

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03041

研究課題名(和文) PM2.5構成成分の複合胎仔期曝露による出生仔雄性生殖系・免疫系に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of gestational PM2.5 exposure on the reproductive and immune system of the male offspring in mice

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) 6,500,000円

研究成果の概要(和文)：大気中に存在する微小粒子状物質(PM2.5)の胎仔期曝露により出生仔雄性生殖機能及び免疫系に悪影響が生じることを明らかにしていたが、その影響発生因子は不明であった。大気中のPM2.5は粒子本体にLPSなどの生物由来成分や有機化学物質(OC)など様々な成分が付着している。そこで、粒子本体(H-PM2.5)のみ、H-PM2.5とLPSの複合、あるいはH-PM2.5とOCの複合胎仔期曝露を行い、出生仔への影響を評価した。その結果、H-PM2.5単独曝露でも雄性生殖機能および免疫系への影響は認められたが、影響の強さはH-PM2.5単独<H-PM2.5+LPS<H-PM2.5+OCであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気中のPM2.5が健康に悪影響を与えることは知られている。我々は妊娠マウスにPM2.5を曝露すると雄性出生仔の生殖機能が悪化すること、アレルギーが悪化することなどを明らかにしてきた。PM2.5は粒子本体に様々な物質を含んでいるが、今回の研究により粒子本体が雄性生殖機能を悪化させる作用やアレルギーを悪化させる作用を持っているが、その粒子に細菌成分や有機化学物質が含まれるとより悪化の程度が増加することを見いだした。特に有機化学物質が含まれるとその作用が強いことを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that fetal exposure to PM2.5 in the atmosphere has adverse effects on the male reproductive function and immune system of the offspring, however, the factors that cause these effects were unknown. The surface of PM2.5 in the atmosphere is covered with various components, including biogenic components such as LPS and organic chemical substances (OC). Therefore, we evaluated the effects of fetal exposure to unattached PM2.5 (H-PM2.5) alone, combined H-PM2.5 and LPS, or combined H-PM2.5 and OC on the male reproductive function and immune system of the male offspring. The results showed that H-PM2.5 alone had effects on male reproductive function and the immune system, and the strength of these effects was H-PM2.5 alone < H-PM2.5+LPS < H-PM2.5+OC.

研究分野：環境系薬学

キーワード：PM2.5 胎仔期曝露 影響因子 造精機能 アレルギー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) による健康影響として、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から示唆されており、実験動物を用いた毒性的研究によって、因果関係も明らかにされつつある。一方、PM<sub>2.5</sub> の次世代への影響を評価したものとして PM<sub>2.5</sub> 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、心血管系障害が生じること、男児の小児喘息の発症と相関することなどが報告されている。さらに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。

このように、PM<sub>2.5</sub> の次世代雄性生殖系に与える影響や、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は未解明であると言える。これまでに、母獣の PM<sub>2.5</sub> 曝露により、胎仔の発育が遅延すること、胎仔期に母獣が PM<sub>2.5</sub> に曝露されると出生した雄性仔マウスの造精機能が低下すること、内分泌系がかく乱されるなど雄性生殖機能に悪影響が生じ、また、炎症関連遺伝子発現の亢進、アレルギー増悪作用など免疫系に影響を与えることを明らかにした。これら知見は、PM<sub>2.5</sub> の濃度と低出生体重児の増加、小児ぜん息や男性不妊患者数の増加といった、疫学調査により明らかにされた影響と一致するものである。さらに、申請者等は、影響発生要因を探索する一環として構成成分である生物由来成分 (LPS) や有機化学物質 (タール成分) を用いて評価したが、これらの成分単独処理では影響が弱いことを明らかにし、PM<sub>2.5</sub> の胎仔期曝露による出生仔への影響は PM<sub>2.5</sub> の複数の構成成分が共存することによる各種成分の複合曝露により影響が生じる可能性を示した。

PM<sub>2.5</sub> による各種影響を詳細に解析する上で、影響発生要因の解明は重要であり、PM<sub>2.5</sub> 構成成分の複合曝露による影響評価が影響発生要因の解明に必須なものであると考えた。

### 2. 研究の目的

実大気中から採取した PM<sub>2.5</sub> の胎仔 (児) 期曝露により発育遅延、出生後の雄性 (男性) 生殖機能への影響、免疫系への影響が認められた一方、単一構成成分ではそれらの影響が認められなかった。これらのことから、本申請課題では複数の構成成分による複合曝露が影響発生要因であることを示すとともに、胎仔および出生仔を経時的に評価することで影響発生メカニズムを明らかにする。また、複合曝露による影響評価および影響発生メカニズムは気管内投与手法を用い、複数の構成成分のうち、影響発生が認められた構成成分の組み合わせによる吸入曝露実験を行い、ヒトが生活環境において曝露される様態に即した評価を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 使用粒子、有機化学物質、生物由来成分

使用粒子は中国瀋陽市で採取した PM<sub>2.5</sub> およびその粒子を 360 度で 30 分間加熱し附着している有機化学物質や生物由来成分を除去した粒子を用いた (H-PM<sub>2.5</sub>)。使用した有機化学物質 (OC) は北九州市で採取した PM<sub>2.5</sub> からジクロロメタンで抽出し、抽出前の粒子に含まれる PAHs 濃度の一部は次の濃度であった (BaP : 0.018ng/m<sup>3</sup>、BkF : 0.016ng/m<sup>3</sup>、BghiP : 0.016ng/m<sup>3</sup>)。使用した生物由来成分は市販の大腸菌由来の標準 LPS (LPS-EB : 0111:B4) である。

#### 2. 使用動物

ICR 系妊娠マウス (導入時妊娠 6 日齢) を一群 10 匹とした。妊娠 14 日までは 1 ゲージ 10 匹、妊娠 15 日目からは 1 ゲージ 1 匹とした。妊娠 7 日目、14 日目に 3% イソフルラン吸入麻酔下、一匹あたり 100μL の生理食塩水中に粒子 200μg、OC200ng、LPS2μg となるように調整した溶液を気管内投与した。出生仔マウスが 12 日齢の時点で産仔調整を行い、3 週齢の時点で離乳、5 週齢および 15 週齢の時点で雄性生殖機能および免疫系への影響について評価を行った。免疫系への影響評価群において、アレルギー増悪作用への影響を評価する目的で卵白アルブミン (OVA) の吸入曝露によりアレルギーぜん息モデルマウスを作成し、あわせて評価した。なお、実験は、H-PM<sub>2.5</sub>、H-PM<sub>2.5</sub>+OC の影響評価と H-PM<sub>2.5</sub>+LPS の影響評価にわけて実施した。

胎仔期曝露の影響については、PM<sub>2.5</sub> および H-PM<sub>2.5</sub> を妊娠マウスに同様に投与した後、妊娠 15 日の時点で胎仔を摘出し、評価した。

#### 3. 評価項目

##### 3.1. 造精機能及び精子性状解析

5 週齢および 15 週齢の出生仔の精巣を摘出し、造精機能の評価を一日精子産生量 (DSN) および一日精子産生能 (DSN) を指標とした。また、精子性状解析は精巣上部尾部中の精子について精子機能解析・形態解析システム SCA を用いて行った。5 週齢の出生仔では精巣上部尾部中に精子が存在しないため、15 週齢の出生仔のみを対象に精巣上部を摘出し、尾部中の精子について解析を行った。

##### 3.2 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数の測定

0.8mL の生理食塩水を 2 回注入して BALF を回収、自動細胞収集装置を用い、塗抹標本を作成した後、ディフクイック染色を行い炎症細胞数の測定を行った。

### 3.3 精巣および肺組織、胎仔の遺伝子発現解析

精巣および肺組織、胎仔から ISOGEN II を用いて total RNA を回収し、Real-Time PCR 法あるいは DNA マイクロアレイ法を用いて解析した。なお、胎仔は性決定遺伝子の存在の有無を Real-Time PCR にて確認し、雄性胎仔を解析に用いた。

### 3.4 精巣及び肺組織の病理解析

精巣はブアン溶液で肺は中性ホルマリン溶液でそれぞれ固定、パラフィン包埋後薄切し、HE 染色を行い光学顕微鏡で観察した。

### 3.5 統計処理

統計処理はダネット検定法および  $\chi^2$  検定法にて行った。危険率が 5%以下をもって有意とした。データは平均値±標準偏差で示した。

## 4. 研究成果

### 4.1 母獣の出産率、胎仔重量、出生仔の性比への影響

H-PM2.5、H-PM2.5+OC、H-PM2.5+LPS の曝露による母獣への影響を検討したところ、全ての処理によって出産率性比に影響は認められなかった。また、PM2.5 および H-PM2.5 の曝露による胎仔および胎盤重量にも有意な変動は認められなかった。

### 4.2 出生仔の体重への影響

H-PM2.5、H-PM2.5+OC、H-PM2.5+LPS の曝露による 5 週齢および 15 週齢時点における雄性出生仔の体重に有意な影響は認められなかった。

### 4.3 出生仔の精巣および精巣上体重量への影響

H-PM2.5、H-PM2.5+OC、H-PM2.5+LPS の曝露による 5 週齢および 15 週齢時点における雄性出生仔の精巣および精巣上体重量に有意な影響は認められなかった。

### 4.4 出生仔の造精機能への影響

H-PM2.5 の胎仔期曝露により、造精機能の低下は 5 週齢、15 週齢の時点でともに認められなかった。一方、H-PM2.5+OC の胎仔期曝露により 5 週齢では DSN、DSP とともに低下し、15 週齢では DSN に有意な低下が認められた (図 1)。また、H-PM2.5+LPS の胎仔期曝露でも H-PM2.5+OC による影響より弱いものも造精機能の低下が認められた (図 2)。これまでの研究で OC あるいは LPS の単一曝露では造精機能への影響は軽微なものであった。これらのことから、PM2.5 による造精機能の低下は、粒子本体ではなく、粒子本体と付着成分特に有機化学物質の複合曝露により生じることが考えられた。

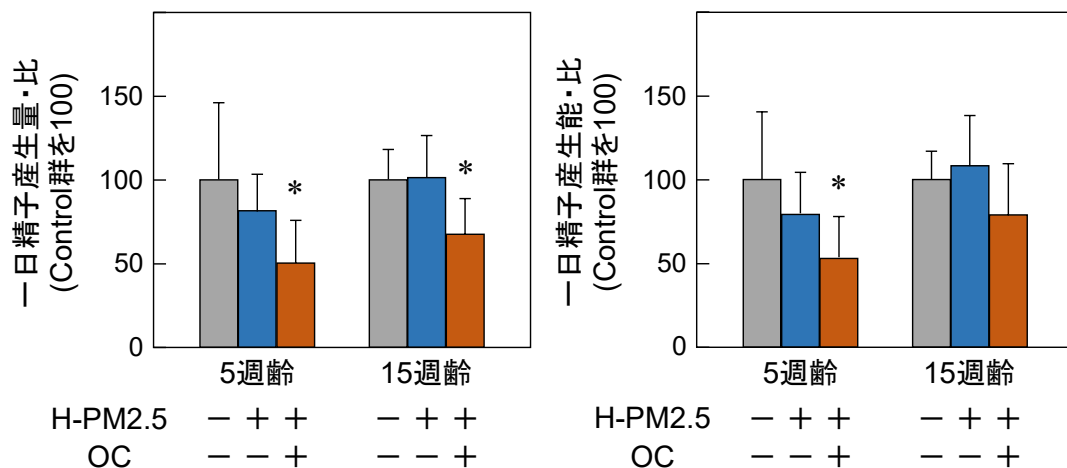


図 1 H-PM2.5 および H-PM2.5+OC の胎仔期曝露による出生仔造精機能への影響

\*  $p < 0.05$  vs Control

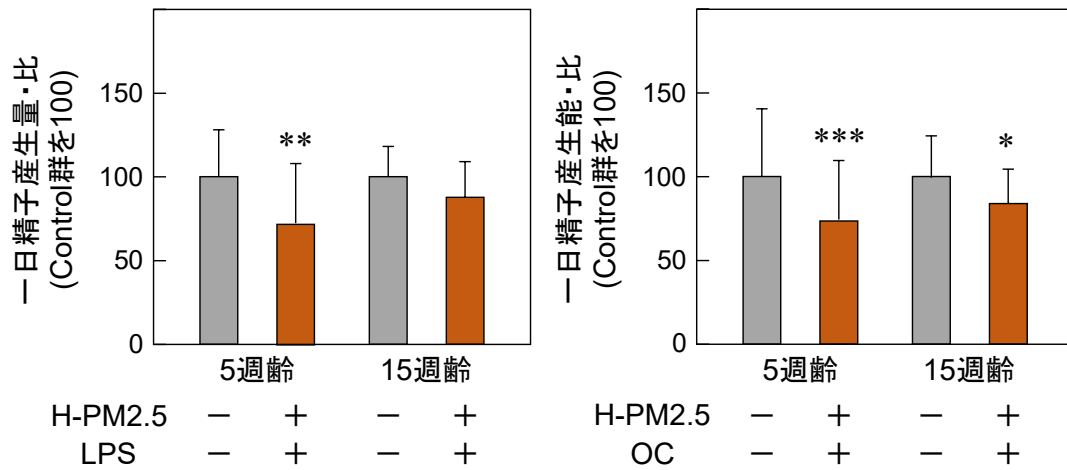


図 2 H-PM2.5+LPS の胎仔期曝露による出生仔造精機能への影響

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs Control

#### 4.5 出生仔の精巣組織への影響

H-PM2.5、H-PM2.5+OC、H-PM2.5+LPS の胎仔期曝露により 5 週齢、15 週齢の精巣組織において精細管の変性像が認められ、その影響は H-PM2.5 < H-PM2.5+LPS < H-PM2.5+OC であった。精細管の変性が造精機能の低下に関与する可能性が示唆された。

#### 4.6 出生仔の精子性状への影響

H-PM2.5 の単独曝露により、15 週齢の出生仔の運動精子の割合が低下した。一方、これらの影響は H-PM2.5+OC および H-PM2.5+LPS では認められなかった。

#### 4.7 出生仔の精巣遺伝子発現への影響

H-PM2.5+OC および H-PM2.5+LPS において共通して発現変動が認められた遺伝子として *tex11* mRNA および *urb2* mRNA があった。これらの遺伝子は精子形成に関連する遺伝子であり、造精機能の低下に関与することが考えられた。

#### 4.8 BALF 中免疫担当細胞数への影響

H-PM2.5+OC の胎仔期曝露では免疫担当細胞数に顕著な変動は認められなかったが、H-PM2.5+OC の胎仔期曝露を行った出生仔を OVA によるアレルギー症状を発症させた場合、免疫担当細胞の増加が認められたことから、H-PM2.5+OC の胎仔期曝露は出生後の炎症惹起作用は小さいが、アレルギー増悪作用を惹起する能力があることが示唆された。また、H-PM2.5+LPS においても同様の傾向が認められたことから、胎仔期に粒子及び付着物質 (生物由来成分あるいは化学物質またはその両者) の複合曝露を受けると出生後のアレルギー症状が増悪する可能性を示唆するものであり、PM2.5 によるアレルギー増悪作用は粒子本体と付着成分の複合曝露により生じることが考えられた。

#### 4.9 出生仔の肺組織への影響

胎仔期 H-PM2.5+OC あるいは H-PM2.5+LPS 曝露を行い、出生後にアレルギー症状を発症させると、気道粘膜下に炎症細胞の顕著な浸潤が生じた。しかし、アレルギー症状を発症させなかった場合はこのような影響は小さく、BALF 中の細胞数の変化と同様なものが認められた。

#### 4.10 出生仔の肺遺伝子発現への影響

各種サイトカイン、ストレス関連因子、炎症関連因子などの遺伝子発現を解析したが、共通して発現変動を認める遺伝子はなかった。

#### 4.11 PM2.5 および H-PM2.5 の胎仔への影響

ステロイド合成酵素の各種 mRNA 発現量は H-PM2.5 曝露では有意な変動は認められなかったが、PM2.5 曝露では解析した 6 種類 (StAR, P450scc, 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD, P450C17, Aromatase) 全てにおいて発現誘導が認められた (表 1)。また胎仔期曝露雄性出生仔の精巣で発現変動が認められた *tex11* および *urb2* mRNA 発現も H-PM2.5 では有意な発現変動は認められなかったが、PM2.5 曝露群では有意な発現誘導が認められた。また、性分化関連因子である、SF-1、MIS も同様な発現変動を示し (表 2)、これは性分化の遅滞が生じている可能性を示すものであり、出生後の雄性生殖機能への影響が生じたことに関連する可能性が考えられる。

表 1 胎仔期粒子曝露による胎仔ステロイド合成酵素遺伝子発現への影響

	Control	H-PM2.5	PM2.5
StAR	0.48±0.07	0.36 ±0.17	1.19 ±0.66 *
P450scc	0.81±0.15	0.77 ±0.40	2.32 ±1.08 *
17β-HSD	0.75±0.50	0.25±0.50	2.25 ±0.96 *
3β-HSD	0.91±0.22	0.38±0.11	1.20 ±0.54
P450C17	2.80±0.62	2.65 ±1.45	7.60 ±3.49 *
Aromatase	0.20±0.07	0.16 ±0.11	0.87 ±0.37 *

\*  $p < 0.05$  vs Control

表 2 胎仔期粒子曝露による性分化関連遺伝子発現への影響

	Control	H-PM2.5	PM2.5
SF-1	0.25±0.03	0.24 ±0.10	0.79 ±0.37 *
DAX-1	0.57±0.16	0.46 ±0.18	2.45 ±1.24 **
MIS	0.17±0.06	0.27±0.11	1.13 ±0.33 ***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs Control

以上より、PM2.5 の胎仔期曝露による雄性出生仔の生殖機能および免疫系に与える影響因子として、PM2.5 の粒子本体ではなく、粒子本体とそこに吸着している成分特に有機化学物質が影響寄与因子であると考えられる治験を得た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 He Miao, Ichinose Takamichi, Yoshida Seiichi, Nishikawa Masataka, Sun Guifan, Shibamoto Takayuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of iron and oxidative stress in the exacerbation of allergic inflammation in murine lungs caused by urban particulate matter <math>\leq 2.5\mu\text{m}</math> and desert dust	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 855 ~ 867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ren Yahao, Ichinose Takamichi, He Miao, Youshida Seiichi, Nishikawa Masataka, Sun Guifan	4. 巻 15
2. 論文標題 Co-exposure to lipopolysaccharide and desert dust causes exacerbation of ovalbumin-induced allergic lung inflammation in mice via TLR4/MyD88-dependent and -independent pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy, Asthma & Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13223-019-0396-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 He Miao, Ichinose Takamichi, Ito Tomohiro, Toriba Akira, Yoshida Seiichi, Kaori Sadakane, Nishikawa Masataka, Sun Guifan, Shibamoto Takayuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Investigation of inflammation inducing substances in PM2.5 particles by an elimination method using thermal decomposition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Toxicology	6. 最初と最後の頁 1137 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tox.22816	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Seiichi, Ichinose Takamichi, Shibamoto Takayuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Effects of Fetal Exposure to Heat-Not-Burn Tobacco on Testicular Function in Male Offspring	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1687 ~ 1692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00390	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、市瀬 孝道
2. 発表標題 PM2.5由来有機化学物質の胎仔期曝露が出生子の生殖系に及ぼす影響
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、市瀬 孝道
2. 発表標題 PM2.5とLPSの胎仔期複合曝露による雄性出生子の免疫系への影響
3. 学会等名 第60回大気環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、市瀬 孝道
2. 発表標題 PM2.5由来有機化学物質の胎仔期曝露が出生子の免疫系に及ぼす影響
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 成一、村木 直美、伊藤 剛、嵐谷 奎一、市瀬 孝道
2. 発表標題 PM2.5の胎仔期曝露が雄性胎仔発育に及ぼす影響
3. 学会等名 第59回大気環境学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

妊娠期に飛来した黄砂が生まれた子どもの雄性生殖機能に与える影響  
<http://www.oita-nhs.ac.jp/news/detail/504>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------