

や抑うつ、妄想やせん妄の存在しているときには信頼できる結果が出ない。精神科をベースとして調査している場合には特にこの点に注意が必要であり、施行時期を遅らせるなどして工夫を凝らした。また超高齢者(85歳以上)では高率に難聴が生じて、検査が施行しづらくなるが、今回の被検者ではそのような被検者は含めていない。

MMSEは、アルツハイマー病の巣症状を敏感にとらえる傾向があり、アルツハイマー病の中期症状が始まっている患者群ではHDSより低下が大きくなるが、非アルツハイマー型痴呆には、むしろHDSの方が敏感に反応することが多い。本研究では両方を見比べながら、主たる標的群は生活習慣病による脳障害を有する群においた。

しかし、一般には「アルツハイマー型痴呆」という用語が広義に使用されすぎて、混乱が生じているのは周知の通りである。数年以上の追跡結果で見れば、アルツハイマー病群ではあらゆる痴呆スケールが大きく低下することが避けられず、アルツハイマー病ならびにこれに近いアルツハイマー型痴呆群は、生活習慣病群とは別に扱う必要が生じてくる。著者らは先行研究によってこの知見を得ている。

#### E. 結論

- (1) MCI患者群14名を対象として、栄養士による一年半の栄養学的介入のあと、主治医による1年半の指導が、赤血球膜の脂質組成に与える影響を確認した。栄養士の指導が終わっても、DHAを中心として、n-3系不飽和脂肪酸の低下は維持されており、n-6/n-3比はさらに低下する傾向を示した。
- (2) 今回の対照群については、栄養学的介

入により、魚の摂取量は増えたと思われるが、野菜の摂取は長くは続かず、ビタミンCやビタミンB12の増加は観られなかった。総コレステロールは低下していないのにHDLコレステロールの低下があり、コレステロール管理はうまくいっていなかった。

(3) 不十分な点はあったが、今回のデータで、数回の食事指導によって食事を変えることができれば、持続的に膜脂質組成を変えることが可能なことが示された。食事指導により高脂血症や脂肪酸のアンバランスを危険要因とした脳障害と痴呆には、予防効果が出ることを期待される。

#### F. 研究発表

1. Namura, I: Alcoholic brain damage and dementia viewed by MRI ..... with special reference to frontal atrophy and white matter damage in dyslipidemic patients. *Psychogeriatrics* 2006 (in press)

#### G. 関連する先行論文

1. 苗村育郎、菅原純哉、菱川泰夫：成人病による慢性脳障害の画像疫学(1)―大脳皮質の萎縮所見の危険因子について―。精神医学. 40:175-182, 1998
2. 苗村育郎、菅原純哉、菱川泰夫：成人病による慢性脳障害の画像疫学(2)―白質・基底核・脳幹障害の危険因子群のロジスティック解析―。精神医学 40:279-287, 1998
3. 苗村育郎：画像診断から見たアルコール症の器質的脳障害―痴呆化の頻度と発生予測の試み。日ア精医誌 5:91-101, 1998

4. 苗村育郎、阿部清子、菱川泰夫：痴呆の危険因子としての高血圧の疫学的検討-痴呆群の層別とロジスティック解析の問題点-. 精神医学 41:275-281, 1999
5. 苗村育郎、菱川泰夫：高脂血症の脳障害(2)-白質障害と痴呆化の危険度の推定. 精神医学 41:147-152, 1999
6. 苗村育郎；生活歴とMRIデータベースに基づく痴呆予測システム-ロジスティックモデルを用いた統計的手法とその精度. 精神医学 41:1051-1060, 1999
7. 菅原純哉 苗村育郎；海馬および側頭萎縮と高血圧の関係についての画像疫学的検討. 精神医学 41:505-512, 1999
8. 苗村育郎；危険因子研究の現状-痴呆の危険因子と統計モデル-. 老年精神医学雑誌 11:599-608, 2000
9. 苗村育郎；精神疾患への画像診断の応用---アルコール関連脳障害. 臨床精神医学講座 S10. pp.511-525, 中山書店 2000
10. 苗村育郎、菅原純哉；MRI の T2 強調画像の意味. Cognition and Dementia 2(4); 327-335, 2003
11. 苗村育郎、菅原純哉、武村尊生；EPA の減少と MRI 上の脳障害の関連および痴呆予防の可能性. 厚生科学研究費補助金 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(植木班)」(分担)総合研究報告書(3カ年のまとめ) p.12-23, 2004
12. 苗村育郎、菅原純哉、猪又祥子、武村尊生. 15年間の生活習慣病管理による痴呆予防効果の定量的判定-MRIデータベースに基づく脳障害予測モデルを利用した定量化-. 厚生労働科学研究費補助金(痴呆・骨折臨床研究事業)「痴呆の予防・治療と食事栄養(植木班)」研究報告書 p.24-37,2005

謝辞：本研究においては、膜脂質の測定は、同じ研究班でご指導いただいた、島根大学医学部環境生理学教室の橋本道男先生にお願い申し上げた。ご尽力とご指導に篤く感謝申し上げます次第であります。

症例数: 14例(男2:女12)  
 年齢: 68.9±5.2歳(57~76歳)  
 身長: 152.0cm±6.9cm(138.0~164.0cm)  
 体重: 53.9kg±9.3kg(38.0~67.0kg)  
 BMI: 23.2±2.8(17.8~27.6)

表1: 対象患者の背景

変数名	平均±標準偏差		差	差のSD	t	df	p	有意差
	指導前	指導後						
TP (mg/dl)	7.6±0.3	7.6±0.4	0.03	0.17	0.56	9	0.59	—
GOT (IU/dl)	24.9±9.5	22.3±6.5	2.58	5.93	1.5	11	0.16	—
BUN (mg/dl)	16.5±12.0	19.6±15.5	-0.02	4.07	-2.4	9	0.04	↑*
UA (mg/dl)	6.3±1.7	6.5±3.4	-0.18	1.73	-0.2	3	0.85	—
T. cho (mg/dl)	205±35	203±37	2	31.2	0.23	12	0.82	—
HDL-C (mg/dl)	62±14.1	58±11.5	2.88	6.3	2.22	12	0.04	↓*
LDL-C (mg/dl)	124±37	123±41	1.3	36.5	0.11	9	0.91	—
TG (mg/dl)	98±48.6	107±72.2	-9	52.4	-0.61	12	0.54	—
FBS (mg/dl)	107±19	110±25	-2.58	26.9	-0.33	11	0.75	—
WBC (/ml)	6116±1679	5883±1521	233.3	1409	0.58	11	0.58	—
Hb (g/dl)	13.4±1.5	13.2±1.6	0.23	0.29	2.76	11	0.018	↓*
Plt. (×10 <sup>4</sup> /ml)	23.7±4.7	22.9±5.9	0.8	1.98	1.36	10	0.2	—

\*: p<.05

表2: 栄養指導前後における一般血液生化学的検査の比較

変数名	リノール酸	$\alpha$ リノレン酸	アラキドン酸	EPA	DHA	EPA/AA	DHA/AA比	n-6/n-3比	
	18:2/n-6	18:3/n-3	20:4/n-6	20:5/n-3	22:6/n-3	-	-	-	
平均±標準偏差	指導前	8.25±1.15	0.19±0.22	9.03±1.25	2.36±0.87	6.53±1.39	0.27±0.10	0.73±0.17	1.91±0.48
	指導後1	9.03±1.49	0.21±0.12	9.45±1.48	3.10±0.86	8.75±1.39	0.34±0.12	0.94±0.18	1.49±0.36
	指導後2	9.73±1.35	0.13±0.02	9.47±1.24	2.31±0.69	9.04±1.83	0.25±0.10	0.98±0.21	1.38±0.29
p	指導前後1	<.01	0.83	0.25	<.001	<.01	<.01	<.01	<.001
	指導前後2	<.001	0.32	0.27	0.74	<.001	0.4	<.01	<.001
	指導後1後2	<.01	<.05	0.92	<.001	0.15	<.01	0.15	<.05
	<前:後2>	↑**	n.s.	n.s.	n.s.	↑**	n.s.	↑**	↓**

\*\* : p<.01

表3: 栄養指導前後における赤血球膜脂肪酸の変化

変数名	平均±標準偏差		差	差のSD	t	df	p	有意差
	指導前	指導後						
葉酸 (ng/ml)	10.5±3.45	8.9±3.06	2.61	3.16	3.09	13	0.0087	↓**
ビタミンB6 (ng/ml)	32.0±83.2	12.5±12.9	19.5	83	0.88	13	0.39	-
ビタミンB12 (pg/ml)	730±415	684±427	14.5	123.3	1.4	13	0.182	-
ホモシステイン ( $\mu$ mol/l)	7.82±2.14	9.14±2.57	-1.3	1.87	-2.61	13	0.021	↑*
ビタミンC ( $\mu$ g/ml)	7.19±3.49	8.34±3.44	-1.15	3.23	-1.33	13	0.205	-
ビタミンE (mg/dl)	1.55±0.68	2.66±1.04	-1.12	1.22	-3.4	13	0.005	↑**

\* : p<.05, \*\* : p<.01

表4: 栄養指導前後における血中ビタミンの比較

MMSE前	28.1±1.64	] n.s. ]	<.05
MMSE後1	27.6±1.86		
MMSE後2	22.3±5.74		

HDS-R前	25.3±4.22	] n.s. ]	n.s.
HDS-R後1	24.1±4.05		
HDS-R後2	21.6±5.52		

表5: 栄養指導前後のMMSE/HDS-R変化

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

「痴呆の予防・治療と食事栄養」

分担研究報告書

食事摂取量と認知機能の推移に関する研究

分担研究者 須貝佑一 認知症介護研究・研修東京センター 研究部長

## 研究要旨

本研究は要介護状態にある特別養護老人ホームの高齢者の栄養摂取状態が入所後の知的機能, 日常生活能力の推移にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることにある。とくに特別養護老人ホーム利用者の約80%にみられる認知症の進展にどのような影響があるかに焦点をあてた。

そのために特別養護老人ホーム入所者の日常の食事摂取の状況を調べ, 栄養摂取状態を評価するとともに調査対象者の日常生活レベル, 認知レベル, 認知症の有無を検索し, 食事摂取の状態と認知機能の推移について調べた。特別養護老人ホームの利用者では, 入所後にMMSEで測定される認知機能は在宅の一般高齢者平均28.2より有意に低く, 平均で8.9であった。1年間の認知レベルの推移も顕著で, 1年で平均-0.71点の低下がある。1年で約20%の入所者が死亡または入院のために退所する。一方, 健在で過ごす入所者の食事摂取の状態は概ね良好で, 1年間の食事摂取の状態から推算した栄養摂取量と認知レベルを調べると認知機能の低い利用者ほど栄養摂取状態が良好という負の相関を示した。これらの結果は淘汰された健在者群についてであって1年のうちに入院, または死亡した脱落群についても解析の必要がある。

### A. 研究目的

認知症の発症, 進展に食事内容や栄養摂取の状態が深く関わっているとの知見が集積されつつある。多くは一般の住民の中の高齢者を対象とした疫学的調査研究で明らかにされているが, ひとたび要介護状態になった高齢者にあっても食事摂取の状態, 栄養摂取の状態がその後の要介護の状態の推移や認知レベルの推移に影響を及ぼすかどうかについての研究は乏しい。本研究は要介護状態となって特別養護老人ホームに入所した高齢者の日常の食事摂取の状態と栄養状態を調べ, 食事が入所後の介護状態の推移, 認知レベルの推移に影響するかどうかを明らかにすることにある。

### B. 研究方法

施設介護を受けている要介護者として東京都杉並

区内の特別養護老人ホームの入所者202人(男性80人, 女性163人)を調査対象とした。調査同意を得たうえで, 入所者の平成16年4月から6月にかけてと平成17年4月から6月にかけての2回にわたり認知能力をMMSEで測定し, 1年間の推移を検査した。測定は専任の臨床心理士が各人に面接して行った。

食事摂取の状態は各人の誕生月内の連続4日間, 朝, 昼, 夕の食事摂取量を観察して調べた。各人の食事摂取量から食品栄養表ソフトを用いて各栄養素の摂取量を算出した。

調査対象者は誕生月ごとに健診を受けており, その際に調べられた身長, 体重, 血液一般の所見, 血液生化学データを調査, 栄養状態を評価した。これらの調査データをもとにベースラインの平成16年MMSEと各栄養素の摂取量の相関を検査した。

### C. 研究結果

平成16年、ベースラインのMMSEが測定できたのは187例であった。平均年齢は85.5±7.4歳で、男性41人、女性146人。平均MMSEは9.8±8.7であった。このうち平成17年4月までに40例が入院または死亡のため脱落した。1年間健在だったのは187例中147例だった。

ベースラインのMMSEでみると1年後も健在だった人のMMSEの平均は10.2±8.6点で、1年以内に入院、または死亡したケースのMMSEの平均は4.2±3.6で、明らかな有意差がみられた。ベースラインのMMSEの低得点は入院、または死亡のリスクが高いことを示唆する所見だった。

1年間健在だった入所者の1年間のMMSEの推移は平均で-0.71点の低下を示した。

一方、平成17年12月までに連続4日間の食事摂取状態が観察された。そのうち栄養摂取の状態が測定できたケースは94例である。男性、20例、女性74例、平均年齢は85.8歳で、62歳から105歳までの入所者であった。

平均の介護度は4.0、平均のMMSEは8.9であった。入所者の認知症の有無ではアルツハイマー病が調査した94例中68%を占め、脳血管認知症は9%に過ぎなかった。その他の認知症は約5%、認知症を認めず、生理的な老化あるいは虚弱によると考えられたケースは調査できた94例中18%であった。このことから入所者の約80%に何らかの認知症がみられたことになる。

誕生日月健診による血液データとMMSEによる認知レベルとの相関では血中コレステロール値がMMSEと有意の正の相関( $r=0.231, p<0.1$ )を示したが、その他血液中総たんぱく、血糖、中性脂肪、尿素窒素など栄養指標を示す血液所見とは相関が認められなかった。

入所者94例の食事摂取による一日の総熱量の平均は1047.3キロカロリーで、うち、800キロカロリーを下回っていたのは8例、8.5%であった。8例中6例は自立レベルで、MMSE零点が2例混じってはいるが、MMSEの平均は18.2と全体の平均を大幅に上回っていた。

MMSEと食事摂取による総熱量の相関をみると $r=-0.224 (p<0.1)$ と有意な負の相関を示した。摂取総熱量を体重あたりに計算して相関をみても $r=-0.376 (p<0.1)$ であった。MMSE零点レベルは食事全介助状態も含まれるため、零点ケースを除外してもMMSEと摂取熱量は有意な負の相関を示した。

おもな栄養素の摂取状態をみるとビタミンB群はB1が1日平均0.68mg、B2が1日平均0.79mg、B6が1日平均1.03mg摂取していた。ビタミンB12は1日平均5.5 $\mu$ gだった。この摂取量は厚労省の発表した日本人の食事摂取基準のうちの70歳以上の高齢者の推定平均必要量を満たしていた。

ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、葉酸についてもビタミンCは1日平均95.24mg、ビタミンDは1日平均6.33 $\mu$ g、ビタミンEは1日平均6.28mg、葉酸は1日平均318.7 $\mu$ gで、いずれも70歳以上の高齢者の推定平均必要量を上回っていた。食事摂取状態の著しく低い高齢者をのぞくと特別養護老人ホーム入所者94例の栄養素摂取は平均的であった。

各種栄養素の摂取状態とMMSEの相関を調べると炭水化物摂取量、ビタミンKの摂取量、微量元素の銅の摂取量以外はほとんどの栄養素摂取量とMMSEとは有意な負の相関を示した。

血中栄養素レベルでMMSEと有意な相関が認められたのはコレステロール値であった。すなわち、血中コレステロールレベルとMMSEとは $r=0.231 (p<0.05)$ の有意な順相関が認められ、食事中コレステロール摂取量とは有意な負の相関 $r=0.224 (p<0.05)$ を示すという結果だった。

### D. 考察

要介護状態にある施設入所高齢者の年間の変化は激しい。脱落例を死亡とみなすと1年で約20%が死亡し、入所者が入れ替わる。

今回の横断面での調査からみると要介護状態にあつて施設入所という環境下では食事摂取量すなわち

摂取総熱量と MMSE で測定される認知レベルとは有意な負の相関を示すことがわかった。しかし、これはベースラインの MMSE との関連をみたものであり、さらに1年間健在だったケースの結果とみななければならない。

認知症(痴呆症)、とくにアルツハイマー病や脳血管性認知症(痴呆症)については過剰な熱量摂取が認知症(痴呆症)発症のリスクとなることが知られているが、今回の結果はそうした熱量過剰摂取を意味していない。調査対象となった特別養護老人ホームでは、毎日の食事総熱量を約 1400 キロカロリーになるよう調節している。したがって、提供されている食事を全量摂取しても熱量過剰にはならないように設定されている。この状況下で提供される食事の総摂取量が少ない方が認知レベルが高い、という結果になっている。

極端な例では一日 800 キロカロリー以下の群 8 例中 6 例は MMSE で 20 点以上の認知レベルである。こうした結果と日常経験する認知症患者の示す食行動を考慮すると今回の負の相関は認知レベルが低いほど多食する傾向を反映した結果ではないかと思われる。認知レベルが低い群では多食行動が目立ち、認知レベルの高い群では提供された食事をえり好みして摂取している結果とすると解釈が可能である。

今回の調査の方法論的な問題でもあるが、一律に提供された食事をどれだけ摂取したかという計量は調査対象の食行動に大きく依存する。多食傾向のある認知症入所者の栄養摂取の状態は良好になる傾向があるし、少食あるいはえり好みのある高齢者では栄養摂取の状態は低くなる傾向を示すだろう。各種の栄養素摂取量は食事の摂取量から計算したものであるゆえに各人の食事摂取量で決まる。この結果、ほとんどのビタミン類、微量元素、脂質などの推定摂取量と MMSE とは有意の負の相関を示したのであろう。

今回の結果では食事摂取量から算出した摂取栄養素の量と血液中栄養素の濃度には相関がみられなかった。食物摂取量と血液中栄養素量とは一般に相関が

みられないことはこれまでの他の調査でもたびたび指摘されているが、血液中栄養素量は客観的で確実な栄養状態指標であり、その把握は重要である。今回は一部の栄養素の血液中濃度しか測れなかったが、その中でも血液中コレステロール値が要介護状態の高齢者の認知レベルと有意な順相関を示したことは興味深い。

各栄養素摂取の状態が何らかの形で認知レベルに影響を及ぼしているかどうかは平成16年のベースラインの MMSE 結果だけの調査からはわからない。とくに今回のように食行動が大きく関係しているとなるとなおさらである。その関係を明らかにするためには現在までの認知レベルの推移と栄養摂取の状態との関連を調べなければならない。さらに長期経過観察することで食行動の影響は相殺され、栄養摂取の推移と MMSE の推移との関連がみえてくるはずである。

とくに今回の調査で注目すべきことは脱落例がきわめて多いことである。淘汰された健在者のみの観察から得られたデータであったことも結果に偏りをもたらしたかもしれない。このため今後は死亡、脱落例も含めた解析も必要となろう。

## E. 結論

本研究は、要介護状態にある施設入所の高齢者の食事、栄養の状態と認知レベルを調べた。ベースライン調査における栄養摂取の状態と認知レベルとは有意な負の相関を示した。その背景には認知レベルに規定された食行動が大きく関与している可能性が考えられた。

さらに対象が健在で淘汰されたケースのみの観察であったことも問題点であった。今後、継続して調査することで栄養摂取の状態が要介護状態にある高齢者の認知レベルにどのような影響を及ぼすかが明らかになると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表 準備中
2. 学会発表 準備中



厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

「痴呆の予防・治療と食事栄養」

分担研究報告書

オメガ3系統長鎖不飽和脂肪酸がアルツハイマー病脳病理におよぼす影響の研究

分担研究者 池田 和彦

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所 副所長

研究要旨

本研究班長植木らの先行調査研究によれば、アルツハイマー病群においては食習慣の乱れが顕著であり、それは脂肪酸 $\omega 3/\omega 6$ の低下につながっている可能性がたかい。したがってこれらの変化を改善させるような栄養学的介入はアルツハイマー病の予防や治療に寄与することが期待される。文献的には、 $\omega 3$ 系統長鎖不飽和脂肪酸が記憶改善や抗うつ作用をもつ可能性が指摘されている。ところでアルツハイマー病にみられる記憶障害やうつ状態の原因は、海馬神経細胞の障害である可能性がたかい。また近年のうつ病研究からは、海馬の神経細胞新生が阻害されていることがうつの要因ではないかと想定されている。そこで $\omega 3$ 系統のEPAあるいはDHAが海馬神経細胞の新生および分化を促進するかどうかを培養レベルでしらべた。成熟ラット脳から海馬の細胞を培養し、神経幹細胞が高密度に生存できる条件をまずしらべた。通例使用されている線維芽増殖因子(FGF2)を添加するとある程度の幹細胞が得られるが、これに代えて別種の増殖因子を添加するときわめて多量の幹細胞を培養できることがあきらかになった。EPA および DHA はそれぞれ細胞毒性を有していたが、培地に抗酸化剤をいれて検索したところ、EPAとDHAとは、培養細胞の突起の延長総距離を対照(無添加あるいはアラキドン酸添加)にくらべて有意に増やすことがあきらかになった。

研究協力者

楯林 義孝: 東京都精神医学総合研究所  
気分障害研究プロジェクトリーダー  
千 秀 軍: 東京都精神医学総合研究所  
気分障害プロジェクト研究員

A. 研究目的

本研究班長植木らの先行調査研究によれば、アルツハイマー病群においては食習慣の乱れが顕著であり、それは脂肪酸 $\omega 3/\omega 6$ の低下につながっている可能性がたかい。したがってこれらの変化を改善させるような栄養学的介入はアルツハイマー病の予防や治

療に寄与することが期待される。

文献的には、 $\omega 3$ 系統長鎖不飽和脂肪酸が記憶改善や抗うつ作用をもつ可能性が指摘されている。ところでアルツハイマー病にみられる記憶障害やうつ状態の原因は、海馬神経細胞の障害である可能性がたかい。また近年のうつ病研究からは、海馬の神経細胞新生が阻害されていることがうつの要因ではないかと想定されている。

そこで $\omega 3$ 系統のEPAあるいはDPAが海馬神経細胞の新生および分化を促進するかどうかを培養レベルでしらべた。

## B. 研究方法

### 神経幹細胞の培養:

成体ラット脳から海馬領域を切除し、パパイン消化により細胞を分散させ、密度勾配の遠心分離をおこなった。特定細胞層に存在する細胞をあつめ、これを培養した。培地には栄養因子として、FGF2、BDNF、PDGFを単独で、あるいは混合して添加した。

### 被験物質:

エイコサペンタエン酸(EPA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)を検索物質として、アラキドン酸を対照とした。

## C. 研究結果

### 実験1 EPA および DHA の細胞毒性性

神経幹細胞の培養後に、EPA および DHA をそれぞれ 10mg/ml をスタートに段階希釈して培地に添加し、LDH 法により細胞毒性をしらべた。EPA および DHA は低濃度でも細胞毒性をしめした。そこでこれを解消するため、培地にアルファ・トコフェノールを添加して、EPA や DHA の酸化をおさえた。これにより、細胞毒性は抑制されたので、以下の細胞突起伸長におよぼす効果をしらべた。

### 実験2 EPA および DHA の神経幹細胞に対する効果

薬剤を添加したあと、細胞から伸長する突起の全長を画像法により測定した。EPA と DHA とは、培養神経幹細胞の突起の延長総距離を対照(無添加あるいはアラキドン酸添加)にくらべて有意に増やすことがあきらかになった。また、EPA あるいは DHA の添加により、分化マーカー免疫染色の強度が対照にくらべ増強していた。

## D. 考察

アルツハイマー病の初期にはうつ状態が高頻度に

みとめられるが、これは病気に随伴する症状というよりは病気の基本症状のひとつだと理解されはじめている。

アルツハイマー病でみられる記憶障害については海馬の神経細胞の傷害が重要な生物学的要素と考えられている。他方、うつ病研究においては、海馬歯状回に存在する神経幹細胞の新生が障害されている可能性をしめす種々の研究成果が近年出されている。

そこで本研究では、アルツハイマー病におけるうつ状態が海馬の神経幹細胞新生に関連づけられると仮定して、検索をおこなうことにした。本研究は、アルツハイマー病症状発現の予防および治療における栄養学的介入のなかで、 $\omega$ 3系統脂肪酸が抗うつ効果をもつかどうかの基礎をなすものである。

われわれの検索では、成体ラットの海馬から神経幹細胞を培養し、それに対する EPA および DHA の効果を見ようとするものであり、胎児ラット脳をもちいている従来の研究とは本質的に異なるものである。

成体ラット脳の花馬から新規の神経幹細胞を培養する系を確立したが、ここでは詳述しない。

EPA および DHA などの脂肪酸は培養株細胞に対して細胞毒性をしめすことが報告されているので、まず神経幹細胞に対する細胞毒性性をしらべた。神経幹細胞の培養後に EPA および DHA をそれぞれ 10mg/ml から段階希釈して添加し、細胞毒性をしらべたところ、両脂肪酸は低濃度でも細胞毒性をしめした。そこでこれを解消するため、培地にアルファ・トコフェノールを添加して、EPA や DHA の酸化をおさえた。これにより、細胞毒性は抑制された。

そこで EPA および DHA の神経幹細胞に対する効果をしらべた。薬剤を添加したあと、細胞から伸長する突起の全長を画像法により測定した。EPA と DHA とは、培養神経幹細胞の突起の延長総距離を対照(無添加あるいはアラキドン酸添加)にくらべて有意に増やすことがあきらかになった。また、EPA と DHA とは、細胞分化のマーカー免疫染色の強度が対照にくらべ増強し

ていた。

成体ラット海馬から得られる神経幹細胞を用いた本研究での所見はなお追試が必要であるが、橋本らは胎児ラット脳神経幹細胞が DHA により突起を伸長させることをみているので、確かさの可能性はたかいと考えられる。両脂肪酸が神経幹細胞の新生に促進的にかかわっているのかどうかについては、今後の検討を要するところである。

#### E. 結論

EPA および DHA の成体ラット海馬の神経幹細胞に対する効果をしらべた。薬剤を添加したあと、細胞から伸長する突起の全長を画像法により測定した結果、EPA と DHA は、培養神経幹細胞の突起の延長総距離を増やした。また、EPA と DHA の添加により、細胞は分化マーカー免疫染色の強度が増強していたことから、生体においても両脂肪酸は海馬の神経幹細胞の分化を促進させる可能性のあることが考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2005 Oct 13; [Epub ahead of print]

#### H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

「痴呆の予防・治療と食事栄養」

分担研究報告書

痴呆の予防・改善に関する実験学的研究

分担研究者 橋本 道男 島根大学医学部環境生理学教室・助教授

**研究要旨：**【目的】欧米での疫学調査結果では、認知症の予防には、魚油とポリフェノールの摂取が有効である事が報告されている事から、本研究では、アルツハイマー型認知症（AD）モデルラットを用いて緑茶カテキンによるアルツハイマー病予防効果と、ドコサヘキサエン酸（DHA）による認知症予防・改善効果の作用機序を明らかにするために、ラット胎児脳由来神経幹細胞機能、とくにその分化誘導能に及ぼすDHAの影響について検討した。

【結果】1）緑茶カテキンを5週齢のWistar系雄ラットに26週間給水投与したのち、ADモデルラットを作製すると、コントロール群では空間認知機能障害がみられるにもかかわらず、カテキンの飲水投与群ではコントロール群に比べて、認知機能障害の程度が軽度であった。また、カテキンの飲水投与群では、海馬・大脳皮質での抗酸化作用の指標である過酸化脂質と活性酸素種（ROS）が有意に低下した。これらの結果から、緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症の予防効果が示唆された。2）DHA添加神経幹細胞では、無添加細胞に比べて、分化誘導能、神経軸索伸長能、ならびにアポトーシス抑制作用が有意に増加した。この分化誘導促進作用には、Mash 1 や Neurogenin 1、などの分化誘導関連蛋白の発現増加が見出された。また、DHA長期投与ラットでは、コントロールラットに比べて海馬歯状回の神経幹細胞数が有意に増加した。

【考察】1）ポリフェノールである緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症の予防効果が実験的に実証され、その機序としてカテキンによる生体内抗酸化能増強作用に起因することが示唆された。2）DHAは神経幹細胞のニューロンへの分化誘導を促進する事がin vitroとin vivoの系で明らかとなり、DHAによるアルツハイマー型認知症予防・改善効果には新生ニューロンの関与が示唆された。

研究協力者

片倉賢紀 島根大学医学部環境生理学・助手

藤井由己 同大学医学部・事務補佐員

体内抗酸化能の低下と認知症の発症との関連性を考慮すると、ポリフェノールや魚油の主成分であるドコサヘキサエン酸（DHA）による生体内抗酸化能の増強作用は、認知症の予防・改善効果機序を解明するうえでは重要な要因であると思われる。

海馬や側脳室でその存在が明らかにされた神経幹細胞の多岐にわたる機能の解析により、神経再生は可能である、との報告がなされている。アルツハイマー型認知症の予防・改善効果の機序を解明するうえで、食品成分による神経再生能への影響を検討

## A. 研究目的

「アルツハイマー病と食事栄養」に関する欧米での大規模な疫学調査結果や平成13年度から開始された本研究班の疫学調査に関する中間報告によれば、アルツハイマー病の予防には魚油や野菜・果実が有効であることが推察されている。加齢に伴う生

する事は有意義であると思われる。本研究では、最初に、生体内で強力な抗酸化作用を発揮する緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症の予防効果を検討するために、アミロイドβ蛋白を脳内に沈着させ空間認知機能障害を誘発させたラット(アルツハイマー型認知症モデルラット：AD モデルラット)に緑茶カテキンを給水投与して、空間認知機能と脳、特に海馬・大脳皮質の抗酸化機能との関連性について検討した。また、DHAによるアルツハイマー型認知症予防・改善効果と新生ニューロンとの関連性を明らかにするために、ラット胎児脳由来神経幹細胞をもちいて、神経幹細胞機能に及ぼすDHAの影響について検討を行なった。

## B. 研究方法

1) ADモデルラットの作製法と空間認知機能評価法、ならびに緑茶カテキン投与：

ラットにペントバルビタール (60mg/kg) 麻酔下で、アミロイドβ蛋白 (1-40) (Aβ) が封入されたミニ浸透圧ポンプを背側皮下に装着し、カニューレを介してラットの脳梁にAβを持続注入する。ポンプ内のAβは2週間後には全て注入され、その後、放射状迷路法で評価した空間認知機能は低下することから、Aβの脳内沈着によりラットの空間認知機能は障害をうけ、ADモデルラットとして評価する事が出来る。このとき、放射状迷路法で得られる評価項目としては、Reference Memory Error (RME：参照記憶エラー)と Working Memory Error (WME：作業記憶エラー)があり、RMEは長期記憶、WMEは短期記憶の指標として各々扱われている。

5週齢雄 Wistar ラットに 0.5%緑茶カテキン (Polyphenon<sup>R</sup> E: epigallocatechin gallate (EGCG 63%), epicatechin (EC: 11%), epigallocatechin (EGC 6%), epicatechin gallate (ECG 6%))を 26週間にわたり飲水投与した後、ラットに Aβを封入したミニ浸透圧ポンプを装着させ空間認知機能障害ラット (ADモデルラット)を

作製し、放射状迷路法による空間認知機能評価を行なった。

2) ラットの血漿と海馬・大脳皮質での脂肪酸と過酸化脂質 (LPO) および活性酸素種 (ROS) の測定：

脂肪酸はガスクロマト法、LPO はチオバルビツール酸関連物質測定法 (TBARS 法)、ROS は DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)法で測定した。

3) ラット胎児脳からの神経幹細胞の単離・培養法の確立と in vitro の系での DHA による神経幹細胞機能への影響：

ラット胎児の終脳を単離し、細胞を分散した後 bFGF を含む培養液で 5~7 日間培養すると神経幹細胞の細胞塊 (neurosphere) が得られる。この neurosphere を bFGF の含まない培養液に移し培養すると、neuron、astrocyte、oligodendrocyte などの各種神経細胞に分化する (分化誘導能)。この neuron を組織免疫化学的手法を用いて、DHA 存在下での neuron の形態的・機能的変化を共焦点レーザー顕微鏡と画像解析ソフトにより、観察・解析評価を行なった。また、PCR 法により DHA 添加による発現蛋白を同定し、DHA による神経細胞への分化誘導促進効果の作用機序を検討した。

4) in vivo の系での DHA による神経幹細胞機能への影響：

3 世代魚油抜き飼料で飼育した 18 週齢雄ラットに 8 週間、DHA の経口投与を行った。この間、投与 3 週間目から BrdU (分裂細胞マーカー) を 5 日間腹腔内投与したのち、4 週間経過後にパラホルムアルデヒドによる脳固定を行い、脳スライス標本作製して、海馬歯状回の BrdU 染色細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、NIH イメージをもちいてその画像解析と定量化を検討した。

### C. 研究結果

1) アミロイドβ蛋白誘発性空間認知機能障害に及ぼす緑茶カテキンによる予防効果：

0.5% Polyphenon E (PE) を 26 週間予め投与した PE 前投与 AD モデルラット群では AD モデルラット群に比べて、RME と WME は共に有意に低下した (図 1)。この結果から、緑茶カテキンによるアルツハイマー型痴呆予防効果が示唆された。

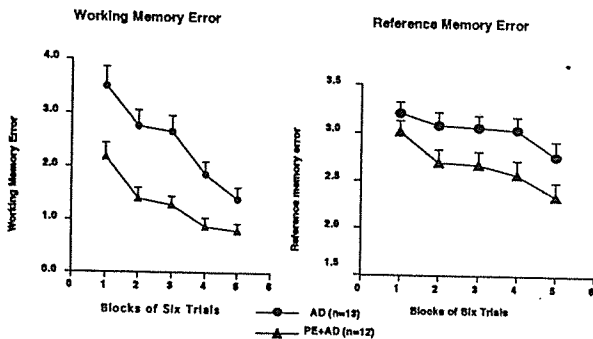


図 1 AD モデルラットの空間認知機能障害におよぼす緑茶カテキン前投与の影響

2) 海馬・大脳皮質での過酸化脂質と ROS に及ぼす緑茶カテキンの影響：

PE 前投与 AD モデルラット群では AD モデルラット群に比べて海馬の過酸化脂質量と ROS 量はそれぞれ有意に減少した ( $P < 0.05$ )。

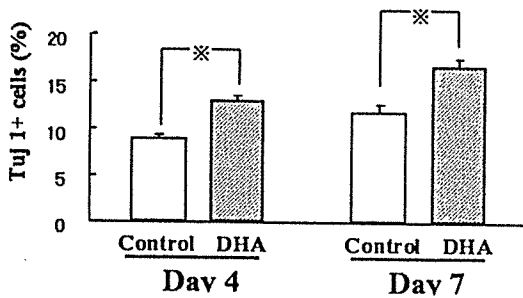


図 2 神経幹細胞での DHA による分化誘導促進作用

3) DHA による神経幹細胞機能への影響：

ラット胎児の大脳から単離・培養した神経幹細胞

に 10μg の DHA を添加して、4 日目と 7 日目には、神経幹細胞から新生ニューロンへの分化誘導が DHA 無添加細胞に比べて有意に亢進した (図 2)。

DHA 添加により、神経幹細胞のアポトーシス抑制効果、神経軸索突起の伸長増強作用、さらには自己増殖抑制作用が見いだされた。また、PCR 法により発現蛋白を検討したところ、DHA 添加神経幹細胞では分化誘導と関連の深い Mash 1 と Neurogenin 1 の発現量が増加し、逆に、増殖に関連の深い Hes 5 の発現量は低下した。

In vivo の系において、DHA 長期投与ラットの脳スライス標本による海馬歯状回領域の BrdU (神経幹細胞マーカー) と NeuN (成熟ニューロンマーカー) による二重染色(+)細胞数は、DHA 投与群ではコントロール群に比べて有意に増加した (図 3)。

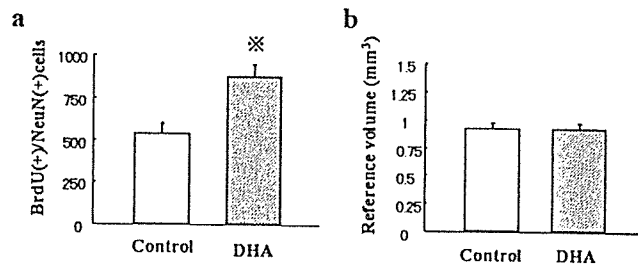


図 3 海馬歯状回での DHA によるニューロン新生促進作用

a: BrdU (神経幹細胞マーカー) と NeuN (成熟ニューロンマーカー) による二重染色(+)細胞数

b: 海馬歯状回の容積

### D. 考察

欧米における大規模な疫学調査結果や、本研究班の疫学調査結果ならびに介入試験結果では、魚油や抗酸化物質の摂取増加はアルツハイマー病発症の予防とその進展を抑制する可能性のあることが明らかにされているが、その詳細なメカニズムは不明である。

分担者らは食餌性 DHA がアルツハイマー型認

知症モデルラットでの空間認知機能障害の発症を予防（2002）・改善（2005）することを見出し、このDHAによる機能障害予防効果は、海馬・大脳皮質での抗酸化作用をDHAが増強することに起因することを報告した。

本実験では、生体内での抗酸化作用が食品成分中最も高いとされているカテキンが、ADモデルラットの空間認知機能障害の発症を予防することが明らかにされた。この予防効果の詳細な機序は不明である。しかし、ADモデルラットの海馬・大脳皮質において増加した過酸化脂質やROS量が、長期間、緑茶カテキンを摂取することにより低下することから、少なくとも緑茶カテキンによる生体内抗酸化能増強作用がAD発症への予防効果に影響を及ぼしたものと思われる。カテキンが血液脳関門を通過して神経細胞に作用する可能性については未だ明らかにされていない。しかし、加齢による抗酸化力の低下と認知症発症頻度の増加とは密接に関連する事が良く知られていることから、緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症予防効果機序として、カテキンの生体内抗酸化力増強作用が推察される。

最近の脳研究の進歩には目覚ましいものがあるが、その一つとして、神経幹細胞が海馬や側脳室周辺でその存在が見出されたことである。その後の多くの研究成果により、この神経幹細胞が新生ニューロンに分化することが明らかとなり、神経再生の可能性が示唆されている。今回、ラット胎児脳由来神経幹細胞を用いて検討したところ、神経幹細胞から新生ニューロンへの分化誘導がDHA摂取により増加することが明らかとなった。神経幹細胞は記憶・学習機能の中心的な役割を司る海馬に存在することから、DHA摂取により増加した神経幹細胞が、空間認知機能障害ラットの記憶・学習機能改善効果に寄与している可能性が推察される。

## E. 結論

緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症の予防効果が動物実験により実証され、アルツハイマ

ー型認知症にたいするDHAの予防・改善効果には、海馬でのニューロン新生が関与する可能性が明らかとなった。

## F. 研究発表

著書

1. Michio Hashimoto and Shahdat Hossain. Effects of dietary docosahexaenoic acid on spatial cognition of normal and Alzheimer's disease model rats. NOVA Science Publishers, Inc., New York, *in press*
2. 橋本道男、食品脂質と脳機能（総説）、「脂質栄養と健康」日本栄養・食糧学会監修、p217-242、2005

論文

1. Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Yoko Tanabe, Osamu Shido. Effects of aging on the relation of adenylyl purine release with plasma membrane fluidity of arterial endothelial cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73: 475-483, 2005
2. Naoko Tanaka, Namie Nejime, Yoko Kubota, Satomi Kagota, Keiko Yudo, Kazuki Nakamura, Masaru Kunitomo, Koichi Takahashi, Michio Hashimoto, Kazumasa Shinozuka. Myosin light chain kinase and Rho-kinase participate in P2Y receptor-mediated acceleration of permeability through the endothelial cell layer. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 335-340, 2005.
3. Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Molecular and Cellular Biochemistry* *in press*.
4. Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Haque Abdulle, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in

- amyloid  $\beta$ -infused rats relates to the decreases of amyloid  $\beta$  and cholesterol levels in detergent insoluble membrane fractions. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1738: 91-98, 2005.
5. Eisuke Kawakita, Michio Hashimoto, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience in press*.
  6. 山下一也、井山ゆり、橋本道男、加藤節司、地域在住高齢者のBMI、食事栄養調査、血清アルブミン、血清脂質に関する研究。島根県立看護短期大学紀要 11: 1-8, 2005.
  7. Yoko Tanabe, Michio Hashimoto, Abdul Haque, Kozo Sugioka, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Osamu Shido. Dietary effects of docosahexaenoic acid on the spatial cognition learning ability in rats fed n-3 fatty acid-adequate diet. *Shimane Journal of Medical Science*. 22: 29-34, 2004-2005.
  8. 橋本道男、ドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と神経疾患への応用、*オレオサイエンス* 6: 67-76, 2006.
  9. 橋本道男、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の記憶・学習機能向上効果とアルツハイマー型認知症への応用、*行動科学*、2006、印刷中

#### 国際学会発表

1. M. Hashimoto, Y. Tanabe, Y. Fujii, H. Shibata, O. Shido. Docosahexaenoic acid is a possible therapeutic means of ameliorating learning deficiencies attributed to Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Parkinson's Diseases: 7<sup>th</sup> International Conference AD/PD 2005*, March 9-13, 2005, Sorrento, Italy
2. M. Hashimoto, K. Matsuzaki, A. Haque, T. Yamakuni, Y. Mimaki, Y. Sashida, O. Shido, Y. Ohizumi. F-1, a citrus flavonoid, makedly protects the impairment of leaning ability in Alzheimer's disease model rats. *Alzheimer's and Parkinson's Diseases: 7<sup>th</sup> International Conference AD/PD 2005*, March 9-13, 2005, Sorrento, Italy
3. M. Hashimoto, M.A. Haque, K. Yamashita, O. Shido, A. Ueki. Effects of n-3 fatty acid on impairment of spatial cognition learning ability in amyloid  $\beta$ -infused rats. *3<sup>rd</sup> Annual Congress International Academy on Nutrition and Aging*, May 6-8, 2005, Saint Louis, USA
4. K. Yamashita, Y. Iyama, M. Hashimoto, S. Kato. Relationships among cognitive function and fish consumption in elderly people. *3<sup>rd</sup> Annual Congress International Academy on Nutrition and Aging*, May 6-8, 2005, Saint Louis, USA
5. K. Shiwaku, M. Hashimoto, K. Kitajima, A. Nogi, E. Annurad, E. Byambaa, Y. Yamane. Triglyceride levels are ethnic-specifically associated with as an index of stearoyl-CoA desaturase activity and n-3 PUFA levels in Asians. *The 1<sup>st</sup> International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome*, Berlin, Germany, 2005

#### 国内発表

1. 仲川清隆、橋本道男、長嶋 等、小林國男、松末隆志、荒井啓行、宮澤陽夫、プラズマローゲンの神経細胞死抑制作用：脳機能賦活食材の開発を目指して、第7回生化学研究会シンポジウム・仙台、2005、1月、仙台
2. 橋本道男 (話題提供者)、DHA が認知学習を促進する、日本行動科学学会第12回ウインターカンファレンス、2005、3月、妙高高原
3. 山国 徹、松崎健一郎、橋本道男、大泉 康、F-1, a natural compound, improves impairment of memory and inhibits  $\beta$ -amyloid accumulation. 第78回日本薬理学会年会、2005、3月、横浜
4. 橋本道男、ハク・アブドゥール、石川友美、原 征彦、紫藤 治 (シンポジスト)、カテキンによるアルツハイマー型痴呆予防効果、第2回日本カテキン学会総会、2005、6月、横浜
5. 板村裕之、中村宗一郎、橋本道男、赤間一仁、中村守彦、伴 琢也、小林伸雄、健康長寿社会を創



出するための医工農連携プロジェクトー新たな体  
解析システムの確立と地域に根ざした機能性食品  
の開発ー 第4回産学官連携推進会議、2005、6  
月、京都

6. 橋本道男、川北映輔、片倉賢紀、矢野 崇、原田  
剛、ハク・アブドゥール、水口 清、紫藤 治、  
内在性神経幹細胞の分化誘導と n-3 系多価不飽和  
脂肪酸、第 14 回日本脂質栄養学会、2005、9 月、  
姫路
7. 橋本道男、川北映輔、原田 剛、片倉賢紀、岡崎  
友史子、Haque Md Abdul、矢野 崇、水口 清、  
紫藤 治、n-3 系多価不飽和脂肪酸の空間認知機  
能改善効果と内在性神経幹細胞、第 33 回薬物活  
性シンポジウム、2005、10 月、新潟
8. 松崎健太郎、山国 徹、中田徳仁、橋本道男、  
Haque Md. Abdul、三巻祥浩、指田 豊、紫藤  
治、大泉 康、A $\beta$  誘発性学習・記憶障害に対す  
る果実成分 F-1 の保護作用およびそのメカニズム、  
第 56 回日本薬理学会北部会、2005、10 月、新潟
9. 橋本道男、片倉賢紀、田邊洋子、篠塚和正、紫藤  
治、 $\beta$ -アミロイド蛋白の脳内沈着によるラットの  
空間認知機能障害はドコサヘキサエン酸投与によ  
り改善する、第 108 回日本薬理学会近畿部会、  
2005、11 月、西宮

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許申請中

平成 17 年 2 月 22 日、神経再生促進剤、発明者：  
橋本道男・紫藤 治・川北映輔・原田 剛、出願  
人：持田製薬株式会社、国立大学法人島根大学、  
日本国、特願 2005-46203  
国際特許化への申請書作成中

### 2. 実用新案登録

なし

# 厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合 研究事業

痴呆の予防・治療と食事栄養

(H16-痴呆・骨折-002)

平成17年度 総括・分担研究報告書

2/2冊

主任研究者 植木 彰

平成18(2006)年 4月

研究成果の刊行に関する一覧表

(平成 17 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
宮永 和夫	認知症高齢者の薬物療法 特集1「通所サービスにおける認知症高齢者のケア」	通所けあ	3(4)	32-40	2005
宮永 和夫	アンチエイジングサプリメントの認知機能に対する効果 DAH(ドコサヘキサエン酸) 特集「抗加齢サプリメントの認知機能改善効果」	老年精神医学雑誌	17(1)	39-46	2006
Kumiko Ishizaki, Takao Takeshima, Yoko Fukuhara, Haruko Araki, Kazuhiro Nakaso, Masayoshi Kusumi and Kenji Nakashima	Increased plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 in migraine	Headache	45	1224-1228	2005
Hisanori Kowa, Emi Fusayasu, Tamami Ijiri, Kumiko Ishizaki, Kenichi Yasui, Kazuhiro Nakaso, Masayoshi Kusumi, Takao Takeshima and Kenji Nakashima	Association of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene in patients of migraine with aura	Neuroscience Letters	374	129-131	2005
Takashi Nomura, Yuichi Inoue, Masahiro Miyake, Kenichi Yasui and Kenji Nakashima	Prevalence and clinical characteristics of restless legs syndrome in Japanese patients with Parkinson's disease	Movement Disorders	21(3)	380-384	2006
大塚 美恵子	食事・栄養 アルツハイマー病の危険因子と予防の可能性	Modern Physician	25(9)	1073-1076	2005
大塚 美恵子	女性の認知症・アルツハイマー病と生活習慣 特集「女性外来のいまー性差医療をめぐる課題と展望の多角的アプローチ 女性外来での重要疾患とその現状」	カレントセラピー	24(2)	49-52	2006
大塚 美恵子	食事・栄養 特集「認知症の予防・治療ー新しい時代への序章 生活習慣によるアルツハイマー病の予防」	カレントセラピー	24(3)	51-55	2006

Ikuro Namura	Alcoholic Brain Damage and Dementia viewed by MRI; with Special Consideration on Frontal Atrophy and White Matter Damage in Dyslipidemic Patients	Psychogeriatrics (in press)			2006
橋本 道男	ドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と神経疾患への応用	オレオサイエンス	6(2)	67-76	2006
Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Haqu Agdul and Osamu Shido	Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid $\beta$ -infused rats relates to the decreases of amyloid $\beta$ and cholesterol levels in insoluble-membrane fractions	Biochimica et Biophysica Acta	1738	91-98	2005
Abdul M. Haque, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Yukihiko Hara and Osamu Shido	Long-Term Administration of Green Tea Catechins Improves Spatial Cognition Learning Ability in Rats	J Nutr	136	1-5	2006
E.Kawakita, M. Hashimoto and O. Shido	Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo	Neuroscience (in press)			2006