

妊娠期のカルシウム制限が血清中性脂肪及び母乳の脂肪酸組成に及ぼす影響

Effects of calcium restriction during pregnancy to serum triglyceride and breast milk fatty acid composition.

外尾 亜利珠¹⁾、古田 美咲²⁾、熊井 まどか²⁾

1)長崎短期大学地域共生学科、2)長崎国際大学健康管理学部健康栄養学科

要旨

【目的】 現在、生活習慣病の成因として FOAD 説・DOHaD 説が注目されている。本研究は、妊娠期のカルシウム (Ca) 制限が、血清中性脂肪 (TG) 及び母乳中の脂肪酸組成に及ぼす影響について検討した。

【方法】 5 週齢 SD 系雌性ラットに、コントロール食又は Ca 制限食を摂取させ、交配を行った。仔は生後 21 日目に離乳し、離乳時に搾取した母乳中の各脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより測定した。母体及び仔の採血は、尾静脈から行った。

【結果】 出産直前の母体、及び離乳後の母体・仔において、TG は Ca 制限食群で高値を示した。離乳時の母乳はコントロール食群と比較し Ca 制限食群において、ラウリン酸 (C12)・ミリスチン酸 (C14) 及び EPA (C20:5, n-3) は有意に高値を示し、パルミトレイン酸 (C16:1)・ γ -リノレン酸 (C18:3, n-6) は、有意に低値を示した。

【結論】 妊娠期の Ca 制限は、母体・仔の TG 及び母乳中の脂肪酸組成に影響を与えらる。

キーワード：カルシウム 妊娠期 FOAD DOHaD

1. 目的

近年、世界的に生活習慣病が増加し、この予防が課題となっている。生活習慣病は、遺伝的要因と生活習慣の 2 つの要因により発症するという考えが主であったが、現在第 3 の要因として、Barker らが提唱した成人病胎児期発症 (Fetal Origins of Adult Disease: FOAD) 説が注目されている。FOAD は、「受精時、胎芽期、胎児期または乳幼児期に低栄養の環境に曝露されると、成人病の (遺伝) 素因が形成され、その後生活習慣の負荷により成人病が発症する」という概念である。この FOAD 説は、さらにその考え方や概念を拡大して、疾病及び健康は胎児期を中心とした極めて初期にその素因が形成されるという Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説に発展している¹⁾。

日本では若い女性のやせ願望が強く、ここ 40 年で妊娠可能な時期の平均体重が低下し、近年では低栄養状態が危惧されている。BMI < 18.5 の日本人女性のやせの割合は、1980 年では 20 代で 13.1%、30 代で 7.9%、40 代で 4.9%であったが、2017 年では 20 代で 21.7%、30 代で 13.4%、40 代で 10.6%となっており、1980 年と比較すると 20 代で 8.6%、30 代で 5.5%、40 代で 5.7%も増加している²⁾。また、日本では「小さく産んで大きく育てる」という考え方があり、出生時の平均体重は、1975 年では 3,200 g であったが、2009 年に 3,020 g と約 200 g 減少している。この出生体重の減少に伴い、2,500 g 未満の低出生体重児が増加しており、1975 年には約 5%であったが、2018 年には約 9.4%となっており、約 10 人に 1 人の割合で低出生体重児が生まれている³⁾。経済協力開発機構 (OECD) に加盟している 25 か国における低出生体重の割合は約 7%である中、日本の割合が高い値となっている⁴⁾。

Ca は体内において体重の 1~2%を占め、そのうち 99%は骨及び歯に存在する。残りの 1%は血液中に含まれ、筋肉の収縮や脂質代謝などの役割を担っている⁵⁾。また、骨の形成に必要な不可欠な栄養素であると同時に、脂質やグリコーゲンの代謝、脂肪細胞の増殖や分化など、多くの生命活動に重要な役割を果たしていると考えられている⁶⁾。妊娠中や授乳中は Ca 吸収率が増加するため、「日本人の食事摂取基準 2020 版」で妊婦や授乳

婦に対するCaは付加されていない⁷⁾。Ca摂取状況は非妊娠時においても全ての年代で推奨量の650 mg/日を満たしていないことから⁸⁾、妊娠時には母体と胎児の需要に満たない可能性がある⁴⁾。

脂質は、母乳成分の中で乳児が必要とするエネルギーの約50%を賄っているだけでなく、脂溶性ビタミンの媒体として、またエイコサノイドの前駆体としても重要である。母乳の脂質中には、リノール酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、 α -リノレン酸、エイコタペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)など数多くの脂肪酸が含まれている⁹⁾。母乳組成は一般に母親の食事によって影響され、特に脂肪酸組成及び脂溶性ビタミンや水溶性ビタミンの含量が食事のこれらの栄養成分レベルによって影響される¹⁰⁾。

そこで、本研究では妊娠前及び妊娠中にCa制限を行い、母体・仔の血清中性脂肪(TG)及び母乳の脂肪酸組成への影響について検討することを目的とする。

2. 方法

1). 飼料組成

乾式灰化法に従い、飼料原料であるカゼイン、 α -コンスターチ、 β -コンスターチ、AIN-93G ビタミン Mix を灰化し、そのサンプルを用いて試料溶液を作成した。試料溶液中のCa濃度はAAAnalyst800(PerkinElmer)を用いて干渉抑制剤添加-原子吸光法で測定した。AIN-93G ミネラル Mix [オリエンタル酵母工業株]はCaを除去したものを使用し、CaCO₃を添加してCa量を調整した。実験食は、AIN-93Gの組成及び飼料原料中のCa量に基づき、飼料1 kg当たりのCa含有量がコントロール食で5,049 mg、Ca制限食で47 mgとなるように調製した。作成した2種類の実験食は、妊娠前及び妊娠期間中の母体の飼料とした。出産後の母体及び仔は固形飼料[CE-2(日本クレア)]を用いて飼育を行った。

2). 実験動物・飼育条件

5週齢SD系雌性ラット[九動株]8匹を用い、1週間コントロール食で予備飼育し、各群4匹ずつに分け、4週間それぞれの実験食で飼育した。10週齢より同系雄性ラットと交配を行い出産させた。授乳期間中の母体は、固形飼料を摂食させた。

仔は生後24時間以内に1母体当たり雌雄3匹ずつになるように調整し、生後21日目の離乳まで母仔同ケージで母乳により飼育した。

ラットは、室温24℃、湿度60%、明暗サイクル12時間(7:00~19:00明期)に調節した飼育室で管理した。飼育中の飼料、蒸留水は、自由摂取とした。

3). 採血

飼育期間中の母体の採血は、週に1回、尾静脈から行った。解剖時の血液は腹大動脈から採取した。仔において、離乳開始時より隔週、尾静脈から採血を行った。

血液は、遠心分離(3,000 rpm、10分間、4℃)を行い、血清を用いた。

4). 母乳の採取

出産後21日目の母体にオキシトシン(株式会社ペプチド研究所)を2 IU/40 mL腹腔内投与し、30分後搾乳装置を用いて母乳の採取を行った。

5). 母乳の脂肪酸組成の測定

母乳50 μ Lに20倍量のクロロホルム-メタノール(2:1)混合液を加えて総脂質を抽出後、クロロホルム-メタノール(2:1)混合液の0.2倍量の蒸留水を加え攪拌した。3,000 rpm、5分間遠心後、下層を採取し揮発させた。その後、n-ヘキサンに転溶させ、2N KOH/メタノールを加えメチルエステル化し、遠心後の上清をガスクロマトグラフィー(GC)[装置:GC-2014(島津製作所)、カラム:DB-WAX(Agilent Technologies)]

で測定した。条件は、カラム温度：150～250℃、上昇速度：5℃/分、注入温度：250℃、スプリット比：50：1に設定した。母乳中の脂肪酸は、F.A.M.E Mix, C4-C24 (SIGMA-ALDRICH) の保持時間から同定した。母乳中の各脂肪酸割合は、クロマトグラフ総面積より算出した。

6). 母体・仔の空腹時血清中性脂肪濃度測定

トリグリセライド E テストワコー (FUJIFILM) を用いて、妊娠 21 日目・産後 21 日目の母体血清及び生後 21 日目の仔血清の TG 濃度を測定した。サンプルは 2 回測定し、その吸光度の平均値を求め、標準液の吸光度に対する比から TG 濃度を算出した。

7). 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。検定には IBM SPSS Version 22.0 (IBM) を使用した。母体の実験食群間の比較には、Mann-Whitney の U 検定を行った。仔の場合は一元配置分散分析を使用し、等分散性の検定を行った後、等分散性が成り立つときは Bonferroni 検定、等分散性が成り立たない場合は Dunnett T3 検定を用いた。有意水準を $p < 0.05$ とした。

3. 結果

1). TG 濃度

妊娠 21 日目の母体 TG 濃度は、コントロール食で 119.3 ± 64.9 mg/dL、Ca 制限食群で 254.5 ± 86.8 mg/dL であり、Ca 制限食群が高値を示したが、有意差はみられなかった (図 1)。

産後 21 日目の母体 TG 濃度は、コントロール食で 59.2 ± 13.8 mg/dL、Ca 制限食群で 94.7 ± 72.1 mg/dL であり、妊娠中と同様に Ca 制限食群で高値を示した (図 2)。

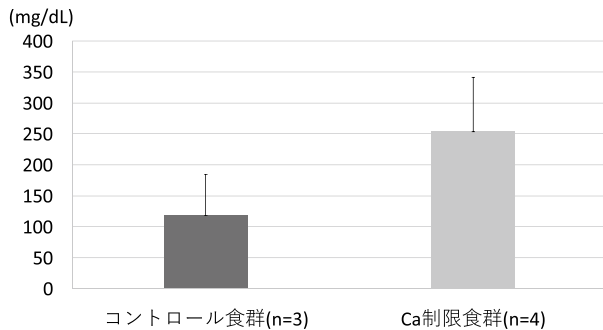


図 1 母体出産直前 血清中性脂肪濃度

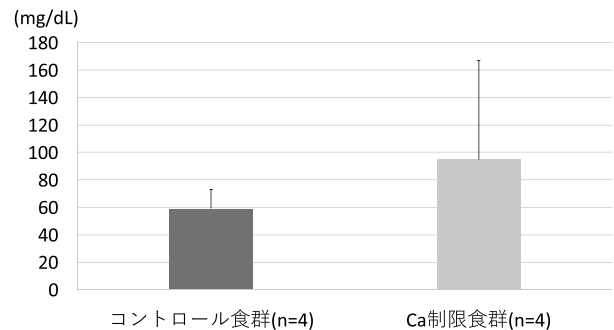


図 2 母体離乳時 血清中性脂肪濃度

生後 21 日目の仔 TG 濃度は、雄においてコントロール食群： 191.3 ± 68.8 mg/dL、Ca 制限食群： 220.1 ± 63.9 mg/dL、雌ではコントロール食： 159.8 ± 60.2 mg/dL、Ca 制限食群： 201.3 ± 137.6 mg/dL となり、雌雄ともにコントロール食群と比べ、Ca 制限食群で高値を示したが、両群間で有意差は認められなかった (図 3)。

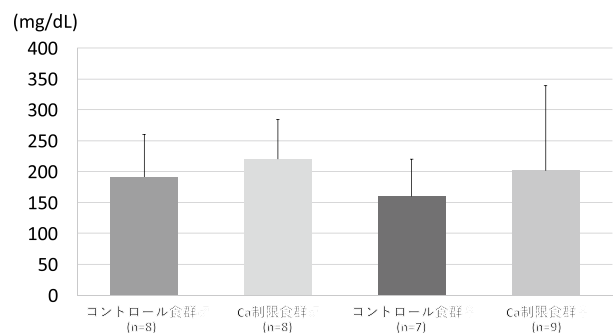


図 3 仔離乳時 血清中性脂肪

2). 母乳の脂肪酸組成

母乳の脂肪酸組成において、飽和脂肪酸のラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14) は共にコントロール食群と比較してCa制限食群で有意に高値を示した (表1)。

また、不飽和脂肪酸では、パルミトレイン酸 (C16:1)、 γ -リノレン酸 (C18:3, n-6) がコントロール食群と比べCa制限食群で有意に低値を示し、EPA (C22:5, n-3) においてはCa制限食群で有意に高値を示した (表2)。

表1 母乳の飽和脂肪酸組成 (平均値 \pm SD)

脂肪酸		コントロール食群 n=4	Ca制限食群 n=4
酪酸	C4	0.62 \pm 0.20*	0.74 \pm 0.21
ヘキサン酸	C6	1.19 \pm 0.32	1.56 \pm 0.25
ラウリン酸	C12	0.52 \pm 0.14	1.03 \pm 0.15**
ミリスチン酸	C14	0.88 \pm 0.04	0.98 \pm 0.05**
パルミチン酸	C16	23.23 \pm 0.48	23.26 \pm 0.39
ステアリン酸	C18	3.39 \pm 0.19	3.49 \pm 0.29
リグノセリン酸	C24	0.58 \pm 0.21	0.73 \pm 0.04
飽和脂肪酸合計		30.41 \pm 1.58	31.80 \pm 1.34

*:n=3

**: $p < 0.05$ 表2 母乳の不飽和脂肪酸組成 (平均値 \pm SD)

脂肪酸		コントロール食群 n=4	Ca制限食群 n=4
パルミトレイン酸	C16:1	3.39 \pm 0.46	2.30 \pm 0.22*
オレイン酸	C18:1 n-9	26.87 \pm 1.58	23.26 \pm 0.39
シスバクセン酸	C18:1 n-7	3.52 \pm 0.06	3.44 \pm 0.21
リノール酸	C18:2 n-6	25.44 \pm 0.96	25.57 \pm 1.47
γ -リノレン酸	C18:3 n-6	1.22 \pm 0.15	0.96 \pm 0.15*
エイコサジエン酸	C20:2 n-6	0.92 \pm 0.17	0.98 \pm 0.13
イコサトリエン酸	C20:3 n-6	5.02 \pm 1.05	5.54 \pm 0.47
アラキドン酸	C20:4 n-6	0.41 \pm 0.07	0.36 \pm 0.06
n-6系合計		33.0 \pm 2.01	33.40 \pm 0.99
α -リノレン酸	C18:3 n-3	1.26 \pm 0.06	1.14 \pm 0.04
EPA	C20:5 n-3	0.71 \pm 0.12	1.05 \pm 0.06*
DHA	C22:6 n-3	0.97 \pm 0.20	0.99 \pm 0.09
n-3系合計		2.94 \pm 0.20	3.17 \pm 0.12
不飽和脂肪酸合計		69.74 \pm 1.09	68.20 \pm 0.61

*: $p < 0.05$

4. 考察

本研究では、妊娠前及び妊娠中のCa制限が、母体・仔のTG及び母乳の脂肪酸組成に及ぼす影響について検討することを目的とした。

母体のTG濃度は出産直前及び離乳直後において、コントロール食群と比べCa制限食群で高い値を示した。また、外尾は妊娠前及び妊娠中のCa制限により母体血清Ca濃度が低値を示し、血清PTH濃度は高くなったことを報告している¹¹⁾。Rostandらは、ラットへのPTH投与及び副甲状腺機能亢進症においてTG濃度が増加したことを報告している¹²⁾。Ca摂取が低いと、1,25ジヒドロキシビタミンD (1,25(OH)₂D)の生成を刺激し、PTHやカルシウム調節ホルモンの分泌を促し、腸におけるCa取り込みを増加させる。細胞内のCaの増加は脂質生成を促し、脂質分解を抑え、脂肪細胞の肥大と脂肪重量の増加を引き起こす¹³⁾。そのため、Ca制限食群の母体のTG濃度が高値を示したのではないかと考えられる。

仔のTG濃度においては、コントロール食群と比較しCa制限食群で高値を示したが、有意差は認められなかった。Ping Liらの研究では、妊娠中及び授乳中の母体にCa制限食を与えた仔は生後21日目の血漿TG濃度が有意に高くなったことが報告されており、妊娠期・授乳期のCa状態が脂質代謝に影響を与えたことを示している⁶⁾。今回、授乳期にはCa制限をしていないことから、妊娠中の母体のCa制限が仔TG濃度に影響を及ぼしている可能性がある。

Ca制限食群の母乳の脂肪酸組成において、ラウリン酸(C12)、ミリスチン酸(C14)及びEPA(C20:5, n-3)は有意に高値を示し、パルミトレイン酸(C16:1)、 γ -リノレン酸(C18:3, n-6)は、有意に低値を示した。一価不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸(C16:1)は、 $\Delta 9$ デサチュラーゼにより飽和脂肪酸であるパルミチン酸(C16)に2重結合を導入して変換する¹⁵⁾。そのため、パルミトレイン酸(C16:1)が低値を示したのは、 $\Delta 9$ デサチュラーゼの影響が関係しているのではないかと考えられる。多価不飽和脂肪酸であるリノール酸(C18:2, n-6)から γ -リノレン酸(C18:3, n-6)の不飽和化には $\Delta 6$ デサチュラーゼ、エイコサテトラエン酸(C20:4, n-3)からEPA(C20:5, n-3)では $\Delta 5$ デサチュラーゼが触媒する(図4)。西谷らの研究では、エネルギー・タンパク質制限した飼料を産後0日から14日までの間与えた場合、産後12日目の母乳において、リノール酸(C18:2, n-6)、 γ -リノレン酸(C18:3, n-6)で有意に増加し、アラキドン酸で有意な変化がなかったことから、デサチュラーゼ活性が減少していることを示している¹⁶⁾。今回、母体のCa制限食によりEPA(C20:5, n-3)は高値を示し、 γ -リノレン酸(C18:3, n-6)は低値を示したことは、母体の栄養不良に共通する反応として $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性が関与しているのではないかと考えられる(図4)。

今回、妊娠期のCa制限が、TG及び母乳の脂肪酸組成に及ぼす影響について検討したが、母体及び仔のTGで有意差は見られなかった。これは妊娠中に不足するCaを母体が補い、仔へ輸送するためであると考えられる。また、母乳中の脂肪酸組成に有意な差がみられたことから、妊娠期のCa制限が脂質代謝に影響を与えることが予想される。今後は、母体及び仔の脂質代謝に関する因子について更なる検討をしていきたい。

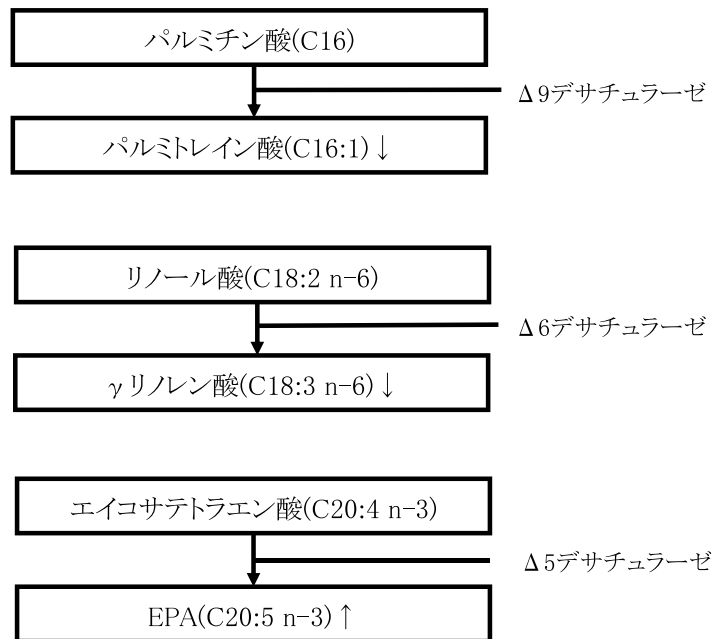


図4 乳汁中の脂肪酸の不飽和化反応

参考文献

- 1) 福岡秀興 (2008) : 胎内低栄養環境と成人病素因の形成 . 日産婦誌 60 卷 9 号 . 300-305
- 2) 厚生労働省 (2018) : 平成 29 年国民健康・栄養調査結果の概要
- 3) 厚生労働省 (2019) : 平成 30 年人口動態統計年報統計表
- 4) 野末みほ, 猿倉薫子, 瀧本秀美 (2012) : 母体と胎児の需要から見た妊娠期におけるカルシウムの役割 Nutrition Reviews 日本語版 . 79, 152-167
- 5) M.F. ホリック /B. ドーソン-ヒューズ (2009) : 骨の健康と栄養科学大辞典 . 西村書店 p74
- 6) Ping Li 1, Xuelian Chang, Xiuqin Fan, Chaonan Fan, Tiantian Tang, Rui Wang, Kemin Qi (2018) : Dietary calcium status during maternal pregnancy and lactation affects lipid metabolism in mouse offspring. Sci Rep 8;8 (1) :16542
- 7) 厚生労働省 (2019) : 日本人の食事摂取基準 2020
- 8) 厚生労働省 (2011) : 平成 19 ~ 23 年国民健康栄養調査 (妊娠・授乳婦別データ)
- 9) 前田隆子・高山美佐子*1・三瓶まり・笠置綱清・田中俊行本1・岩井伸夫*2・能勢隆之 (1996) : 妊産婦の血清中脂肪酸と母乳中脂肪酸組成に関する研究 - とくに、エイコサペンタエン酸に関する検討 - 鳥医短大紀要, 第 25 号, 15-24
- 10) 米久保明得 (1999) : 母乳および調製粉乳と乳児の脂質栄養, 日本油学会誌 第 10 号, 1025-1031
- 11) 外尾亜利珠 (2016) : 妊娠期のカルシウム制限が母体及び仔の IGF-1 に及ぼす影響, 長崎国際大学大学院修士論文
- 12) STEPHEN G. ROSTAND and TILMAN B. DRÜ EKE (1999) : Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. Kidney International, 56: 383-392
- 13) Frank B. Hu (2010) : 肥満の疫学, 名古屋大学出版会 p258
- 14) C J Bautista, S Montaña, V Ramirez, A Morales, P W Nathanielsz, N A Bobadilla, E Zambrano (2016) : Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. Br J Nutr 14;115 (3) :538-546
- 15) 木原章雄, (2010) : 脂肪酸の多彩な代謝、生理機能と関連疾患, 生化学 第 82 卷・第 7 号 591-605
- 16) 西谷しのぶ, 古田千恵, 坂内慎 (2015) : 授乳期におけるタンパク質およびカロリー制限が乳汁成分と子どもの成長に与える影響, 最新医学 70 卷・5 号 74-81