

称号及び氏名	博士(獣医学)	小川 祥司
学位授与の日付	2023年2月28日	
論文名	腎臓機能障害母体から生まれた新生仔の発達: Intrauterine growth retardation (IUGR)モデルの作出	
論文審査委員	主査	岡田 利也
	副査	桑村 充
	副査	東 泰孝
	副査	近藤 友宏

論文要旨

緒論

現在、我が国においては、年出生数が80万人程度と低くとどまっている一方、低出生体重児と呼ばれる児童の出生数に対する割合が、2005年以降9%台中盤の高値での横ばいが続いている。低出生体重児とはWHOの定義で出生体重が2500g未満の出生児を指し、特に成長に問題はなくとも早く生まれてしまったため体重が軽く生まれた早産児も含まれる。さらに、低出生体重児の中には胎児の成長が正常より遅れている状態があり、この状態は子宮内発育遅延 (Intrauterine growth retardation 以下、IUGR) と呼ばれる。IUGRによる低出生体重児が、成熟後のメタボリック症候群発症リスクが高いことや脳神経系の発達遅延が生じることが多いことが報告されている。低出生体重児には、通常、正常児の体重に急速に追いつく現象 (以下、Catch Up Growth) が認められ、成熟後のメタボリック症候群発症リスクがさらに上昇することが報告されている。またIUGRでは、発達障害の発症もみられるが、Catch Up Growthを示す子供では、代謝系のリスクが高いものの、学習スキルが改善するとされている。このことから低出生体重児に生じる Catch Up Growth は、長期的には成熟後のメタボリック症候群を引き起こす負の側面を示すが、短期的には神経発達障害を改善する正の側面があると考えられる。

IUGRの要因として母体低栄養や胎盤機能の低下、喫煙、腎不全など様々な事柄が報告されている。疾患モデル動物を用いたIUGRモデルの開発が幅広く行われており、食餌制限、低タンパク飼料給餌、子宮動脈結紮などによって作出されるIUGR

モデルがある。また、喫煙による影響を考慮したモデルとして、母体を低酸素状態にする母体低酸素環境飼育モデルがある。一方、妊娠前に異常がなくても一定の割合で妊娠高血圧腎症を発症することや腎不全の既往歴のある妊婦あるいは片側の腎臓を移植腎として提供したドナーが妊娠を希望することがしばしば見受けられ、その妊婦からは、IUGR の発生が高率であることが報告されている。このように、腎不全が IUGR の有力な原因の一つであると考えられるにもかかわらず、腎不全に起因する IUGR モデルは見当たらない。妊娠母体に 5/6 腎臓摘出を施すと母体腎臓で処理しきれない老廃物への暴露によって、胎仔の成長抑制が生じることが明らかにされている。また、母体 5/6 腎臓摘出ラットの胎生 22 日齢胎仔の体重は有意に軽く、IUGR の基準である「対照群の体重の平均値-2x 標準偏差」を下回っていることが報告されており、新生仔は低体重で出生することが予想される。本研究では、5/6 腎臓摘出母体から生まれたラット新生仔の成長、並びに腎臓の変化を調べることにより、IUGR 児としての特性を明らかにし、母体腎不全に起因する新たな IUGR モデルを作出することを目的とした。

第 1 章 5/6 腎臓摘出母体から生まれた新生仔の発達

Wistar-Imamichi ラットを用い、8~10 週齢の雌を雄と一晩同居させ、翌日、膣垢中の精子を確認できた個体を、妊娠 1 日目とした。5/6 腎臓摘出母体は妊娠 5 日目に左側腎臓の 2/3 を摘出し、妊娠 12 日目に右側腎臓を全摘出することにより作製した。摘出群には 5/6 腎臓摘出母体から得られた雄のうち先に述べた IUGR の基準を満たすものを使用し、対照群には無処置母体から得られた雄を使用した。両群ともに生後 1 日目に体重を測定し、哺育仔数を 8 匹に litter 調整した。体重は経時的に 1 週齢までは毎日、1 週齢以降は 1 週間毎に測定した。4、8、12 および 24 週齢時点で収縮期血圧を測定した後、三種混合麻酔下で大腿動脈からの全採血によって安楽死処置を施し、血清および左側腎臓を採取した。血清生化学検査によって、腎障害マーカーとして Cre (creatinine)、BUN (blood urea nitrogen)、また脂質異常症マーカーとして HDL-C (high density lipoprotein cholesterol)、LDL-C (low density lipoprotein cholesterol)、T-Cho (total cholesterol)、TG (triglyceride) を測定した。採取した腎臓は PAS 染色を実施し、糸球体硬化の程度を示す糸球体硬化指数 (GSI: glomerular sclerosis index) を測定した。免疫組織化学染色により血圧調節因子であるレニン陽性細胞およびアンジオテンシノーゲン陽性細胞の腎臓における局在を調べた。

新生仔の体重は 1 日齢から摘出群が有意に軽く、19 週齢まで有意に軽い状態が継続した。血清生化学的検査では、4 週齢時点で、摘出群は対照群と比較して、2 群間に有意な差は認められなかった。12 週齢では、摘出群の TG が対照群と比較して、有意に低かったが、Cre と BUN を含む他の指標は 2 群間に有意な差は認められなかった。24 週齢では、摘出群の HDL-C が対照群と比較して、有意に低かったが、その他の指標で 2 群間に有意な差は認められなかった。収縮期血圧はいずれの週齢でも有意な差は認められず、16 週齢で血圧が有意に高くなる動脈結紮による子宮血流不全 IUGR モデルとは異なる結果が得られた。12 週齢における GSI は摘出群と対照群の間で有意な差は認められず、24 週齢における摘出群の GSI は対照群に比べて有意に高かったが、その値は 1 未満と小さかった。4、8、12 週齢および 24 週齢において、傍糸球体装置に認められるレニン陽性領域および近位尿細管に認められるアンジオテンシノーゲン陽性領域は対照群と摘出群で同程度であった。

これらのことから、5/6 腎臓摘出母体から生まれた新生仔は低体重で出生し、Catch Up Growth を起こさないことがわかった。さらに、重篤な腎臓機能障害は起こっておらず、収縮期血圧の上昇、脂質代謝異常などのメタボリック症候群の発症徴候に乏しいことがわかった。

第2章 哺育仔数の減少による過剰栄養供給時の新生仔の発達

第1章では5/6 腎臓摘出母体から得られた次世代は、低体重で生まれてくるものの、成熟後のメタボリック症候群の発症徴候は乏しかった。この結果は、第1章の IUGR 出生仔が Catch Up Growth を示さなかったためと考えられたため、本章では、第1章で作製した IUGR 出生仔に意図的に Catch Up Growth を引き起こすことにより、メタボリック症候群発症リスクが高まるかどうかを明らかにすることを目的とした。哺育子数を3匹に litter 調整 (L3 群) し、出生仔1匹あたりの授乳量を増やし高栄養負荷とする手法を用い、新生仔期、幼若期および成熟期における腎臓の特徴を調べた。また、成熟後の疾患として高血圧および脂質異常症に焦点を当て、成熟期の血圧および血清生化学的特徴を調べ、IUGR モデル動物としての特徴を評価した。

L3 群は3週齢における体重が摘出群よりも大きく、対照群と同じレベルに達し、幼若期において Catch Up Growth が起こることが確認された。また L3 群では4週齢において収縮期血圧の上昇、腎臓 renin 発現の増加、TG の上昇が認められた。12週齢以降では、L3 群は TG に加えて、T-Cho、HDL-C、LDL-C、および Cre が、対照群および摘出群と比較して有意に増加し、LDL-C/ HDL-C 比は24週齢で有意に増加した。このことから IUGR 出生仔に Catch Up Growth を引き起こすことでメタボリック症候群発症リスクが高くなることが示唆された。

第3章 5/6 腎臓摘出母体から得られた次世代ラットの神経発達への影響

IUGR は学習障害、記憶障害、気分障害などの神経発達障害との関連が指摘されており、本章では、5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR 新生仔における神経発達障害について明らかにすることを目的とした。新生仔の神経発達テストは神経筋協調運動の発達の程度を測定する最も簡便な離乳前テストのひとつである正向反射テスト、および運動機能を評価する神経-筋活動試験であり、運動協調性のほか、平衡感覚、筋力などを複合的に評価する行動発達検査である Negative geotaxis test (背地走性テスト) を実施した。神経発達テストは Catch Up growth が起こる前の生後4~12日齢の新生仔を用いて実施した。どちらのテストでも、出生直後は摘出群のスコアが対照群と比べて有意に低く、5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR 出生仔において、神経発達遅延およびそれに起因する運動協調性、平衡感覚の発達障害が起きていると考えられた。正向反射テストのスコアは、4日齢、5日齢では対照群に比べて摘出群の方が有意に低かったが、6日齢以降、二群間で有意な差はみられなくなった。一方、背地走性テストでは4日齢から12日齢まで、摘出群は対照群より劣った結果を示した。これらの結果から IUGR 出生仔の神経筋協調運動における発達遅延は Catch Up Growth なしに自然に正常動物の神経発達に追いつくが、行動発達検査では改善が観察されず、IUGR で引き起こされる神経発達遅延には、様々な段階が存在すると考えられた。次に、ラットを新奇な環境に置いた時に生じる自発運動を観察し、個体の運動活動性、探索行動および種々の認知行動を反映する行動活性の指標であるオープンフィールドテストを対照群、摘出群および L3 群の4週齢、8週齢、12週齢、および

24 週齢のラットを用いて行った。4 週齢において摘出群の総移動距離は対照群よりも有意に低下したが、立ち上がり数に有意な差は認められず、総移動距離が増加する子宮血流不全による IUGR モデルや立ち上がり回数が有意に減少する母体栄養制限による IUGR モデルとは異なる結果が得られた。L3 群の総移動距離は摘出群に比較して、増加する傾向がみられた。このことから、5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR で見られる行動活性の低下が、Catch Up Growth によって改善される可能性が示唆された。

総括

1. 5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR モデルラットは、低体重で生まれてくるものの、そのままでは Catch Up Growth は認められず、成熟後のメタボリック症候群の発症も引き起こされないことを示した。
2. 5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR モデルラットは、外因的に高栄養状態にすることで Catch Up Growth が引き起こされ、メタボリック症候群の発症傾向が上昇することを示した。
3. 5/6 腎臓摘出母体から得られた IUGR モデルラットは、出生時の神経発達遅延および若年期の行動学的な異常を呈すること、および Catch Up Growth を引き起こすことにより若年期の行動異常が緩和されることを示した。

本研究から、5/6 腎臓摘出により他手法とは異なる性質をもった IUGR モデルが作出されることが明らかになった。IUGR には様々な原因が複雑に関係しているが、母体腎臓 5/6 摘出術によって作製した母体腎不全に起因する新たな IUGR モデルの作出により、腎機能の低下した母親への妊娠期治療や低出生体重児への治療介入のバランス等の解明につながり、胎児・新生児医学に貢献するものと考えられる。

審査結果の要旨

現在、我が国では出生率の低下と低出生体重児割合の増加が問題となっている。低出生体重児（WHO 基準、2500g 未満）となる原因の一つに子宮内発育遅延（Intrauterine growthretardation、IUGR）と呼ばれる胎児の成長が正常より遅れている場合があげられる。IUGR による低出生体重児は成熟後のメタボリック症候群の発症リスクが高いことや脳神経系の発達遅延が生じることが報告されている。また、IUGR による低体重出生児には急速に成長し、正常児の体重に追いつく Catch Up Growth が認められ、Catch Up Growth 達成に伴う成熟後のメタボリック症候群発症リスクのさらなる上昇と脳神経系の発達障害の改善が報告されている。母体低栄養や胎盤機能の低下、喫煙、腎臓機能障害など様々な IUGR の要因が報告されており、食事制限、低タンパク飼料給餌、子宮動脈結紮、母体低酸素環境飼育などによる IUGR モデル動物の開発が幅広く行われている。一方、妊娠前に異常がなくても一定の割合で発症する妊娠高血圧腎症や腎不全の既往歴のある妊婦、あるいはドナーとして片側の腎臓を提供した妊婦では高率に IUGR が発生することがわかっており、母体腎臓機能障害

は IUGR の有力な原因の一つである。しかしながら、母体腎臓機能障害に起因する IUGR モデルは見当たらない。本研究では、5/6 腎臓摘出を施した腎臓機能障害母体から生まれた新生仔ラットの IUGR モデルとしての特性を調べ、以下の成果を得た。

第 1 章では 5/6 腎臓摘出母体から生まれた新生仔（摘出新生仔）と無処置母体から生まれた新生仔（対照新生仔）に関して体重、血圧、血清の腎臓障害マーカー（クレアチニン、BUN）および脂質異常症マーカー（HDL コレステロール、LDL コレステロール、総コレステロール、中性脂肪）を調べた。さらに、腎臓における組織変化を糸球体硬化指数(GSI: glomerular sclerosis index)、レニン陽性細胞およびアンジオテンシノーゲン陽性細胞の局在を指標として調べた。摘出新生仔の出生時体重は対照新生仔に比べて有意に軽く、その状態は 19 週齢まで続いた。摘出、対照両新生仔間で、血圧に有意な差は認められず、比較的早期に血圧上昇が認められる子宮動脈結紮 IUGR モデルとは異なる結果が得られた。血清腎臓障害マーカーおよび脂質異常症マーカー、傍糸球体装置のレニン陽性領域や近位尿細管のアンジオテンシノーゲン陽性領域に著しい変化は認められなかった。これらのことから、母体腎臓機能障害により新生仔は低体重で出生するが、Catch Up Growth を示さないことが示唆された。さらに、収縮期血圧の上昇をはじめとするメタボリック症候群の発症徴候に乏しいことがわかった。

第 2 章では摘出新生仔の哺育子数を 3 匹に litter 調整（L3 新生仔）し、出生仔 1 匹あたりの授乳量を増やし高栄養を負荷する手法を用い、新生仔期、幼若期および成熟期における腎臓の特徴を調べた。さらに、血圧および血清生化学的特徴を調べ、IUGR モデル動物としての特性を評価した。L3 新生仔は 3 週齢における体重が摘出新生仔よりも大きく、対照新生仔と同じレベルに達し、幼若期で Catch Up Growth を達成した。L3 新生仔では 4 週齢において血圧の上昇、腎臓レニン発現の増加、中性脂肪の上昇が認められた。12 週齢以降では中性脂肪に加えて、L3 新生仔の総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、およびクレアチニンは摘出新生仔および対照新生仔と比べて有意に高く、LDL コレステロール/HDL コレステロール比は 24 週齢で有意に高かった。このことから母体腎臓機能障害時の出生仔に Catch Up Growth を引き起こすことでメタボリック症候群の発症リスクが高くなることが示唆された。

第 3 章では、腎臓機能障害母体から得られた IUGR 新生仔における脳神経系の発達障害を明らかにした。生後 4~12 日齢の新生仔を用いた正向反射テストおよび背地走性テストにおいて、出生直後の摘出新生仔のスコアが対照新生仔に比べて有意に低かった。すなわち、腎臓機能障害母体から得られた IUGR では、脳神経系の発達遅延およびそれに起因する運動協調性、平衡感覚の発達障害が起きていると考えられた。次に、L3、摘出、対照新生仔を用いてオープンフィールドテストを行った。4 週齢において摘出新生仔の総移動距離は対照新生仔よりも有意に低下したが、立ち上がり数に有意な差は認められず、総移動距離が増加する子宮血流不全による IUGR モデルや立ち上がり回数が減少する母体栄養制限による IUGR モデルとは異なる結果が得られた。また、L3 新生仔の総移動距離は摘出群に比べて増加する傾向がみられた。このことから、腎臓機能障害母体から得られた IUGR で見られる行動活性の低下は Catch Up Growth によって改善される可能性が示唆された。

以上、腎臓機能障害母体から得られた新生仔ラットは、他の作出方法による IUGR モデル

とは異なる性質を有する IUGR モデルであることが明らかになった。本 IUGR モデルは出生時に脳神経系の発達遅延および若年期の行動学的な異常を呈するが、成長後のメタボリック症候群の発症兆候に乏しいことを示した。さらに、この新たな IUGR モデルに高栄養状態を引き起こすことで Catch Up Growth が発現すること、その場合、成長後のメタボリック症候群の発症傾向は上昇するが、若年期の行動異常は緩和されることを示した。これらの成果は、胎児・新生児医学に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。