

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00877

研究課題名(和文)鉄による脳の老化制御に関する研究

研究課題名(英文)Role of iron as dietary modulators of brain ageing

研究代表者

横井 克彦(YOKOI, Katsuhiko)

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：10200883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳の老化制御因子としての鉄の役割について検討した。鉄欠乏ラットでは、オープンフィールドにおける種々の行動異常が見られた。鉄欠乏ラットの脳の各部位では、鉄濃度の低下とマンガン濃度の上昇が見られた。大脳皮質・小脳などでは、飼料中マンガンレベル依存性のマンガン濃度の上昇が、鉄欠乏によって増強された。また、鉄欠乏によって脳各部位における、広範なカテコラミン系濃度やセロトニン系濃度の異常が認められた。また、新たな数学モデルを用いた、鉄必要量の新規推定法を試みた。わが国では女性の鉄欠乏が著しいが、これらの研究結果は、鉄の補充により、脳の老化や変性疾患の予防が可能であることを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義の1つは、鉄欠乏は動物の行動異常を伴い、特に、オープンフィールド投入直後にすくみ行動が見られることを見出したことである。新規環境におけるすくみ行動は、認知症患者やパーキンソン病患者が新規環境に対して戸惑う状況に類似したものである。また、鉄欠乏に伴う脳のマンガン蓄積の様態が脳の部位によって異なることを、数理解析を用いて明示し、鉄欠乏にカテコラミン代謝やセロトニン代謝の異常を伴うことを示した点も挙げられる。社会的意義は、本研究の成果に基づき、鉄補充による脳の老化および脳変性疾患の防止につながる可能性を示し得たことである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of iron as modulators of brain ageing. In iron-deficient rats, abnormal behaviors in an open field were observed. In brain parts, decrease of iron and increase of manganese were remarkable. In some brain parts such as cerebrum cortex and cerebellum, dietary manganese-dependent manganese increase was enhanced by iron deficiency. In iron-deficient rats, generalized abnormalities in catecholamine metabolites and serotonin metabolites were observed. New estimation method of iron requirements using mathematical model was attempted also. Iron deficiency is common in Japanese women. These results suggest that prevention of brain ageing and brain degeneration is possible using iron supplementation.

研究分野：栄養学、食生活学、衛生学

キーワード：老化 脳 鉄 マンガン 行動異常 カテコラミン

1. 研究開始当初の背景

わが国は超高齢社会を世界に先駆けて迎え、労働人口の不足と要介護人口の増加による社会の衰退に直面し、有効性のある老化制御法が求められている。実際、寿命の延びとともに、認知症と脳の変性疾患の発症が増え続けており、この傾向は女性において著しい。

平成 26 年患者調査における女性患者数は、アルツハイマー病が男性の 2.8 倍、パーキンソン病が 1.6 倍である。65~69 歳でも、アルツハイマー病、パーキンソン病ともに 1.4 倍であり、女性が長寿であるからだけでなく、女性であること自体が発症の危険因子である。しかし、欧米ではパーキンソン病は男性に多い¹⁾。このことから、日本には女性にパーキンソン病等を招きやすい環境因子、中でも食事性因子が存在すると考えられる。

日本人の調査に基づいて、鉄の摂取不足がパーキンソン病の危険因子であることが報告された²⁾。以前、日本人を対象に行なった調査から、貧血のない鉄欠乏の女性は、疲労度、緊張性、怒り易さ、神経症傾向が有意に高く、パーキンソン病患者の心理的特徴と一致していることを明らかにした³⁾。日本人女性の鉄欠乏有病率は国際的に際立って高い。研究代表者が国民健康・栄養調査を解析した結果、20~49 歳女性の鉄欠乏有病率は約 70% で、実証的に求めた鉄の必要量に摂取量が達していない者が大半だった⁴⁾。

鉄欠乏以外の注目すべき食事性因子に、マンガン過多がある。マンガンは食事摂取基準が定められた新規の必須栄養素であるが、同時に毒性も高い。高濃度のマンガンを含む井戸水等の摂取や完全静脈栄養法でマンガン中毒を起こし、脳にマンガンが蓄積してパーキンソン病類似の変性と症状を招く⁵⁾。日本人はマンガン含有量が高い米・茶の摂取が多く、マンガン摂取量は、平均 5 mg で欧米人の約 2 倍⁶⁾、英国のマンガン推奨量 1.4 mg の 3.6 倍であり、マンガン摂取が過多傾向にある。予備的な結果ではあるが、世界に先駆けて鉄欠乏ラットの脳にマンガンが蓄積することを報告し⁷⁾、鉄欠乏に伴うマンガン蓄積が脳の老化や障害をもたらす可能性を指摘してきた⁸⁾。

2. 研究の目的

本研究では、鉄欠乏およびマンガン過剰によってもたらされる脳のマンガン蓄積を脳の部位別に明らかにするとともに、脳の代謝の変化や行動に与える鉄欠乏の影響を明らかにし、現在問題となっている脳の老化防止に資することを主な目的としている。

3. 研究の方法

実験 1

飼料中铁レベル 2 段階(充足と重度欠乏)と飼料中マンガンレベル 4 段階(NRC マンガン必要量の 1、3、6、9 倍)に設定した 2 要因計画で、3 週齢 Wistar 系雄ラット 7 週間飼育し、オープンフィールド法を用いたラットの行動解析を実施した。飼育終了後、脳を採取し、各部位に分けた。脳の各部位は灰化し、マンガン濃度ならびに各種ミネラル濃度を誘導結合プラズマ質量分析法で測定した。

オープンフィールドにおける行動の解析に際しては、用手法ならびに行動解析ソフトによる自動解析法を併用した。

実験 2

飼料中铁レベル 2 段階(充足と軽度欠乏)と飼料中マンガンレベル 4 段階(NRC マンガン必要量の 1、3、6、9 倍)に設定して 7 週間飼育した 3 週齢 Wistar 系雄ラットのオープンフィールドにおける行動を用手法で解析した。

実験 3

飼料中铁レベル 2 段階(充足と重度欠乏)と飼料中マンガンレベル 2 段階(必要量の 1 および 100 倍)に設定して 6 週間飼育した 3 週齢 Wistar 系雄ラットの脳各部位中カテコラミン代謝物濃度を HPLC 法にて測定した。

鉄必要量の新規推定法の開発

正確な鉄必要量の決定は、鉄補充の効果が期待される人口の割合を推定する上で最も重要な要素である。そこで、新規数学モデルを用いて、鉄必要量の新推定法の構築を試みた。

統計解析

データは、二元配置分散分析、非線形回帰分析、Fisher の直接確率法を用いて解析し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

実験 1

鉄欠乏飼料の摂取により、ヘモグロビン濃度は、鉄充足飼料摂取時のおよそ 4 分の 1 に低下し、

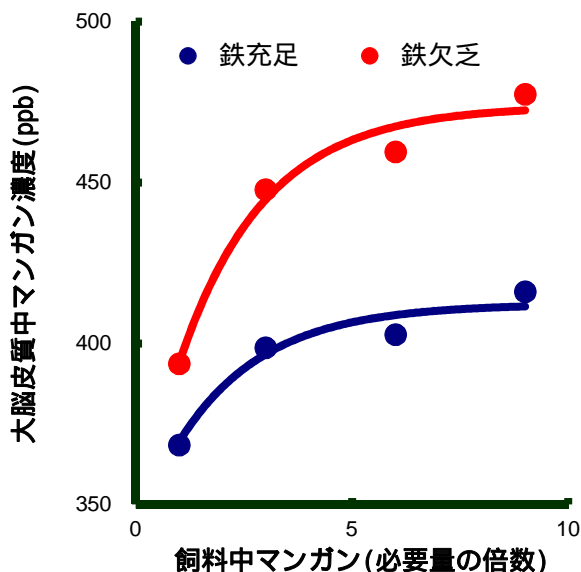


図1. 大脳皮質中マンガンの用量効果関係

効果関係について、非線形回帰分析を用いて詳細な解析を加えた。データは個々のラットの脳各部位中マンガン濃度を従属変数、飼料中铁レベルとマンガンレベルを独立変数とした。

検討するモデルとして、鉄効果モデル(鉄主効果項のみ)、線形モデル(鉄およびマンガンの主効果項のみ)、一般線形モデル(鉄およびマンガンの主効果項と両者の交互作用項)、指数飽和モデル(マンガンの指数飽和用量効果関係を鉄レベルが修飾)ならびに対照として定数モデル(鉄・マンガンの影響なし)を設定した。SYSTAT13 Software (Systat, Inc.)の非線形回帰 NONLIN を使用し、各モデルに適合する最適の係数を求めた。さらに、赤池統計情報量(AIC)を求め、最小の値を与えるモデルを選択した。

その結果、大脳皮質、間脳、小脳については、指数飽和モデルが選択された(図1)。海馬と線条体については、線形モデルが選択された(図2)。中脳と延髄については、鉄効果モデルが選択された。橋については、一般線形モデルが選択された。

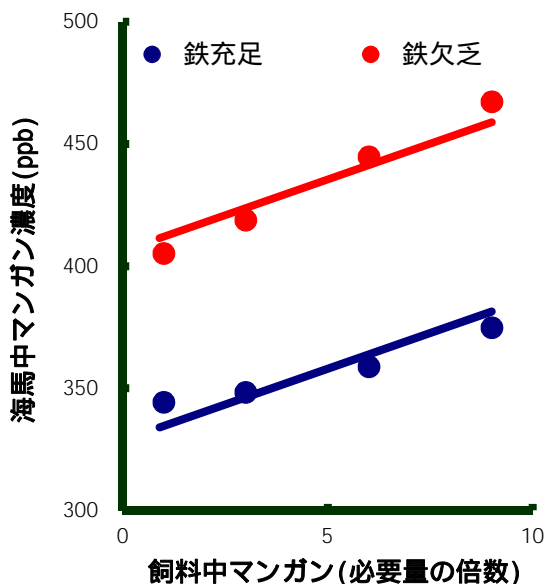


図2. 海馬中マンガンの用量効果関係

ラットは重度の貧血状態となった。すべての脳部位中(大脳皮質、海馬、線条体、間脳、中脳、橋、小脳、延髄)で、鉄欠乏により鉄濃度は有意に低下し、マンガン濃度は有意に上昇した。鉄欠乏飼料の摂取により、中脳の垂鉛濃度が有意に低下し、海馬と間脳のセレン濃度が有意に上昇した。鉄欠乏飼料の摂取により全ての脳部位におけるルビジウム濃度が有意に上昇した。

飼料中マンガンレベルの増加に伴って間脳のカルシウム濃度は有意に下がり、大脳皮質・線条体・小脳のマンガン濃度は有意に上がった。また、飼料中マンガンレベルの増加に伴い、小脳のセレン濃度は有意に上昇、大脳皮質中ルビジウム濃度は有意に上昇、橋中ルビジウム濃度は有意に低下した。

脳各部位中マンガン濃度における、飼料中铁レベルの効果、ならびに飼料中マンガンレベルの用量

すなわち、大脳皮質、間脳、小脳では、マンガン必要量の9倍までは、脳部位中マンガン濃度が飽和型の用量効果関係を示し、その関係が鉄欠乏によって増強されることが明らかとなった。また、橋では、マンガン濃度が、マンガン必要量の9倍まで直線的な用量効果関係を示し、それが鉄欠乏で増強されることが明らかとなった。これらの脳部位では、マンガン過剰摂取に伴うマンガンの脳部位での蓄積が、鉄欠乏で増強されることが明らかとなった。

一方、海馬、線条体、中脳、延髄については、すべて鉄欠乏によるマンガン濃度の上昇は存在するが、マンガン過剰摂取に伴うマンガン濃度の上昇を鉄欠乏が増強しないことが明らかとなった。

一般に広く用いられる二元配置分散分析では、用量効果関係まで加味した解析はできない。今回用いた非線形回帰によるAICを用いたモデル選択は、用量効果関係の別要因(ここでは鉄欠乏)による修飾を評価する上で、有効な解析ツールであることを示している。

また、オープンフィールド内の行動には、鉄欠乏による著明な変化が認められた。無活動時間は、鉄欠乏飼料の摂取で有意に延長し、鉄充足飼料を与えた場合より約70%長くなった。グルーミング開始までの時間は、鉄欠乏飼料の摂取によって有意に延長し、鉄充足飼料を摂取させた場合の約3倍になった。鉄を充足させた場合、グルーミング開始までの無活動時間は、24匹中

19 匹で認められず、無活動時間として記録されたものも 4 秒未満であった。一方、鉄を欠乏させた場合、平均約 60 秒の無活動時間が記録された。マンガンレベルについては軽微な変化は認められるものの、鉄欠乏のような顕著な差は認められなかった。

実験 2

実験 2 は、鉄欠乏のレベルが軽度鉄欠乏である点が、実験 1 とは異なるが、マンガンレベルは実験 1 と同様である。軽度鉄欠乏飼料を摂取したラットでは、ヘモグロビン濃度が僅かではあるが有意に低下した。オープンフィールド投入後の最初の 5 分間における、動作を伴わない静止時間が軽度鉄欠乏で有意に延長した。

また、グルーミング開始時間は、二元配置分散分析では有意な影響がみられなかったが、マンガンレベルを統合し、軽度鉄欠乏と鉄充足に分けて、Fisher の直接確率法で検定した結果、グルーミングが遅れる個体（鉄充足飼料摂取ラットの平均値 + 2 標準偏差超）が、軽度鉄欠乏飼料を摂取した場合に、有意に多く見られた。以上の結果から、重度鉄欠乏に比べれば軽微ではあるが、重度鉄欠乏時と同様の行動異常が、軽度鉄欠乏でも見られることが明らかとなった。

実験 3

重度鉄欠乏飼料の摂取によって、間脳のノルエピネフリンが有意に上昇し、ホモバニリン酸は有意に低下した。重度鉄欠乏で、海馬のノルエピネフリンが有意に上昇、ヒドロキシインドール酢酸は有意に低下した。重度鉄欠乏で、橋のノルエピネフリンは有意に上昇、ドーパミン濃度は有意に上昇、ホモバニリン酸は有意に低下、セロトニンは有意に上昇した。重度鉄欠乏で、中脳のノルエピネフリンは有意に上昇、ドーパミン濃度は有意に上昇、セロトニンは有意に上昇した。重度鉄欠乏で、大脳皮質のノルエピネフリンは有意に上昇、ドーパミンは有意に上昇、ホモバニリン酸は有意に低下、セロトニンは有意に上昇した。概ね、重度鉄欠乏で、カテコラミン系のノルエピネフリンとドーパミンが上昇する傾向にあり、ホモバニリン酸は低下する傾向にあった。また、セロトニンは上昇する傾向にあった。

鉄欠乏に比べてマンガン過剰の影響は小さかったが、橋のヒドロキシインドール酢酸は有意に上昇した。

鉄必要量の新規推定法の開発

正規分布と対数正規分布の積和として鉄損失を推定する方法を以前開発したが⁴⁾、この方法では、コンピュータの計算力に大きく依存し、数値計算に習熟していない者にとってはアクセスが困難である欠点があった。今回、ガンマ分布の積和を基盤とした数学モデルを導入することにより、比較的簡単で正確な近似式（条件によっては、厳密な解析解）を導くことが出来た。本法により、鉄必要量の推定が、従来よりも容易になるものと期待される。

結果のまとめ

鉄欠乏ラットの行動には、無活動時間の延長やグルーミング開始までの時間の延長など、特徴的な異常が見られた。グルーミング開始までの無活動時間は、すくみ行動（freezing behavior）と解釈できる。認知症やパーキンソン病では、新規の状況に直面した際、必要な行動に踏み出せなくなる状態があるが、動物のすくみ行動は、これに類似したものである⁹⁾。重度鉄欠乏によって、脳各部位における鉄濃度の有意な低下に加え、マンガン濃度の上昇が見られた。特に、大脳皮質や小脳では、鉄欠乏によって飼料中マンガンレベル依存性のマンガン濃度の上昇がさらに増強された。また、鉄欠乏によるルビジウム濃度の上昇も、脳の部位を問わず認められた。また、広範なカテコラミン系やセロトニン系の異常が、鉄欠乏によって認められた。

このように、鉄欠乏に、認知症類似の行動異常と脳でのマンガン蓄積、神経伝達物質の代謝の異常を伴うことが明らかとなった。以上の結果から、鉄の補充と同時にマンガン過剰を避けることによって、脳の老化や変性を予防できる可能性が示された。

< 引用文献 >

- 1) 木村 英紀、加藤 丈夫、パーキンソン病の疫学、総合臨牀、59 巻、2010、2371 - 2376
- 2) Y. Miyake, K. Tanaka, W. Fukushima, S. Sasaki, C. Kiyohara, Y. Tsuboi, T. Yamada, T. Oeda, T. Miki, N. Kawamura, N. Sakae, H. Fukuyama, Y. Hirota, M. Nagai, Dietary intake of metals and risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan, J. Neurol. Sci. 306 (1-2), 2011, 98-102
- 3) T. Sawada, A. Konomi, K. Yokoi, Iron deficiency without anemia is associated with anger and fatigue in young Japanese women, Biol. Trace Elem. Res. 159 (1-3), 2014, 22-31
- 4) K. Yokoi, Estimation of iron requirements for women by numerical analysis of population-based data from the national health and nutrition surveys of Japan 2003-2007, J. Trace Elem. Med. Biol. 28 (4), 2014, 453-458
- 5) 川村 麟也、生田 秀雄、福住 定吉、山田 良三 椿 精一、兒玉 威、倉田 重久、井戸水ノ飲用二依ル「マンガ」中毒例ノ集團的發生ニ就テ、細菌學雜誌、537 号、1940、687-711
- 6) M. Yamada, K. Asakura, S. Sasaki, N. Hirota, A. Notsu, H. Todoriki, A. Miura, M. Fukui, C. Date, Estimation of intakes of copper, zinc, and manganese in Japanese adults using 16-day semi-weighted

- diet records, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 23 (3), 2014, 465-72
- 7) K. Yokoi, M. Kimura, Y. Itokawa, Effect of dietary iron deficiency on mineral levels in tissues of rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 29 (3), 1991, 257-65
 - 8) 横井 克彦, 鉄欠乏と老化の関連、*Biomed. Res. Trace Elements* 20(1)、2009、30-38
 - 9) J. E. Hanson, W. J. Meilandt, A. Gogineni, P. Reynen, J. Herrington, R. M. Weimer, K. Scearce-Levie, Q. Zhou, Chronic glun2b antagonism disrupts behavior in wild-type mice without protecting against synapse loss or memory impairment in Alzheimer's disease mouse models, *J. Neurosci.* 34 (24), 2014, 8277-8288

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsuhiko Yokoi	4. 巻 188
2. 論文標題 Investigating the Essentiality and Requirements of Iron from the Ancient to the Present	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 140-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12011-018-1584-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 横井克彦	4. 巻 39
2. 論文標題 生体機能に必要な微量元素	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 消化と吸収	6. 最初と最後の頁 166-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 横井克彦、岩田理佳、許斐亜紀
2. 発表標題 重度鉄欠乏ラットにおける脂質異常 - ペアードフィーディングによる検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井克彦、許斐亜紀、岡崎有紀、貞方怜那、中村茉理
2. 発表標題 鉄欠乏およびマンガン摂取がラットの脳中マンガン濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第36回日本微量栄養素学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi
2. 発表標題 Severe iron deficiency and manganese concentrations in the rat cerebrum
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井克彦、許斐亜紀
2. 発表標題 鉄欠乏ラットにおける脳内マンガンレベル
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井克彦、許斐亜紀、岡崎有紀、貞方怜那、中村茉理
2. 発表標題 鉄欠乏およびマンガン摂取がラットの行動に与える影響
3. 学会等名 第35回日本微量栄養素学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuhiko Yokoi
2. 発表標題 Improved Numerical Analysis of Population-Based Data for Estimating Iron Requirements in Menstruating Women
3. 学会等名 Symposium Parallel Session 3: Metals in Nutrition, The 13th Conference of International Society For Trace Element Research In Humans (ISTERH), Prama Sanur Hotel, Bali, Indonesia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi
2. 発表標題 Dietary iron levels and manganese concentrations in the rat brain regions
3. 学会等名 Poster session: The 13th Conference of International Society For Trace Element Research In Humans (ISTERH), Prama Sanur Hotel, Bali, Indonesia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井克彦、志鎌美紀、海藤美希、許斐亜紀
2. 発表標題 軽度鉄欠乏ラットで見られたオープンフィールドにおける行動異常
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井克彦、許斐亜紀、岡崎有紀、貞方怜那、中村茉理
2. 発表標題 鉄欠乏およびマンガン摂取がラットの脳内各種ミネラル濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第37回日本微量栄養素学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	許斐 亜紀	安田女子大学・家政学部・講師	
	(KONOMI Aki)		
	(40529658)	(35408)	