

メラトニンの胎児抗酸化能増強作用に関する研究

橋本結花・岡谷裕二・田辺恵子・千浦淑子・西田佳世・馬場才悟
(臨床看護学)

Melatonin Stimulates Plasma Total Antioxidant Status in Fetus

Yuka HASHIMOTO, Yuji OKATANI, Keiko TANABE, Yoshiko CHIURA,
Kayo NISHIDA, Saigo BABA

Department of Clinical Nursing Science, Kochi Medical School

Abstract. Melatonin (MLT) is highly ubiquitous direct free radical scavenger and indirect antioxidant. This study was designed to evaluate maternal-fetal transfer of MLT and stimulatory effect of MLT on antioxidant status in fetus. MLT (6 mg) was administered orally to healthy nonpregnant volunteers and pregnant women who received elective Cesarean section. MLT was administered 2h or 4h before delivery. Blood from non-pregnant women were obtained 1h, 2h and 4h after MLT administration. Blood from maternal vein and umbilical vein were obtained at delivery. Plasma MLT concentration in volunteers increased markedly at 1h (20.27 ± 1.32 ng/ml) compared with the value prior to MLT administration (0.031 ± 0.01 ng/ml) and showed the same level until 4h. Plasma total antioxidant status (TAS) also significantly increased at 1h (1.229 ± 0.065 mM/l) compared with the pre-treatment level (0.984 ± 0.030 mM/l). Plasma MLT concentration in maternal vein markedly increased at 2h (17.83 ± 1.64 ng/ml) and decreased at 4h (13.46 ± 1.61 ng/ml). Plasma TAS also significantly increased at 2h (1.250 ± 0.044 mM/l) compared with the group without MLT treatment (1.018 ± 0.074 mM/l). Plasma MLT and TAS levels in umbilical vein also significantly increased at 2h (17.36 ± 2.64 ng/ml, 1.444 ± 0.060 mM/l) compared with the group without MLT treatment (0.024 ± 0.001 ng/ml, 1.079 ± 0.039 mM/l). These results suggest that MLT readily cross placenta and increase antioxidant activity in fetus. The results also suggest that MLT may have potential clinical applicability for preeclampsia and fetal distress where excess of free radicals are involved in the pathology.

緒 言

メラトニンは主に松果体で産生される活性アミンで、夜間に著明に増量する日内変動を有する¹⁾。メラトニンの研究はこれまで主として生殖生理領域や日内リズムに集約されてきた。し

かしながら、近年、本アミンに強い抗酸化作用を有することが明らかにされて以来、生体老化、炎症、動脈硬化、悪性腫瘍などフリーラジカルがその病態形成に強く関与する疾患に対する抗酸化剤としての薬理作用が注目されている^{2,3)}。

妊娠中のメラトニンの生理的意義については未だ明確ではない。しかし、筆者らは、メラトニンの胎盤移行性は極めて迅速かつ良好であり、胎児のメラトニン産性能は未だ未熟であることから、胎児のメラトニン動態は母体のそれに依存することを明らかにしてきた⁴⁾。また、胎児は低酸素環境下にあり、低酸素負荷に対してはある程度の耐性があるものの、抗酸化能活性は未だ低く、酸化ストレスには弱い特性を有する。さらに、胎児仮死発症の主要因である妊娠中毒症ではフリーラジカルの産生は亢進しており⁵⁻⁷⁾、本疾患の基本的病態である血管攣縮にフリーラジカルが強く関与していることも明らかにしてきた。さらに、メラトニンの直接的な抗酸化作用とは別に、メラトニン投与により絨毛中および胎仔能内の抗酸化酵素である glutathione peroxidase (GSH-Px) および superoxide dismutase (SOD) 活性は増加し、より強い抗酸化能を発揮していることも明らかにした^{8,9)}。

そこで、本研究はメラトニンの経母体投与により、胎児の抗酸化能が増加するか否かを明らかにするために、メラトニン投与後の母体、胎児の血中メラトニン濃度、および Total Antioxidant Status (TAS) を指標に、その経時的変化とその相互関連を検討した。

対象および方法

研究 1. 21歳から52歳までの健康な婦人 9 名を対象とした。研究の同意のもとにメラトニン 6mg を午前 8 時 30 分に内服した。採血は肘静脈より内服直前、内服後 1 時間、2 時間、4 時間に行った。

研究 2. 合併症のない健康妊婦で妊娠 37-39 週に予定反復帝王切開を行った 36 例を対象とした。帝王切開は午後 1 時から 2 時の間に行い、患者の同意のもとに児娩出前 2 時間 (13 例)、および 4 時間 (9 例) にメラトニン 6 mg を内服した。メラトニン内服群およびメラトニン非内服群 14 例共に、児娩出時に母体血、臍帯静脈血を採取した。

血液は直ちにヘパリンを含むチューブに入れ、遠心分離まで氷水中に保存した。4℃下で 3000 回転、10 分間遠心後、血漿を採取し、メラトニン濃度および TAS 活性の測定まで -80℃ 下に保存した。

血漿中メラトニンの測定

1. 血漿中メラトニンの抽出

血漿中メラトニンは逆相系 C-18 ミニカラムを用いて抽出した。純メタノール 1 ml を 2 回、ついで純水 1 ml を 2 回添加し、カラムを活性化した後、血漿 0.2 ml を加えた。10% メタノール 1 ml で 2 回、ついで n-ヘキサン 1 ml で洗浄後、100% メタノール 1 ml で溶出した。メタ

ンノール相は冷却遠心で吸引乾固し、再組成用バッファ0.25mlで可溶し、測定まで-20℃下に保存した。

2. メラトニン濃度の測定

抽出したメラトニン濃度の測定はBuhlmann Laboratories AG社製のDIRECT SALIVA MELATONIN ELISAキット (スイス) を用いて測定した。本キットの測定感度は1pg/mlで、測定間および測定内変動係数は10%以内である。

Total Antioxidant Status (TAS) の測定

血漿中のTASはRandox Laboratories 社製 (英国) のTotal Antioxidant Statusキットを用いて測定した。この測定系の原理はmetmyoglobinが過酸化水素と反応し ferrylmyoglobinを産生する。ついでクロモゲンである (2, 2'-azinodi-[ethylbenzthiazoline sulfonate]; ABTS) を ferrylmyoglobinと反応させることで青緑色のラジカル種ABTS^{•+}を産生し、これを600nmの吸光度を測定する。検量のためのスタンダードは、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acidを用いた。TAS含量はmmol/l で表わした。本測定系の感度は0.25 mmol/l, で、測定間および測定内変動係数は5%以内である。

統計処理

血漿中メラトニン濃度およびTAS含量はmean ± SE で表わした。メラトニン投与後の経時的変化についてはone way of analysis of variance を用い、各時間の差については Scheffe' testを用いた。また、二群間の差についてはMann-Whitney U testを用いた。P<0.05を示すものを推計学的に有意差ありとした。

成 績

研究1

メラトニン投与後の血中メラトニン濃度および TAS 活性の変動

メラトニン内服前の血漿中メラトニン濃度は0.031 ± 0.006 ng/mlで、メラトニン内服後1時間、2時間、4時間で、それぞれ20.273 ± 1.324 ng/ml, 22.117 ± 1.133 ng/ml, 20.032 ± 1.108 ng/mlで著明な増加がみられた。しかしながら、1時間値、2時間値、4時間値に有意の差はみられなかった (図1)。

一方TAS含量はメラトニン投与前、投与後1時間、2時間、4時間で、それぞれ0.984 ± 0.03 mmol/l, 1.229 ± 0.065 mmol/l, 1.358 ± 0.068 mmol/l, 1.249 ± 0.05 mmol/lで、メラトニン投与前に比較し1時間後 (P<0.05, 2時間後 (P<0.001, 4時間後 (P<0.05)で有意に増加した (図2)。

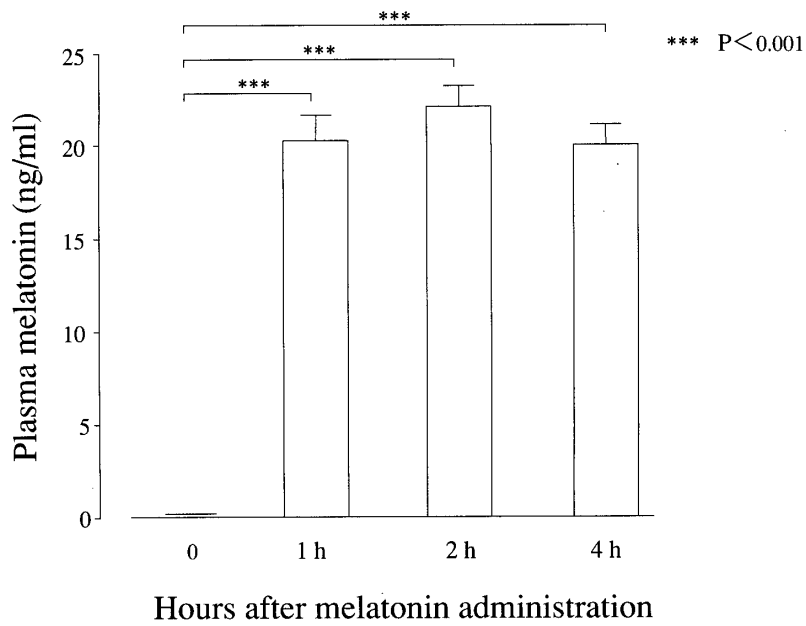


図1. メラトニン内服後の血漿中メラトニン濃度の変動

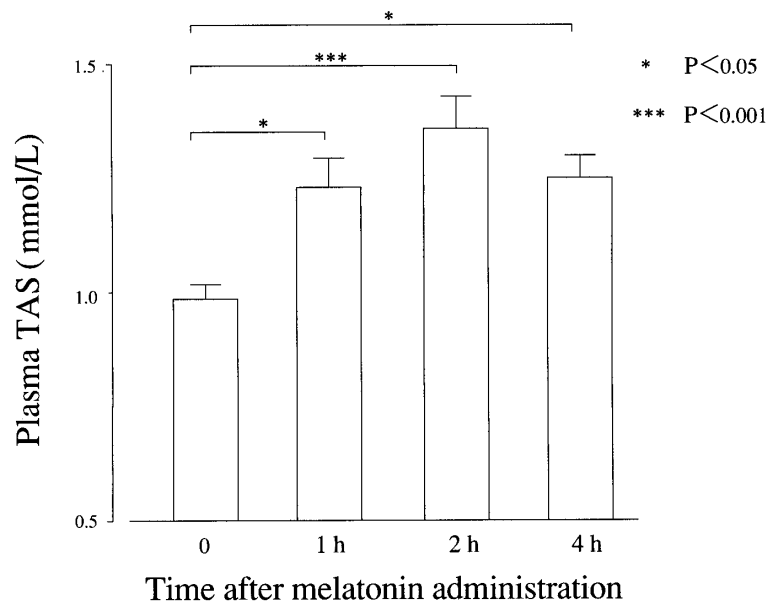


図2. メラトニン内服後の血中TAS含量の変動

研究2

1. 非妊婦と妊婦の血中メラトニン濃度およびTAS含量の比較

非妊婦および妊婦の血漿中メラトニン濃度は、それぞれ 30.03 ± 3.33 pg/ml, 32.88 ± 4.02 pg/mlで、有意の差はみられなかった。一方、非妊婦および妊婦の血漿中TAS含量は、それぞれ 1.178 ± 0.041 mmol/l, 0.999 ± 0.027 mmol/lで妊婦群が有意に高値を示した ($P < 0.01$)。

3. メラトニン投与後の血中メラトニン濃度およびTAS含量の変動

メラトニン非内服群、およびメラトニン内服2時間群、4時間群の母体血漿中のメラトニン濃度は、それぞれ 0.025 ± 0.001 、 17.828 ± 1.640 ng/ml、 13.457 ± 1.610 ng/mlで、いずれも投与群で著明な増加がみられた(図3)。また、臍帯静脈血漿中についても、それぞれ 0.024 ± 0.001 ng/ml、 17.364 ± 2.641 ng/ml、 11.691 ng/mlであり、母体血と同一の変動を示した(図4)。

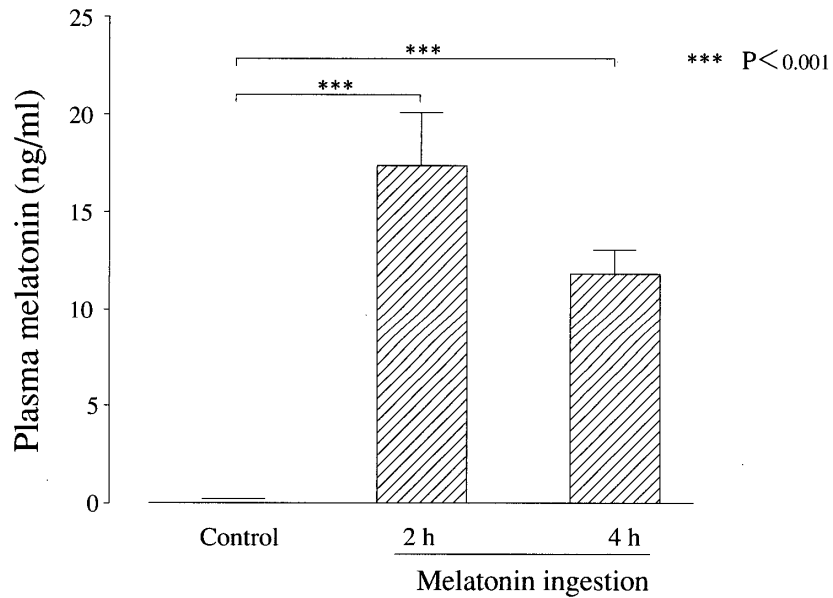


図3. 母体血漿中のメラトニン濃度の変動

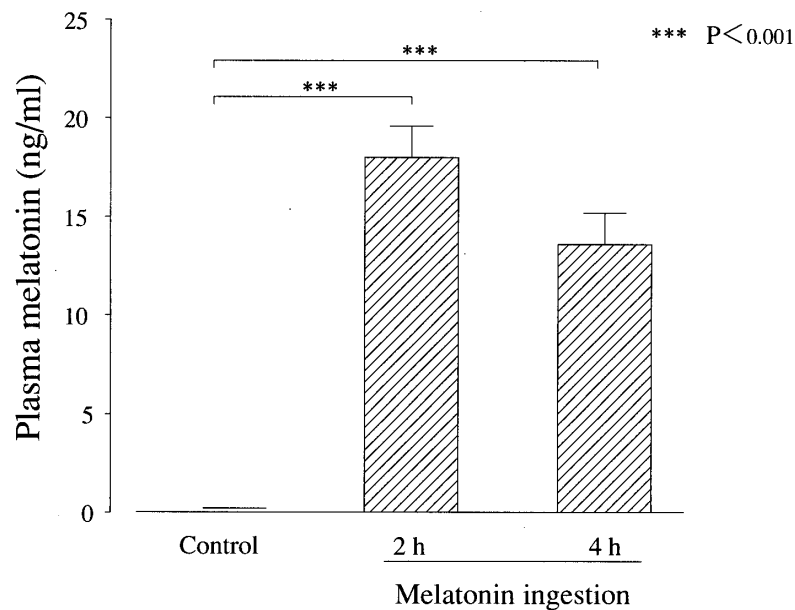


図4. 臍帯静脈血漿中のメラトニン濃度の変動

一方、TAS含量については、メラトニンと類似した変動を示し、メラトニン内服2時間群、4時間群の母体血漿中TAS含量は、それぞれ 1.018 ± 0.074 mmol/l, 1.250 ± 0.044 mmol/l, 1.187 ± 0.038 mmol/lであった(図5)。また、臍帯静脈血漿中についても、それぞれ 1.079 ± 0.039 mmol/l, 1.444 ± 0.060 mmol/l, 1.282 ± 0.070 mmol/lを示した(図6)。メラトニン投与2時間群は非投与群に比較し、母体血 ($P < 0.05$)、臍帯静脈血 ($P < 0.01$) 共に有意

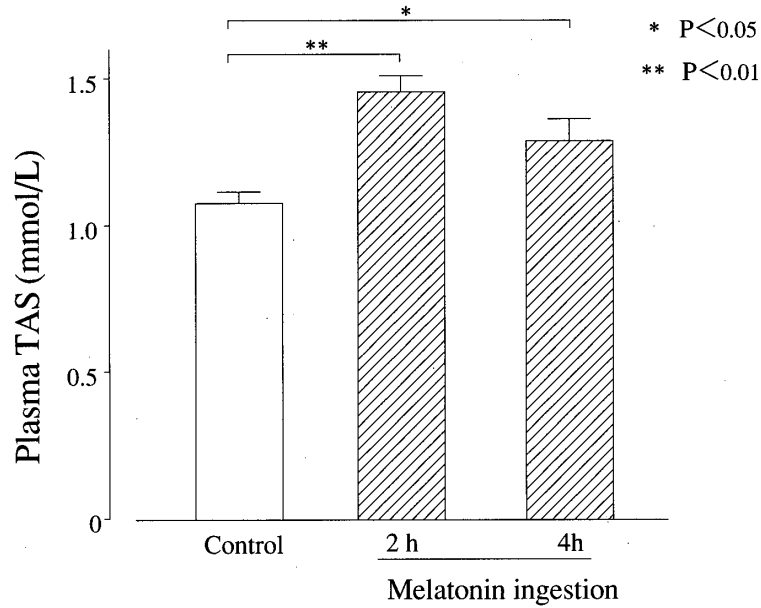


図5. 母体血漿中TAS含量の変動

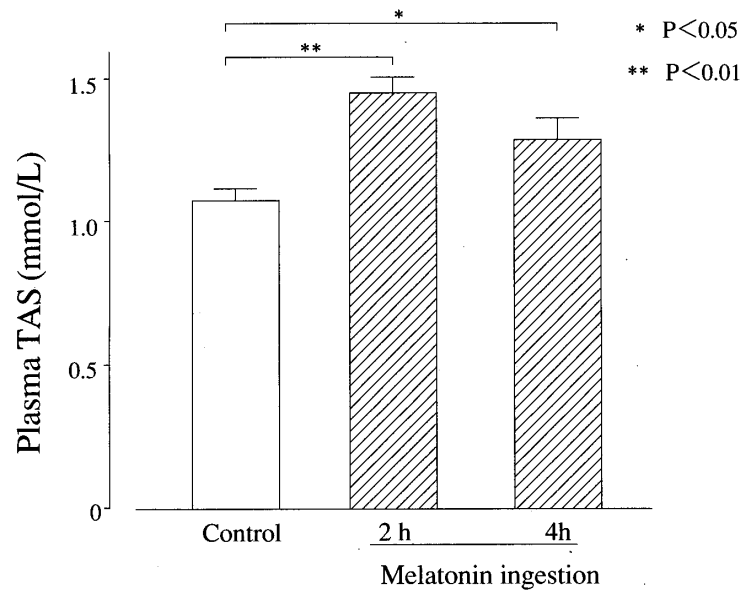


図6. 臍帯静脈血漿中のTAS含量の変動

の増加がみられた。しかしながら、メラトニン非投与群のメラトニン濃度およびTAS含量は、母体血、臍帯静脈血共に有意の差はみられなかった。

考 察

胎児の中樞神経系障害の発症機序については、低酸素症とは別にフリーラジカルの関与が注目されつつある。胎児仮死を認めた新生児血中の脂質過酸化物質濃度は有意の増加がみられている¹⁰⁾。低酸素環境下にある胎児にとっては、低酸素負荷に対してはある程度の耐性を有するものの、フリーラジカルに対しては酸化的障害をきたしやすい特性を有する。また、脳は活発な代謝を維持するために酸素を最も多く消費する臓器であり、ミトコンドリアを中心としたフリーラジカルの産生が多い¹¹⁾。さらに、脳組織は多価不飽和脂肪酸に富み、その不飽和結合はフリーラジカルに対する易酸化性は高いとされる¹²⁾。また、脳組織は非ヘムを多く含み、細胞障害活性の高い水酸化ラジカル(OH·)を産生しやすい¹³⁾。一方、抗酸化系については、抗酸化酵素であるGSH-Pxやcatalaseの活性、およびビタミンE含量は肝臓に比較し低値である¹⁴⁾。このような脳の臓器特異性に加え、胎児ではフリーラジカルに対する抗酸化能がまだ未熟であることから、胎児期のフリーラジカルによる酸化的障害が中枢神経系の長期的予後に強く関与しているものと考えられる。

今回の検討から、メラトニンは迅速に胎盤を通過し胎児に移行することが示された。また、血中のメラトニン濃度も母児共にほぼ同レベルであることから、メラトニンの胎盤通過性は極めて良好なことが示された。このメラトニンの良好な胎盤移行性は羊¹⁵⁾、サル¹⁶⁾でも認められている。妊娠ラットを用いた筆者らの検討でも、メラトニンの母体腹腔内投与により、胎仔脳内メラトニン含量は1時間後にピークを示している⁸⁾。また、生理学的にも胎児の松果体でのメラトニン産生能は極めて低く、胎児に認められる明らかな血中メラトニン濃度の日内変動は母体血中に依存している⁴⁾。メラトニンこのメラトニンの胎盤および脳血液関門の良好な通過性は、メラトニンが水溶性かつ脂溶性である化学的性質によるものと考えられる³⁾。

一方、血中抗酸化能の総合的評価としてのTASについては、非妊婦、妊婦、胎児共に、その血中メラトニン濃度に関連して増量することが明かとなった。メラトニンの抗酸化能については、とくにOH·に対する直接的なスクャベンジャー作用を有し、さらに、superoxide anion radical (O₂·⁻)、singlet oxygen, peroxy radical (LOO·)や細胞障害活性の極めて強い peroxynitrite anion (ONOO⁻) に対する抗酸化作用も知られている^{2, 3)}。さらに、筆者らの検討では、メラトニンを経母体的にラットに投与することで、胎仔脳組織の抗酸化酵素であるGSH-PxおよびSOD活性を増加させることを明らかにした⁸⁾。さらに、ヒト絨毛組織中のGSH-Px活性も高めることも明らかにした⁹⁾。すなわち、メラトニンはそれ自身の直接的な抗酸化作用に加え、間接的には抗酸化酵素活性を高めることでより強い抗酸化作用を発揮しているものと考えられる。

メラトニンの胎児仮死に対する抗酸化薬としての可能性については、筆者等は妊娠ラットを用い、子宮／胎盤の虚血再灌流モデルにより、*in vivo*下に再灌流後に大量に産生するフリーラジカル暴露に対する胎仔脳組織への影響を検討している^{17, 18)}。この虚血再灌流負荷により、胎仔脳および胎盤組織の脂質過酸化、DNAの酸化的障害は増加し、ミトコンドリアの呼吸活性は障害されるが、メラトニンを経母体的に前投与することでこれらの障害は軽減されることを報告している。胎児仮死の主要な発症要因である妊娠中毒症では、血中の脂質過酸化物は増加し、抗酸化物質であるビタミンE濃度およびGSH-Px, SOD活性は低い⁵⁻⁷⁾。しかしながら、胎児血中ビタミンEの濃度は母体に比較し低値であることから、胎盤移行性は不良であることが推測される¹⁹⁾。

胎児仮死および妊娠中毒症にたいする抗酸化剤としてのメラトニンの可能性については未だ議論の多いところである。しかしながら、今回の検討から、メラトニン6 mg投与により、胎児血中のTASの有意の増加が示された。メラトニンは内因性に産生され、重篤な副作用も報告されていないことから、胎児仮死および妊娠中毒症といったフリーラジカルの産生増加が病態形成に強く関与する産科的疾患に対する、抗酸化剤としての臨床応用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Reiter, RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12: 151-180, 1991.
- 2) Tan DX, Chen LD, Poeggeller B, Manchester LC, Reiter, RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57-60, 1993.
- 3) Reiter RJ, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M. Melatonin: Mechanism and actions as an antioxidant. *Curr. Topics. Biophys.* 24: 171-183, 2000.
- 4) Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in human umbilical artery. *J. Pineal Res.* 22: 163-168, 1998.
- 5) Wang Y, Walsh SW, GUO J, Ehang J. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 1695-1700, 1991.
- 6) Sushil K, Wise R. Relationship between elevated lipid peroxides, vitamin E deficiency, and hypertension in preeclampsia. *Mol. Cell Biochem.* 15: 33-38, 1995.
- 7) Poranen, AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 14: 401-405, 1996.
- 8) Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J. Pineal Res.* 28: 89-96, 2000.
- 9) Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara, K, Kaneda C, Fukaya. T. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J. Pineal Res.* 30: 199-205, 2001.
- 10) Schmot H, Grune T, Muller R, Siems, WG, Wauer RR. Increased level of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Perdiatr. Res.* 40: 15-20, 1996
- 11) Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623, 1992.

- 12) Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 32: 71 – 110, 1993.
- 13) Harman D, Hendricks S, EDDY DE, SiEbOId J. Prolongation of life: role of free radical reactions in aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 17: 721 – 725, 1976.
- 14) Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 8: 22 – 26, 1985.
- 15) Yallon SM, Longo LD. Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in the sheep. *Am. J. Physiol.* 252: 799 – 805, 1987.
- 16) Reppert SM, Chez RA, Anderson A, Klein DC. Maternal-fetal transfer of melatonin in non-human primate. *Pediatr. Res.* 13: 788 – 791, 1979.
- 17) Wakatsuki A, Okatani Y, Izumiya C, Ikenoue. N. Melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative lipid and DNA damage in fetal rat brain. *J. Pineal Res.* 26; 147 – 152, 1999.
- 18) Akihiko Wakatsuki, Yuji Okatani, Koichi Shinohara, Nobuo Ikenoue, Takao Fukaya. Melatonin protects against ischemia reperfusion induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *J. Pineal Res.* 31; 167 – 172, 2001.
- 19) Van Saun RJ, Herot TH, Stowe HD. Maternal and fetal relationship in serum vitamin E level. *J. Nutr.* 119: 1156 – 1164, 1988.