

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 12 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791128

研究課題名(和文) 妊婦の摂取栄養が子どもの脳と精神に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of maternal nutrition on cerebral and mental development of the offspring

研究代表者

秋武 義治 (Akitake, Yoshiharu)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：20508791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内胎児発育遅延による低出生体重児では学習障害や気分障害など発達障害の発症率が高いことが指摘されている。しかしながら子宮内胎児発育遅延の原因は妊婦の低栄養、妊娠高血圧症、先天奇形など多様であるため低出生体重児における発達障害の発症機序の詳細は不明である。本研究では若い女性の痩せ志向に着目し、妊娠中の摂餌制限が子ども脳と精神の発達に及ぼす影響をマウスを用いて検討した。妊娠中に摂餌制限を受けた母獣から生まれたマウスは、正常マウスと比較して小さく、認知機能や情動に異常が認められた。本研究結果は妊婦のダイエットは子宮内胎児発育遅延の原因となるだけでなく、子どもの精神発達に影響を及ぼすことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Recent human studies have shown that intrauterine growth retardation (IUGR) is associated with neurodevelopmental disabilities such as learning disorder, memory impairment and mood disturbance in the offspring. However, the interaction between IUGR with neurodevelopmental disabilities is unclear because of the variety of the causes of IUGR. Fetal development is dependent on the placental supply of nutrition. Undernutrition of childbearing or pregnant woman is, therefore, one of the main causes of IUGR. In this study, we produced an IUGR model by moderate food restriction from pregnancy to the early lactation period in mice. There was low birth weight in the offspring. The IUGR models also showed delayed physical development and behavioral abnormalities such as anxiety and poor cognitive function. These results suggested that an abstemious maternal diet is a risk for not only IUGR but also for neurodevelopmental disability in the offspring.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：子宮内胎児発育遅延 低出生体重児

### 1. 研究開始当初の背景

日本では太りたくないという痩せ志向が強くなり、若い女性で BMI18.5 以下の痩せの割合は年々増加している。特に妊婦の場合、このような痩せ志向は子宮内胎児発育遅延 (IUGR = intrauterine growth retardation) の原因となり低出生体重児 (出生体重が 2500g 未満) の出産リスクとなる。日本の低出生体重児の出生割合は 1975 年が 5.1% だったのに対して 2010 年には 9.6% と大幅に増加しており、これは先進国の中でもトップである。胎児期から新生児期は器官の形成に重要な時期であり、その栄養源は主として母体に由来することから母親の食生活が子供に反映されることは容易に想像できる。実際に第二次世界大戦末期にオランダの一部の地域で起こった食糧難を経験した妊婦の子供は糖尿病、高血圧や高脂血症など生活習慣病を発症しやすいことが報告されており、胎児期の低栄養状態が出生時の体重だけでなく、その後の成長や健康に様々な影響を及ぼすことが明らかとなっている。

近年、低出生体重児では学習障害、気分障害および注意欠陥・多動性障害など発達障害の発症率が高いことを指摘されている。しかしながら IUGR の原因は妊婦の低栄養だけでなく妊娠高血圧症、感染症、先天奇形など多様であるため低出生体重児における発達障害の発症機序の詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では胎児期の低栄養状態が脳の形成と精神の発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、女性の痩せ志向を反映させた妊娠中の摂餌制限が子どもの発育、運動能力、情動および学習記憶能力に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 低出生体重児モデル (IUGR マウス) の作成

妊娠 8 日目から授乳 7 日目まで自由摂餌群の 70% の摂餌量のなるように母獣に対して制限を行うことで IUGR マウスを作成した。

(2) IUGR マウスの身体的発達の確認

生後 0 日目から生後 7 週目まで定期的に体重測定をし、また開眼日を記録した。

(3) 正向反射試験

平坦な板の上にマウスを仰向けに静置し、うつ伏せに戻るまでの時間を計測した。1 日 3 試行を 1 セッションとし 5 日間連続で 5 セッション行った。最大観察時間は 60 秒間とした。

(4) 背地走性試験

滑り止め処理をした 25° の傾斜板の上にマウスの頭を下向き静置し、体軸を 180° 旋回させ、上方に登る姿勢を示すまでの時間を計測した。1 日 3 試行を 1 セッションとし 4 日間連続で 4 セッション行った。最大観察時間は 60 秒間とした。

(5) オープンフィールド試験

実験装置はアクリル製で縦 40cm x 横 40cm x 高さ 30cm の装置を使用した。装置の底面には 1 辺 8cm x 8cm で 25 分割したラインが引かれている。実験はマウスを装置中央に静置し、その行動を装置の上部に設置したビデオカメラで記録した。観察時間は 120 秒間で、評価項目はマウスが移動によりライン上を通過した回数、装置の中央分画に滞在した時間、立ち上がりの回数、および毛繕いの回数を測定した。

(6) 物体認識試験

実験装置はオープンフィールド試験と同じ装置を使用した。物体は 1 辺 7cm の立方体あるいは直径 7cm x 高さ 7cm の円柱を使用した。物体認識試験は装置に対する馴化、獲得、試験の 3 つからなる。装置に対する馴化は何も設置していない装置内を自由に探索させた (15 分間/日)。これを 2 日間連続で行った。獲得は装置内に設置した 2 個の同一物体を 5 分間自由に探索させた。4 時間経過後、物体

の片方を新奇物体に変えて、装置内にマウスを再投入した。マウスの行動を装置の上部に設置したビデオカメラで記録し、それぞれの物体に触れるあるいは鼻先が0.5cm以内に近づいた時間を測定した。

#### (7)組織学的検討

神経幹細胞，神経前駆細胞を標識するため，マウスにBrdU(50mg/kg)を3時間毎に1日計4回の腹腔内投与を行い，最終投与の24時間後あるいは4週間後に，イソフルラン麻酔下に4%PFAで灌流固定を行った。摘出した脳を4℃で4%PFA中に72時間浸漬固定をした後，脳重量を測定した。4%PFAを20%スクロースに置換し，厚さ14μmの連続した凍結切片を作成し免疫組織化学的検討を行った。標識したBrdUの検出には抗BrdU抗体を用いて，新生神経の検出には抗Doublecortin(DCX)抗体を用いた。さらに染色した顕微鏡写真から測定した海馬面積を基に海馬体積を算出した。

#### 4. 研究成果

妊娠マウスに30%の摂餌制限を行うことで出生体重が約16%小さいIUGRマウスを作成できた(図1)。実験期間を通してIUGRマウスの体重は正常マウスより小さかった(図2)。開眼日は正常マウスが生後約13日目であったのに対し，IUGRマウスでは約14日目と約一日の遅れが認められた。

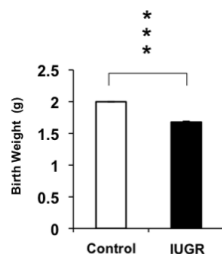


図1. 出生体重

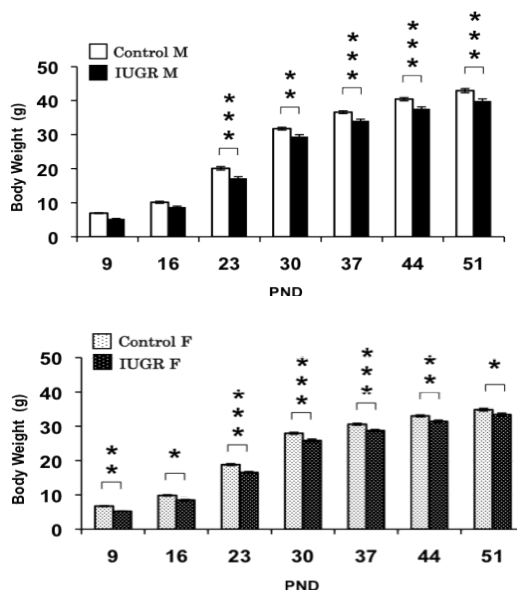


図2. IUGRマウスにおける体重変化

協調運動能の発達を評価するために行った正向反射試験では仰向けの状態からうつ伏せになるまでの時間がIUGRマウスで正常マウスより遅く，背馳走性試験では生後6日齢のみIUGRマウスで有意な遅れが認められた。

オープンフィールド試験による自発運動量は生後21日齢の雌性IUGRマウスで低下が認められたものの雄性IUGRマウスおよび生後49日齢では雄雌共に差は認められなかった。またIUGRマウスでは装置の中央滞在時間が短く，立ち上がり回数が少なかったことからIUGRマウスでは不安が強いと考えられる(図3)。

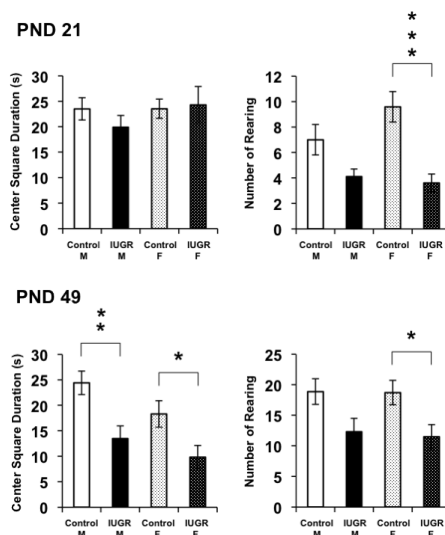


図3. オープンフィールド試験

また認知機能を評価するために行った物体認識試験では生後24日齢の雄性IUGRマウスは新奇物体に興味を示す割合が正常マウスと比較して有意に少なく、記憶能力の障害が示唆された。雌性IUGRマウスの記憶能力は正常マウスと比較して有意な差を認められなかったが低い傾向にあった。生後52日齢では雄雌共に有意な差を認められなかったが、IUGRマウスでは記憶能力が低い傾向にあった(図4)。

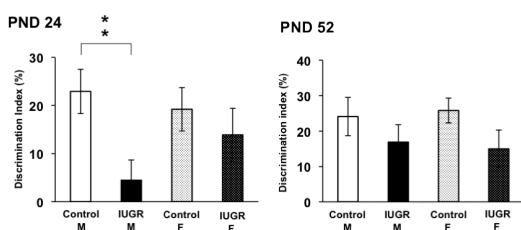


図4. 物体認識試験

組織学的には生後3週齢および生後7週齢におけるIUGRマウスの脳重量は正常マウスと比較して小さく、特に生後7週齢の雌性IUGRマウスの脳重量は正常マウスと比較して有意に小さかった。また記憶を司る海馬および歯状回の体積を調べた結果、IUGRマウスで小さい傾向があった。これらの原因として海馬歯状回における神経幹細胞、神経前駆細胞および神経新生の異常を考え、BrdUで標識した神経幹細胞、神経前駆細胞および幼若神経マーカーであるDCXの検出を行ったがIUGRマウスと正常マウスで有意な差は認められなかった。

以上をまとめると母獣の摂餌制限という単純な負荷で子どもの情動、認知機能は障害され、また検討した週齢時における神経新生に異常は認められなかったものの脳重量、海馬体積は小さく器質的発達も妨げられた。したがって本研究結果は妊婦の低栄養が子どもの神経発達障害の危険因子となることを示唆する。

## 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)

Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, Hosoda H.

Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. Nutr Res. 2014 Nov 7. pii: S0271-5317(14)00257-7. doi: 10.1016/j.nutres.2014.10.014. [Epub ahead of print] 査読有

[学会発表](計1件)

秋武義治, 桂木真司, 細川雅人, 池田智明, 細田洋司, 妊婦の摂取栄養が子どもの脳と精神の発達に及ぼす影響, 第3回日本DOHaD研究会 学術集会, 2014年7月25日,26日, 東京

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

秋武 義治 (AKITAKE YOSHIHARU)

国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号: 20508791