

ビタミン E 摂取量が母体の健康状態と胎児の発育に及ぼす影響について ～実験動物を用いての検討～

今村 友美¹⁾, 高橋 志乃²⁾, 大内智恵子¹⁾, 境谷 友希¹⁾, 西村 典子¹⁾,
松井 理恵¹⁾, 安井恵理子¹⁾, 堀江 登¹⁾

(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科¹⁾,
武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻²⁾)

Influence of vitamin E intake to state of health of mother's body and fetal development. ～ Examination using laboratory animals ～

Tomomi Imamura, Shino Takahashi, Chieko Ouchi, Yuki Sakaiya, Noriko Nishimura,
Rie Matsui, Eriko Yasui, Noboru Horie

¹⁾ Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,

²⁾ Food Science and Nutrition Major,
Graduate School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, 663-8558, Japan

This study is focused on overdose of vitamin E. In particular, we examined its influence on pregnancy using a laboratory animal.

It showed no change of hemoglobin level and triglyceride level in blood by the difference of vitamin E dose. However, it showed that antioxidation of the vitamin E was shown because the fall of TBARS value in the brain that was taken have much vitamin E intakes.

The cause was not clear, the vitamin E intake of inappropriate quantity may cause pregnancy abnormality. Because, pregnancy abnormal ratios increased that growth insufficiency of the fetus was observed low group and high group in vitamin E.

It suggested that the surplus intake of the vitamin E have possibilities to cause bad influence to pregnancy.

緒 言

ビタミン E は脂溶性の抗酸化物質であり, その抗酸化作用により活性酸素消去, がん予防, 老化防止などの作用があるといわれている. ビタミン E の生理作用は先に述べた抗酸化作用を中心とした作用であり, 生体膜に分布し, 生体膜リン脂質不飽和脂肪酸の酸化を防止することで, 生体膜の機能を保持し, さまざまな生理作用に関与していると考えられる¹⁾²⁾.

ビタミン E は他の脂溶性ビタミンに比べると比較的毒性は低いとされている. これは, 脂溶性ビタミンとしてはビタミン E の吸収率が約 10% と低く, 体内の貯留時間が短期間であるからである³⁾. さらに, あらゆる組織の細胞膜に分布していることにより, その貯蔵能力がきわめて高く, このことが欠乏症や過剰症が起こりにくい要因であると考えられる⁴⁾.

一般的な食生活においては, ビタミン E 含量が多いのは, アーモンドなどの種実類で食品 100

グラムあたり数十ミリグラム含んでいる⁵⁾. このようにビタミンE含量が多い食品であっても, 数十ミリグラムという単位での経口的なビタミンE摂取レベルではその過剰症の危険はかなり低いと思われる. それに対して, サプリメントでは数百ミリグラムが容易に摂取できてしまう. ビタミンEの過剰症の報告としては, まれではあるが, 疲労感, 筋力低下, コレステロール値の上昇が報告されている⁶⁾.

ビタミンEは, 妊娠・出産と関係の深いビタミンとして発見され, 特に妊娠期および授乳期には不足させてはならないことが広く知られている⁷⁾. 現在も, 不妊症の治療の一つとしてビタミンE投与が試みられており, 不妊症の婦人が, ビタミンEの長期投与によって妊娠したという症例は少なくない⁷⁾. 妊娠中のビタミンEの作用としては, 胎盤における血流促進作用, フリーラジカルなどからの保護作用, 胎児への酸素供給量の増加などが考えられる⁷⁾. しかし, 妊娠中における多量のビタミンE摂取については十分な知見が得られていない.

近年, ビタミンE投与に関する世界中の大規模な疫学研究をまとめたメタアナリシスの結果において, 1日に400IU以上のビタミンEをサプリメントとして長期間摂取すると, 総死亡率が増加するという報告がなされた⁸⁾. サプリメントの普及により, 自己の判断で多量のビタミンEを摂取することが可能になっており, こういった背景から, ビタミンEの大量投与に関するさらなる研究が検討されるべきである. よって, 本研究は, 特にビタミンEの多量摂取に注目し, 実験動物を用いてビタミンE摂取量が妊娠期における母体の健康と胎仔の発育に及ぼす影響について検討した.

実験材料および方法

1. 実験動物

(1) 実験動物の飼育交配

実験動物は, 雌性の3週齢Jcl-ICRマウス(日本クレア)を使用した. 飼育には環境制御装置(日本クレア)を用い, 温度は22~24℃に, 湿度は45~55%に調節し, 飼育棚内に床敷きとしてかなな屑(日本クレア)を約2cmの厚さに敷いて清潔な環境を作った. 明暗サイクルは12時間(明期8~

20時)とした. ケージは225mm×338mm×140(h)mmを使用し, 1ケージに10匹を飼育した.

環境への適応のため1週間自然飼育した後, 餌中のビタミンE含有量によってlow群(0.0005%), middle群(0.0075%), high群(0.5%)に分け, 29週齢まで飼育した. ビタミンEとして, 最も生理活性の強い α -トコフェロールを用いた. 餌の組成はTable 1に示す. 餌として使用した材料は α -トコフェロール, L-シスチン, 第三ブチルヒドロキノン(以上和光純薬工業), パーム核油, (市販品)以外はすべてオリエンタル酵母工業のものを使用した. 給水は給水瓶によって水道水を自由摂取させた.

Table 1. Composition of experimental diets.

(weight%)	low	middle	high
α -tocopherol	0.0005	0.0075	0.5
Casein	20.0	20.0	20.0
L-cystine	0.3	0.3	0.3
β -cornstarch	39.7	39.7	39.7
α -cornstarch	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0
Palm kernel oil	7.0	7.0	7.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN-93G)	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93, vitamin E free)	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.3	0.3	0.3
Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014

(2) 交配

27週齢において, 各群を無作為的に非妊娠群と妊娠群に分け, 同系のオスマウスと交配を行ない, その後もそれぞれの餌を与え続けた. オスとの交配後, 臍栓の確認を持って妊娠0日目とした.

(3) 解剖

各グループのマウスを妊娠18日目でエーテル麻酔により安楽死後, 採血に引き続いて解剖を行った. この時点で胎仔および各種器官を摘出し, 非妊娠群についても同時期に解剖を行い実験に使用した.

2. 血色素量(血中ヘモグロビン濃度)の測定⁹⁾

血液サンプルを用いて, ヘモグロビンB-テストワコー(SLS-ヘモグロビン法, 和光純薬工業)を用いて測定を行った. 操作は同測定キット付属の取扱説明書に従って行い, 測定は分光光度計(MICROPLATE READER, Model 550, BIO-RAD)を用いて540nmにおける吸光度を測定し, 同時

に測定した標準サンプルより作成した検量線にて濃度を求めた。

3. 血中トリグリセリド濃度の測定¹⁰⁾

血漿サンプルを用いて、トリグリセライドE-テストワコー (GPO・DAOS法, 和光純薬工業) を用いて測定を行った。操作は同測定キット付属の取扱説明書に従って行い、測定は分光光度計 (MICROPLATE READER, Model 550, BIO-RAD) を用い、600nmにおける吸光度を測定し、同時に測定した標準サンプルより作成した検量線にて濃度を求めた。

4. チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の測定¹¹⁾

解剖時に摘出した全脳を9倍量の1.15%塩化カリウム (和光純薬工業) 溶液とともにホモジネートした。作製した10%脳ホモジネート75 μ lに1%リン酸 (ナカライテスク) 450 μ l, 10mM BHT (2, 6-ジ-t-ブチル-p-クレゾール; ナカライテスク) エタノール溶液20 μ l, 0.67% TBA (2-チオバルビツール酸; ナカライテスク) 溶液150 μ lを加えて混合し、80 $^{\circ}$ Cで60分間加温した。放冷後、1-ブタノール (和光純薬工業) 600 μ lを加え、ボルテックスミキサーにて激しく混合することにより、赤色の呈色物質をブタノール層に抽出した。その後、550 \times gにて10分間遠心分離を行い、その上清 (ブタノール層) の535nmにおける吸光度を分光光度計 (MICROPLATE READER, Model 550, BIO-RAD) を用いて行った。チオバルビツール酸反応物質であるTEP (1, 1, 3, 3-テトラエトキシプロパン; ナカライテスク) を標準物質として用い、同様に測定を行って、検量線を作成し、サンプルのTBARS値はTEP当量で計算した。なお、10%脳ホモジネートサンプル中のタンパク質量をBradford法¹²⁾により測定し、結果はタンパク質1mgあたりのTBARS量で示した。

5. 解析方法

データの解析は分散分析 (Post-hoc テスト: Bonferroni/Dunn) を用いて行なった。

実験結果および考察

まず、Fig.1に母マウスの発育状況を示した。妊娠により体重および体積ともに顕著に増加した。しかし、ビタミンE摂取量の違いによる差はみられなかった。

次に、Fig.2には血液生化学検査の結果を示し

た。血中ヘモグロビン濃度は妊娠により低下した (Fig.2-a)。これは、妊娠により循環血漿量が増加したため、相対的にヘモグロビン濃度が低下したと考える。ビタミンE摂取量の違いによる差はみられなかった。血中の中性脂肪濃度は妊娠により減少した (Fig.2-b)。データには示していないが、血中総コレステロール、HDL-コレステロール濃度も妊娠により減少した。胎児発育のために母体の栄養分が利用されたためと考える。しかし、どの測定項目においてもビタミンE摂取量の違いによる差はみられなかった。

次に、脳ホモジネートにおけるTBARS値をFig.3に示した。TBARS値は、脂質過酸化の程度を反映し、その値が高いほど脂質が酸化されていることをあらわす。low群、middle群およびhigh群のどの群においても、妊娠の有無による変化はみられなかった。しかし、ビタミンE摂取量の違いによりlow群、middle群、high群の順にTBARS値が低下し、脂質過酸化の抑制がみられた。ビタミンEは脂質の酸化を抑制する抗酸化作用を有しており、餌から摂取したビタミンEが脳における脂質過酸化を抑制したためと推察した。

次に、Table 2 (a)に母体の妊娠状況を示した。妊娠不成立とは、膣栓が確認されず、その後の経過観察でも妊娠が確認されなかったマウスの数を表した。実験に使用したICRマウスでは膣栓が確認された場合、90%以上の確率で妊娠が成立するとされており¹³⁾、厳密には膣栓が確認されても妊娠しない個体が現れる可能性が考えられるが、本実験では便宜上、膣栓の確認を持って妊娠とした。妊娠したマウスにおいて、解剖時に摘出した胎仔の中に一匹でも何らかの異常を含んでいた場合を異常と判断した。ビタミンE投与middle群において、最も高い効率で妊娠し、胎仔に異常はみられなかった。low群では交配させた6匹のうち4匹が妊娠し、しかし、そのうち3匹が異常な胎仔を含んでいた。high群では7匹中5匹が妊娠し、そのうち3匹が異常妊娠であった。

妊娠した母マウスにおいて、異常と判断した個体の胎仔の詳細についてTable 2 (b)に示した。我々が異常と判断した胎仔は主に未成熟、胎仔死亡、胎盤のみの観察の3つに区分した。まず、胎仔の平均体重の2分の1以下を未成熟とした。胎仔死亡は、胎仔摘出時に死亡していた胎仔の数を

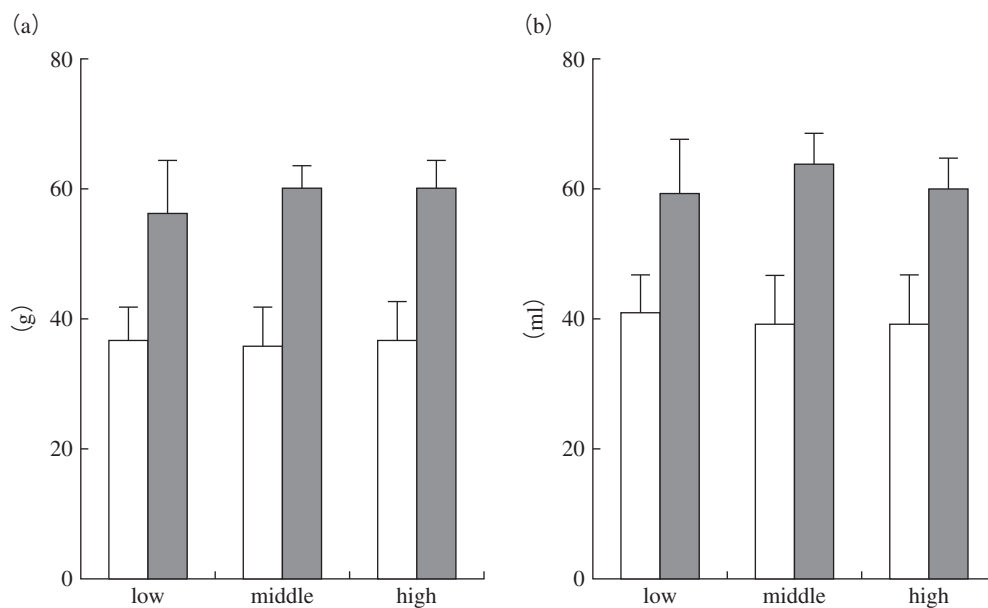


Fig. 1. Body weight (a) and body volume (b) of the mouse fed each experimental diets for 25 weeks. Several bars are means and SD. □ ; non-pregnancy, ■ ; pregnancy.

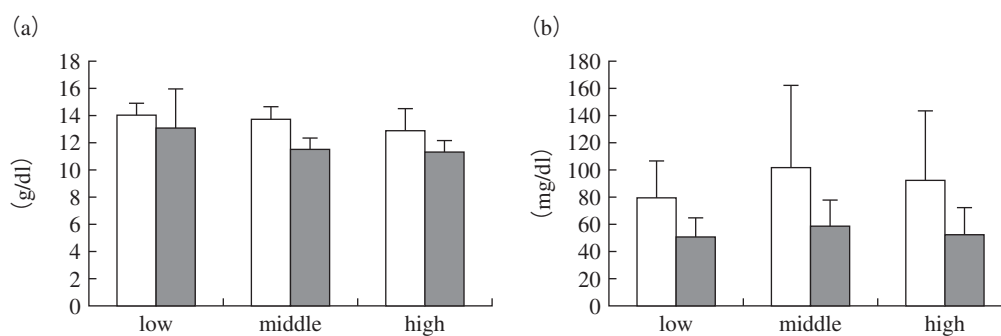


Fig. 2. Effects of vitamin E on blood biochemical parameters in mouse fed each experimental diets. Blood hemoglobin level (a), blood triglyceride level (b). Several bars are means and SD. □ ; non-pregnancy, ■ ; pregnancy.

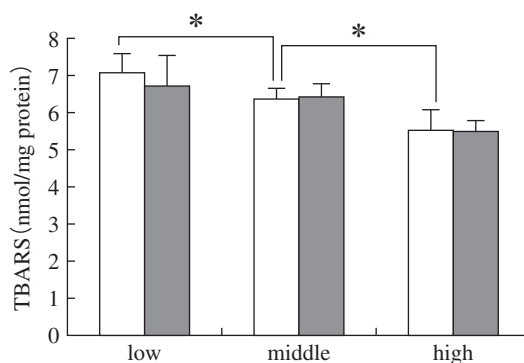


Fig. 3. TBARS values of brain homogenate of mouse fed each experimental diets. Several bars are means and SD. □ ; non-pregnancy, ■ ; pregnancy. *:p<0.05

示した。胎盤のみと表記したものは、本来、胎仔と胎盤は必ず対になって存在する。胎仔の存在が確認されず胎盤のみ存在していた場合を胎盤のみとあらわした。その原因としては、胎仔が死亡したため自己消化され吸収されてしまった可能性が考えられる。low群で総胎仔数の約7.6%、high群で約10.9%に異常がみられた。high群では未成熟の胎仔も確認された。このように、ビタミンE low群およびhigh群では、妊娠率の低下や、異常をもった胎仔が確認されたことから、何らかの妊娠異常の危険性が高まることが示唆された。

次に、Table 3 に母マウス1匹あたりの平均胎仔数を示した。有意な差は認められなかったが、low群およびhigh群ではmiddle群と比較して胎仔数が減少する傾向がみられた。

次に、胎仔の体長および体重を Fig.4 (a), (b) に示した。胎仔の体長と体重の両方において、low群およびhigh群はmiddle群より有意に減少した。多くの場合、母マウス1匹あたりの胎仔数が多いほど胎児1匹は小さくなる傾向がある。前記のTable 3 に示したとおり、low群およびhigh群はmiddle群より平均胎仔数が少なかったにもかかわらず、胎仔の大きさも小さいことから、ビタミンE low群およびhigh群では、胎仔の発育不良を招く可能性が示唆された。

以上のことから、非妊娠期～妊娠期においてビ

タミンEは決して不足させてはならないが、サプリメント等からの過剰な摂取には十分に注意すべきであると考えられる。

Table 2. Effects of vitamin E on pregnancy. (a) A result of becoming pregnant or not. It is shown with numbers of mother mice. (b) The details of the pregnancy abnormality. It is shown the numbers of fetuses.

(a)

Dose of vitamin E		Non pregnancy	pregnancy	
			normal	abnormal
low	(n=6)	2	1	3
middle	(n=6)	1	5	0
high	(n=7)	2	2	3

(b)

Dose of vitamin E	The ratio of an abnormal fetus	The number of abnormal fetuses		
		immature	fetal death	Observation only the placenta
low	7.55% (4/53)	0	1	3
middle	0% (0/69)	0	0	0
high	10.94% (7/64)	1	5	1

Table 3. Numbers of the average fetuses per one mother mouse fed each experimental diets.

Dose of vitamin E	The number of fetuses
low	13.3 ± 2.75
middle	13.8 ± 1.64
high	12.8 ± 3.03

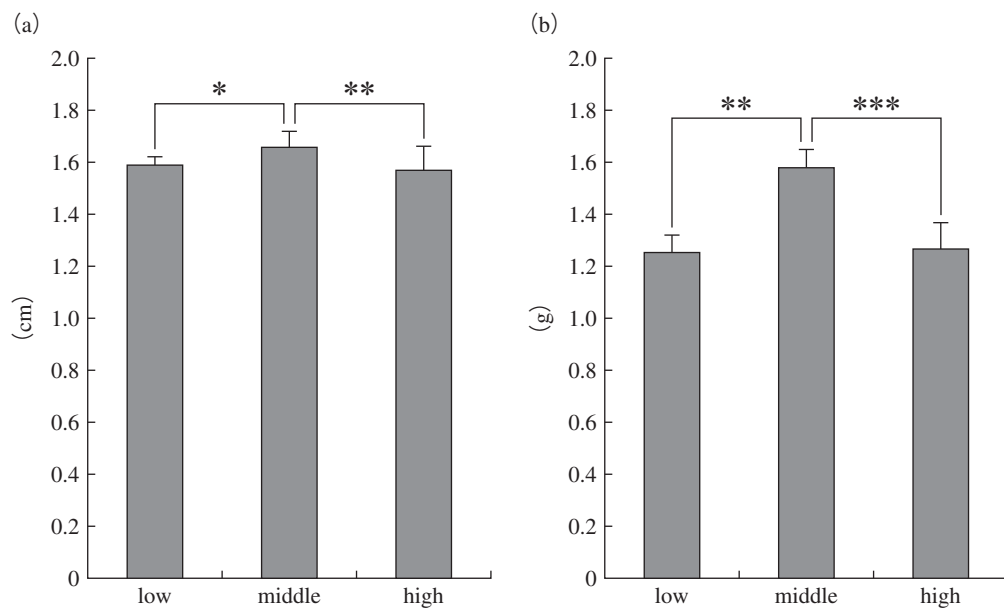


Fig. 4. Effect of Vitamin E on state of the growth of the fetus. Length (a) and weight (b) of the fetus on 18th day after mate. Several bars are means and SD. *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

要 約

本研究ではビタミンEの過剰症に着目し, 特に妊娠への影響を実験動物において検討した.

ビタミンE摂取量の違いにより, 血色素量, 血中脂質(血中トリグリセリド, 血中総コレステロール, HDL-コレステロール濃度)に差はみられなかった. しかし, ビタミンE摂取量が多いほど脳におけるTBARS値の低下がみられたことから, 脂溶性の抗酸化物質であるビタミンEの抗酸化作用が発揮されていたことがわかった.

ビタミンE low群およびhigh群において妊娠異常の割合が増加し, 胎仔の発育不良もみられた.

本研究において, 原因は明らかではないが, 不適切な量のビタミンE摂取は妊娠異常や胎児の正常な発育を妨げる可能性が示唆された. 特に, 今まで報告の少なかったビタミンE過剰摂取の妊娠への悪影響も示唆された.

参考文献

- 1) 糸川嘉則, 最新ビタミン学, フットワーク出版株式会社, pp.38, (1998).
- 2) 日本ビタミン学会, ビタミンハンドブック①脂溶性ビタミン, 化学同人, pp.61, (1989).
- 3) 日本ビタミン学会, ビタミンハンドブック④ビタミンと栄養, 化学同人, pp.79, (1990).
- 4) 平原文子, ビタミンE 基礎と臨床, 医歯薬出版株式会社, pp.287-294, (1985).
- 5) 香川芳子, 五訂増補 日本食品標準成分表, 女子栄養大学出版部, (2007)
- 6) 糸川嘉則, 最新ビタミン学, フットワーク出版株式会社, pp.43, (1998).
- 7) 吉岡保, ビタミンE 基礎と臨床, 医歯薬出版株式会社, pp.479-487, (1985).
- 8) Miller, E.R. III, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., Guallar, E., *Ann Intern Med.*, 142 (1), 37-46, (2005).
- 9) 大城巖 他, 臨床病理, 29, 203-209, (1981).
- 10) Spayd, R.W., et al., *Clin. Chem.*, 24, 1343-1350, (1978).
- 11) Uchiyama, M., Mihara, M., *Anal. Biochem.*, 86, 271-278, (1978).
- 12) Bradford M., *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).
- 13) 日本実験動物協会著, 実験動物の基礎と技術Ⅱ各論, 丸善, pp.11, (1989).