



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

S-アリルシステインを活性本体とする熟成ニンニク抽出物による学習記憶能の改善効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 雅和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81594

S-アリルシステインを活性本体とする
熟成ニンニク抽出物による学習記憶能の改善効果

Improvement of Learning and Memory in Senescence-Accelerated Mice
by S-Allylcysteine in Garlic Extract

2020 年度

橋本 雅和

目次

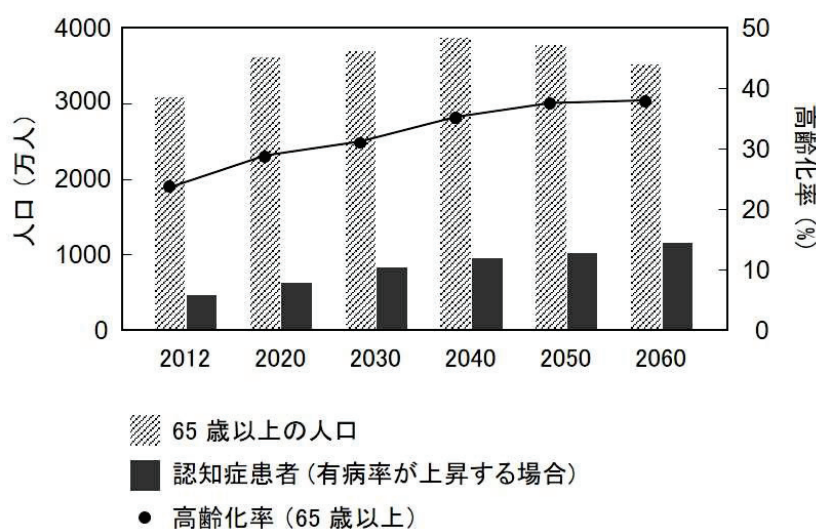
第 1 章 序論	4
1.1 超高齢化社会における認知症および軽度認知障害とその治療法	4
1.2 海馬と記憶	10
1.3 老化促進モデルマウスを用いた抗老化研究	17
1.4 熟成ニンニク抽出物および S-アシルシステインの脳に与える影響	18
1.5 本研究の目的	22
第 2 章 実験材料および方法	23
2.1 低温熟成ニンニク抽出物	23
2.2 初代培養海馬神経細胞の調製および培養	25
2.3 免疫蛍光染色および画像定量解析	26
2.4 行動学習試験	26
2.4.1 Y 字型迷路試験	27
2.4.2 ステップスルー型受動回避試験	28
2.4.3 新奇物体認識試験	30
2.5 イムノブロット解析	31
2.6 統計学的解析	32
第 3 章 結果	33
3.1 初代培養海馬神経細胞の神経総突起長および突起数に対する熟成ニンニク抽出物および S-アシルシステインの効果	33
3.2 行動学習試験に対する熟成ニンニク抽出物および S-アシルシステインの効果	35
3.2.1 Y 字型迷路試験	35
3.2.2 ステップスルー型受動回避試験	36
3.2.3 新奇物体認識試験	38
3.3 シナプス後膜受容体および記憶形成関連分子に対する熟成ニンニク抽出物および S-ア	

リルシステインの効果	39
第 4 章 考察	42
第 5 章 総括	49
謝辞	50
引用文献.....	51
略語一覧.....	73

第 1 章 序論

1.1 超高齢化社会における認知症および軽度認知障害とその治療法

認知症のリスク低減は、「Global Action Plan」に掲げる戦略的行動領域のひとつであり、この難題に対する精力的な取り組みが促されている。認知症を引き起こす病気は、脳の神経細胞の機能が低下していく神経変性疾患や、脳の血管の病気が原因となる脳血管疾患等があり、神経変性疾患を起因とする認知症は約 70% を占める。神経変性疾患は中枢神経系に発症し、神経細胞群の構造や機能が欠落し、脳の神経細胞の数が徐々に減少する現象である (1)。認知機能に関係する脳内の神経細胞が障害を受けると恒常性を維持することができず、認知症等の認知障害を発症する。認知症の要因として、遺伝的要因による家族性アルツハイマー病 (2)、動脈硬化による高血圧症 (3)、糖尿病による高血糖やインスリン代謝の異常 (4) が多数報告されている。近年、Lancet の認知症予防・介入・ケア委員会の専門家による見解では、認知症発症抑制へのリスク因子の寄与割合として、生活習慣病である中年期の高血圧は 2%、肥満は 1%、高齢期の糖尿病は 1% とされ、非常に低く推計されている (5)。本国では、福岡市に隣接した糟屋郡における久山町研究から、糖尿病の罹患は認知症の発症リスクと相関しており、病理学的にも老人斑の出現および海馬の萎縮の進行と有意に関連していることから、糖尿病のリスク因子としての寄



内閣府, 平成29年版高齢社会白書 (10) を一部改変

図 1 高齢者 (65 歳以上) の人口と認知症患者の将来推計

与は大きく推計されている(6-8)。神経変性疾患が原因の認知症には、脳の神経細胞の数が徐々に減少するアルツハイマー型認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症等が挙げられる。2012年の日本の認知症高齢者数は462万人であり、65歳以上の高齢者の約7人に1人(有病率:15.0%)であったが、認知症の有病率と有意な関連を示す糖尿病の頻度を考慮すると、2030年に830万人(有病率:22.5%)、2060年には1154万人(有病率:33.3%)と推計されている(図1)(4,9-11)。また、最も発生頻度が高いアルツハイマー型認知症は、2012年には314万人であり、2030年に579万人、2060年には816万人と推計されている(11)。アルツハイマー病の病理学的特徴は、早期に老人斑が見られ、その後に神経原線維変化が生じ、神経細胞の変性および脱落が生じる(1)。老人斑は細胞外に沈着するアミロイドβ(Aβ)により形成され、神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウタンパク質が細胞内に蓄積する。神経原線維

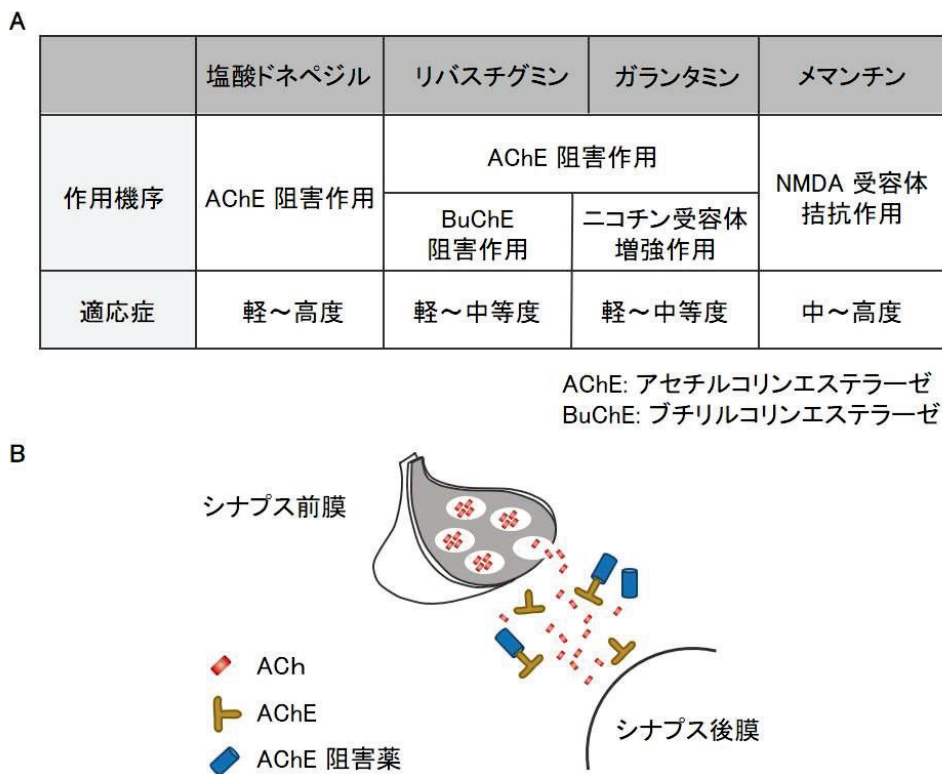
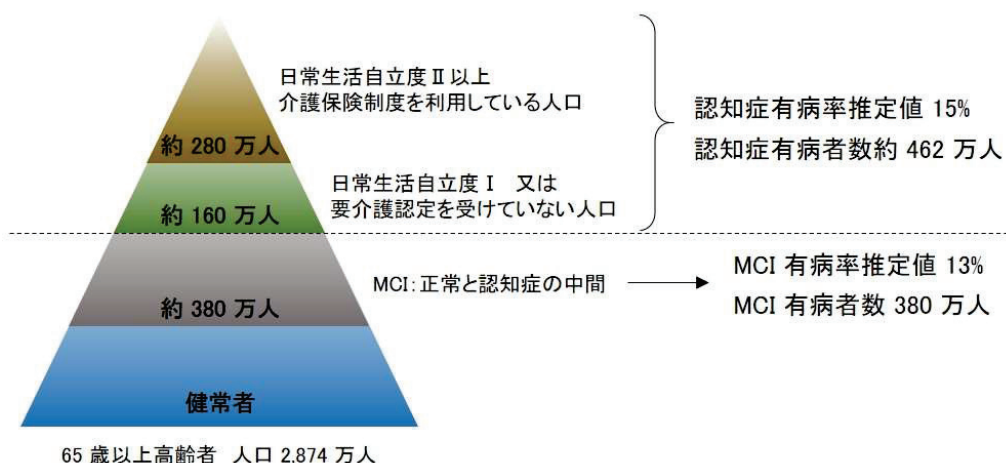


図2 アルツハイマー型認知症の主な治療薬

- A, アセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害薬とNMDA受容体拮抗薬のグループに分けられる。
 B, AChE阻害薬は、神経伝達物質のアセチルコリンを分解するAChEの働きを阻害し、脳内アセチルコリンレベルを増加させる。

変化はアルツハイマー病以外にも見られるが、 $A\beta$ の蓄積および神経毒性の発症との関連はアルツハイマー病と関連性が高く (12)、 $A\beta$ がアルツハイマー病の主たる原因とするアミロイドカスケード仮説が強く支持されている。また、家族性アルツハイマー病の遺伝的要因とされるアミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) やプレセニリン-1 および -2 の変異が $A\beta$ を増加させることも、支持される仮説の理由として挙げられている (13)。現状では、神経回路網の働きを維持するための神経伝達物質のコントロールを目的とした薬剤はいくつか本国で実用化され、保険適応となっている。アルツハイマー病ではアセチルコリン (ACh) 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が低下し、神経伝達物質を必要とする系の活動低下がみられることから (14, 15)、ACh を分解するコリンエステラーゼ (AChE) の阻害薬が症状進行阻止効果を示し、塩酸ドネペジル (16)、ガランタミン (17)、リバスチグミン (18) が使用されている (図 2)。また、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の神経伝達が過剰興奮すると神経細胞死をもたらすことから、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (以下、NMDA 受容体) 阻害薬であるメマンチン (19) が中等度から高度のアルツハイマー病の治療薬として使用されている。しかし、これら薬物は対症的治療薬であり、吐き気や食欲不振等の副作用も生じる (19, 20)。一方で、大脳皮質の老人斑やアミロイドアンギオパチーの原因となる $A\beta$ 、あるいは神経原線維の構成成分で

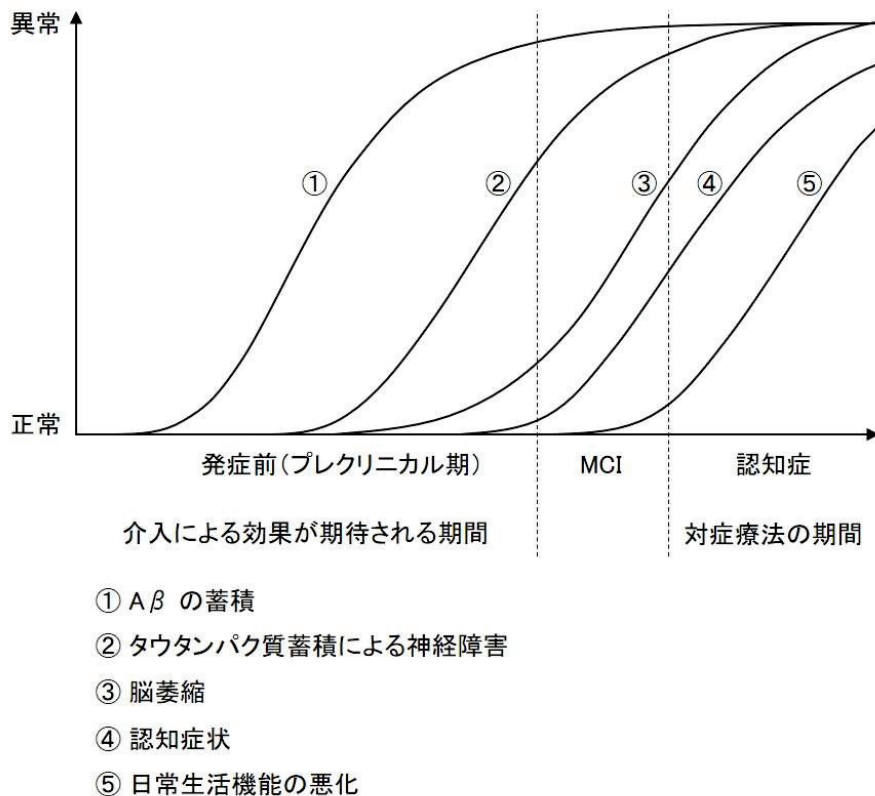


朝田隆, 厚生労働科学研究費補助金 (認知症対策総合研究事業) 「都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応」2013 (23) を一部改変

図 3 MCI の位置付けと有病者数

あるタウタンパク質の凝集や過剰リン酸化を阻害する治療法の開発が現在も続けられている。また、抗酸化物質が豊富なフルーツや野菜を摂取すると疾患の発症リスクを下げる事が可能なことより (21)、それらはブレインフードと呼ばれ、サプリメントとして開発されている。

記憶障害が見られるが認知機能は保たれ、日常生活に影響がない、健常でも認知症でもない状態である軽度認知障害 (mild cognitive impairment: MCI) がある (22)。本国の 65 歳以上の高齢者の MCI の有病率は 13% であり、約 380 万人が MCI 有病者であると推計されている (図 3) (23)。あるコホート研究において、70 歳以上の MCI 有病者は、1 年で 5.4%、2 年で 16.1%、3 年で 23.4%、4 年で 31.1%、5 年で 42.5% が認知症を発症するが、38% 程度は 5 年後に正常な認知機能に回復する報告もあることから (24, 25)、MCI は認知症の前駆状態であり、改善可能な期間と考えられている。しかし、重要な期間であるにもかかわらず、MCI は疾患に該当しないため、上述した治療薬を使用することができない。アルツハイマー病の発症の 20 年程前から予防効果



Jack, C.R. Jr., et al. *Lancet Neurol.* 2010, 9, 119-128. (26) を一部改変

図 4 Aβ 進行に伴うバイオマーカーの推移

のある介入を行うことが近年では推奨され、その期間はプレクリニカル期（図 4）(26) と呼ばれている。A β オリゴマーは可溶性であり、神経毒性を有し、記憶や認知機能を担うシナプ스에 障害を与えることが知られており (27, 28)、20 年かけて A β 凝集体を形成して脳内に蓄積するためとされている。しかし、目立った症状がない時期に介入する難しさや、アルツハイマー型認知症等の変性疾患の原因は不明な部分が多いことから、根本的な介入方法および治療法はまだ確立されていない。海外では、MCI に対する薬物療法の報告があり、AChE 阻害剤である塩酸ドネペジルを無作為化対照試験で検討し、アルツハイマー病の発症を 12 か月遅延させる結果が得られている。また、遺伝的要因のリスク因子として知られるアポリポ蛋白 E の対立遺伝子 ϵ 4 保有者においても、3 年間の発症遅延効果が確認されている (29)。

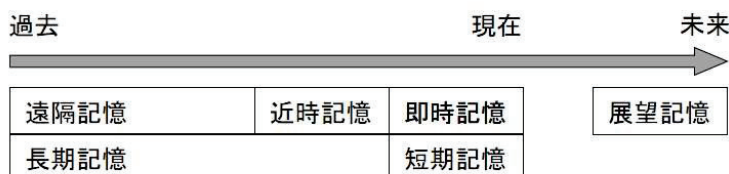
認知機能の検査には、短時間で可能な改定長谷川式認知症スケール、Mini-cog、ミニメンタルステート検査 (mini-mental state examination: MMSE) 等が推奨され、それらの得点により進行度が診断される方法が一般的に行われているが、これらの検査結果のみで認知症や MCI と診断することは極めて困難であり、血液検査や脳の CT・MRI 検査で精密に脳機能状態を判定する必要がある。近年、早期のアルツハイマー病や MCI を見出すためのスクリーニング方法として、脳内から脊髄液に排出される A β 毒性に対する防御機構を担うアポリポ蛋白 A1、トランスサイレチンおよび補体タンパク質の非活性型 C3 の血中濃度を測定する方法が注目されている (30)。これらの血中濃度は加齢においても減少するが、MCI や認知症でも顕著に低下することが知られ、プレクリニカル期から早期の MCI では非活性型 C3 およびアポリポ蛋白 A1 が、MCI から早期のアルツハイマー病ではアポリポ蛋白 A1 およびトランスサイレチンの変化が有意であり、高感度で健常者、MCI、アルツハイマー病を識別することが可能とされている (31)。これら方法によって、症状の進行の早い段階で適切な介入を行うことで、認知症を予防することが可能とってきている。

MCI の治療法は根本的な介入方法および治療法として確立されていないことから、非薬物的である栄養学的アプローチが進められている。その方法は、アルツハイマー病の発症および進行予防に影響を与える可能性が示唆されている上、費用対効果が高く、実施が容易で、社会的に受け入れられ、一般的に安全であり、重大な有害事象がほぼないという利点がある (32)。そのため、

MCI またはそれ以前から予防可能な栄養素の候補が挙げられている。しかしながら、特定の栄養素、植物、食事パターンと認知症の発症予防および進行抑制を示す確定的な結果が得られていないのが現状である。以下、それらの一部を示すが、ビタミン C や E 等は抗酸化物質として機能し、酸化ストレスや炎症から脳細胞を守り、アルツハイマー病の発症を予防する (33, 34) 報告がある。一方で、中年期にそれらを摂取しても、晩年期の発症を予防できない (35) という報告もある。また、葉酸、ビタミン B6、B12 および D の欠乏が認知症の発症リスクを上昇させる (36, 37) ことが報告されており、それらの摂取はアルツハイマー病に有用とされている。不飽和結合を 2 つ以上有する多価不飽和脂肪酸には、脂質異常症や動脈硬化の予防にも使用されるエイコサペンタエン酸 (EPA) や脳細胞膜を形成するリン脂質の成分であるドコサヘキサエン酸 (DHA) があり、魚油に多く含まれている。その根拠から、魚の継続摂取によりアルツハイマー病の発症リスクを低下させるという大規模調査の結果が報告されているが (38)、DHA および EPA を 24 か月間摂取した無作為化対照試験では認知症に対する効果が得られなかった (39) ことや、90 日間、または、6 か月間の摂取による試験においては、MCI のみ有用であったことが報告されている (40, 41)。観察研究の大多数は、DHA の認知機能に対する有用性を示しているが、10 報の無作為化対照試験によるメタ解析では認知機能低下への遅延効果は認められていない (42)。他にも、茶と認知機能に関する報告では、緑茶カテキンの主成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、 $A\beta$ の凝集阻害を介した神経保護効果を示す (43, 44) こと、65 歳以上の日本人高齢者に緑茶を摂取させた前向きコホート研究では、緑茶の摂取頻度が高いほど認知症の発症リスクが低下したことが報告された (45)。ドイツの前向きコホート研究では、75 歳以上の高齢者では、緑茶の摂取は認知症の発症や認知機能の低下に関与しないと報告されたが、その理由として、アジア地域との人種差による代謝反応の差による影響が示唆されている (46)。食文化が大きく異なる日本では難しいが、欧米では、地中海食は MCI およびアルツハイマー病の発症リスクを低下させ、進行リスクの低下に関連していることが報告されている (47)。また、系統的レビューとメタ分析によって、地中海食は想起や作業記憶等の認知機能を改善させるが、注意力や処理速度等には影響しないことが報告されている (48)。これらのように、試験条件や地域により解釈が異なり、栄養学的アプローチは有用性の判断が難しいのが現状である。

1.2 海馬と記憶

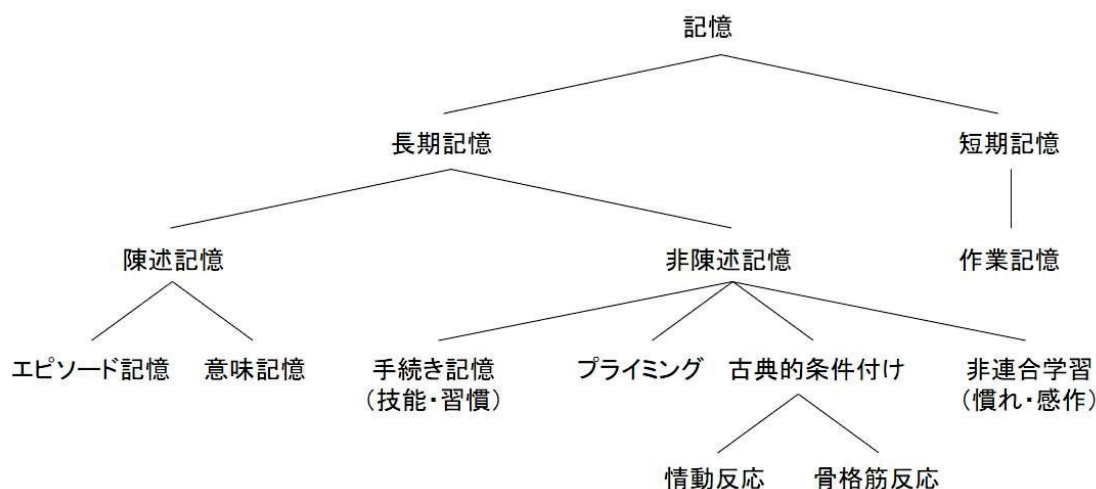
外部環境の情報は、感覚器を介して感覚情報（視覚、聴覚、味覚等）に置き換えられ、記憶として保たれる。記憶は短期記憶および長期記憶に大別されているが、これらは認知心理学領域で用いられてきた用語であり、臨床神経学領域では、即時記憶、近時記憶、遠隔記憶に分類される（図 5）(49)。即時記憶は数字の順唱等の数十秒後までの記憶、また、近時記憶は MMSE における 3 単語の再生行為や、前日の食事の内容を尋ねた際に必要とする記憶である。遠隔記憶は近時記憶より更に保持時間の長い記憶を指すが、明確な時間の定義はないとされている。短期記憶は上記の即時記憶に相当し、長期記憶は近時記憶と遠隔記憶に含まれる。短期記憶は短い時間内の出来事の想起であり、短期記憶に分類される作業記憶とは記憶と情報処理機能を併せ持った概念であり、短時間の情報を保持し、同時に処理する能力である。作業記憶は、会話、読み書き、計算の基礎となり、国語や数学等の学習と密接に関連し、発達障害のある子どもの多くが問題を抱えていることが明らかになっている（50, 51）。短期記憶は、獲得後しばらくは不安定な状態で維持されているため、何度も反復して想起することや情報整理を行うことで、長期記憶として固定されやすくなる。つまり、短期記憶表象の強度が十分である場合は、短期記憶は長期記憶へと移行する。長期記憶は、陳述記憶と非陳述記憶に分けられる（図 6）(52)。陳述記憶は、イメージや言語として意識上に内容を想起、かつ、その内容を陳述できる記憶であり、海馬を中心とした内側側頭葉が担っている。時間・空間的文脈、身体的・心理的状态等、ある経験とその付随



三村将, 記憶障害. In 高次脳機能障害のリハビリテーション, 2004; pp. 38-44. (49) を一部改変

図 5 時間軸からみた記憶の分類

遠隔記憶は、数週から何十年に渡り保持される記憶で、近時記憶は数日から数時間、即時記憶は数十秒以内の記憶を表す、臨床神経学領域で用いられる分類である。認知心理学領域では、即時記憶を短期記憶、近時記憶と遠隔記憶を合わせて長期記憶と呼ぶ。

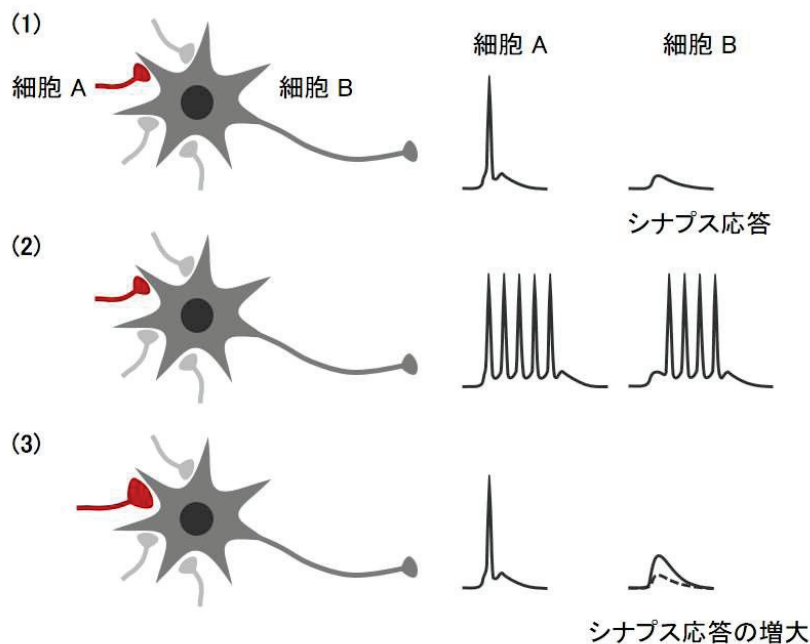


Squire, L.R., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93, 13515-13522. (52) を一部改変

図 6 記憶の分類

情報の記憶であるエピソード記憶と、物事や言葉の概念等の知識の記憶に該当する意味記憶に分けられる (53)。単に記憶障害という場合は、このエピソード記憶の障害を指す。非陳述記憶は、意識上に内容を想起できず、言語等を介してその内容を陳述できない記憶とされ、手続き記憶 (運動技能、知覚技能、習慣)、プライミング (前に入力されていた情報が、その後の情報に影響を与えるような記憶)、古典的条件付け (生体が本来持っている反応や、経験の繰り返しや訓練により形成された条件反射)、非連合学習 (1 種類の刺激に関する学習で、同じ刺激の反復による慣れや感作) に分けられ、線条体、大脳新皮質、扁桃体、小脳等が担っている (52, 54)。海馬がエピソード記憶と意味記憶に重要であることは、てんかんの治療として海馬を含む内側側頭葉を切除した患者 Henry M. の例で知られるようになった (55)。Henry M. は、手術後から新しいイベントを長期記憶に転送することが困難となり、新しい情報を保持することができなくなったが、短期記憶や手続き記憶は保持されていた。このことより、陳述記憶には海馬を含む内側側頭葉が重要であり、他の記憶に関しては異なる脳領域の機能であることが知られるようになった。

学習や記憶の神経機能の基盤は、シナプスの可塑性と考えられている。神経シナプスの可塑性は、複雑な神経ネットワークがつくられる際に、軸索が伸長して神経細胞の樹状突起とシナプスを形成すること、神経回路の新たな結合や繋ぎ変えが起こること、シナプス間の神経伝達効率が刺激に応じて持続的に変化することである。その変化は力動的変化ではなく、構造的な変化とさ



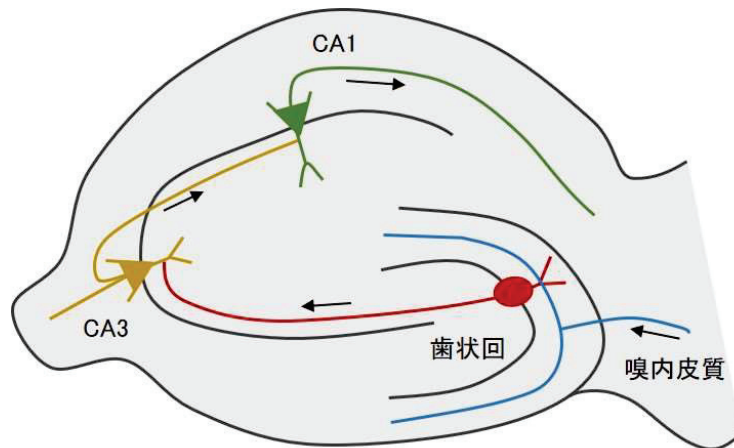
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/ヘブ則> を一部改変

図 7 ヘブ則の概念図

細胞 A と細胞 B はシナプスを形成し (1)、細胞 A が連続的に発火および入力して細胞 B が発火し (2)、細胞間のシナプスが強化され、シナプス応答が増大する (3)。

れており、多くの神経回路の中で特定の 2 つの神経がシナプスを介して結合し、シナプス前細胞が繰り返し興奮することにより、結合したシナプス後細胞も同期して興奮し、そのシナプスの伝達効率が持続的に増加する。構造的変化の例として、シナプス前膜および後膜の増大に伴う面積の増加がある。これをヘブ則 (図 7) (56) と呼び、海馬における長期増強 (long-term potentiation: LTP) は解釈することができる。LTP とは、神経細胞を同時刺激することにより 2 つの神経細胞間の信号伝達が持続的に向上する現象である (57)。この現象は、ウサギの海馬の歯状回の貫通線維に高頻度刺激を与えた際、シナプス後細胞集団は脱分極を起こして興奮状態となり、興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential: EPSP) と呼ばれる活動電位が長時間に及んで増大および継続したことから発見され (58)、学習記憶の生理学的基盤と考えられるようになった。

海馬は、内側側頭葉の中心に位置し、認知、情動発現および記憶形成に関与している大脳辺縁系に存在する海馬体の一部である。海馬体には、他に、歯状回とアンモン角 (CA1-3、cornu



Yasuda, M., et al. *Neuron* 2011, 70, 1128–1142. (60) を一部改変

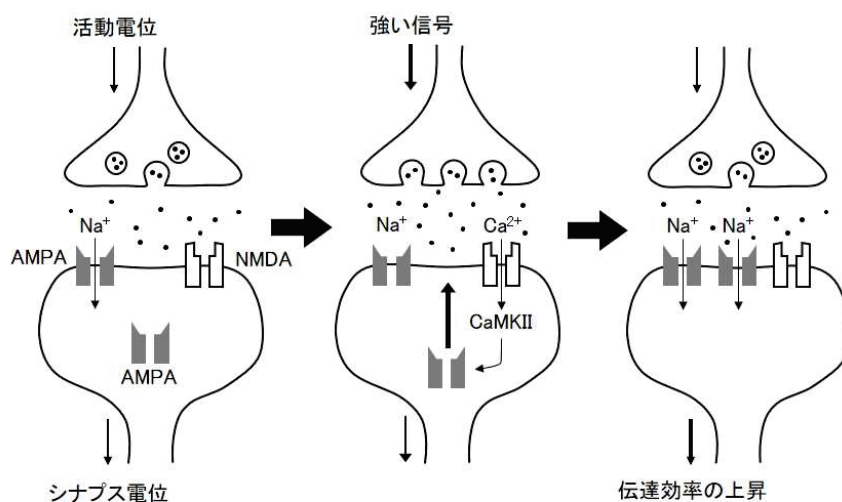
図 8 海馬神経回路

海馬の水平断面。嗅内皮質→歯状回→CA3 領域→CA1 領域とめぐる 3 シナプス回路 (trisynaptic pathway) を形成している。他に、嗅内皮質から CA1 領域に直接入力する経路などがある。

ammonis: CA) が含まれ、歯状回は顆粒細胞、アンモン角は錐体細胞という興奮性神経細胞が存在している。海馬内には一方向性の興奮性神経回路があり、海馬に入力される主な情報伝達経路は、海馬周辺皮質（嗅周皮質、海馬傍回等）を起点とし、貫通線維（図 8 青線）を通して歯状回の顆粒細胞に到達した後、顆粒細胞の軸索である苔状線維（図 8 赤線）を経て CA3 錐体細胞に入力される。そして、CA3 錐体細胞の軸索であるシャッフアー側枝（図 8 黄線）が CA1 錐体細胞の樹状突起（図 8 緑線）に入力すると、CA1 から再び海馬外へ軸索が向かい、嗅内皮質に戻る。このように、海馬は高度に組織化された一方向性のシナプス結合により形成されており、嗅内皮質→歯状回→CA3→CA1 は海馬神経回路と呼ばれている (59, 60)。CA1 と CA3 に挟まれた CA2 領域は他の領域に比べて狭く、正確な領域と記憶神経回路を決定することは困難とされていたが、近年、CA2 領域は正確に同定され、歯状回から直接シナプスを介して CA2 に入力されていることが発見された。同時に、CA2 は CA1 の深い細胞層の錐体細胞に優先的に入力していることも明らかになり、嗅内皮質→歯状回→CA2→CA1deep という記憶神経回路の存在が知られるようになった (61)。また、CA2 は CA1 および CA3 の活性化や抑制を調節し、正しい空間認識に寄与していることが報告された (62)。海馬とともに内側側頭葉に存在する嗅周皮質および海馬傍回皮質は、頭頂、側頭、前頭葉感覚連合野から情報を集めていること

から、海馬は広範囲に及ぶ皮質の情報を得ることが可能である (63)。

記憶が保存される際には、グルタミン酸を神経伝達物質とするグルタミン酸産生興奮性神経細胞のシナプスに変化が起き、alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体 (以下、AMPA 受容体) および NMDA 受容体が媒介することが知られている。長期記憶の回路は LTP の誘導により形成され、NMDA 受容体の活性化および AMPA 受容体の発現誘導が必要とされている (64-68)。AMPA 受容体は中枢神経系の多くの部位に発現している主要な速い興奮性シナプス伝達を担うイオンチャネルであり、その発現調節はシナプス可塑性の根底にある重要なメカニズムである。通常の状態において NMDA 受容体はシナプス伝達には関与しないとされており、細胞膜電位が静止膜電位である -70 mV 程度から -30 mV の状態では、細胞外からの Mg^{2+} によってブロックされている (69)。このような状態では、主に AMPA 受容体が細胞内に陽イオンを通過させるイオンチャネルとして機能し、興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) を引き起こしている。AMPA 受容体には 4 種類のサブユニット GluR1-4 が存在しており、NMDA 受容体は NR1 と NR2 サブユニットで構成され、更に NR2 は NR2A-2D の 4 つのサブユニットから構成されている (70)。各サブユニットの発現は、発達段階や脳の部位、細胞の種類によって異なり、海馬の錐体細胞では GluR1 が多く発現している。シナプス前膜からグルタミン酸が放出され、シナプス後膜の AMPA 受容体に結合すると、この受容体を介してナトリウムイオンの流入が起こり、脱分極が誘導され、シナプス伝達を完了させる。このように、シナプス後膜の AMPA 受容体の発現調節はシナプス可塑性の重要なメカニズムのひとつであり、AMPA 受容体が増加すると活動電位に対する反応も増加する (71-75)。AMPA 受容体はリガンド依存性ナトリウムチャネルであるのに対し、NMDA 受容体はリガンド依存性かつ電位依存性カルシウムチャネルである。強い刺激により記憶が保存される際、シナプス前膜から持続的なグルタミン酸が放出され、AMPA 受容体を介して十分な脱分極を起こすことによって細胞膜電位が 0 mV に近付くと Mg^{2+} ブロックが外れ、NMDA 受容体はグルタミン酸に対する反応性を有するようになり、シナプス後膜にカルシウム流入を起こす (69)。このカルシウム流入は、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)、protein kinase C (PKC)、protein kinase A (PKA)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 等のリン酸化酵素を活性化す



池谷祐二, 脳のメモリー菓子. In 記憶を強化する, 2001 (81) を一部改変

図 9 LTP の発生メカニズム

通常、AMPA 受容体が細胞内に陽イオンを通過させるイオンチャネルとして機能して Na^+ イオンを取り込み、シナプス電位を生じさせる。より強い信号が伝達されると、NMDA 受容体から Ca^{2+} イオンの流入が起こり、CaMKII 依存性の細胞内カスケードを引き起こし、AMPA 受容体は膜上へリクルートされてシナプス伝達効率を高めることにより、LTP は誘発・持続される。

る (76, 77)。CaMKII は AMPA 受容体の GluR1 サブユニットの 831 番目のセリンをリン酸化してチャネルコンダクタンスを上昇させ、AMPA 受容体からのナトリウムイオンの流入を更に引き起こす (78, 79)。同時に、シナプス後膜内に埋没していた AMPA 受容体は膜上へリクルートされてシナプス伝達効率を高め、EPSC および神経可塑的变化の増加を介して LTP を誘発・持続させると考えられている (図 9) (64-66, 68, 80, 81)。PKC も同様に GluR1 サブユニットの 831 番目のセリンのリン酸化を引き起こすことが知られている (79)。PKA は GluR1 サブユニットの 845 番目のセリンのリン酸化に係わり、開口確率を上昇させることにより、AMPA 受容体の活性を上昇させることが知られている (79, 82)。これらリン酸化酵素の連続した働きにより、シナプス伝達率は上昇を続け、LTP は持続される。このように、記憶形成にはシナプス膜上に GluR1 サブユニットを含む AMPA 受容体が発現している必要があり、それを促す NMDA 受容体の活性化は、この過程で欠かすことができない。

しかし、老齢げっ歯類の海馬は AMPA および NMDA 受容体の発現の減少が多数報告されており (83-88)、加齢に伴う学習能力の低下との関連が示唆されている。また、海馬の破壊実験

等からも、これら受容体やリン酸化酵素の重要性が示されている。空間記憶を評価するモリス水迷路試験は、乳白色の水で満たされた小さなプールで強制的に泳がせるもので、水泳開始点から水面下に隠されたプラットフォームに到達する時間を計測する試験である (89, 90)。複数回泳がせると、周囲の空間情報からプラットフォームの位置を学習し、到達時間は短縮されていくが、海馬を損傷させたラットは成績が低下するため、海馬の空間記憶に対する重要性が示されている。海馬破壊や、NMDA 受容体の阻害剤を投与したラットを用いて水迷路試験を行うと、いずれも学習記憶障害を生じることが報告されている (91, 92)。他にも、NR2B を成体脳で過剰発現させたトランスジェニックマウスが野生型に比べ高い記憶力を呈して天才マウスとして有名になった報告 (93) や、野生型マウスの初代培養海馬神経細胞を神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) で刺激すると NR2B のリン酸化が上昇すること、電流刺激等で恐怖条件付けした後は NR2B のリン酸化が増加してシナプス可塑性の維持と長期記憶が起こることが報告されている (94)。恐怖条件付けの際に活性化したマウス海馬の CA1 を抑制すると、恐怖反応や扁桃体等の活性も抑制され、海馬内外の記憶の重要な関りが報告されている (95)。CaMKII のノックアウトマウスを用いた研究では、LTP と学習記憶能の両方に障害が見られ、海馬および前頭皮質の 286 番目スレオニンにおける CaMKII の自己リン酸化の減少は、シナプス機能障害、神経変性、記憶障害の主要な原因と報告されている (96, 97)。ヒトにおいても、アルツハイマー型認知症の最も初期の生物学的症状のひとつは、CaMKII の活性化を必要とする AMPA 受容体の減少とシナプス可塑性障害とされている (98, 99) こと等、学習能力と海馬神経細胞内カスケードの重要な関係が多く報告されている。

一般的に、動物実験の結果をヒトに適応する点についてはしばしば問題となることがあるが、下等動物から高等動物に至るまで類似した脳内の機構が存在することより、上述するような動物実験で得られた成果を利用する価値は高いことと考えられ、マウスやラットの行動パターンを定量化する行動学習試験によって学習記憶能の評価が行われている。行動学習試験は、比較的实施が容易な異なる種類を効率的に組み合わせて行い、マウス等の被験体の行動に及ぼす影響を評価する方法である (100)。多種類の試験を同一の被験体に行う学習記憶や情動等の高次脳機能の評価は 1990 年代から行われ、ノックアウトマウス等を用いることで記憶や情動に関係する因子

の同定が進められた (101, 102)。汎用されている評価として、Y 字型迷路試験 (空間作業記憶: 短期記憶) (90, 103-106)、恐怖条件付け文脈学習試験 (文脈記憶、注意能力: 長期記憶) (107, 108)、新奇物体認識試験 (非空間記憶: 長期記憶) (108-111)、受動回避試験 (恐怖記憶: 短期・長期記憶) (90, 112, 113)、モリス水迷路試験 (空間記憶: 長期記憶) (90) 等があり、試験期間は 1 日から 1 か月とされている。空間記憶能とは、目的地や自分の現在地点を特定するという空間や場所に関する認知能力であり、非空間記憶能とは、輝度・形状・色等の非空間属性情報に関する認知能力である。また、作業記憶能とは、情報の一時的保持と並行的に情報を理解し行動する認知処理能力である。これら試験方法を用いて、被験体に予防効果が期待される栄養素等を投与して得られた成果は、ヒトをはじめとする高等生物の記憶形成過程の理解や脳機能疾患の病態解明に応用されている。このように、現時点においては、認知症には治療法がないものの、発症や進行を遅らせるための知見を得る動物実験や臨床試験が精力的に行われ、候補とされた有用成分の利益が害を上回ると結論付けられるものが推奨される。

1.3 老化促進モデルマウスを用いた抗老化研究

ヒトの老化に伴う障害の研究モデルとして確立された老化促進マウス (senescence-accelerated mouse: SAM) は、京都大学結核胸部疾患研究所病理部門 (現京都大学再生医科学研究所) で開発された、いくつかの生理機能の老化促進を示す近交系マウスである。SAM は、老化促進および短寿命を示す P 系 (prone) と通常老化および長寿命を示す R 系 (resistant) からなり、P 系は、早期に多くの特徴的な年齢依存性の病理を示し、老化病態により 9 系統 (P1、P2、P3、P6、P7、P8、P9、P10 および P11) に、R 系は 3 系統 (R1、R4 および R5) に分類されている (114-121)。その内、学習記憶障害をはじめとする生理学的行動障害を示す系統は SAMP8 および SAMP10 マウスとされている。SAMP8 マウスは、海馬のグルタミン酸含量と放出の増加、NMDA 受容体および ACh 受容体等の記憶関連受容体が減少し (118-120)、受動回避試験やモリス水迷路試験における低不安状態や学習記憶障害を示すことが報告されている (121, 122)。SAMP10 マウスは、SAMP8 マウスと同様に早期の学習記憶障害を示し、大脳の前頭部分で年齢依存性の進化的変化を示し、脳の重量は生涯を通じて 8.6% 減少する。最も脆弱

な萎縮領域は前頭前野を含む大脳皮質の前頭領域で、脳老化の自然発症モデルとされている (123, 124)。SAMP10 マウスの脳に加齢に伴う変化は、樹状突起の収縮や減少およびシナプスの喪失 (125, 126)、動機付けの欠如および鬱的傾向 (127)、神経伝達物質の異常 (128-130)、神経栄養因子の異常 (131, 132)、行動学習試験による学習記憶の障害 (127-130, 133) 等が報告されているが、アルツハイマー病に見られるような $A\beta$ 蓄積や神経原線維変化は見られず (123)、正常なヒトに加齢に伴う変化と類似している (126, 134)。SAMP10 マウスには免疫系異常も報告されており、中枢の免疫担当細胞として神経保護機能を有するミクログリアが退行変性した形態を示し、3 か月齢からその総突起長および分岐数の減少が見られるため、炎症性サイトカインに対する保護機能が破綻し、海馬の錐体細胞層が萎縮することが、脳の脆弱性の根底にあると報告されている (135-137)。一方、SAMR1 マウスは、高齢においてもほとんどの脳領域で萎縮は見られず、ミクログリアの形態的变化も 14 か月齢まで保たれ、学習記憶能は比較的維持される。これらのことから、SAMP10 および SAMR1 マウスを利用した脳老化の予防に影響を与える食品素材の検討が広く研究されており、ニンニク (138-145) や茶 (112, 113, 146) の成分が記憶障害を改善することや脳萎縮を抑制することが報告されている。

1.4 熟成ニンニク抽出物および S-アリルシステインの脳に与える影響

ニンニク (*Allium sativum* L. *Amaryllidaceae*) は、料理や薬用の目的で長い間広く使用され、健康促進や疾病予防のための伝承薬として認識されている (146-149)。ニンニクの潜在的な利点への関心は古代に起源があり、病気の治療と健康の維持に使用される植物として、最古に文書化された例のひとつとされている。ニンニクは聖書の中でも言及され、エジプト、ギリシャ、ローマ、中国、インドの古代の医学書では、その医学的応用について記載されていた (149)。近年では、動脈硬化や高脂血症への適応が中心であり、ニンニク抽出物や加工ニンニクを含有する健康食品等の品質の適正が厳しく図られている (150, 151)。また、ニンニク抽出物やニンニク含有硫黄化合物の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果や発がん予防効果が報告されており (152-154)、米国国立がん研究所 (National Cancer Institute: NCI) から示されたデザイナーフーズプロジェクト (図 10) では、ニンニクは最もがん予防効果の高い食品と位置付けられた。ニンニクを 15-20% エタノール抽出液を含有する食品は、がん予防効果が高いと評価された。

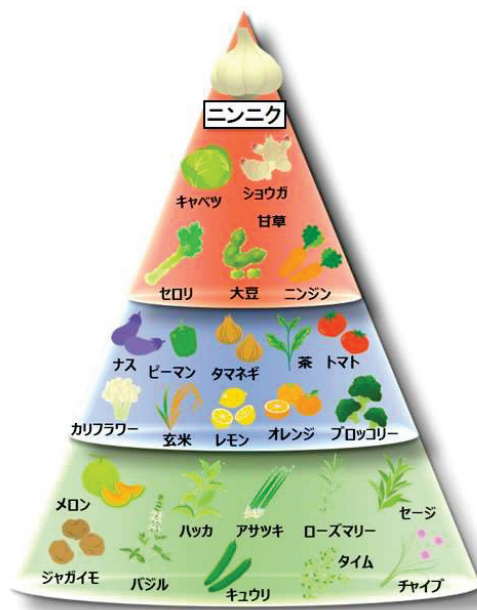
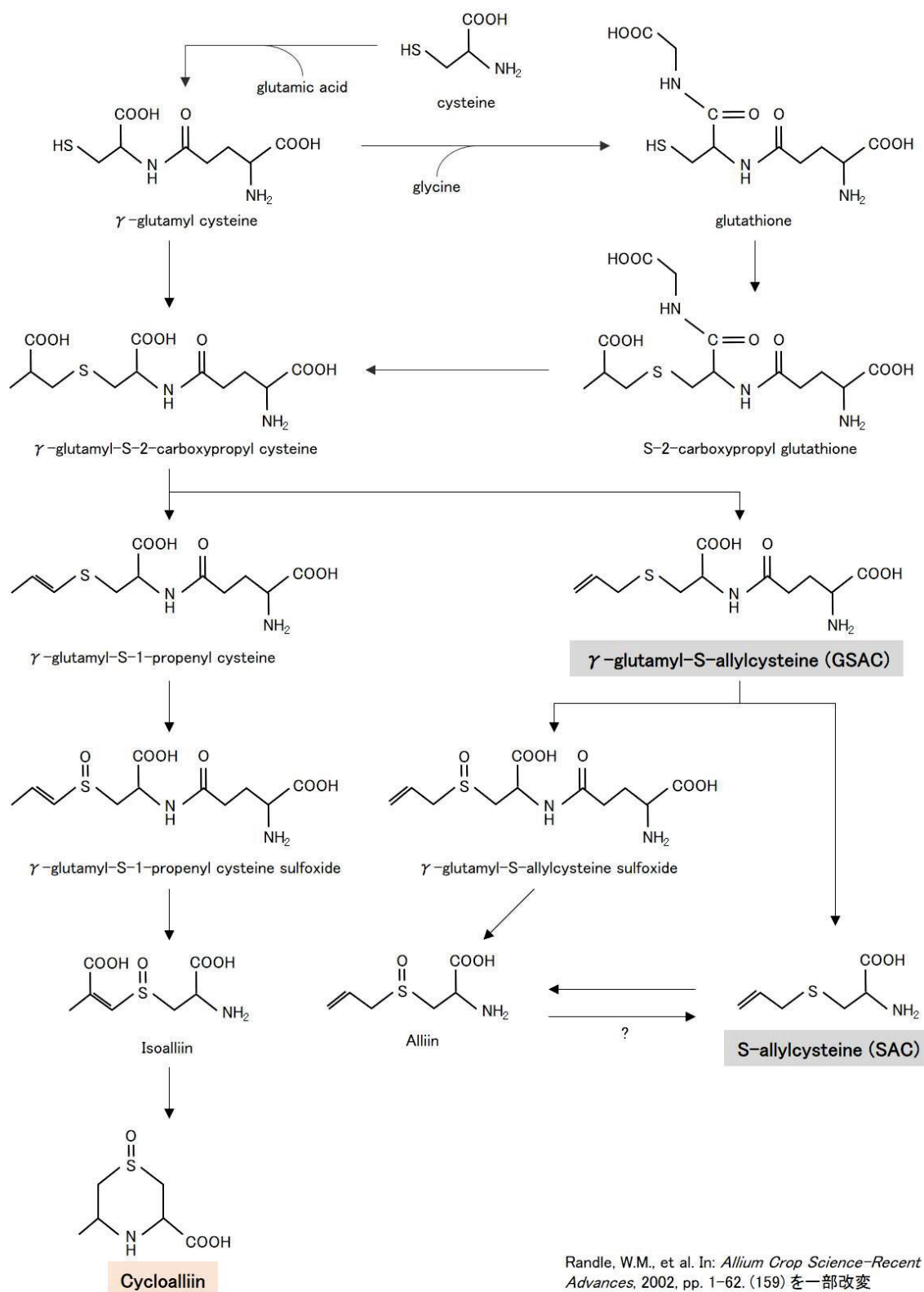


図 10 デザイナーフーズプロジェクト (1990, NCI)

ール水溶液に長期間浸漬することで得られる熟成ニンニク抽出物 (aged garlic extract: AGE) は生理活性について最も検討されているニンニク加工品であり、血中脂質 (155)、血圧 (155, 156)、動脈硬化 (157)、免疫機能 (158) 等に対して有用な薬理効果が示され、その活性本体として含有硫黄化合物である S-アリルシステイン (S-allylcysteine: SAC) を指標成分としている。AGE の製法では、SAC は γ -glutamyl-SAC (GSAC) (図 11) (159) を前駆体として脱グルタミル化反応によって生成するが、GSAC 量は変化せずに SAC を生成させる方法も報告されている (160)。SAC は高い水溶性と安定性を有しており、経口摂取により消化管より吸収され、副作用もないことが報告されている (156)。SAC の血中動態についてはいくつか報告されており、ラットの経口投与における生体内利用率は 98% とされている (161, 162)。非常に高い経口吸収性を示し、血液脳関門も通過して全身循環に到達することから、脳へ様々な影響を及ぼすと考えられている (162)。

ニンニクに含まれるチオアリル基 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-$) を有する化合物は、初代培養海馬神経細胞の生存を促進し、特に SAC は神経細胞軸索の分岐数を有意に増加させたことから、神経栄養因子としての機能が注目された (163, 164)。BDNF 等、このような神経栄養因子は学習・記憶障害を改善する (94, 165) ことから、SAC は脳機能に対する有益成分と位置付けられた。また、



Randle, W.M., et al. In: *Allium Crop Science—Recent Advances*, 2002, pp. 1–62. (159) を一部改変

図 11 S-アリルシステインおよび類縁化合物の発生フロー

SAC を腹腔内投与したラットの脳内に A β ペプチドを注入し、その後の学習能力の変化を観察した研究では、SAC が中枢神経に移行して中枢神経保護作用を示し、A β ペプチドによって上昇した脳内の活性酸素種と脂質過酸化を有意に抑制して海馬を保護し、学習能力の低下が抑制されたことが報告されている (166)。このような酸化ストレス存在下における SAC の特性に関する報告は多いが (167, 168)、小胞体ストレスの抑制に言及した報告もある。グルコース欠乏、Ca²⁺ 枯渇、フリーラジカルへの曝露等により構造異常タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレスが発生し細胞死を引き起こす (169)。この現象は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病等の神経変性疾患で見られることが報告されている (170)。アルツハイマー病患者の脳に見られる老人斑の主成分は A β の線維形成物であり、A β が蓄積されることで上記のような細胞障害や炎症による神経毒性を引き起こすが、その進行を抑制させる手段は臨床的に存在していない。しかし、SAC はシステインプロテアーゼのカルパイン活性部位に結合することにより、神経変性疾患で生じる小胞体ストレス誘発性神経細胞死に対する神経細胞死を防ぐこと、抗酸化物質および小胞体ストレスのモジュレーターとして神経保護効果を発揮することが報告されている (171-173)。また、SAC はカスパーゼ 3 の活性化を阻害し A β の神経毒性を抑制することや (174, 175)、上述したカルパイン活性抑制によるカスパーゼ 12 の活性抑制効果もあることから (171, 176)、AGE および SAC の神経変性疾患への応用が期待されている。他にも、SAC が A β の折りたたみ構造の特定の部位に結合することで線維凝集化を阻害すること (177)、アルツハイマーモデルマウスに SAC を摂餌させ、抗炎症、抗 A β 形成、タウタンパク質の過剰リン酸化および線維凝集の抑制作用 (178) 等が報告されている。脳以外にも、AGE および SAC について、抗癌 (153, 154, 179-181)、抗糖尿 (144, 182)、抗高血圧 (155, 156) 等、複数の生物学的効果が報告されている。これらのいずれの結果からも、AGE が有する多面的な生理活性の中心的役割は SAC が担っていることが示唆されている。

薬理学的行動学習試験においては、SAM マウスに AGE を 8-10 か月という長期間に渡り摂餌させた研究が報告されている (138-141)。それらの結果として、SAMP8 マウスは記憶の獲得が促進されたが、記憶保持の低下を抑制することはできず、記憶の獲得と保持が異なるメカニズムに基づいているという考えが示された。また、SAMP10 マウスは学習記憶障害を改善する結果

が得られ、脳重量減少および前頭脳萎縮の抑制が報告された (138, 139, 141)。SAC を単独で SAMP8 および SAMP10 マウスに長期摂餌させた結果においても行動学習試験によって学習障害の軽減が示されている (142)。また、リポポリサッカライド (LPS) により学習記憶障害および炎症が誘導されたラット、および、ストレプトゾシンによる糖尿病と併せて学習記憶障害および炎症が誘導されたラットに対して SAC を経口投与させると、Y 字型迷路の空間作業記憶、新奇物体認識試験の非空間記憶 (物体認識率)、受動回避試験の恐怖記憶の保持が改善されたことが報告されている (143, 144)。これら研究では、SAC が海馬のスーパーオキシドディスムターゼや還元型グルタチオン等の抗酸化防御因子の増強および AChE 活性の低下に関与したことを示しており、神経変性に対する SAC の主要な利点は酸化ストレスと炎症反応の軽減であると報告している。

1.5 本研究の目的

これまで、SAC および AGE の生理的機能について、抗酸化機能、培養神経細胞の形態学的変化、行動学習試験への効果について多く研究され、記憶低下の抑制に関与することが報告されているが、神経栄養因子としての機能 (163, 164) に関しては十分に理解されておらず、LTP を誘導する記憶メカニズムの本質である AMPA 受容体や NMDA 受容体といったシナプス後部に局在する記憶関連受容体への影響に言及した報告もなかった。また、長期間の被験物質の摂餌による学習記憶に与える効果については、同グループを除き、ほとんど検討されていない (138-142)。本研究では、まず、MGE の神経細胞の形態学的変化を促進する可能性および SAC の活性本体としての寄与を検討するため、胎児マウスの海馬から採取した初代培養海馬神経細胞に対する総神経突起長および樹状突起数への影響を検討した。また、SAMP10 マウスに MGE または SAC を長期間 (2 か月齢から 11 か月齢の 10 か月間) 摂餌させたあと、薬理的行動学習試験および SAMP10 マウス海馬の記憶関連タンパク質の発現を評価し、学習記憶能の形成に与える影響を検討した。

第 2 章 実験材料および方法

2.1 低温熟成ニンニク抽出物

熟成ニンニクとは、一般的に、高温で長期間の熟成を経て製造される黒ニンニクのことである。生ニンニクに含まれるアリインおよび物理的な衝撃によりアリインより生成されるアリシンは、吸収後のほとんどがすぐに肝臓で代謝され、アリル硫黄化合物に変化する。その代謝物であるジアリルジスルフィドの LD₅₀ は SAC の 60-70 倍とされている (181)。熟成ニンニクは、それら硫黄化合物による刺激や臭いが低減されており、気軽にニンニクを食することが可能なことから、近年で

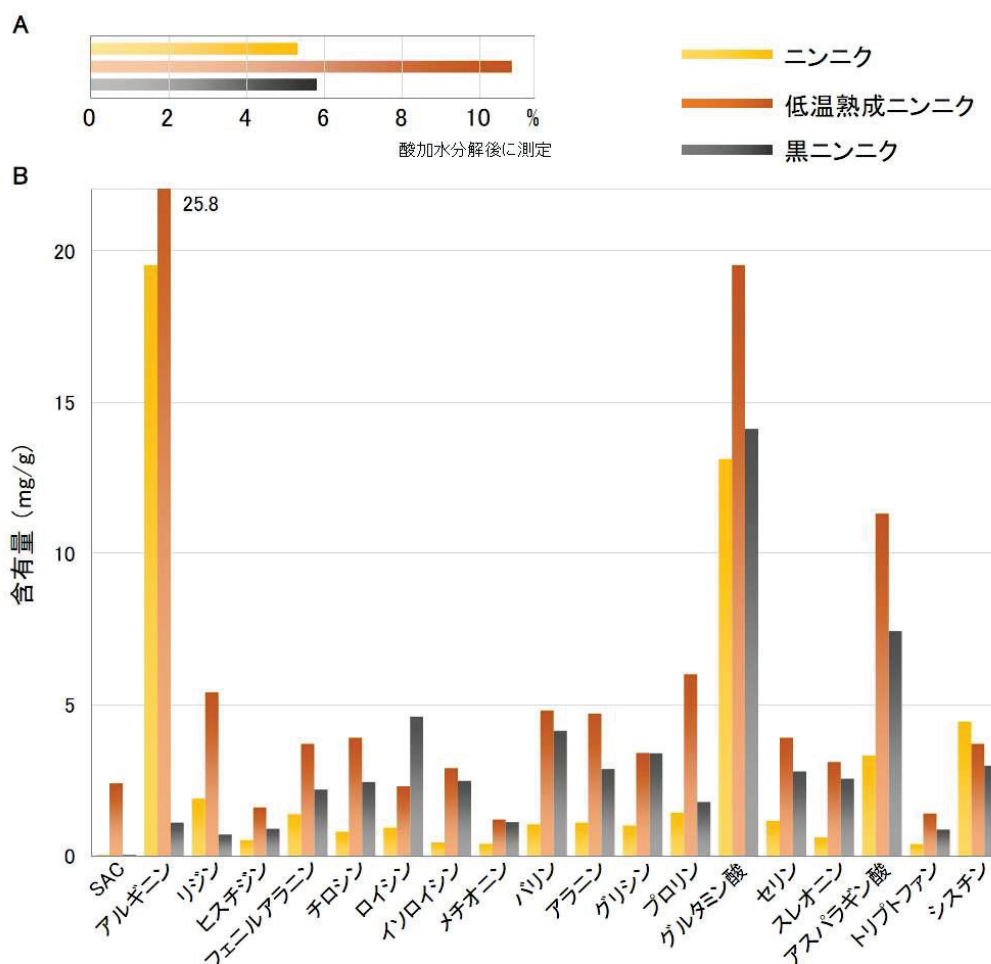


図 12 加工法により異なるアミノ酸量

A. 全重量に対するアミノ酸量 (18 種)

B. 各種アミノ酸量

は非常に多くの種類が販売されている。しかし、それらに含まれる SAC 量は熟成方法により大きく差異があり、ほとんど検出されないものが多い。また、本来ニンニクに豊富に含まれるアルギニン等のアミノ酸、また、GSAC 等の γ -グルタミルペプチド類といったニンニクの特有成分がほとんど失われ、ニンニクに期待される複合的な栄養が得られないことが推測される (図 12、図 13)。一方、AGE は指標成分と位置付けられている SAC を 2 mg/g 含有している (139, 140, 142)。

我々が本研究に用いた低温熟成ニンニク抽出物 (mature garlic extract: MGE) は、低温で自己発酵された低温熟成ニンニク (田子かわむらアグリサービス(有)社製) を原料としている。低温熟成ニンニクは、AGE のように GSAC を前駆体としておらず、収穫後のニンニクを特殊環境下で一定期間冷蔵貯蔵して休眠状態を維持させた後、短期間の低温加熱により SAC を 2-3 mg/g

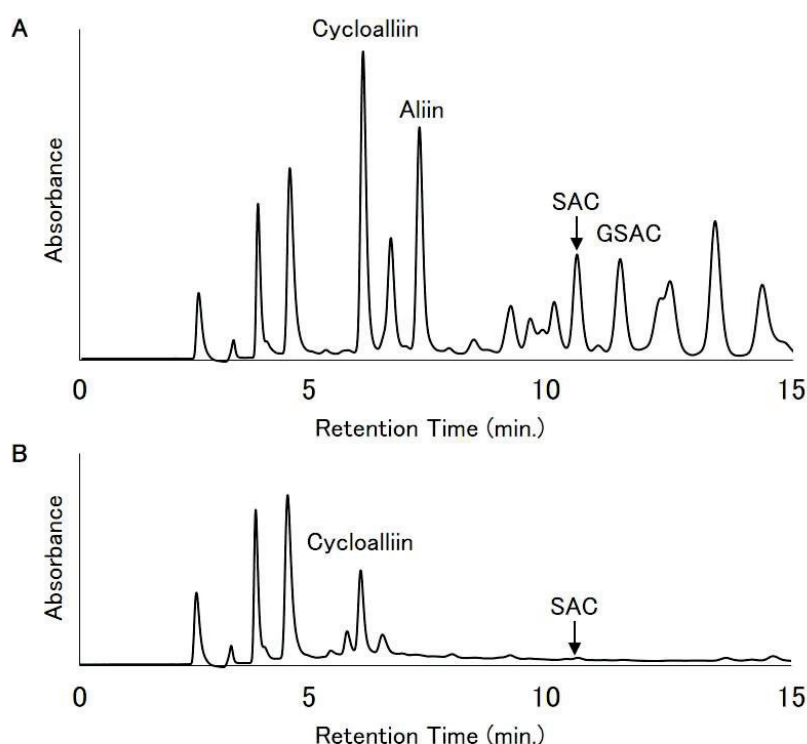


図 13 加工温度による含有成分の差

A, 低温熟成ニンニク抽出物 (MGE)

B, 黒ニンニク抽出物

HPLC, column; Capcell Pack SCX UG, column temperature; 45°C, flow rate; 1 mL/min., mobile phase; 5 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 2.50), wavelength; 210 nm.

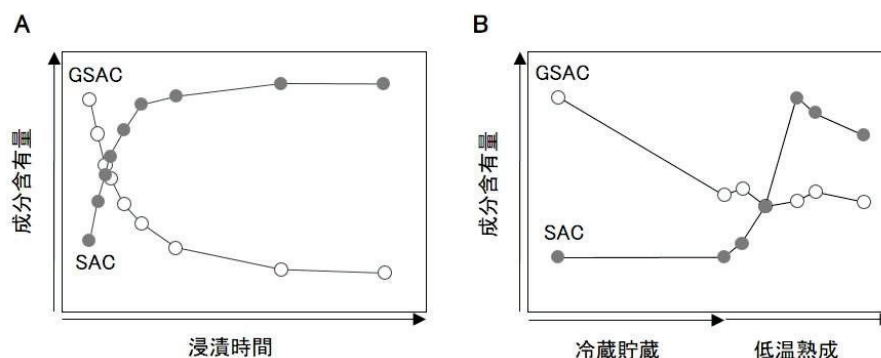


図 14 加工法による異なる成分変化

- A, 熟成ニンニク抽出物 (AGE)
B, 低温熟成ニンニク抽出物 (MGE)

まで増加させている (図 14) (160)。低温熟成ニンニクが GSAC を前駆体とせず SAC を生成させる経路は未だ明らかになってはいないが、アリインの減少と SAC の増加が相関することより、何らかの酵素による還元反応が起きていることが推察されている (図 11)。MGE は、そこから水溶性画分を抽出し、濃縮、乾燥工程を経て得られる乾燥物であり、SAC を 2 mg/g 含有している。アンジオテンシン I 変換酵素阻害作用および血管拡張作用 (183, 184) を有することが報告されている GSAC や、線溶活性 (185) の上昇や高脂血症 (186) の予防に有用とされるシクロアリインも多く含まれる (図 11、図 13)。

2.2 初代培養海馬神経細胞の調製および培養

初代培養海馬神経細胞は、既報にならい、妊娠 15-16 日に C57BL/6J マウス (Charles River Laboratory) から調製した (187)。胎児海馬を 0.25% トリプシンおよび 0.1 mg/mL DNase を用いて 37°C で 10 分間消化し、ピペッティングにより解離させた。海馬神経細胞をポリ-D-リジンコーティングされたセルディスク (住友ベークライト) に播種し (10000 cells/well, 24 well)、B-27 および GlutaMax サプリメント (Gibco) を含む神経細胞培養培地で培養した (day 0 in vitro: DIV 0)。DIV 2 に、MGE および SAC を 10 μ M の cytosine β -D-arabinofuranoside を含む培地に加え、グリア細胞の増殖を抑制した。

2.3 免疫蛍光染色および画像定量解析

48 (DIV 4) および 72 時間 (DIV 5) 後、セルディスク上の海馬神経細胞をホルムアルデヒドで 10 分間固定し、ブロッキングバッファー (10% ヤギ血清および 1% BSA を含む PBS) を用いて室温で 1 時間の処理を行った。次に、樹状突起マーカーとして使用する抗 MAP2 抗体 (Abcam) を反応液 (Can Get Signal®, 東洋紡) で 1:1000 に希釈してセルディスクに加え、室温で 1 時間反応させた。その後、TBS-T 溶液で 10 分間の洗浄を 2 回行い、反応液で 1:200 に希釈した Alexa fluor 568 標識抗 IgG 抗体 (Life Technologies) を加え、遮光条件下かつ室温で 30 分間反応させた。TBS-T 溶液で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、Hoechst 33342 (Dojindo) により核染色を行い、更に 10 分間の洗浄を 3 回行った後、FluorSAVE™ Reagent (Calbiochem) を用いてスライドガラスにマウントした。画像は蛍光顕微鏡 (オリンパス) により取得した。免疫蛍光染色によって得られた MAP2 陽性細胞の画像は、IN Cell Translator (GE Healthcare) を使用して変換し、IN Cell Analyzer Workstation (GE Healthcare) により神経細胞の総突起長および神経細胞あたりの突起数を定量化した。

2.4 行動学習試験

SAMP10/TaSlc (以下、老齢 SAMP10) および SAMR1/TaSlc (以下、老齢 SAMR1) マウスは、4 週齢で日本 SLC から入手した。マウスは、 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の一定温度で 12 時間の明暗サイクル (明期 9:00-21:00) で飼育し、実験中は食物と水を自由に摂取させた。SAMP10 マウスは無作為に 4 群 ($n = 18$) に分けられ、2-11 か月齢の 10 か月間、被験物質である MGE または SAC (東京化成) を含む食餌 (CE-2, クレア) が与えられた。ひとつの SAMP10 マウス群および SAMR1 マウス群 ($n = 12$) には被験物質を与えず、コントロール群とした。これら先行して飼育したマウスをそれぞれ老齢 SAMP10 および老齢 SAMR1 マウスとした。加齢による脳機能の低下程度を比較するため、飼育開始から 6 か月後に、あらたに 4 週齢の SAMP10 マウスを入手し、若齢 SAMP10 マウスとした。学習記憶能は、マウスが 11-12 か月 (老齢 SAMP10 および SAMR1 マウス) または 5-6 か月 (若齢 SAMP10 マウス) の時点で薬理的行動試験を課し、Y 字型迷路試験、ステップスルー型受動回避試験および新奇物体認識試験によって測定した。行

動学習試験の終了後、12 か月（老齢 SAMP10 および SAMR1 マウス）または 6 か月（若齢 SAMP10 マウス）齢で屠殺し、海馬組織を採取し、すぐに -80°C で凍結した。

本研究では、MGE を低容量 (0.2%; L-MGE) および高容量 (1%; H-MGE) 含有する食餌を用意し、老齢 SAMP10 マウスに与えた。また、HPLC による MGE 中の SAC 量の定量結果 (2 mg/g MGE) (図 13) に基づき、H-MGE と同量の SAC を含有する食餌を用意し、老齢 SAMP10 マウスに与えた。上記の MGE 配合量の設定根拠として、試験スケジュールが類似した過去の報告 (138-145) では、2% (20 mg/g diet) の AGE または 0.002-0.004% (20-40 $\mu\text{g/g}$ diet) の SAC を含む食餌を与えたマウスに有意な記憶改善効果が認められていることより、H-MGE の量を 1% (10 mg/g diet)、SAC の量を 0.002% (20 $\mu\text{g/g}$ diet) とした。濃度依存性を検討するために、L-MGE の量を 0.2% (2 mg/g diet) とした。1 日のマウスの食餌量は 150 g/kg weight と報告されていることから (188)、L- および H-MGE 摂餌群はそれぞれ MGE を 0.3 および 1.5 g/日、SAC を 0.60 および 3.0 mg/日消費する。尚、本研究の動物試験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (1973 年 10 月 1 日法律第 105 号) に基づき、静岡県立大学動物実験倫理委員会の承認 (approval No. 166197) を得て行った。

2.4.1 Y 字型迷路試験

Y 字型迷路における自発的な交替行動の評価は、自発行動量と空間作業記憶能を評価する

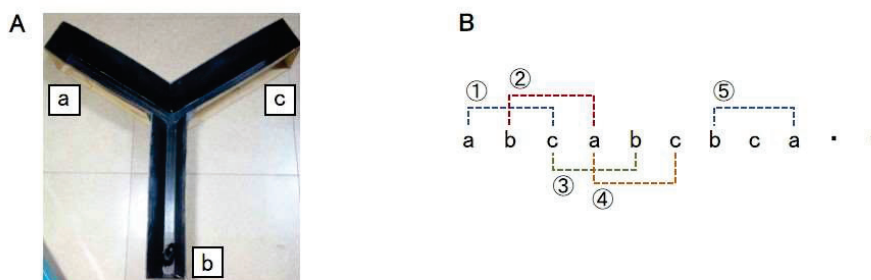


図 15 Y 字型迷路試験

A、マウスをいずれかのアームの先端に置き、8 分間装置内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録した。

B、交替行動数は、3 回連続して異なるアームに進出した組み合わせの回数と定義し、空間作業記憶を求めた。

ことが可能である。この試験は海馬依存的な短期記憶を測定する方法とされており (90, 103-106)、Y 字型迷路試験の交替行動における学習記憶能は、海馬の LTP 発現と正の相関を示すことが報告されている (189, 190)。Y 字型迷路装置は、120° の中央プラットフォームから伸びる黒いプラスチック製の 3 本のアーム (40 cm × 15 cm × 35 cm) が連結された装置で、マウスをいずれかのアームの先端に置き、8 分間装置内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録した (図 15A)。この交替行動の測定は、ラットやマウスが探索行動で自発的に異なるアームに進入する性質を利用しており、アームへの総進入回数から自発行動量を求めることができる。各アームへの進入を記録する際、マウスの後足が完全にアーム内に侵入したときをアームへの進入として定義した。また、交替行動数は、3 回連続して異なるアームに進入した組み合わせ (abc, bca 等) (図 15B) の回数と定義し、下記の式より自発的交替行動率 (Alternation, %) を求め、空間作業記憶能を求めることができる。

$$\text{自発的交替行動率 (Alternation, \%)} = \frac{\text{交替行動数}}{\text{総アーム進入回数} - 2} \times 100$$

2. 4. 2 ステップスルー型受動回避試験

ステップスルー型受動回避試験は過去の報告に従って行った (112, 113)。この試験は、マウスが明るい場所より暗い場所を好むことを利用した簡便な評価方法である (90)。装置は明室と暗室が扉を介してつながっており、明室にマウスを入れてから暗室に移動するまでの時間を記憶の指標にした (図 16)。まず、扉を閉めた明室にマウスを入れ、1 分後に扉を開け、暗室への移動を可

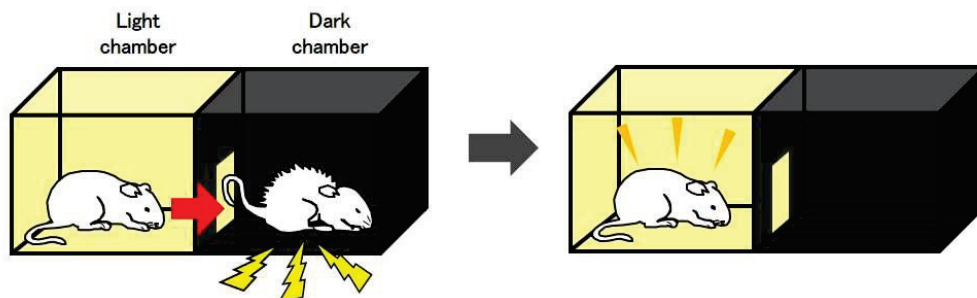


図 16 ステップスルー型受動回避試験

マウスが暗室に入らずに明室に 300 秒間留まった時点を見なして 1 回の試験を終了した。暗室に入る場合は、マウスが獲得基準を満たすまで最大 5 回繰り返し、明室にとどまる合計時間が長いほど学習能力が高い指標とした。

能とした。暗室に移動後、扉を閉め、電気刺激（0.05 mA、1 秒、室町機械株式会社）を与え、記憶獲得試行とした。再びマウスを明室に入れ、1 分後に上記と同様に暗室につながる扉を開けた際に、明室に留まる行動を記憶再生試行とし、暗室に入るまでの時間を測定した。1 回の試行を最大 300 秒とし、300 秒間明室に留まった時点を記憶獲得基準と見なした。マウスが 300 秒以内に暗室に入る場合は、再度電気刺激を与え、獲得基準を満たすまで、試験を最大 5 回まで繰り返した。マウスが記憶獲得基準を満たした場合、または、最大 5 回でも基準を満たさない場合に本試験を終了した。このような複数回の試行の受動回避試験では、マウスが獲得基準を満たす試行回数や明室に留まった時間の合計が記憶獲得の指標と見なされることがあるが、下記の例のように、明室で過ごした時間は正しく評価できない。

マウス A: 1 回目－10 秒、2 回目－300 秒（試験終了）

マウス B: 1 回目－10 秒、2 回目－10 秒、3 回目－10 秒、4 回目－10 秒、5 回目－10 秒（試験終了）

マウス C: 1 回目－10 秒、2 回目－150 秒、3 回目－300 秒（試験終了）

マウス D: 1 回目－10 秒、2 回目－10 秒、3 回目－300 秒（試験終了）

これらの中で学習能力が高いのはマウス A であることは明らかである。しかし、これらのマウスを明室に留まった時間の合計で評価した場合、下記のように計算され、マウス C が最も学習能力が高く、マウス B が最も学習能力が低いことを意味する。

C (460 秒) > D (320 秒) > A (310 秒) > B (50 秒)

また、マウス A とマウス D の差はほとんど見られない。試行回数を記憶獲得の指標とした場合も同様に、マウス C とマウス D はともに 3 回で終了しているため差があると判断できない。一方、300 秒から差し引いた時間の合計で評価した場合、下記のように計算され、マウス A の学習に必要な時間は最短であり、最も学習能力が高いと考えることができる。

B (1450 秒) > D (580 秒) > C (440 秒) > A (290 秒)

更に、マウス A とマウス D、マウス C とマウス D の差も判別可能となる。本研究では、各試行中に明室に留まった時間を 300 秒から差し引き、その時間の合計を学習に必要な時間と定義し、最大 5 回の合計時間が短いほど学習能力が高い指標とした。

1 か月後、1 回のみ、記憶再生試行を行い、300 秒間明室に留まったマウスの数を計測し、長期記憶能を評価した。

2. 4. 3 新奇物体認識試験

新奇物体認識試験は、マウスの新奇性を好む特徴を利用したものである。プロトコル（108-111）にいくつかの変更を加え、1-5 日目に実行した。本試験は 3 つの異なる試行（馴化、訓練、記憶保持）で構成される（図 17A）。馴化試行では、3 日間、物体がない状態で各マウスを個別にボックス（30 cm × 30 cm × 35 cm）に入れ、毎日 10 分間探索させた。4 日目の訓練試行では、2 つの新奇物体（X および Y）をボックス内に置き、マウスに自由に 10 分間探索させた（図 17B）。2 つの物体の探索に費やされた合計時間は、物体と鼻の距離が 1 cm 未満および触れた時間と定義し、2 つのストップウォッチを使用して 10 分間の測定を行った。それぞれの物体の探索に費やした時間の割合が 50% に近い場合、学習能力が障害されていないことになる。続いて、5 日目の保持試行では、マウスには形状と色の異なる 2 つの物体（既知物体 X および新奇物体 Z）の存在下で 10 分間の探索をさせ、各物体の探索に費やされた時間を同様に記録

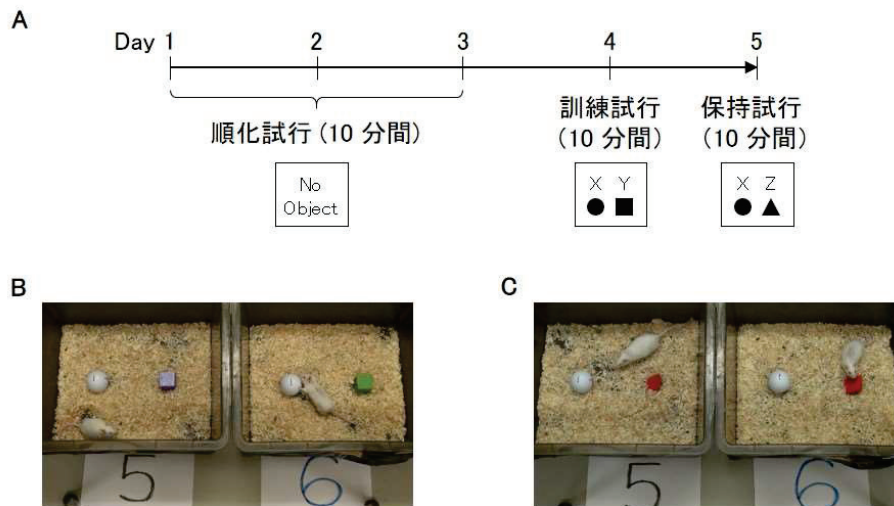


図 17 新奇物体認識試験

A, 試験スケジュール

B, 訓練試行では、2 つの新奇物体をボックスに置き、自由に 10 分間探索させた。それぞれの物体探索時間の割合が等しい場合、学習能力が障害されていないことになる。

C, 保持試行では、一方の物体を新奇物体に変え、各物体の探索に費やされた時間を記録した。新奇物体に対する探索時間が有意に高い場合、良好な学習記憶を示す。

した (図 17C)。記憶保持試行で 2 つの物体の探索に費やした合計時間に対する新奇物体 Z の探索時間の比率を探索的嗜好率として求め、非空間記憶能 (形状・色・コントラスト) を評価した。探索的嗜好率 50% はチャンスレベル (偶然に起こり得る確率) であり、それより有意に高い探索的嗜好率を新奇物体に対して示した場合、良好な学習記憶能を意味する。

2.5 イムノブロット解析

薬理学的行動学習試験が終了したマウスから摘出した海馬を氷冷プレート上に置き、すぐに凍結して -80°C で保存した。海馬タンパク質抽出物は、海馬組織をプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を添加した Passive Lysis Buffer (Promega) で均質化処理することで得られた。均質化した懸濁液は遠心分離で可溶性タンパク質と不溶性タンパク質に分離した。抽出した可溶性タンパク質は Bradford アッセイで定量した。ウェスタンブロットティングに使用する組織懸濁液を調製するために、4X Laemmli Buffer (Bio-Rad Laboratories) を加え、 95°C で 6 分間変性させた。等量の総タンパク質 (20 μg) および分子量マーカー (Bio-Rad Laboratories) は、7.5% ミニゲル (Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad Laboratories) を用いて SDS-PAGE にて分子量分離を行った。分離ゲル上のタンパク質バンドを Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories) にて PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に転写後、室温で 1 時間ブロッキングバッファー (Can Get Signal[®], 東洋紡) でブロッキングを行った。1 次抗体は、抗 GluR1 抗体 (分子量 (molecular weight: MW; 102 kDa, Abcam) を 1:1000、抗リン酸化 GluR1 (Ser 831) 抗体 (MW; 106 kDa, Abcam) を 1:1000、抗 NR2B 抗体 (MW; 166 kDa, Abcam) を 1:1000、抗リン酸化 NR2B (Tyr 1472) 抗体 (MW; 180 kD, Merck) を 1:1000、抗リン酸化 CaMKII (Thr 286) 抗体 (MW; 50 kDa, Cell Signaling Technology) を 1:1000、抗 β -actin 抗体 (MW: 42 kDa, Sigma-Aldrich) を 1:20000 となるように反応液 (Can Get Signal[®] 1 次抗体用 Immunoreaction Enhancer Solution, 東洋紡) で希釈を行った後に反応させた。メンブレンは、0.1% Tween-20 (TBS-T) を含む Tris 緩衝生理食塩水で洗浄し、反応液 (Can Get Signal[®] 2 次抗体用 Immunoreaction Enhancer Solution, 東洋紡) で 1:10000 に希釈した 2 次抗体 (HRP-Linked Anti-IgG, GE Healthcare) を用い、室温で 1 時間反応させた。再度 TBS-T で洗浄した後、化学

発光基質 (ECL, GE Healthcare) を使用して発光処理を行い、Chemi Doc Imaging system および ImageLab™ ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories) を使用して特定のバンドを検出および定量した。

2.6 統計学的解析

得られた結果は、JMP 8 (SAS Institute Inc.) を使用して解析した。データは少なくとも 3 回の独立した試験から得られており、平均値および標準誤差 (SEM) で表した。すべての結果はガウス分布を想定しており、一元配置分散分析 (ANOVA) による分析を行った。ANOVA 後に多重比較検定として Dunnett's 検定または Tukey-Kramer 検定を行った。 $p < 0.05$ は、統計的に有意であると判断した。統計的有意性のレベルは次のように示した。*; $p < 0.05$ 、**; $p < 0.01$ 。

第 3 章 結果

3. 1 初代培養海馬神経細胞の神経総突起長および突起数に対する熟成ニンニク抽出物および S-アリルシステインの効果

初代培養海馬神経細胞を免疫蛍光染色して得られた MAP2 陽性細胞の画像を、IN Cell Translator によって変換し (図 18)、IN Cell Analyzer Workstation により神経細胞の総突起長および神経細胞あたりの突起数を定量化した。培養 0 時間 (DIV 2) における神経細胞の総突起長および突起数は、それぞれ細胞あたり $212.5 \pm 6.08 \mu\text{m}$ および 3.47 ± 0.127 本であった。MGE で処理した神経細胞は、48 (DIV 4) および 72 (DIV 5) 時間において、時間および濃度に対し、ほぼ依存して総突起長および突起数の有意な増加を示した (図 19A、図 20A)。SAC で処理した神経細胞は、MGE と同様に総突起長および突起数を有意に増加させ、明らかな神経栄養因子としての作用を示した。興味深いことに、SAC が最大栄養効果を示した濃度は 10 ng/mL であり (図 19B、図 20B)、72 時間 (DIV 5) において、いずれの MGE 濃度よりも総突起長の伸長効果を示した。これらのことから、SAC は神経細胞への効果を及ぼす活性本体であること、比較的 low 濃度で神経細胞の分化を促進する成分であることが示唆された。また、MGE $500 \mu\text{g/mL}$

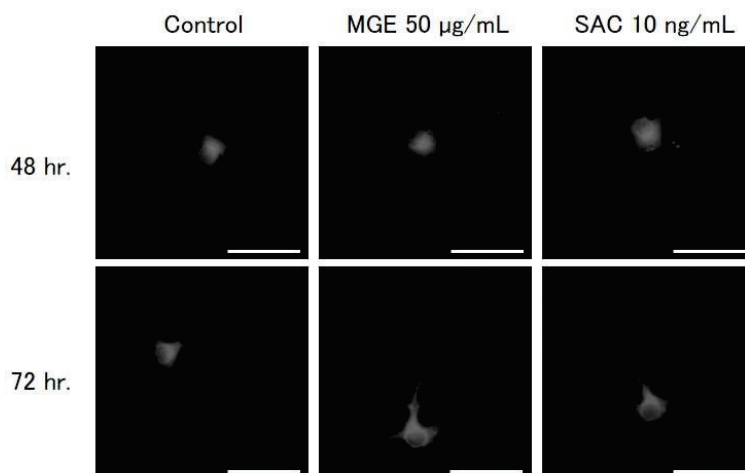


図 18 MGE および SAC の栄養効果による MAP2 陽性初代培養海馬神経細胞の形態変化
MGE または SAC で処理された神経細胞を 48 または 72 時間後に処理した。免疫蛍光染色
によって得られた MAP2 陽性細胞の画像は、IN Cell Translator を使用して画像変換を行っ
た。Bar = $100 \mu\text{m}$

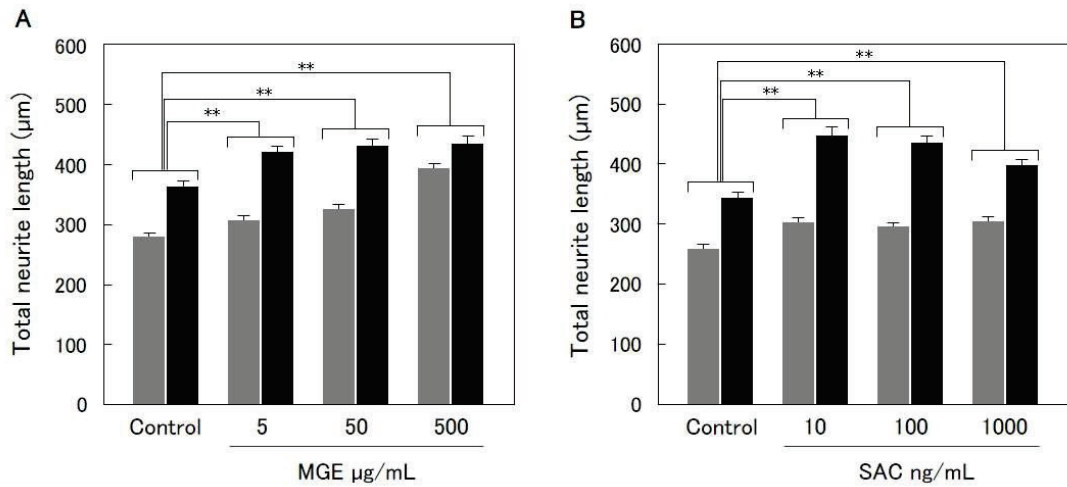


図 19 初代培養海馬神経細胞の総突起長伸長に対する MGE および SAC の影響

MGE (A) および SAC (B) 添加後、48 (■) および 72 (■) 時間の海馬神経細胞の総突起長を定量した。上記のデータは $n = 102-144$ 、平均 \pm SEM、**、 $p < 0.01$ vs. Control (ANOVA および Dunnett's post-hoc 検定) と示した。

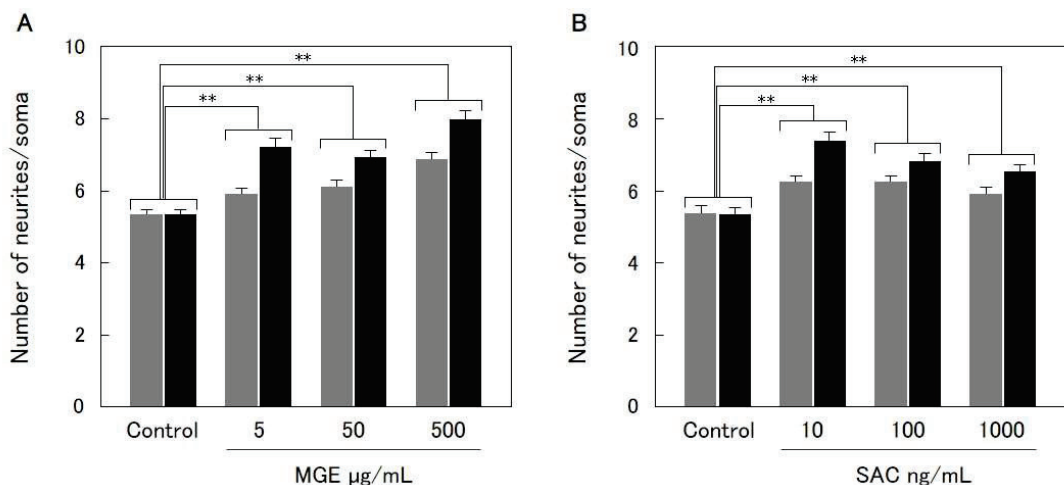


図 20 初代培養海馬神経細胞の樹状突起数に対する MGE および SAC の影響

MGE (A) および SAC (B) 添加後、48 (■) および 72 (■) 時間の海馬神経細胞の樹状突起数を定量した。上記のデータは $n = 102-144$ 、平均 \pm SEM、**、 $p < 0.01$ vs. Control (ANOVA および Dunnett's post-hoc 検定) と示した。

と SAC 1000 ng/mL は総突起長および突起数が大きく異なることから、MGE に含まれる アリインや GSAC 等の SAC 類縁化合物 (図 13) や豊富なアミノ酸 (図 12) が相乗的な効果を示したと推測された。更に、本試験で得られた海馬神経細胞の総突起長の増加は、情報伝達を司るための神経ネットワークの形成に寄与し、突起数の増加は、他の神経細胞の軸索から送り出される情報を受け取る機能の増幅に寄与することが推察された。

3.2 行動学習試験に対する熟成ニンニク抽出物および S-アリルシステインの効果

3.2.1 Y 字型迷路試験

Y 字型迷路試験は、短期記憶の一種である空間作業記憶に対する MGE および SAC による改善効果を検討する目的で実施した。老齢 SAMP10 マウスは、老齢 SAMR1 マウスおよび若齢 SAMP10 マウスと比較して、自発的交替行動率 (Alternation, %) が有意に減少した ($F(2, 33) = 17.33, p = 7.17 \times 10^{-6}$; 図 21A)。一方、MGE または SAC を摂餌させた老齢 SAMP10 マウスは、対照群と比較して自発的交替行動率が有意に増加した ($F(3, 57) = 23.99, p = 3.62 \times 10^{-6}$)

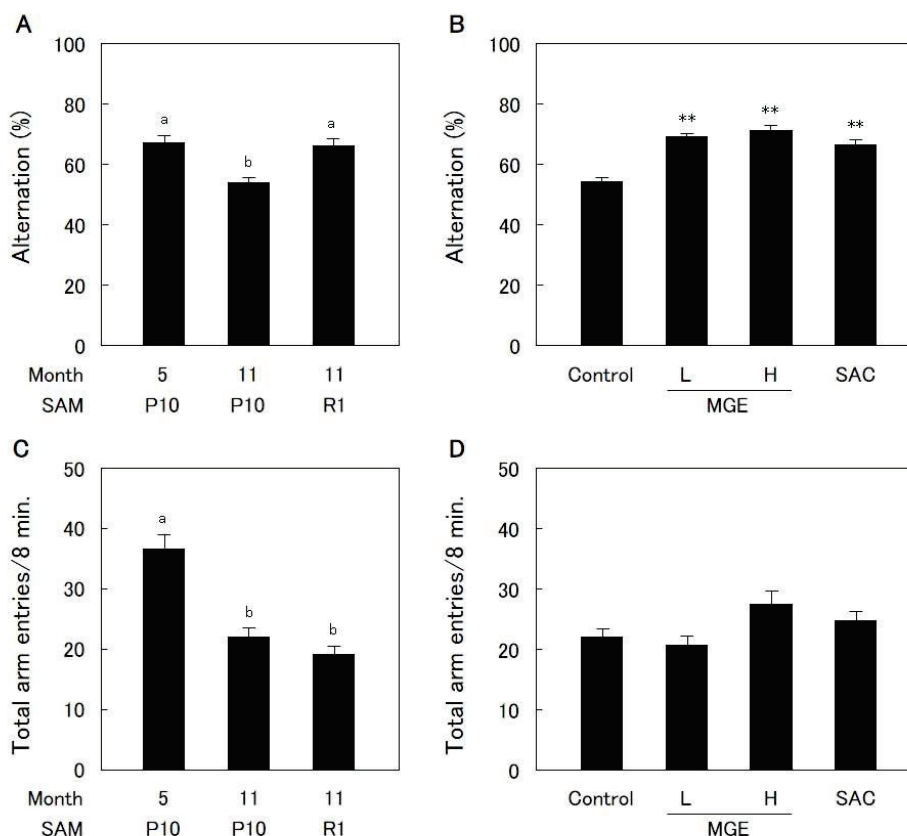


図 21 老化促進マウス (SAM) の作業記憶に対する MGE と SAC の効果

Y 字型迷路を用いて、若齢および老齢 SAMP10 マウス (5 および 11 か月齢) および老齢 SAMR1 マウス (11 か月齢) の行動を 8 分間観察し、交替行動率 (A, B) および総アーム腕エントリー数 (C, D) を測定した。B および D には、MGE または SAC を摂餌した老齢 SAMP10 の結果を示した。L- および H-MGE 摂餌群は、それぞれ 0.20 および 1.0% の MGE を含有する食餌を消費した。SAC および H-MGE 摂餌群グループは、同じ量の SAC を含有する食餌を消費した。上記のデータは、 $n = 8-17$ 、平均 \pm SEM、有意差は a, b; $p < 0.05$ (ANOVA および Tukey-Kramer post-hoc 検定)、**; $p < 0.01$ (ANOVA および Dunnett's post-hoc 検定) と示した。

表 1 SAMP10 および SAMR1 (12 か月齢) の回避反応記憶

Mice	Age (Months)	Number of Animals		Memory Retention (%)
		Success	Failure	
SAMP10	6	8	0	100
SAMP10	12	7	8	46.7
SAMR1	12	7	4	63.6

表 2 老齢 SAMP10 (12 か月齢) の回避反応記憶に対する MGE および SAC の影響

Mice	Diet	Number of Animals		Memory Retention (%)
		Success	Failure	
SAMP10	Control	7	8	46.7
SAMP10	L-MGE	9	4	69.2
SAMP10	H-MGE	10	3	76.9
SAMP10	SAC	11	4	73.3

が短いほど学習記憶能が高いことを意味している。老齢 SAMP10 マウスの合計学習時間は、若齢 SAMP10 および老齢 SAMR1 マウスの学習時間よりも有意に長く ($F(2, 33) = 18.38, p = 4.32 \times 10^{-6}$; 図 22A)、加齢に伴う学習記憶能の低下が認められた。しかし、MGE または SAC を摂餌した老齢 SAMP10 マウスでは合計学習時間の大幅な短縮が見られ ($F(3, 56) = 25.99, p = 1.15 \times 10^{-10}$; 図 22B)、若齢 SAMP10 マウスの学習記憶能と同等の値を示した。この結果より、MGE および SAC は加齢に伴う回避反応記憶能の低下を抑制する作用を有することが示唆された。また、本試験で H-MGE 群と SAC 群に有意な差はなく、SAC は学習記憶能を向上させる活性本体であることが推察された。

更なる長期の記憶保持能を判別する試行として、1 か月後に 1 度だけ記憶再生試行を行い、明室に 300 秒間留まったマウスの数を測定した。表 1 に示すように、全ての若齢 SAMP10 マウスが獲得基準を満たし、老齢 SAMP10 マウスは 46.7%、SAMR1 マウスは 63.6% の成功率 (Memory Retention, %) であったことから、加齢に伴う長期記憶保持能の低下が認められた。一方、MGE および SAC 摂餌群の老齢 SAMP10 マウスは、対照群に対して獲得基準を満たした数が増加し、老齢 SAMR1 マウスの成功率を上回った (表 2)。これらの結果から、MGE および SAC が長期記憶保持能の低下を抑制する作用を有することが示唆された。

3.2.3 新奇物体認識試験

非空間情報（形状・色・コントラスト）の学習記憶能力は、新奇物体認識試験により検討した。4 日目の訓練試行において、いずれの群においても、ボックス内に置かれた 2 つの物体（X および Y）に対する探索的嗜好率（Preference index, %）の偏りは見られず、チャンスレベルを示した（図 23A、B）。5 日目に行った記憶保持試行の結果は、新奇物体 Z に対する反応時間が長いほど、探索的嗜好率が高いことを示している（図 23C、D）。若齢 SAMP10 および老齢 SAMR1 マウス

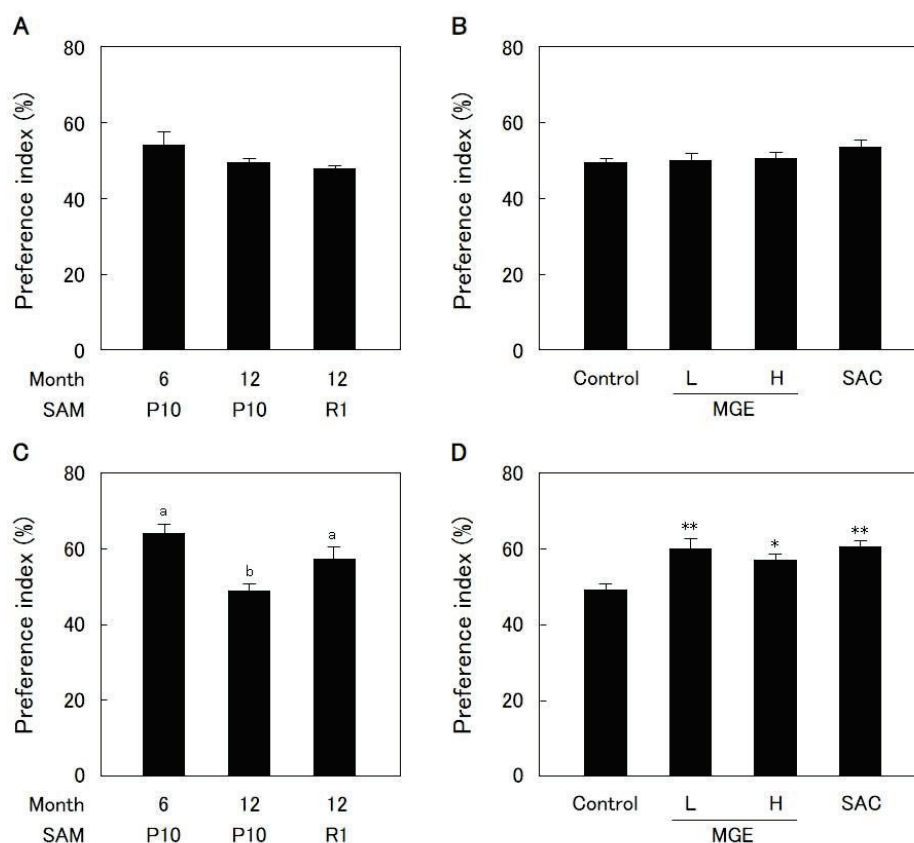


図 23 SAM の非空間記憶能に対する MGE および SAC の効果

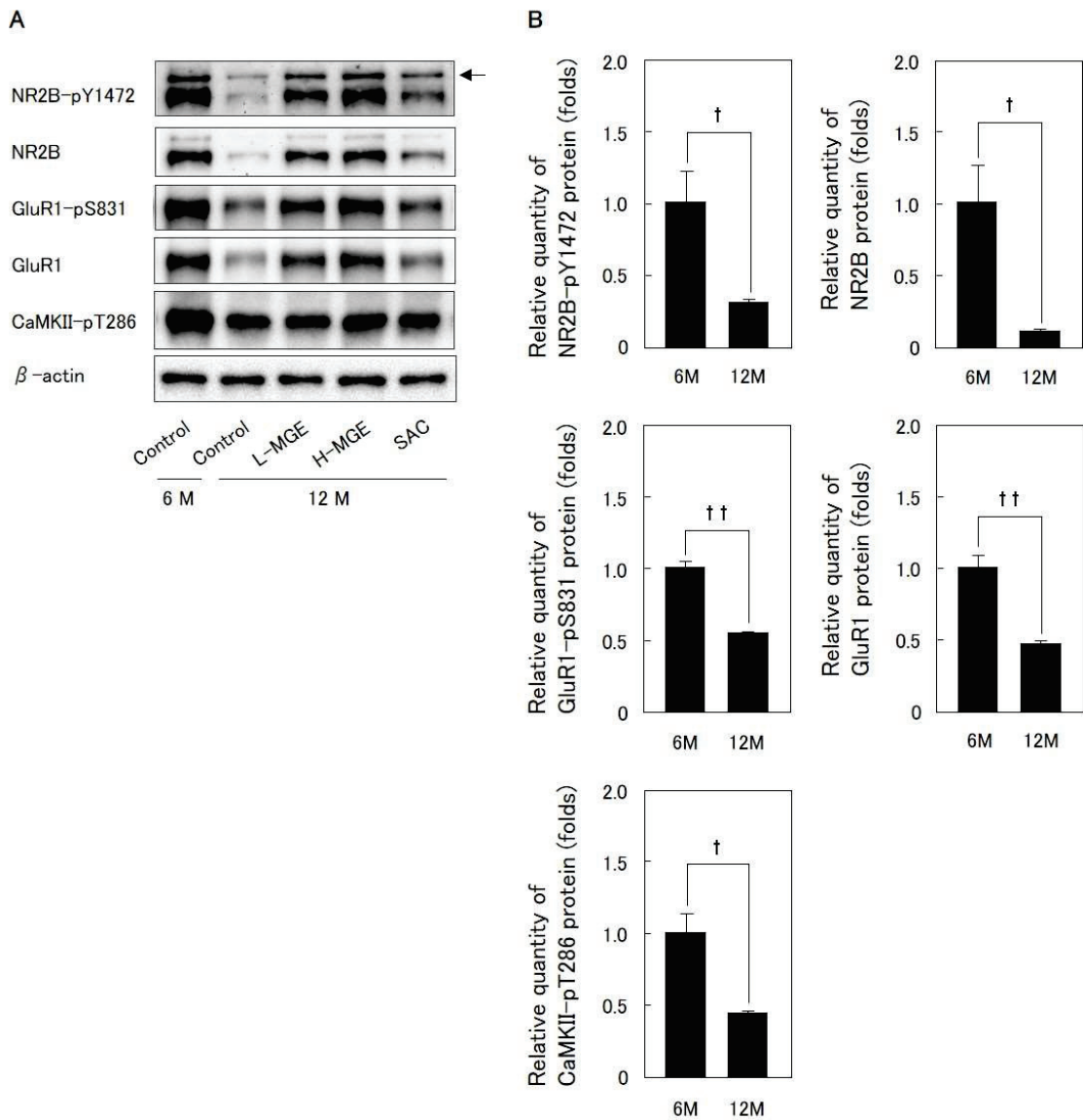
新奇物体認識試験により、若齢および老齢 SAMP10 マウス（6 および 12 か月齢）、老齢 SAMR1 マウス（12 か月齢）の行動を 10 分間観察し、異なる 2 つの物体に対する探索時間を測定することにより、訓練試行（A、B）および保持試行（C、D）における探索的嗜好率（Preference index, %）を求めた。B および D には、MGE または SAC を摂餌した老齢 SAMP10 マウスの結果を示した。L- および H-MGE 摂餌群は、それぞれ 0.20 および 1.0% の MGE を含有する食餌を消費した。SAC および H-MGE 摂餌群は、同じ量の SAC を含有する食餌を消費した。上記のデータは、 $n = 8-15$ 、平均 \pm SEM、有意差は a, b; $p < 0.05$ (ANOVA および Tukey-Kramer post-hoc 検定)、**; $p < 0.01$ vs. Control (ANOVA および Dunnett's post-hoc 検定) と示した。

ウスは有意に探索的嗜好率の増加を示したが、老齢 SAMP10 マウスは訓練試行と同等であった ($F(2, 31) = 9.299, p = 6.86 \times 10^{-4}$; 図 23C)。一方、MGE または SAC を摂餌した老齢 SAMP10 マウスは、新奇物体 Z に対する反応時間が有意に増加し、探索的嗜好率が大幅に増加した ($F(3, 52) = 6.788, p = 6.00 \times 10^{-4}$; 図 23D)。MGE 摂餌群に用量依存的な変化は見られなかったが、MGE および SAC は加齢に伴う記憶低下を抑制し、非空間情報の長期記憶保持能を増強させることが示唆された。また、本試験で H-MGE 群と SAC 群に有意な差はなく、SAC は長期記憶能を向上させる活性本体であることが推察された。

3. 3 シナプス後膜受容体および記憶形成関連分子に対する熟成ニンニク抽出物および S-アリルシステインの効果

いくつかの研究において、NR2B の 1472 番目チロシンリン酸化 (pY1472) と GluR1 の 831 番目セリンリン酸化 (pS831) が神経細胞の NMDA および AMPA 受容体の活動を調節することや、これらのリン酸化反応が学習と記憶形成に関与することが報告されている (64-67, 74, 75, 77, 79, 80, 82, 94)。また、CaMKII 依存性シグナル伝達が神経細胞の生存、脳の発達、学習および記憶形成に関与し、286 番目スレオニン残基の自己リン酸化 (pT286) によるシナプス活性化状態の持続と LTP の関係についても多く報告されている (76, 78, 79, 96, 97)。これらのことより、行動学習試験の終了後に採取した海馬組織を使用し、ウェスタンブロッティング法により、MGE および SAC が関与する記憶獲得の分子機構について検討した (図 24A)。若齢 SAMP10 マウスと比較して、老齢 SAMP10 マウスは、記憶関連受容体 (NR2B-pY1472、NR2B、GluR1-pS831、GluR1) (191) およびリン酸化酵素 CaMKII-pT286 のタンパク質発現レベルが低下しており、シナプス伝達、記憶制御機構の破綻が推測された (図 24B)。それらの中でも、GluR1-pS831 および GluR1 は、より有意 ($p < 0.01$) に発現が低下しており、SAMP10 マウスの記憶形成能の低下に最も関与している可能性が示唆された。一方、H-MGE を摂餌した老齢 SAMP10 マウスは、いずれの受容体および CaMKII-pT286 の発現低下も抑制した。しかし、MGE の容量依存性や H-MGE と SAC の相関関係は観察されなかった。SAC 摂餌群は、GluR1 および CaMKII-pT286 の発現低下を有意に抑制し (図 24C)、SAC と MGE には記憶形成メカニズムに係るタンパク質

の発現を増強させる作用が共通する点と相違する点があることが確認された。SAC 摂餌群は NR2B-pY1472 および NR2B のタンパク質発現が有意でなかったが、GluR1-pS831 発現については有意傾向 ($p = 0.08$) で、概ね運動した細胞内カスケードの活性化を示しており、行動学習試験においては MGE 摂餌群と同等の学習記憶能を示したことから、GluR1 および CaMKII-pT286 の記憶獲得に対する重要性が示唆された。



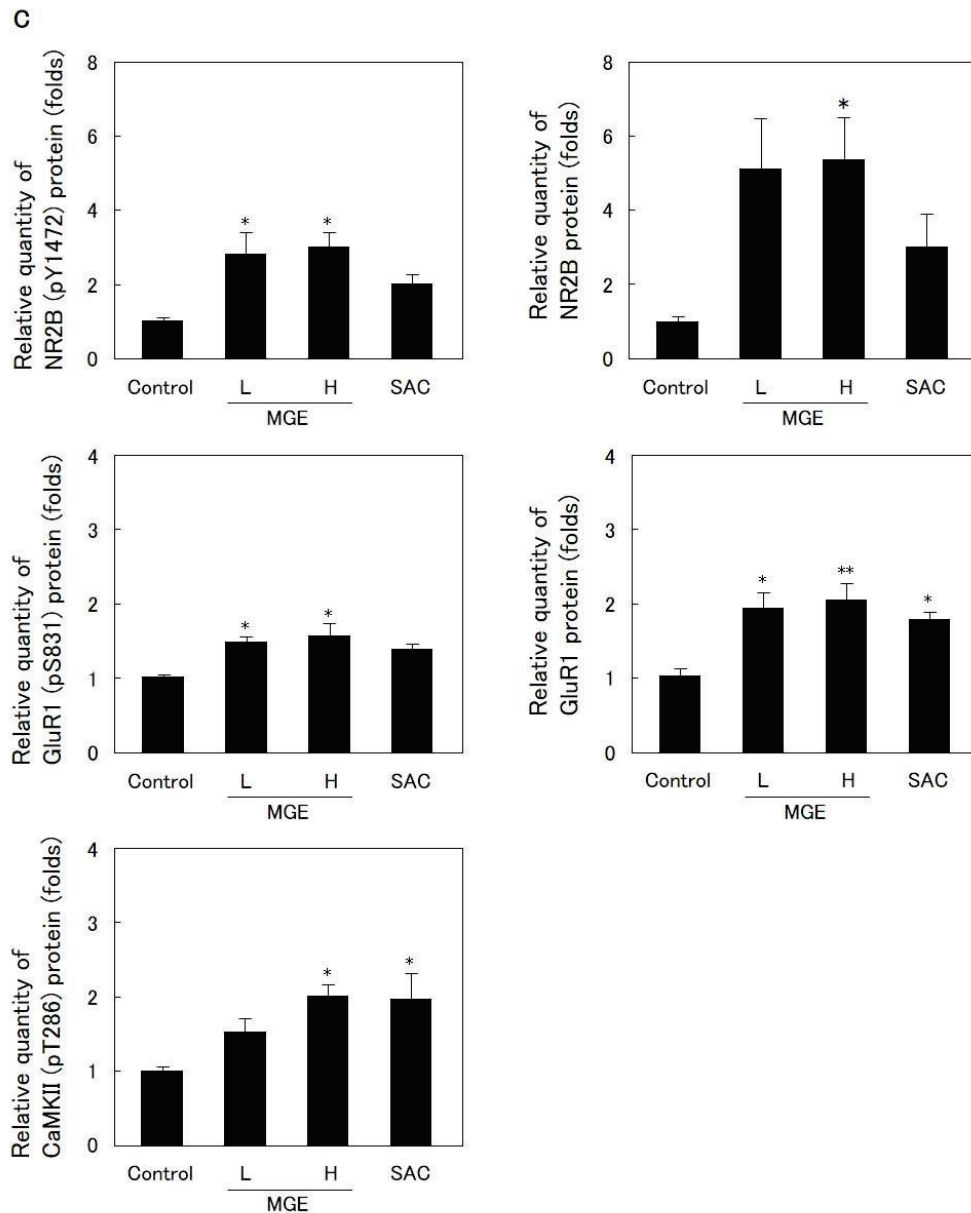


図 24 SAMP10 マウスの海馬タンパク質に対する MGE および SAC の効果

若齢および老齢 SAMP10 マウス (6 および 12 か月齢) の海馬から抽出した記憶関連タンパク質を抽出物中の記憶関連をイムノブロッティングにより検出した (A)。NR2B-pY1472 (upper band)、NR2B、GluR1-pS831、GluR1 および CaMKII-pT286 のバンドを検出し、 β -actin にて標準化して解析を行った (B, C)。上記のデータは、 $n = 4$ 、平均 \pm SEM、有意差は †; $p < 0.05$ 、††; $p < 0.01$ (student's t-検定)、*; $p < 0.05$ 、**; $p < 0.01$ vs. Control (ANOVA および Dunnett's post-hoc 検定) と示した。

第 4 章 考察

脳の本質は、神経機能を可塑的に調節して外界からの情報を記憶し、並行的にその情報を処理することである。神経細胞はシナプスを介して神経ネットワークを形成しており、神経伝達物質とその受容体によって相互にコミュニケーションをとっている (192)。そのコミュニケーションにより、脳内では様々な情報が伝達され、記憶や判断という情報処理に伴い、状況に応じた行動をとることが可能となる。シナプス間の情報伝達の効率は一定ではなく、刺激の強度に応じて変化することが知られており、それを神経可塑的变化 (シナプス可塑性) という (56, 64-66, 68, 80, 81)。学習時の刺激にตอบสนองして活動する神経細胞は、強いシナプス結合で結ばれて細胞集団を形成し、その中に記憶を符号化して保存する。この符号化された複数の細胞集団が調和して 1 つの記憶全体を構成しており、その神経細胞群は痕跡細胞と呼ばれている。また、記憶の形成に伴って脳内に形成される神経細胞の結合や構造的変化等の物理的な記憶の実体は記憶痕跡と呼ばれている。この記憶痕跡が脳内に存在することで記憶は保たれ、活性化時には記憶が想起される (図 25) (193)。つまり、共有化された記憶を担っている痕跡細胞は、何らかのきっかけでその一部が活動的になると、強いシナプスで結ばれた細胞集団全体が活動し、記憶が想起される仕組みである。このように、個々の神経細胞のシナプスレベルの繋がり、細胞集団の神経ネットワークレベルの繋がりにより形成される記憶痕跡が脳の本質を担っている。しかし、加齢や様々なストレスは、神経ネットワークが破綻または脆弱化した神経変性疾患を引き起こし、認知機能の低下、更には認知症を発症させてしまう。近年、記憶痕跡は形成されるが記憶痕跡を正しく想起できない、シナプス構造が減少したアルツハイマー病モデルマウスを用いた研究において、記憶想起が困難な状態であっても、記憶形成時に活動した痕跡細胞の再活性化により記憶の想起能が回復する可能性が報告された (194)。このことは、認知症は過去の記憶を想起できない障害を伴うが、記憶が失われたのではなく、神経シナプスの形成や神経ネットワークの機能亢進により記憶の想起が可能になることを示唆しているため、その予防や治療法の創出に益々期待が高まっている。これまで、神経細胞に対する AGE や SAC の有用性検討に関する研究において、それら成分が神経細胞に顕著な形態学的変化をもたらすこと (163, 164) や行動学習試験で記憶低下の抑制に

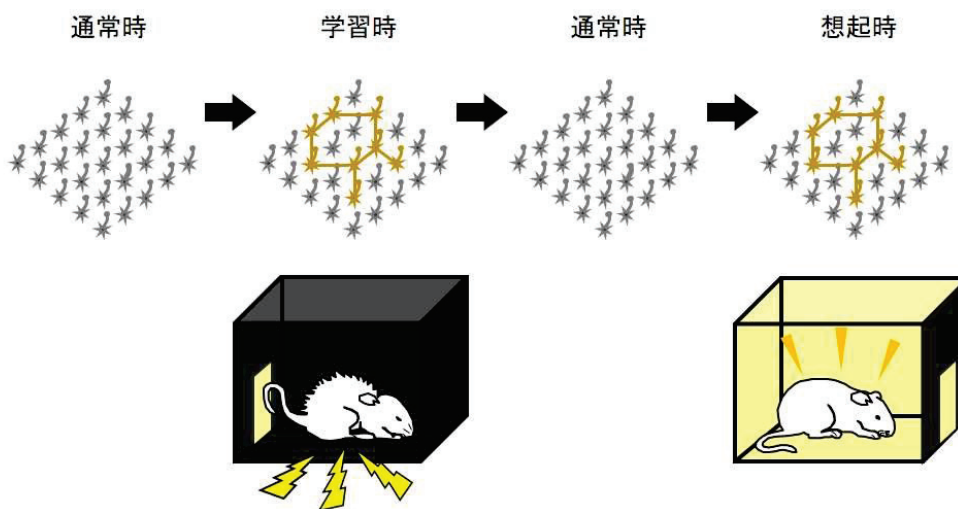


図 25 痕跡細胞による記憶の想起

学習時に記憶が細胞集団として符号化され、脳内に蓄えられる。何らかのきっかけで痕跡細胞が活動的になると、強いシナプス伝達で連絡されたネットワークが同時に活動することにより記憶は想起される。ステップスルー型受動回避試験の場合、学習時の明室から暗室に移動し経験する電気刺激の獲得試行で記憶痕跡が形成され、想起時に再び明室に入る再生試行で痕跡細胞が活動し、記憶が想起される。

関与すること (138-145) については報告されている。しかし、NMDA および AMPA 受容体の増加および活性化によりもたらされる活動電位こそが記憶形成の上で最も欠かすことのできない現象であるにも関わらず、それら受容体や細胞内カスケードに言及した報告はこれまでなかった。

本研究において、MGE および SAC の初代培養海馬神経細胞に対する影響を検討した結果、総突起長の伸長および突起数を有意に増加させた (図 19、図 20)。これらは明らかな神経栄養因子としての作用を有しており、SAC は比較的低濃度 (10 ng/mL) で最大栄養効果を示し、培養 72 時間においてはいずれの MGE 濃度よりも総突起長の伸長効果を示したことから、SAC は神経細胞への効果を及ぼす活性本体であることが示唆された。先行研究では、海馬神経細胞に対する SAC の最大栄養効果は 100 ng/mL で得られており、それ以上の濃度では栄養効果は低下することが報告されていることから (163)、神経細胞数に対する最適濃度の更なる検討が必要である。MGE の多様な成分が高濃度である場合には、それらは SAC と同様の総突起長および突起数に対する栄養効果を示すことが考えられ、MGE に含有される SAC 類縁化合物である GSAC、アリイン、シクロアリイン等が影響したと推察された。これら成分の総突起長に及ぼす効果は、神経可塑性を生じさせる神経シナプスの構築や維持を促し、情報伝達効率や処理能力を高

めること、同様に、突起数の増加は神経回路の新たな結合や繋ぎ変えを促進させ、シナプス伝達効率の持続的増加に寄与することが推測された。更に、SAC は血液脳関門を通過する非常に高い生体内利用率を有する成分であることから (161, 162)、in vivo 試験による学習記憶効果を検証した。

SAC または MGE を含有する食餌を SAMP10 マウスに長期間与え、学習記憶能の低下に対する抑制効果を薬理的行動学習試験によって評価した。各試験の間隔を 1-2 日、または 1 週間とした場合、両者の試験結果に有意な差は見られないことが報告されており (195)、すべての行動学習試験で同じマウスを使用するにあたり、試験スケジュールには十分な期間を設けた。最初の行動学習試験では、マウスへのストレスが少ない Y 字型迷路試験を行った。24 時間後に、電気刺激を伴うステップスルー型受動的回避試験を行い、その 10 日後に新奇物体認識試験を実施した。Y 字型迷路は、アームを連続して選択していく自発的な交替行動の回数と組み合わせから自発行動量と空間作業記憶を評価する短期記憶の指標とされる海馬依存的な試験であり (90, 103-106)、MGE および SAC 摂餌群は自発的交替行動率 (Alternation, %) の有意な増加を示したことから (図 21B)、情報の一時的保持と並行的に情報を理解し行動する空間作業記憶能の亢進をもたらしたことが示唆された (105, 196)。一方、自発行動量は、いずれの SAMP10 マウス群にも有意な差はなく (図 21D)、MGE および SAC は、運動量、探索行動量および動機付けに対して影響を与えない成分であることが示された。ステップスルー型受動回避試験は、マウスが明るい場所より暗い場所を好む性質を利用し、一度経験した嫌悪刺激 (電気刺激) に対する回避行動を評価する長期記憶の指標とされる試験である (90, 112, 113)。この試験は状況 (文脈) および恐怖の記憶に基づく扁桃体に深い係りを持つが (95, 197)、恐怖記憶形成には LTP の実体である海馬シナプス後膜上への AMPA 受容体の増加が必要であると報告されていることから (64-66, 68, 80, 81)、この種の記憶は海馬にも大きく依存している。短期記憶の形成にはグルタミン酸受容体の他にリン酸化酵素群の活性化が重要であり、不安定である短期記憶から長期記憶へ変換し固定化させるプロセスには、学習後に脳内で誘導される新規のタンパク質合成を必要とすることが報告されている (198, 199)。そのため、このステップスルー型受動回避試験で確認された老齢 SAMP10 マウスの長期記憶保持能の促進 (図 22) には、上述した記憶の固

定化の過程が存在していたはずである。新奇物体認識試験は、既に探索した経験のある物体よりも新奇な物体をより長く探索するげっ歯類の性質を利用しており、既知物体を新奇物体に変更した際の非空間情報（形状・色・コントラスト）の認識程度を長期記憶の指標とする内側側頭葉（海馬・海馬傍回）依存的な試験である（52, 200）。この試験に関して、嗅周囲・嗅後部皮質を損傷させると、海馬の空間記憶能に依存する迷路課題に影響はなく、物体認識能が低下することから嗅周皮質依存的な試験との報告もあるが（201-202）、物体を記憶する訓練試行後に起きる記憶の固定化には海馬が関与することや、記憶の記銘、固定、探索といった各段階すべてに海馬が関与する報告もされていることから（203, 204）、空間記憶能と非空間記憶能は区別された脳領域によって制御される単純な仕組みではないことが論じられている。更に、海馬は記憶探索時に扁桃体や嗅周囲皮質等に存在する特定の記憶の再現を活性化することが報告されている（95）。特に、扁桃体と海馬は、関連領域からの情報を集束して、認知、記憶形成および感情表現のプロセスに深く関わっている（63, 205）。これらのことから、新奇物体認識試験は、嗅周囲皮質依存的な非空間情報の記憶のみを評価したものではなく、海馬とその周囲の相互の関係で形成される空間情報にも関与すると考えることができる。推測の域は出ないが、これらの報告から、MGE および SAC がもたらした新奇物体認識試験の長期記憶能の増強（図 23D）は、内側側頭葉の海馬や嗅周囲皮質の神経回路の活性化、また、より広範囲の皮質からの情報を取得・処理し、判断力を向上させた結果である可能性も十分に考えられた。このように、実施したすべての薬理学的行動学習試験において、MGE と SAC を摂餌させた老齢 SAMP10 マウスは学習記憶障害を抑制したことから、これら成分は短期および長期記憶能の改善に有用であることが示唆された。特筆すべきは、SAC 単独で学習記憶能への効果は有意であり、これら結果の本質は、SAC を活性化本体とする MGE の学習記憶能の改善効果であると考えられた。

記憶が固定される際には、グルタミン酸を神経伝達物質として使用する興奮性神経細胞でシナプスの変化が発生するため、AMPA および NMDA 受容体は、シナプス後膜で発生する記憶プロセスで重要な役割を果たす（64-67, 74, 75, 77, 79, 80, 82, 94）。本研究の行動学習試験の結果から、MGE および SAC が神経伝達物質を受容するシナプス後膜の AMPA および NMDA 受容体の活性化や増加に関わり、記憶メカニズムに有用な変化をもたらした可能性が示唆された。

その理由として、学習記憶形成は、① GluR1 を含む AMPA 受容体が発現すること、② NMDA 受容体が活性化すること、③ NMDA 受容体から流入したカルシウムイオンによる CaMKII の活性化と自己リン酸化および GluR1 リン酸化が起こることを必要とするためである (76, 78, 79, 96, 97)。その検証を行うために、行動学習試験後の SAMP10 マウスの海馬タンパク質の解析を行ったところ、AMPA 受容体 (GluR1)、NMDA 受容体 (NR2B) および リン酸化 CaMKII の発現レベルが MGE 摂餌群で有意に増強されていた (図 24C)。NMDA 受容体の活性化により、リン酸化 CaMKII が GluR1 をリン酸化することが LTP を誘発・持続させる重要なメカニズムであることから、MGE はこの細胞内カスケードを包括的に促進することが示唆された。AGE や本研究で利用した MGE の活性本体と推測される SAC の学習記憶メカニズムについては不明な点が多い。本研究において、SAC 摂餌群の海馬内の記憶関連タンパク質については MGE と異なる点もあり、NMDA 受容体への有意な変化は見られなかったが、SAC は AMPA 受容体とそれに係るリン酸化 CaMKII の機能亢進に関与し、記憶形成経路を増強させるという興味深いメカニズムが本研究において解明された (図 26)。同時に、SAC 摂餌群は MGE 摂餌群と同等の学習記憶能を示したことから、記憶形成や保持能の亢進に一層重要な因子は GluR1 およびリン酸化 CaMKII であることが示唆された。また、SAMP10 マウスの老化に伴う AMPA 受容体の発現低下が顕著 ($p < 0.01$) (図 24B) であったことから、記憶形成能の低下に最も関連性の強い因子であることが推察され、SAC が学習記憶能の向上に非常に有用であると考えられた。SAC の神経変性に対する適応の主要な利点と報告されている抗酸化防御因子の増強および AChE 活性の低下作用 (168, 143, 144) が本結果に関与している可能性は考えられるが、その寄与率は本研究では検証しておらず、今後の課題としたい。

記憶の固定化の過程において必須とされるタンパク質の新規合成の引き金となる cyclic AMP response element binding-protein (CREB) は、カルシウムイオンの流入により活性化する PKA の標的とする転写調節因子であり、CREB 遺伝子発現の活性化は LTP の持続において必要であることが明らかにされている (図 26) (206)。記憶の固定化の際の CREB の標的遺伝子としては、神経可塑性や学習記憶を制御する初期応答遺伝子 c-fos および activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)、BDNF が知られている (94, 207, 208)。また、CREB は記

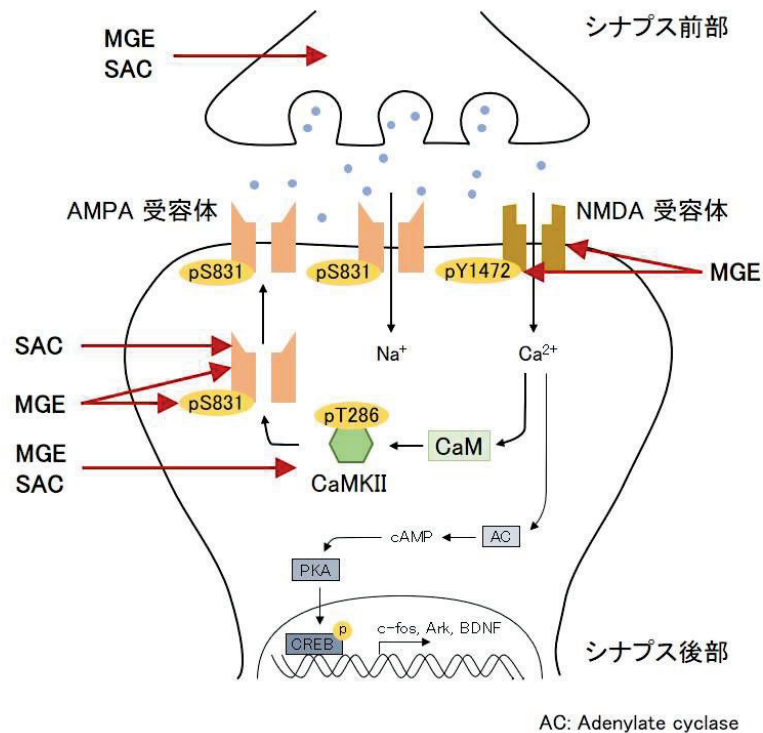


図 26 海馬シナプスにおける MGE および/または SAC の作用メカニズム

憶の固定化のみならず、BDNF を介した短期記憶にも関与し (209, 210)、BDNF は神経栄養因子として、あらゆる種の記憶に影響することが報告されている。それらのことから、海馬培養神経細胞に対して神経栄養因子様作用を示した SAC は、本試験の短期および長期記憶形成能の促進において、AMPA 受容体およびリン酸化 CaMKII の発現増強以外にも有益に機能した可能性がある。本研究で検証した分子は、記憶形成に係る細胞内カスケードの一部でしかなく、上記に挙げる因子に対する影響については次の課題としたいが、アニソマイシン等のタンパク質合成阻害剤を投与した動物では短期記憶は観察される一方で、24 時間程度経過した際の長期記憶の形成は阻害されることより (211)、CREB や BDNF 等が本結果の記憶形成経路に関与している可能性は十分にありと推察された。

本研究により、SAC は神経細胞とそのシナプス後膜の機能維持に寄与することが培養海馬神経細胞および薬理的行動学習試験の結果から明らかとなった。MGE に含まれる複数の構成成分は SAC と幾らかの相乗効果を示したが、その効果の同等性から、SAC は海馬神経細胞の分化を促進する MGE の活性本体であり、MGE の構成成分と協調してシナプス微小環境を形成し、記憶関連タンパク質の減少を抑制するメカニズムを介して、シナプス可塑性および学習記憶

能の促進に関与している可能性が示唆された。MGE に含まれるどの成分が、MGE と SAC のタンパク質発現量の差を生じさせたのか、また、SAC とどのように協調して記憶形成の経路に影響を与えるのか、今後の課題として興味深い点である。ヒトのアルツハイマー型認知症の最も初期の生物学的症状のひとつは、AMPA 受容体の減少とシナプス可塑性障害である (98, 99)。また、ヒトと類似した加齢依存性に起こる認知障害を有する SAMP10 マウスは (126, 134)、神経細胞の突起の退縮、減少や長さの退縮、神経栄養因子の減少による学習記憶障害が顕著であり (125-133)、本研究の老齢 SAMP10 マウスにおいても明らかな行動学習機能の低下や記憶関連タンパク質の減少が見られたが、これらの変化に対し、MGE の活性本体である SAC は有益な結果をもたらした。状況 (刺激の強さ) に応じ、記憶に必要な LTP に要するリン酸化酵素 CaMKII とその基質となる AMPA 受容体の発現調整が可能であれば、ヒトにおいても認知レベルの維持や回復が期待できるかもしれない。

本研究の目的は、マウスの学習記憶の形成に関与する薬理学的行動学習および海馬の記憶関連タンパク質の発現に与える影響を検討する事であったが、より上位の目的は MGE のヒトへの適応であり、現代の超高齢化社会における認知症および MCI 有病者の認知機能の治療に寄与することである。特に、保険適応の範疇でない MCI 有病者や、プレクリニカル期にある症状未然のヒトは、このようなブレインフードによって健康寿命を延ばせる可能性が十分にある。本研究で得られた MGE および SAC が示した結果は、「人生 100 年時代」が抱える認知症有病者の増加という社会課題に対して、食を通じて貢献できるものと考えられた。

第 5 章 総括

本研究では、SAC および MGE が海馬神経細胞の分化促進による形態学的変化、薬理的行動学習能の改善および記憶関連タンパク質発現の低下抑制作用を見出した。また、SAC はこれら作用の中心的役割を果たす MGE の活性本体として、学習記憶能の維持・改善に寄与することが示唆された。

ヒトの老化脳研究のモデルとされている SAMP10 マウスにおいて得られた本研究結果は、現代が抱える認知症有病者の増加という社会課題に対して、脳機能の促進と維持を目的とした食品、特に記憶と判断の精度を向上させることを目的としたブレインフードへの応用に非常に興味深いものであると考えられる。

謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行に際して、終始御指導と御鞭撻を賜りました、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 赤尾 幸博 特任教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成に際し、有益な御助言および御校閲を賜りました、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 江坂 幸宏 教授、上田 浩 教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、共同研究を御快諾いただき、有益なる御助言および御指導を賜りました、静岡県立大学薬学研究院統合生理学講座 海野 けい子 准教授に心より感謝いたします。

本研究に際し、終始深い御理解をいただきました、一丸ファルコス株式会社 安藤 芳彦 社長、アルナシリ イダマルゴダ 開発部長、田中 清隆 開発部次長、伊藤 賢一 開発部次長に深く感謝いたします。

本研究遂行に際し、多大な御協力をいただきました、一丸ファルコス株式会社 榎谷 晃明 開発部開発 2 課長、中井 剛 氏に心より感謝いたします。

最後に、温かく見守り、辛抱強く支援してくれた家族に、心より感謝いたします。

引用文献

1. Selkoe, D.J. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **1989**, *12*, 463–490
2. Goate, A.; Chartier-Harlin, M.C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L.; Mant, R.; Newton, P.; Rooke, K.; Roques, P.; Talbot, C.; Pericak-Vance, M.; Roses, A.; Williamson, R.; Rossor, M.; Owen, M.; Hardy, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**, *349*, 704–706
3. Kivipelto, M.; Helkala, E.L.; Laakso, M.P.; Hänninen, T.; Hallikainen, M.; Alhainen, K.; Soininen, H.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* **2001**, *322*, 1447–1451
4. Xu, W.; Qiu, C.; Winblad, B.; Fratiglioni, L. The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Diabetes* **2007**, *56*, 211–216.
5. Livingston, G.; Sommerlad, A.; Orgeta, V.; Costafreda, S.G.; Huntley, J.; Ames, D.; Ballard, C.; Banerjee, S.; Burns, A.; Cohen-Mansfield, J.; Cooper, C.; Fox, N.; Gitlin, L.N.; Howard, R.; Kales, H.C.; Larson, E.B.; Ritchie, K.; Rockwood, K.; Sampson, E.L.; Samus, Q.; Schneider, L.S.; Selbæk, G.; Teri, L.; Mukadam, N.; Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* **2017**, *390*, 2673–2734.
6. Hirabayashi, N.; Hata, J.; Ohara, T.; Mukai, N.; Nagata, M.; Shibata, M.; Gotoh, S.; Furuta, Y.; Yamashita, F.; Yoshihara, K.; Kitazono, T.; Sudo, N.; Kiyohara, Y.; Ninomiya, T. Association Between Diabetes and Hippocampal Atrophy in Elderly Japanese: The Hisayama Study. *Diabetes. Care* **2016**, *39*, 1543–1549.
7. Matsuzaki, T.; Sasaki, K.; Tanizaki, Y.; Hata, J.; Fujimi, K.; Matsui, Y.; Sekita, A.; Suzuki, S.O.; Kanba, S.; Kiyohara, Y.; Iwaki, T. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* **2010**, *75*, 764–770

8. Ohara, T.; Doi, Y.; Ninomiya, T.; Hirakawa, Y.; Hata, J.; Iwaki, T.; Kanba, S.; Kiyohara, Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology* **2011**, *77*, 1126–1134
9. Xue, M.; Xu, W.; Ou, Y.N.; Cao, X.P.; Tan, M.S.; Tan, L.; Yu, J.T. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *55*, 100944.
10. 厚生労働省. 平成 29 年度版高齢社会白書
11. 二宮 利治, 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究」 **2014**
12. Hardy, J.; Salkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356.
13. De Strooper, B.; Annaert, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. cell Sci.* **2000**, *113*, 1857–1870.
14. Davies, P.; Maloney, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **1976**, *2*, 1403.
15. Bowen, D.M.; Smith, C.B.; White, P.; Davison, A.N. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **1976**, *99*, 459–496.
16. Rogers, S.L.; Farlow, M.R.; Doody, R.S.; Mohs, R.; Friedhoff, L.T. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* **1998**, *50*, 136–145.
17. Rockwood, K.; Mintzer, J.; Truyen, L.; Wessel, T.; Wilkinson, D. Effects of a flexible galantamine dose in Alzheimer's disease: a randomised, controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2001**, *71*, 589–595.
18. Rösler, M.; Anand, R.; Cicin-Sain, A.; Gauthier, S.; Agid, Y.; Dal-Bianco, P.; Stähelin, H.B.; Hartman, R.; Gharabawi, M. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* **1999**, *318*, 633–638.

19. Nakamura, S.; Murayama, N.; Noshita, T.; Katsuragi, R.; Ohno, T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid- β and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *548*, 115–122.
20. Davis, K.L.; Thal, L.J.; Gamzu, E.R.; Davis, C.S.; Woolson, R.F.; Gracon, S.I.; David A. Drachman, M.D., Schneider, L.S.; Whitehouse, P.J.; Hoover, T.M.; Morris, J.C.; Kawas, C.H.; Knopman, D.S.; Earl, N.L.; Kumar, V.; Doody, R.S. and the Tacrine Collaborative Study Group. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **1992**, *327*, 1253–1259.
21. Hughes, T.F.; Andel, R.; Small, B.J.; Borenstein, A.R.; Mortimer, J.A.; Wolk, A.; Johansson, B.; Fratiglioni, L.; Pedersen, N.L.; Gatz, M. Midlife fruit and vegetable consumption and risk of dementia in later life in Swedish twins. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2010**, *18*, 413–420.
22. Petersen, R.C.; Smith, G.E.; Waring, S.C.; Ivnik, R.J.; Tangalos, E.G.; Kokmen, E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* **1999**, *56*, 303–308.
23. 朝田隆, 厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)「都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応」 **2013**
24. Roberts, R.O.; Knopman, D.S.; Mielke, M.M.; Cha, R.H.; Pankratz, V.S.; Christianson, T.J.; Geda, Y.E.; Boeve, B.F.; Ivnik, R.J. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal. *Neurology* **2014**, *82*, 317–325.
25. Iwashita, T.; Ikeda, M. Mild cognitive impairment in a population-based epidemiological study. *Psychogeriatrics* **2007**, *7*, 104–108.
26. Jack, C.R. Jr.; Knopman, D.S.; Jagust, W.J.; Shaw, L.M.; Aisen, P.S.; Weiner, M.W.; Petersen, R.C.; Trojanowski, J.Q. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 119–128.
27. Shankar, G.M.; Li, S.; Mehta, T.H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N.E.; Smith, I.; Brett, F.M.; Farrell, M.A.; Rowan, M.J.; Lemere, C.A.; Regan, C.M.; Walsh, D.M.; Sabatini, B.L.; Selkoe, D.J. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic

- plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 837–842.
28. Palop, J.J.; Mucke, L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 812–818.
 29. Petersen, R.C.; Thomas, R.G.; Grundman, M.; Bennett, D.; Doody, R.; Ferris, S.; Galasko, D.; Jin, S.; Kaye, J.; Levey, A.; Pfeiffer, E.; Sano, M.; van Dyck, C.H.; Thal, L.J. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2379–2388.
 30. Uchida, K.; Shan, L.; Suzuki, H.; Tabuse, Y.; Nishimura, Y.; Hirokawa, Y.; Mizukami, K.; Akatsu, H.; Meno, K.; Asada, T. Amyloid- β sequester proteins as blood-based biomarkers of cognitive decline. *Alzheimers Dement. (Amst)* **2015**, *1*, 270–280.
 31. 内田和彦, 血液を用いた MCI スクリーニング検査の実際. *Current Therapy* **2016**, *34*, 252–257.
 32. Swaminathan, A.; Jicha, G.A. Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 282.
 33. Engelhart, M.J.; Geerlings, M.I.; Ruitenberg, A.; van Swieten, J.C.; Hofman, A.; Witteman, J.C.; Breteler, M.M. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* **2002**, *287*, 3223–3229.
 34. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Bienias, J.L.; Tangney, C.C.; Bennett, D.A.; Aggarwal, N.; Wilson, R.S.; Scherr, P.A. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA* **2002**, *287*, 3230–3237.
 35. Laurin, D.; Masaki, K.H.; Foley, D.J.; White, L.R.; Launer, L.J. Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Am. J. Epidemiol.* **2004**, *159*, 959–967.
 36. Luchsinger, J.A.; Tang, M.X.; Miller, J.; Green, R.; Mayeux, R. Higher folate intake is related to lower risk of Alzheimer's disease in the elderly. *J. Nutr. Health Aging* **2008**, *12*, 648–650.
 37. Buell, J.S.; Dawson-Hughes, B.; Scott, T.M.; Weiner, D.E.; Dallal, G.E.; Qui, W.Q.; Bergethon, P.;

- Rosenberg, I.H.; Folstein, M.F.; Patz, S.; Bhadelia, R.A.; Tucker, K.L. 25-Hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology* **2010**, *74*, 18–26.
38. Kalmijn, S.; Launer, L.J.; Ott, A.; Witteman, J.C.; Hofman, A.; Breteler, M.M. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 776–782.
39. Dangour, A.D.; Allen, E.; Elbourne, D.; Fasey, N.; Fletcher, A.E.; Hardy, P.; Holder, G.E.; Knight, R.; Letley, L.; Richards, M.; Uauy, R. Effect of 2-y n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive function in older people: a randomized, double-blind, controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 1725–1732.
40. Freund-Levi, Y.; Eriksdotter-Jönhagen, M.; Cederholm, T.; Basun, H.; Faxén-Irving, G.; Garlind, A.; Vedin, I.; Vessby, B.; Wahlund, L.O.; Palmblad, J. Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized doubleblind trial. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 1402–1408.
41. Kotani, S.; Sakaguchi, E.; Warashina, S.; Matsukawa, N.; Ishikura, Y.; Kiso, Y.; Sakakibara, M.; Yoshimoto, T.; Guo, J.; Yamashima, T. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* **2006**, *56*, 159–164.
42. Mazereeuw, G.; Lanctôt, K.L.; Chau, S.A.; Swardfager, W.; Herrmann, N. Effects of ω -3 fatty acids on cognitive performance: a meta-analysis. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1482.e17–29.
43. Ehrnhoefer, D.E.; Bieschke, J.; Boeddrich, A.; Herbst, M.; Masino, L.; Lurz, R.; Engemann, S.; Pastore, A.; Wanker, E.E. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 558–566.
44. Afzal, M.; Safer, A.M.; Menon, M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology* **2015**, *23*, 151–161.
45. Noguchi-Shinohara, M.; Yuki, S.; Dohmoto, C.; Ikeda, Y.; Samuraki, M.; Iwasa, K.; Yokogawa, M.; Asai, K.; Komai, K.; Nakamura, H.; Yamada, M. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. *PLoS One* **2014**, *9*, e96013.

46. Fischer, K.; Melo van Lent, D.; Wolfsgruber, S.; Weinhold, L.; Kleineidam, L.; Bickel, H.; Scherer, M.; Eisele, M.; van den Bussche, H.; Wiese, B.; König, H.H.; Weyerer, S.; Pentzek, M.; Röhr, S.; Maier, W.; Jessen, F.; Schmid, M.; Riedel-Heller, S.G.; Wagner, M. Prospective Associations between Single Foods, Alzheimer's Dementia and Memory Decline in the Elderly. *Nutrients* **2018**, *10*, 852.
47. Singh, B.; Parsaik, A.K.; Mielke, M.M.; Erwin, P.J.; Knoman, D.S.; Petersen, R.C.; Roberts, R.O. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *39*, 271–282.
48. Loughrey, D.G.; Lavecchia, S.; Brennan, S.; Lawlor, B.A.; Kelly, M.E. The Impact of the Mediterranean Diet on the Cognitive Functioning of Healthy Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv. Nutr.* **2017**, *8*, 571–586.
49. 三村將, 記憶障害. In *高次脳機能障害のリハビリテーション*, Ver. 2.; 江藤文夫, 武田克彦, Eds.; 医師薬出版: 東京, 2004; pp. 38–44.
50. Alloway, T.P. *Improving working memory: Supporting Students' Learning*, SAGE Publications Ltd.: CA, USA, 2010
51. Gathercole, S.E.; Alloway, T.P. *Working memory and learning: A Practical Guide for Teachers*, SAGE Publications Ltd.: CA, USA, 2008
52. Squire, L.R.; Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13515–13522.
53. Tulving, E. Episodic and semantic memory. In *Organization of Memory*, Tulving, E., Donaldson, W., Eds.; Academic Press: NY, USA, 1972; pp. 381–403.
54. Squire, L.R.; Stark, C.E.; Clark, R.E. The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 279–306.
55. Scoville, W.B.; Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1957**, *20*, 11–21.
56. Hebb, D.O. *The Organization of Behavior*, John Wiley & Sons, NY, USA, 1949.
57. Cooke, S.F.; Bliss, T.V. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* **2006**, *129*, 1659–

1673.

58. Bliss, T.V.; Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **1973**, *232*, 331–356.
59. Amaral, D.G.; Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **1989**, *31*, 571–591.
60. Yasuda, M.; Johnson-Venkatesh, E.M.; Zhang, H.; Parent, J.M.; Sutton, M.A.; Umemori, H. Multiple forms of activity-dependent competition refine hippocampal circuits in vivo. *Neuron* **2011**, *70*, 1128–1142.
61. Kohara, K.; Pignatelli, M.; Rivest, A.J.; Jung, H.Y.; Kitamura, T.; Suh, J.; Frank, D.; Kajikawa, K.; Mise, N.; Obata, Y.; Wickersham, I.R.; Tonegawa, S. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 269–279.
62. Boehringer, R.; Polygalov, D.; Huang, A.J.Y.; Middleton, S.J.; Robert, V.; Wintzer, M.E.; Piskorowski, R.A.; Chevaleyre, V.; McHugh, T.J. Chronic Loss of CA2 Transmission Leads to Hippocampal Hyperexcitability. *Neuron* **2017**, *94*, 642–655.e9.
63. O'Reilly, R.C.; Bhattacharyya, R.; Howard, M.D.; Ketz, N. Complementary learning systems. *Cogn. Sci.* **2014**, *38*, 1229–1248.
64. Shi, S.H.; Hayashi, Y.; Petralia, R.S.; Zaman, S.H.; Wenthold, R.J.; Svoboda, K.; Malinow, R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **1999**, *284*, 1811–1816.
65. Nicoll, R.A. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2003**, *358*, 721–726.
66. Nicoll, R.A.; Malenka, R.C. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **1995**, *377*, 115–118.
67. Nayak, A.; Zastrow, D.J.; Lickteig, R.; Zahniser, N.R.; Browning, M.D. Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* **1998**,

- 394, 680–683.
68. Malenka, R.C.; Bear, M.F. LTP and LTD; an embarrassment of riches. *Neuron* **2004**, *44*, 5–21.
 69. Johnson, J.W.; Ascher, P. Voltage-dependent block by intracellular Mg^{2+} of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophys. J.* **1990**, *57*, 1085–1090.
 70. Hollmann, M.; Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 31–108.
 71. Malinow, R.; Malenka, R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **2002**, *25*, 103–126.
 72. Brecht, D.S.; Nicoll, R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* **2003**, *40*, 361–379.
 73. Ju, W.; Morishita, W.; Tsui, J.; Gaietta, G.; Deerinck, T.J.; Adams, S.R.; Garner, C.C.; Tsien, R.Y.; Ellisman, M.H.; Malenka, R.C. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 244–253.
 74. Derkach, V.A.; Oh, M.C.; Guire, E.S.; Soderling, T.R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 101–113.
 75. Benke, T.A.; Lüthi, A.; Isaac, J.T.; Collingridge, G.L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **1998**, *393*, 793–797.
 76. Lisman, J.; Schulman, H.; Cline, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 175–190.
 77. Luscher, C.; Malenka, R.C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a005710.
 78. Derkach, V.; Barria, A.; Soderling, T.R. Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3269–3274.
 79. Mammen, A.L.; Kameyama, K.; Roche, K.W.; Huganir, R.L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by

- calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32528–32533.
80. Zalutsky, R.A.; Nicoll, R.A. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* **1990**, *248*, 1619–1624.
81. 池谷祐二, 脳のメモリー菓子. In *記憶を強化する*; 講談社: 東京, 2001
82. Roche, K.W.; O'Brien, R.J.; Mammen, A.L.; Bernhardt, J.; Huganir, R.L. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* **1996**, *16*, 1179–1188.
83. Gocel, J.; Larson, J. Evidence for loss of synaptic AMPA receptors in anterior piriform cortex of aged mice. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5*, 39.
84. Bahr, B.A.; Godshall, A.C.; Hall, R.A.; Lynch, G. Mouse telencephalon exhibits an age-related decrease in glutamate (AMPA) receptors but no change in nerve terminal markers. *Brain Res.* **1992**, *589*, 320–326.
85. Nicoletti, V.G.; Condorelli, D.F.; Dell'Albani, P.; Ragusa, N.; Giuffrida Stella, A.M. AMPA-selective glutamate receptor subunits in the rat hippocampus during aging. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *40*, 220–224
86. Magnusson, K.R. Aging of glutamate receptors: Correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech. Ageing Dev.* **1998**, *104*, 227–248.
87. Wenk, G.L.; Barnes, C.A. Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat. *Brain Res.* **2000**, *885*, 1–5.
88. Cantanelli, P.; Sperduti, S.; Ciavardelli, D.; Stuppia, L.; Gatta, V.; Sensi, S.L. Age-dependent modifications of AMPA receptor subunit expression levels and related cognitive effects in 3xTg-AD mice. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 200.
89. Morris, R.G.; Garrud, P.; Rawlins, J.N.; O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **1982**, *297*, 681–683.
90. Yamada, K.; Tanaka, T.; Mamiya, T.; Shiotani, T.; Kameyama, T.; Nabeshima, T. Improvement by nefiracetam of beta-amyloid-(1–42)-induced learning and memory impairments in rats. *Br.*

- J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 235–244.
91. Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* **1984**, *11*, 47–60.
92. Morris, R.G.; Anderson, E.; Lynch, G.S.; Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **1986**, *319*, 774–776.
93. Tang, Y.P.; Shimizu, E.; Dube, G.R.; Rampon, C.; Kerchner, G.A.; Zhuo, M.; Liu, G.; Tsien, J.Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **1999**, *401*, 63–69.
94. Nakai, T.; Nagai, T.; Tanaka, M.; Itoh, N.; Asai, N.; Enomoto, A.; Asai, M.; Yamada, S.; Saifullah, A.B.; Sokabe, M.; Takahashi, M.; Yamada, K. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 14995–15008.
95. Tanaka, K.Z.; Pevzner, A.; Hamidi, A.B.; Nakazawa, Y.; Graham, J. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron* **2014**, *84*, 347–354.
96. Amada, N.; Aihara, K.; Ravid, R.; Horie, M. Reduction of NR1 and phosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **2005**, *16*, 1809–1813.
97. Ghosh, A.; Giese, K.P. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **2015**, *8*, 78.
98. Guntupalli, S.; Widagdo, J.; Anggono, V. Amyloid- β -induced dysregulation of AMPA receptor trafficking. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, 3204519.
99. Jurado, S. AMPA receptor trafficking in natural and pathological aging. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *10*, 446.
100. Crawley, J.N.; Paylor, R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm. Behav.* **1997**, *31*, 197–211.

101. Miyakawa, T.; Yagi, T.; Watanabe, S.; Niki, H. Increased fearfulness of Fyn tyrosine kinase deficient mice. *Brain Res. Mol. Brain res.* **1994**, *27*, 179–182.
102. Miyakawa, T.; Yagi, T.; Kagiya, A.; Niki, H. Radial maze performance, open-field and elevated plus-maze behaviors in Fyn-kinase deficient mice: further evidence for increased fearfulness. *Brain Res. Mol. Brain res.* **1996**, *37*, 145–150.
103. Mamiya, T.; Ukai, M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 1597–1599.
104. Hiramatsu, M.; Inoue, K. Nociceptin/orphanin FQ and nocistatin on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 655–660.
105. Fortin, N.J.; Agster, K.L.; Eichenbaum, H.B. Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 458–462.
106. Hughes, R.N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2004**, *28*, 497–505.
107. Zeng, H.; Chattarji, S.; Barbarosie, M.; Rondi-Reig, L.; Philpot, B.D.; Miyakawa, T.; Bear, M.F.; Tonegawa, S. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* **2001**, *107*, 617–629.
108. Nagai, T.; Yamada, K.; Kim, H.C.; Kim, Y.S.; Noda, Y.; Imura, A.; Nabeshima, Y.; Nabeshima, T. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: A role of oxidative stress. *FASEB J.* **2003**, *17*, 50–52.
109. Kamei, H.; Nagai, T.; Nakano, H.; Togan, Y.; Takayanagi, M.; Takahashi, K.; Kobayashi, K.; Yoshida, S.; Maeda, K.; Takuma, K.; Nabeshima, T.; Yamada, K. Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. *Biol. Psychiatry* **2006**, *59*, 75–84.
110. Ito, Y.; Takuma, K.; Mizoguchi, H.; Nagai, T.; Yamada, K. A novel azaindolizone derivative ZSET1446 (spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one) improves methamphetamine-induced impairment of recognition memory in mice by activating extracellular signal-regulated

- kinase 1/2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 819–827.
111. Takuma, K.; Matsuo, A.; Himeno, Y.; Hoshina, Y.; Ohno, Y.; Funatsu, Y.; Arai, S.; Kamei, H.; Mizoguchi, H.; Nagai, T.; Koike, K.; Inoue, M.; Yamada, K. 17beta-estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. *Neuroscience* **2007**, *146*, 60–68.
112. Unno, K.; Takabayashi, F.; Kishido, T.; Oku, N. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 1027–1034.
113. Unno, K.; Yamamoto, H.; Ohtaki, T.; Ishikawa, Y.; Noda, S.; Maeda, K.; Fujitani, K.; Miyazaki, H.; Takabayashi, F.; Sasaki, T. Hoshino, M. Active component in green tea catechins and effective intake period for prevention of age-related brain dysfunction. *J. Anti-Aging Med.* **2011**, *8*, 75–81.
114. Takeda, T.; Hosokawa, M.; Takeshita, S.; Irino, M.; Higuchi, K.; Matsushita, T.; Tomita, Y.; Yasuhira, K.; Hamamoto, H.; Shimizu, K.; Ishii, M.; Yamamuro, T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* **1981**, *17*, 183–194.
115. Takeda, T.; Hosokawa, M.; Higuchi, K. Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1991**, *39*, 911–919.
116. Hosokawa, M.; Kasai, R.; Higuchi, K.; Takeshita, S.; Shimizu, K.; Hamamoto, H.; Honma, A.; Irino, M.; Toda, K.; Matsumura, A.; Matsushita, M.; Takeda, T. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* **1984**, *26*, 91–102.
117. Takeda, T.; Hosokawa, M.; Higuchi, K.; Hosono, M.; Akiguchi, I.; Katoh, H. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch. Gerontol. Geriatr.* **1994**, *19*, 185–192.
118. Nomura, Y.; Yamanaka, Y.; Kitamura, Y.; Arima, T.; Ohnuki, T.; Oomura, Y.; Sasaki, K.; Nagashima, K.; Ihara, Y. Senescence-accelerated mouse. Neurochemical studies on aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *15*, 410–418.

119. Zhao, X.H., Nomura, Y. Age-related changes in uptake and release on L-[3H]noradrenaline in brain slices of senescence accelerated mouse. *Int. J. Develop. Neurosci.* **1990**, *8*, 267–272.
120. Kitamura, Y.; Zhao, X.H.; Ohnuki, T.; Takei, M.; Nomura, Y. Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* **1992**, *137*, 169–172.
121. Miyamoto, M.; Kiyota, Y.; Yamazaki, N.; Nagaoka, A.; Matsuo, T.; Nagawa, Y.; Takeda, T. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol. Behav.* **1986**, *38*, 399–406.
122. Yagi, H.; Irino, M.; Matsushita, T.; Katoh, S.; Umezawa, M.; Tsuboyama, T.; Hosokawa, M.; Akiguchi, I.; Tokunaga, R.; Takeda, T. Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1989**, *48*, 577–590.
123. Shimada, A.; Ohta, A.; Akiguchi, I.; Takeda, T. Inbred SAM-P/10 as a mouse model of spontaneous, inherited brain atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1992**, *51*, 440–450.
124. Shimada, A.; Hosokawa, M.; Ohta, A.; Akiguchi, I.; Takeda, T. Localization of atrophy-prone areas in the aging mouse brain: Comparison between the brain atrophy model SAM-P/10 and the normal control SAM-R/1. *Neuroscience* **1994**, *59*, 859–869.
125. Shimada, A.; Tsuzuki, M.; Keino, H.; Satoh, M.; Chiba, Y.; Saitoh, Y.; Hosokawa, M. Apical vulnerability to dendritic retraction in prefrontal neurones of ageing SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2006**, *32*, 1–14.
126. Shimada, A.; Keino, H.; Satoh, M.; Kishikawa, M.; Hosokawa, M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. *Synapse* **2003**, *48*, 198–204.
127. Miyamoto, M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 139–148.
128. Okuma, Y.; Murayama, T.; Tha, K.K.; Yamada, C.; Hosokawa, M.; Ishikawa, A.; Watanabe, R.;

- Maekawa, M.; Nomura, Y. Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10. *Mech. Ageing Dev.* **2000**, *114*, 191–199.
129. Onodera, T.; Watanabe, R.; Tha, K.K.; Hayashi, Y.; Murayama, T.; Okuma, Y.; Ono, C.; Oketani, Y.; Hosokawa, M.; Nomura, Y. Depressive behavior and alterations in receptors for dopamine and 5-hydroxytryptamine in the brain of the senescence accelerated mouse (SAM)-P10. *Jpn. J. Pharmacol.* **2000**, *83*, 312–318.
130. Nie, K.; Yu, J.C.; Fu, Y.; Cheng, H.Y.; Chen, F.Y.; Qu, Y.; Han, J.X. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *378*, 103–107.
131. Ohnishi, K.; Tomimoto, H.; Akiguchi, I.; Seriu, N.; Kawamata, T.; Nakamura, S.; Kimura, J.; Nishio, T.; Higuchi, K.; Hosokawa, M. Age-related decrease of nerve growth factor-like immunoreactivity in the basal forebrain of senescence-accelerated mice. *Acta. Neuropathol.* **1995**, *90*, 11–16.
132. Miyazaki, H.; Okuma, Y.; Nomura, J.; Nagashima, K.; Nomura, Y. Age-related alterations in the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the senescence-accelerated mouse brain. *J. Pharmacol. Sci.* **2003**, *92*, 28–34.
133. Shimada, A.; Ohta, A.; Akiguchi, I.; Takeda, T. Age-related deterioration in conditional avoidance task in the SAM-P/10 mouse, an animal model of spontaneous brain atrophy. *Brain Res.* **1993**, *608*, 266–272.
134. Dickstein, D.L.; Kabaso, D.; Rocher, A.B.; Luebke, J.I.; Wearne, S.L.; Hof, P.R. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* **2007**, *6*, 275–284.
135. Hosokawa, T. Immune system deficiencies in SAM, In *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM) : An Animal Model of Senescence*; Nomura, Y., Takeda, T., Okuma, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, NL, 2004; pp. 41–46.
136. Hasegawa-Ishii, S.; Takei, S.; Chiba, Y.; Furukawa, A.; Umegaki, H.; Iguchi, A.; Kawamura, N.;

- Yoshikawa, K.; Hosokawa, M.; Shimada, A. Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. *Neuropathology* **2011**, *31*, 20–28.
137. Hasegawa-Ishii, S.; Takei, S.; Inaba, M.; Umegaki, H.; Chiba, Y.; Furukawa, A.; Kawamura, N.; Hosokawa, M.; Shimada, A. Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. *Brain Behav. Immun.* **2011**, *25*, 83–100.
138. Nishiyama, N.; Moriguchi, T.; Saito, H. Beneficial effects of aged garlic extract on learning and memory impairment in the senescence-accelerated mouse. *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 149–160.
139. Moriguchi, T.; Saito, H.; Nishiyama, N. Anti-ageing effect of aged garlic extract in the inbred brain atrophy mouse model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1997**, *24*, 235–242.
140. Moriguchi, T.; Saito, H.; Nishiyama, N. Aged garlic extract prolongs longevity and improves spatial memory deficit in senescence-accelerated mouse. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 305–307.
141. Moriguchi, T.; Takashina, K.; Chu, P.J.; Saito, H.; Nishiyama, N. Prolongation of life span and improved learning in the senescence accelerated mouse produced by aged garlic extract. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 1589–1594.
142. Nishiyama, N.; Moriguchi, T.; Morihara, N.; Saito, H. Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1093S–1095S.
143. Zarezadeh, M.; Baluchnejadmojarad, T.; Kiasalari, Z.; Afshin-Majd, S.; Roghani, M. Garlic active constituent s-allyl cysteine protects against lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in the rat: Possible involved mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *795*, 13–21.
144. Baluchnejadmojarad, T.; Kiasalari, Z.; Afshin-Majd, S.; Ghasemi, Z.; Roghani, M. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *794*, 69–76.

145. Ray, B.; Chauhan, N.B.; Lahiri, D.K. Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by aged garlic extract and S-allyl-L-cysteine treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 388–402.
146. Unno, K.; Ishikawa, Y.; Takabayashi, F.; Sasaki, T.; Takamori, N.; Iguchi, K.; Hoshino, M. Daily ingestion of 528 green tea catechins from adulthood suppressed brain dysfunction in aged mice. *Biofactors* **2008**, *34*, 263–271.
147. Amagase, H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 716S–725S.
148. Kik, C.; Kahane, R.; Gebhardt, R. Garlic and health. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *11*, 57S–65S.
149. Rivlin, R.S. Historical perspective on the use of garlic. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 951S–954S.
150. Hahn, G. History, folk medicine, and legendary uses of garlic. In *Garlic: The Science and Therapeutic Applications of Allium sativum L. and Related Species*, 2nd ed.; Koch, H.P., Lawson, L.D., Eds.; William & Wilkins: Baltimore, MA, USA, 1996; pp. 1–24.
151. Block, E. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* **1985**, *252*, 114–119.
152. Liu, J.; Lin, R.I.; Milner, J.A. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder. *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 1847–1851.
153. Nishino, H.; Iwashima, A.; Itakura, Y.; Matsuura, H.; Fuwa, T. Antitumor-promoting activity of garlic extracts. *Oncology* **1989**, *46*, 277–280.
154. Welch, C.; Wuarin, L.; Sidell, N. Antiproliferative effect of the garlic compound S-allylcysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.* **1992**, *63*, 211–219.
155. Steiner, M.; Khan, A.H.; Holbert, D.; Lin, R.I. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 866–870.
156. Ried, K.; Frank, O.R.; Stocks, N.P. Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. *Maturitas* **2010**, *67*, 144–150.

157. Budoff, M.J.; Ahmadi, N.; Gul, K.M.; Liu, S.T.; Flores, F.R.; Tiano, J.; Takasu, J.; Miller, E.; Tsimikas, S. Aged garlic extract supplemented with B vitamins, folic acid and L-arginine retards the progression of subclinical atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Prev. Med.* **2009**, *49*, 101–107.
158. Nantz, M.P.; Rowe, C.A.; Muller, C.E.; Creasy, R.A.; Stanilka, J.M.; Percival, S.S. Supplementation with aged garlic extract improves both NK and $\gamma \delta$ -T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. *Clin. Nutr.* **2012**, *31*, 337–344.
159. Randle, W.M.; Lancaster, J.E. Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality. In *Allium Crop Science—Recent Advances*; Rabinowitch, H., Currah, L., Eds.; CABI Publishing: Oxford, UK, 2002; pp. 1–62.
160. 山崎賀久, 奥野智旦, ニンニク鱗茎の加温処理による S-アリル-L-システインの蓄積. *日食科工会誌* **2008**, *55*, 410–415.
161. Amano, H.; Kazamori, D.; Itoh, K. Pharmacokinetics of s-allyl-L-cysteine in rats is characterized by high oral absorption and extensive renal reabsorption. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 456S–459S.
162. Yan, C.K.; Zeng, F.D. Pharmacokinetics and tissue distribution of s-allylcysteine in rats. *Asian J. Drug Metab. Pharm.* **2005**, *5*, 61–69.
163. Moriguchi, T.; Matsuura, H.; Koderu, Y.; Itakura, Y.; Katsuki, H.; Saito, H.; Nishiyama, N. Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem. Res.* **1997**, *22*, 1449–1452.
164. Moriguchi, T.; Saito, H.; Nishiyama, N. Trophic effects of aged garlic extract (AGE) and its fractions on primary cultured hippocampal neurons from fetal rat brain. *Phytother. Res.* **1997**, *10*, 472–486.
165. Calamandrei, G.; Alleva, E. Neuronal growth factors, neurotrophins and memory deficiency. *Behav. Brain Res.* **1995**, *66*, 129–132.

166. Pérez-Severiano, F.; Salvatierra-Sánchez, R.; Rodríguez-Pérez, M.; Cuevas-Martínez, E.Y.; Guevara, J.; Limón, D.; Maldonado, P.D.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverrí, J.; Santamaría, A. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *489*, 197–202.
167. Shi, H.; Jing, X.; Wei, X.; Perez, R.G.; Ren, M.; Zhang, X.; Lou, H. S-allyl cysteine activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **2015**, *133*, 298–308.
168. Colín-González, A.L.; Santana, R.A.; Silva-Islas, C.A.; Chánez-Cárdenas, M.E.; Santamaría, A.; Maldonado, P.D. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2012**, *2012*, 907162.
169. Kaufman, R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes. Dev.* **1999**, *13*, 1211–1233.
170. Placido, A.I.; Pereira, C.M.; Duarte, A.I.; Candeias, E.; Correia, S.C.; Carvalho, C.; Cardoso, S.; Oliveira, C.R.; Moreira, P.I. Modulation of endoplasmic reticulum stress: An opportunity to prevent neurodegeneration? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2015**, *14*, 518–533.
171. Kosuge, Y.; Koen, Y.; Ishige, K.; Minami, K.; Urasawa, H.; Saito, H.; Ito, Y. S-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid beta-protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience* **2003**, *122*, 885–895.
172. Imai, T.; Kosuge, Y.; Saito, H.; Uchiyama, T.; Wada, T.; Shimba, S.; Ishige, K.; Miyairi, S.; Makishima, M.; Ito, Y. Neuroprotective effect of S-allyl-L-cysteine derivatives against endoplasmic reticulum stress-induced cytotoxicity is independent of calpain inhibition. *J. Pharmacol. Sci.* **2016**, *130*, 185–188.
173. Imai, T.; Kosuge, Y.; Endo-Umeda, K.; Miyagishi, H.; Ishige, K.; Makishima, M.; Ito, Y. Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. *Amino Acids* **2014**, *46*, 385–393.
174. Marín, N.; Romero, B.; Bosch-Morell, F.; Llansola, M.; Felipo, V.; Romá, J.; Romero, F.J. Beta-

- amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. *Mech. Ageing Dev.* **2000**, *119*, 63–67.
175. Jackson, R.; McNeil, B.; Taylor, C.; Holl, G.; Ruff, D.; Gwebu, E.T. Effect of aged garlic extract on caspase-3 activity, in vitro. *Nutr. Neurosci.* **2002**, *5*, 287–290.
176. Kosuge, Y.; Sakikubo, T.; Ishige, K.; Ito, Y. Comparative study of endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death in rat cultured hippocampal and cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* **2006**, *49*, 285–293.
177. Gupta, V.B.; Rao, K.S. Anti-amyloidogenic activity of S-allyl-L-cysteine and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neurosci. Lett.* **2007**, *429*, 75–80.
178. Chauhan, N.B. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 385–394.
179. Chu, Q.; Lee, D.T.; Tsao, S.W.; Wang, X.; Wong, Y.C. S-allylcysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgen-independent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU Int.* **2007**, *99*, 925–932.
180. Ng, K.T.; Guo, D.Y.; Cheng, Q.; Geng, W.; Ling, C.C.; Li, C.X.; Liu, X.B.; Ma, Y.Y.; Lo, C.M.; Poon, R.T.; Fan, S.T.; Man, K. A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **2012**, *7*, e31655.
181. Amagase, H.; Petesch, B.L.; Matsuura, H.; Kasuga, S.; Itakura, Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 955S–962S.
182. Saravanan, G.; Ponmurugan, P. S-allylcysteine Improves Streptozotocin-Induced Alterations of Blood Glucose, Liver Cytochrome P450 2E1, Plasma Antioxidant System, and Adipocytes Hormones in Diabetic Rats. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2013**, *11*, e10927.
183. Watabe, K.; Tanaka, S.; Yamaguchi, H. Studies on the mechanism of antihypertensive action of a constituent of garlic, γ -glutamyl-S-allyl-cysteine (GSAC). *Oyo Yakuri (Pharmacomet.)* **2006**, *71*, 79–87. (In Japanese)
184. Nakasone, Y.; Nakamura, Y.; Yamamoto, T.; Yamaguchi, H. Effect of a traditional Japanese

- garlic preparation on blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *Exp. Ther. Med.* **2013**, *5*, 399–405.
185. Agarwal, R.K.; Dewar, H.A.; Newell, D.J.; Das, B. Controlled trial of the effect of cycloalliin on the fibrinolytic activity of venous blood. *Atherosclerosis* **1977**, *27*, 347–351.
186. Yoshinari, O.; Shiojima, Y.; Igarashi, K. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats. *Nutrients* **2012**, *4*, 1518–1526.
187. Ibi, D.; Nagai, T.; Nakajima, A.; Mizoguchi, H.; Kawase, T.; Tsuboi, D.; Kano, S.; Sato, Y.; Hayakawa, M.; Lange, U.C.; Adams, D.J.; Surani, M.A.; Satoh, T.; Sawa, A.; Kaibuchi, K.; Nabeshima, T.; Yamada, K. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia* **2013**, *61*, 679–693.
188. Jacoby, R.O.; Fox, J.G. Federal support for training in laboratory animal medicine should be reinstated. *Lab. Anim. Sci.* **1999**, *49*, 348.
189. Mori, K.; Togashi, H.; Ueno, K.I.; Matsumoto, M.; Yoshioka, M. Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behav. Brain Res.* **2001**, *120*, 159–168.
190. Nakao, K.; Ikegaya, Y.; Yamada, M.K.; Nishiyama, N.; Matsuki, N. Spatial performance correlates with long-term potentiation of the dentate gyrus but not of the CA1 region in rats with fimbria–fornix lesions. *Neurosci. Lett.* **2001**, *307*, 159–162.
191. Um, J.W.; Nygaard, H.B.; Heiss, J.K.; Kostylev, M.A.; Stagi, M.; Vortmeyer, A.; Wisniewski, T.; Gunther, E.C.; Strittmatter, S.M. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 1227–1235.
192. Lovinger, D.M. Communication networks in the brain: Neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res. Health* **2008**, *31*, 196–214.
193. Liu, X.; Ramirez, S.; Pang, P.T.; Puryear, C.B.; Govindarajan, A.; Deisseroth, K.; Tonegawa, S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* **2012**, *484*, 381–385.

194. Roy, D.S.; Arons, A.; Mitchell, T.I.; Pignatelli, M.; Ryan, T.J.; Tonegawa, S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* **2016**, *531*, 508–512.
195. Paylor, R.; Spencer, C.M.; Yuva-Paylor, L.A.; Pieke-Dahl, S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol. Behav.* **2006**, *87*, 95–102.
196. Terada, S.; Sakurai, Y.; Nakahara, H.; Fujisawa, S. Temporal and Rate Coding for Discrete Event Sequences in the Hippocampus. *Neuron* **2017**, *94*, 1248–1262.e4.
197. Ressler, K.; Davis, M. Genetics of childhood disorders: L. Learning and memory, part 3: Fear conditioning. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* **2003**, *42*, 612–615.
198. Davis, H.P.; Squire, L.R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* **1984**, *96*, 518–559.
199. Wang, H.; Tiedge, H. Translational control at the synapse. *Neuroscientist* **2004**, *10*, 456–466.
200. Shimizu, K.; Kobayashi, Y.; Nakatsuji, E.; Yamazaki, M.; Shimba, S.; Sakimura, K.; Fukada, Y. SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12926.
201. Winters, B.D.; Forwood, S.E.; Cowell, R.A.; Saksida, L.M.; Bussey, T.J. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 5901–5908.
202. Murray, E.A.; Richmond, B.J. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 188–193.
203. de Lima, M.N.; Luft, T.; Roesler, R.; Schröder, N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters* **2006**, *405*, 142–146.
204. Cohen, S.J.; Munchow, A.H.; Rios, L.M.; Zhang, G.; Asgeirsdóttir, H.N.; Stackman, R.W. Jr. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology*, **2013**, *17*,

1685–1690.

205. Richter–Levin, G.; Akirav, I. Amygdala–hippocampus dynamic interaction in relation to memory. *Mol. Neurobiol.* **2000**, *22*, 11–20.
206. Dash, P.K.; Hochner, B.; Kandel, E.R. Injection of the cAMP–responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long–term facilitation. *Nature* **1990**, *345*, 718–721.
207. Suzuki, A.; Fukushima, H.; Mukawa, T.; Toyoda, H.; Wu, L.J.; Zhao, M.G.; Xu, H.; Shang, Y.; Endoh, K.; Iwamoto, T.; Mamiya, N.; Okano, E.; Hasegawa, S.; Mercaldo, V.; Zhang, Y.; Maeda, R.; Ohta, M.; Josselyn, S.A.; Zhuo, M.; Kida, S. Upregulation of CREB–mediated transcription enhances both short– and long–term memory. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8786–8802.
208. Kawashima, T.; Okuno, H.; Nonaka, M.; Adachi–Morishima, A.; Kyo, N.; Okamura, M.; Takemoto–Kimura, S.; Worley, P.F.; Bito, H. Synaptic activity–responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse–to–nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 316–321.
209. Gonzalez, G.A.; Yamamoto, K.K.; Fischer, W.H.; Karr, D.; Menzel, P.; Biggs, W. 3rd.; Vale, W.W.; Montminy, M.R. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP–regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **1989**, *337*, 749–752.
210. Suzuki, A.; Fukushima, H.; Mukawa, T.; Toyoda, H.; Wu, L.J.; Zhao, M.G.; Xu, H.; Shang, Y.; Endoh, K.; Iwamoto, T.; Mamiya, N.; Okano, E.; Hasegawa, S.; Mercaldo, V.; Zhang, Y.; Maeda, R.; Ohta, M.; Josselyn, S.A.; Zhuo, M.; Kida, S. Upregulation of CREB–Mediated Transcription Enhances Both Short– and Long–Term Memory. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8786–8802.
211. Abel, T.; Nguyen, P.V.; Barad, M.; Deuel, T.A.; Kandel, E.R.; Bourtchouladze, R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus–based long–term memory. *Cell* **1997**, *88*, 615–626.

略語一覧

A β	amyloid beta	アミロイド β
AC	adenylate cyclase	アデニル酸シクラーゼ
ACh	acetylcholine	アセチルコリン
AChE	acetylcholinesterase	アセチルコリンエステラーゼ
AGE	aged garlic extract	熟成ニンニク抽出物
AMP	adenosine monophosphate	アデノシンーリン酸
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl- 4-isoxazolepropionic acid	α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオ キサゾールプロピオン酸
ANOVA	analysis of variance	分散分析
APP	amyloid precursor protein	アミロイド β 前駆体タンパク質
Arc	activity-regulated cytoskeleton- associated protein	活動調節細胞骨格関連タンパク質
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	脳由来神経栄養因子
CA	cornu ammonis	アンモン角
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase	カルシウムカルモジュリン依存性タンパク 質キナーゼ
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシンーリン酸
CREB	cyclic AMP response element binding-protein	サイクリック AMP 応答配列結合タンパク質
DHA	docosahexaenoic acid	ドコサヘキサエン酸
DIV	day(s) in vitro	in vitro での培養日数
EGCG	epigallocatechin gallate	エピガロカテキンガレート
EPA	eicosapentaenoic acid	エイコサペンタエン酸
EPSC	excitatory postsynaptic current	興奮性シナプス後電流
EPSP	excitatory postsynaptic potential	興奮性シナプス後電位

GSAC	gamma-glutamyl-S-allylcysteine	γ -グルタミル-S-アリルシステイン
LTP	long-term potentiation	長期増強
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MCI	mild cognitive impairment	軽度認知障害
MGE	mature garlic extract	(低温)熟成ニンニク抽出物
MMSE	mini-mental state examination	ミニメンタルステート検査
MW	molecular weight	分子量
NMDA	<i>N</i> -methyl-d-aspartic acid	<i>N</i> -メチル-d-アスパラギン酸
PKA	protein kinase A	プロテインキナーゼ A
PKC	protein kinase C	プロテインキナーゼ C
SAC	S-allylcysteine	S-アリルシステイン
SAM	senescence-accelerated mouse	老化促進マウス
SEM	standard error of the mean	標準誤差