

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-104850
(P2005-104850A)

(43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl.⁷

A61K 31/352
A61P 25/28

F I

A61K 31/352
A61P 25/28

テーマコード(参考)

4C086

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2003-336539 (P2003-336539)
(22) 出願日 平成15年9月26日(2003.9.26)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 803000023
有限会社金沢大学ティ・エル・オー
石川県金沢市角間町ヌ7番地金沢大学内
(71) 出願人 504145320
国立大学法人福井大学
福井県福井市文京3丁目9番1号
(74) 代理人 100105809
弁理士 木森 有平
(74) 代理人 100126398
弁理士 浅野 典子
(72) 発明者 山田 正仁
石川県金沢市石引4-2-16-702
(72) 発明者 小野 賢二郎
石川県金沢市小立野1-4-7-301

最終頁に続く

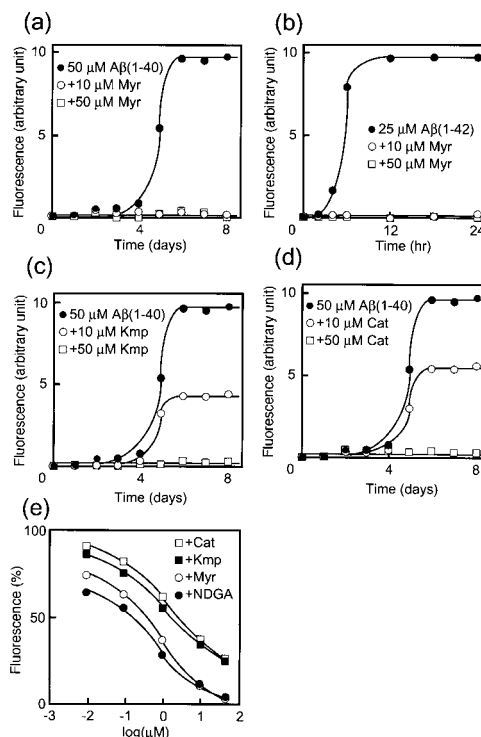
(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の治療薬および予防薬

(57) 【要約】

【課題】 アミロイド線維に対する直接的な生成抑制あるいは分解の効果を持つ、アルツハイマー病の根本的な治療薬、または予防薬を提供する。

【解決手段】 ポリフェノール類を有効成分として含有し、アミロイド線維の生成又は脳組織への沈着を抑制するアルツハイマー病予防薬、または、ポリフェノール類を有効成分として含有し、脳組織に沈着したアミロイド線維の除去作用を有するアルツハイマー病治療薬。ここで、上記ポリフェノール類としては、ミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキンおよびエピカテキンの内の少なくとも1種類であることが望ましい。特に、上記ポリフェノール類の中でも、ミリセチン、モリン、またはケルセチンを高濃度に含有していることが望ましい。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリフェノール類を有効成分として含有し、アミロイド線維の生成および脳組織への沈着を抑制することを特徴とするアルツハイマー病予防薬。

【請求項 2】

前記ポリフェノール類がミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキンおよびエピカテキンの内の少なくとも1種類であることを特徴とする請求項 1 記載のアルツハイマー病予防薬。

【請求項 3】

前記ポリフェノール類を複数種類含有し、ミリセチン、モリン、あるいはケルセチンを、カンフェロール、カテキン、あるいはエピカテキンよりも高濃度に含有することを特徴とする請求項 2 記載のアルツハイマー病予防薬。

10

【請求項 4】

ポリフェノール類を有効成分として含有し、脳組織に沈着したアミロイド線維の除去作用を有することを特徴とするアルツハイマー病治療薬。

【請求項 5】

前記ポリフェノール類がミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキンおよびエピカテキンの内の少なくとも1種類であることを特徴とする請求項 4 記載のアルツハイマー病治療薬。

【請求項 6】

前記ポリフェノール類を複数種類含有し、ミリセチン、モリン、あるいはケルセチンを、カンフェロール、カテキン、あるいはエピカテキンよりも高濃度に含有することを特徴とする請求項 5 記載のアルツハイマー病治療薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の病因となるアミロイドペプチド重合体（アミロイド線維）の脳組織での沈着を抑制し、また既に沈着したアミロイド線維の除去を促進する薬剤に関する。

【背景技術】

30

【0002】

アルツハイマー病（以下、ADと略記する。）は、タウ蛋白が神経原線維変化を形成し神経細胞内に蓄積すること、及びアミロイドペプチド（以下、Aと略記する。）が老人斑あるいは脳血管アミロイドを形成して細胞外に沈着することにより神経機能が著しく阻害されることが広く知られている。これまでに、アセチルコリンの分解を抑制する薬剤を用いてコリン作動性ニューロンを賦活化することによる本症の治療法が開発されているが、ADの神経機能阻害過程を直接的に抑制する方法、特にAの中枢神経系への沈着を抑制する根本的治療方法の開発はされていない。近年、AD遺伝子組み換えマウスをAで免疫することにより、Aの脳内蓄積を低下させる試みが行われている（非特許文献1）。

40

【0003】

一方、デンマークでの疫学的研究の結果は、適度のワイン飲用者にはADの発病抑制効果が見られることを示唆している（非特許文献2）。赤ワインには原料ブドウの表皮や種子に由来する多種のポリフェノール類が含まれている（非特許文献3）。最近、多くの天然産ポリフェノール類がin vivoあるいはin vitroで神経保護効果を示すこと、特にそれが活性酸素種の除去作用によるものである事が報告されている（非特許文献4、非特許文献5）。さらに、緑茶のポリフェノールであるカテキンおよびエピカテキンが、培養海馬細胞に対するAの細胞毒性を軽減する効果があることから、同カテキン及びエピカテキンを神経細胞毒性軽減剤として用いる手法が開示されている（特許文献1）。しかし、ポリフェノールがアミロイド線維（以下、fAと略記する。）のin vitroでの形成を阻

50

害し、また分解を引き起こす事を示す報告はこれまでに成されていない。

【0004】

A Dの病因・治療に関する従来技術として、特許文献1及び非特許文献1～非特許文献5が挙げられる。

【特許文献1】特開平10-245342号公報

【非特許文献1】Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vanderver, C., Walker, S., Wogulis, M., Ywdnock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999) Nature 400, 173-177. 10

【非特許文献2】Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. Truelsen, T., Thudium, D. and Gronback, M. (2002) Neurology 59, 1313-1319.

【非特許文献3】Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. Goldberg, D.M., Tsang, R., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G., and Ng E. (1996) Anal. Chem. 68, 1688-1694.

【非特許文献4】Oral administration of (-)catechin protect against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. Inanami, O., Watanabe, Y., Syuto, B., Nakano, M., Tsuji, M., and Kuwabara, M. (1998) Free Radic. Res. 29, 359-365. 20

【非特許文献5】Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. Bastianetto, S., Zheng, W.H., and Quirion, R. (2000) Br. J. Pharmacol. 131, 711-720.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、前述した非特許文献1に公開されている、Aに対する免疫療法を用いてAを除去する試みでは、髄膜脳炎等の障害を併発することが治験で明らかになっている。また、特許文献1には緑茶ポリフェノールであるカテキン及びエピカテキンを神経細胞毒性軽減剤として用いる手法が公開されているが、Aが有する神経細胞毒性を軽減させるに留まっており、アミロイド線維に対する直接的な生成抑制あるいは分解といった、アルツハイマー病の根本的な治療もしくは予防を示すものではなかった。本発明は、このようなアルツハイマー病の根本的な治療薬、及び予防薬の提供を目的とする。 30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、広く飲用されている赤ワインに成分として含まれるポリフェノール類が、脳組織に沈着して毒性を示すアミロイド線維の生成を抑制する作用と、既に生成し脳組織に沈着したアミロイド線維の分解を促進する作用との両方を有することを初めて見出した。さらに、上記ポリフェノール類のうち、ある特定の数種類がこれらの作用を強く有することを初めて見出した。そして、これらのポリフェノール類がアルツハイマー病の治療に応用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。 40

【0007】

すなわち、本発明のアルツハイマー病予防薬は、ポリフェノール類を有効成分として含有し、アミロイド線維の生成又は脳組織への沈着を抑制することを特徴とする。また、本発明のアルツハイマー病治療薬は、ポリフェノール類を有効成分として含有し、脳組織に沈着したアミロイド線維の除去作用を有することを特徴とする。さらに、上記ポリフェノール類は1種類のみを含有しても、複数種類を含有してもよく、ミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキンおよびエピカテキンの内の少なくとも1種類で 50

あることが望ましい。特に、上記ポリフェノール類を複数種類含有する場合は、ミリセチン、モリン、あるいはケルセチンを、カンフェロール、カテキン、あるいはエピカテキンよりも高濃度に含有していることが望ましい。

【0008】

ポリフェノール類は、アミロイド ペプチドの重合形成反応及び線維伸長反応を抑制し、アルツハイマー病の病因となる アミロイドの脳組織への沈着を抑制する。したがって、本発明のアルツハイマー病治療薬をアルツハイマー病患者に投与することにより、アミロイド ペプチドの重合形成反応及び線維伸長反応が抑制されるとともに、すでに脳組織に沈着している アミロイドが分解されるので、アルツハイマー病の病因となる アミロイドの脳組織への沈着が抑制され、また、 アミロイドが脳組織から除去される。

10

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、赤ワイン等に含まれるポリフェノール類が、脳組織に沈着して毒性を示す アミロイド線維の生成を抑制するため、これを含有するアルツハイマー病予防薬として投与することにより、アルツハイマー病を予防することが可能である。また、上記ポリフェノール類は、すでに生成し脳組織に沈着した アミロイド線維の分解を促進するため、これを含有するアルツハイマー病治療薬として投与することにより、アルツハイマー病の進行を抑制することが可能である。すなわち、アルツハイマー病を根本的に治療することが可能である。上記ポリフェノール類の内、ミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキン及びエピカテキンは、 アミロイド線維生成抑制効果及び同線維分解効果を強く有し、中でも、ミリセチン、モリン、及びケルセチンは特に強い効果を有しているため、アルツハイマー病を根本的且つより効率的に治療することが可能である。

20

【0010】

また、本発明のポリフェノール類は広く飲用されている赤ワイン等に多量に含まれている物質である為、大量生産が可能であり、且つ安全性の高いものである。従って、アルツハイマー病治療薬あるいはアルツハイマー病予防薬としてばかりでなく、栄養補助食品としても汎用することが可能であり、実用性が高いものである。

【発明を実施するための最良の形態】

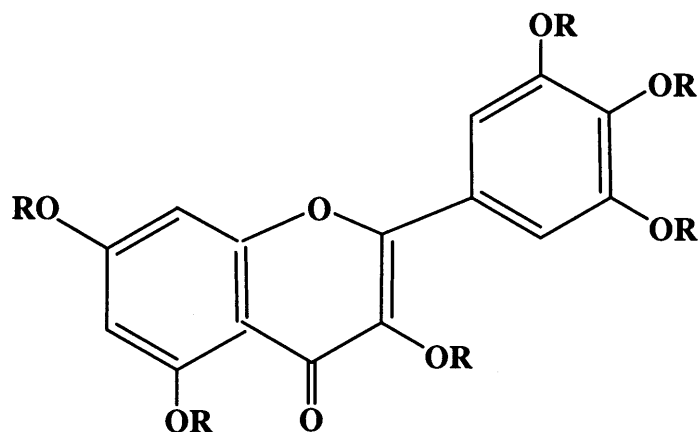
【0011】

本発明のアルツハイマー病予防薬又は治療薬として用いるポリフェノール類は、以下に示す一般式(1)から一般式(6)で表されるビオフラビン類であり、これらを単独で、あるいは組み合わせて使用することが出来る。

30

【0012】

【化1】



(1)

40

【0013】

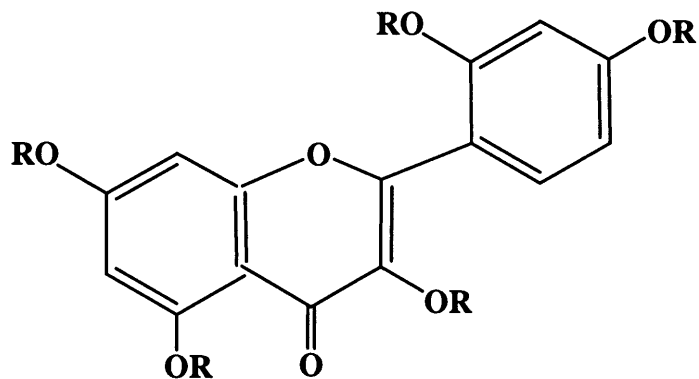
ただし、前記一般式(1)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的

50

化合物としては、前記一般式(1)においてR = Hであるミリセチン(Myricetin、以下の文中においてMyrと略記する)を挙げることができる。

【0014】

【化2】



10

(2)

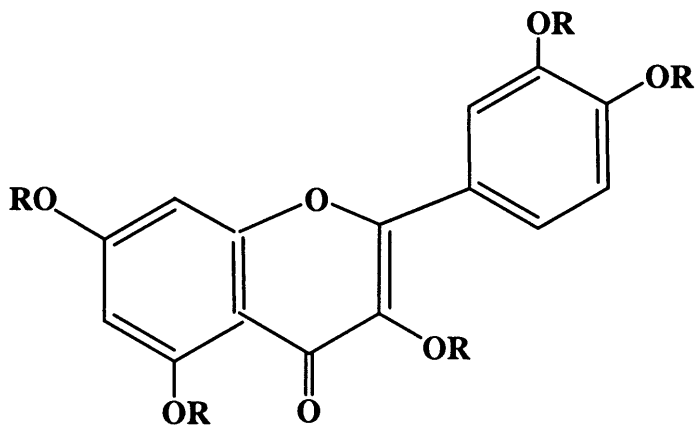
【0015】

ただし、前記一般式(2)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的化合物としては、前記一般式(2)においてR = Hであるモリン(Morin、以下の文中においてMorと略記する)を挙げることができる。

20

【0016】

【化3】



30

(3)

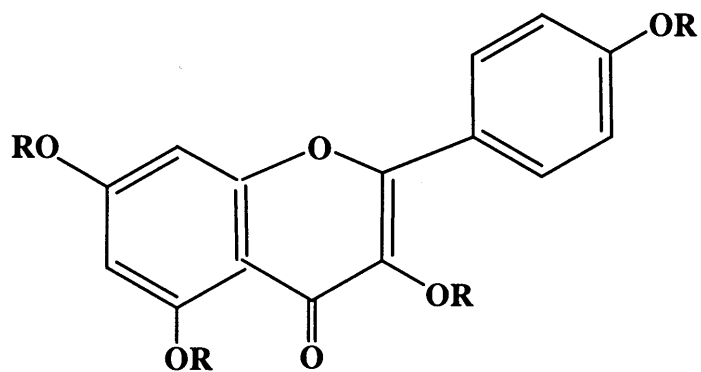
【0017】

ただし、前記一般式(3)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的化合物としては、前記一般式(3)においてR = Hであるケルセチン(Quercetin、以下の文中においてQurと略記する)を挙げることができる。

40

【0018】

【化4】



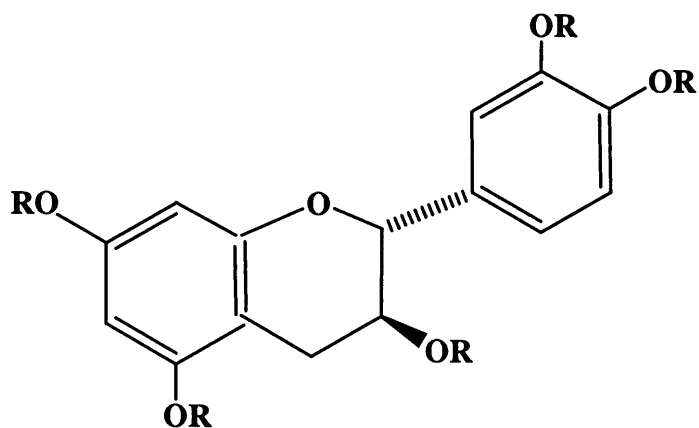
10

【0019】

ただし、前記一般式(4)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的化合物としては、前記一般式(4)においてR=Hであるカンフェロール(Kaempferol、以下の文中においてKmpと略記する)を挙げることができる。

【0020】

【化5】



20

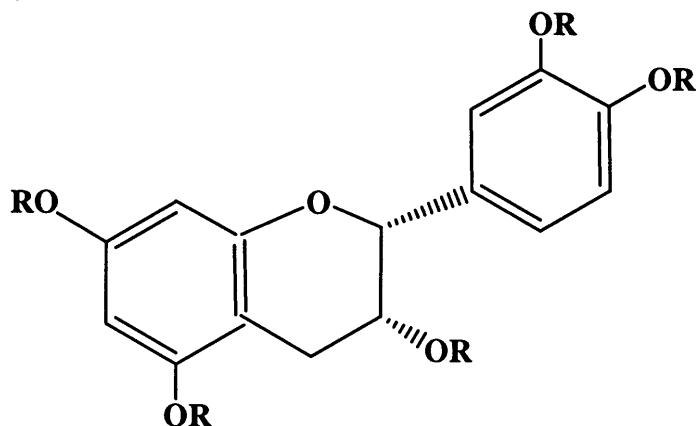
30

【0021】

ただし、前記一般式(5)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的化合物としては、前記一般式(5)においてR=Hであるカテキン(+)-Catechin、以下の文中においてCatと略記する)を挙げることができる。

【0022】

【化6】



(6)

10

【0023】

ただし、前記一般式(6)において、RはHまたはアルキル基(C₁-C₃)またはアシル基(R₁CO)でR₁の炭素数は1から3個である。また、これらの配糖体も含まれる。具体的化合物としては、前記一般式(6)においてR=Hであるエピカテキン[(-)-epi-Catechin、以下の文中においてepi-Catと略記する]を挙げることができる。

【0024】

上述のように、ポリフェノール類としてはミリセチン、モリン、ケルセチン、カンフェロール、カテキン、エピカテキン等のビオフラビン類を例示できる。特に、アルツハイマー病予防薬又は治療薬が上記ポリフェノール類を複数種類含有する場合は、ビオフラビン類のなかでも、ミリセチン、モリン、ケルセチンを含有することが望ましく、これらをカンフェロール、カテキン、あるいはエピカテキンよりも高濃度に含有していることが望ましい。

20

【0025】

これらのポリフェノール類は、赤ワインばかりではなくブドウの果実、果皮を原料として製造することが可能である。例えば、以下に示す方法によって製造することができる。まず、脱アルコールされたワインを濃縮し、吸収樹脂カラムに通す。用いる樹脂は、溶媒を使って溶離することによりポリフェノール類が得られるものならどれでもよい。次に、水性アルコールで溶離し、アルコールを除去し、混合物を加熱により濃縮する。ぶどうの皮の場合、当該材料を、適当な溶媒、好ましくは水またはアルコール水溶液と十分に混合する。抽出処理を促進するために溶媒を加熱することができる。次に、静止デカンテーション、遠心分離、またはろ過(凝集剤を加えても加えなくてもよい)により、透明な溶液を得る。この液体は、脱アルコールワインについて上述したのと同じ態様で樹脂カラムにかけることができる。さらに、このようにして得られた抽出成分濃縮液を高速液体クロマトグラフィーにて前述した各物質に分離することができる。

30

【0026】

また、これらのポリフェノール類は、アルツハイマー治療薬及びアルツハイマー予防薬として用いるだけでなく、栄養補助食品として用いる事ができる。また、飲食物や酒類などの嗜好品に添加して用いることも可能である。

40

【0027】

本発明のアルツハイマー病治療薬及び予防薬の投与量については、その使用目的に応じて適宜決定すればよいが、有効成分の安全性が高いので、多量を継続的に投与しても副作用の心配は少ないと考えられる。

【0028】

本発明のアルツハイマー病予防薬及び治療薬の剤型としては特に限定されないが、例えば錠剤、顆粒剤、カプセル剤等の経口剤や、注射剤等とすることができる。また、これらは、従来公知の方法に従って製造することができる。また、本発明のアルツハイマー病予

50

防薬及び治療薬は、有効成分であるポリフェノール類の他に、安定剤等の従来公知の添加剤等を含んでもよい。本発明のアルツハイマー病予防薬及び治療薬の投与方法としては、経口投与、非経口投与等、特に限定されず、従来公知の投与方法を適宜選択することができる。

【実施例】

【0029】

以下、本発明の実施例として、Myr、Mor、Qur、Kmp、Cat、及びepi-Catを用いてアミロイド線維の生成の抑制を行う例を詳しく説明する。しかし、本発明はこれらを限定するものではなく、上記一般式(1)から一般式(6)に示されるピオフラビン類であれば同様の効果が得られる。

10

【0030】

Aは40乃至42アミノ酸から成るペプチドであり、同ペプチドを単位構造としたものが重合してアミロイド線維を形成する。この反応は、重合核形成反応相と線維伸長相から成る。重合核形成反応は熱力学的に起り難く、全体の律速段階となっている。いったん反応核となる重合体が形成されると、線維伸長は一次反応モデル、すなわち、重合核あるいはすでに存在する線維断端にAが立体構造を変化させながら次々と結合することによって速やかに進行する。この重合核形成反応および線維伸長反応は生体内ばかりでなく、試験管内の緩衝液中でも以下に記述する反応が容易に起こる。すなわち、40アミノ酸のA〔以下の文中においてA(1-40)と略称する。〕溶液または42アミノ酸のA〔以下の文中においてA(1-42)と略称する。〕溶液を用いて反応させると、その反応はゆるやかなシグモイド曲線を描いて進行して、やがて平衡に達する。一方、Aを含む反応溶液に超音波破碎された短いA(1-40)線維またはA(1-42)線維〔以下の文中においてそれぞれfA(1-40)、fA(1-42)と略称する。〕を重合核として添加することにより、Aのみの反応の場合に比べ、遥かに速やかにアミロイド線維が形成される。これらの反応は、反応混合液に加えたチオフラビンT(以下、ThTと略記する)の蛍光強度を測定することにより重合の度合いを把握することが出来る。これらの反応混合液に前述したポリフェノール類を添加して、同ポリフェノール類のアミロイド線維形成抑制効果および分解効果を確認した。

20

【0031】

A(1-40)およびA(1-42)の溶液の調製：

30

A(1-40)およびA(1-42)はそれぞれトリフッ化酢酸塩(Peptide Institute, Inc.社製)である。それぞれを0.02%アンモニア溶液に溶解して、終濃度500 μ M(2.2mg/mL)及び250 μ Mとした。これらは使用するまで-80にて保存した。この溶液をそれぞれA(1-40)溶液、A(1-42)溶液とした。fA(1-40)およびfA(1-42)は、Hasegawaらの報告(Hasegawa, K., et al., Biochemistry 38, 15514-15521, 1999)に従い、上記A溶液を37に静置して調製した。次に、Onoらの報告(Ono, K., et al., Biol. Psychiatry 52, 880-886, 2002、及びOno, K., et al., J. Neurochem. 81, 434-440, 2002)に従い、新鮮な非凝集fA(1-40)及びfA(1-42)は、超音波処理したfA(1-40)あるいはfA(1-42)を新鮮なA(1-40)あるいはA(1-42)とそれぞれ分解反応の直前に反応させ調製した。この時の反応混合液600 μ Lは10 μ g/mL(2.3 μ M)のfA(1-40)と、50 μ MのA(1-40)と、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)と、100mM塩化ナトリウムを含んでいる。また、fA(1-42)およびA(1-42)の場合も同じ濃度条件を使用した。ThTの蛍光強度測定により調べたところ、37で3から6時間静置の後には伸長反応は平衡に達していた。以下の実験では、fA(1-40)およびfA(1-42)溶液は、濃度50 μ Mとして使用した。

40

【0032】

蛍光強度測定、電子顕微鏡観察、偏光顕微鏡観察：

蛍光強度測定は日立F-2500分光蛍光光度計を用いて行った。fA(1-40)

50

及び f A (1 - 4 2) の蛍光強度測定は 4 4 5 n m の励起光、4 9 0 n m の蛍光波長を用いて測定した。測定試料溶液は 5 μ M T h T (和光純薬社製) 及び 5 0 m M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 (p H 8 . 5) の混合液 1 m L に f A を含む試料溶液 5 μ L を加えたものである。f A 反応物の電子顕微鏡観察および偏光顕微鏡観察は既法に従った。

【 0 0 3 3 】

A (1 - 4 0) および A (1 - 4 2) の重合化反応 :

1 % D M S O、5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 5) 及び 1 0 0 m M 塩化ナトリウムを含む反応緩衝液を作製し、同緩衝液を、終濃度 5 0 μ M の A (1 - 4 0) を加える群、2 5 μ M の A (1 - 4 2) を加える群、及び 5 0 μ M の A (1 - 4 2) を加える群に分けた。それぞれの群を更に 1 0 μ g / m L の f A (1 - 4 0) を加える群、1 0 μ g / m L の f A (1 - 4 2) を加える群、及びどちらも加えない群に分けた。各群の溶液に対して、終濃度 0 . 0 1、0 . 1、1、1 0 または 5 0 μ M のポリフェノール類 (M y r、M o r、Q u r、K m p、C a t、及び e p i - C a t、S i g m a 社製) を加えた反応液、陽性対照群として 0 . 0 1、0 . 1、1、1 0 または 5 0 μ M の nordihydroguaiaretic acid (以下、N D G A と略称する。Sigma 社製) を加えた反応液、及び、ポリフェノール類と N D G A のどちらも添加していない陰性対照群の反応液を作製した。ここで、N D G A とポリフェノール類は、初め D M S O に対してそれぞれ 1 μ M、1 0 μ M、1 0 0 μ M、1 m M、及び 5 m M となるように溶解して、反応液に終濃度 0 . 0 1、0 . 1、1、1 0、及び 5 0 μ M となるように加えた。次に、オイル - フリー P C R 試験管 (0 . 5 m L、Takara 社製) に 3 0 μ L の反応液を加え、これを D N A サーマルサイクラーに入れ、4 で始め、3 7 まで最速で温度を上げ反応を開始した。反応試験管は静置して、反応時間は 0 日から 8 日間とした。それぞれの実験結果は図 1 に示した。反応の停止は試験管を氷冷して行った。各反応試験管から 5 μ L を分取して、蛍光測定を行った。各々 3 回の測定を行って、平均値を求めた。実験する N D G A あるいはポリフェノール類の濃度は、T h T 溶液中では反応混合液中の濃度の 2 0 0 倍に希釈された。これらの化合物はこの希釈した濃度においては T h T の蛍光強度を妨害する事は無いことを確認した。

【 0 0 3 4 】

A の重合化反応とその反応に対するポリフェノールの阻害効果 :

図 1 (a) から (d) に示す様に、A (1 - 4 0) あるいは A (1 - 4 2) 溶液を 3 7 で上記の反応条件で静置した場合、T h T の蛍光強度は典型的なシグモイド曲線を描いて増加した。この曲線は重合核依存性重合モデルと一致した。赤色色素 C o n g o R e d で染色した f A (1 - 4 0) あるいは f A (1 - 4 2) は偏光顕微鏡での観察で典型的な橙緑色の複偏光を示した。A (1 - 4 0) を 1 0 μ M、あるいは 5 0 μ M の M y r、M o r あるいは Q u r で処理すると、図 1 (a) に示す様に重合化反応の間に蛍光強度の増加は観察されなかった (図は M y r の場合を示す)。同様な効果は、A (1 - 4 2) においても、M y r、M o r、あるいは Q u r で観察された (図 1 (b)、M y r の場合を示す)。A (1 - 4 0) を 1 0 μ M、あるいは 5 0 μ M の K m p、C a t、あるいは e p i - C a t で処理すると、最終の蛍光強度の増加レベルは試薬濃度に依存して低下した (図 1 (c) 及び (d))。同様な効果は、A (1 - 4 2) においても K m p、C a t、あるいは e p i - C a t で見られた。

【 0 0 3 5 】

f A の伸長反応とその反応に対するポリフェノールの阻害効果 :

図 2 (a) から (d) に示す様に、新鮮な A (1 - 4 0) と f A (1 - 4 0) を、あるいは A (1 - 4 2) と f A (1 - 4 2) をそれぞれ混合して静置した場合、反応初期の潜時は無く、直ちに反応が起こり、飽和曲線的に蛍光の増加が観察された。重合反応核となる f A (1 - 4 0) あるいは f A (1 - 4 2) が無い場合に比較して、非常に速やかに平衡レベルに達した。この曲線は一次反応モデルの曲線と一致した。A (1 - 4 0) と f A (1 - 4 0) の混合溶液にポリフェノール類を添加しておく、最終平衡レベルは低下した (図 2 (a)、(c) または (d))。ポリフェノール類の同様の効

果は $fA_{(1-42)}$ の伸長反応においても観察された(図2(b))。また、定濃度の $fA_{(1-40)}$ の存在下で $A_{(1-40)}$ の濃度を变化させた場合、濃度増加に依存して $fA_{(1-40)}$ の伸長初速度は直線的に増加した。Myrが存在する場合、または存在しない場合のいずれにおいても(図2(e))、この直線関係は一次反応モデルと一致して、それぞれの $A_{(1-40)}$ の濃度で $fA_{(1-40)}$ の伸長の実質速度は重合速度と脱重合速度の総和になる。10 μM の Myr の存在下では、この直線の勾配は約 1/3 に下がる。新鮮な $A_{(1-40)}$ を超音波処理した $fA_{(1-40)}$ と 37 で反応すると、明瞭な $fA_{(1-40)}$ の伸長の様子を電子顕微鏡で観察することが出来る(図3(b))。しかし、50 μM の Myr を加えると、超音波処理した $fA_{(1-40)}$ の伸長反応は阻害された(図3(a), (c))。Myr は $fA_{(1-42)}$ の伸長反応も同様に阻害した。同様の阻害結果が Mor、Qur あるいは Kmp でも $fA_{(1-40)}$ および $fA_{(1-42)}$ の伸長反応で観察された。

【0036】

$fA_{(1-40)}$ のポリフェノールによる分解反応：

$fA_{(1-40)}$ の分解試験は次の反応液中で行った。25 μM の新鮮な $fA_{(1-40)}$ あるいは $fA_{(1-42)}$ と、0、0.01、0.1、1、10 あるいは 50 μM の NDGA あるいはポリフェノール類と、1% の DMSO と、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) と、100 mM の塩化ナトリウムの混合液に、1% (w/v) のポリビニルアルコール(和光純薬社製)を $fA_{(1-40)}$ の凝集を避けるために、また反応中に反応試験管の内壁への $fA_{(1-40)}$ の吸着を避けるために加えた。反応液を良く混合した後に、5 μL の反応液を分取して蛍光測定を行い、また 30 μL を分取して PCR 試験管に入れた。反応試験管を DNA サーマルサイクラーに入れ、4 で始め、37 まで最速で温度を上げ反応を開始した。反応は 0 から 72 時間行い、反応停止は試験管を氷冷して行った。反応中は反応試験管はサーマルサイクラー中に静置した。各反応試験管から、5 μL の反応液を分取して蛍光強度測定を行った。各々 3 回の測定を行って、平均値を求めた。

【0037】

$fA_{(1-40)}$ と $fA_{(1-42)}$ の分解反応：

図4(a)から(d)に示す様に、新鮮な $fA_{(1-40)}$ あるいは $fA_{(1-42)}$ 溶液を 37 で置いた場合には、ThT の蛍光強度は殆ど変化しないが、一方、この反応液にポリフェノール類を添加すると、ThT の蛍光強度は急激に低下する。25 μM の新鮮な $fA_{(1-40)}$ (図5(a))を 50 μM の Myr で 1 時間処理すると、多くの短く断片化した $fA_{(1-40)}$ の生成が起きる(図5(b))。6 時間後には、断片化線維の数は著しく減少して、小型の不定形凝集体がところどころに観察されるようになる(図5(c))。同様の形態変化が 25 μM の新鮮な $fA_{(1-42)}$ でも、50 μM の Myr で処理すると見られる。他のポリフェノール類によっても $fA_{(1-40)}$ あるいは $fA_{(1-42)}$ の分解が起きる。50 μM の Myr、Qur、あるいは Kmp で 6 時間、あるいは 50 μM の Cat あるいは epi-Cat で 72 時間処理すると、 $fA_{(1-40)}$ および $fA_{(1-42)}$ は赤色色素 Congo Red により僅かに染色されるのみである。ところが偏光顕微鏡での観察では橙緑色の複偏光が観察される。これはかなりの量が元のままの $fA_{(1-40)}$ や $fA_{(1-42)}$ として、反応後でも反応液中に残っていることを意味している。この溶液を 4 で 2 時間、 $1.6 \times 10^4 g$ で遠心した後に、上清液を Bradford 法で調べたところ、タンパクの存在は検出されなかった。これはポリフェノール類が $fA_{(1-40)}$ 、 $fA_{(1-42)}$ の分解を起こして凝集体に変化させるが、 $A_{(1-40)}$ や $A_{(1-42)}$ の単量体や、オリゴマーまでは分解していないことを示している。

【0038】

ポリフェノール類の活性の比較：

図1(e)、図2(f)、及び図4(e)は、ポリフェノール類が $fA_{(1-40)}$ の形成や伸長を濃度依存的に阻害、また生成した $fA_{(1-40)}$ の濃度依存的な分解を行うことを示している。EC₅₀ ($A_{(1-40)}$ の重合または $fA_{(1-40)}$ 伸長の対照値に対して 50% の阻害を示す NDGA ある

いはポリフェノール類の濃度、または fA 分解の対照値に対して 50% の分解促進を示す濃度) を図 1 (e)、図 2 (f)、及び図 4 (e) のデータを元にシグモイド曲線最適化処理により計算して求め、その結果を表 1 に示した。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

| 化合物 | 重合反応抑制 | | 伸長反応抑制 | | 分解反応 | |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | $fA\beta$ (1-40) | $fA\beta$ (1-42) | $fA\beta$ (1-40) | $fA\beta$ (1-42) | $fA\beta$ (1-40) | $fA\beta$ (1-42) |
| ミリセチン | 0.29 μ M | 0.40 μ M | 0.22 μ M | 0.13 μ M | 1.8 μ M | 0.58 μ M |
| モリン | 0.24 | 0.67 | 0.20 | 0.14 | 1.9 | 0.68 |
| ケルセチン | 0.24 | 0.72 | 0.25 | 0.12 | 2.1 | 0.73 |
| カンフェロール | 1.7 | 3.2 | 0.83 | 0.45 | 3.7 | 2.9 |
| カテキン | 2.9 | 5.3 | 2.4 | 1.4 | 28 | 24 |
| エピカテキン | 2.8 | 5.6 | 2.4 | 1.7 | 23 | 24 |
| NDGA | 0.14 | 0.86 | 0.23 | 0.09 | 1.3 | 0.87 |

10

20

30

40

【 0 0 4 0 】

前記表 1 に示されるように、Myr、Mor、Qur、あるいはKmpの fA の形成・伸長反応に対する EC_{50} 値は fA 分解反応促進に対する EC_{50} 値と似た値である。一方、Cat、epi-Catの fA 分解反応促進に対する EC_{50} 値は fA の生成・伸長反応の阻害に対する EC_{50} 値よりも一桁高い値である。従って、表 1 により、本実施例における fA 形成阻害反応および分解促進反応の活性は、Myr = Mor = Qur > Kmp > Cat = epi-Cat の順に強いことが示された。

50

【0041】

培養細胞における f A の毒性、及びポリフェノール類の毒性減弱効果：

培養細胞における f A の影響、及び f A に対するポリフェノール類の効果は、ヒト胎児腎臓 293 細胞（以下 HEK 293 細胞と記す。）を用いて、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) の呼吸酵素系による還元による細胞生存率の測定 (MTT アッセイ) を行うことにより解析した。具体的には、HEK 293 細胞を 10% ウシ胎児血清 (HyClone 社製) を加えた Dulbecco's modified Eagle's 培地 (DMEM、Sigma 社製) 中において、37 で 5% CO₂ を気相とする湿度 85% の培養器で培養した。f A 処理の前日に、細胞の培養液を血清を含まない DMEM に交換して、細胞を 96 穴コラーゲンコートマイクロプレート上に、1 穴当たり 2×10^4 細胞として移した。ここで、10 μM の f A (1 - 40) を 0 または 0.2% DMSO 存在下、あるいは 10 μM の Myr + 0.2% DMSO 存在下において、pH 7.5、37 の条件下に処理を行い、ThT 蛍光強度の変化を経時的に測定した。6 時間後、f A (1 - 40) 反応液を HEK 293 細胞の培養液中に、終濃度が 0 あるいは 1 μM になるように添加した。引き続き MTT を各培養穴に加えて CO₂ 培養器中において更に 2 時間静置した後、各培養穴に可溶化液 (50% ジメチルホルムアミド、20% SDS、pH 4.7) を加えて、一夜静置した。MTT の還元反応の活性は 37 で 570 nm の吸収を測定して求めた。MTT 還元の % 活性値は f A、Myr、あるいは DMSO を加えないものの値を 100% として計算した。

10

【0042】

前述した方法により、培養細胞に対する f A の細胞毒性、及び f A の毒性に対するポリフェノール類の抑制効果を調べた結果を図 6 に示す。Myr 処理 f A (1 - 40) の細胞毒性は未処理あるいは 0.2% DMSO 処理した f A (1 - 40) の毒性よりも有意に低かった。この結果は Myr 処理 f A は未処理の f A よりも細胞毒性が低いことを示している。ただし、1 μM の Myr で処理した f A (1 - 40) 標品で培養細胞を処理した場合の細胞毒性の低下は、Myr そのものの (たとえば活性酸素種の除去作用による) 保護効果により起きている可能性も除外出来ない。

20

【0043】

以上に記述したように、本発明によれば、赤ワイン等に含まれるポリフェノール類を用いて A の重合を阻害し、f A の生成を抑制することができる。また、本発明によれば、既に生成した f A の分解を促進することができる。特に、Myr、Mor、Qur、Kmp、Cat、及び epi-Cat は、上記の作用を強く有しており、その中でも、Myr、Mor、及び Qur は特に強い作用を示した。

30

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】(a) は、A (1 - 40) の重合反応、及び同反応に対して Myr が示す抑制効果のグラフである。(b) は、A (1 - 42) の重合反応、及び同反応に対して Myr が示す抑制効果のグラフである。(c) は、A (1 - 40) の重合反応、及び同反応に対して Kmp が示す抑制効果のグラフである。(d) は、A (1 - 40) の重合反応、及び同反応に対して Cat が示す抑制効果のグラフである。(e) は、A (1 - 40) の重合反応に対する NDGA およびポリフェノール類の抑制効果のグラフである。

40

【図 2】(a) は、f A (1 - 40) の伸長反応、及び同反応に対して Myr が示す抑制効果のグラフである。(b) は、f A (1 - 42) の伸長反応、及び同反応に対して Myr が示す抑制効果のグラフである。(c) は、f A (1 - 40) の伸長反応、及び同反応に対して Kmp が示す抑制効果のグラフである。(d) は、f A (1 - 40) の伸長反応、及び同反応に対して Cat が示す抑制効果のグラフである。(e) は、伸長反応初速度の A (1 - 40) 濃度依存性と Myr の影響を示すグラフである。(f) は、f A (1 - 40) の伸長反応に対する NDGA およびポリフェノール類の抑制効果のグラフである。

【図 3】f A (1 - 40) の電子顕微鏡像 (スケールバーは 250 nm の長さを示す。

50

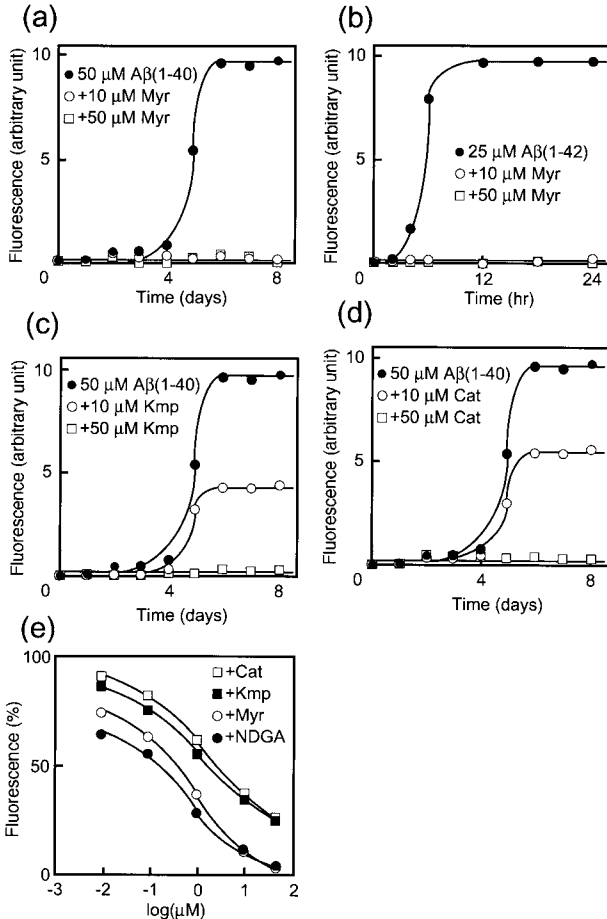
）である。(a)は2.3 μMの f A (1-40)と50 μMの A (1-40)に50 μMの My rを加えたときの0時間の反応物の像である。(b)は(a)から My rを除き、6時間反応した反応物の像である。(c)は(a)を6時間37で反応したものの像である。

【図4】(a)は、f A (1-40)に対して My rが示す分解効果のグラフである。(b)は、f A (1-42)に対して My rが示す分解効果のグラフである。(c)は、f A (1-40)に対して K m pが示す分解効果のグラフである。(d)は、f A (1-40)に対して C a tが示す分解効果のグラフである。(e)は、f A (1-40)の分解反応に対する N D G Aおよびポリフェノール類の促進効果のグラフである。

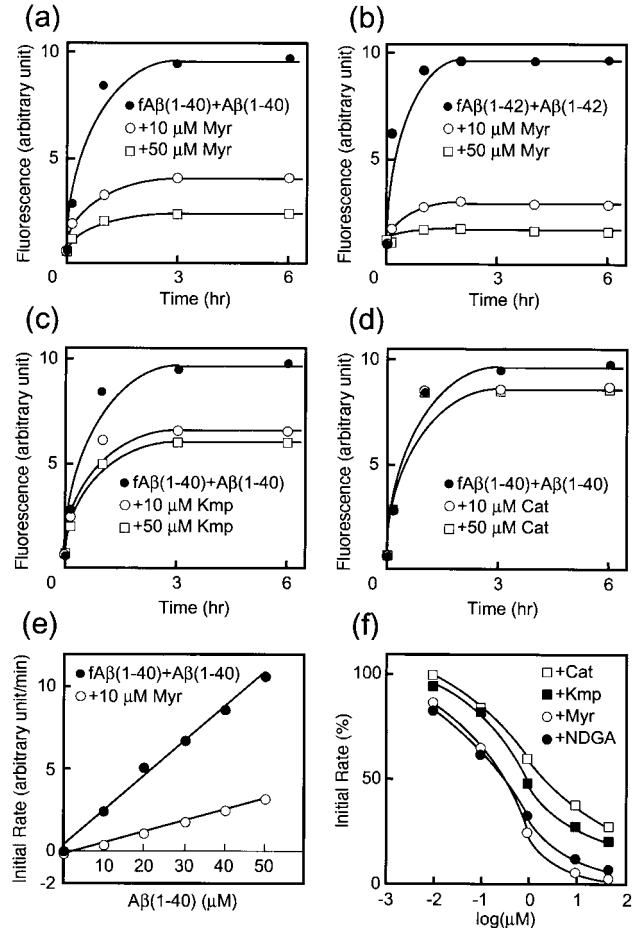
【図5】f A (1-40)の分解産物の電子顕微鏡像(スケールバーは250 nmの長さを示す。)である。(a)は、f A (1-40)を50 μMの My rで処理する前の像である。(b)は、f A (1-40)を My rで1時間処理したものの像である。(c)は、f A (1-40)を My rで6時間処理したものの像である。

【図6】未処理 f A (1-40)または My r処理 f A (1-40)の細胞毒性を示すグラフである。(a)は T h T 蛍光強度、(b)は M T T の還元反応の活性値を示す。(b)中、白色カラムは f A を加えない対照、黒色カラムは f A を加えたものを示す。

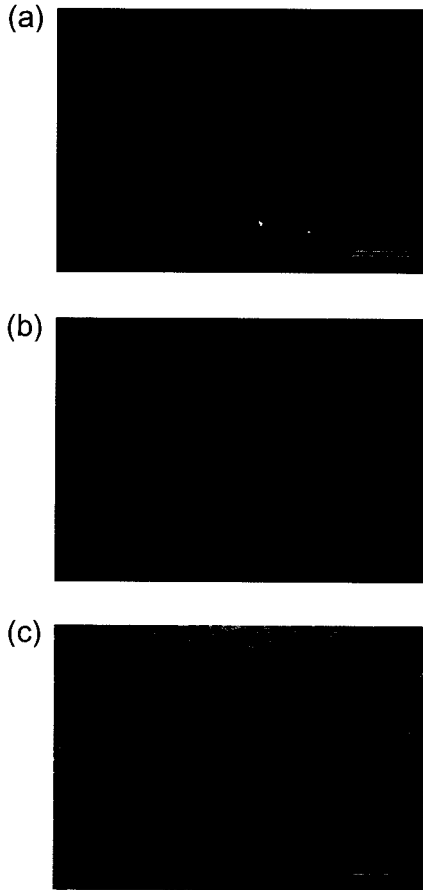
【図1】



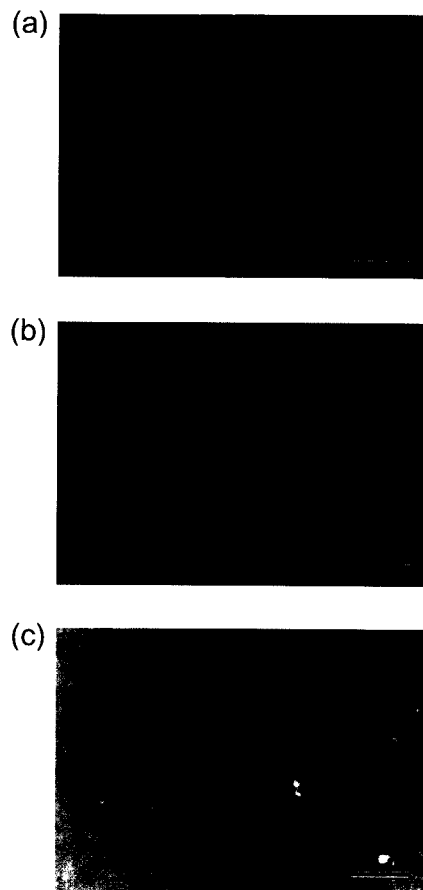
【図2】



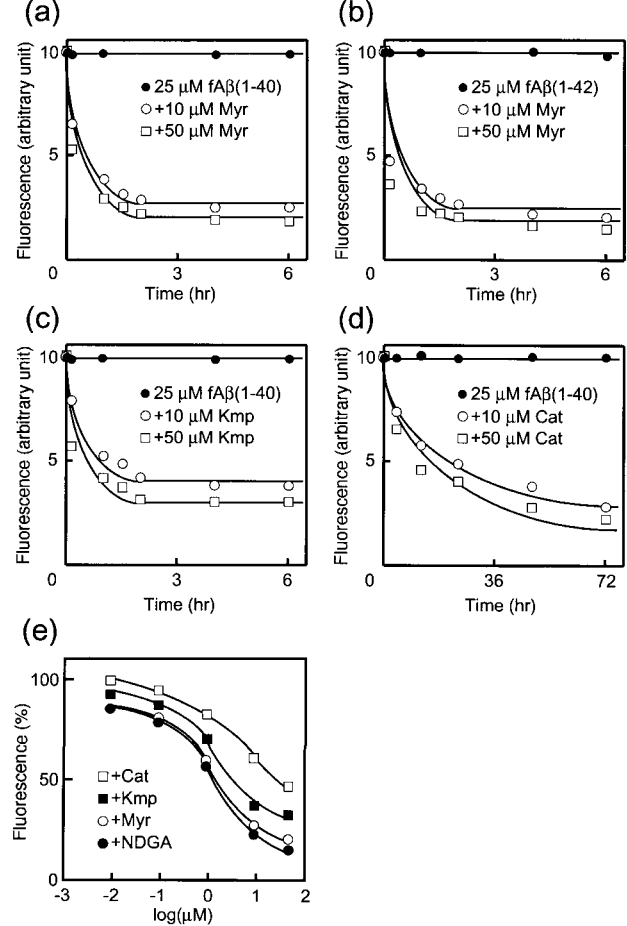
【 図 3 】



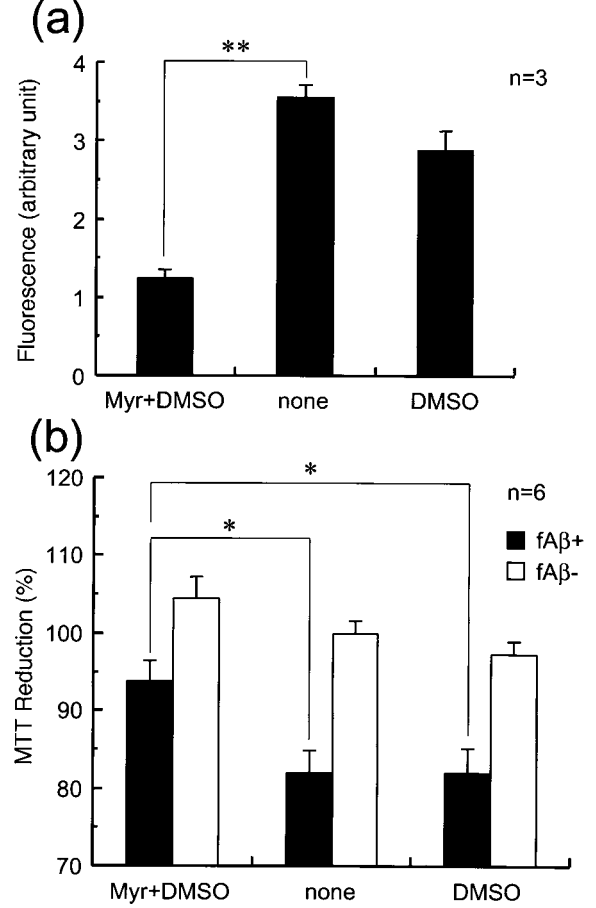
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 内木 宏延

福井県福井市経田 2 - 1 0 0 1 - 2 0 5

(72)発明者 長谷川 一浩

福井県福井市二の宮 2 1 2 - 1 2 - 3 0 5

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 NA14 ZA16