

原 著

妊娠中のストレス下における咀嚼運動が
出生後の仔の肥満に及ぼす影響について

山 田 久美子¹⁾ 林 櫻子²⁾ 飯 沼 光 生²⁾

Impact of maternal chewing during prenatal stress on obesity risk
in mouse offspring

YAMADA KUMIKO¹⁾, HAYASHI SAKURAKO²⁾, IINUMA MITSUO²⁾

妊娠中のストレスは母体だけでなく胎児にも様々な影響を及ぼし、妊娠期のストレスによって出生後の子供の疾病や肥満発症のリスクが高まることも知られている。咀嚼運動には食物摂取の最初の段階である食物を細かく砕くという働き以外にも様々な効果が知られており、ストレス緩和作用もその一つである。本研究は妊娠中のストレス下での咀嚼運動が出生後の仔の肥満にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。妊娠マウスをストレス群、ストレス/咀嚼運動群、対照群の3群に分けた。ストレス群には拘束ストレスを負荷し、ストレス/咀嚼運動群には拘束ストレスと同時に咀嚼運動を行わせた。ストレス負荷と咀嚼運動は妊娠12日目から出産まで行った。3群の母マウスから生まれた雄性仔マウスをそれぞれS群、S/C群、C群とし、離乳後、仔マウスには高脂肪飼料を与え16週齢まで飼育した。離乳後の仔マウスは、1週間ごとに体重と摂食量を測定し、脂肪量と血中アディポネクチン濃度については、16週齢のマウスについて測定した。

16週齢のマウスでは、S群の脂肪量はC群と比較して有意に増加し、S/C群の脂肪量はS群よりやや減少した。また、血中アディポネクチン濃度はC群と比較してS群で有意に減少し、S/C群の血中濃度はS群より増加する傾向がみられた。これらの結果より、妊娠中のストレス下での咀嚼運動は、出生後の仔マウスの肥満を抑制する効果を示す可能性が示唆された。

キーワード：咀嚼運動、胎児期ストレス、肥満、脂肪量、アディポネクチン

Previous studies indicated that stress during pregnancy had negative consequences, such as learning deficits, diabetes and obesity, for both the mother and the offspring. Chewing is the initial action for food intake and is also an effective stress-coping behavior. We investigated effects of the prenatal stress and chewing on obesity risk in adult mouse offspring. Pregnant mice were randomly divided into control, stress, and stress/chewing groups. Stress was induced by placing mouse in a ventilated restraint tube, and was initiated on the day 12 of pregnancy and continued until delivery. Mice in the stress/chewing group were given a wooden stick to chew during restraint. Weaned male pups were fed a high-fat diet until 16 weeks of age. The body weights and food intakes were measured weekly. At the end of the experiment, the mouse fat weights and serum adiponectin levels were assessed. Prenatal stress led to increased fat weights and decreased serum adiponectin levels in adult offspring. Maternal chewing during stress attenuated stress-induced the elevated fat weights and reduced adiponectin levels. These findings suggest that maternal chewing during prenatal stress in dams could prevent obesity risk in their offspring.

Key words : Chewing, Prenatal stress, Obesity, Fat weight, Adiponectin

¹⁾ 名古屋女子大学家政学部

²⁾ 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座小児歯科学分野

¹⁾ 〒467-8610 名古屋市瑞穂区汐路町3-40

²⁾ 〒501-0296 瑞穂市穂積1851

¹⁾ Faculty of Human Life and Environmental Science, Nagoya Women's University.

²⁾ Department of Pediatric Dentistry, Asahi University School of Dentistry.

¹⁾ Shioji-cho 3-40, Mizuho-ku, Nagoya Aichi, 467-8610, JAPAN

²⁾ Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, JAPAN

(平成30年4月4日受理)

諸 言

肥満は白色脂肪組織が過度に増加することであり、糖尿病、脂質代謝異常症、高血圧症などの生活習慣病の主要な原因と考えられている。厚生労働省によって3年ごとに行われる「糖尿病患者数調査の概要（2014年）」によると、糖尿病患者は316.6万人であり、過去最高となっており¹⁾、「2016年国民健康・栄養調査」でも、糖尿病が強く疑われる人は1000万人と推計され²⁾、我が国で最も深刻な疾病の一つとなっている。また、生活習慣病の発症・進行には食習慣、運動習慣、喫煙などの生活習慣が関与する。このため、糖尿病予防の観点からも肥満の予防は非常に重要だと考えられる。近年、「受精時、胎児期または乳児期に、低栄養または過栄養に暴露されると成人病の素因が形成され、その後マイナスの生活習慣が負荷されると、成人病が発症する。すなわち成人病はこの2段階を経て発症する」という「成人病胎児期発症（起源）説（FOAD）」^{3,4)}やこれからさらに発展した「健康および疾病は胎生期にその起源があるとする（DOHaD）学説」^{4,5)}も知られており、肥満の発症および発症抑制の機序を明らかにするためには、胎生期の子宮内の環境を検討することも非常に重要であると考えられる。

ストレスは心身に様々な影響を及ぼし、それに伴って引き起こされる疾病も脳、心臓、骨など多岐にわたる⁶⁻⁸⁾。妊娠期に受けたストレスは、母体だけでなく出生後の子供にも様々な影響を与えることが知られており、これまでに母マウスのストレスが仔マウスの学習機能や代謝機能、肥満に及ぼす影響などについて報告されている⁹⁻¹²⁾。また、妊娠期のストレスに対する咀嚼運動の有効性については、妊娠中のストレスによって引き起こされた仔の記憶や学習機能の低下が咀嚼運動によって改善したという報告がなされているが^{13,14)}、肥満に対するストレスの影響と咀嚼の効果については、報告が少なく不明な点が多い。そこで、本研究では妊娠中の母マウスにストレスを負荷することによって、出生後の仔マウスの肥満にどのような影響を及ぼすかを検討した。さらに、母マウスにストレス負荷と同時に咀嚼運動をさせることによって、仔へのストレスの影響がどのように変化するのかを検討し、妊娠期の咀嚼運動がストレス緩和に有効な方法となり得るのかについて検討した。

材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

交配には妊娠の経験のない3か月齢に達したDDYマウス雄18匹と雌36匹を用いた。雄1匹に対し雌2匹を同一のケージに入れて交配させた。交配の翌日に膈

のプラグを確認し、プラグが認められたマウスを妊娠0日とした。妊娠が確認されたマウスは、それぞれ個別ケージにて飼育し、ストレス負荷などの実験に供した。妊娠中のマウスは餌と水ともに自由に摂取できるようにし、妊娠期間中の餌は固形飼料CLEA Rodent Diet CE-2（日本クレア、東京）を用いた。飼育環境は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 2\%$ 、6時から18時までを明期、18時から6時までを暗期に保たれ、実験に用いたマウスは、朝日大学歯学部実験動物飼育施設において飼育された。なお、本研究で行われた動物実験は朝日大学歯学部動物実験専門委員会の承認を得て行った（承認番号 第17-025号）。

2. ストレス負荷と咀嚼運動

妊娠が確認されたマウスは、ストレスを負荷する「ストレス群」とストレス負荷時に同時に咀嚼運動をさせる「咀嚼運動群」およびストレス負荷も咀嚼運動もさせない「対照群」に分けた（各群12匹ずつ）。ストレス負荷および咀嚼運動はAzumaら⁸⁾およびOnishiら¹³⁾の方法に従った。ストレスは呼吸用の穴を開けた内径4.5cmのプラスチック製のチューブを用い、チューブの中で自由に動けない状態に保つ拘束ストレスとし、妊娠12日目から出産までの7日間連続で、1日3回（9時、13時、17時）、1回45分間ストレスを負荷した。また、マウスは鼻先に木の棒を与えると自然に木の棒を噛み始めることが一般的に知られている。咀嚼運動群にはこの性質を利用し、拘束ストレス用のプラスチックチューブの片端の2カ所に爪楊枝が通るように穴をあけ、マウスの鼻先に爪楊枝が位置するように固定し、マウスに爪楊枝を噛ませる咀嚼運動をさせた。爪楊枝を噛み切った場合は、新たな爪楊枝を与え、ストレス負荷時を通じて咀嚼運動が行われるようにした。

3. 出生後の仔マウスの飼育

各群の妊娠マウスから出生した仔マウスは、それぞれ「S群（ストレス群）」、「S/C群（咀嚼運動群）」および「C群（対照群）」とした。出生後の仔マウスはそれぞれの母マウスと同一ケージで飼育し、4週齢で離乳させた。各群の母マウスからそれぞれ1匹または2匹ずつの雄性仔マウスを3群間で体重に差がでないように選び、個別ケージで16週齢まで飼育した。離乳後の仔マウスは、自由に摂食、飲水させ、餌は高脂肪飼料CLEA Rodent Diet Quick Fat（日本クレア、東京）を用いた。体重、摂食量および脂肪量の測定には各群11匹ずつの仔マウス（合計33匹）を、血中アディポネクチン濃度の測定には各群6匹ずつの仔マウス（合計18匹）を使用した。

4. 体重と摂食量および脂肪量の測定

出生後のマウスは離乳直後の4週齢から16週齢に達するまで、1週間ごとに体重と摂食量を測定した。また、脂肪量については16週齢のマウスについて、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪組織、後腹壁脂肪を摘出し、それぞれの重量を測定した。

5. 血中アディポネクチン濃度の測定

16週齢に達したマウスの血中アディポネクチン濃度を測定した。麻酔下でマウスの胸腔を切開し、心臓より全血を採取した。血液は血清採取用の遠心管に採取し、4℃で10分間、3,500×gで遠心分離した後、血清のみを回収し、分析するまで-80℃で冷凍保存した。アディポネクチン濃度の測定には Mouse Adiponectin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて行い、測定方法の詳細についてはキットに添付のプロトコールに従った。

6. 検定

得られた結果は、一元配置分散分析によって有意差の検定を行った後、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行った。なお、有意差基準 $p < 0.05$ とした。

結果

1. 体重と摂食量の変化

離乳直後(4週齢)から16週齢までのS群、S/C群およびC群の体重の平均値の変化を図1に示す。離乳後12週間の体重増加の変化は各群で差はみられず、離乳開始時の体重の2.1から2.2倍であった。

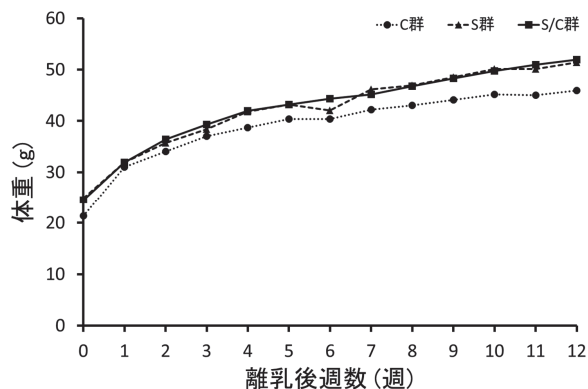


図1. 離乳後の体重の変化

離乳後の各群の仔マウスの摂食量の変化を図2に示す。摂食開始後、摂食量は各群で大きな差はみられず、その後、各群ともに徐々に摂食量が減少する傾向が認められた。16週齢に達するまでの全摂食量に有意な差

は認められなかったが、咀嚼運動群でわずかに多くなる傾向がみられた。

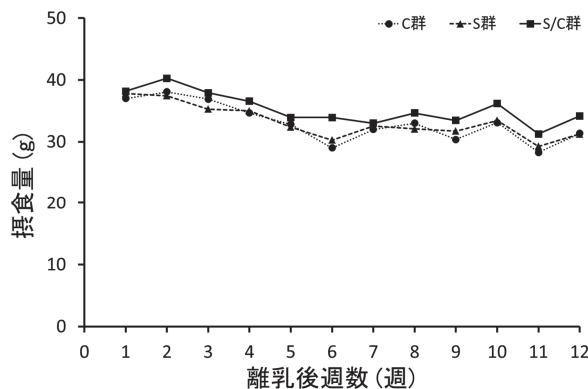


図2. 離乳後の摂食量の変化

2. 脂肪量の変化

脂肪量については、精巣周囲、腸間膜および後腹壁の脂肪量をそれぞれ測定したが、部位による大きな差異は認められなかったため、摘出したそれぞれの脂肪を合わせた全脂肪量として評価した(図3)。16週齢のマウスの全脂肪量は、3実験群間で有意差が認められた ($p < 0.05$)。S群はC群より有意に多くなり ($p < 0.05$)、S/C群とS群を比較するとS/C群で脂肪量がやや減少する傾向が認められた。体重に対する脂肪量の割合(体脂肪率)についても全脂肪量の変化と同様な変化が認められたが、3群間で有意差は認められなかった(図4)。

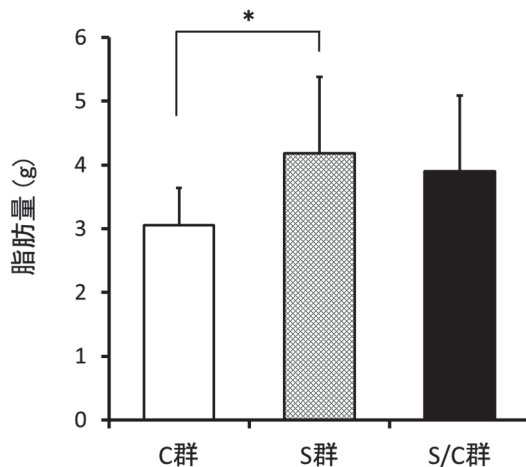


図3. 16週齢マウスにおける脂肪量
 平均値±標準偏差で示す。*: $p < 0.05$

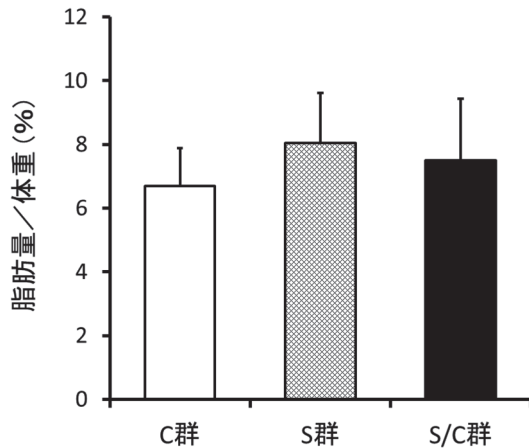


図4. 16週齢マウスにおける体脂肪率
平均値±標準偏差で示す.

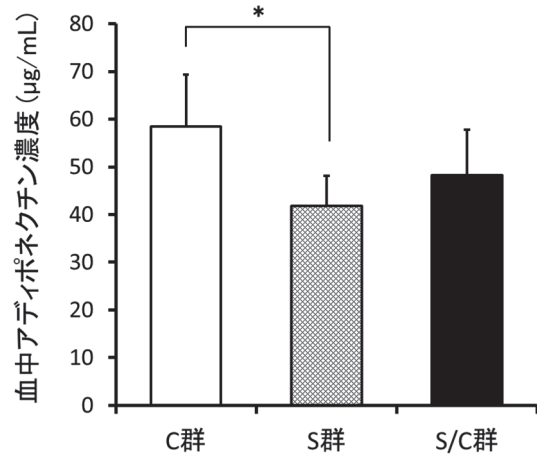


図6. 16週齢マウスにおける血中アディポネクチン濃度
平均値±標準偏差で示す.* : $p < 0.05$

離乳後、16週齢に達するまでの全摂食量に対する脂肪量の割合を検討したところ、図5に示すように3実験群間有意差が認められ ($p < 0.05$)、S群はC群より有意に多くなった ($p < 0.05$)。S/C群とS群を比較するとS/C群でやや減少する傾向が認められた。

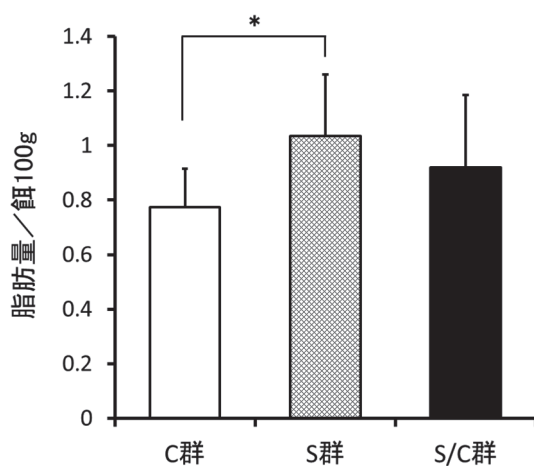


図5. 16週齢マウスにおける摂食量100gに対する脂肪量
平均値±標準偏差で示す.* : $p < 0.05$

3. 血中アディポネクチン濃度の変化

16週齢マウスの血中アディポネクチン濃度の結果を図6に示す。3実験群間で有意な差が認められ ($p < 0.05$)、C群と比較してS群で有意に低くなり ($p < 0.05$)、S/C群ではS群より高値を示した。

考察

肥満とは白色脂肪組織が過度に増加することであり、脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞数の増加によって起こる。脂肪細胞は間葉系多機能幹細胞から脂肪前駆細胞が分化し、増殖後、脂肪細胞へと分化する。細胞内に中性脂肪を蓄積し、成熟脂肪細胞となり、機能を終わるとアポトーシスなどにより生体から排除されると考えられている^{15,16}。成人では脂肪量は主として脂肪細胞数に起因するが、その数は小児期から青年期に決まり、成人ではほとんど変化しないと考えられている¹⁷。また、肥満に伴う脂肪細胞の大きさ数と数の変化については、4週齢のC57BL/6マウスに高脂肪飼料を給餌した研究により、脂肪細胞が中性脂肪の蓄積により肥大化した後に、脂肪細胞数の増加が生じることが分かっている¹⁸。

ストレスは体重や摂食量を変化させることが知られており、拘束ストレスによって体重や摂食量が減少することが明らかとなっており¹⁹⁻²²、ストレス負荷後、摂食量は回復しても体重については回復がみられなかったという報告もある¹⁹。さらに、妊娠中に暴露されたストレスについても、妊娠期のどの時期であっても一定期間の拘束ストレスによって母体の体重は減少し、ストレス終了後においても体重の回復はみられなかったと報告されている²³。また、妊娠期のストレスは母体だけでなく胎仔の発達にも影響を及ぼし、成長の遅延による低体重および死亡率の上昇を引き起こすだけでなく、胎仔の形態異常も引き起こす²³。本研究では、妊娠中に拘束ストレスを負荷した母マウスから出生した仔マウス (S群) の摂食量と体重の変化を16週齢についてストレス負荷を行わなかった対照群 (C群) と比較したところ、摂食量、体重ともにC群と

有意な差はみられなかった。しかし、16週齢マウスの脂肪量については、S群ではC群に比べて有意な増加が認められた ($p<0.05$)。すなわち、離乳後に脂肪の多い飼料を摂取し続けるというマイナスの食習慣に暴露することで、摂食量に差がないにもかかわらず、S群ではC群と比較して脂肪量で有意な増加が認められた。このことは、「成人病胎児期発症説 (FOAD)」³⁾ や「健康および疾病は胎生期にその起源があるとする (DOHaD) 学説」⁵⁾ を支持する結果と思われた。

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンで肝臓や骨格筋で糖代謝活性を亢進し、血糖を消費するとともに脂肪燃焼を高める働きをもつ。しかし、脂肪細胞が肥大化するなど肥満傾向がみられると、分泌量は大幅に減少すると言われている²⁴⁾。本研究においても、脂肪量の有意な増加が認められたS群では、血中アディポネクチン濃度がC群より有意に減少することが認められた ($p<0.05$)。これらの結果より、妊娠期のストレスは出生後16週齢のマウスにおいて、脂肪量を増加させ、また、血中アディポネクチン濃度を低下させることが明らかとなり、妊娠期のストレスは出生後のマウスの肥満を促進する要因となることが示唆された。

脂肪量と血中アディポネクチン濃度について本研究のS群とS/C群の結果を比較すると、有意差は認められなかったが、胎児期に暴露されたストレスによって引き起こされる出生後の脂肪量の増加や血中アディポネクチン濃度の低下をやや改善する傾向が認められた。すなわち、妊娠期の咀嚼運動は妊娠中のストレスを軽減させる効果が期待でき、出生後の肥満を抑制する可能性があると考えられた。また、ストレス条件下での咀嚼運動は、骨粗鬆症の発症に抑制効果を示すことも知られており、ストレスによって低下した骨量が咀嚼運動をさせることによって改善すると報告されている⁸⁾。妊娠中に暴露された拘束ストレスに対する咀嚼運動の効果についても、出生後の仔のストレスによる学習機能の低下、海馬の新生細胞数の減少、神経細胞の変性などが咀嚼運動によって改善することが明らかとなっている^{13,14)}。

肥満発症の抑制には、摂食に関与するホルモンであるグレリンやレプチンおよび脂肪燃焼に関与するUCP-1の発現量なども関係していると考えられ、グレリンの発現量やレプチンの血中濃度はストレスによって変化することが報告されている¹⁹⁾。今後も、妊娠期のストレスおよび咀嚼運動によって、出生後にこれらの肥満発症抑制に関わる因子の発現がどのように変化するかについての詳細な検討が望まれる。

結 論

妊娠期の母マウスに拘束ストレスを暴露し、出生後の仔マウスの肥満発症にどのような影響を及ぼすかを評価した。また、拘束ストレスと同時に合わせた咀嚼運動についても、仔マウスの肥満発症との関連を検討した。

その結果、妊娠期のストレスは出生後の仔の脂肪量を増加させ、肥満を発症させる一因となることが確認された。また、咀嚼運動にはストレスを軽減させる効果が期待でき、出生後の肥満発症を抑制する可能性があると考えられた。

謝 辞

本研究はJSPS 科研費 JP16K13058の助成を受けたものです。

利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健社会統計課保健統計室. 平成26年(2014)患者調査の概要. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/kanja-01.pdf>
- 2) 厚生労働省健康局健康課栄養指導室. 平成28年国民健康・栄養調査結果の概要. http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkoukouzoushinka/kekkagaiyou_7.pdf
- 3) Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition*. 1997; 13: 807-813.
- 4) 福岡秀興. 胎児期の低栄養と成人病(生活習慣病)の発症. *栄養学雑誌*. 2010; 68: 3-7.
- 5) Gluckman P and Hanson M. *The Fetal Matrix*. Cambridge: Cambridge University Press; 2005.
- 6) Proietti R, Mapelli D, Volpe B, Bartoletti S, Sagone A, Bianco LD, Daliento L. Mental stress and ischemic heart disease: evolving awareness of a complex association. *Future Cardiol*. 2011; 7: 425-437.
- 7) Marin MF, Lord C, Andrews J, Juster RP, Sindi S, Arseneault-Lapierre G, Fiocco AJ, Lupien SJ. Chronic stress, cognitive functioning and mental health. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; 96: 583-595.
- 8) Azuma K, Furuzawa M, Fujiwara S, Yamada K, Kubo K. Effect of active mastication on chronic stress-induced bone loss in mice. *Int J Med Sci*. 2015; 12: 952-957.
- 9) Hosseini-sharifabad M, Hadinedoushan H. Prenatal stress induces learning deficits and is associated

- with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anatomical Science International*. 2007; 82: 211-217.
- 10) Tamashiro KLK, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JJ, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*. 2009; 58: 1116-1125.
 - 11) Pankevich DE, Mueller BR, Brockel B, Bale T. Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy. *Physiol Behav*. 2009; 98: 94-102.
 - 12) Entringer S. Impact of stress and stress physiology during pregnancy on child metabolic function and obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16: 320-327.
 - 13) Onishi M, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K. Learning deficits and suppression of the cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of offspring are attenuated by maternal chewing during prenatal stress. *Neurosci Lett*. 2014; 560: 77-80.
 - 14) Suzuki A, Iinuma M, Hayashi S, Sato Y, Azuma K, Kubo K. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced hypomyelination, synaptic alterations and learning impairment in mouse offspring. *Brain Research*. 2016; 1651: 36-43.
 - 15) Rosen ED and MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 885-896
 - 16) 阪上浩. 脂肪細胞の大きさと数のメカニズム, *実験医学*. 2007; 25(15): 2262-2270.
 - 17) Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453: 783-787.
 - 18) Sakai T, Sakaue H, Nakamura T, Okada M, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Nakayama K, Nakayama KI, Kasuga M. Skp2 controls adipocyte proliferation during the development of obesity. *J Biol Chem*. 2007; 282: 2038-2046.
 - 19) Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effect of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expression in mice. *Endocrinol. Metab*. 2013; 28: 288-296.
 - 20) Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effect of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int*. 2003; 42: 107-117.
 - 21) Harris RBS, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, Ryan DH. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol*. 1998; 275(6 Pt 2): R1928-1938.
 - 22) Marti O, Marti J, Armario A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol. Behav*. 1994; 55: 747-753.
 - 23) Lee YE, Byun SK, Shin S, Jang JY, Choi B, Park D, Jeon JH, Nahm SS, Kang JK, Hwang SY, Kim JC, Kim YB. Effect of maternal restraint stress on fetal development of ICR mice. *Exp Anim*. 2008; 57: 19-25.
 - 24) Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005; 26: 439-451.
-