

高脂肪食摂取加齢マウスにおける亜鉛の長期間過剰投与が 学習・記憶能に及ぼす影響

吉田 香^{1,2)}, 魏 民²⁾, 藤岡正喜²⁾, 寺本 勲²⁾

(¹⁾同志社女子大学生活科学部*, (²⁾大阪市立大学大学院医学研究科**)

(受付 2021年9月1日, 受理 2021年10月12日)

Effects of long-term excessive zinc intake on learning and memory in high-fat diet-fed aged mice

Kaoru YOSHIDA^{1,2)}, Min GI²⁾, Masaki FUJIOKA²⁾, Isao TERAMOTO²⁾

¹⁾Department of Food Science and Nutrition, Doshisha Women's College of Liberal Art

²⁾Osaka City University Graduate School of Medicine,

Summary

Although Zinc (Zn) is an essential element, an excess amount of Zn is known to cause neurotoxic effects. The increased consumption of saturated fats in a westernized high-fat diet contributes to neurodegenerative disease and senile dementia. In our previous study, aged female mice were administered 0, 200, or 500 ppm Zn in drinking water for 30 weeks and subjected to Y-maze, novel object recognition, and step-through passive avoidance tests. Thirty-week exposure to Zn did not inhibit learning and memory in the Y-maze test, but was found to inhibit learning and memory in the novel object recognition and step-through passive avoidance tests in a dose-dependent manner. These results suggested that administration of excess Zn impaired long-term memory and object recognition memory in aged mice. As such, we studied whether a high-fat diet influences learning and memory deficits caused by chronic exposure to Zn in aged mice. The results of novel object recognition, step-through passive avoidance, and fear conditioning tests showed that high-fat diet feeding inhibited learning and memory in the step-through passive avoidance and fear conditioning tests but improved learning and memory in the novel object recognition test.

わが国では、65歳以上の高齢者人口が年々増加しており、2020年10月1日時点で、総人口に占める割合（高齢化率）は28.8%となっている¹⁾。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）やパーキンソン症候群（PD）などの高齢者に多い脳神経変性疾患が増加してきている。しかし、老人性認知症の原因は未だ明らかになっていない。また、近年、人々の健康への関心が高まり、種々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っている可能性がある。我々の研究において、中高年者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っており、サプリメント飲用により微量元素の過剰摂取が起こる可能性が示唆されている²⁾。

微量元素の健康被害の一つとして、脳神経疾患が注目さ

れている。亜鉛（Zn）、銅（Cu）、鉄（Fe）、マンガン（Mn）がAD、PD、脳血管性認知症などの神経疾患と関連していることを示す報告がある³⁻⁶⁾。また、Zn、Cu、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ること⁷⁾、ADでみられる老人斑には、Zn、Cu、Feイオンが共存すること⁸⁾、CuとZnがβアミロイド蛋白（Aβ）と直接結合してAβを脳内に沈着させ、老人斑が形成されること⁹⁾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起こることも示されている¹⁰⁾。しかし、詳細は未だ明らかになっていない。我々の先行研究において、加齢マウスへのZnの長期間投与により、視覚的認知記憶の指標となる新奇物体探索試験及び長期記憶の指標となる受動的回避試験で用量依存的に記憶能の低下が起こることが示された¹¹⁾。

老人性認知症と食習慣の関連性は不明であったが、近年、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸を多く含む食事をするヒ

*所在地：京都市上京区今出川通寺町西入（〒602-0893）

**所在地：大阪市阿倍野区旭町1-4-3（〒545-8585）

トはADの発症率が高いことが示されている¹²⁾。また、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸を多く摂取するヒトが、さらに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を示す報告もある¹³⁾。動物試験においては、高脂肪食摂取マウスで脳の脂質過酸化が促進され、海馬の神経新生と神経前駆細胞の増殖が抑制されること¹⁴⁾、高脂肪食摂取ラットでは海馬における脳由来神経栄養因子のmRNA およびタンパク質発現が低下し、認知機能が低下すること、また、この認知機能低下に酸化ストレスの亢進が関与すること¹⁵⁾が報告されている。しかし、高脂肪食摂取下での微量元素過剰摂取の影響を調べた研究は少ない。以上のことから、微量元素の過剰摂取により起こる学習・記憶障害が飽和脂肪酸やコレステロールを多く摂取する欧米型食生活により加速されるかどうかを明らかにすることは極めて重要である。本研究では、Znの過剰摂取で起こる学習・記憶障害に高脂肪食が及ぼす影響を動物行動試験により調べた。

実験方法

1. 動物投与試薬

塩化亜鉛 (ZnCl₂) は、関東化学株式会社 (東京) の特級試薬を用いた。飲水投与用の 200 ppm 及び 500 ppm Zn 水溶液は、ZnCl₂ 4.169 g を水に溶かして 1000 ml とし、2000 ppm Zn 水溶液とした後、用時希釈して調製した。

2. 実験動物及び実験計画

実験 1：高脂肪食摂取の加齢マウスへの Zn 200 ppm 連続投与が学習・記憶障害に与える影響

ICR-JCL (7 週齢) 雌性マウス (23~26 g) を日本クレア株式会社 (東京) から 41 匹購入した。室温 22 ± 3 °C、湿度 55 ± 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 1 ケージのみ 6 匹)、26 週齢になるまで水と一般飼育用固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社、東京) を自由摂取させて飼育した。26 週齢になったマウスを CE-2 (粗脂肪 5.03%、脂肪エネルギー比率 13.2%) を摂取させる普通食群 (C 群) と高脂肪食である日本クレア株式会社製の Quick Fat (粗脂肪 13.55%、脂肪エネルギー比率 30.2%) を摂取させる高脂肪食群 (F 群) に分け、それぞれに Zn 0 または 200 ppm 水溶液を飲水投与し、Zn0-C 群 (n=11)、Zn200-C 群 (n=10)、Zn0-F 群 (n=10)、Zn200-F 群 (n=10) とした。各群にそれぞれの水溶液と飼料を 32 週間自由摂取させ、投与期間中、体重を 1 週間に 1 回測定した。投与 30 週間後に Y 字迷路試験及び新奇物体探索試験を、投与 31 週間後にステップスルー型受動的回避試験を行った。投与 32 週間後、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの血液を心臓採血により採取後、採取血液より血清を分離し、生化学的検査を行った。

実験 2：高脂肪食摂取の加齢マウスへの Zn 500 ppm 連続投与が学習・記憶障害に与える影響

ICR-JCL (7 週齢) 雌性マウス (28~30 g) を日本クレア株式会社から 40 匹購入した。実験 1 と同様に室温 22 ± 3 °C、湿度 55 ± 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)、26 週齢になるまで水と一般飼育用飼料 CE-2 を自由摂取させて飼育した。26 週齢になったマウスを同様に普通食 CE-2 を摂取させる C 群と高脂肪食 Quick Fat を摂取させる F 群に分け、C 群には Zn 500 ppm を、F 群には、Zn 0 または 500 ppm 水溶液を飲水投与し、それぞれ Zn500-C 群 (n=15)、Zn0-F 群 (n=10)、Zn500-F 群 (n=15) とした。各群にそれぞれの水溶液と飼料を 30 週間自由摂取させ、投与期間中、体重を 1 週間に 1 回測定した。投与 11 週間後に新奇物体探索試験を、投与 29 週間後に新奇物体探索試験及び恐怖条件付け試験を行った。投与 30 週間後、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの血液を心臓採血により採取後、採取血液より血清を分離し、生化学的検査を行った。

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、大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会動物実験計画審査小委員会の承認 (承認番号 09016) を得て行った。

3. 学習・記憶行動試験

Y 字型迷路試験

Y 字型迷路試験は、マウスが Y 字型迷路内を探索する際、直前に進入したアームとは異なったアームに入ろうとする習性を利用したもので、空間作業記憶 (短期記憶) の指標となる¹⁶⁾。有限会社京都エル技研 (滋賀) 製の Y 字型迷路を用い、室町機械株式会社 (東京) 製の DV-Track ビデオトラッキングシステム (DV-TS) を用いて解析した。すなわち、マウスを Y 字型迷路に入れ、8 分間の測定時間内に各アームに侵入した回数及び連続して異なる 3 本の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、記憶能を比較した。

新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は、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となる^{16,17)}。試験は有限会社京都エル技研製の円形のオープンフィールドを用いて実施し、DV-TS を用いて解析した。まず、試験の前日にオープンフィールド内に動物を入れ、10 分間自由に散策させた。翌日、オープンフィールド内に同じ物体 A を 2 つ置き、マウスを 10 分間自由に探索させ (訓練試行)、2 つの物体 A、A に近づく時間を測定し、総探索時間に対するそれぞれの物体への探索時間割合 (%) を求めた。訓練試行の 3 時間後、A、A の片方を新奇物体 B に変え、装置内を 5 分間自由に探索させ (テスト試行)、元

の物体 A と新奇物体 B に近づく時間をそれぞれ測定し、探索時間割合 (%) を求めた。さらに、群間の差を明らかにするため、Discrimination index (DI) 値を $\{(\text{テスト試行時の新奇物体 B への探索時間} / \text{総探索時間}) - (\text{新奇物体を置く位置への訓練試行時の物体 A への探索時間} / \text{総探索時間})\} \times 100$ により求めて¹¹⁾、比較した。

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、長期記憶の指標となる試験である¹⁶⁾。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。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）。獲得試行の翌日、実験室環境に 10 分間馴化させた後、マウスを同じ装置内の明室に入れ、暗室への移行時間である潜時を測定した（再生試行）。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。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及び測定上限 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。

恐怖条件付け試験

恐怖条件付け試験は、文脈記憶の指標となるものである¹⁶⁾。試験は室町機械株式会社製の恐怖条件付け実験装置を用いて実施し、DV-TS を用いて解析した。まず、床に電線を敷いたチャンバーの中にマウスを入れ、0.3 mA の電流を 3 秒間、60 秒の間隔をあけて 3 回流す電気ショックを与え、電気ショックによる恐怖文脈条件づけを行った。翌日、同じチャンバーに入れ、恐怖を感じている程度をフリージング割合 (%) として評価した。

4. 血液生化学検査

マウスより採取した血清中の総タンパク (TP)、アルブミン (Alb)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、尿素窒素 (BUN) クレアチニン (Cre)、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)、コリンエステラーゼ (ChE)、アミラーゼ (Amy) の測定を行い、肝臓、腎臓、膵臓に毒性が現れていないかを確認した。また、高脂肪食の影響を調べるため、血清中の総コレステロール (T-Chol)、LDL コレステロール (LDL-Chol)、HDL コレステロール (HDL-Chol)、中性脂肪 (TG) を調べた。なお、本研究における各血液生化学検査値は、LSI メディエンス株式会社（東京）に委託して測定した。

5. 統計解析

全てのデータは、平均値 ± 標準誤差 (SE) で示した。学習・記憶行動試験及び血液生化学検査については、有意差検定を GraphPad Prism の解析ソフトを用い Tukey 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

Zn, Mn, Cu 等の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、さらにその障害が高脂肪食によって増強される可能性が指摘されているが、その詳細については不明である。我々は先行研究において加齢マウスへの Zn の投与が長期記憶能の指標である受動的回避試験と視覚認知記憶の指標である新奇物体探索試験で用量依存的に記憶障害を引き起こすことを示した¹¹⁾。本研究では、この Zn により起こる学習・記憶障害に高脂肪食が与える影響を調べるため、26 週齢 ICR 雌性マウスを Zn0-C 群 (n=11)、Zn200-C 群 (n=10)、Zn0-F 群 (n=10)、Zn200-F 群 (n=10) に分け、それぞれの飲用水及び飼料を 32 週間自由摂取させた (実験 1)。さらに、実験 1 の結果を再確認するため、投与量と投与群の匹数を増やし、Zn500-C 群 (n=15)、Zn0-F 群 (n=10)、Zn500-F 群 (n=15) を設け、加齢マウスへの Zn 500 ppm 連続投与 (30 週間) により起こる学習・記憶障害に高脂肪食が与える影響を調べた (実験 2)。実験 1 の観察期間中の体重変化を Fig. 1 に示した。なお、投与 32 週間中に死亡したマウスは、Zn0-C 群、Zn0-F 群、Zn200-C 群、Zn200-F 群のマウスでそれぞれ 11 匹中 4 匹 (死亡率 36.4%)、10 匹中 2 匹 (死亡率 20%)、10 匹中 3 匹 (死亡率 30%)、10 匹中 1 匹 (死亡率 10%) であった。実験 2 の観察期間中の体重変化を Fig. 2 に示した。なお、投与 30 週間中に死亡したマウスは、Zn0-F 群、Zn500-C 群、Zn500-F 群で、それぞれ 10 匹中 2 匹 (死亡率 20%)、15 匹中 5 匹 (死亡率 33.3%)、15 匹中 1 匹 (死亡率 6.7%) であった。いずれの実験においても、同じ Zn 投与量では、普通食群に比べて

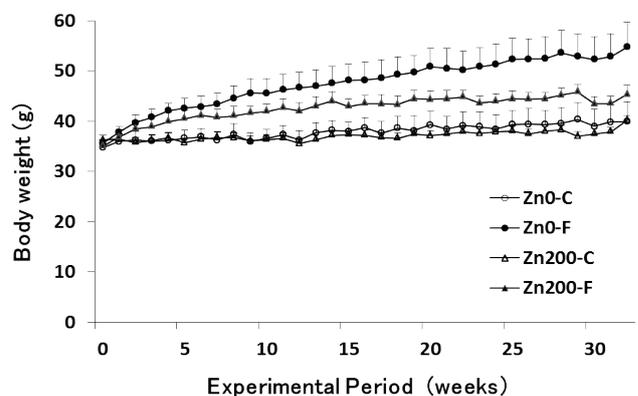


Fig. 1 Body weight curves of ICR-JCL female mice administered 200ppm Zn or/and high-fat diet the 32-week experimental period. Values represent the mean ± SE

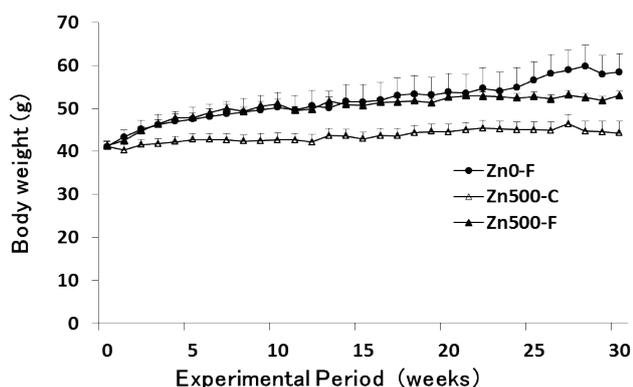


Fig. 2 Body weight curves of ICR-JCL female mice administered 500ppm Zn or/and high-fat diet during the 30-week experimental period. Values represent the mean \pm SE.

高脂肪食群の体重増加率が大きかった。また、同じ Zn 投与量では、高脂肪食群の方が普通食群より死亡率が低かった。

実験 1 及び実験 2 の血清の生化学検査の結果、TP, Alb, A/G, BUN, Cre, AST, ALT, ALP, ChE, Amy は、普通食群と高脂肪食群で有意差が認められず、いずれの群も正常値範囲内で、肝臓、腎臓、膵臓の毒性は認められなかった (Table 1, 2)。T-Cho, TG および LDL-Cho の測定値は、有意差は認められないものの高脂肪食群が普通食群に比べて上昇していた。HDL-Cho の測定値は、高脂肪食群が普通食群に比べて有意に上昇していた (Table 1, 2)。

実験 1 で、投与 30 週間後に行った Y 字型迷路試験の結果を Fig.3 に、新奇物体探索試験の結果を Fig.4 に示し

Table 1 Serum biochemistry parameters in ICR-JCL female mice after 32-week administered 200ppm Zn or/and high-fat diet

	Zn0-C	Zn0-F	Zn200-C	Zn200-F
TP (g/dL)	4.8 \pm 0.1 ^a	5.0 \pm 0.2 ^a	4.7 \pm 0.1 ^a	4.9 \pm 0.1 ^a
ALB (g/dL)	3.5 \pm 0.1 ^a	3.5 \pm 0.3 ^a	3.4 \pm 0.1 ^a	3.5 \pm 0.1 ^a
A/G	2.9 \pm 0.2 ^a	2.4 \pm 0.3 ^a	2.6 \pm 0.2 ^a	2.7 \pm 0.3 ^a
BUN (mg/dL)	21.5 \pm 0.8 ^a	22.1 \pm 4.3 ^a	21.4 \pm 1.8 ^a	18.1 \pm 1.0 ^a
CRE (mg/dL)	0.10 \pm 0.0 ^a	0.11 \pm 0.01 ^a	0.10 \pm 0.0 ^a	0.10 \pm 0.0
AST (IU/L)	90 \pm 3 ^a	102 \pm 23 ^a	78 \pm 9 ^a	83 \pm 16 ^a
ALT (IU/L)	33 \pm 6 ^a	50 \pm 14 ^a	23 \pm 2 ^a	23 \pm 3 ^a
ALP (IU/L)	293 \pm 24	226 \pm 40 ^a	220 \pm 28 ^a	179 \pm 26 ^a
ChE (IU/L)	52 \pm 4 ^a	53 \pm 6 ^a	43 \pm 4 ^a	41 \pm 4 ^a
AMY (IU/L)	943 \pm 57 ^a	1327 \pm 213 ^a	1056 \pm 73 ^a	1023 \pm 63 ^a
T-CHO (mg/dL)	61 \pm 9 ^{abc}	183 \pm 36 ^a	69 \pm 6 ^{bc}	121 \pm 11 ^{ab}
LDL-C (mg/dL)	10 \pm 1 ^{abc}	20 \pm 5 ^a	7 \pm 0 ^{bc}	11 \pm 1 ^{ab}
HDL-C (mg/dL)	43 \pm 3 ^c	97 \pm 10 ^a	44 \pm 4 ^c	77 \pm 6 ^{ab}

Data are represented as the mean \pm SE.

^{ac} Means in a row without a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2 Serum biochemistry parameters in ICR-JCL female mice after 30-week administered 500ppm Zn or/and high-fat diet

	Zn0-F	Zn500-C	Zn500-F
TP (g/dL)	5.5 \pm 0.1 ^a	5.1 \pm 0.5 ^a	5.2 \pm 0.4 ^a
ALB (g/dL)	3.4 \pm 0.1 ^a	2.9 \pm 0.4 ^a	3.1 \pm 0.5 ^a
A/G	1.7 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.3 ^a	1.5 \pm 0.4 ^a
BUN (mg/dL)	19.2 \pm 1.6 ^a	22.3 \pm 4.4 ^a	20.0 \pm 2.8 ^a
CRE (mg/dL)	0.13 \pm 0.02 ^a	0.14 \pm 0.07 ^a	0.12 \pm 0.02 ^a
AST (IU/L)	68 \pm 10 ^a	88 \pm 24 ^a	76 \pm 18 ^a
ALT (IU/L)	26 \pm 8 ^a	39 \pm 18 ^a	31 \pm 13 ^a
ALP (IU/L)	169 \pm 50 ^a	233 \pm 84 ^a	190 \pm 49 ^a
ChE (IU/L)	49 \pm 10 ^a	49 \pm 12 ^a	58 \pm 15 ^a
AMY (IU/L)	3615 \pm 1040 ^a	3321 \pm 408 ^a	3426 \pm 835 ^a
T-CHO (mg/dL)	132 \pm 33 ^a	74 \pm 13 ^a	163 \pm 123 ^a
TG (mg/dL)	142 \pm 84 ^a	61 \pm 28 ^a	143 \pm 87 ^a
LDL-C (mg/dL)	11 \pm 4 ^a	6 \pm 2 ^a	15 \pm 12 ^a
HDL-C (mg/dL)	73 \pm 16 ^{ab}	44 \pm 7 ^b	83 \pm 47 ^a

Data are represented as the mean \pm SE.

^{ab} Means in a row without a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

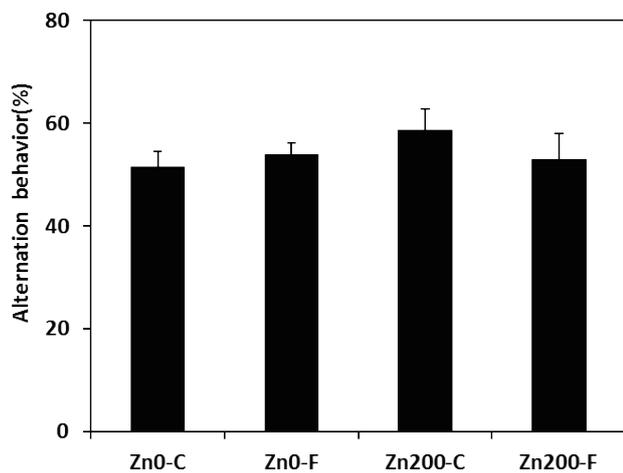


Fig. 3 Effects of Zn on spontaneous alternation behavior during an 8-min session in a Y-maze task in high-fat diet-fed aged mice after 30 week-administration of 200 ppm Zn.

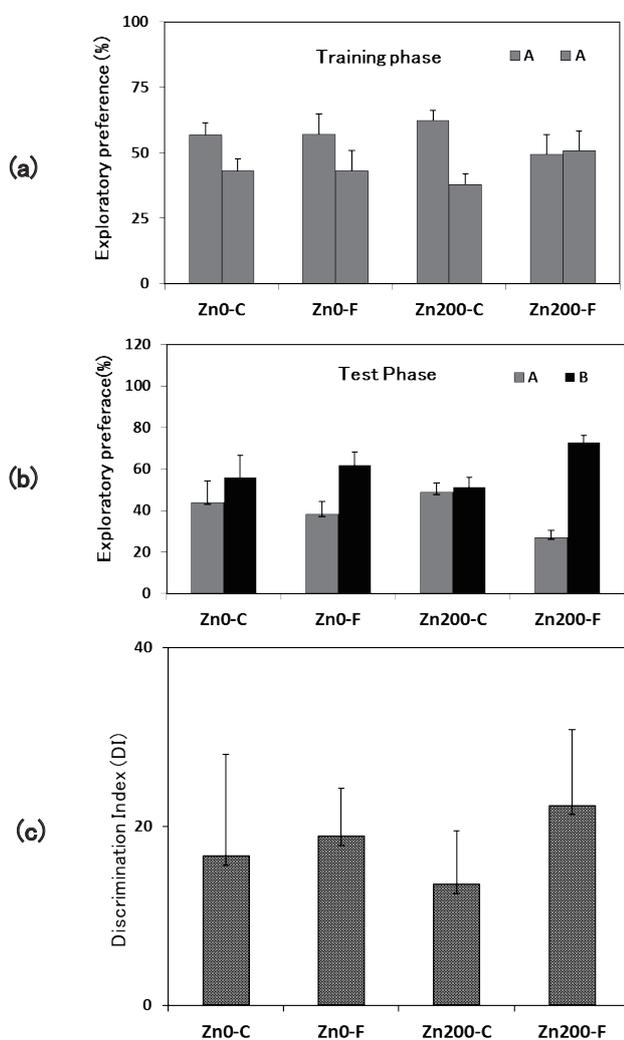


Fig. 4 Effects of Zn on exploratory preference during training phase (a) and during test phase (b) and DI (c) of an object recognition test in high-fat diet-fed aged mice after 30 week-administration of 200 ppm Zn. Discrimination index (DI) = (novel object position exploration time after 3h/total exploration time) - (novel object position exploration time after 0h/total exploration time) × 100

た。投与 31 週間後に行った受動的回避試験の結果は Fig. 5 に示した。Y 字型迷路試験で交替行動率 (%) を求めて比較した結果、いずれの群においても加齢により交替行動率 (%) は低くなっており、群間の差はなかった (Fig. 3)。新奇物体探索試験では、有意差は認められなかったものの Zn200-C 群は Zn0-C 群に比べて記憶能の低下傾向が見られ、Zn200-F 群では Zn200-C 群に比べて記憶能の向上傾向が示された (Fig. 4)。一方、受動的回避試験では、有意差は認められなかったが、Zn0-C 群、Zn200-C 群、Zn0-F 群に比べて、Zn200-F 群で記憶能の低下傾向が見られた (Fig. 5)。以上の結果より、高脂食下では、Zn 投与により受動的回避試験では記憶能の低下傾向があるが、新奇物体探索試験では記憶能が向上する傾向があるという逆の結果が得られることが示された。この結果と Zn の長期間投与の影響を確認するため、実験 2 では、Zn の投与量を 200 ppm から 500 ppm に増やし、投与 11 週間後に新奇物体探索試験を、投与 29 週間後に新奇物体探索試験及び恐怖条件付け試験を行った。投与 11 週間後に行った新奇物体認識試験では、いずれの群においても記憶能の低下は認められなかったが (データ非表示)、29 週間後に行った新奇物体認識試験では、有意差は認められなかったものの Zn500-C 群で記憶能の低下傾向が見られた (Fig. 6)。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¹⁸⁾、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¹⁹⁾。本研究においても 11 週間後に行った新奇物体認識試験では全ての群で記

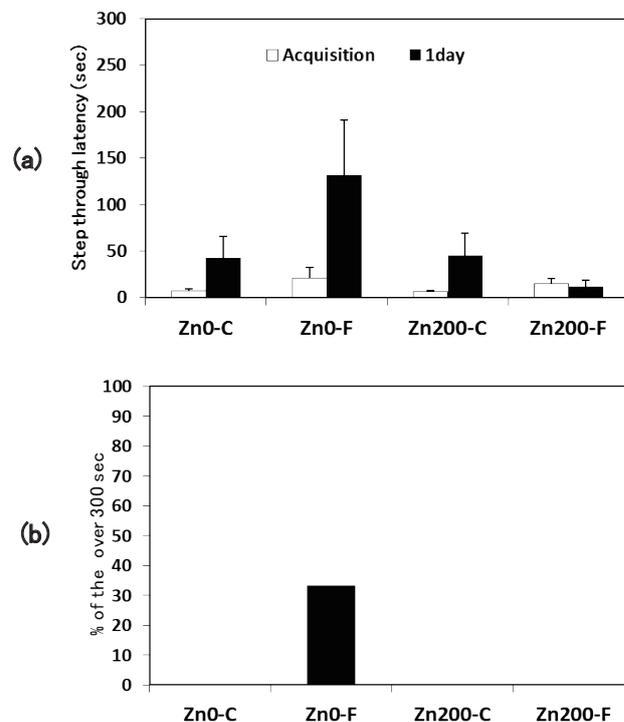


Fig. 5 Effects of Zn on step through latency (a) and on the impaired acquisition response (%) of the over 300 sec (b) 1 day later in a passive avoidance test in high-fat diet-fed aged mice after 31 week-administration of 200 ppm Zn.

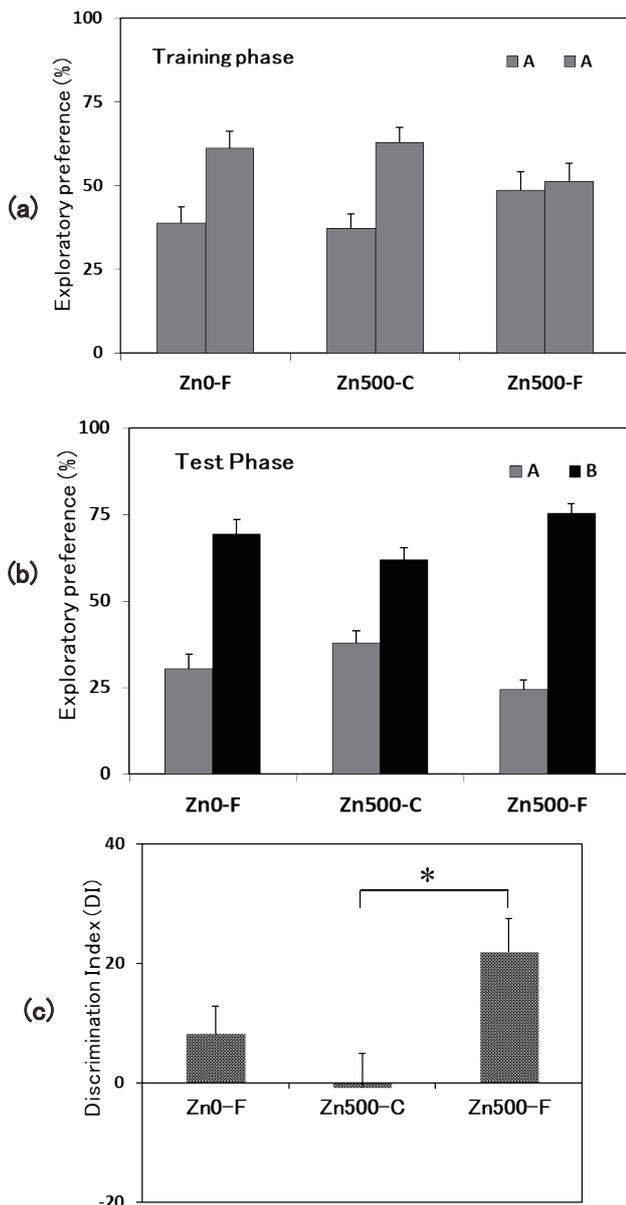


Fig. 6 Effects of Zn on exploratory preference during training phase (a) and during test phase (b) and DI (c) of an object recognition test in high-fat diet-fed aged mice after 29 week-administration of 500 ppm Zn. * $p < 0.05$.

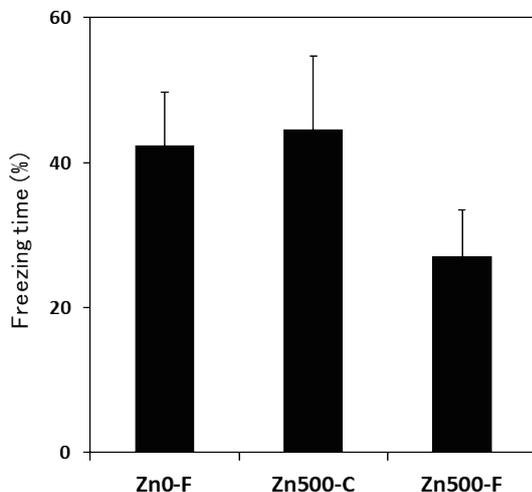


Fig. 7 Effects of Zn on a freezing time of a fear conditioning test in high-fat diet-fed aged mice after 29 week-administration of 500 ppm Zn.

憶能の変化が認められず、29週後に行った新奇物体認識試験では、Zn500-C群で記憶能の低下傾向が見られたことより、加齢マウスに長期間 Zn 投与を行うことにより、Zn 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。しかし、Zn500-F 群は記憶能の低下が認められず、Zn500-C 群に比べて有意に記憶能が向上していた (Fig.6)。一方、投与30週間後に行った恐怖条件付け試験では、有意差は認められなかったが、Zn500-F 群で記憶能の低下が見られた (Fig.7)。すなわち、高脂肪食下では、Zn の長期間投与により恐怖条件付け試験で記憶能の低下傾向が認められるが、新奇物体認識試験では記憶能の向上傾向が認められることが示された。

高脂肪食下での Zn 投与により記憶能が低下した受動的回避試験と恐怖条件付け試験はいずれも恐怖記憶の想起が起こるかどうかを調べる試験である。恐怖記憶には、扁桃体が重要な役割を果たすことが知られている²⁰⁾。一方、高脂肪食により記憶能が向上した新奇物体認識試験は海馬や嗅周皮質が重要な役割を果たす試験である^{17,21)}。脳の部位による高脂肪食の影響の違いが関与している可能性がある。今後、免疫組織学的染色等により部位による神経変性や酸化ストレスについて調べていく必要がある。

高脂肪食は脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンの分泌を上昇させるが、近年、海馬のレプチンが脳神経新生に関与する可能性が報告されている²²⁾。また、本研究で与えた高脂肪飼料 Quick Fat には牛脂が加えられており、一般飼料 CE-2 に比べてオレイン酸が多く含まれている。オレイン酸は活性酸素による細胞障害を防御するとの報告がある²³⁾。Zn による学習・記憶能障害を高脂肪食が防御する機構について、さらに遺伝子の発現機構等などにより詳細に検討していく必要がある。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP26350163 の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) 内閣府. 令和2年度 高齢化の状況及び高齢社会対策の実施状況: 令和3年版高齢社会白書 (全体版) (PDF版): pp2-6. https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2021/zenbun/03pdf_index.html (2021.9.30 閲覧)
- 2) 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.
- 3) Barnham KJ, Bush AI (2006) Metals in Alzheimer's and parkinson's diseases. Curr Opin Chem Biol, 12: 222-228.
- 4) 川原正博, 水野大 (2015) 微量元素と神経疾患: 疾患

- 関連タンパク質と金属とのシナプス間隙における相互作用. *Biomed Res Trace Elements* 26: 10-22.
- 5) Kawahara M, Kato-Negishi M, Tanaka K (2017) Cross talk between neurometals and amyloidogenic proteins at the synapse and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Metallomics* 9: 619-633.
 - 6) Kawahara M, Mizuno D, Koyama H, Konoha K, Ohkawara S, Sadakane Y (2014) Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia. *Metallomics* 6: 209-219.
 - 7) 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 subject of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414: 212-216.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345: 91-104.
 - 11) 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 Toxicol Sci* 44: 681-691.
 - 12) Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Schneider J, Wilson RS (2003) Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60: 194-200.
 - 13) Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider J, Wilson RS, Scherr PA (2006). Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol* 63: 1085-1088.
 - 14) HR Park, M Park, J Choi, KY Park, HY Chung, J Lee (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett* 482: 235-239.
 - 15) Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 19: 1699-1707.
 - 16) 田熊一敏, 永井拓, 山田清文 (2007) 学習・記憶行動の評価法. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* 130 : 112-116.
 - 17) Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13: 93-110.
 - 18) Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV (2015) Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 85: 296-302.
 - 19) Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Balialetti M, Mocchegiani 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.
 - 20) 天野大樹 (2012) 恐怖条件付け記憶の想起, 消去に対する扁桃体垂核の役割. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* 140 : 14-18.
 - 21) Wilson DI, Langston RF, Schlesiger MI, Wagner M, Watanabe S, Ainge JA (2013) Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* 23: 352-366.
 - 22) Yook JS, Rakwal R, Shibato J, Takahashi K, Koizumi H, Shima T, Ikemoto MJ, Oharomari LK, McEwen BS, Soya H (2019) Leptin in hippocampus mediates benefits of mild exercise by an antioxidant on neurogenesis and memory. *PNAS* 116: 10988-10993.
 - 23) 日比野英彦 (2006) オレイン酸は活性酸素よりの細胞障害を防御する. *オレオサイエンス* 6 : 50-54.