

## 卵黄成分によるマウス加齢性難聴抑制原理の解明

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門・主任研究員 大池 秀明

### ■ 緒言

加齢性難聴は動物全般に共通する老化現象であり、ヒトにおいては、高齢者の約半数が聴力に問題を抱えると言われている。その原因は、老化に伴う聴覚神経の細胞死であり、一度死滅した神経細胞は、ほぼ回復しないことから、聴力は加齢と共に低下していく。現状では根本的な治療は難しく、加齢性難聴を阻止するためには、聴覚神経を死なせない“予防”が重要である。数十年をかけて進行する老化を予防するためには、日々の食生活で有効成分を継続的に摂取する必要があるが、これまでの研究において、鶏卵(卵黄)摂取がマウス加齢性難聴の進行を遅延させることを明らかにしている<sup>1,2)</sup>。卵黄中には、レシチン、各種ビタミン、カロテノイド、コレステロールなどの機能性成分が含まれており、ここでは、レシチンとコレステロールに焦点を絞り、効果の有無を検討した。また、老化促進モデルマウスにおける有効性を検討することで、他の老化現象の抑制にも効果があるのかを検討することを目的とした。

### ■ 方法

C57BL/6J マウス(オス、5週齢)を購入し(日本チャールス・リバー)、通常飼料(MF; オリエンタル酵母工業)で7週間の予備飼育後(3ヶ月齢)、8匹を若齢コントロール群として聴性脳幹反応試験による聴力測定を行った。残りの個体を10匹(5匹×2ケージ)ずつ6群に分け、AIN93M 標準精製飼料(オリエンタル酵母工業)をコントロール飼料とし、3大栄養素の組成が変わらないように以下の試験素材に置き換えた試験飼料を調製し(オリエンタル酵母工業)、6ヶ月間の試験飼育を行った。3ヶ月目(6ヶ月齢)と6ヶ月目(9ヶ月齢)に聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施した。①コントロール(AIN93M そのまま)、②全卵乾燥粉末8%(乾燥全卵 No.1)、③卵黄乾燥粉末5.3%(乾燥卵黄 No.1)、④卵黄油3.4%(PL-30S)以下PLと表記、⑤ホスファチジルコリン1%(PC-98N)以下PCと表記、⑥コレステロール0.2%。②~⑤の鶏卵関連試料はキューピー株式会社より入手し(カッコ内に記載したものが商品名)、②の全卵粉末8%飼料に含まれる相当量を各飼料への配合量とした。コレステロールについては、オリエンタル酵母工業がマウス飼料作製用に使用しているものをそのまま利用した。聴性脳幹反応試験は、塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノールの3種混合麻酔下において、頭部皮下に針電極を挿入し、8、16、24、32kHzの音域に対する左右の聴覚閾値を測定した。また、老化促進マウス系統として知られるSAMP8 マウス(日本エスエルシー)に関しても、上記と同様のタイムコースで、②全卵乾燥粉末8%置換飼料について、同様の試験を行った。統計処理については、R(ver3.3.1)をベースとしたフリーソフトEZR ver1.33(自治医科大学)<sup>3)</sup>を使用した。

### ■ 結果

C57BL/6 マウスについてであるが、全卵、卵黄、PL、PC群は、コントロール群、コレステロール群と比較して、試験期間全体を通して摂餌量が増加傾向にあり、6ヶ月間の累積摂餌量として、1匹あたりの平均換算で40~100g程度の増加となった(図1左下)。それに伴い、前者4群は、後者2群といずれの群間比較においても体重が増加していた( $p<0.1$ , One-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $N=8$ )。また、各群の最終的な平均体重と累積摂餌量に $R^2=0.61$ の相関が見られた(図1上、右下)。聴力については、まず、すべての群において、加齢が進むにつれて閾値が上昇しており、加齢性難聴の進行が認められた(図2上)。その中で、全卵、卵黄、PL、PC群は、コントロール群、コレステロール群と比較して、閾値の上昇が有意に小さく、加齢性難聴の進行が抑制されていた(図2下; 閾値の差が大きく現れている16kHzについて統計処理の結果と合わせて図示;  $p<0.01$ , One-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。コレステロール群に関しては、コントロール群と比較して、わずかに加齢性難聴の進行が抑制された(16 kHzにおいて $p=0.035$ )。

続いて、SAMP8 系統の結果であるが、C57BL/6 マウスと同様に全卵粉末含有飼料の摂取により、コントロール群よりも摂餌量および体重が増加した(図3左上および右上)。聴力に関しては、両群とも、加齢に伴った閾値上昇が確認され、加齢性難聴の進行が認められた(図3下)。C57BL/6 マウス

と同様、全卵摂取群は、コントロール群と比較して有意に聴覚閾値が低い値を示したことから、全卵の摂取により加齢性難聴の進行が抑制された(9ヶ月齢における両群の有意差は $p < 0.01$ , Two-way ANOVA)。また、9ヶ月齢の時点において、体重以外の外見的老化度の差異は認められなかった。

## ■ 考 察

以前の試験において、全卵粉末(20%、8%)および卵黄粉末(13.3%)の摂取が、マウス加齢性難聴の進行を抑制することを示したが<sup>1,2)</sup>、有効成分については不明であった。今回の試験において、まず、ベースとなる飼料をAIN93GからAIN93Mに変更したが、それに関わらず、8%の全卵含有飼料により加齢性難聴の進行抑制効果が再現できた。また、卵黄粉末については、前回使用量13.3%(全卵20%飼料に含まれる相当量)の半分以下である5.3%(全卵8%飼料に含まれる相当量)にまで減らしたが、効果はそのまま保たれており、全卵8%飼料相当の卵黄で十分な効果が得られることを確認できた。卵黄中の代表的な構成要素の1つであるレシチンを多く含む卵黄油(リン脂質を30%以上含有)においても、全卵8%に相当する量で同等の効果が得られたことから、卵黄レシチンが効果の本体を含んでいることが示された。さらに、卵黄レシチン中の主要構成成分であるPCにおいても、全卵8%に相当する量で同等の効果が得られたことから、前回および今回の試験で得られた全卵、卵黄、卵黄油による加齢性難聴抑制効果は、主に、PCによる効果であると結論づけられる。一般的にPCもしくはレシチン(卵黄レシチン、大豆レシチンなど)は、サプリメントとして販売されており、認知症予防効果等を期待した商品も多く存在することから、抗老化全般に効果があるのかもしれない。ただし、国立健康・栄養研究所が運営する「健康食品」の素材情報データベース<sup>4)</sup>においては、「ヒトでの有効性については信頼できるデータが見当たらない」(2017年3月25日現在)とされていることから、加齢性難聴抑制効果も含め、メカニズムの解明とさらなる抗老化効果の検証が必要である。今回の試験で、老化促進モデル(SAMP8)を利用して、聴力以外の老化現象についても検証できることを期待したが、9ヶ月齢において、両群とも十分に老化が進んでいないと判断され、今後、さらなる長期試験による解析を実施する予定である。また、C57BL/6マウスとSAMP8マウスの聴覚閾値の加齢変化を比較すると、前者は高音域から閾値が上昇しているのに対し、後者はいずれの音域においても一斉に閾値が上昇する傾向が認められた。この違いの原因は不明であるが、どちらの系統においても、全卵の摂取が加齢性難聴の進行を遅延させたことから、系統による加齢性難聴特性とは関係なく、本質的な部分に作用するものであることが期待される。

また、卵黄レシチンは、医薬品・化粧品・食品の乳化剤として広く利用されていることから、食品の物性や吸収特性に影響を与えた可能性も考えられる。今回、PCを含む4種類の飼料を与えた群では、いずれも摂餌量と体重が増加していたことから、嗜好性もしくは栄養吸収等に影響があったのかもしれない。体重の増加と加齢性難聴の抑制に関しては、これまでに関連報告はなく、現状では関係ないと考えているが、腸内細菌叢の変化に伴う全身性(免疫系)の変化である可能性は捨てきれない。我々は、乳酸菌H61株の摂取によるマウス加齢性難聴の抑制について報告しているが<sup>5)</sup>、その時は、腸内細菌叢と血中脂質が変化していた。今回のPCによる加齢性難聴の抑制においても、PCが直接的に内耳に効いた可能性以外に、腸内細菌叢や血中脂質を介して間接的に効いた可能性もあり、今後の追加解析によるメカニズムの全容解明を目指したい。

## ■ 要 約

C57BL/6マウスに鶏卵粉末を添加した飼料を与えることで、加齢性難聴の進行が抑制できることを以前に示したが、ここでは、全卵、卵黄、卵黄油(レシチンを多く含む)、ホスファチジルコリン、コレステロールについて同様の試験を実施した。その結果、ホスファチジルコリンを同等量含む前者4群において加齢性難聴の抑制効果が認められたことから、主な有効成分はホスファチジルコリンであることが明らかとなった。また、老化促進モデルマウスであるSAMP8系統においても、全卵含有飼料により加齢性難聴の進行が抑制されたことから、今後、他の老化現象との相関性検証やメカニズム解明につながることを期待される。

## ■ 文 献

- 1) 大池秀明、鶏卵摂取による加齢性難聴の抑制効果に関する研究、2014年度 旗影会研究助成報告書
- 2) 大池秀明(2017)タマゴによるマウス加齢性難聴の抑制、日本食品科学工学会誌 64(2), 104-107.
- 3) Kanda(2013)Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplantation 48, 452-458.

4) <https://hfnet.nih.go.jp/contents/indiv.html>

5) Oike H, Aoki-Yoshida A, Kimoto-Nira H, Yamagishi N, Tomita S, Sekiyama Y, Wakagi M, Sakurai M, Ippoushi K, Suzuki C, Kobori M. (2016) Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Sci Rep.* 6:23556.

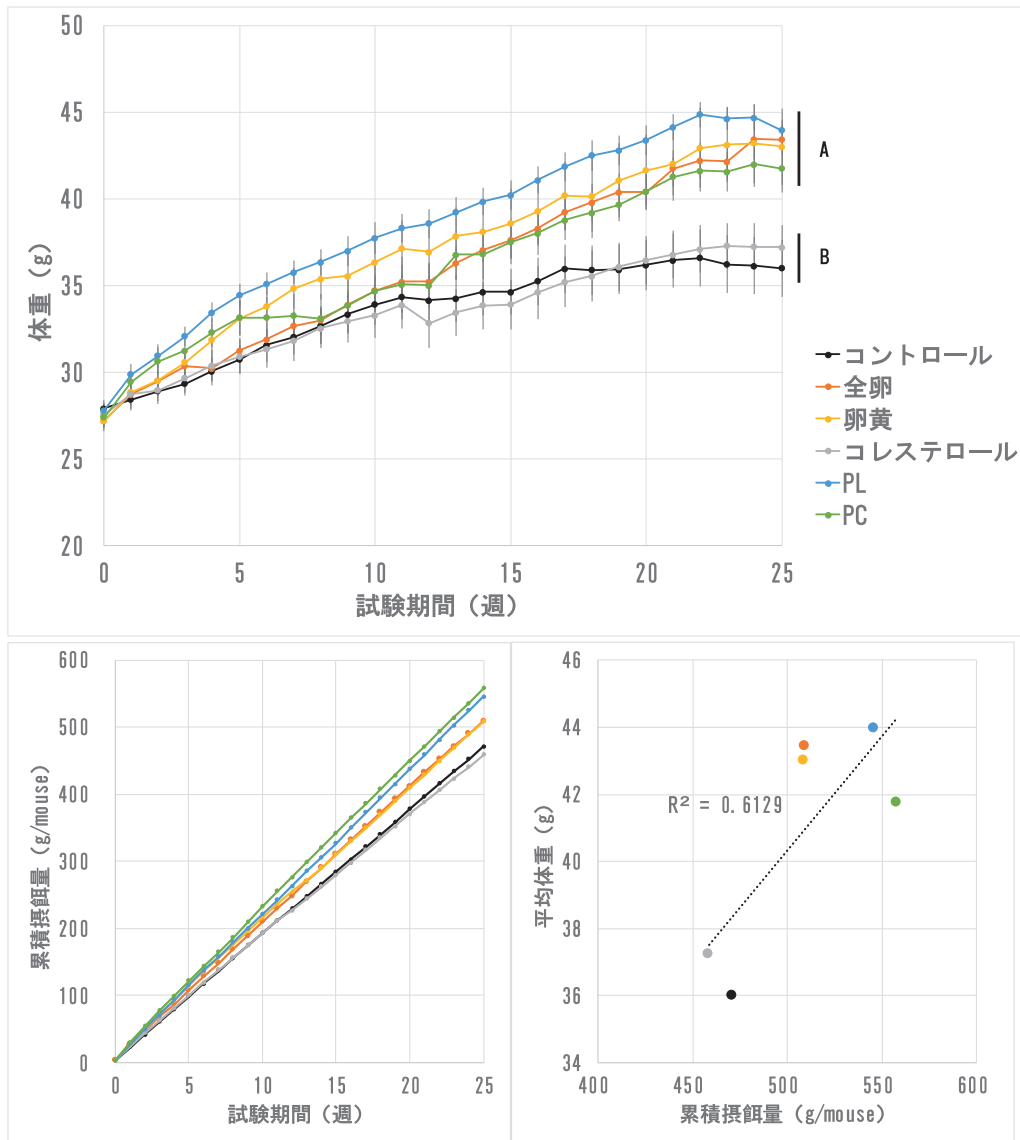


図1 C57BL/6J マウスの体重と摂餌量

C57BL/6J マウス(オス、3ヶ月齢)に各試験試料を6ヶ月間与えた際の、1週間ごとの体重変化(上)、累積摂餌量(左下)、最終週における各群の平均体重と累積摂餌量の相関関係(右下)。摂餌量はケージごとの測定値を個体数で割った値を使用。上図において、Aグループ(4群)とBグループ(2群)はいずれの群間比較においても  $p < 0.1$  を示した(1 way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $N=8$ )。

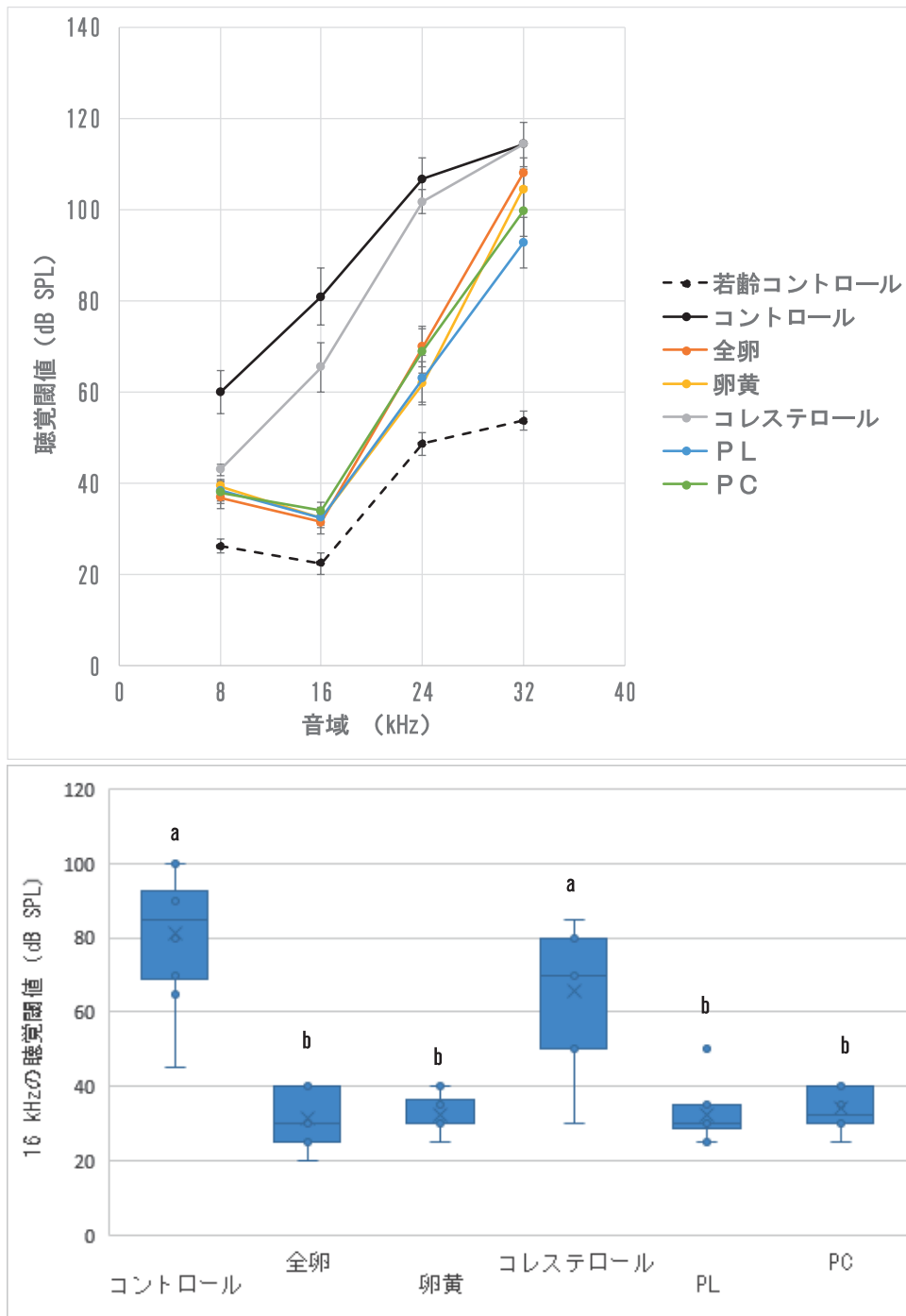


図2 C57BL/6J マウスの聴力

試験食を6ヶ月間与えた後のC57BL/6Jマウス(9ヶ月齢；若齢コントロールは3ヶ月齢)の聴覚閾値。聴性脳幹反応試験による8, 16, 24, 32 kHzにおける閾値(上)と16 kHzにおける閾値と統計的有意差(下)。異なるアルファベットは  $p < 0.01$  を示す(1 way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $N=8$ )。

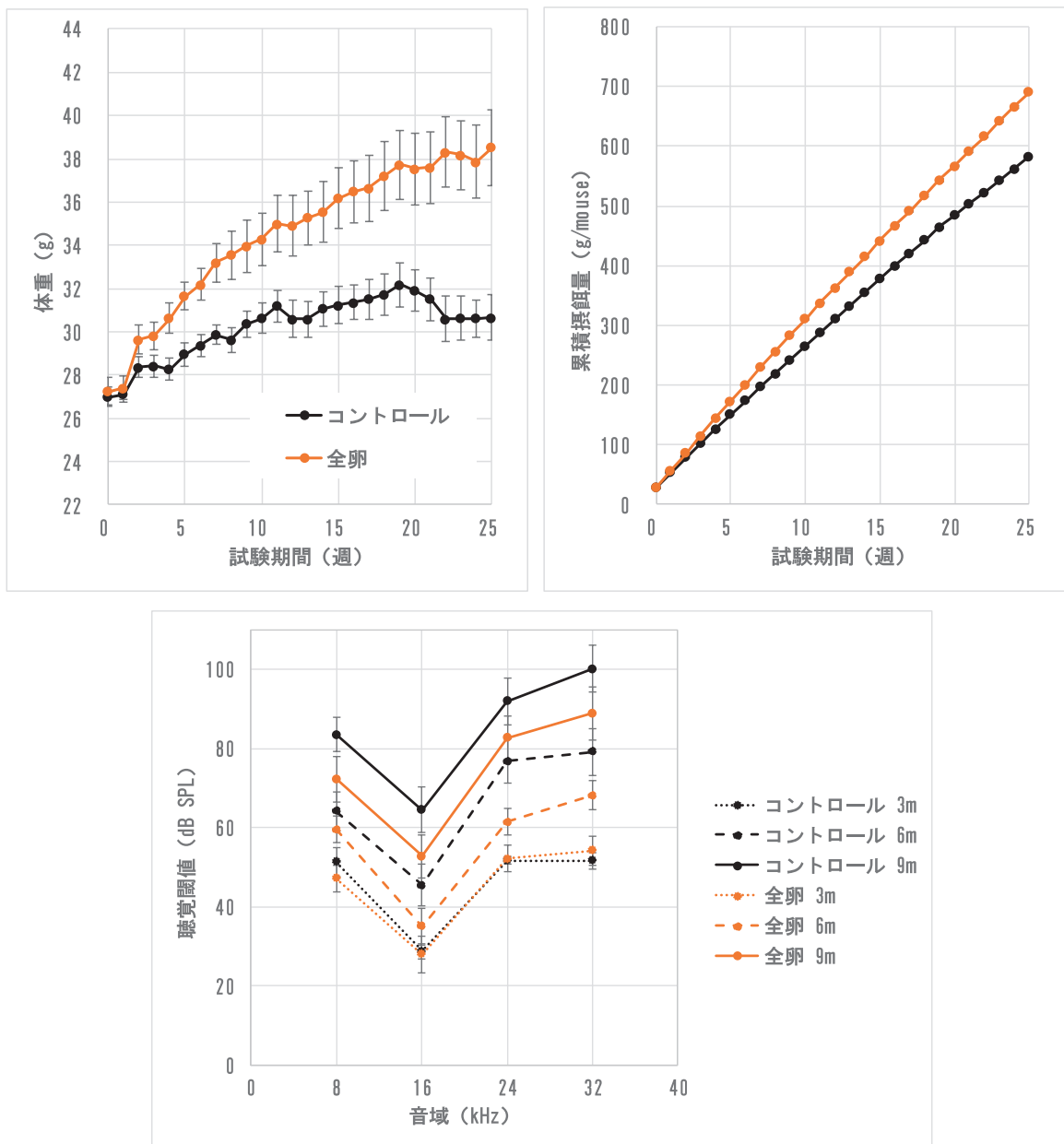


図3 SAMP8 マウスの体重、摂餌量、聴力

SAMP8 マウス(オス、3ヶ月齢)にコントロール食もしくは全卵 8%含有飼料を半年間与えた際の、1週間ごとの体重変化(左上)と累積摂餌量(右上)。摂餌量はケージごとの測定値を個体数で割った値を使用。聴性脳幹反応試験による3、6、9ヶ月齢(3m, 6m, 9m)における聴覚閾値(下)。