

201445009A

厚生労働科学研究委託費

認知症研究開発事業

アルツハイマー病に対する
ポリフェノールの安全性と有効性に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 篠原もえ子

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の認知症研究開発事業による委託業務として、国立大学法人金沢大学学長 山崎 光悦が実施した平成 26 年度「アルツハイマー病に対するポリフェノールの安全性と有効性に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

[I] 委託業務成果報告（総括）

アルツハイマー病に対するポリフェノールの安全性と有効性に関する研究 …………… 1
篠原もえ子

[II] 委託業務成果報告（業務項目）

1. ポリフェノールの安全性と忍容性およびアルツハイマー病に対する有効性…………… 5
の証明に関する研究
篠原もえ子、山田正仁

2. ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究…………… 9
小林彰子、永井俊匡

3. ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究…………… 12
山田正仁、篠原もえ子

[III] 学会等発表実績 …………… 17

[I] 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費 認知症研究開発事業
委託業務成果報告（総括）

アルツハイマー病に対するポリフェノールの安全性と有効性に関する研究

研究代表者：篠原もえ子 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 助教

研究要旨 【目的】金沢大学神経内科では、*in vitro* および *in vivo* の実験系で植物性ポリフェノールの一種である、ロスマリン酸(RA)のアルツハイマー病(AD)病理予防効果を解明してきた。*Melissa officinalis* (レモンバーム)より抽出した RA を用いて試験食品を作成し、AD 患者に長期間レモンバーム抽出 RA を経口投与した時の安全性と有効性を検証する。また、クーロアレイ HPLC を用いたヒト血清中の RA/ RA 代謝物濃度の測定法を確立し、ヒトにレモンバーム抽出 RA を経口投与した際に検出される血清中 RA および RA 代謝物の種類および濃度を明らかにする。

【方法】1) ポリフェノールの安全性と忍容性および AD に対する有効性の証明：金沢大学病院外来にて、60 歳以上の軽度 AD 患者を対象にレモンバーム抽出 RA の無作為化、プラセボ対照、二重盲検、第 I/II 相臨床試験を実施した。主要評価項目はレモンバーム抽出 RA の安全性、副次評価項目はレモンバーム抽出 RA の AD に対する有効性とした。2) ポリフェノールの代謝動態解明：クーロアレイ HPLC を用いた、ヒト血清中の RA/ RA 代謝物濃度の測定法の検討として、酢酸エチル抽出法とメタノール沈殿法の二つを比較検討した。3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明：健常人にレモンバーム抽出 RA 500 mg を経口投与し投与前～投与 48 時間後の血清 RA/ RA 代謝物濃度を測定した。

【結果】1) ポリフェノールの安全性と忍容性および AD に対する有効性の証明：平成 24 年 5 月より平成 27 年 1 月末までに AD 患者 16 名に対して試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)の 48 週間投与を完了した。有害事象は 5 件報告があり、いずれも軽症で、完遂率は 88.9%であった。2) ポリフェノールの代謝動態解明：酢酸エチル抽出法は RA 検出限界が 20 nM と低濃度の RA も検出できたが、脱抱合化反応を至適 pH で行えない欠点があり、メタノール沈殿法は RA 検出限界が 50 nM と低濃度の RA 検出にはやや劣るが、脱抱合化反応は至適 pH で実施できた。酢酸エチル抽出法、メタノール沈殿法ともに RA 回収率は十分高かった。3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明：総 RA 血中濃度－時間曲線下面積 (AUC) は 832.13 nmol・hour/L であり、フリー体型 RA、抱合体型 RA の AUC はそれぞれ、228.77 nmol・hour/L、603.36 nmol・hour/L であった。

【結論】レモンバーム抽出 RA 試験食品 500 mg/日の長期間投与の安全性および忍容性は高いと思われた。クーロアレイ HPLC を用いたヒト血清中の RA/ RA 代謝物濃度の測定では、脱抱合化反応を至適 pH で行えるメタノール沈殿法が適していた。レモンバーム抽出 RA 経口摂取後のヒト体内ではフリー体型 RA よりも抱合体型 RA が多く存在することを明らかにした。今後、試験管内アミロイド β 線維およびオリゴマー形成反応モデルを用いて、抱合体型 RA の抗アミロイド作用の解明を行う。

研究分担者

小林彰子 東京大学大学院農学生命科学研究
科食の安全センター 准教授
永井俊匡 高崎健康福祉大学健康福祉学部
健康栄養学科 講師
山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系脳
老化・神経病態学 教授

A. 研究目的

わが国では高齢人口の増加とともに認知症患者が急増し、アルツハイマー病(AD)に代表される認知症の予防、治療法確立は急務である。AD の主病態は脳のアミロイド β 蛋白(A β)沈着である。金沢大学神経内科では、*in vitro* および *in vivo* の実験系で植物性ポリフェノールの一種

であるロスマリン酸(RA)のA β 線維形成、伸長抑制及びA β 線維不安定化作用、RAを投与したADモデル動物における脳内A β 沈着減少、A β オリゴマー減少を明らかにし、RAのAD病理予防効果を解明した。さらに、*Melissa officinalis*(レモンバーム)より抽出したRAを用いて試験食品を作成し、健常人にて薬物動態と安全性を評価した(論文投稿中)。平成24年5月より軽度AD患者を対象にレモンバーム抽出RAの臨床試験を開始し、平成26年1月までにAD患者10名に対して試験食品(プラセボまたは実薬)投与を完了した[文部科学省 若手研究(B)平成23-24年度の支援による]。

本研究では、AD患者に長期間レモンバーム抽出RAを経口投与した時の安全性および脳アミロイド蓄積抑制効果、認知機能障害の進行抑制効果等を明らかにする。これまでに同臨床試験を行った患者群と合わせて解析を行うことで、大規模介入試験に向けたレモンバーム抽出RAの安全性と有効性を検討する臨床試験を完了させる。

さらに、レモンバーム抽出RAを連続経口摂取しているAD患者の血液および脳脊髄液を用いて、RA/RA代謝物の濃度測定をおこない、RA代謝動態を解明する。まず、クーロアレイHPLCを用いたヒト血清中のRA/RA代謝物濃度の測定方法を確立する。

また、ヒトに摂取されたポリフェノールは体内でグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受け、多くは抱合体として存在することより、患者検体から検出されるRA代謝物の抗アミロイド作用を明らかにする。本年度は、ヒトにレモンバーム抽出RAを経口投与した際に検出される血清中RAおよびRA代謝物の種類および濃度を明らかにする。

B. 研究方法

1) ポリフェノールの安全性と忍容性およびADに対する有効性の証明に関する研究

金沢大学病院外来にて、60歳以上の軽度AD患者を対象にレモンバーム抽出RAの無作為化、プラセボ対照、並行群間、単施設、二重盲検、第I/II相臨床試験を医師主導型治験として実施する。主要評価項目はレモンバーム抽出RAの安全性、副次評価項目は脳アミロイド蓄積変化

および疾患の進行抑制効果などの、レモンバーム抽出RAのADに対する有効性とした。

また、臨床試験のデータや安全性に関するモニタリングについて独立したデータ安全性モニタリング委員会(Data and Safety Monitoring Board, DSMB)を設置する。

2) ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究

クーロアレイ HPLC を用いてヒト血清中の RA/RA 代謝物濃度を測定するため、血清前処理方法として、酢酸エチル抽出法とメタノール沈殿法の2つを比較検討した。

3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究

金沢大学神経内科にて、健常人に対して絶食下にレモンバーム抽出RA 500mgまたはプラセボを投与し、投与前、投与15分後、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後に採血を実施した。

高崎健康福祉大学にて、クーロアレイ HPLC を用いてヒト血清中の RA/RA 代謝物濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

患者を対象とする臨床試験および臨床研究については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。

C. 研究結果

1) ポリフェノールの安全性と忍容性およびADに対する有効性の証明に関する研究

RAは*Melissa officinalis*(レモンバーム)など、ハーブ類に多く含まれる植物性ポリフェノールである。レモンバームより抽出したRAの含量を規格化し、RA含有レモンバーム抽出物を用いて試験食品を作成した。レモンバーム抽出RAカプセルおよび、プラセボは丸善製薬株式会社より無償提供を受けた。動物実験の結果等より、ヒトにおけるRAの一日摂取許容量は500mg/日と計算された。

平成24年5月より、平成27年1月末までの間にAD患者16名に対して、試験食品(プラセボまたは実薬)の48週間投与を完了した。

主要評価項目(レモンバーム抽出RAの安全

性)：試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)との関連が疑われる有害事象として5件の報告があった。内訳は皮疹1件、肝機能障害<軽度>1件、認知障害2件、激越(Agitation)1件であった。試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)内服の完遂率は88.9%であった。臨床試験は終了していないため、レモンバーム抽出 RA 群、プラセボ群の關鍵はしておらず、副次的評価項目の評価は未実施である。

2) ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究

酢酸エチル抽出法：RA 回収率は81.8%、検出限界は20 nMであった。しかし、酵素バッファは pH 2.5 と β -グルクロニダーゼの至適 pH(グルクロニダーゼ活性：4.5~5.0, サルファターゼ活性：6.2)を大きく下回っていたので、十分な脱抱合が行われていないと推定された。高 pH の酵素バッファを用いると、RA 回収率が低下した。

メタノール沈殿法：RA 回収率は99.4 ± 4.4%、検出限界は50 nMであった。酵素バッファの pH は4.6 と β -グルクロニダーゼの至適 pH と合致し、抱合体型 RA の検出にも成功した。

3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究

レモンバーム抽出 RA 500 mg内服群の総 RA 濃度は内服1時間後に最高血中濃度に達し、血中濃度-時間曲線下面積(AUC)は832.13 nmol・hour/Lであった。フリー体型 RA および抱合体型 RA の AUC はそれぞれ、228.77 nmol・hour/L、603.36 nmol・hour/Lであった。

RA 代謝物としては、抱合体型 RA のほかに、血清中の抱合体型クマル酸、抱合体型フェルラ酸、抱合体型カフェ酸が測定できたが、RA 500 mg内服群とプラセボ内服群間でそれらの血中濃度に有意な差は認めなかった。

D. 考察

1) ポリフェノールの安全性と忍容性およびアルツハイマー病に対する有効性の証明に関する研究

AD 患者16名を対象にプラセボまたはレモンバーム抽出 RA 500 mg を48週間連続経口投与した際、5件の有害事象が報告されたが、い

れも軽症であり、試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)内服の完遂率は88.9%であり忍容性は高いものと思われた。

2) ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究

酢酸エチル抽出法は pH2.5 では高い RA 回収率が得られたが、脱抱合化処理に用いる β -グルクロニダーゼの至適 pH では、RA 回収率が低下したため、フリー体型および抱合体型 RA の測定には不適と考えた。

メタノール沈殿法は β -グルクロニダーゼの至適 pH でも十分な RA 回収率が得られ、フリー体型および抱合体型 RA の測定に適していると考えられた。

3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究

レモンバーム抽出 RA 500 mg内服後のヒト血清中抱合体型 RA は、フリー体型 RA に比べて AUC が2.6倍大きいことが分かった。レモンバーム抽出 RA 500 mg内服後のヒト血清中に抱合体型クマル酸、抱合体型フェルラ酸、抱合体型カフェ酸の有意な上昇は見られなかった。

E. 結論

1) ポリフェノールの安全性と忍容性およびアルツハイマー病に対する有効性の証明に関する研究

高齢の軽度 AD 患者における、レモンバーム抽出 RA 500 mg/日の長期間投与の安全性および忍容性は高いとおもわれた。臨床試験終了後に、レモンバーム抽出 RA 群、プラセボ群の關鍵を行ったあと、再度、レモンバーム抽出 RA の安全性、忍容性および有効性について検討を行う。

2) ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究

クローアレイ HPLC を用いたヒト血清中 RA /RA 代謝物測定に、メタノール沈殿法を用いた前処理が適していた。

3) ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究

レモンバーム抽出 RA 内服後、ヒト体内ではフリー体型 RA よりも抱合体型 RA が多く存在することが明らかとなった。今後、試験管内ア

ミロイドβ線維およびオリゴマー形成反応モデルを用いて、抱合体型RAの抗アミロイド作用の解明を行っていく予定である。

[参考文献]

- 1) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181, 2003.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565, 2009.
- 3) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J-I, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 4) Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL, Heber D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 80:1558-1564, 2004.
- 5) Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, Yoshioka E. Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 53: 4740-4746, 2005.
- 6) 錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自己点検ガイドライン（食安発第0201003号、平成17年2月1日）
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/dl/kankeihourei_01.pdf、2015年2月5日 access
- 7) いわゆる健康食品の摂取量及び摂取方法等の表示に関する指針について（食安発第0228001号）
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/topics/050131/dl/tuuchi07.pdf>、2015年2月5日 access

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（主要原著論文のみを示す。詳細は業務項目の成果報告書を参照のこと）

1. 論文発表

- 1) Wang J, Varghese M, Ono K, Yamada M, Levine S, Tzavaras N, Gong B, Hurst WJ, Blitzer RD, Pasinetti GM. Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid-β: implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 643-650.
- 2) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. *PLoS One* 2014; 9: e96013.
- 3) Ono K, Takahasi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β-protein aggregation. *Biochim Biophys Acta- Molecular Basis of Disease* 2014; 1842: 646-653.
- 4) Takamura Y, Ono K, Matsumoto J, Yamada M, Nishijo H. Effects of the neurotrophic agent T-817MA on oligomeric amyloid-β-induced deficits in long-term potentiation in the hippocampal CA1 subfield. *Neurobiol Aging* 2014; 35:532-536.
- 5) Kobayashi S, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K. Anti-allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *J Funct Foods*. 13: 100-107, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

[Ⅱ] 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費 認知症研究開発事業
委託業務成果報告（業務項目）

ポリフェノールの安全性と忍容性およびアルツハイマー病に対する有効性の証明に関する研究

研究代表者：篠原もえ子 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 助教
研究分担者：山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 教授

研究要旨 金沢大学神経内科では、*in vitro* および *in vivo* の実験系で植物性ポリフェノールの一種である、ロスマリン酸(RA)のアルツハイマー病(AD)病理予防効果を証明してきた。*Melissa officinalis*(レモンバーム)より抽出したRAを用いて試験食品を作成し、AD患者に長期間レモンバーム抽出RAを経口投与した時の安全性および脳アミロイド蓄積抑制効果、認知機能障害の進行抑制効果を明らかにする。金沢大学病院外来にて、60歳以上の軽度AD患者を対象にレモンバーム抽出RAの無作為化、プラセボ対照、並行群間、単施設、二重盲検、第I/II相臨床試験を医師主導型治験として実施した。主要評価項目はレモンバーム抽出RAの安全性、副次的評価項目は脳アミロイド蓄積変化および疾患の進行抑制効果等、レモンバーム抽出RAのADに対する有効性とした。レモンバームより抽出したRAの含量を規格化し、試験食品を作成した。動物実験の結果より、ヒトにおけるRAの一日摂取許容量は500mg/日と計算された。平成24年5月より平成27年1月末までの間にAD患者16名に対して、試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出RA)の48週間投与を完了した。主要評価項目の安全性については、試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出RA)との関連が疑われる有害事象として5件の報告があったが、いずれも軽症と分類された。試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出RA)内服の完遂率は88.9%であり、レモンバーム抽出RAの忍容性は高いものと思われた。臨床試験は継続中のため、レモンバーム抽出RA群、プラセボ群の關鍵はしておらず、臨床試験終了後にレモンバーム抽出RAの安全性、忍容性の再検討および有効性について検討を行う予定である。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の主病態は脳のアミロイド β 蛋白(A β)沈着である。金沢大学神経内科では、*in vitro* および *in vivo* の実験系でロスマリン酸(RA)のA β 線維形成、伸長抑制およびA β 線維不安定化作用、RAを投与したADモデル動物における脳内A β 沈着減少、A β オリゴマー減少を明らかにし、RAのAD病理予防効果を証明した¹⁾²⁾³⁾。

われわれは、レモンバーム抽出RAで試験食品を作成し、健常人(n = 11)にてレモンバーム抽出RAの薬物動態と安全性を評価した(論文投稿中)。また、平成24年5月より軽度AD患者を対象に、レモンバーム抽出RAの臨床試験を開始し、平成26年1月までにAD患者10名に対して試験食品(プラセボまたは実薬)の投与を完了した[文部科学省 若手研究(B)平

成23-24年度の支援による]。

本研究ではAD患者において長期間レモンバーム抽出RAを経口投与した時の安全性およびレモンバーム抽出RAの脳アミロイド蓄積抑制効果、認知機能障害の進行抑制効果を明らかにする。本研究で新たにAD患者15名についてレモンバーム抽出RAの安全性と有効性に関する臨床試験を実施し、これまでに同臨床試験を行った患者群と合わせて解析を行い、レモンバーム抽出RAの安全性と有効性を検討する臨床試験を完了させる。

B. 研究方法

60歳以上の軽度AD患者を対象にレモンバーム抽出RAの無作為化、プラセボ対照、並行群間、単施設、二重盲検、第I/II相臨床試験を医師主導型治験として実施する。

一日の RA 投与量は、動物実験で悪影響がなかった最大無毒性量に安全係数を乗じてもとめた一日摂取許容量を参考にして決定する。

金沢大学病院外来にて、スクリーニング検査後、選択／除外基準を満たす約 15 例の被験者を実薬群またはプラセボ群に 1:1 の比で割り付ける。被験者は投与開始 8、16、24、32、40、48 週後に有害事象、服薬状況、併用薬、一般血液検査と RA 血中濃度測定、認知機能検査、医療経済と QOL 評価を受ける。スクリーニング時と投与 24 週後にすべての被験者で頭部 MRI、PIB/FDG-PET、脳脊髄液マーカー(A β ₁₋₄₂、リン酸化タウ蛋白測定)を施行する。

主要評価項目はレモンバーム抽出 RA の安全性である。有害事象発現頻度、身体所見、神経学的所見、バイタルサイン、臨床検査、頭部 MRI および認知機能検査を含む安全性を評価する。

副次的評価項目は①脳アミロイド蓄積変化(PIB-PET および脳脊髄液マーカー)、②脳代謝病態の変化(FDG-PET)、③海馬萎縮変化(頭部 MRI)、④疾患の進行抑制効果(認知機能検査)および医療経済と QOL 評価である。認知機能検査には、Alzheimer's disease assessment scale-cognitive part (ADAS-cog)、Mini-mental state examination (MMSE)、Clinical dementia rating (CDR)を用いる。評価項目は ApoE E4 遺伝子型によりサブ解析を行う。

また、臨床試験のデータや安全性に関するモニタリングについて独立したデータ安全性モニタリング委員会(Data and Safety Monitoring Board, DSMB)を設置する。DSMB は、介入試験の経過・結果(プロトコルの遵守状況、安全性等)を審査する。DSMB は審査結果により、試験の続行・中止、プロトコルの変更を決定し、研究代表者に勧告する。

(倫理面への配慮)

金沢大学の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。

C. 研究結果

RAは*Melissa officinalis* (レモンバーム)など、ハーブ類に多く含まれる植物性ポリフェノールであり、抗酸化、抗炎症、抗細菌、抗ウイルス

ス活性を有するとされている。レモンバームより抽出したRAの含量を規格化し、RA含有レモンバーム抽出物を用いて試験食品を作成した。レモンバーム抽出RAカプセルおよびプラセボは丸善製薬株式会社より無償提供を受けた。

一日の試験食品摂取量はTg2576マウス(メス)に1g/ kg・BW/日のRAを270日経口投与した動物実験で明らかな毒性を認めなかったことより、最大無毒性量(no observed adverse effect level, NOAEL)を1g/ kg・BW/日とした。食品においては、生涯にわたり毎日摂取し続けても影響が出ないと考えられる量を一日摂取許容量(acceptable daily intake, ADI)と定義し、NOAELに安全係数を乗じてもとめる⁴⁾⁵⁾。安全係数には、実験動物とヒトとの種の違い(10倍)と個人差(10倍)を考慮し、それらに乗じた100が用いられる。RAのADIは10 mg/ kg・BW/日と計算され、平均的な成人の体重を50 kgと仮定し、RA 500 mg/日の投与は安全と考えた。

平成 24 年 5 月より平成 27 年 1 月末までの間に AD 患者 16 名に対して試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)投与を完了した。

主要評価項目の安全性については、試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)との関連が疑われる有害事象として、皮疹 1 件、肝機能障害<軽度>1 件、認知障害 2 件、激越(Agitation)1 件の、合計 5 件であった。有害事象共通用語基準による重症度分類では 5 件すべて軽症と分類された。試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)の 48 週間内服が完了できた患者数は 16 名、内服を開始した患者数は 18 名であり、試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)内服の完遂率は 88.9%であった。したがって、レモンバーム抽出 RA の忍容性は高いものと思われた。

現時点で(平成 27 年 2 月)臨床試験が終了していないため、レモンバーム抽出 RA 群、プラセボ群の關鍵はしておらず、副次的評価項目の①脳アミロイド蓄積変化、②脳代謝病態の変化、③海馬萎縮変化、④疾患の進行抑制効果および医療経済と QOL 評価は未実施である。

D. 考察

試験食品(プラセボまたはレモンバーム抽出 RA)を軽症の AD 患者 16 名に 48 週間投与した

際の有害事象は 5 件あり、皮疹、肝機能障害、認知障害、激越 (Agitation) を認めたが、いずれも軽症であった。試験食品 (プラセボまたはレモンバーム抽出 RA) 内服の完遂率は 88.9% であり、レモンバーム抽出 RA の忍容性は高いものと思われた。

E. 結論

レモンバーム抽出 RA 試験食品 500mg/日の長期間投与の安全性および忍容性は高いと思われた。臨床試験終了後に、レモンバーム抽出 RA 群、プラセボ群の開鍵を行ったあと、再度、レモンバーム抽出 RA の安全性、忍容性および有効性について検討する必要がある。

[参考文献]

- 1) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181, 2003.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565, 2009.
- 3) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J-I, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 4) 錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自己点検ガイドライン（食安発第 0201003 号、平成 17 年 2 月 1 日）
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/dl/kankeihourei_01.pdf、2015 年 2 月 5 日 access
- 5) いわゆる健康食品の摂取量及び摂取方法等の表示に関する指針について（食安発第 0228001 号）
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/topics/050131/dl/tuuchi07.pdf>、2015 年 2

月 5 日 access

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang J, Land D, Ono K, Galvez J, Zhao W, Vempati P, Steele JW, Cheng A, Yamada M, Levine S, Mazzola P, Pasinetti GM. Molecular topology as novel strategy for discovery of drugs with A β lowering and anti-aggregation dual activities for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014; 9: e92750.
- 2) Wang J, Varghese M, Ono K, Yamada M, Levine S, Tzavaras N, Gong B, Hurst WJ, Blitzer RD, Pasinetti GM. Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid- β : implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 643-650.
- 3) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. *PLoS One* 2014; 9: e96013.
- 4) Miyashita A, Wen Y, Kitamura N, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Furukawa K, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moirhara T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Yamaguchi H, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R. Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 1031-1038.
- 5) Ono K, Takahasi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *Biochim Biophys Acta- Molecular Basis of Disease* 2014; 1842: 646-653
- 6) Takamura Y, Ono K, Matsumoto J, Yamada M,

Nishijo H. Effects of the neurotrophic agent T-817MA on oligomeric amyloid- β -induced deficits in long-term potentiation in the hippocampal CA1 subfield. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 532-536.

2. 学会発表

- 1) 篠原もえ子、柚木颯穂、堂本千晶、池田芳久、佐村木美晴、岩佐和夫、横川正美、浅井貴美子、駒井清暢、中村裕之、山田正仁：緑茶摂取と認知症および軽度認知障害の罹患リスク：前方視的縦断研究。第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、2014.5.21-24
- 2) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein。第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、2014.5.21-24
- 3) 山田正仁：認知症の神経病理を臨床診断する、治療・予防する。第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2014.6.7
- 4) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Differences in the prevalence of dementia and mild cognitive impairment between early and delayed responders in a community-based study. *Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen, July 12-17, 2014*
- 5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2014, Denmark, July 12-17, 2014*
- 6) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：アミロイド β 蛋白と α -シヌクレイン蛋白のクロス・シーディング効果。第 2 回日本アミロ

- イドーシス研究会学術集会、東京、2014.8.22
- 7) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein。第 37 回日本神経科学大会 *Neuroscience 2014*、横浜、2014.9.11-13
 - 8) 小野賢二郎、山田正仁：病態に基づいた Alzheimer 病の予防・治療薬の開発。第 32 回日本神経治療学会総会、東京、2014.11.20-22
 - 9) 篠原もえ子、柚木颯穂、堂本千晶、池田芳久、佐村木美晴、岩佐和夫、横川正美、駒井清暢、中村裕之、山田正仁：緑茶摂取と認知症・軽度認知障害の罹患リスク：なかじまプロジェクト。第 33 回日本認知症学会学術集会、横浜、2014.11.29-12.1
 - 10) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea is associated with reduced risk of cognitive decline. *12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/ PD)*, Nice, 2015. 3. 18-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費 認知症研究開発事業
委託業務成果報告（業務項目）

ポリフェノール代謝動態の解明に関する研究

研究分担者：小林彰子 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター 准教授
研究分担者：永井俊匡 高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科 講師

研究要旨 本分担研究は、クーロアレイ HPLC を用いてヒト血液中のロスマリン酸（RA）および RA 代謝物濃度の測定方法を確立することを目的とした。酢酸エチル抽出とメタノール沈殿の 2 つの血清前処理方法を検討し、酢酸エチル抽出法 81.8%、メタノール沈殿法 99.4±4.4%という高い RA 回収率を得た。酢酸エチル抽出は、脱抱合化反応を至適 pH で行えないことが明らかとなり、最終的にメタノール沈殿法を選択した。この方法は、RA 検出感度 50 nM、低濃度 RA 回収率 60-70%と良好な数値を示し、RA 代謝産物として抱合体型 RA、フェルラ酸、クマル酸の検出に成功したことから、RA 体内動態の解析に有効であることが示された。

A. 研究目的

金沢大学神経内科では、平成 24 年よりポリフェノール試験食品の安全性等を評価するための医師主導型臨床試験（二重盲検ランダム化比較試験）を開始した。本委託業務研究を含めてアルツハイマー病（Alzheimer's disease, AD）患者 25 名について臨床試験を実施中であり、試験食品の安全性および有効性を評価している。さらに、試験食品を連続経口摂取している AD 患者の血液および脳脊髄液を用いて、ポリフェノール／ポリフェノール代謝物の濃度測定をおこない、ポリフェノール代謝動態を解明する計画である。

本分担研究は、その一環としてクーロアレイ HPLC を用いてヒト血液中のポリフェノール／ポリフェノール代謝物濃度の測定方法を確立することを目的とした。ポリフェノールのうち、特に AD の病変抑制能が高いことが示唆されている¹⁻³⁾、シソ科植物由来の天然ポリフェノール、ロスマリン酸（rosmarinic acid, RA）を主な測定対象とした。そこで、RA およびその予想代謝産物の血液中濃度測定を試みた。

B. 研究方法

金沢大学において、健常人ボランティアに対して RA 製剤またはプラセボ製剤の投与および採血を行った。

ラット等を用いた先行研究を調査し、次の 2

つの方法を、検討候補として選択した。

1. 酢酸エチル抽出法⁴⁾の変法

血清 50 μ l に、酵素バッファー（0.1 mM 酢酸 Na、0.2 M アスコルビン酸）50 μ l に β -グルクロニダーゼ（Type H-5、シグマ・アルドリッチ・ジャパン）を添加し、脱抱合化反応を行った。反応後、酢酸エチルを 800 μ l 加え、20 分間攪拌し、2,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離した。酢酸エチル層を取得し、濃縮乾固した。溶解液 100 μ l を加え、20 分攪拌し、超音波処理した。その後、14,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、得られた溶液の上清を濾過して、クーロアレイ HPLC で測定した。

2. メタノール沈殿法⁵⁾

血清 50 μ l に、0.1 M 酢酸 Na バッファー（pH 5.0）50 μ l に懸濁した β -グルクロニダーゼ（Type H-5）を添加し、脱抱合化反応を行った。反応度、0.83 M 酢酸／メタノールを 200 μ l 加え、vortex で 1 分間、超音波で 1 分間処理した後、遠心分離（8,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間）した。遠心分離後、得られた上清を濾過して、クーロアレイ HPLC で測定した。

HPLC 分離条件は、1、2 とも同様に、以下の通りである。カラムは C18（ODS 150、エム・シー・ジャパン株式会社）を使用した。移動相 A = 50 mM 酢酸ナトリウム／5%メタノール

(pH 3.0)、移動相 B = 50 mM 酢酸ナトリウム / 20% メタノール / 40% アセトニトリル (pH 3.5) を用い、移動相流速を 0.6 ml/min とした。移動相の混合比を 0~28.5 min は A : B = 85% : 15% ~ 20% : 80% の濃度勾配をつけ、28.5~31 min は B = 100%、31~35 min は A : B = 85% : 15% と比率を変え、分析を行った。スタンダードのクロマトグラムのピークの高さから検量線を作成し、サンプル中のポリフェノール濃度を定量した。

（倫理面への配慮）

健常人ボランティア血清の取り扱いについては、金沢大学（RA 製剤投与および採血）および高崎健康福祉大学（ポリフェノール濃度測定）の両研究施設において倫理審査を受け、承認されている。

C. 研究結果

実際の濃度測定に先立ち、血清に RA 標品を添加し、酢酸エチル抽出にて RA の検出を試みた。その結果、5 μ M RA 添加血清から 81.8% の高い RA 回収率が得られた。低濃度の RA を添加し、検出限界を検討したところ、20 nM RA の検出に成功した。

しかし、この時の酵素バッファーは、pH 2.5 と β -グルクロニダーゼの至適 pH（グルクロニダーゼ活性：4.5-5.0、サルファターゼ活性：約 6.2）を大きく下回っており、十分な脱抱合が行われていないことが考えられた。

次にメタノール沈殿にて、1 μ M RA 添加血清を測定したところ、99.4 \pm 4.4% という高い RA 回収率が得られた（図1）。加えて、この方法は操作も簡便であった。この方法による RA 検出限界は、脱抱合化反応なし、ありの条件ともに 50 nM であった。低濃度における RA 回収率は、脱抱合化反応なしの条件で 60-70%、ありの条件で約 50% であった。

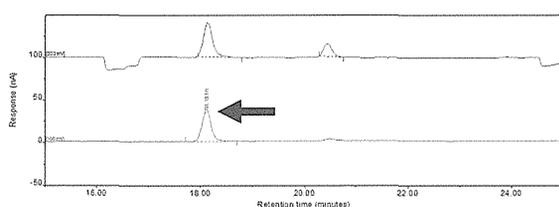


図 1. RA 添加血清のクロマトグラム
RA 終濃度 500 nM となるように血清に添加し、

メタノール沈殿法による前処理を行った。緑線、赤線は、それぞれ酸化電位 100 mV、200 mV。矢印は RA 検出を示す。

D. 考察

酢酸エチル抽出法では、より高 pH の酵素バッファーを用いた場合、RA 回収率が低下した（data not shown）。これは高 pH 時に、フェノール性水酸基のプロトンが解離して、RA の水溶性が高くなることが原因と考えられた。よって脱抱合化処理も考えると、高 pH で適用できない酢酸エチル抽出は不適であるとした。

メタノール沈殿法では、99% もの高い回収率を得ることができた。用いている酵素バッファーの pH も 4.6 と、グルクロニダーゼ活性の至適と合致する。実際にこの方法で、抱合体型 RA の検出に成功している（data not shown）。低濃度での回収率低下という欠点はあるものの、RA 体内動態を経時的に測定するには十分であると考えている。

また、RA の予想代謝産物として、抱合体型 RA に加えて、クマル酸、フェルラ酸それぞれの標品検出に成功した（data not shown）。

E. 結論

以上の結果より、血清中 RA および RA 代謝産物の検出に、メタノール沈殿⁵⁾による前処理が有効であることを示した。この方法を用いて、RA 製剤を投与した健常人ボランティアの血中 RA 動態を解析した（Noguchi-Shinohara *et al.*, 投稿中）。

今後、本研究で確立した測定法を用いて、健常人ボランティアおよび AD 患者における RA 薬物動態の解明を行っていく予定である。

【参考文献】

- 1) Ono K, Yamada M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils *in vitro*. *J Neurochem* 97: 105-115, 2006.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565, 2009.

- 3) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J-I, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 4) Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL, Heber D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 80:1558-1564, 2004.
- 5) Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, Yoshioka E. Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 53: 4740-4746, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K, Kobayashi S. Luteolin and Quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats. *PLoS One*. 10: e97901, 2014
- 2) Kobayashi S, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K. Anti-allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *J Funct Foods*. 13: 100-107, 2015
- 3) Tamura T, Ozawa M, Kobayashi S, Watanabe H, Arai S, Mura K. Inhibitory effect of oligomeric polyphenols from peanut-skin on sugar digestion enzymes and glucose transport. *Food Sci Technol Res*. In press.
- 2) 横山博、鈴木淳、船隈奈緒子、小林彰子。クロマグロの筋肉寄生ムツボシクドアの毒性試験。第35回日本食品微生物学会、大阪、2014.9.19
- 3) 石井剛志、竹内由紀、安井美奈、小林彰子、保田倫子、下位香代子、越阪部奈緒美、中山勉。テアフラビン類の脂質膜における分子挙動。第19回日本フードファクター学会、鹿児島、2014.11.9
- 4) 石井剛志、竹内由紀、安井美奈、小林彰子、保田倫子、下位香代子、越阪部奈緒美、中山勉。テアフラビン類の難吸収性に影響する因子の解析。第11回日本カテキン学会年次学術大会、東京、2014.11.22
- 5) 永井俊匡、清水愛恵、齊藤美佳、緑川景子、熊倉慧、阿部啓子、朝倉富子。粉末あるいは固形飼料を摂取させたラットの摂食行動および視床における発現遺伝子の比較解析。日本農芸化学会、岡山、2015.3.27
- 6) 鈴木千尋、安岡顕人、近藤隆、石井剛志、阿部啓子、小林彰子。大豆イソフラボンの腸管輸送因子の探索。日本農芸化学会、2015.3.28
- 7) 小川真奈、山梨義英、高田龍平、阿部啓子、小林彰子。フラボノイドがコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響。日本農芸化学会、岡山、2015.3.28
- 8) 宍戸駿、豊田集、浜口毅、篠原もえ子、小野賢二郎、山田正仁、阿部啓子、小林彰子。Tg2576 マウスにおけるロスマリン酸による脳内Aβ凝集抑制効果のトランスクリプトミクスによる解析。日本農芸化学会、岡山、2015.3.29

2. 学会発表

- 1) 田村倫子、小沢恵実、小林彰子、渡辺寛人、荒井綜一、村清司。重合度の異なるラッカセイ種皮プロシアニジンの糖吸収抑制作用。第61回日本食品科学工学会、福岡、2014.8.29

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費 認知症研究開発事業
委託業務成果報告（業務項目）

ポリフェノール代謝物の抗アミロイド作用の解明に関する研究

研究分担者：山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 教授
研究代表者：篠原もえ子 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 助教
研究分担者：小林彰子 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター 准教授
研究分担者：永井俊匡 高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科 講師

研究要旨 ヒトにレモンバーム抽出ロスマリン酸（RA）を経口投与した際に検出される、RA および RA 代謝物の種類および濃度を明らかにする。健常人に対して絶食下にレモンバーム抽出 RA 500 mg またはプラセボを投与し、投与前、投与 15 分後から 48 時間後の採血を実施した。総 RA 濃度は内服 1 時間後に最高血中濃度に達し、血中濃度－時間曲線下面積（AUC）は 832.13 nmol・hour/L であった。抱合体型 RA の AUC は、フリー体型 RA の AUC のおよそ 2.6 倍大きく、RA 内服後のヒト体内では、フリー体型 RA よりも抱合体型 RA が多く存在することが明らかとなった。今後、試験管内アミロイド β 線維およびオリゴマー形成反応モデルを用いて、抱合体型 RA の抗アミロイド作用の解明を行っていく予定である。

A. 研究目的

金沢大学神経内科では、*in vitro* および *in vivo* の実験系でロスマリン酸（RA）のアルツハイマー病（AD）病理予防効果を証明してきた¹⁾²⁾³⁾。また、レモンバーム抽出 RA の安全性と AD に対する有効性を検証するための、AD 患者を対象とした臨床試験を実施中である。

ヒトに摂取されたポリフェノールは体内でグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受け、多くは抱合体として存在するといわれている。本分担研究では、ヒト血液および脳脊髄液検体から検出される RA 代謝物の抗アミロイド作用について、試験管内アミロイド β 線維およびオリゴマー形成反応モデルを用いて明らかにする計画である。

本年度の分担研究では、ヒトにレモンバーム抽出 RA を経口投与した際に検出される RA および RA 代謝物の種類および濃度を明らかにする。

B. 研究方法

金沢大学神経内科にて、健常人に対して絶食下にレモンバーム抽出 RA 500 mg（n=6）またはプラセボ（n=9）を投与し、投与前、投与 15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後、3 時間後、

6 時間後、24 時間後、48 時間後に採血を実施した。

RA の予想代謝産物としては、抱合体型 RA（グルクロン酸抱合体および硫酸体）の他に、シソ抽出 RA 内服後のヒト血液中 RA および RA 代謝物を測定した先行研究⁴⁾を参考にして、クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸の血液中濃度を測定した。ヒト血清中の RA（フリー体型 RA）および RA 代謝物〔抱合体型 RA（グルクロン酸抱合体および硫酸体）およびクマル酸、フェルラ酸、カフェ酸〕の測定は、高崎健康福祉大学にて、クーロアレイ HPLC を用いて行った。

（倫理面への配慮）

金沢大学および高崎健康福祉大学の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。

C. 研究結果

レモンバーム抽出 RA 500 mg 内服 1 時間後に血清中の総 RA 濃度（フリー体型および抱合体型 RA 濃度）は最高血中濃度（162.20 ± 40.20 nmol/L；平均 ± 標準誤差）に達した。総 RA の血中濃度－時間曲線下面積（AUC）は 832.13 ± 238.10 nmol・hour/L であった。血清中のフリー体型 RA

濃度は、RA500 mg内服1時間後に、最高血中濃度（124.03 ± 39.13 nmol/L）に達し、AUCは228.77 ± 82.65 nmol・hour/Lであった。血清中の抱合体型RA濃度は、RA500 mg内服2時間後に、最高血中濃度（74.50 ± 15.93 nmol/L）に達し、AUCは603.36 ± 170.92 nmol・hour/Lであった。プラセボ内服後の血清中フリー体型RAおよび抱合体型RAはいずれも測定感度以下であった。

RA代謝物としては、抱合体型RAのほかに、血清中の抱合体型クマル酸、抱合体型フェルラ酸、抱合体型カフェ酸が測定できたが、レモンバーム抽出RA 500 mg内服群とプラセボ群間でそれらの血中濃度に有意な差は認めなかった。

D. 考察

レモンバーム抽出RA 500 mg内服後の血清中抱合体型RAのAUCは、フリー体型RAに比べておよそ2.6倍大きかった。レモンバーム抽出RA 500 mg内服後の血清中抱合体型クマル酸、抱合体型フェルラ酸、抱合体型カフェ酸の有意な上昇は見られなかった。

今後、試験管内アミロイドβ線維およびオリゴマー形成反応モデルを用いて、抱合体型RAの抗アミロイド作用の解明を行っていく予定である。

E. 結論

RA内服後、ヒト体内ではフリー体型RAよりも抱合体型RAが多く存在することが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181, 2003.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565, 2009.
- 3) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J-I, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 4) Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur J Nutr* 44: 1-9, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang J, Land D, Ono K, Galvez J, Zhao W, Vempati P, Steele JW, Cheng A, Yamada M, Levine S, Mazzola P, Pasinetti GM. Molecular topology as novel strategy for discovery of drugs with Aβ lowering and anti-aggregation dual activities for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014; 9: e92750.
- 2) Wang J, Varghese M, Ono K, Yamada M, Levine S, Tzavaras N, Gong B, Hurst WJ, Blitzer RD, Pasinetti GM. Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid-β: implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 643-650.
- 3) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. *PLoS One* 2014; 9: e96013.
- 4) Miyashita A, Wen Y, Kitamura N, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Furukawa K, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moirhara T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Yamaguchi H, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y,

Ikeuchi T, Kuwano R. Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 1031-1038.

5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *Biochim Biophys Acta- Molecular Basis of Disease* 2014; 1842: 646-653.

6) Takamura Y, Ono K, Matsumoto J, Yamada M, Nishijo H. Effects of the neurotrophic agent T-817MA on oligomeric amyloid- β -induced deficits in long-term potentiation in the hippocampal CA1 subfield. *Neurobiol Aging* 2014; 35:532-536.

7) Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K, Kobayashi S. Luteolin and Quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats. *PLoS One*. 10: e97901, 2014.

8) Kobayashi S, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K. Anti-allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *J Funct Foods*. 13: 100-107, 2015.

9) Tamura T, Ozawa M, Kobayashi S, Watanabe H, Arai S, Mura K. Inhibitory effect of oligomeric polyphenols from peanut-skin on sugar digestion enzymes and glucose transport. *Food Sci Technol Res*. In press.

2. 学会発表

1) 篠原もえ子、柚木颯憇、堂本千晶、池田芳久、佐村木美晴、岩佐和夫、横川正美、浅井貴美子、駒井清暢、中村裕之、山田正仁：緑茶摂取と認知症および軽度認知障害の罹患リスク：前方視的縦断研究。第55回日本神経学会学術大会、福岡、2014.5.21-24

2) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein。第55回日本神経学会学術大会、福岡、2014.5.21-24

3) 山田正仁：認知症の神経病理を臨床診断する、治療・予防する。第55回日本神経病理学

会総会学術研究会、東京、2014.6.7

4) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Differences in the prevalence of dementia and mild cognitive impairment between early and delayed responders in a community-based study. Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen, July 12-17, 2014

5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2014, Denmark, July 12-17, 2014

6) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：アミロイド β 蛋白と α -シヌクレイン蛋白のクロス・シーディング効果。第2回日本アミロイドーシス研究会学術集会、東京、2014.8.22

7) 田村倫子、小沢恵実、小林彰子、渡辺寛人、荒井綜一、村清司。重合度の異なるラッカセイ種皮プロシアニジンの糖吸収抑制作用。第61回日本食品科学工学会、福岡、2014.8.29

8) 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclei。第37回日本神経科学大会 Neuroscience 2014、横浜、2014.9.11-13

9) 横山博、鈴木淳、船隈奈緒子、小林彰子。クロマグロの筋肉寄生ムツボシクドアの毒性試験。第35回日本食品微生物学会、大阪、2014.9.19

10) 石井剛志、竹内由紀、安井美奈、小林彰子、保田倫子、下位香代子、越阪部奈緒美、中山勉。テアフラビン類の脂質膜における分子挙動。第19回日本フードファクター学会、鹿児島、2014.11.9

11) 石井剛志、竹内由紀、安井美奈、小林彰子、保田倫子、下位香代子、越阪部奈緒美、中山勉。テアフラビン類の難吸収性に影響する因子の解析。第11回日本カテキン学会年次学術大会、東京、2014.11.22

12) 小野賢二郎、山田正仁：病態に基づいたAlzheimer病の予防・治療薬の開発。第32回日本神経治療学会総会、東京、2014.11.20-22

13) 篠原もえ子、柚木颯憇、堂本千晶、池田芳久、佐村木美晴、岩佐和夫、横川正美、駒井清

暢、中村裕之、山田正仁：緑茶摂取と認知症・軽度認知障害の罹患リスク：なかじまプロジェクト。第33回日本認知症学会学術集会、横浜、2014.11.29-12.1

14) 永井俊匡、清水愛恵、齊藤美佳、緑川景子、熊倉慧、阿部啓子、朝倉富子。粉末あるいは固形飼料を摂取させたラットの摂食行動および視床における発現遺伝子の比較解析。日本農芸化学会、岡山、2015. 3. 27

15) 鈴木千尋、安岡顕人、近藤隆、石井剛志、阿部啓子、小林彰子。大豆イソフラボンの腸管輸送因子の探索。日本農芸化学会、2015.3.28

16) 小川真奈、山梨義英、高田龍平、阿部啓子、小林彰子。フラボノイドがコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響。日本農芸化学会、岡山、2015. 3. 28

17) 宍戸駿、豊田集、浜口毅、篠原もえ子、小野賢二郎、山田正仁、阿部啓子、小林彰子。Tg2576 マウスにおけるロスマリン酸による脳

内 A β 凝集抑制効果のトランスクリプトミクスによる解析。日本農芸化学会、岡山、2015.3.29
18) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea is associated with reduced risk of cognitive decline. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/ PD), Nice, 2015. 3. 18-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし