

令和元年6月17日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19690

研究課題名(和文) 胎児発育不全児の高血圧発症リスク軽減のための栄養管理に関する研究

研究課題名(英文) A study on nutritional management for preventing elevation of blood pressure in the FGR new born

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎児発育不全(FGR)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FGR新生児の神経発達にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、FGRモデルマウスに対する成長期での栄養管理は神経発達に悪影響を及ぼしていないことが明らかとなった。成長期途中からの栄養介入は神経発達を阻害することなく、将来的な血圧上昇抑制に効果的であると考えられた。また、新たなFGRモデルとして、妊娠母体5/6腎臓摘出によるFGRモデルを作製し、その特性を明らかとすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低出生体重児が将来かかりやすい病気として、神経発達異常や高血圧などのメタボリックシンドロームがあげられる。これらを同時に予防するような栄養管理法は現在まで明らかでない。モデルマウスを使った研究ではあるが、本研究では、ある程度中枢神経系の成長を待った後に栄養介入を行うことで、両方のリスクを低下させることが可能であることを示すことができた。現在困難とされている未熟な状態で生まれてきたヒト新生児に対する適切な栄養管理法の確立や臨床的治療応用にもつながる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The effective nutritional management to low birth weight infants by fetal growth restriction (FGR) 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 neurodevelopment in FGR infants. As a result, it was revealed that nutritional management at the growth phase for FGR model mice did not adversely affect neurodevelopment. This nutritional management plan (i.e. protein restriction after the juvenile period) is effective in preventing elevation of blood pressure in FGR mice without inhibiting neural development. Moreover, as a new FGR model, the FGR model by maternal subtotal nephrectomy was produced, and the characteristic was clarified.

研究分野：実験動物学

キーワード：胎児発育不全 未熟児医学 栄養管理 高血圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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胎児発育不全 (Fetal Growth Restriction, FGR)が報告されており、日本での FGR 発症率は女性の強い痩せ型思考の影響などから、他の先進国に比べ高くなっている。低出生体重児の多くは出生直後に急速な成長 (catch-up growth)を示し、体重が回復することが報告されている。出生後早期の catch-up growth はその後の発達障害のリスクを減少させるが、メタボリックシンドローム発症リスクの増加が指摘されている。また低出生体重児が catch-up growth を達成できなかった場合、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樣ではなく、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。しかしながら FGR 新生児に対して、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

我々は FGR モデルマウスを用いた以前の研究で catch-up growth を穏やかに達成させた後に、栄養介入を行うという栄養管理法を導入したところ、成熟後の血圧上昇を抑制できることを見出した (図 1)。そこで本研究では、この栄養管理法が中枢神経系へどのような影響を与えているかを検討することによって、FGR 新生児の栄養管理法として有用となり得るかどうかを明らかにすること、さらにこの栄養管理法が、動物種や FGR モデル作出方法を変更した場合でも効果的であるかどうかを明らかとすることを当初の目的とした。

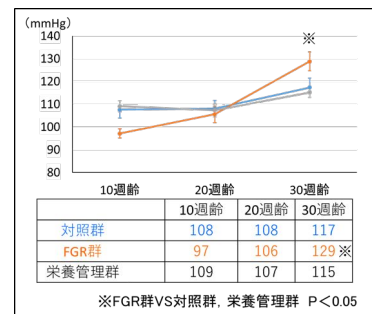


図 1. 収縮期血圧の変化

3. 研究の方法

(1) FGR ならびに栄養管理が中枢神経系に与える影響の解析

モデル作出方法ならびに栄養管理法

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、FGR モデル (FGR 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。出生後は FGR 群、対照群ともに通常蛋白含有飼料を給餌した。一部の FGR 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。採材ならびに行動解析を 10 週齢で実施した。

形態学的解析ならびに組織学的解析

体長、脳重量、大脳半球総面積、大脳皮質総面積を測定するとともに、脳のホルマリン固定標本を薄切後、H.E 染色、クリューバー・バレラ染色を施した。

行動解析

a: オープンフィールドテスト

正方形 (縦 40 cm x 横 40 cm x 高さ 30 cm) のオープンフィールドを用い 10 分間自由に探索させた。移動距離、不動時間、中央区画 (16 区画に分割した中央の 4 区画) にマウスが滞在した時間を解析した。

b: 高架式十字迷路

エレベータープラス迷路 (高さ 50 cm、オープンアーム 2 本: 25 cm x 4 cm、エンクロードアーム 2 本: 25 cm x 4 cm x 壁の高さ 15 cm、中央エリア: 4 cm x 4 cm) 内を 5 分間自由に探索させ、不安様行動の指標としてオープンアーム滞在時間を解析した。

c: Y 字迷路

隣り合う 3 本のアームの角度が 120° となっている Y 字迷路 (アーム: 長さ 40 cm x 幅 5 cm x 高さ 12 cm) 内を 8 分間自由に探索させ、自発交替率を算出した。

d: ステップスルー型受動回避試験

マウスをパッシブアボイダンス実験装置 (暗室: 33 x 32 x 34 cm、明室: 24 x 11 x 29 cm、明室/暗室分離ドア: 8 x 7.5 cm) の明室に入れ、20 秒間放置した。その後、明室/暗室分離ドアを開け、マウスが暗室に入ると同時に、明室/暗室分離ドアを閉め 3 秒間 (0.3 mA) 電流を流した。その後 10 秒間暗室に滞在させて獲得試行とした。24 時間後に再生試験を行い、カットオフ時間を 600 秒とし、暗室に侵入するまでの時間 (latency time)、明室内で身動きしない時間 (freezing time)、身動きしない時間の割合 (freezing) を計測した。

(2) FGR モデル作出方法の変更 (母体 5/6 腎臓摘出による FGR モデル)

FGR モデルラットの作製

Wistar 系ラットを使用し、交配翌日、プラグ確認日を妊娠 1 日目とし、妊娠 5 日目に左側腎臓の 2/3 を摘出、妊娠 12 日目に右側腎臓を摘出することにより、母体の 5/6 腎臓摘出とした。無処置の妊娠母体を対照群の母体とした。出産後哺育子数の調整を行い、対照群 (哺育数: 8)

ope 群 (5/6 腎臓摘出手術後、哺育数：8 匹)、ope-3 群 (5/6 腎臓摘出手術後、哺育数：3 匹) とした。

体重測定および血圧測定

出生時および 24 週齢まで定期的に体重を記録した。4 週齢、8 週齢、12 週齢、24 週齢の収縮期血圧は非観血式血圧計を用い記録した。

組織学的解析

出生時ならびに 4 週齢での、単位体積当たりの腎小体数ならびに腎小体体積の計測を行った。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。

血液生化学検査

12 週齢および 24 週齢のラットより血清を採取し、クレアチニン (CRE)、総コレステロール (T-CHO)、中性脂肪 (TG)、HDL コレステロール (HDL) の値を測定した。

4. 研究成果

(1) FGR ならびに栄養管理が中枢神経系に与える影響の解析

形態学的解析ならびに組織学的解析

生後 10 週齢での体重、脳重量、大脳半球面積、大脳皮質面積に、3 群間 (対照群、FGR 群、栄養管理群) に有意差は認められなかった。また脳組織の H.E 染色像ならびにクリューバー・バレラ染色像 (図 2) においても目立った差異は観察されなかった。

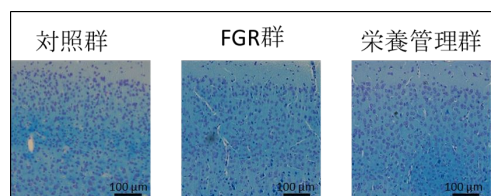


図 2. クリューバー・バレラ染色像

行動解析

形態学的解析と同様に生後 10 週齢で行った、オープンフィールド試験での移動距離、不動時間、中央区画滞在割合、高架式十字迷路試験でのオープンアーム滞在時間、Y 字迷路試験での自発交替率、受動回避学習試験での latency、freezing、すべてにおいて 3 群間に有意な差は認められなかった (図 3)。多動や抗不安様行動、作業記憶や恐怖記憶に栄養管理を施すことによる悪影響は認められなかった。

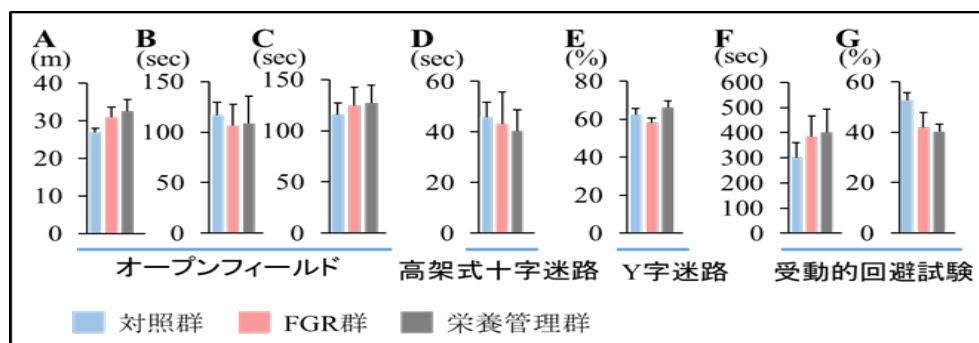


図 3. 行動解析結果 A: 移動距離, B: 不動時間, C: 中央区画滞在時間, D: オープンアーム滞在時間, E: 自発交替率, F: latency, G: freezing

以上の結果より、catch-up growth を穏やかに達成させた後に、栄養介入を行うという栄養管理法をおこなった場合、中枢神経系への悪影響は確認できないことが明らかとなった。この栄養介入を行うことにより、成熟後の血圧上昇を抑制できることを以前の研究で明らかにしており、成長期からの栄養管理は FGR 新生児の中枢神経系に悪影響を与えず、将来的な高血圧を防止する方法として有用であると考えられる。

(2) FGR モデル作出方法の変更 (母体 5/6 腎臓摘出による FGR モデル)

体重推移

妊娠期間中に母体に 5/6 腎臓摘出手術を施すことにより出生時体重が約 15% 低下しており、新たな FGR モデル動物として用いることができると考えられた (図 4)。出生直後に得られた新生子の哺育数を 3 匹にした場合 (ope-3 群) は 3 週齢で対照群の体重に追いつき、比較的早期に catch-up-growth を達成させることができた。しかしながら対照群と同様の哺育子数の ope 群は 4 週齢においても対照群と比較し有意に小さいままであった (図 5)。また ope 群は 24 週齢まで catch-up-growth を達成しなかった

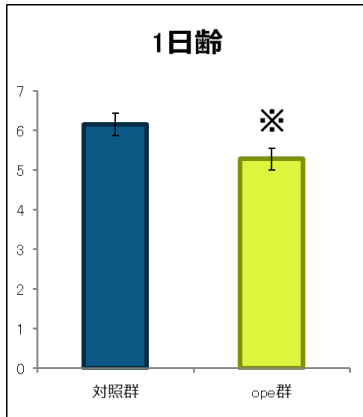


図 4. 出生時体重

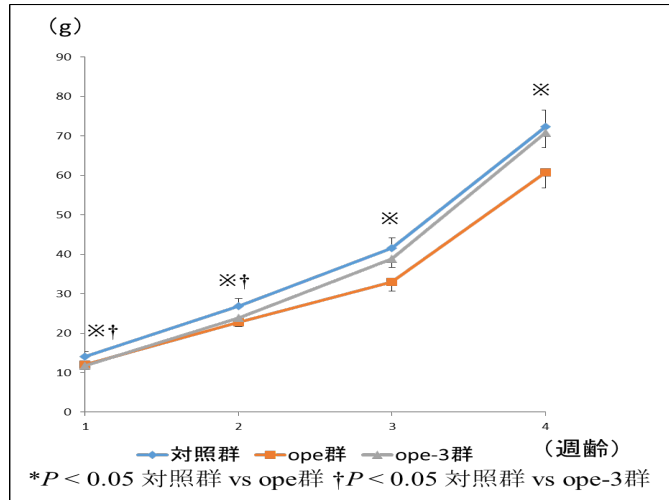


図 5. 新生子体重推移

血圧変化

収縮期血圧は4週齢より一貫して、ope-3群が他の2群より有意に高くなっていった。24週齢においてもope群と対照群との間に有意差はなく、ope群がcatch-up-growthを達成していないことがその一因であると考えられた。

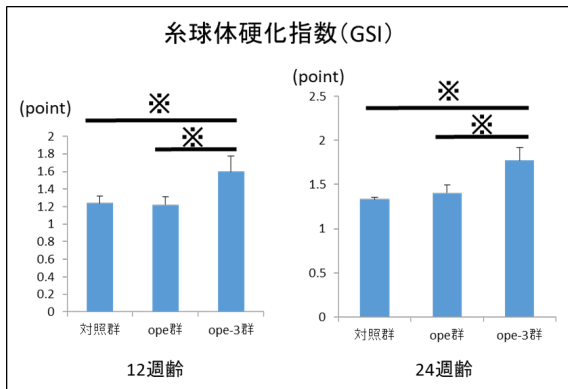


図 6. 糸球体硬化指数

組織学的解析

糸球体硬化指数 (GSI) は ope-3 群が対照群、ope 群に比べ有意に高い値となり、FGR 後の急速な catch-up-growth により腎糸球体の硬化が促進され、catch-up-growth 非達成の場合、その悪影響が緩和されることが明らかとなった (図 6)。

血液生化学検査

12週齢において、ope-3群は対照群・ope群と比較して、腎障害マーカーのCre、脂質異常症マーカーのTG、T-Cho、HDLcが有意に増加していた。また、ope-3群は対照群と比較して、LDLcも有意な増加がみられた。ope群と対照群においては、全ての項目で有意な差はみられなかった。24週齢において、ope-3群は対照群およびope群と比較して、Cre、TG、T-Cho、HDLc、LDLcの有意な増加がみられた。Ope群と対照群には多くの項目で有意差が認められなかったが、HDLcのみope群で対照群と比較し有意に上昇していた。

以上をまとめると、妊娠期間中に母体に5/6腎臓摘出手術を施すことにより新たなFGRモデルを作製することができた。その特徴として、他の多くのモデルと違い無処置の場合メタボリックシンドローム発症リスクが上昇しないこと、人為的に成長を加速してやることにより、他のモデル同様、成熟後のメタボリックシンドローム発症リスクが増加することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Okada T, Yana T, Ishii M, Nagai H, Ogawa S, Nakamura J, Takeshita A, Mino M, Kondo T
Fetal growth restriction (FGR) rat by maternal subtotal nephrectomy
Congenital Anomalies. Vol. 58, A9 (2018) (査読無)
DOI: 10.1111/cga.12314

[学会発表](計 7件)

Kondo T, Yoshidome S, Takeshita A, Okada T

Nutritional management from the middle of the growth phase is effective in preventing elevation of blood pressure in FGR model mice without inhibition of neurodevelopment. 6th International Conference on Nutrition and Growth (Valencia, Spain) 2019年3月7~9日

石井麻衣、梁珠生、長井寛明、小川祥司、中村純、武下愛、三野将城、近藤友宏、岡田利也
母体5/6腎臓摘出による胎児発育不全(FGR)モデルの作製
第58回日本先天異常学会学術集会(新宿区) 2018年7月27~29日

梁珠生、長井寛明、小川祥司、中村純、武下愛、三野将城、近藤友宏、岡田利也
母体腎臓障害に起因する胎児発育不全(FGR)モデルの作製
第123回日本解剖学会総会・全国学術集会(武蔵野市) 2018年3月28~30日

梁珠生、長井寛明、中村純、武下愛、三野将城、近藤友宏、岡田利也
母体5/6腎臓摘出による胎児発育不全(FGR)モデルの作製
第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島市) 2017年9月13~15日

岡田利也、吉留翔哉、長井寛明、武下愛、三野将城、近藤友宏
胎児発育不全モデル(FGR)マウス新生子に対する生後蛋白質摂取制限の影響
第57回日本先天異常学会学術集会(新宿区) 2017年8月26~28日

吉留翔哉、近藤友宏、長井寛明、武下愛、岡田利也
胎児発育不全モデルマウスを用いた低出生体重児への有用な栄養管理法の検討
第132回関西実験動物研究会(京都市) 2016年12月9日

岡田利也、繁村綾佑、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(姫路市) 2016年7月29~31日