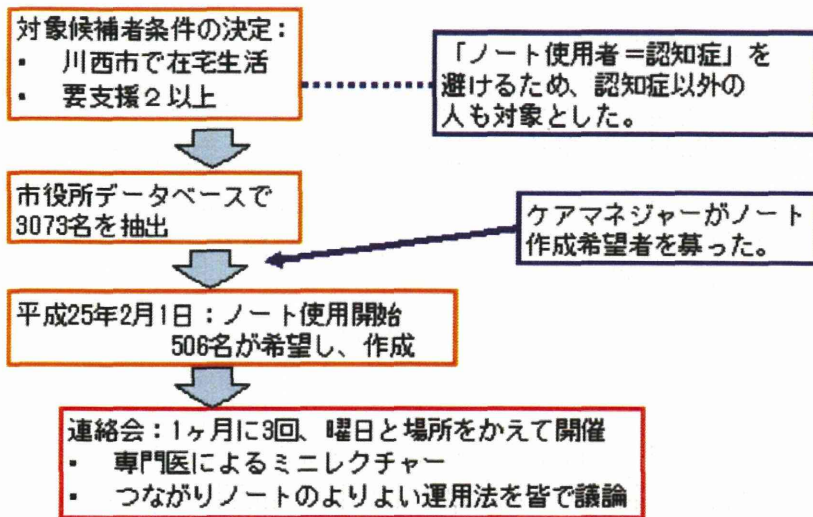


図7: 川西市つながりノート事業の流れ



## (6) 情報共有ノートを用いた認知症地域連携システムの自治体への導入手順

本事業を開始して約1年間が経過した。最後に、本事業の導入の手順を簡単にまとめる。この手順は、今後、認知症地域連携システムを導入しようとしている自治体に役立つと思われる。

1. 認知症地域連携に関わる地域の代表者に説明し協力を得る。今回川西市で円滑に事業が導入できたのは、元々機能していた川西市認知症地域資源ネットワーク構築事業推進会議の存在が大きいのと思われる。地域連携は様々な職種や役割の人の協力が必要なので、その代表者の協力を得たうえで、その代表者から各団体のメンバーに協力を得るという流れがよいと思う。
2. 実際の事業のとりまとめをする事務局を設置する。今回は中央包括支援センターに置かれた。
3. 情報共有ノートを作成する。どこかで作成された物をそのまま使用するのではなく、使用する人達で作成したほうが、愛着がわき円滑に利用されると思う。そしてまず中心となる人達が担当する患者さんで情報共有ノートを作成し試験運用を行う。
4. ノートを持つ利用者の範囲と運用地域、施設の範囲を決定する。今回の事業では、ケアマネジャーが、利用者にこの事業を案内する、利用者を連絡会に誘う、ノートの使用法を指導するなどの重要な役割を担当した。すなわちケアマネジャーがいることが必須であったので介護保険を利用している人に限った。今後、要支援1の人にも広げ、川西市で介護保険を申請する人、全てにこの事業を案内することを考えている。また運用範囲は、都道府県、市町村などの行政単位が望ましい。行政単位と医師会単位が一致している川西市は特に導入しやすかったと考えられる。
5. 本事業のための予算を自治体で確保していただく。介護保険事業費補助金(認知症対策等総合支援事業分)を本事業では使用したとのことであった。
6. 事業や情報の扱いに関して、自治体内、あるいは何らかの機関の倫理審査を受ける。本事業では、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の審査を受け承認された。
7. 医師会、薬剤師会、介護支援専門員、介護保険サービス協会、患者家族会などの会員および市民に対する事業の説明、協力要請を繰り返し行う。
8. ノートの利用者が集まる連絡会のような継続的な会を事業継続中に定期的で開催する。
9. 本事業でもまだ実現していないが、介護サービス事業所ごとに作成されている連絡帳をつながりノートに一本化できれば、つながりノートがよりよく使用されると思われる。

おわりに

連携パスや情報共有ツールを作成すること自体は難しいことではないが、これを実際の臨床場面で普及、定着させることは容易ではない。認知症患者が安心して在宅生活を送れるように連携パスを定着させようという熱意をもって継続的に活動するチームが必要である。認知症連携パスは、認知症に限らず要介護者の連携パスへと発展する可能性を秘めており、今後の展開が期待される。なお本稿で紹介した川西市版つながりノートの元となった「つながりノート・みまもりノート」は、我々の専用ホームページ (<http://handaichiikirenkei.com/index.html>) で公開している。

謝辞

本稿で紹介した調査、事業にご協力いただいた全ての皆様に深謝いたします。本論文で紹介した一連の研究活動は、H13-15 年度厚生労働科学研究費補助金「一般病床における痴呆性高齢者のクリティカルパスの作成に関する研究(研究代表者:遠藤英俊)」、H21-23 年度厚生労働科学研究費補助金「認知症の行動心理症状に対する原因疾患別の治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究(研究代表者:数井裕光)」、および H24-25 年度厚生労働科学研究費補助金「身体疾患を合併する精神疾患患者の診療の質の向上に資する研究(研究代表者:伊藤弘人)」、H24 年度杉浦地域医療振興財団杉浦地域医療振興助成金「連携ノートと疾患別・重症度別ガイドブックを用いた認知症地域連携システムの自治体への導入と自治体導入マニュアルの作成研究」、H24-25 年度日本生命財団高齢社会実践的研究助成「認知症患者の家族介護者と介護従事者のための連携システムを利用した教育的支援法の自治体での効果検証研究」でおこなわれた。

引用文献

1. 遠藤英俊監修・執筆：痴呆性高齢者のクリニカルパス。日総研出版、名古屋、2004
2. Kazui H, Hashimoto M, Nakano Y, et al: Effectiveness of a clinical pathway for the diagnosis and treatment of dementia and for the education of families. *Int J Geriatr Psychiatry* 19:892-897, 2004
3. 杉山博通、数井裕光、繁信和恵ほか：認知症地域連携パス。老年精神医学雑誌 23 : 314-322, 2012
4. 数井裕光、武田雅俊。精神科における BPSD 治療の現状とこれから。日本精神科病院協会雑誌 31 (8) : 15-21、2012
5. 数井裕光、杉山博通、武田雅俊：認知症診療におけるクリニカルパスと情報共有ノートを用いた認知症地域連携。つながりノート・みまもりノートの有用性。臨床精神医学 41(12):1731-1740, 2012
6. 武田雅俊監修、数井裕光、杉山博通、板東潮子著：認知症。知って安心! 症状別対応ガイド、メディカルレビュー社、大阪、2012

特集 ◀  
精神科救急の  
最新知識

Emergency  
psychiatry:  
up-to date

## II. 症候・精神疾患に対する対応

### 精神科救急における Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) 治療の実際

清水 芳郎<sup>1,2)</sup> 数井 裕光<sup>2)</sup> 武田 雅俊<sup>2)</sup> 澤 温<sup>1)</sup>

Key words: BPSD, 認知症, 精神科救急, 周辺症状, 疫学調査

抄録：近年、本邦では認知症患者、特に Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) への治療と対応も精神科医療の主要な対象になってきている。われわれが調査したところ、精神科救急を受診している BPSD を主訴とした認知症患者は極めて少なかった。しかしながら、夜間および休日時間帯に本当は BPSD で困っているのに、さまざまな事情のため、多くの患者が精神科救急を受診していないことも判明した。そのため、実際に精神科救急にたどりつく患者の BPSD は重症なケースが多い。

#### 1 はじめに

近年、認知症患者、特に Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) への治療と対応も精神科医療の主要な対象になっているが、今後さらに、精神科医療全体における認知症医療の比率が増していくことは明らかである。当然ながら今後、認知症患者の精神科救急利用数も増加していくことが十二分に考えられ、将来的に認知症患者への対応で精神科救急システムが機能しなくなってしまう可能性も考えられる。

しかしながら、本邦において、認知症患者の精神科救急利用についての調査は、不十分であった。また、日本が高齢社会の最先端を走っているためと思われるが、国外においても BPSD の治療における精神科救急利用についての大規模な調査はなされておらず、BPSD と精神科救急の関係はよくわからない状態であった。

われわれは、平成 21～23 年度に精神科救急における BPSD の実態調査を行ったが、本稿では 2 つの調査結果<sup>4,5,7)</sup>をまとめて紹介する。また、筆者が勤務するさわ病院のデータをもとに、現場で実践されている精神科救急における BPSD への対応をまとめたい。

#### 2 BPSD を主訴として精神科救急を利用する患者の実態調査<sup>4,7)</sup>

そもそも、どのくらいの認知症患者が BPSD のために夜間休日時間帯に精神科を受診しているか実態を明らかにする必要がある、平成 21 年度に全国規模の調査を行った。

##### 1. 対象と方法

＜調査対象病院および調査対象者＞

日本精神科病院協会に所属している精神科病院の中で平成 21 年 4 月 1 日現在において、救急入院料病棟、急性期治療病棟、認知症疾患医療セン

Reality of the dementia patients who visit psychiatric emergency hospitals for the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD)

<sup>1)</sup> SHIMIZU Yoshiro and SAWA Yutaka 社会医療法人北斗会さわ病院〔〒 561-0803 大阪府豊中市城山町 1-9-13〕

<sup>2)</sup> SHIMIZU Yoshiro, KAZUI Hiroaki and TAKEDA Masatoshi 大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学講座精神医学

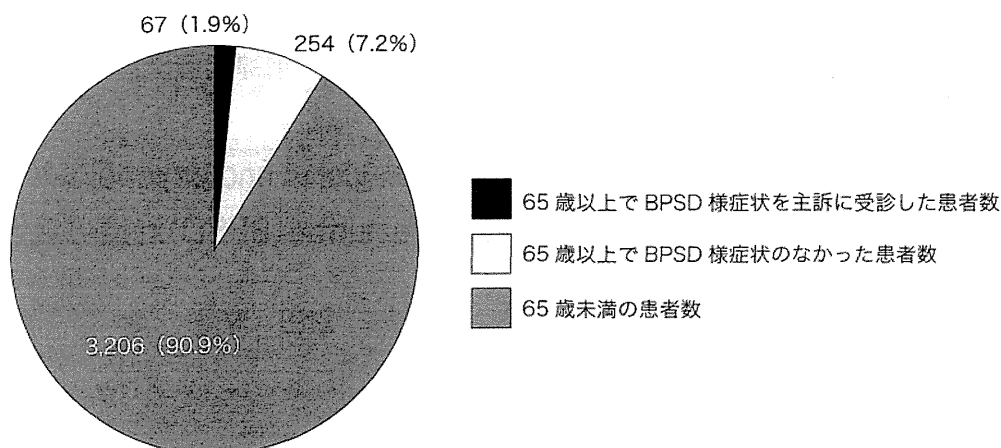


図1 平成21年10月1日～11月30日の間に夜間休日帯に受診した救急患者数と割合

ター、重度認知症デイケアのいずれか1つでも認可を受けている360病院を対象とした。

#### <方法>

調査期間は、平成21年10月1日～同年11月30日までの2カ月間とした。その調査期間内に、65歳以上でBPSD様症状を主訴として、夜間休日時間帯に上記の病院を受診した高齢患者についてアンケート調査を行った。受診動機となったBPSD様症状は、Neuropsychiatric Inventory-Nursing Home Version (NPI-NH)<sup>6)</sup>の12個の下位項目の中から選択(複数回答可)させた。なお、ここで「BPSD様」と表現するのは、精神科救急の現場では、精神症状が認知症によるものか精神病によるものかを判断するのが困難な場合があるためであり、その精神症状が少しでも認知症によるものと医師が疑った場合は、調査の対象としてもらった。

## 2. 結果

### 1) BPSD様症状のために精神科救急を利用した高齢患者の割合

360病院にアンケートを郵送し、143病院より回答を得た(回収率39.7%)。調査期間に年齢や疾患を問わず、1人でも夜間休日時間帯に患者が受診したのは102病院であった。これら102病院の2カ月間における夜間休日時間帯の受診患者総数は3,527例で、そのうち65歳以上の受診者総数は321例であった。BPSD様症状を主訴に受診した65歳以上の患者は67例で、これは夜間休日時間帯の受診患者総数のわずか1.9%であった(図1)。

### 2) BPSD様症状のために精神科救急を受診した高齢患者の詳細

#### ①患者の背景

67例の内訳は男性33例、女性34例で男女差はなかった。平均年齢 $79.4 \pm 6.4$ 歳(68～93歳)であった。BPSD様症状の発生場所は自宅44例(うち同居者有38例)、施設16例、一般病院4例、その他2例、無回答1例であった。数日以内に身体科コンサルトが必要な重篤な身体合併症については有りが8例、なしが57例、無回答が2例であった。そして受診後の転帰は入院46例、通院16例、施設入所4例、無回答1例であった。

#### ②BPSD様症状を主訴に受診した、67例の受診歴と診断

この67例の、直近1年間の精神科受診歴の有無と、有りの場合はその診断を図2に示す。受診歴があった患者の中では認知症と診断されていた患者が多かったが、約1/3は受診歴がなかった。事前に診断がなされていない患者も入院後あるいは外来通院後精査した結果、診断がなされた。その結果、認知症と診断されたのは合計47例(男性22例、女性25例、平均年齢 $80.8 \pm 6.2$ 歳(70～93歳)、直近1年間の精神科受診歴有り25例、なし16例、不明5例、無回答1例)であった。この47例の診断を図3に示す。入院したが診断未確定が3例、外来受診のみで終わったため診断をできなかった患者が5例であった。無回答は1例であった。

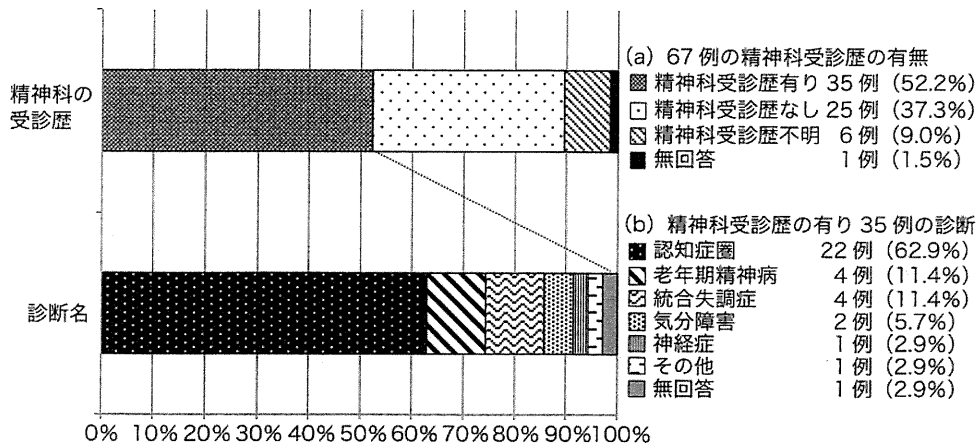


図2 夜間および休日時間帯にBPSD様の主訴で受診した67例の精神科受診歴およびその診断

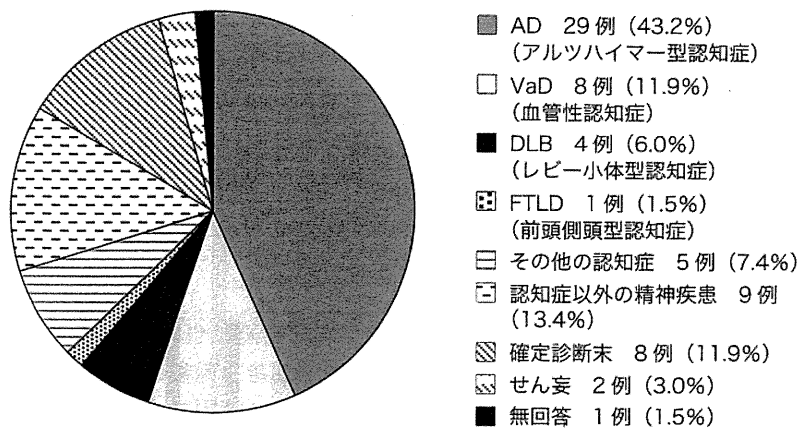


図3 夜間および休日時間帯にBPSD様の主訴で受診した67例の臨床診断  
AD:アルツハイマー型認知症, VaD:血管性認知症,  
DLB:レビー小体型認知症, FTLD:前頭側頭型認知症

③認知症と診断された47例における、受診の原因となったBPSDの内訳

認知症と診断された47例における、受診の原因となったBPSDは興奮、易怒性、異常行動、妄想、睡眠障害、幻覚の順に多かった(図4 (a))。アルツハイマー型認知症では興奮、異常行動、易怒性が、血管性認知症では興奮、易怒性が、レビー小体型認知症では幻覚、妄想が多かった(図4 (b))。

3. 考察

この調査で最も注目すべき結果は、調査した2カ月間の夜間休日帯において65歳以上でBPSD様症状を主訴に受診する患者は67例であり、全体のわずか1.9%にとどまったということである。

さらに、この中から明らかに認知症と診断されたのは、47例(1.3%)にすぎない。厚生労働省の資料<sup>1)</sup>によると、平成20年の時点で精神科外来患者は290.0万人おり、そのうち認知症の精神科外来患者は30.6万人(10.5%)である。今回の調査の1.3% (47例に診断が未確定な8例を加えても1.6%)をこの10.5%と比較すると、認知症患者が精神科救急を利用している割合は明らかに低いと考えられる。また、認知症は精神科だけでなく神経内科、老年内科などでも治療されており、このことを考慮すると、今回の調査で明らかになった精神科救急を利用した患者の割合はさらに低いと考えられる。この調査結果より、われわれは夜間

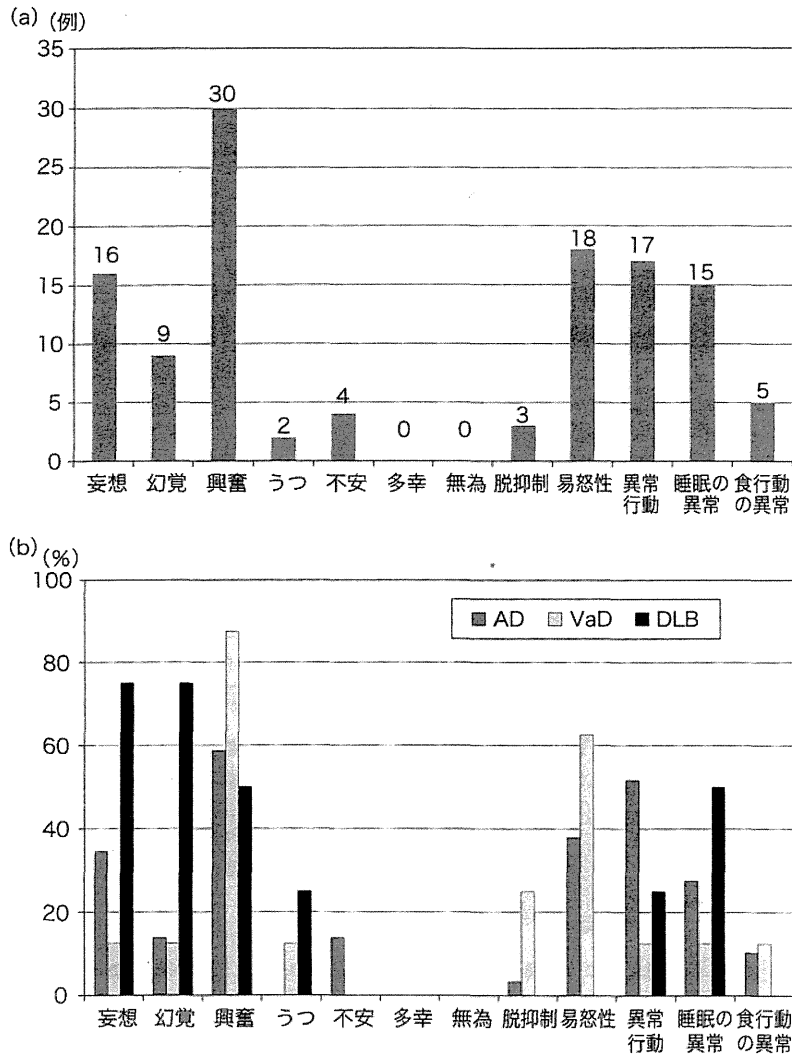


図4 受診の動機となったBPSDの内訳  
 (a) 全47例 棒グラフ上の数字は症例数(複数回答あり)  
 (b) AD, VaD, DLBの疾患別の受診の動機となったBPSDの内訳  
 AD:アルツハイマー型認知症, VaD:血管性認知症, DLB:レビー小体型認知症

休日時間帯にBPSDの治療を要するにもかかわらず、精神科救急の受診に至っていない(適切なサポートを受けられていない)認知症患者が多数存在しているのではないかと、という仮説を立てるに至った。また本調査では直近の精神科受診歴があるのは、67例中35例で52.2%にとどまったが、BPSDを有する患者が精神科救急の受診に至らない理由の1つに、そもそもBPSDの緊急的治療ができる医療機関があることすら知られていない可能性があると考えられた。

### 3 精神科救急受診に至っていない BPSD患者の実態調査<sup>5)</sup>

前述のように、BPSDを主訴として精神科救急を利用する患者は極めて少ないことが判明した。実際は夜間休日時間帯にBPSDで困っているのに、適切なサポートが受けられないケースが多いのではないかと、つまり前述の67例は氷山の一角であり、精神科救急受診に至っていないBPSD患者が実際には膨大にいるのではないかとわれわれ

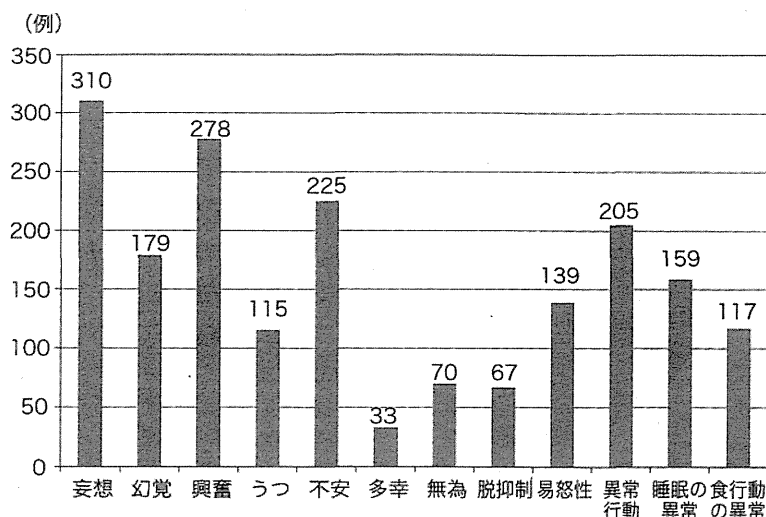


図5 最も対応に困った認知症患者701名の、特に困ったBPSD（複数回答あり）棒グラフの上の数字は症例数

は考えた。また、受診に至らない原因も調べる必要があり、平成22年度に次のような調査を行った。

### 1. 対象と方法

#### <対象>

平成22年9月から11月にかけて医療法人北斗会が主催した認知症に関する講演に参加した人たちの中で、認知症患者と接して困ったことがあるという方にアンケート調査を行った。また、平成22年12月豊中市内の居宅介護事業所全113箇所にも同様のアンケート調査を実施した。

### 2. 結果

#### 1) 回答者の内訳

有効回答は701名であった。回答者の内訳は、ケアマネジャー、民生委員、ヘルパー、一般市民、認知症患者家族、看護師の順であった。

#### 2) BPSDの内容と発生時間帯

「今まで接した中で1番対応に困った認知症患者1人を思い出して」もらい、その患者について回答をしてもらった。1番対応に困った認知症患者の生活状況は、自宅で同居者あり325名、自宅で独居248名、施設99名、その他17名、無回答11名であった。該当する認知症患者の特に対応に困ったBPSDをNPI-NHの12個の下位項目の中から選択（複数回答）させたところ、図5のとおりで、妄想、興奮/攻撃性、不安の順であった。BPSDが発生して1番対応に困った時間帯は平日日中318名、夕方から深夜0時124名、深夜から朝まで149名、休日日中19名、無回答90名であった（図6）。無回答を除くと、ほぼ半数が夜間のBPSDに1番困ったと回答したことになる。

り、妄想、興奮/攻撃性、不安の順であった。BPSDが発生して1番対応に困った時間帯は平日日中318名、夕方から深夜0時124名、深夜から朝まで149名、休日日中19名、無回答90名であった（図6）。無回答を除くと、ほぼ半数が夜間のBPSDに1番困ったと回答したことになる。

#### 3) BPSD診療のできる医療機関についての知識

BPSDを積極的に治療する医療機関を知っているかとの設問に対して、知っていたと回答したのは453名、知らなかったが188名、無回答が60名であった。認知症患者家族に限ると、知っていたと回答したのは半数以下であった。またケアマネジャーも、およそ5分の1が知らないと回答した。

#### 4) 夜間休日時間帯の受診

BPSDで1番困った人について夜間休日時間帯に医療機関をぜひ受診させたいと思ったかとの問いに対し、701名中96名が受診させたいと思い実際に医療機関を探したと回答した。また189名が受診させたいと思ったが医療機関を探さなかったと回答し、307名は受診させたいと思わなかったと回答した。無回答は109名であった（図7）。夜間休日時間帯に実際に医療機関を探した96名のうち、すぐに医療機関が見つかったのは28名、なかなか見つからなかったのは14名、見つからなかったのは43名、見つかったが受診を断られ

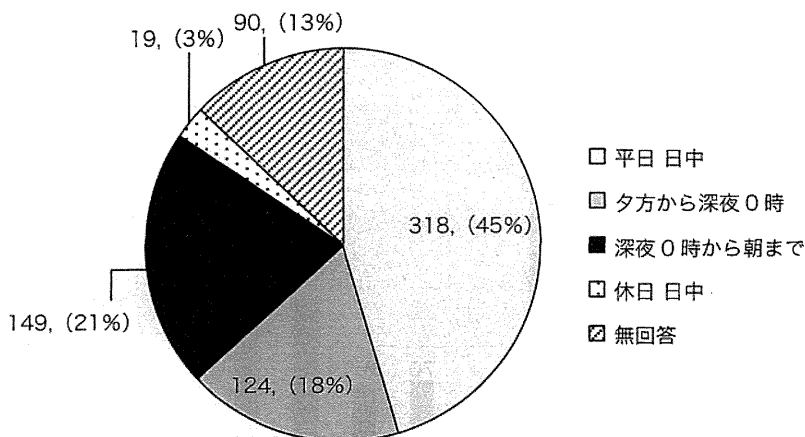


図6 最も対応に困った認知症患者701名のBPSDについて対応に困った時間帯

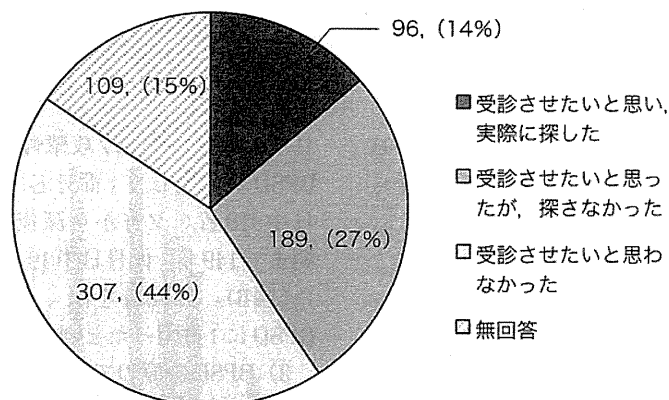


図7 最も対応に困った認知症患者701名を、夜間休日時間帯に医療機関に受診させたいと思ったかどうか

たのは11名であった(図8)。

#### 5)精神科救急を受診しなかった理由

夜間休日時間帯にぜひ受診させたいと思ったが医療機関を探さなかった理由を尋ねたところ、認知症患者の家族からは「自分以外の家族が反対した」、「どうしていいかわからなかった」、「自分ひとりでは連れて行けない」などの回答があった。ケアマネジャーは「家族が反対した」と「本人が反対した」との回答が圧倒的に多く、「受診させる医療機関があることが知らなかった」、「人手がない」、「近くに診てもらえる医療機関がない」などが続いた。ヘルパーも「家族が反対した」と「本人が反対した」と回答したのが多かった。本人や家族が反対した背景には、精神科受診に対する抵抗や偏見を指摘する回答が複数あった。

### 3. 考察

BPSD治療のため、夜間休日時間帯に医療機関を探し、実際に医療機関が見つかったのは96名のうち43件であった。しかしながら、受診させたいと思いつつも医療機関を探さなかった人を母数に含めると、医療機関にたどりつけたのは285件中42件で14.7%である。アンケートは「1番対応に困った人を1人思い出して回答してください」と依頼したので、現実を直接反映した数字ではないが、夜間休日時間帯に医療機関にたどり着けなかった事例はこれ以上に多いと考えられる。また、無回答を除くと回答者の半数が、過去に最低一度は夜間休日時間帯にBPSD治療のために医療機関を受診したいと答えている。つまり、われわれが考えていたように、夜間休日時間帯に



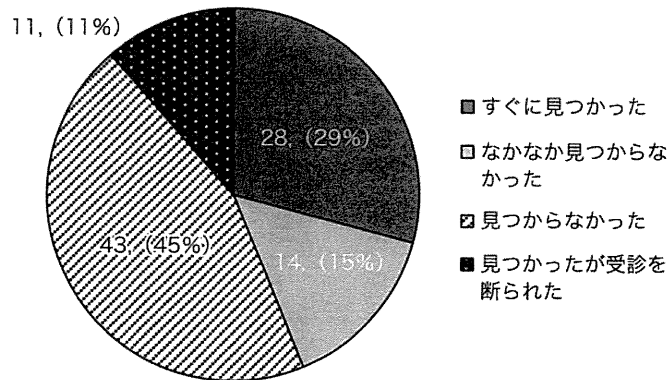


図8 夜間休日時間帯に医療機関を探した96名について、すぐに受診する医療機関が見つかったかどうか

BPSDで困っている認知症患者は多いが、実際に受診できている患者はわずかであることが判明した。

受診に至らない理由として、まずは、そもそもBPSDを治療できる医療機関があることを知らないことがあげられる。認知症患者家族で知っている回答したのが半分以下であり、介護保険制度で指導的な役割を果たすケアマネジャーですら、5分の1が知らないと回答した。さらに、仮に、夜間休日時間帯に精神科救急でBPSDの治療ができることを知っていたとしても、本人が受診に反対すると受診はかなり困難のようである。その理由として独居の認知症患者の場合やいわゆる老老介護の場合は、医療機関に連れていく人手が足りないことがあげられよう。また、ケアマネジャーやヘルパーなどの介護職員が受診の必要性ありと判断しても、本人が受診に反対をするのと同じくらい多い頻度で、家族が受診に反対し治療できないケースあることがわかった。精神科への偏見や敷居の高さのためと思われる。

#### 4 BPSDを主訴に受診した認知症患者への対応の実際

ここでは、さわ病院における、夜間休日時間帯にBPSDを主訴として受診した患者への対応を中心に、BPSDに対する救急対応について述べる。

##### 1. さわ病院に、BPSDを主訴に受診した患者

平成25年1月1日～12月31日までの1年間に、BPSDを主訴に夜間休日時間帯に受診した患者は

26例(男性12例、女14例、平均年齢78.4±6.04歳)であった。その転帰は外来受診のみが3例、入院は23例であった。外来受診3例のうち1例は、興奮を主訴に受診したが、実は意識障害であり外来で精査の結果、重度の低ナトリウム血症が判明し、同日他院へ転送となった。同期間の夜間休日時間帯にさわ病院に受診した患者総数は1,627例であり、BPSDを主訴に受診した26例は全体の1.6%であった。また、同期間に入院した患者総数は388例であり、BPSD治療のために入院した23例は全体の5.9%であった。26例の診断の内訳はADが13例、DLB3例、VaD1例、VaD+アルコール依存症1例、せん妄2例(内、ADがベースにあるのが1例)、入院後数日後送や転院するなどの理由で診断ができなかったのが6例であった。

##### 2. 入院後の行動制限の必要性

入院となった23例中、入院と同時に隔離を要したものが5例、隔離と身体的拘束を要したものが8例と、なんらかの行動制限を要したのが15例(65.2%)であった。隔離や身体的拘束はしなかったものの、個室対応を要したものが7例(30.4%)であった。夜間休日時間帯にBPSDの治療を要する患者は潜在的に多いが、実際に医療機関を受診する患者は少ないことはすでに述べた。なかなか受診できない患者を、やっとのことで家族や関係者がその時間帯に連れてくるのだから、BPSDはかなり重いものと考え。平成21年度の調査でもBPSD様症状を主訴に受診した67例中、入院は46例(68.7%)であった。そのため、受診の依頼

を受けた病院は、受診イコール入院と想定したうえで、隔離のできる保護室や身体的拘束に対応できる病室を準備しておかねばならない。

### 3. 入院後の薬物治療

入院23例中、入院直後に身体管理上、持続点滴を要したものが4例であった。また、入院したものの脳挫傷が判明したために翌日転院したものが1例あった。向精神薬の使用に関しては、入院直後は前医の処方薬を継続し経過を観察したものは6例、前医の向精神薬を減薬したものは4例あった。また入院時に抗精神病薬を新たに追加処方した症例はほぼ半数であったが、そのうち、オランザピンの筋肉注射を使用した症例が1例あった。それ以外は内服薬のみで、アリピプラゾール、クエチアピン、リスペリドン、オランザピンの順に使用頻度が高かった。これらの多くは頓服での処方であった。入院前の向精神薬の継続、もしくは減薬、および新たな抗精神病薬は頓服が多い理由は、入院という環境変化だけでも患者のBPSDが大きく変化するため、その患者にとって適切な向精神薬の使用量が入院直後ではわからず、過鎮静や誤嚥、転倒などを防ぐためである。なお、日本精神科救急学会では、精神科救急ガイドライン<sup>2)</sup>が作成されており、精神科救急の場面でどのような薬物治療を行うべきか示されているが、主として統合失調症患者を想定しており、認知症患者については記載されていない。日本神経学会が作成した認知症疾患治療ガイドライン2010<sup>3)</sup>では、認知症患者の焦燥性興奮を改善する目的として非定型精神薬のリスペリドン、クエチアピン、オランザピン、アリピプラゾールの使用が推奨されている(グレードB)。また、バルプロ酸とカルバマゼピンは必要な場合は考慮してよいとされている(グレードC1)。認知症患者の幻覚妄想には非定型抗精神病薬のリスペリドン、オランザピン、アリピプラゾールが推奨されている(グレードB)。また、暴力や不穏にはリスペリドンやその他の非定型抗精神病薬、気分安定薬が使用の候補とされている(グレードC1)。しかしながら、非定型精神薬は適用外使用のため、本人と家族に十分説明して、有害事象に留意しながら使用しなければならない。特に、レビー小体型認知症は抗精神病

薬に過敏に反応することは広く知られているが、救急で診療する時点では未診断であったり、診断がついていても当事医に適切な情報が届いていないケースも十分想定されるため、抗精神病薬の使用は慎重にならざるをえない。

## 5 まとめ

精神科救急において、BPSDを主訴に受診する患者は極めて少ない。一方で、夜間休日時間帯に治療の必要性があるにもかかわらず、受診に至っていないBPSD患者が多数存在する。精神科救急でBPSD治療ができることが周知されていないことに加え、精神科治療への心理的な抵抗や偏見が、実際に受診に至る患者を少なくさせていると思われる。そしてこのような抵抗や偏見があるにもかかわらず実際に受診に至った患者のBPSDの症状は重く、行動制限を要するケースが多かった。しかしながら、現在、受診に至っていない多数のBPSD患者が精神科救急に殺到してしまうと、精神科救急が機能しなくなる恐れがある。そもそも救急診療はやむをえないときに利用する最終の診療手段であり、救急医療を利用しなくても良いように、BPSDを早期から、かつ継続的に診療する必要がある。そのためにも日常診療としてBPSDを治療する医療機関があることを、患者家族や介護職員に対して啓発する必要がある。認知症の診療は神経内科や老年科でも行われているが、BPSDの治療は(重症の場合はなおさら)精神科が中心になる。患者や患者家族は精神科への受診に抵抗を持っているケースが多いが、早期から継続的な受診を促すには国や自治体からの啓発以外にも、かかりつけ医やケアマネジャーからの助言や指導が重要と考える。

謝辞：本稿で紹介した成果は、平成21～23年度厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業「認知症の行動心理症状に対する原因疾患別の治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究(研究代表者:数井裕光)」の助成を受け行った研究の一部である。また、アンケート調査にご協力いただいた日本精神科病院協会所属の病院の先生方、北斗会さわ病院の講演会に参加した皆様、豊中市内の居宅介護事業所の皆様に深謝いたします。

## 文献

- 1) 厚生労働省：精神科医療の機能分化と質の向上等に関する検討会（第1回），平成24年3月23日  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200000264pr-att/2r985200000264x9.pdf> (2014年4月2日確認)
- 2) 日本精神科救急学会：精神科救急ガイドライン(2)（薬物療法），2009年12月9日版 <http://www.jaep.jp/gl/gl-2-2.pdf> (2014年4月2日確認)
- 3) 日本神経学会「認知症疾患治療ガイドライン」作成合同委員会：認知症疾患治療ガイドライン2010. 医学書院，東京，2010
- 4) 澤 温，清水芳郎：認知症のBPSDに対する原因疾患別治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究. 精神科救急におけるBPSDに関する研究：認知症の行動心理症状に対する原因疾患別の治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究 平成21年度総括・分担研究報告書，pp20-43，2010
- 5) 澤 温，清水芳郎：認知症のBPSDに対する原因疾患別治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究. 精神科救急におけるBPSDに関する研究：認知症の行動心理症状に対する原因疾患別の治療マニュアルと連携クリニカルパス作成に関する研究 平成22年度総括・分担研究報告書 101-112，2011
- 6) 繁信和恵，博野信次，田伏 薫ほか：日本語版NPI-NHの妥当性と信頼性の検討. Brain and Nerve：神経研究の進歩 60：1463-1469，2008
- 7) 清水芳郎，数井裕光，澤 温ほか：Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD) の治療目的で精神科救急を受診する高齢患者の実態調査. 精神神経学雑誌 115：1113-1121，2013

\*

\*

\*

ORIGINAL ARTICLE

***In vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of *Aegle marmelos* leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease**

Md. ASADUZZAMAN,<sup>1</sup> Md. Josim UDDIN,<sup>1</sup> M.A. KADER,<sup>1</sup> A.H.M.K. ALAM,<sup>1</sup> Aziz Abdur RAHMAN,<sup>1</sup> Mamunur RASHID,<sup>1</sup> Kiyoko KATO,<sup>2</sup> Toshihisa TANAKA,<sup>2</sup> Masatoshi TAKEDA<sup>2</sup> and Golam SADIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, University of Rajshahi, Rajshahi, Bangladesh; and <sup>2</sup>Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Correspondence: Dr Golam Sadik PhD, Department of Pharmacy, Rajshahi University, Rajshahi 6250, Bangladesh. Email: gsadik2@yahoo.com

Received 1 April 2013; revision received 18 August 2013; accepted 27 August 2013.

**Abstract**

**Background:** Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder clinically characterized by loss of memory and cognition. The effective therapeutic options for AD are limited and thus there is a demand for new drugs. *Aegle marmelos* (Linn.) (*A. marmelos*) leaves have been used in traditional medicine to promote intellect and enhance memory. In this study, we evaluated *A. marmelos* for its acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity and antioxidant property *in vitro* in the treatment of AD.

**Methods:** A crude methanol extract and four fractions (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and aqueous) were prepared from the leaves of *A. marmelos*. The preparations were assessed for AChE inhibitory activity by the Ellman method, and their antioxidant properties were assessed by several assays: reducing power, scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical and hydroxyl radical, and inhibition of lipid peroxidation. Qualitative and quantitative analyses of endogenous substances in *A. marmelos* were performed by the standard phytochemical methods.

**Results:** Among the different extracts tested, the ethyl acetate fraction exhibited the highest inhibition of AChE activity. In the same way, ethyl acetate fraction showed the highest reducing activity and radical scavenging ability towards the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (half maximal inhibitory concentration = 3.84 µg/mL) and hydroxyl free radicals (half maximal inhibitory concentration = 5.68 µg/mL). The antiradical activity of the ethyl acetate fraction appeared to be similar to that of the reference standard butylated hydroxytoluene and catechin used in this study. In addition, the ethyl acetate fraction displayed higher inhibition of brain lipid peroxidation. Phytochemical screening of different extractives of *A. marmelos* showed the presence of phenols and flavonoids, alkaloid, saponin, glycoside, tannin and steroids. Quantitative analysis revealed higher contents of phenolics (58.79-mg gallic acid equivalent/g dried extract) and flavonoids (375.73-mg gallic acid equivalent/g dried extract) in the ethyl acetate fraction.

**Conclusion:** The results suggest that the ethyl acetate fraction of *A. marmelos* is a significant source of polyphenolic compounds with potential AChE inhibitory property and antioxidant activity and, thus, may be useful in the treatment of AD.

**Key words:** acetylcholinesterase inhibition, *Aegle marmelos*, Alzheimer's disease, antioxidant activity, phytochemical screening.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), a major cause of mortality in elderly people, is a progressive neurodegenerative disorder characterized by a gradual loss of memory, cognition and behavioural abnormalities. The pathological hallmarks of AD are profound loss of cholinergic neurons, senile plaque consisting of Abeta protein, and neurofibrillary tangles of microtubule-associated protein tau.<sup>1-5</sup> Although there has been tremendous progress in understanding the aetiology and pathogenesis of AD, effective drugs remain limited.

Extensive loss of cholinergic neurons, particularly in the basal forebrain is a prominent feature observed in AD patients that is accompanied by deficiency of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter found in the synapses of the cerebral cortex.<sup>6-8</sup> The loss of cholinergic neurons and the associated decrease in levels of ACh has been found to correlate well with the cognitive impairment seen in AD patients.<sup>9</sup> Therefore, elevating ACh by inhibiting acetylcholinesterase (AChE), which is involved in the breakdown of ACh, appears to improve the symptoms of cognitive deficit in AD and serves as an important strategy in the development of drugs. To date, only three cholinesterase inhibitors, donepezil, galantamine and rivastigmine, have been approved by the US Food and Drug Administration to treat AD.<sup>10,11</sup> These drugs have ameliorated symptoms and improved the functioning of patients with AD, but none can completely restrict or reverse the progression of AD.<sup>12</sup>

A substantial body of evidence implicates oxidative stress in the aetiology and pathogenesis of AD. It has been shown that the reactive oxygen species (ROS) and other free radicals, which are formed and accumulated during oxidative stress as a result of an imbalance between their production and removal by the antioxidant system, induce cellular and molecular abnormalities in sporadic AD.<sup>13-16</sup> Although the exact mechanisms underlying these deleterious effects remain unclear, it is known that oxidative stress occurs before the formation of neurofibrillary tangles and senile plaques, both of which are hallmarks of AD.<sup>17,18</sup> It has been further demonstrated that Abeta protein, the major component of senile plaque in the brain of AD patients, causes an increase in free radical production in neuronal cells, leading to oxidative stress and cell death.<sup>19,20</sup> Therefore, antioxidants have been suggested as therapies to prevent, delay or ameliorate the pathological changes underlying the progression of

AD.<sup>21,22</sup> Recently, there has been increasing interest in the natural antioxidants contained in the medicinal plants, which are candidates to prevent oxidative damage.<sup>23,24</sup>

*Aegle marmelos* (*A. marmelos*), commonly known as bael and belonging to the family Rutaceae, is a tree widely distributed throughout Bangladesh. The medicinal properties of *A. marmelos* are well described in Ayurveda, traditional Indian medicine.<sup>25</sup> The leaf of this plant has a folkloric reputation for promoting intellect and enhancing memory.<sup>26</sup> Traditionally, the plant has been used to treat fever, diabetes, diarrhoea, abscesses and snake bites. Phytochemical investigations of *A. marmelos* demonstrated several active elements including marmelosin, marmelide, luvangetin, auraptene, psoralen and tannin.<sup>27,28</sup> The extract of the plant has been reported to possess important pharmacological effects including anti-diabetic, anti-hyperlipidaemic, contraceptive, anti-diarrhoeal, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory, antimicrobial and anti-proliferative effects.<sup>28-34</sup> A preliminary study has shown that *A. marmelos* has 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity.<sup>29</sup>

Although *A. marmelos* has important medicinal values for the treatment of AD, no studies have yet examined its anti-AD capabilities. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inhibition of AChE activity and antioxidant properties of *A. marmelos* leaves in order to treat AD.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Aluminium chloride, ammonium molybdate, ascorbic acid (AA), bicinechonic acid, DPPH, Folin-Ciocalteu reagent, Tris-HCl and Triton X-100 were obtained from Sigma-Aldrich (Bangalore, India). Gallic acid was obtained from Wako Pure Chemical Company Ltd (Osaka, Japan). 2-deoxy-D-ribose, thiobarbituric acid, (+)-catechin, 5,5'-dithio-bis-(2-nitro) benzoic acid, acetylthiocholine iodide and donepezil were obtained from Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan). Unless otherwise specified, all other chemicals were of analytical grade.

### Plant materials

The leaves of *A. Marmelos* were collected from the city of Rajshahi, Bangladesh, and identified by an expert taxonomist. A voucher specimen was submitted to the

herbarium of the Department of Botany, Rajshahi University.

### Extraction

The leaves of *A. marmelos* were dried at room temperature for 9 days, finely powdered and used for extraction. Powdered leaves (500 g) were placed in an amber-coloured reagent bottle and soaked in 1.5-L methanol. The contents were sealed in the bottle for 7 days and occasionally shaken and stirred. The whole mixture was filtered through cotton and then through Whatman No. 1 filters paper, and the filtrate was concentrated with a rotary evaporator under reduced pressure at 50°C to obtain the crude methanol extract (CME) (13.485 g). An aliquot (10 g) of the concentrated methanol extract was fractionated as described previously,<sup>35</sup> and the resultant soluble fractions of petroleum ether (PEF, 2.693 g), chloroform (CLF, 1.834 g), ethyl acetate (EAF, 1.580 g) and aqueous (AQF, 6.195 g) were obtained for the experiment.

### Phytochemical screening of the plant extract

The extracts were tested to determine the presence of various phytochemicals, including tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, glycosides and steroids in accordance with the methods described.<sup>35</sup>

### Determination of total phenolic content

Total phenolic content of the different extracts from *A. marmelos* was determined with the Folin–Ciocalteu reagent.<sup>36</sup> The reaction mixture contained 0.5-mL plant extract or standard solution at different concentrations, 2.5-mL Folin–Ciocalteu reagent (diluted 10 times with water) and 2.5-mL sodium carbonate solution (7.5%). The test tube was incubated for 20 min at 25°C to complete the reaction, and the absorbance of the reaction mixture was measured at 760 nm. Gallic acid was used as the standard and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE)/g of dried extractives.

### Determination of total flavonoid content

Total flavonoid content of the different *A. marmelos* extracts was determined by the aluminium chloride colorimetric method.<sup>37</sup> The plant extract (1.0 mL) was added to 3.0-mL methanol, 0.2-mL 10% AlCl<sub>3</sub>, 0.2-mL 1 M potassium acetate and 5.6-mL distilled water. The test tube was then incubated at room temperature for 30 min to complete the reaction. The absorbance of

the solution was measured at 420 nm. Gallic acid was used as standard and the results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g of dried extractives.

### Determination of reducing power

The reducing power of different *A. marmelos* extracts was evaluated using the method employed by Oyaizu.<sup>38</sup> Various concentrations of plant extract or standard solutions (1 mL) were mixed with 2.5-mL potassium buffer (0.2 M) and 2.5-mL potassium ferricyanide. After heating for 20 min at 50°C, 2.5-mL trichloroacetic acid (10%) solution was added to the test tube. The total mixture was centrifuged at 3300 g for 10 min. Next, 2.5-mL supernatant solution was withdrawn from the mixture and mixed with 2.5-mL distilled water and 0.5-mL ferric chloride (0.1%) solution. The absorbance was measured at 700 nm. AA was used for comparison.

### Determination of DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity of the different *A. marmelos* extracts was determined according to the method reported by Choi *et al.* with slight modifications: 2-mL methanol solution of plant extract or reference standard butylated hydroxytoluene at different concentration was mixed with 3-mL methanol solution of DPPH in the test tube.<sup>39</sup> The test tube was incubated at room temperature for 30 min in a dark place to complete the reaction. The absorbance of the solution was measured at 517 nm. DPPH free radical scavenging ability (%) was calculated with the following formula:

$$\frac{(A_{\text{absorbance of control}} - A_{\text{absorbance of sample}})}{A_{\text{absorbance of control}}} \times 100$$

### Determination of hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical scavenging activity of different *A. marmelos* extracts was determined by the method described by Elizabeth *et al.* but with a slight modification.<sup>40</sup> The assay is based on the quantification of the degradation product of 2-deoxyribose by condensation with thiobarbituric acid. Hydroxyl radical was generated by the Fe<sup>3+</sup>-ascorbate-EDTA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system (the Fenton reaction). In a final volume of 1 mL, the reaction mixture contained 2-deoxy-2-ribose (2.8 mM);

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH buffer (20 mM, pH 7.4); FeCl<sub>3</sub> (100 μM); EDTA (100 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.0 mM); ascorbic acid (100 μM); and various concentrations of the test sample or reference compound catechin (CA). After incubation for 1 h at 37°C, 0.5-mL reaction mixture was added to 1-mL 2.8% trichloroacetic acid, then 1-mL 1% aqueous thiobarbituric acid was added, and the mixture was incubated at 90°C for 15 min to develop the colour. After it cooled, the mixture's absorbance was measured at 532 nm against an appropriate blank solution. Hydroxyl radical scavenging ability (%) was calculated by using the formula:

$$\frac{((A_{\text{absorbance of control}} - A_{\text{absorbance of sample}}) / A_{\text{absorbance of control}}) \times 100}$$

#### Determination of lipid peroxidation inhibition activity

The inhibition of lipid peroxidation activity was determined according to the method described by Liu *et al.* with a slight modification.<sup>41</sup> The 150-g adult long Evan rats were anaesthetized with sodium phenobarbitone. The rats' brain were dissected and homogenized with a homogenizer in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) to produce a 1/10 homogenate. The homogenate was centrifuged at 10 000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was used as liposome for an *in vitro* lipid peroxidation assay. The ability of plant extract to inhibit lipid peroxidation was studied by incubating rat brain homogenates treated with hydrogen peroxide (10 μM) and different concentrations of plant extract. Hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in the rat brain homogenates. Lipid peroxides reacted with thiobarbituric acid to form a pink product, thiobarbituric acid reacting substances, measurable colorimetrically at 532 nm. The difference between the control and plant extract treated sample was the measured decrease in thiobarbituric acid reacting substances formation, reflecting reduced hydroxyl radical-induced lipid peroxidation. CA was used as the reference standard for comparison.

#### Determination of AChE inhibitory activity

The AChE inhibitory assay was performed according to the colorimetric method by Ellman *et al.*,<sup>42</sup> with acetylthiocholine iodide as a substrate. For the enzyme source, the rat brains were homogenized in a homogenizer with five volumes of a homogenation buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.2), which contained 1 M NaCl,

50 mM MgCl<sub>2</sub> and 1% Triton X-100), and centrifuged at 10 000 *g* for 30 min. The resulting supernatant was used as an enzyme source. All of the extraction steps were carried out at 4°C. Protein concentration was determined by using a bicinchoninic acid kit (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) with bovine serum albumin as a protein standard. The rates of hydrolysis by AChE were monitored spectrophotometrically. Each extract or standard (500 μL) was mixed with an enzyme solution (500 μL) and incubated at 37°C for 15 min. Absorbance at 405 nm was read immediately after adding Ellman's reaction mixture (3.5-mL 0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5, 5'-dithio-bis (2-nitro benzoic acid)) in a 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) to the above reaction mixture. Reading was repeated for 10 min at 2 min intervals to verify that the reaction occurred linearly. The blank reaction was measured by substituting saline for the enzyme. Donepezil was used as a positive control. The percentage inhibition of AChE activity was calculated using the following formula:

$$\frac{((A_{\text{absorbance of control}} - A_{\text{absorbance of sample}}) / A_{\text{absorbance of control}}) \times 100}$$

#### Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate. Data were presented as mean ± SD. Free R-software version 2.15.1 (<http://www.r-project.org/>) and Microsoft Excel 2007 (Roselle, IL, USA) were used for the statistical and graphical evaluations. Significant differences (*P*-value <0.05) between the means were determined using the *t*-test.

## RESULTS

#### AChE inhibitory activity

Reduction of ACh in the hippocampus and cortex of the brain is one of the most important remarkable changes observed in AD.<sup>5-8</sup> Therefore, elevation of ACh level in the synaptic cleft by inhibition of AChE, which is involved in the breakdown of ACh, is an accepted therapeutic strategy for AD. The inhibitory activity of CME derived from *A. marmelos* against rat brain AChE was determined by Ellman's method.<sup>41</sup> This method estimates AChE using acetylthiocholine iodide (substrate) and dithiobis nitro benzoic acid. The enzymatic activity was measured by the yellow colour compound produced by thiocholine when it reacts with dithiobis nitrobenzoate ion. The result of the

**Table 1** AChE inhibitory activity of different extractives from *Aegle marmelos*

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CME	PEF	AChE Inhibition (%)		AQF	Donepezil
			CLF	EAF		
50	16.20 $\pm$ 2.41 <sup>c</sup>	8.75 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	13.48 $\pm$ 1.75 <sup>b</sup>	23.68 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	17.71 $\pm$ 1.49 <sup>d</sup>	92.76 $\pm$ 2.15 <sup>f</sup>
100	29.55 $\pm$ 1.72 <sup>c</sup>	14.07 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	22.06 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	36.95 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	31.46 $\pm$ 2.00 <sup>d</sup>	97.14 $\pm$ 0.99 <sup>f</sup>
200	35.78 $\pm$ 1.56 <sup>c</sup>	20.37 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	29.87 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>	47.58 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	40.13 $\pm$ 1.74 <sup>d</sup>	98.58 $\pm$ 1.43 <sup>f</sup>

AChE, acetylcholinesterase; AQF, aqueous fraction; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; PEF, petroleum ether fraction. <sup>a-f</sup>Means between columns differ significantly ( $P < 0.05$ ) in each concentration.

AChE inhibitory activity of CME is shown in Table 1. The extract showed AChE inhibitory activity in a concentration-dependent manner. CME was found to inhibit AChE activity by 29% at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ , while donepezil, used as the reference standard in this study, inhibited the AChE activity by 97% under the same experimental condition. To further understand the activity of the plant, CME was partitioned successively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and water, and the resulting fractions were evaluated similarly. Among the fractions, EAF showed the highest activity with 37% inhibition of AChE activity followed by AQF, CLF and PEF with 31%, 22% and 14% inhibition, respectively. Our results demonstrate that *A. marmelos* has a moderate AChE inhibitory activity.

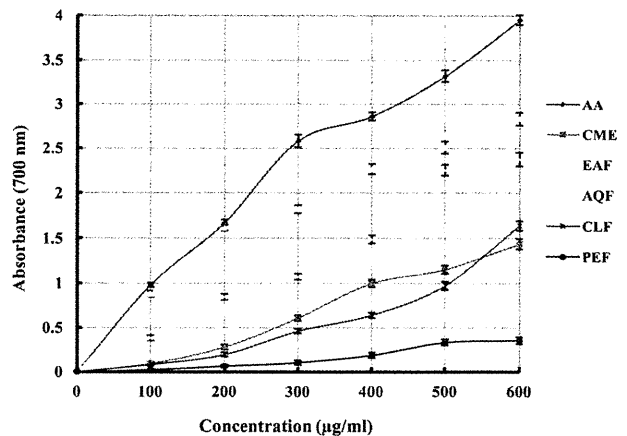
### Antioxidant activity

#### Reducing power assay

The reducing capacity of a compound is a significant indicator of its potential antioxidant activity because of its ability to break the free radical chain through donation of a hydrogen atom. The reducing capacity of the different extracts was evaluated by the method described by Oyaizu,<sup>38</sup> which is based on the reduction of the  $\text{Fe}^{3+}$ -ferricyanide complex to the ferrous form by donating an electron. Figure 1 depicts the reducing power of CME, EAF, CLF, AQF, PEF and the reference standard AA. All the test extracts showed considerable reducing power; 100–600-mg/mL EAF, CLF, AQF, PEF and CME gave an absorbance within the 0.025–2.835 range. All the extracts increased the absorbance significantly, further demonstrating the antioxidant potential of *A. marmelos*. The reducing power of the different extracts and reference standard was in the following order: PEF < CME < CLF < AQF < EAF < AA.

#### DPPH radical scavenging activity

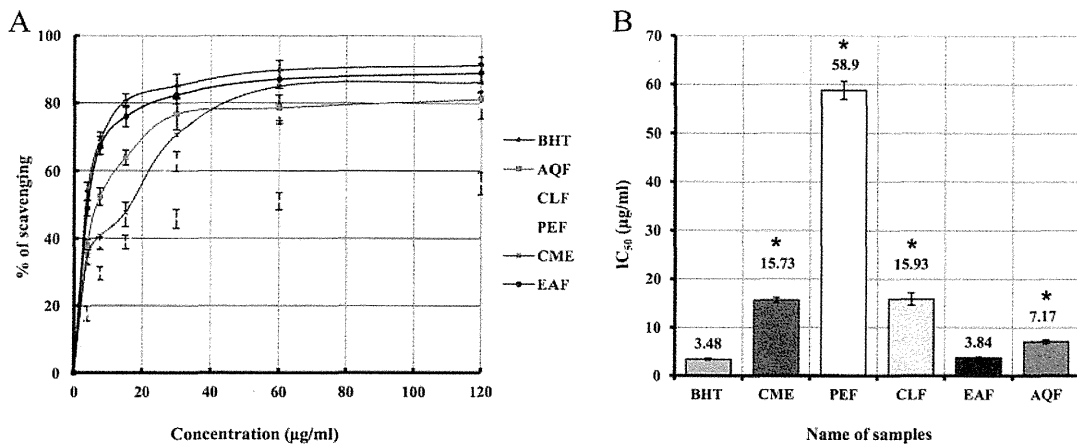
Radical scavenging activities are very important to prevent the deleterious role of free radicals in AD. The



**Figure 1** The reducing power of different *Aegle marmelos* extracts compared with the standard. Reducing power was measured by ferric reducing power assay. Results are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). AA, ascorbic acid; AQF, aqueous fraction; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; PEF, petroleum ether fraction.

stable DPPH radical scavenging model is a widely used method to evaluate the free radical scavenging ability of various samples, including plant extracts, because of the relatively short time required for analysis. DPPH antioxidant assay is based on the ability of DPPH, a stable free radical, to decolourize in the presence of antioxidants that can be quantitatively measured from the change in absorbance; the percentage of scavenging activity is then calculated. The results of DPPH radical scavenging assays of CME, EAF, CLF, AQF, PEF and butylated hydroxytoluene are given in Figure 2. A significant decrease in the concentration of DPPH radical was observed due to the test extracts' free radical scavenging ability. The percentage of scavenging DPPH radicals at various concentrations of the extracts indicated that EAF has potential scavenging activity with a half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) value of  $3.84 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ , which is comparable to that of the reference standard butylated





**Figure 2** DPPH radical scavenging activity of different *Aegle marmelos* extracts compared with the standard. DPPH radical scavenging activity was measured spectrophotometrically using DPPH free radicals. (a) Percentage of DPPH radical scavenging by different concentrations of the extracts and reference standard BHT. Results represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (b) IC<sub>50</sub> (mean  $\pm$  SD) for DPPH radical scavenging activity of the extracts and BHT. \*Values that significantly differed ( $P < 0.05$ ) from the reference standard. AQF, aqueous fraction; BHT, butylated hydroxytoluene; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; EAF, ethyl acetate fraction; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; PEF, petroleum ether fraction.

hydroxytoluene (IC<sub>50</sub> = 3.48  $\pm$  0.17  $\mu$ g/mL). AQF, CME and CLF also showed good antiradical activity with IC<sub>50</sub> values of 7.17  $\pm$  0.36, 15.73  $\pm$  0.51 and 15.93  $\pm$  1.24  $\mu$ g/mL, respectively. PEF had the lowest activity with an IC<sub>50</sub> of 58.90  $\pm$  1.86  $\mu$ g/mL.

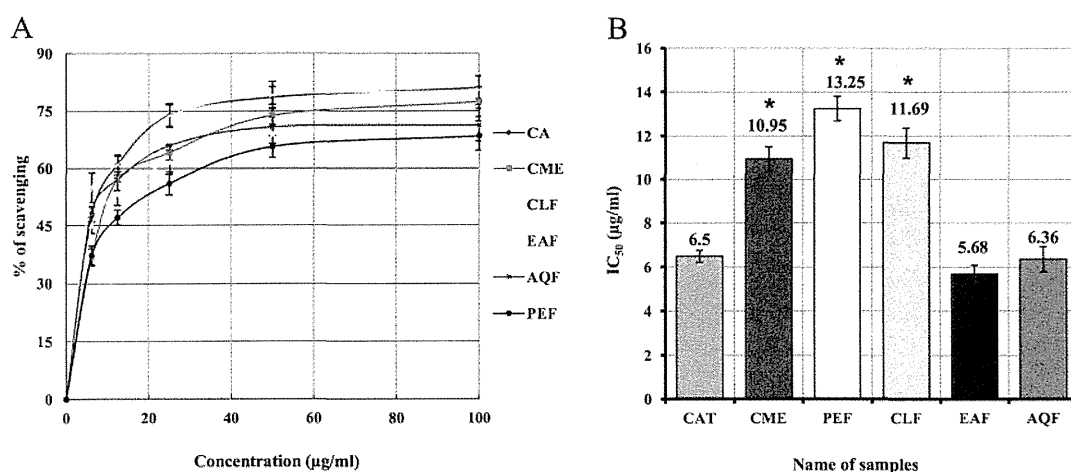
**Hydroxyl radical scavenging activity**

Several studies have indicated that Abeta induces apoptosis and neuronal cell death by producing ROS, which leads to the peroxidation of membrane lipids and oxidative stress.<sup>15,19,20</sup> Hydroxyl radicals are the major reactive oxygen species causing lipid oxidation and enormous biological damage.<sup>43</sup> To determine the extracts' hydroxyl radical scavenging capacity, the effect of each extract on hydroxyl radical generated in an Fe<sup>3+</sup>-ascorbate-EDTA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system (the Fenton reaction) was analyzed by evaluating the degree of deoxyribose degradation (Fig. 3). All the extracts scavenged the hydroxyl radicals generated in the reaction and prevented degradation of deoxyribose. The hydroxyl scavenging activity of all the extracts was significant. The results demonstrated that EAF and AQF are strong hydroxyl radical scavengers with respective IC<sub>50</sub> values of 5.68  $\pm$  0.41 and 6.36  $\pm$  0.58  $\mu$ g/mL, which appeared to be similar to that of the reference standard CA with IC<sub>50</sub> of 6.50  $\pm$  0.27  $\mu$ g/mL. In contrast, CME, CLF and PEF showed similar activity

with IC<sub>50</sub> of 10.95  $\pm$  0.56, 11.69  $\pm$  0.69 and 13.25  $\pm$  0.56  $\mu$ g/mL, respectively.

**Lipid peroxidation inhibition activity**

Lipid peroxidation has been reported to be elevated in the brains of AD patients.<sup>15,44,45</sup> Reactive oxygen species produced by Abeta protein have numerous pathological effects including lipid peroxidation and cellular degeneration in AD. During lipid peroxidation, low molecular weight end products, generally malonaldehyde, are formed by oxidation of polyunsaturated fatty acids that may react with two molecules of thiobarbituric acid to produce a pinkish red chromogen.<sup>46</sup> In the lipid peroxidation assay, the activity of *A. marmelos* extract against non-enzymatic lipid peroxidation in rat brain homogenate was evaluated (Table 2). The addition of Fe<sup>2+</sup>-ascorbate to the brain homogenate caused an increase in lipid peroxidation. All the test extracts significantly inhibited brain lipid peroxidation in a concentration-dependent manner. The percentage of lipid peroxidation inhibition at the different concentrations of the extracts indicated that CME possessed the greatest potential inhibitory activity. This extract inhibited lipid peroxidation by 47% at a concentration of 100  $\mu$ g/mL, while CA, used as the reference standard, decreased the lipid peroxidation by 59% under the same experimental condition. Among the different fractions, EAF and



**Figure 3** Hydroxyl radical scavenging activity of different *Aegle marmelos* extracts compared with the standard. Hydroxyl radical scavenging was measured by the Fenton reaction initiated deoxyribose degradation method. (a) Percentage of hydroxyl radical scavenging by different concentrations of the extracts and reference standard CA. Results represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (b) IC<sub>50</sub> (mean  $\pm$  SD) for hydroxyl radical scavenging activity of the extracts and CA. \*Values that significantly differed ( $P < 0.05$ ) from the reference standard. AQF, aqueous fraction; CA, (+) catechin; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; PEF, petroleum ether fraction.

**Table 2** Inhibition of hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates by different extracts of *Aegle marmelos*

Concentration (µg/mL)	Inhibition (%)					
	CME	PEF	CLF	EAF	AQF	Catechin
50	23.39 $\pm$ 1.63 <sup>b</sup>	18.75 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	21.79 $\pm$ 1.99	25.77 $\pm$ 1.67 <sup>c</sup>	31.28 $\pm$ 1.69 <sup>d</sup>	47.34 $\pm$ 2.57 <sup>e</sup>
100	47.81 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	24.50 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>	30.17 $\pm$ 2.52 <sup>b</sup>	37.61 $\pm$ 2.28 <sup>c</sup>	40.29 $\pm$ 1.88 <sup>d</sup>	59.85 $\pm$ 4.37 <sup>f</sup>
200	53.95 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>	25.77 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	30.67 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>	39.55 $\pm$ 2.57 <sup>c</sup>	42.19 $\pm$ 2.65 <sup>d</sup>	65.54 $\pm$ 2.27 <sup>f</sup>

AQF, aqueous fraction; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; PEF, petroleum ether fraction. <sup>a-f</sup>Means between columns differ significantly ( $P < 0.05$ ) in each concentration.

AQF exhibited higher inhibitory activity that reduced lipid peroxidation by 38% and 40%, respectively, at the same concentration.

### Phytochemical screening

The phytochemical screening of different *A. marmelos* extracts was done to ascertain the presence or absence of bioactive components; qualitative results are shown in the Table 3. The analyses revealed the presence of tannins, alkaloids, flavonoids, saponins, glycosides and steroids. Quantitative analysis of phenolics and flavonoids revealed that CLF had the highest total phenolic content (61.67-mg GAE/g dried extract), followed by EAF (58.79-mg GAE/g dried extract), PEF (40.70-mg GAE/g dried extract) and AQF (26.55-mg GAE/g dried extract) (Table 4). Similarly, the highest total flavonoid content was observed

**Table 3** Qualitative phytochemical screening of different extracts from *Aegle marmelos*

	CME	PEF	CLF	EAF	AQF
Tannins	+	-	-	-	+++
Flavonoids	+	+	+++	++	++
Phenolic compounds	+	+	++	++	+
Alkaloids	+	-	-	-	++
Saponins	+	-	-	-	+++
Steroids	+++	++	+	-	-
Glycosides	+	++	+	+	+++

AQF, aqueous fraction; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; PEF, petroleum ether fraction.

in CLF (410.4-mg GAE/g dried extract), followed by EAF (375.73-mg GAE/g dried extract), PEF (234-mg GAE/g dried extract) and AQF (204.35-mg GAE/g dried extract). Our results clearly demonstrated that EAF, which was found to possess the highest AChE

**Table 4** Total phenolic and flavonoid contents of different extracts from *Aegle marmelos*

	Total phenolic content (mg GAE/g dried extract)	Total flavonoid content (mg GAE/g dried extract)
CME	46.73 ± 0.51 <sup>c</sup>	246.13 ± 3.60 <sup>c</sup>
PEF	40.70 ± 1.77 <sup>b</sup>	234.00 ± 3.38 <sup>b</sup>
CLF	61.67 ± 3.74 <sup>a</sup>	410.40 ± 5.77 <sup>a</sup>
EAF	58.79 ± 5.07 <sup>d</sup>	375.73 ± 4.01 <sup>d</sup>
AQF	26.55 ± 2.04 <sup>a</sup>	204.35 ± 6.27 <sup>a</sup>

AQF, aqueous fraction; CLF, chloroform fraction; CME, crude methanol extract; EAF, ethyl acetate fraction; GAE, gallic acid equivalent; PEF, petroleum ether fraction. <sup>a-d</sup>Means between columns differ significantly ( $P < 0.05$ ).

inhibitory activity and antioxidant property, contained a large amount of phenolics and flavonoids.

## DISCUSSION

AD is a severe neurodegenerative disease and a leading cause of death among the elderly. Although a number of factors have been identified, oxidative stress and cholinergic dysfunction have been implicated as major contributing factors in the pathogenesis of AD.<sup>1-5</sup> Therefore, it has been suggested that the compounds, either plant or plant-derived molecules, that modulate cholinesterase activity and multiple components of the oxidative stress pathway would be an effective candidates for potential drugs that restrict the development of AD. *A. marmelos* has been reported to possess anti-diabetic, anti-hyperlipidaemic, gastroprotective, antidiarrhoeal, radioprotective, antimicrobial and anti-proliferative properties.<sup>28-34</sup> Our findings indicate that *A. marmelos* also possesses AChE inhibitory properties and antioxidative activities.

It is now well accepted that inhibition of AChE activity can ameliorate the symptoms and improve the functioning of patients with AD.<sup>10,11</sup> The results of this *in vitro* study revealed that CME of *A. marmelos* inhibited rat brain AChE in a dose-dependent manner (Table 1). To further understand the activity of the plant, CME was partitioned successively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and water, and the resulting fractions were evaluated similarly. The highest activity (37%) was found in EAF and was higher than the activity of CME (29%). Under the same experimental condition, donepezil, an anti-AD drug with potential AChE inhibitory activity, inhibited the activity by 97%, which is consistent with results pub-

lished earlier.<sup>47</sup> However, our results demonstrated the moderate AChE inhibitory activity of *A. marmelos*.

The antioxidant potential of the different *A. marmelos* extracts was evaluated by several *in vitro* assays, including DPPH radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay and lipid peroxidation assay, as no single assay reflects the antioxidant property. As a preliminary study to estimate the antioxidant abilities of the test extracts, several assays that are not biologically relevant, such as reducing capacity and DPPH free radical scavenging assays, were performed. All the extracts showed radical scavenging activity and iron reducing ability in a concentration-dependent manner (Figs. 1,2). Among the different extracts, EAF showed the highest activity, and the activity of the other three fractions was in the following order: AQF>CLF>PEF.

Extensive evidence indicates that the ROS, which are formed during oxidative stress, induce cellular and molecular abnormalities in sporadic AD.<sup>13-16</sup> Hydroxyl radicals are the major ROS and are highly toxic; they greatly contribute to oxidative stress and are known contributors to neuronal damage in AD.<sup>48</sup> The results revealed that all the extracts possessed potential hydroxyl radical scavenging activity (Fig. 3). Among the extracts, EAF showed the highest activity with a  $IC_{50}$  of 5.68  $\mu$ g/mL, which appeared to be more potent than that of the reference standard used in this study, CA with a  $IC_{50}$  of 6.5  $\mu$ g/mL under the same condition.

Lipid peroxidation is the mechanism by which lipids are attacked by ROS to form a carbon radical that reacts with oxygen, resulting in a peroxy radical and thus generating lipid peroxides.<sup>15,44,45</sup> Due to the high lipid content and unusually high concentration of polyunsaturated fatty acids that are particularly susceptible to oxidation, the brain is an important target of oxidative stress. The brains of individuals with AD have increased levels of lipid peroxidation products, such as 4-hydroxynonenal or 2-propenal, and enhanced lipid peroxidation has been detected in the cerebrospinal fluid and plasma of individuals with AD.<sup>49</sup> Lipid peroxidation products can be measured by using thiobarbituric acid.<sup>46</sup> The results of an *in vitro* assay revealed that, induced by hydrogen peroxide in a concentration-dependent manner, CME of *A. marmelos* inhibited peroxidation of brain lipid (Table 2). The activity of CME was found to be higher than the other four fractions, indicating the presence of

inhibitors of lipid peroxidation acting additively or synergistically in the mother CME.

The AChE inhibitory property and antioxidant activity of *A. marmelos* were supported by the presence of endogenous polyphenols and flavonoids, tannin, alkaloids, and steroids (Table 3). Polyphenols are the most abundant antioxidants in the plant kingdom, and it is claimed they have neuroprotective effect.<sup>50</sup> The antioxidant activity of the polyphenolic compound is believed to result from their redox properties, which play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals. Flavonoids are the most ubiquitous groups of plant secondary metabolites and have good antioxidant potential.<sup>51</sup> The mechanism of action of flavonoids is through the scavenging of free radicals. Numerous polyphenolic and flavonoid compounds have been isolated from plants that reduce oxidative stress and inhibit AChE.<sup>52–56</sup> Our results indicate that EAF derived from *A. marmelos* is a significant source of phenolics and flavonoids, which may contribute to inhibition of AChE and antioxidant activity (Table 4).

## Conclusion

The results suggest that EAF derived from *A. marmelos* effectively inhibits AChE activity and multiple components of the oxidative stress pathway that can contribute to Alzheimer's pathology. As a result, EAF has the potential to be an effective and safe treatment for AD. The validity of this plant as folkloric medicine is now being evaluated critically in cell-free systems.

## REFERENCES

- Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid  $\beta$ -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**: 1–24.
- Iqbal K, Wang X, Blanchard J, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration: pivotal and multifactorial. *Biochem Soc Trans* 2010; **38**: 962–966.
- Kudo T, Tani H, Takeda M. Neurodegenerative dementias involving aberrant protein aggregation. *Psychogeriatrics* 2007; **7**: 114–117.
- Tanaka T, Tomioka M, Sadik G, Takeda M. 13th Congress of the International Psychogeriatric Association and recent expansion of research into psychogeriatrics. *Psychogeriatrics* 2007; **7**: 1–3.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**: 821–827.
- Davies P, Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; **2**: 1403.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1977; **1**: 189.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; **215**: 1237–1239.
- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S *et al*. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem* 1995; **64**: 749–760.
- Massoud F, Gauthier S. Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 2010; **8**: 69–80.
- Neugroschl J, Sano M. Current treatment and recent clinical research in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 2010; **77**: 3–16.
- Tanaka T, Kazui H, Morihara T, Sadik G, Kudo T, Takeda M. Post marketing survey of donepezil Hydrochloride in Japanese patients with Alzheimer's disease with behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). *Psychogeriatrics* 2008; **8**: 114–123.
- Bonda DJ, Wang X, Perry G *et al*. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology* 2010; **59**: 290–294.
- Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med* 2010; **4**: 27–36.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A *et al*. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997; **68**: 2061–2069.
- Lovell MA, Gabbita SP, Markesbery WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 1999; **72**: 771–776.
- Sultana R, Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; **19**: 341–353.
- Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol* 2006; **545**: 39–50.
- Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F *et al*. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 19–24.
- Sponne I, Fiffre A, Drouet B *et al*. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 3437–3445.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; **16**: 357–363.
- Morris MC, Beckett LA, Scherr PA, Hebert LE, Bennett DA *et al*. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998; **12**: 121–126.
- Atmani D, Chaheer N, Atmani D. Flavonoids in human health: from structure to biological activity. *Curr Nutr Food Sci* 2009; **5**: 225–237.
- Darvesh AS, Carroll RT, Bishayee A *et al*. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Rev Neurother* 2010; **10**: 729–745.
- Kirtikar KR, Basu BD. *Indian Medicinal Plants*, 2nd edn. Dehradun: International Book Distributors, 1999.
- Bhattacharya S. *Chironjib Bonoushodhi*, 7th edn. Kolkata: Anondo Publishers, 1991.