

博士學位論文

β -セクレターゼおよびコリンエステラーゼ阻害作用を
有する天然植物資源の探索研究

平成 28 年 11 月 9 日

松 村 晋 一

目 次

緒論	1
第1章 カレースパイス類の β -セクレターゼおよびアセチルコリンエステラーゼ阻害作用	
第1節 カレースパイス類エキスの β -セクレターゼおよびアセチルコリンエステラーゼ阻害作用	5
第2節 ターメリック (<i>Curcuma longa</i> の根茎), カレーリーフ (<i>Murraya koenigii</i> の葉) およびブラックペッパー (<i>Piper nigrum</i> の果実) エキスの有効成分の探索	15
第2章 アジア各国で食されているスパイス類の β -セクレターゼ阻害作用	
第1節 アジア各国で食されているスパイス類エキスの β -セクレターゼ阻害作用および有効成分の探索	24
第2節 ターメリック (<i>Curcuma longa</i> の根茎) エキスの β -セクレターゼ阻害作用成分の探索	42
第3節 ターメロン類のマウスを用いた経口投与による脳内移行の検討	52
第3章 ゴマ (<i>Sesamum indicum</i> の種子) の β -セクレターゼおよびコリンエステラーゼ阻害作用	
第1節 ゴマ (<i>Sesamum indicum</i> の種子) エキスの β -セクレターゼおよびコリンエステラーゼ阻害作用	58
第2節 ゴマリグナン類のマウスを用いた経口投与による脳内移行の検討	64
総括	70
引用文献	73
略語一覧表	80
謝辞	

緒 論

近年、日本では急速に高齢化が進み、超高齢化社会を迎えている。厚生労働省の 2013 年の推計によると、日本人男性の平均寿命が 80.2 歳、女性の平均寿命が 86.6 歳であった¹⁾。高齢化に伴い、認知症患者も急増している。厚生労働省の発表によると、75～79、80～84 および 85～89 歳の認知症罹患率はそれぞれ 13.6、21.8 および 41.4%であり、高齢になるほど認知症の罹患率は高くなっている²⁾。また、2003 年の調査で認知症に罹患している高齢者は 2015 年までに 250 万人、2020 年には 289 万人に達すると推計していた³⁾が、2013 年の推計で認知症患者数は 462 万人にのぼったことを発表した²⁾。このように、現在予想をはるかに上回るペースで認知症患者が増加しており、その介護費および医療費など個人の経済的負担のみならず、それに伴う公的医療費の増大、被介護者の家族の介護疲労などが社会的問題となっている²⁾。したがって、認知症治療薬の開発は急務となっている。

認知症とは、学習や記憶といった認知機能が低下する疾患であり、不安やうつ、さらに異常行動などの症状が伴う。認知症にはアルツハイマー型認知症 (AD)、脳血管型認知症、レビー小体型認知症および前頭側頭型認知症があり²⁾、その中で最も患者数が多く、総認知症患者数の 5 割以上を占めているのが AD である。

AD の発症メカニズムについては多くの研究がなされ、最も有力とされているのがアミロイド仮説である。アミロイド仮説とは「老人斑」の生成が神経原線維変化を引き起こし、アセチルコリン (ACh) の減少から AD を発症するという説である。老人斑とは、神経細胞体の細胞膜上に存在するアミロイド前駆蛋白質が、セクレターゼと呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼによって切断されることで生成するアミロイド β ペプチドの凝集体である。セクレターゼには、アミロイド前駆蛋白質の切断ポイントが異なる β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼがある。最初にアミロイド前駆蛋白質に β -セクレターゼが作用し、その後 γ -セクレターゼが作用することでアミロイド β ペプチドが生成する^{4,5)}。

このように AD は、老人斑が引き起こす ACh 作動性神経系の障害により、神経伝達物質である ACh が減少することから、神経間の情報伝達が悪くなることで発症すると考えられている。よって、ACh の減少を抑制し、症状を改善させることを目的と

したアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤の開発が進められた。現在 donepezil, galantamine および rivastigmine を有効成分とする阻害薬が臨床利用されており、大きな成果を挙げている^{6,7)}。しかしながら、これら AChE 阻害剤の効果は、初期の症状に対する症状の緩和にとどまっており、病状の進行を阻止し治癒するには至っていない。また、継続服用によるスウェアーリングオフも報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

一方、アミロイド仮説をもとに、AD の根治を目指した医薬品の開発も進められている。Solanezumab のようなアミロイド β ペプチド凝集抑制を標的にした治療薬候補の研究が行われ臨床試験段階まで進んでいるが、有効性がはっきりせず未だ実用化されていない¹¹⁾。また、アミロイド前駆蛋白質の最終の切り出し酵素である γ -セクレターゼ活性を制御する治療薬の開発が行われてきたが、 γ -セクレターゼ活性の阻害はアミロイド β ペプチド産出の抑制だけでなく、細胞分化や運命決定に重要な役割を果たす Notch シグナルも抑制することが明らかになったため¹²⁾、副作用の懸念が高く、開発途中で中止になったものが多い。また、 β -セクレターゼ阻害作用を標的とした新薬の開発も進行しており、複数の製薬会社で臨床段階まで進んでいる¹³⁾。血漿中および脳脊髄液中でアミロイド β ペプチドの顕著な減少効果が認められているが、軽度の認知症患者を対象とした臨床での症状改善の有効性に関してははっきりせず、さらなる長期的な臨床を必要としている段階である。

このように、AD は薬物による根治が難しい病態であり、医薬品開発も一定の成果はあるものの、決定打となる医薬品が世に出るまでには今後さらに時間がかかる。そこで、著者は AD の「予防」の重要性に着目した。老人斑は若年期から壮年期の長期間に渡って生成・蓄積することが明らかとなっており、その生成を長期間に渡って抑制すれば、AD を未然に防ぐことができると着想した。そこで、老人斑生成の基となるアミロイド β ペプチドの生成を抑制する標的として、アミロイド前駆蛋白質の最初の切り出し酵素である β -セクレターゼに着目した (Fig. 1)。また、著者は、 β -セクレターゼを長期間に渡って阻害できる素材を天然植物資源、なかでも我々が日常口にしている食品に求めた。これは、食品が長期間に渡って、安全に摂取できるという利点があるからである。特に本研究で着目したのは、古来、その機能性を期待され、様々な分野で利用されてきたスパイスである。スパイスは食品保存のための保存料、古代

エジプトにおいては王家の死後のミイラ作りの際に防腐目的で使用されるなど、その抗菌力が着目されていた¹⁴⁾。また、インドを含むアジアや中国などの東洋では古くから生薬として使用されているものが多数ある。現代では、スパイスは主に食品の味と香りを付与する嗜好品として使用されるようになった。このように、食品でありながら様々な薬理作用・生物活性が期待できるスパイスは、AD 予防の指標となる β -セクレターゼ阻害作用のスクリーニングには、有用な資源となると考えられた。本学位論文では、スパイスからの β -セクレターゼ阻害作用を指標にしたスクリーニングに端を発し、有効成分の解明および有効成分の動態研究を実施したので、報告する。

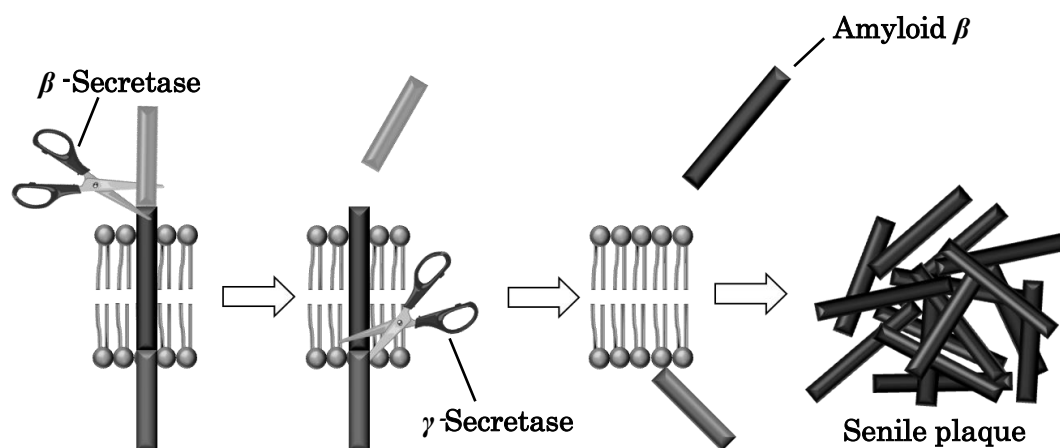


Fig. 1 Mechanism of senile plaque formulation

第 1 章第 1 節では、各スパイスのスクリーニング実験を始めるにあたり、 β -セクレターゼ阻害作用試験として新たに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて酵素反応によって生成した基質由来の蛍光ペプチド断片のみを検出する方法を検討した。スクリーニング素材としては、疫学調査でインド人に認知症の発症例が少ないことが報告¹⁵⁾されていることより、インド人が多く摂取しているカレーに着目し、その主な構成スパイス 7 種について、AD の予防効果が期待できる β -セクレターゼ阻害作用および既に医薬品の標的とされている AChE 阻害作用を検討した。第 2 節では、第 1 章第 1 節で比較的高い β -セクレターゼ阻害作用を示した各抽出エキスに関して、その有効成分の探索研究を実施した。

第2章第1節では、第1章でカレー構成スパイスに β -セクレターゼ阻害作用の有効成分が見出されたことより、さらにスクリーニングの対象を主にアジア全域で食されているスパイス16種の抽出エキスについて β -セクレターゼ阻害作用を検討し、その有効成分の探索研究を実施した。第2節では、第1章および第2章第1節の結果より、 β -セクレターゼ阻害作用が最も高かったターメリックのヘキササン抽出エキスに着目し、その中の有効成分として明らかになった α -turmerone、 β -turmerone および ar-turmerone について、より効率よく抽出できる水蒸気蒸溜にて精油成分の採取を行い、減圧蒸溜にて精油成分を分画し¹⁶⁾、その際、得られた各分画について、 β -セクレターゼ阻害作用を指標にさらなる有効成分の探索研究を実施した。第3節では、これまでの結果で β -セクレターゼ阻害作用の最も高かったターメリック由来の α -turmerone、 β -turmerone および ar-turmerone を用いて、マウスを用いた経口投与による動物実験で、老人斑の生成ポイントである脳内への有効成分の移行を検討した。

第3章第1節では、これまでのスクリーニング過程において、比較的高い β -セクレターゼ阻害作用を示したゴマ種子に着目した。その抽出物の β -セクレターゼ阻害、AChE 阻害および BuChE 阻害作用を検討し、 β -セクレターゼ阻害作用に関してはその有効成分の探索研究を行った。第2節では、第3章第1節で明らかになった有効成分についてはマウスを用いた経口投与による動物実験で、老人斑の生成ポイントである脳内への有効成分の移行を検討した。

現在 AD と同様に発症までに数十年かかると言われている疾患にがんがある。がんは日本人の死因第1位であり、世界各国の死因でも上位を占め様々な角度から治療、予防策が提案されている。その予防策のひとつとして1990年にアメリカ国立がん研究所から発表された「デザイナーフーズピラミッド」があり、がん予防に効果のある食品をその効果の強さに分け、一般の人々にもわかりやすい形で紹介している¹⁷⁾。日本でもがん予防の啓蒙に利用されている。しかしながら、認知症に関してこのようなアプローチはほとんどなく、今後できるだけ早い時期に認知症に関するデータが作成され、発表されることが期待される。本研究の成果は、認知症におけるデザイナーフーズピラミッドの一助となることが期待される。

第1章 カレースパイス類の β -セクレターゼおよびアセチルコリンエステラーゼ阻害作用

第1節 カレースパイス類エキスの β -セクレターゼおよびアセチルコリンエステラーゼ阻害作用

I. 緒言

β -セクレターゼ阻害作用を有する植物資源を探索するにあたり、食経験が豊富で安全性の担保されている食品、特に生薬として既に利用されていることから薬効が期待できるスパイスに着目した。その中でも疫学調査によりインド人に認知症の発症例が少ないことが報告¹⁵⁾されていることから、インド人が多く摂取しているカレーに着目した。その主な構成スパイスであるクミン (*Cuminum cyminum* の種子, CC), ターメリック (*Curcuma longa* の根茎, CL), チリペッパー (*Capsicum annum* の果実, CP), コリアンダーリーフ (*Coriandrum sativum* の葉, CSL), コリアンダーシード (*Coriandrum sativum* の種子, CSS), カレーリーフ (*Murraya koenigii* の葉, MK) およびブラックペッパー (*Piper nigrum* の果実, PN) の各抽出エキスについて、 β -セクレターゼおよび AChE 阻害作用を検討した。

β -セクレターゼ阻害作用試験においては、従来法であるマイクロプレートリーダーにより蛍光強度を測定する試験法について、蛍光検出する際に抽出エキスの自家蛍光による妨害物質の懸念があった。各スパイスのスクリーニング実験を始めるにあたり、この妨害物質の影響を排除するため、蛍光 HPLC を用いて酵素反応により生成した基質由来の蛍光ペプチド断片のみを検出する方法を検討した。

また、 β -セクレターゼ阻害作用に関して、天然植物抽出エキスからの研究報告が少ない。本研究では 70%メタノール抽出エキス (MeOH-ext) での評価だけでなく低極性から高極性の抽出溶媒である *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc), 次いで methanol (MeOH) で同一原料を順番に分画抽出し、極性の違いにより抽出エキスの阻害作用が異なるかを検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

実験材料として、CC, CL, CP, CSL, CSS, MK および PN を Plant Lipids (P) Limited (Cochin, India) より購入し、被検体に供した。

2. 試薬

Fast blue B salt (MP Biomedicals Inc.) および Triton X-100 (Alfa Aesar®, サーマフィッシャーサイエンティフィック (株)), β -セクレターゼ基質; MOCAc-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Arg-Arg-NH₂, β -セクレターゼ阻害剤; Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe[Sta(Statine): (3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanoic acid] (Inhibitor I) (以上, (株) ペプチド研究所), AChE, β -セクレターゼ (以上, (株) Sigma-Aldrich), galantamine hydrobromide (東京化成工業 (株)) を用いた。その他の試薬は、特に断りがない限り和光純薬工業 (株), GE ヘルスケアおよびナカライテスク (株) の特級グレードを用いた。

3. 実験方法

3-1) 70%メタノール抽出エキスの調製方法

粉碎した各被検体 20 g に 70% (v/v) MeOH 160 mL を加えて、40 °C で 1 h 攪拌抽出し、懸濁液をろ紙ろ過した。その残渣に 70% (v/v) MeOH 40 mL を加えて、再び 40 °C で 30 min 攪拌抽出し、懸濁液をろ紙ろ過した。先に抽出したろ液と合わせ、エバポレーターで溶媒を溜去し、抽出エキスを得た。上述の方法で得たそれぞれの被検体からの抽出エキスの収率は、CC ; 37.6, CL ; 16.1, CP ; 28.6, CSL ; 24.8, CSS ; 4.4, MK ; 17.6 および PN ; 21.0%であった。

3-2) ヘキサン, 酢酸エチルおよびメタノール抽出エキスの調製方法

粉碎した各被検体 1,000 g に *n*-hexane 5,000 mL を加えて, 40 °C で 2 h 攪拌抽出し, 懸濁液をろ紙ろ過した. その残渣に *n*-hexane 5,000 mL を加えて, 40 °C で 2 h 攪拌抽出し, 懸濁液をろ紙ろ過した. 先に抽出したろ液と合わせ, エバポレーターで溶媒を溜去し, ヘキサン抽出エキス (*n*-hexane-ext) を得た. 抽出残渣を乾燥させ, EtOAc, 次いで MeOH にて先の *n*-hexane-ext と同様の方法で抽出し, 酢酸エチル抽出エキス (EtOAc-ext) および MeOH-ext を得た. 各抽出エキスの収率は Table 1 に示した.

Table 1 Yields of *n*-hexane, EtOAc and MeOH-ext obtained from spices

Sample	Yields (%)		
	<i>n</i> -Hexane	EtOAc	MeOH
<i>Cuminum cyminum</i> (CC)	22.6	1.8	11.9
<i>Curcuma longa</i> (CL)	5.0	9.4	3.0
<i>Capsicum annum</i> (CP)	20.7	1.0	10.1
<i>Coriandrum sativum</i> (CSL)	1.4	1.4	18.0
<i>Coriandrum sativum</i> (CSS)	20.5	1.2	6.1
<i>Murraya koenigii</i> (MK)	3.2	1.9	10.2
<i>Piper nigrum</i> (PN)	6.6	5.4	3.2

3-3) β -セクレターゼ阻害作用試験

アッセイバッファー (20 mmol/L sodium acetate buffer, pH 4.5, 0.1% Triton X-100 添加) 78 μ L と被検体の dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液 2 μ L を 0.6 mL サンプルチューブに入れ, その後, 酵素溶液 (β -セクレターゼ, 17.4 μ g protein/mL) 10 μ L を入れて混合し, 37 °C で 10 min プレインキュベートした. β -セクレターゼ基質溶液 0.1 mmol/L 10 μ L を加えて混合し, 37 °C で 1 h インキュベートした. 反応後, 2.5 mol/L sodium acetate 溶液 50 μ L を加え, 反応を停止させた. 反応液 100 μ L に水 900 μ L 加えて 10 倍希釈し, HPLC 分析に供した. 生成した蛍光ペプチド断片由来のピーク面積値を測定し, 下記の式より阻害率 (%) を算出した. 陽性対照薬には Inhibitor I を用いた.

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{被検体由来のピーク的面積値}}{\text{コントロール由来のピーク面積値}} \right) \times 100 \right]$$

HPLC 分析条件 (蛍光ペプチド断片 ; MOCAc-Ser-Glu-Val-Asn-Leu)

装置 ; Shimadzu Class VP system (LC-10AD_{VP})

カラム ; L-column ODS (4.6 i.d. × 250 mm, 5 μm, (財) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; 0.1% (v/v) formic acid water : acetonitrile

0 min (9 : 1, v/v) → 20.00 min (1 : 1, v/v) → 21.00 min (9 : 1, v/v) → 35.00 min (9 : 1, v/v) → 35.01 min (STOP)

流速 ; 1.0 mL/min

カラム温度 ; 40 °C

検出器 ; 蛍光検出器 (RF-10A_{XL}), 励起波長 Ex. 325 nm / 蛍光波長 Em. 395 nm

注入量 ; 20 μL

保持時間 (R.T.) ; 16.8 min

3-4) AChE 阻害作用試験^{18, 19)}

アッセイバッファー (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer, Tris-塩酸 pH 7.8) 180 μL, 被検体の DMSO 溶液 5 μL, 酵素溶液 (AChE, 0.10 U/mL) 10 μL および基質溶液 (1-naphthylacetate, 0.45 mM) 5 μL を加えて混合し, 37 °C で 1 h インキュベートした. 反応後, 5% sodium dodecylsulfate (SDS) 25 μL および発色試薬 (Fast blue B salt, 0.20 mM) 25 μL を加えて, 波長 600 nm における吸光度を測定した. 酵素阻害率は, 被検体を含まない反応液から得られた吸光度に対する割合から算出した. 陽性対照薬には, galantamine hydrobromide を用いた.

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - [(\text{被検体由来の吸光度} / \text{コントロール由来の吸光度}) \times 100]$$

4. 統計処理

すべてのデータは、一元配置分散分析によって統計的に解析し、多重比較検定 (Bonferroni/Dunn の計算式) を用いて有意差検定を実施した。ソフトウェアには Statcel 3 (出版社 OMS (株)) を使用した。

III. 実験結果および考察

1. 70% MeOH-ext の β -セクレターゼ阻害作用

β -セクレターゼ阻害実験を始めるにあたり、当該酵素の阻害作用試験として既に報告されている消光性蛍光基質を用いたマイクロプレートリーダーによる試験を予備的に実施した (データ省略)。予備実験では、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定する場合、抽出エキスの自家蛍光により妨害されることが判明した。そこで、妨害物質の影響を排除するため、本実験では HPLC にて消光性蛍光基質由来の蛍光ペプチド断片 (MOCAc-Ser-Glu-Val-Asn-Leu) のみを分離して検出する方法を検討した。本実験で用いた HPLC での検出例を Fig. 2 に示した。R.T. 30.6 min に不純物由来の大きなピークを検出した。このピークは蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定では妨害物質になっていると考えられた。HPLC 法では不純物由来のピークを分離でき、蛍光ペプチド断片のみのピークを検出できるので、より正確な測定ができると考えられた。

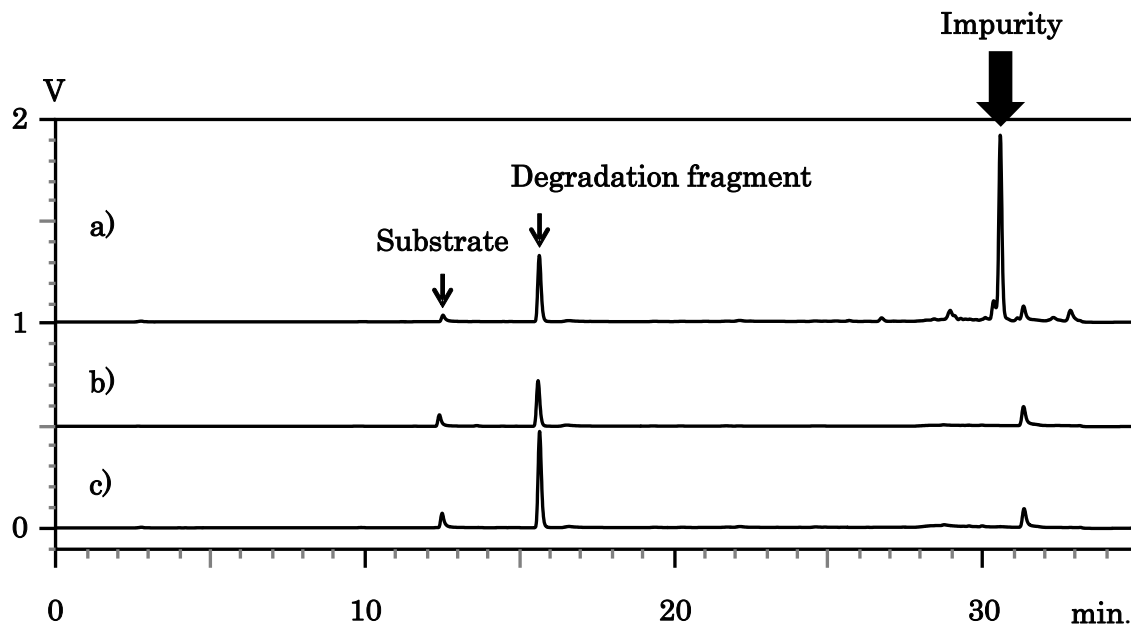


Fig. 2 Typical chromatogram of a detecting fluorescent fragment cleaved by β -secretase

The chromatograms were obtained from the injection of reaction mixture of *n*-hexane-ext from MK (a), Inhibitor I (b) and control (c).

各被検体の 70% MeOH-ext の阻害作用を Fig. 3 に示した. CL および PN において高い阻害作用が認められた. CL は 250 $\mu\text{g/mL}$ で 47.4%, 500 $\mu\text{g/mL}$ で 49.3% の阻害作用で, PN はそれぞれ 38.3 および 49.7% の阻害作用であった.

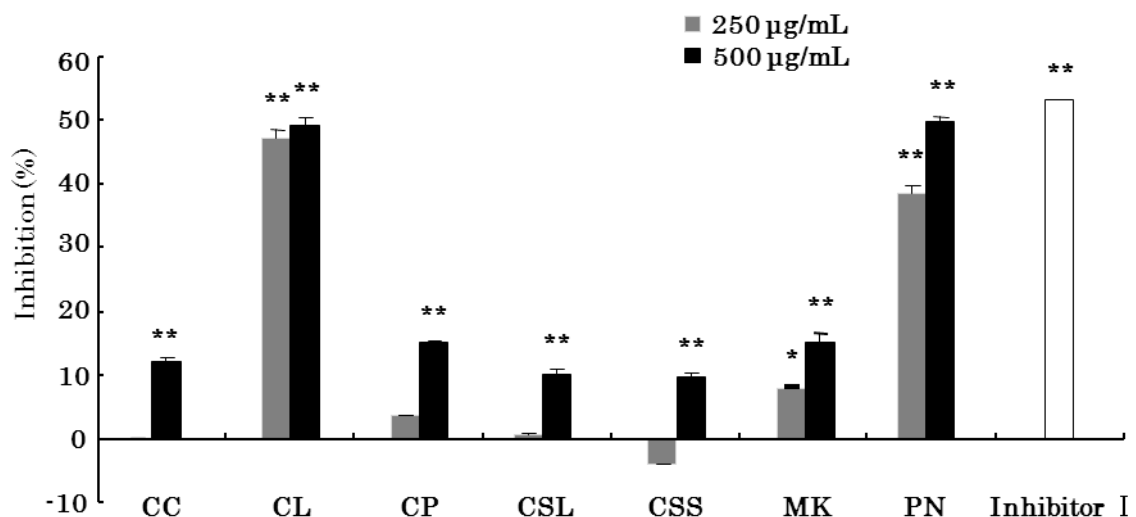


Fig. 3 β -Secretase inhibitory activities of 70% MeOH-ext obtained from spices

Inhibitor I was tested at 2 μM . Data are shown in mean with standard deviations as error bars ($n=3$). Significantly different from control group, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

2. 70% MeOH-ext の AChE 阻害作用

緒論で述べた通り，AChE 阻害作用は，既に認知症の治療薬の創薬ターゲットとして認知されている．この酵素を阻害する作用を評価することで，認知症の治療素材としての有効性を評価し得ると考えられる．各被検体の阻害作用を Table 2 に示した．CL と PN は 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で阻害作用がそれぞれ 53.7 および 21.6%を示した．

Table 2 AChE inhibitory activities of 70% MeOH-ext obtained from spices

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibition (%)
<i>Cuminum cyminum</i> (CC)	250	5.6 \pm 0.2
	500	1.8 \pm 0.1
<i>Capsicum annum</i> (CP)	250	8.7 \pm 0.4
	500	10.1 \pm 0.3
<i>Coriandrum sativum</i> (CSL)	250	- 0.2 \pm 0.0
	500	4.9 \pm 0.4
<i>Coriandrum sativum</i> (CSS)	250	3.9 \pm 0.2
	500	- 4.6 \pm 0.2
<i>Curcuma longa</i> (CL)	250	53.7 \pm 1.7**
	500	76.4 \pm 7.6**
<i>Murraya koenigii</i> (MK)	250	9.7 \pm 0.4
	500	12.7 \pm 0.3**
<i>Piper nigrum</i> (PN)	250	21.6 \pm 1.0**
	500	36.2 \pm 0.7**
Galantamine	5 μM	45.3 \pm 2.2**
	10	54.9 \pm 4.3**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from the control group, **; $p < 0.01$.

3. *n*-Hexane-ext, EtOAc-ext および MeOH-ext の β -セクレターゼ阻害作用

スパイスは香料成分を多く含んでおり、香料成分は揮発性、低分子のものが多いため、 β -セクレターゼ阻害作用のスクリーニングには、70% MeOH-ext での評価だけでなく低極性から高極性の抽出溶媒である *n*-hexane, EtOAc, 次いで MeOH で同一原料を順番に分画抽出し、極性の違いによる抽出エキスの阻害作用に差異が見られるか比較検討した。各エキスの β -セクレターゼ阻害結果を Fig. 4 に示した。

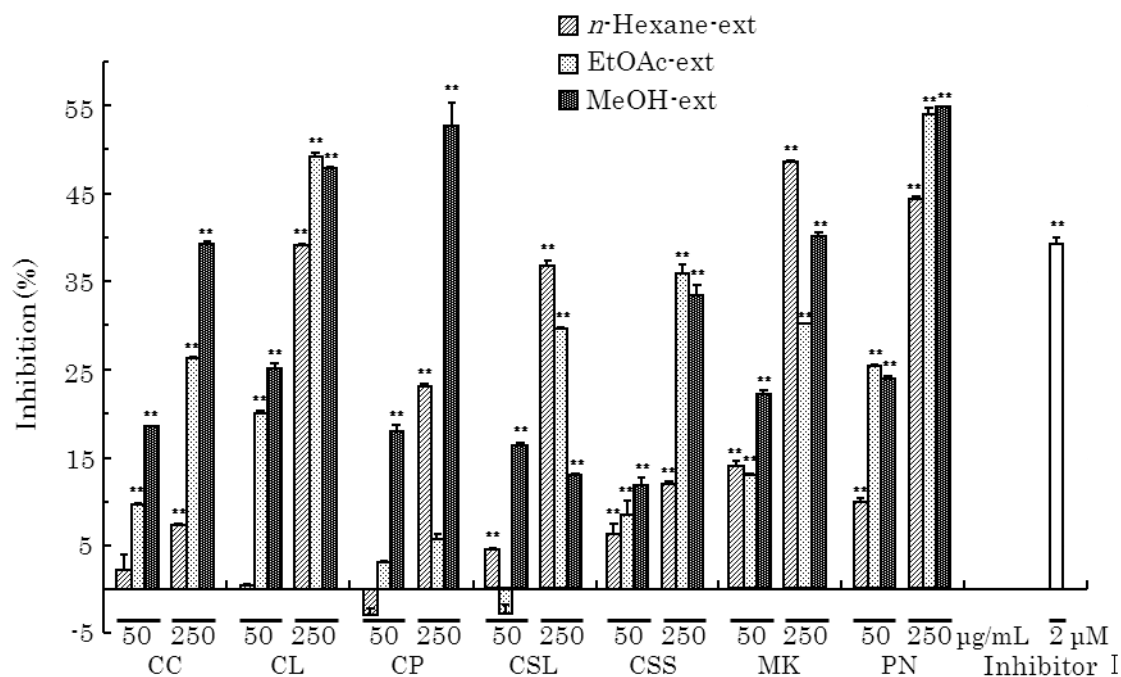


Fig. 4 β -Secretase inhibitory activities of *n*-hexane, EtOAc and MeOH-ext obtained from spices

Data are shown in mean with standard deviations as error bars ($n=3$). Significantly different from control group, **: $p<0.01$.

CL, MK および PN の *n*-hexane-ext と EtOAc-ext は, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 39.1, 48.6 および 49.2, 30.2 および 53.9%の阻害作用を示した. それぞれ同素材の 70% MeOH-ext と比較しても高い阻害作用を示した. よって植物由来の β -セクレターゼ阻害作用成分の探索には低極性抽出物および精油が適していると考えられた²⁰⁾.

次に, MeOH-ext においては PN の阻害作用が最も強く 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 54.7%の阻害作用が認められた. MeOH-ext は, *n*-hexane-ext および EtOAc-ext と同様に阻害作用は認められたが, 酵素反応液そのものに濁りを生じたため非特異的阻害作用の可能性を考慮し, MeOH-ext からのさらなる探索は中止した.

IV. 小括

本節では、インド人が多く摂取しているカレーに着目し、その主な構成スパイスである CC, CL, CP, CSL, CSS, MK および PN の抽出物について、AD の予防に繋がると期待できる β -セクレターゼ阻害作用を検討した。さらに、AD の改善に繋がると期待できる AChE 阻害作用を検討した。その際 β -セクレターゼ阻害作用試験においては、各スパイスのスクリーニング実験を始めるにあたり、HPLC を用いて酵素反応によって生成した基質由来の蛍光ペプチド断片のみを検出する方法を検討した。

その結果、自家蛍光を持つ植物の粗抽出エキスであっても正確に β -セクレターゼ阻害作用を評価する方法を考案し実施した。上記 7 種のスパイスの抽出エキスについて、この方法を用いて β -セクレターゼ阻害作用および AChE 阻害作用を検討した結果、CL および PN の 70% MeOH-ext において高い阻害作用が認められた。また、CL, MK および PN の *n*-hexane-ext および EtOAc-ext では、それぞれの同素材の 70% MeOH-ext のそれらと比較すると高い阻害作用を示した。天然植物資源からの AChE 阻害物質のスクリーニングは、galantamine を発見し大きな成功を収めた²¹⁾。これに対し、 β -セクレターゼ阻害作用成分の探索の現状は、ソテツ科植物から得られるビフラボノイド²²⁾やスペインカンゾウからのヒドロキシカルコン²³⁾に限られていた。これは、正確な測定方法の欠如がその要因のひとつと推定される。本研究で用いた HPLC 法は、消光性蛍光基質から生成した蛍光ペプチド断片を検出する方法であるため、マイクロプレートリーダーによる分析と比較するとより正確であると考えられる。

第2節 ターメリック (*Curcuma longa* の根茎), カレーリーフ (*Murraya koenigii* の葉) およびブラックペッパー (*Piper nigrum* の果実) エキスの有効成分の探索

I. 緒言

第1章第1節でカレーの構成スパイスである CC, CL, CP, CSL, CSS, MK および PN について, それぞれの 70% MeOH-ext および同一原料からそれぞれ *n*-hexane-ext, EtOAc-ext および MeOH-ext を調製し, β -セクレターゼおよび AChE 阻害作用を明らかにした. その結果, CL の EtOAc-ext, MK の *n*-hexane-ext および PN の EtOAc-ext に比較的高い阻害作用が見られた. それらの各抽出エキスに関して, その β -セクレターゼ阻害作用成分の探索研究を実施した.

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

第1章第1節にて抽出された CL の EtOAc-ext, MK の *n*-hexane-ext および PN の EtOAc-ext を被検体に供した.

2. 試薬

第1章第1節に記したものをを用いた.

3. 実験方法

3-1) β -セクレターゼ阻害作用試験

第1章第1節に記した方法で行った.

3-2) CL-EtOAc-ext の HPLC 定量分析

CL-EtOAc-ext を下記の条件で分析し、定量は標準品 (bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin および curcumin) を使用し、絶対検量線法より求めた。

HPLC 分析条件 (bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin)

装置 ; Shimadzu Class VP system (LC-10AD_{VP})

カラム ; L-column ODS (4.6 i.d. × 250 mm, 5 μm, (財) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; 0.1% (v/v) formic acid water : acetonitrile

0 min (11 : 9, v/v) → 25 min (STOP)

流速 ; 1.0 mL/min

カラム温度 ; 40 °C

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; 450 nm

注入量 ; 20 μL

標準試薬 ; Bisdemethoxycurcumin (≧ 98%, HPLC, 長良サイエンス (株))

R.T. : 14.1 min

Demethoxycurcumin (≧ 98%, HPLC, 長良サイエンス (株))

R.T. : 15.9 min

Curcumin (≧ 98%, HPLC, 長良サイエンス (株))

R.T. : 18.0 min

3-3) ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析

MK-*n*-hexane-ext は下記の条件で分析し、その含有量はガスクロマトグラフィー (GC) にて面積百分率法により求めた。また、化合物の同定は、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) の結果をデータベース (Wiley 7th および NIST08) のマスフラグメントを照合し、さらに R.T.を確認することで実施した。

GC 分析条件

装置 ; Agilent 6890N GC System

カラム ; Inertcap Pure Wax (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm, GLサイエンス (株))

注入量 ; 1.0 μL

昇温プログラム ; 0 min, 50 °C → 2 min, 50 °C → (2.5 °C昇温/min) → 78 min
240 °C (STOP)

気化室温 ; 250 °C

キャリアガス ; ヘリウム (1.2 mL/min)

スプリット比 ; 1/80

検出器 ; 水素炎イオン化検出器

GC/MS 分析条件

装置 ; Agilent 5973 GC/MS System

測定モード ; 電子イオン化法 (70 eV), TIC Scan

MS 温度 ; イオン源 230 °C, 四重極 150 °C

スキャン幅 ; m/z 25~350

検出器 ; 質量分析 (MS) 検出器

3-4) MK-*n*-hexane-ext の有効成分の精製

MK-*n*-hexane-ext 5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (No. 107734, silica gel 60, Merck, 5.0 i.d. × 50 cm, 490 g) に付した. *n*-Hexane / EtOAc 混合溶媒系でそれぞれ 1,000 mL ずつ溶出し, *n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (10 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (5 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) および EtOAc 分画を得た. *n*-Hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) の分画を GC/MS で分析した.

3-5) PN-EtOAc-ext の HPLC 定量分析

PN-EtOAc-ext を下記の条件で分析し, 定量は標準品 (piperine) を使用し, 絶対検量線より求めた.

HPLC 分析条件 (piperine)

装置 ; Shimadzu Class VP system (LC-10AD_{VP})

カラム ; YMC-Pack ODS-A (4.6 i.d. × 150 mm, 5 μm, (株) YMC)

移動相 ; 0.1% (v/v) formic acid water : acetonitrile : tetrahydrofuran

0 min (55 : 47 : 7, v/v) → 20 min (STOP)

流速 ; 1.0 mL/min

カラム温度 ; 40 °C

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; 343 nm

注入量 ; 20 μL

標準試薬 ; Piperine (98%, Alfa Aesar®, サーマフィッシャーサイエンティフィック (株))

R.T. : 6.3 min

4. 統計処理

第 1 章第 1 節と同様の方法で行った.

III. 実験結果および考察

1. CL-EtOAc-ext の有効成分

CL-EtOAc-ext からの有効成分の探索には、HPLC 分析を用いた。主成分として bisdemethoxycurcumin (1), demethoxycurcumin (2) および curcumin (3) がそれぞれ 6.4, 9.8 および 29.8%含有していた (Fig. 5) (Fig. 6)。これら 3つの化合物の β -セクレターゼ阻害作用を測定した結果、化合物 1, 2 および 3 の IC_{50} 値はそれぞれ 1.5, 0.63 および 0.56 mM であった。クルクミノイドの β -セクレターゼ阻害作用については、既に報告されている²⁴。また、3 にはタウタンパク質の分解を促進することも報告^{25, 26}されており、これらのことから既に神経疾患における臨床試験に適用されている²⁷⁻³⁰。よってクルクミンは認知症の予防および治療に有望な成分であるといえる。

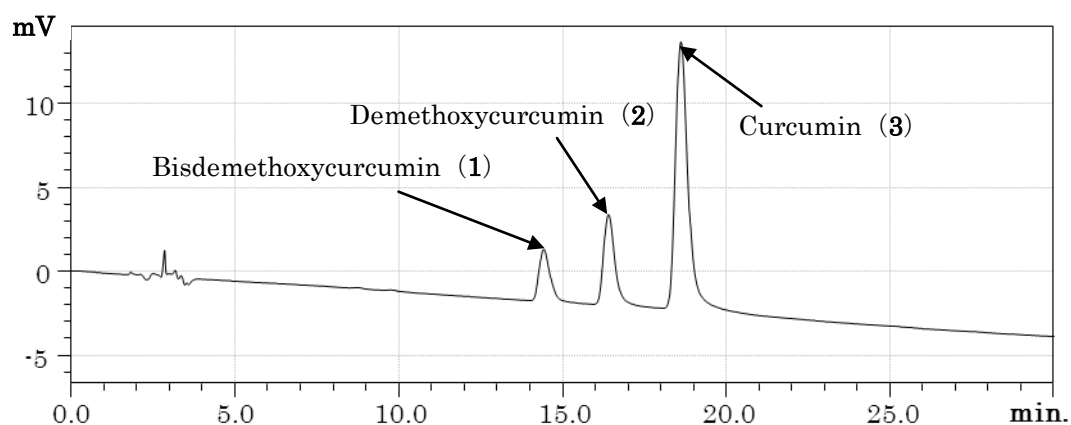


Fig. 5 HPLC chart of CL-EtOAc-ext (450 nm)

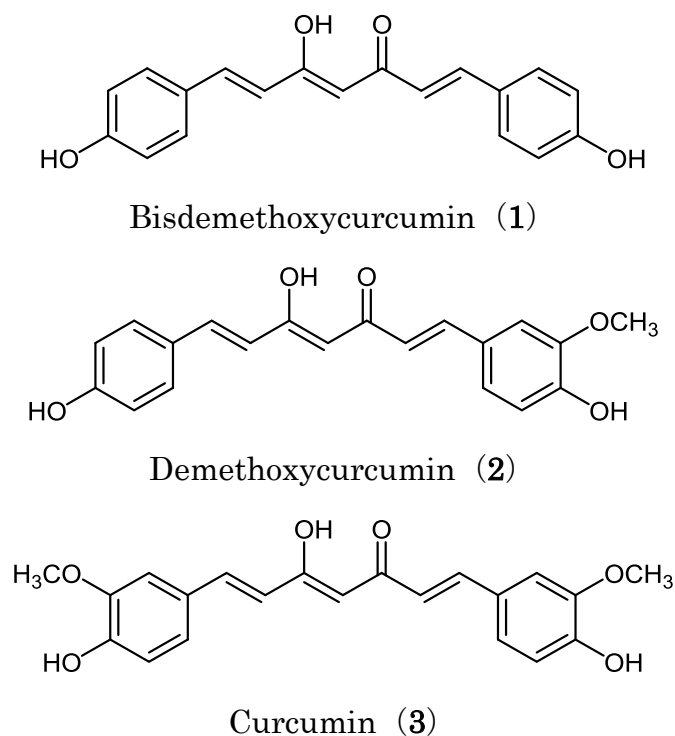


Fig. 6 Structures of β -secretase inhibitors identified from CL-EtOAc-ext

2. MK-*n*-hexane-ext の有効成分

MK からの β -セクレターゼ阻害作用成分の精製は、高い阻害作用を示した *n*-hexane-ext を用いて行った。展開溶液として *n*-hexane と EtOAc の混合物により、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画した。阻害作用は最も低極性分画で高い阻害作用を示した。高い阻害作用を示した分画について、GC および GC/MS で分析し成分およびその含有量を確認した (Fig. 7)。その結果、 β -caryophyllene (4) が 26.5%、 α -caryophyllene (5) が 25.9% および β -caryophyllene oxide (6) が 26.6% を同定した (Fig. 8)。これら 3 つの化合物は炭素数 15 からなるセスキテルペンである。化合物 4、5 および 6 の IC₅₀ 値はそれぞれ 4.2、2.3 および 1.2 mM であった。これらのことよりカリオフィレン骨格では酸素原子が付加したエポキサイドの方が、より阻害作用が高いことが判明した。

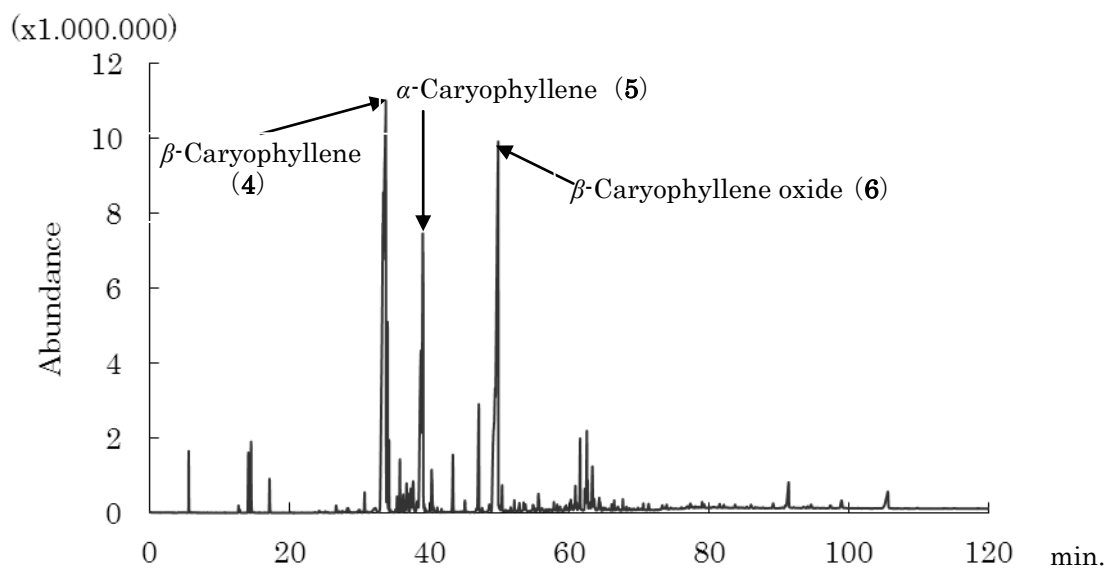


Fig. 7 GC chart of *n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) fraction of MK-*n*-hexane-ext

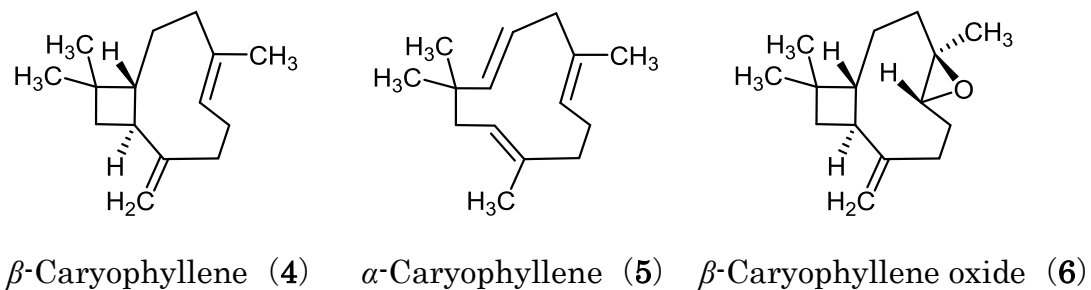
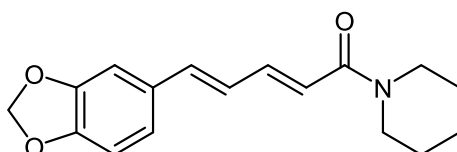


Fig. 8 Structures of β -secretase inhibitors identified from MK-*n*-hexane-ext

3. PN-EtOAc-ext の有効成分

PN-EtOAc-ext からの有効成分の探索では、HPLC 分析により、piperine (7) (Fig. 9) を 72.7%含有していたことから、これを有効成分であると推定した (Fig. 10). 化合物 7 の β -セクレターゼ阻害作用を測定したところ、その IC_{50} 値は 0.58 mM であった.



Piperine (7)

Fig. 9 Structure of β -secretase inhibitor identified from PN-EtOAc-ext

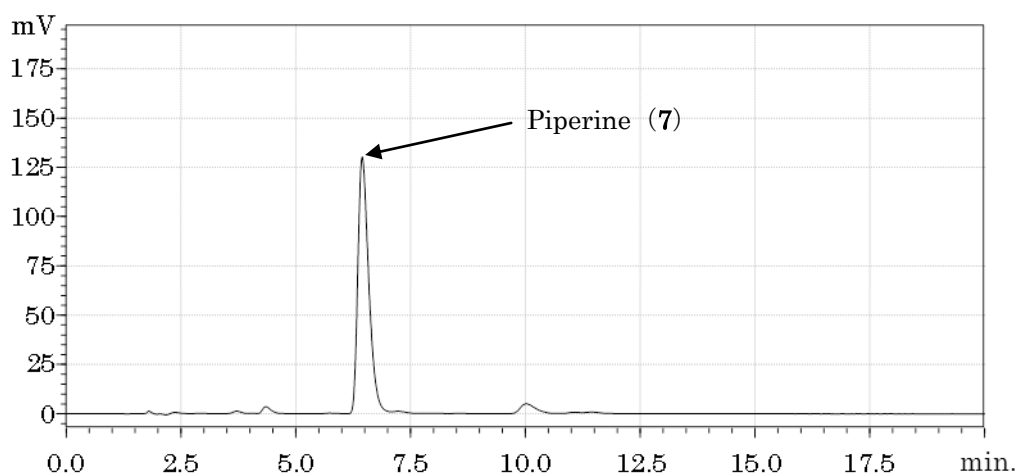


Fig. 10 HPLC chart of PN-EtOAc-ext (343 nm)

IV. 小括

第1章第1節でカレーの構成スパイスである CC, CL, CP, CSL, CSS, MK および PN について, β -セクレターゼおよび AChE 阻害作用を指標に CL の EtOAc-ext, MK の *n*-hexane-ext および PN の EtOAc-ext に比較的高い阻害作用を確認し, それらの各抽出エキスに関して, その有効成分の探索研究を実施した. その結果, CL より化合物 **1**, **2** および **3** を明らかにした. さらに本研究により初めて MK および PN から β -セクレターゼ阻害作用成分としてセスキテルペン類である化合物 **4**, **5** および **6** を, アルカロイドである **7** を明らかにした.

第1章第1節および第2節から得られた結果より, CL, MK および PN は β -セクレターゼ阻害作用と AChE 阻害作用の両方の作用を併せ持ち, さらに長期に渡り食経験が豊富であることより, 有望な抗認知症作用素材になり得る可能性がある.

第2章 アジア各国で食されているスパイス類の β -セクレターゼ阻害作用

第1節 アジア各国で食されているスパイス類エキスの β -セクレターゼ阻害作用および有効成分の探索

I. 緒言

第1章において蛍光ペプチド断片を HPLC で測定する方法を検討し、妨害物質の影響を排除し β -セクレターゼ阻害作用を評価できた。その結果、自家蛍光を有する植物のエキスについても阻害作用を正確に評価することが可能となった。よって第1章で検討したカレーに含まれるスパイスから、アジアの国々で使用されるスパイスにも拡大し β -セクレターゼ阻害作用を検討することを着想した。第1章第1節および第2節で有効性が見出された CL より着想を得て、ショウガ類で根茎が用いられるジャヴァランガル (*Alpinia galanga* の根茎, AG), 春ウコン (*Curcuma aromatica* の根茎, CA), ガジュツ (*C. zedoaria* の根茎, CZ), ガランガル (*Kaempferia galanga* の根茎, KG), ジンジャー (*Zingiber officinale* の根茎, ZO) および白ウコン (*Z. zerumbet* の根茎, ZZ) の6種類, PN 類より着想を得て、キンマ (*Piper betle* の葉, PB), ヒハツ (*P. longum* の果実, PL) および“チャイニーズペッパー”と称されているカショウ (*Zanthoxylum bungeanum* の花, ZB) の3種類を選定した。さらに、カレー構成スパイスとしても常用されるシナモン (*Cinnamomum zeylanicum* の樹皮, CI), クローブ (*Syzygium aromaticum* の蕾, SA) およびメッチ (*Trigonella foenum-graecum* の種子, TF) の3種類, 非常に高価であり生薬として鎮静および鎮痛目的で使用されるサフラン (*Crocus sativus* の柱頭, CS), 高価であり高貴な香りを持つことから“クイーンスパイス”と称され、生薬としても小豆蔻の名称で芳香性健胃作用が知られているカルダモン (*Elettaria cardamomum* の種子, EC) およびスパイスとして使用されるだけでなく広く食用油の原料として使用されるゴマ (*Sesamum indicum* の種子, SI) を選定した。選定したスパイス類の β -セクレターゼ阻害作用の検討および有効成分の探索を行った。その際、再現性の確認と他の素材

との比較対象として CL についても再度検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

実験材料には, AG, CA, CL, CZ, KG, ZO, ZZ, PB, PL, ZB, CI, SA, TF, CS, EC および SI (すべて稲畑香料 (株) より提供) を用いた。

2. 試薬

第 1 章第 1 節に記したものをを用いた。

3. 実験方法

3-1) *n*-Hexane-ext, EtOAc-ext および MeOH-ext の調製方法

粉碎した各被検体に 5 倍量の *n*-hexane を加えて, 40 °C で 1 h 攪拌抽出し, 懸濁液をろ紙ろ過した。その残渣に 5 倍量の *n*-hexane を加えて, 40 °C で 30 min 攪拌抽出し, 懸濁液をろ紙ろ過した。先に抽出したろ液を合わせ, エバポレーターで溶媒を溜去し, *n*-hexane-ext を得た。抽出残渣を乾燥させ, EtOAc, 次いで MeOH にて先の *n*-hexane-ext と同様の方法で抽出し, EtOAc-ext および MeOH-ext を得た。各抽出エキスの収率を Table 3 に示した。

Table 3 Yields of *n*-hexane, EtOAc and MeOH-ext obtained from spices

Sample	Yields (%)		
	<i>n</i> -Hexane	EtOAc	MeOH
<i>Alpinia galanga</i> (AG)	0.8	1.4	2.1
<i>Curcuma aromatica</i> (CA)	3.1	3.2	3.2
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (CI)	0.3	3.0	11.8
<i>Curcuma longa</i> (CL)	6.2	5.5	3.2
<i>Crocus sativus</i> (CS)	4.3	2.2	37.2
<i>Curcuma zedoaria</i> (CZ)	1.8	1.7	2.4
<i>Elettaria cardamomum</i> (EC)	0.9	2.2	4.0
<i>Kaempferia galanga</i> (KG)	1.9	0.4	2.8
<i>Piper betle</i> (PB)	2.7	6.5	12.8
<i>Piper longum</i> (PL)	6.8	1.4	2.4
<i>Syzygium aromaticum</i> (SA)	8.2	6.3	5.8
<i>Sesamum indicum</i> (SI)	51.0	6.3	3.8
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (TF)	3.5	2.2	8.3
<i>Zanthoxylum bungeanum</i> (ZB)	10.7	3.3	12.2
<i>Zingiber officinale</i> (ZO)	3.7	1.8	5.7
<i>Zingiber zerumbet</i> (ZZ)	1.4	0.9	2.1

3-2) β -セクレターゼ阻害作用試験

第1章第1節に記した方法で行った.

3-3) GC および GC/MS 分析

第1章第2節に記した方法で行った.

3-4) CL-*n*-hexane-ext の有効成分の精製

CL-*n*-hexane-ext を以下の条件下で分取 HPLC に付し, R.T. 12.5, 11.4 および 8.4 min よりそれぞれ淡黄色オイル状物質が得られ, *n*-hexane-ext からの収率は, それぞれ 3.1, 2.9 および 0.8%であった.

分取 HPLC 条件

装置 ; Shimadzu LC-solution system (LC-8A)

カラム ; L-column ODS (20 i.d. × 250 mm, 5 μm, (財) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; water : acetonitrile (20 : 80, v/v)

流速 ; 18.9 mL/min

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; 190 および 243 nm

3-5) PL-*n*-hexane-ext の有効成分の分画精製

PL-*n*-hexane-ext (5.0 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (No. 107734 silica gel 60, Merck, 5.0 i.d. × 50 cm, 490 g) に付した. *n*-Hexane / EtOAc 混合溶媒系でそれぞれ 1,000 mL ずつ溶出し, *n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (10 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (5 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) および EtOAc 分画を得た. 得られた活性分画のうち *n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) 分画 0.6 g および *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) 分画 0.23 g を以下の分取 HPLC 条件で精製した. *n*-Hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) 分画の有効成分として R.T. 20.4 min より無色結晶を単離した. *n*-Hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) 分画からは R.T. 9.3 min より白色粉末を単離した.

分取 HPLC 条件

装置 ; Shimadzu LC-solution system (LC-8A)

カラム ; L-column ODS (20 i.d. × 250 mm, 5 μm, (財) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; water : acetonitrile (25 : 75, v/v)

流速 ; 18.9 mL/min

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; 260 nm

4. 統計処理

第 1 章第 1 節に記した方法で行った.

III. 実験結果および考察

1. 各種スパイスエキスのβ-セクレターゼ阻害作用

各スパイスから取得した *n*-hexane-ext, EtOAc-ext および MeOH-ext についてβ-セクレターゼ阻害作用を検討し, その結果を Fig. 11, 12 および 13 に示した.

はじめに, *n*-hexane-ext においては, 250 μg/mL 濃度で CL が 82.5% と最も高い阻害作用を示した. また EC, PL, ZB, CI, PB, CZ および KG が同濃度でそれぞれ 75.3, 71.7, 60.6, 57.1, 56.3, 54.1 および 54.0% の阻害作用を示した (Fig. 11).

CL-*n*-hexane-ext の阻害作用は, 250 μg/mL 濃度で約 50% であることを第 1 章第 2 節で示した. 今回の結果のずれは, 阻害作用成分が揮発性化合物であるため, 抽出の際のわずかな手順の変化により含有量が変わる可能性があることを示した.

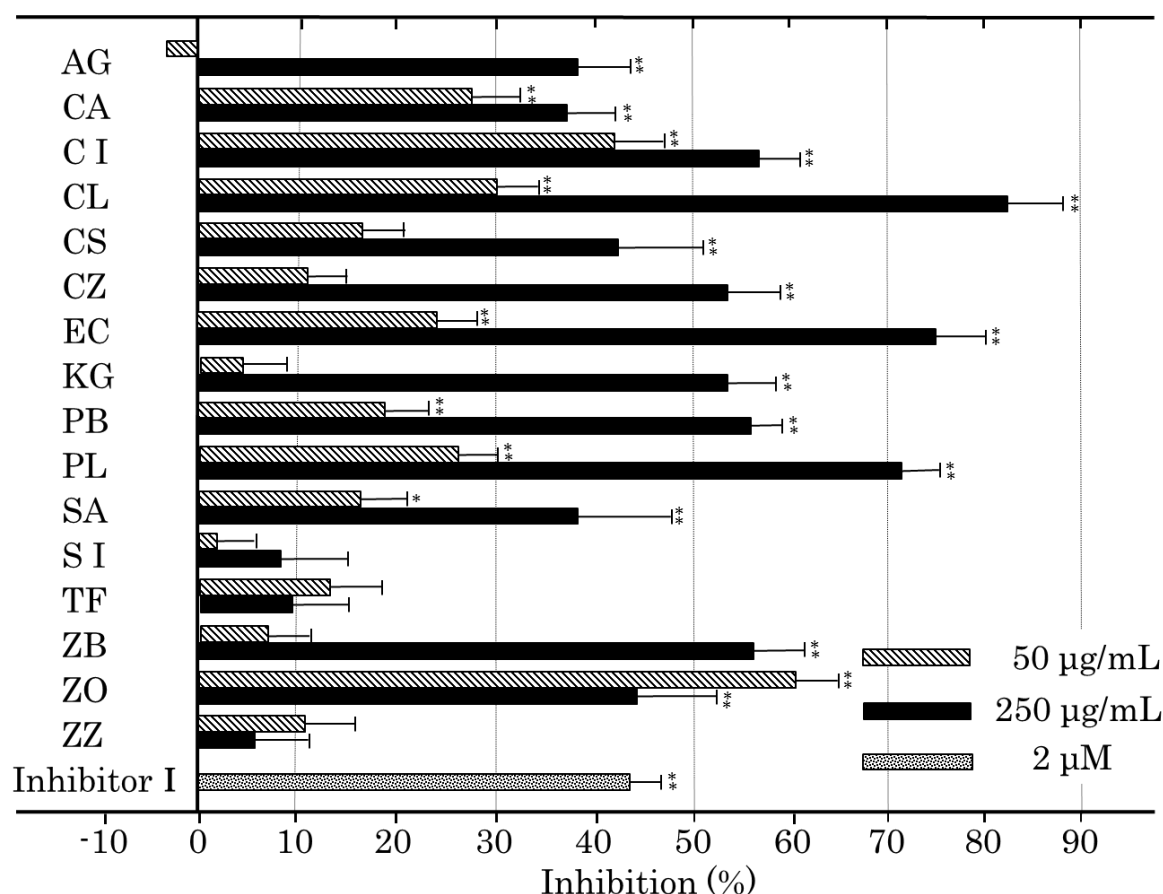


Fig. 11 β-Secretase inhibitory activities of *n*-hexane-ext

Data are shown in mean with standard deviations as error bars ($n=3$). Significantly different from control group, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

EtOAc-ext においては、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で CL が 70.8% と最も高い阻害作用を示した。また、PL, CI, EC, TF および ZB は、同濃度で 61.1, 60.4, 56.3, 50.7 および 42.1% の阻害作用を示した (Fig. 12)。

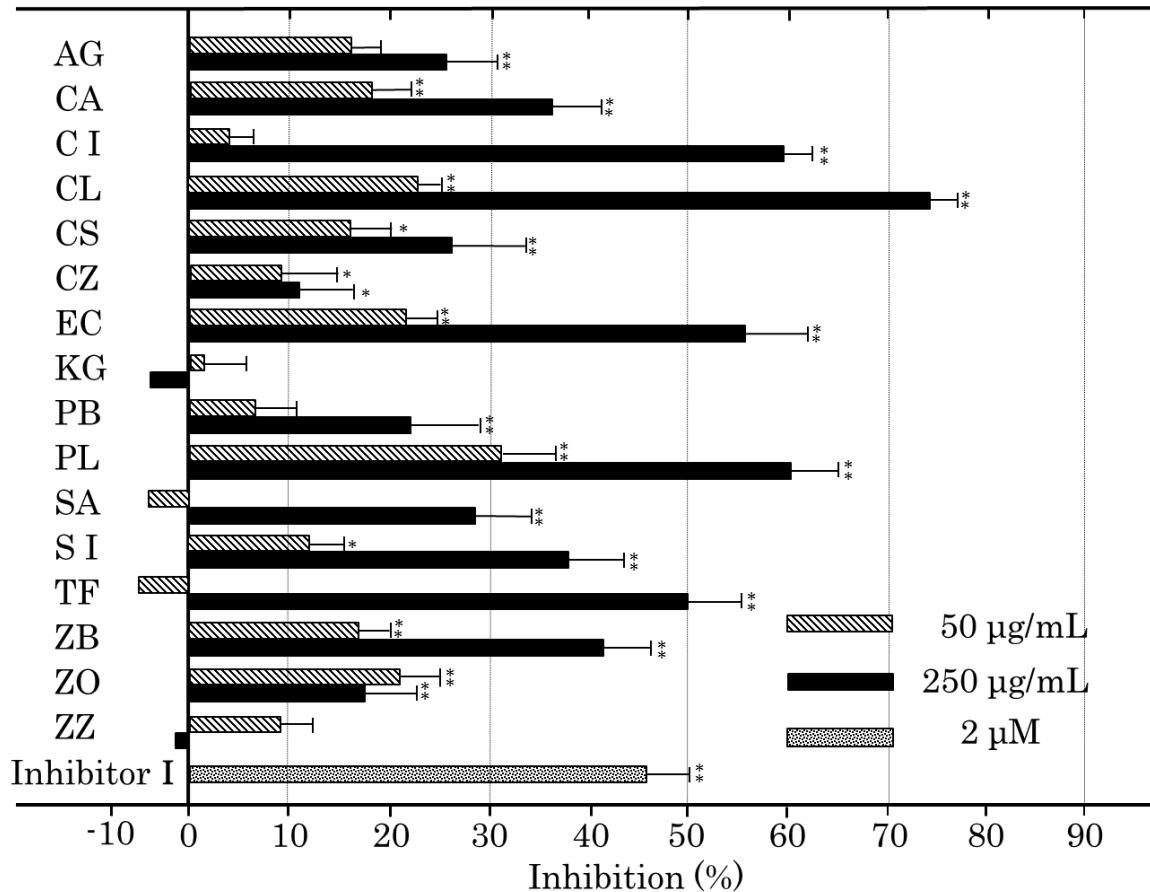


Fig. 12 β -Secretase inhibitory activities of EtOAc-ext

Data are shown in mean with standard deviations as error bars ($n=3$). Significantly different from control group, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

MeOH-ext においては、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で EC が 38.3% と最も高い阻害作用を示した (Fig. 13).

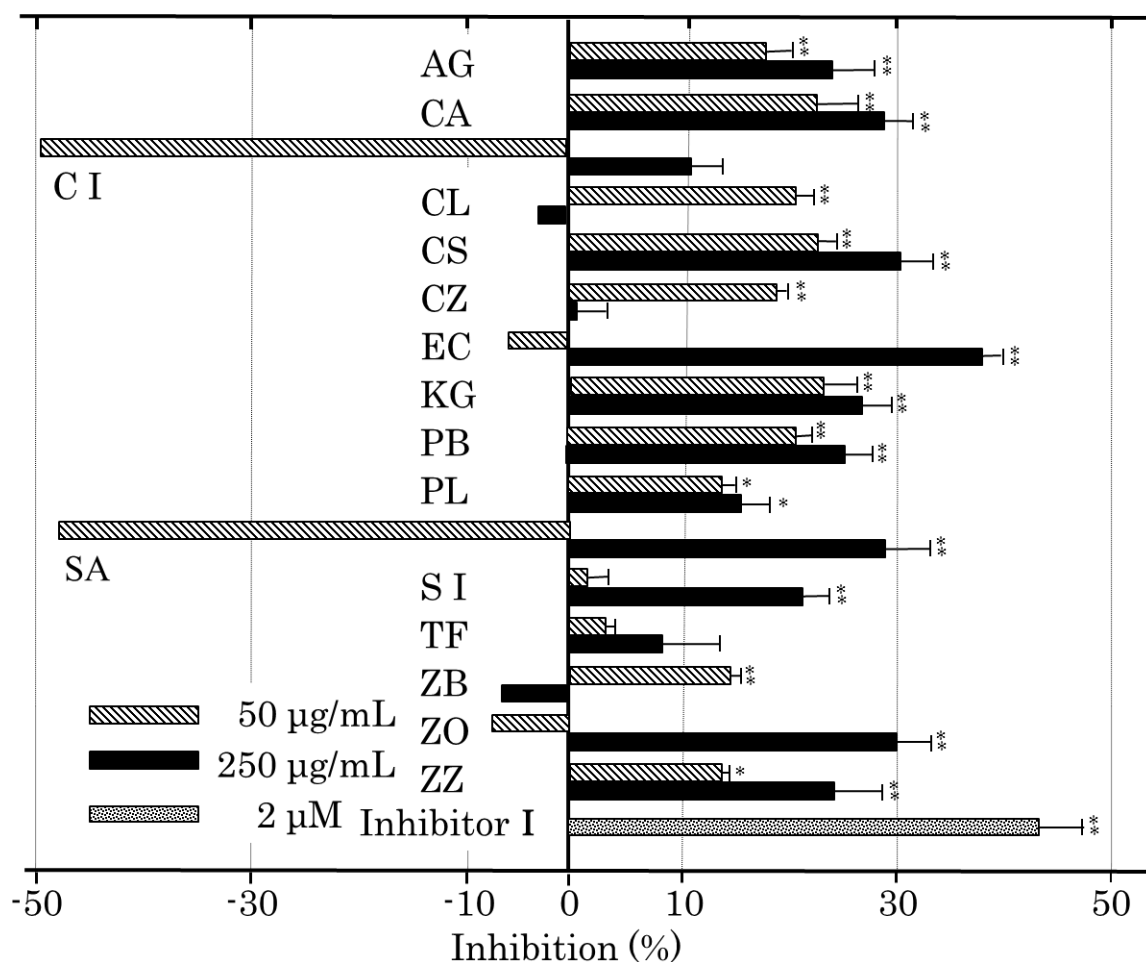


Fig. 13 β -Secretase inhibitory activities of MeOH-ext

Data are shown in mean with standard deviations as error bars ($n=3$). Significantly different from control group, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

いずれの被検体においても、*n*-hexane-ext に高い阻害作用を認める傾向が確認できた。*n*-Hexane は、低極性化合物であるモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンおよびフェニルプロパノイドなどを効率よく抽出する溶媒である。これらの化合物はスパイスを特徴付ける味と香りを有する傾向があり、特定の香気成分が AD 患者の症状を改善したという報告もある²⁰⁾。これらのことから低極性化合物に β -セクレターゼ阻害作用成分の存在が示唆された。さらにこれらの香気成分は低分子化合物であり、低分子化合物は血液脳関門を通過し、老人斑形成が起こるポイントに到達することが

期待される。これらの考察から、著者は *n*-hexane-ext に着目し、それらの有効成分の探索を行った。

2. CL-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

n-Hexane-ext 中に含まれる有効成分を探索するにあたり、GC および GC/MS 分析を行った。その結果、CL の *n*-hexane-ext の主成分として α -turmerone (8) が 30.4%、 β -turmerone (9) が 11.5% および ar-turmerone (10) が 9.9% 含有していることが明らかとなった (Fig. 14)。

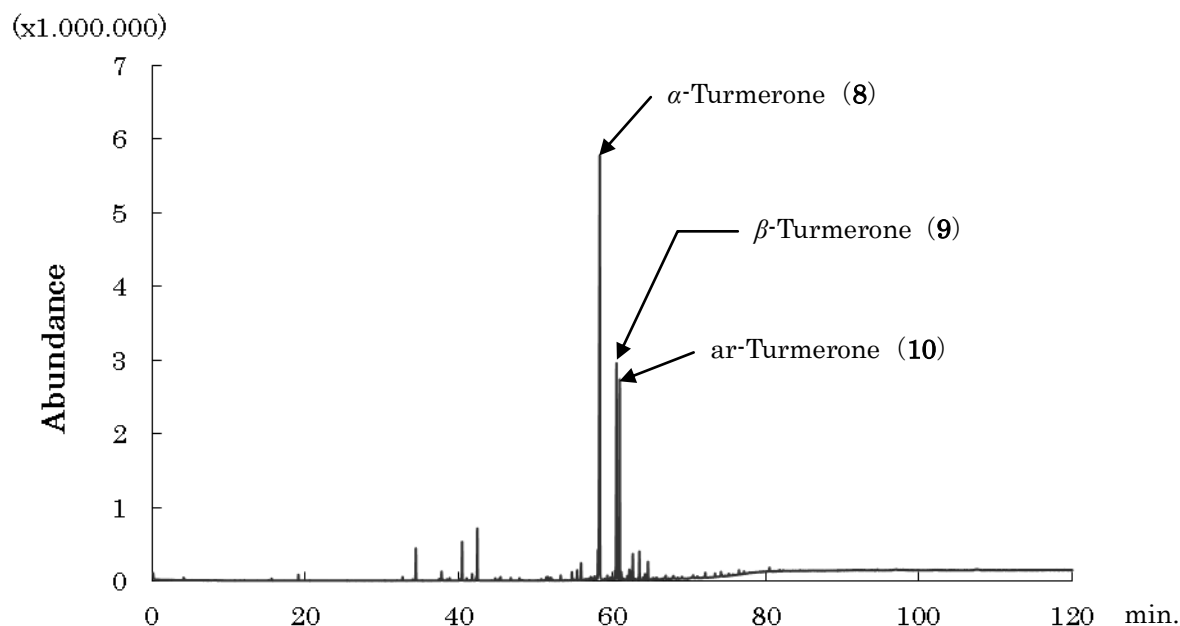


Fig. 14 GC chart of CL-*n*-hexane-ext

これらの化合物を単離する目的で、CL-*n*-hexane-ext を分取 HPLC に付し、得られた単離成分について、核磁気共鳴分析 (NMR) および GC/MS 分析を行った。その結果、R.T. 12.5 min, R.T. 11.4 min および R.T. 8.4 min より得られた各淡黄色オイル状物質は、NMR および MS スペクトルの文献値³¹⁾と比較して、それぞれ化合物 8, 9 および 10 であることを再確認した。

それらの β -セクレターゼ阻害作用を測定した結果、化合物 8, 9 および 10 の β -

セクレターゼに対する IC₅₀ 値はそれぞれ 39, 62 および 92 μM であった (Fig. 15).

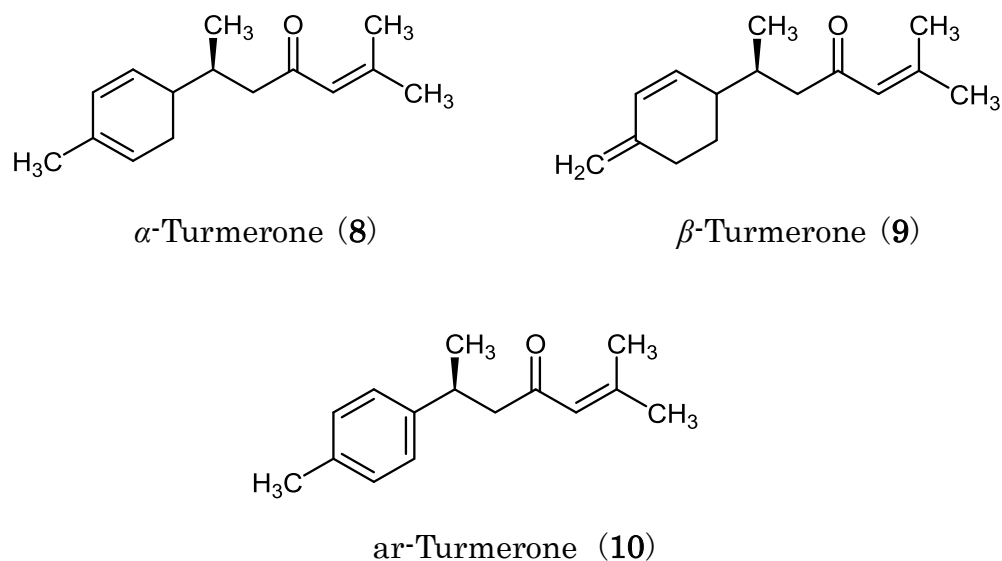


Fig. 15 Structures of β -secretase inhibitors identified from CL-*n*-hexane-ext

第1章第2節の報告で CL-EtOAc-ext から単離されたクルクミノイド(化合物 1~3) は IC₅₀ 値 ; 560~1,500 μM の阻害作用を示した. 今回有効成分として同定したターメロン類 (化合物 8~10) は, さらに高い阻害作用を示した.

3. EC-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

EC の *n*-hexane-ext の主成分は, GC および GC/MS 分析の結果より, linalyl acetate (11) が 5.3% および α -terpinyl acetate (12) が 53.7% と同定された (Fig. 16). 化合物 11 および 12 の β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値はそれぞれ 407 および 470 μM であった (Fig. 17).

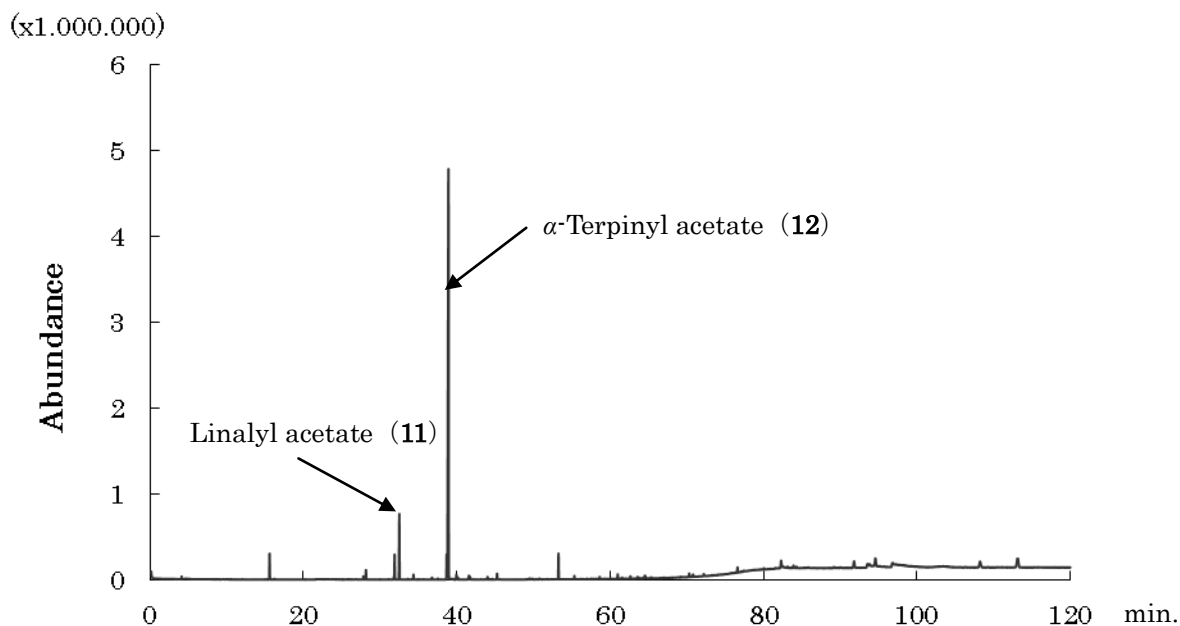


Fig. 16 GC chart of EC-*n*-hexane-ext

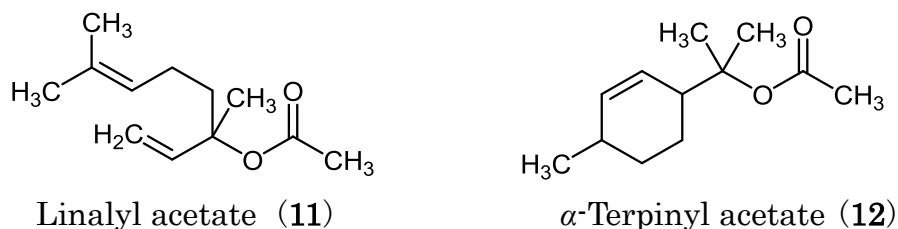


Fig. 17 Structures of β -secretase inhibitors identified from EC-*n*-hexane-ext

さらに、化合物 11 および 12 のアセテート部分が切断された linalool および terpineole について、50 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度における β -セクレターゼ阻害作用を検討した。その結果、それらには阻害作用は認められなかったため（データ省略）、これらの化合物の阻害作用にはアセテート構造が寄与していることが示唆された。

4. PL-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

PL の *n*-hexane-ext の主成分は、GC および GC/MS 分析の結果より、化合物 **5** が 4.5%、*n*-pentadecane が 3.7%、 β -bisabolene が 2.4%、**6** が 1.2%、pellitorine (**13**) が 13.3% および pipatalin (**14**) が 43.0% 含有していることが明らかとなった (Fig. 18).

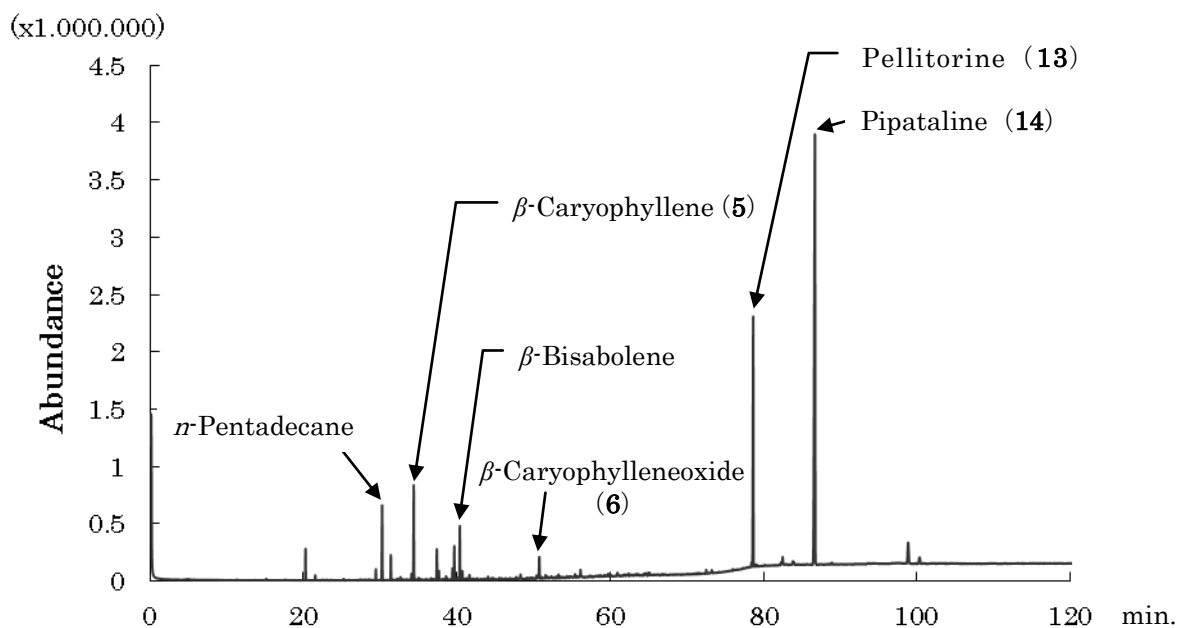
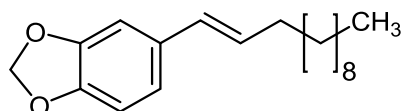


Fig. 18 GC chart of PL-*n*-hexane-ext

化合物 **13** および **14** については、当初 GC/MS 分析において構造を決定することができなかったが、当初検出された揮発性化合物の阻害作用だけでは *n*-hexane-ext 全体の作用強度を説明できないことから、阻害作用を指標にシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。得られた分画のうち比較的高い β -セクレターゼ阻害作用を示した *n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) 分画 0.6 g および *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) 分画 0.23 g を分取 HPLC により精製を実施した。その結果、*n*-hexane / EtOAc (20 : 1, v/v) 分画の有効成分として R.T. 20.4 min より無色結晶を単離した。*n*-Hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) 分画からは R.T. 9.3 min より白色粉末を単離した。それらの構造は NMR および MS スペクトルの文献値と比較してそれぞれ pellitorine (**13**) および pipataline (**14**) と決定した^{32, 33}。 β -セクレターゼ阻害作用を検討し

た結果, 化合物 **14** の IC_{50} 値は $304 \mu\text{M}$ であった (Fig. 19). 一方, 化合物 **13** は 5.0 mM で阻害作用が 20.0% 未満であり, IC_{50} 値は算出できなかった. 化合物 **13** および **14** は, GC/MS にて再度確認し, マスフラグメントと R.T.が一致したことより, GC/MS での同定が可能になった.



Pipataline (**14**)

Fig. 19 Structure of β -secretase inhibitor identified from PL-*n*-hexane-ext

5. CI-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

CI の *n*-hexane-ext の主成分は, GC および GC/MS 分析の結果より, cinnamaldehyde (**15**) が 31.9% 含有されていることが明らかとなった (Fig. 20). 化合物 **15** の標品を用いて β -セクレターゼに対する IC_{50} 値を検討したところ, $947 \mu\text{M}$ (Fig. 21)であった. CI は AChE 阻害作用を有することが既に報告されている³⁴⁾が, その有効成分は明らかにされていない. また, cinnamic acid に $250 \mu\text{g/mL}$ での阻害作用はなかった (データ省略) ため, 本化合物においてはアルデヒド基がその活性に寄与している可能性が示唆された.

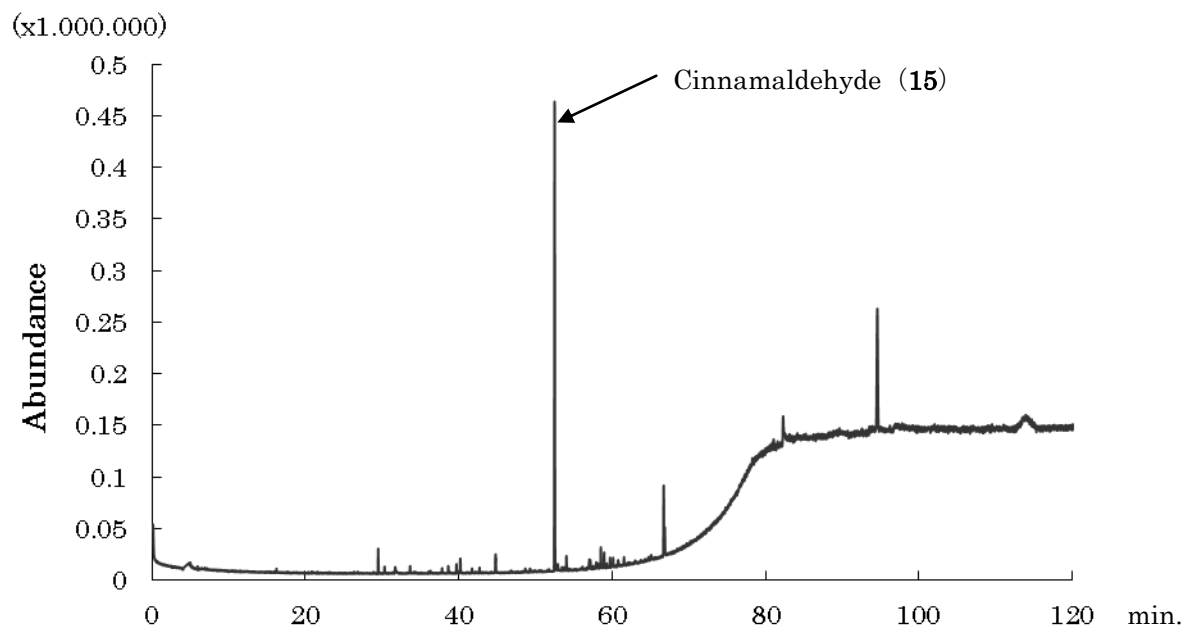
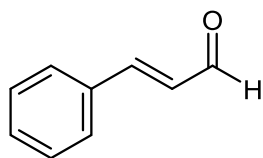


Fig. 20 GC chart of CI-*n*-hexane-ext



Cinnamaldehyde (15)

Fig. 21 Structure of β -secretase inhibitor identified from CZ-*n*-hexane-ext

6. ZB-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

ZB の *n*-hexane-ext の主成分は、GC および GC/MS 分析の結果より、sabinene (16) が 14.8%、 β -phellandrene が 11.0%、 d -limonene が 6.1% および piperitone が 3.6% 含有していることが確認された (Fig. 22). 最も含有量の多い 16 について、標品を用いて β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値を検討したところ、2,000 μ M (Fig. 23) であった. 他の化合物については、*n*-hexane-ext の阻害作用に関与している可能性があるが、標品が入手できなかったため評価ができなかった. また、72 min 付近の大きなピークに関しては、データライブラリーがなかったため同定できなかった.

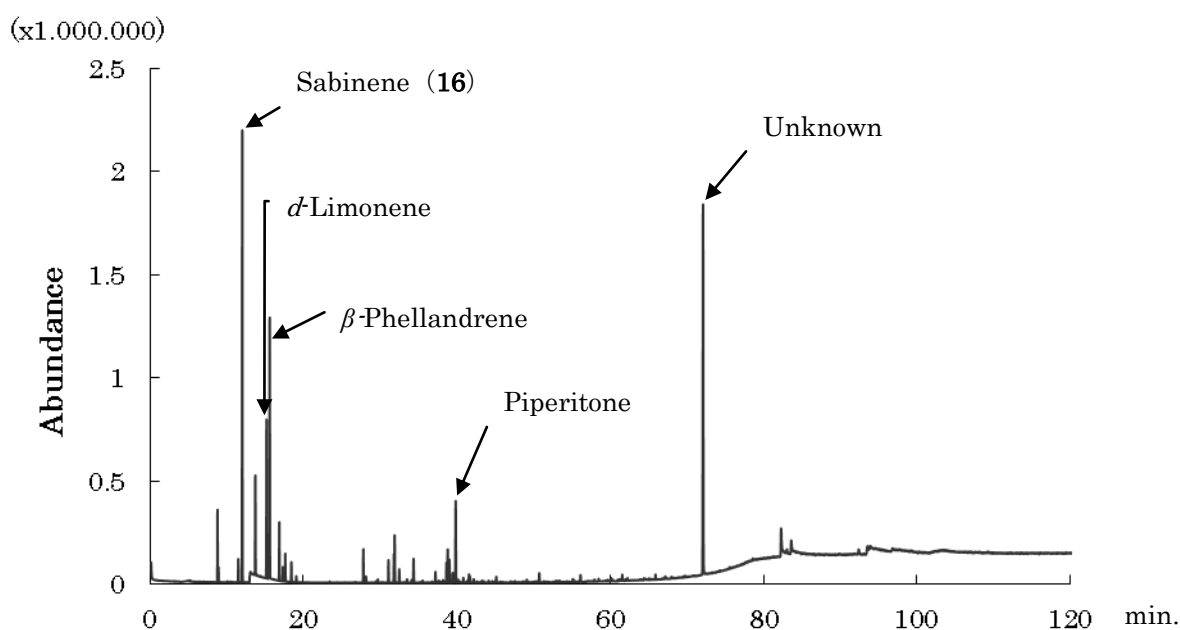
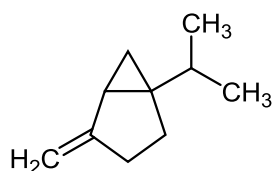


Fig. 22 GC chart of ZB-*n*-hexane-ext



Sabinene (16)

Fig. 23 Structure of β -secretase inhibitor identified from ZB-*n*-hexane-ext

7. PB-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

PBの *n*-hexane-ext の主成分は、GC および GC/MS 分析の結果より、safrole (17) が 24.4% および eugenol (18) が 23.2% 含有していることが明らかとなった (Fig. 24). 化合物 17 および 18 の標品を用いて β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値を検討したところ、それぞれ 703 および 580 μ M であった (Fig. 25). これら 2 つの化合物は同じ骨格構造を共有しているが、化合物 17 には芳香環の 3 位および 4 位に benzodioxole, 18 には 3-methoxy-4-hydroxybenzene という相違点がある. しかしながら、化合物 17 および 18 の作用の強度に顕著な差は見られなかったため、これらの構造は阻害作用には寄与していないことが示唆された.

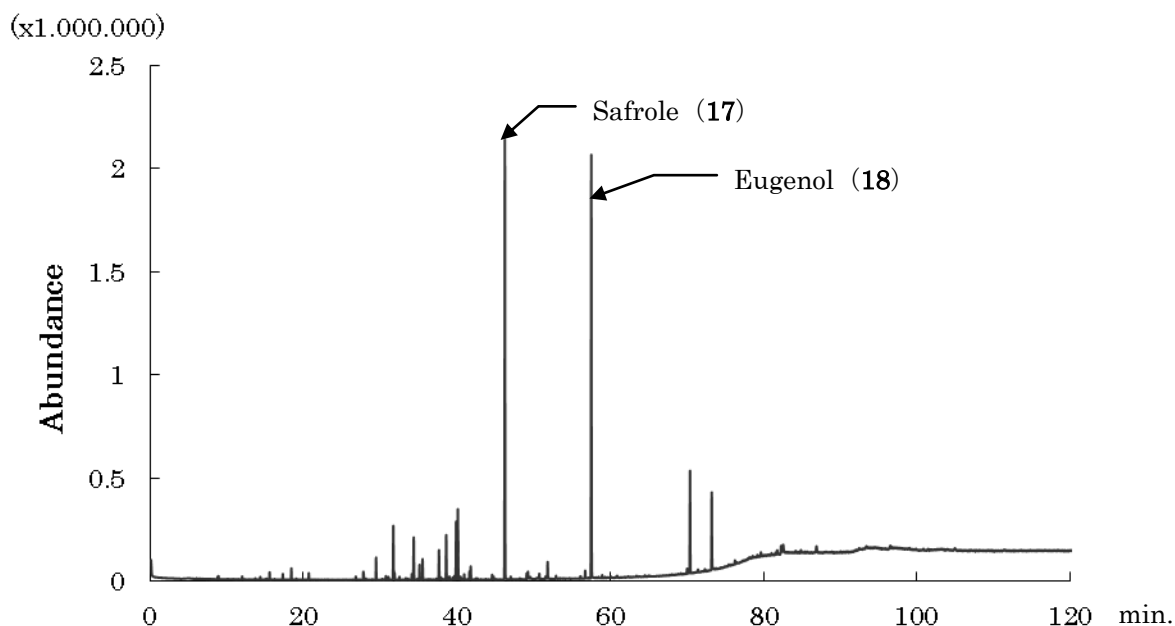


Fig. 24 GC chart of PB-*n*-hexane-ext

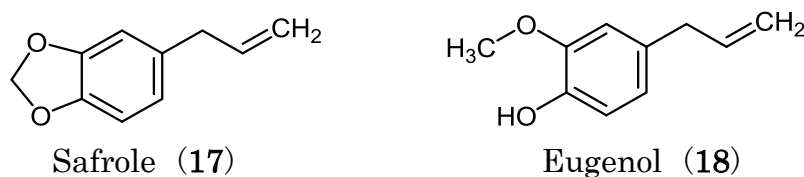


Fig. 25 Structures of β -secretase inhibitors identified from PB-*n*-hexane-ext

8. CZ-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

CZの *n*-hexane-ext の主成分は, GCおよびGC/MS分析の結果より, epicurzerenone (19) が 24.9%含有していることが明らかとなった (Fig. 26). 化合物 19 の標品を用いて β -セクレターゼに対する IC₅₀値を検討したところ, 408 μ Mであった (Fig. 27). また, 72 min 付近の大きなピークはライブラリーがなかったため同定できなかったが参考文献の検索によって curcumenol と同定した^{35, 36}. 標準品が入手できなかったため β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値の検討はできなかった.

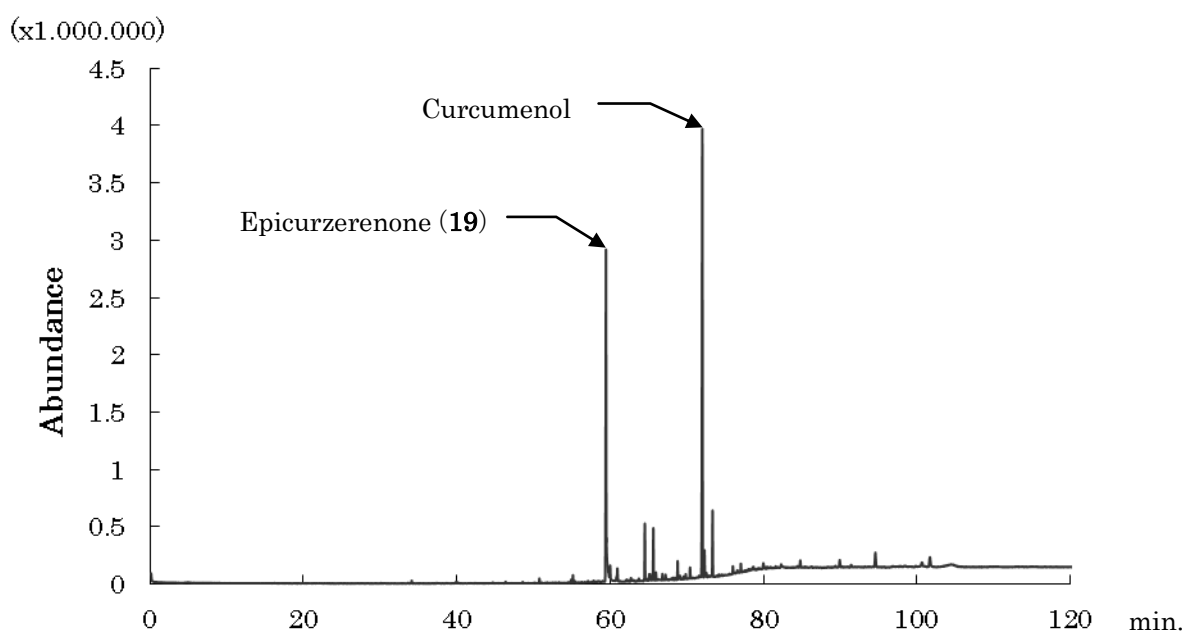
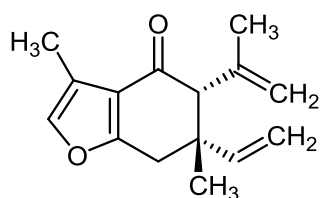


Fig. 26 GC chart of CZ-*n*-hexane-ext



Epicurzerenone (19)

Fig. 27 Structure of β -secretase inhibitor identified from CZ-*n*-hexane-ext

9. KG-*n*-hexane-ext の有効成分の探索

KGの *n*-hexane-ext の主成分は、GCおよびGC/MS分析の結果より、*n*-pentadecane が 18.0%、ethylcinnamate (20) が 8.0%および ethyl-4-methoxycinnamate (21) が 56.5%含有していることが明らかとなった (Fig. 28). 化合物 20 および 21 の標品を用いて β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値を検討したところ、それぞれ >2,000 および 676 μ M であった (Fig. 29). これらのことより 4-メトキシ基が強く阻害作用に関与していると考えられた. *n*-Pentadecane は、標準品が入手できなかったため IC₅₀ 値を算出できなかった.

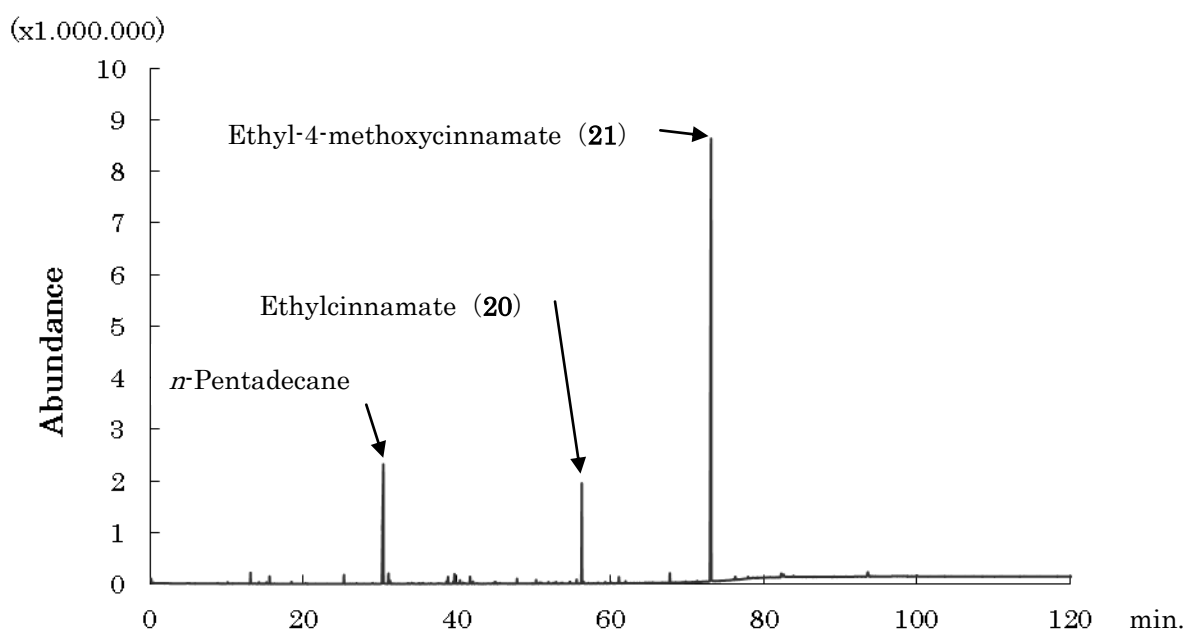
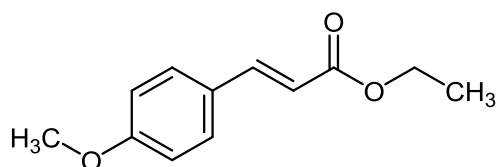


Fig. 28 GC chart of KG-*n*-hexane-ext



Ethyl-4-methoxycinnamate (21)

Fig. 29 Structure of β -secretase inhibitor identified from KG-*n*-hexane-ext

IV. 小括

第1章で実施した β -セクレターゼ阻害作用を指標としたスクリーニングについて、対象をカレー構成スパイスだけではなく、アジアの国々で使用されるスパイスに拡大し、ショウガ類7種類、コショウ類3種類、その他6種類のスクリーニングを実施した。その結果、 β -セクレターゼ阻害作用成分が多くの *n*-hexane-ext に確認することができた。このことは様々なスパイスの低極性抽出物が、AD の予防の有力な候補であることを示唆した。

また、それらの *n*-hexane-ext より有効成分を探索した結果、ターメリック、カルダモン、ヒハツ、シナモン、カショウ、キンマ、ガジュツおよびガランガルより新たに16種類の有効成分を明らかにした。これらは、モノおよびセスキテルペンやフェニルプロパノイドなどであり、それぞれのスパイスを特徴付ける味と香りを有する。今回の結果より、食用とすることが多いスパイスはADを予防するための効果的な素材になりうる可能性を示唆した。すなわち毎日の食事にスパイスを追加するという、一般的な食生活の中でAD予防が期待できることを示唆したものである。

β -セクレターゼはAD予防のための有望な標的として認識されているにもかかわらず、天然植物資源からの阻害作用スクリーニングは、いくつかの報告に限定され、十分に実施されたスクリーニングはほとんどなかった。本研究では、 β -セクレターゼ阻害作用成分として脂肪酸誘導体（化合物13）、モノテルペン（11, 12 および16）、セスキテルペン（8~10 および19）およびフェニルプロパノイド（15, 17, 18 および20）などの様々な構造を持つ低分子化合物を明らかにした。分子量700以下の低分子化合物は、容易に血液脳関門を通過するという報告がある³⁷⁾。そのため老人斑形成が起こるポイントに到達することが考えられる。現時点で体系だった構造活性相関を見出すことはできないが、本研究により様々な構造を持つ低分子量の阻害作用成分が発見できたことより、さらに β -セクレターゼ阻害作用のスクリーニング研究が継続されることが望まれる。

第2節 ターメリック (*Curcuma longa* の根茎) エキスの β -セクレターゼ阻害作用成分の探索

I. 緒言

第1章および第2章第1節においてターメリック (CL) *n*-hexane-ext に高い β -セクレターゼ阻害作用を見出し、その有効成分が化合物 **8**, **9** および **10** であることを明らかにした。それらの IC₅₀ 値はそれぞれ 39, 62 および 92 μ M であった。これらの化合物は *n*-hexane を用いた抽出により得た精油成分であった。*n*-Hexane-ext は抽出エキスの溶媒を溜去する過程で低沸点の精油成分も同時に溜去される懸念がある。そこで、第2章第2節では、より効率よく精油成分を抽出できる水蒸気蒸溜にて精油成分の採取を行い、減圧蒸溜にて精油成分を分画した³⁸⁾。その際に得られた各分画について、 β -セクレターゼ阻害作用を指標にさらなる有効成分の探索を実施した。また、有効成分であるターメロン類 (化合物 **8**~**10**) をより高純度で得られる分画の検討も合わせて実施した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

第2章第1節に記したものをを用いた。

2. 試薬

第1章第1節に記したものをを用いた。

3. 実験方法

3-1) CL 精油の調製方法

粉碎した被検体 500 g に 5 倍量の水を加えて、常圧下で水蒸気を吹き込んで蒸溜し、溜出液を 15 kg 採取した。その後、遠心分離 (CAX-371, (株) トミー精工, 1,700 × g, 3 min) により上清を回収し、13 g の CL 精油を得た (収率 2.6%)。

3-2) β -セクレターゼ阻害作用試験

第 1 章第 1 節に記した方法で行った。

3-3) GC および GC/MS 分析

第 1 章第 2 節に記した方法で行った。

3-4) CL 精油の減圧蒸溜による分画精製

CL 精油 100 g を 110 °C にて減圧蒸溜を実施し、溜出物を得た (Fr. 1)。溜出が止まった時点で、120 °C に加温し、さらに溜出物を得た (Fr. 2)。溜出が止まった時点で 130 °C に加温し、130 °C 溜出物を得た (Fr. 3)。溜出が止まった時点で 140 °C に加温し、140 °C 溜出物を得た (Fr. 4)。溜出されなかった精油は蒸溜残渣 (Fr. 5) とした (Fig. 30)。

3-5) CL 精油 Fr. 2 のシリカゲルクロマトグラフィーによる分画精製

CL 精油 Fr. 2 (1 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (No. 107734 silica gel 60, Merck, 2.5 i.d. × 30 cm, 70 g) に付した。*n*-Hexane / EtOAc 混合溶媒系でそれぞれ 200 mL ずつ溶出し、*n*-hexane 分画 (Fr. 2-1) 0.48 g, *n*-hexane / EtOAc (200 : 1, v/v) 分画 (Fr. 2-2) 0.07 g, *n*-hexane / EtOAc (100 : 1, v/v) 分画 (Fr. 2-3) 0.02 g, *n*-hexane / EtOAc (50 : 1, v/v) (Fr. 2-4) 0.16 g および EtOAc 分画 (Fr. 2-5) 0.19 g を得た (Fig. 30)。

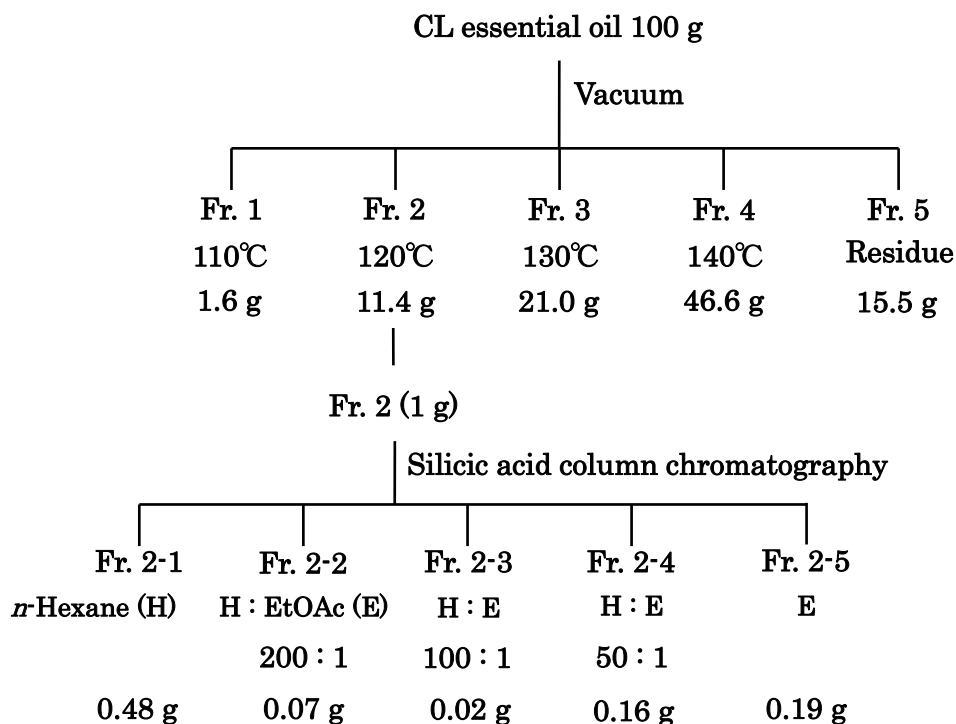


Fig. 30 Purification scheme of CL essential oil by vacuum distillation and silicic acid column chromatography

3-6) CL精油 Fr. 2-1 の分取 HPLC による分画精製

CL精油 Fr. 2-1 は、以下の条件で分取 HPLC に付し、有効成分の探索を実施した。

分取 HPLC 条件

装置 ; Shimadzu LC-solution system (LC-8A)

カラム ; L-column ODS (20 i.d. × 250 mm, 5 μm, (財) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; water : acetonitrile (5 : 95, v/v)

流速 ; 18.9 mL/min

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; UV190 および 243 nm

4. 統計処理

第 1 章第 1 節に記した方法で行った。

III. 実験結果および考察

1. CL 精油および各種精製による各分画の成分組成および β -セクレターゼ阻害作用

粉碎した CL より水蒸気蒸溜にて得られた CL 精油について、減圧蒸溜を行い、蒸溜温度により Fr. 1~5 の 5 つに分画した。CL 精油および各分画について、GC 分析にて成分組成を確認した結果を Table 4 に示した³⁹⁾。Fr. 4 は **8**、**9** および **10** がそれぞれ 27.5、14.9 および 36.6% であり、蒸溜温度 140 °C での減圧蒸溜によりターメロン類（化合物 **8**~**10**）を最も効率よく濃縮することができた。

また、各分画の 250 $\mu\text{g/mL}$ における β -セクレターゼ阻害作用を Table 5 に示した。CL 精油、Fr. 3、4 および 5 には化合物 **8**~**10** がトータルでそれぞれ 56.6、45.5、79.1 および 60.6% 含まれていること、 β -セクレターゼ阻害作用がそれぞれ 53.4、69.2、74.3 および 63.2% であることより、 β -セクレターゼ阻害作用の主な有効成分は化合物 **8**~**10** であると考えられる。

Table 4 Chemical contents detected by GC and GC/MS analysis of CL essential oil and its fractionated samples

R.T. (min)	Compound	Peak area (%)					
		Essential oil	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
15.9	α -Phellandrene	1.8	31.0	-	-	-	-
17.4	d -Limonene	0.1	3.0	-	-	-	-
17.9	1,8-Cineole	0.5	12.9	-	-	-	-
20.8	<i>p</i> -Cymene	0.9	21.0	-	-	-	-
21.4	Terpinolene	0.3	8.5	0.1	-	-	-
36.9	β -Caryophyllene (2)	1.3	1.8	7.4	1.3	-	-
42.5	<i>f</i> -Zingiberene	4.4	1.8	13.4	8.2	0.2	-
42.8	β -Bisabolene	0.8	0.4	3.2	2.0	0.1	-
44.6	β -Sesquiphellandrene	4.3	1.5	11.4	9.7	0.5	0.2
44.8	ar-Curcumene	2.6	1.4	10.5	6.9	0.2	-
60.7	α -Turmerone (8)	21.4	1.3	8.9	18.1	27.5	13.7
62.9	β -Turmerone (9)	13.0	0.5	3.6	7.5	14.9	15.9
63.3	ar-Turmerone (10)	22.2	1.4	9.3	19.8	36.6	31.0
Total peak area (%)		73.6	86.5	67.8	73.5	80.0	60.8
Yields* (g)		-	1.6	11.4	21.0	46.6	15.5

*Yields are indicated by the grams of each fraction obtained from 100 g of essential oil.

Table 5 β -Secretase inhibitory activities of CL essential oil and its fractionated samples

Sample	Concentration	Inhibition (%)
Essential oil	250 μ g/mL	53.4 \pm 0.8**
Fr. 1	250	33.2 \pm 0.4**
Fr. 2	250	57.1 \pm 1.1**
Fr. 3	250	69.2 \pm 2.8**
Fr. 4	250	74.3 \pm 1.5**
Fr. 5	250	63.2 \pm 1.2**
Inhibitor I	2 μ M	47.7 \pm 0.7**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from control at **: $p < 0.01$.

Fr. 2 に関しては、化合物 8~10 が 21.7%と CL 精油のそれと比較して半分以下の含有量にもかかわらず、阻害率が 57.1%とほぼ同等の値を示したため、他の成分に阻害作用があることが示唆された。そこで、Fr. 2 をさらにシリカゲルクロマトグラフィーにて Fr.2-1 から 2-5 の 5 つに分画し、それぞれの分画について、GC および GC/MS 分析にて成分組成を確認した結果を Table 6 に示した。また、各分画の 250 µg/mL 濃度における β -セクレターゼ阻害作用を Table 7 に示した。

Table 6 Chemical contents elucidated by GC analysis of fractionated samples obtained from Fr. 2 by silicic acid column chromatography

R.T. (min)	Compound	Peak area (%)				
		Fr. 2-1	Fr. 2-2	Fr. 2-3	Fr. 2-4	Fr. 2-5
36.9	β -Caryophyllene (5)	14.8	-	-	-	-
42.5	<i>l</i> -Zingiberene	34.4	-	-	-	-
42.8	β -Bisabolene	7.0	-	-	-	-
44.6	β -Sesquiphellandrene	21.6	-	-	-	-
44.8	ar-Curcumene	9.5	84.3	87.4	-	-
60.7	α -Turmerone (8)	-	-	-	41.3	-
62.9	β -Turmerone (9)	-	-	-	14.9	-
63.3	ar-Turmerone (10)	-	-	-	16.7	87.9
	Total peak area (%)	87.3	84.3	87.4	72.9	87.9
	Yields* (g)	0.48	0.07	0.02	0.16	0.19

*Yields are indicated by the grams of each fraction obtained from 1 gram of Fr. 2.

Table 7 β -Secretase inhibitory activities of fractionated samples obtained from Fr. 2 by silicic acid column chromatography

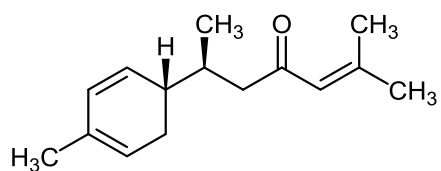
Sample	Concentration	Inhibition (%)
Fr. 2-1	250 µg/mL	77.9 ± 9.9**
Fr. 2-2	250	39.6 ± 3.4**
Fr. 2-3	250	39.2 ± 0.9**
Fr. 2-4	250	87.2 ± 2.4**
Fr. 2-5	250	63.5 ± 5.4**
Inhibitor I	2 µM	48.0 ± 6.8**

Each value represents the mean ± S.D. of triplicates. Significantly different from control at **; $p < 0.01$.

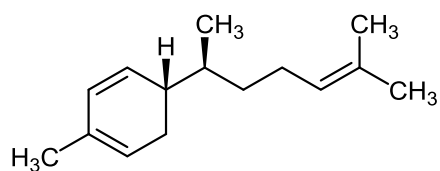
Fr. 2-1~2-5 の β -セクレターゼ阻害作用は、それぞれ 77.9, 39.6, 39.2, 87.2 および 63.5%であった。Fr. 2-4 の成分組成は、化合物 **8**, **9** および **10** がそれぞれ 41.3, 14.9 および 16.7%であり、Fr. 2-5 のそれは化合物 **10** が 87.9%であったため、それらの阻害作用の有効成分はターメロン類であることが判明した (Fig. 31)。

Fr. 2-1 については、化合物 **5** が 14.8%検出されているが、 β -セクレターゼ阻害作用の強度から化合物 **5** 以外にも有効成分が存在することが示唆された。よって、分取 HPLC に付しさらなる有効成分の探索を行った。その結果、R.T. 21.1 min, 21.8 min, 20.5 min および 13.3 min よりそれぞれ無色オイル状物質を得た。得られた化合物はそれぞれ GC/MS にて構造確認を行い、それぞれ *l*-zingiberene (**22**), β -bisabolene (**23**), β -sesquiphellandrene (**24**) および ar-curcumene (**25**) と決定した^{40, 41}。それらの構造式を Fig. 31 に示した。化合物 **22**, **23**, **24** および **25** の β -セクレターゼに対する IC₅₀ 値はそれぞれ 398, 552, 447 および 470 μ M であった。これら化合物の β -セクレターゼ阻害作用に関する報告は本研究が初めてである。

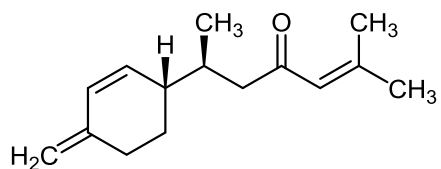
第 1 章および第 2 章第 1 節までの研究と合わせてビスボレン型セスキテルペンにおいては、化合物 **8**, **9** および **10** の IC₅₀ 値がそれぞれ 100 μ M 未満であるのに対して、今回明らかになった化合物 **22**~**25** の IC₅₀ 値は 398~552 μ M であり、ターメロン類と比較すると弱い阻害作用であった。これらの結果より、9 位炭素がケトンに酸化されることで阻害作用が 4 倍以上強力になることが示唆された。



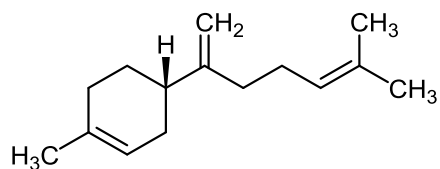
α -Turmerone (8)



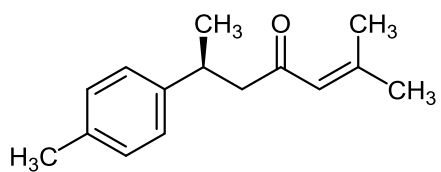
l-Zingiberene (22)



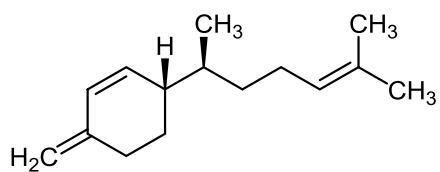
β -Turmerone (9)



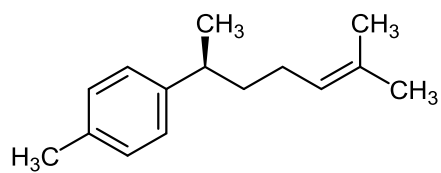
β -Bisabolene (23)



ar-Turmerone (10)



β -Sesquiphellandrene (24)



ar-Curcumene (25)

Fig. 31 Structures of β -secretase inhibitors (sesquiterpenoids) obtained from CL essential oil

Fr. 1 から明らかにされたメンタン型モノテルペン類の標品を用いて 250 $\mu\text{g/mL}$ 濃度における β -セクレターゼ阻害作用を検討した。その結果, α -phellandrene (26), d -limonene (27), 1,8-cineole (28), p -cymene (29) および terpinolene (30) (Fig. 32) の阻害作用は, それぞれ 25.3, 19.0, 27.3, 39.1 および 34.4%であった (Table 8)。化合物 27 および 28 については, AChE 阻害作用に関する報告はあるが⁴²⁾, β -セクレターゼ阻害作用に関しては, 本研究で初めて明らかになった。

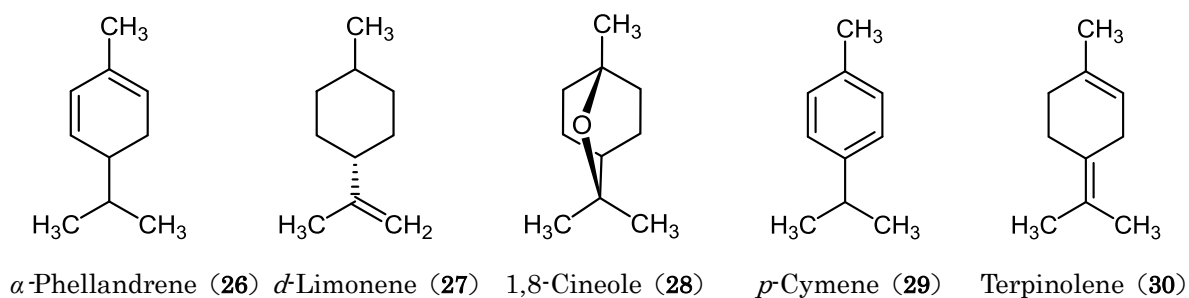


Fig. 32 Structures of β -secretase inhibitors (monoterpenoids) obtained from CL essential oil

Table 8 β -Secretase inhibitory activities of active compounds (monoterpenoids) obtained from Fr. 1 of CL essential oil by vacuum distillation

Compound	Concentration	Inhibition (%)
α -Phellandrene (26)	250 $\mu\text{g/mL}$	25.3 \pm 1.0**
d -Limonene (27)	250	19.0 \pm 0.7**
1,8-Cineole (28)	250	27.3 \pm 0.6**
p -Cymene (29)	250	39.1 \pm 1.0**
Terpinolene (30)	250	34.4 \pm 1.0**
Inhibitor I	2 μM	51.8 \pm 0.1**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from control at **: $p < 0.01$.

IV. 小括

第2章第2節では、より効率よく抽出できる水蒸気蒸溜にて精油成分の採取を行い、減圧蒸溜にて精油成分を分画し、得られた各分画について、 β -セクレターゼ阻害作用を指標にさらなる有効成分の探索を実施した。その結果、新たにモノテルペンである化合物 **26**, **27**, **28**, **29** および **30** と、セスキテルペンである **22**, **23**, **24** および **25** に β -セクレターゼ阻害作用を見出した。また、有効成分であるターメロン類（化合物 **8**~**10**）をより高純度で得られる抽出方法の検討も合わせて実施した結果、減圧分画蒸溜によりターメロン類は約 80%純度まで濃縮できることが明らかになった。このように簡便に高純度ターメロン分画を調製する方法が明らかになったことより、動物実験などに十分な量の化合物を確保できるようになった。さらにこれまで分離精製が困難であった化合物 **8** および **9** の単離が容易になり、それらの様々な薬理的評価が進展することが期待される。

第3節 ターメロン類のマウスを用いた経口投与による脳内移行の検討

I. 緒言

第2章第2節では、水蒸気蒸溜にて精油成分を採取し、減圧蒸溜にて精油成分を分画して高純度のターメロン類(8~10)が得られる方法を検討した。化合物10に関する報告には神経保護作用や、神経幹細胞の増殖作用があり⁴³⁾、経口投与による脳内移行の報告⁴⁴⁾もあるが、8および9のそれらは報告されていない。これは化合物8および9の分子構造が類似しており、それぞれを分離精製することが困難なため、それぞれの様々な薬理作用試験について容易に成し得なかったことが原因であると考えられる。そこで、高い β -セクレターゼ阻害作用を示した8、9および10について、第2章第2節で得られたターメロン類が高純度に含有する分画を用いてターメロン類をそれぞれ動物実験が実施できる十分な量を単離した。そして、本節では、化合物8、9および10をそれぞれ個別にマウスに経口投与し、それら成分が脳内に移行するか否かを検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

第2章第2節で得られたFr. 4より第2章第1節の手法で得られた8、9および10を被検体に供した。また、動物実験には5週齢の雄のSlc: ddY系マウス(清水実験材料(株)、京都、日本)を用いた。

2. 試薬

マウス飼育用標準飼料(オリエンタル酵母工業(株)、東京、日本)、麻酔剤; ドミトール®(日本全薬工業(株)、hydrochloric acid medetomidine 1.0 mg/mL)、ドルミカム®(アステラス製薬(株)、midazolam 5.0 mg/mL)およびベトルファール®(Meiji Seika ファルマ(株))を用いた。その他の試薬は、第1章第1節に記したものをを用いた。

3. 実験方法

3-1) ターメロン類の薬物動態試験

動物実験は近畿大学動物実験規程に従って計画し、施設内動物管理使用委員会によって承認後、実施した（承認番号; KAAG-25-002）。5週齢の雄のSlc: ddY系マウスを用いて、湿度制御された部屋で、水道水を自由に摂食させる環境の下、標準飼料を供給し、12 hの明条件と12 hの暗条件サイクル、室温は 25 ± 1 °Cに維持して飼育した。1週間馴化後、マウスを4群（コントロール、 α -turmerone投与、 β -turmerone投与および ar-turmerone 投与群）に分けた。 α -Turmerone、 β -turmerone および ar-turmerone を2% carboxymethylcellulose 溶液に溶解し、ゾンデを用いて単回経口投与した。

各試料投与30 min後、3種混合麻酔を投与して下大動脈から採血し、その後生理食塩水により灌流し、解剖により脳を採取した。3種混合麻酔は、ドミトール® (hydrochloric acid medetomidine 1.0 mg/mL) 0.75 mL、ドルミカム® (midazolam 5.0 mg/mL) 2 mL およびベトルファール® (butorphanol tartrate 5.0 mg/mL) 2.5 mL に生理食塩水 19.75 mL を加え調製し、マウス体重10 gあたり0.1 mLを腹腔内投与した。得られた血液は、室温で30 min インキュベートし、4 °Cにて約16 h 放置して血餅を凝集させ、遠心分離（ $1000 \sim 1200 \times g$, 20~30 min, 4 °C）後、上清を採取し血清サンプルとした。血清および脳の試料は分析するまで-80 °Cで保存した。

3-2) 液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計による脳内移行成分の定量分析

血清試料および脳の分析用試料は下記の方法により調製した。

分析試料の調製

血清；血清100 μ Lにacetonitrile 500 μ Lを加え、ボルテックス（約3 min）によって抽出後、遠心分離（ $760 \times g$, 10 min）し上清を採取した。

大脳および小脳；脳30 mgを精秤し、acetonitrile 150 μ Lで超音波（ASU-6, アズワン（株））抽出（10 min）後、遠心分離（ $760 \times g$, 10 min）し上清を採取した。

分析用試料は、液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) を用いて、以下の条件により **8**, **9** および **10** の定量分析を実施した。

LC-MS/MS 条件 (α -turmerone, β -turmerone, ar-turmerone)

装置 ; Shimadzu Lab-solutions system LC-30AD

カラム ; L-column 2 ODS (2.1 i.d. \times 150 mm, 2 μ m, (財) 化学物質評価研究機構)

流速 ; 0.4 mL/min

移動相 ; acetonitrile : water (4 : 1, v/v)

R.T. ; α -turmerone, 3.19 min

β -turmerone, 3.10 min

ar-turmerone, 2.41 min

注入量 ; 1 μ L

検出器 ; MS (LCMS-8050)

インターフェース電圧 ; 4.0 kV

イオン化モード ; エレクトロスプレーイオン化法 (ESI), ポジティブモード ((+))

イオン源温度 ; 400 $^{\circ}$ C

脱溶剤ガス流量 ; 10 L/min

脱溶剤温度 ; 500 $^{\circ}$ C

コーン電圧 ; 10 V

多重反応モニタリング (MRM) 条件 ;

α -Turmerone のプリカーサーイオンとして $[M+H]^+=m/z$ 219.1, プロダクトイオンとして $[C_9H_{13}]^+=m/z$ 121.1 を測定した。

β -Turmerone のプリカーサーイオンとして $[M+H]^+=m/z$ 219.1, プロダクトイオンとして $[C_9H_{13}]^+=m/z$ 121.1 を測定した。

ar-Turmerone のプリカーサーイオンとして $[M+H]^+=m/z$ 217.4, プロダクトイオンとして $[C_9H_{11}]^+=m/z$ 119.1 を測定した。

定量は、それぞれ標準品により作成した検量線より濃度を求めた。

4. 統計処理

第1章第1節に記した方法で行った.

III. 実験結果および考察

1. ターメロン類の脳内移行性の検討

全ての投与群において解剖前の所見および解剖後の所見および臓器に顕著な病理的变化はなかった（データ省略）。化合物 **8**, **9** および **10** はそれぞれ血清中に 290, 398 および 65 ng/g, 大脳中に 362, 640 および 118 ng/g, 小脳中に 505, 926 および 150 ng/g 検出された (Fig. 33)。マウスを用いた経口投与による化合物 **10** の脳への移行は報告⁴¹⁾されているが, **8**, **9** の経口投与による大脳および小脳への移行確認は, 本研究が初めてである。また, 化合物 **10** については, 神経幹細胞の増殖作用や AChE 阻害作用を有することが報告されている⁴⁵⁾。著者は, 第2章第1節においてターメロン類の β -セクレターゼ阻害作用について明らかにしている。またターメロン類が, マウスにおいて経口投与により血液脳関門を通過し, 未変化体として脳に到達することができることを明らかにした。

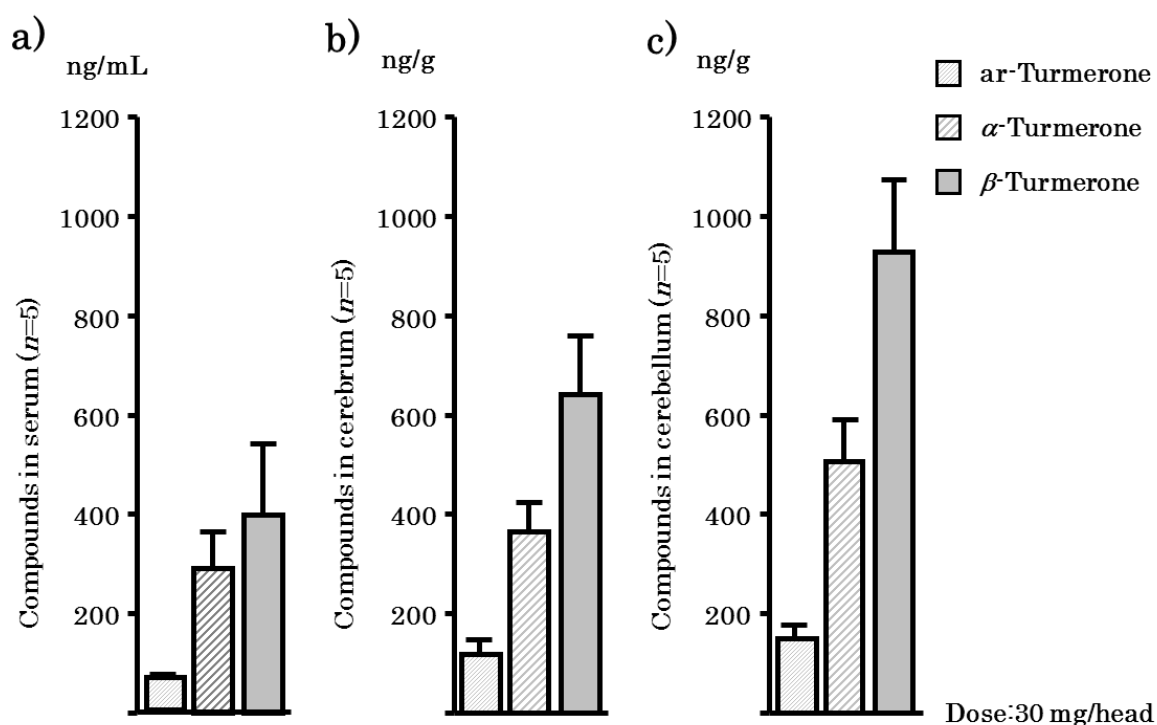


Fig. 33 Concentrations of ar-turmerone, α -turmerone and β -turmerone in mouse serum and brain, a) serum, b) cerebrum, c) cerebellum

Data are shown as averages with error bars (standard error). Vertical axis: ng/mL indicates the concentration of the compounds in serum, and ng/g indicates the concentration of the compounds in cerebrum or cerebellum.

IV. 小括

本研究において最も β -セクレターゼ阻害作用が高かったターメロン類について、マウスに経口投与することにより、それら成分が脳内に移行するか否かを検討した。その結果、それぞれのターメロン類は血液脳関門を通過し、脳内へ移行することを確認した。CLは精油成分を2~4%含有しており、精油の約50%が**8**、**9**および**10**で占められている⁴⁶⁾。また、CLは同様に β -セクレターゼ阻害作用成分としてクルクミノイド(**1~3**)も3~4%含有している⁴⁷⁾。インドの4人家族の家庭ではターメリックを1か月に1kg以上消費すると言われている(データ省略)。また、アーユルベーダ医学においては、一般的にターメリックは1日当たり1~4g処方されている⁴⁸⁾。さらに、インド人の認知症罹患率はアメリカ人のそれに比較して低いとの報告がある¹⁸⁾。これらを考慮すると、インド人の認知症の罹患率の低さはCLを日常的に食用していることが一因である可能性が示唆された。

第3章 ゴマ (*Sesamum indicum* の種子) の β -セクレターゼおよびコリンエステラーゼ阻害作用

第1節 ゴマ (*Sesamum indicum* の種子) エキスの β -セクレターゼおよびコリンエステラーゼ阻害作用

I. 緒言

認知症予防に有効な天然素材を探索する中で、第1章および第2章第1節において、スパイスに着目して β -セクレターゼ阻害作用を指標にスクリーニングを実施してきた。その結果、クルクミノイド (1~3)、モノテルペノイド (11 および 12)、セスキテルペノイド (4~9 および 22~25) およびアルカロイドの piperine (7)、さらにはフェニルプロパノイド誘導体 (15, 17, 18 および 20) など 30 種類の β -セクレターゼ阻害作用化合物を見出してきた。著者はこれらスクリーニング過程において 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 39.0%と比較的高い阻害作用を示したゴマ (SI) の酢酸エチル抽出エキス SI-EtOAc-ext に着目した。

ゴマはスパイスとして利用されるだけでなく、一般に広く食されている。また、通常のスパイスと比較して香辛味が弱く、多量に摂食できる利点がある。また、食経験の豊富さから安全性が高いと考えられる。近年ゴマの機能性としては、その抗酸化力による老化防止や、コレステロール値を低下させる効果など、生活習慣病の予防に役立つ多くの報告があり、既にサプリメントとして市場に出回っている⁴⁹⁾。

そこで本研究では、ゴマエキスの新たな機能性探索の一環として β -セクレターゼ阻害作用を検討し、さらに有効成分を明らかにした。また、ゴマエキスの抗認知症作用を検証するために、コリンエステラーゼ阻害作用を併せて検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

第2章第1節に記したものをを用いた.

2. 試薬

ブチリルコリンエステラーゼ (BuChE, 1.0 U/mL) ((株) Sigma-Aldrich) および tetraisopropylpyrophosphoramidate (ナカライテスク (株)) を用いた. その他の試薬は, 第1章第1節に記したものをを用いた.

3. 実験方法

3-1) *n*-Hexane, EtOAc および MeOH-ext の調製方法

第2章第2節に記した方法で行った. それぞれの抽出溶媒から得られた抽出エキスの収率は 50.7, 2.2 および 5.4%であった.

3-2) β -セクレターゼ阻害作用試験

第1章第1節に記した方法で行った.

3-3) AChE 阻害作用試験

第1章第1節に記した方法で行った.

3-4) BuChE 阻害作用試験

第1章第1節の AChE 阻害作用試験方法の酵素溶液を AChE から BuChE (BuChE, 1.0 U/mL) に変更して実施した. 陽性対照薬として tetraisopropylpyrophosphoramidate を用いた.

3-5) SI-EtOAc-ext の有効成分の精製

Fig. 34 のスキームに従い、SI-EtOAc-ext (5.0 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (No. 107734 silica gel 60, Merck, 2.0 i.d. × 30 cm, 30 g) に付した。*n*-Hexane / EtOAc 混合溶媒系でそれぞれ 200 mL ずつ溶出し、*n*-hexane / EtOAc (9 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (8 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (4 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (1 : 1, v/v) および EtOAc 分画を得た。得られた分画のうち阻害作用の高かった *n*-hexane / EtOAc (4 : 1, v/v), *n*-hexane / EtOAc (2 : 1, v/v) および *n*-hexane / EtOAc (1 : 1, v/v) 分画を混合し以下の分取 HPLC 条件で精製した。R.T. 7.5 min および 8.5 min のピークより 2 つの白色結晶が得られた (Fig. 34)。それぞれの化学構造は、NMR, MS および旋光度のデータを解析して決定した。

分取 HPLC 条件

装置 ; Shimadzu LC-solution system (LC-8A)

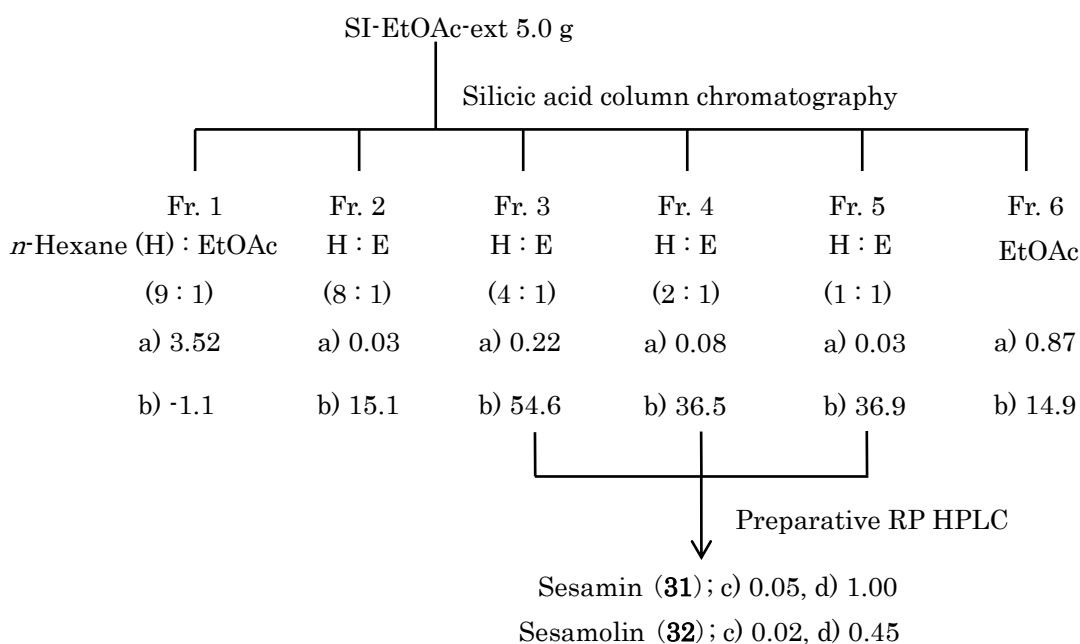
カラム ; L-column ODS (20 i.d. × 250 mm, 5 μm, (株) 化学物質評価研究機構)

移動相 ; water : acetonitrile (1 : 9, v/v)

流速 ; 18.9 mL/min

検出器 ; フォトダイオードアレイ

検出波長 ; UV 286 nm



a) Yield (g), b) β -Secretase inhibition at 250 μ g/mL
 c) Yield (g), d) Percentage of yield from EtOAc extract

Fig. 34 Purification scheme of SI-EtOAc-ext silicic acid column chromatography

4. 統計処理

第 1 章第 1 節に記した方法で行った。

III. 実験結果および考察

1. 各種 SI 抽出エキスの β -セクレターゼ, AChE および BuChE 阻害作用

各種 SI 抽出エキスの酵素阻害試験結果を Table 9, 10 および 11 に示した。 β -セクレターゼ阻害作用は, SI-EtOAc-ext が 250 μ g/mL 濃度で 39.4%の阻害率を示し, 最も高い阻害作用を示した。これは, 第 2 章第 1 節の阻害率 (39.0%) とほぼ同等の結果を得た。この結果より, SI は AD の予防に有望な素材である可能性があることが示唆された。一方, AChE 阻害作用および BuChE 阻害作用は, いずれの被検体にも顕著な阻害作用が認められなかった。

Table 9 β -Secretase inhibitory activities of *n*-hexane-ext, EtOAc-ext and MeOH-ext from SI

Sample	Concentration	Inhibition (%)
<i>n</i> -Hexane-ext	50 μ g/mL	1.8 \pm 0.0
	250	8.1 \pm 0.1**
EtOAc-ext	50	13.0 \pm 0.1**
	250	39.4 \pm 0.3**
MeOH-ext	50	4.2 \pm 0.0**
	250	19.4 \pm 0.1**
Inhibitor I	2 μ M	46.0 \pm 0.5**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from control at **: $p < 0.01$.

Table 10 AChE inhibitory activities of *n*-hexane-ext, EtOAc-ext and MeOH-ext from SI

Sample	Concentration	Inhibition (%)
<i>n</i> -Hexane-ext	100 μ g/mL	4.6 \pm 0.1
	250	5.4 \pm 0.1
EtOAc-ext	100	4.1 \pm 0.2
	250	5.2 \pm 0.2
MeOH-ext	100	0.3 \pm 0.0
	250	2.3 \pm 0.1
Galantamine hydrobromide	10 μ M	64.2 \pm 2.2**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from control at **: $p < 0.01$.

Table 11 BuChE inhibitory activities of *n*-hexane-ext, EtOAc-ext and MeOH-ext from SI

Sample	Concentration	Inhibition (%)
<i>n</i> -Hexane-ext	100 μ g/mL	- 5.9 \pm 0.2
	250	- 10.1 \pm 0.3
EtOAc-ext	100	- 9.5 \pm 0.1
	250	33.8 \pm 1.1**
MeOH-ext	100	5.1 \pm 0.1
	250	1.9 \pm 0.0
Tetraisopropylpyrophosphoramidate	30 μ M	62.8 \pm 4.3**

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates. Significantly different from control at **: $p < 0.01$.

第2節 ゴマリグナン類のマウスを用いた経口投与による脳内移行の検討

I. 緒言

第3章第1節で、SI-EtOAc-ext より新たに β -セクレターゼ阻害作用成分として **31** および **32** を明らかにし、ターメロン類に次ぐ高い阻害作用が認められた。また、第3章第1節の緒言でも述べたように、ゴマは他のスパイスと比較し、その香辛味が弱く多量に摂食できる利点がある。阻害作用が強くても、香辛味が強く毎日の食事で少量ずつしか摂取できなければ、予防としても効果もそれだけ小さくなると考えられる。そこで著者は、化合物 **31** および **32** について、マウスに経口投与して脳内へ移行するか否かを検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

第3章第1節から得られた **31** および **32** を被検体に供した。動物実験には、第2章第3節と同様のマウスを用いた。

2. 試薬

第2章第3節に記したものをを用いた。

3. 実験方法

3-1) Sesamin および sesamolin の薬物動態試験

経口投与する化合物を第2章第3節に記した方法で sesamin および sesamolin に変更して行った。

3-2) LC-MS/MS による脳内移行成分の定量分析

マウスの血清および脳の分析試料は以下の方法により調製した。分析試料は LC-MS/MS を用いて下記の条件で分析し、**31** および **32** の定量分析を実施した。

分析試料の調製

血清；血清 100 μL に acetonitrile 500 μL を加え、ボルテックス（約 3 min）によって抽出後、遠心分離（760 $\times g$, 10 min）し上清を採取した。有機溶剤除去後、残留物を acetonitrile 50 μL で溶解した。

大脳および小脳；脳 30 mg を精秤し、acetonitrile 150 μL で超音波抽出（10 min）後、遠心分離（760 $\times g$, 10 min）し上清を採取した。有機溶媒除去後、残留物を acetonitrile 75 μL で溶解した。

LC-MS/MS 条件 (sesamin)

装置；Shimadzu Lab-solutions system (LC-30AD)

カラム；Shimpack XR-ODS II (2.0 i.d. \times 75 mm, 2.2 μm , 島津製作所)

流速；0.2 mL/min

移動相；MeOH : 5 mM ammonium acetate water solution (4 : 1, v/v)

R.T.；2.25 min

注入量；1 μL

検出器；MS (LCMS-8050)

インターフェース電圧；2.5 kV

イオン化モード；ESI (+)

イオン源温度；100 $^{\circ}\text{C}$

脱溶剤ガス流量；10 L/min

脱溶剤温度；100 $^{\circ}\text{C}$

コーン電圧；11 V

MRM 条件；Sesamin のプリカーサーイオンとして $[\text{M}+\text{NH}_4]^+=m/z$ 372.2, プロダクトイオンとして $[\text{M}+\text{NH}_4\cdot\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\cdot\text{H}_2\text{O}]^+=m/z$ 233.0 を測定した。定量値は標準品により作成した検量線より求めた。

LC-MS/MS 条件 (sesamolin)

装置 : Shimadzu Lab-solutions system (LC-30AD)

カラム ; Shimpack XR-ODS II (2.0 i.d.×75 mm, 2.2 μm, (株) 島津製作所)

流速 ; 0.2 mL/min

移動相 ; MeOH : 5 mM ammonium acetate water solution

0 min (4 : 1, v/v) → 2.5 min (1 : 0, v/v)

R.T. ; 2.55 min

注入量 ; 1 μL

検出器 ; MS (LCMS-8050)

インターフェース電圧 ; 4.0 kV

イオン化モード ; ESI (+)

イオン源温度 ; 225 °C

脱溶剤ガス流量 ; 10 L/min

脱溶剤温度 ; 150 °C

コーン電圧 ; 27 V

MRM 条件 ; Sesamolin のプリカーサーイオンとして $[M+NH_4]^+$ m/z 388.2, プロダクトイオンとして $[M-C_{12}H_{12}O_5+H]^+$ m/z 135.0 を測定した. 定量値は標準品により作成した検量線より求めた⁵³⁾.

III. 実験結果および考察

3. Sesamin と sesamolin の薬物動態試験

化合物 **31** および **32** 投与群で顕著な病理的变化はみられなかった. 血清および臓器中の化合物 **31** および **32** 濃度を測定するにあたりそれらの濃度がそれぞれ ng/g および ng/mL レベルと非常に低く高感度に検出する必要があるため LC-MS/MS を使用し, MRM にて良好なピークを得てそれぞれの濃度を測定した (Fig. 36).

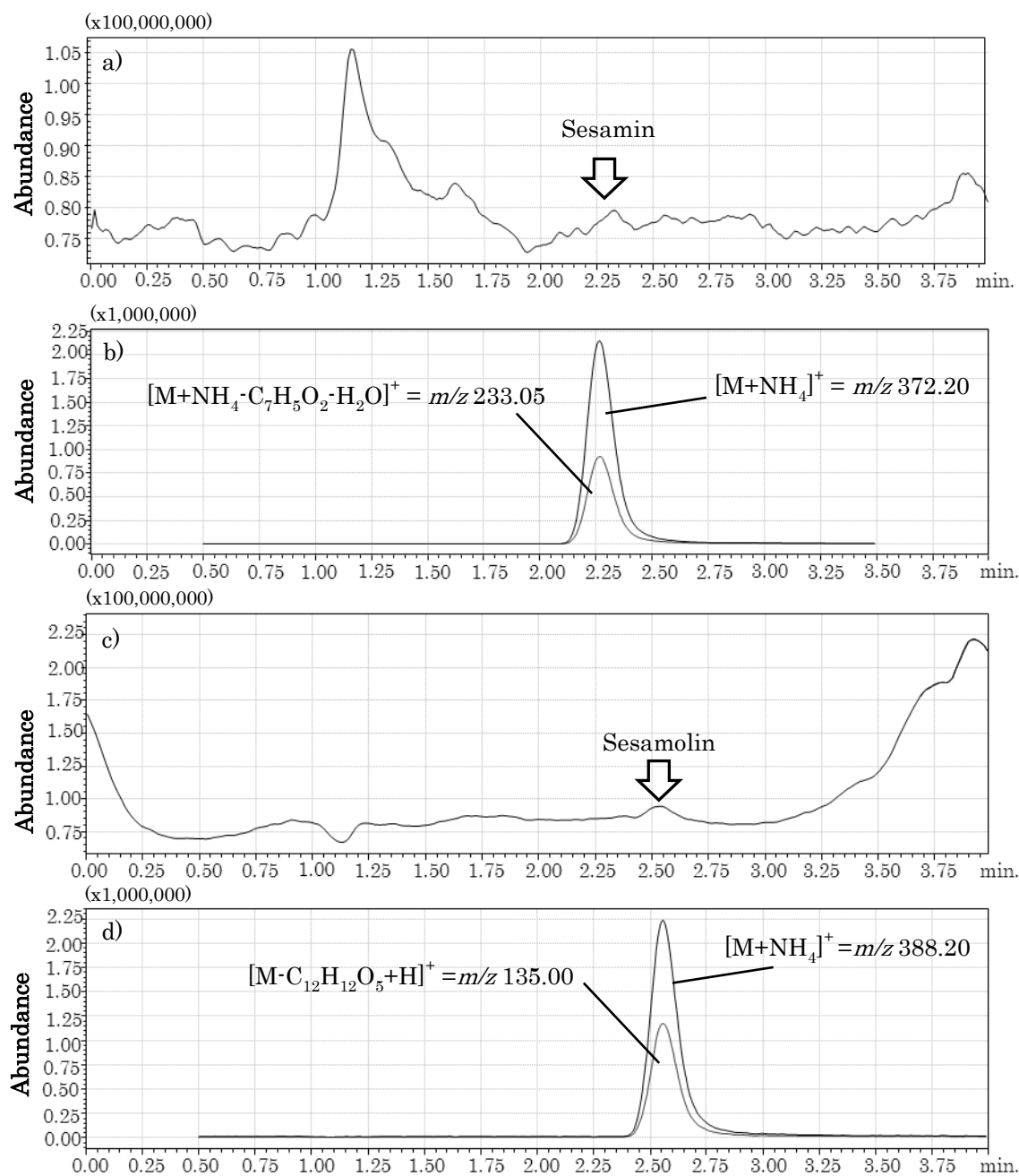


Fig. 36 LC-MS/MS chart of cerebellum samples prepared from mice injected with sesamin and sesamolin

a) TIC of a cerebellum sample from a mouse injected with sesamin, b) MRM of a cerebellum sample from a mouse injected with sesamin, c) TIC of a cerebellum sample from a mouse injected with sesamolin, d) MRM of a cerebellum sample from a mouse injected with sesamolin.

化合物 **31** および **32** は 1 mg/head 投与において、血清中で 38.3 および 174.8 ng/mL, 大脳中で 28.9 および 88.7 ng/g および小脳中で 6.4 および 67.7 ng/g 検出された。また、5 mg/head 投与においては、血清中でそれぞれ 218.2 および 328.8 ng/mL, 大脳中で 68.7 および 183.8 ng/g および小脳中で 57.9 および 137.5 ng/g 検出された。さらに、50 mg/head 投与においては、血清中でそれぞれ 281.2 および 624.3 ng/mL, 大脳中で 54.9 および 305.8 ng/g および小脳中で 96.0 および 232.6 ng/g 検出された (Fig. 37)。これは、**31** および **32** をマウスに経口投与することにより、血液脳関門を通過して脳に移行したことを示唆すると考えられる。化合物 **31** に関しては、ラットを使用した経口投与により血清中に移行すること⁵⁴⁾、また血液脳関門を介して脳に移行するという報告がある⁵⁵⁾。しかし、化合物 **32** のマウスを用いた経口投与による脳への移行確認は本研究が初めてである。

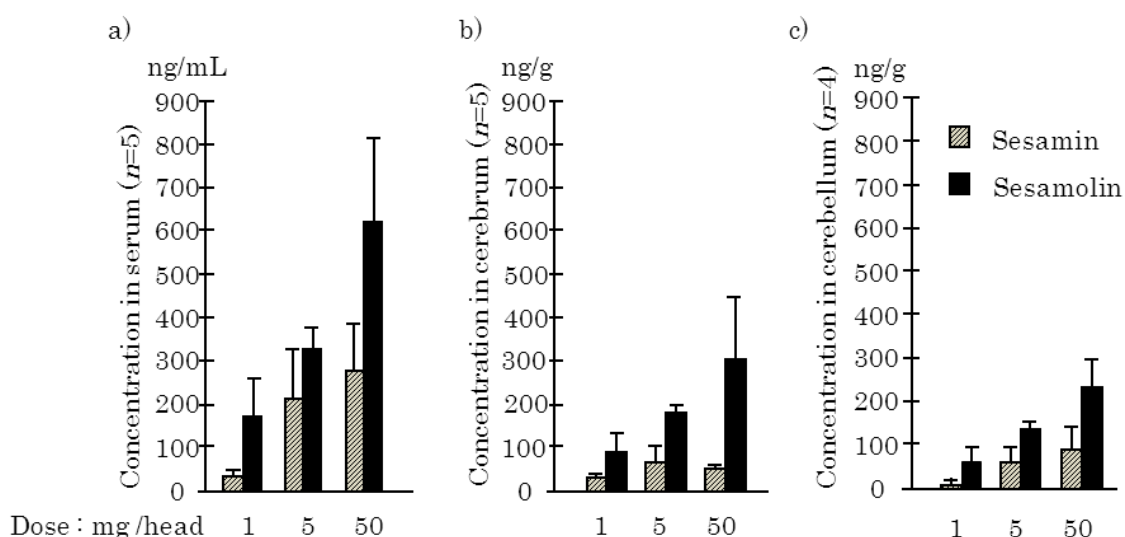


Fig. 37 Concentrations of sesamin and sesamol in mouse a) serum, b) cerebrum and c) cerebellum

Data are shown as averages with error bars (standard error). Vertical axis: ng/mL indicates the concentration of the compounds in serum, and ng/g indicates the concentration of the compounds in cerebrum or cerebellum.

ゴマはその栄養価の高さから世界中で食され、栄養機能についての報告が多数ある。なかでも抗酸化作用が注目され、その抗酸化作用の主成分が化合物 **31** および **32** であることが報告されている⁵⁶⁾。化合物 **31** および **32** の抗酸化力に関する PC12 細胞を用いた研究では、酸化ストレスによるアミロイド β の蓄積抑制効果が報告されている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。

上記の報告に合わせて、本研究において **31** および **32** に β -セクレターゼ阻害作用が明らかになったことで、アミロイド β の生成を抑制し、認知症予防に効果があることが期待された。

IV. 小括

本研究でゴマ中の **31** および **32** は、マウスを用いた薬物動態試験では、経口投与により脳内まで移行することが確認された。生のゴマ中の **31** および **32** の含量はそれぞれ 0.8~1.1%, 0.1~0.7%であり、合計で 0.6~0.9%との報告がある⁶⁰⁾。このように **31** および **32** を多く含むゴマを毎日食することで認知症の予防に繋がる可能性があることが示唆された。古来、このゴマを積極的に食事に取り入れてきたインド、中国、中東諸国の人々、また日本人もゴマを日常的に食することで認知症の予防に役立っていた可能性が示唆された。

総 括

日本における急速な高齢化に伴い、認知症患者が急増している。そのため介護や医療費の負担が増加し、社会問題化している。このような背景において著者は認知症、特に患者数が一番多く半数を占める AD に着目した。AD の治療薬で実用化されているのは、AChE 阻害剤が現在主流である。いずれも症状の緩和効果である。現在アミロイド仮説をもとに AChE 阻害剤とは異なる作用機序を持つ新薬の開発が行われている。アミロイド β ペプチド凝集抑制、 γ -セクレターゼ阻害剤および β -セクレターゼ阻害剤の開発が進行しており、複数の製薬会社で臨床段階まで進んでいるが、未だ実用化には至っていない。AD 治療薬の開発の難しさは、AD は脳の神経細胞が壊死することで発症する疾患であり、現在の医療技術では脳細胞の再生が不可能なことが大きな要因であると考えられる。

そこで著者は、AD 予防の重要性に着想した。そして発症に密接な関連を持つ、老人斑の生成に関与する β -セクレターゼを阻害することで、老人斑の抑制および AD の発生を抑制できるのではと着想した。老人斑の蓄積は 10 年以上を要すると言われており、予防措置は長期に渡ることが推定される。よって安全性の高い素材からの探索が必要と考えた。また、継続するには手軽さも必要なため日常的に食用とするものから探索することを着想した。そこで著者は、食経験が豊富で安全性の担保された食品であり、かつ生薬としても使用されており、薬効が期待できるスパイスから有望な β -セクレターゼ阻害作用についての探索に着手した。

第 1 章第 1 節では、疫学調査でインド人に認知症の発症例が少ないことが報告されていることより、インド人が多く摂取しているカレーに着目した。その主な構成スパイスであるクミン、ターメリック、チリペッパー、コリアンダーリーフおよびコリアンダーシード、カレーリーフ、ブラックペッパーの抽出物について、 β -セクレターゼ阻害作用を探索した。

本実験を始めるにあたり、 β -セクレターゼ阻害作用試験として既に消光性蛍光基質を用いたマイクロプレートリーダーを用いる方法が報告されていたが、蛍光検出する際に植物成分の自家蛍光が、マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定する際の

妨害物質になる可能性があると考え、新たに HPLC を用いて蛍光ペプチド断片のみを検出することで、妨害物質の影響を受けない評価方法を見出すことができた。第 1 章第 2 節では、第 1 章第 1 節で阻害作用の高かったターメリック、ブラックペッパーおよびカレーリーフについて、有効成分の探索を行った。その結果、 β -セクレターゼ阻害剤としてターメリックより bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin および curcumin を、ブラックペッパーよりアルカロイドである piperine を、カレーリーフよりセスキテルペン類である β -caryophyllene, α -caryophyllene および β -caryophyllene oxide を初めて明らかにした。これらの結果より、長期間に渡りインドで食されているターメリックおよびブラックペッパーは、認知症の予防効果をすでに発揮していた可能性が示唆された。

第 2 章第 1 節では、第 1 章でカレー構成スパイスに β -セクレターゼ阻害作用の有効成分が見出されたことより、さらにスクリーニングの対象をアジア全域で食用されているスパイス 16 種（ショウガ類 7 種類、コショウ類 3 種類、その他 6 種類）に拡大し、 β -セクレターゼ阻害作用を指標としてスクリーニングを実施した。その結果、多くのヘキサン抽出物から阻害作用を確認した。それらの *n*-hexane-ext から有効成分を探索した結果、ターメリックから新たに有効成分として α -turmerone, β -turmerone および ar-turmerone を、カルダモンから linalyl acetate および α -terpinyl acetate を、ヒハツからは pipataline を、シナモンからは cinnamaldehyde を、カショウからは sabinene を、キンマからは safrole および eugenol を、ガジュツからは epicurzerenone を、ガランガルからは ethyl 4-methoxycinnamate を明らかにした。これらすべての化合物の β -セクレターゼ阻害作用は、本研究で初めて明らかになった。

第 2 章第 2 節では、第 1 章および第 2 章第 1 節の結果より β -セクレターゼ阻害作用が最も高かったターメリックに着目し、低極性抽出エキスの有効成分の探索を実施した。その結果、モノテルペンである α -phellandrene, d -limonene, 1,8-cineole, *p*-cymene および terpinolene, セスキテルペンである *l*-zingiberene, β -bisabolene, β -sesquiphellandrene および ar-curcumene の β -セクレターゼ阻害作用を初めて明らかにした。第 2 章第 3 節では、最も高い阻害作用を確認した α -turmerone, β -turmerone および ar-turmerone について、マウスに経口投与することにより、脳

内に移行することを確認した。

第3章では、第2章第1節の結果より、比較的高い β -セクレターゼ阻害作用を示したゴマに着目し、有効成分の探索をした結果、sesamin および sesamol in が新たに β -セクレターゼ阻害作用成分として明らかにされた。第3章第2節では第2章第2節同様に sesamin および sesamol in について、マウスを用いた薬物動態試験を実施し、脳内までインタクトとして移行することが確認された。

本研究では、従来の手法であるマイクロプレートリーダーによる分析ではなく、新たに HPLC を用いて蛍光ペプチド断片のみを検出することで、妨害物質の影響を受けない最良の評価方法を見出すことに成功した。この手法を用いて合計 22 種類のスパイスをスクリーニングした結果、 β -セクレターゼ阻害作用成分として IC₅₀ 値を測定できたもの 25 種類、できなかったものを含めると 32 種類の化合物を明らかにした。

今回明らかになった化合物の化学構造は多種であり、今後これらの知見は医薬品開発のリード化合物の発見の手掛かりになることを期待する。

さらなる詳細な研究が必要であるが、著者は今後本研究の成果が普及、発展していくことで、食生活の改善による認知症の予防が、がんのデザイナーフーズピラミッドのような形で啓蒙され、普及することを期待する。

引用文献

- 1) 厚生労働省. 平均寿命の国際比較,(2013).
- 2) 厚生労働省. 認知症有病率等調査について-都市における認知症有病率と認知症の生活機能障害への適応. 総合研究報告書,(2013).
- 3) 厚生労働省. 2015年の高齢者介護. 高齢者介護研究会報告書,(2003).
- 4) 富田 泰輔. γ セクレターゼ活性制御機構の理解に基づいたアルツハイマー病治療薬開発. *臨床神経学*, **52**, 1165-1167 (2012).
- 5) Williams P, Sorribas A, Howes M J R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*, **28**, 48-77 (2011).
- 6) 下濱 俊. アルツハイマー病の治療-現状と解決すべき諸問題. *日本薬理学雑誌*, **131**, 351-356 (2008).
- 7) Sakamoto S, Katayama Y. The present state of an outpatient memory disorders clinic. *日医大医会誌*, **2**, 148-151 (2006).
- 8) Hwang T Y, Ahn I S, Kim S and Kim D K. Efficacy of galantamine on cognition in mild-to-moderate Alzheimer's dementia after failure to respond to donepezil. *Psychiatry Investigation*, **13**, 341-348 (2016).
- 9) Rogers S, Doody R S, Pratt R D, Ieni J R. Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: final analysis of a US multicentre open-label study. *European Neuropsychopharmacology*, **10**, 195-203 (2000).
- 10) Winblad B, Wimo A, Engedal K, Soininen H, Verhey F, Waldemar G, Wetterholm A L, Haglund A, Zhang R, Schindler R. 3-Year study of donepezil therapy in Alzheimer's disease: effects of early and continuous therapy. *Dementia Geriatric Cognitive Disorders*, **21**, 353-363 (2006).
- 11) Salloway S, Sperling R, Fox N C, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig L S, Porsteinsson A P, Ferris S, Reichert M, Ketter N, Nejadnik B, Guenzler V, Miloslavsky M, Wang D, Lu Y, Lull J, Tudor I C, Liu E, Grundman M, Yuen E, Black R, Brashear H R. Two phase 3 trials of

- bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, **370**, 322-333 (2014).
- 12) 笠貫 浩史, 井関 栄三. アルツハイマー病の薬物開発の現状. *日本老年医学会誌*, **48**, 597-605 (2011).
 - 13) Ankarcrona M, Winblad B, Monteiro C, Fearn C, Powers E T, Johansson J, Westermark G T, Presto J, Ericzon B G, Kelly J W. Current and future treatment of amyloid diseases. *Journal of internal medicine*, **280**, 177-202 (2016).
 - 14) 岩井 和夫, 中谷 延二. 香辛料成分の食品機能. *光生館*, 82-96 (1989).
 - 15) Chandra V, Pandav R, Dodge H H, Johnston J M, Belle S H, Dekosky S T, Ganguli M. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: The Indo-US study. *Neurology*, **57**, 985-989 (2001).
 - 16) Braga M E M, Leal P F, Carvalho J E, Meireles M A A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6604-6611 (2003).
 - 17) 矢野 友啓. 食品成分による癌予防. *日本未病システム学会雑誌*, **12**, 56-58 (2006).
 - 18) Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, **13**, 51-54 (2002).
 - 19) Giovanni S D, Borloz A, Urbain A, Marston A, Hostettmann K, Carrupt PA, Reist M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **33**, 109-119 (2008).
 - 20) 木村 有希, 綱分 信二, 谷口 美也子, 斎藤 潤, 北浦 美貴, 細田 理恵子, 米原 あき, 長谷川 順子, 児玉 憲江, 清水 百合子, 森本 靖子, 頼田 孝男, 小嶋 良平, 浦上 克哉. アルツハイマー病患者に対するアロマセラピーの有用性. *Dementia Japan*, **19**, 77-85 (2005).
 - 21) Henrich M, Teoh H L. Galanthamine from snowdrop-the development of a

- modern drug against alzheimer's disease from local Caucasian. *Journal of ethnopharmacology*, **92**, 147-162 (2004).
- 22) Sasaki H, Miki K, Kinoshita K, Koyama K, Juliawaty L D, Achmad S A, Hakim E H, Kaneda M, Takahashi K. β -Secretase (BACE-1) inhibitory effect of biflavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 4558-4560 (2010).
- 23) Zhu Z, Li C, Wang X, Yang Z, Hen J, Hu L, Jiang H, Shen X. 2,2',4'-Trihydroxychalcone from *Glycyrrhiza glabra* as a new specific BACE1 inhibitor efficiently ameliorates memory impairment in mice. *Journal of Neurochemistry*, **114**, 374-385 (2010).
- 24) Wang X, Kim J R, Lee S B, Kim Y J, Jung M Y, Kwon H W, Ahn Y J. Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease. *Drosophila* models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**, 88 (2014).
- 25) Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation. *Journal of Neurochemistry*, **19**, 1329-1333 (2008).
- 26) Huang H C, Tang D, Xu K, Jiang Z F. Curcumin attenuates amyloid- β -induced tau hyperphosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells involving PTEN/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, **34**, 26-37 (2014).
- 27) Ringman J M, Frautschy S A, Teng E, Begum A N, Bardens J, Beigi M, Gyls K H, Badmaev V, Heath D D, Apostolova L G, Porter V, Vanek Z, Marshall G A, Helleman G, Sugar C, Masterman D L, Montine T J, Cummings J L, Cole G M. Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Research & Therapy*, **4**, 43-51 (2012).
- 28) Lopresti L A, Maes M, Maker L G, Hood D S, Drummond D P. Curcumin for

- treatment of major depression: a randomised, double-blind, placebo controlled study. *Journal of Affective Disorders*, **167**, 368-375 (2014).
- 29) Liao J C, Tsai J C, Liu Y C, Huang H C, Wu L Y, Peng W H. Antidepressant-like activity of turmerone in behavioral despair tests in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**, 299 (2013).
- 30) Baum L, Lam W K C, Cheung K S, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu F K H, Goggins B W, Zee C Y B, Cheng F K, Fong Y S C, Wong A, Mok H, Chow S S M, Ho C P, Ip P S, Ho S C, Yu W X, Lai Y L C, Chan M H, Szeto S, Chan H S I, Mok V. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **28**, 110-112 (2008).
- 31) Uehara S, Yasuda I, Takeya K, Itokawa H. Terpenoids and curcuminoids of the rhizome of *Curcuma xanthorrhiza* ROXB. *Yakugaku Zasshi*, **112**, 817-823 (1992).
- 32) Banerji A, Sarkar M, Ghosal T, Chandrapal S. Carbon-13 NMR spectra of *Piper* alkaloids and related compounds. *Organic Magnetic Resonance*, **22**, 734-736 (1984).
- 33) Kosmulalage K S, Zahid S, Udenigwe C C, Akhtar S, Ata A, Samarasekera R. Glutathione *S*-transferase, acetylcholinesterase inhibitory and antibacterial activities of chemical constituents of *Barleria prionitis*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **62**, 580-586 (2007).
- 34) Malik J, Munjal K, Deshmukh R. Attenuating effect of standardized lyophilized *Cinnamomum zeylanicum* bark extract against streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, **26**, 275-85 (2015).
- 35) Yang F Q, Li S P, Chen Y, Lao S C, Wang Y T, Dong T T X, Tsim K W K. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of *Curcuma* rhizomes by pressurized liquid extraction and gas

- chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**, 552-558 (2005).
- 36) Firman K, Kinoshita T, Itai A, Sankawa U. Terpenoids from *Curcuma heyneana*. *Phytochemistry*, **27**, 3887-3891 (1988).
- 37) Jeon S Y, Bae K, Seong Y H, Song K S. Green tea catechins as a BACE1 (β -secretase) inhibitor. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, **13**, 3905-3908 (2003).
- 38) Singh G, Kapoor I P S, Singh P, Heluani C S, Lampasona M P. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1026-1031 (2010).
- 39) Liju V, Jeena K, Kuttan R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa* L. *Indian Journal of Pharmacology*, **43**, 526-531 (2011).
- 40) Teris A B, Gerrit P L. Isolation and identification of the five major sesquiterpene hydrocarbons of ginger. *Phytochemical analysis*, **2**, 26-34 (1991).
- 41) Malasoni R, Naqvi A, Srivastava A, Pandey R R, Singh A, Chaudhary M, Paliwal K S, Dwivedi K A. An improved HPLC method for simultaneous estimation of isocurcumenol, α -turmerone and β -turmerone in hexane soluble fraction of *Curcuma longa* and its formulations. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **4**, 405-410 (2014).
- 42) Pulok K M, Venkatesan K, Mainak M, Peter J H. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **14**, 289-300 (2007).
- 43) Hucklenbroich J, Klein R, Neumaier B, Graf R, Fink G R, Schroeter M, Rueger M A. Aromatic-turmerone induces neural stem cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Research & Therapy*, **5**, 100 (2014).
- 44) Monserrath A, Paucar O, Afrikanova T, Thomas J, Aibuldinov K Y, Dehaen W, Witte A M P, Esguerra V C. Insights from zebrafish and mouse models on the

- activity and safety of ar-turmerone as a potential drug candidate for the treatment of epilepsy. *PLOS ONE*, **8**, e81634 (2013).
- 45) Fujiwara M, Yagi N, Miyazawa M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (yellow batai) and bisabolane-type sesquiterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 2824-2829 (2010).
 - 46) Herebian D, Choi J H, Abd EI-Aty A.M., Shim J H, Spiteller M. metabolite analysis in *Curcuma domestica* using various GC-MS and LC-MS separation and detection techniques. *Biomedical Chromatography*, **23**, 951-965 (2009).
 - 47) Mathew Attokaran. Natural food flavors and colorants. Blackwell publishing Ltd. And Institute of food technologists, pp. 391-398 (2011).
 - 48) Kapoor L D. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC PRESS, pp. 149-150 (1990).
 - 49) Kamal-Eldin A, Moazzami A, Washi S. Sesame seed lignans: potent physiological modulators and possible ingredients in functional food & nutraceuticals. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, **3**, 17-29 (2011).
 - 50) Ahmad A D, Kumar N V, Arumugam N. An updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans - sesamin and sesamol, from sesame oil. *Industrial Crops and Products*, **64**, 201-208 (2015).
 - 51) Yoshida M, Kashimoto T. Determination of sesamin and sesamol in sesame oil by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **23**, 142-148 (1982).
 - 52) Budowski P. Sesame Oil. VII. Optical rotation and the minor components of sesame oil. *The Journal of the American Oil Chemist's Society*, **28**, 54-55 (1951).
 - 53) Ma Y, Xu K, Wang S, Han Y. Simultaneous determination of two epimeric furofuran lignans (sesamin and asarinin) of *Asarum heterotropoides* extract

- in rat plasma by LC/MS/MS: application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatographic Science*, **52**, 793-798 (2014).
- 54) Song Y, Deng Y, Huang D, Wen J, Liu Z, Li F. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of four lignin components in rat plasma after oral administration of *Acanthopanax sessiliflorus* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **141**, 957-963 (2012).
- 55) Umeda-Sawada R, Ogawa M, Igarashi O. The metabolism and distribution of sesame lignans (sesamin and episesamin) in rats. *Lipids*, **34**, 633-637 (1999).
- 56) Pathak N, Rai A K, Kumari R, Bhat K V. Value addition in sesame: a perspective on bioactive components for enhancing utility and profitability. *Pharmacognosy Reviews*, **8**, 147-155 (2014).
- 57) Hou C, Chang S, Jeng K. Protective effects of a sesamin derivative, 3-bis(3-methoxybenzyl)butane-1,4-diol on $A\beta$ -stressed PC12 cells. *Archives of Pharmacal Research*, **38**, 543-548 (2015).
- 58) Hou R C, Huang H M, Tzen J T, Jeng K C. Protective effects of sesamin and sesamol on hypoxic neuronal and PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, **74**, 123-133 (2003).
- 59) Huang H M, Ou H C, Hsieh S J. Antioxidants prevent amyloid peptide-induced apoptosis and alteration of calcium homeostasis in cultured cortical neurons. *Life Sciences*, **66**, 1879-1892 (2000).
- 60) Wang L, Zhang Y, Li P, Zhang W, Wang X, Qi X, Zhang X. Variation of sesamin and sesamol contents in sesame cultivars from china. *Pakistan Journal of Botany*, **45**, 177-182 (2013).

略語一覧表

ACh	アセチルコリン
AChE	アセチルコリンエステラーゼ
AD	アルツハイマー型認知症
AG	ジャヴァガランガル (<i>Alpinia galanga</i> の根茎)
BuChE	ブチリルコリンエステラーゼ
CA	春ウコン (<i>Curcuma aromatica</i> の根茎)
CC	クミン (<i>Cuminum cyminum</i> の種子)
CI	シナモン (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> の樹皮)
CL	ターメリック (<i>Curcuma longa</i> の根茎)
CP	チリペッパー (<i>Capsicum annum</i> の果実)
CS	サフラン (<i>Crocus sativus</i> の柱頭)
CSL	コリアンダーリーフ (<i>Coriandrum sativum</i> の葉)
CSS	コリアンダーシード (<i>Coriandrum sativum</i> の種子)
CZ	ガジュツ (<i>Curcuma zedoaria</i> の根茎)
DMSO	dimethylsulfoxide
EC	カルダモン (<i>Elettaria cardamomum</i> の種子)
ESI	エレクトロスプレーイオン化
EtOAc	ethyl acetate (酢酸エチル)
EtOAc-ext	酢酸エチル抽出エキス
GC	ガスクロマトグラフィー
GC/MS	ガスクロマトグラフィー質量分析
<i>n</i> -hexane-ext	ヘキサン抽出エキス
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
Inhibitor I	Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe (Sta: (3S,4S) - 4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanoic acid)
KG	ガランガル (<i>Kaempferia galanga</i> の根茎)
LC-MS/MS	液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計
MRM	多重反応モニタリング

NMR	核磁気共鳴分析
MeOH	methanol (メタノール)
MeOH-ext	メタノール抽出エキス
MK	カレーリーフ (<i>Murraya koenigii</i> の葉)
MS	質量分析
PN	ブラックペッパー (<i>Piper nigrum</i> の果実)
PB	キンマ (<i>Piper betle</i> の葉)
PL	ヒハツ (<i>Piper longum</i> の果実)
SA	クローブ (<i>Syzygium aromaticum</i> の蕾)
SDS	sodium dodecylsulfate
R.T.	保持時間
SI	ゴマ (<i>Sesamum indicum</i> の種子)
TF	メッチ (<i>Trigonella foenum-graecum</i> の種子)
Tris	tris (hydroxymethyl) aminoacetate
ZB	カシヨウ (<i>Zanthoxylum bungeanum</i> の花)
ZO	ジンジャー (<i>Zingiber officinale</i> の根茎)
ZZ	白ウコン (<i>Zingiber zerumbet</i> の根茎)
(+)	ポジティブモード

謝 辞

終わりに臨み、本研究の実施において終始御懇切なる御指導と御鞭撻および御校閲を賜りました近畿大学大学院薬学研究科 松田秀秋教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の実施において終始御懇切なる御指導と御鞭撻および御校閲を賜りました近畿大学大学院薬学研究科 岩城正宏教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻および御校閲を賜りました近畿大学大学院薬学研究科 村田和也准教授に深謝いたします。

さらに、本研究に際し、御懇切なる御指導および御鞭撻を賜りました近畿大学農学部応用生命学科 森本正則准教授，財満信宏准教授に深謝いたします。

本研究の機会を与您いただきました稲畑香料株式会社 稲畑謙一郎会長，稲畑譲二社長に深謝いたします。

実験に際し、御協力くださいました近畿大学薬学部創薬科学科 薬用資源学研究室および株式会社ア・ファーマ近大の皆様方に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始実験に際し、御協力くださいました稲畑香料株式会社 新規事業部および研究開発部門の皆様方に厚く御礼申し上げます。