

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860916

研究課題名(和文) IUGR新生児の適切な栄養管理とメタボリックシンドローム発症リスクに関する研究

研究課題名(英文) A Study on appropriate nutritional management for the IUGR new born and risk of metabolic syndrome

研究代表者

近藤 友宏 (Kondo, Tomohiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：40585238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内胎児発育遅延(IUGR)による低出生体重児への、効果的な栄養管理は未だ明らかとなっていない。本研究では正常体重に追いついた後の成長期に蛋白摂取制限を導入するという新たな栄養管理法が、メタボリックシンドロームのうち主に高血圧発症にどのような影響を及ぼすかを検討した。IUGRモデルマウスに対する、成長期での栄養管理は体重増加に悪影響を及ぼすことなく高血圧発症リスクを低下させることが明らかとなった。また栄養管理は高血圧以外の肥満や高脂血症にも好影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effective nutritional management to low birth weight infants by intrauterine growth restriction (IUGR) does not become clear yet. In this study, new nutritional management methods to introduce the protein intake restriction after the catch-up growth was examined what kind of influence on the mainly hypertension among the metabolic syndrome. The nutritional management to IUGR model mice was found to reduce hypertension risk without affecting growth. Also, the nutritional management has been suggested that exert a positive influence on obesity and hyperlipidemia.

研究分野：実験動物学

キーワード：子宮内胎児発育遅延 栄養管理 高血圧 腎臓

## 1. 研究開始当初の背景

新生児全体の約 10%が未熟な状態で生まれてくることが知られている。2,500g 未満の低出生体重児が生まれる原因として低栄養状態などの劣悪な母体環境下での子宮内胎児発育不全 (Intrauterine Growth Retardation, IUGR)が報告されており、近年日本での IUGR 発症率は女性の強い痩せ型思考の影響などから、増加傾向にある。IUGR により、新生児は低体重で生まれ、さらに成長後のメタボリックシンドローム発症の危険性が増加することが知られている。また、低出生体重児は出生直後に急速な成長を示し、体重が回復する (catch-up growth) ことが報告されているが、しかし、IUGR 新生児の一部は catch-up growth を達成できない。その場合、未熟度が高いほど障害は大きく、脳性麻痺や発達遅延が発生する割合が有意に高くなることも報告されている。このように、未熟な新生児の出生直後の成長は一様ではなく、この時期の成長をコントロールすることが重要であると考えられる。

IUGR 新生児の低体重の治療法として、出生後に高蛋白食を与え体重を早期に正常レベルまで回復させる方法がある。しかしながら、出生後の高蛋白食の投与は糸球体に過剰な血流をもたらすことで腎障害を重篤化させ、メタボリックシンドローム発症の危険性をさらに高めるという報告もある。低栄養が中枢神経系に恒久的な影響を及ぼす臨界期の結論も出ておらず、IUGR 新生児が中枢神経系に影響を及ぼさず、またメタボリックシンドローム発症の危険性を抑制するような効果的な栄養管理は未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では IUGR による低出生体重児の乳児期、小児期における適切な栄養管理法の開発を最終目的とし、IUGR が幼若期および成熟後の腎臓に及ぼす影響を明らかとし、成長期での蛋白摂取制限という栄養管理法が腎臓障害、メタボリックシンドローム発症リスクにどのような変化をもたらすかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) IUGR モデルマウスの作製

C57BL/6J 系マウスを使用し、交配翌日、プラグ確認後より、妊娠期間中に 6%蛋白含有飼料を給餌することにより、IUGR モデル (IUGR 群) を作製した。また妊娠期間中に通常蛋白含有飼料を給餌する群を対照群とした。

(2) IUGR が幼若期の腎臓に及ぼす影響及び急激な catch up growth を達成した後に栄養管理を導入した場合の変化

### 給餌スケジュールおよび採材

出生後は IUGR 群、対照群ともに通常蛋白含有飼料を給餌した。一部の IUGR 群は 2 週齢より 8 週齢まで 12%蛋白含有飼料を給餌し、これを栄養管理群とした。採材は 1 日齢、4

週齢、8 週齢で行った。

### 体重測定および血圧測定

出生時および 8 週齢まで定期的に体重を記録した。4 週齢および 8 週齢の収縮期血圧は非観血式血圧計を用い記録した。

### 組織学的検討

生後 1 日齢の腎臓重量、腎臓体積、腎小体数、腎小体体積、近位尿管長、近位尿管総体積および生後 4 週齢の腎臓重量、腎臓体積、腎小体数の計測を行った。

また 1 日齢、4 週齢、8 週齢の腎臓での上皮成長因子 (EGF)、レニン (REN)、アンジオテンシノーゲン (AGT) の局在を酵素抗体法により調べた。

(3) IUGR が成熟後の腎臓などに及ぼす影響及びおだやかな catch up growth を達成した後に栄養管理を導入した場合の変化

### 給餌スケジュールおよび採材

出生後は IUGR 群、対照群ともに通常蛋白含有飼料を給餌した。一部の IUGR 群は 6 週齢より 12%蛋白含有飼料を給餌し、これを栄養管理群とした。20 週齢から 30 週齢まではすべての群に高脂肪食 (32%fat) を給餌した。採材は 30 週齢で行った。

### 体重測定および血圧測定

出生時および 30 週齢まで定期的に体重を記録した。10、20、30 週齢の収縮期血圧は非観血式血圧計を用い記録した。

### 血液生化学検査

30 週齢のマウスより血清を採取し、血糖値 (GLU)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、中性脂肪 (TG)、総コレステロール (T-CHO)、HDL コレステロール (HDL) の値を測定した。

### 病理組織学的観察

尿細管間質の線維化を、マッソントリクローム染色を施すことにより観察した。また糸球体の硬化の程度を PAS 染色標本を用いて糸球体硬化指数 (GSI) を算出することにより測定した。具体的には、糸球体における PAS 陽性領域の占める割合により糸球体に 1 (<25%) ~ 4 (75%) のポイントをつけ、腎臓切片中に認められたすべての腎小体のポイントの平均を算出した。さらに肝臓組織に H.E. 染色を施し観察を行った。

細胞増殖因子ならびに血圧調整因子の発現量

EGF、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- ) の腎臓での mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により、REN、アンジオテンシンタイプ 1 受容体 (AT1) の腎臓での蛋白発現量をウェスタンブロット法により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) IUGR モデルマウスの作製

妊娠期間中に低蛋白食を給餌することにより出生時体重が約 15%低下しており IUGR を引き起こしていることを確認した (図 1)。対照群と IUGR 群の平均である 1.2g を境とし、

対照群で 1.2g 以下もしくは IUGR 群で 1.2g 以上の出生時体重の個体は以降の実験から除外した。

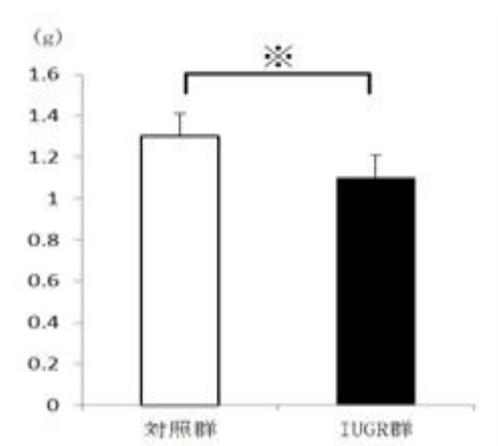


図 1. 出生時体重

(2) IUGR が幼若期の腎臓に及ぼす影響及び急激な catch up growth を達成した後に栄養管理を導入した場合の変化

#### 体重推移

出生直後に人為的に介入を行うことにより、生後 2 週齢で IUGR 群は catch up growth を達成した (対照  $6.4 \pm 0.2$ 、IUGR  $6.7 \pm 0.1$ )。そのため IUGR 群の一部に生後 2 週齢より 12% 蛋白含有飼料を給餌し、これを栄養管理群とした。その後生後 8 週齢まで、三群間で体重に有意差は認められず、栄養管理が体重増加に及ぼす悪影響は観察されなかった。

#### 組織形態計測

出生直後の IUGR マウスの腎臓では腎臓重量、腎臓体積、腎小体数が対照マウスと比べ有意に小さくなっており、4 週齢の IUGR 群では腎臓重量、腎臓体積、腎小体数全てにおいて対照群との有意な差は認められなくなっていた。また栄養管理群も他の二群との有意差は認められなかった。このことより、IUGR により出生時の腎臓に発達遅延が生じていること、また 4 週齢までにその発達遅延は解消され、栄養管理による腎臓の発達への悪影響は認められないことを明らかとした。

細胞増殖因子ならびに血圧調整因子の局在

細胞増殖因子である EGF の陽性細胞は腎臓が幼若な時は近位尿細管に認められ、成熟するにしたがって遠位尿細管に局限して観察されることがわかっている。1 日齢では EGF 陽性細胞は対照群、IUGR 群ともに近位尿細管に認められたのに対して、4 週齢では、EGF 陽性細胞は遠位尿細管にのみ局限して認められた。栄養管理群でも EGF 陽性細胞は遠位尿細管にのみ局限し、三群間に差は認められなかった。組織形態計測から示されたような発達の遅延による局在変化は認められなかった。血圧調整因子である AGT は局在に変化は

なかったが、陽性反応の強さは、4 週齢の IUGR 群で弱く、8 週齢の栄養管理群で強い反応が認められた。

#### 血圧変化

4 週齢の血圧は IUGR 群が対照群に比べて有意に高くなっており、栄養管理群ではその上昇は認められなかった。8 週齢の血圧は IUGR 群および栄養管理群が対照群に比べて有意に高くなっていったことから、栄養管理は高血圧発症時期の遅延効果があることが示唆された。

高血圧発症の遅延効果は認められたものの急激な catch up growth では IUGR による未熟な状態の腎臓にかかる負荷が大きいため一時的な遅延となったと考えられるため、catch up growth の時期を変えた次の実験系を行った。

(3) IUGR が成熟後の腎臓などに及ぼす影響及びおだやかな catch up growth を達成した後に栄養管理を導入した場合の変化

#### 体重推移

出生後から生後 5 週齢までは IUGR 群が有意に小さかったが、生後 6 週齢 (対照  $21.8 \pm 1.4$ 、IUGR  $20.8 \pm 1.8$ ) で有意差がなくなり、catch up growth を達成したため、この時より栄養管理群を設定した。その後、20 週齢まではすべての群間で体重の差は認められなかった。高脂肪食負荷後の生後 30 週齢において栄養管理群は対照群に較べて有意に小さくなっていった (図 2)。このことから IUGR マウスに栄養管理を施すことは、成長期での成長抑制などの悪影響を認めず、さらに高脂肪食負荷による体重増加を抑制することが明らかとなった。

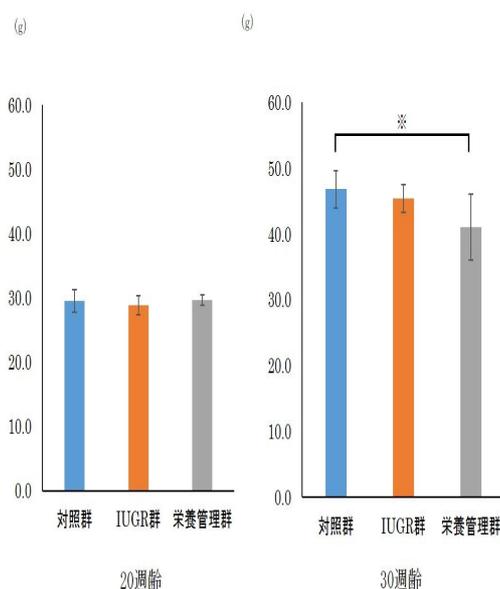


図 2. 成熟後の体重変化

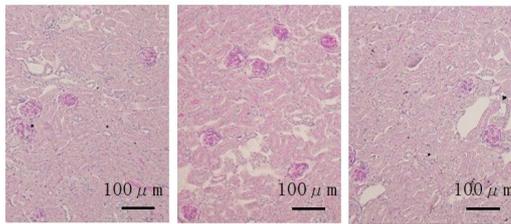
### 血液生化学検査

GLU, BUN, CRE, TG, T-CHO, HDL すべてにおいて三群間に有意差は認められなかったものの、栄養管理群は GLU, T-CHO の値が IUGR 群にくらべ低い傾向にあった。栄養管理を行うことによって、高脂肪食負荷に対するメタボリックシンドローム発症リスクの低下が示唆された。

### 病理組織学的観察

糸球体硬化指数 (GSI) は IUGR 群が栄養管理群に比べ有意に高い値となり、IUGR により腎糸球体の硬化が促進され、栄養管理を施すことによりその悪影響が緩和されることが明らかとなった (図 3)。またマッソントリクローム染色での結果は尿細管の間質線維化には差が認められなかったものの、糸球体の青染部位が IUGR 群で他の二群とくらべ明らかに多くなっており、PAS 染色の結果を支持する結果となった。また肝臓組織では、对照群や IUGR 群において中心静脈周囲に大粒の脂肪滴が多数観察されたのに対して、栄養管理群では少数しか確認できず、肝全体としても脂肪肝の病態の軽減が明らかであった。

### PAS染色像



对照群 IUGR群 栄養管理群

### 糸球体硬化度 (GSI)

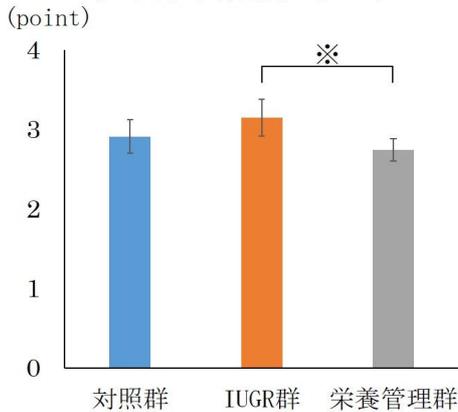


図 3. 糸球体硬化指数

### 血圧変化

急激な catch up growth を達成した場合と異なり、IUGR 群においても生後 20 週齢までは高血圧発症が確認されなかった。高脂肪食負荷後である生後 30 週齢において IUGR 群は対

照群とくらべ、有意に高くなっており、その上昇は栄養管理群では認められなかった (図 4)。成熟後ならびに高脂肪食負荷後でも高血圧発症を抑制したことから、おだやかな catch up growth 達成後に栄養管理を行うという方法は非常に有用であると考えられた。



\*: IUGR群VS对照群, 栄養管理群

図 4. 血圧変化

### 細胞増殖因子ならびに血圧調整因子の腎臓での発現量

EGF は群間で差は認められなかった。TGF- $\beta$  の mRNA 発現量は对照群と比べ IUGR 群で有意に増加しており、その増加は栄養管理群では認められなかった。TGF- $\beta$  は腎臓の線維化に関与しているため、IUGR によって線維化の促進がおこっていることが示唆された。血圧調整因子である REN, AT1 の蛋白発現量も对照群と比べ IUGR 群で有意に増加しており、その増加は栄養管理群では認められなかった。IUGR による成熟後の高血圧発症リスクが栄養管理を行うことにより低下させることができることが蛋白発現量からも示唆された。

以上のことをまとめると、IUGR により、腎臓はより未熟な状態で出生する。その後、腎臓の発達遅延は解消されるが、その際に腎臓にかかる負荷が将来的な高血圧発症リスクを変化させると考えられる。また、栄養管理を IUGR 新生児に施すことが、高血圧発症リスクを低下させることを明らかとし、さらに栄養管理はメタボリックシンドロームの他の因子である肥満や高脂血症にも好影響を与えることも示唆した。したがって、穏やかに catch up growth を達成させ、その後栄養管理を行う方法はメタボリックシンドローム発症リスク低下に非常に有用であると考えられる。今後、成長と学習障害や多動性障害などの発達障害との関連性についても詳細に解析を行い、より適切な栄養管理法を明らかとする。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yuasa K, Kondo T, Nagai H, Mino M, Takeshita A, Okada T. Maternal protein restriction that does not have an influence on the birthweight of the offspring induces morphological changes in kidneys reminiscent of phenotypes exhibited by intrauterine growth retardation rats. *Congenit Anom.* 56, 79-85, 2016. doi: 10.1111/cga.12143. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

岡田利也、繁村綾祐、長井寛明、武下愛、三野将城、日下部健、近藤友宏：子宮内胎児発育遅延(IUGR)マウス新生子の腎臓および血圧に対する生後蛋白質摂取制限の影響、第56回日本先天異常学会学術集会、2016年7月29日-31日、姫路商工会議所(兵庫県・姫路市)

吉留翔哉、長井寛明、武下愛、日下部健、岡田利也、近藤友宏：子宮内胎児発育遅延(IUGR)マウス新生子への栄養管理が成熟後の腎臓に及ぼす影響、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日-9日、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)

近藤友宏、繁村綾祐、長井寛明、武下愛、三野将城、日下部健、岡田利也：子宮内胎児発育遅延(IUGR)マウス新生子の腎臓の発達：蛋白質摂取制限による影響、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日-12日、北海道大学(北海道・札幌市)

岡田利也、繁村綾祐、長井寛明、武下愛、三野将城、日下部健、近藤友宏：子宮内胎児発育遅延(IUGR)マウス新生子の腎臓に関する形態学的観察、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27日-29日、自治医科大学(栃木県・下野市)

繁村綾祐、岡田利也、武下愛、三野将城、日下部健、近藤友宏：子宮内胎児発育遅延(IUGR)モデルマウス新生子の腎臓に関する形態学的観察、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日-23日、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 友宏 (KONDO TOMOHIRO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：40585238