

〈研究ノート〉

## 母乳を介しての新生仔へのアルコールの影響を 検討するための動物モデルの作製

蛭間 眞悟\*・田淵 聡子\*\*・門田 永治\*\*\*

An attempt of producing a rat model to examine influence  
of the alcohol to the newborn rat by mother's milk

Shingo Hiruma, Satoko Tabuchi and Eiji Kadota

抄録：エタノールを主成分とするアルコール飲料は、食前食後に愛飲されている。ストレスの解消や疲労回復などプラス面も多く認められるがアルコールの過剰摂取によって人の健康に急性もしくは慢性のダメージを引き起こす。またアルコール代謝及び薬理作用による生体に対する作用も不明な点がある。特に妊娠中のアルコール依存症は脳への悪影響があり、胎児性アルコール症候群と言われる。現在では、アルコールに起因する神経性行動異常として広い範囲の障害を胎児性アルコールスペクトラム障害と呼ばれている。これらの起因の解明の一端のために今回は、新生仔へのアルコールの影響を検討するための動物モデル作製を試みた。

**Abstract :** The alcohol is drunk habitually before a meal or after a meal and effective for not only reducing of the stress but also fatigue recovery. But, the excessive intake of the alcohol causes acute or chronic damages for the human health. All the reaction of the alcohol metabolism in the living body is not elucidated, too. Alcohol abuse during pregnancy produces brain damages such as fetal alcohol syndrome (FAS). And now fetal alcohol spectrum disorder (FASD) is termed in the wide variability of the alcohol-induced neurobehavioral deficits.

An experimental animal model is attempted to examine influences of the alcohol to the newborn rat by mother's milk in this article.

**Key words :** アルコール alcohol ラット rat モデル model 母乳 mother's milk 小脳 cerebellum

はじめに

アルコール飲料は、酒は百薬の長ともいわれ古くから人々に飲まれてきた。アルコール飲料

と食文化との関わりも深く洋の東西を問わず世界各地で様々なアルコール飲料がある。アルコールの摂り方によっては健康に有害と考えられる。アルコールの代謝や薬理作用に基づく生体

\*関西福祉科学大学健康福祉学部 教授

\*\*関西福祉科学大学事務局 職員 (実習助手)

\*\*\*岸和田市民病院病理検査部 検査部長

に対する作用も詳細に研究されてきている。アルコール飲料の人体への影響としては急性作用として急性アルコール中毒、血圧変化、人格変化また社会問題化している酩酊もしくは飲酒運転による交通事故など例をあげればきりが無い。慢性作用としてはアルコール依存症、循環器（心臓・血圧など）、消化器（肝臓・膵臓・胃）、性腺機能異常、中枢神経系に対する影響があげられる<sup>1)</sup>。特に周産期においては、妊婦が依存症的にアルコール飲料を摂取することで、胎児性アルコール症候群（FAS）と言われる、身長・体重・頭囲の成長不全、特徴的な顔貌、心奇形、小関節、四肢の異常や中枢神経系の障害が認められている。これに関連してアルコール関連神経発達障害（行動や認知の異常）、アルコール関連先天異常（心臓・腎臓・骨・聴覚の障害）などを含め、アルコールに起因することから現在では胎児性アルコールスペクトラム障害と呼ばれている<sup>2)</sup>。

ラットを用いた実験でも、中枢神経系におよぼす影響が多数報告されている。今回は、新生仔へのアルコールの影響を検討する動物モデル作製を試みた。

### 試料・方法・結果

#### 1. 動物

妊娠 13 日齢の SD ラット（日本エスエルシー K. K.）を用いた。

#### 2. 飼料

アルコール用液体飼料及びコントロール液体飼料、Isocarolic control food（オリエンタル酵母 K.K.）や固型飼料 MF（オリエンタル酵母 K. K.）を用いた。

#### 3. 実験方法

妊娠 13 日齢の SD ラットを固型飼料及び水を自由に与え出産させる。

出産後、1 日目から 4% エタノール添加液体飼料（以下アルコール群）、コントロール液体

飼料（以下 pair-fed 群）及び固型飼料（以下固型飼料群）を用いて飼育した。

新生仔は 1 週後及び 2 週後に、断頭後手早く脳を取り出し、4% ホルマリンにて固定後正中断に切り出しパラフィン切片を作製した。

#### 4. 動物観察

液体飼料中のアルコール摂取量の計測をした。新生仔動物は毎日体重を計測し、背臥位からの立ち直り時間を計測した。

#### 5. 組織観察・計測

パラフィン切片は、H & E 染色後、関心領域を Nikon Microphot-FXA/CD、カメラ Polaroid PDMc-Ic-i を用いて顕微鏡で撮影した。組織は同倍率で写真印刷を行い、小脳の面積（mm<sup>2</sup>）、小脳周囲長（mm）、各小葉の嵌入長を算出して比較検討した。

#### 6. 結果

6-1：アルコール摂取量は、Fig. 1 に示した。4% エタノール添加液体飼料の摂取量から算出すると、エタノールは 41.2 g～45.2 g であった。

6-2：新生仔の体重は、Fig. 2 に示した。

固型飼料群はほぼ正常な体重増加を示したが、アルコール群と pair-fed 群の体重増加は、良くなかった。

6-3：Fig. 3 は、生後 1、2 週のホルマリン固定後の脳を示す。アルコール群が固型飼料群に比べて小さかった。

6-4：Fig. 4 は、生後 1、2 週の小脳 H & E を示す。生後 1 週では各群とも小さく、丸味を帯びて単純な形状である。2 週では、固型飼料群・pair-fed 群ともに、各小葉形状、小葉嵌入部位が明瞭となる。逆にアルコール群では 1 週の小脳の形状によく似る。

各群の差異が著明となる。

6-5：Fig. 6 は、生後 1、2 週の小脳面積、小脳周囲長及び小葉嵌入長の計測結果を示す。2

週ではアルコール群が他の2群に比べて小さくまた単純な形状であることがわかる。特に第6・9小葉部位の嵌入部位では顕著であった。

## ま と め

アルコール摂取した母親母乳にはほぼ血中濃度と同等のアルコールが検出されるという<sup>3)</sup>。本実験では母親ラットは4%濃度のアルコール液体試料約100 mlを毎日摂取していた。母親ラットから胎盤を経由して新生仔にもアルコールを摂取していると考えられた。新生仔の体重増加はFig. 2で示した。固型飼料群では日本エスエルシー K. K. のデータ<sup>4)</sup>とほぼ同程度であるが、アルコール群の体重増加が著しく低いことがわかった。摂取したアルコールと等価のカロリーを含む pair-fed 群も体重の増加はあまり良くなかった。

現時点では、小脳の肉眼的所見や前額断のH & E染色切片におけるマクロ的な所見からの結果からのみであるが、アルコール群で小脳に低形成様所見が認められた。さらに各小葉を見ると小葉の小型化、分葉不全、fissure 低形成様所見が特に第6第9小葉で確認された。

過去の授乳期アルコール暴露モデルの多くは胃ゾンデを用いた強制投与方法による<sup>5)</sup>。これらでは手技上の煩雑さや新生仔へのストレス、更に、胃穿孔や気道への誤注入による事故も付随すると考えられる。母乳を介した非侵襲的な本モデルは病変作製率も良好で事故もない。今後の病態解明に有用であると考えられた。

脳の発生と成長は、その過程から考えると、外胚葉の一部から神経板が形成された後に神経管ができ、様々な遺伝子制御を受けながら、神経上皮細胞由来の神経幹細胞が脳室層周辺に多数認められるようになる。そこから神経細胞の産生に続いて、神経膠細胞の産生が生ずる。これらの細胞が外套層への移動や組織再構築を繰り返した後に、シナプス回路形成を経て神経活動依存的な修飾を受けて脳が完成されるといわれる。小脳ではプルキンエ細胞や小脳核ニュー

ロンがこれらと同様に第4脳室の上位蓋から発生し、皮質配列、層構造を形成する。一方、軟膜直下の外胚芽層から顆粒細胞、バスケット細胞、星状細胞が分化し、移動して小脳が形成される。この外胚芽層からの神経細胞の分化、移動は生後2~3週以内で行われる。これらの一連の小脳の完成にも時間軸に沿った遺伝子プログラムに従っていると考えられている。同時にグリア系細胞が神経細胞の分化促進、神経突起伸長の促進、シナプス形成の促進などの神経細胞の発達や支持を行っていると考えられている<sup>6)</sup>。

新生仔ラットに胃ゾンデを用いて胃にアルコールを投与し小脳への影響を報告したのものにはプルキンエ細胞の減少<sup>7)</sup>や神経成長因子への影響<sup>8)</sup>などを報告している。これらの報告では、概ね生後3日~7日にアルコールに対する感受性が強く現れるとしている。この時期に小脳では基本的組織構築がなされる時であり、アルコールが、顆粒膜細胞やプルキンエ細胞間に発現する機能性蛋白、SDF-1 $\alpha$ <sup>9)</sup>、リーリントンパク質<sup>10)</sup>などに、また受け手側の膜蛋白に対して、作用するのではないかと推測される。本報告でも、1週、2週ともに小脳に対するアルコールの作用（低形成様に小さいこと、小脳の特徴である各葉間の、6や9葉間の嵌入に変化がある）があると考えられた。

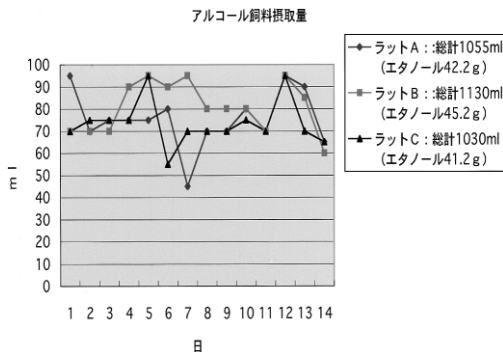
今後、シグナル蛋白やアポトーシス及び細胞増殖等のマーカーを用いた免疫組織化学的検討が新生児に対するアルコールの作用を一層明らかにすると考えられた。

## 参考文献

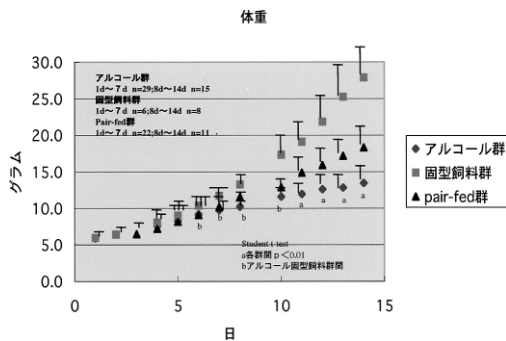
- 1) 糸川嘉則・栗山欣弥・安本教博：アルコールと栄養，光生館。
- 2) C. R. Goodlett, K. H. Horn, F. C. Zhou : Alcohol Teratogenesis : Mechanisms of Damage and Strategies for intervention. *Exp. Biol. Med.*, 230 : 394-406, 2005.
- 3) Y. C. Chien, J. F. Liu, Y. J. Huang, C. S. Hsu, J. C. Chao : Alcohol levels in Chinese lactating moth-

- ers after consumption of alcoholic diet during postpartum “doing-the-month” ritual. *Alcohol.*, 37 (3), 143–50. 2005 Nov.
- 4) SD ラットデータ [www.Labanimal.co.kr/slcddata/sd.pdf](http://www.Labanimal.co.kr/slcddata/sd.pdf) より日齢の体重や諸臓器の重量を述べている。
  - 5) K. E. Light, S. M. Belcher, D. R. Pierce : Time course and manner of purkinje 3 neuron death following a single ethanol exposure on postnatal day 4 in the developing rat. *Neuroscience*, vol. 114, No. 2, pp 327–337, 2002.
  - 6) 渡辺雅彦編 脳・神経科学入門講座 下巻 羊土社 2001.
  - 7) D. R. Pierce, C. C. Cook, J. A. Hinson, K. E. Light : Are oxidative mechanisms primary in ethanol induced Purkinje neuron death of the neonatal

- rat. *Neuroscience Letters*, 400, 130–134, 2006.
- 8) Yun Ge, S. M. Belcher, K. E. Light : Alteration of cerebellar mRNA specific for BDNF, p 75 NTR, and T 4 rkB receptor is forms occur within hours of ethanol administration to 4-day-old rat pups. *Developmental brain research*, 151, 99–109, 2004.
  - 9) R. S. Klein, J. B. Rubin : SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development*, 128(11), 1971–81. 2001 Jun.
  - 10) W. Darmanto, M. Inouye : Derangement of Purkinje cells in the rat cerebellum following prenatal exposure to X-irradiation : decreased Reelin level is a possible cause. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (3), 251–62, 2000 Mar.



**Fig. 1** 4% エタノール添加液体飼料の摂取量 毎日の摂取量と2週間での総量を示した。 アルコールとして1日約3g 摂取している。



**Fig. 2** 新生仔の体重変化 生後1日から14日までの体重増加を示した。 固型飼料群はほぼ正常な体重増加を示した。



**Fig. 3** ホルマリン固定後の脳 1週2週ともアルコール群が固形飼料群に比べて小さい。

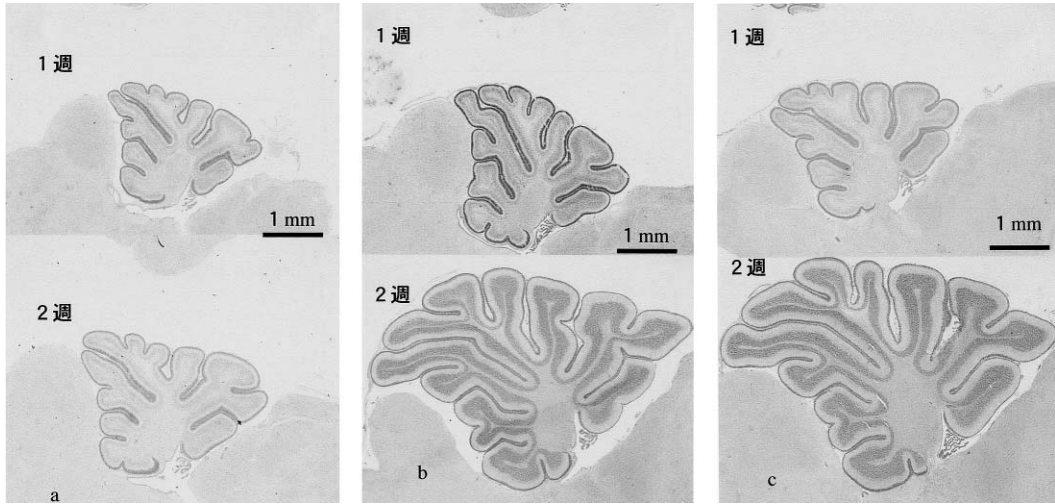


Fig. 4 小脳の組織 (H & E 染色)

4 a : アルコール群 4 b : 固型飼料群 4 c : pair-fed 群

生後1週では各群とも小さく、丸味を帯びて単純な形状である。生後2週では、固型飼料群や pair-fed 群とも、各小葉形状、小葉嵌入部位が明瞭となる。逆にアルコール群では1週の小脳形状によく似る。各群の差異が著明となる。

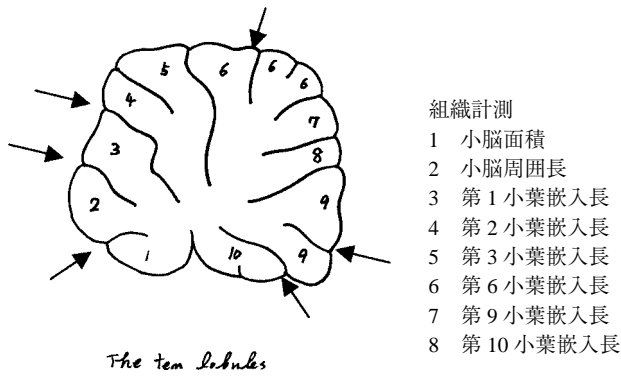


Fig. 5 小脳組織計測

1 から 8 項目を写真上で組織計測行い、各群間の有意差検定を行った。

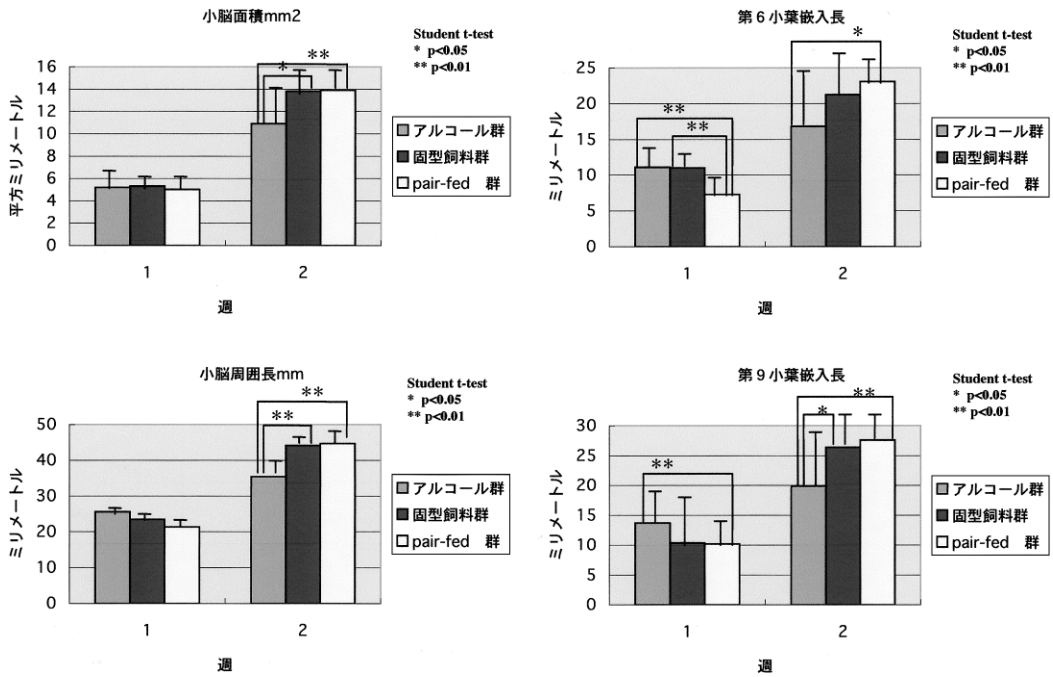


Fig. 6 小脳組織計測結果

生後 1、2 週の小脳面積、小脳周囲長及び小葉嵌入長の計測結果を示す。2 週ではアルコール群が他の 2 群に比べて小さくまた単純な形状であることがわかる。特に第 6・9 小葉部位の嵌入部位では顕著であった。