

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

今回の横断面での調査からみると要介護状態にあっ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。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。平成16年と平成17年の2回MMSEを測定しており、平成17年のMMSEの結果が出そうとこの1年間のMMSEの推移が明らかとなるであろう。認知機能の高い入所者では別に補食や間食をしている場

合もある。提供された食事以外の食事摂取の状況を把握したうえで認知レベルの変動を引き続き調査していくことが今後の課題である。

#### 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)総合研究報告書(2ヵ年のまとめ)

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。アルツハイマー型認知症においては、脳において老人斑、神経原線維変化(タングル)、神経細胞変性がみとめられる。分担研究者は、脳に老人斑を出現するトランスジェニックマウスを $\omega 3$ 脂肪酸含有飼料あるいは $\omega 6$ 脂肪酸含有飼料で飼育したばあい、びまん性老人斑の出現が抑制される可能性を見ているので、平成16年度は、EPAあるいはDHAが老人斑形成を抑制する機序について培養細胞系をもちいて検索した。ヒト・アミロイド幹体蛋白(APP)を産生する培養細胞にEPAあるいはDHAを添加したところ、24、48時間後の培養上清の $A\beta 1-40$ 、 $A\beta 1-42$ 量は対照と比べて有意の差をしめさなかった。平成17年度はアルツハイマー病にみられるうつ症状に対する栄養学的介入をめざして、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培養レベルでしらべた。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。

## 研究協力者

難波吉雄:青森県健康福祉部次長

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。

アルツハイマー型認知症においては、脳において老人斑、神経原線維変化(タングル)、神経細胞変性がみとめられる。分担研究者は、脳に老人斑を出現するトランスジェニックマウスを $\omega 3$ 脂肪酸含有飼料あるいは $\omega 6$ 脂肪酸含有飼料で飼育したばあい、びまん性老人斑の出現が抑制される可能性を報告しているので、平成16年度は、EPAあるいはDHAが老人斑形成を抑制する機序について培養細胞系をもちいて検索した。

平成 17 年度は、 $\omega$ 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ので、うつ症状改善のための栄養学的介入についての基礎的研究をおこなった。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、海馬における神経細胞障害による可能性がたかい。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を促進するかどうかを培養レベルでしらべた。

(なお、用語「痴呆」は 2004 年 12 月に「認知症」に変更となったので本用語を使用している。)

## B. 研究方法

### (1) 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1

細胞株: 以下の2細胞株をもちいた。これらは  $A\beta$  蛋白のもととなるヒト・アミロイド幹体蛋白 (APP) をハムスター細胞 (CHO 細胞) に強制導入したものである。

CHO-695 は、ヒト APP 遺伝子の全長を導入したものである。

1)

CHO-W は、Swedish 変異の APP 遺伝子導入を導入したものである。

#### 被験物質添加法:

CHO-695 細胞および CHO-W 細胞をフラスコで継代培養し、24 穴プレートに播種した。

播種 24 時間後に EPA あるいは DHA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加した。培地は DMEM に 10% FBS と 0.5% BSA を加えてものである。培地には培養選択のために抗生物質 G418 を加えている。

$A\beta$  測定: 薬剤添加 24、48 時間後に培養上清を回収し、そのなかに存在する  $A\beta$  1-40、 $A\beta$  1-42 量を

$A\beta$  測定キット (IBL 社製) にて測定した。

### (2) 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2

#### 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epsin 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みつめ、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。

#### 被験物質添加法:

エイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエ酸 (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

### (1) 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1

実験結果は CHO-695 と CHO-W とで同様であったので、以下 CHO-W 細胞の結果を報告する。

#### CHO-W 細胞と EPA

細胞播種 24 時間後に EPA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加した。その 24、48 時間後に培養上清を回収し、そのなかに存在する  $A\beta$  1-40、 $A\beta$  1-42 量を  $A\beta$  測定キットにて測定した。

24 時間後および 48 時間後の EPA 無添加 (対照) の培養上清  $A\beta$  1-40、 $A\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml および 600pg/ml であった。EPA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加したばあいの 24 時間後および 48 時間後の培養上清  $A\beta$  1-40、 $A\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml 前後および 600pg/ml 前後であり、これらの数値はすべて対照と比べて有意の差をしめさなかった。

## 2) CHO-W 細胞と DHA

細胞播種 24 時間後に DHA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加した。その 24、48 時間後に培養上清を回収し、そのなかに存在する A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量を A $\beta$  測定キットにて測定した。

24 時間後および 48 時間後の DHA 無添加(対照)の培養上清 A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml および 600pg/ml であった。DHA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加したばあいの 24 時間後および 48 時間後の培養上清 A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml 前後および 600pg/ml 前後であり、これらの数値はすべて対照と比べて有意の差をしめさなかった。

## (2) 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2

### 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

われわれはすでに、脳に老人斑を出現するトランスジェニックマウスを $\omega$ 3 脂肪酸含有飼料あるいは $\omega$ 6 脂肪酸含有飼料で飼育したばあい、びまん性老人斑の出現が抑制される可能性を示唆している。そこで平成 16 年度は、 $\omega$ 3 長鎖不飽和脂肪酸の EPA や DHA が老人斑アミロイド構成蛋白である A $\beta$  蛋白の産生を抑えるかどうか、抑えたとすればその機序はどのようなものかを培養レベルでしらべることにした。

ヒト・アミロイド幹体蛋白(APP)をハムスター細胞(CHO 細胞)に強制導入した2細胞株をもちいた。今回の検索で、これらの細胞は培養上清に A $\beta$  1-40 蛋白を 1500pg/ml 産生しており、また A $\beta$  1-42 蛋白を 600pg/ml 産生していることが明らかになった。従って両細胞は今回の実験系に活用できることがわかった。

そこで細胞播種 24 時間後に EPA あるいは DHA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加し、その 24、48 時間後の培養上清の A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量を A $\beta$  測定キットにて測定した。24 時間後および 48 時間後の培養上清 A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml 前後および 600pg/ml 前後であった。これらの数値はすべて対照と比べて有意の差をしめさなかった。

この結果からは A $\beta$  蛋白が細胞外に分泌される過程を EPA あるいは DHA が抑制する可能性は少ないものと解釈される。しかしながら APP から産生された細胞内貯留の A $\beta$  については今回検索していない。最近の報告からは、神経細胞毒性を有するものは細胞内の A $\beta$  だと想定されているので、今後、細胞内 A $\beta$  産生にたいして EPA あるいは DHA が抑制効果をしめしているのかどうか検索しなければならない。

また、老人斑アミロイドの A $\beta$  蛋白沈着は A $\beta$  蛋

白の増加と A $\beta$  蛋白の除去とのバランスから考察されるべきものでもあるので、EPA あるいは DHA が A $\beta$  蛋白の除去に係わっている可能性も検証されなければならない。

ついで平成 17 年度は、アルツハイマー病の初期に頻発するうつ状態への栄養学的介入の基礎研究をおこなった。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、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、検索をおこなった。

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。

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、両脂肪酸ともに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 あるいは DHA の添加では、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の神経幹細胞が 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

ヒト・アミロイド幹体蛋白 (APP) をハムスター細胞 (CHO 細胞) に強制導入した 2 細胞株をもちいた。今回の検索で、これらの細胞は培養上清に A $\beta$  1-40 蛋白を 1500pg/ml 産生しており、また A $\beta$  1-42 蛋白を 600pg/ml 産生していることが明らかになった。従って両細胞は今回の実験系に活用できることがわかった。

そこで細胞播種 24 時間後に EPA あるいは DHA をそれぞれ 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml 添加し、24、48 時間後の培養上清の A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量を A $\beta$  測定キットにて測定した。24 時間後および 48 時間後の培養上清 A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42 量は、それぞれ 1500pg/ml 前後および 600pg/ml 前後であった。これらの数値はすべて対照と比べて有意の差をしめさなかった。

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

- 1) 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* 9: 1-11, 2004
- 2) Ikeda K, Ikeda K, Iritani S, Ueno H, Niizato K, Distribution of neuropeptide Y interneurons in the dorsal prefrontal cortex of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:379-383, 2004
- 3) Motoi Y, Takanashi M, Itaya M, Ikeda K, Mizuno Y, Mori H, Glial localization of four-repeat tau in atypical progressive supranuclear palsy. *Neuropathology* 24: 61-65, 2004
- 4) 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* 55: 804-810, 2004
- 5) Motoi Y, Itaya M, Mori H, Mizuno Y, Iwasaki T, Hattori H, Haga H, Ikeda K. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in neuritic plaque formation in APP sw mice. *Neurosci Letters* 368: 144-147, 2004

- 6) 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)総合研究報告書(2ヵ年のまとめ)

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

欧米での大規模な疫学調査や本研究班の疫学調査の中間報告によれば、魚肉や抗酸化物質であるビタミンEやCを多く含む野菜・果実、などの摂取は、アルツハイマー病の予防に有効である事が明らかになりつつある。本研究では、脳内にアミロイドβ蛋白を沈着させて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)を用いて、魚肉の主成分であるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)、さらには抗酸化物質としての緑茶カテキンについて、アルツハイマー型認知症への予防・改善効果とその作用機序について検討した。n-3系脂肪酸であるDHAやEPA、さらには緑茶カテキンによるアルツハイマー型認知症予防・改善効果が明らかとなった。その機序として、これら食事成分による海馬での抗酸化能増強作用とアミロイドβ蛋白の沈着阻害効果、さらに神経幹細胞から新生ニューロンへの分化誘導促進作用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  
川北映輔 同 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

は、魚肉からはn-3系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)とエイコサペンタエン酸(EPA)が、野菜・果実からは抗酸化物質であるビタミンEやポリフェノールなどが考えられる。

研究 : 食事成分によるアルツハイマー型認知症予防・改善効果とその作用機序の解明—動物実験による検討

最近、記憶・学習機能に中心的な役割を担う海馬で神経幹細胞の存在が明らかにされ、その細胞は新生ニューロンへの分化する機能(分化誘導能)をもつことから、長年信じられていた従来の定説とは異なり、神経細胞は再生可能である、と考えられるようになった。また、アルツハイマー病患者の海馬にも神経幹細胞が見出されている。認知症患者の海馬での神経幹細胞の分化誘導機能を発揮させることが出来れば、新生ニューロンを介する神経再生も可能であり、低下した認知機能の改善も期待できる。したがって本研究では、アミロイド

A. 研究目的

欧米の大規模な疫学調査結果や、平成13~15年度におこなわれた「痴呆の予防・治療と食事栄養」に関する本研究班の中間報告によれば、アルツハイマー病の発症予防には魚肉や野菜・果実の摂取が有効であることが推察されている。これらに含まれる栄養成分



$\beta$  蛋白誘発性空間認知機能障害ラット(アルツハイマー型認知症モデルラット)を用いて、DHA や EPA、ならびにポリフェノール属である緑茶カテキンによる認知症予防・改善効果とその機序を解明するために検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1. アルツハイマー型認知症 (AD) モデルラットの作製と空間認知機能評価

アミロイド  $\beta$  蛋白 (1-40) ( $A\beta$ ) を封入したミニ浸透圧ポンプをラットの背側皮下に装着し、カニューレを介して脳梁に  $A\beta$  を持続注入する。ポンプ内の  $A\beta$  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、 $A\beta$  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。

ラットの記憶・学習機能の評価法としては8 走路放射状迷路法を用い、4 走路に報酬餌を置く。得られる評価指数としては、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。

### B-2. DHA と EPA、ならびに緑茶カテキンの投与方法

予防効果を検討するために、AD モデルラットを作製する前に、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%)) は 26 週間、EPA (300mg/kg/day) は 10 週間、其々投与した後、AD モデルラットを作製し、3 週間後に空間認知機能の評価した。アミロイド  $\beta$  蛋白誘発性空

間認知機能障害が確認された AD モデルラットに、DHA (300mg/kg/day) を 12 週間投与した後、再度放射状迷路法による空間認知機能の評価した。

### B-3. in vitro と in vivo の系における DHA の神経幹細胞機能への影響:

in vitro の系では、ラット胎児終脳から単離・培養した神経幹細胞を用いて、その細胞機能に及ぼす DHA の影響について検討した。得られた細胞塊 (neurosphere) は、neuron、astrocyte、oligodendrocyte などの各種神経細胞に分化する機能 (分化誘導能) と、自己増殖能をもつ。DHA 存在下で神経幹細胞の形態的・機能的変化を免疫組織化学的手法により、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。

in vivo の系では、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、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、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、画像解析と定量化を行った。

### B-4. 神経細胞膜の界面活性剤不溶性膜分面の作製

AD モデルラットの大脳皮質から神経細胞膜の界面活性剤不溶性膜分面を単離し、分面中のコレステロール、脂肪酸、アミロイド  $\beta$  蛋白 (1-40) を測定し、DHA 摂取の影響を検討した。

### B-5. 生化学的測定法

- 1) 過酸化脂質 (LPO) : チオバルビツール酸  
関連物質測定法 (TBARS 法)
- 2) 脂肪酸とコレステロール: ガスクロマト法
- 3) 活性酸素種 (ROS) : dichlorofluorescein  
diacetate (DCFDA 法)
- 4) アミロイド  $\beta$  蛋白: ELISA 法

### C. 研究結果

C-1. アミロイド  $\beta$  蛋白誘発性空間認知機能障害に及ぼす EPA と緑茶カテキンによる予防効果:

EPA前投与ラットでは、vehicle群に比べて、アミロイド  $\beta$  蛋白沈着後のWMEが有意に低下したことから、EPAによるアルツハイマー型痴呆予防効果が明らかとなった。このとき海馬の過酸化脂質量・ROS量が有意に減少したことから、このAD予防効果はEPAによる脳内抗酸化能増強効果に起因することが示唆された。

0.5% Polyphenon E (PE)の場合も同様に、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ことから、緑茶カテキンによるアルツハイマー型痴呆予防効果が明らかとなった。血漿EGCG量の増加と共に海馬の過酸化脂質・ROS量は減少したことから、このAD予防効果は緑茶カテキンによる生体内抗酸化能増強効果に起因するものと思われる。

C-2. DHAによるアミロイド  $\beta$  蛋白誘発性空間認知機能障害改善効果:

ADモデルラットにDHAを12週間投与すると、vehicle群に比べてWME、RMEが共に低下することから、DHAによるAD改善効果が明らかにされた。このとき、海馬のDHA量の増加と共に過酸化脂質量とROS量が減少したことから、食餌性DHAによる海馬での抗酸化増強作用の関与が示唆された。

さらには、DHAによる認知機能障害改善群ではADモデルラット群に比べて、大脳皮質神経細胞膜の界面活性剤不溶性画分のステアリン酸、オレイン酸、アミロイド  $\beta$  蛋白 (1-40) 量とコレステロール量は減少し、これらの減少は空間認知機能指標であるRMEを低下させることが明らかとなった。

C-3. n-3系脂肪酸 (DHA・EPA) による海馬の新生ニューロン増加作用:

ラット胎児脳由来神経幹細胞にDHA、EPAを処置すると、神経幹細胞からニューロンへの分化が促進され、同時に神経軸索突起の伸長度も増加した。さらにアポトーシスや自己増殖能への抑制効果が見出された。また、PCR法を用いてDHA処置による神経幹細胞内の発現蛋白を同定・解析すると、新生ニューロンへの分化誘導に関連した蛋白が増加し、逆に増殖に関連した蛋白発現が抑制された。

DHA長期投与ラットの海馬歯状回では、コントロール群に比べて、成熟ニューロンマーカーと神経幹細胞ニューロンマーカーによる二重染色(+)細胞数が有意に増加した。

これら *in vivo* と *in vitro* の結果から、食餌性DHAはラット海馬歯状回の神経幹細胞を増加させ、新生ニューロンへの分化を促すことが明らかにされた。

### D. 考察

欧米や本研究班で行われた「食事栄養とアルツハイマー型認知症」に関する疫学調査結果、あるいは介入試験結果では、魚肉や食事由来抗酸化物質の摂取増加はAD発症の予防とその進展を抑制することが明らかにされているが、その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、食品成分中最も抗酸化作用が強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。本研究では、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、緑茶カテキンの長期間摂取により低下した。加齢に伴う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、DHA や EPA さらには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、生体内とくに脳内抗酸化力増強作用が推察される。また、カテキンは金属イオンキレート効果を有することから、細胞内の Fenton 反応に関与する Fe イオンの神経細胞内への流入を阻止することにより、加齢に伴い増加する脳内酸化ストレスを軽減しているかもしれない。

図1には、本研究から得られた DHA によるアルツハイマー型認知症予防・改善効果の作用機序が示されている。

分担者らは、以前から DHA による脳内抗酸化増強作用が関与することを報告してきた。この作用に加えて、本研究成果によって食餌性 DHA によるアミロイド  $\beta$  蛋白沈着抑制作用が明らかとなり、その機序として、神経細胞膜コレステロールと飽和・一価不飽和脂肪酸にたいする DHA の低下作用が密接に関与することが推察された。

図2には認知症を生活習慣病として捉えたときの n-3 系脂肪酸による予防・改善効

果機序が示されている。本研究結果から、神経幹細胞から新生ニューロンへの分化誘導が食餌性 DHA により亢進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多く存在することから、DHA 摂取により神経幹細胞から分化した新生ニューロンが、障害を受けた脳組織において再生神経細胞として機能し、記憶・学習機能向上効果に関与することが推察される。この効果に神経幹細胞が関与することがヒトにおいて実証されると、老人性認知症も治療対象となり、さらには、アルツハイマー型認知症も生活習慣病として認知できるようになり、認知症の予防・治療の確立は近い将来可能となる。

#### E. 結論

動物実験により、1) 認知症は生活習慣病として捉えることが可能であり、2) 脳内抗酸化作用を増強する DHA や緑茶カテキンなどの抗酸化物質は、認知症の予防効果を発揮することが明らかとなり、3) DHA によるアルツハイマー型認知症予防・改善効果には脳内抗酸化増強作用に加えて、アミロイド  $\beta$  蛋白低下作用と新生ニューロン増加作用の関与が示唆された。

#### F. 研究発表

平成 16 年度

論文発表

1. Ishtiaq Mahmud, Anwar Hossain, Shahdat Hossain, Abdul Hannan, Liaquat Ali, Michio Hashimoto. Effects of Hilsa Ilsa Fish oil on atherogenic lipid profile and glycaemic status of streptozotocin-treated type 1 diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31:

- 76-81
2. Kuninori Shiwaku, Michio Hashimoto, Akiko Nogi, Keiko Kitajima, Masayuki Yamasaki. Traditional Japanese dietary basics: a solution for modern health issues? *Lancet* 2004; 363 (9422): 1737-1738
  3. Naoko Tanaka, Kumiko Kawasaki, Namie Nejime, Yoko Kubota, Kazuki Nakamura, Masaru Kunitomo, Koichi Takahashi, Michio Hashimoto, Kazumasa Shinozuka. P2Y receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling increases human vascular endothelial cell permeability. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 95: 174-180
  4. Hossain Shahdat, Michio Hashimoto, Toshio Shimada, Osamu Shido. Synaptic plasma membrane-bound acetylcholinesterase activity is not affected by docosahexaenoic acid-induced decrease in membrane order. *Life Sciences* 2004; 74: 3009-3024
  5. Kuninori Shiwaku, Michio Hashimoto, Keiko Kitajima, Akiko Nogi, Erdembileg Anuurad, Byambaa Enkhmaa, Jung-Man Kim, In-Shik Kim, Sung-Kook Lee, Tsendsuren Oyunsuren, Osamu Shido, Yosuke Yamane. Triglyceride levels are ethnic-specifically associated with an index of stearoyl-CoA desaturase activity and n-3 PUFA levels in Asians. *Journal of Lipid Research* 2004; 45: 914-922
  6. Yoko Tanabe, Michio Hashimoto, Kozo Sugioka, Megumi Maruyama, Yoshimi Fujii, Rika Hasegawa, Toshiko Hara, Shahdat Md Hossain and Osamu Shido. Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in fos expression in rat CA1 hippocampus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31: 700-703
  7. Michio Hashimoto, Yoko Kubota, Noriko Tanaka, Yu Yamaguchi, Yoshimi Fujii, Satomi Kagota, Eisuke Kawakita, Osamu Shido, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka. Relationship between plasma and hippocampal lipid peroxidation in obese and hypertensive SHR/NDmcr-cp rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31: S62-S64
  8. Naoko Tanaka, Namie Nejime, Satomi Kagota, Yoko Kubota, Kazuki Nakamura, Masaru Kunitomo, Michio Hashimoto, Ryuichi Yamamoto and Kazumasa Shinozuka. Dysfunction of purinergic regulation of sympathetic neurotransmission in SHR/NDmcr-cp (SHR-CP) rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31: S60-S61
  9. Michio Hashimoto, Yoko Tanabe, Yoshimi Fujii, Toshihiko Kikuta, Hitoshi Shibata, Osamu Shido. Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates impairment of spatial cognition learning ability in amyloid  $\beta$ -infused rats. *Journal of Nutrition* 2005; 135: 549-555
- 国際学会発表
1. Naoko Tanaka, Namie Nejime, Satomi Kagota, Yoko Kubota, Kazuya Nakamura, Masaru Kunitomo, Michio Hashimoto, Ryuichi Yamamoto, Kazumasa Shinozuka. Dysfunction of purinergic regulation of sympathetic neurotransmission in SHR/NDmcr-cp (SHR-CP) rat. *Lifestyle Related Diseases -Perspectives for Primary Prevention and Treatment in Animal Models and Humans-* (Satellite Symposium to the 11th International

- Symposium on the SHR and Cardiovascular Risk -Genomics to Disease Prevention-); May 13, 2004, Spokane, WA, USA
2. Michio Hashimoto, Yoko Kubota, Naoko Tanaka, Yuko Yamaguchi, Yoshimi Fujii, Satomi Kagota, Osamu Shido, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka. Age-related changes in fatty acid composition of plasma and hippocampus of Wistar-Kyoto and SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) rats. Lifestyle Related Diseases -Perspectives for Primary Prevention and Treatment in Animal Models and Humans- (Satellite Symposium to the 11th International Symposium on the SHR and Cardiovascular Risk -Genomics to Disease Prevention-); May 13, 2004, Spokane, WA, USA
  3. Naoko Tanaka, Namie Nejime, Satomi Kagota, Yoko Kubota, Kazuya Nakamura, Masaru Kunitomo, Michio Hashimoto, Ryuichi Yamamoto, Kazumasa Shinozuka. Change of purinergic prejunctional modulation on NE-release from sympathetic nerves in the caudal artery of SHR/NDmcr-cp RAT (SHR-CP). The 11th International Symposium on the SHR and Cardiovascular Risk -Genomics to Disease Prevention; May 16-17, 2004, Portland, Ore., USA
  4. Michio Hashimoto, Yoko Kubota, Naoko Tanaka, Yuko Yamaguchi, Yoshimi Fujii, Satomi Kagota, Osamu Shido, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka. Fatty acid composition and lipid peroxide of plasma and hippocampus of Wistar-Kyoto and SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) rats. The 11th International Symposium on the SHR and Cardiovascular Risk -Genomics to Disease Prevention; May 16-17, 2004, Portland, Ore., USA
  5. M Hashimoto, Y tanabe, Y Fujii, T Harada, A Kawashima, E Kawakita, T Yano, K Mizuguchi, A Ueki, O Shido. An improvement effect of spatial cognitive functions with dietary eicosahexaenoic acid in young rats. International Academy Nutrition and Aging (IANA) Symposium on nutrition and Alzheimer's Disease, October 1-2, 2004, Tokyo, Japan
  6. M Hashimoto, Y tanabe, Y Fujii, E Kawakita, T kikuta, H Shibata, O Shido. Post-administration with docosahexaenoic acid has an improvekent effect on the impairment of spatial cognition learning ability in Alzheimer's disease model rats. International Academy Nutrition and Aging (IANA) Symposium on nutrition and Alzheimer's Disease, October 1-2, 2004, Tokyo, Japan
  7. M.A Haque, Michio Hashimoto, Yoko tanabe, Yukihiko Hara, Osamu Shido. Chronic administration of polyphenon E improves spatial cognitive learning ability in rats. 2004 International Conference on O-cha (tea) culture and Science, November 4-6, 2004, Shizuoka, Japan
- 国内発表
1. 橋本道男、田邊洋子、矢野 崇、藤井由己、原田 剛、川島晶子、川北映輔、水口清、紫藤 治: エイコサペンタエン酸によるラット記憶・学習機能向上効果 第13回日本脂質栄養学会、山形、9月3-4日、2004
- 平成17年度  
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, <review> 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

#### 論文発表

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 Abdule, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid b-infused rats relates

to the decreases of amyloid b 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: 2005 (in press)
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:  
7th 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, markedly protects the impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: 7th 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 b-infused rats. 3rd 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. 3rd 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 stearyl-CoA desaturase activity and n-3 PUFA levels in Asians. The 1st 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 b-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

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

2005-46203

国際特許化への申請書作成中

8. 松崎健太郎、山国 徹、中田徳仁、橋本道  
男、Haque Md. Abdul、三卷祥浩、指田  
豊、紫藤 治、大泉 康、Aβ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

2. 実用新案登録

なし

9. 橋本道男、片倉賢紀、田邊洋子、篠塚和  
正、紫藤 治、β-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）

平成16年度

##### 1. 特許取得

1) 平成16年9月2日、茶カテキン類を有効  
成分とする空間認知機能改善剤、発明  
者：原 征彦・橋本道男・紫藤 治、出願  
人：原 征彦・橋本道男、日本国、特願  
2004-255373

2) 平成16年11月9日、認知機能障害治療  
剤、発明者：飛永精照・恒松徳五郎・橋本  
道男・田口恭治・宇都宮 郁、出願者：飛  
永精照、日本国、特願2004-325222

##### 2. 実用新案登録

なし

平成17年度

##### 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



図1. DHA のアルツハイマー型認知症改善効果機序

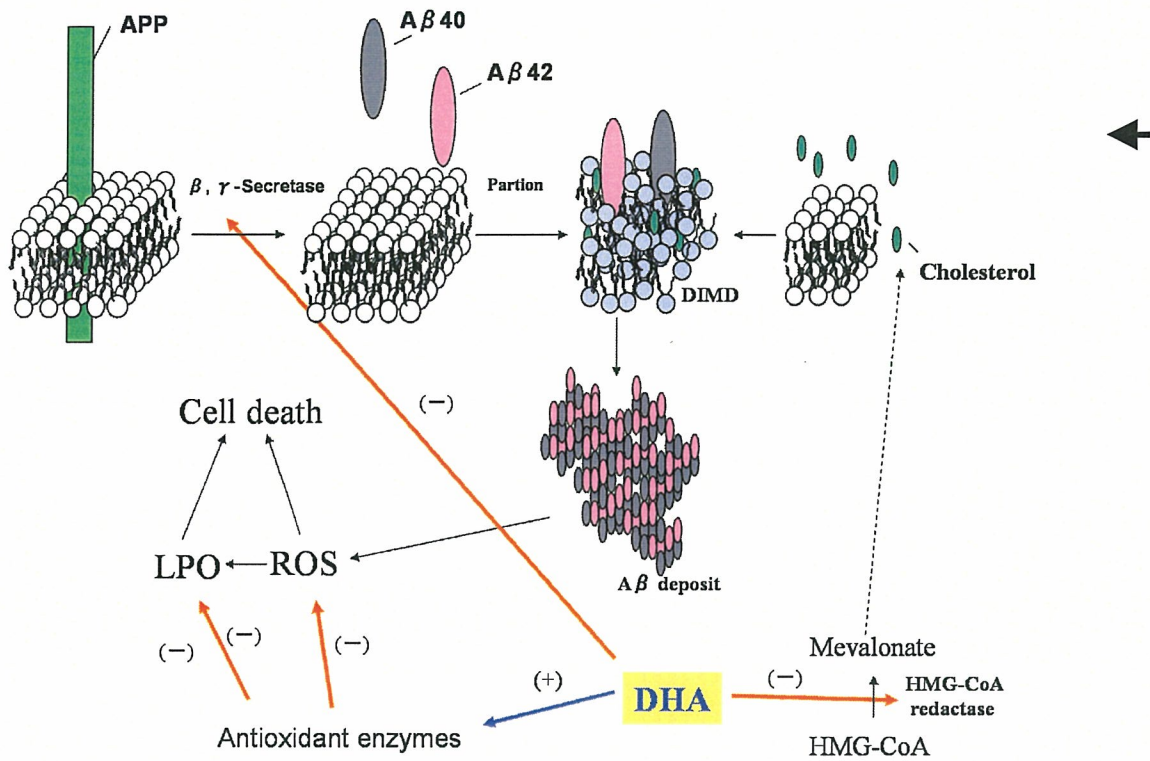
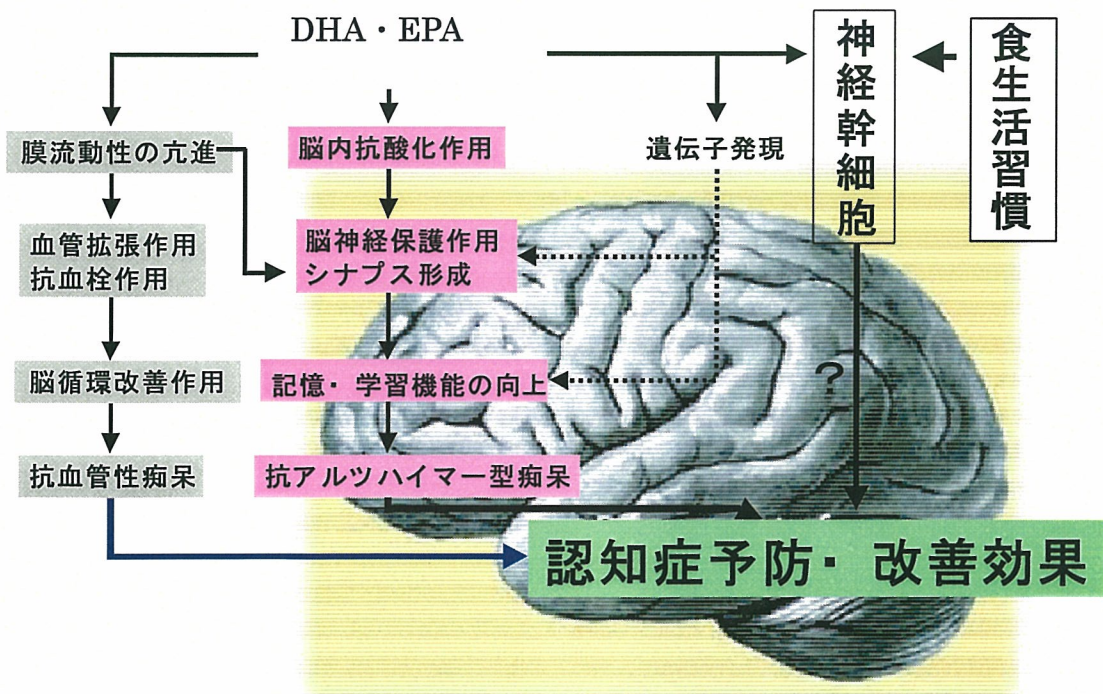


図2. 認知症予防・改善効果と生活習慣



# 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16～17年度 総合研究報告書

2/3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 16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
Akira Ueki and Mieko Otsuka	Life style risks of Parkinson's disease: Association between decreased water intake and constipation	J Neurol	251(7)	18-23	2004
Nobuto Shibata, Tohru Ohnuma, Tadashi Takahashi, Yoichiro Matsubara, Akira Ueki, Masatsugu Nagao and Heii Arai	No genetic association between tumour necrosis factor receptor II 196R polymorphism and Japanese sporadic Alzheimer's disease	Lippincott Williams & Wilkins		53-55	2004
K. Yamashita and Y. Sakamura	Relationships between Depression and Dietary Variety in Elderly People Living in a Community	Asia Pacific Regional Meeting Mental Health of the Elderly in Rapidly Aging Societies		147-148	2004
宮永 和夫	抗痴呆薬の効果と今後の展開 特集2「痴呆性高齢者への薬物療法 -行動障 害への薬物を理解する! -」	痴呆介護	5(2)	56-64	2004
宮永 和夫	4.痴呆の治療 第46回日本老年医学会学術集会記録 〈ワークショップII:地域に生きる「痴呆」-物忘れ 早期発見・早期診断と介護予防〉	日本老年医学会	42(1)	49-51	2005
Sayoko Hattori, Kenji Sakuma, Yosuke Wakutani, Kenji Wada, Masaru Shimoda, Katsuya Urakami, Hisanori Kowa and Kenji Nakashima	A novel presenilin 1 mutation(Y154N) in a patient with early onset Alzheimer's disease with spastic paraparesis	Neuroscience Letters	368	319-322	2004
Yosuke Wakutani, Hisanori Kowa, Masayoshi Kusumi, Kazuhiro Nakaso, Ken-ichi Yasui, Kenji Isoe-Wada, Hidetaka Yano, Katsuya Urakami, Takao Takeshima and Kenji Nakashima	A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease	Neurobiology of Aging	25	291-294	2004

M. Kusumi, H. Arai T. Ijiri, H. Kowa, Y. Adachi, T. Takashima F. Sakurai and K. Nakashima	Serotonin 2C receptor gene Cys23Ser polymorphism: a candidate genetic risk factor of migraine with aura in Japanese population	Act Neurol Scandinavica	109	407-409	2004
須貝 佑一, 小林 奈美	施設における痴呆高齢者の転倒・転落事故の発生状況と対策 特集「痴呆高齢者の転倒・転落事故は防げるか?」	看護学雑誌	68/1	10-18	2004
須貝 佑一	脳変性疾患における痴呆の知識 第4回ピック病	痴呆介護	5(4)	84-87	2004
須貝 佑一, 丸井 英二 松村 康弘, 林 邦彦, 杉下 知子	高齢者の生活習慣と知的機能	第19回日本老年精神医学会 プログラム・抄録集		67	2004
Yuichi Sugai	Association between cognitive function and life style of old ages	Proceedings of The 19th conference of the Japanese Psychogeriatric Society			2004
須貝 佑一	介護保険制度を通じた保健・医療・福祉の統合と課題 特集「精神科医療における介護保険制度」	精神医学	46 (10)	1035-1040	2004
Yumiko Motoi, Masako Itaya, Hideo Mori, Yoshikuni Mizuno, Tadao Iwasaki, Hiroaki Hattori, Seichi Haga and Kazuhiko Ikeda	Apolipoprotein E receptor 2 is involved in neuritic plaque formation in APP sw mice	Neuroscience Letters	368	144-147	2004
K. Iwamoto, C. Kikuchi, M. Bundo, K. Ikeda and T. Kato	Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders	Molecular Psychiatry		1-11	2004
Hossain Shahdat, Michio Hashimoto, Toshio Shimada and Osamu Shido	Synaptic plasma membrane-bound acetylcholinesterase activity is not affected by docosahexaenoic acid-induced decrease in membrane order	Life Sciences	74	3009-3024	2004