香りが認知能力に与える影響

名古屋大学大学院理学研究科
上田(石原) 奈津実、福枡 直人、布施 尚城、木下 專

Japan faces the super-aged society on which the increasing number of patients with dementia is becoming a fast social problem. It reported that individuals diagnosed with mild cognitive impairment show deficits in pattern separation and the decline of the hippocampal function due to aging induces the disability to separate similar patterns. However, the molecular basis is still unclear. The molecular basis about simple memory formation such as fear memory formation, is well understood now. On the other hand, in addition to intrinsic factors, external factors such as aroma and exercise etc., are intricately involved in memory retention decline. Therefore, there is not enough information to stop the progression of forgetfulness with age.

We have been studying the physiological significance of the neural network formation, rearrangement and maintenance of the septin cytoskeleton consisting of the nucleotide binding protein family SEPT1-14 (Ageta-Ishihara et al., Nature Commun 2013, 2015, Neurochem Int 2018, Neurosci Res 2020). In the course of this study, we found that *Septin*-deficient mice retain memory of spatial context for 2h, but not for 24h in the spatial pattern separation paradigm (unpublished).

In this study, we developed a new behavioral paradigm to examine the influence of external factor on memory retention, evaluated this new pattern separation paradigm in *Septin*-deficient mice and assessed effects of aroma (Vanilla Musk) on cognitive ability. Our new behavioral paradigm sheds light on providing new lifestyle modification (using aroma) as the scientific basis for prevention of "forgetfulness" in elderly people.

1. 緒　言

我が国において急速に高齢化が進展する中、健康寿命の延伸や要介護人口の減少は重要な課題である。認知機能に焦点をあてると、認知症の中核症状は進行性の学習・記憶の障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。初期の段階では記憶障害の程度は軽いため、この時点で進行を抑制することが望まれるが、頭部MRI画像などで異常を発見できるのは中後期となってしまう。近年、認知症患者と診断される数年前の時点でも視空間認知障害として空間弁別(既知と未知の場所を区別できない)などの高次機能が低下することが報告され[1)]、遺伝的要因の解明が注目されている。一方で、空間弁別に影響を与える環境的要因については、運動で促進される神経新生は空間弁別能力を向上させ[2-3)]、カフェイン摂取がこのパターン分離の成績を高めることも示されている[4)]。興味深いことに、レモンやローズマリーなどのアロマの刺激は物忘れや認知症を防ぐ可能性があると期待されているが、空間弁別に与える影響は全く評価されていない。我々は、重合性ヌクレオチド結合蛋白質セプチン細胞骨格に着目し、神経系での生理機能の解明を行っている[5)]。セプチンは出芽酵母の温度感受性致死変異体の単離から細胞周期に異常がみられる変異体として発見された[6)]。分裂細胞においては収縮環、鞭毛や繊毛のリングの構成成分であり、多数の分子を集積し相互作用させる足場として、また、細胞の微小領域における分子の局在や非対称性を保証する拡散障壁としての役割が報告されている[7-8)]。興味深いことに、セプチンは最終分化した神経系の細胞で最も高発現することから[9)]、細胞質分裂を超えたセプチン系の未知の生体機能を探索する必要性が示唆されている。我々はこの問題にアプローチする過程で、セプチン細胞骨格欠損マウスの行動レベルでの異常を精査した結果、セプチン細胞骨格欠損マウスは正常な空間定位能力をもつ一方で、異なる形状の空間の弁別試験において記憶保持で低成績を示すことを見出した(投稿準備中)。しかしながら、既存の空間弁別試験では新奇と既知の空間への暴露の待機時間が2時間から24時間で設定されており、数日以上にわたる環境的要因の影響を評価することができない。そこで本研究では、香りが空間弁別能力に与える影響を評価し、遺伝的要因により低下した能力を向上しうることを確認する目的で、空間弁別試験に環境的要因を暴露できる実験系を構築し、この実験系において遺伝的要因により記憶保持低下マウスが従来法と同様の成績低下を示すかを検証した。続いて、構築した実験系にアロマの香りを組み合わせ、行動解析を実施した。

*

Effects of scent on cognitive ability

*Natsumi Ageta-Ishihara, Naoto Fukumasu, Naoki Fuse, Makoto Kinoshita

Division of Biological Science, Nagoya University Graduate School of Science

2. 方　法

2. 1. 実験動物

実験には野生型マウス(C57BL/6NまたはC57BL/6J系統)の雄を日本SLCから購入して用いた。セプチン細胞

骨格欠損マウスを用いた行動試験においては、*Septin*$^{+/-}$マウス同士の交配により、雄の*Septin*欠損群（*Septin*$^{-/-}$）と同性、同生育環境対照群（*Septin*$^{+/+}$）を作製し、毛並みやひげの状態を記録し、健康状態を確認したうえで実験に使用した。明暗サイクルを12時間（8：00－20：00が明期）とした部屋で飼育を行い、行動実験は9：00から19：00の間に行った。行動解析装置内は、装置中央が100luxになるよう調光した。実験の30分前にはマウスを行動解析装置付近の待機場所に入れて実験環境に慣らした。各マウスの試行終了後、次亜塩素酸水もしくは70％エタノールを用いて殺菌消毒し、匂いによる影響を最小限にした。

全ての動物実験は名古屋大学の動物実験委員会の許可を受け、動物実験ガイドラインに従い行った。

2. 3. 空間弁別試験

6－18週齢の同生育環境の野生型雄マウスに対し、外部からの視覚刺激を可能な限り排除するため、試験開始3－4日前にケージ周囲に白色のケージカバーを装着した。試験前日は、マウスに不定形（四角と丸の性質をもつ）の箱を10分間自由に探索させることで、新奇空間探索行動量に群間有意差がないことを確認したうえで、実験者による接触・拘束によるストレス負荷（ハンドリング）を5分間、7日間連続で与えて実験環境に馴化させた。1日目から4日目は、マウスの尾をつかんだ状態を維持し、マウスの背側を撫でることで実験者によるマウス個体への接触に馴化させた。この時、噛まれても強引に引き離すことはせず、マウスに不快感をもたせないよう留意した。5日目から7日目は、マウスが跳ねないようであれば尾を放して自由に手のひらの上を歩かせつつ体を触った。マウスの尾を放した状態でマウスが実験者の手のひらから降りようとせず、尾が下がった状態かつ触れても恐怖を感じない（すくみ反応を示さない）状態を、マウスが実験者に馴化した状態と見なした。形状のみが異なる新奇空間、1辺30cmの立方体または直径34cm, 高さ30cmの円筒を探索させ、移動距離を6分間計測した後、ホームケージに戻し、24時間の遅延時間後に異なる空間での移動距離を3分間計測した。遅延時間前後の移動距離の比を算出した。

2. 4. 環境的要因を評価しうる空間弁別試験

6－18週齢の同生育環境の野生型もしくはセプチン細胞骨格欠損雄マウスに対し、容器（白い四角箱、縦×横×高さ: 17.5×16.5×30cm）と、同素材、同色、同面積である容器（白い円筒形、直径×高さ: 17×27cm）を用い試験を実施した。1試行目に円筒の容器にマウスを5分間入れ、探索行動量（移動距離）を測定した。これを8日間連続で行った。9日目に1試行目とは異なる（新奇）容器に3分間入れ、探索行動量（移動距離）を測定した。8もしくは9試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量でそれぞれ割り、100を掛け、パーセンテージで表したものを用いて既知もしくは新奇の探索行動量として比較を行った。アロマ（Vanilla Musk）はケージの端にプラスチック容器を設置し、1滴（約10ml程度）をたらし1日目の試行の後に暴露を開始し、試験当日まで継続した。

2. 5. データ解析と統計処理

マウス行動データの取得及び解析には、ビデオ・トラッキング・システム（Ethovision）もしくはImage J（NIH）を用いた。統計解析はソフトウェアPrismを利用した。グラフは平均値と標準誤差で示した。統計解析によって求められたp値が0.05未満であることをもって有意であると判断した。

3．結　果

3. 1. 環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験の確立

空間弁別評価のために汎用的なパラダイムは1試行目に立方体または円筒の容器にマウスを入れ、探索行動量（移動距離）を測定し、24時間後に新奇もしくは既知の容器にマウス入れ行動量を測定することで、新奇もしくは既知空間の認識を評価している（図1A, B）。今回は、揮発性成分の行動解析に与える影響を評価するため、同一個体において、新奇と既知の測定をし、環境的要因として揮発性成分の暴露の有無により既知と新奇の認識率の変化を評価する必要がある。そこで、新たに環境的要因を評価できる空間弁別試験の構築を行った。様々な条件を検討した結果、マウスが実験操作に慣れすぎると、活動性が自然に増加する傾向がみられることがわかったため、実験期間を9日間に設定した（図1C）。試行2－8は既知空間への暴露を継続した。試行3－8に関しては、実験系の再現を繰り返しても有意差がなく、この間に揮発性成分への暴露の有無を組み合わせて実験を行い、試行3－8での行動変化をモニターしながら、9試行目の成績を評価できることがわかった（図1D）。8試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量で割った値（既知：30.19 ± 4.77％ n=7）は9試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量で割った値（新奇：46.65 ± 4.42％ n=7）と比べ優位に低下しており（p=0.0263）、新奇と既知空間の認識可能な実験系が構築できた。

3. 2. 環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験における遺伝的要因の影響

遺伝的要因により空間弁別の記憶保持が低下したセプチン細胞骨格欠損マウスを用いて、新たに構築した実験系を用いて行動試験を実施した。その結果、野生型マウスは既

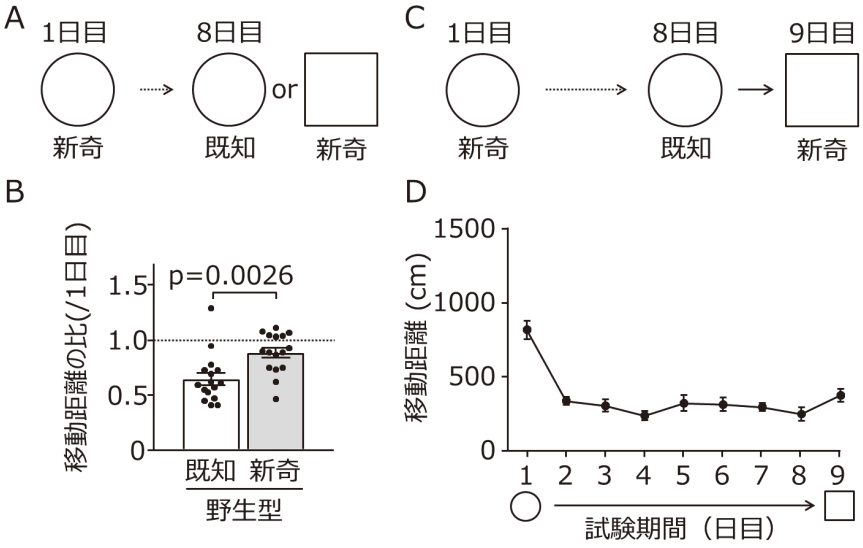

図１　既存の空間弁別試験と環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験

A）既存の空間弁別試験　B）既知空間と新奇空間における移動距離の比　C）環境的要因を評価しうる新たな空間弁別試験　D）移動距離の推移

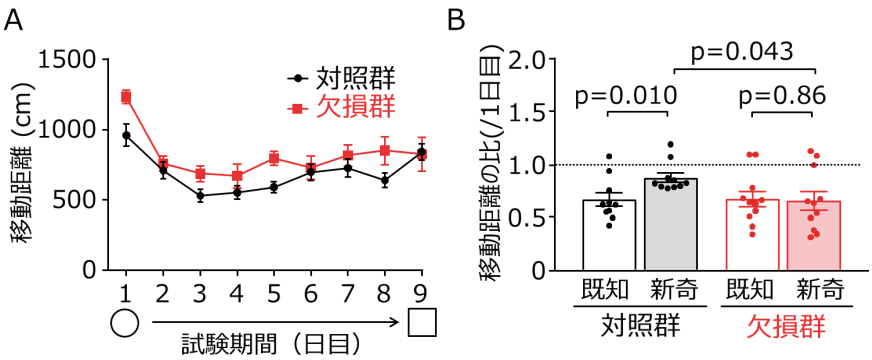

図2　新たな実験系におけるセプチン細胞骨格欠損マウスの空間弁別試験における訂正性の再現

A）移動距離の推移　B）移動距離の比

知空間（8日目）より新奇空間（9日目）で有意に高い移動距離を示した（68 ± 6.4 vs. 85 ± 4.4％, p=0.010, n=10）が、セプチン細胞骨格欠損は両空間で同等の移動距離を示した（68 ± 7.3 vs. 66 ± 8.8%, p=0.86, n=11）。

3. 3. 空間弁別試験における香りの効果

野生型マウスを用いて、新たに構築した実験系を用いてVanilla Muskの香りの有無で行動試験を実施した。その結果、香り暴露群では記憶の保持に異常が認められた（80 ± 7.4 vs. 85 ± 5.5%, p=0.64, n=7, 8）。一方で、対照群では有意差は認められないものの、新奇と既知空間を判別している傾向が認められた（77 ± 7.8 vs. 95 ± 6.9%, p=0.11, n=7）。

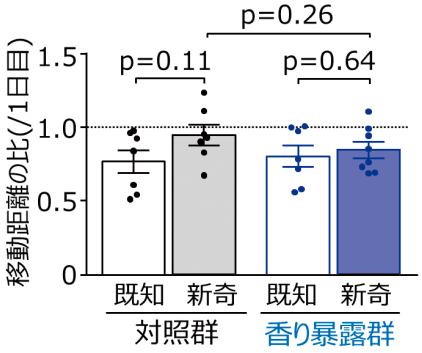

図3　香り暴露が空間弁別試験に与える影響

4．考　察

本研究の遂行により、揮発性成分を含む外的要因（環境的要因）の行動解析に与える影響を評価しうる空間弁別試験系の構築に成功した。さらに、遺伝的要因により従来広く用いられている空間弁別試験において低成績を示すことを見出しているセプチン細胞骨格欠損マウスにおいても、外的要因を評価系に組み込んだ試験でも同様に、空間弁別の記憶保持の機能低下が認められることを見出した。今回使用したアロマの香りでは認知機能の向上は認められなかったが、今後はさらにこの系を用いて、様々な香りや揮発性成分を暴露し、認知機能を向上させる物質を同定することを目指す。最終的には、空間弁別の記憶保持障害マウス（セプチン細胞骨格欠損マウス）に空間弁別試験の向上を引き起こす匂い物質を暴露し、試験結果が向上するかを評価することで、揮発性低分子化合物を含むフラグレンスなど日常に取り入れやすい形での香りを用いて認知症に対する処方介入の提案を目指す。

認知機能の向上に効果が見出された揮発性低分子化合物に関しては、この成分を含む形の製品開発を進めることで日常に取り入れやすい形での香りの提供につながる。さらに、補完代替医療としての臨床メディカルアロマテラピーも徐々に普及してきており、医療機関や介護施設で取り入れるところが出てきている。メディカルアロマセラピーは科学的根拠が不足していることなどが原因で、積極的に取り入れている医療現場はまだ少ないが、本研究を通じて香りの認知に与える影響に対して科学的根拠を示すことができれば、空間弁別記憶保持向上を指標に同定した香り成分を含む芳香浴をより多くの医療現場で取り入れていただくことが可能となる。この基礎研究成果が「医療」や「健康」といった産業展開につながる成果の蓄積の一助となり、コスメや関連商品が健康寿命にも影響を与える製品として波及することを期待する。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。また研究の遂行にあたり木下専教授（名古屋大学理学研究科）に温かいご指導をいただきました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し上げます。

（引用文献）

1）Stark SM, Yassa MA, Lacy JW, Stark CE. A task to assess behavioral pattern separation(BPS) in humans: Data from healthy aging and mild cognitive impairment, *Neuropsychologia*, 51(12) : 2442-2449(2013)

2）Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation, *Science*, 325 (5937) : 210-213 (2009)

3）Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation, *Nature*, 472 (7344) : 466-470 (2011)

4）Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans, *Nat Neurosci.*, 17 (2) : 201-203 (2014)

5）Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain, *Neurosci Res.*, S0168-0102 (20) : 30440-30445 (2020)

6）Hartwell LH. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast, *J Bacteriol.*, 93 (5) : 1662-1670 (1967)

7）Sharma S, Quintana A, Findlay GM, Mettlen M, Baust B, Jain M, Nilsson R, Rao A, Hogan PG. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry, *Nature*, 499 (7457) : 238-242 (2013)

8）Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G, Niehrs C. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation, *Cell*, 163 (5) : 1225-1236 (2015)

9）Kinoshita A, Noda M, Kinoshita M. Differential localization of septins in the mouse brain, *J Comp Neurol.*, 428 (2) : 223-239 (2000)