

## ラットの母体年齢と仔の脳に及ぼす影響 (その1)

出 海 みどり・遠 藤 京 子

(昭和61年9月30日受理)

### The Influence of Maternal Age on the Infant Rat's Brain

Midori Izumi and Kyoko Endo

(Received September 30, 1986)

#### 緒 言

母体年齢がいくつであるかということは、妊娠の経過や出産の予後を見出す上で軽視することができない条件のひとつである。そして、それは産児にとっても身体的、精神的に少なからぬ影響をもたらす要因であると考えられる。例えば、ヒトの場合、妊産婦死亡や周産期児死亡の割合など、20歳未満の若年者と40歳以上の高齢者に高率であることが知られ、また異常妊娠や妊娠中毒症の発現は妊婦の年齢が高くなるに従って増えてゆくことが報告されている<sup>1)</sup>。さらに、ダウン症候群という染色体異常によって起こる知恵遅れを伴う先天性異常児の出生頻度と母体の年齢との関係はよく知られていることであるが、これも高齢になるほど高くなっている。例えば、母親が20歳では2000出産に1回位の発生頻度が、45歳を過ぎると45出産に1回というような高危険率を示すようになるという<sup>2)</sup>。

そこで今回、ラットの出産をできるだけ自然に可能な限り繰り返し、経産回数の違いにより生仔の脳に現れる影響を二、三の生化学的観点から検索を試みた。

#### 実験方法

##### 1) 実験動物

生後11週令ではじめて交配させ、妊娠後期に至ったドブリュウ系ラット4匹を購入(日本ラットK.K.)して母親ABCDとし、各個別ケージで飼育、出産させた。生まれた仔をそのまま自然に母親に育てさせ、10日目に生存した仔の内、雄のみを試料として母親から分離し、液体窒素で固定して一産目の仔とした。その後、母ラット

は残した雌を離乳するまで(出産後3週間)授乳してから仔を分離し、1週間休養させたあと同系統でほぼ同週令の雄(日本ラットK.K.より購入)と交配させた。3週間余りの妊娠期間の後出産した仔を一産目と同様に雄の仔のみを10日目に分離固定し、二産目の仔とした。

以降、同様に交配を繰り返し、八産目まで試料を得た。しかし、実際にはABCD一斉に交配させても妊娠しない場合があり、二産目からは出産時の母ラットの週令がマチマチとなった。妊娠しなかった場合は雄を交換して再交配させた。

##### 2) 飼育条件

1985年4月11日より妊娠後期のラット4匹(母ラットA~D)を購入し、個別ケージ(45cmW, 25cmD, 24cmH, アルミ製)で飼育を開始した。ケージの中には木製チップを厚さ6~7cmに敷き、それぞれの母ラットが出産に備えて巣を作りやすいようにした。試料は市販の繁殖用固形飼料(日本クレア製CA-1, 粗蛋白質含有量26.7%, 熱量346.4 kcal/100g)を自由摂取させ、水も水道水を充分与えた。飼育室は、温度20~26°C, 湿度50~60%に空調し自然採光としたが、出産前後1週間程は上面、前面を新聞紙などで遮光して母ラットが落ち着くようにした。最終の試料採取まで15か月飼育を続け、八産目までの試料を得た。

##### 3) 試料処理法

それぞれの親が育てた雄の10日令の仔を親から離し、体重測定後直ちに全身を液体窒素中(-190°C)に投入し、組織中心部まで完全に凍結(約30秒)させてから取り出し、硬質ビニール袋で密封して-75°Cのフリーザー(K.K.荏原製作所製)に保存し、順次分析に供した。

栄養学第5研究室

#### 4) 組織の処理法

①凍結状態のままのラットの頭部を切り離し、頭皮、頭蓋骨、脳膜をはがして脳組織を大脳、小脳別にガラス製のホモジナイザーカップに取り出す。各脳湿重量測定後、氷冷0.4N-HClO<sub>4</sub>にて酸可溶性分画を取り、中和後クエン酸リチウム緩衝液 (pH2.20) でpHをコントロールして遊離アミノ酸 (以降FAAと略す) 分析試料とした。

②酸可溶性分画抽出後の沈渣から脂質を除去し、0.3N-KOHを用いて37°C、17時間で分解してリボ核酸 (以降RNAと略す) を抽出分離、さらに4%-HClO<sub>4</sub>を用いて90°C、15分間加熱分解してデオキシリボ核酸 (以降DNAと略す) を抽出分離した。

#### 5) 試料の分析法

①酸可溶性分画は、脳内遊離アミノ酸試料として一定量を取り、高速液体クロマトグラフ (日本分光製 TWINCLE アミノ酸分析システム) を用いて各アミノ酸を定量した。尚、インテグレーターにはクロマトコーダー11 (SIC社製) を使用した。

②核酸の定量は、RNAをS-T-S法、DNAをBurtonの変法で行った。

### 結果及び考察

ラットの交配繁殖可能な期間は、雌の場合、生後8~10週令 (約2か月前後) から60~70週令 (約15~18か月) くらいまで<sup>2)</sup>ということで、今回の交配繁殖は所定の目標に達したと言える。ただし、表1に示したように個体差が大きく、A群の母ラットは4産目41週令以降は仔が得られなかったし、D群は5産目48週令、B群は6産目56週令、C群は8産目72週令までというような結果であった。これは、必ずしも各母ラットの閉経かどうかは不明である。産仔数の平均は、4産目までは回を追う毎に多くなってゆき、それ以降は少なくなっている。

試料とした仔ラット (雄) の脳組織の固定の時期を生後10日目とした理由は、ラットの場合、脳の発育が生後10日前後までは認められるからで、それは第I期…神経細胞が分裂増殖する時期、第II期…樹状突起や軸索が伸展発育する時期、第III期…軸索に髄鞘が形成される時期、第IV期…その後の脳全体の発達の時局という4つの段階に区分されている中で、ちょうど第II期に相当するのである。10日令の群別平均の値を見てみると、体重は表2に示したように、1~3産目までは各群に差は見られないが、産仔数の多い群は1匹当たりの体重が少なくなる。

従って、産仔数の最も多くなった4産目のものがどの群も最低となっている。脳重量についてはまだ4産目までしか分析が進んでいないが、大脳、小脳共に4産目が1~3産目に比べてどの群も少なくなっている。体重が少ないものは、脳重量も少ない傾向にある。一方、脳内物質については、核酸の分析も1~4産目までであるが、RNA、DNAの含有量の平均は、表4、表5に示したように1産目と4産目の間には差が見られなかった。また、脳内遊離アミノ酸についても、1産目と4産目の比較の段階では表6に示したように、両者の間に差は見出せなかった。しかし、4産目のものは脳重量が少ない割に、各アミノ酸の濃度が高くなっている。少し細かく見ると、大脳ではL-スレオニン、L-グルタミン酸、L-メチオニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の含有量は1産目の方が多いためであるが、タウリン、L-グルタミンは4産目が多くなっている。小脳ではL-グルタミン酸、グリシン、GABAが1産目の方で多く、そのほかのほとんどのアミノ酸は4産目の方が多くなっている。4産目の仔は、体重、脳重量ともに1産目より少ない傾向にあるとはいえ、脳内物質 (核酸量、遊離アミノ酸量) においては差がないようである。4産目出産時の母ラットは41週令 (約8か月) であり、ラットの一般的な閉経は15~18か月ということから考えると、まだ高年齢出産とはいえないと思われる。精細な比較検討は、8産目までの試料の分析が終了してからの次報にゆずることとする。

### 要 約

①初産のドンリュウ系ラット (14週令) 4匹を購入し、母ラットABCDとした。直ちに生まれた仔を1産目として10日間哺育し、仔の内、雄だけを分離して脳組織を固定し試料とした。各母ラットは、残った雌を離乳まで哺育し、仔を分離し、1週間の休養の後、同系統、ほぼ同週令の雄と交配して2産目の仔を得、同様にして交配を繰り返し8産目までの試料を得た。

②出産は母ラットによつての個体差が生じ、Aは4産目 (41週令)、Bは6産目 (56週令)、Cは8産目 (72週令)、Dは5産目 (48週令) というような結果となった。

③試料として得た各回、各群の10日令の雄ラットは合計131匹に達し、順次生化学分析を行っている。体重、脳重量については、1~3産目には各群間に差はないが、4産目は各群とも産仔数が最も多く、1匹当たりの体重、脳重量は小さくなっている。しかし、脳内物質 (核酸量、

ラットの母体年齢と仔の脳に及ぼす影響 (その1)

表1 経産回数(1~8産目)別産仔数

単位(匹)

出産回数 群	1 (14W)	2 (A, B, D21W, C26W)	3 (B, D29W, A, C33W)	4 (B, D37W, A, C41W)	5 (48W)	6 (56W)	7 (64W)	8 (72W)	計
	A	全 6	10	14	19 (死亡4 性別不明)				
	♂ 4	6	7	8					25
B	全 15	10	9	17	7	3 (死亡1 性別不明)			61
	♂ 9	3	4	10	4	1			31
C	全 14	15	18	14	10	10	8	8	97
	♂ 9	7	8	9	6	5	6	4	54
D	全 4	11	15	14	9				53
	♂ 1	3	5	7	5				21
計	全 39	46	56	64	26	13	8	8	260
	♂ 23	19	24	34	15	6	6	4	131

( )内は親週令

表2 経産回数(1~8産目)別試料仔ネズミの群平均体重(10Days ♂)

単位(g)

出産回数 群	1	2	3	4	5	6	7	8	平均 (SD)
A (SD) 個数	25.38 (±0.25) N=4	19.00 (±2.14) N=6	18.29 (±1.75) N=7	14.19 (±4.23) N=8					19.22 (±4.62) N=25
B (SD) 個数	18.50 (±0.94) N=9	24.67 (±1.04) N=3	34.00 (±0.00) N=4	13.85 (±2.95) N=10	24.25 (±0.65) N=4	17.00 N=1			22.05 (±7.21) N=31
C (SD) 個数	19.76 (±1.01) N=9	20.00 (±1.87) N=7	16.94 (±0.90) N=8	21.83 (±1.06) N=9	25.50 (±0.63) N=6	23.30 (±0.84) N=5	17.80 (±1.20) N=6	25.25 (±4.79) N=4	21.30 (±3.23) N=54
D (SD) 個数	25.50 N=1	26.33 (±0.76) N=3	19.60 (±2.41) N=5	18.57 (±1.37) N=7	27.50 (±0.79) N=5			25.25	23.50 (±4.11) N=21
平均 (SD) 合計個数	22.29 (±3.68) N=23	22.50 (±3.55) N=19	22.21 (±7.94) N=24	17.11 (±3.81) N=34	25.75 (±1.64) N=15	20.15 (±4.45) N=6	17.80 N=6	25.25 N=4	N=131

表3 経産回数(1~4産目)別試料仔ネズミの群平均脳湿重量(10Days ♂)

単位(g)

出産回数 群	1		2		3		4	
	大脳	小脳	大脳	小脳	大脳	小脳	大脳	小脳
A (SD)	0.8150 (±0.1257)	0.1765 (±0.0936)	0.7453 (±0.0344)	0.2095 (±0.0232)	0.6651 (±0.0301)	0.1218 (±0.0198)	0.5173 (±0.0951)	0.1657 (±0.0508)
B (SD)	0.6963 (±0.0468)	0.2394 (±0.0288)	0.8108 (±0.0295)	0.1726 (±0.0665)	0.8983 (±0.0119)	0.1866 (±0.0201)	0.5181 (±0.0535)	0.1618 (±0.0513)
C (SD)	0.6631 (±0.0523)	0.1596 (±0.0263)	0.6524 (±0.0245)	0.1512 (±0.0170)	0.6995 (±0.0475)	0.1747 (±0.0371)	0.7230 (±0.0215)	0.2064 (±0.0212)
D (SD)	0.7844	0.2196	0.7374 (±0.0829)	0.2117 (±0.0517)	0.7782 (±0.0214)	0.1694 (±0.0259)	0.6662 (±0.0275)	0.1806 (±0.0230)
平均 (SD)	0.7397 (±0.0717)	0.1988 (±0.0370)	0.7365 (±0.0650)	0.1863 (±0.0295)	0.7593 (±0.1043)	0.1631 (±0.0285)	0.6062 (±0.1047)	0.1786 (±0.0202)

表4 経産回数(1~4産目)別試料仔ネズミの群平均脳内RNA量(10Days ♂) 単位(μg)

群	出産回数 大小脳別	1		2		3		4	
		大脳	小脳	大脳	小脳	大脳	小脳	大脳	小脳
A		2355.2	619.1	2953.7	776.8	2605.1	498.3	1914.2	567.7
(SD)		(±814.8)	(±247.1)	(±292.8)	(±103.1)	(±80.9)	(±95.2)	(±424.1)	(±174.2)
B		2511.1	1006.4	3051.2	641.7	3668.1	871.5	1870.4	547.0
(SD)		(±190.6)	(±143.4)	(±92.7)	(±193.6)	(±296.4)	(±137.9)	(±310.1)	(±168.9)
C		2291.6	627.3	2557.8	610.9	2310.1	576.8	2380.0	728.1
(SD)		(±217.0)	(±96.2)	(±143.7)	(±60.5)	(±193.3)	(±130.6)	(±288.1)	(±146.2)
D		2725.2	893.0	3063.6	890.4	2438.5	579.2	2445.3	697.7
(SD)				(±352.9)	(±205.1)	(±268.5)	(±92.6)	(±189.2)	(±102.3)
平均		2470.8	786.5	2906.6	730.0	2755.5	631.5	2152.5	642.6
(SD)		(±193.1)	(±194.1)	(±237.7)	(±129.0)	(±620.3)	(±164.4)	(±302.1)	(±84.7)

表5 経産回数(1~4産目)別試料仔ネズミの群平均脳内DNA量(10Days ♂) 単位(μg)

群	出産回数 大小脳別	1		2		3		4	
		大	小	大	小	大	小	大	小
A		755.0	549.4	253.8	504.5	475.3	370.5	490.2	379.3
(SD)		(±184.6)	(±253.7)	(±209.4)	(±70.3)	(±119.1)	(±35.2)	(±91.2)	(±85.0)
B		489.8	509.6	533.3	519.2	623.8	659.3	498.9	338.0
(SD)		(±37.9)	(±129.6)	(±22.5)	(±29.5)	(±13.9)	(±70.1)	(±78.7)	(±132.8)
C		463.8	424.7	469.5	370.3	580.2	502.8	546.8	587.0
(SD)		(±98.1)	(±140.2)	(±68.3)	(±53.3)	(±71.1)	(±84.8)	(±74.6)	(±83.8)
D		555.0	345.8	157.1	537.9	592.8	531.3	575.4	596.2
(SD)				(±39.5)	(±64.2)	(±88.7)	(±83.9)	(±89.3)	(±49.9)
平均		565.9	457.4	353.4	483.0	568.0	516.0	527.8	475.1
(SD)		(±131.8)	(±90.8)	(±177.3)	(±76.4)	(±64.5)	(±118.5)	(±40.3)	(±135.6)

表6 脳内遊離アミノ酸量1産目と4産目の比較(10Days ♂) 単位:  $\mu\text{mol}$

遊離アミノ酸	出産回数 大・小脳別	1		4	
		大脳 (SD)	小脳 (SD)	大脳 (SD)	小脳 (SD)
O-Phosphoserine		0.838 (0.011)	0.022 (0.003)	0.066 (0.012)	0.020 (0.002)
Taurine		8.999 (0.278)	1.930 (0.263)	9.066 (1.209)	2.205 (0.312)
O-Phosphoethanolamine		3.731 (0.311)	0.872 (0.110)	3.689 (0.505)	0.935 (0.126)
L-Aspartic Acid		1.247 (0.184)	0.277 (0.058)		
Hydroxy-L-proline					
L-Threonine		0.548 (0.025)	0.186 (0.034)	0.437 (0.075)	0.210 (0.033)
L-Serine		0.684 (0.070)	0.235 (0.034)	0.543 (0.134)	0.152 (0.053)
L-Asparagine		0.203 (0.028)	0.069 (0.012)	3.888 (0.955)	
L-Glutamic Acid		4.284 (0.442)	1.048 (0.204)	3.388 (1.764)	0.935 (0.250)
L-Glutamin		2.053 (0.316)	0.629 (0.114)	2.403 (0.560)	0.808 (0.095)
Sarcosine					
L-a-Amino adipic Acid					
L-Proline		0.219 (0.113)		0.178 (0.036)	
Glycine		0.745 (0.038)	0.332 (0.064)	0.767 (0.061)	0.256 (0.015)
L-Alanine		0.579 (0.070)	0.197 (0.032)	0.584 (0.070)	0.166 (0.059)
L-Citrulline		0.113 (0.020)	0.047 (0.008)	0.177 (0.083)	
DL-a-Amino-n-butyric Acid				0.069 (0.023)	0.049 (0.029)
L-Valine		0.146 (0.031)	0.048 (0.008)	0.089 (0.026)	0.038 (0.009)
L-Cystine					
L-Methionine		0.120 (0.041)	0.037 (0.013)	0.035 (0.020)	
L-Cystathionine		0.124 (0.003)	0.129 (0.029)	0.222 (0.022)	0.142 (0.069)
L-Isoleucine		0.108 (0.003)	0.045 (0.010)	0.123 (0.021)	0.081 (0.013)
L-Leucine		0.194 (0.067)	0.076 (0.015)	0.220 (0.037)	0.125 (0.040)
L-Tyrosine		0.228 (0.024)	0.075 (0.013)	0.195 (0.051)	0.062 (0.034)
L-Phenylalanine		0.095 (0.020)	0.308 (0.002)	0.088 (0.024)	0.031 (0.008)
$\beta$ -Alanine				0.031 (0.007)	
L- $\beta$ -Amino-iso-butyric Acid					
$\gamma$ -Aminobutyric Acid		1.113 (0.144)	0.367 (0.030)	0.896 (0.262)	0.316 (0.071)
Ethanolamine		0.217 (0.033)	0.920 (0.025)	0.172 (0.073)	0.072 (0.022)
Ammonium Chloride					
DL-plus allo- $\sigma$ -Hydroxylysine		0.652 (0.068)	0.364 (0.073)	0.796 (0.298)	0.507 (0.158)
L-Ornithine		0.057 (0.010)	0.025 (0.008)	0.067 (0.005)	0.042 (0.030)
L-Lysine		0.226 (0.049)	0.082 (0.010)	0.183 (0.052)	0.063 (0.021)
L-I-Methylhistidine					
L-Histidine		0.146 (0.014)	0.039 (0.011)	0.124 (0.040)	0.038 (0.014)
L-3-Methylhistidine					
L-Anserine		0.046 (0.008)			0.048 (0.021)
L-Carnosine					
L-Arginine		0.162 (0.033)	0.053 (0.008)	0.060 (0.042)	0.035 (0.025)

FAA量)には影響を与えていないようである。まだ8産目までの分析を終えていないので、精細な比較検討は次報にゆずることとする。

謝 辞

終わりに、本研究は昭和61年3月本学栄養学科栄養学専攻理科コース卒業の小堀悦子さん、高橋ルミ子さんに御協力いただきました。ここに記して心より感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 椎名美博他：日産婦誌, 31, 82 (1979)
- 2) Kram, D. & Schneider, E.L. : Aging 4, 237 (1978)
- 3) 山川民夫編：医化学実験法講座 I 卷生体構成成分 I, 中山書店(東京) 1971 pp. 55~58
- 4) 細谷憲政他：小動物を用いる栄養実験, 第一出版(東京) 1980 pp. 6~7
- 5) 塚田裕之他：脳の生化学, 朝倉書店(東京) 1969 pp. 77~78