

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34307

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500978

研究課題名(和文)微量元素の過剰摂取が老人性神経障害に与える影響及び摂取量のモニタリング方法の開発

研究課題名(英文)Effects of excessive intake of trace elements on senile neuropathy and the development of a method for biological monitoring of trace elements

研究代表者

吉田 香(YOSHIDA, KAORU)

京都光華女子大学・健康科学部・教授

研究者番号：10336787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、天然原料サプリメントに老人性神経変性に関与するマンガン(Mn)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、鉄(Fe)が多く含まれているものがあること、サプリメントの摂取状況および意識調査により中高年者で天然原料サプリメントと食事の合わせた摂取により微量元素の過剰摂取の可能性があることを示した。また、Y字型迷路試験、新奇物質探索試験およびステップスルー型受動的回避学習試験により、Mnは長期記憶能に、Znは視覚的認知記憶に影響を与える可能性があることが示唆された。モニタリング指標の開発では、マグネシウム(Mg)、Cuの尿中排泄量が摂取量のモニタリング指標として使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Trace elements, such as zinc (Zn), iron (Fe), copper (Cu) and manganese (Mn) are essential elements but excess amounts of these elements are known to cause many neurodegenerative diseases. Our studies showed that some supplements of botanical or animal origin contained high concentrations of Zn, Fe, Cu and Mn. Our questionnaire survey suggested that the risk of excessive intake of the trace elements is caused by taking food plus botanical or animal origin supplements. We investigated the effects of chronic exposure to Mn, Zn and Cu on animal behavior tests, a step-through passive avoidance task, a Y-maze test and a novel object recognition test, in male or female adult rats. These behavioral tests indicated the possibilities that chronic exposure to Mn inhibited long-term memory and chronic exposure to Zn inhibited object recognition memory.

研究分野：食と環境・食の安全

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：微量元素 サプリメント 脳神経障害 動物行動試験 過剰摂取 マウス モニタリング

### 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化がますます進み、2015年には65歳以上の高齢者人口が3,395万人に達すると見込まれている。こうした社会の高齢化に伴いアルツハイマー病(AD)やパーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症といった高齢者に多い神経変性疾患が増加してきている。一方、近年、サプリメントへの関心が高まり、その市場は年間6千億円以上ともいわれ、消費量は年々増加している。サプリメントの中には、天然原料をもとに作られたサプリメントも多く、それらを濃縮して作られるサプリメントでは、原料となる農作物や魚介類の環境汚染により高濃度の微量元素が含まれている可能性がある。微量元素と脳神経変性疾患の関係を示す研究として、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、鉄(Fe)イオンはADで変化する脳新皮質領域で高レベルであり、しかも加齢とともに脳でのCu、Feイオンレベルが上昇すること、ADでみられる老人斑には、Zn、Cu、Feイオンが共存することがある。Zn、Cu、マンガン(Mn)とADやPDの関連を示唆する報告もある。また、Feを同時に摂取することにより、Mnのわずかな過剰摂取によってもPDの発病率が高まるという疫学研究報告もある。しかし、未だ詳細は明らかになっていない。サプリメント使用者の中には常用者も多く、サプリメントの長年にわたる連続摂取に伴い、微量元素の過剰摂取がおり、神経障害が起こる可能性があるが、この研究に関しては現在ほとんど行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、Mn、Zn、Cuに焦点を当て、これらの微量元素と脳神経変性の関連性を多角的に調べていく。まず、加齢マウスにMn、Zn、Cuを長期間単独および組み合わせ投与し、行動試験により記憶学習能力に与える影響を調べる。また、脳の免疫組織学的検査により神経変性を観察し、神経変性が起こっているかを明らかにする。動物実験と並行して、サプリメント常用者の食生活の調査と市場より購入したサプリメント中に含まれる微量元素量より、過剰摂取可能性を考察する。さらに、尿など簡易に採取できる生体試料中の微量元素量と摂取微量元素量を調べ、有効に使えるモニタリング指標の開発を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) サプリメント中の微量元素量の測定

市場より購入したサプリメントを粉碎し、食品衛生検査指針に準じた方法により試料を乾式灰化後、Cu、Zn、Mn、Fe量を原子吸光度法により測定した。

#### (2) サプリメントの摂取状況調査

10~80歳代の人322名を対象とし、健康への意識と食生活、食に対する考え方や意識の高さ、サプリメント飲用の実態を把握することを目的に、自記式アンケートを行った。

アンケートの集計はMicrosoft Excel 2007を用いて行った。クロス集計表の検定はGraphPad Prismの解析ソフトを用い、<sup>2</sup>検定を行った。P<0.05を有意差ありとした。

#### (3) Mn、ZnおよびCuの長期間投与が高齢雄マウスの記憶能に与える影響

20週令雄マウスにMn(100ppm)、Zn(100ppm)およびCu(100ppm)を56週間、飲料水として自由摂取させたのち、ステップスルー型受動的回避試験により対照群(水を自由摂取)との比較を行った。また、投与58週後、血清を採取し、総タンパク(TP)、アルブミン(Alb)、アルブミングロブリン比(A/G)、チモール混濁試験(TTT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -GPT)、コリンエステラーゼ(ChE)、アミラーゼ(Amy)、クレアチニン(Cre)、尿素窒素(BUN)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)および総ビリルビン(T-Bil)濃度の測定を行い、肝臓、腎臓、膵臓などに毒性が現れていないかを確認した。さらに、脳組織のHE染色および免疫組織化学染色により脳神経変性の有無を調べた。

#### (4) MnおよびZnの長期間投与が高齢雌マウスの学習・記憶能に与える影響

25週令雌マウスにMn(100ppm)、Zn(100ppm)およびMn+Zn(50ppm+50ppm)水溶液を飲料水として50週間自由摂取を、対照群には水を自由摂取させた。30週および50週間後、ビデオトラッキングシステムを用いてY字型迷路試験および新奇物質探索試験により対照群と投与群の比較を行った。また、50週間後、ステップスルー型受動的回避学習試験により投与群と対照群との比較を行った。投与51週間後、血清を採取し、(3)と同様、生化学検査を行った。さらに、脳組織のHE染色および免疫組織化学染色により脳神経変性の有無を調べた。

#### (5) 微量元素摂取量の指標としての尿中排泄量の利用

被験者は女子大学生5名とし、微量元素の日常摂取期間と過剰摂取期間を設け、日常摂取期間1日、過剰摂取期間2日、過剰摂取期間後の2日の連続5日分の1日尿を採取した。過剰摂取期間に摂取する微量元素量は食事摂取基準2010年度版の耐容上限量に近い量もしくは推奨量の4倍以上の量を摂取することとし、合同で調理し、同じものを摂取した。日常摂取期間はそれぞれ自由に摂取し、秤量法により微量元素量を調べた。過剰摂取期間2日分の微量元素量は、秤量法と陰膳法(分析値)により調べ、比較した。食品中の微量元素の定量は食品衛生検査指針に準じた方法で行い、原子吸光度法により測定した。尿中の微量元素量は、硝酸・過酸化水素分解

を行った後、Zn、Mgの測定は原子吸光度計(日立Z-6100型)により、Fe、Cu、Mnの測定は、誘導結合プラズマ質量分析装置(Agilent 7700型 ICP-MS)により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) サプリメント中の微量元素量

天然原料より作られるサプリメントは濃縮して作られるため、原料となる動植物が育つ土壌や水の影響を受けやすい。そのため、メーカーやロットにより微量元素量が大きく異なる可能性がある。ウコン、ビール酵母、クロレラ、ブルーベリー、ローヤルゼリーを市場より数点ずつ購入し、サプリメント中のCu、Zn、Mn、Feの測定を行った。その結果、クロレラでFe、Mn、Cu濃度が高いものが、ビール酵母でZn、Fe、Mn濃度が高いものが、ウコンでCu、Mn濃度が高いものがあった。パッケージ記載の1日摂取目安量をもとに1日摂取量を計算すると、クロレラのCuで1,450 µg、Feで4,710~6,460 µg、ビール酵母のCuで359 µg、Znで4,990~7,930 µg、Mnで1,670 µg、ウコンのCuで386 µg、Mnで1,500 µgと高いものがあった。また、メーカーにより微量元素量が著しく異なることが明らかになった。メーカーやロットによりさらに高濃度の微量元素が含まれる可能性があるため、天然原料由来のサプリメントを摂取する際は充分注意する必要がある。

##### (2) サプリメントの摂取状況調査

10~80歳代の人322名を対象とし、サプリメント摂取状況、サプリメントに対する意識調査、食生活調査などをアンケート方式で行った。サプリメント摂取経験がある人は、女性で60.9%、男性で44.5%であった。特に女性で現在飲用している人は男性の倍以上の36.3%であり、どの年代も男性より多く飲用しており、女性は年代を問わず男性よりサプリメントを飲用していることが明らかになった。特に、50歳代以降の中老年女性では約50%の人が現在飲用していた。また、年代が上がるにつれ、健康に気を使って食事をする人の割合、サプリメントへの興味がある人の割合、飲用者の割合が増えていた。現在サプリメントを摂取している人は、健康に気を使って食事をしている人が多く、現在摂取している人の73.2%が毎日飲用していた。サプリメント飲用理由としては、「健康のため」が最も多く、サプリメントの種類としては、天然原料のものが多かった。この結果から、年代が上がるに伴い、健康意識が向上し、食行動として食事と合わせてサプリメントを毎日飲用する人が増える傾向があると考えられた。また健康のため、飲用サプリメントの種類としては、天然原料を求める人が多いと考えられた。サプリメント現在飲用と健康・食意識の関連性を表1に示した。欠食とサプリメント飲用の間には関連性は認められなかった。サプリメント飲用と食への興味

の関連性を調べてみると、統計学的に有意な差は認められなかったが、食に興味がある人の方がサプリメントを飲用するという傾向が示された。サプリメント飲用と健康に気を使って食事をしている人の関連性では、現在サプリメントを飲用している人の約60%が健康に気を使って食事をしているという結果が得られ、サプリメント飲用と健康に気を使った食事の間には統計学的に関連性が認められた( $p < 0.05$ )。以上の結果より、食事とサプリメントの摂取により、微量元素の過剰摂取が引き起こされる可能性があることが示唆された。

表1 サプリメント現在飲用と健康・食意識の関連性

	現在、サプリメントを飲用しているか		p値
	はい (n = 93)	いいえ (n = 228)	
欠食するか			
ほぼ毎日	7	26	
時々する	23	61	
ほとんどしない	42	90	n.s.
全くしない	20	51	
食に興味はあるか			
はい	83	187	
いいえ	1	16	n.s.
どちらでもない	8	25	
健康に気を使った食事をしているか			
はい	56	101	
いいえ	17	74	$p < 0.05$
どちらでもない	20	52	

<sup>2</sup>検定 n.s.: not significant

##### (3) Mn、ZnおよびCuの長期間投与が高齢雄マウスの記憶能に与える影響

20週令雄マウスにMn(100ppm)、Zn(100ppm)およびCu(100ppm)を飲料水として56週間自由摂取させたのち、ステップスルー型受動的回避試験により対照群との比較を行った。なお、対照群には水を自由摂取させた。ステップスルー型試験は、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。訓練試行後、1、3、5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を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。その結果、MnおよびCu投与、特にMn投与群では、反応潜時が対照群に比べて短くなっていった(Fig. 1(a))。また、300秒を超えて暗室に入らなかったマウスの割合も少なくなっていた(Fig. 1(b))。以上の結果より、対照群に比べてMnおよびCu投与、特にMn投与群では記憶能の低下が起こることが示された。

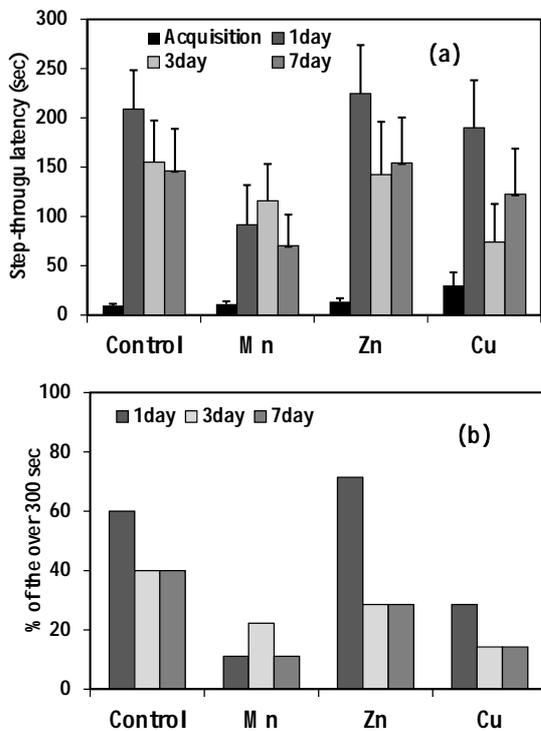


Fig.1 Effects of 56 week-administration of Mn, Zn and Cu to aged male mice on step through latency (a) and on the impaired acquisition response (% of the over 300 sec) (b) 1 day, 3day and 7 day later in a passive avoidance task.

Mn, Zn および Cu の長期間投与により脳神経に変性が起こっていたかを HE 染色および免疫組織化学染色（抗リン酸化タウ蛋白抗体、抗リン酸化 -シヌクレイン抗体）により調べた。その結果、対照群と投与群の間で差は認められなかった。また、Mn, Zn および Cu の投与による肝障害や腎障害が起こっていないことが生化学検査により確認された。

### (3) Zn および Mn の長期間投与が高齢雌マウスの記憶能に与える影響

25 週令雌マウスに Mn(100ppm)、Zn(100ppm) および Mn+Zn (50ppm+50ppm)水溶液を飲料水として自由摂取させたのち、30 および 50 週間後、ビデオトラッキングシステムを用い、Y 字型迷路試験と新奇物質探索試験により対照群との比較を行った。また、投与 50 週間後、ステップスルー型受動的回避学習試験により対照群との比較を行った。

Y 字型迷路試験は、マウスを Y 字型迷路内で探索させた際に認められる自発交替行動を短期記憶として評価するものである。連続して異なるアームに侵入した組み合わせの数より交替行動率(%)を求めて比較した結果、投与 30 週間後、50 週間後とも対照群と投与群の間に差は認められなかった。

新奇物質探索試験は、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 (Fig.2(a))。訓練の一定時間後、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 (Fig.2(b))。Fig.2(b)において新奇物質 B への探索時間の割合が視覚認知記憶の指標となる。投与 30 週間後の Zn 投与群で対照群に比べて新奇オブジェクト B に近づく割合が有意に減少しており、視覚認知機能の有意な低下が認められた。Zn と Mn の組み合わせ投与においても視覚認知機能の低下は認められた。投与 50 週間後においても Zn 投与群および Zn と Mn の組み合わせ投与群で視覚認知機能の低下が認められた。

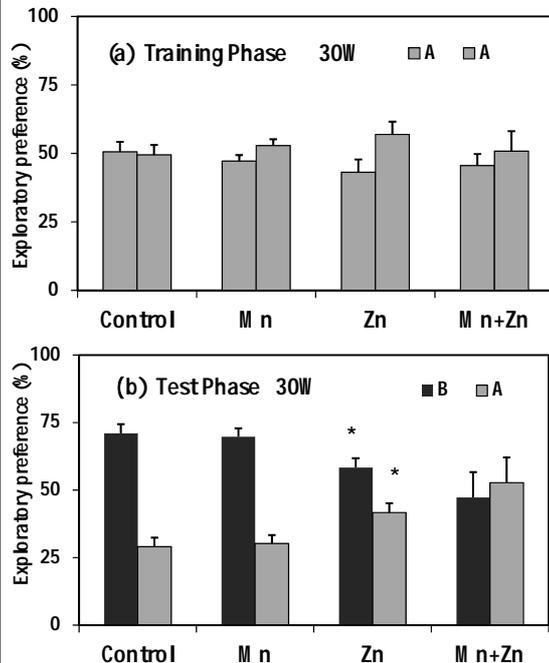


Fig.2 Effects of 30 week-administration of Mn, Zn and Mn+Zn to aged female mice on exploratory preference in training phase (a) and in test phase of novel recognition (b) in a object recognition test. (\* p<0.05)

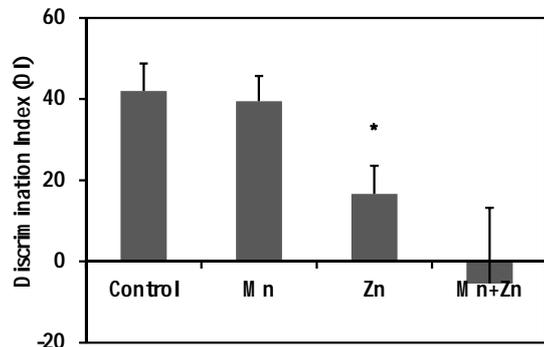


Fig.3 Effects of of Mn, Zn and Mn+Zn to aged female mice on DI after 30 week-administration in a object recognition test. Discrimination index (DI) = (novel object exploration time/total exploration time)-(familial object exploration time/total exploration time) x 100(\* p<0.05)

さらに、DI 値による記憶能の比較を行った (Fig. 3)。DI 値は、 $DI = (\text{新規物質探索時間} / \text{総探索時間} - \text{元の物質探索時間} / \text{総探索時間}) \times 100$  により求められる値で、新奇物質探索試験の記憶能の指標として使われるものである。DI 値が低いと記憶能の低下が起こっていることを示している。30 週間の Zn 投与群で対照群に比べて DI 値が有意に低下しており、視覚認知機能の低下が認められた。Zn と Mn の組み合わせ投与においても DI 値は低下しており、視覚認知機能の低下が認められた。50 週間投与後も Zn 投与および Zn と Mn の組み合わせ投与において記憶能の低下は認められた。

次に、ステップスルー型受動回避試験により、Zn および Mn の 50 週間投与が高齢マウスの長期記憶能へ与える影響を調べた。その結果、対照群に比べ Mn 投与群で訓練試行 1、5 日後の反応潜時が短くなっていた (Fig.4(a))。また、300 秒を超えて暗室に入らなかった割合は Mn、Zn および Mn+Zn 投与群で低くなっていた (Fig.4(b))。以上の結果より、対照群に比べて Mn および Zn 投与、特に Mn 投与群では長期記憶能の低下が起こることが示された。

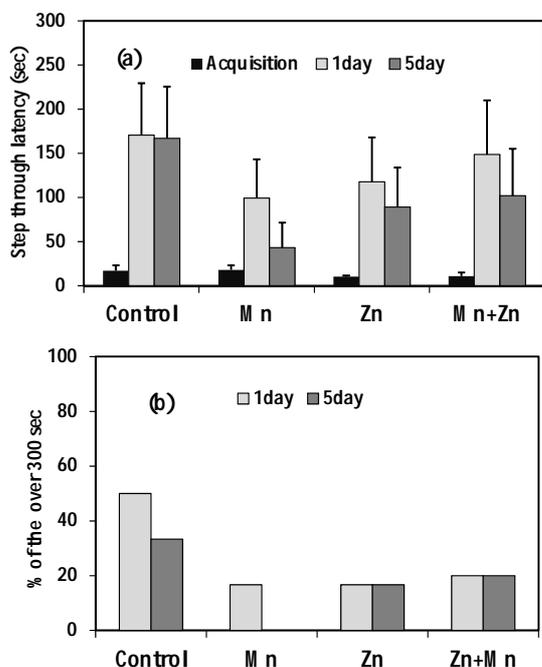


Fig.4 Effects of 50 week-administration of Mn, Zn and Mn+Zn to aged female mice on step through latency (A) and on the impaired acquisition response (% of the over 300 sec) (B) 1 day and 5 day later in a passive avoidance task.

Zn および Mn の長期間投与により高齢雌マウスの脳神経に変性が起こっていたかを HE 染色および免疫組織化学染色 (抗リン酸化タウ蛋白抗体、抗リン酸化 -シヌクレイン抗体、抗ミクログリア抗体) により調べた。その結果、対照群と Zn および Mn 投与群の間に差は認められなかった。また、Mn、および Zn の長期間投与により肝障害や腎障害が起こ

っていないことが生化学臨床検査により確認された。

以上の結果より、Mn は長期記憶に、Zn は視覚的認知記憶に影響を与える可能性があることが示唆された。

#### (4) 微量元素摂取量の指標としての尿中排泄量の利用

過剰摂取期間に摂取した朝、昼、夕それぞれの食事と間食の微量元素量を陰膳法により測定し、その値を秤量法により算出した栄養価計算値と比較した。その結果、Fe、Cu、Zn、Mn、マグネシウム(Mg)とも献立に使用する食材や調理方法の違いにより栄養価計算値と分析値が異なるものが多いことが明らかとなった。特に Mg は分析値の方が 2~3 倍近く高い値に、Mn では分析値の方が 1/10 近く低い値となっていた。以上の結果より、食品成分表を用いた食事調査方法は実際の微量元素摂取量を表していないことが多いことが示された。

摂取した微量元素の尿中排泄パターンを調べるため、過剰摂取前日から過剰摂取後 2 日に渡る計 5 日間の尿を採取し、被験者 5 名の尿中排泄量の経日変化を調べた。その結果、Cu と Mg では過剰摂取期間の尿採取 2 日目と 3 日目の 2 日間に尿中排泄量が増加し、日常摂取期間に戻った 4 日目には排泄量が減少していた。この結果より過剰摂取した Cu および Mg の尿中排泄は摂取後ほぼ 24 時間内に行われることが示唆された。Fe と Mn では過剰摂取期間の 2 日目や 3 日目に排泄量が増加しているものがあったが、尿採取期間を通じて変化の少ないものもあり、個人差があることが明らかになった。一方、Zn 排泄量は過剰摂取により尿中排泄量が上昇する傾向は認められなかった。

尿採取 1 日目の尿を日常摂取群、2 日目と 3 日目の尿を過剰摂取群の尿として排泄量の比較をした。Cu と Mg では、日常摂取群に比べて過剰摂取群の排泄量は明らかに高くなっていた。一方、Fe、Mn では全体としては両群に明らかな差は認められず、Zn では日常摂取群と過剰摂取群では排泄量の違いはほとんど認められなかった。以上の結果より、微量元素過剰摂取のモニタリング指標として、尿中 Mg、Cu 排泄量は利用できる可能性が高いことが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

吉田 香、桐木 麻紀、久保田 祐子、上甲 有利、北村 真理 (2013) サプリメントによる微量元素過剰摂取の可能性について サプリメントの使用実態・意識調査、Trace Nutrients Research、査読有、30、74-78

吉田 香、相磯 恵、一垣 有希乃、岡崎 有加、勝見 翼、本郷 綾香 (2013) 微量元素摂取量の指標としての尿中排泄量の利用、京都光華女子大学健康栄養学科学術報告、査読無、5、39-47

吉田 香、岩崎 理紗、寺本 敬子 (2012) 無機元素分析による冷凍サトイモの産地判別方法確立の検討(第1報)、Biomedical Research on Trace Elements、査読有、23、243-246

梅澤 真樹子、吉田 香 (2011) 新調理システムの栄養学的有用性について、三重短期大学生生活科学研究会紀要、査読無、59、33-40

〔学会発表〕(計4件)

吉田 香、魏 民、木俣 勲、寺本 敬子 亜鉛およびマンガンの長期間投与が高齢マウスの学習・記憶能に与える影響について、第31回日本微量栄養素学会学術集会(2014年6月7日、吹田市)

吉田 香、魏 民、木俣 勲、寺本 敬子 微量元素の長期間投与による高齢マウスの学習・記憶障害について、フォーラム2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー(2013年9月13日、福岡市)

吉田 香、北村 真理 食物中の微量元素量の変化について、第59回日本栄養改善学会学術総会(2012年9月14日、名古屋市)

吉田 香、北村 真理 サプリメントの利用実態と健康意識および食生活との関係について、第58回日本栄養改善学会学術総会(2011年9月10日、広島市)

〔その他〕

ホームページ

<http://ivy.koka.ac.jp:8080/professor/profile.aspx?kyoinid=kyoshida>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 香 (YOSHIDA KAORU )  
京都光華女子大学・健康科学部・教授  
研究者番号：10336787

(2) 研究分担者

魏 民 (GI MIN)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：70336783

川添 禎浩 (KAWAZOE SADAHIRO)  
京都女子大学・家政学部・教授  
研究者番号：00224783

北村 真理 (KITAMURA MARI)  
武庫川女子大学・生活環境学部・准教授  
研究者番号：40369666

寺本(木俣) 勲 (TERAMOTO (KIMATA) ISAO)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：20153174