

## 26 マリンオリゴペプチドの高齢者記憶改善能力に及ぼす影響

裴新荣<sup>1,2</sup>, 杨睿悦<sup>1</sup>, 赵海峰<sup>1</sup>, 李琼<sup>1</sup>, 李勇<sup>1</sup>

1. 北京大学公衆衛生学院、栄養・食品衛生学研究科、北京 100191

2. 首都医科大学、食品・医薬品安全評価センター 北京 100069

劉克洋訳(大阪大学医学部 医学博士課程)

## 要旨

マリンオリゴペプチド(MCP)が高齢者の学習記憶能力を改善する効果とそのメカニズムを探求するため、20月齢 C57BL/6J マウス雌を選択し、無作為に高齢対照群と0、0.22%、0.44%、および1.32%のMCPを混入した特殊加工飼料により給餌した)3群、および、3ヶ月齢の若いマウスを通常飼料で給餌して青年対照群とした。飼育開始6ヵ月後、ステップダウン型試験とモリス水迷路試験を実施し、マウスの記憶および学習能力を評価した。ニッスル染色像により海馬体組織を観察し、同時に、各対象群のマウス肝臓内のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性、マロンジアルデヒド(MDA)含有量および海馬における脳由来神経栄養因子(BDNF)の分泌動態を検出した。結果、MCP投与により、老化モデルマウスの空間学習記憶能力と受動的回避能力が有意に高められた。0.44%MCP投与量群マウスの肝臓SOD活性は高齢対照群より有意に上昇したが、MDA含有量は顕著に低下した。0.44%と1.32%MCP投与量群のマウスの海馬体におけるBDNFの発現量は高齢対照群より高かった。各群における海馬の神経細胞数には有意差は認められなかった。以上の結果により、マリンオリゴペプチドは、抗酸化能、或いはBDNFの分泌を促進することにより、加齢に伴う学習記憶能力の低下を予防することを示した。

**キーワード** 生理活性ペプチド、学習記憶、老化、酸化ストレス、脳由来神経栄養因子

中图分类号 Q819 文献標識番号 A 文章コード 1000-7857(2009)16-0026-06

### Preventive Effects of Marine Collagen Peptide on Learning and Memory in Aged C57BL/6J Mice

PEI Xinrong<sup>1,2</sup>, YANG Ruiyue<sup>1</sup>, ZHAO Haifeng<sup>1</sup>, LI Qiong<sup>1</sup>, LI Yong<sup>1</sup>

1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

2. Center for Food and Drug Safety Evaluation, Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract** To observe the preventive effects of Marine Collagen Peptide (MCP) on learning and memory in aged mice, 20-month old female C57BL/6J mice were divided into an aged control group and three MCP-treated groups. The effects on cognitive function, hepatic antioxidative systems, hippocampal morphology and

expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) were studied after feeding the aged mice MCP (0.22% or 0.44% or 1.32% (wt/wt) indiet) for 6 months. Cognitive functions were assessed using the Step-down test and the Morris water maze, respectively. Hippocampal morphology was examined by nissl stain. RT-PCR and Western blot were used to evaluate the expression of BDNF in hippocampus. There sults show that their spatial memory and passive avoidance ability were significantly improved when they were fed with MCP. Furthermore, the activity of SOD was significantly increased and the level of MDA was decreased in the 0.44% MCP supplementation group as compared to the aged control group. The expression of hippocampal BDNF was significantly up-regulated in the aged mice treated with

0.44% and 1.32% MCP. However, the number of nissl positive cell saw no significant difference among all groups. These results suggest that MCP administration has a preventive effect on memory tasks by lowering oxidative damage and up-regulating expression of BDNF.

**Keywords** bioactive peptide, learning and memory, aging, oxidative stress, brain-derived neurotrophic factor

## 0 はじめに

国民の高齢化に伴い、脳変性疾患および認知機能の低下は、中国高齢者人口死因の第一位を占めるようになってきた。近年の報告によると、高齢者人口の約50%が記憶障害を訴えており、異なる検査による客観的評価方法では、記憶の異常率が32%~78%まで確認された。現在、世界における認知症高齢者数は約2000万であり、そのうち中国での罹患者数は500万~600万人にも上る。中でも、65歳以上の高齢者のうち、記憶障害者は約5%に達し、85歳以上の高齢者では、さらに50%近くに及んでいる。近年、老人性記憶障害は人間の健康を脅かす深刻な社会問題となっている。したがって、機能性食品の開発により、老人性記憶障害の発生を早期に予防することは、高齢者の生活の質を向上させ、健康老齢化の実現のために、重要な科学意義を持ち、生物医学研究の重要な課題の一つでもある<sup>[1-3]</sup>。

生物学的な酵素技術の活用で海洋生物から抽出された活性ペプチドは、抗菌抗酸化作用、血中脂質濃度の調整、降圧作用、抗腫瘍効果など多彩な生理機能を保持する。よって、海洋から食品や機能性タンパク質や特定活性物質を得ることは、世界の健康食品や医薬品開発の重要な分野となっている<sup>[4-5]</sup>。マリンオリゴペプチド(MCP)は、サケやその他の深海魚皮を主原料とし、加

水分解酵素技術で生産されたハイブリッド体ペプチドである。本実験では、月齢20ヶ月のC57BL/6J雌マウスを使用して、マリンオリゴペプチドの老齢マウスの学習能力や記憶力に及ぼす影響について検討した。本研究は海洋資源のさらなる開発と利用のために、その理論的根拠を提供する。

## 1 材料と方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 マリンオリゴペプチド

北京中食海氏生物技術株式会社により提供されたサケ皮を原料として、洗浄、ホモジナイズ→複合結合、酵素分解→酵素作用の失活→脱脂→多段階分離→浸透精製→濃縮→脱色→造粒乾燥などの工程技術を用いて製造された。

#### 1.1.2 実験動物

月齢20ヶ月 SPF レベルの C57BL /6J 雌マウス (老化モデルマウス) 80 匹と月齢3ヶ月 SPF レベル C57BL /6J 雌マウス 20 匹を用いた。すべての動物は北京大学医学部実験動物センターにより提供され (動物合格証号: SCXK11-00-0004)、SPF 動物飼育室 (飼育環境温度 21~23℃、相対湿度 50%~60%) にて飼育管理された。

#### 1.1.3 主要機器と試薬

Morris 水迷路システム (中国医学科学院薬物研究所研究製造)、マウス電気刺激飛び込み台器 (中国科学院上海薬物研究所)、遠心分離機

(Eppendorf5840R)、XH2B 型うずまき混合造粒機、UV-762 型分光光度計 (上海精密科学機器株式会社)、GeneAmp PCR-9700PCR PCR 増幅装置 (アメリカ PE 会社)、タンパク質電気泳動装置 (アメリカ Bio-Rad 会社)、ゲルイメージングシステム (日本復日会社)。

RT-PCR キットは Promega 会社より、TRIzol は Gibco 会社より購入した。SOD、MDA キットは南京生物製品購入建設工学研究所にて購入した。その他の試薬はすべて中国国内、または輸入による分析用試薬を使用した。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 実験動物とその飼育方法

実験用マウスを3日間ケージ環境に適應するよう飼育した後、体重を測定し、高齢対照群と低、中、高、3つのMCP投与量群(0、0.22%、0.44%と1.32%のMCPを添加した特殊加工飼料にて投与)に分類した。同時に、若いマウスの陰性対照群には標準飼料を与えた。すべてのマウスが自由に飲水できるようにし、実験開始より6か月後に行動学テストを実施した。

### 1.2.2 行動学テスト

#### 1) 飛び込み台の実験

マウスを境に適應させるために飛び降り反応槽内に置き、その3分後に、36ボルトの交流電流を流した。マウスの電気ショック後に逃れる応答は、まず、プラットフォームに飛び乗り、そのうち、何匹かの動物は、再度、或いは繰り返し、銅グリッドに降りては、電気ショックを受けプラットフォームにジャンプした。5分間訓練を実施し、その24時間後に、マウスを底面の銅グリッドが通電されるプラットフォームに直接配置した。第一回飛び降り時間—飛び降り潜伏期間(step-down latency)、および5分以内にマウスがプラットフォームから飛び降りた数をエラー数として記録した。

#### 2) Morris 水迷路実験

飛び込み台の実験後に水迷路試験を行った。ナビゲーション・テストと空間探索実験の2テストバッテリーを実

施した。ナビゲーション・テスト中、毎日4箇所の入水ポイントからマウスを壁に直面させ水中に置いた。マウスがプラットフォームを探すのに要した時間、およびプラットフォームに登るまでの所要時間—脱出潜伏期間(escape latency)と水泳速度とその距離を記録した。マウスが90秒以内にプラットフォームを見つけられなかった場合、プラットフォームの位置を指示するために、プラットフォーム上に10秒間滞在させ、脱出潜伏時間を90秒として記録した。日に4度の脱出潜伏期間、および水泳速度とその距離の平均値を求め、1日の最終スコアとして統計解析を行った。空間プローブ試験ではマウスのプラットフォームへの空間的位置の正確な記憶を測定し、その記憶維持能力を計測した。第7日目にプラットフォームを撤去し、入水ポイントを随時選択してマウスを水に入れ、60秒間自由に泳がせ、60秒以内にマウスが目標象制限(オリジナルプラットフォーム象限)中に位置した持続時間とプラットフォームを越えた回数を記録した。

### 1.2.3 海馬台の形態学的解析

行動学により観察後、各対象群より5匹ずつのマウスを選択し、1%ペンタバルビタールナトリウムの腹腔内注射により麻酔し、左心室より灌流固定した。最初に冷たい生理食塩水を急速注入し、流出液が透明になった後、4%パラホルムアルデヒド(4°C)で30分間灌流し、抜脳後、4°Cの4%パラホルムアルデヒドの中で引き続き24時間固定した。摘出した組織は急速凍結させ、切片に作成した。10 $\mu$ mの厚度で、各ラットから3枚ずつ作成し、ニッスル染色を行った。光顕下に海馬CA1、CA3とDG区にニッスル染色陽性の細胞体数を比較した。各切片に連続した3ヶ所を選び、3枚の切片の平均値がサンプルの陽性細胞の数とした。

1. 2. 4 肝臓における SOD 濃度と MDA 含有量の測定

行動テスト終了後の動物を致死させ、肝臓組織を摘出し、氷浴しながら PBS でホモジナイズし、組織漿液を 10% に調製した。4500r/min で 15 分間遠心機にかけ、上清を回収した。キットの説明に従い、黄色プリン体酸化酵素法を採用し、スーパーオキシドジスムターゼ活性 (Superoxide) と酸化物マロンジアルデヒド (Malondialdehyde, MDA) の含有量を検出した。

1. 2. 5 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により BDNF の発現および調節を検出

Trizol キットの説明に従い海馬体総 mRNA を抽出し、紫外可視分光光度計でその濃度を検出した。1  $\mu$ g 総 RNA を取り cDNA に逆転写し、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) を行った。反応システム: 3.0  $\mu$ L cDNA テンプレート、10  $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ L、脳由来神経栄養因子 (Brain -derived Neurotrophic Factor, BDNF) プライマー各 0.8  $\mu$ L、PCR 染料 2.0  $\mu$ L、Taq 酵素 0.3  $\mu$ L、DEPC 水 10.6  $\mu$ L、20  $\mu$ L まで充填した (表 1)。

1. 2. 6 ウェスタンブロット法による BDNF タンパク質の発現と調整の分析

各群のマウスから海馬のタンパク質を抽出し、Lowry 法によりタンパク質含有量を定量を行った。電気泳動および免疫テストを行い、ECL 免疫テストキットにより発色させ、画像化、Band Lead 画像解析システムでテープ分析をした。

1. 2. 7 統計解析

全てのデータを SPSS ソフトウェアで統計解析を行い、結果は  $\bar{X} \pm SD$  の形で示した。Morris 水迷路実験で脱出

潜伏期間と水泳距離を繰り返し測定した結果は二元配置 ANOVA (two-way repeated measures ANOVA) により分析した。他の指標は一元配置分散分析を用いた。両グループ間の比較は最小有意差法に基づく。P < 0.05 が統計的検定の臨界値である。

2 結果

2. 1 MCP のジャンプ潜伏期間ミス回数への影響

表 2 から分かるように、高齢対照群を青年対照群と比較すると、ジャンプ潜伏期間は縮短し、エラー数も減少し、有意差が認められた。学習記憶能力の低下した高齢マウスにおいて、MCP 投与は、プラットフォームに滞在する潜伏期間を延長すさせ、老化を原因とするエラー数を減少させた。そのうち、MCP の中、高投与量群では、高齢対照群と比較して潜伏期が有意に延長された。青年対照群と比較しても有意差は認められなかった。高齢対照群と比較して、0.44% の MCP 中投与量群のエラー数が減少した。MCP 投与が老齢マウスの受動的回避能力に有意な改善効果を齎したと考察された。同時に、MCP の投与効果は中投与量群において最も顕著であった。

表 2 MCP が飛び降り潜伏期間とエラー数への影響  
Table 2 Effects of MCP on latency and number of errors in step-down passive avoidance test

グループ	動物数	潜伏期/s	エラー数
高齢対照グループ	15	90.93 $\pm$ 28.81 <sup>#</sup>	1.67 $\pm$ 0.67
0.22% MCP	16	104.6 $\pm$ 21.80 <sup>#</sup>	1.53 $\pm$ 0.52
0.44% MCP	16	143.5 $\pm$ 34.70 <sup>*</sup>	1.38 $\pm$ 0.50
1.32% MCP	16	140.69 $\pm$ 33.55 <sup>*</sup>	1.44 $\pm$ 0.51
青年対照グループ	16	153.00 $\pm$ 20.25 <sup>**</sup>	1.38 $\pm$ 0.62

注: 高齢対照群と比較して、有意差がある \*P < 0.05、\*\*P < 0.01 青年対照群と比較して、有意差がある: #P < 0.05、# #P < 0.01 Notes: Compared to aged control, \*

means P < 0.05, \*\* means P < 0.01. Compared to young control, # means P < 0.05, ## means P < 0.01

表1 RT-PCR プライマー序列と増幅条件  
Table 1 Sequences of primer pairs and annealing temperatures of RT-PCR

基因来源	プライマー序列	プライマー長さ /bp	アニール温度 /°C	サイクル数
β-actin	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3'	123	72	30
	5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGG-3'			
BDNF	5'-TTGAGCACGTGATCGAAGAGC-3'	267	70	30
	5'-GTTCCGGCATTCCGACTTCAG-3'			

2.2 MCP 投与によるマウスの空間学習記憶能力への影響

脱出潜伏期間の結果では、時間の延長に伴い、各対象群マウスの潜伏期間を縮めていた (F (5, 370) = 210.32, P < 0.01) ; その時間と対象群間の相互関係は認められなかった (F (20370) = 0.728, P > 0.05) ; 各対象群間の脱出潜伏期に有意差が認められた (F (4, 74) = 9.71, P < 0.01)。LSD 方法で各対象群間の潜伏期を一对比較すると、3つのMCP 投与量群と青年対照群マウスの脱出潜伏期が、高齢対照群より有意に低かった (P < 0.01)。0.22%と1.32%のMCP 投与量群は青年対照群と比較しても、潜伏期が延長され、有意な差が認められた (P < 0.05) (図1)。

水泳距離結果では、トレーニング時間を延長することに伴い、各対象群のマウスの水泳距離を徐々に短縮した (F (5, 370) = 292.13, P < 0.01) ; が、その時間と対象群間に交互作用は認められなかった (F (20, 370) = 1.20, P > 0.05) ; 各対象群間の水泳距離に有意差が認められた (F (4, 74) = 21.36, P < 0.01)。LSD 法で一对比較により、高齢者対照群に比べ、3段階のMCP 投与量群と青年対照群の水泳距離は短縮され、有意差が認められた (P < 0.01)。MCP 投与量群と青年陰性対照群を比較すると、水泳距離が著しく延びた (P < 0.05) (図2)。が、各対象群間の水泳速度に有意差は認められなかった (データ未記載)。

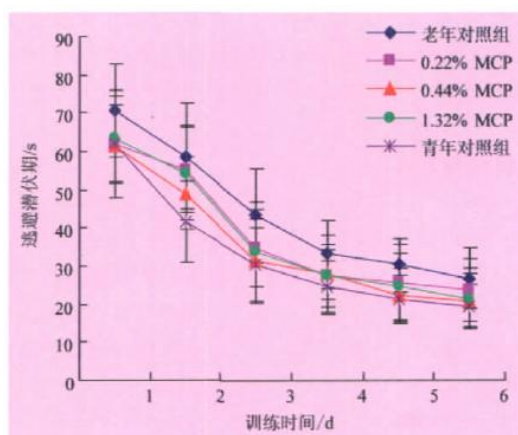


図1 Morris 水迷路実験における MCP の脱出潜伏期間への影響

Fig. 1 Effect of MCP on escape latency in Morris water maze test

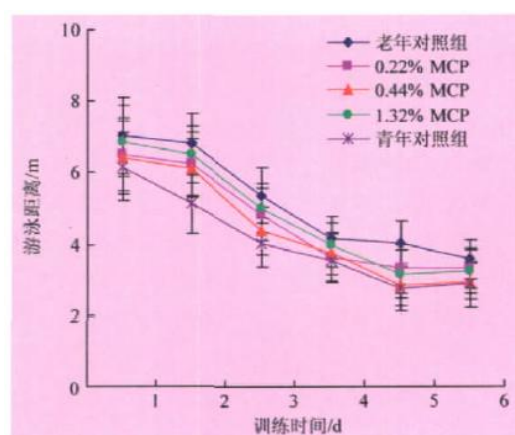


図2 Morris 水迷路実験における MCP の水泳距離への影響

Fig. 2 Effect of MCP on swimming distance in Morris water maze test

表3のように、空間探索実験では高年齢対照群と他の対象群を比較して、0.44%MCP投与量群で、マウスがターゲット象限にいる期間を延長した。1.32%MCP投与量群では、マウスがプラットフォームを横断する回数を増加した。

表3 空間探索実験中、MCPは高齢マウスがターゲット象限にいる期間とプラットフォームを横断する数への影響  
Table 3 Effects of MCP on time spent in target quadrant and numbers of crossing during the probe test

グループ	動物数	ターゲット象限にいる時間/s	横断数
高齢対照グループ	15	14.41±1.52 <sup>#</sup>	2.13±0.54 <sup>#</sup>
0.22% MCP	15	16.39±1.37	3.31±0.58
0.44% MCP	16	18.28±1.80*	2.81±0.64
1.32% MCP	15	16.58±1.85	3.38±0.59*
青年対照グループ	16	19.47±1.77*	3.44±0.62*

注：高齢対照群と比較して、有意差がある\*P < 0.05  
青年対照群と比較して、有意差がある：#P < 0.05  
Notes: Compared to aged control, \* means P < 0.05.  
Compared to young control, # means P < 0.05

2.3 MCPが肝臓組織のSOD活性およびMDAレベルに与えた影響

表4 MCP対小鼠肝臓SOD活性とMDA含量の影響  
Table 4 Effects of MCP on superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxides (MDA) in hepar

グループ	動物数	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> タンパク質)	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> タンパク質)
高齢対照グループ	15	91.56±20.08 <sup>##</sup>	4.68±0.36 <sup>##</sup>
0.22% MCP	15	97.23±24.05 <sup>#</sup>	4.29±0.31 <sup>#*</sup>
0.44% MCP	16	115.26±19.92*	3.79±0.33*
1.32% MCP	15	105.05±20.58 <sup>#</sup>	4.32±0.67 <sup>#</sup>
青年対照グループ	16	132.68±13.49 <sup>**</sup>	3.67±0.62 <sup>**</sup>

注：高齢対照群と比較して、有意差がある\*P < 0.05、\*\*P < 0.01  
青年対照群と比較して、有意差がある：#P < 0.05、##P < 0.01  
Notes: Compared to aged control, \* means P < 0.05, \*\* means P < 0.01  
Compared to young control, # means P < 0.05, ## means P < 0.01

表4から見ると、高齢対照群の肝臓SOD活性は青年対照群より有意に低下したが、MDA含有量は有意に上昇した(P < 0.01)。このことから、高齢マウスの体内で脂質酸化ストレスによる損傷が青年対照群より重いことが示唆された。MCP投与後、各マウスの肝臓SOD活性が高齢対照群に比べて上昇した。中でも、0.44%MCP投与量群では、SOD活性上昇に有意差が認められた(P < 0.05)。0.22%と0.44%投与量群の肝臓MDA含有量は高齢対照群より有意に低かった。

2.4 MCPの海馬神経細胞への影響

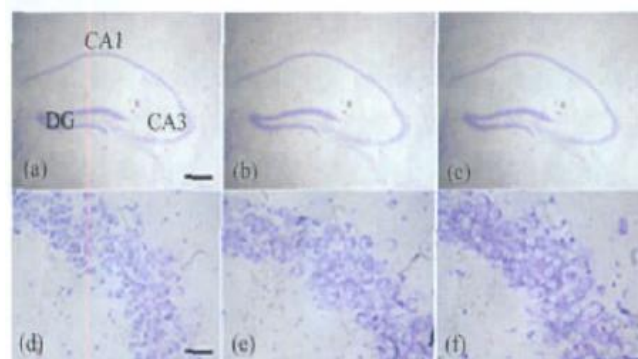


図3 海馬錐体細胞 (nissl 染色図)  
(a)-(c): 10x; (d)-(f): 400x  
Fig. 3 Representative photomicrographs of hippocampal structures stained with nissl ((a)-(c): 10x; (d)-(f): 400x)

注：高齢対照群：(a) (d)  
0.44%MCP投与量群：(b) (e) 青年陰性対照群：(c) (f)  
Notes: (a) and (d) are for the aged control group; (b) and (e) are for the 0.44% MCP-treated group; (c) and (f) are for the young control group

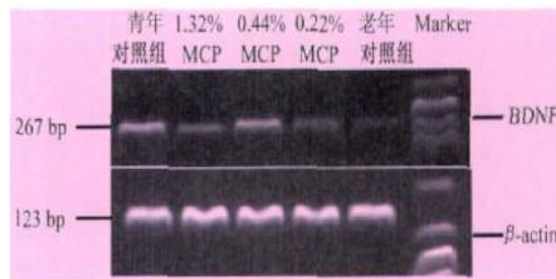
図3では、青年対照群の錐体細胞が、整然と集積したニッスル小体をたくさん含んでいる。青年対照群に比べ、高齢対照群の錐体細胞の構成は相対的に緩み、ニッスル小体も減少している。MCP投与量群では、青年対照群と比較しても有意差は認められなかった。細胞数計測により、青年対照群と3つのMCP投与量群の海馬CA1、CA3とDG域のニッスル染色陽性細胞を比較すると、有意差はなかったが、増加の傾向が観

察された (表 5)。

表 5 MCPが海馬CA1、CA3とDG区錐体細胞の数への影響			
Table 5 Effect of MCP on nissl-positive cell numbers in hippocampal CA1, CA3 regions and DG			
グループ	錐体細胞/mm <sup>-2</sup>		
	CA1	CA3	DG
高齢対照グループ	7 591±1 392	5 164±665	17 822±996
0.22% MCP	7 811±1 217	5 314±857	18 302±1 292
0.44% MCP	7 915±1 050	5 639±591	18 115±1 026
1.32% MCP	7 050±1 149	5 505±586	17 989±1 134
青年対照グループ	7 972±759	6 213±1 128	18 044±1 058

2.5 MCPが高齢マウスの海馬領域のBDNF発現および調節に与えた影響

RT-PCR法およびWestern blot法を用いて、各対象群マウスの海馬領域におけるBDNF mRNAとBDNFタンパクの発現レベルを検出した。RT-PCRの結果から、高齢対照群の海馬におけるBDNF mRNA発現が弱く、青年対照群、およびMCP投与量群の発現レベルが増加した(図4)。Western blotの結果から、

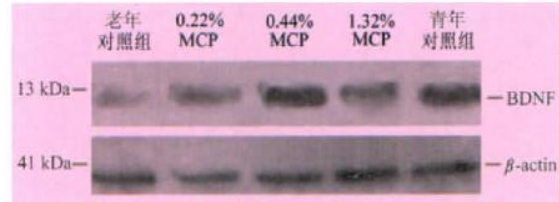


4 MCPの高齢マウス海馬区BDNF発現への影響 (RT-PCR)

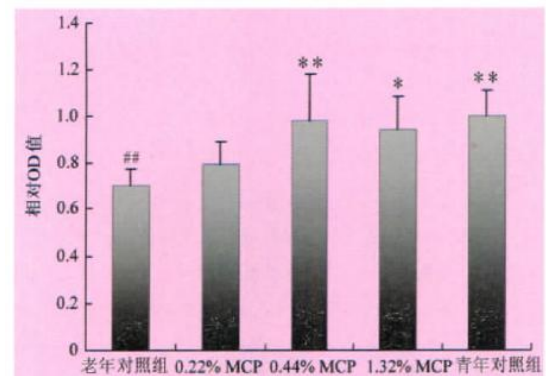
Fig. 4 Effect of MCP on expression of BDNF in hippocampus (RT-PCR)

青年対照群と比較して、高齢者対照群のマウスの海馬領域内でのBDNFタンパクの発現は、30%減少し、有意差が確認された。0.44%と1.32%のMCP投与量群では、6ヶ月後、高齢マウスの海馬領域でのBDNFタンパク発現の減少率は、それぞれ29%と26%に上昇し、

高齢対照群と比較して有意差が認められた。3つのMCP各投与量群のマウスの海馬領域におけるBDNFの発現レベルは青年対照群と比べ有意差は認められなかった(図5)。



(a) Western blotによるバンドの発現状態  
(a) Expression band of Western blot



(b) 白黒階調分析結果

(b) Result of densitometric analysis

図5 BDNFの各対象群マウスにおける海馬体での発現状態(Western blot)

Fig. 5 Immunoblot analysis of BDNF in the hippocampus of the young, aged and MCP-treated mice

注：老年対照群(組)と比較して、有意差がある\*P<0.05、\*\*P<0.01 青年対照群(組)と比較して、有意差がある：#P<0.05、##P<0.01

Notes: Compared to aged control, \* means P<0.05, \*\* means P<0.01 Compared to young control, # means P<0.05, ## means P<0.01

3 考察

老化のメカニズムとして有名なフリーラジカル説では、老化による記憶や学習能力の低下がフリーラジカルによる損傷と密接に関与することを明らかにしている。多くの調査から、老化高

齢者の脳組織中のグリア細胞、星状膠細胞中のMDA含有量が有意に高く、免疫電子顕微鏡で神経細胞にMDAの堆積が観察できるが、若者にはMDAの堆積がほとんど検出できなかった<sup>[6-7]</sup>。Kasapogluら<sup>[8]</sup>は、異なる年齢層の人の血清SODとMDAの指標を測定し、SOD活性が60歳以上の年齢層の血清中で減少し、MDAが増加した。

通常の状態では、フリーラジカルの生成と除去速度がダイナミックバランスを維持している。年齢の増加に伴い、体内の抗酸化酵素の活性が徐々に減少し、フリーラジカル消去能力の低下を招き、生体内のフリーラジカルを増加させる。脳内の酸素消費量が多くなり、不飽和脂肪酸が過酸化され、フリーラジカルによる損傷をより受けやすく、脳機能の低下により、記憶や学習能力の低下を招く<sup>[7,9]</sup>。本実験では、陰性対照群の青年マウスと比較すると、高齢マウスの肝臓SOD活性は大幅に低下した。体内のフリーラジカル消去能力も低下し、フリーラジカルによる過酸化物質MDAが増加した。最終的には、神経損傷を引き起こして、学習や記憶能力の低下を招いた。MCP投与後、抗酸化酵素のSOD活性が有意に増強され、酸化生成物MDAの含有量が下降した。MCPが高齢マウスの抗酸化能力を向上させ、神経細胞のフリーラジカルによる酸化損傷を防ぐことを指摘する。この作用は、MCPが高齢マウスの学習記憶能力を向上させる分子メカニズムの一つだと考えられる。

ニッスル染色の結果では、高齢対照群と比較して、MCP投与量群と青年陰性対照群のマウス海馬体のCA1、CA3とDG領域ではnissl染色陽性細胞数が増加したが、有意差は認められなかった。この結果から、MCPが記憶や学習能力を向上させる効果は、主に神経細胞の機能を向上させることに在り、海馬における神経単位数に影響することではないと考えられる。

BDNFは、ドイツの神経生物学者により、1982年に初めてブタの脳から単離精製された。神経細胞の成長や機能

亢進、調節等に不可欠であり、記憶形成における重要なタンパク質の一つである。シナプス前膜とシナプス後膜に多彩に作用できる<sup>[10]</sup>と知られている。本実験では、Western blot およびRT-PCR法により各対象群のマウスの海馬にBDNF mRNA およびタンパク質の発現を検出した。結果より、青年対照群マウスの海馬組織BDNFのmRNAおよびタンパク質の発現量が高齢対照群と比較して有意に高かった。0.44%と1.32%のMCP混入飼料により飼育した6ヶ月後、マウスの海馬体におけるBDNFの発現量を高齢対照群と比較すると、それぞれ29%及び26%増加した。BDNFは記憶や学習効果の保持に重要な意味を持ち、多彩な神経細胞の生存や成長、機能促進、或いは、神経細胞の生物学的活性を向上し、フリーラジカルによる損傷後の神経細胞の自然死を減らす。また、シナプスの可塑性を促進することができ、脳の神経細胞の形態を変化させ、シナプス終末の密度を増加させ、樹状突起と軸索の成長を促進する；また、長期増強作用と学習の可塑性のメカニズムに関与し、BDNFは細胞内のカルシウム結合タンパク質の調節を制御し、細胞内カルシウム濃度を安定させ、損傷から神経細胞を保護する。また、細胞内の抗酸化酵素の活性を高め、フリーラジカルを抑制し、細胞損傷の修復を促進する。同時に、BDNFはアポトーシスを阻害する<sup>[11-13]</sup>。よって、MCPがBDNFの発現を促進させることは老人性記憶障害を改善させる重要なメカニズムの一環だと考えられる。

#### 4 おわりに

本研究では高齢の動物モデル(20月齢C57BL/6J雌、老化モデルマウス)を使用し、MCPの記憶と学習効果に及ぼす影響を検討した。結果からは、MCPは高齢マウスの空間的記憶能力と非空間的記憶能力を改善できた。0.44%MCPを飼料に混入投与して飼育後、ジャンプ実験中に高齢対照群と比較し、潜伏



期が明らかに延長され、エラーの数を減らし、陰性対照群とほぼ近い値になった。Morris 水迷路試験中に3つのMCP投与量群のマウスの脱出潜伏期、および水泳距離は、高齢対照群と比べて明らかに短縮した。空間探索試験では、ターゲット象限内時間と通過回数にそれぞれの増加が観察された。同時に、肝臓抗酸化酵素SOD活性が向上され、過酸化生成物MDAが減少された。海馬体各領域でのニッスル小体数に有意な変化は認められなかったが、海馬BDNF発現量は有意に増加された。

要約すると、本実験では、MCPが老人性記憶を向上させる機能を持っていることを明らかにした。また、高齢マウスの抗酸化活性を向上させることができ、神経栄養因子の発現を促進できる。しかしながら、海馬の神経単位数に有意な影響はなかった。学習と記憶障害のメカニズムは非常に複雑で、たとえばシナプスの形態と機能の変化、神経伝達物質と受容体の変化、カルシウムイオン濃度の変化などどちらも学習記憶障害と関連している。今後、MCPの作用メカニズムについてはさらに検討する必要がある。

## 参考文献

- [1] 韩大雄, 杨频.「老年痴呆症的分子病理机制」『化学通报』2003, 2: 95-101.  
Han Daxiong, Yang Pin. Chemistry Online, 2003, 2: 95-101.
- [2] Small S A. Age-related memory decline: Current concepts and future directions  
*Journal of Arch Neurol*, 2001, 58(3): 360-364.
- [3] 全国老龄办公室.『中国人口老龄化发展趋势预测研究报告』北京,2004.  
China National Committee on Ageing.  
*The report of developmental trend on China's population aging*. Beijing, 2004.
- [4] Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatogr B Analyt, Technol Biomed Life Sci*, 2004, 803(1): 41-53.
- [5] Hannu K, Anne P. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 2006(16): 945-960.
- [6] Kishida K T, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity memory. *Journal of Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(2): 233-244.
- [7] Droge W, Schipper H M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Journal of Aging Cell*, 2007, 6(3): 361-370.
- [8] Kasapoglu M, Ozben T. Alteration of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Journal of ExpGerontol*, 2001, 36(2): 209-220.
- [9] Muller F L, Lustgarten M S, Jang Y, et al. Trends in oxidative aging theories. *Journal of Free RadicBiol Med*, 2007, 43(4): 477-503.
- [10] Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *Journal of BMB Rep*, 2009, 42(5): 239-244.
- [11] Hwang I K, Yoo K Y, Jung B K, et al. Correlations between neuronal loss, decrease of memory, and decrease expression of brain-derived neurotrophic factor in the gerbil hippocampus during normal aging. *Journal of ExpNeurol*, 2006, 201 (1): 75-83.
- [12] Choy K H, de Visser Y, Nichols N R, et al. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Journal of Hippocampus*, 2008, 18(7): 655-667.derived
- [13] Miyajima F, Ollier W, Mayes A, et al. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Journal of Genes Brain Behav*, 2008, 7(4): 411-417.