



4'-デメチルノビレチンと 4'-デメチルタンゲレチン含有サプリメントによる 健常人の認知機能に対する効果の検証： ランダム化二重盲検クロスオーバー試験

宮田晃史¹⁾ / 小林憲正²⁾ / 北尾 聡²⁾ / 草野崇一²⁾

● 要旨

目的：本研究の目的は、4'-デメチルノビレチンと4'-デメチルタンゲレチンを含むサプリメントが認知機能の改善にどのように寄与するかを明らかにすることである。

方法：ランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験デザインにより実施した。主要アウトカムとして、WMS-R スコアにより記憶機能を評価し、副次アウトカムとして、WFT と TMT-J を評価した。被験品の効果を単回摂取によりプラセボ品と比較した。各々、3 週間のウォッシュアウト期間を設けて摂取した。また、安全性も評価した。

結果：被験品またはプラセボ品の一回目摂取のため、36 人の被験者がランダムに 2 つのグループに分けられた。1 人の被験者が個人的な理由で 2 回目の摂取を辞退し、残りの 35 人の被験者が研究を完了した。35 人の被験者から得られたデータは適格であり、分析対象とした。その結果、WMS-R の結果をまとめた指標において、言語記憶、視覚記憶、一般記憶、遅延再生で有意な改善が認められた。また、安全上の問題は発生しなかった。

結論：4'-デメチルノビレチンと4'-デメチルタンゲレチンを含むサプリメントは、認知機能を改善することが明らかとなった。また、被験品の摂取による悪影響はなかった。

キーワード：ノビレチン，タンゲレチン，PMF ; polymethoxyflavonoid，カンキツ類，認知機能，記憶，遅延再生

緒 言

認知症の有病率は年齢とともに急激に増加している¹⁾。九州大学の二宮らは、久山町の大規模・長期コホート研究のデータ²⁾ から、2025 年には認知症の有病率が 19 ~ 20.6% に達し、患者数は約 700 万人に達すると推計している³⁾。現在でも、自動車の逆走や引きこもり、認知症高齢者の孤独死などが深刻な社会問題となっている。一方、正常と認知症の中間的な状態である軽度認知障害 (MCI) は、必ずしも認知症に進行するとは限らず、正常に戻るこ

もある^{4)~6)}。そのため、早期から適切な対策を行うことが認知症の発症を防ぐと考えられている⁷⁾。また、食事を中心とした食習慣の重要性も指摘されており、食品由来成分の認知症予防への有用性も知られている⁸⁾。

ノビレチンやタンゲレチンなどのポリメトキシフラボノイドはカンキツ果皮に多く含有されている⁹⁾¹⁰⁾。体内においては、小腸や肝臓において代謝され、3', 4', 5 位などのメトキシ基がシトクロム P450 (CYP) 酵素により脱メチル化し、一部が水酸基になることが報告されている¹⁰⁾。4'-デメチルノビレチン (4'-DeNOB) および 4'-デメチルタンゲレチン (4'-DeTAN) はその代謝産物のひとつであるが、ポリメトキシフラボン骨格 B 環 4' 位が脱メチ

1) 日本橋エムズクリニック

2) 富士産業株式会社

ル化され水酸基となった 4'-DeNOB はノビレチンに比べ、長期記憶形成の認知機能と関連する cAMP 応答配列エレメント (CRE) を介した転写活性ならびにコリン作動性機能を有するコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 転写活性がノビレチンに比べて、増強されていることが報告されている¹¹⁾。加えて、NMDA 受容体阻害剤 MK801 で誘発した健忘症モデルマウスにおいては 4'-DeNOB および 4'-DeTAN を含有するエキスの経口摂取により恐怖体験、すなわち恐怖記憶の固定化が促進され、エピソード記憶が向上していることが示された¹¹⁾。これらのことは 4'-DeNOB および 4'-DeTAN 摂取による記憶の形成、想起への有用性を示している。

そこで、本研究では 4'-DeNOB および 4'-DeTAN を含有するサプリメントの認知機能に及ぼす効果について、WMS-R によりワーキングメモリならびにエピソード記憶を中心に評価する¹²⁾ ことを目的とし、軽度認知機能障害 (MCI) を含む健常人のボランティアを対象にプラセボ対照のランダム化二重盲検クロスオーバー試験を実施した。

試験方法

1. 試験デザイン

2020 年 12 月から 2021 年 1 月にかけて日本臨床試験協会 (JACTA, 東京都) においてプラセボ対照二重盲検単回投与クロスオーバーデザイン試験が実施された。試験の追跡期間は 2020 年 12 月から 2021 年 1 月までであり、すべての試験は JACTA で実施された。本試験は、ヘルシンキ宣言の倫理原則と、ヒトを対象とする医学および健康研究に関する倫理指針に従って実施した。試験プロトコルは薬事法有識者会議倫理審査委員会の承認を得た (東京都承認番号: 1200011)。すべての被験者から自由意思による同意を書面で取得した。本試験は UMIN 臨床試験登録システムに登録されている (試験 ID: UMIN 000042623)。

2. 被験者

本試験には健常者が参加している。すべての被験者は株式会社ブレイクスルー (東京) のモニターバ

ンクに登録した治験ボランティアであり、2020 年 10 月から 12 月にかけて募集された。

2.1 選択基準

- (1) 40 歳から 69 歳の健常な日本人男女 (MMSE スコアでは 24 以上, MCI: 軽度認知症の疑いの方を含む)
- (2) 認知症に罹患していないが、加齢に伴う認知機能低下の自覚がある方

2.2 除外基準

- (1) 認知症と判断される方、認知症により医師による治療、投薬、生活指導を受けている方、過去に受けたことがある方
- (2) 重篤な脳血管疾患、心疾患、肝疾患、腎疾患、消化器疾患、届出が必要な感染症などに罹患している方
- (3) 血圧測定、血液検査で著しい異常が認められる方
- (4) 高度の貧血のある方
- (5) 40 歳以降、難聴と診断されたことがある方
- (6) 認知機能に影響する医薬品、健康食品、サプリメントを常用している方
- (7) 閉経前後の女性で体調の著しい変化がみられる方
- (8) 薬物または食品に対しアレルギー症状を示す恐れのある方
- (9) 過度の喫煙者*およびアルコールの常用者**ならびに食生活が極度に不規則な方
- (10) 妊娠中、授乳中の者、およびその予定のある方
- (11) 同意取得時から遡って 1 カ月以内に本試験に影響される他の臨床試験に参加していた方および参加予定がある方
- (12) その他、試験責任医師が不適切と判断した方

3. ランダム化

50 人の応募者のうち、4 人が研究への参加を辞退し、46 人がスクリーニング検査の MMSE (mini-mental state examination) を受けた。選択 / 除外基準に従って、MMSE で満点 (30 点) となった 10 人を除外した。残る 36 人を被験者として、乱数表

*: 概ね 1 日 21 本以上の喫煙者を指す。

** : 概ね 1 日純アルコールで 20 g (日本酒 1 合 180 mL, ビール中瓶 1 本 500 mL, ウイスキーダブル 60 mL, 焼酎 0.5 合 90 mL, ワイングラス 2 杯弱 200 mL 程度) 以上の量を、週 6 日以上飲酒している者を指す。

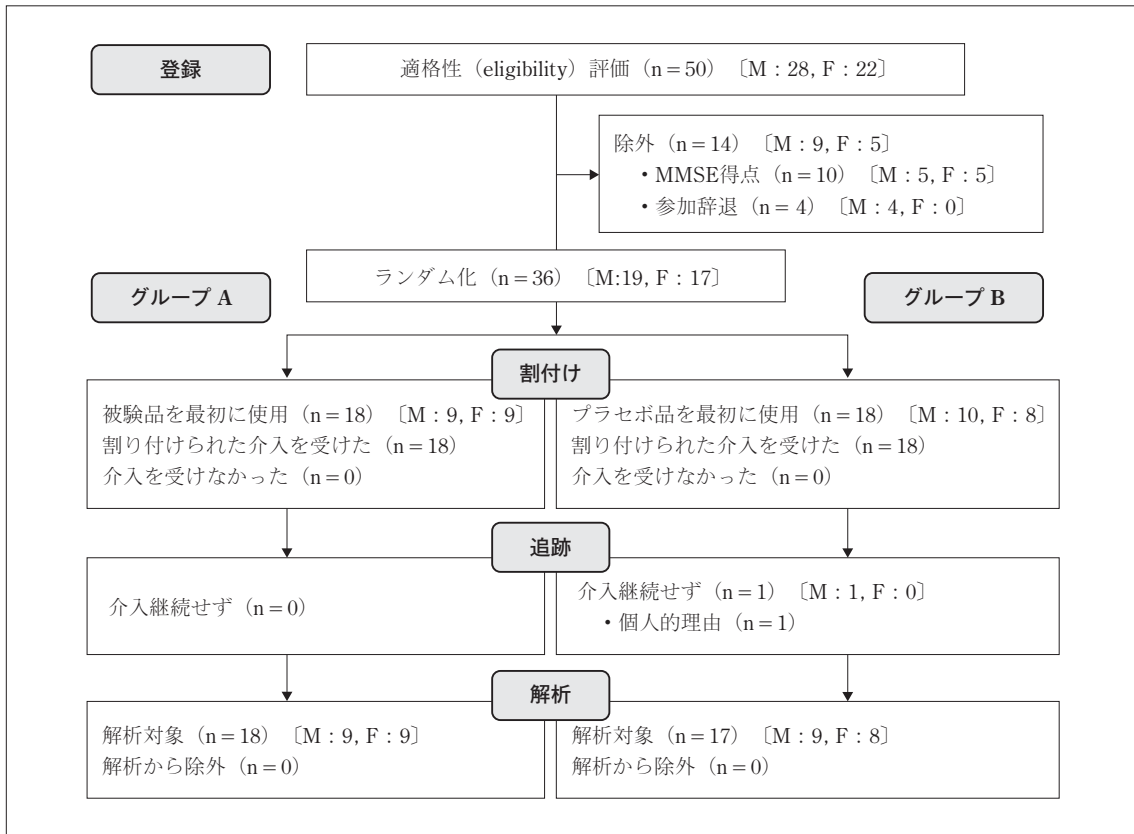


図1 被験者割付けのフローチャート

で18人毎の2グループに分けた。割付けの過程で、性別、年齢、MMSEスコア等の背景要因を考慮して分布の偏りを抑えた(層別ランダム化)。割振り順の作成、被験者の組み込み、各グループへの被験者の割付けは、各担当者が行った。割付けリストは、割付け担当者が施錠できる保管庫に保管され、臨床試験データが確定した後に公開された。被験者は割付けに基づき、被験品またはプラセボ品のいずれかを受け取った。被験者が最初に被験品を摂取したグループをA、および被験者が最初にプラセボ品を摂取したグループをBとする(図1)。

4. 試験食品

試験食品として、被験品とプラセボ品を用意した。被験品は、みかん麴FJ-319(富士産業(株)製)を配合した錠剤であり、1回摂取量あたり4'-DeNOB: 10 mg, 4'-DeTAN: 5.2 mgを含有する。プラセボ品は、みかん麴FJ-319を含まない錠剤である。被験品、プラセボ品とも1回の摂取量は3錠である。両方とも富士産業(株)より供与されており、色、匂い、形、味では区別できず、識別用マークで管理していたためブラインド化されている。被

表1 試験食品の栄養成分表(3錠あたり)

成分	被験品	プラセボ品
エネルギー	4.8 kcal	4.8 kcal
たんぱく質	0.3 g	0.004 g
脂質	0.06 g	0.01 g
炭水化物	0.8 g	1.2 g
食塩相当量	0.007 g	0.001 g

験品とプラセボ品の栄養成分を表1に示す。

5. 試験手順

5.1 試験プロトコル

被験者はセッション1に参加した後、3週間のウォッシュアウト期間を経てセッション2に参加した。各セッションは、試験食品の摂取1週間前のベースラインを評価するための最初の試験、1回の摂取、および摂取後を評価するための摂取1時間後の2回目の試験で構成される。被験者は、セッションより前に実施されるスクリーニング検査、および各セッションの摂取前後の検査を受けるために試験会場に訪れた。スケジュール(図2)に従って、サプリメントの有効性に関するパラメーターを

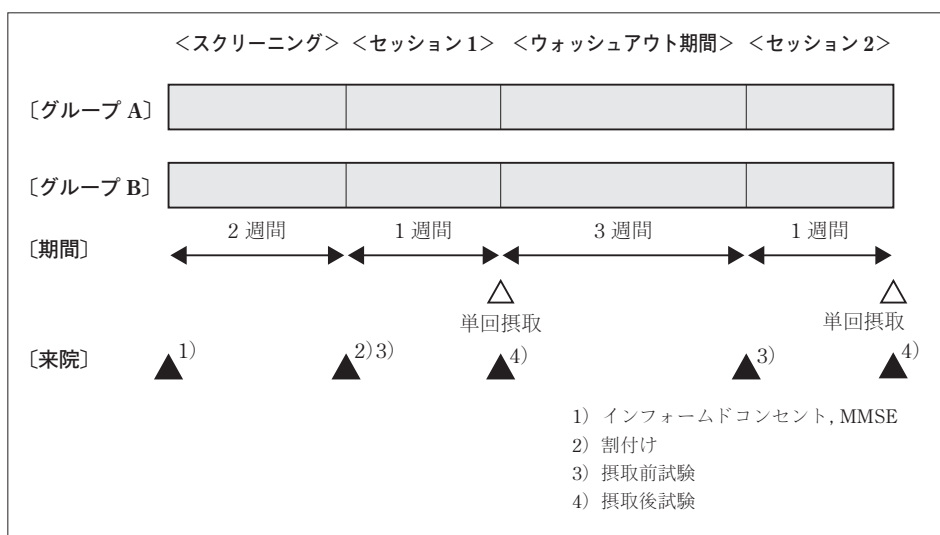


図2 試験スケジュール

測定した。試験期間中、被験者は以下の指示を受け遵守した。

通常のライフスタイルと習慣を維持する。他のサプリメントや薬を新たに服用しないようにする。過剰な量の食事、またはアルコールを避ける。認知機能に影響を与える可能性のある食品やトクホ（特定保健用食品）を避ける。

5.2 アウトカム

本試験の目的は、4'-DeNOB および 4'-DeTAN を含む被験品の摂取による認知機能の改善作用を解明することである。この目的を評価するために、WMS-R を主要アウトカムとして測定し、WFT と TMT-J を副次アウトカムとして定めた。

5.3 WMS-R（ウェクスラー記憶検査）

原著は David Wechsler によるもので、1987 年に米国で改訂版（WMS-R）が発表された¹³⁾。国際的に最もよく使用されている記憶検査で、日本では 2001 年に杉下により標準化された¹⁴⁾。短期記憶、長期記憶、言語性・非言語性記憶、即時記憶・遅延記憶など、記憶が持つさまざまな側面を総合的に測定することができ、認知症を始めとする種々の疾患の記憶障害を評価するのに有効である。言語を使った問題と図形を使った問題とで構成され、13 の下位検査〔(1) 情報と見当識 / (2) 精神統制 / (3) 図形の記憶 / (4) 論理的記憶 I / (5) 視覚性対連合 I / (6) 言語性対連合 I / (7) 視覚性再生 I / (8) 数唱 / (9) 視覚性記憶範囲 / (10) 論理的記憶 II / (11) 視覚性対連合 II / (12) 言語性対連合 II / (13) 視覚性再生 II〕がある。

表2 被験者背景（解析対象者）

項目	グループ A	グループ B	P 値
人数	18	17	
男女比 ¹⁾	9 : 9	9 : 8	1.000
年齢 ²⁾	54.9 ± 5.3	54.2 ± 7.3	0.745
MMSE ²⁾	27.4 ± 1.7	27.8 ± 1.5	0.428

Mean ± SD

1) Fisher's exact test

2) Student's t-test

上記の下位検査の結果をまとめた主要な指標である「一般的記憶」、「注意 / 集中力」、「遅延再生」を求め、一般的記憶を細分化した「言語性記憶」、「視覚性記憶」の指標を求めた。1 問につき 1 ~ 5 点の得点を合算した合成得点を被験者の年齢に従い換算して指標を算出した¹⁴⁾。表示の値は指数で、数値が大きいほど良好である。

5.4 WFT（言語流暢性課題）

言語流暢性課題（WFT ; Word fluency test）は、一定の時間内に意味カテゴリーより語想起を促す意味流暢性課題（CFT ; Category fluency test）と、頭文字より語想起を促す文字流暢性課題（LFT ; Letter fluency test）がある¹⁵⁾。WFT は認知症を評価するのに有用な神経心理学的検査の一つである¹⁶⁾。CFT では、「野菜」「果物」などのカテゴリーを、LFT では「し」「た」などの頭文字から始まる語を 1 分以内にできるだけ多く想起して口頭で述べさせた¹⁷⁾。単語数が多いほど良好である。

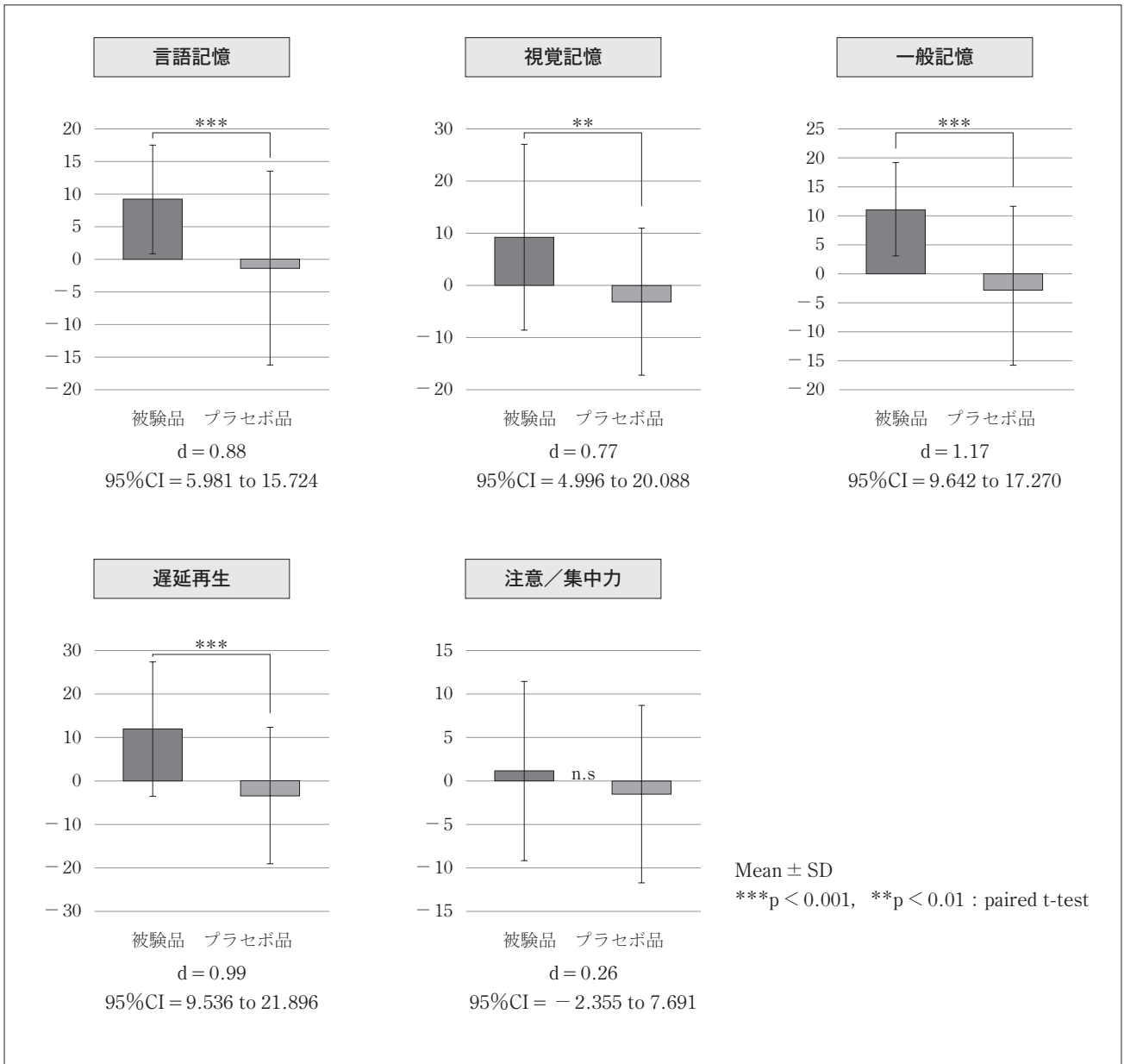


図3 WMS-R 主要指標における試験食品の摂取前後での変化量

5.5 TMT-J (Trail making test - 日本語版)

Trail making test (TMT) は、数字を順番に結ぶ Part A と、数字と五十音を交互に結ぶ Part B で構成され、注意機能の評価スケールとして広く用いられている¹⁸⁾。日本では2019年に一般社団法人日本高次脳機能障害学会 Brain Function Test 委員会により TMT 日本版 (TMT-J) が発表された¹⁹⁾。Part A, B とも、紙面にバラバラに配置されている対象を線で結ぶまでの時間を測定した。数値が少ないほど良好である。

6. 安全性

被験品の安全性を評価した。試験期間中、不都合

な医学的事象があった場合は、有害事象と定義する。ただし、必ずしも被験品と因果関係があるとは限らない。有害事象を確認した場合は発症と経過、重症度、治療の有無、治療内容、予後の詳細を記録して、有害事象の原因と結果との関係を決定する。

7. データ解析

計画されたサンプルサイズ (n = 35) は、検出力 80%、有意水準 5%、脱落率 10%との仮定で、予備検討での遅延再生スコアにおけるプラセボ品群と被験品群との群間差が 9 ポイントであり、統合した標準偏差が 13.0 であったことに基づく。統計値は平均値 ± 標準偏差で示した。測定値については、

表3 認知機能試験の結果

試験	アウトカム	測定単位	タイミング	試験食品 ¹⁾	
				被験品 (n = 35)	プラセボ (n = 35)
WMS-R	言語記憶	スコア	摂取前	107.9 ± 17.2	114.3 ± 15.0
			摂取後	117.1 ± 16.8**	112.9 ± 18.5
	視覚記憶	スコア	摂取前	103.9 ± 21.0	109.6 ± 20.0
			摂取後	113.1 ± 15.9**	106.4 ± 22.2
	一般記憶	スコア	摂取前	107.5 ± 19.4	114.4 ± 17.3
摂取後			118.6 ± 16.3**	112.3 ± 19.6	
注意 / 集中力	スコア	摂取前	110.1 ± 13.1	113.7 ± 12.9	
		摂取後	111.3 ± 14.8	112.2 ± 13.9	
遅延再生	スコア	摂取前	106.5 ± 21.4	112.3 ± 19.4	
		摂取後	118.5 ± 16.5**	108.9 ± 23.5	
WFT	CFT	語数	摂取前	15.8 ± 4.2	17.1 ± 4.2
			摂取後	15.4 ± 4.3	17.1 ± 3.7
	LFT	語数	摂取前	11.0 ± 3.6	10.8 ± 3.4
			摂取後	12.7 ± 3.5**	12.2 ± 2.8**
TMT-J	TMT-A	秒	摂取前	37.1 ± 21.0	31.2 ± 10.5
			摂取後	29.3 ± 8.8*	31.5 ± 13.6
	TMT-B	秒	摂取前	67.7 ± 31.1	69.0 ± 44.6
			摂取後	64.7 ± 37.8	58.4 ± 15.4

Mean ± SD

1) *p < 0.05, **p < 0.01 : Student's t-test で摂取前後を比較

対応のある t 検定を摂取前後および試験食品間の分析に用いた。被験者背景のグループ間比較には、フィッシャーの正確確率検定とスチューデントの t 検定を用いた。解析対象は FAS とし、欠損値は無かった。多重度の調整は実施していない。効果量の指標として Cohen's d (d) を記載した。両側検定で危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した。統計解析には Excel 統計 3.21 (Bell Curve), Statce 14 (柳井, 2015), EZR (Ver.1.54)²⁰⁾ を使用した。

結 果

1. 被験者背景

36 人の被験者がランダムに 2 つのグループに割り当てられ、セッション 1 が開始された。グループ B の被験者 1 人は個人的な理由で離脱し、残りの 35 人の被験者が試験を完了した。除外された被験者はいなかったため、35 人 (男性: 18, 女性: 17) からのデータが分析に使用された (図 1)。被験者の性別, 年齢, および MMSE の得点にグルー

プ A, B 間で有意差は確認されなかった (表 2)。

2. 試験結果

表 3 に, 認知機能試験の結果を示す。WMS-R に関しては主要指標のうち, 言語記憶, 視覚記憶, 一般記憶, および遅延再生が, 被験品摂取により摂取前に比べて有意にスコアが改善した。一方, プラセボ品摂取ではスコアの有意な変化は認められなかった。さらに, 各々の試験食品摂取前後でのスコア変化量において, 被験品摂取時はプラセボ品摂取時と比較して, 言語記憶 ($p < 0.001$), 視覚記憶 ($p < 0.01$), 一般記憶 ($p < 0.001$), および遅延再生 ($p < 0.001$) で有意な改善を示した (図 3)。副次アウトカムである WFT と TMT-J は, いずれも被験品摂取時とプラセボ品摂取時の変化量の比較で有意差を示さなかった。ただし, 摂取前後の比較では, 被験品摂取時とプラセボ品摂取時の両方で, 摂取前と比較して有意な変化が見られ, TMT-A は被験品摂取時のみ有意に変化した (表 3)。

3. 有害事象

本試験において, 被験品摂取による有害事象は確

認められなかった。

考 察

我々は、4'-DeNOB と 4'-DeTAN を含む被験品が認知機能に及ぼす効果を検証するため、ランダム化プラセボ対照二重盲検単回摂取クロスオーバー試験を実施した。4'-DeNOB 10.0 mg と 4'-DeTAN 5.2 mg の摂取で、主要アウトカムの言語性記憶、視覚性記憶、一般的記憶、遅延再生が有意に向上した。この結果から、4'-DeNOB と 4'-DeTAN を含むサプリメントには認知機能改善作用のあることが示された。また、試験期間中に有害事象の発生はなかった。

4'-DeNOB には強い抗炎症作用があることが知られており、一酸化窒素 (NO) 産生を阻害し、PGE2 (Prostaglandin E2)、IL-1 β および IL-6 の発現を減少させる⁹⁾、マウスの炎症性耳浮腫を改善する²¹⁾ などの報告がある。さらに 4'-DeNOB には抗動脈硬化作用があり、TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) により酸化 LDL 受容体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1; LOX-1) 遺伝子の発現上昇を抑える²²⁾。また 4'-DeNOB はアドレナリン受容体を刺激することにより、褐色脂肪細胞を活性化し脂肪燃焼と熱産生を促すという報告や²³⁾、肺がん抑制の報告²⁴⁾ がある。タンゲレチンが脱メチル化した 4'-DeTAN にも、NO 産生、PGE2、IL-1 β 、iNOS (誘導型一酸化窒素合成酵素; inducible nitric oxide synthase)、COX-2 (シクロオキシゲナーゼ 2; cyclooxygenase) を抑制するなどの抗炎症効果や²⁵⁾、乳がん抑制作用²⁶⁾ が報告されている。

4'-DeNOB には神経変性抑制作用があることが知られている。Rahim (2009) は、4'-DeNOB がマウスの学習障害を改善したことを報告した²⁷⁾。Kawahara (2017) もまた、4'-DeNOB によるマウスの記憶改善効果を示した¹¹⁾。近年、記憶のメカニズムが分子レベルで解明されているが、長期記憶の形成には記憶遺伝子の発現とタンパク質合成を介した新規シナプスの形成や受容体の発現が必要である²⁸⁾。核タンパク質である CREB (cAMP 応答配列結合タンパク質; cAMP response element binding protein) は、海馬においてシナプス形成に関係する遺伝子発現やタンパク質合成を制御し、長期記憶の形成に深く関与することが知られている²⁹⁾。強い

刺激が興奮性ニューロンに届くと、NMDA 型グルタミン酸受容体によるカルシウムイオン流入と、電位依存性カルシウムイオンチャンネルからのカルシウムイオン流入が起こり、カルシウムイオン濃度上昇によりカルシウムイオン情報伝達経路が強く活性化される。その結果カルシウム / カルモジュリン依存性キナーゼ IV (CaMK IV) が活性化される。また、カルシウムイオン依存的アデニル酸シクラーゼも活性化され、cAMP (環状アデノシン 3',5'-リン酸; cyclic adenosine monophosphate, cyclic AMP) が産生され、PKA (プロテインキナーゼ A; protein kinase A) も活性化される。CREB はこれらのキナーゼ群によってリン酸化を受け活性型となり、標的遺伝子の転写を活性化する³⁰⁾³¹⁾。記憶が保存される際に神経回路に誘導される可塑的变化を長期増強 (LTP; long-term potentiation) という³²⁾、LTP の持続には CREB による記憶遺伝子発現活性化が必要であることも明らかにされている³³⁾。前出の Rahim (2009) によれば、4'-DeNOB は PKA を介して ERK (細胞外シグナル制御キナーゼ; extracellular signal-regulated kinase) リン酸化と CREB リン酸化を促し、CRE (cAMP 応答配列; cAMP responsive element) 依存的転写活性を促進させるとの報告がある²⁷⁾。

他方、アルツハイマー病者の大脳皮質では、アセチルコリン (ACh) 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT; choline acetyltransferase) 活性が低下していることが発見され³⁴⁾³⁵⁾、ChAT 活性と記憶スコアが相関していることが分かった³⁶⁾。アセチルコリンは、1914 年に Dale によって発見された神経伝達物質である³⁷⁾。海馬は内側中隔核から、ACh を放出するコリン作動性神経の投射を受けており、ACh が錐体細胞や介在ニューロンのニコチン受容体 (nAChR; nicotinic acetylcholine receptor) やムスカリン受容体 (mAChR; Muscarinic acetylcholine receptor) に作用することで、記憶の形成や強化に関与するとされる³⁸⁾。また、ACh は長期増強 (LTP) や長期抑圧 (long-term depression; LTD) などのシナプス可塑性に関与することが示されている³⁸⁾。先の Kawahara (2017) は、4'-DeNOB が CRE を介した ChAT 転写を強力に促進することを示した¹¹⁾。

今回我々は、被験品の単回摂取による効果を評価

した。Rahim (2009) は、マウスの腹腔に 4'-DeNOB を投与した後に、脳中に 4'-DeNOB を検出したことを報告した²⁷⁾。Asakawa (2011) もまた、脱メチル化ノビレチンをマウスの尾静脈に投与すると、5 分後に脳へ移行することを確認した³⁹⁾。これらのことから、4'-DeNOB および 4'-DeTAN が体内に吸収されると、血液を通して脳に達し、中枢神経に作用することで学習障害を回復したと考えられる。

以上のことから、ポリメトキシフラボンデメチル体 (4'-DeNOB, 4'-DeTAN) は脳において、海馬での CRE の転写活性化と神経伝達物質アセチルコリンを介したメカニズムにより中枢神経に作用することで学習機能の改善効果を示したものと考えられる。特に CREB は記憶固定化 (長期記憶形成) を正に制御すると共に、BDNF 発現を増加させて短期記憶も促進することが報告されている³⁰⁾。

今回の被験品に含まれる 4'-DeNOB, 4'-DeTAN 2 種の有効性について、被験品からの抽出物を用い、抽出物に含有する同濃度の 4'-DeNOB, 4'-DeTAN の単独、ならびに 4'-DeNOB, 4'-DeTAN 混合物を、無添加を対照として、CRE 転写活性について評価した。具体的には、PC12 細胞を用いて、 4×10^4 /well. 96 well プレートに播種し、トランスフェクション後、サンプル添加を行い、8 時間後に細胞を回収して、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、4'-DeNOB $6.2 \mu\text{g/mL}$, 4'-DeTAN $3.2 \mu\text{g/mL}$ の各単独、その混合物、被験品抽出物のそれぞれの相対活性は 11.1 : 3.3 : 15.2 : 16.5 倍であり、4'-DeNOB, 4'-DeTAN 添加により、顕著に CRE 転写活性は増大するとともに、被験品抽出物とその同濃度の 4'-DeNOB, 4'-DeTAN 混合物との差はなく、高い寄与率を示した (92%)。

上述のように、経験した事柄を記憶情報として保存するためには脳の神経細胞において CREB が新たな記憶遺伝子 (BDNF など) を読み出す CRE の転写を行う必要があるが、4'-DeNOB, 4'-DeTAN の高い寄与率から、これらが今回の臨床試験で得られた記憶改善効果に対する活性本体であると考えられた。

我々は認知症 (病者) を除外する目的で、スクリーニングとして MMSE (Mini-Mental State Examination)⁴⁰⁾ を使用した。MMSE 日本版の信頼性と妥当性も確認されており⁴¹⁾、一般社団法人日本

老年医学会 (The Japan Geriatrics Society) が推奨するスクリーニング検査の 1 つである。MMSE は 30 点満点の認知機能検査で、23 点以下は認知症疑い⁴²⁾、27 点以下は MCI が疑われる⁴¹⁾。本研究では、平均年齢 54 歳、MMSE の平均得点は 27 点台で、23 点以下と 30 点 (満点) を除外し、MCI の疑いや、加齢による認知機能の低下した正常域者での、日常生活の認知機能の衰えを自覚する健常者を対象とした。

今回主要アウトカムとして採用した WMS-R は、総合的な標準化された検査として国際的に最も広く用いられている⁴³⁾。日本語版も標準化されており⁴⁴⁾、妥当性も確認されている⁴⁴⁾。認知症をはじめ、記憶障害の評価へも国際的によく使用され、エピソード記憶とともにワーキングメモリも評価する¹²⁾。ワーキングメモリ (作業記憶) は、即時・短期の想起を一般的記憶、言語性記憶、視覚性記憶より評価し、新しい情報の獲得に関与している。一方、エピソード記憶は言語性、視覚性、聴覚性からなり、以前に自身が経験した記憶の長期システムであるが、WMS-R での遅延再生検査からその評価をすることが可能である¹²⁾。記憶障害の例や認知症の例でどのような成績を示すかについて資料の蓄積があるため、その有用性は大きい⁴³⁾。最近では高齢者に対して、面接や簡便な検査で正常範囲と考えられるケースを対象に、MCI などを示唆する記憶機能低下がないかを詳細に検討するために実施する機会が多い⁴⁵⁾。今回 WMS-R において、「言語性記憶」、「視覚性記憶」、「一般的記憶」のワーキングメモリならびに言語性、視覚性、聴覚性評価からなる遅延再生記憶においてプラセボと比べて有意な改善効果が認められた。言語、視覚、聴覚課題の保持は「いつ、どこで、どんなことがあったか、といった出来事の記憶」であるエピソード記憶のための長期システムであるが、特に、加齢によりその機能が低下することが知られており⁴⁶⁾、今回の対象者でもある中高年への有用性を示していると思われる。また、このことは動物試験においても、恐怖体験 (電気刺激) のエピソード記憶モデルマウス評価系において、4'-DeNOB および 4'-DeTAN 含有エキスでの有効性が示されたこと¹¹⁾ からも裏付けられている。

4'-DeNOB および 4'-DeTAN 摂取により、MCI を含む健康な中高年のワーキングメモリやエピソード

記憶が改善したことは、日常生活のQOL向上および将来の認知症予防への可能性もあり大変意義のあることと考えられる。これらの結果を基に、日常生活での記憶の衰えに対して効果を示す場面を想定すると、相手の言葉の理解力の衰え（言語性記憶）、道順を覚えにくくなった（視覚性記憶）、物忘れやひとの名前が覚えにくくなった（一般的記憶）、何かを取りに来たかを忘れる（ワーキングメモリ）、昨夜食べたものが思い出せない、カギや携帯電話をどこに置いたか忘れる（遅延再生、エピソード記憶）、といった状況の改善が期待できると考えられる。

一方、WFTとTMT-Jについては、群間有意差は認められなかった。LFTとTMT-Jは副次的アウトカムであり、今回主要アウトカムのWMS-Rの記憶機能はその作用機序が反映されやすかったのと比較して、言語流暢性評価のLFTあるいは注意評価のTMT-Jについては、単回摂取では、即効的効果が出難かったものと考えられる。反復での摂取効果についても検討の必要がある。

結 論

我々は4'-DeNOB, 4'-DeTAN含有サプリメントが、認知機能の一部である言語性記憶、視覚性記憶、一般的記憶および遅延再生を向上する機能のあることを見出した。加えて、被験品摂取による有害事象は認められなかった。

利 益 相 反

本試験の費用および本論文の掲載費用は、富士産業株式会社が出資した。

文 献

- 1) 朝田 隆 (研究代表者): “都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応”. 厚生労働科学研究費補助金認知症対策総合研究事業 (平成 23 ~ 24) 総合研究報告書.
- 2) 九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野 久山町研究室.
- 3) 二宮利治 (研究代表者): “日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究”. 平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金特別研究事業, 平成 26 年度総括・分担研究報告書.
- 4) Shimada H, Makizako H, Doi T, Lee Sungchul, Lee Sangyoon : Conversion and Reversion Rates in Japanese Older People With Mild Cognitive Impairment. *J Am Med Dir Assoc* 2017; **18** (9) : 808.e1-808.e6.

- 5) Malek-Ahmadi M : Reversion From Mild Cognitive Impairment to Normal Cognition : A Meta-Analysis. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2016; **30** (4) : 324-330.
- 6) Ishikawa T, Ikeda M : Mild cognitive impairment in a population - based epidemiological study. *Psychogeriatrics* 2007; **7** (3) : 104-108.
- 7) 橋本 衛, 池田 学 : 認知症に対する早期介入のエビデンス. *臨床精神薬理* 2009; **12** (3) : 435-445.
- 8) 下方浩史 : 認知症の要因と予防. *名古屋学芸大学健康・栄養研究年報* 2015; **7** : 1-13.
- 9) Wu X, Song M, Rakariyatham K, Zheng J, Guo S, Tang Z, Zhou S, Xiao H : Anti-inflammatory effects of 4'-demethylnobiletin, a major metabolite of nobiletin. *J Funct Foods* 2015; **19** (Pt A) : 2782-2787.
- 10) Wu X, Song M, Wang M, Zheng J, Gao Z, Xu F, Zhang G, Xiao H : Chemopreventive effects of nobiletin and its colonic metabolites on colon carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2015; **59** (12) : 2383-2394.
- 11) Kawahata I, Suzuki T, Rico EG, Kusano S, Tamura H, Mimaki Y, Yamakuni T : Fermented Citrus reticulata (ponkan) fruit squeezed draff that contains a large amount of 4'-demethylnobiletin prevents MK801-induced memory impairment. *J Nat Med* 2017; **71** (4) : 617-631.
- 12) 中島恵子 : 実践講座 神経心理学的検査の実際④ WMS-R. *総合リハビリテーション* 2016; **44** (4) : 321-324.
- 13) Wechsler D : WMS-R : Wechsler Memory Scale-Revised : Manual. The Psychological Corporation 1987; New York, p.150, ISBN 9780749100544.
- 14) 杉下守弘 : 日本版 WMS-R マニュアル. 日本文化科学社 2001 ; 東京.
- 15) Tombaugh TN, Kozak J, Rees L : Normative data stratified by age and education for two measures of verbal fluency : FAS and animal naming. *Arch Clin Neuropsychol* 1999; **14** (2) : 167-177.
- 16) 大沢愛子, 前島伸一郎, 種村 純, 関口恵利, 板倉 徹 : “もの忘れ外来”における認知症と言語流暢性課題. *高次脳機能研究* 2006; **26** (3) : 327-333.
- 17) 吉村貴子, 前島伸一郎, 大沢愛子, 苧坂満里子 : 言語流暢性課題に現れた認知症のワーキングメモリの特徴—言語流暢性課題にはワーキングメモリの中央実行系が関連する可能性がある—. *高次脳機能研究* 2016; **36** (4) : 484-491.
- 18) Tombaugh TN : Trail Making Test A and B : Normative data stratified by age and education. *Arch Clin* 2004; **19** (2) : 203-214.
- 19) 一般社団法人日本高次脳機能障害学会 Brain Function Test 委員会 : Trail Making Test 日本版 (TMT-J), 2019年1月7日発行.
- 20) Kanda Y; Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow*

- Transplant 2013; **48** (3) : 452-458.
- 21) Wu X, Song M, Rakariyatham K, Zheng J, Wang M, Xu F, Gao Z, Xiao H : Inhibitory Effects of 4'-Demethylnobiletin, a Metabolite of Nobiletin, on 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) -Induced Inflammation in Mouse Ears. *J Agric Food Chem* 2015; **63** (51) : 10921-10927.
 - 22) Eguchi A, Murakami A, Li S, Ho CT, Ohigashi H : Suppressive effects of demethylated metabolites of nobiletin on phorbol ester-induced expression of scavenger receptor genes in THP-1 human monocytic cells. *Biofactors* 2007; **31** (2) : 107-116.
 - 23) 根岸文子, 大蔵直樹, 高橋由佳, 忍足鉄太, 山口真二 : ノビレチンとそのCYP代謝物によるマウス褐色脂肪細胞の活性化. *日本薬学会年会要旨集* 2020; **140** : 27p-pm163.
 - 24) Sun Y, Han Y, Song M, Charoensinphon N, Zheng J, Qiu P, Wu X, Xiao H : Inhibitory effects of nobiletin and its major metabolites on lung tumorigenesis. *Food & Function* 2019; **10** (11) : 7444-7452.
 - 25) Guo S, Wu X, Zheng J, Smith SA, Dong P, Xiao H : Identification of 4'-Demethyltangeretin as a Major Urinary Metabolite of Tangeretin in Mice and Its Anti-inflammatory Activities. *J Agric Food Chem* 2021; **69** (15) : 4381-4391.
 - 26) Surichan S, Arroo RR, Tsatsakis AM, Androutsopoulos VP : Tangeretin inhibits the proliferation of human breast cancer cells via CYP1A1/CYP1B1 enzyme induction and CYP1A1/CYP1B1-mediated metabolism to the product 4' hydroxy tangeretin. *Toxicol In Vitro* 2018; **50** : 274-284.
 - 27) Rahim MA, Nakajima A, Saigusa D, Tetsu N, Maruyama Y, Shibuya M, Yamakoshi H, Tomioka Y, Iwabuchi Y, Ohizumi Y, Yamakuni T : 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. *Biochemistry* 2009; **48** (32) : 7713-7721.
 - 28) Dudai Y : Molecular bases of long-term memories : a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 2002; **12** (2) : 211-216.
 - 29) Cardinaux JR, Notis JC, Zhang Q, Vo N, Craig JC, Fass DM, Brennan RG, Goodman RH : Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 2000; **20** (5) : 1546-1552.
 - 30) 喜田 聡 : 記憶形成とアップデートのメカニズム. *化学と生物* 2013; **51** (2) : 81-89.
 - 31) Lonze BE, Ginty DD : Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002; **35** (4) : 605-623.
 - 32) 谷藤 学 : 長期増強 (LTP) をめぐる最近の話題. *生物物理* 1993; **33** (5) : 281-287.
 - 33) Bartsch D, Casadio A, Karl KA, Serodio P, Kandel ER : CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 1998; **95** (2) : 211-223.
 - 34) Lehéricy S, Hirsch EC, Cervera P, Hersch LB, Hauw JJ, Ruberg M, Agid Y : Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86** (21) : 8580-8584.
 - 35) Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN : Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; **99** (3) : 459-496.
 - 36) Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH : Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* 1978; **2** (6150) : 1457-1459.
 - 37) Wickens A : Sir Henry Hallet Dale. *Resonance* 2019; **24** : 833-845.
 - 38) Teles-Grilo Ruivo LM, Mellor JR : Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci* 2013; **5** : 2.
 - 39) Asakawa T, Hiza A, Nakayama M, Inai M, Oyama D, Koide H, Shimizu K, Wakimoto T, Harada N, Tsukada H, Oku N, Kan T : PET imaging of nobiletin based on a practical total synthesis. *Chem Commun (Camb)* 2011; **46** (10) : 2868-2870.
 - 40) Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR : "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatric Res* 1975; **12** (3) : 189-198.
 - 41) 杉下守弘, 腰塚洋介, 須藤慎治, 杉下和行, 逸見 功, 唐澤秀治, 猪原匡史, 朝田 隆, 美原盤 : MMSE-J (精神状態短時間検査 - 日本版) 原法の妥当性と信頼性. *認知神経科学* 2018; **20** (2) : 91-110.
 - 42) Tsoi KKF, Chan JYC, Hirai HW, Wong SYS, Kwok TCY : Cognitive Tests to Detect Dementia : A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2015; **175** (9) : 1450-1458.
 - 43) 杉下守弘 : 痴呆の記憶障害の研究に向けて. *神経心理学* 1991; **7** (2) : 100-104.
 - 44) 大村一史, 杉下守弘 : 日本版 WMS-R 標準化標本における確認的因子分析. *認知神経科学* 2001; **3** (1) : 34-36.
 - 45) 村山憲男 : 記憶 ウェクスラー記憶検査 (WMS-R). *日本老年医学会雑誌* 2020; **31** (6) : 589-596.
 - 46) 神崎恒一 : 加齢に伴う認知機能の低下と認知症. *日本内科学会雑誌* 2018; **107** (12) : 2461-2468.

Effects of Supplement Containing 4'-Demethylnobiletin and 4'-Demethyltangeretin on Cognitive Function in Healthy Subjects :

A Randomized Double-Blind Crossover Trial

Akinobu MIYATA¹⁾ / Norimasa KOBAYASHI²⁾ / Satoshi KITAO²⁾ / Shuichi KUSANO²⁾

1) Nihonbashi M's Clinic 2) Fuji Sangyo Co., Ltd.

Abstract

Objectives : The objective of this study is to elucidate how the supplement containing 4'-demethylnobiletin and 4'-demethyltangeretin contributes to improvements in cognitive function.

Methods : A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study design was used. The primary outcome of this study was memory function, which was assessed using WMS-R score. The secondary outcomes included WFT and TMT-J. We investigated the effects of a single ingestion of the test food or placebo in the comparative study. Each treatment was separated by a 3-week washout period. We also evaluated the safety of test food.

Results : 36 subjects were randomly divided into two groups, the test food or placebo for the first treatment. One subject discontinued the second treatment due to personal reasons, and the remaining 35 subjects completed the study. There was no rejection, thus the data obtained from 35 subjects were eligible for the analysis. As a result, significant improvement was confirmed for placebo in the index summarizing the results of WMS-R, verbal memory, visual memory, general memory, and delayed recall. Further, no safety-related matter occurred.

Conclusion : It turned out that the supplement containing 4'-demethylnobiletin and 4'-demethyltangeretin improved cognitive function. Additionally, there was no adverse effect by the ingestion of the food.

Key words: nobiletin, tangeretin, PMF; polymethoxyflavonoid, citrus, cognitive function, memory, delayed recall