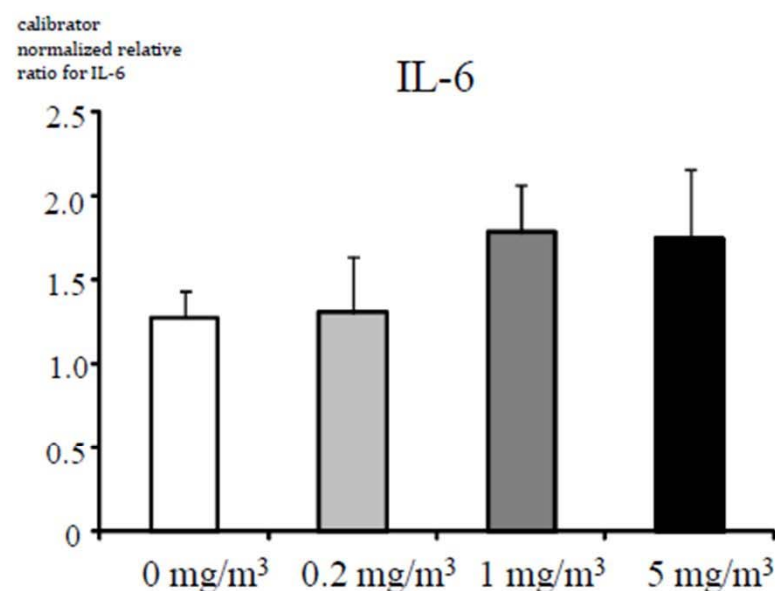
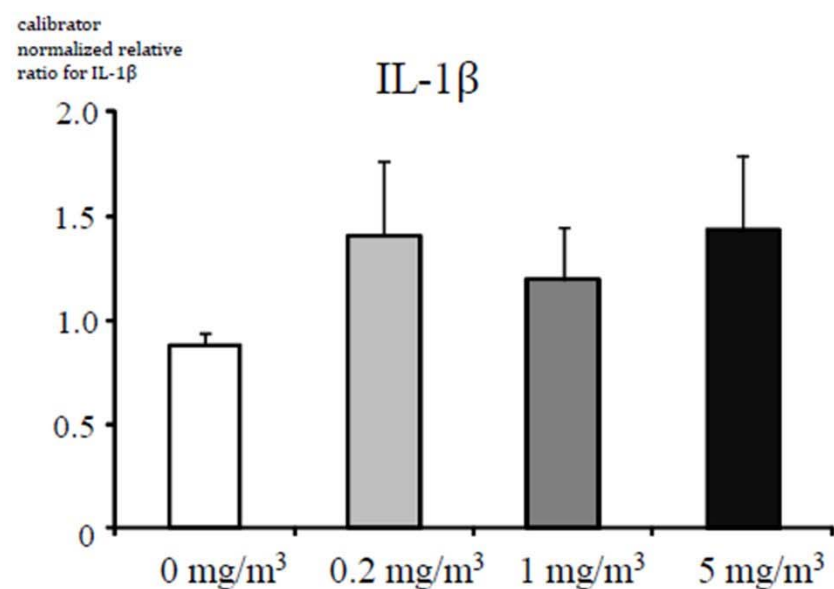


Figure 1. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic macrophages from male rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

p=0.495 by ANOVA for IL-1 β

p=0.264 by ANOVA for TNF- α

p=0.499 by ANOVA for IL-6

p=0.871 by ANOVA for IL-10

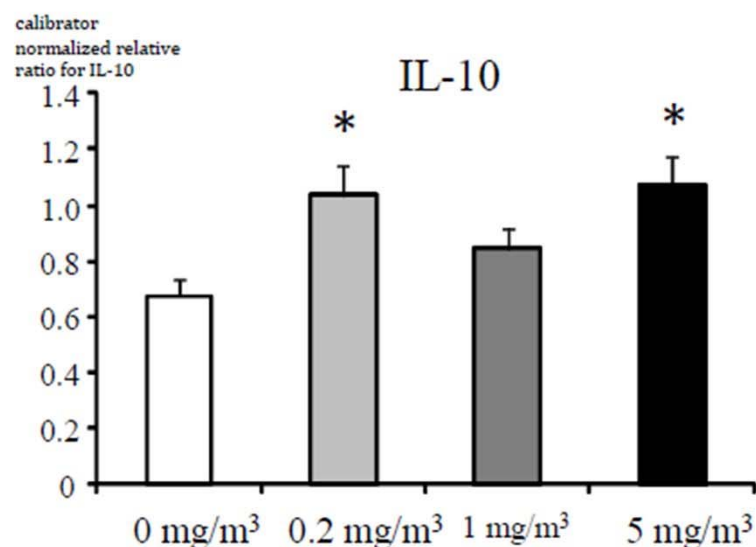
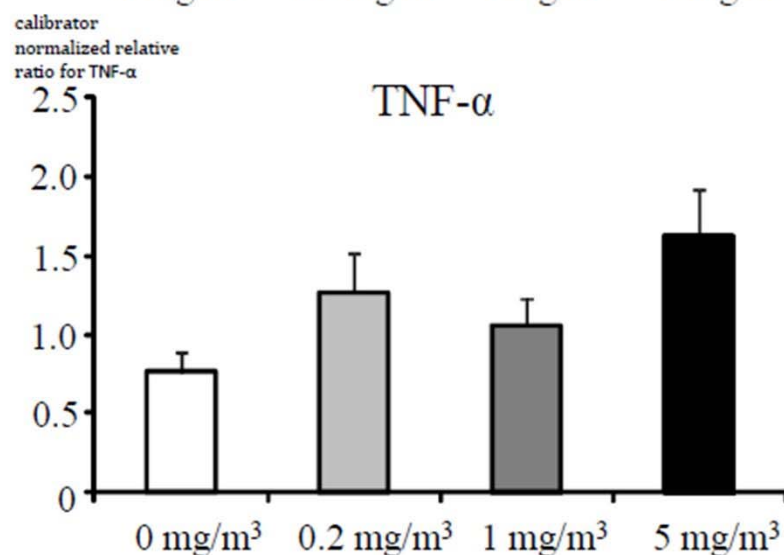
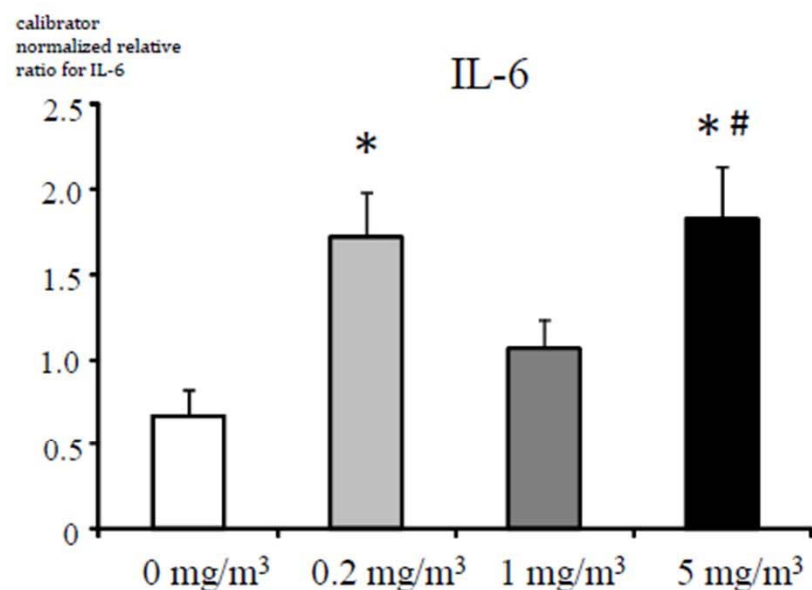
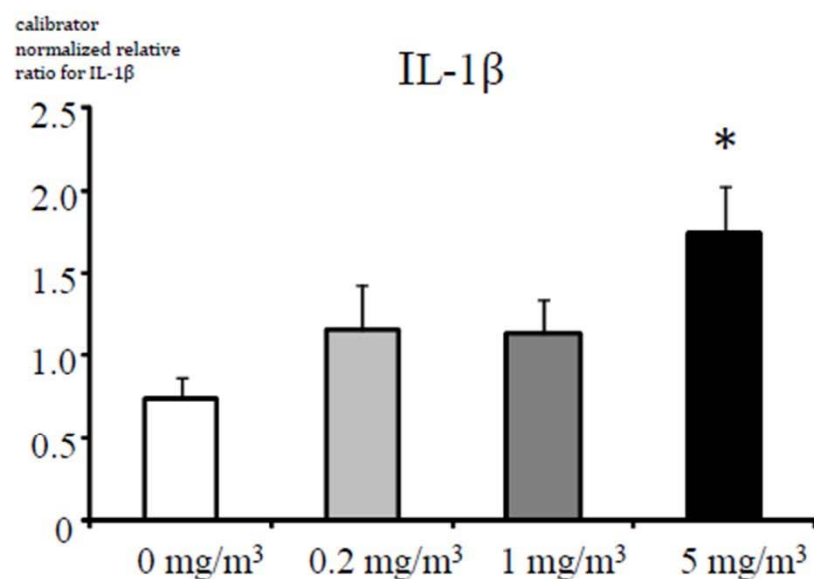


Figure 2. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic macrophages from female rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

p=0.047 by ANOVA for IL-1 β

* p < 0.05 (VS 0mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.073 by ANOVA for TNF- α

p=0.006 by ANOVA for IL-6

* p < 0.05 (VS 0mg/m³), #p < 0.05 (VS 1mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.020 by ANOVA for IL-10

* p < 0.05 (VS 0mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

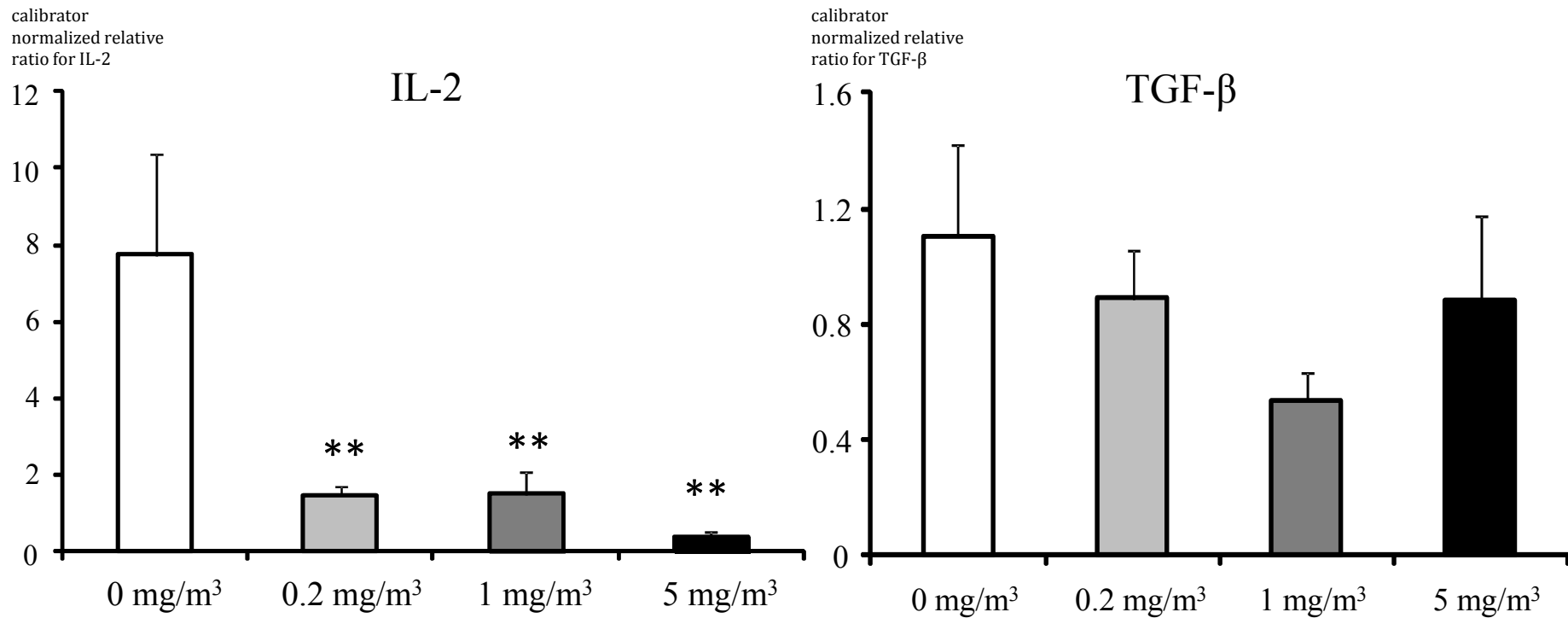


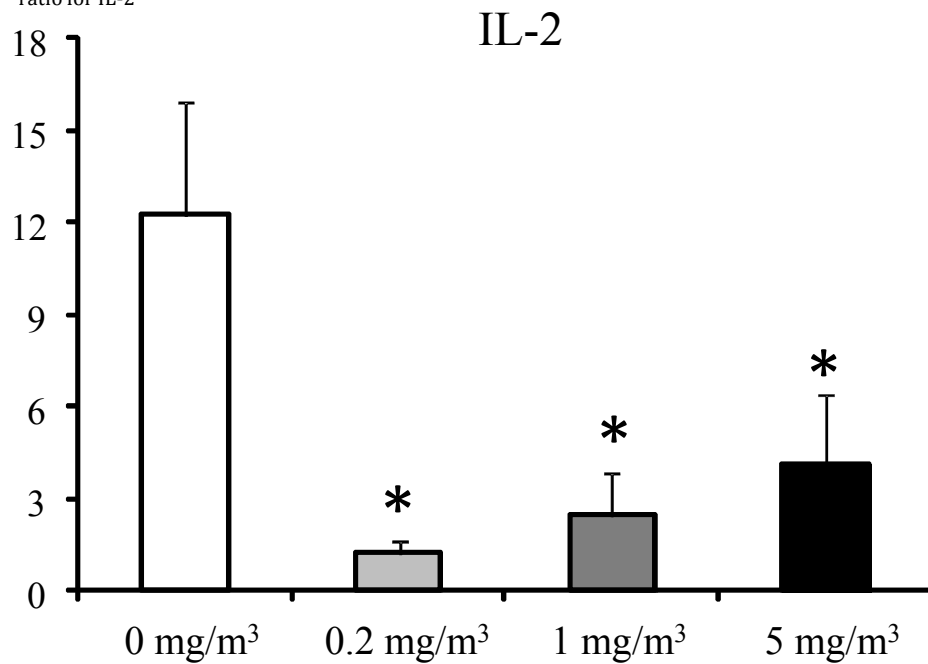
Figure 3. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic T-lymphocytes cell from male rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

p=0.0037 by ANOVA for IL-2

** p < 0.01 (VS 0 mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.424 by ANOVA for TGF-β

calibrator
normalized relative
ratio for IL-2



calibrator
normalized relative
ratio for TGF- β

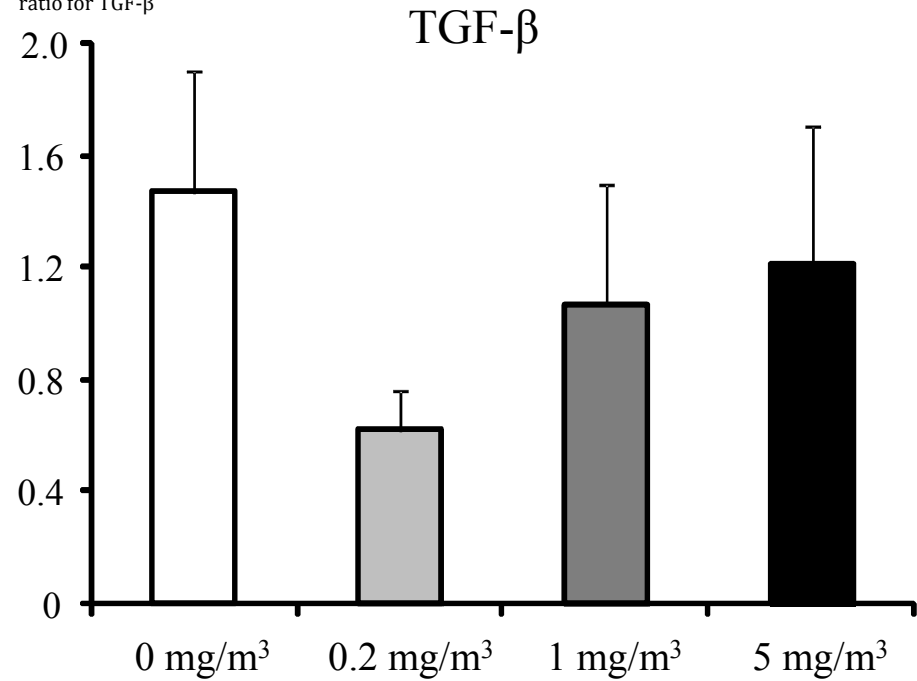


Figure 4. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic T-lymphocytes cell from female rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

p= 0.0193 for IL-2

* p < 0.05 (VS 0 mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p= 0.505 by ANOVA for TGF- β

Table 1. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic macrophages from male rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

IL-1 β ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.877	0.152	0.062	0.4945
0.2 mg/m ³	1.406	0.875	0.357	
1 mg/m ³	1.194	0.612	0.250	
5 mg/m ³	1.433	0.870	0.355	
IL-6 ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	1.277	0.379	0.155	0.499
0.2 mg/m ³	1.307	0.816	0.333	
1 mg/m ³	1.787	0.687	0.280	
5 mg/m ³	1.758	0.994	0.406	
TNF- α ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.779	0.178	0.073	0.2638
0.2 mg/m ³	1.177	0.395	0.161	
1 mg/m ³	1.517	0.747	0.305	
5 mg/m ³	1.325	0.947	0.387	
IL-10 ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	1.379	0.304	0.124	0.8714
0.2 mg/m ³	1.286	0.757	0.309	
1 mg/m ³	1.590	0.890	0.363	
5 mg/m ³	1.459	0.499	0.204	

p=0.495 by ANOVA for IL-1 β

p=0.499 by ANOVA for IL-6

p=0.264 by ANOVA for TNF- α

p=0.871 by ANOVA for IL-10

Table 2. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic macrophages from female rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

IL-1 β ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.743	0.29	0.118	0.0467
0.2 mg/m ³	1.156	0.655	0.268	
1 mg/m ³	1.131	0.522	0.213	
5 mg/m ³	1.741*	0.704	0.287	
IL-6 ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.670	0.383	0.156	0.0056
0.2 mg/m ³	1.721*	0.628	0.257	
1 mg/m ³	1.067	0.422	0.172	
5 mg/m ³	1.829* [#]	0.747	0.305	
TNF- α ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.759	0.316	0.129	0.0733
0.2 mg/m ³	1.271	0.614	0.251	
1 mg/m ³	1.058	0.410	0.167	
5 mg/m ³	1.622	0.727	0.297	
IL-10 ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	0.674	0.151	0.062	0.0203
0.2 mg/m ³	1.034*	0.270	0.110	
1 mg/m ³	0.846	0.185	0.075	
5 mg/m ³	1.067*	0.254	0.104	

p=0.047 by ANOVA for IL-1 β

* p < 0.05 (VS 0mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.073 by ANOVA for TNF- α

p=0.006 by ANOVA for IL-6

* p < 0.05 (VS 0mg/m³), #p < 0.05 (VS 1mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.020 by ANOVA for IL-10

* p < 0.05 (VS 0mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

Table 3. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic T-lymphocytes cell from male rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

IL-2 ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	7.761	6.409	2.617	0.0037
0.2 mg/m ³	1.463**	0.606	0.247	
1 mg/m ³	1.508**	1.413	0.577	
5 mg/m ³	0.396**	0.303	0.124	
TGF-β ♂	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	1.106	0.778	0.314	0.4238
0.2 mg/m ³	0.887	0.409	0.167	
1 mg/m ³	0.537	0.231	0.094	
5 mg/m ³	0.879	0.729	0.298	

p=0.0037 by ANOVA for IL-2

** p < 0.01 (VS 0 mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p=0.424 by ANOVA for TGF-β

Table 4. The relative mRNA expressions of cytokines in splenic T-lymphocytes cell from female rats expose to MWCNT by whole-body inhalation for 13-weeks.

IL-2 ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	12.246	8.964	3.660	
0.2 mg/m ³	1.224*	0.790	0.353	0.0193
1 mg/m ³	2.470*	2.999	1.341	
5 mg/m ³	4.112*	5.508	2.248	
TGF-β ♀	average	standard deviation	standard error	P-value
0 mg/m ³	1.470	1.052	0.430	
0.2 mg/m ³	0.617	0.359	0.147	0.5047
1 mg/m ³	1.071	1.053	0.430	
5 mg/m ³	1.209	1.201	0.490	

p= 0.0193 for IL-2

* p < 0.05 (VS 0 mg/m³) by Student-Newman-Keuls test

p= 0.505 by ANOVA for TGF-β