

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05426

研究課題名(和文) エクスポソーム暴露による酸化ストレスを指標とした生体への影響と予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of biological effects and their prevention methods against oxidative stress induced by exposome exposure

研究代表者

南山 幸子 (Minamiyama, Yukiko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00362989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食品添加物(エクスポソーム)の暴露が特に不妊や認知症と関連するかを明らかにするために行った。これまで単体で影響のあったいくつかの食品添加物を最大無毒性量(NOEL)の1/10000で混合して与え、2週間および8週間で精巣および脳で酸化ストレスが惹起され、抗酸化物質のトコフェロール投与はそれらを予防できることを検証した。精子では2週間より活性酸素産生が上昇し、曲線運動などの受精に重要な運動機能の一部も有意に低下した。精巣及び海馬においても酸化ストレスが惹起された。また、これらの変化に関してトコフェロールが改善した。腸内フローラ(菌種数、構成菌種)は、大きな変化はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品衛生法で認可されている一日摂取許容量(ADI)の1/100の添加物摂取でも精子や海馬に酸化ストレスを与え、それは単独投与に比べて混合投与で増強することが判明した。現在、不妊や若年性認知症が増加しているが、加工食品摂取などの生活習慣が一因の可能性が示唆された。これらの現象は抗酸化物質の摂取によって予防できることも判明したので、添加物混合加工食品を摂取する際は抗酸化物質も一緒に摂ることが重要かもしれない。また、加工食品に偏らず、地産地消の推進も検討すべきと考える。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to determine whether exposure to food additives (exposomes) is associated with infertility and dementia, in particular. We tested the hypothesis that a mixture of several food additives, which have been shown to have effects by themselves, at 1/10,000 of the NOEL, induces oxidative stress in the testes and brain at 2 and 8 weeks, and that administration of the antioxidant, alpha-tocopherol can prevent these stresses. In spermatozoa, ROS production was increased from 2 weeks, and some motor functions important for fertilization, such as curvilinear motility, were also significantly decreased. Oxidative stress was also induced in testes and hippocampus. Tocopherol also ameliorated these changes. Intestinal flora (number and composition of bacteria) did not significantly change.

研究分野：食環境安全性学

キーワード：食品添加物 酸化ストレス 不妊 認知症 加工食品 エクスポソーム

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症、不妊、アレルギー疾患が毎年急増していることから、WHOはその対策が急務であるとしている。それらの疾患の増加は環境因子の変化が一因である。その背景には、加速度的なコンビニ普及による食品添加物摂取や輸入果実、シャインマスカットなどに塗布する防かび剤利用の増加も一因である。近年、人工甘味料(Nature 514:2014)、乳化剤(Nature 519:2015)などが腸内フローラに影響して、糖尿病などの生活習慣病のリスクを高めることが報告された。また、人工甘味料入り飲料を習慣的に摂取しているヒトの虚血性脳疾患や認知症のリスクが約3倍である(Stroke. 2017;48:1139-1146)など、構造の全く異なるこれらの化学物質全体が生体へ影響を及ぼす原因物質として**エクスポソーム**という概念が提唱されている。

食環境の変化による食品添加物や農薬などを含む化学物質の**エクスポソーム**が認知症、不妊、アレルギー疾患急増の一因と考えられるが、明確な機序は不明である。このように、人類にとって化学物質は種々の健康被害に関連することが示唆される。特に、注意欠陥多動性障害(ADHD)、不妊、アレルギー、認知症が増加している背景からも、**内分泌(精子)-脳神経系(海馬)-免疫系への関連**が考えられる。本研究では**エクスポソームとしての食品添加物による精子-脳に関連する共通の作用として、酸化ストレスを中心に検討し、病態早期診断マーカーとなる酸化修飾タンパク質の探索およびリスク予防の方策を提言したいと考えた。**

2. 研究の目的

本申請は**エクスポソームの内分泌系(精子)-脳神経系への関連動態と機序を明らかにし、それを予防することを目的とする。**そこで、暴露されると考えられる食品添加物混合の清掃関連臓器および海馬への影響を検討した。さらに、血液・尿で共通の特異的酸化修飾タンパクを発見できれば、不妊や認知症の早期診断マーカーの開発に繋がる。

3. 研究の方法

ラットに1日摂取許容量の100分の1の食品添加物5種類(アセスルファムカリウム、オルトフェニルフェノール、アスパルテーム、ピフェニル、ビスフェノールA; Mix)を混合投与し精子形成細胞群および海馬への影響を検討した。さらに、脂溶性抗酸化物質である α -Tocopherol (Toc)の予防効果についても追究した。

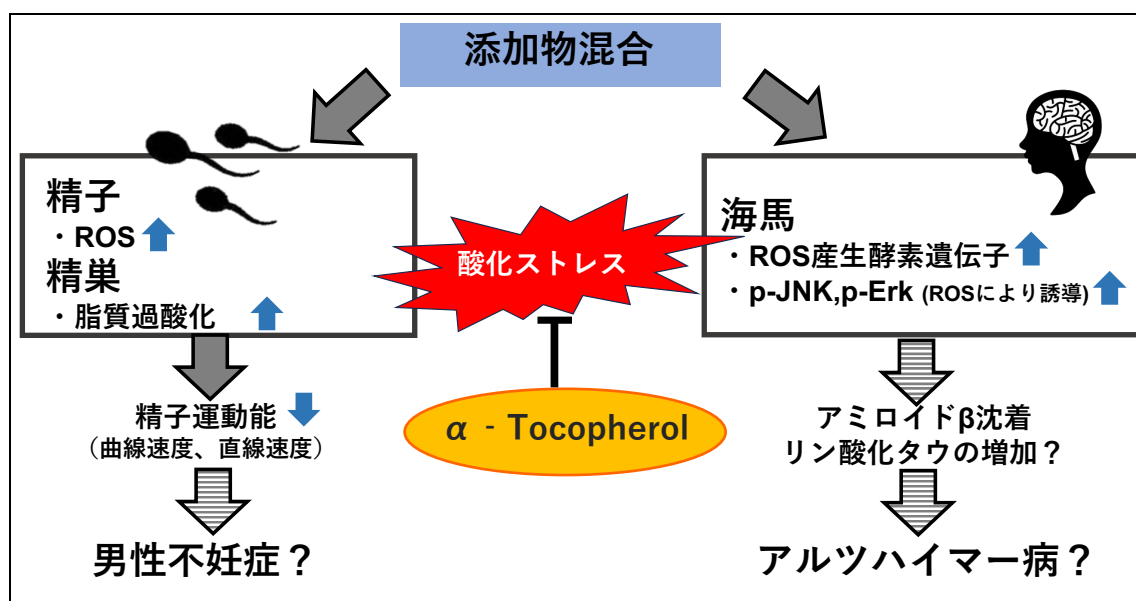
雄性Wistar系ラットに食品添加物Mixを2週間および8週間自由飲水させた。また、添加物投与1週間前からToc(100 mg/kg BW/day)を混餌飼料として与えた。解剖時に精子を取り出し、精子からの活性酸素種(ROS)産生量を化学発光法で、精子運動機能を精子機能解析装置 SMAS (Sperm Motility Analysis System)により解析した。また、精巣での脂質過酸化修飾タンパク4-Hydroxynonenal (4-HNE)の発現量をウエスタンブロット法で、局在を蛍光免疫染色法にて評価した。また、海馬でTaqMan Arrayによる酸化ストレス関連遺伝子のスクリーニングに行い、上昇したと考えられるROSを産生するNADPH oxidase4 (Nox4)およびDual oxidase 1 (Duox1)の遺伝子発現をRT-qPCR法で測定した。さらに、ROSにより増加するp-Erkおよびp-JNKタンパク質発現やアルツハイマー関連タンパク質のアミロイド β 、タウタンパクの異常リン酸化(Ser396)などをウエスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

Mix8週間投与により精子からのROS産生量は増加し、精子運動機能(曲線速度、直線速度)は低下した。精子産生臓器である精巣では4-HNE発現が増加し、精子形成の後期ステージである精

細管の精子細胞にて 4-HNE が増加していた。このことから、Mix により精子形成段階から精子細胞に酸化ストレスが惹起され、精子の ROS 産生過剰および機能低下に繋がったことが示唆された。これらの変化は食品添加物単独投与よりも混合投与の方が顕著である可能性が示唆される結果を得た。さらに、海馬において Nox4 および Duox1 遺伝子発現が Mix 群 2 週間もしくは 8 週間投与で増加した。そして、ROS により増加する p-Erk および p-JNK が Mix 群 8 週間により増加したことから海馬においても ROS が過剰産生されていると考えられる。アミロイドβおよびタウタンパク質のリン酸化は変化しなかった。しかしながら、一つのリン酸化部位しか検討していないため、その他のリン酸化部位の検討を行う必要があると考えられた。また、Toc 併用はこれら精子形成細胞群および海馬の酸化ストレスを予防した。

【結論】食品添加物投与により、精子形成細胞群および海馬で酸化ストレスが惹起されていることが示唆され、精子では過剰な ROS による精子運動機能を低下させた。また、α-Tocopherol がこれらを予防することから、抗酸化物質の摂取が食品添加物による酸化ストレス障害を予防するために重要であると考えられる。



【今後の展望】

今後は、ヒトにおける評価を実施する予定であり、まずは男性不妊患者についての検討を行う準備中である。

【参考文献】

- [1] Minamiyama Y, *et al.* Glycative Stress. Res. 2 (2020)
- [2] Minamiyama Y, *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 701 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minamiyama Yukiko, Takemura Shigekazu, Ichikawa Hiroshi	4. 巻 701
2. 論文標題 Food additive-induced oxidative stress in rat male reproductive organs and hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108810 ~ 108810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108810	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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古市優衣、竹村茂一、市川 寛、松尾和奏、南山幸子
2. 発表標題 食品添加物による生体への影響と -Tocopherolによる予防効果
3. 学会等名 日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市優衣、竹村茂一、市川 寛、南山幸子
2. 発表標題 食品添加物による生体への影響と -tocopherolの予防効果
3. 学会等名 第32回ビタミンE研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南山幸子
2. 発表標題 生活習慣による酸化ストレス-食習慣を中心に-
3. 学会等名 フリーラジカルスクール2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古市優衣、竹村茂一、市川 寛、南山幸子
2. 発表標題 食品添加物による生体への影響と -tocopherolの予防効果
3. 学会等名 フリーラジカルスクール2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南山幸子
2. 発表標題 食品添加物の正しい知識と生体への影響
3. 学会等名 日本抗加齢医学会 認定委員会講習会(実践/応用編) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南山幸子
2. 発表標題 食品添加物の正しい知識と生体への影響
3. 学会等名 日本抗加齢医学会 認定委員会講習会(指導士編) (招待講演)
4. 発表年 2023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	竹村 茂一 (Takemura Shigekazu) (00322363)	大阪公立大学・大学院医学研究科・特任教授 (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	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	市川 寛 (Ichikawa Hiroshi) (60336732)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関