

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：27501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12610

研究課題名(和文) 妊娠期の微小粒子曝露が母体環境に与える影響

研究課題名(英文) PM2.5 Exposure during Pregnancy and Maternal Environment

研究代表者

吉田 成一 (Yoshida, Seiichi)

大分県立看護科学大学・看護学部・准教授

研究者番号：40360060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大気汚染物質のPM2.5：微小粒子の次世代影響は、微小粒子の胎仔移行による直接影響か、妊娠環境の変化による間接影響が不明である。そこで、妊娠マウスに微小粒子を処理し、母体肝臓、胎盤、胎仔の遺伝子発現変動を評価し解明を試みた。微小粒子が胎仔移行し直接影響を与える場合、異物代謝に係わる遺伝子(対象遺伝子数125)発現変動は胎仔と母体肝臓や胎盤で同様の変化が認められるが、共通発現変動様式を認めた遺伝子はなかった。一方、母体血中の炎症性サイトカインMCP-3は有意に高値となり、微小粒子による次世代影響は微小粒子の胎仔移行による影響ではなく、母体環境の変化により、次世代に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent experimental studies, we reported the aggravating effects of in utero exposure to PM 2.5 on male reproduction and immune system in offspring male mice. However, the effects of pregnancy PM exposure on the pregnant mice, placenta and fetus have not been investigated. Therefore, we investigated the effects of fetal PM2.5 exposure on gene expression in maternal liver, placenta, and fetus. If the PM2.5 have a direct effect on the fetal transition, the gene associated with the foreign body metabolism (125 target genes) expression variation is observed similar changes in fetal and maternal liver and placenta, but there was no gene that recognized the common expression variation. On the other hand, inflammatory cytokine MCP-3 in maternal blood becomes significantly higher, the next-generation effect by micro particles is not the effect of fetal migration of PM2.5, the change in the maternal environment, it is possible to influence the next generation it was suggested.

研究分野：環境影響評価

キーワード：PM2.5 胎仔 母体 サイトカイン 炎症

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、微小粒子 (PM2.5) などの粒子状物質の曝露により、マウスの雄性生殖機能の低下や炎症誘発、アレルギー増悪作用が生じることを明らかにしてきた。さらに、妊娠マウスに PM2.5 を曝露し、雄性出生仔マウスの生殖系や免疫系への影響を検討し、雄性生殖機能の低下、アレルギー症状の増悪が生じることを明らかにしてきた。しかし、雄性出生仔マウスへの影響は、妊娠マウスに処理した粒子が胎仔に移行し影響を与えているか、妊娠環境の変化により間接的に胎仔に影響が生じるか不明であった。

2. 研究の目的

胎仔期 PM2.5 曝露による出生後の影響が PM2.5 の胎仔移行により、直接影響を及ぼすものか、PM2.5 が母体環境に影響を与え、間接的に胎仔に影響を与えるか明らかにすることを目的とした。母体、胎盤、胎仔における遺伝子発現変動を比較し、三者で共通する変動様式であれば、PM2.5 が母体、胎盤を経由し胎仔に移行し、PM2.5 は胎仔に直接影響を与えることを、三者で共通する発現変動様式が認められない場合、PM2.5 は胎仔移行せず、母体環境に影響を与え、その影響が間接的に胎仔に何らかの影響を与えることを示すことになり、影響発生機序の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

妊娠マウスに PM2.5 を気管内投与した。使用した PM2.5 は、中国瀋陽市で採取した PM2.5 である。使用した粒子の平均粒径は 1.3 μ m であった。生理食塩水に懸濁した PM2.5 を妊娠 7 日目及び 14 日目に生理食塩水 100 μ l に 200 μ g の PM2.5 が含まれるように調整し、1 匹あたり、100 μ l を投与した。対照群には生理食塩水を投与した。

妊娠 15 日目に、各群の妊娠マウスをハロタン麻酔下で心採血後、肝臓、胎盤および胎仔を摘出し、胎仔胎盤は重量を測定し、1.5ml の RNA later (Ambion 社製) の中に入れ、-20 で保存した。また、胎仔の性別判断用に胎仔上肢の一部分を切り取り、1.5ml エッペンドルフチューブに入れ、-80 で保存した。採取した上肢から DNA を抽出、Sry 遺伝子の有無により性別を判定、雄性胎仔およびその胎盤、母獣肝臓の RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8 x 60K Ver 2.0 (Agilent Technologies, CA, USA)) にハイブリダイズ、マイクロアレイスキャナ (Agilent DNA マイクロアレイスキャナ (G2505B、Agilent Technologies, CA, USA)) にて蛍光強度を測定し、GeneSpringGX Ver10.0 (Agilent Technologies, CA, USA) により遺伝子発現を解析した。遺伝子発現の値は、発現比 2n 倍の時の n として示した。母体血液中の各種サ

イトカイン・ケモカインを ELISA 測定法にて測定した。

統計処理は KyPlot Ver5 を用い Student の t 検定による有意差検定を行い、危険率が 5% 以下を持って有意とした。

4. 研究成果

PM2.5 曝露による母獣妊娠率及び胎仔数、胎仔および胎盤重量への影響

PM2.5 曝露による母獣への影響を検討するため、各群の妊娠率、胎仔数を解析した。妊娠率、胎仔数は、対照群と比較して、PM2.5 処理による有意な変動は認められなかった。また、胎仔期 PM2.5 曝露による胎仔および胎盤重量を測定し、PM2.5 の胎仔期曝露による影響を検討したところ、胎仔重量が 5.5% 有意に低下した (p<0.001) (表 1)。一方、胎盤重量に有意な変動は認められなかった。

表1 PM2.5曝露による妊娠率・胎仔数及び胎仔重量と胎盤重量への影響

	Control群	PM2.5群
妊娠率	5/5	5/5
胎仔数	66	76
胎仔重量 (mg)	529.8 \pm 39.1	500.7 \pm 89.1
胎盤重量 (mg)	95.5 \pm 19.4	98.1 \pm 24.8

平均値 \pm 標準偏差, *** p<0.001

遺伝子発現に及ぼす影響

DNA マイクロアレイによる全解析遺伝子 56,689 のうち、胎仔における PM2.5 群の発現量が Control 群の 2 倍以上となった遺伝子は 2,645、発現量が 1/2 以下となった遺伝子は 298 であった。また、胎盤と母体肝臓においては、PM2.5 群の発現量が Control 群の 2 倍以上となった遺伝子は、それぞれ 740、2,971、発現量が 1/2 以下となった遺伝子は 1,639、476 であった (表 2)。

DNA マイクロアレイによる全解析遺伝子のうち、性分化に関連する遺伝子は 428 あり PM2.5 群の雄性胎仔の発現量が Control 群の雄性胎仔の 2 倍以上となった遺伝子は 16、発現量が 1/2 以下となった遺伝子は 3 であった (表 2)。抗ミューラー管ホルモンや、黄体形成ホルモン/絨毛性腺刺激ホルモン受容体遺伝子の発現誘導が認められた。また、精子形成において必須な遺伝子の発現抑制が認められた。

細胞周期に関連する遺伝子は 6,179 あり PM2.5 群の雄性胎仔の発現量が Control 群の雄性胎仔の 2 倍以上となった遺伝子は 137、発現量が 1/2 以下となった遺伝子 27 であった。シグナル伝達関連因子の発現誘導、成長ホルモン放出ホルモン受容体やプロテアーゼイ

ンヒビターといった遺伝子の発現抑制が認められた。

表2 PM2.5曝露による発現変動遺伝子数

	母体肝臓		胎盤		胎仔	
	誘導 ^b	抑制 ^c	誘導	抑制	誘導	抑制
全解析遺伝子 (56,689) ^a	2971	476	740	1639	2645	298
性分化 (428)	-	-	-	-	16	3
細胞分化 (6,179)	-	-	-	-	137	27
異物代謝 (125)	10	5	3	0	4	2

^a解析対象遺伝子数

^bControl群と比較して発現量が2倍以上となった遺伝子, ^c発現量が1/2以下となった遺伝子

異物代謝に関連する遺伝子は125あり、胎仔におけるPM2.5群の発現量がControl群の2倍以上となった遺伝子は4、発現量が1/2以下となった遺伝子は2であった。また、胎盤と母体肝臓において、PM2.5群の発現量がControl群の2倍以上となった遺伝子は、それぞれ3、10、発現量が1/2以下となった遺伝子は、肝臓は5であった。肝臓ではCyp2a5などの遺伝子の発現が誘導され、Cyp2c44などの遺伝子の発現が抑制された。肝臓と胎仔で共通して発現が誘導されている遺伝子はCyp2c39で、肝臓と胎盤で共通して発現が誘導されている遺伝子はCyp2d34であった。また、肝臓と胎仔や肝臓と胎盤で共通して発現が抑制されている遺伝子は認められなかった(図1)。

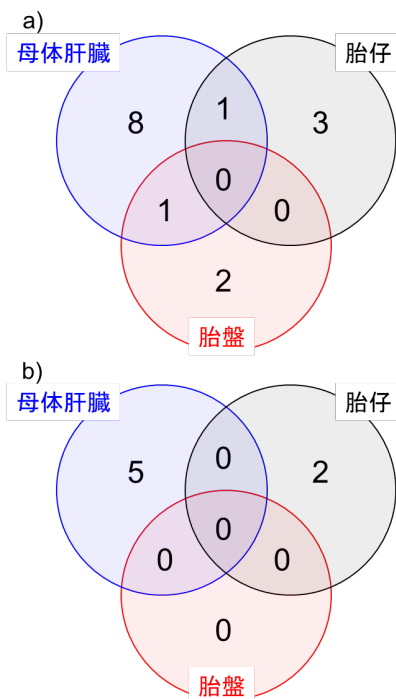


図1 母体肝臓、胎盤及び胎仔における発現が認められた異物代謝関連遺伝子の関係(ベン図)
a) 発現誘導 b) 発現抑制

また、酸化ストレスに関連する遺伝子は525あり、母体肝臓において、PM2.5群の発現量がControl群の2倍以上となった遺伝子は11、発現量が1/2以下となった遺伝子は6であった。母体肝臓と胎盤、胎仔で共通した遺伝子は認められなかった(図2)。

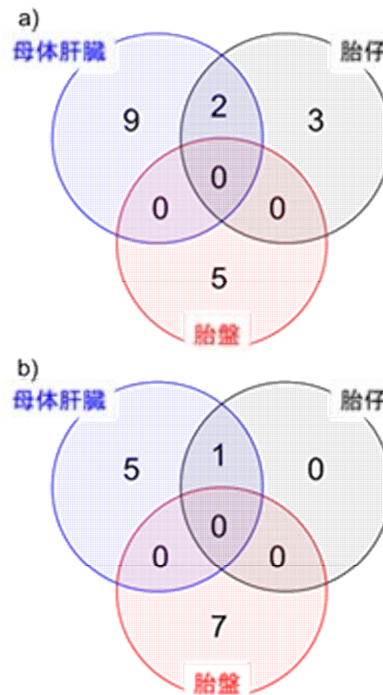


図2 母体肝臓、胎盤及び胎仔における発現が認められた酸化ストレス関連遺伝子の関係(ベン図)
a) 発現誘導 b) 発現抑制

母体血液中の各種サイトカイン・ケモカイン量への影響

胎仔期PM2.5曝露による母体血液中のサイトカイン・ケモカイン量に対する影響を検討した。MCP-3は、Control群では発現していなかったが、PM2.5群で発現が認められた($p < 0.001$) (表3)。

表3 血清中のサイトカイン・ケモカイン量

	Control群	PM2.5群
Eotaxin	269.4 ± 23.1	234.2 ± 69.7
INT- γ	0.2 ± 0.3	0.8 ± 1.3
IL-5	1.1 ± 1.4	2.0 ± 3.8
IL-6	0.3 ± 0.7	0.3 ± 0.7
IL-12	1676.5 ± 332.1	1941.5 ± 423.2
IL-13	N.D.	N.D.
IL-17	N.D.	N.D.
KC	64.7 ± 18.5	72.0 ± 11.0
MCP-1	30.5 ± 8.6	49.9 ± 20.2
MCP-3	N.D.	59.5 ± 1.4***
MIP-1 α	N.D.	N.D.
RANTES	100.8 ± 39.1	75.8 ± 19.8
TNF	4.6 ± 0.9	5.9 ± 1.0

平均値 ± 標準偏差, *** $p < 0.001$

これらの結果から、PM2.5の胎仔期曝露は胎仔の発育を抑制することが示唆された。また、母体と胎仔において、共通の発現変動様式が認められた因子はほとんどなく、PM2.5の胎仔移行の可能性が小さいことが示唆された。一方、PM2.5の曝露により、母体環境ではストレス関連因子の発現が亢進するとともに、炎症性サイトカインの発現量が誘導されることから、母体環境の変化が認められた。

妊娠中に曝露したPM2.5は直接胎仔に作用するのではなく、母体環境の変化を介した間接的な影響であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yoshida S, Ichinose T, Arashidani K, He M, Takano H, Shibamoto T., Effects of Fetal Exposure to Asian Sand Dust on Development and Reproduction in Male Offspring. Int J Environ Res Public Health. 13(11). pii: E1173. 2016.

[学会発表](計 1 件)

吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、市瀬 孝道：PM2.5の胎仔期曝露が雄性胎仔発育に及ぼす影響 2018年9月 福岡 第59回大気環境学会年会

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 成一 (YOSHIDA SEIICHI)

大分県立看護科学大学・看護学部・准教授
研究者番号：40360060