

機関番号：27501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009年～2010年

課題番号：21790131

研究課題名(和文) 大気中の微小粒子(CAPs)の胎仔期曝露が出生仔の肺のアレルギー増悪に与える影響

研究課題名(英文) The aggravate effects of fetal exposure to concentrated urban air particles on Th2-associated immune response 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

## 研究成果の概要(和文)：

近年、小児アレルギー罹患者数が増加しており、原因として食生活や住環境の変化の他、妊娠中の母親の生活環境も原因の一つとして考えられているが詳細は不明である。胎児期の大気中の微小粒子(CAPs)の曝露が出生児の低体重や雄性生殖機能への影響が示唆されているが免疫系への影響は不明である。そこで本研究では、CAPsを妊娠マウスに投与し、出生仔の免疫系に与える影響を検討した。ICR系妊娠マウス40匹を用い、CAPs(200 $\mu$ g/匹)を妊娠7日目と14日目に気管内投与した。妊娠18～19日目に出生した仔マウスを実験に用い、5、10、15および30週齢における仔マウスの免疫系への影響を検討した。なお、15週および30週齢における免疫系への影響は、9週あるいは24週から2週間に1度OVA(200 $\mu$ g/匹)を4回気管内投与し、最終曝露の翌日に解剖した。検討項目は、気管支・肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数、肺の組織像である。胎仔期にCAPsの曝露を受けた出生仔(CAPs群：5週齢、30週齢)のBALF中の総細胞数は対照群と比較してそれぞれ2.0倍、2.4倍、有意に増加した。また、胎仔期にCAPs曝露を受けた出生仔にOVAを曝露させると総細胞数は、OVAのみの曝露したマウスと比較して15週齢で有意に増加した。また、BALF中の各炎症細胞数を検討したところ、マクロファージ数、好酸球数等の増加が認められた。免疫系を担当するマクロファージや好酸球数が変動したことから、CAPsの胎仔期曝露が出生仔の免疫系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)：

Concentrated airborne particulate matters (CAPs) has been shown to have an aggravate effect on immune systems in adult mice. However, the effects of fetal exposure to CAPs on immune response in offspring have not been elucidated. In the present study we created a bronchial asthma mouse model by exposing offspring to ovalbumin (OVA), then we sequentially evaluated the effects of fetal exposure to CAPs on worsening of allergic manifestations in OVA-exposed male offspring. We administered CAPs (200  $\mu$ g/animal) by intratracheal injection into dams during pregnancy on days 7 and 14 of gestation. Nine and twenty-four week-old male offspring were injected intratracheally with OVA (4 times at 2-week intervals). We evaluated histological findings, inflammatory cell number in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) at ages of 5, 10, 15, and 30 weeks after birth. Histological examination showed that the fetal CAPs exposure caused a slight infiltration of eosinophils and lymphocytes in the submucosa of the airway accompanied in the bronchial epithelium. Fetal exposure to CAPs caused significant increases in macrophage, eosinophil, and lymphocyte. Fetal exposure to CAPs enhanced immune response in male offspring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：浮遊粒子状物質、アレルギー、次世代影響、マウス、胎仔、免疫系

1. 研究開始当初の背景

微小粒子 (CAPs) の健康影響として、呼吸器系疾患や心血管系疾患、さらには死亡率の増加などが疫学調査によって明らかにされている。近年、小児のアレルギー罹患患者数が増加している。実際、文部科学省が行っている学校保健統計調査の結果では、幼稚園、小学校、中学校、高等学校別のぜん息罹患率が、いずれも平成元年以降増加しており、平成 19 年には 10 年前に比べて約 2 倍になっている。小児のアレルギー発症の原因として、食生活や住環境の変化が考えられているが、妊娠期の母親の生活環境（例えば喫煙や居住地域等）もその原因の一つとして考えられているが詳細は明らかではなく、解明が必要である。

2. 研究の目的

- (1) 胎仔期 CAPs 曝露による出生仔の気管支ぜん息をモデルとしたアレルギー増悪作用の解明 CAPs を投与した妊娠マウスから出生した仔マウスに、卵白アルブミン(OVA)曝露を行い、気管支喘息モデルマウスを作成後、アレルギー応答に関する因子を検討し、免疫系への修飾作用を評価した。
- (2) 胎仔期 CAPs 曝露により、胎仔において、遺伝子の発現にどのような影響が生じるか解析し、出生後に認められた影響発現の機序の解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 胎仔期曝露による出生仔への影響解析

① 使用動物

ICR 系妊娠マウス (導入時妊娠 5 日齢) 40 匹を用いた。CAPs 投与群と非投与群に分け、各群 20 匹とした。

② 使用微粒子

使用した粒子は中国都市部のビルの換気フィルターに付着した粉塵 (CAPs) である。

フィルターに機械的振動を与え、CAPs をフィルターから分離した。採取した CAPs の平均粒径は 200nm であった。

③ 妊娠マウスへの CAPs 投与

CAPs 投与群では CAPs を 0.05 % Tween80-生理食塩水で 2mg/ml の濃度に調整した溶液 100 $\mu$ l を気管内投与し、CAPs 非投与群では 0.05 % Tween80-生理食塩水 100 $\mu$ l を気管内投与した。妊娠 7 日目と 14 日目にハロタン麻酔下で 2 回投与した。

④ 産仔調整

出生仔マウスは妊娠日数が 18~19 日の母獣から産出されたものを実験に適用した。出生した仔マウスが 12 日齢の時点で、産仔調節を行った。雄の仔マウスが 6 匹以上のケージは雄マウスを 6 匹とし、雄マウスが 5 匹以下のケージは出生した雄マウスのみとして産仔調整を行った。離乳は生後 25~26 日に実施した。

⑤ 出生仔への卵白アルブミン (OVA) 投与

実験群は各週齢で 1 群 16 匹とし、計 192 匹の仔マウスを用いた。OVA は注射用生理食塩水に溶かし (10 $\mu$ g/ml)、投与量はマウス一匹あたり 1 $\mu$ g とし 2 週間に 1 度計 4 回投与した。また生理食塩水のみを 0.1ml 気管内投与したものを OVA 非投与群とした。OVA 最終気管内投与の翌日、または所定の週齢時点にてペントバルビタールナトリウム麻酔下で心採血によって屠殺した。なお、CAPs 非投与群の母獣から出生した仔の OVA 非投与群を Control 群とし、OVA 投与群を OVA 群とした。また、CAPs 投与群の母獣から出生した仔の OVA 非投与群を CAPs 群とし、OVA 投与群を CAPs+OVA 群とした。5、10 週齢では Control 群と CAPs 群のみで検討し、15、30 週齢では Control 群、CAPs 群、OVA 群、

CAPs+OVA 群の 4 群で検討した。

⑥ 気管支肺胞洗浄液中の細胞数の測定

気管支肺胞洗浄液 (BALF) はマウスの気管支上部より留置針を挿入し、0.8ml の生理食塩水を 2 回注入して気管支肺胞洗浄液を回収することで採取した。その後、1500 回転にて 10 分間遠心し上清と沈渣に分離した。沈渣中の白血球数を測定し、総細胞数が 5 万個になるように生理食塩水を加えて調整後、サクラ自動細胞収集装置 (桜世紀株式会社、東京) を用い、1500 回転にて 7 分間遠心し沈渣の塗抹標本を作製した。その後、ディフクイック染色を行い、各炎症細胞 (マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球、単球) 数は 1 標本あたり 250~300 個の白血球数を数え各炎症細胞数のパーセンテージを算出し、これらを総細胞数にかけて求めた。上清は BALF 中のサイトカイン・ケモカインを測定するまで -80°C にて保存した。

⑦ 肺の病理組織標本の作製と観察

各群 8 匹のマウスを肺の病理観察用とした。マウスを屠殺後、肺は気管より 10% 緩衝ホルマリン液を注入して固定した。各肺葉を幅約 2mm 切片に切り出し定法に従ってパラフィン包埋後、3 $\mu$ m の薄切り標本を作製した。その後、好酸球等の炎症細胞を観察するためにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

(2) 胎仔期曝露による胎仔への影響

① 使用動物

(1) で用いたマウスと同条件のものを用いた。

② 使用微粒子

(1) で用いた粒子と同一のものを用いた。

③ 妊娠マウスへの CAPs 投与

CAPs 投与群では CAPs を 0.05 % Tween80-生理食塩水で 2mg/ml の濃度に調整した溶液 100 $\mu$ l を気管内投与し、CAPs 非投与群では 0.05 % Tween80-生理食塩水 100 $\mu$ l を気管内投与した。妊娠 7 日目と 13 日目にハロタン麻酔下で 2 回投与した。

④ 胎盤及び胎仔の摘出

妊娠 14 日目に、各群の妊娠マウスをハロタン麻酔下で心採血後、胎仔胎盤摘出し、重量を測定した。胎仔の性別判断用に、胎仔上肢の一部を切り取り 1.5ml エッペンドルフチューブに入れ、-80°C で保存した。胎仔 12 匹を遺伝子解析用とした。13 匹目以降は病理組織用とし、ホルマリンで固定した。匹数が少ないものについては、最低 3 匹を病理組織用とし、残りを遺伝子解析用とした。

⑤ 胎仔性別判断

4) で採取した上肢を用い、SRY DNA の有無にて雌雄を判別した。

⑥ 発現遺伝子の解析

雄性胎仔 3 匹を無作為に抽出し、定法に従い、cDNA を合成した。合成した cDNA を ABI PRISM<sup>®</sup>7000 Sequence Detection System を用いて遺伝子の発現定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 1 胎仔期曝露による出生仔への影響

① 胎仔期 CAPs 曝露による体重への影響

胎仔期 CAPs 曝露による出生仔マウスの体重に及ぼす影響を検討した結果、CAPs 曝露による有意な変動は認められなかった。

② 肺の病理学的変化

15 週齢、30 週齢ともに Control 群では認められない気管支粘膜下への好酸球とリンパ球の浸潤が、CAPs 群では認められた。また、OVA 曝露を受けた気管支ぜん息モデルマウスでも気管支粘膜下に好酸球とリンパ球の浸潤が認められ、胎仔期に CAPs 曝露を受けた CAPs+OVA 群ではそれらの浸潤が顕著に認められた。

③ 気管支肺胞洗浄液中 (BALF) 中の炎症細胞数への影響

胎仔期 CAPs 曝露による BALF 中の免疫細胞に対する影響を検討するために各炎症細胞を解析した。BALF 中の総細胞数の変化を検討したところ、5、30 週齢の CAPs 群で Control 群と比較して BALF 中の総細胞数はそれぞれ 2.0 倍、2.4 倍有意に増加した ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ )。また、15 週齢の CAPs+OVA 群では OVA 群と比較して 2.0 倍有意に増加した。

5、30 週齢の CAPs 群の BALF 中のマクロファージ数は、Control 群と比較してそれぞれ 1.8 倍、1.6 倍有意に増加した ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ )。

10 週齢の CAPs 群の BALF 中の好中球数は、対照群と比較して有意に増加した ( $p < 0.01$ )。

5、10、30 週齢の CAPs 群の BALF 中の好酸球数は、対照群と比較して有意に増加した ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ )。

30 週齢における BALF 中のリンパ球数は、対照群と比較し CAPs 群で、OVA 群と比較し CAPs+OVA 群で、それぞれ有意に増加した ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ )。

(2) 胎仔への影響

① CAPs 曝露による母獣妊娠率及び胎仔数、性比への影響

CAPs 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、性比を解析し

た。妊娠率、胎仔数、性比は、対照群と比較して、CAPs 処理による有意な変動は認められなかった。

### ② 胎仔重量及び雄の胎盤重量に及ぼす影響

胎仔期 CAPs 曝露による胎仔重量及び、胎盤重量を測定し、CAPs の胎仔期曝露による影響を検討したところ、雌の胎盤重量が対照群と比較して CAPs 群で有意に減少した。それ以外の雄の胎盤重量、胎仔重量において有意な変動は認められなかった。

### ③ 遺伝子発現に及ぼす影響

CAPs 曝露を受けた雄性胎仔は対照群と比べ、性分化に関連する Ad4BP/SF-1 mRNA 発現量が 28.6%、PDGFR $\alpha$ -1 mRNA 発現量が 13.0%それぞれ増加した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ )。鉄の輸送蛋白に関連するトランスフェリンレセプター mRNA 発現量が 35.3%増加した ( $p < 0.01$ )。異物代謝に関連する芳香族炭化水素受容体 (Ah レセプター) mRNA 発現量が 67.1%減少し、Ah レセプター制御因子 mRNA 発現量が 28.7%それぞれ増加した ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) (図 1)。その他の遺伝子発現に有意な変動は認められなかった。

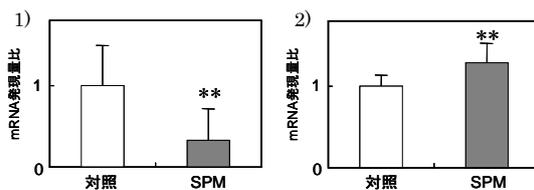


図 1. SPM 曝露による雄性胎仔の異物代謝関連因子の mRNA 発現量 \*\* :  $p < 0.01$

- 1) Ah レセプター
- 2) Ah レセプター制御因子

これらの結果より、胎仔期 CAPs 曝露により、出生仔の肺のアレルギーを増悪することを明らかにした。これは、アレルギー反応が生じていない状態であっても、胎仔期に CAPs 曝露を受けると抗原提示細胞の一つであるマクロファージ数が増加したことに起因する可能性がある。一方、胎仔期に種々の遺伝子発現が影響を受け、免疫系をかく乱する可能性が示唆されたことから、今後、胎仔期において発現変動した遺伝子がマクロファージなどの免疫担当細胞分化に影響を与えるか否か詳細な解析が必要となる。

## 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 1 件)

Yoshida S, Hiyoshi K, Oshio S, Takano H, Takeda K, Ichinose T., Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring., Fertil Steril. 93(5), 1695-1699 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

吉田 成一、高野 裕久、市瀬 孝道 大気中に含まれる微粒子の胎仔期曝露が出生仔の免疫系に与える影響 日本薬学会第 130 年会岡山

[図書] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 成一 (YOSHIDA EIICHI)

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

(3) 連携研究者