

## ラットにおける妊娠前期の極端な制限食が授乳量 および母乳成分に及ぼす影響

鈴木 美季子<sup>\*1)</sup>, 森 恵 見<sup>1)</sup>, 柴 沼 真友美<sup>1)</sup>,  
中西 由季子<sup>1)</sup>, 星 清 子<sup>2,3)</sup>, 木 村 修 一<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>昭和女子大学大学院生活機構研究科, (<sup>2)</sup>明治乳業株式会社研究本部食機能科学研究所, (<sup>3)</sup>尚絅学院大学)

### Effect of Maternal Severe Dietary Restriction during Early Gestation on the Milk Yield and Milk Nutrients in Rats

Mikiko SUZUKI<sup>1)</sup>, Emi MORI<sup>1)</sup>, Mayumi SHIBANUMA<sup>1)</sup>,  
Yukiko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Seiko HOSHI<sup>2,3)</sup> and Shuichi KIMURA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Showa women's university graduate school of Human Life Science,

<sup>2)</sup>Food Science Institute, Division of research and Development, Meiji Dairies Corporation,

<sup>3)</sup>Department of Human Health and Nutrition, Shokei Gakuin university

#### Summary

There are many studies that maternal exposure to under nutrition in early gestation induced adult obesity.

We examined the influence of the dietary restriction in the early gestation period. Control group was permitted free access to food throughout the gestation and lactation period. Early dietary restricted group was permitted to intake 50 % of the consumption had by the control group during early gestation. And, the dams were allowed to eat ad libitum during lactation period. It was found that the body weights of early dietary restricted pups were significantly higher than those of the control pups during late lactation period. So, milk yields of both groups were examined. As a result milk yields of the early dietary restricted dams were tended to lower than those of the control dams during late lactation period. To solve this discrepancy the nutritional components of both milks were compared. However there was no difference in the nutritional component of milk between the control group and early dietary restriction group. There were no association between remarkable growth in pups and nutritional component of milk. We need to seek for the other factor.

飽食の時代といわれる現在の日本では、男性の肥満増加が問題になる一方、女性は世界でもめずらしい肥満の減少と痩せの増加が問題となっている<sup>1)</sup>。さらに、痩せの女性が妊娠し子どもを出産した場合、その子どもは低体重で誕生する割合の高いことが報告されている<sup>2,3)</sup>。そして、低出生体重児は成人期に肥満になりやすく、メタボリックシンドローム (Metabolic Syndrome) になりやすいことが報告され、注目されている<sup>4-7)</sup>。日本ではその低出生体重児が増加しているが、その原因の一つとして、妊娠する年齢にある若い女性がダイエットをしている可能性が考えられる。世界のなかで日本女性だけが、肥満者の率が減少して「やせ」が増加しているという事実からも推測されるからである。ダイエットをしている女性が、妊娠に気がつかなかった場合、妊娠初期に低栄養という悪影響が懸念されている。

第二次世界大戦でドイツ軍の占領下にあつて、3ヶ月間

飢餓状態におかれたオランダ西部住民の妊婦から誕生した子供たちが成人したときの、大規模な疫学調査で、妊娠初期に飢餓にあったものに肥満が多く、妊娠の後期および中期に飢餓にあったものには耐糖能異常が多いことが確認されている<sup>8,9)</sup>。RabelliらがDuch famineの疫学研究において妊娠初期に低栄養であると、肥満発症のリスクが高くなると報告しているように、妊娠初期の栄養は大変重要なものである<sup>10)</sup>。

上記のような理由から、われわれは妊娠前期の栄養状態に注目し実験を行った。今回、仔ラットの成長において重要な授乳期に焦点をおき、授乳量と母乳成分に注目した。母乳成分は母親の妊娠期の状態に影響を受けやすく、仔ラットの成長にかかせないものであるからである。

そこで、本研究では、妊娠前期にコントロール群が摂取した食餌量の50%の食餌量を与える群、つまり妊娠前期食餌制限モデルを作成し、妊娠前期に極端な食餌制限を施

\*所在地：東京都世田谷区太子堂 1-7 (〒154-8533)

した場合の授乳量の変化と母乳成分に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

## 実験方法

### 1. 実験1 妊娠前期の食餌制限が授乳（とくに授乳量）に及ぼす影響

#### 1) 妊娠期間の実験デザインと摂餌方法

実験動物として7週齢のWistarラット雌・雄を日本チャールスリバー(株)より購入し、温度  $24 \pm 1$  °C、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗交替（明期 21:00~9:00、暗期 9:00~21:00）の環境下で飼育した。2週間の環境馴化後、2週間の繁殖期間を設けた。繁殖方法は、雄1匹に対して雌2~3匹を同居させる複数法を用いて行った。毎朝、9時から10時にスメアテストを行い、膣内より精子が検出されたものを妊娠成立と判断し、妊娠0日目とした。妊娠を確認したのから実験を開始した。馴化期間にはすべてのラットにオリエンタル酵母工業(株)製MF固形飼料を自由摂食させた。繁殖期間は、標準精製飼料であるAIN93Gを

与えた。水道水を飲料水とし全実験期間、全ラットに自由摂食させた。コントロール群は実験期間を通して自由飲水させた。前期制限群には妊娠0日目から妊娠7日目までコントロール群が摂食した量の半分の量を9時と18時の2回に分けて給餌した。妊娠期間は制限食を開始した妊娠0日目から21日目までとし、毎日飼料摂食量を測定した。また、妊娠6日目、12日目、18日目に体重を測定した。

#### 2) 授乳期間の実験デザインと授乳量の測定法

妊娠期間と授乳期間の実験デザインを Fig. 1, Experimental 1 に示した。出産後4日目に1親あたりの授乳仔を10匹にそろえた。仔ラットの体長は出生4日目、体重は5日目から毎日、授乳量測定直前に同親の10匹をまとめて測定した。仔ラットの乳摂取量を推定するために、出産4日目から21日目までの毎日、12:00から13:30までの1.5時間、授乳量を測定した。授乳量測定の3時間前(9:00)に母仔を隔離した。授乳させる直前と直後に母仔それぞれの体重を測定した。授乳前後の母親の体重減少量(泌乳量)と乳仔の体重増加量(吸乳量)から仔ラットの乳摂取量を算出した。乳摂取量(授乳量)を測定するため

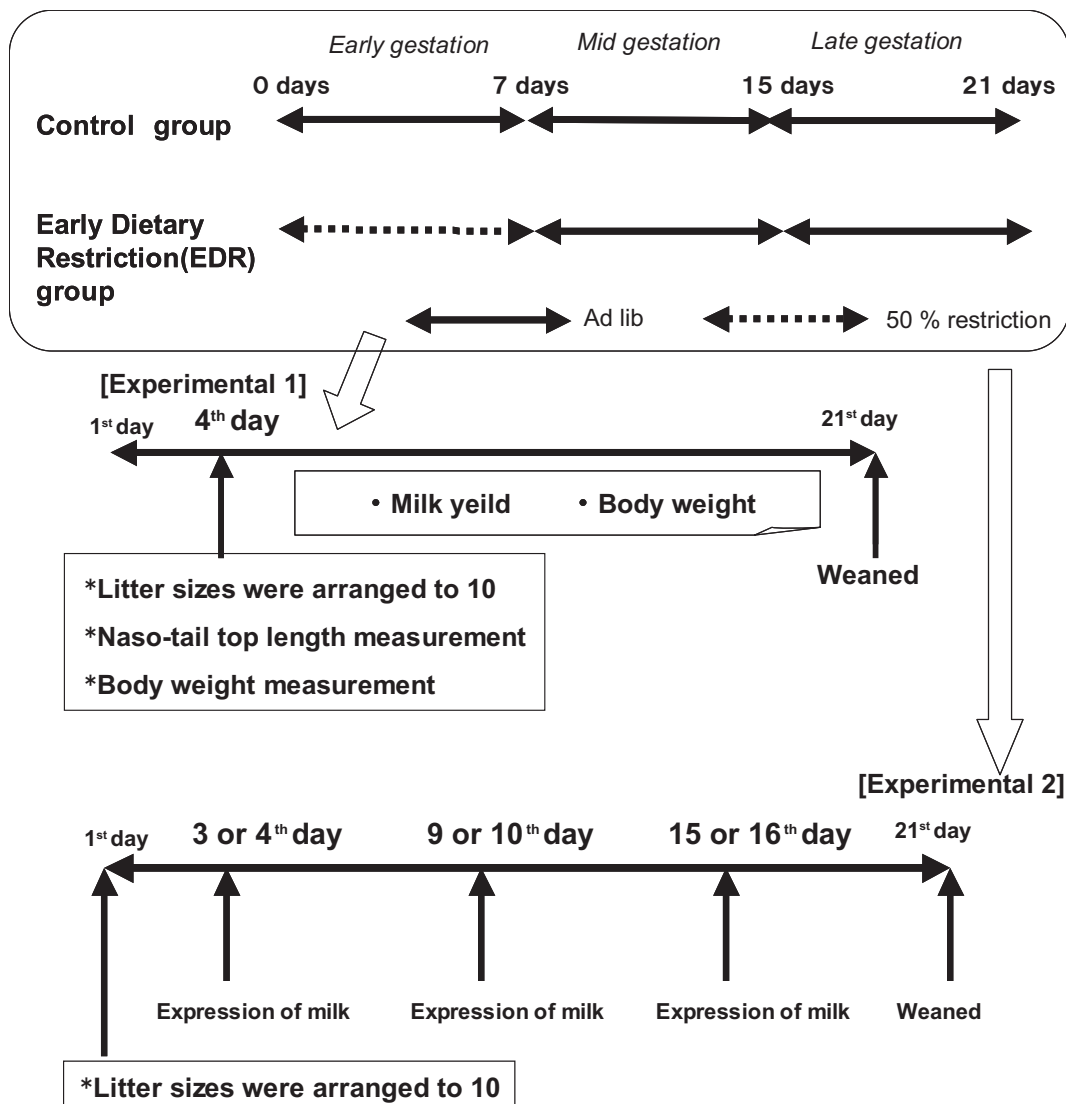


Fig. 1 Experimental design.

に、測定の前に母仔を隔離して3時間の断乳時間が必要であった。そこで、乳摂取制限による仔ラットの成長への影響を考慮して、乳摂取量の測定は1日1回、1.5時間とした。測定前3時間の母仔隔離時間以外は、常に母仔同居で自由に授乳させた。

### 3) 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差により示した。一元配置分散分析を行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

## 2. 実験2 妊娠前期の食餌制限が母乳成分に及ぼす影響

### 1) 授乳期間の実験デザイン

母乳搾乳のための実験デザインをFig. 1, Experimental 2に示した。出産後、1日目に1親あたりの授乳仔匹数を10匹にそろえた。その後、生後3日目または4日目、生後9日目または10日目および生後15日目または16日目の3回搾乳を行った。生後3日目または4日目の母乳を初乳、生後9日目または10日目の母乳を中間乳および生後15日目または16日目の母乳を後期乳として母乳の栄養評価を行った。授乳期間は母親の摂食量が両群間で同じになるように、実験1での摂食量を参考にして、飼料を給餌した。

### 2) 搾乳方法

搾乳開始4時間前に仔ラットを隔離した。長時間乳が飲めない状況を避けるために隔離している間、仔ラットは代理母に授乳された。搾乳15分前に、母親にオキシトシン溶液(0.05 mL-0.5 U/100 g BW)を皮下注射した。ジエチルエーテルで浅く麻酔をかけながら実験動物用搾乳装置(WAT-2001 有限会社・リトルレオナルド)を用いて1匹の母親あたり約1時間の搾乳を行った。なお、搾乳機を、吸引力-150 mmHg、拍動数60 pulse/min、拍動比60%に設定した。採取した乳は、分析時まで-80°C下で保存した。

### 3) 母乳成分の分析方法

タンパク質、乳糖、脂肪、灰分および固形分について分析した。タンパク質は、ケルダール法によって測定し、脂肪抽出はFolchらの方法に準じて行った。また、乳糖は酵素法によるキット(株式会社JK インターナショナル・乳糖/D-ガラクトースFキット)を用いて測定した。灰分は550°Cで、5時間以上灰化を行い測定し、固形分はブロックヒータを使用し、100°Cで乾燥させる方法を用いた。

### 4) 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差により示した。二元配置分散分析(授乳期間×群)を行いさらに多重検定(最小有意差法)を用いて解析し、危険率5%未満を有意差ありとした。

## 結果

### 1. 妊娠期間における母親ラットの摂食量および体重変化

Fig. 2に妊娠期間中の摂食量を示した。妊娠期間の体重変化のデータは示さないが、コントロール群は妊娠が進むにつれて体重増加がみられた。一方、前期制限群では飼料の制限期間においてコントロール群と比較して体重増加が小さかった。食餌制限解除後は、徐々に体重が増え、出産前日までには、コントロール群に追いついた。前期制限群の摂食量は制限解除後、コントロール群と比較して有意に高かった。

### 2. 生後4日目の体長および生後5日目の体重

仔ラットの体長と体重をFig. 3に示した。前期制限群から産まれた仔ラットの生後4日目の体長はコントロール群から産まれた仔ラットと比較して高値を示す傾向にあり、生後5日目の体重は5%の危険率で有意に高かった。

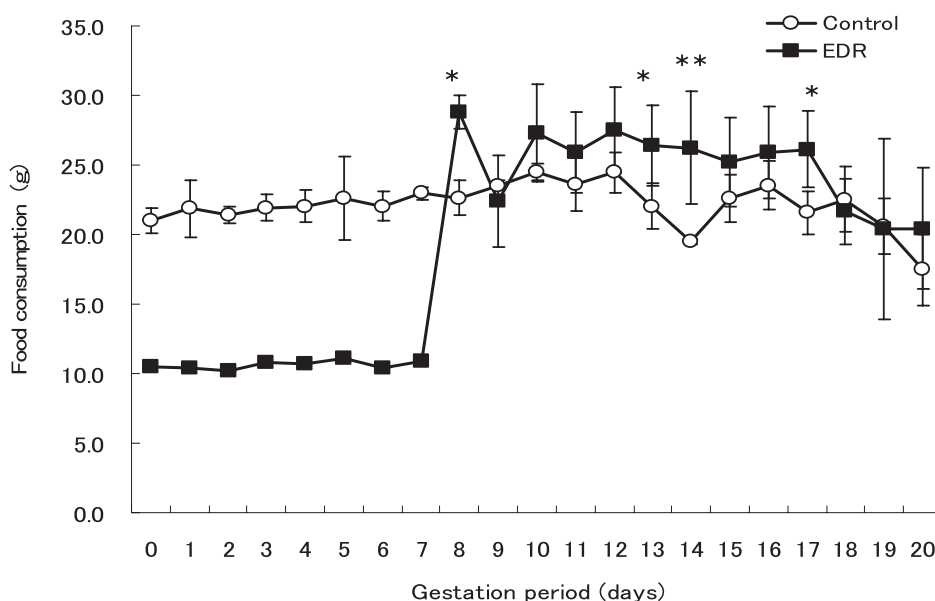
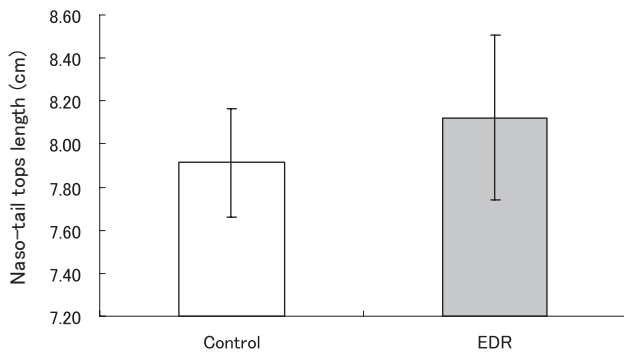


Fig. 2 Daily food consumption of dams during gestation.

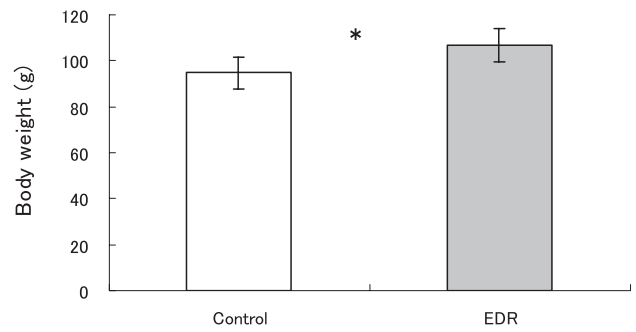
Means ± SD. Control: n = 4, EDR: n = 5.

Mean values were significantly different from control values at the same time point:  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.05^{*}$ .

(a) Pups naso-tail tops length at 4days



(b) Pups body weight at 5days (10 in a mass)

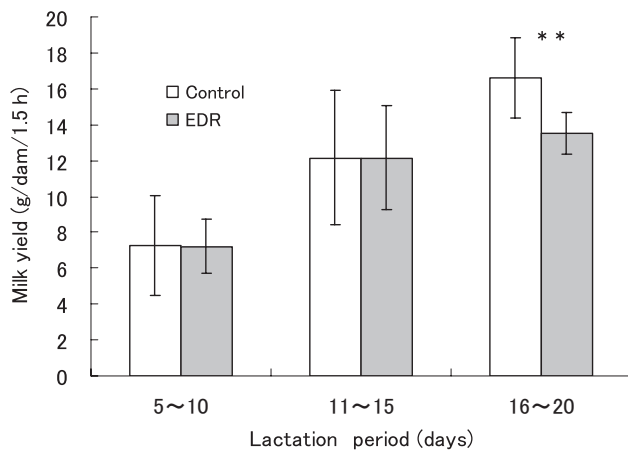


**Fig. 3** Pups of and naso-tail tops body weight.

Values are means  $\pm$  SD, Control dams: n = 4, EDR dams: n = 5.

Control pups: n = 19, EDR pups: n = 23.

Mean values were significantly different from control values:  $p < 0.05^*$ .



**Fig. 4** Milk yield of dams.

Values are means  $\pm$  SD and have been given per 1.5 h, Control dams: n = 4, EDR dams: n = 5.

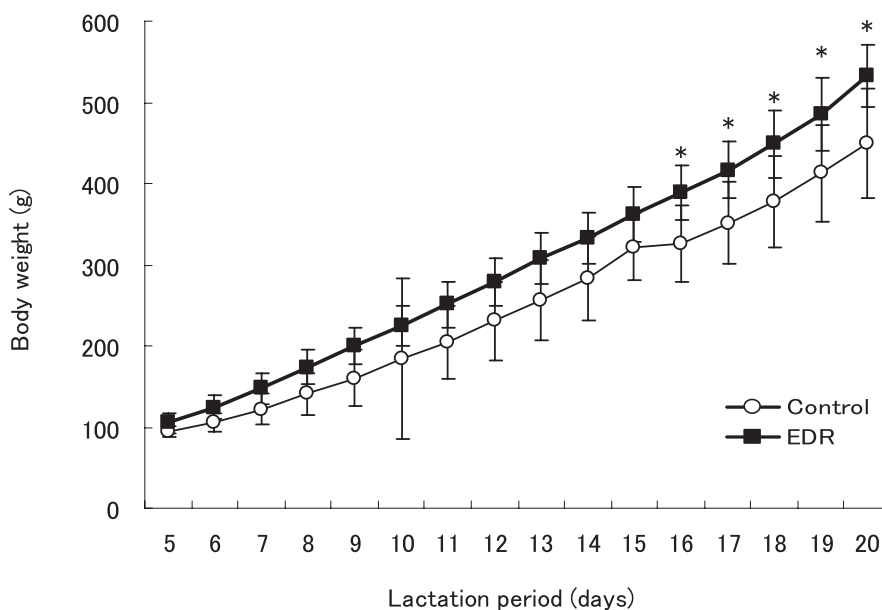
Mean values were significantly different from control values:  $p < 0.01^{**}$ .

### 3. 授乳量

Fig. 4 に 1.5 時間分の授乳量を示した。授乳量は出産後 5~10 日間を授乳前期, 11~15 日間を授乳中期および 16~20 日間を授乳後期として 3 期にわけ, おのこの期間の 日々測定値の平均値を示した。授乳後期に, 前期制限群はコントロール群と比較して授乳量が有意に少ない結果となった。仔ラットの吸乳量と母親の泌乳量は, ほぼ対応する数値を示したので授乳量はある程度正確さを持つものと推定できた。

### 4. 授乳期の仔ラット体重変化

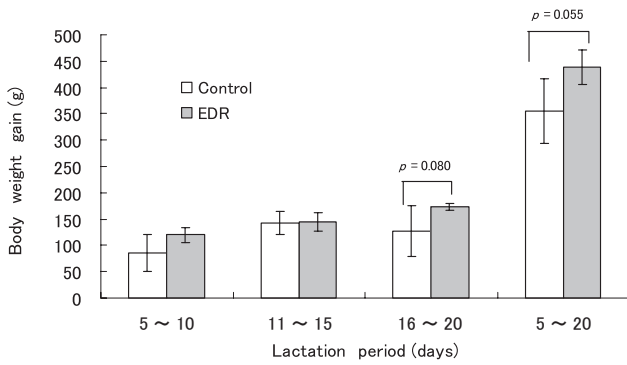
仔ラットの体重変化を Fig. 5 に, 授乳期間を 5 日または 6 日間ごとにまとめた仔ラットの平均体重増加量を Fig. 6 に示した。体重変化を見ると 16 日目を過ぎた授乳後期から両群間に有意な差が観察され, 前期制限群はコントロー



**Fig. 5** Body weight of pups during lactation.

Values are means  $\pm$  SD, Control dams: n = 4, EDR dams: n = 5.

Mean values were significantly different from control values:  $p < 0.05^*$ .

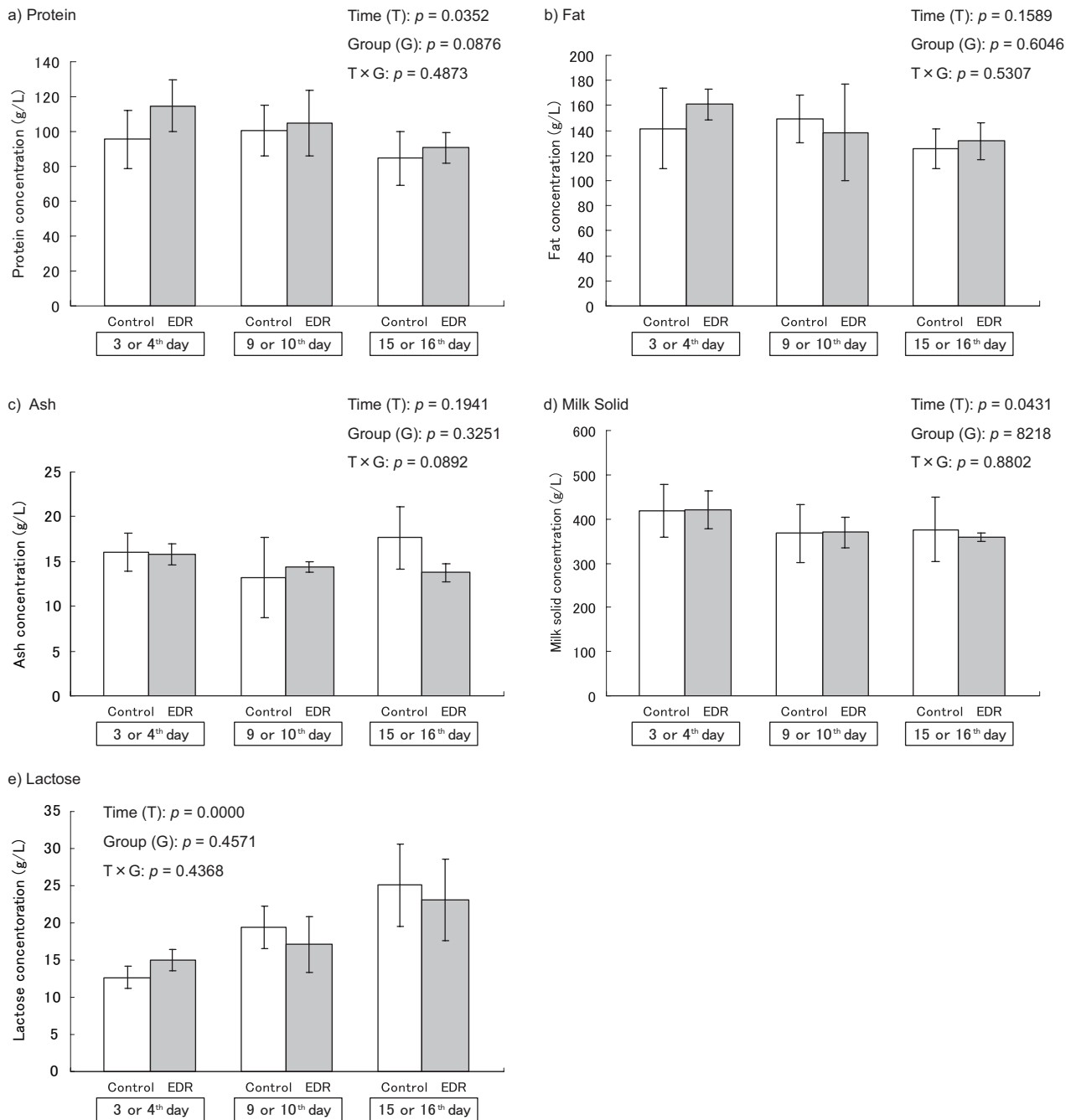


**Fig. 6** Body weight gain of pups (10 in a mass). Values are means  $\pm$  SD, Control dams : n = 4, EDR dams : n = 5. Average body weight gain during the period indicates in X-axis.

ル群と比較して著しい成長を遂げた。さらに、授乳期間を5日または、6日間ごとにまとめて、仔ラットの体重増加量を検討した結果、前期制限群は、コントロール群と比較して授乳後期において  $p = 0.08$  の危険率で体重増加量が高い傾向にあった。また、測定を開始した生後5日目から生後20日の間の体重増加量は、コントロール群と比較して前期制限群で  $p = 0.055$  の危険率で高値を示す傾向にあった。

## 5. 乳成分分析

母乳成分分析結果を Fig. 7 に示した。母乳成分を授乳期間と実験群を要因とする二元配置分散分析で検討した結果、乳タンパク質濃度は、初乳で高く、経日的に低下した。ま



**Fig. 7** Nutritional component of Milk.

Values are means  $\pm$  SD, Control dams : n = 4, EDR dams : n = 5.

The data was analyzed by two-way (Time  $\times$  group) ANOVA, followed by a post hoc tests.

た、前期制限群の乳タンパク質濃度はコントロール群と比較して高い傾向にあった ( $p = 0.08$ )。乳固形分濃度も初乳で有意に高かった。 ( $p < 0.05$ )。しかし、コントロール群と前期制限群の間に差はなかった。脂肪と灰分濃度は授乳期間による変動もなく群間の差もなかった。乳糖は、乳タンパク質とは逆に初乳から後期乳になるにつれ濃度が有意に高くなった。コントロール群と前期制限群の間には有意な差はなかった。また、相互作用をみたところ、どの栄養素にも2つの要因(授乳期間×群)による統計的な有意な差はなかった。

## 考 察

自由に摂取したコントロール群の食餌量の50%を妊娠前期に与えた妊娠前期食餌制限を設け、妊娠前期の低栄養が出生後の仔の成長に及ぼす影響について検討した。妊娠前期の摂取制限解除後に、制限群の母親の食餌摂取量がコントロール群の母親に比べて有意に増加する結果を得たが、この現象は摂取制限の反動により食事が著しく増えたためと推測される。

前期制限群から産まれた仔ラットはコントロール群から産まれた仔ラットと比較して生後4日目の体長が高値を示す傾向にあり、生後5日目の体重においては有意に高値を示していた。これは、臓器形成において最も重要な期間である妊娠中期および胎仔成長期間である妊娠後期に食餌制限の反動により母親の摂食量が多くなったことが、胎児の成長を増大させたものと考えられた。また、妊娠期の母親の摂食量の増加によって、初乳の栄養価を高め、さらには仔の成長にも影響を及ぼした可能性も考えられる。母親の妊娠中に栄養素の異なる試料を給餌した場合に母乳成分が変化するか否かを見た論文は数多くある<sup>11)</sup>。例えば、妊娠中期から授乳期にかけて母ラットにグルコース濃度の異なる餌で飼育した場合、グルコース濃度が高くなるに連れて母乳中の脂肪が高くなるとの報告がある<sup>12)</sup>。本実験では妊娠前期に食餌を制限したために妊娠後期の摂食量が明らかに増えており、摂食量の増加が乳成分に影響した可能性がある。

授乳前期から中期までの授乳量は、コントロール群と比べて等しく、妊娠前期の食餌制限は母親の必乳量に影響を及ぼさなかった。一方、授乳後期の授乳量はコントロール群に比べて少なかった。しかし、前期制限群は15日~20日の間の授乳量が低いにも関わらず、コントロール群と比較して仔ラットの成長が著しかった。同時期の体重増加量をみると、コントロール群と比較して前期制限群は高値を示す傾向にあった。この原因として下記の点がいくつか考えられる。前期制限群の仔ラットの成長が著しい分、離乳が早まり、母親の固形飼料を早くから摂食し始めた可能性もある。しかし、データは示していないが、前期制限群の母獣の摂食量がコントロール群と同じであったことから、仔が固形飼料を食べた可能性は少ない。また、今回の授乳量の測定値は一日のうちの1.5時間の値であり、この値が

24時間の授乳量を反映しているかどうかについては、日内変動や母子隔離によるストレスの影響を考慮してさらに検討が必要である。しかし、毎日、同一時刻一定時間に測定した授乳量が一日の乳摂取量を反映していると仮定すると、前期制限群の仔ラットは授乳後期において、コントロール群の仔ラットよりも少ない授乳摂取量で大きな体重増加を示したことになる。そこで、実験2として母乳成分の検討を行った。

妊娠前期に食餌制限を負荷した場合、食餌制限解除後に摂食量が増加したが、これは自然なことであり、この現象が初乳の栄養価を高めることは十分に考えられる。しかし、授乳期間(授乳の時期)と群を要因とした二元配置分散分析で母乳成分を検討したところ、初乳から中間乳、後期乳へと移行するにつれて、栄養価の変動が確認されたが、コントロール群と前期制限群の間には有意な差は見られなかった。タンパク質と固形分濃度は後期乳より初乳で高く、乳糖の濃度は後期乳で高かった。

実験1で示したように生後4日目の体長と5日目の体重が高値を示す傾向にあったのは、妊娠中に多くの栄養をとった母親の初乳の栄養価が高かったためと推測したがコントロール群と前期制限群の乳成分に差はなかった。しかし、妊娠期中期から後期にかけて母親の摂食量が増えたため、胎生期において前期制限群の仔ラットはコントロール群より成長をしていたということも考えられる。今後は、出生時の体長・体重を明らかにする必要がある。

実験1で、前期制限群は、授乳後期の授乳量が少ないのに仔ラットの成長が著しかった。その原因の一つとして想定した母乳成分の違いを検討した結果、仔ラットの体重増加量が高値を示す傾向にあった授乳期間の母乳成分は両群間で差がなかった。すなわち、前期制限群から誕生した仔ラットの成長が大きかったのは、母乳の栄養価の違いによるものではないことが示された。今回の仔ラットの乳摂取量は1.5時間の授乳量を測定した結果であるので、今後は、24時間の授乳量を測定し検討することも必要である。また、イギリスのBarkerらは母体を通じて胎児栄養障害が起こると、胎児の成長は抑制されるが、このような環境へ胎児自身の生理・代謝機能が適応できるようにプログラミングを変化させているという説を提唱している<sup>13)</sup>。この説に基づくと今回、妊娠前期に母親が食餌制限されていたことにより仔ラットへの栄養が足りなかったことで、仔ラット自身が胎生期に少ない栄養を体に蓄積しようとし、成長に影響を及ぼした可能性も考えられるがこれについても、今後検討すべき課題であると考えている。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大なご協力をいただきました明治乳業株式会社研究本部食機能科学研究所・村上大輔氏、栢之間愛氏に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 吉池信男, 松下由実, 金田美美, 滝本秀美 (2003) 肥満の疫学—国際比較と年次推移. 動脈硬化予防 2(3): 8-16.
- 2) 水上尚典, 佐藤郁夫 (2000) 妊娠中の栄養管理 妊婦の体重と児の予後について. JJPEN 22: 599-603.
- 3) 平松祐司 (2007) 妊婦と栄養. 日本臨床栄養学会雑誌 28: 284-288.
- 4) Law CM, Barker DJ, Osmond C, Fall CH, Simmonds SJ (1992) Early growth and abdominal fatness in adult life. *J Epidemiol Community Health* 46: 184-186.
- 5) Loos RJ, Beunen G, Fagard R, Derom C, Vlietinck R (2001) Birth weight and body composition in young adult men—a prospective twin study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1537-1545.
- 6) Loos RJ, Beunen G, Fagard R, Derom C, Vlietinck R (2002) Birth weight and body composition in young women: a prospective twin study. *Am J Clin Nutr* 75: 676-682.
- 7) Malina RM, Katzmarzyk PT, Beunen G (1996) Birth weight and its relationship to size attained and relative fat distribution at 7 to 12 years of age. *Obese Res* 4: 385-390.
- 8) Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351 (9097): 173-177.
- 9) Roseboom TJ, van der Meulen JH, van Montfrans GA, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (2001) Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life. *J Hypertens* 19: 29-34.
- 10) Ravelli GP, Stein Z, Susser M (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295: 349-353.
- 11) Del Prado M, Delgado G, Villalpando S (1997) Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr* 127: 458-462.
- 12) Lanoue L, Koski KG (1994) Glucose-restricted diets alter milk composition and mammary gland development in lactating rat dams. *J Nutr* 124: 94-102.
- 13) Barker DJ (2004) The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 23: 588S-595S.