

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発に

関する研究

(H15-長寿-009)

平成15～17年度

総合研究報告書

主任研究者 原 英夫

平成18（2006）年4月

目次

I. 総合研究報告	
アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発に関する研究-----	1
原 英夫	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	64
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	74

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総合研究報告書

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発に関する研究

主任研究者 原 英夫

国立長寿医療センター研究所血管性認知症研究部室長

研究要旨

我々は、アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発を行った。アルツハイマー病の病因として amyloid cascade 仮説に基づき、経口ワクチン療法により抗 A β 抗体を産生させ、沈着した A β 蛋白を除去し、さらに A β の凝集を抑制することが目的である。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに分泌型 A β cDNA を組み込み、この rAAV を経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A β 抗原を腸管上皮細胞に発現させ、腸管粘膜免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導した。アルツハイマー病の動物モデルである APP トランスジェニック(Tg)マウスに経口投与した。血清中の A β に対する抗体は、4週後をピークとして、6ヶ月間持続した。またこの抗体は、*in vitro*での A β の凝集を抑制した。13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。経口ワクチン療法により APP トランスジェニックマウスの血清及び脳組織での TGF- β 濃度が減少し、脳アミロイドアンギオパチーや小血管周囲の炎症を抑制する可能性が示唆された。経口ワクチンによる高次脳機能の改善を検索するため、10ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス治療後、種々の学習機能の評価を行った。新規物質認識試験、水迷路試験、恐怖条件付け学習試験の改善が13ヶ月齢で認められた。さらに老齢サルに経口ワクチン投与により、神経細胞内 A β 蛋白沈着が激減し、前頭葉・頭頂葉・海馬のアミロイド β 蛋白沈着や老人斑の減少などの改善を示した。rAAV を用いたワクチン療法は、1回の投与により、比較的長期（約6ヶ月間）に腸管において抗原提示ができ、細胞性免疫を惹起せず液性免疫（抗体）のみを誘導する利点がある。さらにアジュバントを必要としないため強い免疫反応を起こさず脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。我々が開発した経口ワクチンは、アルツハイマー病脳病理とともに高次脳機能の改善も示し、有効な治療法と考えられる。

研究組織

分担研究者

高橋慶吉（国立長寿医療センター研究所
血管性認知症研究部部長）

田平 武（国立長寿医療センター研究所
所長）

鍋島俊隆（名古屋大学大学院医学研究科
医療薬学教授）

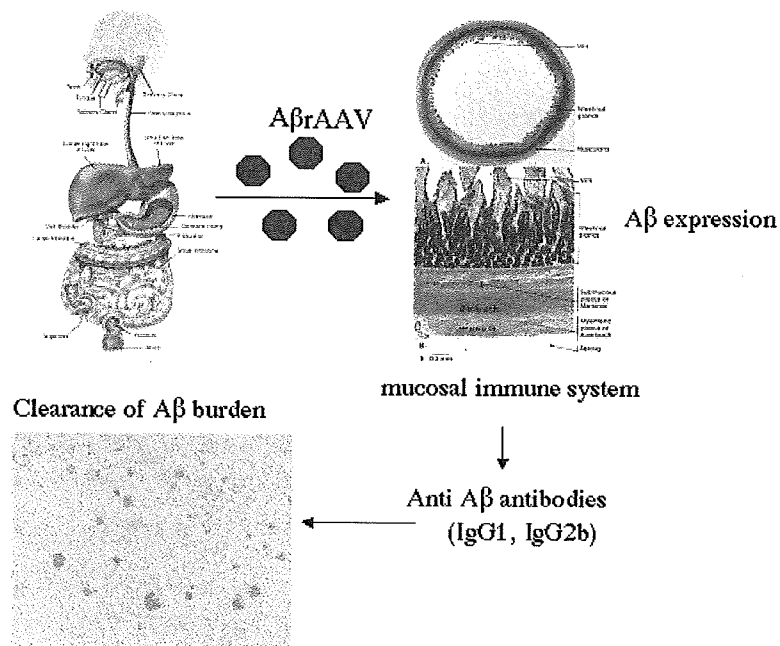
A. 研究目的

アルツハイマー病は、痴呆性疾患の二大原因の1つであり、現在有効な治療法はなく、高齢社会の進行と共に患者が増加し、社会的にも問題となっている。

アルツハイマー病の病因として、Selkoe等が唱える amyloid cascade 説が有力で、細胞外に分泌された A β ペプチドが不溶化し、凝集・蓄積することがアルツハイマー病の病態の本質であると考えられている。即ち神経細胞内の b-amyloid precursor protein (APP)が、 β , γ -secretaseにより部分的に分解され、amyloid- β peptide (A β)が生成され細胞外へ沈着し、老人斑を形成することが考えられている。アルツハイマー病に対するワクチン療法は、Schenkらが、前凝集 Ab42 ペプチドをアジュバントと共に PDAPP トランスジェニックマウスに投与し、脳アミロイド沈着が減少したという報告より始まる。さらにアルツハイマー病の動物モデルに対し、A β ペプチドを免疫投与した

ところ、老人斑の減少と高次機能の回復が認められた報告もある。この様に A β ペプチドをワクチンとして投与し、抗 A β 抗体を体内で産生させ、抗体が老人斑を除去し、さらに分泌された A β の凝集・沈着を抑制することにより神経細胞の脱落を防止しようとする免疫療法が、アルツハイマー病の新しい治療法として注目されている。その後、Elan/Wyeth社によりアルツハイマー病患者への臨床治験 (AN-1792)が開始されたが、phase II trialで、6%の患者に髄膜脳炎の副作用が起こり、2名の死亡例も報告され、治験は中止された。我々は、アルツハイマー病に対する新しい安全なタイプのワクチン療法を開発するためにアデノ随伴ウイルスベクターを用いる系を発案した。人体での抗原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターに A β cDNA を組み込みこんだリコンビナントアデノ随伴ウイルス (recombinant AAV, rAAV)を作製した。アルツハイマー病のモデルマウスの APP transgenic mouse (Tg2576, Taconic 社、Mayo Clinic) に経口投与し、腸管上皮細胞に感染させた。そして A β 抗原を腸管細胞に発現させ、腸管粘膜免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導し、中枢神経系での老人斑の形成とアミロイド沈着を抑制するかどうか、その治療としての有効性及び副作用を検証した。

Oral vaccine with A β rAAV



B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築
 amyloid- β 1-43(A β 1-43) cDNA は、ヒト amyloid- β precursor protein (APP) 遺伝子を鋳型として PCR にて増幅した。APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸) を A β 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 1-43 cDNA を作成し、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) に組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に transfection し、大量培養により recombinant adeno-associated virus (rAAV) を産生し、セシ

ウムクロライド超遠心にて精製した。

別に A β 1-43 の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV も同様に PCR で増幅後、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) に組み込み、大量培養後に精製した。

2. アデノ随伴ウイルスのアルツハイマー病の動物モデルマウスへの経口投与。
 アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576) は、Taconic 社 (Mayo Clinic) から購入した。15 週齢、

30 週齢の 45 週齢の APP transgenic mouse にそれぞれ A β 1-43rAAV 5x10¹¹ genome を 1 回のみ経口投与した。さらに Ab1443 の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV を同様に 3 つの時期に分けて投与した。

3. マウス血清中の抗 A β 抗体の検出

A β 42 ペプチド(5mg/ml)を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp)の各 well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノ随伴ウイルスを投与したマウスより採取した血清を加え (500 倍希釈)、peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

4. マウスの血清が *in vitro* で A β 凝集反応を阻害するか検討した。A β 1-40 ペプチドを 120mM の濃度に調整し、37°C でインキュベーションした。24 時間後に A β の凝集が開始するのが見られた。この A β の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20 (vol: vol) の濃度で加え、37°C で 1 週間インキュベーションした。A β 1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2mM Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter (445nm, excitation; 490nm, emission) を用いて測定した。

5. 組織からの DNA 抽出及び PCR。

アデノ随伴ウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎

臓を摘出し、Tris 溶液の中で組織を homogenate した後、proteinase K で蛋白を分解し、phenol/chloroform 処理し、DNA を精製した。次に、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)の promotor 領域の 5' 塩基配列とベクターの 3'塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCR を行った。PCR 産物は、2 % agarose gel に泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

6. マウス脾細胞の A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。

アデノ随伴ウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5 x 10⁴細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 4 8 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。

7. 免疫組織染色

組織中の A β 蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、5% H₂O₂ で内因性の peroxidase 活性を失活させた。抗 A β 抗体(4G8:1000 倍希釈)またはラビット抗 A β 40 抗体(1000 倍希釈)と反応させた後、peroxidase 標識 2 次抗

体を加え、DAB 染色を行った。

アミロイド沈着を定量的に解析するため、マウス脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を 4G8 抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き 3CCD カメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位（アミロイド沈着）の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。

中枢神経系にリンパ球の浸潤の有無を検索するため、抗 CD4 抗体、抗 CD86 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 GFAP 抗体（アストロサイト）、抗 Iba-1 抗体（ミクログリア）などの抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色した。

中枢神経系組織中の TGF- β の発現を検索するために、凍結切片をポリクローナル・ウサギ抗 TGF- β 抗体で染色後、ABC 法にて発色した。

8. TGF- β 1 ELISA

マウス血清中の TGF- β 1 濃度は、R&D systems 社の ELISA kit を用いて測定した。

9. 動物モデルマウスの高次脳機能解析（自発的交替行動試験、新規物質認識試験、モリス水迷路試験、恐怖条件付き学習試験）を行った。10ヶ月齢の APP トランスジェニックマウスに経口ワクチンを投与し、13ヶ月齢まで解析を行った。

10. 高齢サルへの経口ワクチン投与。
推定年齢 20 歳以上のアフリカミドリザ

ルの雌サル 12 頭を 3 群に分けて経口ワクチンを投与した。各群、分泌型 A β 発現アデノ随伴ウイルスベクター投与群 2 頭とコントロールの GFP 発現アデノ随伴ウイルスベクター (GFP/rAAV) 投与群 2 頭に分類した。そして 3, 6, 12 ヶ月後に解剖した。さらにカニクイザル 10 頭（治療群 5 頭、コントロール群 5 頭）にも経口ワクチン投与し、6 ヶ月後の脳アミロイド沈着を検索した。アフリカミドリザル・カニクイザルは、国立感染症研究所霊長類センターより入手した。

投与法は A β 1-43/rAAV または GFP/rAAV（コントロール群）の腸溶剤カプセルを 1 回のみ経口投与し、3~6 ヶ月後に解剖した。

11. アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体の検出

A β 42 ペプチド (5mg/ml) を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp) の各 well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノ随伴ウイルスを投与したアフリカミドリザルより採取した血清（前、4 週、8 週）を加え（1000 倍希釈）、peroxidase 標識抗サル IgG 抗体（2000 倍希釈）で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度 (O.D.450) を測定した。

倫理面への配慮

動物、特にマウスに対する実験は、当国立長寿医療センター研究所動物実験施設

の倫理規定に基づき、動物に対して苦痛を軽減する投与方法、および安楽死後の処置を行った。遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は、当国立長寿医療センター研究所の組み換え DNA 安全委員会の承認 (P2 規制レベル) を得た。

C. 研究結果

A β ペプチドを効率的に細胞外へ分泌させるために、APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸) を A β 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; signal sequence+A β 1-43 cDNA を作成し、効率よく A β が細胞外に分泌されるようなベクター (A β 1-43pXXUF1) を開発した。

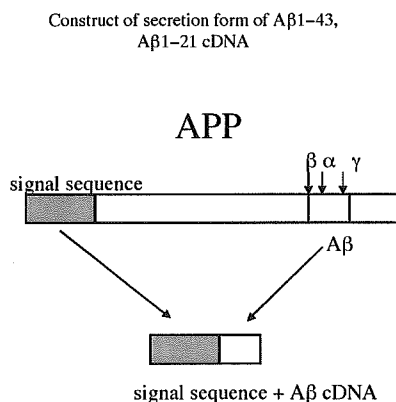
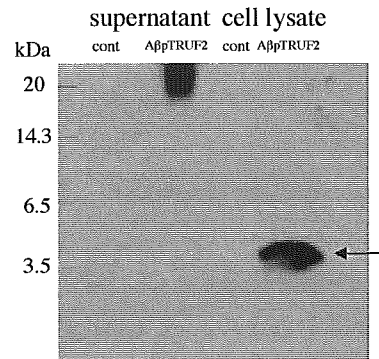


図 1 signal sequence+ A β 43 cDNA の構造。

実際に A β が細胞外に分泌される事を確認するため、APP signal sequence+ A β 43 cDNA を発現ベクターpXXUF1 に組み込

み、lipofectamine 2000 (In vitrogen)を用いて CHO 細胞へ導入した。48 時間後に培養上清と cell lysate を抽出し、SDS-



PAGE gel に泳動した。A β ペプチドが oligomer を形成しながら細胞外に分泌されることを western blot にて確認した。細胞内では多量の A β ペプチドモノマー 4kDa の蛋白が認められた。(図 2)

A β アデノ随伴ウイルスの作製には、A β 1-43 pXXUF1, AAV packaging plasmid, adeno helper plasmid を HEK293 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、293 細胞を大量培養後、cell lysate からウイルス粒子を CsCl の超遠心により精製した (図 3)。

15 週齢の APP transgenic mouse (Tg2576) に A β 1-43rAAV 5x10¹¹ genome を 1 回のみ経口投与した。経時的に採血し血清中の抗 A β 抗体の産生を解析した。血清中の抗体価は、主として経口投与後 4 週間でピークを示し、6 ヶ月後まで抗体の持続的産生を認めた。

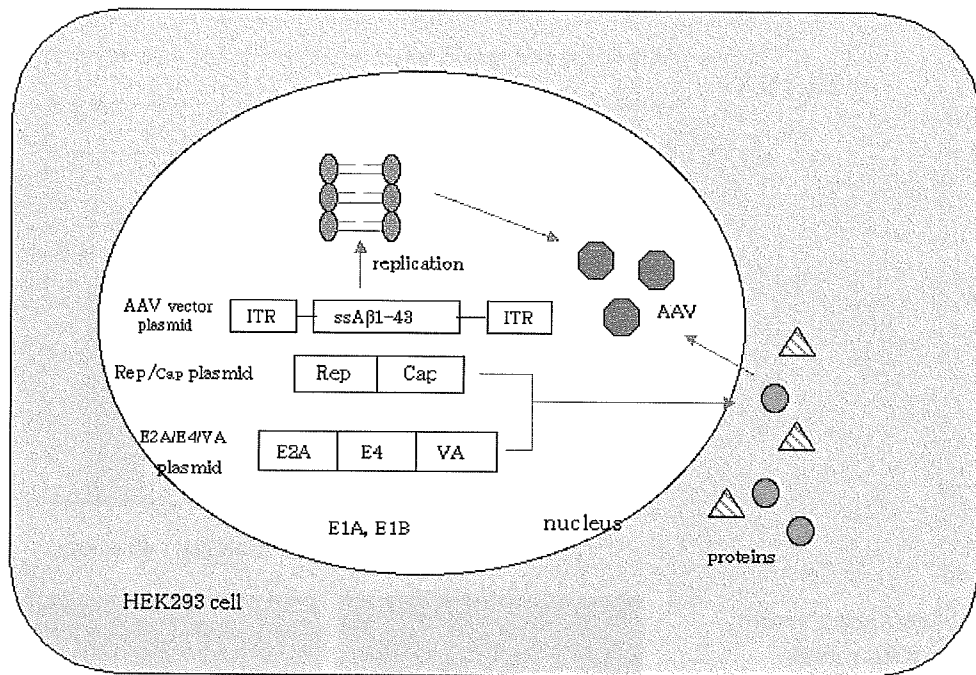
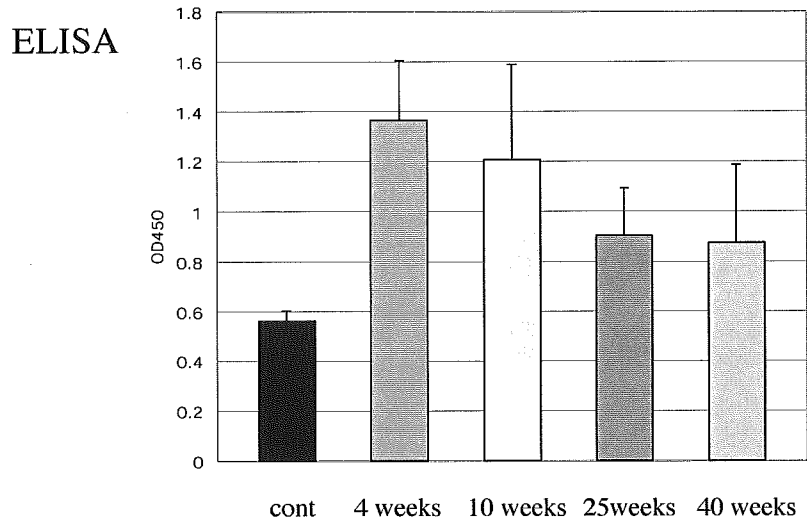


図3. リコンビナント Aβ アデノ随伴ウイルスの作製。

次にマウスの血清が *in vitro* で Aβ凝集反応を阻害するか検討した。Aβ1-40 ペプチドを 120mM の濃度に調整し、この Aβ の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20 (vol: vol) の濃度で加え、37°C で1週間インキュベーションした。Aβ1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2μM Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter で測定した。AβrAAV を投与したマウス血清は、コントロールのマウス血清と比べ有意に *in vitro* で Aβ1-40 の凝集・結合を阻害した。

アデノ随伴ウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを確認するため、アデノ随伴ウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎臓を摘出し、各組織より DNA を精製した。アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)の promotor 領域の 5' 塩基配列とベクターの 3' 塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCR を行った。PCR 産物は、2% agarose gel に泳動した。目的とする 500bp のバンドは、上部消化管組織のみに認められた。

Serum IgG antibody against A β 42 in the treated APP-Tg mouse



Double staining senile plaque with mouse serum and thioflavin S

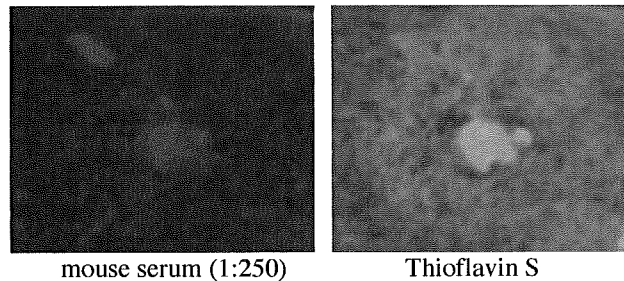


図4 マウス血清中の抗 A β 抗体の産生。ヒトの老人斑をマウス血清と thioflavin S と共に二重染色した。

腸管に免疫した場合には、細胞性免疫を惹起しにくい現象が報告されている。そこで rAAV を投与したマウス脾細胞を分離し in vitro において A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応を解析した。rAAV を投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5×10^4 細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 48 時間培養した。細胞培養終

了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。rAAV を投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

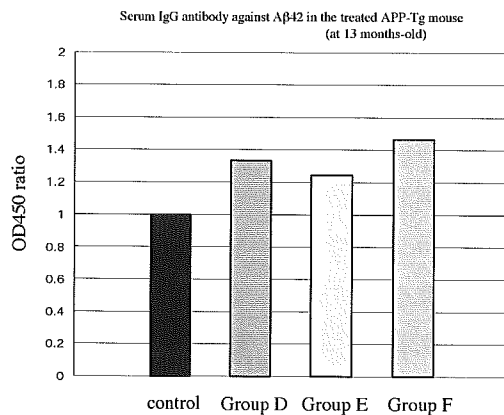


図5 Aβ1-21rAAVを投与したマウス（13ヶ月齢）の血清中の抗Aβ抗体。

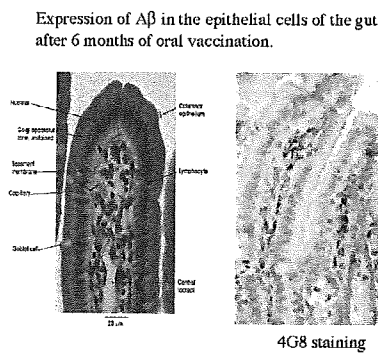


図6 Aβ1-43rAAV粒子を経口投与したAPP-Tgマウスの上部消化管上皮細胞。Aβ蛋白の発現が lamina propria に認められた。

30週齢時にAβ1-43rAAV粒子をAPP Tgマウスに経口投与し、6ヶ月後に解剖し、上部消化管上皮細胞の lamina propria にAβ蛋白の発現を認めた。

通常のAPP transgenic mouse (Tg2576)は、加齢と共にアミロイド沈着が進み、6ヶ月齢では脳に軽度の沈着を認めるのみであるが、10ヶ月齢になると、アミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認

められるようになる。

APP transgenic mouse に対して、投与時期を Group A(15週齢時投与)、Group B(30週齢時投与)、Group C(45週齢時投与)の3つのグループに分け、Aβ1-43rAAVをそれぞれ1回のみ経口投与した。

Aβ1-43rAAV粒子を経口投与したAPP-Tgマウスにおいて、12~13ヶ月齢の脳を

解析すると、コントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。アミロイド沈着を定量的に解析するため、脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を 4G8 抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き 3CCD カメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位（アミロイド沈着）の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。未治療のコントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、A β 1-43rAAV 治療群では Group A ($0.55 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$), Group B ($0.48 \pm 0.35\%$, $P < 0.001$) and Group C ($0.46 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$) と有意差を持って減少していた。

他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、最も炎症が起りやすいと考えられる脳および腎臓を含め、炎症所見は認められなかった。脳組織を T 細胞マーカー (CD4)、T 細胞活性化分子 (CD86) で染色したが、コン

トロール群・治療群とも陰性であった。末梢のマクロファージ (CD11b) マーカーも陰性であった。アストログリオシスは治療群で改善が認められた。治療群の前頭葉、側頭葉に活性化したミクログリア (Iba-1 陽性) の増加を認めた。

一方、A β 1-21rAAV についても、APP transgenic mouse に対して、投与時期を Group D (15 週齢時投与)、Group E (30 週齢時投与)、Group F (45 週齢時投与) の 3 つのグループに分け、それぞれ 1 回のみ経口投与した。Ab1-21rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、12~13 ヶ月齢の脳を解析すると、同様にコントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少していた。定量的解析でもアミロイド沈着がコントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、Group D ($0.39 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$), Group E ($0.45 \pm 0.30\%$, $P < 0.001$), Group F ($0.37 \pm 0.20\%$, $P < 0.001$) と著明な改善が認められた。

Inhibition of A β aggregation *in vitro*
Thioflavin T Binding Assay

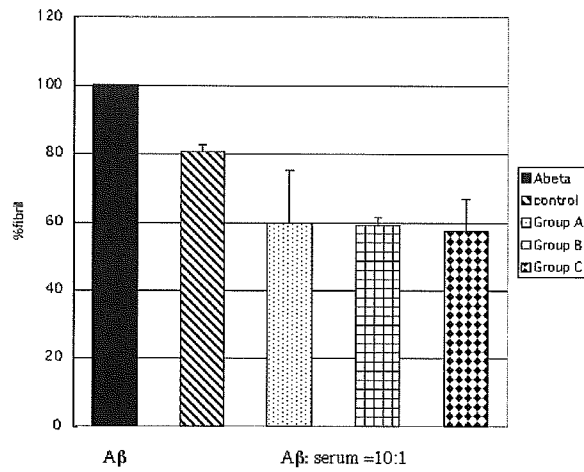


図 7. マウス血清中の抗体による *in vitro* での A β 凝集抑制。治療したマウス(Tx)の血清は、A β 凝集を抑制した。

Detection of rAAV DNA by PCR

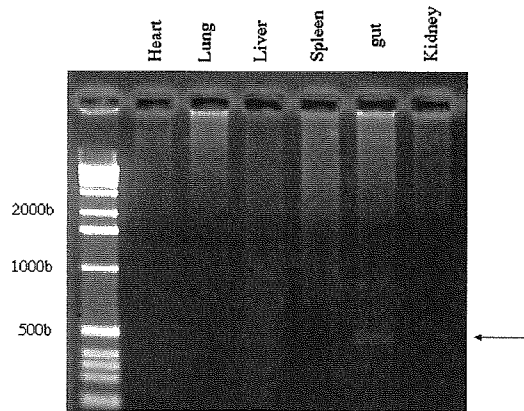


図 8. 治療したマウス各臓器から精製した DNA を用いて、ウイルスベクターDNA を PCR で検出した。上部消化管組織に目的の 500 bp のバンドを認める。

Low lymphocytes proliferation against A β 42 peptide

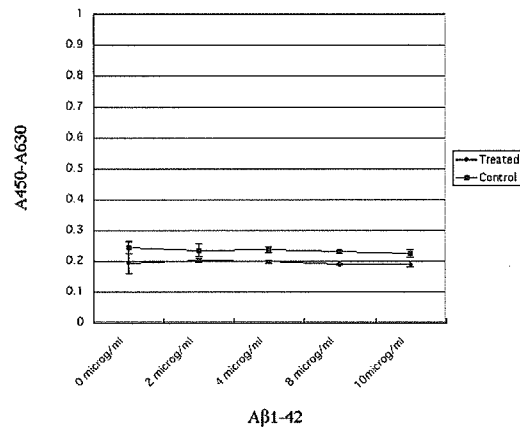


図 9 治療したマウスの脾細胞の A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

rAAV/A β 43

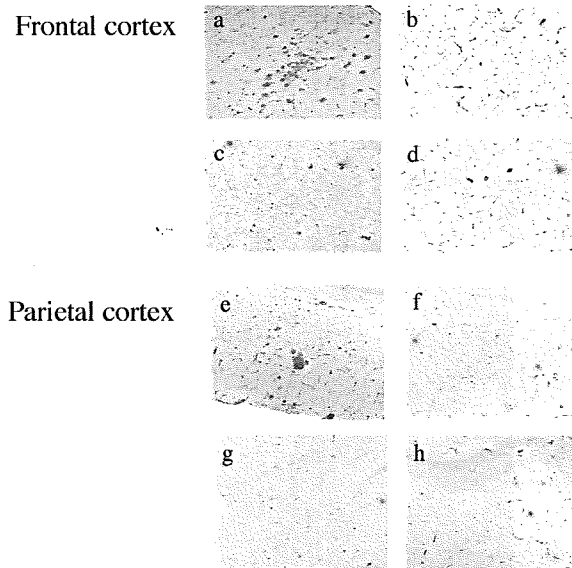


図 10 A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) の脳 (前頭葉、頭頂葉) におけるアミロイド β 沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a,e; コントロール、b,f; 15 週齢時投与、c,g; 30 週齢時投与、d,h; 45 週齢時投与。

Reduction of A β burden at 13 months of age in mice treated with A β 1-43 rAAV.

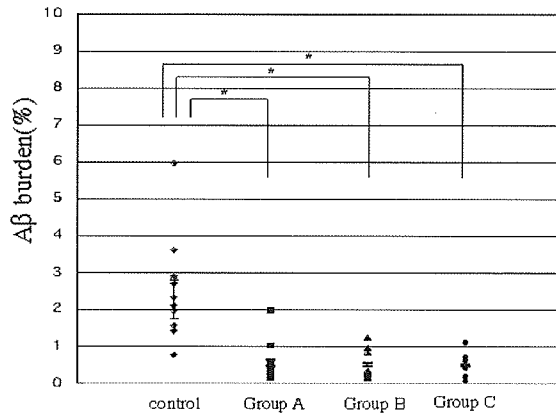


表 1 脳組織における老人斑面積の定量的解析。

マウス脳組織

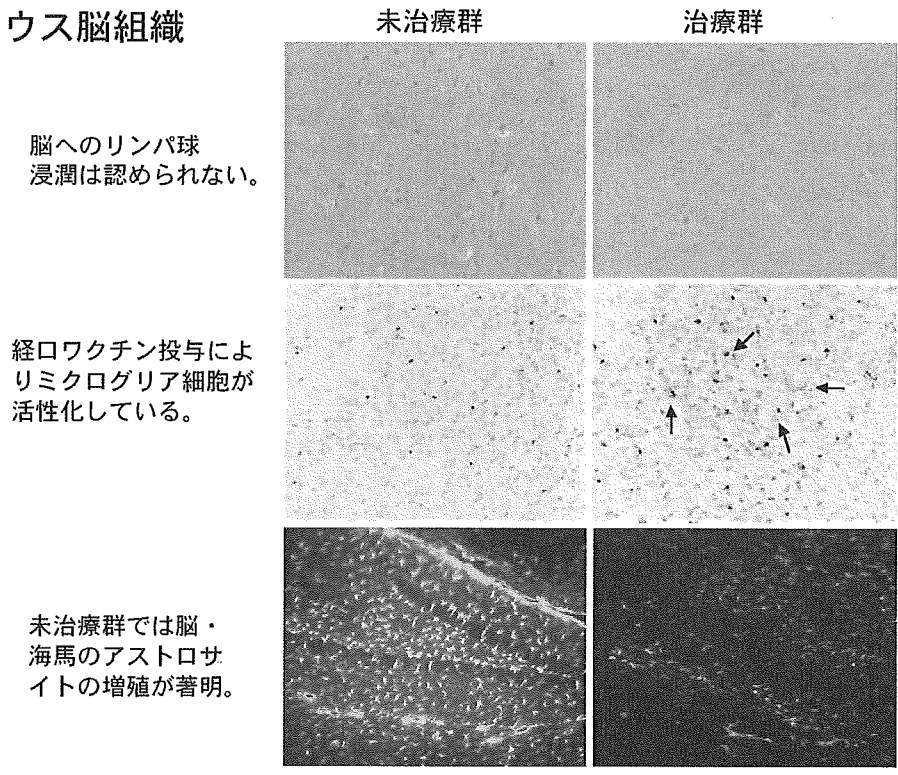


図 11 APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) のコントロール群と治療群の脳の HE 染色。両群ともにリンパ球浸潤は認められない。

2段目：脳のミクログリア染色。治療群に活性化したミクログリア細胞の増殖を認める。

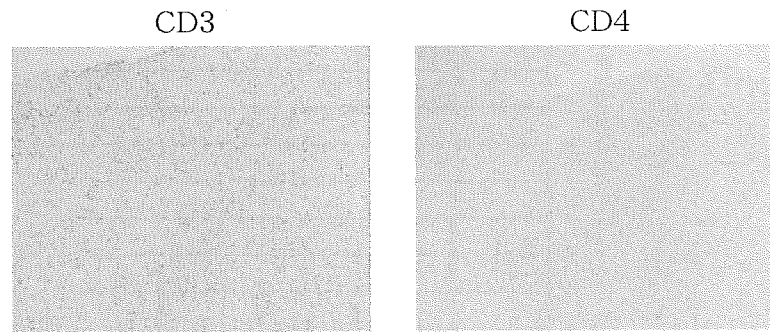
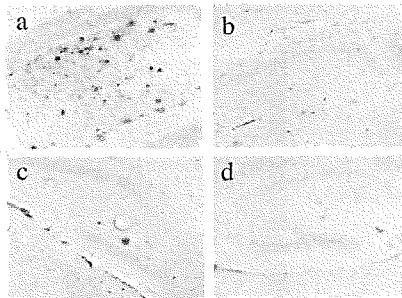


図 12 治療群の脳の CD3, CD4 抗体染色。T リンパ球の浸潤は認められない。

rAAV/A β 21

hippocampus



Frontal cortex

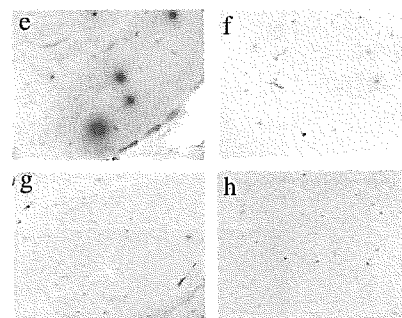


図 1 3 A β 1-21rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) の脳 (海馬、前頭葉) におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a, e; コントロール、b, f; 15 週齢時投与、c, g; 30 週齢時投与、d, h; 45 週齢時投与。

Reduction of A β burden at 13 months of age in mice treated with A β 1-21 rAAV.

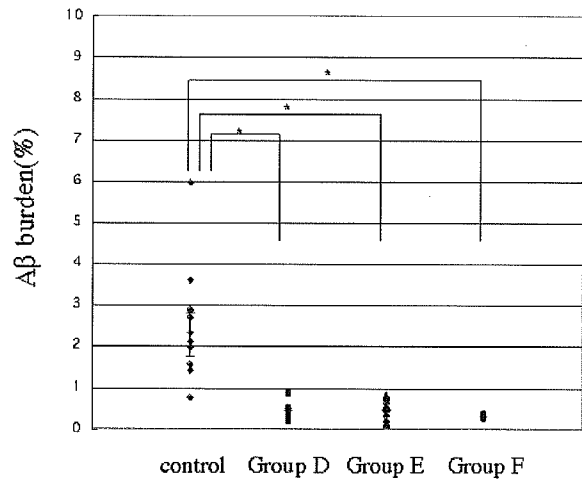


表2 脳組織における老人斑面積の定量的解析。

血清中の TGF- β 1 濃度

A β 1-43rAAV または A β 1-21rAAV を経口投与した 13 ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス (Tg2576) 血清を用いて、TGF- β 1 濃度を ELISA にて測定した (図 1)。

A β 1-43rAAV 投与 Group A ;
80.5 \pm 12.9ng/ml, $p=0.09$, Group B;
76.0 \pm 6.3ng/ml, $p=0.06$, Group C;
74.3 \pm 21.0ng/ml, $p=0.07$ でコントロール群の TGF- β 1 濃度 111.6 \pm 40.0ng/ml と比べ有意に減少していた。

A β 1-21rAAV 投与 Group D;
99.4 \pm 21.2ng/ml, Group E;
80.2 \pm 17.2ng/ml, $p=0.09$, Group F;

72.9 \pm 15.8ng/ml, $p=0.06$ の TGF- β 1 濃度もコントロール群と比べ低下していた。

2. 脳組織での TGF- β 1 免疫組織染色

図 2 に示すように、コントロール群の APP トランスジェニックマウス脳では、TGF- β 1 の発現が強く認められる。

一方、A β 1-43rAAV 経口投与した 13 ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳では、有意に TGF- β 1 の発現は減少していた。

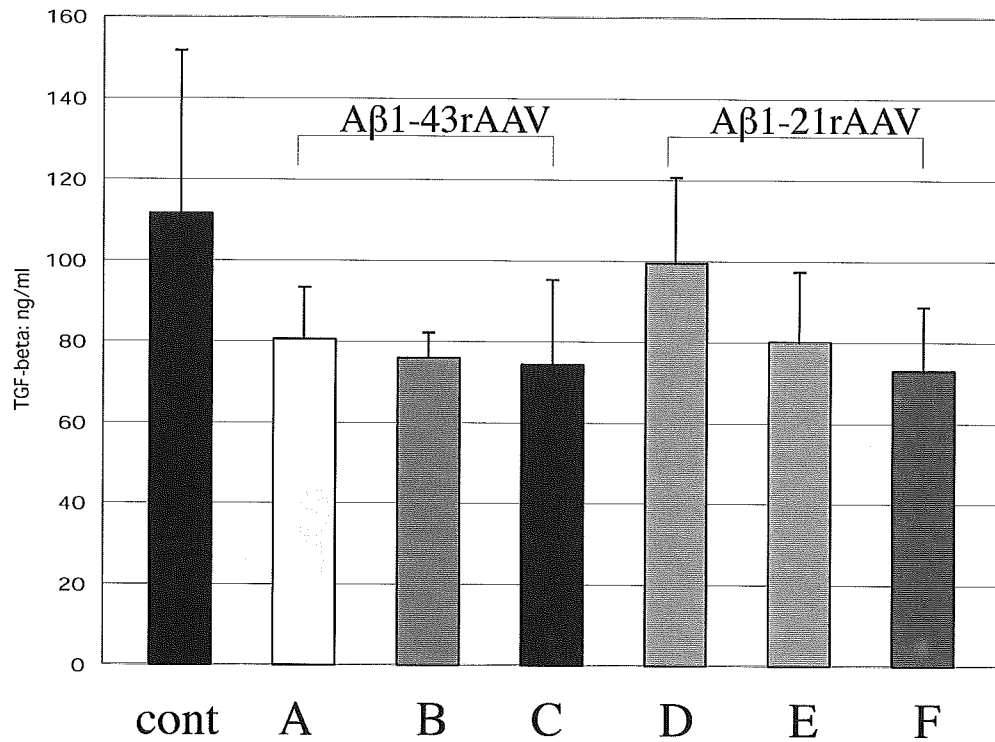


図 14 血清中の TGF-β1 濃度。コントロール群と比べ Aβ1-43rAAV または Aβ1-21rAAV を経口投与した APP トランスジェニックマウス血清では、有意に TGF-β1 濃度が低下している。

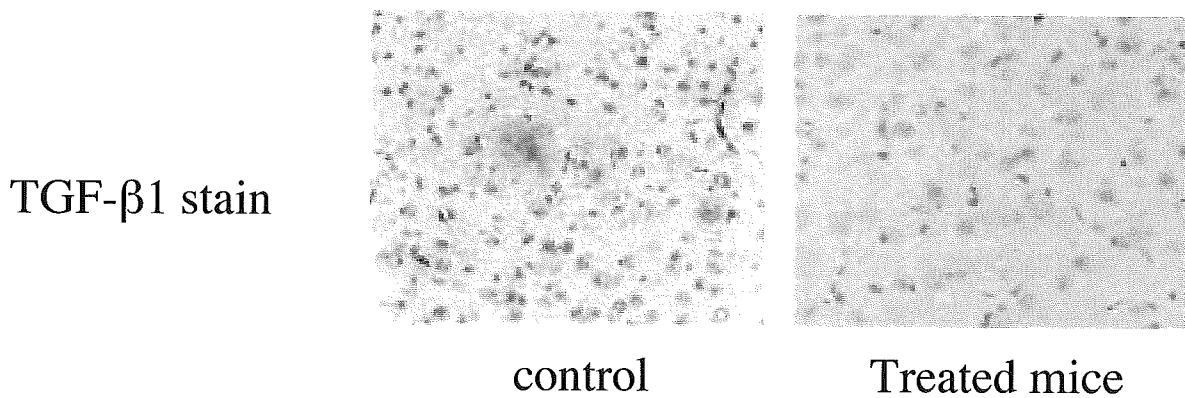


図 15 APP トランスジェニックマウス 脳組織での TGF-β1 免疫組織染色。

高次脳機能解析

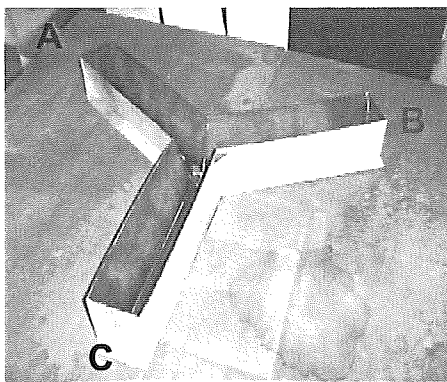
1. 自発的交替行動試験

自発的交替行動試験は作業記憶の指標として用いられている。

実験には、1本のアームの長さが40 cm、壁の高さ12 cm、床幅3 cm、上部幅10 cmの3本のアームがそれぞれ120度の角度で接続されたY字迷路を用い、常時一定の明るさになるように間接照明のみを当てた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後8分間にわたって装置内を自由に散策させ、移動したアームの位置を移動した順に記録した。マウスが測定時間内にアーム

に移動した回数をtotal arm entriesとした。つぎに、連続して異なる三つのアームを選択した組み合わせを調べ、この数をno. of alternationとした。No. of alternationをtotal arm entriesから2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値をpercent alternationとし、これを自発的交替行動の指標とした。本学習記憶試験は6および13ヶ月齢時に行い、13ヶ月時において前回の実験の影響が無いように、異なる部屋で異なる装置を用いた（実験装置のサイズや色、部屋の明るさ等は同じ）。

Y-maze test



Trial duration :8min

ex)

A B C A C B A B C B

Alternation Behavior (%)

$$\begin{aligned} &= \frac{[\text{No. of alternation}]}{[\text{total arm entries}] - 2} \times 100 \\ &= \frac{5}{10-2} \times 100 = 62.5 \end{aligned}$$

2. 新規物質認識試験

新規物質認識試験は、海馬や前頭前皮質に関連した探索嗜好学習・記憶の指標として用いられている。

中央に2種類の異なったobjectを離して設置した装置（縦30 cm、横30 cm、高さ35 cm）内にマウスを入れ、各

objectに対する探索嗜好行動を10分間測定した（訓練試行）。訓練24時間後に、2種類のobjectのうち片方のobjectを全く異なった新規objectと置換し、各objectに対する探索嗜好行動を10分間測定した（テスト試行）。本学習記憶試験は6、10および13ヶ月