

老化促進マウス SAMP8 の嗅覚反応障害と
認知機能障害への人参養栄湯の治療効果研究

**Study of the therapeutic effect of Ninjinyoeito on olfactory response
impairment and cognitive dysfunction in senescence-accelerated
mouse SAMP8**

PD191006 平田茉莉花

目次

緒言	1
第1章 老化促進マウス (SAMP 8 マウス) の嗅覚反応障害の検討	3
第1節 SAMP8 マウスの悪臭回避行動の評価	
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	5
1.2 嗅覚嗜好テスト (olfactory preference test)	5
1.3 匂い物質	6
1.4 実験スケジュール	7
1.5 統計解析	7
2. 結果	
2.1 3ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テスト結果	
2.1.1 探索エリア滞在時間	8
2.1.2 総走行距離	8
2.1.3 回避エリア滞在時間	8
2.2 5ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テスト結果	
2.2.1 探索エリア滞在時間	12
2.2.2 総走行距離	12
2.2.3 回避エリア滞在時間	12
第2節 アルデヒド臭に反応する嗅覚神経経路の解析	
1. 実験材料ならびに実験方法	
1.1 匂い物質暴露手順	16
1.2 脳灌流固定	16
1.3 脳切片作成	17
1.4 免疫組織染色	17
1.5 c-fos 陽性細胞数の定量	17
1.6 統計解析	18
2. 結果	
2.1 各脳部位の c-fos 陽性細胞数	18
小括	25

第2章	SAMP8 マウスの嗅覚反応障害に対する人参養栄湯の検討	28
第1節	SAMP8 マウスの悪臭回避行動低下に対する人参養栄湯の効果の検討	
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	28
1.2	嗅覚嗜好テスト(olfactory preference test)	28
1.3	匂い物質	28
1.4	人参養栄湯	29
1.5	実験スケジュール	31
1.6	統計学的解析	31
2.	結果	
2.1	探索エリア滞在時間	31
2.2	総走行距離	31
2.3	回避エリア滞在時間	32
第2節	嗅覚神経経路異常に対する人参養栄湯の効果の検討	
1.	実験材料ならびに実験方法	
1.1	匂い物質暴露手順	35
1.2	脳灌流固定	35
1.3	脳切片作成	35
1.4	免疫組織染色	35
1.5	c-fos 陽性細胞数の定量	35
1.6	統計解析	35
2.	結果	
2.1	各脳部位の c-fos 陽性細胞数に対する人参養栄湯の効果	35
第3節	SAMP8 マウスの嗅覚識別異常に対する人参養栄湯の効果の検討	
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	41
1.2	嗅覚識別テスト(odor discrimination test)	41
1.3	匂い物質	42
1.4	人参養栄湯	42
1.5	実験スケジュール	42
1.6	統計学的解析	42
2.	結果	42
小括		45

第3章 SAMP8 マウスの空間記憶障害・精神様症状に対する人参養栄湯の効果…… 47

第1節 SAMP8 マウスの空間記憶障害に対する人参養栄湯の効果

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……48
 - 1.2 モリス水迷路試験……48
 - 1.3 人参養栄湯……49
 - 1.4 実験スケジュール……49
 - 1.5 統計学的解析……49
2. 結果…… 49

第2節 SAMP8 マウスの不安様行動に対する人参養栄湯の効果

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……51
 - 1.2 Open field 試験……51
 - 1.3 人参養栄湯……52
 - 1.4 実験スケジュール……52
 - 1.5 統計解析……52
2. 結果
 - 2.1 総走行距離……53
 - 2.2 内側エリア滞在時間……53

第3節 SAMP8 マウスの無気力様行動に対する人参養栄湯の効果

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……55
 - 1.2 Sucrose splash 試験…… 55
 - 1.3 人参養栄湯……56
 - 1.4 実験スケジュール……56
 - 1.5 統計解析……56
2. 結果
 - 2.1 身繕い時間……56
 - 2.2 身繕い回数……56

小括…… 58

総括……59

参考文献……62

謝辞……72

【緒言】

我が国の65歳以上の高齢者における認知症の有病率は、1980年代から2000年代にかけては3.8～11%と報告されていたが、2012年頃には15%、更に2025年には20%にまで上昇すると報告されている⁽¹⁾。World Alzheimer Report 2015によると認知症患者は3.2秒に1人の割合で増え、2050年には世界総数1.3億人を突破する見込みである。また、世界保健機関による国際疾病分類第10版(ICD-10)によると、認知症は「通常、慢性あるいは進行性の脳疾患によって生じ、記憶、思考、見当識、理解、計算、学習、言語、判断など多数の高次脳機能障害からなる症候群」とされている⁽²⁾。認知症には様々な原因疾患や病態が含まれるが、アルツハイマー型認知症(Alzheimer's disease)、Lewy小体型認知症の他、前頭側頭葉変性症、血管性疾患、外傷性脳損傷、物質・医薬品の使用、HIV感染、プリオン病、パーキンソン病、Huntington病、他の医学的疾患、複数の病因、特定不能に分類されている⁽³⁾。その中でもADは、認知症患者の約7割を占めていると言われており、数値にすると世界中で5000万人にも上り、有病率は今後ますます増加して行くことが懸念されている。ADはアミロイド β とリン酸化タウの脳内蓄積が認知機能障害の原因であることが示唆されており、一度発症すると、その脳機能を回復させる治療法は現時点では見出されていない。このような背景から、ADの早期発見・早期予防への取り組みが重要視され始めている。

ADでは脳内のアミロイド β とリン酸化タウの蓄積が病因である可能性を先述したが、これらの蓄積は認知機能障害が現れるより20-30年前から始まっているともいわれている⁽⁴⁾。さらに、嗅覚障害も認知機能障害の発現に先行して認められることが示されており⁽⁷⁾一次嗅覚野の一部である嗅内野皮質にもこれらの病因蛋白が蓄積することが報告されている⁽⁵⁾⁽⁶⁾。正常な認知機能障害からADを発症するまでの中間段階である軽度認知機能障害(MCI)の患者は、認知機能障害が検出されにくく、脳内で病変がすでに始まっているも見過ごされがちである⁽⁸⁾。MCIからADへ移行する背景には嗅覚同定機能低下、言語性記憶能力低下、海馬体積低下、嗅内野皮質体積低下、髄液A β 42低下などが挙げられており⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾、MCIの段階においても、有意な嗅覚障害が認められている⁽¹¹⁾。嗅覚障害では、においの感受性低下やにおいを同定できない症状が認められる。嗅覚の経路には、一般的な匂い物質の受容に関与する主嗅覚経路と、フェロモンなどの受容に関わる副嗅覚経路が知られている⁽¹²⁾。主嗅覚経路では、匂い物質は嗅神経が多数存在する嗅上皮や嗅粘膜で受容され、嗅覚を刺激する。その情報は、嗅神経の投射先である主嗅球(第一次嗅覚野)に伝わり、その後、主嗅球から嗅皮質(第二次嗅覚野)の様々な部位(前嗅覚、嗅結節、梨状皮質、扁桃体、嗅内皮質)に伝わる。さらには、嗅皮質を介して大脳辺縁系である海馬や視床下部、視床へと情報が伝わる⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。扁桃体や視床下部への情報伝達は情動行動、海馬は記憶と深く関連があり、匂いの情報を利用して餌を探したり、外敵の危険を察知するなどの機能を有している⁽¹⁵⁾。ADでは嗅内皮質の神経原線維変化と神経細胞減少が認められており、認知機能障害が軽度の患者においても健常人と比較して32%の細胞数が減少してい

る⁽¹⁶⁾。また、前嗅核においても軽度 AD 患者は、多数の神経原線維変化を示している⁽¹⁷⁾。これらのことから、AD の早期病態の一つに嗅覚神経経路の障害が示唆される。従って、認知機能障害が発症する前段階において、嗅覚障害の早期発見ならびに治療を開始することで認知機能障害への進行を抑制できることが期待される。AD の検査には、トレーサー分子による陽電子放射断層撮影法 (PET) と脳脊髄液 (CSF) 中たんぱく質分析が用いられており、これらの検査は AD 症状発症の 20 年前から、その変化を検出している⁽¹⁸⁾。しかし、これらの方法は費用と侵襲性の点で実用性に問題がある。そのため、ある程度障害が進行した段階での診断に用いられることが多く、進行を抑制するには既に手遅れであることが少なくない。そこで、実用的な AD 早期発見技術について、バイオマーカーや遺伝子に着目した方法など様々な研究が進められている。その中で、嗅覚障害検査は侵襲性は低く、費用も安価で、診察室で比較的簡単にできるものである。嗅覚障害検査は、AD 患者の匂い同定能力の低下を検出しており⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾、有用性が高いと考えられる。しかし、嗅覚障害に関する詳細な情報は少なく、早期の嗅覚障害の特性や治療法に関する報告は無い。

人参養栄湯は当帰・芍薬・地黄・白朮・茯苓・人参・甘草・桂皮・陳皮・遠志・黄耆・五味子の 12 種の生薬から構成されている代表的な補剤であり、気血両虚を補うとされ、がんをはじめとする緩和医療の領域で使用されている⁽²¹⁾。また、臨床では主に術後の体力低下、食欲不振、疲労倦怠、そしてそれに付随する抑うつや無気力状態などの精神症状に対しても処方されている。また、近年ではフレイルといわれる高齢者の虚弱に対しても使用されている。フレイルとは介護前段階を意味する用語として 2014 年日本老年医学会より提唱された概念で、体重減少や筋力の衰えなどの身体面だけでなく、孤独、閉じこもりなどの社会的側面、そしてうつや無気力、認知機能障害などを含めた精神・心理面も含んでいる。身体的機能低下による歩行障害や転倒と認知機能の低下は双方に影響を及ぼし、身体的にフレイルであることは、後の認知機能低下のリスクであり⁽²²⁾、認知症発症の危険因子であることが報告されている⁽²³⁾。このような背景から、近年では人参養栄湯は AD を含む認知症予防にその有効性が提唱されている漢方薬である。しかし、AD による嗅覚障害に対する効果は不明である。

老化促進マウスである senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) マウスは、記憶障害や神経細胞数減少、さらにアミロイド β とリン酸化タウの増加を示し、その他にも AD と類似の病態変化が現れることから、AD モデルマウスとして提案されている⁽²⁶⁾。しかし、SAMP8 マウスが AD 早期の嗅覚障害の病態を呈しているかは検討されておらず、それに対する人参養栄湯の治療効果も未検討である。この SAMP8 マウスを用いた早期嗅覚障害の検討は、AD の早期嗅覚障害の病態解明に繋がると考えられる。さらに人参養栄湯の治療効果の評価は、AD の嗅覚障害治療法の確立に繋がると期待される。

そこで本稿第 1 章では、SAMP8 マウスの悪臭回避行動と嗅覚神経経路の神経細胞活性を解析し、AD 早期の嗅覚障害との類似性とその病態メカニズムを検討した。続く第 2 章では SAMP8 マウスの嗅覚障害に対する人参養栄湯の治療効果を解析し、人参養栄湯の嗅覚障害治療薬としての有用性を検討した。また、第 3 章では SAMP8 マウスの記憶障害や精

神症状に対する人參養榮湯の治療効果を解析し、AD の中核症状である認知機能障害と周辺症状である無気力や不安症状に対する人參養榮湯の効果を検討した。

第1章 老化促進マウス (SAMP 8 マウス) の嗅覚反応障害の検討

AD は、認知症患者の約 7 割を占めており、世界中で 5000 万人が罹患している進行性の神経変性疾患である。AD 脳では、アミロイド β の蓄積やリン酸化タウによる神経原繊維変化が認められ、認知機能障害が緩徐に進行して行く。また、記憶力低下が発症するより早い段階から嗅覚障害が認められることが報告されているが⁽²⁵⁾ (図 1)、その病態の全貌は明らかではない。この段階から医療介入を開始することで AD への進行抑制が期待される。MCI の段階においても、有意な嗅覚機能障害が認められており、嗅覚障害の病態を解明することは、AD 早期段階での治療法開発に有益であると考えられる。

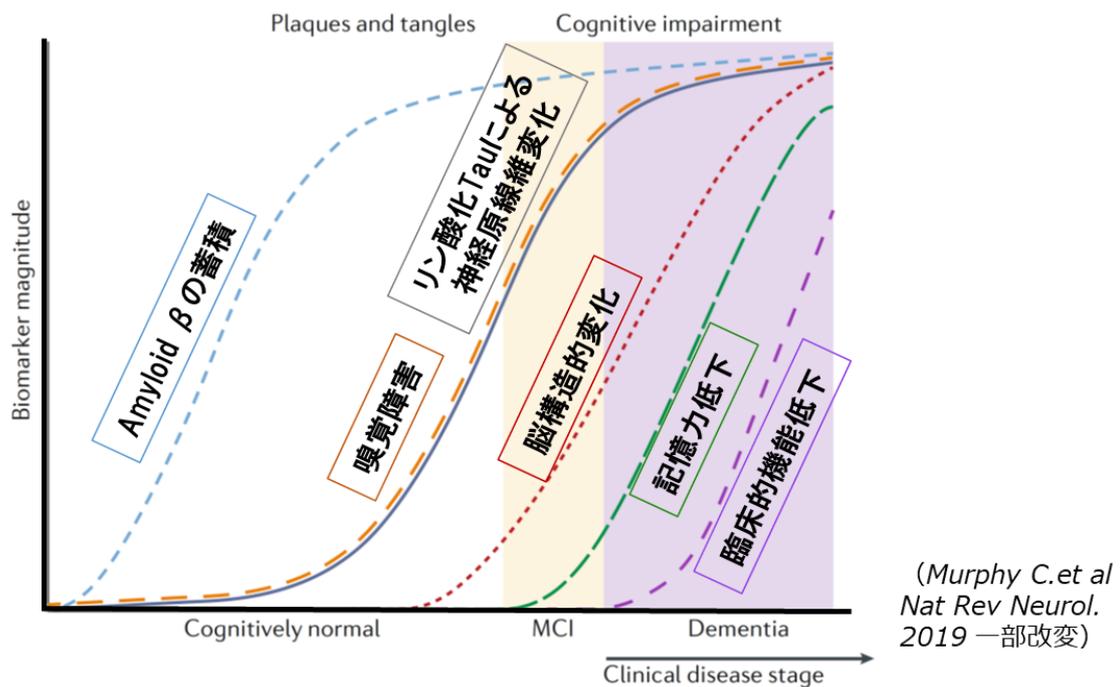


図 1. AD における病態の変化

Senescence-Accelerated Mouse (SAM) は、老化促進・短寿命を示す Senescence-Accelerated Mouse Prone (SAMP) 系統と正常老化を示す Senescence-Accelerated Mouse Resistant (SAMR) 系統がある。SAMP 系統の一つである SAMP8 マウスは、学習記憶障害を示し、アミロイド β やリン酸化タウの脳蓄積が認められることから、AD モデルマウスの一つとして提案されている⁽²⁶⁾ (表 1)。従って、AD や MCI で認められる嗅覚障害の病態解明の手段の一つとして、SAMP8 マウスの病態解析は有効であると考えられる。しかし、SAMP8 マウスの嗅覚変化に関する報告は皆無である。

本章では、SAMP8 マウスが嗅覚障害の病態モデルとなるか否かの検討を目的として、様々な匂い物質に対する SAMP8 マウスの反応行動を解析した。さらに、嗅覚神経経路における神経活動の変化を検討した。

	Alzheimer's disease	SAMP8
アミロイド β 過剰発現	○	○
アミロイド斑	○	○
リン酸化タウ	↑	↑
ニューロン欠失	○	○
シナプス機能障害	○	○
コリン作動性神経欠失	○	○
学習記憶障害	○	○

表 1. SAMP8 マウス脳における AD 病変

第1節 老化促進マウス SAMP8 の悪臭回避行動低下の評価

マウスは本能的に忌避する匂いがあり、天敵であるキツネの肛門腺から分泌される trimethyl-thiazoline (TMT) や、傷んだ食品の刺激臭である pentanal や 2-methylbutyric acid などに対して、接近を回避する⁽⁴⁹⁾。そこで、本節では pentanal などのアルデヒド臭に対する SAMP8 マウスの回避行動を解析した。

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

10 週齢の SAMP8 マウスと senescence accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) マウス (正常老化) を日本エスエルシー株式会社から購入した。室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 2\%$ 及び 12 時間の明暗サイクル (7:00 A.M. 点灯) の実験室で一匹ずつケージにいれ、単独飼育した。なお、水及び餌 (CE-2; 日本クレア株式会社、東京) は自由に摂取できるようにした。また、実験は福岡大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号: 1806022、1915122、2115132)。

1.2 嗅覚嗜好テスト (olfactory preference test)

嗅覚嗜好テストは Hyung-Ju Cho らの報告に基づき⁽²⁷⁾、中型プラスチックケージ (25×35×17 cm) の端にろ紙 (1.5×1.5 cm) を設置した装置を用いた (図 2)。匂いを発する液体をろ紙に滴下した後、装置内にマウスを入れ、上部からカメラでマウスの行動を 3 分間撮影した。撮影した動画の解析は、ビデオ・トラッキング・ソフトウェア ANY-maze (Stoelting 社、イリノイ州、米国) を用いて、探索エリア (ろ紙を中心として半径 10cm 以内の範囲) と回避エリア (ろ紙を設置した壁の反対の壁から 5cm の範囲) の 2 つのエリア内での滞在時間を解析した。

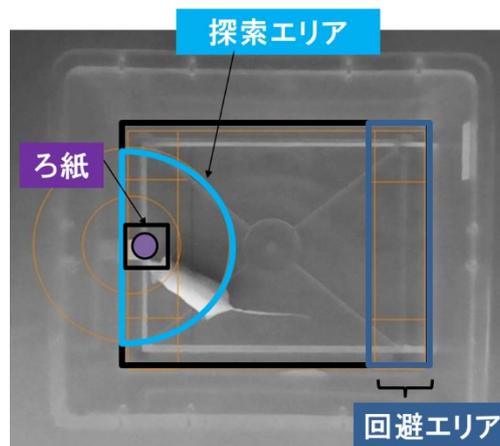


図 2. 嗅覚嗜好テスト

1.3 使用した匂いを発する液体

eugenol (Cat. No. A0232、東京化成工業、東京)、DL-2-Methylbutyric Acid (2MB : Cat No. M0181、東京化成工業)、pentanal (Cat No. V0001、東京化成工業)、hexanal (Cat. No. H0133、東京化成工業)、heptanal (Cat. No. H0025、東京化成工業)、n-Octanal (Cat. No. O0044、東京化成工業)を使用した。ろ紙に各液体を 10 μ L 染み込ませた。以下、各匂い物質について詳細を記載した。

eugenol : 化学式 $C_{10}H_{12}O_2$ で表記され、グアイアコールにアリル基が置換した構造を持つ、フェニルプロパノイドの一種である。無色から淡黄色の油状液体で、クローブ（丁子）などのスパイスに多く含まれている。天然にはシナモンやバナナなどにも含まれており、刺激のある快い芳香であるため香水などに利用される。マウスにとって無害な匂いとされているが、一方で、ヒトにおいては、歯科領域で局所麻酔としても使用されていることから、歯科を連想させ嫌悪を抱く場合もあると報告がある⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾。

DL-2-methylbutyric Acid (2-MB) : 化学式 $C_5H_{10}O_2$ で表記され、メチル酪酸やイソ吉草酸と同類である。無色の液体で、加齢臭、足の裏の臭い、蒸れた靴下のおいなどの不快臭を放つ原因物質であり、マウスにとっても嫌悪感を抱く臭いである。

pentanal : 化学式 $C_5H_{10}O$ で記される鎖状有機化合物である。アルデヒドの一種で、パレルアルデヒドや吉草酸アルデヒド、アミルアルデヒドとも呼ばれる。無色の液体で、甘酸っぱい焦げた刺激臭を放ち、果物や酒の香り成分でもあるため食品添加物の香料としても使用されている。ペンタナールの一種である 4-methylpentanal は、生態系では危険を伝える匂いに含まれていると報告があり⁽³⁴⁾、hexanal との混合物が特定悪臭物質の 1 つである。人間が嗅ぐとスイートグリーン様の匂いを感じる。

hexanal : 化学式 $C_6H_{12}O$ で表記される鎖状有機化合物である。アルデヒドの一種で、ヘキシルアルデヒドやカプロンアルデヒドとも呼ばれる無色の液体で、大豆や草などの青臭さの原因物質であり、香料や建材の防腐剤として使用されている。また、生態系では危険を伝える警告フェロモンの成分であることも報告されており、Noge らはオオツマキヘリカメムシが放つ臭気成分のうち、hexanal は逃避行動を誘発する警告フェロモンであると同定している⁽³⁰⁾。

heptanal : 化学式 $C_7H_{14}O$ で表記される鎖状有機化合物である。アルデヒドの一種で、エナントアルデヒドとも呼ばれる。無色の液体で、ツンとする果実臭を放ち、古米の臭気に多く含まれていると報告されている⁽³¹⁾。

octanal：化学式 $C_8H_{16}O$ で表記される鎖状有機化合物である。アルデヒドの一種で、オクチルアルデヒドやカプリルアルデヒドとも呼ばれる。無色ないし淡黄色の可燃性の液体で、パクチー様の青臭い臭いを放ち、微量だとシトラス様のフレッシュな香りがするとも言われている。塗料や香水、食品用香料の原料として使用されているが、消防法に定める第4類危険物第2石油類に該当している^(32, 33)。

危険を感じた動物が発する匂いの存在は、マウスやラットなどのげっ歯類だけでなく、シカやウシ、ブタ、そして我々人間においても報告されている。そのため危険を伝える匂いは重要なものと考えられており、動物種によっては警告フェロモンと呼ばれる。今回実験に用いた pentanal 及び hexanal は、ラットが危険を伝える匂いに含まれ、それを嗅いだラットの不安を増大させることが報告されている⁽³⁴⁾。上記の匂い物質の中で、pentanal、hexanal、heptanal、octanal 及び 2-MB は本能的に嫌がると考えられている匂いである。なお、コントロールには無臭である mineral oil を用いた。

1.4 実験スケジュール

3ヶ月齢と5ヶ月齢になった時点で、嗅覚嗜好テストを行った。SAMR1 (N=10), SAMP8 (N=10)。

1.5 統計解析

統計解析は、Unpaired t-test を用いた。なお、危険率が 5%以下だった場合を統計学的に有意差があるものとみなした。結果は平均値±標準誤差で示した。

2. 実験結果

2.1 3ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テスト結果

2.1.1 探索エリア滞在時間

SAMR1 マウスにおいては、無害である mineral oil と eugenol での探索エリア滞在時間と比較して、pentanal などのアルデヒド類と 2-MB での探索エリア滞在時間の短縮を示した。同様に SAMP8 マウスもアルデヒド類と 2-MB での探索エリア滞在時間の短縮を示した。しかし、SAMP8 マウスは pentanal でのみ顕著な時間短縮を示さず、SAMR1 マウスの滞在時間と比較して有意な延長を示した。従って、SAMP8 マウスでは pentanal に対する回避行動の低下が認められ、嗅覚障害を呈することが示唆された。(図 3)

2.1.2 総走行距離

SAMP8 マウスと SAMR1 マウスの間では、2-MB での検討を除いて各検討での総走行距離に差は認められなかった。2-MB の検討では、SAMP8 マウスで有意な延長が認められた(図 4)。

2.1.3 回避エリア滞在時間

Mineral oil および eugenol において、SAMP8 マウスの回避エリア滞在時間は SAMR1 マウスと比較して有意に増加した。一方、pentanal では SAMP8 マウスの回避エリア滞在時間は有意に減少した。また、octanal は SAMP8 マウスの方が回避エリア滞在時間が増加傾向にあり、2-MB、hexanal、heptanal では有意な差は認められなかった。(図 5)

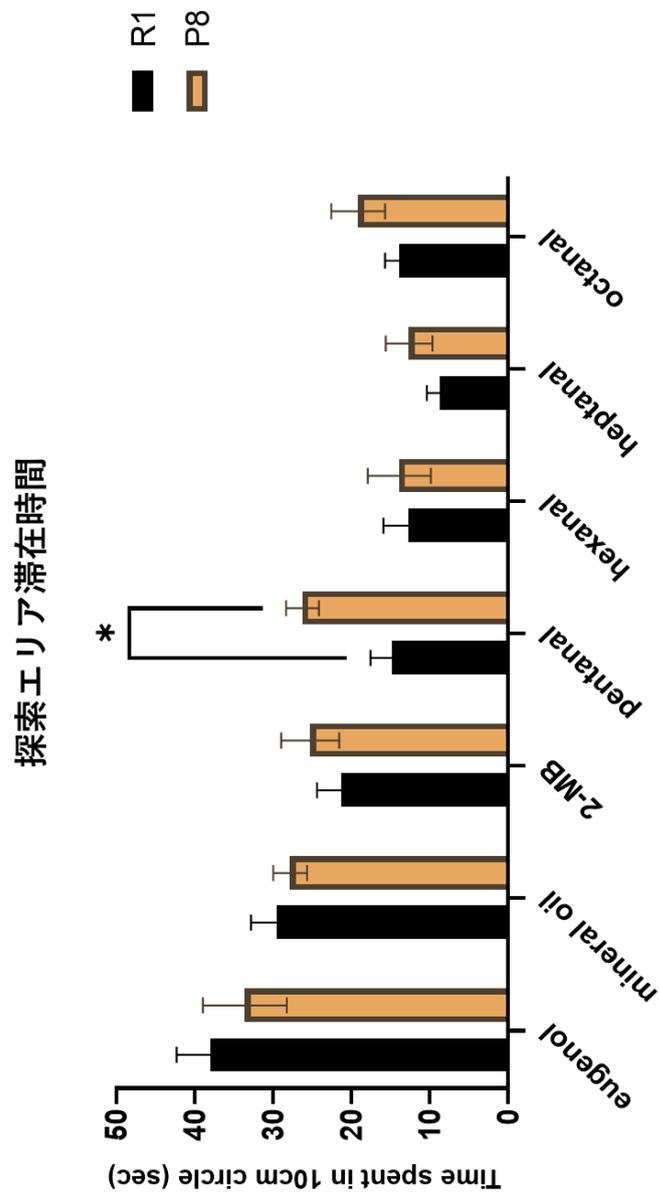


図3 3ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける探索エリア滞在時間

グラフの縦軸は、探索エリア滞在時間 [ろ紙周囲半径 10 cm内の滞在時間 (秒)] を示す。この時間が長くなるほど、悪臭に対する回避行動は低下している、すなわち嗅覚障害があると考えられる。pentanal での検討において、SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、探索エリア滞在時間の有意な延長を示した。unpaired t-test. ** $p < 0.01$ 、R1: SAMR1、P8: SAMP8

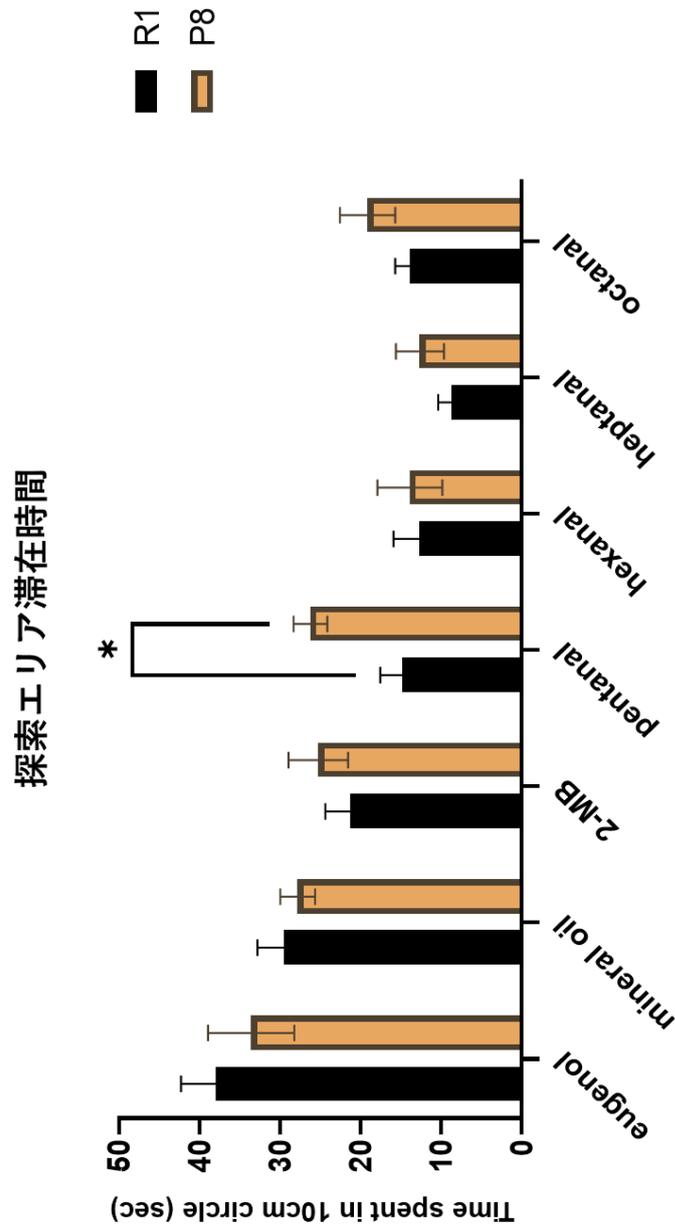


図4 3ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける総走行距離

3分間におけるマウスの走行距離を測定した。2-MB での検討において、SAMR1 マウスと SAMP8 マウス間で走行距離に有意な差が認められた。unpaired t-test. * $p < 0.05$

R1: SAMR1、P8: SAMP8

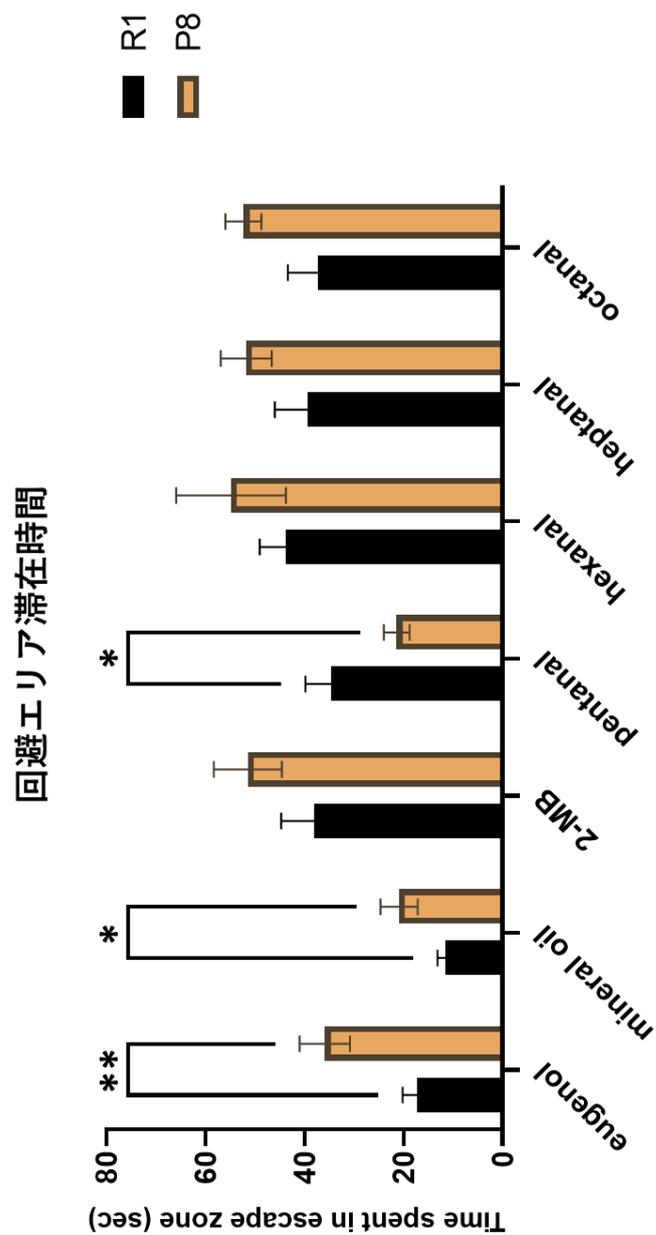


図5 3ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける回避エリア滞在時間
 グラフの縦軸は、回避エリア滞在時間 [ろ紙を設置した壁の反対の壁から 5cm の範囲] を示す。unpaired t-test. * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、R1: SAMR1、P8: SAMP8

2.2 5ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テスト結果

2.2.1 探索エリア滞在時間

SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、mineral oil、 eugenol、 2-MB の検討での探索エリア滞在時間に差は認められなかったが、pentanal および hexanal、 heptanal、 octanalでの検討で探索エリア滞在時間の有意な延長を示した (図6)。これらの結果から、SAMP8 マウスはアルデヒド類に対する回避反応の低下が認められ、アルデヒド臭に対する嗅覚障害を示していることが示唆された。

2.2.2 総走行距離

SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、2-MB、 pentanal、 hexanal、 heptanal、 octanal の検討での総走行距離を有意に延長した。一方、mineral oil および eugenol の検討では、両マウス間で差は認められなかった (図7)。

2.2.3 回避エリア滞在時間

SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、mineral oil の検討での回避エリア滞在時間を有意に延長したが、eugenol、 2-MB、 pentanal、 hexanal、 heptanal、 octanal については、差は認められなかった。(図8)

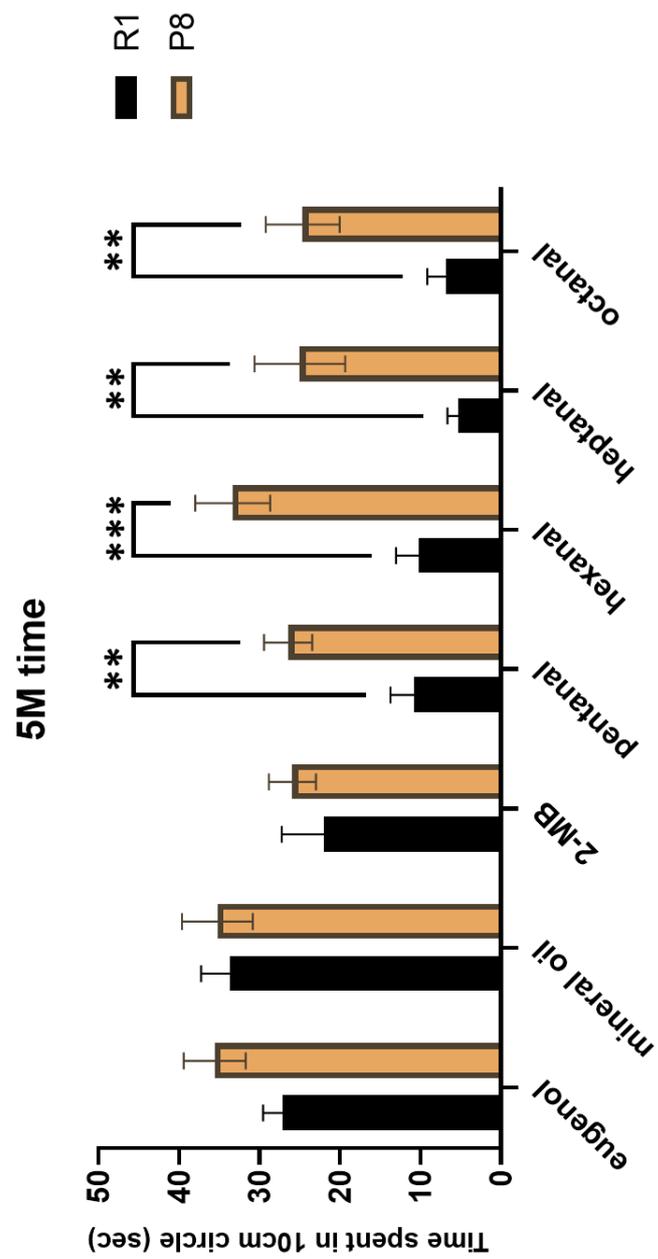


図 6. 5 ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける探索エリア滞在時間

unpaired t-test. ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、R1: SAMR1、P8: SAMP8

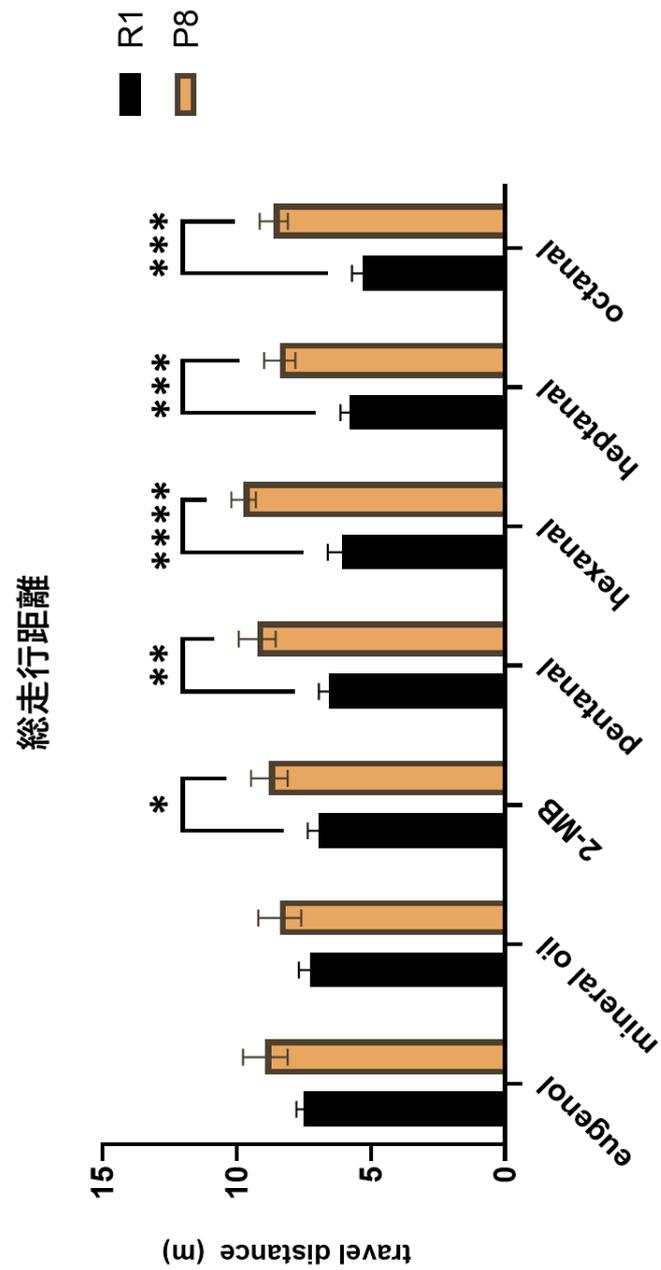


図7. 5ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける総走行距離
 unpaired t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ R1: SAMR1、
 P8: SAMP8

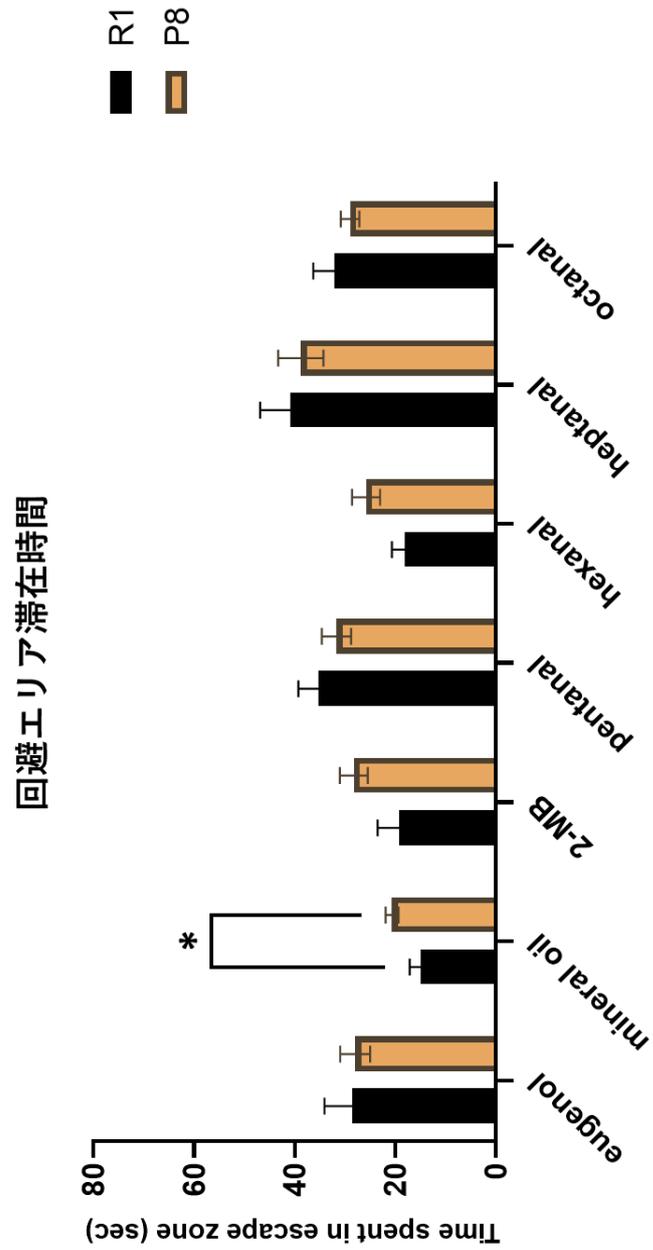


図8. 5ヶ月齢 SAMP8 マウスの嗅覚嗜好テストにおける回避エリア滞在時間

unpaired t-test. * $p < 0.05$, R1: SAMR1, P8: SAMP8

第2節 アルデヒド臭に反応する嗅覚神経経路の解析

第2節では、SAMP8 マウスがアルデヒド臭に対して回避反応低下を示すメカニズムについて検討を行った。脳が臭いを感知・認識する過程では、臭気が鼻腔内上皮の嗅細胞に発現する受容体に結合し、嗅覚刺激となり、嗅神経を通じて一次中枢の嗅球、二次中枢の嗅皮質へ情報が伝達される（図 9）。その後、嫌悪反応などの情動行動を司る扁桃体や、認知・記憶を司る海馬、そして自律神経や内分泌のコントロールセンサーである視床下部などの大脳辺縁系領域に伝達され、行動に反映される⁽³⁵⁻³⁷⁾。以前の報告では、マウスにとって天敵であるキツネの肛門腺から分泌される成分である TMT の臭いを嗅いだマウスは、梨状皮質、視床下部、扁桃体中心核、および海馬領域における c-fos 陽性細胞数の発現増加が認められている⁽³⁸⁾。c-fos は核に局在するリン酸化タンパク質であり、種々の刺激により一過性に発現する超初期遺伝子としての性質を持つことから、神経細胞における c-fos タンパク質レベルの上昇は神経細胞活動性の指標とみなされている^(39, 40)。従って、嗅覚刺激に応じた嗅覚神経経路の神経細胞活動性を c-fos を用いて評価することができる。

そこで第2節では、SAMP8 マウスのアルデヒド臭に対する回避反応低下メカニズムを検討するため、hexanal 暴露後の嗅覚神経経路の各脳領域における c-fos 陽性細胞数の発現量を解析した。

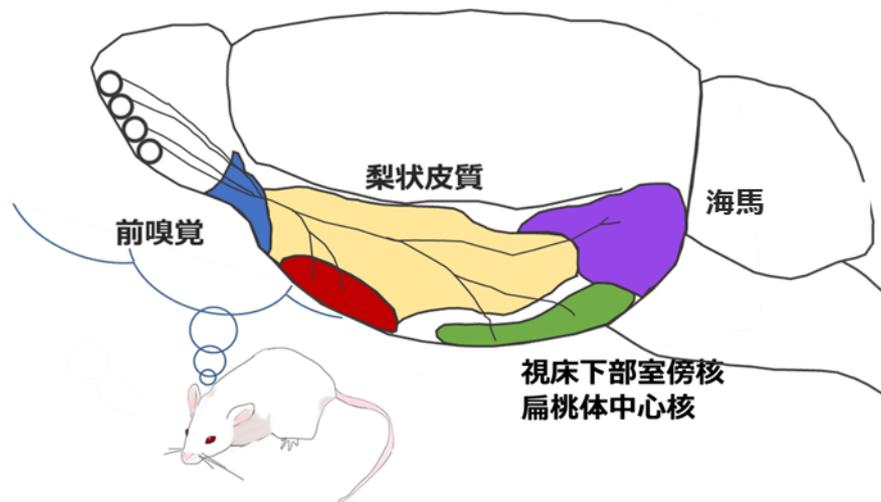


図 9. マウス脳における嗅覚神経経路の模式図

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1 匂い物質暴露手順

小型プラスチックケージの端に、ろ紙 (1.5×1.5 cm) を設置し、eugenol または hexanal を 10 µL 添加した後、装置内へマウスを入れ、60 分間放置した。その後、脳灌流固定を行った。

1.2 脳灌流固定

マウスに、メドトミジン 0.75 mg/kg (Meiji Seika Pharma Co. Ltd. 東京)、ミダゾラム 4 mg/kg (SANDOZ K.K. Holzkirchen, Germany)、ブトルファノール 5 mg/kg (Meiji Seika Pharma Co. Ltd.) の 3 種混合麻酔を腹腔内投与した。正向反射が消失していることを確認後、仰臥位にして開胸した。肋骨を切開して心臓を露出させた後、先端を削った 25G 注射針を左心室から刺入させた状態で心臓を鉗子で固定した。右心耳を切開した後、注射針からリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (ヘパリン Na 含む) を約 50 mL 灌流し、脱血処理を行った。その後、氷冷した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH7.4) 200 mL を灌流し、脳組織の固定を行った。

灌流固定後、マウスの脳組織を摘出した。摘出した脳組織を 4% paraformaldehyde 溶液に一晩浸漬固定した。翌日、0.05% アジ化 Na 含有 PBS に置換し、冷蔵保存した。

1.3 脳切片作成

凍結切片作製時は、浸漬液を 15% スクロース溶液に置換後、さらに 30% スクロース溶液に置換し、それぞれ脳組織が沈むまで冷蔵庫に静置した。脳組織が完全に沈んだ後、小脳を切除し、切断面を底に向け包埋容器内に静置した。容器内に凍結用包埋剤 (OCT compound、サクラファインテックジャパン株式会社: 30% sucrose = 2:1 の混合液) を注いだ後、包埋容器の底を凍結用剤 (ドライアイスで冷却したエタノール) に浸して、急速に凍結した。

凍結包埋した脳組織は、庫内温度 -20°C のクリオスタット (LEICA 社) 内に 30 分程度放置し、薄切し易い硬さにした。厚さ 30 µm の冠状切片に薄切した。表 2 に示すように、脳領域を大きく 9 つに分けて、各部位 3~6 枚程度の切片を薄切後、あらかじめアジ化 Na 入り PBS を入れた 24 well plate に入れて冷蔵庫にて保存した。

1.4 c-fos 免疫組織学的染色

Yanagida らと Hiraoka らの報告を基に⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾、凍結冠状切片を c-fos 抗体を用いて免疫染色した。24well plate 内の切片を 0.1 M PBS で洗った後、3% H_2O_2 /メタノールに置換後 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。0.1 M PBS で洗浄後、5% 正常ヤギ血清 (S-1000、Vector Laboratories、カリフォルニア州、米国) に置換し、30 分間インキュベートすることで、二次抗体の非特異的結合を防いだ。切片を一次抗体 (ウサギ由来抗 c-fos 抗

体、 #2250、 1 : 2000、 Cell Signaling Technology、 マサチューセッツ州、 米国) 溶液で 4° C にて一晩インキュベートした。切片を入れたプレートは一晩ローテーター上に置いた。翌日、切片を 0.1 M PBS で洗い、ビオチン化二次抗体 (ヤギ由来ビオチン化ウサギ IgG 抗体、 BA-1000、 1 : 100、 Vector Laboratories) 溶液に置換し、 2 時間インキュベートした。洗浄後ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ複合体 (P0397、 1 : 300、 Dako 社、 グロストルプ、 デンマーク) 溶液で 1 時間インキュベートした。洗浄後、 diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit、 SK-4100 Vector Laboratories) とニッケルの混合液内で 30 分間程度で反応させ、 PBS にて洗浄後直ちに切片をスライドガラスにマウントし、 1 時間程度風乾させた。その後、アルコールで段階的に脱水、キシレンで透徹した後、最後にエンテランニュー (Merck、ダルムシュタット、ドイツ) にて封入した。

1.5 c-fos 陽性細胞数の定量

c-fos 陽性細胞数の定量を行うため、表 2 と図 9 に示す脳領域を mouse brain atlas を参考にして⁽⁴³⁾、顕微鏡 (KEYENCE、倍率 4 倍) 下で撮影した。撮影画像上で測定対象部位を 0.1mm² の正方形にて囲い込んだ。盲検下でその範囲内における c-fos 陽性細胞数を測定した。

脳領域	亜領域	bregmaからの距離	
anterior olfactory nucleus (前嗅核)	lateral part	+2.33	①
anterior piriform cortex (前梨状皮質)	piriform cortex 2	+1.09	②
dorsal endopiriform nucleus (背側梨状核)		+1.09	
caudate putamen(striatum) (線条体)		-0.35	③
bed nucleus of stria terminalis (分界条床核)	medial (posterointermediate part)		
	medial (posterolateral part)	-0.35	
	medial (posteromedial part)		
central amygdala (扁桃体中心核: CeA)		-0.71	④
lateral anterior hypothalamic nucleus (外側前方視床下部核: LA)		-0.71	
hypothalamic paraventricular nucleus (視床下部室傍核: PVN)		-1.07	
medial amygdala (内側扁桃体)		-1.23	⑤
posterior piriform cortex (後梨状皮質)	piriform cortex 2	-2.03	⑥
hippocampus (海馬)	comus ammon 1 (CA1)	-2.15	⑦
	comus ammon 2 (CA2)		
	comus ammon 3 (CA3)		
amygdala piriform transition area (扁桃体梨状移行領域: Ampir)		-3.39	⑧
posteromedial cortical amygdala (後内側皮質扁桃体: PMCo)		-3.39	
cingulate cortex (帯状回皮質)		-3.79	⑨
visual cortex (視覚野)		-3.79	
entohinal cortex (嗅内皮質)		-3.79	

表 2. 本研究で評価対象とした脳領域 (亜領域含む)

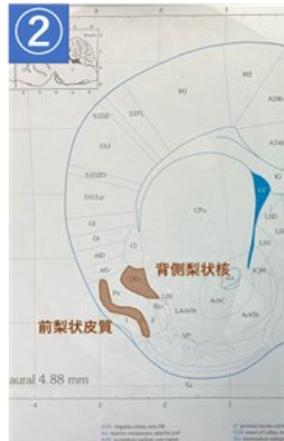
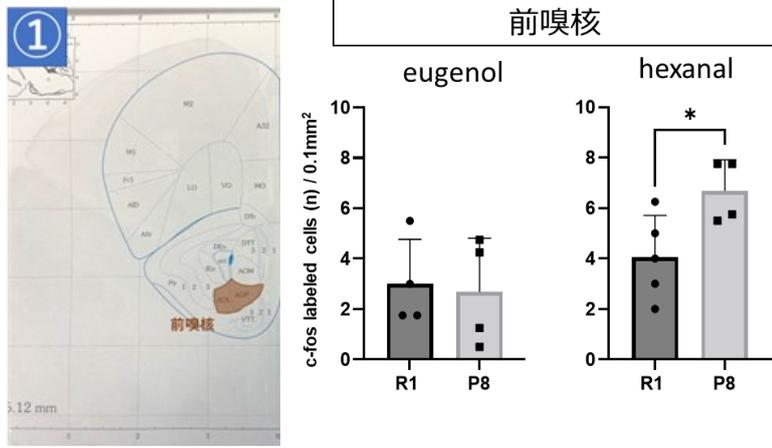
1.6 統計解析は、Unpaired t-test を用いた。なお、危険率が 5%以下だった場合を統計学的に有意差があるものとみなした。結果は平均値±標準誤差で示した。

2. 結果

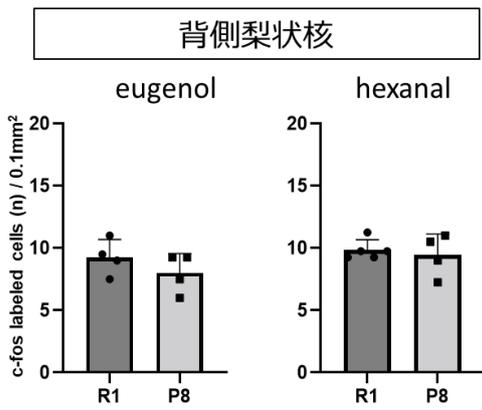
2.1 各脳部位の c-fos 陽性細胞数

hexanal 暴露群の SAMP8 マウスでは、同条件下の SAMR1 マウスと比較して前嗅核、前梨状皮質において c-fos 陽性細胞数が有意に増加しており、神経細胞活動の上昇が認められた (図 10 A、C)。また、海馬 CA3 領域においても同様の結果が得られた (図 10 J)。一方、大脳辺縁系である視床下部室傍核および扁桃体中心核では、SAMR1 マウスと比較して SAMP8 マウスは c-fos 陽性細胞数の有意な減少を示し、SAMP8 マウスは視床下部室傍核および扁桃体中心核の神経細胞活動が低下していることが示唆された (図 10 E、F)。また、嗅内皮質においても SAMP8 マウスで神経細胞活動の低下が認められた。(図 10 M)

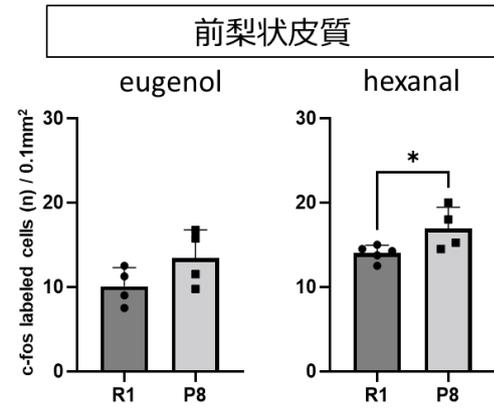
A)



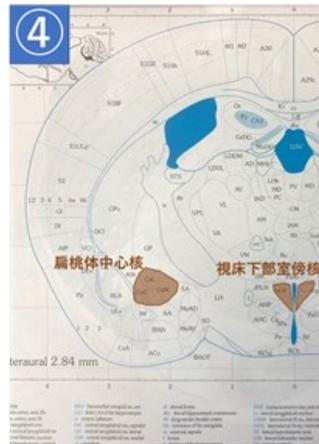
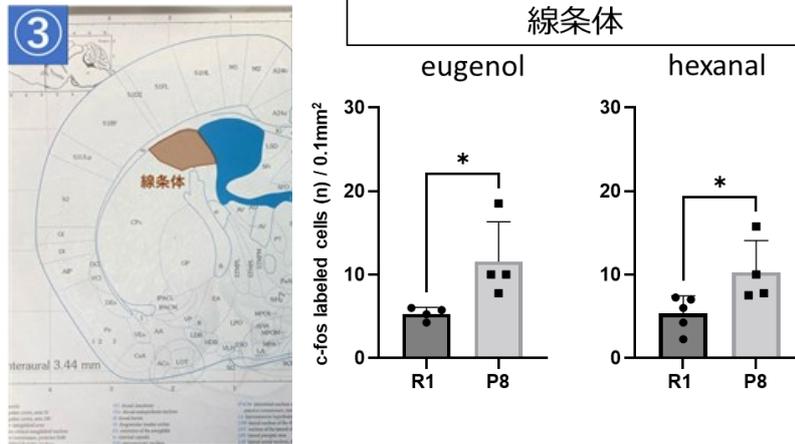
B)



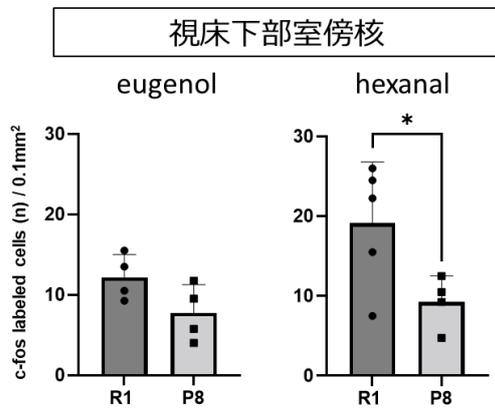
C)



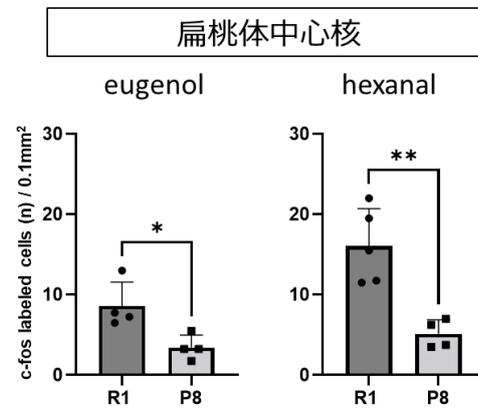
D)



E)

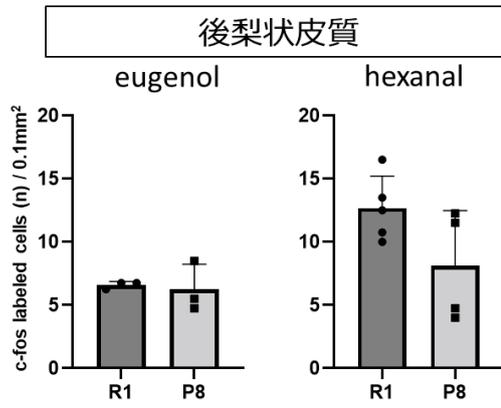


F)

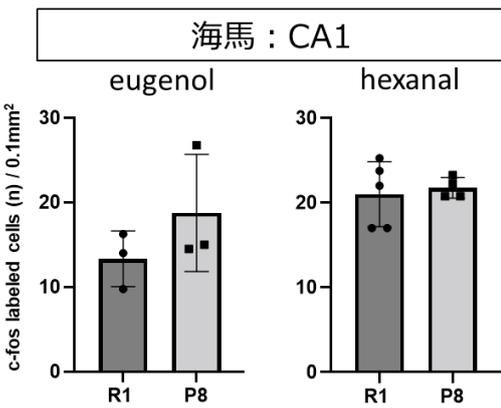
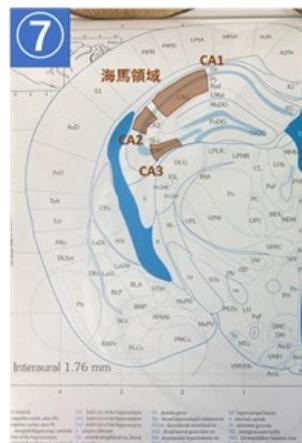




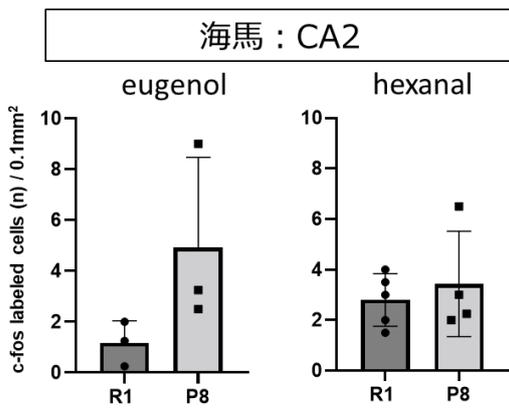
G)



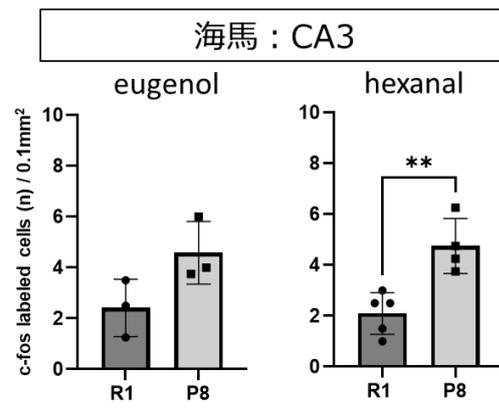
H)



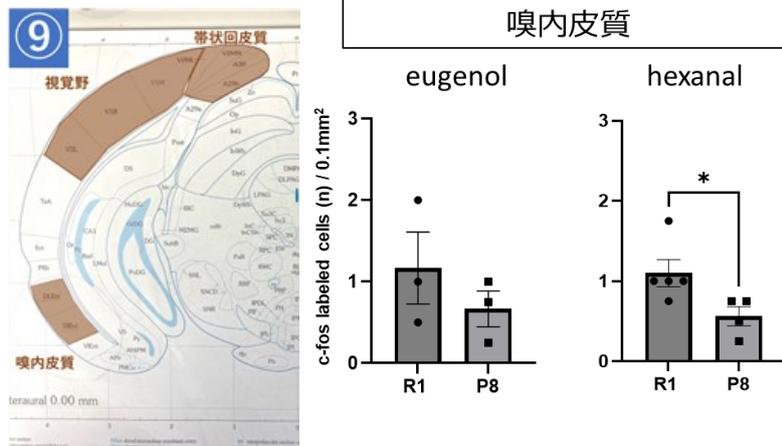
I)



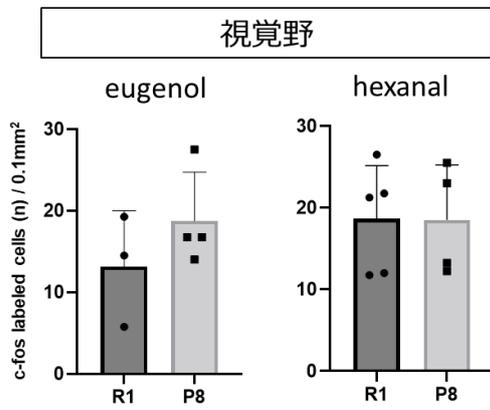
J)



M)



N)



O)

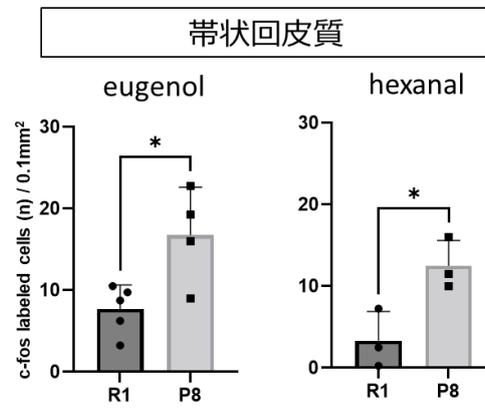


図 10. 各脳領域における c-fos 陽性細胞数

eugenol ならびに hexanal に 1 時間暴露させた際の c-fos 陽性細胞数
unpaired t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, R1: SAMR1、P8: SAMP8

小括

第 1 章では、AD モデル動物である SAMP8 マウスの悪臭回避行動の低下を検討し、SAMP8 マウスはアルデヒド臭に対する回避行動が低下することが認められた。さらに嗅覚神経経路の障害の有無を評価するため、アルデヒド類の一つである hexanal を暴露した際の脳内 c-fos 陽性細胞数を測定し、嗅覚神経経路の各脳領域における神経細胞活動を解析した。その結果、SAMP8 マウスは視床下部室傍核と扁桃体中心核において hexanal 暴露による神経細胞活動が低下していることが認められた。これらのことから、SAMP8 マウスでは嗅覚反応における視床下部室傍核と扁桃体中心核での神経細胞不応答が、回避行動低下に関与することが示唆された。

第 1 節では、マウスが本能的に嫌悪する匂いである 2-MB やアルデヒド類に対する嗅覚反応を解析した。マウスが嫌悪する匂い成分を添加したろ紙への探索時間の延長は、悪臭回避行動の低下と考えられる。3 ヶ月齢と 5 ヶ月齢の両時点で SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して pentanal に対する回避行動の低下を示した。残りのアルデヒド類に対しては、SAMP8 マウスは、3 ヶ月齢では回避行動の低下を示さなかったが、5 ヶ月齢で低下を示した。一方、2-MB に対する回避行動は、3 ヶ月齢と 5 ヶ月齢ともに SAMP8 マウスと SAMR1 の間で差は認められなかった。このことから SAMP8 マウスはアルデヒド類の臭いに対する回避反応が低下していることが示唆された。更に、この回避反応低下は 3 ヶ月齢と比較して 5 ヶ月齢で顕著なことから、加齢に依存して悪臭回避行動低下が進行していくことが示唆された。

総走行距離は、3 ヶ月齢では SAMR1 マウスと SAMP8 マウス間で殆ど差は認められなかったが、5 ヶ月齢では 2-MB とアルデヒド類に関して SAMP8 マウスで総走行距離の増加が認められた。マウスは嫌悪臭に対して警戒心または恐怖を抱くと、ambulation（歩行行動）が有意に減少するという報告がある^(44, 45)。3 ヶ月齢時点では、2-MB とアルデヒド類に対する SAMR1 マウスと SAMP8 マウスの総移動距離の平均値は、どちらも約 5 メートルで、mineral oil などの無臭なものと比較すると嫌悪臭を感じて Ambulation が低下していることが分かる。5 ヶ月齢へと老化が進行すると、SAMR1 では嫌悪臭を嗅がせた時の総移動距離は約 5 メートルと 3 ヶ月齢時点と同じであったが SAMP8 では 10 メートル弱まで増加しており、ambulation が増えている。このことから、SAMP8 マウスは嫌悪刺激に対する正常な認識が低下していることが示唆された。

SAMR1 マウスと比較して SAMP8 マウスでは、アルデヒド類に対して回避行動が有意に減少していたにもかかわらず、回避エリア滞在時間は SAMR1 マウスと SAMP8 マウス間で大きな差は認められなかった。回避エリアは臭い物質から最も遠く離れたエリアであると同時に、ケージの隅でもある。げっ歯類は大きく開けた場所などは危険であると認識しており、本能的に壁際を体が触れるように隅に移動する習性がある^(46, 47)。

この習性により、回避行動とは異なる理由で、SAMR1 マウスと SAMP8 マウス間の回避エリア滞在時間に有意な差は見られなかったと考えられた。またヒトにおいても不安が強い場合は隅の方や暗い場所を好む傾向があり、その不安を感じる強弱には個人差がある。本研究における回避エリア滞在時間も 3 ヶ月齢、5 ヶ月齢のどちらも個体差によるばらつきが大きく見られることから、マウスにも不安を感じる度合いに個体差があり、今回の結果のようにばらついたと考えられた。

第 2 節では、SAMP8 マウスのアルデヒド臭回避行動低下の病態機序を検討するため、hexanal 暴露後の嗅覚神経経路の各脳領域における c-fos 陽性細胞数の発現変化量を解析した。hexanal の暴露は、SAMR1 マウスと比較して SAMP8 マウスの前嗅核および前梨状皮質、海馬 CA3 の神経活動を有意に上昇したが、視床下部室傍核および扁桃体中心核の領域では有意な減少が認められた。匂いを受容した後、情報は嗅球から嗅皮質の各領域（前嗅覚、嗅結節、梨状皮質、扁桃体、嗅内皮質）に伝達される。その後、嗅内皮質から海馬へ情報が伝達される経路①と、扁桃体中心核から視床下部へ伝達される経路②がある^{(13, 14)(48)}。本研究では、海馬へ伝達する経路①では、神経活動の上昇が認められる部位があるものの、神経活動が減少している部位は無く、経路①では障害が無いことが示唆された。一方で、視床下部へ伝達する経路②では、視床下部での神経活動が減少しており、経路②で情報伝達が障害されていることが示唆された。扁桃体や視床下部が情動行動と関連することを考慮すると、SAMP8 マウスは嫌悪臭による情動変化が正常に機能しなくなっていると考察した。

本章の研究結果から、SAMP8 マウスはアルデヒド類の匂い成分に対する回避反応が低下していることが示唆された。AD 患者では、墨汁ならびに木材の匂いに対する嗅覚機能が低下しており⁽⁴⁹⁾、このうち木材はホルムアルデヒドを発散させているため、AD 患者もアルデヒド類に対する嗅覚機能が低下している可能性が考えられる。従って、SAMP8 マウスの嗅覚機能障害の機序を明らかにすることで、AD の嗅覚障害機序解明に近づくと考えられた。SAMP8 マウスは視床下部へ到達する嗅覚神経経路の障害が示唆され、AD 患者においても同様の経路の障害が考えられる。本章での研究成果は AD 早期にみられる嗅覚の障害の病態解明への糸口となることが期待される。

第2章 SAMP8 マウスの嗅覚反応障害に対する人參養栄湯の検討

前章では嗅覚障害モデルの探索のため、SAMP8 マウスの嗅覚障害発現について検討した。SAMP8 マウスはアルデヒド臭に対する回避反応が低下していることが認められ、その病態機序の一部も明らかとなった。そこで次なる展開として、AD 患者の早期に認められる嗅覚障害の予防・治療薬の探索のため、漢方薬である人參養栄湯の効果を検討した。人參養栄湯は、当帰・芍薬・地黄・白朮・茯苓・人參・甘草・桂皮・陳皮・遠志・黄耆・五味子の 12 種の生薬から構成されており、気と血を補う漢方薬として使用されている。人參養栄湯は主に病後の体力低下や疲労倦怠、そしてそれに付随する、抑うつや無気力状態などの精神症状に対して処方されており、最近では高齢者の虚弱（フレイル）や認知症の予防効果も期待されている。2014 年に日本老年医学会はフレイルとは介護前段階を意味する用語として提唱し、体重減少や筋力の衰えなどの身体的要素だけでなく、孤独、閉じこもりなどの社会的要素と、うつや無気力、認知機能障害などの精神・心理要素を含んでいる。基礎研究では、マウスへのストレス負荷により誘発される無気力症状を人參養栄湯が改善することが報告されている⁽⁵⁰⁾。さらに、嗅神経切除マウスの嗅覚機能回復を人參養栄湯が促進することも報告されている⁽⁵¹⁾。従って、人參養栄湯による嗅覚障害改善効果が期待されるが、SAMP8 マウスの嗅覚障害に対する人參養栄湯の効果についてはこれまで検討されていない。そこで、本章では SAMP8 マウスの嗅覚障害に対する人參養栄湯の効果を検討した。

第1節 SAMP8 マウスの悪臭回避行動低下に対する人參養栄湯の効果の検討

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

第 1 章、第 1 節、1.1.と同様である。

1.2 嗅覚嗜好テスト

第 1 章、第 1 節、1.2.と同様である。

1.3 匂い物質

第1章、第1節、1.3.と同様である。

1.4 人参養栄湯

人参養栄湯エキス末(Lot No. 372176700)は、株式会社ツムラから提供されたものを用いた。6gの人参養栄湯乾燥抽出物を精製するために使用された生薬配合を以下の表に示す。12種類の各生薬は、日本薬局方およびツムラ株式会社の規定に従い、同定された。生薬を95°Cの精製水で1時間加熱抽出した後、抽出液から不純物をとりのぞき、減圧下で水分を除去し、濃縮したのちに噴霧乾燥し、エキス粉末とした。

3D-HPLC法による構成成分は以下の通りである(ツムラ株式会社より)。

生薬名	人参養栄湯乾燥エキス6gの精製 に使用する生薬量(g)
Rehmanniae Radix (地黄)	4
Angelicae Acutilobae Radix (当帰)	4
Atractylodis Rhizoma (白朮)	4
Poria (茯苓)	4
Ginseng Radix (人参)	3
Cinnamomi Cortex (桂皮)	2.5
Polygalae Radix (遠志)	2
Paeoniae Radix (芍薬)	2
Citri Unshiu Pericarpium (陳皮)	2
Astragali Radix (黄耆)	1.5
Glycyrrhizae Radix (甘草)	1
Schisandrae Fructus (五味子)	1

表3. 人参養栄湯の構成生薬

1.5 実験スケジュール

10週齢の SAMP8 マウスと SAMR1 マウスを、第1章、第1節、1-1記載の条件で2週間飼育した後、3ヶ月齢から人参養栄湯を2用量（300 or 1000 mg/kg/day、NYT300 or NYT1000）になるように飲水ボトルに添加し、SAMP8 マウスに対して飲水投与を開始した。8ヶ月齢になった時点で嗅覚嗜好テストを行った。飲水投与は行動解析終了まで行った。摂取量は、前週の飲水量と体重を基に調整した。群分けは、R1+water (control)、P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000 の4群に分けた。

1.6 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。データは一元配置分散分析を行った後、Tukey's multiple comparisons test で解析した。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た。

2. 実験結果

2.1 探索エリア滞在時間

eugenol または 2-MB では、SAMP8 マウスと SAMR1 マウスの間で、探索エリア滞在時間に差は認められなかった。一方、hexanal と pentanal では、SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、探索エリア滞在時間の有意な延長を示した。従って、8ヶ月齢においても SAMP8 マウスは悪臭回避行動の低下、すなわち嗅覚障害を示した（図12）。さらに、hexanal では、人参養栄湯を与えていない SAMP8 マウスと比較して、人参養栄湯を 1000 mg/kg 投与した SAMP8 マウスは、探索エリア滞在時間の有意な減少を示した。従って、人参養栄湯は hexanal への嗅覚反応低下を改善することが示唆された。しかし、pentanal への嗅覚反応低下に対しては、人参養栄湯は有意な改善効果を示さなかった。

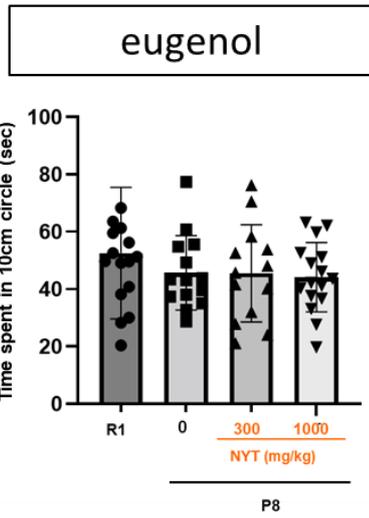
2.2 総走行距離

8ヶ月齢では、SAMP8 マウスと SAMR1 マウス間で、pentanal と hexanal の検討において、総走行距離に差は認められなかった。さらに人参養栄湯の投与は、総走行距離に影響を与えなかった（図13）。

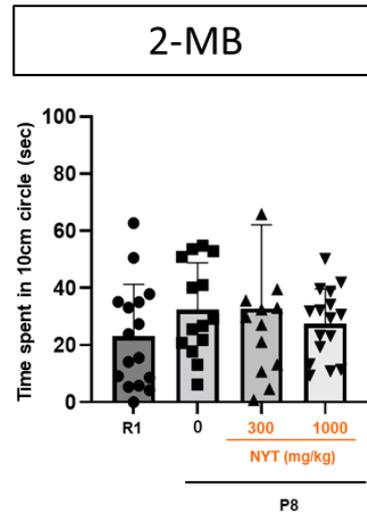
2.3 回避エリア滞在時間

eugenol の検討において、SAMR1 マウスと比較して SAMP8 マウスでは、人参養栄湯の投与に関係なく回避エリア滞在時間が有意に増加する結果となった。2-MB ならびに pentanal、hexanal の検討では、各マウスの回避エリア滞在時間に差は認められなかった（図14）。

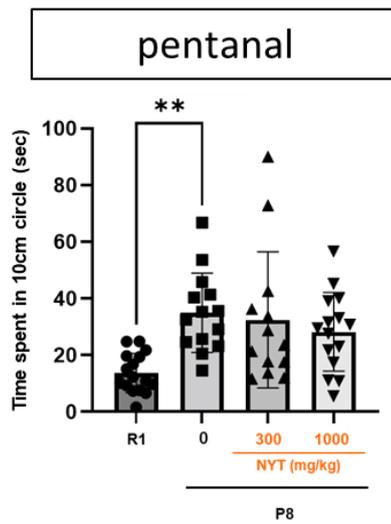
A)



B)



C)



D)

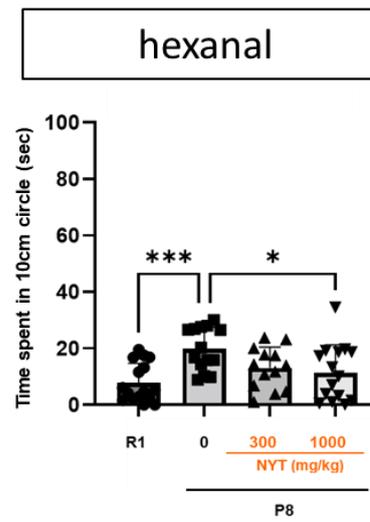
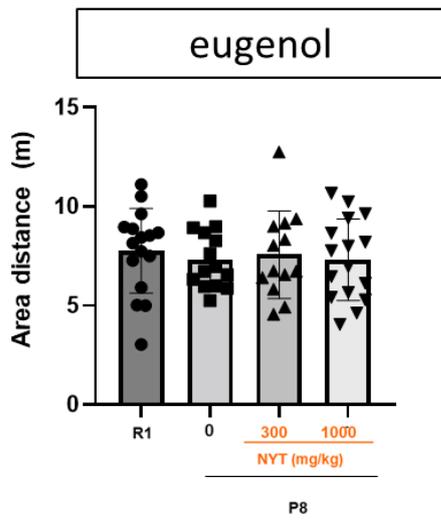


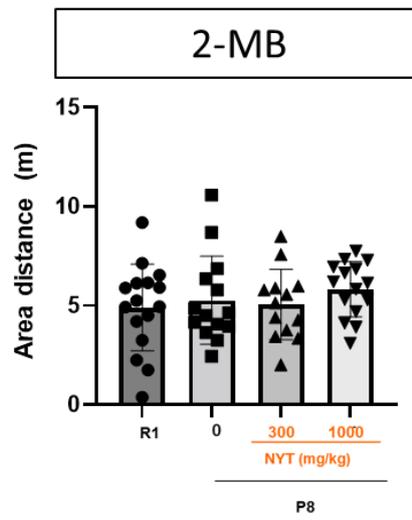
図 12. 嗅覚嗜好テストにおける SAMP8 マウスの探索エリア滞在時間

グラフの縦軸は、探索エリア滞在時間 [ろ紙の半径 10 cm内滞在時間 (秒)]を示す。この時間が長くなるほど、悪臭に対する回避行動は低下している、すなわち嗅覚障害があると考えられる。Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ R1: SAMR1、P8: SAMP8、NYT: 人参養栄湯

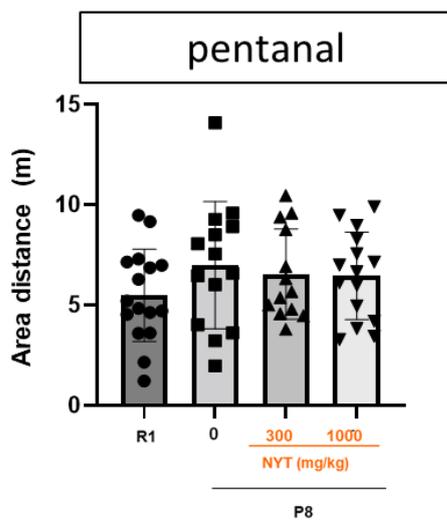
A)



B)



C)



D)

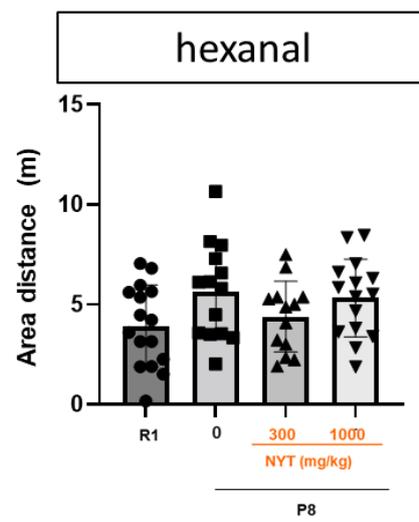
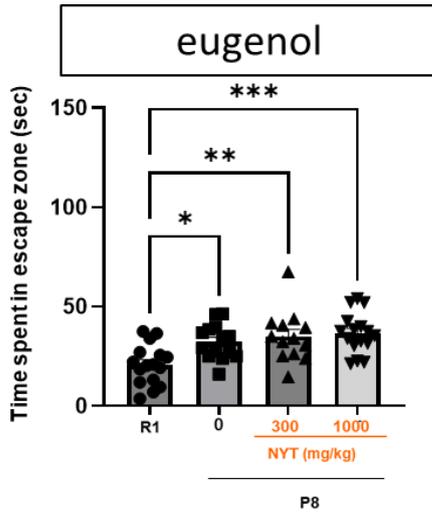


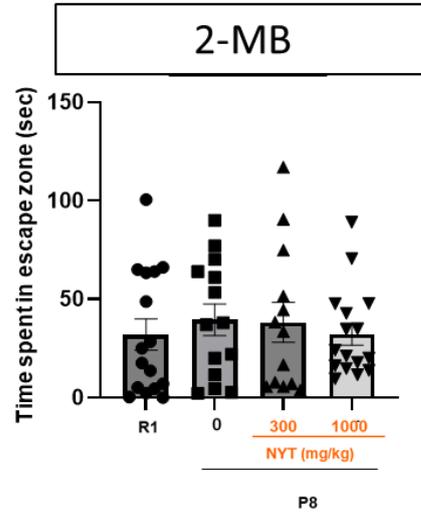
図 13. 嗅覚嗜好テストにおける SAMP8 マウスの総走行距離

3 分間におけるマウスの走行距離を測定した。

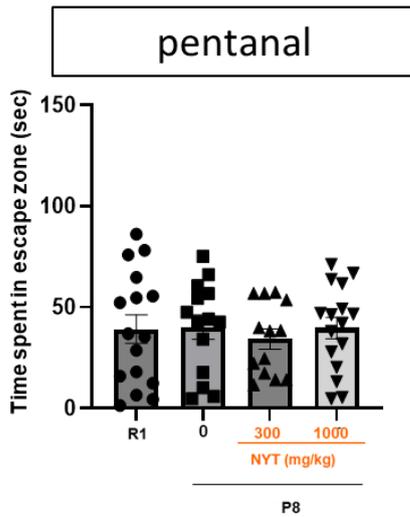
A)



B)



C)



D)

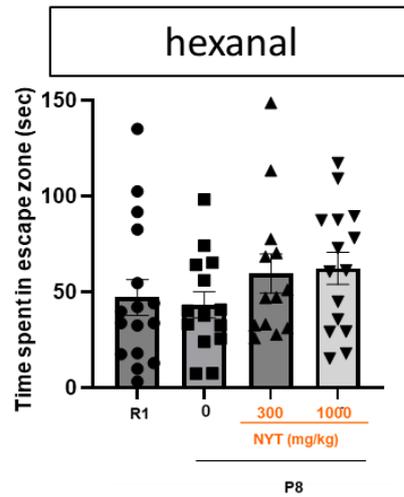


図 14. 嗅覚嗜好テストにおける SAMP8 マウスの回避エリア滞在時間

グラフの縦軸は、回避エリア滞在時間 [ろ紙を設置した壁の反対の壁から 5cm の範囲] を示す。Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, R1: SAMR1、P8: SAMP8、NYT: 人參養榮湯

第2節 嗅覚神経経路異常に対する人参養栄湯の効果の検討

1. 実験材料並びに実験方法

1.1 匂い物質暴露プロトコール

第1章、第2節 1.1と同様に行い、hexanalのみ検討した。

1.2 脳灌流固定

第1章 第2節 1.2と同様である。

1.3 脳切片作成

第1章 第2節 1.3と同様である。

1.4 免疫組織学的染色

第1章 第2節 1.4と同様である。

1.5 c-fos 陽性細胞数の定量

第1章 第2節 1.5と同様である。

1.6 統計解析

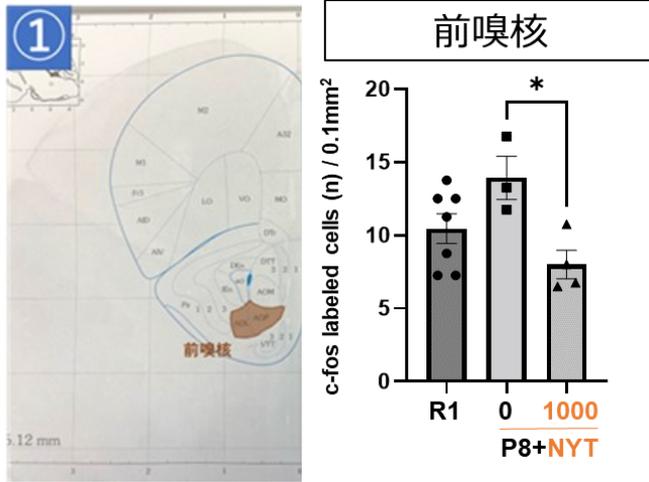
結果は平均値±標準誤差で示した。R1+waterとP8+water、P8+NYT1000の3群間の統計解析は、一元配置分散分析の後、Tukey's multiple comparisons testを用いた。なお、危険率が5%以下だった場合を統計学的に有意差が有るものとみなした。

2. 結果

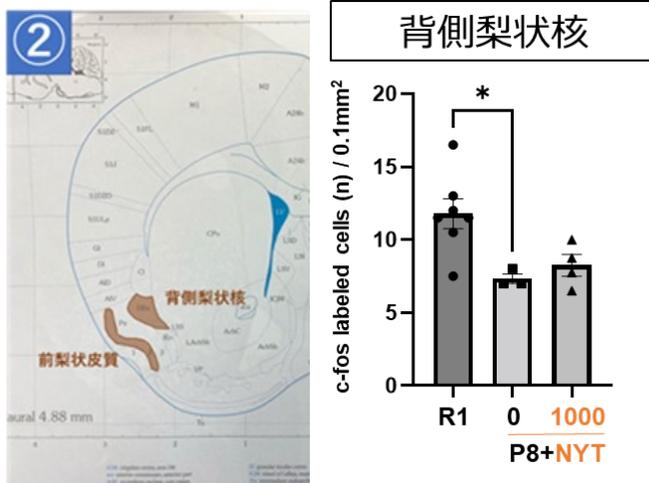
2.1 各脳部位のc-fos陽性細胞数に対する人参養栄湯の効果

hexanalの暴露は、SAMR1マウスと比較してSAMP8マウスでは、大脳辺縁系である視床下部室傍核および扁桃体中心核、嗅内皮質のc-fos陽性細胞数を有意に減少し、神経細胞活動の低下が示唆された。さらに、人参養栄湯1000mg/kg投与は、視床下部室傍核と嗅内皮質におけるc-fos陽性細胞数の有意な増加を示した。一方、扁桃体中心核においては増加は認められなかった(図15F、G、O)。また、人参養栄湯投与は、前嗅核のc-fos陽性細胞数を減少させ、海馬CA3のc-fos陽性細胞数を増加させた(図15A、L)。

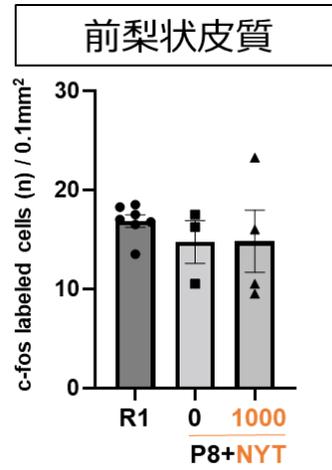
A)



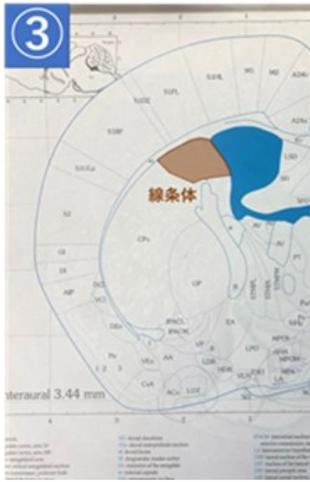
B)



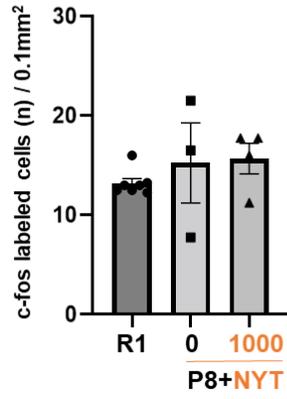
C)



D)

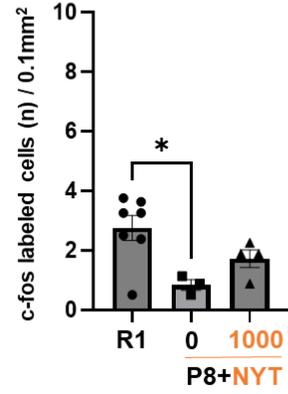


線条体

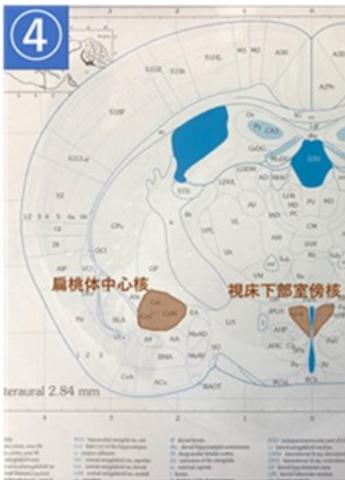


E)

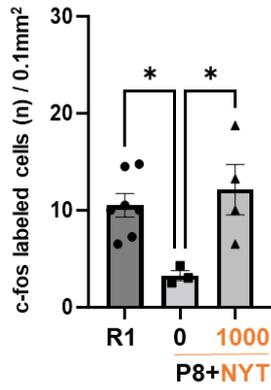
分界条床核



F)

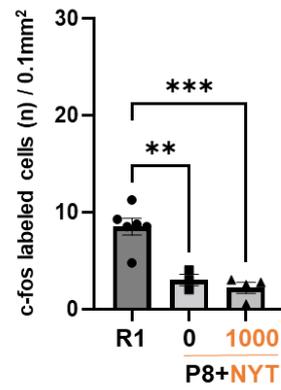


視床下部室傍核

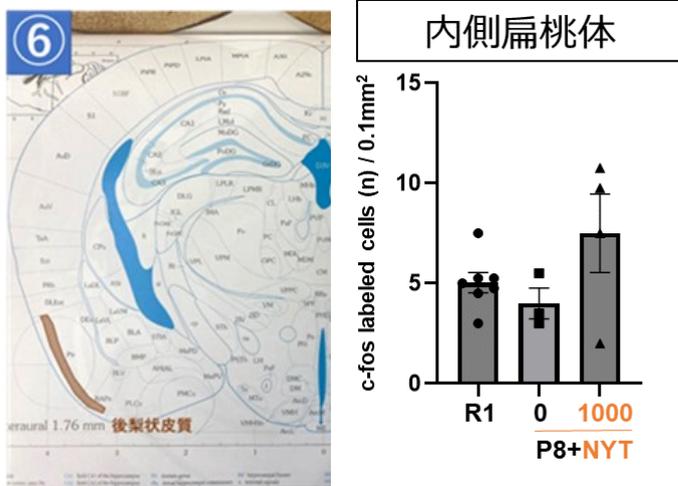


G)

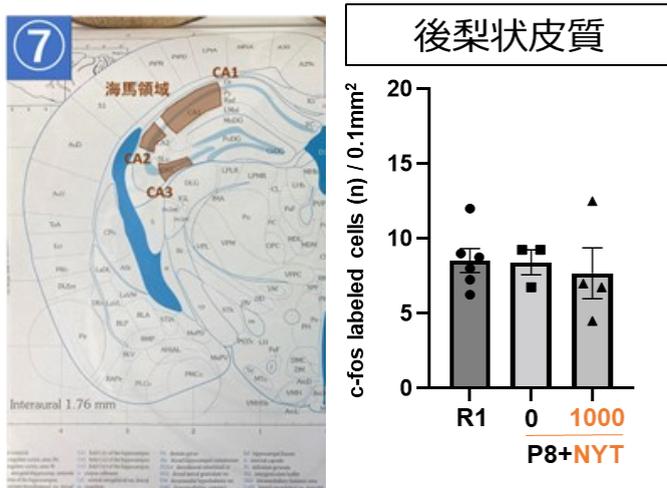
扁桃体中心核

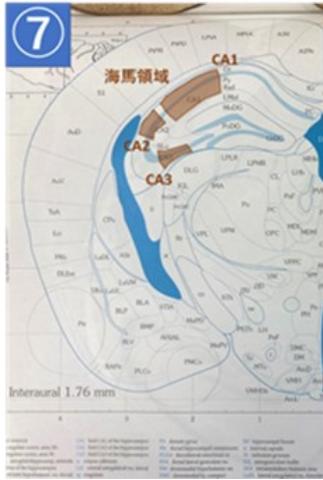


H)

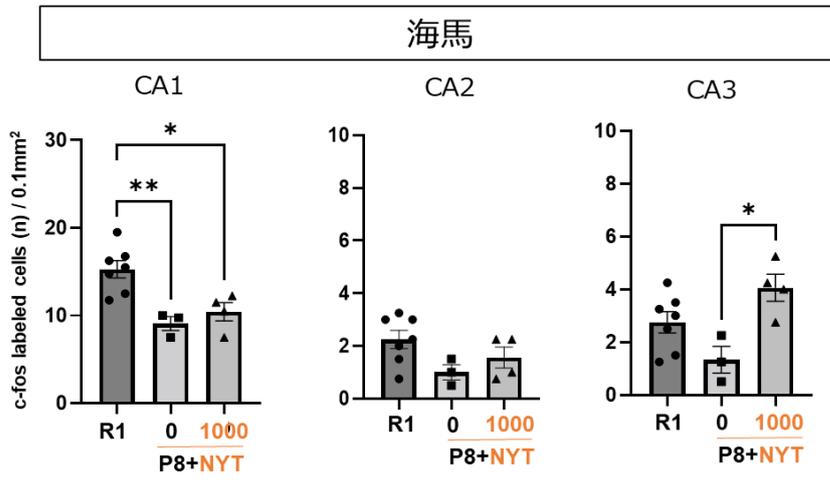


I)



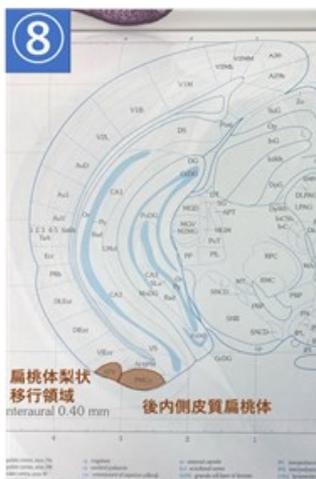


J)



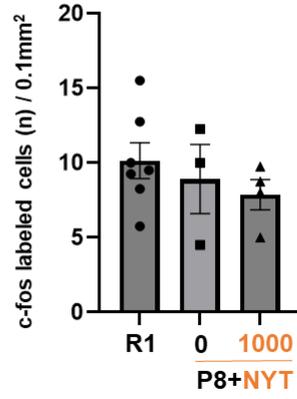
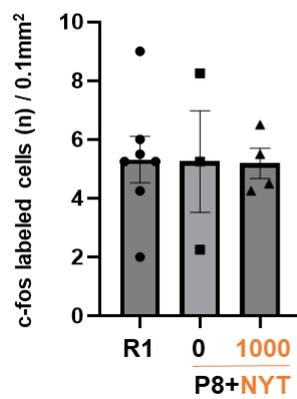
K)

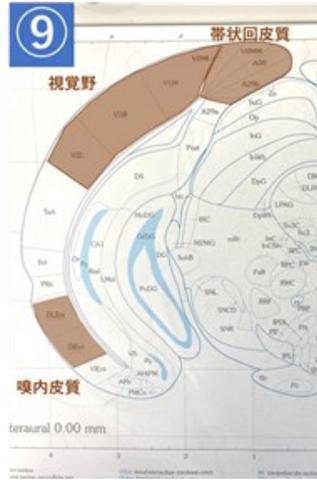
L)



扁桃體梨狀皮質移行領域

後內側皮質扁桃體





M)

N)

O)

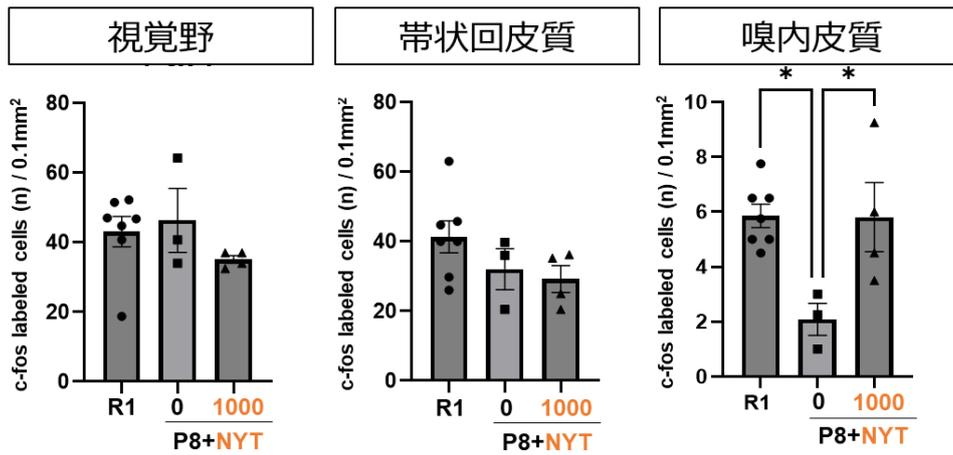


図 15. 各脳領域における c-fos 陽性細胞数

Hexanal を 1 時間暴露した際の嗅覚神経経路の各脳部位における c-fos 陽性細胞数。

Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, R1: SAMR1, P8: SAMP8, NYT : 人參養榮湯

Discrimination test (day 10)

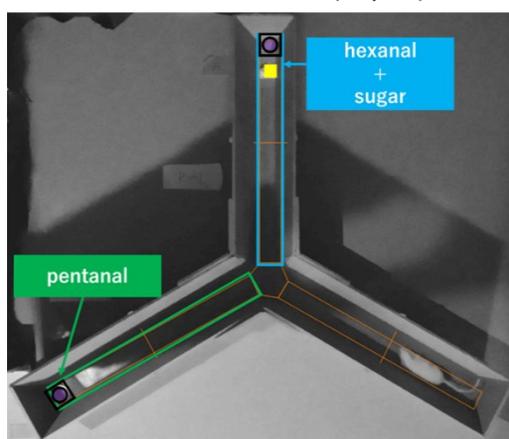


図 16. 嗅覚識別テスト

1.3 匂い物質

Vanillin (Cat.No.H0264、東京化成工業、東京)、hexanal、pentanal、eugenol に関しては、第 1 章、第 1 節、1.3 と同様のものを使用した。ろ紙に各液体を 10 μ L 染み込ませた。

1.4 人参養栄湯

第 2 章、第 1 節、1.4.と同様である。

1.5 実験スケジュール

1.6 統計学的解析

2. 結果

図 16 嗅覚識別テストにおいて、hexanal の臭いと砂糖粒を関連付ける訓練を行った SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウスにおいて、P8+water 群では hexanal が置かれたアームと pentanal が置かれたアームに滞在した時間に差は認められなかった。一方、人参養栄湯 1000 mg/kg の投与により hexanal が置かれたアームに滞在する時間が有意に増加した。

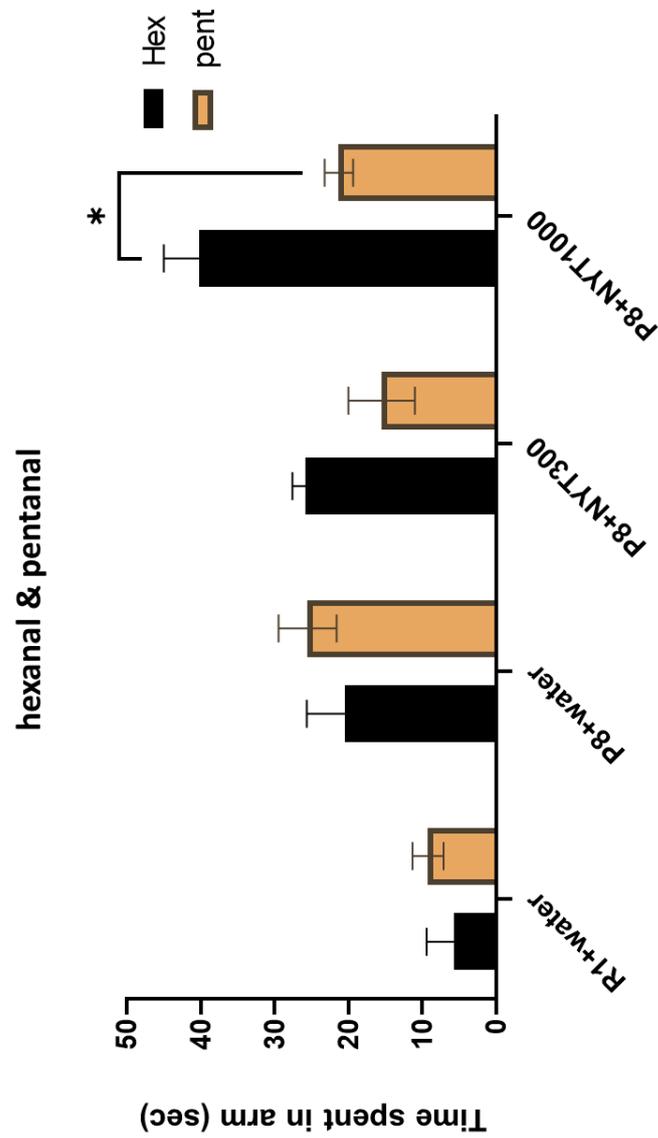


図 17. SAMP8 マウスの嗅覚識別テストにおけるアーム滞在時間

hexanal が置かれたアームに滞在した時間を縦軸に示した。

Unpaired t-test. * $p < 0.05$ 、R1: SAMR1、P8: SAMP8

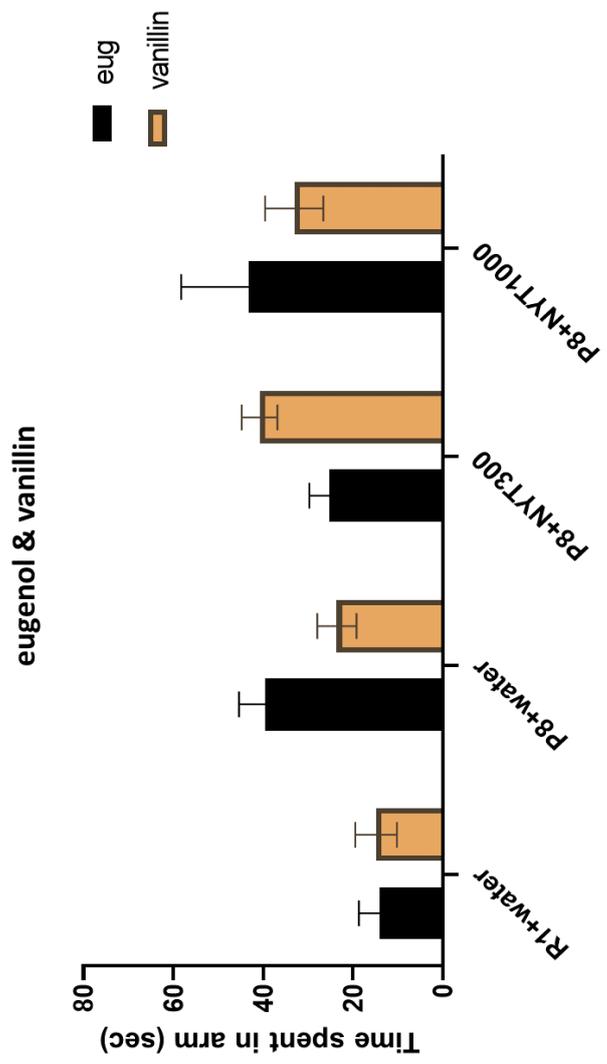


図 18. SAMP8 マウスの嗅覚識別テストにおけるアーム滞在時間
Eugenol が置かれたアームに滞在した時間を縦軸に示した。

小括

本章では、SAMP8 マウスの嗅覚障害に対する人參養栄湯の治療効果の検討を目的として、人參養栄湯を摂取させた SAMP8 マウスのアルデヒド臭に対する回避行動を解析した。嗅覚嗜好テストでは、SAMP8 マウスの hexanal 回避行動低下に対する人參養栄湯の抑制効果が認められた。さらに、hexanal 暴露時の視床下部室傍核における c-fos 陽性細胞数減少を人參養栄湯が抑制する結果が認められた。このことから、人參養栄湯による悪臭回避行動低下改善には、視床下部室傍核への嗅覚神経経路異常の改善が寄与することが示唆された。また、嗅覚識別テストでは、SAMP8 マウスの嗅覚識別障害に対する人參養栄湯の改善効果も認められた。MCI や AD 患者では、嗅覚識別能の障害が報告されていることから、本評価項目に関しても早期の AD 患者の嗅覚障害病態を反映していることが考えられ、人參養栄湯が治療に有効である可能性が示唆された。

第 1 節では悪臭回避行動に対する人參養栄湯の効果を検討した。人參養栄湯を未摂取の SAMP8 マウスは、hexanal に対する回避行動が SAMR1 マウスと比較して低下していたが、人參養栄湯を摂取した SAMP8 マウスは未摂取の SAMP8 マウスと比較して、回避行動が亢進していた。この結果から人參養栄湯は SAMP8 マウスの hexanal に対する嗅覚反応低下を軽減することが示唆された。従って、人參養栄湯が AD 早期嗅覚障害の予防・治療薬の一つとなる可能性が期待できると考えられた。しかし、hexanal と同様のアルデヒド類である pentanal への回避行動低下には人參養栄湯は効果を示さなかった。3ヶ月齢の SAMP8 マウスは、pentanal への回避行動低下を示すが、hexanal への回避行動は低下していないことを第一章で明らかにした。本章では 3ヶ月齢から人參養栄湯を摂取していることから、pentanal への嗅覚障害がすでに生じている段階で人參養栄湯を摂取開始しているのに対し、hexanal への嗅覚障害が生じる前に人參養栄湯を摂取開始している。従って、人參養栄湯は hexanal への嗅覚障害発現は予防したが、すでに発現した pentanal への嗅覚障害は改善することができなかったと考えられた。このことから、アルデヒド臭に対する嗅覚障害に対しては、人參養栄湯の予防的摂取が必要であることが提案された。pentanal と hexanal は炭素数が一つ異なり、これらの匂いにおける障害発現時期や人參養栄湯による障害の改善効果も異なった。サルを用いた検討では、アルデヒド類の炭素数の差異は、嗅覚の閾値に影響しないことが示されている⁽⁵⁴⁾。従って、SAMP8 マウスの pentanal と hexanal に関する障害の差異は、pentanal と hexanal の嗅覚の閾値の違いによるものでは無いことが考えられた。マウスを対象とした内因性光シグナルイメージング解析では、propanal (炭素 3 個) ならびに butanal (炭素 4 個)、pentanal (炭素 5 個)、hexanal (炭素 6 個)、heptanal (炭素 7 個) による嗅覚刺激では、嗅球内で活動する領域が異なり、炭素数の増加に従い、嗅球の前方から後方へ領域がシフトすることが報告されている⁽⁵⁵⁾。このことから、SAMP8 マウスでは嗅球の前方から後方にかけて加齢とともに障害範囲が増大していることが示唆された。

嗅上皮では嗅覚受容体を有する嗅覚神経細胞が存在し、同じ嗅覚受容体を発現する嗅覚神経細胞の軸索同士が収斂して、嗅球内の糸球体に投射している。その後、糸球体へと送られた情報は、嗅皮質へと情報が伝達される。嗅球の「におい受容体地図」にはゾーン構造や領域構造があり、領域構造では特異的なマーカーの発現に基づき、嗅球を背側領域（D）と腹側領域（V）へと二分割できる⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾。D 領域欠損マウスは野生型マウスと比較して、pentanal や hexanal からの回避行動が低下していることが示されている。しかし、pentanal や hexanal の臭いの識別能力を D 領域欠損マウスと野生型マウスで比較すると D 領域欠損マウスの方が高いことが報告されている⁽⁵²⁾。従って、D 領域は悪臭回避反応には関与するが、嗅覚識別能には影響しないことが考えられた。SAMP8 マウスは嗅覚識別能力の障害と悪臭回避行動低下が認められており、D 領域に加えて、その他の領域での病態変化もあることが示唆された。本研究では、嗅球の病態変化を解析していないため、その領域の特定には至っていないが、SAMP8 マウスでは V 領域での病態変化も起きている可能性があり、今後検討する必要がある。

第2節では、hexanal への嗅覚障害に対する人参養栄湯の改善機序を検討するため、第1章と同様に hexanal 暴露直後の各脳領域における c-fos 陽性細胞数の発現変化量を解析した。その結果、SAMP8 マウスでは視床下部室傍核と扁桃体中心核で c-fos 陽性細胞数が減少しており、人参養栄湯は視床下部室傍核の c-fos 陽性細胞数を増加させたが、扁桃体中心核ではその効果を示さなかった。視床は体性感覚、視覚および聴覚などの末梢感覚情報を大脳皮質や大脳基底核へ送る中継地点としての役割に加え、皮質領域から送られてきた情報の処理機能を有し、感覚刺激による情動や疼痛反応、睡眠と覚醒、記憶や認知機能および運動機能といった形で複数の脳機能に関係することが知られている⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾。視床の垂核である視床下部室傍核は、脳幹からの密接な入力を受けており、本能行動そして不安などの情動行動を司るといわれ、近年では視床下部の後部に位置する乳頭体は、記憶に関連の深い海馬の機能を調節する役割も担うことが報告されている⁽⁶²⁾。更に、視床下部室傍核は扁桃体などの辺縁系領域に対する出力を行う働きもあるため、恐怖/不安関連行動の制御や薬物依存、ストレス誘発性のうつ病性障害の病態生理にも重要な役割を果たしている^(63, 64)。扁桃体は、不安や恐怖を司る脳領域という認識が一般的であるが⁽⁶⁵⁾、近年の光遺伝学あるいは化学遺伝学的手法により、その垂核によって不安の発現や恐怖記憶の獲得および消去などへの関与が異なることがわかってきており、扁桃体中心核は基底外側核と協働して恐怖記憶の獲得、固定化および発現に重要であることが示されている⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾。SAMP8 マウスの hexanal に対する回避行動低下は、hexanal による嫌悪刺激が視床下部室傍核ならびに扁桃体中心核へと伝達されておらず、恐怖/不安反応を示さなかったことが原因であると考えられた。これに対して人参養栄湯は、視床下部室傍核への伝達を改善することで、悪臭に対する正常な回避反応を回復させたと考えられた。

嗅覚神経切除マウスの悪臭回避行動低下は、時間と共に改善していくが、人参養栄湯の摂取は早期に改善することが示されている⁽⁵¹⁾。このことから、嗅覚神経経路遮断に対して人参養栄湯は改善効果を示すことが明らかとなった。人参養栄湯は、神経成長因子

(nerve growth factor: NGF) 発現を増加することが報告されており⁽⁷¹⁾、嗅覚神経経路遮断に対する改善効果には、人参養栄湯による NGF 発現増加を介した嗅覚神経成長促進が寄与していると考えられる。SAMP8 マウスにおいては嗅覚神経経路の遮断を検討できていないが、人参養栄湯による NGF 発現増加を介して悪臭回避行動低下を改善している可能性がある。また、人参養栄湯は、視床下部弓状核の NPY 発現神経細胞を活性化することが報告されている⁽⁷²⁾。Neuropeptide Y (NPY) は、嗅覚神経細胞の成熟や生存の栄養因子として機能することが提案されていることから⁽⁷³⁾、人参養栄湯は NPY を介して嗅覚神経の成熟を促進している可能性もある。さらに、人参養栄湯は orexin1 受容体を活性化することが報告されている⁽⁷⁴⁾。Orexin の脳室内投与は嗅覚感受性を亢進することが示されていることから⁽⁷⁵⁾、人参養栄湯は orexin1 受容体を活性化することで、SAMP8 マウスの悪臭回避行動低下を改善したことが考えられた。本研究では NGF 発現ならびに NPY 受容体と orexin1 受容体の活性については未検討であり、今後検討が必要である。

AD 患者の嗅覚障害発現は以前から報告されていたが、その病態の全貌は不明なままであり、予防・治療法も確立されていないのが現状である。本章では、SAMP8 マウスの嗅覚障害に対して人参養栄湯の予防投与が有効であることを明らかにした。MCI の段階で人参養栄湯の摂取開始は、AD での嗅覚障害発症に対して予防効果が期待される。

第3章 SAMP8 マウスの記憶障害・精神様症状に対する人参養栄湯の効果検討

AD 患者は、認知機能障害や遂行機能障害などの中核症状に加えて、BPSD と呼ばれる周辺症状を示す。周辺症状には、抑うつ、無気力、不安、動揺、攻撃性の増加などの精神症状や、夜間徘徊や奇異行動などの行動障害も含まれる⁽⁷⁶⁾。嗅覚障害は、中核症状と周辺症状に先行して発症する。第2章では、SAMP8 マウスのアルデヒド臭回避行動低下に対する人参養栄湯の予防効果を提示したが、AD の嗅覚障害発症後に現れる中核症状や周辺症状に対する人参養栄湯の効果は不明である。そこで本章では、人参養栄湯の予防的な長期摂取が SAMP8 マウスの記憶障害や精神症状様行動に対しても有効であるか検討を行った。

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 モリス水迷路課題を用いた学習記憶障害の評価方法

水温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の水を入れたプール（直径 150 cm、高さ 45 cm、水深 32 cm）を用いた。プールを設置している実験室の壁には、様々な目立つ手がかり（光を当てた壁、○・△・□が記載されたポスター等）を掲示した。直径 12 cm の透明なプラットフォームをプールの壁面から中心側へ 30 cm の位置に設置した。プラットフォームの表面は水面下 1.5 cm に位置し、マウスが泳いでいる状態では水面下のプラットフォームは見ることはできなくなっている。プールの上部には CCD カメラを設置し、ビデオアナライザー（WaterMaze™, Ver.3.12, Actimetrics, Inc., イリノイ州, USA）にて画像処理をし、マウスの遊泳軌跡と遊泳時間を解析した。

図 19 に示す A、B、C のいずれかの出発点からマウスがプラットフォームに遊泳して、到達するまでの行動を解析した。1 日 3 試行（各試行で各出発地点；A、B、C）し、毎日出発地点の順序を変えて 5 日間連続で課題を行い、その獲得過程を評価した。壁向きにマウスをプールの中に入れた時点を測定開始とし、マウスがプラットフォームにたどり着くまでの到達時間（escape latency; sec）と遊泳距離（travel distance; m）を測定した。1 日の 3 試行の平均値で評価した。なお、測定開始から 120 秒以内にマウスがプラットフォームに到達しない場合には、遊泳時間を 120 秒と記録し、試行終了後にプラットフォームの位置を認知させるために、マウスをプラットフォーム上に乗せた状態で 30 秒間放置した。

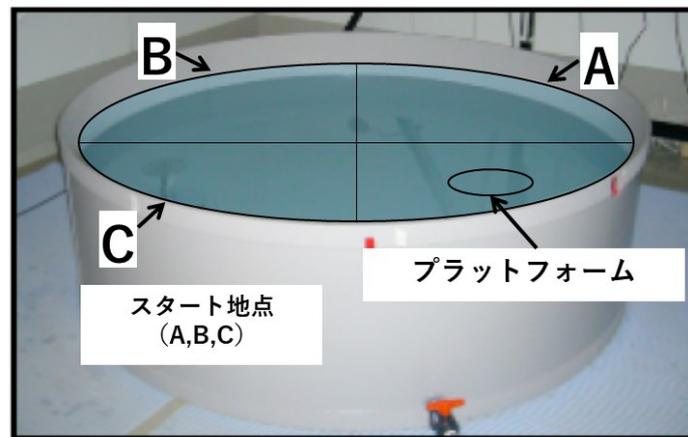


図 19. 水迷路

プラットフォーム到達までの軌跡図

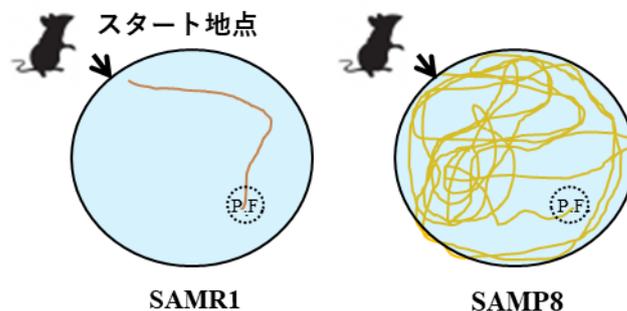


図 20. SAMR1 マウスと SAMP8 マウスの代表的遊泳軌跡図

1.3 人参養栄湯

第 2 章 第 1 節 1.4 と同様である。

1.4 実験スケジュール

第 2 章 第 1 節 1.5 で既述したマウスを、嗅覚嗜好テスト後も人参養栄湯の飲水投与を継続し、9 ヶ月齢の時点で水迷路課題を行い、学習記憶の評価をした。

1.5 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で示した。R1+water、P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000 の各 4 群間の統計解析は、一元配置分散分析を行った後 Tukey's multiple comparisons test にて解析した。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た。

2. 結果

5 日間にわたる空間記憶獲得過程でのプラットフォーム到達時間の推移を図 19 に示した。P8+water 群のプラットフォーム到達時間は、R1+water 群と比較し、2 日目および 4 日目、5 日目で有意に延長した。(2 日目：P=0.020、4 日目：P=0.006、5 日目：P=0.0002)。更に、5 日目の P8+NYT1000 群のプラットフォーム到達時間は、P8+water 群と比較して有意に短縮したことから、人参養栄湯の投与により、学習記憶の獲得障害は予防される可能性があることが示唆された。(5 日目：P=0.038) (図 21)

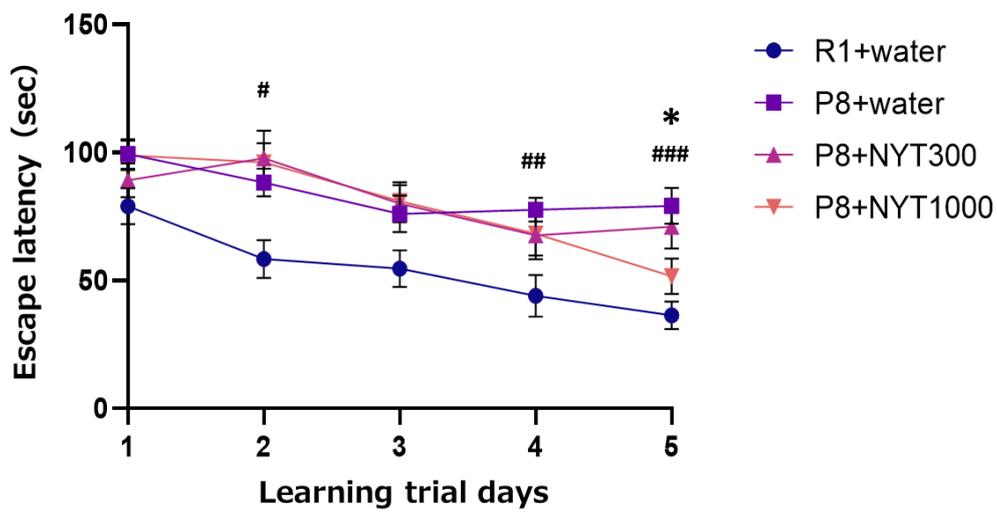


図 21. 5 日間の水迷路課題によるプラットフォーム到達時間

モリス水迷路課題を用いて空間記憶を評価した。1日3試行で5日間解析した。データは3試行の平均を示している。Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs R1+water、* $P < 0.05$ vs P8+water

第2節 SAMP8 マウスの不安様行動に対する人参養栄湯の効果

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

第1章 第1節 1.1 と同様である。

1.2 Open-field テストを用いた不安様行動の評価

実験装置は、図22に示す open-field 装置を用いた。(底面直径60 cm、壁の高さ50 cm、壁の上縁の直径80 cm のバケツ状のもの) 内面は灰白色に塗装され、底面は赤色の線を引き、ほぼ等面積の19区画に分類されている。装置内の照度(15-20 lux)が均一になるように調節した照明下で、マウスを装置の中央に静かに入れ、その動きを10分間ビデオカメラにて撮影した。撮影した動画は、ビデオ・トラッキング・ソフトウェア ANY-maze を用いて、10分間における総移動距離と内側エリア (Inner zone) 滞在時間を測定した。総移動距離からマウスの運動量を、内側エリア滞在時間から不安症状を評価した。本実験では、マウスの内側エリアでの活動の増加は不安が少ない状態にあり、不安を感じると壁沿いを歩くという習性を利用し、内側エリア滞在時間が減少すると不安症状があると評価した⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾。

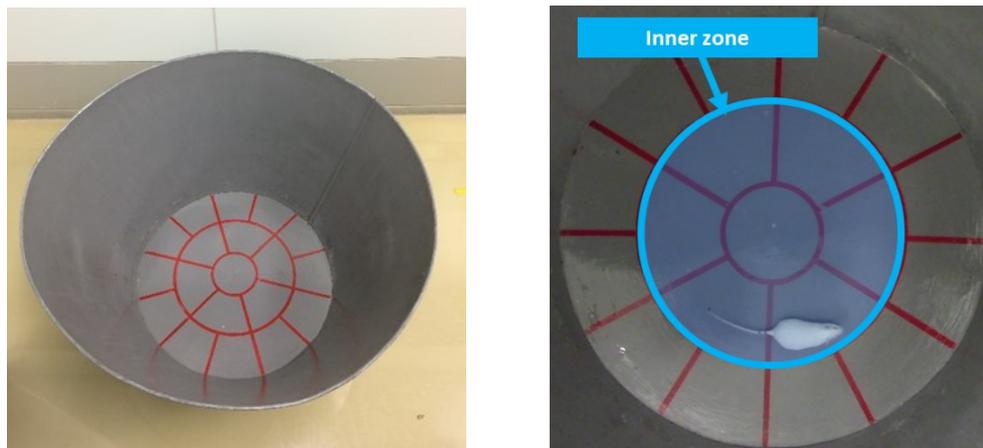


図22. Open-field 装置

1.3 人参養栄湯

第2章 第1節 1.4と同様である。

1.4 実験スケジュール

10週齢のSAMP8マウスおよび正常対照のSAMR1マウスを、第1章、第1節、1-1記載の条件で2週間飼育した後、3ヶ月齢から人参養栄湯を2用量(300 or 1000 mg/kg/day)になるように飲水ボトルに添加し、SAMP8マウスに対して飲水投与を開始し、5ヶ月齢と8.5ヶ月時点でopen-fieldテストを行った。飲水投与は行動解析終了まで行った(図23)。人参養栄湯のボトル添加量、は、前週の飲水量と体重を基に調整した。群分けは、R1+water(control)、P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000の4群に分けた。

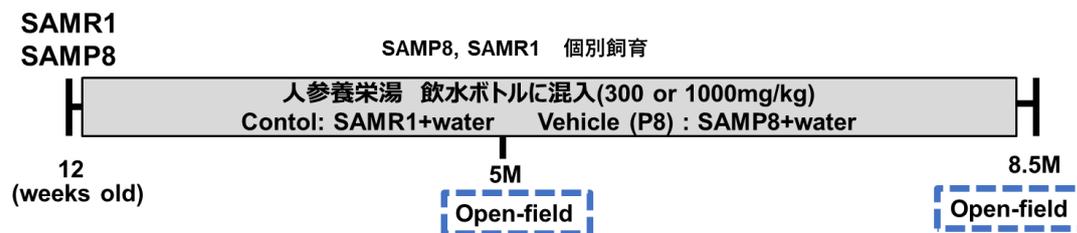


図 23. 実験スケジュール

1.5 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、有意差があった場合にSAMP8+waterを比較対象とし、Dunnett's multiple comparisons testを用いた。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た。

2. 結果

2.1 総移動距離

Open-field test における SAMP8 マウスの総移動距離を図 22 に示した。5 ヶ月齢の SAMP8 マウスにおいては、R1+water ならびに P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000 のどのグループ間においても、差は認められなかった (図 24A)。また、8.5 ヶ月齢においても同様の結果となった (図 24B)。

2.2 内側エリア滞在時間

Open-field test における SAMP8 マウスの内側エリア滞在時間において、5 ヶ月齢の SAMP8 マウスでは、R1+water ならびに P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000 のどのグループ間においても、内側エリア滞在時間に差は認められなかった (図 25A)。また、老化が進行した 8.5 ヶ月齢においては、R1+water 群と比較して P8+water 群では、内側エリア滞在時間が有意に減少し、不安様行動の発現が認められた (図 25B)。しかし、この変化に対して人参養榮湯の 300 および 1000 mg/kg 用量は共に影響を示さなかった。

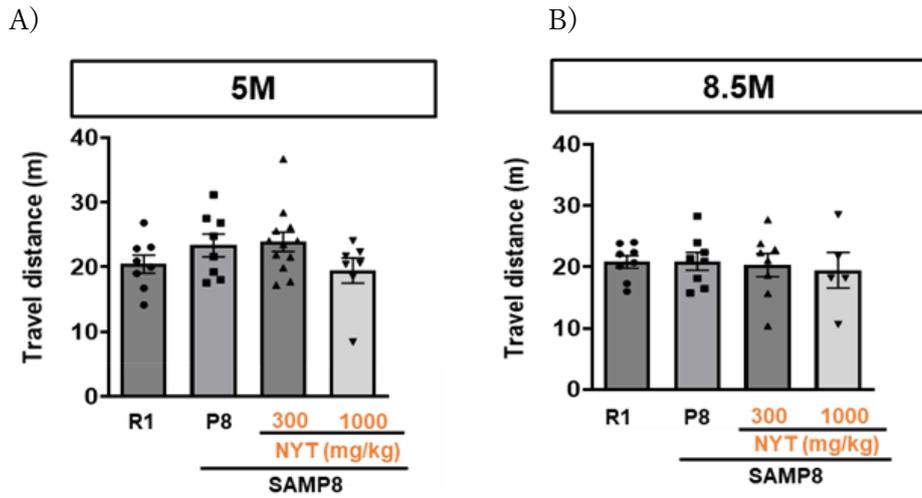


図 24. Open-field test における SAMP8 マウスの総移動距離

Open-field 内での 10 分間の移動距離を測定した。A)5 ヶ月齢、B)8.5 ヶ月齢

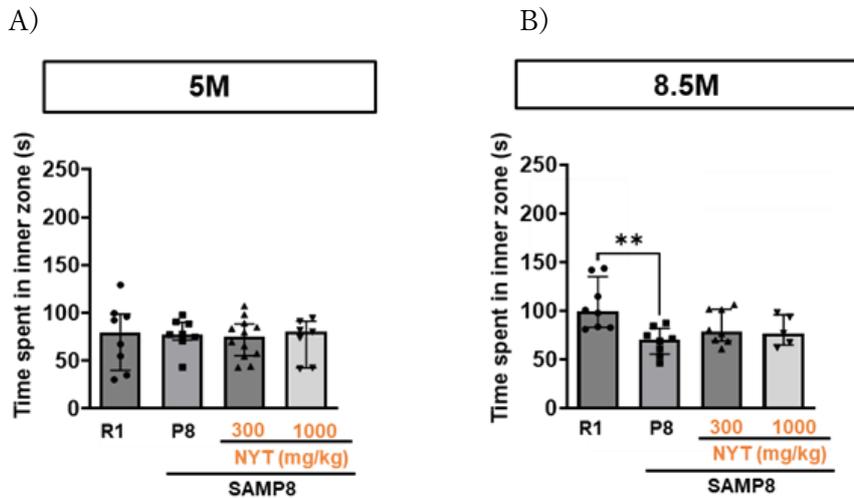


図 25. Open-field test における SAMP8 マウスの内側エリア滞在時間

Open-field 装置の内側エリアにおける滞在時間を測定し、不安様行動を解析した。

A)5 ヶ月齢、B)8.5 ヶ月齢

** $p < 0.01$ 、Data were subjected to Dunn's multiple comparison tests after one-way ANOVA

R1: SAMR1、P8: SAMP8

第3節 SAMP8 マウスの無気力様行動に対する人参養栄湯の効果

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

第1章 第1節 1.1 と同様である。

1.2 Sucrose splash テストによる無気力様行動の評価

マウスをホームケージに入れた状態で、ホームケージを 30～50 lux の照明に設定した部屋に置いた。食紅で着色した 10%スクロース溶液をマウスの背部に一回噴霧し、300 秒間の行動をビデオカメラにて動画撮影した。撮影した動画は、Event Rec ソフトウェア (LabDesign、茨木) を用いて、300 秒間における身繕いした時間を計測した (図 26)。無気力症状を呈する患者は、ゴール指向的行動 (セルフケア、探索、社交性、仕事、レクリエーション) の低下が認められている。ヒトでのセルフケアは、マウスでの身繕い行動を反映していると提案されている⁽⁷⁹⁾。そこで本実験は、マウスが体の衛生や機能維持を目的として行う grooming (身繕い) の低下を無気力症状の指標として評価した。

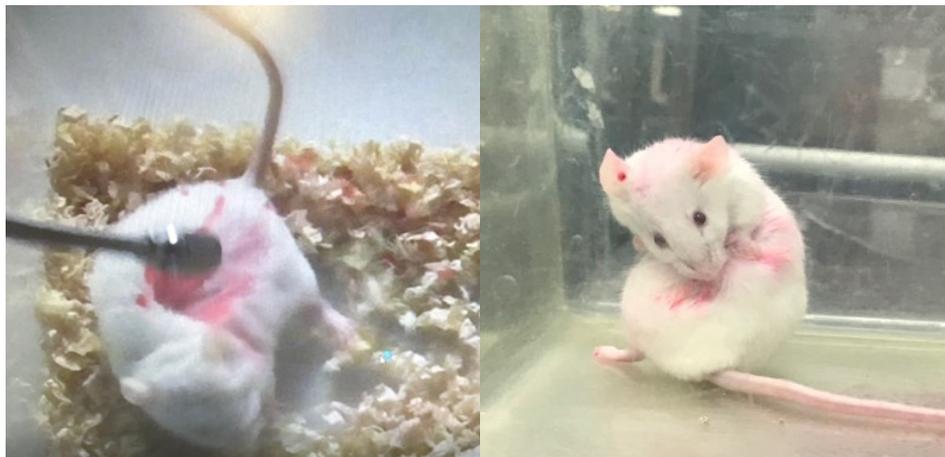


図 26. Sucrose splash テスト

1.3 人参養栄湯

第2章 第1節 1.4と同様である。

1.4 実験スケジュール

第3章 第2節 1.4と同様である。5ヶ月齢時点で sucrose splash テストを行った。飲水投与は行動解析終了まで行った(図27)。摂取量は、前週の飲水量を基に調整した。群分けは、R1+water (control)、P8+water、P8+NYT300、P8+NYT1000 の4群に分けた。



図27. sucrose splash test スケジュール

1.5 統計学的解析

第3章 第2節 1.5と同様である。

2. 結果

Sucrose splash テストにおける SAMP8 マウスの身繕い時間および身繕い回数を図28に示した。R1+water 群と比較して P8+water 群では、身づくろい時間が有意に減少し、無気力様行動の発現が認められた。そして、この減少は人参養栄湯 1000 mg/kg の投与により、有意に改善された。このことから、無気力様症状に対して人参養栄湯は効果がある可能性が示唆された(図28A)。一方、身繕い回数は、4群間で有意な差は認められなかった。

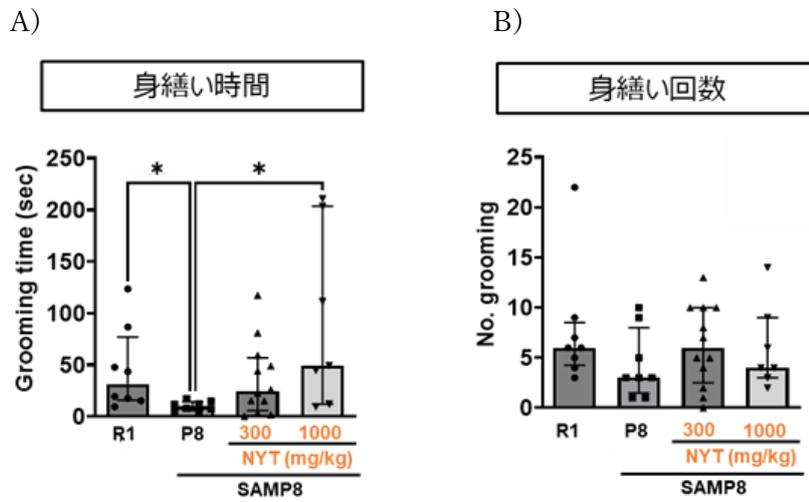


図 28. Sucrose splash テストにおける SAMP8 マウスの身繕い時間および回数

A)身繕い時間、B)身繕い回数

マウスが背部に付着したスクロース溶液を身繕いする行動を観察し、身繕い時間と身繕い回数を解析した。Data were subjected to Dunn's multiple comparison tests after one-way ANOVA、* $p < 0.05$ 、R1: SAMR1、P8: SAMP8

小括

本章では、SAMP8 マウスの空間記憶障害と精神症状様行動に対する人參養栄湯の効果を検討した。SAMP8 マウスは空間記憶障害と無気力様行動、不安様行動を示し、人參養栄湯は空間記憶障害と無気力様行動を軽減した。一方、不安様行動に対して人參養栄湯は改善効果を示さなかった。このことから、人參養栄湯は、嗅覚障害だけでなく、記憶障害や精神症状に有効であることが示唆された。

AD 患者への人參養栄湯投与は、認知機能を向上することが示されている⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾。本研究においても人參養栄湯は、SAMP8 マウスの認知機能低下を軽減することが認められた。人參養栄湯はコリン神経系活性化を介してスコポラミン誘発記憶障害を改善することが示されている⁽⁸²⁾。SAMP8 マウスの前脳基底部のコリン神経細胞は、SAMR1 マウスと比較して、2ヶ月齢では有意な差は無いが、6ヶ月齢で有意に減少している⁽⁸³⁾。従って、人參養栄湯は SAMP8 マウスのコリン神経系減弱を改善することで認知機能障害を軽減したことが考えられた。NGF シグナルは、コリン神経系の維持に重要であることに加えて⁽⁸⁴⁾、人參養栄湯が NGF 発現を増加することから⁽⁸⁵⁾、人參養栄湯は NGF 発現を介してコリン神経系を維持することが考えられた。

Sucrose splash テストは、マウスの身体の衛生に対する気力の評価に用いられる方法であることから、人參養栄湯はセルフケアに関する気力を向上することが考えられた。ストレス誘発性無気力様行動に対する人參養栄湯の改善作用機序には、ドパミン D₂ 受容体活性化の寄与が示されている⁽⁵⁰⁾。それ故、SAMP8 マウスの無気力様行動に対しても人參養栄湯は D₂ 受容体活性化を介して改善作用を示したことが考えられた。嗅球摘出マウスでは海馬のドパミン量が減少しており、人參養栄湯の投与はドパミン量を増加することが報告されている⁽⁸⁶⁾。また、培養細胞への人參養栄湯の処置もドパミン量を増加することが示されている⁽⁸⁷⁾。人參養栄湯に含まれる生薬の黄耆の成分である calycosin、陳皮の hesperetin、遠志の onjixanthone、tenuifolioside、onjisaponin は MAO-B、COMT、DAT の阻害を示している⁽⁵⁰⁾。これらの阻害作用により、ドパミン量を増加し、D₂ 受容体を活性化している可能性がある。

また、SAMP8 マウスでは、SAMR1 マウスと比較して、水迷路課題における空間記憶獲得能力は2ヶ月齢で差がなく、4ヶ月齢で低下していることが示されている⁽⁸⁸⁾。嗅覚障害を検討した3ヶ月齢での空間記憶障害の発現の有無は明らかではないが、SAMP8 マウスの嗅覚障害は空間記憶障害に先行して現れているか、もしくは同時点で現れているのかもしれない。2ヶ月齢における嗅覚障害の検討を行うことで、嗅覚障害が先行して現れることを検討できると考えられる。

総括

ADにおける嗅覚障害は1970年代から報告があったが、その詳細な病態メカニズムは不明であり、予防・治療法も開発されていない。AD嗅覚障害のモデル動物も確立していないという観点から、本研究ではADモデル動物の一つであるSAMP8マウスに着目し、嗅覚障害と嗅覚神経経路障害の基礎的検討を行った。さらに嗅覚障害に対する予防・治療法の探索のため、漢方薬である人參養栄湯に着目し、SAMP8マウスの嗅覚障害に対する効果と、その作用メカニズムを検討した。第1章ではSAMP8マウスの悪臭回避行動低下と嗅覚神経経路障害の基礎的検討を行い、第2章ではSAMP8マウスの嗅覚障害および嗅覚神経経路障害に対する人參養栄湯の効果を検討した。さらに、第3章では、SAMP8マウスの記憶障害・精神症状様行動に対する人參養栄湯の効果について検討を行った。

1. SAMP8マウスの悪臭回避行動低下と嗅覚神経経路障害の基礎的検討

嗅覚嗜好テストにおいて、3ヶ月齢のSAMP8マウスは同月齢のSAMR1マウスと比較して、pentanalに対する回避行動低下を示した。さらに、5ヶ月齢においては、pentanalに加えてhexanal、heptanal、octanalに対する回避行動低下も示した。一方で、eugenolや2-MBに対する回避行動低下は認められなかった。このことから、SAMP8マウスはアルデヒド類に対する回避行動の低下が認められ、アルデヒド類への嗅覚障害を示している可能性が示唆された。AD患者はホルムアルデヒドを放つ木材に対して嗅覚反応が低下するという報告があり、SAMP8マウスと同様にAD患者はアルデヒド臭に対する嗅覚能の低下が考えられた。そこで、アルデヒド臭への嗅覚反応異常を調べるため、hexanal暴露直後に嗅覚神経経路上のc-fos陽性細胞の発現を定量し、嗅覚神経経路における神経活性を評価した。SAMP8マウスは前嗅核・前梨状皮質・海馬領域において有意に神経活性が上昇したが、視床下部室傍核および扁桃体中心核の領域では有意に減少した。これらの結果から、SAMP8マウスはADと同様の嗅覚障害を呈していることが示唆され、その病態メカニズムの一部には、臭いが鼻腔を通して脳内へ入力される経路において視床下部室傍核や扁桃体中心核の領域での正常な神経活性が損なわれることが関与していると示唆された。

2. SAMP8 マウスの嗅覚障害および嗅覚神経経路障害に対する人参養栄湯の効果検討

8ヶ月齢の SAMP8 マウスは同月齢の SAMR1 マウスと比較して、アルデヒド臭を放つ pentanal と hexanal に対して回避行動低下を示し、更に人参養栄湯（1000 mg/kg/day）の3ヶ月齢からの長期投与は hexanal に対する回避行動低下を有意に抑制した。一方、eugenol および 2-MB に対する嗅覚反応行動は、SAMP8 マウスと SAMR1 マウスの間で差は認められなかった。また、hexanal 暴露直後の c-fos 陽性細胞の発現に対する人参養栄湯の効果について検討を行った結果、人参養栄湯は SAMP8 マウスの視床下部室傍核における c-fos 陽性細胞数を有意に増加させた。これらの結果から、人参養栄湯の投与時点で嗅覚障害が認められた pentanal については、人参養栄湯の有効性は認められないが、後に発症する hexanal への嗅覚障害に対しては、人参養栄湯の予防効果が認められることが示唆された。その機序の一部には視床下部室傍核への神経経路の維持が関与していることが考えられた。

3. SAMP8 マウスの記憶障害・精神症状様行動に対する人参養栄湯の効果検討

水迷路課題において、9ヶ月齢の SAMP8 マウスは同月齢の SAMR1 マウスと比較して、空間記憶障害を示した。人参養栄湯（1000 mg/kg/day）の3ヶ月齢からの長期投与は、この空間記憶障害を有意に軽減した。このことから人参養栄湯は学習記憶障害に対する予防効果が示唆された。また、open-field テストでは、8.5ヶ月齢の時点で SAMP8 マウスは不安様行動を示したが、人参養栄湯の効果は認められなかった。更に、5ヶ月齢時点で行った sucrose splash テストでは、SAMP8 マウスは身繕い行動の低下を示し、無気力様行動が認められた。この身繕い行動低下は、人参養栄湯の投与により有意に改善したことから、人参養栄湯は無気力様行動を改善することが示唆された。以上の結果から、人参養栄湯は SAMP8 マウスの不安様行動に対しては改善効果は期待できないが、学習記憶障害および無気力様行動に対して改善効果があることが明らかとなった。

結論

AD 患者における嗅覚障害の発現と、嗅覚障害の AD 症状進行への深い関連性は以前から報告されていたが、その病態の全貌は不明なままであり、予防・治療法も確立されていない。本研究結果から AD モデルマウスの一つとして提案されている SAMP8 マウスでの嗅覚障害の発現が明らかとなった。今後 AD 早期の嗅覚障害の病態を解明する糸口となる可能性が期待できる。更に、AD の嗅覚障害に対して人参養栄湯が有効であることが提案され、早期段階からの投与により記憶障害や無気力様行動などの中核症状や周辺症状の進行を予防する可能性も示された。本研究結果は AD の嗅覚障害の病態解明に関する数少ない知見であり、人参養栄湯の基礎研究における新たなエビデンスである。また、AD 患者の嗅覚障害の治療や AD の進行抑制を目的として、人参養栄湯が臨床適応される可能性を示した。人参養栄湯は AD 早期の嗅覚障害に対して、より安全性の高い新たな治療薬になり得る可能性が示された。

参考文献

1. Dodge, Hiroko H et al. "Trends in the prevalence of dementia in Japan." *International journal of Alzheimer's disease* vol. 2012 (2012): 956354.
2. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. *World Health Organization 10th Revision. Geneva*:1993
3. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth Edition : DSM-5 Arlington. VA: *American Psychiatric Association*: 2013
4. Bateman, Randall J et al. "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease." *The New England journal of medicine* vol. 367,9 (2012): 795-804.
5. Braak, H, and E Braak. "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta neuropathologica* vol. 82,4 (1991): 239-59.
6. Thal, Dietmar R et al. "Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD." *Neurology* vol. 58,12 (2002): 1791-800.
7. Dan, Xiuli et al. "Olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative diseases." *Ageing research reviews* vol. 70 (2021): 101416.
8. Roberts, Rosebud, and David S Knopman. "Classification and epidemiology of MCI." *Clinics in geriatric medicine* vol. 29,4 (2013): 753-72.
9. Doty, Richard L, and Vidyulata Kamath. "The influences of age on olfaction: a review." *Frontiers in psychology* vol. 5 20. 7 Feb. 2014,
10. Growdon, Matthew E et al. "Odor identification and Alzheimer disease biomarkers in clinically normal elderly." *Neurology* vol. 84,21 (2015): 2153-60.
11. Kouzuki, Minoru et al. "Comparison of olfactory and gustatory disorders in Alzheimer's disease." *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* vol. 39,2 (2018): 321-328.

12. Trinh, Kien, and Daniel R Storm. "Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium." *Nature neuroscience* vol. 6,5 (2003): 519-25.
13. Canavan, Sofija V et al. "Changes in maternal gene expression in olfactory circuits in the immediate postpartum period." *Frontiers in psychiatry* vol. 2 40. 1 Jul. 2011
14. Soudry, Y et al. "Olfactory system and emotion: common substrates." *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* vol. 128,1 (2011): 18-23.
15. Weera, Marcus M et al. "Central Amygdala Projections to Lateral Hypothalamus Mediate Avoidance Behavior in Rats." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 41,1 (2021): 61-72.
16. Gómez-Isla, T et al. "Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 16,14 (1996): 4491-500.
17. Price, J L et al. "The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* vol. 12,4 (1991): 295-312.
18. Bateman, Randall J et al. "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease." *The New England journal of medicine* vol. 367,9 (2012): 795-804.
19. Payne, Magali et al. "Olfactory identification disorders due to Alzheimer's disease: A new test from France to Quebec." *PloS one* vol. 17,4 e0265764. 4 Apr. 2022,
20. Jimbo, Daiki et al. "Specific feature of olfactory dysfunction with Alzheimer's disease inspected by the Odor Stick Identification Test." *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society* vol. 11,4 (2011): 196-204.

21. Rokot, Natasya Trivena et al. "A Role of Ginseng and Its Constituents in the Treatment of Central Nervous System Disorders." *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* vol. 2016 (2016): 2614742.
22. Samper-Ternent, Rafael et al. "Relationship between frailty and cognitive decline in older Mexican Americans." *Journal of the American Geriatrics Society* vol. 56,10 (2008): 1845-52.
23. Kojima, Gotaro et al. "Frailty as a Predictor of Alzheimer Disease, Vascular Dementia, and All Dementia Among Community-Dwelling Older People: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of the American Medical Directors Association* vol. 17,10 (2016): 881-8.
24. Hirata M et al. "Effects of two kinds of Kampo-hozai, ninjinyoeito and kamikihito, on mental disorder-like behaviors in senescence-accelerated mouse prone 8 mice." *Traditional & Kampo medicine*.vol. 8,2 (2021): 176-180.
25. Murphy, Claire. "Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease." *Nature reviews. Neurology* vol. 15,1 (2019): 11-24.
26. Morley, John E et al. "The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1822,5 (2012): 650-6.
27. Cho, Hyung-Ju et al. "Newly developed method for mouse olfactory behavior tests using an automatic video tracking system." *Auris, nasus, larynx* vol. 45,1 (2018): 103-110.
28. Wolkoff, Peder, and Gunnar D Nielsen. "Effects by inhalation of abundant fragrances in indoor air - An overview." *Environment international* vol. 101 (2017): 96-107.
29. Robin, O et al. "Basic emotions evoked by eugenol odor differ according to the dental experience. A neurovegetative analysis." *Chemical senses* vol. 24,3 (1999): 327-35.

30. Noge, Koji et al. "Identification of the Alarm Pheromone of *Hygia lativentris* and Changes in Composition during Development." *Journal of chemical ecology* vol. 41,8 (2015): 757-65.
31. Tsuchida et al. "Chemical Analyses to Examine the Smell of Cooked Rice and the Effect of Bamboo Charcoal on the Improvement of Smell." *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. 2019
32. Truong, Khai-Nghi et al. "Favored Conformations of Carbonyl Compounds: A Structural Study of n-Octanal." *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* vol. 18,19 (2017): 2631-2636.
33. N-Octanal 124-13-0 東京化成工業株式会社法規情報
34. Inagaki, Hideaki et al. "Identification of a pheromone that increases anxiety in rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,52 (2014): 18751-6.
35. Shepherd GM et al: *The Synaptic Organization of The Brain* (fifth ed.) Oxford University Press. New York. 2003
36. Sosulski, Dara L et al. "Distinct representations of olfactory information in different cortical centres." *Nature* vol. 472,7342 (2011): 213-6.
37. Mori, K et al. "The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information." *Science (New York, N.Y.)* vol. 286,5440 (1999): 711-5.
38. Pantazopoulos, Harry et al. "A fear-inducing odor alters PER2 and c-Fos expression in brain regions involved in fear memory." *PloS one* vol. 6,5 (2011): e20658.
39. Hudson, Andrew E. "Genetic Reporters of Neuronal Activity: c-Fos and G-CaMP6." *Methods in enzymology* vol. 603 (2018): 197-220.
40. Sagar, S M et al. "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level." *Science (New York, N.Y.)* vol. 240,4857 (1988): 1328-31.

41. Yanagida, Satoru et al. "Effect of acute imipramine administration on the pattern of forced swim-induced c-Fos expression in the mouse brain." *Neuroscience letters* vol. 629 (2016): 119-124.
42. Hiraoka, Kentaro et al. "Pattern of c-Fos expression induced by tail suspension test in the mouse brain." *Heliyon* vol. 3,6 e00316. 2 Jun. 2017,
43. Mouse Brain Atlas. (Franklin and Paxinos. 2007)
44. 耳鼻臨床 77 : 増 3 ; 861-888, 1984861
45. Fujimoto, Tetsuya. "Prenatal exposure to bisphenol A impairs predator odor-induced fear behavior in young rat offspring." *Neuro endocrinology letters* vol. 41,5 (2020): 275-283.
46. Webster DG et al. "Open field behavior in eight taxa of murid rodents." *Bull. Psychonom. Soc.* 1979:13:90–92.
47. Wilson, R C et al. "Open-field behavior in muroid rodents." *Behavioral biology* vol. 17,4 (1976): 495-506.
48. Zhang, Limei et al. "Behavioral role of PACAP signaling reflects its selective distribution in glutamatergic and GABAergic neuronal subpopulations." *eLife* vol. 10 e61718. 19 Jan. 2021
49. Jimbo, Daiki et al. "Specific feature of olfactory dysfunction with Alzheimer's disease inspected by the Odor Stick Identification Test." *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society* vol. 11,4 (2011): 196-204.
50. Yamada C et al. "Ninjinyoeito ameliorates anorexia and decrease in the Nest building via a dopamine D2 receptor-dependent manner in a novel murine apathy model." *Jpn Pharmacol Ther.* :46,2 (2018): 207–16

51. Yamasaki, Aigo et al. "Effect of Ninjin-yoei-to (Rensheng-Yangrong-Tang) on olfactory behavior after olfactory nerve transection." *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* vol. 15,5 (2008): 358-66.
52. Kobayakawa, Ko et al. "Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb." *Nature* vol. 450,7169 (2007): 503-8.
53. Islam, Saiful et al. "Odor preference and olfactory memory are impaired in Olfaxin-deficient mice." *Brain research* vol. 1688 (2018): 81-90.
54. Laska, M et al. "Olfactory sensitivity for aliphatic aldehydes in squirrel monkeys and pigtail macaques." *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* vol. 189,4 (2003): 263-71.
55. Belluscio, L, and L C Katz. "Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 21,6 (2001): 2113-22.
56. Yoshihara, Y et al. "OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 17,15 (1997): 5830-42.
57. Oka, Yuichiro et al. "O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner." *European journal of biochemistry* vol. 270,9 (2003): 1995-2004.
58. Guillery, R W. "Anatomical evidence concerning the role of the thalamus in corticocortical communication: a brief review." *Journal of anatomy* vol. 187 (Pt 3),Pt 3 (1995): 583-92.
59. Mitchell, Anna S et al. "Advances in understanding mechanisms of thalamic relays in cognition and behavior." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 34,46 (2014): 15340-6.

60. Saalman, Yuri B. "Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition." *Frontiers in systems neuroscience* vol. 8 83. 9 May. 2014
61. Sherman, S Murray, and R W Guillery. "The role of the thalamus in the flow of information to the cortex." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* vol. 357,1428 (2002): 1695-708.
62. Chen, Shuo et al. "A hypothalamic novelty signal modulates hippocampal memory." *Nature* vol. 586,7828 (2020): 270-274.
63. Hsu, David T et al. "Contributions of the paraventricular thalamic nucleus in the regulation of stress, motivation, and mood." *Frontiers in behavioral neuroscience* vol. 8 73. 11 Mar. 2014
64. Kirouac, Gilbert J. "Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior." *Neuroscience and biobehavioral reviews* vol. 56 (2015): 315-29.
65. Duvarci, Sevil, and Denis Pare. "Amygdala microcircuits controlling learned fear." *Neuron* vol. 82,5 (2014): 966-80.
66. Campeau, S, and M Davis. "Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 15,3 Pt 2 (1995): 2301-11
67. Goosens, Ki A, and Stephen Maren. "Pretraining NMDA receptor blockade in the basolateral complex, but not the central nucleus, of the amygdala prevents savings of conditional fear." *Behavioral neuroscience* vol. 117,4 (2003): 738-50.
68. Pape, Hans-Christian, and Denis Pare. "Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear." *Physiological reviews* vol. 90,2 (2010): 419-63.

69. Wilensky, Ann E et al. "Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 26,48 (2006): 12387-96.
70. Zimmerman, Joshua M, and Stephen Maren. "NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats." *The European journal of neuroscience* vol. 31,9 (2010): 1664-70.
71. Yabe, T et al. "Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjinyoei-to." *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* vol. 10,2-3 (2003): 106-14.
72. Goswami, Chayon et al. "Ninjinyoei-to activates ghrelin-responsive and unresponsive NPY neurons in the arcuate nucleus and counteracts cisplatin-induced anorexia." *Neuropeptides* vol. 75 (2019): 58-64.
73. Doyle, Kharen L et al. "Neuropeptide Y and peptide YY have distinct roles in adult mouse olfactory neurogenesis." *Journal of neuroscience research* vol. 90,6 (2012): 1126-35.
74. Miyano, Kanako et al. "Japanese Herbal Medicine Ninjinyoei-to Mediates Its Orexigenic Properties Partially by Activating Orexin 1 Receptors." *Frontiers in nutrition* vol. 7 5. 27 Feb. 2020
75. Julliard, A K et al. "Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation." *Behavioural brain research* vol. 183,2 (2007): 123-9.
76. Ballard, Clive et al. "Alzheimer's disease." *Lancet (London, England)* vol. 377,9770 (2011): 1019-31.
77. Prut, Laetitia, and Catherine Belzung. "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." *European journal of pharmacology* vol. 463,1-3 (2003): 3-33.

78. Yamaguchi, Taku, and Mitsuhiro Yoshioka. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* vol. 130,2 (2007): 105-11.
79. Cathomas, Flurin et al. "The translational study of apathy-an ecological approach." *Frontiers in behavioral neuroscience* vol. 9 241. 9 Sep. 2015,
80. Ohsawa, Makoto et al. "A Possibility of Simultaneous Treatment with the Multicomponent Drug, Ninjin'yoeito, for Anorexia, Apathy, and Cognitive Dysfunction in Frail Alzheimer's Disease Patients: An Open-Label Pilot Study." *Journal of Alzheimer's disease reports* vol. 1,1 229-235. 9 Dec. 2017,
81. Kudoh, Chiaki et al. "Effect of ninjin'yoeito, a Kampo (traditional Japanese) medicine, on cognitive impairment and depression in patients with Alzheimer's disease: 2 years of observation." *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society* vol. 16,2 (2016): 85-92.
82. Egashira, N et al. "Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang) and Polygalae radix improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice." *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* vol. 10,6-7 (2003): 467-73.
83. Matsui, Nobuaki et al. "Magnolol and honokiol prevent learning and memory impairment and cholinergic deficit in SAMP8 mice." *Brain research* vol. 1305 (2009): 108-17.
84. Allard, Simon et al. "Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 32,6 (2012): 2002-12.
85. Yabe, T et al. "Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-yoei-to." *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* vol. 10,2-3 (2003): 106-14.
86. Song, QH et al. "Effects of Ninjin-yoei-to (Rensheng-Yangrong-Tang), a Kampo medicine, on brain monoamine and nerve." *Journal of Traditional Medicines*, 18 (2012): 64-7.

87. Miyazaki, Shinji et al. "Ninjin'yoeito, a traditional Japanese medicine, increases dopamine content in PC12 cells." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* vol. 85,11 (2021): 2274-2280.
88. Gao, Shichao et al. "POLD1 deficiency is involved in cognitive function impairment in AD patients and SAMP8 mice." *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 114 (2019): 108833.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始ご指導ご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、ならびに有益なご助言と御高閲を賜りました、生薬学教室の金城順英教授、免疫・分子治療学教室の細川雅人准教授に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり終始御指導とご助言を賜りました渡辺拓也助教、ならびに多くのご指導をいただいた桂林秀太郎教授、窪田香織講師に深く感謝し、誠に御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり終始御指導とご協力いただいた長尾昌紀博士、ツムラ株式会社研究開発部の皆様に深く感謝いたします。また、終始苦楽を共にし、支えて下さった同期の内野鉦也氏、木村（土岐）衣梨奈氏に深く感謝いたします。また、共同研究者として、多くの議論、実験を共に行ってくださった谷口知世氏、波多江旺信氏、山田真綾氏、松井一磨氏、山下真由氏、宮路えりか氏、岩中麗氏、末岡一成氏をはじめとする福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の皆様に深く感謝申し上げます。そして、学生生活を通じて、終始精神的、経済的支援を賜りました家族や私を支えて下さった方々に心より感謝いたします。最後に、本研究に尊い生命を提供していただきました実験動物諸霊に深く感謝いたします。誠にありがとうございました。