<平成19年度>

記憶障害に予防効果を持つ食品成分の有用性の解明

小宇田 智 子 · 今 井 秀 樹 (宮崎大学医学部社会医学講座衛生学分野)

1. はじめに

日本人の平均寿命は他国に例をみないほど急速に延伸し、平成 18 年の簡易生命表では男性 79.00歳、女性 85.81歳となっており、世界有数の長寿国である。長寿は人々の共通の願いであるが、生命活動を維持するだけでは人間らしい豊かな生活を送ることはできない。健康で障害のない期間、つまり支援や介護を必要としない期間は健康寿命と定義され、この健康寿命の延伸こそが人々の真の願いである。平成 16 年度の厚生労働省による国民生活調査において、健康寿命を縮める原因すなわち介護が必要となった原因の第三位が認知症であり、要介護となる原因の 12.5%を占めている。つまり、認知症を予防することができれば、人々の健康寿命の延伸が多いに期待できると言える。

認知症に伴う記憶障害の予防の一つとして,より多くの人が普段の生活に取り入れやすい手軽な方法が必要であると考える。我々はこれまでに,身近な食品の中で記憶障害に対して予防効果を持つものを探索すべく,記憶障害モデルラットを使った行動学的な実験によりソバポリフェノール類混合物の記憶能低下抑制効果を明らかにした。本研究では,ソバポリフェノール類混合物のどの成分が有効であるかを特定し,作用機序の一端を明らかにすることを目的とした。

記憶障害モデルラットはトリメチルスズ (TMT) を用いて作成した。TMT はヒトやげっ 歯類に対して中枢機能障害を及ぼすことが明らか

になっている。げっ歯類への単回投与により,脳の辺縁領域,特に海馬に重篤な傷害を及ぼし,記憶の減弱,情動変化(攻撃性増大)などの表現型に加えて,海馬内で惹起されるアミロイド前駆体,プレセニリン1および炎症性サイトカイン(interleukin(IL)-1 β)の発現変化がアルツハイマー病態に類似している。従って,TMTを処置したラットは非常に有効な記憶障害のモデル動物となり得る。TMTを処置した記憶障害モデルラットを用いて,食品成分による記憶能低下抑制効果の作用機序を解明することで,アルツハイマー病の病因解析にも応用できる可能性がある。

ソバポリフェノール類混合物には、ルチン、カテキンおよびケルセチンなどが含まれている。本研究では、これらの成分のうちルチンに注目した。ルチンはフラボノイド類の一種であり、主にソバに多く含まれている。ソバは米や小麦と同様に主食となりうるため、一度の食事で無理なく比較的大量に摂取することが可能である。また、荒地ややせ地でも栽培できるという利点もあり、日本以外でも様々な調理法で食されている。ソバは脳の老化を予防すると言われているが、科学的に証明されておらず有効成分も同定されていない。今回我々は、ルチンが記憶能低下抑制効果を持つ有効成分の一つであることを見出し、さらにその作用機序の一端を解明したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

トリメチルスズ (TMT) (CAS No. 56-24-6) は Strem Chemicals 社 製 を, ルチン (CAS No. 153-18-4) は東京化成工業社製を用いた。

2.2 実験デザイン

4 週齢の Sprague-Dawley (Jcl:SD) 雄性ラッ トを12時間の明暗周期で飼育し、自由に飲水さ せた。粉末飼料はオリエンタル酵母社製の NIH-07PLD を用いた。ラットを4群 (Control 群, rutin 群, TMT 群および TMT+rutin 群) に分け, control 群と TMT 群には粉末飼料を、rutin 群と TMT+rutin 群にはルチンを 0.75%の重量比で混 合した粉末飼料を実験期間中, 自由に摂食させた。 6週齢時にTMT群とTMT+rutin群にTMT (8.5mg/kg 体重) を単回強制経口投与した。尚, 粉末飼料およびルチン添加粉末飼料は4週齢目か ら実験終了まで同じ物を与えた。TMT を投与し てから2週間後より、モリス水迷路試験にて空間 記憶能を測定し、屠殺後すばやく脳を取り出し、 組織学的実験および分子生物学的実験に供した。 動物実験の内容については宮崎大学動物実験委員 会の承認を得て実施した。

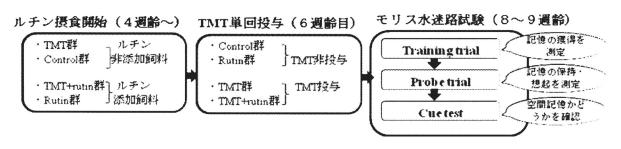
2.3 モリス水迷路試験

直径 145cm,深さ 45cm の円形プールに 20℃ 前後の水を入れ,避難場所として 10cm × 10cm のプラットフォームを水面下 2 cm の位置に置い た。ラットからプラットフォームが見えないよう に、白い絵の具を水に溶かした。プールの側壁の ランダムな位置よりラットを入水させ、プラット フォームへ逃避するまでの時間(逃避潜時:最大

120秒間)を1日2回,4日間連続して測定した。 各測定日の2回の平均値を測定値とし,2日目以 降については1日目の逃避潜時に対する割合 (%) を求めた。この測定段階を training trial と し、ラットは周りの風景によりプラットフォーム の位置の記憶を獲得していく。Training trialの 最終日の翌日に probe trial を行った。プラット フォームを除去したプールで,ラットを120秒間 泳がせ、プラットフォームが存在していた全体の 4分の1にあたる象限における滞在時間の割合 (%) を測定した。この測定により、training trial で獲得した記憶がどの程度,保持・想起さ れたかが比較できる。Training trialやprobe trial の結果が空間記憶によるもので、泳力や視力、 麻痺等による影響がないことを確認するため, probe trial の翌日に cue test を行った。泳いで いるラットからプラットフォームが見えるように するため, 水面上 2 cm になるように水を張り, ラットを放ち, プラットフォームまでの潜時を測 定した。

2.4 組織学的実験

モリス水迷路試験終了後、屠殺したラットの大脳の左半分をドライアイスで素早く凍結し、クライオスタット(LEICA CM1850)にて凍結切片(16 μ m)を作成した。ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、海馬の各領域(CA1, CA3a, CA3bおよび CA3c)の神経細胞数(個/mm²)を光学顕微鏡下で数えた。また、TUNEL法(ApopTagr Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit: ケミ



コン社製)により TUNEL 陽性細胞を検出し、 海馬の各領域において、1 mm² あたりの神経細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の割合(%)を 光学顕微鏡下で数えた。1個体あたり1枚の切片 の神経細胞数および TUNEL 陽性細胞数を数え、 各群の平均値を求めた。

2.5 分子生物学的実験

屠殺したラットの右側の脳から海馬を取り出し、 重量を測定した後SV Total RNA Isolation System (プロメガ社製) を用いてトータル RNA を抽出した。トータル RNA の濃度を測定した後, PrimeScriptTM RT Reagent Kit (タカラバイオ社 製)を用いて iCyclerTM (バイオラッドラボラト リー株式会社製) により cDNA を合成し, TagMan Gene Expression Assays (アプライド バイオシステム社製)を用いてリアルタイム PCR (7300 Real-Tmne PCR system) を行った。 この方法により、活性化ミクログリアの指標 (OX-42), アストロサイトの指標 (GFAP), 抗酸 化 酵素 類 (superoxide dismutase (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1), catalase (CAT)) および炎症性サイトカイン類 (interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α) の mRNA 発現量を, ハウスキーピン グ遺伝子である β -actin の発現量と比較定量した。

2.6 統計処理

モリス水迷路試験のデータ(逃避潜時およびプラットフォームの存在した象限への滞在時間の割合),実験開始前の体重,実験期間中の摂食量,体重増加量,右側海馬重量,海馬の各領域におけ

る神経細胞数および mRNA の発現量について, 一元配置分散分析(ANOVA)および,Fisher's Protectes Least Squares Difference (PLSD) test の多重比較検定を用いて平均値の差を解析した。 TUNEL 陽性細胞は control 群と rutin 群では検 出されなかったため,TMT 群と TMT+rutin 群 の TUNEL 陽性細胞数の割合について,対応の ないt検定を行った。危険率 5 %未満 (P < 0.05)を有意差ありと判定した。これら統計処理 には StatView-J 5.0 (SAS Institute Inc.)を用い た。

3. 結果

3.1 実験開始前の体重,実験期間中の摂食量, 体重増加量および右側海馬重量

各群間で実験開始前の体重と実験期間中の摂食量に有意差はみられなかった。TMT群とTMT+rutin群の体重増加量および右側海馬重量はcontrol群およびrutin群に比べて統計学的に有意に少なかった(表1参照)。

3.2 モリス水迷路試験

Training trial により測定した逃避潜時の割合は、4日間とも各群間で有意差はみられなかった(図1(A)参照)。Probe trial では、TMT 群は他の群に比べてプラットフォームの存在していた象限に滞在していた時間の割合が有意に小さかった。また、TMT+rutin 群では rutin 群と比較して滞在時間の割合が有意に小さかったが、control 群との間に有意差はみられなかった(図1(B)参照)。また、これらの結果は cue test により泳力や視力、

表1 実験開始前の体重,実験期間中の摂取量,体重増加量および右側海馬重量

	Control	Rutin	TMT	TMT + Rutin
実験開始前の体重 (g)	89.2 ± 1.3	89.0 ± 1.6	98.0 ± 1.07	90.3 ± 1.09
実験期間中の摂取量(g/34days)	873.8 ± 22.9	830.1 ± 12.2	902.6 ± 30.6	910.5 ± 36.7
体重増加量(g/34days)	296.7 ± 6.1	275.9 ± 9.1	245.1 ± 7.7 *****	$247.3 \pm 7.1****$
右側海馬重量(mg)	66.6 ± 3.4	71.4 ± 2.1	51.0 ± 2.2 *******	$51.9 \pm 1.1********$

数値は平均値 ± 標準誤差とした. ***P<0.001 vs control群, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs rutin群.

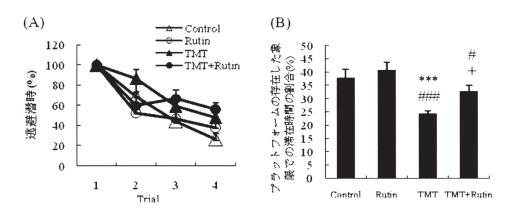


図1 モリス水迷路試験。(A) 逃避潜時の割合(%, mean ± SEM),(B) プラットフォームの存在した象限での滞在時間の割合(%, mean ± SEM)。***P< 0.001 vs control 群,**P< 0.05,****P< 0.001 vs rutin 群,+ P< 0.05 vs TMT 群。

麻痺等による影響がないことを確認した(データ 示さず)。

3.3 海馬の各領域における神経細胞数

CA1 領域と CA3a 領域においては,各群間で有意差はみられなかったが,CA3b 領域ではTMT 群の神経細胞数は他の群の神経細胞数と比較して有意に少なかった。CA3c 領域においては,TMT 群と TMT+rutin 群の神経細胞数は control群と rutin 群の神経細胞数に比べて有意に少なかった。統計学的な有意差はみられなかったが,TMT+rutin 群の神経細胞数は TMT 群の神経細胞数よりも多い傾向にあった(図2参照)。

3.4 海馬の各領域における TUNEL 陽性細胞 数の割合

Control 群と rutin 群では TUNEL 陽性細胞が 検出できなかったため、TMT 群と TMT+rutin 群の比較を行った。CA1 領域と CA3a 領域では 両群間で TUNEL 陽性細胞数の割合に有意差は みられなかったが、CA3b 領域と CA3c 領域では TMT+rutin 群の TUNEL 陽性細胞数の割合は TMT 群と比較して有意に少なかった(図3参照)。

3.5 OX-42 と GFAP の mRNA 発現量

TMT 群 と TMT+rutin 群 の OX-42 と GFAP の mRNA 発現量は control 群および rutin 群と比較して有意に多かった。また,TMT+rutin 群の OX-42 と GFAP の mRNA 発現量は TMT 群と比

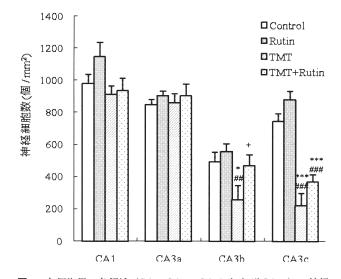


図2 左側海馬の各領域(CA1, CA3a, CA3b および CA3c)の神経細胞数(個/mm², mean ± SEM)。*P < 0.05, ****P < 0.001 vs control 群, *** P < 0.01, ****P < 0.001 vs rutin 群, + P < 0.05 vs TMT群。

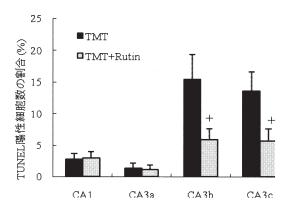


図3 左側海馬の各領域 (CA1, CA3a, CA3b および CA3c) の TUNEL 陽性細胞数の割合 (%, mean ± SEM)。+ P < 0.05 vs TMT 群。

較して有意に少なかった (**図**4(A)参照)。

3.6 SOD1, GPx1 およびCATのmRNA 発現量

SOD1の mRNA 発現量は各群間で有意差はみ

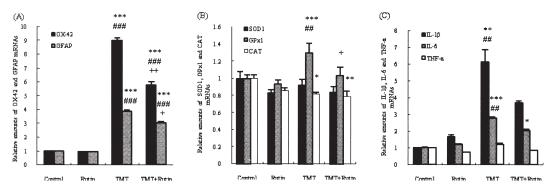


図4 (A) OX-42 および GFAP の mRNA 発現量,(B) SOD1,GPx1 および CAT の mRNA 発現量,(C) IL-1 β ,IL-6 および TNF- α の mRNA 発 現 量。*P< 0.05,**P< 0.01,***P< 0.001 vs control 群,**P< 0.01,***P< 0.001 vs rutin 群,+P< 0.05,++P< 0.01vs TMT 群。

られなかった。TMT 群の GPx1 の mRNA 発現 量は他の群と比較して有意に多かった。TMT 群 と TMT+rutin 群 の CAT の mRNA 発 現 量 は control 群および rutin 群と比較して有意に少な かった(図 4(B)参照)。

3.7 IL-1eta, IL-6 お よ び TNF-lpha の mRNA 発 現量

TMT 群の IL-1 β の mRNA 発現量は control 群 および rutin 群と比較して有意に多かった。 TMT 群の IL-6 の mRNA 発現量は control 群 および rutin 群と比較して有意に多く,TMT+rutin 群は control 群に比べて有意に多かった。 TNF- α の mRNA 発現量については,各群間で有意差は みられなかった(図 4(C) 参照)。

4. 結論と考察

Puらは繰り返し脳虚血による空間記憶能の低下および海馬 CA1 領域の神経細胞に対するルチンの保護効果を報告している¹⁾。本研究では、TMT 処置による記憶障害モデルラットを用いて、記憶能低下および海馬 CA3 領域の神経細胞に対するルチンの保護効果を明らかにした。TMT は、げっ歯類への単回投与により、CA3 領域をはじめとする海馬を特異的に傷害することで記憶障害を誘導することが知られている^{2,3)}。記憶の形成には海馬で神経回路ができることが必要である⁴⁾。TMT 投与による空間記憶能の低下は、CA3 領域

の錐体細胞への傷害により、CA3 領域から CA1 領域へ至る神経回路の形成が阻害されたことによ る可能性がある。TMT による神経細胞傷害性の 詳しい作用機序は明らかになっていないが、in vitro 試験では活性酸素種生成を介して細胞のア ポトーシスを誘導することが報告されている5)。 また、マウスの海馬と前頭葉において、TMT を 処置してから48時間後でH₂O₂などの活性酸素 種が産生されることが報告されている゜。今回の 研究では、TMT 処置により傷害をうけた CA3 領域の神経細胞が、ルチン摂食により保護された。 また、TMT 処置による GPx1 の mRNA 発現量 の増加をルチン摂食が抑制することが明らかにな った。抗酸化酵素である GPx1と CAT はアスト ログリアにおいてH₂O₂を無害化するが^{7,8)}, GPx1 は低濃度の H_2O_2 の無害化に重要であり $^{7)}$, 一方 CAT は高濃度の H₂O₂ の無害化に重要であ る⁹⁾。つまり,TMT 処置によって海馬で産生さ れた低濃度のH₂O₂によるCA3領域の神経細胞 に対する傷害が、ルチンの抗酸化作用により保護 された可能性が示唆された。

TMT 処置により OX-42, GFAP, IL-1 β および IL-6の mRNA 発現量が増加した。この結果は他の研究結果と一致していた $^{3,10)}$ 。本研究では、TMT 処置によって誘導された OX-42と GFAPの mRNA 発現量の増加がルチン摂食により抑制されることが明らかになった。さらに、統計学的

な有意差はみられなかったものの、TMT 処置により増加した IL-1 β と IL-6の mRNA 発現量がルチン摂食により抑制された。ミクログリアによって分泌されたこれらの炎症性サイトカイン類は、アストロサイトを増殖させ ^{11, 12, 13)}、海馬に依存した学習記憶機能をかく乱させる ¹⁴⁾。 Maier らは活性化ミクログリアと炎症性サイトカイン類が TMT 処置による神経毒性を調節していることを報告している ¹⁰⁾。ルチン摂食による記憶能低下抑制効果は、TMT 処置によって活性化されたミクログリアによる炎症反応がもたらす神経傷害性を、ルチン摂食が保護した結果かもしれない。

5. ま と め

TMT 処置による記憶障害モデルラットを使った今回の研究で、行動学的実験により、ルチンが記憶能低下を抑制することを見出した。ルチンの記憶能低下抑制効果は、TMT 処置が海馬のCA3b および CA3c 領域にもたらす神経細胞傷害を、抗酸化作用および抗炎症作用によって低下させたことに由来する可能性が示唆された。活性酸素種はパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の原因となる ^{15,16)}。作用機序を解明するためにさらなる研究が必要であるが、ルチン摂食は、アルツハイマー病や加齢による海馬傷害に対して有益な作用を持つ可能性がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団並びに関係各位に心から感謝を申し上げます。それとともに、貴財団の将来にわたる益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

1) Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y.,

- Oriti, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M. Neuroprotective effects of quercetin and rutin in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci.* 104, 329-334 (2007).
- 2) Ishida, N., Akaike, M., Tsutsumi, S., Kanai, H., Masui, A., Sadamatsu, M., Kuroda, Y., Wakanabe, Y., McEwen, Bo S., Kato, N. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and leaning impairment. *Neurosci.* 81, 1183-1191 (1997).
- 3) Liu, Y., Imai, H., Sadamatsu, M., Tsunashima, K., Kato, N. Cytokines participate in neuronal death induced by Trimethyltin in the rat hippocampus via type 2 glucocorticoid receptors. *Neurosci Res* 51, 319-327 (2005).
- Nakazawa, K., McHugh, T.J., Wilson, M.A., Tonegawa,
 NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 361-372 (2004).
- 5) Jenkins, S.M., Barone, S. The neurotoxicant trimethyltin induces apoptotis via caspase activation, p38 protein kinase, and oxidative stress in PC12 cells. *Toxicol Lett* 147, 63-72 (2004).
- 6) Ali, S.F., LeBel, C.P., Bondy, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicol* 13, 637-648 (1992).
- 7) Dringen, R., Hamprecht, B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759, 67-75 (1997).
- 8) Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J.M., Dringen, R. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurons, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* 82, 635-644 (2002).
- 9) Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 24 (7), 1531-1540, (2004).
- 10) Maier, W.E., Brown, H.W., Tilson, H.A., Luster, M.I., Harry, G.J. Trimethyltin increases interleukin (IL) -1 alpha, IL-6 and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in rat hippocampus. *J Neuroimmunol* 59, 65-75 (1995).
- Giulian, D., Lachman, L.B. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228, 497-499 (1985).

- 12) Selmaj, K.W., Farooq, M., Norton, W.T., Raine, C.S., Brosnan, C.F. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144, 129-135 (1990).
- 13) Benveniste, E.N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75, 165-173 (1997).
- 14) Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., Yoshida, T. Lipopolysaccharide-
- induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. J Neurosci Res 83, 557-566 (2006).
- 15) Weber, G.F. The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in the central nervous system. *Med Hypothes* 43, 223-230 (1994).
- 16) Bowling, A.C., Beal, M.F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56, 1151-1171 (1995).

Studies for the effects of composition of foods on memory deficits

Tomoko Koda and Hideki Imai

(Division of Environmental Health Sciences, Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

Aims: Rutin is attracting considerable attention because of its biological activities that are beneficial to human health. Trimethyltin is a toxic organotin compound, and rats injected with trimethyltin serve as a useful in vivo model for hippocampal neurodegeneration. To determine the protective effect of rutin on spatial memory impairment and the molecular mechanisms of rutin-mediated neuroprotection, we investigated the protective effect of rutin against the trimethyltin-induced impairment of the hippocampus by assessing the profile of mRNA expression levels related to antioxidative and anti-inflammatory effects in the hippocampus.

Main methods: Four-week-old male rats were fed chow with rutin (0.75 %) during the experimental period and administered a single dose of trimethyltin (8.5 mg/kg b.w., p.o.) at 6 weeks of age. Spatial memory was assessed using the Morris water maze task and then histological and molecular examinations were conducted on the hippocampal region.

Key findings: Trimethyltin induced spatial memory impairment and loss of cells in the hippocampal CA3 region, and those were significantly reversed by rutin supplementation. In addition, rutin supplementation significantly suppressed the trimethyltin-induced mRNA expression levels of activated glial cell markers, antioxidase, and pro-inflammatory cytokines.

Significance: The present results suggest that the protective effects of rutin against trimethyltin-induced spatial memory impairment and damage to cells in the hippocampal CA3 region could be due to its antioxidative and anti-inflammatory effects. Rutin supplementation may have a beneficial effect against hippocampal changes observed in Alzheimer's disease or aging.