

【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



産業医科大学
UNIVERSITY OF OCCUPATIONAL AND
ENVIRONMENTAL HEALTH, JAPAN

産業医科大学 産科婦人科学教室
柴田 英治

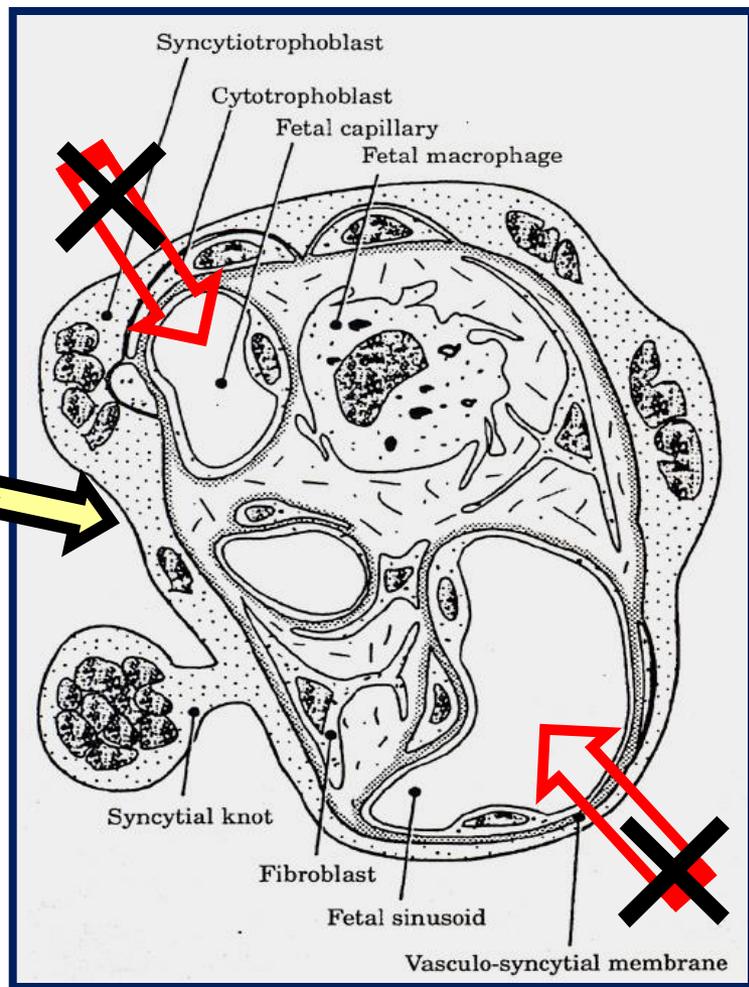
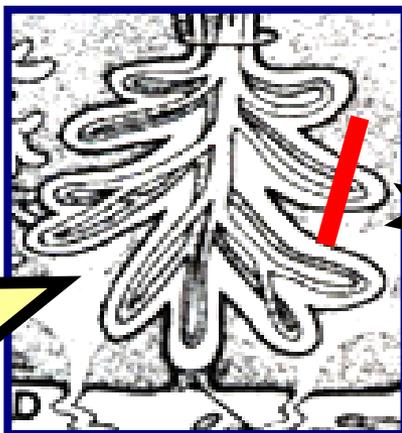
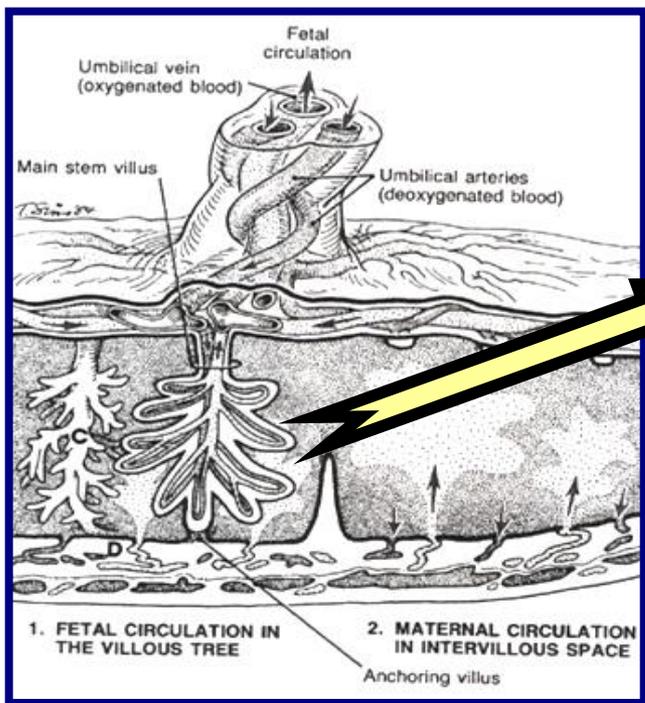
平成27・28年度環境研究総合推進費
成果報告会 2017.03.10
課題番号 【5-1553】

研究背景1

- 近年、**生殖年齢の女性喫煙率の増加が著しい**。妊婦の1日10本以上の喫煙は、**子宮内胎児発育不全を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栄養素に依存しており、胎児への栄養素供給には母体の体組成や栄養摂取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。

子宮内胎児発育遅延の成因

- ・病理学的異常
- ・栄養素輸送機能異常



研究背景2

- エコチル調査では胎盤試料の採取はなく、胎盤に関するデータは、ドクター調査表に記録された「胎盤重量と胎盤・臍帯の簡易な臨床的異常」のみである。
- 本研究の目的である喫煙が胎盤に与える構造変化や栄養素輸送機能の修飾機構を明らかにすることは、喫煙による間接的な胎児毒性の評価ばかりでなく、エコチル調査において**喫煙**という重要な交絡因子の評価にも有用である。

研究仮説

1. 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙は胎盤の病理組織学的異常を起こす。
2. 妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙は胎盤の糖・アミノ酸・脂肪酸輸送機能を修飾する。

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実施された530名
(ホルマリン固定および新鮮凍結試料)

- ・対象者にはエコチル調査とは個別にICを行い同意を取得している。
- ・本研究申請者はコアセンターおよび環境省に追加調査:「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」の承認されている。

研究計画1（平成27年度）

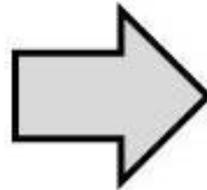
相関性の分析：

上記(1)と(2)の相関性を解析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が胎盤組織形態に与える影響を調べる。

(1)

妊婦とパートナーの 喫煙習慣

- ・喫煙の有無
- ・喫煙時期
- ・喫煙期間
- ・喫煙の程度
- ・受動喫煙 など



(2)

胎盤栄養素輸送機能

- ・組織学的分析
 - a. 栄養膜細胞数
 - b. 血栓・梗塞範囲
 - c. 絨毛間腔容積
 - d. 末梢絨毛の発達度
 - e. 絨毛膜羊膜炎の有無
 - f. 螺旋動脈再構築障害の評価
- g. 関連因子
 - ・Glycocalyx
 - ・酸化ストレス障害

胎盤病理組織学的検索

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

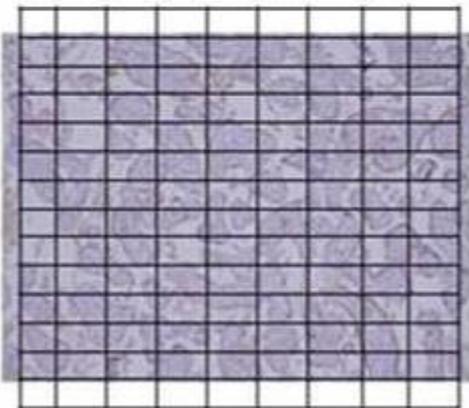


Image scored	栄養膜細胞 Trophoblast	絨毛血管 Intra-capillary	絨毛間腔 Intervillous space	出血・壊死 Non-Villous (fibroid, etc.)	total points scored
1	19	18	11	36	108
2	20	15	40	9	108
3	28	15	41	1	108
4	33	20	31	0	108
5	30	25	17	11	108
6	20	18	27	26	108
7	40	23	24	2	108
8	22	17	38	0	108
9	27	21	43	3	108
10	33	27	17	7	108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

研究計画2(平成28年度)

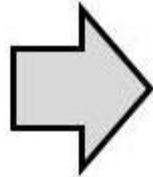
相関性の分析:

上記(1)と(3)の相関性を解析し、妊婦の喫煙並びに家庭内喫煙が栄養素輸送体に与える影響を調べる。

(1)

妊婦とパートナーの 喫煙習慣

- ・喫煙の有無
- ・喫煙時期
- ・喫煙期間
- ・喫煙の程度
- ・受動喫煙 など



(3)

胎盤機能

・栄養素輸送担体分析

a. 糖輸送蛋白

GLUT1・GLUT3

b. アミノ酸輸送蛋白

system A (SNAT1,2)

system L (4F2hc, LAT1)

systemB^o (ASCT2)

c. 遊離脂肪酸輸送関連因子

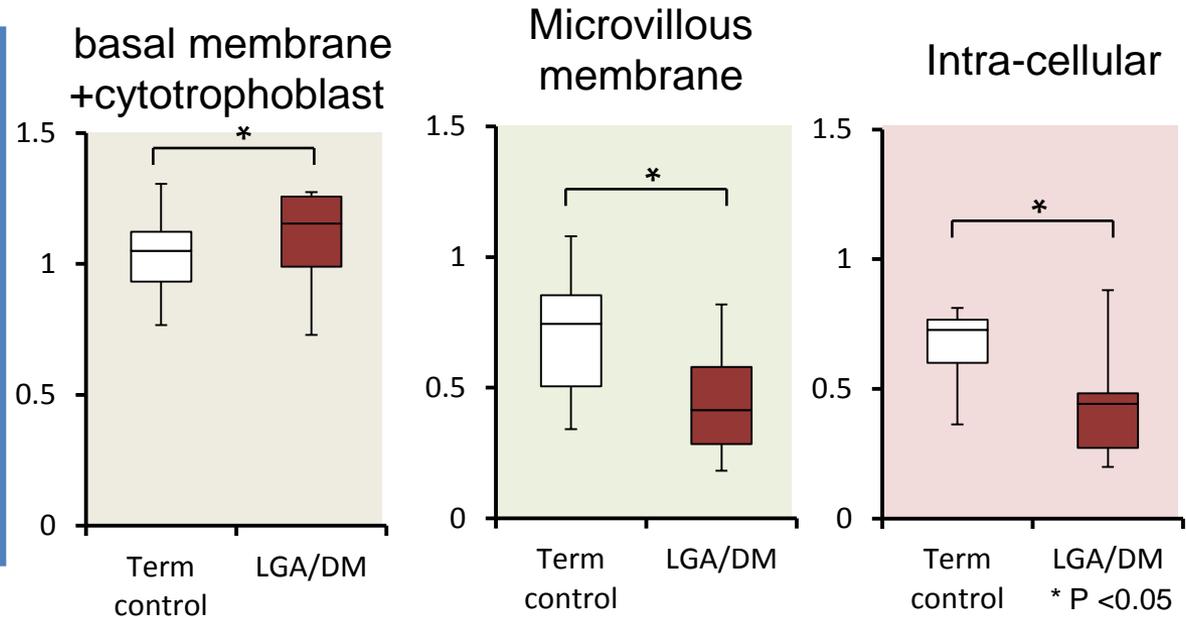
FATP: fatty acid transporter protein (FATP-2,4,6)

FABP: fatty acid binding protein (FABPpm, FABP-3,4)

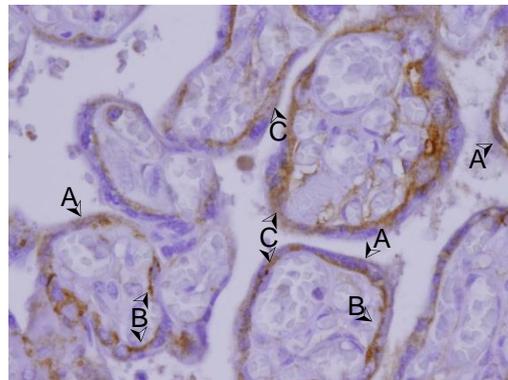
FAT: fatty acid translocase]

例 : Subcellular localization of amino acid transporter ASCT2

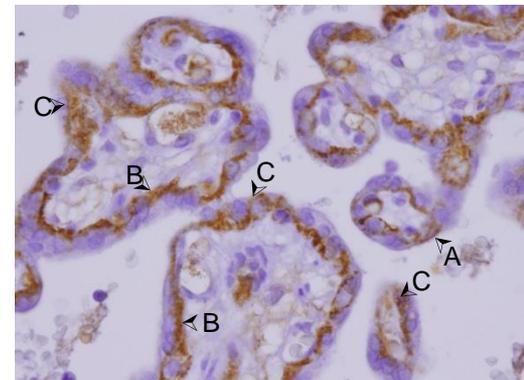
一切片につき
5視野の染色強度
をスコアリング化
(染色強度なし=0、
弱い=1、中等度=2、
強い=3)し、比較検
討した。



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

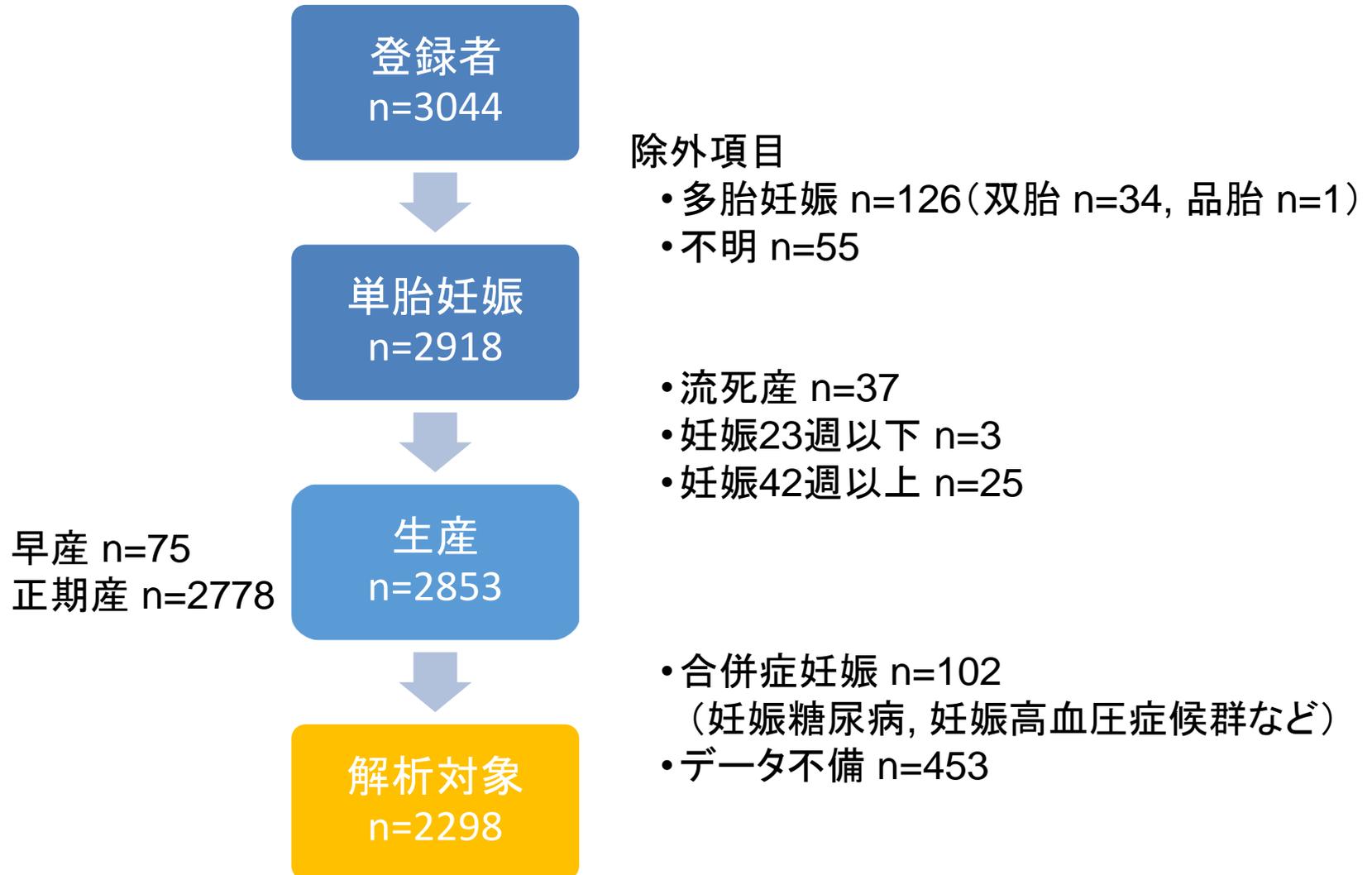


Term control

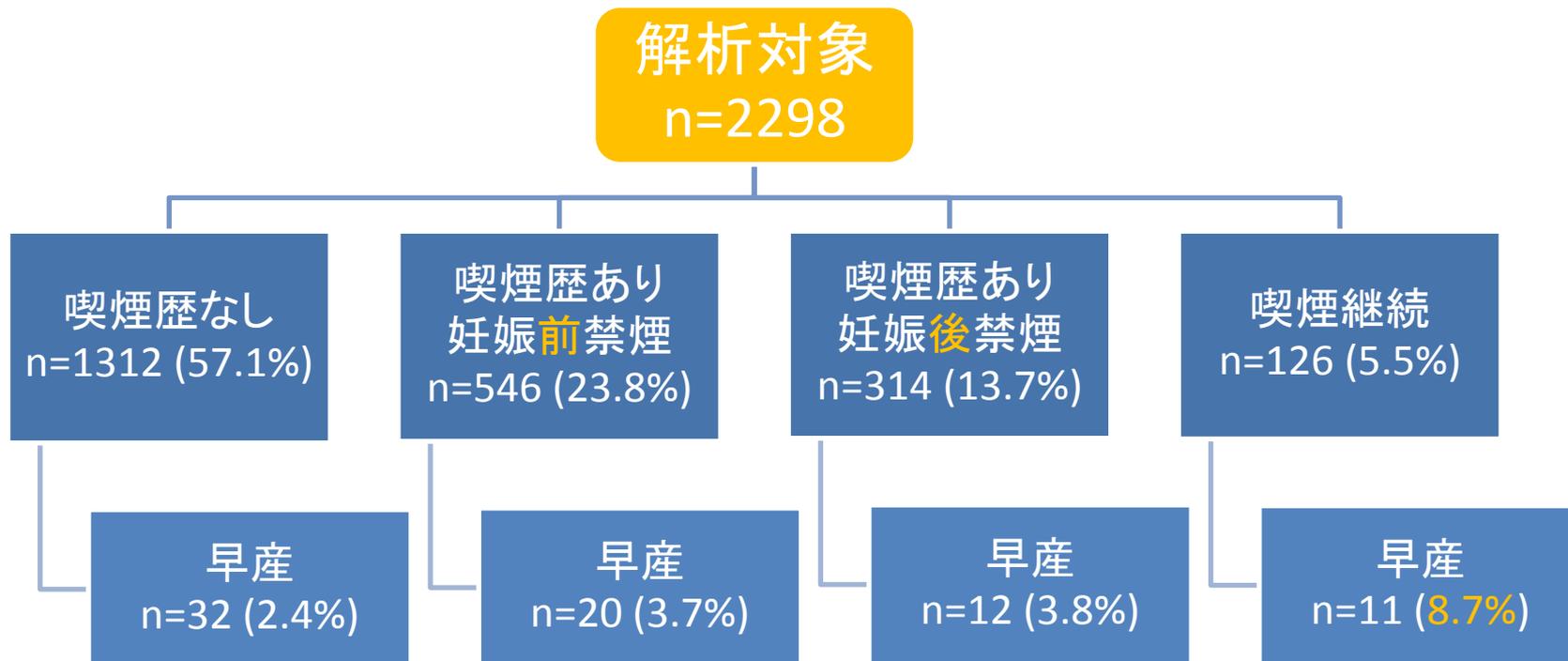


DM/LGA

エコー調査 産業医科大学SUC登録者 3044人



解析対象者2298人 喫煙歴による内訳

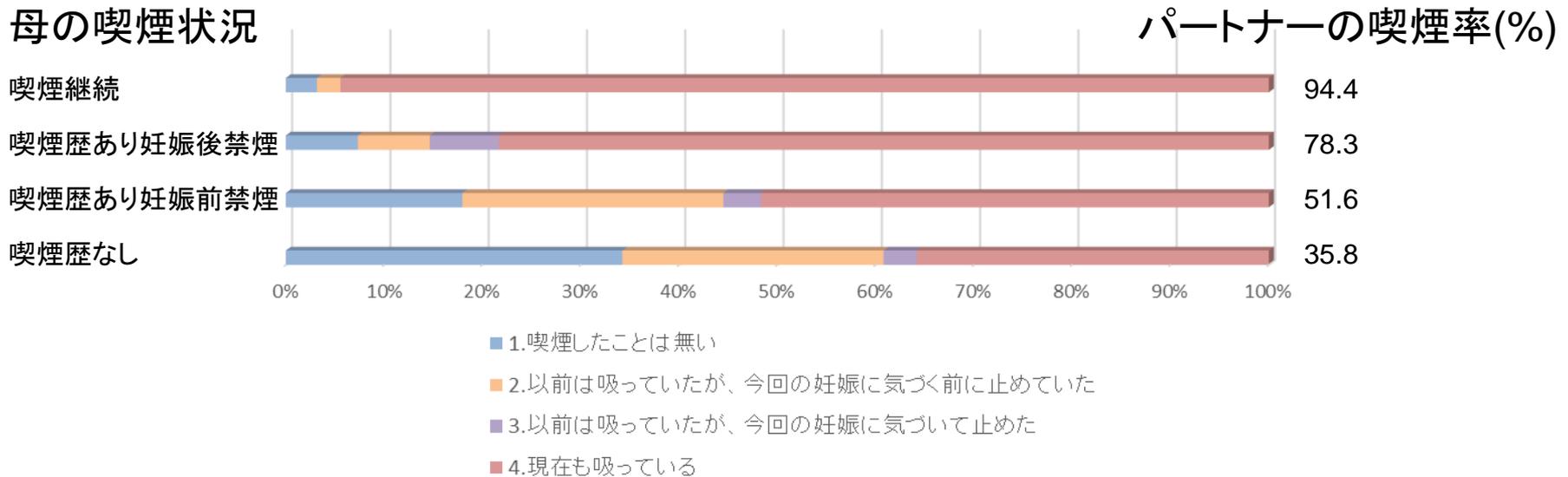


早産: 妊娠24週～妊娠41週として集計
(%) 各グループにおける早産の割合

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														
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



Characteristics of the study population (24w-41weeks of pregnancy) All data n=2298

	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).

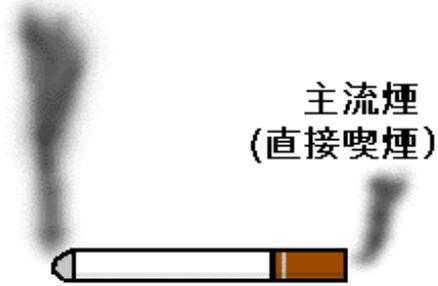
a; Non smokers vs. Smoked Preconception, Smoked Through the 1,2nd Trimester and Smoked Throughout Pregnancy,

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.

直接喫煙の影響

副流煙
(間接喫煙、受動喫煙)



- ニコチン
- タール
- 一酸化炭素

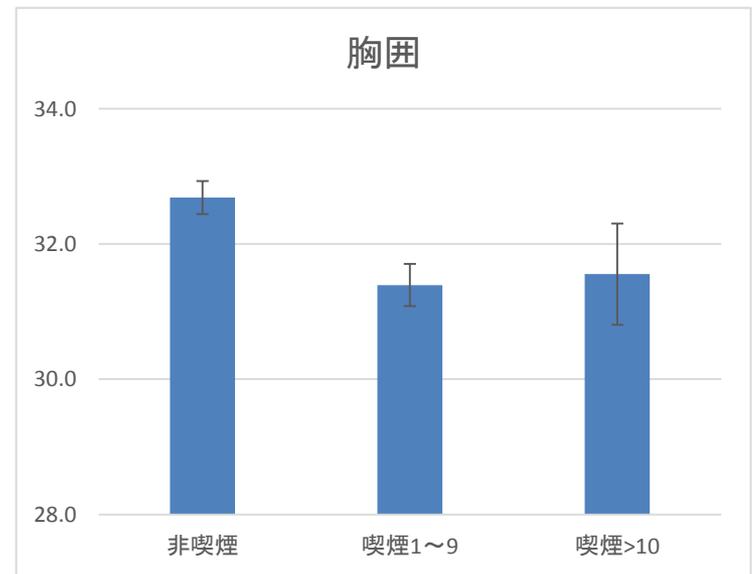
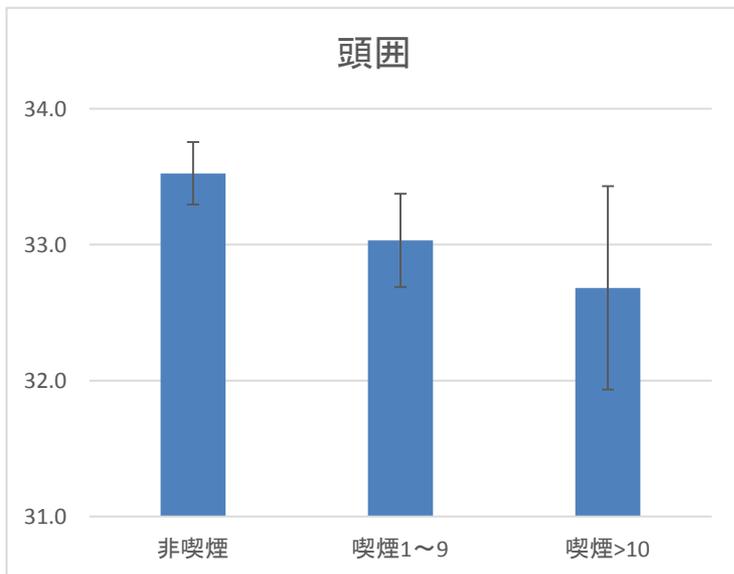
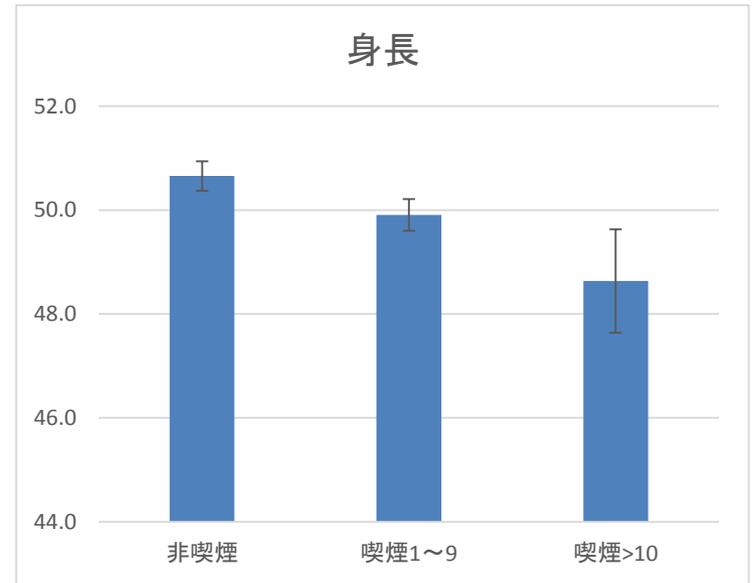
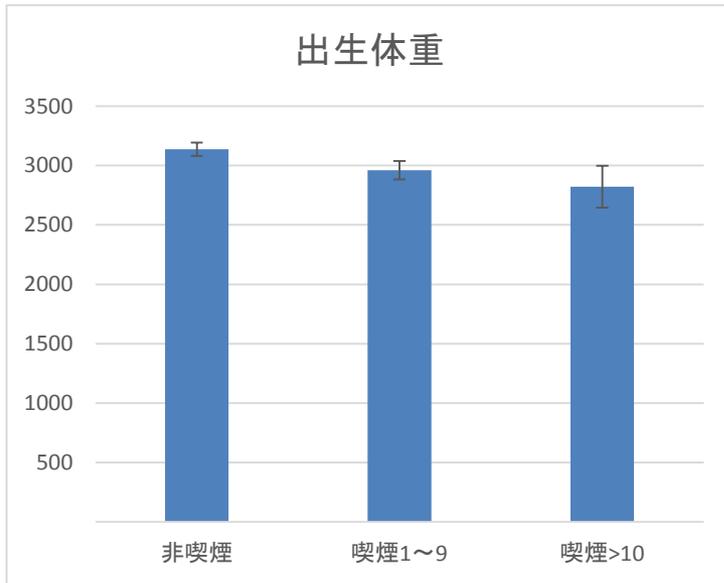
たばこ一本中の主な有害物質			
	有害物質名	主流煙	副流煙
発癌物質 (ng/本)	ベンゾ(a)ピレン	20~40	68~140
	ジメチルニトロソアミン	5.7~43	680~820
	メチルエチルニトロソアミン	0.4~5.9	9.4~30
	N-ニトロソノルニコチン	100~550	500~2750
	ニトロソピロリジン	5.1~22	200~380
	キノリン	1700	18000
	メチルキノリン類	700	8000
	ヒドラジン	32	96
	2-ナフチルアミン	1.7	67
	4-アミノビフェニール	4.6	140
0-トルイジン	160	3000	
その他の有害物質 (mg/本)	タール(総称として)	10.2	34.5
	ニコチン	0.46	0.27
	アンモニア	0.16	7.4
	一酸化炭素	31.4	148
	二酸化炭素	63.5	79.5
	窒素酸化物	0.014	0.051
	フェノール類	0.228	0.603

母体背景と新生児転帰

	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
(percentile)	49.6±24.6	41.1±26.3	41.1±26.3	0.372	0.436	0.986
Birth height (cm)	50.6±1.1	49.9±1.1	48.6±3.2	0.085	0.031	0.203
(percentile)	72.9±19.0	63.4±21.4	51.9±37.0	0.219	0.064	0.353
Head circumference (cm)	33.5±0.9	33.0±1.2	32.6±2.4	0.229	0.224	0.660
(percentile)	52.6±23.8	44.4±26.1	53.6±35.9	0.390	0.931	0.476
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)	—	5±1.5	11±3.3	—	—	0.000

P<0.05 significant difference

新生兒發育Profile



- 妊娠前、妊娠中の母体栄養状態に有意差はない。
- 喫煙群の出生体重、身長、胸囲は、非喫煙群と比較して低い傾向にあった。
- 頭囲は有意差を認めず、頭囲の発育は比較的保たれていた。
- 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。

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
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
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

P<0.05 significant difference

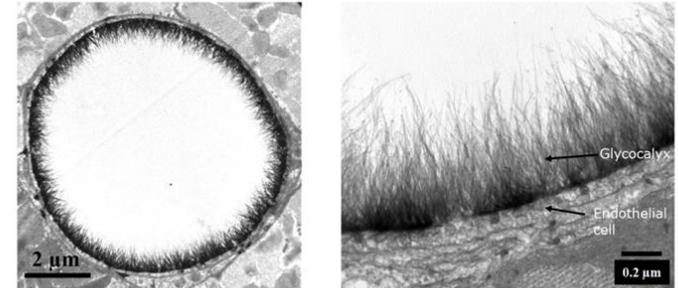
Glycocalyxの機能

- 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

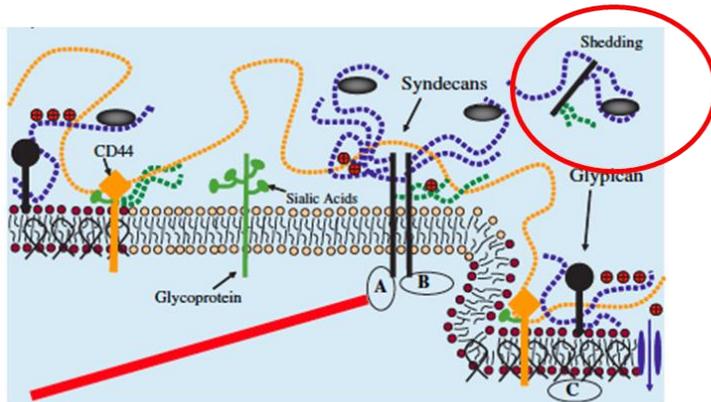
Syndecan-1~4で構成

- 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？

胎盤におけるGlycocalyx (GCX)の発現

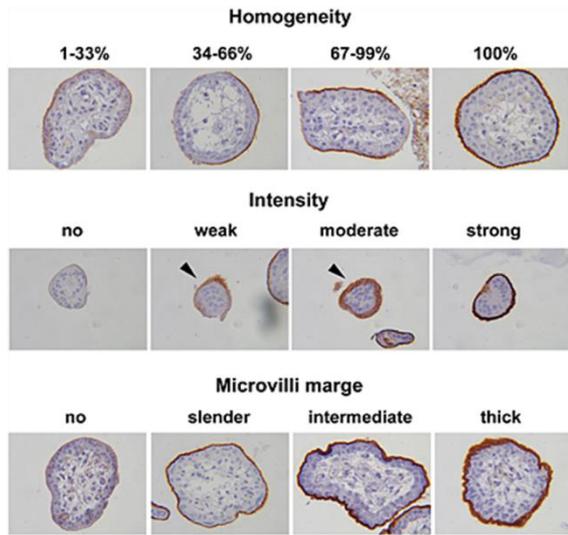
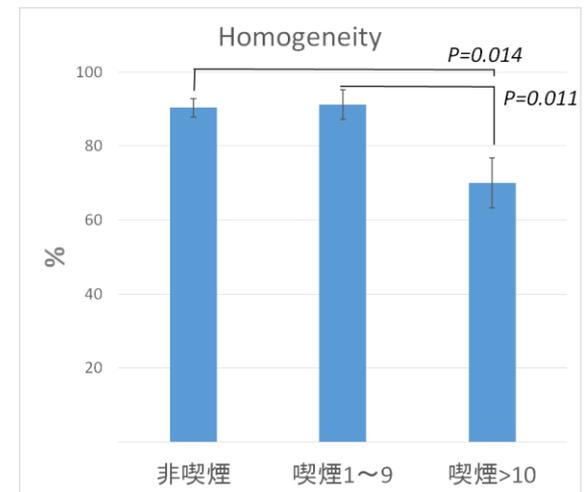
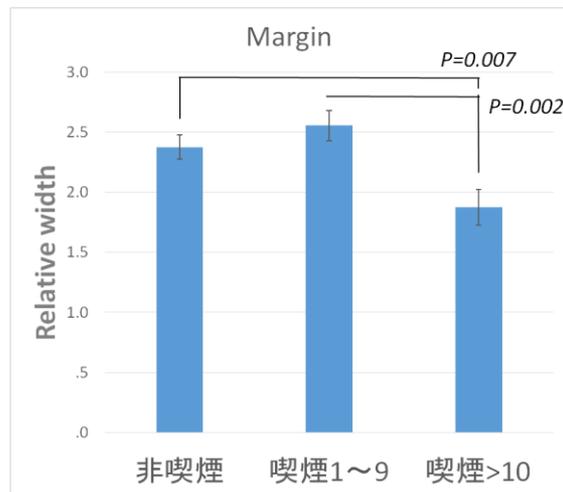
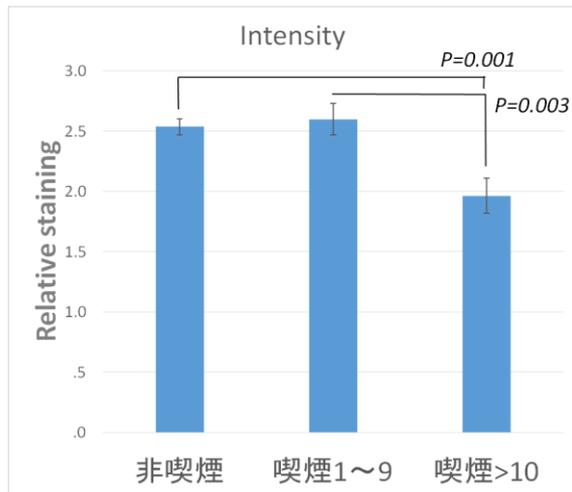
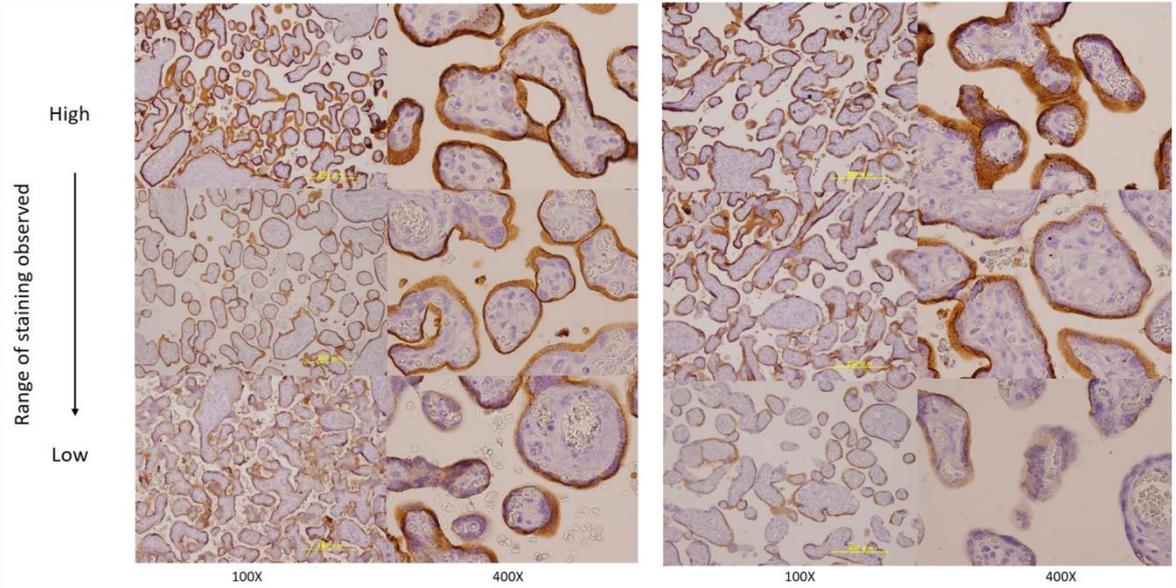


図1. Syndecan-1発現強度の評価法

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

非喫煙群(コントロール)

喫煙群



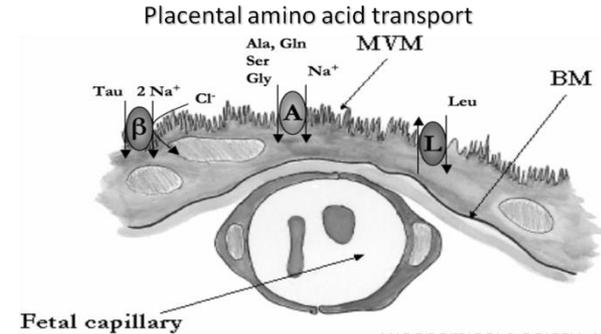
アミノ酸輸送体タンパク

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。

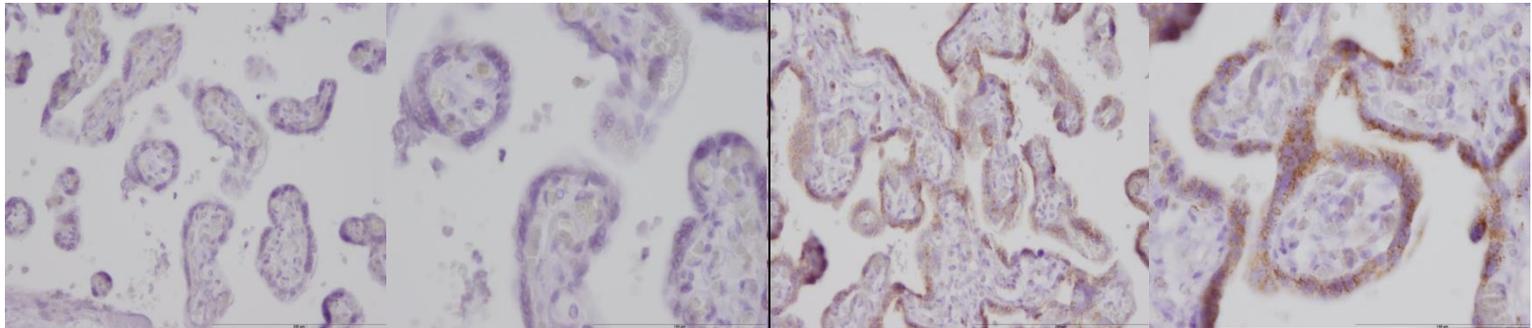


Biochemical Society Transactions
(2009) 37, 295-298 - Sara Roos, et al.

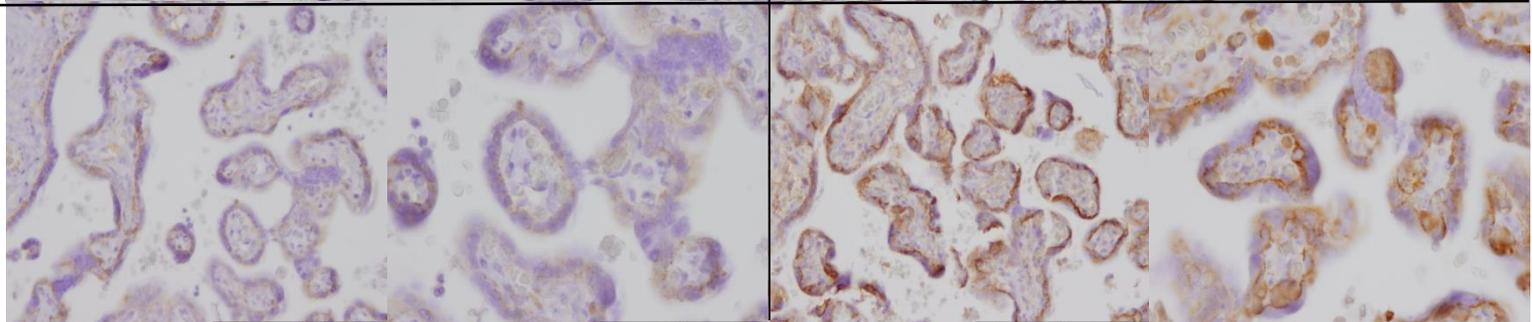
喫煙群

非喫煙群

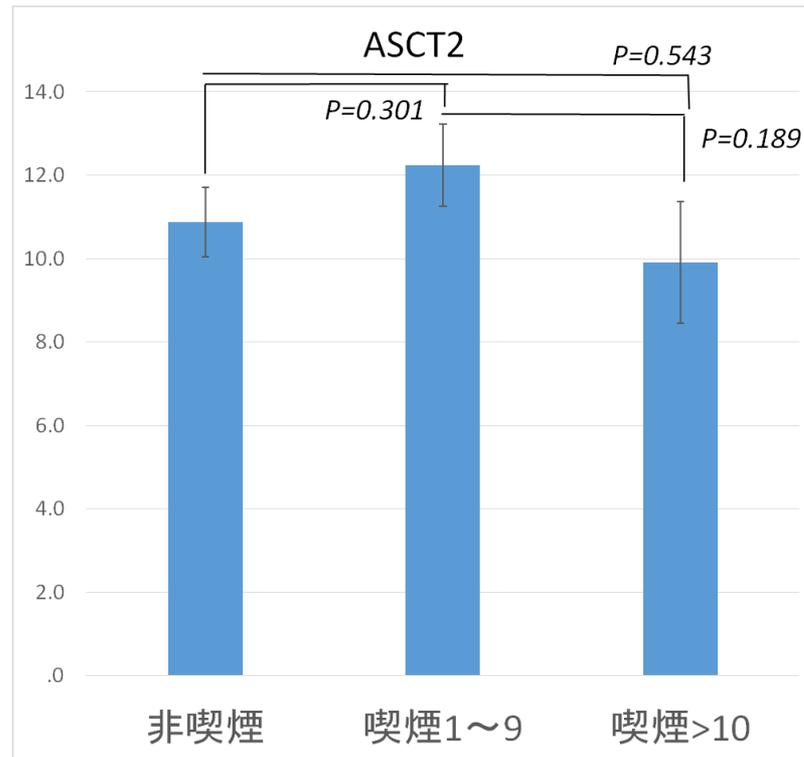
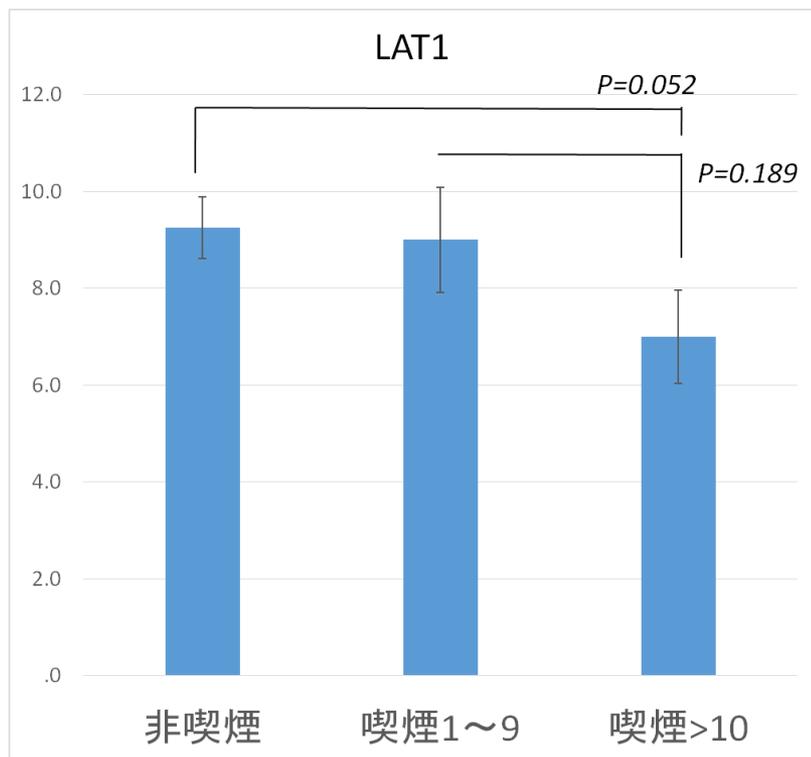
LAT1



ASCT2



LAT1, ASCT2発現強度スコアの比較

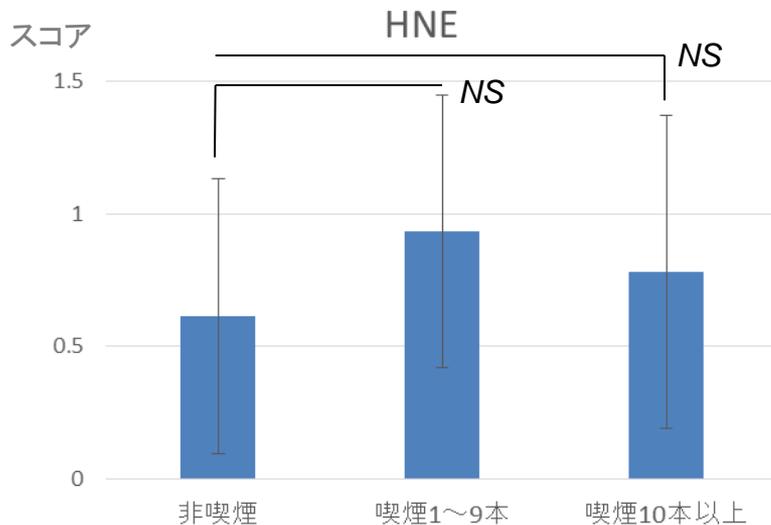
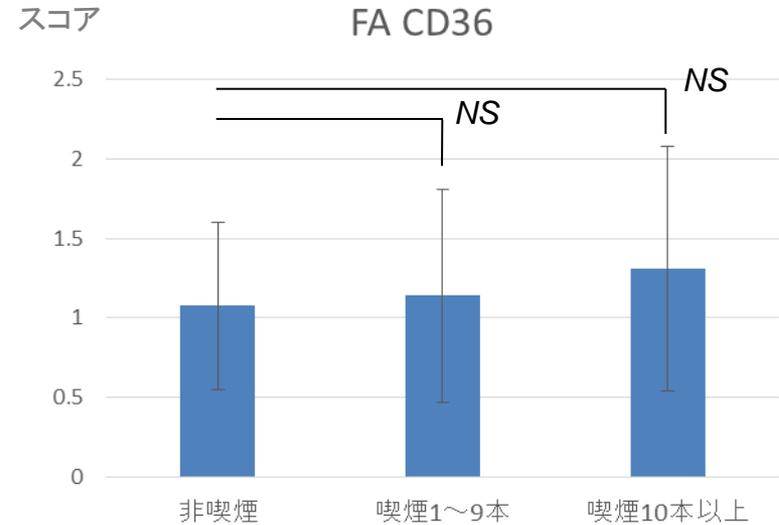
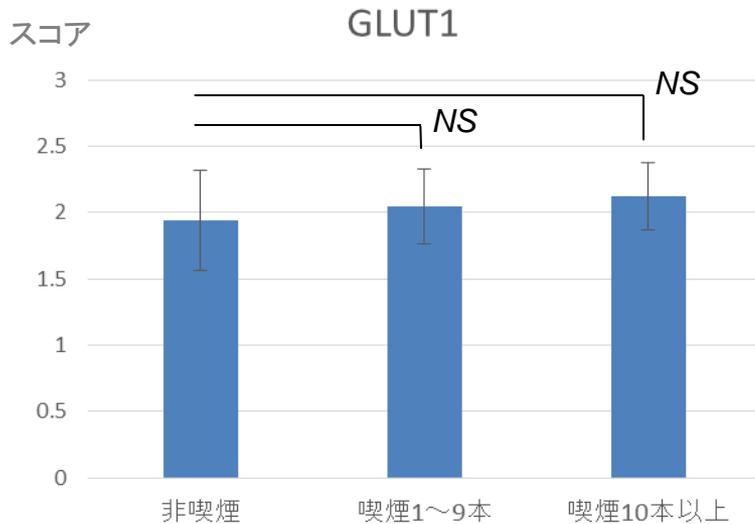


アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法

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)

GLUT1, FAT/CD36, HNE発現強度スコアの比較



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)*

- 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。
- 母体喫煙の有無により、胎盤のGlycocalyxとL型アミノ酸輸送体タンパク(LAT1)の発現に変化を認め、特に1日の喫煙本数が10本以上の母体では、非喫煙者と比較し発現の低下傾向を認めた。

結論

- 母体の喫煙が胎盤の構造や機能を修飾し、間接的に胎児発育へ影響している可能性が示唆された。

間接喫煙の影響

副流煙
(間接喫煙、受動喫煙)



- ニコチン
- タール
- 一酸化炭素

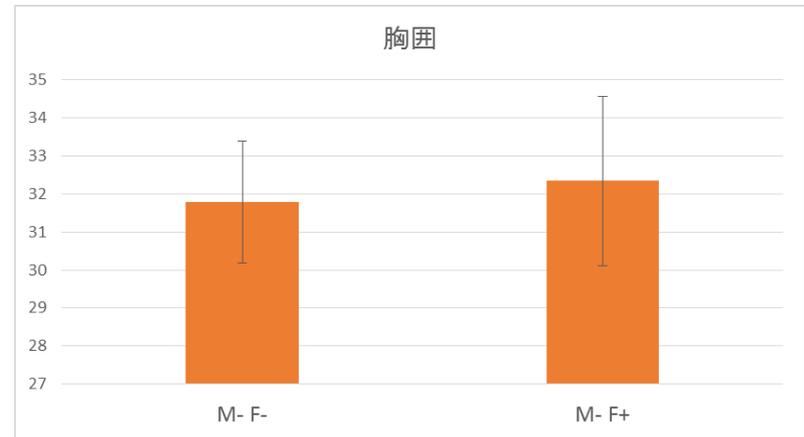
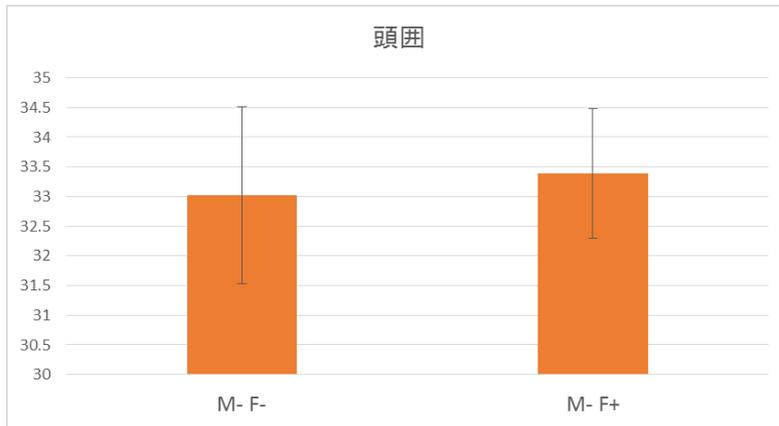
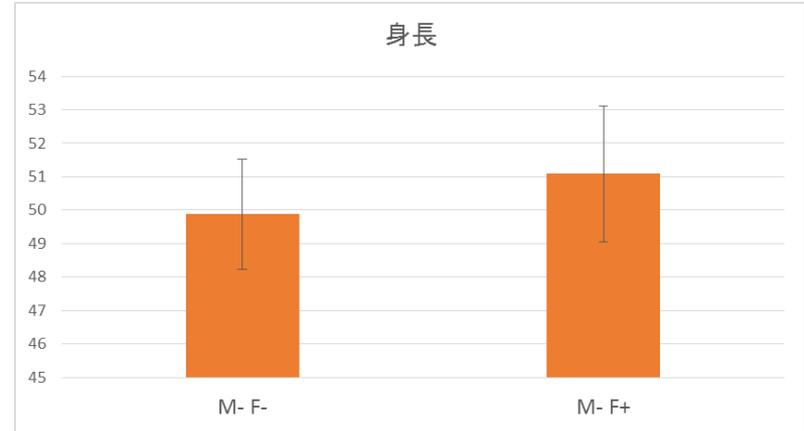
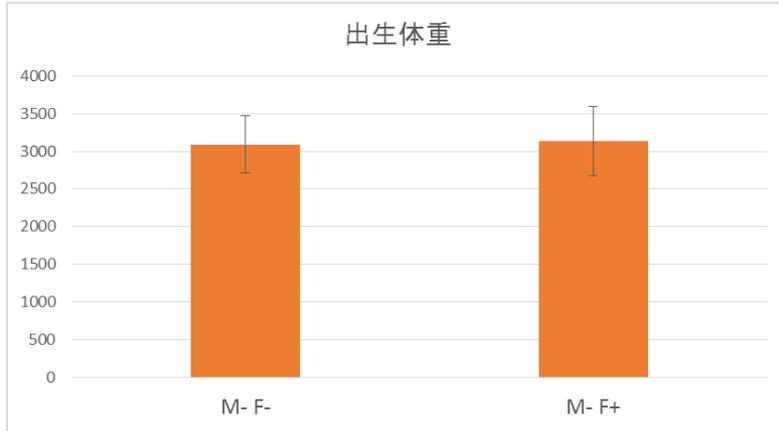
たばこ一本中の主な有害物質			
	有害物質名	主流煙	副流煙
発癌物質 (ng/本)	ベンゾ(a)ピレン	20~40	68~140
	ジメチルニトロソアミン	5.7~43	680~820
	メチルエチルニトロソアミン	0.4~5.9	9.4~30
	N-ニトロソノルニコチン	100~550	500~2750
	ニトロソピロリジン	5.1~22	200~380
	キノリン	1700	18000
	メチルキノリン類	700	8000
	ヒドラジン	32	96
	2-ナフチルアミン	1.7	67
	4-アミノビフェニール	4.6	140
0-トルイジン	160	3000	
その他の有害物質 (mg/本)	タール(総称として)	10.2	34.5
	ニコチン	0.46	0.27
	アンモニア	0.16	7.4
	一酸化炭素	31.4	148
	二酸化炭素	63.5	79.5
	窒素酸化物	0.014	0.051
	フェノール類	0.228	0.603

母体背景と新生児転帰

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	<i>P value</i>
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	

Mean± S.D *P*<0.05 significant difference

新生児発育Profile



- 妊娠前、妊娠中の母体栄養状態に有意差はない。
- 父親喫煙群の出生体重、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。
- 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。

胎盤の組織学的分析

	M-, F- n=30	M-, F+ n=30	<i>P value</i>
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

P < 0.05 significant difference

胎盤におけるGlycocalyx (GCX)の発現

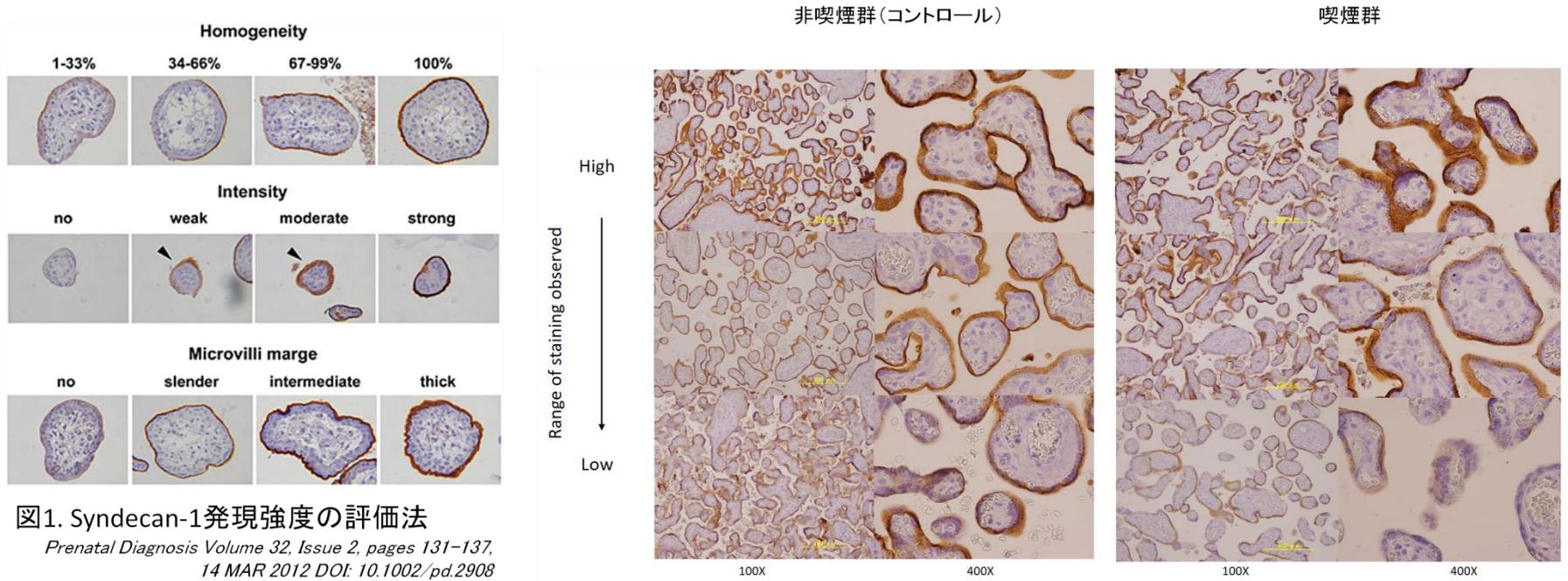
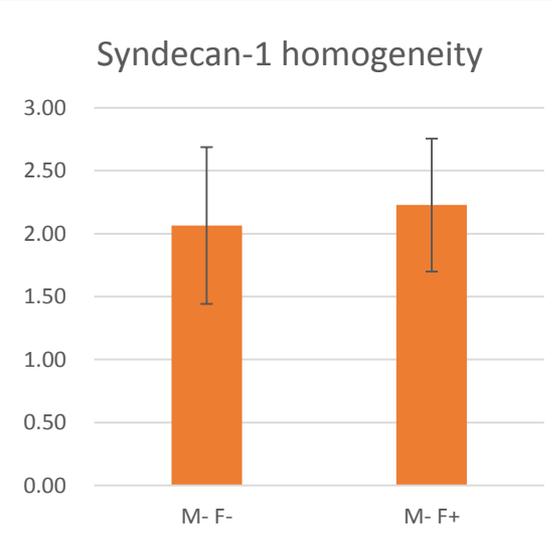
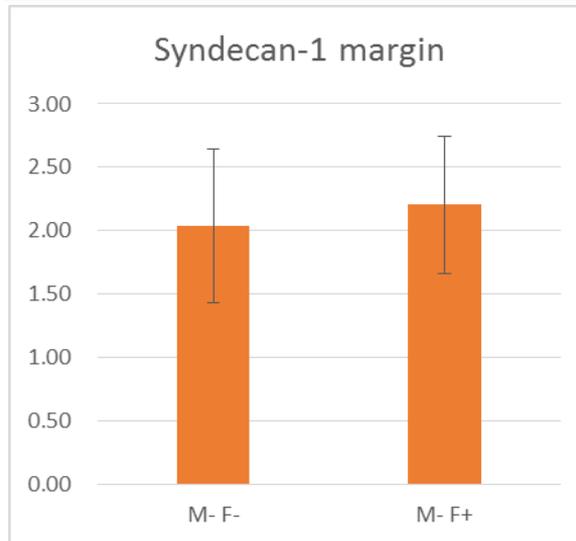
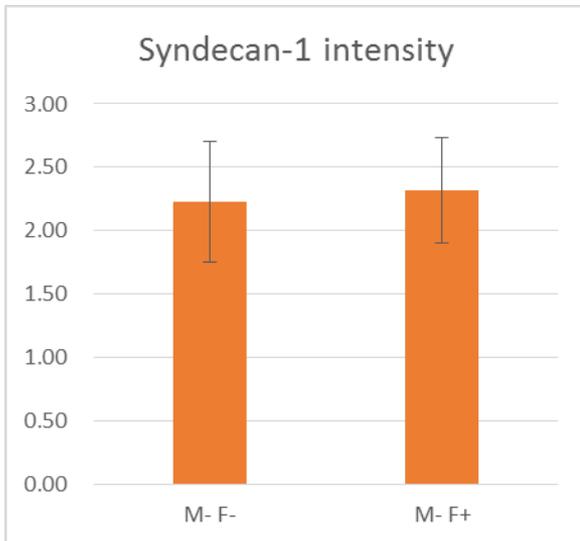
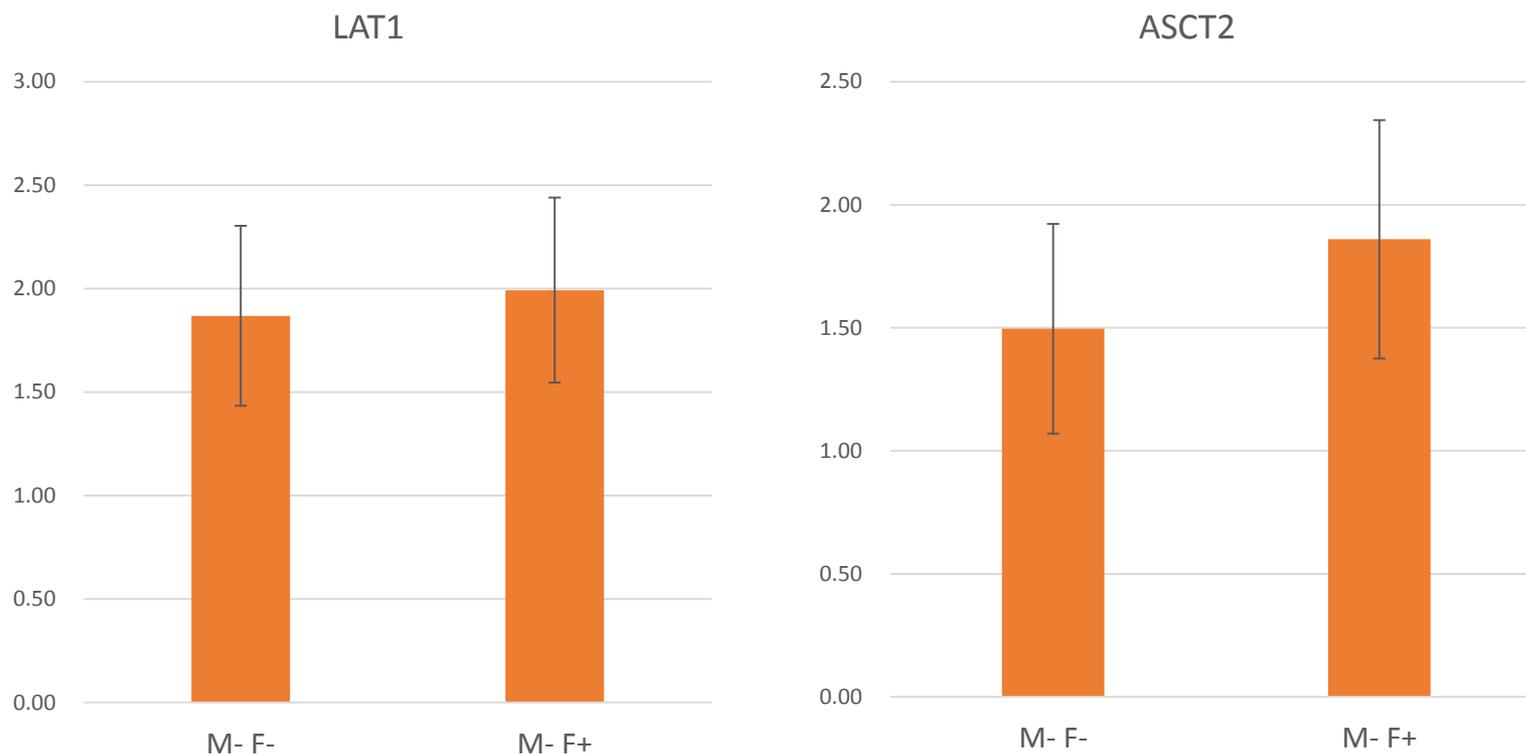


図1. Syndecan-1発現強度の評価法

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



LAT1, ASCT2発現強度スコアの比較

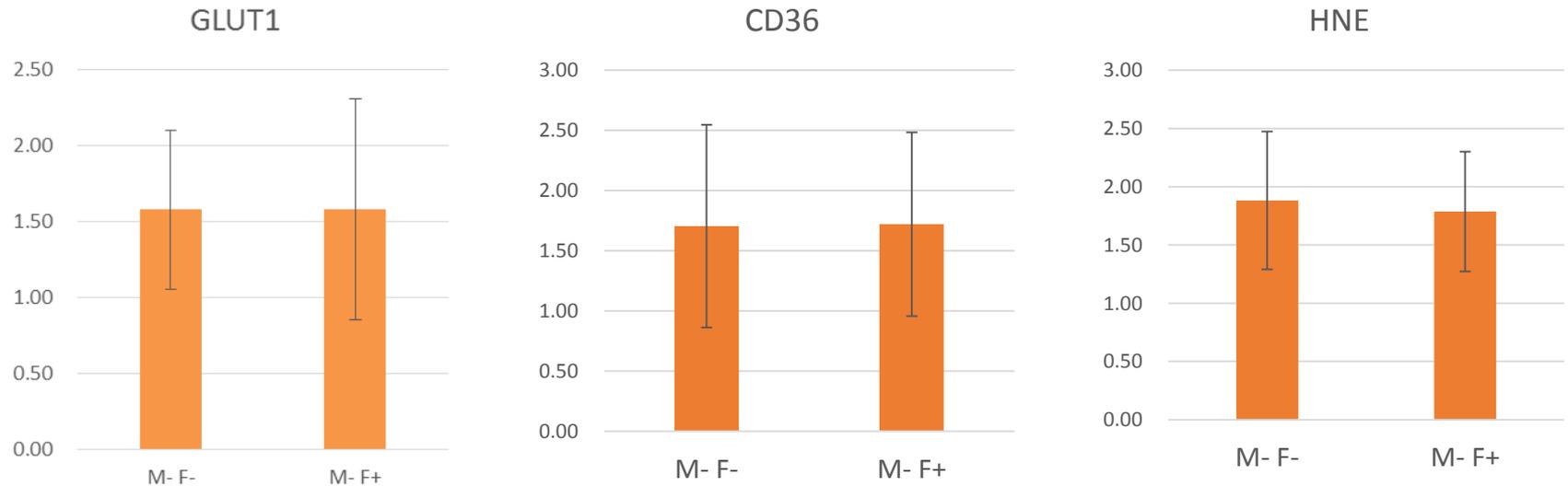


アミノ酸輸送体タンパク発現強度の評価法

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)

GLUT1, FAT/CD36, HNE発現強度スコアの比較



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)

- 父親の喫煙は出生時の出生体重、身長、頭位、胸囲を減少させなかった。
- 父親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。

結論

- 父親の喫煙は、胎児発育への影響は少ないのではないか？

ご清聴誠にありがとうございました。



UNIVERSITY OF OCCUPATIONAL AND
ENVIRONMENTAL HEALTH, JAPAN

産業医科大学 産科婦人科学教室

柴田 英治