

博士論文

ホップ由来苦味成分の  
認知機能改善効果に関する研究

綾部 達宏

## 目次

〈序論〉 .....	3
〈第1章 イソ $\alpha$ 酸の認知機能改善効果〉 .....	16
第1節 イソ $\alpha$ 酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する .....	17
1. 要約 .....	17
2. 背景 .....	18
3. 実験方法 .....	19
4. 結果 .....	23
5. 考察 .....	33
第2節 イソ $\alpha$ 酸はタッチパネルオペラント試験系において高次認知機能を改善する .....	36
1. 要約 .....	36
2. 背景 .....	37
3. 実験方法 .....	39
4. 結果 .....	44
5. 考察 .....	48
〈第2章 熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果〉 .....	51
第1節 熟成ホップ苦味酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する .....	52
1. 要約 .....	52
2. 背景 .....	53
3. 実験方法 .....	54
4. 結果 .....	56
5. 考察 .....	62
第2節 熟成ホップ苦味酸は迷走神経およびノルエピネフリンシグナルの活性化を介して認知機能を改善する .....	64

1. 要約 .....	64
2. 背景 .....	65
3. 実験方法 .....	66
4. 結果 .....	69
5. 考察 .....	78
〈総括〉 .....	80
〈発表論文リスト〉 .....	88
〈引用文献〉 .....	89
〈謝辞〉 .....	99
〈要旨〉 .....	100

# 〈序論〉

我が国では高齢化が急速に進行し、内閣府の 2018 年の報告では 65 歳以上の高齢者の人口は 3,558 万人、総人口に占める割合は 28.1%に達した[1]。今後も高齢化の進行が続くと予測される中、それに伴う健康や社会保障制度上の問題が注目されている。なかでも認知症は患者本人の生活の質 (QOL) を著しく低下させるだけでなくその家族や介護者にも身体的、精神的な負担となり、さまざまな社会課題を引き起こしている。我が国における認知症の患者数は 2012 年の時点で 462 万人、2025 年には 700 万人に達すると推計され[2]、世界的全体での患者数は 2015 年の時点で 5,000 万人にのぼるとされる[3]。

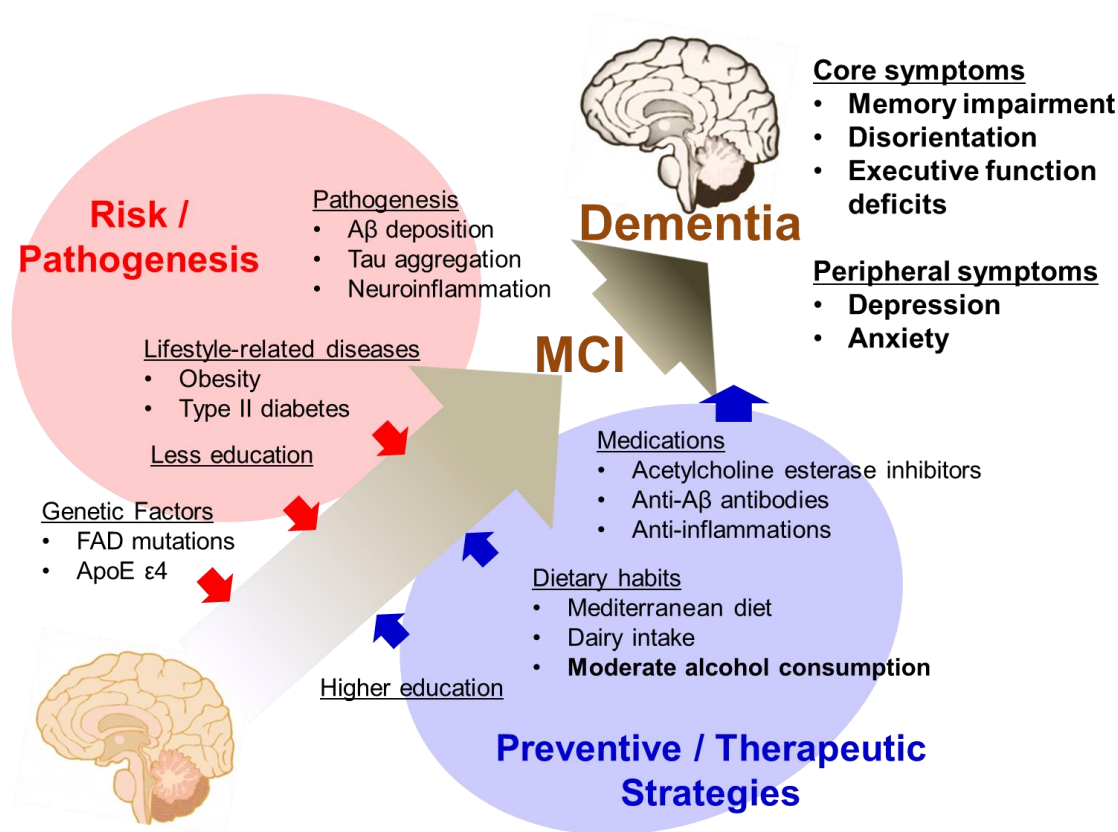
認知症や認知機能の低下のうちアルツハイマー型認知症はもっとも主要な病態であり、細胞外のアミロイド  $\beta$  沈着および細胞内のタウタンパク質蓄積に伴う神経変性を特徴とする[4,5]。また、脳内炎症がアルツハイマー病の病態において重要な役割を果たしていることが明らかになってきており[6,7]、アミロイド  $\beta$  やタウタンパク質に加えて脳内炎症をターゲットとした研究が増加している。認知症の症状は中核症状と周辺症状に大別され、中核症状は記憶障害、見当識障害、実行機能障害などの認知機能の低下であり、周辺症状は抑うつや不安障害などの精神症状、暴力や徘徊などの行動異常、妄想や幻覚など多岐にわたる (Fig. 1)。

近年、II 型糖尿病などの生活習慣病や肥満が認知症の主要なリスクとなることが明らかになってきた[8-10]。これまでに体重や body mass index (BMI) と認知機能が負の相関関係にあることや、中年期の肥満により高齢になってからの認知機能が低下することなどが報告されている[11]。我が国においても、久山町の住民を対象とした疫学調査の結果から II 型糖尿病がアルツハイマー病発症において有意な危険因子であることが報告された[12]。動物を用いた研究からは、肥満や II 型糖尿病に伴う脳内炎症が認知症や認知機能低下を引き起こすことが示唆され[13]、肥満やそれに伴う脳内炎症を抑制することは認知症予防に有用であると考えられる。

認知症と健常者との間には境界域が存在し、この状態は軽度認知障害 (Mild cognitive impairment; MCI) と呼ばれる。MCI となった人がすべて認知症になるわけではなく、一部の人は健常な認知機能に戻るとされる。日本人を対象とした研究では、MCI と診断された人のうち約半数が健常な状態に回復したことが報告された[14]。また、車を運転する、地図を見ながら初めての土地を旅行する、本や新聞を読むなどといった活動を行っている人において MCI から回復する期待値が高いことが確認された。このことから、認知機能を改善する、あるいは維持することは認知症の発症を防ぐうえで有用なアプローチであると考えられる。

認知症の病態や発症メカニズムが精力的に研究されている一方で、いまだ発症後の根

本的な治療法は確立されていない。その原因として、認知症は長い年月をかけて脳内に老廃物や神経変性が蓄積するため、症状が現れた段階では治療が困難な状態となることが挙げられる。そのため、症状が現れる以前から予防に取り組むことが重要であり、食生活などの日常生活で実施できる予防方法に注目が集まっている。例を挙げると、多量の野菜、果物、ナッツ類の摂取やオリーブオイルの使用などに特徴づけられる地中海式食事が認知症予防効果を有するとして着目されている[15]。また、我が国においては、2015年より開始された機能性表示食品制度により科学的根拠に基づいた食品の機能性を表示することが可能になり、今後ますます食品を通じた認知症予防が注目される可能性がある。



**Fig. 1** Schematic image of dementia risk/pathogenic factors and preventive/therapeutic strategies [16,17]. FAD; familial Alzheimer's disease, MCI; mild cognitive impairment.

食生活と認知症リスクの関係についての疫学調査の結果から、日常的な適量のアルコール飲料の摂取が認知症の予防因子となることが示唆されている[18,19]。そのメカニズムとしてはアルコールそのものの摂取による血流改善やストレス低減効果などに加えて、アルコール飲料に含有される成分の生理機能による寄与も想定される。レスベラトロールはブドウに由来するポリフェノール化合物であり、赤ワインに多く含まれる。レスベラトロールは動脈硬化予防や血圧低下作用など多様な生理機能を有することが知られており、認知症に対しても予防効果を示すことが示唆されている[20,21]。赤ワインやレスベラトロールの健康増進効果は盛んに研究、報告され、一般の消費者にも赤ワインは健康に良いものとして浸透している。その一方で、世界で最も多く消費されるアルコール飲料であるビールについて、その含有成分の認知症に対する予防効果に関する報告は少ない。

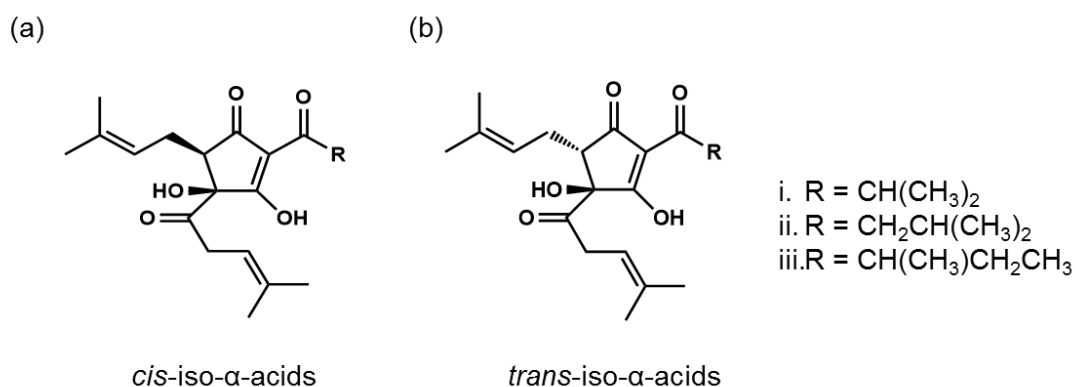
ホップはビールの醸造に用いられる主要な原料のひとつである (Fig. 2)。つる性の植物であるホップ (学名 : *Humulus lupulus* L.) の鞠花がビールの原料として用いられ、ビールに特徴的な味わいや香りを付与している。ホップには  $\alpha$  酸および  $\beta$  酸が含まれ、このうち  $\alpha$  酸は醸造工程の加熱により異性化し、ビールの主要な苦味成分であるイソ  $\alpha$  酸 (Iso- $\alpha$ -acids; IAAs) が生成する。また、 $\alpha$  酸および  $\beta$  酸はホップの貯蔵過程で酸化反応を受け、多様な酸化化合物を生成することが古くから知られていた。近年、ホップ由来の酸化化合物のうち代表的なものの構造が決定され、総称して熟成ホップ苦味酸 (Matured hop bitter acids; MHBAs) と名付けられた[22]。イソ  $\alpha$  酸や熟成ホップ苦味酸などのホップ由来苦味酸はビールの風味への寄与だけでなく、多様な生理機能を示すことが明らかになっている。そこで、本研究ではイソ  $\alpha$  酸および熟成ホップ苦味酸に着目し、認知機能に及ぼす影響とそのメカニズムについて検証を行った。



Fig. 2 Photographic imagery of hops (*Humulus lupulus* L.)

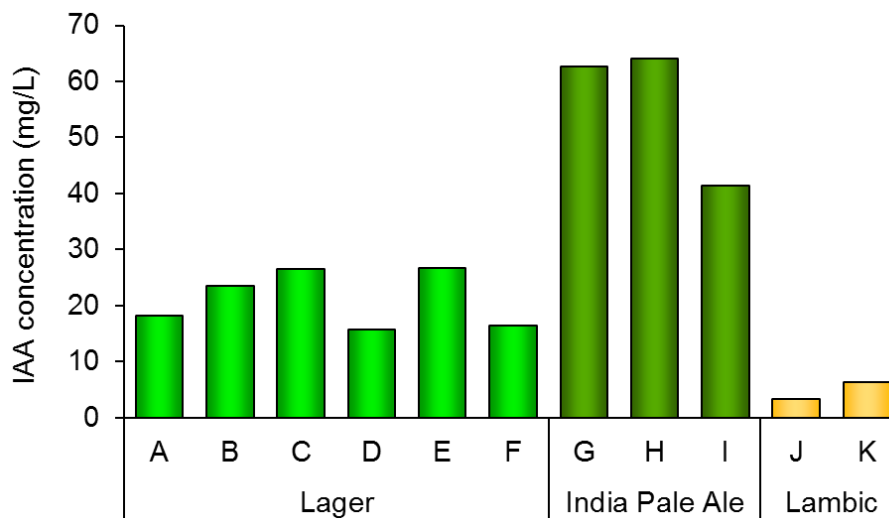
## 1. イソ $\alpha$ 酸

イソ $\alpha$ 酸はホップに含まれる $\alpha$ 酸が加熱などにより異性化することで生成する化合物である。苦味受容体への強いアゴニスト活性を持ち、ビールに含まれる主要な苦味成分である[23,24]。風味への影響に加えて、泡の持続性向上や抗菌作用によるビールの保存性向上にも寄与することが知られている[25,26]。イソ $\alpha$ 酸には側鎖のアシル基の構造によって *isocohumulone*、*isohumulone*、*isoadhumulone* などが存在し、それぞれに *cis* 体、*trans* 体が存在する (Fig. 3)。日本国内で製造される一般的なラガータイプのビールにはイソ $\alpha$ 酸が 16–27 mg/L 含まれ、大量のホップを使って醸造される India Pale Ale (IPA) タイプのビールには 41–64 mg/L のイソ $\alpha$ 酸が含まれることが報告されている (Fig. 4) [22]。



**Fig. 3** Chemical structures of iso- $\alpha$ -acids. (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. 4** Concentrations of iso- $\alpha$ -acids in commercial beers. Column A-K represent individual brand. Reproduced from *Tanighchi et al., Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components.* [22]

イソ  $\alpha$  酸は脂質や糖代謝において重要な役割を果たす peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  に対しアゴニストとして作用する[27]。PPAR $\alpha$  や PPAR $\gamma$  の活性化を介して、イソ  $\alpha$  酸は II 型糖尿病モデル KK-A $^y$  マウスの血中グルコース、トリグリセリド、遊離脂肪酸を減少させた。また、高脂肪食誘導肥満モデルマウスのインスリン感受性や耐糖能を改善し、コレステロール代謝にも影響を与えることが報告されている[28,29]。加えて、イソ  $\alpha$  酸はランダム化二重盲検の臨床試験において、血糖値低下や脂肪低減効果を有することが確認されている[30]。

PPAR $\gamma$  は代謝調節機能に加えて、脳内における免疫細胞であるミクログリアの機能にも影響を与える。ミクログリアは炎症型と抗炎症型の二種類のフェノタイプを示すが、PPAR $\gamma$  活性化により抗炎症型のフェノタイプに誘導され炎症を抑制することが報告されている[31]。実際に、イソ  $\alpha$  酸はミクログリアを抗炎症型に誘導し、アルツハイマー病モデルマウスにおいてアミロイド  $\beta$  沈着に伴う脳内炎症を抑制した[32]。

このように、イソ  $\alpha$  酸は PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  の活性化を介して肥満抑制効果や脳内炎症抑制効果を示す。さらに、肥満は脳内炎症を惹起することで認知機能低下を引き起こすことから、肥満抑制と炎症抑制効果を併せ持つイソ  $\alpha$  酸は、肥満に伴う認知機能の低下を効率的に改善する可能性が考えられた。

本研究では、肥満に伴う認知機能低下に対するイソ $\alpha$ 酸の効果を検証するため、マウスに通常食、高脂肪食、またはイソ $\alpha$ 酸含有高脂肪食を摂餌した。体重、脂肪重量、血中パラメータの測定によりイソ $\alpha$ 酸の肥満抑制効果を確認し、脳内炎症に及ぼす影響を評価するため海馬中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量を測定した。また、炎症に伴う神経系への影響を評価するため、海馬重量や神経活動マーカーなどを評価した。さらに、認知機能を評価するため行動薬理試験を実施した。これらの予防的な効果の検証に加えて、高脂肪食誘導肥満モデルマウスにイソ $\alpha$ 酸を短期投与し治療的な効果の検証も行った。

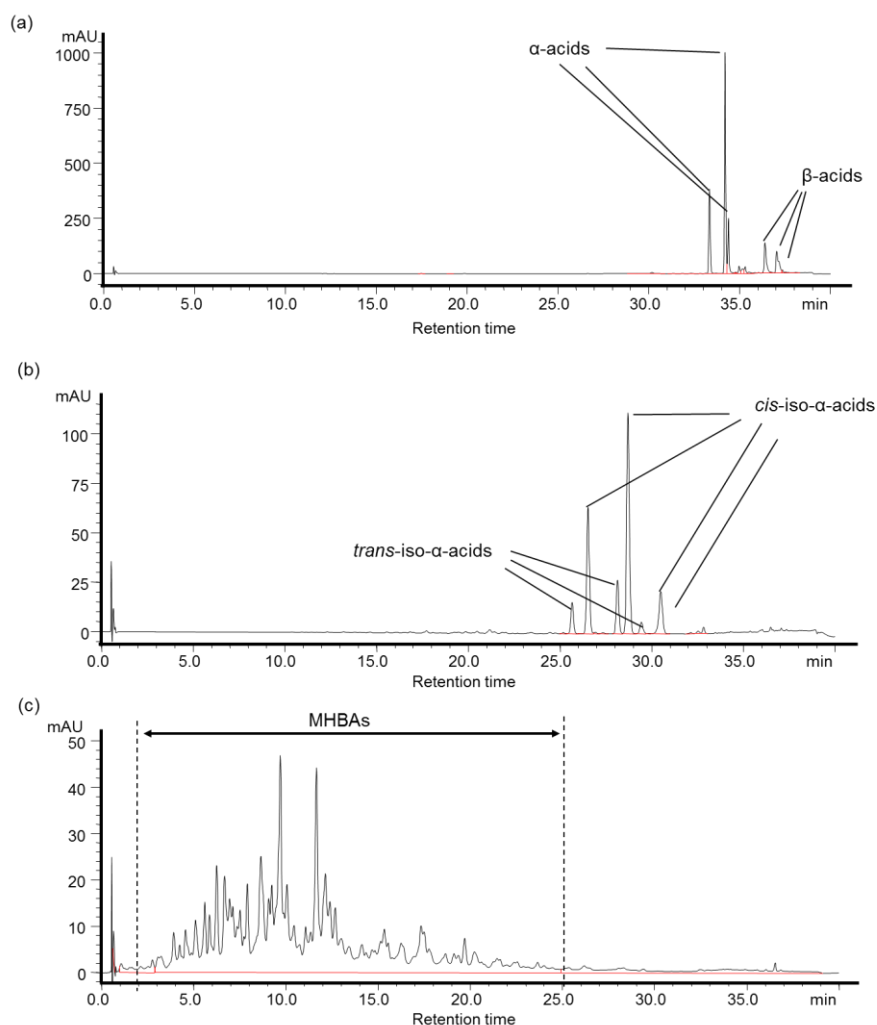
また、筆者らの最近の研究で、イソ $\alpha$ 酸は単回投与によりスコポラミン誘導健忘症モデルマウスや通常マウスの海馬に関連した記憶機能を改善することが明らかになった [33]。イソ $\alpha$ 酸は海馬のドーパミン含有量および海馬でのドーパミン分泌量を増加させた。ドーパミン D1/D5 受容体アンタゴニストや海馬特異的 D1 受容体ノックダウンマウスを用いた検証により、海馬ドーパミン D1 受容体を介した認知機能改善メカニズムが示唆されている。イソ $\alpha$ 酸が短期的な海馬に関連した記憶機能を改善した一方で、長期間にわたる学習能力や、注意、実行機能などの前頭皮質に関連した高次認知機能に及ぼす影響は不明であった。

本研究では、高次認知機能に及ぼすイソ $\alpha$ 酸の影響を評価するため、タッチパネルオペラント試験系を用いた視覚弁別課題および逆転弁別課題を実施した。タッチパネルオペラント試験系は近年確立された行動試験系であり、ヒトにおける認知機能評価系に比較的近いこと、複雑な課題設定が可能であることなどから高次認知機能の評価に適している。スコポラミン誘導健忘症モデルマウスを用いて視覚弁別課題中の学習能力および注意力に及ぼす影響を評価した。続いて逆転弁別課題を実施し、記憶の柔軟性に及ぼすイソ $\alpha$ 酸の影響を評価した。

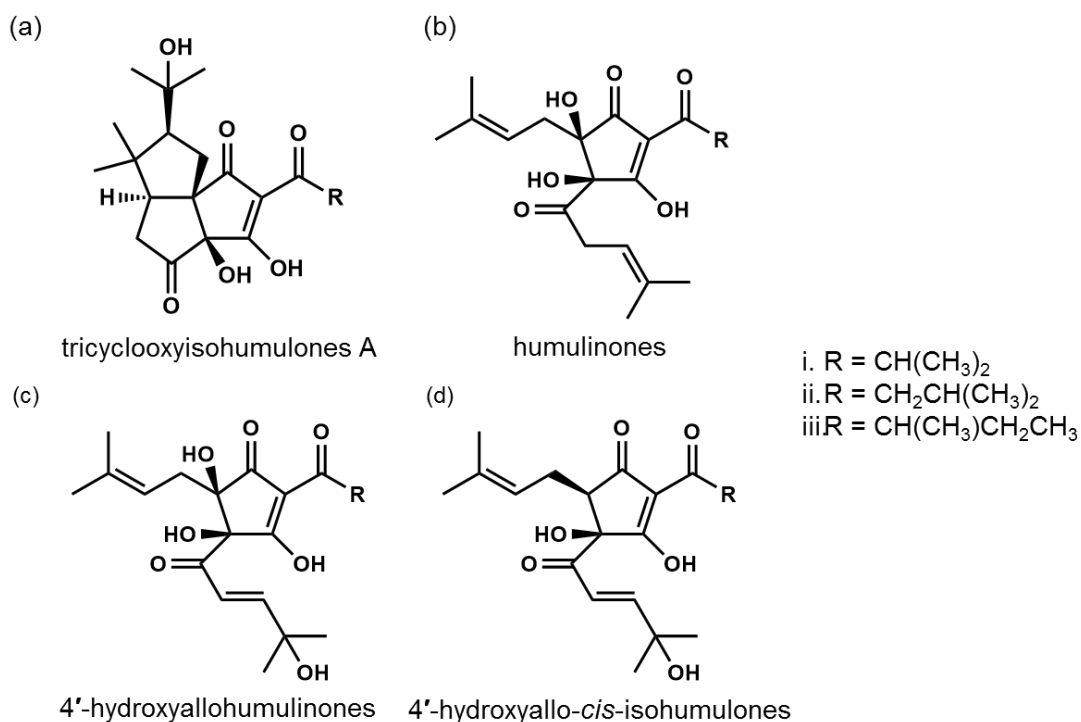
## 2. 熟成ホップ苦味酸

ホップに含まれる $\alpha$ 酸および $\beta$ 酸は、ホップの貯蔵過程で酸化反応を受け、多様な化合物を生成することが知られていた。近年、これらの酸化化合物を含むフラクションが分画され、ここに含まれる化合物は熟成ホップ苦味酸と名付けられた (Fig. 5) [22]。さらに熟成ホップ苦味酸に含まれる代表的な化合物の構造が同定され、これらはイソ $\alpha$ 酸と共通した構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有することが明らかになった (Fig. 6)。熟成ホップ苦味酸は一般的なラガータイプのビールに 19–38 mg/L 含有され、長期間の熟成工程を経て製造されるランビックタイプのビールには 100–151 mg/L、IPA では 152–

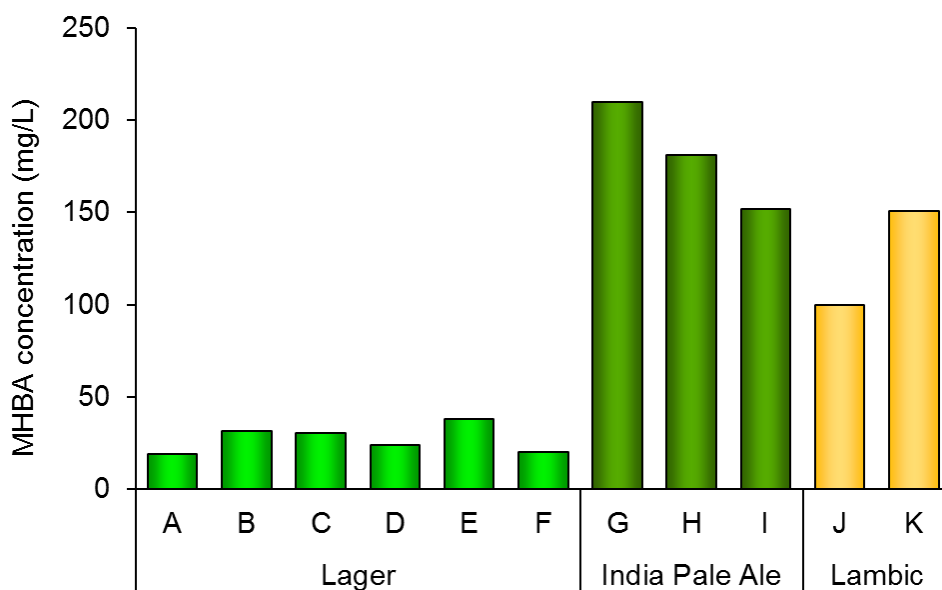
210 mg/L 含まれることが報告されている (Fig. 7) [22]。熟成ホップ苦味酸はイソ  $\alpha$  酸とは異なる苦味を示すことも確認されており、熟成ホップ苦味酸はビールの複雑な苦味の形成に寄与していると考えられる[34]。



**Fig. 5** HPLC-UV chromatograms of the (a) EtOH extract of fresh hops, (b) isomerized hop extract, and (c) water extract of hops stored at 60 °C for 120 h after heating the extract. When fresh hops are boiled at brewery process,  $\alpha$ -acids are converted into iso- $\alpha$ -acids. When hops are mildly heated (e.g. 60 °C for 120 h),  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids are oxidized to form bitter acid oxides with  $\beta$ -carbonyl moiety, designated as matured hop bitter acids (MHBAs). The analyses were performed using the following conditions: column: 100  $\times$  2.1 mm id, 3  $\mu$ m, C<sub>18</sub> column; solvent: H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), 1000/0.2, (v/v) containing EDTA (0.02% w/v) (solvent A) and MeCN (solvent B), a linear gradient from 10 to 52% B in 0  $\rightarrow$  26.7 min, 52% B for 26.7  $\rightarrow$  30 min, 52 to 75% B in 30  $\rightarrow$  32.7 min, 75 to 85% B in 32.7  $\rightarrow$  36.7 min, and 85% B for 36.7  $\rightarrow$  37.7 min; flow rate: 0.6 mL/min; detector: 270 nm; and column temperature: 40 °C. Reproduced from *Tanighchi et al., Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components.* [22]

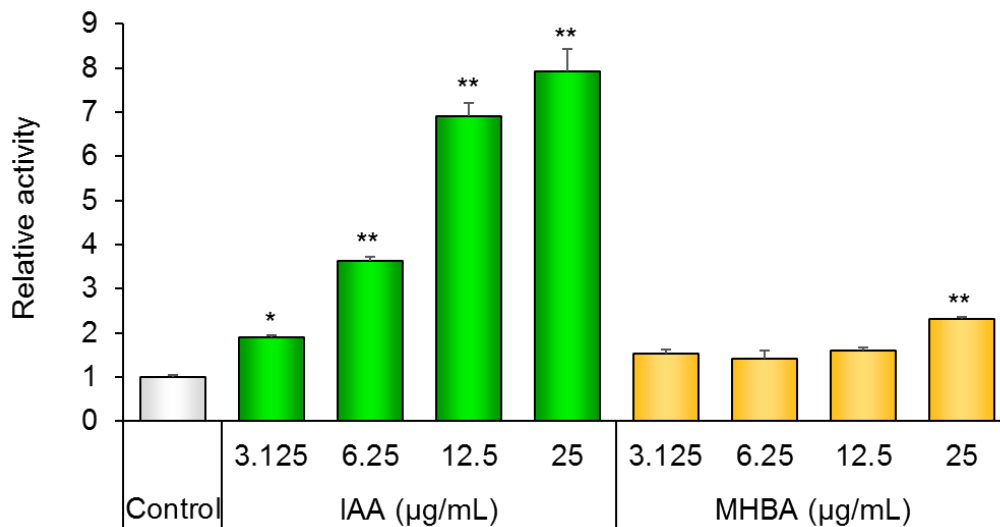


**Fig. 6** Chemical structures of representative MHBA components. (a) tricyclooxyisohumulones A; tricyclooxyisocohumulone A (i), tricyclooxyisohumulone A (ii), and tricyclooxyisoadhumulone A (iii). (b) humulinones; cohumulone (i), humulinone (ii), and adhumulinone (iii). (c) 4'-hydroxyallohumulinones; 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).



**Fig. 7** Concentrations of MHBAs in commercial beers. Column A-K represent individual brand. Reproduced from *Taniguchi et al., Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components.* [22]

熟成ホップ苦味酸はイソ  $\alpha$  酸と共通した  $\beta$  トリカルボニル構造を有することから、イソ  $\alpha$  酸に類似した生理機能を持つ可能性が考えられた。実際に、高脂肪食誘導肥満モデルマウスに熟成ホップ苦味酸を摂餌投与したところ、肥満抑制効果を示すことが報告されている。一方、そのメカニズムは異なっており、熟成ホップ苦味酸は褐色脂肪の **uncoupling protein 1** 発現量を増加させ、褐色脂肪でのエネルギー代謝を向上させることで肥満抑制効果を示すことが示された。さらに、内臓組織の刺激を中枢神経へ伝達する役割を担う迷走神経を切除したマウスにおいては褐色脂肪活性化効果が消失したことから、熟成ホップ苦味酸は迷走神経の活性化を介して生理機能を発揮することが示唆されている[35]。また、熟成ホップ苦味酸の **PPAR $\gamma$**  アゴニスト活性はイソ  $\alpha$  酸と比較して非常に弱いことが確認されている (Fig. 8、キリンホールディングス社社内報告書より引用)。共通した構造を持ちながら生理活性が異なることから、その生理機能の共通点や相違点を検証することでホップ由来苦味酸の機能の解明につながると考えられる。



**Fig. 8** PPAR $\gamma$  agonist activities of IAAs and MHBAs. CV-1 cells were co-transfected with a luciferase reporter plasmid, pG5 luc, containing five copies of GAL4 upstream activating sequence in the promoter region and an expression vector for the human PPAR $\gamma$  ligand binding domain fused to the GAL4 DNA binding domain. IAAs (3.125–25  $\mu$ g/mL) or MHBAs (3.125–25  $\mu$ g/mL) were added to the transfected cells. Results are the relative luciferase expression levels normalized with the control group. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 4). \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 vs control group (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

本研究では、熟成ホップ苦味酸の肥満抑制効果に着目し、肥満に伴う認知機能低下に対する予防効果を検証した。マウスに通常食、高脂肪食、または熟成ホップ苦味酸含有高脂肪食を与え、体重、脂肪重量および認知機能を評価した。また、高脂肪食誘導肥満モデルマウスに対して熟成ホップ苦味酸を短期投与し、認知機能改善効果を検証した。

近年、迷走神経は腸管の刺激や情報を脳に伝達することで中枢神経機能を制御していることが明らかになってきており、この現象は「腸脳相関」と呼ばれ注目を集めている。迷走神経を介して脳幹の青斑核に伝えられた刺激は、おもにノルエピネフリン神経を介して海馬を含む脳の様々な部位を活性化することが報告されており[36]、熟成ホップ苦味酸の投与により認知機能が改善する可能性が考えられた。そこで本研究では、スコポラミン誘導健忘症モデルマウスや通常マウスを用いて、空間作業記憶やエピソード記憶に及ぼす熟成ホップ苦味酸の影響を評価した。さらにメカニズムを検証するため、熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果におけるノルエピネフリン神経系や迷走神経の関与

を検証した。



# 〈第 1 章 イソ $\alpha$ 酸の認知機能改善効果〉

## 第1節 イソ $\alpha$ 酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する

### 1. 要約

肥満や生活習慣病などが認知症のリスクを高めることが報告されており、そのメカニズムとして脳内炎症の関与が想定されている。イソ $\alpha$ 酸は肥満抑制効果および炎症抑制効果を示すことが報告されており、これらを併せ持つことで肥満に伴う認知機能低下の改善に有用であると考えられた。そこで、本研究では高脂肪食誘導肥満モデルマウスにイソ $\alpha$ 酸を摂餌投与し認知機能に及ぼす影響を評価した。

通常食、高脂肪食、イソ $\alpha$ 酸含有高脂肪食を8週間摂餌したところ、イソ $\alpha$ 酸は高脂肪食摂取に伴う体重、内臓脂肪重量、血中トリグリセリド量の増加を有意に抑制した。また、高脂肪食摂取は脳内での炎症性サイトカイン、ケモカイン量を増加させ、それに伴う脂質酸化、神経活動の低下を引き起こしたが、イソ $\alpha$ 酸の摂取によりこれらの反応が抑制された。エピソード記憶を新奇物体探索試験により評価したところ、高脂肪食摂取マウスでは記憶機能の低下が認められ、イソ $\alpha$ 酸の摂取により記憶機能が有意に改善した。イソ $\alpha$ 酸含有高脂肪食摂取マウスの脳内炎症や記憶改善効果は体重減少量から予測される以上に改善していたため、肥満抑制効果と抗炎症効果を併せ持つことにより強い認知機能改善効果を示したと考えられる。また、高脂肪食による肥満誘導後のマウスにイソ $\alpha$ 酸を短期投与した場合もイソ $\alpha$ 酸はエピソード記憶を改善した。イソ $\alpha$ 酸は予防的な効果に加えて、認知機能が低下した後に治療的な効果を示すと考えられる。これらの結果から、イソ $\alpha$ 酸は肥満抑制だけをターゲットとした手段と比較して、より効率的に肥満に伴う認知機能低下を改善することが期待される。

## 2. 背景

近年、疫学的な研究によって肥満や生活習慣病が認知症のリスクを高めることが報告されている[8-10]。肥満や過度の体重増加が認知機能や、海馬などの脳領域の容積と負の相関を持つことが明らかになっている[37]。また、動物を用いた研究により、高脂肪食の摂取が脳内炎症やそれに伴う神経の減少を引き起こし、認知機能を低下させることが明らかになっている[13]。認知症の根本的な治療方法や効果的な予防方法が確立されていない中で、肥満や生活習慣病の予防は有効な認知症予防方法になる可能性がある。

ホップ由来のビール苦味成分イソ  $\alpha$  酸はさまざまな生理機能を持ち、特に肥満や II 型糖尿病に対する効果について研究がおこなわれてきた。イソ  $\alpha$  酸は脂質や糖代謝において重要な役割を果たす proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  および PPAR $\gamma$  のアゴニスト活性を有する[27]。II 型糖尿病モデル KK-A $^y$  マウスや高脂肪食誘導肥満モデルマウスにイソ  $\alpha$  酸を長期投与したところ、血糖値や血中トリグリセリド、遊離脂肪酸濃度を低下させ、インスリン感受性や耐糖能を改善した[27,28]。イソ  $\alpha$  酸の有効性はランダム化二重盲検の臨床試験においても評価されている。コントロール群と比較して、イソ  $\alpha$  酸 (32、48 mg/day) 4 週間の摂取により空腹時血糖が有意に低下し、8 週間の摂取により HbA1c 濃度が有意に低下した。また、48 mg/day 12 週間の投与により BMI および総脂肪面積が有意に減少した[30]。

さらに最近の研究において、イソ  $\alpha$  酸は脳内にアミロイド  $\beta$  を過剰に蓄積するアルツハイマー病モデルマウスの脳内炎症を抑制し、認知機能を改善することが報告された[32]。イソ  $\alpha$  酸は PPAR $\gamma$  活性化を介して、脳内の炎症反応に関与するミクログリアの炎症反応を抑制していると考えられる。肥満抑制効果と脳内炎症抑制効果を併せ持つことから、イソ  $\alpha$  酸は肥満に伴う認知機能低下に特に有効である可能性が考えられた。そこで本研究では、肥満に伴う脳内炎症および認知機能低下に及ぼすイソ  $\alpha$  酸の影響を評価することを目的とし、高脂肪食誘導肥満モデルマウスにイソ  $\alpha$  酸の長期摂餌投与を行った。

### 3. 実験方法

#### 1) 試薬

イソ $\alpha$ 酸は異性化ホップエキス (Hopsteiner 社、Mainburg、Germany) として用いた。異性化ホップエキスはイソ $\alpha$ 酸カリウム塩を 30.5% w/v 含む水溶液であり、*trans*-isocohumulone (1.74% w/v)、*cis*-isocohumulone (7.61% w/v)、*trans*-isohumulone (3.05% w/v)、*cis*-isohumulone (14.0% w/v)、*trans*-isoadhumulone (0.737% w/v)、*cis*-isoadhumulone (3.37% w/v) を含んでいる。イソ $\alpha$ 酸以外には、少量の $\alpha$ 酸 (<0.6% w/v)、 $\beta$ 酸 (<0.2%)、ホップオイル (<0.1%) を含有する。

#### 2) 動物

長期摂取試験では、5 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー社) を購入した。飼育は 12 時間の明暗サイクル (明期: 午前 8 時–午後 8 時)、室温 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度 30–70% で管理された飼育室で行い、飼料として CE-2 (日本クレア社) を与えて 1 週間馴化した。馴化後、体重をもとに各群 10 匹の 3 群に群分けし、通常食 (ND 群)、高脂肪食 (HFD 群)、イソ $\alpha$ 酸 0.05% (w/w) 含有高脂肪食 (HFD+IAA 群) を摂取させた。高脂肪食には脂質を 60 kcal% 含有する D12492 (Research Diet 社、New Brunswick、USA) を用い、通常食として脂質を 10 kcal% 含有する D12450J (Research Diet 社) を用いた。飼料の組成は Table 1-1-1 に示す。試験期間は 8 週間とし、体重を毎週測定した。なお、イソ $\alpha$ 酸の混餌投与による摂餌量の変化は認められていない[38]。

短期投与試験では、通常食 (CE-2) または高脂肪食 (D12492) を 4 週齢時より摂餌した 11 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー社) を購入した。それぞれ通常食と高脂肪食を与え、上記と同様の飼育室で 1 週間馴化し、行動試験に用いた。動物実験は、キリンホールディングス株式会社動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った (実験承認番号: AN10266-Z00、AN10379-Z01)。

**Table 1-1-1.** High fat diet and normal diet formulation

	HFD (D12492)		ND (D12450J)	
	g	kcal	g	kcal
Protein (%)	26	20	19	20
Carbohydrate (%)	26	20	67	70
Fat (%)	35	60	4	10
Total		100		100
kcal/g	5.24		3.85	
Casein	200	800	200	800
L-cystine	3	12	3	12
Corn starch	0	0	506	2025
Maltodextrin 10	125	500	150	500
Sucrose	68.8	275	68.8	275
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Lard	245	2205	20	180
Mineral Mix S10026	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0

### 3) 代謝関連パラメータ測定

摂食開始 8 週間後にマウスをイソフルラン (富士フィルム和光純薬社) により安楽殺して解剖を行った。解剖は午前 9 時から開始し、午前 11 時 30 分までにすべての動物の解剖を完了した。心採血により全血を採取してヘパリンチューブに回収し、 $3,000 \times g$  で

5 分間遠心し、上清を血漿として回収した。血漿中生化学指標は自動分析装置 7180（日立ハイテクノロジーズ社）を用いて測定した。解剖時に副睾丸周囲脂肪と肝臓を採取し重量を測定した。

#### 4) 脳内炎症および脂質酸化解析

解剖時に左脳海馬を回収し、液体窒素を用いて凍結し、-80°Cで保存した。回収した海馬はプロテアーゼ阻害剤（BioVision 社、Mountain View、USA）を含むトリス緩衝生理食塩水中でマルチビーズショッカー（安井器械社）を用いて破砕した。抽出液を 50,000 ×g で 30 分間遠心し、上清をタンパク質抽出サンプルとして以下の測定に用いた。総タンパク質量は BCA assay kit（Thermo Scientific 社、Rockford、USA）を用いて測定した。炎症性サイトカインおよびケモカインはマルチプレックスアッセイ（Bio-Plex 23; Bio-Rad 社、Richmond、USA）を用いて測定した。過酸化脂質（Malondialdehyde; MDA）は MDA adduct competitive ELISA kit（Cell Biolabs 社、San Diego、USA）を用いた ELISA により測定した。

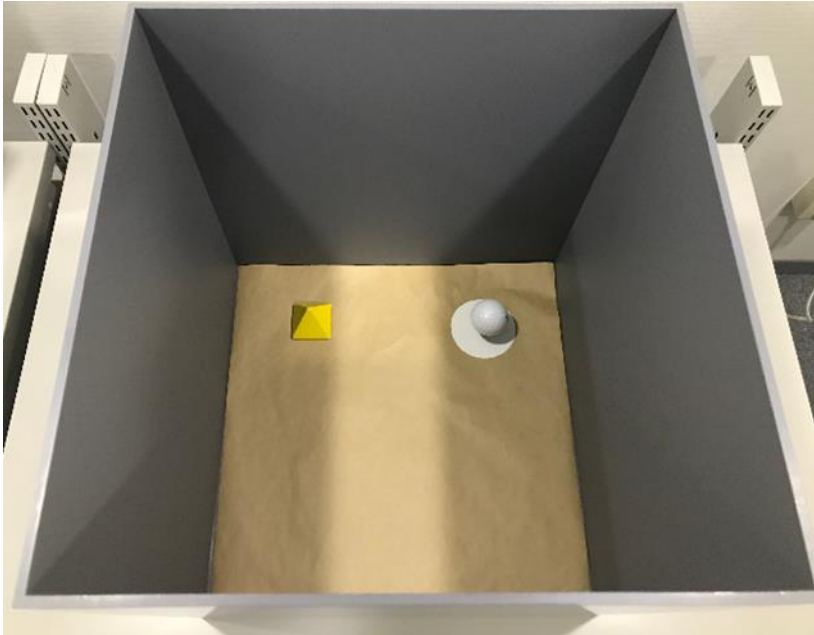
#### 5) 認知機能関連パラメータ測定

解剖時に左脳海馬を回収し重量を測定した。cAMP response element binding protein（CREB）、リン酸化 CREB（p-CREB）はそれぞれ CREB（total）ELISA kit（Invitrogen 社、Carlsbad、USA）、Phospho-CREB（S133）ELISA kit（R&D systems 社、Minneapolis、USA）を用いた ELISA により測定した。

#### 6) 新奇物体探索試験（NORT）

エピソード記憶機能は NORT により評価した。NORT はマウスが既知の物体よりも新奇の物体に強い関心を示す習性を利用した行動試験である。試験にはポリ塩化ビニルでできた 1 辺 40 cm の立方体型のオープンフィールド（Fig. 1-1-1）を用いた。試験は獲得試行（acquisition）と想起試行（recall）からなり、獲得試行では 2 種類の物体をオープンフィールド内に設置した状態でマウスに 10 分間探索させた。24 時間後に想起試行を実施し、一方の物体を新奇物体に変更し、再度マウスに 5 分間探索させた。各物体へのアプローチ時間を測定し、新奇物体に対するアプローチ時間の割合をエピソード記憶の指標として評価した。また、（新奇物体への探索時間－既知物体への探索時間）／（総探索時間）によって Discrimination Index（DI）を算出した。長期投与試験では試験食摂取開始 7 週間目に NORT を実施した。短期投与試験では獲得試行および想起試行実施

60 分前にイソ  $\alpha$  酸（1、10 mg/kg 体重）または蒸留水を胃ゾンデにより経口投与した。



**Fig. 1-1-1** Experimental apparatus of NORT and NOLT.

#### 7) 新奇場所探索試験 (NOLT)

長期投与試験において、空間記憶は NORT を実施した翌日から NOLT により評価した。オープンフィールドの壁面に視覚的目印を設置し、マウスが各方向を認識できる状態とした。マウスに 10 分間オープンフィールド内を探索させ装置に馴化させた。24 時間後、2 つの物体をオープンフィールド内の 2 か所に設置し、マウスを 5 分間探索させた。4 時間後、2 つの物体のうち一方の場所を変更し、再度マウスに 8 分間探索させた。新奇場所に対するアプローチ時間の割合を空間記憶の指標として評価した。また、(新奇場所への探索時間 - 既知場所への探索時間) / (総探索時間) によって DI を算出した。

#### 8) 統計解析

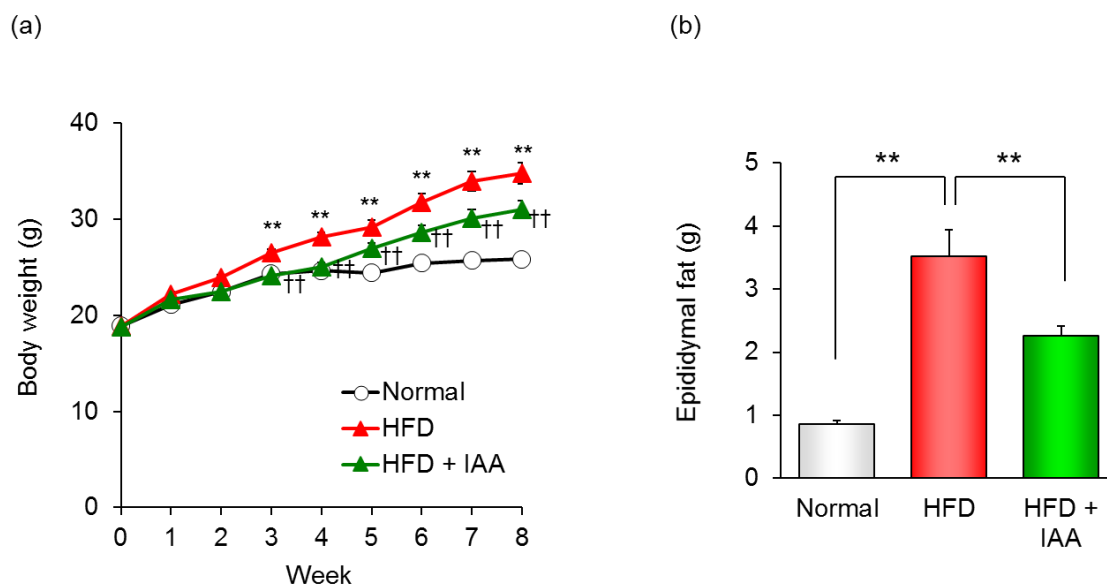
すべてのデータは平均値  $\pm$  標準偏差で示した。体重変化は two-way ANOVA により飼料と摂取期間の影響を解析した。2 群の比較は student's *t* test を用いて行い、その他の他群比較は one-way ANOVA による分散分析の後に Tukey-Kramer's test により解析した。

P 値 0.05 以下を統計学的有意差ありと判断した。統計解析にはエクセル統計 (Bell Curve 社) を用いた。

## 4. 結果

### 1) 体重、脂肪重量

マウスに試験食を摂取させ 8 週間の体重を評価した。有意な摂取期間の主効果 ( $F_{[8,243]} = 139.6, p < 0.001$ )、有意な試験食の主効果 ( $F_{[2,27]} = 112.2, p < 0.001$ )、および有意な摂取期間と試験食の相互作用 ( $F_{[16,243]} = 8.438, p < 0.001$ ) を検出した。通常食摂取群 (ND 群) に対して、高脂肪食摂取群 (HFD 群) では試験食摂取開始 3 週目以降の体重が有意に増加した。一方、イソ  $\alpha$  酸 0.05% 含有高脂肪食摂取群 (HFD+IAA 群) では HFD 群に対して摂取開始 3 週目以降の体重が有意に減少した (Fig. 1-1-2a)。試験食摂取 8 週目の副睪丸周囲脂肪重量は ND 群に対し HFD 群で有意に増加し、HFD 群に対し HFD+IAA 群では有意に減少した ( $F_{[2,27]} = 26.31, p < 0.001$ ) (Fig. 1-1-2b)。イソ  $\alpha$  酸の摂取は高脂肪食摂取による体重増加、脂肪重量増加を抑制することが確認された。



**Fig. 1-1-2** The effect of iso- $\alpha$ -acids on body weight (a) and epididymal fat weight (b) in the HFD-fed mice. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 10$  mice per group). (a) \*\* $P < 0.01$  versus ND fed group, †† $P < 0.01$  versus HFD fed group. (b) \*\* $P < 0.01$ , versus each group.



## 2) 血中生化学指標

試験食摂取 8 週目の血中生化学指標を測定したところ、高脂肪食摂取によりアスパルギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、尿素窒素 (UN)、トリグリセリド (TG) が有意に増加した。イソ  $\alpha$  酸摂取により AST、UN の有意な増加が抑制され、TG 量は HFD 群に対して有意に減少した (AST,  $F_{[2,27]} = 5.346$ ,  $p = 0.011$ ; UN,  $F_{[2,27]} = 3.585$ ,  $p = 0.042$ ; TG,  $F_{[2,27]} = 6.730$ ,  $p = 0.004$ ) (Table 1-1-2)。

**Table 1-1-2.** Iso- $\alpha$ -acids attenuate high fat diet induced dyslipidemia

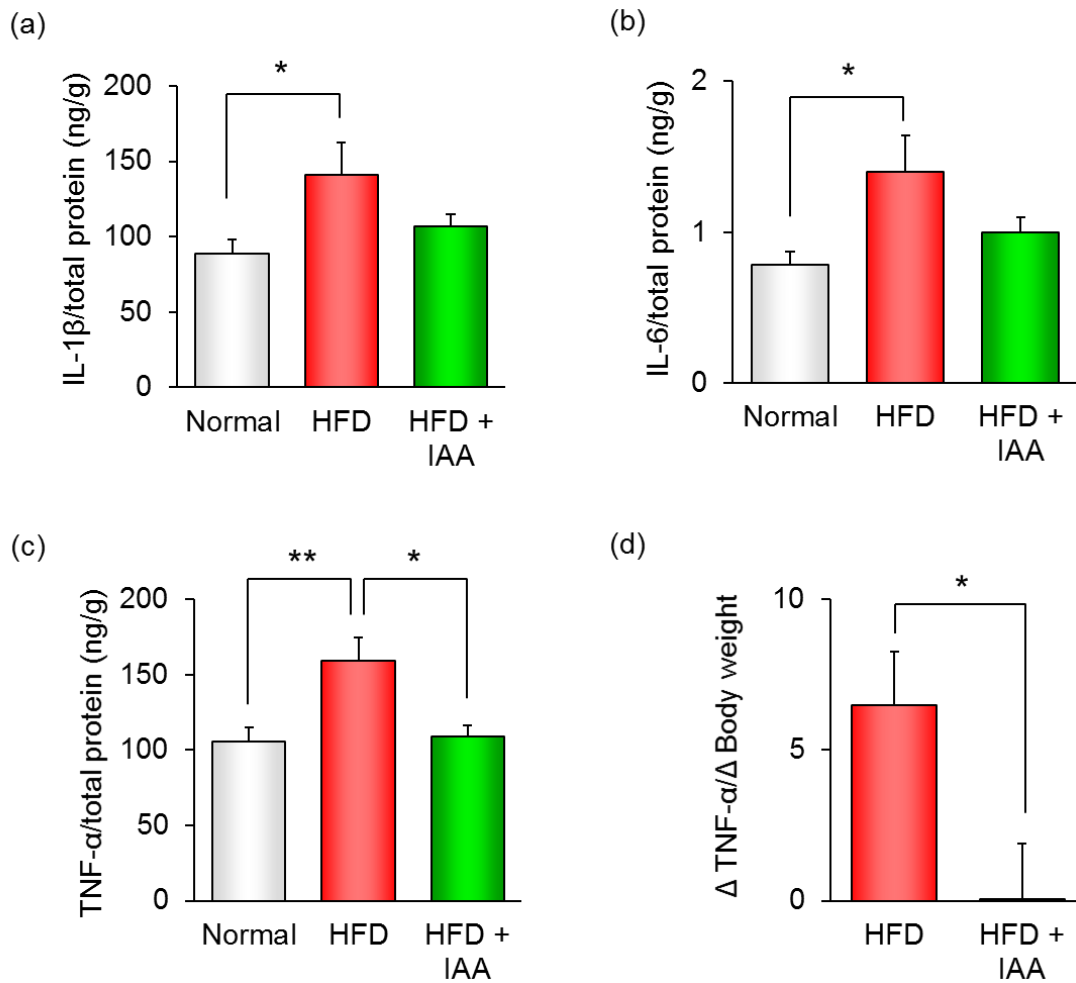
The plasma composition was analyzed using a biochemistry autoanalyzer. TP; total protein, ALB; albumin, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, UN; urea nitrogen, CRE; creatine, PL; phospholipase, TG; triglyceride, CHO; cholesterol, GUL; glucose. All values are expressed as means  $\pm$  SEM (n=10 mice per group). \*\*P<0.01, \*P<0.05 versus ND fed group, †P<0.05 versus HFD fed group.

	ND	HFD	HFD + IAA	
TP	5.12 $\pm$ 0.08	5.40 $\pm$ 0.14	5.20 $\pm$ 0.08	g/dL
ALB	3.60 $\pm$ 0.06	3.92 $\pm$ 0.05	3.60 $\pm$ 0.06	g/dL
AST	59.6 $\pm$ 3.6	82.1 $\pm$ 3.0*	75.8 $\pm$ 7.3	IU/L
ALT	21.7 $\pm$ 2.4	26.2 $\pm$ 1.4	20.0 $\pm$ 2.0	IU/L
ALP	202.4 $\pm$ 12.6	201.1 $\pm$ 9.9	203.9 $\pm$ 14.3	IU/L
UN	29.2 $\pm$ 1.0	34.4 $\pm$ 1.9*	30.4 $\pm$ 1.2	mg/dL
CRE	0.10 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	mg/dL
PL	313.2 $\pm$ 20.9	365.2 $\pm$ 18.9	310.4 $\pm$ 14.7	mg/dL
TG	61.2 $\pm$ 4.5	108.4 $\pm$ 11.2**	73.6 $\pm$ 11.0†	mg/dL
CHO	173.6 $\pm$ 14.2	190.8 $\pm$ 11.4	168.0 $\pm$ 12.3	mg/dL
GUL	292.8 $\pm$ 11.2	327.2 $\pm$ 10.7	308.8 $\pm$ 16.7	mg/dL

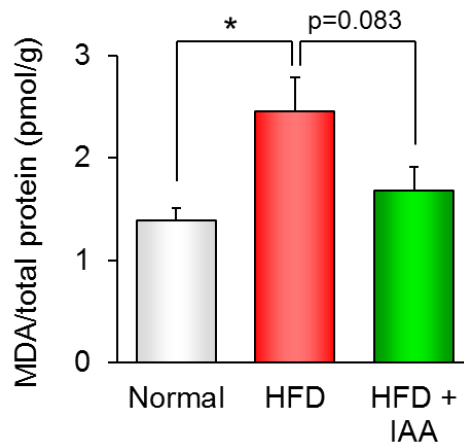
### 3) 脳内炎症および脂質酸化

海馬の炎症性サイトカイン、ケモカイン量を測定したところ、ND 群と比較して HFD 群において Interleukin (IL) -1 $\beta$ 、IL-6、Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  量が有意に増加した。HFD+IAA 群では IL-1 $\beta$ 、IL-6 の有意な増加が抑制され、TNF- $\alpha$  量は HFD 群と比較して有意に減少した (IL-1 $\beta$ ,  $F_{[2,27]} = 3.329$ ,  $p = 0.051$ ; IL-6,  $F_{[2,27]} = 3.812$ ,  $p = 0.035$ ; TNF- $\alpha$ ,  $F_{[2,27]} = 6.979$ ,  $p = 0.004$ ) (Fig. 1-1-3a-c)。HFD 群、HFD+IAA 群において、ND 群と比較した TNF- $\alpha$  変化量と体重変化量の比を算出したところ、比の値は HFD 群と比較して HFD+IAA 群において有意に低下した ( $t_{[18]} = 2.539$ ,  $p = 0.021$ ) (Fig. 1-1-3d)。すなわち、HFD+IAA 群における脳内炎症は体重の減少により想定される以上に抑制されていることが示唆された。

脳内炎症の惹起により活性酸素種の生成が促進され、その結果脂質酸化が引き起こされ神経変性につながることを報告されている[39,40]。そこで酸化脂質の指標である MDA を測定したところ、ND 群と比較して HFD 群では海馬の MDA 量が有意に増加し、HFD+IAA 群では有意な増加が抑制されることが明らかになった ( $F_{[2,27]} = 5.030$ ,  $p = 0.014$ ) (Fig. 1-1-4)。



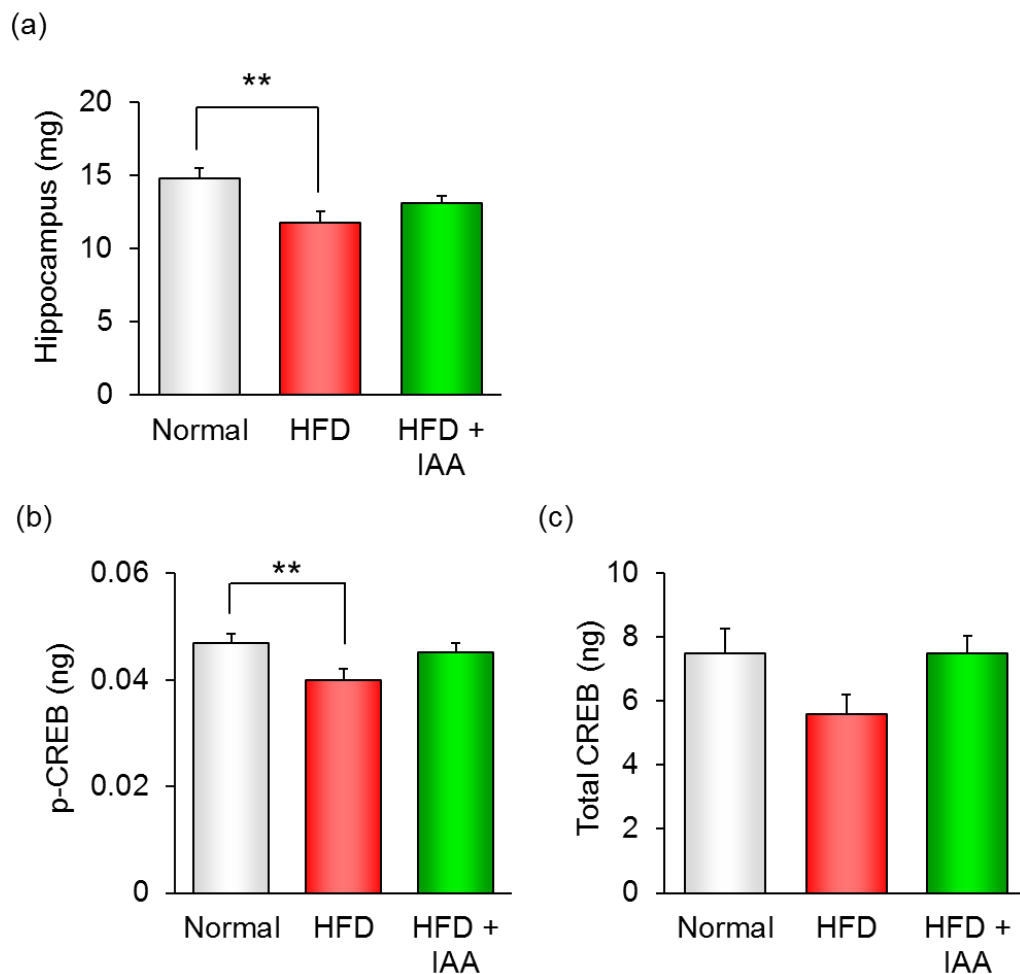
**Fig. 1-1-3** The effect of iso- $\alpha$ -acids on obesity-induced neuroinflammation in the hippocampus. The levels of IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b) and TNF- $\alpha$  (c) were measured using a multi-plex assay. (d) The ratio of variation of the TNF- $\alpha$  level to that of body weight gain was calculated by the following formula: (individual TNF- $\alpha$  concentration minus average TNF- $\alpha$  concentration in ND-fed mice)/(individual body weight minus average body weight in ND-fed mice). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10 mice per group). \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 versus each group.



**Fig. 1-1-4** The effect of iso- $\alpha$ -acids on obesity-induced lipid peroxidation in the hippocampus. The level of malondialdehyde (MDA) was measured by ELISA. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.

#### 4) 認知機能パラメータ評価

海馬重量を比較したところ、ND 群と比較して HFD 群において有意に減少し、HFD + IAA 群では有意な変化は認められなかった ( $F_{[2,27]} = 5.313, p = 0.011$ ) (Fig. 1-1-5a)。神経活動の指標である CREB およびリン酸化 CREB を評価したところ、ND 群と比較して HFD 群においてリン酸化 CREB 量が有意に減少し、イソ  $\alpha$  酸の摂取によりリン酸化 CREB の減少が抑制された ( $F_{[2,27]} = 3.763, p = 0.036$ ) (Fig. 1-1-5b)。一方で、total CREB 量に有意な変化は認められなかった ( $F_{[2,27]} = 3.003, p = 0.066$ ) (Fig. 1-1-5c)。これらの結果から、高脂肪食の摂取により海馬の委縮および神経活動低下が引き起こされ、イソ  $\alpha$  酸の摂取によりこれらの変化が抑制されることが示唆された。

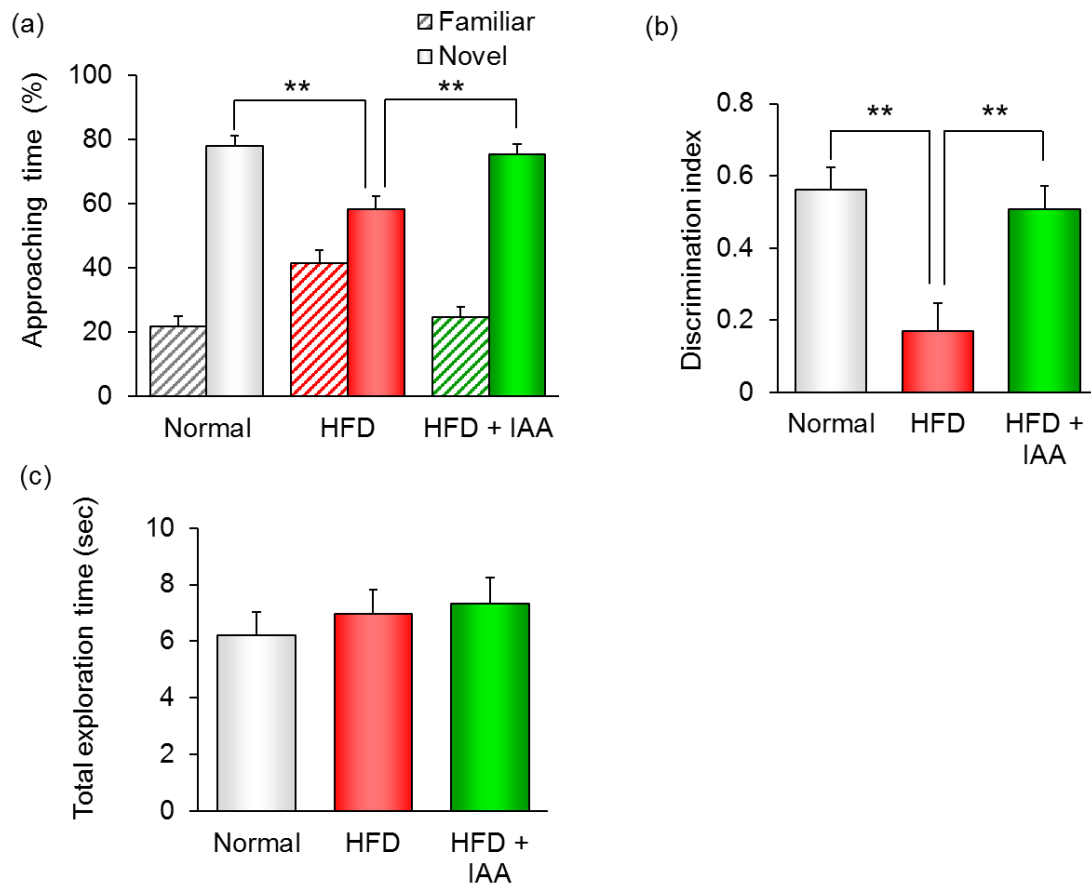


**Fig. 1-1-5** The effect of iso- $\alpha$ -acids on hippocampal volume and neuronal activity parameters. (a) Weights of hippocampus. (b, c) The levels of phosphorylated CREB (b) and total CREB (c). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10 mice per group). \*\*P < 0.01 versus each group.

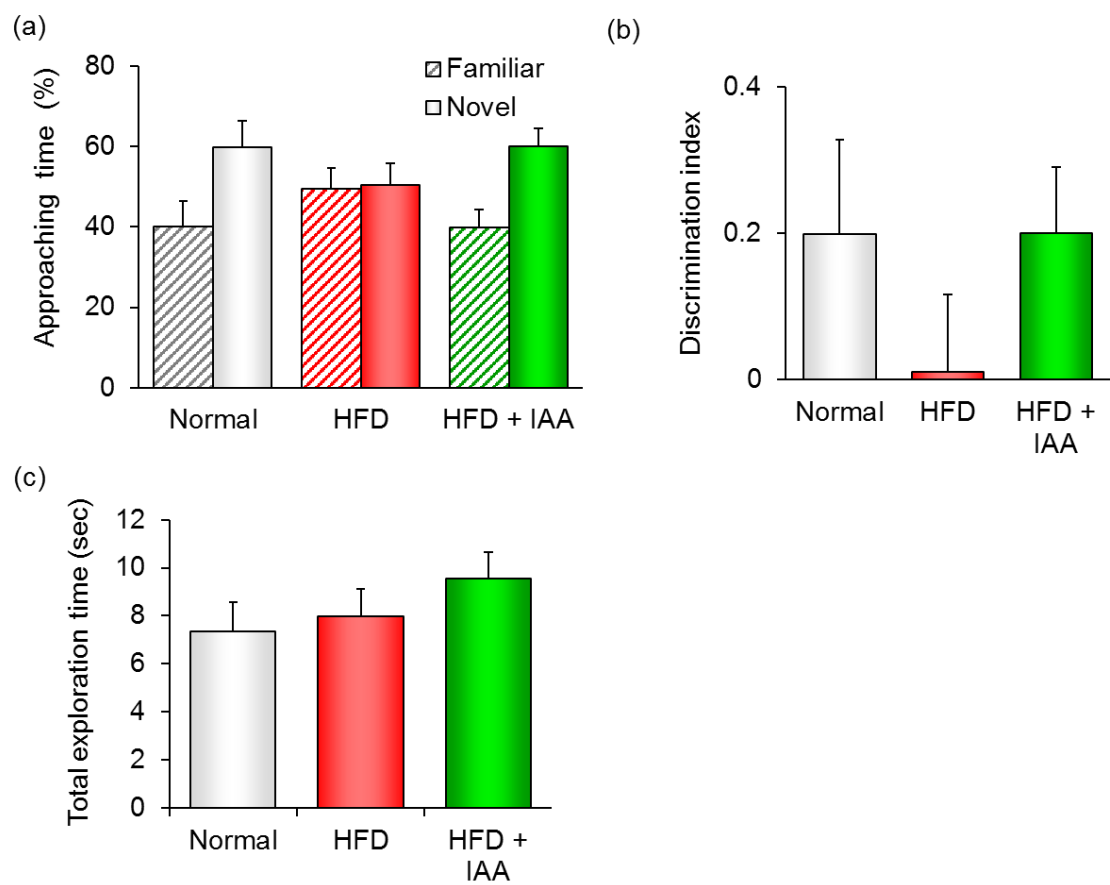
##### 5) 認知機能評価

エピソード記憶機能を NORT により評価したところ、新奇物体探索時間および DI 値が ND 群と比較して HFD 群において有意に減少し、HFD 群と比較して HFD+IAA 群において有意に増加した ( $F_{[2,25]} = 9.883, p = 0.001$ ) (Fig. 1-1-6ab)。総探索時間に変化は認められなかった ( $F_{[2,25]} = 0.441, p = 0.648$ ) (Fig. 1-1-6c)。高脂肪食摂取に伴うエピソード記憶機能の低下がイソ  $\alpha$  酸により改善することが明らかになった。空間記憶機能を NOLT により評価したところ、有意な差は認められなかったが新奇場所探索時間及び DI

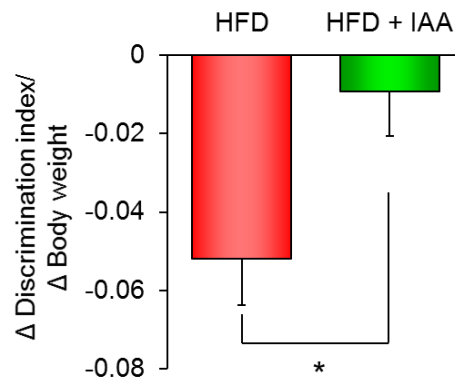
値が ND 群と比較して HFD 群において減少し、イソ  $\alpha$  酸摂取により増加する傾向が認められた ( $F_{[2,23]} = 1.057, p = 0.364$ ) (Fig. 1-1-7ab)。総探索時間に変化は認められなかった ( $F_{[2,23]} = 0.961, p = 0.397$ ) (Fig. 1-1-7c)。さらに、HFD 群、HFD+IAA 群において、ND 群と比較した NORT の DI 値変化量と体重変化量の比を算出したところ、比の値は HFD 群と比較して HFD+IAA 群において有意に増加した ( $t_{[18]} = 2.589, p = 0.019$ ) (Fig. 1-1-8)。すなわち、HFD+IAA 群におけるエピソード記憶は体重の減少により想定される以上に改善していることが示唆された。



**Fig. 1-1-6** The effect of iso- $\alpha$ -acids on obesity-induced episodic memory deficits in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object) / (total exploration time)). (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  mice per group). \*\* $P < 0.01$  versus each group.



**Fig. 1-1-7** The effect of iso- $\alpha$ -acids on obesity-induced spatial memory deficits in the NOLT. (a) Time spent exploring novel or familiar locations. (b) Discrimination index. (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 8–10 mice per group).

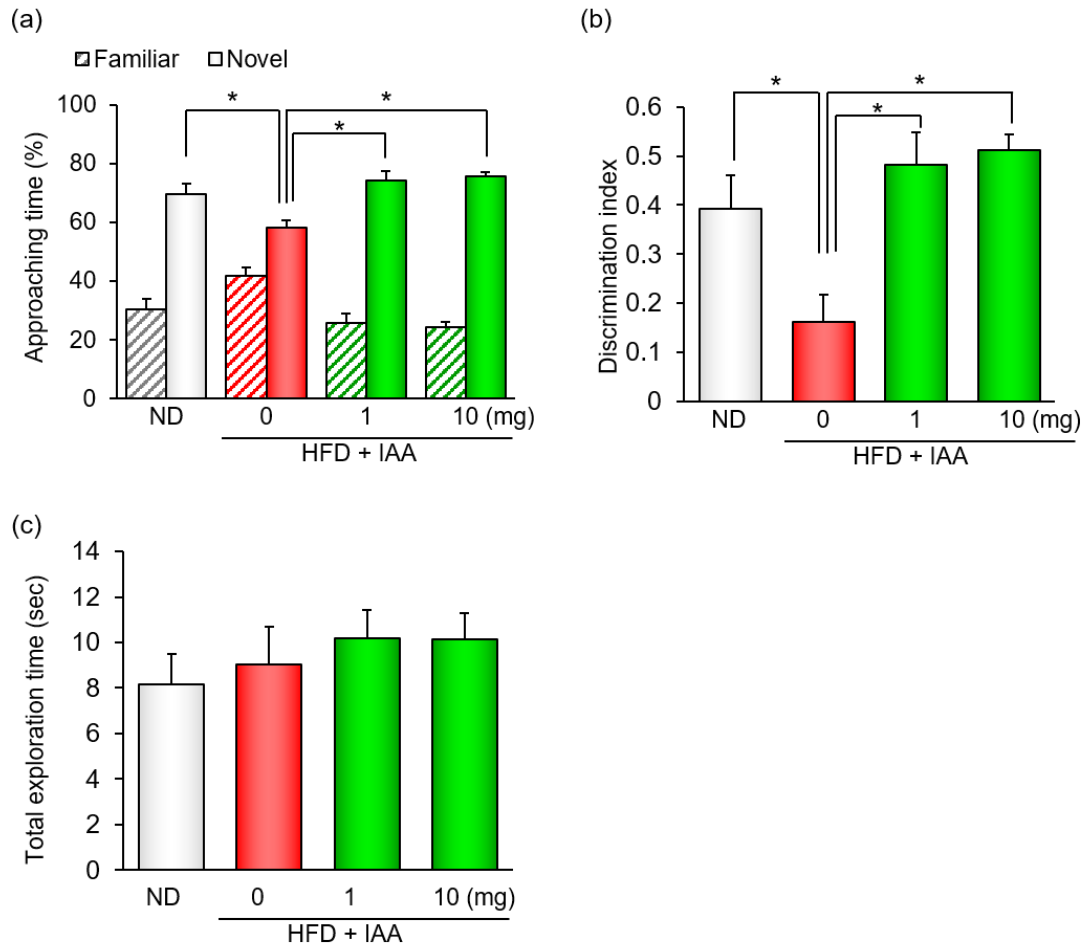


**Fig. 1-1-8** The ratio of the DI score variation to the body weight gain was calculated by the following formula: (individual DI score minus average DI score in ND-fed mice)/(individual body weight minus average body weight in ND-fed mice). Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 versus each group.

#### 6) 短期投与による認知機能評価

肥満に伴う認知機能低下に対するイソ $\alpha$ 酸短期投与の影響を評価するため、高脂肪食摂取による肥満誘導後のマウスを用いて NORT を実施した。新奇物体探索時間および DI 値が ND 群と比較して HFD 群において有意に減少し、イソ $\alpha$ 酸 (1、10 mg/kg) の投与により有意に増加した ( $F_{[3,30]} = 7.883, p = 0.001$ ) (Fig. 1-1-9ab)。総探索時間は各群間での変化は認められなかった ( $F_{[3,30]} = 0.481, p = 0.698$ ) (Fig. 1-1-9c)。これらの結果から、イソ $\alpha$ 酸は短期投与によって肥満に伴うエピソード記憶の低下を改善することが明らかになった。





**Fig. 1-1-9** The effect of single administration of iso- $\alpha$ -acids on obesity-induced episodic memory deficits in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object) / (total exploration time)). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.

## 5. 考察

本実験では、肥満に伴う認知機能低下に対するイソ $\alpha$ 酸の効果を検証することを目的に、通常食、高脂肪食、イソ $\alpha$ 酸含有高脂肪食をそれぞれマウスに摂餌し、肥満や認知機能に関する指標を評価した。

本実験により、イソ $\alpha$ 酸の長期摂取が高脂肪食摂取に伴う脳内の炎症性サイトカインの増加を抑制し、脳内炎症を抑制することが明らかになった (Fig. 1-1-3)。近年、脳内の慢性的な炎症は認知症を含む神経変性疾患、うつ病などの精神疾患などにおいて主要な病態の一つとして着目されている[7,41]。脳内の炎症はアミロイド $\beta$ などの老廃物の沈着、ストレス、細菌の感染、肥満などによって引き起こされることが知られている[42,43]。これまでにイソ $\alpha$ 酸は脳内にアミロイド $\beta$ を蓄積するアルツハイマー病モデルマウスの脳内炎症および認知機能低下を改善することが明らかになっている[32]。また、筆者らはイソ $\alpha$ 酸がリポ多糖の脳室内投与によるマウスの脳内炎症および認知機能低下を改善することを確認している (キリンホールディングス社未公表データ)。これらに加えて、本研究ではイソ $\alpha$ 酸が肥満に伴う脳内炎症を抑制することを明らかにし、イソ $\alpha$ 酸がさまざまな要因に伴う脳内炎症を抑制することを見出した。

通常食摂取群と比較した TNF- $\alpha$  の増加量と体重増加量の比を計算したところ、イソ $\alpha$ 酸摂取群の脳内炎症は体重減少量から予測される以上に低下していることが確認された (Fig. 1-1-3c)。イソ $\alpha$ 酸が肥満抑制効果だけでなく、炎症抑制効果を有することが肥満に伴う脳内炎症を強く抑制することにつながっていると考えられる。

これまでにイソ $\alpha$ 酸が肥満抑制や抗糖尿病効果を示し、そのメカニズムとしてイソ $\alpha$ 酸が PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  を活性化することが報告されている[27-29]。本試験においても、イソ $\alpha$ 酸は高脂肪食摂取に伴う体重や内臓脂肪重量の増加を有意に抑制した (Fig. 1-1-2)。また、イソ $\alpha$ 酸は血中の AST、尿素窒素、中性脂肪などの代謝に関する指標を改善した (Table 1-1-2)。これらの血中指標は PPAR アゴニストの投与により改善することが報告されており[44-46]、イソ $\alpha$ 酸は高脂肪食摂取に伴う内臓の損傷を抑制していると考えられる。

脳内炎症の惹起には、脳内における免疫機能をつかさど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。ミクログリアは食食作用により老廃物を除去して脳内環境を正常に維持する一方で、老廃物やウイルス感染などの刺激に伴い炎症状態のフェノタイプに変化し、脳内炎症を惹起する[47]。PPAR $\gamma$  はミクログリアを抗炎症状態のフェノタイプに変えることで炎症反応を抑制し、アミロイド $\beta$ に対する食食能を高めることから、近年アルツハイマー病の治療ターゲットとして着目されている[31]。筆者らのグル

ープでは、イソ  $\alpha$  酸がミクログリアを抗炎症型のフェノタイプに誘導し、炎症性サイトカイン分泌を抑制することを確認している[32]。本研究においてもイソ  $\alpha$  酸は PPAR $\gamma$  の活性化を介して肥満に伴う脳内炎症を抑制したと考えられる。実際に、PPAR $\gamma$  の選択的アゴニストで II 型糖尿病治療薬として用いられるロシグリタゾンは高脂肪食誘導肥満モデルラットのインスリン抵抗性改善および空間学習能を改善することが報告されており[48]、PPAR $\gamma$  アゴニストが高脂肪食摂取に伴う認知機能低下に有用であることが確認されている。一方、ロシグリタゾンなどの PPAR $\gamma$  アゴニストは薬剤として用いられしており、予防のために日常的に摂取することは困難である。イソ  $\alpha$  酸は食経験が豊富な食品成分であるため日常的な摂取に適しており、肥満に伴う認知機能低下を予防する有用な手段となりうる。

本実験では、高脂肪食摂取により海馬の重量減少、脂質酸化、神経活動マーカー p-CREB 量の有意な減少が認められ、有意な変化ではないが total CREB についても減少傾向が認められた。イソ  $\alpha$  酸摂取による有意な改善は認められなかったが、高脂肪食摂取群と比較して抑制する傾向が認められた (Fig. 1-1-4, 1-1-5)。過去の報告においても、高脂肪食摂取による脳内炎症の惹起に伴い酸化ストレスや脂質酸化が引き起こされ、神経の減少につながることを報告されており、同様の変化が認められた[49,50]。なお、神経活動を評価する際に一般的に用いられる p-CREB / total CREB 比は各群間において有意な変化は認められなかった (Data not shown)。過去の報告において、高脂肪食摂取に伴い海馬の p-CREB、total CREB のタンパク質量がいずれも減少することが報告されている[51]。本試験においても pCREB / total CREB 比の変化ではなく、海馬萎縮に伴う p-CREB、CREB の減少そのものが神経活動低下につながっていると考えられる。実際に、本試験では高脂肪食摂取によって NORT におけるエピソード記憶が有意に低下し、イソ  $\alpha$  酸の摂取により有意な改善を示した (Fig. 1-1-6)。脳内炎症の場合と同様に、通常食摂取群と比較した DI 値の変化量と体重増加量の比を計算し、イソ  $\alpha$  酸摂取群の認知機能が体重減少量から予測される以上に改善していることが確認された (Fig. 1-1-8)。これらの結果から、イソ  $\alpha$  酸が肥満抑制効果と脳内炎症抑制効果を併せ持つことで肥満に伴う認知機能低下を効果的に改善することが示唆された。

イソ  $\alpha$  酸の長期摂取による認知機能改善効果に加えて、イソ  $\alpha$  酸は短期投与により肥満に伴う認知機能低下を改善することが明らかになった (Fig. 1-1-9)。イソ  $\alpha$  酸は予防的な効果を示すだけでなく、認知機能低下後の治療的な効果を発揮する可能性がある。また、イソ  $\alpha$  酸は肥満抑制や脳内炎症抑制などの長期的なメカニズム以外にも、短期的なメカニズムによって認知機能を改善することが示唆された。このイソ  $\alpha$  酸の認知機能

改善効果については次節で詳細に報告する。

本研究の限界として、イソ $\alpha$ 酸の肥満抑制効果における摂餌量への影響が検証できていない点が挙げられる。行動試験により認知機能を評価する場合、動物へのストレスを低減するため複数飼育を実施することが望ましく、そのため本実験でも複数飼育を実施したため各個体の摂餌量は評価していない。なお、高脂肪食にイソ $\alpha$ 酸を混餌投与した過去の報告では、イソ $\alpha$ 酸が摂餌量に影響を与えないことが確認されている[38]。

以上、本実験ではイソ $\alpha$ 酸が肥満抑制および脳内炎症抑制作用を介して認知機能低下を抑制することを示した。肥満は認知症のリスクになると考えられており、イソ $\alpha$ 酸は肥満抑制を介した認知症予防のための有用な手段となる可能性がある。

## 第2節 イソ $\alpha$ 酸はタッチパネルオペラント試験系において高次認知機能を改善する

### 1. 要約

筆者らの最近の研究で、イソ $\alpha$ 酸は海馬ドーパミン神経系の活性化を介して、海馬に関連した空間作業記憶やエピソード記憶を改善することが明らかになった。しかし、長期的な学習機能や前頭皮質に関連した注意、実行機能、記憶の柔軟性などの高次認知機能に及ぼす影響は不明であった。そこで、高次認知機能の評価が可能なタッチパネルオペラント試験系を用いて、視覚弁別 (VD) 課題および逆転弁別 (RD) 課題におけるイソ $\alpha$ 酸の影響を検証した。

VD 課題において、通常マウスと比較してスコポラミン誘導健忘症モデルマウスの正答率が有意に低下し、反応時間が有意に増加した。イソ $\alpha$ 酸 (1 mg/kg) の経口投与により、スコポラミン投与に伴う正答率低下、反応時間増加が有意に改善した。続いて、VD 課題を完了したマウスを用いて RD 課題を実施したところ、イソ $\alpha$ 酸 (1 mg/kg) の経口投与により RD 課題の正答率が有意に改善した。これらの結果から、イソ $\alpha$ 酸は学習機能、注意、実行機能、記憶の柔軟性などを改善することが明らかになった。

## 2. 背景

第1章第1節では、イソ $\alpha$ 酸が短期投与で認知機能を改善する可能性を示した。実際に、筆者らの最近の研究により、イソ $\alpha$ 酸は単回投与でスコポラミン誘導健忘症モデルマウスの空間作業記憶を改善すること、および通常マウスのエピソード記憶を改善することが明らかになった[33]。空間作業記憶やエピソード記憶は海馬に関連した機能であると言われているため、海馬での神経伝達に着目してメカニズムを検証したところ、イソ $\alpha$ 酸は海馬のドーパミン含量および海馬からのドーパミン産生量を増加させることを見出した。ドーパミン D1/D5 受容体アンタゴニストの投与および海馬特異的なドーパミン D1 受容体ノックダウンによりイソ $\alpha$ 酸の認知機能改善効果は減弱した。これらの結果から、イソ $\alpha$ 酸が海馬のドーパミン神経伝達を強化し、空間作業記憶やエピソード記憶などの海馬に関連した記憶機能を改善することが示唆された。

イソ $\alpha$ 酸の海馬機能に及ぼす影響が明らかになった一方で、認知機能において重要な役割を果たす前頭皮質機能への影響や、長期間の試行による学習機能への影響は検証されていなかった。前頭皮質機能の代表的なものとしては、注意、実行機能、記憶の柔軟性などが挙げられる。注意機能は外界の情報から目的に合った情報を選択する機能であり、実行機能は目的に応じた行動を連続的に切り替えながら実行していく機能である[52]。記憶の柔軟性は、一度記憶した情報や組織化した行動を、環境の変化に応じて切り替え新しく組織化した行動を形成する能力を指す[53]。いずれの機能も、動物においては環境に合わせて効率的に食糧を得るためや外敵から身を守るためなど生存に必須な能力であり、ヒトにおいても社会的な生活を送るうえで重要な能力である。これらの能力を高く維持することは、加齢に伴う認知機能低下や認知症患者の QOL 改善への寄与が大きく特に期待されるものである。

近年、タッチパネルオペラント試験系の発展によりマウスにおける高次認知機能の評価が可能になった。タッチパネルオペラント試験系はパブプロフ型オートシェイピングに基づいて構築された試験系であり[54,55]、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症などの疾患モデルマウスの認知機能を評価するために使用されてきた[56-58]。この試験系はヒトにおける認知機能評価方法に近いことや、複雑な課題設定が可能であることから、マウスにおける高次認知機能の評価に有用であると考えられている。

本研究ではタッチパネルオペラント試験系を用いて視覚弁別機能および逆転学習機能の評価した。視覚弁別には学習機能と記憶処理の統合が必要であり[59]、逆転学習には記憶の柔軟性が必要である[60]。加えて、これらの課題における反応時間は注意機能の指標として評価することができる。これまでにスコポラミンを脳室内に投与したマウ

スにおいて視覚弁別や逆転学習の低下が報告されているが[61]、これらの系を用いて食品成分の有効性を明らかにした報告はまだない。本研究では、スコポラミン誘導健忘症モデルの視覚弁別課題における正答率、反応時間、および同じマウスを用いた逆転学習課題における正答率に及ぼすイソ  $\alpha$  酸の影響を評価した。

### 3. 実験方法

#### 1) 試薬

イソ $\alpha$ 酸は異性化ホップエキス (Hopsteiner 社) として、第 1 章第 1 節と同じものを用いた。スコポラミン塩酸塩は Sigma Aldrich 社 (St. Louis, USA) より購入した。

#### 2) 動物

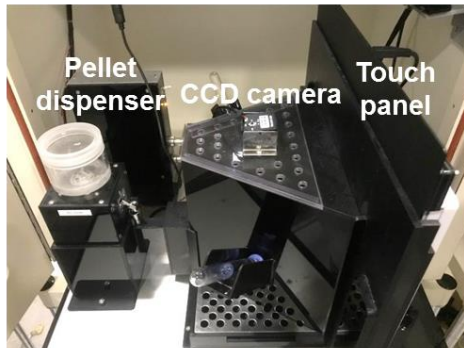
7 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー社) を購入した。飼育は 12 時間の明暗サイクル (明期: 午前 8 時–午後 8 時)、室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30–70% で管理された飼育室で行い、飼料として CE-2 (日本クレア社) を与えて 1 週間馴化した。動物実験は、キリンホールディングス株式会社動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った (実験承認番号: AN10163-Z00、AN10364-Z00)。

#### 3) タッチパネルオペラント試験装置

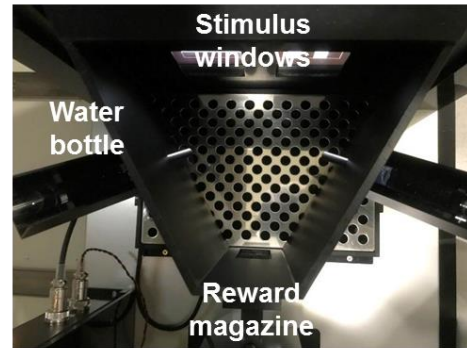
タッチパネルオペラント試験装置は小原医科産業社より購入した。装置はタッチパネル、ペレットディスペンサー、給水ボトルで構成されている (Fig. 1-2-1)。タッチパネルは  $6\text{ cm}\times 6\text{ cm}$  の正方形から成る刺激提示窓により 2 つに分割されている。CCD カメラを装置の上に設置し、試験中のマウスの行動を観察できるようにした。装置は照明とスピーカーを設置した防音チャンバー内に設置し、さらにチャンバーは室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  の防音室内に設置した。



(a)



(b)



**Fig. 1-2-1** The touch panel operant system apparatus. (a) The apparatus is composed of a touch panel, pellet dispenser, and water bottles. The apparatus is contained within a sound-isolated chamber. A CCD camera is mounted on the apparatus. (b) The touch panel is divided into two stimulus windows by a black wooden board, and a reward magazine is placed at the opposite side of the touch panel.

#### 4) 馴化

試験実施前に動物の摂餌量を制限し、体重を 80% に低下させた。試験期間中は毎日マウスの体重を測定し、過度に体重が減少しないよう摂餌量のコントロールを行った。体重が 80% に減少したのちに、報酬として使用される 10 mg のペレット (AIN-76A; TestDiet 社、St. Louis、USA) を各マウスに 100 粒/日、3 日間与え、ペレットに馴化させた。続いてマウスをタッチパネルオペラント試験装置に入れて 15 分間探索させる試行を 3 日間実施し、装置への馴化を行った。装置内のペレットディスペンサーにペレットを 15 粒設置し、マウスにペレットの供給場所を学習させた。

#### 5) プレトレーニング (Fig. 1-2-2a)

##### i) マガジントレーニング

マガジントレーニングでは、報酬ペレットが 1 分間に 1 粒、音による合図とともに自動的に供給される試行を 15 分間行い、音の合図とともにペレットが供給されることをマウスに学習させた。マガジントレーニングは 1 日に 1 回、3 日間実施した。

##### i i) オールコレクトトレーニング

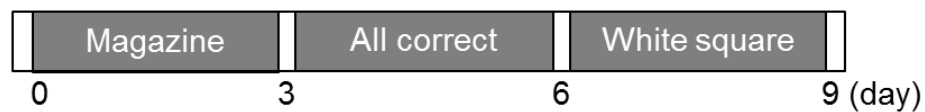
オールコレクトトレーニングでは、白色の正方形の画像を両方の刺激提示窓に表示し、マウスがどちらかの画像にタッチすれば報酬ペレットが供給される試行を実施した。一度の課題は 50 回の試行の完了または 15 分間が経過すると終了とし、課題は 1 日に 1 回、3 日間実施した。

i i i) ホワイトスクエアトレーニング

ホワイトスクエアトレーニングでは、白色の正方形の画像をランダムに片方の刺激提示窓に表示し、もう一方の窓はブランクとした。マウスが画像にタッチすると報酬ペレットが供給され、マウスに一方の画像をタッチすると報酬が得られることを学習させた。一度の課題は 50 回の試行の完了または 15 分間が経過すると終了とした。オールコレクトトレーニングは 1 日に 1 回、3 日間実施した。

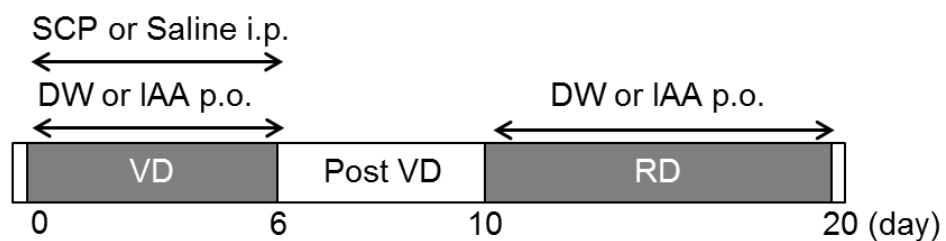
(a)

Training schedule



(b)

Test schedule



**Fig. 1-2-2** The schedule of training period (a) and test period (b). SCP, scopolamine; DW, distilled water; IAA, iso- $\alpha$ -acids.

6) 視覚弁別 (Visual Discrimination; VD) 課題 (Fig. 1-2-2b)

VD 課題では、各試行で縦縞と横縞の画像のペアを左右ランダムに表示し、半数のマ

ウスは縦縞の画像を正解、横縞の画像を不正解とし、残りの半数のマウスは横縞の画像を正解、縦縞の画像を不正解とした (Fig. 1-2-3)。マウスが正解の画像をタッチすると正解音による合図とともに報酬ペレットが供給され、2 秒間の inter-trial interval (ITI) とした。マウスが不正解の画像をタッチすると報酬ペレットは供給されず、ハウスランプを消灯して 5 秒間の ITI とした。ITI の後にマウスがペレットマガジンに触れると次の試行を開始した。マウスが 30 秒間タッチパネルにタッチしない場合はその試行を終了とした。一度の試験は 50 回の試行を完了または 15 分間経過した場合に終了とした。イソ  $\alpha$  酸 (1 mg/kg) または蒸留水を試験開始 60 分前に胃ゾンデにより経口投与し、スコポラミン (0.8 mg/kg) または生理食塩水を試験開始 30 分前に腹腔内投与した。

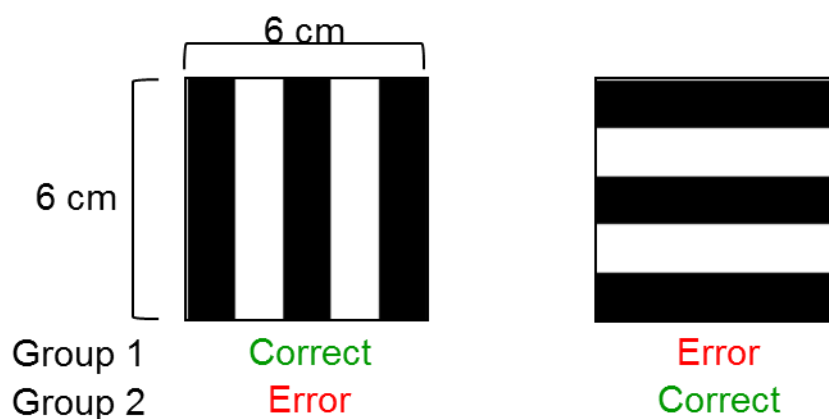


Fig. 1-2-3 The pictures used in the VD and RD tasks.

#### 7) 逆転弁別 (Reversal Discrimination; RD) 課題 (Fig. 1-2-2b)

RD 課題は VD 課題で学習した正解と不正解の画像を入れ替えて試験を行い、記憶の柔軟性を評価する系である。すなわち、VD 課題において縦縞を正解、横縞を不正解としたマウスでは、横縞を正解、縦縞を不正解として試験を実施した。RD 課題には VD 課題におけるスコポラミン投与群およびイソ  $\alpha$  酸+スコポラミン投与群を引き続き使用した。RD 課題を実施する前に、マウスはサンプルの投与を行わずに VD 課題を続けて実施し、正答率 80%を超えたのちに RD 課題を実施した。イソ  $\alpha$  酸 (1 mg/kg) または蒸留水を試験開始 60 分前に胃ゾンデにより経口投与した。課題の逆転に伴う負荷に

対する効果を評価するため、スコポリミンの投与は行わなかった。試験開始1日目の正答率からの変化量（(各試験日の正答率) - (1日目の正答率)）を記憶の柔軟性の指標として評価した。

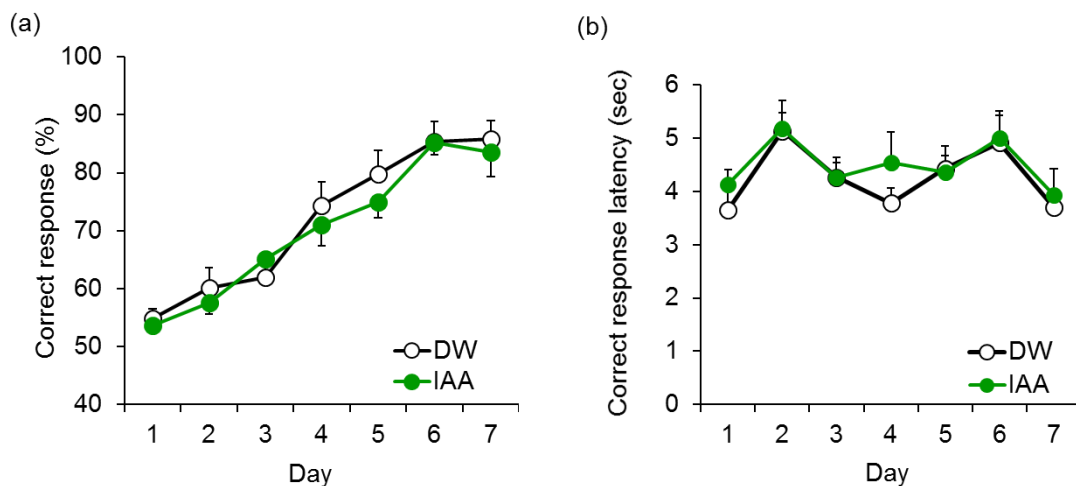
#### 8) 統計解析

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。正答率変化は two-way ANOVA によりサンプル投与と試験期間の影響を解析したのちに、群間の差を Bonferroni's test または student's *t* test により評価した。その他の他群比較は one-way ANOVA による分散分析の後に Tukey-Kramer's test により解析し、2群の比較は student's *t* test を用いて行った。P 値 0.05 以下を統計学的有意差ありと判断した。統計解析にはエクセル統計（Bell Curve 社）を用いた。

## 4. 結果

### 1) 通常マウスにおける視覚弁別機能

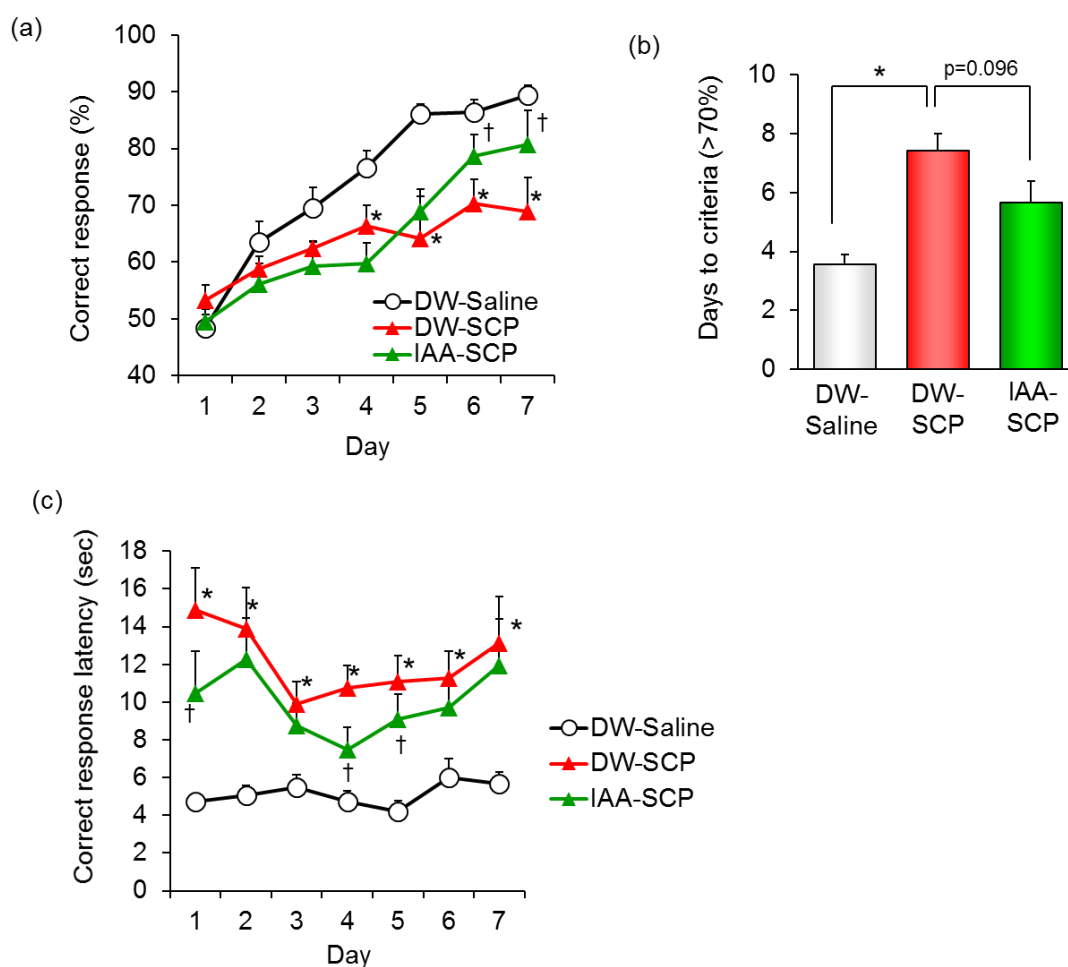
タッチパネルオペラント試験系の妥当性の確認および通常マウスにおけるイソ  $\alpha$  酸の影響を評価するため、通常マウスを用いた VD 課題を実施した。有意な試験期間の主効果を検出し ( $F_{[6,102]} = 39.38, p < 0.001$ )、投与の有意な主効果 ( $F_{[1,17]} = 0.173, p = 0.683$ ) および交互作用 ( $F_{[6,102]} = 0.535, p = 0.781$ ) は認められなかった。通常マウス、イソ  $\alpha$  酸投与マウスともに 1 日目の正答率と比較して 4 日目以降の正答率が有意に増加し、6 日目には正答率が 85% を超えた (Fig. 1-2-4a)。課題の反応時間において、有意な試験期間の主効果を検出し ( $F_{[6,102]} = 5.055; p < 0.001$ )、投与の有意な主効果 ( $F_{[1,17]} = 0.210, p = 0.653$ ) および交互作用 ( $F_{[6,102]} = 0.462, p = 0.835$ ) は認められなかった。経時的な反応時間の変化は認められなかった (Fig. 1-2-4b)。これらの結果から、本研究で実施したタッチパネルオペラント試験において通常マウスが VD 課題を遂行できることが明らかになり、試験系の妥当性が確認された。一方、通常マウスにおいてイソ  $\alpha$  酸の有効性は認められなかった。



**Fig. 1-2-4** VD learning in untreated control mice and iso- $\alpha$ -acids-treated mice. (a) Proportion of correct responses (%) across sessions by DW-treated mice (control group) and iso- $\alpha$ -acids-treated mice (IAA group) in the VD task. (b) Correct response latency, which indicates the time between the trial start and correct response. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$  mice per group).

## 2) スコポラミン誘導健忘症モデルにおける視覚弁別機能

続いて、スコポラミン誘導健忘症モデルを用いてイソ  $\alpha$  酸の視覚弁別学習に及ぼす影響を評価した。有意な試験期間の主効果 ( $F_{[6,114]} = 26.36, p < 0.001$ )、投与の主効果 ( $F_{[2,19]} = 11.35, p < 0.001$ )、および試験期間と投与の交互作用 ( $F_{[12,114]} = 2.475, p = 0.006$ ) が認められた。通常マウスと比較してスコポラミン投与マウスでは試験 4 日目以降の正答率が有意に減少した。イソ  $\alpha$  酸+スコポラミン投与群ではスコポラミン投与群と比較して試験 6、7 日目の正答率が有意に増加した (Fig. 1-2-5a)。正答率が 70% を超えるまでに要した日数は通常マウスと比較してスコポラミン投与群において有意に増加し、イソ  $\alpha$  酸投与により有意に減少した ( $F_{[2,19]} = 14.47, p < 0.001$ ) (Fig. 1-2-5b)。これらの結果から、スコポラミン投与により視覚弁別機能が低下し、イソ  $\alpha$  酸はスコポラミン健忘症モデルの視覚弁別機能を改善することが明らかになった。課題の正答率に加えて課題への反応時間を評価したところ、有意な試験期間の主効果 ( $F_{[6,114]} = 2.831, p = 0.013$ ) および投与の主効果 ( $F_{[2,19]} = 24.38, p < 0.001$ ) を検出した一方、有意な交互作用は認められなかった ( $F_{[12,114]} = 1.049, p = 0.410$ )。通常マウスと比較してスコポラミン投与により有意に増加し、イソ  $\alpha$  酸投与により有意に減少した (Fig. 1-2-5c)。スコポラミンは VD 課題における注意力を低下させ、イソ  $\alpha$  酸が注意力の低下を改善することが明らかになった。

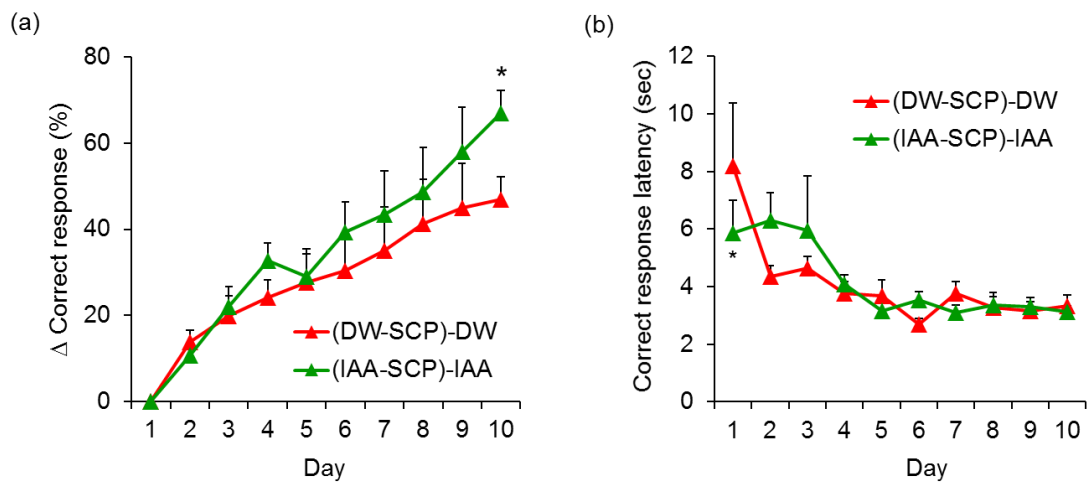


**Fig. 1-2-5** The effect of iso- $\alpha$ -acids on VD learning in scopolamine-induced amnesia model mice. (a) Correct responses (%) across sessions in the VD task. Mice were divided into three groups: DW and saline-treated group (DW-saline group), DW and scopolamine-treated group (DW-SCP group), and iso- $\alpha$ -acids and scopolamine-treated group (IAA-SCP group). (b) Daily sessions required to reach the correct response criterion (>70%). (c) Correct response latency. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6-9 mice per group). \*P < 0.05 vs. DW-saline group, †P < 0.05 vs. DW-SCP group.

### 3) 逆転学習機能

VD 課題におけるスコポラミン投与群およびイソ  $\alpha$  酸+スコポラミン投与群のマウスを用いて、サンプルの投与を行わずに VD 課題を行い、正答率 80%以上となったマウスを用いて RD 課題を実施した。RD 課題ではスコポラミン投与は行わず、蒸留水投与群

およびイソ  $\alpha$  酸投与群とした。有意な試験期間の主効果 ( $F_{[9,99]} = 38.30, p < 0.001$ ) を検出したが、有意な投与の主効果 ( $F_{[1,11]} = 1.220, p = 0.293$ ) および交互作用 ( $F_{[9,99]} = 1.444, p = 0.180$ ) は認められなかった。正答率の変化量は蒸留水群と比較してイソ  $\alpha$  酸群において試験 10 日目に有意に改善し、イソ  $\alpha$  酸が記憶の柔軟性を改善することが明らかになった (Fig. 1-2-6a)。課題への反応時間を評価したところ、有意な試験期間の主効果を検出し、サンプル投与の主効果および試験期間とサンプル投与の相互作用は認められなかった。課題 1 日目の反応時間は蒸留水投与群と比較してイソ  $\alpha$  酸投与群において有意に減少した一方、その他の日数において差は認められなかった (Fig. 1-2-6b)。



**Fig. 1-2-6** The effect of iso- $\alpha$ -acids on RD learning. (a) Changes in correct response rate across sessions in the RD task  $\Delta$  correct response was calculated as (Correct response rate of each daily trial) – (Correct response rate of 1st trial). Mice were administered DW or iso- $\alpha$ -acids (1 mg/kg) by oral gavage 60 min before the task. (b) Correct response latency. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6-7 mice per group). \*P < 0.05 vs. control group.



## 5. 考察

本実験では、タッチパネルオペラント試験系を用いて VD 課題および RD 課題を実施した。最近の筆者らの研究で、イソ  $\alpha$  酸が Y 字迷路試験によって評価される空間作業記憶や NORT によって評価されるエピソード記憶を改善することを報告した[33]。空間作業記憶やエピソード記憶は海馬に関連する記憶機能であるとされており、認知機能において重要な役割を果たす前頭皮質の機能に及ぼすイソ  $\alpha$  酸の影響は不明であった。一方で、注意、実行機能、記憶の柔軟性などの前頭皮質に関連した機能はげっ歯類を用いた迷路試験などによっては評価が困難である。そこで、本実験ではタッチパネルオペラント試験系を構築、実施した。

げっ歯類のタッチパネルオペラント試験系は、パプロフ型オートシェイピング、すなわち報酬を得られる正の刺激と報酬を得られない負の刺激を用いた学習強化に基づいた試験系である[54,55]。この試験系には二つの大きな利点があり、一つは比較的ヒトの認知機能検査に近い試験系であること、もう一つは課題の設定方法により様々な認知機能を評価可能であることである。

一つ目の利点について、げっ歯類のタッチパネルオペラント試験は Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB[62]) などのタッチパネルを用いたヒトの認知機能検査に近い試験系である。実際に、統合失調症などの発症に関与する遺伝子 *Dlg2* に異常が認められるヒトと、同様の遺伝子を欠損したマウスそれぞれにタッチパネルを用いて、画像の種類と提示される場所を組み合わせる対連合学習 (Paired associates learning; PAL) 課題を実施したところ、両者で同様の認知機能低下を検出したことが報告されている[63]。これらの報告から、げっ歯類のタッチパネルオペラント試験で得られた結果はヒトへの外挿性が高いと考えられる。本試験ではイソ  $\alpha$  酸が VD 課題、RD 課題の正答率を高めたことから、ヒトの視覚弁別機能や記憶の柔軟性にも有効性を示すことが期待できる。今後、ヒトの認知機能に及ぼすイソ  $\alpha$  酸の効果を検証する臨床試験の実施が期待される。

もう一つの利点について、タッチパネルオペラント試験系は表示する画像の種類や場所、課題時間、聴覚や嗅覚刺激の提示の有無などを組み合わせることで多様な試験系を構築可能である。本実験で使用した VD 課題と RD 課題や前述の PAL 課題に加えて、画像を 1 種類ずつ提示し、タッチすると正解となる画像とタッチしないと正解となる画像を学習させ抑制機能を評価する Go-No go 課題などが実施可能とされる。これらの機能は過去にはげっ歯類では評価できない、またはげっ歯類にこれらの機能は備わっていないと言われていたが、タッチパネルオペラント試験系の発展により評価が可能となっ

てきた。これらの評価系を用いた、イソ  $\alpha$  酸の高次認知機能への影響のさらなる検証が期待される。

本研究では、スコポラミン投与により引き起こされる視覚弁別機能の低下がイソ  $\alpha$  酸の投与により改善することが明らかになった (Fig. 1-2-5)。本結果は筆者らの知る限りではタッチパネルオペラント試験において投与物質の有効性を見出した初めての報告である。一方、スコポラミンを投与していない通常マウスに対しては、イソ  $\alpha$  酸の投与による視覚弁別機能改善効果は認められなかった (Fig. 1-2-4)。VD 課題における通常マウスの学習曲線はすでに限界に達しており、イソ  $\alpha$  酸の投与による更なる改善効果は検出できなかったためと考えられる。VD 課題の評価にはスコポラミン誘導健忘症モデルや認知機能が低下した病態モデルなどの使用が適していると考えられる。

イソ  $\alpha$  酸は海馬のドーパミン含有量および海馬におけるドーパミン分泌量を増加させること、およびイソ  $\alpha$  酸の記憶改善効果には海馬ドーパミン D1 受容体が関与することが明らかになっている[33]。近年、ドーパミン D2 様受容体が VD 課題、RD 課題の遂行に関与していることが報告された[64]。また、セロトニンは記憶の柔軟性に関与しており、筆者らの未公表データでも通常マウスの視覚弁別機能と皮質セロトニン量に正の相関があることが確認されている。このように視覚弁別や逆転学習にもドーパミンを含むモノアミン神経伝達物質が重要な役割を果たしていることが示唆されている。イソ  $\alpha$  酸の視覚弁別、逆転学習改善効果におけるドーパミンシグナルの関与については未検証であるが、ドーパミン神経系の活性化を介したメカニズムであることが予想される。

また、本研究ではイソ  $\alpha$  酸がスコポラミン投与群と比較して VD 課題中の反応時間を有意に改善することを示した (Fig. 1-2-5c)。VD 課題は注意力の評価を目的とした評価系ではないものの、この結果からイソ  $\alpha$  酸が注意力を改善することが示唆された。注意力の低下はコリン作動性神経の機能低下により引き起こされ、アルツハイマー病の病態の一つである[65]。また、ドーパミンは注意欠如・多動性障害 (ADHD) において重要な役割を果たしており、ドーパミンを補うことは重要な治療戦略の一つである[66]。イソ  $\alpha$  酸はドーパミン神経を活性化することで注意機能を改善すると考えられる。今後、認知機能への影響だけでなく、アルツハイマー病や ADHD における注意機能低下へのより詳細な検討が期待される。

VD 学習の低下はアルツハイマー病を含む様々な神経変性疾患の患者で認められる[67]。本試験で用いたスコポラミン誘導健忘症はアルツハイマー病様の認知機能低下を示すモデルであり、タッチパネルオペラント試験系における視覚弁別機能の低下が確認された。イソ  $\alpha$  酸はスコポラミン誘導健忘症モデルの認知機能を改善したことから、ア

アルツハイマー病の病態に有効である可能性がある。今後、よりアルツハイマー病に近い病態を示すモデルマウスなどを用いた、イソ $\alpha$ 酸の高次認知機能への効果検証が期待される。

以上、本実験では高次認知機能に及ぼすイソ $\alpha$ 酸の効果をタッチパネルオペラント試験系にて評価し、イソ $\alpha$ 酸が視覚弁別機能や逆転学習機能を高めることを示した。イソ $\alpha$ 酸が注意、実行機能、記憶の柔軟性を高めることを示唆するとともに、タッチパネルオペラント試験系を用いて食品成分の有効性を評価可能であることを示した。注意、実行機能、記憶の柔軟性はいずれもマウスにおいては生存に必須、ヒトにおいても社会的生活を送るうえで重要な能力であり、イソ $\alpha$ 酸によりこれらの機能を維持することが可能になれば認知症患者のQOLを大きく改善することが期待できる。

## 〈第2章 熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果〉

## 第1節 熟成ホップ苦味酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する

### 1. 要約

熟成ホップ苦味酸はホップに含まれる $\alpha$ 酸および $\beta$ 酸が酸化反応を受けて生成する $\beta$ トリカルボニル化合物群である。熟成ホップ苦味酸はイソ $\alpha$ 酸と共通した構造を有することから、イソ $\alpha$ 酸と似た生理機能を有することが期待された。実際に、熟成ホップ苦味酸は肥満抑制効果を有することが明らかになっている。しかし、肥満に伴う認知機能低下に及ぼす効果は不明であった。

マウスに通常食、高脂肪食、熟成ホップ苦味酸 (0.05% w/w) 含有高脂肪食を8週間摂取させ、体重、脂肪重量、血中生化学指標、および認知機能を評価した。熟成ホップ苦味酸は高脂肪食摂取に伴う体重、内臓脂肪重量の増加を有意に抑制した。また、血中グルコース、インスリン濃度を低下させた。さらに、NORTによりエピソード記憶を評価したところ、熟成ホップ苦味酸は高脂肪食摂取マウスのエピソード記憶を有意に改善した。体重および内臓脂肪重量はエピソード記憶と負の相関があり、熟成ホップ苦味酸は体重、脂肪重量低下を介して認知機能を改善することが示唆された。また、高脂肪食による肥満誘導後のマウスに熟成ホップ苦味酸を短期投与した場合も熟成ホップ苦味酸はエピソード記憶を改善した。以上、熟成ホップ苦味酸は肥満に伴う認知機能低下を改善することが明らかになった。

## 2. 背景

ホップに含まれる  $\alpha$  酸および  $\beta$  酸は、ホップの貯蔵過程で酸化反応を受け、多様な化合物を生成することが知られていた。近年、 $\alpha$  酸、 $\beta$  酸およびそれらの酸化物の HPLC を用いた分析および精製技術が確立され、これら化合物の構造及び生成過程が明らかになった[68]。さらに苦味酸の酸化物群を含むフラクションが分画され、ここに含まれる化合物は熟成ホップ苦味酸と名付けられた[22]。熟成ホップ苦味酸に含まれる化合物の分析結果から、これらの化合物は  $\beta$  トリカルボニル構造を有することが明らかになり、この構造はイソ  $\alpha$  酸とも共通するものであった。

熟成ホップ苦味酸がイソ  $\alpha$  酸と共通の構造を有することから、イソ  $\alpha$  酸と類似した生理機能を有することが予想された。実際に、熟成ホップ苦味酸は高脂肪食誘導肥満マウスの体重増加量、内臓脂肪重量、血中遊離脂肪酸量を減少させ、肥満抑制効果を有することが報告されている[35]。マウスを用いてその作用機序が検証され、熟成ホップ苦味酸は単回投与により迷走神経の活性化を介して交感神経を活性化し、褐色脂肪組織での熱産生を促すことが報告されている。また、ランダム化二重盲検臨床試験において、熟成ホップ苦味酸 (35 mg/day) 12 週間の摂取により CT スキャンによって評価された内臓脂肪面積および総脂肪面積が有意に減少することが明らかになった[69]。

熟成ホップ苦味酸が肥満抑制効果を示したことから、肥満に伴う認知機能の低下を抑制することが期待された。そこで本研究では、肥満に伴う認知機能低下に対する熟成ホップ苦味酸の長期投与による影響を検証した。また、肥満誘導後のマウスに対する熟成ホップ苦味酸の短期投与の影響についても検証した。

### 3. 実験方法

#### 1) 試薬

熟成ホップ苦味酸は過去の報告に従い調製、精製した[22]。概要を述べると、ホップペレットを 60°C で 120 時間貯蔵し、 $\alpha$  酸、 $\beta$  酸の酸化物を水で抽出した。夾雑物を除去したのち、活性炭およびポリビニルポリピロリドン进行处理し、これらをフィルター処理により除去した。得られた溶液を 90°C、4 時間処理したのち冷却し、凍結乾燥により粉末を得た。さらに、水に溶解したのちジクロロメタン抽出を行い、抽出物をエバポレーターにて濃縮し熟成ホップ苦味酸画分を得た。得られた画分はエタノールに溶解した状態で -20°C で保管した（固形分濃度 256.82 mg/mL、固形分中の熟成ホップ苦味酸純度 94.90 w/w%）。実験に使用する直前にエタノールを揮発させ、得られた固形分を蒸留水に溶解した。

#### 2) 動物

熟成ホップ苦味酸摂餌投与の試験では、5 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー社）を用いた。飼育は 12 時間の明暗サイクル（明期：午前 8 時–午後 8 時）、室温 23±1°C、湿度 30–70% で管理された飼育室で行い、飼料として CE-2（日本クレア社）を与えて 1 週間馴化した。馴化後、体重をもとに各群 10 匹の 3 群に群分けし、通常食（ND 群）、高脂肪食（HFD 群）、熟成ホップ苦味酸 0.05%（w/w）含有高脂肪食（HFD + MHBA 群）を摂取させた。第 1 章第 1 節と同様に、高脂肪食には脂質を 60 kcal% 含有する D12492（Research Diet 社）を用い、通常食として脂質を 10 kcal% 含有する D12450J（Research Diet 社）を用いた。試験期間は 8 週間とし、体重を毎週測定した。

熟成ホップ苦味酸短期投与の試験では、通常食（CE-2）または高脂肪食（D12492）を 4 週齢時より摂餌した 11 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー社）を購入した。それぞれ通常食と高脂肪食を与え、上記と同様の飼育室で 1 週間馴化し、行動試験に用いた。動物実験は、キリンホールディングス株式会社動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った（実験承認番号：AN10379-Z01、AN10451-Z01）。

#### 3) 代謝関連パラメータ測定

摂食開始 8 週間後にマウスをイソフルランにより安楽殺して解剖を行った。解剖は午前 9 時から開始し、午前 11 時 30 分までにすべての動物の解剖を完了した。心採血により全血を採取してヘパリンチューブに回収し、3,000×g で 5 分間遠心し、上清を血漿と

して回収した。血漿中のグルコース濃度およびインスリン濃度はそれぞれ Glucose Assay Kit II (BioVision 社)、レビスインスリン ELISA キット (シバヤギ社) を用いて測定した。解剖時に副睾丸周囲脂肪を採取し重量を測定した。

#### 4) 新奇物体探索試験 (NORT)

エピソード記憶機能は NORT により評価した。NORT は第 1 章第 1 節と同様の方法で実施した。長期投与試験では試験食摂取開始 7 週目に実施した。短期投与試験では獲得試行および想起試行実施 60 分前に熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) または蒸留水を胃ゾンデにより経口投与した。

#### 6) 新奇場所探索試験 (NOLT)

空間記憶は NOLT により評価した。NOLT は第 1 章第 1 節と同様の方法で実施した。長期投与試験では試験食摂取開始 7 週目に、NORT 実施の翌日から実施した。短期投与試験では獲得試行および想起試行実施 60 分前に熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) または蒸留水を胃ゾンデにより経口投与した。

#### 7) 統計解析

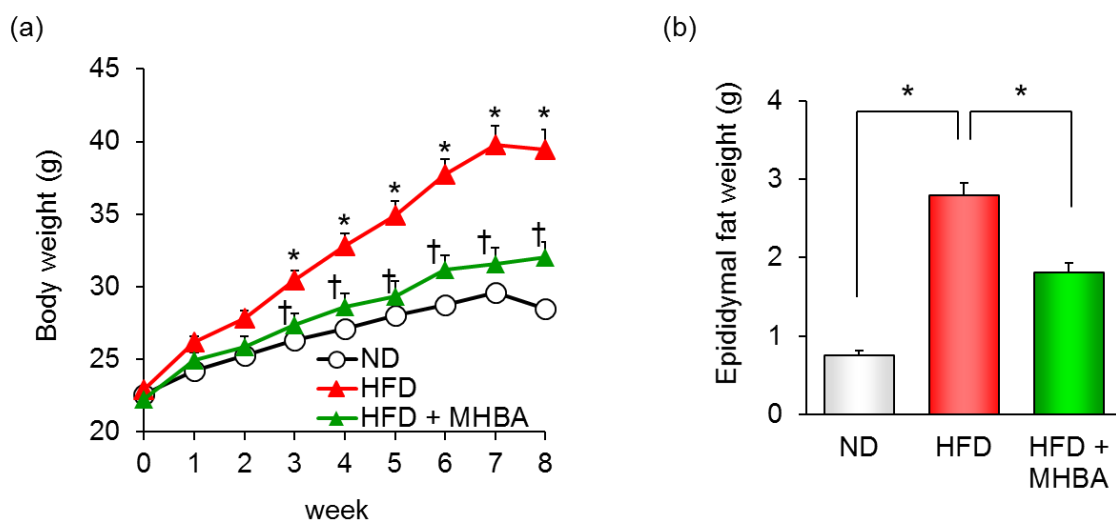
すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。体重変化は two-way ANOVA により飼料と摂取期間の影響を解析した。2 群の比較は student's *t* test を用いて行い、その他の他群比較は one-way ANOVA による分散分析の後に Tukey-Kramer's test により解析した。P 値 0.05 以下を統計学的有意差ありと判断した。統計解析にはエクセル統計 (Bell Curve 社) を用いた。



## 4. 結果

### 1) 体重、脂肪重量

マウスに試験食を摂取させ 8 週間の体重を評価した。有意な摂取期間の主効果 ( $F_{[8,243]} = 76.79, p < 0.001$ )、有意な試験食の主効果 ( $F_{[2,27]} = 135.9, p < 0.001$ )、および有意な摂取期間と試験食の相互作用 ( $F_{[16,243]} = 6.556, p < 0.001$ ) を検出した。通常食摂取群 (ND 群) に対して、高脂肪食摂取群 (HFD 群) では試験食摂取開始 3 週目以降の体重が有意に増加した。一方、熟成ホップ苦味酸 0.05% 含有高脂肪食摂取群 (HFD+MHBA 群) では HFD 群に対して摂取開始 3 週目以降の体重が有意に減少した (Fig. 2-1-1a)。試験食摂取 8 週目の副睾丸周囲脂肪重量は ND 群に対し HFD 群で有意に増加し、HFD 群に対し HFD+MHBA 群では有意に減少した (Fig. 2-1-1b)。熟成ホップ苦味酸の摂取は高脂肪食摂取による体重増加、脂肪重量増加を抑制することが確認された。

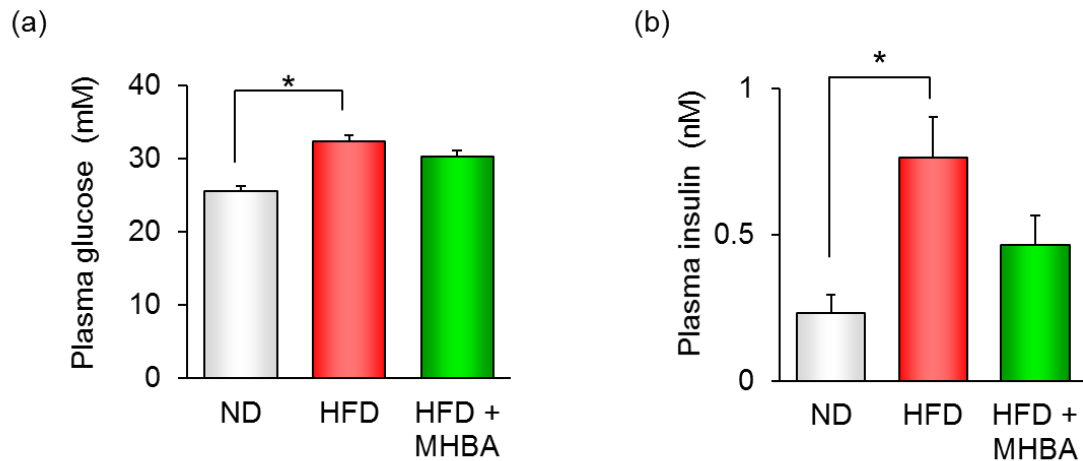


**Fig. 2-1-1** The effect of MHBAs on body weight (a) and epididymal fat weight (b) in the HFD-fed mice. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 10$  mice per group). (a) \* $P < 0.05$  versus ND-fed group, † $P < 0.05$  versus HFD-fed group. (b) \* $P < 0.05$  versus each group.

### 2) 血中生化学指標

試験食摂取 8 週目の血中グルコース、インスリン濃度を測定したところ、高脂肪食摂取によりグルコース ( $F_{[2,25]} = 4.760, p = 0.018$ ) およびインスリン ( $F_{[2,24]} = 6.209, p = 0.007$ )

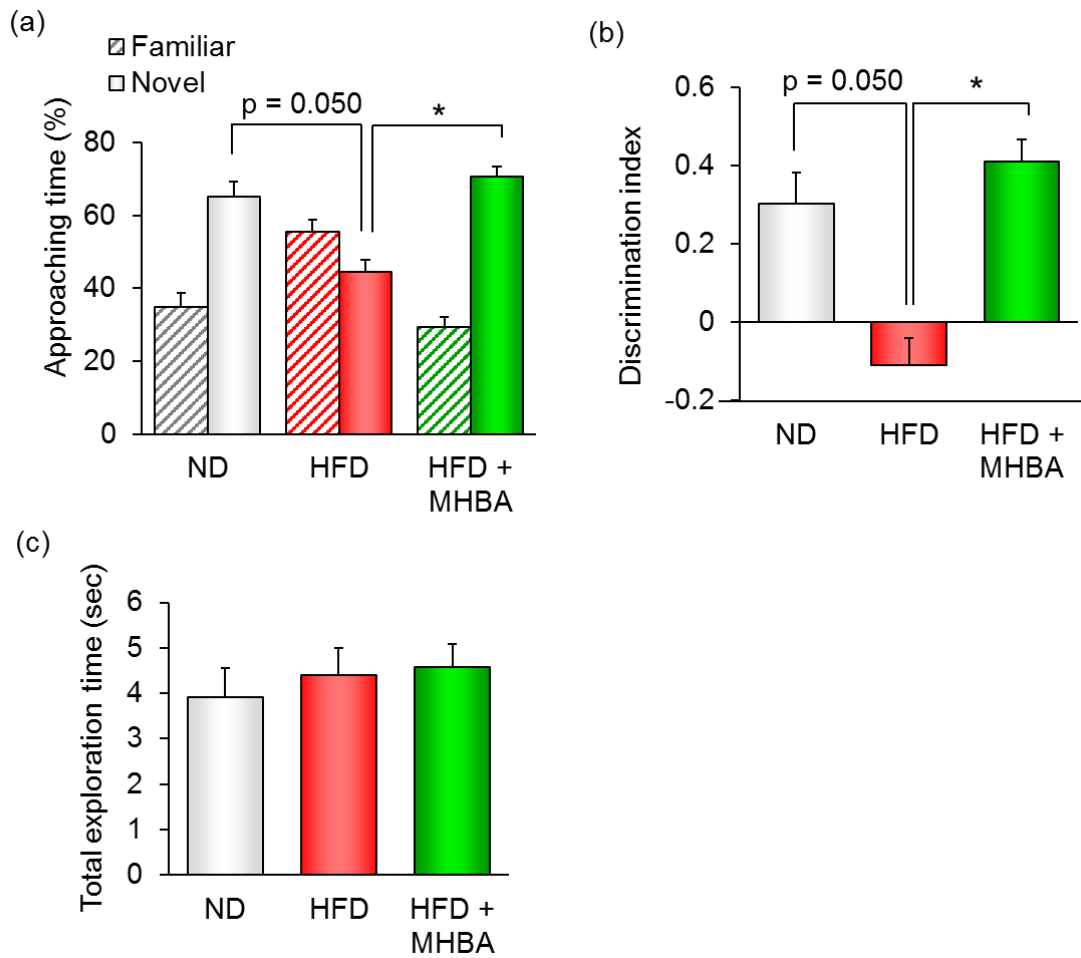
が有意に増加し、熟成ホップ苦味酸によりこれらの増加が抑制された (Fig. 2-1-2)。



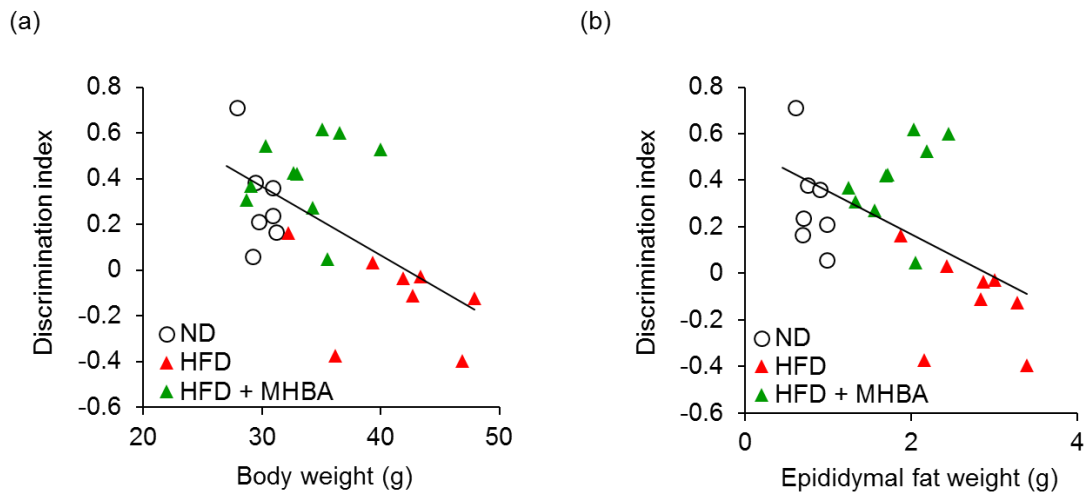
**Fig. 2-1-2** The effect of MHBAs on plasma glucose level (a) and plasma insulin level (b) in the HFD-fed mice. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 9-10 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.

### 3) 認知機能評価

エピソード記憶機能を NORT により評価したところ、新奇物体探索時間および DI 値が ND 群と比較して HFD 群において減少する傾向が認められ、HFD 群と比較して HFD + MHBA 群において有意に増加した ( $F_{[2,25]} = 8.050, p = 0.002$ ) (Fig. 2-1-3ab)。各群間において総探索時間に差は認められなかった ( $F_{[2,25]} = 1.114, p = 0.344$ ) (Fig 2-1-3c)。これらの結果から、高脂肪食摂取に伴うエピソード記憶機能の低下が熟成ホップ苦味酸により改善することが明らかになった。また、体重および脂肪重量と DI 値の相関関係を調べたところ、それぞれ負の相関を示すことが明らかになった (Fig. 2-1-4)。



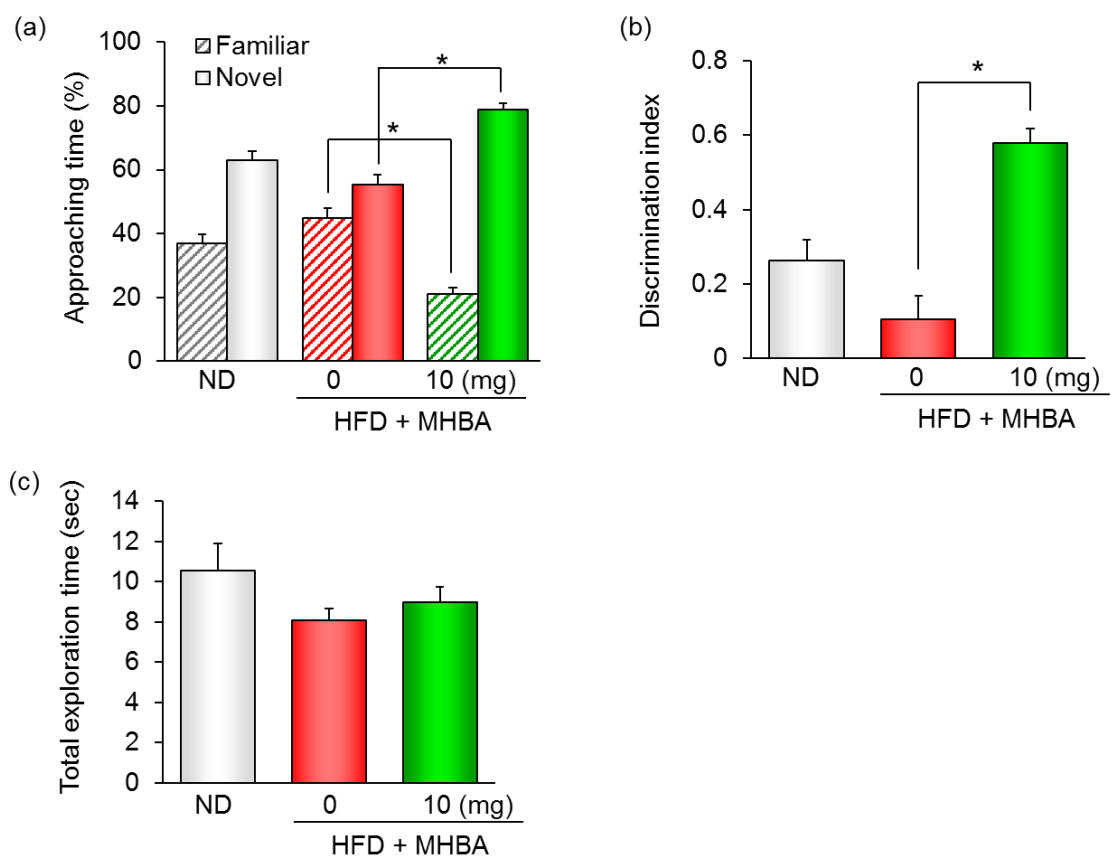
**Fig. 2-1-3** The effect of MHBAs on obesity-induced episodic memory deficits in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object) / (total exploration time)). (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 8–10 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.



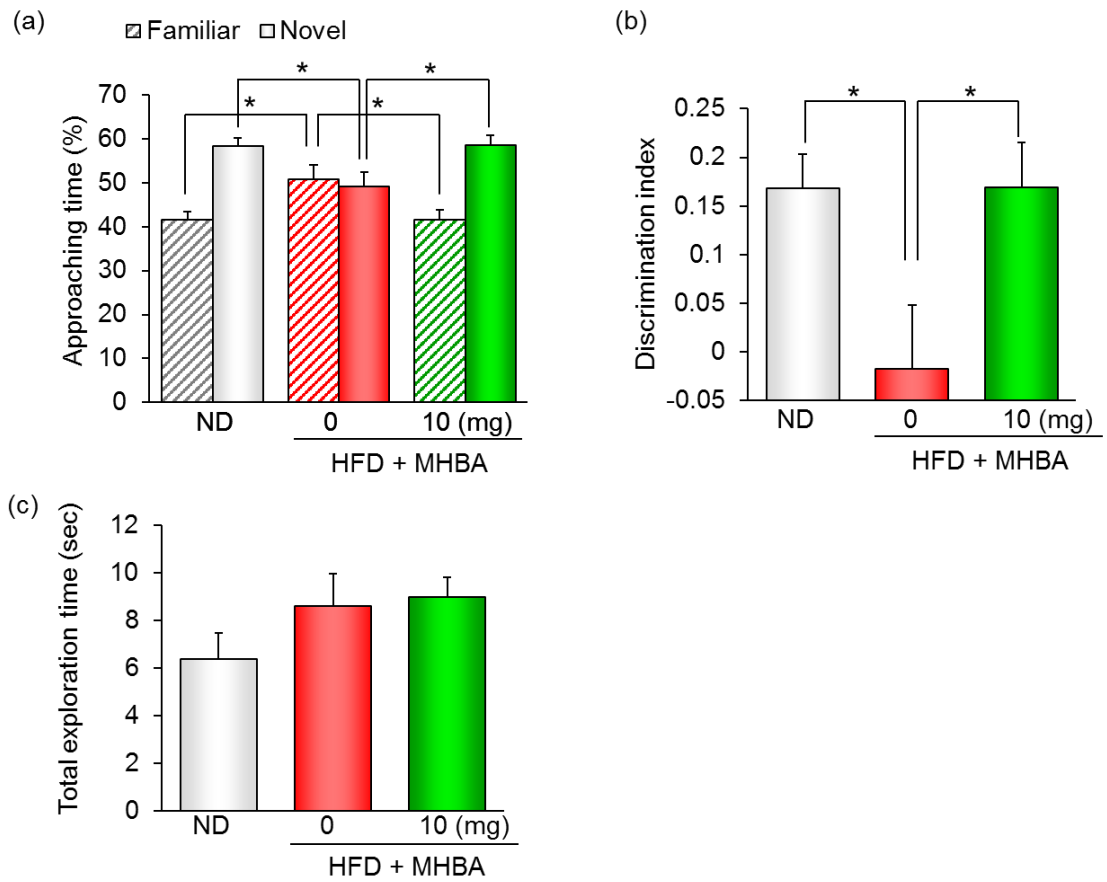
**Fig. 2-1-4** The relationship between discrimination index and body weight, or epididymal fat weight. The discrimination index was negatively correlated with body weight ( $r = -0.601$ ,  $p = 0.0002$ ) (a) and epididymal fat weight ( $r = -0.546$ ,  $p = 0.0021$ ) (b).

#### 4) 短期投与による認知機能への影響

高脂肪食により肥満を誘導したマウスを用いて熟成ホップ苦味酸の短期投与の影響を評価した。エピソード記憶を NORT により評価したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) の投与により新奇物体探索時間および DI 値が有意に増加した ( $F_{[2,17]} = 24.77$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2-1-5ab)。各群間で総探索時間に変化は認められなかった ( $F_{[2,17]} = 1.763$ ,  $p = 0.202$ ) (Fig. 2-1-5c)。続いて空間記憶を NOLT により評価したところ、同様に熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) の投与により新奇場所探索時間および DI 値が有意に増加した ( $F_{[2,25]} = 5.643$ ,  $p = 0.010$ ) (Fig. 2-1-6ab)。こちらも各群間で総探索時間に変化は認められなかった ( $F_{[2,25]} = 0.707$ ,  $p = 0.504$ ) (Fig. 2-1-6c)。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸は肥満に伴うエピソード記憶、空間記憶の低下を短期投与により改善することが明らかになった。



**Fig. 2-1-5** The effect of short-term administration of MHBAs on obesity-induced episodic memory deficits in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object)/(total exploration time)). (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 6–7 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.



**Fig. 2-1-6** The effect of short-term administration of MHBAs on obesity-induced spatial memory deficits in the NOLT. (a) Time spent exploring novel or familiar locations. (b) Discrimination index. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 6–10 mice per group). \*P < 0.05 versus each group.

## 5. 考察

本実験では、肥満に伴う認知機能低下に対する熟成ホップ苦味酸の効果を検証することを目的に、通常食、高脂肪食、熟成ホップ苦味酸含有高脂肪食をそれぞれマウスに摂餌し、肥満に関する指標および認知機能を評価した。

過去の報告と同様に、熟成ホップ苦味酸は高脂肪食によって誘導される体重や内臓脂肪重量の増加を有意に抑制した (Fig. 2-1-1)。また、高脂肪食により血中グルコースおよびインスリン濃度が有意に増加した一方、熟成ホップ苦味酸投与群では有意な増加は認められなかった (Fig. 2-1-2)。肥満に加えて II 型糖尿病も認知症リスクを高める要因となり、熟成ホップ苦味酸によりこれらの状態を抑制することが認知症予防に有用であると考えられる。

熟成ホップ苦味酸は迷走神経の活性化を介して褐色脂肪細胞の熱産生を促進することで肥満抑制効果を示すことが報告されている[35]。実際に、迷走神経を電氣的に刺激する装置を用いて、迷走神経の活性化が高脂肪食誘導肥満モデルラットの脂質代謝を改善し、認知機能を改善することが示されている[70]。本実験では迷走神経の関与は検証していないが、迷走神経活性化を介した同様のメカニズムで肥満に伴う認知機能低下を改善していることが可能性の一つとして考えられる。

熟成ホップ苦味酸はイソ  $\alpha$  酸と共通した構造を持ち、両者とも肥満抑制効果を示した一方で、そのメカニズムは異なると考えられる。イソ  $\alpha$  酸は PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  のアゴニスト活性を持つことで肥満抑制、抗糖尿病効果を示すが、熟成ホップ苦味酸の PPAR に対するアゴニスト活性はイソ  $\alpha$  酸より低く (キリンホールディングス社未公表データ、序論 Fig. 8)、迷走神経を介して肥満抑制効果を示す。メカニズムが異なることで、これらの苦味酸を組み合わせることによる相加、相乗効果を示す可能性がある。通常飲用されるビール中にはイソ  $\alpha$  酸と熟成ホップ苦味酸は共存していると考えられ、組み合わせの効果を検証することでビールの健康機能への影響をより正確に評価できる可能性がある。

イソ  $\alpha$  酸と同様に、熟成ホップ苦味酸は長期摂取による効果だけでなく、短期投与により肥満に伴うエピソード記憶および空間記憶の低下を改善することが確認された (Fig. 2-1-5、2-1-6)。熟成ホップ苦味酸は肥満により認知機能低下後の投与によっても認知機能を改善することが見出された。認知機能に及ぼす熟成ホップ苦味酸の短期投与の影響については第 2 章第 2 節で詳細に検証する。

第 1 章第 1 節と同様に、本研究の限界として熟成ホップ苦味酸の抗肥満効果における摂餌量への影響が評価できていない点が挙げられる。本実験においても行動試験への影

響を抑えるために複数飼育を行い、摂餌量は評価していない。高脂肪食に熟成ホップ苦味酸 0.1%の混餌投与により摂餌量がわずかに減少することが報告されているが[35]、本試験では熟成ホップ苦味酸の混餌濃度は 0.05%であり、摂餌量への影響はより少ないと想定される。

以上、熟成ホップ苦味酸が肥満に伴う認知機能低下を長期投与による予防的な効果、および短期投与による治療的な効果により改善することを見出した。



## 第2節 熟成ホップ苦味酸は迷走神経およびノルエピネフリンシグナルの活性化を介して認知機能を改善する

### 1. 要約

これまでに、熟成ホップ苦味酸が迷走神経の活性化を介して肥満抑制効果を示すことが報告されている。迷走神経の刺激はノルエピネフリン神経を介して様々な脳領域を活性化することが報告されていることから、熟成ホップ苦味酸が認知機能を改善する可能性が考えられた。そこで、行動薬理学的手法を用いてマウスの認知機能に及ぼす熟成ホップ苦味酸の作用およびメカニズムを検証した。

スコポラミン誘導健忘症モデルマウスを用いて、空間作業記憶の評価系である Y 字迷路試験により熟成ホップ苦味酸の効果を検証したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) およびそこに含まれる 4'-hydroxyallohumulinone、4'-hydroxy-cis-alloisohumulone (1 mg/kg) の投与により空間作業記憶が有意に改善した。通常マウスを用いて NORT を実施したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) の投与によりエピソード記憶が有意に改善した。熟成ホップ苦味酸は海馬のノルエピネフリン含有量および分泌量を有意に増加させた。また、ノルエピネフリン受容体の阻害剤の投与により認知機能改善効果が消失したことから、熟成ホップ苦味酸はノルエピネフリン系を介して認知機能を改善すると考えられる。さらに、迷走神経切除マウスを用いて Y 字迷路試験および NORT を実施したところ、熟成ホップ苦味酸の効果が減弱した。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸は迷走神経活性化を介して海馬ノルエピネフリン神経系を活性化し、認知機能を改善することが明らかになった。本研究は食品成分による迷走神経活性化を介した認知機能改善効果を示した初めての例であり、認知症予防への新たなアプローチの可能性を示した。

## 2. 背景

これまでに熟成ホップ苦味酸が迷走神経を活性化して肥満抑制効果を示すことが明らかになっている[35]。迷走神経は様々な内臓の情報を脳幹にある青斑核に伝え、続いて主にノルエピネフリン作動性神経を介して海馬を含む脳の様々な部位を活性化する[36]。ノルエピネフリンは精神疾患、気分障害、てんかんなどにおいて重要な役割を果たしており[71,72]、これらの疾患に対する治療法として迷走神経刺激療法が用いられている[73-75]。加えて、ノルエピネフリンはアルツハイマー病の病態にも関与しており、迷走神経刺激療法がアルツハイマー病の症状を緩和する可能性が報告されている[76]。そのため、熟成ホップ苦味酸が迷走神経の活性化を介して認知機能に影響を与える可能性が考えられた。

本実験では、認知機能に与える熟成ホップ苦味酸の影響を行動薬理学的手法により評価した。まず、アルツハイマー病治療薬のスクリーニング系を参考に、スコプラミン誘導健忘症モデルマウスを用いた Y 字迷路試験を実施し空間作業記憶に及ぼす熟成ホップ苦味酸の影響を検証した。続いて、通常マウスを用いて NORT を実施し、エピソード記憶に及ぼす影響を評価した。メカニズム検証のため、脳内のノルエピネフリン量の定量およびノルエピネフリン阻害剤を用いてノルエピネフリンシグナルに及ぼす影響を評価した。さらに、迷走神経切除マウスを用いて熟成ホップ苦味酸の効果における迷走神経の関与を検証した。

### 3. 実験方法

#### 1) 試薬

熟成ホップ苦味酸は第2章第1節と同様のものを用いた。熟成ホップ苦味酸の代表的な化合物である 4'-hydroxyallohumulinone (HAH)、4'-hydroxy-cis-alloisohumulone (HAIH)、tricycloxyisohumulone A (TCOIH-A)、cohulupone、humulinone は過去の報告の通りに精製した[22,77]。ノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニン、スコポラミン、レボキセチン、およびプロプラノロールは Sigma Aldrich 社より購入した。アミロイド  $\beta_{1-42}$  はペプチド研究所社より購入した。

#### 2) 動物

5週齢の雄性 ICR マウスは日本チャールスリバー社より購入した。迷走神経切除マウスは5週齢の雄性 ICR マウスを日本チャールスリバー社において手術を行い、1週間の回復期間を設けて6週齢で購入した。飼育は12時間の明暗サイクル（明期：午前8時-午後8時）、室温  $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 30-70%で管理された飼育室で行い、飼料として CE-2（日本クレア社）を与えて1週間馴化した。動物実験は、キリンホールディングス株式会社動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った（実験承認番号：AN10174-Z00、AN10316-Z00、AN10213-Z00、AN10237-Z00、AN10268-Z00、AN10316-Z00、AN10349-Z00、AN10474-Z00、AN10506-Z00、AN10519-Z00）。

#### 3) Amyloid-derived diffusible ligand (ADDL) 投与

簡易的なアルツハイマー病モデルマウスとして、アミロイド  $\beta$  のオリゴマーの一種である ADDL をマウスに脳室内投与し、ADDL モデルマウスとした。アミロイド  $\beta_{1-42}$  をヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP、富士フィルム和光純薬社) に 1 mM となるように溶解し、室温で 30 分間インキュベートした。HFIP を揮発させたのち、5 mM となるようにジメチルスルホキシドに溶解し、PBS で 100  $\mu\text{M}$  に希釈した。この溶液を  $4^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートし、アミロイド  $\beta$  を凝集させた。10,000 rpm、15 分間遠心した上清を ADDL 溶液として用いた。マウスをペントバルビタール（ソムノペンチル；共立製薬社）により麻酔し、ADDL を片脳に 5  $\mu\text{L}$  ずつ脳室内投与し、3 日間回復させたのちに Y 字迷路試験に使用した。

#### 4) 脳内モノアミン定量

マウスに熟成ホップ苦味酸 (1, 10 mg/kg) または蒸留水を 5 日間胃ゾンデにより経

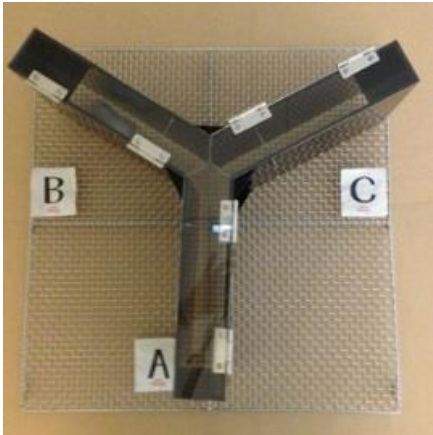
口投与した。5日目の投与から60分後にマウスをイソフルランにより安楽殺し、前頭皮質および海馬を採材した。採材化した脳はプロテアーゼ阻害剤を含むTBSバッファを用いてマルチビーズショッカー（安井器械社）によりホモジネートした。ホモジネートサンプルは50,000×gで30分間遠心し、上清を回収した。回収した上清は0.2M過塩素酸の処理により徐タンパクした。モノアミンはHPLC-ECD（エイコム社）を用いて分析した。カラムにはSC-50DSカラム（エイコム社）を用い、ノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニンを定量した。

#### 5) *in vivo* マイクロダイアリシス

マウスはペントバルビタール（ソムノペンチル；共立製薬社）により麻酔し、リドカイン（キシロカインゼリー；アストラゼネカ社）により頭部表面に局所麻酔した。マウスはステレオタキシクフレーム（ナリシゲ社）に固定し、頭蓋骨に穴をあけ海馬領域（ブレグマから後方に3.5 mm、左に3.0 mm、垂直に1.8 mm）にガイドカニューレ（エイコム社）を挿入した。ダミーカニューレをガイドカニューレに挿入した状態で5日間の回復期間を設けた。マイクロダイアリシスプローブ（エイコム社）を海馬領域に挿入し、プローブを通じてリンゲル液（147 mM 塩化ナトリウム、3.0 mM 塩化カリウム、1.2 mM 塩化カルシウム、1.2 mM 塩化マグネシウム）、流速 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  にて透析した。熟成ホップ苦味酸（10 mg/kg）を胃ゾンデにより経口投与し、投与20分前から投与120分後まで20分毎に透析液を回収した。

#### 6) Y字迷路試験

空間作業記憶機能はスコポラミン誘導健忘症モデルマウスを用いたY字迷路試験により評価した。実験に使用したY字迷路は黒色の3本のアームから成り、それぞれのアームは長さ250 mm、高さ200 mm、幅50 mmとした（Fig. 2-2-1）。試験は防音室内で行い、マウスの行動は天井に設置したカメラからの映像で観察した。マウスは試験実施の16時間前に防音室内に移動させ、馴化させた。試験サンプルは試験開始の60分前に胃ゾンデにより経口投与した。スコポラミン（0.8 mg/kg）は試験開始20分前に腹腔内投与した。 $\beta$ 受容体阻害試験では、プロプラノロール（10 mg/kg）とスコポラミン（0.8 mg/kg）を試験開始20分前に腹腔内投与した。マウスを一方のアームの先端に入れ、Y字迷路の中を8分間自由に探索させた。3本のアームを順番に探索する行動、すなわち、A-B-C-...などの順に探索する行動を自発交換行動と定義し、自発交換量（ $100 \times (\text{自発交換行動の回数}) / (\text{総アーム進入回数} - 2)$ ）を空間作業記憶の指標として評価した。



**Fig. 2-2-1** The apparatus of Y-maze.

7) 新奇物体探索試験 (NORT)

エピソード記憶は NORT により評価した。NORT は第 1 章第 1 節と同様に実施した。試験サンプルは獲得試行および想起試行開始の 60 分前に胃ゾンデにより経口投与した。

8) 統計解析

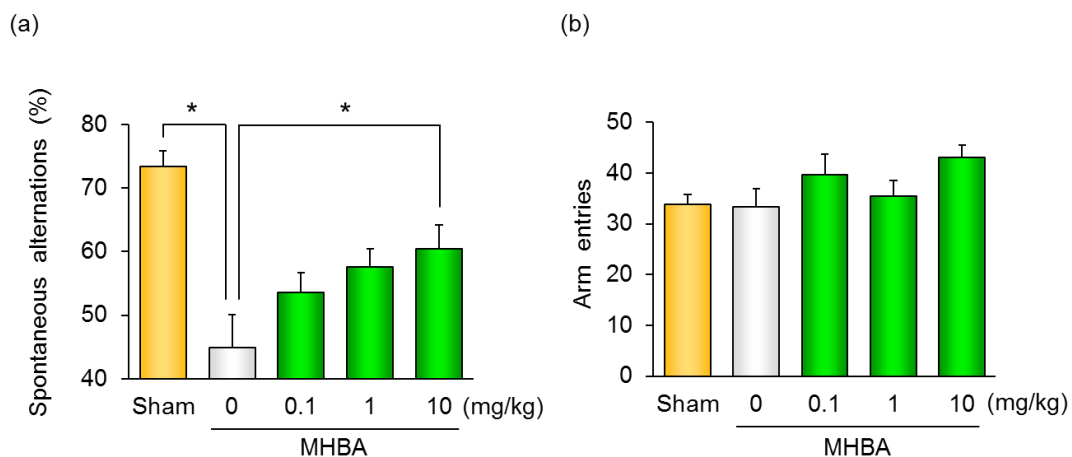
すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。2 群の比較は student's *t* test を用いて行い、その他の他群比較は one-way ANOVA による分散分析の後に Tukey-Kramer's test により解析した。P 値 0.05 以下を統計学的有意差ありと判断した。統計解析にはエクセル統計 (Bell Curve 社) を用いた。

## 4. 結果

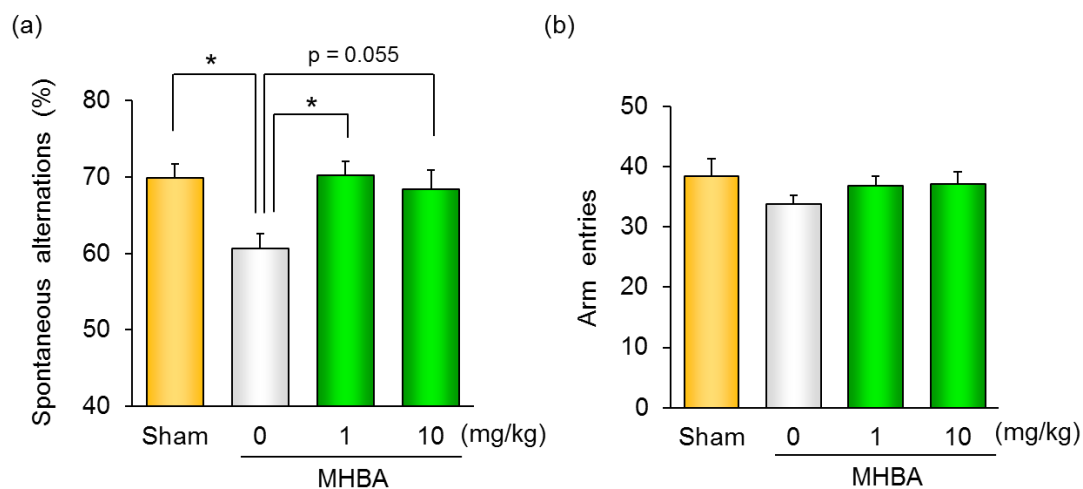
### 1) 空間作業記憶評価

スコポラミン誘導健忘症モデルマウスを用いた Y 字迷路試験により、空間作業記憶に及ぼす熟成ホップ苦味酸の影響を検証した。スコポラミン非投与群と比較してスコポラミン投与コントロール群の自発交換量が有意に減少し、Y 字迷路試験において健忘状態を検出できていることを確認した。熟成ホップ苦味酸は 10 mg/kg の経口投与により自発交換量をコントロール群と比較して有意に増加させることが明らかになった ( $F_{[4,35]} = 8.345, p < 0.001$ ) (Fig. 2-2-2a)。アーム進入回数に変化は認められなかったことから ( $F_{[4,35]} = 1.831, p = 0.145$ ) (Fig. 2-2-2b)、熟成ホップ苦味酸が用量依存的に健忘症モデルマウスの空間作業記憶を改善することが明らかになった。

続いて、ADDL 誘導 AD モデルマウスを用いて Y 字迷路試験を実施した。ADDL 非投与群と比較して ADDL 投与コントロール群の自発交換量が有意に減少し、熟成ホップ苦味酸 1 mg/kg の経口投与により自発交換量が有意に増加した ( $F_{[3,56]} = 4.085, p = 0.011$ ) (Fig. 2-2-3a)。アーム進入回数に変化は認められなかったことから ( $F_{[3,56]} = 0.855, p = 0.470$ ) (Fig. 2-2-3b)、熟成ホップ苦味酸が AD モデルマウスの空間作業記憶を改善することが明らかになった。



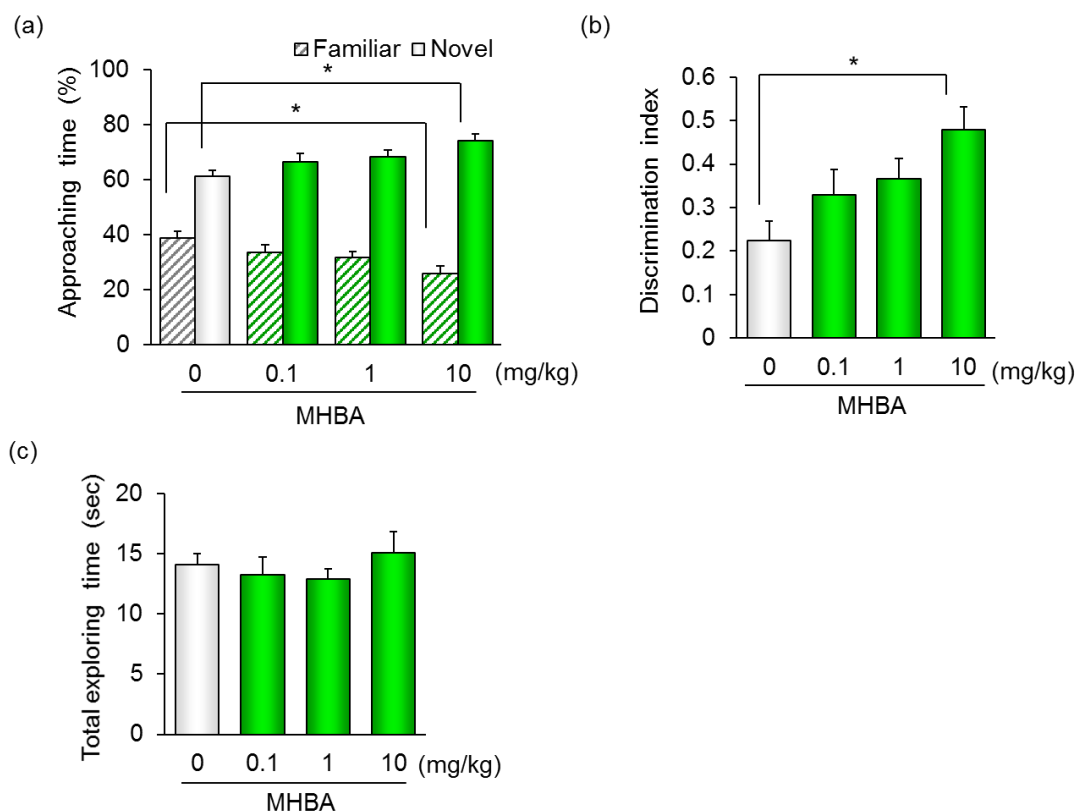
**Fig. 2-2-2** The effect of MHBAs on spatial working memory in the scopolamine-induced amnesia model mice assessed in the Y-maze test. (a) Spontaneous alternation was calculated using the following formula:  $(100 \times \text{number of spontaneous alternation behaviors}) / (\text{total number of arm entries} - 2)$ . (b) The number of arm entries. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus each group.



**Fig. 2-2-3** The effect of MHBAs on spatial working memory in the ADDL-induced AD model mice assessed in the Y-maze test. (a) Spontaneous alternation. (b) The number of arm entries. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 14$ – $16$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus each group.

## 2) エピソード記憶評価

通常マウスを用いた NORT によりエピソード記憶に及ぼす熟成ホップ苦味酸の影響を評価した。熟成ホップ苦味酸は 10 mg/kg の経口投与により新奇物体探索時間および DI 値が有意に増加した ( $F_{[3,36]} = 4.671$ ,  $p = 0.007$ ) (Fig. 2-2-4ab)。総探索時間は変化がなかったことから ( $F_{[3,36]} = 0.427$ ,  $p = 0.735$ ) (Fig. 2-2-4c)、熟成ホップ苦味酸が用量依存的に通常マウスのエピソード記憶を改善することが明らかになった。



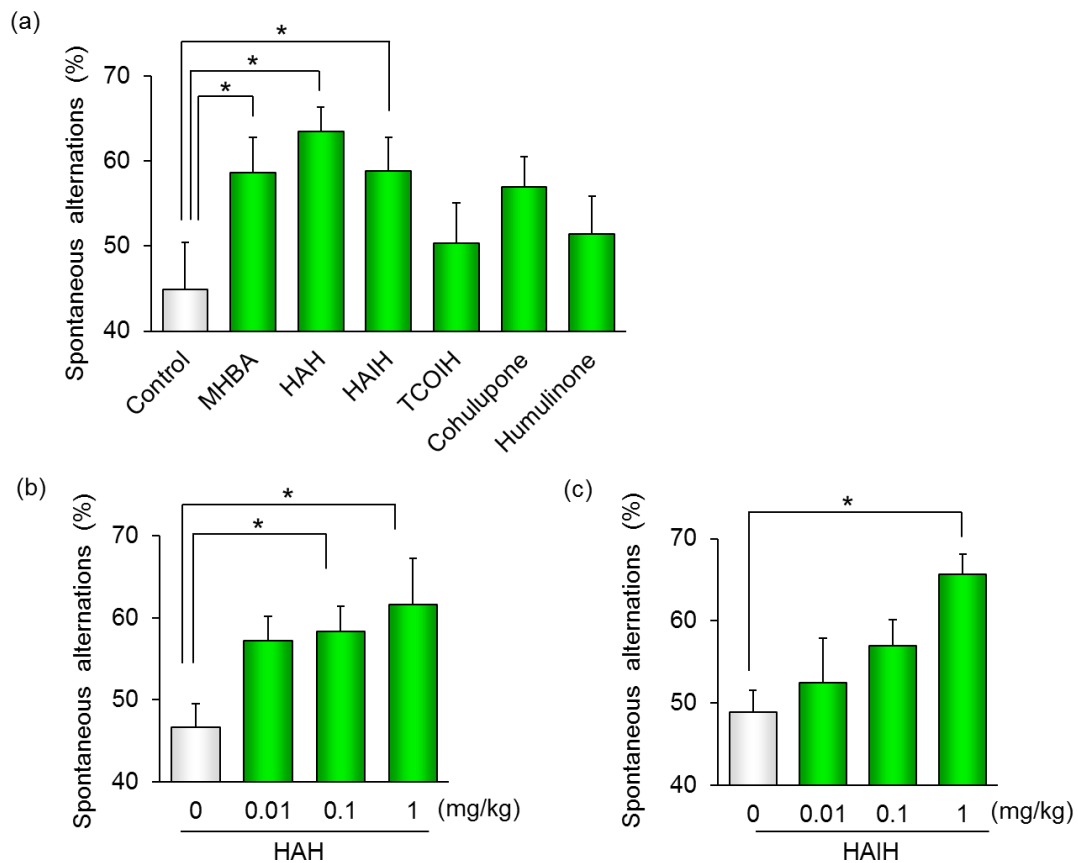
**Fig. 2-2-4** The effect of MHBAs on episodic memory in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object)/(total exploration time)). (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  mice per group). \* $P < 0.05$  versus each group.

### 3) 代表的化合物の効果検証

熟成ホップ苦味酸は  $\alpha$  酸および  $\beta$  酸の酸化物からなる  $\beta$  トリカルボニル化合物群である。熟成ホップ苦味酸に含まれる代表的化合物のうち 5 種類 (HAH、HAIH、TCOIH-A、cohulupone、humulinone) の効果をスコポラミン誘導健忘症モデルを用いた Y 字迷路試験により評価した。各サンプルを 1 mg/kg 経口投与したところ、HAH および HAIH 投与群において自発交換量が有意に増加し、熟成ホップ苦味酸 10 mg/kg と同程度の効果が認められた ( $F_{[6,62]} = 2.827$ ,  $p = 0.017$ ) (Fig. 2-2-5a)。有効性が認められた HAH および HAIH について、さらに複数の濃度で検証したところ、これらの化合物が用量依存的に自発交換量を増加させた (HAH,  $F_{[3,34]} = 3.198$ ,  $p = 0.036$ ; HAIH,  $F_{[3,36]} = 3.958$ ,  $p = 0.016$ )



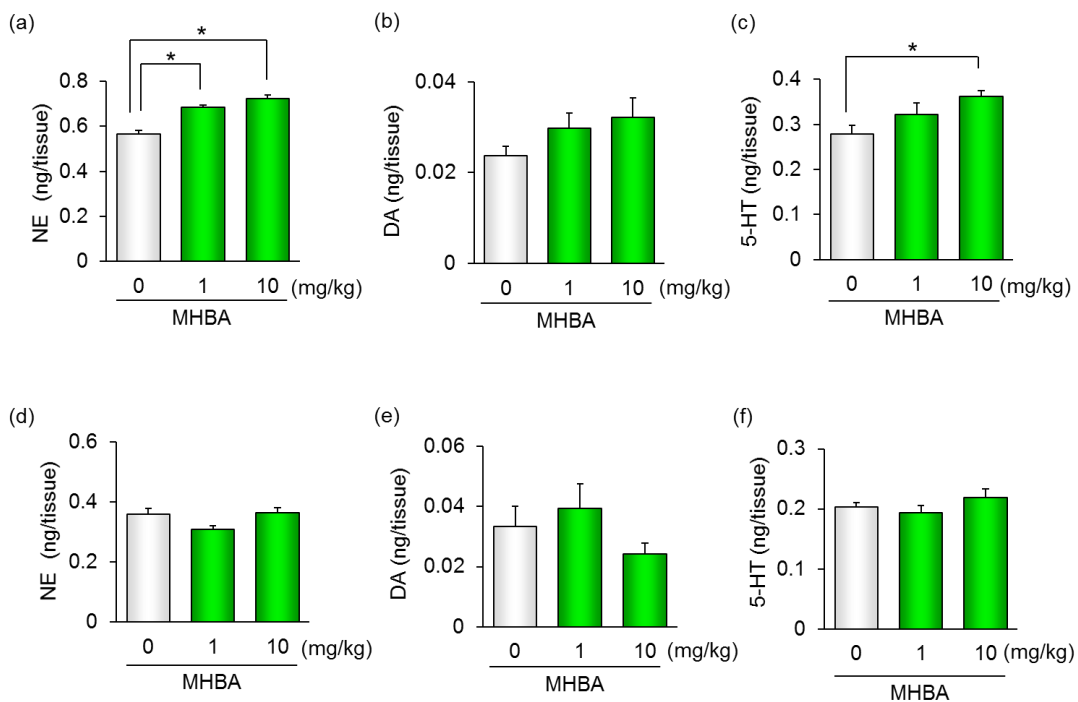
(Fig. 2-2-5bc)。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸に含まれる化合物が空間作業記憶を改善することが明らかになった。



**Fig. 2-2-5** The effect of representative components in MHBAs on spatial working memory in the Y-maze test. (a) Mice were administered MHBA orally at a dose of 10 mg/kg. The component compounds, 4'-hydroxyallohumulinones (HAH), 4'-hydroxyalloisohumulones (HAIH), tricycloxyisohumulones A (TCOIH-A), hulupones, and humulinones were administered orally at 1 mg/kg, respectively. (b) Mice were administered HAH (0, 0.01, 0.1, 1 mg/kg). (c) Mice were administered HAIH (0, 0.01, 0.1, 1 mg/kg). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 8–10 mice per group). \*p < 0.05 versus control (0 mg/kg) group.

#### 4) ノルエピネフリン含有量評価

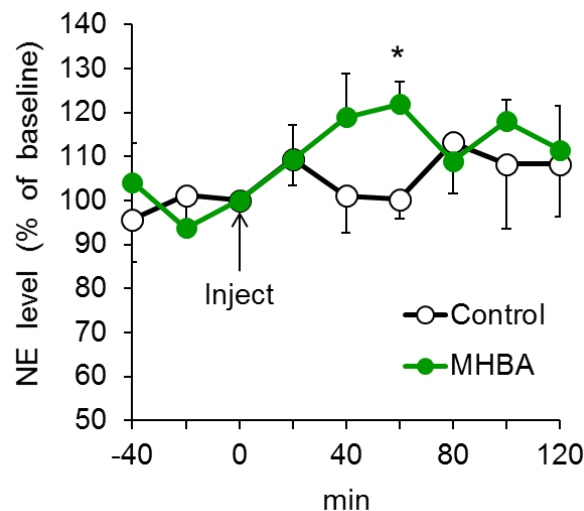
熟成ホップ苦味酸を5日間連続で経口投与し、大脳皮質および海馬に含まれるモノアミン量を評価した。熟成ホップ苦味酸（1、10 mg/kg）5日間の投与により海馬に含まれるノルエピネフリン量が用量依存的に有意に増加した（ $F_{[2,27]}=4.952$ ,  $p=0.015$ ）（Fig. 2-2-6a）。熟成ホップ苦味酸（10 mg/kg）の投与によりセロトニン量も増加した一方（ $F_{[2,27]}=3.960$ ,  $p=0.031$ ）、ドーパミン量は有意な変化は認められなかった（ $F_{[2,27]}=1.667$ ,  $p=0.207$ ）（Fig. 2-2-6bc）。また、大脳皮質に含まれるノルエピネフリン（ $F_{[2,27]}=3.704$ ,  $p=0.038$ ）、ドーパミン（ $F_{[2,27]}=1.402$ ,  $p=0.264$ ）、セロトニン（ $F_{[2,27]}=1.138$ ,  $p=0.336$ ）量はいずれも熟成ホップ苦味酸投与による増加は認められなかった（Fig. 2-2-6d-f）。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸の反復投与が海馬のモノアミン量、特にノルエピネフリン量を増加させることが明らかになった。



**Fig. 2-2-6** The effect of MHBAs on the levels of monoamines contained in the brain. (a-c) The levels of norepinephrine (a), dopamine (b), and serotonin (c) in the hippocampus. (d-f) The levels of norepinephrine (d), dopamine (e), and serotonin (f) in the cerebral cortex. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 10$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus control (0 mg/kg) group.

## 5) ノルエピネフリン放出量評価

熟成ホップ苦味酸の単回投与による海馬ノルエピネフリンへの影響を評価するため、*in vivo* マイクロダイアリシスにより海馬で放出されるノルエピネフリン量を評価した。時間の主効果 ( $F_{[8,108]} = 1.079, p = 0.383$ )、投与サンプルの主効果 ( $F_{[1,8]} = 2.064, p = 0.154$ )、および時間と投与サンプルの相互作用 ( $F_{[8,108]} = 0.731, p = 0.664$ ) は認められなかった。各時間におけるノルエピネフリン量を群間比較したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) 投与群のマウスではコントロール群のマウスと比較して投与 60 分後のノルエピネフリン量が有意に増加した ( $t_{[12]} = 3.257, p = 0.007$ ) (Fig. 2-2-7)。熟成ホップ苦味酸は単回投与により海馬でのノルエピネフリン放出を促進した。

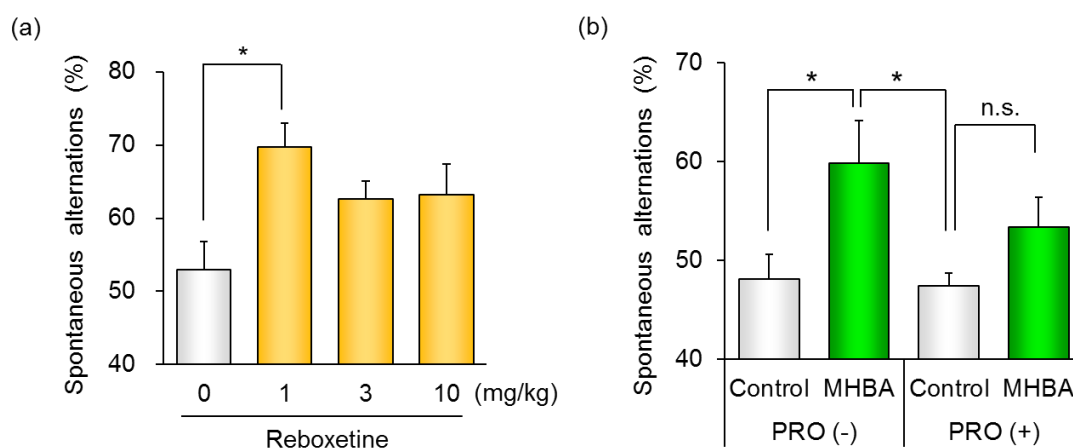


**Fig. 2-2-7** The effect of MHBAs on norepinephrine release in the hippocampus. Brain interstitial fluid (ISF) norepinephrine levels in the hippocampus were measured using the microdialysis system every 20 min before and after the MHBA administration. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 7$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus control (0 mg/kg) group.

## 6) $\beta$ アドレナリン受容体の関与検証

熟成ホップ苦味酸の記憶機能改善効果においてノルエピネフリン分泌が関与していることが示唆された。ノルエピネフリンが空間作業記憶を改善することを確認するため、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤であるレボキセチンの影響を Y 字迷路試験により

評価した。レボキセチン (1 mg/kg) の投与により自発交換量が有意に増加し、ノルエピネフリンの増加により空間作業記憶が改善することが確認された ( $F_{[3,28]}=3.903$ ,  $p=0.019$ ) (Fig. 2-2-8a)。熟成ホップ苦味酸の作用におけるノルエピネフリンの関与を検証するため、ノルエピネフリンの脳内での主要な受容体である  $\beta$  アドレナリン受容体の阻害剤プロプラノロールを用いて Y 字迷路試験を実施した。熟成ホップ苦味酸はスコポラミン誘導健忘症マウス (プロプラノロール非投与) の自発交換量を増加させた一方、スコポラミン+プロプラノロール投与マウスでは有意な自発交換量の増加は認められなかった ( $F_{[3,36]}=3.705$ ,  $p=0.020$ ) (Fig. 2-2-8b)。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸の空間作業記憶改善効果にはノルエピネフリンシグナルが関与していることが示唆された。

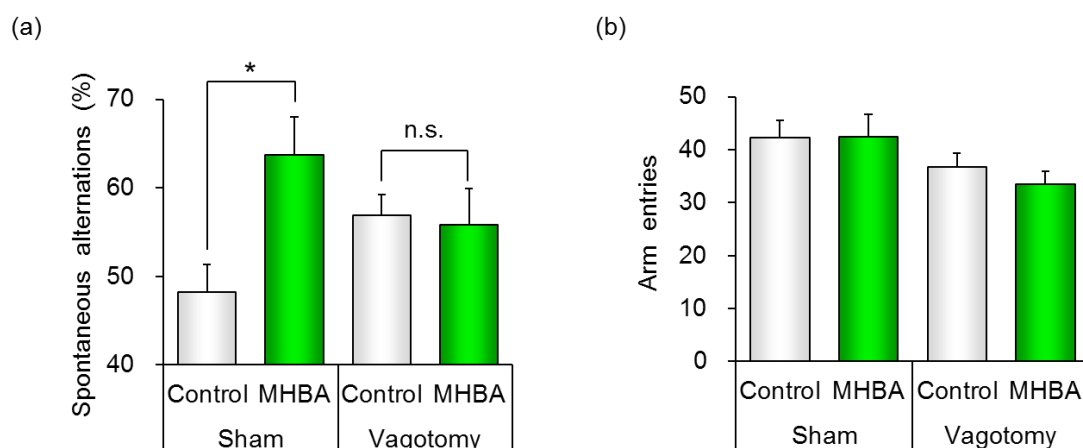


**Fig. 2-2-8** The involvement of norepinephrine signal in the effect of MHBAs. (a) The effect of reboxetine on spatial working memory was evaluated in the Y-maze test. Mice were administered reboxetine (0, 1, 3, 10 mg/kg). (b) The effect of MHBAs on spatial working memory was examined using scopolamine-induced amnesia model mice with a  $\beta$ -adrenergic receptor blocker. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n=8-10$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus each control (0 mg/kg) group

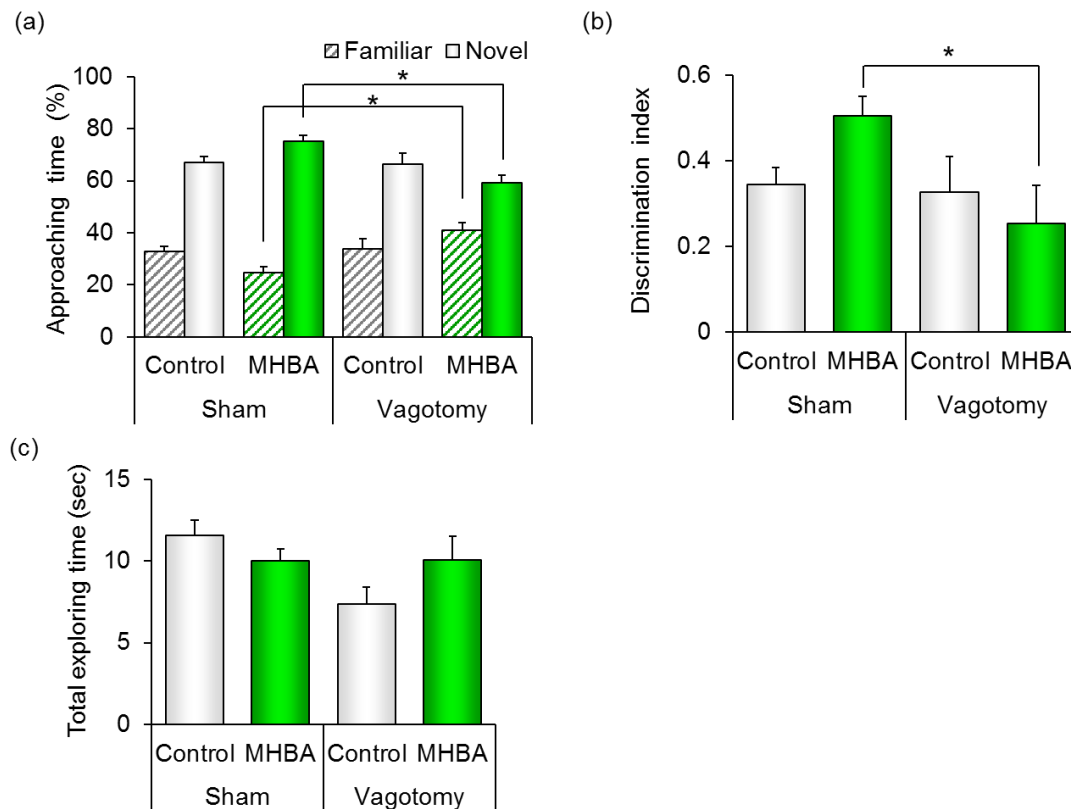
## 7) 迷走神経の関与検証

熟成ホップ苦味酸の記憶機能改善効果における迷走神経の関与を検証するため、迷走

神経切除マウスを用いて Y 字迷路試験および NORT を実施した。Y 字迷路試験において、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) はシャムマウスの自発交換量を増加させた一方で、迷走神経切除マウスの自発交換量を変化させなかった ( $F_{[3,35]}=3.144$ ,  $p=0.037$ ) (Fig. 2-2-9a)。アーム進入回数は各群間で有意な変化は認められなかった ( $F_{[3,35]}=1.879$ ,  $p=0.151$ ) (Fig. 2-2-9b)。NORT において、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) はシャムマウスの新奇物体探索時間および DI 値を増加させた一方、迷走神経切除マウスでは変化が認められなかった ( $F_{[3,32]}=5.364$ ,  $p=0.004$ ) (Fig. 2-2-10ab)。総探索時間は各群間で有意な変化は認められなかった ( $F_{[3,32]}=2.782$ ,  $p=0.057$ ) (Fig. 2-2-10c)。迷走神経切除に熟成ホップ苦味酸の記憶改善効果が減弱することが明らかになり、迷走神経の関与が示唆された。



**Fig. 2-2-9** The involvement of vagus nerve in the effect of MHBAs on spatial working memory in the Y-maze test. Spontaneous alternation after MHBA administration was evaluated using vagotomized or sham mice with scopolamine-induced amnesia. (a) Spontaneous alternation. (b) The number of arm entries. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n=9-10$  mice per group). \* $p < 0.05$  versus each control (0 mg/kg) group.



**Fig. 2-2-10** The involvement of vagus nerve in the effect of MHBAs on episodic memory in the NORT. (a) Time spent in exploring novel or familiar objects. (b) Discrimination index (DI; (time spent investigating novel object minus time spent investigating familiar object)/(total exploration time)). (c) Total exploration time. Values are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  mice per group). \* $P < 0.05$  versus each group.

## 5. 考察

本実験では、ホップ由来の苦味成分である熟成ホップ苦味酸の認知機能に及ぼす影響を、行動薬理学的手法を用いて評価した。また、脳内のモノアミン神経伝達物質および迷走神経の活動に着目してメカニズムを検証した。

空間作業記憶の評価系である Y 字迷路試験を用いた検討において、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) は単回経口投与によりスコポラミン誘導健忘症モデルマウスの自発交換量を有意に増加させた (Fig. 2-2-2)。熟成ホップ苦味酸が空間作業記憶を改善し、認知機能改善効果を示すことを初めて示した。続いてエピソード記憶の評価系である NORT を実施し、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) が新奇物体への探索時間を増加させエピソード記憶を改善することを示した (Fig. 2-2-4)。空間作業記憶とエピソード記憶はともに海馬に関連した記憶機能であると言われており [78]、熟成ホップ苦味酸が海馬に関連した記憶機能を改善することを示した。今後、タッチパネルオペラント試験系等を用いた前頭皮質機能への影響の評価が期待される。

熟成ホップ苦味酸に含まれる 5 種類の代表的な化合物の効果を Y 字迷路試験により検証したところ、HAH、HAIH が有意な記憶機能改善効果を示した (Fig. 2-2-5)。β トリカルボニル化合物群である熟成ホップ苦味酸に含まれるいくつかの化合物が認知機能改善効果を有することが明らかになり、これら単体化合物の活性が熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果に寄与していると考えられる。一方、同じ β トリカルボニル構造を持つ化合物でも活性に差があることが明らかになった。これらの化合物は苦味受容体へのアゴニスト活性を持つことが想定されるが、化合物によって受容体への親和性などが異なる可能性がある。

脳内モノアミン神経伝達物質に着目して認知機能改善メカニズムを検証したところ、熟成ホップ苦味酸は海馬のノルエピネフリン含有量および海馬におけるノルエピネフリン分泌量を増加させることが明らかになった (Fig. 2-2-6、2-2-7)。ノルエピネフリンが認知機能の改善に寄与するかどうかについては十分な検証が行われていなかったため、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤であるレボキセチンを投与し Y 字迷路試験により評価したところ、空間作業記憶を改善することが明らかになった (Fig. 2-2-8a)。このことから、脳内のノルエピネフリン量を増加させることが認知機能改善につながることを確認された。さらに脳内におけるノルエピネフリンの主要な受容体である β 受容体阻害剤プロプラノロールの投与により熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果が減弱した (Fig. 2-2-8b)。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸はノルエピネフリン量を増加させ、β 受容体を介して認知機能改善効果を示すことが示唆された。

迷走神経切除マウスを用いて熟成ホップ苦味酸の効果を検証したところ、空間作業記憶およびエピソード記憶改善効果が減弱した (Fig. 2-2-9、2-2-10)。このことから、熟成ホップ苦味酸の記憶改善効果には迷走神経の活性化が関与していると考えられる。迷走神経は脳幹にある青斑核に投射し、その刺激はおもにノルエピネフリン作動性神経を介して海馬を含む脳の各領域に伝えられ、認知機能の活性化に寄与することが報告されている[79-81]。本実験の結果は、これら過去の報告と一致したものであると考えられる。

スコポリン誘導健忘症モデルマウスを用いた Y 字迷路試験は、アルツハイマー病治療薬のスクリーニング手法として広く用いられている。加えて、アミロイド  $\beta$  オリゴマー (ADDL) の脳室内投与によって誘導される認知機能低下を熟成ホップ苦味酸の投与により改善した (Fig. 2-2-3)。ADDL モデルは簡易的にアルツハイマー病モデルとして用いられる系であり、遺伝子改変によるアルツハイマー病モデルマウスを用いた追加の検証が必要であるが、本実験の結果から熟成ホップ苦味酸がアルツハイマー病に伴う認知機能の低下に有効である可能性がある。

近年、迷走神経を刺激することが認知機能の維持やアルツハイマー病の予防に有用である可能性が明らかになってきた[76]。一方で、これまでに確立された迷走神経の刺激方法は、体内にペースメーカー様の装置を埋め込み、迷走神経を電氣的に刺激することにより行われていた。しかし装置の埋め込みに外科的手術が必要であり患者の負担となりうることから、アルツハイマー病などの予防を目的として使用することは困難であった。熟成ホップ苦味酸の安全性はこれまでの報告で確認されており[82]、熟成ホップ苦味酸摂取による迷走神経刺激は簡便かつ安全なアルツハイマー病予防法になりうると思われる。

熟成ホップ苦味酸のマウスにおける有効量 (10 mg/kg) を、ヒト等価量係数を用いて体重 60 kg のヒトでの有効量に換算すると約 48 mg に相当する[83]。国内で製造、販売されているビールや海外で製造されたビールに含まれる熟成ホップ苦味酸の量が 20–200 mg/L であることから、0.24–2.4 L のビールの摂取により有効量が摂取できると考えられる。ビールの種類にもよるが、適度な飲酒によって有効量の熟成ホップ苦味酸を摂取できる可能性がある。

以上、本実験では熟成ホップ苦味酸が迷走神経およびノルエピネフリン神経活性化を介して海馬に関連した記憶機能を改善することを明らかにした。



# 〈総括〉

急速に高齢化が進行するわが国では、認知症や認知機能低下を含めた加齢に伴う疾患の患者数が増加し、その治療法や予防法の開発が社会的な課題となっている。特に認知症は発症後の根本的な治療方法が確立されていないため、発症する前から積極的に予防に取り組む必要がある。医薬品は明確な症状が出てから処方されることが一般的であるため、現状では認知症の発症前から医薬品を投薬して認知症予防に取り組むことは困難である。認知症予防効果を持つ食品成分の摂取やバランスのとれた食生活は、日常生活に取り入れることが簡便であることから有効な認知症予防手段となりうる。

その一方で、食品や食生活を通じた認知症予防は一般の消費者自身に取り組んでもらう必要がある、科学的根拠に基づいた正しい情報を誤解のないように提供しなければならない。2015年4月からは、国内で機能性表示食品制度が開始され、事業者の責任において科学的根拠に基づいた食品の機能性を表示することが可能になった。認知機能の分野においても、「記憶力を維持する」「思い出す力をサポート」などの表示が可能となり、消費者に食品の機能性を伝える有用な手段となっている。しかし、どのようにして作用しているのかが分からず、有効性や安全性に不安を感じる消費者がいることも事実である。消費者によりベネフィットをもたらすためにも、食品成分の機能性メカニズムを詳細に解明し有効性や安全性を担保することが今後より重要になってくると考えられる。

本研究では、適度なアルコール飲料の摂取が認知症予防因子となりうるという疫学研究の報告から[18,19]、ビールに含まれる機能性成分に着目した。ホップはビールの原料として使用されるが、ヨーロッパでは古来より薬用植物として用いられており、睡眠導入効果、抗炎症効果、消化管機能調節効果などが知られていた[84]。その後の研究で、ホップ由来の機能性成分としてエストロゲン様の作用を持つ 8-prenylnaringenin や、抗炎症、抗酸化、抗糖尿病作用を持つキサントフモール (xanthohumol) などのプレニルフラボノイドが同定されている[85,86]。これらの成分はホップの機能性に寄与していると考えられるものの、ビール中の含有量は低いことから、適度なアルコール飲料摂取の認知症予防効果への寄与は少ないことが想定された。イソ $\alpha$ 酸や熟成ホップ苦味酸はビールの主要な苦味成分であり含有量が高いことから、本研究ではこれらの成分に着目し認知機能に及ぼす影響を評価した。

第1章第1節において、肥満に伴う認知機能低下に対するイソ $\alpha$ 酸の効果を検証した。その結果、イソ $\alpha$ 酸が肥満に伴う脳内炎症および認知機能の低下を改善することを見出した。2017年のLancet誌にて報告された論文では[17]、認知症リスクを高める9つの要因を明らかにし、認知症の35%は予防可能であることが報告され話題となった。この報告の中で肥満は中年期(45歳–65歳)に注意すべきリスクとして挙げられており、

肥満を抑制することは認知症予防の有用な手段となりうる。イソ $\alpha$ 酸は肥満抑制効果と炎症抑制効果を併せ持つことから、イソ $\alpha$ 酸を日常的に摂取することでより効果的に認知症を予防できると考えられる。

第1章第2節では、前頭皮質に関連した認知機能に及ぼすイソ $\alpha$ 酸の効果をタッチパネルオペラント試験系により評価した。その結果イソ $\alpha$ 酸はVD課題における正答率と反応時間、およびRD課題における正答率を改善し、イソ $\alpha$ 酸が注意、実行機能、記憶の柔軟性などの高次認知機能を高めることを示した。メカニズムに関する検証が不十分ではあるものの、イソ $\alpha$ 酸が幅広い認知機能の改善に有効であることを示した。加えて、タッチパネルオペラント試験系が食品成分の評価に応用可能であることを示した点も興味深い成果であるといえる。実際に、この評価系を用いた筆者らの最新の報告では、ホエイ由来認知機能改善ペプチド $\beta$ ラクトリンの効果 TOUCHパネルオペラント試験系にて評価し、 $\beta$ ラクトリンが記憶の柔軟性を改善することを見出した[87]。ヒトの認知機能検査に近い評価系であるという利点を活かして、タッチパネルオペラント試験系が今後より多くの食品素材の評価に応用されることが期待される。

第2章では熟成ホップ苦味酸に着目し機能性を検証した。熟成ホップ苦味酸はイソ $\alpha$ 酸に類似した構造を持つが、苦味の強さはイソ $\alpha$ 酸より低いことが確認されている(キリンホールディングス社未公表データ)。そのためイソ $\alpha$ 酸と比較して食品への応用により適しており、熟成ホップ苦味酸の機能性を解明することは機能性食品としての実用化に有意義であると考えられる。実際に、第2章第1節では熟成ホップ苦味酸がイソ $\alpha$ 酸と同様に、肥満に伴う認知機能低下を抑制する効果を示すことを明らかにした。熟成ホップ苦味酸を機能性成分として含み、体脂肪低減効果を謳った機能性表示食品はすでに上市されており、この商品を通じた消費者の健康への貢献が期待される。

さらに第2章第2節では熟成ホップ苦味酸が単回投与により迷走神経の活性化およびノルエピネフリン神経系を介して海馬に関連した記憶機能を改善することを示した。近年、脳と腸管の状態が互いに影響を及ぼしているとする「腸脳相関」という現象が注目を集めている。腸内細菌叢が迷走神経を介して精神機能に影響を与えるという報告が多くなされ[88,89]、また、大豆由来のペプチドが迷走神経を介して抗うつ、抗不安効果を示すことなどが報告されている[90]。しかし、筆者らの知る限りでは特定の食品成分が迷走神経を介して記憶機能を改善した報告はこれまでになく、本研究の成果は食品成分が迷走神経活性化を介して記憶機能を改善した初めての例である。

近年、熟成ホップ苦味酸が迷走神経を活性化する詳細なメカニズムが報告された。熟成ホップ苦味酸の受容体であると想定される苦味受容体は、口腔内に加えて消化管内分

泌細胞にも多く発現している[91,92]。苦味刺激が消化管内分泌細胞に受容されるとカルシウムイオンの流入を引き起こし、消化管ホルモンであるコレシストキニンの分泌を促進し、迷走神経を活性化することが知られている[93]。このメカニズムに着目し熟成ホップ苦味酸の効果を検証したところ、消化管内分泌細胞に熟成ホップ苦味酸を処理することでカルシウムイオンの流入とコレシストキニンの分泌促進が確認された。また、動物を用いた検討において、熟成ホップ苦味酸摂取に伴う褐色脂肪細胞の熱産生増加効果がコレシストキニン受容体の阻害剤により減弱した[94]。これらの結果から、熟成ホップ苦味酸は消化管内分泌細胞の苦味受容体を介してコレシストキニンの分泌を促進し、コレシストキニン受容体を介して迷走神経を活性化することが示唆された。熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果におけるこれらのメカニズムは未検証であるが、同様のメカニズムを介して作用していることが想定される。機能性成分が脳内に届いて作用することに対して不安を感じる消費者もいるため、腸管の受容体をターゲットとした作用機序を解明することは消費者の安心感に貢献する成果になると考えられる。

さらに、別の研究で筆者らはイソ $\alpha$ 酸の認知機能改善効果およびメカニズムについて検証を行った。その結果、熟成ホップ苦味酸と同様に、イソ $\alpha$ 酸が迷走神経活性化を介して認知機能を改善することを報告している[33]。イソ $\alpha$ 酸は苦味受容体の強力なアゴニストであることから、イソ $\alpha$ 酸も消化管内分泌細胞の苦味受容体を介して迷走神経を活性化し認知機能を改善すると考えられる。一連の研究で、ホップ由来の苦味酸が迷走神経を活性化し認知機能を改善することが明らかになった。

イソ $\alpha$ 酸と熟成ホップ苦味酸は共通の構造である $\beta$ トリカルボニル構造を有し、苦味受容体へのアゴニスト活性を有する点や、腸管の苦味受容体を介して迷走神経を活性化する可能性がある点では共通している。また、いずれも肥満抑制効果や認知機能改善効果を示すなど、生理機能の表現型は共通しているが、興味深いことにその作用機序は異なることが示唆されている。イソ $\alpha$ 酸はPPAR $\alpha$ 、 $\gamma$ の活性化を介して肥満抑制、糖代謝改善効果を示すのに対し[27]、熟成ホップ苦味酸は迷走神経活性化による褐色脂肪細胞での熱産生促進により肥満抑制効果を示す[35]。認知機能改善効果においては脳内の作用機序が異なっており、イソ $\alpha$ 酸はおもにドーパミン神経系を、熟成ホップ苦味酸はおもにノルエピネフリン神経系を介して作用している。作用機序が異なる理由は未解明であるが、これらの成分が血液—脳関門を通過して脳内で作用するかどうかは寄与していると想定される。イソ $\alpha$ 酸は経口投与後に脳内で検出されることが確認されている一方[32]、熟成ホップ苦味酸は経口投与後の脳内では検出限界以下であった（キリンホールディングス社未公表データ）。また、イソ $\alpha$ 酸を *ex vivo* で海馬切片に処理することで

一パミン分泌量が増加する可能性があること、およびイソ  $\alpha$  酸が神経細胞に発現する特定の受容体へのアゴニスト活性を示す可能性を見出している（キリンホールディングス社未公表データ）。熟成ホップ苦味酸は迷走神経活性化を介して作用し、イソ  $\alpha$  酸は迷走神経活性化と神経細胞への直接の影響を組み合わせる可能性があり、これらが認知機能改善メカニズムの差となっていると予想される。

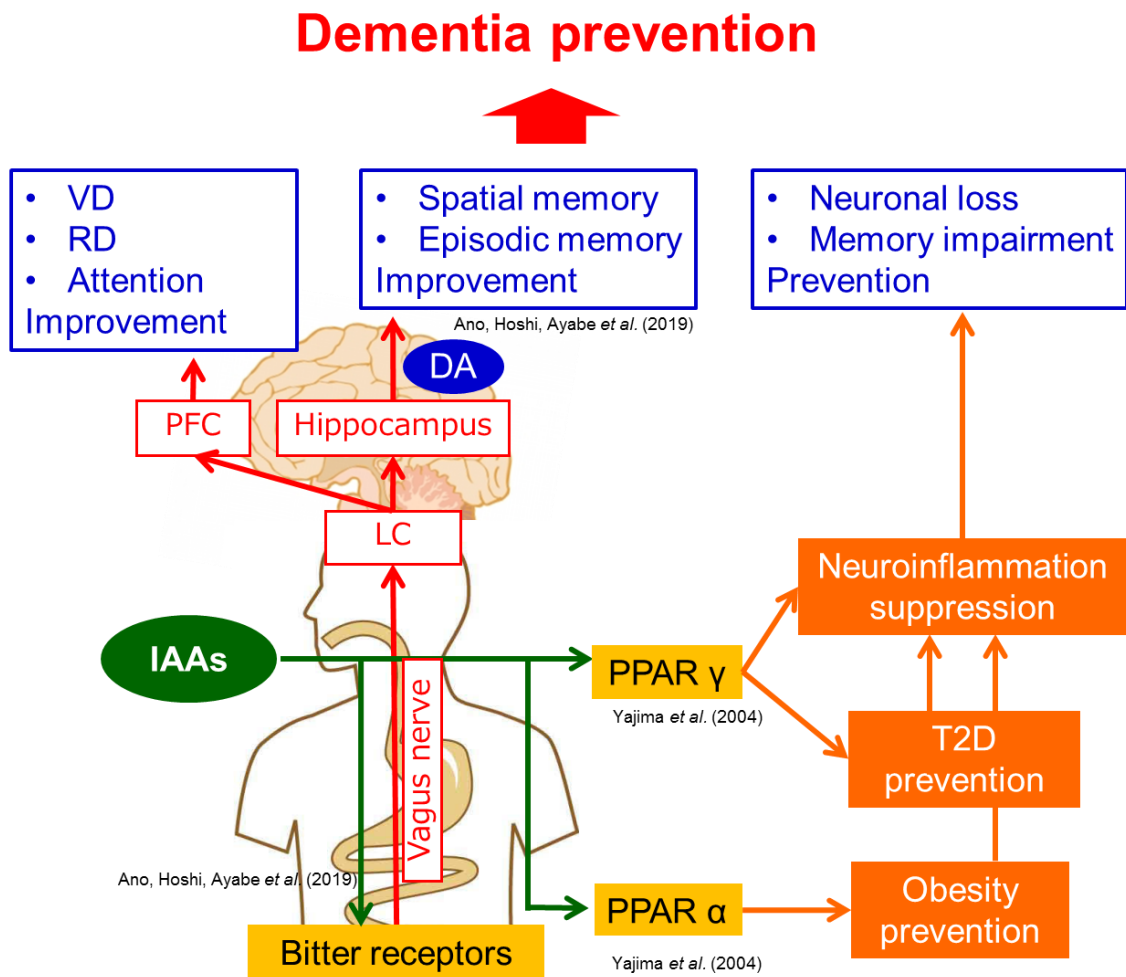
さらに、イソ  $\alpha$  酸と熟成ホップ苦味酸の血液—脳関門の透過性の差には、両者の疎水性の差が寄与している可能性がある。C<sub>18</sub>-ODS カラムを用いた HPLC による分析ではイソ  $\alpha$  酸（溶出時間：25–31 分）と比較して熟成ホップ苦味酸（溶出時間：2–25 分）は早く溶出し、疎水性が低いことが示唆される（序論 Fig. 5）。一般的に血液—脳関門は疎水性の高い物質が拡散によって浸透しやすく、イソ  $\alpha$  酸が熟成ホップ苦味酸と比較して血液—脳関門を透過しやすい理由となりうる。また、熟成ホップ苦味酸に含まれる化合物においても溶出時間に差があることから、熟成ホップ苦味酸の代表的化合物の活性の差に寄与していると考えられる（Fig. 2-2-5）。今後、ホップ由来苦味酸の生理活性の違いを疎水性の観点から評価することで、詳細な作用機序の解明やより強力な作用を持った化合物の取得などにつながるかもしれない。

迷走神経のシグナルが伝達される脳部位である青斑核はアルツハイマー病の病態において重要な役割を果たしており、青斑核および青斑核から投射されるノルエピネフリン神経の変性はほとんどのアルツハイマー病患者で観察されている[95]。最近では、青斑核はアルツハイマー病において最初に委縮する部位であるとも言われている[96]。そのため、青斑核の活性化につながる迷走神経の活性化はアルツハイマー病の治療ターゲットともなりうる。これまでに報告されている迷走神経の刺激方法はペースメーカーを体内に埋め込み電気生理的に刺激する方法であったが、この方法では侵襲性が高く簡便に使用できなかった。ホップ苦味成分を用いた迷走神経活性化は実施が簡便であることから、有効な認知症予防方法となることが期待される。

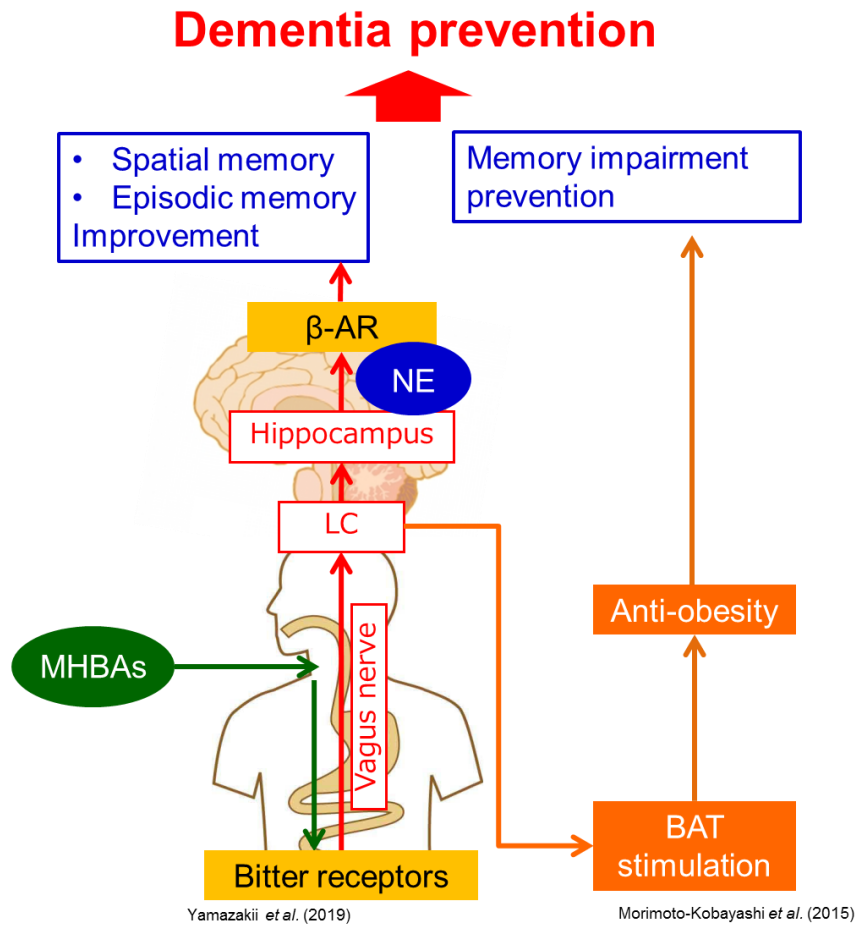
イソ  $\alpha$  酸および熟成ホップ苦味酸の肥満抑制効果は臨床試験においても確認されており、ヒトにおいても肥満抑制を通じた認知機能改善が期待できる。加えて、近年筆者らのグループではホップ由来苦味酸の認知機能への影響を評価する臨床試験を実施している。オープンラベル前後比較試験において、イソ  $\alpha$  酸（3 mg/day）4 週間の摂取により MRI によって評価される認知機能の指標が改善されることが明らかになった[97]。また、プラセボ対照ランダム化二重盲検試験において、熟成ホップ苦味酸（35 mg/day）12 週間の摂取により、認知機能の一部である実行機能や思い出す力が改善することが明らかになった[98]。これらの報告から、ホップ由来苦味酸の認知機能改善効果や、肥

満抑制を介した認知症予防効果はヒトでも有効であり、今後これらの成分を活用した人々の健康への貢献が期待される。

以上、本研究ではビールに含まれるホップ由来苦味成分イソ $\alpha$ 酸および熟成ホップ苦味酸が肥満の抑制を介して認知機能低下を抑制すること、および迷走神経や脳内のモノアミン神経伝達を活性化することで認知機能を改善することを明らかにした (Fig. 9, 10)。これらの知見が、大きな社会課題である認知症の予防・改善に貢献することを期待したい。



**Fig. 9** Expected mechanism of IAAs underlying dementia prevention. PPAR  $\alpha$  and  $\gamma$  agonistic activity of IAAs may contribute to suppress obesity-induced neuroinflammation, leading to cognitive improvement. IAAs are also reported to activate dopamine signaling, and thus enhance PFC- and hippocampus associated cognitive functions. IAAs DA; dopamine, LC; locus coeruleus, PFC; prefrontal cortex, PPAR; peroxisome proliferator-activated protein, RD; reversal discrimination, T2D; type II diabetes, VD; visual discrimination.



**Fig. 10** Expected mechanism of MHBAs underlying dementia prevention. MHBAs are reported to stimulate BAT activity and prevent obesity, which may improve obesity-induced memory impairment. Further, MHBAs stimulate vagus nerve and norepinephrine signaling in the hippocampus, and thus improve hippocampus associated memory functions. BAT; brown adipose tissue,  $\beta$ -AR;  $\beta$  adrenal receptor, LC; locus coeruleus, NE; norepinephrine.



〈発表論文リスト〉

(第1章 第1節)

• Ayabe T, Ohya R, Kondo K, Ano Y. Iso- $\alpha$ -acids, bitter components of beer, prevent obesity-induced cognitive decline. *Sci Rep*. 2018 Mar 19;8(1):4760.

(第1章 第2節)

• Ayabe T, Ohya R, Ano Y. Hop-Derived Iso- $\alpha$ -acids in beer improve visual discrimination and reversal learning in mice as assessed by a touch panel operant system. *Front Behav Neurosci*. 2019 Apr 2;13:67.

(第2章 第1節)

• Ayabe T, Ohya R, Ano Y. Iso- $\alpha$ -acids and matured hop bitter acids in beer improve obesity-induced cognitive impairment. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019 Oct;83(10):1937-1945.

(第2章 第2節)

• Ayabe T, Ohya R, Taniguchi Y, Shindo K, Kondo K, Ano Y. Matured hop-derived bitter components in beer improve hippocampus-dependent memory through activation of the vagus nerve. *Sci Rep*. 2018 Oct 18;8(1):15372.

(その他)

• Ano Y, Hoshi A, Ayabe T, Ohya R, Uchida S, Yamada K, Kondo K, Kitaoka S, Furuyashiki T. Iso- $\alpha$ -acids, the bitter components of beer, improve hippocampus-dependent memory through vagus nerve activation. *FASEB J*. 2019 Apr;33(4):4987-4995.

• 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*. 2020 Jan 13;10(1). pii: E131.

• Ayabe T, Ano Y. Alzheimer model 5 $\times$ FAD mice and applications to dementia: transgenic mouse models, a focus on neuroinflammation, microglia, and food-derived components. *The Neuroscience of Dementia*. Elsevier 2020:833-847.

〈引用文献〉

1. 内閣府. 令和元年版高齢社会白書. **2019**.
2. 内閣府. 平成 29 年版高齢社会白書. **2016**.
3. Prince, M.J. *World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends*; Alzheimer's Disease International: **2015**.
4. Glenner, G.G.; Wong, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, *120*, 885-890.
5. Querfurth, H.W.; LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* **2010**, *362*, 329-344, doi:10.1056/NEJMra0909142.
6. Amor, S.; Puentes, F.; Baker, D.; Van Der Valk, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* **2010**, *129*, 154-169.
7. Heneka, M.T. Inflammasome activation and innate immunity in Alzheimer's disease. *Brain pathology* **2017**, *27*, 220-222.
8. Vanhanen, M.; Koivisto, K.; Moilanen, L.; Helkala, E.; Hänninen, T.; Soininen, H.; Kervinen, K.; Kesäniemi, Y.; Laakso, M.; Kuusisto, J. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* **2006**, *67*, 843-847.
9. Whitmer, R.; Gustafson, D.; Barrett-Connor, E.; Haan, M.; Gunderson, E.; Yaffe, K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* **2008**, *71*, 1057-1064.
10. Xu, W.; Atti, A.; Gatz, M.; Pedersen, N.; Johansson, B.; Fratiglioni, L. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology* **2011**, *76*, 1568-1574.
11. Albanese, E.; Launer, L.J.; Egger, M.; Prince, M.J.; Giannakopoulos, P.; Wolters, F.J.; Egan, K. Body mass index in midlife and dementia: Systematic review and meta-regression analysis of 589,649 men and women followed in longitudinal studies. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* **2017**, *8*, 165-178.
12. Ohara, T.; Doi, Y.; Ninomiya, T.; Hirakawa, Y.; Hata, J.; Iwaki, T.; Kanba, S.; Kiyohara, Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology* **2011**, *77*, 1126-1134.
13. Spencer, S.J.; D'Angelo, H.; Soch, A.; Watkins, L.R.; Maier, S.F.; Barrientos, R.M. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal-and

- amygdalar-dependent memory. *Neurobiology of Aging* **2017**, *58*, 88-101.
14. Shimada, H.; Doi, T.; Lee, S.; Makizako, H. Reversible predictors of reversion from mild cognitive impairment to normal cognition: a 4-year longitudinal study. *Alzheimer's Research & Therapy* **2019**, *11*, 24.
  15. Safouris, A.; Tsivgoulis, G.; N Sergentanis, T.; Psaltopoulou, T. Mediterranean diet and risk of dementia. *Current Alzheimer Research* **2015**, *12*, 736-744.
  16. Rakesh, G.; Szabo, S.T.; Alexopoulos, G.S.; Zannas, A.S. Strategies for dementia prevention: latest evidence and implications. *Therapeutic advances in chronic disease* **2017**, *8*, 121-136.
  17. Livingston, G.; Sommerlad, A.; Orgeta, V.; Costafreda, S.G.; Huntley, J.; Ames, D.; Ballard, C.; Banerjee, S.; Burns, A.; Cohen-Mansfield, J. Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet* **2017**, *390*, 2673-2734.
  18. Neafsey, E.J.; Collins, M.A. Moderate alcohol consumption and cognitive risk. *Neuropsychiatric disease and treatment* **2011**, *7*, 465.
  19. Xu, W.; Wang, H.; Wan, Y.; Tan, C.; Li, J.; Tan, L.; Yu, J.-T. Alcohol consumption and dementia risk: a dose–response meta-analysis of prospective studies. Springer: **2017**.
  20. Bastianetto, S.; Ménard, C.; Quirion, R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **2015**, *1852*, 1195-1201.
  21. Turner, R.S.; Thomas, R.G.; Craft, S.; Van Dyck, C.H.; Mintzer, J.; Reynolds, B.A.; Brewer, J.B.; Rissman, R.A.; Raman, R.; Aisen, P.S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* **2015**, *85*, 1383-1391.
  22. 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. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2015**, *79*, 1684-1694, doi:10.1080/09168451.2015.1042832.
  23. Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three TAS2R bitter taste receptors mediate the psychophysical responses to bitter compounds of hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Chemosensory Perception* **2009**, *2*, 118-132.
  24. Kowaka, M.; Kokubo, E. Composition of bitter substances of hops and characteristics of beer bitterness. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **1977**, *35*, 16-21.
  25. Kunimune, T.; Shellhammer, T.H. Foam-stabilizing effects and cling formation patterns

- of iso- $\alpha$ -acids and reduced iso- $\alpha$ -acids in lager beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 8629-8634.
26. Simpson, W.; Smith, A. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology* **1992**, *72*, 327-334.
  27. Yajima, H.; Ikeshima, E.; Shiraki, M.; Kanaya, T.; Fujiwara, D.; Odai, H.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Ezaki, O.; Oikawa, S.; Kondo, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 33456-33462, doi:10.1074/jbc.M403456200.
  28. Yajima, H.; Noguchi, T.; Ikeshima, E.; Shiraki, M.; Kanaya, T.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Ezaki, O.; Oikawa, S.; Kondo, K. Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. *International journal of obesity (2005)* **2005**, *29*, 991-997, doi:10.1038/sj.ijo.0802965.
  29. Miura, Y.; Hosono, M.; Oyamada, C.; Odai, H.; Oikawa, S.; Kondo, K. Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPARalpha activations in C57BL/6 mice. *The British Journal of Nutrition* **2005**, *93*, 559-567, doi:10.1079/bjn20041384.
  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. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* **2009**, *28*, 278-284, doi:10.1016/j.clnu.2009.03.012.
  31. Agarwal, S.; Yadav, A.; Chaturvedi, R.K. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *483*, 1166-1177.
  32. Ano, Y.; Dohata, A.; Taniguchi, Y.; Hoshi, A.; Uchida, K.; Takashima, A.; Nakayama, H. Iso- $\alpha$ -acids, bitter components of beer, prevent inflammation and cognitive decline induced in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292*, 3720-3728.
  33. Ano, Y.; Hoshi, A.; Ayabe, T.; Ohya, R.; Uchida, S.; Yamada, K.; Kondo, K.; Kitaoka, S.; Furuyashiki, T. Iso-alpha-acids, the bitter components of beer, improve hippocampus-dependent memory through vagus nerve activation. *FASEB Journal* **2019**, *33*, 4987-

- 4995, doi:10.1096/fj.201801868RR.
34. Almaguer, C.; Gastl, M.; Arendt, E.K.; Becker, T. Comparative study of the contribution of hop (*Humulus lupulus* L.) hard resins extracted from different hop varieties to beer quality parameters. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2015**, *73*, 115-123.
  35. Morimoto-Kobayashi, Y.; Ohara, K.; Takahashi, C.; Kitao, S.; Wang, G.; Taniguchi, Y.; Katayama, M.; Nagai, K. Matured Hop Bittering Components Induce Thermogenesis in Brown Adipose Tissue via Sympathetic Nerve Activity. *PloS One* **2015**, *10*, e0131042, doi:10.1371/journal.pone.0131042.
  36. Roosevelt, R.W.; Smith, D.C.; Clough, R.W.; Jensen, R.A.; Browning, R.A. Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Research* **2006**, *1119*, 124-132.
  37. Raji, C.A.; Ho, A.J.; Parikshak, N.N.; Becker, J.T.; Lopez, O.L.; Kuller, L.H.; Hua, X.; Leow, A.D.; Toga, A.W.; Thompson, P.M. Brain structure and obesity. *Human Brain Mapping* **2010**, *31*, 353-364.
  38. Shimura, M.; Hasumi, A.; Minato, T.; Hosono, M.; Miura, Y.; Mizutani, S.; Kondo, K.; Oikawa, S.; Yoshida, A. Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR $\alpha$ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2005**, *1736*, 51-60.
  39. Butterfield, D.A.; Lauderback, C.M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid  $\beta$ -peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, *32*, 1050-1060.
  40. Markesbery, W.R.; Kryscio, R.J.; Lovell, M.A.; Morrow, J.D. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **2005**, *58*, 730-735.
  41. Brites, D.; Fernandes, A. Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2015**, *9*, 476.
  42. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; El Khoury, J.; Landreth, G.E.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M. Neuroinflammation in

- Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* **2015**, *14*, 388-405.
43. Almond, M.H.; Edwards, M.R.; Barclay, W.S.; Johnston, S.L. Obesity and susceptibility to severe outcomes following respiratory viral infection. *Thorax* **2013**, *68*, 684-686.
  44. Fernández-Miranda, C.; Pérez-Carreras, M.; Colina, F.; López-Alonso, G.; Vargas, C.; Solís-Herruzo, J. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease* **2008**, *40*, 200-205.
  45. Filippatos, T.; Gazi, I.; Liberopoulos, E.; Athyros, V.; Elisaf, M.; Tselepis, A.; Kiortsis, D. The effect of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on small dense LDL and lipoprotein-associated phospholipase A2 in obese patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **2007**, *193*, 428-437.
  46. Balakumar, P.; Chakkarwar, V.A.; Singh, M. Ameliorative effect of combination of benfotiamine and fenofibrate in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction and nephropathy in the rat. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2009**, *320*, 149.
  47. Tang, Y.; Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology* **2016**, *53*, 1181-1194.
  48. Pathan, A.R.; Gaikwad, A.B.; Viswanad, B.; Ramarao, P. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *589*, 176-179.
  49. Jeon, B.T.; Jeong, E.A.; Shin, H.J.; Lee, Y.; Lee, D.H.; Kim, H.J.; Kang, S.S.; Cho, G.J.; Choi, W.S.; Roh, G.S. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **2012**, *61*, 1444-1454.
  50. Zhang, X.; Dong, F.; Ren, J.; Driscoll, M.J.; Culver, B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology* **2005**, *191*, 318-325.
  51. Molteni, R.; Barnard, R.; Ying, Z.; Roberts, C.K.; Gómez-Pinilla, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* **2002**, *112*, 803-814.
  52. Jurado, M.B.; Rosselli, M. The elusive nature of executive functions: a review of our current understanding. *Neuropsychology Review* **2007**, *17*, 213-233.
  53. Cañas, J.; Quesada, J.; Antolí, A.; Fajardo, I. Cognitive flexibility and adaptability to environmental changes in dynamic complex problem-solving tasks. *Ergonomics* **2003**,

- 46, 482-501.
54. Parkinson, J.A.; Robbins, T.W.; Everitt, B.J. Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *European Journal of Neuroscience* **2000**, *12*, 405-413.
  55. Tomie, A.; Di Poce, J.; Aguado, A.; Janes, A.; Benjamin, D.; Pohorecky, L. Effects of autoshaping procedures on 3H-8-OH-DPAT-labeled 5-HT1a binding and 125I-LSD-labeled 5-HT2a binding in rat brain. *Brain Research* **2003**, *975*, 167-178, doi:10.1016/s0006-8993(03)02631-3.
  56. Romberg, C.; Horner, A.E.; Bussey, T.J.; Saksida, L.M. A touch screen-automated cognitive test battery reveals impaired attention, memory abnormalities, and increased response inhibition in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **2013**, *34*, 731-744.
  57. Morton, A.J.; Skillings, E.; Bussey, T.J.; Saksida, L.M. Measuring cognitive deficits in disabled mice using an automated interactive touchscreen system. *Nature Methods* **2006**, *3*, 767-767.
  58. Brigman, J.L.; Padukiewicz, K.E.; Sutherland, M.L.; Rothblat, L.A. Executive functions in the heterozygous reeler mouse model of schizophrenia. *Behavioral Neuroscience* **2006**, *120*, 984.
  59. Gilbert, C.D.; Sigman, M.; Crist, R.E. The neural basis of perceptual learning. *Neuron* **2001**, *31*, 681-697.
  60. Kehagia, A.A.; Murray, G.K.; Robbins, T.W. Learning and cognitive flexibility: frontostriatal function and monoaminergic modulation. *Current Opinion in Neurobiology* **2010**, *20*, 199-204.
  61. Winters, B.D.; Bartko, S.J.; Saksida, L.M.; Bussey, T.J. Muscimol, AP5, or scopolamine infused into perirhinal cortex impairs two-choice visual discrimination learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* **2010**, *93*, 221-228.
  62. Barnett, J.H.; Blackwell, A.D.; Sahakian, B.J.; Robbins, T.W. The paired associates learning (PAL) test: 30 years of CANTAB translational neuroscience from laboratory to bedside in dementia research. In *Translational Neuropsychopharmacology*, Springer: **2015**; pp. 449-474.
  63. Nithianantharajah, J.; McKechnie, A.; Stewart, T.; Johnstone, M.; Blackwood, D.; St Clair, D.; Grant, S.; Bussey, T.; Saksida, L. Bridging the translational divide: identical

- cognitive touchscreen testing in mice and humans carrying mutations in a disease-relevant homologous gene. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 14613.
64. Morita, M.; Wang, Y.; Sasaoka, T.; Okada, K.; Niwa, M.; Sawa, A.; Hikida, T. Dopamine D2L Receptor Is Required for Visual Discrimination and Reversal Learning. *Molecular Neuropsychiatry* **2016**, *2*, 124-132, doi:10.1159/000447970.
  65. D'Esposito, M.; Postle, B.R. The cognitive neuroscience of working memory. *Annual Review of Psychology* **2015**, *66*, 115-142.
  66. Tarver, J.; Daley, D.; Sayal, K. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): an updated review of the essential facts. *Child: Care, Health and Development* **2014**, *40*, 762-774.
  67. Freedman, M.; Oscar-Berman, M. Spatial and visual learning deficits in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Brain and Cognition* **1989**, *11*, 114-126, doi:10.1016/0278-2626(89)90009-2.
  68. Taniguchi, Y.; Matsukura, Y.; Ozaki, H.; Nishimura, K.; Shindo, K. Identification and quantification of the oxidation products derived from alpha-acids and beta-acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 3121-3130, doi:10.1021/jf3047187.
  69. Morimoto-Kobayashi, Y.; Ohara, K.; Ashigai, H.; Kanaya, T.; Koizumi, K.; Manabe, F.; Kaneko, Y.; Taniguchi, Y.; Katayama, M.; Kowatari, Y., et al. Matured hop extract reduces body fat in healthy overweight humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group study. *Nutrition Journal* **2016**, *15*, 25, doi:10.1186/s12937-016-0144-2.
  70. Chunchai, T.; Samniang, B.; Sripetchwandee, J.; Pintana, H.; Pongkan, W.; Kumfu, S.; Shinlapawittayatorn, K.; KenKnight, B.H.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S.C. Vagus Nerve Stimulation Exerts the Neuroprotective Effects in Obese-Insulin Resistant Rats, Leading to the Improvement of Cognitive Function. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 26866, doi:10.1038/srep26866.
  71. Moret, C.; Briley, M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **2011**, *7*, 9.
  72. Giorgi, F.S.; Pizzanelli, C.; Biagioni, F.; Murri, L.; Fornai, F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **2004**, *28*, 507-524.
  73. Ben-Menachem, E. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *The Lancet*



- Neurology* **2002**, *1*, 477-482.
74. Sackeim, H.A.; Rush, A.J.; George, M.S.; Marangell, L.B.; Husain, M.M.; Nahas, Z.; Johnson, C.R.; Seidman, S.; Giller, C.; Haines, S. Vagus nerve stimulation (VNS™) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25*, 713.
  75. Nahas, Z.; Teneback, C.; Chae, J.-H.; Mu, Q.; Molnar, C.; Kozel, F.A.; Walker, J.; Anderson, B.; Koola, J.; Kose, S. Serial vagus nerve stimulation functional MRI in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 1649-1660.
  76. Vonck, K.; Raedt, R.; Naulaerts, J.; De Vogelaere, F.; Thiery, E.; Van Roost, D.; Aldenkamp, B.; Miatton, M.; Boon, P. Vagus nerve stimulation... 25 years later! What do we know about the effects on cognition? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **2014**, *45*, 63-71.
  77. Ayabe, T.; Ohya, R.; Taniguchi, Y.; Shindo, K.; Kondo, K.; Ano, Y. Matured Hop-Derived Bitter Components in Beer Improve Hippocampus-Dependent Memory Through Activation of the Vagus Nerve. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 15372, doi:10.1038/s41598-018-33866-1.
  78. Hughes, R.N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **2004**, *28*, 497-505.
  79. Follesa, P.; Biggio, F.; Gorini, G.; Caria, S.; Talani, G.; Dazzi, L.; Puligheddu, M.; Marrosu, F.; Biggio, G. Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Research* **2007**, *1179*, 28-34.
  80. Mello-Carpes, P.B.; de Vargas, L.d.S.; Gayer, M.C.; Roehrs, R.; Izquierdo, I. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory* **2016**, *127*, 84-92.
  81. Mello-Carpes, P.B.; Izquierdo, I. The nucleus of the solitary tract→ nucleus paragigantocellularis→ locus coeruleus→ CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* **2013**, *100*, 56-63.
  82. Suzuki, S.; Morimoto-Kobayashi, Y.; Takahashi, C.; Taniguchi, Y.; Katayama, M. Genetic,

- acute and subchronic toxicity studies of matured hop extract produced by extraction from heat-treated hops. *The Journal of Toxicological Sciences* **2018**, *43*, 473-484.
83. Nair, A.B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* **2016**, *7*, 27.
  84. Biendl, M.; Pinzl, C. Hops and health. *MBAA TQ* **2009**, *46*, 1-7.
  85. Štulíková, K.; Karabín, M.; Nešpor, J.; Dostálek, P. Therapeutic perspectives of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops. *Molecules* **2018**, *23*, 660.
  86. Liu, M.; Hansen, P.E.; Wang, G.; Qiu, L.; Dong, J.; Yin, H.; Qian, Z.; Yang, M.; Miao, J. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* **2015**, *20*, 754-779.
  87. Ayabe, T.; Ohya, R.; Ano, Y.  $\beta$ -lactolin, a whey-derived glycine—threonine—tryptophan—tyrosine lactotetrapeptide, improves prefrontal cortex-associated reversal learning in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2020**, 1-8.
  88. Bravo, J.A.; Forsythe, P.; Chew, M.V.; Escaravage, E.; Savignac, H.M.; Dinan, T.G.; Bienenstock, J.; Cryan, J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 16050-16055.
  89. Foster, J.A.; Neufeld, K.-A.M. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences* **2013**, *36*, 305-312.
  90. Mori, Y.; Asakura, S.; Yamamoto, A.; Odagiri, S.; Yamada, D.; Sekiguchi, M.; Wada, K.; Sato, M.; Kurabayashi, A.; Suzuki, H. Characterization of soy-deprestatin, a novel orally active decapeptide that exerts antidepressant-like effects via gut–brain communication. *The FASEB Journal* **2018**, *32*, 568-575.
  91. Egan, J.M.; Margolskee, R.F. Taste cells of the gut and gastrointestinal chemosensation. *Molecular Interventions* **2008**, *8*, 78.
  92. Wu, S.V.; Rozengurt, N.; Yang, M.; Young, S.H.; Sinnett-Smith, J.; Rozengurt, E. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 2392-2397.
  93. Chen, M.C.; Wu, S.V.; Reeve Jr, J.R.; Rozengurt, E. Bitter stimuli induce Ca<sup>2+</sup> signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup>

- channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2006**, *291*, C726-C739.
94. Yamazaki, T.; Morimoto-Kobayashi, Y.; Koizumi, K.; Takahashi, C.; Nakajima, S.; Kitao, S.; Taniguchi, Y.; Katayama, M.; Ogawa, Y. Secretion of a gastrointestinal hormone, cholecystokinin, by hop-derived bitter components activates sympathetic nerves in brown adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2019**, *64*, 80-87, doi:10.1016/j.jnutbio.2018.10.009.
95. Bondareff, W.; Mountjoy, C.Q.; Roth, M. Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* **1982**, *32*, 164-164.
96. Theofilas, P.; Ehrenberg, A.J.; Dunlop, S.; Alho, A.T.D.L.; Nguy, A.; Leite, R.E.P.; Rodriguez, R.D.; Mejia, M.B.; Suemoto, C.K.; Ferretti-Rebustini, R.E.D.L. 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 & Dementia* **2017**, *13*, 236-246.
97. Kita, M.; Yoshida, S.; Kondo, K.; Yamakawa, Y.; Ano, Y. Effects of iso-alpha-acids, the hop-derived bitter components in beer, on the MRI-based Brain Healthcare Quotient in healthy middle-aged to older adults. *Neuropsychopharmacology Reports* **2019**, *39*, 273-278, doi:10.1002/npr2.12077.
98. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 206-212, doi:10.1021/acs.jafc.9b06660.

## 〈謝辞〉

本論文を執筆するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 佐藤隆一郎教授に深く感謝いたします。

熟成ホップ苦味酸に含まれる化合物の構造決定にあたり、NMR 測定を実施頂きデータを提供くださいました日本女子大学家政学部 新藤一敏教授に深く感謝いたします。

本研究における行動実験手法をご指導、ご助言頂いた、協和キリン株式会社研究開発本部中枢神経研究所の山田浩司博士、内田真一博士に深く感謝いたします。

本研究をまとめるにあたりご尽力いただいたキリンホールディングス株式会社 R&D 本部副本部長 近藤恵二博士、知財戦略推進部部長 矢島宏昭博士に深く感謝いたします。

最後に、筆者に研究の機会を与えて下さいましたキリンホールディングス株式会社 小川俊也健康技術研究所所長（当時）、出内桂二キリン中央研究所所長、小原有晶主幹、三浦裕博士、吉田聡博士に深く御礼申し上げます。そして、本研究の遂行にあたり多大なるご助言、ご協力いただいたキリンホールディングス株式会社キリン中央研究所の阿野泰久博士、大屋怜奈研究員、谷口慈将博士、福田隆文研究員、高橋千佳研究員、ならびに多くの同僚の皆様に深く感謝いたします。

## 〈要旨〉

### 序論

我が国では高齢化が急速に進行し、それに伴い認知症患者数が増加しさまざまな社会課題を引き起こしている。アルツハイマー病は認知症のうちもっとも主要な病態であり、細胞外のアミロイド  $\beta$  沈着や細胞内のタウタンパク質蓄積に伴う神経変性などの特徴に加え、病態惹起に脳内炎症が関与していることが明らかになっている。また、II型糖尿病をはじめとした生活習慣病や肥満が認知症リスクを高めることが明らかになってきている。

認知症の病態や発症メカニズムが精力的に研究されている一方で、いまだ発症後の根本的な治療方法は確立されていない。そのため、食生活などの日常生活を通じた予防法に注目が集まっている。疫学調査の結果から、日常的な適量のアルコール飲料の摂取が認知症の予防因子となることが示唆され、特にワインに含まれるレスベラトロールの認知症予防効果に関する研究がさかんに行われている。一方、世界で最も多く消費されるアルコール飲料であるビールについて、その含有成分の認知症予防に関する研究はほとんどなされていない。

ホップはビールの主要な原料の一つであり、ビールに特徴的な味わいや香りを付与している。ホップには  $\alpha$  酸および  $\beta$  酸が含まれ、このうち  $\alpha$  酸は醸造工程の加熱により異性化し、ビールの主要な苦味成分であるイソ  $\alpha$  酸 (Iso- $\alpha$ -acids; IAAs) が生成する。一方、 $\alpha$  酸および  $\beta$  酸はホップの貯蔵過程で酸化反応を受け、多様な酸化化合物を生成することが古くから知られていた。近年、ホップ由来の酸化化合物のうち代表的なものの構造が決定され、総称して熟成ホップ苦味酸 (Matured hop bitter acids; MHBAs) と名付けられた。イソ  $\alpha$  酸や熟成ホップ苦味酸などのホップ由来苦味酸はビールの風味への寄与だけでなく、多様な生理機能を示すことが明らかになっている。そこで、本研究ではイソ  $\alpha$  酸および熟成ホップ苦味酸に着目し、認知機能に及ぼす影響とそのメカニズムについて検証を行った。

## 第1章 イソ $\alpha$ 酸の認知機能改善効果

### 第1節 イソ $\alpha$ 酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する

肥満や生活習慣病などが認知症のリスクを高めることが報告されており、そのメカニズムとして脳内炎症の関与が想定されている。イソ  $\alpha$  酸は peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  活性化を介して肥満抑制効果および炎症抑制効果を示すことが報告されており、これらを併せ持つことで肥満に伴う認知機能低下の改善に

有用であると考えられた。そこで、高脂肪食誘導肥満モデルマウスにイソ $\alpha$ 酸を摂餌投与し認知機能に及ぼす影響を評価した。

通常食、高脂肪食、イソ $\alpha$ 酸（0.05% w/w）含有高脂肪食を8週間摂餌したところ、イソ $\alpha$ 酸は高脂肪食摂取に伴う体重、内臓脂肪重量、血中トリグリセリド量の増加を有意に抑制した。また、高脂肪食摂取は脳内での炎症性サイトカイン、ケモカイン量を増加させ、それに伴う脂質酸化、神経活動の低下を引き起こしたが、イソ $\alpha$ 酸の摂取によりこれらの反応が抑制された。エピソード記憶の評価系である新奇物体探索試験により記憶機能の評価したところ、高脂肪食摂取マウスでは記憶機能の低下が認められ、イソ $\alpha$ 酸の摂取により記憶機能が有意に改善した。イソ $\alpha$ 酸含有高脂肪食摂取マウスの脳内炎症や記憶機能は体重減少量から予測される以上に改善していたため、肥満抑制効果と抗炎症効果を併せ持つことにより強い認知機能改善効果を示したと考えられる。また、高脂肪食による肥満誘導後のマウスにイソ $\alpha$ 酸を短期投与した場合もイソ $\alpha$ 酸はエピソード記憶を改善した。イソ $\alpha$ 酸は予防的な効果に加えて、認知機能が低下した後に治療的な効果を示すと考えられる。

以上、イソ $\alpha$ 酸が肥満に伴う脳内炎症および認知機能の低下を改善することが明らかになった。イソ $\alpha$ 酸は肥満抑制だけをターゲットとした手段と比較して、より効率的に肥満に伴う認知機能低下を改善することが期待される。

## 第2節 イソ $\alpha$ 酸はタッチパネルオペラント試験系において高次認知機能を改善する

筆者らの最近の研究で、イソ $\alpha$ 酸は海馬ドーパミン神経系の活性化を介して、海馬に関連した空間作業記憶やエピソード記憶を改善することが明らかになっている。しかし、長期的な学習機能や前頭皮質に関連した注意、実行機能、記憶の柔軟性などの高次認知機能に及ぼす影響は不明であった。そこで、高次認知機能の評価が可能なタッチパネルオペラント試験系を用いて、視覚弁別課題および逆転弁別課題におけるイソ $\alpha$ 酸の影響を検証した。

視覚弁別課題において、通常マウスと比較してスコポラミン誘導健忘症モデルマウスの正答率が有意に低下し、反応時間が有意に増加した。イソ $\alpha$ 酸（1 mg/kg）の経口投与により、スコポラミンに伴う正答率低下、反応時間増加が有意に改善した。続いて、視覚弁別課題を完了したマウスを用いて逆転弁別課題を実施したところ、イソ $\alpha$ 酸（1 mg/kg）の経口投与により逆転弁別課題の正答率が有意に改善した。

以上、イソ $\alpha$ 酸は学習機能、注意、実行機能、記憶の柔軟性などの前頭皮質に関連し

た高次認知機能を改善することが明らかになった。また、食品成分の有効性評価において、タッチパネルオペラント試験系の有用性を示した。

## 第2章 熟成ホップ苦味酸の認知機能改善効果

### 第1節 熟成ホップ苦味酸は肥満に伴う認知機能低下を改善する

熟成ホップ苦味酸は迷走神経活性化を介して肥満抑制効果を有することが明らかになっており、肥満に伴う認知機能低下を抑制することが期待された。そこで高脂肪食誘導肥満モデルマウスを用いた検証を行った。

マウスに通常食、高脂肪食、熟成ホップ苦味酸 (0.05% w/w) 含有高脂肪食を8週間摂取させたところ、熟成ホップ苦味酸は高脂肪食摂取に伴う体重、内臓脂肪重量の増加を有意に抑制し、血中グルコース、インスリン濃度を低下させた。さらに、新奇物体探索試験によりエピソード記憶を評価したところ、熟成ホップ苦味酸摂取マウスのエピソード記憶が有意に改善した。体重および内臓脂肪重量はエピソード記憶と負の相関があり、熟成ホップ苦味酸は体重、脂肪重量低下を介して認知機能を改善することが示唆された。また、高脂肪食による肥満誘導後のマウスにおいて、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) の短期投与により肥満に伴う認知機能低下が改善することが明らかになった。

以上、熟成ホップ苦味酸は肥満に伴う認知機能低下を改善することが明らかになった。

### 第2節 熟成ホップ苦味酸は迷走神経およびノルエピネフリンシグナルの活性化を介して認知機能を改善する

熟成ホップ苦味酸が迷走神経の活性化を介して肥満抑制効果を示すことが報告されている。迷走神経の刺激はノルエピネフリン神経を介して様々な脳領域を活性化することが報告されていることから、熟成ホップ苦味酸が認知機能を改善する可能性が考えられた。そこで、行動薬理学的手法を用いてマウスの認知機能に及ぼす熟成ホップ苦味酸の作用およびメカニズムを検証した。

スコポラミン誘導健忘症モデルマウスを用いて、空間作業記憶の評価系である Y 字迷路試験により熟成ホップ苦味酸の効果を検証したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) およびそこに含まれる代表的な化合物の投与により空間作業記憶が有意に改善した。通常マウスを用いて新奇物体探索試験を実施したところ、熟成ホップ苦味酸 (10 mg/kg) の投与によりエピソード記憶が有意に改善した。熟成ホップ苦味酸は海馬のノルエピネフリン含有量および分泌量を有意に増加させた。また、ノルエピネフリン受容体阻害剤の投与により認知機能改善効果が消失したことから、熟成ホップ苦味酸はノル

エピネフリン系を介して認知機能を改善すると考えられる。さらに、迷走神経切除マウスを用いて Y 字迷路試験および新奇物体探索試験を実施したところ、熟成ホップ苦味酸の効果が減弱した。

以上、熟成ホップ苦味酸は迷走神経活性化を介して海馬ノルエピネフリン神経系を活性化し、認知機能を改善することが明らかになった。本研究は食品成分による迷走神経活性化を介した認知機能改善効果を示した初めての例であり、認知症予防への新たなアプローチの可能性を示した。

### まとめ

本研究において、ビールに含まれるホップ由来苦味成分イソ  $\alpha$  酸および熟成ホップ苦味酸が肥満抑制を介して認知機能低下を改善すること、および迷走神経活性化や脳内モノアミン神経伝達活性化を介して認知機能を改善することを明らかにした。これらの知見が認知症の予防、治療に活用され人々の健康維持に貢献することを期待したい。

以上