

<平成27年度助成>

妊娠期の葉酸過剰摂取が仔の耐糖能に及ぼす影響

金 高 有 里

(十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科)

緒 言

妊娠期の葉酸の摂取により胎児の二分脊椎症などの神経管閉鎖障害の罹患リスクを減らせるという報告から、葉酸摂取の重要性が見直されるようになった。世界的に不足が問題となっていた葉酸の普及が行われ、米国では1998年より葉酸の穀物への添加が義務化され、海外では58か国が葉酸強化を行っている。日本では、それを受けて厚生労働省が発表している「日本人の食事摂取基準」において妊娠期の葉酸の付加量が設定され、様々な機関の呼びかけにより葉酸サプリメントが普及してきている。

その背景の中、最近のコホート研究によると、妊娠期の葉酸過剰摂取によって子の喘息、発がん、白血病の罹患リスクの上昇、発達遅延や耐糖能異常などの悪影響を生じる可能性が報告された。この報告は、葉酸を過剰に摂った妊婦の子供において、出生後の疾患リスクに影響をもたらす可能性を示唆している。今後さらに、国内外において妊娠期の葉酸サプリメントの普及が予測されることから、疫学の検証とメカニズムの解明が重要となってくる。

したがって、妊娠期の人工性葉酸の過剰摂取による仔への影響を検討するため、マウスを用いて妊娠期における葉酸摂取の意義について研究を行ってきた。その中で、母獣の葉酸過剰が胎児に及ぼす影響について脳・肝臓の組織において、DNAマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。肝臓のマイクロアレイの結果、インスリン遺

伝子として知られるINS2の変動を確認し、PCRによる変動の確認および膵臓のインスリン染色によって母獣の葉酸過剰による仔への影響を見出した。このことから、特に、妊娠期の葉酸過剰が耐糖能異常や免疫に及ぼす影響については、生理学的変化および機序について早急に検討すべき課題と考えた。

葉酸はエピゲノム変化におけるメチル基供与体として働くことが知られている。その葉酸の機能性を解明すると同時に、とくに胎児期から出生後に至る組織学的、生理学的、エピジェネティックな変化をDNAマイクロアレイおよびメチル化解析により得た候補遺伝子に基づいて具体的に解明していくことはきわめて重要な課題と考えられる。さらに、DOHaD説に基づいた胎児期の栄養環境に着目した研究は、母体の栄養状態が仔の出生後にもたらす疾患の原因究明と治療に新たな道を開く可能性がある。このことから、本研究では、妊娠期の葉酸過剰摂取が仔に及ぼす影響を検討することとしてマウスを用いて出生後の仔の耐糖能を検討することとした。

方 法

飼料の設定はAIN-93Gを①基礎飼料：コントロール食(2mg/kg:葉酸含量)(:以下CN群)とし、②葉酸過剰食(40mg/kg)(:以下FA群)を作製した。特殊飼料の作製はオリエンタル酵母(株)に依頼した。

実験動物にはC57/BL6J系マウスを用いた。6週齢で購入し、2週間の予備飼育後に雄マウス1

匹に対し雌マウス3匹を同ケージに入れて交配させた。膣栓が確認できた日を0日とし、各群に組成の異なる飼料をそれぞれ与えて飼育した。群は2群に分け、それぞれコントロール食、葉酸過剰食を与えた。自然分娩させ、出生後児数および4日目の体重を確認した。FA群は出生時に餌をコントロール食に切り替え、自由摂食とした。摂食量は毎日測定した。離乳までの栄養環境を統一するために出生8日目に雌雄の確認および仔の数を揃えた後、以下の実験に用いた。

(I) 血糖値インスリンの評価

出生後22日目のマウスを用いて8時間(7:00~15:00)の絶食後、空腹時尾静脈採血を行った。さらに50日目で8時間(7:00~15:00)の絶食後に空腹時血糖値を測定したあと、Oral Glucose Tolerance Test(以下、OGTT)を行い、0分値、15分値、30分値、60分値、120分値の血糖値を尾静脈採血によりラボグルコ(Fora Care社)を用いて測定した。53日目は非絶食下で採血と解剖を行い、組織を取り出した。いずれのポイントにおいても血液(血漿)を用いて血糖値とインスリンの測定を行った。

(II) 臓器組織の評価

解剖時に体重、腹部脂肪組織の卵巣・精巣周囲脂肪組織、骨格筋(右足腓腹筋)重量を測定し、摘出した組織を用いて免疫組織学的検討を行った。免疫組織学的検討は、摘出した脾臓を用いてインスリン染色を行った。肝臓の組織を用いてreal-time PCRにより炭化水素、脂質、タンパク質等の

細胞内代謝と細胞の分化に密接に関与する転写因子であるPPAR α 、PPAR γ や、グルコースと脂質代謝の両方に関与する核内転写因子であるLXR α の発現パターンを検討した。

(III) DNA マイクロアレイ解析

DNAアレイ解析とRT-PCR法にて遺伝子発現(エピジェネティックマーカー)の解析を行った。信頼性の高いDye-Swap法に従い、Whole Mouse Genome オリゴDNA マイクロアレイキット(G4122F:アジレント社)を用いてそれぞれの群の7週齢における肝臓の遺伝子発現解析を行った。

(IV) 統計解析

統計解析はエクセルを用いて*t*検定を行い、FA群とCN群の比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

群の数(出生した母獣のうち、仔を53日目まで飼育できた数)は、CN、FA群ともに $n=10$ 匹ずつとなった。両群の平均出生児数(各 $n=10$)はCN群で 6.43 ± 1.99 匹、FA群で 5.63 ± 1.03 匹となり、CN群の方が多い傾向がみられたが、両群間に有意差は認められなかった。

出生後50日までの平均摂食量(各 $n=10$)は、全ての日においてCN群と比較してFA群で多くなる傾向が見られた。FA群の1日あたりの平均摂食量はCN群と比較して出生後2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 24, 49日目において有意に増加していた(Fig. 1)。

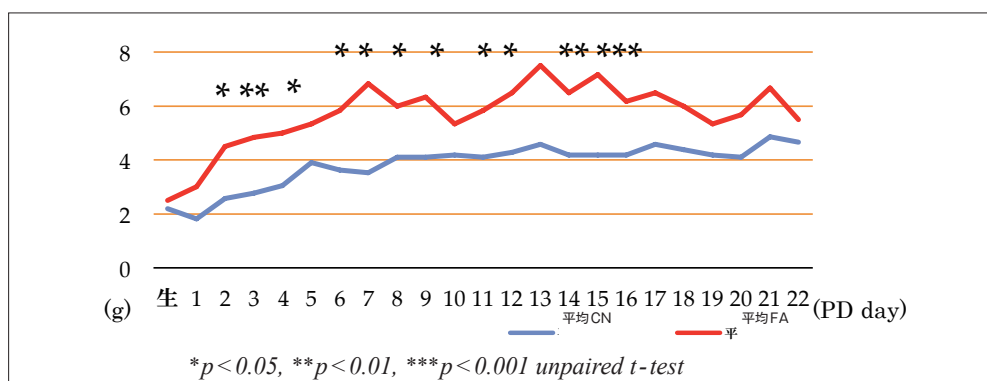


Fig. 1 Food Intake

出生後4日目の平均体重は、CN群で雄 2.54 ± 0.22 g、雌 2.35 ± 0.51 g、雌雄平均 2.42 ± 0.37 gとなったのに対し、FA群では雄 2.04 ± 0.23 g、雌 1.90 ± 0.09 g、雌雄平均 2.10 ± 0.24 gとなりCN群と比較してFA群が小さい傾向を示したが有意な差ではなかった。

出生後8日目の平均体重は、CN群で雄 4.28 ± 0.69 g、雌 3.72 ± 0.50 g、雌雄平均 4.14 ± 0.42 gとなったのに対し、FA群では雄 3.81 ± 0.45 g、雌 3.7 ± 0.73 g、雌雄平均 3.74 ± 0.48 gとなり雄ではCN群と比較して、FA群の体重が有意に減少していた。

出生後22日目の平均体重は、CN群で雄 8.28 ± 0.77 g、雌 7.20 ± 1.04 g、雌雄平均 7.74 ± 1.05 gとなったのに対し、FA群では雄 8.16 ± 1.80 g、雌 7.37 ± 1.02 g、雌雄平均 7.76 ± 1.53 gとなり、出生後より、週数を重ねることによりFA群の体重がCN群と逆転し、大きくなる傾向がみられた。

出生後22日目の空腹時血糖値は、CN群では雄で 146.5 ± 36.7 となり、雌では 145.4 ± 25.7 、雌雄平均が 146.0 ± 31.9 に対し、FA群では、雄で 132.64 ± 21.6 となり、雌では 130.47 ± 20.17 、雌雄平均 131.5 ± 20.5 となった。両群間に差は認められなかった。

出生後50日目における糖負荷前における平均空腹時血糖値は、CN群では雄で 217.6 ± 33.0 、雌で 163.4 ± 36.7 、雌雄平均値は 195.0 ± 43.5 となった。FA群では、雄では 155.1 ± 37.3 、雌では 165.8 ± 46.9 、雌雄平均値は 161.0 ± 42.5 となった。CN群と比較して、FA群では雄の平均値、雌雄の平均値ともに有意に低値を示した。

出生後50日目に行った糖負荷試験の結果は、糖負荷前の血糖値を100%として負荷後0分、15分後、30分後、60分後、120分後の値を変化率で示した。OGTTでは、CN群の雄において0分104%、15分後218%、30分後249%、60分後167%、120分後91%、雌においては0分110%、

15分後232%、30分後236%、60分後148%、120分後79%となり、FA群においては雄で0分93%、15分後196%、30分後215%、60分後167%、120分後95%、雌で0分123%、15分後245%、30分後245%、60分後170%、120分後106%となった。CN群とFA群の比較では、雌の120分値でCN群と比較してFA群で有意に高値を示した(Fig. 2)。

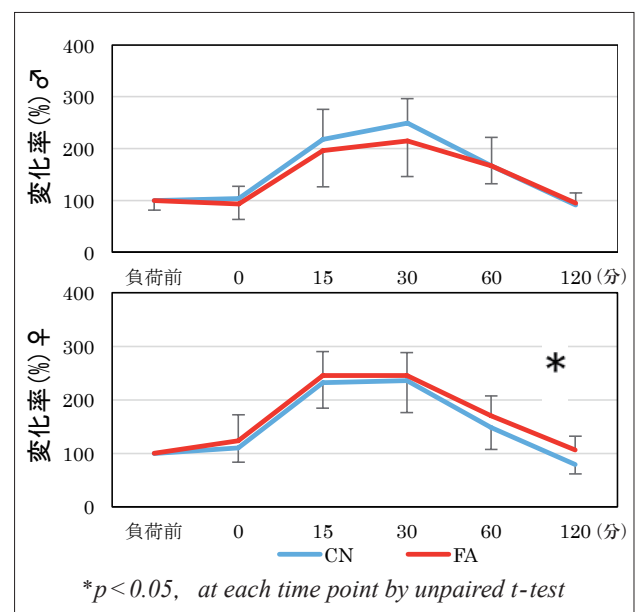


Fig. 2 Rate of change of blood glucose level

出生後22日、50日、53日目の血清インスリン値は、CN群では22日目雄 3318.9 ± 122.5 、雌 3633.5 ± 73.5 、50日目雄 3802.2 ± 117.0 、雌 3743.2 ± 120.9 、53日目雄 3880.6 ± 141.9 、雌 3790.0 ± 298.5 となった。FA群では、22日目雄 2965.0 ± 94.7 、雌 2744.4 ± 186.6 、50日目雄 2618.8 ± 142.1 、雌 2702.2 ± 365.7 、53日目雄 2855.0 ± 386.0 、雌 2674.1 ± 239.7 となった。CN群と比較して、22日、50日、53日いずれの値においても、雌雄共にFA群の血清インスリン値は低値を示した(Fig. 3)。

組織学的な検討においては、上述したインスリン値の違いを検討するため、摘出した膵臓を用いてインスリン染色を行った。その結果、53日目の膵臓ではCN群と比較してFA群で抗インスリン抗体陽性細胞の面積が増加していた(Fig. 4)。

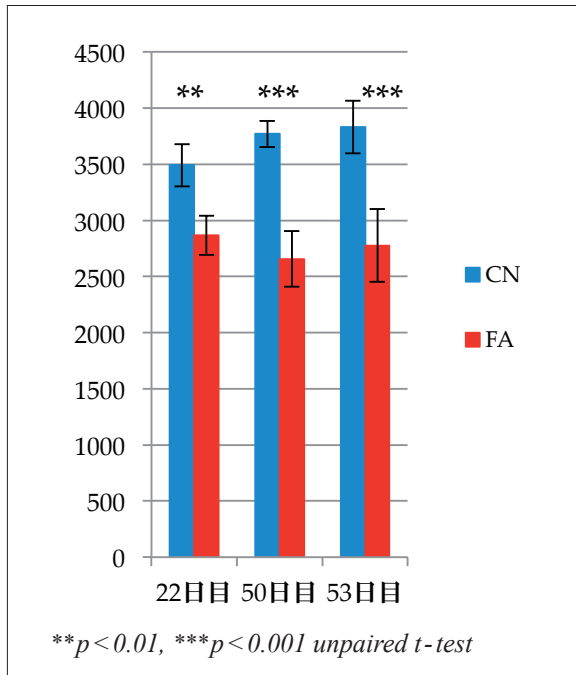


Fig. 3 Serum insulin concentration

DNAマイクロアレイについては仔の肝臓を用いて行ったが、現在その結果について解析を進めている。

考察とまとめ

母獣の妊娠期の葉酸過剰摂取により、仔の出生後における過食、糖負荷後の血糖値低下抑制、インスリン分泌能低下が起こる可能性が示された。しかし、インスリン染色により、インスリン陽性細胞の減弱が見られなかったことから、インスリンの産生は保たれている可能性がある。今後、胎

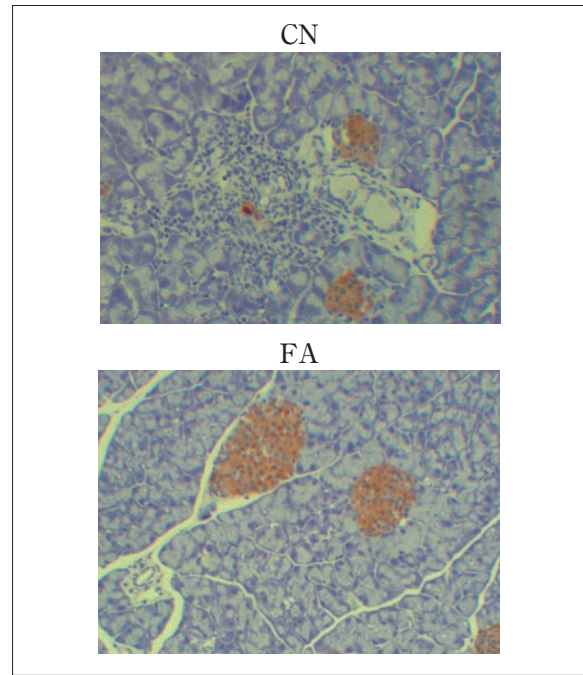


Fig. 4 Insulin Immunostaining

生期の葉酸がインスリンの分泌へ及ぼすメカニズムについて検討する必要性を見出した。

今後は日本の現状に即し、葉酸過剰摂取が耐糖能や糖代謝にどのような影響を及ぼすかについて、さらなる検討を進めていく必要がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団並びに関係者の皆様に篤く御礼申し上げます。

Effect of high maternal folic acid supplementation on glucose metabolism in mouse offspring

Yuri Kintaka

*Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life
Jumonji University*

Maternal supplementation of folic acid lowers the risk of birth defects in offspring; hence, many countries encourage periconceptional folic acid supplementation in the prenatal period. Excessive supplementation of folic acid is becoming a worldwide problem. Our previous investigation on the effect of high maternal folic acid supplementation on mouse offspring showed that exposure to excessive folic acid in the prenatal period down regulated the *Ins2* gene in the liver and attenuated the number of insulin-staining positive cells. Therefore, excessive supplementation of pteroyl-monoglutamic acid in the prenatal period may affect the glucose tolerance of pups. To investigate this, mated C57/BL mice were divided into two dietary groups and fed the AIN93G diet containing 4 [control group (CN)] and 40 mg folic acid/kg of diet [folic acid group (FA)] in the maternal period. On postnatal day (PD) 22 and PD 50, fasting blood glucose was compared among the offspring of both groups. The oral glucose tolerance test on PD 50 for the female FA group showed a significantly higher blood glucose rate of change at 120 min post loading. Furthermore, folic acid had reduced fasting serum insulin concentrations at PD 22, PD 50 (after 8 h of fasting), and PD 53 (no fasting). On the otherhand, the difference was not observed in the number of insulin-staining positive cells of both groups. In conclusion, our results suggest that excessive maternal supplementation of folic acid exacerbates the detrimental effect on insulin secretion and glucose intolerance.