

抑肝散が老化促進モデルマウスの加齢に  
伴う海馬機能の低下を抑制する

とやまたつや

外山達也

本論文の要旨は，第146回朝日大学大学院歯学研究科発表会（2019年4月24日，瑞穂）において発表した．本論文の一部は，第32回老化促進モデルマウス（SAM）学会学術大会（2017年7月22日，岐阜）において発表した．また，本論文の一部は以下の論文に掲載した．

Azuma K, Toyama T, Katano M, Kajimoto K, Hayashi S, Suzuki A, Tsugane H, Iinuma M, and Kubo K.

Yokukansan ameliorates hippocampus-dependent learning impairment in senescence-accelerated mouse. *Biol. Pharm. Bull.* 2018;41:1593-1599.

## 緒 言

認知症は、加齢に伴う神経認知疾患で、記憶喪失、認知機能障害および QOL の低下を特徴としている。2015 年の世界の認知症人口は 4700 万人と推定されているが、この数は 2030 年には 7500 万人に増加するとされている<sup>1)</sup>。認知症と世界的な高齢化人口の増加が、健康および社会経済的に影響を与える重要な問題となっている。認知症の病因はまだ解明されていないことが多い。しかし、海馬がこの疾患を予防し治療するための重要な標的であることは明らかになってきた<sup>2,3)</sup>。空間学習と記憶の過程に極めて重要な役割を果たす海馬は、ニューロン間のコミュニケーションにシナプスが関与し、シナプスの大きさの変化が様々な神経成長とリンクしている<sup>4,5)</sup>。また、シナプス後肥厚部 (PSD) の長さは、シナプスの可塑性の変化および神経伝達速度に影響を与える<sup>6)</sup>。高齢マウスや記憶障害を呈するラットなどで PSD 長さが顕著に減少することが確認されている<sup>7)</sup>。

また最近、認知症のメカニズム解明のため東洋医学の臨床効果が再評価されている<sup>8,9)</sup>。とくに抑肝散は厚生労働省によって認可されている漢方薬で、神経症、不眠症、過敏症の治療に使用されており、認知症の行動的および心理的症状を改善

する可能性も報告されている<sup>10,11)</sup>。さらに最近の研究では、抑肝散が神経保護作用を持ち、神経可塑性を促進し、学習障害を改善することも示している<sup>12)</sup>。しかし、それらに対する抑肝散のメカニズムはまだ完全には解明されていない。

老化促進モデルマウス(SAMP8)は4か月齢から加齢に伴う海馬依存性学習行動障害が生じる認知症モデルである<sup>13-16)</sup>。

そこで本研究では、SAMP8マウスに抑肝散を飲ませた場合と飲ませなかった場合における海馬の変化に着目し、空間認知能、海馬CA1領域のミエリン鞘やシナプスの超微細構造および海馬神経新生を解析し、抑肝散摂取の効果を検討した。

## 材料および方法

実験には SAMP8 マウス (中部科学資材, 名古屋) 5 か月齢の雄マウスを用いた。実験に用いた SAMP8 マウスは朝日大学歯学部実験動物飼育施設において飼育し, 固形飼料 (日本クレア社, CE-2, 東京) と水を自由摂取できる状態とした。雄 1 匹ずつを個別にケージ飼育を行った。

実験に用いた抑肝散の乾燥抽出物粉末は, ツムラ社 (東京) によって供給された。抑肝散には 7 種類の薬草が含まれている。表 1 に抑肝散の薬草成分および含有量を示す。抽出物の品質は, 厚生労働省による適正製造基準に基づいて標準化されている<sup>11)</sup>。抑肝散 300 mg を滅菌水 200 ml に溶解し, 0.15% 抑肝散水を作製し, これを飲料水とし 8 週間自由摂取させた。0.15% 抑肝散水を摂取したマウスを「実験群」, 抑肝散の代わりに滅菌水を自由摂取したマウスを「対照群」とし, 各群 16 匹ずつ使用した。

なおこの実験は朝日大学歯学部動物実験専門委員会の承認 (19-006) を得ている。

表 1 抑肝散の成分および含有量

抑肝散の成分および量	植物名	含有量(g)
		・蒼朮(ソウジュツ)
	・茯苓(ブクリョウ)	4.0
	・当帰(トウキ)	3.0
	・釣藤鈎(チョウトウコウ)	3.0
	・川芎(センキュウ)	3.0
	・柴胡(サイコ)	2.0
	・甘草(カンゾウ)	1.5
	注:本製品7.5g中,上記割合の混合生薬の乾燥エキス3.25gを含有.通常成人1日7.5gを用量とする.	

### 1. Morris 水迷路学習テスト

齧歯類の空間認知機能の測定には広く利用されている Morris 水迷路学習テスト<sup>17,18)</sup>を利用した。各群のマウスに5日間連続し、1日に4回ずつ Morris 水迷路学習テストを実施し、空間認知機能に及ぼす影響を検討した(各群 n=6)。水を張った円形のステンレス製のプールを用いて、プールの中央近くの水面下の位置にプラットフォームを設置し、プラットフォームへ到達するまでの時間を測定した。本実験では4箇所投入場所からマウスを静かに投入した。なお投入場所の順序は乱数表により毎日変化させた。初日のマウスはプラットフォームの存在を知らず泳ぎ回るが、テストの日数を重ねるにつれ、プラットフォームの位置をプール周囲の目標物との位置関係で記憶し、プラットフォームへの到達時間が次第に短くなる。

各群のマウスを遊泳中の動きをコンピュータシステム (Move-tr/2D<sup>®</sup>, Library, 東京) に連結した CCD カメラ (Exwane<sup>®</sup>, SONY, 東京) により記録し, プラットフォームへの到達時間を計測した. さらに, 5 日目のテスト終了後プラットフォームを水面上に露出させ, 視力および遊泳能力による影響を調べるため, Visible Probe Test<sup>19)</sup>を行った.

## 2. 血中コルチコステロン (CO) 濃度の測定

血中 CO 濃度は実験最終日に各群マウス (n = 6) で測定した. 三種混合麻酔 (0.01 ml / g) 下でマウスの心臓より全血を採取した. 採血した血液を 2.0 ml のマイクロ遠心管に採取し, 10 分間, 4℃ 下 3,500×G で遠心分離した後, 血清のみを採取し, -80℃ の冷凍庫で分析するまでの間保存した. 血中 CO 濃度はラジオイムノアッセイにより SRL Biochemistry Lab (東京) で測定した.

## 3. 海馬歯状回における神経細胞新生機構の解析

海馬歯状回での神経細胞新生機構に及ぼす影響を調べた. 細胞の分裂周期における S 期の細胞 DNA に選択的に取り込まれる 5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) は, 新生細胞のマーカーとなる化学物質である<sup>20)</sup>. 今回, 新生細胞の増殖数について BrdU をマウスに投与し, 解析した.

## BrdU 投与

Gilbert ら<sup>21)</sup>の方法に準じて、各群の5か月齢マウスに3時間毎に5回、10mg/mlを50mg/kgの割合でBrdU溶液(BrdU:チミジン類似物質)を腹腔内投与した。

### 1) BrdU 陽性細胞の染色

BrdU 投与 24 時間後マウスを 3 種混合麻酔 (0.01ml/g) 下で、心臓から 37℃ の生理食塩水を 30ml 灌流させ、続いて 4℃ の 4% パラホルムアルデヒド 0.1M リン酸緩衝液 (PB) 固定液 100ml を灌流させ組織固定を行った。その後、摘出した脳を、一晩 4℃ の 2% パラホルムアルデヒドにより後固定し、その翌日から 4℃ の 10% スクロース、20% スクロース、30% スクロース加 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 1 日おきに浸漬させ高張処理を行った。高張処理した脳を凍結させ、クリオスタット (CM1850, LEICA, 東京) を用いて前額断で厚さ 40 $\mu$ m の海馬の連続切片を作製した。染色には rat monoclonal to BrdU (abcam, Cambridge, UK) 200 倍希釈 (0.3% の Triton X-100 を含んだ PBS : PBS-T), rabbit anti-rat (DAKO, Glostrup, Denmark) 500 倍希釈 (PBS-T), peroxidase - conjugated - streptoavidin (DAKO, Glostrup, Denmark) 500 倍希釈 (0.05M トリス塩酸緩衝液 : TBS) を使用した。



発色は 1 %  $H_2O_2$  および di amino benzidine tetrahydrochloride (同仁化学研究社, 熊本)により行った。

## 2) BrdU 陽性細胞数の解析方法

Li ら<sup>22)</sup>の方法に準じて, 作製した海馬の連続切片を 4 枚ごと (120  $\mu m$  間隔) に 1 切片を選び出し, 左側海馬歯状回の BrdU 陽性細胞を計 8 枚の切片について光学顕微鏡 (BX53M, オリンパス, 東京) 下で計測した (各群,  $n = 5$ )。

## 4. 加齢に伴う海馬機能低下に対する抑肝散の影響の検討

海馬神経細胞やミエリン鞘の厚さとシナプスの超微細構造の透過電子顕微鏡による検索

### 1) 動物の固定と標本作製

マウス (各群  $n = 5$ ) に 3 種混合麻酔 (0.01 ml/g) を行い, 続いて 4°C の 4% PFA/0.1M PB と 1% グルタルアルデヒドの混合固定液にて灌流固定を行った。次いで, 摘出した海馬を, 4°C の同混合固定液で一晩固定を行った。

PB で組織を洗浄後, 1% 四酸化オスミウムにて 1 時間後固定し, アセトンで脱水した後, エポン包埋した。ブロックのトリミング後, 厚さ 100 nm

の超薄切切片の作製を Porter-Blum MT-1 Ultramicrotome (Dupont-Sorvll, Wilmington DE, USA)で行った。その後、電子染色を酢酸ウラニルと鉛塩類にて施し、海馬 CA1 領域の微細構造、ミエリン鞘および PSD 長さ・厚さ・面積を透過電子顕微鏡 (JEOL - 1010, JEOL, 東京)にて観察した。

## 2) 海馬 CA1 領域における神経細胞の超微細構造およびミエリン鞘、シナプスの形態変化

海馬 CA1 領域の神経細胞、ミエリン鞘およびシナプスの超微細構造の形態変化を観察した。ミエリン鞘はマウス 1 匹当たり 20 の画像に基づいて分析を行い、200 以上の軸索を検討した。シナプスは、シナプス小胞の存在によってシナプス前終末と PSD を特定し、PSD の測定を行った。PSD 長さ・厚さ・面積の測定は、Hara ら<sup>23)</sup>の方法にしたがって、1 動物当たり約 50 のシナプスを計測した。

## 3) G-ratio

G-ratio の値が高値を示すとミエリン鞘が薄く、神経伝達の速度が遅くなると報告されている<sup>24)</sup>。各群の海馬 CA1 領域のミエリン鞘の G-ratio (内径 / 外径 = G-ratio) を Chomiak ら<sup>24)</sup>の方法に従って求めた。透過型電子顕微鏡の形態変化を観察したミエリン鞘で G-ratio も計測を行った。

## 5. 統計学的処理

各計測結果の統計処理は `repeated measures ANOVA` または `t` 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差があるものと判定した。

## 結 果

### 1. Morris 水迷路学習テスト

Morris 水迷路学習テストの結果を図 1 および Visible Probe Test の結果を図 2 に示す。

実験群のプラットフォームへの到達時間は対照群に比較して有意に短縮した ( $p < 0.01$ )。Visible Probe Test のプラットフォームへの到達時間は両群の間で有意な差は認められなかった ( $p > 0.83$ )。

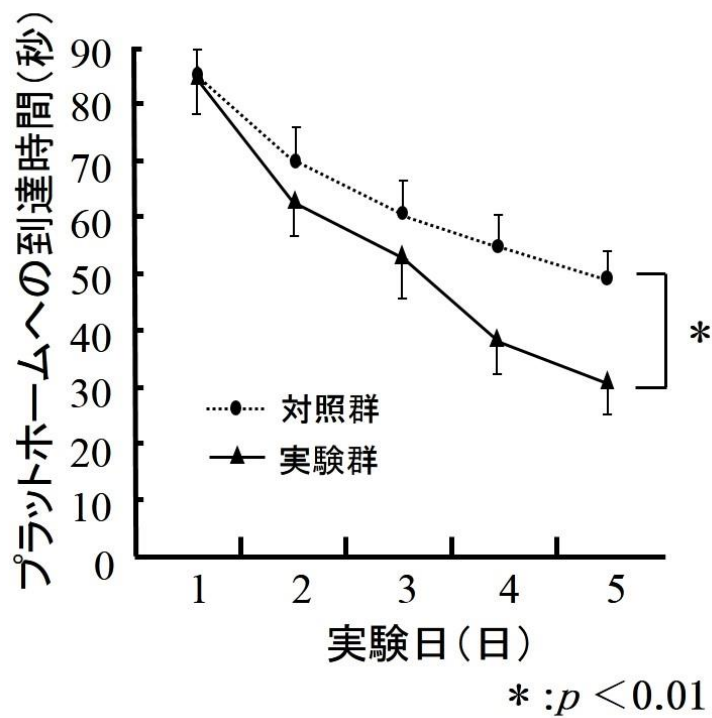


図 1 Morris 水迷路テスト (mean ± SE, 各群 n = 6)

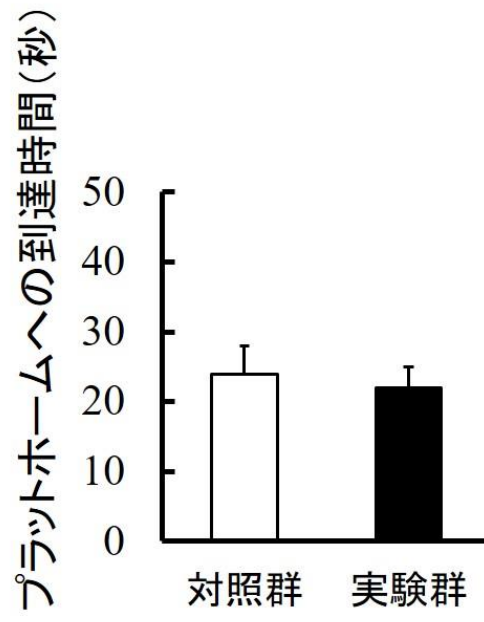


図 2 Visible Probe Test (mean ± SE, 各群 n = 6)

## 2. 血中 CO 濃度の発現量

実験群と対照群における血中 CO 濃度の結果を図 3 に示す。対照群と実験群との間で血中 CO 濃度に有意な差は認められなかった ( $p > 0.07$ )。

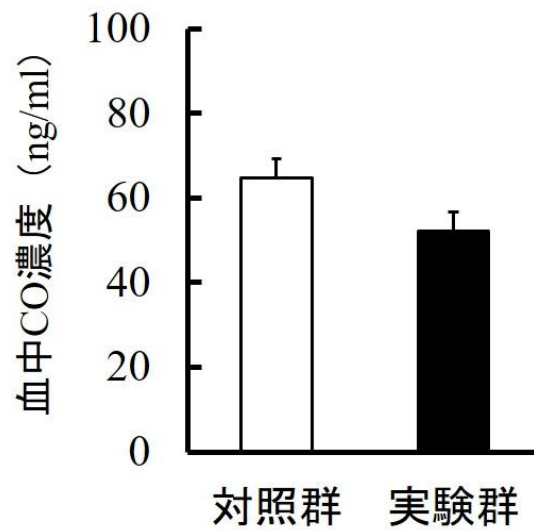
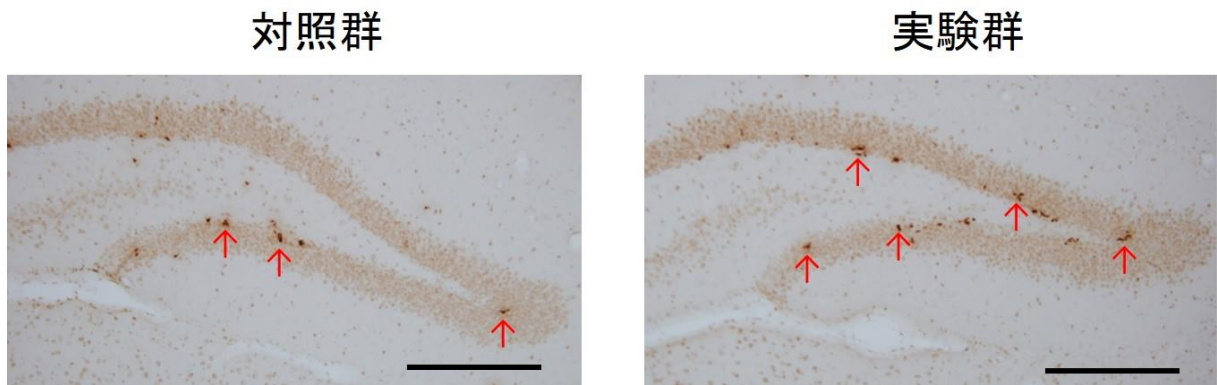


図 3 血中 CO 濃度

### 3. 抑肝散の摂取が BrdU 陽性細胞に及ぼす影響

各群の海馬 DG における BrdU 陽性細胞の免疫組織染色像の典型例を図 4 に示す。実験群の BrdU 陽性細胞は対照群の BrdU 陽性細胞より多数認められた。BrdU 陽性細胞数を測定し分析した結果を図 5 に示す。実験群の BrdU 陽性細胞数は対照群より高値を示し有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。



→: BrdU 陽性細胞, Bars: 100  $\mu$ m

図 4 海馬歯状回 DG 領域における  
BrdU 陽性細胞の免疫染色像

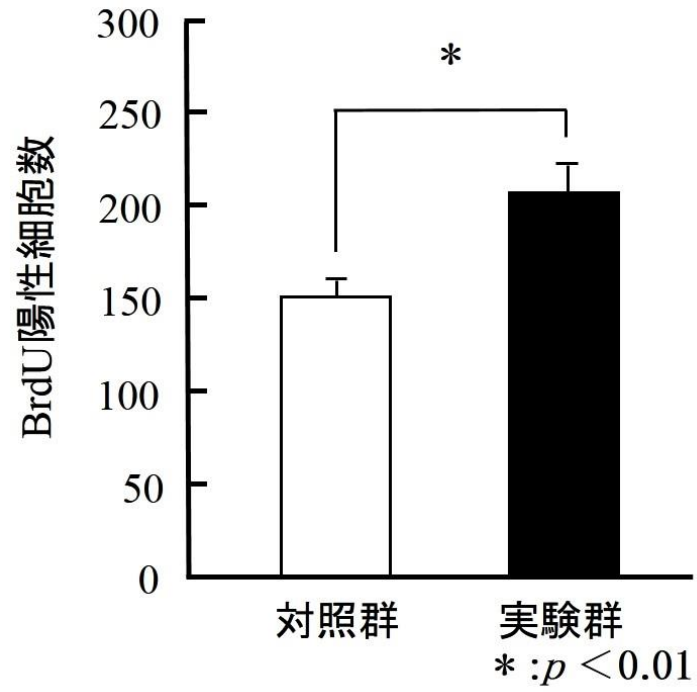
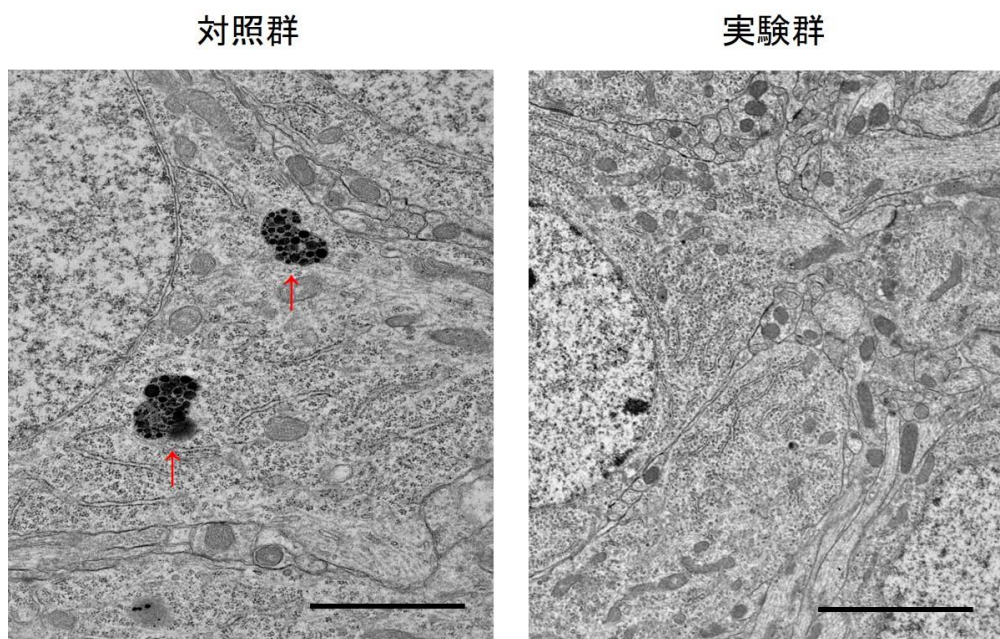


図 5 海馬齒状回 DG 領域における  
BrdU 陽性細胞数 (mean ± SE, 各群 n = 6)



#### 4. 海馬神経細胞の超微細構造

海馬 CA1 領域の神経細胞の超微細構造の一例を図 6 に示す。対照群では，リポフスチン封入体が多く認められたが，実験群ではほとんど観察できなかった。

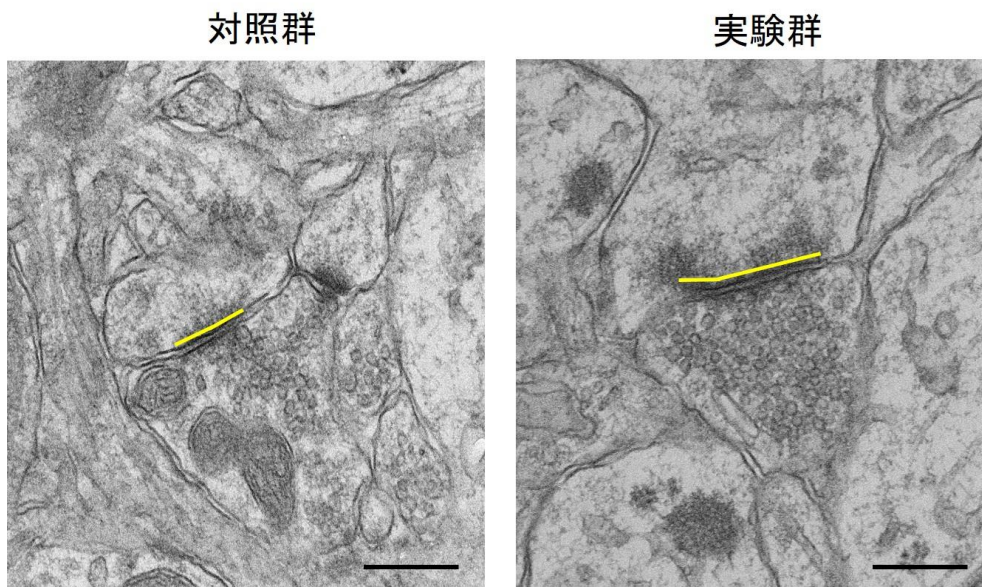


→ : リポフスチン封入体 , Bars : 5 nm

図 6 海馬 CA1 領域の神経細胞の超微細構造

## 5 シナプスの超微細構造と PSD

海馬 CA1 領域のシナプスの超微細構造を図 7 に PSD 長さ・厚さ・面積の分析結果を図 8 に示す。 PSD は、実験群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。



黄線 : PSD 長さ計測部 , Bars : 200 nm

図 7 海馬 CA1 領域のシナプスの超微細構造

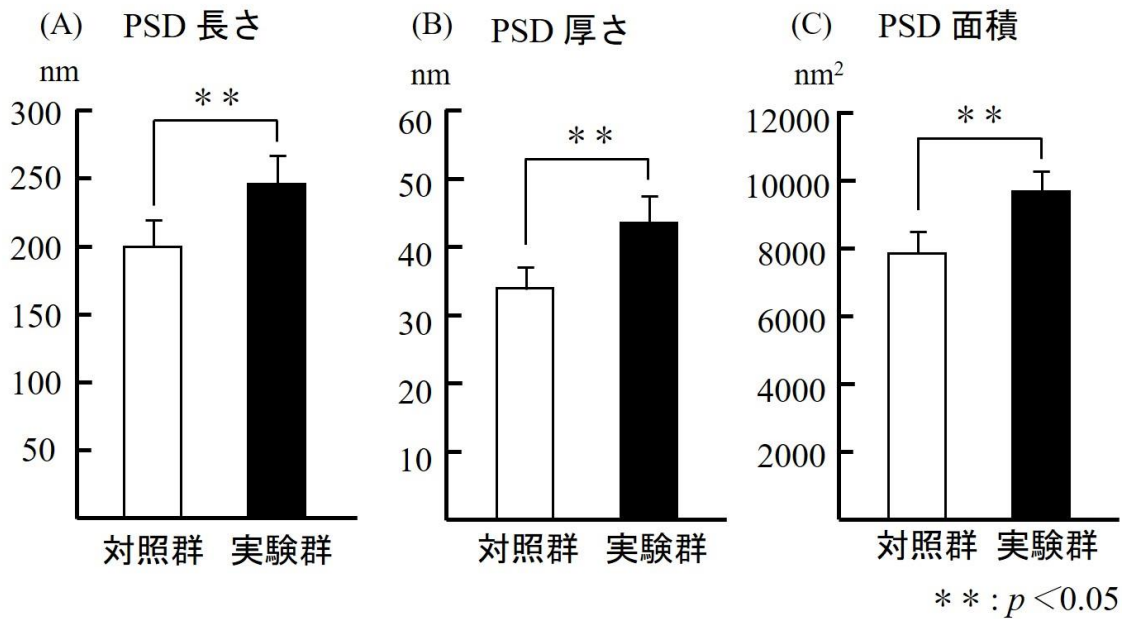
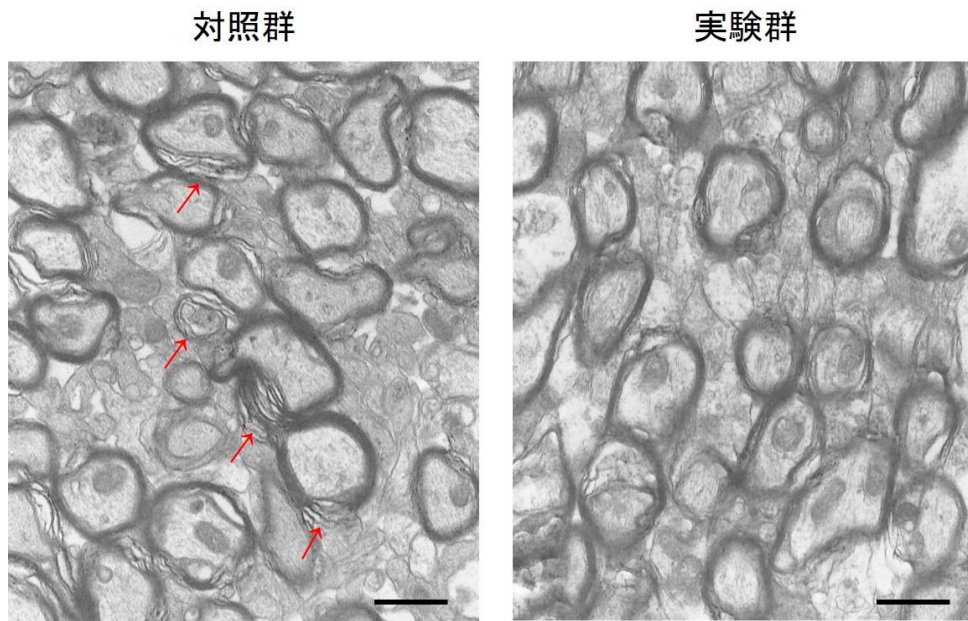


図 8 PSD 長さ・厚さ・面積 (mean ± SE, 各群 n = 6)

## 6. 海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造とミエリン鞘の厚みの解析

海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造の一例を図 9 に, G-ratio を図 10 に示す. ミエリン鞘の断面は実験群で円形または楕円形に観察されたが, 対照群では変性および萎縮が認められた. G-ratio はミエリン鞘の内径/外径で計算され, 値が小さいほどミエリン鞘が厚いことを示している. 実験群の G-ratio は対照群より小さい値を示し, 有意差を認めた ( $p < 0.01$ ). つまり, 実験群のミエリン鞘が対照群に比べて厚いことが示された.



→ : 構造変性 , Bars : 1 μm

図 9 海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造

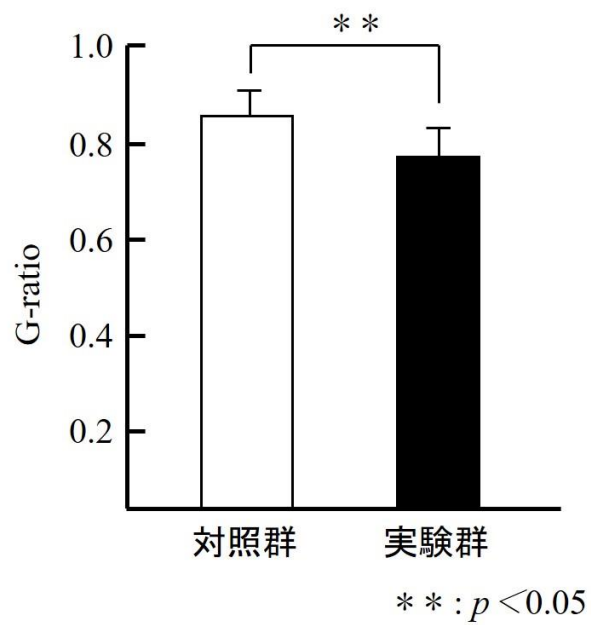


図 10 G-ratio (mean ± SE, 各群 n = 8)

## 考 察

今回の研究では，8週間にわたる抑肝散の投与が SAMP8 マウスにおける海馬の形態および記憶障害を改善するという効果が得られた．SAMP8 マウスは，加齢性記憶障害および老化の急速な進行を示す<sup>25)</sup>．本研究では，抑肝散を用いることで SAMP8 マウスの空間記憶障害を改善することを明らかにした．また，両群の血中 CO 濃度に差がなかったことから抑肝散の摂取がストレスとなっていないこと，ストレスを抑制しないことも明らかとなった．

抑肝散は，アルツハイマー病モデルトランスジェニックマウス<sup>26)</sup>，脳室内アミロイドペータタンパク注入マウス<sup>27)</sup>，統合失調症モデル動物<sup>28)</sup>および老齢ラット<sup>29)</sup>においても，認知障害を予防することが報告されている．

以前の研究報告では，抑肝散が認知に関連する海馬の神経発生を刺激することが示され<sup>30)</sup>，今回の研究でも，抑肝散が SAMP8 マウスの海馬 DG 領域における神経新生を増加させることを示した．いくつかの研究により，海馬 DG 領域における新生ニューロンと空間学習能の相関が確認されている<sup>31)</sup>．そして海馬の神経新生は，連想記憶の形成に関与しており，神経新生の減少したマウスは海

馬依存性の空間学習テストの能力が対照群よりも低下していた<sup>32)</sup>。したがって、学習と神経新生との間の関連性は、抑肝散摂取後の海馬 DG 領域における細胞新生が、SAMP8 マウスにおける空間記憶の維持に関与することを示唆している。老齢マウスでは、海馬の BrdU 陽性細胞の数が減少し、この減少は抑肝散摂取によって改善され、これは海馬 DG 領域の神経幹細胞の増殖に影響を及ぼしていることが考えられる。抑肝散は、加齢動物における神経発生を増加する薬理的効力を有することが示唆されている<sup>30)</sup>。

海馬神経細胞のリポフスチン蓄積は、加齢動物において一般的に観察され<sup>33)</sup>、SAMP8 マウスの海馬神経において、特にカイニン酸で処理した後に、リポフスチンの蓄積が観察されたことが報告されている<sup>33)</sup>。したがって SAMP8 マウスは、海馬神経のリポフスチン蓄積の原因因子の 1 つであるかもしれないカイニン酸誘導性酸化損傷に感受性があると考えられる<sup>33)</sup>。本研究は、対照群の SAMP8 マウスの海馬神経に多数のリポフスチン封入体が存在することを確認した。しかし、抑肝散の摂取群では、リポフスチン封入物はほとんど存在しなかった。よって抑肝散は、リポフスチン蓄積に関与するニューロンの老化過程を遅延させる役割を果たすことが示唆される。しかしながら、

リポフスチン蓄積，脂質過酸化およびタンパク質酸化の老化過程への寄与に関する正確なメカニズムは未だに同定されていない。

シナプスは，ニューロン間の効率的なシグナル伝達を保証するように設計された構造である<sup>34)</sup>。シナプスの構造的可塑性は，機能的可塑性を反映し，学習および記憶において重要な役割を果たす<sup>35)</sup>。PSDの長さを含むシナプスの形態学的変化は，シナプスの生理学的機能に密接に関連している。さらに，シナプス機能の変化は常に構造変化を伴うと報告されている<sup>36)</sup>。PSDには，シナプス伝達と可塑性に関与する受容体，足場タンパク質，シグナル伝達複合体が多数含まれている。シナプス伝達の長期増強の誘導はPSDの長さの増加と関連していることが報告されている<sup>37)</sup>。シナプスの大きさは，シナプス可塑性および神経伝達に関与する重要なパラメータであるPSDの長さを測定することによって間接的に決定することができる<sup>38)</sup>。本研究では，抑肝散の摂取がSAMP8マウスの海馬CA1領域におけるPSD長さ，厚さおよび面積を増加させることを見出した。このため，抑肝散によりSAMP8マウスの海馬PSDに関与する学習および記憶障害の抑制が生じると推測できる。

有髄線維は，海馬と他の脳領域との間の神経インパルスの伝達に寄与し，海馬機能のための構造



的基礎とみなされている。本実験において G-ratio は対照群より小さい値を示した。G-ratio はミエリン鞘の内径/外径で計算され、値が小さいほどミエリン鞘が厚いことを示している。つまり、実験群のミエリン鞘が対照群に比べて厚いことが示されたため、伝導能が維持されていると考えられる。このためミエリン鞘の菲薄化および変性は、神経伝導速度の低下につながっている<sup>39)</sup>。脳内の異常なミエリン鞘は、神経行動障害に関与し、認知発達遅延を誘発する<sup>40)</sup>。したがって本研究では、抑肝散摂取による SAMP8 マウスにおける学習機能の低下の予防は、海馬ミエリン鞘の維持に関連すると考えている。過去の研究では、海馬 CA1 領域のオリゴデンドロサイトが加齢とともに徐々に減少することを示した<sup>41)</sup>。ミエリン鞘は中枢神経系のオリゴデンドロサイトによって形成される。本研究でオリゴデンドロサイトは評価しなかったが、ミエリン鞘の変化が SAMP8 マウスにおけるオリゴデンドロサイトの加齢性変性に関連すると考えられる。

今後さらに研究は抑肝散の神経保護効果の根底にある詳細なメカニズムを解明する必要があると考える。



## 結 論

SAMP8 マウスを用いて，抑肝散摂取による加齢性脳機能障害に及ぼす影響について検討した結果，以下の結論を得た．

1. Morris 水迷路学習テストを行い，空間認知能に与える影響を検討した結果，プラットフォームへの到達時間は，実験群では有意に短縮した．
2. 血中 CO 濃度は，実験群と対照群との間で差はなかった．
3. BrdU 陽性細胞数は，実験群では有意に増加した．
4. 海馬神経細胞における超微細構造では対照群で多くの変性が認められたが，実験群では対照群に比較して少なかった．
5. PSD 長さ・厚さ・面積では実験群で数値の上昇が認められた．
6. 海馬ミエリン鞘では対照群に比べ実験群で萎縮が少なく，G-ratio が低値であったため，ミエリン鞘が厚いことが示された．

以上の結果から，抑肝散の摂取が，マウスの加齢性の脳機能変性や空間認知機能低下の予防法として有用であることが示唆された．

## 引用文献

- 1) Reiz C, Brayne C and Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7: 137-152.
- 2) Vivar C. Adult hippocampal neurogenesis, aging and neurodegenerative diseases: Possible strategies to prevent cognitive impairment. *Curr Top Med Chem*. 2015;15: 2175-2192.
- 3) Lazarov O and Hollands C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Prog Neurobiol*. 2016; 138-140:1-18.
- 4) Margeta MA and Shen K. Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43:261-267.
- 5) Fiala JC, Spacek J and Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev*. 2002; 39:29-54.
- 6) Desmond NL and Levy WB. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1986;253:476-482.
- 7) Muller D, Nikonenko I, Jourdain P and Alberi

- S. LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med*. 2002;2:605-611.
- 8) Mu Y and Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011;6:85.
- 9) Mizoguchi K and Ikarashi Y. Cellular pharmacological effects of the traditional Japanese kampo medicine yokukansan on brain cells. *Front Pharmacol*. 2017;8:655.
- 10) Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M, Monma Y, Nemoto M, Tomita N, Tanji H, Fujiwara H, Seki T, Fujii M, Arai H and Sasaki H. A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J Clin Psychiatry*. 2005;66:248-252.
- 11) Nagata K, Yokoyama E, Yamazaki T, Takano D, Maeda T, Takahashi S and Terayama Y. Effects of yokukansan on behavioral and psychological symptoms of vascular dementia: an open-label trial. *Phytomedicine*. 2012;19:524-528.
- 12) Ikarashi Y and Mizoguchi K.

Neuropharmacological efficacy of the traditional Japanese kampo medicine yokukansan and its active ingredients.

*Pharmacol Ther.* 2016;166:84-95.

- 13) Fujiwara H, Takayama S, Iwasaki K, Tabuchi M, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Kase Y, Arai H and Yaegashi N. Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid b proteins in amyloid precursor protein transgenic mice.

*Neuroscience.* 2011;180:305-313.

- 14) Nogami A, Takasaki K, Kubota K, Yamaguchi K, Kawasaki C, Nakamura K, Fujikawa R, Uchida N, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M and Iwasaki K. Effect of yokukansan on memory disturbance in an animal model of cerebrovascular dementia. *J Trad Med.* 2013;30:164-175.

- 15) Liu Y, Nakamura T, Toyoshima T, Lu F, Sumitani K, Shinomiya A, Keep RF, Yamamoto T, Tamiya T and Itano T. Ameliorative effects of yokukansan on behavioral deficits in a gerbil model of global cerebral ischemia.

- Brain Res.* 2014;1543:300-307.
- 16) Yanai S and Endo S. Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behav Brain Res.* 2016;308:187-195.
- 17) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11:47-60.
- 18) Bromley-Brits K, Deng Y and Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp.* 2011;53:e2920.
- 19) Kubo K, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Fujita M and Onozuka M. Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice. *Brain Res.* 2005;1057:191-195.
- 20) Onishi M, Iinuma M, Tamura Y and Kubo K. Learning deficits and suppression of the cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of offspring are attenuated by maternal chewing during prenatal stress. *Neurosci Lett.* 2014;560:77-80.
- 21) Gilbert ME, Kelly ME, Samsam TE and Goodman JH. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat

- hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicol Sci.* 2005;86:365-374.
- 22) Li G, Zhang X, Cheng H, Xie H, Zhang X, Yu J and Han J. Acupuncture improves cognitive deficits and increase neuron density of the hippocampus in middle-aged SAMP8 mice. *Acupunct Med.* 2012;30:339-345.
- 23) Hara Y, Rapp PR and Morrison JH. Neuronal and morphological bases of cognitive decline in aged rhesus monkeys. *Age.* 2012;34:1051-1073.
- 24) Chomiak T and Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One.* 2009;4:e7754.
- 25) Yanai S and Endo S. Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behav. Brain Res.* 2016;308:187-195.
- 26) Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y and Kase Y. Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol.* 2009;122:157-162.
- 27) Uchida N, Takasaki K, Sakata Y, Nogami A,

- Oishi H, Watanabe T, Shindo T, Egashira N, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Nishimura R and Iwasaki K. Cholinergic involvement and synaptic dynamin 1 expression in Yokukansan-mediated improvement of spatial memory in a rat model of early Alzheimer's disease. *Phytother Res.* 2013;27:966-972.
- 28) Makinodan M, Yamauchi T, Tatsumi K, Okuda H, Noriyama Y, Sadamatsu M, Kishimoto T and Wanaka A. Yi-gan san restores behavioral alterations and a decrease of brain glutathione level in a mouse model of schizophrenia. *J Brain Dis.* 2009;1:1-6.
- 29) Mizoguchi K, Shoji H, Tanaka Y and Tabira T. Ameliorative effect of traditional Japanese medicine yokukansan on age-related impairments of working memory and reversal learning in rats. *Neuroscience.* 2011;177:127-137.
- 30) Tanaka Y and Mizoguchi K. Influence of aging on chondroitin sulfate proteoglycan expression and neural stem/progenitor cells in rat brain and improving effects of a herbal medicine, yokukansan. *Neuroscience.* 2009;164:1224-

1234.

- 31) Leuner B, Gould E and Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. 2006;16:216-224.
- 32) Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, Vandenberg SR and Fike JR. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res*. 2004;162:39-47.
- 33) Kim HC, Bing G, Jhoo WK, Kim WK, Shin EJ, Park ES, Choi YS, Lee DW, Shin CY, Ryu JR and Ko KH. Oxidative damage causes formation of lipofuscin-like substances in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse after kainate treatment. *Behav Brain Res*. 2002;131:211-220.
- 34) Margeta MA and Shen K. Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43:261-267.
- 35) Muller D, Nikonenko I, Jourdain P and Alberi S. LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med*. 2002;2:605-611.
- 36) Weeks AC, Ivanko TL, Leboutillier JC, Racine RJ and Petit TL. Sequential changes in the



synaptic structural profile following longterm potentiation in the rat dentate gyrus. III. Long-term maintenance phase. *Synapse*. 2001;40:74-84.

- 37) Sheng M and Kim E. The postsynaptic organization of synapses. Cold Spring Harb. *Perspect Biol*. 2011;3:a005678.
- 38) Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD and Zoghbi HY. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci*. 2006;26: 319-327.
- 39) Chomiak T and Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS ONE*. 2009;4:e7754.
- 40) Fan LW, Chen RF, Mitchell HJ, Lin RC, Simpson KL, Rhodes PG and Cai Z. Alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitron attenuates lipopolysaccharide-induced brain injury and improves neurological reflexes and early sensorimotor behavioral performance in juvenile rats. *J Neurosci Res*. 2008;86: 3536-3547.
- 41) Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K and Nomura Y.

The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:615-618.