

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号: 37116

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2009~2012

課題番号: 21791049

研究課題名(和文) 環境汚染物質が胎児発育に与える影響の研究

研究課題名(英文) The effect of environmental contaminants on placental nutrient transport

研究代表者

柴田 英治(SHIBATA EIJI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90419838

研究成果の概要 (和文): 我々は環境化学物質の胎盤栄養素輸送機能に与える影響について In vivo および In vitro にて検証した。In vivo 実験の結果、様々な環境化学物質の中で Polychlorinated biphenyls (PCBs) は母体・臍帯血液中の PCBs 濃度上昇に伴い、胎児栄養化を担う合体栄養膜細胞を減少させることを発見し、PCBs 曝露による胎児発育制限機構の 1 つの可能性を見出した。また、PCBs 濃度上昇に伴い胎盤血管新生に寄与する Placental growth factor (PlGF) 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反映していると考えられ、化学物質曝露による胎盤機能修飾機構には特有の PlGF と Soluble fms-like tyrosin kinase-1 (sFlt-1) のプロファイルが存在することが示唆された。In vitro 実験の結果、様々な環境化学物質の中でアルデヒド類、金属元素、プラスチック樹脂アミノ酸輸送活性を低下させた。全ての化学物質および金属元素は培養液中の乳酸脱水素酵素を増加させなかった。

研究成果の概要 (英文): Polychlorinated Biphenyls (PCBs) exposure decreases the infant birth weight in the previous report, but the underline mechanism is no known. we report that PCBs decrease the Placental syncytiotrophoblast Volume and increase Placental Growth Factor (PlGF) in the placenta of normal pregnancy. The increase of PlGF may be an adaptive response to maintain the placental nutrient transport function. Like a tobacco smoking, PCBs exposure has a unique profile of PlGF and in pregnant women. Even if the PCBs exposure is very low level, placental nutrient function may be changed. In vitro experiments, aldehyde analogue including glutaraldehyde, formaldehyde decreased system A amino acid transport activity but acetaldehyde did not in the placental villous fragment. Glutaraldehyde had the strongest effect on it. Heavy metals including arsenic, cadmium decreased system A amino acid transport activity but methylmercury did not in the placental villous fragment. Arsenic had the strongest effect on it. Plastic legins including toluene diisocyanate, phthalic anhydride, and methyl acrylate decreased system A amino acid transport activity but acrylamide did not in the placental villous fragment. Toluene diisocyanate had the strongest effect on it. All of the chemicals and heavy metals did not increase lactase dehydrogenase concentration in the culture media.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：環境化学物質、胎盤、栄養素輸送、子宮内胎児発育不全、アミノ酸輸送

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では様々な環境管理の努力がなされ、環境汚染は減少していると考えられることが多い。しかしながら、近隣諸国の急速な産業化に伴い、大気・海・輸入食料を媒介として受ける“外からの”環境汚染問題や、重金属やダイオキシン類のように、環境中や生体内で分解速度の遅い化学物質の人体内への蓄積による影響が危惧されている。また、胎児期や学童期にかけては、内分泌・神経・免疫などの機能は急速な発達を認め、これらの機能に関わる未成熟な器官は、成人に比べ、極微量の化学物質への曝露でも影響を受け易いことが示されている。ところが、世界的に、特に胎児や学童のような未熟な器官を有する時期に必要なとされる環境管理基準が明確でないことも大きな問題となっている。このように、健全な児の発育・発達のため、胎児や学童の発育・発達に影響する環境要因やその作用について明らかにし、このような時期に見合う適切な環境管理基準を作成することが急務となっている。

子宮内胎児発育遅延は周産期死亡率の増加、神経発達障害、また成人後の心血管疾患や糖尿病発症のリスク因子として重要である。胎盤は母体胎児間の物質交換を担い、正常な胎児発育は胎盤の栄養素輸送に大きく依存している。正常な胎児発育において、糖はエネルギー源として不可欠であり、アミノ酸はタンパク質合成のみならずエネルギー源としても重要である。従来から子宮内胎児発育遅延は子宮胎盤血流量の減少による酸素や栄養素の胎児への供給量低下が主要な病態とされてきたが、近年、子宮内胎児発育

遅延児の胎盤では糖・アミノ酸輸送活性そのものが低下していることが示されている。さらに、近年、妊婦の様々な環境汚染物質への曝露と出生体重減少との関与についての報告がなされている。これらは、胎盤の糖・アミノ酸輸送活性が、胎児への栄養素供給不足のみでなく、環境因子によっても修飾されていることを示唆している。

わが国では環境省を中心に小児環境保健に関する取組について検討が重ねられ、平成21年1月から「子どもの健康と環境に関する全国調査：子宮内化学物質曝露が子供の発育・発達に与える影響に関する研究」のパイロット調査を、平成22年4月から全国調査を実施することとなった（環境省「小児環境保健疫学調査」

<http://www.env.go.jp/chemi/ceh/examination/index.html>）。

我々はこれまで、定量的に胎盤絨毛における糖・アミノ酸輸送活性を測定する研究を重ね、子宮内胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群の病態に迫ってきた。これらの研究の経験から、我々は、定量的胎盤絨毛における糖・アミノ酸輸送活性の測定法に十分習熟したばかりか、糖・アミノ酸輸送活性の修飾因子とその機序について多くの知識を得てきた。また、本学、衛生学・産婦人科学講座（申請者は産業医科大学における本パイロット調査の研究実施責任者）は、上記の環境省「小児環境保健疫学調査」の九州地区ユニットセンターとなった。そこで、我々は、平成21年1月から5年間行われる「子どもの健康と環境に関する全国調査：子宮内化学物質曝露が子供の発育・発達に与える影響に関する研究」

のパイロット調査で得られる胎盤を利用して(本研究はこのパイロット調査とは個別に行われる)、新鮮胎盤絨毛の糖・アミノ酸輸送活性を測定するとともに、国立環境研究所で測定された母体血・胎盤・臍帯血中の様々な環境汚染物質濃度と、我々が測定した新鮮胎盤絨毛の糖・アミノ酸輸送活性値の相関などについて詳細に解析する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

研究目的(1): 母体血・臍帯血中の環境汚染物質濃度と胎盤の栄養素輸送機能の関連性の検討

胎盤絨毛のアミノ酸輸送活性と妊娠中(妊娠初期、後期、分娩時)に採取された母体血、また分娩時に採取された胎盤・臍帯血の環境汚染物質[総水銀、メチル水銀、鉛、カドミウム、セレン、亜鉛、銅、ヒ素などの金属、PCB(polychlorinated biphenyl)などのダイオキシン類、

DDT(dichlorodiphenyltrichloroethane)、クロルデン類、ドリリン類、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロル類、ヘキサクロロシクロヘキサン類、マイレックス、トキサフェン、パーフルオロオクタンスルホン酸、パーフルオロオクタノ酸などの残留有機汚染物質、有機リン系、カーバメート系などの農薬]濃度との相関関係について明らかにする。

研究目的(2): 環境汚染物質の胎盤糖・アミノ酸輸送活性に与える濃度依存性変化の検討

In vitro において上記の様々な環境化学物質の中で、どのようなものが胎盤のアミノ酸輸送活性(System A アミノ酸輸送活性)をどのような濃度で低下させるのか詳細に分析する。

3. 研究の方法

エコチル調査「パイロット調査」の55症例の胎盤の試料採取及びヘマトキシリン・エオジン染色標本の画像解析による形態学的検討を行った。

以下に評価項目を示す。

- イ) 胎盤栄養膜細胞の定量化
- ロ) 胎盤血栓・梗塞範囲の定量化
- ハ) 絨毛間腔(胎盤内の母体血流スペース)の定量化
- ニ) 末梢絨毛の発達度の評価
- ホ) 絨毛膜羊膜炎の有無
- ヘ) 螺旋動脈再構築障害の評価
- イ) ~ ヘ) の分析結果と母体および臍帯血中の環境化学物質濃度との相関について分析した。

胎盤のアミノ酸輸送活性の検討

培養液: Tyrode's Buffer; 135mM NaCl (Na含有 Tyrode's Buffer), 135mM choline chloride (Na非含有 Tyrode's Buffer), 5mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, and 5.6mM glucose (pH 7.4) を作成し、Dulbecco's Modified of Eagle's Medium (DMEM) を Tyrode's Buffer で4倍希釈する。その結果、培養液の糖・アミノ酸及び電解質濃度は生理的濃度に近く、この DMEM/Tyrode's Buffer (4倍希釈) を培養液として用いる。

胎盤小絨毛片 満期で分娩となった新鮮胎盤を採取する。直ちに絨毛組織の生検を行い、PBS で洗い DMEM/Tyrode's Buffer に入れ研究所に運ぶ。この組織を解剖し径 3mm³ 大の末梢小絨毛片を得る。この小絨毛片を #4-0 絹糸に結び固定し、糸の他方は特性のフックに固定(1つのフックには3つの小絨毛片を固定)し、DMEM/Tyrode's Buffer 中で培養する。これらの操作は全て常温で行う。

System A アミノ酸輸送活性の測定 アミノ酸輸送は胎児発育に重要な System A アミノ酸輸送活性について調べる。System A 活性は、特異的輸送基質: C¹⁴-Methylaminoisobutylic acid (以下 MeAIB) の小絨毛片(タンパク質 1mg 当たり)への Na 依存性および非依存性の取り込み量を調べ評価する。恒温槽で小絨毛片を 1ml の DMEM/Tyrode's Buffer で培養する(環境汚染物質に曝露する場合、ここで曝露群と非曝露群に分ける: 60 minutes, 37°C)。次に小絨毛片を 1ml の Tyrode's Buffer (Na 含有) と Tyrode's Buffer (Na 非含有) で洗浄し、Na 依存性の C¹⁴-MeAIB (1.7nmol/ml in Tyrode's Buffer; Na 含有) の取り込みと Na 非依存性の C¹⁴-MeAIB (1.7nmol/ml in Tyrode's Buffer; Na 非含有) の取り込み(非特異的)を行う(20 minutes: 直線的な取り込み増加が認められる時間, 37°C)。C¹⁴-MeAIB の取り込みは、氷冷した Na 非含有 Tyrode's Buffer で 15 秒間洗浄し停止する。小絨毛片内に取り込まれた C¹⁴-MeAIB を 1ml の蒸留水に 18 時間放出し、その放射線値(cpm) から C¹⁴-MeAIB (pmol) を再計算する。小絨毛片は 1ml の 3N NaOH に溶解され、タンパク濃度を Bradford assay で調べ小絨毛片 1 つ当りのタンパク量 (mg) を計算する。取り込まれた C¹⁴-MeAIB (pmol) をタンパク量 (mg) で補正し、System A 活性は次のように算出される。

System A 活性 (pmol C¹⁴-MeAIB / mg protein / 20 minutes) =

Na 依存性の C¹⁴-MeAIB の取り込み (pmol

C¹⁴-MeAIB/ mg protein/ 20 minutes) – Na非依存性 (非特異的) のC¹⁴-MeAIBの取り込み (pmol C¹⁴-MeAIB/ mg protein/ 20 minutes) 上記の手法により In vitro での環境化学物質添加による System A 活性の変化を分析する。

4. 研究成果

PCBs の胎盤栄養素輸送に与える影響
エコチル調査パイロット調査参加者 2 2 人 (正常妊娠) の PCB s の曝露推定を母体・臍帯血の PCB s 濃度測定により行い、胎盤栄養素輸送機能との相関関係を解析した。

PCBs concentration in maternal & cord blood

	maternal blood (pg/g fat)		cord blood (pg/g fat)		P value*
	Median	95%CI	Median	95%CI	
Total PCBs	3300	(2830, 44416)	1250	(1005, 1600)	<0.001
MoCBs ^a	0	(0, 0)	0	(0, 0)	N/D
DiCBs	145	(9, 1,290)	120	(10, 141)	0.108
TiCBs	370	(28, 435)	205	(169, 251)	<0.001
TeCBs	1650	(1300, 2114)	665	(579, 861)	<0.001
PoCBs	4200	(2879, 4949)	1650	(1300, 2014)	<0.001
HiCBs	15000	(13000, 21070)	6000	(4923, 7814)	<0.001
HpCBs	10500	(8969, 12139)	3000	(2386, 4036)	<0.001
OoCBs	2100	(1683, 2621)	665	(419, 695)	<0.001
NeCBs	260	(199, 313)	54.0	(40.0, 93.0)	0.043
DxCB	160	(129, 212)	47.5	(40.0, 93.0)	0.068

Total PCBs is the total of the concentrations of the 229 congeners.
For congeners <MCL, homolog and total PCBs calculations used a 0 value substitution.
* P values were obtained by Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test.
^a MoCBs were detectable in only 2/22 sample sets; statistics not performed (N/D).

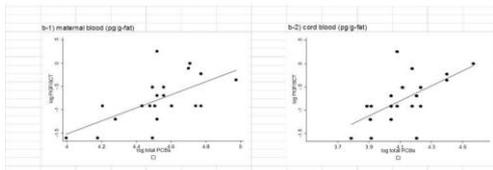
PCBs concentration in blood and ST, PIGF, & sFlt-1 concentration in placenta

	ST			PIGF*			sFlt1*		
	Coefficient	SE	P value	Coefficient	SE	P value	Coefficient	SE	P value
Total PCBs (pg/g fat) in maternal blood	-74.2	39.9	0.061	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

N/D: 2 score transformation was performed.
P values were obtained by multiple regression model.
Coefficient: regression coefficient
SE: standard error

PIGF (Placental Growth Factor) & sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase) profile is unique like tobacco smoking

PCBs concentration and PIGF/ST value



	PIGF/ST**		
	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

a) N/D: 2 score transformation was performed.
P values were obtained by multiple regression model.
Coefficient: regression coefficient
SE: standard error

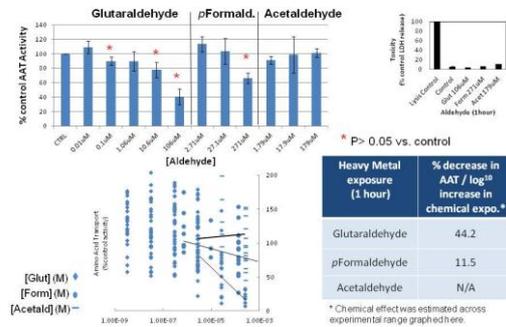
- PCB s は母体血で臍帯血より有意に高い傾向にあり、分子量が大きい PCB ほど胎盤を通過し難い傾向にあった。
- 母体・臍帯血液中の PCBs 濃度上昇に伴い、胎児栄養化を担う合体栄養膜細胞が減少することを世界で先駆けて発見し、PCBs 曝露による胎児発育制限機構の 1 つの可能性を見出した。
- また、PCBs 濃度上昇に伴い胎盤血管新生に寄与する PIGF 産生は亢進していることを発見した。これは正常妊娠における胎盤の

適応機能を反映していると考えられた。

- 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。

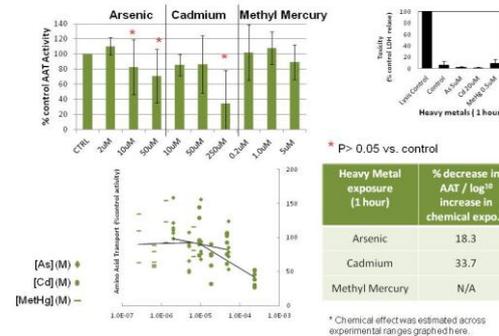
環境化学物質、金属の添加による胎盤 SystemA アミノ酸輸送活性の測定

Aldehyde analogue effect on system A AAT activity



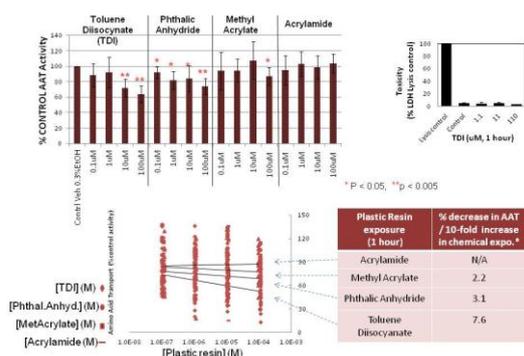
- グルタルアルデヒドは比較的低濃度より濃度依存性にアミノ酸輸送活性を低下させた。ホルムアルデヒドは高濃度でのみアミノ酸輸送活性を低下させた。アセトアルデヒドは変化させなかった。全てのアルデヒド類は培養液中の乳酸脱水素酵素を増加させなかった。グルタルアルデヒドが最も強くアミノ酸輸送活性を低下させた。

Heavy metals effect on system A amino acid transport (AAT) activity



- ヒ素は比較的低濃度より濃度依存性にアミノ酸輸送活性を低下させた。カドミウムは高濃度でのみアミノ酸輸送活性を低下させた。メチル水銀は変化させなかった。全ての金属元素は培養液中の乳酸脱水素酵素を増加させなかった。

Plastic resin effect on system A AAT activity



・トリレンジイソシアネート、無水フタル酸は比較的低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しなかった。全てのプラスチック樹脂は培養液中の乳酸脱水素酵素を増加させなかった。

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 3 件)

- ①Mayumi Tsuji; Yukiyo Aiko; David J Askew; Toshiro Kawamoto; Tohru Hachisuga; Chihaya Kooriyama; Mai Myoga; Chiharu Tomonaga; Fumio Matsumura; Ayumi Anan; Masayuki Tanaka; Hsu-Sheng Yu; Yasuko Fujisawa; Reiko Suga; Eiji Shibata, “Polychlorinated Biphenyls (PCBs) decrease the Placental Syncytiotrophoblast Volume and increase Placental Growth Factor (PlGF) in the placenta of normal pregnancy”, PLACENTA 2013 In press
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.03.007
- ②茗荷舞、愛甲悠希代、蜂須賀 徹、柴田 英治、「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、49 (1)、2013、261-266
ISSN 1348-964X
- ③菅 礼子、愛甲悠希代、David J Askew、川本俊弘、蜂須賀徹、田中政幸、辻 真弓、阿南あゆみ、柴田英治、「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」、産婦人科治療、査読有、vol. 103 no. 5、2011、550-51
[学会発表] (計 9 件)

- ①Eiji Shibata, Toshihiro Kawamoto, Yukiyo Aiko, David J Askew, Rei Suga, Mai Myoga, Toru Hachisuga: 59th Annual Meeting Society for Gynecologic Investigation, March 21-24 (2012) San Diego, USA
-Investigation for the Effect of the Environmental Contaminants Exposure on the Placental Amino Acid Transport Activity-
- ②Yukiyo Aiko, Eiji Shibata, David J Askew, Toru Hachisuga: 59th Annual Meeting Society for Gynecologic Investigation, March 21-24 (2012) San Diego, USA
-Restricted Nutrient Supply from Mother to Fetus Is Associated with Up-regulated Placental Amino Acid Transporter and mTOR Protein Expression-
- ③Eiji Shibata, Yukiyo Aiko, David J Askew, Rei Suga, Mayumi Tsuji, Toru Hachisuga, Toshihiro Kawamoto: The 3rd PPTOX conference, May 14-16 (2012) Paris, France
“Investigation of the Effect of Environmental Contaminants Exposure on the Placental Amino Acid Transport Activity”
- ④愛甲悠希代、柴田英治、David J. Askew、蜂須賀徹、菅 礼子、阿南あゆみ、田中政幸、辻真弓、川本俊弘：日本産業衛生学会九州地方会 (2011) 7月1日 佐賀「妊娠中の労働が胎盤機能に与える影響の検討」
- ⑤菅 礼子、愛甲悠希代、柴田英治、David j. Askew、蜂須賀徹、阿南あゆみ、田中政幸、辻真弓、川本俊弘：日本産業衛生学会九州地方会 (2011) 7月1日 佐賀「母体の体重変化が胎児・胎盤機能に与える影響」
- ⑥柴田英治、愛甲悠希代、David j. Askew、菅 礼子、川本俊弘、蜂須賀徹：第32回日本妊娠高血圧学会 (2011) 10月15日～16日 金沢
「正常胎盤における mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル活性とアミノ酸輸送蛋白の発現の検討」
- ⑦愛甲悠希代、柴田英治、David j. Askew、菅 礼子、川本俊弘、蜂須賀徹：第32回日本妊娠高血圧学会 (2011) 10月15日～16日 金沢
「母体栄養状態と妊娠高血圧症候群、胎児発育不全の胎盤におけるアミノ酸輸送蛋白の検討」
- ⑧茗荷 舞、愛甲悠希代、柴田英治、David Askew、菅 礼子、川本俊弘、吉村和晃、

蜂須賀 徹：第 27 回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会（2011）11 月 11 日～12 日
神戸

「妊娠中の母体の体重変化と胎盤栄養素輸送機能についての検討」

- ⑨柴田英治、David A. Askew、愛甲悠希代、蜂須賀徹、川本俊弘、田中政幸、阿南あゆみ：「喫煙と胎児発育制限」－胎盤アミノ酸輸送および妊娠高血圧症候群との関連について－」シンポジウム「子宮内胎児発育遅延の基礎と臨床」，第 18 回日本胎盤学会学術集会（2010）9 月 30 日～10 月 1 日
熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 英治 (SHIBATA EIJI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90419838