

妊娠時におけるビタミン E の役割 —血小板凝集阻止活性を中心に—

奈良県立医科大学産婦人科

赤田 忍 飯岡 秀晃 森山 郁子
久永 浩靖 森本 圭子 一條 元彦

The Role of Vitamin E during Pregnancy—Anti Platelet Aggregation Activity of α -Tocopherol—

Shinobu AKADA, Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA,
Hiroyasu HISANAGA, Keiko MORIMOTO
and Motohiko ICHIJO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

概要 ビタミン E の周産期において果たす役割について知る目的で、血小板凝集を中心に検討し以下の成績を得た。

1. plasma 中ビタミン E (α -tocopherol) 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) は、非妊娠婦人：6.65, 妊娠婦人 (37～40週)：15.5 であり妊娠経過とともに増加を認めた。また、一方、血小板中ビタミン E 濃度 ($\mu\text{g/g protein}$) も非妊娠婦人：99, 妊娠婦人 (37～40週)：244 で妊娠経過とともに増加を認めた。

2. ビタミン E には、in vitro で、ADP (adenosine diphosphate), PAF (platelet activating factor) 惹起血小板凝集の阻止活性を認め、500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、ADP および PAF の血小板凝集をほぼ 100% 阻止した。

3. ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞には著明な血小板凝集阻止活性が存在しており、20 $\mu\text{g/ml}$ (終蛋白濃度) では、ADP および PAF による血小板凝集をほぼ 100% 阻止した。

4. ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞存在下では、ビタミン E の血小板凝集阻止作用は、著明に増強された。

以上の成績より、母体血小板中ビタミン E 濃度は、妊娠経過とともに著明に増加し、胎盤絨毛組織内には、比較的高濃度に、ビタミン E が存在することが判明した。また、ビタミン E には血小板凝集阻止活性があり、胎盤内の微小循環の維持への関与も示された。

Synopsis To clarify the role of vitamin E (α -tocopherol) during pregnancy, we mainly investigated the relation between platelet function and vitamin E and obtained the following results.

1. The concentration of vitamin E (α -tocopherol) in plasma and platelet increased gradually during pregnancy. The concentration of vitamin E in plasma was 6.65 $\mu\text{g/ml}$ in non pregnant women and 15.5 $\mu\text{g/ml}$ in full term pregnant women. And the concentration of vitamin E in platelet was 99 $\mu\text{g/g protein}$ in non pregnant women and 244 $\mu\text{g/g protein}$ in full term pregnant women.

2. Vitamin E (α -tocopherol) inhibited platelet aggregation induced by ADP (adenosine diphosphate) and PAF (platelet activating factor). At a concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ vitamin E almost completely inhibited platelet aggregation induced by ADP and PAF.

3. There exists a strong platelet aggregation inhibiting activity in human placental brush border membrane vesicles. At a protein concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ the brush border membrane vesicles almost completely inhibited platelet aggregation induced by ADP and PAF.

4. With the co-existence of the brush border membrane vesicles, the platelet aggregation inhibiting activity of vitamin E (α -tocopherol) increased prominently.

These results indicate that vitamin E plays an important role in the regulation of platelet function and might contribute to the maintenance of placental microcirculation by inhibiting platelet aggregation.

Key words: Vitamin E • Platelet aggregation • Placenta • Brush border membrane vesicles

緒 言

近年、活性酸素による酸素毒性や過酸化脂質の生成が、生体組織および細胞を障害する機構が次第に判明してきた。生体内には、活性酸素の除去に関与する数々の物質が存在し、活性酸素による組織障害の防御に寄与している。ビタミンEは、脂溶性が高く、膜の脂質層に非特異的に分布し、脂質過酸化反応の現場である細胞小器官内の膜内で重要な役割を果たしている。今回は、ビタミンEが妊娠時において果たす役割につき検討するために、血小板凝集をモデルとして基礎的な検討を行った。

方 法

1. ビタミンEの測定

ビタミンE(α -tocopherol)の測定は、高速液体クロマトグラフィーを用いて施行した⁷⁾。plasmaは、静脈血のクエン酸採血により得た。また、血小板分画は、クエン酸採血後、分別遠心により得た。

2. 対象

20～30歳の合併症のない非妊娠婦人ならびに正常妊娠婦人を対象とし検討を行った。非妊娠婦人ならびに各妊娠週数〔10週、20週、30週、満期(37～40週)〕別に各々5例の平均値ならびにS.D.を求めた。胎盤は、妊娠初期(8～12週)、妊娠中期(20～24週)、妊娠満期(37～40週)の各々5例の平均値ならびにS.D.を求めた。

3. ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞の分離

刷子縁膜小胞は、正常産正常分娩直後のヒト胎盤を用いて、既に報告した方法で分離した¹⁾。蛋白量の測定はLowryの方法に従い施行した⁹⁾。

4. 血小板凝集の測定

多血小板血漿〔platelet rich plasma (PRP)〕を、合併症のない妊婦よりクエン酸採血後、22℃、190g、7分間遠沈し分離した。PRPは、最終濃度が30万/mm³になるように乏血小板血漿を用いて希釈した。血小板凝集能は、PRPを用いて、Born et al. の比濁法によつて最大凝集率の変化を測定した⁴⁾。

5. 試薬

血小板凝集に用いた試薬は、ADP〔adenosine

diphosphate-二光バイオメディカル社製〕、PAF〔platelet activating factor-フナコシ薬品株式会社製〕であつた。

成 績

1. ビタミンE(α -tocopherol)のplasma中、血小板中濃度(図1, 2)

plasma中のビタミンEの濃度(μ g/ml)は非妊娠婦人(コントロール)では、 6.65 ± 0.98 で、また、妊娠婦人では、妊娠10週： 8.2 ± 1.0 、妊娠20週： 11.3 ± 1.9 、妊娠30週： 13.6 ± 1.4 、妊娠満期： 15.5 ± 0.9 であつた。また、血小板中ビタミンE濃度(μ g/g protein)は、非妊娠婦人(コントロール)では 99 ± 25 で、また妊娠婦人では、妊娠10週： 110 ± 23 、妊娠20週： 191 ± 22 、妊娠30週： 211 ± 24 、妊娠満期： 244 ± 19 であつた。

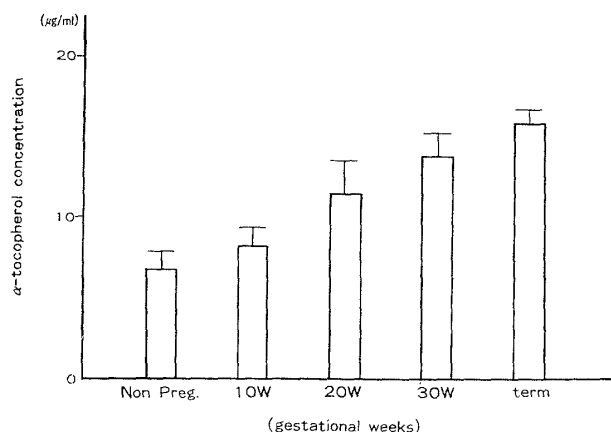


図1 Blood concentration of Vitamin E (α -tocopherol)

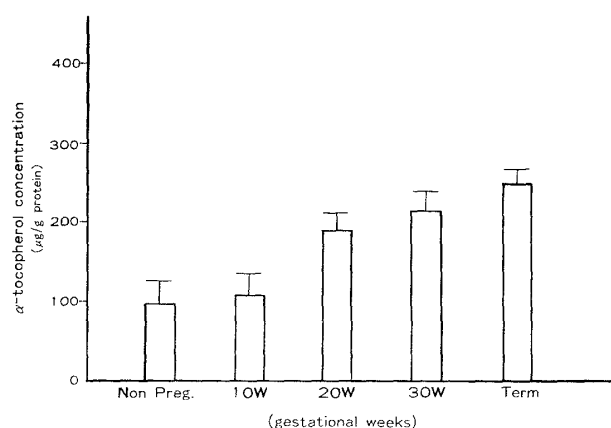


図2 Vitamin E (α -tocopherol) concentration in platelet

2. ビタミン E (α -tocopherol) の血小板凝集に与える影響

ビタミン E の終濃度を変化させて、血小板凝集に与える影響を検討した。

実験は、PRP にビタミン E を添加し、3 分間、preincubation した後に、inducer である ADP ($5\mu\text{M}$)、PAF (2ng/ml) を加えて施行した。コントロール (ビタミン E 無添加時) の血小板二次凝集 (10 分後の値) は、ADP、PAF それぞれ 70%、80% であった。ビタミン E 添加時の血小板凝集率は、ビタミン E 無添加時の血小板二次凝集率を 1.0 とし、それに対する比であらわした。

1) ADP 凝集 (図 3)

ビタミン E $500\mu\text{g/ml}$ 添加時の ADP の血小板二次凝集率は、 0.03 ± 0.01 (平均値 $\pm$ S.D., $n=5$)

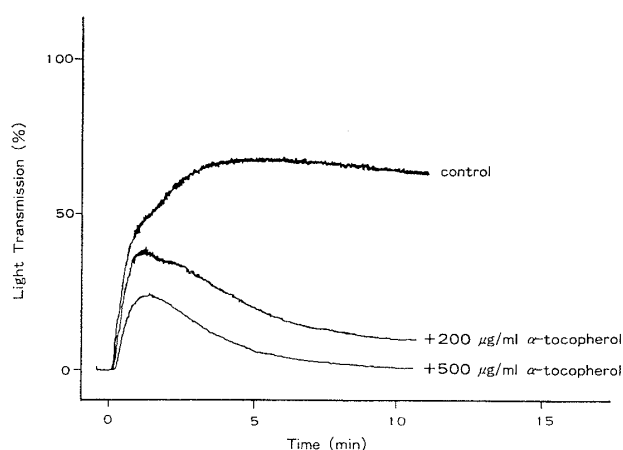


図 3 ビタミン E (α -tocopherol) の血小板凝集に与える影響 ADP ($5\mu\text{M}$)

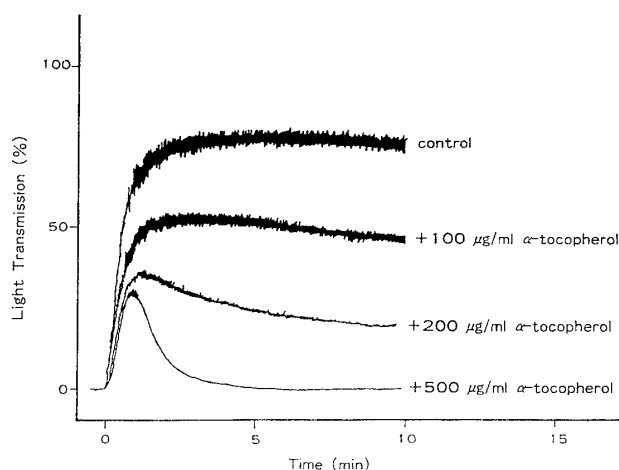


図 4 ビタミン E (α -tocopherol) の血小板凝集に与える影響 PAF (2ng/ml)

であり、ビタミン E によつて ADP 凝集はほぼ 100% 阻害された。

2) PAF 凝集 (図 4)

ビタミン E $500\mu\text{g/ml}$ 添加時の血小板二次凝集率は 0 であり、ビタミン E によつて PAF 凝集は 100% 阻害された。

3. ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞の血小板凝集に与える影響

刷子縁膜小胞の終蛋白濃度を変化させて、血小板凝集に与える影響を検討した。

実験は、PRP に刷子縁膜小胞を添加して、3 分間、preincubation した後に、inducer である ADP ($5\mu\text{M}$)、PAF (2ng/ml) を加えて行つた。コントロール (刷子縁膜小胞無添加時) の ADP ならびに PAF による血小板二次凝集 (10 分後の値) は、そ

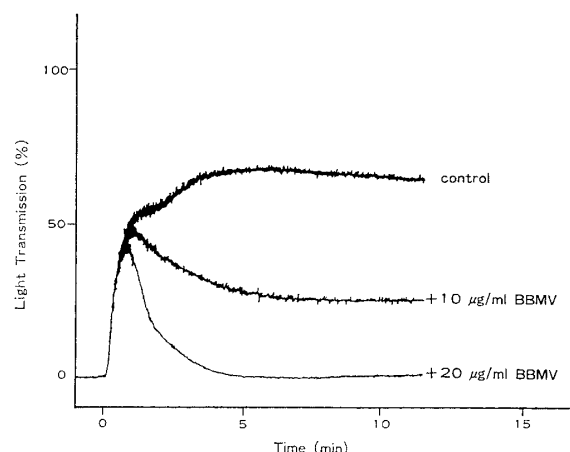


図 5 ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞 (BBMV) の血小板凝集に与える影響 ADP ($5\mu\text{M}$)

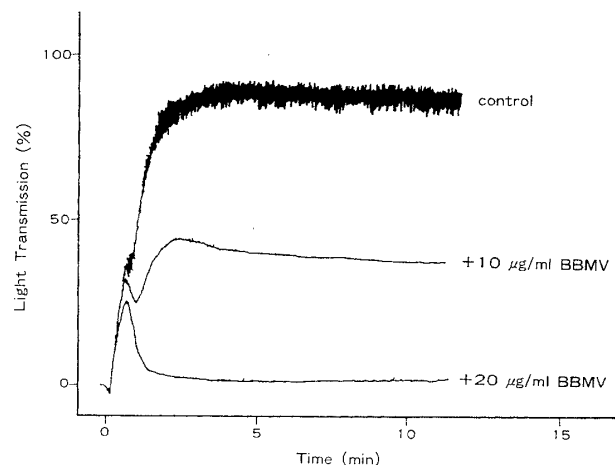


図 6 ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞 (BBMV) の血小板凝集に与える影響 PAF (2ng/ml)

れぞれ72%, 85%であつた。刷子縁膜小胞添加時の血小板凝集率はコントロールの血小板二次凝集率を1.0とし、それに対する比であらわした。

1) ADP 凝集 (図5)

刷子縁膜小胞20 μ g/ml添加時のADPによる血小板二次凝集率は0であり、刷子縁膜小胞によつてADP凝集は100%阻害された。

2) PAF 凝集 (図6)

刷子縁膜小胞20 μ g/ml添加時のPAFによる血小板二次凝集率は0であり、刷子縁膜小胞によつてPAF凝集は100%阻害された。

4. ビタミンE (α -tocopherol) のヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞共存下での血小板凝集阻止活性

刷子縁膜小胞存在下でビタミンEの血小板凝集阻止活性につき知るために、刷子縁膜小胞ならびにビタミンEを各々単独で、PRPに作用させた場合、ならびに、両者を同時に作用させた場合の血小板凝集に与える影響につき検討した。なお、PRPと、刷子縁膜小胞ならびにビタミンEとのpreincubation時間は3分間とした。

1) ADP 血小板凝集 (図7)

刷子縁膜小胞2.0 μ g/ml存在下での血小板二次凝集の阻止率は22%であり、また、ビタミンE 20 μ g/ml存在下での血小板二次凝集の阻止率は11%であつたが、両者の共存下での血小板二次凝集阻止率は100%であつた。

2) PAF 血小板凝集 (図8)

刷子縁膜小胞2.0 μ g/ml存在下での血小板二次凝集の阻止率は10%であり、また、ビタミンE 20 μ g/ml存在下での血小板二次凝集の阻止率は15%であつたが、両者の共存下での血小板二次凝集阻止率は100%であつた。

考 案

妊娠中に血中のビタミンE濃度が増加することは、従来より指摘されてきたが、その役割については明らかでない点も多い。ビタミンEは、ミトコンドリア膜や細胞膜などの生体膜内で過酸化脂質の生成を防ぐことで、free radical scavengersとしての役割を果たしている。重症妊娠中毒症では血中のビタミンE濃度が低下しており、その病態の発生への関与も示されている¹⁰⁾。妊娠中毒症については、慢性のDICを、その病態の基礎

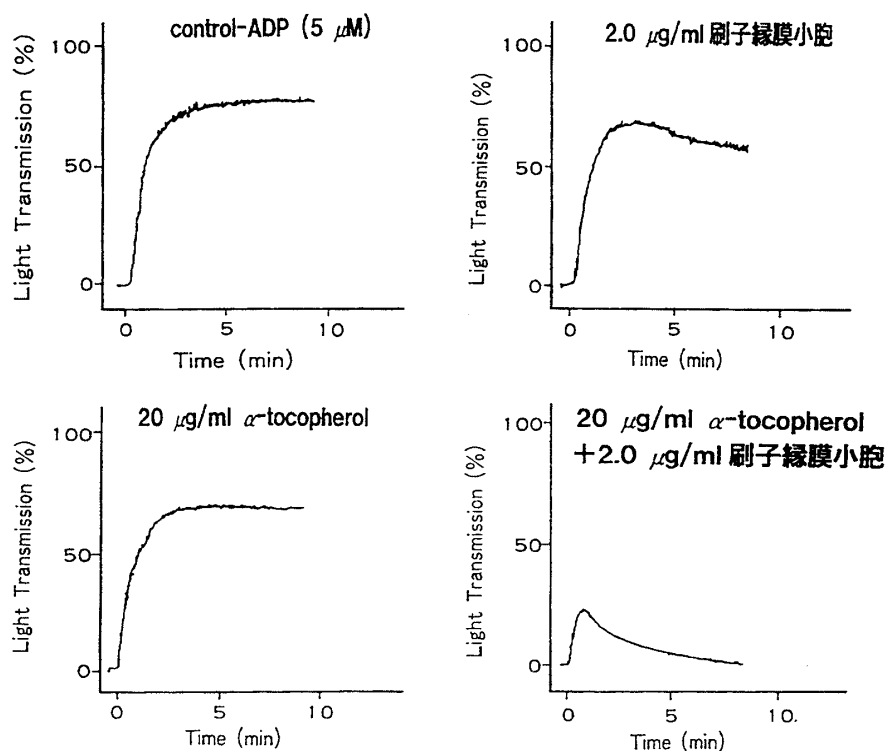


図7 ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞と α -tocopherolの血小板凝集に与える影響
ADP (5 μ M)

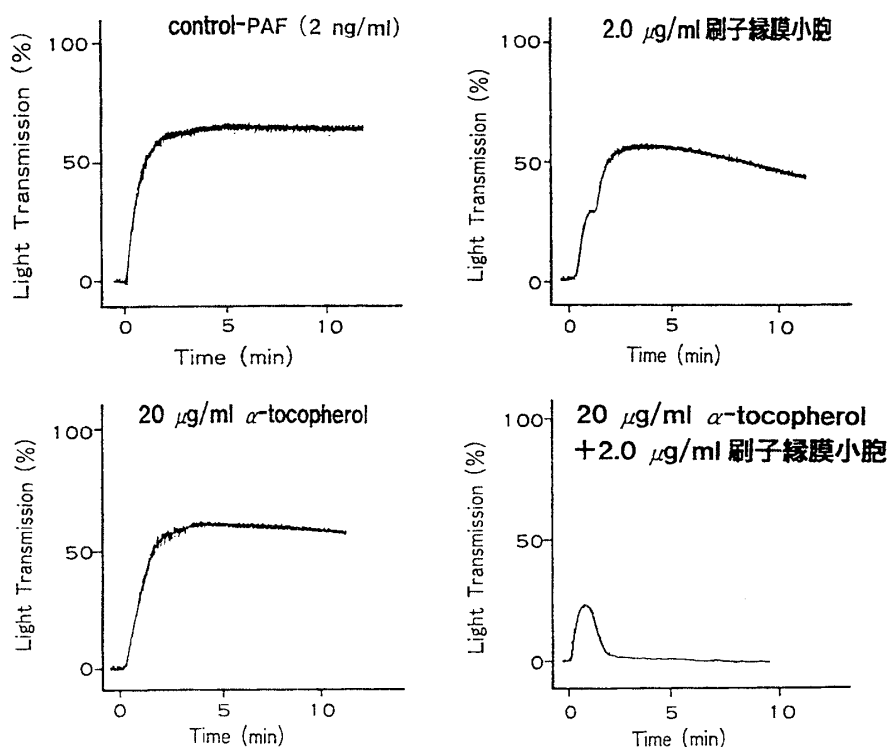


図8 ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞と α -tocopherol の血小板凝集に与える影響
PAF (2ng/ml)

にもつことが明らかにされており、血液凝固系の関与が示されている。最近では、血小板が妊娠中毒症の病態に深く関与することが示され、アスピリン、トロンボキサン合成阻害剤などの薬剤が、妊娠中毒症、特にそれに合併する胎盤機能不全による IUGR の治療に有効であることが報告された¹¹⁾。以上のような観点から、今回は、ビタミン E (α -tocopherol) の抗血小板作用について検討した。その結果、*in vitro* において、ビタミン E には、明らかな血小板凝集阻止活性のあることが判明した。また、血小板中のビタミン E 濃度は妊娠経過とともに著明に増加することも判明した。

さて、ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜は絨毛間腔にて母体血流との直接の接点となる点で血管内皮としての役割を果たすことになる。既に、血管内皮には強力な血小板凝集阻止活性の存在することが明らかにされており⁷⁾、特に内皮細胞膜が血小板凝集阻止活性を有することで血管内の血液循環が維持されている。一方、母体血流との直接の接点であるヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜にも血小板凝集を阻止するような活性が存在しており²⁾、胎盤内

の血液循環の維持に関与しているものと考えられる。そこで、ヒト胎盤より分離した絨毛上皮刷子縁膜小胞を用いてさらに検討を加えた。その結果、ヒト胎盤絨毛上皮刷子縁膜小胞の共存下では、ビタミン E の血小板凝集阻止活性は、著明に増強された。したがって、*in vivo* においても、胎盤内で血小板凝集阻止作用をビタミン E が示し、胎盤内の血液循環の維持に関与していることが示唆された。

妊娠中毒症では胎盤内に血栓が多発することが多い。一方、胎盤組織には、血小板凝集を阻止する作用を有する物質が存在して、胎盤の微小循環の維持に重要な役割を果たしているものと考えられている²¹⁵⁾。一方、ビタミン E には、*in vivo* でも、その血中濃度に比例して血小板凝集阻止活性のあることも報告されている³⁾。したがって、今後、妊娠中毒症症例での血小板中のビタミン E の変化などの検討によつて、ビタミン E が妊娠中毒症の病態にどのように関与しているかが明確になるものと考えられる。

文 献

1. 飯岡秀晃, 森山郁子, 尼崎真実, 伊藤公彦, 日野晃治, 一條元彦: Phosphate の胎盤輸送機構の解明 (人胎盤微絨毛膜 (刷子縁膜) 小胞を用いて). 日産婦誌, 37: 2675, 1985.
2. 飯岡秀晃, 久永浩靖, 森山郁子, 赤崎正佳, 南渕芳, 片上佳明, 加藤由美子, 一條元彦: 胎盤刷子縁の血小板凝集阻止活性の研究 (血小板凝集阻止機序について). 日産婦誌, 41: 1916, 1989.
3. 矢追公一, 辰巳和人, 美濃 真: 血小板凝集と α -トコフェロール. 血液と脈管, 16: 368, 1985.
4. Born, G.V.R. and Gross, M.J.: The aggregation of blood platelet. J. Physiol., 168: 178, 1963.
5. Duchesne, M.J.D., Dao, H.T., Chavis, C. and Crastes, A.: The human placental anti-aggregating factor is neither prostacyclin nor a prostacyclin metabolite. Prostaglandins, 24: 701, 1982.
6. Glasgow, J.G., Scade, R. and Pitlick, F.A.: Evidence that ADP hydrolysis by human cell is related to thrombogenic potential. Thrombos. Res., 13: 255, 1978.
7. Hiroshi, T.: Determination of tocopherol in buccal mucosal cells using an electrochemical detector. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 58: 202, 1988.
8. Hutton, R.A., Dandona, P., Chow, F.P.R. and Craft, I.L.: Inhibition of platelet aggregation by placental extracts. Thrombos. Res., 17: 465, 1980.
9. Lowry, O.H.: Protein measurement with Folin phenol agent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
10. Tsukatani, E.: Etiology of EPH-gestosis from the viewpoint of dynamics of vasoactive prostanoïd, lipid peroxides and vitamin E. Acta Obst. Gynaec. Jpn., 35: 713, 1983.
11. Wallenburg, H.C.S., Dekker, G.A., Makivitz, J. W. and Rotmans, P.: Low dose aspirin prevents pregnancy induced hypertension and preeclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. Lancet, i: 1, 1986.

(No. 6942 平3・1・12受付)