原 著

老化促進モデルマウス(SAMP8)の加齢に対する Ginkgo biloba の効果:酸化ストレス状態,脳内セロトニン量, 空間認知学習及び海馬神経細胞の定量的解析

具 然和^{1,3}, 糸川由佳¹, 井上登太¹, 田中順子¹, 丸山源司¹, 山口倫直¹, 伊藤秀隆¹, 鈴木典子¹, 大嶋正己¹, Ki-Mun KANG², 山下剛範¹, 石田寅夫^{1,3}

1) 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科

²⁾Department of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

³⁾鈴鹿医療科学大学東洋医学研究所(High-Tech Research Center)

キーワード:認知症, SOD, ペルオキシラジカル, 過酸化脂質, Morris 水迷路

——要旨-

本研究では、老化促進モデルマウス(SAMP8)を用いて、イチョウ葉エキス(Ginkgo biloba; EGb)を投与し、 空間認識能および脳海馬への影響について検討した。

Morris 水迷路実験では, SAMR1 マウスから構成される Control 群に比し, SAMP8 マウスの EGb 非摂取群であ る Sham control 群に於いてプラットホームまでの到達時間に有為な延長が認められ, さらにプローブテストに於 ける 4 分割での滞在時間および仮想プラットホーム面積の横切り回数でも有為な減少が認められた。Sham control 群に比べて EGb 群では経時的な到達時間が短い傾向が有るかのようであったが, 有為差は無かった。しかしなが ら, 水迷路試験の各テストで Control 群と Sham control 群で有為差を認めたにもかかわらず, EGb 摂取により有為 差がなかった。このことは EGb 摂取が SAMP8 の水迷路試験に於ける空間記憶機能改善に有効であることを示唆 する。

Sham control 群と比較すると, EGb 投与群において血清ペルオキシラジカルが有為に抑制された。さらに肝及 び腎臓に於いて Control 群に比し Sham control 群で有為に過酸化脂質濃度が増大しているにもかかわらず, EGb 摂取により有為差が消失した。これらの事より, EGb 摂取は SAMP8 の全身の, 特にこれら臓器に於ける酸化反応 増大に対して抗酸化作用を有すると考える。脳過酸化脂質濃度においては EGb 投与群での有為差は認められな かった。また, 脳内セロトニン濃度でも, Sham control 群と比較し, EGb 投与群に有為差は認められなかった。 CA1 領域においては, Sham control 群と比較して EGb 群での CA1 および CA3 領域を含めた海馬全域で, 著しく 錐体細胞の密度が高かった。特に CA1 領域においては, Sham control 群と比較して EGb 群での CA1 領域の錐体 細胞の密度が有為に高かった。よって, EGb 摂取は老化促進マウス SAMP8 の全身の酸化ストレス状態を一部軽減 することより,加齢に関連した海馬(特に CA1 領域の)神経細胞死を抑制し,水迷路試験に於ける空間記憶機能を 改善したと考える。EGb 摂取は老人性痴呆症の記憶障害に対して効果が期待される。

緒言

AD (Alzheimer-type dementia; AD) は 1907 年に Alzheimer¹⁾ により報告された進行性神経変性疾患 で,病理学的には, β アミロイド (Amyloid β) 沈着に よる老人班², Tau 蛋白の過剰リン酸化による神経原 線維変化の形成³が原因とされている。また, AD の 剖検脳におけるアセチルコリン合成酵素コリンアセチ ル転移酵素 (choline acetyltransferase; CAT) 活性の 低下が認められており4, 大脳皮質におけるアセチル コリン作動系求心線維の障害度と認知機能の程度がよ く相関することが報告されている⁵。この他に、急性 期反応蛋白の増加や老人斑周囲に活性化されたミクロ グリアの蓄積などから炎症プロセスの関与⁶, 脂質の 過酸化と脳の神経変性を引き起こすフリーラジカルの 蓄積⁷ により酸化ストレス (oxidative stress; OS) が AD に関与していることが報告されている。また、セ ロトニン(5-HT)が高次の認知過程において重要な 役割を果たすことが示唆されている[®]。5-HT 受容体 サブタイプの中でもとくに 5-HT₁受容体は辺縁系, なかでも学習と記憶に重要な役割を有することが明ら かとされている海馬領域に高い分布を示す¹⁾。また, セロトニンは情動にも関連しており、5-HT アゴニス トにおいて、攻撃性を低下させることが示されている ことから、セロトニンは認知症の周辺症状である情動 障害に関与していることが考えられる。

治療薬としては、AD では記憶や学習と関係してい るアセチルコリン系の活性低下が認められることか ら、アセチルコリン系賦活薬^{®)} が最も多く、この他、 抗炎症薬^{®)}、ステロイド^{®)}、抗酸化薬²⁰ などが用いら れている。日本で承認されている薬物は AChE (acetylcholinesterase) 阻害薬である塩酸ドネペジル のみである。

イチョウは5,000 年も前から中国の漢方治療に利用 されていたが,近年,イチョウの葉の抽出物が臨床応 用され,その有用性が報告されてきている¹³⁾。Ginkgo biloba の作用機序としては,抗酸化作用や神経伝達促 進作用などが報告されている¹⁴⁾。このことからフリー ラジカルがその発病に深く関係していると考えられる 脳疾患に対する治療効果が期待される。

フリーラジカルがその発病に深く関係していると考 えられる疾患に AD が挙げられるが,その動物モデル の一つとして老化促進モデルマウス SAMP8 があ る¹⁵⁾。老化促進モデルマウス SAMP8 は早期から学 習・記憶障害を来たすが,AD 同様酸化ストレス (oxidative stress)の亢進が明らかにされており,ま た AD に特徴的な β アミロイドの脳内沈着が加齢に 伴って増加することが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。

本研究では、老化促進モデルマウス SAMP8 を用い て、アルコールによるイチョウ葉抽出物の経口摂取が 加齢に伴う酸化ストレス亢進、海馬神経細胞死及び学 習・記憶力の低下へ及ぼす影響を調べた。実験結果よ り、イチョウは、酸化ストレス(oxidative stress)を 抑制することにより、海馬錐体神経細胞の細胞死を抑 制すると考察した。アルコール抽出によるイチョウ葉 抽出物はより副作用が少ない簡便な AD の予防及び 治療薬として期待される。

研究材料及び方法

1)研究試料

イチョウ葉エキス (Ginkgo biloba extract; EGb)

イチョウ葉の活性成分をアルコールにより抽出・濃 縮し,液状の抽出物を乾燥させて得られたもので,(株) ラティーナより提供して頂いた「Ginkgo biloba 末」を 用いた。有効成分は,フラボノール配糖体,フラボン, フラボノールアグリコン,ビフラボノイド,タンニン, テルペノイド,ファイトステロール,有機酸類等であ る。

2) 使用機器

脳ホモジネートには冷却遠心分離の国産遠心器㈱製 H-500R を用いた。ルミノール測定には、ALOKA 社 製ケミルミネッセンスリーダー BLR-201 を用いた。 超音波粉砕器は、島津製作所㈱製の ULTRASONIC CLEANER Hi-POWER SUS-100 を用いた。 水迷路実験は、動物用アルツハイマー遊泳実験観察 装置 MU-403S を、灌流装置は、MITSUMI SCIENTIFIC (株製の PERISTA MINI-PUMP (Lot. SJ-1211)を使用した。脳切片作製には、ファインテッ ク(株製のクリオスタット LEICA CM1850を用いた。 顕微鏡は、ソニー(株製 Digital Interface DFW-SX900 を接続した、オリンパス(株製の倒立型システム顕微鏡 IX70を使用した。

3) 実験動物

SAM モデルマウス

本研究では、老化促進マウス (Senescence Accelerated—prone Mouse: SAMP)及び正常老化マ ウス (Senescence Accelerated—resistant Mouse: SAMR)を用いた。

雄性 SAMR1 マウス(7-8 週齢を各群 10 匹)および 雄性 SAMP8 マウス(7-8 週齢を各群 10 匹)は日本エ スエルシー(株)(提供元: SAM 研究協議会)より購入し た。

4) 処置方法

飼育環境は、水および餌(CE-2,日本クレア(株))を 自由に与え、室温25℃、日照サイクル12時間(明期 8:00~20:00,暗期20:00~8:00)とし、実験に 供するまで1週間以上飼育した。

EGb 500mg/kg(蒸留水懸濁液)を SAMP8 マウス に一日一回経口投与(10mL/kg)した。Control 群で は SAMR1 マウスに, Sham control 群では SAMP8 に 蒸留水 (distilled water; DW)を経口投与(10mL/kg) した。

投与開始 30 日後に眼底静脈叢採血を行い,各検討 を行った。投与開始 31 日後から 9 日間 Morris 水迷 路試験を行った。各実験項目における投与期間は,実 験終了まで継続投与を行った。水迷路試験後,頚椎脱 臼により屠殺し,マウスの脳(大脳皮質,間脳及び脳 幹まで含む),肝臓,腎臓における過酸化脂質濃度およ びマウス脳におけるセロトニン濃度の測定を行った。 また,投与開始 18 週後(26-27 週齢)に屠殺し,脳を 摘出し,凍結スライド標本を作製して各染色を行った。実験動物は本学の動物倫理委員会による承認(第27号)のもと,動物に与える苦痛を最小限に努力した。

5) 抗酸化測定

5-1) SOD 様活性度測定

血 清 中 の ス ー パ ー オ キ シ ド ジ ス ム タ ー ゼ (superoxide dismutase; SOD) 様活性を抗酸化作用 の指標の1つとした。

マウス眼底採血により 75 μ L の血液を採取し,遠心 分離後 (10,000 × g, 10min) 得られた血清を用いた。 測定は、ニトロブルーテトラゾリウム (NO₂-TB) 還元 法に準ずるスーパーオキシドジスムターゼ測定用 SOD テストワコー (和光純薬:株)、Code No: 435-70601) にて行い、プロトコールに従った。スー パーオキシドラジカル (O₂⁻⁻) と NO₂-TB との反応に 基づく阻害率を、血清中 SOD 様活性度の評価とし た¹⁹⁰。

5-2) ルミノール測定

2,2- アゾビス (2- アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) の加温発生ペルオキシラジカルとアルカリ 条件下のルミノール発光におけるケミルミネッセンス 抑制を抗酸化作用の指標の1つとした。

マウス眼底採血により 75 μ L の血液を採取し,遠心 分離後 (10,000 × g, 10min) 得られた血清を用いた。 血清を 0.1M PBS (pH 7) にて 100 倍希釈し,等量の AAPH を添加した。ルミネッセンスリーダーに試料 を挿入し,加温後 (37 \mathbb{C} , 2min) 希釈血清と等量のル ミノール試薬を添加し, 20 秒後の発光強度を測定し た。発光強度によりベルオキシラジカルに対するスカ ベンジング作用の評価を行った。

5-3) 過酸化脂質濃度測定

組織の過酸化脂質測定は内山・三原の方法²⁰⁾ に準じ て行い, TBA 反応物質(thiobarbituric acid reaction substrate; TBARS) 濃度を過酸化脂質濃度の評価と した。左心室生理食塩水灌流(1mL/min, 15min)に より脱血し、マウス脳、肝臓および腎臓を摘出してホ モジネートした後、10% w/v になるように1.15% w/v 塩化カリウム溶液を加えた。ホモジネート溶液 0.5mL に 1 % リン酸 3mL および 0.67% TBA 試薬 1mL を加え、95 ~ 100℃で 45 分間加熱した。加熱後 速やかに室温まで冷却し、n-ブタノール 4mL を加え て振とう抽出し、遠心分離(300 × g、10min)した。 得られた n-ブタノール層を用いて、535nm および 520nm の 2 ヶ所で吸光度測定を行った。標準試薬は 10nmol/mL テトラエトキシプロパン・メタノール溶 液 0.5mL を用い、上記と同様の操作を行った。検体 および標準試薬の各吸光度から、過酸化脂質濃度を次 式により算出した。

過酸化物濃度 (nmol/mL)

= f/F × 10nmol/mL 組織ホモジネート F:標準試薬の吸光度(A₅₃₅₋₅₂₀)

f:検体の吸光度(A₅₃₅₋₅₂₀)

6) セロトニン濃度測定

脳セロトニン濃度測定は、EIA serotonin kit (BECKMAN COULTER 社, Code No: IM1749) に よって行った。左心室生理食塩水灌流(1mL/min, 15min) により脱血し、マウスの脳を摘出してホモジ ネートし、10 μ L 0.2N 過塩素酸/mg brain homogenate を加え、さらに超音波粉砕を行った。その後、ろ過フィ ルター(0.45 μ m)でろ過し、等量の1Mホウ酸緩衝液 (pH 9.25)を加え、2-8℃で遠心分離(300 × g, 1min) した。得られた上清を用い、BECKMAN COULTER 社プロトコールに従って、脳セロトニン濃度を測定し た。

7) Morris 水迷路試験

水迷路実験は Morris の方法に準じた²¹⁾。装置は水 を張った円形タンク (直径 150cm, 深さ 50cm) とマウ

В



Fig. 1. Cross-sectional diagram of pool (A), and its position in the laboratory (B). The water maze was a cylindrical pool (diameter 50cm) filled with water (depth 16 cm, 23 ± 2°C that was made opaque by the addition of a quantity of skim milk. Approximately 1 cm below the surface was a 12.5 × 12.5 cm² hidden platform made of transparent acrylic. Four points around the circumference of the pool are arbitrarily designated North, South, East, or West and, on this basis, the pool area divided into 4 quadrants. There were numerous distal cues in the laboratory (doors, students (△), fluorescent lights on the ceiling, black curtains).

Α

スが回避できるためのプラットホーム(直径 12.5cm, 高さ 15cm)からなっている。プラットホームは透明 なアクリル製で,水面下 1cm になるように 23 ± 2℃ の水(マウスが視覚的にプラットホームを捉えられな いように 2%のスキムミルクを混入)を張った。また, 円形タンクの壁面を東西南北の4つの区域に分け,4 分割の中央(北東)にプラットホームを設置した(Fig. 1A)。実験者は 2名で行い,円形タンクの周囲を黒色 のカーテンで覆い,背景を一定にして静かな環境下で Step1-3までの実験を行った(Fig. 1B)。

【Step1:予備訓練セッション】

訓練セッションを行う前日に1回行った。円形タン クの中央に,水面より数 cm 高い位置にプラットホー ムを固定しておき,マウスをプラットホームにのせた。 マウスをプラットホームから離して 15 秒以上泳がせ た後,プラットホームに戻るように誘導した。この操 作を1匹につき 10 秒以上の間隔を空けて3回繰り返 した。



【Step2:訓練セッション】

マウスを円形タンクの壁面に頭を向けた状態でプ ラットホームから等距離にある3点から無作為に入水 させた。入水からプラットホームに到達するまでの時 間を測定し,到達後10秒間放置し,その位置を記憶さ せた。なお,120秒経ってもプラットホームに到達し ない場合は,強制的にプラットホームまで移動させ, 10秒間放置し,その位置を記憶させた。この場合にお けるマウスの到達時間を120秒とした。

試行は1日2回行い,経口投与30-60分後に1回目の試行を行い,1回目の試行終了後60-90分の間に2 回目の試行を行った²²。これを10:00~16:00の間 で毎日繰り返して9日間行い,プラットホームまでの 到達時間を測定した。2回試行の到達時間平均値を算 出し,経時的な空間認識能の評価を行った。



【Step3:プローブテスト】

訓練セッションの最終日にプローブテストを1回 行った²³⁾。プラットホームの位置を記録した後取り除 き,訓練セッションと同様にマウスを水面に放ち,120 秒間の遊泳行動を記録した。プラットホームを置いて いた4分割での滞在時間および,仮想プラットホーム 面積を横切った回数をデータ解析の対象とし,空間認 識能を評価した。



8) 組織学的研究

8-1) 凍結スライド標本の作成

経口投与 18 週後に各群のマウスを頸椎脱臼し,左 心室生理食塩水灌流(1mL/min)により脱血し,10% ホルマリン溶液での灌流(1mL/min,15min)により 固定した。脳を摘出して,10%ホルマリン溶液で24 時間浸漬(4℃)し,さらに10%スクロース/0.1M PBS(4℃)に4時間,20%スクロース/0.1M PBSに 4時間(4℃),最後に30%スクロース/0.1M PBSに 一晩浸漬(4℃)した。次に,OCT コンパウンド(凍結 用包埋剤)を用いて凍結包埋し,クリオスタットで脳 を 9 μ m に薄切し,スライドガラスに貼り付けた。そ の後,冷風で1時間以上乾燥させ,50% EtOH に 30-60 分浸漬し, 流水で 2-4 分洗浄した後, 各染色法 により組織学的検討を行った。本研究では, 切片作製 に際し David らのラット脳における海馬の構造を参 考に行い, Fig. 2 の A 部分において薄切した。

8-2) 脳切片の染色法

ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxilin and eosin;
HE) 法に従って各群マウス脳切片標本を作成後,マイヤーのヘマトキシリン溶液で5分間染色し,流水で20分水洗した。次に1%エオジン液で2-4分染色し,10秒程度軽く水洗して,余分のエオジン液を洗い,この操作を2回繰り返した。70%,80%,90%,95%,99%(I,Ⅱ)エタノールに各10秒ずつ浸漬して弁色と同時に脱水を行い,キシレンI,Ⅱで透徹後,オイキッ

トを用いて封入した。

また、クリューバー・バレラ(Kluver-Barrera's stain; KB stain)法に従って各群マウス脳切片標本を 作成後、95%エタノールに 2-5 分浸漬し、0.1%ルク ソールファスト青液で一晩(56-60°C)染色した。染色 後、95%エタノールに1-3分浸漬し、蒸留水で3回, 各 30 秒程度すすいだ。次に0.05%炭酸リチウム水溶 液に5分浸漬し、70%エタノールに適宜3回浸けて目 的の薄さまで調整した後、蒸留水を3回替えて、各 30 秒程度すすぎエタノールを完全に除去した。さらに、 0.1%クレシル紫液にて 5-8 分染色し、95%エタノー ルに適宜3回浸けて目的の薄さまで調整した。染色 後、70%、80%、90%、95%、99%(I、II)エタノー ルに各 10 秒ずつ浸漬して弁色と同時に脱水を行い、



Fig. 2. Line drawings showing the three-dimensional organization of the hippocampal formation in the rat brain. Three coronal sections (A, B and C) are shown at different rostrocaudal levels through the hippocampal formation. CA1 and CA3, fields of the hippocampus; EC, entorhinal cortex; DG, dentate gyrus. (David G. A, Menno P. W., The rat nervous system. Second edition, Academic Press, Inc., (1995)) キシレンⅠ, Ⅱで透徹後,オイキットを用いて封入した。

9)統計

平均値の有為差検定は Dunnett を用い, p < 0.05および p < 0.01 において算出した。また, データは, mean ± S.E. で示す。また, 海馬錐体細胞数の統計的 評価は, Student t-test を用いた。

研究結果

A 抗酸化作用

1-1) SOD 様活性度

EGb 投与 30 日後の,マウス血清における SOD 様 活性度を Fig. 3 に示した。Control 群の SOD 様活性 度 21.2 ± 1.5% (n=19), Sham control 群の SOD 様 活性度 24.2 ± 1.8% (n=8) と比較して, EGb 群で は, 17.9 ± 2.2% (n=8) 値であった。3 群間に於け る有為差は認められなかった。

1-2) ルミノール測定

縦軸に測定した発光強度をとり,投与 30 日後の Control, Sham control, EGb 群の,マウス血清におけ るペルオキシラジカルに対するスカベンジング作用の 結果を Fig. 4 に示した。Control 群の発光強度 0.060 ± 0.005Kcounts (n=9) と比較して, Sham control 群 の発光強度 0.073 ± 0.005Kcounts (n=13) に有為 (p < 0.05) な発光増大が見られた。また, Sham control 群の発光強度 0.073 ± 0.005Kcounts (n=13) と比較 して, EGb 群 (0.051 ± 0.006Kcounts) (n=13) に有 為 (p < 0.01) な発光抑制が見られた。

1-3) 過酸化脂質濃度

脳、肝臓及び腎臓における過酸化脂質濃度

水迷路試験終了後の Control, Sham control 群と EGb 群のマウス脳における過酸化脂質濃度は、組織 TBARS 値により評価した (Fig. 5. a)。Control 群 1.2 ± 0.3nmol/mL (n = 12), Sham control 群 3.0 ± 0.5nmol/mL (n = 12) と EGb 群 1.8 ± 0.4nmol/mL (n = 12) であった。



Groups

Fig. 3. Effect of EGb on SOD activity (inhibition rate, %) in SAMR1 and SAMP8 serum. DW, EGb was administered (p. o., each dose was 500mg/kg body weight) for 30 days. The results represent the mean \pm S. E. (control, n=19; sham control, n=8; EGb, n=8).



Fig. 4. Effect of EGb on blood levels of antioxidation activity in SAMR1 and SAMP8 serum. DW, EGb was administered (p. o., each dose was 500mg/kg body weight) for 30 days. The results represent the mean ± S. E. (control, n= 9; sham control, n= 13; EGb, n= 13). Asterisks indicate groups significantly different from sham control at p < 0.01 (**) and p 0.05 (*).

マウス肝臓における各群の過酸化脂質濃度の組織 TBARS 値を Fig. 5. b に示した。Control 群 0.76 ± 0.1nmol/mL (n = 7), Sham control 群 2.0 ± 0.3nmol/mL (n = 7) と EGb 群 1.1 ± 0.2nmol/mL (n = 7) であった。Control 群と比較して Sham control 群では肝及び腎臓に於いて有為に過酸化脂質 濃度の増大を認めた (p < 0.01)。

マウス腎における各群の過酸化脂質濃度の組織 TBARS 値を Fig. 5. c に示した。Control 群 0.8 ± 0.1nmol/mL (n=6), Sham control 群 2.6 ± 0.2nmol/mL (n=5) と EGb 群 1.5 ± 0.3nmol/mL (n=10) であり,各臓器において Sham control 群と 比較して, EGb 群に TBARS 値の有為差は認められな かった。

4) セロトニン濃度

正常老化モデルである Control 群(SAMR1 マウス) および老化促進モデルである Sham control 群 (SAMP8 マウス)における水迷路試験・訓練トライ アル直後のマウス脳におけるセロトニン濃度の結果を Fig. 6 に示した。Control 群が 179 ± 34ng/g brain (n=6) であり, Sham control 群は 122 ± 11ng/g brain (n=4) であった。よって, SAMR1 マウスと比 較すると SAMP8 マウスではセロトニン濃度の有為差 はなかった。

EGb 投与による水迷路試験・訓練トライアル直後の マウス脳におけるセロトニン濃度の結果を Fig. 6 に 示した。EGb 群でのセロトニン濃度は, 193 ± 30ng/g brain (n=12) であった。3 群間に於けるセロ トニン濃度の有為差は認められなかった。

5) Morris 水迷路試験

空間認識の評価として Morris 水迷路試験を行い, 正常老化モデルである Control 群(SAMR1 マウス) および老化促進モデルである Sham control 群 (SAMP8 マウス)における試験結果を Fig. 7 に示し た。Control 群(SAMR1 マウス)と比較すると Sham control 群(SAMP8 マウス)と EGb 群ではプラット



Fig. 5. Effect of EGb on TBARS levels in SAMP8 brain, liver and kidney homogenate. The results represent the mean \pm S. E. (a) Brain homogenate experiment by n= 12; b) Liver homogenate experiment by n= 7; c) Kidney homogenate experiment (control, n= 6; sham control, n= 5; EGb, n= 10).

ホーム到達時間が有為に遅かった(p<0.01)。

SAMP8 マウスの EGb 群と Sham control 群のプ ラットホーム到達時間の有為差は認められなかった。

さらに,プローブテストにおいて,プラットホーム を置いていた4分割での滞在時間および,仮想プラッ トホーム面積を横切った回数を評価の対象とした。 正常老化モデルである Control 群 (SAMR1 マウス) および老化促進モデルである Sham control 群 (SAMP8 マウス) における試験結果を Fig. 8 に示し た。4 分割での滞在時間は, Control 群が45 ± 3sec (n=16) に対して, Sham control 群は25 ± 3sec (n=23) と有為に (p < 0.01) 滞在時間が減少し, 仮



Fig. 6. Serotonin concentration (ng/g brain) of SAMR1 and SAMP8 brain after water maze test. Sham control (DW; p. o., each dose was 10 mL/kg body weight) and EGb (p. o., each dose was 500 mg/kg body weight) was administered 30-60 min before the acquisition trial. The results represent the mean ± S. E. (control, n= 6; sham control, n= 4; EGb, n= 12).



Fig. 7. Latency to escape from the water. DW was administered (p. o., each dose was 10 mL/kg body weight), and EGb were administered (p. o., each dose was 500 mg/kg body weight) 30-60 min before the acquisition trial. The results represent the mean \pm S. E. (control, n = 16; sham control, n= 23; EGb, n= 12). Asterisks indicate groups significantly different from control at p < 0.01 (**).

想プラットホーム面積を横切った回数においては、 Control 群が 4.8 ± 0.5times (n = 16) に対して、 Sham control 群が 1.7 ± 0.3times (n = 23) と有為な (p < 0.01) 低下が認められた。

一方, SAMP8マウス群に於ける4分割での滞在時 間は Sham control 群と EGb 群の2 群間で有為差は認 められなかったが, EGb 群は 36 ± 5sec (n=13)の滞 在時間を示し, Sham control 群のそれの1.4 倍であっ た。

EGb 群 (SAMP8 マウス) における試験結果を Fig. 8 に示した。

仮想プラットホーム面積を横切った回数に於いても SAMP8マウス群の2群間で有為差は認められなかっ たが、Sham control 群 1.69 ± 1.5times (n=16) に対 して EGb 群 2.3 ± 1.5times (n=13) は 1.36 倍の仮 想プラットホームの横切り回数を示した。

6) 脳組織染色

6-1) ヘマトキシリン・エオジン法

EGb の長期投与後の,海馬における HE 染色による 組織学的変化の結果を Fig. 9 に示し, CA1 領域およ び CA3 領域の観察により組織学的変化を評価した。 Control 群 (SAMR1 マウス)と比較して, Sham control 群 (SAMP8 マウス)での海馬 CA3 領域での, 錐体細胞の密度が低下していた (A2, B2)。さらに, この密度低下は CA1 領域において顕著であった (A1, B1)。しかし, EGb 群では CA1 および CA3 領域にお いて細胞密度が高く (D1), Control 群の海馬領域と類 似した細胞密度を示した。

また, Control 群と比較して, Sham control 群での 海馬 CA1 領域での, 錐体細胞の密度を Table 1 に示 した。CA1 領域においては, Sham control 群と比較 して EGb 群での CA1 および CA3 領域を含めた海馬



Fig. 8. Target zone (A), platform crossings (B) of probe test. DW (Control, Sham control), and EGb were administered (p. o., each dose was 10 mL/kg body weight). DW (Sham control) were administered (p. o., each dose was 500 mg/kg body weight) 30-60 min before the acquisition trial. The results represent the mean \pm S. E. (control, n= 16; sham control, n= 23; EGb, n= 12). Asterisks indicate groups significantly different from the control at p < 0.01 (**).

全域で、著しく錐体細胞の密度が高かった。特に CA1 領域においては、Sham control 群と比較して EGb 群 での CA1 領域の錐体細胞の密度が有為に高かった(p< 0.01)。

6-2) クリューバー・バレラ法

EGb の長期投与後の,海馬における KB 染色による 組織学的変化の結果を Fig. 10 に示し, CA1 領域およ び CA3 領域の観察により組織学的変化を評価した。 また, Control 群, Sham control 群, EGb 群の組織切 片を各々 A, B, Dと表記し, 海馬領域は Fig. 9 と同 様に表記した。

Control 群 (SAMR1 マウス)と比較すると, Sham control 群 (SAMP8 マウス)では CA1 および CA3 領 域を含めた海馬全域での, 錐体細胞の密度が著しく低 下していることが明らかとなった (A, B)。これに対 して, EGb 群では CA1 および CA3 領域において細胞 密度が顕著に大きく (D), Control 群の海馬領域と類 似した細胞密度を示すことが見られた。



Fig. 9. Histopathological alterations of the hippocampal CA1 (double arrow ↑ ↑) and CA3 (arrow ↓) regions in 26-27 week-old SAM. Microphotographs of coronal sections of the hippocampus in Control (A), Sham control (B) and EGb (D) were stained with hematoxylin and eosin. Scale bar, 40µmx1 (A-D), 200µmx5 (A1-D1), 100µm x 2.5 (A2-D2)



Fig. 10. Histopathological alterations of the hippocampal CA1 (double arrow ↑ ↑) and CA3 (arrow ↑) regions in 26–27 week-old SAM. Microphotographs of coronal sections of the hippocampus in Control (A), Sham control (B) and EGb (D) were stained with Kluver-Barrera. Scale bar, 40µmx1 (A–D), 200µmx5 (A1–D1), 100µmx 2.5 (A2–D2)

	Number of surviving neurons in the CA1 region
	26-27 week-old
Control (SAMR1)	243.5 ± 4.6
Sham control (SAMP8)	$198.3 \pm 7.5^{**}$
EGb (SAMP8)	254.9 ± 6.8##

Table 1. Surviving neurons in the hippocampal CA1 region in each SAM strain

The surviving pyramidal neurons per unit length (1mm) in the entire hippocampal CA1 region were counted five times in independent fields under a light microscope. Results are the mean \pm S. E. M. of three to four independent experiments. ** P < 0.01, (Control vs Sham control); ## P < 0.01, (Sham control vs EGb), compared with 26–27 week-old SAM by Student's t-test.

考察

1) SAM モデル

SAM (Senescence Accelerated Mouse) $\exists \vec{\tau} \mathcal{N}^{^{24)}}$ は AKR/J 系マウスと他系統マウスと予期せざる交雑 を基礎にして、老化度評点、寿命、病理所見を基準に した選抜交配を繰り返すことにより開発されてきた近 交系マウスで、促進老化および正常老化をそれぞれ主 徴とする SAMP (Senescence Accelerated-prone Mouse) 14 系統および SAMR (Senescence Acceleratedresistant Mouse) 4系統よりなる。さらに, SAMP 各 系統は促進老化に加えて加齢に伴い比較的系統特異的 にさまざまの老化病態を自然発症する^{24,25)}。これらの 病態にはヒト高齢者で生理学的老化に伴い必発と考え られている病態の主要なものが含まれる。今回用いた SAMP8 マウスは学習・記憶能障害,情動障害²⁶⁾,免疫 機能異常27, 日内リズム異常28)等の病態を示し、それ らは SAMR1 マウスなどと比べて老化促進症候であ ることから、広義での認知症のモデル動物に位置づけ られている²⁹⁾。これに対して、SAMR1マウスは正常 老化をたどり, 老化度評点判定システムにより評価さ れた老化度評点の加齢に伴う増加が SAMP マウスに 比べ有為に鈍化・抑制されており²⁵⁾. コンベンショナ ル飼育 SAMR1 マウスの寿命 (50% 生存) は SAMP マ ウスに比べ 40% 長いことから。研究において SAMP マウスの対照として用いられることが多い。

2) 抗酸化作用

AD の疫学的特徴は、加齢に伴い有病率が増加する ことであり¹⁹⁾、加齢に伴う退行性変化の一つに OS が 密接に関連することは広く知られている²⁰⁾。酸素を利 用しエネルギーを得る生体内では、常に活性酸素種

(reactive oxygen species; ROS) が産生されている。 ROS はその高い反応性からタンパク質,脂質,DNA などの機能分子を修飾することで,細胞機能の障害を 引き起こす。細胞は ROS に対する防御機構を備えて いるが,細胞の内外で過剰に産生される ROS を十分 に処理できないときに OS が生じる。AD を含めた神 経変性疾患の発症に ROS の関与が指摘されている³⁰。 また、生体の OS 防御に関わる物質は、SOD、グルタ チオン・ペルオキシダーゼなどのフリーラジカル発生 防止型抗酸化物質、ビタミン C、ビタミン E、フラボ ノイドなどのフリーラジカル捕捉型抗酸化物質、およ びリパーゼ、プロテアーゼなどの酸化傷害修復酵素に 分けられる³¹⁾。

EGb の中でも EGb761 は, 医薬品 (脳循環改善薬) と して承認されており³²⁾, 欧州をはじめ広く使用され³³⁾, 多くの臨床データが蓄積された特許製法で抽出された エキスである。EGb761 は *in vitro* において AAPH や AMVN (2,2-azobis (2,4dimethylvaleronitrile) などの アゾ化合物から発生するペルオキシラジカルを消去 し, アゾ化合物による LDL (low-density lipoprotein) の酸化を抑制し, これらの活性酸素種に対する消去作 用の主な成分はフラボノイドであることが報告されて いる³⁴⁾。

本研究では、AAPH 由来のペルオキシラジカルの 消去能を抗酸化作用の指標として評価した結果、 Sham control 群 (SAMP8)の発光強度と比較して Control 群 (SAMR)の発光強度に有為な発光抑制が 見られた。

本研究では、O₂一分解酵素である SOD 様の活性度 および AAPH 由来のペルオキシラジカルの消去能を 抗酸化作用の指標とし、EGb の抗酸化作用に対する影 響を検討した。EGb 群において SOD 様の活性は認め られなかったが、AAPH 由来のルミノール発光強度 が顕著に抑制されたことから、AAPH によるマウス 血清の抗酸化によって生じたペルオキシラジカルが EGb によってスカベンジングされ、その結果生体内の OS が減弱されたことが推察される。従って、EGb は、 認知症の予防およびこれらの疾病の進行を防ぐと考え られる。

3) 過酸化脂質濃度

AD の患部では, 脂質過酸化反応の指標となる TBARS の蓄積が見られる³⁵⁾。また, 平井ら³⁶⁾は, Wistar 系ラットの脳内 TBARS を測定し,老化に伴 う過酸化脂質の増加を最初に報告している。その後, 内山ら²⁰⁾ がラット脳,肝臓,腎臓において,武内³⁷⁾ ら がラット血清,肝ミクロソームにおいて老化に伴う TBARS の上昇を報告している。SAM マウスを用い た縦断的研究においても,過酸化脂質の上昇が老化症 状の発現に先行することを見出し,フリーラジカルに よる脂質過酸化反応が直接的に老化促進に関与するこ とが明らかとなった³⁸⁾。また,SAMP マウスの血清 TBARS は SAMR マウスと比較して,生後 2-8ヶ月後 に上昇傾向を認め³⁹⁾,肝組織ならびに皮膚組織におい ても同様な変化を示す⁴⁰⁾ ことが報告されている。

EGb761 を用いた *in vitro* 実験において,濃度依存 的に自動酸化を抑制し,肝ミクロソームを用いた検討 においても濃度依存的に脂質過酸化反応を抑制するこ とが報告されている⁴¹⁾ また,マウスにおいては,脳皮 質線条体脂質過酸化生成物の増加を抑制⁴²⁾,ラットに おいては,虚血再灌流後に増加する脳組織内過酸化脂 質の増加を EGb761 は有為に抑制し⁴³⁾,過酸化水素に よって誘導される培養細胞のアポトーシス⁴⁴⁾ や過酸 化脂質の増加も抑制傾向が見られた⁴⁵⁾。

本研究では、SAMP8 マウス脳、肝臓、腎臓における TBARS を測定し、各臓器における EGb および LPC (lysophosphatidylcholine)の脂質過酸化への影響を 検討した。

AAPH によって生じたペルオキシラジカル量は過 酸化脂質量とある程度相関すると考えられるので, EGb によるペルオキシラジカル量の低下は脳・肝臓・ 腎臓の過酸化脂質量低下を引き起こすと推察された が、実際は Sham control 群と EGb 群とで有為差は認 められなかった。しかしながら、EGb 群の平均値は常 に Sham control 群のそれより低い値であったことか ら、実験数を増やす等、更なる研究が必要と考える。

4) セロトニン濃度

記憶は,多くの神経構造および神経伝達物質システムを含む高度に複雑な過程からなる。これまでにコリン及びグルタミン系システムが注意,学習および記憶

機能などの認知過程と結び付けられており40, さらに, セロトニン(5-HT)が高次の認知過程において重要 な役割を果たすことが示唆されている470。5-HT 受容 体サブタイプの中でもとくに 5-HT1A 受容体は辺縁系, なかでも学習と記憶に重要な役割を有することが明ら かとされている48)海馬領域に高い分布を示す49。ま た, セロトニンは情動にも関連しており, 5-HT アゴ ニストにおいて、心理テストで計測される怒りや攻撃 性を低下させることが示されている500 ことから、セロ トニンは認知症の周辺症状である情動障害に関与して いることが考えられる。一方, AD 病脳において, 多 くの神経伝達物質に異常が生じることが知られてお り⁵¹⁾, セロトニンと関係の深い縫線核, 上中心核, 背側 被蓋核の神経細胞数が減少していることが報告されて いる⁵²⁾。また,著者らは Lysolecithin 投与により SAMP8マウス血清において、セロトニン濃度が増加 することを明らかとした⁵³⁾。そこで本研究では、EGb における SAM マウスの脳内セロトニン濃度への影響 について検討した。脳内セロトニン濃度に関して3群 間で統計的有為差は認められなかった。抗酸化作用を 示す Lysolecithin は血清セロトニン量の増加をもたら したことから EGb の血清セロトニン量に対する作用 やLysolecithinの脳内セロトニンに対する作用, また アセチルコリン等の神経伝達物質に対する EGb の作 用等、更なる研究が必要と考える。

5) Morris 水迷路試験

本実験で試行した Morris 型水迷路には関連学習が 必要であり,迷路の中を移動するために,迷路の壁ご しにみえる特定の目印へ進むことを学習する⁵⁴⁾。この Morris 水迷路試験は,マウス個体を用いた実験手法 としてゴールデンスタンダードとなっている3つの実 験方法の1つであり,空間情報を手がかりとした退避 行動を利用するもので,空間記憶を評価することがで きる。

本研究では, EGb における SAM マウスの水迷路試 験を行い空間認識能の評価を行った。

SAMR1 マウスの Control 群と SAMP8 マウスの

Sham control 群を比較すると、訓練セッション開始1 日目から最終日まで、Sham control 群の有為な到達時 間の延長が認められ、さらにプローブテストにおいて も、4分割での滞在時間および仮想プラットホーム面 積の横切り回数の顕著な増加が認められた。また、 Sham control 群では試験7日目まで到達時間の短縮 は見られず、経時的変化は認められなかった。このこ とより、正常老化である SAMR1 マウスと比較すると 老化促進系である SAMP8 マウスでは空間認知に於け る学習・記憶障害を確認した。

Control 群と比較して Sham control 群及び EGb 群 で有為な差が認められ、Sham control 群と EGb 群で は有為差は認められなかったが,投与4日以降の到達 時間の平均値に於いて常に EGb 群は Sham control 群 より Control 群により近い値を示した。また,横切り 回数の平均値に於いても同様であった。また、 Control 群に比し、有為に Sham control 群で差を認め たにもかかわらず,EGb 摂取により有為差が無くなっ たので,EGb 摂取は SAMP8 の水迷路試験に対して有 効であると考えられる。EGb 投与による海馬錐体細 胞の細胞死抑制は空間認知学習・記憶障害の改害を示 唆することから,EGb 投与量の増加,実験数の増大, 或いは長期観察等はこの傾向をより顕著にするかもし れない。更なる研究が必要となるだろう。

6) 脳の組織学的変化

認知症の多くは神経細胞の著しい減少に起因して発 症することが明らかとされ,海馬が記憶と深く関係す ることは動物を用いた実験例で確かめられている。海 馬は歯状回, CA1, CA3,海馬台(とその下位領域)で 構成されている。海馬への最も重要な入力部位は嗅内 皮質であり⁵⁵⁾,歯状回, CA1, CA3に終止する軸索を もつニューロンが存在している。重要な空間情報は, 嗅内皮質と CA1 の直接結合により海馬へ入力され る⁵⁶⁾。Morris は,海馬スライスの標本において CA1 の錐体細胞領域における NMDA 受容体アンタゴニス ト投与のラットにおいて水迷路試験の成績が低下する ことを報告した²¹⁾。また, Riedel らは海馬抑制がすで に学習した課題の遂行を阻害することを見出しており,固定のみならず空間記憶の想起にも海馬が必要なことを示している⁵⁷⁾。さらに,10ヶ月齢のSAMR1マウスと比較してSAMP8マウスの海馬CA1領域では神経細胞が減少していることが報告されている⁵⁸⁾。

本研究での組織学的変化の観察については, David らのラット脳における海馬の構造を参考に行い, SAMマウス海馬における CA1 および CA3 領域の判 定を行った⁵⁸⁾。げっ歯類海馬の CA3 錐体細胞はアー チ型をしており, 錐体細胞が密に詰まっていて極端に 色素が濃くなっている。これに対して CA1 領域の神 経細胞層は薄く,詰まっており, CA3 錐体細胞より明 らかに CA1 細胞が小さいため, Fig. 9, 10 の↑↑部分 を CA1 領域, ↑部分を CA3 領域と判断した⁵⁸⁾。

HE 染色および KB 染色の結果, Control 群 (SAMR1 マウス)と比較して, Sham control 群 (SAMP8 マウ ス) での CA1 および CA3 領域を含めた海馬全域で, 著しく錐体細胞の密度が低下していた。このことか ら,老化促進により海馬における神経細胞が減少し, 空間情報の入力能が低下した結果,水迷路試験での空 間認識能評価が低くなったと推察された。

一方, EGb 群での CA3 領域の細胞密度は, Sham control 群よりも増加していた。また, CA1 領域にお いては, Sham control 群と比較して EGb 群での CA1 および CA3 領域を含めた海馬全域で, 著しく錐体細 胞の密度が高かった。特に CA1 領域においては, Sham control 群と比較して EGb 群での CA1 領域の 錐体細胞の密度が有為に高かった (Table 1)。した がって, 海馬における神経細胞 (CA1 領域) が密にな り, CA1 の直接結合によって記憶改善が期待される。

参考文献

- 1) Alzheimer A: Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg. Z. Psychiat. **64**, 146–148, 1907.
- Selkoe DJ: Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature, 399, A 23-31, 1999.
- 3) Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al.: Association

of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature, **393**, 702-705, 1998.

- Bowen DM, Smith CB, White P, et al.: Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. Brain, 99, 459-496, 1976.
- 5) Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, et al.: Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br. Med. J., 2, 1457–1459, 1978.
- 6) Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al.: Inflammation and Aazheimer's disease. Neurobiol. Aging, 21, 383-421, 2000.
- Harman D: Aging a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol., 11, 298–300, 1956.
- Alzheimer A: Die Seelenstoerungen auf arteriosklerotischer Grundlage. Allg. Z. Psychiat.
 59, 695-711, 1902.
- 9) Zhou YH, Yu JP, Liu YF, et al.: Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-a, NF-κBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. Mediators Inflamm., 5, 1-9, 2006.
- Smith PF, Maclennan K, Darlington CL: The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). J. Ethnopharmacol., 50, 131–139, 1996.
- Ahlemeyer B, Kriegelstein J: Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. Amerrican Chemical Society, Washington D. C. 1998.
- 12) Vogt W: Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. Biochem. Pharmacol., 12, 415-420, 1963.
- 13) Rogers SL, Friedhoff LT: The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-

Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. Dementia, 7, 293–303, 1996.

- 14) Dumont E, D'Arbigny P, Nouvelot A: Protection of polyunsaturated fatty acids against irondependent lipid peroxidation by a Ginkgo biloba extract (EGb 761). Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 17, 83-88, 1995.
- 15) Morley JE, Farr SA, Kumar VB, et al.: Alzheimer's disease through the eye of a mouse. Acceptance lecture for the 2001 Gayle A. Olson and Richard D. Olson prize. Peptides 23, 589–599, 2002.
- 16) Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, et al.: Betaamyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. Peptides. 21, 1761–1767, 200.
- 17) Butterfield DA.: Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. Free. Radic. Res., 36, 1307-1313, 2002.
- 18) Butterfield AD, Howard BJ, Yatin S.: Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-aphenylnitrone. Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 674–678, 1997.
- 19) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase.J. Biol. Chem., 244, 6049–6055, 1969.
- Uchiyama M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem., 86, 271–278, 1978.
- Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, et al.: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature, **319**, 774–776, 1986.
- 22) Nunomura A, Tabata K, OhibaS, et al.: Temporal primacy of oxidative stress in the pathological

cascade of Aozheimer disease. In oxidative stress and age-related neurodegeneration. CRC press Boca Raton, 365-372, 2005.

- 23) Nunomura A, Moreira PI, Zhu X, et al.: The role of oxidative insult and neuronal survival in Alzheimer and Parkinson diseases. In Alzheimer's and Parkinson's diseases: Insighrs, progress and perspectives. Springer New York, 2005.
- 24) Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al.: A new murine model of accelerated senescence. Mech. Ageing Dev., 17, 183-194, 1981.
- 25) Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, et al.: Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescense accelerated mouse (SAM). Mech. Ageing Dev., 26, 91-102, 1984.
- 26) Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, et al.: Senescence-accelerated mouse (SAM): agerelated reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. Physiol. Behav., 51, 979-985, 1992.
- 27) Abe Y, Yuasa M, Kajiwara Y, et al.: Defects of immune cells in the senescence-accelerated mouse: a model for learning and memory deficits in the aged. Cell Immunol., 157, 59–69, 1994.
- 28) Powers DC, Morley JE, Flood JF: Age-related changes in LFA-1 expression, cell adhesion, and PHA-induced proliferation by lymphocytes from senescence-accelerated mouse (SAM) -P/8 and SAM-R/1 substrains. Cell. Immunol., 141, 444-456, 1992.
- 29) Butterfield DA, Poon HF: The senescenceaccelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. Exp. Gerontol., 40, 774-783, 2005.
- 30) Nunomura A, Zhu X, Moreira PI, et al.: Involvement of oxidative stress in the early-stage

of Alzheimer's disease; Implications for therapeutics. In Progress in Alzheimer's disease research, Nova Science Publishers, 2005.

- Smith CD, Carney JM, Tatsumo T, et al.: Protein oxidation in aging brain. Ann. NY Acad. Sci., 663, 110–119, 1992.
- 32) Eckmann F, Schlag H: Controlled double-blind study for the determination of the effect of Tebonin forte in patients with cerebrovascular insufficiency. Fortschr. Med., 100, 1474–1478, 1982.
- 33) Rai GS, Shovlin C, Wesnes KA: A double-blind placebo controlled study of Ginkgo biloba extract ('tanakan') in elderly outpatients with mild to moderate memory impairment. Curr. Med. Res. Opin., 12, 350-355, 1991.
- 34) Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, et al.: Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. Biochem. Pharmacol., 49, 1649-1655, 1995.
- 35) Behl C: Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. Prog. Neurobiol., 57, 301-323, 1999.
- Yoshikawa M, Hirai S: Lipid peroxide formation in the brain of aging rats. J. Gerontol., 22, 162–165, 1967.
- 37) Takeuchi N, Tanaka F, Katayama Y, et al.: Effect of alpha-tocopherol on thiobarbituric acid reactive substances in serum and hepatic subcellular organelles and lipid metabolism. Exp. Geront., 11, 179–185, 1976.
- Yoshikawa T, Naito Y, Kondo M: Free radical involvement in the aging process. Neurosciences, 16, 603-612, 1990.
- 39) Yagi K, Yoshino K, Komura S: Lipie peroxide lecels in senescence-accelerated mouse. J. Clin. Biochem. Nutr., 5, 21-27, 1988.
- 40) Komura S, Yoshino K, Kondo K : Lipid peroxide levels in the skin of the senescence-accelerated

mouse. J. Clin. Biochem. Nutr., 5, 255-260, 1988.

- 41) Kawas C, Resnick S, Morrison A, et al.: A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore longitudinal study of aging. Neurology, 48, 1517–1521, 1997.
- 42) Le Bars PL, Katz MM, Berman N, et al.: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North american EGb study group. JAMA, 278, 1327–1332, 1997.
- 43) Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB: Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect ? Neurology, 49, 1491–1497, 1997.
- 44) Wei T, Ni Y, Hou J, et al.: Hydrogen peroxideinduced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by Ginkgo biloba extract. Pharmacol. Res., 41, 427-433, 2000.
- 45) Kose K, Dogan P: Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. 2. Comparison of the antioxidant effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) with those of water-soluble and lipid-soluble antioxidants. J. Int. Med. Res., 23, 9-18, 1995.
- 46) Winkler J, Suhr ST, Gage FH, et al.: Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. Nature, 375, 484–487, 1995.
- 47) Meneses A: 5-HT system and cognition. Neurosci. Biobehav. Rev., 23, 1111-1125, 1999.
- Press GA., Amaral DG, Squire LR : Hippocampal abnormalities in amnesic patients revealed by highresolution magnetic resonance imaging. Nature, 341, 54-57, 1989.
- 49) Buhot MC, Martin S, Segu L: Role of serotonin in

memory impairment. Ann. Med., 32, 210-221, 2000.

- 50) Coccaro EF, Kavoussi RJ: Fluoxetine and impulsive aggressive behavior in personalitydisordered subjects. Archives of General Psychiatry, 54, 1081-1088, 1997.
- 51) Hardy J, Adolfsson R, Alafuzoff I, et al.: Transmitter deficits in Alzheimer's disease. Neurochem. Int., 7, 545-563, 1985.
- 52) Coleman PD, Flood DG: Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging, 8, 521–545, 1987.
- 53) Itokawa Y, Kozu A, Nakamura T, et al. : Effects of K. Lysolesithin on blood levels of monoamines in mice. J. Trad. Chin. Med., 27, 212–219, 2007.
- 54) Eichenbaum H, Stewart C, Morris RGM: Hippocampal representation in place learning. J. Neurosci., 10, 3531–3542, 1990.
- 55) Miller VM, Best PJ: Spatial correlates of hippocampal unit activity are altered by lesions of the fornix and entorhinal cortex. Brain Res., 194, 311-323, 1980.
- 56) McNaughton BL, Leonard B, Chen L: Cortical hippocampal interactions and cognitive mapping: A hypothesis based on reintegration of the parietal and inferotemporal pathways for visual processing. Psychobiology, 17, 230–235, 1989.
- 57) Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, et al.: Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. Nat. Nurosci., 2, 898–905, 1999.
- 58) Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, et al.: The agerelated degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. Biol. Pharm. Bull., 28, 615–618, 2005.

Effect of Ginkgo biloba on aging of senescenceaccelerated mouse (SAM) P8 strain : quantitative studies of systemic oxidative stress, 5-hydroxytryptamine in the brain, spatial learning and hippocampal neurons

Yeunhwa GU^{1,3)}, Yuka ITOKAWA¹⁾, Tota INOUE¹⁾, Junko TANAKA¹⁾, Kenji MARUYAMA¹⁾, Michinao YAMAGUCHI¹⁾, Hidetaka ITO¹⁾, Noriko SUZUKI¹⁾, Masami OSHIMA¹⁾, Ki-Mun KANG²⁾, Takenori YAMASHITA¹⁾ and Torao ISHIDA^{1,3)}

¹⁾Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science

²⁾Department of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

³⁾High-Tech Research Center, Suzuka University of Medical Science

Key Words: Dementia, Superoxide anion radical (SOD), Peroxyradical, Lipid peroxide (LPO), Morris water maze

-Abstract-

Ginkgo biloba extract (EGb) is prescribed for Alzheimer's disease (AD) in Europe and many controlled clinical trials justify its prescription. Experimentally, EGb is known to have actions on membrane lesions caused by active oxygen, neurotransmission with glutamate, acetylcholine and serotonin, learning and memory. However, there are a few reports concerning its effect on the animal models of dementia. The P/8 line of the senescence-accelerated mouse model (SAMP8) is known as a murine model of accelerated aging and memory dysfunction that becomes progressively worse with age.

The impairment of learning and memory is thought to be derived from an increased oxidative stress status in the brain of SAMP8. Some pathological studies emphasize the similarity in brain lesions between AD and SAMP8. SAMP8 will be a useful animal model for studying the fundamental mechanism involved in AD.

By Morris water maze, a remarkable shortening of arrival time was found when we compared the sham control group (SAMP8) with the control group (SAMR1). Furthermore, in pre-test, stay time with division into 4 a remarkable increase of the cutting across the number of times of a virtual platform area was found. A shortening of arrival time was seen in the whole examination, and EGb group had a shorter platform arrival time than the

sham control group.

Comparing the sham control with EGb treated group, serum peroxyradical was not significantly inhibited in an EGb treated group. In the hippocampus area we compared the EGb group with sham control group, and was able to include CA1 and CA3 lesion, we noticed, the CA1 lesion density of a cone cell was high. We compared the EGb group with sham control group, and in a CA1 lesion, the density of a cone cell of a CA1 lesion was in particular significantly high. Therefore, a nerve cell (CA1 lesion) in a hippocampus becomes dense, and memory improvement is expected by a nerve cell of CA1.