

認知機能への高血糖の影響に関する研究

2023

佐藤 雅也

Research on the effects of hyperglycemia on
cognitive function

2 0 2 3

Masaya Sato

学位論文の要旨

認知機能への高血糖の影響に関する研究
大学院薬学研究科医療薬学専攻 佐藤雅也
(指導教員：三輪高市)

序論

「日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究」によると、2012年時点での認知症高齢者数は約462万人で、2020年には、認知症高齢者数は約600万人まで増加している。2025年には65歳以上の5人に1人、約700万人が認知症を患っていると予測されており、認知症患者の数は今後さらなる増加が見込まれている。近年、血糖コントロール不良に伴う認知機能低下、また糖尿病（Diabetes Mellitus：以下、DM）がアルツハイマー型認知症（Alzheimer's Disease：以下、AD）を始めとした認知症の危険因子であることが指摘されている。65歳以上を対象とした久山町研究では、糖尿病患者は非糖尿病患者に比べて海馬容積が有意に小さいとの報告があり、DMと認知症との関係に関する様々な研究が行われている。また、高血糖及びDMによる認知症発症には終末糖化産物（Advanced Glycation End Products：以下、AGEs）の関与が報告されている。しかし、DMによる認知症発症のメカニズムの詳細は不明である。

当研究室では、DMによる認知症発症のメカニズムの解明を目指して研究を行ってきた。本研究では、高血糖が認知機能及び海馬に与える影響について検証するため、患者を対象とした高血糖と認知機能の関係に関する臨床調査研究、動物モデルを用いた高血糖による認知機能及び脳組織への影響について臨床研究と基礎研究の両面から研究を行った。

第1章 高血糖と認知機能の関係に関する調査

第1章では、精神科領域の患者を対象に高血糖による認知機能への影響について調査を行った。65歳以上の患者401名（男性：188名、女性：213名）を電子カルテにより、後方視的調査を行い、解析対象者125名（男性：61名、女性：64名）とした。このうち、AD患者（39名）に対して、非DM群とDM群のHbA1c値と長谷川式簡易知能評価スケール（HDS-R）による認知機能評価を行った。その結果、非DM群と比較してDM群でHbA1c値が有意に高く、HDS-Rの平均スコアの有意な低下がみられ、高血糖による認知機能低下が

考えられた。また HDS-R の 9 項目のうち、海馬の機能を評価している「3つの単語の遅延再生」で非 DM 群と比較して DM 群で低下傾向がみられ、高血糖による海馬へ影響も示唆された。このことから、高血糖が海馬を萎縮させ、認知機能低下を引き起こしている可能性が示唆された。

第 2 章 糖負荷によるマウスの認知機能への影響

第 1 章から得られた「高血糖による認知機能低下」についての考察を検証するため、マウスを用いた糖負荷試験による認知機能と脳組織（海馬）への影響について検証を行った。試験動物は ddY 系雄性マウス 3 週齢を用いた。Control 群と糖負荷群に分けて飼育を行い、糖負荷には Maltodextrin 溶液濃度を 10 %、20 %、30 % と設定し、90 日間の糖負荷を行った。90 日間の糖負荷で体重と血糖値は、経日的に上昇し、20 % 糖負荷群において、control 群と比較して有意な上昇が認められた。自発運動、ローターロッド試験及び八方迷路試験の 3 つの行動薬理試験は、体重及び血糖値で最も影響が大きかった 20 % 糖負荷群に絞り、更なる調査を行った。その結果、自発運動は control 群と 20 % 糖負荷群で活動量に差はみられず、ローターロッド試験及び八方迷路試験では control 群と比較して 20 % 糖負荷群で認知機能における運動機能障害及び、記憶障害が確認された。また、海馬についても CA1、CA2、CA3 と歯状回の各領域で control 群と比較し、20 % 糖負荷で有意な縮小がみられた。海馬の萎縮と行動薬理試験における認知機能低下の併行性がみられたことから、高血糖により海馬の萎縮が起こり、認知機能低下を引き起こしている可能性が示唆された。この結果は、第 1 章で得られた考察を支持する。

第 3 章 海馬の萎縮と AGEs の関係

第 2 章までの結果においても「高血糖が海馬の萎縮を起こし認知機能低下を引き起こしている」可能性が示唆された。第 3 章では、先行研究を基にした高血糖モデルマウスの作成と、高血糖による認知機能と海馬への影響について検討を行った。動物モデルは C57BL/6J 7 週齢 マウスを用いて試験を実施した。糖負荷群には、ニコチンアミド（Nicotinamide：以下、NA）、ストレプトゾトシン（Streptozotocin：以下、STZ）を事前に腹腔内投与した。その後、control 群と STZ 群（Maltodextrin 溶液：1 %、5 %、20 %）に分けて、4 ヶ月間飼育を行った。体重は control 群と 1 % 糖負荷群で差はなく、血糖値は 1 % 糖負荷群で control 群と比較し、有意な上昇がみられた。行動薬理試験は血糖値の有意な上昇が確認された 1 % 糖負荷群に絞り行った。自発運動量では、control 群と 1 % 糖負荷群で活動量に差はみられなかった。ローターロッド試験および八方迷路試験では control 群と比較して 1 % 糖負荷群で認知機能における運動機

能障害及び、記憶障害が確認された。海馬は各領域（CA1、CA2、CA3、歯状回）で、control 群に比べて 1 %糖負荷群で有意な縮小がみられ、また脳内に AGEs も確認された。このことから、高血糖により海馬の萎縮が起こり、認知機能低下を引き起こしている可能性が示唆された。また、脳内に AGEs の形成が確認されたことから、海馬の萎縮と AGEs は関連がある可能性が示唆された。この結果から、第 3 章で作成したモデルマウスは高血糖モデルマウスとして評価可能であり、第 1 章から第 2 章までの「高血糖が認知機能低下を引き起こしている」可能性を支持するものである。

結論

本研究を通じて、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能低下を引き起こしていること、また海馬の萎縮と AGEs の形成と蓄積は関連がある可能性が示唆された。この高血糖が持続することで、AD などの認知症へ発展していく可能性が考えられる。そのため、DM の前段階である高血糖が認知機能低下を引き起こすことは、DM による認知症発症のメカニズムの解明に繋がると考えられる。今回の結果を踏まえ、研究を継続することで DM による認知症発症のメカニズムの解明の一助としていきたい。

佐藤雅也

目次

緒言	1
第1章 高血糖と認知機能に関する調査	3
— 方法 —	3
1. 対象	3
2. 調査・評価項目	3
3. 統計学的解析	4
4. 倫理的配慮	5
— 結果 —	5
1. AD群と非AD群間における糖尿病既往歴の比較	5
2. AD患者におけるDM-非DM群間でのHDS-R平均スコアの比較	6
3. AD患者におけるDM-非DM群間でのHDS-R(9項目)の比較	7
— 考察 —	8
第2章 糖負荷試験におけるマウスの認知機能への影響	11
— 方法 —	11
1. 実験動物	11
2. 行動薬理試験	11
3. 脳標本の作成	12
4. 統計学的解析	12
— 結果 —	12
1. 実験動物	12
2. 行動薬理試験	12
1) 自発運動	12
2) ローターロッド試験	13
3) 八方迷路試験	14
3. 脳病理標本	15
— 考察 —	16
第3章 海馬の萎縮とAGEsの関係	19
— 方法 —	19
1. 実験動物	19
2. 行動薬理試験	20
3. 脳標本の作成	21
4. 統計学的解析	21

— 結果 —	2 2
1. 実験動物	2 2
2. 行動薬理試験	2 3
1) 自発運動	2 2
2) ローターロッド試験	2 3
3) 八方迷路試験	2 4
3. 脳病理標本	2 5
— 考察 —	2 8

結語	3 1
利益相反	3 2
引用文献	3 3
謝辞	3 6
英文要旨	3 8

緒 言

認知症とは、「一度獲得された知的機能（記憶・見当識・言語・認識・計算・思考・意欲・判断力など）が、後天的な脳の機能障害によって全般的に低下し、社会生活や日常生活に支障をきたすようになった状態で、それが意識障害のないときに観られる」と定義されている¹⁾。認知症や認知症様症状をきたす疾患は数多く存在するが、アルツハイマー型認知症、レビー小体型認知症、脳血管性認知症の「三大認知症」が全体の85%を占めている¹⁾。症状として、記憶障害や見当識障害、理解及び判断力低下など認知症に必ず観られる「中核症状」と認知機能障害を基板に、身体的要因・環境的要因・心理的要因などの影響を受けて出現する、徘徊や不安や抑うつ、妄想や暴力などの「BPSD（行動・心理症状）」からなっている¹⁾。内閣府より発表された「平成29年度高齢社会白書」によると、2012年時点での認知症患者は約462万人となっている。2025年には65歳以上の5人に1人、約700万人が認知症を患っていると推定されており²⁾、認知症患者の数は今後さらなる増加が見込まれている。

認知症になる危険因子は様々存在し、教育不足・高血圧・聴覚障害・喫煙・肥満・抑うつ・運動不足・糖尿病・社会的接触の少なさ・過度のアルコール・頭部外傷・大気汚染などが考えられている。具体的には、(1)40歳前後から中年期に収縮期血圧130 mmHg以下の維持を目指す、(2)難聴に対する補聴器の使用の奨励と過度の騒音曝露から耳を保護し難聴を軽減する、(3)大気汚染や副流煙を減らす、(4)頭部の怪我を防ぐ、(5)週21単位以上の飲酒は避ける、(6)禁煙、(7)すべての子どもたちに初等・中等教育を提供する、(8)肥満と糖尿病の防止と治療、(9)中年期以降の身体活動を維持などの取り組みにより認知症を予防することが可能であり、これらの危険因子の予防に取り組むことで世界の認知症の約40%の修正が可能であると言われている³⁾。

近年、これらの危険因子のうち糖尿病による認知症の発症や進展が注目され、様々な研究が行われている。ACCORDMIND研究では、HbA1c値の上昇と認知機能低下が相関を示し、血糖コントロール不良に伴う認知機能低下が報告されている⁴⁾。久山町研究をはじめとするコホート研究においても、糖尿病が認知症の危険因子となっていることが指摘され、DM群では正常群と比較して、ADの発症リスクが2倍と有意に高い。また、DM患者では非DM患者と比べて、海馬の萎縮がみられるとの報告もされている⁵⁾。Chengらのメタ解析においても、高齢糖尿病患者では非糖尿病患者と比較して、ADのリスクが1.46倍と有意に高いと報告されている⁶⁾。

この高血糖や糖尿病に伴う認知症の発症には糖化最終生成物であるAGEsの関与が指摘されている⁷⁾。AGEsは、血糖コントロールの程度とその持続期間によ

り不可逆的に生体内で生成、蓄積される。ひとたび生体内で形成されるとなかなか代謝されず組織に長く留まる化学的特性と、AGEs により持続的に発現が誘導される RAGE (Receptor for AGE) との相互作用・悪循環系が、長期にわたる「高血糖の記憶」を形成していると考えられている⁷⁾。高血糖により生成された AGEs は、その細胞表面受容体である RAGE によって認識され、酸化ストレスや炎症反応を惹起し、認知症発症及び進展に関わっていると考えられている⁸⁾。

先行研究より、高血糖及び糖尿病が認知症の発症リスクとなり、認知機能障害を引き起こすことや高血糖により形成された AGEs による脳機能障害も報告されている。しかし、これらの関係の病態生理学的メカニズムの詳細は不明である。

本研究では、高血糖が認知機能・海馬に与える影響について検証するため、患者を対象とした高血糖と認知機能の関係に関する調査、動物モデルを用いた高血糖による認知機能及び脳組織への影響について臨床と基礎の両面から研究を行った。

第1章 高血糖と認知機能に関する調査

精神科病院に入院を要する認知症患者は、認知症の悪化により家族や施設などの対応が難しくなることで入院してくるケースが多い。入院を要するほどの重度の認知症患者では、認知機能の低下による服薬コンプライアンス不良であることが多く、血糖コントロール不良などにより長期的に高血糖に晒されていた可能性がある。

ACCORDMIND 研究においても血糖コントロール不良に伴う認知機能低下が報告されており⁴⁾、血糖コントロール不良による長期にわたる高血糖が認知機能の更なる低下を引き起こすと考えられる。そのため、精神科病院に入院を要する認知症患者を対象とすることで、高血糖と認知機能の関係を把握することが可能であると考えられる。

第1章では、高血糖による認知機能への影響を調べるため、精神科病院へ入院を要した患者を対象とし、AD患者における血糖値（HbA1c）と認知機能との関係について調査研究を行った。

—方法—

1. 対象

2017年4月1日から2020年3月31日の間に総合心療センターひなが（以下、当院）に入院した患者のうち、65歳以上の401名を本研究の対象者とした。

2. 調査・評価項目

対象者について、AD、DM、統合失調症、双極性障害、うつ病の有無、その他の既往歴、入院時の年齢、性別、HbA1cの項目について、電子カルテを用いて、後方視的に情報を得た。また、AD患者については入院時に使用していた認知症治療薬、長谷川式簡易知能評価スケール（Hasegawa Dementia Scale - Revised：以下、HDS-R）についても同様に調査した。さらに、DM患者に対しては、入院時に使用していた糖尿病治療薬についても調べた。本研究では、AD患者の病名は電子カルテより決定したため、主病名がレビー小体型認知症（6名）、脳血管性認知症（12名）、前頭側頭型認知症（2名）、混合型（4名）、統合失調症（150名）であった患者は除外した。また、ADが副病名であった患者（7名）も除外した。その他の既往歴に高次脳機能障害（2名）や甲状腺機能低下症（2名）を持つ患者も、認知機能に影響があることを考慮して除外した。除外後の対象者216名のうち、65歳以上で主病名がADである39名を症例群（AD群）

とした。また、症例群の患者1名に対して性別の一致、年齢が ± 3 歳となる条件で2名から3名となるように対応させて選定を行った86名を対照群（非AD群）とした。この条件に一致しなかった91名は解析対象者から除外した。その結果、本研究では、症例群39名ならびに対照群86名の125名を解析対象者とした。解析対象者選定までのフローチャートを図1に示した。

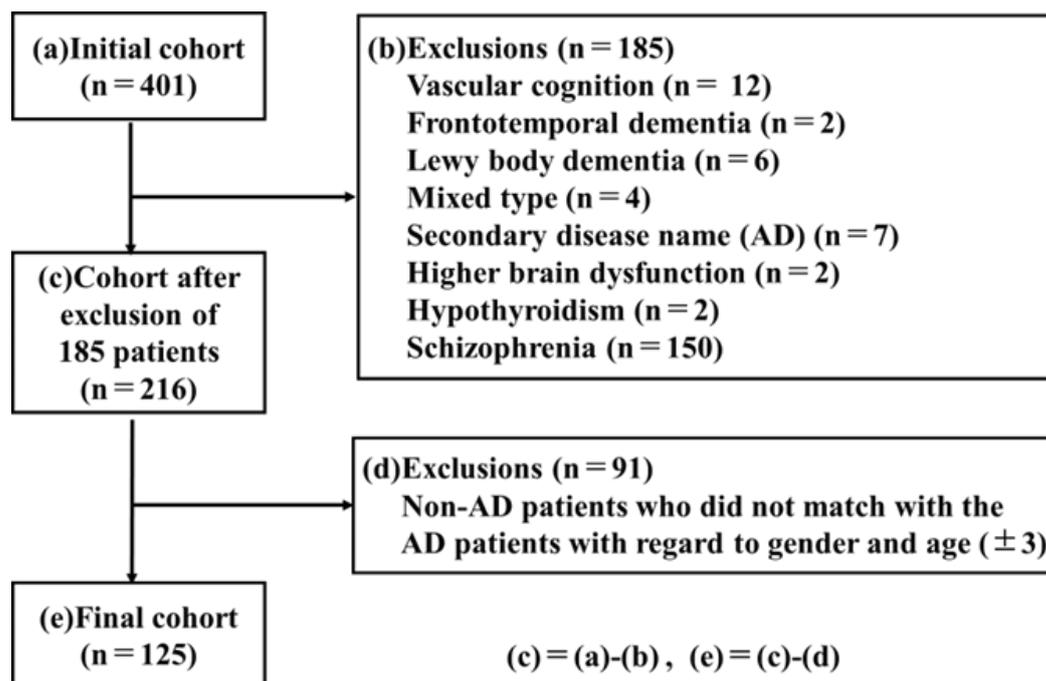


図1 解析対象者選定のフローチャート

3. 統計学的解析

AD群と非AD群間において、性別、年齢、HbA1c値、糖尿病既往歴について比較を行った。性別、糖尿病既往歴の比較にはFisherの正確確率検定、年齢、HbA1c値の比較にはStudentのt検定をそれぞれ用いて評価した。

AD群内におけるDM群と非DM群間の性別、年齢、HbA1c値、HDS-Rスコアについて比較を行った。性別の比較にはFisherの正確確率検定を用いて評価を行い、年齢、HbA1c値、HDS-Rスコアの比較にはMann-Whitney U検定を用いて評価した。さらに、AD群内において、DM群と非DM群間のHDS-Rの年齢、時間の見当識、場所の見当識、3つの単語の直後再生、計算、数字の逆唱、3つの単語の遅延再生、5つの物品課題、言語の流暢性の9項目のスコアの比較をMann-Whitney U検定により行った。

いずれの検定においても統計解析ソフトにはSPSS version25（IBM社製）を

用い、有意水準 5 %未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありとした。

4. 倫理的配慮

本調査や解析は、特定の個人を識別することができないように匿名化したうえでデータベース化して個人情報を慎重に取り扱い、十分に倫理的に配慮しながら実施した。本研究については当院倫理審査委員会の承認 (整理番号 : 98-01) を受け実施している。

—結果—

1. AD 群と非 AD 群間における糖尿病既往歴の比較

解析対象者 125 名の背景を表 1 に示した。解析対象者 125 名のうち、非 AD 群は 86 名 (男性 : 44 名、女性 : 42 名)、AD 群は 39 名 (男性 : 17 名、女性 22 名) であった。DM 患者の割合は、非 AD 群で 6 名 (7.0 %)、AD 群で 8 名 (20.5 %) であり、非 AD 群と比較して AD 群で有意に高いことが明らかとなった ($p = 0.034$)。また、非 AD 群と AD 群それぞれの年齢と HbA1c 値は、非 AD 群では、 79.9 ± 5.7 歳と 5.7 ± 1.3 %、AD 群では 83.0 ± 5.2 歳と 5.8 ± 0.8 %であった。

入院時の各薬剤の処方状況に関して、認知症治療薬が処方されていたのは 26 名で、ドネペジルが 4 名、ガランタミン、リバスチグミンは 1 名ずつ、メマンチンが 20 名であった。また、認知症治療薬が処方されていないのは 13 名であった。

糖尿病治療薬が処方されていたのは、非 AD 群では 9 名で、DPP-4 阻害薬が 4 名、ビグアナイド薬が 2 名、SU 剤あるいは速効型インスリン分泌薬、食後過血糖降下薬、SGLT-2 阻害薬が 1 名ずつであり、糖尿病治療薬が処方されていない患者が 1 名であった。

一方 AD 群で糖尿病治療薬が処方されていたのは 11 名で、DPP-4 阻害薬が 7 名、SU 剤あるいは速効型インスリン分泌薬が 2 名、食後過血糖降下薬、ビグアナイド薬が 1 名ずつで、糖尿病治療薬が処方されていない患者が 1 名であった。

表 1. 解析対象者背景

		non-AD group	AD group	p-values
Number of people ^a		86(68.8%)	39(31.2%)	
Gender (male/female) ^a		44/42	17/22	0.44 ^d
Ages ^b		79.9±5.7	83.0±5.2	0.43 ^e
HbA1c ^b (%)		5.7±1.3	5.8±0.8	0.69 ^e
Previous Diabetes History	Presence	6(7.0%)	8(20.5%)	<0.05 ^d
	Absence	80(93.0%)	31(79.5%)	

^a Number of Examples ^b Mean ± Standard deviation ^c Percentage

^d Fisher's exact test ^e Student's t-test

2. AD 患者における DM-非 DM 群間の HDS-R 平均スコアの比較

AD 群の 39 名のうち入院時に HDS-R のスコアを計っていなかった 13 名を除外し、HDS-R のスコアを計っていた 26 名を非 DM 群、DM 群に分類して、比較を行った (表 2)。非 DM 群は 20 名 (男性 8 名、女性 12 名) で、平均年齢は 82.5 ± 4.7 歳 (男性: 83.5 ± 4.8 歳、女性: 83.2 ± 4.9 歳) であった。また DM 群は 6 名 (男性 4 名、女性 2 名) で、平均年齢は 84.0 ± 6.5 歳 (男性: 81.0 ± 6.2 歳、女性: 90.0 ± 5.7 歳) であった。

HbA1c は非 DM 群では、5.5 ± 0.4 %、DM 群で 6.7 ± 1.2 % となり、非 DM 群と比較して DM 群で HbA1c の有意な上昇がみられた (p = 0.0001)。

また、HDS-R の平均スコアは非 DM 群 20 名で 16.6 ± 5.5 点 (男性: 17.0 ± 5.9 点、女性: 16.3 ± 5.4 点)、DM 群では 6 名で 8.3 ± 4.3 点 (男性: 8.5 ± 5.3 点、女性: 8.0 ± 2.8 点) となった。HDS-R の平均スコアにおいて、非 DM 群と比較して DM 群で有意な低下がみられた (p = 0.006)。また、男女間の HDS-R の平均スコアは、非 DM 群と DM 群共に差はみられなかった。

表 2. DM 群、非 DM 群の患者背景

	non-DM group	DM group	p-values
Gender (male/female) ^a	8/12	4/2	0.37 ^{c)}
Ages ^b	82.5±4.7	84.0±6.5	0.46 ^{d)}
HbA1c ^b (%)	5.5±0.4	6.7±1.2	<0.05 ^{d)}
HDS-R ^b	16.6±5.5	8.3±4.3	<0.05 ^{d)}

^a Number of Examples ^b Mean ± Standard deviation

^c Fisher's exact test ^d Mann-Whitney U test

3. AD 患者における DM-非 DM 群間の HDS-R (9 項目) の比較

AD 群における、DM 群と非 DM 群について HDS-R の 9 項目を調査し、図 2 に示した。入院時に HDS-R の 9 項目のスコアを測定していた対象患者は 15 名 (非 DM 群 : 11 名、DM 群 : 4 名) であった。9 項目の平均スコアは、年齢 (非 DM 群 0.7 ± 0.5 歳、DM 群 0.5 ± 0.6 歳)、時間の見当識 (非 DM 群 0.7 ± 1.2 点、DM 群 0.5 ± 1.0 点)、場所の見当識 (非 DM 群 1.1 ± 0.7 点、DM 群 0.8 ± 1.0 点)、3 つの単語の直後再生 (非 DM 群 2.7 ± 0.6 点、DM 群 2.0 ± 1.4 点)、計算 (非 DM 群 1.5 ± 0.7 点、DM 群 0.8 ± 1.0 点)、数字の逆唱 (非 DM 群 1.2 ± 0.9 点、DM 群 0.8 ± 1.0 点)、3 つの単語の遅延再生 (非 DM 群 1.3 ± 1.6 点、DM 群 0 点)、5 つの物品課題 (非 DM 群 2.3 ± 1.2 点、DM 群 1.5 ± 0.6 点)、言語の流暢性 (非 DM 群 1.6 ± 2.0 点、DM 群 0.8 ± 1.0 点) であった。

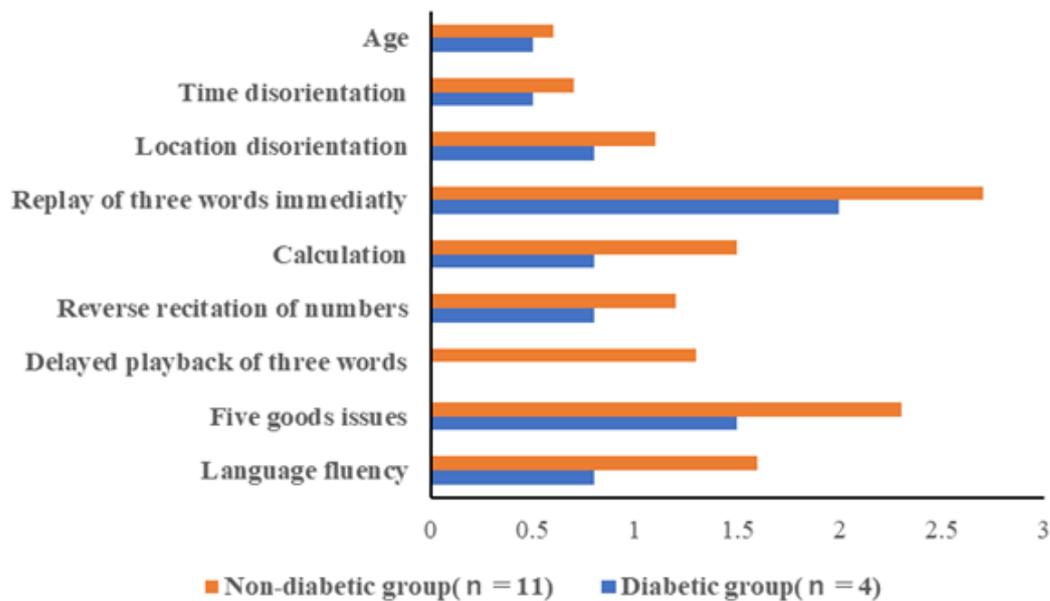


図 2. AD 患者における DM-非 DM 群間の HDS-R (9 項目) の比較

HDS-R は、図 2 に示した 9 項目から構成されている。各項目 (0-満点) で評価され、合計 30 点満点の認知機能検査である。それぞれの点数は、以下に示すとおりである。

Age: 0-1、 Time disorientation: 0-1、 Location disorientation: 0-2、
 Replay of three words immediately: 0-1、 Calculation: 0-1、
 Reverse recitation of numbers: 0-1、 Delayed playback of three words: 0-2、
 Five goods issues: 0-5、 Language fluency: 0-5

— 考察 —

本研究では、精神科病院へ入院を要した患者を対象に高血糖による認知機能への影響について調査を行った。その結果、AD 群で DM の既往歴を有する割合が高くなり、AD と DM との間には発症率に正の相関が示唆された。また、DM 群で非 DM 群と比べ HbA1c 値が有意に高く、認知機能の低下が確認された。近年のメタ解析では、DM 患者では AD を合併とする割合が約 1.5 倍から 2 倍高くなることが報告されている⁹⁾。当院では、AD 群で糖尿病を既往に持つ割合が非 AD 群と比較して 3 倍高く、非 AD 群に比べて DM 既往歴を有する患者の割合が有意に高く、DM と AD とは発症率に正の相関が考えられた。また、DM 群において非 DM 群と比べて HbA1c が高く、HDS-R の平均スコアの有意な低下がみられたことから、高血

糖による認知機能低下が示唆された。

HbA1c 値は過去 1 ヶ月から 2 ヶ月前の平均血糖値を反映する高血糖を示す指標として汎用されている。本研究では DM 群の HbA1c の平均値は非 DM 群と比較して有意に高く、HbA1c 値で約 1.2 % の高い値を示していた。HbA1c 値は 1 % 増加するごとに認知症の相対危険の上昇が約 1.5 倍になると報告されており¹⁰⁾、DM 群は AD のリスクとなると考えられた。また、DM 群は非 DM 群と比較して HbA1c 値が高いことから、慢性的な高血糖状態であったと推察される。この高血糖状態に加え、HDS-R の平均スコアの有意な低下がみられたことから、高血糖により認知機能低下が起きている可能性が示唆された。AD 発症により記憶の低下や認知機能障害などが観られるが、この認知機能障害や AD のスクリーニング検査として HDS-R が汎用されている。HDS-R により AD 患者の認知機能評価を行った結果、非 DM 群と比べて DM 群で HDS-R スコアの有意な低下がみられた。HDS-R は、認知症のスクリーニングを目的に作成されたものであり、得点による重症度分類は行わないとされているが、加藤ら¹¹⁾は、認知症軽度者では 19.10 ± 5.04 点、中等度者では 15.43 ± 3.68 点、重度者では 4.04 ± 2.62 点であったと報告し、HDS-R 重症度を 5 段階に分類している。本研究における非 DM 群の HDS-R の平均スコアは中等度、DM 群の HDS-R の平均スコアは重度に相当し、非 DM 群と比較して DM 群で認知症の重症度が増している。また DM 群で非 DM 群と比較して HbA1c 値が有意に高いことから、高血糖が認知機能障害を引き起こす可能性が示唆された。また加藤らは、HDS-R の結果に年齢とは相関を示さないとも報告している¹¹⁾。本研究においても AD 患者では HDS-R と年齢との間で差は見られず、DM 群の HDS-R の平均スコアの低下に年齢は影響しないことが考えられた。

DM 群において、非 DM 群と比較して HDS-R の平均スコアの有意な低下がみられたが、HDS-R の 9 項目のうち、特に 3 つの単語の遅延再生の平均スコアが低下傾向であった。このことから、DM 群は記憶の想起が障害されている可能性が示唆された。AD には、海馬周辺、頭頂後頭連合野、前頭連合野の障害による 3 つの主な症状が観られる。特に海馬周辺が障害されることでエピソード記憶遅延再生の障害が起こると考えられている¹²⁾。本研究結果では、非 DM 群と比較して DM 群で HDS-R のすべての項目の平均スコアが低下していたが、特に「3 つの単語の遅延再生」の平均スコアが低下傾向であった。加えて DM 群では高血糖状態であったことから、高血糖が海馬に影響し、海馬の機能障害につながっている可能性が示唆された。ただし、今回の調査では HDS-R の 9 項目を調査していた患者は 15 名と症例数が少ないことから、今後、症例数を増やした上で再現性の検証が必要であると考えられた。

本研究より、精神科に入院している AD 患者では、DM の影響を強く受けていることが示唆された。また、DM 群で非 DM 群と比較して HbA1c 値が高く、HDS-R の

平均スコアが有意に低下していたことから、高血糖により認知機能低下が起きていると考えられた。加えて、HDS-Rの項目のうち、海馬の機能を評価している「3つの単語の遅延再生」の項目で低下傾向であったことから、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能を低下させている可能性が示唆された。しかし、本研究では、一施設の入院患者を対象としており、また調査例数も少なく、後方視的に調査を行っている。そのため、より多い例数による研究や前向き研究の実施が必要であると考えられる。今後、症例数を増やすと共に、モデルマウスを用いた基礎研究を行うことで、得られた考察を検証していく必要があると考えられた。

第2章 糖負荷試験によるマウスの認知機能への影響

第1章の結果から、DM群で非DM群と比べHbA1c値が有意に高く、DM群で高血糖状態であった。また、DM群で非DM群と比べ認知機能を評価するHDS-Rの平均スコアで有意な低下が確認された。そして、HDS-Rの各項目（9項目）を比較した結果、非DM群と比べ、DM群でHDS-Rの全てのスコアで低下していたが、特に海馬機能を評価している「3つの単語の遅延再生」のスコアで低下傾向であった。この、3つの結果より、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし認知機能を低下させる可能性が示唆された。この考察を検証するためには、高血糖による認知機能への影響について基礎レベルでの検討が必要であると考えられる。

第2章では、第1章で得られた考察である「高血糖による認知機能低下」について検証するため、動物モデルを用いた糖負荷による認知機能と脳への影響について検証を行った。

—方法—

1. 実験動物

ddY系雄性マウス3週齢（日本クレア株式会社、東京、日本）を用い、90日間の糖負荷試験を行った。食餌として、control群には通常餌を、高血糖群にはDIO Rodent Purified Diet w/60 % Energy From Fat-Blue（SLC株式会社、静岡、日本）を摂取させた。飲水はcontrol群には通常の水道を、高血糖群にはMaltodextrin（SLC株式会社、静岡、日本）を水道水で10%、20%、30%に希釈して飲水させた。各群12匹とし、1ゲージあたり3匹ずつを4つに分けて飼育した。飼育期間中、約2週間ごとに各マウスの体重と血糖値の測定を行った。血糖値は、マウス尾静脈から採血し、血糖値をヒトの自己検査用グルコース測定器（ニプロフリースタイルフリーダムライト）、血糖測定電極（ニプロFS血糖測定電極ライト）を用いて測定した。血糖値は測定器の上限が500 mg/dLであるため、上限を500 mg/dLとした。

2. 行動薬理試験

糖負荷86日目に八方迷路試験、糖負荷90日目に自発運動量測定、ロータリーロード試験を行った。自発運動量は自発運動測定装置（メルクエスト株式会社、富山、日本）を用いてケージ下部に取り付けられた赤外線センサーで行動量を数値化して測定した。通常飼育ケージと同じものを測定ケージとして使用し、各濃度群の各々を1匹ずつ新規環境に入れて（馴化なし）、それぞれの自発運動量

を 20 分間計測した。ローターロッド試験（シンファクトリー株式会社、福岡、日本）は、ロッドの回転速度を 10 回転/分に設定し、ローターロッドのローラーレーンにマウスを置き、マウスがレーンへ落下までの時間を落下潜時としてカットオフ値を 360 秒として記録した。1 施行はマウスが落下するか、360 秒が経過するまで行った。八方迷路試験（バイオリサーチ株式会社、名古屋、日本）は、マウスを前日から絶食させて食餌を報酬に用いて試験を行った。また、糖負荷群に与えていた Maltodextrin 溶液は、絶食を行った際に通常の水道水への切り替えを行った。食餌を 3 つ食べ終えた時間を課題達成時間とし、食餌が置いてない部屋に入る、あるいは食餌を食べずに部屋を出た回数をエラー数としてカウントした。カットオフは 10 分とした。ローターロッド試験、八方迷路試験共に施行は 3 回行い、1 回目と 2 回目を訓練試験とし、3 施行目をデータとして使用した。なお、本研究におけるフローチャートを図 1 に示した。

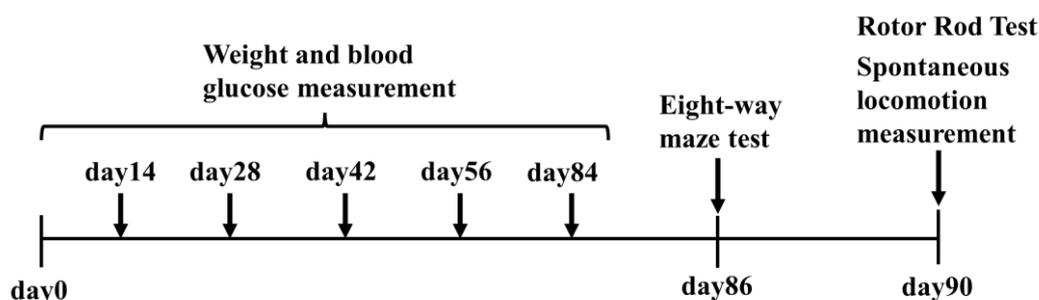


図 1. 90 日間の糖負荷試験のフローチャート

3. 脳標本の作成

行動試験実施後に脳標本を作成した。作成した脳標本を用いてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。CA1、CA2、CA3、歯状回それぞれの神経細胞層の厚さを ImageJ（国立衛生研究所 NIH 作成）より各 10 箇所測定し、測定 10 箇所の平均値を数値化した。

4. 統計学的解析

体重及び海馬は parametric 検定の Tukey 検定法を、血糖値、自発運動量、ローターロッド試験、八方迷路試験は non-parametric 検定の Kruskal-Wallis 検定法を実施後に t -検定にて有意差を求めた。なお、この有意水準について、Bonferroni の補正を行った。いずれの検定においても統計解析ソフトには SPSS version25（IBM 社製）を用い、有意水準 5 %未満（ $p < 0.05$ ）の場合を有意差ありとした。

—結果—

1. 実験動物

体重は各群で経日的に増加し、糖負荷 42 日目から各濃度の糖負荷群で control 群と比較して有意に増加した。体重は、糖負荷 90 日間で control 群が 46.5 g であるのに対して 10 %糖負荷群では 61.7 g (control 比 : 約 1.3 倍)、20 %糖負荷群で 63.2 g (control 比 : 約 1.4 倍)、30 %糖負荷群で 61.2 g (control 比 : 約 1.3 倍) となり、control 群と比較して糖負荷群の各群で有意に体重が増加した (10 %糖負荷群 : $p=0.001$ 、20 %糖負荷群 : $p=0.0003$ 、30 %糖負荷群 : $p=0.002$)。糖負荷により有意に体重は増加したが、糖負荷濃度による体重増加への影響の違いはみられなかった (図 2A)。

血糖値は control 群で 90 mg/dL から 120 mg/dL 程度を推移していた。それに対して糖負荷群では経日的に上昇し、糖負荷 90 日間で 10 %糖負荷群の平均値は 238.4 mg/dL、20 %糖負荷群では 259.3 mg/dL、30 %糖負荷群では 245.1 mg/dL となった (図 2B)。糖負荷により血糖値は上昇傾向がみられ、20 %糖負荷群において control 群と比較して有意な上昇がみられた ($p=0.047$)。control 群と比較して血糖上昇はみられたが、糖負荷濃度による血糖値への濃度依存性はなかった。

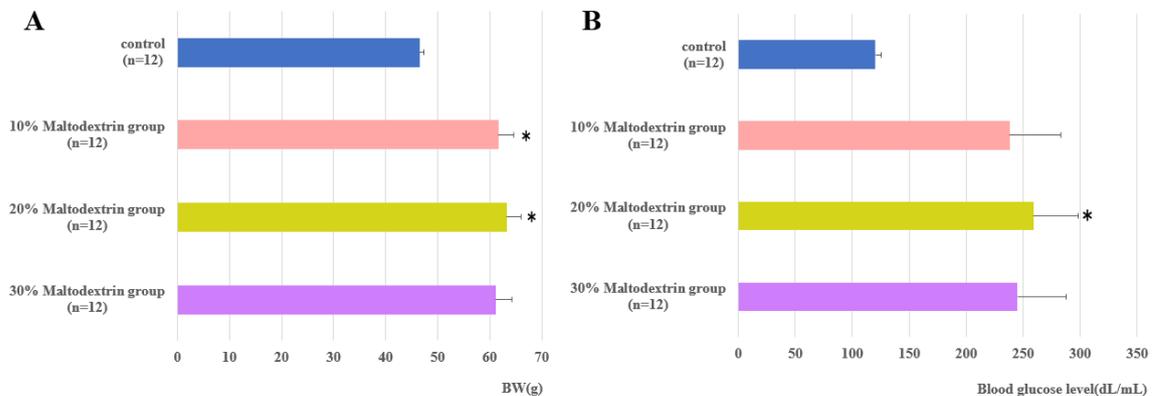


図 2. 糖負荷による動物モデルへの影響

90 日間の糖負荷試験で、体重 (A) と血糖値 (B) とともに経時的な上昇がみられた。各数値は平均値 \pm S.D. で表示されている。(* $P < 0.05$ vs control)

2. 行動薬理試験

1) 自発運動

活動量は control 群の平均値は 703.3 カウント、20 %糖負荷群では 688.6 カウントとなり、20 %糖負荷群で control 比の 0.98 倍であった。個体の中には活発は動きをするマウスがみられたが、20 %糖負荷群の活動量は control 群とほぼ同程度となった。(図 3)。

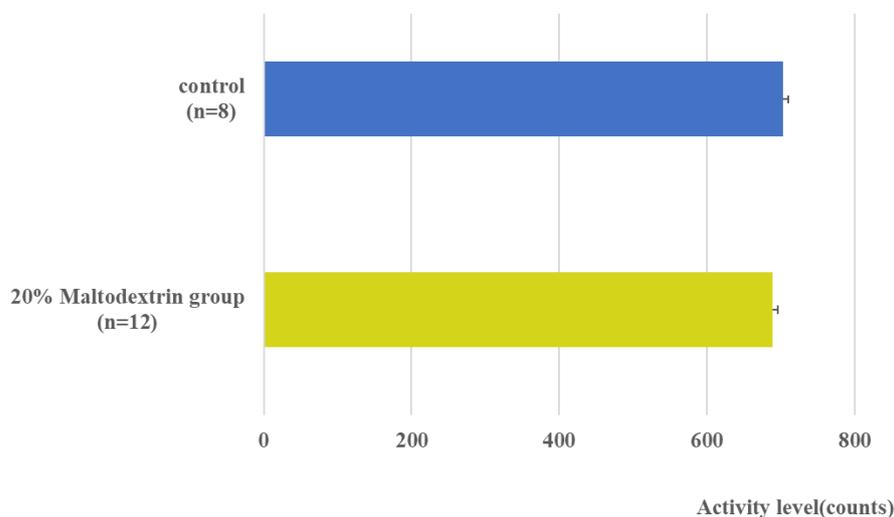


図 3. Control 群と 20 %糖負荷群の自発運動量の比較

糖負荷することによる、行動量の違いを比較した。各数値は平均値 ± S.D. で表示されている。

2) ローターロッド試験

ローターロッド試験は control 群、20 %糖負荷群共に 3 回の試行による学習によって落下潜時が延長する傾向がみられたが、control 群と比較して 20 %糖負荷群では落下潜時の短縮がみられた。また、20 %糖負荷群では、3 回目の試行において control 群と比較し有意な低下がみられた ($p=0.009$) (図 4)。

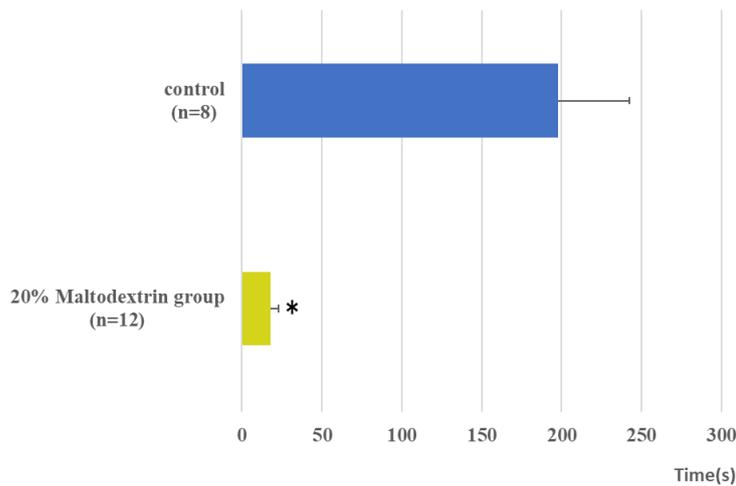


図 4. Control 群と 20 %糖負荷群の落下潜時の比較

上限を 6 分間と設定し、マウスが落下するまでの時間を計測し、認知機能における運動機能を評価・比較した。各数値は平均値±S. D. で表示されている。(* $P < 0.05$ vs control)

3) 八方迷路試験

ローターロード試験同様に、八方迷路試験において control 群及び 20 %糖負荷群は学習することで課題達成時間の短縮がみられた。20 %糖負荷群では、control 群と比較して課題達成時間の有意な延長がみられた ($p = 0.036$) (図 5A)。

エラー数についても学習により、減少傾向がみられた。課題達成時間同様にエラー数は、control 群と比較して 20 %糖負荷群で増加傾向がみられたが、有意差はなかった (図 5B)。

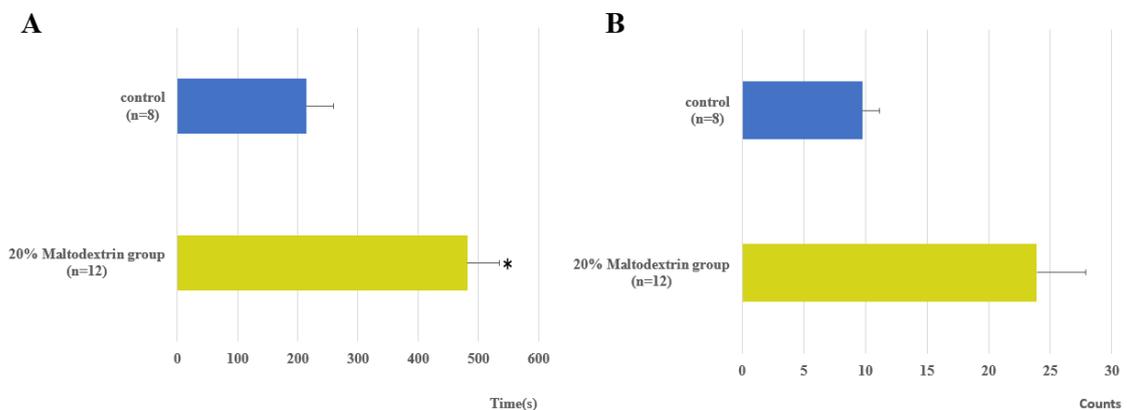


図 5 Control 群と 20 %糖負荷群の八方迷路試験の比較

10 分間の間に、3 つの報酬を得るまでの時間 (A) とエラー数 (B) を計測し、認知機能の記憶の機能を評価・比較した。各数値は平均値±S. D. で表示されている。(*P < 0.05 vs control)

3. 海馬病理標本

海馬の神経細胞層は 20 %糖負荷群で CA1 領域、CA2 領域、CA3 領域、歯状回の各領域共に、control 群と比較して有意な縮小がみられた。Control 比で CA1 領域は約 0.52 倍 (p = 0.002)、CA2 領域は約 0.73 倍 (p = 0.001)、CA3 領域は約 0.75 倍 (p = 0.001)、歯状回は約 0.64 倍 (p = 0.0005) であった (図 6、7)。

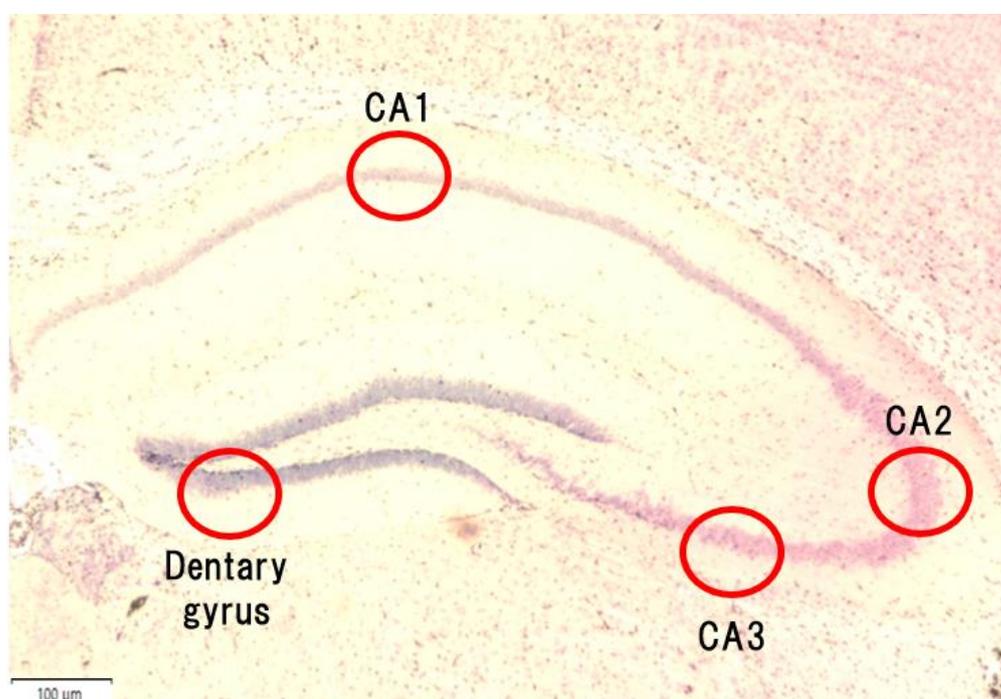


図 6 海馬の測定領域図

海馬の各領域 (CA1、CA2、CA3、歯状回) の神経細胞層の厚みを測定し、図 7 に結果を示した。

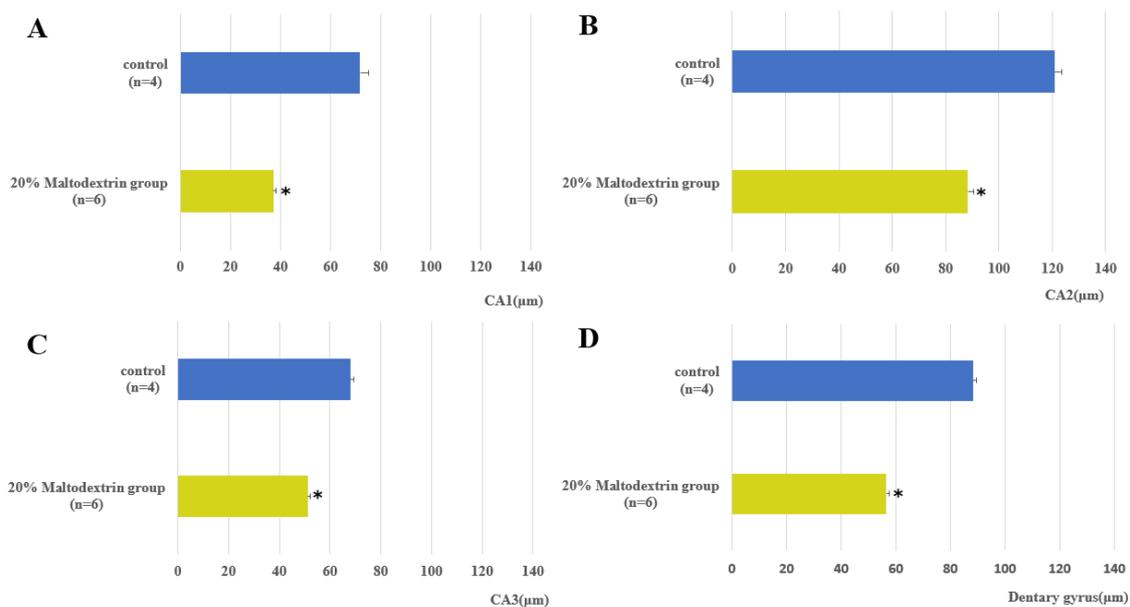


図7 Control 群と糖負荷群の海馬各領域の比較

糖負荷によるマウスの海馬（神経細胞層）への影響。Image J を用いて、各領域の神経細胞層の厚みを 10 箇所計測し、その平均を取り数値化した。A：CA1 領域 B：CA2 領域 C：CA3 領域 D：歯状回を示している。

各数値は平均値 ± S.D. で表示されている（*P < 0.05 vs control）。

—考察—

第 2 章では、糖負荷によるマウスの認知機能と海馬への影響について調査を行った。その結果、マウスを高血糖にすることで、行動薬理試験によるマウスの認知機能低下と海馬病理検討により海馬の萎縮が確認された。このことから、高血糖は海馬の萎縮を起こし、認知機能を低下させる可能性が示唆された。これは、第 1 章で得られた考察を支持する。

本研究では、Maltodextrin を糖として使用した。Maltodextrin のような難消化性デキストリンは食物繊維の一種であり、食事と共に摂取すると、炭水化物の吸収を遅延させ、食後血糖値上昇を緩やかにすることが動物実験及び臨床試験で確認されている^{13)~15)}。本研究においても血糖値は緩やかな上昇がみられており、この血糖値の緩やかな上昇は、Maltodextrin によると考えられた。

行動薬理試験は、糖負荷後の体重と血糖値が共に有意な上昇がみられた 20 %

糖負荷群に限定し実行した。その結果、高血糖が認知機能低下を引き起こす可能性が示唆された。認知機能は、自発運動量、ローターロッド試験、八方迷路試験の3つから総合的に評価を行っている。自発運動は運動量を活動量として数値化し外部刺激等で誘発されず自発的に示す運動のことである。本研究では、control群と20%糖負荷群の活動量は同程度であり有意差がみられなかったことから、高血糖は活動量の増減に影響を与えず、運動機能を障害しないと考えられた。また、20%糖負荷群ではcontrol群よりも体重が有意に増加しているが、活動量はcontrol群と同程度であることから、体重は運動機能へ影響していないと考えられた。次に、ローターロッド試験は、認知機能における運動機能障害を評価している¹⁶⁾。また、八方迷路試験は認知機能における記憶に関する機能の評価を行っている。ローターロッド試験ではcontrol群と比較して20%糖負荷群で落下潜時の有意な短縮がみられた。自発運動測定による活動量に差がみられず、ローターロッド試験において、落下潜時の有意な短縮がみられたことから、高血糖は、認知機能における運動機能を障害すると考えられた。また、八方迷路試験においても、20%糖負荷群でcontrol群と比較して課題達成時間の有意な延長、またエラー数の増加がみられたことから、高血糖は、認知機能における記憶に関する機能を障害すると考えられた。これらの行動薬理試験の3つを総合的に判断し、高血糖は認知機能低下を引き起こす可能性が示唆された。

高血糖は認知機能を直接低下させる、いわゆる慢性高血糖による代謝性脳症であると言われている¹⁷⁾。健常人で脳機能の変化を調べた研究では血糖値が300 mg/dLを超えると脳機能は可逆的に低下し、情報処理速度、ワーキングメモリーや注意などが低下するとの報告がある¹⁸⁾。また、2型糖尿病患者における高血糖の認知機能への影響をみた報告では、高血糖による認知障害は可逆性に低下し、270 mg/dLから300 mg/dL程度が認知障害の閾値であることが示唆される報告もある¹⁹⁾。本研究において、20%糖負荷群のマウスの平均血糖値は240 mg/dLから260 mg/dLであり、個々のマウスでも血糖値が500 mg/dLを超えるマウスもみられた。20%糖負荷群の平均血糖値はこの報告と近い結果であり、行動薬理試験の結果も考慮すると、認知機能へ影響を与えるのに十分な高血糖状態であったと考えられる。この高血糖状態が認知機能に影響し、脳機能を障害した可能性が考えられた。この結果は、第1章における「高血糖による認知機能低下」という結果を支持するものである。

海馬は上昇層、放射状層、網状層、錐体細胞層、顆粒細胞層などで形成されている。20%糖負荷群では、CA1領域、CA2領域、CA3領域及び歯状回の各領域でcontrol群と比較して神経細胞層が縮小しており、すべての領域において有意な縮小がみられた。このことから20%糖負荷群では、海馬全体が縮小している可能性が示唆された。従来から、糖尿病患者は非糖尿病患者に比べて脳の萎縮が強い

ことが報告されている²⁰⁾。最近の久山町研究からも、糖尿病患者では脳、特に海馬の萎縮が強くみられるとの報告もされている²¹⁾。本研究においても90日間の糖負荷による高血糖状態が持続したことで海馬に影響を及ぼし、海馬の萎縮を引き起こした可能性が示唆された。第1章では、DM群の「3つの単語の遅延再生」の平均スコアで低下傾向であり、高血糖による海馬への影響が示唆された。動物モデルによる海馬の萎縮はこの結果を支持するものであり、また高血糖による認知機能低下もみられたことから、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能を低下させている可能性が示唆された。

本研究を通して、高血糖による認知機能低下と海馬の萎縮が確認された。この結果は第1章での考察を支持するものであると考えられた。この病態モデルマウスを用い、さらなる研究を継続することでDMによる認知症発症の原因の解明に繋がるものであると考えられた。

第3章 海馬の萎縮と AGEs の関係

第2章では、糖負荷を行うことでマウスを高血糖状態にすることが可能となり、行動薬理試験での認知機能低下もみられたことから、高血糖モデルマウスとして評価することが可能となった。また、3ヶ月間の糖負荷試験による糖負荷群の有意な血糖値の上昇と行動薬理試験における認知機能低下に加え、糖負荷群における海馬の各領域の神経細胞層が有意に縮小したことから、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能を低下させる可能性が示唆され、第1章の考察が支持された。

この高血糖による認知機能障害を引き起こす原因物質として、糖化最終生成物である AGEs の関与が指摘されており、AGEs は高血糖の持続により生成及び蓄積されると考えられている⁷⁾。この生成された AGEs による認知機能障害は報告されているが、海馬の萎縮と AGEs との関連に関する調査や報告はない。

第3章では先行研究を基にした新たな高血糖モデルマウスを作成と、その動物モデルを用いた高血糖による認知機能と脳組織への影響について検討を行った。

—方法—

1. 実験動物

C57BL/6J 7週齢（日本クレア株式会社、東京、日本）マウスを使用し、control群と1%糖負荷群、5%糖負荷群、20%糖負荷群の4群を各群5匹ずつ設定した。糖負荷群には、24時間絶食させた後、1.2% w/v NA水溶液（和光純薬株式会社、東京、日本）240 mg/kg 体重を腹腔内投与し、その15分後に1% w/v STZ水溶液（和光純薬株式会社、東京、日本）100 mg/kg 体重を腹腔内投与した。この操作を1日空けて2回繰り返し行った。投与後、糖負荷群には、食餌としてDIO Rodent Purified Diet (g)w/60% Energy From Fat-Blue（SLC株式会社、静岡、日本）を与え、飲水は水道水でMaltodextrin（SLC株式会社、静岡、日本）を1%、5%、20%に希釈させたMaltodextrin溶液を与えた。また、control群には通常餌と水道水を与えた。各群とも食餌と飲水は自由摂取とし、4ヶ月間試験を行った。飼育期間中、体重と血糖値を1ヶ月ごとに測定した。血糖値は、マウス尾静脈から採血し、血糖値をヒトの自己検査用グルコース測定器（ニプロフリースタイルフリーダムライト）、血糖測定電極（ニプロFS血糖測定電極ライト）を用いて測定した。血糖値は測定器の上限が500 mg

/dL であるため、上限を 500 mg/dL とした。モデルの作成方法と飼育スケジュールは図 1 に示した。

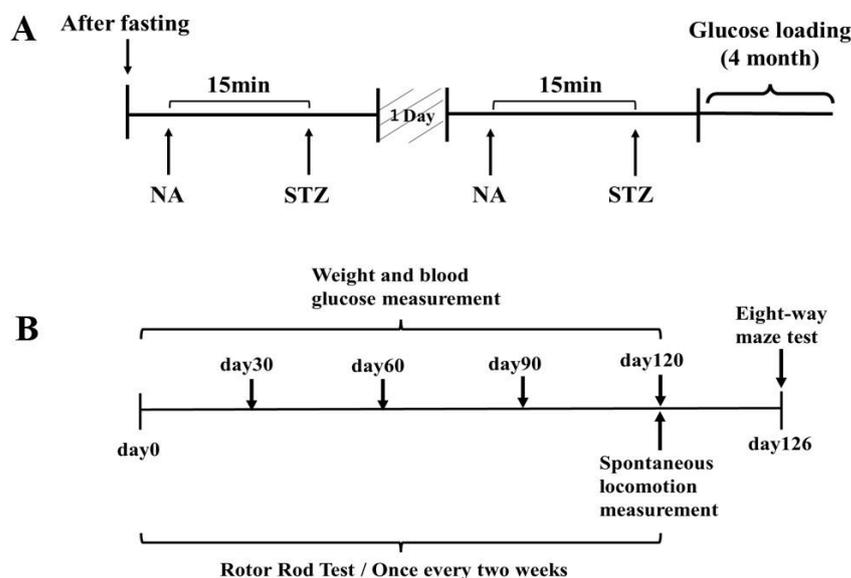


図 1, 実験スケジュール

高血糖モデルマウス作成 (A) 後、4 ヶ月間の糖負荷を行った。4 ヶ月間の糖負荷試験後に行動薬理試験を行った (B)。

2. 行動薬理試験

4 ヶ月間の糖負荷試験後、自発運動量測定、ローターロッド試験、八方迷路試験を行った。自発運動量は自発運動測定装置 (メルクエスト有限会社、富山、日本) を用いてケージ下部に取り付けられた赤外線センサーで行動量を数値化して測定した。通常の飼育ケージと同じものを測定ケージとして使用し、各濃度群の各々を 1 匹ずつ新規環境に入れて (馴化なし)、それぞれの自発運動量を 20 分間計測した。ローターロッド試験 (シンファクトリー株式会社、福岡、日本) は、ロッドの回転速度を 10 回転/分に設定し、ローターロッドのローラーレーンにマウスを置き、マウスがレーンへ落下までの時間を落下潜時としてカットオフ値を 360 秒として記録した。1 施行はマウスが落下するか、360 秒が経過するまで行った。八方迷路試験 (バイオリサーチ株式会社、名古屋、日本) は、マウスを前日から絶食させて食餌を報酬に用いて試験を行った。また、糖負荷群に与えていた Maltodextrin 溶液は、絶食を行った際に水道水への切り替えを行った。食餌を 3 つ食べ終えた時間を課題達成時間とし、食餌が置いてない部屋に

入る、あるいは食餌を食べずに部屋を出た回数をエラー数としてカウントした。カットオフは 10 分とした。ローターロッド試験は、2 週間に 1 回測定し、糖負荷 4 ヶ月後の試験結果をデータとして使用した。また八方迷路試験についても糖負荷 4 ヶ月後に施行を 3 回行い、1 回目と 2 回目を訓練試験とし、3 施行目をデータとして使用した。

3. 脳標本の作成

行動試験実施後に脳標本を作成した。マウスはジエチルエーテルで安楽死させた。脳組織サンプルは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の 4 %ホルムアルデヒドで 1 日間固定した。その後、脱水およびパラフィン浸潤後、脳をパラフィンブロックに埋め込み、Leica Microsystems（Wetzlar, Germany）を用い、5 μ m の厚さに切片化した。脳の病理組織学的外観は、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色で評価した。次に、免疫組織化学分析のために、パラフィン包埋されたマウス脳切片をキシレンおよび一連のアルコールで脱パラフィンした。熱によるエピトープの回収と 1 %スキムミルクによるブロッキングの後、切片を一次抗体（抗 AGE 抗体、abcam ab23722、1 : 400）と一晩インキュベートし、続いてビオチン化二次抗体（Vector Laboratories Burlingame, California, CA）と 2 時間インキュベートし、免疫反応を過酸化酵素染色 DAB キット（ナカライテスク株式会社、京都、日本）により可視化した。AGE 染色試料の核カウンターステインをヘマトキシリンで行い、顕微鏡およびデジタルカメラ（BX53、DP72、Olympus、東京、日本）で組織の観察および撮影を行った。調製した脳標本は、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色と抗 AGE 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡で観察した。HE 染色した標本については、CA1、CA2、CA3 領域及び歯状回の神経細胞層の厚さを ImageJ（国立衛生研究所、NIH で作成）により各 10 箇所測定し、測定 10 箇所の平均値を数値化した。また、抗 AGE 抗体を用いた免疫染色を行った標本は、染色された AGE が標本全体の 25 %で +1、50 %で +2、75 %で +3、100 %で +4 とし、血管に染色されている頻度でスコア化し比較を行った。

4. 統計学的解析

体重及び海馬は parametric 検定の Tukey 検定法を、血糖値、自発運動量、ローターロッド試験、八方迷路試験は non-parametric 検定の Kruskal-Wallis 検定法を実施後に *t*-検定にて有意差を求めた。なお、この有意水準について、Bonferroni の補正を行った。いずれの検定においても統計解析ソフトには SPSS version25（IBM 社製）を用い、有意水準 5 %未満（ $p < 0.05$ ）の場合を有意差ありとした。

—結果—

1. 実験動物

体重は4ヶ月間の試験で、control群の平均値が31.4であるのに対して、1%糖負荷群では39.2g(control比:約1.2倍)、5%糖負荷群で38.4g(control比:約1.2倍)、20%糖負荷群で33.3g(control比:約1.1倍)となり、体重増加はみられたが、control群と糖負荷群の間で有意な差はみられなかった(図2:A)。

血糖値はcontrol群の平均値で111.6mg/dLであった。それに対して、糖負荷群では経日的に上昇し、4ヶ月間の糖負荷試験で1%糖負荷群は300.6mg/dL、5%糖負荷群では226.8mg/dL、20%糖負荷群では95mg/dLとなった。糖負荷により血糖値の上昇傾向がみられ、control群と比較して、1%糖負荷群において有意な上昇がみられた($p = 0.011$)。Control群と比較して血糖上昇はみられたが、糖負荷濃度による血糖値への濃度依存性はなかった(図2:B)。

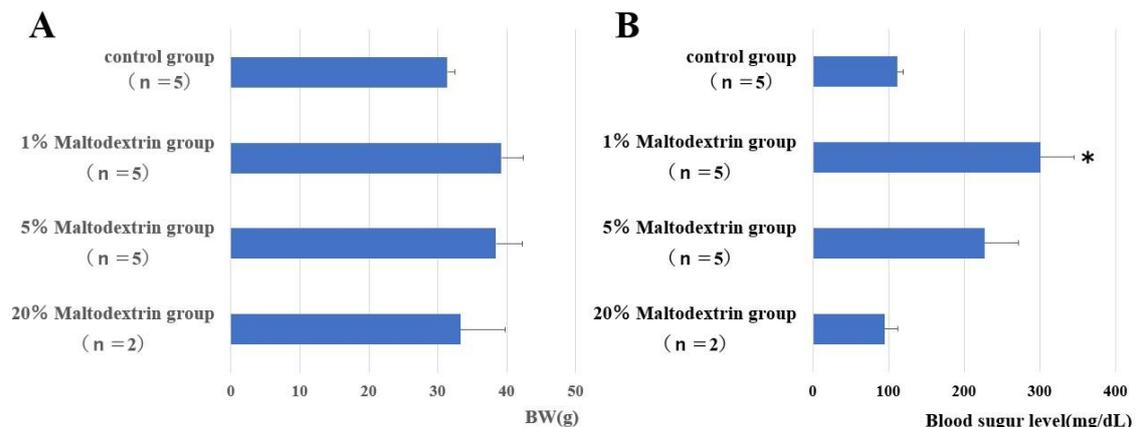


図2. 糖負荷による動物モデルへの影響

120日間の糖負荷試験で、体重(A)と血糖値(B)ともに経時的な上昇がみられた。各数値は平均値 ± S.D. で表示されている。(* $P < 0.05$ vs control)

2. 行動薬理試験

1) 自発運動

活動量はcontrol群の平均値で932カウント、1%糖負荷群では754.6カウントであった。その活動量は1%糖負荷群でcontrol比の0.81倍となり、control

群と1%糖負荷群で活動量に差はなく、ほぼ同程度の活動量となった(図3)。

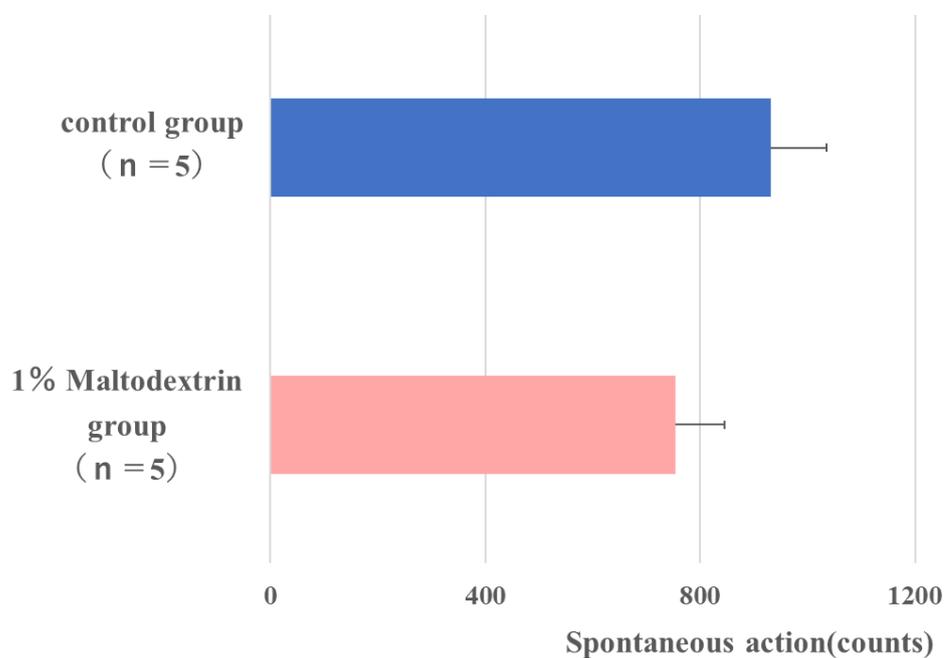


図3 Control群と糖負荷群の自発運動量の比較

糖負荷による、行動量の違いを比較した。各数値は平均値 ± S.D. で表示されている。

2) ローターロッド試験

ローターロッド試験における落下潜時は4ヶ月間の糖負荷後の結果、control群の平均値で306.5秒、1%糖負荷群では182.2秒であった。1%糖負荷群とcontrol群の間で有意差はみられなかったが、control群と比較して1%糖負荷群で落下潜時の短縮傾向がみられた(図4)。

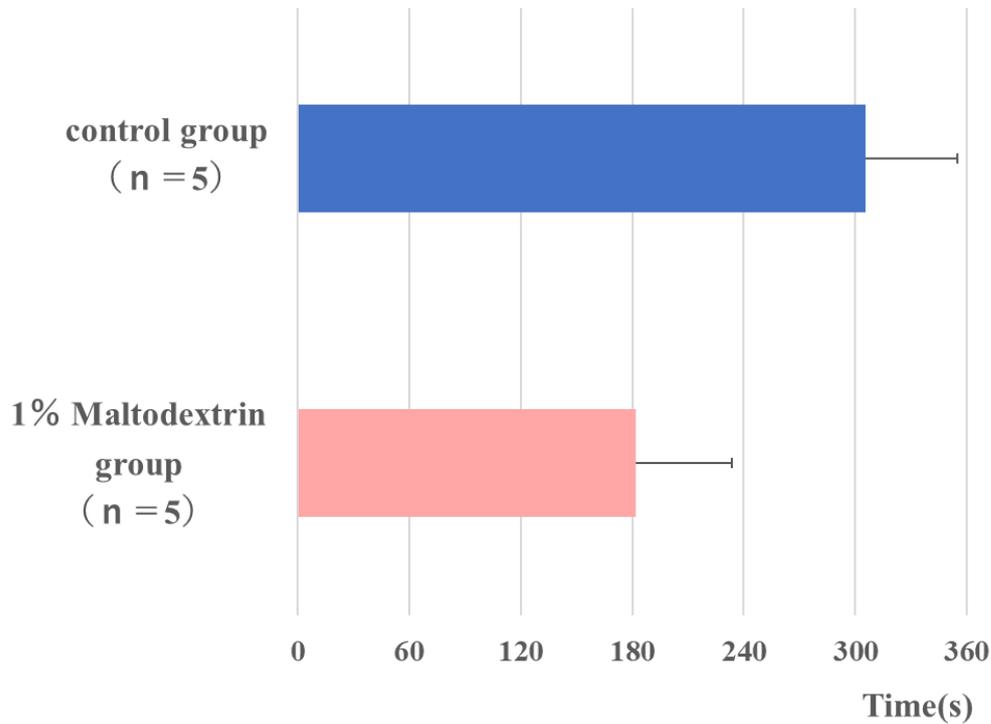


図 4. Control 群と糖負荷群の落下潜時の比較

上限を 6 分間と設定し、マウスが落下するまでの時間を計測し、認知機能における運動機能の評価と比較を行った。各数値は平均値 \pm S.D. で表示されている。

3) 八方迷路試験

課題達成時間の平均値は、control 群では 200 秒、1 %糖負荷群では 600 秒であった。control 群と比べ 1 %糖負荷群で課題達成時間の延長がみられ、control 群と比較して、1 %糖負荷群で課題達成時間の有意な延長がみられた ($p = 0.018$) (図 5A)。またエラー数は、control 群で 5 回であったのに対して、1 %糖負荷群で 23 回であった。課題達成時間同様に 1 %糖負荷群でエラー数が増加し、control 群と比較し、1 %糖負荷群でエラー数の有意な増加がみられた ($p = 0.006$) (図 5B)。

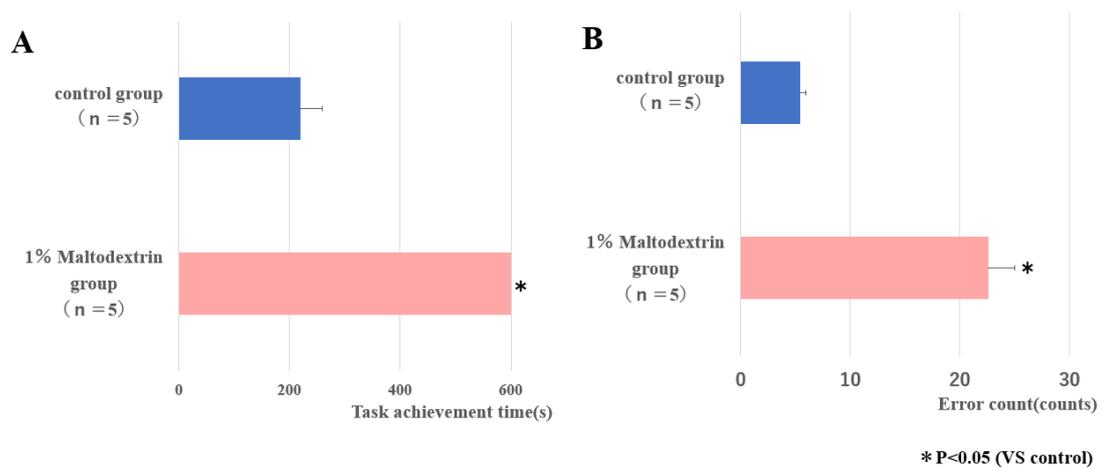


図 5. Control 群と糖負荷群の八方迷路試験による比較

上限を 10 分間とし、その間に 3 つの報酬を得るまでの時間 (A) とエラー数 (B) を計測し、認知機能における記憶の機能について評価と比較を行った。各数値は平均値 \pm S.D. で表示されている。 (*P < 0.05 vs control)

3. 脳病理標本

海馬の神経細胞層は control 群と比較して 1 %糖負荷群で、CA1 領域、CA2 領域、CA3 領域、歯状回の各領域で有意な縮小がみられた。1 %糖負荷群では、control 比で CA1 領域は約 0.52 倍 ($p < 0.0001$)、CA2 領域は約 0.8 倍 ($p < 0.0001$)、CA3 領域は約 0.84 倍 ($p < 0.0001$)、歯状回は約 0.76 倍 ($p < 0.0001$) であった (図 6、7)。

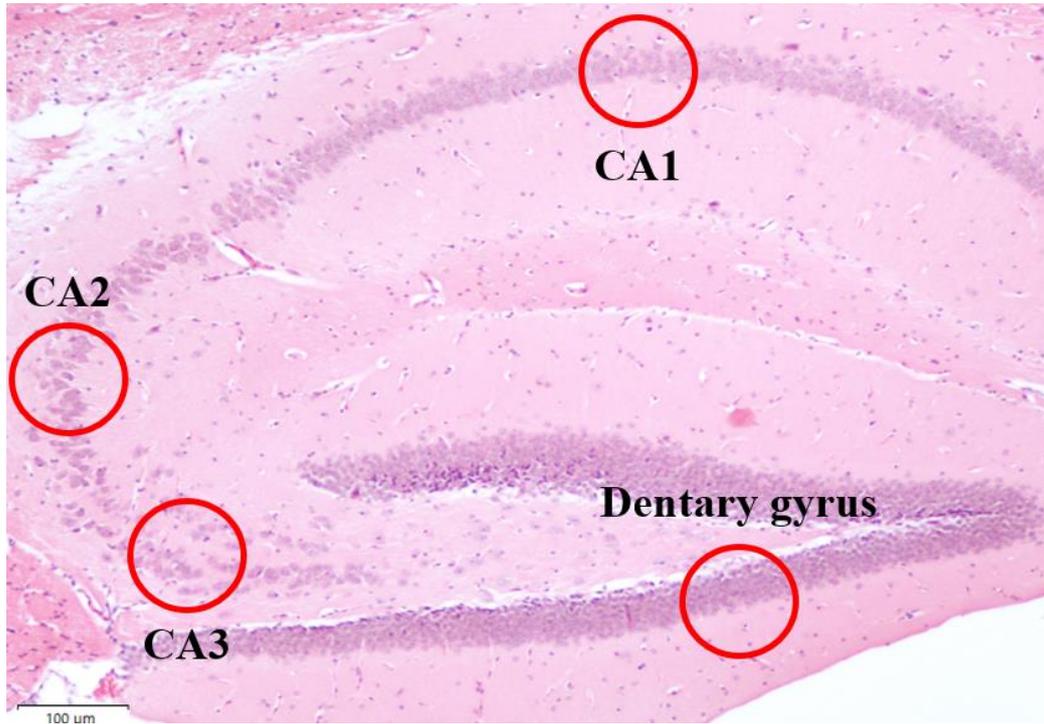


図 6. 海馬の各領域図 (測定領域)

海馬の各領域 (CA1、CA2、CA3、歯状回) の神経細胞層の厚みを測定し、図 7 に結果を示した。

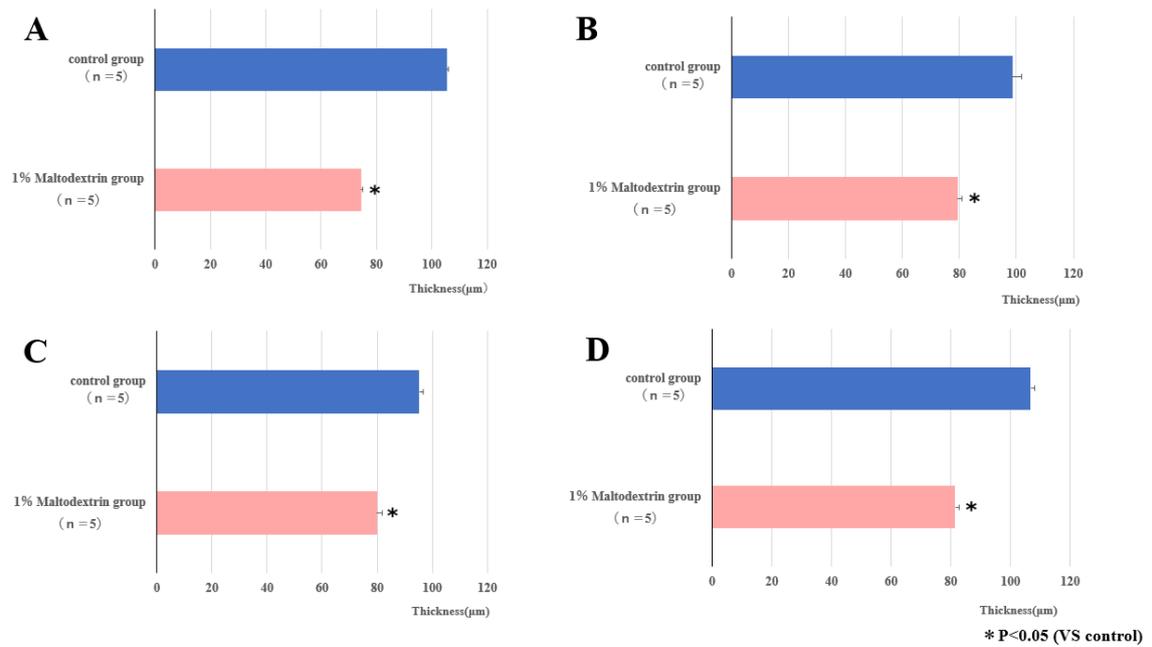


図 7. Control 群と糖負荷群の海馬各領域の比較

糖負荷によるマウスの海馬（神経細胞層）への影響。Image J を用いて、各領域の神経細胞層の厚みを 10 箇所計測し、その平均を取り数値化した。A: CA1 領域 B: CA2 領域 C: CA3 領域 D: 歯状回を示している。各数値は平均値±S.D. で表示されている（*P < 0.05 vs control）。

また、抗 AGE 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ（図 8）、control 群と比較し、1%糖負荷群で脳内 AGE 量（スコア）の有意な増加が確認された（図 9）。

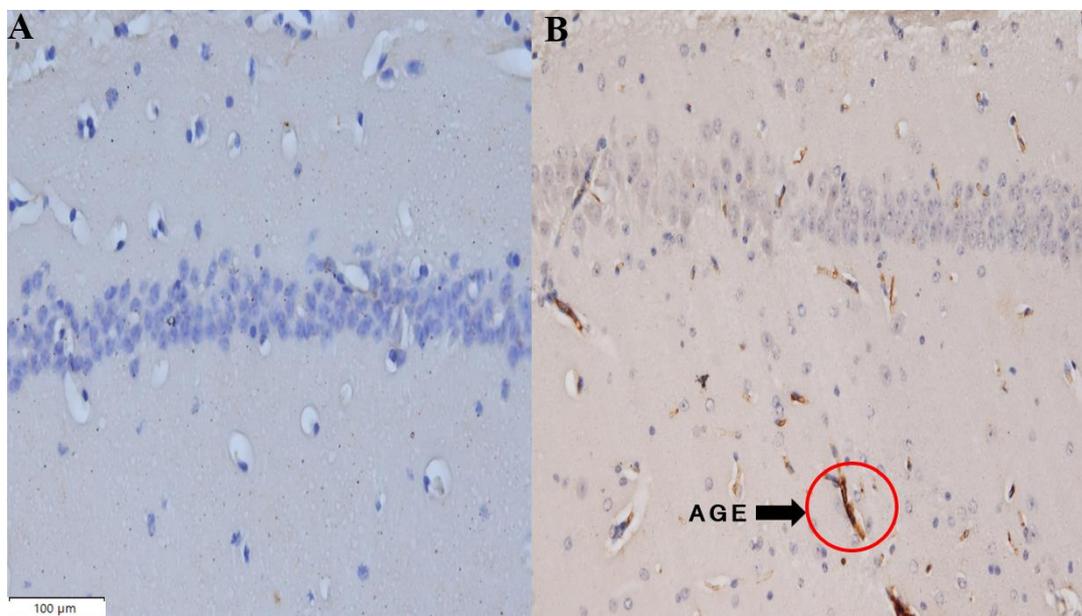


図 8. Control 群と糖負荷群の AGE の比較

抗 AGE 抗体を用いた海馬（CA1 領域）の染色画像。A: Control 群 B: 1%糖負荷群を示している。Scale bar=100 μm。

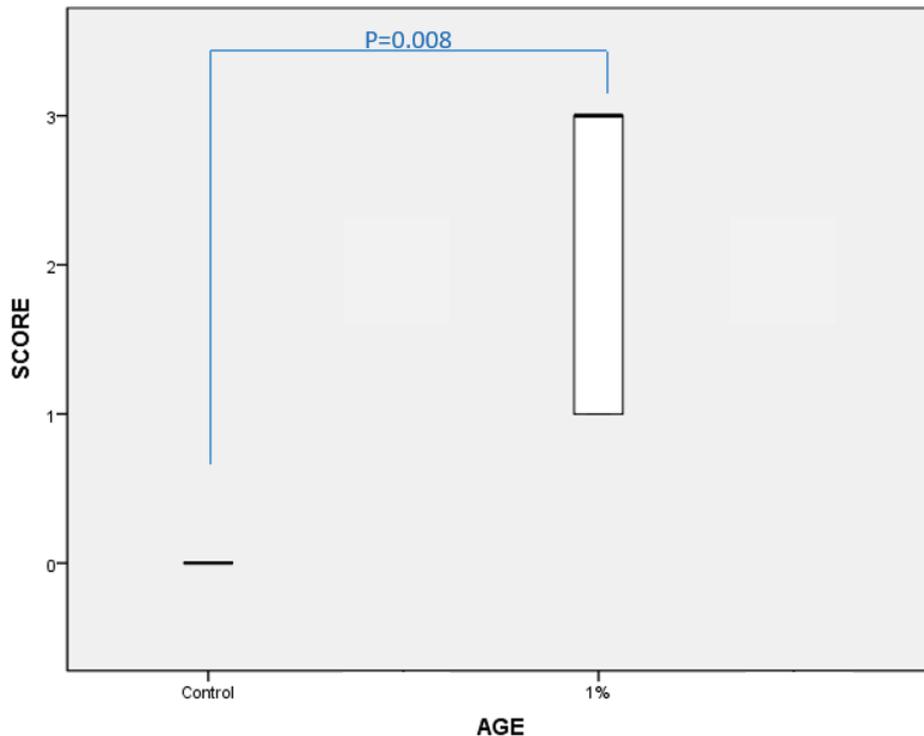


図 9. AGEs 量 (スコア) の比較

AGE 量のスコア化を行い、control 群と 1 %糖負荷群との比較を行った。
 (*P<0.05 vs control)

—考察—

本研究は糖負荷によるマウスの認知機能と海馬への影響を調査し、加えて脳内の AGE 量 (スコア) の測定を行った。その結果、高血糖による認知機能低下や海馬の各領域の萎縮が確認され、高血糖が AD などの認知症のリスクとなる可能性が示唆された。また、脳内 AGEs スコアの有意な増加がみられたことから、AGEs と海馬の萎縮が関係している可能性が考えられ、高血糖による認知機能低下と AGEs の関与が示唆される結果が得られた。

本研究においても、糖負荷には Maltodextrin を使用した。第 2 章と同様に血糖値は緩やかな上昇がみられており、この血糖値は緩やかな上昇は Maltodextrin によると考えられた。また、maltodextrin が高用量になるにつれ血糖値の上昇が抑制され、20 %糖負荷群では、control 群と同程度の血糖値まで改善されている。これは、Maltodextrin による糖の吸収速度の抑制効果により高用量では血糖値が上昇しなかった可能性が考えられた。

STZ と NA を用いた高血糖モデルマウスの作成方法が報告されており、このモデルマウス作成には、STZ のラジカルによる膵臓細胞の DNA 障害とその障害の修復に必要な NA の前投与が必要とされている²²⁾。STZ は一酸化窒素ドナー、DNA メチル化剤であり、糖尿病の実験動物モデルを誘導するために使用され、膵臓β細胞でフリーラジカルを産生し、DNA 鎖の断片化を引き起こす²³⁾。断片化された DNA の修復には、細胞内ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)が大量に消費される²³⁾。そのため、NA を前投与することにより効果的に NAD が補充され、β細胞が保護されている²⁴⁾。本研究の高血糖モデルマウスは、このメカニズムにより糖尿病に似た症状を引き起こすと考えられた。

行動薬理試験は、第 2 章と同様に血糖値の有意な上昇のみられた 1 %糖負荷群に限定し実行した。その結果、高血糖が認知機能低下を引き起こす可能性が示唆された。行動薬理試験については、第 2 章と同様に自発運動量測定、ローターロッド試験、八方迷路試験の 3 つの試験により総合的に判断した。control 群と 1 %糖負荷群の活動量は同程度であり有意差がみられず、糖負荷は運動機能を障害しないと考えられた。また、体重増加はみられたが、活動量が control 群と 1 %糖負荷群で同程度であったことから、体重の運動機能への影響はないと考えられた。ローターロッド試験では、control 群と比較して 1 %糖負荷群で落下潜時の短縮がみられたことから、糖負荷による高血糖は、認知機能における運動機能を障害することが示唆された。結果に有意差がみられなかった原因として、認知機能評価を目的として 2 週間に 1 回、ローターロッド試験を行ったことにより長期記憶が成立し、落下潜時の短縮に影響を与えた可能性が考えられた。八方迷路試験も 1 %糖負荷群で課題達成時間の有意な延長、1 %糖負荷群と 5 %糖負荷群でエラー数の有意な増加がみられたことから、高血糖は認知機能における記憶に関する機能を障害すると考えられた。これらの行動薬理試験の結果から、高血糖が認知機能を低下させる可能性が示唆された。また、糖負荷による血糖値を考慮すると、1 %糖負荷群で最も認知機能が低下していると考えられた。

糖負荷により CA1 領域、CA2 領域、CA3 領域、歯状回の各領域の神経細胞層で control 群と比較して 1 %糖負荷で縮小がみられており、すべての領域において有意な縮小がみられたことから、海馬全体が縮小している可能性が示唆された。本研究では 4 ヶ月間の糖負荷を行った。第 2 章同様に長期間にわたり高血糖状態が持続し、この高血糖状態が海馬に影響を及ぼし、海馬の萎縮を引き起こしたと考えられた。この海馬の萎縮と行動薬理試験における認知機能低下の併行性が確認されたことから、高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能を低下させる可能性が示唆された。この脳機能を障害する原因として AGEs が考えられている²⁵⁾。この AGEs は慢性的な高血糖状態で形成と蓄積が起こる²⁵⁾と言われ、AGEs の蓄積と RAGE (Receptor for AGEs) を介した炎症およびアポトーシス

の誘導が神経細胞死の促進や増強に関与し、認知機能障害を引き起こすと考えられている²⁶⁾。本試験による4ヶ月間の長期にわたる糖負荷とそれに伴う有意な血糖上昇がみられたことから慢性的な高血糖状態であったといえ、この高血糖がAGEsの形成と蓄積を起し、認知機能障害を引き起こしたと考えられた。またAGEsにより脳内の神経細胞死が起こり、脳機能障害が起きている可能性が考えられた。加えて、脳内でのAGEsの形成と海馬の萎縮が起きていることから、AGEsと海馬の萎縮との関連が示唆された。

高血糖により認知機能低下が引き起こされ、また海馬の萎縮もみられたことから、高血糖が海馬を萎縮させ、認知機能を低下させる可能性が示唆された。また、脳内でAGEsの形成が確認されたことから、AGEsの形成と蓄積が海馬の萎縮と関連している可能性が示唆された。本研究を通して、糖負荷を行うことでマウスを高血糖状態にすることが可能となった。第3章も第2章と同様に行動薬理試験の結果より糖負荷による認知機能低下がみられ、第3章ではAGEsの形成も確認されたことから、糖尿病に近い病態モデルマウスを作成することが出来たと考えている。基礎研究を通して高血糖による認知機能低下、海馬の萎縮、またAGEs形成を確認できたことはDMによる認知症発症の原因の解明に繋がるものであると考えられる。今後、研究結果を踏まえ、さらなる研究を続けることでメカニズムの解明に近づくと考えられた。

結語

薬剤師は、患者の薬物療法に関与している。早期から、血糖管理を行うなどの薬学的管理を行うことは重要である。認知症の前段階である軽度認知障害（Mild Cognitive Impairment：以下、MCI）は、日常生活への影響がほとんどなく、認知症と診断できない状態のことであるが、年間 10 %から 15 %の患者が認知症に進展する。この、MCI に DM が合併することで高率で認知症へ移行しやすいと考えられているため²⁷⁾、服薬コンプライアンスの向上は血糖コントロールの安定に繋がり、MCI から認知症への移行や重症化を抑制することが出来ると考えられる。また、安定した血糖コントロールは高血糖状態を回避することが出来るため、認知機能低下の抑制に繋がると考えられる。具体的な方法として、服用回数の改善、家族への服薬指導、服薬カレンダーや服薬サポートアプリの使用などの活用が挙げられ、早期の薬学的介入は高血糖による認知機能低下を予防する上で重要であると考えられる。

糖尿病に伴う認知機能低下は、薬物治療により改善するとの報告がされている。チアゾリジン誘導体あるいはメトホルミンといったインスリン感受性改善薬の使用により、認知症発症のリスクが低減することが示されている²⁸⁾。また、最近では DPP-4 阻害薬で認知機能が改善したとの報告もみられている²⁹⁾。脳内インスリンを補う方法も注目されており、海馬に関わる認知機能、すなわち短期記憶の改善がみられ、生活機能や脳血流の改善も報告されている³⁰⁾。

認知症患者は今後さらなる増加が見込まれるなか、高血糖と認知機能との関係は超高齢化社会において重要な研究課題である。そのため、高血糖が認知機能へ与える影響について、臨床と基礎の両面から研究を行うことは DM による認知症発症のメカニズム解明、更には認知症予防に繋がるため重要であると考えられる。本研究は、高血糖が認知機能に与える影響の調査及び研究を行った。その結果、研究全体を通して高血糖が海馬の萎縮を引き起こし、認知機能を低下させることが分かった。また海馬の萎縮と AGEs の形成との関連が示唆されることが新たに分かった。海馬の萎縮と AGEs に関連する報告はなく、AGEs による認知機能障害解明のための重要な結果の 1 つであると考えられた。また、高血糖状態は DM の前段階であり、この高血糖が持続することで AD を始めとした認知症へ発展していく可能性がある。そのため、「高血糖による認知機能低下」は、認知症発症のメカニズムの解明に繋がると考えられる。今後、臨床において認知症予防に勤め、基礎研究では今回の結果を踏まえ、研究を継続することで DM による認知症発症のメカニズムの解明の一助としていきたい。

利益相反

本研究の実施にあたり、開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) 日本神経学会, 監修. 「認知症疾患診療ガイドライン」作成委員会, 編集. 認知症疾患診療ガイドライン 2017. 医学書院, 東京, 2017.
- 2) 内閣府: 高齢社会白書 平成 29 年度版, 2017, pp19-21, 日経印刷, 東京
- 3) Gill Livingston, Jonathan Huntley, Andrew Sommerlad: Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. The Lancet Commissions 2020 Aug 8, vol.396, 413-446
- 4) Launer LJ, et al: Effects of intensive glucose lowering on brain structure and function in people with type 2 diabetes (ACCORD MIND): a randomized open-label substudy. Lancet Neurol 10: 969-977, 2011
- 5) Ohara T, et al: Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hiayama study Neurology, 77: 1126-1134, 2011
- 6) Cheng G, Huang G, Deng H, Wang H: Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment; A meta-analysis of longitudinal studies. Intern Med J, 42 (5): 484-491 (2012).
- 7) Yamagishi S, Fukami K, Matsui T: Crosstalk between advanced glycation end products (AGEs) -receptor RAGE axis and dipeptidyl peptidase-4-incretin system in diabetic vascular complications. Cardiovasc Diabetol 14: 2, 2015.
- 8) Takeuchi M, Yamagishi S: Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease J Alzheimer's Dis 16: 845-858, 2009
- 9) 櫻井 孝: 高齢者糖尿病の管理 (血糖管理を中心に). 糖尿病 57: 696-698, 2014
- 10) Whitmer RA et al: Hypoglycemic episodes and risk of dementia in

older patients with type 2 diabetes mellitus, JAMA 301:1565-1572, 2009.

11) 加藤 伸司, 下垣 光, 小野寺 敦志, 他: 改訂長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R) の作成. 老年精神医学雑誌 2 (11): 1339-1347, 1991

12) 玉井 顯: 認知症における高次脳機能検査について. 精神経誌 vol. 111(1) 2009: 93-100

13) 若林茂, 植田由香, 松岡瑛. 各種糖質負荷後のラットの血糖値ならびにインスリン分泌に及ぼす難消化性デキストリンの影響. 日本栄養・食糧学会誌 1993; 46 (2): 131-7.

14) 竹内治男, 佐野淳, 仲村太志. 難消化性デキストリン含有茶飲料のデンプン質食品摂取後の血糖値に及ぼす影響. 健康栄養食品研究 2001; 4 (4): 61-9.

15) 中川致之, 太河原雅晴, 北川雄一郎. 難消化性デキストリン含有緑茶飲料摂取の食後血糖値への影響および長期連続摂取の安全性への影響. 健康栄養食品研究 2003; 6 (1): 81-8.

16) Gerlai R, Millen KJ, Herrup K, et al. Behav Neurosci. 1996; 110: 126-133

17) 櫻井孝: 比較的マイルドな糖尿病管理を行う, Geriatric Medicine Vol50 No. 1 2012-1, pp88-94

18) Sommerfield AJ, Deary LJ, Frier BM, et al: Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 2335-2340, 2004.

19) Cox DJ, Kovatchev BP, Gonder-Frederick LA, et al: Relationships between hyperglycemia and cognitive performance among adults with type 1 and type 2 diabetes. Diabetes Care 28: 71-77, 2005.

20) 河村孝彦: 糖尿病と認知機能障害, 最新医学・72 巻・1 号, 40-46, 2017

- 21) Hirabayashi N, Hata N, Ohara T, et al : Association between diabetes and hippocampal atrophy in elderly Japanese: The Hisayama Study. *Diabetes Care* 39: 1543-1549, 2016.
- 22) Shimizu R, Sakazaki F, Okuno T, et al. Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Biomed Res* 2012; 33: 63-66.
- 23) Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 537-546.
- 24) Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, et al. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 1982; 257: 6084-6088.
- 25) Yamagishi S : AGEs/RAGE and vascular lesions, *J Jpn Coll Angiol*, 2010, 50: 555-559
- 26) Adav SS, Sze SK. Insight of brain degenerative protein modifications in the pathology of neurodegeneration and dementia by proteomic profiling. *Mol Brain*. 2016; 9: 92
- 27) 笠井 高士 : 認知症と糖尿病, 京府医大誌 126 (10), 697~705, 2017
- 28) Ye F, Luo Y, Yu N, et al. Impact of insulin sensitizers on the incidence of dementia: A meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2016; 41: 251-260.
- 29) Rizzo MR, Barbieri M, Boccardi V, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors have protective effect on cognitive impairment in aged diabetic patients with mild cognitive impairment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69: 1122-1131.

30) Craft S, Baker L, Montine T, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch Neurol.* 2012; 69: 29-38.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力・ご助言をいただきました鈴鹿医療科学大学薬学部教授 三輪 高市先生に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力・ご助言をいただきました鈴鹿医療科学大学薬学部 教授 有馬 寧先生、教授 郡山 恵樹先生、准教授 坂 晋先生、助教 古川 絢子先生および諸先生方に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご助言をいただきました社会医療法人居人会 総合心療センターひなが 理事長 藤田 康平先生に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力・ご助言をいただきました社会医療法人居人会 総合心療センターひなが 診療技術部長 浅井 慶介先生、診療技術部 薬剤課長 羽佐田 祥浩先生、同薬剤課の皆様にご協力いただきまして深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、動物実験にご協力いただきました鈴鹿医療科学大学薬学部の卒業生ならび在校生の皆様にご協力いただきまして深く感謝いたします。

Abstract

Research on the effects of hyperglycemia on cognitive function

Introduction

According to the "Study on Future Projections of the Elderly Population with Dementia in Japan," the number of elderly people with dementia as of 2012 is estimated to be approximately 4.62 million. It is also estimated that by 2025, one in five persons aged 65 and over, or approximately 7 million people, will have dementia, and the number of people with dementia is expected to further increase in the future.

In recent years, it has been pointed out that cognitive decline associated with poor glycemic control and diabetes mellitus (DM) are risk factors for Alzheimer's disease (AD) and other forms of dementia. In the Hisayama-cho study of subjects aged 65 years and older, diabetics were reported to have significantly smaller hippocampal volume than non-diabetics, and various studies have been conducted on the relationship between DM and dementias. In addition, Advanced Glycation End Products (AGEs) are thought to be involved in the development of dementia due to DM. However, the details of the mechanism of DM-induced dementia onset are unknown. Our laboratory has been conducting research to elucidate the mechanism of DM-induced dementia. To examine the effects of hyperglycemia and DM on cognitive function and the hippocampus, we conducted both clinical and basic research on the relationship between hyperglycemia and cognitive function in patients and the effects of hyperglycemia on cognitive function and the brain using animal models.

Chapter 1. Investigation of the relationship between hyperglycemia and cognitive function

In Chapter 1, we investigated the effects of hyperglycemia on cognitive function in psychiatric patients. A total of 401 patients (male: 188, female: 213) aged 65 years or older were studied retrospectively by electronic medical records, with 125 patients (male: 61, female: 64) included in the analysis. Among these patients, HbA1c values and cognitive function in the non-DM and DM groups were evaluated using the HDS-R for AD patients (39 patients). The results showed significantly higher HbA1c levels and significantly lower mean HDS-R scores in the DM group compared to the non-DM group, suggesting cognitive decline due to hyperglycemia. Of the nine items of the HDS-R, "delayed replay of 3 words," which assesses hippocampal function, showed a decreasing trend in the DM group compared to the non-DM group, suggesting that hyperglycemia

also affects the hippocampus. This suggests that hyperglycemia may cause atrophy of the hippocampus, leading to cognitive decline.

Chapter 2. Effects of glucose loading groups on cognitive function in mice

To verify the discussion of "cognitive function decline due to hyperglycemia" obtained from Chapter 1, we examined the effects of a glucose tolerance test on cognitive function and brain tissue (hippocampus) using mice. The test animals were 3-week-old male ddY mice, which were divided into a Control group and a glucose loading group, and glucose loading with Maltodextrin solution at concentrations of 10%, 20%, and 30% for 90 days. Body weight and blood glucose levels increased over time, with significant increases in both body weight and blood glucose levels in the 20% glucose load group compared to the Control group. Behavioral pharmacological tests (Locomotor activity test, rotor rod test, and eight-way maze test) were further examined only in the 20% glucose loading group, which had the greatest impact on body weight and blood glucose levels. The results showed no difference in spontaneous locomotion between the Control and 20% glucose loading groups, but a decrease in cognitive function was observed in the 20% glucose loading group compared to the Control group in the rotor rod test and the eight-way maze test. In the hippocampus, CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus regions also showed significant shrinkage at 20% glucose loading group compared to Controls. The concomitant presence of hippocampal atrophy and cognitive decline in behavioral pharmacology tests suggests that hyperglycemia may cause hippocampal atrophy, which in turn may induce cognitive decline. This result was considered to support the discussion obtained in Chapter 1.

Chapter 3. Relationship between Hippocampal Atrophy and AGEs

The results up to Chapter 2 also suggested the possibility that "hyperglycemia causes hippocampal atrophy, leading to cognitive decline. In Chapter 3, we created a mouse model of hyperglycemia based on previous studies and examined the effects of hyperglycemia on cognitive function and the hippocampus. The animal model was tested using C57BL/6J (7-week-old) mice. Nicotinamide (NA) and streptozotocin (STZ) were administered intraperitoneally prior to the glucose loading group. The animals were then divided into Control and STZ groups (Maltodextrin solution: 1%, 5%, and 20%) and kept for 4 months. There was no difference in body weight in the glucose loading group compared to the Control, but there was a significant increase in blood glucose levels in the 1% glucose loading group compared to the Control. Behavioral pharmacology testing was limited to the 1% glucose loading group, which showed a significant increase in blood glucose levels. Behavioral pharmacology testing was limited to the 1% glucose loading group, which showed a significant

increase in blood glucose levels. There was no difference in spontaneous locomotor activity between the Control and glucose-loaded groups. Cognitive decline was observed in the 1% glucose loading group compared to the Control group in the rotor-rod test and the eight-way maze test. In the hippocampus, each region (CA1, CA2, CA3, and dentate gyrus) showed significant shrinkage in the 1% glucose loading group compared to the Control group, and AGEs were also observed in the brain. This suggests that hyperglycemia may cause hippocampal atrophy, leading to cognitive decline. The formation of AGEs in the brain was also observed, suggesting that hippocampal atrophy and AGEs may be related. These results suggest that the mouse model created in Chapter 3 can be evaluated as a hyperglycemia model mouse and support the possibility that "hyperglycemia causes cognitive decline" as described in Chapters 1 through 2.

Conclusion

Through this study, it was suggested that hyperglycemia causes hippocampal atrophy, leading to cognitive decline, and that the formation and accumulation of AGEs may be associated with hippocampal atrophy. Persistence of this hyperglycemia may lead to development of AD and other dementias. Therefore, the fact that hyperglycemia, a preliminary stage of DM, causes cognitive decline may help elucidate the mechanism of DM-induced dementia onset. Based on the results of this study, we would like to continue our research to help elucidate the mechanism of DM-induced dementia onset.