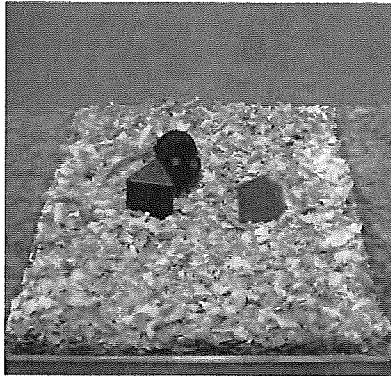


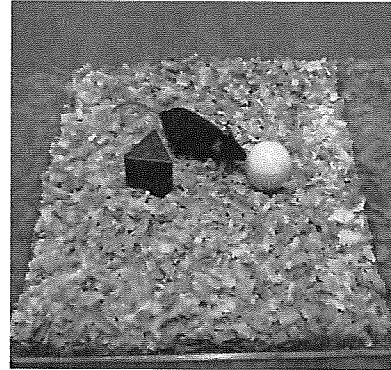
月齢時に行い、前回の試験の影響が無いように、objectは毎回異なるものを使用した。

Novel object recognition test

Training



Retention



Trial duration (training · retention): 10min

ex)



30sec



28sec

Exploratory preference (%)

$$= \frac{[\text{approach time of } \triangle]}{[\text{total approach time}]} \times 100$$

$$= \frac{28}{30+28} \times 100 = 48.3\%$$



17sec



38sec

Exploratory preference (%)

$$= \frac{[\text{approach time of } \bigcirc]}{[\text{total approach time}]} \times 100$$

$$= \frac{38}{17+38} \times 100 = 69.1\%$$

3. モリス水迷路試験（陳述記憶実験）

モリス水迷路試験は、陳述記憶の指標であり、海馬依存的な学習課題である。

直径 120cmのプールに直径 7cmのプラットフォームを水面より 1cm下に設置し、プールに入れられたマウスが周りの空間を手がかりにしてプラットフォームに到達する時間（escape latency）

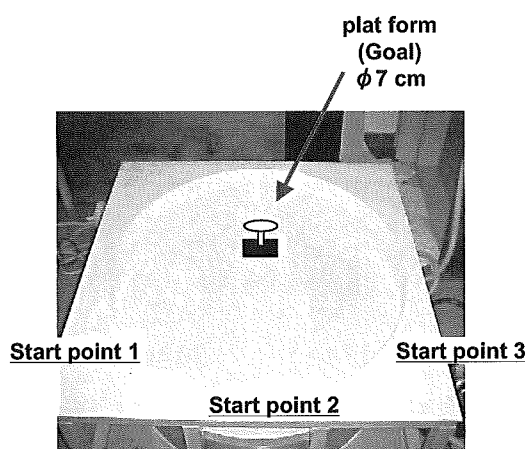
を測定した。最大観察時間は 60 秒とし、1 日 2 試行で 10 日間行った。プラットフォームの位置は一定で、マウスを入れる位置は施行ごとに変えた。また、水迷路試験 10 日目終了後にプールからプラットフォームを除去し、プローブテストを行った。プールを 4 区画（Trained、Right、Opposite、Left）に分け、プールに入れられたマウスのプラットフォームが設置してあった区

間 (Trained) を探索する時間の割合 (percent search time) を求めた。観察時間は 60 秒とした。また、各マウス群の遊泳速度 (swimming speed) および距離 (swimming distance) を測定した。マウスを入れる位置はラン

ダムに変えた。本学習記憶試験は 6 および 13 ヶ月齢時に行い、13 ヶ月齢時において、前回の実験の影響が無いように、異なる部屋でプラットホームの位置を変えた (実験装置のサイズや水温、部屋の明るさ等は同じ)。

Morris water maze test

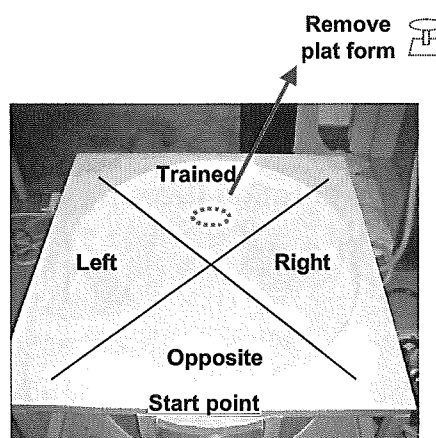
Reference memory test



Training trials

- 1 training: 60 sec
- 1 session: 2 trainings/ day
- training duration: 10 day

Probe trial



• Trial duration : 60sec

• Percent search time (%)

$$= \frac{[\text{search time of area}]}{[\text{trial time}]} \times 100$$

4. 恐怖条件付け学習試験

恐怖条件付け学習試験は恐怖 (電気ショック) に条件づけられた刺激 (音および環境) に対してのフリージング (無動) を指標とした音刺激学習および文脈学習を評価するものである。文脈学習は扁桃体と海馬機能に依存し、音刺激学習では扁桃体機能にのみ依存する。

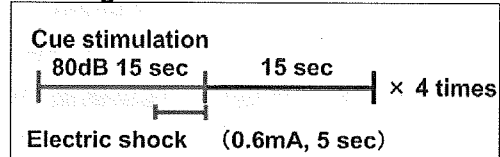
床がグリッドからなる装置 (訓練ケージ) に入れ、2 分間無動時間を測定し、その後マウスを訓練時に用いる測定ケージとは異なるケージ (ニュートラルケージ) に入れ、1 分間無動時間を測定した。その後、訓練ケージに入れ、80 dB の音刺激を 15 秒間呈示し、その最後の 5 秒間に 0.6 mA の電気刺激を与える作業を、連続して 4 回行った。24

時間後、再び訓練ケージに入れ、2 分間の無動時間（freezing time）を測定した（電気および音刺激なし；文脈学習）。その後、ニュートラルケージ

に入れ、1 分間の音刺激（80 dB）を与えている間のfreezing timeを測定した（音刺激学習）。恐怖条件付け学習試験は 13 ヶ月齢時に行った。

Conditioned fear learning

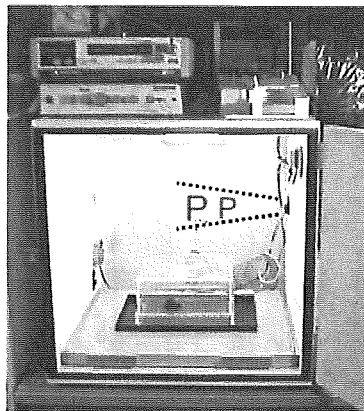
Training trial



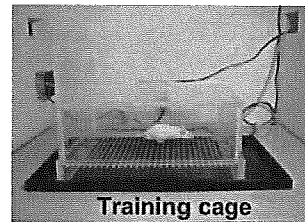
Test trial

Freezing time (%)

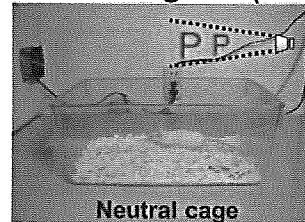
$$= \frac{[\text{freezing time}]}{[\text{trial time}]} \times 100$$



Context freezing test (2min)



Cue freezing test (1min)



結果および結論

1. 自発的交替行動試験

6および13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスのY迷路試験における作業記憶能を調べたところ、各月齢のAPPトランスジェニックマウスのpercent alternationは、ノントランスジェニックマウスのそれと比べて有意に低下しており、作業記憶の障害が認められた (Fig. 1AとB)。10ヶ月齢時にワクチンを投与したAPPト

ランスジェニックマウスではpercent alternationの低下は認められず、作業記憶の障害が改善された (Fig. 1B)。各月齢のAPPトランスジェニックマウスのtotal arm entriesは、ノントランスジェニックマウスのそれと有意な差は認められなかった (データ示さず)。したがって、各月齢のAPPトランスジェニックマウスに認められた作業記憶の障害は、運動機能の障害によるものではないと示唆される。

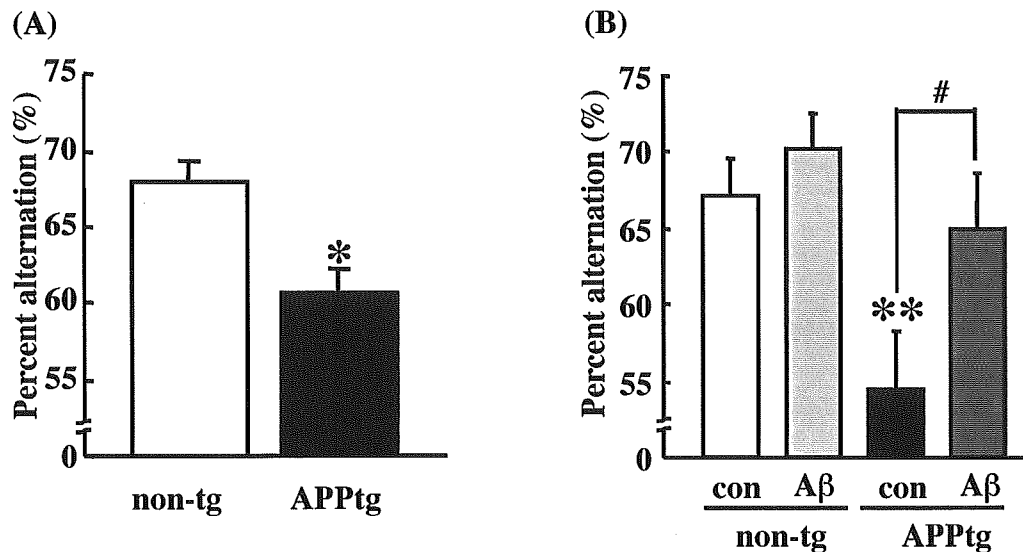
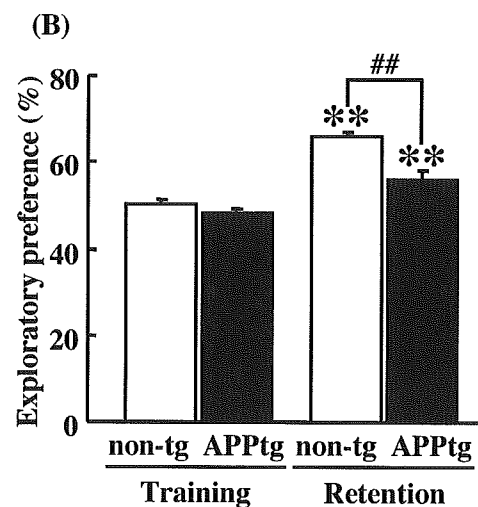
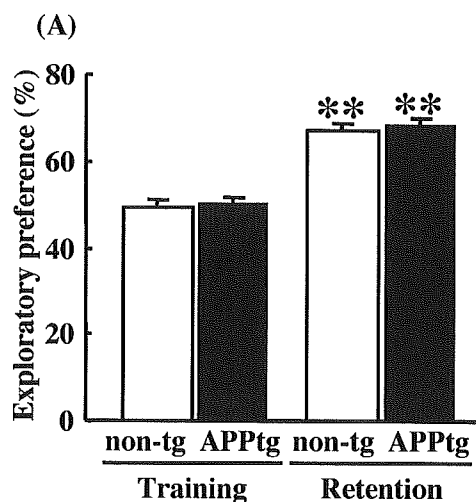


Fig. 1 Spontaneous alternation behavior in the Y-maze test. Cognitive function in APP-transgenic mice (6 months old) (A). Percent alternation during an 8-min session in the Y-maze test were measured on 6 months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 30). *P<0.05 vs non-transgenic mice. Effect of oral vaccination with AAV/A β on cognitive function of APP transgenic mice (13 months old) (B). Spontaneous alternation behavior during an 8-min session in the Y-maze test was measured on 13 months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 14). **P<0.01 vs control AAV vaccinated, non-transgenic mice. #P<0.05 vs control AAV vaccinated APP transgenic mice. con: control AAV vaccination, A β : AAV/A β vaccination, APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice.

2. 新規物質認識試験

新規物質認識試験の訓練試行時には、各月齢におけるマウスは、各objectに対して約50%の割合で探索嗜好行動 (exploratory preference) を示した (Fig. 2A-C)。テスト試行において各月齢のノントランスジェニックマウスでは、新規objectに対するexploratory preferenceが有意に増加した (Fig. 2A-C)。6ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスでは、新規objectに対するexploratory preferenceは有意に増加していた (Fig. 2A)。10ヶ月齢時には新規objectに対するexploratory preferenceは有意に増加していたが、ノントランスジェニックマウスのそれに比べ有意に低下しており、新規物質認識学習の障害が認められた

(Fig. 2B)。13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスでは、新規objectに対するexploratory preferenceに有意な増加が認められず、顕著な認知障害が認められた (Fig. 2C)。10ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスにワクチンを投与し、13ヶ月齢時に新規物質認識試験を行ったところ、非ワクチン投与APPトランスジェニックマウスのそれよりも有意に増加しており、認知障害が改善された (Fig. 2C)。各月齢時の各マウスの全探索行動時間 (total approach time) に有意な差は認められなかったため (データ示さず)、10および13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスに認められた新規物質認識学習障害は、運動もしくは情動機能の障害によるものではないと示唆される。



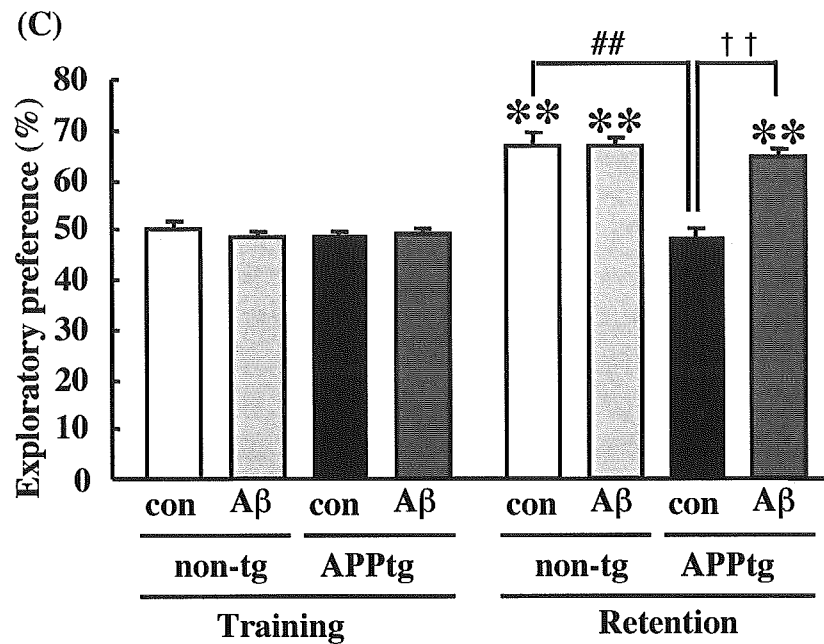


Fig. 2 Novel object recognition test. Cognitive function in APP-transgenic mice (6 and 10 months old) (A and B). Retention session was carried out 24hr after the training. Exploratory preference during a 10-min session in the novel object recognition task were measured on 6 months (A) and 10 months (B) after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 30). **P<0.01 vs training mice, respectively. ##P<0.01 vs trained, non-tg mice. Effect of oral vaccination with AAV/Ab on cognitive function of APP transgenic mice (13 months old) (C). Retention session was carried out 24hr after the training. Exploratory preference during a 10-min session in the novel object recognition task were measured on 13months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 14). **P<0.01 vs training mice, respectively. ##P<0.01 vs trained, control AAV vaccinated non-transgenic mice. ††P<0.01 vs trained, control AAV vaccinated APP transgenic mice. con: control AAV vaccination, Aβ: AAV/Aβ vaccination, APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice.

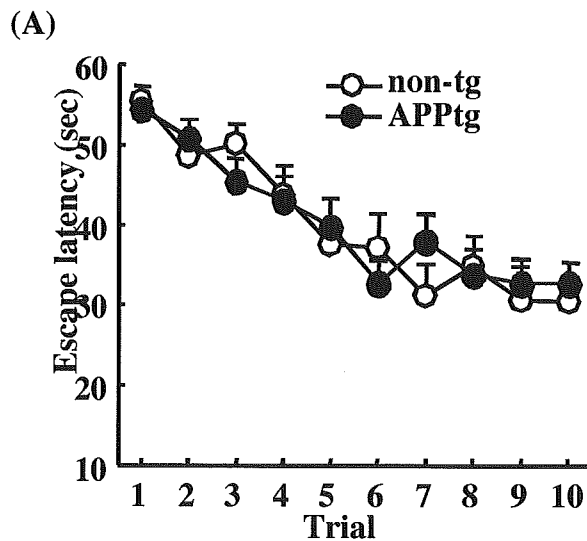
3. モリス水迷路試験（陳述記憶実験）

モリス水迷路試験において6ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスのプラットホームへのescape latencyは、ノントランスジェニックマウスと同様に短縮し (Fig. 3A, B)、空間認知

障害は認められなかった。13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスでは、プラットホームへのescape latencyはノントランスジェニックマウスに比べ有意に延長し (Fig. 5A, B)、陳述記憶障害が認められた。10ヶ月齢

時にワクチンを投与したAPPトランスジェニックマウスでは、APPトランスジェニックマウスの非ワクチン投与群のそれと比べ有意な短縮が認められ (Fig. 5A, B)、陳述記憶障害が改善された。プローブ試験において、6ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスではノントランスジェニックマウスと同様にプラットフォームが設置してあった区間 (trained quadrant) におけるpercent search timeが他のquadrantのそれに比べ有意な増加が認められた (Fig. 4)。13ヶ月齢時においてもノントランスジェニックマウスではtrained quadrantにおけるpercent search timeは他のquadrantに比べ有意に増加していたが、APPトランスジェニックマウスではそのよ

うな有意な増加が認められなかった (Fig. 6)。10ヶ月齢時にワクチンを投与したAPPトランスジェニックマウスでは13ヶ月齢時において、trained quadrant における percent search timeが他のquadrantに比べて有意に増加が認められた (Fig. 6)。各月齢時におけるswimming speedにはいずれの群においても有意な差は認められなかった (データ示さず)、13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスに認められたescape latencyの延長やプローブ試験におけるtrained quadrant に対する percent search timeの増加は海馬機能の異常に伴う、陳述記憶が障害されたことによるものと示唆される。



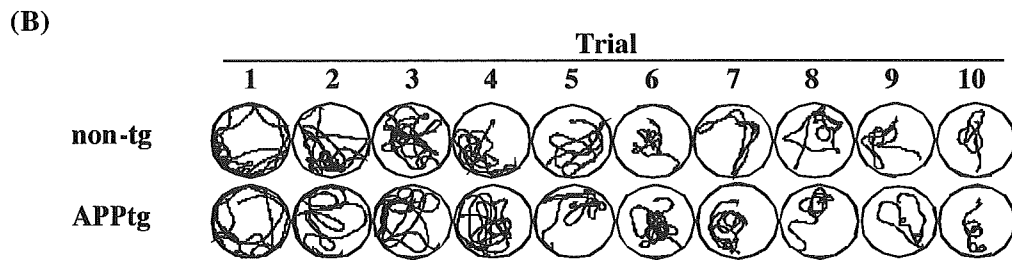


Fig.3 Cognitive function in APP-transgenic mice. Reference memory in Morris water maze test (A) Escape latency during a 60-sec session in the Water maze task were measured on 6months after birth. (B) Representative swimming paths during 10 trials. Values indicate means \pm s.e.mean (n=30). **P<0.01 vs non-tg mice. APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice.

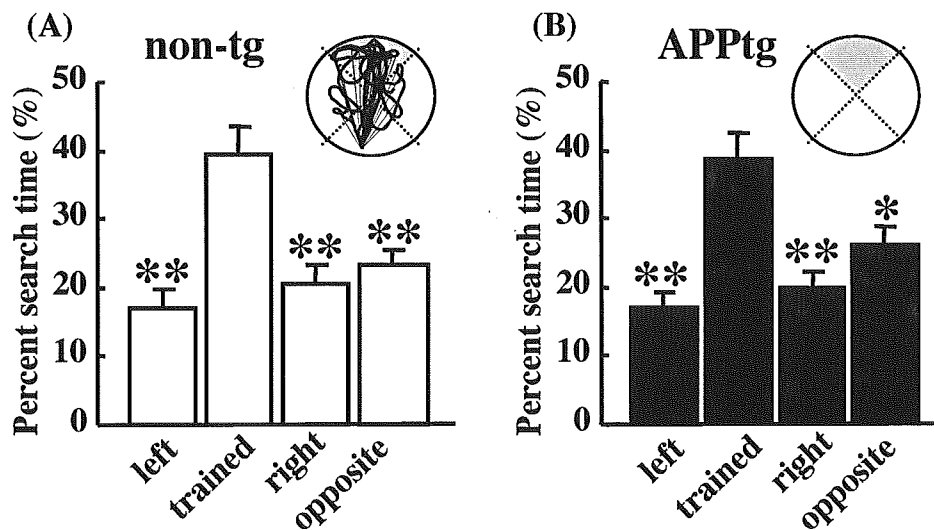


Fig.4 Cognitive function in APP-transgenic mice. Spatial memory for a platform location during the probe trial after training in reference memory of morris water maze task Percent search time during a 60-sec session in the Water maze task were measured on 6months after birth. The inset shows representative swimming path in probe trial and filled area is a target quadrant. Values indicate means \pm s.e.mean (wild; n=30, APPtg; n=30). *P<0.05, **P<0.01 vs trained quadrant, respectively. APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice.

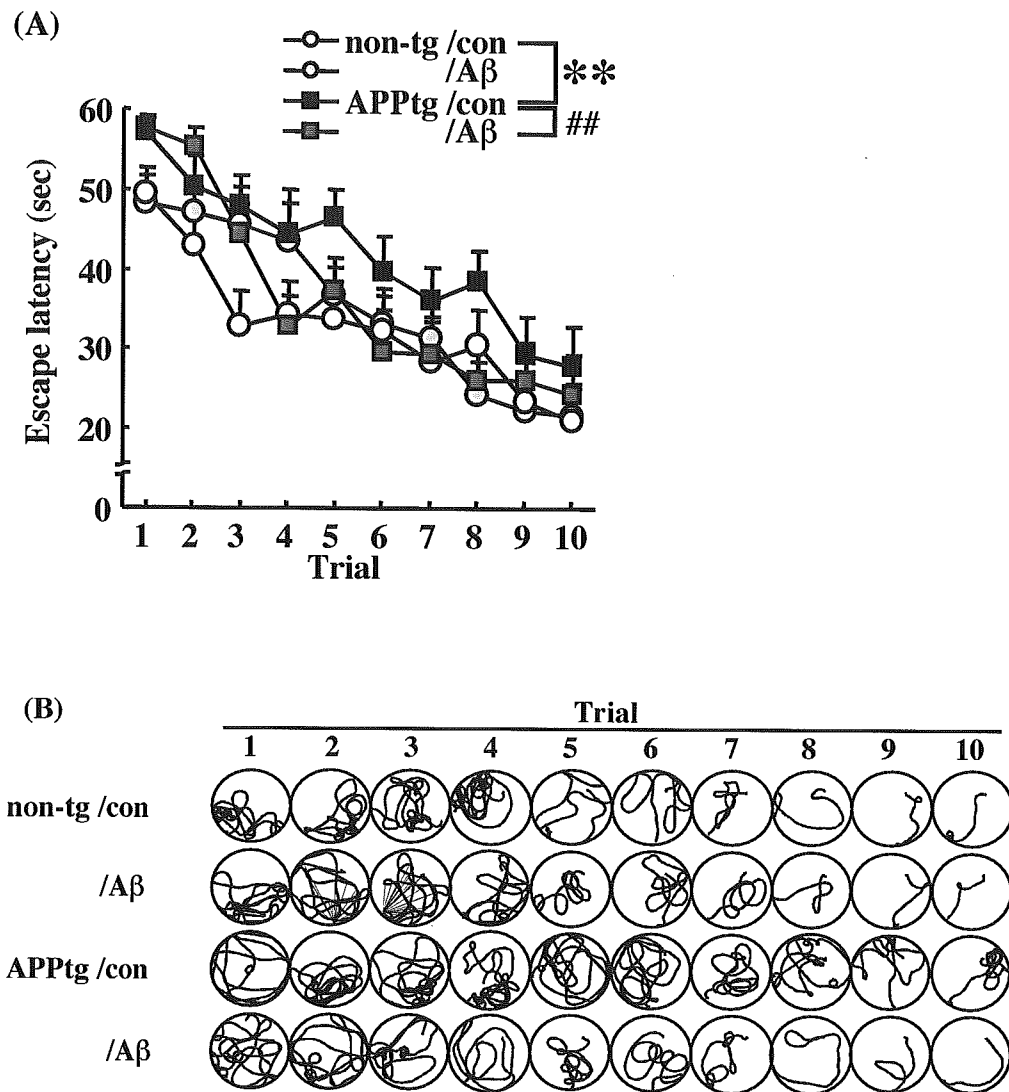


Fig.5 Effect of oral vaccination with AAV/Ab on cognitive function of APP transgenic mice. Reference memory in morris water maze task (A) Escape latency during a 60-sec session in the Water maze task were measured on 13 months after birth. **(B)** Representative swimming paths during 10 trials. Values indicate means \pm s.e. mean (n=14). **P<0.01 vs control AAV vaccinated non-transgenic mice. ##P<0.01 vs control AAV vaccinated APP transgenic mice. con: control AAV vaccination, Aβ: AAV/Aβ vaccination, APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice.

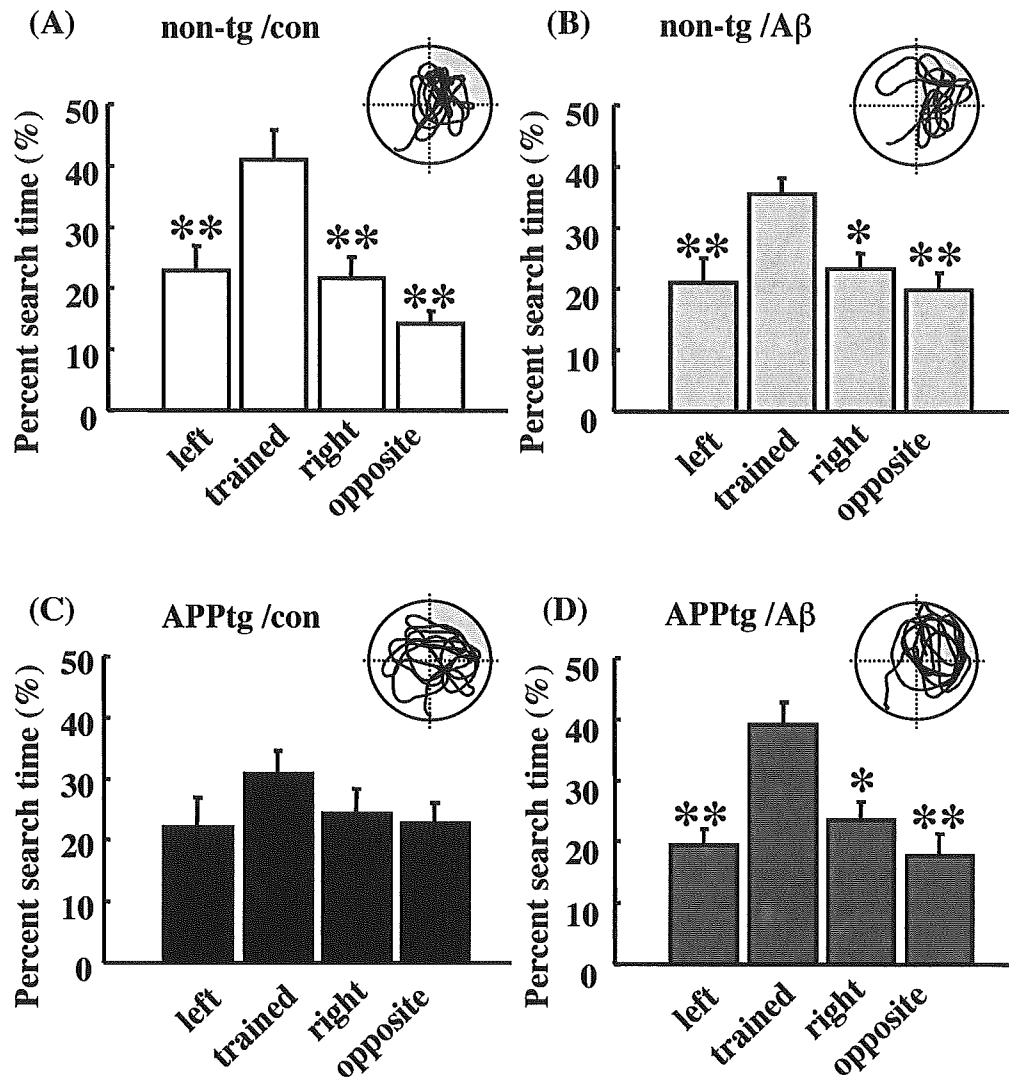


Fig.6 Effect of oral vaccination with AAV/A β on cognitive function of APP transgenic mice. Spatial memory for a platform location during the probe trial after training in reference memory of moris water maze task Percent search time during a 60-sec session in the Water maze task were measured on 13months after birth. The inset shows representative swimming path in probe trial and filled area is a target quadrant. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 14). **P<0.01, *P<0.05 vs search time of trained area respectively. con: control AAV vaccination, A β : AAV/A β vaccination, APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic mice

4. 恐怖条件付け学習試験

恐怖条件付け学習試験を13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスにおいて行ったところ、訓練ケージ内のfreezing timeは、ノントランスジェニックマウスのそれに比べ有意に短縮され (Fig. 7A)、文脈学習の障害が認められた。10ヶ月齢時にワクチンを投与したAPPトランスジェニックマウスでは13ヶ月齢において非ワクチン投与群と比べ有意な延長が認められ (Fig. 7A)、文脈学習障害が改善された。ニュートラルケージにおけるfreezing timeはすべての群において有意な差が認められなかった (Fig. 7B)。これらマウスにおいて電気刺激に対する応答性には有意な違いは認められなかった (データ示さず)、13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスに認められた訓練ケージ内でのfreezing timeの減少は文脈学習が障害されたことによるものと示唆される。しかし、ニュートラルケージにおけるfreezing timeは13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスは他群のマウスと比べ有意な差が認められないため、音刺激学習は正常であると示唆され、APPトランスジェニックマウスで認められた文脈学習における障害は、海馬機能の低下によるものと示唆された。

結論として、加齢に伴い新規物質認識試験およびモリス水迷路試験における学習・記憶機の障害が認められた。APPトランスジェニックマウスにおいて脳内におけるベータアミロイド ($A\beta$) が11から13ヶ月齢において顕著に沈着することが報告 (*Science* 274: 99-103) されていることから、これら学習・記憶障害は加齢に伴う $A\beta$ の沈着によるものと示唆される。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処置すると、13ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスに認められたY字迷路試験、新規物質認識試験、モリス水迷路試験および恐怖条件付け学習試験における学習・記憶障害は緩解された。これは、本経口ワクチンを10ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウスに投与することにより13ヶ月齢時における $A\beta$ の沈着が認められなくなることが報告 (*J Alzheimers Dis* 6: 483-488) されていることから、本経口ワクチンはAPPトランスジェニックマウスの加齢に伴う $A\beta$ の沈着を抑制した結果、学習・記憶障害が改善されたものと示唆された。今後、本経口ワクチンのアルツハイマー病の新しい治療薬としての可能性が期待される。

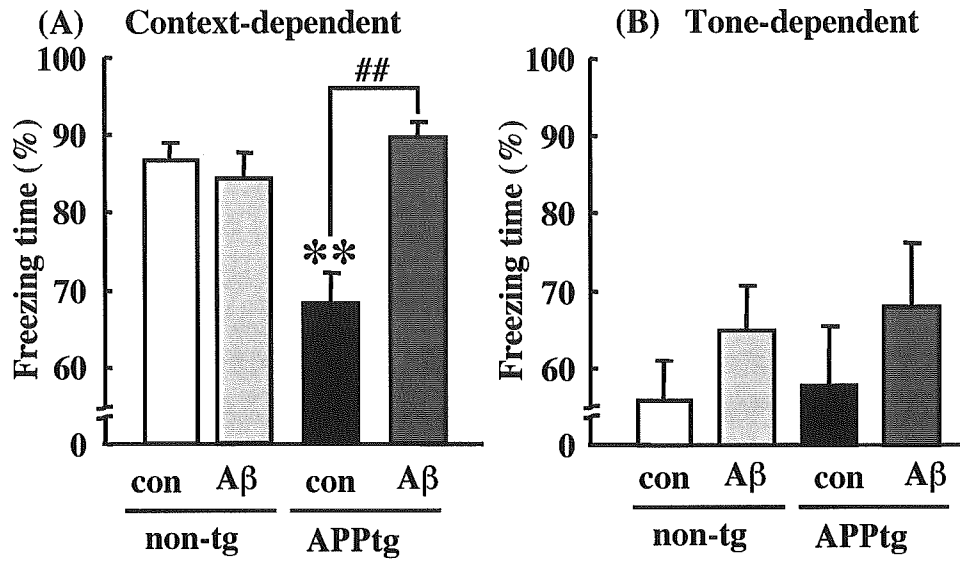


Fig.7 Effect of oral vaccination with AAV/A β on cognitive function of APP transgenic mice. Conditioned-fear learning task. Retention session was carried out 24hr after the training. Context-dependent test (A) and Cue-dependent test (B) were measured on 13 months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (n= 15-17) **P<0.01 vs vehicle treated, wild type mice. **P<0.01 vs control AAV vaccinated non-transgenic mice. ##P<0.01 vs control AAV vaccinated APP transgenic mice. con: control AAV vaccination, A β : AAV/A β vaccination, APPtg: APP transgenic mice, non-tg: non-transgenic

C. 研究結果

1. 各アフリカミドリザルの剖検所見を記す。

1) 動物番号 G-4 (体重 : 2.60kg・脳重量 : 48.581g)

・左腎 : 白色結節 (5mm 程度、2箇所) 及びのう胞 (1mm 程度)

・右腎 : のう胞 (1-2mm 程度、表面に散在)

・左肺 : 癒着 (左肺上部が胸膜と癒着)

・左右肺 : 気腫

・右下顎リンパ節 (右下顎部に 10mm 程度の白色のう胞あり、内容液 : 粘度なし)

・大脳 : 黒色変 (左右月状溝に 1mm 程度の黒色変あり)

2) 動物番号 G-5 (体重 : 2.36kg・脳重量 : 49.518g)

・肝臓 : 表面粗 (肝全体)

3) 動物番号 G-6 (体重 : 2.42kg・脳重量 : 55.491g)

・左右腎 : 退色

・左腎 : 桑実状変化

4) 動物番号 G-7 (体重 : 2.44kg・脳重量 : 53.934g)

・十二指腸 : 水疱 (胃～十二指腸結合部 (十二指腸より) に存在、5mm 程度の透明水胞あり、内容液 : 粘度あり)

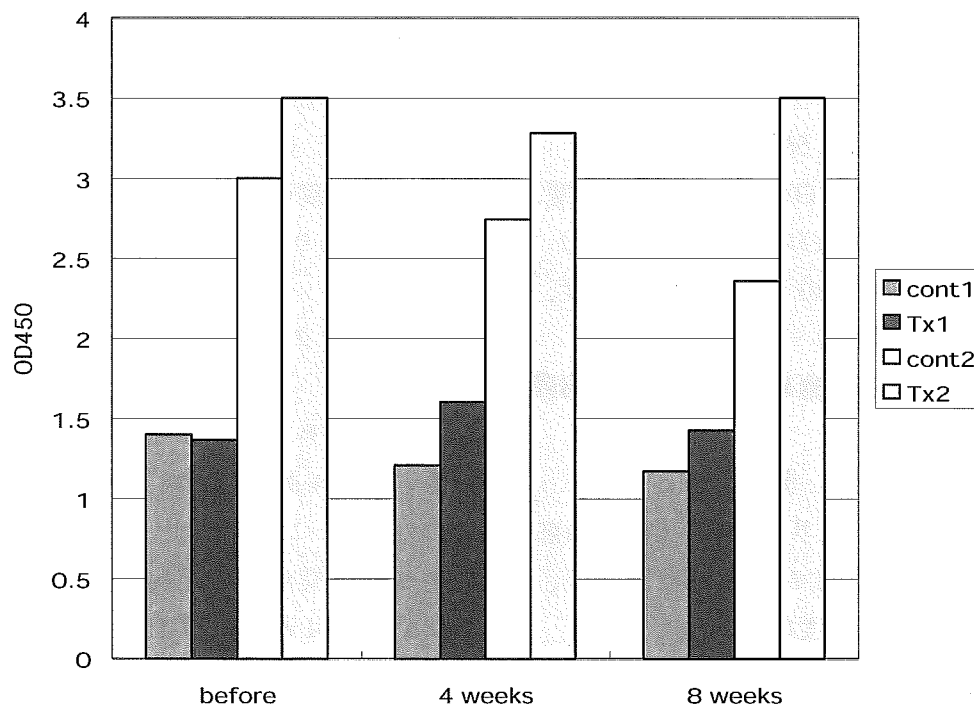
2. 経口ワクチン投与サル血清中の抗 A β 抗体価

経口ワクチン投与により、アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体価は2つのパターンを示した。

1つは、投与前に比べ著しい増加はないが、4週後には上昇しており、8週後には投与前の値に下降した。

2番目のパターンは、投与群・コントロール群とも、開始前より既に高値を示し、観察期間中持続する傾向を示した。高抗体価を示す血清は、A β ペプチド以外の未同定の蛋白に交差反応している可能性も考えられる。

図1 アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体価の推移 (1000 倍希釈)。



3. 老人斑免疫組織染色

アフリカミドリザルの脳組織老人斑を抗 A β 抗体(4G8)で染色した図2を示す。成熟型老人斑 (mature senile

plaques) とびまん型老人斑 (diffuse senile plaques) を認める。小血管に沈着したアミロイド β 蛋白も認められる。

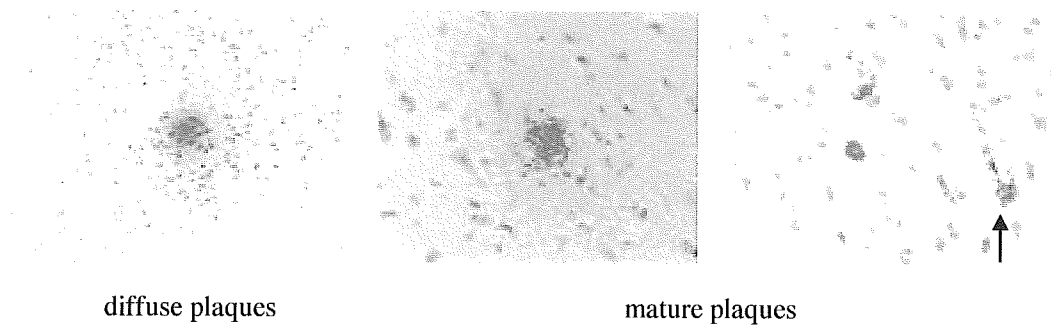


図2 アフリカミドリザルの脳組織老人斑。成熟型老人斑(mature senile plaques)とびまん型老人斑(diffuse senile plaques)を認める。矢印は、血管に沈着したアミロイド β 蛋白。

アフリカミドリザルの前頭葉では、コントロール群および治療群とも老人斑の数は比較的少数であるが、コントロール群では神経細胞内 A β 蛋白沈着が有意に増加していた(図3)。

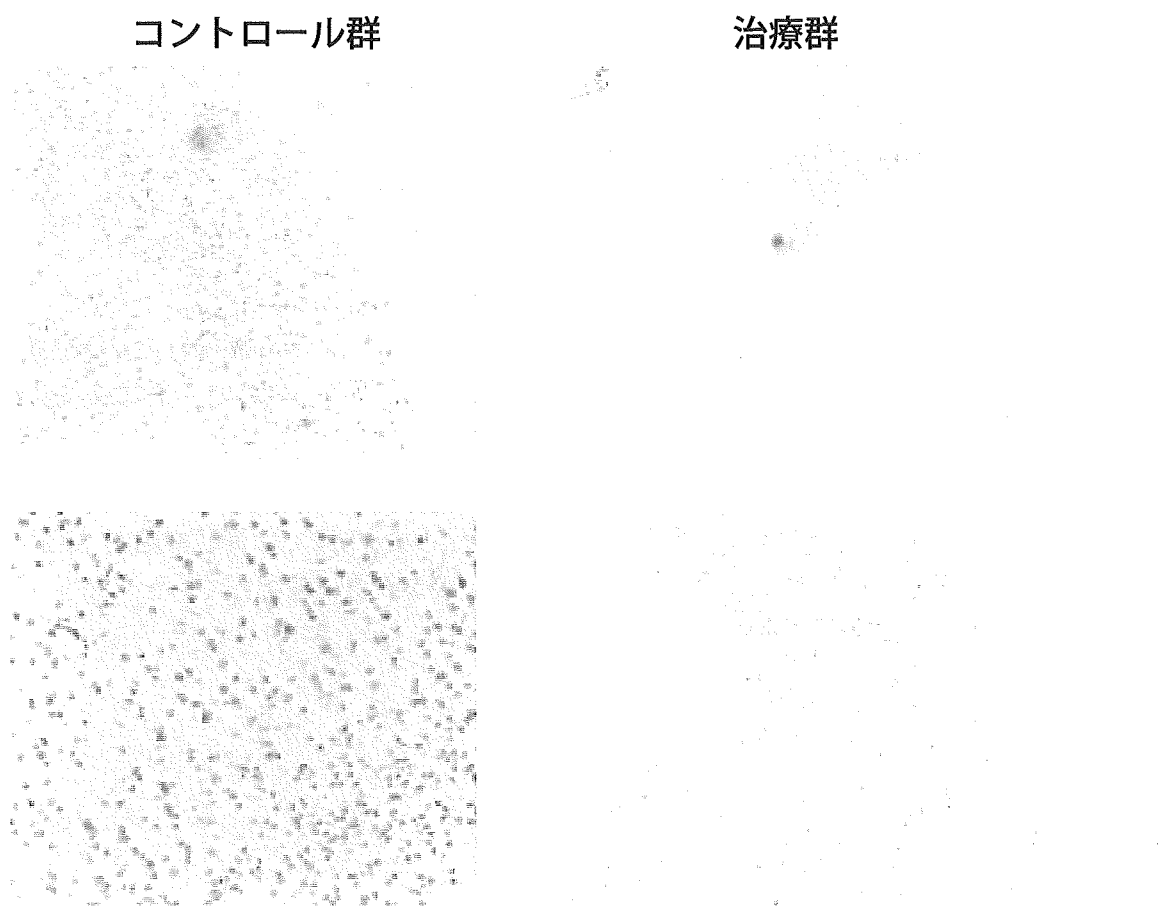


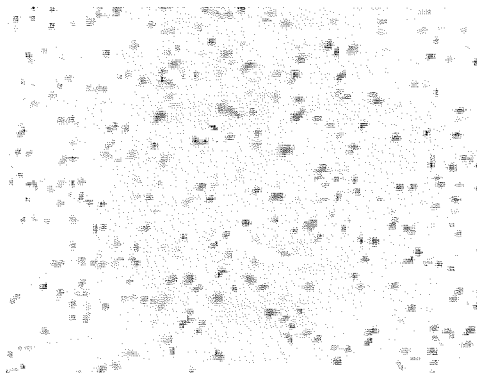
図3 アフリカミドリザル前頭葉のアミロイド β 染色。

アフリカミドリザルの頭頂葉では、治療群 G-4 サルに老人斑がやや目立つが、コントロール群においても老人斑の形成や、神経細胞内 $A\beta$ 蛋白沈

着が多く認められた (図4)。

治療群 G-5 サルでは、殆どアミロイド β 蛋白の沈着は認められない。

コントロール群



治療群

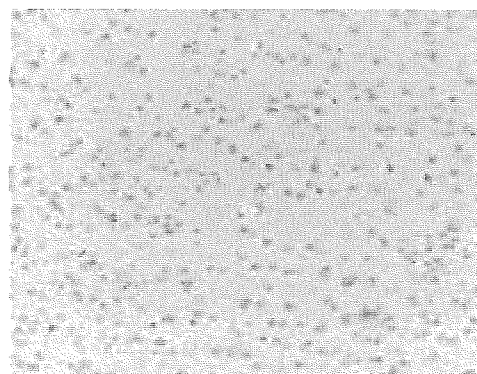
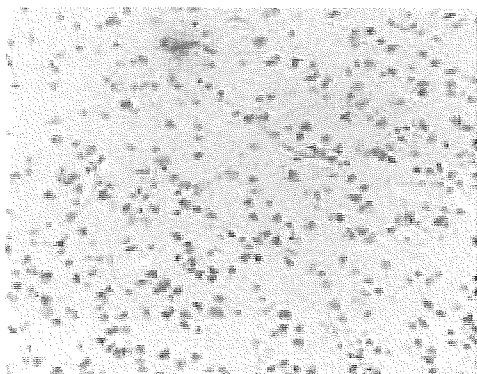
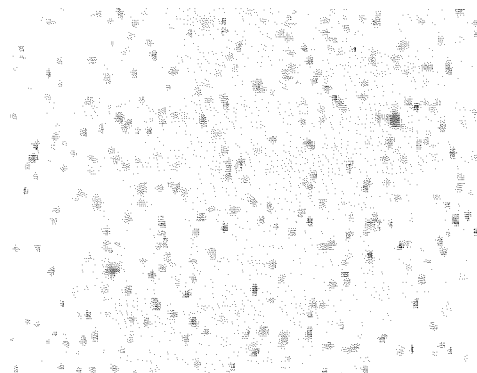
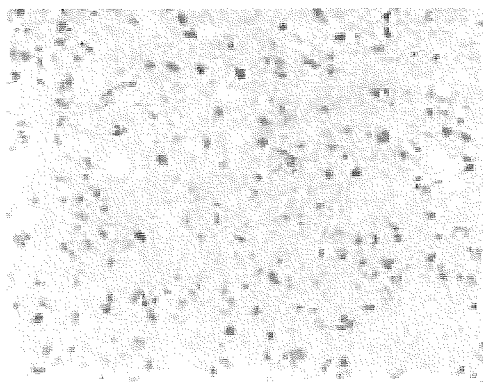
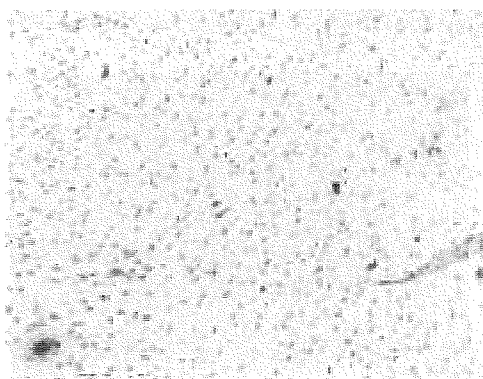


図4 アフリカミドリザル頭頂葉のアミロイド β 染色。

アフリカミドリザル側頭葉のアミロイド β 染色を示す(図5)。治療群 G-4 サルにアミロイド β 蛋白の沈着は軽微である。治療群 G-5 サルでは、殆ど

アミロイド β 蛋白の沈着は認められない。一方、コントロール群では、老人斑の形成や、神経細胞内 A β 蛋白沈着が目立つ。

コントロール群



治療群

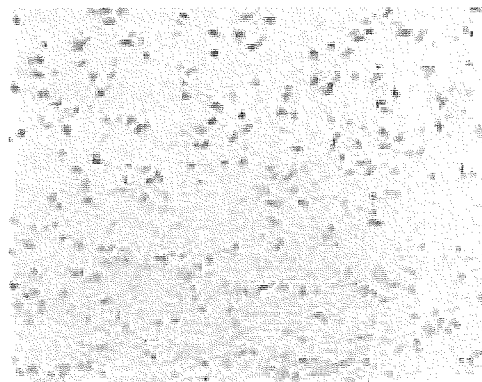
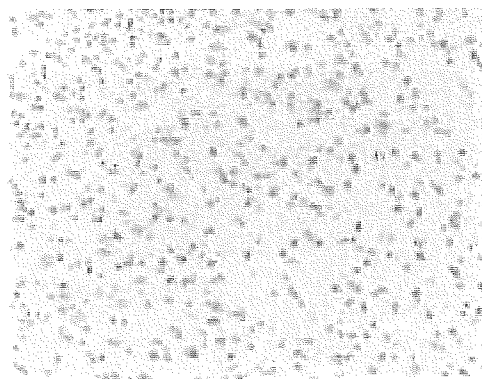
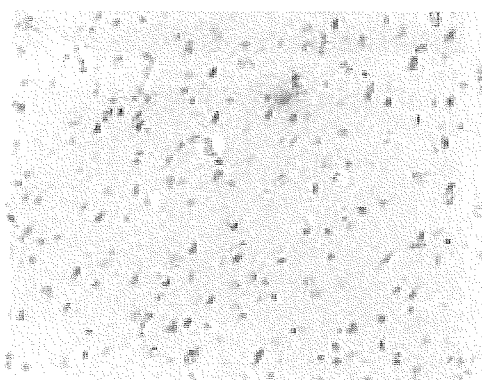
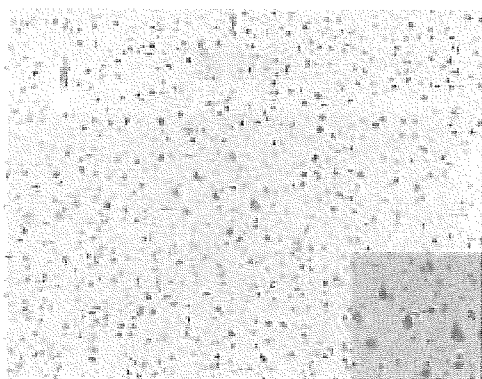


図5 アフリカミドリザル側頭葉のアミロイド β 染色。

アフリカミドリザル後頭葉では、コントロール群において老人斑の形成や、著明な神経細胞内 A β 蛋白沈着が認められる。治療群では、小さな老

人斑の形成を認めるのみで、神経細胞内 A β 蛋白沈着の所見は認められない（図 6）。

コントロール群



治療群

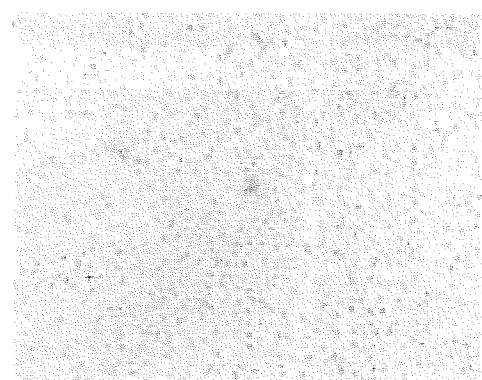
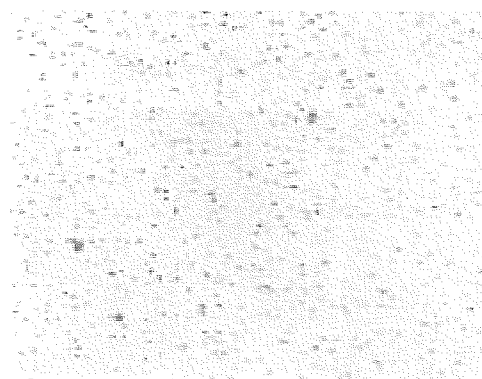
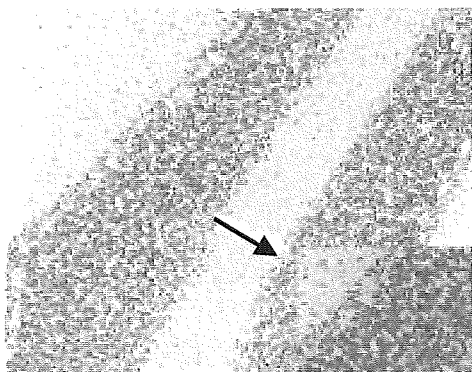


図 6 アフリカミドリザル後頭葉のアミロイド β 染色。

アフリカミドリザル小脳においては
(図7)、ヒトと同様に小脳プルキン
エ細胞層にアミロイド β 蛋白が1列に
沈着し、プルキンエ細胞層・顆粒層
においては老人斑の形成が認められ

る。コントロール群に比べ、治療群
では小脳プルキンエ細胞層のアミロ
イド β 蛋白沈着は少なく、顆粒層の老
人斑も著明に減少していた。

コントロール群



治療群

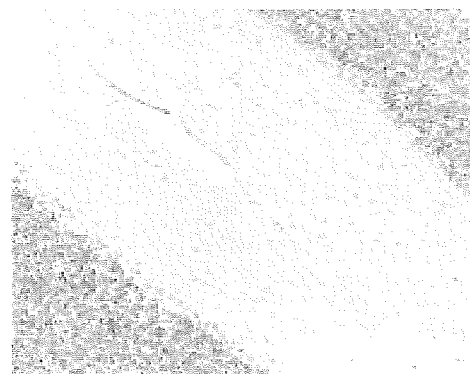
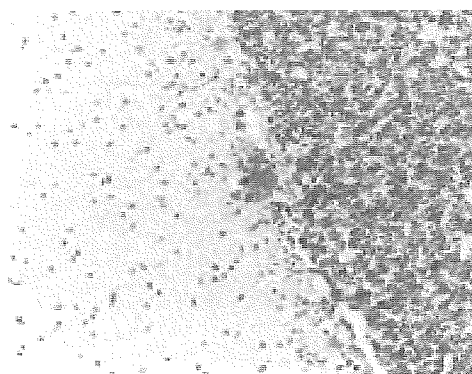
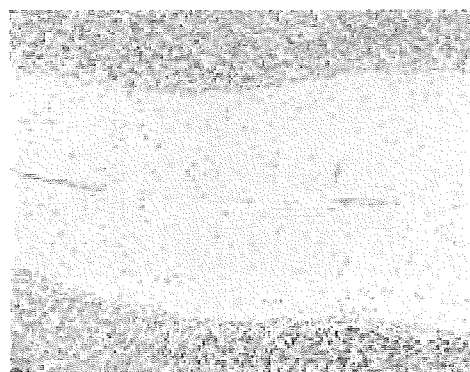


図7 アフリカミドリザル小脳のアミロイド β 染色。