

各 10 匹)にわけた。

飼料の調製:魚粉抜き F1 飼料(船橋農場)にn-3(エイコサペンタエン酸(EPA)、持田製薬)あるいはn-6(リノール酸)を添加したものを実験飼料とした。対照は、n-9(オレイン酸)添加の飼料である。添加脂肪酸は酸化変性を受けやすいため、2 週間分をまとめて作製した。1 日分の飼料は、脱酸素剤とともにポリ袋に密閉し、マイナス 20 保存し、毎朝、開封して給餌した。

検索方法:3 群のマウスを 3 匹ずつ、給餌開始後 3 ヶ月、7 ヶ月および 12 ヶ月の時点で深麻酔下に放血し、脳を採取した。ホルマリンあるいはブアン溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切片を作製した。脳切片については、通常の HE 染色、KB 染色、Bodian 染色をほどこし、3 群の脳病理学的検索をおこなった。また、A β 蛋白抗体により老人斑を選択的に染め出し、3 群における A β 陽性の面積を画像解析により定量的に比較した。

飼料摂取の状態は、肝臓の脂肪酸分画の変化から判断した。肝臓組織を 10%乳剤として、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸 24 分画を定量し、各分画のモル濃度を算定した。なお、給餌後 12 ヶ月の動物では、小脳を採取し、その脂肪酸 24 分画も測定した。

C. 研究結果

本年度は、給餌開始後 12 ヶ月の時点の検索結果を報告する。ここでは、結果の理解をたすけるため、3 ヶ月および 7 ヶ月の所見(既報)をまず簡単に記載しておく。

1) 給餌後 3 ヶ月

給餌後 3 ヶ月の 3 群各 3 匹のマウスの肝臓の脂肪酸分画をまずしらべた。n-9 群を対照としたばあい、n-3 群と n-6 群では、著しい脂肪酸分画の変化がみとめられた。n-3 群(EPA 投与)では、アラキドン酸分画が低下し、ドコサペンタエン酸(DPA)とドコサヘキサエ

ン酸(DHA)分画が上昇していた(mol%値の平均値を非等分散として t-検定)。また、n-6 群(リノール酸投与)では、アラキドン酸分画の上昇がみとめられた。したがって、それぞれの給餌の効果が肝臓で反映されていた。

そこで脳切片を作成し、脳病理学的検索をおこなった。3 群のあいだで、明確な変化はみられなかった。A β 免疫染色で老人斑の検出をこころみたが、対照である n-9 群をふくめた 3 群において、老人斑はみられなかった。

2) 給餌後 7 ヶ月

a) 肝臓の脂肪酸分画

7 ヶ月給餌のマウスの肝臓の脂肪酸分画は、3 ヶ月給餌のそれと同様の変化がみられた。n(3EPA)投与では、アラキドン酸分画が低下し、ドコサペンタエン酸(DPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)分画が上昇していた。また、n-6 群(リノール酸投与)では、アラキドン酸分画の上昇がみとめられた。

b) 老人斑の出現

老人斑は、3 群すべてにみられた。これらの老人斑は、A β 免疫染色(A β ポリクロ 2 種、A β 1-40、A β 1-42)で陽性であった。好発部位は、海馬および大脳皮質(とくに帯状回、梨状野)である。

老人斑の多寡は、n-6 群では、散在性に少数みとめるのみであったが、n-9 群(対照)と n-3 群では多量にみられた。Tg マウスの老人斑は、A β 陽性の大小不揃いの顆粒がグループをなしている形態をしめした。また、散在している顆粒もみとめられた。ヒトの典型斑のように見えるものもあるが、コアは A β で染まらず、周辺の顆粒だけが A β 陽性になっているものが大半であった。しかし、PAS 染色では中央のコアが陽性であったところから、コアもまた A β 繊維が存在し、それが強固にかたまっている可能性が考えられた。

ガリヤス染色で神経細胞死の有無をしらべるところ、老人斑の周囲の神経細胞が細胞死をおこしていると

いう所見はまったく見られなかった。また、タウ蛋白免疫染色で変性神経突起の有無をしらべたが、変性神経突起やタウ陽性神経細胞はみとめられなかった。

c) マウスの加齢にともなって脳に出現するPAS陽性顆粒(PPG)

PPGはマウス脳の加齢にともなって、海馬および梨状野を好発部位として出現することが知られている。PPGの出現については、明確な差異がみられた。n-9群とn-6群の海馬では、PPGは存在しないか存在してもごく僅かであったが、n-3群の海馬では著しい数のPPGがみとめた。

3) 給餌後12ヶ月

7ヶ月から12ヶ月のあいだに、n3群(EPA投与)のマウスは2匹が死亡したため1匹のみの検索であり、n-6群(リノール酸投与)のマウスは1匹が死亡したため2匹の検索である。

a) 肝臓の脂肪酸分画

12ヶ月給餌のマウスの肝臓の脂肪酸分画検索では、n-3群(EPA投与)では、アラキドン酸が低下し、ドコサペンタエン酸(DPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)が上昇していた。また、n-6群(リノール酸投与)では、アラキドン酸分画の上昇がみとめられた。

b) 小脳の脂肪酸分画

12ヶ月給餌のマウスの小脳の脂肪酸分画検索では、n-3PA投与)では、アラキドン酸が低下し、ドコサペンタエン酸(DPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)が上昇しているのがみられた。

c) 脳病理学的検索

老人斑の数は、いずれの群でも7ヶ月投与マウスより増加していた。

n-3群(EPA投与)では、大型の老人斑が顕著にみられた。しかしながら、びまん性老人斑の数は少なかった。n-6群(リノール酸投与)では、老人斑を多数みとめたが、びまん性老人斑は少なかった。抗Aβ1-40抗体で染色される老人斑の数は、n-3群(EPA投与)より少なかったが、抗Aβ1-42抗体で染色され

るびまん性老人斑は、梨状野に多数みとめた。n-9群(オレイン酸投与、対照)では、n-3群あるいはn-6群にくらべて、より多数の老人斑がみられた。

d) マウスの加齢にともなって脳に出現するPAS陽性顆粒(PPG)

投与後12ヶ月のマウス脳では、7ヶ月のときの結果と異なり、PPGはn-3群の海馬において、少量をみとめるにすぎなかった。これに対して、n-9群とn-6群の海馬では、著しい数のPPGをみとめた。

D. 考察

給餌後3ヶ月マウスの肝臓脂肪酸分画検索からは、それぞれの給餌に添加された脂肪酸がマウスの体内に取り込まれていると考えられる。脳の老人斑については、対照であるn-9群をふくめた3群で検出されなかった。この時期にはまだ、本実験にもちいたTgマウスでは、老人斑は出現していない。

給餌後7ヶ月のn-3群(EPA投与)では、対照であるn-9群(オレイン酸投与)と同程度に老人斑が多数みられた。n-6群(リノール酸投与)では、老人斑はわずしかみられなかった。この所見の解釈は、n-9群(オレイン酸投与)を対照としたわけなので、EPA投与群では老人斑の出現数は対照と変わらず、リノール酸投与群では減っていた、とするのが妥当であろう。本所見は、予想していたものと逆であった。

給餌後12ヶ月のマウスでは、肝臓と同様の脂肪酸分画変化が、小脳にもみとめられた。したがって、脳の細胞膜やシナプス膜は、投与脂肪酸の影響を受けていることが確認された。老人斑についてみると、3群において、その数は7ヶ月のマウスよりもはるかに多数出現していた。n-3群(EPA投与)では、大型の老人斑(典型斑)が多数みられたが、びまん性老人斑の数は少なかった。3群のなかでは、n-9群(オレイン酸投与)においてもっとも多数の老人斑をみた。この結果は、7ヶ月でのそれと同一であった。したがって、老人斑の出現数はn-6群(リノール酸投与)で

は減少していたと判断される。また、n-3 群(EPA 投与)では、びまん性老人斑が少ないという特徴がみられた。1例だけの検索結果なので確定的なことはいえないが、EPA はびまん性老人斑の出現を抑制している可能性が考えられる。

マウスの脳加齢性変化であるPAS染色陽性顆粒は、7ヶ月のマウスでは n-3 群に多発していた。しかし、12ヶ月のマウスでは、3群の間に目立った差異はなかった。したがって、EPAがPAS染色陽性顆粒を多く出現させるということは言えない。

E. 結論

EPA 給餌によりびまん性老人斑の出現が抑制される可能性が示唆された。アルツハイマー病においては、典型斑よりもびまん性老人斑のほうが病態と関連していることが指摘されているので、EPA (n-3) はアルツハイマー病の予防に活用される可能性が考えられる。ごく最近、ドコサヘキサエイン酸(DHA) 給餌が、本研究で使用したのと同種の老人斑出現マウスにおいてその老人斑出現を抑制したという報告がなされている(北米神経科学会、ニューオルリンズ、2003年)。したがって、n-3系多価不飽和脂肪酸は、アルツハイマー病の予防に関与する可能性がきわめてたかいものと推定される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Haga S, Haga C, Aizawa T, Ikeda K Neuronal degeneration and glial cell responses following trimethyltin toxication in the rat brain. *Acta Neuropathol* 103: 575-582, 2002
- Mizuguchi M, Takashima S, Ikeda K, Kato M, Hori A. Loss of doublecortin from heterotopic gray matter of a fetus with subcortical laminar

heterotopia. *Neurology* 59: 143-144, 2002

- Tokudome S, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, Okuyama H, Kuriki K, Cheng J, Nakamura T, Fujii T, Ichikawa H, Itoh M. Rationale and study design of dietary intervention in patients polypectomized for tumors of the colorectum. *Jpn J Clin Oncol.* 2002 ;32:550-553.
- Itokawa M, Arai M, Kato S, Ogata Y, Furukawa A, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T Association between a novel polymorphism in the promoter region of the neuropeptide Y gene and schizophrenia in humans. *Neurosci Lett* 347:202-204, 2003
- Hamazaki T, Okuyama H. The Japan Society for Lipid Nutrition recommends to reduce the intake of linoleic acid. A review and critique of the scientific evidence. *World Rev Nutr Diet.* 2003 92:109-132.
- Miyazawa D, Ikemoto A, Fujii Y, Okuyama H. Dietary alpha-linolenic acid suppresses the formation of lysophosphatidic acid, a lipid mediator, in rat platelets compared with linoleic acid. *Life Sci.* 2003 73:2083-2090.
- Du C, Sato A, Watanabe S, Wu CZ, Ikemoto A, Ando K, Kikugawa K, Fujii Y, Okuyama H. Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils. *Biol Pharm Bull.* 2003 26:766-770.
- Cheng J, Ogawa K, Kuriki K, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, Okuyama H, Wang J, Luo C, Fujii T, Ichikawa H, Shirai T, Tokudome S. Increased intake of n-3 polyunsaturated fatty acids elevates the level of apoptosis in the

normal sigmoid colon of patients polypectomized for adenomas/tumors. *Cancer Lett.* 2003 193:17-24.

10. Tokudome S, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, Okuyama H, Kuriki K, Cheng J, Nakamura T, Fujii T, Ichikawa H, Itoh M. Rationale and study design of dietary intervention in patients polypectomized for tumors of the colorectum. *Jpn J Clin Oncol.* 2002 ;32:550-553.
11. 糸川昌成、新井誠、古川愛造、加藤修平、尾形容子、羽賀誠一、氏家寛、曾良一郎、池田和彦、吉川武男(2003) 統合失調症におけるニューロペプチドYの遺伝子解析、精神薬療研究年報 35:46-52, 2003
12. Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Ikeda K, Kato T Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Molecular Psychiatry* (in press)
13. Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Arai M, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese. *Biol. Psychiatry* (in press)

20030489 (2/2)

厚生労働科学研究研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

栄養学的介入による痴呆の予防・治療システム

(H13-痴呆・骨折-004)

平成15年度 総括・分担研究報告書

2 / 2 冊

主任研究者 植木 彰

平成16(2004)年 4月

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
植木彰	アルツハイマー病の病前生活習慣—特に食事因子について	長寿科学研究業績集(Advance in Aging and Health Research)	老年期痴呆の克服を目指して	財団法人長寿科学振興財団		2003	53-64
宮永和夫		若年痴呆家族会 [編]	若年痴呆患者家族のたまたかい	筒井書房	東京	2003	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M.OTSUKA, K.YAMAGUCHI, AND A.UEKI	Similarities and Differences Between Alzheimer's Disease and Vascular Dementia from the Viewpoint of Nutrition	Ann.N.Y.Acad.Sci	977	155-161	2002
植木 彰	アルツハイマー病の病前生活習慣 特に食事栄養因子について	老年期痴呆の克服を目指して		53-64	2003
植木彰	アルツハイマー病の予防: 栄養. 特集 非薬物によるアルツハイマー病の予防と治療	Cognition & Dementia	2 (2)	33-39	2003
植木 彰	痴呆の発症予防 特集 精神障害の予防	月刊精神科	2(4)	322-327	2003
大塚美恵子[訳] 植木彰[監修、解説]	イチョウの葉による記憶機能の増強.	JAMA [日本語版]		90-96	2003
大塚美恵子、植木彰	痴呆患者の食事因子の解析およびエイコサペンタエン酸(EPA)による認知機能改善効果の検討	Dementia Japan	15	21-29	2001
M.Kusumi, K.Ishizaki, H.Kowa, Y.Adachi, T.Takashima, F.Sakai, K.Nakashima	Glutathione S-Transferase Polymorphisms : Susceptibility to Migraine without Aura	European Neurology	49	218-222	2003

Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Yasui K, Wada-Isoe K, Urakami K, Takeshima T, Nakashima K,	A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease.	Neurobiology of Aging	25	291-294	2004
Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Yasui K, Wada-Isoe K, Urakami K, Takeshima T, Nakashima K	The Regulatory Region Polymorphisms of the MTHFR Gene Are Not Associated with Alzheimer's disease	Geriatr Cogn Disord	7	145-150	2004
苗村育郎、菅原純哉	T2 high intensity所見の原因は様々で脳血管病変以外の病巣も多い —脂質関連の所見を中心に	Cognition and Dementia	2	327-335	2003
苗村育郎、菅原純哉、 武村尊生、木村京子	栄養学的介入による痴呆の予防・治療システム	厚生労働科学研究報告書	1	15-19	2003
苗村育郎、田中紀子、 木之下徹、山下典生、 菅原純哉、武村尊生	痴呆性疾患の危険因子と予防介入	厚生科学研究報告書	1	23-26	2003
苗村育郎、菅原純哉、 武村尊生、小松完治、 木村京子	栄養学的介入による痴呆の予防・治療システム	厚生科学研究報告書	1	13-16	2002
Satoshi S, Mi Kyung Kim	Validation of Self-Administered Dietary Assessment Questionnaires Developed for Japanese Subject: Systematic Review	J Community Nutrition	5(2)	83-92	2003
Satoshi S, Tomiko T	Influence of Co-Habitation on a Family Line Resemblance in Nutrient and Food-Group Intake among Three Generation of Japanese Women	J Community Nutrition	5(2)	93-104	2003
Satoshi S, Yoshiko T, Mi Kyung Kim	Tailored Dietary Counseling Using Self-Administered Diet History Questionnaire is Effective for Hearth Promotion: Japanese Experience	J Community Nutrition	5(2)	112-119	2003

糸川昌成、新井誠、 古川愛造、加藤修平、 尾形容子、羽賀誠一、 氏家寛、曾良一郎、 池田和彦、吉川武男	統合失調症におけるニューロペプチドYの遺伝 子解析	精神薬療研究年報	35	46-52	2003
Itokawa M, Arai M, Kato S, Ogata Y, Furukawa A, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T	Association between a novel polymorphism in the promoter region of the neuropeptide Y gene and schizophrenia in humans.	Neurosci Lett	34	202-204	2003
Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Ikeda K, Kato T	Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. Molecular Psychiatry (in press)				

20030489

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。