

妊娠期の母ラットの潜在的亜鉛欠乏が 育児放棄・食塩嗜好に及ぼす影響と作用機構の解析

後藤 知子, 白川 仁, 駒井 三千夫

東北大学大学院農学研究科

概要 必須微量元素の1つである亜鉛は、胎児の発育にも必須であり、妊娠期には亜鉛摂取量を増やすことが推奨されている。しかしながら、我が国では近年、食習慣の乱れや食生活の偏りなどにより潜在的な亜鉛欠乏が増えているといわれている。特に若年女性において「やせ」割合が増加していると報告されており、妊娠期の潜在的な亜鉛欠乏は多いと考えられる。これまでも母体の亜鉛欠乏で、不妊、遷延分娩、低出生体重児の出産、胎児死亡などが報告されてきたが、育児行動に及ぼす影響については明らかでない。また、うつ病患者で血清亜鉛濃度が低下していることも報告されており、妊娠期・授乳期の潜在的な亜鉛欠乏に起因して産後うつを発症する可能性も考えられる。加えて、妊娠期には妊娠高血圧症候群が危惧され、過剰な食塩摂取に注意が必要であるが、我々はこれまでのラットを用いた検討により、潜在的な亜鉛欠乏が食塩嗜好に変化を及ぼすことを確かめている。このように、妊娠期・授乳期の潜在的な亜鉛欠乏の影響は多岐に渡る可能性がある。そこで本研究では妊娠期の母ラットをモデルとして、潜在的な亜鉛欠乏が分娩状況や育児行動、および食塩嗜好に及ぼす影響を検討した。SD系雌ラット(妊娠1日齢)に、妊娠期を通して亜鉛添加食(亜鉛含量33.7 mg/kg diet)または低亜鉛食(亜鉛含量8.0 mg/kg diet)を自由摂食させた Zn-Suf 群、Low-Zn 群を設け、妊娠期の体重、妊娠期間、出生仔ラット数、死産率、育児行動を追跡した。その結果、妊娠期の体重増加量、妊娠期間、死産率は、Zn-Suf 群と Low-Zn 群で同程度であった。しかし、Low-Zn 群では、出生仔ラット数が著しく少ない個体、育児放棄様行動(授乳を行わない、接触の欠如など)が観察された個体が認められた。次に、妊娠期ラットの亜鉛欠乏が食塩嗜好に及ぼす影響を追跡した。SD系雌ラット(妊娠1日齢)に亜鉛欠乏食(亜鉛含量2.1 mg/kg diet)を自由摂食させた Zn-Def 群の食塩嗜好率は、飼育3日目から食塩嗜好率が上昇し、飼育8日目から13日目まで、Zn-Suf 群に比べて有意な高値を示した。今後は、食塩嗜好上昇に関わるホルモン分泌や因子の変化など、更に詳細な検討が必要であると考えている。

1. 研究目的

亜鉛は、必須微量元素の1つであり、欠乏すると、食欲不振、成長遅延、皮膚炎、生殖機能の低下、免疫能低下、味覚障害などが起こることが知られている。また、亜鉛は、胎児の発育にも必須であり、妊娠期には亜鉛摂取量を増やすことが推奨されている⁽¹⁾。しかし、我が国では近年、飽食の時代であるにもかかわらず、朝食の欠食など食習慣の乱れや食生活の偏りなどにより、潜在的な亜鉛欠乏が増えているといわれている。特に若年女性においては、肥満者(BMI \geq 25)の割合が低く、やせの者(BMI $<$ 18.5)の割合が高いと報告されている⁽²⁾。平成25年国民健康・栄

養調査結果(厚生労働省)では、やせの者の割合は若年女性で高く、20歳代で21.5%、30歳代で17.6%であった⁽²⁾。若年女性では、やせ願望による過度の食事制限が問題となっているだけでなく、神経性食欲不振症などの摂食障害も増えているといわれている。さらに、亜鉛必要量が増加する妊娠期は、悪阻などによる食欲不振を呈することも多く、妊娠期の潜在的な亜鉛欠乏は多いと考えられる。実験動物やヒトの研究では、母体の亜鉛欠乏で、不妊、高血圧、遷延分娩、子宮内成長障害、低出生体重児の出産、胚段階や胎児での死亡をもたらすことが報告された^(3, 4)。さらに、うつ病患者で血清亜鉛濃度が低下していることが

報告されている⁽⁵⁾ことから、妊娠期・授乳期の潜在的亜鉛欠乏に起因して産後うつを発症する可能性も考えられる。しかし、妊娠期の母ラットの潜在的亜鉛欠乏が育児行動に及ぼす影響については明らかでない。そこで本研究では、妊娠期の母ラットの潜在的亜鉛欠乏が、分娩状況や育児行動に及ぼす影響を観察することを目的とした。また、離乳後の成長期ラットを用いた当研究室の検討で、亜鉛欠乏食給餌 3~4 日目に速やかに食塩嗜好が上昇することを観察し⁽⁶⁾、亜鉛欠乏によりオキシトシン分泌が低下する可能性を示唆した。オキシトシンは子宮収縮・乳汁射出作用を有することが知られるが、食塩嗜好低下・尿中ナトリウム排泄量増加作用のほか⁽⁷⁾、母性の発現に重要であることも知られている⁽⁸⁾。したがって、妊娠期の母ラットの潜在的亜鉛欠乏で、オキシトシン分泌が低下し、食塩嗜好が変化する可能性も考えられる。妊娠期の過剰な食塩摂取は妊娠高血圧症を悪化させる要因となり、母体の健康への影響が懸念される。そこで本研究では、妊娠期の母ラットをモデルとして、潜在的亜鉛欠乏が、分娩状況や育児行動および食塩嗜好に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

2. 1 妊娠期の潜在的亜鉛欠乏が育児行動に及ぼす影響

2. 1. 1 実験動物

動物実験は「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき承認を受けて行った。Sprague-Dawley (SD) 系雌ラット、妊娠 1 日齢 (Slc: SD/SPF; 日本エスエルシー株式会社) を購入した。ポリカーボネイトケージに実験動物用床敷の滅菌済ペパークリーン(日本エスエルシー株式会社)を敷き、異なる亜鉛含量となるよう調製した実験食と精製水を自由摂取させた。室温 23±3℃、湿度 50±10%、午前 8:00~午後 20:00 を明期とする 12 時間明暗サイクルに設定された動物実験飼育室で飼育した。摂食量は毎日、体重は毎週測定した。出生後 7 日目に、母ラット 1 腹あたりの仔ラット数を 6~7 匹に統一した。

2. 1. 2 実験食および実験群

タンパク質源は、亜鉛含量の少ない乾燥卵白を用いた。卵白には、ビオチンと強く結合し吸収阻害をもたらすアビジンが多く含まれるため、ビオチンを添加した。実験群は、

低亜鉛食 (Low-Zn) 群と亜鉛添加食 (Zn-Suf) 群の 2 群とした。妊娠期の実験食中亜鉛含量は、Low-Zn 群で 8.0 mg/kg diet (低亜鉛食)、Zn-Suf 群で 33.7 mg/kg diet (亜鉛添加食) とした。出産後の母ラットには、すべて亜鉛添加食 (33.7 mg/kg diet) を給餌した。

2. 1. 3 育児行動の追跡

妊娠期間、妊娠期の体重増加量、死産率、出生仔ラット数、育児放棄様行動の有無、死産の有無、出生 3 日以内の仔ラット死亡数を記録した。

2. 2 妊娠期の潜在的亜鉛欠乏が食塩嗜好に及ぼす影響

動物実験は「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき承認を受けて行った。SD 系雌ラット、妊娠 1 日齢 (日本エスエルシー株式会社) を購入し、亜鉛含量が異なる実験食と精製水を自由摂取させた。飼育環境は前述と同様とした。

実験群は、亜鉛欠乏食 (Zn-Def) 群と亜鉛添加食 (Zn-Suf) 群の 2 群とした。Zn-Def 群の実験食中亜鉛含量は、妊娠 1 日齢から 13 日齢まで 2.1 mg/kg diet、妊娠 14 日齢から 22 日齢まで 8.0 mg/kg diet とした。Zn-Suf 群の実験食中亜鉛含量は、妊娠 1 日齢から 22 日齢まで 33.7 mg/kg diet とした。食塩嗜好の経日変化は、二瓶選択嗜好実験により追跡した。AN (Aseptic Nursing) パック (ディスプレイザブルタイプ無菌給水容器) (ムサシ株式会社) および SE 給水ノズル (米国 SE 社) により、食塩水 (0.15M 塩化ナトリウム水溶液) と精製水を呈示し選択摂取させた。食塩嗜好率は、総溶液摂取量に対する食塩水摂取量の割合 (%) で評価した。

2. 3 授乳期の潜在的亜鉛欠乏が育児行動に及ぼす影響

2. 3. 1 実験動物

動物実験は「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき承認を受けて行った。SD 系雌ラット、妊娠 16 日齢 (Slc: SD/SPF; 日本エスエルシー株式会社) を購入し、出産まで市販固型飼料 (MB-3) にて飼育した。摂食量は毎日、体重は毎週測定した。飼育環境は前述と同様とした。

2. 3. 2 実験食および実験群

出産後の授乳期 (0~3 週齢) に、異なる亜鉛含量の実験食 (低亜鉛食: 4.1 mg/kg diet、亜鉛添加食: 33.7 mg/kg

diet)を自由摂食させた。実験群は、低亜鉛食(Low-Zn)群と亜鉛添加食(Zn-Suf)群の2群とした。

2. 3. 3 育児行動の追跡

育児放棄様行動の有無を記録した。

3. 研究結果

3. 1 妊娠期の潜在的亜鉛欠乏が育児行動に及ぼす影響

3. 1. 1 妊娠期の摂食量・体重

摂食量は、妊娠1日齢から妊娠20日齢まで、Zn-Suf群とLow-Zn群で同程度であった。しかし、Low-Zn群の摂食量は妊娠21日齢頃から低下し、妊娠22日齢でZn-Suf群に比べて有意に低値を示した(data not shown)。妊娠期の体重は、Zn-Suf群とLow-Zn群で同程度であった(Fig. 1)。

3. 1. 2 育児行動の追跡

妊娠期間、妊娠期の体重増加量は、Zn-Suf群とLow-Zn群で同程度であった。死産率は両群ともに0%であった。仔ラットの出生数は、Low-Zn群で少ない傾向を示し、著しく少ない個体も認められた。Zn-Suf群では、出産後に仔ラットを集め、腹の下に収めて授乳する行動をとった。しかし、Low-Zn群では、仔ラットを腹の下に収めず授乳しない等の育児放棄様行動を認める個体が観察された。また、出生3日以内に仔ラットの死亡が認められた個体や、食仔行動を認めた個体も観察された。

3. 2 妊娠期の潜在的亜鉛欠乏が食塩嗜好に及ぼす影響⁽⁹⁾

妊娠1日齢から13日齢のZn-Def群に亜鉛欠乏食(亜鉛含量2.1 mg/kg diet)を給餌した結果、亜鉛欠乏食飼育4日目で、Zn-Suf群に比べて摂食量が有意に低下した。しかし、亜鉛欠乏食飼育7日目の体重はZn-Suf群と同程度であった。妊娠14日齢から22日齢のZn-Def群に、低亜鉛食(亜鉛含量8.0 mg/kg diet)を給餌した結果、摂食量および体重はZn-Suf群と同程度であった。食塩嗜好率は、Zn-Def群で、亜鉛欠乏食飼育3日目から上昇し、亜鉛欠乏食飼育8日目から13日目まで、Zn-Suf群に比べて有意な高値を示した(data not shown)。妊娠14日齢に低亜鉛食(亜鉛含量8.0 mg/kg diet)に切り替えると、食塩嗜好率は速やかに低下し、Zn-Suf群と同程度となった。

3. 3 授乳期の潜在的亜鉛欠乏が育児行動に及ぼす影響

3. 3. 1 摂食量

Low-Zn群はZn-Suf群に比べて、低亜鉛食(亜鉛含量4.1 mg/kg diet)飼育5日目から摂食量が有意な低値を示し、以降4~5日の摂食量増減サイクルが認められた(Fig. 2)。

3. 3. 2 体重

Low-Zn群の体重はZn-Suf群に比べて、出産後1週目より低下しはじめ、2週目、3週目で有意な低値を示した(Fig. 3)。

3. 3. 3 育児行動

育児行動は両群で同様であり、育児放棄様行動は認められなかった。

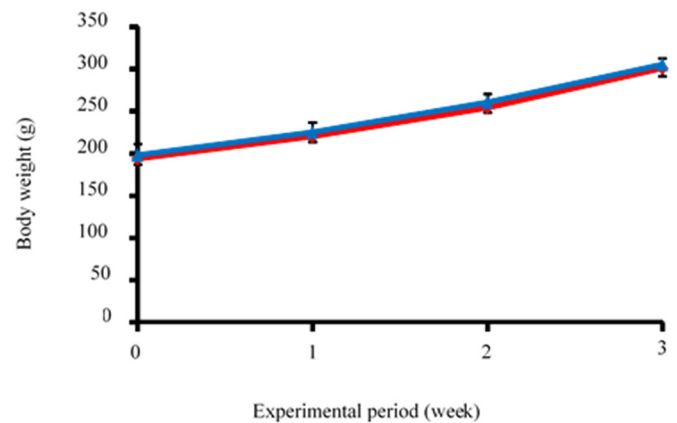


Fig. 1. Body weight changes in pregnant rats. n=4, Mean ± SE

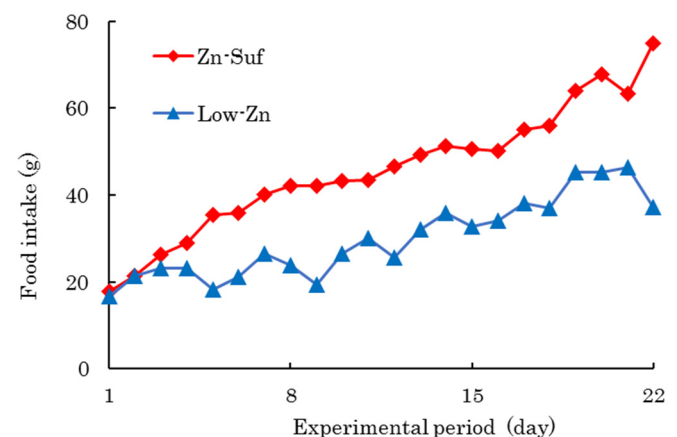


Fig. 2. Food intake changes in lactation rats. n=6~8, Mean ± SE

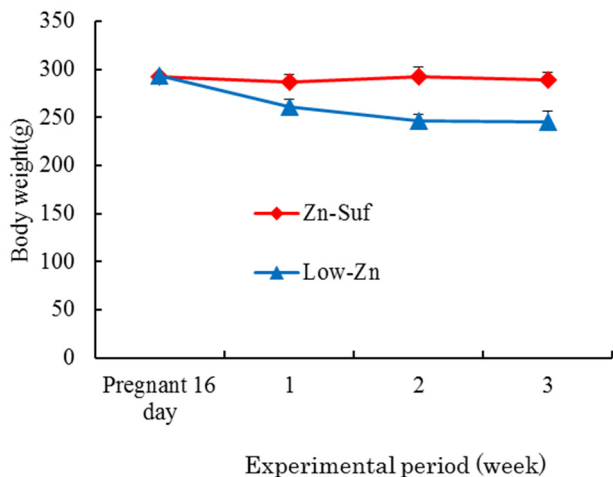


Fig. 3. Body weight changes in lactation rats. n=6~8, Mean±SE

4. 考 察

妊娠期の母ラットに、低亜鉛食(亜鉛含量 8.0 mg/kg diet) または亜鉛添加食(亜鉛含量 33.7 mg/kg diet)を給餌した結果、妊娠 1 日齢から 20 日齢までの摂食量は同程度であった。しかし、Low-Zn 群の摂食量は、妊娠 21 日齢頃から低下しはじめ、妊娠 22 日齢で Zn-Suf 群に比べて有意に低値を示した。したがって、妊娠期の潜在的亜鉛欠乏では、出産直前で摂食量が低下すると考えられた。授乳期の母ラットに低亜鉛食(亜鉛含量 4.1 mg/kg diet)または亜鉛添加食(亜鉛含量 33.7 mg/kg diet)を給餌した結果、Low-Zn 群の摂食量は、実験食飼育 5 日目から Zn-Suf 群に比べて有意な低値を示し、以降 4~5 日周期の cyclic pattern(摂食量の減少と増加)を継続して示した。当研究室ではこれまで、成長期ラット(SD 系雄ラット 4 週齢)に亜鉛欠乏食(亜鉛含量 2.2 mg/kg diet)あるいは低亜鉛食(亜鉛含量 4.1 mg/kg diet)を給餌すると、飼育 3~4 日目より速やかに摂食量が減少し、その後、3~4 日周期の特徴的な cyclic pattern(摂食量の減少と増加)を継続して示すことを観察してきた。したがって、授乳期ラットの潜在的亜鉛欠乏は、成長期ラットの潜在的亜鉛欠乏で認められる摂食量減少や cyclic pattern と類似した現象が認められると考えられた。妊娠期ラットへの低亜鉛食(亜鉛含量 8.0 mg/kg diet)給餌による潜在的亜鉛欠乏では、摂食量の減少が産前まで認められず、産前まで亜鉛欠乏症状が顕れにくいと考えられた。しかし、妊娠中に潜在的亜鉛欠乏であった母ラットには、産後、育児放棄様行動を示した個体や、

出生数が著しく少ない個体が観察された。したがって、妊娠期ラットでは、摂食量減少が認められない程度の潜在的亜鉛欠乏でも、産後の育児行動に影響が及ぶ可能性が考えられた。なお、本検討に先立ち、妊娠期の母ラットに亜鉛含量 4.1 mg/kg diet の低亜鉛食を給餌して検討したが、すべて死産となった。本検討で用いた低亜鉛食(亜鉛含量 8.0 mg/kg diet)は、妊娠期間、死産率に影響を及ぼさなかったことから、潜在的な亜鉛欠乏状態における検討であったと考えている。

妊娠期ラットの食塩(0.15M 塩化ナトリウム水溶液)嗜好率は、亜鉛欠乏食(亜鉛含量 2.1 mg/kg diet)飼育 3 日目から上昇し、亜鉛欠乏食飼育 8 日目から 13 日目まで高値を維持した。この現象は、成長期ラットや授乳期ラットの潜在的亜鉛欠乏で観察された食塩嗜好上昇と類似しており、妊娠期ラットへの亜鉛欠乏食給餌で食塩嗜好は上昇すると考えられた。ただし、亜鉛含量 2.1 mg/kg diet の亜鉛欠乏食は、妊娠期でも摂食量低下や cyclic pattern を呈するほど、重篤な亜鉛欠乏状態を作出する実験食である。妊娠 14 日齢に低亜鉛食(亜鉛含量 8.0 mg/kg diet)に切り替えると、食塩嗜好率は速やかに低下し、産前直前の食塩嗜好率は Zn-Suf 群と同程度となった。妊娠期ラットの食塩嗜好率は、亜鉛欠乏食(亜鉛含量 2.1 mg/kg diet)給餌で上昇したが、低亜鉛食(亜鉛含量 8.0 mg/kg diet)給餌で上昇しなかったことから、妊娠期の亜鉛要求性や欠乏に対する耐性は、成長期や授乳期と異なる可能性も考えられた。今後、子宮収縮作用や乳汁射出作用を有するオキシトシンの分泌など、食塩嗜好に影響を及ぼす因子との関連についても検討する必要があると考えられる。

5. 今後の課題

Low-Zn 群では、産数が著しく少ない個体、育児放棄様行動が観察された個体、出生 3 日以内に仔ラットが死亡した個体などが認められたが、現象は様々であった。本検討で用いた低亜鉛食の亜鉛含量(8.0 mg/kg diet)は、妊娠期の母ラットにとって、亜鉛欠乏の感受性に大きな個体差を生じる含量であった可能性も考えられた。妊娠期間や出生数には影響を及ぼさなかったことから、妊娠期の母ラットにおいて、潜在的亜鉛欠乏食給餌であったと考えられるが、今後はさらに詳細な検討が必要であると考えている。また、妊娠期には妊娠高血圧症候群も危惧され、食

塩嗜好上昇は注意が必要である。今後は、食塩嗜好上昇に関わるホルモン分泌の変化など、更に詳細に検討が必要であると考えている。

6. 文献

- 1) 厚生労働省 (2014) 日本人の食事摂取基準 (2015 年版). 東京.
- 2) 厚生労働省 (2014) 平成 25 年国民健康・栄養調査報告. 東京.
- 3) King JC (2000) Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 71, 1334S-1343S
- 4) Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Merialdi M (1998) Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am J Clin Nutr* 68, 499S-508S.
- 5) Maes M, D'Haese PC, Scharpé S, D'Hondt P, Cosyns P, De Broe ME (1994) Hypozincemia in depression. *J Affect Disord* 31, 135-140.
- 6) Goto T, Komai M, Suzuki H, Furukawa Y (2001) Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J Nutr* 131, 305-310.
- 7) Bernal A, Mahía J, Mediavilla C, Puerto A (2015) Opposite effects of oxytocin on water intake induced by hypertonic NaCl or polyethylene glycol administration. *Physiol Behav* 141, 135-142.
- 8) Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao MV3, Froemke RC (2015) Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* 520, 499-504.
- 9) 後藤知子、西村沙奈恵、中川美希、白川仁、駒井三千夫(投稿中) 妊娠期ラットの亜鉛欠乏が食塩嗜好に及ぼす影響: 日本味と匂学会誌 22(3)

Effects and Potential Mechanisms of Marginal Zinc Deficiency on Brooding Behavior and Salt Preference in Pregnant Rats

Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Summary

Zinc is known to be necessary for growth of the fetus. Therefore, adequate intake of zinc during pregnancy is recommended. The number of cases of potential zinc deficiency is increasing in Japan, because of unbalanced diet and disordered dietary habits. In addition, it has been reported that the number of underweight young women is particularly increasing in Japan. Therefore, one can reasonably speculate that the cases of marginal zinc deficiency of pregnant women may be increasing in Japan. It has been reported that zinc deficiency is related to infertility, prolonged labor, underweight infants and fetal death. Moreover, postnatal depression and nursing behavior of the mother may also be affected by zinc, as there have been several reports indicating the relation between depression and the amount of intake of zinc. In this study, we tested the effects of feeding low-zinc diet in pregnant rats on the state of delivery and brooding behavior. One-day pregnant SD female rats were divided into two groups: zinc-sufficient (Zn-Suf) or low-zinc (Low-Zn). Zn-Suf and Low-Zn groups were fed on zinc-sufficient diet (zinc 33.7mg/kg diet) and low-zinc diet (8.0 mg/kg) during pregnancy, respectively. After delivery, Low-Zn were switched to zinc-sufficient diet. Maternal body weight, duration of pregnancy, the number of birth, the fetal death rate, and brooding behavior were monitored. As a result, maternal bodyweight, duration of pregnancy and the fetal death rate were not significant different between Zn-Suf and Low-Zn. However, several cases of low number of birth, and abnormal behavior of neglecting cubs were observed with Low-Zn. We also tested effects of feeding zinc-deficient diet in pregnant rats on salt preference. One-day pregnant SD female rats were fed on zinc-sufficient diet and zinc-deficient diet (Zn-Def; 2.2 mg/kg diet) during pregnancy. We found that salt preference increased with Zn-Def comparing to Zn-Suf.