

卵巣摘出マウス脳内の ChAT 活性, NGF および NGF-mRNA の変動に対する当帰芍薬散およびエストラジオールの作用

朴 正福,^{a)} 鳥居塚和生,^{*a,b)} 矢部 武士,^{a)} 花輪 壽彦,^{a)} 丁 宗鐵^{c)}

^{a)}北里研究所東洋医学総合研究所 臨床研究部, ^{b)}昭和大学薬学部 生薬学・植物薬品化学

^{c)}東京大学医学部 生体防御機能学

The effects of estradiol and Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San) on choline acetyltransferase activity, NGF, and NGF-mRNA in the brain regions of ovariectomized mice

Zheng-Fu PIAO,^{a)} Kazuo TORIIZUKA,^{*a,b)} Takeshi YABE,^{a)} Toshihiko HANAWA,^{a)} Jong-Chol CYONG^{c)}

^{a)}The Research Division, Oriental Medicine Research Center, The Kitasato Institute, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan.

^{b)}Laboratory of Pharmacognosy & Phytochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan.

^{c)}Department of Bioregulatory Function, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.

(Received May 21, 2001. Accepted September 6, 2001.)

Abstract

Ovariectomized (OVX) mice were used to investigate the effects of estradiol and Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San; TSS) on the central nervous system. OVX mice were injected subcutaneously with estradiol 500 μ g/kg body weight/day for 7 days or administered orally TSS 1g/kg body weight/day for 10 days. The ChAT activity, and NGF contents and NGF-mRNA in the cerebral cortex and hippocampus were measured. It was demonstrated that the ChAT activity and NGF contents were markedly reduced in the cerebral cortex and hippocampus of OVX mice compared with those in the normal mice. In estradiol-treated OVX mice, ChAT activity and NGF contents were increased remarkably, and NGF-mRNA also showed a tendency to increase. In TSS-treated OVX mice, ChAT activity was increased significantly, but there were no remarkable effects on NGF and NGF-mRNA.

From the above results, it was suggested that both estrogen and TSS treatment alleviate the symptoms of postmenopausal women, maybe via an improvement of cholinergic function. And it is inferred that estradiol and Toki-shakuyaku-san reverse menopausal dementia maybe by some different mechanisms.

Key words choline acetyltransferase, estrogen, Kampo medicine, menopausal disorder, nerve growth factor, Toki-shakuyaku-san.

Abbreviations ChAT, choline acetyltransferase; E₂, estradiol; NGF, nerve growth factor; OVX, ovariectomized; TSS, Toki-shakuyaku-san.

緒 言

更年期不定愁訴は多彩で個人差も大きい, のぼせ,

ほてり, 冷え性など身体的愁訴のほか, 精神面では不安感, 憂鬱, 不眠などといった症状を呈する。閉経前後では卵巣機能の低下によりエストロゲンの分泌が低下し, 視床下部からのゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH)

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: k-tori@pharm.showa-u.ac.jp

や下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモンなどの過剰分泌が起こる。この過剰分泌による調節機能の障害が自律神経に異常をきたし更年期障害の諸症状がもたらされると考えられている。またエストロゲンが精神症状に及ぼす影響については、いまだに不明な点も多いが、Gerardらの疫学的調査やAronsonらの報告によると^{1,2)} 痴呆は女性の方が男性に比べて、約2-3倍ぐらい発症しやすく、その発症原因の一つとして更年期女性の卵巣機能低下に伴う女性ホルモン類の減少が指摘されている。更にまたエストロゲンの補充療法(ERT)を行った例では、アルツハイマー(AD)などの痴呆症の発病率の減少と発症年齢の延期などの効果が報告され^{3,4)} 痴呆症発症と性ホルモンの密接な関連性が示されている。

一方、近年漢方薬が神経-内分泌-免疫系を介して種々の更年期症状を改善することが基礎的、臨床的研究によって明らかとされつつある。我々は加齢老化マウスや卵巣摘出動物を用いた実験で漢方方剤の当帰芍薬散や人參養榮湯などが脳内神経伝達物質の変化や記憶学習能の低下を改善することを見出し、これらの漢方方剤の中樞神経系に対する作用に関して一連の検討をしてきた。^{5,6)}

前報においては、卵巣摘出マウスを用い卵巣摘出後10日目、20日目の経日的なアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性、ノルエピネフリンなどのモノアミン類の低下、マイトゲン活性の低下に対する当帰芍薬散の改善作用を報告した。また免疫系に影響を与える用量のエストラジオール投与(2.5および100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)ではChAT活性への影響は認められなかったことを報告した。^{5,6)} 今回、記憶学習能に関与する脳内コリン作動性ニューロンのChAT活性および神経細胞の生存維持に重要な働きをする神経栄養因子(NGF)とNGF-mRNA発現量に対する当帰芍薬散投与の影響を検討した。またエストラジオール投与との差異についても比較検討したので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物：5週齢のメスC57BL/6CrSlcマウス(日本SLC)を購入し、約1週間予備飼育をした後実験に用いた。動物は恒温恒湿(23 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度55 $\pm$ 2%)、明暗サイクル12時間(明期7:00-19:00)の動物室にて飼育し、実験開始まで食飼(日本クレアCE-2)及び水は自由に摂取させた。

(2) 外科的処置：ネブタール麻酔(50mg/kg; i.p.)下にて背部を切開し、両側の卵巣を摘出した。偽手術は背部筋層切開のみ行った。

(3) 薬物：当帰芍薬散(TSS)は(株)ツムラ & Co.よ

り提供されたエキス原末(TJ-23: lot 240023020)を1g/kgに相当する様に調製し、卵巣摘出日より10日間給水瓶にて自由摂取させた。飲水量は毎日確認し調製した。対照群には水を投与した。エストラジオール投与実験群では、estradiol benzoate (Sigma)を適量の1.0%エタノール-生理食塩水に溶解し500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ に相当する量を卵巣摘出の翌日より7日間皮下投与を行った。対照群には1.0%エタノール-生理食塩水を投与した。いずれも卵巣摘出日より10日目に、断頭し脳を取り出した。脳は直ちに液体窒素で凍結し、脳の分画まで-80 $^{\circ}\text{C}$ に保存した。脳はドライアイス上でGlowinskiとIversenの方法⁷⁾に従って分割した。

(4) ChAT活性の測定方法：ChAT活性はFonnumの方法⁸⁾の変法により測定した。大脳皮質あるいは海馬などの脳組織に1% Triton-X100 PBSを0.5mlを加えて水中でホモジネートし、0.2M NaCl, 8mM choline chloride, 1mM EDTA, 0.1mM eserine, 0.5% Triton-X100, 25 μM [1-¹⁴C] acetyl CoA (0.15 GBq/mmol; NEN)を含む反応液を加え37 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間インキュベーションした。反応終了後、300 μl の氷冷した50mMリン酸緩衝液(1mM EDTA, pH 6.5)を加え、ただちに5mg/mlのsodium tetraphenylborateを含むアセトニトリル溶液1mlとトルエン2mlを加え攪拌した後に、3000rpmで10分間遠心した。有機溶媒層1mlをトルエン系シンチレーターと混合し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(5) NGFの定量

a) NGF polyclonal 抗体の作成：NGF抗血清は50 μg の2.5S NGFをアジュバント(初回免疫ではFreund's complete adjuvant, 追加免疫時はFreund's incomplete adjuvant)とともにNZWラビットに3回免疫することにより得た。得られた抗血清はprotein G Sepharose column (Pharmacia)によりIgG画分に調製した後に、さらにNGF-conjugated Sepharose 4B columnにてマウス2.5S NGFに対するaffinity精製を行った後に実験に用いた。また抗NGF affinity精製抗体をbicarbonate buffer (pH 9.0)中でNHS-LC-biotinと4 $^{\circ}\text{C}$ で2時間作用させることによりbiotin化抗NGF affinity精製抗体を作成しTwo-site ELISAの際の検出用抗体として用いた。

b) マウス脳組織中のNGF定量：大脳皮質あるいは海馬にPBSを0.5mlを加えてホモジネートし、遠心(10000rpm, 10分, 4 $^{\circ}\text{C}$)をかけて得られた上清を用いてTwo-site ELISA法にて測定を行った。

(6) NGF-mRNA の測定

a) RNAの調製：分画された脳組織にグアニジン溶液を加え超音波によりホモジネートした。total RNAは

グアニジン・ホットフェノール法により調製した。

b) RT-PCR: 上記の方法により得られた total RNA 画分 $1\mu\text{g}$ より, First strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は cDNA $2.5\mu\text{l}$, Taq DNA Polymerase $0.25\mu\text{l}$, $5\times$ PCR buffer $10\mu\text{l}$, 25mM dNTPs $0.5\mu\text{l}$, $2\text{pmol}/\mu\text{l}$ sense primer および $2\text{pmol}/\mu\text{l}$ down stream primer を $2.5\mu\text{l}$ ずつ加えて, 蒸留水で全量を $50\mu\text{l}$ とし 30-33 回の増幅を行った。PCR 反応は (i) 熱変性; 94°C , 30秒 (ii) アニリング; 55°C , 1分 (iii) 伸長反応; 72°C , 1分の条件で行った。使用したセンスプライマー (A) とアンチセンス (B) は, 既報⁹⁾ の cDNA 配列に基づいて合成した。また cyclophilin を reference gene として用い補正した。合成したプライマーの塩基配列を以下に示す。

NGF (sense): 5'-GTAATGTCCATGTTGTTCTACA CTCTG-3'

NGF (antisense): 5'-GGCAAGTCAGCCTCTTCTTG TTAGCCTTCC-3'

cyclophilin (sense): 5'-GGTCAACCCACCGTGTCT TCGA-3'

cyclophilin (antisense): 5'-AACGGTTAGGTCGGT AAGTCAGAAC-3'

得られた PCR 産物は, 1.5% アガロースゲル電気泳動により分離した後, SYBR Green (Takara) により染色を行い, 257nm の紫外線照射により得られる蛍光を Poraroid film 上に検出した。

(7) タンパク量の測定: Bradford 方法¹⁰⁾ により行った。

(8) 統計学的処理: それぞれの測定結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。また得られたデータの有意差の検定は Student's t-test を用いて行い危険率 5% 以下を有意とした。

結 果

1) 卵巣摘出による脳内の ChAT 活性と NGF 量の変化

卵巣摘出 10 日後マウス大脳皮質での ChAT 活性を測定したところ, 卵巣摘出群マウスでは偽手術群に比べ有意な活性低下が認められた。また NGF 量を測定した結果においても卵巣摘出群マウスでは偽手術群に比べ大脳皮質および海馬で NGF 量の有意な減少が認められた。NGF-mRNA には有意な差は認められなかった (Fig 1)。

2) 卵巣摘出マウス脳内の ChAT 活性と NGF 量および NGF-mRNA 発現量に対するエストラジオールの影響

卵巣摘出マウスにエストラジオール $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (s.c.) を 7 日間行った後, ChAT 活性と NGF 量および NGF-mRNA 発現量を測定した。その結果, エストラジ

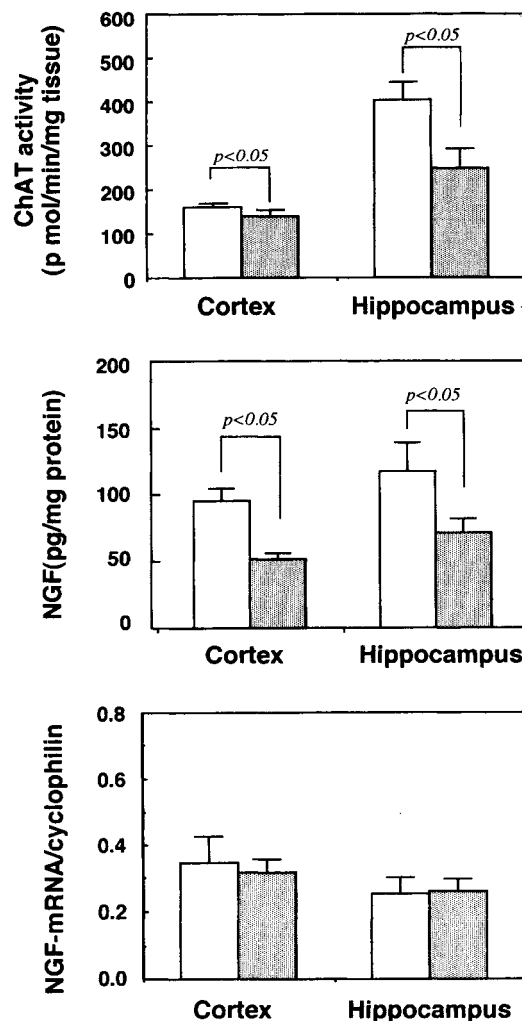


Fig. 1: ChAT activity, NGF contents and NGF-mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of ovariectomized mice. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 mice.
□ Sham ■ OVX

オール投与により大脳皮質と海馬で ChAT 活性と NGF 量の有意な増加が観察された。大脳皮質と海馬での NGF-mRNA 発現量は増加傾向 ($p < 0.1$) が示された (Fig 2)。

3) 卵巣摘出マウス脳内の ChAT 活性と NGF 量および NGF-mRNA 発現量に対する当帰芍薬散の影響

卵巣摘出マウスに当帰芍薬散エキス (TJ-23) を $1\text{g}/\text{kg}$ で 10 日間摂取させた後, ChAT 活性と NGF 量および NGF-mRNA 発現量の測定を行った。その結果, 当帰芍薬散の投与により大脳皮質で ChAT 活性の有意な増加が認められた。一方, NGF 量および NGF-mRNA 発現量に関しては当帰芍薬散の投与による有意な変化は観察されなかった (Fig 3)。

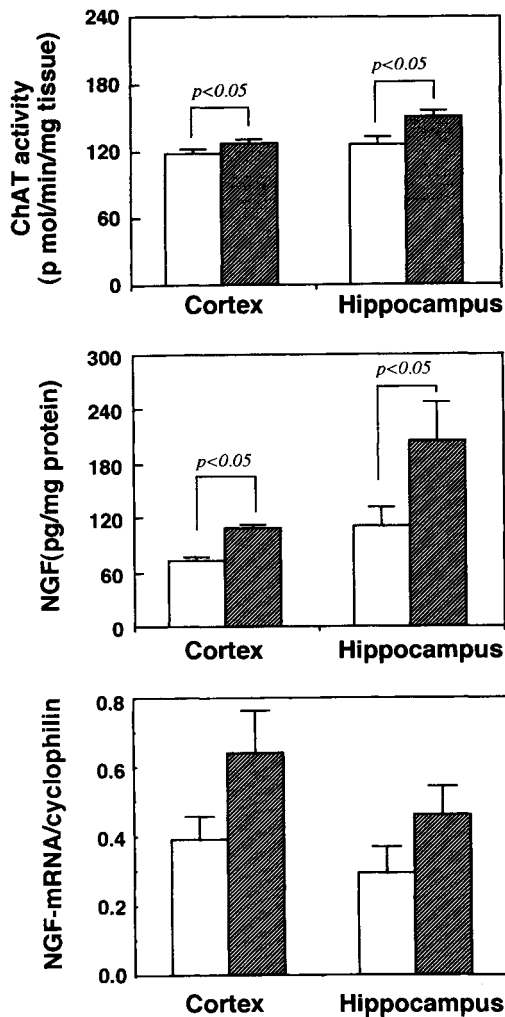


Fig. 2: Effect of estradiol (E_2) on ChAT activity, NGF and NGF-mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of ovariectomized mice. OVX group was injected with saline. Group of E_2 was administered with E_2 500 μ g/kg body weight/day for 7 days. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 mice.
 □ OVX ▨ OVX+ E_2

考 察

アルツハイマー病をはじめとした記憶学習機能障害では大脳皮質や海馬のコリン作動性ニューロンの障害が顕著であり、大脳皮質や海馬が記憶や学習に密接に関係していることが知られている。また NGF は主に大脳皮質と海馬で合成、分泌され、神経細胞の分化、生存、機能の維持に関わり、栄養因子として働くことが知られている。前報において、卵巣摘出後 10 日目、20 日目の経日の ChAT 活性の低下、ノルエピネフリンなどのモノアミン類の低下、記憶学習能の低下が観察されることを報

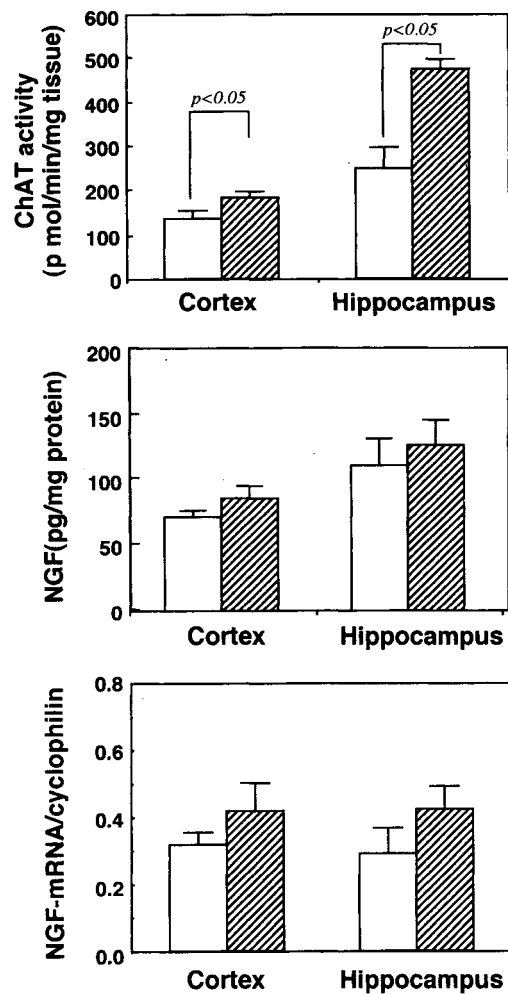


Fig. 3: Effect of TSS on ChAT activity, NGF and NGF-mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of ovariectomized mice. OVX group was administered water. Group of TSS was administered with TSS 1.0g/kg body weight/day for 10 days. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 mice.
 □ OVX ▨ OVX+TSS

告した。^{6,11)} そこで本実験では卵巣摘出マウスを用い、脳内コリン作動性ニューロンに焦点を絞り ChAT 活性の測定に加え、神経細胞の生存維持に重要な働きをする NGF について測定を行なった。その結果、卵巣摘出マウス大脳皮質での ChAT 活性は偽手術群に比べ有意に低下し、前報を支持する成績が得られた。またその時の NGF の変化を測定したところ卵巣摘出群では有意に減少していることが確認され、Singh らの報告を支持する成績を得た。^{12,13)}

このような卵巣摘出動物の脳内の ChAT 活性と NGF 量の変化に対するエストラジオール投与の影響について検討を行なった。前報^{5,6)} では、エストラジオール 2.5

μg および $100 \mu\text{g/kg/day}$ の用量で検討したところ、ChAT 活性には影響を与えず、免疫系のマイトーゲン活性のみを変化させた。そこで今回は、MacMillan らが¹⁴⁾ ChAT 活性に影響を及ぼす用量として報告している $500 \mu\text{g/kg/day}$ で検討を行った。その結果、エストラジオール投与により卵巣摘出マウスの ChAT 活性は有意に増加し、それらの報告と同様の成績が得られた。またこのときの大脳皮質および海馬における NGF 量は有意に増加することが認められた。一方、漢方方剤の当帰芍薬散を経口投与した場合には、前報と同様に ChAT 活性の有意な増加が観察された。しかしながら NGF 量については大脳皮質および海馬のいずれにおいても有意な変化は観察されなかった。次いで NGF 量だけではなく、mRNA レベルで増加が起きているかについて RT-PCR を用いて測定を行った。Cyclophilin を対照として補正を行い比較したところ、エストラジオール投与では NGF-mRNA の増加傾向が観察され、転写レベルにおいても増加することが推定できた。これに対し当帰芍薬散の経口投与においては NGF-mRNA の有意な変化は観察されなかった。

コリン作動性神経系は学習記憶や認知機能に対し重要な働きをすること¹⁵⁾や AD 患者では脳内の ChAT 活性が著しく減少していることなどが知られているが、¹⁶⁾ 卵巣摘出モデルでの ChAT 活性の低下は、更年期以降の痴呆発症のリスク増加や認知機能の低下と密接に関連するものと考えられる。また更年期障害や更年期以降の気分関連障害の治療にエストロゲン補充療法が行われているが^{17,18)} 抑うつ感、¹⁹⁾ 記憶力低下²⁰⁻²²⁾ などの症状が改善されることが知られている。今回の検討で、卵巣摘出により起因される脳内での ChAT 活性や NGF 量の低下はエストラジオール ($500 \mu\text{g/kg}$) の投与により有意に改善されることが認められ、更に NGF-mRNA 発現量も増加傾向を示した。これらの成績から減少したエストロゲンを直接補うことによりコリン作動性神経系が活性化され、記憶学習能障害や認知機能障害などが改善されるものと思われた。NGF のレセプター発現量はエストロゲンにより調節されることや、²³⁾ NGF のプロモーター領域に estrogen response element (ERE) が存在していること²⁴⁾ が報告されている。本実験でエストロゲンの補充投与による up regulation の結果、NGF が増加しまた転写レベルでも増加傾向を示したものと推定している。さらに NGF が老化ラットのコリン神経ニューロンの萎縮や記憶障害に対し回復作用を有する²⁵⁻²⁷⁾ との報告があり、NGF を介したコリン作動性神経系の賦活が考えられた。

当帰芍薬散は臨床的には卵巣機能不全、不妊症、更年

期障害などの婦人科疾患に広く用いられている。また全身血流の改善などの作用を有し卵巣機能低下によって生じる内分泌系、神経系、免疫系の異常を改善する可能性が示されている。これまでに当帰芍薬散は中枢神経系においてはスコポリンにより誘発される学習記憶障害やラットの空間認知障害に対する改善作用、²⁸⁾ ニコチン性アセチルコリンレセプターの賦活作用、²⁹⁾ 老齡ラット大脳皮質での ChAT 活性の増加作用²⁹⁾ などが報告されている。また、卵巣摘出マウスを用い免疫組織学的にコリン作動性神経細胞に対する影響を検討したところ、当帰芍薬散投与では卵巣摘出による中隔野の ChAT 陽性細胞の低下を抑えたが、加味逍遙散投与では影響を受けないなど、当帰芍薬散の ChAT 活性に対する作用が非特異的な作用でないことを示している。³⁰⁾ これらの研究結果を総合すると当帰芍薬散は卵巣機能の活性化や脳内神経伝達物質の変化を介してコリン作動性神経系の機能を賦活させ、その結果、記憶学習能の改善作用を示すことが推定できる。今回の検討でも、当帰芍薬散の投与によって大脳皮質での ChAT 活性が有意に増加することが認められ、先の報告⁶⁾ と同様の成績が得られた。しかしながら大脳皮質および海馬での NGF 量および NGF-mRNA 発現量には当帰芍薬散投与は有意な影響を及ぼさなかった。今後、投与量・投与期間など条件を変えて検討する必要があると考えるが、当帰芍薬散投与では血中のエストラジオール量の上昇が見られないことから (エストラジオール投与群; 77.0 pg/ml , 当帰芍薬散投与群; 3.4 pg/ml)、当帰芍薬散の作用はエストラジオールの補充による作用とは異なると推定された。

痴呆患者などの記憶学習障害に対するエストラジオール補充療法は有用といわれるが、投与経路の問題点や、乳癌などの発症リスクの亢進などの副作用の問題点があることから、経口投与で脳内 ChAT 活性の改善作用を示す当帰芍薬散は、それらの治療に試みる価値があるものと考えられた。

結 論

今回、性ホルモンと漢方方剤の中枢神経系に対する作用の異同を明らかにすることを目的として、卵巣摘出マウスを用いて脳内のアセチルコリン合成酵素 (ChAT) 活性と神経栄養因子 (NGF) および NGF-mRNA 発現量などの変化に対するエストラジオール投与および当帰芍薬散投与の影響について比較検討を行った。その結果、卵巣摘出 10 日後の大脳皮質および海馬における ChAT 活性や NGF 量の低下に対しては、エストラジオール皮下投与はそれらを増加させることが示された。また NGF-

mRNA に対しても増加傾向が示された。一方、当帰芍薬散は経口投与で、大脳皮質・海馬の ChAT 活性の有意な増加が示されたが、NGF 量および NGF-mRNA 発現量に関しては有意な変化は観察されなかった。

謝 辞

本研究の一部は厚生省長寿科学総合研究費および(株)ツムラ&Co.の研究助成費によった。

*〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8

昭和大学薬学部生薬学・植物薬品化学 鳥居塚和生

References

- 1) Aronson, M.K., Ooi, W.L., Morgenstern, H., Hafner, A., Masur, D., Crystal, H., Frishman, W.H., Fisher, D., Katzman, R.: Women, myocardial infarction, and dementia in the very old. *Behav. Neural Biol.* **40**, 1102-1106, 1990.
- 2) Gerard, M.G., Brenda, T., Cecilia, M.Q., John, M.S., William, J.M., Lawrence, J.W.: Epidemiology of Alzheimer's presenile dementia in Scotland, 1974-88. *BMJ*, **306**, 680-683, 1993.
- 3) Paganini-Hill, A., Henderson, V.W.: Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am. J. Epidemiol.* **1140**, 256-261, 1994.
- 4) Tang, M.-X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., Mayeux, R.: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, **348**, 429-432, 1996.
- 5) Toriizuka, K., Piao, Z.-F., Iijima, K., Yabe, T., Cyong, J.-C.: Effects of Kampo medicine on central nervous system in aging processing mice. *J. Trad. Med.*, **13**, 362-363, 1996 (in Japanese).
- 6) Toriizuka, K., Hou, P.-H., Yabe, T., Iijima, K., Hanawa, T., Cyong, J.-C.: Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san, on choline acetyltransferase activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacology*, **71**, 133-143, 2000.
- 7) Glowinski, J., Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamine in the rat brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655-669, 1966.
- 8) Fonnum, F.A.: A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* **24**, 407-409, 1975.
- 9) Ulrich, A., Gray, A., Berman, C., Dull, T.J.: Human beta-nerve growth factor gene sequence is highly homologous to that of mouse. *Nature*, **303**, 821-825, 1983.
- 10) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976.
- 11) Toriizuka, K.: Effect of Toki-shakuyaku-san on the nervous system, learning and memory, immune function. *Modern Physician*. **15** (3), 376-383, 1995 (in Japanese).
- 12) Singh, M., Meyer, E.M., Huang, F.S., Millard, W.J., Simpkins, J.M.: Ovariectomy reduces ChAT activity and NGF-mRNA levels in the frontal cortex and hippocampus of the female Sprague-Dawley rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* **19**, 1254, 1993.
- 13) Singh, M., Meyer, E.M., Simpkins, J.W.: The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*. **136**, 2320-2324, 1995.
- 14) McMillan, P.J., Singer, C.A., Dorsa, D.M.: The effects of ovariectomy and estrogen replacement on trkA and choline acetyltransferase mRNA expression in the basal forebrain of the adult female Sprague-Dawley rat. *J. Neurosci.* **16**, 1860-1865, 1996.
- 15) Blokland, A.: Acetylcholine; a neurotransmitter for learning and memory?. *Brain Res. Review*. **21**, 285-300, 1995.
- 16) Bartus, R.T., Dean III, R.L., Beer, B., Lippa, A.S.: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, **217**, 408-417, 1982.
- 17) Sherwin, B.B.: Affective changes with estrogen and androgen replacement therapy in surgically menopausal women. *J. Affect. Disord.*, **14**, 177-187, 1988.
- 18) Dittkoff, E.C., Crary, W.G., Cristo, M., Lobo, R.A.: Estrogen improves psychological function in asymptomatic postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* **78**, 991-995, 1991.
- 19) Klaiber, E.L., Broverman, D.M., Vogel, W., Kobayashi, Y.: Estrogen replacement therapy for severe persistent depressions in women. *Arch. Gen. Psychiatry*. **36**, 550-554, 1979.
- 20) Campbell, S., Whitehead, M.: Estrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* **4**, 31-47, 1977.
- 21) Hackman, B.W., Gailbraith, D.: Replacement therapy and piperazine oestrone sulphate and its effects on memory. *Curr. Med. Res. Opin.*, **4**, 303-306, 1976.
- 22) Ohkura, T., Isse, K., Akazawa, K., Hamamoto, M., Yaoi, Y., Hagino, N.: Long-term estrogen replacement therapy in female patients with dementia of the Alzheimer's type, Seven case reports. *Dementia*, **6**, 99-107, 1995.
- 23) Sohrabji, F., Miranda, R.C., Toran-Allerand, C.D.: Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J. Neurosci.*, **14**, 459-471, 1994.
- 24) Watson, M.A., Milbrandt, J.: The NGFI- β gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily, Genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 4213-4219, 1989.
- 25) Fischer, W., Victorin, K., Bjorklund, A., Williams, L.R., Varon, S., Gage, F.H.: Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, **329**, 65-68, 1987.
- 26) Hefti, F., Dravid, A., Hartikka, J.: Chronic intraventricular injections of nerve growth factor elevates hippocampal choline acetyltransferase activity in adult rats with partial septo-hippocampal lesions. *Brain Res.* **293**, 305-311, 1984.
- 27) Williams, L.R., Jodelis, K.S., Donald, M.R.: Axotomy-dependent stimulation of choline acetyltransferase activity by exogenous mouse nerve growth factor in adult rat basal forebrain. *Brain Res.* **498**, 243-256, 1989.
- 28) Fujiwara, M.: Experimental memory disorder and Kampo medicine. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU (J. Trad. Med.)*. **6**, 234-237, 1989 (in Japanese).
- 29) Hagino, N., Sakamoto, S., Toriizuka, K.: Effects of Toki-shakuyaku-san (TJ-23) on the brain acetylcholine nervous cells and its receptors in the aged rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU (J. Trad. Med.)*. **7**, 340-341, 1990 (in Japanese).

- 30) Hagiwara, H., Toriizuka, K., Yabe, T., Mizowaki, M., Nakada, T., Hanawa, T.: Effects of Kampo medicines administration on estrogen receptors, trkA-, and choline acetyltransferase-immunoreactivity in the brain of ovariectomized female mice. Abstract of the 16th General Meeting of the Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, p. 110, 1999 (in Japanese).