

# 博士論文

ホップ (*Humulus lupulus* L.) 由来苦味成分の  
認知機能および精神機能改善効果に関する研究

福田 隆文

## 略語一覽

Abbreviation	English name	和名
ACC	anterior cingulate cortex	前帯状皮質
ACh	acetylcholine	アセチルコリン
AChE	acetylcholinesterase	アセチルコリンエステラーゼ
AChR	acetylcholine receptor	アセチルコリン受容体
AD	Alzheimer's Disease	アルツハイマー病
A $\beta$	amyloid beta	アミロイドベータ
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenergic receptor	$\beta$ アドレナリン受容体
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	脳由来栄養因子
BMI	body mass index	ボディマス指標
BPSD	behavioral and psychological symptom of dementia	認知症の行動・心理症状
CCK	cholecystokinin	コレシストキニン
CEN	central executive network	中央実行系ネットワーク
dIPFC	dorsolateral prefrontal cortex	背外側前頭前野
DMN	default mode network	デフォルトモードネットワーク
DW	distilled water	蒸留水
EMC	Everyday Memory Checklist	日常記憶チェックリスト
fMRI	functional magnetic resonance imaging	磁気共鳴機能画像法
GLP-1	glucagon-like peptide-1	グルカゴン様ペプチド-1
HDS-R	Hasegawa Dementia Scale-Revised	改訂長谷川式簡易知能評価スケール
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal	視床下部・下垂体・副腎系
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta	インターロイキン 1 ベータ
LC	locus ceruleus	青斑核
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
mAChR	muscarinic-AChR	ムスカリン性アセチルコリン受容体
MCI	mild cognitive impairment	軽度認知障害
MEC	mecamylamine hydrochloride	メカミルアミン塩酸塩
MHBA	matured hop bitter acids	熟成ホップ由来苦味酸
MLA	methyllycaconitine citrate	メチルリカコニチンクエン酸塩
MMSE	Mini Mental State Examination	ミニメンタルステート検査
nAChR	nicotinic-AChR	ニコチン性アセチルコリン受容体
NBM	nucleus basalis of Meynert	マイネルト基底核

Abbreviation	English name	和名
NE	norepinephrine	ノルエピネフリン
NORT	novel object recognition test	新奇物体認識試験
NTS	nucleus tractus solitarius	孤束核
OFC	orbitofrontal cortex	眼窩前頭皮質
PET	positron emission tomography	陽電子放出断層撮影
POMS2	Profile of Mood States 2nd Edition	気分プロフィール検査（第二版）
QOL	quality of life	生活の質
RAVLT	Rey Auditory Verbal Learning Test	レイ聴覚性言語学習検査
SCD	subjective cognitive decline	主観的認知機能低下
SCP	scopolamine hydrochloride	スコポラミン塩酸塩
SDMT	Symbol Digit Modality Test	符号数字モダリティ検査
S-PA	Standard Verbal Paired-Associate Learning Test	標準言語性対連合学習検査
SPECT	single photon emission computed tomography	単一光子放射断層撮影
STAI	State-Trait Anxiety Inventory	状態・特性不安検査
TST	tail suspension test	尾懸垂試験
TTR	transthyretin	トランスサイレチン
UMIN	University Hospital Medical Information Network	大学病院医療情報ネットワーク
VACS	Voluntary Attention Control Scale	能動的注意制御尺度
VAS	visual analogue scale	視覚的評価スケール
VNS	vagus nerve stimulation	迷走神経刺激療法
WMS-R	Wechsler Memory Scale-Revised	改訂ウェクスラー記憶検査

# 目次

発表論文.....	8
第1章 序論.....	10
1.1. 社会課題としての認知症.....	10
1.2. 認知症の進行.....	10
1.3. 認知症の症状.....	11
1.4. 認知症と気分障害.....	11
1.5. 認知症の予防.....	11
1.6. ホップ ( <i>Humulus lupulus</i> L.) .....	13
1.6.1. ホップについて.....	13
1.6.2. ホップ由来苦味酸.....	14
1.6.3. ホップ由来苦味酸の健康機能性.....	14
1.6.4. MHBA による迷走神経の活性化を介した生体機能調節.....	15
1.7. 本研究について.....	15
第2章 MHBA による空間認知機能および物体認識機能改善効果に対するアセチルコリン受容体の関与の検討.....	18
2.1. 要約.....	18
2.2. 背景.....	18
2.3. 材料及び研究方法.....	19
2.3.1. 試薬.....	19
2.3.2. 動物.....	19
2.3.3. Y字迷路試験.....	20
2.3.4. 新奇物体認識試験 (NORT, novel object recognition test) .....	21
2.3.5. AChE の活性評価.....	22
2.3.6. 統計解析.....	22
2.4. 結果.....	22

2.4.1.	MHBA による空間認識に関わるワーキングメモリ改善効果に対する nAChR の関与の検討.....	22
2.4.2.	MHBA による物体認識機能改善効果に対する nAChR の関与の検討.....	23
2.4.3.	MHBA による物体認識機能改善効果に対する $\alpha 7$ nAChR の関与の検討...	23
2.4.4.	MHBA が AChE の活性に及ぼす影響の評価.....	23
2.4.5.	MHBA による物体認識機能改善効果への迷走神経の関与の評価.....	23
2.5.	考察.....	28
第3章 MHBA が脳内炎症モデルマウスのうつ様行動に与える影響およびその作用メカニズムの検討.....		
30		
3.1.	要約.....	30
3.2.	背景.....	30
3.3.	材料及び研究方法.....	32
3.3.1.	試薬.....	32
3.3.2.	動物.....	32
3.3.3.	試薬の投与.....	32
3.3.4.	TST.....	32
3.3.5.	オープンフィールド試験.....	33
3.3.6.	海馬の炎症性サイトカインの定量.....	33
3.3.7.	海馬の NE の定量.....	33
3.3.8.	ゴルジ染色.....	33
3.3.9.	統計解析.....	34
3.4.	結果.....	34
3.4.1.	MHBA が LPS によって誘導されたうつ様行動に及ぼす影響の評価.....	34
3.4.2.	MHBA に含まれる化合物単体が LPS によって誘導されたうつ様行動に及ぼす影響の評価.....	35
3.4.3.	MHBA によるうつ様行動改善効果への迷走神経の関与の評価.....	35
3.5.	考察.....	42

第4章 MHBA が健常な中高齢者の認知機能および精神機能に及ぼす影響の検証 –ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験–	45
4.1. 要約	45
4.2. 背景	45
4.3. 研究方法	46
4.3.1. 研究デザイン	46
4.3.2. 被験者	46
4.3.3. 介入	47
4.3.4. 神経心理テストによる認知機能の評価	47
4.3.5. 疲労感・気分状態・主観的認知機能の評価	48
4.3.6. 統計解析	48
4.3.7. 倫理審査およびプロトコルの事前登録	49
4.4. 結果	49
4.4.1. 被験者	49
4.4.2. 認知機能	49
4.4.3. 疲労感・気分状態・主観的認知機能	50
4.5. 考察	60
第5章 MHBA が主観的認知機能低下を伴う中高齢者の認知機能およびストレスに及ぼす影響の検証 –ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験–	63
5.1. 要約	63
5.2. 背景	63
5.3. 研究方法	64
5.3.1. 研究デザイン	64
5.3.2. 被験者	65
5.3.3. 介入	65
5.3.4. 神経心理テストによる認知機能評価	66
5.3.5. ストレス、気分状態およびメタ記憶の評価	67
5.3.6. 血中指標の評価	67

5.3.7.	サブグループ解析（事後解析） .....	67
5.3.8.	統計解析 .....	68
5.3.9.	倫理審査およびプロトコルの事前登録 .....	68
5.4.	結果 .....	68
5.4.1.	被験者 .....	68
5.4.2.	認知機能（注意機能） .....	68
5.4.3.	認知機能（記憶機能） .....	68
5.4.4.	唾液中ストレス指標 .....	69
5.4.5.	主観的認知機能（メタ記憶尺度）および精神機能 .....	69
5.4.6.	STAI およびカロリンスカ眠気尺度 .....	69
5.4.7.	血中指標 .....	69
5.4.8.	SCD-Q によるサブグループ解析 .....	69
5.5.	考察 .....	81
第6章	総括 .....	84
	参考文献 .....	89
	謝辞 .....	98

## 発表論文

### <第2章>

**Fukuda, T.**, Ayabe, T., Ohya, R. & Ano, Y.

Matured hop bitter acids improve spatial working and object recognition memory via nicotinic acetylcholine receptors.

*Psychopharmacology (Berl)*. 236, (2019).

### <第3章>

**Fukuda, T.**, Ohya, R., Kobayashi, K. & Ano, Y.

Matured hop bitter acids in beer improve lipopolysaccharide-induced depression-like behavior.

*Front. Neurosci.* 13, (2019).

### <第4章>

**Fukuda, T.**, Obara, K., Saito, J., Umeda, S. & Ano, Y.

Effects of Hop Bitter Acids, Bitter Components in Beer, on Cognition in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial.

*J. Agric. Food Chem.* 68, (2020).

### <第5章>

**Fukuda, T.**, Ohnuma, T., Obara, K., Kondo, S., Arai, H. & Ano, Y.

Supplementation with Matured Hop Bitter Acids Improves Cognitive Performance and Mood State in Healthy Older Adults with Subjective Cognitive Decline.

*J. Alzheimer's Dis.* 76, 387–398 (2020).

### <その他>

#### 原著論文

**Fukuda, T.**, Uchida, K., Nakayama, H. & Ano, Y.

Short-term administration of iso- $\alpha$ -acids increases transthyretin transcription in the hippocampus.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 507, (2018).

**Fukuda, T.**, Akiyama, S., Takahashi, K., Iwadate, Y. & Ano, Y.

Effect of non-alcoholic beer containing matured hop bitter acids on mood states in healthy adults:  
A single-arm pilot study.  
*Nurs. Heal. Sci.* 24, (2022).

総説

Ayabe, T., **Fukuda, T.** & Ano, Y.

Improving effects of hop-derived bitter acids in beer on cognitive functions: A new strategy for  
vagus nerve stimulation.  
*Biomolecules* 10, (2020).

# 第 1 章

## 序論

### 1.1. 社会課題としての認知症

先進諸国では高齢化の急速な進展に伴い、加齢に伴い生じる疾患への対応が重要な社会課題となっている。なかでも高齢期を好発期とする高次脳機能障害については一度その機能が失われると元の状態への機能回復が難しいことや、社会的コストの大きさから火急で取り組むべき課題としてとらえられている。高次脳機能には、記憶や注意機能など認知機能としての側面のほか、抑うつや不安など精神機能としての側面があり、それぞれ病的に機能が低下した状態が「認知症」や「気分障害」となる。認知症に関しては、2015 年の全世界の認知症者数は 4,700 万人と報告されており、2050 年までにその数は約 3 倍に増加すると予想されている<sup>1</sup>。これは、65 歳以上の高齢者の人口が 3,600 万人以上の超高齢社会である日本においても当然例外ではなく、内閣府の報告によると国内における認知症者数は 2012 年時点で 462 万人であり、65 歳以上の高齢者の約 15%が認知症であると報告されている<sup>2</sup>。また、認知症の予備軍である軽度認知障害（MCI, mild cognitive impairment）は推定 400 万人とされており、2025 年には約 730 万人が認知症を発症するといわれている。認知症は、自立して生活を営むことができる期間、すなわち健康寿命と実寿命の乖離の一番の原因であることから明らかなように<sup>3</sup>、発症した本人にとどまらずそれを支える家族や社会にとっても大きな負担を強いる。佐藤らの報告によると、2014 年の認知症による社会的コストは 14.5 兆円で、その内訳は、医療費が 1.9 兆円、介護費が 6.4 兆円、家族等によるケアコストが 6.2 兆円であるとされている<sup>4</sup>。

### 1.2. 認知症の進行

認知症とは、一度正常に発達した認知機能が後天的な脳の障害によって持続的に低下し、日常生活や社会生活に支障をきたすようになった状態を指す<sup>5</sup>。その「後天的な脳の障害」の要因に該当する疾病によって認知症はいくつかのタイプに分類される。代表的には、アルツハイマー（AD, Alzheimer's Disease）型認知症、Lewy 小体型認知症、脳血管性認知症、前頭葉型認知症があり、なかでも最も患者数が多いのが AD 型認知症で、認知症全体の約 70%を占めている。AD は脳の神経細胞が脱落する疾病であり、神経細胞外へのアミロイドβ（Aβ）の凝集体の沈着による老人斑および神経細胞内へのタウタンパク質の蓄積による神経原線維変化という二つの病変を示すことが特徴である。また、病変周囲では慢性的な脳内炎症が生じており、神経細胞の応答性の減弱や樹状突起の萎

縮を加速させていると考えられる。

これらの病変は認知症を発症する 20–30 年前から徐々に脳内で生じており、長い時間をかけて病態が進行することが知られている<sup>6</sup>。認知症の発症や経過については様々な研究がなされており、認知症の前段階として MCI が想定され、さらにその前段階として、自覚的な認知機能の低下が認められる「主観的認知機能低下」(SCD, subjective cognitive decline) という概念が提唱されている。

### 1.3. 認知症の症状

認知症の症状は、中核症状と周辺症状に大別される。中核症状とは、先に述べた認知機能低下に関わる側面であり、「精神障害の診断・統計マニュアル (第 5 版)」による認知症の診断基準では、認知機能は複雑性注意、遂行機能、学習および記憶、言語、知覚-運動、社会的認知に分けられており、記憶だけではなく、注意や認知機能の制御に関わる遂行機能の低下が起こることも認知症の特徴である<sup>7</sup>。

一方で周辺症状 (BPSD, behavior and psychological symptom of dementia) とは、抑うつや不安などの気分・感情障害が強く関わる症状や、無気力・無関心状態となるアパシーなどの精神的な不調をきたす症状を指し、認知症患者の約 80%が何らかの BPSD 症状を有しているという報告も存在する<sup>8</sup>。BPSD は、患者本人の生活の質 (QOL, quality of life) の低下を招くだけでなく認知症の介助者の心的負担の原因となるため、中核症状に加えて BPSD も含めて予防・早期にケアすることが重要である。

### 1.4. 認知症と気分障害

BPSD として抑うつや不安症状がみられることからわかるように、認知症と気分障害はしばしば併発し、例えば AD 型認知症患者のうち 20–30%が抑うつ症状を有していることが報告されている<sup>9</sup>。また、気分障害が認知症発症の危険因子となることも指摘されており<sup>10</sup>、なかでもうつ病は老年期の発症と認知症発症のリスクが強く関連することが報告されている<sup>11</sup>。以上のことから、認知症とうつ病には共通の病態があると考えられ、その一つとして脳内炎症の関与が示されている。

### 1.5. 認知症の予防

2022 年の時点では、認知症を根治できる治療法は存在しない。2021 年に初の AD 治療薬である ADUHELM™が米国食品医薬品局に承認された。ADUHELM™は Aβプラークを減少させる効果が臨床試験で示されているが、臨床的有用性の確認が必要との条件付き承認であり、その有効性についてはさらなる検証が必要であるとされている。その他、AD における神経細胞の変性・脱落のメカニズムを直接抑える疾患修飾薬の治験が

これまでに盛んに実施されてきたが、尽く開発中止となっている。これは、認知症の症状が現れた時点で投薬を開始しても、神経細胞の変性・脱落を抑えることは難しく、かつ発症の 20–30 年前から長年蓄積されてきた脳の構造変化を正常な状態に戻し、失われた認知機能を回復させることは困難であるためと考えられている。

このような背景から、認知症に対しては発症してから治療するのではなく、発症前段階である SCD や MCI の段階から対策すること、すなわち一次予防が重要であると考えられている。実際に MCI は年間約 10%が認知症へ移行するのに対し、適切な介入を行うことで 14–44%は正常な認知機能に回復することが報告されており、SCD や MCI の段階からの予防が重要であるといえる。

一次予防を実装するため、日常生活における認知症の危険因子や保護因子を明らかにすることで早期対策や予防に生かそうとする研究が近年盛んに行われている。認知症予防・介入・ケアに関する国際委員会が 2020 年に発表した包括的レビューでは、認知症の 12 の危険因子を明らかにしており、それらをコントロールすることによって認知症の約 40%は予防できる可能性があると指摘されている<sup>12</sup>。日本国内においても、厚生労働省がまとめた「認知症施策推進大綱」のもと、認知症になっても住みよい地域づくりおよび「予防」の取り組みの推進が図られている。

これらの知見に加え、後ろ向き研究によって明らかにされた保護因子による前向き介入研究も多く実施されている。代表的な例として、生活習慣による認知症予防の可能性を検証したフィンランドの大規模介入研究（FINGER, Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability）の成果が 2015 年に報告されている<sup>13</sup>。この研究では、フィンランドの地域在宅高齢者を対象として、60 歳から 77 歳の高齢者 1,260 人を生活習慣改善群と非介入群に分け、1 年後、2 年後の認知機能を評価している。生活習慣への介入として、野菜、果物、豆を中心に魚介類やオリーブオイル、適量の赤ワインを積極的に取り入れた地中海食の摂取、定期的な運動、認知トレーニング、健康観察および管理を行ったところ、介入を行わなかった対照群と比較して生活習慣改善群では、認知機能テストのスコアが 25%改善することが示された。その一方で、対照群では認知機能低下のリスクが 30%高くなることが併せて報告されている。

FINGER 研究では多因子介入の効果が検討されたが、食習慣だけに着目した研究も多数存在する。例えば Morris らは、MIND（Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative）という、脂肪やコレステロールを控え、ミネラルを積極的に摂取するという「DASH 食」と地中海式食事とを組み合わせた介入を行い、AD 型認知症の発症リスクが 53%低下することを報告した<sup>14</sup>。したがって、生活習慣の中でも適切な食生活は重要な保護因子の一つであることがわかる。地中海式食事で摂取が推奨される食品の一つとして、適量の赤ワインが挙げられている<sup>13,14</sup>。適度なアルコール飲料の摂取が認知症やうつ病の保護因子になりうるという報告はいくつかなされているが<sup>15–17</sup>、特に

赤ワインについてはその生理活性成分の研究も進んでおり、赤ワインに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールが認知症の予防効果を有することが非臨床試験および臨床試験で報告されている<sup>18</sup>。これらの背景から、アルコール飲料の中でも赤ワインの健康価値については広く知られている。その一方で、世界で最も消費されるアルコール飲料であるビールに含まれる成分が脳機能、すなわち認知機能や精神機能に及ぼす影響についてはほとんど研究されていない。

## 1.6. ホップ (*Humulus lupulus* L.)

### 1.6.1. ホップについて

ホップとは、アサ科のつる性多年草の一種であり、その毬花がビール醸造において香りや抗菌作用、そして苦味の付与を目的として使用される。ホップは、8世紀頃からヨーロッパで栽培が始まったとされ、11世紀頃からビール醸造に用いられていたという記録が残っている<sup>19</sup>。今日では年間に10万t以上が世界中で消費されており、ホップは歴史的にも地理的にも食経験が豊かな植物であるといえる。

日本ではホップは専らビール醸造に使用されることが多いが、ヨーロッパにおいては薬用ハーブとして活用されるなどその高い薬理作用が古くから知られていた。実際に8世紀当初も、薬用ハーブとしての使用を目的に栽培が始まったとされている。ホップの健康への有効性としては様々な報告がなされており、例えば、ホップに含まれるフラボノイドの一種である8-prenylnaringeninや6-prenylnaringeninはエストロゲン様作用を有しており、更年期障害の症状を軽減することが報告されている<sup>20</sup>。また、同様にフラボノイドの一種であるxanthohumolがインスリン感受性を改善することが報告されている<sup>21</sup>。さらには、ホップ抽出物による消化管症状の緩和や食欲の調節作用<sup>22</sup>、アレルギー症状の緩和作用<sup>23</sup>、不眠の改善作用<sup>24</sup>など多様な臨床エビデンスが蓄積されている。



Fig. 1-1 ホップとその毬花 (キリンホールディングス株式会社 杉村哲博士より写真提供)

### 1.6.2. ホップ由来苦味酸

ホップの毬花にはルプリンという黄色の樹脂が存在しており、その中には $\alpha$ 酸および $\beta$ 酸という化合物分群が含まれる。このうち $\alpha$ 酸はビールの醸造過程において異性化し、ビールの主要な苦味成分であるイソ $\alpha$ 酸を生じる (Fig. 1-2)。また、 $\alpha$ 酸および $\beta$ 酸はホップの輸送や貯蔵に伴う酸化反応により、イソ $\alpha$ 酸と比較して苦味の抑えられた化合物群に変化することが知られている。この特性を生かすことにより、ベルギーで伝統的に醸造されるランビックという種類のビールは、ホップを大量に使用し抗菌作用を担保しつつも苦味が抑えられるように、2-3年以上貯蔵して酸化させたホップを用いて醸造されている<sup>25</sup>。谷口らの研究により、この $\alpha$ 酸および $\beta$ 酸が酸化して生じた化合物群は $\beta$ トリカルボニル構造というイソ $\alpha$ 酸と共通の分子構造を有することが近年明らかにされ、総称して熟成ホップ由来苦味酸 (MHBA, matured hop bitter acids) と命名された<sup>26</sup> (Fig. 1-3)。MHBA は、一般的なラガータイプのビールに 19-38 mg/l、上述のランビックタイプのビールには 100-151 mg/l、ホップをより多く使用して醸造するインディアペールエールタイプのビールには 152-210 mg/l の濃度で存在することが報告されている<sup>26</sup>。

### 1.6.3. ホップ由来苦味酸の健康機能性

ビールの主要な苦味成分であるイソ $\alpha$ 酸は、高脂肪食誘導肥満モデル動物においてインスリン抵抗性、糖代謝、体脂肪の蓄積、コレステロール代謝を改善することが報告されている<sup>27-29</sup>。さらに、境界型糖尿病を対象としたランダム化比較試験によって、イソ $\alpha$ 酸は体脂肪低減効果や血糖値低下効果を示すことが確認されている<sup>30</sup>。また、イソ $\alpha$ 酸と共通の分子構造を有する MHBA についても高脂肪食誘導肥満モデルマウスを用いた検討により、MHBA が体脂肪低減効果を有することが明らかになっている<sup>31</sup>。また、BMI が高めの健常者を対象としたランダム化比較試験によって、MHBA が体脂肪低減効果を示すことも確認されている<sup>32</sup>。MHBA の体脂肪低減効果の作用メカニズムをマウスによって検討した結果、MHBA は褐色脂肪組織の熱産生を誘導することが示され、さらに、消化管からの刺激を中枢神経へ伝達する迷走神経を切除したモデルマウスではその効果が消失したことから、MHBA は迷走神経を介してその生理作用を発揮すると考えられている<sup>31</sup>。

さらに我々の研究グループは、ホップ由来苦味酸が認知機能に及ぼす影響を検討してきた。阿野らは、AD 型認知症のモデルである 5×FAD マウスを用いた検討により、イソ $\alpha$ 酸の混餌投与が海馬の  $A\beta$  の沈着を減少させ、病態の進行に伴って低下する認知機能を維持することを明らかにした<sup>33</sup>。さらに、その作用メカニズムとしてミクログリアの形質を保護型に誘導することで脳内炎症を抑制し、貪食能を促進することを示している<sup>33</sup>。また、綾部らの研究により、ムスカリン受容体のアンタゴニストであるスコポラミン塩酸塩 (SCP, scopolamine hydrochloride) 処理によって誘導した健忘症モデルマウスに MHBA を経口投与しておくことで、空間認識に関するワーキングメモリを改善する

ことが示された<sup>34</sup>。さらに、その作用メカニズムを検討した結果、MHBAは脳内のノルエピネフリン (NE, norepinephrine) を増加させることが明らかになり、迷走神経を切除したマウスではNE増加作用および認知機能改善効果が消失したことから、体脂肪低減効果と同様に、認知機能に対してもMHBAは迷走神経を介してその効果を発揮していると考えられた<sup>34</sup>。しかしながら、MHBAが認知機能に及ぼす影響の作用メカニズムの詳細や、精神機能への作用、さらにはヒトに対する有効性については不明である。

#### 1.6.4. MHBAによる迷走神経の活性化を介した生体機能調節

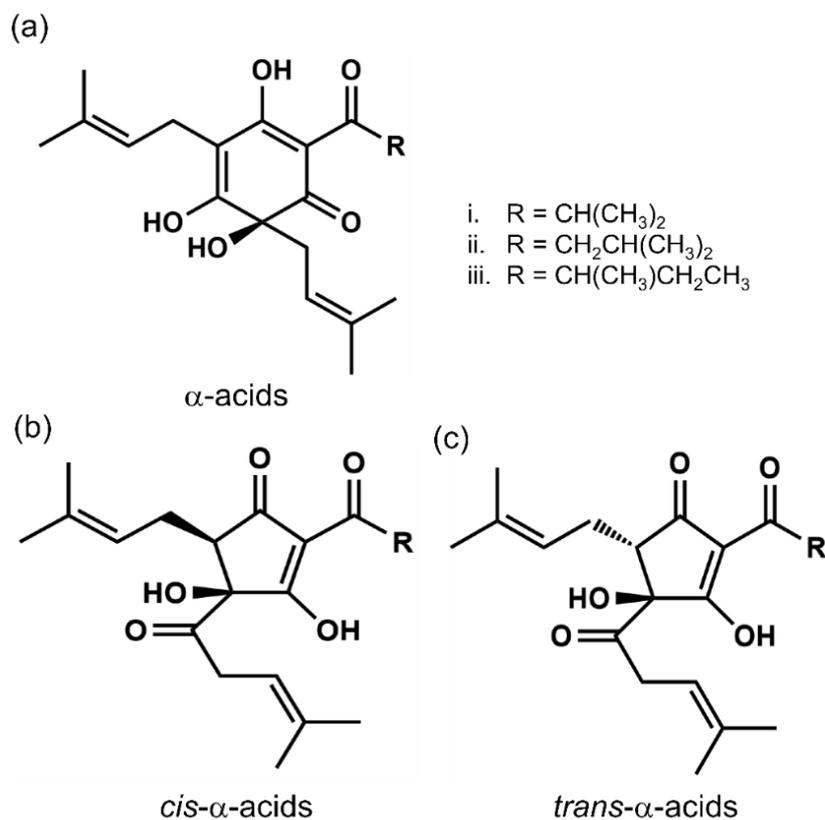
MHBAは体脂肪低減効果および認知機能改善効果を有し、その共通のメカニズムとして迷走神経を活性化することが確認されている。迷走神経は、頸部、胸部から腹部に達し、消化管を含むすべての内臓に分布している。迷走神経はその約80%が求心性繊維で構成されており、内臓の状態を脳に伝達することで、心拍数や発汗、胃腸の蠕動運動などの様々な生理機能の調節に関与している。また、腸管内の分泌細胞から分泌されたコレシストキニン (CCK, cholecystokinin) やグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1, glucagon-like peptide-1) などの消化管ホルモンが迷走神経を活性化することで情報が脳に伝達され、食欲の調整にも関わっていることが報告されている<sup>35</sup>。さらには、CCKをマウスの腹腔内に投与することにより記憶機能が増強され、迷走神経を切除することによりその効果が阻害されることから、迷走神経を介して認知機能を制御するという生理機構が存在する可能性も指摘されている<sup>36</sup>。このように、脳と腸が双方の機能に影響を及ぼし生体の機能制御を行うことを「脳腸相関」と呼び、近年盛んに研究が進められている。MHBAの認知機能改善効果についてもこの脳腸相関を介しているということが出来る。

求心性の迷走神経を刺激することにより脳の機能を制御するという試みは「迷走神経刺激療法 (VNS, vagus nerve stimulation)」として臨床にも応用されている。VNSは主として抗てんかん薬治療抵抗性てんかんの治療に用いられるが、てんかん患者の抑うつ症状に効果があることが報告されるようになり、諸外国においては治療抵抗性のうつ病へと適応範囲が広がっている。さらには、限定的な臨床エビデンスではあるが認知症に対する有効性も確認されており、認知症の新たな治療戦略の候補として注目を集めている<sup>37</sup>。VNSは、頸部の迷走神経に電極を設置し、リード線を皮下に通して小型の刺激発生装置を胸部に外科的に埋め込むという方法によって行われるのが主流である。

### 1.7. 本研究について

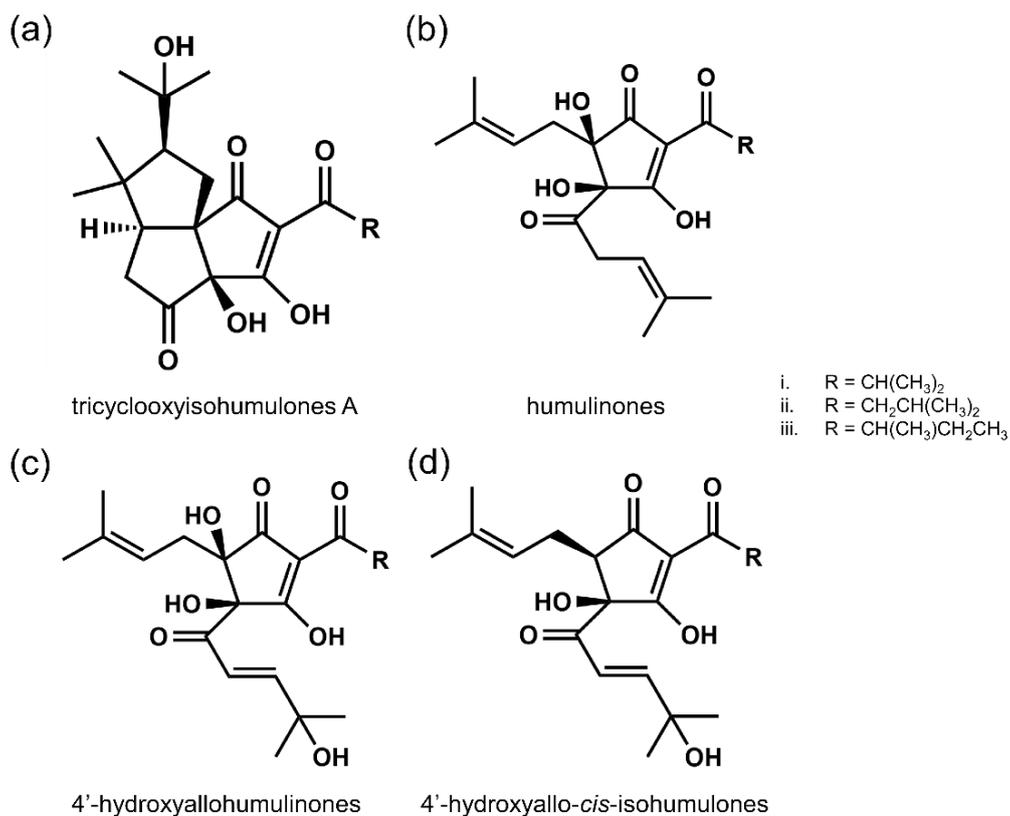
これまで述べてきたように、認知症は長い時間をかけてその病態が進行し、認知機能低下以外にも抑うつなどのBPSDの症状も示すため、その症状が表出する前から対策、すなわち一次予防することが重要である。近年、認知症の予防因子の探索研究が盛んに行われており、特に日常生活で重要な位置を占める食習慣や特定の食品成分の研究が注

目されている。我々もこれまでの研究によりビールに含まれるホップ由来の苦味成分の一種である MHBA が迷走神経を介して脳内の神経伝達物質を増加させることで認知機能を改善することを見出してきたが、その作用メカニズムは不明な部分が多く、さらにはヒトへの有効性については検討されていない。本研究では、MHBA の認知機能改善効果および BPSD や認知症の危険因子として想定される精神機能への影響について、非臨床および臨床の両面から検討した。



**Fig. 1-2  $\alpha$ 酸およびイソ $\alpha$ 酸の構造**

(a) *cis*-iso- $\alpha$ -acids; *cis*-isocohumulone (i), *cis*-isohumulone (ii), and *cis*-isoadhumulone (iii). (b) *trans*-iso- $\alpha$ -acids; *trans*-isocohumulone (i), *trans*-isohumulone (ii), and *trans*-isoadhumulone (iii).



**Fig. 1-3 MHBA の主要化合物の構造**

(a) tricycloxyisohumulones A; tricycloxyisocohumulone A (i), tricycloxyisohumulone A (ii), and tricycloxyisoadhumulone A (iii). (b) humulinones; cohumulone (i), humulinone (ii), and adhumulinone (iii). (c) 4'-hydroxyallohumulinones; 4'-hydroxyallocohumulone (i), 4'-hydroxyallohumulinone (ii), and 4'-hydroxyalloadhumulinone (iii). (d) 4'-hydroxyallo-*cis*-isohumulones; 4'-hydroxyallo-*cis*-isocohumulone (i), 4'-hydroxyallo-*cis*-isohumulone (ii), 4'-hydroxyallo-*cis*-isoadhumulone (iii).

## 第2章

# MHBAによる空間認知機能および物体認識機能改善効果に対するアセチルコリン受容体の関与の検討

### 2.1. 要約

MHBAは、空間認知に関わるワーキングメモリおよび物体認識に関わる記憶学習機能を向上させることが健忘症モデルマウスを用いた先行研究によって明らかにされている。また、その作用メカニズムの一端としてMHBAが迷走神経を介して海馬のNE量の増加させることが確認されている。しかしながら、NE以外の神経伝達物質の認知機能改善効果に対する関与は不明であった。本研究では、求心性の迷走神経が青斑核(LC, locus ceruleus)を介してコリン作動性ニューロンが集積するマイネルト基底核(NBM, nucleus basalis of Meynert)にシグナル伝達することに着想し、神経伝達物質の中でもアセチルコリン(ACh, acetylcholine)に着目してMHBAによる認知機能改善効果への関与を検討した。ニコチン性ACh受容体(nAChR, nicotinic ACh receptor)のアンタゴニストであるメカミルアミン塩酸塩(MEC, mecamlamine hydrochloride)を前処理したマウスでは、MHBAの空間認知に関わるワーキングメモリの改善効果が消失することが明らかとなった。また、nAChRのサブタイプのうち、認知機能に強く関与することが報告されている $\alpha 7$ nAChRに特異的なアンタゴニストであるメチルリカニコチンクエン酸塩(MLA, methyllycaconitine citrate)の前処理によってもMHBAの効果は消失した。以上の結果から、MHBAの認知機能改善効果にはNEの他に、AChを介した作用メカニズムがあることが示唆された。

### 2.2. 背景

MHBAによる空間認知に関わるワーキングメモリおよび物体認識に関わる記憶学習機能の改善には海馬のNEの増加が関与していることが、SCP誘導健忘症モデルマウスを用いた先行研究によって報告されている<sup>34</sup>。迷走神経を切除したマウスではMHBAによるNEの増加および認知機能改善効果が消失することから、MHBAは迷走神経を介して脳腸相関を活性化することにより認知機能改善効果をもたらすと考えられている<sup>34</sup>。一方で、先行研究ではNEが作用する $\beta$ アドレナリン受容体( $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenergic receptor)の遮断薬を前処理したマウスでもMHBAの空間性ワーキングメモリの改善効果が完全には消失しないことから、他の作用メカニズムが存在することが示唆されていた。

神経伝達物質の一種として知られるAChは、記憶の形成や強化に関与するとされており<sup>38-40</sup>、脳内のACh量の低下は、加齢に伴う認知機能の低下に関与していることが

報告されている<sup>41</sup>。軽度から中度の認知症患者に処方される医薬品の一つであるドネペジル塩酸塩が ACh の分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE, ACh esterase) を阻害することで ACh を増加させるメカニズムを有していることから、脳内の ACh 量を維持・増加させることは認知機能を保つために重要であることがわかる。ACh が作用する AChR はニコチン性 (nAChR, nicotinic-AChR) とムスカリン性 (mAChR, muscarinic-AChR) に大別され、それぞれ 17 種類、5 種類のサブタイプが存在する<sup>42,43</sup>。過去の報告では、 $\alpha 7$ nAChR アゴニストが認知機能改善効果や神経細胞保護作用を有することが示されており、 $\alpha 7$ nAChR を標的とした認知症の創薬研究も行われている<sup>44-46</sup>。以上のことから AChR の中でも  $\alpha 7$ nAChR は特に認知機能との関連が深いと考えられる。

求心性の迷走神経は、孤束核 (NTS, nucleus tractus solitarius) に到達し、NE 作動性ニューロンが集積する LC を介してコリン作動性ニューロンが集積する NBM にシグナルを伝達することが報告されている<sup>16,37,47,48</sup>。NBM は大脳皮質の広範な領域にコリン作動性神経線維を投射しており、NBM を電氣的に刺激することで大脳皮質の ACh 量が増加することが示されている<sup>49</sup>。以上の背景から、MHBA による認知機能改善効果には NE の他に ACh が関与すると仮説を立て、nAChR および  $\alpha 7$ nAChR の阻害剤を用いた行動薬理学的手法によって検討することにした。

## 2.3. 材料及び研究方法

### 2.3.1. 試薬

MHBA は、先行研究に記述されたとおりホップペレットを加熱し、熱水で抽出したのち、ジクロロメタンで有機層を抽出することによって調製した<sup>26</sup>。健忘症モデルマウスの誘導には、生理食塩水に溶解した SCP (Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いた。非選択型 nAChR のアンタゴニストとして MEC (Abcam plc.) を、 $\alpha 7$ nAChR のアンタゴニストとして MLA (Abcam plc.) をそれぞれ生理食塩水に溶解して用いた。

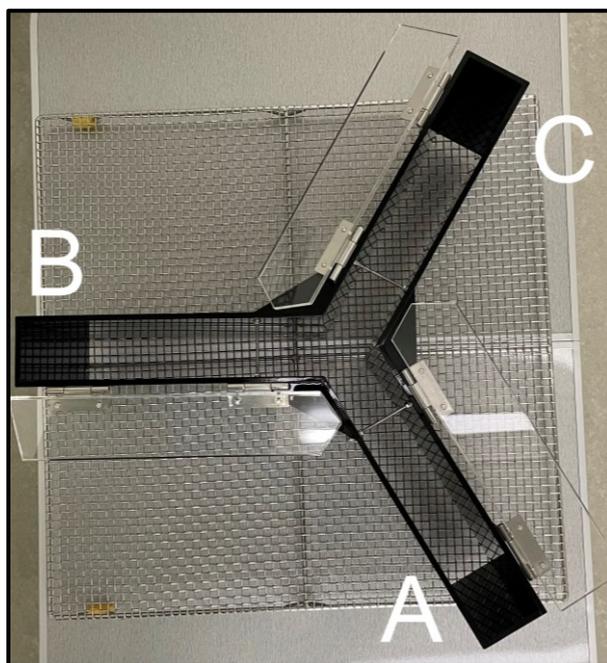
### 2.3.2. 動物

5-8 週齢の雄の Crj:CD1 (ICR) マウスを研究に用いた (Charles River Japan Inc.)。迷走神経切除マウスは、5 週齢時に横隔膜下で迷走神経を切除する手術をすることで作成し、6-8 週齢で実験に供した。迷走神経切除マウスのコントロールとして、同様に 5 週齢時に偽手術を施したマウスを準備し、6-8 週齢で実験に供した。以上の手術は、Charles River Japan Inc. で施された。

全てのマウスは、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (明期: 午前 8 時から午後 8 時)、自由摂食および摂水が可能な条件で飼育された。飼料として CLEA Rodent Diet CE-2 (CLEA Japan Inc.) を用いた。全ての実験手順は、キリン株式会社の動物実験倫理審査委員会に承認され、動物に与える苦痛を最小限に抑える様に配慮して行われた。

### 2.3.3. Y字迷路試験

MHBA が空間認識に関わるワーキングメモリに与える影響を評価するために Y 字迷路試験を実施した。Y 字迷路試験は、Fig. 2-1 に示す装置内をマウスに自由に探索させた際に認められる自発交替行動を評価する試験である。実験は、温度と照度をコントロールした防音室で行い、天井に設置したビデオカメラによって別室からマウスの探索行動を観察・評価した。マウスは、実験の 13 時間前までに飼育室から防音室に移し、環境に馴化させた。実験の 60 分前に、MHBA (10 mg/kg 体重) またはコントロールとして蒸留水をゾンデを用いて強制経口投与 (容量: 10 ml/kg 体重) し、その 40 分後に健忘症を誘導するために生理食塩水に溶解した SCP (0.8 mg/kg 体重) を腹腔内投与した。MHBA の投与用量は既報にしたがって決定した<sup>34</sup>。健忘症を誘導しない対照群には生理食塩水を投与した (共に容量: 10 ml/kg 体重)。過去の報告にしたがい、MEC (1.0 mg/kg 体重) または生理食塩水を SCP と同じタイミングに腹腔内投与した (容量: 10 ml/kg 体重)<sup>50</sup>。アームの末端からマウスを装置に入れ、行動を 8 分間観察した。連続して異なるアームに侵入した組み合わせの回数 (自発交替行動数) をアームに侵入した総回数-2 回で除した値を自発交替行動率として定義し、空間ワーキングメモリの指標として用いた。

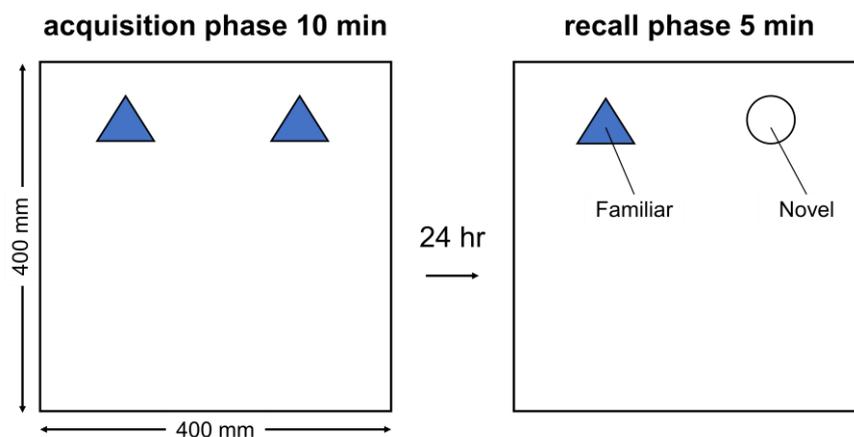


**Fig. 2-1 Y 字迷路試験**

Y 字迷路試験のセッティングを示す。マウスは A のアームの末端から装置に入れ、各アームに侵入した回数とその順番を評価した。

### 2.3.4. 新奇物体認識試験 (NORT, novel object recognition test)

MHBA が物体認識機能に与える影響を評価するために NORT を実施した。NORT は、マウスが新しい物体 (=新奇性) を好むという新奇探索欲求の性質を利用したもので、物体を認識させる段階 (AP, acquisition phase) と記憶機能をテストする段階 (RP, recall phase) で構成される (Fig. 2-2)。実験は、Y 字迷路試験と同様に防音室内で行った。



recall phase のセッティング



Fig. 2-2 新規物体認識試験

NORT のセッティングを示す。Acquisition phase としてマウスを 10 分間箱の中を探索させた。24 時間後に recall phase として片方の物体を変えて 5 分間箱の中を探索させ、それぞれの物体へのアプローチ時間を評価した。

マウスは、AP の 13 時間前までに飼育室から防音室に移し、環境に馴化させた。AP では、400 mm × 400 mm × 400 mm の灰色の箱の二つの隅に、それぞれ同じ色、形の木製の物体 (積み木) を設置し、マウスをその箱の中に 10 分間入れ、自由に探索させ

ることによって物体を記憶させた。24 時間後に、二つの物体のうち片方を別の物体（土台を付けて転がらないようにしたゴルフボール）に変え、5 分間箱の中をマウスに自由に探索させた。元と同じ物体を familiar object (FO)、新奇物体を novel object (NO) としてそれぞれの物体へのアプローチ時間（鼻を物体に付けていた時間）を計測し、弁別指標 (DI, discrimination index) を下式のとおり定義して物体認識機能の評価に用いた<sup>51-53</sup>。なお、FO と NO の位置をマウス毎に入れ替えることにより場所の影響が出ないように配慮した。

$$DI = \frac{\text{NO へのアプローチ時間} - \text{FO へのアプローチ時間}}{\text{総アプローチ時間}}$$

各 phase の 65 分前に、MEC (1.0 mg/kg 体重)、MLA (3.0 mg/kg 体重) または生理食塩水を腹腔内投与した (容量: 10 ml/kg 体重)<sup>50,54</sup>。その 5 分後に MHBA またはコントロールとして蒸留水をゾンデを用いて強制経口投与 (容量: 10 ml/kg 体重) し実験に供した。

### 2.3.5. AChE の活性評価

MHBA (1 pg/ml–1 mg/ml) が AChE の活性に及ぼす影響を Acetylcholinesterase Assay Kit (AAT Bioquest Inc.) を用いて *in vitro* で評価した。ポジティブコントロールとして AChE 阻害活性を有するドネペジル塩酸塩 (1 pg/ml–1 mg/ml) を用いた。MHBA およびドネペジル塩酸塩は、AChE (500 mU/ml) 存在下で 10 分間インキュベートし、基質として ACh を加え、AChE 活性によって産生されるチオコリンを定量することで AChE 活性を評価した。

### 2.3.6. 統計解析

各データは、正規性を D'Agostino-Pearson test/Kolmogorov-Smirnov test で検定し、等分散性を Bartlett's test によって検定した。各データが正規分布している場合には、Tukey-Kramer test によって平均値の検定を行った。正規分布していない場合には、Steel-Dwass test によって平均値の検定を行った。P 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。全ての統計解析は BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いて行った。

## 2.4. 結果

### 2.4.1. MHBA による空間認識に関わるワーキングメモリ改善効果に対する nAChR の関与の検討

MHBA の空間ワーキングメモリ改善効果に対する nAChR の関与を評価するために、

AChR のアンタゴニストを前処理したマウスに MHBA を投与して Y 字迷路試験を行った (Fig. 2-3)。SCP 処理によって自発交替行動率が有意に減少し、MHBA (10 mg/kg 体重) の投与によってそれが有意に改善した。一方で、SCP に加えて nAChR の非選択的アンタゴニストである MEC を前処理したマウスでは自発交替行動率の改善は確認されなかった。各試薬の処理によってアームへの総進入回数は変化しなかった。以上の結果は、nAChR が MHBA による空間ワーキングメモリ改善効果に関与することを示す結果である。

#### 2.4.2. MHBA による物体認識機能改善効果に対する nAChR の関与の検討

AChR のなかでも nAChR が認知機能との関りが深いという既報に従い、nAChR の関与を検討することとした。MHBA の物体認識機能改善効果に対する nAChR の関与を評価するために、MEC を前処理したマウスと未処理のマウスにそれぞれ MHBA を投与して NORT を行った (Fig. 2-4)。その結果、MEC 未処理マウスでは蒸留水を投与した対照群と比較して MHBA 群で DI が有意に改善した。一方で、MEC を前処理したマウスでは MHBA による有意な DI の改善効果が消失した。この結果は、MHBA による物体認識機能に nAChR が関与することを示唆するものである。

#### 2.4.3. MHBA による物体認識機能改善効果に対する $\alpha 7$ nAChR の関与の検討

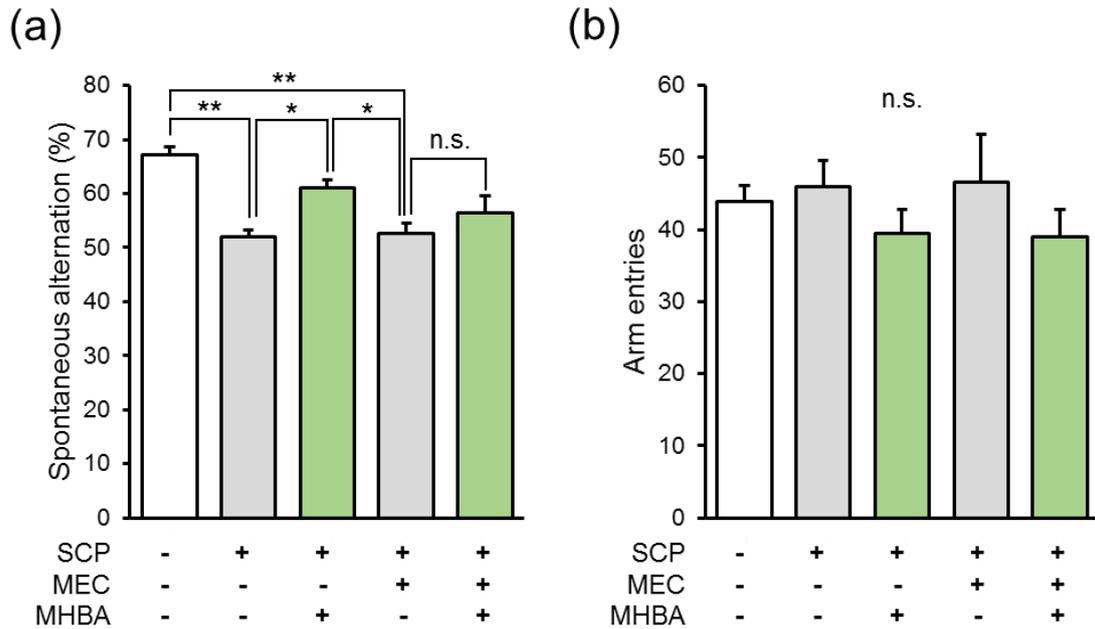
nAChR のサブタイプの一つである  $\alpha 7$ nAChR の MHBA による物体認識機能改善効果への関与を評価した (Fig. 2-5)。MHBA 投与によって蒸留水を投与した対照群と比較して DI が有意に改善したが、一方で MLA を前処理したマウスでは MHBA 投与による有意な DI の改善効果が消失した。以上より、MHBA による物体認識機能改善効果には、 $\alpha 7$ nAChR が関与することが示唆された。

#### 2.4.4. MHBA が AChE の活性に及ぼす影響の評価

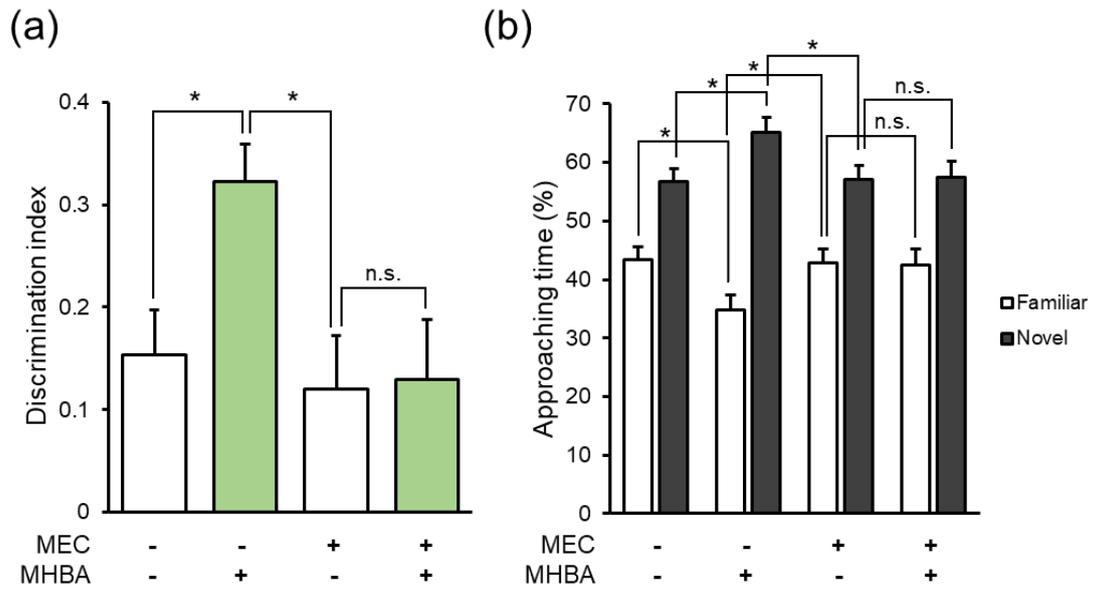
MHBA が AChE を直接阻害することによって脳内の ACh 量を増加させている可能性を検討するために、MHBA が AChE 活性に及ぼす影響を *in vitro* で評価した (Fig. 2-6)。ポジティブコントロールであるドネペジル塩酸塩は、濃度依存的に AChE を阻害したが、一方で MHBA は 1 pg/ml–1 mg/ml の濃度範囲においてその活性に影響を及ぼさなかった。

#### 2.4.5. MHBA による物体認識機能改善効果への迷走神経の関与の評価

MHBA による物体認識機能改善効果への迷走神経の関与を評価するために、迷走神経切除マウスを用いて新奇物体認識試験を行った (Fig. 2-7)。MHBA (10 mg/kg 体重) の強制経口投与によって、蒸留水を投与した対照群と比較して DI が有意に改善した。一方で、迷走神経切除マウスでは MHBA による DI の有意な改善効果が消失した。



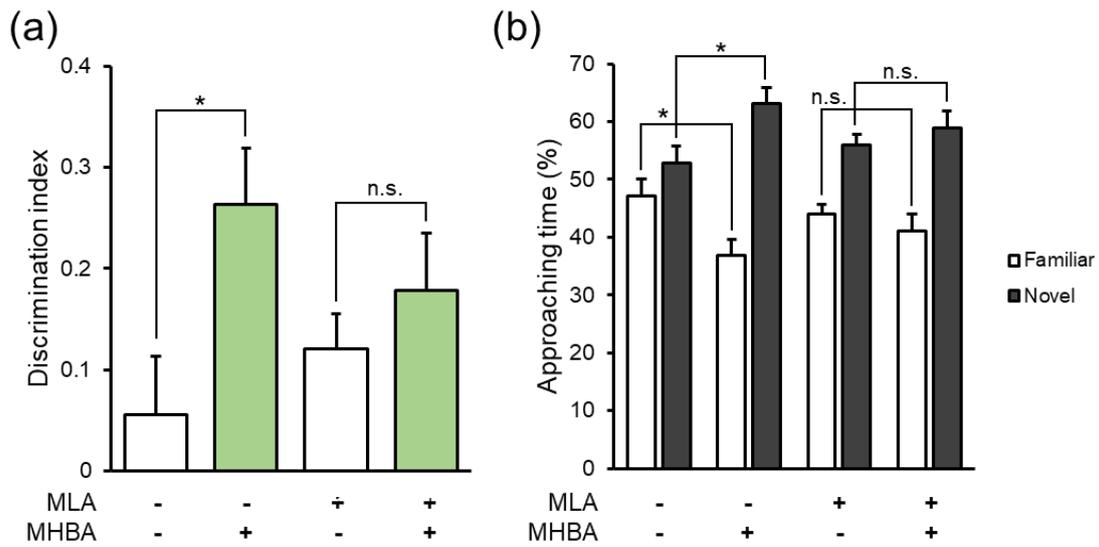
**Fig. 2-3 MHBA による空間ワーキングメモリ改善効果に対する nAChR の関与の検討**  
 SCP (0.8 mg/kg 体重) or/and MEC (1.0 mg/kg 体重) を処理したマウスに対して MHBA (10 mg/kg 体重) または蒸留水を強制経口投与し、Y 字迷路によって空間ワーキングメモリに対する影響を評価した. (a) 各群の自発交替行動率の平均値の比較. (b) 各群のアームへの総進入数の平均値の比較. 各棒グラフは平均値 + 標準誤差を表す (各群 N = 10). 統計解析は Kruskal–Wallis one-way ANOVA, followed by Steel–Dwass test によって行った. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . MHBA, matured hop bitter acids; SCP, scopolamine hydrochloride; MEC, mecamlamine hydrochloride.



**Fig. 2-4 MHBA による物体認識機能改善効果に対する nAChR の関与の検討**

MEC (1.0 mg/kg 体重) を処理したマウスに対して MHBA (10 mg/kg 体重) または蒸留水を強制経口投与し、新奇物体認識試験によって物体認識機能に対する影響を評価した。

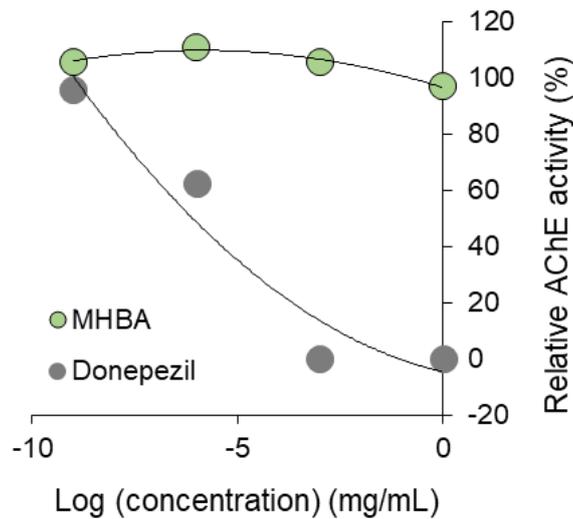
(a) 各群の弁別指標の平均値の比較. (b) 各群のアプローチ時間の平均値の比較. 各棒グラフは平均値 + 標準誤差を表す (各群 N = 11-12). 統計解析は Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Steel-Dwass test によって行った. \* $P < 0.05$ . MHBA, matured hop bitter acids; MEC, mecamylamine hydrochloride.



**Fig. 2-5 MHBA による物体認識機能改善効果に対する $\alpha 7nAChR$  の関与の検討**

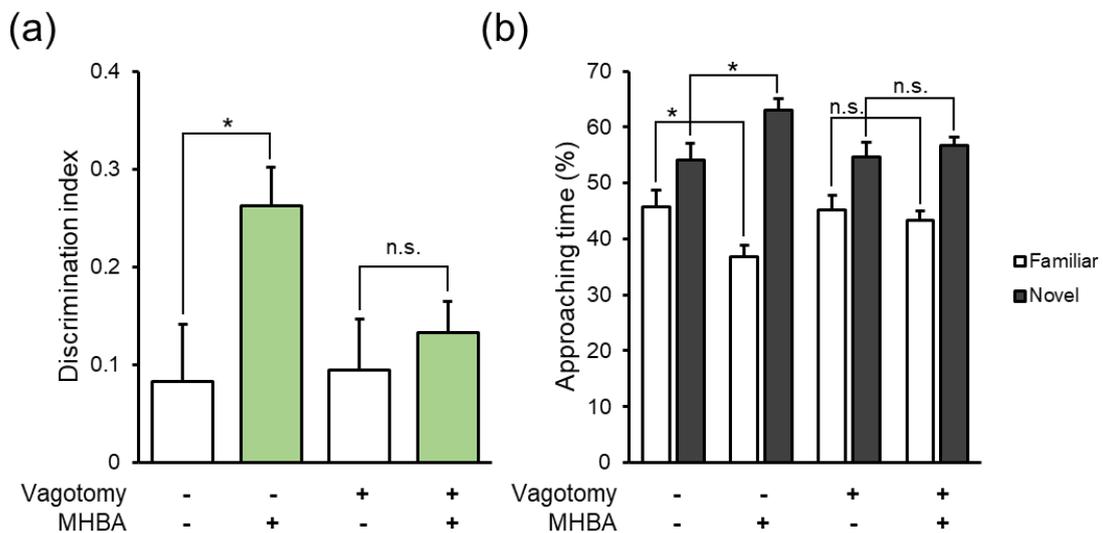
MLA (3.0 mg/kg 体重) を処理したマウスに対して MHBA (10 mg/kg 体重) または蒸留水を強制経口投与し、新奇物体認識試験によって物体認識機能に対する影響を評価した。

(a) 各群の弁別指標の平均値の比較. (b) 各群のアプローチ時間の平均値の比較. 各棒グラフは平均値+標準誤差を表す (各群 N=10). 統計解析は Kruskal–Wallis one-way ANOVA, followed by Steel–Dwass test によって行った. \* $P < 0.05$ . MHBA, matured hop bitter acids; MLA, methyllycaconitine citrate.



**Fig. 2-6 MHBA が AChE の活性に及ぼす影響の評価**

MHBA が AChE の活性に及ぼす影響を *in vitro* で評価した. 各値は溶媒のみのコントロールを 100%とした際の平均値を表す(各点 N=2). AChE, acetylcholine esterase; MHBA, matured hop bitter acids.



**Fig. 2-7 MHBA による物体認識機能改善効果への迷走神経の関与の評価**

迷走神経を切除したマウス (Vagotomy) に対して MHBA (10 mg/kg 体重) または蒸留水を強制経口投与し、新奇物体認識試験によって物体認識機能に対する影響を評価した. (a) 各群の弁別指標の平均値の比較. (b) 各群のアプローチ時間の平均値の比較. 各棒グラフは平均値 + 標準誤差を表す (各群 N = 11-12). 統計解析は one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test によって行った. \* $P < 0.05$ . MHBA, Matured hop bitter acids.

## 2.5. 考察

本研究では、MHBA の認知機能改善効果に対する ACh の関与を明らかにすることを目的として、行動薬理学的手法により評価を行った。その結果、MHBA による空間ワーキングメモリ改善効果に nAChR が関与することを明らかになった。さらに、物体認識機能改善効果に対しては、nAChR のなかでも特にそのサブタイプである $\alpha 7$ nAChR が関与することが示された。先行研究では、MHBA が迷走神経を介して海馬の NE を増加させることで認知機能を改善するという作用メカニズムが確認されていたが、NE の主要な受容体である $\beta$ -AR の遮断薬の存在下でも MHBA の空間ワーキングメモリ改善効果が完全には消失しないことから、他の作用メカニズムが存在することが示唆されていた<sup>34</sup>。本研究結果は、MHBA の新たな作用メカニズムを示すものである。

認知症の治療薬であるドネペジル塩酸塩やガランタミンが AChE を阻害することにより脳内の ACh 量を増加させるという作用メカニズムに着目し、MHBA も同様のメカニズムによって ACh を増加させている可能性を検討したが、MHBA は AChE 活性に影響を及ぼさなかった。一方で、迷走神経を切除したマウスでは MHBA の認知機能改善効果が消失したことから、MHBA は、体内に吸収され脳に到達して効果を発揮するのではなく、迷走神経活性化による脳腸相関を介して認知機能改善効果をもたらしていると考えられる。求心性の迷走神経を電氣的に刺激する方法は、VNS として臨床応用されており、主にてんかんや難治性のうつ病、統合失調症の治療に用いられる<sup>55,56</sup>。さらに、近年の研究により VNS は認知機能に対しても有効であることが示唆されている<sup>57-59</sup>。VNS による迷走神経を介した認知機能改善効果の作用メカニズムについては未だ不明な部分が多いものの、NE-LC 系の活性化に加え、求心性の迷走神経が NTS を介してコリン作動性ニューロンの核である NBM を活性化することや、限定的なエビデンスではあるが皮質の ACh 分泌を増加させることが報告されている<sup>16,37,47,48,60</sup>。本研究で認知機能の評価に用いた Y 字迷路試験と NORT はともに、海馬および前頭前野依存的な認知機能を反映している<sup>61,62</sup>。 $\alpha 7$ nAChR は海馬および前頭前野を含む大脳皮質の広範な領域で発現が認められ認知機能に関与することから<sup>63,64</sup>、MHBA は求心性の迷走神経を刺激することによって NE 作動性神経およびコリン作動性神経を活性化することによって空間ワーキングメモリおよび物体認識機能の改善効果をもたらしたと考察される。 $\alpha 7$ nAChR の活性化は、認知機能改善作用の他にも認知症の予防において重要な神経細胞保護作用を示すことや<sup>44</sup>、ミクログリアに発現する $\alpha 7$ nAChR は抗炎症作用に関与することが知られているため<sup>65</sup>、長期的に MHBA を摂取することによる認知症予防効果も期待される。

本研究の限界として、脳内の ACh を直接定量していないことが挙げられる。本研究によって示唆されたメカニズムが、ACh を介しているか否かはマイクロダイアリシスなどの手法によって脳内の ACh 量が MHBA によって増加するか確認する必要がある。

また、MHBA を長期的に投与した際の効果については検討できていない。認知症予防効果を検証するためには、AD モデルや加齢モデル動物を用いて長期間 MHBA を摂取させた際の有効性を評価する必要がある。

本研究により MHBA が迷走神経を介することで海馬および前頭前野依存的な認知機能を改善し、その効果には nAChR、特にそのサブタイプである $\alpha 7$ AChR が関与することが明らかになった。

## 第3章

# MHBA が脳内炎症モデルマウスのうつ様行動に与える影響およびその作用メカニズムの検討

### 3.1. 要約

脳内炎症がうつ病をはじめとする精神疾患の危険因子であることが近年の研究によって明らかにされている。我々は、ビール中に含まれるホップ由来のイソ $\alpha$ 酸が海馬の神経炎症を抑制し、認知機能の低下を抑えることを AD モデルマウスによる検討で明らかにしてきた。しかしながら、イソ $\alpha$ 酸以外のホップ由来成分が脳内炎症に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究ではイソ $\alpha$ 酸と共通の分子構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有する MHBA に着目し、脳内炎症および脳内炎症によって誘導されたうつ様行動に対する効果を検討することを目的とした。MHBA または蒸留水を 7 日間強制経口投与したマウスの脳室内にリポ多糖 (LPS, lipopolysaccharide) を投与し、尾懸垂試験 (TST, tail suspension test) によってうつ様行動評価したところ、MHBA を投与したマウスでは対照群と比較してうつ様行動が改善することが確認された。また、MHBA 群では対照群と比較して海馬の炎症性サイトカインの一種である interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) が有意に抑制されることが明らかになった。さらに、先行研究と同様に MHBA 投与によって海馬の NE が対照群と比較して有意に増加することが確認された。迷走神経を横隔膜下で切除したマウスでは MHBA によるうつ様行動改善効果および NE 量の増加は確認されなかった。加えて、海馬の NE 量と IL-1 $\beta$ 量はそれぞれうつ様行動と弱い相関を示すことが確認された。以上の結果から、MHBA は迷走神経を介して脳腸相関を活性化させることにより海馬の NE 増加および炎症抑制によってうつ様行動を改善することが示唆された。

### 3.2. 背景

うつ病をはじめとする精神疾患の患者数が世界的に増加しており、2021 年の WHO の報告によると世界中で 2 億 8 千万人がうつ病に罹患しているとされている<sup>66</sup>。また、精神疾患に関連する医療費は経済的な負担となっており、経済協力開発機構によると国内総生産の最大 4%を占めると試算する結果もある<sup>67</sup>。また、抑うつ症状は BPSD の主要な症状の一つとして知られており、患者本人のみならず介助者の QOL 低下を生じる。MCI を対象とした調査研究では、MCI のうち 27%に抑うつ症状を合併することが報告されており<sup>68</sup>、高齢社会という観点においても対処すべき重要な社会課題である。

しかしながら、うつ病に対する治療法は限られており、既存の方法ではうつ病患者の3分の2に対しては有効でないとする報告もされている<sup>69</sup>。そのため、治療に加えて食習慣などの日常生活を通じた予防、ケアに対する関心が高まっている。

うつ病が認知症の危険因子であることと、BPSDとして抑うつ症状がみられることから、認知症とうつ病および抑うつには共通の病態が存在すると考えられる。近年、うつ病患者の脳内において、脳内の免疫機能を司るミクログリアが過剰に活性化していることが報告されており、病態進行に対する脳内炎症の関与が明らかにされている<sup>70,71</sup>。これは、慢性ストレスによって誘導された神経細胞由来の内因性因子がミクログリアのToll様受容体を介してミクログリアを活性化するためであると考えられている<sup>72</sup>。また、IL-1受容体を阻害すると反復ストレスによるうつ様行動が生じないことから、炎症性サイトカインのなかでも、IL-1がうつ様行動に重要な役割を担っていると考えられる<sup>73,74</sup>。さらに、AD型認知症においても、A $\beta$ オリゴマーがミクログリアを活性化することにより脳内炎症を惹起することで病態が進行することが報告されている。いずれの場合にも、脳内炎症により細胞が障害され細胞から漏出した内因物質によってさらに炎症が増悪するという悪循環に陥ることにより脳神経活動の恒常性の破綻につながるとされている。これらのエビデンスからうつ病と認知症に共通する病態である脳内炎症、予防や治療のターゲットとして注目されており、実際に、セレコキシブやミノサイクリンなどの抗炎症剤がうつ病や認知症の症状を緩和することが複数の研究で報告されている<sup>75</sup>。

食品成分を対象とした研究ではn-3系の脂肪酸が炎症に関連したうつ病に対して有効である可能性が示唆されている<sup>76</sup>。また、我々の研究グループは、脳内炎症を病態の特徴の一つとして有するADモデルマウスを用いた検討により、ビールに含まれるホップ由来の苦味成分の一種であるイソ $\alpha$ 酸がミクログリアの形質を保護型に誘導することで海馬の炎症反応を抑え、認知機能低下を抑制することを明らかにしてきた<sup>33</sup>。しかしながら、ホップ由来の他の成分が脳内炎症およびうつ様行動に及ぼす影響に対する検討は十分ではない。

MHBAは、イソ $\alpha$ 酸と共通の分子構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有するホップ由来の化合物の混合体である<sup>26</sup>。綾部らの先行研究および第2章の研究によって、MHBAは求心性迷走神経の刺激を介して脳腸相関を活性化し、NEの増加およびAChRを介して認知機能改善効果をもたらすことが示されている<sup>34</sup>。VNSは、難治性のうつ病の治療法として臨床応用されており<sup>55,56</sup>、その作用メカニズムの詳細は不明であるものの、一部の報告ではLC-NE系の活性化を介した脳内のNEの増加および抗炎症作用を介していることが示されている<sup>55,77</sup>。

以上の背景から、イソ $\alpha$ 酸と共通の分子構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有するMHBAが迷走神経を介して脳内炎症抑制効果およびうつ様行動の改善効果を示す可能性があるとして着想し、その有効性を検討した。

### 3.3. 材料及び研究方法

#### 3.3.1. 試薬

MHBA は第 2 章の研究と同様のものを用いた。MHBA の構成化合物である 4'-hydroxyallohumulones ( HAH )、4'-hydroxyalloisohumulones ( HAIH )、tricycloxyisohumulones A (TCOIH-A) は、先行研究に記述された方法で精製した<sup>78</sup>。定量に用いた NE 標品は Sigma-Aldrich Co. LLC より購入した。マウスの麻酔には、ペントバルビタールナトリウム (共立製薬株式会社) を用い、脳内炎症の誘導には LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いた。

#### 3.3.2. 動物

5 週齢の雄の Crlj:CD1 (ICR) マウスを研究に用いた (Charles River Japan Inc.)。迷走神経切除マウスは、5 週齢時に横隔膜下で迷走神経を切除する手術をすることで作成し、6-8 週齢時に実験に供した。迷走神経切除マウスのコントロールとして、同様に 5 週齢時に偽手術を施したマウスを準備し、6-8 週齢時に実験に供した。以上の手術は、Charles River Japan Inc. で施された。全てのマウスは、 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (明期：午前 8 時から午後 8 時)、自由摂食が可能な条件で飼育された。飼料として CLEA Rodent Diet CE-2 (CLEA Japan) を用いた。全ての実験手順は、キリン株式会社の動物実験倫理審査委員会に承認され、動物に与える苦痛を最小限に抑える様に配慮して研究を行った。

#### 3.3.3. 試薬の投与

各実験において試験化合物として MHBA (1、10、50 mg/kg 体重)、HAIH (1 mg/kg 体重)、TCOIH (1 mg/kg 体重)、HAH (1 mg/kg 体重) または蒸留水をそれぞれ、1 日 1 回決められた投与時刻に 6 日間連続でマウスに強制経口投与した (10 ml/kg 体重)。脳内の炎症を誘導するために、6 日目の試験化合物投与の 1 時間後にペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔したマウスの脳室内に LPS (15  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) または生理食塩水を投与した<sup>79</sup>。脳室内投与の 23 時間後に、マウスに試験化合物または蒸留水を強制経口投与しその 1 時間後に行動薬理実験 (TST およびオープンフィールド試験) を行った。

#### 3.3.4. TST

マウスのうつ様行動は、LPS によって誘導した脳内炎症モデルマウスのうつ様行動を評価する方法として広く用いられている TST によって評価した<sup>80-83</sup>。TST は、抗うつ薬のスクリーニング法として広く使用される手法であり、逃避不可能なストレス刺激を付加したときに誘発される行動低下を抑うつ行動として検出する手法である。実験は、温度と照度をコントロールした防音室で行い、ビデオカメラによって別室からマウスの探索行動を観察・評価した。マウスは、LPS または生理食塩水の脳室内投与後に飼育室か

ら防音室に移し、環境に馴化させた。接着テープ（150 mm × 10 mm）を用いてマウスの尻尾を床から 40–50 cm の高さに固定し、6 分間行動観察を行った。マウスが動作を示さず無気力にぶら下がっている時間を不動時間として、6 分間中の不動時間の発現時間を抑うつ状態の指標として評価した<sup>84</sup>。

### 3.3.5. オープンフィールド試験

マウスの活動量を評価するために、尾懸垂試験の 120 分後にオープンフィールド試験を行った。実験は、TST と同様に温度と湿度をコントロールした防音室で行った。マウスを灰色のポリビニル製の箱（400 mm × 400 mm × 400 mm）の中央に入れ、SMART Video Tracking System（Harvard Apparatus）を用いて 6 分間の総移動距離を記録した。

### 3.3.6. 海馬の炎症性サイトカインの定量

オープンフィールド試験の直後マウスの両脳から海馬を取得した。海馬は、EZBlock™ Protease Inhibitor Cocktail（BioVision Inc.）を加えた RIPA buffer（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）中に移し、マルチビーズショッカー（Yasui Kikai）でホモジナイズした。取得したサンプルは 25°C、14,000 rpm で 30 分間遠心し上清を回収した。マウスの左側半脳の花馬を炎症性サイトカインの一種である IL-1β および総タンパク質の定量に供した。IL-1β は、Mouse IL-1 beta ELSA Ready-SET-GO!（eBioscience Inc.）を、総タンパク質は BCA Protein Assay Kit（Thermo-Scientific Inc.）を用いてそれぞれ定量し、IL-1β 量を総タンパク質量で除した値を脳内炎症の指標として評価に用いた。

### 3.3.7. 海馬の NE の定量

マウスの右側半脳の花馬を NE の定量に供した。RIPA buffer 中でホモジナイズした海馬に過塩素酸（Sigma-Aldrich Co. LLC）を最終濃度 0.2 M になる様に加え、0.22 μm membrane filter（Merck Millipore）でタンパク質を除いたサンプルを準備し、high-performance liquid chromatography- electrochemical detector（HPLC-ECD）（Eicom）を用いて NE を定量した。カラムには、Eicompak SC-5ODS（Eicom）を用い、移動相の組成は、83% 0.1 M クエン酸緩衝液（pH 3.5）、17% メタノール、190 mg/mL の 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5 mg/mL の EDTA-Na<sub>2</sub>（全て Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）とした。ECD での検出の設定は、Ag/AgCl を基準として 750 mV とした。

### 3.3.8. ゴルジ染色

海馬の樹状突起スパイン密度を評価するためにゴルジ染色を行った。ゴルジ染色には FD Rapid GolgiStain Kit（FD Neurotechnologies Inc.）を用いた。染色した脳は、bregma から -2.16 mm の位置を水平に 100 μm の厚さに切断し海馬を観察した。観察には、対物レンズとして UPlanApo 20×（Olympus）を用いた。スパインは、マウスあたり 3–5 個の

神経細胞を無作為に選び、細胞体から伸びた樹状突起の 20–30  $\mu\text{m}$  の領域を数えて評価した。

### 3.3.9. 統計解析

各データは、Dunnett's test または Tukey-Kramer's test によって検定した。相関関係の解析には、Pearson product-moment correlation coefficient を用いた。P 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。全ての検定は、BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いて行った。

## 3.4. 結果

### 3.4.1. MHBA が LPS によって誘導されたうつ様行動に及ぼす影響の評価

MHBA が LPS 処理によって誘導されたうつ様行動に及ぼす影響を評価するために TST を行った (Fig. 3-1a)。LPS を脳室内に投与したマウスは、生理食塩水を脳室内に投与したマウスと比較して有意に不動時間が延長し、うつ様行動が誘導されていることが確認された。LPS 処理したマウスに MHBA (1、10、50 mg/kg 体重) を強制経口投与すると、蒸留水を投与した対照群と比較して不動時間増加が短縮し、10、50 mg/kg 体重の用量では統計的に有意な差が確認された。

さらに、TST 後にオープンフィールド試験によって 6 分間のマウスの総移動距離を評価した (Fig. 3-1b)。その結果、マウスの活動量に群間で有意差はなかった。この結果は、LPS の投与によって延長した TST の不動時間がマウスの身体活動能が低下したことに起因するものではないことを示している。

脳内の炎症状態を評価するために、海馬の IL-1 $\beta$  を定量した (Fig. 3-1c)。LPS 処理したマウスでは、LPS 未処理のマウスと比較して IL-1 $\beta$  量が有意に増加することが確認された。LPS 処理したマウスに MHBA (1、10、50 mg/kg 体重) を強制経口投与すると、蒸留水を投与した対照群と比較して IL-1 $\beta$  量が減少し、1、10 mg/kg 体重の用量ではそれぞれ有意な変化が確認された。

次に海馬の NE 量を評価した (Fig. 3-1d)。LPS 処理によって NE 量の平均値は減少したが、有意な変化は確認されなかった。LPS 処理マウスに MHBA (1、10、50 mg/kg 体重) を強制経口投与すると、蒸留水を投与した対照群と比較して NE 量が増加し、10、50 mg/kg 体重の用量では有意な変化が確認された。さらに、TST の不動時間と IL-1 $\beta$  量および NE 量の相関関係を評価したところ、IL-1 $\beta$  量は不動時間と弱い正の相関を示した (Pearson's product moment correlation coefficient:  $r=0.26, P=0.052$ ) (Fig. 3-2a)。また、NE 量は不動時間と弱い負の相関を示した (Pearson's product moment correlation coefficient:  $r=-0.35, P=0.009$ ) (Fig. 3-2b)。一方で、IL-1 $\beta$  量と NE 量に相関関係は確認

されなかった (Pearson's product moment correlation coefficient:  $r = -0.12$ ,  $P = 0.37$ )。以降の検討は、最も強いうつ様行動改善効果が確認された MHBA (10 mg/kg 体重) の用量で検討を進めることとした。

### 3.4.2. MHBA に含まれる化合物単体が LPS によって誘導されたうつ様行動に及ぼす影響の評価

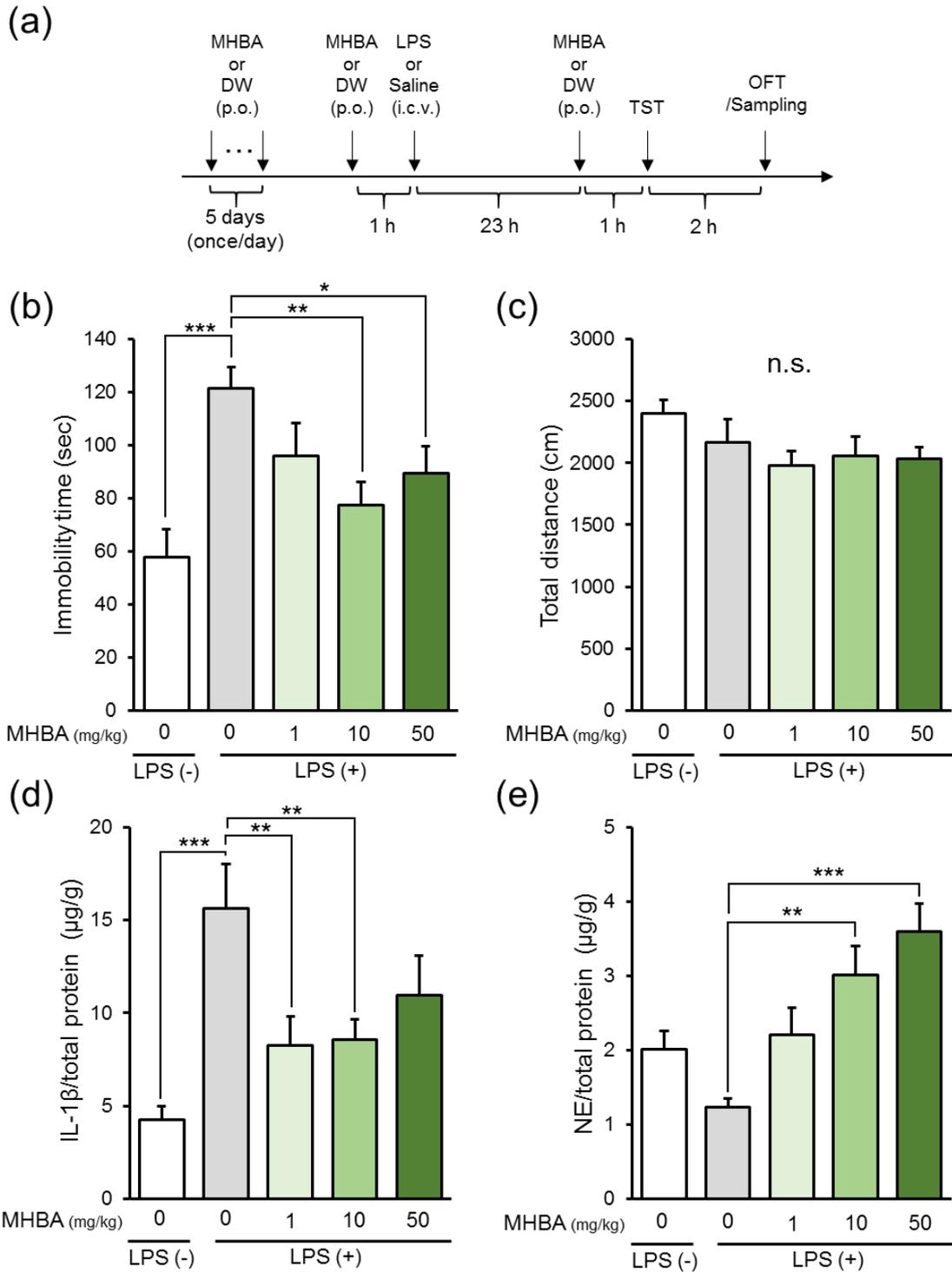
MHBA は $\alpha$ 、 $\beta$ 酸の酸化物であり、 $\beta$ トリカルボニル構造という共通の分子構造を有する化合物の混合物である。MHBA の効果が混合物のうち特定の化合物に起因するものであるのかを明らかにするために、MHBA の構成化合物のうち 3 つの代表的な化合物 (HAH、HAIH、TCOHA) がうつ様行動に及ぼす影響を TST によって評価した (Fig. 3-3)。LPS 処理したマウスは、生理食塩水によって処理したマウスと比較して有意に不動時間が延長した。LPS 処理マウスに MHBA (10 mg/kg 体重)、HAIH、HAH、TCOHA (それぞれ 1 mg/kg 体重) を強制経口投与すると、蒸留水を投与した対照群と比較してそれぞれ不動時間増加が短縮し、HAIH、HAH では有意な変化が確認され、TCOHA では不動時間が低値となる傾向が確認された。

### 3.4.3. MHBA によるうつ様行動改善効果への迷走神経の関与の評価

MHBA によるうつ様行動改善効果への迷走神経の関与を検討するために、迷走神経切除マウスを用いて TST を行った (Fig. 3-4a)。偽手術を施したマウスでは、LPS 処理によって生理食塩水の処理と比較して不動時間が有意に延長し、MHBA の強制経口投与によって対照群と比較して有意に不動時間増加が短縮した。一方で、迷走神経を切除したマウスでは LPS 処理によって不動時間が有意に延長したが、MHBA (10 mg/kg 体重) 投与によっても、対照群と比較して不動時間の有意な変化は確認されなかった。

さらに、オープンフィールド試験によって 6 分間のマウスの総移動距離を評価した (Fig. 3-4b)。その結果、偽手術を施したマウスでは LPS 処理によって、活動量が有意に減少した。このことは、偽手術群においては TST で評価された不動時間が身体的な活動能を反映している可能性を示唆するものである。しかしながら、LPS 処理のうち蒸留水投与群と MHBA 投与群に活動量の差はないことから、MHBA のうつ様行動に対する効果は正しく評価できているものと考えられた。一方で、迷走神経切除マウス群では活動量に有意な差は確認されなかった。Fig. 3-2a および b の結果から、MHBA によるうつ様行動改善効果には NE の寄与が大きいことが示唆されたため、海馬中の NE 量を評価したところ、偽手術マウスでは、MHBA 投与によって NE 量が増加する傾向が確認されたが、迷走神経を切除したマウスでは NE 量の変化は確認されなかった (Fig. 3-4c)。最後に、脳内炎症のモデルマウスでは神経細胞のスパイン密度が減少するという既報に従い<sup>85,86</sup>、海馬の神経細胞の状態を樹状突起スパイン密度によって評価した (Fig. 3-5)。その結果、LPS を脳室内に投与したマウスでは、海馬のスパイン密度が有意に低値であ

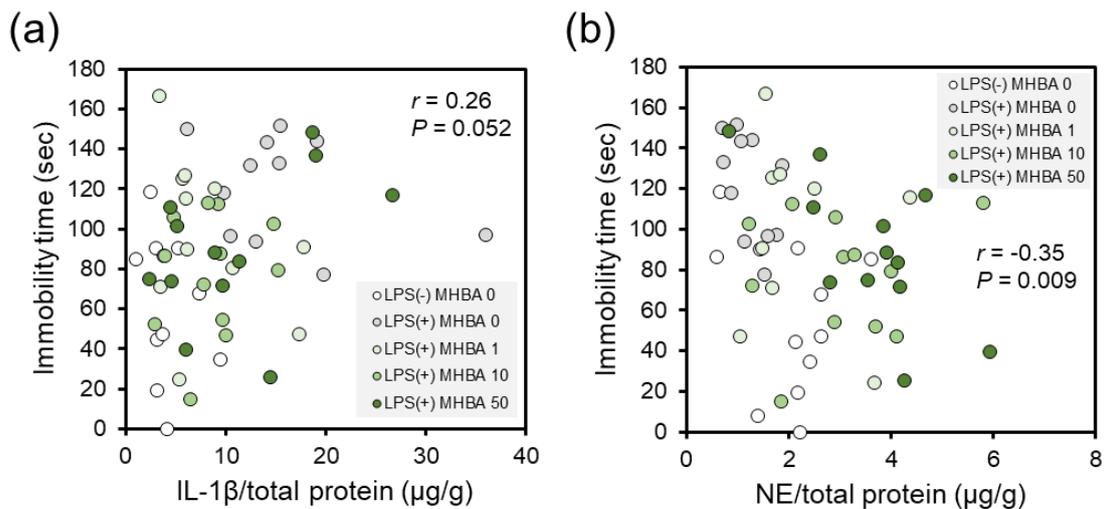
った。しかし、MHBA 投与マウスでは、蒸留水投与マウスと比較してスパイン密度が有意に高値となった。一方で、迷走神経切除マウスでは MHBA 投与によっても、スパイン密度の変化は確認されなかった。



**Fig. 3-1 MHBA が LPS によって惹起されたうつ様行動に及ぼす影響の評価**

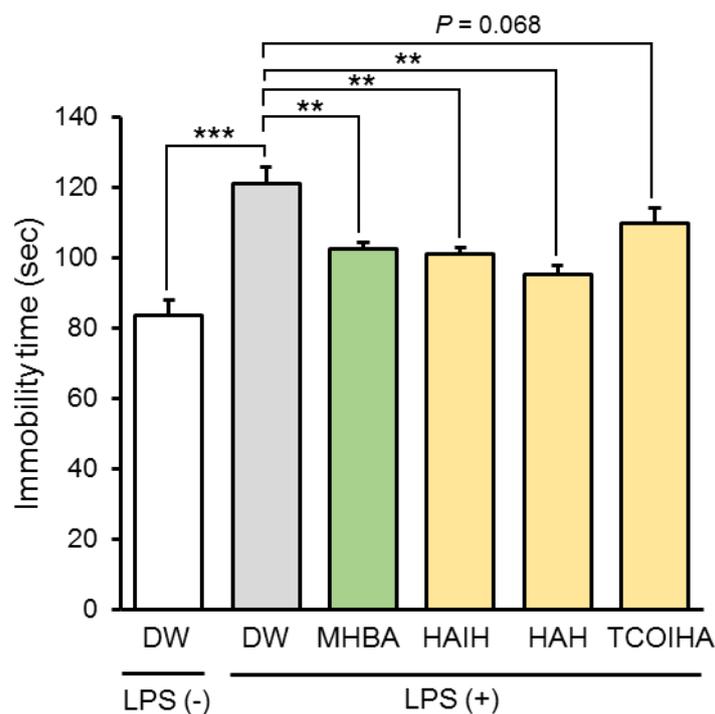
LPS (15  $\mu$ g/mouse) または生理食塩水を処理したマウスに対して MHBA または蒸留水を強制経口投与し、尾懸垂試験によってうつ様行動を評価した。(a) 研究のスキーム。(b) 各群の尾懸垂試験 (6 分間) における不動時間の平均値の比較。(c) 各群のオープンフ

フィールド試験（6分間）における総移動距離の平均値の比較. (d) 各群の海馬におけるIL-1 $\beta$ 量の平均値の比較. (e) 各群の海馬におけるNE量の平均値の比較. 各棒グラフは平均値+標準誤差を表す（各群N=9-12）. 統計解析はLPS処理し蒸留水を投与した群をコントロールとしたDunnet's testによって行った. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . DW, distilled water; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta; LPS, lipopolysaccharide; MHBA, matured hop bitter acids; NE, norepinephrine; OFT, open field test; TST, tail suspension test.



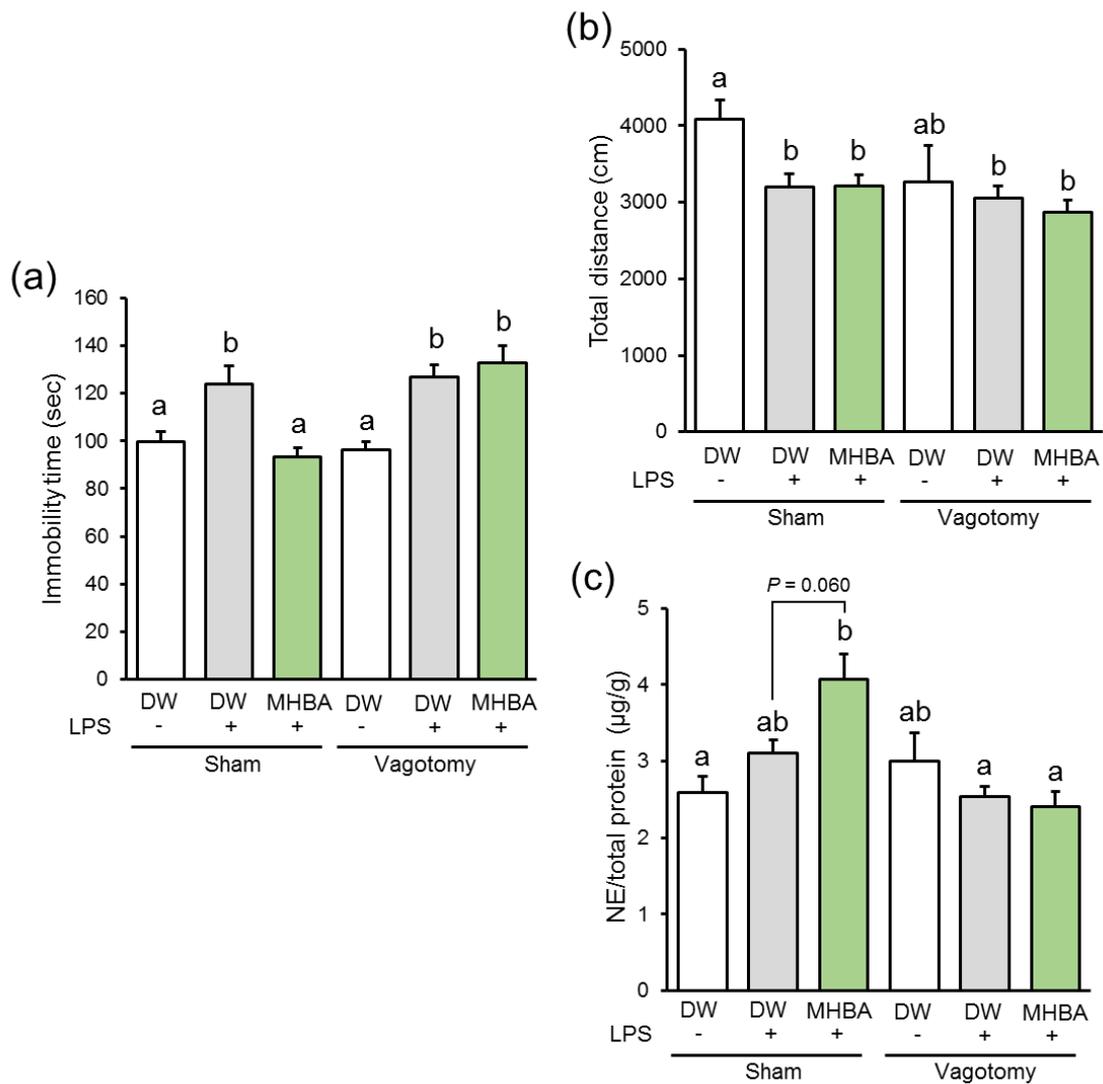
**Fig. 3-2 海馬中のIL-1 $\beta$ およびNEとうつ様行動の関係**

(a) 海馬中のIL-1 $\beta$ 量と尾懸垂試験の不動時間の関係. (b) 海馬中のNE量と尾懸垂試験の不動時間の関係. MHBAの投与量別に色分けして示した.  $r$  = Pearson correlation coefficient. IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta; MHBA, matured hop bitter acids; NE, norepinephrine.



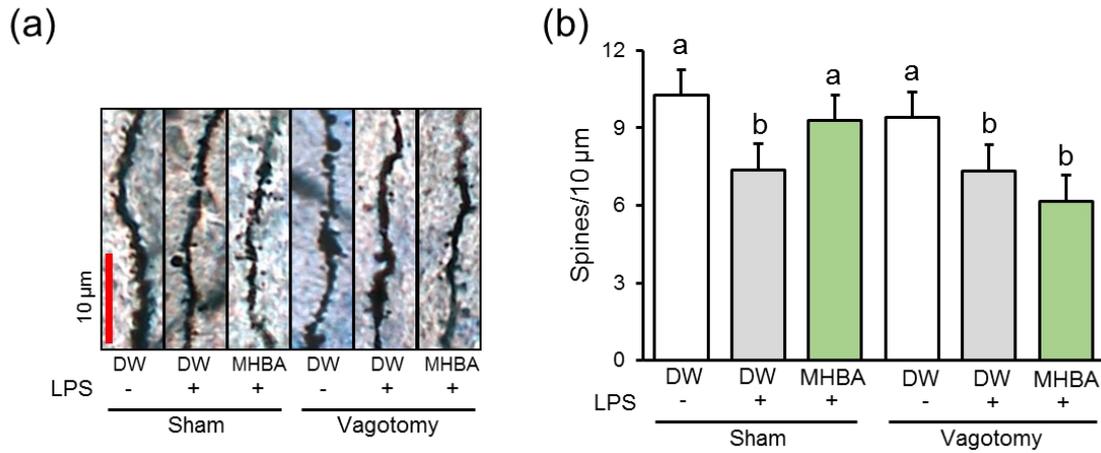
**Fig. 3-3** MHBA 中の主要化合物が LPS によって惹起されたうつ様行動に及ぼす影響の評価

LPS (15  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) または生理食塩水を処理したマウスに対して MHBA、HAIH、HAH、TCOIHA または蒸留水を強制経口投与し、尾懸垂試験によってうつ様行動を評価した。各群の尾懸垂試験 (6 分間) における不動時間の平均値の比較を示した。各棒グラフは平均値 + 標準誤差を表す (各群  $N = 5$ )。統計解析は LPS 処理し蒸留水を投与した群をコントロールとした Dunnet's test によって行った。\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ 。DW, distilled water; HAH, 4'-hydroxyallohumulones; HAIH, 4'-hydroxyalloisohumulones; LPS, lipopolysaccharide; MHBA, matured hop bitter acids; TCOIHA, tricycloxyisohumulones A.



**Fig. 3-4** MHBA が LPS によって惹起された迷走神経切除マウスのうつ様行動に及ぼす影響の評価。

LPS (15 µg/mouse) または生理食塩水を処理した迷走神経切除マウスまたは偽手術 (Sham) マウスに対して MHBA または蒸留水を強制経口投与し、尾懸垂試験によってうつ様行動を評価した。(a) 各群の尾懸垂試験 (6 分間) における不動時間の平均値の比較。(b) 各群のオープンフィールド試験 (6 分間) における総移動距離の平均値の比較。(c) 各群の海馬中の NE 量の平均値の比較。各棒グラフは平均値 + 標準誤差を表す (各群 N = 5-7)。統計解析は Tukey-Kramer's test によって行った。P < 0.05 を有意な差異と判断し、異なる記号同士は平均値が有意に異なることを示す。DW, distilled water; LPS, lipopolysaccharide; MHBA, matured hop bitter acids.



**Fig. 3-5 MHBA が海馬の樹状突起密度に及ぼす影響の評価**

LPS (15 μg/mouse) または生理食塩水を処理した迷走神経切除マウス (Vagotomy) または偽手術 (Sham) マウスに対して MHBA または蒸留水を強制経口投与し海馬の樹状突起密度に及ぼす影響を評価した. (a) ゴルジ染色による代表図. (b) 各群のスパイン密度の平均値の比較. 各棒グラフは平均値+標準誤差を表す (各群N=5-7). 統計解析は Tukey-Kramer's test によって行った.  $P < 0.05$  を有意な差異と判断し、異なる記号同士は平均値が有意に異なることを示す. DW, distilled water; LPS, lipopolysaccharide; MHBA, matured hop bitter acids.

### 3.5. 考察

本研究では、MHBA が脳内炎症によって惹起されたうつ様行動に及ぼす影響を TST によって評価した。また、先行研究に基づき迷走神経および脳内の神経伝達物質に着目して作用メカニズムを検証した。

うつ様行動の評価系である TST を用いた検討において、MHBA を 7 日間連続で強制経口投与することにより、LPS 処理によって脳内炎症を誘導した脳内炎症モデルマウスの不動時間を対照群と比較して有意に短縮させた。これは、MHBA が認知機能改善効果のみならず精神機能に対する改善効果を有していることを示す結果である。さらに、迷走神経を切除することによりその効果が消失したことから、うつ様行動の改善効果もまた認知機能と同様に迷走神経を介したものであると考察される。

脳内炎症はうつ病や認知症を含む神経変性疾患に共通する病態の一つであることから、これらの疾病に対する予防および治療のターゲットとして注目されている<sup>70,71</sup>。脳内炎症の増悪には、脳内の免疫機能を司る細胞であるミクログリアが重要な役割を果たしている。ミクログリアは、異物に対する貪食作用により脳の恒常性を保つ一方で、老廃物の蓄積やウイルス感染などの刺激に伴い炎症性の形質に変化し、脳内炎症を促進する。特に、加齢に伴ってミクログリアは炎症性の形質に誘導されやすくなることから、ミクログリアの形質を抗炎症型に維持することは予防の観点からも重要である<sup>87</sup>。TST は LPS によって惹起した脳内炎症モデルマウスのうつ様行動を評価する方法として広く用いられており、不動時間は海馬の IL-1 $\beta$ 量と関連することが報告されている<sup>80-83</sup>。また、IL-1 受容体の阻害したでは反復ストレス負荷によるうつ様行動が生じなくなることが報告されている<sup>73,74</sup>。以上のことから、本研究では海馬の IL-1 $\beta$ に着目して検討を行ったところ、MHBA が海馬の IL-1  $\beta$ 量を減少させることが明らかになった。これまでの研究により、MHBA は迷走神経を活性化することで脳内の NE を増加させることが明らかになっているが、NE はミクログリアに発現する $\beta$ 2-AR を介してミクログリアを抗炎症型の形質に誘導することにより抗炎症作用を呈することが知られている<sup>88</sup>。また、第 2 章に示した研究により、MHBA は $\alpha$ 7nAChR を介して認知機能を改善することが示唆されているが、 $\alpha$ 7nAChR もミクログリアに発現しており、 $\alpha$ 7nAChR を刺激することでミクログリアは抗炎症型の形質に誘導されることが報告されている<sup>65</sup>。したがって、MHBA は迷走神経の活性化を介してミクログリアの $\beta$ 2-AR や $\alpha$ 7nAChR ヘシグナルを伝達することによりミクログリアを抑制型に誘導することで IL-1 $\beta$ 量を減少させた可能性が考えられる。一方で、脳内の NE 量と IL-1 $\beta$ 量に相関関係が確認されなかったことから、抗炎症作用についてはほかのメカニズムが関与する可能性も考えられ、さらなる深耕のためにはそれぞれの受容体のアンタゴニストを用いた検討等により抗炎症作用に対する寄与を明らかにする必要がある。

MHBA に含まれる 3 種類の代表的な化合物がうつ様行動に及ぼす効果を TST によっ

て評価した。その結果、HAIH、HAH が有意なうつ様行動改善効果を示し、TCOIHA は改善傾向を示した。綾部らの先行研究により、HAIH、HAH が認知機能改善効果を示す一方で、TCOIHA の効果は比較的弱いことが報告されており<sup>34</sup>、本研究結果と一致している。また最近の研究により、 $\beta$ カルボニル骨格を有するモデル化合物が認知機能改善効果を発揮することも明らかにされた<sup>89</sup>。これらの結果は、MHBA のうち特定の化合物のみが活性を有するのではなく、各化合物の $\beta$ カルボニル構造が活性全体に寄与していることを示している。

本研究では、先行研究に基づき脳腸相関と脳内の NE に着目してメカニズムの検証を行った。NE は意欲との関連が深い神経伝達物質であり、大うつ病の患者では脳内の NE が減少していることが報告されている。また、脳内の NE を増やす作用があるセロトニン・NE 再取り込み阻害薬がうつ病の治療薬として用いられている<sup>90</sup>。したがって、脳内炎症の抑制だけではなく神経細胞が NE によって直接活性化されることにより、うつ様行動が改善したというメカニズムも存在すると考えられる。それぞれの作用メカニズムの寄与を明らかにするためには、脳内炎症モデル以外の評価系において MHBA の有効性を検討する必要がある。また、本研究では急性の脳内炎症モデルマウスを用いたが、予防効果をさらに検証するには、例えば社会的敗北モデルマウスなど、慢性的なストレスがかかる条件でうつ様行動に対する有効性を評価する必要がある。最近の研究により、MHBA を 2 週間混餌投与したマウスに社会的敗北ストレスを負荷したところ、対照群と比較して海馬や mPFC のドーパミン作動性神経が活性化することにより、ストレス耐性が向上することが明らかにされおり、慢性的なストレスに対する有効性も示唆されている<sup>91</sup>。

本研究では、脳内環境の客観的指標として海馬神経細胞のスパイン密度を評価した<sup>85,86</sup>。その結果、対照群では LPS 処理によってスパイン密度が低下したが、MHBA 投与群では維持されることが明らかになった。NE は神経細胞保護作用を有しており<sup>92</sup>、さらに樹状突起の再構築にも関与することから<sup>37</sup>、NE の増加がスパイン密度の維持効果を発揮した可能性がある。

求心性の迷走神経を刺激し、難治性うつ病やてんかんを治療する VNS が臨床応用されているが、主流な従来法では電気刺激をするための小型装置を外科的に胸部に埋め込むという手術が必要であることから、患者にとっての負担となり予防に活用することは困難であった<sup>55,56</sup>。本研究の結果は、食品由来成分である MHBA を日常的に摂取することによって、簡便かつ安全に VNS と同様の作用メカニズムを介してうつ病の予防、改善に役立てることができる可能性を示すものである。本研究でうつ様行動改善効果が確認された MHBA (10 mg/kg 体重) は、ヒト等価用量換算で 60 kg のヒトに対して約 49 mg である。苦味の強いインディアペールエールタイプのビールには 152–210 mg/l の MHBA が含まれることから<sup>26</sup>、日常生活において適量の飲酒の範囲で効果用量の MHBA

を摂取することが可能である。

本研究の限界として、ミクログリアの極性変化や脳内の病理変化を直接評価していない点が挙げられる。将来の研究においては、免疫染色やフローサイトメトリーを用いて MHBA がミクログリアに及ぼす影響を直接的に検討する必要がある。また、本研究では IL-1 $\beta$ に着目して検討を進めたが、その他の炎症性・抗炎症性サイトカインや液性因子の関与については検討できていない。ミクログリアが保護型に誘導されることで増加が想定される IL-4 や IL-10 をはじめとする抗炎症性サイトカインや BDNF の関与を深掘する必要がある。

以上、本研究によって MHBA は海馬の NE 増加作用および脳内炎症の抑制作用を示し、LPS によって惹起されたうつ様行動の改善作用を発揮することが確認された。また、その効果には迷走神経が関与する可能性が示された。

## 第4章

# MHBA が健常な中高齢者の認知機能および精神機能 に及ぼす影響の検証 –ランダム化二重盲検プラセボ 対照並行群間比較試験–

### 4.1. 要約

MHBA が迷走神経を介して脳腸相関を活性化することにより認知機能およびうつ様行動を改善することが第2章、3章に記述した動物実験および先行研究によって明らかにされている。しかしながら、ヒトに対する有効性は不明である。そこで、本研究では物忘れを自覚する中高齢者を対象として MHBA が認知機能および精神機能に及ぼす影響をランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験で評価することを目的とした。60名の健康な中高齢者（45–64歳）を無作為に30名ずつ2群に分け、プラセボ群とMHBA群に割付けた。研究食品はカプセル形態で提供し、MHBAは35mg/日を1日1回摂取させた。介入期間は12週間とし、認知機能および精神機能の評価は、研究食品摂取開始前、摂取開始6週間後、12週間後の計3回行った。評価の結果、長期記憶からの検索機能や実行機能を反映する語流暢性のスコアのベースラインからの変化量が摂取開始6週間後にプラセボ群と比較してMHBA群で有意に改善した。また、注意の制御機能を反映するストループテストのスコアが摂取開始12週間後にプラセボ群と比較してMHBA群で有意に改善した。さらに、精神機能のうち不安感、緊張感および疲労感が摂取開始12週間後にプラセボ群と比較してMHBA群で有意に改善した。本研究により、ビールに含まれるホップ由来苦味成分のヒトの認知機能および精神機能に対する有効性を初めて明らかにした。

### 4.2. 背景

第2章の研究および綾部らの先行研究により、MHBA が迷走神経活性化による脳内のNEの増加および $\alpha 7nAChR$ を介した作用メカニズムにより、健忘症モデルマウスの空間ワーキングメモリおよび通常マウスの物体認識機能を改善することが明らかにされている。さらに、第3章の研究によりMHBA が迷走神経を介したメカニズムにより脳内炎症モデルマウスのうつ様行動を改善することを示した。これらの研究結果は、迷走神経活性化という共通のメカニズムによってMHBA が脳機能の認知的側面と精神的側面に有効であること示すものであり、ヒトへの応用が期待される。しかしながら、現状ではモデル動物での検証にとどまっており、サプリメント等の食品として実装するためにはヒトでの有効性検討が重要である。そこで本研究では、動物を用いた検討から

MHBA の有効性が期待される前頭前野および海馬依存的な認知機能および精神機能に焦点を当て、MHBA がヒトの認知機能に及ぼす影響をランダム化プラセボ対照並行群間比較試験によって検討することとした。対象者は、認知症予防を開始する時期として有効とされる物忘れの自覚症状を有する SCD とした。

### 4.3. 研究方法

#### 4.3.1. 研究デザイン

研究デザインとして、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を採用した。目標被験者数は 60 例とし、被験者の募集は日本で行った。今回の研究は、MHBA のヒトでの効果を検討する初めての試みであり、探索的な位置づけであったため、同様に食品成分が認知機能に及ぼす影響を評価した先行研究を参考に症例数を設定した。被験者の 1 次スクリーニングでは、後述の選択基準に該当し、除外基準に抵触しないことを確認するための背景調査、改定長谷川式簡易知能評価スケール、血液検査、および尿検査を実施した。2 次スクリーニングでは認知機能検査および気分状態検査を実施し、認知機能検査のスコアが低い者から優先的に研究に組み入れた。第三者機関（株式会社クロエ）でコンピュータプログラムを用いて 1:1 の例数比になるように無作為に 2 群に分けた後、MHBA 群またはプラセボ群へ割付を行った。割付者は、適格性の判断、データ収集、データ解析、その他研究結果に影響を及ぼす事項には関わらなかった。また、アウトカムの評価者、解析者を含む研究スタッフはデータが固定されるまで割付を知らされなかった。研究に参加している間、被験者には研究参加前の生活様式を守り、認知機能に影響を及ぼす可能性があるサプリメントおよび医薬品は摂取しないように指導した。研究食品の摂取率は、介入 12 週目検査時に回収した残薬を数えることによって評価した。また、生活習慣は生活日誌を毎日記入させることによって聴取した。認知機能評価のための神経心理テストおよび気分状態の評価は、研究食品摂取開始前、摂取開始 6 週間後、12 週間後に実施した。被験者には、神経心理テスト開始 4 時間前から水以外の飲食はしないよう指導した。データ収集はメディカルステーションクリニック（東京）で行った。

#### 4.3.2. 被験者

被験者の選択基準は (1) 45–64 歳である、(2) 第一言語が日本語である、(3) 物忘れの自覚を有する、の全てに当てはまる者とした。除外基準は、(1) 試験に影響を及ぼすほどの難聴・弱視である、(2) 改定長谷川式簡易知能評価スケールによって認知症が疑われる（スコア 20 点以下）、(3) 脳神経系疾患の既往歴がある、(4) ホルモン治療中である、(5) 生活習慣が不規則である（交代勤務など）、(6) ビール系飲料の飲用習慣が

ある、(7) 1日あたり純アルコール 20 g 以上の飲酒習慣がある、(8) 喫煙習慣がある、(9) 過去 1 年以内に神経心理テストを受けたことがある、(10) 認知機能に影響を及ぼす医薬品を服用している、(11) 睡眠関連疾患の既往歴がある、(12) 3 か月以内に献血を行った、(13) 他の臨床研究に参加している、(14) 妊娠中または授乳中である、(15) 研究食品にアレルギーがある、のうちいずれか一つでも当てはまる者とした。適格性の判断に必要な情報は、スクリーニング検査時に、質問紙および神経心理テストによって取得した。

#### 4.3.3. 介入

MHBA は、谷口らの報告にしたがって調製した<sup>78</sup>。MHBA (35 mg/3 粒) を含むカプセルおよびプラセボはキリンホールディングス株式会社によって準備された。1 日あたりの摂取用量は、同様の作用メカニズムである迷走神経活性化によって発揮される MHBA の体脂肪低減効果を評価したヒト試験で 35 mg/kg で有効性が確認されていること<sup>32</sup>、および非臨床研究で 10 mg/kg で有効性が確認されており、体表面換算でヒトに外挿すると有効用量が 0.81 mg/kg となることに基づいて設定した。それぞれの研究食品の組成および栄養成分は Table 4-1 に示すとおりである。研究食品は水またはぬるま湯とともに毎日 1 回 3 粒摂取させ、摂取のタイミングは定めなかった。介入期間は、同様に食品成分が認知機能に及ぼす影響を評価した既報を参考に 12 週間と設定した<sup>93-95</sup>。研究食品は、日本の食品衛生基準を満たした環境で製造した。MHBA 含有カプセルとプラセボは外見、味によって見分けることができないことを第三者機関で確認した。

**Table 4-1 研究食品の栄養組成 (1 日摂取量当たり)**

	placebo capsule	MHBA capsule
MHBA (mg)	0	35
moisture (mg)	67	63
protein (g)	0.23	0.27
fat (mg)	< 1	23
ash (mg)	3	34
carbohydrate (g)	0.7	0.6
energy (kcal)	3.7	3.7
sodium (mg)	0.4	0.7

#### 4.3.4. 神経心理テストによる認知機能の評価

神経心理テストは、テストの質を一定にするために訓練を受けた評価者が行った。記憶機能を評価するために、単語の記憶、物語の記憶、語流暢性、視覚性対連合を実施し

た。単語の記憶は浜松式高次脳機能スケールにしたがって実施した<sup>96</sup>。被験者には7個の単語を音で提示し、即時、5分後、20分後に再生するよう求めた。正しく回答できた単語の個数を単語の記憶の成績とした。物語の記憶は、日本語版リバーミード行動記憶記録検査にしたがって実施した<sup>97</sup>。語流暢性では、『あ』から始まる単語、「野菜の名前」、「動物の名前」をそれぞれ1分間のうちに可能な限り列挙させ、列挙できた単語の個数を語流暢性の成績とした。視覚性対連合は、日本語版ウエクセラ記憶検査法(WMS-R, Wecheler Memory Scale-Revised)にしたがって実施した<sup>98</sup>。注意機能を評価するために、空間ワーキングメモリ、ストループおよび数唱を実施した。空間ワーキングメモリは、コルシブロック課題にしたがって実施した<sup>99</sup>。ストループは色文字干渉のものを用いた<sup>100</sup>。Step 1として黒インクで記載された字呼称を実施した。Step 2として赤、青、黒で印刷されたドットの色名呼称を実施した。Step 3として色と文字の意味が異なる字列の字呼称を実施した。Step 4として色と文字の意味が異なる字列の色名呼称を実施した。それぞれの課題を完了するまでの時間を計測し、「Step 3の所要時間-Step 1の所要時間」および「Step 4の所要時間-Step 2の所要時間」をストループの成績とした。数唱は、標準注意検査法に従い検査者が読み上げた数系列(2桁から開始し9桁まで1桁ずつ増やしていく)を復唱させることによって評価した<sup>101</sup>。2回連続で間違えた時点で検査終了となり、最長到達桁数を数唱の成績とした。実行機能を評価するために、トレイルメイキングテストを実施した<sup>102</sup>。トレイルメイキングテストは、1-25の数字を線で結ぶPart Aと、ひらがなと数字を交互に結ぶPart Bを実施した。それぞれ課題を完了するまでの時間を計測し、Part B-Part Aをトレイルメイキングテストの成績とした。単語の記憶、物語の記憶を主要評価項目として、その他の項目を副次評価項目として設定した。

#### 4.3.5. 疲労感・気分状態・主観的認知機能の評価

神経心理テストによって生じる疲労感は、100 mmの視覚的評価スケール(VAS, visual analogue scale)および自覚症しらべを神経心理テストの前後に実施して評価した<sup>103,104</sup>。主観的気分状態は、POMS2 (Profile of Mood States 2<sup>nd</sup> edition short version)によって評価した<sup>105</sup>。主観的な認知機能は、日常記憶チェックリストおよび能動的注意制御尺度(VACS, Voluntary Attention Control Scale)によって評価した<sup>106,107</sup>。

#### 4.3.6. 統計解析

統計解析は、あらかじめプロトコルに定めた方法にしたがって行った。データは、平均値に標準偏差を付記した。統計解析には、IBM SPSS Statistics 23 (IBM)およびBellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd.)を用いた。日常記憶チェックリスト、自覚症しらべおよびVACS以外の評価項目は、群内の比較をpaired *t*-testで検定し、群間の比較をunpaired *t*-testで検定した。日常記憶チェックリスト、自覚症しらべおよ

び VACS は群内の比較を Wilcoxon signed-rank test で検定し、群間の比較を Mann-Whitney U test で検定した。P 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。

#### 4.3.7. 倫理審査およびプロトコルの事前登録

本研究は、ヘルシンキ宣言および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針にしたがって実施し、上野クリニックの倫理審査委員会（委員会番号：12000071）の承認を得て実施した。研究プロトコルは被験者募集の開始前に、大学病院医療情報ネットワーク（UMIN, University Hospital Medical Information Network）に登録した（登録番号：UMIN000029572）。

### 4.4. 結果

#### 4.4.1. 被験者

被験者のスクリーニング検査は 2017 年の 10 月から 12 月に実施し、介入は 2018 年 1 月から 4 月に実施した。227 例の候補者から 60 例の被験者を研究に組み入れ、全被験者が 12 週間の介入を完了した。3 例が除外基準にしたがって解析対象者から除外された（被験者日誌の紛失：1 例、生活様式の変化：2 例）。そのため、最終解析対象者は 57 例となった（Fig. 4-1）。解析対象者の検討は盲検下で行った。被験者の背景情報に群間で有意な偏りはなかった（Table 4-2）。また、研究食品の摂取率はプラセボ群と MHBA 群で有意な差はなく、重篤な有害事象および研究食品に起因する有害事象は生じなかった。

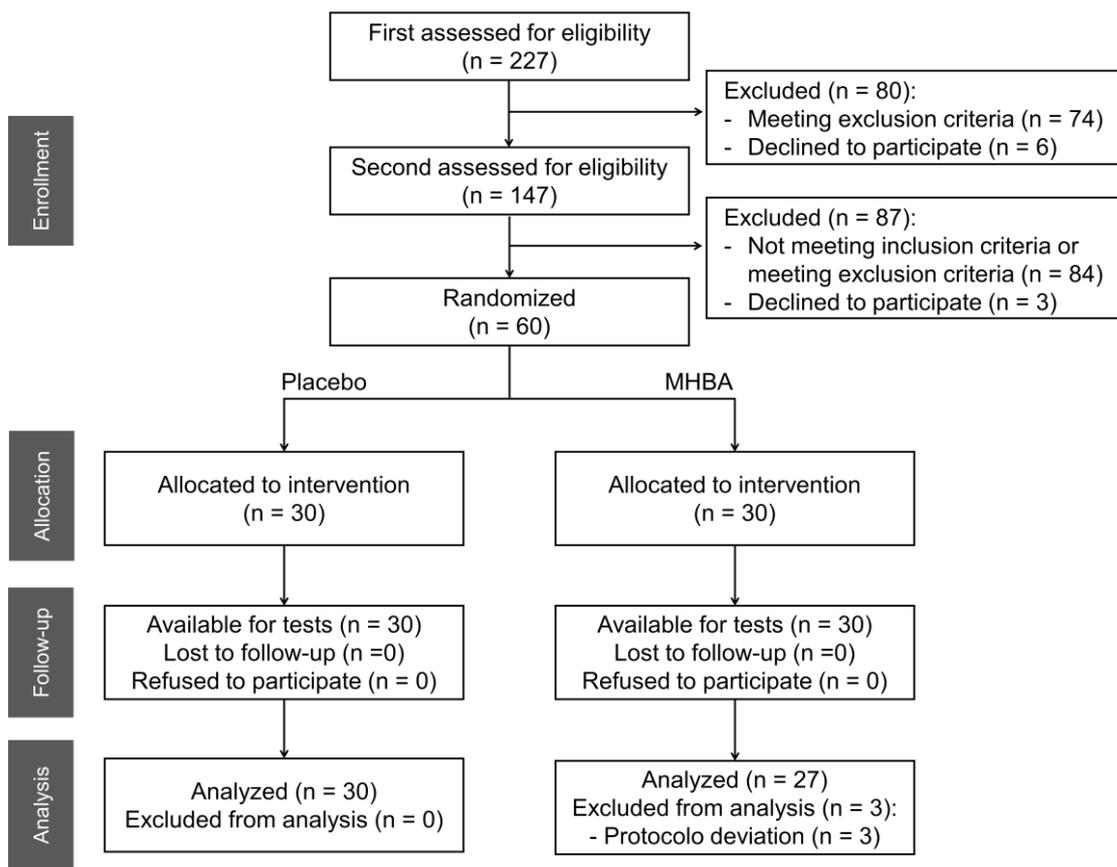
#### 4.4.2. 認知機能

神経心理テストによって評価した記憶機能、注意機能、実行機能の結果を Table 4-3 および 4-4 にまとめた。主要評価項目の単語の記憶および物語の記憶では、プラセボ群と MHBA 群の比較で有意な差は認められなかった。一方で、長期記憶からの検索機能および実行機能を評価する語流暢性のうち「野菜」の項目において、ベースラインから摂取開始 6 週目の変化量が MHBA 群でプラセボ群と比較して有意に改善した（Fig. 4-2）。また、注意機能を評価する項目のうち注意の制御機能を評価するストループ（Step 3-Step 1）の実測値が、摂取開始 12 週目にプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した（Table 4-4）。群内の比較では、物語の記憶において MHBA 群でベースラインと比較して摂取開始 6 週目に有意な改善を示した（Table 4-3）。一方で、プラセボ群では群内比較で有意差は確認されなかった。さらに、空間ワーキングメモリにおいて MHBA 群でベースラインと比較して摂取開始 12 週目に有意な改善を示した（Table 4-4）。一方で、プラセボ群では群内比較で有意差は確認されなかった。

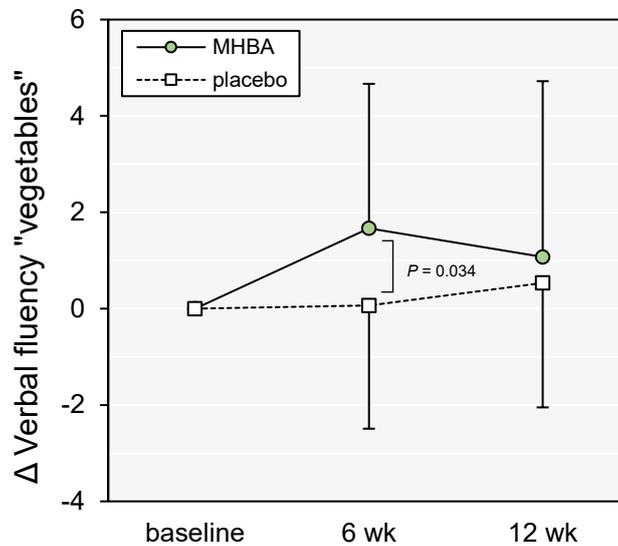
#### 4.4.3. 疲労感・気分状態・主観的認知機能

VAS によって評価した神経心理テスト実施前から実施後の疲労感の変化量のベースラインから摂取開始 12 週後の変化量が MHBA 群でプラセボ群と比較して有意に改善した (Fig. 4-3)。さらに、自覚症しらべの下位項目のうち「注意集中困難」の実測値が摂取開始 6 週目に MHBA 群でプラセボ群と比較して有意に低値 (改善) を示した (Table 4-5)。また、POMS2 によって評価した気分状態のうち、「緊張-不安」の実測値が摂取開始 12 週目にプラセボ群と比較して有意に改善した (Fig. 4-4)。さらに、「混乱-当惑」、「疲労-無気力」、「総合的気分状態」のスコアが摂取開始 6 週目に MHBA 群と比較してプラセボ群で改善傾向を示した (Fig. 4-5)。

また、主観的認知機能を評価する日常記憶チェックリスト (EMC, Everyday memory checklist) のスコアが摂取開始 6 週間後にプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した (Fig. 4-6)。VACS については群間の有意差は確認されなかった (Table 4-7)。

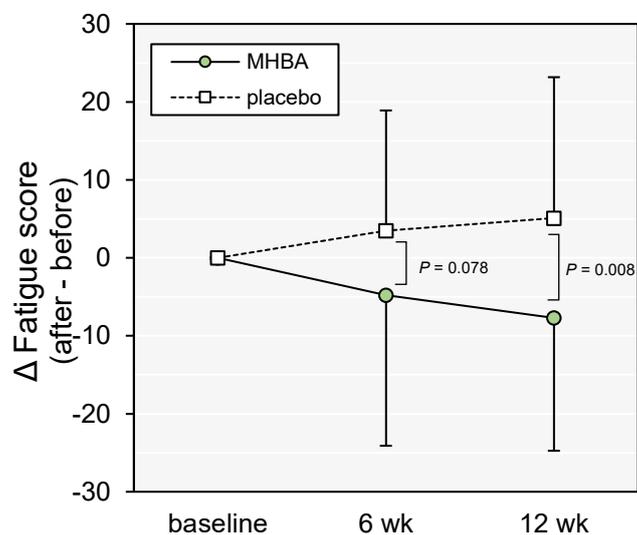


**Fig. 4-1 CONSORT ダイアグラム**  
MHBA, matured hop bitter acids.



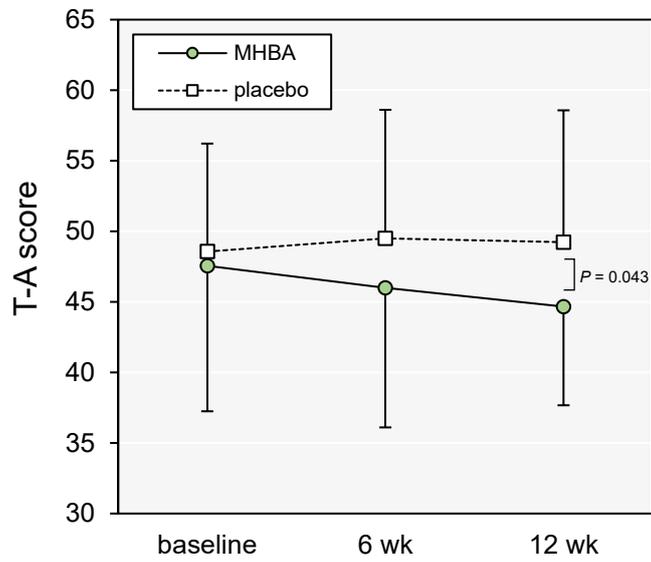
**Fig. 4-2 語流暢性「野菜」のベースラインからの変化量の平均値の比較**

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 27, placebo 群: N = 30. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids.



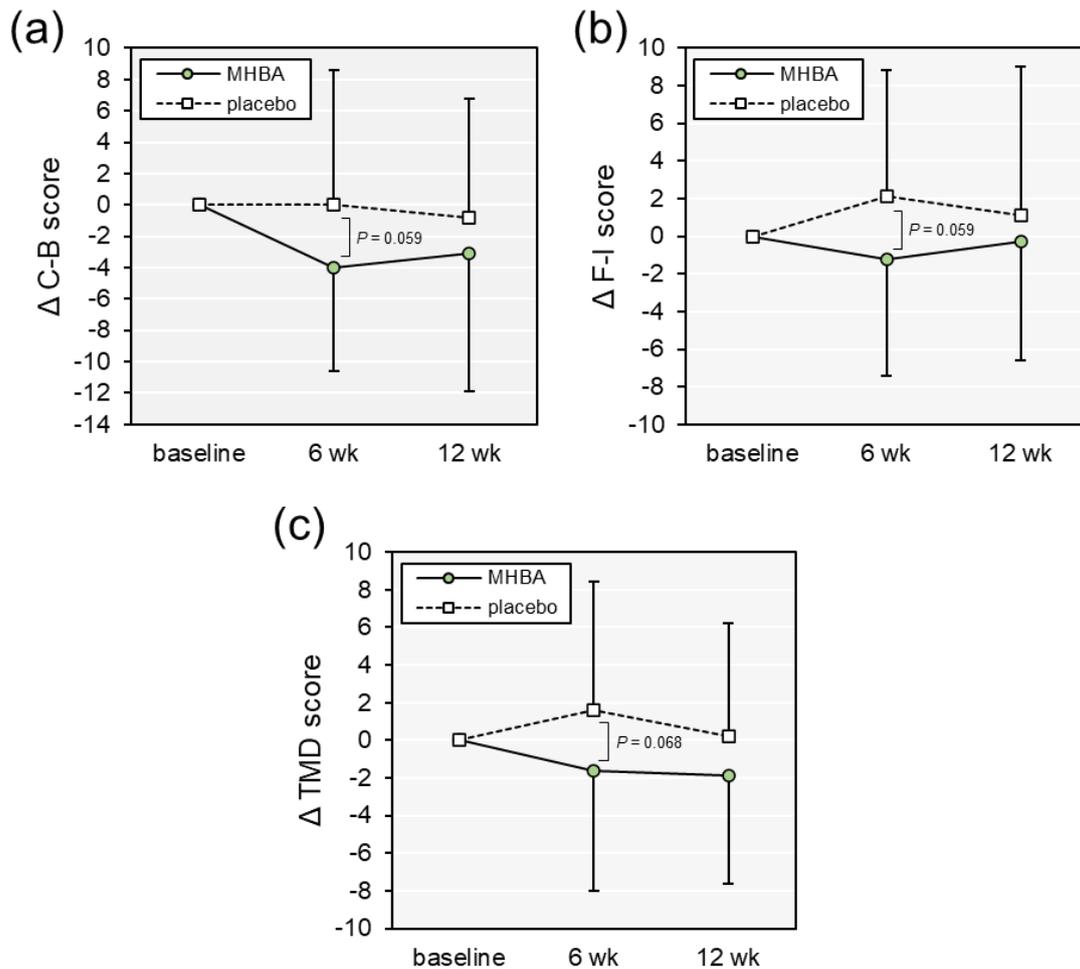
**Fig. 4-3 疲労感スコアのベースラインからの変化量の平均値の比較**

神経心理テスト前後の疲労感スコア (visual analogue scale による評価) のベースラインからの変化量の平均値を示す. 各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 27, placebo 群: N = 30. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids.



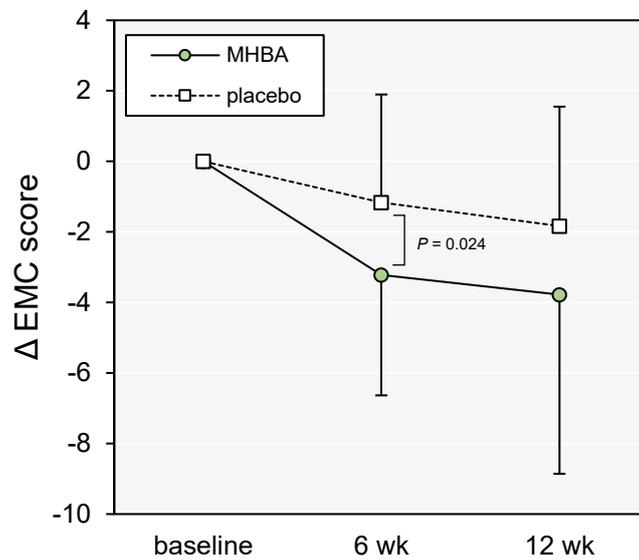
**Fig. 4-4 POMS2 によって評価される緊張-不安スコアの平均値の比較**

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 27, placebo 群: N = 30. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids; T-A score, 緊張-不安スコア.



**Fig. 4-5 POMS2 によって評価される「混乱-当惑」、「疲労-無気力」、「総合的気分状態」スコアのベースラインからの変化量の平均値の比較**

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す。(a) 混乱-当惑スコア。(b) 疲労-無気力スコア。(c) 総合的分状態スコア. MHBA 群: N = 27, placebo 群: N = 30. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids; C-B score, 混乱-当惑スコア; F-I score, 疲労-無気力スコア; TMD score, 総合的気分状態スコア.



**Fig. 4-6** EMCによって評価される物忘れの自覚のベースラインからの変化量の平均値の比較

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 27, placebo 群: N = 30. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. EMC, Everyday Memory Checklist; MHBA, matured hop bitter acids.

**Table 4-2** ベースラインにおける被験者背景

	placebo group (N = 30)	MHBA group (N = 27)	P-value (between groups)
age	55.4 (5.3)	54.6 (5.4)	0.55
male/female	14/16	13/14	1.00
HDS-R score	28.4 (1.5)	28.3 (1.7)	0.81
education year	14.7 (2.1)	14.5 (1.9)	0.64
employed/unemployed	26/4	23/4	0.87

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は age、HDS-R、education year については unpaired *t*-test によって行い、male/female、employed/unemployed については  $\chi^2$  test によって行った。HDS-R, revised Hasegawa dementia rating scale; MHBAs, matured hop bitter acids.

**Table 4-3** 記憶力のスコア

		placebo group (N = 30)			MHBA group (N = 27)			P-value (between groups)		
		baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12
words recall	immediate recall	4.5 (1.0)	4.7 (0.9)	4.9 (0.9)*	4.1 (1.0)	4.6 (0.8)*	4.9 (1.0)**	0.15	0.64	0.86
	5 min delayed recall	3.8 (0.9)	4.1 (1.5)	4.7 (1.2)**	3.7 (1.0)	4.2 (1.6)	4.6 (1.7)*	0.52	0.77	0.64
	20 min delayed recall	4.2 (1.0)	4.3 (1.4)	5.3 (1.3)**	4.0 (1.1)	4.6 (1.4)	5.0 (1.6)**	0.42	0.38	0.54
story recall	immediate recall	14.5 (3.2)	15.5 (3.3)	18.5 (2.9)**	14.7 (3.1)	16.1 (3.0)	18.6 (3.2)**	0.74	0.47	0.86
	20 min delayed recall	13.6 (3.0)	13.8 (3.7)	17.6 (2.7)**	13.6 (3.0)	15.2 (3.2)*	17.3 (3.0)**	0.98	0.14	0.78

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、ベースラインを対照とした群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。MHBAs, matured hop bitter acids.

**Table 4-4 実行機能および注意力のスコア**

		placebo group (N = 30)			MHBA group (N = 27)			<i>P</i> -value (between groups)		
		baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12
verbal fluency	vegetables	15.9 (3.7)	15.9 (3.1)	16.4 (3.4)	15.5 (3.5)	17.2 (3.8)**	16.6 (4.5)	0.72	0.18	0.86
	beginning with "a"	13.1 (4.0)	12.2 (3.6)	14.3 (4.3)	12.8 (3.6)	13.1 (4.1)	14.2 (5.3)	0.78	0.35	0.93
	animals	17.6 (3.5)	18.1 (4.5)	19.3 (4.1)*	18.3 (3.4)	19.5 (4.2)	20.0 (4.3)*	0.47	0.23	0.53
visual paired associates		14.2 (2.9)	15.6 (1.9)*	16.4 (1.3)**	13.4 (3.6)	14.9 (2.9)*	15.9 (2.3)**	0.35	0.32	0.33
spatial working memory		11.7 (1.9)	12.4 (2.1)	12.3 (1.9)	11.2 (1.6)	11.4 (2.0)	12.0 (1.8)*	0.35	0.064	0.54
Stroop	step 3 - step 1	0.7 (6.6)	1.2 (5.5)	3.6 (6.2)*	-2.3 (6.3)	-1.5 (5.6)	-0.3 (5.7)*	0.085	0.07	0.019
	step 4 - step 2	14.1 (8.6)	14.2 (9.1)	12.4 (7.5)	14.7 (11.5)	11.9 (7.2)	11.5 (7.7)	0.84	0.28	0.66
trail making test (B-A)		22.8 (14.0)	22.5 (18.3)	17.8 (18.6)	26.1 (15.2)	22.9 (23.8)	23.9 (16.4)	0.40	0.95	0.20
digit span		6.2 (1.1)	6.5 (1.1)*	6.5 (1.3)*	6.1 (1.2)	6.2 (1.49)	6.2 (1.3)	0.75	0.35	0.48

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、ベースラインを対照とした群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。MHBA, matured hop bitter acids.

**Table 4-5** 自覚症しらべのスコア

	placebo group (N = 30)			MHBA group (N = 27)			P-value (between groups)		
	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12
drowsiness	-0.4 (3.8)	0.2 (2.0)	0.3 (2.9)	0.4 (0.7)	0.0 (2.6)	0.0 (2.5)	0.025	0.51	0.57
instability	1.4 (2.7)	1.2 (2.5)	1.2 (2.6)	1.6 (2.7)	1.0 (3.1)	1.0 (2.6)	0.54	0.38	0.60
uneasiness	0.7 (2.5)	1.0 (2.3)	0.8 (2.4)	0.9 (1.8)	0.4 (2.3)	0.3 (1.8)*	0.29	0.14	0.28
local pain or dullness	-0.3 (1.4)	-0.1 (0.8)	0.0 (0.8)	-0.4 (1.8)	0.1 (1.4)	0.2 (1.6)	0.85	0.80	0.79
eyestrains	0.7 (3.2)	1.0 (1.8)	0.8 (2.8)	0.4 (2.5)	0.4 (1.7)	0.4 (2.3)	0.79	0.14	0.32
difficulties in attention and concentration	4.0 (6.5)	4.1 (5.1)	3.9 (5.2)	3.3 (5.4)	2.5 (5.3)	2.6 (4.9)	0.54	0.025	0.15
total	5.5 (16.6)	6.7 (10.7)	6.3 (13.8)	5.7 (10.6)	4.0 (13.9)	4.0 (12.7)	0.71	0.054	0.24

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を Mann-Whitney U test によって行い、ベースラインを対照とした群内比較を Wilcoxon signed-rank test によって行った。群内比較について\* $P < 0.05$  で示した。MHBA, matured hop bitter acids.

**Table 4-6 POMS2 のスコア**

	placebo group (N = 30)			MHBA group (N = 27)			P-value (between groups)		
	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12
anger-hostility	45.8 (8.4)	48.0 (9.4)	45.6 (6.4)	44.3 (6.2)	44.9 (8.0)	44.8 (6.5)	0.46	0.20	0.62
confusion-bewilderment	49.3 (7.4)	49.3 (9.1)	48.4 (8.3)	50.4 (10.8)	46.5 (8.9)**	47.3 (6.8)	0.63	0.25	0.59
depression-dejection	46.8 (5.2)	47.6 (10.0)	46.6 (6.0)	46.8 (5.8)	45.9 (7.9)	45.7 (4.9)	0.97	0.50	0.54
fatigue-inertia	43.9 (5.4)	45.9 (8.4)	44.9 (6.9)	46.0 (7.6)	44.8 (8.1)	45.7 (7.6)	0.22	0.60	0.70
vigor-activity	52.0 (8.6)	50.4 (9.9)	51.2 (9.8)	49.1 (11.9)	49.7 (10.9)	51.6 (12.4)	0.29	0.82	0.89
friendliness	52.9 (9.3)	51.1 (8.1)	49.9 (8.3)*	51.4 (10.6)	50.0 (8.6)	50.4 (10.2)	0.56	0.60	0.85
total mood disturbance	45.9 (6.3)	47.6 (9.4)	46.2 (7.1)	46.8 (8.4)	45.2 (9.2)	45.0 (7.0)	0.65	0.34	0.52

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。MHBAs, matured hop bitter acids; POMS2, Profile of Mood States 2nd Edition.

**Table 4-7 主観的認知機能のスコア**

	placebo group (N = 30)			MHBA group (N = 27)			P-value (between groups)		
	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12	baseline	week 6	week 12
EMC	12.7 (4.2)	11.5 (4.6)	10.9 (4.3)**	13.6 (5.0)	10.4 (4.8)**	9.8 (5.3)**	0.63	0.32	0.38
VACS	58.1 (13.3)	63.3 (12.4)**	62.9 (12.7)*	58.0 (13.3)	61.3 (11.1)	63.4 (11.3)*	0.82	0.57	0.83

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を Mann-Whitney U test によって行い、ベースラインを対照とした群内比較を Wilcoxon signed-rank test によって行った。群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。EMC, Everyday Memory Checklist; MHBAs, matured hop bitter acids; VACS, Voluntary Attention Control Scale.

#### 4.5. 考察

本研究では、MHBA がヒトの認知機能および気分状態に及ぼす影響を明らかにすることを目的にランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を行った。本研究により、MHBA (35 mg/日) を 6–12 週間摂取することによって語流暢性およびストループの成績が改善することが確認された。また、精神機能として、不安感、緊張感および精神的な疲労感に対する MHBA の有効性を見出した。

語流暢性は、長期記憶からの検索、条件への該当性の吟味および出力という一連の実行機能を評価する検査であり<sup>108</sup>、ストループは優勢反応に対する抑制機能を反映し、やはり実行機能に分類される認知機能を評価する指標として広く用いられる<sup>101</sup>。これらの神経心理テストに共通して有効性が認められたことから考察すると MHBA は複数の認知処理を伴う目的志向型の認知制御機能である実行機能に対して効果を発揮すると考えられる。限定的なエビデンスではあるが、VNS が語流暢性やストループの成績を改善することも報告されていることや、経皮的耳介 VNS が健常者の認知機能のうち実行機能を改善するというメタアナリシスの結果が報告されているため<sup>109</sup>、想定される作用メカニズムからも MHBA が実行機能に有効性を示したことは妥当である。

実行機能は、背外側前頭前野 (dlPFC, dorsolateral prefrontal cortex) や前帯状皮質 (ACC, anterior cingulate cortex) を中心とした中央実行機能ネットワーク (CEN, central executive network) の神経基盤に支えられていることから<sup>110</sup>、MHBA は迷走神経を介してこれらの脳領域を活性化した可能性が考えられる。機能的磁気共鳴画像法 (fMRI, functional magnetic resonance imaging) を用いたニューロイメージングによる検討で VNS がヒトの dlPFC の神経活動を活性化させることや<sup>112</sup>、単一光子放射断層撮影 (SPECT, Single photon emission computed tomography) により dlPFC の脳血流を増加させることも示されている<sup>113</sup>。一方で、CEN はワーキングメモリに対しても重要な働きを有しているが、本研究では MHBA の有効性は確認できなかった。また、海馬依存的な単語の記憶および物語の記憶に対する MHBA の有効性は確認されなかった。経皮的耳介 VNS のメタアナリシスにおいても記憶機能に対する有効性は確認されなかったことから<sup>109</sup>、MHBA の記憶機能への有効性は限定的である可能性がある。この点も含めて今後の研究で再現性を確認し、作用メカニズムや MHBA が作用する脳領域について考察を深める必要がある。

なお、語流暢性では摂取開始 6 週間後に改善効果が確認され、12 週間後には変化値、実測値ともに群間の有意差は確認されなかった。これは、語流暢性が方策を必要とする検査であるという特性上、プラセボ群において繰り返し測定による学習効果が生じたこと、および 1 分間で列挙することができる単語数には限界がある (天井効果) という二つの要因によるものであると考察される。

本研究では、認知機能に加えて MHBA が精神機能に及ぼす影響を質問紙によって評価した。その結果、POMS2 で評価される日常における不安感および緊張感が改善し、

また、神経心理テストという精神的な負荷によって生じる疲労感が改善することが明らかになった。不安の神経基盤としては、社会的敗北モデルマウスを用いた検討により、前頭前野腹内側部、帯状回後部、頭頂葉楔前部、下頭頂小葉からなるデフォルトモードネットワーク（DMN, default mode network）や、扁桃核、分界条床核、線条体といった神経核群が過剰に活性化することが報告されている。NE は上述の通り、CEN の神経活動を活性化することから DMN に対しては抑制的に作用する。動物を用いた近年の研究により、LC の NE 産生ニューロンを刺激すると、dlPFC の活性化と不安様行動の軽減が確認されており<sup>114</sup>、これは NE 産生ニューロンの刺激が DMN に対して抑制的に働いた結果であると考えられる。したがって、MHBA は認知機能の改善効果と同様に脳内の NE 増加を介し、DMN を抑制することで抗不安効果を発揮した可能性が考えられる。

精神的な疲労感は、脳の眼窩前頭野（OFC, orbitofrontal cortex）が過剰に活性化することによって生じることが報告されている<sup>115</sup>。OFC もまた、DMN に含まれる脳領域であることから、不安感の低減効果と同様のメカニズムにより疲労感が低減したと考察される。

POMS2 で評価した抑うつに対する有効性については、プラセボ群と比較して MHBA 群で平均値は低値（改善）を示したものの有意な改善効果は確認されなかった。この要因について、本研究では認知機能を評価することを主目的としていたため精神機能については比較的良好、すなわち改善する余地の少ない被験者も多く組み入れられていることが考えられる。この根拠として POMS2 の depression-dejection のスコアが標準値より高い被験者（50 点以上）に絞ってサブグループ解析をしたところ、ベースラインからの変化量が摂取開始 6 週目、12 週目においてプラセボ群と比較して MHBA 群で改善傾向を示した（それぞれ 6 週目： $P = 0.068$ 、12 週目： $P = 0.087$ （プラセボ群： $N = 10$ 、MHBA 群： $N = 6$ ）。したがって、MHBA の抑うつに対する有効性の有無を結論付けるためには抑うつの程度が高い集団を対象に検討を行う必要があると考えられる。

以上をまとめると、有効性が示された認知ドメインおよび精神機能から、MHBA は迷走神経を介して CEN に関わる脳領域を活性化することによりその有効性を発揮していると考察される。前頭葉を含む CEN の機能は加齢による影響を受けやすく、他の脳領域と比較して早期にその機能が低下することが報告されている<sup>116-118</sup>。認知症の前段階である MCI においても前頭葉機能の低下が生じ<sup>119</sup>、認知機能の低下のみならず精神機能へも影響することから<sup>120</sup>、認知症予防、BPSD のケアの観点からも前頭葉機能を維持向上することは重要である。したがって、本研究によって明らかになった MHBA の作用点は早期からの認知症予防に対して有効である可能性を示すものである。

本研究の限界として、認知機能と精神機能がそれぞれ神経心理テストと調査票による調査でのみ行われていることが挙げられる。非臨床研究および本研究から考察された、脳内の神経伝達物質や炎症性サイトカインを介する作用メカニズムを直接検証するに

は、血中マーカやポジトロン断層撮影法（PET, positron emission tomography）等の客観指標を用いて評価する必要がある。

本研究によって、MHBA を 6–12 週間摂取することで物忘れの自覚症状と有する健全な中高齢者の認知機能、そのなかでも CEN の神経基盤に支えられる実行機能が改善することが示唆された。さらに、精神機能のうち不安感、緊張感および疲労感が改善することが示され、認知機能改善効果と同様の作用メカニズムに支えられていると考察された。本研究により、ビールに含まれるホップ由来の苦味成分がヒトの脳機能を改善する可能性が初めて示された。

## 第5章

# MHBA が主観的認知機能低下を伴う中高齢者の認知機能およびストレスに及ぼす影響の検証 –ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験–

### 5.1. 要約

これまでに、MHBA が迷走神経の活性化を介して認知機能改善および脳内炎症によって誘導されたうつ様行動を改善することが動物を用いた検討で確認されている。さらに、健常な中高齢者を対象としたランダム化比較試験によって MHBA の 6–12 週間の摂取が CEN の神経基盤に支えられる高次な認知制御機能を改善することが示唆された。加えて、精神機能のうち不安感、緊張感および疲労感に対する有効性も示されている。しかしながら、ヒトを対象とした有効性の検討は十分ではない。そこで本研究では、MHBA による脳機能改善効果の再現性を確認するとともに、唾液および血中指標を評価することでその有効性を多面的にとらえることを目的とした。認知機能の低下を主観的に感じている 45–69 歳の男女 100 名を 50 名ずつ MHBA 群とプラセボ群に割り付け、12 週間研究食品を摂取させた。研究食品摂取開始前と 12 週目に、認知機能および精神機能の評価、唾液採取、採血を行った。その結果、MHBA 群の摂取開始 12 週間後に、注意の配分機能を反映する符号数字モダリティテスト (SDMT, Symbol Digit Modalities Test) の成績がプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に高値を示した。また、唾液中のストレス指標である  $\beta$ -エンドルフィン濃度がプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に低値を示した。さらに、 $\text{A}\beta$  と結合しシナプス毒性の抑制などに関与するトランスサイレチン (TTR, transthyrein) の血中濃度が摂取開始 12 週間後にプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に高値を示した。SDMT で評価される注意の分配機能には CEN が関与することから、本研究によっても MHBA が CEN を反映する認知機能を改善することの再現性が確認された。

### 5.2. 背景

認知症予防のためには早期の対策が重要であるとされている。近年の研究により、MCI よりさらに早期の段階においては、神経損傷や AD の病理の程度が軽度であるため、この段階から早期介入することにより認知機能障害の表出を遅らせることができる可能性が示されている<sup>121</sup>。この MCI の前段階は SCD と呼ばれ、認知症の鑑別に用いられる神経心理テストにおいて客観的に顕著な認知機能の低下は認められないものの、本人が認知機能の低下を自覚している状態のことを指す。2020 年までに行われた SCD に

関する縦断研究をまとめた包括的レビューによると、SCD は健常高齢者と比較して 2.15 倍 MCI に移行しやすく、2.17 倍認知症になりやすかったと報告されており<sup>122</sup>、SCD という段階を想定することが予防においても重要であることがわかる。SCD の評価尺度として、過去 2 年間の記憶、言語、実行機能に対する主観的な評価 (24 項目) を回答させる SCD 質問紙 (SCD-Q, SCD-Questionnaire) が開発されており<sup>123</sup>、日本語版も作成されている<sup>124</sup>。SCD を鑑別するための明確なカットオフ値は定められていないものの、SCD の程度を把握するために有用なツールとして広く研究に用いられている。また、SCD-Q では自身の認知機能について専門家に相談したいかどうかを問う項目があり、援助希求の有無によっても脳内の病態の進行が異なることが報告されている。

第 4 章のランダム化比較試験では、SCD-Q によるスクリーニングはしていないものの、物忘れの自覚を有する SCD を対象として、MHBA 摂取が語流暢性およびストループで評価される認知の制御機能を改善することを明らかにした。その一方で、第 4 章の研究では認知機能および精神機能はそれぞれ神経心理テストと調査票による評価に限られており、客観的バイオマーカーは評価していなかった。

そこで本研究では、認知症予防において重要な段階である SCD を SCD-Q によって選抜し、MHBA が認知機能および精神機能に及ぼす影響の再現性をランダム化プラセボ対照並行群間比較試験により検討した。さらに、より多面的にその有効性を明らかにするため、唾液中のストレスマーカーおよび血中の MCI マーカーを評価指標として検討した。

### 5.3. 研究方法

#### 5.3.1. 研究デザイン

研究デザインとして、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を採用した。目標被験者数は 100 例とし、被験者の募集は日本で行った。食品成分が認知機能に及ぼす影響を評価した先行研究を参考に症例数を設定した。被験者の 1 次スクリーニングでは、後述の選択基準に該当し、除外基準に抵触しないことを確認するための背景調査、ミニメンタルステート検査 (MMSE, Mini Mental State Examination)、血液検査、および尿検査を実施した。2 次スクリーニングでは認知機能検査、気分状態検査、唾液検査および血液検査を実施し、認知機能検査のスコアが低い者から優先的に研究に組み入れた。第三者機関 (スタットコム株式会社) でコンピュータプログラムを用いて 1:1 の例数比になるように無作為に 2 群に分けた後、MHBA 群またはプラセボ群へ割付を行った。割付者は、割付者は、適格性の判断、データ収集、データ解析、その他研究結果に影響を及ぼす事項には関わらなかった。また、アウトカムの評価者、解析者を含む研究スタッフはデータが固定されるまで割付を知らされなかった。研究に参加している間、被験者には研究参加前の生活様式を守り、認知機能に影響を及ぼす可能性があるサプリメント

トおよび医薬品は摂取しないように指導した。研究食品の摂取率は、介入 12 週目検査時に回収した残薬を数えることによって評価した。また、生活習慣は生活日誌を毎日記入させることによって聴取した。認知機能評価のための神経心理テストおよび気分状態の評価は、研究食品摂取開始前、12 週間後に実施した。被験者には、神経心理テスト開始 4 時間前から水以外の飲食はしないよう指導した。データ収集は DRC 評価センター（大阪）で行った。

### 5.3.2. 被験者

被験者の選択基準は (1) 45-69 歳である、(2) 第一言語が日本語である、(3) SCD-Q で一つでも“はい”と回答し SCD であると判断される、の全てに当てはまる者とした。除外基準は、(1) 試験に影響を及ぼすほどの難聴・弱視である、(2) MMSE 日本語版によって認知症が疑われる（スコア 24 点未満）、(3) 脳神経系疾患の既往歴がある、(4) ホルモン治療中である、(5) 生活習慣が不規則である（交代勤務など）、(6) ビール系飲料の飲用習慣がある、(7) 1 日あたり純アルコール 20 g 以上の飲酒習慣がある、(8) 喫煙習慣がある、(9) 過去 1 年以内に神経心理テストを受けたことがある、(10) 認知機能に影響を及ぼす医薬品を服用している、(11) 睡眠関連疾患の既往歴がある、(12) 3 か月以内に献血を行った、(13) 他の臨床研究に参加している、(14) 妊娠中または授乳中である、(15) 研究食品にアレルギーがある、(16) ドライマウスと診断されている、(17) 不整脈と診断されている、のうちいずれか一つでも当てはまる者とした。適格性の判断に必要な情報は、スクリーニング検査時に、質問紙および神経心理テストによって取得した。

### 5.3.3. 介入

研究食品は第 4 章の研究と同じものをキリンホールディングス株式会社が準備した。1 日あたりの摂取用量は、第 4 章で示した先行研究にしたがって設定した。研究食品の栄養組成は Table 5-1 に示した通りである。それぞれの研究食品は水またはぬるま湯とともに毎日 1 回 3 粒摂取させ、摂取のタイミングは定めなかった。研究食品は、日本の食品衛生基準を満たした環境で製造した。MHBA 含有カプセルとプラセボは外形、味によって見分けることができないことを第三者機関で確認した。

**Table 5-1 研究食品の栄養組成（1日摂取量当たり）**

	placebo capsule	MHBA capsule
MHBA (mg)	0	35
moisture (mg)	73	61
protein (g)	0.23	0.27
carbohydrate (g)	0.6	0.5
energy (kcal)	3.4	3.5
sodium (mg)	0.07	0.12

#### 5.3.4. 神経心理テストによる認知機能評価

神経心理テストは、テストの質を一定にするために訓練を受けた評価者が行った。注意機能を評価するために、標準注意検査法のうち SDMT、視覚性抹消検出、上中下検査、記憶更新検査を実施した<sup>101</sup>。SDMT は 1-9 の数字とそれに対応する記号を記載した対応表と記号のみを 110 個記載した回答表を同時に提示して、回答表に 90 秒間に正確にできるだけ早く対応する数字を記入させた。回答数と正解数を SDMT の成績とした。視覚性抹消検出は、ターゲット文字（「記号 1」、「記号 2」、「3」、「か」）と干渉文字がランダムに並んだ文字列をそれぞれ紙で提示し、正確にできるだけ早くターゲット文字に鉛筆で斜線を引かせた。完遂までの時間と正解率を視覚性抹消の成績とした。上中下検査は、「上」「中」「下」の文字を、上中下のランダムな位置に印刷した紙を提示し、文字に惑わされないように文字の印刷された位置を「上」「中」「下」のいずれかで正確にできるだけ早く呼称させた。完遂までの時間と正答率を上中下検査の成績とした。記憶更新検査では、検査者が数字列を音読し、最後の 3 桁または 4 桁を復唱させた。検査者が音読する数字列の桁数はランダムであり、被験者には伝えられなかった。正答率を記憶更新検査の成績とした。記憶機能を評価するために、標準言語性対連合学習検査（S-PA, Standard Verbal Paired-Associate Learning Test）<sup>125</sup>、レイ聴覚言語学習検査（RAVLT, Rey Auditory Verbal Learning Test）<sup>126</sup> および図形の記憶<sup>98</sup>を実施した。S-PA では、意味のつながりが無い単語の対を 10 組提示し、一方の単語を提示して、もう一方の単語を回答させた。同じ 10 組の単語対を 3 回提示し、正しく回答できた組数を S-PA の成績とした。RAVLT では、15 個の単語（リスト A）を提示し、即時で再生させ、これを 5 回繰り返した（T1-5）。正しく回答できた単語の個数を即時記憶の成績とした（0-75 点）。次に、リスト A とは異なる 15 個の単語（リスト B）を提示し即時で再生させた。その後、再度リスト A を即時（T6）、20 分後（T7）に再生させ、回答数をそれぞれ評価した。更に T7-T6 を忘却数の成績とした。図形の記憶は WMS-R にしたがって実施した。被験者に図形を提示して記銘させ、ダミーも含めた図形を再度複数種類提示し、記銘した図形を選択させた。正しく回答できた個数を図形の記憶の成績とした。

### 唾液中ストレス指標の評価

ストレスを客観的に評価するために、神経心理テストの前後に唾液を専用のチューブ（ザルスタット株式会社）を用いて回収した。唾液中の $\beta$ -エンドルフィン（ $\beta$ -Endorphine S-1134 S-1134kit, Peninsula Laboratories Inc.）、コルチゾール（Cortisol EIA Kit, Yanaihara Institute）、クロモグラニン A（Chromogranin A EIA Kit, Yanaihara Institute）、 $\alpha$ -アミラーゼ（ $\alpha$ Amylase Assay Kit, Salimetrics Inc.）はそれぞれ市販のキットを用いて定量した。

#### 5.3.5. ストレス、気分状態およびメタ記憶の評価

性格特性としての不安感を表す「特性不安」を、神経心理テストの前に State-Trait Anxiety Inventory (STAI) -FormX-2 を用いて評価した<sup>127</sup>。主観的な認知機能であるメタ記憶は「変化」「不安」「能力」「支配」「方略」「課題」の 6 因子に分けて成人メタ記憶尺度を用いて評価した<sup>128</sup>。さらに、その時感じている不安感を表す「状態不安」を、神経心理テストの前後に STAI-FormX-1 を用いて評価した。また、眠気を神経心理テストの前後にカロリンスカ眠気尺度を用いて評価した<sup>129</sup>。

#### 5.3.6. 血中指標の評価

血液は神経心理テスト実施後に採取した。血清中の MCI マーカーとして報告されている TTR (N- assay TIA preALB, ニットーボーメディカル株式会社)、アポリポタンパク質 A1 (N-assay TIA ApoA1, ニットーボーメディカル株式会社)、補体成分 3 (N-assay TIA C3-SH, ニットーボーメディカル株式会社) はそれぞれ市販のキットを用いて定量した<sup>130</sup>。作用メカニズムの深耕を目的として脳由来神経栄養因子の一種である脳由来神経栄養因子 (BDNF, brain-derived neurotrophic factor)、消化管ホルモンの一種である CCK を市販のキットを用いて定量した (BDNF, Human/Mouse BDNF DuoSet ELISA, R & D Systems, Inc.; CCK, Human/Mouse/Rat CCK Enzyme Immunoassay Kit, RayBiotech, Peachtree Corners)。

#### 5.3.7. サブグループ解析（事後解析）

SCD は自身の認知機能について医師等の専門家に対して援助希求がある集団 (SCD-C, SCD-Clinical) と援助希求が無いあるいは希薄な集団 (SCD-P, SCD-Population) に分けられ、SCD-P と比較して SCD-C の方が脳内の病態が進行していることが報告されている<sup>131</sup>。そこで、病態の違いが MHBA の効果に与える影響を探索的に評価するため、SCD-C と SCD-P に分けてサブグループ解析を実施した。SCD-Q のうち 1) 記憶や認知機能に対して困難を自覚しますか?、2) その困難について医師に相談したいですか?、3) 過去 2 年間で記憶力や認知機能に衰えを感じますか? という項目で、全ての項目が“はい”の被験者を SCD-C、1,3) が“はい”、2) が“いいえ”の被験者を SCD-P と判別して事後的にサブグループ解析を行った。

### 5.3.8. 統計解析

統計解析は、あらかじめプロトコルに定めた方法にしたがって行った。データは、平均値に標準偏差を付記した。統計解析には、IBM SPSS Statistics 23 (IBM) および BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いた。メタ記憶尺度、カロリンスカ眠気尺度および STAI 以外の評価項目は、群内の比較を paired *t*-test で検定し、群間の比較を unpaired *t*-test で検定した。メタ記憶尺度、カロリンスカ眠気尺度および STAI は群内の比較を Wilcoxon signed-rank test で検定し、群間の比較を Mann-Whitney U test で検定した。P 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。

### 5.3.9. 倫理審査およびプロトコルの事前登録

本研究は、ヘルシンキ宣言および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針にしたがって実施し、健昌会の倫理審査委員会（委員会番号：14000047）の承認を得て実施した。研究プロトコルは被験者募集の開始前に、UMIN に登録した（登録番号：UMIN000035601）。

## 5.4. 結果

### 5.4.1. 被験者

被験者のスクリーニング検査は 2019 年の 1 月から 4 月に実施し、介入は 2019 年 4 月から 7 月に実施した。286 例の候補者から 100 例の被験者を研究に組み入れ、99 例が 12 週間の介入を完了した（1 例は介入開始前に同意を撤回した）。1 例が除外基準にしたがって解析対象者から除外された（認知機能に影響を及ぼす医薬品の摂取：1 例）。そのため、最終解析対象者は 98 例となった（Fig. 5-1）。被験者の背景情報を Table 5-2 に示した。研究食品の摂取率はプラセボと MHBA 群で有意な差はなく、重篤な有害事象は生じなかった。

### 5.4.2. 認知機能（注意機能）

注意機能の評価結果を Table 5-3 に示した。摂取開始 12 週間後の SDMT のスコアがプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した（Fig. 5-2）。ベースラインとの群内比較では、視覚性抹消検出の達成までの時間と上中下検査の達成までの時間が両群において有意に改善した。

### 5.4.3. 認知機能（記憶機能）

記憶機能の評価結果を Table 5-4 に示した。群間の比較で有意差は確認されなかった。干渉による忘却数（T6-T5）は各群 1 例ずつ正しく評価できなかった可能性があるため解析から除外した。S-PA と RAVLT の total immediate memory が両群においてベースラ

インと比較して有意に改善した。

#### 5.4.4. 唾液中ストレス指標

一部の被験者ですべての指標の測定に必要な量の唾液を取得できなかったため各項目の解析対象者数は Table 5-5 に示す通りとなった。神経心理テスト実施後の $\beta$ -エンドルフィン濃度のベースラインからの 12 週目までの変化量が、プラセボ群と比較して MHBA 群で有意に低下した (Fig. 5-3a)。さらに、MHBA 群において神経心理テスト実施後のコルチゾール濃度および神経心理テスト実施前の $\alpha$ -アミラーゼ濃度がベースラインと比較して有意に低減した (Fig. 5-3b および Table 5-5)。一方で、プラセボ群において有意差は確認されなかった。

#### 5.4.5. 主観的認知機能 (メタ記憶尺度) および精神機能

メタ記憶尺度のうち「不安 (anxiety)」の項目のベースラインから摂取開始 12 週間後の変化量がプラセボ群と比較して MHBA 群で低下傾向であった (Fig. 5-4)。「課題 (task)」の項目では MHBA 群ではベースラインと比較して摂取開始 12 週間後に有意に高値であった (Table 5-6)。一方で、プラセボ群では群内の比較で有意差は確認されなかった。

#### 5.4.6. STAI およびカロリンスカ眠気尺度

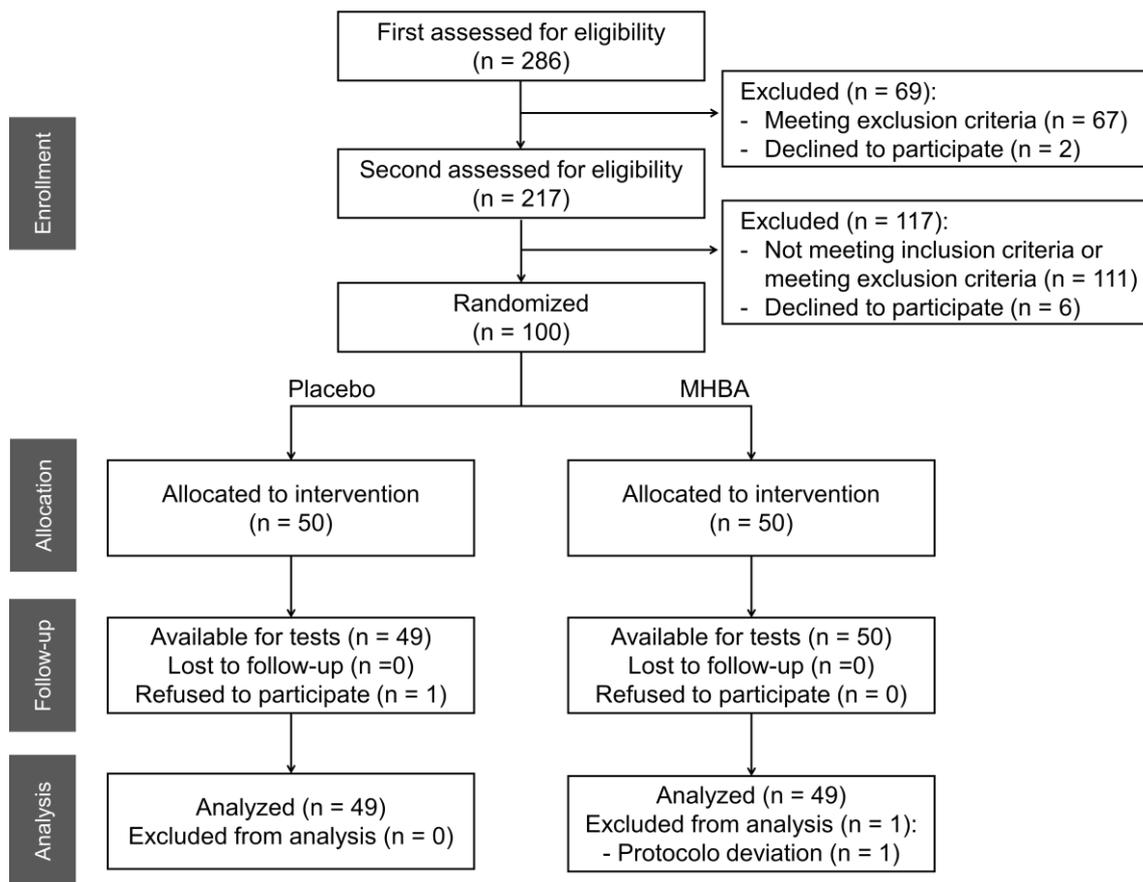
STAI およびカロリンスカ眠気尺度の結果を Table 5-7 に示した。STAI で評価される不安感のうち、特性不安のスコアが MHBA 群でベースラインと比較して摂取開始 12 週間後に有意に改善した。一方で、プラセボ群では有意な変化は確認されなかった。

#### 5.4.7. 血中指標

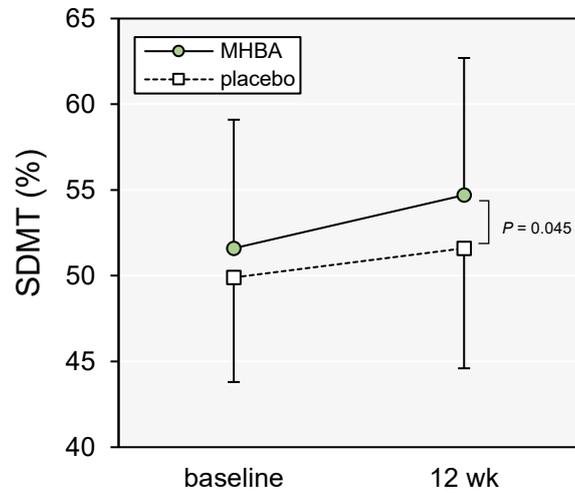
血中指標の結果を Table 5-8 に示した。TTR 濃度が摂取開始 12 週間後にプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に高値を示した (Fig. 5-5)。その他の項目については、群間の有意差は確認されなかった。

#### 5.4.8. SCD-Q によるサブグループ解析

SCD-Q による SCD-C と SCD-P の被験者背景を Table 5-9 に示した。援助希求が無い或いは希薄な SCD-P のサブグループでは、全体解析の結果と同様に SDMT のスコアがプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した (Fig. 5-6a)。さらに、S-PA のスコアのベースラインから摂取開始 12 週間後の変化量がプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した (Fig. 5-7b)。また、RAVLT の忘却数 (T7-T6) がプラセボ群と比較して MHBA 群で有意に改善した (Fig. 5-7c)。

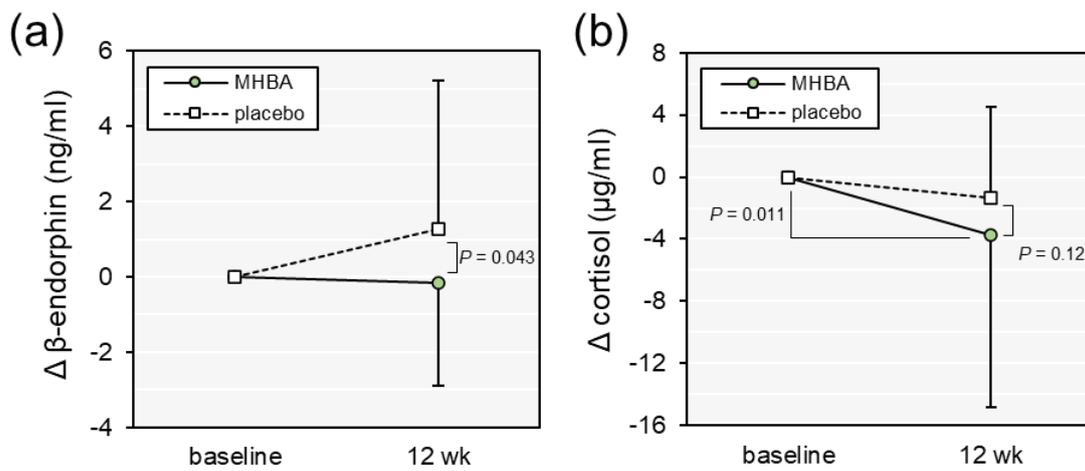


**Fig. 5-1 CONSORT ダイアグラム**  
 MHBA, Matured hop bitter acids



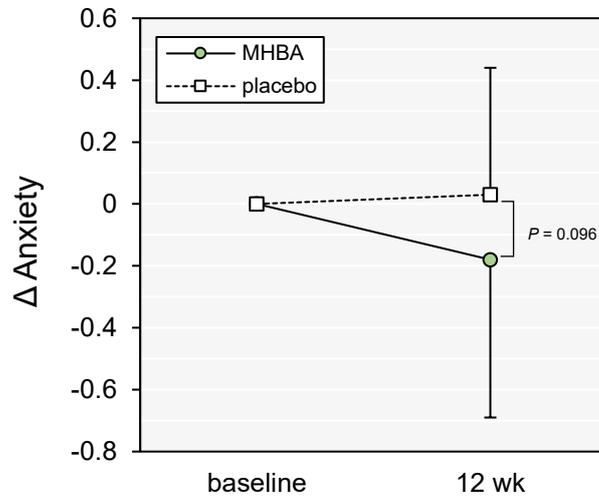
**Fig. 5-2 SDMT の平均値の比較**

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 49, placebo 群: N = 49. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids; SDMT, symbol digit modality test.



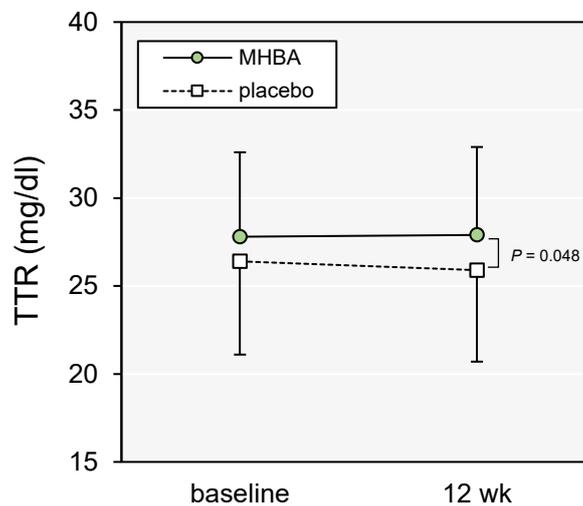
**Fig. 5-3 唾液中のストレス指標のベースラインからの変化量の平均値の比較**

神経心理テスト実施後の唾液中ストレス指標を評価した. (a) β-エンドルフィン濃度の平均値の比較. (b) コルチゾール濃度の平均値の比較. 各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 49, placebo 群: N = 46. 統計解析は群間の比較を unpaired *t*-test によって行い、群内の比較を paired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids



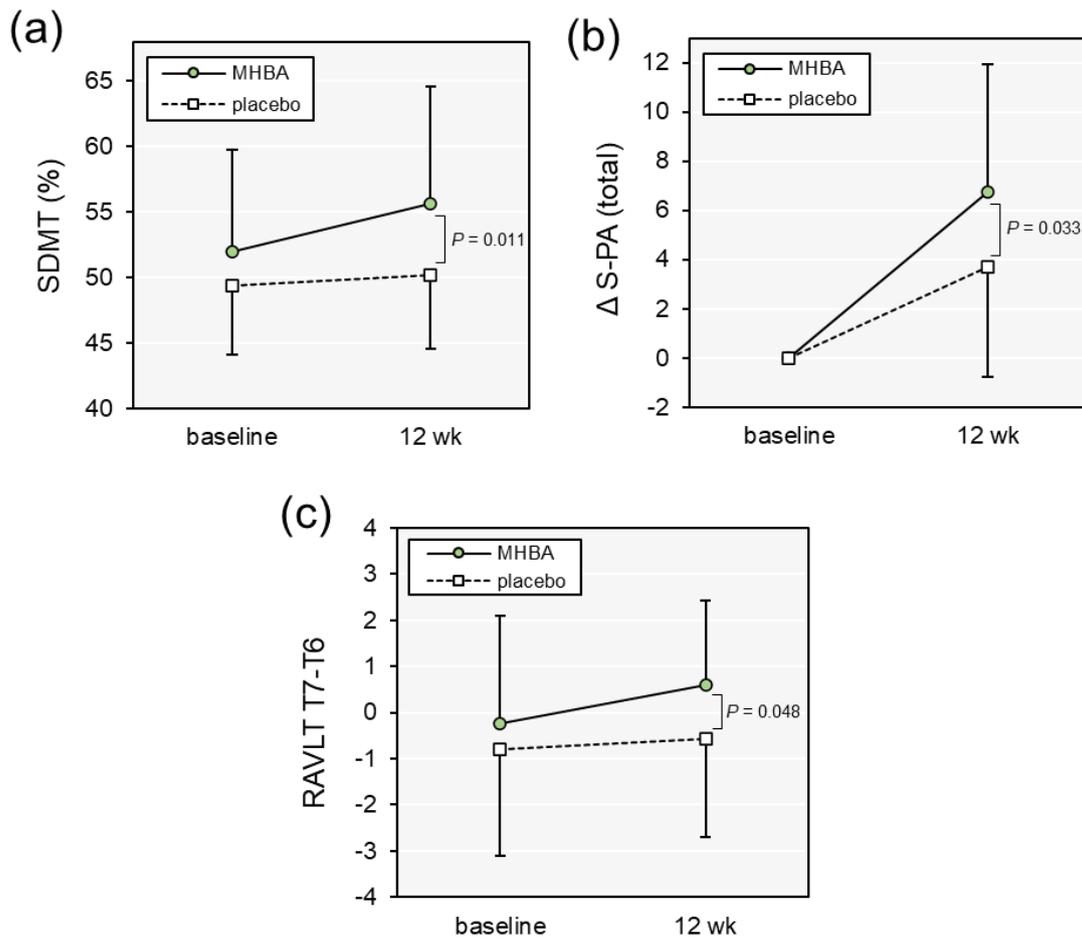
**Fig. 5-4** メタ記憶質問紙で評価される不安感スコアのベースラインからの変化量の平均値の比較

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 49, placebo 群: N = 49. 統計解析は群間の比較を Mann-Whitney U test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids



**Fig. 5-5** 血清中のトランスサイレチン濃度の平均値の比較

各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 49, placebo 群: N = 49. 統計解析は群間の比較を unpaired t-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids; TTR, transthyretin.



**Fig. 5-6 SCD-P の各認知機能に対する MHBA の有効性評価**

SCD-P を対象としたサブグループ解析結果を示す. (a) SDMT の平均値. (b) S-PA スコアのベースラインからの変化量の平均値. (c) RAVLT の忘却数の平均値. 各点とエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す. MHBA 群: N = 22, placebo 群: N = 28. 統計解析は群間の比較を unpaired *t*-test によって行った. MHBA, matured hop bitter acids; RAVLT, Rey Auditory Verbal Learning Test; SDMT, symbol digit modality test; S-PA, Standard Verbal Paired-Associate Learning Test.

**Table 5-2** ベースラインにおける被験者背景情報

	placebo group (N = 49)	MHBA group (N = 49)	<i>P</i> -value (between groups)
age	53.3 (4.9)	54.6 (6.3)	0.25
male/female	21/28	20/29	1.00
MMSE (/30)	28.5 (1.2)	28.3 (1.2)	0.55
SCD-Q a) (YES/NO)	46/3	40/9	0.12
SCD-Q b) (YES/NO)	18/31	16/33	0.83
SCD-Q c) (YES/NO)	48/1	44/5	0.21
employed/unemployed	39/10	40/9	1.00

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は age、MMSE については unpaired *t*-test によって行い、male/female、SCD-Q、employed/unemployed については  $\chi^2$  test によって行った。MMSE, mini mental state examination; MHBAs, matured hop bitter acids; SCD-Q, subjective cognitive decline questionnaire.

**Table 5-3 実行機能および注意力のスコア**

	placebo group (N = 49)		MHBA group (N = 49)		<i>P</i> -value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
SDMT (achievement rate [%])	49.9 (6.1)	51.6 (7.0)*	51.6 (7.5)	54.7 (8.0)**	0.23	0.045
visual cancelation [sec]						
sign 1	55.9 (12.5)	48.8 (8.4)**	57.7 (14.4)	48.1 (6.9)**	0.51	0.67
sign 2	60.6 (12.4)	53.3 (10.1)**	61.1 (10.4)	52.1 (8.2)**	0.83	0.53
number "3"	94.6 (15.7)	86.0 (12.8)**	94.2 (15.7)	84.0 (12.9)**	0.91	0.43
Japanese "ka"	113.0 (16.6)	104.0 (15.0)**	113.1 (17.4)	102.6 (16.6)**	0.97	0.65
position response test [sec]						
1st	75.2 (14.6)	68.5 (10.8)**	76.9 (14.1)	67.7 (9.8)**	0.56	0.70
2nd	71.0 (19.7)	65.3 (11.0)**	71.1 (14.1)	65.1 (10.1)**	0.99	0.91
memory updating (achievement rate [%])						
3 span	83.7 (15.7)	85.8 (14.1)	81.1 (13.2)	84.3 (13.9)	0.39	0.59
4 span	68.4 (21.9)	70.9 (21.0)	65.7 (21.0)	68.8 (19.0)	0.54	0.59

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について\**P*< 0.05, \*\**P*< 0.01 で示した。MHBA, matured hop bitter acids; SDMT, symbol digit modality test.

**Table 5-4 記憶力のスコア**

	placebo group (N = 49)		MHBA group (N = 49)		P-value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
S-PA	12.0 (6.6)	16.5 (7.2)**	10.7 (6.5)	15.2 (8.4)**	0.33	0.43
RAVLT						
TIM	42.0 (7.9)	46.1 (8.6)**	40.0 (11.0)	42.6 (11.0)**	0.30	0.084
T6-T5	-2.3 (2.4)	-1.4 (1.9)*	-2.5 (2.0)	-1.9 (2.3)	0.55	0.24
T7-T6	-0.2 (2.1)	-0.6 (1.9)	-0.4 (2.1)	-0.2 (2.2)	0.63	0.28
WMS-R figural memory	7.0 (1.6)	7.4 (1.2)	7.1 (1.5)	7.4 (1.5)	0.90	0.94

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。MHBA, matured hop bitter acids; RAVLT, Rey Auditory Verbal Learning Test; SDMT, Symbol digit modality test; S-PA, Standard Verbal Paired-Associate Learning Test; TIM, total immediate memory.

**Table 5-5 唾液中ストレス指標**

	placebo group		MHBA group		<i>P</i> -value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
cortisol [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
before tests	19.3 (9.6)	19.2 (10.1)	16.7 (6.8)	17.7 (6.6)	0.14	0.40
after tests	17.9 (7.6)	16.6 (8.1)	18.6 (15.9)	14.8 (7.6)*	0.80	0.26
chromogranin A [pmol/ml]						
before tests	14.7 (16.2)	19.3 (24.5)	14.2 (12.1)	13.9 (13.8)	0.86	0.18
after tests	13.1 (15.7)	19.4 (19.0)**	10.7 (13.0)	16.8 (23.6)*	0.42	0.55
$\alpha$ -amylase [U/ $\mu\text{l}$ ]						
before tests	0.26 (0.36)	0.21 (0.20)	0.23 (0.17)	0.20 (0.13)*	0.63	0.58
after tests	0.29 (0.30)	0.26 (0.27)	0.27 (0.20)	0.23 (0.16)	0.64	0.49
$\beta$ -endorphin [ng/ml]						
before tests	4.0 (6.8)	3.7 (3.6)	3.5 (4.8)	3.5 (5.1)	0.68	0.84
after tests	3.1 (3.1)	4.4 (4.2)*	3.4 (3.4)	3.3 (2.4)	0.65	0.11

各値は平均値（標準偏差）を表す. MHBA 群：N = 49、placebo 群：N = 49（cortisol は week 12 の before tests は placebo 群：N = 47、chromogranin A、 $\alpha$ -amylase は week 12 の before tests は placebo 群：N = 48、 $\beta$ -endorphin は baseline、week 12 の after tests は placebo 群：N = 48、before tests は placebo 群：N = 46）. 統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、群内比較を paired *t*-test によって行った. 群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した. MHBA, matured hop bitter acids.

**Table 5-6** メタ記憶質問紙のスコア

	placebo group (N = 49)		MHBA group (N = 49)		<i>P</i> -value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
Change	1.8 (0.4)	1.9 (0.5)	1.9 (0.6)	2.0 (0.7)	0.54	0.68
Task	4.0 (0.5)	4.1 (0.6)	3.9 (0.5)	4.1 (0.5)**	0.52	0.66
Capacity	2.3 (0.4)	2.5 (0.5)*	2.4 (0.6)	2.6 (0.6)**	0.48	0.72
Anxiety	3.6 (0.7)	3.7 (0.6)	3.6 (0.8)	3.4 (0.8)	0.89	0.073
Strategy	2.8 (0.8)	2.9 (0.8)	2.6 (0.5)	2.8 (0.7)	0.29	0.54
Locus	3.0 (0.6)	3.1 (0.5)	3.2 (0.5)	3.2 (0.5)	0.23	0.51

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を Mann-Whitney U test によって行い、群内比較を Wilcoxon signed-rank test によって行った。群内比較について\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  で示した。MHBA, matured hop bitter acids.

Table 5-7 STAI およびカロリンスカ眠気尺度のスコア

	placebo group (N = 49)		MHBA group (N = 49)		<i>P</i> -value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
STAI-Form X						
Trait	44.0 (9.0)	43.0 (9.4)	43.9 (10.0)	42.3 (8.8)*	0.97	0.93
State (before tests)	42.0 (6.8)	42.1 (6.9)	42.1 (7.8)	41.7 (7.0)	0.79	0.72
State (after tests)	44.0 (9.2)	40.6 (6.3)**	44.0 (10.2)	40.9 (8.4)**	0.93	0.70
KSS-J						
before tests	2.6 (1.2)	2.9 (1.5)	3.3 (1.5)	3.2 (1.5)	0.056	0.24
after tests	3.2 (1.7)	3.0 (1.7)	3.7 (2.2)	3.2 (1.6)*	0.44	0.49

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を Mann-Whitney U test によって行い、群内比較を Wilcoxon signed-rank test によって行った。群内比較について\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  で示した。KSS-J, Japanese version of Karolinska sleepiness scale; MHBA, matured hop bitter acids; STAI, State-Trait Anxiety Inventory.

**Table 5-8 血清中指標**

	placebo group (N = 49)		MHBA group (N = 49)		<i>P</i> -value (between groups)	
	baseline	week 12	baseline	week 12	baseline	week 12
BDNF [ng/ml]	44.7 (10.8)	43.9 (10.1)	48.4 (12.8)	46.9 (10.5)	0.13	0.15
C3 [mg/dl]	101.7 (15.4)	100.0 (15.3)	100.5 (16.8)	98.8 (16.4)	0.71	0.70
TTR [mg/dl]	26.4 (5.3)	25.9 (5.2)	27.8 (4.8)	27.9 (5.0)	0.18	0.048
ApoA1 [mg/dl]	157.4 (21.0)	151.7 (20.7)**	154.0 (20.1)	150.0 (20.9)	0.42	0.68
CCK [pg/ml]	661.2 (266.7)	602.0 (223.3)*	732.1 (236.1)	664.2 (200.8)*	0.17	0.15

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は群間比較を unpaired *t*-test によって行い、群内比較を paired *t*-test によって行った。群内比較について\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 で示した。ApoA1, apolipoprotein AI; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CCK, cholecystokinin; C3, complement component 3; MHBA, matured hop bitter acids; TTR, transthyretin.

**Table 5-9 SCD-P および SCD-C のベースラインにおける背景情報**

	SCD-P (N = 50)			SCD-C (N = 33)		
	placebo (N = 28)	MHBA (N = 22)	<i>P</i> -value	placebo (N = 17)	MHBA (N = 16)	<i>P</i> -value
age	53.7 (5.5)	53.5 (5.8)	0.92	52.9 (4.4)	55.0 (5.0)	0.22
male/female	17/11	8/14	0.15	3/13	7/10	0.31
MMSE score (/30)	28.5 (1.1)	28.3 (1.1)	0.58	28.6 (2.0)	28.3 (1.5)	0.56
SCD-Q score (/24)	14.4 (3.9)	13.4 (4.2)	0.38	17.6 (4.5)	20.4 (3.2)	0.051
employed/unemployed	23/5	18/4	1.00	13/3	13/4	1.00

各値は平均値（標準偏差）を表す。統計解析は age、MMSE、SCD-Q score については unpaired *t*-test によって行い、male/female、employed/unemployed については  $\chi^2$  test によって行った。MMSE, mini mental state examination; MHBAs, matured hop bitter acids; SCD-C, subjective cognitive decline clinical; SCD-P, subjective cognitive decline population; SCD-Q, subjective cognitive decline questionnaire.

## 5.5. 考察

健康加齢から認知機能が低下し、認知症へ移行する可能性を持つ段階として、MCI および SCD が想定されており、早期の対策は認知症予防に重要である。特に、SCD では神経細胞の損傷や AD 病理が比較的軽度であることから、この段階から対策することで高い認知症予防効果が期待される。本研究では、SCD-Q によってスクリーニングした SCD を対象として 12 週間の MHBA 摂取が認知機能および精神機能に及ぼす影響を検討した。その結果、認知機能については SDMT の成績が MHBA 群でプラセボ群と比較して有意に改善した。SDMT は標準注意検査法のほか、世界的に広く用いられる神経心理学的バッテリーであるアーバンス神経心理検査やウエクスラー知能検査 III でも採用されている評価手法であり<sup>98,132</sup>、注意による制御機能のうち分配性注意機能やワーキングメモリ、情報処理機能を含む CEN の神経基盤に支えられる機能を反映しているとされる<sup>101</sup>。第 4 章に示した研究では、MHBA 摂取によって語流暢性とストループの成績が向上することが確認されており、それぞれ、長期記憶からの検索機能から出力過程の実行機能と、注意による制御機能の一部である葛藤条件下における抑制機能を反映している。先行研究と本研究結果を併せて考察すると、MHBA は認知機能の中でも比較的高次の CEN に支えられる認知の制御機能に対して効果を有すると考えられる。一方で、ワーキングメモリの負荷が高い記憶更新検査では有効性が確認されなかった。要因として、標準注意検査法が脳損傷例にみられる注意の障害を検出・評価することを目的に作成されているため、記憶更新検査の難易度が本研究の対象者に対する有効性評価に適切ではなかった可能性がある。ワーキングメモリに対する有効性についてはより詳細な検討が必要である。また、先行研究と同様に海馬依存的な記憶機能を評価する S-PA や RAVLT では、MHBA の有効性は確認できなかった。

本研究では、唾液中のストレス指標を評価した。認知機能検査後におけるβ-エンドルフィン濃度のベースラインからの変化量が、MHBA 群でプラセボと比較して 12 週目に有意に改善した。また、MHBA 群では、認知機能検査後のコルチゾール濃度がベースラインと比較して有意に低下したが、プラセボ群では有意な変化は確認されなかった。β-エンドルフィンもコルチゾールも視床下部・下垂体・副腎（HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal）系を介した内分泌反応を反映していることから<sup>133,134</sup>、MHBA の摂取は HPA 系の恒常性を改善した可能性がある。限定的なエビデンスではあるが、うつ病患者への VNS 療法が HPA 系の恒常性を改善することが報告されている<sup>135</sup>。また、最近の研究により MHBA が社会的敗北マウスの海馬および mPFC のドーパミン代謝を向上させることによりストレス耐性を高めることが報告されていることから<sup>91</sup>、NE 以外の神経伝達物質が関与している可能性も想定され、さらなる検討が必要である。

メタ記憶尺度の下位項目の「不安」のスコアのベースラインからの変化量がプラセボ群と比較して MHBA 群で改善傾向を示した。一方で、STAI で評価される不安では MHBA

による介入の効果は確認されなかった。メタ記憶尺度で評価される不安は、日常的な記憶行動に伴う不安状態についての認識を評価する尺度である<sup>128</sup>。一方で、STAIでは性格傾向としての不安を表す特性不安、およびその時感じている不安を表す状態不安を評価する尺度であり、それぞれ異なる不安を評価するものである。第4章の研究では、POMS2で評価される日常の「不安感」がMHBA摂取によって改善することが示されていることと合わせて考察すると、MHBAは一過性の心的状態（情動, emotion）としての不安ではなく、長時間持続する心的状態（気分, mood）に対して有効であると考察される。

さらに、MCIのマーカの一つとしての報告されている血清中のTTR濃度がプラセボ群と比較してMHBA群で有意に12週間目に高値を示した。TTRはA $\beta$ と結合してシナプス毒性の抑制などに関与することが報告されており、加齢とともに減少することが知られている<sup>136</sup>。ADモデルマウスを用いた著者らの先行研究では、MHBAと共通の $\beta$ トリカルボニル構造を有するイソ $\alpha$ 酸を摂取することにより、ADの病態の進行に伴って減少する海馬の*Ttr*遺伝子の発現が維持されることが確認されている。さらに、野生型マウスにイソ $\alpha$ 酸を投与すると*Ttr*の発現が上昇することが確認されていることから、イソ $\alpha$ 酸はTTRの維持に寄与すると考えられる。イソ $\alpha$ 酸が*Ttr*遺伝子の発現を上昇させるメカニズムは十分に検討されていないが、イソ $\alpha$ 酸とMHBAで同様の効果が確認されたことから、 $\beta$ トリカルボニル構造が活性に寄与している可能性が考えられる。

本研究では、SCD-Qを用いて被験者を選抜したため、先行研究と比較してより詳細にSCDの特性を分類して評価することが可能であった。SCDの分類方法として、コミュニティベースの集団から抽出したSCD（SCD-P, SCD-population）と、クリニックに通院している集団から抽出したSCD（SCD-C, SCD-clinical）とではその特性が異なることが報告されている<sup>131</sup>。コミュニティベースの集団から抽出した医者に対する援助希求を有さないSCDはSCD-Pと分類され、援助希求を有するSCDはSCD-Cとして分類される。既報では、SCD-Cと比較してSCD-Pの方が、AD病理の進行が軽度であることが報告されている。SCD-CとSCD-Pに分類したサブグループ解析の結果、SCD-PにおいてSDMTに加えて、海馬依存的記憶機能であるS-PA、RAVLTの忘却数のスコアがMHBA群でプラセボ群と比較して有意に改善することが明らかになった。この結果は病理変化が軽度な段階に対するMHBAの介入がより有効であることを示唆する。今後は、fMRIによる画像検査も併せて実施することによって、より効果的な介入タイミングについて研究を深める必要がある。

本研究の限界として介入期間が12週間と短期間であったため、認知症の予防効果については検証できていない点が挙げられる。今後はより長期的な介入研究を実施することによってMHBAの認知症予防効果を検証する必要がある。

本研究の結論として、12週間のMHBA摂取によって、SCDのCEN依存的な認知機

能の一部が改善し、精神的側面として不安感が低減する可能性が示された。これらの結果は、健常な中高齢者を対象とした第4章の研究結果と一貫している。また、新たな知見として HPA 系を介したストレス抵抗性を改善する可能性が示された。

## 第 6 章

### 総括

急速に進行する高齢化に伴い、加齢によって生じる疾病に対する対策が急務である。特に認知症および BPSD はその根本的な治療方法が確立されていないため、対策として一次予防が重要である。近年の研究により、生活習慣を改善することが認知症の一次予防に有効であるというエビデンスが蓄積されており、なかでも、食習慣は毎日の生活と密接に関わっていることから、効果的な食様式や特定の食品由来成分に関する研究が盛んに行われている。

本研究では、食品由来成分のなかでも、ホップ由来の苦味成分である MHBA に着目し認知機能および精神機能に及ぼす影響を基礎および臨床の両面から検討した。その結果、MHBA が有する認知機能および精神機能の改善効果とその作用メカニズムを明らかにし、脳機能低下の予防に資する食品由来素材としての可能性を見出した。以下に一連の研究で得られた知見とその意義についてまとめ、最後に今後の社会実装に向けた展望について触れたい。

AD モデルマウスを用いた先行研究により、ビールに含まれるホップ由来の主要な苦味成分であるイソ $\alpha$ 酸が、脳内の A $\beta$  の沈着抑制および病態の進行によって低下する認知機能の維持効果を有することが明らかにされていた<sup>33</sup>。しかしながら、イソ $\alpha$ 酸は非常に苦味が強く、ビール以外の様々な食品への応用や嗜好性に課題があった。そこで、ホップを加熱酸化させることによりイソ $\alpha$ 酸と共通の $\beta$ トリカルボニル構造を有しながらも苦味を低減させた MHBA を開発し、イソ $\alpha$ 酸と同様に認知機能改善効果を有するか検討することとした。綾部らの先行研究によって、MHBA が迷走神経を活性化することにより、脳内の NE を増加させることでマウスの空間ワーキングメモリおよび物体認識に関わる記憶学習機能を改善することが明らかにされた<sup>34</sup>。しかしながら、 $\beta$ -AR の阻害剤を用いた検討により、NE を介さないメカニズムも存在する可能性が示唆されていた。そこで第 2 章の研究では、AChR に着目して MHBA の作用メカニズムの深耕を試みた。AChR の阻害剤を用いた検討の結果、MHBA の記憶機能の改善効果には、AChR のなかでも $\alpha 7n$ AChR が関与することが示された。 $\alpha 7n$ AChR は神経保護作用、A $\beta$  産生抑制作用、ミクログリアを介した抗炎症作用などに関与し、脳内の環境維持に重要な役割を担っている。本研究により、MHBA の認知機能改善効果に対する $\alpha 7n$ AChR の関与を明らかにし、脳健康維持・改善に対する MHBA の活用拡大に資する知見を得た。

第 3 章では、脳室内に LPS を投与した脳内炎症モデルマウスを用い、うつ様行動に対する MHBA の有効性を評価した。その結果、MHBA はうつ様行動の指標である TST の不動時間を改善することが示された。また、因果関係についてはさらなる検討が必要

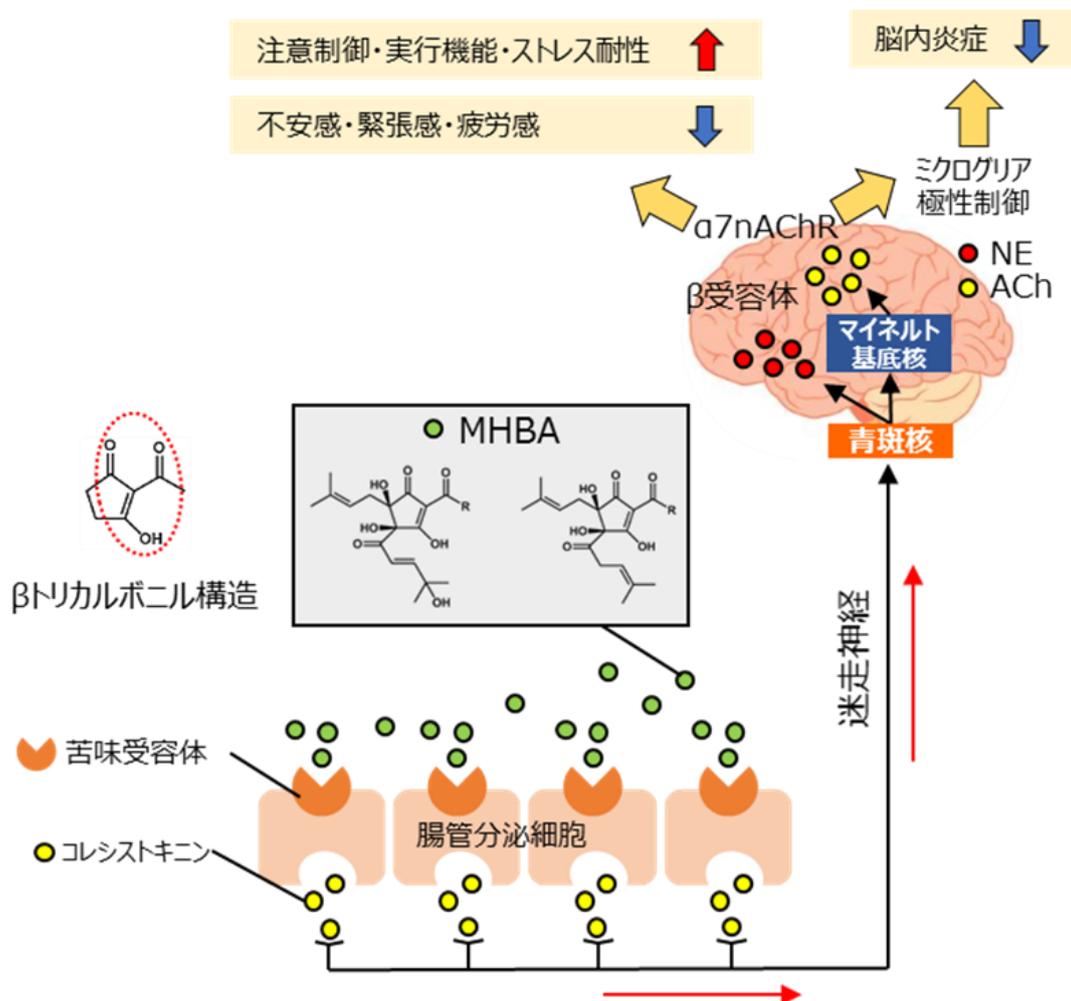
だが、その作用メカニズムとして海馬の NE を増加させることおよび脳内炎症を抑制することが示唆された。脳内炎症はうつ病のほか、認知症をはじめとする神経変性疾患に共通する発症メカニズムとして知られており、治療や予防のターゲットとして近年注目されている。MHBA が脳内炎症を抑制することを明らかにしたことで、様々な神経変性疾患の予防・治療への活用可能性の拡大に資する知見を得た。

第 4 章および第 5 章の研究では、ヒトを対象として MHBA の有効性を検討した。第 4 章では、認知症予防において重要な段階とされる物忘れの自覚症状を有する 45–64 歳の SCD を対象としてプラセボ対照の MHBA (35 mg/日) による 12 週間の介入を行った。その結果、CEN の神経基盤に支えられる認知の制御機能を反映する語流暢性およびストループ試験の成績が改善すること、および精神機能のうち不安感、緊張感および疲労感が改善することが確認された。第 5 章では、SCD-Q によって選抜した SCD を対象として、同様にプラセボ対照の MHBA (35 mg/日) による 12 週間の介入研究を行った。その結果、やはり CEN を反映する SDMT の成績が改善することが確認された。また、HPA 系のストレス反応が改善する可能性が示された。以上のヒトを対象とした二つの研究結果から、MHBA は脳機能のなかでも比較的高次の CEN に関わる認知の制御機能に有効であると考察された。また、不安感や疲労感の原因の一つとして、DMN が過剰に活性化することが報告されている。CEN の活性化は DMN に対して抑制方向に作用することから、MHBA が CEN の活性を高めることにより DMN の働きを抑えることで精神機能の改善をもたらしたと考察される。

一連の研究結果から、MHBA は、迷走神経を活性化することにより脳内の NE および ACh を介したメカニズムによって脳機能の改善効果を示すと考えられるが、最近の研究により、その詳細な分子作用メカニズムが明らかにされつつある。山崎らは、腸管由来の分泌細胞を用いた検討により、MHBA が特定の苦味受容体に作用して CCK の分泌を促進することを見出した<sup>137</sup>。CCK 受容体を介して CCK が迷走神経に刺激を伝達することは既報によって明らかにされていることから<sup>138</sup>、MHBA は腸管の苦味受容体を刺激することで CCK の分泌を促し、その結果求心性迷走神経を活性化していると考えられる。また、阿野らの研究により、イソ $\alpha$ 酸と MHBA の共通の分子構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有するモデル化合物を腸管由来の分泌細胞に作用させたところ、同様に CCK の分泌を促すことが確認された<sup>89</sup>。したがって、MHBA を構成する化合物の $\beta$ トリカルボニル構造が迷走神経の活性化に寄与していると考えられる。

一般的に、脳腸相関の研究は腸内細菌叢を制御することでその代謝物を介して脳機能を改善するというコンセプトで研究が進められており、MHBA はそれ自体が苦味受容体に作用することで脳腸相関を活性化する点において異なる。このメカニズムから MHBA は短期間の摂取でも有効性が期待され、第 2 章の研究では単回投与によってマウスの認知機能が改善することが示されている。短期間の MHBA 摂取によるヒトの脳

機能への有効性については今後の検討課題である。また、腸内細菌叢は個人差が大きい  
ため一様に制御することが難しいという課題がある一方、MHBAはそのメカニズム上、  
腸内細菌叢に左右されることなく有効性を発揮すると考えられる。



**Fig. 6-1 MHBA による認知機能および精神機能改善作用のメカニズム概要**

MHBA は腸管の分泌細胞からのコレシストキニンの分泌を促し、コレシストキニンが求心性の迷走神経にシグナルを伝達すると考えられる。シグナルは青斑核やマイネルト基底核に到達し、NE および ACh の分泌を促し、神経細胞に発現するβ受容体およびα7nAChR を介して CEN を活性化することにより認知機能および精神機能を改善すると考えられる。また、NE および ACh はミクログリアに発現するβ受容体およびα7nAChR を介してミクログリアの極性を制御することにより脳内炎症を抑制すると考えられる。ACh, acetylcholine; α7nAChR, α7nicotinic-ACh receptor; CEN, central executive network; MHBA, matured hop bitter acids; NE, norepinephrine.

前頭葉を中心とした CEN は加齢による影響を受けやすく、MCI や認知症の初期から障害が現れる。また、求心性迷走神経が接続する LC や NBM は AD において最も早くタウ病理が出現する部位の一つとして知られている<sup>139</sup>。LC-NE 系をターゲットとして AD 型認知症の治療に VNS を応用しようとする研究が実際に進められているが、前頭葉機能や LC-NE 系、NBM を構成する神経細胞は初期に脱落が生じるため、病理変化が進行してからは治療効果が得られない可能性も指摘されている<sup>37</sup>。しかしながら、臨床で用いられる VNS は小型のペースメーカを外科的に胸部に埋め込むものが主流であり、予防段階からこの技術を活用することが難しいという課題がある。その点、食品成分である MHBA は、予防段階から VNS を模した作用メカニズムにより脳内環境の維持・改善を実現できる方法として有用であると考えられる。最近の AD モデルマウスを用いた検討により、AD の発症前から継続的に MHBA を摂取させることで、AD の病理変化および認知機能の低下を抑えることが明らかにされた<sup>89</sup>。MHBA の認知症予防効果については今後臨床での検証が待たれる。

最後に本研究成果の社会実装について触れたい。先述の通り、認知症予防や認知機能低下に対して効果的な食様式についてエビデンスが蓄積されている。一方で、毎日の食生活に地中海式料理を取り入れたり、食の多様性を高めたりすることは日本人や高齢者にとっては困難であることが多い。そのため、確かなエビデンスに支えられた食品成分を見出し、サプリメントをはじめとした機能性食品で手軽に対策できるようにすることの意義は大きい。実際、市場では認知機能への有効性を標榜した食品として n-3 系の脂肪酸やイチョウ葉エキスが販売されており、その市場規模は年々拡大していることからそのニーズの高さが伺える。一方で、多くの成分は血液脳関門を通過し、脳に到達して直接作用するとされており、摂取に際して心理的な障壁を感じる消費者も少なからず存在する。その点 MHBA は長い食経験によりその安全性が確認されていることに加え、迷走神経の活性化を通じて脳機能を制御するという、ヒトが元来有している内在的な機能を引き出すというメカニズムに支えられており、摂取についての心理的な障壁は低いと考えられる。また、認知機能改善効果を標榜する機能性食品は効果実感を得ることが難しく、消費者の継続性に課題があった。本研究の成果として、MHBA の認知機能改善効果が体感でも得られることが示された。さらなる検討が必要だが、MHBA が主観的な認知機能も含めて改善することが継続性の向上に寄与する可能性がある。

また、本研究では非臨床研究の結果から体表面積に基づいてヒト等価用量を計算し、MHBA の摂取用量を 1 日あたり 35 mg に設定した。苦味の強いビールであれば、厚生労働省の定める適量飲酒の範囲において十分に摂取可能な量である。しかしながら、アルコールの認知機能への悪影響を指摘する報告も多数存在することから、脳のためにはサプリメントやノンアルコール・ビールテイスト飲料を活用して MHBA を

摂取することが望ましいと考えられる。なお、著者らの最近の研究により、MHBA を強化したノンアルコール・ビールテイスト飲料を生活に取り入れることにより精神機能の改善に役立つ可能性が示唆されている。

以上、本研究によりビールに含まれるホップ由来の苦味成分の一種である MHBA の認知機能および精神機能改善効果とそのメカニズムの一端を、非臨床および臨床の両面から明らかにした。医療費の逼迫が叫ばれる高齢社会において、確かなエビデンスに支えられた健康機能性食品を提供することの意義は大きいと考えられる。今後は、認知症予防に対する MHBA のヒトでの有効性エビデンスを蓄積することにより、急速に進行する高齢社会の課題解決に貢献することを目指したい。

## 参考文献

1. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia. (2015).
2. 朝田隆 (厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業). 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 (平成23年度～平成24年度) 総合研究報告書. (2012).
3. 内閣府. 令和3年版高齢社会白書 (全体版) .
4. 佐渡充洋 (厚生労働科学研究費補助金 (認知症対策総合研究事業) ) . わが国における認知症の経済的影響に関する研究 平成26年度 総括・分担研究報告書. (2015).
5. 日本神経学会, 監修. 「認知症疾患診療ガイドライン」作成委員会, 編集. 認知症疾患診療ガイドライン2017. (2017).
6. Jack, C. R. *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology* vol. 12 (2013).
7. 日本精神神経学会. DSM-5 精神疾患の診断・統計マニュアル. (2014).
8. 鈴木達也、野呂瀬準、須田 (二見) 章子、鈴木一成、関水憲一、大内基司、猪狩吉雅、渡邊健太郎、中野博司、大庭建三. 認知症の周辺症状 (BPSD) への対応. *日医大医会誌* **6**, 135–139 (2010).
9. Savva, G. M. *et al.* Prevalence, correlates and course of behavioural and psychological symptoms of dementia in the population. *Br. J. Psychiatry* **194**, (2009).
10. Da Silva, J., Gonçalves-Pereira, M., Xavier, M. & Mukaetova-Ladinska, E. B. Affective disorders and risk of developing dementia: Systematic review. *British Journal of Psychiatry* vol. 202 (2013).
11. Li, G. *et al.* Temporal relationship between depression and dementia: Findings from a large community-based 15-year follow-up study. *Arch. Gen. Psychiatry* **68**, (2011).
12. Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet* (2020) doi:10.1016/S0140-6736(20)30367-6.
13. Ngandu, T. *et al.* A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): A randomised controlled trial. *Lancet* **385**, 2255–2263 (2015).
14. Morris, M. C. *et al.* Mediterranean-dietary approach to systolic hypertension diet intervention for neurodegenerative delay diet slows cognitive decline with aging. *Alzheimer's Dement.* **11**, (2015).
15. Xu, W. *et al.* Alcohol consumption and dementia risk: a dose–response meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Epidemiol.* **32**, (2017).
16. Hulsey, D. R. *et al.* Reorganization of Motor Cortex by Vagus Nerve Stimulation Requires Cholinergic Innervation. *Brain Stimul.* **9**, (2016).
17. Gea, A. *et al.* Alcohol intake, wine consumption and the development of depression: The

- PREDIMED study. *BMC Med.* **11**, (2013).
18. Thaug Zaw, J. J., Howe, P. R. & Wong, R. H. Long-term effects of resveratrol on cognition, cerebrovascular function and cardio-metabolic markers in postmenopausal women: A 24-month randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Clin. Nutr.* **40**, (2021).
  19. Moir, M. Hops - A millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* vol. 58 (2000).
  20. Štulíková, K., Karabín, M., Nešpor, J. & Dostálek, P. Therapeutic perspectives of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops. *Molecules* vol. 23 (2018).
  21. Liu, M. *et al.* Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* vol. 20 (2015).
  22. Walker, E. G. *et al.* An extract of hops (*Humulus lupulus* L.) modulates gut peptide hormone secretion and reduces energy intake in healthy-weight men: A randomized, crossover clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **115**, (2022).
  23. Segawa, S. *et al.* Clinical effects of a hop water extract on Japanese cedar pollinosis during the pollen season: A double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, (2007).
  24. Morin, C. M., Koetter, U., Bastien, C., Ware, J. C. & Wooten, V. Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Sleep* **28**, (2005).
  25. 山本高之. ランビック ベルギーの自然発酵ビール. (技報堂出版, 2011).
  26. Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Taniguchi, H., Koizumi, H. & Katayama, M. Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, (2015).
  27. Miura, Y. *et al.* Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPAR $\alpha$  activations in C57BL/6 mice. *Br. J. Nutr.* **93**, (2005).
  28. Yajima, H. *et al.* Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **279**, (2004).
  29. Yajima, H. *et al.* Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. *Int. J. Obes.* **29**, (2005).
  30. Obara, K., Mizutani, M., Hitomi, Y., Yajima, H. & Kondo, K. Isohumulones, the bitter component of beer, improve hyperglycemia and decrease body fat in Japanese subjects with prediabetes. *Clin. Nutr.* **28**, (2009).
  31. Morimoto-Kobayashi, Y. *et al.* Matured hop bittering components induce thermogenesis in brown adipose tissue via sympathetic nerve activity. *PLoS One* **10**, (2015).
  32. Morimoto-Kobayashi, Y. *et al.* Matured hop extract reduces body fat in healthy overweight humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group study. *Nutr. J.* **15**, (2016).
  33. Ano, Y. *et al.* Iso- $\alpha$ -acids, Bitter Components of Beer, Prevent Inflammation and

- Cognitive Decline Induced in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* **292**, 3720–3728 (2017).
34. Ayabe, T. *et al.* Matured Hop-Derived Bitter Components in Beer Improve Hippocampus-Dependent Memory Through Activation of the Vagus Nerve. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
  35. Berthoud, H. R. The vagus nerve, food intake and obesity. *Regulatory Peptides* vol. 149 (2008).
  36. Flood, J. F., Smith, G. E. & Morley, J. E. Modulation of memory processing by cholecystokinin: Dependence on the vagus nerve. *Science (80-. )*. **236**, (1987).
  37. Slater, C. & Wang, Q. Alzheimer's disease: An evolving understanding of noradrenergic involvement and the promising future of electroceutical therapies. *Clinical and Translational Medicine* vol. 11 (2021).
  38. Haam, J. & Yakel, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochemistry* vol. 142 (2017).
  39. Everitt, B. J. & Robbins, T. W. Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* **48**, (1997).
  40. Hasselmo, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 16 (2006).
  41. Teles-Grilo Ruivo, L. M. & Mellor, J. R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* vol. 5 (2013).
  42. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. & Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews* vol. 89 (2009).
  43. Eglén, R. M. Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. *Progress in Medicinal Chemistry* vol. 43 (2005).
  44. Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B. E., Corradi, J. & Esandi, M. del C. Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets. *Journal of Physiology* vol. 596 (2018).
  45. Russo, P., Bufalo, A., Frustaci, A., Fini, M. & Cesario, A. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors for Treating Alzheimer's Disease:  $\alpha 7$ -nAChR Agonists in Human Clinical Trials. *Curr. Pharm. Des.* **20**, (2014).
  46. Lendvai, B., Kassai, F., Szájlí, Ágota & Némethy, Z.  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Research Bulletin* vol. 93 (2013).
  47. Hays, S. A. Enhancing Rehabilitative Therapies with Vagus Nerve Stimulation. *Neurotherapeutics* vol. 13 (2016).
  48. Kaczmarczyk, R., Tejera, D., Simon, B. J. & Heneka, M. T. Microglia modulation through external vagus nerve stimulation in a murine model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **146**, (2018).
  49. Kurosawa, M., Sato, A. & Sato, Y. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases acetylcholine release in the cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* **98**, (1989).
  50. Tanaka, K. *et al.* Effects of galantamine on l-NAME-induced behavioral impairment in Y-maze task in mice. *Neurosci. Lett.* **462**, (2009).
  51. Qing, W. *et al.* Inhibiting RIP1 improves chronic stress-induced cognitive impairments in D-galactose-induced aging mice. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, (2018).

52. Tarland, E., Franke, R. T., Fink, H., Pertz, H. H. & Brosda, J. Effects of 2-bromoterguride, a dopamine D2 receptor partial agonist, on cognitive dysfunction and social aversion in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **235**, (2018).
53. Cieřlik, P. *et al.* Mutual activation of glutamatergic mGlu4 and muscarinic M4 receptors reverses schizophrenia-related changes in rodents. *Psychopharmacology (Berl)*. **235**, (2018).
54. Nikiforuk, A., Potasiewicz, A., Kos, T. & Popik, P. The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav. Brain Res.* **313**, (2016).
55. Johnson, R. L. & Wilson, C. G. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. *Journal of Inflammation Research* vol. 11 (2018).
56. Nemeroff, C. B. *et al.* VNS therapy in treatment-resistant depression: Clinical evidence and putative neurobiological mechanisms. *Neuropsychopharmacology* vol. 31 (2006).
57. Clark, K. B., Naritoku, D. K., Smith, D. C., Browning, R. A. & Jensen, R. A. Enhanced recognition memory following vagus nerve stimulation in human subjects. *Nat. Neurosci.* **2**, (1999).
58. Sjögren, M. J. C. *et al.* Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: A pilot study. *J. Clin. Psychiatry* **63**, (2002).
59. Merrill, C. A. *et al.* Vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: Additional follow-up results of a pilot study through 1 year. *J. Clin. Psychiatry* **67**, (2006).
60. Namgung, U., Kim, K. J., Jo, B. G., & Park, J. M. Vagus nerve stimulation modulates hippocampal inflammation caused by continuous stress in rats. *J. Neuroinflammation* **19**, (2022).
61. Warburton, E. C. & Brown, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* **285**, (2015).
62. Kraeuter, A. K., Guest, P. C. & Sarnyai, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1916 (2019).
63. Ma, K. G. & Qian, Y. H. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides* vol. 73 (2019).
64. Yang, Y. *et al.* Nicotinic  $\alpha 7$  receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, (2013).
65. Gamage, R. *et al.* Cholinergic Modulation of Glial Function During Aging and Chronic Neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 14 (2020).
66. Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange (GHDx). <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b> (2021).
67. Organisation for Economic Cooperation and Development. Making Mental Health Count. (2014).
68. Geda, Y. E. *et al.* Prevalence of neuropsychiatric symptoms in mild cognitive impairment and normal cognitive aging: Population-based study. *Arch. Gen. Psychiatry* **65**, (2008).

69. Trivedi, M. H. *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: Implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* **163**, (2006).
70. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 (2008).
71. Miller, A. H. & Raison, C. L. The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 (2016).
72. Nie, X. *et al.* The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron* **99**, (2018).
73. Goshen, I. *et al.* Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry* **13**, (2008).
74. Ja, W. K. & Duman, R. S. IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, (2008).
75. Köhler, O. *et al.* Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry* vol. 71 (2014).
76. Guu, T. W. *et al.* International Society for Nutritional Psychiatry Research Practice Guidelines for Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Major Depressive Disorder. *Psychother. Psychosom.* **88**, (2019).
77. Das, U. N. Vagus nerve stimulation, depression, and inflammation. *Neuropsychopharmacology* vol. 32 (2007).
78. Taniguchi, Y., Yamada, M., Taniguchi, H., Matsukura, Y. & Shindo, K. Chemical Characterization of Beer Aging Products Derived from Hard Resin Components in Hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **63**, (2015).
79. Ano, Y. *et al.* Preventive effects of a fermented dairy product against Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with enhanced microglial phagocytosis and anti-inflammatory activity. *PLoS One* **10**, (2015).
80. Wang, Z. *et al.* The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Behav. Brain Res.* **274**, (2014).
81. Sulakhiya, K. *et al.* Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **744**, (2015).
82. Li, D. D. *et al.* Antidepressant-like effect of zileuton is accompanied by hippocampal neuroinflammation reduction and CREB/BDNF upregulation in lipopolysaccharide-challenged mice. *J. Affect. Disord.* **227**, (2018).
83. Park, B. K. *et al.* Antidepressant and Anti-Neuroinflammatory Effects of Bangpungtongsung-San. *Front. Pharmacol.* **11**, (2020).
84. Can, A. *et al.* Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains.

- Genes, Brain Behav.* **10**, (2011).
85. Ma, M. *et al.* Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Psychopharmacology (Berl)*. **234**, (2017).
  86. Zhang, J. C. *et al.* Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, (2014).
  87. Scheiblich, H., Trombly, M., Ramirez, A. & Heneka, M. T. Neuroimmune Connections in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Trends in Immunology* vol. 41 (2020).
  88. Mori, K. *et al.* Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* **43**, (2002).
  89. Ano, Y. *et al.* Hop bitter acids containing a  $\beta$ -carbonyl moiety prevent inflammation-induced cognitive decline via the vagus nerve and noradrenergic system. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
  90. Cipriani, A. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* **373**, (2009).
  91. Ano, Y., Kitaoka, S., Ohya, R., Kondo, K. & Furuyashiki, T. Hop bitter acids increase hippocampal dopaminergic activity in a mouse model of social defeat stress. *Int. J. Mol. Sci.* (2020) doi:10.3390/ijms21249612.
  92. Marien, M. R., Colpaert, F. C. & Rosenquist, A. C. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: A theory. *Brain Research Reviews* vol. 45 (2004).
  93. Kent, K. *et al.* Consumption of anthocyanin-rich cherry juice for 12 weeks improves memory and cognition in older adults with mild-to-moderate dementia. *Eur. J. Nutr.* **56**, (2017).
  94. Lamport, D. J. *et al.* Concord grape juice, cognitive function, and driving performance: A 12-wk, placebo-controlled, randomized crossover trial in mothers of preteen children. *Am. J. Clin. Nutr.* **103**, (2016).
  95. Kita, M. *et al.* Supplementation with whey peptide rich in  $\beta$ -lactolin improves cognitive performance in healthy older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Front. Neurosci.* **13**, 1–9 (2019).
  96. 今村陽子、上村研一、龍浩志、小島義次、金子満雄. 高次脳機能スケールを用いた脳障害の経時的評価について. *失語症研究* **8**, 217–223 (1988).
  97. 数井裕光、綿森淑子、本多留実、. 日本版リバーミード行動記憶検査(RBMT)の有用性の検討. *神経研究の進歩* **46**, 307–318 (2002).
  98. 杉下守弘. 日本版ウエクスラー記憶検査法: WMS-R. (2001).
  99. Berch, D. B., Krikorian, R. & Huha, E. M. The Corsi block-tapping task: Methodological and theoretical considerations. *Brain Cogn.* **38**, (1998).
  100. Jensen, A. R. & Rohwer, W. D. The stroop color-word test: A review. *Acta Psychol. (Amst)*. **25**, (1966).
  101. 日本高次脳機能障害学会. CAT・CAS 標準注意検査法・標準意欲評価法. (2006).
  102. Crowe, S. F. The differential contribution of mental tracking, cognitive flexibility, visual search, and motor speed to performance on parts A and B of the trail making test. *J. Clin.*

- Psychol.* **54**, (1998).
103. 城憲秀. 新しい「自覚症しらべ」の提案. 産業衛生学雑誌 220 (2002).
  104. 日本疲労学会. 抗疲労臨床評価ガイドライン (第5版) . (2011).
  105. 横山和仁. POMS® 2 日本語版. (2015).
  106. 数井裕光、綿森淑子、本多留実、森悦朗. 日本版日常記憶チェックリストの有用性の検討. 脳と神経 **55**, 317–325 (2003).
  107. 今井正司、熊野宏昭 & 、今井千鶴子、根建金男. 能動的注意制御における主観的側面と抑うつ及び不安との関連. 認知療法研究 **8**, 85–95 (2015).
  108. Delis, D. C., Kramer, J. H., Kaplan, E. & Holdnack, J. Reliability and validity of the Delis-Kaplan Executive Function System: An update. *Journal of the International Neuropsychological Society* vol. 10 (2004).
  109. Ridgewell, C. *et al.* The effects of transcutaneous auricular vagal nerve stimulation on cognition in healthy individuals: A meta-analysis. *Neuropsychology* **35**, (2021).
  110. Barrett, L. F. & Satpute, A. B. Large-scale brain networks in affective and social neuroscience: Towards an integrative functional architecture of the brain. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 23 (2013).
  111. Bär, K. J. *et al.* Functional connectivity and network analysis of midbrain and brainstem nuclei. *Neuroimage* **134**, (2016).
  112. Critchley, H. D. *et al.* Vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression: Behavioral and neural effects on encoding negative material. *Psychosom. Med.* **69**, (2007).
  113. Kosel, M., Brockmann, H., Frick, C., Zobel, A. & Schlaepfer, T. E. Chronic vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression increases regional cerebral blood flow in the dorsolateral prefrontal cortex. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* **191**, (2011).
  114. Bari, A. *et al.* Differential attentional control mechanisms by two distinct noradrenergic coeruleo-frontal cortical pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, (2020).
  115. Tajima, S. *et al.* Medial orbitofrontal cortex is associated with fatigue sensation. *Neurol. Res. Int.* **2010**, (2010).
  116. Salat, D. H., Kaye, J. A. & Janowsky, J. S. Prefrontal gray and white matter volumes in healthy aging and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* (1999) doi:10.1001/archneur.56.3.338.
  117. Raz, N. *et al.* Selective aging of the human cerebral cortex observed in Vivo: Differential vulnerability of the prefrontal gray matter. *Cereb. Cortex* (1997) doi:10.1093/cercor/7.3.268.
  118. Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R. & Terry, R. D. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* **43**, (1993).
  119. Liang, P., Wang, Z., Yang, Y., Jia, X. & Li, K. Functional disconnection and compensation in mild cognitive impairment: Evidence from DLPFC connectivity using resting-state fMRI. *PLoS One* (2011) doi:10.1371/journal.pone.0022153.
  120. Casanova, M. F., Starkstein, S. E. & Jellinger, K. A. Clinicopathological correlates of behavioral and psychological symptoms of dementia. *Acta Neuropathologica* vol. 122 (2011).
  121. Sperling, R. A. *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease:

- Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **7**, (2011).
122. Parfenov, V. A., Zakharov, V. V., Kabaeva, A. R. & Vakhnina, N. V. Subjective cognitive decline as a predictor of future cognitive decline a systematic review. *Dement. e Neuropsychol.* **14**, (2020).
  123. Rami, L. *et al.* The subjective cognitive decline questionnaire (SCD-Q): A validation study. *J. Alzheimer's Dis.* **41**, (2014).
  124. Hiroyuki, K. Who are seeking help from professional at the preclinical/prodromal stage of dementia? *Japanese J. Geriatr. psychiatry* **29**, 486–492 (2008).
  125. 足立 耕平, 伊集院 睦雄, 大槻 美佳, 小池 敦石合 純夫. 標準言語性対連合学習検査 (S-PA) の妥当性に関する検討. *高次脳機能研究* **38**, 414–421 (2018).
  126. 加藤 元一郎, 若松 直樹穴水 幸子. 痴呆の評価 認知機能障害の個別的評価に関する神経心理学的検査 記憶障害 Rey Auditory Verbal Learning Test(RAVLT). *日本臨床* **61**, 279–284 (2003).
  127. 水口公信 下仲順子 中里克治. State-Trait Anxiety Inventory. 三京房.
  128. 金城 光, 井出 訓石原 治. 日本版成人メタ記憶尺度 (日本版MIA) の構造と短縮版の開発. *認知心理学研究* **11**, 31–41 (2013).
  129. Kaida, K. *et al.* Validation of the Karolinska sleepiness scale against performance and EEG variables. *Clin. Neurophysiol.* **117**, (2006).
  130. Liu, S. *et al.* Serum levels of proteins involved in amyloid- $\beta$  clearance are related to cognitive decline and neuroimaging changes in mild cognitive impairment. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* **11**, 85–97 (2019).
  131. Perrotin, A. *et al.* Subjective cognitive decline in cognitively normal elders from the community or from a memory clinic: Differential affective and imaging correlates. *Alzheimer's Dement.* **13**, (2017).
  132. Tetsumori, Y. *et al.* The Japanese Version of RBANS (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status). *Brain Nerve No to Shinkei* **54**, 463–461 (2002).
  133. Charmandari, E., Tsigos, C. & Chrousos, G. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology* vol. 67 (2005).
  134. Poll, E. M. *et al.* Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin. Chim. Acta* **382**, (2007).
  135. O'Keane, V., Dinan, T. G., Scott, L. & Corcoran, C. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis measures after vagus nerve stimulation therapy in chronic depression. *Biol. Psychiatry* **58**, (2005).
  136. Brouillette, J. & Quirion, R. Transthyretin: A key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging. *Neurobiol. Aging* **29**, (2008).
  137. Yamazaki, T. *et al.* Bitter taste receptor activation by hop-derived bitter components induces gastrointestinal hormone production in enteroendocrine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 704–709 (2020).
  138. Janssen, S. & Depoortere, I. Nutrient sensing in the gut: New roads to therapeutics? *Trends*

*in Endocrinology and Metabolism* vol. 24 (2013).

139. Theofilas, P. *et al.* Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimer's Dement.* **13**, (2017).

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くのご指導を賜りました学習院大学大学院自然科学研究科・高島明彦教授に心より感謝申し上げます。

臨床研究を中心に多くの議論をさせて頂き、多大なるご支援を賜りました慶應義塾大学文学部心理学研究室・梅田聡教授、順天堂大学医学部精神医学講座・新井平伊名誉教授、故 大沼徹先任准教授に心より感謝申し上げます。

臨床研究のデータ取得にあたっては、メディカルステーションクリニック・斎藤次郎医師、福島健康管理センター・近藤澄夫医師に多大なるご協力を頂きました。感謝申し上げます。

本論文は、筆者がキリンビール株式会社（現キリンホールディングス株式会社）に入社後に行った研究をまとめたものです。筆者に研究の機会を与えて頂き、また、博士取得の後押しをして下さったキリンホールディングス株式会社の矢島宏昭博士、吉田有人博士、田嶋修氏、近藤恵二博士、小原有晶氏、阿野泰久博士、および同僚諸兄姉に深謝いたします。特に、阿野泰久博士には脳科学領域における研究手法の基礎からご教授頂き、また本論文をまとめるにあたって粘り強くご指導頂きました。重ねて感謝申し上げます。

令和4年6月  
福田隆文