

学位論文

桑枝条抽出物によるアンチエイジング
の機能解析

徐 萍

目次

序論.....	1
謝辞.....	5
第一章 D-galactose による老化モデル惹起の解析	
I. 材料及び方法.....	8
1. 実験動物.....	8
2. 薬物の調製及び投与.....	8
3. ステップスルー型受動的回避実験.....	8
4. モリス水迷路実験.....	10
5. 病理組織学的観察.....	11
6. 統計分析.....	12
II. 結果.....	16
1. マウスの体重, 飲水量及び摂食量.....	16
2. ステップスルー型受動的回避実験.....	16
3. モリス水迷路実験.....	16
4. 臓器指数の分析.....	17
5. 組織学的評価.....	18
III. 考察.....	34
IV. 摘要.....	39
第二章 桑枝条抽出物による老化促進マウス SAM-P8 のアンチエイジング解析	
I. 材料と方法.....	42
1. 実験動物.....	42

2. 供試試料.....	42
3. 供試試料の投与.....	43
4. ステップスルー型受動的回避実験.....	43
5. モリス水迷路実験.....	43
6. 摩擦係数測定.....	43
7. 走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscope, SPM) の観察.....	44
8. 統計分析.....	44
II. 結果.....	45
1. マウスの体重, 飲水量及び摂食量.....	45
2. ステップスルー 型受動回避実験.....	45
3. モリス水迷路実験.....	45
4. 体毛の摩擦係数の測定.....	46
5. 走査型プローブ顕微鏡(scanning probe microscope, SPM)の観察.....	46
III. 考察.....	59
IV. 摘要.....	62
総合考察.....	63
引用文献.....	67

序論

カイコは約 6,000 年位前に中国大陸で人間に飼いつづけられてきたと考えられ、3,500 年位前にはカイコを示す甲骨文字もあった。中国に約 4,600 年前に皇帝がその妃である西陵に養蚕を行わせ、製糸、織物の技術を奨励したという記述が残っている。そのため、中国は絹の国と呼ばれた。中国の絹は世界の各国から求められ、約 2,500 年も前から外国へ輸出された。絹の売買とする東西貿易路をシルクロードと名づけられ、東西文化交流に大切な役割を果たした。長い年月をかけて、カイコは少しずつヨーロッパや日本などの各地に伝わり、養蚕業が広がった。このため、カイコしか食べない桑は世界中に栽培されるようになった (小林ら, 1993 ; 森, 1970)。

桑はアジア大陸の南東端及び西部、日本列島、アラビア、アフリカ西部、南北アメリカ、南ヨーロッパなどに温帯から熱帯にかけて広く分布している落葉樹である。分布の密度が高いのは日本及び中国である (杉山, 1962 ; Venkatesh *et al.*, 2008)。桑は *Artocarpeae* R. Br., *Castilleae* Berg, *Dorstenieae* Gaudich, *Ficeae* Gaudich および *Moreae* Gaudich の 5 つの科 (Tribe) に分類される。*Artocarpeae* R. Br. 科には *Artocarpus* J. R., *G. Forster*, *Bagassa* Aublet, *Batocarpus* Karsten など 8 属で、合わせて 70 種 (Specie) 以上がある。*Castilleae* Berg 科には *Antiaris* Lesch, *Naucleopsis* Miquel, *Perebea* Aublet などの 11 属で、合わせて 59 種 (Specie) 以上がある。*Dorstenieae* Gaudich 科には *Brosimum* Swartz, *Dorstenia* L.; *Scyphosyce* Baillon などの 8 属で、合わせて 128 種以上がある。*Ficeae* Gaudich 科には *Ficus* L. 属で、750 種以上がある。*Moreae* Gaudich 科には *Maclura* Nutt, *Morus* L., *Sorocea* St.Hil.などの 9 属で、合わせて 93 種以上がある (Zereqa *et al.*, 2005)。その中、*Morus alba* 種, *Morus australis* 種, *Morus bomycis* 種などが広く研究されている。

桑はカイコのエサとして利用されることだけではなく、漢方薬と健康茶として利用さ

れている。中国と日本で主に漢方薬として利用してきたのが桑白皮、つまり桑の根の皮である。利尿、消炎、解熱などの作用がすぐれているから、高血圧、動脈硬化、中風などの病に使われてきた。桑椹酒あるいは桑の実を煎じたお茶は滋養強壯、利尿、鎮咳、去痰、緩下作用があり、冷え症、不眠症、低血圧、糖尿病、神経衰弱、運動麻痺、知覚麻痺、性欲低下、腎臓病、尿量減少、便秘、脳出血などに効果がある。桑の葉は咳、高血圧の予防と治療、滋養強壯、糖尿病、中風などに効用を有する。桑枝条は風寒湿痺、四肢拘攣、脇気浮腫、高血圧に供する（大村，1983；村上，1998；吉田，2000）。

伝統漢方薬として利用されてきた桑が近年科学的に着目され、生理活性についての研究が盛んにおこなわれている。桑葉の成分の 1-deoxynojirimycin (DNJ; Yoshikuni, 1988; Asano *et al.*, 1994), 2-arylbenzofuran derivatives (Basnet *et al.*, 1993) および Polyhydroxylated alkaloidas (Asano *et al.*, 2001) は小腸のグルコシダーゼを抑制し、二糖類の加水分解を防ぎ、ブドウ糖が血管への吸収作用を阻害した結果、血糖値の上昇を抑制し、糖尿病マウスの高血糖症を抑制する強い活性が示した。また、DNJ はすぐに消化管から完全な形態として吸収され、その後急速に体内から排泄される特徴を持ち (Nakagawa *et al.*, 2007)、ヒト臨床試験の研究では、0.8~1.2 g の DNJ 濃縮パウダーを単回経口投与すると、食後血糖値とインスリンの分泌の上昇を抑制することが示され、糖尿病を予防する栄養補助食品として使用できるようになった (Kimura *et al.*, 2007)。桑葉の生理活性機能は抗高血糖だけではなく、桑葉 (*Morus alba* L) の水抽出物は *in vitro* で抗炎症活性を示し (Shibata *et al.*, 2007)、桑葉 (*Morus nigra*) の methylene chloride 抽出物は *in vivo* で Carrageenan によって引き起こしたラットの著しい足浮腫を抑えて抗炎症活性を実証したこと (Padilha *et al.*, 2010) などが報告されている。韓国では、桑葉から分離した Mulberroside F がメラニン生合成を抑制する肌の美白作用因子であることが明らかになった (Lee *et al.*, 2002)。桑根についての研究において、例えば、桑根の皮 (*Morus alba* L) から分離された物質の Albanol

A は人の白血病細胞株 LH60 に対してアポトーシス細胞死を誘導し、抗ガン作用を有すること (Kikuchi *et al.*, 2010), さらに単離された3つフェノール類化合物 Moracin M (1), Steppogenin-4'-O-β-D-glucoside (2), Mullberroside A (3) が糖尿病マウスに対する血糖降下作用を示したこと (Zhang *et al.*, 2009) の報告があった。また、桑根 (*Morus bombycis*) のエタノール抽出物には抗肥満効果があり (Kim *et al.*, 2010), 桑根より単離された 2, 5-dihydroxy-4,3'-di(β-D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene は肝臓保護作用を持つ抗酸化物質である (Jin *et al.*, 2006)。桑実についても多く報告されている。例えば、桑実のアントシアニンには抗酸化作用を持ち、ショウジョウバエの寿命を延長させた (Jiang *et al.*, 2010)。また、桑実のパウダーは高脂血症ラットに有益な効果を示した (Yang *et al.*, 2010)。桑実の 70% エタノール抽出物についてはパーキンソン病モデルマウスにおける神経保護効果を有することが示された (Kim *et al.*, 2010)。桑実の水抽出物 (*Morus alba* L) は脂質の蓄積を減少させ、脂肪酸の合成及び肝臓の脂肪合成を抑制した (Ou *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011)。一方、桑の幹樹皮 (*Morus wittiorum*) から生理活性物質 2-arylbenzofuran 誘導体が単離され、抗酸化作用と抗炎症作用を示した (Tan *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2008)。

しかしながら、通常桑の枝条の大部分は廃棄され、さらに桑枝条についての報告の数は極めて限られている。例えば、桑 (*Dorstenia barteri*) の葉と若枝の抽出物はマウスモデルにおける鎮痛作用と抗炎症作用を有すること、そして若枝は葉より効果を持つことが示唆されている (Omisore *et al.*, 2004)。さらに、桑 (*Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*) の枝と葉の抽出物が抗トリコモナスと抗酸化活性を示し、枝の抽出物の方はプレニル化フラボノイドを含み、葉より抗酸化活性が強力であった (Omisore *et al.*, 2005)。

さて、われわれ人類は医療技術の発展とともに寿命が延長され、少子化により、人口構成は高齢化が顕著になっている。老化に伴って白髪、脱毛症、肌老化などの現象が現

れ、そして認知症 (Mehta *et al.*, 2007), 癌腫瘍 (Finkel *et al.*, 2007), 心血管疾病 (Dominguez *et al.*, 2007)などの重篤な病気の発生率も年々に増加している。生活の質を大きく影響すると同時に国民医療費の増加負担になっている。生活の質の向上と健康寿命の延長が世界的な課題となっている。

このような状況下で、近年天然物質を利用し、医薬品や化粧品における応用研究開発が注目されている。特に、桑実 (*Morus alba* L) の抽出物は老化促進マウス SAM-P8 の学習記憶能力の改善を示した (Shih *et al.*, 2009)。桑 (*Morus lhou*) の根から分離したアルキル化フラボノイドはアセチルコリンエステラーゼ (AChE) とブチリルコリンエステラーゼ (BChE) を強力的に抑制することが明らかにされた (Kim *et al.*, 2011)。桑根から分離精製した Mulberroside A がチロシナーゼの阻害活性を示し、肌の美白の原料として活用できると提案されている (Kim *et al.*, 2010)。さらに、桑枝条より単離された Oxyresveratrol は食品フェノール化合物で、パーキンソン病の神経変性において予防及び治療の栄養候補物質とする潜在力が期待されている (Chao *et al.*, 2008)。一方、桑枝皮部から免疫賦活活性を有したタンパク質-ポリサッカライド複合体の存在が示唆され、新しい付加価値が発見された (Sillapakong *et al.*, 2011)。しかし、桑枝条の抗老化作用の機能に関する知見はほとんど見当たらない。

そこで、本研究では、あおばねずみ (*M. alba* 'Aobanezumi') 枝条を用いて、アンチエイジング機能を解析することを目的とし、第一章では老化モデルを確立するため、C57BL/6J マウスにおける D-galactose による老化モデルの惹起の検討をおこなった。第二章では老化促進マウス SAM-P8 における桑枝条のアンチエイジング機能を探索解析することにした。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜った岩手大学農学部共生環境課程准教授小藤田久義博士に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、実験を進める上で、多大なる御指導と御援助を賜った岩手大学農学部獣医課程獣医病理研究室教授・御領政信博士，岩手大学農学部獣医課程基礎獣医学講座名誉教授・小林晴男博士，地域連携推進センター客員教授・首藤文榮博士，ならびに病理切片の製作を丁寧にご指導と励ましをくださった農学部獣医課程獣医病理学研究室助教・佐々木淳博士，工学部機械システム工学科助教・内館道正博士に甚大なる謝意を表します。

また，常に励ましをくださった中国吉林農業大学准教授・朴春紅博士，試料を提供してくださったトヨタマ健康食品株式会社，お世話になった旧応用昆虫学研究室諸氏に深く感謝いたします。

最後に，常に惜しめない愛情で支援してくれた家族に心より感謝いたします。

第一章 D-galactose により老化モデル惹起の解析

加齢とともに脳機能の降下，認知症などがもっとも生活の質に影響している。動物実験を用いて学習・記憶の効果を評価する方法は必ず使用されるのが行動実験法である。よく使われる行動実験には (1) Y 字型迷路試験，(2) ロータロッド試験，(3) 恐怖条件付け文脈学習試験，(4) 水探索試験，(5) 新奇物質探索試験，(6) 受動回避試験，(7) 放射状迷路試験，(8) Morris 水迷路試験，(9) 遅延見本合わせ・非見本合わせ試験などがある (田熊ら，2007)。行動実験は多種要因の影響があることから，一般的に 2 種類以上の実験方法を用いて評価する必要がある。本章では文脈学習評価のステップスルー型受動的回避試験 (McGaugh & Landfield, 1970) と空間記憶評価のモリス水迷路試験 (Morris, 1981) を使用した。

アンチエイジング研究において，マウス (Zhang *et al.*, 2008)，ラット (Lei *et al.*, 2008)，ショウジョウバエ (Cui *et al.*, 2004) などに D-galactose を慢性全身に曝し，老化の加速を引き起こさせ，老化モデルとして使用されている。D-galactose の慢性投与は動物の自然老化に似た変化を誘導し (Li *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 2006)，酸化ストレス (Kumar *et al.*, 2010)，認知機能障害 (Wang *et al.*, 2010)，神経損傷 (Zhang *et al.*, 2005)，遺伝子転写の変化 (Lu *et al.*, 2006)，免疫機能障害 (Yi *et al.*, 2009) などを惹起することが報告されている。D-galactose により老化の誘導は老化や加齢に伴う神経変性に関するメカニズムを研究するための理想的なモデルとなっている。

しかしながら，報告されているマウスへの D-galactose の投与量は広範囲となっており信頼性に欠ける。例えば，50 mg/kg (Lu *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2009)，100 mg/kg (Cui *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2009)，120 mg/kg (Zhao *et al.*, 2008)，150 mg/kg (Zhang *et al.*, 2008)，200 mg/kg (Mao *et al.*, 2008)，500 mg/kg (Ma *et al.*, 2009)，1250mg/kg (Shen *et al.*, 2002) 体重などの投与量の報告があり，慎重性が求められる。特に本研究

のように、桑枝条のアンチエイジングの機能を解析するためには、まず第一に、脳老化モデルを確立する必要があると考えられる。

一方、近交系 C57BL/6J マウスはジャクソンラボラトリーズ系 (Jackson Laboratories stocks) より繁殖し (Popesco *et al.*, 2004), 加齢変化を調査するためもっともよく使用される実験用マウス系統である (Calhoun *et al.*, 1998; Long *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2009;). この系統は加齢に伴う概日リズムが変化し (Valentinuzzi *et al.*, 1997), 空間学習機能が高く (Stavnezer *et al.*, 2002), そしてモリス水迷路で年齢依存的に記憶障害を示している (Magnusson *et al.*, 2003). 老化研究として適切な系統であると考えられる。

また、D-galactose の慢性投与より自然老化を誘発するのは動物の年齢の影響で、12 週齢、22 週齢から D-galactose を注射したマウスが年齢依存的に有意な酸化ストレスを示した (Xu *et al.*, 2009).

そこで、本章では、脳老化を引き起こす D-galactose の投与量を検討するため、12 週齢の C57BL/6J 系統マウスを用いて、D-gal (D-galactose) 200mg/kg, D-gal 400mg/kg, D-gal 800mg/kg 投与群のマウスに対して行動実験と病理組織観察実験をおこなった。また、D-galactose により惹起した病変を判断するため、さらに D-gal 1000mg/kg, D-gal 1500mg/kg 及び D-gal 2000mg/kg の 3 つの高投与量群を増やし、D-gal 200mg/kg, D-gal 400mg/kg 及び D-gal 800mg/kg 投与群の実験条件と統一するように行動実験終了日にマウスを屠殺し、病理組織学観察実験をおこなった。なお、D-galactose を 8 週間連続投与することにより引き起こした病変が自己修復されるかどうかを確認するため、D-gal 1000 mg/kg 群に対して、注射終了の時と注射終了一週後の病理組織学観察実験をおこなった。

I. 材料及び方法

1. 実験動物

動物は9週齢のC57BL/6J系雄マウス(体重23-28g)を日本SLC(株)より購入し、Normal control (NC), D-galactose 200mg/kg 体重/日 (D-gal 200mg/kg), D-galactose 400mg/kg 体重/日 (D-gal 400mg/kg), D-galactose 800mg/kg 体重/日 (D-gal 800mg/kg), D-galactose 1000mg/kg 体重/日 (D-gal 1000mg/kg), D-galactose 1500mg/kg 体重/日 (D-gal 1500mg/kg), D-galactose 2000mg/kg 体重/日 (D-gal 2000mg/kg) の7群に分け、1ケージに5頭ずつ飼育しながら、3週間の環境馴化後、実験に供した (Fig. 1). 動物飼育室は室温が $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照明時間が12時間(朝7時に自動的に照明点灯、夜19時に自動的に消灯)に保たれた。飼育飼料(MEQオリエンタル酵母工業株式会社)は滅菌され、自由に食べさせ、飲水は水道水で自由に飲食させた。実験中、体重を毎日、摂食量と飲水量を隔日計測した。

動物の飼育および取り扱いは動物愛護法並びに実験動物のケア及び使用に関するガイドラインに従いながら、岩手大学動物実験委員会認可のもとで行った。

2. 薬物の調整及び投与

等張液とは細胞内の溶液と浸透圧が等しい生理食塩水に相当する溶液である。薬品の注射剤などは等張液を使用している。そこで塩化ナトリウム(和光)で200mg, 400mg, 800mg, 1000mg, 1500mg, 2000mg/kg 体重/日のD-galactose (Sigma 会社)の等張溶液を調製した。毎日新鮮な試薬を調整し、同じ時間でマウスに8週間に渡り皮下注射をおこなった。一方、対照とするNC群に生理食塩水(扶桑薬品工業)を同じく8週間

皮下注射した。

3. ステップスルー型受動的回避実験

3.1 装置

装置（小原医科産業）は白色光（15W）で照らした明室（上側；幅 300 mm，奥行 98 mm，高さ 90 mm，下側；幅 120 mm，奥行 42 mm，高さ 90 mm）と，床に通電できるグリッド（6 mm 間隔）を設置した暗室（幅 180 mm，奥行 125 mm，高さ 115 mm）に分かれている。2 室の間には，上下に自由に開閉できる仕切りドアがある（Fig. 2）。暗室内にはマウスの入室を検知する赤外線センサーが備わっている。また，暗室に入るまでの時間計測器及び電気刺激発生トリガーが暗室に繋がっている。

3.2 手順

実験の前にマウスの異常個体を選別するために，前獲得試行(Preacquisition trial)をおこなった。前獲得試行とは，仕切りドアを開けたままマウスを明室に入れ，暗室に入るまでの時間をストップウォッチで測定した。Step-through 型受動回避実験は，光を避けるマウスの負の走行性を利用したものであるため，明室におかれたマウスが 60 秒以上明室に留まれば，異常個体と判断し，実験に使用しなかった。

実験 1 日目に前獲得試行をおこない，その後獲得試行 (Acquisition trial) をおこなった。獲得試行とは，仕切りドアを閉めた状態でマウスを明室に入れ，30 秒後に仕切りドアを開け，マウスが暗室に入るまでの時間（反応潜時）を測定した。マウスの後ろ足が暗室に入った，または暗室の中の赤外線センサーに反応した時点で，仕切りドアを

閉め、0.2 mA の電気ショックを 4 秒間与えた。

実験 2 日目（獲得試行から 24 時間後）に再生試行（Retention trial）をおこなった。再生試行は獲得試行と異なり、電気ショックを流さなかった。それ以外の操作は、獲得試行と同様におこなった。反応潜時は最大 300 秒として計測した。

4 モリス水迷路実験

4.1 装置

装置は Fig. 3 に示した円形プール（直径 100cm，深さ 30cm）とマウスが回避できるための透明なプラットホーム（高さ 19cm）からなっている。マウスがプラットホームを水面下 1cm に見えないように、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の水（市販のポスターカラーでプールの水を白濁させる）をプールに深さ 20cm まで入れた。プール水面上から 100cm 位置に白黒 CCD カメラが設置しており、カメラとコンピュータは連動し、マウスの水泳軌跡を 0.5 秒間隔で自動記録された。水泳軌跡の記録と画像分析は NIH Image をもとに作られたソフトウェア Image WMH 2.08（小原医科産業）を使用した。

4.2 手順

モリス水迷路実験は 9 日間、毎日夜 19 時からスタートした。1 日目にマウスをプールに適応させるため、一頭に 1 回ずつ 1 分間泳がせた。また、この日のプラットホームに高さ 10cm の目印を設置し、マウスにプラットホームの存在を認識させた。実験者はコンピュータに指示された地点から、マウスを壁向きにプールに入れてから速やかにマウスが見えない位置に回避した。マウスが 60 秒以内にプラットホームに到達できたら、

そのまま 15 秒間放置し、その位置を記憶させた。なお、マウスが 60 秒でもプラットホームに到達できない場合は、強制的にプラットホームに移動させ、15 秒間放置し、その位置を記憶させた。

2~8 日目に目印を外し、マウスをコンピュータに指示された時点から壁向きに 1 頭に 4 回ずつ 1 分間泳がせるトレーニングを行った。60 秒で到達できない場合は到達時間を 60 秒と記録した。

9 日目にプローブテストを 1 回行った。この日、プラットホームを取り除き、マウスを一頭に 1 回ずつ 60 秒間泳がせた。プラットホームがある場所を横切った回数 (Crossing)、平均水泳速度 (Swimming speed) 及び円形プール 4 分円 (Quadrant) の滞在率を測定した。

5 病理組織学的観察

5.1 スライド標本の作製

モリス水迷路実験後の各群マウスをジエチルエーテルの深麻酔下で断頭し、速やかに脳、心臓、肝臓、脾臓、肺及び腎臓を摘出し、重さを測り、迅速に 10%ホルマリン溶液に 3 日間固定した。さらに、脳部位の海馬を切り出し、2 日間に渡り 10%ホルマリン溶液に再固定した。固定した海馬部位と内臓を流水で 12 時間洗浄した後、75%エタノール溶液、85%エタノール溶液、99%エタノール溶液、100%エタノール溶液に逐次に 12 時間脱水、脱脂した。続いて、キシレンⅠ 30 分、キシレンⅡ 30 分、キシレンⅢ 40 分に浸漬し、65 °C のパラフィンⅠ 30 分、パラフィンⅡ 30 分、パラフィンⅢ 30 分に浸透し、パラフィン包埋をおこなった。作製したパラフィンブロックを滑走式マイクローム (LEICA SM 2010R) で 3 μm の厚さに薄切り、水の中に伸展し、その後、ガラスに

乗せ、水分がなくなるまでパラフィン伸展板（千代田製作所, PS-53）上で 24 時間乾燥させた。

5.2 ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxilin and eosin; HE）染色

作製したスライド標本を脱パラフィンし、キシロール I 5 分, キシロール II 5 分, 99% エタノール I 2 分, 85%エタノール I 2 分, 75%エタノール I 2 分, 水 2 分に浸漬した。続いて、マイヤーのヘマトキシリン溶液 3 分間染色し, 3 回程度軽く水洗して, 余分のヘマトキシリン液を 45 分程洗った。さらに, 75%, 85%エタノールに各 2 分ずつ浸漬し, エタノールエオジン 1%液で 1 分間染色し, 99%エタノール I, II に各 2 分ずつ浸漬し, キシレン I, II で透徹後, オイキッド液の封入剤を使用し, カバーガラスの封入を行った。

作製した切片は光学式顕微鏡（Nikon, ECLIPSE E600, レンズ倍率：×4, ×10, ×20, ×40）に接続したデジタルカメラ（Nikon, DS-Fi1）で撮影した。

6 統計分析

マウスの体重, Step-through 型受動回避実験及び Morris 水迷路実験において, JMP® 8 (SAS Institute Inc.) を用いて, 分散分析 (ANOVA) をおこなった。なお, 有意差が認められた場合は Dunnett の方法で事後検定 (Post-hoc test) をおこなった。

	63	80	136	139	148
Age in Days					
Group					
Normal Control (NC)	Acclimatize	Daily subcutaneous injection of saline (8 weeks)	Step-through test	Morris water maze text	HE staining
D-gal (200mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 200mg /kg body weight/day (8 weeks)	Step-through test	Morris water maze text	HE staining
D-gal (400mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 400mg /kg body weight/day (8 weeks)	Step-through test	Morris water maze text	HE staining
D-gal (800mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 800mg /kg body weight/day (8 weeks)	Step-through test	Morris water maze text	HE staining
D-gal (1000mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 1000mg /kg body weight/day (8 weeks)	12 days		HE staining
D-gal (1500mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 1500mg /kg body weight/day (8 weeks)	12 days		HE staining
D-gal (2000mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 2000mg /kg body weight/day (8 weeks)	12 days		HE staining
D-gal (1000mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 1000mg /kg body weight/day (8 weeks)	HE staining		
D-gal (1000mg/kg)	Acclimatize	D-gal was injected subcutaneously in a dose of 1000mg /kg body weight/day (8 weeks)	one week		HE staining

Fig. 1. Experimental schedule of D-galactose- induced dementia model mice. The animals were divided into 9 groups: (1) NC; (2) D-gal 200 mg/kg; (3) D-gal 400 mg/kg; (4) D-gal 800 mg/kg; (5) D-gal 1000 mg/kg; (6) D-gal 1500 mg/kg; (7) D-gal 2000 mg/kg; (8) D-gal 1000 mg/kg (immediately sacrificed); (9) D-gal 1000 mg/kg (sacrificed after one week); by subcutaneous injection every day for 8 weeks.

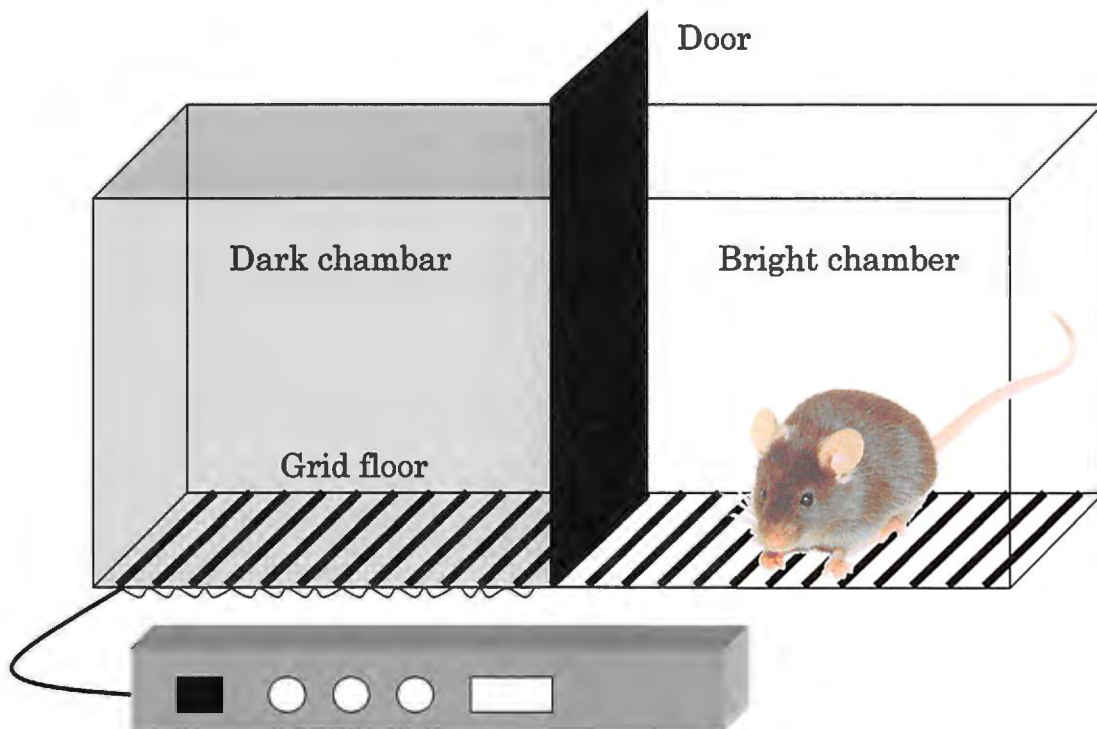


Fig. 2. An equipment of passive avoidance test. The apparatus consisted of illuminated chamber (top; $300 \times 98 \times 90$ mm, bottom ; $120 \times 42 \times 90$ mm) by a fluorescent light of 15 W and dark chamber ($180 \times 125 \times 115$ mm). The floor of the cage was made of metal rods, spaced at 6 mm. When a mouse entered the dark chamber, the door between the two chambers was closed and foot shock (0.2 mA, 4 sec) was delivered through the grill floor of the dark chamber. The presence of the passive avoidance was 24 h later. The mouse was placed on the illuminated chamber once more and the latency to enter the dark chamber was measured with the cutoff time of 300 sec.

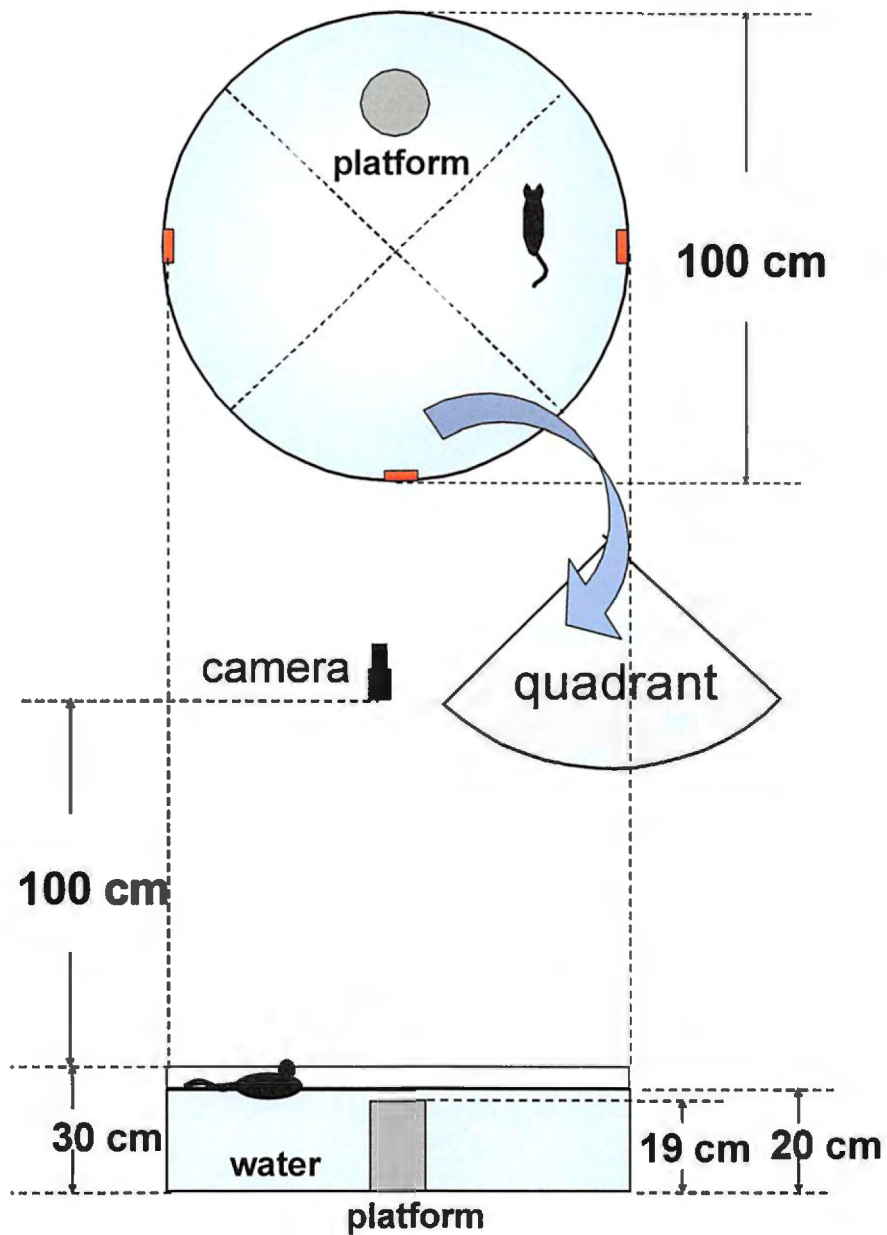


Fig. 3. An equipment of Morris water maze. The pool was filled to depth of 20 cm, so that the mouse could either escape over the edge of the tank nor balance its tail on the bottom of the tank. White paint was added into the water and the temperature controlled at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A video camera was mounted above the tank. Red rectangles indicate start location.

II. 結果

1. マウスの体重, 飲水量及び摂食量

D-galactose を注射する前日の体重, 飲水量, 摂食量を基準とし, 体重増加量, 飲水増加量, 摂食増加量の変化を検討した. D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg 群のマウスの体重増加量の変化を Fig. 4 A に示した. D-gal 200 mg/kg 群では NC 群に比較すると 54 日目で有意な減少が認められた. D-gal 400 mg/kg 群では NC 群に比較すると 34 日目で有意な減少が認められた. D-gal 800 mg/kg 群では NC 群に比較すると 32, 41, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 56 および 58 日目で有意な減少が認められた. D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg, D-gal 2000 mg/kg 群の体重増加量の変化を Fig. 12 A に示した. NC 群に比較すれば 4 群の間に有意な差が認められなかった.

D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg 群の飲水増加量の変化を Fig. 4 B に示した. D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg 群の飲水量が NC 群よりやや減少した. D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg, D-gal 2000 mg/kg 群の飲水増加量の変化を Fig. 12 B に示した. D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg, D-gal 2000 mg/kg 群の飲水量が NC 群より顕著に減少した.

D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg 群の摂食増加量の変化を Fig. 4 C に示した. NC 群に比較すると, 4 群の間に差が示されなかった. D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg, D-gal 2000 mg/kg 群の摂食増加量の変化を Fig. 12 C に示した. NC 群に比較すると, 4 群の間に差が示さなかった.

2. ステップスルー型受動的回避実験

4 群のマウスにおける文脈課題記憶の強度を調べるために Step-through 型受動回避実験をおこなった (Fig. 5). ANOVA の結果, 獲得試行 (Acquisition trial) 及び再生試行 (Post-shock trial) のいずれにおいても 4 群間に有意な差は認められなかった.

3. モリス水迷路実験

4 群のマウスにおける空間記憶能力を調べるために, Morris 水迷路実験をおこなった. トレーニング期間における 4 群のマウスのプラットホームまでの平均到達時間 (Fig. 6), プローブテストにおける 4 群のマウスの Crossing 回数 (Fig. 7A), 平均水泳速度 (Fig. 7B), そして各 Quadrant の滞在率 (Fig. 8) を測定した.

各群訓練 1 日目を基準にプラットホームへの平均反応潜時が短縮されるか検定したところ, 400 mg/kg 群では 5 と 6 日目で, 800 mg/kg 群では 5 と 7 日目で, 平均反応潜時の有意な短縮が認められた.

プローブテストにおいて, 各群の Crossing 回数を NC 群に比較すると, 4 群の間に有意な差が認められなかった. 各群の Target quadrant の滞在率を分析したところ, NC 群の Target quadrant 滞在率が他の 2 つの Quadrant 滞在率 (Quadrant 1 and 3) より有意に高くなり, 800 mg/kg D-gal 群の Target quadrant 滞在率が他の 3 つの Quadrant 滞在率 (Quadrant 1, 2 and 3) より有意に高くなった. また, プローブテストの水泳速度においては 4 群の間に有意な差が認められなかった.

4. 臓器指数の分析

臓器の重量は薬理学や毒性学において重要な観察指標である. 一般的には心臓, 肝臓,

脾臓、肺、腎臓、脳組織などの主要な内臓を測定する。そして、体重による臓器重量への影響を避けるため、適時臓器指数（臓器の重量/体重）で表示する (zhang *et al.*, 2011). D-galactose によるマウス臓器に対する影響を調べたところ、各投与群の臓器指数は NC 群に比較するといずれも有意な差が認められなかった(Figs. 9 and 13).

5. 組織学的評価

D-galactose によるマウス脳部位の海馬と大脳皮質、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓に対する毒性を調べるため、各投与群のマウスの臓器を病理組織学検査のヘマトキシリン・エオジン (Hematoxilin and eosin; HE) 染色をおこなった。

D-galactose の 8 週連続投与によって誘引される病変が自己修復されたかどうかを確認するため、D-gal 1000 mg/kg 群に対して、注射終了とその後一週間後のマウスを屠殺し、HE 染色を行った (Figs. 16 and 17). その結果、NC 群に比較すると、脳部位の海馬と大脳皮質、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓においていずれも変化が認められなかった。しかし、各群において海馬（歯状回(DG)の顆粒細胞および錐体細胞）と大脳皮質（錐体細胞）の神経細胞の乏血性変化が確認された。

また、D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg, D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg 及び D-gal 2000 mg/kg 群のマウスは D-galactose を注射終了した 13 日目に屠殺し、HE 染色をおこなった。Figs. 10, 11, 14, 15 に示したように、D-galactose (200 mg/kg 体重から 2000 mg/kg 体重まで) を注射した群の脳部位の海馬と大脳皮質、心臓、肝臓、脾臓、肺および腎臓においていずれも NC 群と差が認められなかった。NC 群 及び D-galactose (200 mg/kg 体重から 2000 mg/kg 体重まで) を注射した群の海馬（歯状回の顆粒細胞および錐体細胞）と大脳皮質（錐体細胞）には神経細胞の乏血性変化が確認された。しかし、神経細胞の乏血性変化は、D-galactose 投与量

(200 mg/kg から 2000 mg/kg まで)の増加にも関わらず, NC 群との有意差が認められなかった.

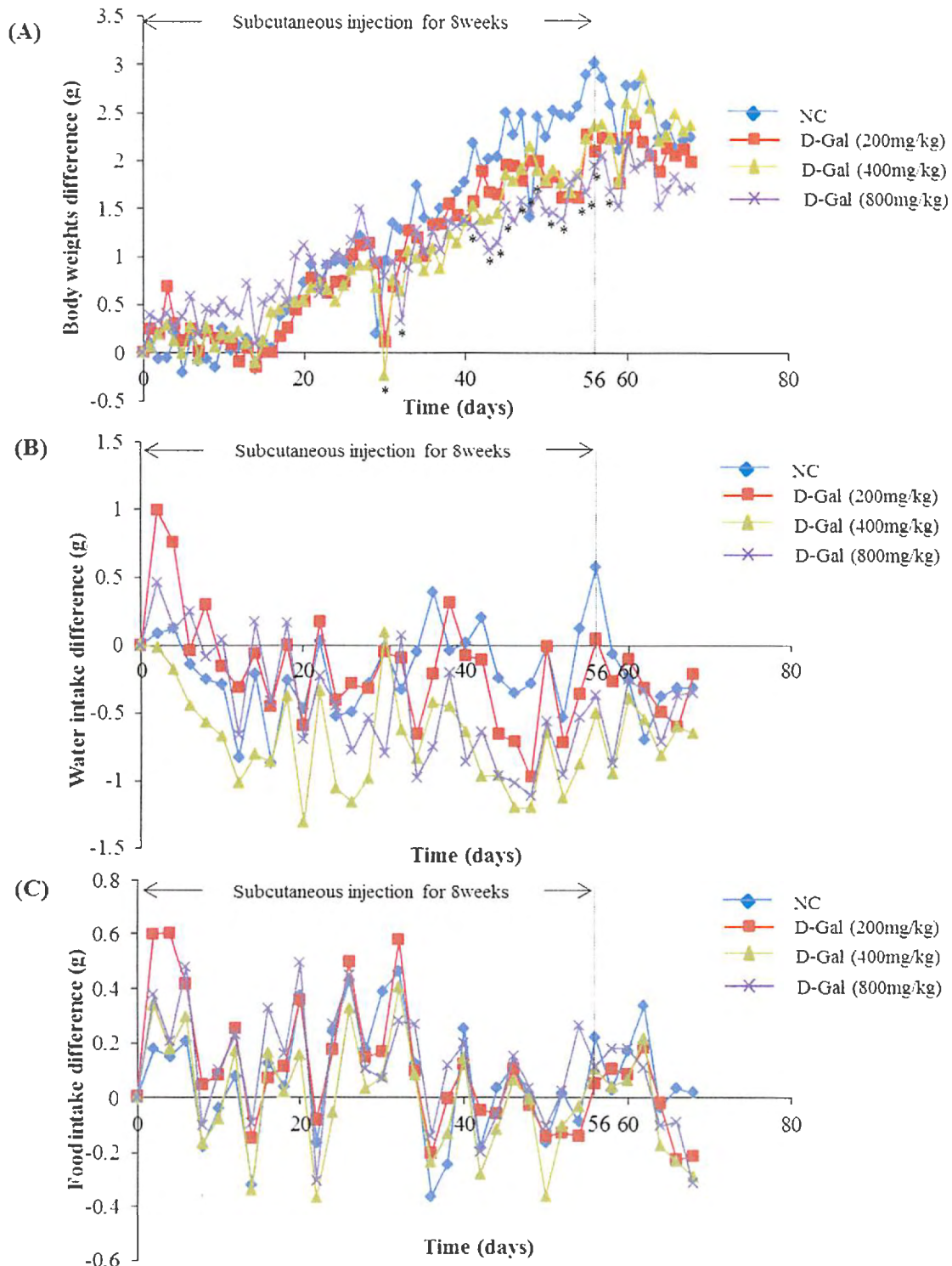


Fig. 4. Body weight, water or food intake in four group mice. (A) Body weight difference in four group mice. Body weight difference of D-gal 200 mg/kg group in day 54 was significantly lower than NC group (*, $P < 0.05$). Body weight difference of D-gal 400 mg/kg group in day 30 was significantly lower than NC group (*, $P < 0.05$). Body weight difference of D-gal 800 mg/kg group in days 32, 41, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 56 and 58 were significantly lower than NC group (*, $P < 0.05$). (B) Daily water intake difference. All values are expressed as means \pm SD. (C) Daily food intake difference. All values are expressed as means \pm SD.

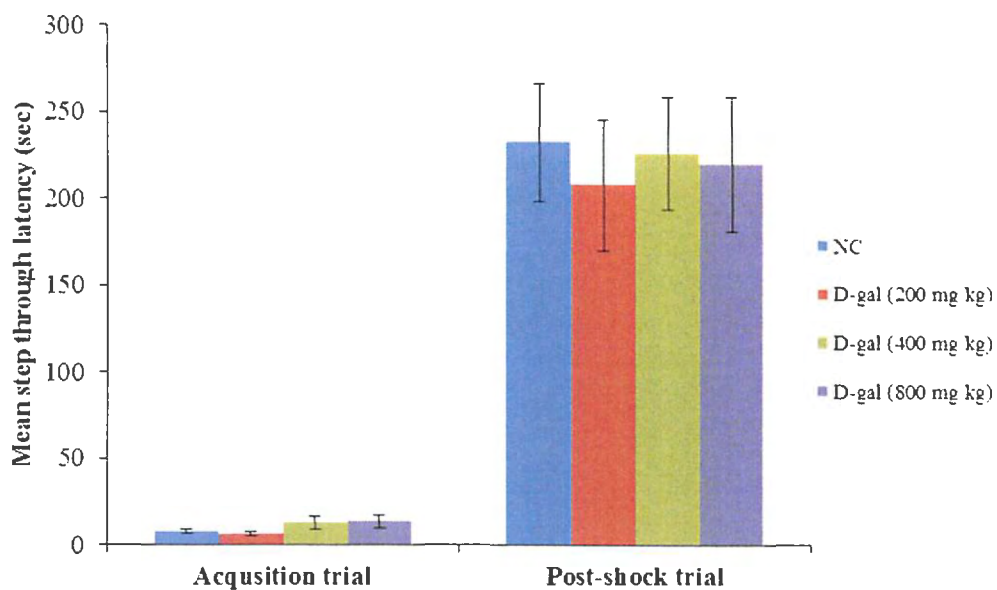


Fig. 5. Mean step-through latency. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=10); (2) D-gal 200mg/kg (n=10); (3) D-gal 400mg/kg (n=10); (4) D-gal 800mg/kg (n=10). The mice of D-galactose groups received subcutaneous injection of D-galactose once daily for 8 weeks. The mice of NC group received subcutaneous injection of 0.9% saline once daily for 8 weeks. Mean step-through latency was not both acquisition and post-shock trial significantly different among four groups by ANOVA ($P > 0.05$). All values are expressed as means \pm SEM.

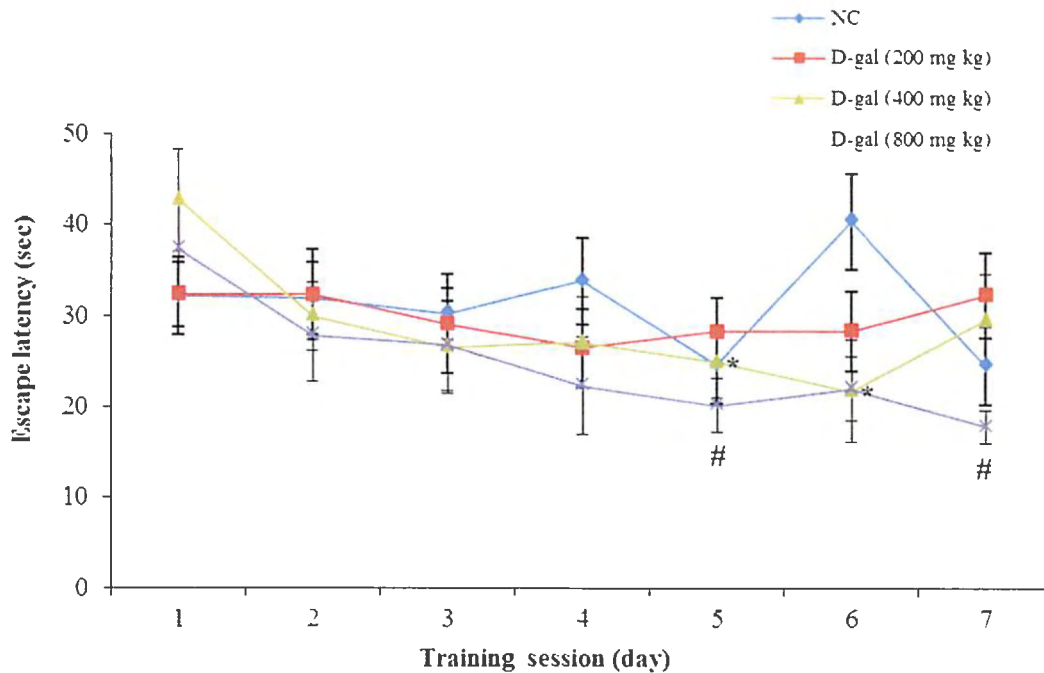


Fig. 6. Mean escape latency of Morris water maze training session. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=10); (2) D-gal 200mg/kg (n=10); (3) D-gal 400mg/kg (n=10); (4) D-gal 800mg/kg (n=10). The mice of D-galactose groups received subcutaneous injection of D-galactose once daily for 8 weeks. The mice of NC group received subcutaneous injection of 0.9% saline once daily for 8 weeks. Mean escape latency of D-gal 400 mg/kg group in days 5 and 6 were significantly lower than D-gal 400 mg/kg group in day 1 (*, $P < 0.05$). Mean escape latency of D-gal 800 mg/kg group in days 5 and 7 were significantly lower than D-gal 800 mg/kg group in day 1 (#, $P < 0.05$). All values are expressed as means \pm SEM.

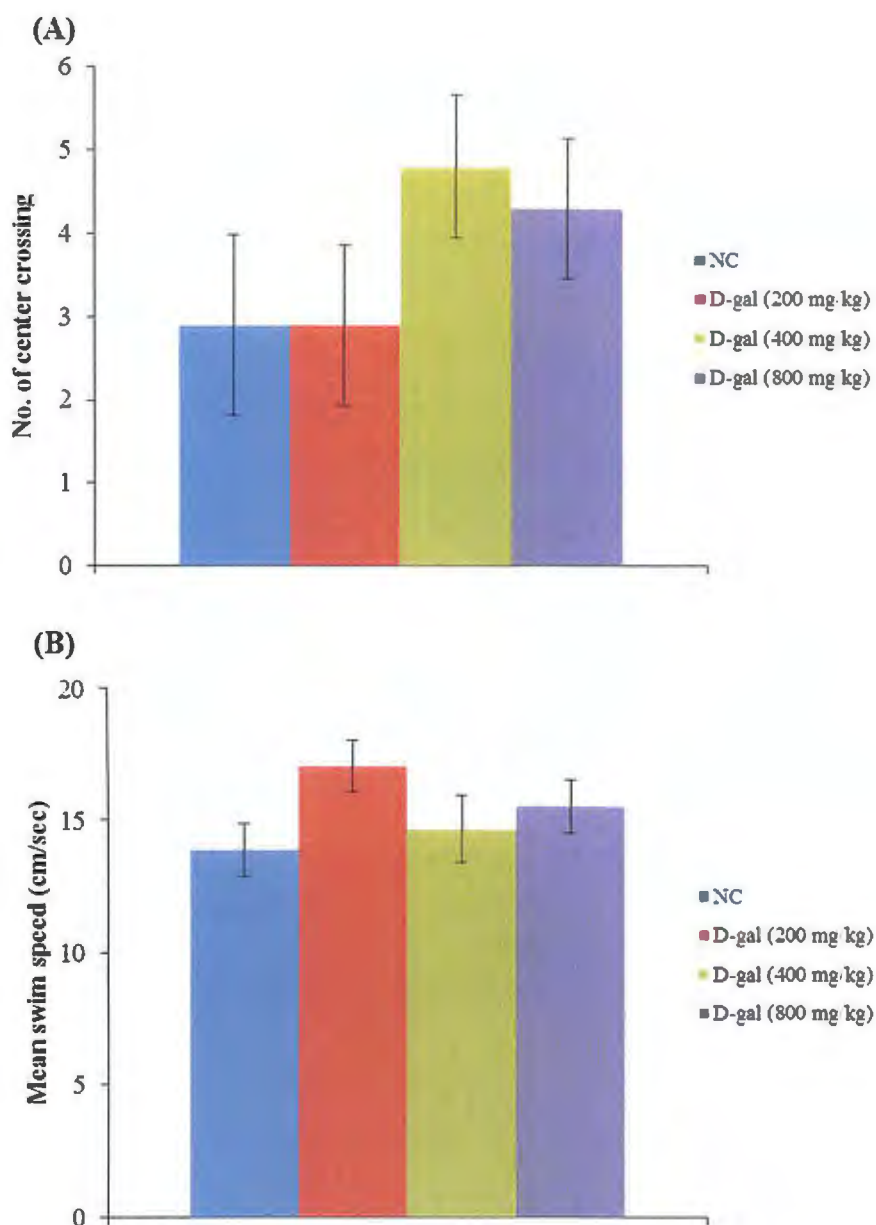


Fig. 7. (A) Mean number of center crossing of Morris water maze probe test. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=10); (2) D-gal 200mg/kg (n=10); (3) D-gal 400mg/kg (n=10); (4) D-gal 800mg/kg (n=10). Mean number of center crossing was not significantly different among four groups by ANOVA ($P > 0.05$). (B) Mean swim speed of Morris water maze probe test. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=10); (2) D-gal 200mg/kg (n=10); (3) D-gal 400mg/kg (n=10); (4) D-gal 800mg/kg (n=10). Mean swim speed was not significantly different among four groups by ANOVA ($p > 0.05$). All values are expressed as means \pm SEM.

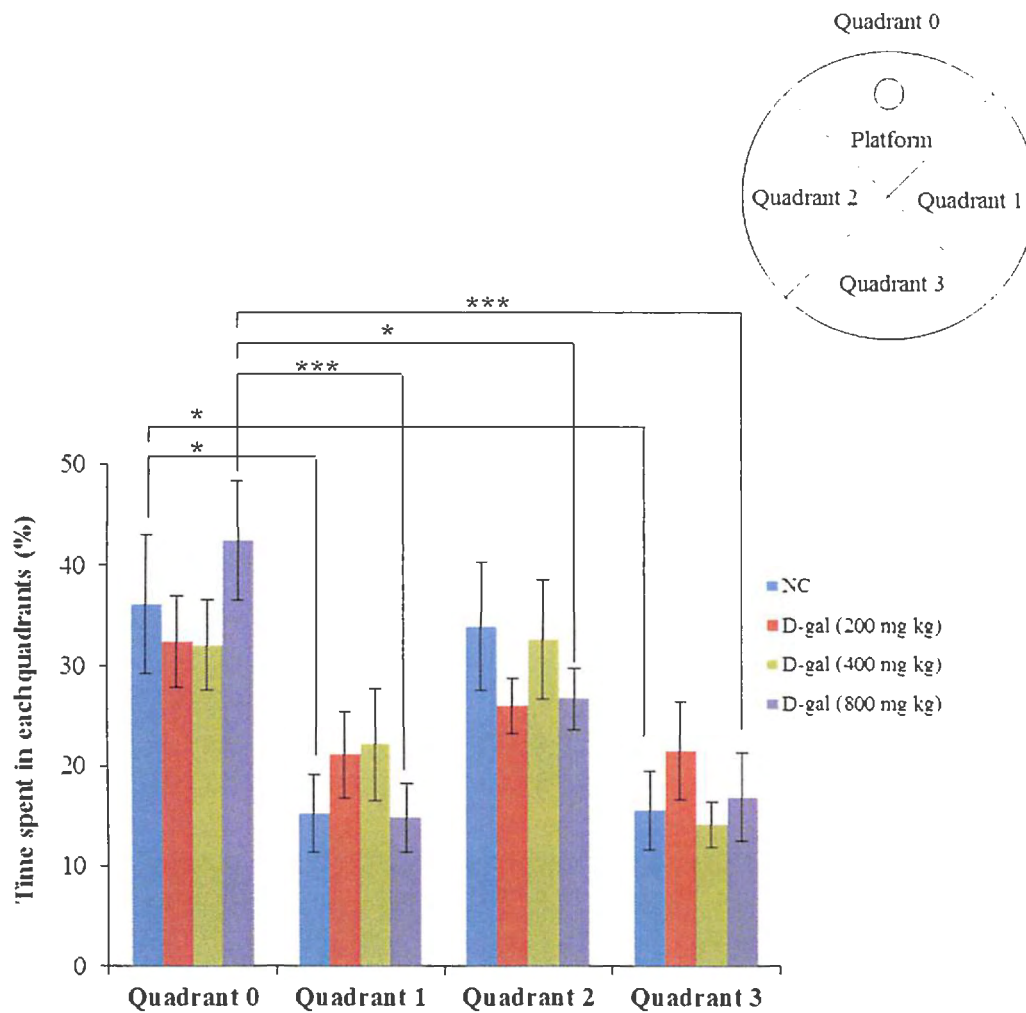


Fig. 8. Mean time in zone (%) of Morris water maze probe test. Quadrant 0 was target quadrant (platform existed quadrant). Quadrant 1 was the left quadrant 0. Quadrant 2 was right quadrant 0. Quadrant 3 was existed oppositely in quadrant 0. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=10); (2) D-gal 200mg/kg (n=10); (3) D-gal 400mg/kg (n=10); (4) D-gal 800mg/kg (n=10). Mean time in zone (%) of NC group in Quadrant 1 and Quadrant 3 were significantly lower than NC group in Quadrant 0 (*, $P < 0.05$). Mean time in zone (%) of D-gal 800mg/kg group in Quadrant 1, Quadrant 2 and 3 were significantly lower than D-gal 800mg/kg in Quadrant 0 (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$). All values are expressed as means \pm SEM.

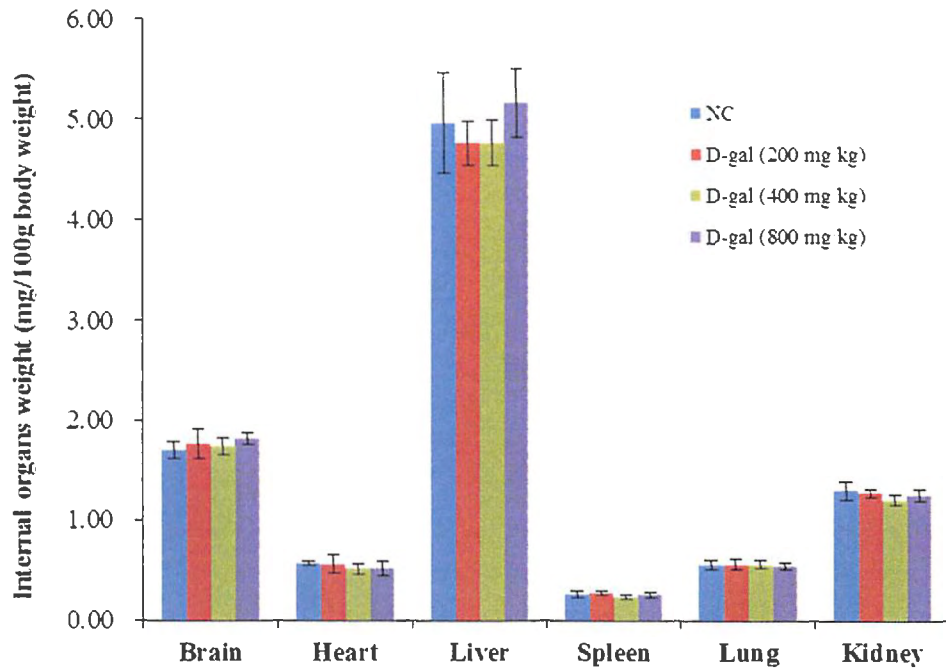


Fig. 9. Effects of D-galactose on relative weights of main organs. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 200mg/kg (n=5); (3) D-gal 400mg/kg (n=5); (4) D-gal 800mg/kg (n=5). The mice of D-galactose groups received subcutaneous injection of D-galactose once daily for 8 weeks. The mice of NC group received subcutaneous injection of 0.9% saline once daily for 8 weeks. The organ index was not statistically significantly different among four groups by ANOVA ($P > 0.05$). All values are expressed as means \pm SD.

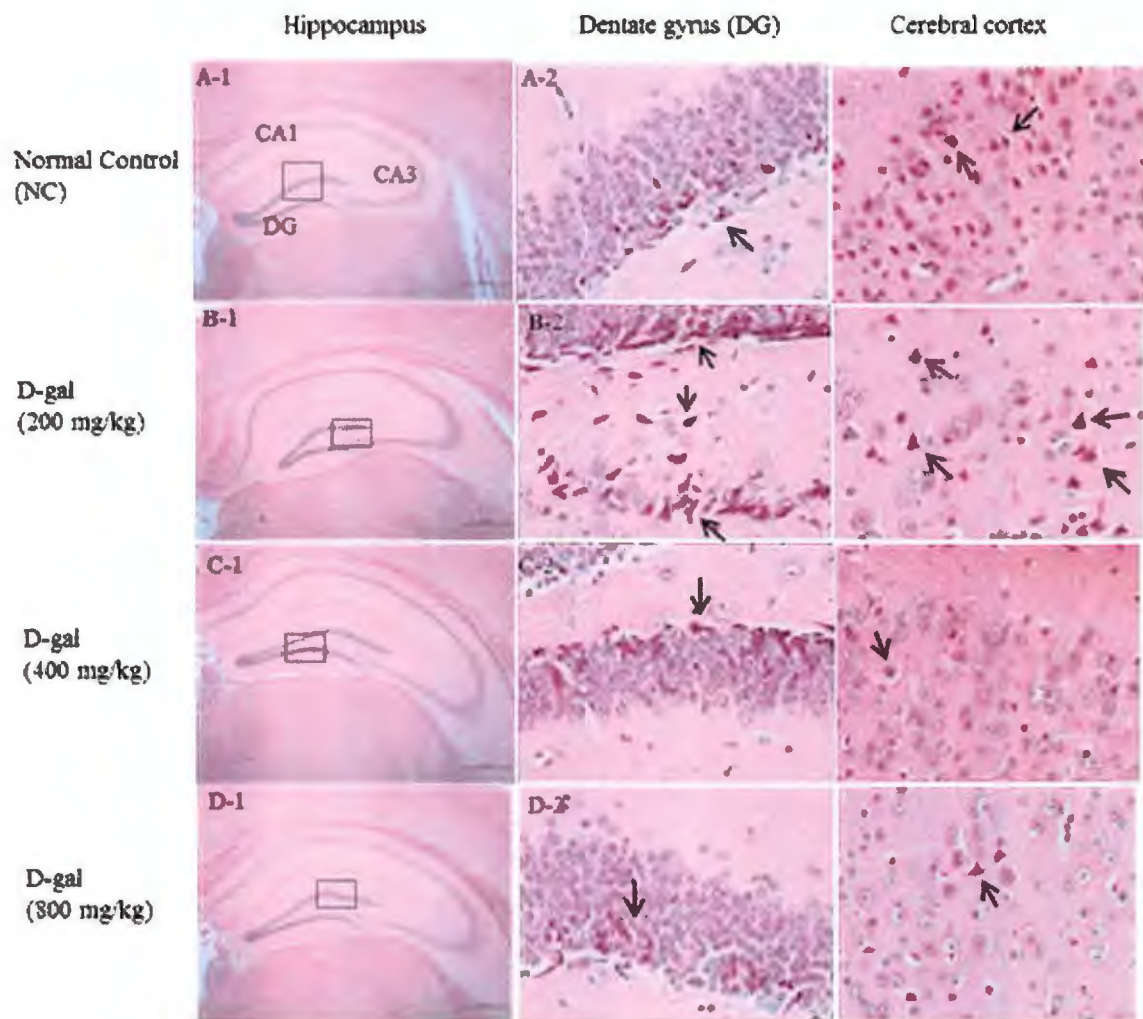


Fig. 10. Morphological alterations in hippocampus and cerebral cortex of D-galactose treated mice observed with hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 200mg/kg (n=5); (3) D-gal 400mg/kg (n=5); (4) D-gal 800mg/kg (n=5). A-2, B-2, C-2 and D-2 were the amplifications of “□” parts in A-1, B-1, C-1 and D-1 correspondingly. In NC group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 200 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 400 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 800 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. Arrows show ischemic changes in neurons.

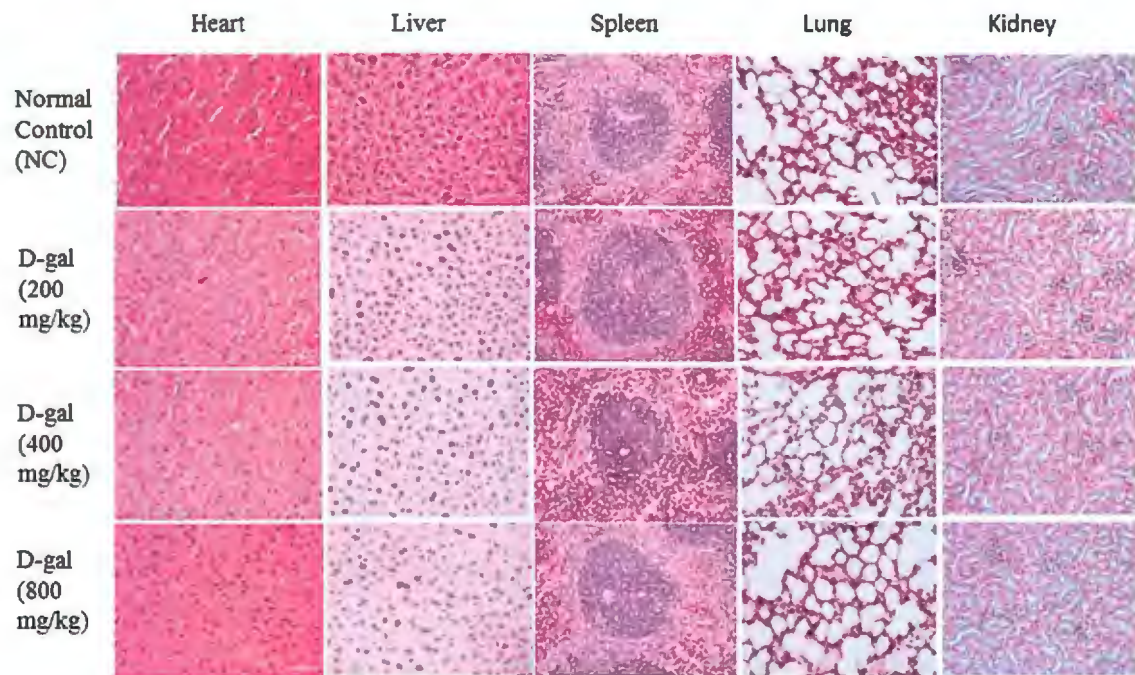


Fig. 11. Morphological alterations in heart liver spleen lung and kidney of D-galactose treated mice observed with hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 200mg/kg (n=5); (3) D-gal 400mg/kg (n=5); (4) D-gal 800mg/kg (n=5). Morphological alterations of heart, liver, spleen, lung and kidney was not different among four groups.

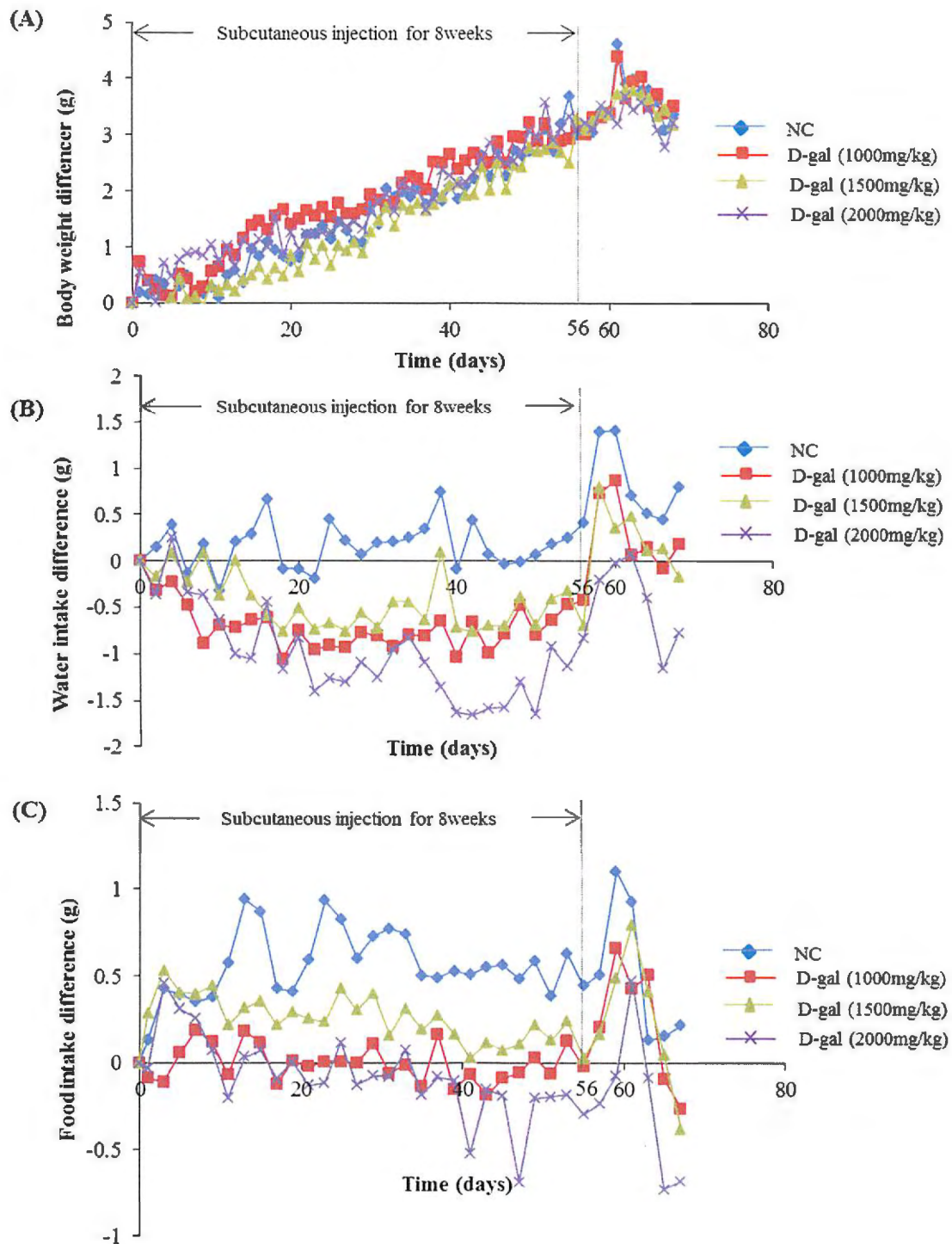


Fig. 12. (A) Body weight, water or intake in four group mice. (A) Body weight difference was not significantly different among four groups by ANOVA ($P > 0.05$). (B) Daily water intake difference. All values are expressed as means \pm SD. (C) Daily food intake difference.

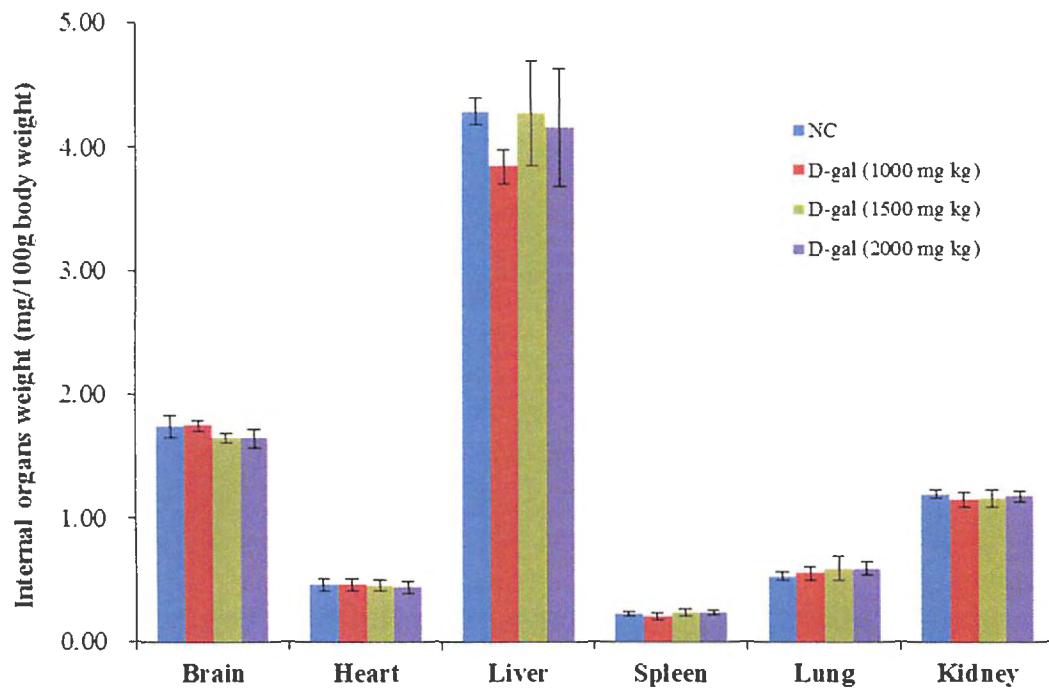


Fig. 13. Effects of D-galactose on relative weights of main organs. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 1000mg/kg (n=5); (3) D-gal 1500mg/kg (n=5); (4) D-gal 2000mg/kg (n=5). The mice of D-galactose groups received subcutaneous injection of D-galactose once daily for 8 weeks. The mice of NC group received subcutaneous injection of 0.9% saline once daily for 8 weeks. The organ index was not statistically significantly different among four groups by ANOVA ($P > 0.05$). All values are expressed as means \pm SD.

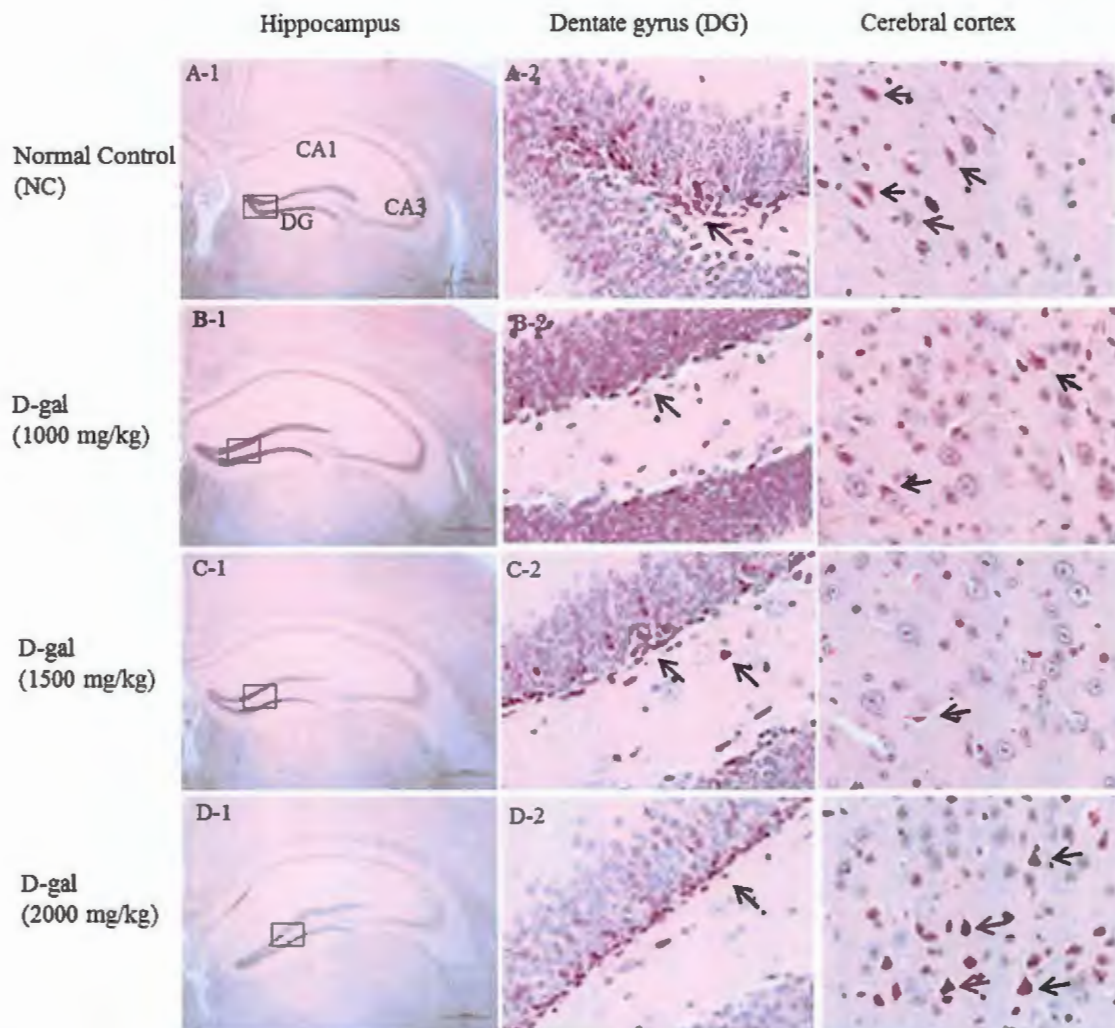


Fig. 14. Morphological alterations in hippocampus and cerebral cortex of D-galactose treated mice observed with hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 1000mg/kg (n=5); (3) D-gal 1500mg/kg (n=5); (4) D-gal 2000mg/kg (n=5). A-2, B-2, C-2 and D-2 were the amplifications of “□” parts in A-1, B-1, C-1 and D-1 correspondingly. In NC group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 1000 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 1500 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 2000 mg/kg group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. Arrows show ischemic changes in neurons.

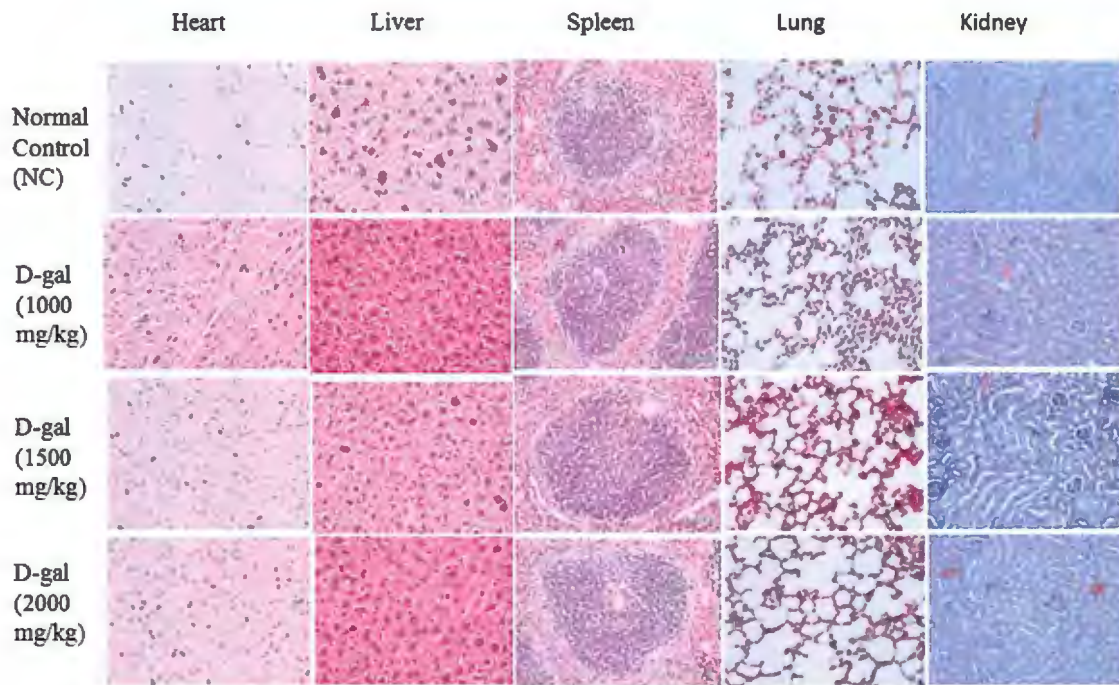


Fig. 15. Morphological alterations in heart liver spleen lung and kidney of D-galactose treated mice observed with hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 1000mg/kg (n=5); (3) D-gal 1500mg/kg (n=5); (4) D-gal 2000mg/kg (n=5). Morphological alterations of heart, liver, spleen, lung and kidney were not different among four groups.

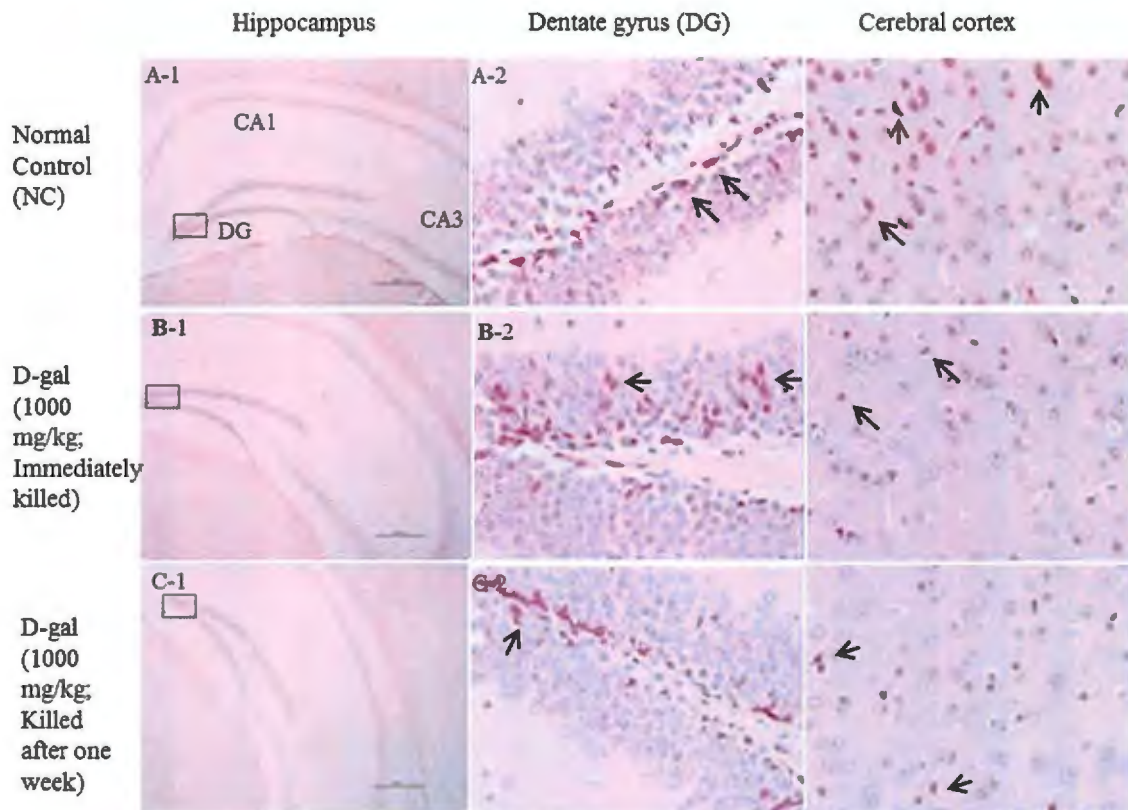


Fig. 16. Morphological alterations in hippocampus and cerebral cortex of D-galactose treated mice observed with hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into four groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 1000mg/kg (Injected for 8 weeks, immediately sacrificed; n=5); (3) D-gal 1000mg/kg (Injected for 8 weeks, sacrificed after one week; n=5). A-2, B-2 and C-2 were the amplifications of “□” parts in A-1, B-1 and C-1 correspondingly. In NC group, the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 1000 mg/kg group (Injected for 8 weeks, immediately sacrificed), the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. In D-gal 1000 mg/kg group (Injected for 8 weeks, sacrificed after one week), the ischemic changes in granule cells and pyramidal neurons of hippocampus and pyramidal neurons of cerebral cortex. Arrows show

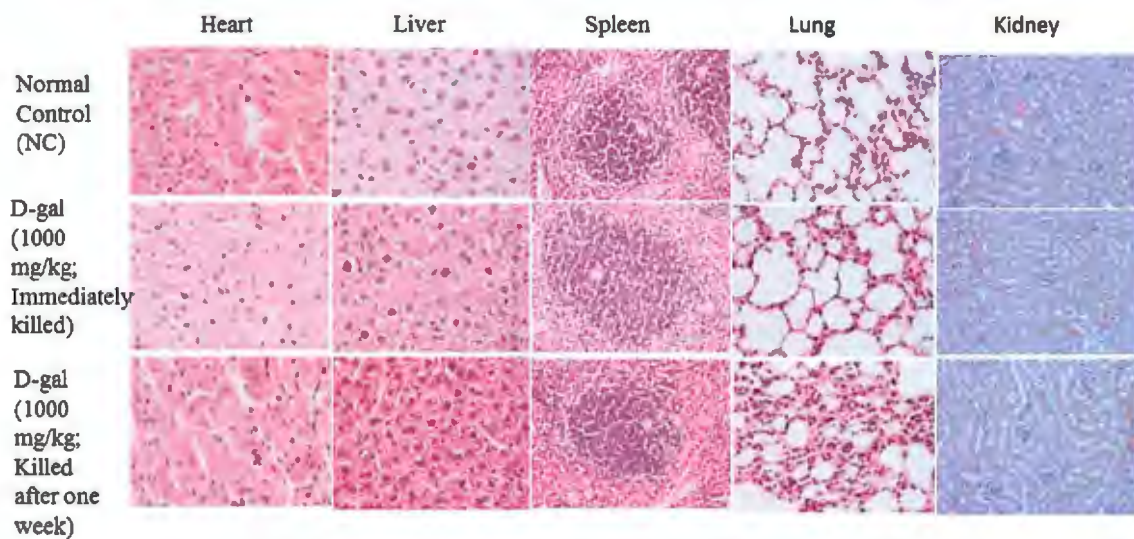


Fig. 17. Morphological alterations in heart liver spleen lung and kidney of D-galactose treated mice by hematoxylin and eosin (HE) staining. Mice were divided into three groups: (1) NC (n=5); (2) D-gal 1000mg/kg (Injected for 8 weeks, immediately sacrificed; n=5); (3) D-gal 1000mg/kg (Injected for 8 weeks, sacrificed after one week; n=5). Morphological alterations of heart, liver, spleen, lung and kidney were not different among three groups.

Ⅲ. 考察

D-galactose がマウスの脳老化を誘導することは最初に中国の研究者より報告された (Li *et al.*, 1995). 2000 年に入ってから, 中国の研究者を中心として D-galactose より老化モデルを誘導し, 加齢に関する研究が盛んに行われている. D-galactose が老化を誘導するメカニズムについて, いくつかの仮説が提案された. 抗酸化酵素 Cu-Zn 系スーパーオキシドディスムターゼ (Cu-Zn-superoxide dismutase, SOD) 活性が減少し, 脂質過酸化生成物マロンジアルデヒド (Malondialdehyde, MDA) とリポフスチン (lipofuscin) が著しく増加したことから, D-galactose の老化惹起が酸化ストレス増加に関係していることを示した (Cui *et al.*, 2004). また, D-galactose を投与したマウス体内の糖化最終産物 (Advanced glycation endproducts, AGE) が増加を示し, 老齢マウスに似て, 老化を引き起こすメカニズムであることを示唆した (Song *et al.*, 1999). しかしながら, 投与量と投与期間が広い範囲で報告され, D-galactose により老化モデルを作製するのが困難になっていると考えている. また, 病理組織学的病変が観察しやすいため, 瀕死状態の病理組織を観察する必要がある. しかし, D-galactose の半数致死量 LD50 も報告されていないことから, 最小致死投与量が確認しにくいことになっている. そこで, 本章では D-galactose の投与量を 200 mg/kg から 2000 mg/kg まで検討した.

D-galactose の投与期間ではマウスの行動が機敏で, 体毛に艶が出て, 健常マウスの NC 群に比較すると, 外観の異常が認められなかった. D-galactose は体重への影響が D-gal 800 mg/kg 群で確認されたが, 800 mg/kg 以上の投与量では体重に影響を与えなかった. 飲水量では D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg, D-gal 2000 mg/kg 群で顕著に抑制されたが, D-galactose の影響ではない可能性があると考えられる. D-galactose の投与量の増加とともに, D-galactose 注射溶液の量も増やしたことから,

飲水量が減少したと考えられる。こうして、D-galactose は摂食量に影響を及ぼさなかった。

行動実験に適切な老化モデルを探索するため、D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg の投与群を文脈学習評価のステップスルー型受動的回避試験と空間記憶評価の Morris 水迷路試験をおこなった。結果は受動的回避試験で、D-galactose の投与によりマウスの記憶悪化が発生しなかった。興味深いのは、Morris 水迷路試験で D-galactose の投与によりマウスの空間学習・記憶が低下することなく、逆に 400 mg/kg, 800 mg/kg D-gal 投与群の空間学習・記憶が向上したことが認められた。また、プローブテストの水泳速度において各群の間に有意な差が認められなかった。以上のことから、200 mg/kg, 400 mg/kg および 800 mg/kg の D-galactose の投与はマウスの記憶神経反応と運動神経反応の低下をもたらさなかったと考えられる。この結果は Parameshwaran ら (2010) 研究結果と一致している。彼らは C57BL/6J 8 週齢の雌マウスに 6 週間腹腔内注射してから、ロータロッド試験 (Rota-Rod test), オープンフィールド試験 (Open-field test), Y 迷路試験 (Y-maze test) 3 つの行動実験をおこなったところ、運動神経、空き地活動、空間記憶の損傷が認識されなかった。加齢に関連した神経反応の徴候を引き起こすために、慢性の短期の D-galactose 注射により、適切なモデルを引き起こさない可能性を示唆した (Parameshwaran *et al.*, 2010)。

細胞の老化・死滅は若い個体の組織でも観察されるが、細胞分裂によって新たな細胞が作られ、死滅消失した細胞を補っている。ところが老齢個体では細胞の死滅消失の促進と再生増殖力の減弱によって、臓器・組織の細胞数が実質減少し、組織・臓器の萎縮が起こり、そしてほとんどあらゆる臓器で萎縮が認められる (梅村ら, 2001)。そこで、本研究では 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, 2000 mg/kg 体重の D-galactose の投与群の臓器指数を検討したところ、いずれも健常マウスの NC 群と比べると有意な差が認められなかった。D-galactose は老齢のような臓器の老化を

引き起こされなかったと考えられる。また、老齢動物では各種臓器の萎縮、機能減退により生命活動に不可欠な代謝が低下する。このため体重、身長、知覚・運動能力の低下が顕著になると言われている(梅村ら, 2001)。体重は D-gal 800 mg/kg 群で一時的に抑制されたが、注射終了後に回復した{Fig. 4 (A)}。D-galactose の投与により老齢ほどの臓器萎縮を引き起こされなかったから、顕著な体重の減少、運動能力の低下が認められないと考えられる。この結果は行動実験の結果と一致した。

さらに、D-galactose を投与したマウスの病理組織学観察では、D-gal 200 mg/kg, D-gal 400 mg/kg, D-gal 800 mg/kg, D-gal 1000 mg/kg, D-gal 1500 mg/kg 及び D-gal 2000 mg/kg 群のマウスは、D-galactose を注射終了した 13 日目に屠殺し、各臓器の脳部位、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓の外観を観察したところ、異常が認められなかった。HE 染色をおこなった結果、健常マウスの NC 群に比較すると、いずれの脳部位の海馬と大脳皮質、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓において差が認められなかった。

D-galactose を投与したマウスと NC 群マウスにおいて、海馬の CA3 錐体細胞と歯状回 (Dentate gyrus; DG) の顆粒細胞は核、細胞質ともに萎縮し、細胞の輪郭は角ばって見え、大脳皮質においても同じ状態の錐体細胞が確認された。林ら (2007) によれば、乏血性変化の神経細胞は核、細胞質ともに萎縮し、細胞質のニッスル小体は消失して好酸性を増やした結果、細胞の輪郭は角ばって見える。乏血性変化は酸素欠乏、中毒、機械的圧迫、感染および低血糖などによって起こる (林ら, 2007)。また、角ばって見える細胞が D-galactose の投与量の増加とともに増加しなかった。さらに、海馬と大脳皮質は虚血に弱い (Valenti *et al.*, 2001; Petito *et al.*, 1984)。したがって、D-galactose と関係なく、酸素欠乏によって乏血性変化を引き起こしたと判断し、NC 群も D-galactose の投与群も乏血性変化の神経細胞が観察された。また、行動実験においては 12 日間経過し、引き起こされた組織病変が自己修復されて、病理切片の観察で病変が見えなくなる可能性があると考えられることから、1000 mg/kg D-galactose を 8

週間投与終了してから直ちに病理組織学観察実験をおこなった。その結果は NC 群と比較しても差が認められなかった。加齢とともに脳が萎縮、重量が軽減、皮質、海馬および小脳領域にあるニューロンが収縮する (Raji *et al.*, 2009)。しかし、D-galactose 投与群ではこれらの老化特徴が確認されなかった。さらに、脳部位の海馬の形が NC 群と比較すると、全く崩れなく、記憶の機能が正常に働いているのではないかと考えられる。脳部位の病理組織学観察の結果は行動実験の結果と一致していた。

加齢とともに内臓の変化が確認された。心筋にリポフスチンという色素が沈着するのは老齢に多く認められる (板倉ら, 1998)。12 月マウスの肝臓では細胞質が緩み、細胞が浮腫と空胞化を示し、24 月マウスの肝臓では細胞が著しい浮腫と空胞化を示した (Uddin *et al.*, 2012)。加齢とともに免疫システムが免疫老化を示し (Nikolich-Zugich *et al.*, 2005)、脾臓の B リンパ球細胞が減少する (Johnson *et al.*, 2002)。また、ヘモジデリンは主に赤脾髄や細動脈周囲リンパ鞘やリンパ小節及び辺縁帯に沈着し、そして加齢とともに増加を示す (Masuda *et al.*, 1993)。肺では加齢とともに肺泡拡張、空域拡大がある (Janssens *et al.*, 1999)。加齢とともに腎小体の系球体が減少、尿細管が萎縮、それに直接比例し腎臓の重量も減少する (Glassock *et al.*, 2011)。

D-galactose 投与群のマウスでは心臓、肝臓、肺、腎臓の病理学病変が認められなかった。細胞核が明瞭に青染し、NC 群と差が認められなかった。免疫器官の脾臓は細胞核が青染し、白脾髄と赤脾髄の限界がはっきり、白脾髄の形が円形とか楕円形になり、細胞減少が見られなく、NC 群と差が認められなかった。最近の報告の 1 つは本研究の結果と一致しており、D-galactose 投与のマウス脾臓の超微細構造の解析で、不規則の B リンパ球細胞が観察されたが、多くの老化指標が D-galactose 投与のマウス脾臓には認められなく、D-galactose で老化模擬をするのは適当かどうか疑問視されている (Uddin *et al.*, 2010)。

以上のことから、12 週齢の C57BL/6J マウスに 8 週間連続的に D-galactose (200

mg/kg～2000 mg/kg)を注射することにより脳老化を引き起こさなかったことから、Uddinn ら (2010) の報告と共に、本研究においても、これまで世界中で 200 報以上の報告がある D-galactose 投与による行動実験モデル作製に関して、普遍性を否定する重要な提案となる。

IV. 摘要

老化を引き起こす適当な D-galactose の投与量を確立するため、12 週齢の C57BL/6J 系統マウスを用いて、行動実験と病理組織観察実験をおこなった。

その結果、200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg 体重の D-galactose を投与したマウスでは文脈学習記憶評価のステップスルー型受動的回避試験と空間記憶評価の Morris 水迷路試験において、記憶の低下を示さなかった。

200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, 2000 mg/kg 体重の D-galactose を投与したマウスでは HE 染色の病理学観察実験において老化の特徴が認められなかった。

以上のことから、行動実験の老化モデルを作製できる D-galactose の投与方法については、総合的に普遍性を否定することができる。

第二章 桑枝条抽出物による老化促進マウス SAM-P8 のアンチ

エイジング解析

第一章では C57BL/6J マウスにおける D-galactose による老化モデルの惹起の検討を行った。その結果、D-galactose 投与量が 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg いずれも行動実験 (Step-through 型受動回避実験, Morris 水迷路実験) において記憶の低下が示さなかった。また、200 mg, 400 mg, 800 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg/kg 投与量で組織学観察実験において老化の特徴が認められなかった。

一方近年、学習と記憶の障害の特徴を持っている SAM 系統の SAM-P8 マウスは、老年病学の認知症研究において注目された (Flood and Morley, 1998)。最初に、SAM 系統は Takeda ら (1981) によって研究開発され、老化発生しやすい系列のマウス (Senescence-prone series of mice) と老化抵抗系列のマウス (Senescence-resistant series of mice) に分け、老化発生しやすい系列のマウスを SAM (Senescence-Accelerated Mouse) と命名された。SAM の SAM-P8 系列は認知機能障害の実験に対する適切なげっ歯類のモデルであり、学習、情動変化、24 時間周期リズムの機能障害 (Miyamoto *et al.*, 2004) および酸化ストレス増加 (Farr *et al.*, 2003) を示す。また、老化抵抗マウス SAM-R1 は対照として多くの研究で使用されている。そこで、本研究では、桑枝条抽出物の機能性を解析するために、老化モデルマウスを SAM 系統の SAM-P8 老化促進マウスと SAM-R1 老化抵抗マウスを用いて検討することにした。

本研究では第一章と同じように、文脈学習評価のステップスルー型受動的回避試験と空間記憶評価の Morris 水迷路試験を使用した。また、毛質の評価方法は摩擦係数および走査型プローブ顕微鏡の観察の 2 種類の方法を用いた。

N-acetyl-L-cysteine (NAC) は血液脳関門を通過する酸化防止剤として SAM-P8 マウスの認知機能と酸化ストレスを改善する (Farr *et al.*, 2003). そこで, 本研究のポジティブコントロールとして NAC を用いることにした.

本章では, 桑枝条抽出物 (MTE) を老化促進マウス SAM-P8 に経口投与し, 記憶改善効果評価の行動実験, さらにアンチエイジング機能解析として毛質改善効果の摩擦係数解析実験および走査型プローブ顕微鏡の観察実験をおこなった.

I. 材料と方法

1. 実験動物

動物は10週齢のSAM系統のSAM-P8(体重23-29g)とSAM-R1(体重27-32g)雄マウスを用いた。マウスは日本SLC(株)より購入し、Normal control(NC; SAM-R1), Aging control(AC; SAM-P8), ポジティブコントロール(NAC; SAM-P8), Mulberry twig extract 5mg/kg(5mg/kg MTE; SAM-P8), Mulberry twig extract 25mg/kg(25mg/kg MTE; SAM-P8)の5群に分け、1ケージに1頭ずつ飼育し、15週齢から実験を行った。動物飼育室は室温が 23 ± 2 °C, 照明時間が12時間(朝7時に自動的に照明点灯, 夜19時に自動的に消灯)に保たれた。飼育飼料(MFオリエンタル酵母工業株)とソフトチップ(日本SLC株)は滅菌したものを使用した。飲水は水道水で自由に飲食させた。実験中, 体重を毎日, 摂食量と飲水量を隔日計測した(Figs.19, 20, 21)。

動物の飼育および取り扱いは動物愛護法並びに実験動物のケア及び使用に関するガイドラインに従いながら, 岩手大学動物実験委員会認可のもとで行った。

2. 供試試料

供試試料はトヨタマ健康食品(株)より提供された桑枝条エキスである。桑枝条は岩手県のあおばねずみ(*M. alba* 'Aobanezumi')の先端から1~1.5mの新鮮な枝を使用した。枝は2~3cmサイズに切断し, 乾燥させた。乾燥チップは 50 ± 5 °Cの50%エタノールに浸漬し, 2時間, 3回の抽出を行った。3回の抽出物を合わせ, 桑枝条エキスとして真空濃縮を行った。本実験では提供された500gの桑枝条エキスを凍結乾燥し, 得ら

れた 147.6g のパウダーを -20°C 冷凍庫に保存し、実験に使用した。

3. 供試試料の投与

15 週齢から 5 mg/kg MTE 群および 25 mg/kg MTE 群に滅菌水で溶解した桑枝抽出物をそれぞれ 5 mg/kg 体重/日及び 25 mg/kg 体重/日の投与量で 12 週間に渡って経口投与した。ポジティブコントロール群に滅菌水で溶解した *N*-acetyl-L-cysteine 溶液 100mg/kg 体重/日の投与量で 12 週間に渡って経口投与した。一方、NC 群と AC 群に生理食塩水（扶桑薬品工業）を 0.1ml/10g 体重/日 の投与量で 12 週間に渡って経口投与した。

4. ステップスルー型受動的回避実験

実験装置と手順は第一章のステップスルー型受動的回避実験と同じである。

5. モリス水迷路実験

実験装置と手順は第一章のモリス水迷路実験と同じである。

6. 摩擦係数測定

毛の表皮は損傷すればするほど摩擦係数が大きいと考えることができる (Bhushan *et al.*, 2005)。桑枝条 50% エタノール抽出物が毛質への作用を調べるために、山本ら (2011) によって使用された携帯機器摩擦計（株トリニティーラボ製、ハンディラブテ

スターTL701)を通して、マウスの体毛の摩擦係数を測定した。この摩擦計は内館らによって研究開発されたものであり、髪の毛の束や顔面の肌などの部位を測定できる機器である (Uchidate *et al.*, 2008)。摩擦計は指紋パターンを模した指先接触子 (指先接触子とは指先に見合った硬度と一面に指紋パターンを模したものである) を利用して触覚を測定する。

そこで、ジエチルエーテルでマウスを麻酔している間におよそ 0.5N 荷重でマウスの頭頸部を滑走接触し、測定した。

7. 走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscope, SPM) の観察

試料 (体毛) はマウスの頭頸部の体毛をマウス用ハサミで根元から切断し、採取し、タッピングモード走査型プローブ顕微鏡走査型プローブ顕微鏡 (SPA400, SII Nano-Technology) を使用し、観察した。体毛は両面テープで観察プレートに固定し、SPM の試料台に載せ、微細な探針と体毛根元の表面を微小な力で接触させて、水平 (X, Y) に走査することで、表面形状を画像化した。

8. 統計分析

マウスの体重など、Step-through 型受動回避実験、Morris 水迷路実験及び摩擦係数測定実験において、JMP® 8 (SAS Institute Inc.) を用いて、分散分析 (ANOVA) をおこなった。なお、有意差が認められた場合は Dunnett の方法で事後検定 (Post-hoc test) をおこなった。

Ⅱ. 結果

1. マウスの体重, 飲水量及び摂食量

105 ~ 201 日齢での体重 (Fig. 19), 飲水量 (Fig. 20), 摂食量 (Fig. 21) の推移を調べた. 分散分析 (ANOVA) の結果, 5 群間に有意な差は認められなかった.

2. ステップスルー 型受動回避実験

5 群のマウスにおける文脈課題記憶の強度を調べるために Step-through 型受動回避実験をおこなった (Fig. 22). ANOVA の結果, 獲得試行 (Acquisition trial) では 5 群間に有意な差は認められなかった. 再生試行 (Post-shock trial) では NAC と 5mg/kg MTE 群 の反応潜時が NC 群より低く有意な差は認められた.

3. モリス水迷路実験

5 群のマウスにおける空間記憶能力を調べるために, Morris 水迷路実験をおこなった. トレーニング期間における 5 群のマウスのプラットフォームまでの平均到達時間 (Fig. 23), プローブテストにおける 5 群のマウスの Crossing 回数 (Fig. 24), 平均水泳速度 (Fig. 25), そして各 Quadrant の滞在率 (Fig. 26) を測定した.

各群訓練 1 日目を基準にプラットフォームへの退避の反応潜時が短縮されるか検定したところ, NC 群において 3, 4, 5, 6 と 7 日目で有意な短縮が認められた (* $P < 0.05$).

プローブテストにおいて, 各群の Crossing 回数が NC 群に比較して顕著に低かった. 各群の Target quadrant の滞在率を分析したところ, NC 群の Target quadrant 滞在

率が他の2つの Quadrant 滞在率 (Quadrant 1 and 3) より有意に高くなり, ポジティブコントロール群の Target quadrant 滞在率が Quadrant 2 滞在率 より有意に低くなった. また, プローブテストの水泳速度においては各群の速度が NC 群に比較して有意に低かった.

4. 体毛の摩擦係数の測定

Fig. 27 に示したように, AC 群の平均摩擦係数はほかの群と比較して有意に高く (** $P < 0.001$), NC 群よりも 31%高かった. ポジティブコントロール群と 5, 25 mg/kg MTE 群の平均摩擦係数が NC 群の近いレベルに回復した. この結果, 桑枝条抽出物の経口摂取により SAM-P8 マウスの体毛の摩擦係数が顕著に改良できることを示した.

5. 走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscope, SPM) の観察

SPM による体毛の形状測定結果は Fig. 28 に示したように, 左側(a)及び(c)が三次元的な形状(走査サイズ: $X \times Y = 20 \times 80 \mu\text{m}^2$, Z (厚さ) = $6 \mu\text{m}$ ぐらい)であり, 右側(b)及び(d)は(a)及び(c)からそれぞれ抜き出した二次元的な断面図である. 老化マウスの AC 群では体毛の表面はいくつかのキューティクルの剥離領域を示し{Fig.28 AC (a) and (c)}, キューティクルの階段状は明確ではなかった{Fig.28 AC (b) and (d)}. また, 健常マウスの NC 群では体毛の表面が規則的な形を示すが{Fig.28 NC (a) and (c)}, キューティクルの階段状は不鮮明であった{Fig.28 AC (b) and (d)}.

驚くべきことは桑枝条抽出物を 12 週に渡って経口投与されたマウスは体毛の損傷が修復された. 特に, 25mg/kg MTE 群で典型的な階段状の特徴がはっきり示された{Fig.28 25mg/Kg MTE (b) and (d)}. また, 5mg/kg MTE 群ではキューティクルはやや不規則

で、段差が AC 群及び NC 群よりやや高く見える{Fig.28 25mg/Kg MTE (b) and (d)}。さらに、体毛の修復作用はポジティブコントロール群でも観察された。体毛の表面が規則的で{Fig.28 NAC (a) and (c)}、キューティクルの階段状は鮮明であった{Fig.28 NAC (b) and (d)}。これらの結果は、摩擦係数の結果と一致でした。

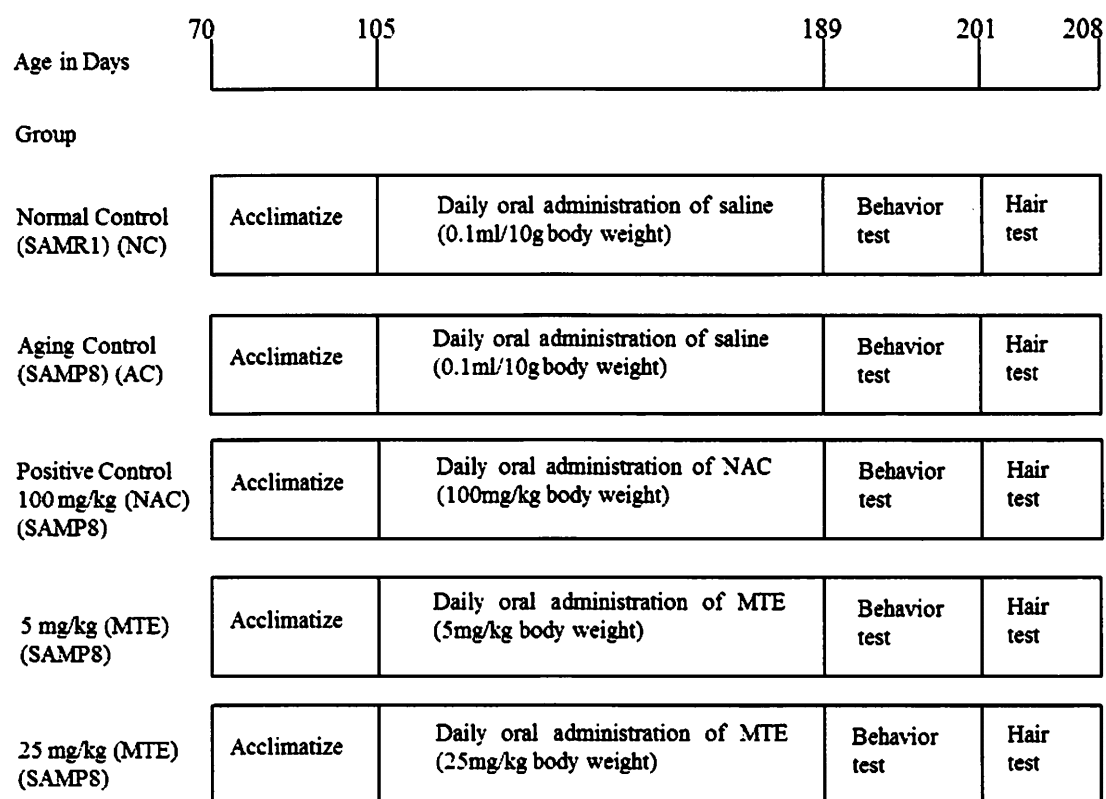


Fig. 18. Experimental schedule of mulberry twig extract treatment on behavior test, hair friction measurement and SPM observation in the senescence-accelerated mice.

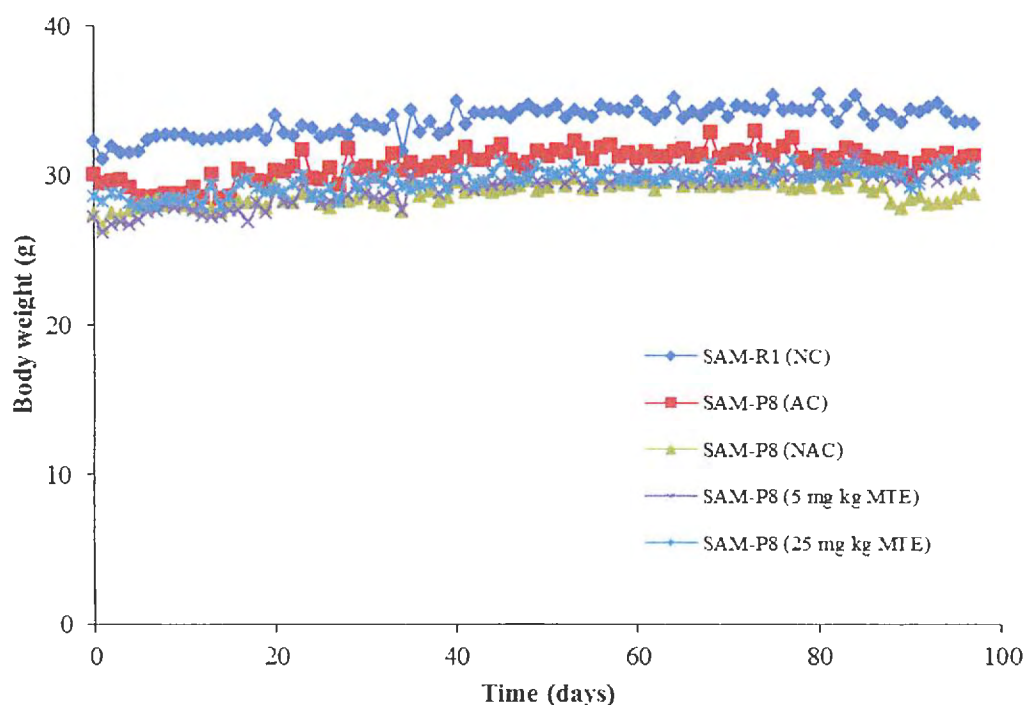


Fig. 19. Body weights in senescence-accelerated mice from 105 to 201 days of ages. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group were *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group were 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Body Weight was not significantly different among five groups by ANOVA ($p > 0.05$).

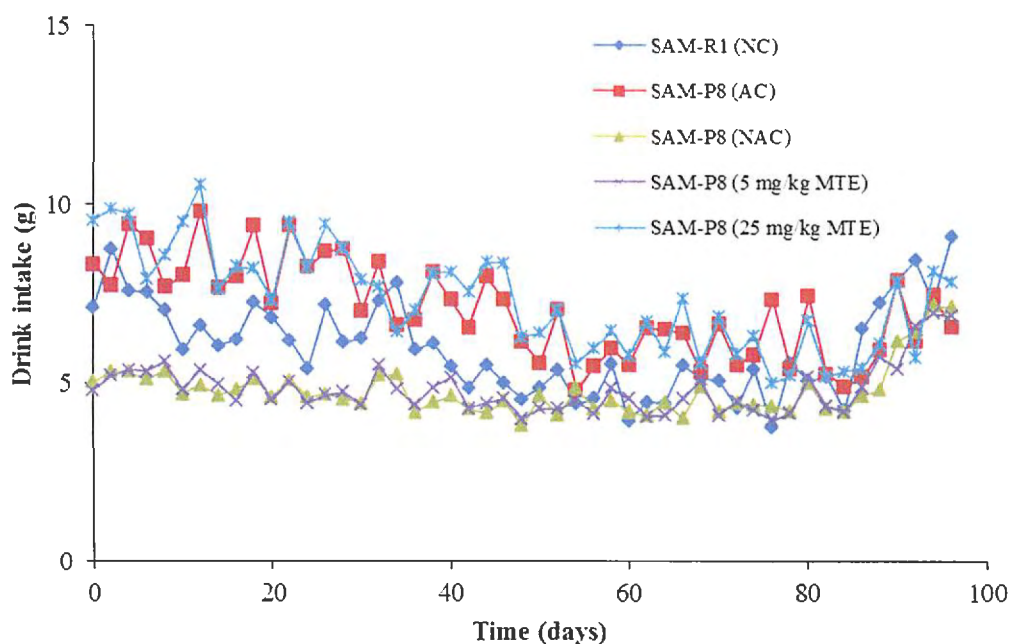


Fig. 20. Drink intakes in senescence-accelerated mice from 105 to 201 days of ages. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group were *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); another two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group were 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Drink intake was not significantly different among five groups by ANOVA ($p > 0.05$).

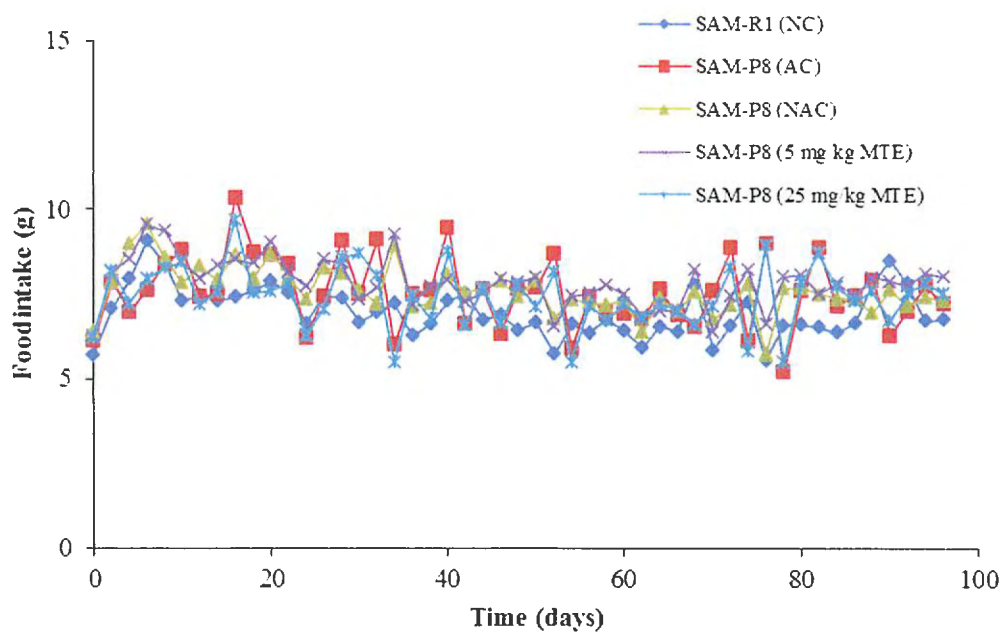


Fig. 21. Food intakes in senescence-accelerated mice from 105 to 201 days of ages. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group were 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Food intake was not significantly different among five groups by ANOVA ($p > 0.05$).

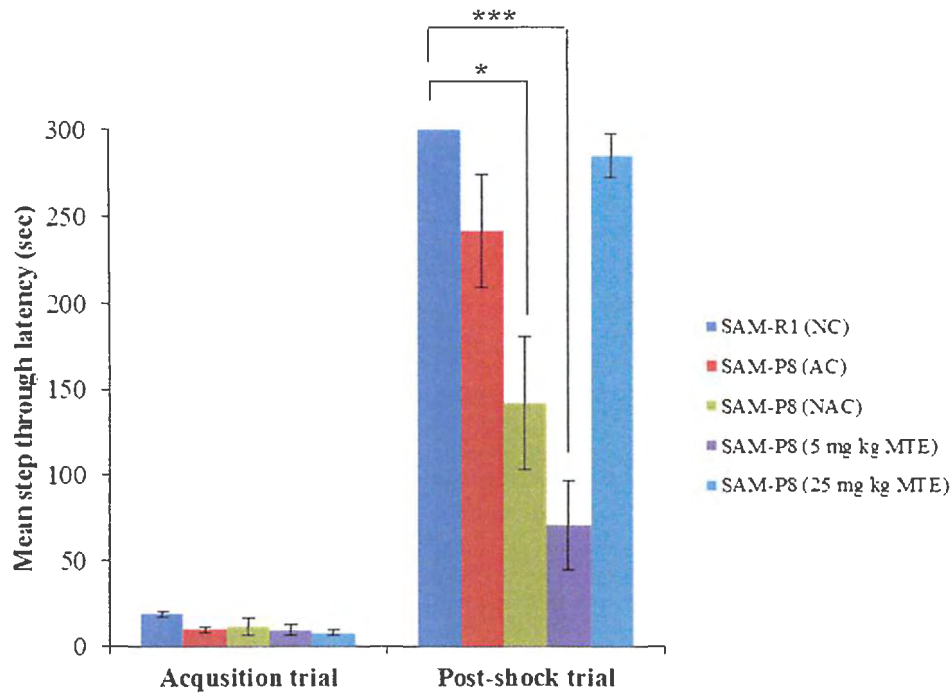


Fig. 22. Effect of mulberry twig extract in a passive avoidance task of senescence-accelerated mice SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAMR1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group were 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Mean step-through latency of acquisition was not significantly different among five groups by ANOVA ($P > 0.05$). Mean step-through latency of post-shock trial was significantly lower in NAC and 5 mg/kg MTE group than in NC group (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$). All values are expressed as means \pm SEM.

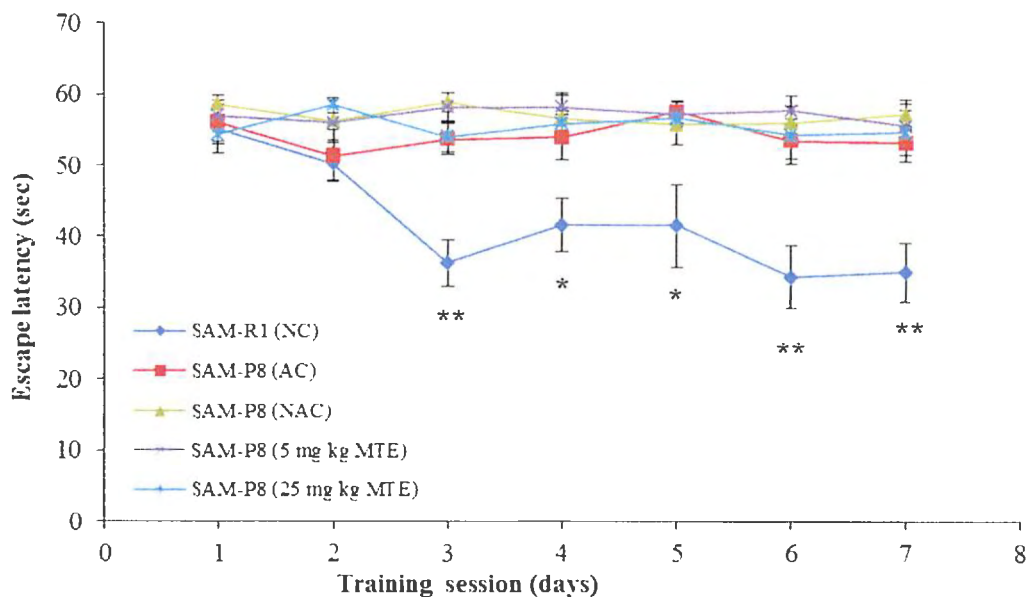


Fig. 23. Mean escape latency of Morris water maze training session. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group was 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Mean escape latency of NC group in day 3, 4, 5, 6 and 7 were significantly lower than the NC in day 1 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). All values are expressed as means \pm SEM.

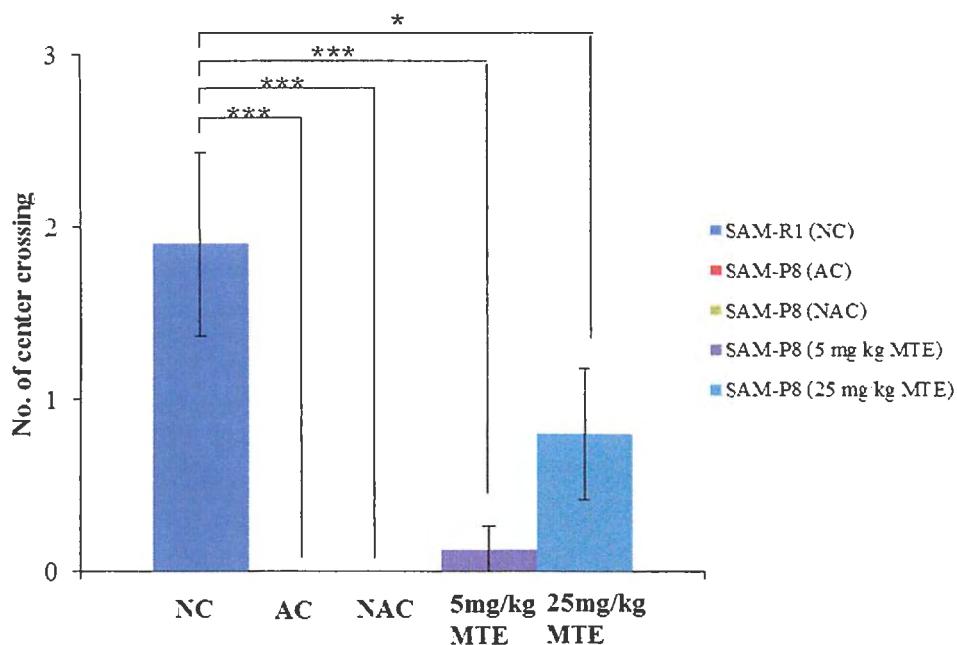


Fig.24. Mean number of center crossing of Morris water maze probe test. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group was 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Mean numbers of center crossing of AC, NAC, 5mg/kg MTE and 25mg/kg MTE group were significantly lower than the NC group (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$). All values are expressed as means \pm SEM.

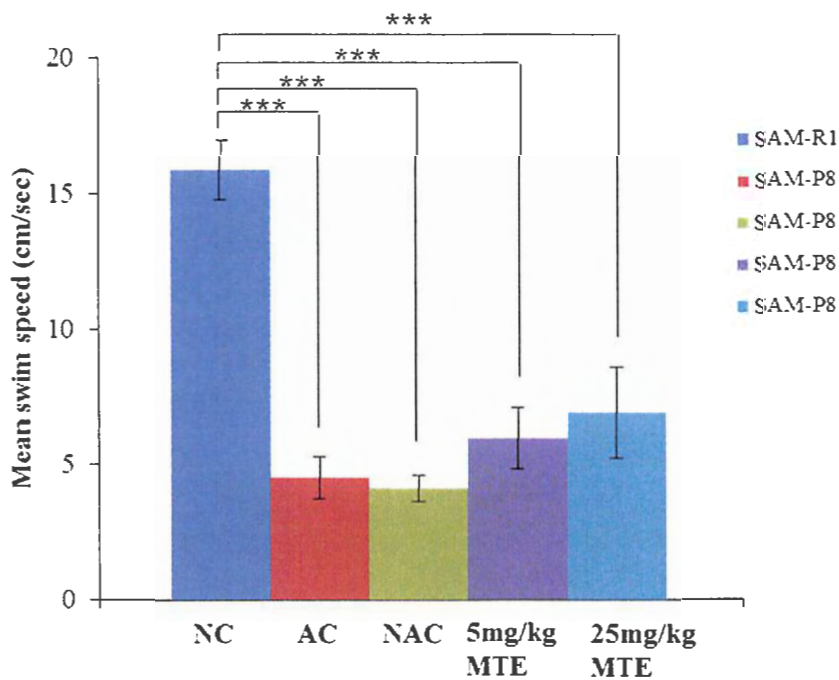


Fig. 25. Mean swim speed of Morris water maze probe test. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group was 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Mean swim speed of AC, NAC, 5mg/kg MTE and 25mg/kg MTE group were significantly lower than the NC group (***P* < 0.0001). All values are expressed as means \pm SEM.

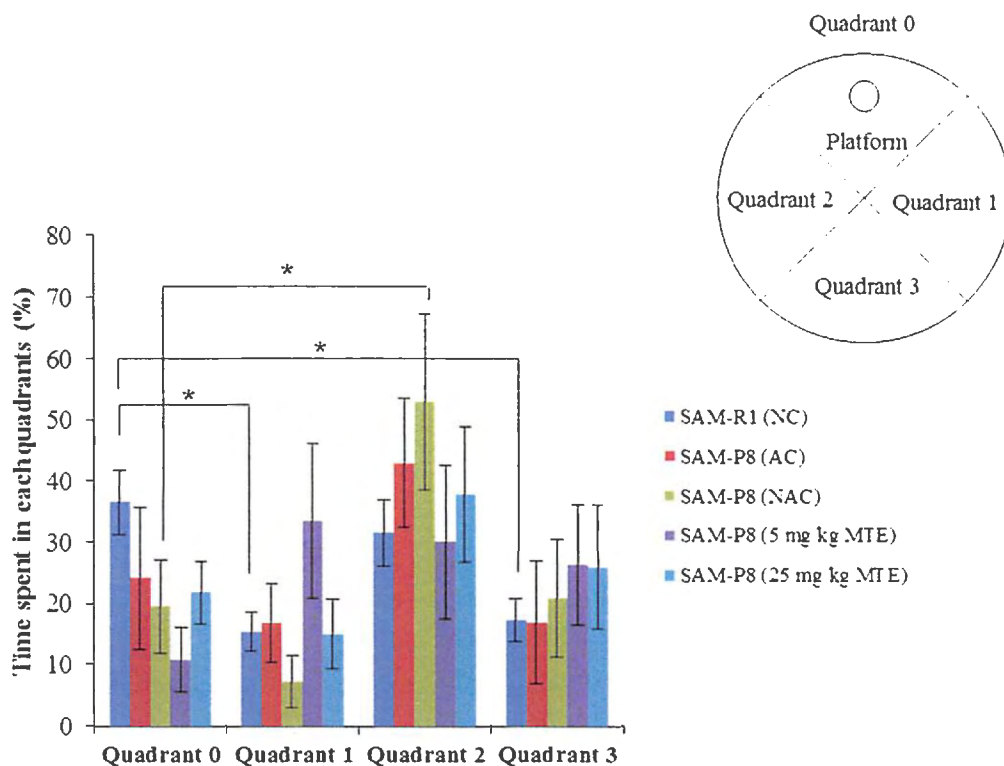


Fig. 26. Mean time in zone (%) of Morris water maze probe test. Quadrant 0 was target quadrant (platform existed quadrant). Quadrant 1 was the left quadrant 0. Quadrant 2 was right quadrant 0. Quadrant 3 was existed oppositely in quadrant 0. SAM-P8 mice (15 weeks old; male) were divided into four groups. The aging control group (AC) was orally given 0.9% saline (n=10); the positive control group was *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) orally at doses of 100 mg/kg body weight/day (n=10); other two groups were mulberry twig extract (MTE) orally at doses of 5 or 25 mg/kg body weight/day (n=10). SAM-R1 mice (15 weeks old; male) were normal control group (NC). The NC group was 0.9% saline orally at doses of 0.1ml/10g body weight/day (n=10). Mean time in zone (%) of NC in Quadrant 1 and Quadrant 3 were significantly lower than NC in Quadrant 0 ($*P < 0.05$). Mean times in zone (%) of NAC in Quadrant 2 was significantly higher than NAC in Quadrant 0 ($*P < 0.05$). All values are expressed as means \pm SEM.

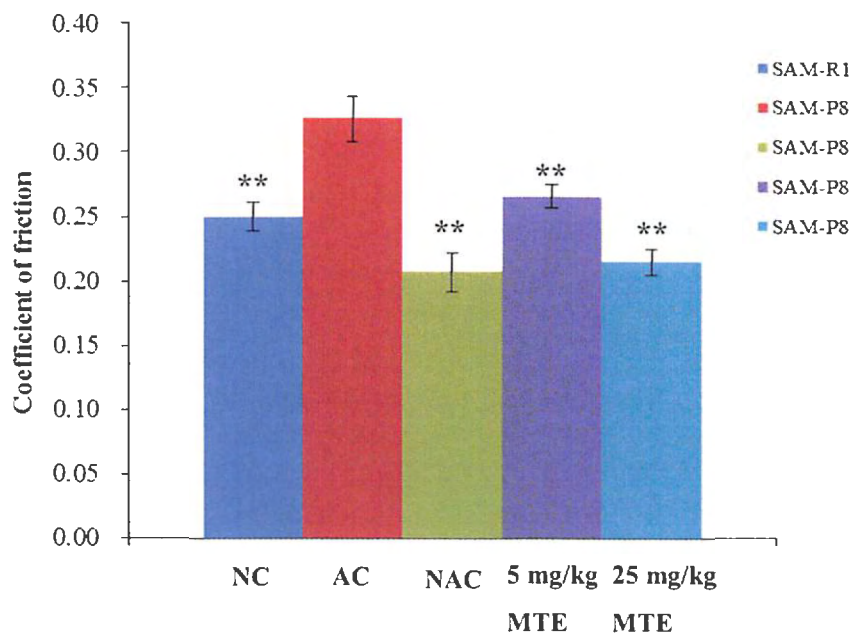


Fig. 27. Effect of mulberry twig extract (MTE) on coefficient of friction of mouse hairs. NC, normal control (n = 5); AC, aging control (n = 5); NAC, positive control (n = 5); MTE at 5 mg/kg (n = 5) and 25 mg/kg (n = 5). Coefficient of friction of AC group was significantly higher than that of the other four groups by ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons (** $P < 0.001$). All values are means \pm SEM.

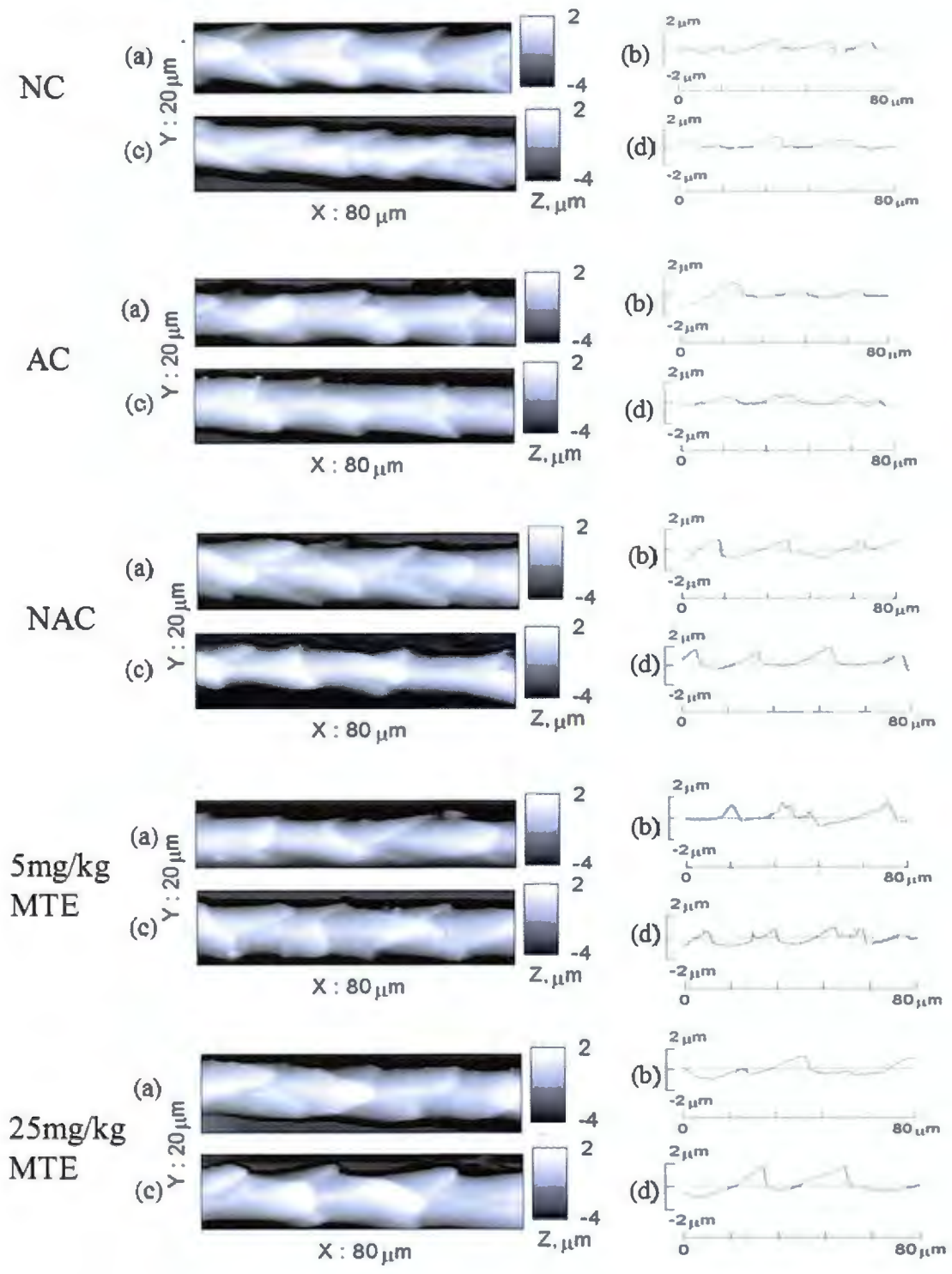


Fig. 28. Effect of mulberry twig extract on hair quality observed by SPM. The left side column denoted as (a) and (c), shows the areal surface topographies. The right side column denoted as (b) and (d) is the cross-sectional topographies extracted from (a) and (c), respectively.

Ⅲ. 考察

認知症 (Alzheimer's disease, AD) は高齢者の死亡の原因の一つで根本的な治療薬が開発されていない, そして承認されている治療薬がわずかな治療効果と副作用をもっている. したがって, 望ましくない副作用がない効果的な予防と治療薬を開発するために天然物質を使用する可能性はかなりの注目を集めている. 例えば, 銀杏の葉は神経保護剤, 酸化防止剤として初期段階のアルツハイマー病, 血管性認知症を治療, β -アミロイドの沈着を阻害する (Sierpina *et al.*, 2003). ウコンの主要成分のクルクミンは脂質過酸化を抑制し, 抗酸化ストレスと抗炎症薬理作用で, 認知症の予防と緩和に注目されている (Butterfield *et al.*, 2002). カシュウ (*Polygonum multiflorum*) のエタノール抽出物は脳の病理学的変化を軽減し, 学習, 記憶力を促進することを示唆している (Chan *et al.*, 2002). 臨床試験ではヤクヨウサルビア (*Salvia officinalis*) の抽出物は AD 軽度から中等度の治療に有効であることが明らかになった (Akhondzadeh *et al.*, 2003).

最近, 桑の実の抽出物は老化促進 SAM-P8 マウスの学習記憶能力の改善 (Shih *et al.*, 2010) を示し, 桑根の抽出物からアセチルコリンエステラーゼ (AChE) とブチリルコリンエステラーゼ (BChE) の阻害剤が単離され, アルツハイマー病の有望な治療薬として期待されている (Kim *et al.*, 2011). また, 桑葉のエキスはアミロイド A β 42 の凝集抑制作用を示した (Sugimoto *et al.*, 2010). さらに, 桑枝から抽出単離した Oxyresveratrol (OXY) は酸化ストレスを軽減するために細胞内抗酸化物質として神経細胞保護作用の可能性が示唆されている (Chao *et al.*, 2008). 桑科の一種 *Dorstenia barteri* の葉と小枝には抗炎症と鎮痛作用が確認され, 小枝抽出物は葉抽出物より活性が高いとされている (Omisore *et al.*, 2004). 桑の一種 *Morus macroura* の樹幹樹皮のエタノール抽出物からは優れた抗酸化 Diels-Alder 型付加体新規化合物が同定され (Dai *et al.*, 2004), もう 1 つの桑の一種 *Morus yunnanensis* Koidz の樹幹樹皮のエタノ

ール抽出物には抗酸化と強力な抗炎症 Diels-Alder 型付加体のフラボノイドが同定されている (Cui *et al.*, 2008).

以上のことから、エタノールで抽出した物質には抗炎症、抗酸化物質が豊富に含まれおり、認知症の予防と治療に効く可能性があると考えられる。一方、エタノール抽出物の場合難溶性であり、経口投与の実験では動物にダメージの少ない溶媒の選択に難点がある。しかし、食品用として利用されている 50%エタノール抽出物はエタノール抽出に類似し、多糖類、ポリフェノール、アルカロイド、アミノ酸、ビタミン類などの多様な生理活性物質の抽出が可能であると考えられる。そこで、SAM-P8 老化促進マウスに桑枝条 50%エタノール抽出物を経口投与し、認知症状を改善するかどうかについて調べた。その結果は文脈学習記憶と空間記憶の改善が認められなかった。高齢動物では空間学習、運動協調、水泳効率が低下を示している (Gage *et al.*, 1984)。本研究では SAM-P8 老化促進マウスの空間学習、運動協調及び水泳効率が SAM-R1 正常老化マウスより低下することを示し、行動実験の時点の SAM-P8 マウスがすでに老化していることを明らかにした。一方、桑実の 70%抽出物は 15 日間 500mg/kg 投与量でパーキンソン病モデルマウスのドーパミン作動性ニューロンを保護することが示されている (Kim *et al.*, 2010)。本研究では 人への投与濃度を考慮して、SAM-P8 マウスに 5 mg/kg と 25 mg/kg 投与量で 12 週間投与してみたところ、神経保護作用が認められなかった。従って、投与の濃度と日数が再検討する必要があると考えられる。

一方、老化とともに記憶が低下するのみではなく、動物の全身に老化が発生していると考えられる。毛の品質劣化、脱毛症、白髪は老化と密接に相関する (Trüeb *et al.*, 2009)。哺乳類の体毛は毛球と毛幹からできる。毛幹は外層のキューティクル、内層のコレテックス、中心部のメデュラの 3 層から構成されている (伊藤ら., 2001)。加齢や酸化ストレスや物理・化学ダメージにより毛球の炎症反応や生理的に変性が引き起こされ、毛幹外層のキューティクルが剥離し、内層のコレテックスの水分が保持できず脱毛

や髪が質が損なわれることになる (Kiso *et al.*, 2009). 酸化ストレスによりメラニン細胞が機能低下及び減少を示し、毛幹の コレテックスにメラニン色素の含量が顕著に減少し、白髪が現れる (Trüeb *et al.*, 2006). また、摩擦係数は髪の外層のキューティクル の状態を示し、キューティクルの損傷が大きいほど、摩擦係数が大きいと考えることができる (Bhushan *et al.*, 2005). そして、毛髪表面の粗さは年齢とともに有意に増加する (Jeong *et al.*, 2010). そこで、マウス体毛表面のキューティクルの状態を調べるため、摩擦係数の測定と走査型プローブ顕微鏡の 観察をおこなった. その結果は AC 群の摩擦係数は顕著に高く、ポジティブコントロール群と 5, 25 mg/kg MTE 群の摩擦係数は大よそ NC 群の近いレベルに回復した. 走査型顕微鏡の観察結果は摩擦係数の結果と見事に一致した. AC 群の体毛表面はキューティクルが剥離し、波状を示した. 同じような現象はヒト高齢者の毛髪でも原子間力顕微鏡 (AFM) で観察された. AFM の画像が荒れ果てた構造、不明確なキューティクルを明らかにし、表面が波状を示した (Jeong *et al.*, 2010). 本研究で明らかになった重要な点は、桑枝条抽出物の経口摂取により SAM-P8 マウスの体毛の質が改良されたことであり、これは初めての知見となる.

酸化ストレスは毛髪の老化に主要な役割を果たしているという仮説がある. そして、抗酸化物質は髪の色と質が改善できる (Trüeb *et al.*, 2009). 最近の報告により桑枝条エタノール抽出物には maclurin, ルチン (rut in) イソクエルシトリン (isoquercit rin), レスベラトロール (resverat rol) 及びモリン (morin) が含有し、天然抗酸化物質のチロシナーゼの抑制剤となっている (Chang *et al.*, 2010). 桑の一種 *Morus nigra* の根と枝条のエタノール抽出物には優れた抗酸化作用の OXY と mulberroside A が含有されている (Zheng *et al.*, 2010). 本研究成果であるマウスの体毛の質を改善メカニズムとして桑枝条抽出物に含有される一連の抗酸化物質の作用と考えられる. 今後は、桑枝条 50% エタノール抽出物に含まれる生理活性物質の単離精製および体毛質を向上させる機構をさらに解析する必要があると考えられる.

IV. 摘要

桑枝条の 50%エタノール抽出物におけるアンチエイジング機能を解析するために、SAM-P8 老化促進マウスに 12 週間経口投与し、記憶改善効果のための行動実験と、毛質改善効果のための摩擦係数および走査型プローブ顕微鏡による観察実験をおこなった。

その結果、ステップスルー型受動回避の文脈学習記憶とモリス水迷路による空間記憶を改善する効果が認められなかったが、毛質改善効果が明らかになった。老化マウス AC 群の摩擦係数はほかの群より有意に高く、ポジティブコントロール群と 5, 25 mg/kg MTE 群の摩擦係数はほぼ NC 群の近いレベルまでに回復した。走査型顕微鏡による観察結果は摩擦係数の結果と一致した。老化マウス AC 群の体毛はキューティクルが極めて不鮮明で、いくつかの剥離領域が観察された。しかし、桑枝条抽出物を経口投与した SAM-P8 マウスの体毛の質は修復され、表面は典型的な階段状の特徴を示し、鮮明なキューティクルが観察された。以上のことから、桑枝条抽出物の経口摂取によって SAM-P8 マウスの体毛の質の改善が誘導されることを初めて明らかにすることができた。

総合考察

平均寿命の増加とともに人口高齢化が世界的な現象となっている。米国国勢調査局により 2000 年から 2030 年の間に 65 歳以上の高齢者の割合はアジアで 6%から 12%まで、北アメリカで 12.6%から 20.3%まで、ヨーロッパで 15.5%から 24.3%まで、世界中で 6.9%から 12.0%まで増加し、すなわち 2000 年の 420 万人から 2030 年までに約 10 億人に増加すると予測されている。加齢とともに発生率の逐年増加の病気には心脳血管疾病、認知症、癌などがある (Akushevich *et al.*, 2012)。世界中の認知症高齢者数は 2000 年の 2500 万人から 2030 年の 6300 万人へと、さらに 2050 年の 1 億 1400 万人への増加が推定され、認知高齢者大半は発展途上国であると考えられている (Wimo *et al.*, 2003)。認知症の分類は主にアルツハイマー病 (Liu *et al.*, 2012)、血管性痴呆 (Lee *et al.*, 2011)、前頭側頭型認知症 (Burrell *et al.*, 2011)、パーキンソン病認知症 (Barcia *et al.*, 2011) の 4 種類がある。この中にはアルツハイマー病が認知症の最も一般的な形式である。今後数十年で認知症の完治は世界的な公共医療における目標となっている。

今まで、予防と治療薬の開発は動物実験、臨床実験の順番で行われている。マウス、ラットを用いて学習・記憶を評価するため、行動実験が不可欠となっている。受動的回避反応では若い動物と比較して高齢動物の記憶が減少している (Drago *et al.*, 1990; Pitsikas *et al.*, 2005)。受動回避実験は動物の文脈学習記憶を調べる方法で、脳の海馬と深く関わっている (田熊ら, 2007)。そこで本研究では、ステップスルー型受動的回避実験を実施した。また、加齢とともに空間学習と記憶能力が損なわれる (Gage *et al.*, 1984; Aitken *et al.*, 1989; Nabeshima *et al.*, 1993)。そこで本研究では学習・記憶能力を分析するモリス水迷路実験を使用した。空間的学習記憶は海馬 (Klur *et al.*, 2009) に関与している。また、海馬の歯状回 (DG) 顆粒細胞 は文脈学習の具体的な機能を制御している (Kheirbek *et al.*, 2013)。一方、大脳皮質 は知覚、運動、認知などの機能を

制御している (Momjian *et al.*, 2003). 従って本研究では, 記憶と深く関わる大脳の海馬と皮質について, 病理組織学観察実験も並行して行った.

近年, D-galactose の投与による認知症モデルの作製が中国を中心として 200 報以上報告されている. しかし, D-galactose の投与量が広範囲過ぎる. 本研究では認知モデルを作製するために D-galactose の投与量について詳細検討したが, モデルを惹起する D-galactose の投与量を明らかにすることができなかった.

本研究と異なる報告として, D-galactose 50 mg/kg 投与量で海馬の C2 錐体細胞は損傷されている (Zhong *et al.*, 2009). D-galactose 150 mg/kg 投与量での海馬の錐体細胞が細胞質濃縮あるいは消失を示されている (Zhang *et al.*, 2008). D-galactose 150 mg/kg 投与量により海馬の歯状回顆粒細胞と錐体細胞の数が減少したこと, モリス水迷路のトレーニングではプラットホームへの退避時間が長いことが報告されている (Tian *et al.*, 2011). しかし, これらの報告に使ったマウスは ICR 系統あるいは中国の Kunming マウスであり, 本研究で使用した C57BL/6J 系雄マウスとは異なることから, 系統による違いも考慮する必要があるかもしれない. また, D-galactose で酸化ストレスを惹起する報告も多い. 例えば, D-galactose を投与した Kunming マウスの脳, 肝臓, 腎臓のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD), グルタチオンペルオキシターゼ (GSH-Px) 活性が顕著に低下し, 脂質過酸化産物のマロンジアルデヒド (MDA) が多量に蓄積し (Liu *et al.*, 2009), 酸化型グルタチオンとカタラーゼが激減した (Kumar *et al.*, 2009). D-galactose の投与で酸化ストレスの初老化を引き起こし, 記憶の損傷と細胞死までを誘導していないと考えられる. 本研究で使用した C57BL/6J 系統マウスへの D-galactose による老化惹起の報告数が僅かで, 韓国の報告の一つで 20 週齢の C57BL/6J マウスに対して D-galactose 100 mg/kg を 10 週間投与した結果, 空間記憶が損傷されている (Yoo *et al.*, 2012). しかし, 本研究に使用した C57BL/6J マウスは 12 週齢で, 若い週齢で空間記憶が損傷されなかった 1 つの原因になるかもしれないと

考えられる。また、200 mg/kg から 2000 mg/kg までの D-galactose の投与においても、記憶に関わる海馬と大脳皮質の神経細胞の損傷が確認されなかった。以上のことから、落葉樹クワ科クワ属由来の桑枝条抽出物における機能を解析する上で、D-galactose による認知モデルを作製の普遍性を確認することができなかつたことから、マウス系統、週齢などの総合的な視点から再検討する必要があると考えられる。

一方、SAM-P8 マウスはアミロイド- β の過剰産生、ニューロンの損失、グリオーシス、コリン欠損、学習と記憶障害、概日リズム障害、酸化的損傷などの特徴を持ち、スペイン、アメリカ、日本、中国など各国に認められた選抜淘汰されて老化促進マウスである (Morley *et al.*, 2012; Fernández-Gómez *et al.*, 2008; Gang *et al.*, 2011; Tsuduki *et al.*, 2011)。天然素材を利用した SAM-P8 マウスの加齢を防ぐ報告が多くなされている。ホウノキ (*Magnolia obovata*) の樹皮である厚朴に由来するマグノロールとホオノキオールが加齢に伴う学習と記憶の障害を改善することが示唆されている (Matsui *et al.*, 2009)。柿由来のオリゴマープロアントシアニジン (Persimmon oligomeric proanthocyanidins) は寿命延長を誘導し、抗老化剤としての有望な天然素材であることを示唆している (Yokozawa *et al.*, 2009)。スピルリナー (*Spirulina*) は抗酸化物質として A β タンパク質の蓄積と酸化損傷を軽減する (Hwang *et al.*, 2011)。このように、樹木を含めた多くの植物起源の抗酸化物質は抗加齢機能を示しており、抗酸化物質を豊富に含む桑の未利用部分である枝条には強力なアンチエイジング機能が期待できた。

また、*In vitro* 実験と *in vivo* 実験は異なり、*In vitro* で抗認知活性を確認されても、必ずしも *in vivo* で活性が反映される訳ではない。経口摂取を介し、消化酵素系および血液循環系のバリアーを経て、さらに血液脳関門を通過することで機能性を発現するかどうかについては多くの課題が残っている。従って、本研究は桑枝条抽出物について経口摂取で抗老化機能について検討した。

桑枝条 50%エタノール抽出物を SAM-P8 マウスに経口投与した結果においては記憶

の改善効果が認められなかったが、体毛の摩擦係数の解析から、体毛質の改善効果が明らかとなり、走査型プローブ顕微鏡の観察結果も一致した。桑枝条抽出物には経口摂取で体毛質の保護機能が認められ、経口的なケア用の化粧品の開発が期待される。しかし、粗抽出物からの機能性本体の単離同定は今後の課題である。

以上のような研究アプローチにより、落葉樹のクワ科クワ属を含む農業生物資源由来からヒトの QOL 向上を目指した機能性素材の開発は、大いに期待できるものと考えられる。特に日本における超高齢化社会の到来により、国民医療費の増大は切迫した課題であり、これに対して農業生物資源を素材とした研究開発が大きなポテンシャルを有しており、本研究によるアプローチとその成果がさらに展開することで一部応えることができると考える。

引用文献：

Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M (2003) *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J. Clin. Pharm. Ther.* 28, 53-59.

Akushevich I, Kravchenko J, Ukraintseva S, Arbeev K, Yashin AI (2012) Age Patterns of Incidence of Geriatric Disease in the U.S. Elderly Population: Medicare-Based Analysis. *J. Am. Geriatr. Soc.* 60, 323-327.

Asano N, Tomioka E, Kizu H, Matsui K (1994) Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* 253, 235-245.

Basnet P, Kadota S, Terashima S, Shimizu M, Namba T (1993) Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1238-1243.

Bhushan B, Wei G, Haddad P (2005) Friction and wear studies of human hair and skin. *Wear* 259, 1012-1021.

Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR (2011) Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* 134, 2582-2594

Butterfield D, Castegna A, Pocemich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V (2002)

Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 13, 444-461.

Calhoun ME, Kurth D, Phinnev AL, Long JM, Hengemihle J, Mouton PR, Ingram DK, Jucker M (1998) Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol. Aging* 19, 599-606.

Chan YC, Cheng FC, Wang MF (2002) Beneficial effects of different *Polygonum multiflorum* Thumb. extracts on memory and hippocampus morphology. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48, 491-497.

Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH (2010) Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food Chem. Toxicol.* 49, 785-790.

Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RC (2008) Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1019-1026.

Cui X, Wang L, Zuo P, Han Z, Fang Z, Li W, Liu J (2004) D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. *Biogerontol.* 5, 317-325 (in Chinese).

Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J (2006) Chronic systemic D-galactose

exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J. Neurosci. Res.* 83, 1584-1590.

Cui XQ, Wang L, Yan RY, Tan YX, Chen RY, Yu DQ (2008) A new Diels-Alder type adduct and two new flavones from the stem bark of *Morus yunnanensis* Koidz. *J. Asian Nat. Prod.* 10, 361-366.

Dai SJ, Wu Y, Wang YH, He WY, Chen RY, Yu DQ (2004) New Diels-Alder type adducts from *Morus macroura* and their anti-oxidant activities. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1190-1193.

Dominguez LJ, Barbagallo M (2007) The cardiometabolic syndrome and sarcopenic obesity in older persons. *J. Cardiometab. Syndr.* 2, 183-189.

Drago F, D'Agata V, Valerio C, Spadaro F, Raffaele R, Nardo L, Grassi M, Freni V (1990) Memory deficits of aged male rats can be improved by pyrimidine nucleosides and n-acetyl-glutamine. *Clin. Neuropharmacol.* 13, 290-296.

Farr SA, Poon HF, Dogrukol-AK D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003) The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAM-P8 mice. *J. Neurochem.* 84, 1173-1183.

Fernández-Gómez FJ, Muñoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Vidal CJ,

Jordán J (2008) The level of butyrylcholinesterase activity increases and the content of the mRNA remains unaffected in brain of senescence-accelerated mouse SAM-P8. *Chem. Biol. Interact.* 175, 332-335.

Finkel T, Serrano M, Blasco MA (2007) The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.

Flood JF, Morley JE (1998) Learning and memory in the SAM-P8 mouse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 1-20.

Gage FH, Dunnett SB, Björklund A (1984) Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging* 5, 43-48.

Gang B, Yue C, Han N, Xue H, Li B, Bun L, Li X, Zhao Q (2011) Limited hippocampal neurogenesis in SAM-P8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1389, 183-193.

Glasscock RJ (2011) The aging kidney: more pieces to the puzzle. *Mayo. Clin. Proc.* 86, 271-272.

Goldman JG, Litvan I (2011) Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Minerva Med.* 102, 441-459.

Hwang JH, Lee IT, Jeng KC, Wang MF, Hou RC, Wu SM, Chan YC (2011) Spirulina

prevents memory dysfunction, reduces oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 57, 186-191.

伊藤隆司, 新井賢二 (2001) 頭髪化粧品の最近の動向. 化粧品講座, 74, 412-417.

Janssens JP, Pache JC, Nicod LP (1999) Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur. Respir. J.* 13, 197-205.

Jeong KH, Kim KS, Lee GJ, Choi SJ, Jeong TJ, Shin MK, Park HK, Sim WY, Lee MH (2011) Investigation of aging effects in human hair using atomic force microscopy. *Skin Res Technol.* 17, 63-68.

Jiang Y (2010) Effects of anthocyanins derived from Xinjiang black mulberry fruit on delaying aging. *J. Hyg. Res.* 39, 451-453 (in Chinese).

Jin YS, Lee MJ, Han W, Heo SL, Sohn SL, Wang MH (2006) Antioxidant effects and hepatoprotective activity of 2,5-dihydroxy-4,3-di(beta-d-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koedzumi roots on CCL4-induced liver damage. *Free Radic. Res.* 40, 986-992

Johnson KM, Owen K, Witte PL (2002) Aging and developmental transitions in the B cell lineage. *Int. Immunol.* 14, 1313-1323.

板倉 智敏, 後藤 直彰 (1998) 獣医病理組織カラーアトラス, pp. 7, 文永堂出版社.

Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77, 955-968

Kikuchi T, Nihei M, Nagai H, Fukushi H, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T (2010) Albanol A from the root bark of *Morus alba* L. induces apoptotic cell death in HL60 human leukemia cell line. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 568-571.

Kim HG, Ju MS, Shim JS, Kim MC, Lee SH, Huh Y, Kim SY, Oh MS (2010) Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *Br. J. Nutr.* 104, 8-16.

Kim JY, Lee WS, Kim YS, Curtis-Long MJ, Lee BW, Ryu YB, Park KH (2011) Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4589-4596.

Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, Kojima Y, Goto Y, Yamagishi K, Oita S, Oikawa S, Miyazawa T (2007) Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5869-5874.

Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y (2002) Oxyresveratrol and

hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **277**, 16340-16344.

Kim YS, Lee YM, Kim H, Kim J, Jang DS, Kim JH, Kim JS (2010) Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: anti-lipase activity and lipolytic effect. *J. Ethnopharmacol.* **130**, 621-624.

Kiso M, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, Okano HJ, Shiroishi T, Okano H, Saga Y (2009) The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 9292-9297.

Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* **19**, 800-816

小林 勝利, 鳥山 国士 (1993) シルクのはなし, pp. 12-13, 技報堂出版.

Kumar A, Dogra S, Prakash A (2009) Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **380**, 431-441.

Kumar A, Prakash A, Dogra S (2010) Naringin alleviates cognitive impairment,

mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice. *Food Chem. Toxicol.* 48, 626-632.

Lee AY (2011) Vascular dementia. *Chonnam. Med. J.* 47, 66-71.

Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY (2002) Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1045-1048.

Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G (2008) Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 1082-1087.

Liu A, Ma Y, Zhu Z (2009) Protective effect of selenoarginine against oxidative stress in D-galactose-induced aging mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1461-1464.

Li W, Wei F, Fan M, Zhang J, Zhang B, Ma X, Yang W, Wei W (1995) Mimetic brain aging effect induced by D-galactose in mice. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.* 9, 93-95 (in Chinese).

Liu XJ, Yang W, Qi JS (2012) Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Acta Physiol. Sin.* 64, 87-95 (in Chinese).

- Long JM, Kalehua AN, Muth NJ, Calhoun ME, Jucker M, Hengemihle JM, Lngan DK, Mouton PR (1998) Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol. Aging* 19, 497-503.
- Lu J, Zheng YL, Luo L, Wu DM, Sun DX, Feng YJ (2006) Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav. Brain Res.* 171, 251-260.
- Lu J, Zheng YL, Wu DM, Luo L, Sun DX, Shan Q (2007) Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1078-1090.
- Magnusson KR, Scruqqs B, Aniya J, Wright KC, Ontl T, Xing Y, Bai L (2003) Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav. Neurosci.* 117, 485-495.
- Ma L, Chen G, Nie L, Ai M (2009) Effect of Cynomorium songaricum polysaccharide on telomere length in blood and brain of D-galactose-induced senescence mice. *China J. Chin. Materia Medica* 34, 1257-1260 (in Chinese).
- Mao M, Zhang JG, Tao AL, Yan XL, Quyang SL, Yuan XP, Qiu LZ, Xie Y, Zou ZH, Lu JZ, Li Q (2008) Detection of hearing threshold and polymorphic molecular marker analysis of guinea pigs of mimetic aging. *Chin. J. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* 43, 830-834 (in Chinese).

Masuda T, Satodate R, Tsuruga K, Kasai T (1993) Quantitative assessment of a change of hemosiderin deposition with age in splenic compartments of rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 170, 169-179.

Matsui N, Takahashi K, Takeichi M, Kuroshita T, Noguchi K, Yamazaki K, Tagashira H, Tsutsui K, Okada H, Kido Y, Yasui Y, Fukuishi N, Fukuyama Y, Akagi M (2009) Magnolol and honokiol prevent learning and memory impairment and cholinergic deficit in SAM-P8 mice. *Brain Res.* 1305, 108-117.

McGaugh JL and Landfield, PW (1970) Delayed development of amnesia following electroconvulsive shock. *Physiol. Behav.* 5, 1109-1113.

Mehta PD (2007) Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 359-363.

Miyamoto M (2004) Emotional disorders and memory deficits in senescence-accelerated mice, SAM-P8 and SAMP10. *Int. Congr. Ser.* 1260, 99-106.

森 精 (1970) カイコによる新生物実験, pp. 13-14, 築波書房.

Momjian S, Seghier M, Seeck M, Michel CM (2003) Mapping of the neuronal networks of human cortical brain functions. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.* 28,

91-142.

村上 光太郎 (1998) よく効く民間薬 100, pp. 246-248, マキノ出版.

Morley JE, Armbrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012) The senescence accelerated mouse (SAM-P8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 650-656.

Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239-260.

Nabeshima T, Hasegawa M, Nakayama S, Kinoshita H, Amano M, Hasegawa T (1993) Impairment of learning and memory and the accessory symptom in aged rats as senile dementia model (2)-Learning and memory. *J. Psychopharmacol.* 13, 73-79.

Nakagawa K, Kubota H, Kimura T, Yamashita S, Tsuzuki T, Oikawa S, Miyazawa T (2007) Occurrence of orally administered mulberry 1-deoxynojirimycin in rat plasma. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8928-8933.

Nikolich-Zugich J (2005) T cell aging: naive but not young. *J. Exp. Med.* 201, 837-840.

(No authors listed) From the Centers for Disease Control and Prevention Public

health and aging: trends in aging-United States and worldwide. *JAMA*. (2003) 289, 1371–1373.

Omisore NO, Adewunmi CO, Lwalewa EO, Ngadjui BT, Adenowo TK, Abegaz BM, Ojewole JA, Watchueng J (2005) Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1087-1094.

Omisore NO, Adewunmi CO, Lwalewa EO, Ngadjui BT, Watchueng J, Abegaz BM, Ojewole JA (2004) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Dorstenia barteri* (Moraceae) leaf and twig extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.* 95, 7-12.

大村 重光 (1983) 中国日本薬用植物・生薬, pp. 198-199, 廣川書店.

Ou TT, Hsu MJ, Chan KC, Huang CN, Ho HH, Wang CJ (2011) Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2740–2748.

Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, dos Santos MH, Alves-da-silva G, Giusti-Paiva A (2010) Antiinflammatory properties of *morus nigra* leaves. *Phytother. Res.* 24, 1496-1500.

Parameshwaran K, Lrwin MH, Steliou K, Pinkert CA (2010) D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice.

Rejuvenation Res. 13, 729-735.

Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ (2011) Mulberry Water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2663-2671.

Petito CK, Pulsinelli WA (1984) Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 141-153.

Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Sakellaridis N, Muller EE (2005) The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol. Aging* 26, 259-264.

Popesco MC, Frosthalm A, Reiniak K, Rotter A (2004) Digital transcriptome analysis in the aging cerebellum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 58-63.

Raji CA, Lopez OL, Kuller LH, Carmichael OT, Becker JT (2009) Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology* 73, 1899-1905.

林 俊春 (2007) 動物カラーアトラス. pp. 170. (日本獣医病理学会編 第1版) 文永堂出版.

Shen YX, Xu SY, Wei W, Sun XX, Yang J, Liu LH, Dong C (2002) Melatonin reduces

memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose.

J. Pineal Res. 32, 173-178.

Shibata Y, Kume N, Arai H, Hayashida K, Lnui-Hayashida A, Minami M, Mukai E, Toyohara M, Harauma A, Murayama T, Kita T, Hara S, Kamei K, Yokode M (2007) Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF α -induced nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 193, 20-27.

Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC (2009) Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 21, 598-605.

Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M (2003) Ginkgo biloba. *Am. Fam. Physician* 68, 923-926.

Sillapakong P, Yang P, Sato Y, Ishiguro S, Yamamoto K, Noda S, Kondo H, Totani K, Konishi T, Yamashita T, Kofujita H, Suzuki K (2011) Mulberry stem bark extract stimulates *in vitro* immunomodulatory response in mouse spleen lymphocytes. *J. Insect Biotech. Sericol.* 80, 1-7.

Song X, Bao M, Li D, Li YM (1999) Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech. Ageing Dev.* 108, 239-251.

Stavnezer AJ, Hyde LA, Bimonte HA, Armstrong CM, Denenberg VH (2002) Differential learning strategies in spatial and nonspatial versions of the Morris water maze in the C57Bl/6J inbred mouse strain. *Behav. brain Res.* 133, 261-270.

杉本 八郎 (2010) ベータアミロイド仮説に基づくアルツハイマー病治療薬の開発研究. *薬学雑誌.* 130, 521-526.

杉山 多四郎 (1962) 桑, pp. 15, 養賢堂発行.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Hiquchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183-194.

Tan YX, Yang Y, Zhang T, Chen RY, Yu DQ (2010) Bioactive 2-arylbenzofuran derivatives from *Morus wittiorum*. *Fitoterapia* 81, 742-746.

Tian Y, Zou B, Yang L, Xu SF, Yang J, Yao P, Li CM (2011) High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1728-1736.

Trüeb RM (2006) Pharmacologic interventions in aging hair. *Clin. Interv. Aging.* 1,

121-129.

Trüeb RM (2009) Oxidative stress in ageing of hair. *Int. J. Trichology* 1, 6-14.

Tsudoku T, Honma T, Nakagawa K, Ikeda I, Miyazawa T (2011) Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescenceaccelerated mice. *Nutrition* 27, 334-337.

Tan YX, Liu C, Chen RY (2008) 2-Arylbenzofuran derivatives from *Morus wittiorum*. *Acta Pharm. Sin.* 43, 1119-1122.

田熊 一徹, 永井 拓, 山田 清文 (2007) 学習・記憶行動の評価法. 日薬理誌. 130, 112-116.

Uchidate M, Iwabuchi A, Sato J, Nomura T, Nomura S (2008) Development of the portable tribometer, Proceedings of JAST Tribology Conference Nagoya, 455-456 (in Japanese).

Uddin MN, Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K (2010) Toxic effects of D-galactose on thymus and spleen that resemble aging. *J. Immunotoxicol.* 7, 165-173.

Uddin MN, Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K (2012) Autophagic activity in thymus and liver during aging. *Age (Dordr).* 34, 75-85.

梅村 孝司 (2001) 動物病理学総論. pp. 69-70. (日本獣医病理学会編 第2版) 文永堂出版.

Valentim LM, Gevers AB, Tavares A, Cimarosti H, Worm PV, Rodnight R, Netto CA, Salbego CG (2001) Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immuncontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience* 107, 43-49.

Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW (1997) Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am. J. Physiol.* 273, 1957-1964.

Venkatesh KP, Chauhan S (2008) Mulberry: Life enhancer. *J. Med. Plant. Res.* 2, 271-278

Wang CQ, Yang GQ (2010) Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* 17, 527-532.

Wimo A, Winblad B, Aquero-Torres H, Von Strauss E (2003) The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17, 63-67.

Xu Y, Wu T, Jin Y, Fu Z (2009) Effects of age and jet lag on D-galactose induced aging process. *Biogerontology* 10, 153-162.

- Yamamoto K, Tsushima M, Yoshida A, Karimazawa M, Nagasuna O, Uchidate M, Iwabuchi A, Goryo M, Yamashita T, Suzuki K (2012) Peptides from *Bombyx* fibroin counter D-Galactose-induced hair aging in mice. *Int. J. Indust. Entomol.* 23, 201-206.
- Yang X, Yang L, Zheng H (2010) Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2374-2379.
- Yi ZJ, Fu YR, Li M, Gao KS, Zhang XG (2009) Effect of LTA isolated from bifidobacteria on D-galactose-induced aging. *Exp. Gerontol.* 44, 760-765.
- Yokozawa T, Lee YA, Zhao Q, Matsumoto K, Cho EJ (2009) Persimmon oligomeric proanthocyanidins extend life span of senescence-accelerated mice. *J. Med. Food* 12, 1199-1205.
- Yoo DY, Kim W, Kim IH, Nam SM, Chung JY, Choi JH, Yoon YS, Won MH, Hwang IK (2012) Combination effects of sodium butyrate and pyridoxine treatment on cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of d-galactose-induced aging model mice. *Neurochem. Res.* 37, 223-231.
- Yoshikuni Y. (1988) Inhibition of intestinal α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by Moranoline and its N-alkyl derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 52,

121-128.

吉田 紹欽 (2000) 榮西喫茶養生記, pp. 186, 講談社學術文庫.

Zereqa NJ, Clement WL, Datwyler SL, Weiblen GD (2005) Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**, 402-416.

Zhang M, Chen M, Zhang HQ, Sun S, Xia B, Wu FH (2009) In vivo hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*. *Fitoterapia* **80**, 475-477.

Zhang Q, Huang Y, Li X, Cui X, Zuo P, Li J (2005) GM1 ganglioside prevented the decline of hippocampal neurogenesis associated with D-galactose. *Neuroreport* **16**, 1297-1301.

Zhang XL, An LJ, Bao YM, Wang JY, Jiang B (2008) D-galactose administration induces memory loss and energy metabolism disturbance in mice: protective effects of catalpol. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2888-2894.

Zhang XL, Shi GF, Liu XZ, An KJ, Guan S (2011) Anti-ageing effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice. *Cell Biochem. Funct.* **(29)**, 342-347. (in Chinese).

Zhao H, Li Q, Pei X, Zhang Z, Yang R, Wang J, Li Y (2009) Long-term ginsenoside administration prevents memory impairment in aged C57BL/6J mice by upregulating the synaptic plasticity-related proteins in hippocampus. *Behav. Brain Res.* 201, 311-317.

Zhao LH, Wen JJ, Yang K, Li AY (2008) Effects of moxibustion on cerebral cortical nitric oxide level and nitric oxide synthase activity in aging mice. *Acupunct. Res.* 33, 255-261 (in Chinese).

Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q, Wang XC, Lin ZX, Wang M (2010) Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5368-5373.

Zhong SZ, Ge QH, Qu R, Li Q, Ma SP (2009) Paeonol attenuates neurotoxicity and ameliorates cognitive impairment induced by d-galactose in ICR mice. *J. Neurol. Sci.* 277, 58-64.