

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が
胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究
(5-1553)

平成27年度～平成28年度

Impact of Active and Secondhand Cigarette Smoking of Pregnant Women on the Placental Nutrient
Transport Function

産業医科大学

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が

胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究

(5-1553)

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	i
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
(1) 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が 胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究 （産業医科大学）		
要旨	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに	・・・・・・・・・・	2
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・	1 4
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・	1 5
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・	2 0
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・	4 4
6. 国際共同研究等の状況	・・・・・・・・・・	4 6
7. 研究成果の発表状況	・・・・・・・・・・	4 6
8. 引用文献	・・・・・・・・・・	4 8
III. 英文Abstract	・・・・・・・・・・	4 9

課題名 5-1553 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究

課題代表者名 柴田 英治（産業医科大学 産科婦人科 講師）

研究実施期間 平成27～28年度

累計予算額 6,070,999円（うち平成28年度：3,049,999円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 喫煙、家庭内喫煙、妊娠、胎盤、アミノ酸、糖、脂肪酸

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

近年、生殖年齢である20歳台女性の喫煙率の増加が著しく、20-50%の女性が妊娠時に喫煙を行っている。疫学的調査では、妊婦の喫煙による影響として、流産、胎児発育不全、早産、周産期死亡率、児の先天奇形・呼吸器疾患・精神発達障害の増加が報告され、喫煙が妊娠に悪影響を及ぼすことは疑う余地はない。妊婦の1日10本以上の喫煙は、周産期死亡率を1.5倍、早産を1.2倍、子宮内胎児発育遅延を2.2倍に上昇させるが、喫煙が胎児発育を制限するメカニズムについては未解決である。

胎児発育は経胎盤的に母体血から供給される糖・アミノ酸・脂肪酸などの栄養素に依存しており、この栄養素の供給には、母体の組成や栄養摂取・内分泌環境が直接影響するほか、胎盤の機能や構造変化が間接的に影響する。一方、Barker仮説によるとメタボリック症候群の発症には、生活習慣や遺伝的素因の他、胎児期から新生児期にかけての栄養環境が密接に関連している。子宮内で低栄養環境に曝露された胎児臓器は、epigeneticな機序を介し遺伝子発現量を調節してエネルギー節約型に適応するが、この適応機構は「胎児プログラミング」として生涯持続する。その結果、出生後の好転した栄養状態下では過適応となり、肥満を背景とした糖代謝異常や高血圧を中心病態とするメタボリック症候群の発症に至るという機序が近年解明されつつある。子宮内の栄養環境を規定する因子と胎児発育との関連性を明らかにすることは、胎児発育不全の病態解明ばかりでなく、一生涯の疾病リスクに対し胎児期から予防的介入を行う手段を構築するために重要である。

エコチル調査「本調査」では胎盤試料の採取および生理学的分析は行われていない。エコチル調査で得られる胎盤に関するデータは、ドクター調査表に記録された「胎盤重量と分娩取り扱い医師の診断による胎盤・臍帯の臨床的異常」のみである。エコチル調査の本来の目的である「子どもの健康に影響を与える環境要因の解明」について考えると、胎盤の生理学的分析は、胎盤を介した間接的な胎児毒性の評価において必要不可欠である。

これらの理由により、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究を提案するに至った。

2. 研究開発目的

エコチル調査「本調査」の質問票から得られた妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙と、当該妊婦から得られた胎盤の病理組織学的特徴との間の相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤組織形態を変化させるか否か明らかにし、さらに、胎盤の栄養素輸送担体（糖・アミノ酸・遊離脂肪酸）発現との相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤栄養素輸送担体の発現を変化させるか否か明らかにすることを研究目的とした。その結果、一般社会において喫煙の有害性の再認識を促し、女性の喫煙率の上昇に歯止めをかけ、安全な妊娠・出産ができる環境づくりに貢献することを本研究の最終目標とした。

3. 研究開発の方法

（1）妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究

研究対象：北九州市八幡西区のエコチル調査参加者で既に分娩し胎盤採取が行われた689名。

研究計画

データ利用および胎盤組織の分析

1. 胎盤採取が行われた妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙に関する質問票：妊婦およびそのパートナーの妊娠前および妊娠期間中の喫煙習慣（喫煙の頻度、本数など）が詳細に調査され、それらのデータが蓄積されている。このデータを母体の喫煙への曝露マーカーとしてデータ化した。
2. 胎盤の病理組織学的分析：分析項目は、HE染色の画像解析により胎盤組織学的分析を行う。

検討項目はa. 合胞体栄養膜細胞数の定量化、b. 血栓・梗塞範囲の定量化、c. 絨毛間腔（胎盤内の母体血流スペース）の定量化、d. 末梢絨毛の発達度の評価、e. 絨毛膜羊膜炎の有無、f. 螺旋動脈再構築障害の5項目である。さらに、胎盤の合胞体栄養膜細胞の母体面に豊富に存在する糖タンパクであるGlycocalyxの損傷が胎児発育不全や異常妊娠発症に関与することが示唆されており、妊婦の喫煙が胎盤のGlycocalyx損傷に関与するか否かについて免疫組織学的に調べた。

3. 胎盤栄養素輸送機能の分析：分析項目：胎児発育に重要な胎盤栄養素輸送担体の発現の局在と程度を免疫組織学染色で分析した。栄養素輸送担体は、糖・アミノ酸・遊離脂肪酸輸送関連因子について調べた。また、胎盤の酸化ストレス障害についても免疫組織学染色で分析した。

相関性の分析：上記1と2および3の相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤組織形態および栄養素輸送機能に与える影響を調べた。

4. 結果及び考察

(1) 妊婦およびそのパートナーの妊娠前および妊娠期間中の喫煙習慣

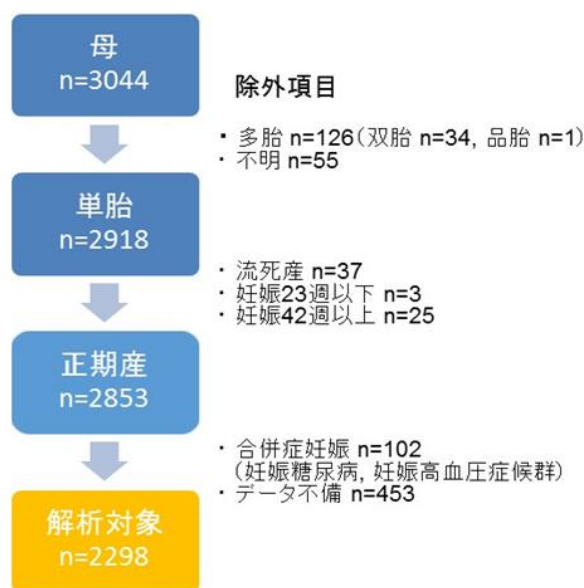
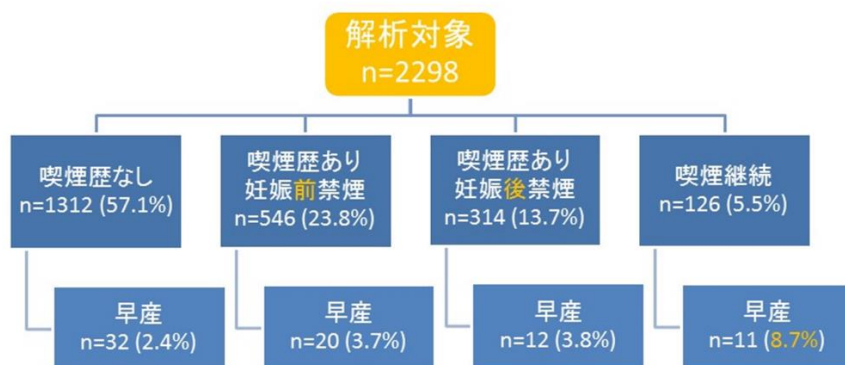


図1：研究登録者および解析対象

図1に研究登録者および解析対象を示した。北九州市八幡西区のエコチル調査参加者3044人のなかで、多胎、流産・死産、妊娠糖尿病や妊娠高血圧症候群などの合併症妊娠、異常妊娠を除いた2298人を解析対象とした。



早産：妊娠24週～妊娠41週として集計
(%) 各グループにおける早産の割合

図2：喫煙歴による内訳

図2に解析対象者の喫煙歴による内訳を示した。妊娠中も喫煙を継続した妊婦は126人(5.5%)であり、早産の割合も高かった。妊娠前に喫煙した者も含めると、喫煙者は986人(52.9%)であった。

表1: 対象者のグループ別パートナーの喫煙状況

質問紙表	母	1.喫煙したことは無い				2.以前は吸っていたが 今回の妊娠に気づく前に止めていた				3.以前は吸っていたが 今回の妊娠に気づいて止めた				4.現在も吸っている				合計
	人数	1312				546				314				126				2298
	%	57.1				23.8				13.7				5.5				100
	胎盤	331				124				49				26				530
父	人数	449				98				23				4				2298
	%	34.2				26.6				7.3				3.2				100
	胎盤	128				24				1				0				530
	人数	349				145				22				3				2298
	%	26.6				3.4				35.8				0.0				100
	胎盤	91				6				106				25				530

母の喫煙状況別にみたパートナーの喫煙習慣

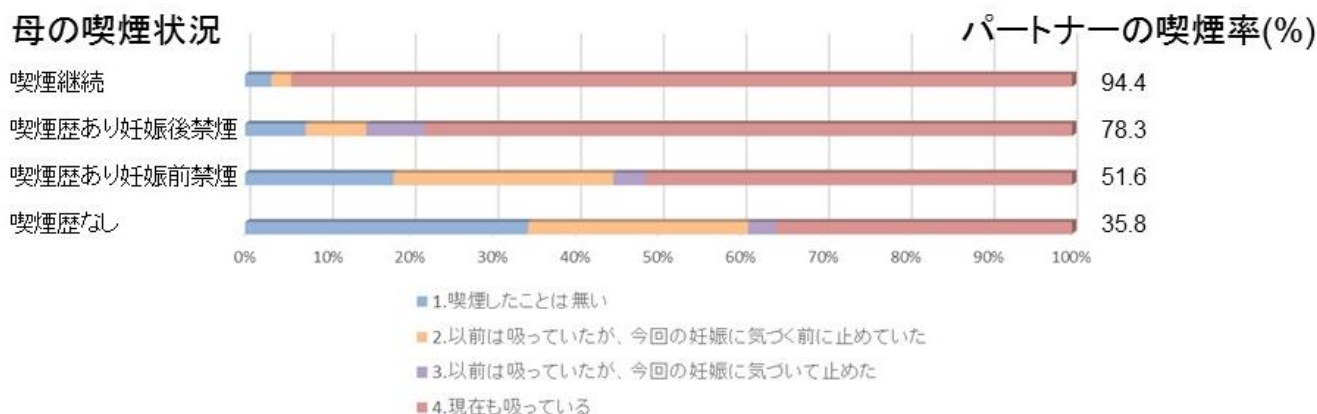


表1に妊婦の喫煙グループ別のパートナーの喫煙状況を示した。妊娠期間中に喫煙した妊婦は126人(5.5%)、パートナーは1117人(48.6%)であった。妊娠中も喫煙を継続した妊婦の94.4%のパートナーが喫煙を継続した。妊娠後禁煙をした妊婦のパートナー78.3%が喫煙を継続した。妊娠前に禁煙をした妊婦のパートナー51.6%のパートナーが喫煙を継続した。パートナーは妊娠後も喫煙を継続する傾向であり、間接喫煙の妊婦への影響が懸念された。

表2: 全解析対象者の臨床的特徴

	Non smokers (n=1312)	Smoked Preconception (n=546)	Smoked Through the 1,2 nd Trimester (n=314)	Smoked Throughout Pregnancy (n=126)
Maternal Age (y)	31.5 ± 4.8	31.6 ± 4.7	29.4 ± 5.1 ^a	29.3 ± 5.7 ^a
Gestational weeks at delivery	39.5 ± 1.3	39.3 ± 1.3 ^a	39.4 ± 1.6	39.0 ± 1.7 ^{a,b,c}
Prepregnancy BMI (kg/m ²)	20.9 ± 3.4	21.6 ± 4.0 ^a	20.7 ± 3.7	21.4 ± 3.8 ^a
Gastational weight gain (Kg)	10.4 ± 3.7	10.3 ± 4.8	12.1 ± 4.5 ^a	10.7 ± 4.6
Birth weight (g)	3060.2 ± 378.3	3046.6 ± 393.3	3052.9 ± 471.8	2888.1 ± 429.1 ^a
Birth weight (percentile)	51.3 ± 27.0	51.1 ± 28.1	52.3 ± 29.5	43.2 ± 28.1 ^{a,b,c}
Birth height (cm)	50.0 ± 2.1	49.9 ± 2.1	49.7 ± 2.7	49.0 ± 2.6 ^{a,b}
Birth height (percentile)	66.0 ± 26.0	64.8 ± 26.3	62.9 ± 28.8	57.2 ± 29.3 ^{a,b}
Birth head circumference (cm)	33.1 ± 1.4	33.0 ± 1.4	33.1 ± 1.5	32.7 ± 1.6 ^{a,b}
Birth head circumference (percentile)	46.4 ± 29.0	46.5 ± 28.7	46.3 ± 28.6	43.4 ± 27.9 ^{a,b}
Birth chest circumference (cm)	31.9 ± 1.6	31.9 ± 1.8	31.9 ± 2.0	31.4 ± 2.1 ^a
Placenta weight (grams)	540.0 ± 100.9	544.6 ± 105.5	563.0 ± 122.1 ^a	553.1 ± 103.7
Apgar score 1 minute	8.9 ± 0.8	8.9 ± 1.0	8.9 ± 1.0	8.7 ± 1.1
Apgar score 5 minute	9.5 ± 0.6	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7
Umbilical artery blood pH	7.307 ± 0.08	7.300 ± 0.22	7.300 ± 0.08	7.301 ± 0.84
Nulliparous (%)	73.0	39.2	70.6	35.4
Number of cigarette (/day)	—	—	—	10.0 ± 5.5

Continuous variables are shown as mean ± standard deviation. Dichotomous variables are given as percentage. BMI, body mass index. Significant differences (P value<0.05, ANOVA Bonferroni / Dunn post hoc).

a; Non smokers vs. Smoked Preconception, Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy,

b; Smoked Preconception vs. Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy

c; Smoked Through the 1,2nd Trimester vs. Smoked Throughout Pregnancy.

表2に全解析対象における臨床的特徴を妊婦の喫煙状況に分けて比較検討した結果を示す。妊娠期間中喫

煙を継続した場合、胎児発育は制限されるが、1st trimester 或いは 2nd trimester に禁煙した場合、胎児発育制限は受けないことが示された。

(2) 直接喫煙による胎盤の組織学的変化や栄養素輸送担体の発現変化の検討

妊娠中も喫煙した妊婦126人のなかで24人の胎盤試料の採取が行われた。この24名を直接喫煙群とし、また胎盤栄養素輸送機能に影響を与える因子(分娩週数、妊娠前BMI値、妊娠中の体重増加量)をマッチさせた正常妊娠16人をコントロール(非喫煙)群として、臨床所見(妊娠予後、出生児の発育など)を比較検討した。喫煙群は、さらに児の出生体重減少に影響の強い1日10本以上の喫煙群と10本以下の喫煙群に分けて検討した。表3に、3群(①非喫煙群、②1日10本以下の喫煙群、③1日10本以上の喫煙群)の臨床的特徴を示した。分娩時週数、妊娠前BMI、妊娠中の体重増加は3群間で有意差を認めなかった。Apgar score値と臍帯動脈血pH(Umbilical cord artery-pH)値も3群間で有意差は無く、出生直後の新生児予後に差を認めなかった。

表3: 非喫煙郡と直接喫煙群の臨床的特徴

	Non Smoker n=16	1-9 Cigarettes/d n=13	≥ 10 Cigarettes/d n=11	P value		
				NS vs 1-9	NS vs ≥ 10	1-9 vs ≥ 10
Age	33.4±4.6	28.3±4.9	30.9±6.2	0.010	0.239	0.280
Delivery week	40.0±0.8	39.7±1.1	38.9±1.8	0.459	0.050	0.802
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	20.7±1.9	20.2±2.3	21.9±4.1	0.469	0.358	0.224
Maternal BW gain(Kg)	10.0±2.2	12.1±3.8	10.0±8.8	0.074	0.970	0.643
Birth weight (g)	3137±222	2960±275	2821±588	0.075	0.061	0.455
Birth height (cm)	50.6±1.1	49.9±1.1	48.6±3.2	0.085	0.031	0.203
Head circumference (cm)	33.5±0.9	33.0±1.2	32.6±2.4	0.229	0.224	0.660
Chest circumference (cm)	32.6±0.9	31.3±1.1	31.5±2.4	0.003	0.110	0.843
Apgar score 1minute score	8.9±0.2	8.9±0.2	8.9±1.0	0.884	0.917	0.963
5minute score	9.6±0.4	9.5±0.5	9.3±0.6	0.429	0.156	0.480
Umbilical cord artery-pH	7.28±0.09	7.29±0.12	7.30±0.05	0.838	0.603	0.840
Placental weight (g)	527±86.6	509±66.5	524±120.8	0.526	0.937	0.692
primiparity (%)	37.5	38.4	27.2	0.960	0.597	0.582
C/S ratio (%)	12.5	7.6	18.1	0.686	0.697	0.461
Number of cigarettes (/day)	0	5±1.5	11±3.3	—	—	—

Non Smoker or NS: matched control 非喫煙群、1-9 Cigarettes/d or 1-9: 一日10本未満の喫煙群、
≥ 10 Cigarettes/d or ≥ 10: 一日10本以上の喫煙群 P<0.05: 優位差あり

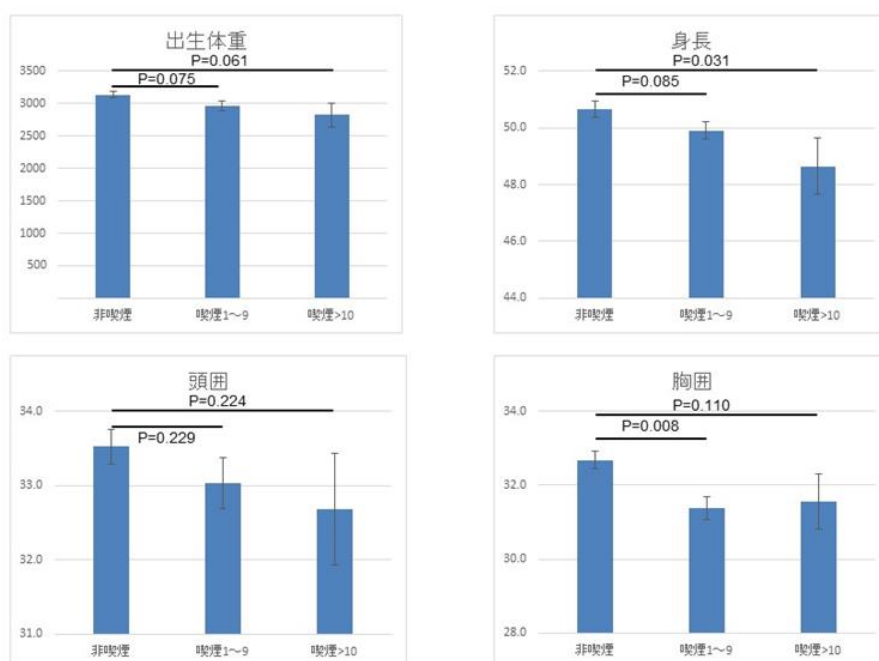


図3: 新生児の身体計測値

図3に新生児身体計測結果を棒グラフで示した。出生体重は喫煙群で低い傾向であったが、有意差は認めなかった。胎盤重量は3群間で差は認めなかった。初産妊婦の割合や帝王切開分娩の割合も3群間で差は認めなかった。一日の喫煙本数は、それぞれ0本、 5 ± 1.5 本、 11 ± 3.3 本であった。出生児の身長は一日10本以上の喫煙群で有意に低く、一日10本未満の喫煙群で低い傾向にあった。頭囲は3群間で有意差を認めなかった。胸囲は一日10本未満の喫煙群と一日10本以上の喫煙群で共に有意に短かった。母体に喫煙習慣のある新生児は、頭囲の発育は保たれている反面、体重、身長、胸囲が小さい傾向にあり、体幹の痩せた非対称性の発育制限を示した。これらの傾向は、全解析対象者における臨床的特徴(表2参照)と類似していた。

胎盤の病理組織学的分析および胎盤栄養素輸送機能の分析

ホルマリン固定胎盤のHE染色標本の画像解析により、a. 合胞体栄養膜細胞数の定量化、b. 血栓・梗塞範囲の定量化、c. 絨毛間腔(胎盤内の母体血流スペース)の定量化の評価を行った。結果を表4に示した。(d. 末梢絨毛の発達度の評価 e. 絨毛膜羊膜炎の有無 f. 螺旋動脈再構築障害については、HE染色では評価が難しく、評価法を新たに検討する必要があった)。

表4: 胎盤の組織学的分析

	Non Smoker n=16	1-9 Cigarettes/d n=13	≥ 10 Cigarettes/d n=11	P value		
				NS vs 1-9	NS vs ≥ 10	1-9 vs ≥ 10
合胞体栄養膜細胞						
カウント数(/1080 point)	422.4±87.4	429.3±84.7	371.0±101.0	0.831	0.172	0.138
総胎盤体積あたり	215.1±52.8	211.2±41.6	192.2±87.9	0.830	0.406	0.496
単位胎盤体積あたり	0.39±0.08	0.39±0.07	0.34±0.09	0.831	0.172	0.138
血栓・梗塞範囲						
カウント(/1080 point)	75.5±33.8	43.0±24.1	50.7±28.3	0.007	0.058	0.478
総胎盤体積あたり	38.8±20.8	21.5±13.2	27.3±18.2	0.015	0.150	0.380
単位胎盤体積あたり	0.06±0.03	0.03±0.02	0.04±0.02	0.007	0.058	0.478
絨毛間腔						
カウント(/1080 point)	275.1±95.1	248.0±64.1	272.1±76.4	0.388	0.931	0.410
総胎盤体積あたり	139.3±47.7	121.4±28.0	136.7±45.0	0.243	0.888	0.342
単位胎盤体積あたり	0.25±0.08	0.22±0.05	0.25±0.07	0.388	0.931	0.410

Non Smoker or NS: matched control 非喫煙群、1-9 Cigarettes/d or 1-9: 一日10本未満の喫煙群、 ≥ 10 Cigarettes/d or ≥ 10 : 一日10本以上の喫煙群 P<0.05: 優位差あり

Glycocalyxは、合胞体栄養膜細胞の母体面に存在する高分子糖タンパク質である。膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンを中心とするSyndecan1~4で構成され、種々のタンパクや増殖因子と結合し細胞間の接着や情報伝達機能を有している。血管内皮では血管透過性や血液凝固機能を調節し、抗炎症作用などの機能も有している。今回、ホルマリン固定胎盤の免疫染色によりGlycocalyxの主要構成要素であるSyndecan-1の発現について調べた。

図4に非喫煙群と直接喫煙群のSyndecan-1に対する免疫組織学的染色の結果を示した。胎盤におけるSyndecan-1の発現は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞の母体面に認められた。Syndecan-1発現は様々な程度で認められ、図5に示した方法によりSyndecan-1発現を定量化した。

非喫煙群(コントロール)

喫煙群

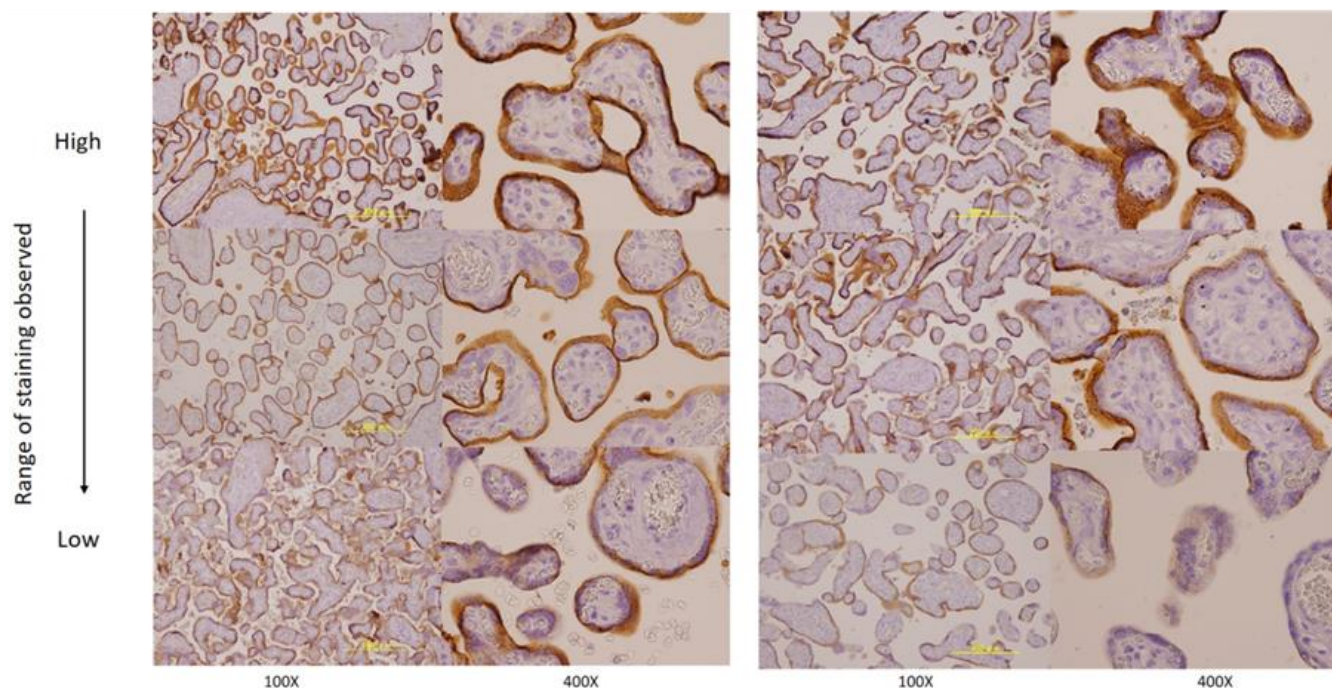


図4: 胎盤におけるSyndecan-1発現の検討

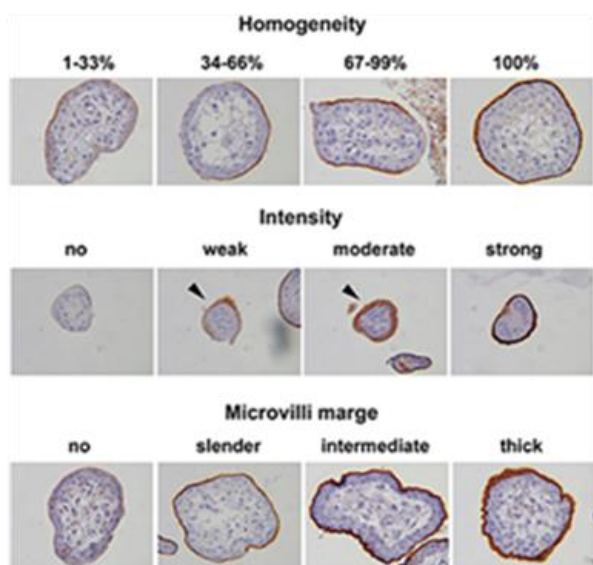


図5: Syndecan-1の発現強度の評価法

Syndecan-1の発現の程度を

- ① Homogeneity(染色の均一性)
- ② Intensity(染色濃度の強さ)
- ③ Marge(染色縁の厚み)

を用いて定量化した。

(Prenatal Diagnosis: 32, 2, 131-137, 2012)

この評価法を用いて、非喫煙群、1日10本未満の喫煙群(喫煙1~9)、1日10本以上の喫煙群(喫煙>10)の3群間のGlycocalyx(Syndecan-1)の発現量の差を分析した。その結果、図6に示した様に、母体喫煙の有無により、胎盤のGlycocalyx(Syndecan-1)の発現に変化を認め、1日の喫煙本数が10本以上の母体では、非喫煙者と比較し有意に発現の低下を認めた。母体の喫煙が胎盤の機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。

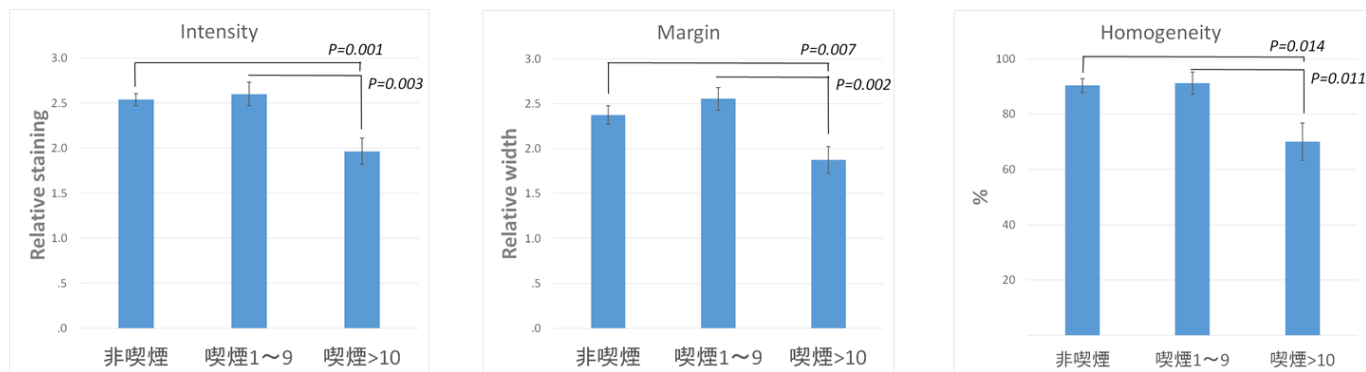


図6: 胎盤におけるGlycocalyx (Syndecan-1)発現量の検討

次に、ホルマリン固定胎盤の免疫組織染色を行い、胎児発育に重要な胎盤栄養素輸送担体の発現の局在と程度を評価した。栄養素輸送担体は、糖: GLUT1、アミノ酸: systemL (LAT1) および systemBo (ASCT2)、遊離脂肪酸輸送関連因子 (FAT: fatty acid translocase/CD36) について検討した。胎盤の酸化ストレスは脂質過酸化修飾タンパク質である4-hydroxy-2-nonenal修飾タンパク質 (HNE) の発現について検討した。免疫組織標本1切片につき5視野の染色強度をスコアリングし (染色なし=0点、弱い染色=1点、中等度の染色=2点、強い染色=3点)、胎盤栄養素輸送担体の発現の程度を比較検討した。

LAT1

必須アミノ酸をNaイオン非依存性に輸送する。胎児発育不全では臍帯血の必須アミノ酸濃度が低く、胎児発育との関連が示唆されている。

ASCT2

アラニン、セリン、システイン、グルタミンなどの中性アミノ酸の輸送を担う。

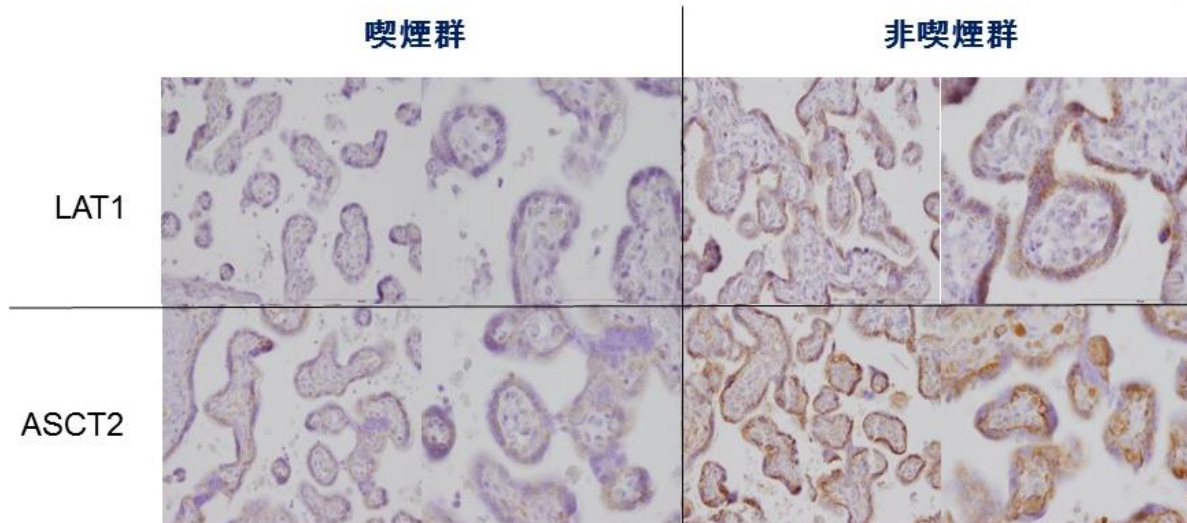
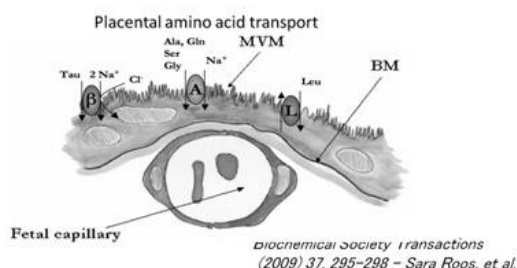


図7: L型アミノ酸輸送タンパク (LAT1) およびBo型アミノ酸輸送タンパク (ASCT2) の発現

図7にL型アミノ酸輸送タンパクであるLAT1およびBo型アミノ酸輸送タンパクであるASCT2の発現の局在を、図8に発現強度を示した。LAT1は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞全体に局在しており、ASCT2は合胞体栄養膜細胞の基底膜に局在していた。染色強度は1日10本以上の喫煙群では、LAT1の発現が減少傾向であったが、ASCT2の発現の変化は認められなかった。同様の手法を用いて、胎盤の糖輸送タンパクであるGLUT3、脂肪酸輸送タンパクであるFTA/CD36、さらに、喫煙は肺臓では酸化ストレス障害の原因となるため、胎盤の酸化ストレス障害を評価するため、脂質過酸化修飾タンパク質である4-hydroxy-2-nonenal modified proteins (HNE) の発現と局在と染色強度についても分析を行った。図9にこれらのタンパク質の発現強度を示した。発現の局在は、GLUT1、FTA/CD36、HNEすべて合胞体栄養膜細胞全体に認められたが、非喫煙群と喫煙群の間に発現の差は認められなかった。

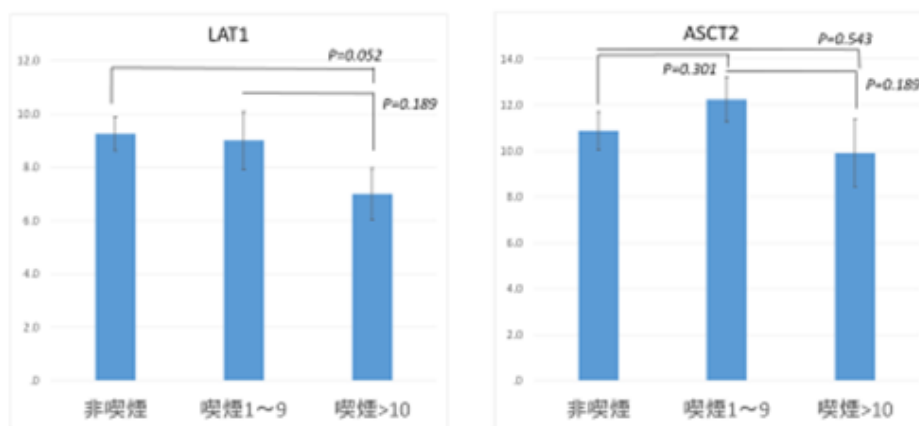
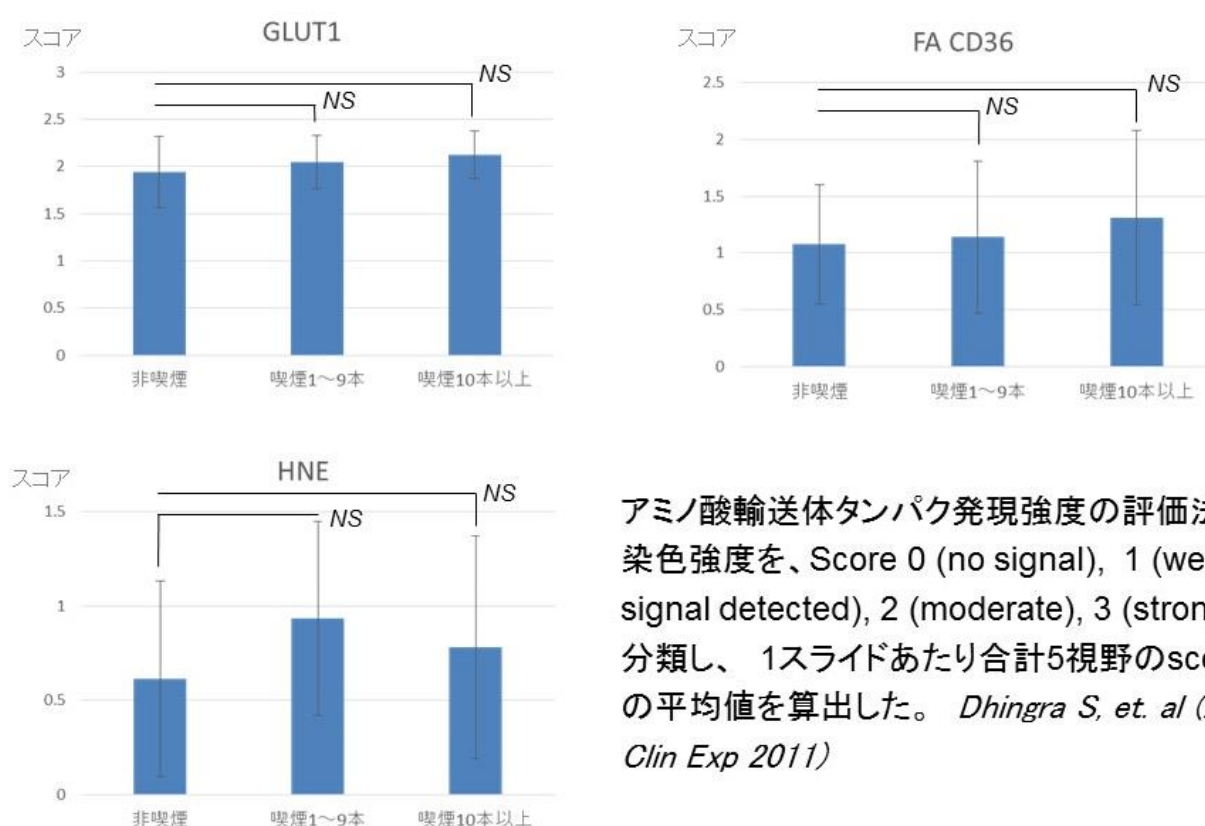


図8: LAT1、ASCT2の発現強度の比較



アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法
染色強度を、Score 0 (no signal), 1 (weak signal detected), 2 (moderate), 3 (strong)に分類し、1スライドあたり合計5視野のscoreの平均値を算出した。 *Dhingra S, et. al (Int J Clin Exp 2011)*

図9: GLUT1, FAT/CD36, HNEの発現強度スコアの比較

(3) 間接喫煙による胎盤の組織学的変化や栄養素輸送担体の発現変化の検討

次に妊婦の間接喫煙(パートナーの喫煙の有無による)の影響について調べた。分析項目は、直接喫煙の影響と同様に、胎盤の組織学的分析と栄養素(糖・アミノ酸・脂肪酸)輸送担体の局在と程度について免疫組織染色を用いて分析した。

喫煙歴のない妊婦1312人のなかで331人の胎盤試料の採取が行われた。このなかからパートナーも喫煙したことがない30人をコントロールとし、パートナーが妊娠中喫煙を継続して行った30人を間接喫煙群とした。これらの群間では、胎盤栄養素輸送機能に影響を与える因子(分娩週数、妊娠前BMI値、妊娠中の体重増加量)をマッチさせた。表5に非喫煙群と間接喫煙群の臨床的特徴を示した。パートナーは一日平均15本程度の喫煙を行った。間接喫煙群の児の出生体重、身長、頭位、胸囲は、非喫煙群と比較して低い傾向はなかった。

表5: 非喫煙郡と間接喫煙群の臨床的特徴

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	P value
母体年齢	32.0±3.0	30.5±2.5	0.243
分娩週数	40.0±1.2	39.0±1.2	0.738
非妊娠時 BMI (kg/m ²)	20.7±3.0	19.8±2.9	0.181
妊娠中の体重増加量(Kg)	11.0±2.6	11.7±3.2	0.428
出生体重 (g)	3042±403.9	3202±458.5	0.917
(percentile)	52.7±26.9	58.1±30.2	0.995
身長 (cm)	50.0±1.9	51.0±2.0	0.043
(percentile)	73.7±26.1	88.5±23.8	0.028
頭囲 (cm)	33.0±1.5	33.3±1.1	0.252
(percentile)	43.1±29.6	45.9±26.6	0.317
胸囲 (cm)	32.0±1.6	32.2±2.2	0.306
Apgar score 1分値	9.0±0.3	9.0±1.0	0.120
5分値	9.0±0.5	9.0±0.5	0.610
臍帯動脈血pH	7.325±0.1	7.330±0.1	0.931
胎盤重量 (g)	500±101.6	520±89.1	0.278
喫煙本数 (本/日) 母:		—	
父:		15±5.7	

M-, F-: 母体非喫煙・パートナー非喫煙群、M-, F+: 母体非喫煙・パートナー喫煙群
P<0.05: 優位差あり

胎盤の病理組織学的分析および胎盤栄養素輸送機能の分析

表6に間接喫煙による胎盤の構造変化に関する結果を示した。間接喫煙群では単位胎盤当たりの合胞体栄養膜細胞数が少なかったが、1つの胎盤当たりの数に換算すると優位な減少とはならなかった。また、間接喫煙群では単位胎盤当たりの間質細胞数が多かったが、1つの胎盤当たりの数に換算すると優位な増加とはならなかった。

表6: 間接喫煙による胎盤の構造変化

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	P value
合胞体栄養膜細胞 カウント数(/1080 point)	354.0±65.8	276.5±81.5	0.012
総胎盤体積あたり	133.5±52.4	133.5±52.4	0.078
血栓・梗塞範囲 カウント(/1080 point)	52.7±28.3	53.4±43.4	0.963
総胎盤体積あたり	24.5±12.3	26.1±21.9	0.833
胎児血管 カウント(/1080 point)	168.7±63.7	186.1±104.6	0.629
総胎盤体積あたり	82.4±43.6	87.0±50.3	0.802
絨毛間腔 カウント(/1080 point)	284.4±79.5	298.2±65.4	0.599
総胎盤体積あたり	132.6±34.3	142.1±41.5	0.527
間質 カウント(/1080 point)	220.2±48.7	265.8±59.1	0.039
総胎盤体積あたり	102.5±21.6	126.8±39.1	0.074

M-, F-: 母体非喫煙・パートナー非喫煙群、M-, F+: 母体非喫煙・パートナー喫煙群
P<0.05: 優位差あり

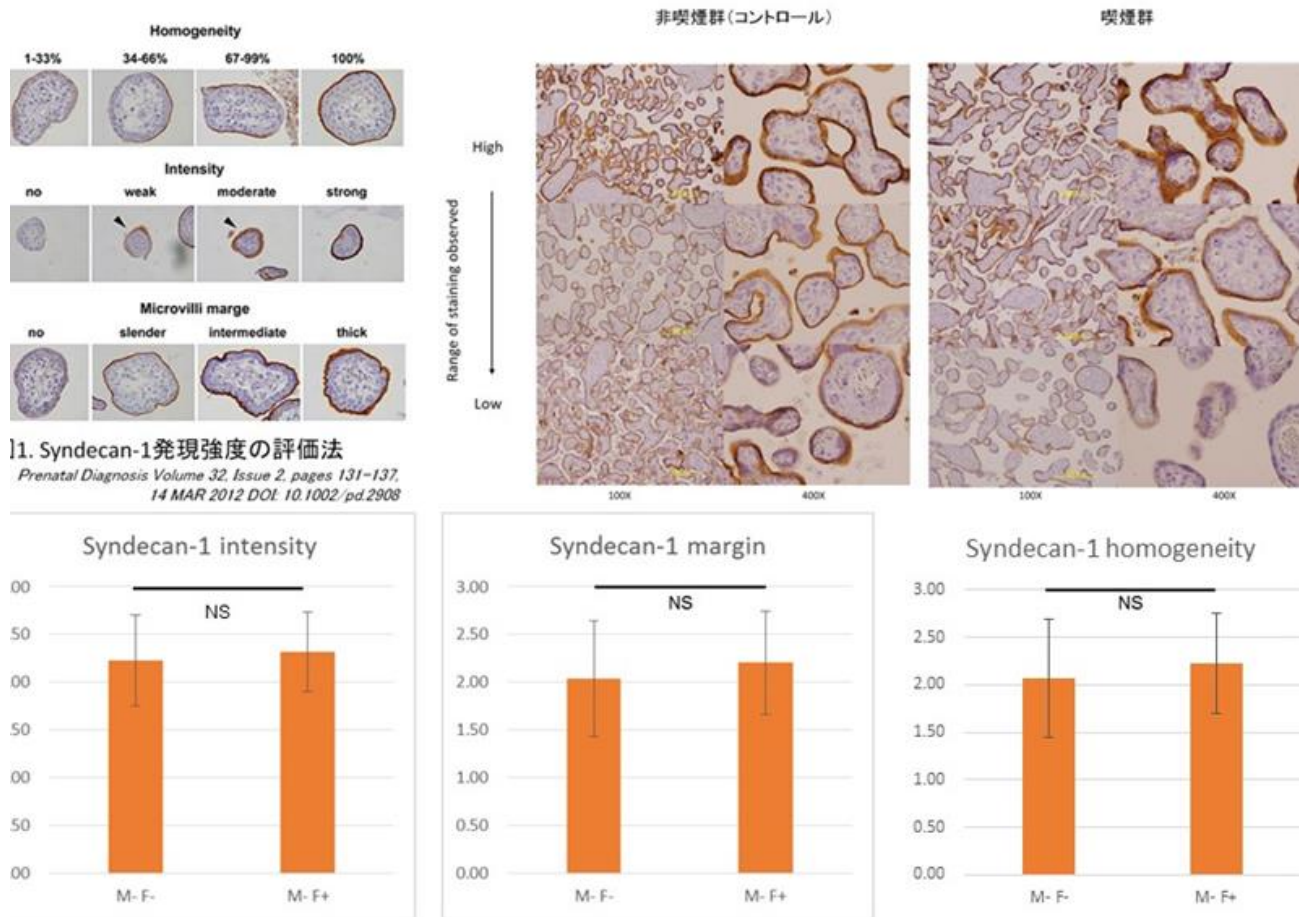


図10: 間接喫煙によるGlycocalyx (GCX)の発現の変化

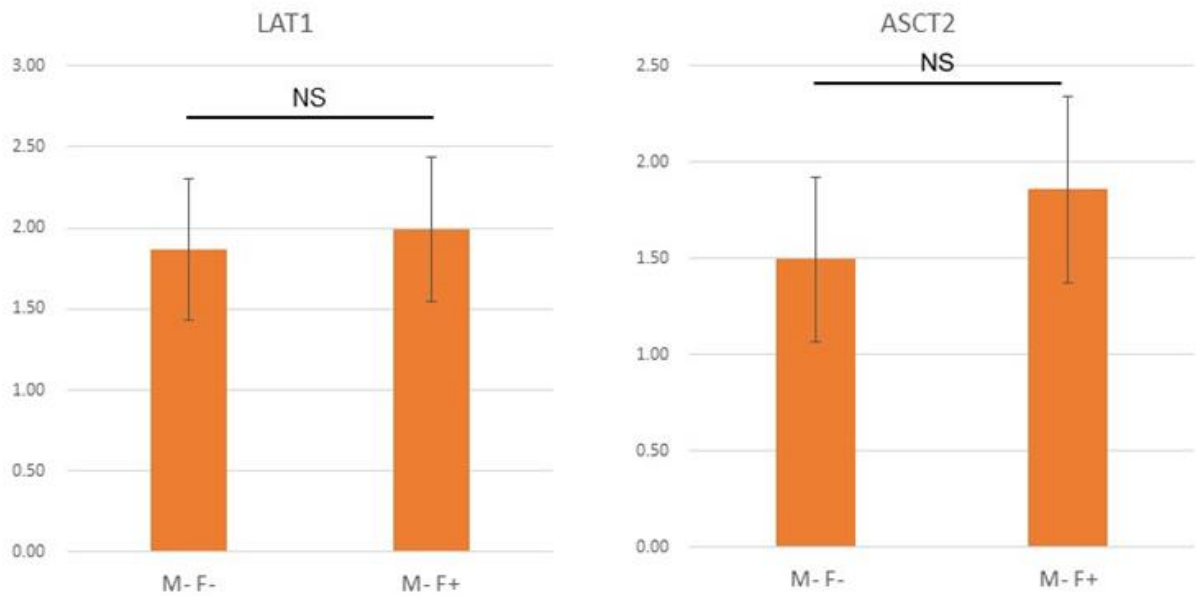


図11: 間接喫煙によるアミノ酸輸送タンパク発現の変化

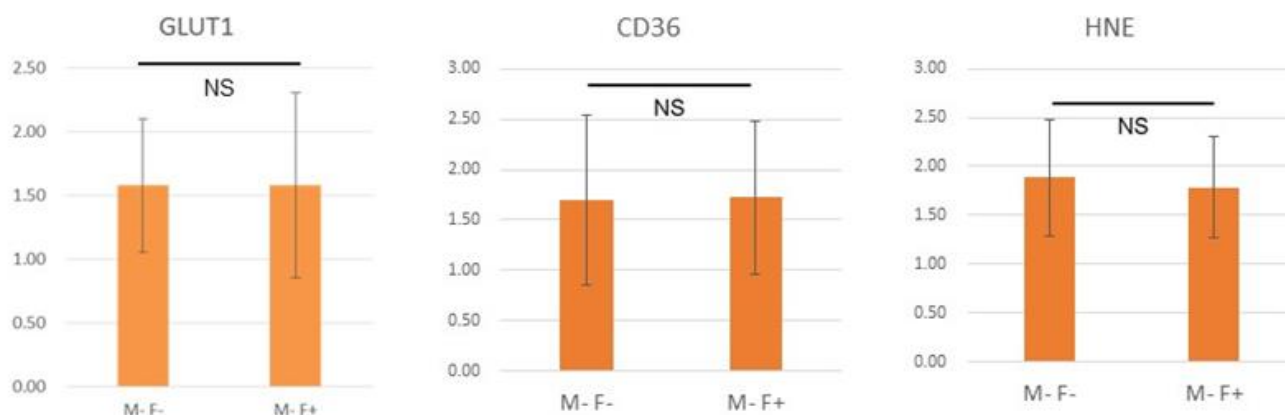


図12: 間接喫煙による糖・脂肪酸輸送タンパク発現およびHNE発現の変化

図10、11、12に示すように、パートナーの喫煙は胎盤の組織学所見、Glycocalyx構造、酸化ストレス障害、アミノ酸輸送体、脂肪酸輸送体に強い影響を与えなかった。パートナーの喫煙は、胎盤栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

我々はこれまで胎盤栄養素輸送機能に関する実験を重ね、子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病における胎盤栄養素輸送修飾機構について研究報告を行ってきた。これまでの研究経験から、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見を得た。この経験を生かし、最近の我々は、重金属（メチル水銀、ヒ素、カドミウム、鉛）、アルデヒド類、プラスチック樹脂がヒト胎盤のアミノ酸輸送活性を有意に減少させることや、Polychlorinated Biphenylsが胎盤の合胞体栄養膜細胞数を減少させ、栄養素輸送機能を修飾することを実証した。このように、母体から摂取された化学物質は直接胎児に到達しなくても、胎盤機能を修飾し間接的に胎児発育や発達を修飾し得ることを示した。また、子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群の胎盤のアミノ酸輸送の研究より、胎盤は低栄養環境において胎児にアミノ酸輸送を増加させる適応反応が存在する可能性についても研究報告を行った。

今回、エコチル調査の追加調査「環境化学物質が胎盤栄養素輸送機能に与える影響に関する研究」に900名以上の同意を得ることに成功しており、エコチル調査参加者の約700例の胎盤を保有している。また、本研究申請者は、エコチル調査の全国データを利用した成果発表「論文テーマ：妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が妊娠に及ぼす影響について、アウトカム：胎盤の異常」の執筆責任者である。この全国データを利用した研究と本研究を並行して行うことにより、妊娠女性の直接喫煙、間接喫煙、また受動喫煙が胎盤に及ぼす影響について効率良くかつ高いエビデンスレベルで解明できる。本研究は、エコチル調査のテーマである「子どもの健康に影響を与える環境因子の解明」或いは「化学物質等に対する感受性の違いを考慮したリスク管理」により効果的に貢献できるものと考えられる。具体的な研究成果は、①妊娠期間中の喫煙を継続すると、出生児の身体計測値の変化（胎児発育制限）が生じるが、この変化は、1st trimester（妊娠第1三半期）或いは2nd trimester（妊娠第2三半期）に禁煙した場合認められないことがわかった。②身体計測値の異常を有する出生児の胎盤にはGlycocalyx発現やL型アミノ酸輸送タンパク発現が低下傾向であることがわかった。母体の喫煙が胎盤機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。これらの影響は、パートナーが喫煙している間接喫煙ではみられなかったため、パートナーの喫煙は、胎盤の組織学的構造変化や栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えられた。しかしながら、パートナーがどのような状況で喫煙しているかは質問票からわからない。家庭内での分煙、または家庭内では喫煙していない可能性もある。したがって、今回の結果が、妊婦の間接喫煙を正しく反映しているか否か疑問が残る。本研究の重要なリミテーションと考えられた。

(2) 環境政策への貢献

近年、世界的に女性の社会進出が進み、生活環境やライフスタイルの変化により、多くの女性が有害物質に曝露される機会が増加している。本邦においても20～30歳代といった生殖年齢にあたる女性の喫煙率の上昇が

認められ、妊婦を含め女性が曝露される最も重要な有害物質の一つは喫煙によるものである。このため、喫煙が女性生殖機能に与える影響については、重要な研究テーマである。子宮内胎児発育不全は周産期死亡率を8倍に上昇させ、精神神経発達障害、小児の肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常、また成人後の心血管疾患や糖尿病発症のリスク因子となる。胎児の正常な発育や発達には胎盤からの適切な栄養素輸送が必要不可欠である。本研究の成果により胎盤栄養素輸送機能障害を引き起こす可能性のある妊婦を取り巻く喫煙環境を把握し、生殖期或いは妊娠女性への直接喫煙や間接喫煙を軽減し、子宮内胎児発育不全を減少させることが期待される。その結果、周産期死亡率の減少による周産期医療への貢献、また小児と成人の生活習慣病減少による医療経済への多大な貢献も期待される。さらに、エコチル調査では、児の身体発達、先天異常、性分化の異常、精神神経発達障害、免疫アレルギー系の異常、代謝・内分泌系の異常の有無を出生時から12歳まで追跡調査する。糖・アミノ酸・脂肪酸は、胎児発育ばかりでなく、胎児の発達にも関与している。本研究により、胎児の栄養素獲得障害(胎盤における糖・アミノ酸・脂肪酸輸送障害)と胎児・小児期に起こる疾患との因果関係についても明らかになる可能性がある。本研究の成果は、これらの疾患の予防や治療に貢献することも期待される。我が国をより安心した子づくりができる国にすることに貢献できる。

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

妊娠期間中の喫煙を継続すると、出生児の身体計測値の変化(胎児発育制限)が生じるが、この変化は、1st trimester、或いは2nd trimesterに禁煙した場合認められないことがわかった。また、1日10本以上喫煙する妊婦の胎盤にはGlycocalyx発現やL型アミノ酸輸送タンパク発現の低下が認められることがわかった。これらの影響は、パートナーが喫煙している間接喫煙ではみられなかったため、パートナーの喫煙は、胎盤の組織学的構造変化や栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えらえた。このことから、①妊婦は喫煙しないこと、②妊娠中喫煙していても途中でやめること、③どうしても禁煙できない妊婦は喫煙するたばこの本数を1日10本以下に抑えることが必要であることを強く社会に発信し、子宮内胎児不全の発症予防に生かすことが必要である。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

＜査読付き論文＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 愛甲 悠希代、柴田 英治、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第51回 日本周産期・新生児医学会学術集会(2015)
「喫煙が胎盤栄養素輸送能に与える影響の検討」
- 2) 愛甲 悠希代、柴田 英治、荒牧 聡、朝永 千春、中島 貴美、稲垣 博英、蜂須賀 徹、千手 絢子
第33回 産業医科大学学会総会 学術講演(2015)
「喫煙が胎盤機能に与える影響の研究」
- 3) 愛甲 悠希代、柴田 英治、Askew J David、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第8回 福岡県医学会総会(2016)
「喫煙が胎盤栄養素輸送能に与える影響の検討」
ポスター優秀賞受賞
- 4) 愛甲 悠希代、柴田 英治、朝永 千春、荒牧 聡、中島 貴美、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第52回 日本周産期新生児医学会学術集会(2016)
「妊婦の喫煙が胎盤栄養素輸送機能に与える影響の検討」
- 5) 愛甲 悠希代、David Askew、辻 真弓、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、千手 絢子、楠原 浩一、川本 俊弘、蜂須賀 徹、柴田 英治
第34回 産業医科大学学会(2016)

「喫煙が胎盤機能に与える影響の研究 -胎盤栄養素輸送機能のおよび胎児発育不全との関連について-

- 6) Y. Aiko, D. Askew, M. Tsuji, A. Senju, S. Araki, S. Morokuma, M. Sanefuji, K. Kusuhaara, T. Kawamoto, T. Hachisuga, E. Shibata

5th Conference on Prenatal Programming and Toxicity (2016)

「Cigarette smoking during pregnancy reduces infant birth-weight by decreased protein levels of placental amino acid transporter and glycocalyx」

7. 研究者略歴

課題代表者: 柴田 英治

産業医科大学医学部卒業、現在、産業医科大学 産科婦人科講師、
産業医科大学病院 総合周産期母子医療センター 室長

研究協力者

- 1) 蜂須賀 徹

順天堂大学医学部卒業、現在、産業医科大学 産科婦人科教授

- 2) 愛甲 悠希代

産業医科大学医学部卒業、現在、産業医科大学 産科婦人科助教

- 3) 川本 俊弘

山口大学医学部卒業、現在、産業医科大学産業衛生学部教授、エコチル調査コアセンター長

5-1553 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究 (サブテーマなし)

産業医科大学

産科婦人科学

柴田 英治

<研究協力者>

産科婦人科学

蜂須賀 徹

愛甲 悠希代

産業衛生学

川本 俊弘

平成27～28年度累計予算額：6,070,999円（うち平成28年度：3,049,999円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

胎盤は母体胎児間の全ての物質交換を担い、正常な胎児発育や発達には、胎盤栄養素輸送に依存しているが、エコチル調査「本調査」では胎盤試料の採取および生理学的分析は行われていない。エコチル調査で得られる胎盤に関するデータは、ドクター調査表に記録された「胎盤重量と分娩取り扱い医師の診断による胎盤・臍帯の臨床的異常」のみである。

エコチル調査の本来の目的である「子どもの健康に影響を与える環境要因の解明」について考えると、胎盤の生理学的分析は、胎盤を介した間接的な胎児毒性の評価において必要不可欠である。

今回、エコチル調査「本調査」でリクルートされた3044名の参加者の中で、追加調査として「環境化学物質が胎盤栄養素輸送機能に与える影響に関する研究」に参加同意が得られた689名を研究の対象とし、分娩後直ちに採取された胎盤を用いて実験を行った。胎盤栄養素輸送機能に関する次の2つの事項の検討を平成27年度、28年度の2年間で行った。その1つは胎盤のHE染色標本の画像解析（a. 合胞体栄養膜細胞数の定量化、b. 血栓・梗塞範囲の定量、c. 絨毛間腔：胎盤内の母体血流スペースの定量、d. 末梢絨毛の発達度の評価）を行い、胎盤の病理学的評価を行った。また妊婦の喫煙が胎盤のGlycocalyx損傷に関与するか否かについて免疫組織学的に調べた。2つ目は、胎盤の免疫組織染色を行い、栄養素輸送担体（糖輸送蛋白、アミノ酸輸送蛋白、遊離脂肪酸輸送関連因子）の発現の局在と程度を分析し、胎盤における実際の栄養素輸送機能を評価した。また、胎盤の酸化ストレス障害についても免疫組織学染色で分析した。これらのデータを胎盤の栄養素輸送機能マーカーとして、エコチル調査「本調査」の質問票で調査された妊婦の主流煙および副流煙曝露の程度との相関性を分析した。研究成果は、①妊娠期間中の喫煙を継続すると、出生児の身体計測値の変化（胎児発育制限）が生じるが、この変化は、1st trimester（妊娠第1三半期）、或いは、2nd trimester（妊娠第2三半期）に禁煙した場合認められないことがわかった。②身体計測値の異常を有する出生児の胎盤にはGlycocalyxやL型アミノ酸輸送タンパク発現が低下していることがわかった。母体の喫煙が胎盤機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。これらの影響は、パートナーが喫煙している間接喫煙ではみられなかったため、パートナーの喫煙は、胎盤の組織学的構造変化や栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少な

いのではないかと考えられた。

本研究の成果は、「喫煙と胎児発育制限」の病態解明に貢献し、周産期医学の発展に貢献するばかりでなく、生殖可能年齢の女性の直接喫煙、間接喫煙に関する新たな環境基準の作成に貢献するものと考えられる。

[キーワード]

喫煙、家庭内喫煙、妊婦、胎盤、アミノ酸、糖、脂肪酸

1. はじめに

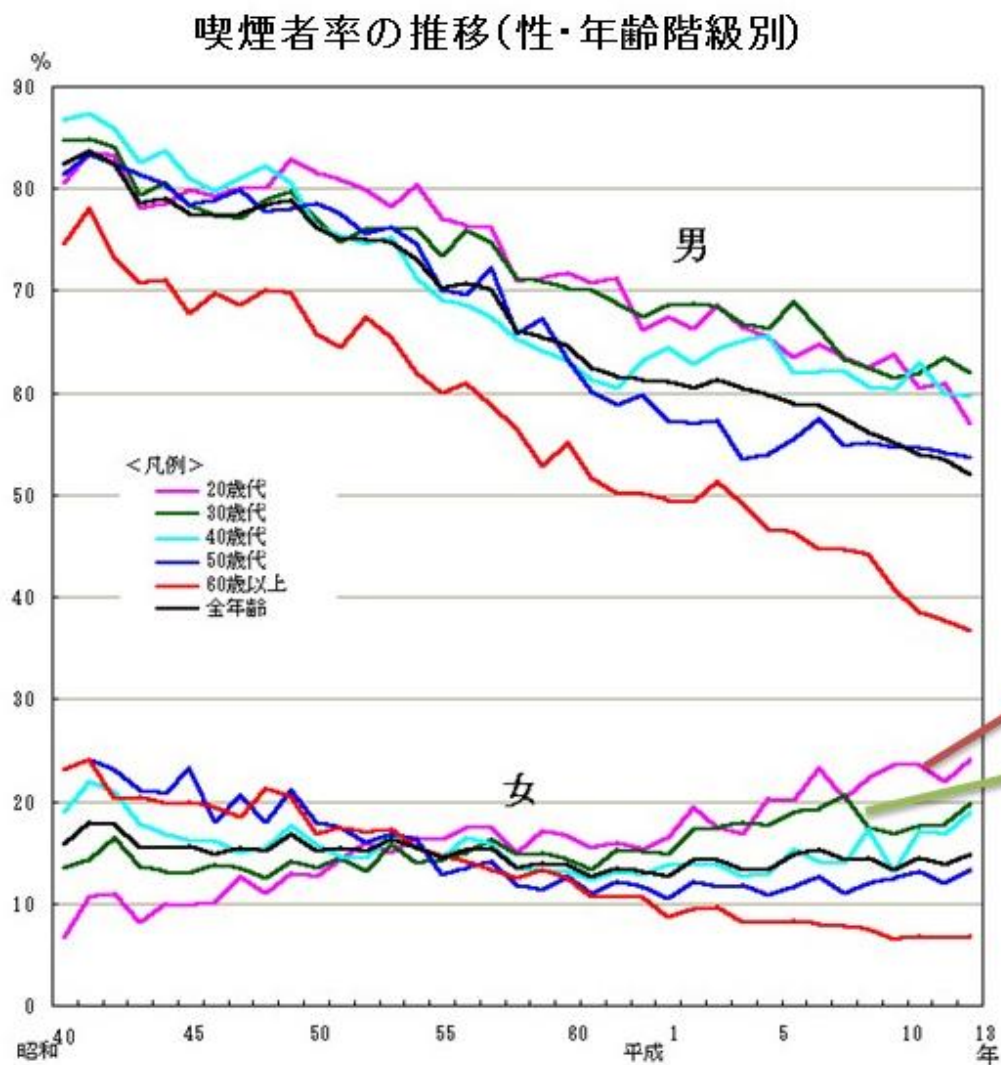
近年、世界的に女性の社会進出が進み、生活環境やライフスタイルの変化により妊婦を含めた多くの女性が有害物質に曝露される機会が増加している。2014年の厚生労働省調査によると、生殖年齢にあたる20～30歳代女性の喫煙率は約12%、男性は約40%であり、全体の成人喫煙率は男性32.2%、女性8.2%であった。本邦においては20～30歳代といった生殖年齢にあたる女性の喫煙率は比較的高く、20-50%の女性が妊娠時にも喫煙を続けている状況より（図1参照）、女性が曝露される可能性のある最も重要な有害化学物質は喫煙由来と考えられる。このため、喫煙が女性生殖機能に与える諸問題については近年注目されている研究領域である。

厚生労働省の「たばこの健康影響評価専門委員会資料」によると、タバコの煙の中には、ニコチン、タール、一酸化炭素をはじめ発がん物質を含む7000種以上の化学物質やポロニウムなどの放射性物質が含まれており、これらの成分は主流煙より副流煙の方が多いことが明らかにされている。妊娠中の喫煙の有害性に関する知識普及により、妊婦の喫煙率は同世代の女性よりも低い事が予想されるが、タバコの有害性は能動喫煙の他に副流煙を吸い込む受動喫煙の影響も大きく、胎児への影響を考える場合は同じ居住空間で生活するパートナーをはじめとした家族の喫煙状況も考慮する必要がある。

妊婦の喫煙と胎児発育不全との関連は多くの疫学調査により証明されている。図2に環境化学物質による胎児発育制限についての大規模な疫学調査結果を示した¹⁾。様々な環境化学物質の中においても、Tobacco smokeは強いエビデンスレベルで子宮内胎児発育不全との関連性が示されている。妊娠中に喫煙した場合、子宮内胎児発育不全の発症頻度は約25%と高く、双胎危険度は、2.0～3.0となる。また、喫煙していない場合に比べて平均200gの出生体重の減少が認められると報告されている。

妊婦の喫煙による影響として胎児発育不全ばかりではなく、妊娠にも影響が強く、流産・早産の増加が報告されている。妊婦の1日10本以上の喫煙は、周産期死亡率を1.5倍、早産を1.2倍、子宮内胎児発育不全を2.2倍に上昇させる。図3に喫煙が妊娠に与える影響をまとめた。

子宮内発育不全には様々な問題がある。図4に示した様に、近年低出生体重児の数は増加傾向にあり、子宮内発育不全児の問題点として、医学的には先天奇形の合併、周産期死亡率の優位な上昇、胎児機能不全率の上昇、学習障害・多動・注意欠陥障害などの精神疾患、神経学的異常、将来の生活習慣病などが指摘されている。



- ・20歳台の女性喫煙率は4倍に増加
- ・4人に1人が喫煙者
- ・20-50%の女性が妊娠時に喫煙

(20歳台女性)

(30歳台女性)

(日本専売公社、日本たばこ産業株式会社による調査)

図1 女性の喫煙率の推移

- SGA: 発症頻度25%前後 (OR 2.0~3.0)
- 平均200gの出生体重の減少

Environmental contaminants and pregnancy outcomes

Gayle Windham, Ph.D., and Laura Fenster, Ph.D.

Division of Environmental and Occupational Disease Control, California Department of Public Health, Richmond, California

Fertility and Sterility® Vol. 89, Supplement 1, February 2008

TABLE 1		
Selected agents with potential adverse effects on fetal growth or gestational age, by strength of evidence ^a .		
Limited	Moderate	Strong
Carbon tetrachloride Dioxins/TCDD PCE/TCE (in water) ^b Perfluorinated acids Phenoxyacetic Herbicides Phthalates	Air pollution Herbicides Metals (Pb, Hg, As) ^b Nicotine OC pesticides ^{b,c} OP pesticides ^{b,c} Pentachlorophenol Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Solvents Water disinfection Byproducts ^c	Carbon monoxide Cocaine Ethanol Tobacco smoke ^c
^a Compiled primarily from CHE Summary of Evidence Website (6) and LaDou, 2007 (5)—see those for details of specific endpoint associations. Bolded compounds are discussed in the text. ^b PCE = perchlorethylene; TCE = trichloroethylene; metals include lead (Pb), mercury (Hg), and arsenic (As); OC = organo-chlorinated; OP = organophosphate. ^c The evidence for these is discussed in detail in Results.		
Windham. <i>Environmental contaminants and pregnancy</i> . Fertil Steril 2008.		

強いエビデンスレベル



Environmental contaminants and pregnancy outcomes (2008)¹⁾より引用

図2 環境化学物質と子宮内胎児発育不全との関連

短期的影響:

流産、**出生体重減少**、早産、周産期死亡率の増加

長期的影響:

母体 : 不妊症、悪性腫瘍

子ども : 先天奇形、呼吸器疾患、精神発達障害

成人後: 虚血性心疾患、高血圧、糖尿病、肥満、
閉塞性呼吸器疾患、脳血管障害

図3 喫煙が妊娠に与える影響

- ・ 先天奇形
- ・ 周産期死亡率
- ・ 胎児機能不全
- ・ 学習障害
- ・ 多動
- ・ 注意欠陥障害
- ・ 神経学的異常
- ・ 生活習慣病

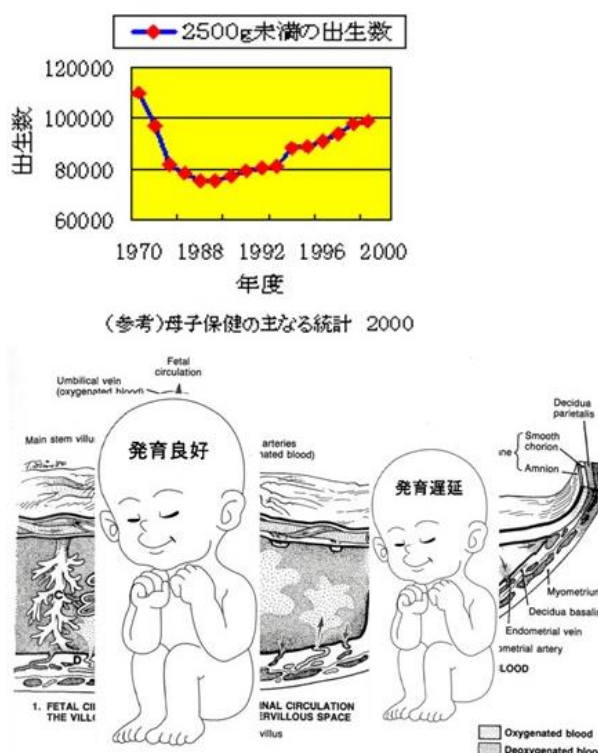


図4 子宮内胎児発育不全児の問題点

しかしながら、喫煙がどのように胎児発育を制限するかについて詳細に分析した研究報告は少ない。さらに、Godfrey KM & Barker DJ²⁾により、子宮内での発育が病的に制限されている胎児発育不全は、新生児周産期死亡や小児疾患のみならず成人期の生活習慣病のリスク因子として重要であることが報告されている。近年、社会的関心を集めているメタボリック症候群の発症には、生活習慣や遺伝的素因の他、胎児期から新生児期にかけての栄養環境が密接に関連している。子宮内で低栄養環境に曝された胎児臓器は、epigeneticな機序を介し遺伝子発現量を調節してエネルギー節約型に適応するが、この適応機構は「胎児プログラミング」として生涯にわたり持続する。その結果、出生後の好転した栄養状態においてはむしろ過適応となり、肥満を背景とした糖代謝異常や高血圧を中心病態とするメタボリック症候群の発症に至るという機序が明らかにされつつある。図5にこのBarker仮説についてまとめた。このように、胎児発育不全ひいては出生児の一生の健康リスクの原因となりうる母体の喫煙は看過できない問題であり、喫煙が胎児発育を制限するメカニズムについて解明が望まれる。

胎盤は母体胎児間で胎児発育に必要な物質交換を担い、酸素、糖やアミノ酸などの栄養物質は全て胎盤の絨毛細胞を介し胎児に供給されている。胎児発育はこの胎盤栄養素輸送機能に依存しており、この機能障害により、胎児は低栄養環境での発育を余儀なくされ胎児発育不全をきたす。図6に従来より指摘されている子宮内発育不全の成因を示した。図6に示したように、子宮らせん動脈から絨毛間腔へ供給される母体血の供給低下（還流異常）により胎児の酸素化・栄養化障害が惹起される。この子宮らせん動脈再構築障害（胎盤の病理学的構造異常）に伴う低還流や栄養素輸送機能異常により胎児へ供給される栄養素の欠乏が生じる。

近年、子宮内胎児発育不全のもう一つの成因として、胎盤絨毛における栄養素輸送機能そのものの機能障害が重要であることが報告されている。図7に胎盤絨毛の細胞構成を示した。絨毛間腔の母体血と絨毛内の胎児血管の間の物質輸送は、合胞体栄養膜細胞が担っている。胎盤における栄養素輸送はこの合胞体栄養膜細胞が担っている。図8に合胞体栄養膜細胞におけるアミノ酸輸送機構（SystemA型）を示した。母体血中のアミノ酸は、合胞体栄養膜細胞の微絨毛膜上に存在する輸送タンパクを介して能動輸送されている。糖や脂肪酸輸送も同様に、輸送タンパクを介して能動輸送が行われている。

胎児発育不全の胎盤では、糖やアミノ酸の輸送活性が低下し、胎児血中の必須アミノ酸濃度が低いことが報告されている（Shibata E, et al.³⁾, Regnault TR, et al.⁴⁾）。最近、我々はPCBs（ポリ塩化ビフェニル）がヒト胎盤の構造や機能を修飾する事を発見し（Tsuiji M, et al.⁵⁾）、化学物質による胎児毒性には、胎盤を通過して直接胎児に影響を与える場合の他に、胎盤機能を間接的に修飾する機序が存在することを報告した。直接的影響については、化学物質自体の胎盤通過性が問題となり、比較的多くのデータの蓄積がある。しかしながら、化学物質が胎盤機能を修飾することにより、間接的に胎児発育を制限するか否かに関する研究報告は非常に少ない。

胎盤の構造には合胞体栄養膜細胞や胎児血管の発達度、合胞体栄養膜細胞の母体面にある細胞外高分子糖タンパク質：Glycocalyxが重要である。Glycocalyxは、血管内皮細胞においてはシェアストレス誘発性NOの合成調節、抗酸化ストレス作用、血管透過性調節、血液凝固機能調節、抗炎症作用などの機能を有することなどが明らかにされつつある⁶⁾。図9にGlycocalyxの構造と機能について示した。またGCX損傷により遊離脂肪酸輸送異常を惹起することも示唆されている。

1977年D. Nelson らによりGCX が胎盤の合胞体栄養膜細胞の母体面に豊富に存在することが免疫組織学的に初めて証明された⁷⁾が、近年、GCX 損傷が胎盤機能を修飾し胎児発育異常や異常妊娠の発症に関与することが考察されている。図10に胎盤におけるGlycocalyxの発現と関連疾患について示した。

しかしながら、胎盤においてGCX の損傷を起こす因子やGCX 機能と胎盤栄養素輸送機能との関連性については未解決である。また、喫煙による細胞障害機序には活性酸素障害が密接に関わることが知られ

ている。

エコチル調査「本調査」では胎盤試料の採取および生理学的分析は行われていない。エコチル調査で得られる胎盤に関するデータは、ドクター調査表に記録された「胎盤重量と分娩取り扱い医師の診断による胎盤・臍帯の臨床的異常」のみである。エコチル調査の本来の目的である「子どもの健康に影響を与える環境要因の解明」について考えると、胎盤の生理学的分析は、胎盤を介した間接的な胎児毒性の評価において必要不可欠である。図11にエコチル中心仮説の環境要因とエンドポイントを示した。この図に示すように、環境要因である喫煙がエンドポイントの一つである胎児の身体発育にどのように関わるのか調査することが、本研究の趣旨である。

これらの理由により、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究を提案するに至った。

Fetal nutrition and adult disease¹⁻³

Keith M Godfrey and David JP Barker

Am J Clin Nutr 2000;71(suppl):1344S-52S. Printed in USA. © 2000 American Society for Clinical Nutrition

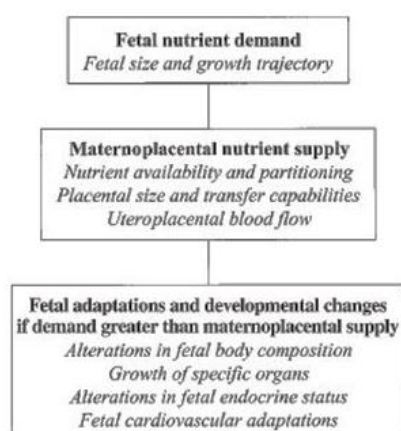


FIGURE 2. Framework for understanding the maternal regulation of fetal development and programming.

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」

“胎児は低栄養状態に適応する”

Fetal nutrition and adult disease (2008) ²⁾ より引用

図5 Barker仮説

子宮内胎児発育遅延：従来より指摘
母体から胎児への血液供給不足

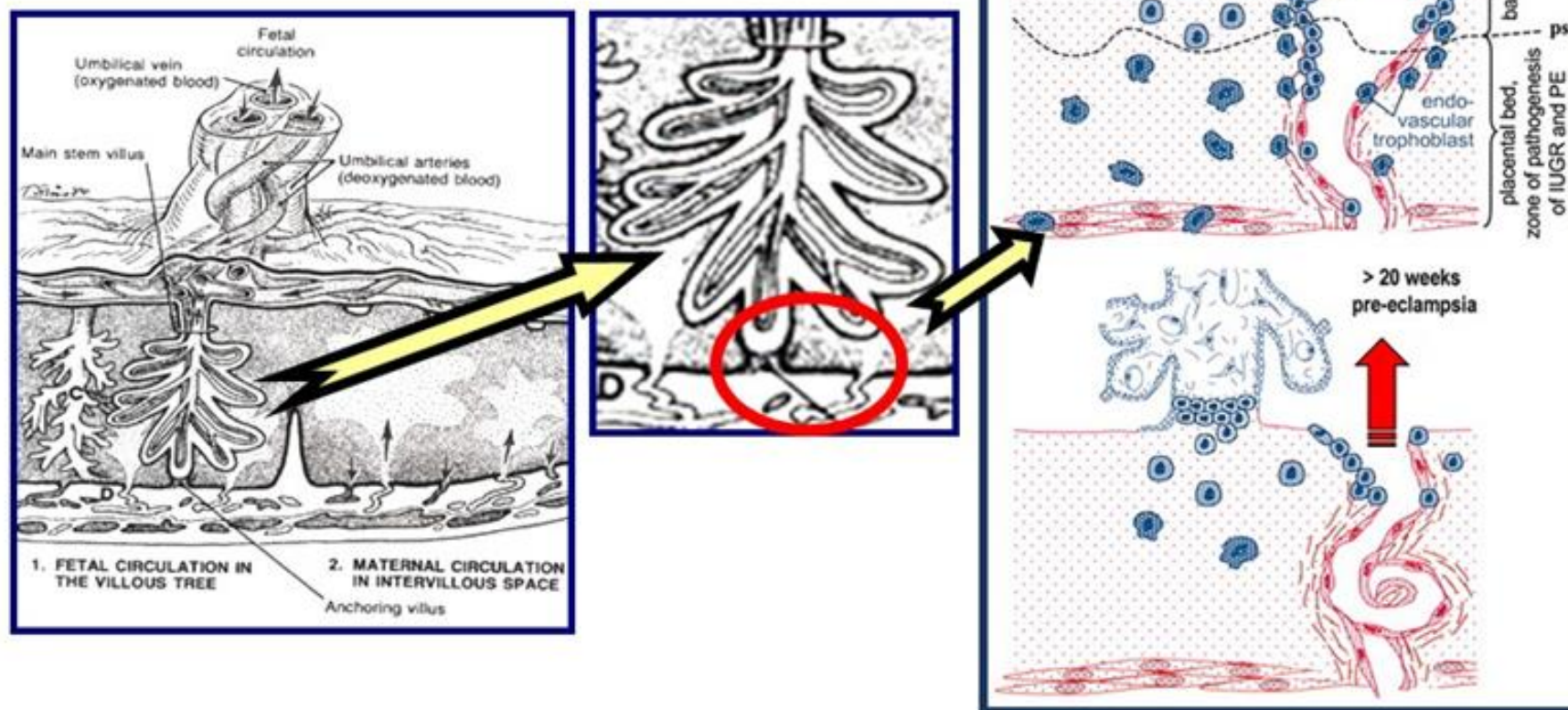


図6 子宮内胎児発育不全の成因1

- ・病理学的異常
- ・栄養素輸送機能異常

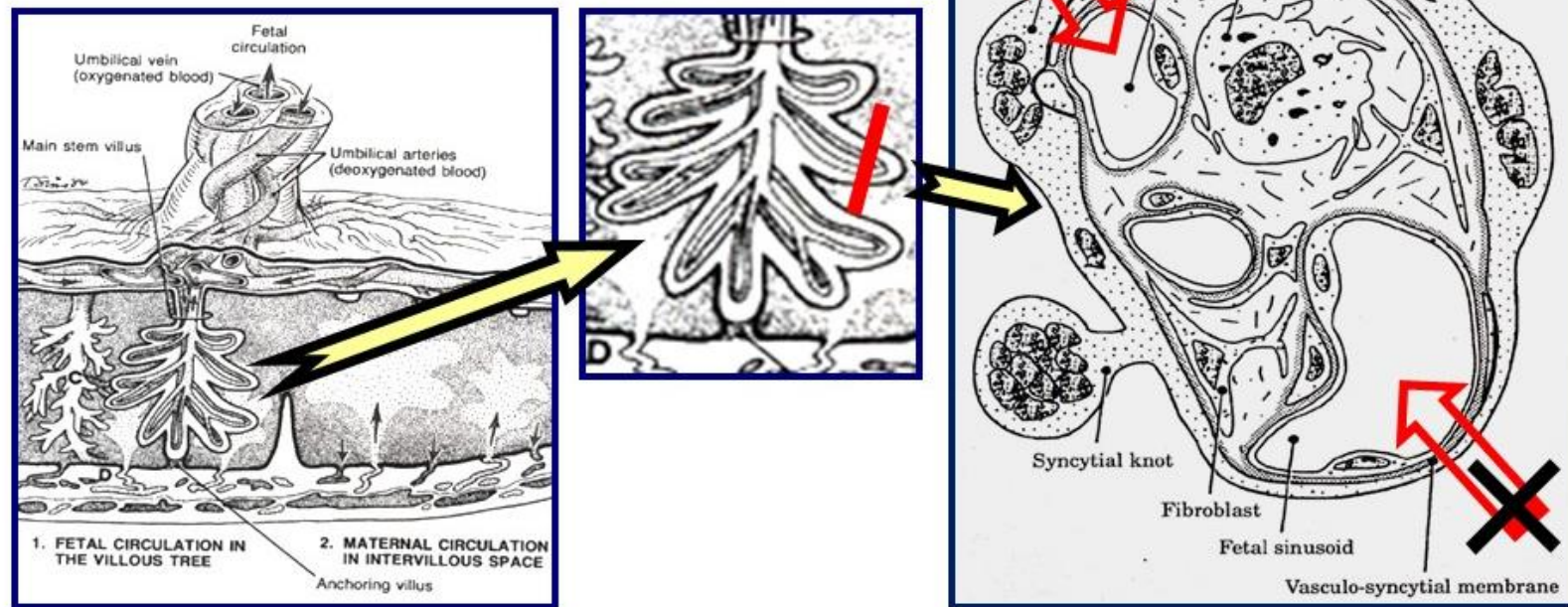


図7 子宮内胎児発育不全の成因2

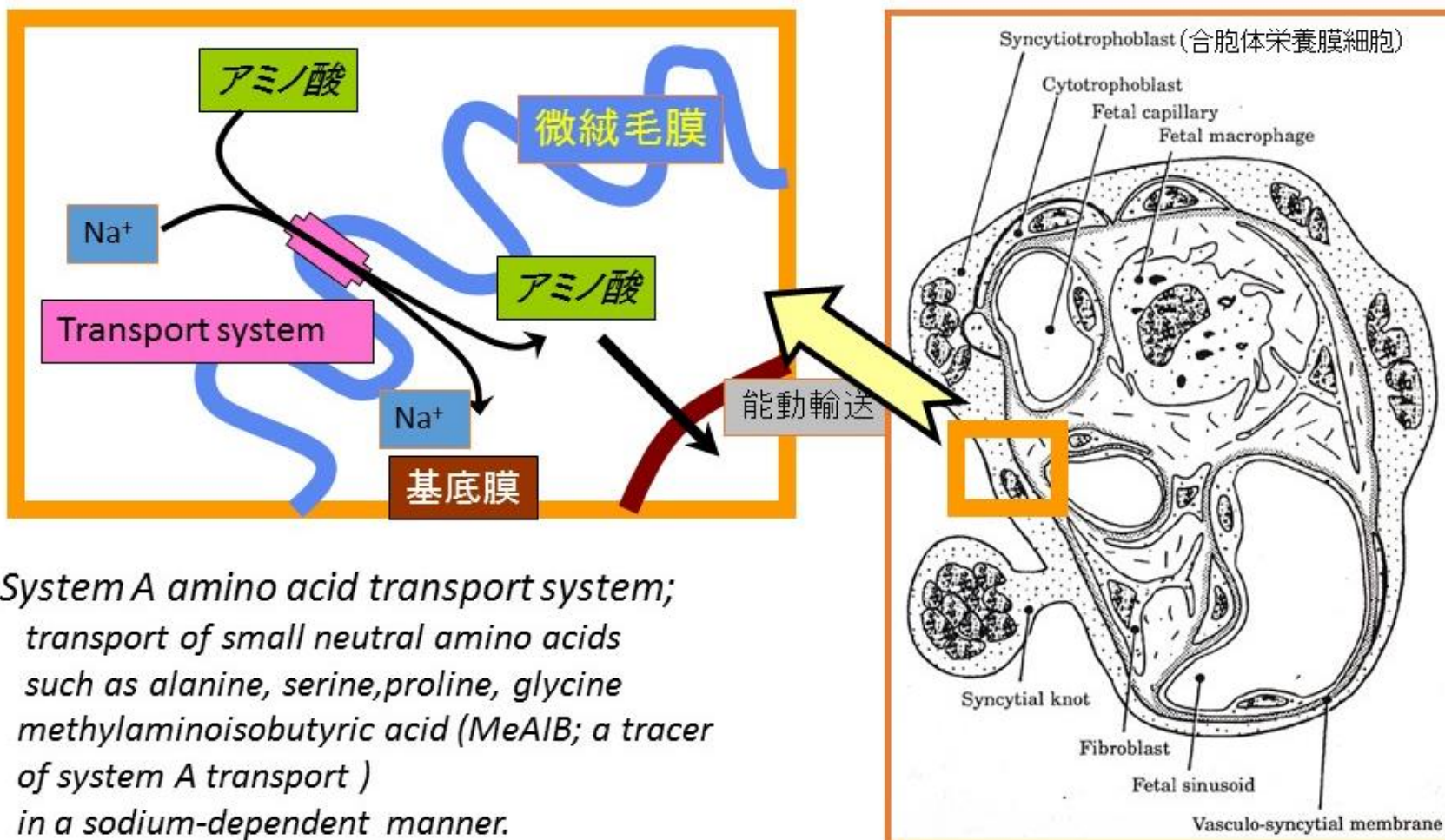


図8 ナトリウム依存性アミノ酸輸送機構 (SystemA型)

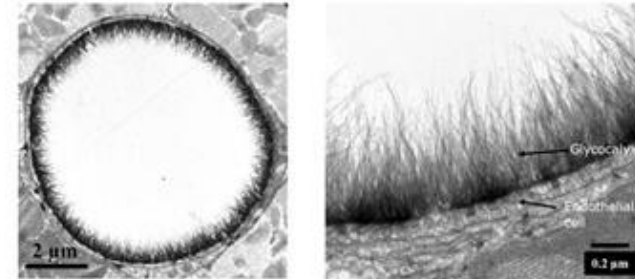
Glycocalyxの機能

- 血管内皮細胞表層に存在する高分子糖タンパク質
- 膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンを主成分とする

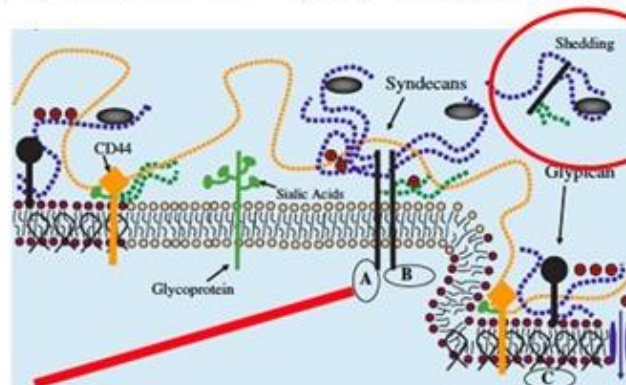
Syndecan-1~4で構成

- 種々のタンパクや増殖因子と結合し細胞間の接着や情報伝達に関与
血管透過性調節、血液凝固機能調節、抗炎症作用などの機能を有する

Endothelial glycocalyx protects the vessel wall



Electron micrograph of myocardial capillary



低酸素、虚血、感染などのストレス
↓
細胞膜表面のSyndecanが切断される
↓
血管内皮細胞機能異常？

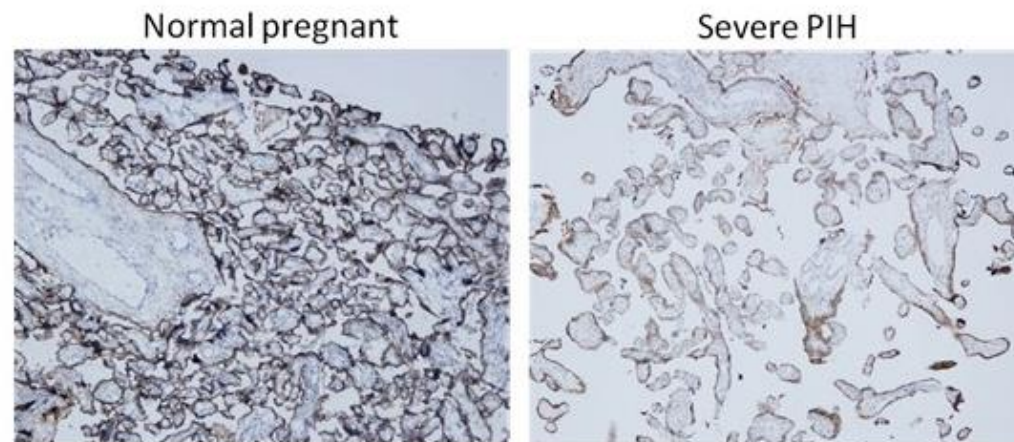
Van den Berg, Vink & Spaan, Circulation Research 2003, 92:592-594⁶⁾より引用

図9 Glycocalyxの機能と構造

- 1975年D.NelsonらによりGCXが胎盤の合胞体栄養膜細胞の母体面に豊富に存在することが免疫組織学的に証明
- GCX損傷が胎盤機能を修飾し、胎児発育不全や異常妊娠発症への関連を示唆

**Reduced syndecan-1
expression on preeclampsia
syncytiotrophoblast**

absent on fetal villous b.v.



Nelson DM, et al, Gynecol Invest, 1977, 267-81⁷⁾より引用

図10 胎盤におけるGlycocalyxの発現と機能

エコチル調査の中心仮説

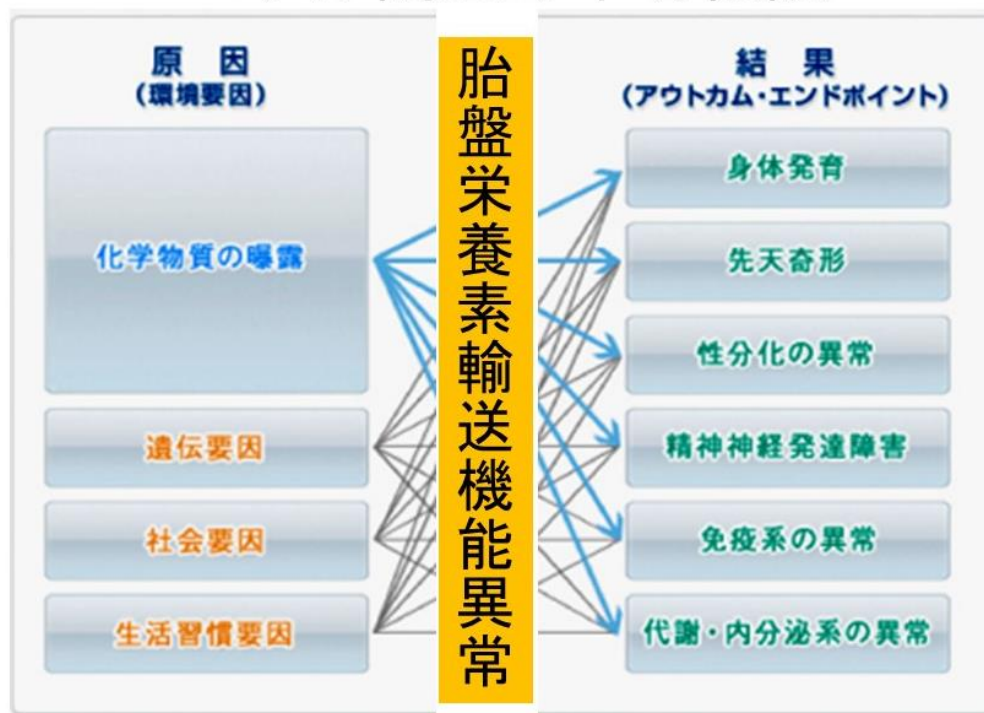


図 1 1 エコチル中心仮説の環境要因とエンドポイント

2. 研究開発目的

今回我々は、妊婦自身の喫煙や夫の喫煙に起因する受動喫煙が胎児発育を制限する機序において、胎盤の構造異常や栄養素輸送機能変化を介した間接的影響が存在するか否か調べることを研究の目的としている。エコチル調査「本調査」の質問票から得られた妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙と、当該妊婦から得られた胎盤の病理組織学的特徴との間の相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤組織形態を変化させるか否か明らかにし、さらに、胎盤の栄養素輸送担体（糖・アミノ酸・遊離脂肪酸）発現との相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤栄養素輸送担体の発現を変化させるか否か明らかに検証する。

疫学的調査では、妊婦の喫煙による影響として、出生体重の減少や子宮内胎児発育不全の罹患率の上昇が報告されている。胎児発育不全は幼少期の問題のみならず、成人期に肥満を背景として糖代謝異常や高血圧を中心病態とするメタボリック症候群の発症に至るという説が、成人病胎児期起源仮説（DOHaD; Development Origins of Health and Disease）として認識されるようになってきた。この流れをうけて、今後さらに多くの研究分野から胎児期の栄養環境に注目が集まることが予想される。子宮内の栄養環境を規定する因子と胎児発育との関連について明らかにすることは、胎児発育不全の病態解明につながるのみならず、一生の疾病リスクに対し胎児期から予防的介入を行う手段を構築する場合に重要な情報を提供する可能性がある。図12に本研究の発展性について示した。

このように、喫煙が妊娠に与える影響を詳細に調べることは、産科学、公衆衛生学だけでなく環境科学や毒性学においても重要な研究領域であると考えられる。本研究結果は、妊娠に対する喫煙の有害性をより詳細に明らかにすることによって、喫煙者である妊婦やその周囲の家族の意識改善に強いインパクトを与えると考えられる。また、一般社会へ喫煙の有害性を再認識させることにより、女性の喫煙率の上昇に歯止めをかけ、安全な妊娠・出産ができる環境づくりにも貢献するものと考えられる。さらに、喫煙が原因となる異常妊娠の発症機構の解明に貢献し、環境化学物質による胎児発育制限の治療法（有害物質の解毒や胎内治療）の開発に貢献ができる可能性がある。

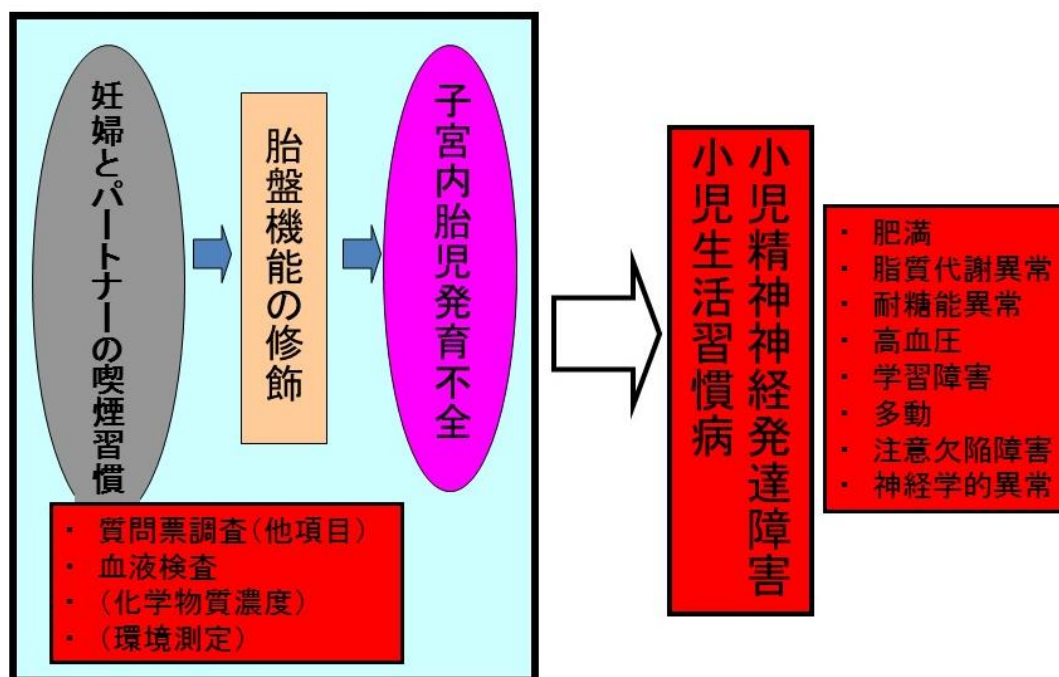


図12 本研究の発展性

3. 研究開発方法

(1) 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送に与える影響の研究
 研究対象：北九州市八幡西区のエコチル調査参加者で既に分娩し胎盤採取が行われた689名。

研究計画

データ利用および胎盤組織の分析

1. 胎盤採取が行われた妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙に関する質問票：妊婦およびそのパートナーの妊娠前および妊娠期間中の喫煙習慣（喫煙の頻度、本数など）が詳細に調査され、それらのデータが蓄積されている。このデータを母体の喫煙への曝露マーカーとしてデータ化する。

2. 胎盤の病理組織学的分析：分析項目は、HE染色の画像解析により胎盤組織学的分析を行う。

検討項目は以下である。

a. 合胞体栄養膜細胞数の定量化 b. 血栓・梗塞範囲の定量化 c. 絨毛間腔（胎盤内の母体血流スペース）の定量化 d. 末梢絨毛の発達度の評価 e. 絨毛膜羊膜炎の有無 f. 螺旋動脈再構築障害の評価。図13に評価法を示した⁸⁾。

さらに、胎盤の合胞体栄養膜細胞の母体面に豊富に存在する糖タンパクであるGlycocalyxの損傷が胎児発育不全や異常妊娠発症に関与することが示唆されており、妊婦の喫煙が胎盤のGlycocalyx 損傷に関与するか否かについて免疫組織学的に調べた。図14に評価法を示した⁹⁾。

胎盤栄養素輸送機能の分析：分析項目：胎児発育に重要な胎盤栄養素輸送担体の発現の局在と程度を免疫組織学染色で分析した。栄養素輸送担体は、糖・アミノ酸・遊離脂肪酸輸送関連因子について調べた。また、胎盤の酸化ストレス障害についても免疫組織学染色で分析した。図15に評価法を示した¹⁰⁾。図15に示すように、細胞局在毎に染色強度をスコアリングし、定量化を行った。

相関性の分析：上記1と2の相関性を分析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤組織形態および栄養素輸送機能に与える影響を調べた（図16に研究全体の概略を示した）。

SCT (Syncytiotrophoblast) : 合胞体栄養膜細胞

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

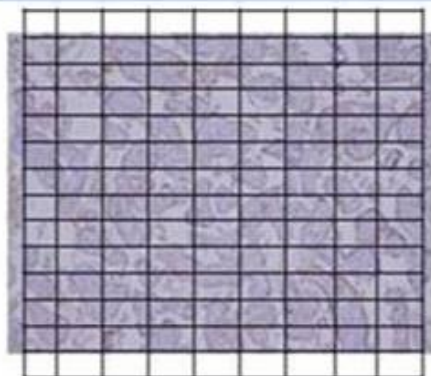
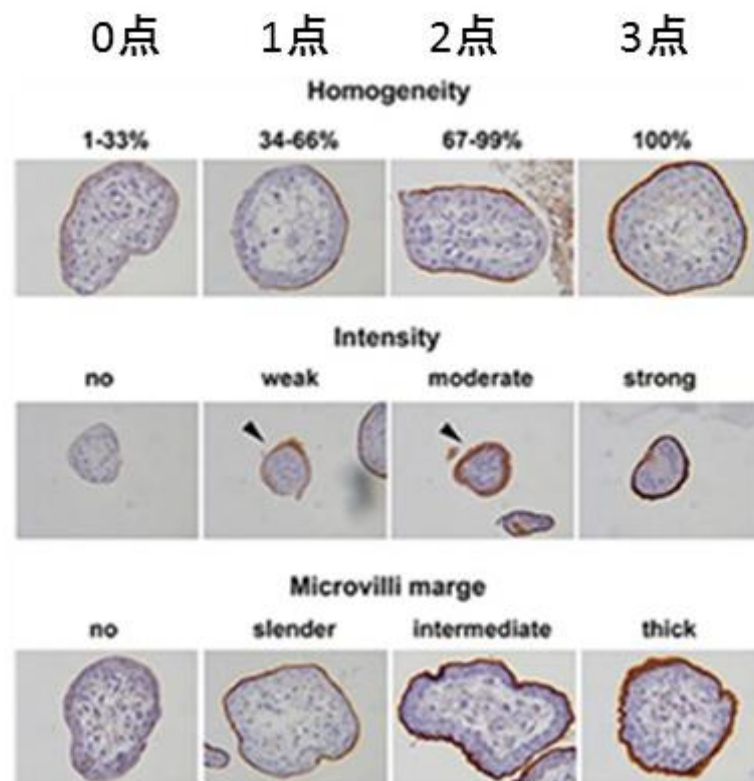


Image scored	栄養膜細胞 Trophoblast	絨毛血管 Intra-capillary	絨毛間腔 Intervillous space	出血・壊死 Non-Villous (fibroid, etc.)	total points scored
1	19	18	11	36	108
2	20	15	40	9	108
3	28	15	41	1	108
4	33	20	31	0	108
5	30	25	17	11	108
6	20	18	27	26	108
7	40	23	24	2	108
8	22	17	38	0	108
9	27	21	43	3	108
10	33	27	17	7	108
Total counts:	272	199	289	95	1080
% of total:	25.2	18.4	26.7	8.8	100
Total placental volume(cm3):	167	122	177	58.3	Total "662.5 cm3

Mayhew et al, Placenta, 2003, 501-9より引用

図13 胎盤病理組織学的評価法



Syndecan-1の発現強度の評価法

(Prenatal Diagnosis: 32, 2, 131-137, 2012)

Syndecan-1の発現を

- ① Homogeneity (染色の均一性)
- ② Intensity (染色濃度の強さ)
- ③ Marge (染色縁の厚み)

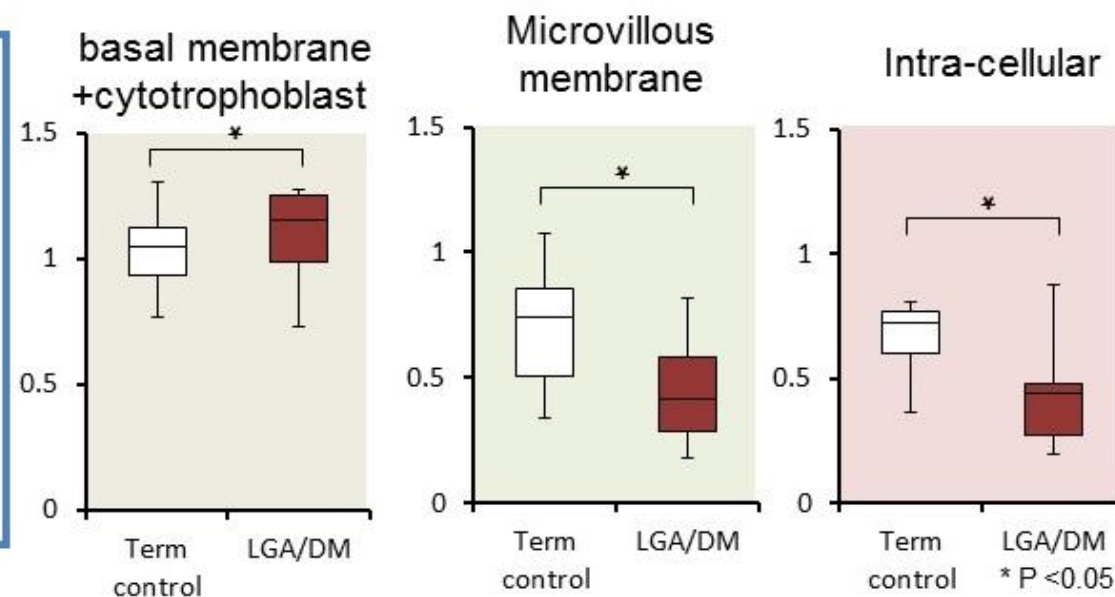
に分類。

スコアリング(0～3点)し、定量化した。

Schmedt A et al, Prenat Diagn. 2012, 131-7より引用

図14 胎盤病理組織学的評価法

一切片につき
5視野の染色強度
をスコアリング化
(染色強度なし=0、
弱い=1、中等度=
2、強い=3)し、比
較検討した。



- A - Microvillous membrane
- B - Basal / Plasma membrane
- C - Cytoplasmic/intracellular

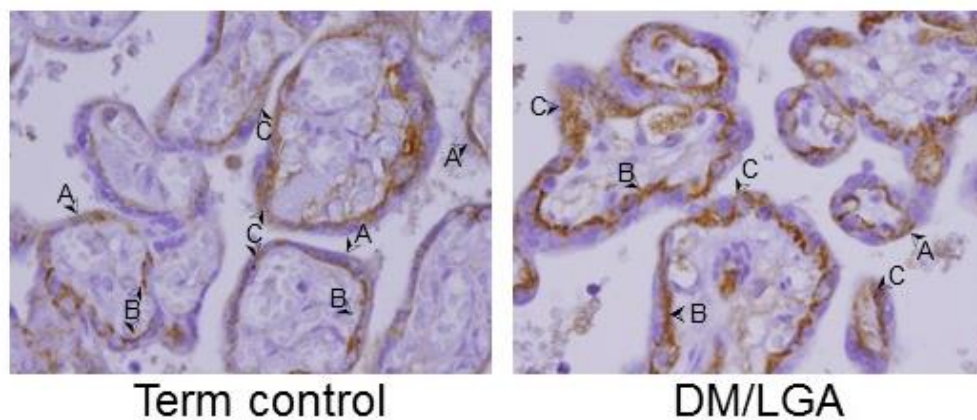


図 1 5 胎盤病理組織学的評価法

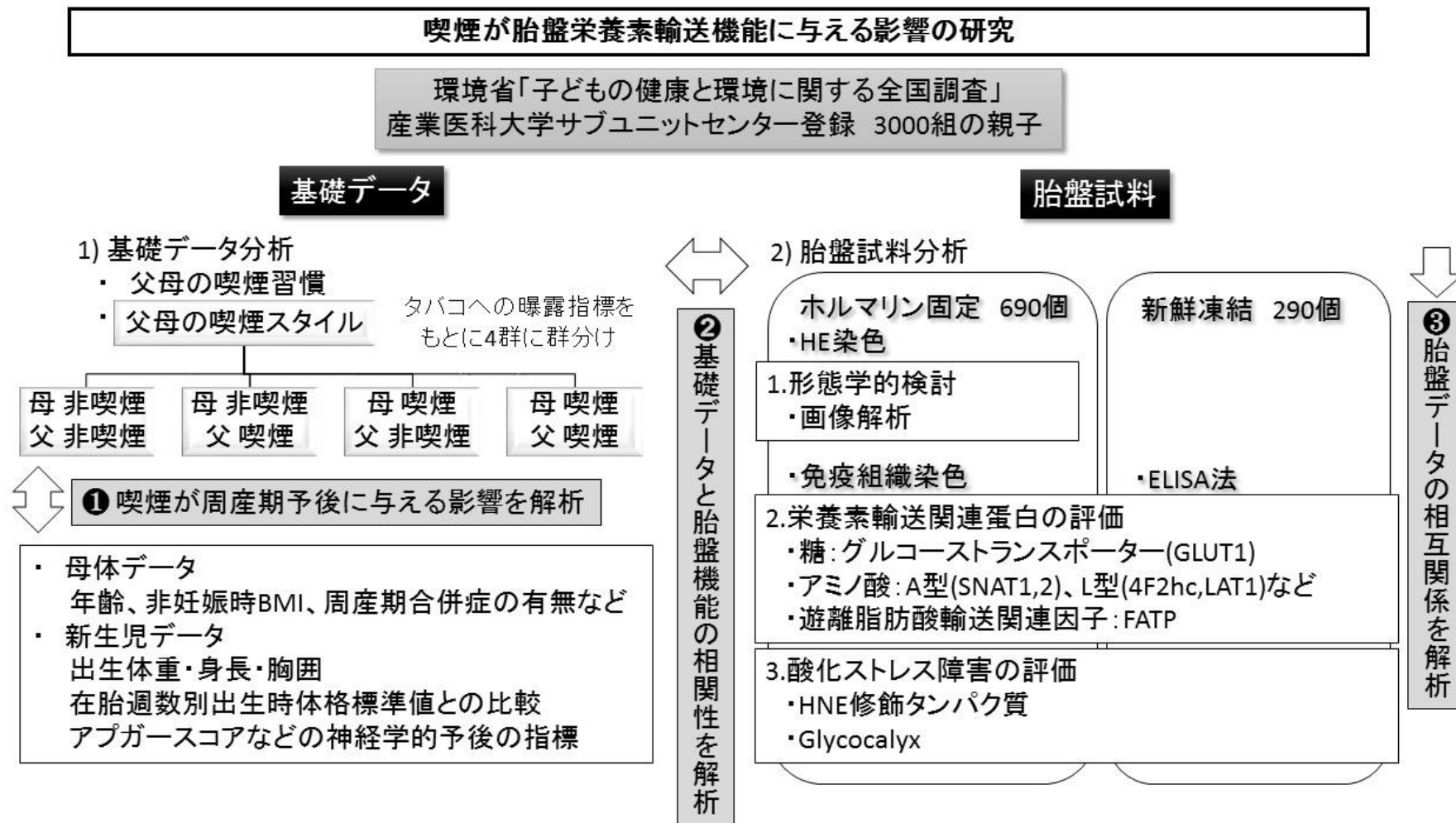


図 1 6 研究概略：妊婦の喫煙と胎盤組織学的検査

4. 結果及び考察

(1) 妊婦およびそのパートナーの妊娠前および妊娠期間中の喫煙習慣

図17に研究登録者および解析対象を示した。北九州市八幡西区のエコチル調査参加者3044人のなかで、多胎、流産・死産、妊娠糖尿病や妊娠高血圧症候群などの合併症妊娠、異常妊娠を除いた2298人を解析対象とした。

図18に解析対象者2298人の喫煙歴による内訳と早産の割合を示した。妊婦とそのパートナーの喫煙歴は、エコチル調査で実施された質問票の中で生活習慣に関する質問項目への回答をもとに調査を行った。質問票は全妊娠期間を通じて、妊娠初期、妊娠中期、分娩時、産後1ヵ月健診時のタイミングで実施され、妊婦自身の自己申告方式で記入されており、それぞれの時期の喫煙状況を確認することが可能となっている。質問票への回答をもとに妊娠前、妊娠中の喫煙の有無を調査し、喫煙歴のある場合は喫煙期間、喫煙本数に関する情報を収集した。さらに解析対象者の夫（パートナー）についても喫煙に関して同様の質問項目が設定されており、回答内容をもとに喫煙の有無、喫煙期間や喫煙本数を調査した。

表1のように、質問票への回答をもとに対象者とそのパートナーをそれぞれ4群に分類した。これまで一度も喫煙経験が無い群、喫煙歴があるが今回の妊娠前に禁煙をしていた群、喫煙歴があり今回の妊娠判明後に禁煙した群、妊娠初期から分娩後にかけて喫煙を継続した群にそれぞれ対象者とパートナーを分類し、全体で16のカテゴリーを作成した。妊娠判明後に禁煙した群の禁煙時期については、妊娠初期と中期を合わせて1群としている。対象者2298人のうち、喫煙歴の無い妊婦は1312人（57.1%）、喫煙歴のある妊婦は986人（42.9%）であり、喫煙歴のある妊婦の中で今回の妊娠前に禁煙していたものは546人（23.8%）、妊娠判明後に禁煙したものは314人（13.7%）、妊娠前から分娩後の産後1ヵ月健診の時期にかけて喫煙を継続したものは126人（5.5%）であった。各群における早産（妊娠24週0日～36週6日）の割合は、喫煙歴の無い群は1312人中32人（2.4%）で最も低く、喫煙歴があり妊娠前に禁煙した群は546人中20人（3.7%）、妊娠判明後に禁煙した群は314人中12人（3.8%）でありほぼ同率であった。妊娠前から分娩後にかけて喫煙を継続した群の早産の割合は、126人中11人（8.7%）と4群で最も高率であり、妊娠中の母体喫煙と早産との関連が示唆される結果となった。さらに、表1に妊婦の喫煙状況別にみたパートナーの喫煙習慣を示した。喫煙歴のない妊婦群において、パートナーの449人（34.2%）は、同様に喫煙経験が無く、今回妊娠前に禁煙していた349人（26.6%）と合わせて798人（60.6%）が両親ともに喫煙の無い妊娠期間を送っていた。一方で、妊娠判明後に禁煙したパートナーは44人（3.4%）と少なく、喫煙を継続したものは470人（35.8%）と4群の中で最も割合として高かった。さらに、喫煙歴があり妊娠前に禁煙した妊婦群におけるパートナーの喫煙率は546人中282人（51.6%）と半数以上であり、妊娠判明後に禁煙した妊婦群ではパートナーの78.3%、喫煙を継続した妊婦群では94.4%のパートナーが喫煙を継続した。妊婦に喫煙歴があり、かつ喫煙期間が長い群においてパートナーの喫煙率も高い傾向にあり、夫婦、カップル間の喫煙に関する認識が近いことが推測された。妊婦自身に喫煙歴のない場合においても、今回の結果からパートナーの4割近くが喫煙を行っており間接喫煙の影響が懸念される結果となった。

表2に全解析対象における臨床的特徴を妊婦の喫煙状況に分けて比較検討した結果を示す。母体年齢、分娩週数の他、胎児発育に影響する可能性のある因子として母体の体格（非妊娠時BMI、妊娠中の体重増加量）を調査した。新生児に関する項目として、出生体重、身長、頭囲、胸囲を調査し、実測値の他に日本小児科学会新生児委員会が作成した「在胎期間別出生時体格標準値」をもとに各計測値のパーセンタイル値を計算した。さらに、新生児の短期予後としてアプガースコア1分値、5分値、臍動脈血pH値を調査した。分散分析により4群間の比較検討を行い、統計解析ソフトはSPSS Statistics version 23を使用した。P値0.05を統計学上の有意差ありとした。

妊娠中に喫煙を継続した妊婦の平均喫煙本数は1日あたり10±5.5本であった。母体年齢の比較におい

て、喫煙歴のない、もしくは妊娠前に喫煙をやめていた妊婦に対し、妊娠判明後に禁煙した妊婦と喫煙を継続した妊婦の年齢は有意に若い傾向にあった (31.5 ± 4.5 歳、 31.6 ± 4.7 歳 vs 29.4 ± 5.1 歳、 29.3 ± 5.7 歳)。

妊娠中に喫煙を継続した妊婦の平均喫煙本数は1日あたり 10 ± 5.5 本であった。母体年齢の比較において、喫煙歴のない、もしくは妊娠前に喫煙をやめていた妊婦に対し、妊娠判明後に禁煙した妊婦と喫煙を継続した妊婦の年齢は有意に若い傾向にあった (31.5 ± 4.5 歳、 31.6 ± 4.7 歳 vs 29.4 ± 5.1 歳、 29.3 ± 5.7 歳)。分娩週数は妊娠中に喫煙を継続した群で有意に早い傾向にあったが、分娩週数は妊娠 39.0 ± 1.7 週であり正常産の範囲内であった。今回の検討では対象者を選択した段階で早産となり得る産科合併症の症例を除外しており、合併症症例に喫煙者が含まれていた場合は本来の喫煙者全体の分娩週数がより早期になっていた可能性もあり、今回の検討だけでは喫煙による分娩週数への影響が正確に反映されていない可能性が考えられた。母体の非妊娠時BMIは、非喫煙群 (20.0 ± 3.4) と比較して妊娠前に禁煙した群 (21.6 ± 4.0) と喫煙継続群 (21.4 ± 3.8) に有意差を認めたが、いずれも標準体型の範囲内であった。妊娠中の母体体重増加については、妊娠後に禁煙した群に増加量が多い傾向を認めた。

新生児計測値の解析では、喫煙継続した群において出生体重の実測値が他の3群より有意に減少しており、妊娠期間中の喫煙継続が出生体重の抑制と関連している事が示唆された (2888.1 ± 429.1 VS 3060.2 ± 378.3 、 3046.6 ± 393.3 、 3052.9 ± 471.8)。パーセンタイル値の比較においても、喫煙継続群が他の3群よりも低く (43.2 ± 28.1 VS 51.3 ± 27.0 、 51.1 ± 28.1 、 52.3 ± 29.5)、分娩週数や母体の経産歴、男女差を補正した上でも、喫煙を継続した群の出生児は喫煙歴のない群や妊娠途中で禁煙した群と比較して出生体重が抑制されている事が示された。

さらに身長、頭囲、胸囲の解析においても、喫煙群の児においては非喫煙群や妊娠前に禁煙していた群の児と比較し有意に発育が抑制されているという結果となった。以上より、妊娠中に喫煙を継続した母体の出生児は、喫煙歴の無い若しくは妊娠第二三半期間までに禁煙した母体の出生児と比較し頭囲を含めた体全体の発育が抑制されるという傾向を認めた。以上の結果より、今回の検討でも過去の報告と同様に妊娠期間中の喫煙は胎児発育に影響を及ぼすことが確認された。さらに、喫煙をしていた場合でも第二三半期間までに禁煙を行った場合は、喫煙を継続した場合と比較して胎児発育への影響は統計学上の有意差としては認められなかった。この結果より、喫煙が胎児発育へ及ぼす影響としては第三三半期間における喫煙が最も影響が大きいと考えられた。

アプガースコア値、臍動脈血pH値といった出生直後の短期予後については、母体の喫煙による差異は認めなかった。

次に、対象者から早産症例をのぞいた正常産症例のみの解析を行った。表3に解析対象者全体2298人から早産域である妊娠24週0日～妊娠36週6日までの分娩症例を除き、正常産2223人を抽出し臨床的特徴を妊婦の喫煙状況に分けて比較検討した結果を示す。正常産に限定した解析においても、母体年齢は非喫煙妊婦と比較して妊娠判明後に禁煙した妊婦と喫煙を継続した妊婦の年齢は有意に若い傾向にあった (31.5 ± 4.8 歳、 31.5 ± 4.7 歳 vs 29.4 ± 5.1 歳、 29.4 ± 5.4 歳)。早産を含めた対象者全体での解析では、喫煙を継続した群において有意に分娩週数が早かったが、正常産に限定した解析では分娩週数に有意差は認められず、喫煙を継続した群に早産症例が多く含まれていたことが要因であると考えられた。

新生児計測値の解析では、出生体重において喫煙を継続した群と比較し非喫煙群と妊娠前に禁煙した群に有意差を認め、正常産の児においても妊娠期間中の喫煙が出生体重の抑制と関連している事が示唆された。パーセンタイル値の比較においても同様の傾向であり、正常産に限定した解析でも喫煙を継続した群の出生児は喫煙歴のない群や妊娠途中で禁煙した群と比較して出生体重が抑制されている事が示された。この検討では早産による計測値の減少という影響が除外されており、同様の在胎週数という条

件下においても児の出生体重が抑制されている事が明らかとなった。さらに身長解析においても、喫煙群の児においては非喫煙群や妊娠前に禁煙していた群の児と比較し有意に発育が抑制されているという結果となった。一方で頭囲や胸囲に有意差は認められなかった。頭部や体幹の発育に関しては、正規産の時点では喫煙による影響が統計学上認められない結果となり、前出の検討で示された頭囲や胸囲の発育抑制は喫煙の影響よりは早産という在胎週数の短縮がより大きく影響している可能性が示唆された。

正期産の検討においても、アプガースコア値や臍帯動脈血pH値といった短期予後の指標については有意差を認めなかった。

エコチル調査 産業医科大学SUC登録者 3044人

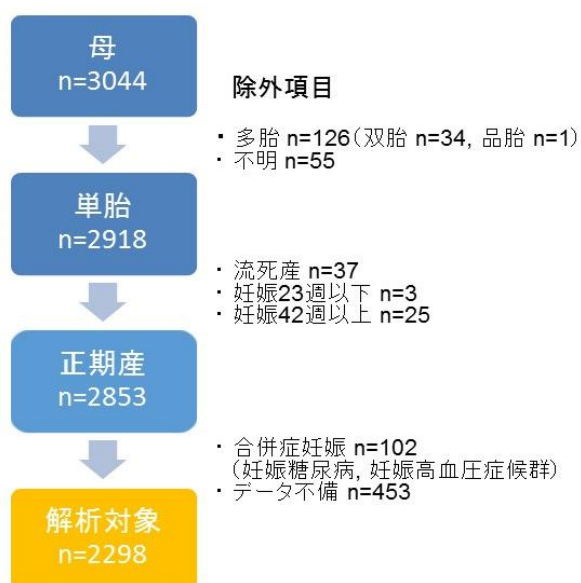
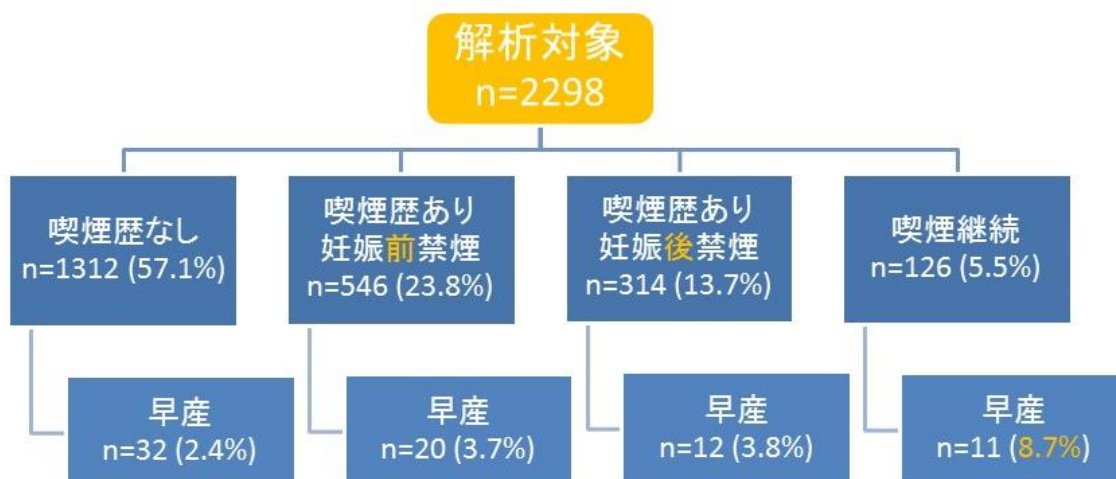


図 1 7 研究登録者および解析対象



早産: 妊娠24週～妊娠41週として集計
(%) 各グループにおける早産の割合

図 1 8 喫煙歴による内訳

表1 対象者のグループ別パートナーの喫煙状況

質問紙表	母	1.喫煙したことは無い				2.以前は吸っていたが 今回の妊娠に気づく前に止めていた				3.以前は吸っていたが 今回の妊娠に気づいて止めた				4.現在も吸っている				合計
	人数	1312				546				314				126				2298
	%	57.1				23.8				13.7				5.5				100
	胎盤	331				124				49				26				530
	父	1.喫煙したことは無い 2.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づく前に止めていた 3.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた 4.現在も吸っている				1.喫煙したことは無い 2.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づく前に止めていた 3.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた 4.現在も吸っている				1.喫煙したことは無い 2.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づく前に止めていた 3.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた 4.現在も吸っている				1.喫煙したことは無い 2.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づく前に止めていた 3.以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた 4.現在も吸っている				
	人数	449	349	44	470	98	145	21	282	23	23	22	246	4	3	0	119	2298
	%	34.2	26.6	3.4	35.8	17.9	26.6	3.8	51.6	7.3	7.3	7.0	78.3	3.2	2.4	0.0	94.4	
	胎盤	128	91	6	106	24	35	6	59	1	3	2	43	1	0	0	25	530

母の喫煙状況別にみたパートナーの喫煙習慣

母の喫煙状況

パートナーの喫煙率(%)

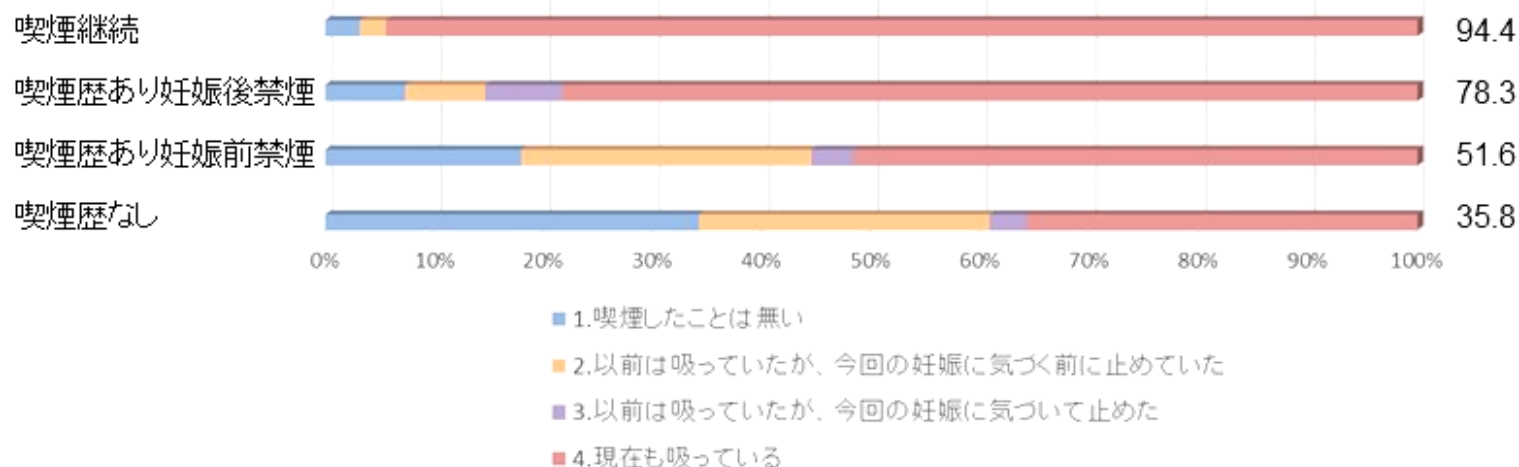


表 2 全解析対象者（早産を含む）の臨床的特徴

	Non smokers (n=1312)	Smoked Preconception (n=546)	Smoked Through the 1,2 nd Trimester (n=314)	Smoked Throughout Pregnancy (n=126)
Maternal Age (y)	31.5 ± 4.8	31.6 ± 4.7	29.4 ± 5.1 ^a	29.3 ± 5.7 ^a
Gestational weeks at delivery	39.5 ± 1.3	39.3 ± 1.3 ^a	39.4 ± 1.6	39.0 ± 1.7 ^{a,b,c}
Prepregnancy BMI (kg/m ²)	20.9 ± 3.4	21.6 ± 4.0 ^a	20.7 ± 3.7	21.4 ± 3.8 ^a
Gastational weight gain (Kg)	10.4 ± 3.7	10.3 ± 4.8	12.1 ± 4.5 ^a	10.7 ± 4.6
Birth weight (g)	3060.2 ± 378.3	3046.6 ± 393.3	3052.9 ± 471.8	2888.1 ± 429.1 ^a
Birth weight (percentile)	51.3 ± 27.0	51.1 ± 28.1	52.3 ± 29.5	43.2 ± 28.1 ^{a,b,c}
Birth height (cm)	50.0 ± 2.1	49.9 ± 2.1	49.7 ± 2.7	49.0 ± 2.6 ^{a,b}
Birth height (percentile)	66.0 ± 26.0	64.8 ± 26.3	62.9 ± 28.8	57.2 ± 29.3 ^{a,b}
Birth head circumference (cm)	33.1 ± 1.4	33.0 ± 1.4	33.1 ± 1.5	32.7 ± 1.6 ^{a,b}
Birth head circumference (percentile)	46.4 ± 29.0	46.5 ± 28.7	46.3 ± 28.6	43.4 ± 27.9 ^{a,b}
Birth chest circumference (cm)	31.9 ± 1.6	31.9 ± 1.8	31.9 ± 2.0	31.4 ± 2.1 ^a
Placenta weight (grams)	540.0 ± 100.9	544.6 ± 105.5	563.0 ± 122.1 ^a	553.1 ± 103.7
Apgar score 1 minute	8.9 ± 0.8	8.9 ± 1.0	8.9 ± 1.0	8.7 ± 1.1
Apgar score 5 minute	9.5 ± 0.6	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7
Umbilical artery blood pH	7.307 ± 0.08	7.300 ± 0.22	7.300 ± 0.08	7.301 ± 0.84
Nulliparous (%)	73.0	39.2	70.6	35.4
Number of cigarette (/day)	—	—	—	10.0 ± 5.5

Continuous variables are shown as mean ± standard deviation. Dichotomous variables are given as percentage. BMI, body mass index. Significant differences (P value<0.05, ANOVA Bonferroni / Dunn post hoc).

a; Non smokers vs. Smoked Preconception, Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy,

b; Smoked Preconception vs. Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy

c; Smoked Through the 1,2nd Trimester vs. Smoked Throughout Pregnancy.

表 3 全解析対象者（早産を除く）の臨床的特徴

	Non smokers (n=1280)	Smoked Preconception (n=526)	Smoked Through the 1,2 nd Trimester (n=302)	Smoked Throughout Pregnancy (n=115)
Maternal Age (y)	31.5 ± 4.8	31.5 ± 4.7	29.4 ± 5.1 ^{a,b}	29.1 ± 5.4 ^{a,b}
Gestational weeks at delivery	39.6 ± 1.1	39.5 ± 1.1	39.6 ± 1.1	39.3 ± 1.1
Prepregnancy BMI (kg/m ²)	20.9 ± 3.4 ^b	21.6 ± 4.0 ^a	20.7 ± 3.7 ^b	21.4 ± 3.9
Gastational weight gain (Kg)	10.4 ± 3.7	10.4 ± 4.8	12.3 ± 4.4 ^{a,b}	10.8 ± 4.7
Birth weight (g)	3080.6 ± 351.2	3070.6 ± 367.3	3084.5 ± 438.0	2958.2 ± 360.5 ^{a,b}
Birth weight (percentile)	51.5 ± 27.0	51.1 ± 27.8	52.2 ± 29.5	43.6 ± 28.0 ^a
Birth height (cm)	50.1 ± 1.9	50.0 ± 1.8	49.8 ± 2.3	49.4 ± 2.3 ^{a,b}
Birth height (percentile)	66.4 ± 25.7	65.3 ± 25.9	63.4 ± 28.6	57.3 ± 29.6 ^{a,b}
Birth head circumference (cm)	33.1 ± 1.3	33.1 ± 1.3	33.1 ± 1.4	32.9 ± 1.4
Birth head circumference (percentile)	46.3 ± 29.0	46.3 ± 28.6	46.4 ± 29.0	43.9 ± 27.9
Birth chest circumference (cm)	32.0 ± 1.5	31.9 ± 1.7	32.0 ± 1.7	31.7 ± 1.6
Placenta weight (grams)	540.9 ± 100.0	545.1 ± 104.1	565.2 ± 121.0 ^{a,b}	557.8 ± 99.1
Apgar score 1 minute	8.9 ± 0.8	8.9 ± 0.9	8.9 ± 0.9	8.9 ± 1.1
Apgar score 5 minute	9.5 ± 0.6	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.6
Umbilical artery blood pH	7.306 ± 0.07	7.299 ± 0.22	7.299 ± 0.08	7.298 ± 0.84
Nulliparous (%)	42.1	28.3	41.7	28.7
Number of cigarette (/day)				10.0 ± 5.5

Continuous variables are shown as mean ± standard deviation. Dichotomous variables are given as percentage. BMI, body mass index.
Significant differences (P value<0.05, ANOVA Bonferroni / Dunn post hoc).

a; Non smokers vs. Smoked Preconception, Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy,

b; Smoked Preconception vs. Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy

c; Smoked Through the 1,2nd Trimester vs. Smoked Throughout Pregnancy.

(2) 直接喫煙による胎盤の組織学的変化や栄養素輸送担体の発現変化の検討

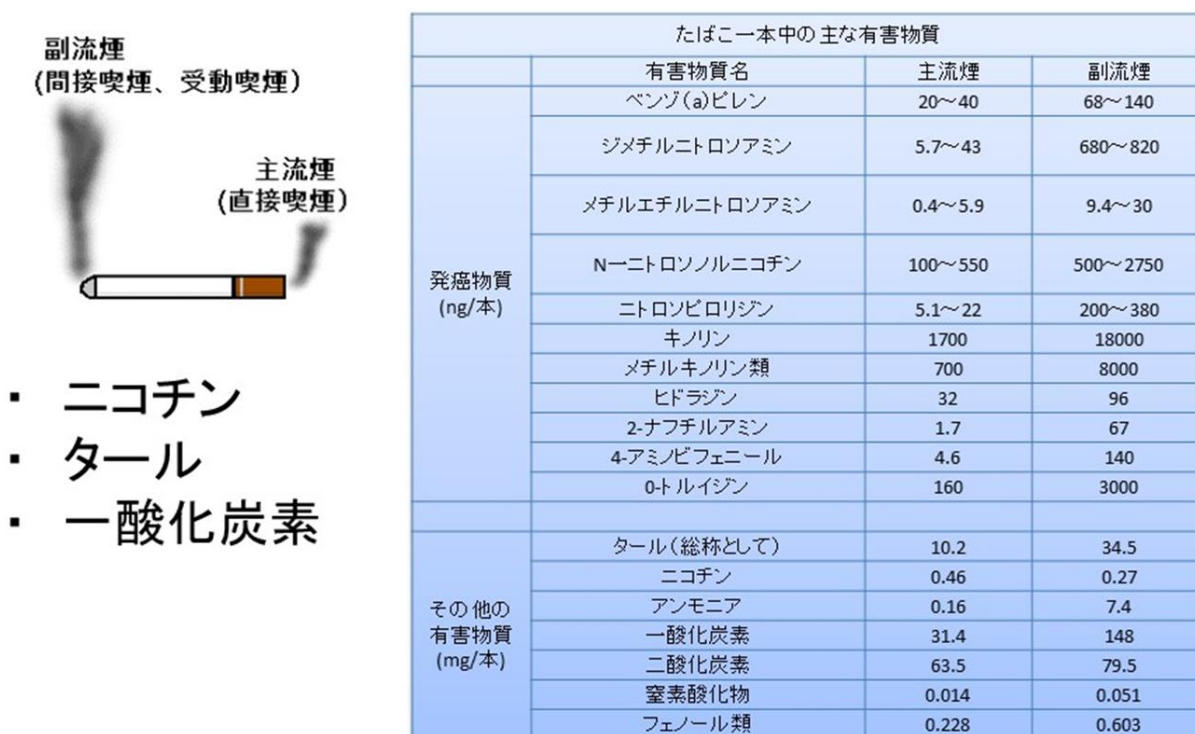


図19 主流煙および副流煙に含まれる発癌・有害物質

直接喫煙と間接喫煙は、図19に示した様に、発生する有害物質の種類は同一でも、含有する有害物質量が異なる。厚生労働省の「たばこの健康影響評価専門委員会資料」によると、タバコの煙の中には、ニコチン、タール、一酸化炭素をはじめ発がん物質を含む7000種以上の化学物質やポロニウムなどの放射性物質が含まれており、これらの成分は主流煙より副流煙の方が多いことが明らかにされている。このため、妊婦に与える影響も異なると考えられた。本研究では、まず妊婦自身が喫煙を行った直接喫煙の影響について調べた。

妊娠中も喫煙した妊婦126人のなかで24人の胎盤試料の採取が行われた。この24名を直接喫煙群とし、また胎盤栄養素輸送機能に影響を与える因子（分娩週数、妊娠前BMI値、妊娠中の体重増加量）をマッチさせた正常妊娠16人をコントロール（非喫煙）群として抽出し、喫煙群の24人を児の出生体重減少に影響の強い1日10本以上の喫煙群13人と10本以下の喫煙群11人に分けた。母体の基礎データ（年齢、分娩週数、非妊娠時BMI、妊娠中の体重増加量、胎盤重量、初経産、帝王切開率、妊娠中の喫煙本数）と新生児基礎データ（出生体重、身長、頭囲、胸囲、アプガースコア、臍帯動脈血pH値）をこの3群間で比較検討した。

表4に、これらの非喫煙群と直接喫煙群の臨床的特徴を示した。分娩年齢は非喫煙群と比較し1日10本以下の喫煙群で有意に若かった（ $P=0.01$ ）。分娩週数は非喫煙群と比較し、1日10本以上の喫煙群で早い傾向にあった（ $P=0.05$ ）。非喫煙群、喫煙群ともに非妊娠時のBMIは標準であり、妊娠中の体重増加量も推奨される至適範囲内であったことより、胎児発育へ影響を与えうる母体の妊娠前、妊娠期間中の栄養状態は3群間で同等であった。アプガースコア値と臍帯動脈血pHを指標とした出生直後の新生児予後に有意差を認めなかった。臍帯動脈血pHにも3群間に差を認めなかった。

図20に新生児身体計測結果を棒グラフで示した。出生体重は喫煙群で低い傾向であったが、有意

差は認めなかった (3137 ± 222 vs 2960 ± 275 , $p=0.075$)、(3137 ± 222 vs 2821 ± 588 , $p=0.061$)。胎盤重量は3群間で差は認めなかった。初産妊婦の割合や帝王切開分娩の割合も3群間で差は認めなかった。一日の喫煙本数は、それぞれ0本、 5 ± 1.5 本、 11 ± 3.3 本であった。出生児の身長は一日10本以上の喫煙群で有意に低く (50.6 ± 1.1 vs 48.6 ± 3.2 , $p=0.031$)、一日10本未満の喫煙群で低い傾向にあった。頭囲は3群間で有意差を認めなかった。胸囲は一日10本未満の喫煙群と一日10本以上の喫煙群で共に有意に短かった (32.6 ± 0.9 vs 31.3 ± 1.1 , $p=0.003$)。母体に喫煙習慣のある新生児は、頭囲の発育は保たれている反面、体重、身長、胸囲が小さい傾向にあり、体幹の痩せた非対称性の発育制限を示した。これらの傾向は、全解析対象者における臨床的特徴 (表(1)-2参照) と類似していた。

妊婦の直接喫煙と胎児発育への影響を比較検討した結果、新生児の体格において3群間で出生体重に有意差を認めないものの、喫煙群の新生児の身長・胸囲は非喫煙群の児と比較して小さい傾向が認められた。3群とも頭囲の発育は保たれており、喫煙群の新生児は体幹の痩せたプロポーションを示す傾向にあった。胎児期は胎盤循環を介した特殊な循環動態にあり、特徴として臍帯から流入した酸素分圧の高い血液が最初に頭部を循環するため、正常新生児においても体幹に比し頭囲が最大径となる非対称性の発育を示す。胎盤機能低下により低酸素環境におかれた場合、胎児は脳血流再分配という適応機構により頭部循環が維持され、頭囲の発育が保たれる一方で体幹の痩せた発育不全を呈する。

今回の検討では、母体の喫煙に関係なく頭囲の発育を認めたが、非喫煙群に比べ喫煙群の新生児は有意に胸囲が小さく、明らかに体幹の痩せたプロポーションであった。過去の疫学調査でも、母体の喫煙と新生児の頭囲・大腿骨長に関連はないものの、腹囲や筋肉量の減少との関連が報告されている。以上より、今回の正期産を対象とした検討では、非喫煙群と比較し喫煙群の新生児は明らかな発育不全を示さないものの体幹は痩せており、子宮内で低酸素・低栄養環境に曝されていた可能性と適応機構が働き頭部の発育が保たれていた可能性が示唆された。

表 4 非喫煙群と直接喫煙群の臨床的特徴

	Non Smoker n=16	1-9 Cigarettes/d n=13	≥ 10 Cigarettes/d n=11	P value		
				NS vs 1-9	NS vs ≥ 10	1-9 vs ≥ 10
Age	33.4±4.6	28.3±4.9	30.9±6.2	0.010	0.239	0.280
Delivery week	40.0±0.8	39.7±1.1	38.9±1.8	0.459	0.050	0.802
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	20.7±1.9	20.2±2.3	21.9±4.1	0.469	0.358	0.224
Maternal BW gain(Kg)	10.0±2.2	12.1±3.8	10.0±8.8	0.074	0.970	0.643
Birth weight (g)	3137±222	2960±275	2821±588	0.075	0.061	0.455
Birth height (cm)	50.6±1.1	49.9±1.1	48.6±3.2	0.085	0.031	0.203
Head circumference (cm)	33.5±0.9	33.0±1.2	32.6±2.4	0.229	0.224	0.660
Chest circumference (cm)	32.6±0.9	31.3±1.1	31.5±2.4	0.003	0.110	0.843
Apgar score 1minute score	8.9±0.2	8.9±0.2	8.9±1.0	0.884	0.917	0.963
5minute score	9.6±0.4	9.5±0.5	9.3±0.6	0.429	0.156	0.480
Umbilical cord artery-pH	7.28±0.09	7.29±0.12	7.30±0.05	0.838	0.603	0.840
Placental weight (g)	527±86.6	509±66.5	524±120.8	0.526	0.937	0.692
primiparity (%)	37.5	38.4	27.2	0.960	0.597	0.582
C/S ratio (%)	12.5	7.6	18.1	0.686	0.697	0.461
Number of cigarettes (/day)	0	5±1.5	11±3.3	—	—	—

Non Smoker or NS: matched control 非喫煙群、1-9 Cigarettes/d or 1-9 : 一日10本未満の喫煙群、≥10 Cigarettes/d or ≥10 : 一日10本以上の喫煙群

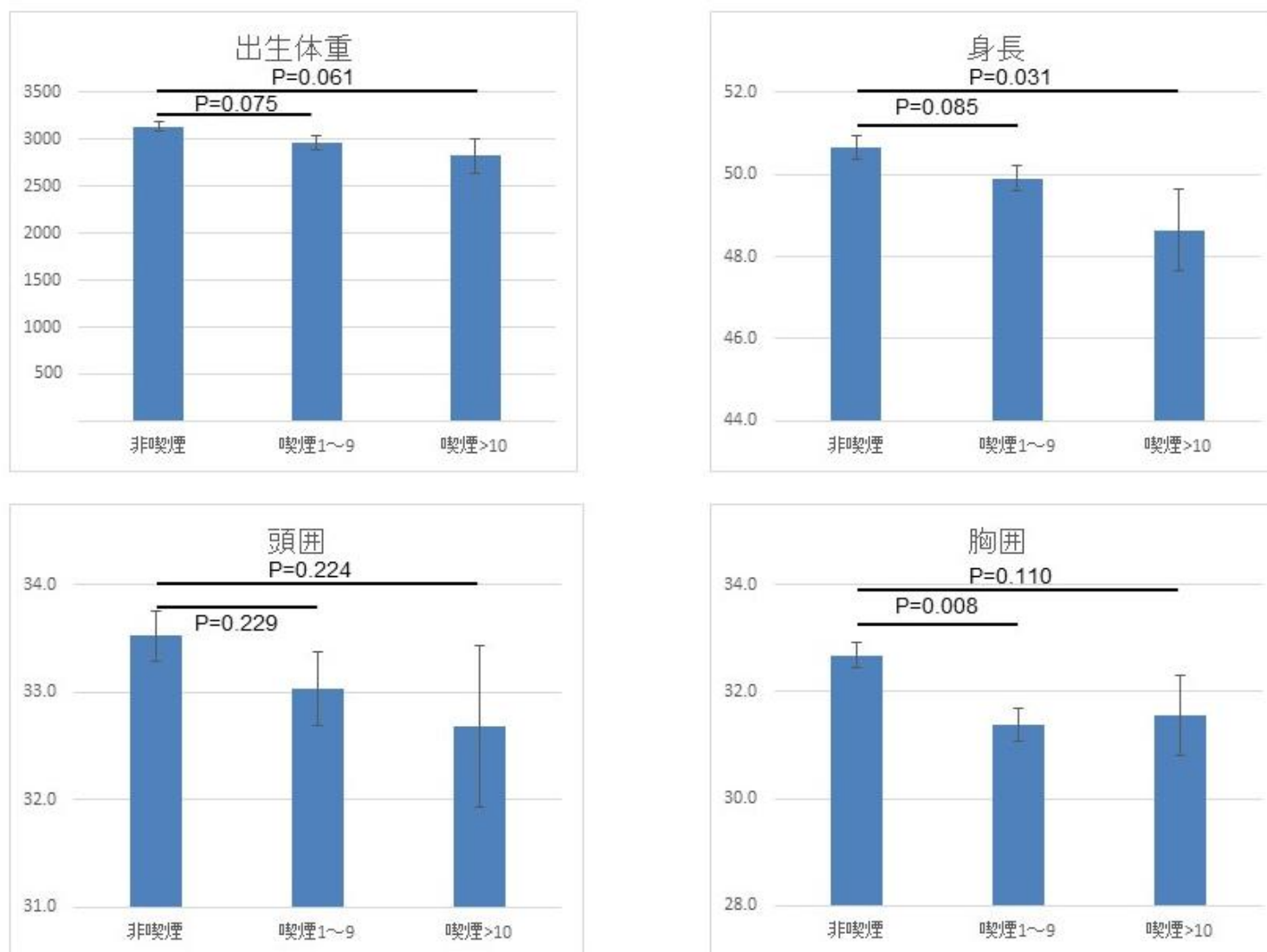


図20 新生児の身体測定結果

胎盤の病理組織学的分析および胎盤栄養素輸送機能の分析

(胎盤の病理組織学的分析)

ホルマリン固定胎盤のHE染色標本の画像解析により、病理組織学的分析を行った。分析は、a. 合胞体栄養膜細胞数の定量化 b. 血栓・梗塞範囲の定量化 c. 絨毛間腔（胎盤内の母体血流スペース）d. 末梢絨毛の発達度の評価 e. 絨毛膜羊膜炎の有無 f. 螺旋動脈再構築障害（HE染色標本では評価が難しく、評価法を新たに検討する必要があった）の定量化の評価を行った。

この結果を表5に示した。非喫煙群と喫煙群間で胎盤栄養素輸送を担う合胞体栄養膜細胞数や絨毛間腔（胎盤内の母体血流スペース）に変化は認められなかったが、血栓・梗塞巣の割合は喫煙群で低い傾向であった。これは、一般的な喫煙による血液凝固異常と異なるため今後さらに慎重に分析する必要があると考えられた。

Glycocalyxは、合胞体栄養膜細胞の母体面に存在する高分子糖タンパク質である。膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンを中心とするSyndecan1～4で構成され、種々のタンパクや増殖因子と結合し細胞間の接着や情報伝達機能を有している。血管内皮では血管透過性や血液凝固機能を調節し、抗炎症作用などの機能も有している。Glycocalyxは血管内皮細胞障害のマーカーとされており、全身の血管内皮細胞障害を主病態とする妊娠高血圧症候群や胎児発育不全、喫煙母体の胎盤ではGlycocalyxの構成要素であるSyndecan-1の発現が低下するとの報告がある。図5にGlycocalyxの構造と機能を示した。近年、Glycocalyxの損傷が胎児発育不全に関与することが示唆されており、今回、ホルマリン固定胎盤の免疫染色によりGlycocalyxの主要構成要素であるSyndecan-1の発現について調べた。図2-1に非喫煙群と直接喫煙群のSyndecan-1に対する免疫組織学的染色の結果を示した。胎盤におけるSyndecan-1の発現は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞の母体面に認められた。Syndecan-1発現の程度は図2-1のように様々な程度で認められ、図1-4に示した方法により、Syndecan-1発現を定量化した。Syndecan-1発現に関する評価法については、先行研究において免疫組織染色による発現の強度を評価する際に3つの指標を用いる方法が報告されている⁸⁾。①Homogeneity、②Staining intensity、③Margeであり、①は類縁形を呈する絨毛断面周囲を覆う割合を示し、②は染色発現の強度を表しタンパクの濃度を反映する。③は絨毛周囲に発現したタンパクの厚み（幅）を示しており、それぞれ4段階でスコアリングを行う。今回はこの方法を用いて各胎盤1スライドあたり合計5視野のscoreの平均値を算出し、非喫煙群、一日10本未満の喫煙群（喫煙1～9）、一日10本以上の喫煙群（喫煙＞10）の3群間のGlycocalyx（Syndecan-1）の発現量の差を分析した。その結果、図2-2に示した様に、母体喫煙の有無により、胎盤のGlycocalyx（Syndecan-1）の発現に変化を認めた。いずれの指標も、非喫煙群と1日10本以下の喫煙群の比較では発現の強度に有意差を認めなかった。一方、1日の喫煙本数が10本以上の母体では、非喫煙者と比較し有意に発現の低下を認めた。母体の喫煙が胎盤の機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。非喫煙群と比較して1日10本以上の喫煙群では、3つの指標すべてにおいてSyndecan-1の発現が有意に低下しており、喫煙による胎盤の血管内皮細胞障害の可能性が示唆された。今後は喫煙と血管内皮細胞障害による胎盤機能障害との関連、さらに胎児発育不全との関連性についても検討の必要があると考えられた。

表 5 非喫煙群と直接喫煙群の臨床的特徴

	Non Smoker n=16	1-9 Cigarettes/d n=13	≥ 10 Cigarettes/d n=11	P value		
				NS vs 1-9	NS vs ≥ 10	1-9 vs ≥ 10
合胞体栄養膜細胞						
カウント数(/1080 point)	422.4±87.4	429.3±84.7	371.0±101.0	0.831	0.172	0.138
総胎盤体積あたり	215.1±52.8	211.2±41.6	192.2±87.9	0.830	0.406	0.496
単位胎盤体積あたり	0.39±0.08	0.39±0.07	0.34±0.09	0.831	0.172	0.138
血栓・梗塞範囲						
カウント(/1080 point)	75.5±33.8	43.0±24.1	50.7±28.3	0.007	0.058	0.478
総胎盤体積あたり	38.8±20.8	21.5±13.2	27.3±18.2	0.015	0.150	0.380
単位胎盤体積あたり	0.06±0.03	0.03±0.02	0.04±0.02	0.007	0.058	0.478
絨毛間腔						
カウント(/1080 point)	275.1±95.1	248.0±64.1	272.1±76.4	0.388	0.931	0.410
総胎盤体積あたり	139.3±47.7	121.4±28.0	136.7±45.0	0.243	0.888	0.342
単位胎盤体積あたり	0.25±0.08	0.22±0.05	0.25±0.07	0.388	0.931	0.410

Non Smoker or NS: matched control 非喫煙群、1-9 Cigarettes/d or 1-9 : 一日10本未満の喫煙群、≥10 Cigarettes/d or ≥10 : 一日10本以上の喫煙群

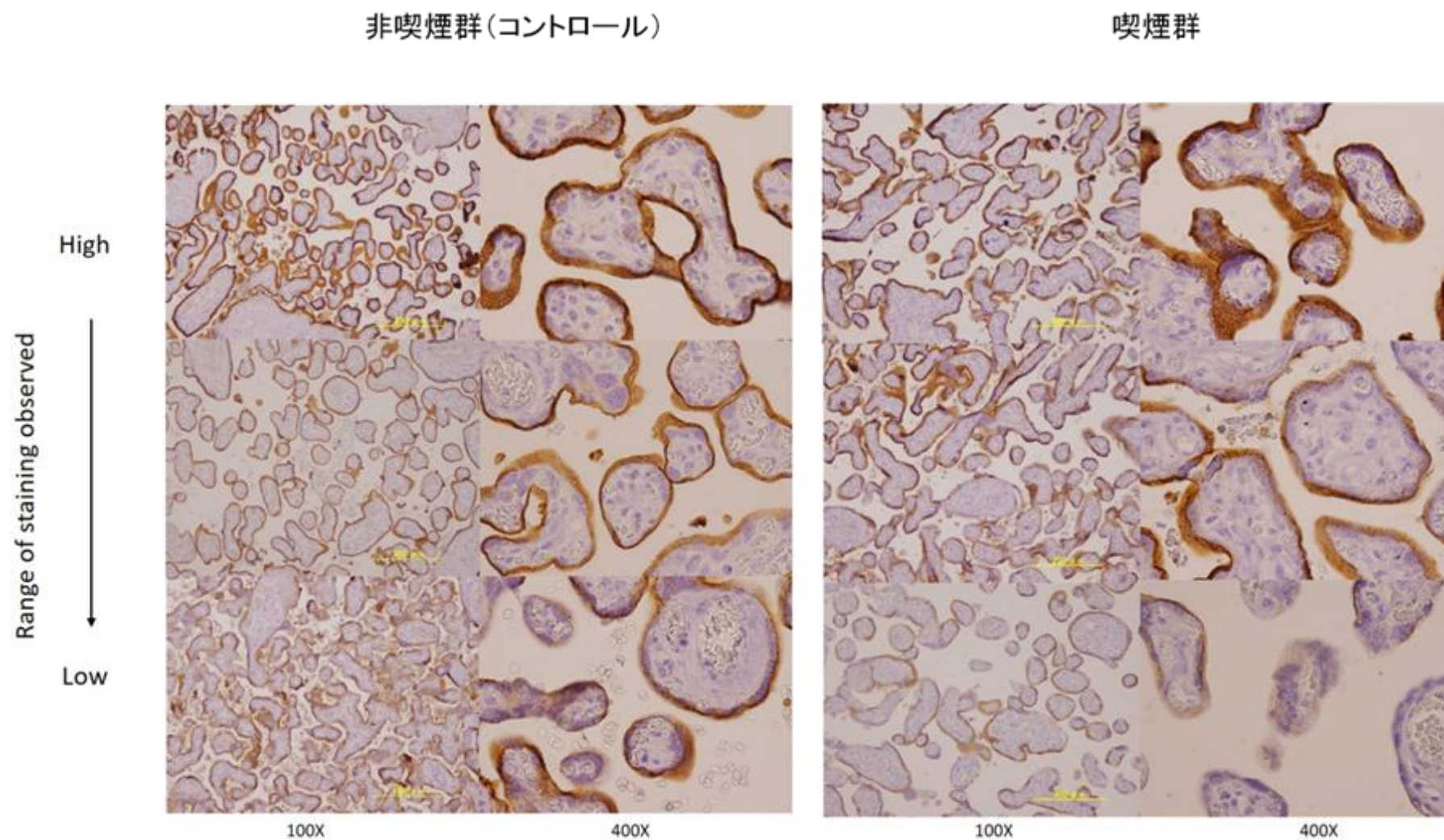


図 2 1 胎盤におけるSyncan-1発現

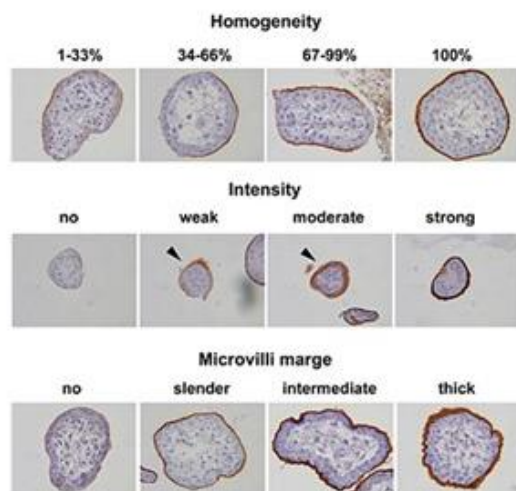


図1. Syndecan-1発現強度の評価法

*Prenatal Diagnosis Volume 32, Issue 2, pages 131-137,
14 MAR 2012 DOI: 10.1002/pd.2908*

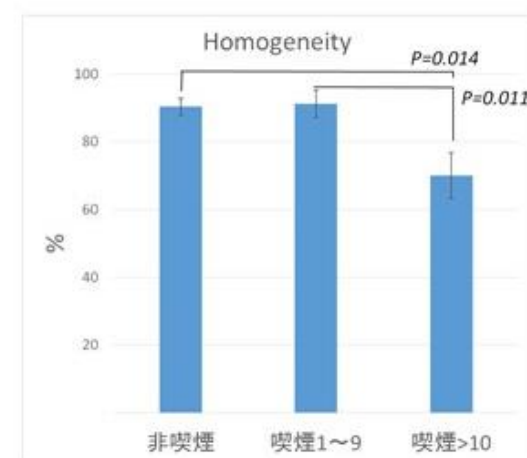
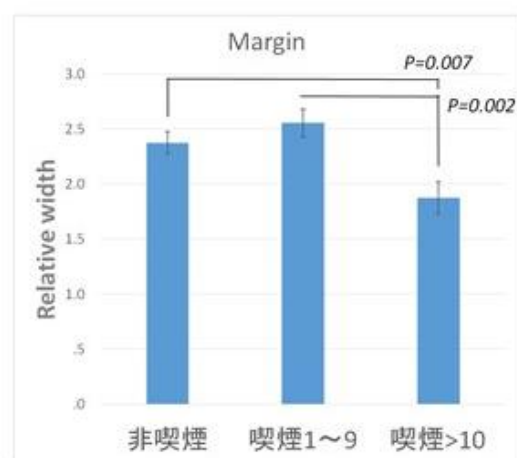
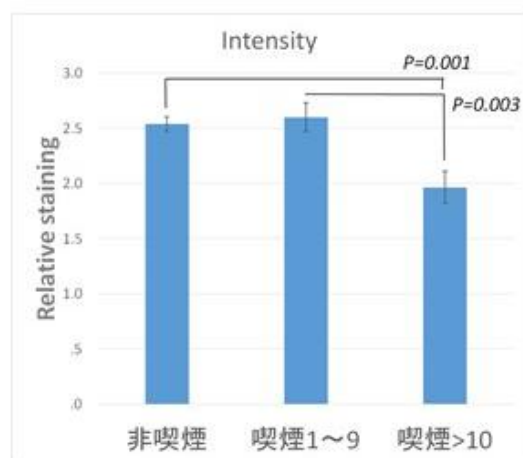
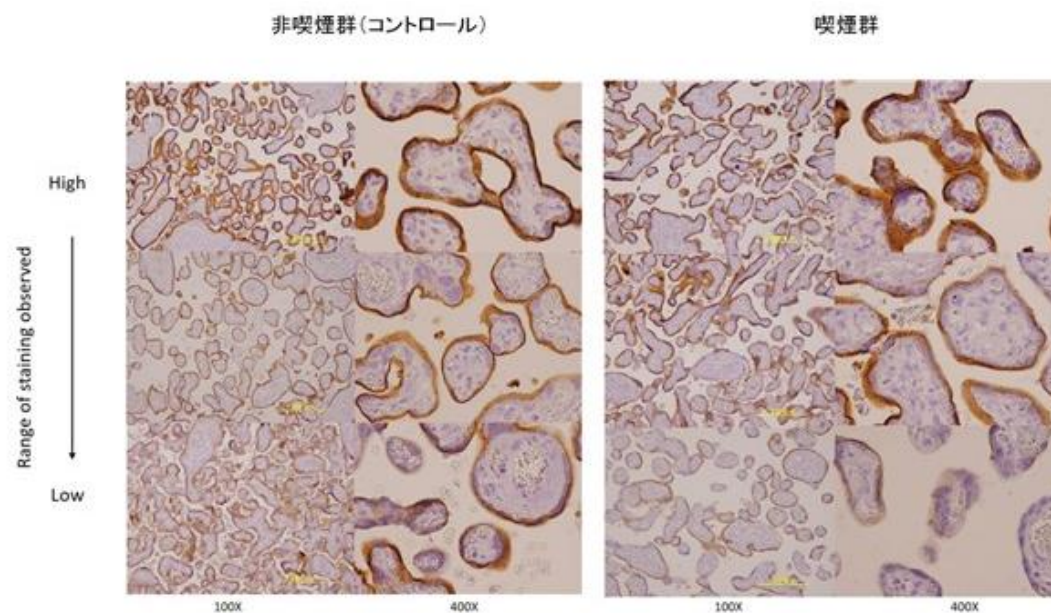


図2 2 胎盤におけるGlycocalyx (Syndecan-1) 発現量の検討

(胎盤栄養素輸送機能の分析)

次にホルマリン固定胎盤の免疫組織染色を行い、胎児発育に重要な胎盤栄養素輸送担体の発現の局在と程度を評価した。栄養素輸送担体は、糖：GLUT1、アミノ酸：systemL (LAT1) およびsystemBo (ASCT2)、遊離脂肪酸輸送関連因子 (FAT:fatty acid translocase/CD36) について検討した。胎盤の酸化ストレスは脂質過酸化修飾タンパク質である4-hydroxy-2-nonenal修飾タンパク質 (HNE) の発現について検討した。免疫組織標本1切片につき5視野の染色強度をスコアリングし (染色なし=0点、弱い染色=1点、中等度の染色=2点、強い染色=3点)、胎盤栄養素輸送担体の発現の程度を比較検討した。

胎盤の栄養素輸送を担う絨毛の合胞体栄養膜細胞には、母体血と接する微絨毛膜側と胎児血管と接する基底膜側にそれぞれ特異的な膜輸送機構が存在しており、アミノ酸輸送に関してはNaイオン依存性の有無と輸送基質選択性により種々の輸送系に分類されている。この膜輸送体を通じ母体側から胎児側にアミノ酸の能動輸送が行われるため、母体血より胎児血中のアミノ酸濃度が高くなるが、胎児発育不全例では正常例と比較して特に必須アミノ酸濃度が低いことが証明されている。本検討では、ロイシン、イソロイシン、バリンなど必須アミノ酸を輸送するL型アミノ酸輸送体タンパク：LAT1と、輸送体のエネルギー源として中心的役割を果たすグルタミン酸などの中性アミノ酸を輸送するASCT2を選択した。図2-3にL型アミノ酸輸送タンパクであるLAT1およびBo型アミノ酸輸送タンパクであるASCT2の発現の局在を、図2-4に発現強度を示した。同様の手法を用いて、胎盤の糖輸送タンパクであるGLUT1、脂肪酸輸送タンパクであるFTA/CD36、さらに喫煙は肺臓では酸化ストレス障害の原因となるため、胎盤の酸化ストレス障害を評価するため、脂質過酸化修飾タンパク質である4-hydroxy-2-nonenal modified proteins (HNE) の発現と局在と染色強度についても分析を行った。図2-5にこれらのタンパク質の発現強度を示した。

LAT1は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞全体に局在しており、ASCT2は合胞体栄養膜細胞の基底膜に局在していた。染色強度の比較では、必須アミノ酸を輸送するLAT1は、非喫煙群と比較し1日10本以上の喫煙群で発現が低下する傾向を認めた ($P=0.052$)。ASCT2の発現強度においては、3群間で統計学上の有意差は認めなかった。先行の研究では、胎児発育不全例において胎盤のL型アミノ酸輸送体タンパクの発現低下と臍帯血中の必須アミノ酸濃度が低いことが報告されており、何らかの原因により母体血中から胎児側へのアミノ酸輸送の障害がおきていることが予想される。今回の検討では喫煙群の胎盤でLAT1の発現が低下している傾向にあり、過去に報告されている胎児発育不全例の胎盤所見と同様の結果であった。母体喫煙の有無により新生児の体格に違いが認められていることから、喫煙の影響を受けた胎盤の栄養素輸送体の発現に変化がおこり胎児発育へ影響している可能性が示唆された。一方で中性アミノ酸を輸送するASCT2では喫煙の有無で有意差を認めなかったことより、喫煙の影響によるアミノ酸輸送体タンパク発現の変化は輸送体ごとに異なる可能性が示唆された。

糖、脂肪酸輸送タンパク、脂質過酸化修飾タンパクにおける発現の局在は、GLUT1、FTA/CD36、HNEすべて合胞体栄養膜細胞全体に認められたが、非喫煙群と喫煙群の間に発現の差は認められなかった。

胎盤において糖は濃度勾配によって細胞内に促進拡散されるが、この促進拡散を担っている輸送体がグルコーストランスポーター (GLUT) であり、GLUT1は主に血液組織関門に豊富に存在し、中でも脳の血管内皮や胎盤の絨毛細胞ではグルコースの関門となっている。GLUT3はヒト胎盤では絨毛細胞や血管内皮に発現する事が示唆されている。胎児血のグルコース血中濃度は、母体血の約80%前後であり、グルコースの母体から胎児への供給は、胎盤に存在するGLUT1、GLUT3を介するものと考えられている。グルコースの必要量は妊娠後期に向かって増加し、またGLUT1が主として局在する合胞体栄養膜細胞の発現も後期にかけて優位となることから、ヒト胎盤におけるグルコース輸送にはGLUT1が主たる役割を果たしていることが推察される。今回の検討ではGLUT1の発現量と母体の喫煙との間に直接の関連性を認めなかったが、

母体高血糖と巨大児の関係など糖と胎児発育との間には密接な関わりが存在していることは明らかである。今後は糖輸送に関して輸送体タンパク発現数の他に、糖輸送を規定する因子を含めた総合的な栄養素輸送機構として他因子との関連についても検討をすすめる予定である。

胎盤の脂肪酸輸送に関して、母体の直接喫煙と輸送タンパク発現の定量との間に直接の関連性は認められなかった。しかし、栄養素輸送機能を規定する因子には輸送体の発現数だけではなく、細胞内における発現部位、輸送体の活性、活性に影響する環境条件など多くの関連因子が存在する。現在のところ脂肪酸輸送担体の存在や輸送メカニズムそのものに未解決な部分が多く、疾患との関連については今後の研究課題と考えている。

LAT1

必須アミノ酸をNaイオン非依存性に輸送する。胎児発育不全では臍帯血の必須アミノ酸濃度が低く、胎児発育との関連が示唆されている。

ASCT2

アラニン、セリン、システイン、グルタミンなどの中性アミノ酸の輸送を担う。

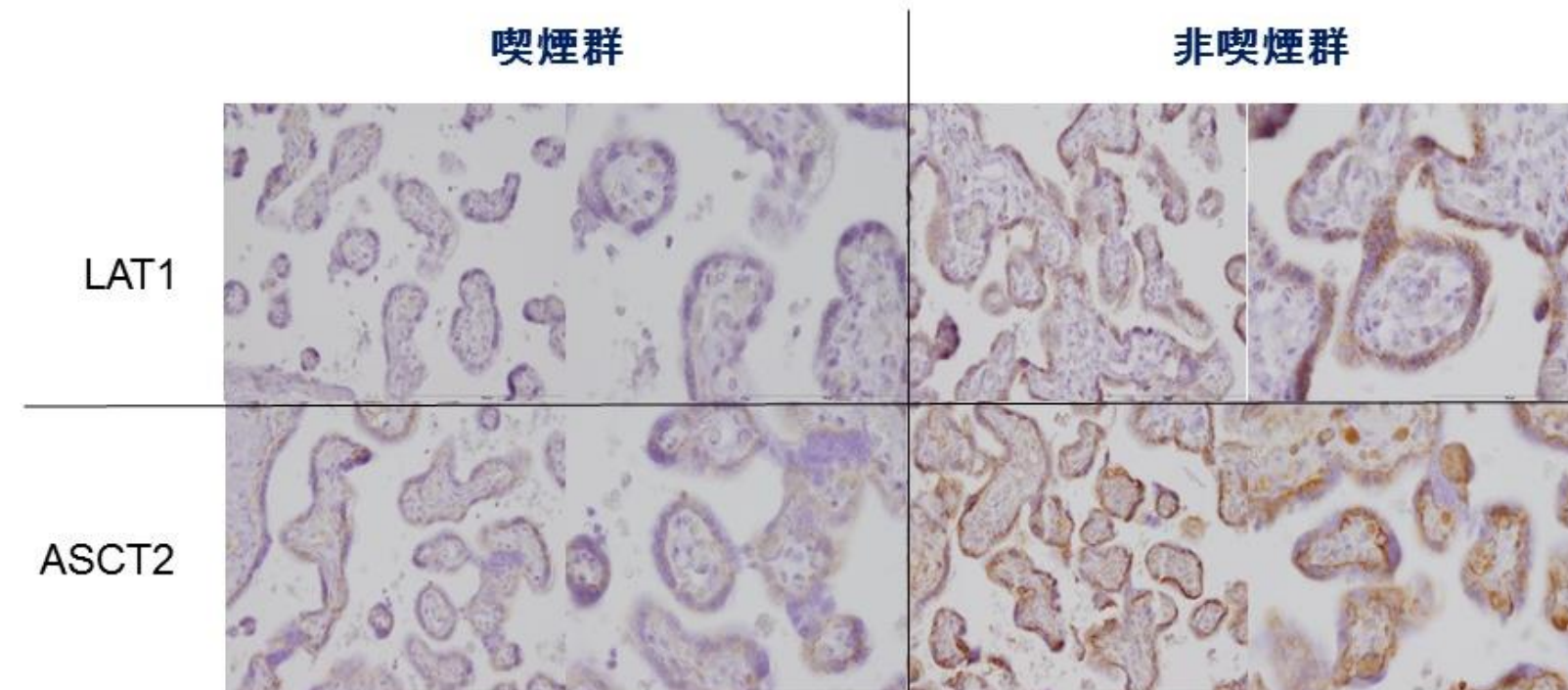
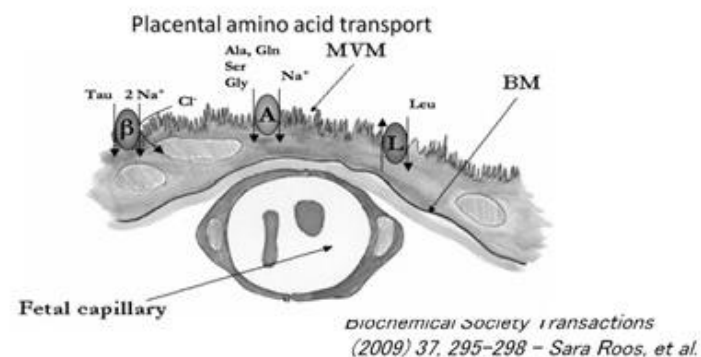
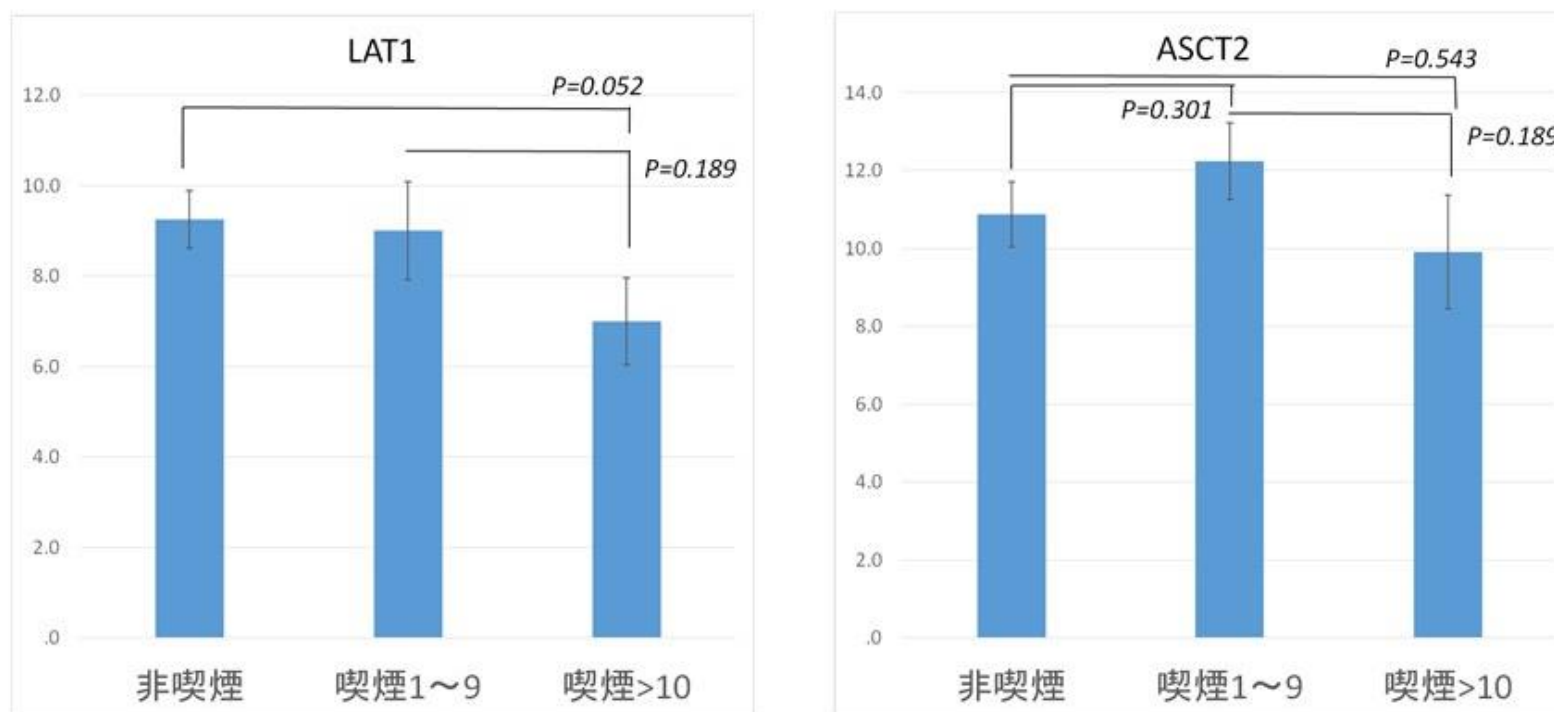


図 2 3 L型アミノ酸輸送タンパク (LAT1) およびBo型アミノ酸輸送タンパク (ASCT2) の発現

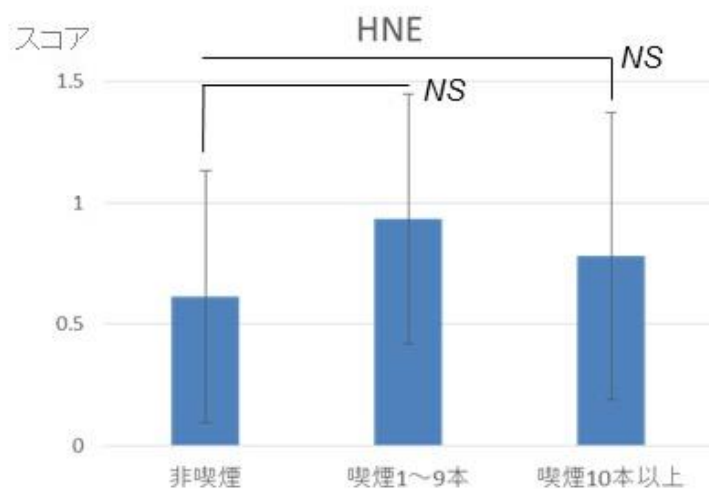
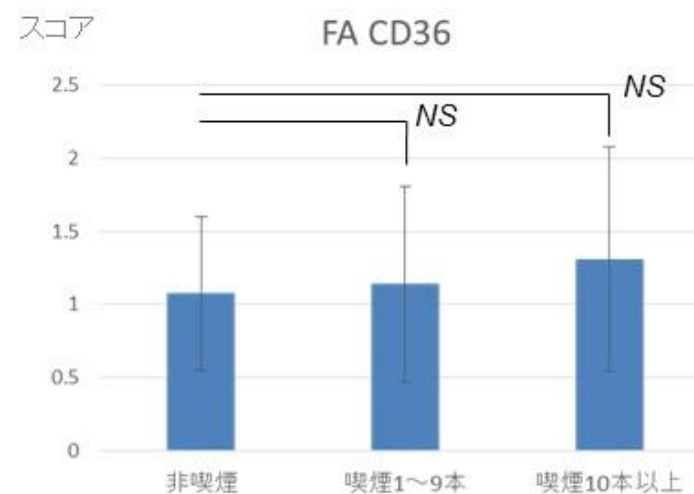
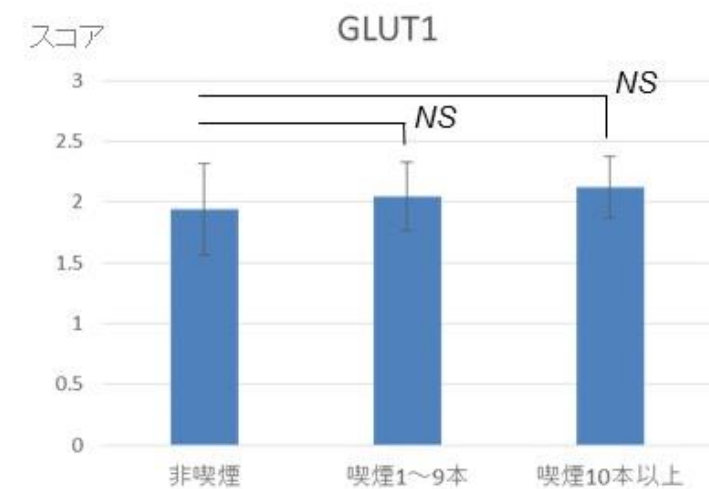


アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法

染色強度を、Score 0 (no signal), 1 (weak signal detected), 2 (moderate), 3 (strong)に分類し、1スライドあたり合計5視野のscoreの平均値を算出した。

Dhingra S, et. al (Int J Clin Exp 2011)

図 2 4 LAT1、ASCT2の発現強度の比較



アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法
 染色強度を、Score 0 (no signal), 1 (weak
 signal detected), 2 (moderate), 3 (strong)に
 分類し、1スライドあたり合計5視野のscore
 の平均値を算出した。 *Dhingra S, et. al (Int J
 Clin Exp 2011)*

図 2 5 GLUT1, FAT/CD36, HNEの発現強度スコアの比較

間接喫煙による胎盤の組織学的変化や栄養素輸送担体の発現変化の検討

次に妊婦の間接喫煙（パートナーの喫煙の有無による）の影響について調べた。分析項目は、直接喫煙の影響と同様に、胎盤の組織学的分析と栄養素（糖・アミノ酸・脂肪酸）輸送担体の局在と程度について免疫組織染色標本を用いて分析した。

喫煙歴のない妊婦1312人のなかで331人の胎盤試料の採取が行われた。このなかからパートナーも喫煙したことがない30人をコントロールとし、パートナーが妊娠中喫煙を継続して行った30人を間接喫煙群とした。これらの群間では、胎盤栄養素輸送機能に影響を与える因子（分娩週数、妊娠前BMI値、妊娠中の体重増加量）をマッチさせた。表6に非喫煙群と間接喫煙群の臨床的特徴を示した。パートナーは一日平均15本程度の喫煙を行った。間接喫煙群の児の出生体重、身長、頭位、胸囲は、非喫煙群と比較して低い傾向はなかった。

表6 非喫煙群と間接喫煙群の臨床的特徴

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	P value
母体年齢	32.0 ± 3.0	30.5 ± 2.5	0.243
分娩週数	40.0 ± 1.2	39.0 ± 1.2	0.738
非妊娠時 BMI (kg/m ²)	20.7 ± 3.0	19.8 ± 2.9	0.181
妊娠中の体重増加量(Kg)	11.0 ± 2.6	11.7 ± 3.2	0.428
出生体重 (g)	3042 ± 403.9	3202 ± 458.5	0.917
(percentile)	52.7 ± 26.9	58.1 ± 30.2	0.995
身長 (cm)	50.0 ± 1.9	51.0 ± 2.0	0.043
(percentile)	73.7 ± 26.1	88.5 ± 23.8	0.028
頭囲 (cm)	33.0 ± 1.5	33.3 ± 1.1	0.252
(percentile)	43.1 ± 29.6	45.9 ± 26.6	0.317
胸囲 (cm)	32.0 ± 1.6	32.2 ± 2.2	0.306
Apgar score 1分値	9.0 ± 0.3	9.0 ± 1.0	0.120
5分値	9.0 ± 0.5	9.0 ± 0.5	0.610
臍帯動脈血pH	7.325 ± 0.1	7.330 ± 0.1	0.931
胎盤重量 (g)	500 ± 101.6	520 ± 89.1	0.278
喫煙本数 (本/日) 母:		—	
父:		15 ± 5.7	

M-, F- : 母体非喫煙・パートナー非喫煙群、M-, F+ : 母体非喫煙・パートナー喫煙群 Mean ± S.D.

P<0.05: 優位差あり

胎盤の病理組織学的分析および胎盤栄養素輸送機能の分析

表6に間接喫煙による胎盤の構造変化に関する結果を示した。間接喫煙群では単位胎盤当たりの合胞体栄養膜細胞数が少なかったが、1つの胎盤当たりの数に換算すると優位な減少とはならなかった。また、間接喫煙群では単位胎盤当たりの間質細胞数が多かったが、1つの胎盤当たりの数に換算すると優位な増加とはならなかった。これらは、胎盤機能維持のための代償機構である可能性が考えられた。

図26、27、28に示すように、パートナーの喫煙は胎盤の組織学所見、Glycocalyx構造、酸化ストレス障害、アミノ酸輸送体、脂肪酸輸送体に強い影響を与えなかった。パートナーの喫煙は、胎盤栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えられた。

しかしながら、パートナーがどのような状況で喫煙しているかは質問票からわからない。家庭内での分煙、または家庭内では喫煙していない可能性もある。さらに、直接喫煙と間接喫煙は、図19に示した様に、発生する有害物質の種類は同一でも、含有する有害物質量が異なる。厚生労働省の「たばこの健康影響評価専門委員会資料」によると、タバコの煙の中には、ニコチン、タール、一酸化炭素をはじめ発がん物質を含む7000種以上の化学物質やポロニウムなどの放射性物質が含まれており、これらの成分は主流煙より副流煙の方が多くことが明らかにされている。したがって、今回の結果が、妊婦の間接喫煙の影響について正しく反映しているか否か慎重に検討すべきであると考えられた。本研究の重要なリミテーションと考えられた。

表6 間接喫煙による胎盤の構造変化

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	P value
合胞体栄養膜細胞 カウント数(/1080 point)	354.0±65.8	276.5±81.5	0.012
総胎盤体積あたり	133.5±52.4	133.5±52.4	0.078
血栓・梗塞範囲 カウント(/1080 point)	52.7±28.3	53.4±43.4	0.963
総胎盤体積あたり	24.5±12.3	26.1±21.9	0.833
胎児血管 カウント(/1080 point)	168.7±63.7	186.1±104.6	0.629
総胎盤体積あたり	82.4±43.6	87.0±50.3	0.802
絨毛間腔 カウント(/1080 point)	284.4±79.5	298.2±65.4	0.599
総胎盤体積あたり	132.6±34.3	142.1±41.5	0.527
間質 カウント(/1080 point)	220.2±48.7	265.8±59.1	0.039
総胎盤体積あたり	102.5±21.6	126.8±39.1	0.074

M-, F-: 母体非喫煙・パートナー非喫煙群、M-, F+: 母体非喫煙・パートナー喫煙群 Mean±S.D. P<0.05: 優位差あり

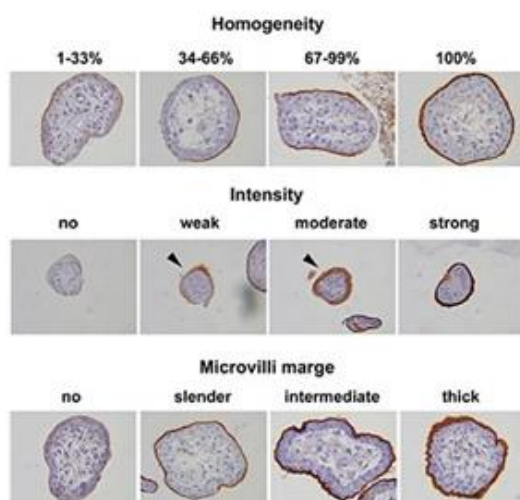


図1. Syndecan-1発現強度の評価法

Prenatal Diagnosis Volume 32, Issue 2, pages 131-137,
14 MAR 2012 DOI: 10.1002/pd.2908

非喫煙群(コントロール)

喫煙群

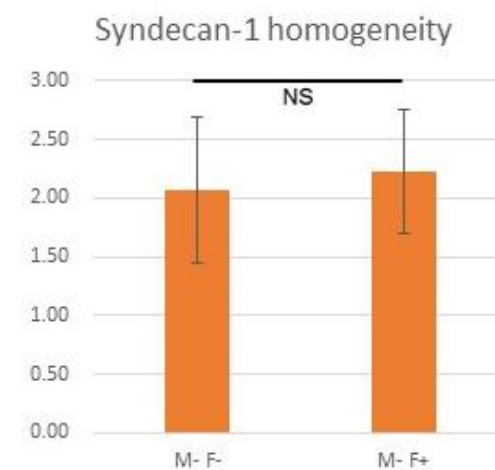
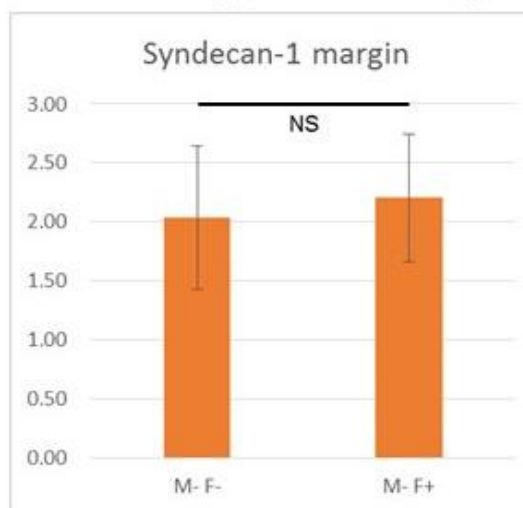
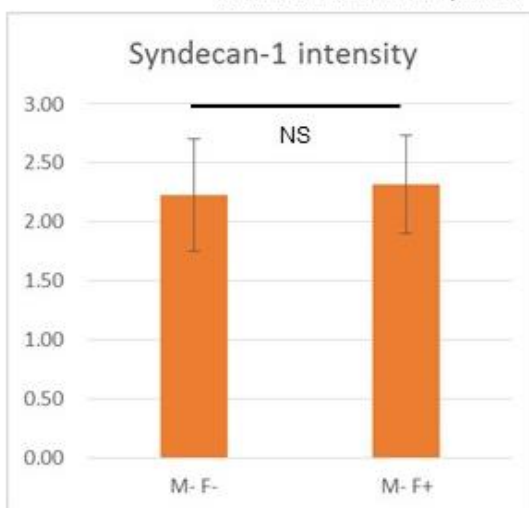
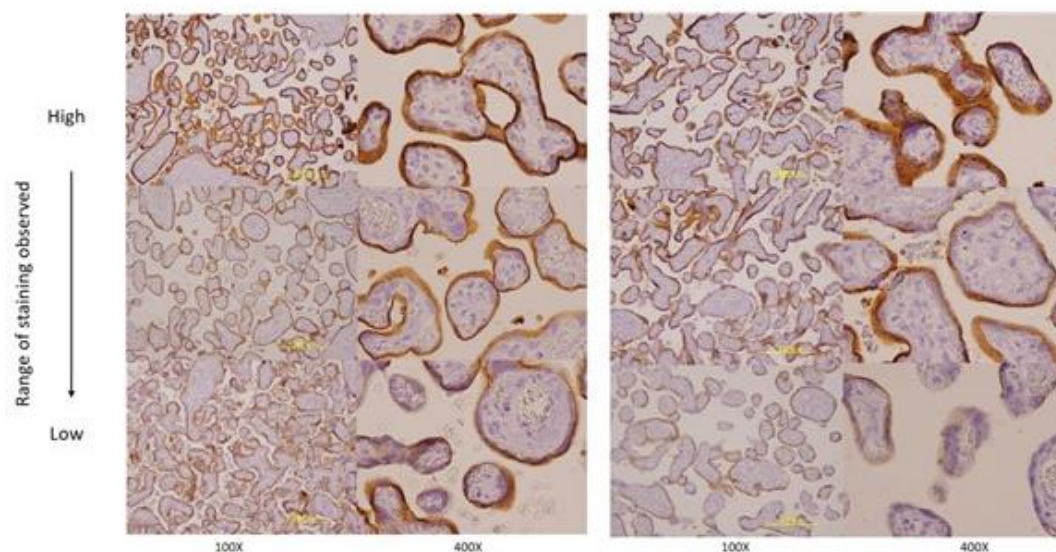
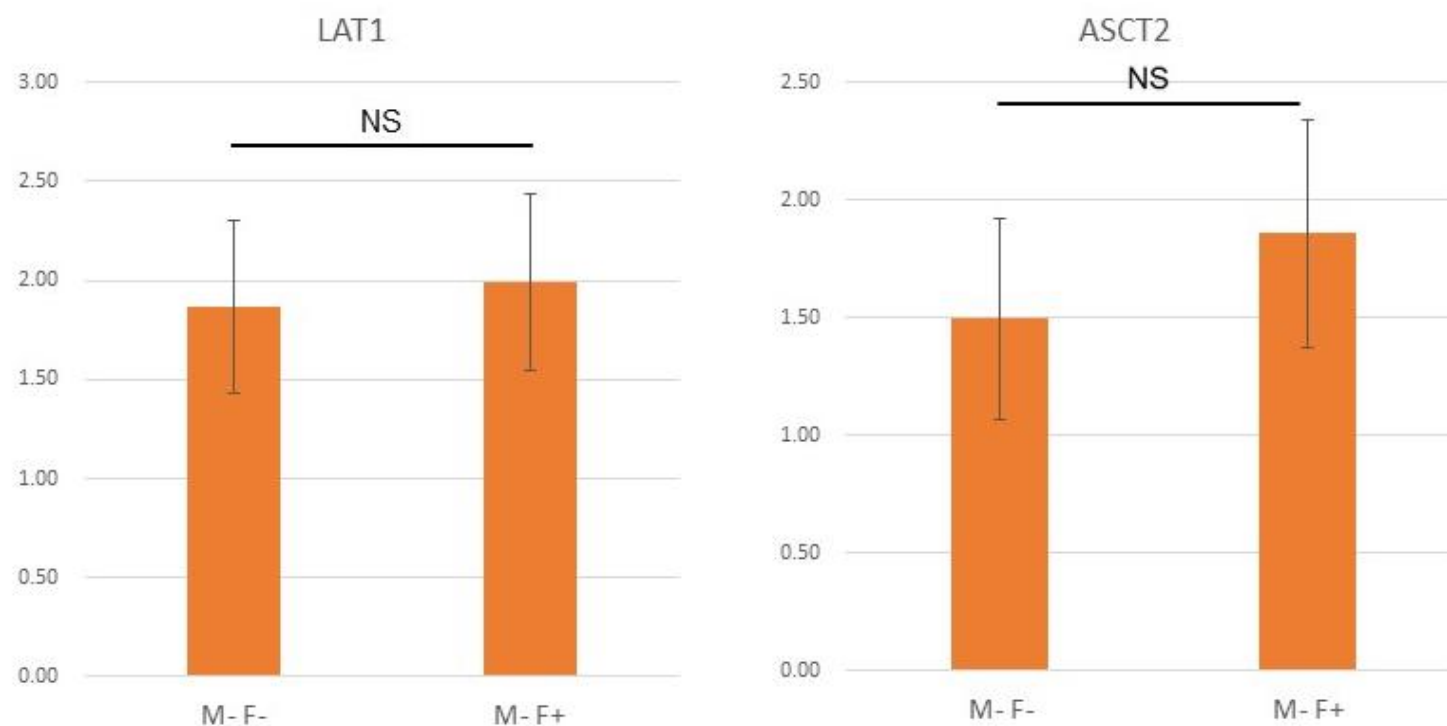


図 2 6 間接喫煙によるGlycocalyx (GCX) の発現の変化

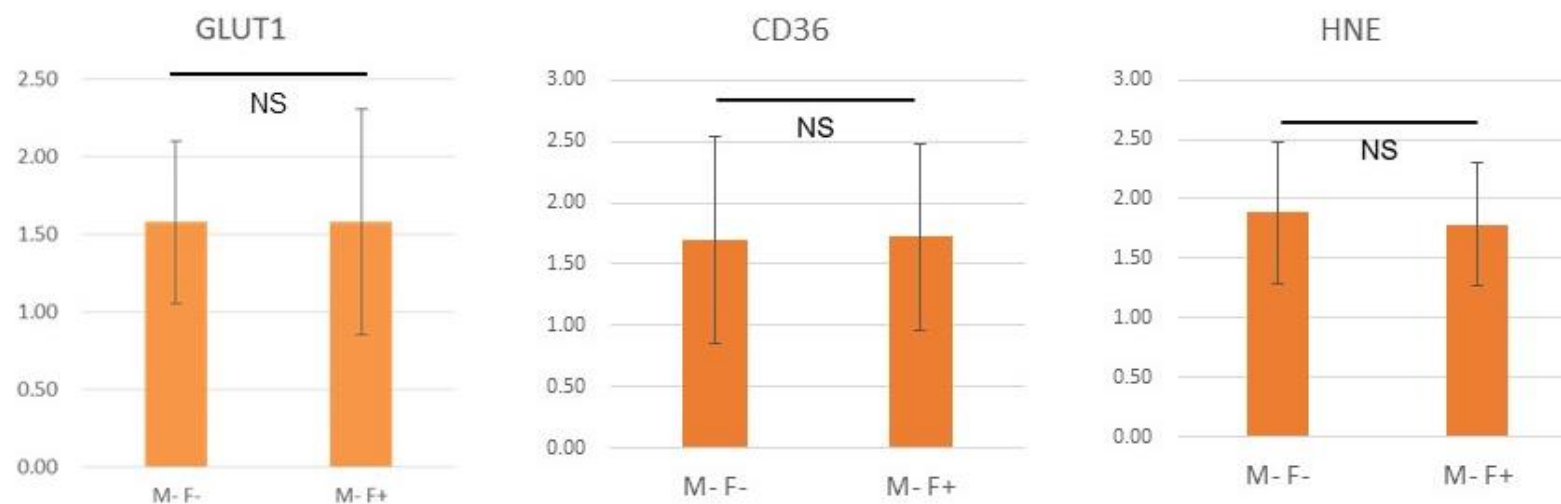


アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法

染色強度を、Score 0 (no signal), 1 (weak signal detected), 2 (moderate), 3 (strong)に分類し、1スライドあたり合計5視野のscoreの平均値を算出した。

Dhingra S, et. al (Int J Clin Exp 2011)

図 2 7 間接喫煙によるアミノ酸輸送タンパク発現の変化



アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法

染色強度を、Score 0 (no signal), 1 (weak signal detected), 2 (moderate), 3 (strong)に分類し、1スライドあたり合計5視野のscoreの平均値を算出した。

Dhingra S, et. al (Int J Clin Exp 2011)

図28 間接喫煙による糖・脂肪酸輸送タンパク発現およびHNE発現の変化

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

我々はこれまで胎盤栄養素輸送機能に関する実験を重ね、子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病における胎盤栄養素輸送修飾機構について研究報告を行ってきた。これまでの研究経験から、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見を得た。この経験を生かし、最近の我々は、重金属（メチル水銀、ヒ素、カドミウム、鉛）、アルデヒド類、プラスチック樹脂がヒト胎盤のアミノ酸輸送活性を有意に減少させることや、Polychlorinated Biphenylsが胎盤の合胞体栄養膜細胞数を減少させ、栄養素輸送機能を修飾することを示した⁵⁾。このように、母体から摂取された化学物質は直接胎児に到達しなくても、胎盤機能を修飾し間接的に胎児発育や発達を修飾し得ることを示した。また、子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群の胎盤のアミノ酸輸送の研究より、胎盤は低栄養環境において胎児にアミノ酸輸送を増加させる適応反応が存在する可能性についても研究報告を行った。今回の研究結果の最も重要な科学的意義は、図29に示した様に、妊婦への化学物質曝露（喫煙への曝露）による胎児毒性には、2つの病態が存在することが示された点である。その一つは、重金属や薬剤にみられるように、妊婦に吸収された化学物質が胎盤のバリア機構を通過して、胎児に直接作用して毒性を発揮する場合である。この理論については、多くの毒物学者が注目し、多種多様な化学物質について、その胎児毒性が証明されている。しかしながら、胎盤は分子量1000 k d以上の物質は通過が難しい。また、分子量が小さい化学物質でも、母体の血液の中で様々なタンパクやアミノ酸と結合して、胎盤に存在する、結合タンパクやアミノ酸の輸送系で胎児へ輸送される場合もある。このため、母体に吸収された多くの化学物質の胎児毒性を考える場合、胎盤曝露による胎児への間接的影響が重要であると考えている。今回我々は、喫煙が直接的胎児毒性ではなく、胎盤の分子生物学的構造異常やアミノ酸輸送障害を介した間接的胎児毒性を発揮し得ることを報告した。今後、この研究を発展させ、エコチル調査、周産期医学、我が国の環境政策へ貢献できることが重要であると考えている。

今回、エコチル調査の追加調査「環境化学物質が胎盤栄養素輸送機能に与える影響に関する研究」に900名以上の同意を得ることに成功しており、エコチル調査参加者の約700例の胎盤を保有している。また、本研究申請者は、エコチル調査の全国データを利用した成果発表「論文テーマ：妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が妊娠に及ぼす影響について、アウトカム：胎盤の異常」の執筆責任者である。この全国データを利用した研究と本研究を並行して行うことにより、妊娠女性の直接喫煙、間接喫煙、また受動喫煙が胎盤に及ぼす影響について効率良くかつ高いエビデンスレベルで解明できる。本研究は、エコチル調査のテーマである「子どもの健康に影響を与える環境因子の解明」或いは「化学物質等に対する感受性の違いを考慮したリスク管理」により効果的に貢献できるものと考えられる。

具体的な研究成果は、①妊娠期間中の喫煙を継続すると、出生児の身体計測値の変化（胎児発育制限）が生じるが、この変化は、1st trimester或いは2nd trimesterに禁煙した場合認められないことがわかった。②身体計測値の異常を有する出生児の胎盤にはGlycocalyx発現やL型アミノ酸輸送タンパク発現が低下傾向であることがわかった。前述したように、母体の喫煙が胎盤機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。これらの影響は、パートナーが喫煙している間接喫煙ではみられなかったため、パートナーの喫煙は、胎盤の組織学的構造変化や栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えられた。しかしながら、パートナーがどのような状況で喫煙しているかは質問票からわからない。家庭内での分煙、または家庭内では喫煙していない可能性もある。したがって、今回の結果が、妊婦の間接喫煙を正しく反映しているか否か疑問が残る。本研究の重要なリミテーションと考えられた。

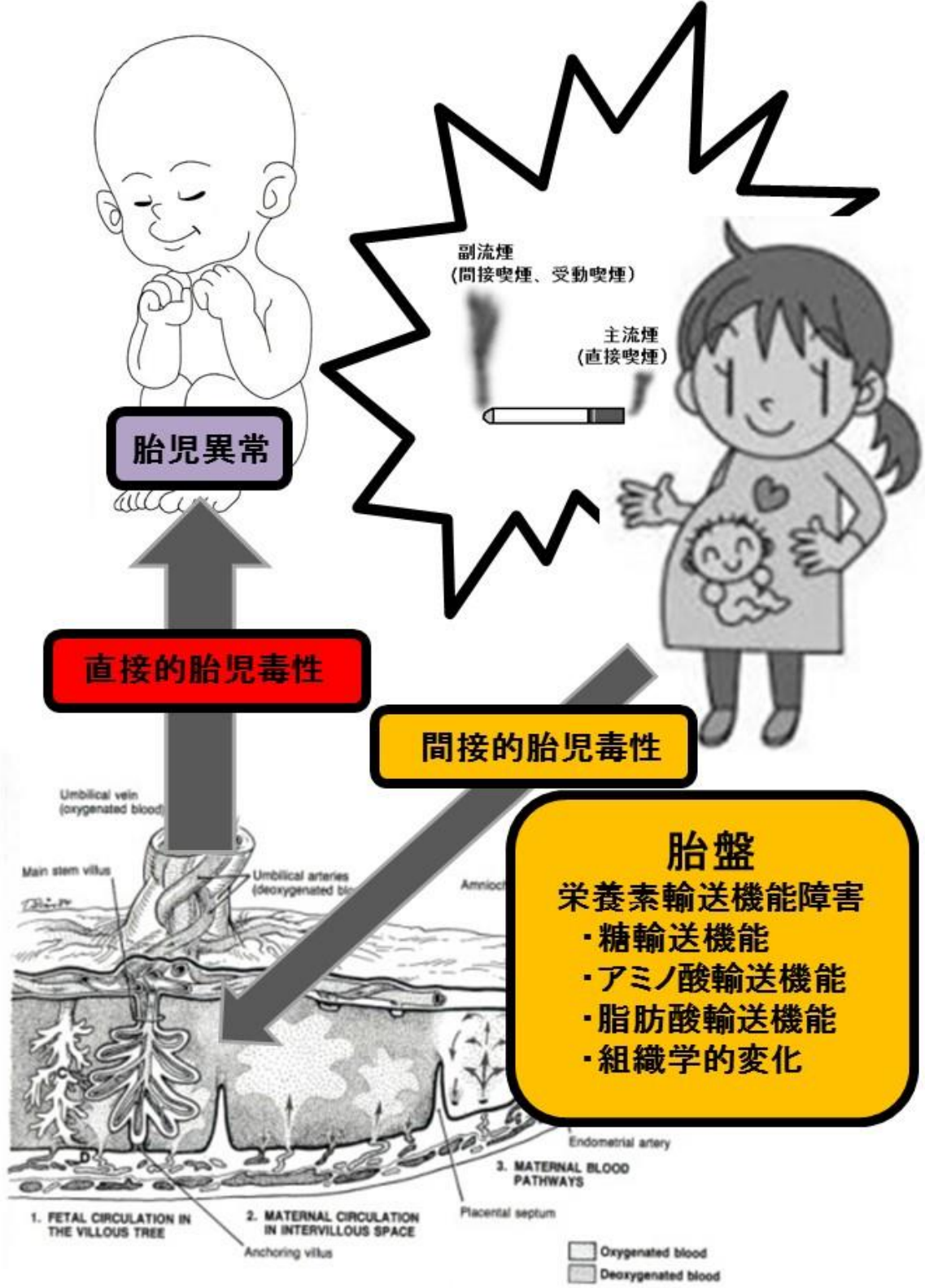


图 2 9 直接的・間接的胎兒毒性

（２）環境政策への貢献

近年、世界的に女性の社会進出が進み、生活環境やライフスタイルの変化により、多くの女性が有害物質に曝露される機会が増加している。本邦においても20～30歳代といった生殖年齢にあたる女性の喫煙率の上昇が認められ、妊婦を含め女性が曝露される最も重要な有害物質の一つは喫煙によるものである。このため、喫煙が女性生殖機能に与える影響については、重要な研究テーマである。子宮内胎児発育不全は周産期死亡率を8倍に上昇させ、精神神経発達障害、小児の肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常、また成人後の心血管疾患や糖尿病発症のリスク因子となる。胎児の正常な発育や発達には胎盤からの適切な栄養素輸送が必要不可欠である。本研究の成果により胎盤栄養素輸送機能障害を引き起こす可能性のある妊婦を取り巻く喫煙環境を把握し、生殖期或いは妊娠女性への直接喫煙や間接喫煙を軽減し、子宮内胎児発育不全を減少させることが期待される。その結果、周産期死亡率の減少による周産期医療への貢献、また小児と成人の生活習慣病減少による医療経済への多大な貢献も期待される。さらに、エコチル調査では、児の身体発達、先天異常、性分化の異常、精神神経発達障害、免疫アレルギー系の異常、代謝・内分泌系の異常の有無を出生時から12歳まで追跡調査する。糖・アミノ酸・脂肪酸は、胎児発育ばかりでなく、胎児の発達にも関与している。本研究により、胎児の栄養素獲得障害（胎盤における糖・アミノ酸・脂肪酸輸送障害など）と胎児・小児期に起こる疾患との因果関係についても明らかになる可能性がある。本研究の成果は、これらの疾患の予防や治療に貢献することも期待される。我が国をより安心した子づくりができる国にすることに貢献できる。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

妊娠期間中の喫煙を継続すると、出生児の身体計測値の変化（胎児発育制限）が生じるが、この変化は、1st trimester或いは2nd trimesterに禁煙した場合認められないことがわかった。また、1日10本以上喫煙する妊婦の胎盤にはGlycocalyx発現やL型アミノ酸輸送タンパク発現の低下が認められることがわかった。これらの影響は、パートナーが喫煙している間接喫煙ではみられなかったため、パートナーの喫煙は、胎盤の組織学的構造変化や栄養素輸送障害を介する胎児発育への影響は少ないのではないかと考えられた。このことから、①妊婦は喫煙しないこと、②妊娠中喫煙していても途中でやめること、③どうしても禁煙できない妊婦は喫煙するたばこの本数を1日10本以下に抑えることが必要であることを強く社会に発信し、子宮内胎児不全の発症予防に生かすことが必要である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 愛甲 悠希代、柴田 英治、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第51回 日本周産期・新生児医学会学術集会（2015）
「喫煙が胎盤栄養素輸送能に与える影響の検討」
- 2) 愛甲 悠希代、柴田 英治、荒牧 聡、朝永 千春、中島 貴美、稲垣 博英、蜂須賀 徹、
千手 絢子
第33回 産業医科大学学会総会 学術講演（2015）
「喫煙が胎盤機能に与える影響の研究」
- 3) 愛甲 悠希代、柴田 英治、Askew J David、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第8回 福岡県医学会総会（2016）
「喫煙が胎盤栄養素輸送能に与える影響の検討」
ポスター優秀賞受賞
- 4) 愛甲 悠希代、柴田 英治、朝永 千春、荒牧 聡、中島 貴美、稲垣 博英、蜂須賀 徹
第52回 日本周産期新生児医学会学術集会（2016）
「妊婦の喫煙が胎盤栄養素輸送機能に与える影響の検討」
- 5) 愛甲 悠希代、David Askew、辻 真弓、朝永 千春、荒牧 聡、稲垣 博英、千手 絢子、
楠原 浩一、川本 俊弘、蜂須賀 徹、柴田 英治
第34回 産業医科大学学会（2016）
「喫煙が胎盤機能に与える影響の研究 -胎盤栄養素輸送機能のおよび胎児発育不全との関連について-」
- 6) Y. AIKO, D. ASKEW, M. TSUJI, A. SENJYU, S. ARAKI, S. MOROKUMA, M. SANEFUJI, K. KUSUHARA,
T. KAWAMOTO, T. HACHISUGA, E. SHIBATA
5th Conference on Prenatal Programming and Toxicity（2016）
「Cigarette smoking during pregnancy reduces infant birth-weight by decreased protein levels of placental amino acid transporter and glycocalyx」

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

第8回 福岡県医学会総会（2016）ポスター優秀賞受賞

8. 引用文献

- 1) Gayle Windham and Laura Fenster
Environmental contaminants and pregnancy outcomes.
Fertility and Sterility, 111-16, 2008
- 2) Godfrey KM and Barker DJ
Fetal nutrition and adult disease.
Am J Clin Nutri, 1344-52, 2000
- 3) E. Shibata, C.A. Hubel, R.W. Powers, F. von Versen-Hoeynck, H. Gammill, A. Rajakumar, and J.M. Roberts
Placental system A amino acid transport is reduced in pregnancies with small for gestational age (SGA) infants but not in preeclampsia with SGA infants.
Placenta, 879-82, 2008
- 4) Regnault TR, Friedman JE, Wilkening RB, Anthony RV, Hay WW Jr.
Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR – a review
Placenta, 52-62, 2005
- 5) Tsuji M, Aiko Y, Kawamoto T, T Hachisuga, Kooriyama C, Myoga M, Tomonaga C, Matsumura F, Anan A, Tanaka M, Yu HS, Fujisawa Y, Suga R, Shibata E
Polychlorinated biphenyls (PCBs) decrease the placental syncytiotrophoblast volume and increase Placental Growth Factor (PlGF) in the placenta of normal pregnancy.
Placenta, 619-23, 2013
- 6) Van den Berg BM & Vink H Spaan JA
The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema.
Circ Res, 592-4, 2003
- 7) Nelson DM, Enders AC, King BF
Galactosyltransferase activity of the microvillous surface of human placental syncytial trophoblast.
Gynecol Invest, 267-81, 1977
- 8) Mayhew TM, Brotherton L, Holliday E, Orme G, Bush PG
Fibrin-type fibrinoid in placentae from pregnancies associated with maternal smoking: association with villous trophoblast and impact on intervillous porosity.
Placenta, 501-9, 2003
- 9) Schmedt A, Götte M, Heinig J, Kiesel L, Klockenbusch W, Steinhard J
Evaluation of placental syndecan-1 expression in early pregnancy as a predictive fetal factor for pregnancy outcome.
Prenat Diagn, 131-7, 2012
- 10) Dhingra S, Feng W, Brown RE, Zhou Z, Khoury T, Zhang R, Tan D
Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma.
Int J Clin Exp Pathol, 733-41, 2011

Impact of Active and Secondhand Cigarette Smoking of Pregnant Women on the Placental Nutrient Transport Function

Principal Investigator: Eiji SHIBATA

Institution: University of Occupational and Environmental Health

1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-city, Fukuoka, 807-8555, JAPAN

Tel: +81-93-603-1611/ Fax: +81-93-603-9337

E-mail: age-s@med.uoeh-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Active cigarette smoking, Secondhand cigarette smoking, Pregnancy, placenta, Amino acid, Glucose, Fatty acid

Cigarette smoking during pregnancy is often associated with Fetal Growth Restriction (FGR), but the underlying mechanisms were unexplained. Fetal growth depends on placental blood flow and nutrient transport system. We hypothesize that active and/or secondhand cigarette smoking during pregnancy reduces infant birth-weight by altered placental nutrient transport function.

The data utilized in the present study were obtained from the Japan Environment and Children's Study (JECS), an ongoing cohort study that began in 2011. Our sample size was 3044 parent-child pairs. We selected pregnant women who smoked more than 10 cigarettes (n=11), less than 10 cigarettes (n=13) per one day during pregnancy, and matched control (non-smokers: n=16) to see an active smoking effect on pregnancy retrospectively. To see a secondhand smoking effect on pregnancy, we also selected pregnant women who never smoked cigarettes, but whose husband smoked cigarettes (n=30) or whose husband smoked cigarettes (n=30) during pregnancy, retrospectively. Characteristics of newborn infants were assessed, the expression of placental system L amino acid transporter (AAT) protein and glycocalyx (syndecan-1) was analyzed by immunohistochemistry.

In the active smoking study, infants in total smoking groups (n=24) showed a restricted baby trunk growth compared to infants in non-smoking group (n=16). The expression of system L amino acid transporter protein (LAT1) and syndecan-1 was localized in the microvillous membrane of syncytiotrophoblast. The expression level of these proteins were decreased significantly in smoking group (more than 10 cigarettes; n=11) compared to non-smoking group ($p<0.05$).

In the secondhand smoking study, infants in total smoking groups (n=30) did not show a restricted baby trunk growth compared to infants in non-smoking group (n=30). The expression of system L amino acid transporter protein (LAT1) and syndecan-1 was localized in the

microvillous membrane of syncytiotrophoblast. The expression level of these proteins were not decreased in smoking group compared to non-smoking group.

Active cigarette smoking during pregnancy affects fetal growth adversely by decreased protein levels of placental amino acid transporter and glycocalyx, but secondhand cigarette smoking did not change infant birth-weight and those protein levels in placenta.