

【論文】

老化促進モデルマウス（SAMP8）の記憶力・活動力低下に対する地獄蒸し食品の効果

仙波 和代* 大賀 恭** 木村 靖浩* 浅田 憲彦*
中村 弘幸* 長谷 真*** 大坪 素秋* 西澤千恵子*

【要 旨】

本研究では、約4ヶ月で老化のために記憶力低下を呈するマウスを用いて、別府地獄蒸し食品の摂取が、これらの低下を抑制することが可能であるのか検討を行った。実験にはマウスの餌を地獄釜で24時間蒸して乾燥させたものを用いた。地獄蒸し餌を継続的に摂取したマウスは、Y字迷路において空間作業記憶の向上を認めるとともに、新奇物体認識試験においても記憶保持力の増強が認められた。これらの結果より、長年湯治客に好んで摂取されてきた地獄蒸し料理には、生体に対する生理的機能を有することが示唆された。

【キーワード】

地獄蒸し、記憶力、海馬、Y字迷路、新奇物体認識試験

はじめに

大分県別府市は温泉地として有名な町である。別府温泉が他の温泉と異なる特徴は、海・陸軍病院や原子爆弾被爆者別府温泉利用研究所など、歴史的に「疾病や怪我の治療・療養」とともに発展してきた点にある。これら歴史的な背景のお蔭で、別府市は現在でも日本有数の湯治客を誇っており、湯治客用の設備も整っている。その設備の1つに「地獄釜」がある。地獄釜から噴出する天然噴気で食物を蒸すことを「地獄蒸し」と呼び、江戸時代から「簡単・便利・安い」という理由で庶民に好まれてきた¹⁾。現在でも、地獄蒸し料理は健康に良く美味しいということから、一部の地域住民と湯治客はほぼ毎日食している。

*別府大学食物栄養科学部, **大分大学工学部応用工学科, ***別府大学短期大学部, First author Corresponding author

これまで別府温泉に関しては数多くの科学的研究が報告されてきており、温泉の効能²⁾、飲泉・鉱泥の効果³⁾、また「地獄蒸し」に関する味や調理の研究⁴⁾もある。しかしながら「地獄蒸し」がなぜ健康に良いとされているのか、またどのような疾病に対して効果があるのかなど、地獄蒸し料理を摂取した際の健康状態や生理的機能を調査・研究した報告は皆無である。

そこで地獄蒸し料理がどのように健康に良いのかを調べるために、昨年度申請者らの研究グループは、ラットの餌を地獄釜で蒸し、正常ラットに摂取させ生理的機能解析を行ったところ以下の結果を得た⁵⁾。

- 1) コントロール群よりも地獄蒸し食群ラットの方が、摂取カロリーが高かった
- 2) 摂取カロリーが高かったにも関わらず、地獄蒸し食群ラットの方が太らなかった。
- 3) 地獄蒸し食群ラットの方がトリグリセリドの値が低かった。
- 4) 地獄蒸し食群ラットの方が、血糖値は低い値を示した。
- 5) Y字迷路の実験より、地獄蒸し食群ラットには自発行動の活発化と空間作業記憶の増強を認めた。

以上の結果より、地獄蒸し食品の摂取は代謝系と脳機能に影響を与えている可能性が推測されたことから、本年度は加齢に伴う行動力・認知力低下に関して、地獄蒸し食品に予防効果があるのか否かの検討を行ったので報告する。

実験と方法

実験動物と飼育

8週齢の雄 SAMP8 マウス（老化促進モデルマウス）30匹と雄 SAMR マウス（コントロールマウス）30匹を購入し（日本 SLC 株式会社）実験に使用した。なお本動物実験は別府大学動物実験委員会の承認を得ている（承認番号28）。購入より最初の2週間は本学の動物実験施設に慣れさせるために普通食と滅菌水を自由摂取させ、2週目より「地獄蒸し食摂取群」と「普通食群」に分け、それぞれに硫黄食と普通食の摂取を開始させた。摂取方法は自由摂取とし、床敷きとケージは毎週交換して清潔に保った。飼育は5匹を同じケージで飼育し、12ケージとした。

硫黄食と普通食の作製

餌はマウス標準資料（オリエンタル酵母 MF）を使用した。硫黄食は MF を別府明礬温泉の噴気（岡本旅館）に24時間あてたものを乾燥させて使用した。この餌を大分県産業科学技術センターにて硫黄分析を行ったところ、噴気にあてる前には硫黄含有量が $0.36 \pm 0.04\%$ であったのに対し、噴気にあてた後は $0.59 \pm 0.03\%$ と増えていた。また普通食は通常の水で蒸して乾燥させたものを使用した。硫黄噴気で24時間蒸すと水分量が $32 \pm 3\%$ となるため、同じ程度の水分量となるように3時間蒸した餌を用いた。

体重測定と餌摂取量

硫黄食群と普通食群のマウスに、それぞれ硫黄食と普通食を12週間摂取させ、定期的に体重測定と餌摂取量の測定を行った。

Y字迷路実験

飼育開始より10週目に Y 字迷路を用いて、自発行動量と空間作業記憶の実験を行った。

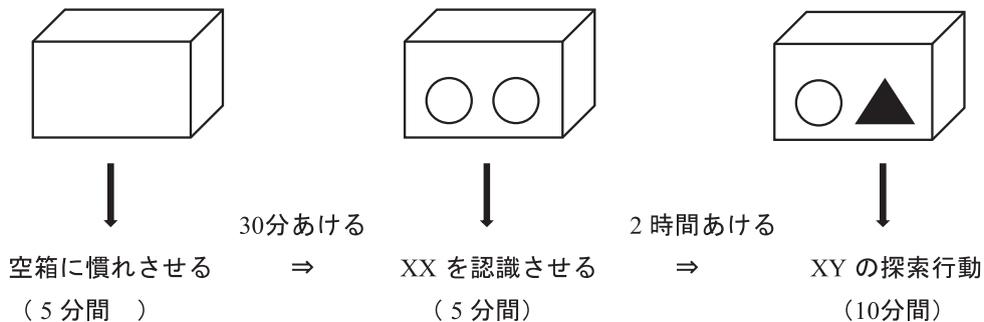


図に示す写真のような Y 字型の装置を用いて実験を行った。各アームを A、B、C と区分し、A にマウスを置いた後、5 分間移動させ、マウスのアームへの進入回数を記録した。

※奥側手前 5 cm に線を引き、そこに後ろ足が入った記録を記入した

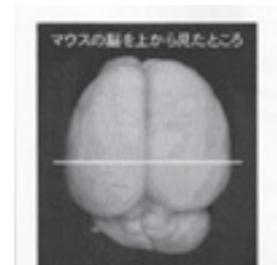
新奇物体認識試験

飼育開始より13週目にマウスの新奇物体認識試験を行った。マウスは本来、新奇物体と認識すると近接して「探索行動」をとる性質がある。記憶している物体に対しては「探索行動」はとらないか、もしくは新奇物体に比べ短時間で終了する。そこで1回目に X と X の物体を置いたケース内で「探索行動」をとらせ、一定時間経過後に片方の X を Y に置き換えたケースで、それぞれの探索した時間を調べ、記憶力の保持効果を確認した。スケジュールを以下に示す。



マウス脳海馬の組織切片作製

飼育開始から14週目の SAMP8 マウスの脳より、記憶を司る海馬領域を取り出した。海馬の切り出しは、マウス脳の中央～前方部に冠状断を断面としを行った。組織を切り出した後はホルマリン固定を行い、組織標本作製した。組織は HE 染色、コンゴレッド染色、ボディアン染色、ガリアス染色を行い、海



馬の神経細胞やアミロイド斑、リン酸化タウの検討を行った。

結果

体重測定（上段：単位は g）と餌摂取量（下段：単位は g/匹）

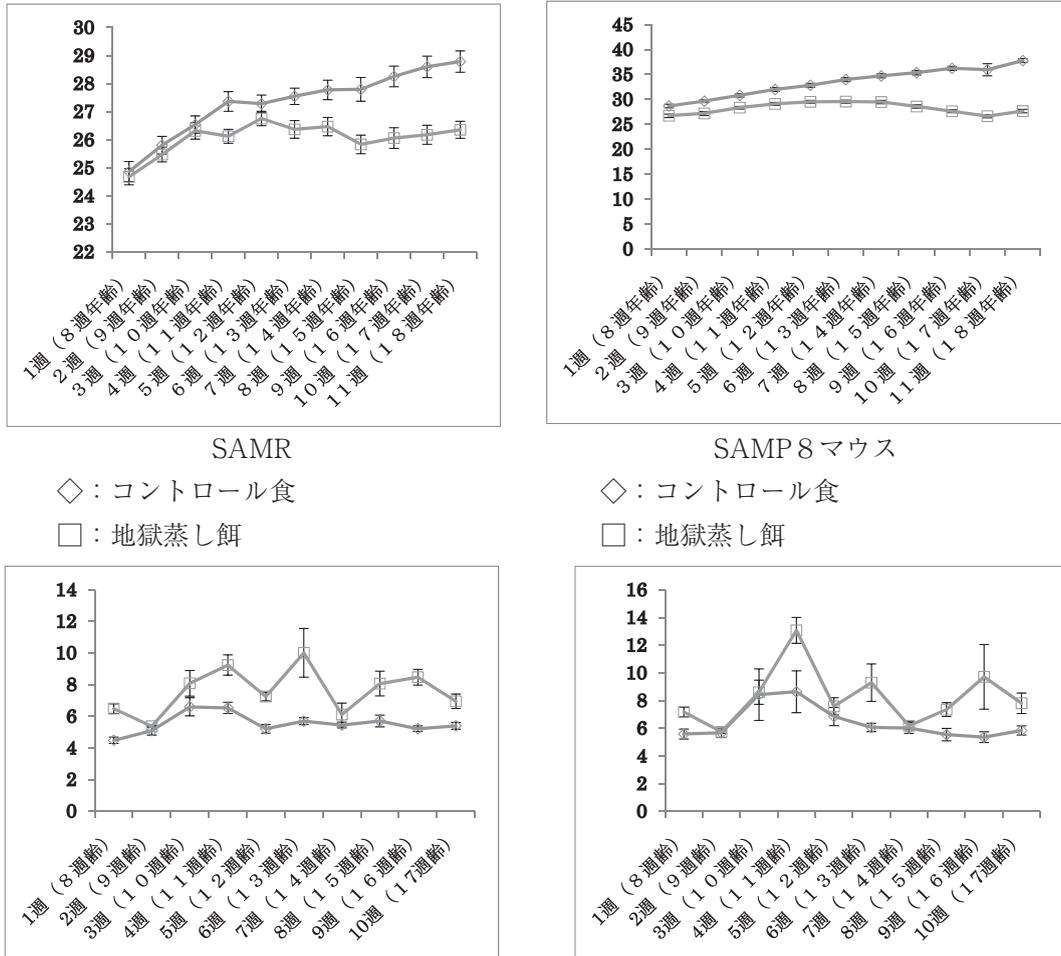


図1. 硫黄食群と普通食群のマウスに、それぞれ硫黄食と普通食を12週間摂取させ、定期的に体重測定と餌摂取量の測定を行った。

本実験で使用した SAMP8 マウスは、早期加齢を呈するように遺伝子操作されており、加齢のみならず日内変動の乱れや摂食にも影響があることから、餌摂取量は各週においてばらつきが認められた。しかしながら SAMR マウスにおいても SAMP8 マウスにおいてもコントロール食より地獄蒸し食の方が餌摂取量が高かったにも関わらず、体重増加はコントロール食よりも低値を示した。これらの結果は、昨年度のラットの報告5)と同じであり、種を変えても再現性を確認することができた。

Y字迷路実験 (自発行動量と空間作業記憶)

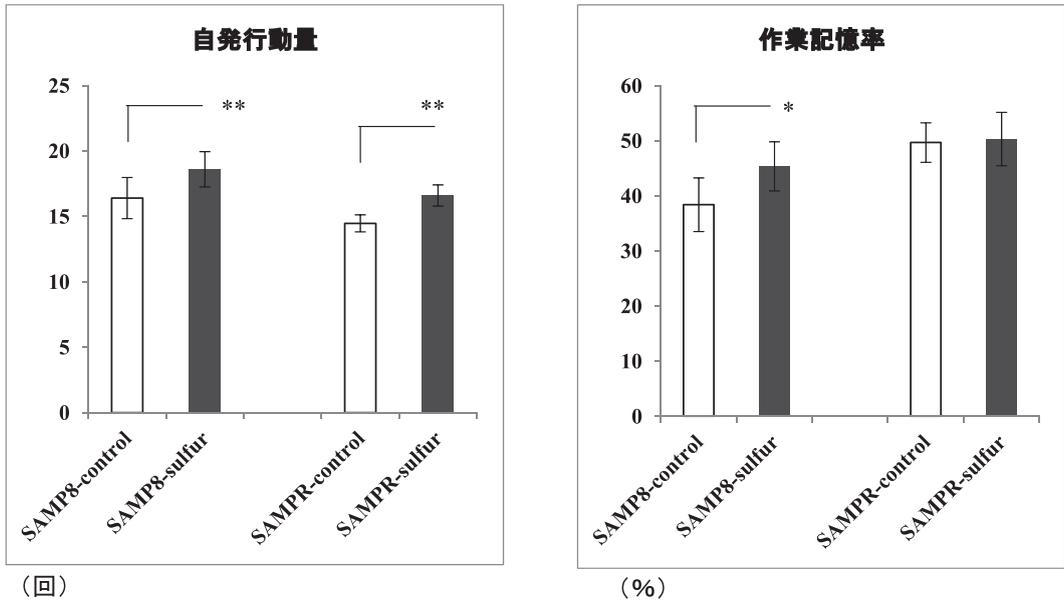


図2. Y字型の装置を用いて実験を行った。各アームをA、B、Cと区分し、Aにマウスを置いた後、5分間移動させ、マウスのアームへの進入回数を記録した。
* p < 0.01 ** p < 0.05

自発行動量はアームの総進入回数から求めた。SAMP8マウスにおいてもSAMRマウスにおいても、各々地獄蒸し食群18.9%、17%、普通食群16.9%、14.5%と地獄蒸し食群での自発行動量が高値であった。しかしながらこの週齢においてはSAMP8とSAMRとの差は認められなかったことより、地獄蒸し食は自発行動を活性化するが、加齢により低下した自発行動量を再活性化するか否かは結果を得られなかった。

空間作業記憶 (短期記憶、ワーキングメモリー) は、3回連続して異なるアームへ進入した回数をアームへの総進入回数から1を引いた値で除した後、100を乗することによって求めた。SAMP8マウスにおいてもSAMRマウスにおいても、各々地獄蒸し食群56.28%、56.33%、コントロール群51.8%、53.8%と地獄蒸し食群での空間作業記憶が高値を示した。さらにSAMP8マウスがSAMRマウスより記憶力が低下していることから、この週齢では加齢により空間作業記憶は低下しており、地獄蒸し食摂取によりこの低下が抑制された。

新奇物体認識試験

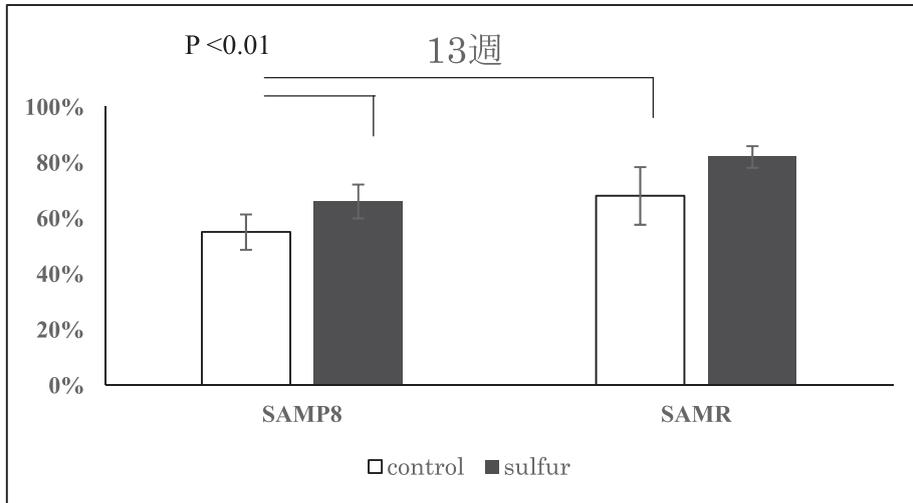
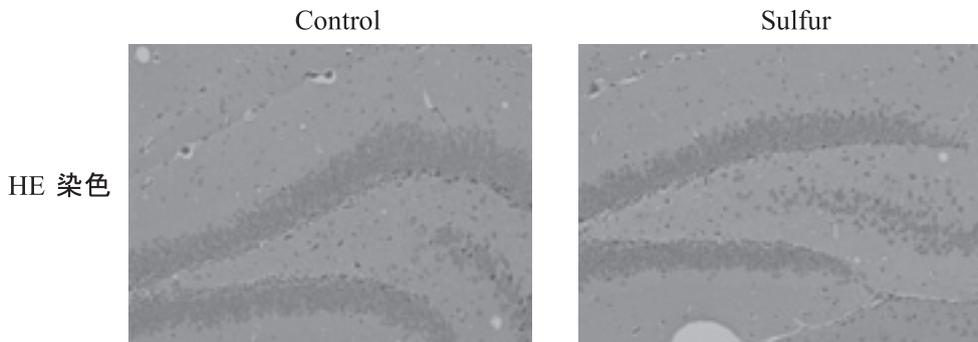


図3. 新規物体認識試験を行った。1回目にXとXの物体を置いたケース内で「探索行動」をとらせ、2時間後に片方のXをYに置き換えたケースで、それぞれの探索した時間を調べ、記憶力の保持効果を確認した。

実験開始より13週目のコントロール食に関して、SAMP8マウスでは55%であり、SAMRマウスの68%よりも低値を示した。これは加齢による認知力の低下である。SAMP8マウスでは、コントロール群で55%、硫黄食群で66%となり、記憶力の増強が認められた。また記憶力の増強はSAMRマウスにおいても同様に認められた。

マウス脳海馬の組織染色



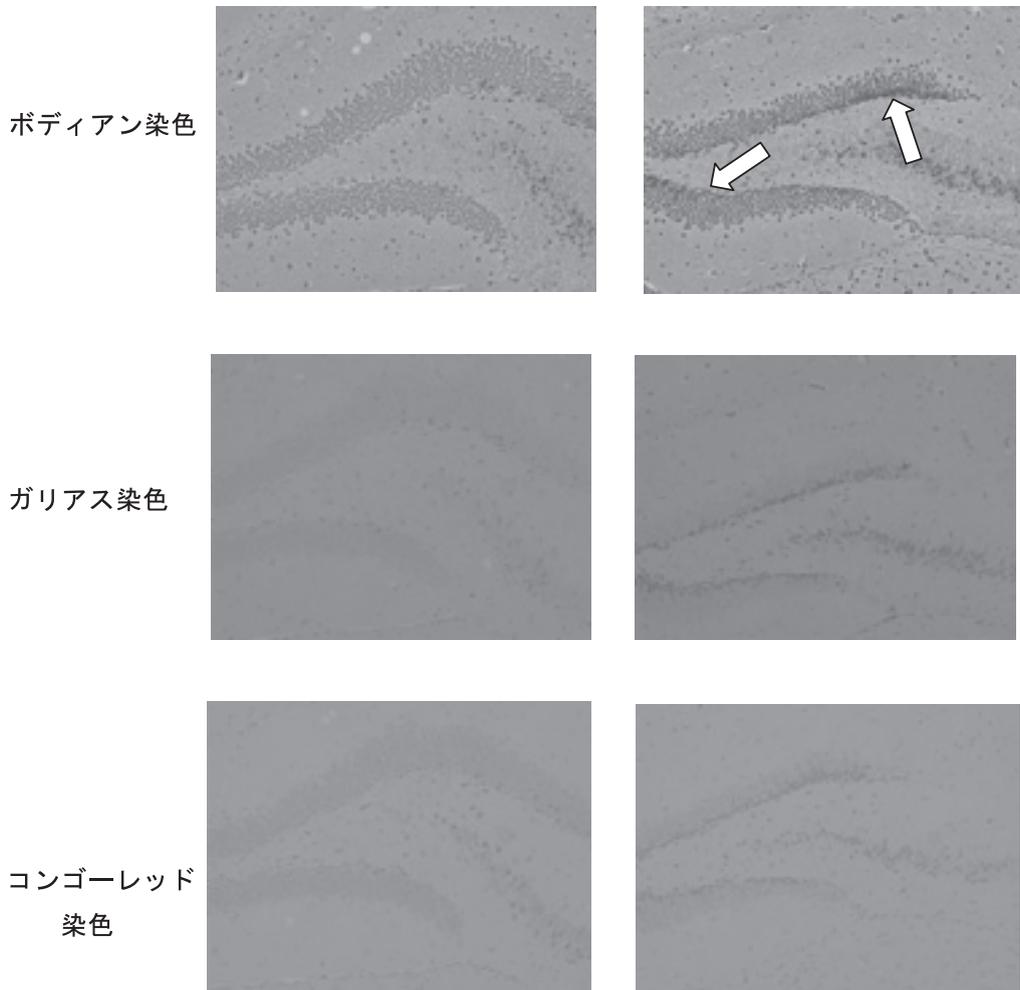


図4. 14週目の SAMP8マウスの脳より海馬領域を取り出しホルマリン固定を行い、組織標本作製した。組織は HE 染色、コンゴレッド染色、ボディアン染色、ガリアス染色を行った。

ガリアス染色は、正常成分には染色せれず、認知症の際に蓄積が認められるリン酸化タウの細胞内蓄積物質を黒く染める性質を有している。今回のマウスではコントロール食および硫黄食群ともに染色されなかったことから、両者とも脳内にはリン酸化タウは認められなかった。またコンゴレッド染色も認知症の際に蓄積が認められるアミロイド線維を染色する性質を有しているが、今回のマウスでは両者ともに染色されなかった。これらの結果より、SAMP8マウスは24週齢でも認知症は呈していないと診断できる。

ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色では、好酸性と好塩基性の識別が可能であり、このことより細胞質や細胞小器官を鑑別することができる。またボディアン染色は神経細胞と神経突起を染める染色法であるが、アストロサイトとオリゴデンドログリアは染まらない性質を有している。今回の実験では、コントロール群には存在せず、地獄蒸し食群に

のみ存在する細胞群があった (⇒)。部位は錐体細胞の歯状回顆粒細胞層側であり、これらは HE 染色では染まらないが、ボディアン染色で染まる細胞群であった。

考 察

日本人の平均寿命は、男性74.94歳、女性86.41歳で、世界の中でもトップクラスの長寿であるが、同時に加齢による弊害も増加している。その中で著しく QOL を低下させ、確実な予防法も治療法も確立されていない疾患が認知症を始めとする認知機能低下である。本研究では、加齢により意欲低下や学習力低下をきたす「加齢促進モデルマウス」を用いて、地獄蒸し食がそれを抑性し得るのか検討を行った。その結果、地獄蒸し食群には、有意差をもって記憶力の増長が認められた (Y 字迷路、新奇物体認識試験)。今回我々が実験に使用した地獄蒸し食はコントロール食を地獄釜で蒸して作製しており、アミノ酸の種類と量は普通食と同じであった。つまり記憶力増加機能は、地獄蒸しの噴気成分と食品との化合結合物によって発揮されていると推測できる。

硫化水素 (H_2S) はミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム c オキシダーゼを阻害する致死性のガスとして有名であるが、1989年頃に脳内に H_2S が存在することが認められ、1996年には脳内でシスタチオニン β -シクターゼにより L-システイン (含硫アミノ酸) から作られて海馬の記憶増強を促進することが発見された⁶⁾。その後、血管平滑筋拡張作用⁷⁾⁸⁾及び膵臓細胞保護作用⁹⁾¹⁰⁾が確認され、現在ではガス性のセカンドメッセンジャーとして位置づけされている。さらに近年、心筋保護作用¹¹⁾¹²⁾とそのメカニズムであるレドックスシグナル制御¹³⁾に関して報告がなされた。以上の過去の報告を加味すると、 H_2S を直接摂取している訳ではないが、 H_2S 噴気で蒸した食材に含まれる硫黄は、生体内で含有アミノ酸の系を介した代謝が行われ、その結果、再び体内で H_2S を産生し生理的に機能している可能性があると考えている。即ち「地獄蒸し」は生体内において H_2S 産生を誘導する調理法であり、経口摂取によって生体内 H_2S が積極的に産生され海馬の機能を活性化しうる可能性がある。硫化水素そのものは、高濃度では毒性があることや、不安定で取り扱いにくいことから、ヒトへの治療へ応用するには、硫化水素と同様の働きがある安全で取り扱いの容易な治療剤の開発が期待されている¹³⁾。本実験結果より、地獄蒸し食品がこれにとって代われる可能性があると考えている。

またマウス脳海馬の組織染色結果から、脳海馬の領域において地獄蒸し食摂取で誘導した細胞群を認めた。その細胞群が何細胞でどういった機能を有しているのか今後検討が必要であるが、集積位置が顆粒細胞の歯状回門部側であることから、神経シナプス、伝達系に深く関与している可能性があると考えている。

少子高齢化が急速に進む中、健康寿命をいかにして延長させるかは、QOL の維持のみならず、介護・福祉・医療における大幅な経費削減にもつながる重要課題である。近年認知力の低下は「食事」や「運動」による予防効果が明らかとなってきた¹⁴⁾。よって食生活の中に科学的根拠を有する予防食品を取り入れることは大変重要であると考えられる。今

後、さらなる研究をすすめて、「地獄蒸し料理」を種々疾患の予防食、分子標的薬膳、また治療薬として確立していくことを目指したい。またそれは別府地域の活性化においても貢献できると考えている。

謝 辞

本実験は、平成25年度別府大学特別強化事業費助成金のサポートにより行われました。本研究を遂行するにあたり、地獄釜を貸して頂きました別府明礬温泉「岡本旅館」の岩瀬公男様、組織染色に関して助言を頂きました本大学の米持英俊教授及び九州歯科大学の矢田直美先生、また産学官連携機構の先生方に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 鶴見七湯廻記
- 2) 笹原武志、井上松久
新規殺菌セラミックによる *Legionella pneumophila* 殺菌効果に及ぼす温泉水質の影響 感染症誌 79 p157-160 (2005)
- 3) 「湯けむり景観調査報告書」(別府市教育委員会)
- 4) 中嶋加代子、岸本律子
玄米炊飯における「地獄蒸し釜」の利用
別府大学短期大学部紀要, 31p133~p139 (2012)
- 5) 仙波和代、矢野義記、木村靖浩、浅田憲彦、大坪素秋、長谷真、石田和人、森大輔、大賀恭、伊達紫、西澤千恵子
別府地獄蒸し食品のアンチエイジング効果に関する研究
別府大学紀要, 54p115-121 (2013)
- 6) Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfides as an endogenous neuromodulator.
J Neurosci 16, 1996, 1066-1071
- 7) Yang G, Wu L, Jiang B, Zhang S, Synder SH, Wang R, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase *Science* 322, 587-590 (2008)
- 8) Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener *EMBO J* 20, 6008-6016 (2001)
- 9) Kaneko Y, Niki I, et al. Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Lett*, 583 : 377-382 (2009)
- 10) Taniguchi S, Niki I, et al. Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic β -cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress *Brit J Pharmacol*, 162 : 1171-1178 (2011)
- 11) Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Ahaio J, Pang Y, Du J, Tang C Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Comm* 318, 756-763 (2004)

- 12) Benavides GA, Squadrito GL, Patel RP, Krasu DW et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. **Proc Natl Acad Sci USA**104, (2007)
- 13) Nishida M, Sawa T, Akaike T et al. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. **Nature Chem Biol**, 8, 714 – 724 (2012)
- 14) Takahiko Shimizu and Takuji Shirasawa.
Cognitive Impairment and Supplement Food Factors.
Anti-Aging Medicine Vol. 8p52 – 58 (2011)