

ラットにおける妊娠前期の極端な制限食が生後仔ラットの体組成に及ぼす影響

鈴木 美季子, 森 恵 見, 中西 由季子, 木村 修 一
(昭和女子大学大学院生活機構研究科*)

**Effect of Maternal Severe Dietary Restriction during Early Gestation
on the Body Composition in Pups Rats After Birth**

Mikiko SUZUKI, Emi MORI, Yukiko NAKANISHI and Shuichi KIMURA
Showa Women's University Graduate School of Human Life Science

Summary

Recently, slim young women are increasing in Japan. On the other hand, low birth weight babies are also increasing. In 1993, Barker *et al.* published highly influential hypothesis indicating a relation between low birth weight and increased risk of developing symptoms of the metabolic syndrome. The low birth weight child has catch-up growth afterwards. Catch-up growth is associated with adulthood obesity in mice as well as in humans. We examined the influence that the dietary restriction group of the early pregnancy gave to body composition of the first day after birth. Control group which was permitted free access to food throughout the gestation and lactation periods. Dietary restricted group which was permitted to intake 50% of the consumption had by the control group during early gestation. Body weight of male pups was larger in dietary restriction group than in control group at first day of birth. And, body fat of male pups from the dietary restriction group was lower than that of the control group. It was suggested that the body weight and body fat of the pups of the dietary restriction group during the fetus period was more increased than the control group. As a result, it is suggested that catch-up growth happens more for the fetus period.

これまでの研究で、妊娠中に低栄養条件にあった母親から生まれた子供が成人したとき、メタボリックシンドロームになりやすいことが示唆されている¹⁻³⁾。また、妊娠期のどの期間に低栄養条件にあったかで、その影響の現れ方は異なることが報告されている。第二次世界大戦でドイツ軍の占領下であって、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、妊娠前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^{1,2)}。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、妊娠前期の栄養は大変重要なものである³⁾。ダイエットをしている女性が妊娠をした場合、何よりも妊娠初期の栄養に影響を及ぼす可能性は大きい。その中でも、低出生体重が問題となっており、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⁴⁻⁷⁾。これは、低栄養状態を反映していると考えられる低出生体重児の急速なキャッチアップグロース (成長の追い上げ) が肥満リスク因子に

なると考察されている^{8,9)}。小さく産まれた子供は、その後のキャッチアップ過程で、肥満制御物質のレプチンの分泌が上昇し (レプチンサージ)、レプチンの感受性を低下させていると報告されている¹⁰⁻¹²⁾。レプチンサージの早期化は、エネルギー代謝調節の中枢である視床下部の発達に影響を及ぼし、レプチンの抗肥満作用に対する抵抗性を形成し、肥満に関係している可能性が示唆されている。

われわれは、これまで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、ラットの妊娠前期に極端な食餌制限が施された場合の、仔ラットに及ぼす影響について様々検討してきた。生後4日目にすでに、前期制限群はコントロール群と比較して成長が良いという結果を得ていることから、妊娠前期に食餌制限されていたことによるキャッチアップが起こっている可能性があることに注目している。その際、母乳成分を検討した結果、初乳の成分に両群間で差がなかったことからこの初乳を飲んでいて成長が著しかったのではなく、胎仔期にすでに、キャッチアップが生じていることをこれまで予測している¹³⁾。ただし、実験では体重・体長を測定した生後4日目の時点で、

*所在地：東京都世田谷区太子堂1-7 (〒154-8533)

すでに母乳を4日間摂取しているため、キャッチアップが実際に起こっている時期は不明である。今回はこの点を明らかにする目的で母乳の影響が少ない生後1日目の仔ラットにおいて検討した。その際、成長のキャッチアップを検討するには、体長および体重だけでは不十分であると考え、生後1日目の体組成（体脂肪・体タンパク質・灰分・水分）にも注目した。さらに今回は、性差についても検討した。

実験方法

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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗周期（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、陰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。コントロール群8匹、前期制限群11匹である。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。食餌については、コントロール群は実験期間を通して自由摂食させ、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。制限食を与える期間は、開始した妊娠0日目から21日目までとし、毎日飼料摂餌量・体重測定を行った。

2. 授乳期間の実験デザインと体組成測定方法

妊娠期間と授乳期間の実験デザインをFig. 1に示した。出産後1日目に他の実験に仔ラットを使用するために、1親あたりの授乳仔を10匹にそろえた。その際、雌雄の出生数を検討し、さらに10匹以上誕生した母親については、間引きした仔ラットの体長（頭から尻尾の先）と体重を測定し、主要臓器（肝臓・腎臓・胃・脳）を他の実験のために取り除いた体幹部は、体組成分析に用いるため -40°C で保存した。体組成分析に用いた仔ラットは間引きしたすべての仔ラットを使用したのではなく、各群4～5匹になるように測定を行った。測定時に凍結してある屠殺体を流水で解凍を行い、水を入れてホモジナイズし、凍結乾燥器を使用して、粉末状とした。その屠殺体粉末を使用し体組成として、水分、タンパク質、脂肪、および灰分について分析した。水分は、粉末にする時の凍結乾燥器を使用して、含まれる水分を乾燥させて得られた値を水分量とした。タンパク質は、ケルダール法¹⁴⁾によって測定し、脂肪はFolchらの方法¹⁵⁾により抽出した。灰分は 550°C で、5時間以上灰化を行い測定した。

3. 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差により示した。有意差の検定は、一元配置分散分析を行い統計学的に解析し、危険率5%未満を有意差ありとした。

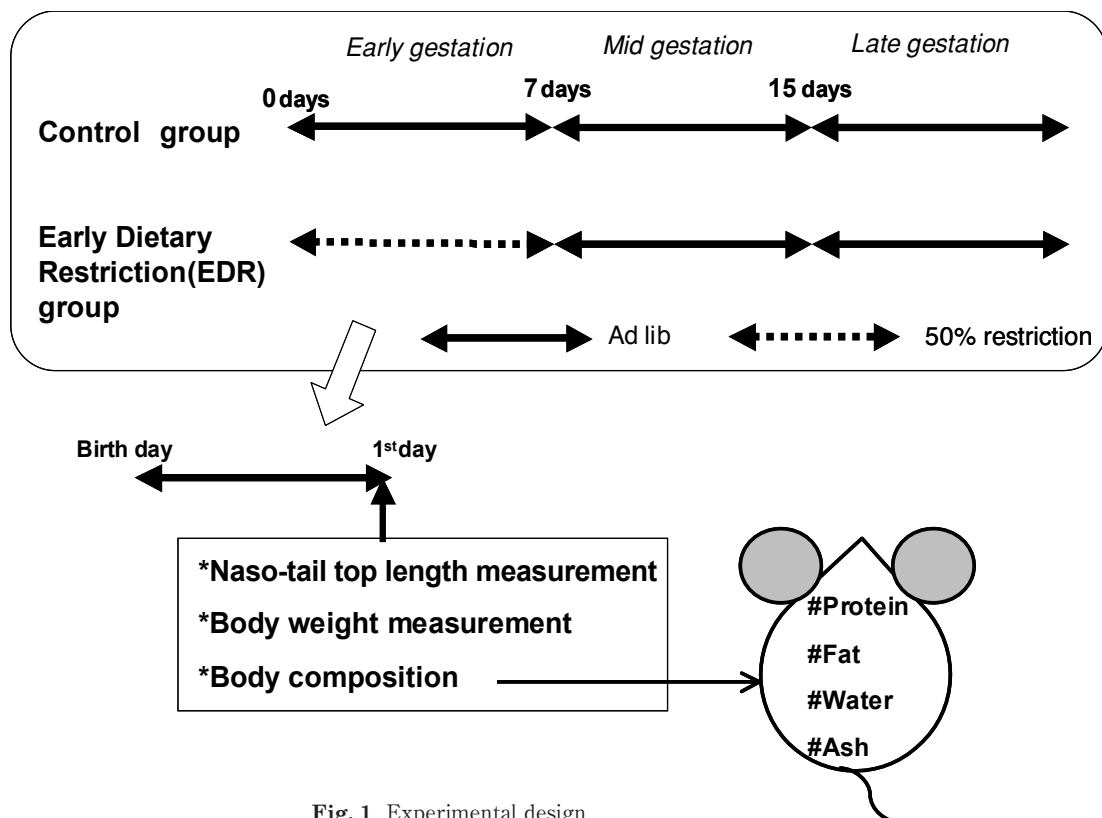


Fig. 1 Experimental design

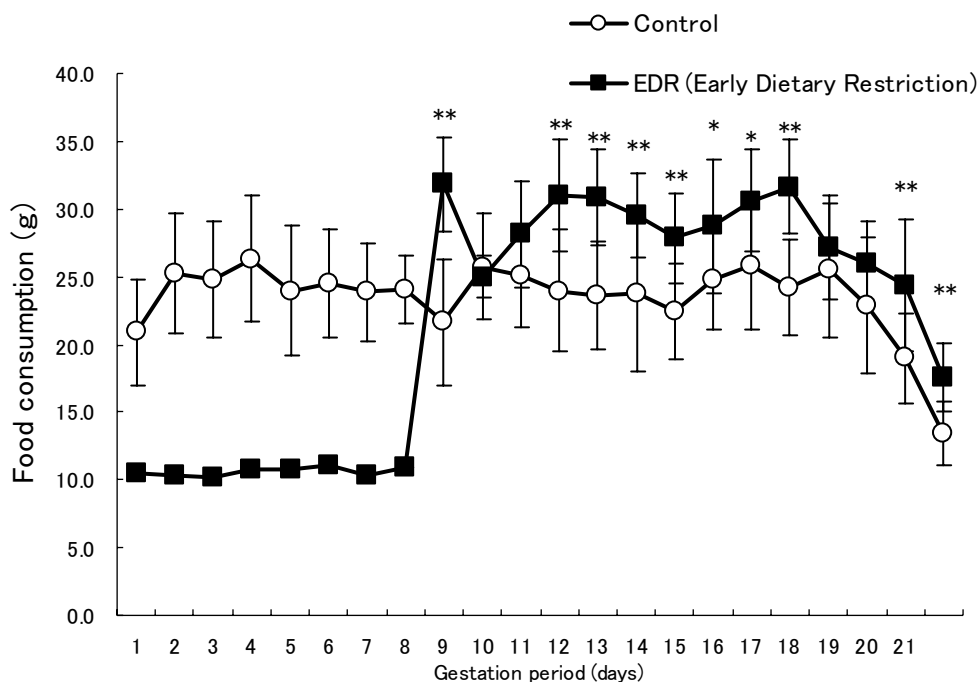


Fig. 2 Daily food consumption of dams during gestation.

Values are mean \pm SD. Control: n=8, EDR: n=11. Mean values were significantly different from control values at the same time point: $p < 0.01^{**}$, $p < 0.05^{*}$.

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。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。しかし、食餌制限解除後は、徐々に体重が増え、出産前日までは、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. 出生数

出生数を Table. 1 に示した。雄の仔ラットおよび雌の仔ラットの出生数に両群間で有意な差はなく、コントロール群は雄仔ラットを 6.88 ± 2.03 匹、雌仔ラットを $6.25 \pm$

Table. 1 Effect of dietary restriction on litter size

	Number	
	Male	Female
Control	6.88 ± 2.03	6.25 ± 1.04
EDR	6.27 ± 1.10	7.18 ± 1.78

Values are means \pm SD. Control dams: n=8, EDR dams: n=11.

1.04 匹、制限群は雄仔ラットを 6.27 ± 1.10 匹、雌仔ラットを 7.18 ± 1.78 匹産んでいた。

3. 生後1日目の体長および体重

仔ラットの体長と体重を Table. 2 に示した。前期制限群から産まれた雄仔ラットの生後1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 ($p=0.073$)、体重は有意に高かった。また、雌仔ラットにおいては、両群間に体重および体長の有意な差はなかった。

4. 生後1日目体組成

生後1日目の体組成を Table. 3 に示した。雄において、水分とタンパク質は両群間に有意な差はなく、脂肪はコントロール群と比較して前期制限群で高い傾向にあった ($p=0.087$)。また、灰分はコントロール群と比較して前期制限群が有意に低かった。雌においては、タンパク質・脂質・水分・灰分に両群間に差はなかった。

Table 2. Effect of dietary restriction on naso-tail tops and body weight of pups at first day of birth

	Male		Female	
	Body weight (g)	Naso-tail top length (cm)	Body weight (g)	Naso-tail top length (cm)
Control	6.07 ± 0.91	6.56 ± 0.38	6.88 ± 0.85	7.29 ± 0.63
EDR	$7.11 \pm 0.80^{**}$	6.87 ± 0.44	7.07 ± 0.37	7.03 ± 0.33

Values are mean \pm SD. Control male pups: n=11, female: n=13, EDR male pups n=15, female: n=23. Mean values were significantly different from control values: $p < 0.01^{**}$.

Table. 3 Effect of dietary restriction on body composition of pups at first day of birth

	Male			
	Water (%/BW)	Fat (%/BW)	Protein (%/BW)	Ash (%/BW)
Control	83.53 ± 0.64	1.88 ± 0.32	9.12 ± 0.39	2.05 ± 0.08
EDR	84.63 ± 0.70	2.27 ± 0.26	8.94 ± 1.31	1.77 ± 0.22*
	Female			
	Water (%/BW)	Fat (%/BW)	Protein (%/BW)	Ash (%/BW)
Control	82.97 ± 0.40	2.54 ± 0.82	9.38 ± 0.88	1.98 ± 0.12
EDR	83.44 ± 0.50	2.13 ± 0.31	8.88 ± 0.43	2.00 ± 0.15

Values are means ± SD. Control male pups: n=5, female: n=4, EDR male pups: n=5, female: n=5.
Mean values were significantly different from control values: $p < 0.05^*$.

考 察

妊娠前期の飼料摂取制限解除後に、前期制限群の母親の摂餌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リバウンドにより摂餌量が著しく増えたためと推測される。この結果は、以前の当研究室での実験結果と同様であった¹³⁾。

出生数を雄のみ・雌のみというように分類して検討したところ、雄のみ・雌のみにおいて両群間において差はなかった。このことにより、全体においても差はなかった。妊娠前期の食餌制限は、雄・雌の出生数および全体の出生数にも影響を及ぼさないことが分かった。

前期制限群から産まれた雄ラットはコントロール群から産まれた雄ラットと比較して、生後1日目の体重は有意に重く、体長も高値を示す傾向にあった。以前の我々の結果では、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¹³⁾。このときは、雄と雌を分けていない状態の測定であり、今回は、その前の段階である生後1日目に雌雄を判別し測定を行っている。雄・雌でそれぞれ結果を検討したところ、雄ラットでは、コントロール群と比較して前期制限群では、生後1日目の体重は有意に重く、体長も高値を示す傾向にあったが、雌では両群間に差はなかった。雄・雌を合わせた総数でみるとコントロール群と比較して前期制限群は有意に体重が重い結果となった。これは、臓器形成においてもっと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餌量が多くなったことが、胎仔の成長を増大させたものと考えられる。性差についてはまだ不明である。

今回は、母乳の影響が少ない生後1日目の体組成を検討した。雄において体重当たりで比較したところ脂肪がコントロール群と比較して前期制限群で高い傾向にあった。雌においては、変化がなかった。前期制限群の雄は体重においても、コントロール群の雄と比較して重いこと、また体重当たりの脂肪が高い傾向にあることから、コントロールより胎生期に著しく成長していたと考えられる。このことから妊娠前期に食餌制限を施すと、胎仔期にすでに

キャッチアップがおこっている可能性が示唆された。また、灰分が有意に低値を示すという結果も得られた。灰分を構成する無機質の減少が示唆されるため、今後仔ラットの骨密度などの測定が望まれる。雌は、雄に見られたような大きく生まれるという現象が見られなかった。胎仔期での雌と雄は、低栄養に対する応答や制限食解除後に受けた影響が異なることが示唆された。妊娠前期に食餌制限をかけると、制限食解除後の母親の摂食量が増す結果が得られており、仔ラットへの栄養がコントロール群よりも十分に取り入れられることになり、胎仔期における成長が良く、このような結果をもたらしたと考えることができる。

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¹⁶⁾。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かった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。

要 約

以上をまとめるとコントロール群と比較して、前期制限群の雄では体重は有意に重く、脂肪が高い傾向にあった。つまり成長が良かったと言える。その理由として考えられることは

1. 制限食解除後の母親の摂餌量の増加により、仔ラットへ栄養がコントロール群よりも十分に取り入れられることになり、胎仔の成長期である妊娠後期における成長が良かった。
2. 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かった栄養素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。キャッチアップは生後のメタボリックシンドロームのリスクになると言われていることから、今後は胎仔に着目し、さらにキャッチアップについて検討すべきであると考えている。

参考文献

- 1) 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: 173-177.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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: 1537-1544.
- 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) Eriksson J, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D (2001) Size at birth, childhood growth and obesity in adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 735-740.
- 9) Gluckman PD, Hanson MA (2004) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 15: 183-187.
- 10) Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S (2005) Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine under-nutrition. *Cell Metab* 1: 371-378.
- 11) Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108-110.
- 12) Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101: 1020-1027.
- 13) 鈴木美季子, 森 恵見, 柴沼真友美, 中西由季子, 星清子, 木村修一 (2009) 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, 微量栄養素研究 26 : 34-40.
- 14) Kimberly AE, Roberts MG (1905) A Method for the Direct Determination of Organic Nitrogen by the Kjeldahl Process. *Public Health Pap Rep* 31: 109-122.
- 15) Folch J, Leesm, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- 16) Barker DJ (2004) The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 23: 588S-595S.