

might have affected the results. However, our study included a fairly large number of subjects compared with most of the previous studies that examined the relationship between ApoE4 and depression. In addition, we used only data from those who provided full data and underwent a structured interview. Although standard practice for MCI study is typically based on average of at least two tests per domain, we used only one test per domain. Self-report measures were used in our study; however, the results of the measures from the participants with diminished insight may be a poor measure of actual functioning. Taking the limitations described earlier into consideration, we should take attention in interpreting the results of this study.

In conclusion, the association of MCI with ApoE4 and DSC suggests that MCI is a confounder for the association between ApoE4 and DSC. ApoE4 contributed to neither DSC nor MDE.

Key points

- ApoE4 contributed to neither DSC nor MDE.
- The comparison between ApoE4 carriers and non-carriers revealed that only MCI prevalence was significantly different between the two groups.
- Sex, MCI, years of education, and N-ADL scores significantly correlated with prevalence of DSC.
- The association of MCI with ApoE4 and DSC suggested that MCI is a confounder for the association between ApoE4 and DSC.

Acknowledgement

Funding for this research was obtained from the Ministry of Health, Labor and Welfare (grant nos. 2001-dementia and fracture-003).

Conflict of interest

None declared.

References

- American Psychiatric Association. 1987. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3rd Ed-revised. American Psychiatric Association: Washington, DC.
- American Psychiatric Association. 1994. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Ed. American Psychiatric Association: Washington, DC.
- Artero S, Ancelin ML, Porter F, et al. 2008. Risk profiles for mild cognitive impairment and progression to dementia are gender specific. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 979–984.
- Azar AR, Murrell SA, Mast BT. 2005. Race and vascular depression risk in community-dwelling older adults. *Am J Geriatr Psychiatry* 13: 329–332.
- Beekman ATF, Deeg DJH, Geerlings SW, et al. 2001. Emergence and persistence of late life depression: a 3-year follow-up of the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Affect Disord* 65: 131–138.
- Bisschop MI, Kriegsman DMW, Beekman ATF, et al. 2004. Chronic disease and depression: the modifying role of psychosocial resources. *Soc Sci Med* 59: 721–733.
- Blumstein T, Benyamini Y, Fuchs Z, et al. 2004. The effect of a communal lifestyle on depressive symptoms in late life. *J Aging Health* 16: 151–174.
- Bonger HR, Richie MB, de Vries HF, et al. 2009. Depression, cognition, apolipoprotein E genotype: latent class approach to identifying subtype. *Am J Geriatr Psychiatry* 17: 344–352.
- Braam AW, Prince MJ, Beekman ATF, et al. 2005. Physical health and depressive symptoms in older Europeans. *Br J Psychiatry* 187: 35–42.
- Brink TL, Yesavage JA, Lum O, et al. 1982. Screening tests for geriatric depression. *Clin Gerontol* 1: 37–44.
- Chan DC, Kasper JD, Black BS, et al. 2003. Prevalence and correlates of behavioral and psychiatric symptoms in community-dwelling elders with dementia or mild cognitive impairment: the Memory and Medical Care Study. *Int J Geriatr Psychiatry* 18: 174–182.
- Copeland JR, Chen R, Dewey ME, et al. 1999. Community-based case-control study of depression in older people. Case and sub-cases from the MRC-ALPHA Study. *Br J Psychiatry* 175: 340–347.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921–923.
- Freedman M, Jacob L, Kaplan F, et al. 1994. *Clock Drawing: a Neuropsychological Analysis*. Oxford University Press: New York.
- Gazmararian J, Baker D, Parker R, et al. 2000. A multivariate analysis of factors associated with depression: evaluating the role of health literacy as a potential contributor. *Arch Intern Med* 160: 3307–3314.
- Grober E, Buschke H, Crystal H, et al. 1988. Screening for dementia by memory testing. *Neurology* 38: 900–903.
- Harwood DG, Baker WW, Ownby RL, et al. 1999. Factors associated with depressive symptoms in non-demented community-dwelling elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 14: 331–337.
- Heun R, Flein S. 2005. Risk factors of major depression in the elderly. *Eur Psychiatry* 20: 199–204.
- Hidaka S, Ikejima C, Kodama C, et al. 2012. Prevalence of depression and depressive symptoms among older Japanese people: comorbidity of mild cognitive impairment and depression. *Int J Geriatr Psychiatry* 27: 271–279.
- Horowitz A, Reinhardt JP, Kennedy GI. 2005. Major and subthreshold depression among older adults seeking vision rehabilitation services. *Am J Psychiatry* 13: 180–187.
- Jang Y, Haley WE, Small BJ, et al. 2002. The role of mastery and social resources in the associations between disability and depression in later life. *Gerontologist* 42: 807–813.
- Jorm AF, Anstey KJ, Christensen H, et al. 2005. MRI hyperintensities and depressive symptoms in a community sample of individuals 60–64 years old. *Am J Psychiatry* 162: 699–705.
- Jorm AF, Mackinnon AJ, Henderson AS, et al. 1995. The Psychogeriatric Assessment Scales: a multi-dimensional alternative to categorical diagnoses of dementia and depression in the elderly. *Psychol Med* 25: 447–460.
- Kraaij V, de Wilde EJ. 2001. Negative life events and depressive symptoms in the elderly: a life span perspective. *Aging Ment Health* 5: 84–91.
- Krishnan KR, Tupler LA, Ritchie JC Jr, et al. 1996. Apolipoprotein E-epsilon 4 frequency in geriatric depression. *Biol Psychiatry* 40: 69–71.
- Lopez OL, Jagust WJ, Dulberg C, et al. 2003. Risk factors for mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognitive Study: part 2. *Arch Neurol* 60: 1394–1399.
- Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, et al. 2002. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA* 288: 1475–1483.
- Miyamoto M, Kodama C, Kinoshita T, et al. 2009. Dementia and mild cognitive impairment among non-responders to a community survey. *J Clin Neurosci* 16: 270–276.
- Muangpaisan W, Intalapaporn S, Assantachai P. 2008. Neuropsychiatric symptoms in the community-based patients with mild cognitive impairment and the influence of demographic factors. *Int J Geriatr Psychiatry* 23: 699–703.
- Nishimura T, Kobayashi T, Hagiuchi S, et al. 1993. Scales for mental state and daily living activities for the elderly: clinical behavioral scales for assessing demented patients. *Int Psychogeriatr* 5: 117–134.
- Ohara K, Nagai M, Suzuki Y, et al. 1999. Apolipoprotein E epsilon 4 allele and Japanese late-onset depressive disorder. *Biol Psychiatry* 45: 308–312.
- Oldenhinkel AJ, Ormel J, Brillman EJ, et al. 2003. Psychosocial and vascular risk factors of depression in later life. *J Affect Disord* 74: 237–246.

- Palmer K, Berger AK, Monastero R, *et al.* 2007. Predictors of progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* 68: 1596–1602.
- Petersen RC, Morris JC. 2005. Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target. *Arch Neurol* 62: 1160–1163.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, *et al.* 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56: 303–308.
- Ramakers IH, Visser PJ, Aalten P, *et al.* 2008. The association between APOE genotype and memory dysfunction in subjects with mild cognitive impairment is related to age and Alzheimer pathology. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26: 101–108.
- Rigaud AS, Traykov I, Caputo I, *et al.* 2001. Association of the apolipoprotein E epsilon4 allele with late-onset depression. *Neuroepidemiology* 20: 268–272.
- Ritchie K, Fuhrer R. 1992. A comparative study of the performance of screening tests for senile dementia using receiver operating characteristics analysis. *J Clin Epidemiol* 45: 627–637.
- Sasaki M, Kodama C, Hidaka S, *et al.* 2009. Prevalence of four subtypes of mild cognitive and APOE in a Japanese community. *Int J Geriatr Psychiatry* 24: 1119–1126.
- Schoevers RA, Deeg DJ, van Tilburg W, *et al.* 2005. Depression and generalized anxiety disorder: co-occurrence and longitudinal patterns in elderly patients. *Am J Geriatr Psychiatry* 13: 31–39.
- Sohlberg M, Mateer CA. 1986. *Attention Process Training Manual*. Association for Neuropsychological Research & Development: Washington, DC.
- Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, *et al.* 2007. Incident occurrence of depressive symptoms among patients with mild cognitive impairment—the Italian longitudinal study on aging. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24: 55–64.
- Soloman PR, Pendlebury WW. 1998. Recognition of Alzheimer's disease: the 7 minute screen. *Fam Med* 30: 265–271.
- Strawbridge WJ, Deleger S, Roberts RE, *et al.* 2002. Physical activity reduces the risk of subsequent depression for older adults. *Am J Epidemiol* 156: 328–334.
- Stutees PG, Wainwright NW, Bowman R, *et al.* 2009. No association between APOE and major depressive disorder in a community sample of 17,507 adults. *J Psychiatr Res* 43: 843–847.
- van der Flier WM, Pijnenburg YA, Schoonenboom SN, *et al.* 2008. Distribution of APOE genotypes in a memory clinic cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25: 433–438.
- van der Wurff FB, Beekman ATF, Dijkshoorn H, *et al.* 2004. Prevalence and risk-factors for depression in elderly Turkish and Moroccan migrants in the Netherlands. *J Affect Disord* 83: 33–41.
- Wechsler D. 1981. *Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised*. Psychological Corporation: Cleveland, OH.
- Yen YC, Rebok GW, Gallo JJ, *et al.* 2007. ApoE4 allele is associated with late-life depression: a population-based study. *Am J Geriatr Psychiatry* 15: 858–868.

Original Article

Immunohistochemical analysis of ubiquilin-1 in the human hippocampus: Association with neurofibrillary tangle pathology

Katsuyoshi Mizukami,¹ Eric E. Abrahamson,^{4,6} Zhiping Mi,⁴ Masanori Ishikawa,²
Kazushi Watanabe,³ Setsuo Kinoshita,³ Takashi Asada² and Milos D. Ikonomovic^{4,5,6}

¹Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tokyo, ²Department of Psychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, ³Proubase Technology Inc., Kawasaki, Japan, Departments of ⁴Neurology, ⁵Psychiatry, University of Pittsburgh and ⁶Geriatric Research Education and Clinical Center, V.A. Pittsburgh Healthcare System, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

This post mortem immunohistochemical study examined the localization and distribution of ubiquilin-1 (UBL), a shuttle protein which interacts with ubiquitin and the proteasome, in the hippocampus from Alzheimer's disease (AD) dementia cases, and age-matched cases without dementia. In Braak stages 0–I–II cases, UBL immunoreactivity was detected in a dense fiber network in the neuropil, and in the cell cytoplasm and nucleoplasm of neurons in Cornu Ammonis (CA) fields and dentate gyrus granular neurons. In Braak stages III–IV and V–VI cases, UBL immunoreactivity was reduced in the neuropil and in the cytoplasm of the majority of CA1 neurons; some CA1 pyramidal neurons and the majority of CA2/3 pyramidal, CA4 multipolar, and dentate granular neurons had markedly increased UBL immunoreactivity in the nucleoplasm. Dual immunofluorescence analysis of UBL and antibody clone AT8 revealed co-localization most frequently in CA1 pyramidal neurons in Braak stage III–IV and V–VI cases. Further processing using the pan-amyloid marker X-34 revealed prominent UBL/X-34 dual labeling of extracellular NFT confined to the CA1/subiculum in Braak stage V–VI cases. Our results demonstrate that in AD hippocampus, early NFT changes are associated with neuronal up-regulation of UBL in nucleoplasm, or its translocation from the cytoplasm to the nucleus. The perseverance of UBL changes in CA2/3, CA4 and dentate gyrus, generally

considered as more resistant to NFT pathology, but not in the CA1, may mark a compensatory, potentially protective response to increased tau phosphorylation in hippocampal neurons; the failure of such a response may contribute to neuronal degeneration in end-stage AD.

Key words: Alzheimer, amyloid, Plic-1, tau, ubiquilin.

INTRODUCTION

The ubiquitin (Ub)–proteasome system is the major non-lysosomal proteolytic pathway in eukaryotes.¹ Ubiquilin-1 (also referred to as “protein linking integrin-associated protein to cytoskeleton 1”, or Plic-1) is a Ub-like (UBL) protein with functional domains on its N-terminus (UB) and C-terminus (Ub-associated; UBA). Ubiquilin interacts with polyubiquitylated proteins through its UBA domain and with two subunits of the 19S proteasome through the UB domain.² UBL protein is observed in neurofibrillary tangles (NFT) in Alzheimer's disease (AD) brains,³ facilitates presenilin synthesis³ and modulates amyloid precursor protein trafficking and amyloid-beta (A β) secretion.⁴ Previous studies reported that early in AD, UBL-1 protein levels decrease in the frontal cortex;⁵ the status of UBL-1 protein levels in the hippocampus in patients with varying degrees of NFT pathology is unknown. In this study, we used immunohistochemical techniques to examine localization and alterations in UBL-1 protein in the hippocampus from cases at different stages of NFT pathology as classified by Braak and Braak.⁶ Multiple-label immunofluorescent microscopy analyses examined the relationship of UBL with early and late NFT changes. We hypothesized that changes in UBL-1 immunoreactivity

Correspondence: Katsuyoshi Mizukami, MD, PhD, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 3-29-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0012, Japan. Email: kmizukam@taiiku.tsukuba.ac.jp

Received 30 October 2012; revised 23 June 2013 and accepted 24 June 2013.

intensity and/or cell type distribution are associated with the development and progression of NFT in AD hippocampus.

METHOD

Hippocampal tissue was obtained post mortem from 23 cases: 18 with a clinical diagnosis of probable AD and five age-matched cognitively intact cases without AD pathology or with NFT confined to the entorhinal cortex. Clinical diagnosis of AD was based on a standardized Alzheimer's Disease Research Center (ADRC) evaluation at a Consensus Conference, utilizing DSM-IV⁷ and National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke / Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS/ADRDA)⁸ criteria. Demographic and neuropathology data are presented in Table 1. Neuropathological diagnosis was determined by a certified neuropathologist using Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD)⁹ and National Institute on Aging (NIA)-Reagan Consensus criteria¹⁰ (Table 1). All cases in the study were classified into stages 0 to VI according to Braak and Braak⁶ (Table 1). One case (Braak stage IV) had a family history of AD.

Brain tissue was processed according to previously described procedures.^{11,12} Blocks from the middle of the hippocampal body were cut in a coronal plane and placed in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (PB, pH = 7.4) containing 4% paraformaldehyde for 48 h at 4°C and then cryoprotected by immersion in 30% sucrose in PB for no longer than 7 days. The tissue was then frozen, sectioned at

40 µm and processed for immunohistochemistry as previously described.^{11,12} Sections were immunolabeled using a rabbit polyclonal antibody against ubiquitin 1 (U7258, Sigma, Lot# E0409, 1:1000; Sigma, St Louis, MO, USA), generated against an immunogen corresponding to carboxy terminus amino acids 502–519 of human ubiquitin-1. This antibody recognizes human ubiquitin-1 as a 62 kDa band on Western blot; this band is eliminated when the antibody is pre-incubated with the immunizing peptide (Sigma, manufacturer details). Furthermore, the immunoreactivity pattern observed using this antibody closely mirrors the pattern observed in a previous investigation of UBL-1 expression in the AD brain,³ both in the pattern of subcellular localization (cytoplasm and nucleoplasm; see below) and association with NFT (see below). Multiple labeling immunofluorescence was performed as previously described.¹³ Sections were incubated overnight in a primary antibody cocktail consisting of rabbit anti-UBL (1:1000; antibody specifics described above) and mouse monoclonal antibody clone AT8 (1:2000; epitope on tau phosphorylated at Ser202,¹⁴ Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, catalogue #MN1020, Lot #KK138691) in 1% normal goat serum for 24 h at 4°C. Indirect immunofluorescence was achieved using a cocktail of goat anti-rabbit antisera conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; catalogue #A-11034, Lot #93C1-1) and goat anti-mouse antisera conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes, catalogue #A-11032, Lot #93C1-1), both diluted 1:250 in 1% normal goat serum. Processed sections were mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with Fluoromount (SouthernBiotech,

Table 1 Case demographic data

Demographic	Braak stage 0-I-II	Braak stage III-IV	Braak stage V-VI
Number of cases (<i>n</i>)	3-1-1	3-4	4-7
[†] Age (years): mean (SD)	61.4 (9)	78.5 (7.2)	75.2 (10.5)
Range	48–71	68–90	63–91
CERAD diagnosis	Not AD (5)	Probable (7)	Definite (11)
[‡] NIA-Reagan diagnosis	Low (5)	Intermediate (7)	High (11)
Brain weight (g): mean (SD)	1120 (346.3)	1192 (161.7)	1110 (137.9)
Range	690–1600	970–1350	930–1300
PMI (hours): mean (SD)	5.8 (1.5)	6 (2.5)	6.5 (2.7)
Range	4–8	2–9	2–17
Sex (male)	1-0-1	2-3	1-2
Aβ deposits (present)	0-0-1	3-4	4-7
[§] Co-neuropsychiatric (present)	0-0-1	0-0	2-4
[¶] Co-pathology (present)	3-0-0	1-2	0-1
Race (White)	2-1-1	2-4	4-7

[†]*P* = 0.013 (Kruskal-Wallis). [‡]Likelihood of Alzheimer's disease. [§]Braak stage 0-I-II: frontotemporal dementia; Braak stage V-VI: abuse (V – indicates Braak stage), delusions (V, VI, VI), depression (V, VI) (all separate).

[¶]Braak stage 0-I-II: Pick's disease (0), corticobasal degeneration (0), MND-inclusion dementia (0) (all separate); Braak stage III-IV: DLB mild (III), DLB severe (IV, IV); Braak stage V-VI: DLB severe (VI). Aβ, amyloid-beta peptide; DLB, Lewy bodies; g, grams; MND, motor neuron disease; CERAD, Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; NIA, National Institute on Aging; PMI, post mortem interval; SD, standard deviation.

Table 2 Qualitative analysis of ubiquilin-1 immunoreactivity intensity in the hippocampus from cases staged Braak 0-I-II, III-IV, and V-VI)

	Neuropil				Neuronal cytoplasm				Neuronal nucleoplasm			
	CA1	CA2/3	CA4	DG	CA1	CA2/3	CA4	DG	CA1	CA2/3	CA4	DG
Braak 0-I-II	++	++	++	+	++	++	+	+	++	+++	++	+
Braak III-IV	+	+	++	+	0/+	++	++	++	+	++++	++++	++
Braak V-VI	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+++	+++	++

CA, Cornu Ammonis; DG, dentate gyrus.

Birmingham, AL, USA). Immunofluorescent signal was detected using an Olympus BX53 upright microscope, the X-Cite 120Q excitation light source (Lumen Dynamics, Mississauga, Ontario, Canada), an Olympus DP72 digital camera, and CellSens Standard 1.6 image acquisition software (Olympus, Tokyo, Japan). After initial analysis of UBL and AT8 immunofluorescence, slides were decovered by immersion in PB, counterstained with the pan-amyloid binding dye, X-34, a highly fluorescent derivative of Congo red which detects NFT and A β plaques with greater sensitivity than thioflavin-S,^{15,16} and coverslipped with Vectashield Hard Set mounting medium with a DNA-specific fluorescent probe DAPI (Vector, Burlingame, CA, USA). Sections were then reanalyzed; X-34 did not interfere with either immunofluorescent marker signal, and was distinguished easily from the 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) labeling of cell nuclei. Confirmation of fluorescence co-labeling of the four fluorescent markers was achieved using an Olympus BX51 upright microscope equipped with an Olympus DSU spinning disk confocal and motorized stage controlled by both StereoInvestigator (Version 8.0, MBF Bioscience, Williston, VT, USA) and SlideBook 4.2 (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO, USA) software, using Lumen200Pro metal halide illumination and a 60X 1.4 N.A. oil immersion objective. The four fluorescent markers were completely dissociable by color (UBL, AT8, X-34/DAPI) and subcellular localization (X-34, DAPI). Additional sections from each case were processed with cresyl violet to delineate the cytoarchitectural boundaries of the hippocampus as defined by Duvernoy.¹⁷ Two independent evaluators determined intensity of the chromogen-based UBL immunoreactivity qualitatively on a scale from 0 (no immunoreactivity) to ++++ (most intense immunoreactivity, see Table 2). To reflect the variability in the immunoreactive signal between neurons in CA1 region of the Braak stage III-IV group, two scores are presented (Table 2). Quantification of chromogen-based UBL immunohistochemical optical density was performed as described previously¹⁸ using Image J freeware.¹⁹ Optical density was measured in the cytoplasm and nucleoplasm of pyramidal neurons in the CA1 and CA2/3 fields, and multipolar neurons in the CA4 field. Due to individual variation in overall intensity of UBL immunoreactivity

between cases in each Braak staged group, analyses are presented as the ratio of nucleoplasm-to-cytoplasm optical density values in the same sections/cases. Data was compared using the Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison *post hoc* test, and Spearman rank order correlation tests, as the data did not conform to the prerequisites for parametric statistical testing. Significance values less than $P = 0.01$ (non-directional) were considered statistically significant.

RESULTS

There were no statistically significant differences in demographics between the three Braak stage groups, although the Braak stage 0-I-II (non-AD) group trended toward younger age ($P = 0.013$ by Kruskal-Wallis, no differences were detected with Dunn's multiple comparison test). UBL immunoreactivity had distinct patterns in the three Braak stage groups (described below), and localization was almost exclusively neuronal in all groups, with only in 2/11 cases (one Braak stage VI, one Braak stage IV with family history of AD) exhibiting UBL immunoreactivity in cells with the morphological appearance of microglia and oligodendrocytes, and located throughout the gray and white matter, respectively (not shown). In Braak stage 0-I-II cases (NFT absent or confined to the entorhinal cortex), UBL immunoreactivity was observed in the neuropil in the stratum pyramidale of the Ammon's horn (CA) and molecular layer of the dentate gyrus (DG). UBL immunoreactivity was also detected in neuronal soma, dendrites and in the nucleoplasm in hippocampal neurons, including pyramidal and multipolar neurons in the CA fields, and DG granular neurons. In the majority of neurons, UBL immunoreactivity intensity was higher in the nucleoplasm compared to the cytoplasm (Fig. 1; Table 2). UBL immunoreactivity in the nucleoplasm appeared punctate/vesicular (Fig. 1 inset a; Fig. 4A) and was most prominent in the CA2/3 field (Table 2).

In Braak stage III-IV cases (NFT involving the entorhinal cortex and hippocampus but not neocortex), UBL immunoreactivity in the neuropil was reduced in the CA1 and CA2/3 regions, and was unchanged in the CA4 and DG, compared to Braak stage 0-I-II cases. The majority of

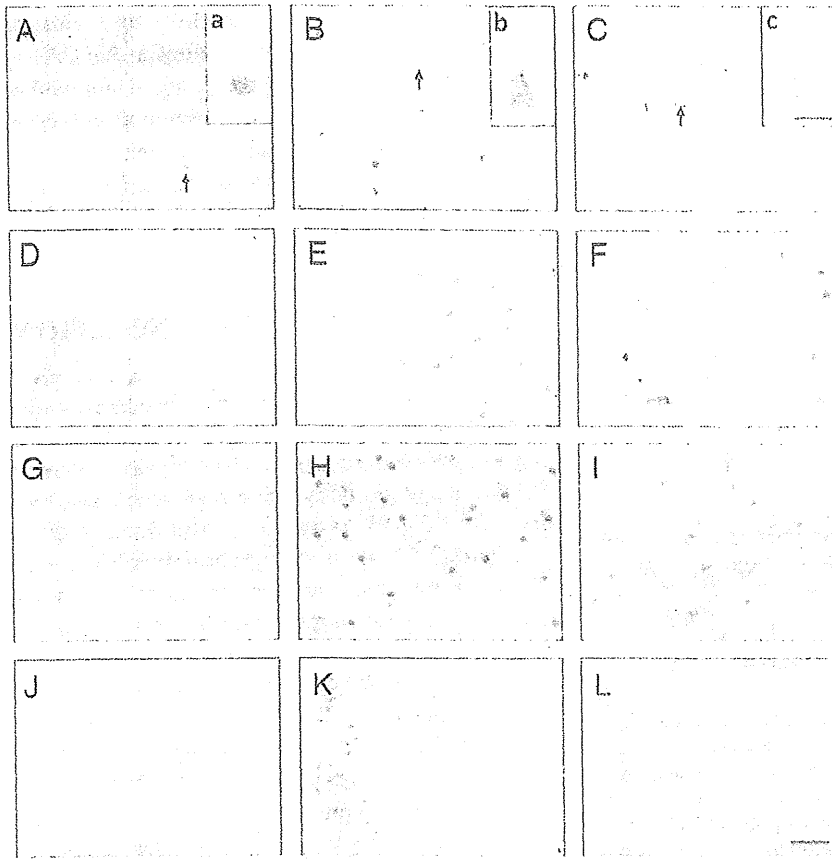


Fig. 1 Photomicrographs showing ubiquilin (UBL) immunoreactivity in Cornu Ammonis 1 (CA1) (A–C), CA2/3 (D–F), CA4 (G–I), and dentate gyrus (J–L; molecular layer is on the right) hippocampal fields in cases representative of Braak stages 0–I–II (A,D,G,J), Braak stages III–IV (B,E,H,K), and Braak stages V–VI (C,F,I,L) groups. In the CA1 field, representative UBL immunoreactive pyramidal neurons (arrows) are illustrated at a higher magnification in the insets (a–c). Scale bar = 50 μ m (A–L); 20 μ m (a–c).

CA1 neurons exhibited reduced cytoplasmic and nucleoplasmic labelling; however, a subset of CA1 pyramidal neurons had prominent UBL immunoreactivity in the nucleoplasm (Fig. 1B). The intensity of UBL immunoreactivity in the nucleoplasm increased markedly in the majority of CA2/3 pyramidal neurons, CA4 multipolar neurons and DG granular neurons (Figs 1E,2H,K; Table 2). We also observed UBL immunoreactivity in fibers in the CA2/3 radiatum/moleculare and DG molecular layer in three of the Braak stage III–IV cases (Braak III: 1; Braak IV: 2; not shown).

In Braak stage V–VI cases, UBL immunoreactivity was less intense in the CA1 field, both in the neuropil and in pyramidal neurons, except those with the morphological appearance of extracellular NFT (eNFT), where UBL immunoreactivity was prominent (Fig. 1C, inset c). In contrast, UBL immunoreactivity in neuropil and neuronal cytoplasm in CA2/3, CA4 and DG was similar to the pattern observed in Braak stage III–IV cases, albeit with a less prominent increase in nucleoplasmic UBL immunoreactivity (Fig. 1F,I,L; Table 2).

Analysis of UBL immunoreactivity optical density confirmed a significant increase ($P < 0.0001$) in the nucleoplasm/cytoplasm optical density ratio in the CA1

field from Braak stages 0–I–II compared to Braak stages III–IV (Fig. 2; in Braak stages V–VI, small numbers of UBL immunoreactive pyramidal cells remaining in the CA1 precluded optical density analyses). The ratio was slightly, but non-significantly, elevated in the CA2/3 field from Braak stage groups III–IV and V–VI when compared to Braak stage group 0–I–II, and a similar trend was observed in the CA4 field (Fig. 2). Optical density measurements in the nucleoplasm and cytoplasm correlated directly across all Braak staged groups in CA2/3 as well as in CA4, but did not correlate in the CA1 field (data not shown). We detected statistically significant (Spearman $r = 0.7$, $P = 0.01$) correlation between more advanced age and higher nucleoplasm/cytoplasm UBL immunoreactivity optical density ratio values in CA1, but not CA2/3 or CA4.

The relationship between UBL protein and a marker of advanced stage NFT including extracellular “ghost NFT” (X-34) or an antibody that also recognizes pre/early NFT (AT8) was examined using multiple-label fluorescence confocal microscopy (Figs 3,4). The pattern of UBL immunofluorescence was consistent with our observations using the same antibody and chromogen-based immunohistochemistry with light microscopy (Fig. 3). In multiple-labeled (UBL, AT8, DAPI, X-34) sections from Braak

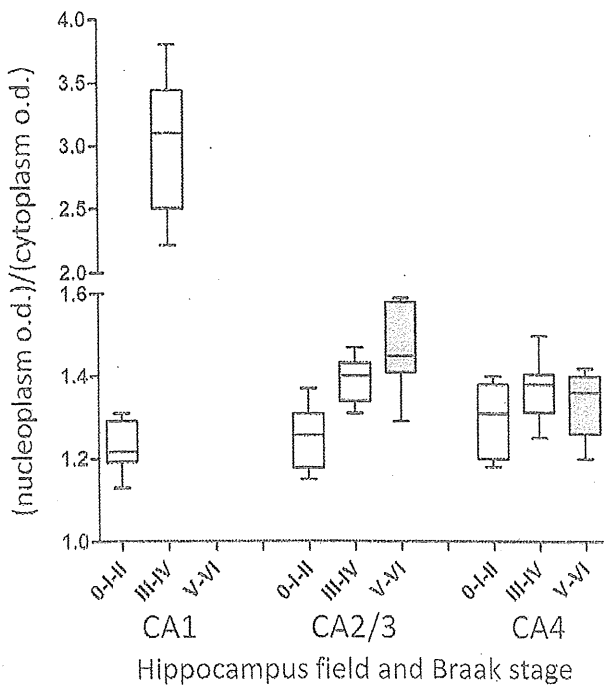


Fig. 2 Box and whiskers graphs represent results from optical density measurements of ubiquilin (UBL) immunohistochemistry in the Cornu Ammonis 1 (CA1), CA2/3, and CA4 hippocampus fields in cases with Braak stages 0-I-II, III-IV, and V-VI. Due to high variability in the intensity of UBL immunoreactivity across cases, data were expressed as a ratio of the values obtained from the nucleoplasm and cytoplasm. There were insufficient pyramidal neurons in CA1 hippocampus in Braak group staged V-VI to perform the analysis. Box plots describe the following: whiskers, maximum and minimum values; line within box, median; upper and lower limits of box, upper and lower quartiles.

stage 0-I-II cases, we observed pyramidal neurons with UBL immunofluorescence in the cytoplasm and nucleoplasm, the latter co-labeled with DAPI (Fig. 3A–D). Braak 0-I-II cases had no AT8- or X-34-positive NFT in the hippocampus, although sparse, scattered AT8 immunofluorescent neuritic elements were observed in the CA fields (Fig. 3E–H).

In Braak stages III-IV and V-VI cases, we observed a complex pattern of UBL/AT8 or UBL/X-34 co-localization in CA fields. Neurons with light cytoplasmic and prominent nucleoplasmic UBL immunofluorescence co-localized AT8, but had little or no X-34, (Fig. 3I–L, M–P, M'–P'). The majority of UBL-immunofluorescent pyramidal neurons in the CA2/3 region were AT8- and X34-negative, yet surrounded by numerous AT8-immunofluorescent neurites (Fig. 3I–L). Pyramidal neurons in CA1 and subiculum of Braak stages V-VI cases had UBL immunofluorescence co-localized with X-34, and very little or no AT8 immunofluorescence and no DAPI labeling, indicative of extracellular "ghost" NFT (eNFT, Fig. 3M–P, M'–P'). UBL

immunoreactive neuritic elements were also detected within X-34 labeled amyloid plaques in the CA1 and DG molecular layer (not shown). A small number of AT8-positive neurons lacking UBL immunofluorescence were observed in the CA1 region of Braak V-VI cases. The overall pattern of UBL/AT8/X-34 immunofluorescence in a representative Braak stage VI case is illustrated diagrammatically in Figure 4.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The present study investigated UBL immunoreactivity in the hippocampus from non-AD and clinically diagnosed AD cases stratified by Braak stages, in relation to markers of primarily advanced stage NFT (the pan-amyloid marker X-34) and the antibody clone AT8 which also recognizes pre/early NFT. We report two novel findings: (i) with the emergence of NFT in the hippocampus, UBL immunoreactivity in pyramidal neurons changes from cytoplasmic/nuclear to predominantly nuclear localization and, in a subset of neurons, co-localizes with phosphorylated tau; and (ii) prominent UBL immunoreactivity is present in a subset of end-stage, eNFT in the CA1/subiculum. Neurons in CA2-4 fields and DG, generally spared from classic NFT pathology development in AD, exhibited markedly increased UBL immunoreactivity in the nucleoplasm in Braak stages III-IV and V-VI AD cases compared to the Braak 0-I-II group. The reason for this change is unknown, but it may be influenced by age differences between Braak groups, since the Braak stage 0-I-II (non-AD) group trended toward being younger than both the Braak stage III-IV and Braak stage V-VI AD groups. Other factors, including nucleotide polymorphisms in the ubiquilin gene, may contribute to the observed differences and warrant future clinical-genetic-pathological studies. Genetic abnormalities in UBL-1 were reported to associate with increased risk²⁰ and age of onset and duration²¹ of AD, although this association was not replicated in all studies.²² Because Braak staged groups represent a continuum, rather than a stepwise progression, of NFT pathology, the large variability in UBL intensity ratios in the Braak stage III-IV group, particularly in the CA1 region, is likely due to variability in the extent of pathologic changes, and UBL expression, in individual pyramidal neurons.

The functional relevance of the changes in the sub-cellular localization of UBL, and their association with different types of NFT, is unknown but it may reflect a response, compensatory or dysregulatory, of the ubiquitin-proteasome system to increased cellular stress due to accumulation of aggregated and heavily phosphorylated proteins, especially tau. Our observation of increased UBL immunoreactivity in X-34-positive eNFT is particularly intriguing considering that ubiquitin, a major component

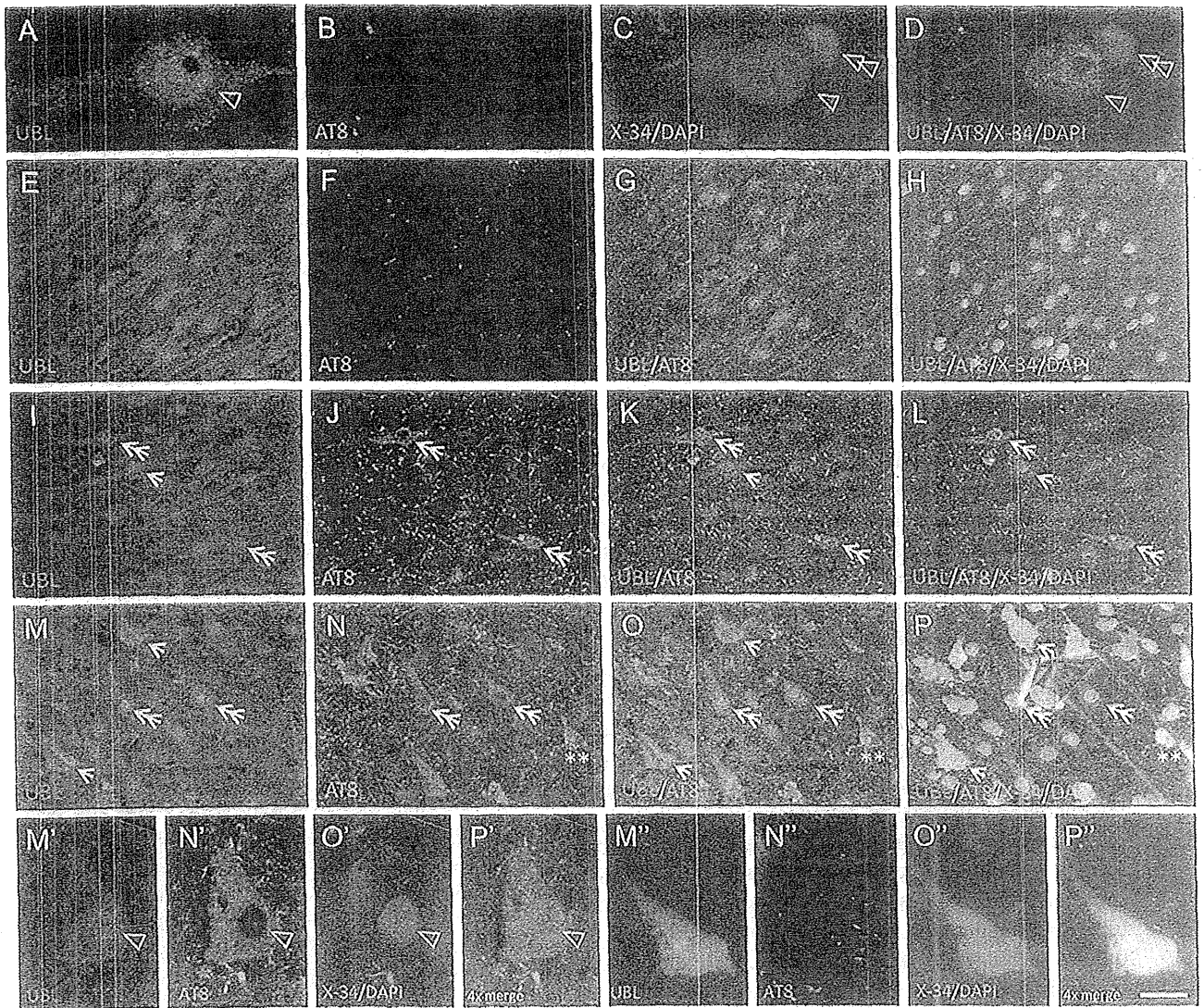
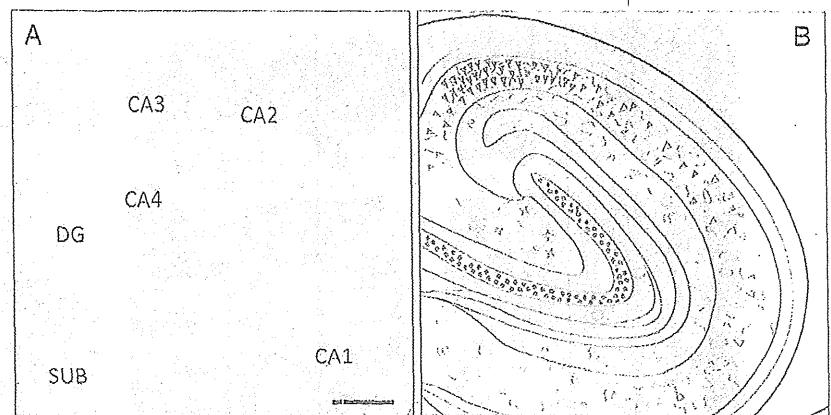


Fig. 3 Multiple-label fluorescent microscopy analyses of associations between ubiquitin (UBL) and markers of NFT (antibody clone AT8 and amyloid dye X-34). (A–D) Confocal imaging of UBL immunofluorescence (A, green) in the nucleoplasm and cytoplasm of a large pyramidal neuron in the Cornu Ammonis I (CA1) region of the hippocampus from a Braak stage I case. The nucleoplasm is co-labeled with the DNA binding compound 4',6-diamidino-2-phenylindole (C,D, single arrowhead; DAPI). The nucleus of an adjacent glial cell is also prominently DAPI-labeled but it lacks UBL immunoreactivity (C,D, double arrowhead). There are only small amounts of AT8 immunofluorescence and X-34 histochemistry in some neuritic processes, but not in neuronal cell bodies (B,D). (E–H) UBL immunofluorescence (E,G,H green) in the nucleoplasm and cytoplasm of neurons in the CA3 region of the hippocampus from a Braak stage II case. AT8 immunofluorescence is scarce, restricted to neurites scattered in the neuropil (F–H, red). UBL-immunofluorescent neurons exhibit prominent nuclear labeling with DAPI (H). No X-34-positive tangles are present (H). (I–L) UBL immunofluorescence (I,K,L, green) in the nucleoplasm and cytoplasm of neurons in the CA3 region of the hippocampus from a Braak stage IV case. AT8 immunofluorescence is observed in neurites (J–L red) scattered in the neuropil and in the cytoplasm of some pyramidal neurons (J, double arrowheads); these neurons are co-labeled with UBL in the cytoplasm and nucleoplasm (K, double headed arrows). A UBL-positive cell that lacks AT8 labeling is indicated by an arrow. UBL and UBL/AT8 immunofluorescent neurons are co-labeled with DAPI but do not contain X-34 histochemistry (L). (M–P) UBL immunofluorescence (M,O,P, green) in the CA1 region of the hippocampus from a Braak stage VI case, co-labeled with AT8 (O). DAPI and X-34 (P, all four markers merged). UBL and AT8 co-localize in the cytoplasm of a subset of neurons which contain UBL (and DAPI) positive nucleus but are devoid of X-34 signal (P; double arrows). UBL is detectable in a subset of X-34-positive extracellular NFT (NFT lacking detectable nucleus) that exhibit little, if any, AT8 signal (M,O,P; arrows). AT8-positive intracellular NFT with no detectable UBL immunofluorescence are also detected (N–P; double asterisk). M'–P': Confocal microscopic image of UBL immunofluorescence in the cytoplasm and nucleoplasm (M', green) of an AT8-positive intracellular NFT with DAPI-confirmed nucleus (O',P') in the CA1. M''–P'': Confocal microscopic image of UBL immunofluorescence (M'', green) in an extracellular NFT (devoid of DAPI signal) with prominent X-34 co-labeling (O'',P'') and very little AT8 signal (N'') in the CA1. Scale bar = 7 μ m (A–D), 40 μ m (E–H), 30 μ m (I–P), 14 μ m (M'–P').

Fig. 4 (A) Sub-regional division of the hippocampus illustrated in a Nissl stained section. CA1, CA2, CA3, CA4 = Cornu Ammonis fields 1–4; DG = dentate gyrus, SUB = subiculum. Scale bar = 200 μ m. (B) Schematic illustration of the pattern of ubiquilin, AT8, and X-34 fluorescence in the hippocampus from a representative Braak stage VI case. A, UBL + pyramidal; B, UBL/AT8 + pre/early NFT; C, AT8 + pre/early NFT; D, AT8/X-34 + NFT; E, X-34 + extracellular NFT; F, UBL/X-34 extracellular NFT; G, UBL + CA4 multipolar neuron; H, UBL + granular neuron; I, UBL + nucleus; J, AT8 + neurites; K, X-34 + neurites; L, X-34 + amyloid plaque with X-34/UBL/AT8 + neurites.



of NFT paired helical filaments in AD,^{23,24} is largely absent from eNFT.^{23,25,26} These changes may occur in relation to ubiquitin-proteasome dysfunction or, alternatively, they may reflect altered antigenic profiles of these proteins in eNFT.²⁷ The observation of UBL immunoreactivity in X-34-positive neuritic plaques in advanced Braak stages further suggests a relationship between UBL and tau changes, and warrants further exploration. Furthermore, the source of the fibers that comprise UBL immunoreactive dystrophic neurites, and the significance of these changes in the pathogenesis of neuritic plaques, is unknown. Further investigation is also warranted regarding the observation of UBL immunoreactive cells with the morphological appearance of microglia and oligodendrocytes in the hippocampus of two AD cases, especially when considering that one case had a family history of AD. Ubiquilin is up-regulated in glial cells in some pathologic conditions, including hypoxia,²⁸ thus glial cells could increase ubiquilin 1 expression due to cell stress induced by neurofibrillary pathology. Alternatively, these observations may be indicative of differences in subjects' agonal states.

In conclusion, these results demonstrate that in AD hippocampus, UBL immunoreactivity increases in the neuronal nucleoplasm and is associated with region-specific neurofibrillary changes. Up-regulation of UBL could contribute to pathology progression, or reflect a compensatory response. Future studies examining the link between UBL and NFT as well as other types of AD pathology are warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the support of the participants in the ADRC at the University of Pittsburgh. This study was supported by NIH grants NIA AG05133 (University of Pittsburgh ADRC), AG014449 and AG025204 (MDI), The Snee-Reinhardt Charitable Foundation (MDI), and by a

Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (KM). Ms. Suganya Srinivasan, Ms. Lan Shao, Ms. Natsuko Kato and Ms. Megumi Mitani provided expert technical assistance.

REFERENCES

- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425–479.
- Ko HS, Uehara T, Tsuruma K, Nomura Y. Ubiquilin interacts with ubiquitylated proteins and proteasome through its ubiquitin-associated and ubiquitin-like domains. *FEBS Lett* 2004; **566**: 110–114.
- Mah AL, Perry G, Smith MA, Monteiro MJ. Identification of ubiquilin, a novel presenilin interactor that increases presenilin protein accumulation. *J Cell Biol* 2000; **151**: 847–862.
- Hiltunen M, Lu A, Thomas AV *et al*. Ubiquilin 1 modulates amyloid precursor protein trafficking and A β secretion. *J Biol Chem* 2006; **281**: 32240–32253.
- Stieren ES, El Ayadi A, Xiao Y *et al*. Ubiquilin-1 is a molecular chaperone for the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 2011; **286**: 35689–35698.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; **82**: 239–259.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edn. Washington, DC: American Psychiatric Association. 1994.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; **34**: 939–944.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D *et al*. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease

- (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; **41**: 479–486.
10. Consensus report of the Working Group on "molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging* 1998; **19**: 109–116.
 11. Mizukami K, Ikonomic MD, Grayson DR *et al*. Immunohistochemical study of GABAA receptor $\beta 2/3$ subunits in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Exp Neurol* 1997; **147**: 333–345.
 12. Iwakiri M, Mizukami K, Ikonomic MD *et al*. An immunohistochemical study of GABA receptor gamma subunits in Alzheimers disease hippocampus: relationship to neurofibrillary tangle progression. *Neuropathology* 2009; **29**: 263–269.
 13. Ikonomic MD, Abrahamson EE, Uz T, Manev H, Dekosky ST. Increased 5-lipoxygenase immunoreactivity in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* 2008; **56**: 1065–1073.
 14. Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U *et al*. Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; **84**: 265–272.
 15. Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 1223–1232.
 16. Ikonomic MD, Abrahamson EE, Isanski BA *et al*. X-34 labeling of abnormal protein aggregates during the progression of Alzheimer's disease. *Methods Enzymol* 2006; **412**: 123–144.
 17. Duvernoy HM. *The Human Hippocampus*. Munchen: JF Bergmann Verlag, 1988.
 18. Iwakiri M, Mizukami K, Ikonomic MD *et al*. Changes in hippocampal GABABR1 subunit expression in Alzheimer's patients: association with Braak staging. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; **109**: 467–474.
 19. Rasband WS. *ImageJ*. Bethesda, MD: U. S. National Institutes of Health, 1997–2012. [Cited 3 July 2013.] Available from URL: <http://imagej.nih.gov/ij/>
 20. Bertram L, Hiltunen M, Parkinson M *et al*. Family-based association between Alzheimer's disease and variants in UBQLN1. *N Engl J Med* 2005; **352**: 884–894.
 21. Kamboh MI, Minster RL, Feingold E, DeKosky ST. Genetic association of ubiquilin with Alzheimer's disease and related quantitative measures. *Mol Psychiatry* 2006; **11**: 273–279.
 22. Smemo S, Nowotny P, Hinrichs AL *et al*. Ubiquilin 1 polymorphisms are not associated with late-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006; **59**: 21–26.
 23. Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 1987; **235**: 1641–1644.
 24. Perry G, Friedman R, Shaw G *et al*. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 3033–3036.
 25. Ikeda K, Haga C, Oyanagi S *et al*. Ultrastructural and immunohistochemical study of degenerate neurite-bearing ghost tangles. *J Neurol* 1992; **239**: 191–194.
 26. Kobayashi K, Muramori F, Aoki T *et al*. KP-1 is a marker for extraneuronal neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer diseased brains. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; **9**: 13–19.
 27. Bancher C, Brunner C, Lassmann H *et al*. Tau and ubiquitin immunoreactivity at different stages of formation of Alzheimer neurofibrillary tangles. *Prog Clin Biol Res* 1989; **317**: 837–848.
 28. Ko HS, Uehara T, Nomura T. Role of ubiquilin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2002; **277**: 35386–35392.

運動によるメンタルヘルス改善のメカニズム

水上 勝義

生体は内的、外的環境の変化（ストレッサー）に対して、機能を一定の範囲内の安定した状態に保とうとする（Cannon のホメオスタシス）。Selye は汎適応症候群という概念を提唱し、ストレッサーに対する生体反応は、反応期、適応期、疲弊期の順に進行するとした。疲弊期にはホメオスタシスが破綻し、さまざまなストレス反応が生じる。ストレス反応には疼痛、胃腸症状をはじめとする身体症状がしばしばみられるが、うつ症状や不安症状などの精神症状も少なくない。ストレスマネジメントとしては、疲弊期になる以前に適切な対処行動（ストレスコーピング）を行い、ストレス反応を予防することが重要といえる。

1. 運動のメンタルヘルスに対する効果

運動にはストレス反応の予防や改善効果があることが知られ、代表的なストレスコーピングの方策のひとつである。25歳から64歳の3,403名の地域住民を対象としたフィンランドにおける横断調査では、少なくとも週に2,3回、20~30分の運動する習慣がある者はまったく運動しない者に比べて、うつ症状、不安症状、ストレスの自覚などが有意に少なかった。一方、首尾一貫感覚や社会的統合感などのストレス耐性を高める因子が、有意に高い結果であった¹⁾。

また、15歳から54歳の5,877名を対象とした米国の調査では、運動習慣がある者はない者に比べて、大うつ病、広場恐怖、社交不安障害、全般性不安障害、パニック障害の頻度が有意に少なかった²⁾。さらには、うつ病の治療に運動が有効なことも報告されている。28のランダム化比較試験のメタ解析の結果から運動のうつ病に対する治療効果が示されており、またうつ病に対して有効性が認められている認知行動療法と比較した6つの試験において、運動の効果は認知行動療法の効果と差が認められなかった³⁾。

ストレッサーに対し、生体内では、神経栄養因子、脳循環系、神経伝達系、自律神経系、代謝内分泌系などのさまざまなシステムに反応性の変化が生じる。したがって、メンタルヘルスに対する運動の効果も、これらのシステムへのさまざまな作用を通して発揮されると考えられる。本稿では、運動のメンタルヘルスに対する効果の生物学的機序について概説する（表1）。

2. BDNF (brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子)

BDNFという神経栄養因子がメンタルヘルスの領域で注目されている。BDNFは、神経細胞の発生、成長、機能の維持、神経可塑性などに関

表1 メンタルヘルスに対する運動の効果の生物学的機序

<ul style="list-style-type: none"> ・成長因子 (BDNF, IGF-I, VEGF) の増加→神経細胞新生 ・脳血流の増加 ・脳内神経伝達物質 (ドーパミン, ノルアドレナリン, セロトニン) の増加, セロトニン系の過活動状態の抑制 ・自律神経系調節 (副交感神経系の活性) ・視床下部・下垂体・副腎皮質系の機能調節
--

与する分子量 13.5kD, アミノ酸 119 個からなるタンパク質である。BDNF は、脳内では海馬に多く、記憶や学習機能に重要な役割を担うことは知られていた。最近 BDNF がうつ病の病態に関与するとの説が注目されている。人間を含むほ乳類の成体の脳でも海馬歯状回など一部の領域で神経細胞の新生が生じることが明らかとなった。これに関与するのが BDNF である。うつ病では BDNF が低下し神経新生能が低下しているが、これがうつ病の病態にかかわっているというのである。うつ病患者の脳の BDNF レベルを調べることはできないが、いくつかの傍証が示されている⁹⁾。

動物実験の結果から、さまざまなストレスにより脳内の BDNF の発現が低下し、海馬における神経新生能が低下する。うつ病患者では血清 BDNF レベルが低下し、血清 BDNF のレベルはうつ病の重症度と負の相関を示す (図1)⁹⁾。また、うつ病患者の BDNF の低下は抗うつ薬による治療で回復する。さらには強制水泳や学習性無力感などのうつ病モデル動物の海馬や側脳室に BDNF を注入すると状態が改善する。したがって BDNF レベルを上昇させる方策はうつ病の治療や予防につながる可能性が示唆される。

動物実験の結果から、運動は BDNF レベルを上昇させることが報告されている。1 回の運動による結果は一致していないが、数日以上継続した習慣的運動は BDNF を増加させる。また運動はストレスで誘発される BDNF の減少を抑制し⁹⁾、抗うつ薬と同じく海馬の神経細胞新生を促進する⁷⁾。

健常者を対象とした研究では、中等度以上の運

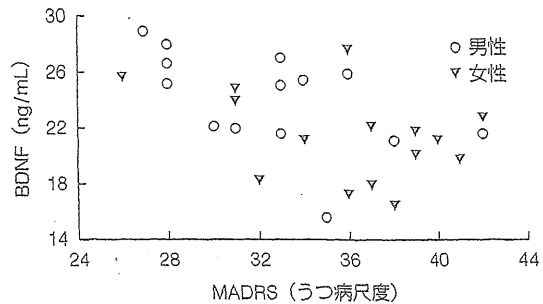


図1 BDNFレベルとうつ病の重症度は負の相関を示す (Karege et al., 2002⁹⁾より引用改変)

動で運動後に血清 BDNF レベルが一過性に上昇することが報告されている。ただし、健常者を対象とした 10 週間あるいは 12 週間の運動介入による BDNF の変化を検討した研究では、血漿中の BDNF レベルに変化は認められていない⁹⁾。

最近 BDNF のほかにも神経栄養因子活性をもつ insulin-like growth factor I (IGF-I, インスリン様成長因子) や vascular endothelial growth factor (VEGF, 血管内皮細胞増殖因子) も運動によって増加することが報告され、BDNF 以外にもいくつかの成長因子がメンタルヘルスの改善に関与する可能性を示唆している。

3. 脳血流・脳代謝への効果

脳血流は他の臓器と異なり、内的外的要因に対する影響を受けにくく、血流の恒常性が比較的保たれる。しかし、運動が脳血流に影響することが明らかとなってきた。経頭蓋ドップラー法を用いた検討では、最大酸素消費量の 60% までの運動では、運動中の脳血流量が増加することが示されている。しかし、この増加は運動による換気量の増大による血中二酸化炭素濃度の低下などの影響を受け、速やかにベースラインまで低下する。さらに負荷の大きい運動の場合、むしろ運動中の脳血流は減少した⁹⁾。

継続的な運動介入の結果脳血流がどのように変化するかについての報告はきわめて少ない。Small et al.¹⁰⁾ は、正常認知機能ながら記憶力低下

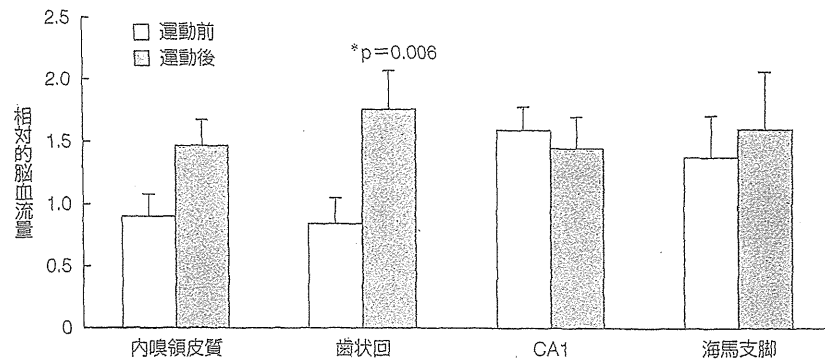


図2. 3カ月間の有酸素性運動によりヒト海馬歯状回で血流が増加した (Pereira et al., 2007¹¹⁾ より引用改変)

の訴えがある17名(平均年齢53歳)をリラックス運動, 適切な食生活, 認知刺激などの健康的な生活を送る介入群と通常の生活を送る対照群の2群に分け, 2週間後の脳機能をPETで検討した。その結果, 介入群では左前頭前野に5%の安静時の活動性低下を認めた。

Pereira et al.¹¹⁾ は, 11名の健常者に対してMRIを用いた検討から, 3カ月の有酸素フィットネス運動により, 海馬歯状回の血流増加を認めた(図2)。海馬の中で歯状回は神経新生が生じる領域であり, この血流増加と神経新生の関連が示唆される。

4. 神経伝達系への効果

うつ病の病態仮説のひとつに, セロトニン神経伝達系やノルアドレナリン神経伝達系の障害がうつ病を引き起こすというモノアミン仮説がある。抗うつ薬は, シナプスにおけるセロトニンやノルアドレナリンの再取り込みを抑制し, シナプス間隙のセロトニンやノルアドレナリンを増加させる。このようなモノアミン伝達系に対する作用が抗うつ効果と関連すると考えられている。

運動中の神経伝達物質の変化については, マイクロダイアリシスという方法を用いた動物実験で検討されている¹²⁾。それによれば, 前頭葉ではノルアドレナリンやその代謝産物であるDHPG (3,4-dihydroxyphenylethylene glycol) や

MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol) の増加が, 海馬ではセロトニンやその代謝産物である5-HIAA (5-hydroxy indole acetic acid) の増加が, また線条体ではドーパミンやその代謝産物であるDOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) やHVA (homovanillic acid) の増加が報告されている。これらの神経伝達系の変化が急性期の気分の変化に関連する可能性が考えられる。

一方, うつ病の動物モデルのひとつとされる学習性無力感ではセロトニン伝達系の活動性亢進や縫線核にあるセロトニン産生神経細胞からのセロトニンの過剰な放出が生じているとされる。自発運動はストレスにさらされている間に生じるセロトニン伝達系の活動を抑制する作用があり, この作用が運動の抗ストレス効果として重要と考えられる¹³⁾。

運動を継続すると海馬の神経新生能が増加することはすでに述べたが, セロトニン1A受容体の阻害剤を投与することで神経新生能が抑制される⁷⁾。また運動はグルタミン酸伝達系への作用もある。ランニングは海馬内のNMDA受容体のNR2A受容体と2Bサブタイプを増加させるが, 2Aサブユニットを欠くマウスではBDNFの増加と神経新生が抑制される¹⁴⁾。したがって, 運動によるBDNFの増加には, セロトニン伝達系やグルタミン酸伝達系の関与も必要であることを示唆している。

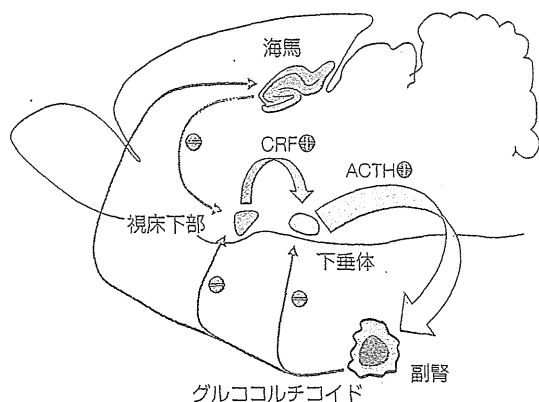


図3 HPA-axisの制御(ラット) (Stranahan et al., 2008¹⁰⁾より引用改変)
 +: 促進, -: ネガティブフィードバック

5. 自律神経系に対する効果

自律神経系は、交感神経系と副交感神経系に大別されるが、一般に緊張状態にある場合、交感神経の活動性が増し、リラックス状態にある場合は副交感神経の活動性が増す。自律神経の状態測定には、心拍変動を用いた計測がしばしば行われている。心拍変動とは心拍間隔の変動のことであり、一般に自律神経系に障害が生じると心拍変動が低下する。また、心筋梗塞や心不全など心臓疾患における心拍変動の低下は死亡率を高めるともいわれている。

心拍変動の周波数成分をパワースペクトル解析するとVLF (0~0.005Hz), LF (0.005~0.20Hz), HF (0.20~0.35Hz) の3つの周波数領域に分けられ、HFは副交感神経の指標として、LF/HFは交感神経の指標として用いられる。健常者においても、また心筋梗塞、慢性心不全、糖尿病などの患者に対しても、定期的な運動あるいは運動療法によって、心拍変動が上昇することが示されている。また、健常人と患者の両者においてHF値の増加やLF/HFの低下が認められる。すなわち運動は交感神経系の活動を低減し、副交感神経の活動性を改善する。運動による心拍変動改善機序の詳細は不明だが、アンジオテンシンIIや一酸

化窒素の関与が想定されている¹⁰⁾。いずれにしても運動のメンタルヘルスへの効果のひとつに自律神経系を介した作用があると考えられる。また同時に、心拍変動の結果は運動が心循環機能の改善効果も有することを示している。

6. 視床下部—脳下垂体—副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) 系に対する効果

ストレス状況下で生じる生体反応のひとつとして、視床下部—下垂体—副腎皮質系の一連の反応が知られている¹⁰⁾。扁桃体など大脳辺縁系がストレスラーを感知すると、視床下部の室傍核へ興奮性刺激を投射し、その結果、視床下部から corticotrophin releasing hormone (CRH) が産生、分泌される。CRHは脳下垂体前葉からの adrenocorticotrophic hormone (ACTH) の分泌を促進する。さらにACTHは副腎皮質からグルココルチコイド(ヒトではコルチゾール)の分泌を促す。分泌されたグルココルチコイドは視床下部や下垂体に対してネガティブフィードバックによりHPA axisの活動を抑制する。

また、海馬の神経細胞はグルココルチコイド受容体を豊富にもち、室傍核へネガティブフィードバックによりHPA axisの活動を抑制する(図3)¹⁰⁾。しかしながら、慢性的なストレス状況下では、持続的にグルココルチコイドが高レベルにあり、海馬の神経細胞は萎縮し、室傍核へのフィードバックも障害される。同時に抗うつ効果と関連するBDNFが低下し海馬の神経細胞の新生能が低下する。グルココルチコイドレベルが高いと、BDNFが低下することから、海馬における神経細胞の萎縮や新生能の低下は、グルココルチコイドの上昇によってBDNFが低下した結果として生じた可能性も考えられる。ただし、副腎を摘出しグルココルチコイドが産生分泌できない動物でも、また血中のグルココルチコイドレベルを一定に保ってもストレスによって海馬のBDNFが低下することから、HPA-axis以外のシステムも

BDNFを制御している。

いずれにしても、海馬神経の障害によって海馬からのネガティブフィードバック機構が障害され¹⁷⁾、さらに悪循環に陥る。外傷後ストレス障害やうつ病はこの状態にあると推察されている。運動は萎縮した海馬の神経細胞の樹状突起を伸展させ樹状突起棘を増加する¹⁸⁾。また、慢性ストレス下でグルココルチコイドが高レベルにある場合でも、ストレスのない状態と比較して時間はかかるものの、神経細胞新生を誘導する¹⁹⁾。

7. 急性期の特殊な効果—ランナーズハイ

急性期に気分の変化を来す特殊な状態としてランナーズハイという現象が知られている。これは、長時間のランニングなど負荷の大きな運動を行っている間に次第に気分が高揚してくる現象で、エンドルフィン（脳に存在するオピオイド受容体と結合する内因性ペプチド）が一因と考えられている。運動により末梢血や脳脊髄液中のエンドルフィンが上昇する。また、オピオイド受容体拮抗薬でこの気分の変化は阻害される。しかし、これまで脳内のエンドルフィンの変化については明らかではなかった。

最近PETを用いた研究で、ランナーズハイが生じているときに、エンドルフィンの産生が増加し脳内のオピオイド受容体を占拠したことが示された。またこの変化は、情動や気分と関連する前頭葉前頭前野や眼窩回皮質、また前部帯状回、島回などの大脳辺縁系に特異的に認められ、変化は多幸感の程度と相関した¹⁹⁾。

まとめ

運動がもたらすメンタルヘルスの改善効果について、生物学的観点から概観した。メンタルヘルスに対する運動の効果は多岐にわたり報告されている。ただしそれらの多くは動物実験のデータをもとにしたものであり、実際ヒトの脳内で起きている変化についてはいまだ不明な点が多い。今後

神経画像技術や生物学的マーカーを用いた、より詳細な検討によって、さらに明らかとなることが期待される。

[文 献]

- 1) Hassmén P et al: Physical exercise and psychological well-being: a population study in Finland. *Prev Med*, 30: 17-25, 2000.
- 2) Goodwin RD: Association between physical activity and mental disorders among adults in the United States. *Prev Med*, 36: 698-703, 2003.
- 3) Rimer J et al: Exercise for depression. *Cochrane Database Syst Rev*, 7: CD004366, 2012.
- 4) Duman RS: Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol Aging*, 26 (Suppl1): 88-93, 2005.
- 5) Karege F et al: Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*, 109: 143-148, 2002.
- 6) Adlard PA et al: Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*, 124: 985-992, 2004.
- 7) van Praag H: Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci*, 32: 283-290, 2009.
- 8) 野藤悠ほか: 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の役割と運動の影響. *健康科学*, 31: 49-59, 2009.
- 9) Ogoh S et al: Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. *J Appl Physiol*, 107: 1370-1380, 2009.
- 10) Small GW et al: Effects of a 14-day healthy longevity lifestyle program on cognition and brain function. *Am J Geriatr Psychiatry*, 14: 538-545, 2006.
- 11) Pereira AC et al: An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 5638-5643, 2007.
- 12) Meeusen R et al: Brain microdialysis in exercise research. *Sports Med*, 31: 965-983, 2001.
- 13) Greenwood BN et al: Exercise, learned helplessness and the stress-resistant brain. *Neuromol Med*, 10: 81-98, 2008.
- 14) Kitamura T et al: Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor e1 subunit. *Neurosci Res*, 47: 55-63, 2003.
- 15) Routledge FS et al: Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Can J Cardiol*,

- 26: 303-312, 2010.
- 16) Stranahan AM et al.: Central mechanisms of HPA axis regulation by voluntary exercise. *Neuromol Med*, 10: 118-127, 2008.
- 17) Mizoguchi K et al.: Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the pre-frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119: 887-897, 2003.
- 18) Eadie BD et al.: Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol*, 486: 39-47, 2005.
- 19) Boecker H et al.: The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain. *cereb cortex*, 18: 2523-2531, 2008.

日本運動生理学会 運動生理学シリーズ 7

運動と高次神経機能

—運動の脳内機能を探検する—

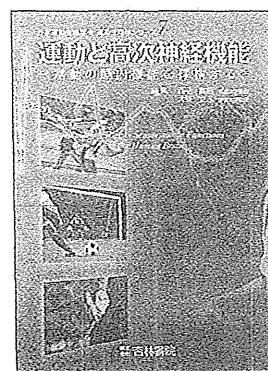
Exploring Higher Sensorimotor Functions in the Human Brain

西平賀昭 (筑波大学教授)・大築立志 (東京大学教授) 編

B5判・212頁/定価 3,360円 (本体 3,200円+税 5%) 978-4-7644-1073-2

- 近年、人間の脳の情報処理過程の研究に有効なもののひとつとして事象関連電位が測定可能となり、人間の脳内機能の解明を大きく進歩させることになりました。事象関連電位とは脳内の情報処理過程を非侵襲的に検討する指標であり、感覚刺激の入力、あるいは刺激を手がかりに被験者に課題を遂行させた際に頭皮上から誘発される電位成分の総称であります。本書ではこの事象関連電位を中心に解説しています。
- そのほかに、運動準備と発現という基礎的な研究から運動における感覚系の重要性、脊髄運動神経機構、そして運動学習と運動制御系研究にとって重要かつ最新の研究成果、手法を網羅的に紹介してあります。本書が体育・健康・スポーツ科学分野やリハビリテーション分野の運動制御研究に従事している若い研究者や大学院性の研究遂行の指針ともなれば望外の幸せです。

好評



株式会社 杏林書院

アルツハイマー病と漢方薬

4

水上勝義

MIZUKAMI Katsuyoshi/筑波大学大学院人間総合科学研究科スポーツ健康システム・マネジメント科学専攻

アルツハイマー病(AD)に対する漢方治療について概説した。ADの臨床症状は、認知機能障害、行動・心理症状(BPSD)、身体症状に大別される。ADに対する薬物療法に際しては安全性への配慮が重要であり、その点、漢方薬は有用な治療選択肢である。特にBPSDに対する抑肝散の効果については多くの報告がある。また、ADの認知機能障害や身体症状に対しても、いくつかの漢方薬で効果が報告されている。漢方薬はADのさまざまな症状に対して活用することが可能である。

はじめに

アルツハイマー病(AD)の症状は、認知機能障害、BPSD (behavioral and psychological symptoms of dementia)、身体症状に大別される。薬物療法として、認知機能障害に対しては抗認知症薬が、BPSDに対しては抗精神病薬が主に用いられてきた。しかし、抗精神病薬の使用は、錐体外路症状や抗コリン症状などの副作用により、運動機能や認知機能の障害を悪化させることが少なくない。副作用が比較的軽い非定型抗精神病薬であっても、死亡率の上昇が指摘され¹⁾、米国食品医薬品局(FDA)や厚生労働省から使用を控えるよう警告が出された。このため最近、安全性の面から漢方治療が注目されている。元来、漢方薬は患者一人ひとりの体質や症状に合わせて処方する随証療法が行われてきた。このため安全ではあるが、漢方に精通した医師

でないと使いこなせないことや、効果についてのエビデンスに乏しいことなどが難点であった。しかし近年、デザイン化された臨床試験により臨床効果が報告されるようになった。なかでもBPSDに対する抑肝散の報告は多い。本稿ではADに用いられる漢方薬について概観する。

ADのBPSDに対する漢方薬

1. 抑肝散

抑肝散は甘草、朮、茯苓、釣藤鈎、柴胡、川芎、当歸の7つの生薬から構成される薬剤である。肝は、精神活動を安定させ、骨格筋トーンを保つ機能を有する働きを持つ。肝の陽気の病的亢進は易怒性、多動性、痙攣を招く。抑肝散は肝の失調による症状を抑える漢方薬である。1984年に原は、48例の情緒障害を認めた高齢者(認知疾患

Key words

アルツハイマー病
漢方薬
抑肝散
行動・心理症状(BPSD)
認知機能障害
身体症状

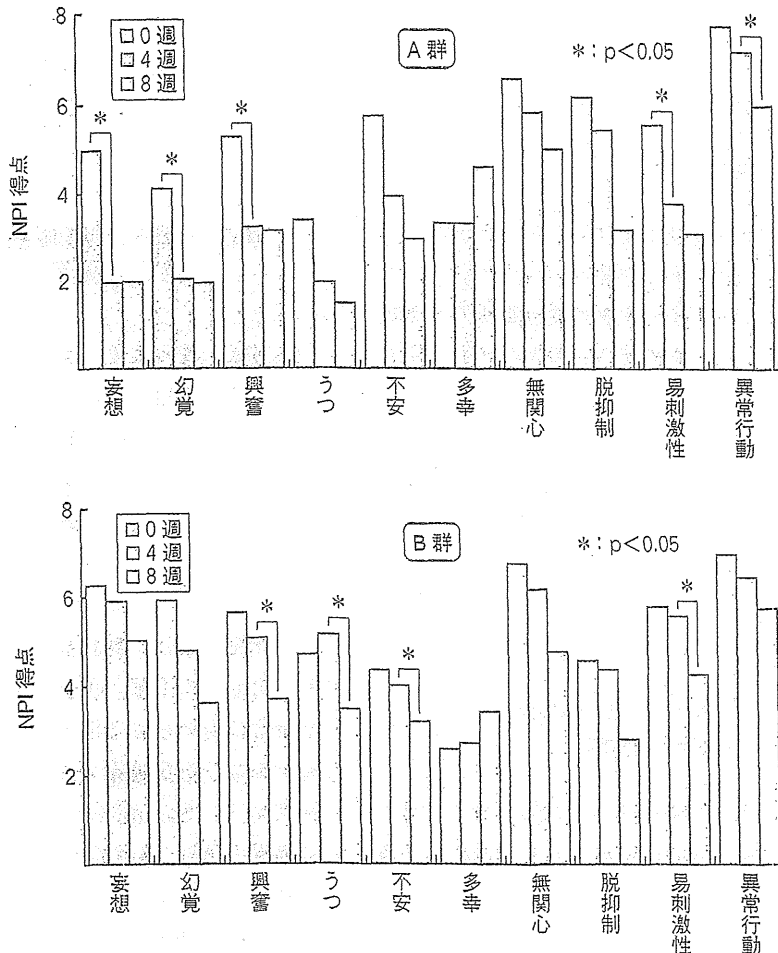


図1 抑肝散の多施設共同クロスオーバー試験の結果 (文献4より改変)

者を含む)に抑肝散および加味方を投与し、著効32例(67%)、有効11例(23%)、やや有効3例、無効2例という著明な改善を報告した。特に不眠、易刺激性、興奮、せん妄に有効だったという²⁾。2005年 Iwasaki ら³⁾は52例の認知症患者(AD 30例、混合型3例、VD:血管性認知症9例、DLB:Lewy小体型認知症10例)を抑肝散投与群

27例、非投与群25例に無作為に分け、4週間の治療効果を観察者ブラインドの単盲験試験で検討した。その結果、抑肝散7.5g投与群はBPSDが有意に改善した。なかでも幻覚、興奮、易刺激性に著効した。われわれは、関東地区20施設の共同研究として、106例(AD78例、混合型13例、DLB15例)に対して、前半4週間抑肝散7.5gを

服用し後半4週間服用しないA群と、前半4週間抑肝散を服用せず後半4週間服用したB群に無作為に分け、クロスオーバー試験を行った。その結果、抑肝散服用中、妄想、幻覚、興奮、うつ、不安、易刺激性に改善がみられ、特に興奮や易刺激性はA群、B群ともに有意に改善した⁴⁾(図1)。これらの検討から、抑肝散は興奮、易怒性を中心に多彩なBPSDに対する効果が示唆された。

日常臨床に即した検討も行われている。たとえば抑肝散と抗精神病薬の併用効果について、Monji ら⁵⁾は、15例のBPSDを呈したADに対して、スルピリド単独治療群と、スルピリドと抑肝散の併用治療群に分けて12週間比較検討した。その結果、抑肝散併用群ではBPSDが有意に改善し、また抑肝散を併用することによってスルピリドの使用量を減量できた。Okahara ら⁶⁾は、ドネベジルと抑肝散の併用効果について検討した。併用群29例とドネベジル単独群32例を4週間検討し、ドネベジルと抑肝散併用群の方が有意にBPSDの改善を認めた。

これまでの抑肝散の臨床研究は、投与後4週時点の効果を判定したものがほとんどだが、われわれはさらに詳細に検討し、多くの例で1~2週間以内の早期に効果が発現することを報告した⁷⁾。一方、4週間を超えて新たに抑肝散の効果が現れることはほとんどないため、4週間で効果が得られない場合は、ほかの薬剤への変更を検討するのが良いと考えられる。

抑肝散には抗コリン作用や錐体外路

症状はみられないが、それでも副作用について一定の注意が必要である。嘔気、嘔吐、下痢などの消化器症状や、甘草の偽アルドステロン症による低K血症を来すことがある。高齢者では5gでも十分効果が得られることが多いことから、副作用の発現を避けるため低用量からの開始が推奨される。

抑肝散はセロトニン1A受容体に対するパーシャルアゴニスト作用⁹⁾やセロトニン2A受容体のダウンレギュレーション作用など、セロトニン神経伝達系に対する調節作用を持ち、さらにグルタミン酸興奮毒性の緩和作用が報告されている⁸⁾⁹⁾。これらの薬理作用がBPSDの改善効果に関連すると考えられる。また、ADの基本病理であるアミロイドβ蛋白質(Aβ)に対する作用に関していくつか報告がある。抑肝散の生薬のひとつである釣藤鈎にAβの凝集抑制作用があること¹⁰⁾、またAβの神経細胞毒性に対して抑肝散が防御作用を持つこと¹¹⁾などが報告されている。

2. 抑肝散加陳皮半夏

抑肝散加陳皮半夏は、抑肝散に陳皮と半夏が加味方で、標的症は抑肝散と同様だが、より体力が低下した患者に好んで用いられる。抑肝散で副作用が出現した場合、抑肝散陳皮半夏に変更することで副作用が改善する場合がある。抑肝散加陳皮半夏については、夜間徘徊や暴力を呈した認知症14例(うちAD6例、血管性6例、混合型2例)のオープン試験の結果から、著効5例、有効7例であり、2~4週に

効果が発現したと報告されている¹²⁾。抑肝散加陳皮半夏は脳内のドーパミン、ノルアドレナリン、アセチルコリンの増加作用が報告されている¹³⁾。

3. 腹証について

抑肝散の効果が得られやすい証として、腹直筋の緊張が知られている。一方、抑肝散加陳皮半夏は腹直筋の緊張がなく、臍周囲の動悸(臍傍悸)が証とされる。先に紹介した原の報告では、対象者の多くに腹直筋の緊張を認めた。また、腹直筋の緊張を認めず臍傍悸を認めた例には抑肝散加陳皮半夏が投与された。したがって原の報告から、腹証によって使い分けることで有効率を高めることが可能と言える。

4. BPSDに効果が報告されている その他の漢方薬

当帰芍薬散は、更年期障害など婦人科系の病態に頻用される虚証の漢方薬だが、BPSDに対する効果が報告されている。AD、VDを含む80例の認知症患者に対する12週間のオープン試験の結果から、感情不安定、動機づけの低下、入眠障害、熟眠障害、対人接触障害などに明らかな改善を認めた。同時にADL(着脱衣、衛生)や認知機能の改善も報告されている¹⁴⁾。また、釣藤鈎散と黄連解毒湯は脳血管障害やVDのBPSDに対する改善効果が報告されている。釣藤鈎散はVDの睡眠障害、せん妄、幻覚・妄想に対する効果が¹⁵⁾、黄連解毒湯は脳血管障害の興奮うつ、不安に対する効果が報告されている¹⁶⁾。ADでも血管障害を合併する

場合が少なくないため、これらの薬剤も使用する場面は少なくない。ただし、黄連解毒湯は実証の薬剤のため、体力が低下した患者には使用を控えた方がよい。

ADの認知機能障害に 対する漢方

漢方薬のなかにも、ADの認知機能に対して改善効果が報告されているものがいくつかある。今後、エビデンスの蓄積が必要だが、補助的な手段として用いることは可能である。

1. 加味温胆湯

加味温胆湯は、消化器系の働きが低下したものに不眠、不安、動悸が生じた場合に用いられる漢方薬であり、アセチルコリン伝達系の賦活作用が知られている。Suzukiら¹⁷⁾は、軽度から中等度のAD(服用群18例と非服用群66例)に対して36週にわたる加味温胆湯服用の効果を比較検討し、両者とも36週時のMMSEスコアはベースラインから低下したものの、加味温胆湯服用群は、3週間後ベースラインから1.8ポイント上昇し、30週時点までスコアはベースラインよりも良かった。最終評価時のMMSEスコアの変化度は服用群で有意に小さかった。また、ドネペジル単独治療群とドネペジルと加味温胆湯との併用群の認知機能を12週後に比較した報告¹⁸⁾によれば、MMSEやADAS-cogのスコアが併用群で有意に改善した。また、併用群ではSPECTにおける前頭葉の血流改善

も認めた。

2. 八味地黄丸

老化に伴い身体諸機能は低下し、健忘、めまい、耳鳴り、難聴、腰痛、下肢の脱力感、冷え、しびれ、排尿の異常などがみられるようになる。このような状態を漢方医学では腎虚という。腎虚に対する代表的な漢方薬が八味地黄丸である。八味地黄丸については、33例のADあるいはADと血管障害の併発例を対象に、8週間のプラセボ対照比較試験が行われている¹⁹⁾。実薬群は8週間の投与により、MMSEの得点とADLが有意に改善した。八味地黄丸に含まれるジオウは、ときに副作用として胃部症状がみられることがあるため注意が必要である。八味地黄丸もアセチルコリン伝達系の賦活作用を有し、認知機能の改善効果と関連する可能性が考えられる²⁰⁾。

3. 帰脾湯

帰脾湯は、虚弱な体質の貧血、易疲労感、不安、不眠などに用いられる方剤である。軽度から中等度のAD 64例を対象に、帰脾湯(7.5g/3回/日)服用群、牛車腎気丸(7.5g/3回/日)服用群、非治療群に無作為に分け、3ヵ月後の変化を検討した。帰脾湯群のMMSEスコアは17.6±4.1から平均1.65ポイント改善し、特に見当識と注意に改善を認めた²¹⁾が、ほかの2群では変化は認めなかった(図2)。また、明らかな副作用は認めなかった。

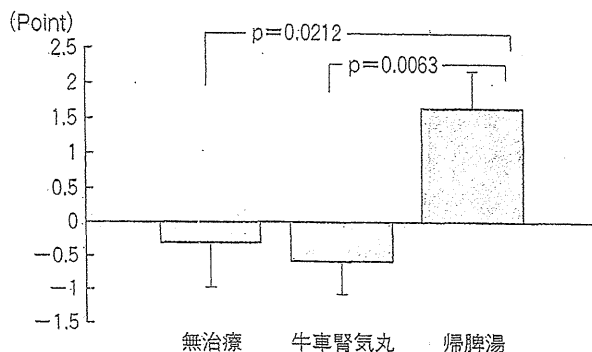


図2 帰脾湯の認知機能障害に対する効果
帰脾湯、牛車腎気丸、無治療の3ヵ月後のMMSE得点の比較。
(文献21より改変)

4. 身体症状に対する漢方薬

ADの経過中に、倦怠感、易疲労感、気力低下、食欲低下などの病像を呈することがある。一見うつ病に類似するが、抑うつ気分は目立たない。このような病像を漢方医学的には気虚といい、補気剤と呼ばれる漢方薬がしばしば有効である。補気剤の代表的な薬剤に補中益気湯や六君子湯がある。最近、認知症の食欲低下に六君子湯が有効との報告がなされた²²⁾。このほか、ADの頭痛、頭重感に釣藤散の効果が報告されている²³⁾。また、先述したように、腰部や下肢の痛みやしびれ、尿意頻回など腎虚の症候には、認知機能改善効果も報告されている八味地黄丸が適応となる。

まとめ

ADの認知機能障害およびBPSDに対して効果が報告されている薬剤を紹

介した。認知機能障害に関する報告はまだ少なく、今後さらなる検討が必要である。BPSDに対する報告は、抑肝散を中心に徐々に蓄積されつつある。BPSDに漢方薬を用いた場合、認知機能、身体機能、ADLへの影響がみられないか、むしろ改善することが報告されており、漢方薬は今やBPSDに対する重要な選択肢と言える。ただし、これまでのところ、認知症に対する漢方治療の検討では、証は考慮されていない。証によって対象を区別して検討すると、効果や有効率がさらに上昇する可能性が考えられる。この点は今後の課題である。

●文献

- 1) Schneider LS, Dagerman KS, Insel P: JAMA 294: 1934-1943, 2005
- 2) 原敬二郎: 日本東洋医学雑誌 35: 49-54, 1984
- 3) Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M et al: J Clin Psychiatry 66: 248-252, 2005
- 4) Mizukami K, Asada T, Kinoshita T