

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350933

研究課題名(和文) 食生活と環境化学物質は子ども達の情動を左右するか？

研究課題名(英文) Do dietary habits and environmental chemicals have influences on children's emotional behavior?

研究代表者

酒井 久美子 (Sakai, Kumiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60225753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達は環境中の安息香酸亜鉛が脳において正常な神経伝達系を乱す可能性を見出しており、本研究では、亜鉛および安息香酸を多めに与えたマウスを継代してその子どもで、行動解析および脳海馬組織中のメタボローム解析、遺伝子発現解析を行った。その結果、通常食の仔マウスに比較して、亜鉛多めでは神経伝達物質が増加し、社会性や記憶・学習の脳機能が向上していた。安息香酸を多めに与えた仔マウスでは、学習効果は見られず、情緒不安定な行動を示した。この群の食餌を通常食に戻したところ、コントロール群と同様の行動を示すようになった。

研究成果の概要(英文)：We incidentally found that environmental zinc benzoate disrupted normal nervous transmission system. The present study was conducted to examine the effects zinc and benzoic acid on the brains of adolescent children using an experimental animal model in which mice were administered excess these materials for a long period. Behavioral experiments showed increases in some brain functions such as memory, learning and sociality of zinc-supplemented mice compared to control ones and some neurotransmitters were significantly increased in metabolomic profiling analysis. Meanwhile, the chronic benzoic acid administration did not affect learning and memory function, but rather we observed emotional lability in the mice compared to control group. After a month benzoic acid washout period, their performance and behavior recovered to the levels of control ones.

研究分野：生命科学

キーワード：脳 情動 亜鉛 安息香酸 メタボローム マイクロアレイ 行動解析

1. 研究開始当初の背景

なぜ、最近の少年達は「荒れ」たり、「キレ」たり、「ひきこもる」ようになったのだろうか？攻撃性は基本的に脳の微細構造障害や遺伝子の変化によるとされるが、それだけでは昨今の少年（若しくは青年）達の異常行動を説明するものではない。必須脂肪酸であるリノール酸摂取促進の戦後間もない栄養政策を長期間引きずった結果、代謝の異なる脂質のバランスが極端に崩れ、特に簡便性を優先した食品（インスタント類、カップ麺、ファーストフード、出来合の総菜、スナック菓子等）はリノール酸過剰となった。現代の、これらを常食とする生活と、好むと好まざるとに関わらず勝手に体内に入る微量な環境化学物質、これらが少年達の情動にどのように影響を与えるか、この重大な社会問題に、生物化学からせまるヒントとなる鍵物質「安息香酸亜鉛」を私たちは発見した。生化学的手法に基づいた科学的観点より、本研究課題を提案し、少年達の心身健全な成長に迫りたい。

研究の学術的背景

これまでの私達の研究成果

(1) リノール酸 (n-6 系脂肪酸) を過剰に摂取させたラットの学習能が低下した。

[文献; Yoshida, S., Sakai, K., Okuyama, H *et al.*, *J. Neurochem.*, 68, 1261-1268 (1997)]

(2) 学習脳が低下した脳ではシナプス周辺の小胞数に変化があった。[文献; Yoshida S., Sakai K. *et al.*, *NeuroReport*, 12, 4127-4131 (2001)]

(3) 純水中にコンタミした環境化学物質が脳の MAOA (モノアミンオキシダーゼ A) 酵素を阻害した。[文献; K. Sakai *et al.*, *Fourier Transform Spectroscopy Twelfth International Conference Proceedings*, 445-446 (1999)]

(4) 脳 MAOA 酵素を阻害する環境化学物質の一つは安息香酸亜鉛である。[文献; T. Egashira, K. Sakai *et al.*, *Toxicology Letters* 145, 161-165 (2003)]

関連する国外の研究成果

(5) MAOA 遺伝子を欠失したマウスでセロトニン量が増え、攻撃性が増す。[O. Cases *et al.*, *Science*, 268, 1763, 1995] (6) ある家系調査で精神遅滞を伴いストレスにより攻撃的になる性格が MAOA 遺伝子の点突然変異による [H. G. Brunner *et al.*, *Science*, 262, 578, 1993]

2. 研究の目的

神経伝達系とそれに影響を与える極微量環境化学物質の相互関係を明らかにし、情動異常という社会的な問題を生化学的観点から解明する。

- (1) 安息香酸亜鉛がマウスの子どもの行動に異常をおこすか？ (行動解析)
- (2) 安息香酸亜鉛・安息香酸・亜鉛をそれぞれ通常より多めに与えたマウスの脳組織において、

- ①モノアミン代謝の変化があるか？ (MAOA 活性測定)
- ② mRNA の発現レベルの変化があるか？ (マイクロアレイによる遺伝子発現解析)
- ③発現タンパク質の差異があるか？ (プロテオーム解析)
- ④ DNA に変異が起こっているか？ (パルスフィールド電気泳動、分子生物学的解析)

3. 研究の方法

(1) マウス実験

- ①安息香酸亜鉛、安息香酸ナトリウム、塩化亜鉛 (それぞれ 0.01-0.02% 重量) を含む特殊飼料でマウスを親の代から飼育し、交配する。
亜鉛の影響を調べる実験においては、塩化亜鉛を飲料水に溶かし (0.02%)、与えた。
- ②産まれた子どもが 5~8 週齢、各群の匹数がそろった時点で、マウスの行動量・軌跡・イベントを記録するとともに、オープンフィールド、ホールボード、ソーシャルインタラクション、新規物体認識テストの行動に関する様々な解析を行う。
- ③行動解析後、マウスより脳組織を海馬、視床下部、扁桃体の部位別に摘出し、ただちに液体窒素中にて凍結し、-80°C で保存する。適宜、以下の実験に供する。

(2) マイクロアレイ発現解析

各組織より mRNA を調製し、遺伝子発現解析を行い、どのような遺伝子の発現が増減しているかを解析し、メカニズム解明につなげる。

(3) メタボローム解析

本実験方法は、申請時点では設置されていなかったガスクロマトグラフ質量分析計が平成 25 年度末に導入され、微量脳組織より、網羅的に代謝物が検出可能となった。脳内で起こっている出来事を物質で捉えることができ、より多くの結果が期待されるため、当初計画していた実験方法に替えて行った。

4. 研究成果

(1) 亜鉛豊富な環境で育ったマウスの子どもの行動解析と脳海馬におけるメタボローム解析および発現解析

- ①亜鉛群 vs コントロール群のマウス行動解析
塩化亜鉛 (0.02%) 水を与えて継代して育てた 8 週齢のマウスで、オープンフィールド、ホールボード、新規物体認識、社会的相互作用の各行動実験を行った。
オープンフィールドとホールボードのテストでは亜鉛群とコントロール群で顕著な差は見られなかったが、自発運動の亢進が見られ、情動面で不安や恐怖心は少なかった。

新規物体認識テストでは、新規物体に対して2日目の認識度が亜鉛群で有意に上昇し、記憶力の向上が見られた。
社会的相互作用テストでは、新しい仲間に対して亜鉛群で接触時間が長く、社会性の向上が見られた。

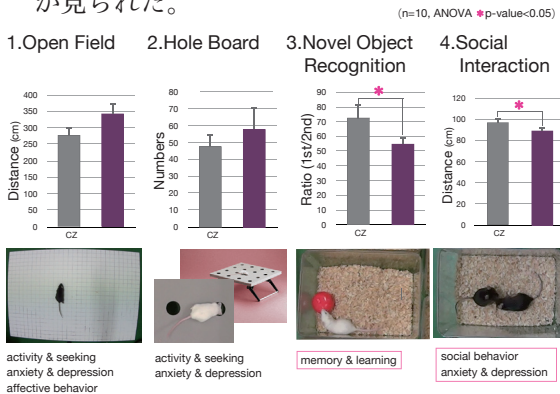


図1. マウス行動解析結果 (亜鉛群 vs コントロール群)

②亜鉛群およびコントロール群マウス (8-10 週令) の脳海馬組織のメタボローム解析

塩化亜鉛 (0.02%) 水を与えて継代して育てたマウスと普通の水を与えて育てたマウスより摘出保存した脳海馬組織のホモジネートより Bligh & Dyer 法で分画した水溶性画分を誘導体化後、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計で脳神経関連 62 代謝物について測定を行った。
得られた代謝物データの化合物名と MS/MS ピークの面積値から、多変量データ解析ソフトウェア SIMCA(UMETRICS 社) により OPLS-DA 法で解析を行ったところ、コントロール群と塩化亜鉛群に分けられた (図2)。

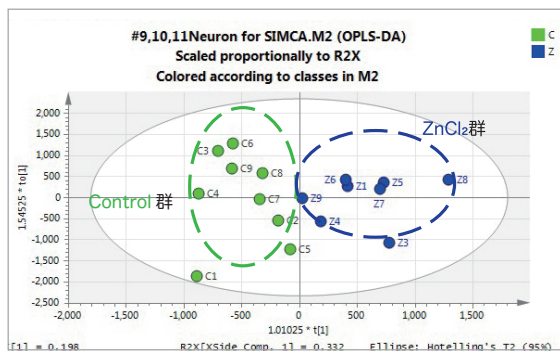


図2. 脳神経関連代謝物に対する判別分析 (亜鉛群 vs コントロール群)

さらに統計解析を行い、塩化亜鉛群で有意に増加している脳神経関連代謝物 16 個が抽出された。これらの多くはアミノ酸、アミン類の神経伝達物質類であった。
また、Bligh & Dyer 法で分画した有機層の膜画分を塩酸メチル誘導体化後、脂肪酸データベースをターゲットにメタボローム解析を行ったところ、コントロール群と塩化亜鉛群で、脂肪酸量と組成において有意な差は認められなかった。

③亜鉛群およびコントロール群マウス (8-10 週令) の脳海馬の発現解析

海馬組織より RNA を抽出して Agilent 社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4x44K) v2 により網羅的発現解析を行った。数値データを正規化した後、シグナル値を比較、Zscore \geq 2 かつ Ratio \geq 1.5、および Zscore \leq -2 かつ Ratio \leq 0.66 で発現の増減変化を示した遺伝子群を抽出し、DAVID でパスウェイ解析を行った。この結果、以下の2つのパスウェイが特に有意にヒットした。

Pathway	p-value
Neuroactive ligand-receptor interaction	2.70E-05
Calcium signaling pathway	4.00E-04

④まとめ

亜鉛を慢性的に通常の数倍与えて継代して飼育したマウスの子どもは、行動解析の結果、記憶・学習、社会性などの脳機能が向上した。これらの脳海馬では、神経伝達物質のアミノ酸やアミン類が有意に増加していた。さらに発現解析では、カルシウム伝達に係わる各種の受容体の発現とそれらのリガンドが変動していることがわかった。
亜鉛は記憶・学習など脳神経系で情報伝達に関与するとされるが、本研究において以上の結果から、亜鉛の慢性的投与により、記憶・学習の基礎となる長期増強/長期抑圧 (LTP/LTD) の調節に亜鉛が密接に関与していることが示された。

(2) 安息香酸亜鉛・安息香酸・亜鉛をそれぞれ添加した食餌で飼育したマウスに何が起きているか?

①脳海馬組織のメタボローム解析

安息香酸亜鉛・安息香酸・亜鉛・コントロールの4群のマウスの海馬組織のホモジネートから、4. (1)-②と同様にメタボローム解析を行った結果を図3. に示す。

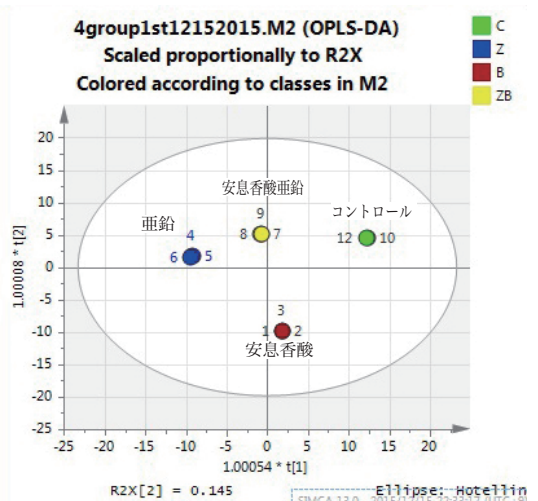


図3. 安息香酸亜鉛・安息香酸・亜鉛・コントロール4群 (n=3) の判別分析

この結果より、安息香酸亜鉛・安息香酸・亜鉛をそれぞれ食餌に慢性的に添加して継代して飼育したマウスの脳海馬では、それぞれの群で、代謝が異なっていることが示唆された。亜鉛の脳海馬への影響は本課題の研究成果(1)に記したとおりである。図3.で、安息香酸亜鉛群はコントロール群と亜鉛群の間に位置し、安息香酸群は他の3群とは代謝がかなり異なっていることがわかった。統計解析により、コントロール群および安息香酸亜鉛群に対して、安息香酸群では一部の脂質類が増加していることがわかった。

②安息香酸群 vs コントロール群のマウス行動解析

上記①の結果をふまえて、コントロール群に対して、安息香酸群のマウスの新規物体認識テストを行った。新規物体を探索に行く回数の初日と2日目の比は、安息香酸群とコントロール群のマウスで有意差はなかった。が、行動を観察すると、明らかな情緒不安定さが認められた。n数が少ないので、今後さらに観察を続け、情緒や情動を計れる行動解析を行う予定である。

③安息香酸群のマウスの食餌を普通食に戻すと行動はどうか？

慢性的に継代して安息香酸を与えたマウスの食餌を安息香酸を含まないコントロールの食餌に戻し、1ヶ月後、新規物体認識テストの行動解析を行った。普通食に戻した安息香酸群のマウスは、コントロール群のマウスと同じ挙動を示し、情緒不安は見られなかった。

④まとめ

安息香酸亜鉛が神経伝達系に影響を及ぼす可能性を調べるために、安息香酸亜鉛、安息香酸、亜鉛をそれぞれ添加した食餌でマウスを長期継代飼育した。それぞれの食餌群で、脳海馬内の代謝が異なっていることがわかった。さらに、代謝が特徴的であった安息香酸群のマウスの行動解析を行ったところ、有意差は認められなかったが、目視の行動観察において、明らかに情緒に問題があることがわかった。今後、観察を継続し、さらに新たな行動解析を行う予定である。また、この安息香酸群のマウスで食餌を安息香酸を含まないコントロールの食餌に戻したところ、行動で観察された情緒面の問題は見られなくなった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 9 件)

①酒井 久美子、「亜鉛豊富な環境がマウスの行動と脳に及ぼす影響」、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 BMB2015、2015年12月1日～2015

年12月4日、「神戸ポートピアアイランド・神戸国際会議場(兵庫県神戸市)」

②酒井 久美子、「亜鉛リッチな環境で育ったマウスの行動と脳のメタボローム解析」、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26日～2015年10月28日、「城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)」

③酒井 久美子、「亜鉛がマウス脳に与える影響のメタボローム解析」、第9回メタボロームシンポジウム2015、2015年9月30日～2015年10月2日、「三島市市民文化会館(静岡県三島市)」

④酒井 久美子、「亜鉛がマウス脳に与える影響のメタボローム解析」、第39回タンパク質と酵素の構造と機能に関するシンポジウム、2015年9月10日～2015年9月12日、「豊泉荘(大分県別府市)」

⑤ Kumiko Sakai, 「Behavioral Analysis of Chronic Zinc Administration on Mouse and Metabolomic Profiling of the Brain」, 13th International Conference on The Biogeochemistry of the Trace Elements, 2015年7月12日～2015年7月16日、「福岡国際会議場(福岡県福岡市)」

⑥酒井 久美子、「質量分析装置で何がわかるか?～医療分析分野への新規参入を目指すには～」, 平成26年度大分大学技術交流会(招待講演)、2014年12月18日、「レンブラントホテル大分(大分県大分市)」

⑦酒井 久美子、「亜鉛を慢性投与したマウス脳のメタボローム解析」、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日～2014年10月18日、「国立京都国際会館(京都府京都市)」

⑧酒井 久美子、「亜鉛の慢性投与がマウス脳に与える影響」、CIA(Cancer, Inflammation and Anti-oxidation)研究会、2013年11月16日、「別府湾ロイヤルホテル(大分県別府市)」

⑨酒井 久美子、「亜鉛の慢性投与がマウス脳に与える影響」、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～2013年9月13日、「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 久美子 (SAKAI, Kumiko)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 60225753

(2) 研究分担者

千葉 政一 (CHIBA, Seiichi)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 20457633

(3) 研究分担者

酒井 謙二 (SAKAI, Kenji)
九州大学・(連合) 農学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 50205704