

□原著論文□

スコポラミン誘発健忘モデルマウスにおけるドコサヘキサエン酸-
ホスファチジルセリン複合体製剤の学習記憶改善効果持田 (齋藤) 淳美¹ 宮川 和也¹ 宮岸 寛子¹ 黒川 和宏¹
君島 秀尚¹ 辻 稔¹ 武田 弘志¹

抄 録

近年、補完代替医療の一環として、認知症に対する各種栄養素あるいは食品成分の有用性が注目されている。本研究では、スコポラミン誘発健忘モデルマウスを用いて、ドコサヘキサエン酸-ホスファチジルセリン複合体 (DHA-PS) 製剤の学習記憶改善効果について検討した。その結果、DHA-PS 製剤が、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 製剤やホスファチジルセリン (PS) 製剤よりも優れた学習記憶改善効果を有することが明らかとなった。しかしながら、DHA-PS 製剤が学習記憶改善効果を示す条件において、海馬におけるアセチルコリン合成酵素、小胞体アセチルコリントランスポーターおよび各種ムスカリン受容体サブタイプの mRNA 発現量に特筆すべき変化は認められなかった。これらの結果より、詳細な作用メカニズムは未だ明らかでないものの、DHA-PS 製剤が認知症に対する新たな予防および治療法開発の一助となる可能性が示唆された。

キーワード：DHA-PS, 学習記憶, アセチルコリン, 認知症, マウス

I. はじめに

厚生労働省の発表によると、2012年の認知症高齢者数は約462万人で、65歳以上の高齢者の約7人に1人が認知症であり、認知症予備群である約400万人を合わせると、約4人に1人が認知症あるいはその予備群であると推計されている。また、急速な高齢化の進展に伴い、認知症の患者数は2025年には約700万人に達し、高齢者の約5人に1人を占めると推測されている。さらに、科学技術の発展により複雑化した現代社会は、小児の成長・発達障害や薬物乱用など、認知症と密接に関連する様々な問題を浮き彫りにしている。認知症は、患者本人はもちろんのこと、周囲の人々の日常生活にまで影響をもたらす重篤な疾患である。現在、認知症の中核症状である学習記憶障害に対しては、アセチルコリンエステラーゼを阻害してアセチルコリンの分解を抑制する薬物、または、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を遮断してグルタミン酸による神経の過剰な活性化を抑制する薬物が用いられ

る。しかし、これら薬物の効果はあくまでも症状の進行を遅らせるものであり、認知症により失われた学習記憶機能を回復させる根本的な治療にはならない。したがって、認知症に対するより有効性の高い予防・治療法を考究することは、現代の生命科学研究に課せられた重要な課題である。

近年、補完代替医療の一環として、認知症に対する各種栄養素あるいは食品成分の有用性が注目されている。ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、脳内においてリン脂質の1種であるホスファチジルセリン (PS) 分画に多く存在するn-3脂肪酸であり^{1,2)}、学習記憶機能の低下を改善する効果を有することが報告されている^{3,4)}。また、PSは、ヒトの脳における含量が生涯を通じて13-14%に維持されており²⁾、DHAに類似した効能を有することが明らかにされている⁵⁾。さらに、DHAの多くは、脳組織中ではPSと結合して存在していることが報告されている⁶⁾。近年、脳内における両栄養素の利用を高めることを目的としてDHAとPS

受付日：2018年10月1日 受理日：2018年11月26日

¹ 国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, International University of Health and Welfare
mtsujji@iuhw.ac.jp

の複合体 (DHA-PS) を含有する製剤が開発され⁷⁻⁹⁾, 臨床研究の結果, 長期投与により高齢者の認知機能の低下を改善する効果が認められたとの報告がある^{7,9)}. また, 高齢者に対する DHA-PS 製剤の長期投与は, 血圧, 心拍および血中の各種生化学的パラメーターに特筆すべき影響を与えず, 安全性が高いことも実証されている⁸⁾. しかし, これら臨床的知見を裏付ける基礎研究はさほど多くなく, 科学的根拠に基づいてより安全かつ有効に DHA-PS 製剤を用いた治療や予防を行うためには, 様々な観点から詳細な薬理的検討を行う必要がある. そこで本研究では, スコポラミン誘発健忘モデルマウスを用いて, DHA-PS 製剤の学習記憶効果の特徴について検討した.

II. 方法

本研究は, 実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し, 本学の「国際医療福祉大学動物実験規定」および, 日本薬理学会の「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し, 国際医療福祉大学動物実験委員会の承認のもと, 適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した.

1. 使用動物および飼育条件

本研究では, ICR 系雄性マウス (日本エスエルシー (株), 静岡) を使用した. マウス (体重 25~30 g) は, 予備飼育 (1 週間) および実験期間を通じて, 恒温恒湿室 (22±1℃, 50±5%) に設置したプラスチックケージにて, 7:00 点灯, 19:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した. また, 摂餌および飲水は自由とした.

2. 試験物質

本研究では, DHA-PS 製剤 (Sharp・PSTM GOLD_{4508P}, Enzymotec Ltd., Migdal HaEmeq, Israel)⁹⁾, DHA 製剤 ((株)明治, 東京), PS 製剤 (Sharp・PSTM GOLD_{60P-IP}, Enzymotec Ltd., Migdal HaEmeq, Israel), DHA 製剤と PS 製剤の混合物およびスコポラミン臭化水素酸塩 (Sigma-Aldrich Co., Ltd., MO, USA) を使用した. DHA-

PS 製剤は, PS 含量が重量比で 51%, PS 中の脂肪酸の 9% (重量比) が DHA に置換された製剤である. DHA 製剤は, 混合比がグレープシードオイル : DHA46G : EPA28G = 70 : 16.5 : 13.5 であり, DHA-PS 製剤に含まれる DHA の比率と合致するように作成された製剤である. また PS 製剤は, PS 含量が重量比で 60% 含有された製剤である. スコポラミン臭化水素酸塩以外の薬物は, 全て溶媒 (1% カルボキシメチルセルロースナトリウム (ナカライテスク (株), 京都)) を混合した生理食塩液 (大塚製薬 (株), 東京) に懸濁し, 経口 (p.o.) 投与した. また, スコポラミン臭化水素酸塩は生理食塩液に溶解し, 腹腔内 (i.p.) 投与した. なお, DHA 製剤および PS 製剤の用量は, DHA-PS 製剤に含まれる DHA および PS の量に基づいて換算した.

3. モーリス型水迷路試験

実験装置には, 水面下 0.3 cm に直径 10 cm の退避用プラットフォームを設置したプール (直径 120 cm) を用いた. プラットホームの設置場所を基準として 4 分割した任意の 1 区画からマウスをプールに入れ, プラットホームにたどり着くまでに要する遊泳時間を測定した. 規定の時間 (1 分) 以内に到達できなかったマウスは実験者がプラットフォームまで誘導し, その場で 30 秒間静止させた. この操作を 1 日あたり 3 回 10 日間にわたり実施し, プラットホームに到達するまでに要する遊泳時間が短縮することを学習記憶の指標とした. なお, マウスがプラットフォームにたどり着く時間は, カラービデオ・トラッキング・システム (CAT-10, 室町機械 (株), 東京) とデータ解析用のソフトウェア (Comp ACT MWM, 室町機械 (株), 東京) にて自動的に測定・解析した. また, 動物の行動に影響を及ぼす可能性のある音, 振動, 光などの外部刺激は, 防音室を使用することで除去した.

4. 恐怖条件付けストレス試験

実験装置には, 床面に電撃刺激負荷用のグリッドを装備した電撃ボックスを用い, 試験はコンディショニングとテストの 2 セッションで実施した. コンディ

ショニングセッションでは、マウスを電撃ボックスに入れ、電撃フットショック刺激(1mA, 1秒間)を1~10秒間隔で36回負荷して条件付けを行った。その24時間後のテストセッションでは、再度同じ電撃ボックス内にマウスを入れ、電撃刺激を与えない状態でマウスが示すすくみ行動(呼吸運動以外の体動を示さない無動状態のまま身体をすくませる行動)の出現時間を6分間測定した。すくみ行動の発現時間が延長することを学習記憶の指標とした。なお、すくみ行動は、スーパーメックス(PAT. P, 室町機械(株), 東京)とデータ解析用のソフトウェア(Comp ACT FSS, 室町機械(株), 東京)にて、自動的に測定・解析した。また、動物の行動に影響を及ぼす可能性のある音、振動、光などの外部刺激は、防音室を使用することで除去した。

5. スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果

マウスに DHA-PS 製剤(30, 100 および 300mg/kg, p.o.) あるいは溶媒を1日1回4週間投与し、最終投与24時間後に水迷路試験および恐怖条件付けストレス試験に従い学習記憶の評価を行った。水迷路試験の期間中は、連日、試験30分前にスコポラミン(1mg/kg, i.p.) あるいは生理食塩液を投与し、マウスがプラットホームに到達するまでの遊泳時間を測定した直後に、DHA-PS 製剤(30, 100 および 300mg/kg, p.o.) あるいは溶媒を投与した。また、恐怖条件付けストレス試験では、スコポラミン(1mg/kg, i.p.) あるいは生理食塩液を投与した30分後に条件付けを行い、その24時間後にマウスのすくみ行動を測定した。

6. スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果と DHA 製剤および PS 製剤の効果との比較

マウスに DHA-PS 製剤(300mg/kg, p.o.), DHA 製剤(117mg/kg, p.o.), PS 製剤(255mg/kg, p.o.), DHA 製剤(117mg/kg, p.o.) と PS 製剤(255mg/kg, p.o.) の混合物あるいは溶媒を1日1回4週間投与し、最終投

与24時間後より水迷路試験に従い学習記憶の評価を行った。水迷路試験の期間中は、連日、スコポラミン(1mg/kg, i.p.) あるいは生理食塩液を投与した30分後にマウスがプラットホームに到達するまでの遊泳時間を測定し、その直後に DHA-PS 製剤(300mg/kg, p.o.), DHA 製剤(117mg/kg, p.o.), PS 製剤(255mg/kg, p.o.), DHA 製剤(117mg/kg, p.o.) と PS 製剤(255mg/kg, p.o.) の混合物あるいは溶媒を経口投与した。

7. スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果発現と投与期間との関連性

マウスに DHA-PS 製剤(300mg/kg, p.o.) あるいは溶媒を1日1回2週間投与し、最終投与24時間後より水迷路試験に従い学習記憶の評価を行った。水迷路試験の期間中は、連日、スコポラミン(1mg/kg) あるいは生理食塩液を投与した30分後にマウスがプラットホームに到達するまでの遊泳時間を測定し、その直後に DHA-PS 製剤(300mg/kg, p.o.) を経口投与した。また、DHA-PS 製剤を水迷路試験開始前に投与しないマウスの学習記憶能力についても、同様に評価した。

8. 各種アセチルコリン関連機能分子の mRNA 発現量の評価

マウスに DHA-PS 製剤(300mg/kg, p.o.) あるいは溶媒を1日1回4週間投与し、最終投与24時間後に全脳を摘出した。摘出した全脳より海馬を分画し、total RNA を ISOGEN ((株) ニッポンジーン, 東京) を用いて抽出した。First strand cDNA 作成のために、抽出した 0.5 μg total RNA を 2.5 μM oligo(dt)₁₆ primers (PerkinElmer, Inc., MA, USA), 10 units RNase inhibitor (PerkinElmer), 4 units Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany) および RT buffer (Qiagen) と共に 37°C で 60 分間および 93°C で 5 分間インキュベートし、その後 4°C にて急冷した。作成した First stand cDNA に 2.5 units Taq DNA Polymerase (Qiagen), 100 pmol primers (Table 1), 0.2 mM dNTP (Qiagen) および RT buffer (Qiagen) を加え、サーマルサイクラー

Table 1 Primer list used in the present study

Target	Predicted Product Size (bp)	Primer Sequences (5'-3')
ChAT	669	FWD: GGG TGA TCT GTT CAC TCA GTT GAG
		REV: CTC TGG TAA AGC CTG TAG TAA GCC
VACHT	814	FWD: AGC GGG CCT TTC ATT GAT CG
		REV: GGC GCA CGT CCA CCA GAA AGG
M ₁	497	FWD: TCT GCT CAT CAG CTT TGA CCG
		REV: CAT CCT CTT CCT CTT CTT CTT TCC
M ₂	480	FWD: TGT CAG CAA TGC CTC CGT TATG
		REV: GCC TTG CCA TTC TGG ATC TTG
M ₃	222	FWD: CAC AGC CAA GAC CTC TGA CA
		REV: ATG ATG TTG TAG GGG GTC CA
M ₄	474	FWD: TCA AGA GCC CTC TGA TGA AGC C
		REV: AGA TTG TCC GAG TCA CTT TGC G
M ₅	485	FWD: GCT GAC CTC CAA GGT TCC GAT TC
		REV: CCG TCA GCT TTT ACC ACC AAT C

FWD, forward; REV, reverse.

(Bio-Rad Laboratories, Co., Ltd., CA, USA) を用いて PCR 反応により以下の条件で DNA 断片を複製した：94℃ で 2 分を 1 サイクル；94℃ で 0.5 分，65℃ で 1 分および 68℃ で 2 分を 30 サイクル；68℃ で 7 分を 1 サイクル。生成された PCR 産物を Loading buffer (Invitrogen™ Life Technologies Co., Ltd., CA, USA) と共に 0.5 μg/ml 臭化エチジウム (エムエステクシステムズ，大阪) を加えた 3% アガロースゲル (Invitrogen™ life technologies) にて電気泳動し，Chemi Doc XRS (Bio-Rad) を用いて UV 光をゲルに照射した。検出される PCR 産物のバンドを，Quantity One software (Bio-Rad) を用いて定量した。

9. 統計処理

実験結果は，すべて平均値 ± 標準誤差として表示した。水迷路試験における経日的変化のデータの統計学的有意差は，二元配置分散分析を行った後に Bonferroni test を行うことで判定した。その他のデータについては，一元配置分散分析を行った後に Student-Newman-Keuls multiple comparison test を行い，統計学的有意差を判定した。判定の結果，危険率が 5% 未満 ($p < 0.05$) であった場合を，統計学的に有意差ありとした。

III. 結果

1. モーリス型水迷路試験におけるスコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果

スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果について，モーリス型水迷路試験に従い検討した結果を Fig. 1 に示した (A：プラットホームへの到達時間の経日変化, B: 試験 10 日目におけるプラットホームへの到達時間)。コントロールマウスにおけるプラットホームへの到達時間は経日的に短縮し，空間記憶の獲得が確認された (Fig. 1A)。一方，スコポラミン (1 mg/kg, i.p.) 投与マウスではプラットホームへの到達時間は短縮せず，学習記憶障害の発現が認められた (Fig. 1B; $p < 0.01$ vs. vehicle plus saline group)。また，このスコポラミン誘発学習記憶障害は，水迷路試験開始前 (4 週間) および期間中に PS-DHA 製剤 (30, 100 および 300 mg/kg, p.o.) を慢性投与することにより，用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 1B; $p < 0.05$ or 0.01 vs. vehicle plus scopolamine group)。

2. 恐怖条件付けストレス試験におけるスコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果

スコポラミン誘発学習記憶に対する DHA-PS 製剤

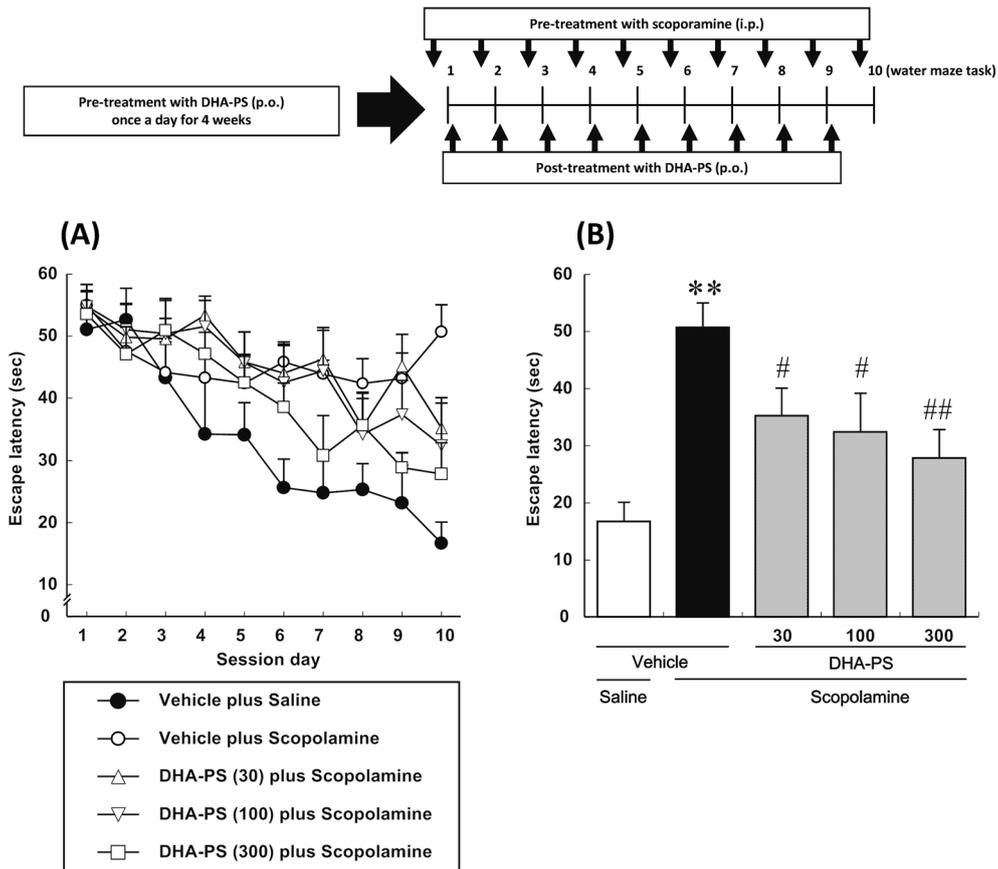


Fig. 1 Effects of DHA-PS on scopolamine-induced spatial memory impairment in the Morris water maze test in mice. (A) The time-course of changes in the escape latency of reaching the platform. (B) Escape latency of reaching the platform on day 10. Each column represents the mean with SEM of 7-9 mice. ** $p < 0.01$ vs. vehicle plus saline group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. vehicle plus scopolamine group (Student-Newman-Keuls multiple comparison test).

の効果について、恐怖条件付けストレス試験に従い検討した結果を Fig. 2 に示した (A: テストセッションにおける1分間のすくみ行動の経時変化, B: テストセッションにおける6分間のすくみ行動の出現時間)。コントロールマウスでは著明なすくみ行動が発現し、恐怖記憶の獲得が確認された (Fig. 2B)。一方、スコポラミン (1 mg/kg, i.p.) 投与マウスではすくみ行動が减弱し、学習記憶障害の発現が認められた (Fig. 2B; $p < 0.01$ vs. vehicle plus saline group)。また、このスコポラミン誘発学習記憶障害は、恐怖条件付けストレス試験開始前に PS-DHA 製剤 (30, 100 および 300 mg/kg, p.o.) を4週間慢性投与しても全く改善されなかった (Fig. 2B; $p < 0.01$ vs. vehicle plus saline group)。

3. スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果と DHA 製剤および PS 製剤の効果との比較

スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果と DHA 製剤および PS 製剤の効果とを、モリス型水迷路試験に従い比較検討した結果を Fig. 3 に示した (A: DHA-PS 製剤投与の効果, B: PS 製剤投与の効果, C: DHA 製剤投与の効果, D: DHA 製剤と PS 製剤の併用投与の効果)。コントロールマウスではプラットホームへの到達時間の経日的な短縮が認められたが、この空間記憶の獲得はスコポラミンの投与により障害された (Fig. 3A~D)。一方、このスコポラミン誘発学習記憶障害は、水迷路試験開始前 (4週間) および試験期間中に PS-DHA 製剤 (300 mg/kg, p.o.) を慢性投与することにより有意に改善した (Fig.

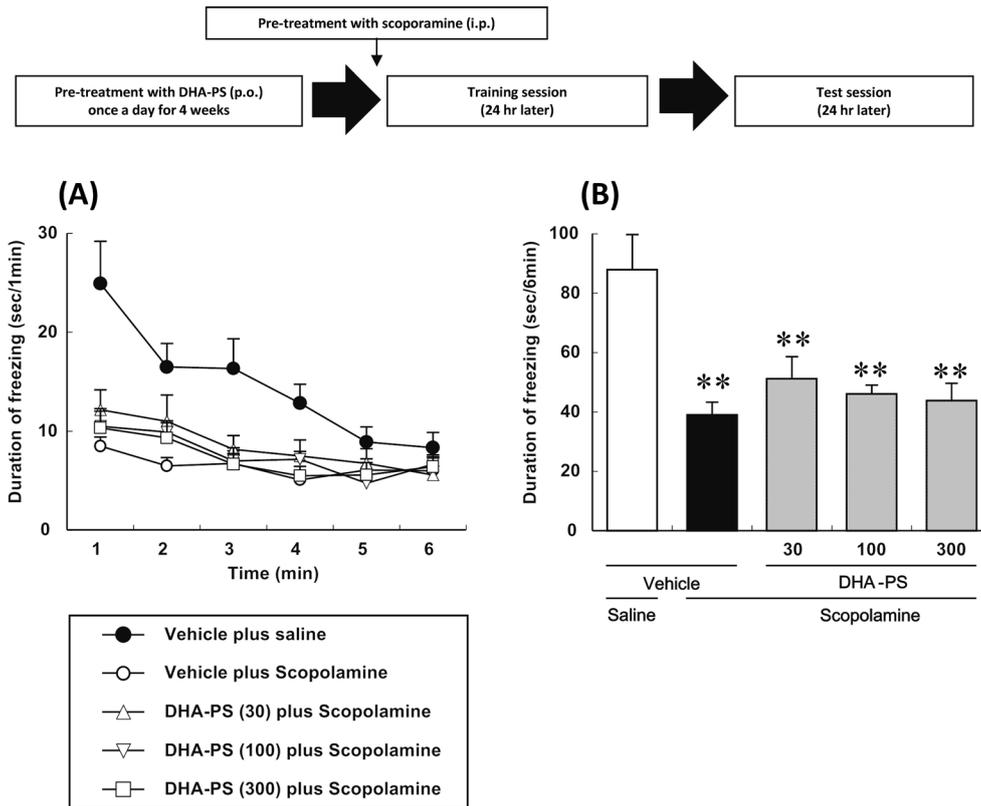


Fig. 2 Effects of DHA-PS on scopolamine-induced cognitive impairment in the contextual fear conditioning in mice. (A) The time-course of changes in the duration of freezing for 1 min in the test session. (B) Duration of freezing for 6 min in the test session. Each column represents the mean with SEM of 12 mice. ** $p < 0.01$ vs. vehicle plus saline group (Student-Newman-Keuls multiple comparison test).

3A, vehicle plus scopolamine group vs. DHA-PS plus scopolamine group, $p = 0.0081$). また、水迷路試験前および試験期間中に PS 製剤 (117 mg/kg, p.o.) あるいは DHA 製剤 (255 mg/kg, p.o.) を慢性投与することによっても学習記憶障害の改善効果が認められたが、これら効果は DHA-PS 製剤 (300 mg/kg, p.o.) の効果よりも弱かった (Fig. 3B, vehicle plus scopolamine group vs. PS plus scopolamine group, $p = 0.0347$; Fig. 3C, vehicle plus scopolamine group vs. DHA plus scopolamine group, $p = 0.0534$). さらに、PS 製剤と DHA 製剤を併用して慢性投与した場合には、スコポラミン誘発学習記憶障害の改善は認められなかった (Fig. 3D, vehicle plus scopolamine group vs. DHA+PS plus scopolamine group, $p = 0.3072$).

4. スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果発現と投与期間との関連性

スコポラミン誘発学習記憶障害に対する DHA-PS 製剤の効果発現と投与期間との関連性について、モリス型水迷路試験に従い検討した結果を Fig. 4 に示した (A: 水迷路試験開始前に DHA-PS 製剤を投与しなかった時のプラットホームへの到達時間の経日変化, B: 水迷路試験開始前に DHA-PS 製剤を 2 週間投与した時のプラットホームへの到達時間の経日変化). コントロールマウスにおいて、プラットホームへの到達時間は経日的に短縮したが、この空間記憶の獲得はスコポラミンの投与により障害された (Fig. 4A, B). また、このスコポラミン誘発学習記憶障害は、水迷路試験前に DHA-PS 製剤を 2 週間慢性投与することによっても一部改善傾向が認められたが、4 週間投与した場合の効果よりも弱かった (Fig. 4B, vehicle plus scopolamine group vs. PS-DHA plus scopolamine group, $p = 0.2291$).

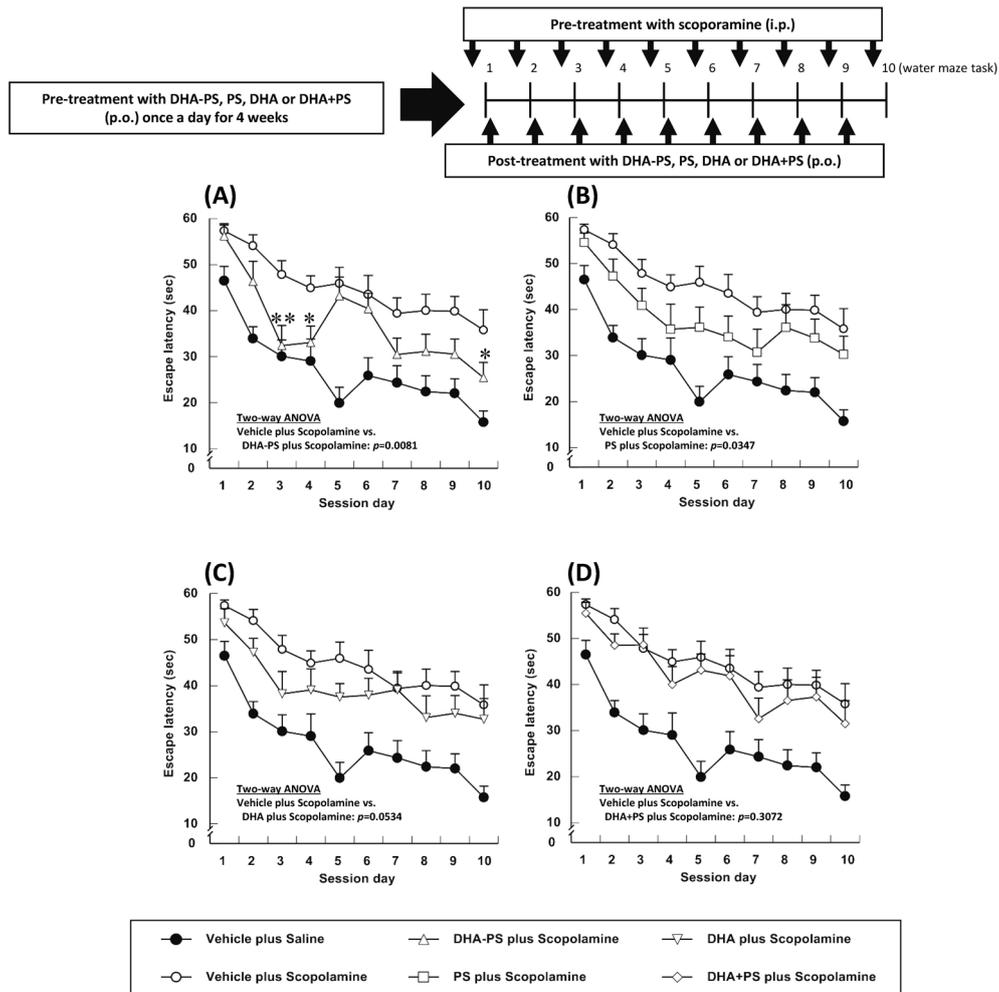


Fig. 3 Effects of DHA-PS, DHA, PS and combination of DHA and PS on scopolamine-induced spatial memory impairment in the Morris water maze test in mice. (A-D) The time-course of changes in the escape latency of reaching the platform with treatment of DHA-PS (A), PS (B), DHA (C) or combination of DHA and PS (D). Each column represents the mean with SEM of 12-14 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle plus scopolamine group (Bonferroni test).

さらに、水迷路試験開始前に PS-DHA 製剤を前投与せず、試験期間中のみの PS-DHA 製剤の投与では、スコポラミン誘発学習記憶障害の改善は全く認められなかった (Fig. 4A, vehicle plus scopolamine group vs. PS-DHA plus scopolamine group, $p = 0.984$).

5. DHA-PS 製剤が海馬における各種アセチルコリン関連機能分子の mRNA 発現に及ぼす影響

DHA-PS 製剤が海馬におけるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT), 小胞アセチルコリントランスポーター (VACHT) および各種ムスカリン受容体 (M_1, M_2, M_3, M_4 および M_5 受容体) の mRNA 発現に及ぼ

す影響について検討した結果を Fig. 5 に示した (A: ChAT mRNA 発現量の変化, B: VACHT mRNA 発現量の変化, C: ムスカリン M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 受容体 mRNA 発現量の変化). PS-DHA 製剤を 4 週間慢性投与しても、海馬における ChAT, VACHT およびムスカリン M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 受容体の mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった.

IV. 考察

我が国は超高齢化社会を迎え、認知症をはじめとする学習記憶障害を伴う様々な疾患が急増している。認知症は、患者本人はもちろんのこと、周囲の人々の日

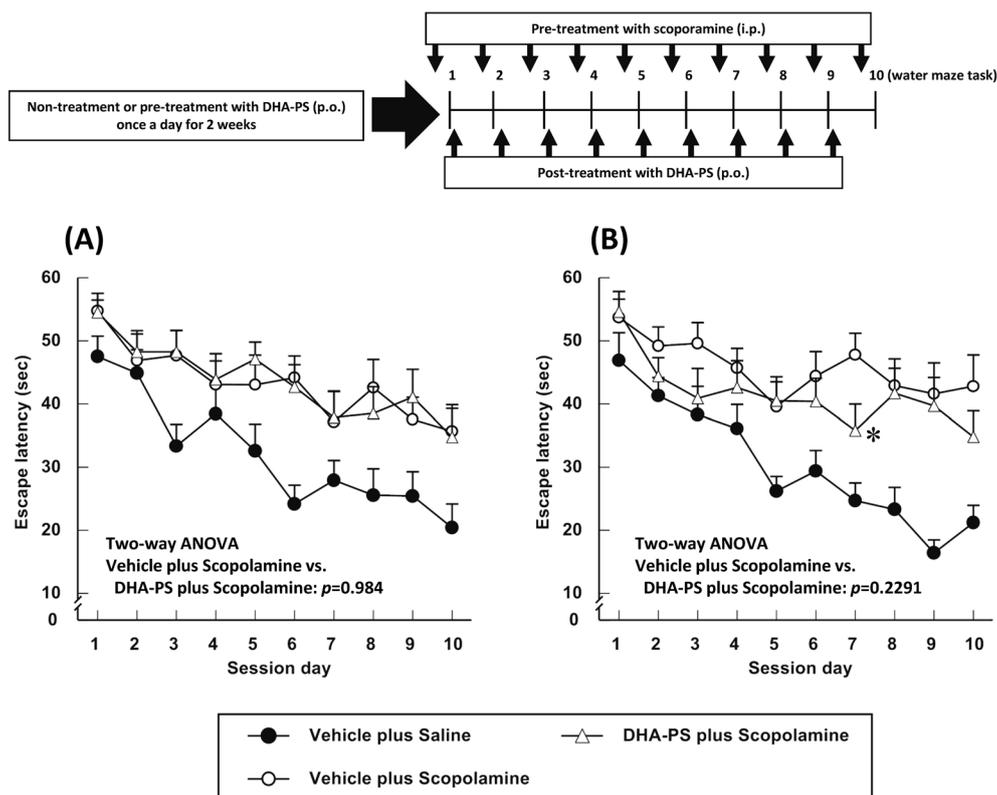


Fig. 4 Effects of non-pretreatment and pretreatment with DHA-PS for 2 weeks on scopolamine-induced spatial memory impairment in the Morris water maze test in mice. (A) The time-course of changes in the escape latency of reaching the platform with non-pretreatment with DHA-PS. (B) The time-course of changes in the escape latency of reaching the platform with pretreatment of DHA-PS for 2 weeks. Each column represents the mean with SEM of 7 mice. * $p < 0.05$ vs. vehicle plus scopolamine group (Bonferroni test).

常生活にまで影響をもたらす重篤な疾患である。現在、認知症の中核症状である学習記憶障害の治療には、脳内アセチルコリンの利用率を高める薬物またはグルタミン酸の過剰な働きを抑制する薬物が使用されているが、その効果はあくまでも症状の進行を遅らせる限定的なものであり、根本的な治療には至っていない。そのため、認知症に対するより有効性の高い予防・治療法の開発が切望されている。近年、補完代替医療の一環として、学習記憶機能に対して有益な効能が期待できるDHAとPSの複合体を含有するDHA-PS製剤が開発され、高齢者における認知記憶の低下を改善したとの臨床報告がなされている^{7,9)}。また、高齢者に対して使用する際の安全性についても確認されており⁸⁾、DHA-PS製剤の認知症治療への応用が期待される。しかしながら、これらの臨床的知見を裏付ける基礎研究は少なく、科学的根拠に基づいてより安全かつ有効に

DHA-PS製剤を使用するためには、様々な観点から詳細な薬理的検討を行う必要がある。そこで本研究では、スコポラミン誘発健忘モデルマウスを用いて、DHA-PS製剤の学習記憶改善効果の特徴について多角的に検討した。

まず、スコポラミン誘発学習記憶障害に対するDHA-PS製剤の効果について、モーリス型水迷路試験に従って検討した。コントロールマウスではプラットホームへの到達時間が経日的に短縮し、空間記憶の獲得が確認されたが、試験期間中に連日スコポラミンを投与することでプラットホームへの到達時間は短縮せず、学習記憶障害の発現が認められた。このスコポラミン誘発学習記憶障害は、水迷路試験開始前(4週間)および試験期間中にPS-DHA製剤を慢性投与することにより、用量依存かつ有意に抑制された。このことから、DHA-PS製剤は、学習記憶改善効果を有する栄養

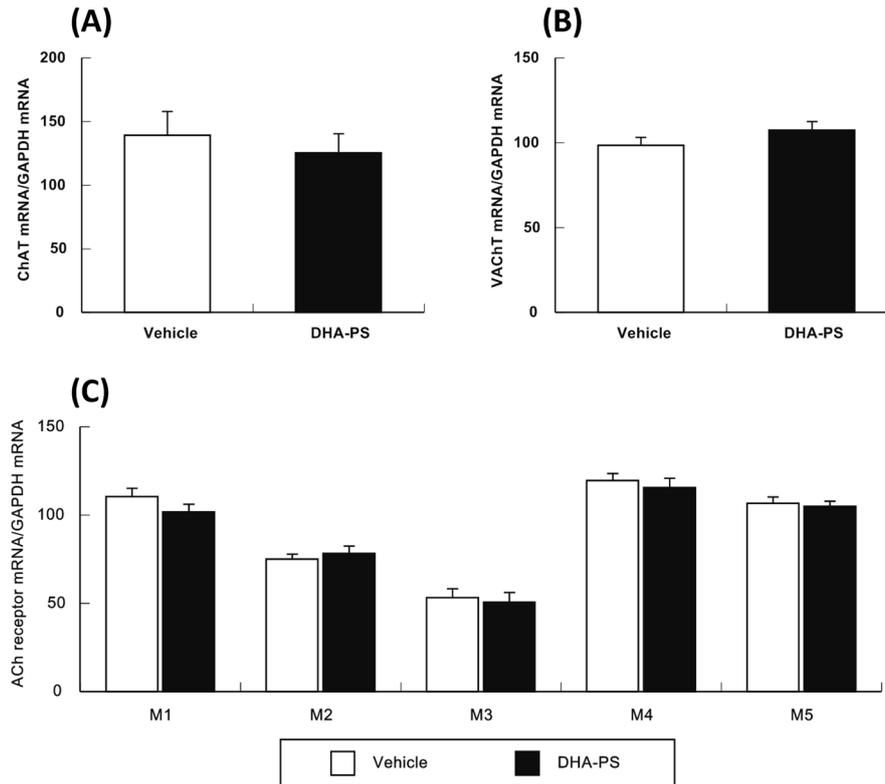


Fig. 5 Effects of treatment with DHA-PS for 4 weeks on the expression of mRNA of molecules related to acetylcholine neurotransmission in the mouse hippocampus. (A-C) The hippocampal mRNA levels of ChAT (A), VACht (B), and muscarinic acetylcholine receptor (M₁, M₂, M₃, M₄ and M₅) (C). Each column represents the mean with SEM of 9–12 mice.

剤であることが示唆された。

次に、恐怖条件付けストレス試験における検討では、コントロールマウスにおいて著明なすくみ行動が発現し、恐怖記憶の獲得が確認されたが、トレーニングセッション前にスコポラミンを投与することによりすくみ行動の発現が減弱し、学習記憶障害の発現が認められた。また、このスコポラミン誘発学習記憶障害は、モーリス型水迷路試験における検討結果と異なり、恐怖条件付けストレス試験開始前にDHA-PS製剤を4週間慢性投与してもまったく改善されなかった。これらの結果より、DHA-PS製剤の効果発現は、学習記憶の種類に依存することが考えられる。モーリス型水迷路試験は、その獲得に海馬が深く関与しているといわれている空間記憶の評価法である¹⁰⁾。一方、恐怖条件付けストレス試験は文脈記憶の評価法であり、この種の記憶の獲得には扁桃体が重要な役割を果たしているとの報告がある^{11,12)}。このような関与する脳領域の違い

が、評価対象とする学習記憶の種類によってDHA-PS製剤の効果発現が異なった原因である可能性が考えられる。

以上、本研究において、スコポラミンにより誘発される空間学習記憶の障害が、DHA-PS製剤の慢性投与により改善することが明らかとなった。そこで、このスコポラミン誘発学習記憶障害に対するDHA-PS製剤の効果について、DHA製剤およびPS製剤の単体または併用投与の効果と比較検討した。その結果、DHA製剤あるいはPS製剤の慢性投与によってもスコポラミン誘発学習記憶障害の改善は認められたが、これらの効果はDHA-PS製剤の効果と比較して弱いものであった。また、DHA製剤およびPS製剤の慢性併用投与では、スコポラミン誘発学習記憶障害の改善は認められなかった。このことから、DHA-PS製剤は、DHA製剤あるいはPS製剤の単体または併用投与と比較して、より強力な学習記憶改善効果を有することが示唆

された。これまでに、n-3 脂肪酸と PS との結合体は、ラットにおける DHA の脳内濃度を増加させ、学習記憶改善効果に優れていることが報告されている¹³⁾。また、DHA-PS 投与により、高齢マウスの海馬における DHA および PS の含量が増加したとの報告もある¹⁴⁾。さらに、本研究で用いた DHA-PS 製剤の社内報告書では、ラットに DHA 製剤を単独で経口投与した時の脳内の DHA 量は、PS 製剤を併用投与しても変化しないが、DHA-PS 製剤の経口投与は、より顕著に脳内の DHA 量を増加させることが示されている¹⁵⁾。これらの報告を踏まえると、DHA 製剤を単体あるいは PS 製剤と併用して摂取するのと比較し、複合体として摂取することで脳内の DHA 利用率が高まり、学習記憶改善効果が増強する可能性が考えられる。

これまでの臨床研究において、本研究で用いた DHA-PS 製剤を 6 週間経口投与することにより、高齢者の認知機能の低下が改善することが明らかにされている⁹⁾。また、他の DHA-PS 製剤を用いた基礎研究では、マウスに DHA-PS 製剤を 2 週間経口投与することにより、記憶の改善が認められたとの報告がある¹⁶⁾。本研究では、これらの報告を踏まえて DHA-PS 製剤の投与期間を 4 週間に設定して検討したところ、上記のように用量依存かつ有意な学習記憶改善効果が得られた。そこで次に、DHA-PS 製剤の学習記憶改善効果と投与期間との関連性についても検討した。モリス型水迷路試験において、DHA-PS 製剤を試験開始前に 2 週間投与することによっても学習記憶障害の改善は認められたが、この効果は DHA-PS 製剤を試験開始前に 4 週間投与した場合と比較して弱いものであった。また、試験開始前に DHA-PS 製剤を投与せず、試験期間中の投与のみでは、まったく効果が認められなかった。これらのことから、DHA-PS 製剤の学習記憶改善効果の発現には、ある一定期間の慢性的な投与が必要であると考えられる。臨床研究においても、DHA による認知機能改善効果の発現には慢性投与が必要であるとの報告があることから¹⁷⁾、DHA-PS 製剤による学習記憶改善効果を十分に得るためには、投与期間を十分に考慮する必要があると考えられる。

認知症の中核症状である学習記憶障害は、脳内アセチルコリン神経系の情報伝達の低下が原因で引き起こされると考えられている。そこで、本研究で認められた DHA-PS 製剤の学習記憶改善効果のメカニズムについて解明すべく、学習記憶に重要な脳部位である海馬における ChAT、VAcHt およびムスカリン M₁、M₂、M₃、M₄、M₅ 受容体の発現変化に着目した検討を行った。その結果、PS-DHA 製剤を 4 週間慢性投与しても、各分子の mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。このことから、DHA-PS 製剤は学習記憶改善効果を示す条件において、アセチルコリン神経系の情報伝達に関わる機能分子の発現に特筆すべき影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、これまでに、DHA および PS が大脳皮質におけるアセチルコリンの放出を変化させるとの報告や、高週齢ラットにおいて PS が学習記憶機能の低下を改善するメカニズムに、海馬における ChAT、アセチルコリンエステラーゼ、コリントランスポーターおよび M₁ 受容体の発現変化が関与しているとの報告がある¹⁸⁻²⁵⁾。本研究において、DHA-PS 製剤の学習記憶改善効果とアセチルコリン神経系の関連性を見出すことができなかった理由としては、実験に使用している動物種および週齢が異なることや、検討した脳部位およびアセチルコリン神経系の分子種・機能の違いが考えられる。したがって、本研究結果は、DHA-PS 製剤の学習記憶改善効果におけるアセチルコリン神経系の関与を完全に否定するものではなく、今後、過去の報告を踏まえてより詳細な検討を加えていく必要があると考える。さらに、これまでに DHA は、神経細胞の膜リン脂質やシナプスタンパクの合成促進、シナプス伝達の長期増強の活性化、神経新生の誘導、神経保護作用など、脳神経細胞に対して多様な効果を与えることが報告されている^{3,4,26,27)}。また、PS は脳神経細胞の膜を形成する重要な成分であるとともに、樹状突起スパインの形成、神経のシグナル伝達や神経伝達物質の放出に影響を与え、脳内の神経ネットワークにおいて重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{5,6)}。これらの知見を踏まえると、DHA-PS 製剤の慢性投与により脳内神経細胞

に可塑的な変化が惹起され、シナプスにおけるシグナル伝達の効率化・活性化が引き起こされることで、学習記憶障害が改善した可能性が示唆される。この仮説を証明するために、今後、さらなる詳細な検討が必要と考える。

V. 結論

本研究では、DHA-PS 製剤が、DHA 製剤や PS 製剤よりも優れた学習記憶改善効果を有することが明らかとなった。この効果の発現メカニズムを明らかにするためにはさらなる詳細な検討を行う必要があるものの、本研究の結果は、DHA-PS 製剤が認知症に対する新たな予防および治療法開発の一助となる可能性を示唆するものと考えられる。

VI. 利益相反

本研究の実施に際し、(株) 明治より委託研究費の助成を受けた。

文献

- 1) O'Brien JS, Sampson EL. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* 1965; 6: 545-551
- 2) Svennerholm L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.* 1968; 9: 570-579
- 3) Cole GM, Ma QL, Frautschy SA. Dietary fatty acids and the aging brain. *Nutr. Rev.* 2010; 68: S102-S111
- 4) Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J. Nutr. Biochem.* 2010; 21: 364-373
- 5) Kidd PM. A review of nutrients and botanicals in the integrative management of cognitive dysfunction. *Altern. Med. Rev.* 1999; 4: 144-161
- 6) Kim HY, Huang BX, Spector AA. Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. *Prog. Lipid Res.* 2014; 56: 1-18
- 7) Vakhapova V, Cohen T, Richter Y, et al. Phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids may improve memory abilities in non-demented elderly with memory complaints: a double-blind placebo-controlled trial. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2010; 29: 467-474
- 8) Vakhapova V, Richter Y, Cohen T, et al. Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double-blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension. *BMC Neurol.* 2011; 11: 79
- 9) Richter Y, Herzog Y, Cohen T, et al. The effect of phosphatidylserine-containing omega-3 fatty acids on memory abilities in subjects with subjective memory complaints: a pilot study. *Clin. Interv. Aging* 2010; 5: 313-316
- 10) Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681-683
- 11) Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1992; 324: 180-194
- 12) Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J. Neurosci.* 1995; 15: 7548-7564
- 13) Vaisman N, Pelled D. n-3 phosphatidylserine attenuated scopolamine-induced amnesia in middle-aged rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2009; 33: 952-959
- 14) Ohkubo T, Tanaka Y. Administration of DHA-PS to aged mice was suitable for increasing hippocampal PS and DHA ratio. *J. Oleo. Sci.* 2010; 59: 247-253
- 15) The clinical and nutritional benefits of DHA conjugation to PS. A Scientific Summary. Enzymotec Delivering Lipids 2006.
- 16) 守口徹, 原馬明子, Norman Salem Jr. ホスファチジルセチン結合型 DHA の脳機能改善効果. *脂質栄養学* 2006; 15: 157
- 17) Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUs) from genesis to senescence: the influence of LCPUs on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog. Lipid Res.* 2014; 53: 1-17
- 18) Casamenti F, Mantovani P, Amaducci L, et al. Effect of phosphatidylserine on acetylcholine output from the cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.* 1979; 32: 529-533
- 19) Pedata F, Giovannelli L, Spignoli G, et al. Phosphatidylserine increases acetylcholine release from cortical slices in aged rats. *Neurobiol. Aging* 1985; 6: 337-339
- 20) Vannucchi MG, Pepeu G. Effect of phosphatidylserine on acetylcholine release and content in cortical slices from aging rats. *Neurobiol. Aging* 1987; 8: 403-407
- 21) Vannucchi MG, Casamenti F, Pepeu G. Decrease of acetylcholine release from cortical slices in aged rats: investigations into its reversal by phosphatidylserine. *J. Neurochem.* 1990; 55: 819-825
- 22) Casamenti F, Scali C, Pepeu G. Phosphatidylserine reverses the age-dependent decrease in cortical acetylcholine release: a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 194: 11-16
- 23) Minami M, Kimura S, Endo T, et al. Dietary docosahexaenoic acid increases cerebral acetylcholine levels and improves passive avoidance performance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997; 58: 1123-1129
- 24) Aïd S, Vancassel S, Linard A, et al. Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *J. Nutr.* 2005; 135: 1008-1013
- 25) Lee B, Sur BJ, Han JJ, et al. Krill phosphatidylserine improves learning and memory in Morris water maze in aged rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2010; 34: 1085-1093
- 26) Cao D, Kevala K, Kim J, et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem.* 2009; 111: 510-521
- 27) Che H, Fu X, Zhang L, et al. Neuroprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylserine against oxidative damage in PC12 cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018; 38: 657-668

Improvement of learning and memory impairment by a docosahexaenoic acid-phosphatidylserine complex in a scopolamine-induced amnesia model in mice

**Atsumi MOCHIDA-SAITO, Kazuya MIYAGAWA, Hiroko MIYAGISHI,
Kazuhiro KUROKAWA, Hidenao KIMIJIMA, Minoru TSUJI and Hiroshi TAKEDA**

Abstract

Recently, the effectiveness of various nutrients or food components on dementia has received considerable attention as a part of complementary and alternative medicine. The present study examined whether a docosahexaenoic acid-phosphatidylserine complex (DHA-PS) could improve learning and memory impairment in a scopolamine-induced amnesia model in mice. The results showed that DHA-PS improved learning and memory better than either DHA or PS alone. Under the conditions at which DHA-PS improved learning and memory, notable changes in mRNA levels of acetylcholine synthase, vesicular acetylcholine transporter and various muscarinic receptor subtypes in the hippocampus were not observed. These results suggest that, although the detailed mechanism of the improvement of learning and memory is not yet clear, DHA-PS may be useful for the development of new preventive and therapeutic methods for dementia.

Keywords : DHA-PS, learning and memory, acetylcholine, dementia, mice