

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：27501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790153

研究課題名（和文）大気中浮遊粒子状物質の次世代免疫系への影響とそのメカニズム解明に関する研究

研究課題名（英文）The aggravate effects of fetal exposure to urban particulate matter on 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

研究成果の概要（和文）： 妊娠動物に中国で採取した大気中の微小粒子（CAPs）を投与すると、出生仔においてぜん息様病態が悪化することを明らかにしてきたが、CAPs による出生仔のぜん息用病態が悪化する詳細な影響発現機構は不明である。そこで、本研究では CAPs の胎仔期曝露により、出生仔の免疫系にどのような影響が生じるか、明らかにすると共に、日本に飛来する黄砂による影響についても検討した。ICR 系妊娠マウス 40 匹を用い、中国で採取した CAPs あるいは黄砂(200 $\mu$ g/匹)を妊娠 7 日目と 14 日目に気管内投与した。10 週および 15 週における仔マウスの免疫系への影響を検討した。気管支ぜん息モデルマウスの作成のため、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。CAPs 投与により、出生仔の肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカイン発現量が高くなり、ぜん息様病態の悪化に関与する知見を得た。また、黄砂の胎仔期曝露により、出生仔の炎症性サイトカイン・ケモカイン発現量及び炎症細胞数の増加が認められ、免疫系に影響が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Prenatal exposure of concentrated airborne particulate matters (CAPs) has been shown to have an aggravate effect on immune system in male offspring. However, little is known about the mechanisms. 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 two type of particles (CAPs and Asian sand dust) on worsening of allergic manifestations in OVA-exposed male offspring. We administered particle (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). CAPs and Asian sand dust significantly increased the level of cytokine and chemokine levels in BALF. Our results suggest that fetal exposure to CAPs and Asian sand dust and postnatal intratracheal administration of OVA enhance allergic lung inflammation by activating the Th2-associated immune response through increase in cytokines and chemokines, which play an important role in bronchial asthma. Our findings suggest that the inhalation of CAPs and Asian sand dust by pregnant women has various effects on the fetus and may be involved in the increased prevalence of childhood allergies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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、次世代影響、免疫系、胎仔、遺伝子発現、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

大気中の浮遊粒子状物質 (SPM)が小児ぜん息の発症に関与していることが疫学研究によって報告されている。また、申請者はこれまでの研究で、胎仔期に実際の大气中から採取した微小粒子 (CAPs)の曝露を受けると出生した仔マウスで抗原曝露によるぜん息様病態が悪化することを見出した。さらに、アレルギー反応に係わる炎症細胞が肺洗浄液 (BALF)中で増加することを明らかにしたがその詳細は不明である。そこで、CAPsの胎仔期曝露を受けた雄性出生仔の各種炎症性サイトカイン・ケモカイン発現変動を検討することでその影響発現機構の解明を試みる。得られる知見は最近問題となっている小児ぜん息と粒子状物質の因果関係を明らかにすることが出来る。

## 2. 研究の目的

- (1) 胎仔期 CAPs 曝露による雄性出生仔各種サイトカイン・ケモカイン発現への影響について、CAPs を投与した妊娠マウスから出生した雄性仔マウスに卵白アルブミン (OVA) 感作を行い、気管支ぜん息モデルマウスを作成後、炎症性サイトカイン・ケモカイン濃度の測定を行った。
- (2) CAPs の一種である黄砂を多く含む日本に飛来した粒子状物質を妊娠マウスに投与し、出生した雄性仔マウスへの影響について、(1)で得た知見をもとに評価した。

## 3. 研究の方法

- (1) 胎仔期 CAPs 曝露による雄性出生仔各種サイトカイン・ケモカイン発現への影響
  - 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じん (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。
  - 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、産仔調整を行った。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 128 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 として 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。

## ⑥ 気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカインの測定

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。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 $^{\circ}$ C にて保存した。測定した炎症性サイトカイン・ケモカインは、IL-4, -5, -12, -13, TNF, Eotaxin, KC, MCP-1, -3, MIP-1 $\alpha$ , RANTES の 11 種類である。

## (2) 日本に飛来した黄砂の胎仔期曝露による出生仔免疫系への影響

- ①使用動物  
(1) で用いたマウスと同条件の者を用いた。
- ②使用粒子  
福岡県北九州市で黄砂飛来観測日に採取した粒子状物質を用いた。
- ③妊娠マウスへの CAPs 投与  
(1) で用いた条件と同様に処理した。
- ④ 産仔調整  
(1) と同様の条件で処理した。
- ⑤気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカインの測定

(1)と同様に行ったが、雄性出生仔数が少なかったため、OVA投与群の設定は行えなかったことおよび適宜、1群の匹数を調整して使用した。

#### 4. 研究成果

(1) 雄性出生仔 15 週齢のマウスでは、CAPs による影響は特に認められなかった。しかし、30 週齢のマウスでは、気管支ぜん息モデルマウスにおいて、CAPs が加わることで、各種

Table 1 Concentration of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid.

	Cytokine expression (pg protein/total BAL supernatant)				
	IL-4	IL-5	IL-12	IL-13	TNF
15 weeks					
Control	0	0	70.0 ± 27.4	0	0
CAPs	0	0	44.4 ± 21.9	0	0
OVA	0	29.6 ± 20.1	121.6 ± 54.2	22.4 ± 16.7	0
CAPs+OVA	0	52.8 ± 36.0	187.0 ± 116.7	14.7 ± 14.7	0
30 weeks					
Control	14.3 ± 6.9	0	0	0	17.3 ± 7.2
CAPs	6.3 ± 4.2	0	30.3 ± 21.3	0	50.3 ± 10.5
OVA	9.6 ± 6.9	10.6 ± 3.5	188.4 ± 29.4 <sup>**</sup>	7.1 ± 1.8 <sup>**</sup>	11.2 ± 11.2
CAPs+OVA	9.5 ± 4.9	131.4 ± 58.6 <sup>*, #, \$</sup>	277.2 ± 64.7 <sup>####</sup>	24.7 ± 8.9 <sup>##</sup>	19.9 ± 10.6 <sup>\$</sup>

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 24 h after the last intratracheal instillation of OVA. All values were expressed as mean ± SE (n = 8).

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

#  $p < 0.05$  vs CAPs, ##:  $p < 0.01$  vs CAPs, ###:  $p < 0.001$  vs CAPs

\$:  $p < 0.05$  vs OVA

Table 2 Concentration of chemokine in bronchoalveolar lavage fluid.

	Chemokine expression (pg protein/total BAL supernatant)					
	Eotaxin	KC	MCP-1	MCP-3	MIP-1 $\alpha$	RANTES
15 weeks						
Control	0	0	2.4 ± 0.1	0	0	1.4 ± 0.5
CAPs	0	0	2.4 ± 0.2	0	0	1.8 ± 0.8
OVA	2.8 ± 2.8	31.1 ± 23.5	9.8 ± 2.9	32.2 ± 32.2	0	2.5 ± 1.1
CAPs+OVA	4.7 ± 4.7	52.0 ± 27.2	14.7 ± 7.0	5.4 ± 5.4	1.4 ± 1.4	3.0 ± 1.5
30 weeks						
Control	0	3.9 ± 3.9	0	0	0	0
CAPs	0	0	0	0	0	0
OVA	0	91.2 ± 16.8 <sup>###</sup>	4.6 ± 4.6	0	10.4 ± 5.5	74.7 ± 24.6 <sup>###</sup>
CAPs+OVA	20.2 ± 15.7	116.3 ± 20.5 <sup>####</sup>	117.7 ± 52.5 <sup>*, #, \$</sup>	118.4 ± 75.7	9.5 ± 5.3	329.6 ± 102.9 <sup>##</sup>

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 24 h after the last intratracheal instillation of OVA. All values were expressed as mean ± SE (n = 8).

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

#  $p < 0.05$  vs CAPs, ###:  $p < 0.001$  vs CAPs

\$:  $p < 0.05$  vs OVA

炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が高くなった。特に、RANTES や MCP-1 で顕著であった (Table1、2)。これらの結果は、胎仔期 CAPs 曝露によるぜん息様症状の悪化、炎症細胞数の変化が生じる知見との関連が示唆される。

(2) 胎仔期黄砂曝露による雄性出生仔への影響を検討したところ、出生仔の性比は対照群と比較して雄の出生比が 0.54 から 0.40 に減少した。一方、出生した雄性仔が 5~15 週齢になった時点における黄砂曝露による影響を評価したところ、BALF 中の各種炎症細胞数が増加するとともに、血中 RANTES 濃度の上昇が認められた。このことは、胎仔期の黄砂曝露により、雄性仔の発育が阻害され出生仔数の低下が生じた可能性を示唆すると共に、出生した雄性仔の免疫系にも悪影響を生じさせていることを示唆している。出生雄性仔の免疫系への影響は、CAPs 胎仔期曝露と同様のメカニズムで生じている可能性が考えられる。今後、粒子状物質の雄性胎仔発育への影響メカニズムを明らかにする必要があると共に、胎仔期粒子状物質曝露による出生仔の炎症性サイトカイン・ケモカイン濃度が高くなる機序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 2 件)

Seiichi Yoshida, Hirohisa Takano, Masataka Nishikawa, He Miao, Takamichi Ichinose, Effects of fetal exposure to urban particulate matter on the immune system of male mouse offspring. Biol Pharm Bull. 2012;35(8):1238-43.

Seiichi Yoshida, Nishikawa Masataka, Shigeru Oshio, Miao He, Takamichi Ichinose, Airborne Asian sand dust aggravates mouse spermatogenesis and sperm quality. Jap. Soc. Atom. Environ. *in press*.

[学会発表] (計 1 件)

吉田成一, 賀森, 嵐谷奎一, 市瀬孝道 妊娠期黄砂エアロゾル曝露による胎仔への影響と雄性出生仔生殖機能への影響第 57 回日本生殖医学会学術講演会・総会 長崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○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 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 なし

(3) 連携研究者 なし