

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00939

研究課題名(和文)微量元素の組み合わせ過剰摂取と高脂肪食が老人性神経障害に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of excessive combined intake of trace elements and westernized high-fat diet on senile dementia

研究代表者

吉田 香 (Yoshida, Kaoru)

同志社女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：10336787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微量元素の過剰摂取により老人性神経障害が起こることが指摘されているが、その詳細は不明である。先行研究により加齢マウスへのZnの投与は長期記憶と視覚的認知記憶を用量依存的に低下させることを示した。本研究では、Znと他の微量元素の組み合わせ投与を加齢マウスにし、組み合わせ投与が記憶能に与える影響を調べた。その結果、CuはZnによる記憶能の低下を増強するが、Mn、Feは逆に記憶能の低下を抑えることが示された。Znとの組み合わせ投与で毒性増強が認められたCuについて、高脂肪食摂取によるZnとCuの組み合わせ投与の影響を調べた結果、脂肪食によって学習・記憶能の低下が発現しなくなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微量元素の過剰摂取に関する研究報告は少なく、報告されている研究でも単独・短期間投与によるものが多い。しかし、実際の健康食品摂取では数種類の微量元素を長期間に渡り過剰摂取する可能性があるため、組み合わせ長期間投与による影響について調べる必要がある。また、近年の欧米化された食生活により老人性認知症が増えている可能性があるが、高脂肪食摂取下の微量元素過剰摂取の影響を調べた研究もほとんどない。ヒトにおいて微量元素摂取量を調べる有効なモニタリング指標についての研究もほとんどない。本研究ではこれらの研究を行い、健康食品摂取の正しい安全性評価及びリスクマネジメントに重要なデータを提供できたと考える。

研究成果の概要(英文)： Our previous studies showed that the possibilities that chronic exposure to Zn dose-dependently inhibited long-term memory and object recognition memory by a step-through passive avoidance task (PA) and a novel object recognition test (NOR). In this study we investigated the effect of Zn administration combined with Mn, Cu or Fe on learning and memory in aged mice. Furthermore, we investigated whether high-fat diet (HFD) influences learning and memory impairment caused by chronic administration of Zn combined with the trace elements in aged mice. The results of PA, and NOR test showed that the administration of Zn combined with Cu enhanced the impairment in learning and memory, but the administration of Zn combined with Mn or Fe no longer showed the impairment in learning and memory. HFD feeding might result in decrease the impairment in learning and memory of mice caused by the administration of Zn combined with Cu.

研究分野：食品安全性学 毒性学 公衆衛生学

キーワード：微量元素 動物行動試験 過剰摂取 学習・記憶障害 老化 脳神経障害 モニタリング マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では人口の高齢化が進み、これに伴い老化関連疾患のひとつである認知症が急増している。また、食生活の多様化に伴い、欠食によるビタミンやミネラルなどの欠乏症が起こる一方、健康志向を反映して種々の健康食品を摂取することにより微量元素の過剰症が起こる可能性も指摘されている。老年性認知症には、脳梗塞や脳出血により脳神経が死滅して起こる脳血管型認知症(VD)、アミロイドタンパク質(A β)やタウタンパクの蓄積を伴うアルツハイマー型認知症(AD)などがある。なかでもADが最も多く発症しているが、その原因は未だ不明である。近年、糖尿病や高血圧のヒトはADの発症率が高いこと、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸を多く含む食事をするヒトはADの発症率が高いことが示されており、食生活と老人性神経変性疾患の関連性が注目されている。また、金属のホメオスタシスの異常(過剰及び欠乏)が脳神経変性疾患の発症と関与していることも注目されている。ZnとCuがA β と直接結合してA β を脳内に沈着させ、老人斑が形成されること、ADで見られる老人斑にはZn、Cu、Feイオンが共存することが報告されている。金属イオンにより起こる酸化ストレスにより脳神経変性がおこることも示されている。しかし、未だ詳細は明らかになっていない。さらに、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸摂取量の多いヒト、血中コレステロール値が高いヒトがCuを多く摂取すると加齢に伴う認知機能の低下が加速されること、Cu及びMnはZnによる神経細胞死を増強するとの報告もあり、微量元素の影響は複雑化してきている。

微量元素の神経毒性に関する研究報告は少なく、報告されている研究でも単独・短期間投与による影響を調べているだけのものが多い。しかし、実際の健康食品摂取では数種類の微量元素を同時に長期間に渡り過剰摂取している可能性があり、組合せ長期間投与による影響について調べる必要がある。また、近年、欧米化された食生活により老人性認知症が増えている可能性が指摘されているが、高脂肪食摂取下の微量元素過剰摂取の影響を動物行動試験や脳神経変性、脳内代謝の面から調べた研究はほとんどない。

ヒトの微量元素摂取量のモニタリング指標として尿中排泄量は、微量元素摂取量を科学的、客観的に把握できる手法となる可能性があるが、報告例は少ない。微量元素の腸管からの吸収には同時に摂取される食事成分やサプリメント成分が大きく影響を与えることが知られているが、これを科学的に証明した研究もほとんどない。

2. 研究の目的

近年の健康志向によりサプリメントなどの健康食品を常用する人が増えており、食品のみから摂る場合には注意する必要がなかった微量元素の過剰摂取が起こる可能性がある。この微量元素の過剰摂取により老人性神経障害が起こる可能性も指摘されている。また、微量元素の組合せ摂取や高コレステロール食下での微量元素摂取が老人性認知症の進行を促進するとの報告があるが、詳細は不明である。本研究では、認知症との関連が注目されているZn、Cu、Mn、Feの組合せ摂取や高脂肪食が脳神経障害に与える影響を加齢マウスに長期間投与後に行った行動試験などにより検証する。さらに、ヒトにおける微量元素摂取量のモニタリング指標としての尿中排泄量の有効性を共存成分による腸管吸収の違いから調べる。

3. 研究の方法

(1) 微量元素との組み合わせ投与試験

加齢マウスへのZnとMn、ZnとCuの組み合わせ投与試験

26週齢雌性マウスに200ppm Zn単独、200ppm Znと200ppm Mn、200ppm Znと100ppm Cuの組み合わせ30週間飲水投与をし、対照群(水投与群)との比較を新奇物質探索試験(ORT)と恐怖条件付け試験(FC)により行った。ORTは、マウスが新奇性を好むという習性を利用したもので、視覚認知記憶の指標である。まず、同じオブジェクト2つを置いた装置内にマウスを自由に探索させ(訓練試行)、オブジェクトに近づく時間を測定し、総探索時間に対するそれぞれのオブジェクトへの探索時間の割合(%)を求めた。訓練の3時間後、片方を新奇オブジェクトBに変え、装置内を再度自由に探索させ(保持試行)、元のオブジェクトAと新奇オブジェクトBに近づく時間をそれぞれ測定し、総探索時間に対するそれぞれのオブジェクトへの探索時間の割合(%)を求めた。訓練試行で2つの同じオブジェクトに均等に近づかないマウスが多かったため、保持試行で新奇オブジェクトを置く側のオブジェクトに焦点を当てた指標DI値を用いて比較することにした。DI値は保持試行で新奇オブジェクトBに近づいた時間の総探索時間に対する割合から訓練試行で同じ位置のオブジェクトAに近づいた時間の総探索時間に対する割合を差し引いて求めた。DI値が大きいほど新規オブジェクトを記憶していたことになる。FCは、電気ショックを与えた翌日、同じケージに入れ、その記憶があるとケージに入っただけでマウスがフリーズするため、そのフリーズ時間を指標として恐怖記憶能を調べる試験である。電気ショックを与えるときにブザー音を同時に鳴らし、翌日、音を鳴らさずにマウスを同じケージに入れ、電気ショックを覚えているかを調べる恐怖文脈試(Test1)と、さらにその翌日、ケージに入れる時に音を鳴らし、音と電気ショックを結びつけて記憶しているかを調べる恐怖音条件付け試験(Test2)を行った。

行動実験終了後、海馬よりRNAを抽出し、マイクロアレイにより海馬における遺伝子発現に投与群間で違いがあったかを解析した。

加齢マウスへのZnとFeの組み合わせ投与試験

前年度行った 26 週齢雌性マウスへの 200ppm Zn、100ppm Fe 及び 200ppm Zn と 100ppm Fe の組み合わせ投与で記憶能の低下が認められなかったため、投与量を増やし、300ppm Zn 単独、300ppm Fe 単独及び 300ppm Zn と 300ppm Fe の組み合わせ飲水投与を行った。しかし、投与中に死亡するマウスが多かったため、投与 17 週目以降 Fe の投与量を 200ppm に減らし、300ppm Zn、200ppm Fe 及び 300ppm Zn と 200ppm Fe の組み合わせ飲水投与に変更した。変更後もマウスが死亡したため、投与期間を当初予定の 30 週間投与から 23 週間投与に短縮し、短期記憶の指標となる Y 字試験、ORT 及び長期間投与により長期記憶の指標となるステップスルー型受動回避試験 (PA) 行動試験を行った。PA は、マウスが暗い場所を好むことを利用したもので、明室に入れたマウスが暗室に移動した時間を記憶の指標としている。訓練試行では、暗室にマウスが移動すると扉を閉め、電気刺激を与える。訓練試行 1 日後、再び明室に入れ、経験した電気刺激に対して回避行動とるかを記憶の指標とし、暗室への移動時間 (反応潜時) を最大 300 秒まで測定した。

行動実験終了後、脳組織の Iba1 を用いた免疫組織化学染色により脳神経変性疾患の有無を調べた。

(2) 高脂肪食摂取の加齢マウスへの Zn と Cu の組み合わせ投与試験

26 週齢雌性マウスを通常食 [CE-2 (fat 4.6%)] を与える群 (通常食群) と高脂肪食 [Quick Fat (fat 14.4%)] を与える群 (高脂肪食群) に分け、通常食群、高脂肪食群それぞれに水投与と 200ppm Zn と 100ppm Cu の組み合わせ投与を行い、10 週間後、21 週間後には Y 字試験を、30 週間後には Y 字試験、ORT 及び PA 試験を行った。

(3) ミネラル及び微量元素摂取量のモニタリング指標としての 1 日尿中排泄量の有効性

近畿地方の K 大学と M 大学の栄養系学科に在籍する 21-22 歳の女子学生 16 名を対象として行った。被験者に P が含まれている加工食品を多く使用した「加工食」、加工食品を使用していない「手作り食」、フィチン酸や食物繊維を含む大豆を多く使用した「大豆食」、大豆食の大豆をすべて豆腐に置き換えた「豆腐食」、食酢を使用した「酢あり食」、食酢を使用していない「酢なし食」の 6 つの食事を提供し、1 日尿を採取した。食物及び尿中の P はモリブデンブルー吸光度法、Ca、Mg、Zn は原子吸光度法により測定し、尿中排泄率を求めることにより、P 過剰摂取によるミネラル吸収阻害、食物繊維・フィチン酸によるミネラル吸収阻害、食酢のミネラル吸収促進効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 加齢マウスへの微量元素の組み合わせ投与が学習・記憶障害に与える影響

先行研究で加齢マウスへの Zn 長期間投与が用量依存的に学習・記憶能障害が起こることが明らかになった。そこで Zn を中心に組み合わせ投与について調べることとし、Zn と Mn 及び Zn と Cu の組み合わせ投与が学習・記憶能に与える影響を調べた。その結果、視覚的認知記憶の指標となる ORT では、Zn 単独投与で起こった記憶能の低下が Mn との組み合わせ投与では認められず、対照群とほぼ同じであった。Cu との組み合わせ投与では、Zn 単独投与に比べて記憶能の低下を示した (Fig. 1)。FC 試験の結果、Test1 では対照群、Zn 単独投与群、Zn と Mn の組み合わせ投与群、Zn と Cu との組み合わせ投与群でフリーズ時間は変わらなかった。一方、Test2 では、対照群と Zn 単独投与群のフリーズ時間が変わらなかったが、Zn と Mn の組み合わせ投与群で若干長くなり、Zn と Cu との組み合わせ投与群では若干短くなっていた。この結果より、

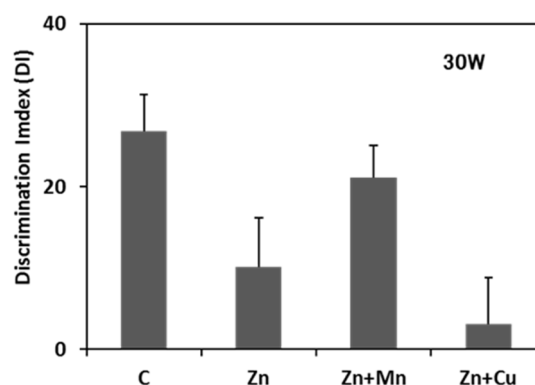


Fig. 1 Effects of 30 week-administration of Zn, Zn+Mn and Zn+Cu to aged female mice on DI in an object recognition test. phase/total exploration time) $\times 100$. Discrimination index (DI) = (novel object position exploration time during test phase/total exploration time) - (novel object position exploration time during training phase/total exploration time) $\times 100$.

Zn と Cu の組み合わせ投与で記憶能の低下が起こる可能性があることが示唆された、ただし、本実験では、怯えがひどいマウスの尻尾が震えたり、恐怖でケージから飛び出ようとしたりしたため、マウスの怯えとフリーズ時間が連動していないようであった。電気ショックが大きすぎたのかもしれない。行動実験終了後、海馬より RNA を抽出し、マイクロアレイにより海馬における遺伝子発現に投与群間で違いがあったかを解析した。その結果、対照群に比べ、Zn 投与群ではドーパミン D2 受容体 (Drd2) 遺伝子の発現が上昇していたが、Zn と Mn、Zn と Cu の組み合わせ投与群では対照群及び Zn 投与群と比べて Drd2 遺伝子の発現の低下が認められた。先行研究において Zn 投与により遺伝子発現が上昇していたトランスサイレチン (Ttr) については、対照群に比べて Zn 投与群と Zn と Cu 組み合わせ投与群では上昇していたが、Zn と Mn 組み合わせ投与群では減少していた。また、Zn 投与群に比べて Zn と Mn 組み合わせ投与群は減少して

いたが、Zn と Cu の組み合わせ投与群ではわずかに上昇していた。以上の結果より Ttr の遺伝子発現の上昇は ORT の記憶能の低下と関係がある可能性が示唆された。

次に、Zn と Fe の組み合わせ投与が学習・記憶障害に与える影響を調べるため、加齢マウスに 300ppm Zn 単独、300ppm Fe 単独及び 300ppm Zn と 300ppm Fe の組み合わせ飲水投与を 16 週間、その後 Fe 用量を減らし 300ppm Zn 単独、200ppm Fe 単独及び 300ppm Zn と 200ppm Fe の組み合わせ飲水投与を 7 週間(合計 23 週間投与)行ったのち、行動試験を行った。その結果、ORT では、対照群に比べて Fe 単独群では Zn と同程度の記憶能の低下が認められたが、Zn と Fe の組み合わせ投与群では記憶能の低下は認められなかった (Fig.2)。Y 字試験では、群間で差が認められなかった。PA では、対照群に比べて Zn 投与群は記憶能が低下し、Fe 投与群ではさらに記憶能が低下していた。一方、Zn と Fe の組み合わせ投与群では、Zn と同程度の記憶能の低下になっていた (Fig.3)。脳組織の Iba1 を用いた免疫組織化学染色の結果、群間で有意な差は認められなかった。

以上の結果より Zn との組み合わせ投与で Cu は認知・行動毒性を増強するが、Mn、Fe は毒性発現を抑えることが示唆された。

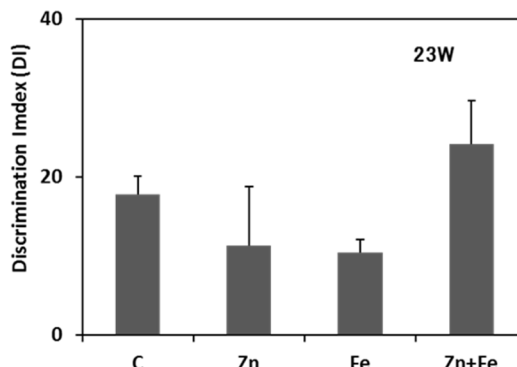


Fig.2 Effects of 23-week administration of Zn, Fe and Zn+Fe to aged female mice on DI in an object recognition test.

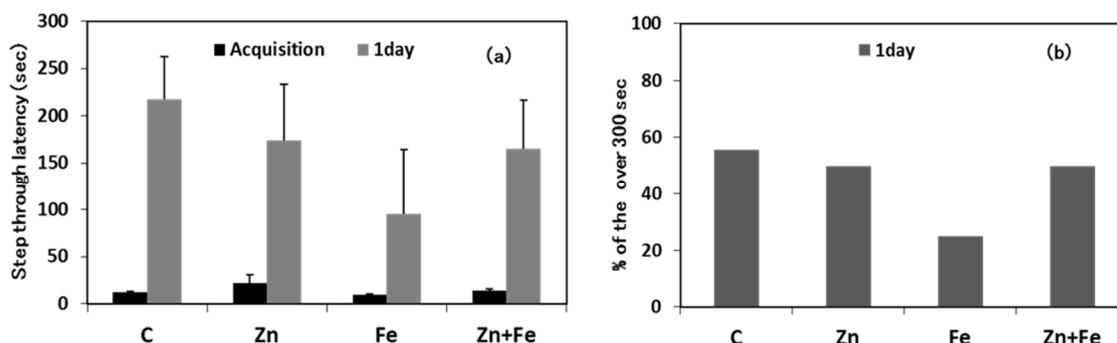


Fig.3 Effects of 31-week administration of Zn, Fe and Zn+Fe to aged female mice on step through latency (a) and on the impaired acquisition response (% of the over 300 sec) (b), 1 day later in a passive avoidance test.

(2) 高脂肪食摂取の加齢マウスへの Zn と Cu の組み合わせ投与が学習・記憶障害に与える影響

組み合わせ投与で毒性が認められた Cu について、高脂肪食摂取による Zn と Cu の組み合わせ投与の影響を調べた。その結果、通常食の Zn と Cu の組み合わせ投与では、ORT により記憶能の低下が認められたが、高脂肪食を摂取した群では、Zn と Cu の組み合わせ投与でも記憶能の低下が認められなかった (Fig.4)。Y 字テストを投与 10 週目と 30 週目に行い、記憶能の低下を比較した結果、通常食の Zn と Cu の組み合わせ投与により記憶能の低下が認められたが、高脂肪食を摂取した Zn と Cu の組み合わせ投与群では記憶能の低下が認められなかった。以上の結果より、脂肪食によって Zn と Cu の組み合わせ投与による認知・行動毒性が発現しなくなることが示された。なお、PA でも同様の傾向が見られた。

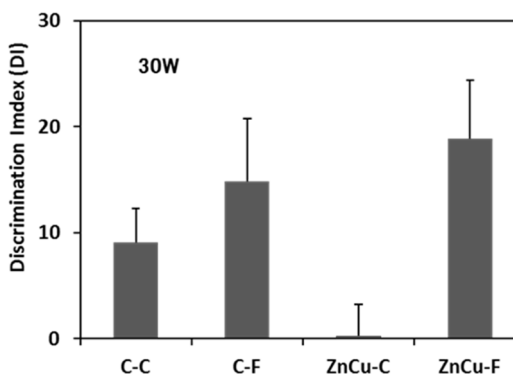


Fig.4 Effects of a high-fat diet on DI in an object recognition test after 30-week administration of Zn+Cu to aged female mice.

(3) ミネラル及び微量元素摂取量のモニタリング指標としての 1 日尿中排泄量の有効性

加工食品で構成された食事では、手作りの食事に比べて Ca、Mg の尿中排泄率の低下が見られた。さらに食事の P 含有量が多いほど、ミネラルの尿中排泄率が低くなる傾向が示された。フィチン酸・食物繊維が多い大豆中心の食事では、豆腐中心の食事と比較して Mg、Zn の尿中排泄率の低下が見られた。一方、食酢を使用した食事と食酢を使用していない食事の尿中排泄率

の比較では差が認められなかった。今回の食酢の使用量、1日間の食酢の使用では吸収促進効果がなかったと考えられる。以上の結果より、PはCa、Mgの吸収を阻害し、フィチン酸・食物繊維はMg、Znの吸収を阻害することが示唆された。食事時のミネラル阻害因子により尿中排泄率に低下が見られたことから、モニタリング指標としての尿中排泄量の有効性が確認できた。

<引用文献>

Morris MC, Evans DA, Bienias JL et al. (2003) Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 60: 194-200.

Dong J, Atwood CS et al. (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry.* 42: 2768-2773.

Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ et al. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158: 47-52.

Barnham KJ, Bush AI. (2008) Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol.* 12: 222-228.

Morris MC, Evans DA, Tangney CC et al. (2006), Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol.* 63: 1085-1088.

Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H (2019) Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. *J. Toxoc. Sci.* 44: 681-691

吉田 香, 鴻野 みさき, 川田 希, 古和栞奈, 岡崎明香里, 古家由貴, 菅野美波, 北村真理 (2019) ミネラル摂取量のモニタリング指標としての1日尿中排泄量の有効性 食品に含まれる吸収促進・阻害因子が若年女性のカルシウム, マグネシウム, 亜鉛の1日尿中排泄率に及ぼす影響, *Trace Nutrients Res.* 36: 87-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 吉田 香, 池田佳菜, 岩崎祐佳, 片神美咲, 鴻野みさき	4. 巻 34
2. 論文標題 収穫時期、地域の違いがニンニクとショウガの無機元素量に及ぼす影響 - 無機元素分析による産地判別への応用 -	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trace Nutrients Research	6. 最初と最後の頁 18-23
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 吉田 香, 魏 民, 藤岡 正喜, 寺本 勲	4. 巻 30
2. 論文標題 加齢マウスへの亜鉛の長期間過剰投与による学習・記憶障害について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research on Trace Elements	6. 最初と最後の頁 72
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 無
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 Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H	4. 巻 44
2. 論文標題 Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 681-691
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 吉田 香, 鴻野 みさき, 川田 希, 古和菜奈, 岡崎明香里, 古家由貴, 菅野美波, 北村真理	4. 巻 36
2. 論文標題 ミネラル摂取量のモニタリング指標としての1日尿中排泄量の有効性 食品に含まれる吸収促進・阻害因子が若年女性のカルシウム, マグネシウム, 亜鉛の1日尿中排泄率に及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trace Nutrients Research	6. 最初と最後の頁 87-94
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 香, 鴻野みさき, 南美帆, 岡本真世, 大前弥生, 井上はるか, 石橋怜奈, 美延賀永子, 宮下 葵, 北村真理
2. 発表標題 食品に含まれる吸収促進・阻害因子がミネラルの1日尿中排泄率に及ぼす影響 ミネラル摂取量のモニタリング指標としての1日尿中排泄量の有効性
3. 学会等名 第35回 日本微量栄養学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴻野みさき, 池田佳菜, 岩崎祐佳, 片神美咲, 吉田 香
2. 発表標題 収穫時期、地域の違いがニンニクとショウガの無機元素量に及ぼす影響 - 無機元素分析による産地判別への応用 -
3. 学会等名 第34回 日本微量栄養学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田 香, 鴻野みさき, 川田 希, 古和栞奈, 岡崎明香里, 古家由貴, 菅野美波, 北村真理
2. 発表標題 ミネラル摂取量のモニタリング指標としての1日尿中排泄量の有効性
3. 学会等名 第36回 日本微量栄養学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 香, 魏 民, 藤岡 正喜, 寺本 勲
2. 発表標題 加齢マウスへの亜鉛の長期間過剰投与による学習・記憶障害について
3. 学会等名 第30回 日本微量元素学会
4. 発表年 2019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	魏 民 (Gi Min) (70336783)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	北村 真理 (Kitamura Mari) (40369666)	武庫川女子大学・生活環境学部・准教授 (34517)	
研究分担者	寺本 勲(木俣勲) (Teramoto Isao) (20153174)	大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員 (24402)	
研究協力者	吉田 泉 (Yoshida Izumi)	一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所	