

## シンポジウム

## 糖尿病と活性酸素

## 糖尿病妊婦と酸化ストレス

東京女子医科大学 糖尿病センター

サナカ マユミ ミネイ サトミ スズキ ナツコ  
佐中真由実・嶺井 里美・鈴木奈津子ヤナギサワ ケイコ イワモト ヤスヒコ  
柳沢 慶香・岩本 安彦

(受付 平成11年3月26日)

## Oxidative Stress and Diabetic Pregnancy

Mayumi SANAKA, Satomi MINEI, Natsuko SUZUKI,

Keiko YANAGISAWA and Yasuhiko IWAMOTO

Department of Medicine (Director : Prof. Yasuhiko IWAMOTO)

Diabetes Center, Tokyo Women's Medical University

In offspring of diabetic mothers congenital malformations are common if blood glucose is poorly controlled during the period of organogenesis. Studies of embryos in culture have suggested that an enhanced production of free radicals is related to the risk of congenital malformations.

To clarify the cause of malformations in infants of diabetic mothers, we investigated the maternal plasma phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) levels, as an index of oxidative stress. In the first trimester there were no differences in plasma PCOOH levels in diabetic pregnant women when compared to normal pregnant women and to healthy non-pregnant women. None of the infants born from the diabetic mothers had malformations. We were unable to find any relation between maternal PCOOH levels and malformations in infants of diabetic mothers.

Administration of vitamin E, a liposoluble free radical scavenger, to diabetic animals has been reported to reduce congenital malformations. We investigated the changes of  $\alpha$ -tocopherol, the main component of vitamin E, in pregnancy to elucidate the correlation between fetal anomaly and plasma  $\alpha$ -tocopherol levels in diabetic pregnant women. No difference in plasma  $\alpha$ -tocopherol level was found in diabetic pregnant women when compared to normal pregnant women. Two diabetic pregnant women delivered neonates with cardiovascular defects, but the maternal plasma  $\alpha$ -tocopherol levels were within the normal range in the first trimester which is an important period of organogenesis.

## はじめに

糖尿病では高血糖に伴い酸化ストレスが増大し、活性酸素やフリーラジカルの産生が増大する。

近年、糖尿病性合併症の発症・進展の因子として酸化ストレスの関与が指摘され、種々の報告が行われている<sup>1)~3)</sup>。

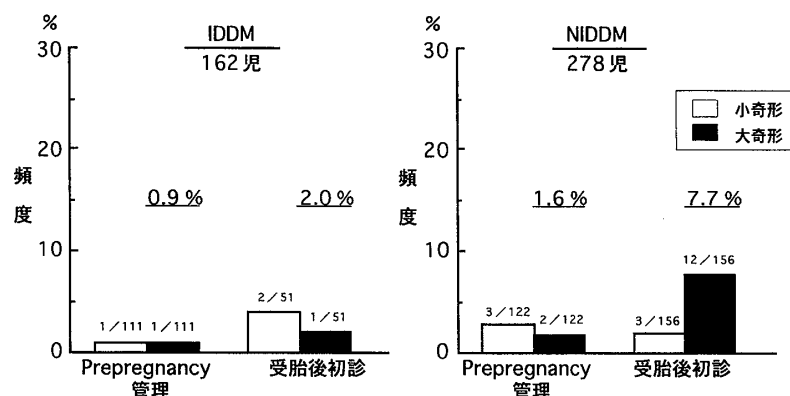


図1 糖尿病妊婦から出生した児の奇形（1988～1997年）

表1 児大奇形と母体の妊娠初期 HbA<sub>1c</sub>

		HbA <sub>1c</sub> (%)						
		児数	～ 5.9	6.0～6.9	7.0～7.9	8.0～8.9	9.0～9.9	10.0～
IDDM 母体								
prepregnancy 管理	110	1/20 * (5.0%)	0/43	0/29	0/12	0/4	0/2	
受胎後初診	46	0/4	0/6	0/6	1/16 (6.3%)	0/7	0/7	
NIDDM 母体								
prepregnancy 管理	119	0/39	0/51	0/21	0/4	0/1	1/3 (33.3%)	
受胎後初診	105	2/28 (7.1%)	0/32	1/11 (9.1%)	0/12	3/14 (21.4%)	2/8 (25.0%)	

\*：体外受精児。

糖尿病合併妊娠では、血糖コントロール不良時には、母体および児に種々の合併症が認められる。母体では、ケトーシス、ケトアシドーシス、網膜症・腎症の悪化、尿路感染症、流産・早産、妊娠中毒症、羊水過多症、子宮内胎児死亡を、また胎児・新生児では、先天奇形、巨大児、低血糖、高ビリルビン血症、多血症、低カルシウム血症、呼吸障害を合併する率が高い。

本稿では、児の合併症の一つである奇形と酸化ストレスとの関連について述べる。

### 1. 糖尿病妊婦から出生した児における奇形

糖尿病母体から出生する児の奇形は、妊娠初期の器官形成期の血糖コントロールが不良の場合に高率に認められ、Millsらは、妊娠7週までに奇形の有無は決定されると報告している<sup>4)</sup>。このため、妊娠判明後に良好な血糖コントロールを目標に治療を行っても、奇形を予防することは困難である。

奇形を防ぐためには、血糖コントロールが良好な状態で妊娠すること、すなわち計画妊娠が重要である。

図1に1988～1997年に糖尿病センターにおいて治療を行った糖尿病母体から出生した児における奇形の頻度を示した<sup>5)</sup>。インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 母体から出生した児における大奇形の頻度は、妊娠前 (prepregnancy) 管理群では0.9%、受胎後初診群では2.0%であり、インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) 母体から出生した児においても、prepregnancy 管理群では1.6%、受胎後初診群では7.7%と、受胎後初診群において高率であった。

更に、児における大奇形と母体の妊娠初期 HbA<sub>1c</sub>との関連について検討した (表1)。Prepregnancy 管理群では IDDM, NIDDM とも大奇形を合併した児は少なく、体外受精児の1児と、

表2 ラット胎仔奇形への抗酸化酵素の影響<sup>15)</sup>

	Malformations			Malformational score *
	None	Minor	Major	
10G	107	3	6	0.1
50G	8	8	68	8.2
10G + CIT	64	2	5	0.7
50G + CIT	43	7	16	2.5
10G + SOD	15	0	1	0.6
50G + SOD	18	2	1	0.6
10G + CAT	16	0	0	0.0
50G + CAT	22	1	18	4.4
10G + GPX	18	0	0	0.0
50G + GPX	16	0	4	2.0

10G : 10mmol/l glucose, 50G : 50mmol/l glucose, CIT : citilone, SOD : superoxide dismutase, CAT : catalase, GPX : glutathione peroxidase, \* : 0 = 奇形なし, 1 = 小奇形, 5 = 大奇形, 10 = 多発大奇形.

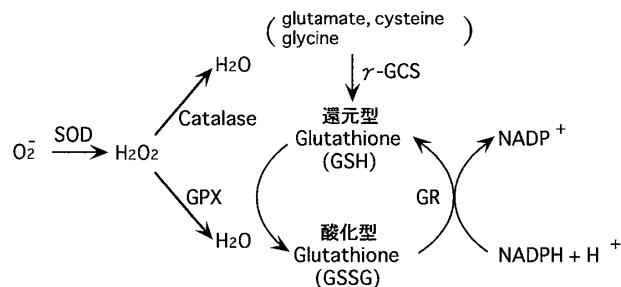
HbA<sub>1c</sub> 10% 台で許可されずに妊娠してしまった1児であった。しかし受胎後初診群ではHbA<sub>1c</sub> 7%以上で多くの大奇形が認められ、特にNIDDM母体出生児において奇形の頻度は高率であり、NIDDM女性に対する避妊を含めた妊娠前教育の重要性が再確認された。

糖尿病母体から出生した児における奇形の成因として、ヒトにおいては高血糖が主な原因であると指摘されている。動物実験においては、①高血糖<sup>6)</sup>、②低血糖<sup>7)</sup>、③ケトン体の増加<sup>8)</sup>、④アラキドン酸の低下<sup>9)</sup>、⑤ソルビトールの増加<sup>10)</sup>、⑥ミオイノシトールの低下<sup>11)</sup>、⑦亜鉛の低下<sup>12)</sup>、⑧高マンノース血症<sup>13)</sup>、⑨somatomedin inhibitorの関与<sup>14)</sup>などが報告されている。さらに、1990年代になり奇形発生にフリーラジカルの産生増加が関与しているという報告が相次いだ<sup>15)16)18)</sup>。

## 2. 動物実験におけるデータ

1991年 Erikssonらは高血糖による奇形発生にはフリーラジカルが関与していることを、ラットの胎芽培養 (whole embryo culture) を用いて初めて次のように報告した (表2)<sup>15)</sup>。

10 mmol/l グルコースと 50 mmol/l グルコースで胎芽 (embryo) の培養を行った場合、50 mmol/l グルコースでは大奇形が高率に認められ、malformational score (0 : 奇形なし, 1 : 小奇形, 5 : 大奇形, 10 : 多発大奇形) で 10 mmol/l グルコー

図2 グルタチオンを中心とする抗酸化機構<sup>17)</sup>

SOD : superoxide dismutase, GPX : glutathione peroxidase,  $\gamma$ -GCS :  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase, GR : glutathione reductase.

スでは 0.1, 50 mmol/l グルコースでは 8.2 と有意に高率であった。

しかし、抗酸化酵素誘導物質である citilone (CIT) や、抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) を培養液に添加し比較検討したところ、50 mmol/l グルコースに抗酸化酵素を添加した場合には malformational score は CIT 2.5, SOD 0.6, CAT 4.4, GPX 2.0 と、添加しなかった場合の 8.2 に比し有意に低値であった。

つまり抗酸化酵素の添加により、高血糖に起因する胎仔の奇形発生率が低下したことから、高血糖はフリーラジカルを発生させ、胎仔に奇形を起こすことが示唆されたと Erikssonらは結論している<sup>15)16)</sup>。

更に、1995年赤沢らのグループは高血糖によって引き起こされる奇形へのグルタチオンを中心とする抗酸化機構<sup>17)</sup> (図2) の関与について検討し<sup>18)</sup>、次のように報告している。

①高血糖 (66.7 mmol/l D-グルコース) で 48 時間培養した embryo では、奇形発生率が高率となった。

②高血糖の培養液 (66.7 mmol/l D-グルコース) に 2 mmol/l GSH ester を添加することにより奇形発生率は完全に正常化した。

③さらにフローサイトメトリーにより細胞内、photometerにより細胞外フリーラジカルの産生を調べた結果、高血糖で培養した embryo では細胞内および細胞外フリーラジカルの産生は増加しており、GSH ester を添加することにより減少し

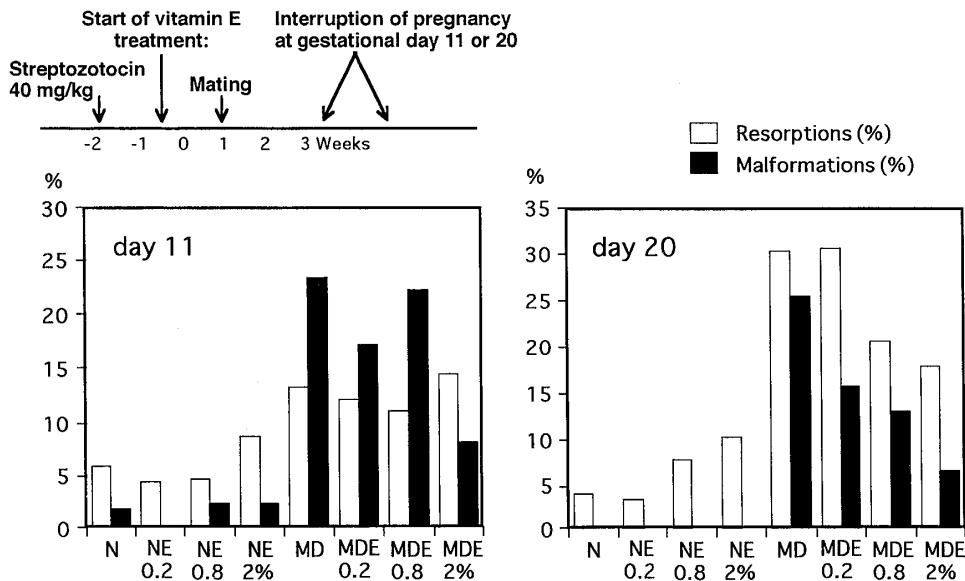


図3 ビタミンE投与のラット胎仔奇形への影響<sup>20)</sup>

N: 正常ラット, NE: 正常ラット+ビタミンE投与, MD: 糖尿病ラット, MDE: 糖尿病ラット+ビタミンE投与.

た。

④embryoのGSH濃度やGSH合成の律速酵素である $\gamma$ -GCS活性は高血糖で培養したembryoでは低下していたが、GSH ester添加により正常化した。

これらの結果から、器官形成期におけるembryo内でのGSH低下が高血糖によって引き起こされる奇形に関係しており、GSH依存性の防御機構が主要な役割を演じていると報告している。

抗酸化物質の一つであるビタミンEについても検討が行われ、1996年Vianaらは糖尿病ラットに経口的にビタミンEを投与することにより奇形発生率が低下することを報告<sup>19)</sup>、さらにSivanらも同様の報告を行っている<sup>20)</sup>。

SimanらもビタミンEが糖尿病ラットの奇形を減少させることを報告した(図3)<sup>21)</sup>。さらに母体と胎仔のビタミンEおよび過酸化脂質レベルを測定し、次のように述べている。

①母体へのビタミンEの投与により、母体、embryo、胎仔のビタミンE濃度は高値となり、embryo、胎仔へビタミンEは明らかに移行していた。

②一方、過酸化脂質は母体、胎芽、胎盤で変化は認められなかったが、胎仔の肝臓で増加してお

り、この増加はビタミンEの投与により減少した。

これらのデータは胎仔における活性酸素のコントロール不全が奇形発生に関与していることを支持しており、将来、糖尿病女性への抗酸化療法が児の奇形を予防するために重要かもしれないと結論している。

以上をまとめると、動物実験において、高血糖による奇形発生機序として、フリーラジカルの産生増加と抗酸化機構の未熟性が関与していること、さらにヒトにおいて、糖尿病妊婦から出生する児における奇形予防対策としてビタミンEなどの抗酸化物質の母体への投与の可能性が示唆された。

### 3. 糖尿病妊婦における血中PCOOH

Phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH)は、生体膜脂質の主成分であるphosphatidylcholine (PC)の過酸化物であり、その存在は生体が酸化ストレスを受けたということを示唆している。

著者らは、ヒトにおいて胎児奇形と酸化ストレスの関係を明らかにするために、母体血漿中PCOOHを宮沢らの方法により<sup>22)</sup>、化学発光-HPLCを用いて測定した<sup>23)</sup>。

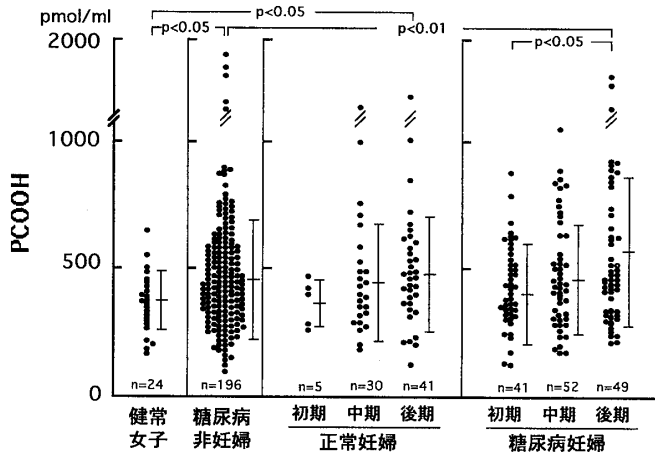


図4 正常妊婦および糖尿病妊婦における PCOOH

対象は糖尿病妊婦 68 例であり, 正常妊婦 76 例, 糖尿病非妊婦 196 例, 健常女子 24 例を対照とした。

健常女子における血漿中 PCOOH は  $368.2 \pm 114.1$  pmol/ml (以下  $m \pm SD$ ) であり, 糖尿病非妊婦では  $454.9 \pm 235.6$  pmol/ml と健常女子に比し有意に高値であった(図4)。糖尿病非妊婦において, 健常女子より PCOOH が高値を示す原因を明らかにするために, 長期血糖コントロールの指標である  $HbA_{1c}$  と PCOOH の関連を検討したところ,  $HbA_{1c}$  6.6~7.5% および 8.6~9.5% の群において PCOOH は有意に高値を示し(図5), 血糖コントロールが不良の場合, 酸化ストレスを受けやすいことが示唆された。

次に, 妊娠時における PCOOH の変動を検討した。正常妊婦において PCOOH は妊娠後期で健常女子に比し有意に高値であり, 糖尿病妊婦では PCOOH は妊娠後期では妊娠初期より有意に高値を示したが, 妊娠各期において正常妊婦と差を認めなかった(図4)。

糖尿病妊婦において, とくに妊娠初期の器官形成期の血糖コントロールが不良の場合, 児の奇形発生率は高率であり, 妊娠初期の PCOOH と  $HbA_{1c}$  について検討したが,  $HbA_{1c}$  のレベルによって PCOOH の値に差は認められず(図6), また対象とした糖尿病妊婦から奇形児の出産は認められなかったため, ヒトにおいて児の奇形とフリーラジカルの関係を明らかにすることはできな

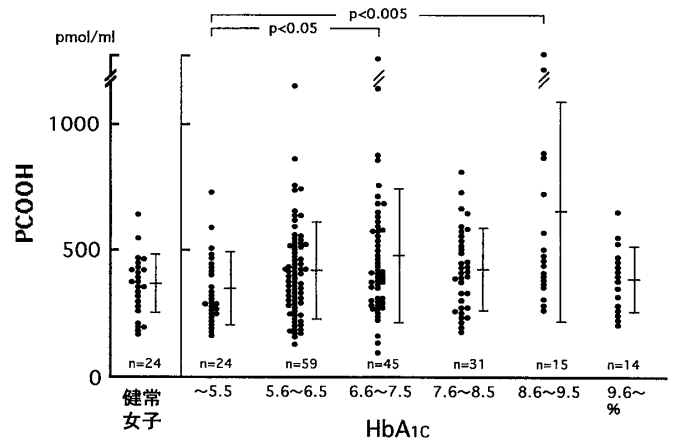


図5 糖尿病非妊婦における PCOOH と  $HbA_{1c}$

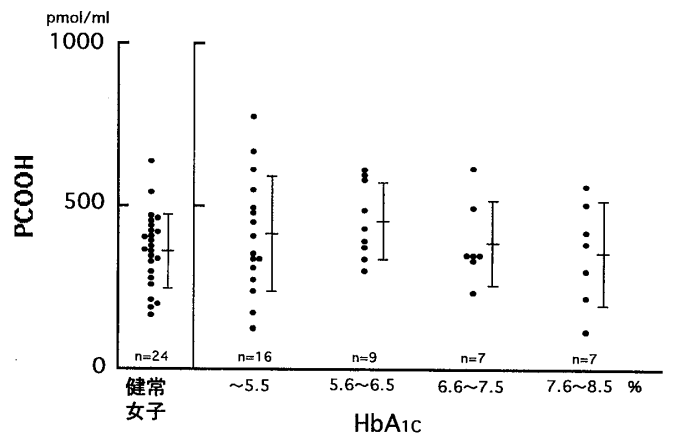


図6 糖尿病妊婦における妊娠初期の PCOOH と  $HbA_{1c}$

かった。

動物実験と異なり, ヒトにおいて妊娠時に胎児のフリーラジカル産生の指標となる PCOOH を測定することは困難なことである。しかし, グルコースは胎盤を通過して胎児に移行し, 母体高血糖は胎児にも高血糖をもたらす。糖尿病非妊婦における結果から, 高血糖の場合胎児においてもフリーラジカル産生が増加し, 児に影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### 4. 糖尿病妊婦における $\alpha$ -tocopherol

抗酸化物質の一つである  $\alpha$ -tocopherol は, 前述のように動物実験において高血糖による奇形を防止することが報告されている。

ヒトにおいて胎児奇形と  $\alpha$ -tocopherol の関係を明らかにするために, 母体血清中および赤血球

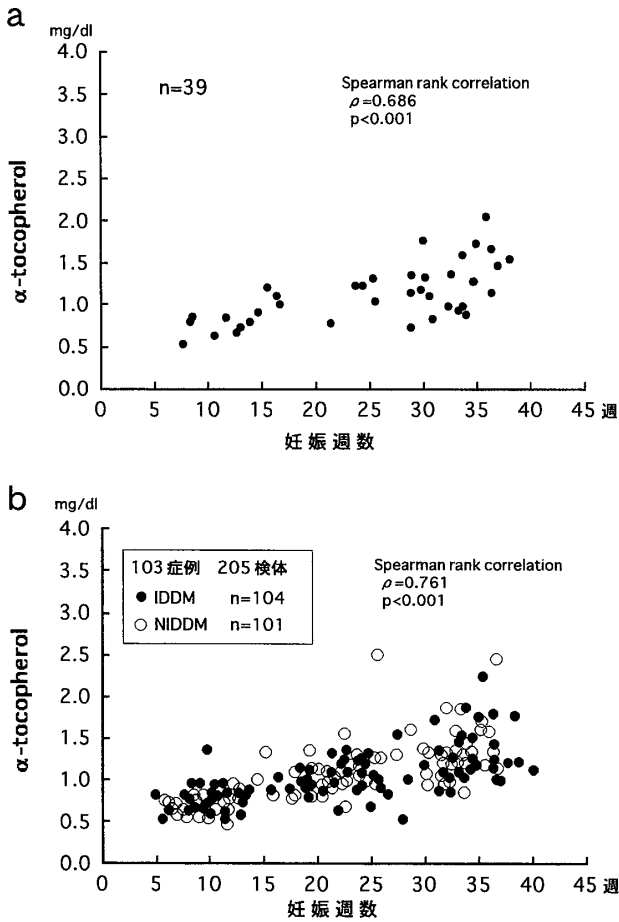


図7 a 正常妊婦における血清中  $\alpha$ -tocopherol の変動  
b 糖尿病妊婦における血清中  $\alpha$ -tocopherol の変動

中  $\alpha$ -tocopherol を測定した。対象は糖尿病妊婦 103 例であり，正常妊婦 39 例，糖尿病非妊婦 239 例，健常女子 20 例を対照とし， $\alpha$ -tocopherol の測定は HPLC 法を用いて行った。

健常女子における血清中  $\alpha$ -tocopherol は  $0.69 \pm 0.14$  mg/dl であり，糖尿病非妊婦では  $0.91 \pm 0.29$  mg/dl と健常女子に比し有意に高値であった。

正常妊婦および糖尿病妊婦において，血清中  $\alpha$ -tocopherol は妊娠経過とともに有意な増加が認められた (図 7 a, b)。

さらに，正常妊婦，IDDM 妊婦，NIDDM 妊婦において，妊娠各期の血清中  $\alpha$ -tocopherol と血糖コントロールとの関係を HbA<sub>1c</sub> を指標とし比較検討した (図 8)。

平均 HbA<sub>1c</sub> は，正常妊婦では，妊娠初期 4.3%，妊娠中期 4.6%，妊娠後期 4.6%，IDDM 妊婦では，妊娠初期 6.5%，妊娠中期 5.7%，妊娠後期 6.1%，

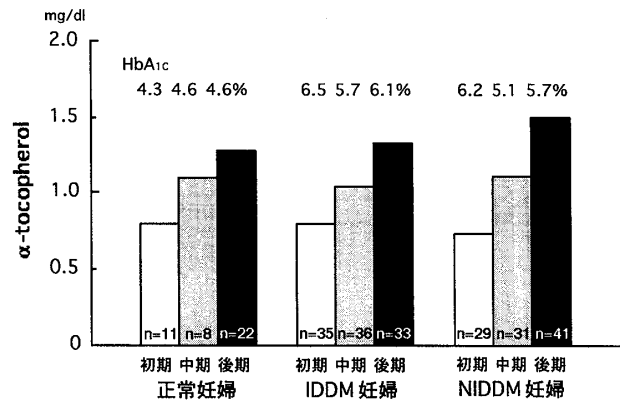


図8 妊娠各期における血清  $\alpha$ -tocopherol と HbA<sub>1c</sub> (正常妊婦・IDDM 妊婦・NIDDM 妊婦)

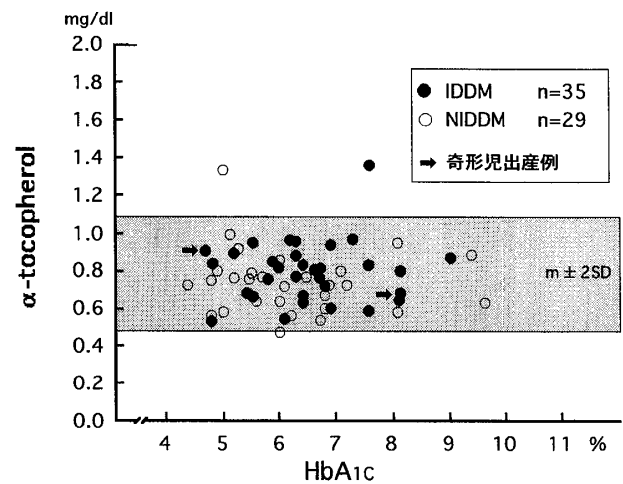


図9 糖尿病妊婦妊娠初期における血清  $\alpha$ -tocopherol と HbA<sub>1c</sub>

NIDDM 妊婦では，妊娠初期 6.2%，妊娠中期 5.1%，妊娠後期 5.7% であり，IDDM 妊婦，NIDDM 妊婦では正常妊婦に比し高値であったが，妊娠各期で差を認めなかった。

血清中  $\alpha$ -tocopherol は，正常妊婦では，妊娠初期  $0.80 \pm 0.18$  mg/dl，妊娠中期  $1.10 \pm 0.18$  mg/dl，妊娠後期  $1.28 \pm 0.34$  mg/dl，IDDM 妊婦では，妊娠初期  $0.80 \pm 0.16$  mg/dl，妊娠中期  $1.04 \pm 0.21$  mg/dl，妊娠後期  $1.33 \pm 0.32$  mg/dl，NIDDM 妊婦では，妊娠初期  $0.74 \pm 0.17$  mg/dl，妊娠中期  $1.11 \pm 0.32$  mg/dl，妊娠後期  $1.50 \pm 0.79$  mg/dl であり，正常妊婦，IDDM 妊婦，NIDDM 妊婦とも妊娠経過とともに増加し，妊娠時には  $\alpha$ -tocopherol が増加することが再確認されたが，妊娠初期，中期，後期において正常妊婦，IDDM 妊婦，NIDDM 妊婦

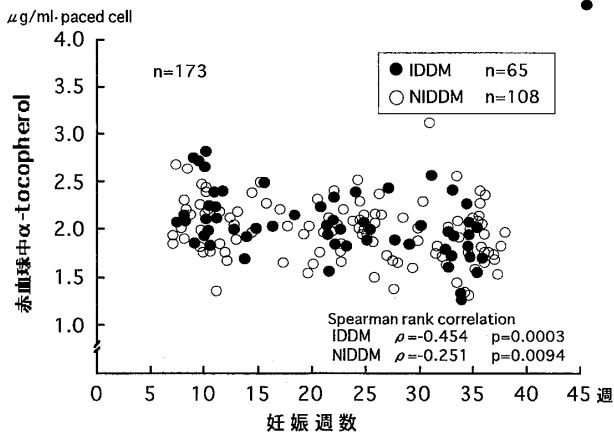


図10 糖尿病妊婦における赤血球中 $\alpha$ -tocopherolの変動

の血清中 $\alpha$ -tocopherolに差は認められず、糖尿病妊婦において血清中 $\alpha$ -tocopherolが高いという結果には至らなかった。

前述のように児の奇形は妊娠7週までに決定されると言われており、器官形成期である妊娠初期において、血糖コントロール指標であるHbA<sub>1c</sub>と血清中 $\alpha$ -tocopherolの関連について検討した。対象とした糖尿病妊婦から心奇形を合併した児の出産は2例認められ、HbA<sub>1c</sub>は4.7, 8.1%と1例では高値であったが、血清中 $\alpha$ -tocopherolは2例とも正常範囲内であった(図9)。

血清中 $\alpha$ -tocopherolは血中脂質の影響を受け、妊娠時には血中脂質は増加するため、赤血球中 $\alpha$ -tocopherolを測定し妊娠時の変化を検討した(図10)。赤血球中 $\alpha$ -tocopherolは、IDDM妊婦、NIDDM妊婦の両者において妊娠経過とともに減少したが(IDDM： $\rho = -0.454$   $p = 0.0003$ , NIDDM： $\rho = -0.251$   $p = 0.0094$ )、同時に測定した血清中 $\alpha$ -tocopherolは、IDDM妊婦、NIDDM妊婦の両者において妊娠経過とともに増加し(IDDM： $\rho = 0.711$   $p < 0.0001$ , NIDDM： $\rho = 0.721$   $p < 0.0001$ )、赤血球中 $\alpha$ -tocopherolとの間に相関は認められなかった。器官形成期である妊娠初期の赤血球中 $\alpha$ -tocopherolは低値を示さず、また赤血球中 $\alpha$ -tocopherolの測定を行った妊婦において奇形児の出産は認められなかった。

## まとめ

糖尿病妊婦における奇形発生機序として、高度の糖代謝異常を惹起させた動物実験による報告では、フリーラジカルの産生増加、グルタチオン、ビタミンEなどの抗酸化機構の障害が示唆された。

しかし、今回のわれわれの臨床症例においては、血糖コントロールが良好に維持されていたことによると思われるが、児奇形とフリーラジカルとの関係を明らかにすることはできなかった。

## 文 献

- 1) Baynes JW : Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40** : 405-412, 1991
- 2) Giugliano D, Paolisso G, Ceriello A : Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **19** : 257-267, 1996
- 3) 田中 逸, 柏木厚典 : 糖尿病性血管障害とフリーラジカル。「分子糖尿病学の進歩—基礎から臨床まで—」(門脇 孝, 春日雅人, 清野 進ほか編), pp 224-233, 金原出版, 東京 (1994)
- 4) Mills JL, Baker L, Goldman AS : Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week: implications for treatment. *Diabetes* **28** : 292-293, 1979
- 5) 佐中真由実, 嶺井里美, 柳沢慶香ほか : 糖尿病患者教育 : 妊娠。「糖尿病の療養指導'98」(日本糖尿病学会編), pp 147-152, 診断と治療社, 東京 (1998)
- 6) Cockroft DL, Coppola PT : Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture. *Teratology* **16** : 141-146, 1977
- 7) Akazawa S, Akazawa M, Hashimoto M et al : Effects of hypoglycemia on early embryogenesis in rat embryo organ culture. *Diabetologia* **30** : 791-796, 1987
- 8) Horton WE Jr, Sadler TW : Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. Alterations in morphogenesis produced by the ketone body,  $\beta$ -hydroxybutyrate. *Diabetes* **32** : 610-616, 1983
- 9) Goldman AS, Baker L, Piddington R et al : Hyperglycemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** : 8227-8231, 1985
- 10) Eriksson UJ, Naeser P, Brodin SE : Increased accumulation of sorbitol in offspring of manifest diabetic rats. *Diabetes* **35** : 1356-1363, 1989
- 11) Hashimoto M, Akazawa S, Akazawa M et al : Effects of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol contents of cultured embryos: treatment

- with aldose reductase inhibitor and myoinositol supplementation. *Diabetologia* **33** : 597-602, 1990
- 12) **Eriksson UJ** : Diabetes in pregnancy: retarded fetal growth, congenital malformations and fetal-maternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat. *J Nutr* **114** : 477-486, 1984
  - 13) **Freinkel N, Lewis NJ, Akazawa S et al** : The honeybee syndrome-implications of the teratogenicity of mannose in rat embryo culture. *N Engl J Med* **313** : 96-101, 1984
  - 14) **Sadler TW, Phillips LS, Balkan W et al** : Somatomedin inhibitors from diabetic rat serum alter growth and development of mouse embryos in culture. *Diabetes* **35** : 861-865, 1986
  - 15) **Eriksson UJ, Borg LAH** : Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* **34** : 325-331, 1991
  - 16) **Eriksson UJ, Borg LAH** : Diabetes and embryonic malformations—role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* **42** : 411-419, 1993
  - 17) **赤澤昭一** : 活性酸素による胎児奇形・内分泌. 糖尿病 **3** : 459-463, 1996
  - 18) **Trocino RA, Akazawa S, Ishibashi M et al** : Significance of glutathione depletion and oxidative stress in early embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture. *Diabetes* **44** : 992-998, 1995
  - 19) **Viana M, Herrera E, Bonet B** : Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* **39** : 1041-1046, 1996
  - 20) **Sivan E, Reece EA, Wu YK et al** : Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: Morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol* **175** : 793-799, 1996
  - 21) **Siman CM, Eriksson UJ** : Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* **46** : 1054-1061, 1997
  - 22) **Miyazawa T** : Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence HPLC assay. *Free Radic Biol Med* **7** : 209-217, 1989
  - 23) **佐中真由実, 嶺井里美, 佐中 孜ほか** : 糖尿病妊婦における血中 Phosphatidylcholine Hydroperoxide (PCOOH) レベルの変動. 糖尿病 **40** : 387-393, 1997