

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500963

研究課題名(和文)脳発育期及び加齢時の脳機能に及ぼすシアル酸の神経科学的解析

研究課題名(英文)Effects of sialic acid on brain function in young and aging rats

研究代表者

横越 英彦(YOKOGOSHI, Hidehiko)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：70109320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シアル酸がn-3系脂肪酸欠乏食を摂取した仔ラットの記憶学習能に及ぼす影響について調べた。9週齢雌ラットにn-3系脂肪酸欠乏食を摂取させ、仔ラットを出産後も同様にn-3系脂肪酸欠乏食を摂取させた。離乳後の仔ラットにはn-3系脂肪酸欠乏食(コントロール群)または、n-3系脂肪酸欠乏食を基準としたN-アセチルノイラミン酸添加食を摂取させた。

試験食を摂取させた後、記憶学習試験(能動回避試験)を行った結果、N-アセチルノイラミン酸添加食を摂取した仔ラットでは記憶学習能の有意な向上が観察された。

研究成果の概要(英文)：The effects of dietary sialic acid in dams on the learning abilities of their pups after weaning were investigated using rats deficient in n-3 fatty acids. During pregnancy and lactation, the female rats were fed the n-3 fatty acid-deficient diet. After weaning, these pups fed the n-3 fatty acid-deficient diet (control) or N-acetylneuramic acid containing n-3 fatty acid-deficient diet. The learning abilities of the pups were evaluated using an active avoidance test. The pups fed N-acetylneuramic acid containing n-3 fatty acid-deficient diet had high score in active avoidance test than control. the result suggested that N-acetylneuramic acid feeding had an improving effect on learning and memory behavior.

研究分野：栄養化学

キーワード：シアル酸

1. 研究開始当初の背景

現在、「健康寿命」という言葉をよく耳にするように、ただ長く生きるのではなく、「健康」の状態できかに長く生きられるかが重要である。そこで注目されるのが、「脳」の健康である。今回注目したのは、脳の主要な構成成分であるシアル酸(ガングリオシド)の栄養生理機能である。N-アセチルノイラミン酸を乳幼児期ラットに経口投与し、成長後の記憶学習能力を行動試験(active avoidance test)で解析し、また、脳内物質変化をみるために NANA 濃度、及び、脳内神経伝達物質を測定する。

2. 研究の目的

本研究では、一般に脳が完成すると言われている授乳(～3週齢)期間、及び、離乳後への NANA 投与による記憶学習能への影響を明確にすることを目的とする。そこで本研究では、脳の発達や学習能力に及ぼすシアル酸の新規の機能を解析することを目的として、特に、脳機能の低下した DHA 欠乏ラットでの記憶学習能への改善効果を解析する。この種の研究は、食品の学習能力に関する独創的、且つ、新規性に富む研究である。本研究が終了したときには、新規の機能性を有した多くの食品開発に応用されると思われる。(なぜなら、これまで当研究室で基礎研究を行ってきた緑茶成分テアニンに関しては、国内外を通じて 100 以上の製品化がなされており、FDA (Food and Drug Administration) からも GRAS (Generally Recognized as Safe) を得るにいたり、さらにサプリメントなどへの利用がなされている)。また、アミノ酪酸(GABA)に関しても、抗ストレス作用を解明したことにより GABA 含有製品が多く市場に出た(例えば、GABA チョコレートなど)。それ故、今回のシアル酸についても学術的な貢献と同時に、社会的にも応用利用という意味で大いに役立つと思われる。すなわち、食品を含めた生活の改善による健康維持を目指している。

3. 研究の方法

(1) N-アセチルノイラミン酸の血中濃度変化

絶食開始から何時間後に血中シアル酸濃度が安定するかを確認するため、絶食開始から、0、5、10、20、30、40、60、90 分後のシアル酸濃度を測定した。

(1) - 1 絶食による N-アセチルノイラミン酸血中濃度変化

実験動物として、Wistar 系雄ラット)を用い、市販の飼育用固型飼料水道水を自由摂取させた。経口ゾンデを用いて N-アセチルノイラミン酸溶液(20 μ g/ml/gB.W.)を投与し、0、0.5、1、2、4、6 時間後に尻尾を切断し、血液採取を行った。

(1) - 2 N-アセチルノイラミン酸経口投与による血中濃度の変化

実験動物として、Wistar 系雄ラットを用い、市販の飼育用固型飼料及び水道水を自由摂取させた。その後ラットの体重がほぼ等しくなるように、蒸留水投与群(control 群)N-アセチルノイラミン酸溶液投与群(sialic acid 群)の 2 グループに分け、投与 18 時間前から絶食し、水は自由摂取させ、他の物質の影響を排除した。経口ゾンデを用いて蒸留水または N-アセチルノイラミン酸溶液(1mg/1ml/gB.W.)を投与し、0、0.5、1、2、4、6 時間後に尻尾を切断し、血液採取を行った。投与後も絶食させ、水のみを摂取させた。

(2) ラット乳幼児期の NANA 投与による脳内成分及び行動変化

一般に脳が完成すると言われている離乳(3週齢)までの期間 N-アセチルノイラミン酸を与えた場合に加え、離乳後に投与した場合の記憶学習能への影響をみることを目的とした。また、記憶学習能をみると同時に脳内神経伝達物質質量を測定することで、脳内の変化をみた。成長期における N-アセチルノイラミン酸濃度の変化は 0 週齢、2 週齢、3 週齢、5 週齢、7 週齢での経時的血中・脳内 N-アセチルノイラミン酸濃度を測定することで確認した。

(3) DHA 欠乏ラットの N-アセチルノイラミン酸投与による脳内成分及び行動変化

前年度においては、N-アセチルノイラミン酸により記憶学習能力が向上するという実験を行う一方、N-アセチルノイラミン酸投与によるガングリオシドへの影響を検討するべきであるという課題を残した。DHA、N-アセチルノイラミン酸はともにガングリオシドの構成成分であり、上記のような関係がある点、ともに記憶学習に係る点と共通点が多いことに着目し、その関係をつかむことを目的とした。本実験では、餌組成調整により、脳内 DHA 構成比がほぼ 0% の DHA 欠乏ラットを作成し、そのラットに N-アセチルノイラミン酸を添加することで、学習行動及び脳内 N-アセチルノイラミン酸濃度変化を検討した。行動試験は能動回避試験を実施した。

能動回避試験で用いるシャトルボックスは、20cm 四方の 2 部屋があり、真ん中は開閉のできるゲートで区切られている。片方の部屋は電球によって明るくする事ができ、もう片方の部屋は暗く、床にはスイッチにより電流が流れる仕組みになっている。ラットを暗い電流が流れる部屋に入れ、10 秒経過したのちに、中央のゲートを開けてラットが明るい部屋にアクセスできるようにした。ラットの四肢が暗い部屋に入ったところで回避成功とし、1 分以上暗室に留まった場合は、電気刺激を 2 秒間流し実験を終了した。以上の行程を 1 セッションとし、1 日 4 セッションを連続した 3 日間の計 12 セッション行った。

(4) DHA 欠乏ラットにおける DHA と N-アセチルノイラミン酸の関係について

N-アセチルノイラミン酸と DHA は深く関わりあっており、N-アセチルノイラミン酸は DHA とともに脳へ入っていくことを予想した。それが事実であれば、DHA 欠乏ラットの N-アセチルノイラミン酸取り込みに比べ DHA を餌に添加したラットの N-アセチルノイラミン酸取り込みが増えることが予想される。そこで、本実験では、N-アセチルノイラミン酸取り込みが盛んな生後 3 週間に着目し、生後、1 週間ごとに血中・脳内量測定と脳脂肪酸組成を調べた。また、今回は 0 週齢からの投与の影響を観察したため母ラットの餌組成を変えることで仔ラットの影響をみる。DHA は母ラットが摂取することにより母乳に移行することが明らかであるが、N-アセチルノイラミン酸は移行することが明らかでないことから、母乳中 N-アセチルノイラミン酸濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) N-アセチルノイラミン酸の経口投与による血中 N-アセチルノイラミン酸の変化について

市販飼料を自由摂取させたラットを 24 時間絶食させた後の、N-アセチルノイラミン酸 (20 μ g/ml/gB.W.) の経口投与による血中の N-アセチルノイラミン酸濃度の変化を自動血液サンプリング装置 DR-II (株式会社エイコム) を用いて観察した実験では、N-アセチルノイラミン酸の経口投与後、5、10 分程度で速やかに血中の NANA 濃度の上昇が観察された。また、投与する N-アセチルノイラミン酸濃度を増加 (1mg/1 ml/gB.W.) させた実験においても、20 μ g/ml/gB.W. の N-アセチルノイラミン酸を投与した同様に速やかな毛中 N-アセチルノイラミン酸濃度の上昇が観察されたが、その毛中濃度は 20 μ g/ml/g B.W 投与時と比べると投与 20 分以降で緩やかな減少となった。これは、腸管からの N-アセチルノイラミン酸の吸収速度に依存する

事が示唆された。

(2) ラット乳幼児期の血中および脳海馬での N-アセチルノイラミン酸濃度の変化について

Wistar 系メス妊娠ラットを飼育し、出産した仔ラットを 7、14、28、42、60、72 日後にそれぞれ仔ラットを解剖して、血液および脳海馬組織を採取し、それぞれの N-アセチルノイラミン酸濃度測定を行った。血中の N-アセチルノイラミン酸濃度は、7、14、28、42、60、72 日齢と日を追うごとに増加した。しかしながら、脳海馬の N-アセチルノイラミン酸濃度は出生後 7 日から 14 日にかけて増加し、28 日には低下傾向を見せて、その後はさらに低下し、一定の濃度になった。以上の事から、血中の N-アセチルノイラミン酸は成長すると共に増加するのに対し、脳内の N-アセチルノイラミン酸濃度は生後間もなく増加し、その後やや低下し一定になる事が明らかになった。脳神経伝達をつかさどる分子機構や神経伝達は、生後から急速に成長する事が知られており、特にラットでは、生後 2 ~ 3 週間において特に活性化される事が明らかとなっている。以上より、脳内の N-アセチルノイラミン酸は脳神経伝達機構の発達期に高くなることから、それらの機構成熟に必要な因子である事が示唆された。

(3) DHA 欠乏ラットの N-アセチルノイラミン酸投与による脳内成分及び行動変化

Wistar 系雌ラットに、n-3 系脂肪酸欠乏食を自由摂取させた。そのラットを交配させて出産した子ラットを DHA 欠乏ラットとして使用した。DHA 欠乏ラットを平均体重が同じになるように 2 群に分け、n-3 系脂肪酸欠乏食を基本としたコントロール食群と N-アセチルノイラミン酸食群の 2 群に分けた。仔ラットの体重は、実験食摂取期間を通して、コントロール食摂取群と N-アセチルノイラミン酸食群において体重に差は観察されなかった。また、行動量測定装置 (ATTOMEX-II) を用いて、仔ラットの自発行動量を観察したが、2 群間に行動量に差は観察されなかった。

能動回避行動試験では、1 回目の実験 (セッション 1) では、コントロール群および N-アセチルノイラミン酸投与群ともに、回避行動の成功率は 0% だったが、両群とも徐々に回避成功率が増加し、N-アセチルノイラミン酸摂取群では回避成功率が有意に高い値を示した。また、N-アセチルノイラミン酸では実験 3 日目の回避成功率が 100% に達した。以上の結果から、N-アセチルノイラミン酸の摂取により記憶行動の向上効果が得られることが示唆された。

N-アセチルノイラミン酸摂取群の脳内神経伝達物質濃度を測定したところ、視床下部および海馬のドーパミン代謝 (DOPAC/DA) の亢進が観察された。また、視床下部、大脳皮質、および海馬のセロトニン代謝 (5HIAA

/5HT)の亢進も観察された。以上の結果から、N-アセチルノイラミン酸が脳神経伝達に影響を及ぼす事が示唆された。

次に、脳内の DHA 含量を測定したところ、n-3 系脂肪酸欠乏食摂取群では、通常食摂取群に比べ大脳皮質の DHA 濃度の有意な低下が観察された。また、n-3 系脂肪酸欠乏食 + N-アセチルノイラミン酸食摂取群においても、DHA 濃度の有意な低下が観察された。一方で大脳皮質の N-アセチルノイラミン酸濃度は、n-3 系脂肪酸欠乏食摂取群において、通常食摂取群と比べ有意な低下を示したが、N-アセチルノイラミン酸食摂取群では、N-アセチルノイラミン酸濃度の有意な回復が観察された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiratsuka, S., Honma, H., Saitoh, Y., Yasuda, Y. and Yokogoshi H.: Effects of dietary sialic acid in n-3 fatty acid-deficient dams during pregnancy and lactation on the learning abilities of their pups after weaning. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 59(2), 136-143, (2013)
査読あり

6 . 研究組織

(1)研究代表者

横越 英彦 (YOKOGOSHI, Hidehiko)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：70109320