

マンガン、亜鉛および銅の長期間投与が 加齢マウスの学習・記憶能に与える影響について

吉田 香^{1,2)}, 魏 民²⁾, 山野 莊太郎²⁾, 木俣 勲³⁾
¹⁾京都光華女子大学健康科学部健康栄養学科*, ²⁾大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学**,
³⁾大阪市立大学大学院医学研究科寄生虫学**)

Learning and Memory Impairments in Aged Mice Following Long-term Exposure to Manganese, Zinc and Copper

Kaoru YOSHIDA^{1,2)}, Min WEI²⁾, Shotaro YAMANO²⁾ and Isao KIMATA³⁾
¹⁾ Dept. of Health and Nutrition, Kyoto Koka Women's University
²⁾ Dep. of Pathology, Osaka City University Graduate School of Medicine
³⁾ Dep. of Parasitology Osaka City University Graduate School of Medicine

Summary

Trace elements such as manganese (Mn), zinc (Zn) and copper (Cu) are essential elements, but excess amounts of these elements are known to cause many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). The risk of excessive intake of Mn, Zn and Cu is increased by taking food plus supplements. Some of botanical or animal origin supplements have been reported to contain high concentrations of Mn, Zn and Cu. We investigated the effects of long-term exposure to Mn, Zn and Cu on learning and memory in aged mice. 20-week-old ICR-JCL male mice were given 100 ppm Mn, Zn or Cu via drinking water for 58 weeks. The effects of Mn, Zn and Cu on non-spatial long-term memory were investigated using step-through-type passive avoidance task in male aged mice after 56-weeks administration. In the retention trials of the passive avoidance test, latencies to enter a dark compartment were shorter in the Mn- and Cu-exposed mice, compared to control mice. The behavioral test indicated the possibility that long-term exposure to Mn and Cu inhibited long-term memory.

微量元素が不足すると欠乏症状が生じ、体調に異変が生じる。しかし、これらの元素を過剰摂取すると健康障害を起こすことも知られている。この欠乏症が現れる量と過剰症が現れる量の間が狭いのが微量元素の特徴である¹⁾。マンガン (Mn)、亜鉛 (Zn) および銅 (Cu) においても、その必須性は高く、それぞれ生体機能を維持するうえで必要な酵素の成分等として重要な役割を果たしている。例えば、Mn は、ピルビン酸カルボキシラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 等の酵素の補因子として働いている。Zn は、核酸、蛋白、糖、脂質の代謝や DNA、RNA の合成に関与する酵素に不可欠で、生体機能に重要な役割を果たしている。また、Cu は、細胞内外で酸化還元酵素の補因子として種々の生理作用に関与している^{1,2)}。欠乏症と過剰症に関しても報告があり、Mn の欠乏症として成長障害、骨格異常、耐糖能障害が、過剰症として Mn 肺やパーキンソン症候群 (PD) が報告されている。Zn の

欠乏症として皮膚炎、味覚異常、毛髪脱落が報告されているが、過剰症の報告例は少ない。Cu の欠乏は貧血、心臓や動脈異常、脳神経障害や色素異常を、Cu の過剰は接触性皮膚炎、発熱、舌苔青色化を引き起こすとされている¹⁾。これまで微量元素の欠乏症については多く研究されてきたが、過剰症については、通常の食生活では起こらないため、研究が進んでこなかった。しかし、近年のサプリメントをはじめとする健康食品志向により、サプリメントと食物を合わせた摂取により過剰摂取が起こる可能性がある。我々の研究においても、中高年のヒトの多くは健康に気を使って食事をしているにもかかわらず不十分と考え、微量元素が濃縮された天然原料を主成分とするサプリメントを複数・毎日飲用する傾向があることが明らかになり、サプリメント飲用により微量栄養素の過剰摂取が起こる可能性が示唆された³⁾。

近年、微量元素と脳神経疾患の関係が注目されてい

*所在地：京都市右京区西京極葛野町38 (〒615-0082)

**所在地：大阪市阿倍野区旭町1-4-3 (〒545-8585)

る^{1,2,4,5)}。わが国では、65歳以上の高齢者人口が年々増加しており、2013年9月15日時点で、総人口に占める割合は25.0%となっている。こうした人口の高齢化に伴い、アルツハイマー型認知症(AD)やPD等の高齢者に多い脳神経変性疾患が増加してきている。脳神経変性疾患と微量元素との関係を示す研究として、Zn, Cu, 鉄(Fe)イオンはADで変化する大脳新皮質領域で高レベルであり、加齢とともに脳でのCu, Feイオンレベルが上昇すること⁶⁾、ADでみられる老人斑には、Zn, Cu, Feイオンが共存すること⁷⁾、CuとZnが β アミロイド蛋白(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⁸⁾が報告がされている。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⁹⁾。Zn, Cu, MnとADやPDの関連を示唆する報告もある¹⁰⁻¹²⁾。しかし、未だ詳細は明らかになっていない。

本研究では、加齢マウスにMn, ZnおよびCuをそれぞれ長期間投与後、脳神経障害が起こっているかを行動試験および脳の病理組織学的検査により調べたので報告する。

実験方法

1. 実験動物

ICR-JCL(7週齢)雄マウスを日本クレア株式会社(東京)から41匹購入した。室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル12時間周期のSPF動物飼育室で、ポリカーボネート製のケージに入れ(5匹/1ケージ、ただし対照群の1ケージのみ6匹)、20週齢になるまで水と飼料を自由摂取させて飼育し、実験に使用した。

2. 動物投与試薬の調製

塩化マンガン(II)四水和物($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)および硫酸銅(II)五水和物($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)は、和光純薬株式会社(大阪)の特級試薬を用いた。塩化亜鉛(ZnCl_2)は、関東化学株式会社(東京)の特級試薬を用いた。投与用の100 ppm Mn水溶液は、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.801 gを水に溶かして500 mLとし1000 ppm Mn水溶液とした後、用事希釈して調製した。投与用の100 ppm Zn水溶液は、 ZnCl_2 1.042 gを水に溶かして500 mLとし1000 ppm Zn水溶液とした後、用事希釈して調製した。100 ppm Cu水溶液は、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.965 gを水に溶かして500 mLとし1000 ppm Cu水溶液とした後、用事希釈して調製した。

3. 実験計画

20週齢ICR-JCL雄マウスを対照群11匹、Mn, Zn, Cu投与群それぞれ10匹の4群に分け、対照群には水を、Mn投与群には100 ppm Mn水溶液を、Zn投与群には100 ppm Zn水溶液を、Mn投与群には100 ppm Mn水溶液をそれぞれ飲料水として58週間自由摂取させた。投与期間中、1週間に1度体重と飲水量を測定した。56週間投与後、学習・記憶能力についてステップスルー型受動的回避試験により評価を行った。

ステップスルー型受動的回避試験終了後の投与58週間目に、ジエチルエーテル麻醉下でマウスの血液を心臓採血により採取後、脳、肝臓を摘出し、重量を測定した。採取血液より血清を分離し、生化学的検査として、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)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -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)およびクロール(Cl)の測定を行った。摘出した脳は、ホルマリン固定・パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および免疫組織化学染色をし、病理組織学的観察を行った。なお、動物を用いた研究は、文部科学省の「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年施行)に沿って作られた「大阪市立大学動物実験管理規定」を遵守して行い、実験プロトコールは、大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会の承認を得た。

4. ステップスルー型受動的回避試験

ステップスルー型受動的回避試験は、小原医科産業株式会社(東京)製のステップスルー型のマウス用受動的回避反応実験装置を用いて実施した。獲得試行は、投与56週間後に次のように行なった。マウスを実験室環境に10分間馴化させた後、扉を閉じた明室(13 Wの電球を明室の上部に設置)に入れ、10秒経過後に扉を開き、マウスが暗室に完全に移動するまでに要した時間(潜時)を測定した。暗室に入った後、直ちにギロチンドアを閉め、5秒後に0.3 mA、5秒間の電気ショックを与えた。マウスが叫声や飛び上がりなどの電撃反応を起こしたことを確認後、扉を開け、直ちにホームケージに戻した。獲得試行の翌日、再生試行を次のように行なった。獲得試行と同様にマウスを明室に入れ、暗室への移行時間である潜時を測定した。ただし、暗室に侵入したマウスに電気ショックは与えず、潜時の測定上限を300秒とした。さらに、3日後と7日後にも同様に再生試行を行った。なお、対照群と投与群の比較は、再生試行時の潜時の平均値および測定上限300秒を超えて暗室に侵入しなかったマウスの割合で行った。

5. 病理組織学的検査

マウスより摘出した脳をホルマリンで固定後、常法に従いパラフィン包埋し、切片標本を作成した後、HE染色し、対照群と投与群で差がないかを観察した。さらに、タウや α -シヌクレインが異常蓄積し、神経変性疾患が行っていないかを調べるため、パラフィン包埋した切片標本を脱パラフィン後、それぞれ抗リン酸化タウ抗体(ab32057:アブカム株式会社)、抗リン酸化 α -シヌクレイン抗体(ab52168:アブカム株式会社)を用いて免疫組織化学染

Table 1 Serum biochemistry parameters in male ICR-JCL mice after 58-week treated with Mn, Zn and Cu

	Control	Mn	Zn	Cu
TP (g/dL)	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
Alb (g/dL)	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
A/G	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1
TTT (U)	1.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1*	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0
AST (IU/L)	78 ± 9	77 ± 11	73 ± 20	68 ± 3
ALT (IU/L)	34 ± 2	40 ± 3	29 ± 4	36 ± 6
ALP (IU/L)	121 ± 13	153 ± 22	140 ± 24	163 ± 11
γ-GPT (IU/L)	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
ChE (IU/L)	24 ± 2	27 ± 2	23 ± 2	23 ± 2
Amy (IU/L)	939 ± 52	1150 ± 195	948 ± 67	1010 ± 120
Cre (mg/dL)	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.26 ± 0.19	0.06 ± 0.01
BUN (mg/dL)	30 ± 4	24 ± 2	52 ± 27	28 ± 2
Na (mEq/L)	155 ± 1	156 ± 1	156 ± 0	157 ± 1
K (mEq/L)	4.7 ± 0.7	6.5 ± 0.6	7.5 ± 0.8	6.6 ± 0.2
Cl (mEq/L)	113 ± 1	115 ± 1	114 ± 1	117 ± 1*
T-Bil (mg/dL)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0

Data are represented as the mean ± SE.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Toxicologically significant changes were not found in serum biochemistry parameters.

色を行い、対照群と投与群で差がないかを観察した。

6. 統計解析

得られた測定値は、平均値 ± 標準誤差 (SE) で表し、対照群と投与群の有意差検定は GraphPad Prism の解析ソフトを用い Dunnett の多重比較検定により行った。なお、有意水準は p 値 < 0.05 とした。

結果と考察

20 週齢マウスに 100 ppm Mn 水溶液、100 ppm Zn 水溶液、100 ppm Cu 水溶液を 58 週間投与した時の投与群および対照群におけるマウスの体重変化を Fig. 1 に示した。

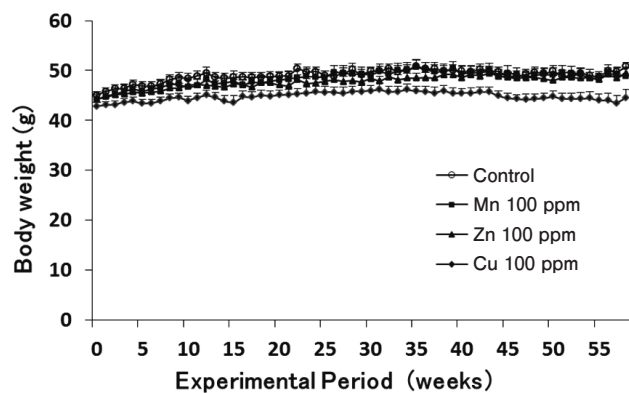


Fig. 1 Body weight curves of male ICR-JCL mice administered Mn, Zn or Cu during the 58-week experimental period. Values represent the mean ± SE.

Mn 投与群および Zn 投与群は、対照群と同様の体重曲線を示したが、Cu 投与群では、対照群の体重曲線に比べて

若干の低下傾向が認められた。脳、肝臓の体重比は対照群と比べ投与群で有意な差は認められなかった (データ未掲載)。

血液生化学検査の結果、TP、Alb、A/G、TTT、AST、ALT、ALP、γ-GPT、ChE、Amy、Cre、BUN、Na、K、Cl は、それぞれ正常値範囲内であった。統計学的に、対照群に比べて Mn 投与群で TTT が、Cu 投与群で Cl に有意差が認められたが、その他の臨床検査項目では、有意な差は認められなかった (Table 1)。以上の結果より、マウスへの 100 ppm Mn 水溶液、100 ppm Zn 水溶液、100 ppm Cu 水溶液の 58 週間投与では、肝毒性、腎毒性および臓器毒性が現れないことが明らかになった。なお、長期間に渡る観察期間の間に死亡したマウスは、対照群で 1 匹 (11 匹中)、Mn 投与群で 1 匹 (10 匹中)、Zn 投与群で 3 匹 (10 匹中)、Cu 投与群で 3 匹 (10 匹中) であった。

ステップスルー型受動回避試験は、マウスが暗い場所を好むことを利用したもので、暗室に入るという行動と電気ショックの間に関係があることを学習させた (獲得試行) 後、その記憶を長時間覚えているかどうかを調べ (再生試行)、長期記憶能を評価する頻用方法である。明室に入れたマウスが暗室に移動するまでに要した時間 (潜時) を記憶の指標とし、潜時が長いほど嫌悪刺激を記憶して回避行動をとっていると判定する。獲得試行後、1, 3, 7 日目に再生試行をし、潜時を最大 300 秒まで測定した。Fig. 2 (A) に各群の潜時の比較を示した。獲得試行時の潜時は群間で差が認められなかったが、再生試行時の潜時は、Mn 投与群が対照群に比べ、1, 3, 7 日後で短くなっていた。Cu 投与群では、3, 7 日後の潜時が対照群に比べて短くなっていた。ただし、潜時が短かった Mn および Cu 投与群においてもバラツキが大きかったため、統計学的に有

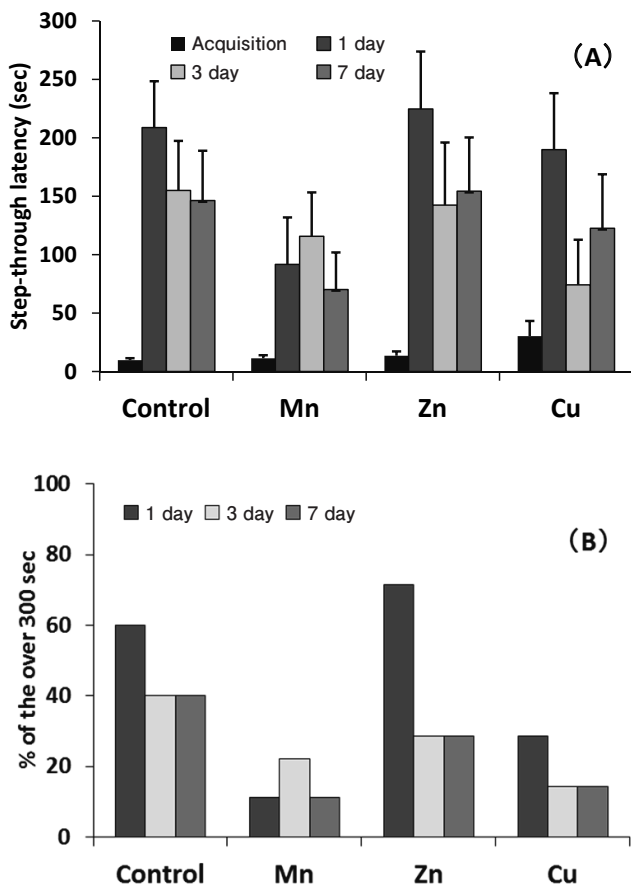


Fig. 2 Effects of 56 week-administration of Mn, Zn and Cu to aged male mice on step through latency (A) and on the impaired acquisition response (% of the over 300 sec) (B) 1 day, 3 day and 7 day later in a passive avoidance task. Mn, Zn and Cu treated groups were not significantly different from control group ($P < 0.05$).

意差は認められなかった。一方、Zn 投与群の潜時は、対照群とあまり変わらなかった。Fig. 2 (B) は、再生試行において 300 秒を超えて暗室に入らず嫌悪刺激を記憶していたマウスの割合を示している。1 日後の再生試行では、対照群が 60.0%であったのに対し、Mn 投与群は 11.1%、Cu 投与群で 28.6%と低下していた。1, 3, 7 日後の再生試行すべての回で 300 秒を超えて暗室に入らず 7 日間記憶を保持していたマウスは、対照群で 40.0%であったが、Mn 投与群は 11.1%、Cu 投与群は 14.3%、Zn 投与群は 28.6%と低下していた。以上の結果より、100 ppm という低投与量でも Mn および Cu、特に Mn 投与により記憶保持率の低下傾向があることが示された。また、Zn 投与においても 7 日間記憶を保持していたマウスの割合は対照群と比べて低下していたことから、若干の記憶保持率の低下傾向があることが示された。加齢に伴い血液脳関門の効果が弱まると、化合物の脳への通過が増加することが知られており、加齢ラットにアルミニウム (Al) を長期間投与すると、Al の脳内蓄積量が増えたという報告がある¹³⁾。本研究においても加齢マウスに長期間投与を行うことにより、Mn, Zn, Cu が血液脳関門を通過し、脳内に蓄積して中枢神経系の変化が起こり、記憶障害が起こった可能性

がある。

近年、神経変性疾患発症の多くは、蛋白質の構造 (コンフォメーション) の異常に起因していることが明らかとなっている¹⁴⁾。その代表例としてタウオパチーとシヌクレイノパチーがある。タウオパチーは、脳内に異常にリン酸化されたタウ蛋白が脂溶性の神経原線維変化 (NFT) を形成し、神経細胞内に蓄積する変性疾患群の総称で、タウオパチーに属する疾患には AD がある¹⁵⁾。シヌクレイノパチーは、リン酸化した α -シヌクレインが脳内に異常蓄積する変性疾患群の総称で、シヌクレオパチーに属する疾患には、PD やレビー小体病 (DLB) がある¹⁶⁾。これまでの研究で、Zn, Cu, Mn と AD や PD の関連性が示されている¹⁰⁻¹²⁾。また、Zn や Cu が $A\beta$ やタウ蛋白質の蓄積性に関連し、さらに AD, PD とも関連しているという報告がある¹⁷⁾。in vitro 実験で、Mn が α -シヌクレインの線維化を加速させること、また、 α -シヌクレインの増加が PD と関連することを示した報告もある¹⁸⁾。本研究においても、Mn, Zn, Cu 摂取によりタウや α -シヌクレインの蓄積が起こっていた可能性がある。このことを調べるため、抗リン酸化タウ抗体および抗リン酸化 α -シヌクレイン抗体を用い免疫組織化学染色を行い、長期記憶障害が起こったマウスの脳内にリン酸化したタウや α -シヌクレインが蓄積しているかを調べたが、染色された部位が対照群にも多く観察され、記憶障害が起こった投与群との間に差が認められなかった。また、HE 染色においても、対照群と投与群で差が認められなかった (データ未表示)。その理由として、以下のことが考えられる。タウおよび α -シヌクレインの異常蓄積、AD, PD, DLB などの神経変性疾患は、加齢と関係することが報告されている^{19, 20)}。本研究の病理組織学検査は、78 週齢の老齢マウスについて行なわれたため、対照群と投与群の間に差が認められなかった可能性がある。また、加齢による学習記憶能力低下に酸化ストレスが関与していること²¹⁾、金属イオンが酸化ストレスを誘導すること^{9, 22)}、 $A\beta$ 誘導性細胞死に活性酸素が関与していること²³⁾が示されている。これらのことより、金属イオンにより発生する活性酸素ストレスにより脳神経細胞の脱落が起こり、記憶障害がおこっていた可能性もある。今後、さらに、酸化ストレスの影響も含め、加齢マウスへの Mn, Zn, Cu の長期間投与より起こる学習・記憶障害について詳細に調べていく必要がある。

謝 辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (C) 課題番号 23500978) によって行った。

参考文献

- 1) 桜井弘 (2006) 生命元素辞典, オーム社, 東京: pp.5-16, pp.73-77, pp.90-101, pp.936-339.

- 2) 中村道子 (2005) 微量元素と精神神経疾患 微量元素：精神医学における現在の知見と臨床. *Biomed Res Trace Elements* 16: 12-18.
- 3) 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 Nutr Res* 30 : 74-78.
- 4) 橋本道男 (2008) アルツハイマー病と食事栄養—とくに銅・亜鉛とドコサヘキサエン酸. *Trace Nutr Res* 25: 8-18.
- 5) 川原正博, 小山裕也, 定金豊 (2011) アミロイド形成蛋白の高次構造変化と神経毒性に及ぼす金属の影響. *Biomed Res Trace Elements* 22: 7-14.
- 6) Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414: 212-216.
- 7) Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158: 47-52.
- 8) Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, Perry G, Carey PR (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* 42: 2768-2773.
- 9) Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345: 91-104.
- 10) Perl DP, Olanow CW (2007) The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 675-682.
- 11) Dobson AW, Erikson KM, Aschner M (2004) Manganese neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 115-128.
- 12) Barnham KJ, Bush AI (2008) Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol* 12: 222-8.
- 13) Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Baliotti M, Mochegiani E, Scancar J, Zambenedetti P, Zatta P (2003) The effect of chronic aluminum(III) administration on the nervous system of aged rats: clues to understand its suggested role in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 5: 437-444.
- 14) Carrell RW, Lomas DA (1997) Conformational disease. *Lancet* 350: 134-138.
- 15) Higuchi M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2002) Chapter 94: Tau Protein and Tauopathy. in *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, ed. by Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, American College of Neuropsychopharmacology: pp.1339-1354.
- 16) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biol* 4: 160-164.
- 17) Stelmashook EV, Isaev NK, Genrikhs EE, Amelkina GA, Khaspekov LG, Skrebitsky VG, Illarioshkin SN (2014) Role of zinc and copper ions in the pathogenic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry* 79: 391-396.
- 18) Covy JP, Giasson BI (2011) α -Synuclein, leucine-rich repeat kinase-2, and manganese in the pathogenesis of Parkinson disease. *Neurotoxicol* 32: 622-629.
- 19) Butterfield DA, Kanski J (2001) Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing* 122: 945-962.
- 20) Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Muraige CA, Lebert F, Pasquier F, David JP (2002) Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp Gerontol* 37: 1291-1296.
- 21) Liu R, Liu IY, Bi X, Thompson RF, Doctrow SR, Malfroy B, Baudry M (2003) Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8526-8531.
- 22) Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65-87.
- 23) Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.