

氏名(本籍)	井澤弘美(青森県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第261号		
学位授与年月日	平成20年9月12日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	ディーゼル排気微粒子のマウス雄性生殖毒性と食品による 毒性低減効果に関する研究)		
審査委員	主査	東京農工大学 教授	田谷一善
	副査	帯広畜産大学 教授	三宅陽一
	副査	岩手大学 教授	橋爪一善
	副査	東京農工大学 教授	下田実
	副査	岐阜大学 教授	志水泰武

### 論文の内容の要旨

ディーゼル排気微粒子(Diesel Exhaust Particle: DEP)は、発癌性やアレルギー性鼻炎、気管支喘息等を引き起こすことが知られている。最近では多環芳香族炭化水素類(Poly Aromatic Hydrocarbon: PAH)、ダイオキシン類およびニトロフェノール類などの内分泌攪乱化学物質が含まれており、生殖機能への影響があることが判明した。PAHやダイオキシン類による内分泌攪乱作用は、Ah受容体(Aryl hydrocarbon Receptor: AhR)の活性化が深く関与している。一方、近年、野菜や果物に含まれるポリフェノール類がダイオキシン類によって誘導されるAhRのアンタゴニストとしてはたらくことが明らかになったことから、食品によりDEPの毒性を低減できる可能性を示唆している。

本研究では、マウスを用いてDEPの雄性生殖機能への影響を明らかにし、DEPの毒性を阻害する食品やその食品成分のスクリーニングを行い、最も効果的なサンプルをマウスに摂取させて、DEPによる毒性が低減されるか否かについて研究した。

第1章では、諸論として、DEPによる大気汚染と生体毒性、DEP中に含有されているPAHと毒性発現およびAhRのアンタゴニストとしてのポリフェノール類について概説し、研究の目的を述べた。

第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、DEPの雄性生殖機能への影響とAhRの関係に関する研究結果を記述した。本研究では、6週齢のBALB/c系雄マウスに、3用量(24.7 $\mu$ g, 74.0 $\mu$ gおよび220 $\mu$ g/mouse)のDEP懸濁液を1週間に2回ずつ5週間にわたって背部皮下投与した。その結果、74.0 $\mu$ gと220 $\mu$ g投与群では、一日精子生産量と精子生存率がvehicle群と比較して有意に低下し、精子形態異常率が有意な増加を示した。さらに、74.0 $\mu$ g群と

220  $\mu$ g 群では精上皮が厚くなり、elongate type 精子細胞が観察されなかった。血中テストステロン濃度は、74.0  $\mu$ g 群で vehicle 群と比較して有意な高値を示した。また、CYP1A1 活性は、Ethoxy Resorufin-O-Deethylase (EROD) 活性として評価可能であることから、AhR 活性の間接的な指標として EROD 活性を測定した。その結果、74.0  $\mu$ g 群の肝 EROD 活性が vehicle 群と比較して有意な高値を示した。これらの結果から、DEP は雄性生殖機能を低減させ、その作用には AhR が関与している可能性を明らかにした。

第4章では、AhR 応答性の異なる4系統のマウスの雄性生殖機能に及ぼす DEP の影響に関する研究結果を記述した。本研究では、6週齢の BALB/c (AhR 高応答性)、C57BL/6 (高応答性)、ICR (中応答性) および DBA/2 (低応答性) に DEP 懸濁液 (74.0  $\cdot$  g/mouse) を1週間に2回ずつ5週間にわたって背部皮下投与した。EROD 活性は、BALB/c > C57BL/6 > ICR > DBA/2 の順に高値を示した。BALB/c と C57BL/6 の一日精子生産量は vehicle 群と比較して有意な低値を示した。BALB/c、C57BL/6 および ICR の精子生存率は、vehicle 群と比較して有意な低値を示した。4系統すべての精子形態異常率は、vehicle 群と比較して有意な高値を示した。BALB/c の血中テストステロン濃度は vehicle 群と比較して有意に高値を示した。4系統の DEP 投与マウスの肝 EROD 活性と DSP および精子形態異常率が正の相関を、肝 EROD 活性と DSP の間では負の相関を示した。以上の結果から、DEP の雄性生殖系に対する毒性は、AhR 活性依存的であることが判明した。

第5章では、DEP による AhR の活性化を抑制する食品成分に関する研究結果を記述した。Ah-Immunoassay 法にて、DEP で誘導される AhR の活性化に対してアンタゴニスト作用を持つ食品とポリフェノール類のスクリーニングを行った。その結果、食品ではイチョウ葉エキス (Ginkgo Biloba Extract; GBE) が最も AhR の活性化を抑制した。その他、緑茶 > タマネギ > ニンニクの順に抑制効果を示した。ポリフェノール類では、ケルセチン > ミリセチン > ギンゴライド B > ギンゴライド A > レズベラトロールの順であった。

第6章では、DEP による雄性生殖機能低下に対する食品成分の回復効果に関する結果を記述した。本研究では、6週齢の BALB/c 系雄マウスに、3濃度 (0.3%、0.1% および 0.03%) のケルセチン含有飼料および 0.5% タマネギ粉末含有飼料を与えて飼育し、DEP 懸濁液 (220  $\cdot$  g/mouse) を1週間に2回ずつ5週間にわたって背部皮下投与して、DEP による精子生産能等の雄性生殖機能の低下が低減するかどうかを検討した。その結果、ケルセチン摂取群の一日精子生産量は、普通食を摂取している DEP 群と比較して有意に改善した。また、ケルセチン摂取とタマネギ摂取群の両方で精子形態異常率が普通食を摂取している DEP 群と比較して有意に改善した。免疫染色したセルトリ細胞数は、DEP 投与によって減少したが、ケルセチン摂取によってその減少が低減された。DEP 投与によってセルトリ細胞の何らかの機能が低下し、その結果染色性が低下したものが、ケルセチンにより回復したものと推察された。以上の結果から、DEP はマウスの一日精子生産量や精子形態、さらにセルトリ細胞の機能を低下させるが、ケルセチンやタマネギがこれら DEP 毒性発現を低減することが明らかとなった。

本研究の結果を総括すると、DEP はマウス雄性生殖毒性を有するが食品によってその毒性を低減できる可能性があることを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、マウスを用いてディーゼル排気微粒子(Diesel Exhaust Particle: DEP)による雄性生殖機能への毒性と Ah 受容体 (Aryl hydrocarbon Receptor: AhR) 活性を調べ、さらに、DEP の毒性を阻害する食品やその食品成分のスクリーニングを行い、最も効果的であったサンプルをマウスに摂取させて、DEP による毒性が低減されるか否かについて研究した。

### 1. DEP の雄性生殖機能への影響と AhR の関係

6 週齢の BALB/c 系雄マウスに、DEP 懸濁液を 3 用量(24.7 $\mu$ g, 74.0 $\mu$ g および 220 $\mu$ g/mouse) を 1 週間に 2 回ずつ 5 週間にわたって背部皮下に投与した。その結果、74.0 $\mu$ g と 220 $\mu$ g 投与群では、vehicle 群と比較して一日精子生産量と精子生存率の有意に低下を、精子形態異常率が有意上昇した。また、精細管の精上皮が肥厚し、elongate type 精子細胞は観察されなかった。血中テストステロン濃度は、74.0 $\mu$ g 群で vehicle 群と比較して有意な高値を示した。AhR は転写活性化因子として薬物代謝酵素 Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)を誘導し、CYP1A1 活性は、Ethoxy Resorufin-O-Deethylase (EROD)活性として評価されることから、本研究では、AhR 活性の間接的な指標として EROD 活性を測定した。その結果、74.0 $\mu$ g 群の肝 EROD 活性が vehicle 群と比較して有意な高値を示した。これらの結果から、DEP は雄性生殖機能を低下させ、その作用発現には AhR の関与が推察された。

次いで、AhR 応答性の異なる 4 系統のマウスを用いて雄性生殖機能に及ぼす DEP の影響について検討した。6 週齢の BALB/c (AhR 高応答性)、C57BL/6 (高応答性)、ICR (中応答性) および DBA/2 (低応答性) 系雄マウスに DEP 懸濁液(74.0 $\mu$ g/mouse)を 1 週間に 2 回ずつ 5 週間にわたって背部皮下に投与した。EROD 活性は、BALB/c > C57BL/6 > ICR > DBA/2 の順に高値を示した。BALB/c と C57BL/6 の一日精子生産量は、vehicle 群と比較して有意な低値を示した。また、BALB/c、C57BL/6 および ICR の精子生存率は vehicle 群と比較して有意な低値を示した。4 系統すべての精子形態異常率は、vehicle 群と比較して有意な高値を示した。BALB/c の血中テストステロン濃度は、vehicle 群と比較して有意な高値を示した。4 系統の DEP 投与マウスの肝 EROD 活性と一日精子生産量および精子形態異常率が正の相関を、肝 EROD 活性と一日精子生産量の間では負の相関を示した。以上の結果から、DEP による一日精子生産量の減少や精子の異常形態率の増加が AhR 活性と相関を示したことから、雄性生殖系に対する DEP の毒性は AhR 活性依存的な反応であると推察された。

### 2. DEP による AhR の活性化を抑制する食品成分の検索と雄性生殖機能低下に対する効果

Ah-Immunoassay 法を用いて、DEP で誘導される AhR の活性化に対してアンタゴニスト作用を持つ食品とポリフェノール類のスクリーニングを行った。その結果、食品ではイチョウ葉エキス (Ginkgo Biloba Extract: GBE) が最も AhR の活性化を抑制した。その他、緑茶>タマネギ>ニンニクの順に抑制効果を示した。ポリフェノール類ではケルセチン>ミリセチン>ギンゴライド B>ギンゴライド A>レズベラトロールの順に AhR の活性化を抑制した。

次に、DEP による雄性生殖機能低下に対する食品成分の効果の検討を行った。本研究では、6 週齢 BALB/c 系雄マウスに、3 濃度 (0.3%, 0.1% および 0.03%) のケルセチン含有飼料および 0.5% タマネギ粉末含有飼料を与えて飼育し、DEP 懸濁液(220 $\mu$ g/mouse)を 1 週間に 2 回ずつ 5 週間にわたって背部皮下投与して、DEP による雄性生殖機能の低下が低減するか否かを検討した。その結果、ケルセチン摂取群の一日精子生産量は、普通食を摂取している DEP 群と比較して有意に改善した。また、ケルセチン摂取とタマネギ摂取群の両方で精子形態異常率が普通食を摂取している DEP 群と比較して有意に改善した。免疫染色したセルトリ細胞を観察した結果、

DEP によって、細胞数が減少したが、ケルセチン摂取によりその減少が回復した。成熟マウスのセルトリ細胞数は変化しないことから、DEP によってセルトリ細胞の何らかの機能が低下し、その結果染色されなかった細胞が、ケルセチンによりその影響を低減したものと推察された。以上の結果から、DEP はマウスの一日精子生産量や精子形態に影響を与え、セルトリ細胞の機能を低下させるが、ケルセチンやタマネギがこれら DEP の生殖毒性の発現を低減することを明らかにした。

ディーゼルエンジン搭載車両は、機能的または経済的理由から世界中で広く利用されているため、DEP は広く大気環境中に放出されており、完全に排除することは難しい。しかし、本研究の結果は、日々の食生活によりその毒性を低減できる可能性を示したものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is aryl hydrocarbon receptor dependent  
著 者 名: Izawa, H., Kohara, M., Watanabe, G., Taya, K. and Sagai, M.  
学術雑誌名: Journal of Reproduction and Development  
巻・号・頁・発行年: 53(5): 1069-1078, 2007
- 2) 題 目: Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness  
著 者 名: Izawa, H., Kohara, M., Watanabe, G., Taya, K. and Sagai, M.  
学術雑誌名: Journal of Reproduction and Development  
巻・号・頁・発行年: 53(6): 1191-1197, 2007
- 3) 題 目: Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles  
著 者 名: Izawa, H., Kohara, M., Aizawa, K., Suganuma, H., Inakuma, T., Watanabe, G., Taya, K. and Sagai, M.  
学術雑誌名: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry  
巻・号・頁・発行年: 72(5): 1235-1241, 2008