

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281033

研究課題名(和文) 胎仔期の越境微小粒子曝露と出生仔の雄性生殖機能低下と気管支喘息増悪への次世代影響

研究課題名(英文) Effects of Fetal Exposure to PM2.5 on the Reproductive System and the Immune System in Male Offspring

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) 9,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔期PM2.5曝露による出生仔の雄性生殖系への影響と気管支ぜん息増悪作用について調べた結果、越境飛来したPM2.5が、雄性生殖機能を低下させ、気管支ぜん息症状を増悪することが明らかになった。しかし、日本で発生したPM2.5ではこのような影響が認められなかった。さらにPM2.5の付着構成成分である、LPSの胎仔期曝露では雄性生殖機能の低下や気管支ぜん息症状の増悪作用が認められなかったことから、PM2.5のその他の構成成分が寄与因子であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the effects of PM2.5 over the central and eastern China on the male reproductive system and immune system in the next generation, we administered PM2.5 intratracheally to pregnant mice. We found decreased daily sperm production (DSP) and seminiferous tubule degeneration in male offspring exposed to PM2.5 during the fetal period. Moreover, postnatal intratracheal administration of OVA to offspring exposed to PM2.5 in utero caused significant increases in the numbers of inflammatory cells. Our findings show that fetal exposure to PM2.5 that humans breathe has an effect male reproductive function and aggravated the sensitized immune system in male offspring.

研究分野：環境影響評価

キーワード：PM2.5 次世代影響 胎仔期曝露 雄性生殖系 免疫系

1. 研究開始当初の背景

東アジア地域における急速な経済発展に起因する、各種大気汚染物質の発生と汚染物質の移送に伴う日本を初めとした周辺各国への越境大気汚染が進んでいる。特に、中国大陸からは著しい経済発展に伴う人為発生源由来の煙霧や土壌由来粒子の黄砂などによる大気汚染の発生頻度および粒子の大気中濃度が、ともに増加している。実際、平成25年10月20日～21日、中国東北地方に発生した大気汚染は極めて深刻で数 $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ の $\text{PM}_{2.5}$ が観測され、 $1000\mu\text{g}/\text{m}^3$ に達したエリアもあり、視界不良、学校の休校など市民生活に影響が生じた。また、平成25年初頭、日本各地において、中国大陸からの越境飛来と推定された高濃度の $\text{PM}_{2.5}$ が観測され、 $\text{PM}_{2.5}$ による健康影響の懸念が急速に高まってきている。これまで、 $\text{PM}_{2.5}$ の健康影響として、死亡率の増加、呼吸器系・循環器系疾患との関連、免疫系に影響を与えることなどが疫学調査、実験動物を用いた毒性学的研究から示唆あるいは明らかにされてきている。しかし、これらの研究は、実際に吸入あるいは曝露を受けたヒト・動物に対する影響を評価するものであり、 $\text{PM}_{2.5}$ による次世代への影響を評価したものはほとんどない。 $\text{PM}_{2.5}$ による次世代への影響が明らかにされているものは、 $\text{PM}_{2.5}$ 濃度が高い地域の妊婦から生まれる子どもの体重が低いこと、自閉症のリスクが増大すること、リンパ球の分化に影響を与えることなどが報告されている。一方、次世代雄性生殖系に与える影響は未解明であり、免疫系(特にアレルギー疾患の増悪)に与える影響についても詳細は不明である。

近年、男性不妊患者数や小児アレルギー性喘息罹患率が増加していることが疫学調査により報告されている。この原因の一つとして環境因子の胎児期曝露が懸念されているが詳細は不明である。 $\text{PM}_{2.5}$ による健康影響の因果関係をモデル動物実験で明らかにし、ヒトにおける健康影響とその影響因子を絞り込むことは、国民、特に次世代を担う子どもの健康を守るために必要不可欠な研究であると言える。また、 $\text{PM}_{2.5}$ は多数の成分で構成されており、その発生過程、飛来過程により化学成分が異なり、 $\text{PM}_{2.5}$ の種類によって健康影響も異なることが容易に想像できるが、越境 $\text{PM}_{2.5}$ と日本で発生した $\text{PM}_{2.5}$ の両者による健康影響を比較検討した研究は皆無である。

2. 研究の目的

(1)胎仔期 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

越境 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による雄性生殖機能への影響

中国大陸より越境大気汚染物質の飛来時に採取した $\text{PM}_{2.5}$ (中国 $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{cPM}_{2.5}$)に

よる次世代雄性生殖機能への影響を評価した。

越境 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

中国大陸より越境大気汚染物質の飛来時に採取した $\text{PM}_{2.5}$ (中国 $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{cPM}_{2.5}$)による次世代気管支ぜん息増悪作用への影響を評価した。

国内発生 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による雄性生殖機能への影響

越境大気汚染物質が飛来しなかった時期に、アンダーセンエアースンプラーを用い、採取した $\text{PM}_{2.5}$ (日本 $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{jPM}_{2.5}$)による次世代雄性生殖機能への影響を評価した。

国内発生 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

越境大気汚染物質が飛来しなかった時期に、アンダーセンエアースンプラーを用い、採取した $\text{PM}_{2.5}$ (日本 $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{jPM}_{2.5}$)による次世代気管支ぜん息増悪作用への影響を評価した。

(2) $\text{PM}_{2.5}$ 構成成分・LPSの胎仔期曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔生殖機能への影響

$\text{PM}_{2.5}$ の構成成分の一つである微生物由来成分 LPS による次世代雄性生殖機能への影響を評価した。

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔気管支ぜん息増悪作用への影響

$\text{PM}_{2.5}$ の構成成分の一つである微生物由来成分 LPS による次世代気管支ぜん息増悪作用への影響を評価した。

3. 研究の方法

(1)胎仔期 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

越境 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露による雄性生殖機能への影響

中国からの越境大気汚染物質飛来時に、アンダーセンエアースンプラーを用い採取した $\text{PM}_{2.5}$ ($\text{cPM}_{2.5}$) ($200\mu\text{g}$ /生理食塩水 0.1ml /マウス/回)を妊娠マウスに妊娠7日目および14日目に気管内投与した。対照群には、生理食塩水を投与した。出生仔の雌雄を判定後、雄性出生仔が母獣1匹あたり最大6匹になるよう産仔調整を行った。出生仔は3週齢となった時点で離乳し、一群16匹になるよう調整した。出生仔が、5、10および1530週齢に達した時点で、体重、精巣および精巣上体重量の測定、造精機能、精子性状の解析、血中ホルモン濃度の測定、精巣組織像解析を行い、越境 $\text{PM}_{2.5}$ の胎仔期曝露による出生

仔雄性生殖機能への影響を評価した (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 cPM2.5 群、10 週齢対照群、10 週齢 cPM2.5 群、15 週齢対照群、15 週齢 cPM2.5 群)。

越境 PM2.5 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

(1)- の雄性出生仔を用いた。15 週齢で評価する群については、気管支ぜん息病態モデルを作成するため、卵白アルブミン (OVA) の吸入曝露を行った (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 cPM2.5 群、10 週齢対照群、10 週齢 cPM2.5 群、15 週齢対照群、15 週齢 cPM2.5 群、15 週齢 OVA 群、15 週齢 cPM2.5+OVA 群)。評価項目は気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数、肺病理組織像、サイトカイン・ケモカイン濃度とした。

国内発生 PM2.5 曝露による雄性生殖機能への影響

(1)- と同様の方法を用いた。ただし、使用した PM2.5 は jPM2.5 とした (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 jPM2.5 群、10 週齢対照群、10 週齢 jPM2.5 群、15 週齢対照群、15 週齢 jPM2.5 群)。

国内発生 PM2.5 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

(1)- の雄性出生仔を用い、(1)- と同様の方法を用いた。ただし、使用した PM2.5 は jPM2.5 とした (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 jPM2.5 群、10 週齢対照群、10 週齢 jPM2.5 群、15 週齢対照群、15 週齢 jPM2.5 群、15 週齢 OVA 群、15 週齢 jPM2.5+OVA 群)。

(2) PM2.5 構成成分・LPS の胎仔期曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔生殖機能への影響

PM2.5 には微生物由来成分の一つである LPS が付着していることが知られている。また、LPS の付着量は jPM2.5 より cPM2.5 で多いことが示されていたため、PM2.5 による影響寄与因子として LPS を想定して評価を行った。LPS の付着量は最大 0.1% と想定されることを考慮し、LPS の投与量を設定した。LPS (200ng/生理食塩水 0.1ml/マウス/回) を妊娠マウスに妊娠 7 日目および 14 日目に気管内投与した。対照群には、生理食塩水を投与した。出生仔を(1)- と同様に処理し、一群 16 匹とした (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 LPS 群、10 週齢対照群、10 週齢 LPS 群、15 週齢対照群、15 週齢 LPS 群)。

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔気管支ぜん息増悪作用への影響

(2)- の雄性出生仔を用い、(1)- と同様の方法を用いた。ただし、LPS を使用し、評価

は 5、10 および 15 週齢とした (群としては、5 週齢対照群、5 週齢 LPS 群、10 週齢対照群、10 週齢 LPS 群、15 週齢対照群、15 週齢 LPS 群、15 週齢 OVA 群、15 週齢 LPS+OVA 群)。

4. 研究成果

(1)胎仔期 PM2.5 曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

越境 PM2.5 曝露による雄性生殖機能への影響

胎仔期越境 PM2.5 曝露による出生仔の性比、体重、精巣および精巣上体重量に有意な変動は認められなかった。

一方、各週齢における、精巣組織は越境 PM2.5 曝露群で精細管変性割合が有意に増加した。さらに、胎仔期の越境 PM2.5 曝露により、PM2.5 投与群では対照群と比較して造精機能が 5、10 および 15 週齢でそれぞれ 29%、26%、27% 有意に低下した ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (図 1)。また、血清テストステロン濃度が 5 週齢の越境 PM2.5 投与群で約 3 倍増加した ($p < 0.05$)。

これらのことから、越境 PM2.5 の胎仔期曝露により、出生仔の雄性生殖機能が悪影響を受けることが明らかになった。

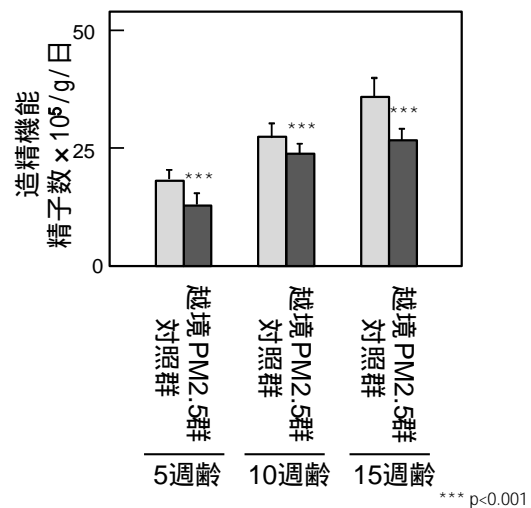


図 1 胎仔期越境 PM2.5 曝露による出生仔造精機能への影響

越境 PM2.5 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

胎仔期に越境 PM2.5 の曝露を受けた出生仔マウスの BALF 中の炎症細胞数は 5、10、15 週齢の越境 PM2.5 群で対照群と比較してそれぞれ 1.8 倍、2.3 倍、2.4 倍に有意に増加した ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$)。また 15 週齢の OVA + 越境 PM2.5 群は OVA 群の炎症細胞数と比較して 1.5 倍有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2)。

胎仔期越境 PM2.5 の曝露を受けた出生仔マウスでは各週齢とも粘膜上皮細胞の増生

が認められ、気管支ぜん息様病態が見られた。OVA+越境 PM2.5 群では粘膜上皮細胞の増生がより顕著となり、粘液を認め、気道周囲に炎症細胞も認められた。

これらのことから、越境 PM2.5 の胎仔期曝露により、出生仔の気道炎症の誘発、アレルギー症状の誘発、アレルギー症状の増悪を惹起することが明らかになった。

国内発生 PM2.5 曝露による雄性生殖機能への影響

胎仔期日本 PM2.5 曝露による出生仔の性比、体重、精巣および精巣上体重量に有意な変動は認められなかった。

さらに、精巣組織における精細管変性割合、造精機能および血中ホルモン濃度において、胎仔期日本 PM2.5 曝露による影響はほとんど認められなかった。

これらのことから、日本 PM2.5 の胎仔期曝露による、出生仔雄性生殖機能への影響はほとんど生じないことが明らかになった。

国内発生 PM2.5 曝露による気管支ぜん息増悪作用への影響

胎仔期に日本 PM2.5 の曝露を受けた出生仔マウスの BALF 中の炎症細胞数は、5、10、15 週齢の全ての週齢において、対照群と同定であった (図 2)。

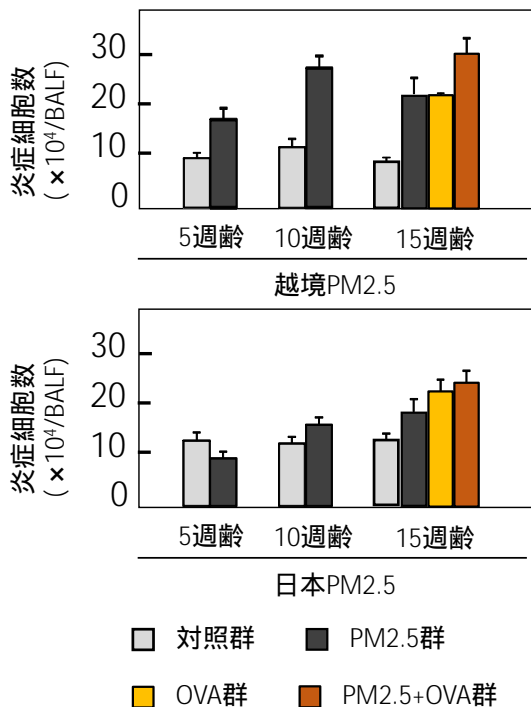


図 2 胎仔期 PM2.5 曝露による出生仔 BALF 中炎症細胞数への影響

胎仔期日本 PM2.5 の曝露を受けた出生仔マウスでは各週齢とも粘膜上皮細胞の増生が認められ、気管支ぜん息様病態が見られたが、その影響は、越境 PM2.5 による影響と比較すると極めて軽微であった。OVA+日本 PM2.5 群では粘膜上皮細胞の増生や粘液を

認め、気道周囲に炎症細胞も認められたが、その影響は軽微であった。

これらのことから、日本 PM2.5 の胎仔期曝露による気管支ぜん息増悪作用など免疫系への影響は小さいことが明らかになった。

(2) PM2.5 構成成分・LPS の胎仔期曝露による雄性出生仔の生殖機能および気管支ぜん息増悪作用への影響評価

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔生殖機能への影響

胎仔期に LPS の曝露を受けた雄性出生仔の体重、精巣および精巣上体重量に有意な変動は認められなかった。造精機能は対照群と比較して 5 週齢および 10 週齢でそれぞれ 33%、20% 有意に低下した ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。血清ホルモンの一つ、黄体形成ホルモン (LH) は、5 週齢において対照群と比較し 4.9 倍に有意に増加した ($p < 0.05$)。

LPS による造精機能の低下にどのような因子が関与しているか検討したところ、精上皮離脱割合、精細管総変性割合、LH の間でそれぞれ有意な負の相関を示した ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。これらのことから、造精機能の低下は精巣組織障害に起因する可能性が示唆された。

以上より、PM2.5 の付着成分である LPS の胎仔期曝露は出生仔の雄性生殖機能を悪化させることが示唆された。

胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔気管支ぜん息増悪作用への影響

BALF 中の炎症細胞数への影響を検討したところ、LPS の胎仔期曝露による炎症細胞数に有意な変動は各週齢とも認められなかった。LPS 胎仔期曝露によるアレルギー増悪作用を検討したところ、胎仔期に LPS の曝露を受けなかった OVA 群と比較して、LPS+OVA 群で炎症細胞数が 1.2 倍に有意に増加した ($p < 0.05$)。また、胎仔期 LPS 曝露による肺組織への影響を評価したが、影響はほとんど認められなかった。

以上のことから PM2.5 付着成分の一つである LPS の胎仔期曝露による免疫系への影響は越境 PM2.5 曝露と比較すると軽度なものであり、越境 PM2.5 の胎仔期曝露による免疫系への影響に LPS の寄与は小さいものと考えられた。今後、PM2.5 におけるその他の構成成分による影響を検討し、原因物質の解明が必要である。

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 4 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.

He M, Ichinose T, Yoshida S, Shiba F, Arashidani K, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: comparison of PM2.5 and coarse PM collected during the hazy events in a Chinese city. Inhal Toxicol. 28(14):706-718. 2016.

He M, Ichinose T, Ren Y, Song Y, Yoshida Y, Arashidani K, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G. PM2.5-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia. Inhal Toxicol. 27(6):287-99. 2015

He M, Ichinose T, Song Y, Yoshida Y, Kobayashi F, Maki T, Yoshida S, Takano H, Shibamoto T, Sun G. The Role of Toll-Like Receptors and Myeloid Differentiation Factor 88 in Bjerkandera adusta-Induced Lung Inflammation. Int Arch Allergy Immunol. 168(2):96-106. 2015

〔学会発表〕(計 8 件)

吉田 成一、市瀬 孝道：胎仔期 LPS 曝露による雄性出生仔生殖系への影響 2017 年 3 月 宮城 日本薬学会第 137 年会

吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露による出生仔免疫系への影響解析 2016 年 9 月 東京 フォーラム 2016：衛生薬学・環境トキシコロジー

吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露による雄性出生仔の生殖機能への影響発現のメカニズムの解析 2016 年 9 月 北海道 第 57 回大気環境学会年会

吉田 成一、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響とそのメカニズムの解析 2016 年 6 月 愛知 第 43 回 日本毒性学会学術年会

吉田 成一、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の免疫系に与える影響 2016 年 3 月 神奈川 日本薬学会第 136 年会

吉田 成一：越境大気汚染物質による雄性生殖機能の低下 2016 年 9 月 東京 JARI 主

催講演会

吉田 成一、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：越境微小粒子(PM2.5)の Maus 雄性生殖機能に与える影響 2015 年 9 月 東京 第 56 回大気環境学会年会

吉田 成一、嵐谷 奎一、市瀬 孝道：微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響 2015 年 9 月 兵庫 フォーラム 2015：衛生薬学・環境トキシコロジー

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

(2) 研究分担者

嵐谷 奎一 (ARASHIDANI KEIICHI)

産業医科大学・保健学部・名誉教授

研究者番号：10141748