

一般演題

- O-1 双胎児の出生体重と adiposity rebound age 及び BMI 推移の関連に関する検討
加藤 則子（国立保健医療科学院 地域保健システム研究分野）
- O-2 女子大学生の DOHaD に関する認識についてのアンケート調査:Gage ら(AJCN 2011)の質問票を用いて
遠藤 綾（藤女子大学 人間生活学研究科 食物栄養学専攻）
- O-3 SGA児の臍帯血遺伝子発現から見た生活習慣病発症リスクについての検討
吉田 丈俊（富山大学附属病院 周産母子センター）
- O-4 極低出生体重児における栄養法がリポ蛋白プロファイルに与える影響の経時的検討
菅沼 広樹（順天堂大学医学部附属静岡病院 新生児センター）
- O-5 早産・超低出生体重で出生し 13 歳時に糸球体サイズ増大と糸球体硬化を認めた一例
西崎 直人（順天堂大学医学部附属静岡病院 新生児センター）
- O-6 出生前 LPS 羊水腔内投与がラットの腎の発育発達に及ぼす影響に関する検討
高橋 秀弘（東京都立小児総合医療センター 新生児科）
- O-7 胎児期ヒ素曝露による C3H マウス雄肝臓での脂質代謝変化と Ha-ras 変異をもった腫瘍の増加
野原 恵子（国立環境研究所）
- O-8 授乳期の高アルギニン摂取による内臓脂肪蓄積誘導に関する報告
小山 彩香（東京大学 総括プロジェクト機構「食と生命」）
- O-9 胎児期タンパク質制限が血圧調節関連遺伝子の制御に及ぼす影響
佐藤 正幸（東京大学 総括プロジェクト機構「食と生命」）
- O-10 胎生初期の低栄養状態による脳発達への影響
金子 隼也（滋賀医科大学 解剖学講座 生体機能形態学部門）
- O-11 ダイオキシン曝露による成熟後のマウス高次脳機能異常
掛山 正心（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター健康環境医工学部門）

双胎児の出生体重と adiposity rebound age 及び BMI 推移の関連に関する検討

○加藤則子、吉田穂波、横山徹爾 国立保健医療科学院
 瀧本秀美 国立健康・栄養研究所
 大木秀一 石川県立看護大学

【はじめに】多胎児は半数以上が低出生体重児であるため、生活習慣病の発症率が単胎児よりも高いと推測されるが、海外の研究によれば、必ずしもこの傾向ではない。

Swedish twin registry では双胎と単胎の間で成人血圧に差がないものの、一卵性双子の小さいほうでは血圧が高いことが指摘された(Vegero et al. Lancet, 1994)。この点については、Vaag et al. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007 も指摘している。喫煙している母親から生まれた双生児で、低体重であるからと言って必ずしも高血圧や肥満につながらないことが分かった(Willians et al. BMJ, 1999)。Netherland twin registry では、成人血圧に双胎と単胎で差がなかった (Geus EJ et al. Twin Res, 2001)。Danish twin registry では、心血管疾患の死亡率に双胎と単胎で差がなかった(Christensen et al. Twin Res, 2001)。Bermingham Twin Study の成果の一つとして、双生児では、低体重であるからと言って必ずしも高血圧や肥満につながらないことが分かった(Baird et al. Diabetologia, 2001)。

一方で、双生児法を用いた検討は、2 型糖尿病の遺伝による要素を評価した報告にはじまり、(Phillips et al. Diabetologia, 1993) 現在まで活発に遺伝と環境のかかわりについて検討が展開されている。

生活習慣病のアウトカム指標としては、血圧、耐糖能、BMI などがあげられるが、幼児期から学童期にかけての身体計測情報からそれを推測する方法がある。小児の BMI の推移は減少から増加に転ずることが分かっている。Cochrea らは Am J Clin Nutr, 1984 で、この時期を Adiposity rebound age (以下 ARA) と名付け、この時期が早いことが成人になってからの肥満リスクと密接な関係があると言った。その後 ARA が成人の肥満リスクにつながることは次々と報告され、Dhargarn. NEJM, 2004 では成人になってからの耐糖能との関連が明らかにされている。

そこで、ARA と BMI の推移に注目し、それと出生体重との関連を双胎と単胎、そして出生体重差のある双胎で比較することにより、両者の間で子宮内発育遅滞が生活習慣病リスクにつながっている度合いがどのように異なるかを検討した。

【研究方法】単胎児の身体発育データとしては、1990 年 4 月から 1991 年 3 月までの間に単胎児として生まれ大阪府内 4 か所の保育所に在籍し 1 か月ごとの身体発育項目の計測を行った 258 例を用いた。双子の身体発育データとしては、1969 年から 1988 年までの間に出生し、都内のふたご学級を有する中学校を受験した 1864 例のうち、出生時から 7 歳まで毎年身体発育記録が揃っている 369 例を解析対象とした。双胎児の出生体重差の基準は、体重差が大きい方の体重の 4 分の 1 以上の場合とした。

ARA の算出に当たっては、単胎児では 1 か月ごとの計測で偶然変動が大きいので、目視でならしてみた場合の最小の BMI を与える年齢を ARA とした。双子の場合一年間隔の計測のため、1 歳以降最小の BMI を与える年齢を ARA とした。

出生体重と妊娠期間によってグループ分けを行った。出生体重 2500g 以上の場合を「非低出生体重」2500g 未満の場合を「低出生体重」妊娠期間 37 週未満の場合を「早産」37 週以上の場合を「満期産」とし、それらを掛け合わせた 4 つのグループに分けて検討を行った。

【研究結果】単胎児の場合 ARA と 6 歳 BMI との関連はあまりみられなかったが、双胎児では ARA が小さいほど 6 歳および 12 歳の BMI は大きかった。各グループの平均 BMI の推移につき、非低出生体重児について図 1 に、低出生体重児について図 2 に示す。BMI の増減のタイミングは各群でほぼ共通していたが、全体的に低出生体重児に BMI が小さい傾向にあった。

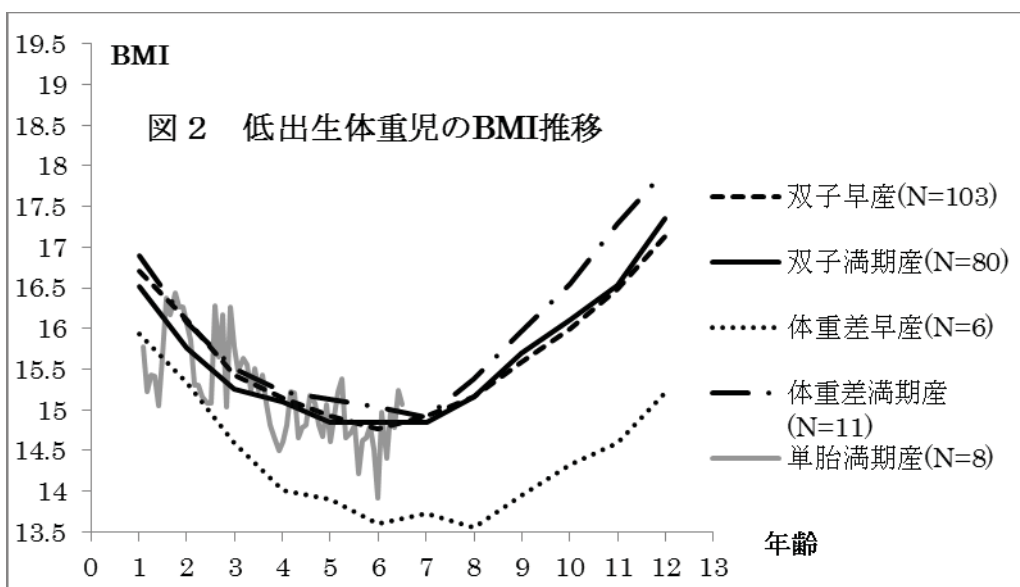
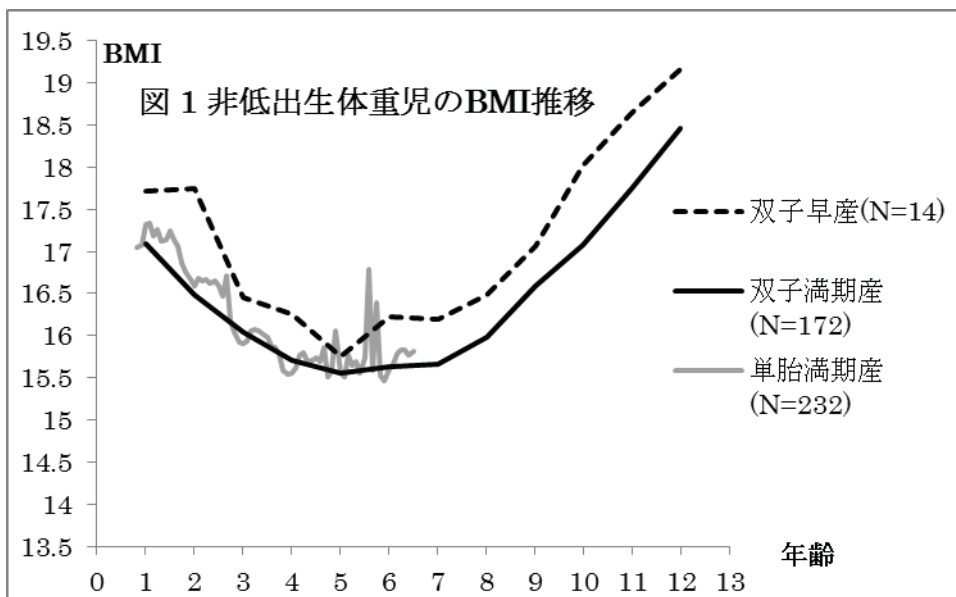
非低出生体重児では、満期産児は単胎と双胎で BMI 推移はほとんど同じだったが、双胎の早産児で BMI が大きかった。6 歳までに ARA のあったものの割合は、双胎の早産児で 36.3%と低かった。他は 50%前後であった。低出生体重児では、2 歳から 6 歳までは、単胎児と、双胎児で BMI がほとんど変わらなかったが、出生体重差を伴う組の小さい方の双児はこれらと離れた経過をしめた。6 歳までに ARA のあったものの割合は、単胎の満期産で 62.5%、満期産で生まれた出生体重差を伴う組の小さい方の双児

で 63.4%と高かった。他は 50%前後であった。

【考察】データセットの性質が異なるために、単胎児と双胎児の比較が適切に行われ難いものの、非低出生体重児で 1 歳から 6 歳、低出生体重児で 2 歳から 6 歳の間でほぼ同じ経過を取ることが分かった。出生体重差のある双胎の小さい方の児の BMI 経過は、他と異なる平均値の推移を示すため、新生児期の臨床経過などに特徴的なものがないかなども含めて検討する必要があるだろう。

出生体重と妊娠期間で分けたグループごとの BMI の推移については、低出生体重の場合全般的に低い経過を取ること以外、特徴的な知見が得られなかったが、むしろこれらの中で、BMI の増加が著しい例が将来の生活習慣病リスクを持ちうると考えられ、そういった観点からの検討が必要になると考える。

周産期医療の進歩普及に伴って、早産低出生体重児がいつ通常の発育にキャッチアップするかが課題となってきたが、キャッチアップの速さが速すぎる場合の長期予後としての生活習慣病リスクが新しい関心となっている。



女子大学生の DOHaD に関する認識についてのアンケート調査：

Gage ら (AJCN 2011) の質問票を用いて

○遠藤 綾、小山田 正人

藤女子大学人間生活学研究科食物栄養学専攻

【目的】DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) は「胎生期から乳幼児期に至る環境が、成人のメタボリックシンドロームを含む様々な疾患の発症に関連する」という概念である。

日本では、1975年以降の約30年間で出生時平均体重は200 g 近く減少しており、現時点で低出生体重児が総出生数に占める割合は10人に1人にまで増加している。これらは、胎児期の栄養状態の悪化を示している。また、平成22年国民健康・栄養調査の結果でも示されているように、わが国における20歳代女性のやせの者の割合は年々増加傾向にある。以上の事実は、今後DOHaDに関連する成人の疾患（肥満症、高血圧症、2型糖尿病、虚血性心疾患、脳卒中、骨粗鬆症、悪性腫瘍、精神神経疾患等）の更なる増加に繋がる危険性を示唆している。このため、DOHaD普及活動は、公衆栄養において重要であると考えられる。

DOHaDの社会への普及活動を行うためにはまず、DOHaDに対する認識の分析が必要となり、そのための質問票が求められる。昨年12月、Gageらは「乳児期の栄養が将来の健康にどの程度影響するか」を問う独自の質問票を作成し、ヨーロッパ5カ国（イギリス／フィンランド／ドイツ／ハンガリー／スペイン）の初産婦に対し、アンケート調査を行った (Am J Clin Nutr 2011;94 (suppl): 2018S)。この論文では、母親達は1歳までの食事が生涯の健康において、多くの生活習慣・行動（態度）・環境因子・遺伝子よりも重要性が低いと認識していることを報告している。

本研究では、今後の日本におけるDOHaD概念の普及活動への基礎資料として、Gageらによる質問票を用いたアンケート調査を行うことにより、日本人女子大学生のDOHaDに対する認識、具体的には女子大生が、

- (1) 1歳までの食事が、遺伝や生活習慣（遺伝・環境と生活習慣の要素）に比べて、成人になった時の健康にどの程度影響を及ぼすと考えているのか、
- (2) 1歳までの食事が、生涯に渡った不健康な食嗜好、肥満症になるリスク、慢性疾患の発症にどの程度影響すると考えているのか、を明らかにする。

【対象】研究対象は、女子大学生で約1,000名（80名×3学科（食物栄養学科／保育学科／人間生活学科）×4学年）を予定しており、年齢はおよそ18～22歳である。

【方法】アンケートは、Gageらによる質問票を日本語に翻訳したものをを用いた（文末に質問票を掲載）。予め用意した文書による説明後、対象者の同意を得た上で記名式での調査を行った。質問票は4つの大項目と21個の設問（うち自由記載1個）で構成されており、所要時間は15～20分程度であった。アンケートはマークシート式により行い、今後、機械的にデータを集計する。アンケート・調査票と個人データの両データを一致させた後、個人識別を暗号化し、個人を同定できないよう匿名化する。なお、本研究は、藤女子大学人間生活学部研究倫理審査委員会の承認を得ている。現在、学生へのアンケートを実施中であるが、今回、本研究会に発表させていただく目的は以下の通りである。

- （１） Gageらによる質問票の妥当性について
- （２） 他施設との連携について／その方法
- （３） これらを踏まえての日本独自の質問票の開発の可能性

アンケート調査										
記入には鉛筆かシャープペンシルを使用し、訂正する場合にはその箇所を丁寧に消してマークし直して下さい。										
良い例 ● 塗りつぶす 悪い例 ○ 穴で開く										
I. 学籍番号（□の上から順に7桁の学籍番号を記載し、同じ数字のマーク欄を塗って下さい。）										
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
□	0 0	0 1	0 2	0 3	0 4	0 5	0 6	0 7	0 8	0 9
II. 今のあなたの年齢（該当するところを塗りつぶして下さい。その他を選んだ方は□□に年齢も記載して下さい。）										
0 18歳 0 19歳 0 20歳 0 21歳 0 22歳 0 23歳 0 24歳 0 その他 □□ 歳										
【質問】										
あなたが『生まれたばかりの子供を持つ母親である』という仮定のもとで、次の1～4、計20項目（選択19項目、記述1項目）の質問に答えてください。（該当するものを1つ選んで塗りつぶして下さい。）										
1. あなたの子供が生後数ヶ月間に摂取した栄養は、その子が1歳の時の健康に影響を及ぼすと思いますか。										
0 はい 0 いいえ （どちらかを選んでください。）										
2. あなたの子供が生後数ヶ月間に摂取した栄養は、その子が3～4歳の時の健康に影響を及ぼすと思いますか。										
(1) 0 はい 0 いいえ （どちらかを選んでください。）										
(2) その理由を自由に記入してください。（いくつでも記載可）										
3. 設問（1）～（9）の項目が、あなたの子供の健康に及ぼす影響は、次の①～⑤のどの程度だと思いますか。（どれか1つを選んでください。）										
	①とても強く影響する	②強く影響する	③やや影響する	④あまり影響しない	⑤全く影響しない					
(1) 乳児期（1歳未満）の栄養（母乳・ミルク・食事など）が、大人になった時の健康に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(2) 子供～思春期の食事が、大人になった時の健康に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(3) 成人期の食事が、その時（成人期）の健康に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
4. 乳児期（1歳未満）の栄養（母乳・ミルク・食事など）が、生涯にわたって、設問（1）～（9）の下線部の病気に及ぼす影響は、次の①～⑤のどの程度だと思いますか。（どれか1つを選んでください。）										
(1) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる食物アレルギーに及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(2) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる肥満に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(3) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる湿疹や喘息や花粉症に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(4) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる糖尿病に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(5) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる骨の弱さ／骨粗鬆症に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(6) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる不健康な食嗜好（好き嫌い）に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(7) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる高血圧に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(8) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたる心臓病に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					
(9) 乳児期（1歳未満）の栄養が、生涯にわたるガン（癌）の発症に及ぼす影響は、①～⑤のどの程度だと思いますか。	0	0	0	0	0					

S G A 児の臍帯血遺伝子発現から見た生活習慣病発症リスクについての検討

○吉田丈俊¹、高崎一郎²、猪又智実¹、田村賢太郎¹、金兼弘和³、宮脇利男³
富山大学附属病院周産母子センター¹、小児科³
富山大学生命科学先端研究センター²

【はじめに】 胎児期の低栄養状態は胎児のエピジェネティクス変化を生じ、成人期の生活習慣病発症に関与している可能性がある。今回、われわれは臍帯血を使用して不当軽量児（以下 SGA 児）臍帯血での遺伝子発現を適正体重児（以下 AGA 児）と比較検討することによって、SGA 児の胎児期における生活習慣病発症リスクについて検討したので報告する。

【対象と方法】 正期産 AGA10 名、SGA10 名を対象とした。出生時体重は、AGA 2996±289g、SGA2214±172g。出生後すぐに臍帯血 0.5-0.8ml 採取し、RNA later に注入し-30℃で保存した。サンプルから RNA を抽出し、アフィメトリックス社 Human GenomeU133Plus2.0 アレイを用い遺伝子解析を実施した。SGA 群と AGA 群間で 2 倍以上発現量の差が認められた遺伝子を SGA 児特異的遺伝子としてパスウェイ解析を行った。SGA 児特異的遺伝子の中から、糖尿病・心血管疾患などの生活習慣病関連遺伝子について各々 RT-PCR を施行した。

【結果】 SGA 児特異的遺伝子を 1711 個同定しパスウェイ解析を行った結果、代謝・内分泌異常及び心血管系疾患と強い相関を認め、臓器毒性における解析では心血管疾患と著しく強い相関を認めた。糖尿病、脂質代謝、心血管疾患の関連遺伝子について RT-PCR を施行したところ、いくつかの心血管疾患関連遺伝子において SGA 児 2 名が著しく高発現していた。

【考察】 AGA 児と比較すると、SGA 児の臍帯血遺伝子発現は出生時すでに生活習慣病に関連した変化が認められた。臍帯血における心血管疾患関連遺伝子の高発現は、将来の心血管疾患の発症予知マーカーとなる可能性が示唆された。

極低出生体重児における栄養法がリポ蛋白プロファイルに与える影響の経時的検討

○菅沼広樹¹⁾、池田奈帆¹⁾、大川夏紀¹⁾、西崎直人¹⁾、東海林宏道²⁾、永田 智¹⁾、清水俊明²⁾
 順天堂大学医学部附属静岡病院 新生児センター1)、
 順天堂大学医学部小児科 2)

【背景】成熟児においては、母乳栄養が成人期の脂質代謝に影響を与え、メタボリックシンドロームの発症を抑えるといわれているとの報告もある。また、母乳栄養児では乳児期早期の血清 LDL-コレステロール(Cho)、中性脂肪(TG)が人工乳栄養児に比べ高値であるとされる。しかし、極低出生体重児(VLBWI)における栄養法の違いが、脂質代謝に与える影響に関する検討は充分ではない。今回、VLBWI における退院時のリポ蛋白プロファイルを測定し、栄養法の違いが及ぼす影響について検討した。

【方法】2010 年 5 月から 2012 年 1 月までに当院 NICU に入院した VLBWI を対象とし、退院時までの総経腸栄養に占める母乳率が 80%以上を母乳群(BM, n=26)、50%以下を人工乳群(PF, n=22)とした。出生時、生後 3 週、退院時に血液検査を行い、リポ蛋白プロファイルを高感度ゲルろ過 HPLC 法を用いて測定し後方視的に比較検討した。

【結果】出生時は BM・PF 両群において VLDL、LDL、HDL 分画に有意差を認めなかった。生後 3 週において BM で有意($p<0.05$)に高値であったのは、総コレステロール(Total-Cho)値 (BM 149.5 ± 27.0 、PF 118.6 ± 29.4 mg/dl)、VLDL-Cho (BM 39.5 ± 11.8 、PF 28.6 ± 9.9 mg/dl)、LDL-Cho (BM 60.9 ± 14.9 、PF 52.8 ± 16.4 mg/dl)、HDL-Cho (BM 46.2 ± 16.2 、PF 35.1 ± 12.1 mg/dl)であった。血清総中性脂肪(Total-TG)値、VLDL-TG、LDL-TG は両群間で差を認めなかったものの、HDL-TG (BM 12.1 ± 5.4 、PF 8.6 ± 7.0 mg/dl)は BM で有意($p<0.05$)に高値であった。退院時において Total-Cho (BM 119.5 ± 31.2 、PF 98.8 ± 19.7 mg/dl)、VLDL-Cho (BM 22.1 ± 7.3 、PF 17.7 ± 6.3 mg/dl)、LDL-Cho (BM 45.8 ± 14.2 、PF 36.7 ± 10.3 mg/dl)は BM で有意($p<0.05$)に高値であったものの、HDL-Cho は両群間で差を認めなかった。Total-TG (BM 71.5 ± 24.3 、PF 56.1 ± 27.0 mg/dl)、VLDL-TG (BM 28.0 ± 13.6 、PF 21.2 ± 15.1 mg/dl)、LDL-TG (BM 22.1 ± 7.6 、PF 19.3 ± 8.9 mg/dl)、HDL-TG (BM 15.2 ± 4.6 、PF 11.7 ± 4.7 mg/dl)は BM で有意($p<0.05$)に高値であった。

【考察】今回の検討では栄養法によりリポ蛋白プロファイルに相違を認めた。母乳が人工乳に比べコレステロールを多く含んでいることと、活性化されたリパーゼなどを多く含んでいるため TG の消化・吸収が良好であることにより生じた可能性がある。VLBWI におけるリポ蛋白プロファイルの意義については不明な点も多く、成人期の脂質代謝に与える影響を明らかにするためには、乳幼児期の変化について経時的に検討する必要がある。

早産・超低出生体重で出生し 13 歳時に 糸球体サイズ増大と糸球体硬化を認めた一例

○西崎 直人¹⁾²⁾, 平野 大志²⁾³⁾, 藤永 周一郎²⁾, 清水 俊明⁴⁾

1) 順天堂大学医学部附属静岡病院新生児センター

2) 埼玉県立小児医療センター 腎臓科

3) 東京大学大学院医学系研究科公共健康医学専攻

4) 順天堂大学医学部 小児科

【はじめに】

早産・低出生体重児では成長後の生活習慣病発症リスクが高いとされ、とくに腎においてはネフロン数の減少、糸球体内圧上昇・過剰濾過（Hyperfiltration theory）により糸球体障害や蛋白尿を生じる結果、遠隔期になって慢性腎臓病（CKD）を来すという報告が散見される。一方で本邦の低出生体重児出生率は上昇しているものの NICU 退院後の児に対する長期的な腎機能のフォローアップ方法について一定の見解はない。今回、早産（23 週）・超低出生体重（ELBW）が一因と考えられる高血圧、腎機能障害を伴う巣状糸球体硬化症（FSGS）の一例を経験した。症例を通じて NICU 退院後の腎機能監視の問題点と今後の対策を考察する。

【症例】

13 歳 5 か月女児。母体切迫早産のため 23 週 5 日、630g にて出生。他院 NICU 入院中に未熟性動脈管開存症に対してインドメサシンを使用された。NICU 退院後の成長発達は概ね正常で普通学級に進学し、NICU 卒業生としてのフォローアップ健診は就学を契機に終了となっていた。学校腎臓健診（学校検尿）は欠かさずに受診していたがこれまでに異常の指摘はなかった。平成 21 年、中学校の学校検尿で初めて蛋白尿 3+ を指摘され埼玉県立小児医療センター腎臓科を受診。初診時の身長 142.9cm（-2.2SD）、体重 38.4kg（-1.2SD）、血圧 140/80mmHg。精査にて尿比重 1.007、蛋白尿 3+（尿蛋白/尿 Cre=1.1）、軽度腎機能障害（BUN 12mg/dl、s-Cre 0.9mg/dl、シスタチン C 1.32mg/l、eGFR 70ml/分/1.73m²）を認め、小児 CKD 分類は stage2 であった。腹部超音波で腎長径は右 75mm、左 82mm であった。低蛋白血症は認めなかったが蛋白尿の原因検索のため腎生検を施行した。

【病理結果および経過】

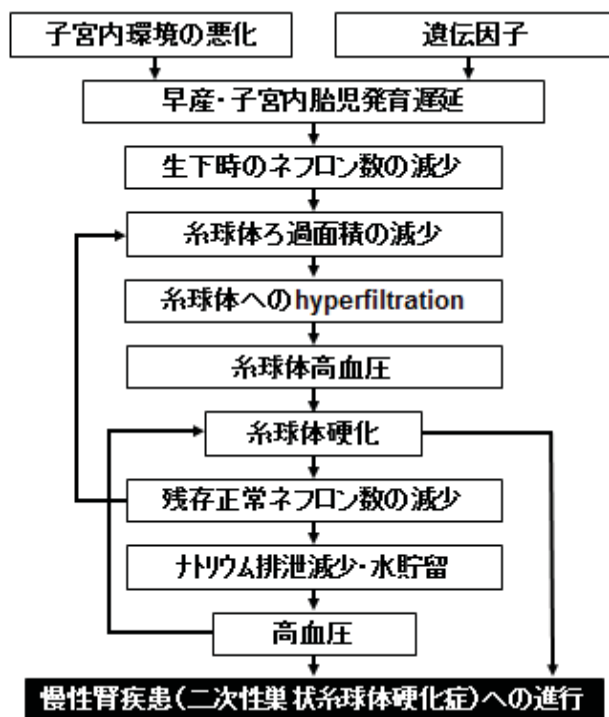
糸球体 8 個採取。残存した糸球体の最大面積は同年齢標準糸球体面積と比して 1.45 倍、平均面積は 1.74 倍とサイズの増大が認められた。病変は荒廃化 2 個、全節性硬化 1 個、分節性硬化 2 個、メサンジウム増殖 1 個を認め、一部に尿細管萎縮、間質へのリンパ球浸潤・線維化を認めた。ボーマン囊の癒着や半月体形成はなく、IF は陰性。電顕では上皮細胞足突起の剥離と一部癒合を認めた。以上から FSGS と診断した。病理診断後、高血圧改善および蛋白尿減少効果を目的にアンギオテンシン受容体拮抗薬（ARB）を投与したところ、血圧および蛋白尿は改善した。現在、s-Cre 0.9mg/dl 前後、蛋白尿 1+ 程度で推移しており外来フォロー中である。

【考察】

本症例の病理像では生来ネフロン数の少ない腎臓で Hyperfiltration が生じた結果、糸球体サイズ増大に加え様々な硬化病変が生じたと考えられた。このような腎病変は今回の発見以前に生じていたものと推測できるが、患児のように軽度腎機能障害を伴う場合、尿比重が低くなることがあるため試験紙法でおこなわれる学校検尿マスキングでは蛋白尿がマスクされ見落とされてしまうケースが起こり得る。こうした経験を踏まえ、今後は就学年齢以降に検尿異常や腎機能障害が出現するリスクのある早産・低出生体重児には少なくとも学校検尿以外の機会を設けて腎機能を監視する必要があると考えられた。そのためには NICU 退院時の保護者への腎機能監視の重要性の啓蒙や NICU 入院中に関わる新生児科医と退院後のフォローアップを担う小児科医に加え、我々のような小児腎臓専門医も積極的に情報共有や診療連携をする必要がある。今後は同様

の児に対し、検尿に加えてどのようなバイオマーカーを用い、どれくらいの間隔で腎機能監視を行うべきかの検討や早期発見・早期治療介入による腎予後のアウトカムの評価が必要である。

【早産・低出生体重児における慢性腎疾患発症プロセス（仮説）】



出生前LPS羊水腔内投与がラットの腎の発育発達に及ぼす影響に関する検討

○高橋秀弘、鈴木啓二
東京都立小児総合医療センター新生児科、東海大学小児科

【背景】

我々新生児科医は多くの早産児を日々診療している。早産の原因のひとつとして絨毛膜羊膜炎（CAM）がある。CAMは早産の誘因となるだけでなく、発達期の諸臓器に影響を及ぼし慢性肺疾患、大脳白質病変などの発症に関与している。しかしCAMが腎の発育・発達に及ぼす影響についての報告は少ない。ヒトでは満期は約40週、胎生34-36週にネフロンが完成する。ラットの妊娠期間は約22日、生後7-10日にネフロンが完成する。腎に関して、ラットの出生時はヒトの胎生24週に相当するとされている。

【目的】

ラット羊水腔内にLPSを投与することによりCAMモデルを作成し腎の発育・発達に及ぼす影響を検討すること。

【方法】

妊娠20日のSprague-Dawleyラットの各羊水腔内にLPS0.1 μ g（LPS群：L群）または生食（control群：C群）を注入、妊娠22日に経膈分娩で出生させた。日齢56に仔を解剖し左腎を採取、重量測定後ホルマリン固定、パラフィン包埋し切片をHE・PAS染色して観察した。糸球体数（Ng）、平均糸球体体積（Vg）、皮質の割合、糸球体濾過の指標を形態計測学的手法により評価した。C群・L群でオスとメスそれぞれ6匹（計24匹）から検体を採取した。

【結果】

仔の体重・腎重量ともにC群・L群の間に差を認めなかったが、オスでメスよりも重かった（Table.1）。相対的腎重量には差を認めなかった。NgはC群・L群、オス・メスで差を認めなかった（Fig.1）。VgはオスにおいてのみC群でL群より小さかった（C vs L: 30 ± 4.2 vs 48 ± 5.7 , mean $\pm$ SE, $\times 10^{-5} \text{mm}^3$, $p < 0.05$ ）（Fig.2）。皮質の割合はオスでメスよりも高かった（Fig.3）。糸球体濾過能の指標はC群でL群より小さい傾向があった（Fig.4）。

【考察】

糸球体数は年齢に逆相関し腎重量に相関するとされている。また糸球体体積は、糸球体数と同様に年齢に逆相関し腎重量に相関するとされている。最近発表されたSheepの羊水腔内にLPSを投与したモデル（Sheepの妊娠期間は約147日、妊娠121日にLPS投与し妊娠128日に帝王切開）では、LPS群で①ネフロンの数が有意に少なく②糸球体の大きさは大きい傾向があった（Galinsky 2011）。GFRはヒトでは加齢とともに減少するが、男性に比べ女性の減少は少ない（Baylis 2005・2009、NOと関連？）。脳の性的二型性に関してはよく知られているが、腎の性的二型性に関してはあまり知られていない。ある物質が大量に用いられた場合には有害であるのに、微量に用いられれば逆に有益な作用をもたらす現象をhormesisという。糸球体濾過能の指標がC群でL群より小さかったのはhormesisかもしれない。

【結語】

ラットにおいて胎生期の羊水を介したLPS暴露によりその後のネフロンの形成に影響を及ぼす可能性が考えられ、その程度には性差が関連することが示唆された。また腎の構造（皮質の割合）に性差があることも示唆された。

	Male		Female	
	Control	LPS	Control	LPS
Body Weight, g	290±14	308±11	214±6 [‡]	207±5 [‡]
Kidney Weight, g	1.29±0.06	1.33±0.06	0.89±0.02 [‡]	0.92±0.04 [‡]
Relative Kidney Weight, g/kg	4.47±0.12	4.16±0.10	4.16±0.09	4.44±0.11

Table. 1 Control vs LPS * <0.05 * * <0.01
Male vs Female † <0.05 ‡ <0.01

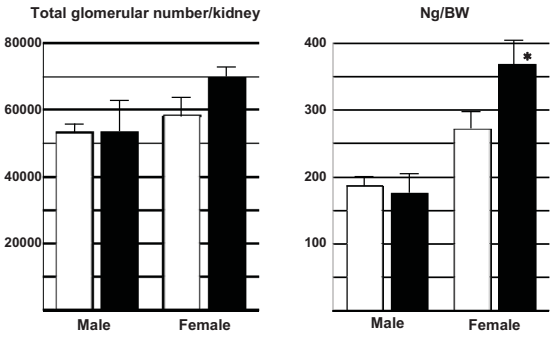


Fig. 1

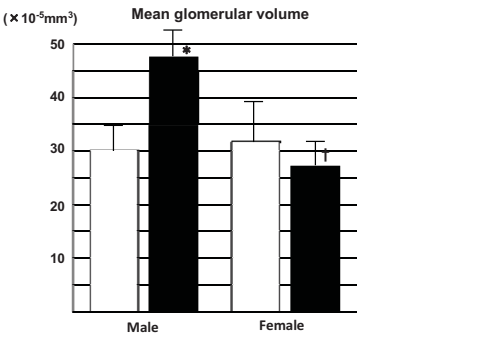


Fig. 2

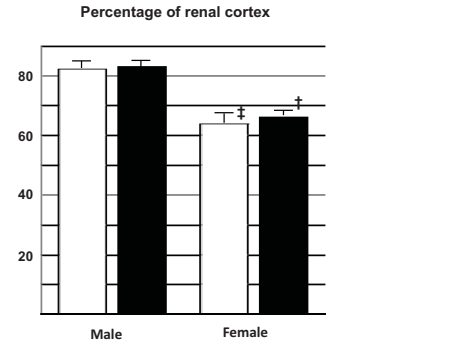


Fig. 3

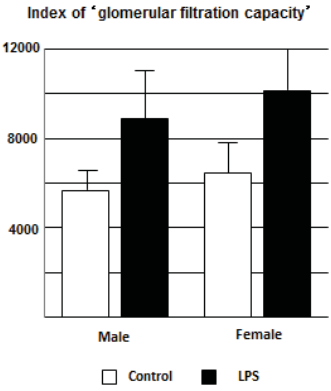


Fig. 4

胎児期ヒ素曝露による C3H マウス雄肝臓での脂質代謝変化と Ha-ras 変異をもった腫瘍の増加

○野原恵子^{1,2}、鈴木武博¹、岡村和幸^{1,2}、内匠正太¹、前川文彦¹、小堀真珠子³
¹国立環境研、²筑波大院・生命環境、³農研機構・食総研

【はじめに】中国、インド、バングラデシュやアルゼンチンなどの世界各国で、地質由来の無機ヒ素（ヒ素）が井戸水等への混入を介して深刻な健康被害をもたらし、大きな環境問題となっている。比較的早い段階で皮膚症状が現れ、20-30 年後に癌が発生することが報告されている。また近年の疫学調査では、胎児期や乳児期のヒ素曝露による成人後の癌の増加が報告されている。

C3H マウスは、成長後に雄が肝臓に腫瘍を高率に自然発症する系統である。妊娠中に 10 日間のみヒ素を含む水を飲ませた C3H マウスの母親から生まれた雄の仔(F1)が、74 週令（1 年 5 カ月）で対照群と比較して肝癌を高率に発症することが見付き、ヒ素発癌のモデルとして報告された（Waalkes et al., 2003）。私たちの追試実験でも、F1 ヒ素曝露群の 74 週令雄で肝腫瘍の発生率、肝臓あたりの個数、1 個当たりの大きさが、いずれも増加傾向を示すことが確認された（表 1）。さらに私たちは、胎児期ヒ素曝露による肝腫瘍増加を促進する因子を探索するために、F1 対照群とヒ素曝露群の 74 週令雄の正常な肝臓について、遺伝子発現変化を検討した。ゲノム不安定化や突然変異を誘導し癌の促進に働く可能性が報告されている酸化ストレスやレトロトランスポゾンの活性化に着目して検討を行った結果、酸化ストレス誘導性遺伝子である *Heme oxygenase 1 (HO-1)* やレトロトランスポゾン L1 の遺伝子発現量がヒ素曝露群の肝臓で 74 週令付近で後発的に増加していることをみいだした。その他に胎児期曝露で後発的に顕著に変動する遺伝子として、2 遺伝子の発現増加(*Crelid2*, *Slc25a*)と 2 遺伝子の発現低下(*Fabp4*, *Ell3*)をみいだした。また 74 週令ヒ素曝露群の肝臓でトリグリセリドの蓄積傾向が観察された。

本研究ではさらに、後発的な酸化ストレス誘導の原因として脂質代謝の変化を疑い、脂質代謝関連遺伝子の発現変化を検討した。また C3H マウスの肝自然発癌では、*Ha-ras* 癌遺伝子の特にコドン 61 番目に突然変異がおこり *Ha-ras* が活性化している例が一定の割合で見つかっている。そこで胎児期ヒ素曝露の *Ha-ras* 変異への影響についても検討した。

【方法】網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析：C3H マウス母親の妊娠 8～18 日に 85 ppm 亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂)を含む、または含まない水を自由摂取させ、生まれた仔を通常条件下で飼育した。F1 の 74 週令雄の正常な肝臓より RNA を調製し、Affymetrix GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。異なるサンプルを用いた 2 回の独立の実験で、繰り返し対照群に対してヒ素曝露群で発現が 1.5 倍以上増加または減少した遺伝子を選択し、解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis を用いてパスウェイ解析を行った。リアルタイム PCR：F1 対照群とヒ素曝露群の 74 週令の雄の正常な肝臓の mRNA 量を、リアルタイム PCR で定量した。Ha-ras 変異：F1 の 74-84 週令雄の肝臓組織より DNA を調製し、変異が報告されている *Ha-ras* コドン 12, 13, 61 の塩基配列を PCR 産物のダイレクトシーケンシングによって解析した。

表 1. C3H マウス対照群および胎児期ヒ素曝露群雄の肝腫瘍^{a)}

	肝腫瘍をもつ個体数 (%)	肝臓あたりの腫瘍の 個数	腫瘍の平均直径
対照群 (n=85)	35 (41%)	1.4	76 mm ²
ヒ素群 (n=85)	43 (51%)	1.7	92 mm ²

^{a)}対照群、ヒ素曝露群で週令を適合させた 74-84 週令のマウスを用いた。

【結果】 胎児期ヒ素曝露による脂質代謝の変化： F1 対照群と胎児期ヒ素曝露群の正常な 74 週令雄の肝臓について網羅的遺伝子発現解析を行い、解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis を用いてパスウェイ解析を行った。その結果、胎児期ヒ素曝露によって最も影響を受けた生物学的機能として、Lipid metabolism, Molecular transport, Small molecule biochemistry が抽出され、胎児期ヒ素曝露によって成長後の肝臓で脂質代謝変化が起こっていることが示された。Lipid metabolism に含まれた遺伝子は、*Fabp4*, *Scd*, *Acat2*, *Acy*, *Ppargc1a*, *Cyp4a11*, *Insig1*, *Lss*, *Tef*, *Cd36* の 10 種類で、いずれも対照群と比較してヒ素曝露群で発現低下を示した。また脂質代謝を転写レベルやタンパクレベルで制御する重要な転写因子の一つである SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) の遺伝子と、その標的遺伝子の一つでトリグリセリド合成酵素をコードする *Gpat* (glycerol-phosphate acyl-transferase) の発現変化をリアルタイム PCR によって測定した結果、*Srebp1* の発現は対照群とヒ素曝露群で差がなかったが、*Gpat* の発現がヒ素曝露群で抑制されていることが示された。

Ha-ras コドン 61 の変異： F1 対照群とヒ素曝露群の肝腫瘍組織の DNA について、Ha-ras コドン 61 番目(CAA)の変異解析を行った。その結果、ヒ素曝露群では変異を含む腫瘍の割合が増加し、特に C が A に置換された変異が顕著に増加していることが明らかとなった。Ha-ras コドン 61 の変異は対照群、ヒ素曝露群とも腫瘍組織でのみ検出され、正常組織では検出されなかった。また対照群、ヒ素曝露群の腫瘍組織で Ha-ras コドン 12, 13 の変異は検出されなかった。

【考察】 胎児期ヒ素曝露による肝腫瘍の増加において、C61A 変異によって活性化した Ha-ras をもつ腫瘍が増加していることが明らかとなった。C から A への置換、すなわち G:C→T:A トランスバージョンは、代表的な酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-2'-deoxyguanosine の生成によって誘導されることが報告されている。本研究の結果は胎児期ヒ素曝露による肝腫瘍の増加に、酸化ストレスによる変異を介した Ha-ras 活性化が関与することを示唆した。Ha-ras の変異は腫瘍組織でのみ検出されることから、変異によって活性化した Ha-ras をもった細胞がクローナルに増殖し腫瘍組織を構成していると考えられる。ヒ素は生体内で活性酸素種 (ROS) を産生し酸化ストレスを誘導することが多くの研究で報告されているが、その機序はまだ不明の部分が多い。胎児期ヒ素曝露がいずれの時期に、どのような機序で酸化ストレスを誘導し Ha-ras 変異を導くかを明らかにすることは、病態解明の重要な手掛かりの一つになると考えられる。

また本研究では、胎児期ヒ素曝露が成体の肝臓において脂質代謝に関与する各種遺伝子の発現低下を誘導することが明らかとなり、胎児期ヒ素曝露による肝臓での脂質代謝の抑制が示唆された。これまでの私たちの研究では、74 週令ヒ素曝露群の肝臓でトリグリセリドの蓄積傾向が観察されている。これらの知見から、胎児期ヒ素曝露によって成体の肝臓において脂質の蓄積が起こり、その結果肝腫瘍が多発する 74 週令付近においては脂質代謝に抑制的フィードバックがかかるという可能性が考えられた。脂質代謝は酸化ストレスの生成と密接に関係することから、胎児期ヒ素曝露による脂質代謝変化と酸化ストレス誘導および発癌の関連について、Ha-ras の C61A 変異との関係を含め、さらに経時的な解析が必要と考えている。

授乳期の高アルギニン摂取による内臓脂肪蓄積誘導に関する報告

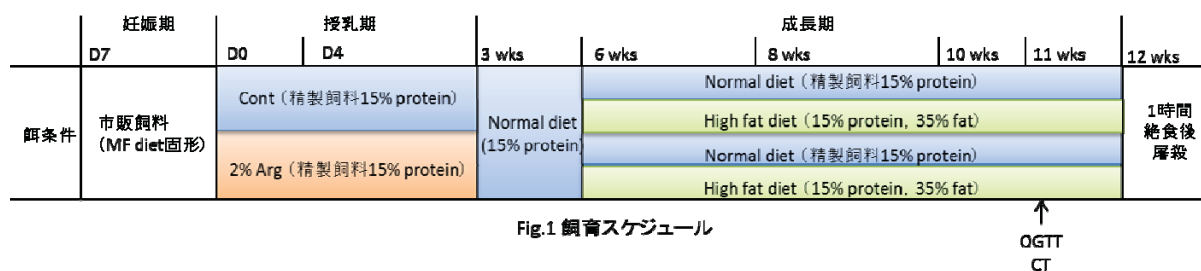
○小山彩香、大谷りら、森友美、加藤久典
東京大学総括プロジェクト機構「食と生命」

【背景】

我々は妊娠期や新生児期のタンパク質・アミノ酸摂取が成長後の代謝システムに変化をもたらすことを研究してきた。近年、授乳期の栄養状態が成長後の肥満に影響することが報告されている。マウスやヒトでは、授乳期の過栄養により急激な成長がもたらされ、成長後に肥満となることが見出されている。ヒトの疫学調査では、Small for gestational age (SGA) 児で出生直後に追いつき成長すると、成長後に腹部への脂肪の蓄積が増加することも報告されている。Lucas らは調製粉乳の摂取と急激な追いつき成長との関連を指摘している。また、授乳期のブタの母獣にアルギニンを過剰摂取させると仔ブタの成長が促進され、筋肉中に脂肪を蓄積することも報告されている。アルギニンは、一酸化窒素・シトルリン供給、免疫機能の改善、成長ホルモン分泌促進、インスリン分泌刺激の誘導などといった重要な働きを持つ。授乳期・成長期の仔獣の体内においては十分な量のアルギニンを合成することができないため、この時期の仔獣がアルギニンあるいはその誘導体を食餌から摂取することは成長において重要である。これらのことから、授乳期の高アルギニン食摂取は仔ラットの急激な成長を誘導し、同時に代謝のプログラミングにも影響を及ぼし、その結果、成長後に肥満になりやすくなるのではないかと考えた。今回我々はモデル動物としてラットを用い、授乳期の母獣および仔ラットへのアルギニン添加食の給餌が仔ラットの成長に及ぼす影響について調べた。さらに、仔ラット成長後の体重、内臓脂肪、インスリン感受性についても検討を行った。

【飼育条件】

雌性 Wistar 系ラットの母獣およびその仔ラットに、出生 0 日から 21 日（3 週齢）までアルギニン添加食（Arg；2%アルギニン添加 15%タンパク質食）または対照食（CN；15%タンパク質食）を給餌した。なお、腹あたりの仔数は 8 匹とした。3 週齢で離乳し、離乳後の飼料は両群の仔ラット（雄性）とともに 15%タンパク質食を 6 週齢まで給餌した。6 週齢時に CN 群と Arg 群をさらに 15%タンパク質食（CN-CN 群および Arg-CN 群；脂肪含量 12.4%）と、高脂肪食（CN-HF 群および Arg-HF 群；脂肪含量 35%）を給餌する群とに分けて 12 週齢まで飼育した。



【測定項目】

〈糖負荷試験〉11 週齢時に糖負荷試験を実施した。16 時間絶食させた後グルコース（2mg/g）を経口投与し、投与前、投与後 15、30、60、120 分に尾静脈より採血を行った。採取した血液は直ちに遠心分離（3000rpm、4℃、5 分間）して血漿を分離した。この血漿を用いて血中インスリン（Morinaga Institute of Biological Science、Tokyo）・グルコース濃度（WAKO）を測定した。

〈CT 断層撮影〉11 週齢時に動物用 X 線 CT 装置（Latheta LCT-100、Hitachi Aloka Medical、Ltd.、Tokyo、Japan）を用いた断層撮影により皮下脂肪および内臓脂肪量を測定した。撮影は第 11 胸椎から坐骨の先までを 2mm 間隔で行い、定量評価は付属のソフトウェア（Latheta、version 3.00）で行った。

〈サンプル採取〉12 週齢時に 1 時間の絶食後、サンプルを採取した。頸動脈から採血し、血清と血漿を得た。肝臓、胸最長筋及び腸間膜脂肪を摘出した。なお、胸最長筋は第 1 腰椎から第 11 胸椎の間の部分を使用した。肝臓、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪および後腹膜脂肪の重量を測定した。

〈組織トリグリセライド (TG) 含量〉肝臓及び胸最長筋に含まれる脂質をホルチ法により抽出した。抽出液に含まれるトリグリセライド含量は市販キット (WAKO) を用いて測定した。

〈統計処理法〉すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。得られた結果は二元配置分散分析を行い、事後検定には Bonferroni の多重比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

〈体重〉離乳時の体重は対照群で $65 \pm 5\text{g}$ 、Arg 群で $60 \pm 9\text{g}$ と、授乳期の 2%アルギニン添加食摂取の影響は認められなかった。離乳時から 12 週齢まで 15%タンパク質食で飼育した場合、アルギニン添加食の影響は認められなかった。(12 週齢時の体重、対照群； $475 \pm 16\text{g}$ 、Arg 群； $475 \pm 27\text{g}$)。対照群のラットを高脂肪食で飼育した場合も体重は CN-CN 群とほとんど同程度であった (CN-HF 群； $478 \pm 34\text{g}$)。一方、授乳期に 2%アルギニン添加食を摂取したラットに高脂肪食を与えると、体重が増加した (Arg-HF 群； $494 \pm 28\text{g}$)。

〈CT 断層撮影結果〉断層画像を解析し、皮下脂肪量と内臓脂肪量を算出した。皮下脂肪量は各群の間に有意な差は認められなかったが、内臓脂肪量は CN-HF 群に比べ Arg-HF 群で有意に増加した。

〈脂肪蓄積の分布〉胸最長筋および肝臓中の TG 量を調べた結果、胸最長筋の TG 含量は高脂肪食を負荷していない Arg-CN 群で対照 (CN-CN) 群に対して有意に増加していた。さらに、高脂肪食を負荷した場合も、筋肉中の TG 含量は Arg-HF 群で増加傾向が見られた。肝臓の TG 含量も同様の傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。血漿 TG 量は高脂肪食の摂取したラットで CN-CN 群に比べ Arg-HF 群で有意に増加していた。

〈インスリン感受性〉15%タンパク質食を摂取させた場合、血糖値は対照 (CN-CN) 群と Arg-CN 群で同程度であった。一方、血漿インスリン濃度はグルコース投与後、対照群に対しやや高い値を示した。次に、高脂肪食を摂取させた場合、血糖値はグルコース投与後 15、30 分後に対照 (CN-HF) 群と比べ、Arg-HF 群で有意に高くなっていた。さらに、インスリン分泌量もグルコース投与後に対照 (CN-HF) 群に比べ Arg-HF 群で有意に増加していた。なお、高脂肪食を無処置 (CN 群) のラットに与えても血糖値やインスリン分泌量に影響は認められなかった。血糖値およびインスリン濃度の結果をエリア・アンダーカーブで見ると、高脂肪食を摂取した場合、Arg-HF 群で対照 (CN-HF) 群に比べ血糖値は高い傾向を、インスリン濃度は有意に高値を示した。

【結論】

ラットにおいて授乳期の母獣および仔ラットにアルギニン添加食を与えても仔ラットの急激な成長は認められなかった。授乳期の母獣および仔ラットにアルギニン添加食を給餌した群で、仔ラットの成長後に高脂肪食を与えると、脂肪蓄積、とくに内臓脂肪蓄積が顕著に増加することを見出した。授乳期のアルギニン添加食摂取の影響は、成長後の高脂肪食摂取により顕在化し、仔ラットの内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性を誘導した。通常食を摂取している場合でも、授乳期にアルギニン添加食を摂取した群の仔ラットで、筋肉や肝臓といった組織への脂肪の蓄積 (異所性脂肪蓄積) が観察された。また、インスリン分泌もわずかながら増加していたことから推測すると、授乳期のアルギニン添加は仔ラットのインスリンシグナル調節等の代謝システムを潜在的に変化させ、その影響は高脂肪食摂取により顕在化したと考えられた。

この研究は生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援により行われた。

胎児期タンパク質制限が血圧調節関連遺伝子の制御に及ぼす影響

○佐藤正幸¹⁾、今門泰久¹⁾、大谷りら¹⁾、村上哲男²⁾、加藤久典¹⁾

¹⁾東京大学 総括プロジェクト機構「食と生命」

²⁾近畿大学 農学部 食品栄養学科

【背景】

胎児期の栄養環境が成長後の血圧上昇の要因になることは、高血圧患者の多い日本では無視できない問題である。遺伝素因がある場合、妊娠期間中の栄養環境が次世代にどのように影響するか不明である。そこで、本態性高血圧・脳卒中モデル SHRSP（脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット）を用いて、妊娠期のタンパク質制限が次世代の脳卒中発症に及ぼす影響について検討を行ってきた。先行研究で、妊娠中に低タンパク質（9%カゼイン）食を与えられた母獣から生まれた子ラットに、出生後に1%食塩水を与えると、子（F1）の血圧が対照群に比べて著しく上昇し、寿命も劇的に短縮することを見出した。興味深いことに、同様の影響は孫（F2）の代においても認められた（図1）。

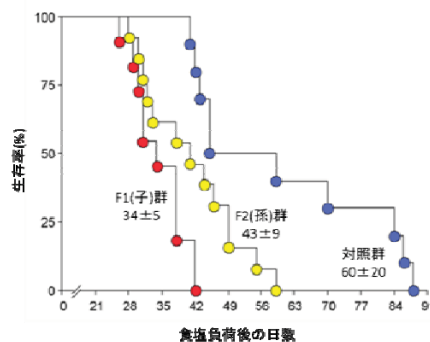


図1. 胎児期にタンパク質制限を受けた SHRSP の食塩負荷後の生存曲線

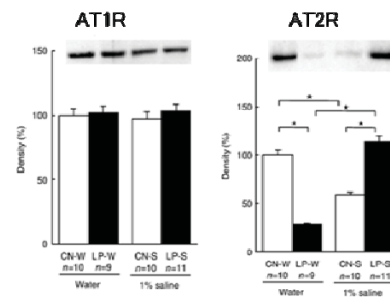


図2. 胎児期にタンパク質制限を受けた SHRSP の腎臓における AT1R と AT2R の発現量

我々はこれまでに妊娠中に低タンパク質食を与えられた母獣から生まれた子 SHRSP でレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）が変化していることを見出している。水道水摂取した場合、妊娠中に低タンパク質制限食を与えられた母獣から生まれた子ラット腎臓 AT2R は、低値を示した。食塩負荷を行うと、腎障害の発症により、妊娠中にタンパク質制限を受けた子で AT2R の発現が増加していた。なお、AT1R の発現量に妊娠中のタンパク質制限や食塩負荷の影響はほとんど認められなかった（図2）。

本研究では、妊娠中に低タンパク質食を与えられた母獣から生まれた子 SHRSP の腎臓で DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、先行研究においてタンパク質レベルでの変動が認められていた AT2R に注目し、胎児期の低タンパク質曝露がプロモーター領域の DNA メチル化に及ぼす影響を調べた。

【飼育条件】

実験動物は SHRSP を使用した。雌性 SHRSP の体重は 150-180g、雄性 SHRSP は体重が 176 g 以上で血圧が 180-185mmHg のラットを交配に使用した。雄と雌は 1 対 1 で一晩同居させ、翌朝の膣栓と膣内の精子の有無により妊娠を確認した。妊娠を確定した雌性 SHRSP は 20% カゼイン食 (Cont 群) と 9% カゼイン食 (MPR 群) を摂取するグループに分けた。妊娠中にタンパク質制限（9% casein 食）を受けた母獣（F0）から生まれたラット（F1）を母タンパク質制限群（MPR）とした。次に F1 世代の妊娠中に通常タンパク質レベル（20% casein 食）で飼育したラットから生まれたラット（F2）を祖母タンパク質制限群（GPR）とした。なお対照群は F0、F1 とも妊娠中に 20% カゼイン食で飼育した母獣から生まれたものを使用した。出生後は市販飼料（船橋 SP 飼料）に切り替え、すべての母および子ラットは市販飼料と水道水で飼育した。出生後 4 日目に間引きを行い、1 腹あたり 6 匹以下に調整した。10 週齢時に Cont 群および MPR 群はそれぞれ水道水もしくは 1% 食

塩水を摂取するグループに分けて 12 週齢時まで飼育した。体重と血圧は毎週測定した。血圧は、ラットを 37℃で予備加温した後、Tail-Cuff 法により測定した。尿は 11 週齢に代謝ゲージに移し、尿を採取した。尿中アルブミン濃度は BCG 法により測定した。12 週齢時に腎臓を摘出した。抽出した Total RNA は群ごとにブールし、DNA マイクロアレイ解析に供した (GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array ; Affymetrix)。得られたデータのシグナル強度の解析は GeneChip Operating Software (GCOS) Version 1.4 (Affymetrix) による Micro Array Suite (MAS) version 5.0 のアルゴリズムにより行なった。腎臓から抽出した DNA は、バイサルファイト・シーケンス法により、AT2R の転写開始点付近におけるメチル化パターンの解析に用いた。PCR 断片は pGEM-T Easy Vector(Promega)に挿入し、クローニングした。制限酵素処理で確認したサンプルについてシーケンスで配列を読み、QUantification tool for Methylation Analysis(QUMA)を用いて解析した。

【結果】

これまでと同様に、血圧は食塩水の負荷により低タンパク質曝露群で上昇した。また、尿へのアルブミンの排泄量もやや増加していた。なお、水道水で飼育した場合は、血圧および尿へのアルブミン排泄量は Cont 群と MPR 群の間に差を認めなかった。腎臓の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では妊娠中タンパク質制限を受けた子 (F1) や孫 (F2) で共通して発現変動が見られた遺伝子を中心に拾い上げた。こうして抽出された遺伝子の中には、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)やカリクレイン・キニン系(KKS)に関連する遺伝子が含まれていた。そこで、これまでに変動が認められていた AT2R のプロモーター領域におけるメチル化解析を行った。AT2R の転写開始点付近-266 から+73 までの 4 ヶ所について解析したところ、-266 の CpG 部位では水摂取 MPR 群で水摂取 Cont 群と比較してメチル化の割合が減少していた。また、-62 の CpG 部位では水摂取 MPR 群で水摂取 Cont 群と比較してメチル化の割合が減少する傾向が見られ、1%食塩水摂取 MPR 群で水摂取 MPR 群と比較してメチル化の割合が増加していた。

【考察】

網羅的遺伝子発現解析の結果や AT2R 発現が変動していたことから、低タンパク質曝露による食塩感受性の亢進は RAAS が中心的な役割を持つことが推測された。AT2R のメチル化解析結果をタンパク質量と比較すると、これらの位置のメチル化はこの遺伝子の発現をむしろ上昇させる可能性が示唆された。現在、メチル化パターンの相違が AT2R の発現特性に寄与しているか検討を行っている。

胎生初期の低栄養状態による脳発達への影響

- 金子隼也¹、原澤俊也¹、河野匡暁¹、野津瑛未奈¹、久保良仁¹、須藤祐輔¹、金井裕彦²
 小島秀人³、山田尚登²、村上哲男⁴、松田和郎¹、岡野純子¹、宇田川潤¹
¹滋賀医科大学解剖学講座生体機能形態学部門、²精神医学講座
³生化学・分子生物学講座分子遺伝医学部門
⁴近畿大学農学部食品栄養学科

【目的】

胎生期の低栄養は、ヒトにおいて生後の統合失調症、うつ病などの精神疾患発症のリスクを上昇させることが疫学的に示されている。げっ歯類においても、全妊娠期間あるいは神経発生の時期以後の低栄養により、仔が行動異常を呈することが報告されている。しかしながら、これまで神経管閉鎖前の初期の神経胚形成期の低栄養と仔の行動異常との関連については、詳細な検討がほとんどなされていない。そこで、本研究では Wistar ラットを妊娠初期に低栄養とし、その出生仔の行動に関して検討を行った。なお、本実験は滋賀医科大学動物実験委員会によって承認されている。

【方法】

実験動物

6 週齢の Wistar ラット(日本クレア)を購入し、温度 24℃、湿度 55%、12 時間の明暗周期の環境下で飼育した。4 週間の馴化後、10 週齢にて体重 200g～230g の雌ラットを雄と交配させ、膣栓を確認した日の午前 0 時を妊娠 0 日とした。

給餌

妊娠ラットを対照群 2 匹と食餌制限群 3 匹に分けた。対照群には妊娠全期間を通して標準精製飼料の AIN-93G(オリエンタル酵母工業)を自由摂取させ、食餌制限群には妊娠 5.5 日から 10.5 日に対照群の 50%の量を給餌した。その他の妊娠期間は、食餌制限群に対し、対照群と同量を給餌した。仔を出生後の母親ラットおよび仔ラットには標準固形飼料 CE-2(日本クレア)を与えた。仔は生後 28 日齢で雌雄別々のケージに分け、2～3 匹を 1 ケージ内で飼育した。

オープンフィールド試験

対照群の仔ラット雄 6 匹、食餌制限群の仔ラット雄 9 匹について、生後 8 週齢でオープンフィールド試験を行った。ラットは試験の 1 日前に行動実験室に持ち込み、全ての個体に対してアイソレーションを行った。試験では、直径 90 cm×壁の高さ 45 cm の円形フィールドの中央に動物を入場させ、10 分間自由探索をさせた。オープンフィールドの半径を 3 分割して同心円状の3つの領域に分け、各領域の滞在時間、移動距離について、十字・八方向迷路行動解析システム(Lime Light: Actimetrics 社)を用いて解析した。また、目視により立ち上がり、身づくろい動作、フリージングおよび洗顔動作回数、さらに糞数を計測した。

体重および臓器重量

仔ラットは 12 週齢で体重を測定し、安楽死させた後、脳、肝臓、脾臓、心臓、左腎臓および左精巣の重量を測定した。

【結果】

オープンフィールド試験

オープンフィールド内での 10 分間の総移動距離は、食餌制限群の仔ラットと対照群の仔ラットとの間で有意差が認められなかった。しかしながら、食餌制限群では対照群と比較して中心部および中間部の滞在時間の有意な減少、および辺縁部の滞在時間の有意な増加を認めた。また、レアリングの回数も食餌制限群で有意に減少していた。

体重および臓器重量

食餌制限群の仔ラット雄と対照群の仔ラット雄との間で、体重や脳、肝臓、脾臓、心臓、左腎臓および左精巣重量に有意差は認められなかった。また、2 群の仔ラット間で肝重量/体重比、脳重量/体重比、

脳重量/肝重量比に有意差は認められなかった。

【考察】

胎生初期の低栄養は、生後の仔の体重および臓器重量には影響しないと考えられた。一方、オープンフィールド試験において、総移動距離は対照群と食餌制限群の仔ラット間で差はなかったにもかかわらず、食餌制限群ではフィールド中心部における滞在時間の減少が認められ、探索行動の指標である立ち上がり回数の減少が認められたことから、不安様行動が亢進していると考えられた。したがって、胎生初期の低栄養は、未分化な神経幹細胞などのエピジェネティクスに影響を与え、生後の神経機能に関わる細胞の特性変化を引き起こしている可能性が考えられる。今後は脳組織の免疫組織化学的解析に加え、エピジェネティクスに関して検討を加える予定である。

【謝辞】

本研究は一般財団法人糧食研究会の一般公募委託研究助成を受けたものである。

環境化学物質への経胎盤・経母乳曝露による成熟後マウスの高次脳機能異常の評価

○掛山正心、遠山千春

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門

【はじめに】

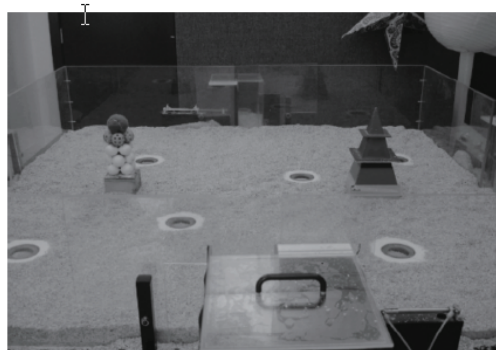
胎児期の低栄養状態が成人病の疾患リスクを高めるという Barker 学説「成人病の発達期起源 (Developmental Origins of Adult Disease)」を支持する医学生物学分野の知見が集積している。他方、胎児期の環境化学物質への曝露による次世代の子どもの健康影響の毒性学研究は、低栄養状態などの環境要因による影響研究に比して、十分な研究がなされていない。

近年、こうした毒性学的研究により、胎児期の環境化学物質曝露がこどもの生育過程や成熟後に様々な側面に影響を及ぼすことを示唆する知見が得られ始めている。しかしながら、実験動物の高次脳機能に焦点をあてた研究は少ない。その理由は、試験結果の再現性が乏しいことや実験動物の行動の意味付けが困難なことにあると我々は考えた。そこで新たな行動試験の開発を行い、妊娠中のラット・マウスに対して低用量の化学物質曝露を行い、その仔動物が成熟後、脳機能にどのような影響が顕れるのかを調べている。

【本文】

我々は脳機能の中でも、影響指標として重要でありながら取り組みの少ない、高次脳機能に着目し、その評価手法の開発を進めている。高次脳機能とは、知覚、記憶、学習といった認知過程に加え、それら外的・内的情報と自身の感情(情動)とあわせて思考、判断し、自己制御を行いながら実行する実行機能までを含めた精神機能である。最初に我々は、R. Morris 教授と共同研究で、ヒトやサルを用いなければ難しいとされていた、獲得済みの知識を利用した対連合学習(スキーマ依存性学習)をラットで実現した(Tse et al. Science 2007)。この試験では、ラットにフィールドの任意の場所に異なる味付けをした報酬ペレットを隠し、どの場所にどの味づけペレットが隠されているかを学習させるという、場所と味の対連合学習を成立させる。ヒトがレストラン・マップを学習するかのよう、ラットが地図を習得するには時間(約1カ月)かかるが、既に獲得した地図上で新しいレストランができると(新しい場所と味のペア)、わずか1分前後の試験時間内に学習できるようになる。スキーマ依存性学習は前頭葉と海馬が同時並行的に働いて行われていることも明らかになっている(Tse et al. Science 333:891-895, 2011)。そして、低用量のダイオキシンを妊娠中の母マウスに曝露した実験では、曝露マウスの仔マウスが成熟後にこの学習試験を行ったところ、短期・長期記憶には影響がない低用量であってもスキーマ依存性学習が阻害されること、すなわち皮質機能が発達期ダイオキシンの曝露影響を受けやすい可能性を見出した。

A Event Arena



B Flavor Map

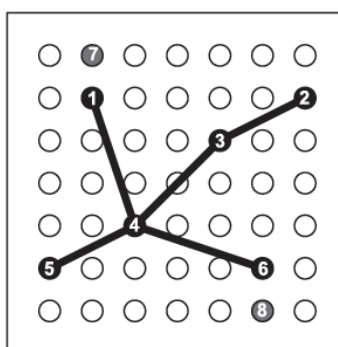


図1. スキーマ依存性学習. (A)Event Arena 試験装置と (B)Flavor Map 配置図. (1:チョコレート味、2:チェリー味、3:アニス味、4:ベーコン味、5:ココナツ味、6:ストロベリー味、7:バナナ味、8:シナモン味)。

次にこの発達期のダイオキシンの曝露影響をマウスで検証するため、集団型全自動行動試験装置 IntelliCage を用いた行動柔軟性課題を開発した(Endo et al. Behav Brain Res 221:172-181, 2011)。行動柔軟性とは、自らが作り出した行動パターンを、状況に応じて変更できる能力であり、状況や目的を判断

し、意識的、無意識的な自らの行動を調節するという、多くの脳機能を統合的に調節する働きのことである。我々の行動課題では、最初の一週間で、フィールド上の対角線上に位置する二か所の水飲み場を往復する行動系列をマウスに十分に獲得させる。その後水飲み場の位置(対角線)を変更する逆転課題を行う。マウスは、対角線上を往復するという自らが確立した行動系列を維持しながら、逆転課題に応じて正しい対角線にシフトしなければならない。逆転課題の最初は昨日までの対角線上を往復しているマウスが、さらに逆転課題を繰り返していくことで、徐々に速やかに、新しい対角線に対応していくことができる。

A IntelliCage



B Behavioral Sequencing Task

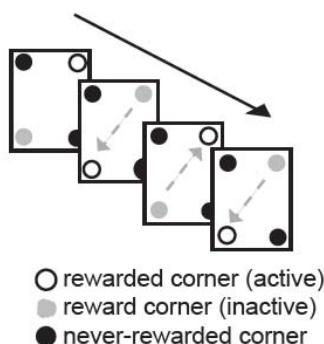


図 2. 行動柔軟性試験.
 (A)集団型全自動行動試験装置 IntelliCage と(B)行動系列課題 (Behavioral Sequencing Task)。

同試験により、ダイオキシン曝露マウスでは行動柔軟性(頭の柔らかさ)が低下していることを見出した。行動柔軟性が問われる場面では、認知学習能力が問われるだけでなく、イライラする、不安になるなど心の問題も表出しやすい。そこで情動行動を詳細に解析したところ、ダイオキシン曝露マウスは、課題遂行中に報酬に対して執着し無駄な行動を繰り返す「強迫的繰り返し行動」があること、さらに複数のマウスで飼育された社会的場面に特異的に、「ひっこみじあんになる」(社会的劣位性を示す)ことを見出した。加えて arc 等の免疫組織解析により、前頭皮質では神経活動が過多に、扁桃体では活動が低下しているという「皮質機能-皮質下機能アンバランス」が生じていることを見出した。以上の知見は、環境化学物質の胎仔期低用量曝露が皮質-皮質下機能アンバランスを引き起こし、認知学習から社会性行動、問題行動に至る行動異常を表出することを示している。「皮質機能-皮質下機能アンバランス」は、自閉症や注意欠陥・多動性障害などの発達障害、双極性障害や統合失調症などの精神疾患でみられる表現型である。

さらに我々は、マウスの生育環境の操作により、ダイオキシン曝露マウスと同じく社会的劣位性を示す生育環境条件、逆に野生型マウスよりも社会的優位性を示す生育環境条件を見出している。興味深いことに、生育環境条件は、その後の体重増加曲線にも変化があらわれることも明らかとなっている。本発表では、生育環境条件と脳行動表現型との関係について議論し、今後のテーマを提起したい。

参考文献

Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood E, Morris RGM, 2007, Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82

Endo T, Maekawa F, Võikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Kakeyama M, 2011, Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research* 221:172-181.

Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RG, 2011, Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333:891-895.