

平成 28 年度 博士学位論文

論題

アルツハイマー病モデルラットを
用いた酸棗仁湯の睡眠障害および
空間記憶障害改善作用

指導教授 岩崎 克典

福岡大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

学籍番号 PD131006

氏名 森山 博史

目次

緒言	・・・1
第1章 アルツハイマー病モデルラット (Cerebral Ischemia : CI, β -amyloid : A β ; CI+A β) を用いた睡眠障害の検出	・・・3
第1節 脳波測定による睡眠時間の検討	
1. 実験材料ならびに実験方法	
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. 脳虚血モデル作製方法	
1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術	
1.2.3. 脳波電極取り付け手術	
1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度	
1.2.5. A β 凝集体の調整方法	
1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順	
1.3. 脳波測定ならびに解析	
1.3.1. 脳波測定装置	
1.3.2. 脳波解析の手順	
1.4. 睡眠評価手順	
1.5. 統計処理	
2. 実験結果	
第2節 脳波測定による覚醒－睡眠サイクルの変化に関する検討	・・・16
1. 実験材料ならびに実験方法	
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. 脳虚血モデル作製方法	
1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術	
1.2.3. 脳波電極取り付け手術	
1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度	

- 1.2.5. A β 凝集体の調整方法
- 1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順
- 1.3. 脳波測定ならびに解析
 - 1.3.1. 脳波測定装置
 - 1.3.2. 脳波解析の手順
- 1.4. 睡眠評価手順
- 1.5. 統計処理

2. 実験結果

第3節 脳波測定による睡眠の質の検討 ・・・20

- 1. 実験材料ならびに実験方法
 - 1.1. 実験動物ならびに飼育方法
 - 1.2. 実験手続き
 - 1.2.1. 脳虚血モデル作製方法
 - 1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術
 - 1.2.3. 脳波電極取り付け手術
 - 1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度
 - 1.2.5. A β 凝集体の調整方法
 - 1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順
 - 1.3. 脳波測定ならびに解析
 - 1.3.1. 脳波測定装置
 - 1.3.2. 脳波解析の手順
 - 1.4. 睡眠評価手順
 - 1.5. 統計処理

2. 実験結果

考察 ・・・23

第2章 CI+A β ラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果 ・・・25

第1節 CI+A β ラットの覚醒－睡眠時間の変化に対する酸棗仁湯の効果

- 1. 実験材料ならびに実験方法

- 1.1. 実験動物ならびに飼育方法
- 1.2. 実験手続き
 - 1.2.1. 脳虚血モデル作製方法
 - 1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術
 - 1.2.3. 脳波電極取り付け手術
 - 1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度
 - 1.2.5. A β 凝集体の調整方法
 - 1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順
- 1.3. 脳波測定ならびに解析
 - 1.3.1. 脳波測定装置
 - 1.3.2. 脳波解析の手順
- 1.4. 睡眠評価手順
- 1.5. 使用薬物と調製および投与方法
- 1.6. 統計処理

2. 実験結果

第2節 CI+A β ラットの覚醒-睡眠サイクルの変化に対する酸棗仁湯の効果 . . . 28

1. 実験材料ならびに実験方法
 - 1.1. 実験動物ならびに飼育方法
 - 1.2. 実験手続き
 - 1.2.1. 脳虚血モデル作製方法
 - 1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術
 - 1.2.3. 脳波電極取り付け手術
 - 1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度
 - 1.2.5. A β 凝集体の調整方法
 - 1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順
 - 1.3. 脳波測定ならびに解析
 - 1.3.1. 脳波測定装置
 - 1.3.2. 脳波解析の手順
 - 1.4. 睡眠評価手順
 - 1.5. 使用薬物と調製および投与方法
 - 1.6. 統計処理

2. 実験結果

第3節 CI+A β ラットの睡眠の質の変化に対する酸棗仁湯の効果 . . . 31

1. 実験材料ならびに実験方法
 - 1.1. 実験動物ならびに飼育方法
 - 1.2. 実験手続き
 - 1.2.1. 脳虚血モデル作製方法
 - 1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術
 - 1.2.3. 脳波電極取り付け手術
 - 1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度
 - 1.2.5. A β 凝集体の調整方法
 - 1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順
 - 1.3. 脳波測定ならびに解析
 - 1.3.1. 脳波測定装置
 - 1.3.2. 脳波解析の手順
 - 1.4. 睡眠評価手順
 - 1.5. 使用薬物と調製および投与方法
 - 1.6. 統計処理

2. 実験結果

考察 . . . 34

第3章 CI+A β モデルラットの空間記憶障害の検出および酸棗仁湯の空間記憶障害に対する作用 . . . 36

第1節 水迷路課題を用いた空間記憶障害の検出

1. 実験材料ならびに実験方法
 - 1.1. 実験動物ならびに飼育方法
 - 1.2. 実験手続き
 - 1.2.1. 脳虚血モデル作製手順
 - 1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術手順
 - 1.2.3. A β 凝集体の調整方法
 - 1.2.4. 脳虚血および A β 投与方法
 - 1.2.5. 実験装置ならびに実験手続き
 - 1.2.6. 空間記憶の獲得方法

1.2.7.	空間記憶の保持の評価	
1.3.	統計処理	
2.	実験結果	
第2節	CI+A β ラットの空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果	・・・41
1.	実験材料ならびに実験方法	
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.2.1.	脳虚血モデル作製手順	
1.2.2.	ガイドカニューレ埋め込み手術手順	
1.2.3.	A β 凝集体の調整方法	
1.2.4.	脳虚血および A β 投与方法	
1.2.5.	実験装置ならびに実験手続き	
1.2.6.	空間記憶の獲得方法	
1.2.7.	空間記憶の保持の評価	
1.3.	使用薬物と調製および投与方法	
1.4.	統計処理	
2	実験結果	
考察		・・・44
第4章	睡眠障害および空間記憶障害に対する酸棗仁湯の改善作用機序解明	・・・45
第1節	ELISA 法を用いた前頭前野の GABA 発現量に対する酸棗仁湯の効果	
1.	実験材料ならびに実験方法	
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.3.	実験装置ならびに実験手続き	
1.3.1.	ELISA 法	
1.3.1.1.	脳組織の摘出	
1.3.1.2.	タンパク質濃度測定	
1.3.1.3.	ELISA 法を用いた前頭前野における GABA 濃度測定	

1.4.	統計処理	
2	実験結果	
第2節	Western blotting 法を用いた海馬コリンアセチルトランスフェラーゼ発現量に対する酸棗仁湯の効果	・・・49
1.	実験材料ならびに実験方法	
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.3.	実験装置ならびに実験手続き	
1.3.1.	Western blotting 法	
1.3.1.1.	脳組織の摘出	
1.3.1.2.	タンパク質濃度測定	
1.3.1.3.	SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)	
1.3.1.4.	転写	
1.3.1.5.	抗体処理	
1.3.1.6.	免疫化学発色法	
1.4.	統計処理	
2.	実験結果	
考察		・・・56
総括		・・・58
結論		・・・60
参考文献		・・・61
謝辞		・・・68

緒言

認知症患者数は2012年の時点で全国に約462万人と推計されており、2025年には700万人を超えることが厚生労働省によって推計されている。認知症患者の約50%は、アルツハイマー型認知症（Alzheimer-type dementia: ATD）患者であり、その割合は最も多い。ATDの症状には記憶障害や見当意識障害などの中核症状と、不眠や不安、妄想、幻覚、徘徊、抑うつ症状などの行動・心理症状（behavioral and psychological symptoms of dementia : BPSD）が周辺症状として認められる⁽¹⁾。BPSDの中でも不眠や昼夜の逆転などの睡眠に関する障害は高頻度に認められ、患者のQuality of Life (QOL)の著しい低下を招くことから、睡眠障害は介護現場において深刻な問題となることが多い。睡眠障害の発現は高齢者において約30%に達する⁽²⁾。ATDでは約40%に夜間の睡眠障害が認められる⁽³⁾。睡眠・覚醒リズムの変化では、健常高齢者とくらべATDでは中途覚醒が増加し、再入眠までの時間が長くなる。これら夜間の睡眠障害は、認知症が進行し重症化するほど高度になる。

睡眠障害は、認知症のリスクファクターになることが報告され始めている。睡眠時無呼吸症候群（sleep apnea syndrome : SAS）があると、（約4～7年間で）軽度認知障害・認知症を発症するオッズ比が1.85となることが報告されている⁽⁴⁾。また、大規模コホート研究では、睡眠不足が認知症発症リスクの増加と相関することが認められている⁽⁵⁾。さらに、アクチグラフで測定された睡眠の断片化とATD発症リスクが関連することも報告されている⁽⁶⁾。これらのことから、ATDを含めた認知症のリスクファクターとなる睡眠障害を改善することは、認知症の予防ないし進行の抑制という観点においても重要である。

ベンゾジアゼピン系薬物は一般的な睡眠障害に対して使用されているが、ATD患者の睡眠障害への使用に関しては、患者の大半が高齢者であるため、薬効の持ち越し効果や前向き健忘の症状、ふらつき、日昼の眠気、および筋弛緩作用による転倒・骨折などの副作用を伴うことが多い⁽⁷⁾。中でも骨折は寝たきり状態を招くおそれがあり、認知機能がさらに悪化する可能性が高い。このように、睡眠障害を伴うATD患者にはベンゾジアゼピン系薬物を用いることに問題がある。ATDの睡眠障害に対して用いられる抗うつ薬の一つにトラゾドンがある。これはベンゾジアゼピン系薬物と比べ副作用は少ないが、同時に催眠作用の減弱といったデメリットもある⁽⁸⁾。また、ATDの治療薬として使用されるコリンエステラーゼ阻害薬のドネペジルにも不眠、悪夢を惹起する可能性があることから、これを服用している患者に睡眠障害改善薬を処方される確率が増加する。従って、このようなケースでは転倒・骨折の危険度もさらに増加する危険性がある⁽⁹⁾。以上のことから、ATD患者の睡眠障害に対する治療満足度は低く、ATD患者の認知機能を増悪させない睡眠障害改善薬を探索する必要がある。

認知機能への悪影響を回避し睡眠障害を改善するという観点から漢方方剤の応用が考えられる。その中でも著者は酸棗仁湯に着目した。酸棗仁湯は不眠症に用いられる代表的な漢方方剤であり、本品7.5g中、酸棗仁（10.0g）、茯苓（5.0g）、知母（3.0g）、川芎（3.0g）、

甘草 (1.0 g) の割合の混合生薬の乾燥エキス 3.25 g を含有している。臨床・非臨床研究において酸棗仁湯が睡眠障害に対して有効であることが示されており⁽¹⁰⁻¹²⁾, さらにラットの睡眠剥奪ストレスによる空間記憶障害に対しても改善効果を示すことが報告されている⁽¹²⁾. これらのことから、酸棗仁湯は、睡眠障害改善に加え、認知機能改善作用を有することが考えられ、酸棗仁湯は ATD の睡眠障害と認知機能障害に対して効果が期待されるが、その検討は未だされていない。

ATD 患者脳では、amyloid- β ($A\beta$) の蓄積が顕著に認められることから、 $A\beta$ がその病因物質として考えられている。また、ATD 患者の多くは脳血管障害を併発していることから⁽¹³⁾, 当研究室では ATD 動物モデルとして全脳虚血処置 (CI : Cerebral Ischemia) と $A\beta$ を脳室内に投与した CI+ $A\beta$ モデルを作製し、薬効評価に用いてきた⁽¹⁴⁾. しかし、このモデルが睡眠障害を呈するかは明らかではない。

以上のことから、本稿では、ATD モデルにおける睡眠障害ならびに認知機能障害に対する酸棗仁湯の効果とその作用機序解明を目的として、第 1 章では CI+ $A\beta$ モデルの睡眠障害が ATD の睡眠障害を反映したモデルであるか脳波測定により行った。第 2 章では睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果を検討した。第 3 章では、本モデルの空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果を検討した。第 4 章では、空間記憶障害および睡眠障害に対する酸棗仁湯の改善作用機序の検討を行った。

第1章 アルツハイマー病モデルラット (Cerebral Ischemia : CI, β -amyloid : A β ; CI+A β) を用いた睡眠障害の検出

ATD 患者の主な睡眠障害は、夜間における睡眠時間 (特に Non-Rapid eye movement: NREM 睡眠) の短縮, 中途覚醒の増加, 入眠時間の延長および熟眠障害などがあげられる⁽¹⁵⁾. 様々な遺伝子改変 ATD モデルマウスでは, NREM 睡眠量減少^(17,18), Rapid eye movement: REM 睡眠量減少⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, 中途覚醒増加^(16,19), REM 睡眠時の θ 波占有率減少⁽¹⁷⁾ が認められている. しかし, 熟眠障害に関しては未検討である. そこで, 本章では当研究室で作成した ATD モデルラット (CI+A β モデルラット) の脳波解析を行い, 睡眠時間や中途覚醒に加え, 熟眠の指標である δ 波を評価項目とし, ATD 患者の睡眠障害との比較解析を行った.

第1節 脳波測定による睡眠時間の検討

ATD 患者で認められる睡眠障害の中で、夜間の睡眠時間減少が最も多い⁽¹⁵⁾. 齧歯類では夜間は活動期 (暗期 : 19:00-7:00) となり, 昼間は非活動期 (明期 : 7:00-19:00) となるため, 各ステージにおける CI+A β モデルラットの脳波を解析し, 覚醒, NREM 睡眠および REM 睡眠の時間を検討した.

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物は, 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 300-350g : 九動) を用いた. ラットはプラスチックケージ (30×35×17 cm) 中に 4-5 匹収容し, 室温 23±2°C, 絶対湿度 60±2%, および 12 時間の明暗サイクル (AM7:00 点灯/PM7:00 消灯) の環境で飼育した. なお, 餌 (CE-2 ; 日本クレア) および水は自由に摂取できるようにした. 実験動物の取り扱いについては, 福岡大学動物実験委員会 (Experimental animal care and use committee) による動物実験倫理規定に準じた (承認番号: 1303643, 1503812) .

1.2. 実験手続き

1.2.1. 脳虚血モデル作製方法

Pulsinelli and Bireley らの方法⁽²⁰⁾ に従い, pentobarbital sodium (東京化成) 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下で, ラットを背位に固定し腹側頸部の皮膚を切開し, 両側総頸動脈を露出した. 後日に血管をクリップで挟むため, 周囲の組織から血管を剥離し, 糸を輪状に装着後, 皮膚を縫合した (図 1). 続いて, 脳定位固定装置 (Narishige Scientific Instrument Lab : SR-5R) に腹位に固定し, 背側頸部の皮膚および筋肉層を切開して, 第一頸椎を露出した. 双極性凝固器 (MICRO-CD : 瑞穂医科工業製) を用い第一頸椎の両側にある alar foramina から脳底部へ上行している頸骨動脈を両側性に電気焼灼切断し, その後皮膚を縫合した. 偽手術

群は両側椎骨動脈を電気焼灼し，総頸動脈を露出するだけの操作を行った。

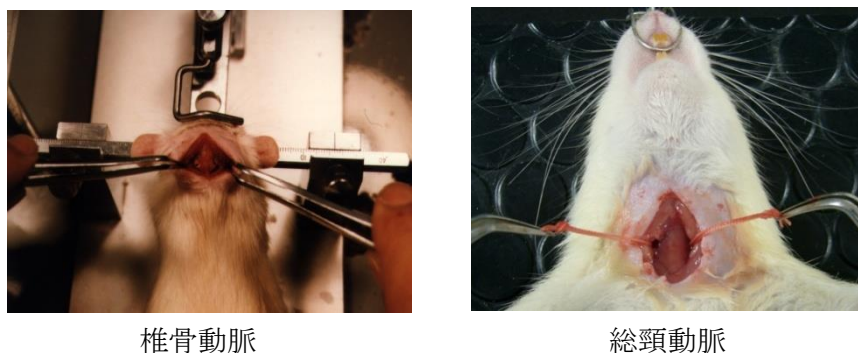


図1 脳虚血モデルの作製

1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術

脳虚血モデル作製に引き続き，Paxinos and Watson の脳図譜⁽²¹⁾に従い側脳室 (A: -0.8, L: ± 1.3 , D: +3.8) に長さ 13 mm の内径 22 ゲージのステンレススチール製のガイドカニューレを埋め込み (図 2)，これを歯科用セメント (クイックレジン，松風) で固定した。歯科用セメントが完全に乾いた後，頭皮を縫合した。ガイドカニューレには，13 mm の内径 28 ゲージのダミーカニューレをはめ込んだ。

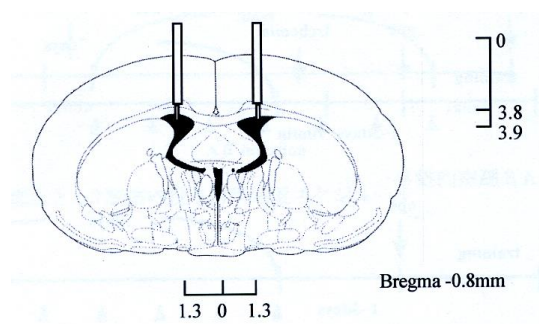


図2 ガイドカニューレ挿入部

1.2.3. 脳波電極取り付け手術

電極の留置手術は大阪バイオサイエンス研究所の方法⁽²²⁾を参考にした。ガイドカニューレ留置手術に引き続き、Paxinos and Watson の脳図譜⁽²³⁾に従って、左前頭葉皮質および右頭頂葉皮質 (A: -3.6, L: +2.0) に電動ドリルで穴を開け、脳波電極ネジ (AN-3; エイコム) を設置した。脳波電極ネジの深度は、2回転埋め込んだ位置とした (図4)⁽²⁴⁾。続いて、筋電図コード (ユニークメディカル) を左頸部筋に2本挿入した (図3)。各電極は電極ソケット (バイオテックス) にハンダ付けをして接続し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。

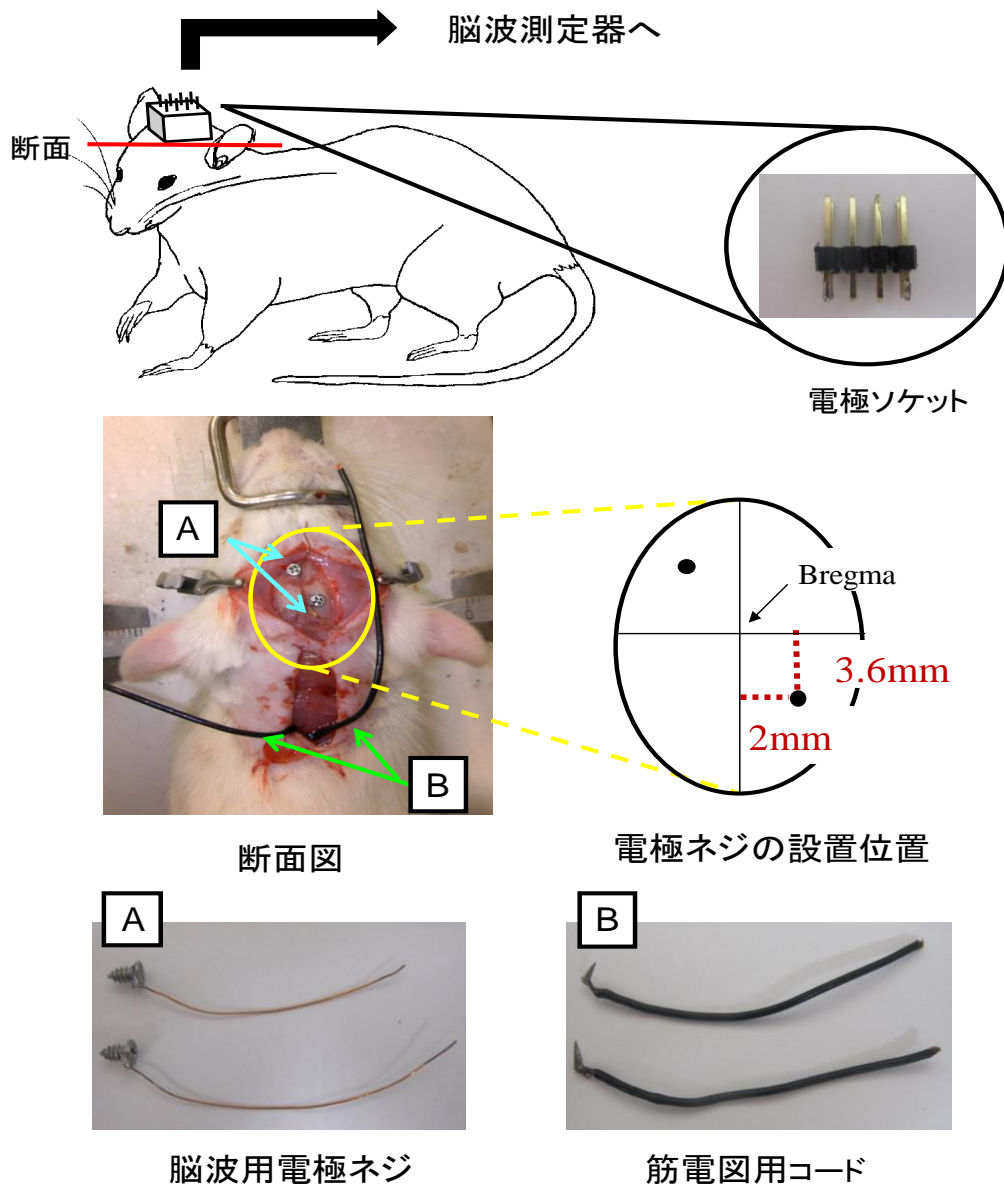


図3 脳波および筋電図電極の取り付け位置と器材

1.2.4. 脳波電極用ネジの設置深度

電気ドリルで左前頭葉皮質および右頭頂葉皮質の頭蓋骨に穴を開け、脳波電極ネジを挿入した位置を基準とし、そこから2回転埋め込んだ位置とした。

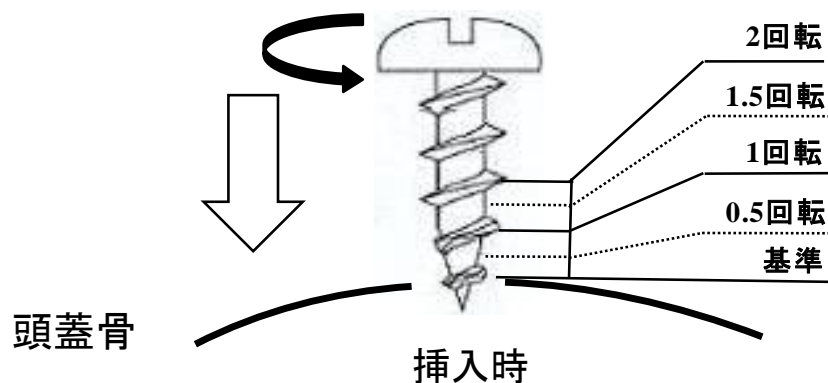


図4 脳波電極ネジの設置深度

1.2.5. A β 凝集体の調整方法

β -amyloid 1-42 (MW=4515.1, ANASPEC Inc) 0.5 mg を 111 μ L の HEPES buffer saline (Fluka) に溶解し (1 mM), 37°C の incubator に入れて7日間静置した。その後、HEPES buffer saline で希釈し (1 mM \rightarrow 30 μ M), -80°C で保存した。使用時に解凍し実験に用いた。

1.2.6. CI+A β モデルラット作製手順

両側総頸動脈にかけてある糸を使って、血管を露出し、クリップで血管を挟み、10分間の脳虚血を行った。正向反射消失を示したラットのみ、虚血されたものとして、以後の実験に使用した。血流再開直後に1回目のA β の投与を行った。翌日からは1日1回、計7回(7日間)の投与を行った。ガイドカニューレの先端より1mm長くした内径28ゲージのステンレスカニューレをはめ込み、ポリエチレンチューブ(427406(PE20): Becton Dickinson)に接続したマイクロシリンジ(25 μ L: HAMILTON)で、マイクロインジェクションポンプ(CMA/100)を用いて1 μ L/minの流速でA β 投与を行った。A β は、1回につき10 μ Lずつ両側の脳室内に計20 μ L(600 pmol)を投与した。

1.3. 脳波測定ならびに解析

1.3.1. 脳波測定装置

実験動物をチャンバー内のケージで飼育し、有線コードを通して脳波および筋電図を、また同時に測定時の動物の挙動を示す画像を記録した(図5)。外界からの音による影響を軽減するために、ホワイトノイズをチャンバー内に発生させた。また、1秒毎の測定回数をあらかず Sampling rate を 256 Hz に、検出感度 (Sensitive) を 100 V/ μ V に設定した(表1)。

実験動物の術後回復期間を1週間以上設け、測定開始時間の約12時間前にホームケージからチャンバー内のケージへ実験動物を移動させた。測定はAM7:00から24時間行った(図8)。実験動物の脳波測定及び映像撮影は脳波解析研究用ソフト Sleep Sigh® Ver2.0 (KISSEI COMTEC) に付属する Viral Recorder 及び Video option を使用した。なお、測定中の餌および水は自由に摂取できるようにした。

表1 脳波測定の設定条件

Sampling rate	256 Hz
Sensitive	100 V/ μ V



図5 脳波測定装置

1.3.2. 脳波解析の手順

脳波 (Electroencephalogram : EEG) による覚醒/睡眠パターンの解析は臨床で睡眠障害の診断に利用される。睡眠は NREM 睡眠と REM 睡眠に大きく分けられる。NREM 睡眠は睡眠の大部分を占める睡眠深度の深い眠りで、脳の活動が低下した状態の睡眠である。また、REM 睡眠は NREM 睡眠から覚醒に移行する時に多く観察され、脳が活動状態にあり、筋肉が弛緩した状態の睡眠である。脳波は多数の神経細胞から誘起された活動電位であり、この解析を行うことで脳の活動をおおよそ把握する事ができる。通常、ヒトの睡眠の評価時には、頭蓋骨と頭皮を介した頭皮上脳波を記録することが多い⁽²⁵⁾。覚醒時には α 波 (8 -13 Hz)、 β 波 (13-30 Hz)、睡眠時には δ 波 (0.5-4Hz)、 θ 波 (4-8 Hz)、spindle (紡錘) 波形 (10-16Hz) といった特異的な周波数帯を持つ脳波が出現することが知られており、これを指標として覚醒/睡眠パターンが解析される⁽²⁶⁾。

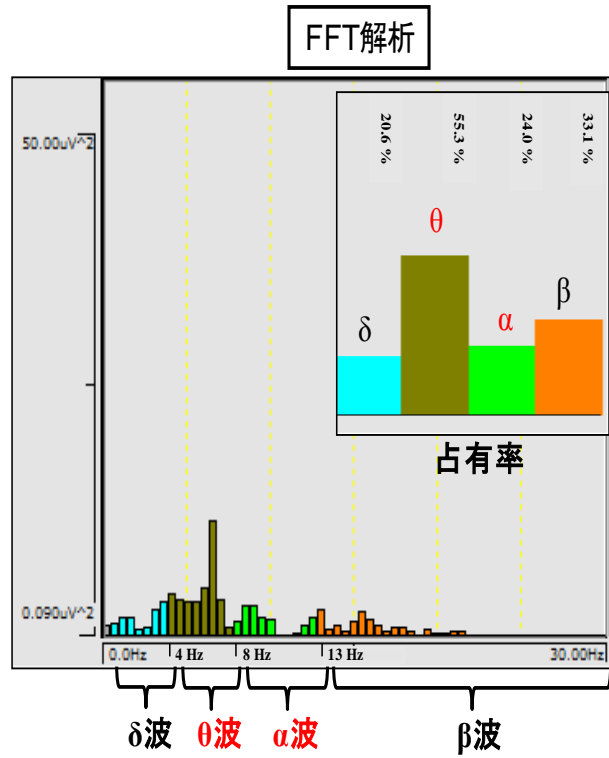
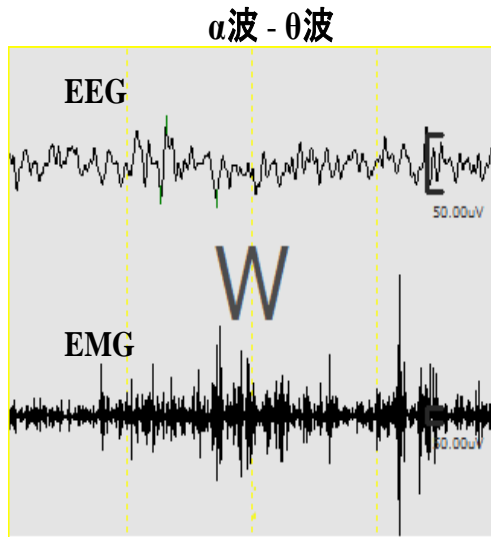
動物の睡眠を評価する場合は、電極脱落の可能性や睡眠体位の違いから、ヒトと同様な頭皮上脳波の測定は困難である。そのため、脳皮質表面および脳深部から脳蓋内脳波を測定し、同時に筋肉の活動電位を記録する筋電図 (Electromyography : EMG) を測定することで評価を行った。動物もヒトと同様に、覚醒時や各睡眠ステージに特有の周波数を持った脳波が観察され、覚醒および NREM 睡眠、REM 睡眠を評価することが出来る。大脳皮質表面電極を用いた場合には、覚醒時に α 波および θ 波の出現と筋電図の大きな変動が観察され、NREM 睡眠時に δ 波、spindle 波形と筋電図の中程度の変動が、REM 睡眠時には θ 波の優位な出現と筋電図の非常に小さな変動が観察される⁽²⁷⁾。

脳波測定法および解析基準は Nagao らの方法を参考にした⁽²⁸⁾。測定した 24 時間の脳波および筋電図の解析は、睡眠解析用プログラムソフトの Sleep Sign® Ver2.0 (KISSEI COMTEC) を用いた。睡眠を判定する時間の単位を epoch と呼び、1 epoch あたりの時間を 4 秒とした。特徴的な脳波周波数帯の占有率と筋電図ならびに動画から、epoch ごとに、覚醒 (Wake)、NREM、REM のステージに判別した (図 6、7)。脳波及び筋電図は、生体信号として必要な周波数帯だけを識別するために、フィルタ処理 (High pass フィルタ : 60 Hz, Low pass フィルタ : 0.5 Hz) をした。表 2 に示すように、 α 波や θ 波の優位な出現と大きな筋電図の変動が観察される epoch を覚醒、spindle 波形や δ 波が優位に出現し中程度の筋電図の変動が観察される epoch を NREM、 θ 波の優位な出現とおよび小さな筋電図の変動が観察される epoch を REM とした。周波数帯の解析は epoch ごとに高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform : FFT) を行い、1 epoch あたりの占有率を求めた (図 6、7)。

表2 各ステージ判定の基準

判定ステージ	EEG	EMG
覚醒 (Wake)	α 波 (8-13 Hz) θ 波 (4-8 Hz)	大
NREM	spindle 波形 (12-16 Hz) δ 波 (0.5-4 Hz)	中
REM	θ 波 (4-8 Hz)	小

【WAKE】



【REM】

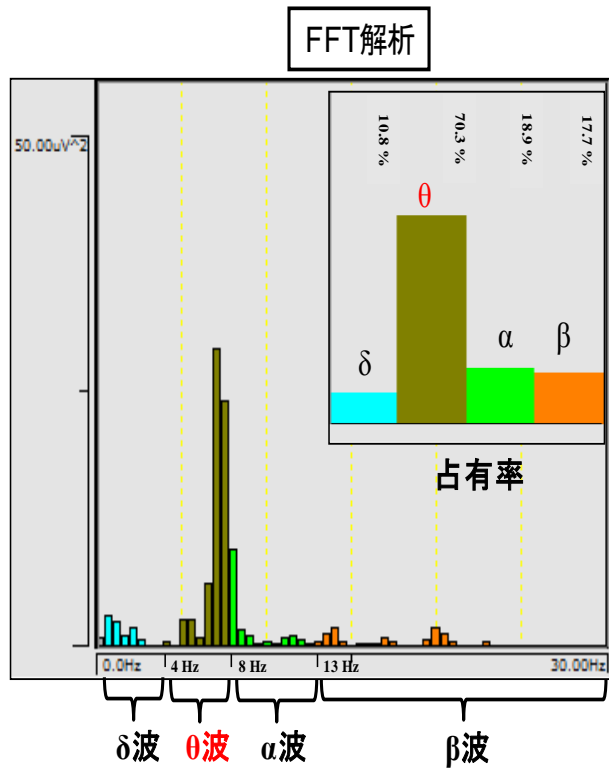
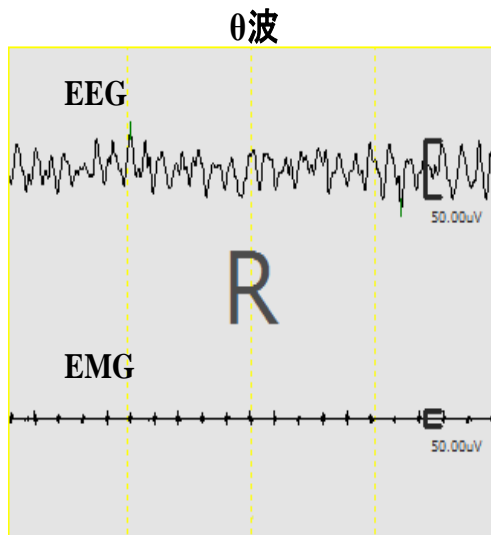
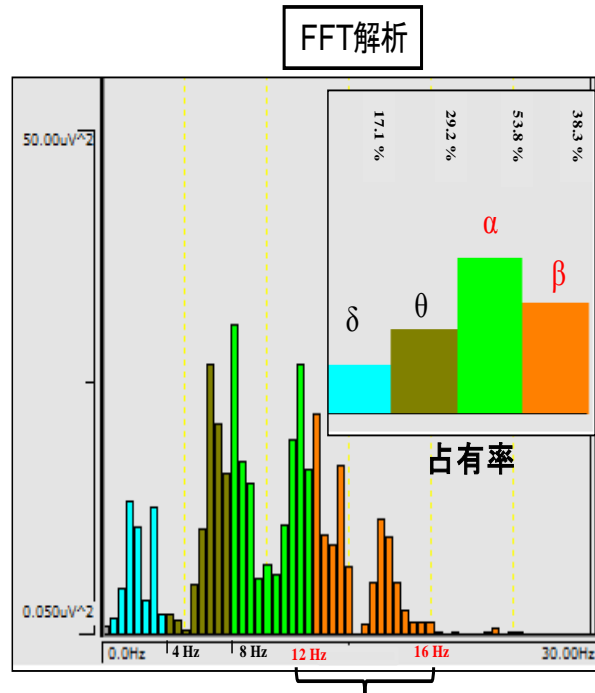
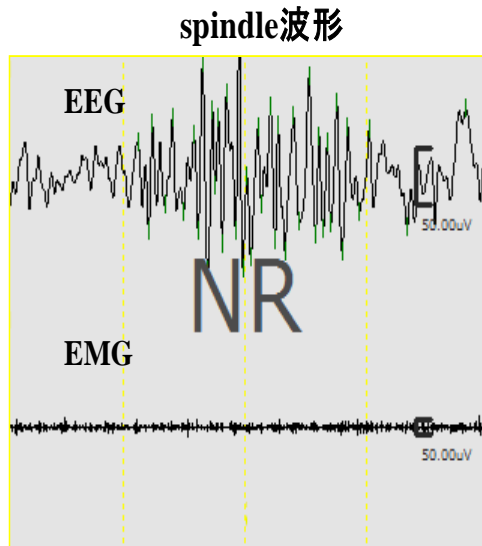
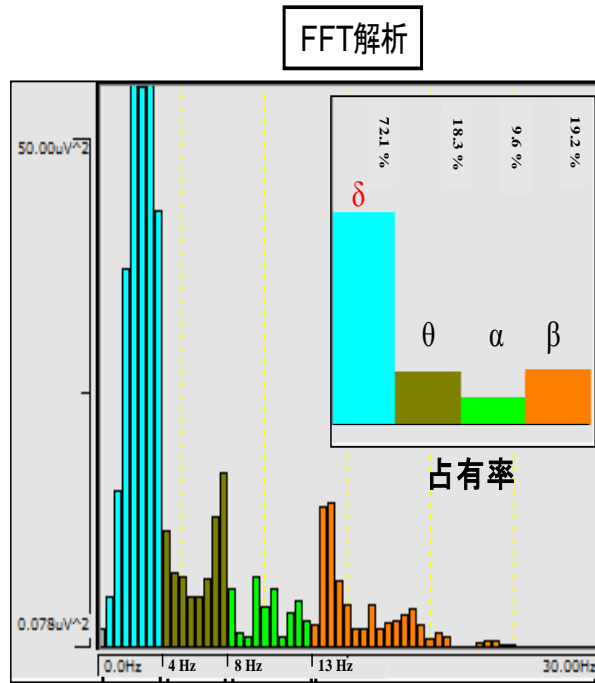
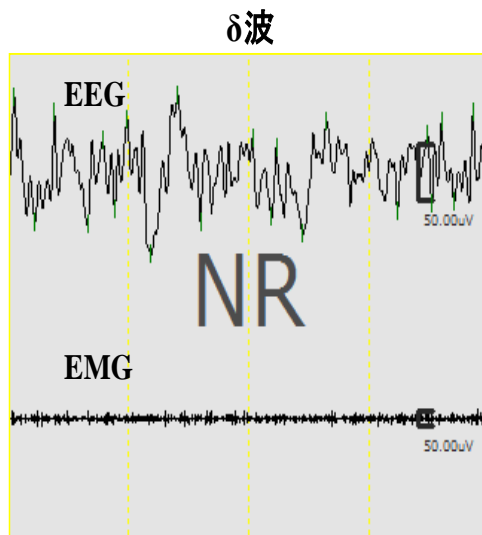


図 6 WAKE, REM 睡眠の特徴的な波形

【NREM】



spindle
波形



δ波 θ波 α波 β波

図 7 NREM 睡眠の特徴的な波形

1.4. 睡眠評価手順

A β 投与開始から、28 日目に脳波ならびに筋電図の記録を行った (図 8)。各ステージ (覚醒, NREM, REM) の 1 時間毎の推移と積算時間 (Total time) をそれぞれ算出し, 偽処置 (Sham) 群と CI+A β 群とで比較した。

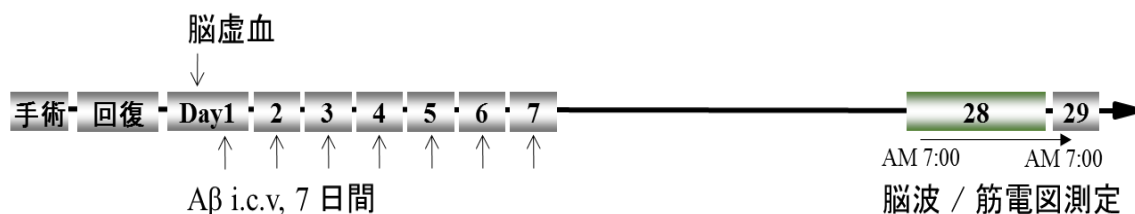


図 8 実験スケジュール

1.5. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理には, Mann-Whitney's U-test を使用した。なお, 危険率が 5%以下だった場合を統計学的に有意差が有るものとみなし, また危険率が 10%以下だった場合を差のある傾向とみなした。

2. 実験結果

2.1.1. 覚醒積算時間の変化

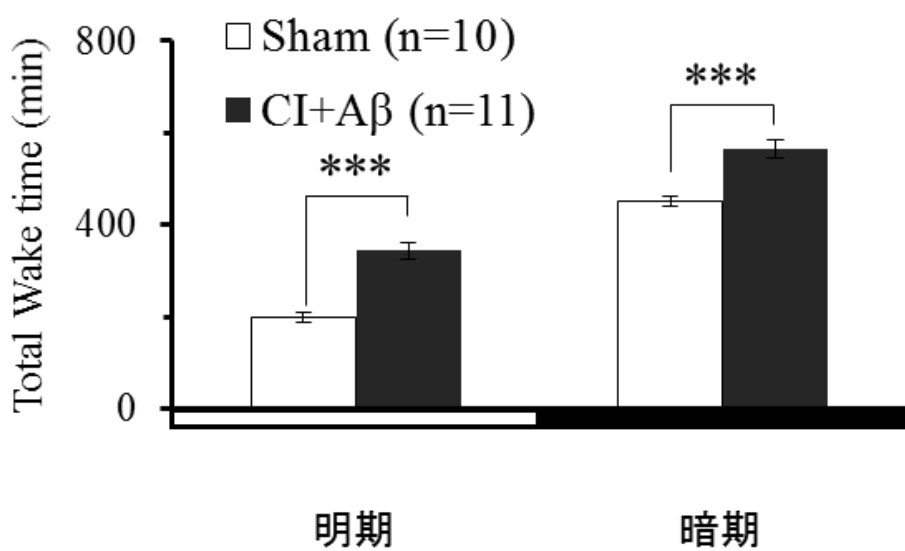
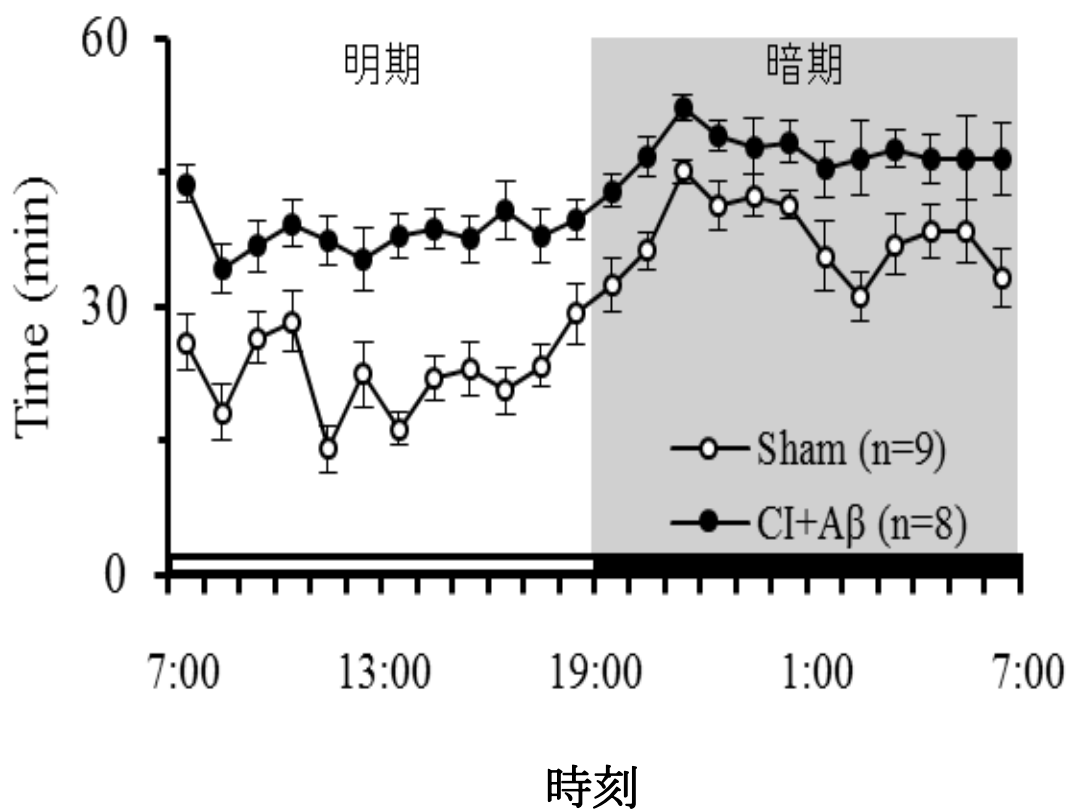
Sham 群ならびに CI+A β 群は, 明期に比べ暗期での覚醒時間が長かった。CI+A β 群では, Sham 群と比べ明期, 暗期ともに覚醒積算時間が有意に延長した (図 9)。

2.1.2. NREM 睡眠における積算時間の検討

Sham 群では, 明期に比べ暗期の NREM 睡眠時間の減少が認められたが, CI+A β 群では明期と暗期間の NREM 睡眠時間に変化は認めにくかった。CI+A β 群では, Sham 群と比べ明期, 暗期ともに NREM 睡眠積算時間が有意に短縮した (図 10)。

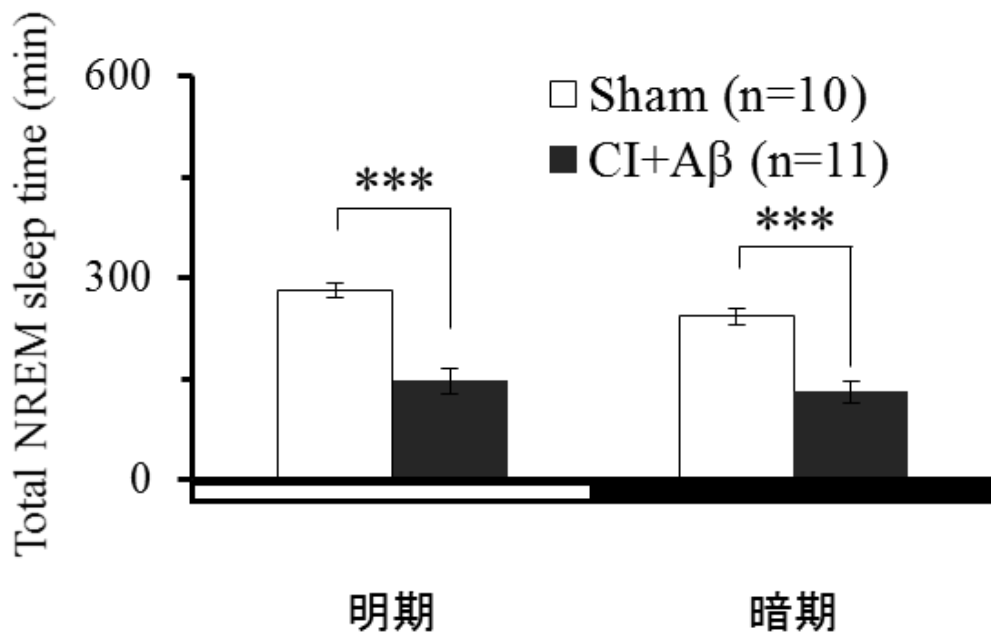
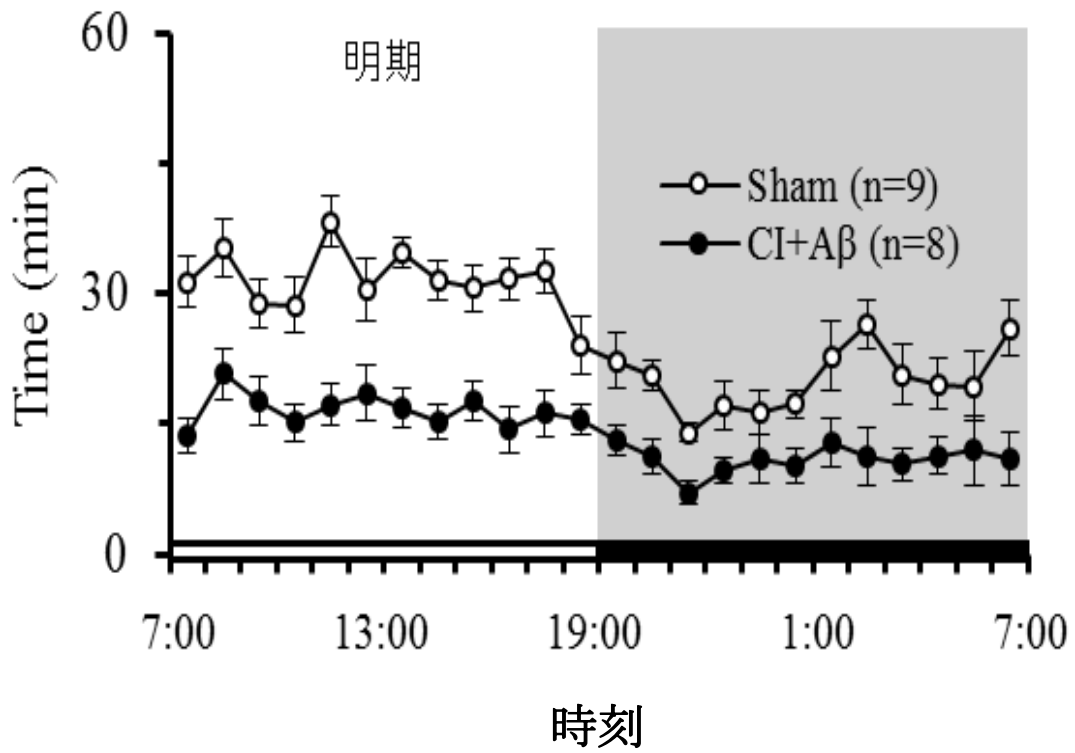
2.1.3. REM 睡眠における積算時間の検討

Sham 群ならびに CI+A β 群は, 明期に比べ暗期での REM 睡眠時間は少なかった。CI+A β 群は Sham 群と比べ明期, 暗期ともに REM 睡眠積算時間に有意な差はなかった (図 11)。



*** $p < 0.001$ vs Sham, followed by Mann-Whitney's U-test

図 9 覚醒の 1 時間ごとの推移と積算値



*** $p < 0.001$ vs Sham, followed by Mann-Whitney's U-test

図 10 NREM 睡眠の 1 時間ごとの推移と積算値

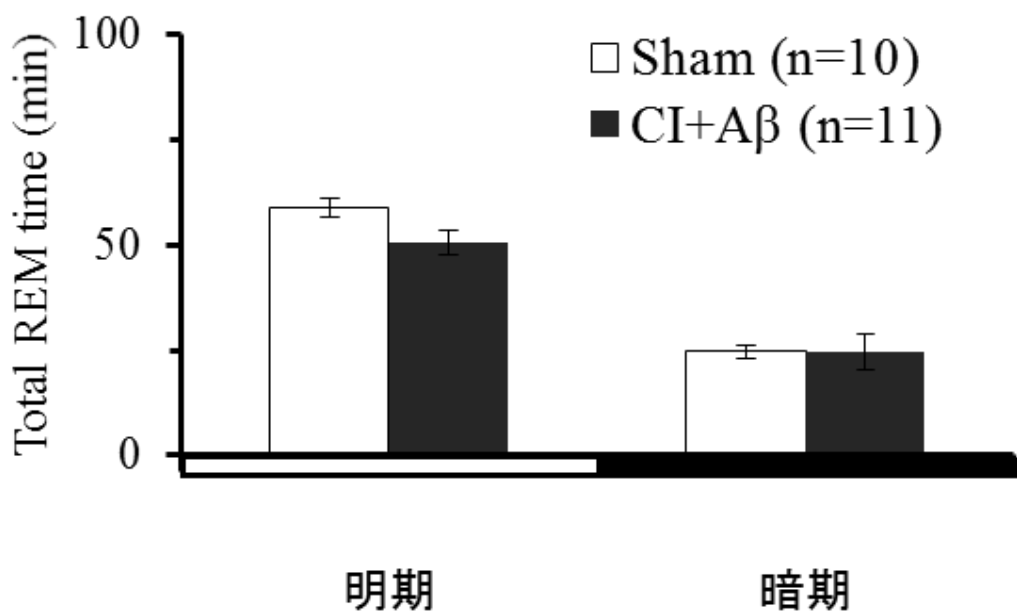
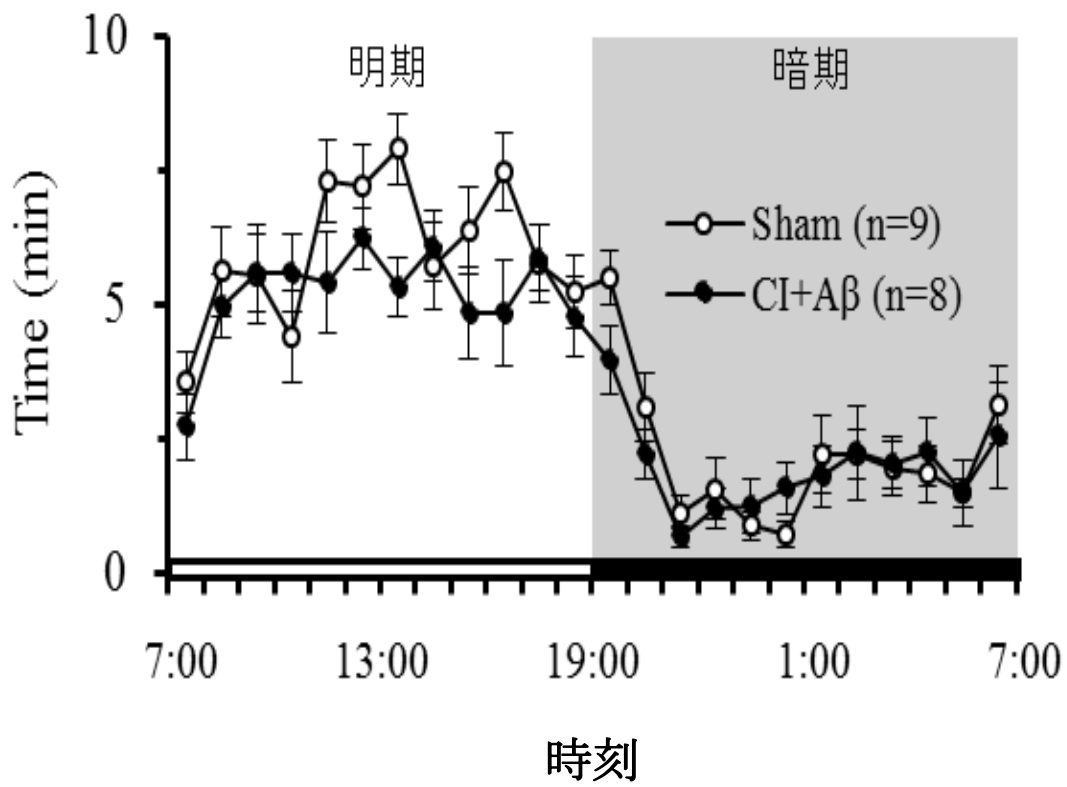


図 11 REM 睡眠の 1 時間ごとの推移と積算値

第2節 脳波測定による覚醒－睡眠サイクルの変化に関する検討

ATD 患者では睡眠の断片化による覚醒－睡眠サイクルの変化が認められ、中途覚醒増加や睡眠持続時間の減少が報告されている⁽¹⁵⁾。中途覚醒では覚醒－NREM 睡眠間のステージ移行回数が増加するため、覚醒および NREM 睡眠エピソード出現回数も増加する。そこで、本節では覚醒－睡眠サイクルの変化を検出するために、CI+A β ラットの各ステージにおけるエピソード出現回数および持続時間を検討した。エピソードとは一連のステージのことである。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1. と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節 1.2. と同様である。

1.3. 脳波測定ならびに解析

第1章第1節 1.3. と同様である。

1.4. 睡眠障害の評価方法

一連のステージをエピソードとし、各ステージ（覚醒、NREM、REM）のエピソードの出現回数（No. of total episodes）および持続時間（Duration）、を算出し、これらを Sham 群と CI+A β 群とで比較した。

1.5. 統計処理

第1章第1節 1.5. と同様である。

2. 実験結果

2.1. 各ステージにおけるエピソード出現回数の検討

CI+A β 群は Sham 群と比べ明期の覚醒出現回数は増加したが、暗期の覚醒出現回数には差がなかった（図 12 A）。また、CI+A β 群は Sham 群と比べ明期の NREM 睡眠出現回数は増加したが、暗期の NREM 睡眠出現回数には差がなかった（図 12 B）。一方、REM 睡眠出現回数に関しては、CI+A β 群と Sham 群間で明期、暗期ともに有意な差はなかった（図 12 C）。

2.2. 各ステージにおける持続時間の検討

CI+A β 群は Sham 群と比べ明期, 暗期ともに NREM 睡眠持続時間は減少した (図 13 B) .
 一方, 覚醒持続時間ならびに REM 睡眠持続時間に関しては, CI+A β 群と Sham 群間で明期,
 暗期ともにに有意な差はなかった (図 13A, 13C)

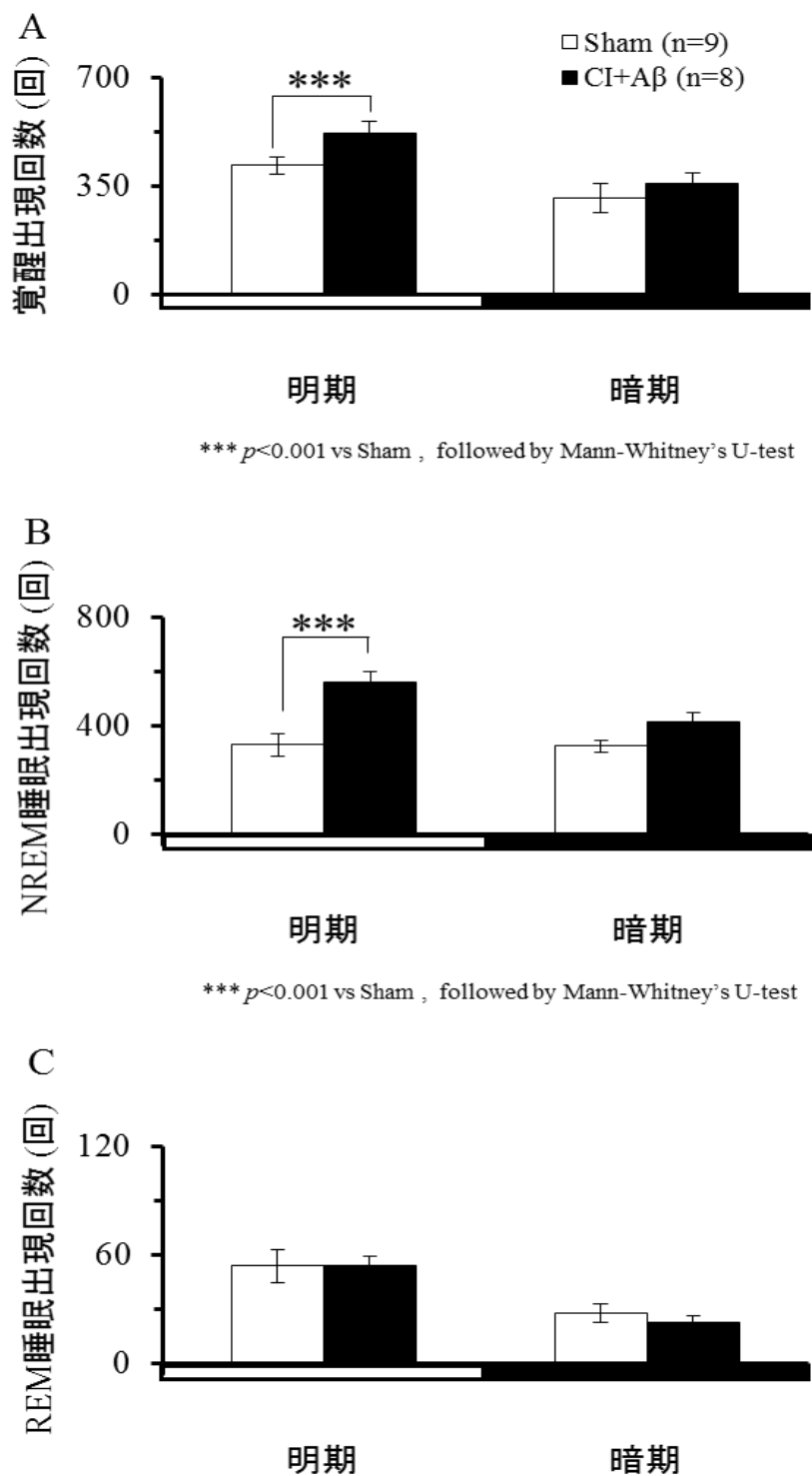


図 12 覚醒,NREM 睡眠,REM 睡眠の出現回数

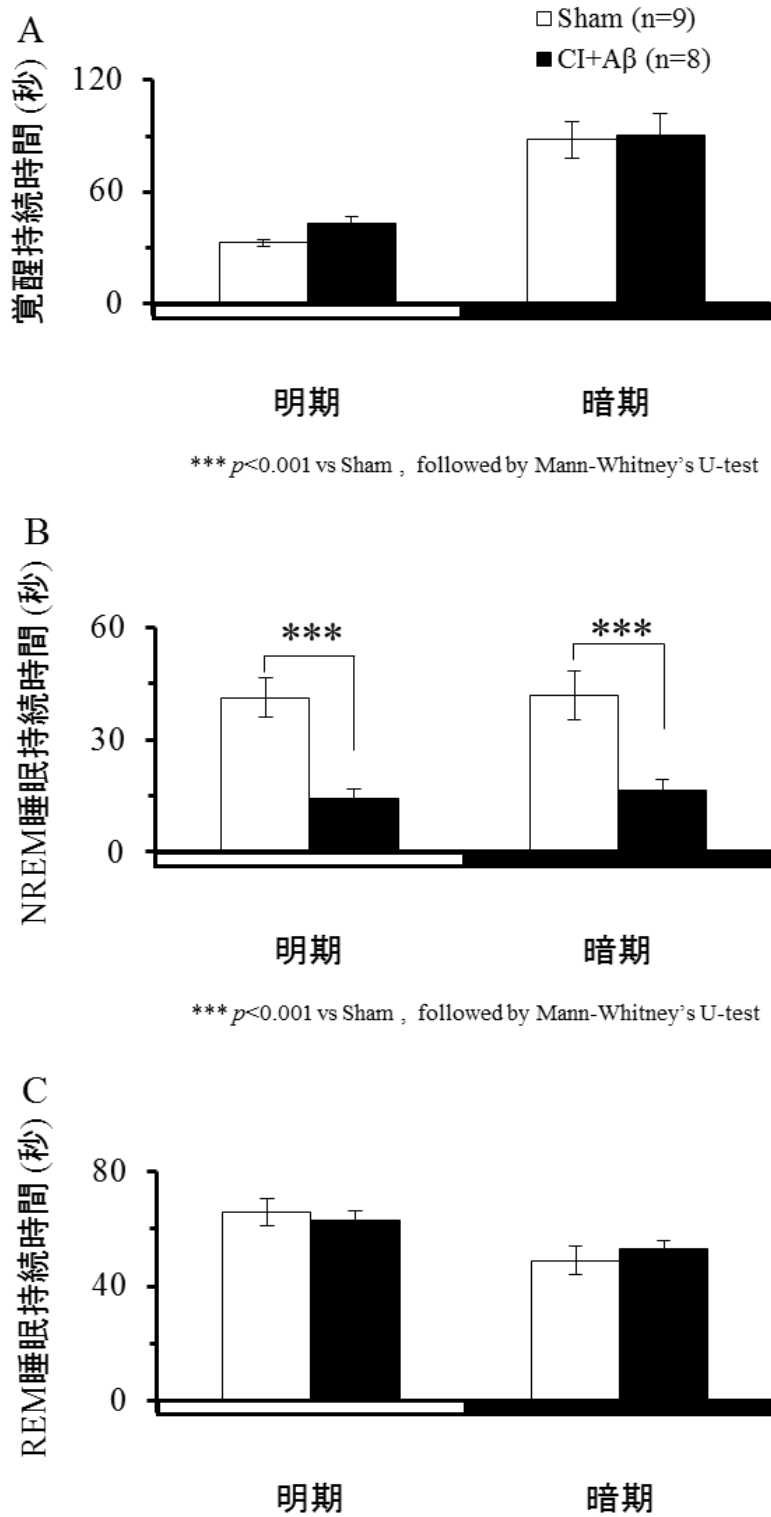


図 13 覚醒,NREM 睡眠,REM 睡眠の持続時間

第3節 脳波測定による睡眠の質の検討

ATD患者の睡眠障害では熟眠障害が報告されている⁽¹⁵⁾。睡眠の深さはNREM 睡眠時の δ 波占有率と相関することが報告されている。また,REM 睡眠時に特徴的な波形である θ 波は海馬の活動と相関することが報告されている。したがって,本節では睡眠の質の低下を評価するために,CI+A β ラットのNREM 睡眠およびREM 睡眠の脳波周波数帯分布とNREM 睡眠時の δ 波占有率およびREM 睡眠時の θ 波占有率を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節1.2.と同様である。

1.3. 脳波測定ならびに解析

第1章第1節1.3.と同様である。

1.4. 睡眠障害の評価方法

NREM 睡眠,REM 睡眠の1 Hz 毎の周波数帯分布 (EEG power density %) およびNREM 睡眠時の δ 波 (0.5–4 Hz) 占有率とREM 睡眠時の θ 波 (4–8 Hz) 占有率をそれぞれ算出し,Sham 群とCI+A β 群とで比較した。

1.5. 統計処理

第1章第1節1.5.と同様である。

2. 実験結果

2.1. NREM 睡眠における周波数帯分布および δ 波占有率の検討

CI+A β 群はSham 群と比べ明期でのNREM 睡眠における2–4 Hz の周波数帯占有率が減少した (図14 A)。また,CI+A β 群はSham 群と比べ暗期でのNREM 睡眠における1–4 Hz の周波数帯占有率に差はなかった (図14 B)。 δ 波占有率については,CI+A β 群ではSham 群と比べ明期,暗期ともに減少していた (図14 C)。

2.2. REM 睡眠における周波数帯分布および θ 波占有率の検討

CI+A β 群はSham 群と比べ明期でのREM 睡眠における7.8 Hz の周波数帯占有率が減少した (図15 A)。また,CI+A β 群はSham 群と比べ暗期でのREM 睡眠における7.8 Hz の周波

数帯占有率が減少した（図 15 B）. θ 波占有率に関しては, CI+A β 群では Sham 群と比べ明期, 暗期ともに減少していた（図 15 C）.

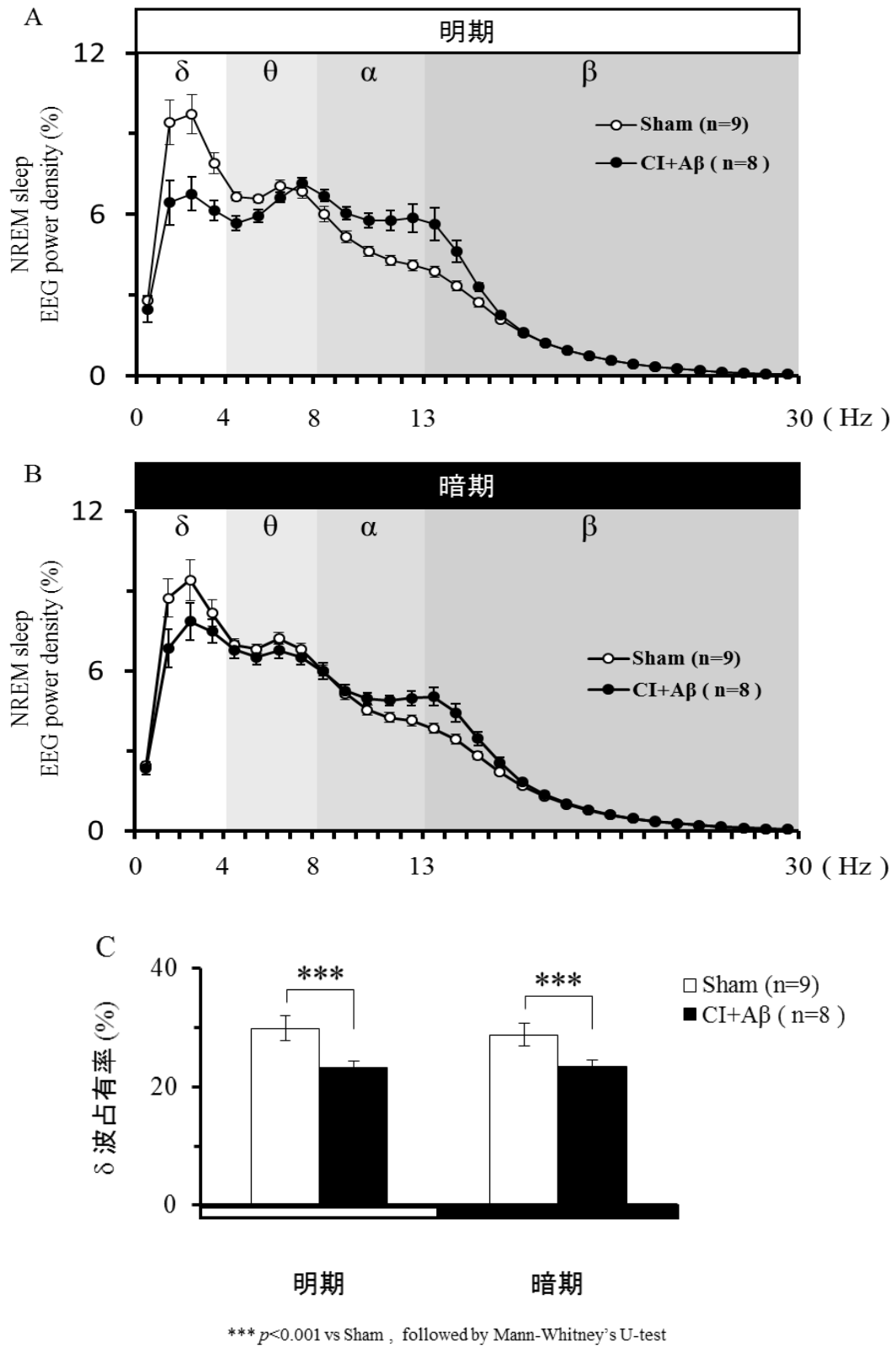


図 14 NREM 睡眠の周波数帯分布および δ 波占有率

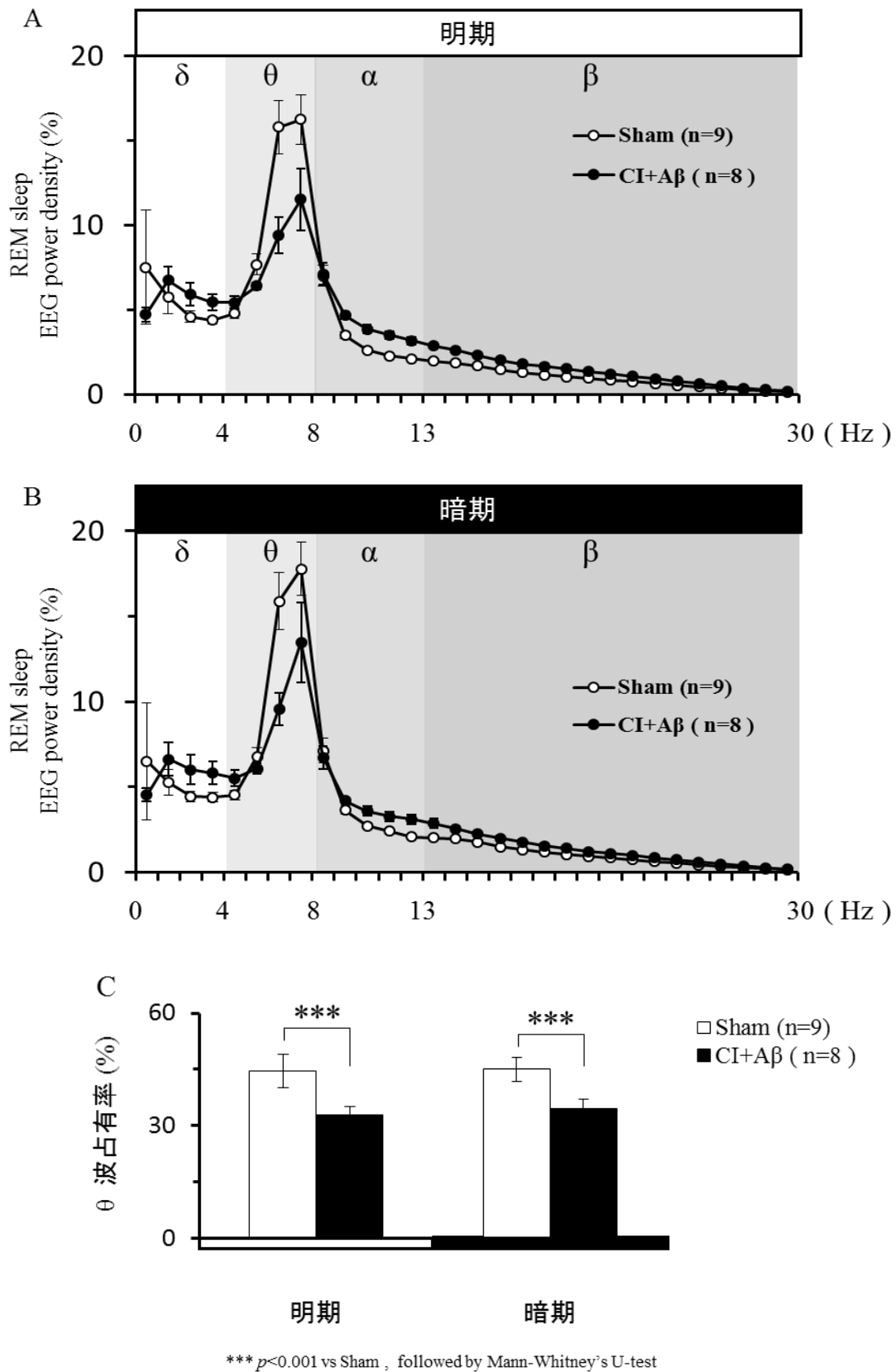


図 15 REM 睡眠の周波数帯分布および θ 波占有率

考察

本章では、当研究室で作製した ATD モデルラットが ATD 患者と同様に睡眠障害を呈するか否かを検討するため、脳波および筋電図測定を用いて睡眠解析を行った。ATD で認められる睡眠障害には、夜間における睡眠時間（特に NREM 睡眠）の短縮、中途覚醒回数の増加、NREM 睡眠持続時間の減少および熟眠障害があり⁽¹⁵⁾、CI+A β モデルラットは同様の睡眠障害を呈することを明らかにした（図 9-15）。

CI+A β 群は Sham 群と比べ明期、暗期ともに覚醒時間の延長と（図 9）、NREM 睡眠時間の短縮が認められた（図 10）。さらに、CI+A β 群は Sham 群と比べ明期における覚醒および NREM 睡眠の出現回数の増加が認められた（図 12 A,B）。この出現回数の増加は、覚醒と NREM 睡眠との間でのステージ移行回数の増加を反映していることから、CI+A β モデルでは中途覚醒回数が増加していることが示された。この NREM 睡眠時間の減少や中途覚醒回数増加は遺伝子改変 AD モデル動物でも認められている。PLB1 knock-in マウスでは皮質神経細胞における機能低下が NREM 睡眠時間短縮に関与することが示唆されている⁽¹⁶⁾。TgCRND8 マウスでは皮質と海馬における病理変化が起こりノルアドレナリン神経の感受性の変化が覚醒・睡眠の調整に影響していると考えられ⁽²⁹⁾、脳波測定により NREM 睡眠時間が短縮していることから⁽¹⁷⁾、CI+A β ラットにおいても、そのような病理変化が起きていることが示唆される。

δ 波は、深い睡眠時に認められるため、熟眠の指標として考えられている。黒谷らは徐波睡眠時に活性化される大脳皮質神経群として nNOS を発現する GABA 作動性神経が存在することを報告している⁽³⁰⁾。また、CI+A β 群は Sham 群と比べ NREM 睡眠時の δ 波占有率が減少したことから（図 14 C）、CI+A β モデルラットは ATD と同様に熟眠障害を呈することが明らかとなった。したがって、CI+A β モデルラットでは、皮質における GABA 神経障害によって、 δ 波が低下していることが示唆された。また近年、徐波睡眠がアルツハイマー病の病態に関わっているとの報告がされている。長期の睡眠不足はアミロイド斑への A β 沈着を促進するが、徐波睡眠が細胞外 A β 濃度低下に関連するといった報告がある⁽³¹⁾。臨床研究では、睡眠後髄液中 A β の濃度が低下することが報告されている。すなわち睡眠には中枢神経系における細胞外可溶性 A β 濃度を低下させる働きがあることが推測される。また、内側前頭前野における A β が NREM 睡眠の徐波活動生成低下に関連し、さらに NREM 睡眠における徐波睡眠の生成障害が睡眠中の記憶固定を障害し、海馬・新皮質の記憶形成の低下をもたらしたと報告している⁽³²⁾。したがって、徐波睡眠は細胞外 A β 濃度の上昇を抑え、AD の病理学的変化の進行に対して抑制的に作用することが予想される。また AD を発症すると、熟眠障害により AD の病態進行が促進する可能性が示唆される。

CI+A β 群は Sham 群と比べ REM 睡眠時の θ 波占有率減少を示した（図 15 C）。また、コリン神経系障害をもつ遺伝子改変 AD モデルマウスでは REM 睡眠時の θ 波占有率の減少が認められている⁽¹⁷⁾。CI+A β モデルラットでは背側海馬におけるアセチルコリン遊離能が

低下していることから⁽¹⁴⁾, このアセチルコリン遊離能低下が θ 波占有率減少を誘導したことが示唆される.

以上のことから, CI+A β モデルラットは, ATD 患者と類似の睡眠障害を呈することが明らかとなった. また, 睡眠時の δ 波、 θ 波の異常が認められたことから, CI+A β モデルラットは, GABA 神経系やコリン神経系が障害されている可能性が示された.

第2章 CI+A β ラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果

漢方方剤の酸棗仁湯は、睡眠障害に対して有効であることが明らかにされている⁽¹⁰⁻¹²⁾。しかし、ATD の睡眠障害に対して有効であるかは明らかではない。したがって、本節では CI+A β ラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果を評価した。また、一般的な睡眠障害に使用され、NREM 睡眠時の δ 波増強作用を示すトリアゾラム (Triazolam; TZL) を比較対照薬として検討した⁽³³⁾。

第1節 CI+A β ラットの覚醒-睡眠時間の変化に対する酸棗仁湯の効果

CI+A β ラットの覚醒-睡眠量の変化に対する酸棗仁湯の効果を評価するために、本節では、CI+A β ラットの覚醒時間、NREM 睡眠時間および REM 睡眠時間に対する酸棗仁湯ならびに TZL の効果を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1. と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節 1.2. と同様である。

1.3. 脳波測定ならびに解析

第1章第1節 1.3. と同様である。

1.4. 睡眠障害の評価方法

A β 投与開始から、28 日目に脳波ならびに筋電図の記録を行った (図 16)。各ステージ (覚醒, NREM, REM) の積算時間 (Total time) をそれぞれ算出し、溶媒 (Vehicle) 群と比較した。

1.5. 使用薬物と調製および投与方法

当研究室では、これまでに CI+A β ラットの脳虚血後 7 日目時点における空間記憶障害など⁽¹⁴⁾を明らかにしてきた。この脳虚血後 7 日目時点で認知機能評価は予防的な観点から薬効評価を行っていた。そこで、本節ではより臨床に則した薬剤投与時期での酸棗仁湯の睡眠障害に対する作用について検討するため、脳虚血後 28 日目時点における睡眠記憶障害を検討した。酸棗仁湯 (ツムラ株式会社 : Lot No. 2120103010) の投与用量を 100, 300, 1000 mg/kg とし、精製水に溶解した。また、TZL (和光 : Lot No. ALE1263) の投与用量を 2 mg/kg

とし、0.5% カルボキシメチルセルロース（東京化成：Lot No. GC01）に溶解した。酸棗仁湯およびTZLは脳虚血後22日目から28日目まで1日1回、7日間経口投与した（図21）。両薬剤の投与時間帯はAM 10:00 からAM 11:00 とした。

1.6. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理には、one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's testを使用した。なお、危険率が5%以下だった場合を統計学的に有意差が有るものとみなし、また危険率が10%以下だった場合を差のある傾向とみなした。

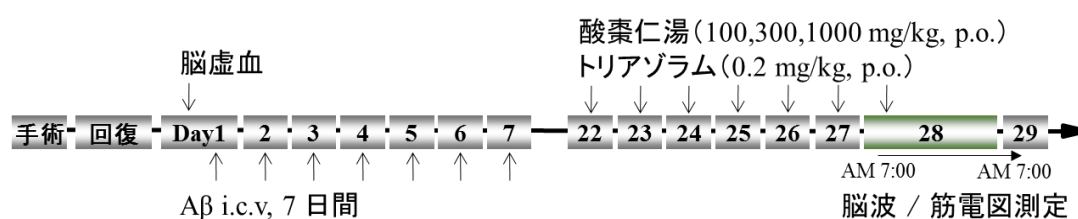
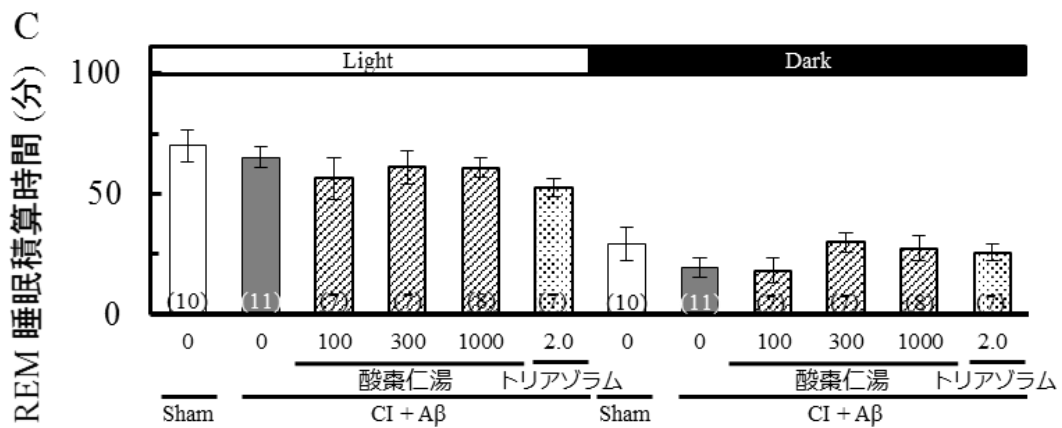
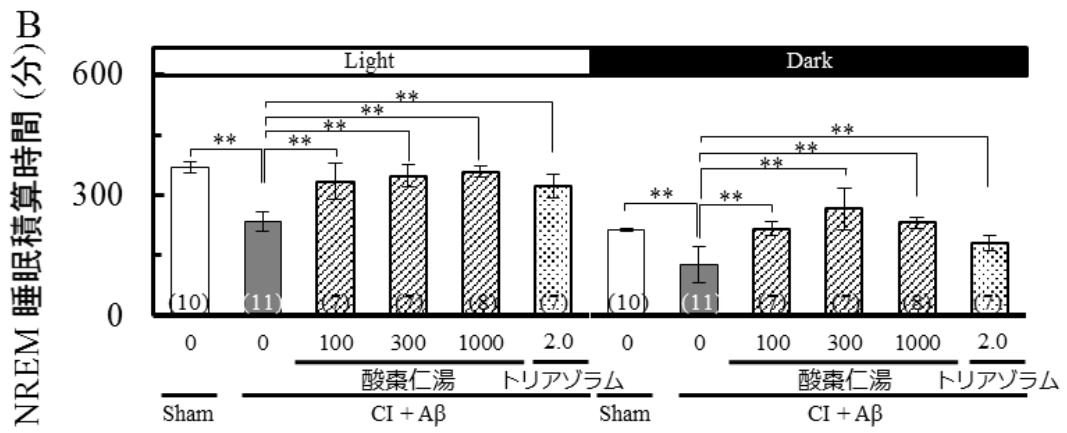
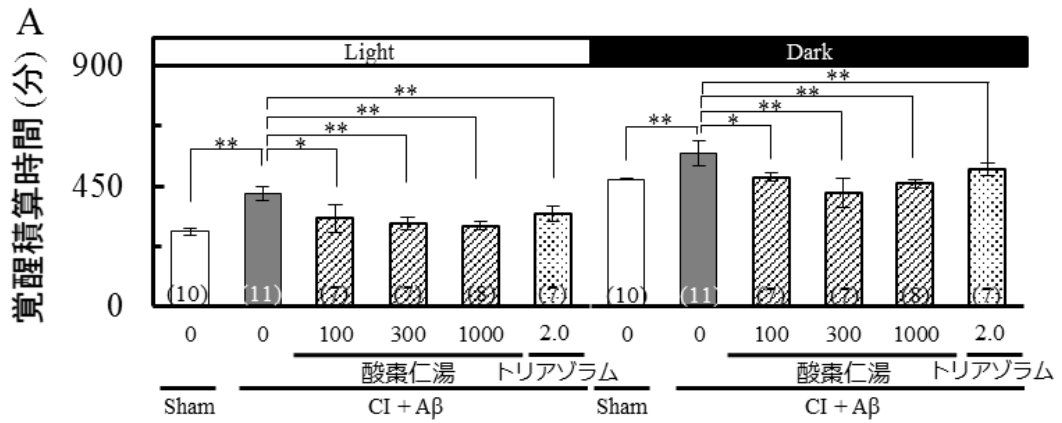


図 16 実験スケジュール

2. 実験結果

酸棗仁湯 100,300,1000 mg/kg および TZL 2 mg/kg 投与は、CI+Aβ ラットの明期、暗期における覚醒時間延長を抑制し、NREM 睡眠時間短縮も抑制した（図 17 A, B）。REM 睡眠時間に関しては、酸棗仁湯および TZL 投与による効果は認められなかった（図 17 C）。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CI+Aβ+vehicle
(one way ANOVA followed by Dunnett's test)

図 17 各ステージの積算時間に対する酸棗仁湯の効果

第2節 CI+A β ラットの覚醒-睡眠サイクルの変化に対する酸棗仁湯の効果

第1章第2節において CI+A β ラットの明期における中途覚醒増加や NREM 睡眠持続時間の短縮が認められた。したがって、本節ではこのような覚醒-睡眠サイクルの変化に対する酸棗仁湯の効果を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1. と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節 1.2. と同様である。

1.3. 脳波測定ならびに解析

第1章第1節 1.3. と同様である。

1.4. 睡眠障害の評価方法

各ステージ（覚醒，NREM，REM）のエピソードの出現回数および持続時間を算出し，溶媒（Vehicle）群と比較した。出現回数に関しては，明期のみ解析した。

1.5. 使用薬物と調製および投与方法

第2章第1節 1.5. と同様である。

1.6. 統計処理

第2章第1節 1.6. と同様である。

2. 実験結果

2.1. 各ステージにおける出現回数に対する効果

酸棗仁湯 100,300,1000 mg/kg および TZL 2 mg/kg 投与は，CI+A β ラットの覚醒出現回数増加を抑制し（図 18 A），NREM 睡眠出現回数増加も抑制した（図 18 B）。REM 睡眠出現回数については，酸棗仁湯および TZL 投与による効果は認められなかった（図 18 C）。

2.2. 各ステージにおける持続時間に対する効果

酸棗仁湯 100,300,1000 mg/kg および TZL 2 mg/kg 投与は，CI+A β ラットの明期・暗期における NREM 睡眠持続時間短縮を抑制した（図 19 A,B）。一方，酸棗仁湯および TZL 投与による覚醒持続時間ならびに REM 睡眠持続時間の変化は認められなかった（図 19 A,C）。

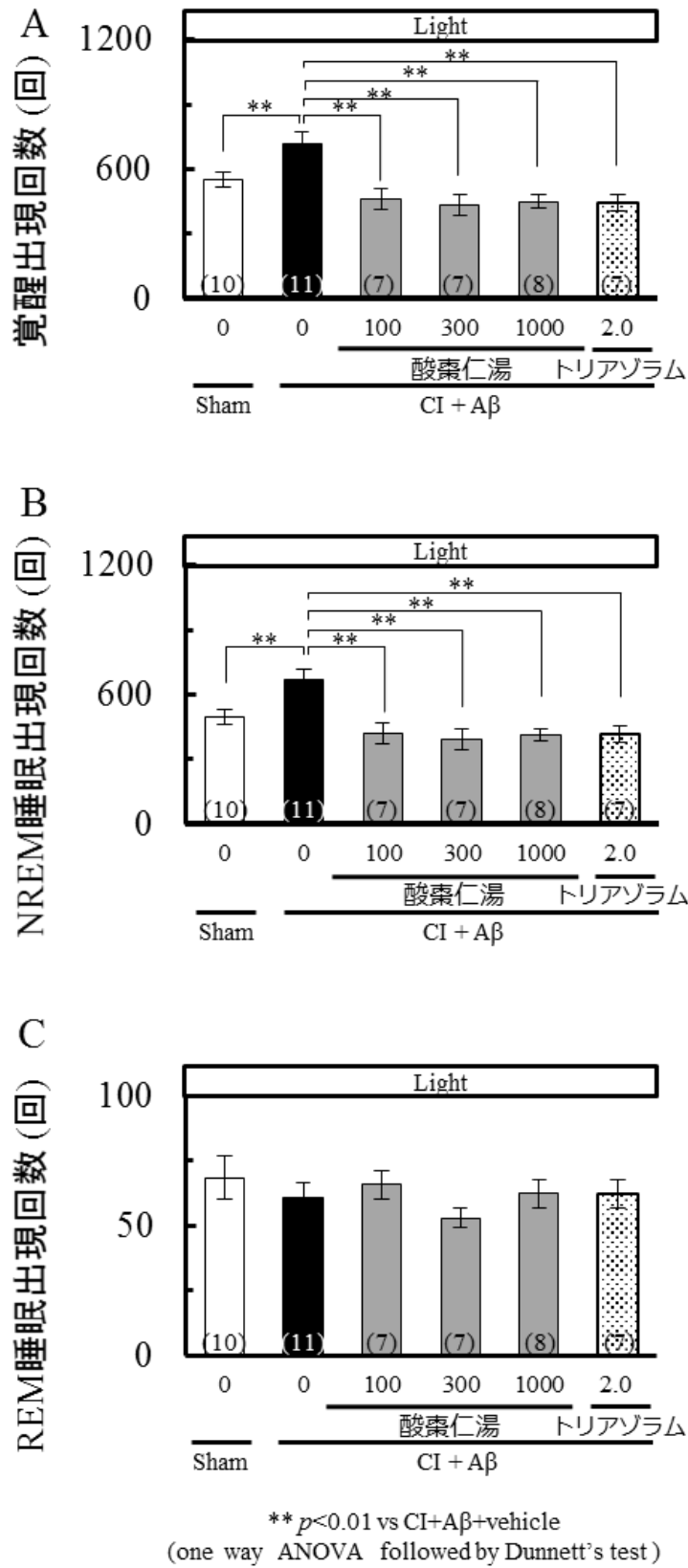
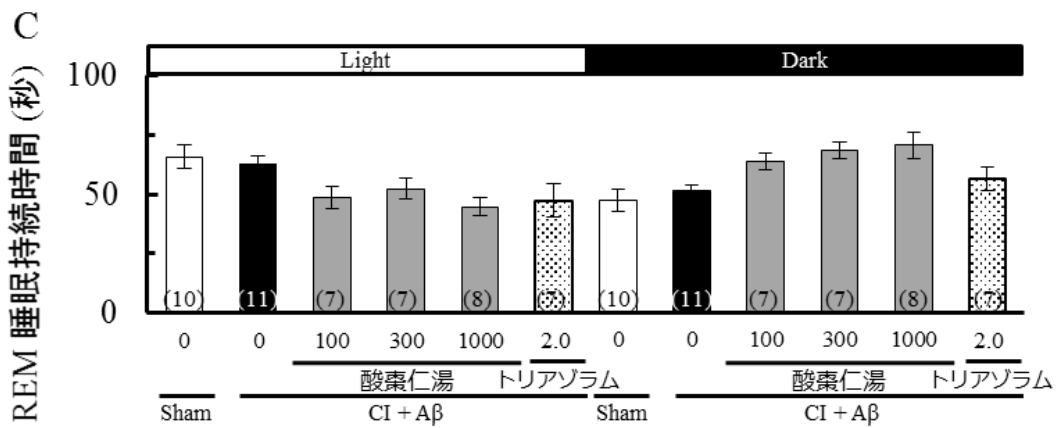
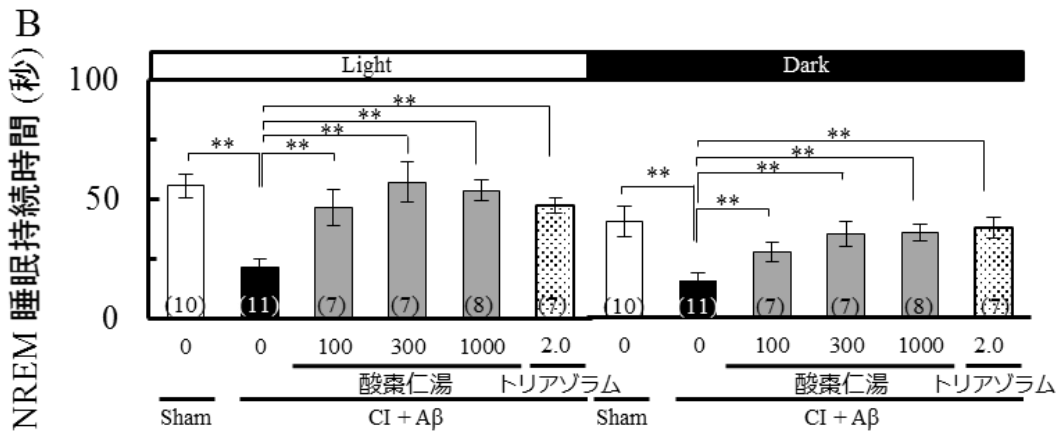
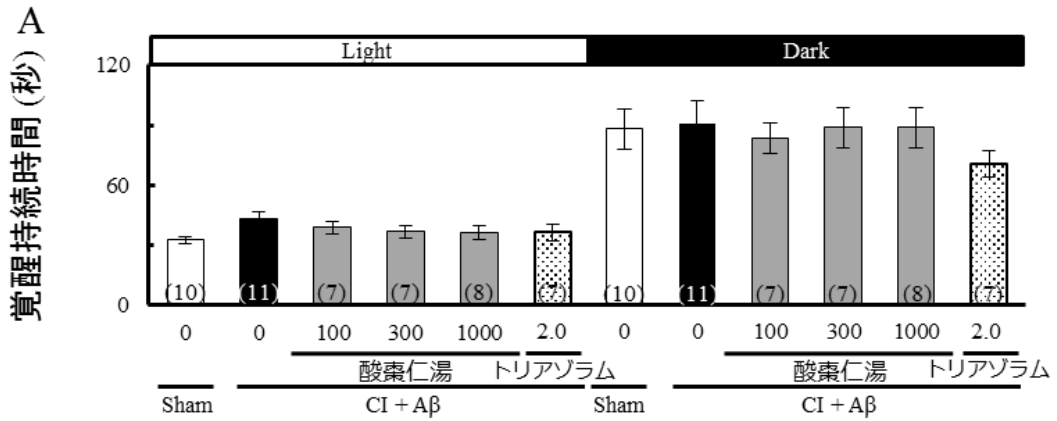


図 18 各ステージの出現回数に対する酸棗仁湯の効果 (明期)



** $p < 0.01$ vs CI+Aβ+vehicle
(one way ANOVA followed by Dunnett's test)

図 19 各ステージの持続時間に対する酸棗仁湯の効果

第3節 CI+A β ラットの睡眠の質の変化に対する酸棗仁湯の効果

第1章第3節においてCI+A β ラットの熟眠障害（NREM睡眠時 δ 波占有率低下）およびREM睡眠時の θ 波占有率の減少が認められた。したがって、本節ではCI+A β ラットのNREM睡眠時 δ 波占有率低下およびREM睡眠時 θ 波占有率低下に対する酸棗仁湯の効果を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節1.2.と同様である。

1.3. 脳波測定ならびに解析

第1章第1節1.3.と同様である。

1.4. 睡眠障害の評価方法

NREM睡眠、REM睡眠の1Hz毎の周波数帯分布（EEG power density %）およびNREM睡眠時の δ 波占有率とREM睡眠時の θ 波占有率をそれぞれ算出し、これらを溶媒（Vehicle）群と比較した。

1.5. 使用薬物と調製および投与方法

第2章第1節1.5.と同様である。

1.6. 統計処理

第2章第1節1.6.と同様である。

2 実験結果

2.1. NREM睡眠における周波数帯分布および δ 波占有率に対する作用

酸棗仁湯1000 mg/kgはCI+A β ラットの δ 波占有率減少を抑制し、特に2 - 4 Hzの占有率減少を抑制した。また、TZL 2 mg/kg投与も δ 波占有率の減少を抑制した（図20）。

2.2. REM睡眠における周波数帯分布および θ 波占有率に対する作用

酸棗仁湯 100,300,1000 mg/kg 投与は CI+A β ラットの θ 波占有率減少を抑制し、特に 7,8 Hz の占有率減少を抑制した。しかし、酸棗仁湯の用量依存的な効果は認められなかった。また、 θ 波占有率に対する TZL の作用が認められなかった (図 21)。

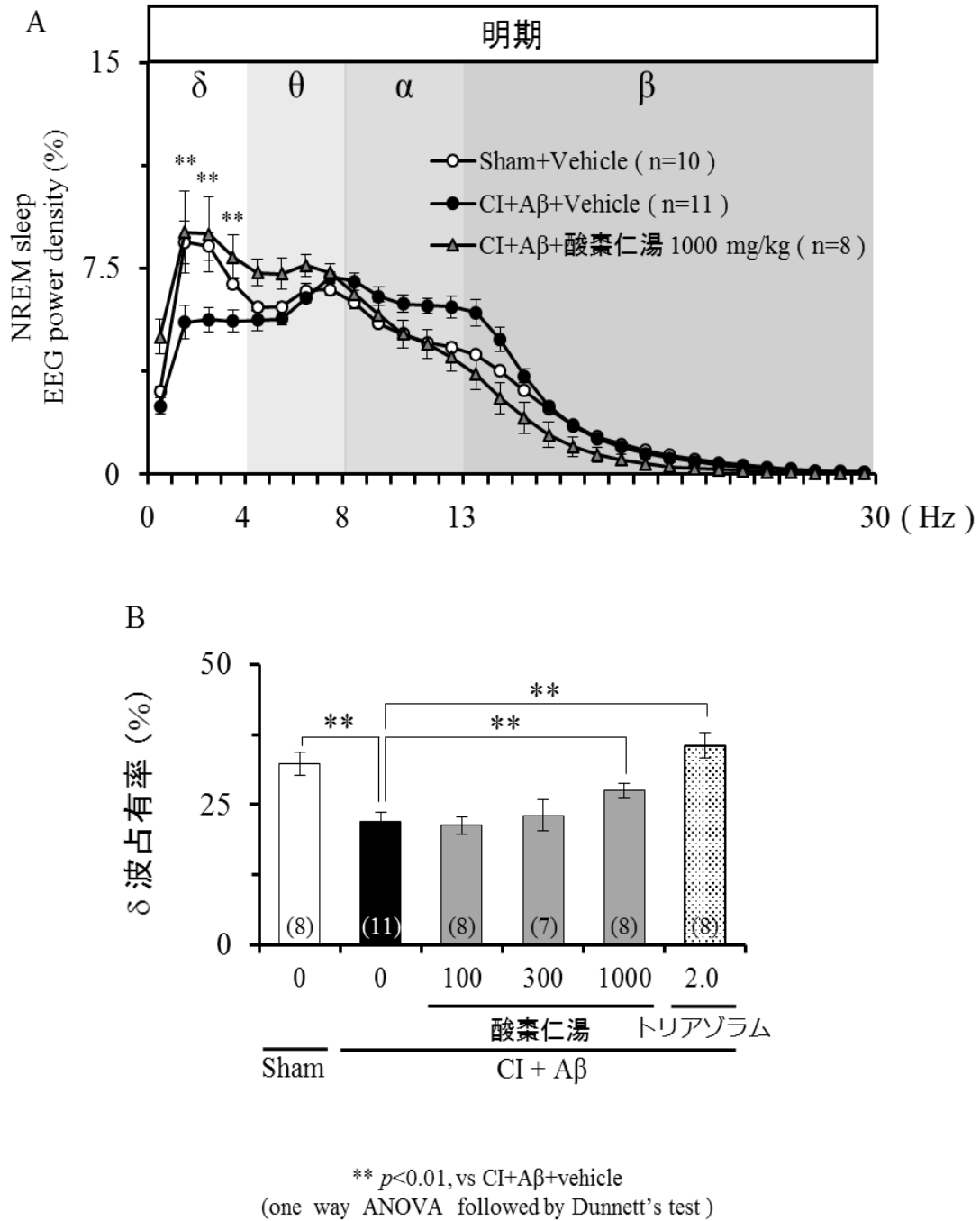
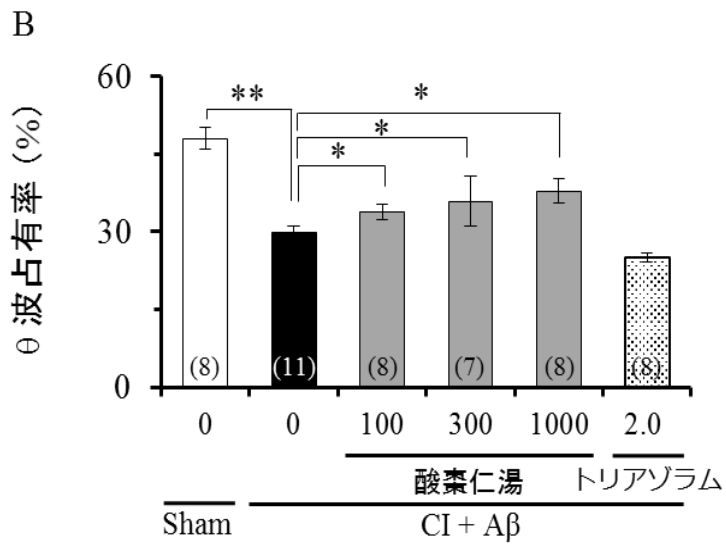
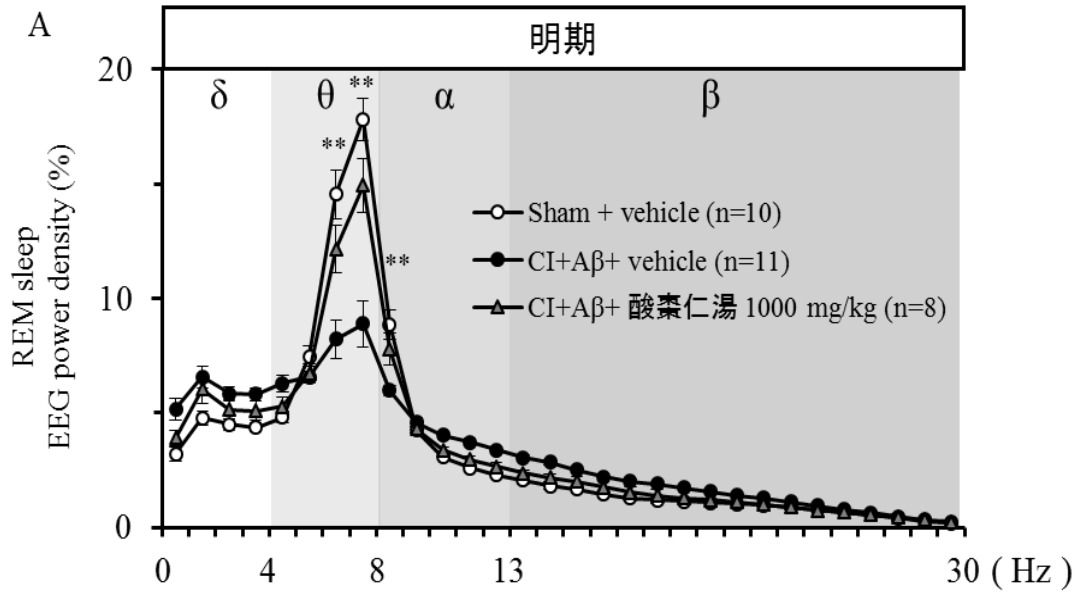


図 20 CI+A β ラットの NREM 睡眠時周波数帯分布および δ 波占有率変化に対する酸棗仁湯の効果



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs CI+Aβ+vehicle
(one way ANOVA followed by Dunnett's test)

図 21 CI+Aβ ラットの REM 睡眠時周波数帯分布および θ 波占有率変化に対する酸棗仁湯の効果

考察

不眠症に用いられる酸棗仁湯が、ATD の睡眠障害に治療効果があるか検討するために、CI+A β モデルラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果を検討した。前章において CI+A β モデルラットは、ATD 患者と同様に NREM 睡眠時間短縮、中途覚醒回数増加、熟眠障害を示したことから、これらの障害に対する酸棗仁湯の効果を評価した結果、改善効果が認められた (図 17-21)。以上のことから、酸棗仁湯が ATD の睡眠障害治療に有用であることが期待される。

CI+A β 処置による覚醒量の増加および NREM 睡眠量の減少は酸棗仁湯投与によって改善することが明らかとなった (図 17 A,B)。また、CI+A β 処置による REM 睡眠量の変化はなく、酸棗仁湯投与によっても REM 睡眠量に影響しないことが明らかとなった (図 17 C)。臨床からの報告では、酸棗仁湯が不眠症治療に用いられている^(34,35)。宮岡らは 81 名の成人精神疾患患者に酸棗仁湯 (2.5g ~7.5g) を 4 週間眠前投与し、睡眠障害改善作用があることを報告している⁽⁴¹⁾。さらに、非臨床からはストレス負荷によるペントバルビタール誘発性正向反射消失時間の短縮に対して酸棗仁湯が有効であることが報告されている⁽³⁶⁾。以上より、酸棗仁湯は ATD 患者の睡眠障害のうち NREM 睡眠量の減少に対して有効である可能性が示された。

また、酸棗仁湯は CI+A β ラットの覚醒出現回数増加を抑制し、NREM 睡眠持続時間短縮を改善したことから (図 18B, 図 19A, 図 19B)、酸棗仁湯による覚醒出現回数増加の抑制と NREM 睡眠持続時間延長は、覚醒—睡眠の switching に酸棗仁湯が作用することが原因であると考えられた。近年、覚醒—睡眠の switching に関する研究がなされている。前脳基底部のコリン神経系の活性は、NREM 睡眠から覚醒への移行を誘導する⁽³⁷⁾。また、腹側被蓋野のドパミン神経の亢進も覚醒を引き起こす⁽³⁸⁾。一方、脳幹の parafacial zone における GABA 神経の活性化は、徐波睡眠 (slow wave sleep: SWS) を引き起こす⁽³⁹⁾。したがって、酸棗仁湯はコリン神経やドパミン神経系の抑制もしくは GABA 神経系の亢進を誘導することで覚醒—睡眠の switching の回数を減少させ、中途覚醒を改善した可能性がある。酸棗仁湯は、GABA 神経系の機能に対して促進的に作用することが報告されており、NREM 睡眠持続時間を延長し、覚醒—睡眠の switching 回数の減少を導いた可能性がある。

REM 睡眠時の θ 波占有率減少対しては酸棗仁湯のみ抑制効果を示し、TZL の作用は認められなかった (図 21B)。一方、NREM 睡眠時の δ 波占有率の減少に対して、酸棗仁湯ならびに TZL は抑制効果を示したことから (図 20 B)、酸棗仁湯は GABA 神経系の亢進を介して δ 波を誘導したことが考えられ、酸棗仁湯の θ 波に対する効果は GABA 神経系を介したのではないことが示唆された。中隔野コリン神経系の活性は海馬の θ 波を誘導することから⁽⁴⁰⁾、酸棗仁湯はコリン神経系に作用したことが考えられた。しかし、アセチルコリンは覚醒誘導物質であるため⁽³⁷⁾、コリン神経系の活性を強制的に誘導することは睡眠障害を招き、酸棗仁湯の結果とは異なることとなる。アセチルコリン分泌は NREM 睡眠時には

減少し、REM 睡眠時には増加することが報告されていることから⁽⁴¹⁾、酸棗仁湯はこの NREM-REM 睡眠間のコリン神経系活性の switching を調節する機構に作用したこと、あるいはコリン神経細胞保護効果を示したことが考えられた。本研究結果では、ベンゾジアゼピン系薬剤である TZL と比較して、酸棗仁湯は θ 波占有率減少を改善していることから (図 21)、ベンゾジアゼピン系薬剤よりも酸棗仁湯は認知機能に対して優位性があることが期待される。

本章では、CI+A β モデルラットの睡眠障害に対して酸棗仁湯が改善効果を示すことが明らかとなった。 δ 波、 θ 波への作用も認められたことから、GABA 神経ならびにコリン神経系へ酸棗仁湯が作用することが示唆された。本結果から、ATD 患者の睡眠障害に対する酸棗仁湯の治療効果が期待される。

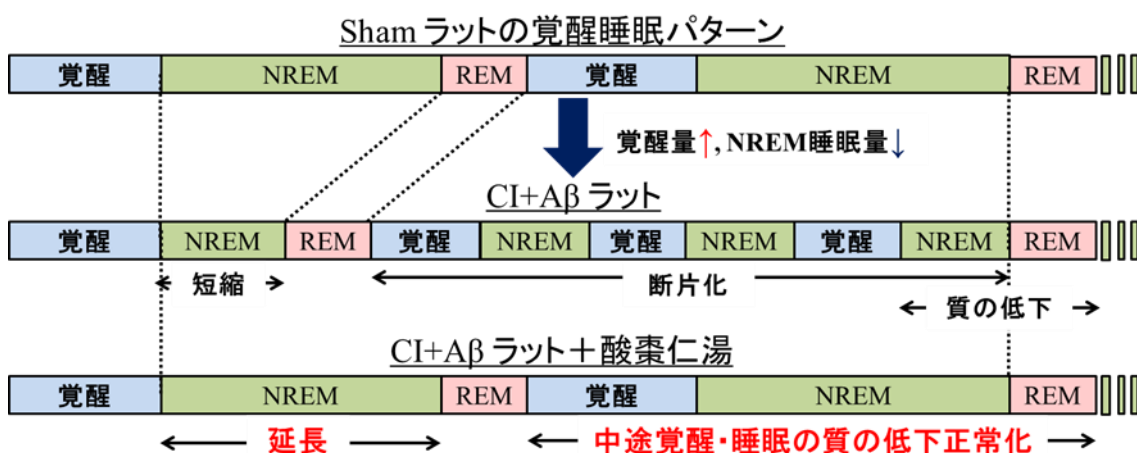


図 22 CI+A β ラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の改善作用

第3章 CI+A β モデルラットの空間記憶障害の検出および酸棗仁湯の空間記憶障害に対する作用

軽度認知症患者では、健常人と比較して睡眠時の δ 波・ θ 波レベルの減少が認められており⁽⁴²⁾、ATD患者の δ 波・ θ 波強度は認知機能を評価するMini-Mental State Examination (MMSE)スコアと相関することが報告されている⁽⁴³⁾。これらのことから、認知症患者の睡眠時 δ 波・ θ 波レベルの減弱は認知機能障害に寄与することが提案されている。第2章において、酸棗仁湯はCI+A β ラットの δ 波・ θ 波レベル減弱を改善したことから、酸棗仁湯はCI+A β ラットの空間記憶障害に対しても改善効果を示すことが期待される。そこで本章では、CI+A β ラットの空間記憶障害に対する酸棗仁湯の作用に関して、水迷路課題を用いて検討した。

第1節 水迷路課題を用いた空間記憶障害の検出

アルツハイマー病患者をはじめとする認知症患者では、中核症状として記憶障害や見当識障害が発現する。認知症の記憶障害のなかでもエピソード記憶が失われやすいことから、CI+A β ラットの記憶の保持を評価した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. 脳虚血モデル作製手順

第1章第1節1.2.1.と同様である。

1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術手順

第1章第1節1.2.2.と同様である。

1.2.3. A β 凝集体の試薬調整方法

第1章第1節1.2.5.と同様である。

1.2.4. 脳虚血およびA β 投与方法

第1章第1節1.2.6.と同様である。

1.2.5. 実験装置ならびに実験手続き

水迷路課題はモリス水迷路課題⁽⁴⁴⁾を参考に CI+Aβ ラットの空間記憶を評価した。水迷路課題の装置は直径 150 cm, 高さ 45 cm, の容器に 23 °C の水を 32 cm の高さまで注いだ。プラットホームは 直径 12 cm, 高さ 30 cm の透明なアクリル製のものを使用した。プラットホームの位置は容器の中心から南東の領域に 23 cm とした。ラットの遊泳軌跡を CCD カメラで録画し, 解析用ソフトを使用して空間記憶を検討した (図 23 A)。

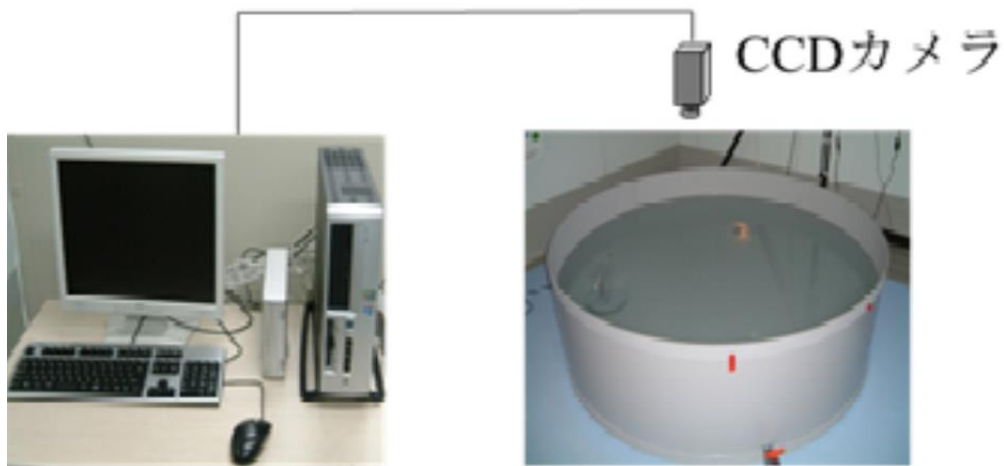
1.2.6. 空間記憶の獲得方法

水面に光点が当たらないように照明を設置し, 試行の 30 分前にラットをケージごと実験環境に置き, 馴化させた。空間記憶獲得の試行は 1 日 3 回 (各試行でスタート地点 A,B,C にする) 5 日間行った (図 23 B)。試行時間の上限を 120 秒とし, ラットが時間内にプラットホームに到達しなかった場合には, ラットをプラットホームに誘導した。プラットホーム到達後 30 秒間は, ラットをプラットホーム上に放置し, プラットホームの位置を認知させた。各試行間隔は 30 分とした。

空間記憶の獲得試行 5 日目のプラットホーム到達の平均時間が 20 秒以下のラットをプラットホームの位置を記憶したとみなし, 以降実験に使用した。

1.2.7. 空間記憶の保持の評価

空間記憶保持の評価ではプラットホームを取り除き, 評価時間を 180 秒とした。評価項目は初回プラットホーム通過時間, プラットホーム通過回数, 遊泳速度とした (図 23 C)。



A) 水迷路の実験装置

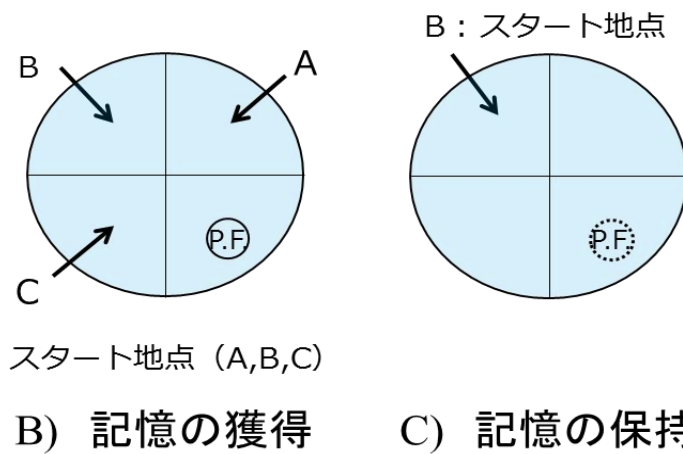


図 23 水迷路課題装置と評価方法および遊泳軌跡例

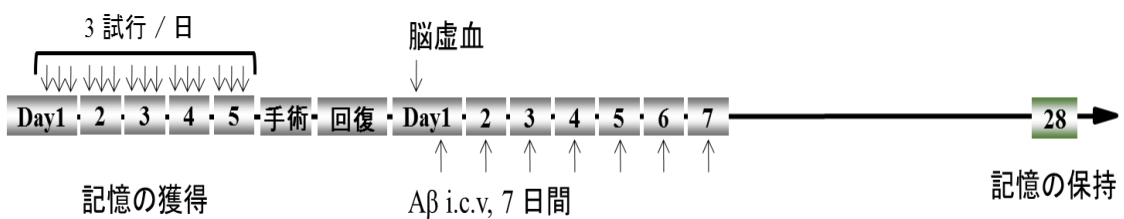


図 24 実験スケジュール

1.3. 統計処理

第 1 章第 1 節 1.3. と同様である.

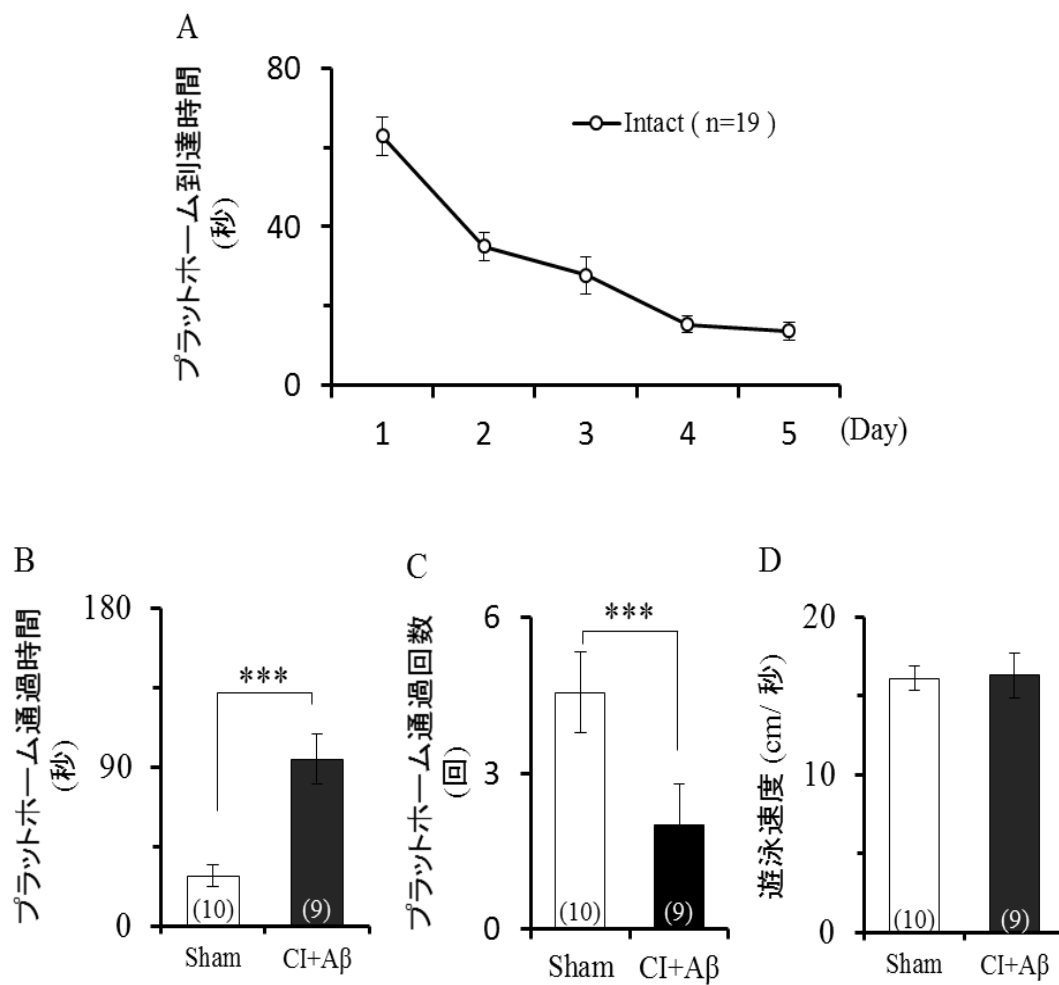
2 実験結果

2.1. 空間記憶の獲得の検討

空間記憶障害の検出に使用したすべての無処置(Intact)ラットは空間記憶の獲得試行 5 日目のプラットホーム到達の平均時間が 20 秒以下であった (図 25 A) .

2.2. 空間記憶の保持の検討

CI+A β 群は Sham 群と比べプラットホーム通過時間が延長し (図 25 B), 評価時間中のプラットホーム通過回数が減少した (図 25 C) . CI+A β 群と Sham 群間で遊泳速度に差はなかった (図 25 D) .



*** $p < 0.001$ vs Sham, followed by Mann-Whitney's U-test

図 25 記憶の獲得 (A) と記憶の保持 (B-D) の結果

第2節 CI+A β ラットの空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果

第1節より、CI+A β ラットは空間記憶障害を発現することが明らかとなった。そこで本節では、空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果について検討した。また、ATD治療に使用されているドネペジル⁽⁴⁵⁾ (Donepezil: DPZ) 10 mg/kg を陽性対照群として評価した。

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1. と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. 脳虚血モデル作製手順

第1章第1節 1.2.1. と同様である。

1.2.2. ガイドカニューレ埋め込み手術手順

第1章第1節 1.2.2. と同様である。

1.2.3. A β 凝集体の試薬調整方法

第1章第1節 1.2.3. と同様である。

1.2.4. 脳虚血および A β 投与方法

第1章第1節 1.2.4. と同様である。

1.2.5. 実験装置ならびに実験手続き

第2章第1節 1.2.5. と同様である。

1.2.6. 空間記憶の獲得方法

第2章第1節 1.2.6. と同様である。

1.2.7. 空間記憶の獲得基準

第2章第1節 1.2.7. と同様である。

1.2.8. 空間記憶の保持の評価

第2章第1節 1.2.8. と同様である。

1.3. 使用薬物と調製および投与方法

酸棗仁湯（ツムラ株式会社：Lot No. 2120103010）の投与用量を 100, 300, 1000 mg/kg とし、精製水に溶解した。また、DPZ（東京化成：Lot No. 6BL5K-TH）の投与用量を 10 mg/kg とし、精製水に溶解させた。酸棗仁湯および DPZ は脳虚血後 22 日目から 28 日目まで 1 日 1 回、7 日間経口投与した（図 26）。両薬剤の投与時間帯は AM 10:00 から AM 11:00 とした。

1.4. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理には、one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's test を使用した。なお、危険率が 5%以下だった場合を統計学的に有意差が有るものとみなし、また危険率が 10%以下だった場合を差のある傾向とみなした。

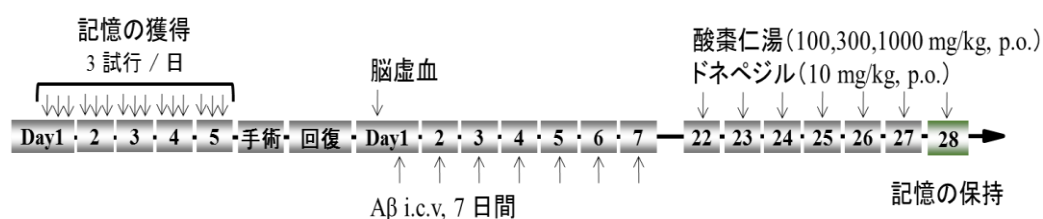


図 26 実験スケジュール

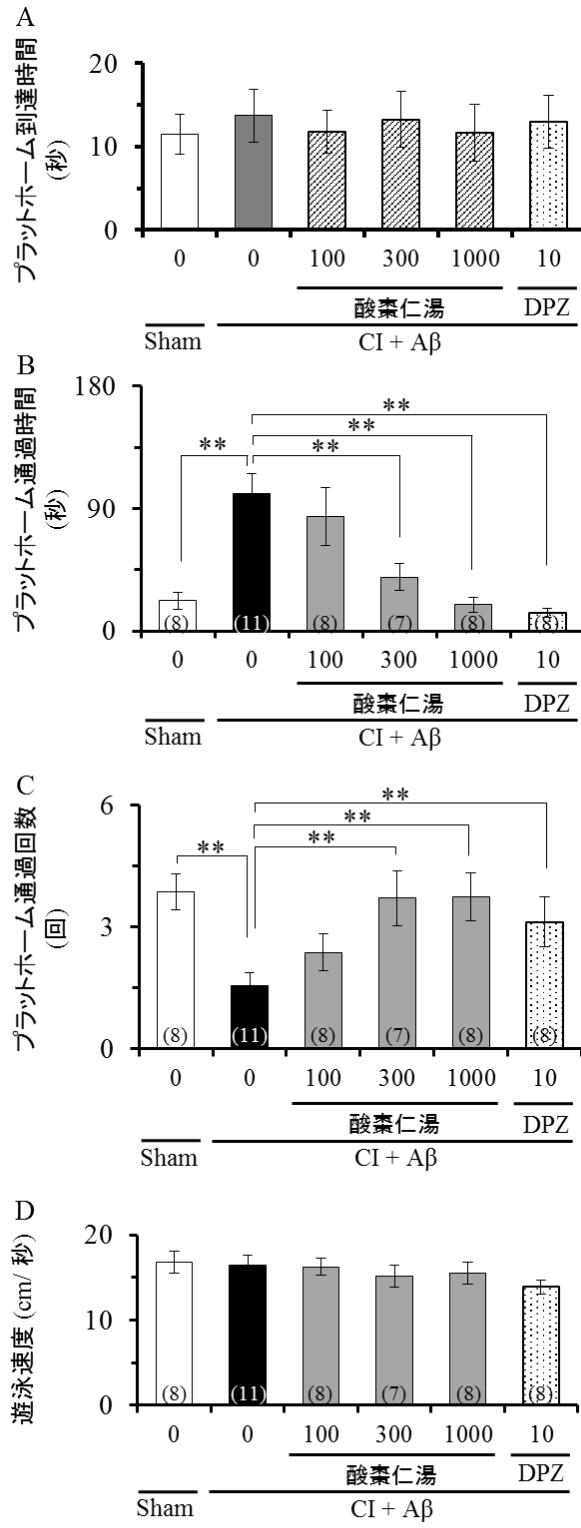
2 実験結果

2.1. 空間記憶の獲得の検討

酸棗仁湯の空間記憶障害に対する効果に使用したすべての無処置（Intact）ラットは空間記憶の獲得試行 5 日目のプラットホーム到達の平均時間が 20 秒以下であった（図 27 A）。

2.2. 空間記憶の保持の検討

酸棗仁湯 300, 1000 mg/kg および DPZ 10 mg/kg 投与は、CI+Aβ ラットのプラットホーム通過時間延長を抑制し（図 27 B）、ラットホーム通過回数減少を抑制した（図 27 C）。しかし、酸棗仁湯 100 mg/kg 投与では、抑制効果は認められなかった。また、酸棗仁湯 100, 300, 1000 mg/kg および DPZ 10 mg/kg 投与は遊泳速度に影響しなかった（図 27 D）。



** $p < 0.01$, vs CI+Aβ+vehicle
 (one way ANOVA followed by Dunnett's test)

図 27 記憶の獲得(A)と空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果(B-D)

考察

本章では CI+A β ラットの睡眠障害を改善した酸棗仁湯が、空間記憶障害に対しても改善効果を示すか否かを検討した。酸棗仁湯は、獲得された記憶の障害に対して改善効果を示した (図 27)。

記憶の過程には、形成、保存、想起のステップがある。本研究では記憶を獲得させた後に、CI+A β 処置を行い、3週間後から酸棗仁湯を投与し、記憶障害改善効果が認められたことから、記憶の想起機構に対する障害ならびにこれに対する酸棗仁湯の作用を評価している。これまでの遺伝子改変 AD モデルマウスでは、獲得過程で記憶障害が検出されるため^(46,47)、記憶保存・想起に関する評価を正確に行うことができない。また、A β を脳室内投与するモデルにおいても、獲得試行前に A β を処置し、獲得過程の記憶障害を検討している⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾。一方、遺伝子改変 AD モデルマウスの恐怖条件付けテストでは、記憶の想起過程に障害があることが解析されており、記憶の痕跡を残している海馬歯状回の細胞 (エンGRAM細胞) におけるスパイン量が減少していることが報告されている⁽⁵¹⁾。これらのことから、CI+A β ラットではエンGRAM細胞のスパイン量減少が考えられた。

δ 波領域の脳波が認められる *slow wave sleep* は、海馬依存的な記憶を増強し⁽⁵²⁾、睡眠障害は記憶の固定化を阻害することが提案されている⁽⁵³⁾。また、睡眠は皮質の神経細胞のスパイン形成を促進することから⁽⁵⁴⁾、記憶の固定化にはスパインの構築が必要であると考えられる。これらのことから、CI+A β ラットで認められた睡眠障害は、エンGRAM細胞におけるスパイン構築を阻害し、記憶の固定化を妨げたことが考えられた。*slow wave sleep* の誘導には GABA 神経の活性化が必要であり⁽⁵²⁾、酸棗仁湯は GABA 神経をの活性化することで、 δ 波を誘導し、エンGRAM細胞のシナプス形成を促進し、記憶障害を改善することが示唆された。

水迷路課題における空間記憶は、前脳基底部分から皮質へ投射したコリン神経系と中隔野から海馬へ投射したコリン神経が関係していると考えられている⁽⁵⁵⁾。CI+A β ラットでは、背側海馬の ACh 遊離量が減少している⁽¹⁴⁾。さらに、第 2 章では海馬の活動レベルと関連する REM 睡眠時の θ 波占有率が CI+A β 処置により減少し、酸棗仁湯により改善することを明らかにした。したがって、酸棗仁湯は海馬へのコリン神経系を活性化することで、空間記憶障害を改善した可能性がある。

以上のことから、酸棗仁湯は CI+A β ラットの空間記憶障害を改善し、その改善作用には δ 波に寄与する GABA 神経系ならびに θ 波に寄与するコリン神経系の活性化を介することが示唆された。

第4章 睡眠障害および空間記憶障害に対する酸棗仁湯の改善作用機序解明

これまでの検討から、酸棗仁湯は δ 波・ θ 波レベルの減少を改善すること、空間記憶障害を改善することが明らかとなった。しかし、その作用機序は明らかではない。 δ 波を含む徐波睡眠は、GABA 作動性神経の活性により誘導されることが示唆されており⁽³⁹⁾、 θ 波はコリン神経系の活性により誘導される⁽⁴⁰⁾。これらのことから、本章では酸棗仁湯のGABA神経系ならびにコリン神経系に対する作用を検討した。

第1節 ELISA法を用いた前頭前野のGABA量に対する酸棗仁湯の効果

第2章において、酸棗仁湯はトリアゾラムと同様に δ 波の占有率減少を改善した。GABA神経の刺激は前頭葉皮質のシナプス結合を調整することが示唆されている⁽⁵⁶⁾ことから、酸棗仁湯は大脳皮質のGABA神経系を活性化したことが示唆された。また、 δ 波は大脳皮質の神経活動⁽³⁰⁾の指標であることから、本節では大脳皮質のなかでも前頭前野のGABA量に対する酸棗仁湯の効果を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節1.2.と同様である。

1.3. 実験装置ならびに実験手続き

1.3.1. ELISA法

1.3.1.1. 脳組織の摘出

<使用試薬>

・TRIzol® Reagent (Invitrogen)

<実験手続き>

脳虚血後28日目のAM 10:00-11:00間に酸棗仁湯1000 mg/kgを経口投与し、投与1時間後に脳を摘出し、速やかに前頭前野を分画した。それぞれの組織にTRIzol® Reagent (Invitrogen) 200 μ Lを加え、ホモジナイズした。ラットの脳サンプリングまでの実験スケジュールを図28に示した。

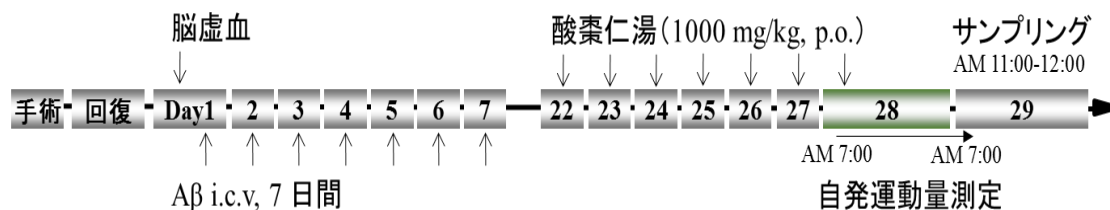


図 28 実験スケジュール

1.3.1.2. タンパク質濃度測定

<使用キット>

- ・ BCA Protein Assay Kit (Thermo)

Standard

Reagent A

Reagent B

Reagent A :Reagent B=50:1 の混合液を Working Reagent (WR) とした。

<使用試薬>

- ・ 10 × Tris-buffered saline (TBS) (pH7.2)

TRIZMA® BASE (Sigma) 24.22 g

NaCl 90 g

塩酸で pH 7.2 に合わせて、蒸留水で 1 L にメスアップした。

使用時は、蒸留水で 10 倍希釈した (1 × TBS)。

<実験手続き>

タンパク量は、BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。スタンダードとして 4000 mg/mL Bovine serum albumin (Sigma) を希釈して、2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 mg/mL に調整した。96 well assay plate に WR を 200 μ L 入れ、各 well にスタンダードおよびサンプルを 10 μ L ずつ加えた。30 秒間 Plate Shaker で振盪し、室温で 30 分間放置した。570 nm の波長でプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。スタンダードの値から検量線を描き、タンパク濃度を算出した。タンパク濃度が 0.8 μ g / μ L になるように 1 × PBS (pH7.2) で希釈した。

1.3.1.3. ELISA 法を用いた前頭前野における GABA 濃度測定

・ 使用キット

- ・ Rat Gamma Aminobutyric Acid ELISA Kit (My Bio Source)

Microtiter Plate (48 well)

Enzyme Conjugate

Standard A (0 nmoL/mL)

Standard B (0.5 nmoL/mL)

Standard C (1.0 nmoL/mL)

Standard D (2.5 nmoL/mL)

Standard E (5.0 nmoL/mL)

Standard F (10 nmoL/mL)

Substrate A

Substrate B

Stop Solution

Wash Solution (100×)

Balance Solution

<実験手続き>

1. すべての試薬は使用直前に室温にした. Standard A-F 及びサンプルを 1 well あたり 100 μ L 加えた.
2. Balance Solution を 1 well あたり 10 μ L 加えた.
3. Enzyme Conjugate を 1 well あたり 50 μ L 加えた. プレートカバーをして 37 °C で 1 時間 インキュベートした.
4. Wash Solution (1×) にて 1 well あたり 300 μ L, 5 回洗浄し, 最終洗浄後, 完全に液体を除去した. 洗浄は抗体プレートの各 well を洗浄液を用いて勢い良く洗い流しその後, 洗浄液を well に満たし 15-30 秒間静置し, アスピレーターを使用して洗浄液を除去した.
5. Substrate A,B を 1 well あたり 50 μ L ずつ加えた. プレートカバーをして 37 °C で 15 分 インキュベートした.
6. Stop Solution を 1 well あたり 50 μ L 加え, ただちに測定波長 450 nm, 参照波長 570 nm の吸光度を測定した.

1.4. 統計処理

第 1 章第 2 節 1.6. と同様である.

2. 実験結果

CI+A β +vehicle ラットの GABA 発現量は, Sham+vehicle ラットと比べ変化は無かった. 一方, 酸棗仁湯 1000 mg/kg 投与は vehicle 投与と比べ, GABA 量の増加傾向を示した (図 29).

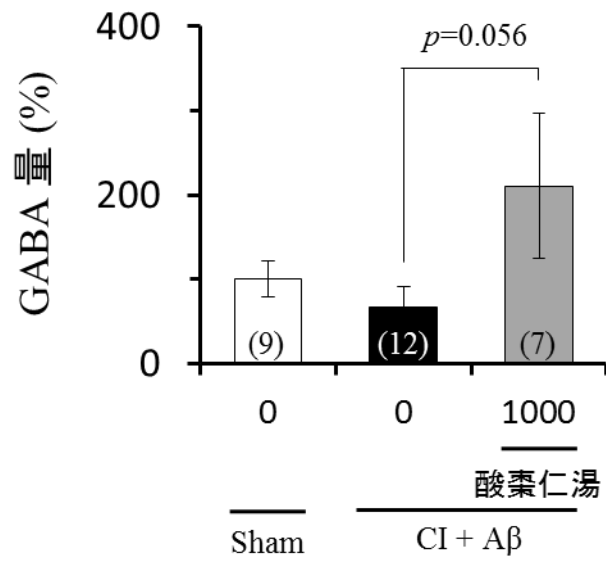


図 29 前頭前野における GABA 量

第2節 Western blotting 法を用いた海馬コリンアセチルトランスフェラーゼ発現に対する酸棗仁湯の効果

酸棗仁湯のθ波への作用や空間記憶障害改善作用の結果から、酸棗仁湯がコリン神経系を活性化させることが示唆された。また、水迷路課題における空間記憶は、中隔野から海馬へ投射したコリン神経が関係していると考えられている⁽⁵⁵⁾。したがって、本節ではアセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT) に着目し、Western blotting 法を用いて海馬における ChAT 発現量に対する酸棗仁湯の効果を検討した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1. と同様である。

1.2. 実験手続き

第1章第1節 1.2. と同様である。

1.3. 実験装置ならびに実験手続き

1.3.1. Western blotting 法

1.3.1.1. 脳組織の摘出

<使用試薬>

・ T-PER[®]Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo)

<実験手続き>

脳虚血後 28 日目の AM 10:00-11:00 間に酸棗仁湯 1000 mg/kg を経口投与し、投与 1 時間後に脳を摘出し、速やかに海馬を分画した。それぞれの組織に T-PER[®]Tissue Protein Extraction Reagent 200 μL を加え、氷冷下ホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (4 °C, 15,000 rpm, 40 min) し上清を採取しタンパク質抽出液を得た。ラットの脳サンプリングまでの実験スケジュールを図 28 に示した。

1.3.1.2. タンパク質濃度測定

<使用キット>

・ BCA Protein Assay Kit (Thermo)
Standard

Reagent A

Reagent B

Reagent A :Reagent B=50:1 の混合液を Working Reagent (WR) とした.

• ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Wako)

Lumigen™ TMA-6 Solution A

Lumigen™ TMA-6 Solution B

ECL Advance Blocking Reagent

< 使用試薬 >

• 10 × Tris-buffered saline (TBS) (pH7.2)

TRIZMA® BASE (Sigma)

24.22 g

NaCl

90 g

塩酸で pH 7.2 に合わせて、蒸留水で 1 L にメスアップした.

使用時は、蒸留水で 10 倍希釈した (1 × TBS).

< 実験手続き >

タンパク量は、BCA Protein Assay Kit を用いて測定した. スタンダードとして 4000 mg/mL Bovine serum albumin を希釈して、2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 mg/mL に調整した. 96 well assay plate に WR を 200 μL 入れ、各 well にスタンダードおよびサンプルを 10 μL ずつ加えた. 30 秒間 Plate Shaker で振盪し、室温で 30 分間放置した. 570 nm の波長でプレートリーダーを用いて吸光度を測定した. スタンダードの値から検量線を描き、タンパク濃度を算出した. タンパク質度が 30 μg /μL になるように 1 × PBS (pH7.2) で希釈し、2×SDS sample buffer (2-メルカプトエタノールを含む) を等量加え、最終的に 4.0 μg / 10 μL の濃度に調整した. その後、95°C、5 分間インキュベートし-20 °C で保存した.

1.3.1.3. SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

< 使用装置 >

• 電気泳動槽

Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD)

• ブロッキング装置

TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD)

• 電源装置

POWER PAC 200 (BIO-RAD)

<使用試薬およびゲル>

・一次抗体

ChAT 抗体: Anti-Choline Acetyltransferase antibody (abcam)

TBS-T : Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1 の混合液で 1000 倍希釈して用いた (1:1000) .

β -actin 抗体:Rabbit polyclonal to beta Actin (abcam)

TBS-T : Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1 の混合液で 500 倍希釈して用いた (1:500) .

・二次抗体

bovine anti-rabbit IgG-HRP (CST ジャパン株式会社)

TBS-T : Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1 の混合液で 10000 倍希釈して用いた (1:10000) .

・ 10 × Tris-buffered saline (TBS) (pH7.4)

TRIZMA® BASE (Sigma)	24.22 g
NaCl	90 g

塩酸で pH 7.4 に合わせて、蒸留水で 1 L にメスアップした。
使用時は、蒸留水で 10 倍希釈した (1 × TBS) .

・ 2 × SDS sample buffer

0.25M Tris-HCl (pH6.8)	25 mL
Sodium dodecyl sulfate (Wako)	2.0 g
蒸留水	9 mL
Glycerin (キシダ化学)	10 mL
Bromphenol blue sodium salt (Sigma)	5mg

使用時に 2-メルカプトエタノールを 100 μ L/mL になるように加えた。

・ 0.75M Tris-HCl (pH=8.8)

TRIZMA® BASE (Sigma)	45.41 g
------------------------	---------

蒸留水で 500 mL にメスアップした.

- 29% アクリルアミド/1% ビスアクリルアミド
アクリルアミド (第一化学薬品) 29 g
N,N'-メチレンビス (アクリルアミド) (Wako) 1.0 g

蒸留水で 100 mL にメスアップした.

- 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
Sodium dodecyl sulfate (Wako) 10 g

蒸留水で 100 mL にメスアップした.

- 10% Ammonium Persulfate (APS)
Ammonium persulfate (林純薬工業) 100 mg を蒸留水 1 mL に溶解した.

- 10 × SDS running buffer
TRIZMA® BASE (Sigma) 30.3 g
Glycin (Wako) 143.1 g
Sodium dodecyl sulfate (Wako) 10 g

蒸留水で 1 L にメスアップした.

使用時は 10 倍希釈して用いた (1 × SDS running buffer).

- Transfer buffer
TRIZMA® BASE (Sigma) 15 g
Glycin (Wako) 18 g

蒸留水で 1 L にメスアップした.

- Tris Buffererd Saline – Tween 20 (TBS-t)
10 × TBS 50 mL
蒸留水 450 mL
Tween 20 (BIO-RAD) 500 μL

・ 12% separating gel を以下の組成で作成した.

0.75M Tris-HCl (pH=8.8)	10 mL
29% アクリルアミド / 1%ビスアクリルアミド	8 mL
10% SDS	0.4 mL
蒸留水	1.6 mL
N,N,N,N-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)	20 μ L
10% APS (用時調整)	150 μ L

・ stacking gel を以下の組成で作成した.

0.5M Tris-HCl (pH=6.8)	5 mL
29% アクリルアミド / 1%ビスアクリルアミド	1.35 mL
10% SDS	0.2 mL
蒸留水	3.45 mL
N,N,N,N-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)	10 μ L
10% APS (用時調整)	75 μ L

※ TEMED および 10% APS は最後に加えた.

1. ゲル板からコームをはずし、泳動槽にゲル板をセットした.
2. 泳動槽の上槽 (陰極側) と下槽 (陽極側) に 1×running buffer を注入した.
3. well に sample および maker (Prestained SDS-PAGE Standards, BIO-RAD) を注入した.
4. 定電圧 100 V, 約 90 分間泳動した.

1.3.1.4. 転写

1. SDS-PAGE 終了前に, PVDF 膜 (Immun-blot™ PVDF membrane, BIO-RAD) を 3×9 cm の大きさに切り, メタノールに 60 秒間浸した後, transfer buffer に浸した.
2. ブロッキング用濾紙 (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD) を transfer buffer に浸した.
3. 泳動終了後, ゲル板からゲルを分離し, transfer buffer に浸けた.
4. ブロッキング装置の陽極面に transfer buffer を十分塗布し, 下から濾紙, PVDF 膜, ゲル, 濾紙の順に気泡が入らないように重ねた.
5. ブロッキング装置の陰極部を乗せて強く押さえ, 濾紙と PVDF 膜を十分密着させた後, 余分な transfer buffer を捨てた.
6. ゲルの面積 1 cm² あたり 2 mA の定電流で 90 分間ブロッキングを行った.
7. ブロッキング終了後, PVDF 膜をブロッキング液 (2% Gelatin from cold water fish skin/ water, SIGMA) に浸し, 4°Cで一晩振盪した.

1.3.1.5. 抗体処理

1. ブロッキング終了後, PVDF 膜をナイロンバッグに入れ三辺をポリシーラーで閉じた.
2. 一次抗体を含むブロッキング液 (Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1) 1mL をナイロンバッグに注入し, 空気を追い出した後, 残りの一辺をポリシーラーで閉じた.
3. ガラス板で挟み, 4°Cで一晩振盪した.
4. ナイロンバッグから PVDF 膜を取り出し, TBS-t で洗浄した (10 min×3).
5. PVDF 膜をナイロンバッグに入れ, 三辺をポリシーラーで閉じた.
6. 二次抗体を含むブロッキング液 (Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2) 1 mL をナイロンバッグに注入し, 空気を追い出した後, 残りの一辺をポリシーラーで閉じた.
7. ガラス板で挟み, 室温で2 時間振盪した.
8. ナイロンバッグから PVDF 膜を取り出し, TBS-t で洗浄した (10min × 3).

1.3.1.6. 免疫化学発色法

1. 発色液 (ImmunoStar® LD) を Solution A: Solution B= 1 : 1 となるよう調整した.
2. PVDF 膜から水分を取り, 室温で5 分間発色液に浸した.
3. PVDF 膜を反応させた後ナイロンバッグに入れ, Fluor Chem™8900 (Alpha Innotech) で撮影した

1.4. 統計処理

第1章第2節1.6. と同様である.

2. 実験結果

CI+Aβ 処置により海馬におけるChAT発現量は減少し, 酸棗仁湯 1000 mg/kg 投与はその減少を減弱した (図 30) .

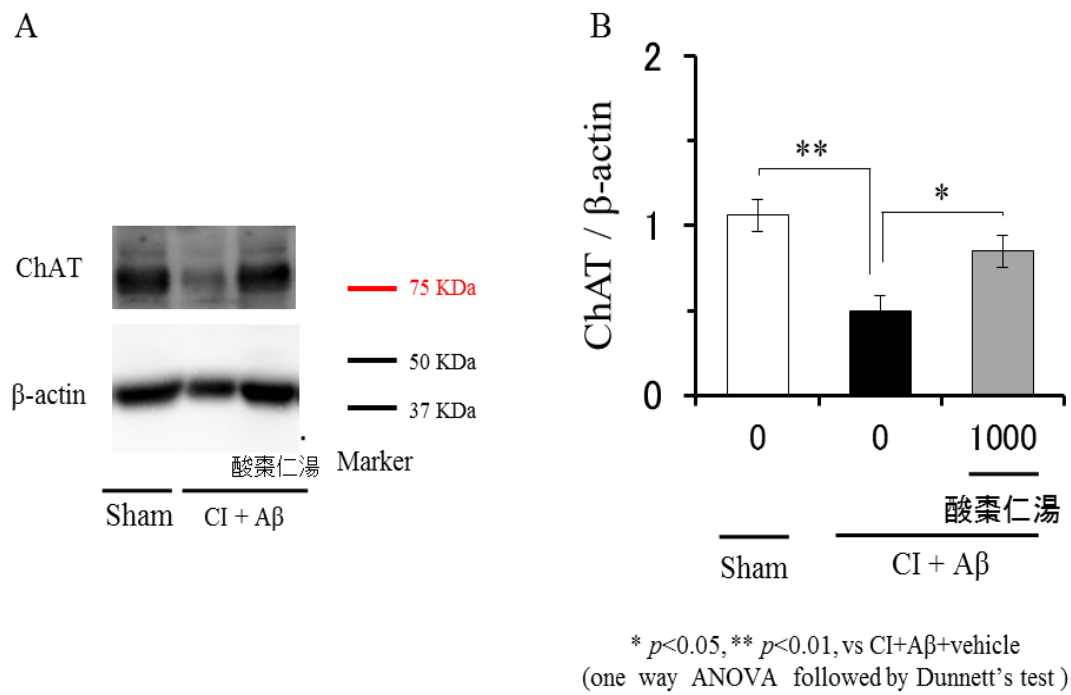


図 30 Western blotting 法による ChAT および β-actin のバンド
および海馬における ChAT 発現量

考察

第1章から3章までの検討により、CI+A β ラットの睡眠時 δ 波・ θ 波強度低下と空間記憶障害が、酸棗仁湯により改善されたことから、酸棗仁湯による睡眠時 δ 波・ θ 波強度低下の改善が記憶障害改善に関与することが示唆された。そこで、 δ 波を制御している GABA 神経系と θ 波を制御しているコリン神経系について検討した結果、酸棗仁湯は前頭前野の GABA 量の増加傾向を示し (図 29)、海馬の Ach 合成酵素である ChAT 発現量を改善させることが明らかとなった (図 30)。以上のことから、酸棗仁湯は GABA 神経系活性とコリン神経系の維持を誘導することで、 δ 波・ θ 波強度低下の改善と空間記憶障害を改善することが示唆された。

酸棗仁湯は正常ラットの GABA_A 受容体 mRNA を増加させること、睡眠剥奪ストレスにより空間記憶障害を呈するラットの海馬 GABA 量減少を改善することが報告されており⁽¹²⁾、酸棗仁湯は GABA 神経系に作用することが示唆されている。本研究結果では、酸棗仁湯は前頭前野の GABA 量を増加させる傾向にあった。本研究では、GABA 遊離量ではなく、GABA の組織含量を解析したことから、GABA 合成が酸棗仁湯によって亢進したことが考えられ、GABA 合成酵素である glutamic acid decarboxylase の発現または活性が酸棗仁湯によって増強されたことが示唆された。

CI+A β ラット海馬では ChAT 発現量が減少し、酸棗仁湯によって回復されたことから、CI+A β ラット海馬へ投射しているコリン神経細胞は減少していることが考えられ、酸棗仁湯は細胞保護もしくは細胞再生・シナプス再生によって改善作用を示したことが示唆された。長期の睡眠剥奪は海馬における brain derived neurotrophic factor (BDNF) 量を減少することが報告されている⁽⁵⁷⁾。また、A β によるコリン神経細胞の神経突起退縮や細胞死は、BDNF により改善することが報告されている⁽⁵⁸⁾。これらのことから、酸棗仁湯は δ 波を基準とした熟眠を誘発することで、BDNF の発現を誘導し、コリン神経系の細胞保護もしくは細胞再生・シナプス再生を引き起こしたことが考えられた。また、睡眠によりニューロンの新生が促されるとの報告がされている。海馬新生ニューロンの数は加齢に伴い、減少することが知られている⁽⁵⁹⁾。この新生ニューロンの数や機能低下は認知症で起こり、睡眠不足でも神経発生は減少する^(60,61)。AD モデルマウスでは、海馬 GABA 回路のアンバランスがおり、新生ニューロンの機能低下が認められている⁽⁶²⁾。さらに、ApoE4 マウスでは、海馬の GABA 回路の機能が低下し、新生ニューロン数も減少したが、この AD モデルマウスにフェノバルビタールを投与すると新生ニューロン数の減少が抑えられたとの報告もされている⁽⁶³⁾。このフェノバルビタールは海馬における GABA の放出を誘導することでニューロン前駆細胞を刺激し、ニューロン分化促進および海馬の新生ニューロン数を増加させる⁽⁶⁴⁾。このようなニューロン分化促進および海馬の新生ニューロン数の増加は GABA の作用を増強するジアゼパムにもみられる⁽⁶⁵⁾。新生ニューロンは、記憶の形成・維持・消去の中核的な機能を担う⁽⁶⁶⁾ことから、酸棗仁湯は δ 波強度を増加させることで海馬のコリン神経をはじめと

する神経新生を促し、認知機能低下を改善したことが考えられる。

ドネペジルは NREM 睡眠の短縮および REM 睡眠の増加など睡眠に対する有害作用が報告されている^(67,68)。Morase らによればドネペジルを 3-6 ヶ月服用した認知症患者では REM 睡眠の増加や REM 睡眠時の脳波異常が発現するとの臨床報告がある⁽⁶⁸⁾。また、Kamei らによればドネペジルを 1 週間投与した正常ラットでは、覚醒時間が増加、NREM 睡眠が減少し、NREM 睡眠時の δ 波の占有率が減少したと報告している⁽⁶⁹⁾。これらの報告から、ドネペジルは睡眠に対して悪影響を及ぼしている可能性が高いと考えられる。ドネペジルの睡眠に対する作用について CI+A β ラットを用いて検討したところ、ドネペジル経口投与により CI+A β ラットの覚醒量は投与後 2 時間まで有意に増加した (Data not shown)。この結果は、アセチルコリンが覚醒関連物質でありアルツハイマー病患者の睡眠障害に対して悪影響を及ぼすという説の裏づけとなると考えられる。また、トリアゾラムは NREM 睡眠時の δ 波占有率の減少を改善したが、REM 睡眠時の θ 波占有率の減少は改善しなかったことから、海馬における神経新生を誘導できなかったことが示唆された。しかしながら、脳虚血後 22-28 日目のトリアゾラム反復経口投与は CI+A β ラットの空間記憶障害を改善することから (Data not shown)、トリアゾラムには δ 波強度の増加を介した認知機能低下の改善作用があることを示唆していると考えられる。これらに対して、酸棗仁湯は NREM 睡眠時の δ 波・REM 睡眠時の θ 波強度低下を改善したことから、酸棗仁湯は、コリン神経系を強制的に活性化したのではなく、減少を改善したことに加え、GABA 神経を活性化したことで、覚醒と睡眠のバランスを正常化したと考えられる。これら酸棗仁湯の直接的な作用と相互作用による間接的な睡眠障害・空間記憶障害改善作用は新たな知見であると考えられる。

以上のことから、酸棗仁湯は GABA 神経細胞活性促進を介して熟眠を誘導し、睡眠の質を改善することで、コリン神経細胞の保護もしくは再生を引き起こすことで記憶障害を改善することが示唆された。

総括

アルツハイマー病患者の睡眠障害は治療満足度が低く、さらに適切な薬効評価モデル動物も未だ作製されていないという背景から、本研究ではまず睡眠障害を伴うアルツハイマー病モデル動物の確立を目的として実験を行った。また、漢方方剤である酸棗仁湯は臨床では睡眠障害に対して比較的安かつ効果的という報告があるが、その作用機序は未だ不明な点が多い。したがって、次に睡眠障害を伴うアルツハイマー病モデル動物の睡眠障害に対して酸棗仁湯が有効か、またその作用機序を検討した。さらに、認知機能と睡眠とは相互に影響していることから、睡眠障害を伴うアルツハイマー病モデル動物の空間記憶障害に対して酸棗仁湯が有効か、またその作用機序を検討した。第1章では CI+A β ラットの睡眠障害の検討を行った。第2章では第1章検出された睡眠障害に対して酸棗仁湯が有効かを検討した。第3章では CI+A β ラットの空間記憶障害の検討を行い、さらに検出された空間記憶障害に対して酸棗仁湯が有効かを検討した。第4章では酸棗仁湯の CI+A β ラットにおける睡眠障害および空間記憶障害改善メカニズムについて検討した。

1. CI+A β モデルラットの睡眠障害検出

CI+A β モデルラットは NREM 睡眠量の減少を示したことから、アルツハイマー病患者の睡眠障害のうち睡眠量の減少を反映したモデルであることが示された。また、CI+A β モデルラットの明期における覚醒および NREM 睡眠の出現回数が増加したことから、中途覚醒を反映したモデルであることが明らかとなった。さらに、CI+A β モデルラットにおける NREM 睡眠時の持続時間が減少したことから、CI+A β モデルラットはアルツハイマー病の睡眠の持続時間の低下を反映したモデルであることが明らかとなった。次に CI+A β モデルラットでは NREM 睡眠時の δ 波占有率が減少したことから熟眠障害を反映したモデルであることが明らかとなった。以上のことから、CI+A β モデルラットの睡眠障害は AD 患者が発症している睡眠障害を反映している可能性が高いと考えられる。

2. CI+A β モデルラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果

酸棗仁湯投与により CI+A β モデルの NREM 睡眠時間の短縮、中途覚醒の増加、NREM 睡眠持続時間の減少および熟眠障害をいずれも改善したことから、酸棗仁湯はアルツハイマー病患者の睡眠障害に対して有効であると考えられる。

3. CI+A β モデルラットの空間記憶障害検出および空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果

CI+A β モデルラットのプラットホーム通過時間は増加し、プラットホーム通過回数が減少したことから、空間記憶障害を示すことが明らかとなった。また、CI+A β モデルラットの遊泳速度は Sham 群と比べ差がなかったことから、CI+A β 処置による運動機能障害はないことが示された。さらに、酸棗仁湯投与により CI+A β モデルのプラットホーム通過時間は増加

およびプラットホーム通過回数が減少を改善したことから、酸棗仁湯はアルツハイマー病患者の睡眠障害に対して有効であると考えられる。

4. 酸棗仁湯の CI+A β モデルラットにおける睡眠障害改善および空間記憶障害改善メカニズムの検討

CI+A β モデルラットにおいては前頭前野における GABA 発現量の変化は認められなかったが、酸棗仁湯投与により CI+A β ラットにおける前頭前野の GABA 発現量を増加させる傾向にあったことから、酸棗仁湯は前頭前野における GABA 発現量の増加を介して NREM 睡眠時間の短縮、中途覚醒の増加、NREM 睡眠持続時間の減少および熟眠障害を改善したことが示唆された。

また、CI+A β モデルラットにおいて海馬における ChAT 発現量は減少し、酸棗仁湯投与により CI+A β ラットにおける海馬の ChAT 発現量の減少を改善したことから、酸棗仁湯は ChAT 発現量の増加を介して空間記憶障害を改善したと考えられる。

結論

CI+A β モデルラットから NREM 睡眠量の減少, 中途覚醒, NREM 睡眠持続時間の減少および熟眠障害が検出されたことから, CI+A β モデルラットはアルツハイマー病の睡眠障害を反映したモデルとなる可能性が示された. また, CI+A β モデルラットの睡眠障害のうち熟眠障害は他の AD モデルの睡眠障害では検出されていないことから, 今後の新規薬物開発での使用が期待される. また, 臨床報告と同様に酸棗仁湯は睡眠障害を改善したことから, さらなる酸棗仁湯の臨床使用が期待される. さらに, 酸棗仁湯は空間記憶障害を改善したことから, アルツハイマー病患者の睡眠障害のみならず認知機能にも良い影響を示すことが示唆された. 次に, 酸棗仁湯は前頭前野の GABA 発現量を増加させる傾向にあったことおよび海馬における ChAT 発現量を増加させたという知見は酸棗仁湯の基礎研究において新たなエビデンスである. したがって, 酸棗仁湯はアルツハイマー病患者の睡眠障害のみならず認知症に対しても治療薬となり得る可能性が示された. さらに今回, 睡眠障害の改善が認知機能障害の改善作用に影響することが示唆されたのは新たな知見であると考えられる.

参考文献

1. Finkel S: The signs of the behavioral and psychological symptoms of dementia. *Clinician*, 16, 33, 1998.
2. Ohayon MM, Roth T. What are the contributing factors for insomnia in the general population? *J Psychosom Res.* 2001; **51**: 745-755.
3. Tractenberg RE, Singer CM. The Sleep Disorders Inventory: an instrument for studies of sleep disturbance in persons with Alzheimer's disease. *J Sleep Res.* 2003; **12**: 331-337.
4. Yaffe K, Laffan AM, Harrison SL et al. Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *JAMA.* 2011; **306**: 613-619.
5. Lim AS, Kowgier M, Yu L et al. Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep.* 2013; **36**: 1027–1032.
6. Tsapanou A, Gu Y, Manly J et al. Daytime Sleepiness and Sleep Inadequacy as Risk Factors for Dementia. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2015; **5**: 286-295.
7. Guo Z, Wills P, et al. Cognitive impairment, drug use, and the risk of hip fracture in persons over 75 years old: a community-based prospective study. *AM J Epidemiolo.* 1998; **887**: 148.
8. Salzman C ed: Clinical geriatric psychopharmacology-3rd edition-. *Baltimore.* 1998.
9. Stahl SM, Markowitz JS, et al. Cause of donepezil and hypnotics among Alzheimer's disease patients living in the community. *J Clin Psychiatry.* 2003; **466**: 64.
10. Miyaoka T, Kawano K, Furuya M et al. Efficacy and Safety of Sansoninto in Insomnia with Psychiatric Disorder: An Open-Label Study. *Altern Integr Med.* 2015; **4**: 1-6.
11. 平田和美, 有光潤介, 小川恵子. 認知症の行動・心理症状 (BPSD) に対する酸棗仁湯の効果. *老年精神医学雑誌* 2016; **27(増刊-2)**: 164 -164.
12. 牧野利明. 酸棗仁湯. *脳21* 2015; **18(4)**: 313-316
13. Liu W, Wong A, Law AC, Mok VC. Cerebrovascular disease, amyloid plaques, and dementia.

Stroke. 2015; **46(5)**: 1402-1407

14. Iwasaki K, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I et al. Cerebral ischemia combined with β -amyloid impairs spatial memory in the eight-arm radial maze task in rats. *Brain Res*. 2006; **1097**: 216-223.
15. Moran M, Lynch CA, Walsh C, Coen R, Coakley D, Lawlor BA. Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. *Sleep Med*. 2005; **6**: 347-352.
16. Platt B, Drever B, Koss D, Stoppelkamp S, Jyoti A, Plano A, et al. Abnormal cognition, sleep, EEG and brain metabolism in a novel knock-in Alzheimer mouse, PLB1. *PLoS One*. 2011; **11**: e27068.
17. Colby-Milley J, Cavanagh C, Jegu S, Breitner JC, Quirion R, Adamantidis A, Sleep-Wake Cycle Dysfunction in the TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease: From Early to Advanced Pathological Stages. *PLoS One*. 2015; **10**: e0130177.
18. Zhang B1, Veasey SC, Wood MA, Leng LZ, Kaminski C, Leight S, et al. Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. *Am J Pathol*. 2005; **5**: 1361-1369.
19. Kam K, Duffy ÁM, Moretto J, LaFrancois JJ, Scharfman HE, Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of β -amyloid neuropathology. *Sci Rep*. 2016; **6**: 20119.
20. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982; **11**: 491-498.
21. Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979; **10**: 267-272.
22. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 1983; **219**: 1184-1190.
23. Wang J, Zhang HY, Tang XC. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment. *Acta Pharmacol Sin*. 2009; **30(7)**: 879-888.

24. Ancoli-Israel S, Amatniek J, et al: Effects of galantamine versus donepezil on sleep in patients with mild to moderate Alzheimer disease and their caregivers: a double-blind, head-to-head, randomized pilot study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2005; **19**: 240-245.
25. 岡田 泰伸: ギャノン生理学 (原書 22 版) . 丸善, 2008.
26. 大熊 輝雄: 臨床脳波学 (第 4 版) . 医学書院, 1991.
27. Witting W, van der Werf D, et al: An on-line automated sleep-Wake classification system for laboratory animals. *J Neurosci Methods*, 1996; **66**: 109-112.
28. Nagao M, Takasaki K, Nogami A *et al*. Effect of Yokukansan on sleep disturbance in a rat model of cerebrovascular dementia. *Trad Kam Med*. 2014; **1**: 19-26.
29. Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *The Journal of biological chemistry*. 2001; **276(24)**: 21562–21570.
30. Kurotani T, Yamada K, Yoshimura Y, Crair MC, Komatsu Y. Neuron. State-dependent bidirectional modification of somatic inhibition in neocortical pyramidal cells. *neuron*. 2008 **57(6)**: 905-916.
31. Platt B, Drever B, Koss D, Stoppelkamp S, Jyoti A, Plano A, et al. Abnormal cognition, sleep, EEG and brain metabolism in a novel knock-in Alzheimer mouse, PLB1. *PLoS One*. 11 2011; **10**: e27068.
32. Colby-Milley J, Cavanagh C, Jegu S, Breitner JC, Quirion R, Adamantidis A, Sleep-Wake Cycle Dysfunction in the TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease: From Early to Advanced Pathological Stages. *PLoS One*. 2015; **11**: e0130177.
33. Noguchi H, Kitazumi K, Mori M, Shiba T, Electroencephalographic properties of zaleplon, a non-benzodiazepine sedative/hypnotic, in rats, *J Pharmacol Sci*. 2004; **94(3)**: 246-251.
34. 小川純人 高齢者の不眠治療におけるポイント 漢方と診療 2016; **7(2)**: 88-89.

35. 小曾根基裕 山寺博史 久永 明人 専門医からみた漢方薬の使い方 漢方と診療
2016; **7(2)**: 93-101.
36. Saito K, Umeda S, Kawashima K, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicines.
XXVI. Effects of Sansohnin-to on pentobarbital sleep in stressed mice. *Biol Pharm Bull.* 2000;
23: 76-79.
37. Han Y, Shi YF, Xi W, Zhou R, Tan ZB, Wang H, et al. Selective activation of cholinergic basal
forebrain neurons induces immediate sleep-wake transitions. *Curr Biol.* 2014; **24(6)**: 693-698.
38. Eban-Rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, Jones JR, de Lecea L. VTA dopaminergic
neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat Neurosci.* 2016; **19(10)**:
1356-1366.
39. Anacleit C, Ferrari L, Arrigoni E, Bass CE, Saper CB, Lu J, et al. The GABAergic parafacial
zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nat Neurosci.* 2014; **17(9)**: 1217-1224.
40. Vandecasteele M, Varga V, Berényi A et al. Optogenetic activation of septal cholinergic neurons
suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proc Natl
Acad Sci U S A.* 2014; **111**: 13535-13540.
41. Beraneck M, Idoux E. Reconsidering the role of neuronal intrinsic properties and
neuromodulation in vestibular homeostasis. *Front Neurol.* 2012; **3**: 1-13.
42. Westerberg CE, Mander BA, Florczak SM, Weintraub S, Mesulam MM, Zee PC, et al.
Concurrent impairments in sleep and memory in amnesic mild cognitive impairment. *J Int
Neuropsychol Soc.* 2012; **18(3)**: 490-500.
43. Knott V, Mohr E, Mahoney C, Ilivitsky V. Quantitative electroencephalography in Alzheimer's
disease: comparison with a control group, population norms and mental status. *J Psychiatry
Neurosci.* 2001; **26**: 106-116.
44. Morris. R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.*
1981; **12**: 239-260.

45. Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, et al. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; **48**: 680-693.
46. Finkel S: The eigns of the behavioral and psychological symptoms of dementia. *Clinician*, 16, 33, 1998.
47. Ohayon MM, Roth T. What are the contributing factors for insomnia in the general population? *J Psychosom Res.* 2001; **51**: 745-755.
48. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett.* 1994; **170(1)**: 63-66.
49. Chen SY, Wright JW, Barnes CD. The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide(25-35). *Brain Res.* 1996; **720(1-2)**: 54-60.
50. Cheng YF, Wang C, Lin HB, Li YF, Huang Y, Xu JP, Zhang HT. Inhibition of phosphodiesterase-4 reverses memory deficits produced by A β 25-35 or A β 1-40 peptide in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2010; **212(2)**: 181-191.
51. Roy DS, Arons A, Mitchell T, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature.* 2016; **7595**: 508-512.
52. Marshall L, Helgadottir H, Molle M, Born J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature.* 2006; **444**: 610–613.
53. Wu L, Mu N, Yang F, Zang J, Zheng JP. A study of the non-motor symptoms in early Parkinson's disease with olfactory deficits. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; **20(18)**: 3857-3862.
54. Yang G, Lai CS, Cichon J, Ma L, Li W, Gan WB. Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science.* 2014; **344(6188)**: 1173-1178.
55. Miyamoto M, Kato J, Narumi S *et al.*, Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. *Brain Res.* 1987; **419(1-2)**: 19-31

56. Huo Q, Chen M, He Q, Zhang J, Li B, Jin K, et al. Prefrontal Cortical GABAergic Dysfunction Contributes to Aberrant UP-State Duration in APP Knockout Mice. *Cereb Cortex*. 2016; doi: 10.1093/cercor/bhw218
57. Zielinski MR, Kim Y, Karpova SA, McCarley RW, Strecker RE, Gerashchenko D. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neurosci Lett*. 2014; **580**: 27-31.
58. Wang Z, Liu Q, Zhang R, Liu S, Xia Z, Hu Y. Catalpol ameliorates beta amyloid-induced degeneration of cholinergic neurons by elevating brain-derived neurotrophic factors. *Neuroscience*. 2009; **163(4)**: 1363-1372.
59. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005; **85(2)**: 523-569.
60. Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011; **33(6)**: 1139-1151.
61. Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103(50)**:19170-5.
62. Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, et al. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2009; **5(6)**: 624-633.
63. Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, et al. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell*. 2009; **5(6)**: 634-645.
64. Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*. 2005; **47(6)**: 803-15.
65. Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 2012; **489(7414)**: 150-154.

66. Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, et al. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*. 2009; **139**(4): 814-27.
67. Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, et al. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*. 2009; **326**: 1005-1007.
68. Mander BA, Marks SM, Vogel JW, Rao V, Lu B, Saletin JM, et al. β -amyloid disrupts human NREM slow waves and related hippocampus-dependent memory consolidation. *Nat Neurosci*. 2015 **18**: 1051-1057.
69. Moran M, Lynch CA, Walsh C, Coen R, Coakley D, Lawlor BA. Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. *Sleep Med*. 2005; **6**: 347-352.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始御指導、御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授、ならびに有益な御助言と御高閲を賜りました藤原道弘名誉教授、生体機能制御学教室の三島健一教授、生薬学教室の金城順英教授に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり終始御指導と御助言を賜りました帝京平成大学薬学部の高崎浩太郎講師、福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の桂林秀太郎准教授、窪田香織助教、渡辺拓也助教に深く感謝いたします。また、多大なご指導ご助言ならびに御協力頂いた原愛女史、長尾昌紀氏に敬意と感謝の意を表します。多彩な御助言、御指導とともに実験を援助してくださった、樋口聖氏、坂元佑哉氏に深く感謝いたします。また、多くの御指導をいただいた河野洋幸氏、中野貴文氏に感謝致します。また、共同実験者の百武裕香女史、吉田詩織女史、同じ分野で実験に励み、多大な協力をしてくれた平井裕子女史、緒方綾香女史、森川花絵女史、安藤なつき女史、西山祐子女史をはじめ、福岡大学臨床疾患薬理学教室の皆様に深く感謝致します。また、学生生活を通じて始終精神的、経済的支援を賜りました家族に心より感謝致します。最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝致します。