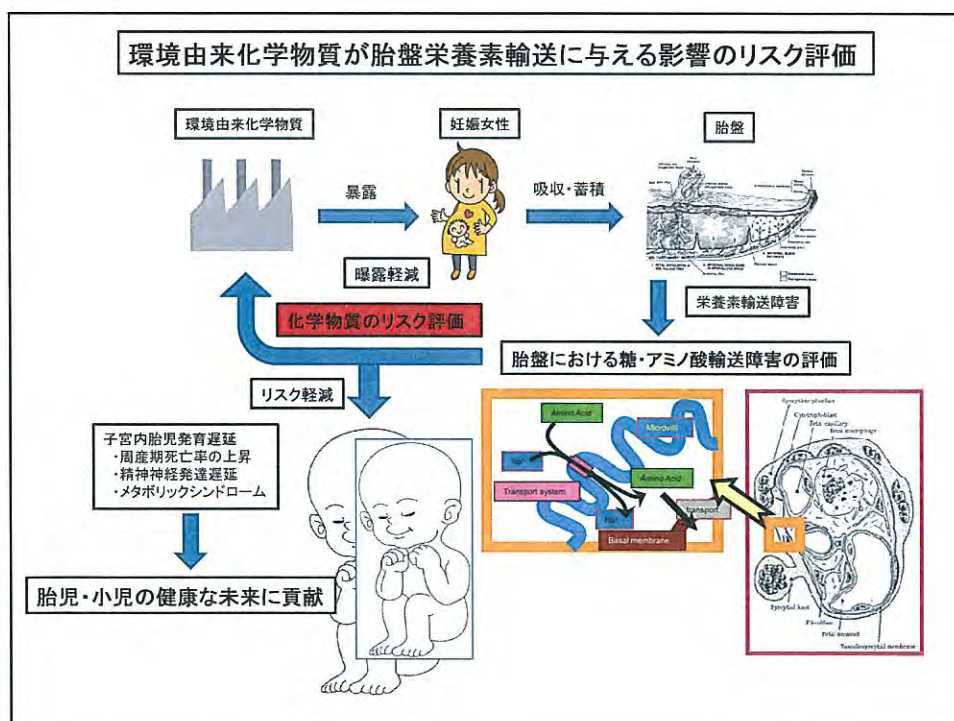


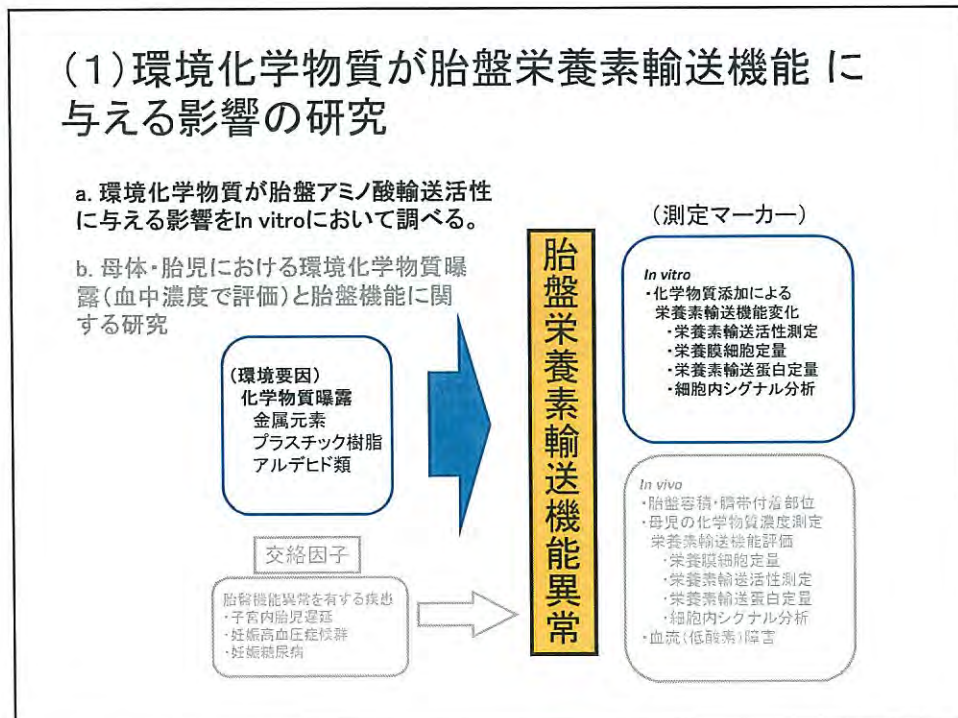
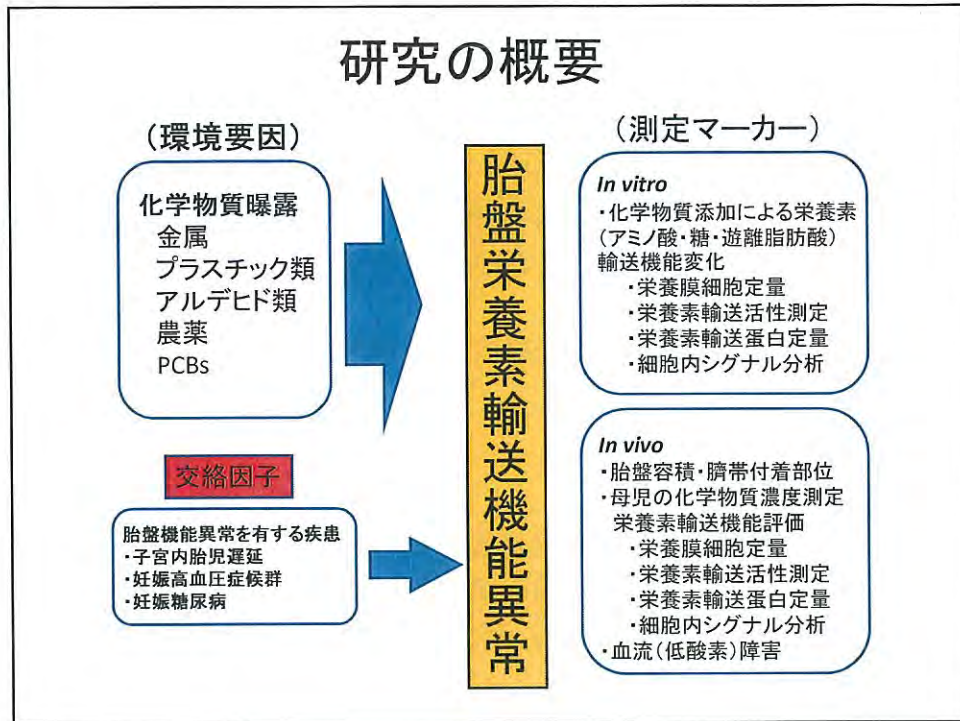
研究課題名 (C-1006) :
 妊婦の環境由来化学物質への曝露が胎盤
 栄養素輸送機能に与える影響の研究

研究期間: H24年度: 最終年度 (成果報告)

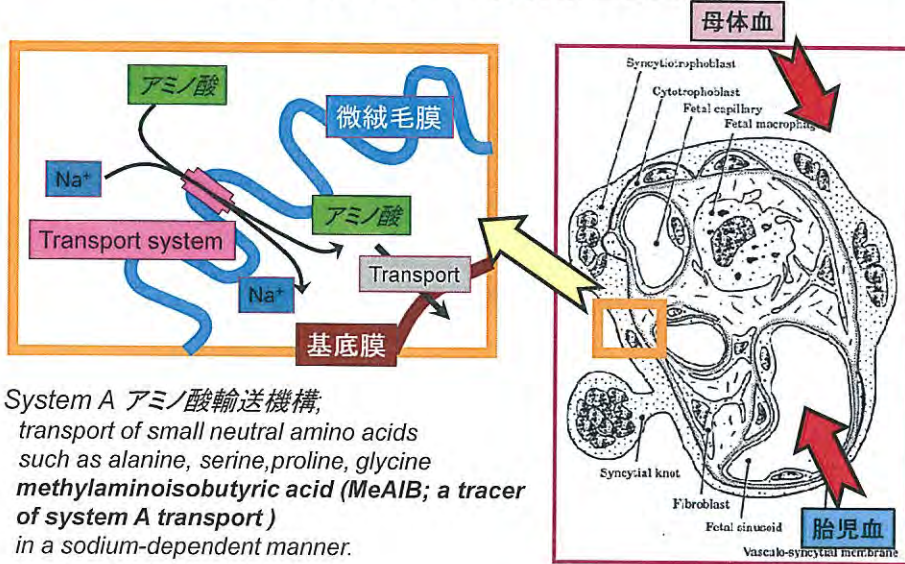


研究代表者氏名: 柴田 英治
 共同研究者: 川本 俊弘、蜂須賀 徹
 所属: 産業医科大学



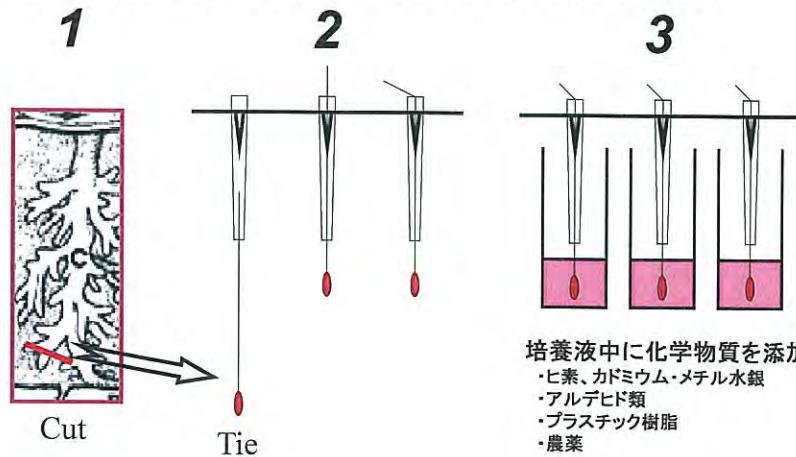


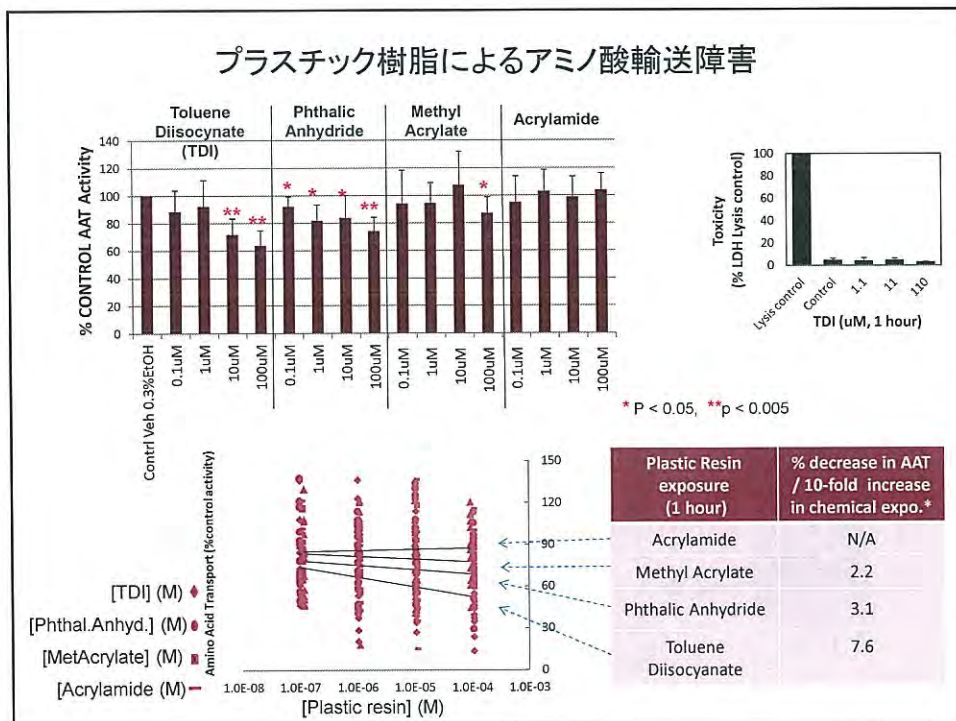
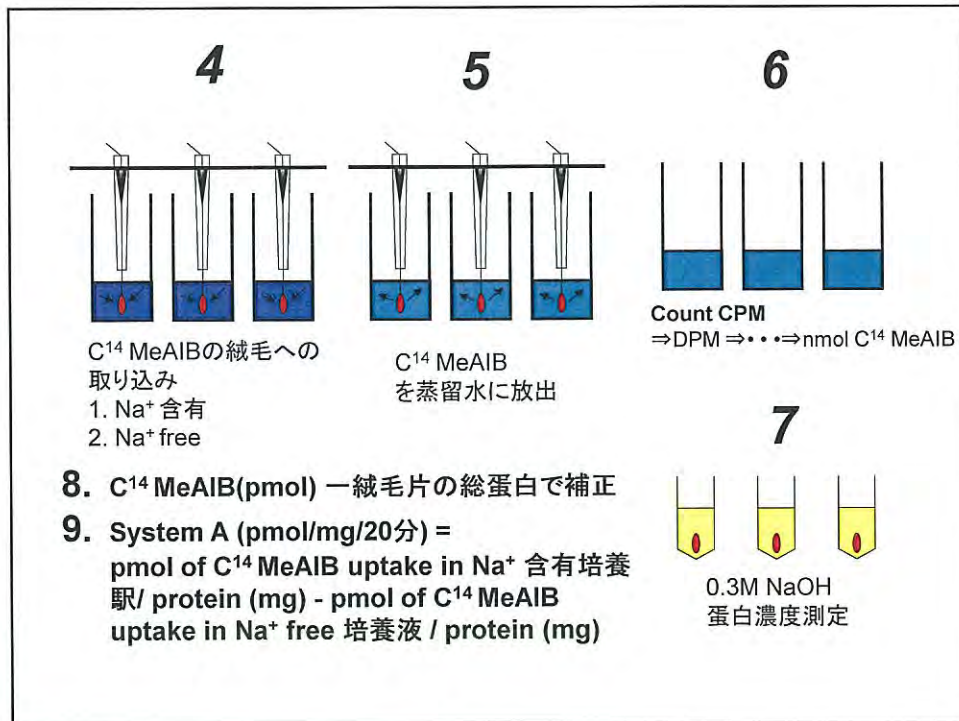
Na依存性アミノ酸輸送機構



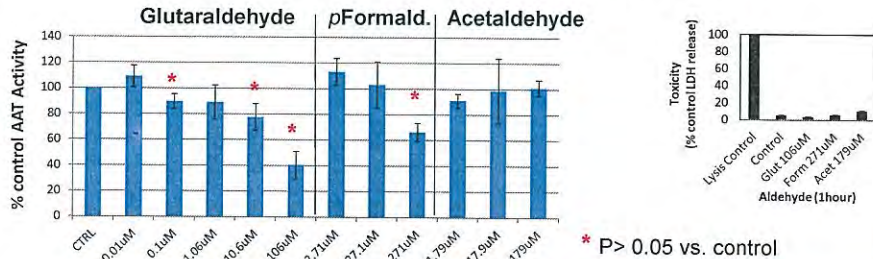
胎盤アミノ酸輸送活性測定法

1. 正常かつ満期産の胎盤を分娩後直ちに得る。
2. 胎盤より小絨毛片を培養し、様々な環境化学物質を添加し反応させる。

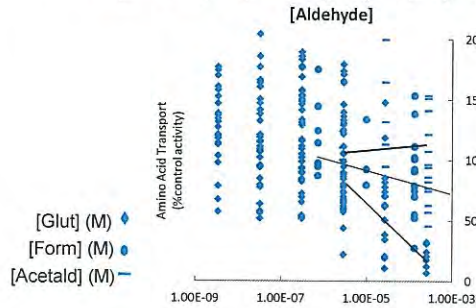




アルデヒド類によるアミノ酸輸送障害



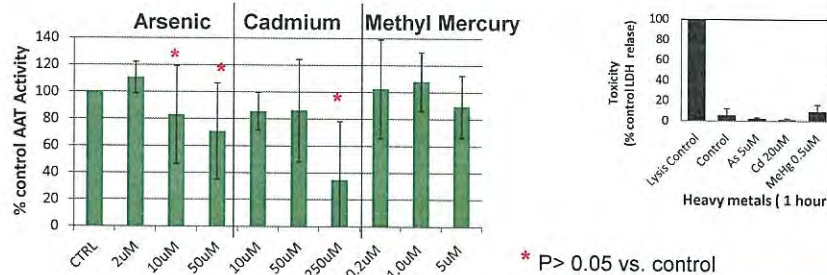
* P > 0.05 vs. control



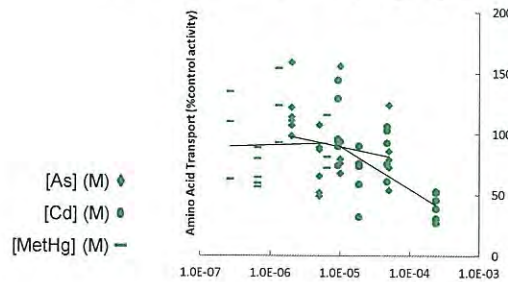
Heavy Metal exposure (1 hour)	% decrease in AAT / log ¹⁰ increase in chemical expo.*
Glutaraldehyde	44.2
pFormaldehyde	11.5
Acetaldehyde	N/A

* Chemical effect was estimated across experimental range graphed here.

重金属によるアミノ酸輸送障害

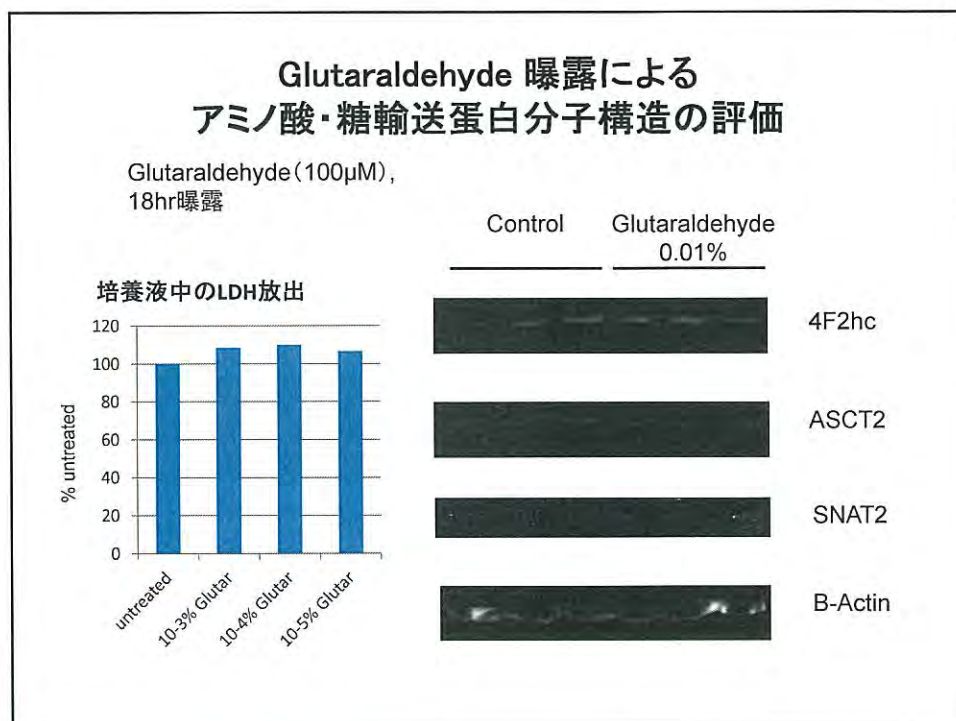


* P > 0.05 vs. control



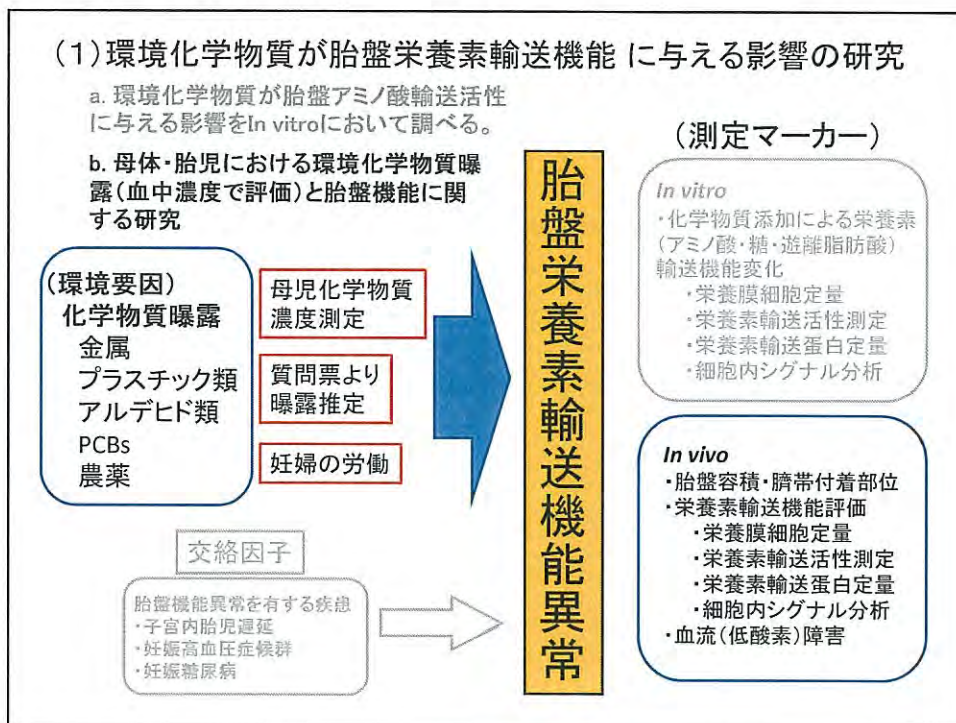
Heavy Metal exposure (1 hour)	% decrease in AAT / log ¹⁰ increase in chemical expo.*
Arsenic	18.3
Cadmium	33.7
Methyl Mercury	N/A

* Chemical effect was estimated across experimental ranges graphed here.



結果

- ヒ素、カドミウムは高濃度でアミノ酸輸送活性を低下させた。
- グルタルアルデヒドは比較的low濃度より濃度依存性にアミノ酸輸送活性を低下させた。ホルムアルデヒドは高濃度でのみアミノ酸輸送活性を低下させた。アセトアルデヒドは変化させなかった。
- トリレンジイソシアネート、無水フタル酸は比較的low濃度より濃度依存性にアミノ酸輸送活性を低下させたが、メチルアクリレートは高濃度でのみアミノ酸輸送活性を低下させた。アクリルアミドは変化させなかった。



環境化学物質と胎盤機能

胎盤栄養膜細胞の定量化法

SCT (Syncytiotrophoblast) : 合体栄養膜細胞

Placental Trophoblast volume measurement protocol was adopted from Mayhew TM, et. al (2003).

- ①胎盤HE染色標本(20倍)と Cell count plug-in (格子状細胞カウント)を画像処理により重ね合わせる。
- ②格子目に存在する細胞組織成分をカウントする(1080カウント)。
- ③目的とする細胞数を合計して単位胎盤当りの密度を算出する

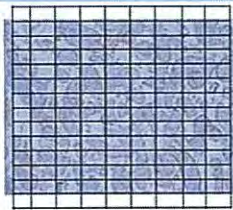


Image scored	Trophoblast	絨毛血管 Intra-capillary	絨毛間腔 Intervillous space	出血・壊死 Non-Villous (fibroid, etc.)	total points scored
1	19	18	11	36	108
2	20	15	40	9	108
3	28	15	41	1	108
4	33	20	31	0	108
5	30	25	17	11	108
6	20	18	27	26	108
7	40	23	24	2	108
8	22	17	38	0	108
9	27	21	43	3	108
10	33	27	17	7	108
Total counts:					1080
% of total:					100
Total placental volume(cm ³):					662.5

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) decrease the Placental Syncytiotrophoblast Volume and increase Placental Growth Factor (PIGF) in the placenta of normal pregnancy
PLACENTA 2013

研究対象

(環境要因)
化学物質曝露
金属
プラスチック類
アルデヒド類
PCBs
農薬

母児化学物質
濃度測定

胎盤栄養素輸送機能異常

Total number (N) 22
Age (yr) 30.7±0.97
Pregnancy week 39.8±0.27
Primipara (N) 18
Multipara (N) 4
BMI before pregnancy (kg/m²) 20.9±0.59
BP 1week postpartum a
Systolic (mmHg) 117±3.4
Diastolic (mmHg) 69.0±2.7
Smoking habits of mother during pregnancy
smokers (N) 0
non-smokers (N) 22
Smoking habits of mother before pregnancy
smokers (N) b 4 c
non-smokers (N) 18
Birth weight (g) 3059±65.7
Placenta weight (g) 475±17.3
Placenta volume (cm³) 499±18.1

Continuous variables are shown as mean (SD).
N=number
All subjects (N=22) were normotensive during pregnancy.
a) Number is 21.
b) Previous smokers were included in category of smokers.
c) The mean ±SD brinkman Index was 120±14.7.

母体および臍帯血液中のPCBs濃度

	maternal blood (pg/g-fat)		cord blood (pg/g-fat)		P value ^a
	Median	(95%CI)	Median	(95%CI)	
Total PCBs	33000	(30930, 44418)	12500	(10805, 16000)	<0.001
MoCBs ^b	0	(0, 0)	0	(0, 0)	N.D.
DiCBs	145	(99.1, 290)	120	(110, 141)	0.108
TriCBs	370	(289, 435)	205	(169, 251)	<0.001
TeCBs	1650	(1300, 2114)	685	(579, 861)	<0.001
PeCBs	4200	(2879, 4949)	1650	(1300, 2014)	<0.001
HxCBs	15000	(13000, 21070)	6000	(4923, 7814)	<0.001
HpCBs	10500	(8868, 12139)	3200	(2386, 4035)	<0.001
OcCBs	2100	(1693, 2621)	565	(419, 695)	<0.001
NoCBs	260	(199, 313)	54.0	(40.0, 93.0)	0.043
DeCB	160	(129, 313)	47.5	(40.0, 93.0)	0.068

Total PCBs is the total of the concentrations of the 209 congeners.

For congeners <MDL, homolog and total PCBs calculations used a 0 value substitution.

a) P values were obtained by Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test.

b) MoCBs were detectable in only 2/22 sample sets, statistics not performed (N.D.).

PCBs濃度と合胞体栄養膜細胞数(ST)、PIGF、及びsFlt-1濃度との関連

	ST			PIGF ^a			sFlt1 ^a		
	Coefficient	SE	P value	Coefficient	SE	P value	Coefficient	SE	P value
Total PCBs (pg/g-fat) in maternal blood	-74.2	39.9	0.081	0.90	0.33	0.014	0.11	0.52	0.830
Total PCBs (pg/g-fat) in cord blood	-37.2	64.0	0.569	1.43	0.34	0.001	-0.29	0.75	0.707

PIGF (Placental Growth Factor):

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)ファミリーの一つで胎盤より分泌され胎盤の発育(血管新生)に深く関わる。

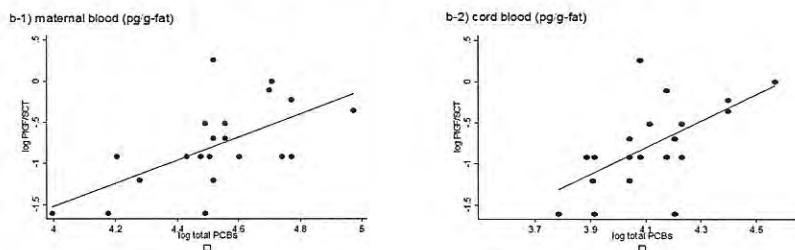
sFlt-1(soluble fms-like tyrosine kinase)

スプライシングバリエーションにより胎盤で産生される可溶性VEGF-Receptor-1である。PIGFと結合し血管新生を阻害する。

* 古典的子宮内胎児発育遅延ではPIGF、sFlt-1共に低下すると考えられている。

* 妊娠高血圧症候群ではsFlt-1は著名に増加、PIGFは低下すると考えられている。

PCBs濃度とPIGF／STとの関連



	PIGF / ST ^{a,b}		
	Coefficient	SE	P value
Total PCBs (pg/g-fat) in maternal blood	2.86	0.82	0.003
Total PCBs (pg/g-fat) in cord blood	3.74	0.88	0.001

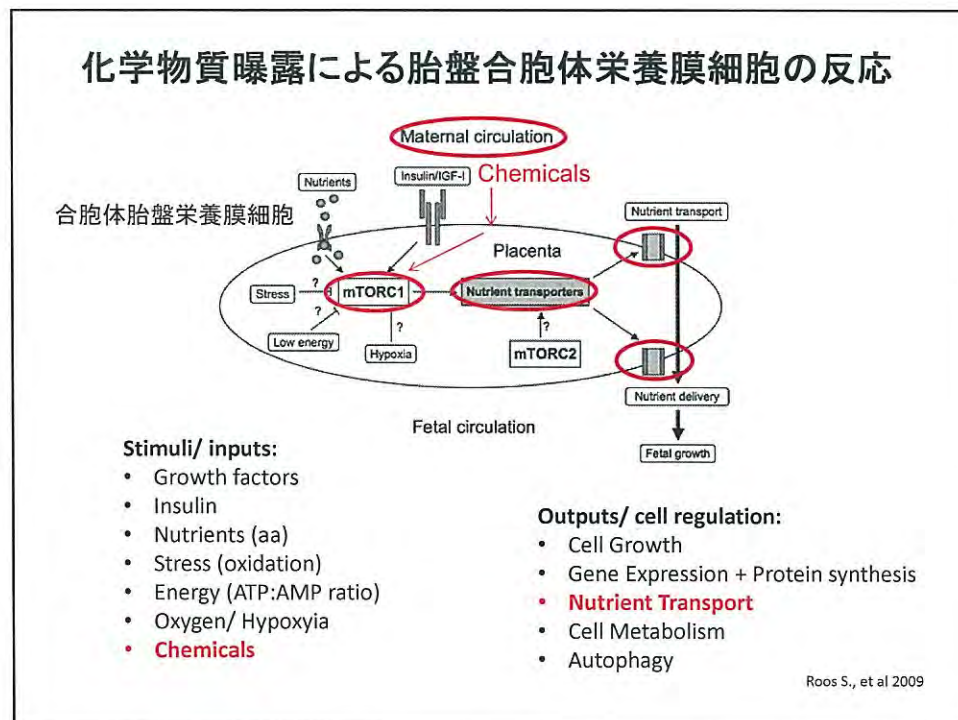
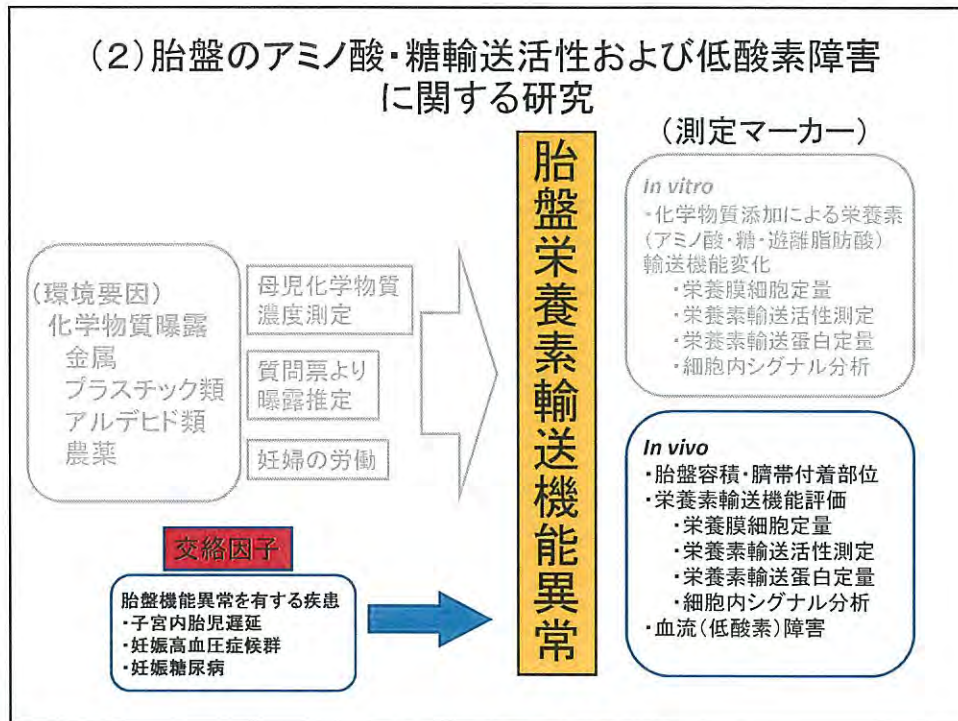
正常妊娠ではPCBs濃度が上昇するほど合胞体栄養膜細胞は減少し、PIGFは上昇している。

a) N=21
 b) z-score transformation was performed.
 P values were obtained by multivariate regression model.
 Coefficient= regression coefficient
 SE: standard error

まとめ及び考察

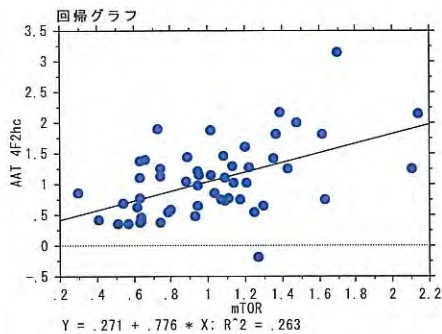
- PCBs曝露が出生体重を減少させることは疫学的調査で明らかになりつつあるが、そのアンダーラインメカニズムはこれまで全くの未解決であった。
- 今回我々は血液中のPCBs濃度上昇に伴い、胎児栄養化を担う合胞体栄養膜細胞が減少することを世界ではじめて発見し、PCBs曝露による胎児発育制限機構を明らかにした。
- また、PCBs濃度上昇に伴い胎盤血管新生に寄与するPIGF産生は亢進していることを発見した。これは正常妊娠における胎盤の適応機能を示唆すると考えている。
- 化学物質曝露による胎児発育制限には特有のPIGF、sFlt1プロファイルが存在することが示唆された。
- PCBsは低濃度でも、胎盤栄養素輸送機能への生物学的活性が高く、妊婦への曝露は極力避けるべきである。

PLACENTA, 2013

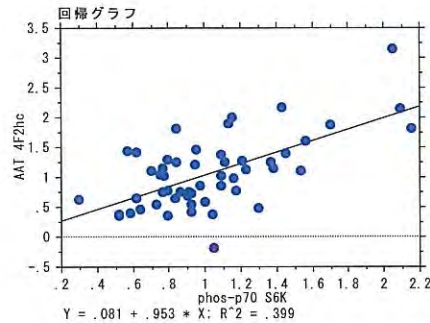


胎盤におけるアミノ酸輸送蛋白発現と mTORシグナルには正の相関性が認められた。

パイロット調査55症例



相関係数0.512 P<0.001



相関係数0.612 P<0.001

母体の体重変化が胎児・胎盤機能に与える影響

Barker仮説:「胎児期に低栄養であることが成人後(小児期)における高血圧・心筋梗塞・糖尿病などのリスクとなる」に基づき、妊娠期間中の母体の体重変化が胎児・胎盤機能に与える影響について調査を行った。

◆正常分娩55症例について、妊娠期間中の体重増加の程度により3群に分類。

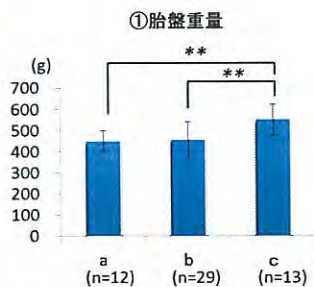
a群:プラス0~4.9kg(12人)/b群:プラス5~9.9kg(29人)/c群:プラス10kg以上(13人)

【解析方法】ANOVA with post hoc(Fisher's PLSD)

母体・新生児基本情報

	a群(n=12)	b群(n=29)	c群(n=13)
年齢	31.7±4.4	30.3±4.7	30.1±4.6
非妊娠時体重(kg)	61.2±7.7	54.8±8.0	57.6±9.0
分娩時体重(kg)	62.7±7.4	62.2±8.0	71.2±8.8*
分娩週数	39w1d±1.7	39w5d±0.9	40w2d±1.5
出生体重(g)	2,950±833	2,967±338	3,282±352*
出生体重(centile)	18.8±15.4	20.3±16.1	30.4±24
分娩方法(帝王切開)	0/12(0%)	1/29(3%)	3/13(23%)

※1例は欠測値のため、除外

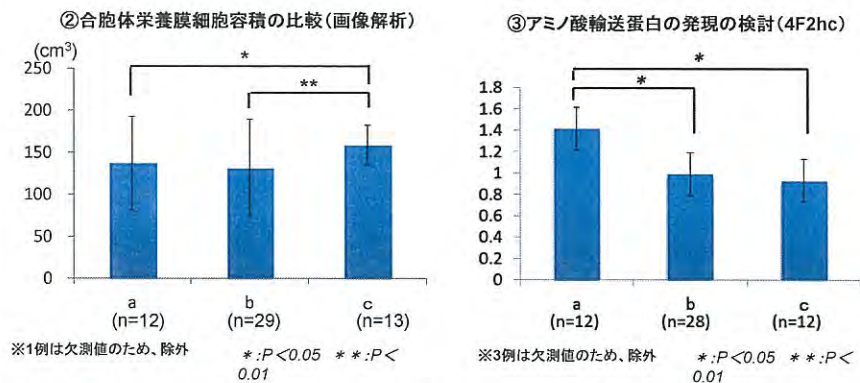


※1例は欠測値のため、除外

*:P<0.05 **:P<0.01

- ・ 妊娠中の母体体重増加が大きいほど、胎盤重量、児の出生体重が重くなる傾向にあった。

母体の体重変化が胎児・胎盤機能に与える影響



- 合胞体栄養膜細胞容積は母体体重増加が大きい群において、平均値が最大となった。
- L型アミノ酸輸送蛋白は、母体体重増加が不良な程、高発現する傾向にあった。

妊娠中の母体体重増加によって胎盤機能が修飾され、児の出生体重が変化することが示唆された。

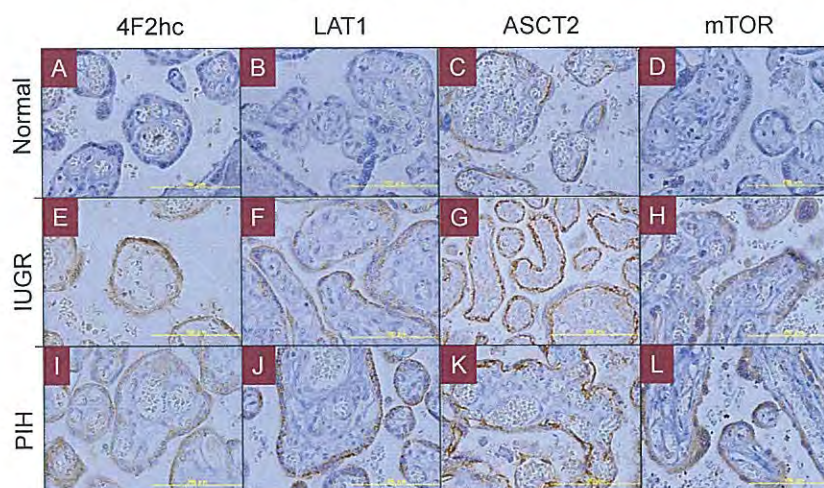
妊娠中に適切な体重管理を行うことが、母児の健康において重要であると考えられた。

子宮内胎児発育遅延 (IUGR)
& 妊娠高血圧症候群 (PIH)

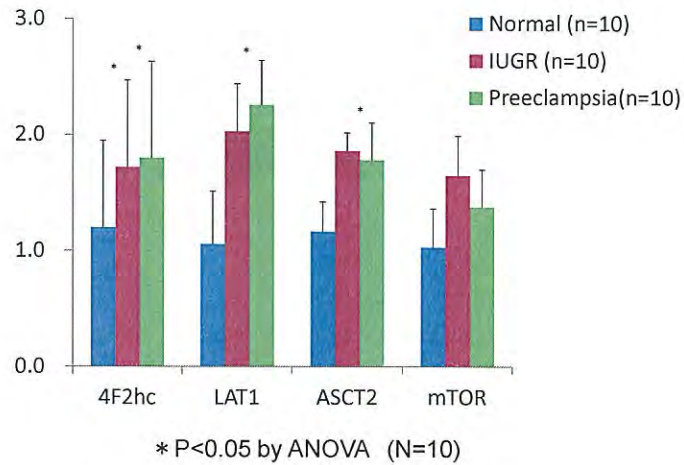
対象：母体・新生児情報

	Normal(n=10)	PIH(n=10)	IUGR(n=10)
Maternal age	31.0±6.4	34.0±4.3	31.6±6.0
Maternal BMI(kg/m ²)	21.3±6.6	23.8±5.0	17.8±1.2
Percent nulliparous	70	30	70
Blood pressure at delivery(mmHg)			
Systolic(mmHg)	121±9	162±19	122±24
Diastolic(mmHg)	73±9	97±10	77±22
Blood pressure <20weeks GA			
Systolic(mmHg)	118±7	141±11	105±21
Diastolic(mmHg)	77±11	87±6	64±12
Gestational weeks at delivery	39.2±1.5	33.6±2.0	34.5±3.1
Birth weight(g)	2835±435	1446±333	1465±335
Birth weight centile	28.0±18.5	8.3±5.17	5.4±5.1
Placental weight(g)	558±141	348±91	332±82
Smoking(%)	0	0	10
Route of delivery(C/S/total)	90	80	60

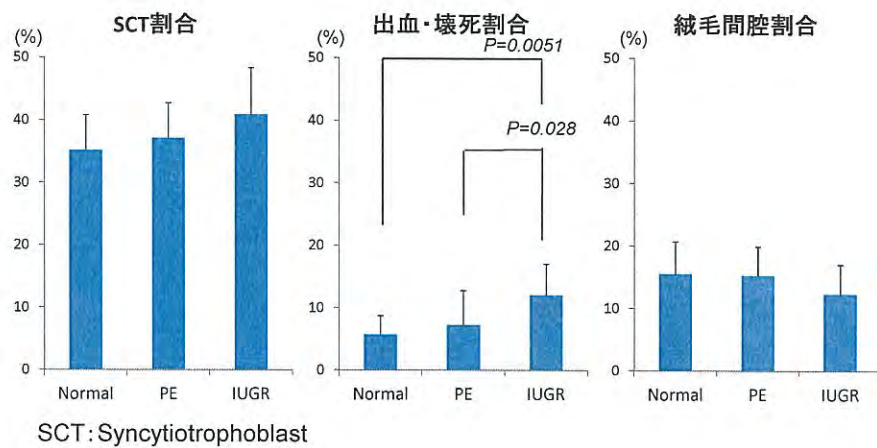
アミノ酸輸送蛋白とmTORの発現 および局在.



IUGR & PIHにおける アミノ酸輸送蛋白・mTORの発現



画像解析による胎盤組織分析



妊娠糖尿病・糖尿病合併妊娠

表1 母体・新生児情報

	GDM/DM群(n=10)	正常群(n=10)
母体年齢	32.6±6.3	31.0±6.4
非妊娠時BMI	27.0±4.3*	21.0±6.6
非妊娠時体重 (kg)	68.6±12.6*	51.0±14
分娩時体重 (kg)	76.0±12*	61.0±10
妊娠中の体重増加量(kg)	8.2±4.7	10.0±5.0
分娩週数(週数±日)	37.6±1.4	39.2±1.5
児の出生体重(g)	3039±486	2835±435
出生体重(SD換算)	+0.5±1.2	-0.5±0.84
胎盤重量(g)	621±125	558±141
分娩方法(帝王切開数/total)	2/10(20%)	9/10(90%)
インスリン治療あり	6/10(60%)	(-)
初診時のHbA1c(%)	6.3±1.1	
分娩時のHbA1c(%)	5.5±0.3	

図1 合胞体栄養膜細胞数

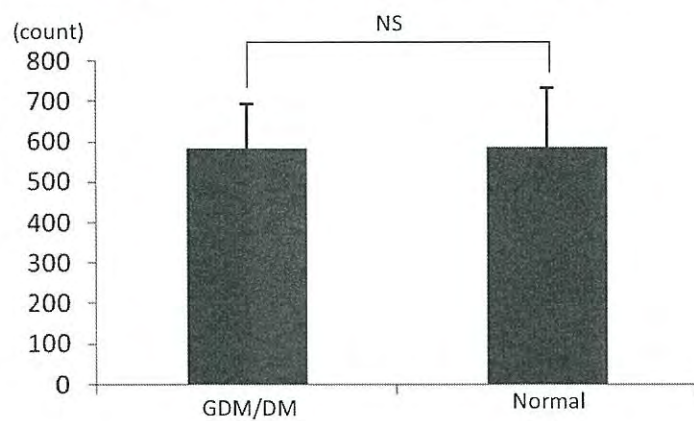
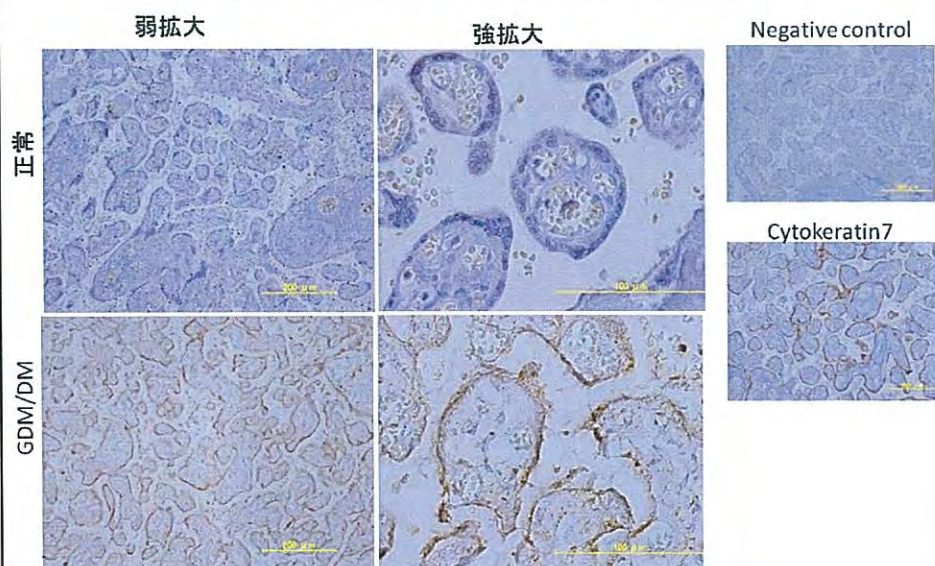


図2 免疫組織染色(4F2hc)



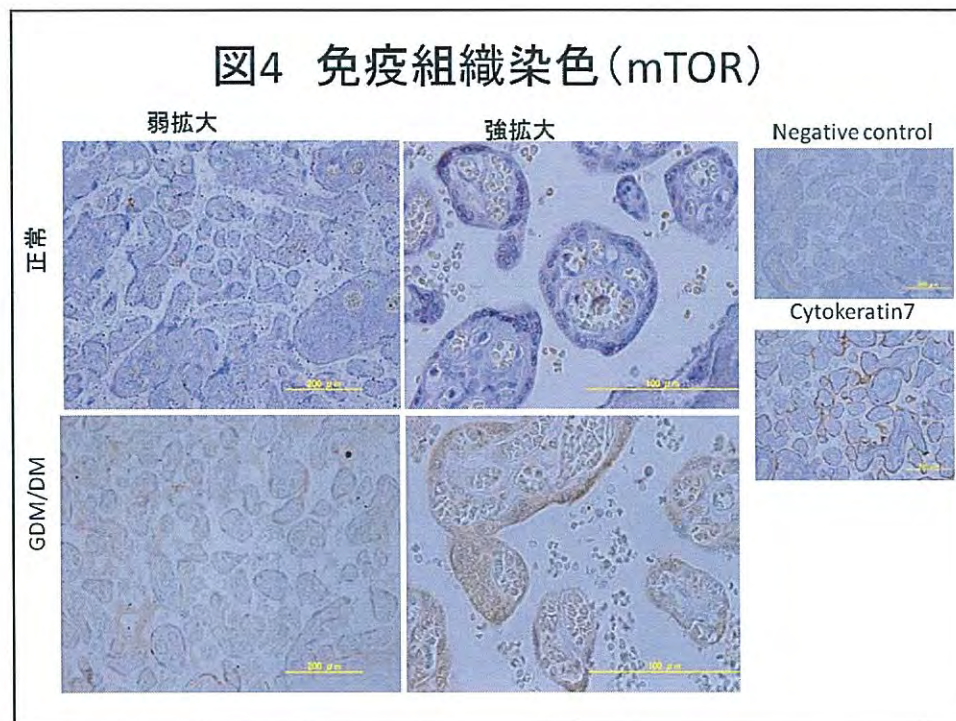
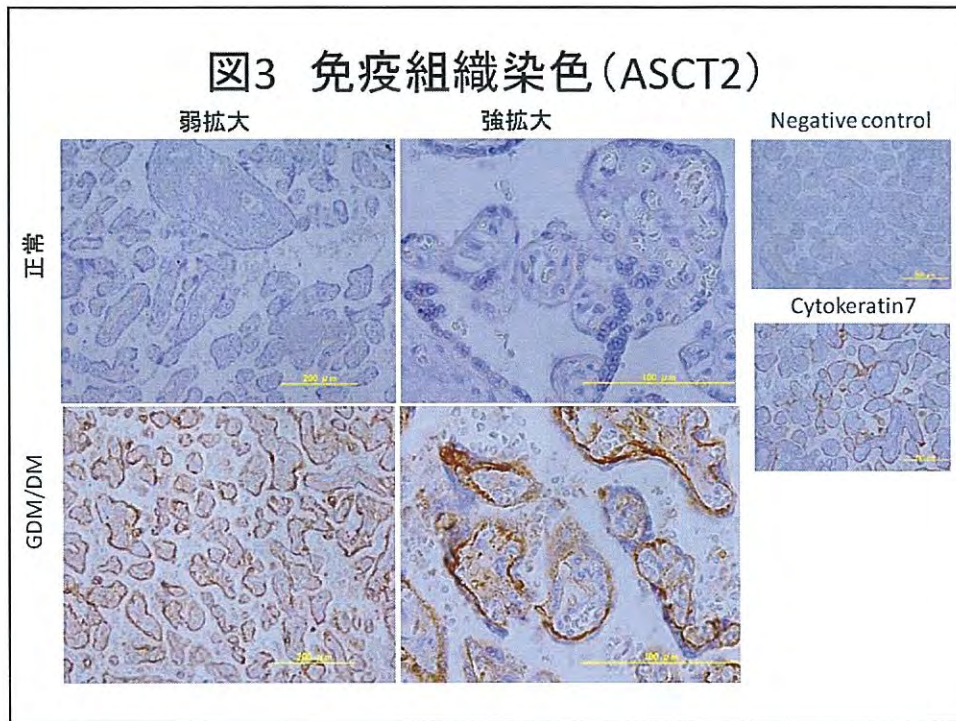
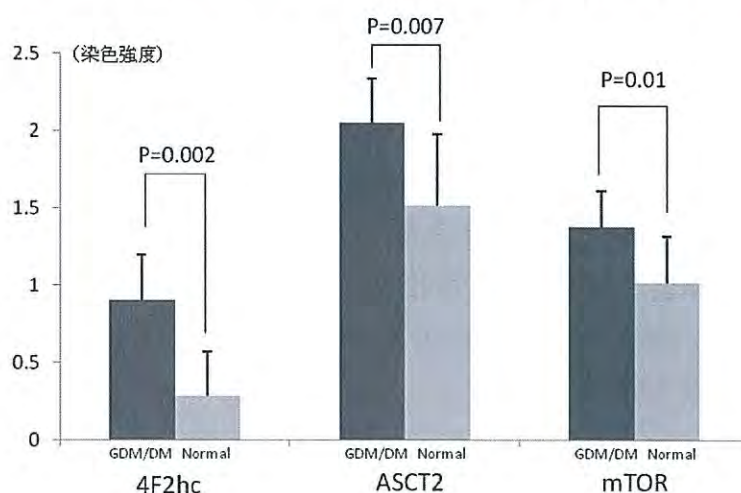


図6 4F2hc, ASCT2, mTOR発現の定量化

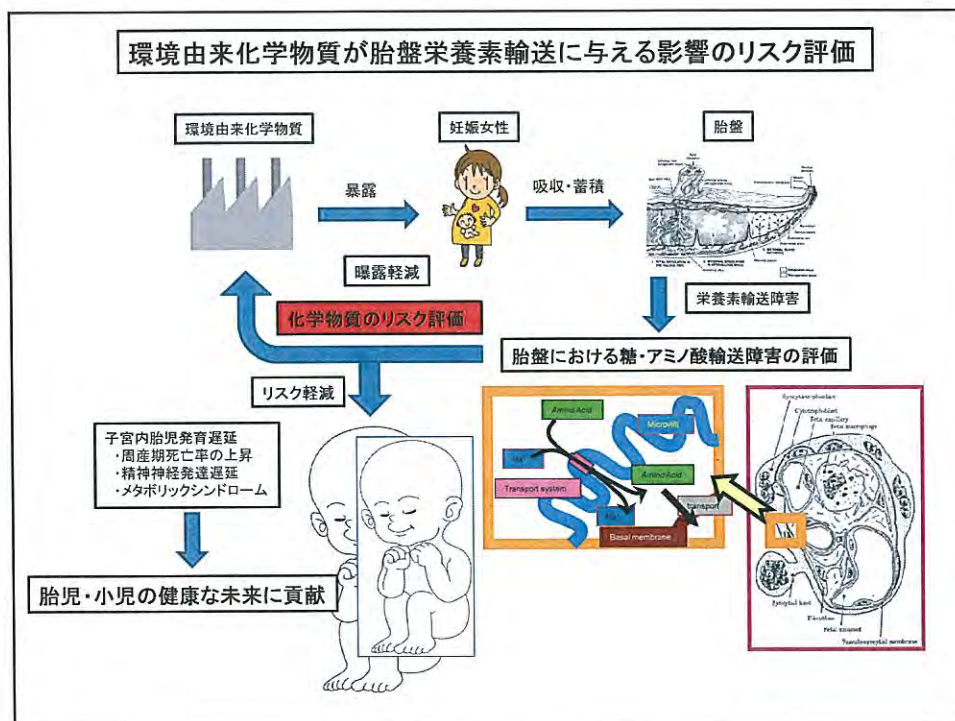


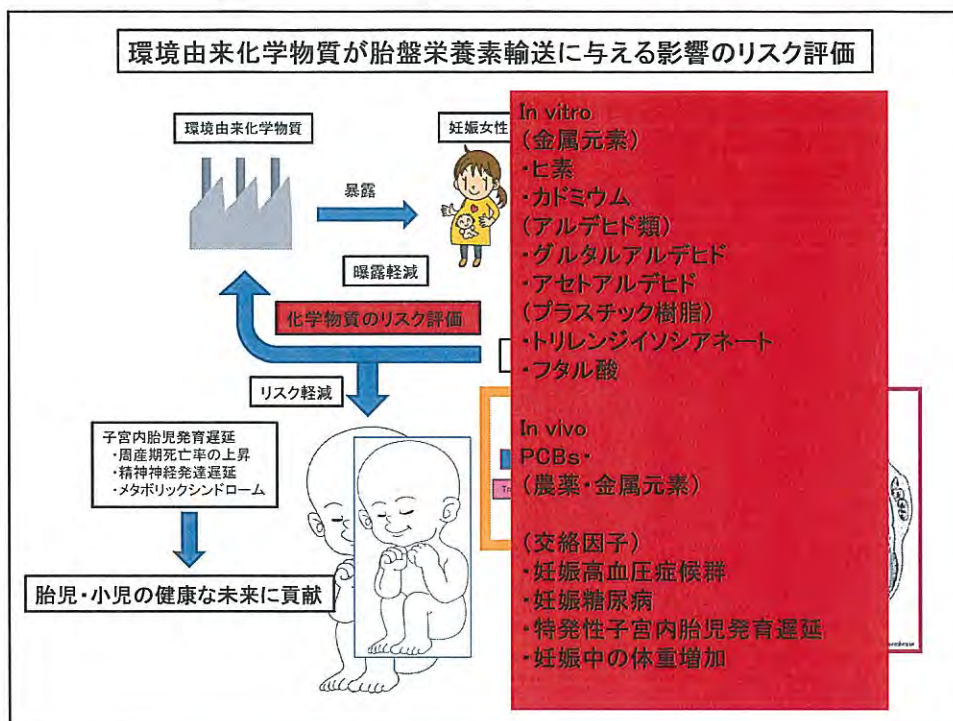
結果

- 正常胎盤におけるアミノ酸輸送蛋白およびmTORシグナルと妊娠中体重増加量との間には正の相関性が認められた。
- 栄養膜細胞数は正常妊娠群と疾患群において有意差を認めなかったが、出血・壊死などの無機能領域はPIH、FGRで広い傾向があった。
- アミノ酸輸送蛋白は、正常胎盤、PIH、IUGR、DM胎盤の合胞体栄養膜細胞に局在し、正常胎盤に比較してPIH、IUGR、DM胎盤では発現の程度が強かった。
- mTORシグナル蛋白も同様の傾向を認めた。

考察

- 胎盤には、低酸素・栄養などのストレスに反応して mTORシグナルを介し、アミノ酸輸送蛋白発現などをコントロールする機構が存在している。
- 環境化学物質が与える胎盤栄養素輸送機能を評価する場合、妊娠中体重増加が等しいこと、GDM、PIH、古典的IUGRなどの異常妊娠を呈していないことが重要である。





研究業績

- ・ 妊娠中の体重変化が胎盤アミノ酸輸送機能に与える影響
2011 産婦人科治療
- ・ 妊娠糖尿病/糖尿病合併妊娠の胎盤におけるアミノ酸輸送機能の検討
日本周産期新生児学会雑誌
2013 (掲載予定)
- ・ Polychlorinated Biphenyls (PCBs) decrease the number of Placental Syncytiotrophoblast and increase Placental Growth Factor (PlGF) in the placenta of normal pregnancy
2013 PLACENTA (投稿中: minor revision)
- ・ The protein level and localization of system L and B^{0,+} amino acid transporter and mammalian target of rapamycin (mTOR) in the placenta of normal, preeclampsia and fetal growth restriction.
The Journal of society for gynecologic investigation 2013 (投稿中)
- ・ The Effect of Aldehyde analogue, Plastic resin, and Heavy Metals in Human Placental Amino Acid Transport Activity.
2013 (投稿準備中)