

鶏卵摂取による加齢性難聴の抑制効果に関する研究

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品機能研究領域・主任研究員 大池 秀明

■ 緒 言

超高齢社会の我が国において、食品による老化予防研究への期待は大きい。一般家庭で広く購入される食材で、加齢性疾患への予防効果が期待できれば、その恩恵を多くの人々が享受可能である。鶏卵は、安価で、栄養価、抗酸化能が高く、脂質代謝改善作用¹⁾や脳機能調節作用^{2,3)}が報告されていることから、老化予防にうってつけの食材である。ここでは、通常のマウスに鶏卵を食餌摂取させ、老化現象の1つである加齢性難聴が抑制されるかどうかを明らかにすることで、鶏卵の抗老化効果を評価した。加齢性難聴は、ヒトとマウスで共通する老化現象であり、加齢に伴い、聴覚神経細胞が死滅することにより聴力が失われていくものである。一般的に、高音域から進行することが知られており、モスキート音と呼ばれる17～18kHz程度の超音音は、10代の若者には聞こえるが、20代以上の成人ではほとんど聞こえないほどに進行が早い。ここでは、ヒトの10代に相当する3ヶ月齢のマウスから試験食を開始し、ヒトの20～30代程度に相当する6～9ヶ月齢の時点の高音域聴力を測定することで、比較的短期間の食餌摂取試験による鶏卵の抗老化効果の評価を試みた。

■ 方 法

ここでは、汎用性の高い実験マウス系統であるC57BL/6Jマウスを使用した。2ヶ月齢のオス60匹を購入し(日本チャールスリバー株式会社)、12匹ずつ5群に分けた。1ヶ月の予備飼育後(3ヶ月齢)、各群から2匹ずつを若齢コントロール群として抽出し、聴性脳幹反応試験による聴力測定を行った。聴性脳幹反応試験は、ペントバルビタール麻酔下(60mg/kgBW、腹腔注射)において、頭部皮下に電極を挿入し、8、16、32kHzの音域に対し、それぞれ100dB(32kHzは95dB)から5dBずつ音量を下げ、反応が得られる最小の音量(閾値)を計測した(System3 ABRシステム、TDT社)。各群残りの10匹ずつについて、以下の条件で6ヶ月間の試験飼育を行った。①コントロール群(改変AIN93G;AIN93Gに大豆油を1.4%増加し(通常7.0%→8.4%)、コーンスターチを1.4%削減した(39.7486→38.3486%)、オリエンタル酵母工業株式会社)②全卵8%群(改変AIN93Gに全卵粉末(乾燥全卵No.1、キューピータマゴ株式会社)8%を添加(相当するカゼイン、大豆油、コーンスターチを前もって差し引き、PFCバランスを①と同等にそろえた;以下③～⑤も同様)③全卵20%群(②③は、それぞれ、ヒト換算で1日当たり鶏卵約2個、5個の摂取に相当)④卵黄13.3%群(乾燥卵黄No.1、キューピータマゴ株式会社)⑤卵白6.7%群(乾燥卵白Kタイプ、キューピータマゴ株式会社;④⑤は、卵黄と卵白の有効性の違いを検討するため、全卵20%群と同等の卵黄、卵白量を使用)。6ヶ月の試験飼育が終了した時点(9ヶ月齢)で、聴性脳幹反応試験により各群の聴力測定を行い、その後、組織サンプリングを行った。摘出した蝸牛、脳からRNAを抽出し(RNAiso、タカラバイオ株式会社)、逆転写(SuperScriptII、Life Technologies社)した後、リアルタイムPCR(Power SYBR Green Master Mix、ABI prism7000、Life Technologies社)による遺伝子発現解析を行った。使用したプライマーの配列は以下の通り; Catalase:ccttcaagttggttaatgcaga / caagttttgatgcctgtg, Gpx1:tttcccgatcaatcagttc / tcggacgtacttgaggaat, Nrf2:tgatgctctgtgccttc / aggcattctgttgggaatg, Sod1:caggacctcatttaatcctcac / tgcccaggtctcaacat, Pgc1a:gaaagggccaacagagaga / gtaaatcacacggcgtctt, Sdhc:gaagaagaacacaggttcaaac / gtgcataggaagaccatt, Sirt3:tgctactcattctgggacctc / gggcactgattctgtactgc, Uqcrb:cagcgcttactctcaggt / tgcagcattataataaccatttcg, Gapdh:catggccttccgtgttctca / cctgcttcaccactcttga (いずれも sense / antisense の順で5'から3'方向の配列)

データの統計処理は統計解析ソフト Prism5(Graphpad Software社)を使用し、One-way ANOVA および Tukey post hoc test により5%の有意水準にて群間差を検定した。

■ 結 果

3ヶ月齢の若齢コントロール群と比較して、6ヶ月齢および9ヶ月齢のコントロール群は、16、32kHzの閾値が有意に上昇し、聴力が低下していた(図1)。9ヶ月齢のコントロール群は8kHzの閾値も有意に上昇していた。また、16kHzに関しては、6ヶ月齢と9ヶ月齢のコントロール群の間でも閾

値が有意に上昇しており、月齢に応じて閾値が上昇していた。

6、9ヶ月齢の全卵群(8%、20%)および卵黄群は、同月齢のコントロール群と比較して32kHzの閾値が有意に低く、加齢性難聴の進行が抑制されていた(図2)。9ヶ月齢においては、16kHzに関しても有意に閾値が低かった。また、全卵8%群および卵黄群に関しては、卵白群と比較して6、9ヶ月齢の16、32kHzの閾値がいずれも有意に低かった。一方で、卵白摂取群は、9ヶ月齢の8kHz以外では、コントロール群と同等の閾値を示し、9ヶ月齢の8kHzにおいては、コントロール群、全卵群、卵黄群よりも有意に高い閾値を示した。

蝸牛および脳サンプルからRNAを抽出し、定量PCR法により、抗酸化酵素関連遺伝子(Catalase、Gpx1、Nrf2、Sod1)およびミトコンドリア関連遺伝子(Pgcl1a、Sdhc、Sirt3、Uqcrb)の発現量を解析したところ、蝸牛は、サンプル間のばらつきが非常に大きく、信頼できるデータが得られなかった。脳においては、安定した結果が得られたが、検討したいずれの遺伝子においても、群間で有意な差は検出されなかった(図3)。

■ 考 察

これまでの報告⁴⁾と同様に、C57BL/6Jマウスにおいて、6ヶ月齢および9ヶ月齢マウスでは、3ヶ月齢の若齢マウスと比較して有意に聴力の閾値が上昇しており、加齢性難聴が進行している様子が確認された。特に、32kHzにおいては、6ヶ月齢の時点で、9ヶ月齢と有意差が検出できないほどに難聴が進行していた。16kHzにおいては、3、6、9ヶ月齢の全ての群間で有意差がついており、月齢依存的に加齢性難聴が進行している様子が確認された。また、8kHzにおいては、6ヶ月齢までは閾値の上昇が見られず、9ヶ月齢になり、ようやく閾値の上昇が検出された。今回の実験スケジュールでは、高音域から順次、加齢性難聴が進行していく様子が捉えられており、試験期間と測定する音域が適切であったと考えられる。

鶏卵摂取の効果に関しては、全卵(8、20%)もしくは卵黄摂取群において、加齢性難聴の進行が明らかに遅延されており、卵黄部に加齢性難聴抑制効果を示す成分があることが明らかとなった。全卵8%群と20%群の聴力に有意差はなく、むしろ8%群の方が加齢性難聴抑制効果が高い傾向にあったことから、濃度としては8%の摂取で充分であったと考えられる。これは、ヒトに換算すると1日当たり2個程度の鶏卵に相当することから、十分に摂取可能な分量であり、今後の疫学調査等による鶏卵の抗老化効果の検証やデータの蓄積が注目される。

メカニズムに関してであるが、これまでの知見から、カロリー制限と同様にSirt3を介した内因性抗酸化能の亢進やミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の変化が予想された^{5,6)}。そこで、蝸牛サンプルからRNAを抽出し、これらの遺伝子発現解析を試みたが、内部標準として検討したGapdhおよびActb遺伝子の発現がサンプルにより10倍以上の差がついてしまい、解析上の問題があると判断した。蝸牛は、骨や硬膜に囲まれた組織であり、素早く分離抽出することが難しいため、サンプル調製時に分解が進んでしまったものと推測される。そこで、同時に採取した脳サンプルを利用し、抗酸化酵素関連遺伝子の発現およびミトコンドリアのエネルギー代謝関連遺伝子の発現を解析したところ、いずれの群間においても有意差は認められず、鶏卵摂取による神経組織の抗酸化能やミトコンドリアの代謝機能に変化はなかったと考えられる。以上の結果から、鶏卵摂取による加齢性難聴の抑制には、卵黄由来成分による直接的な活性酸素の除去や、アポトーシスの抑制作用等によるものと考えられる。具体的な関与成分に関しては、今後の検討課題であるが、βカロテン、卵黄レシチン、コレステロールなどが候補として挙げられるのではないかと。

また、評価系に関してであるが、16kHzや32kHzといった高音域の聴力測定を行うことで、若齢マウスでありながら、3～6ヶ月間の摂食試験により加齢性難聴を十分に評価可能であることが示された。本評価系を用いることで、比較的短期間で食材や食品成分の抗老化効果の一端が評価可能であることから、抗老化食品のスクリーニング系として有用であると考えられる。また、加齢性難聴は聴覚神経細胞死に起因するため、スクリーニングで有効性が認められた食材・食品成分は、神経系の老化全般にも有効であることが期待される。

■ 要 約

3～9ヶ月齢のC57BL/6Jマウスを利用し、鶏卵の食餌摂取による加齢性難聴抑制効果を検討した。その結果、全卵(8%、20%)もしくは卵黄(13.3%)の摂取により、加齢性難聴の進行が抑制されることを明らかにした。また、その効果は、32kHzという超高音域の聴力を測定することにより、3～6ヶ月齢の若齢マウスを使用した3ヶ月間の摂食試験で評価可能であることを示した。

■ 文 献

1. 小田裕昭、寝たきり動物モデルにおける脂質代謝異常の卵タンパク質による改善とその分子機構、2010年度 旗影会研究助成報告書
2. 古瀬充宏、鶏卵によるうつ行動改善に関する研究、2011年度 旗影会研究助成報告書
3. 大日向耕作、脳神経系を介する卵成分の新規機能性の解明、2011年度 旗影会研究助成報告書
4. Vljakovic SM, Guo CX, Telang R, Wong AC, Paramanathasivam V, Boison D, Housley GD, Thorne PR. (2011) Adenosine kinase inhibition in the cochlea delays the onset of age-related hearing loss. *Exp Gerontol.* 46(11), 905-14.
5. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA. (2010) Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143(5), 802-12.
6. Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. (2007) Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging.* 28(10), 1613-22.

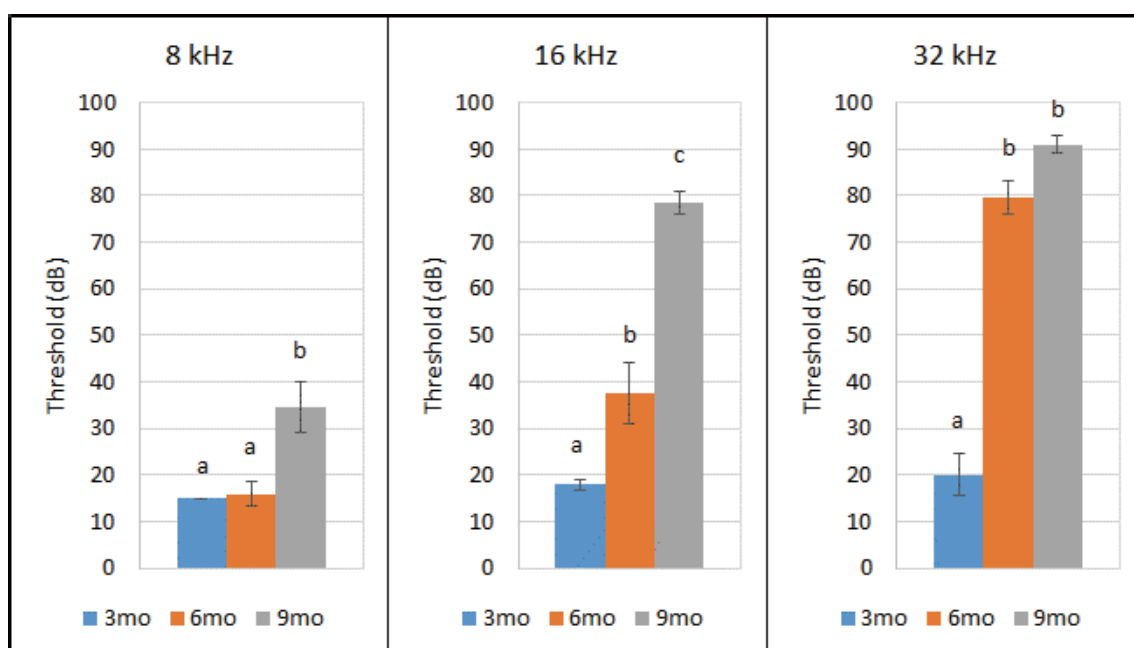


図1 マウスの月齢による聴覚閾値の変化

コントロール食で飼育した C57BL/6J マウスの 3、6、9ヶ月齢における 3 段階の音域(8、16、32 kHz)に対する聴性脳幹反応試験による聴覚閾値。いずれの音域においても加齢とともに閾値が上昇し、聴力が低下していることが認められる。グラフ中の異なるアルファベット間には有意差があることを示す (One-way ANOVA with Tukey post hoc test, $p < 0.05$)。

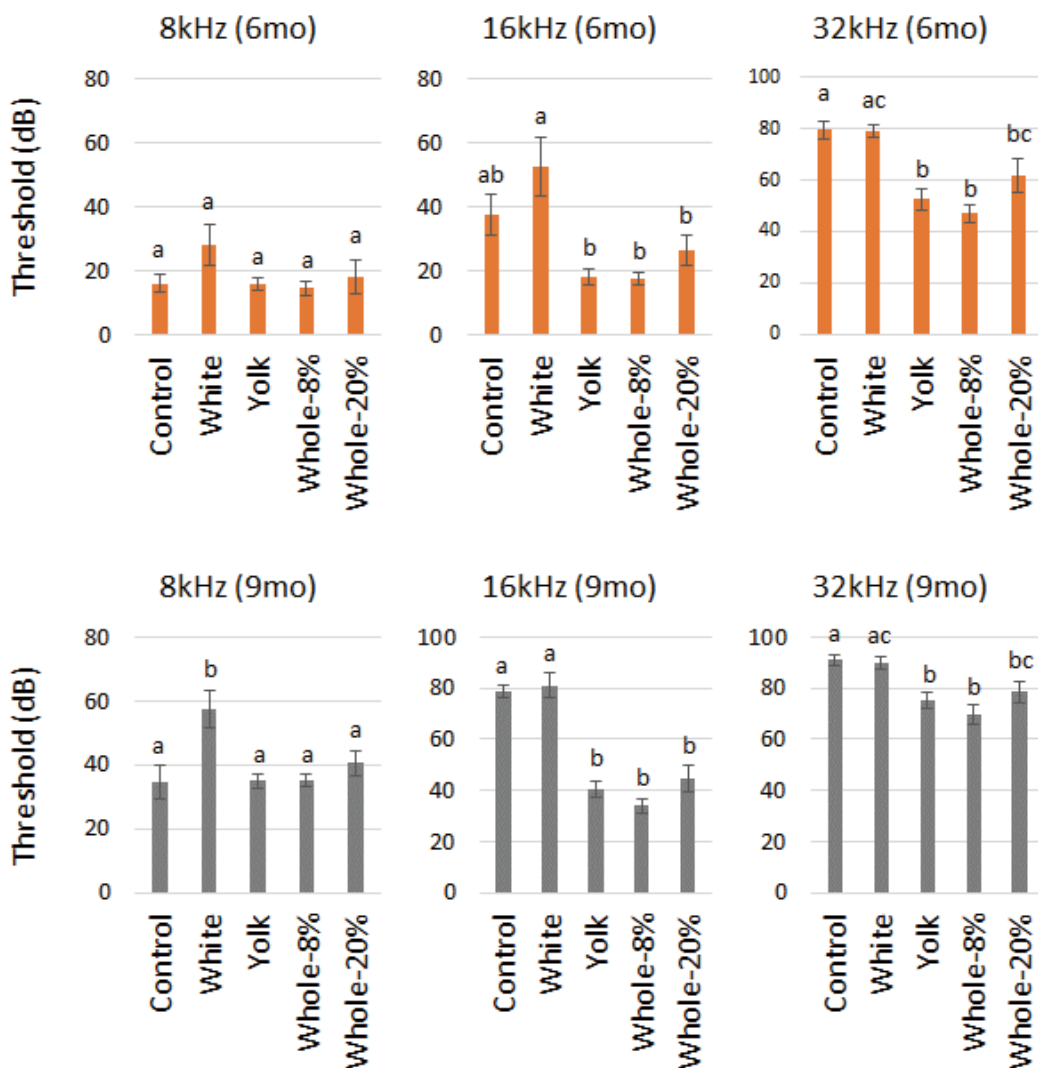


図2 鶏卵の食餌摂取によるマウス聴覚閾値の変化

3ヶ月齢からコントロール食あるいは鶏卵含有食(卵白6.7%、卵黄13.3%、全卵8%、全卵20%のいずれか)で飼育したマウスの6、9ヶ月齢における3段階の音域(8、16、32 kHz)に対する聴性脳幹反応試験による聴覚閾値。卵黄もしくは全卵摂取群は、コントロール群、卵白摂取群と比較して16、32 kHzの閾値が低く、加齢性難聴の進行が遅延されていることがわかる。グラフ中の異なるアルファベット間には有意差があることを示す(One-way ANOVA with Tukey post hoc test, $p < 0.05$)。

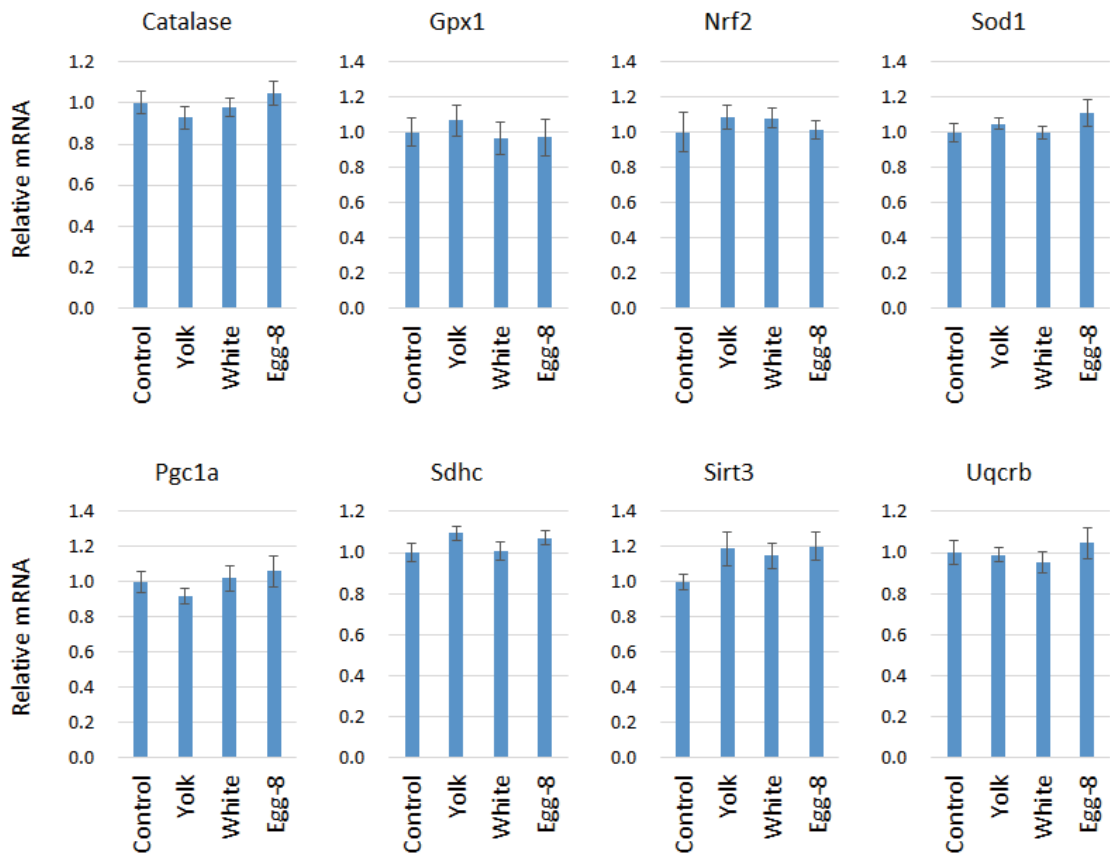


図3 脳における抗酸化関連遺伝子およびミトコンドリア関連遺伝子の発現量
 6ヶ月間の摂食試験終了後の9ヶ月齢のマウス脳からRNAを抽出し、抗酸化酵素関連遺伝子(上段)およびミトコンドリアのエネルギー代謝関連遺伝子(下段)の発現量を定量PCRにより解析した。各データはGapdhを内部標準として補正し、それぞれコントロール群を1.0とした相対値で示した。いずれの群間においても有意差は検出されなかった。