

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：37502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560075

研究課題名（和文）還元性硫黄はガス性セカンドメッセンジャーを介して学習・記憶力を高めるか？

研究課題名（英文）To intake sulfur foods increase the ability of learning memory

研究代表者

仙波 和代（後藤和代）（Senba, Kazuyo）

別府大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号：30381031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：還元性硫黄食品を動物に摂取させてその効果を確認した結果、以下の点が認められた。（1）短期記憶力の増加、（2）長期記憶力の増加、（3）自発行動の活発化、（4）中性脂肪の低下による体重減少、（5）海馬における細胞変化。また硫化ガスで食品を処理した場合、食品が以下の変化をおこすことが判明した。（1）メイラード反応が起こる。（2）硫黄が食品に付加される。

以上の結果より、食品に硫化ガス蒸気をあてて還元性硫黄食品を作製すると硫黄付加食品が作製できるが、それを動物に経口摂取させると、海馬を介した脳・神経機能が活発化させることが判明した。これらを利用し食事面からの認知症予防ができると推測される。

研究成果の概要（英文）：First, we made the sulfur foods by steaming natural hydrogen sulfide. And then, the finished sulfur foods were analysed by nearinfrared spectroscopy and ICP/MS system. The sulfur foods recognized increasing the amount of sulfur and the Maillard reaction.

Second, to investigate the effect of sulfur foods on a learning memory, we examined the short or long learning memory of mice used by maze task. Mice fed sulfur foods showed increasing long learning memory, short learning memory and locomotor activity. And then, we examined the cell of hippocampus in mice brain. The number of hippocampus cell in a bodian stein were increased, but in other stains, HE, Congo red and Gallyas stains were not changed.

研究分野：生化学 食品学 免疫学

キーワード：硫化ガス 硫黄付加食品

1. 研究開始当初の背景

(1) 硫化水素(H_2S)は致死性ガスとして有名であるが、生体内に内在的に存在し、海馬の記憶力を増強すること(Abe Kら、1996)や、糖代謝へ影響を与えていること(Niki Iら、2012)が報告され、ガス性セカンドメッセンジャーとして位置づけられていた。さらに内在性硫化水素イオン(HS^-)が心筋細胞の老化を防ぐという報告(Akaikeら、2012)があり、種々の疾病治療薬として期待がなされていた。しかしながら H_2S 自身は、皮膚や粘膜への刺激性が強だけでなく、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害する有毒気体でもあることから、直接生体内に投与方法は非常に危険で困難でもあることから、外部から体内に H_2S を投与するのではなく、内在性 H_2S を効率よく産生させるか、もしくは内在性 H_2S と同様のはたらきのある安全な食品や物質を開発し利用することが求められていた。

(2) 申請者らは、これまでラットの餌に硫酸化合物を結合させ還元性硫黄餌を作製し、ラットに投与を行ったところ以下の結果を得ていた。還元性硫黄食群ラットには自発行動の活発化と空間記憶の増強が認められた。還元性硫黄食群ラットは学習・記憶力が高く維持された(記憶力増強)。還元性硫黄食群ラットの血糖値は低い値を示した(糖代謝への影響)。6人の研究員がラットを観察した結果、還元性硫黄食群ラットは、毛艶と毛の触感が良かった(老化防止)。還元性硫黄の機能は、内在性 H_2S の機能と「記憶力」「糖代謝」「抗加齢」という点で類似していた。

2. 研究の目的

還元性硫黄が内在性 H_2S 産生に関与するのか、もしくは H_2S と同様の機能を有するのか確認するとともに、学習・記憶力を高めるメカニズムを明らかにし、認知症のような学習・記憶に関連する疾病の予防に発展させることを目的とする。

<具体的な目的>

(1) 疾患モデル動物を用いて還元性硫黄摂取が学習・記憶能力を高めることを再確認し、認知症予防に効果があるのか検討する。

(2) 分子生物学的手法を用いて、還元性硫黄が内在性 H_2S を産生するのか、もしくは同様の機能を有するのか確認し、 H_2S が学習・記憶力を増強する機序・分子メカニズムを明らかにする。

(3) IR法を用いて、還元性硫黄の学習・記憶力を高める機能的部位の化学構造を決定する。

3. 研究の方法

動物実験概略

加齢マウス(SAMP8)をもちいた実験を行った。硫黄食を作製し、動物を硫黄食投与群と非投与群とで飼育を行い、経過データをすると同時に以下の実験を行った。

- (1) 学習・記憶に関する試験
 - 短期記憶力測定(Y字迷路試験)
 - 自発行動試験(Y字迷路試験)
 - 長期記憶力測定(物体認識試験)
 - 海馬の組織解析
- (2) 代謝系に関する試験
 - 体重測定
 - 摂取カロリー測定
 - 血糖値測定

食品に関する化学的解析概略

動物の餌を用いて硫黄餌を作製し、その構造解析と特性の解析を行った。硫黄餌は動物の普通食を硫化ガス噴気に12時間あて、乾燥させることで作製した。

- (1) 餌の硫黄値測定(IPC-MS/MS)
- (2) 遠赤外分光法(FT-IR-600)
- (3) 近赤外分光法(SpectraStar2500XL)

実験と方法

(1) 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。

(2) 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。

(3) 硫黄餌の化学解析

(2)で作製した餌を用いてIPC-MS/MS、FT-IR-600、SpectraStar2500XLにてそれぞれ分析・解析を行った。

(4) 体重測定と餌摂取量

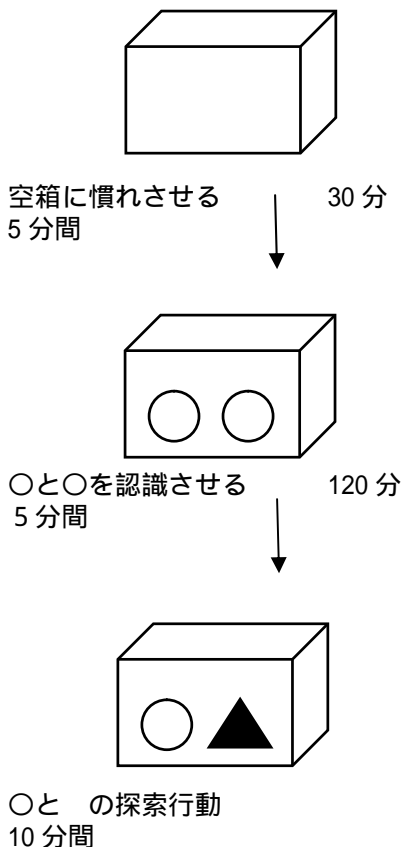
硫黄食群と普通食群のマウスに、それぞれ硫黄食と普通食を 12 週間摂取させ、定期的に体重測定と餌摂取量の測定を行った。

(5) 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。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。

(6) 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。



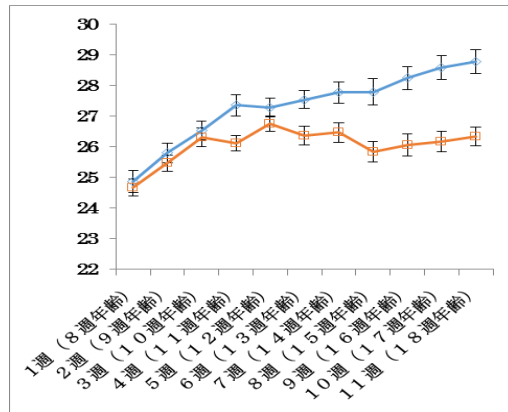
(7) マウス脳海馬の組織切片作製

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～前方部に冠状断を剖面とし行った。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

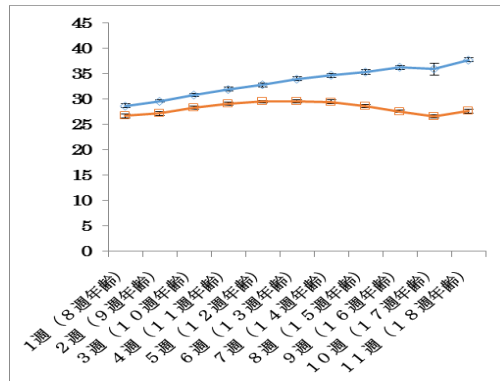
ディアン染色、ガリアス染色を行い、海馬の神経細胞やアミロイド斑、リン酸化タウの検討を行った。

4. 研究成果

(1) 体重測定 (単位: g)



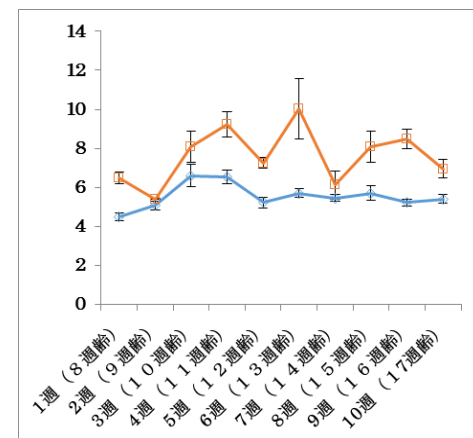
SAMP8 マウス



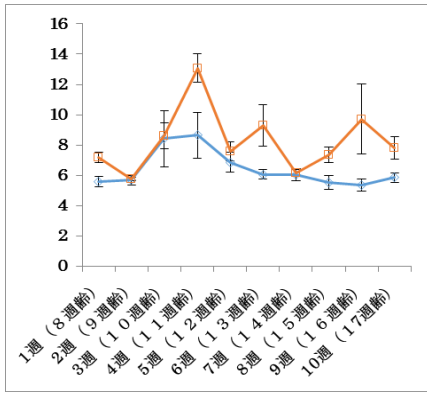
SAMP8 マウス

- : コントロール食
- : 地獄蒸し餌

(2) 摂取カロリー (単位 g / 匹)



SAMP8 マウス

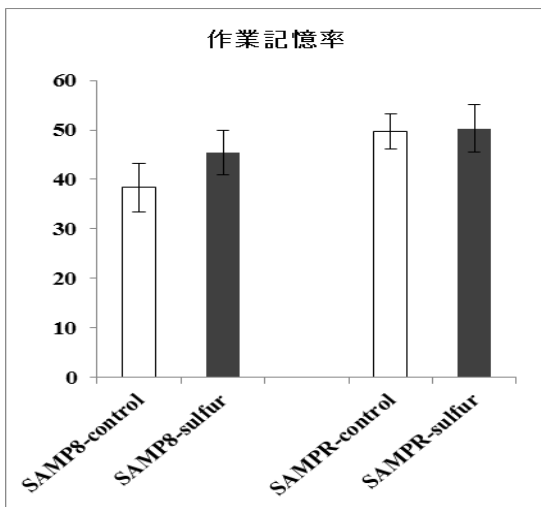
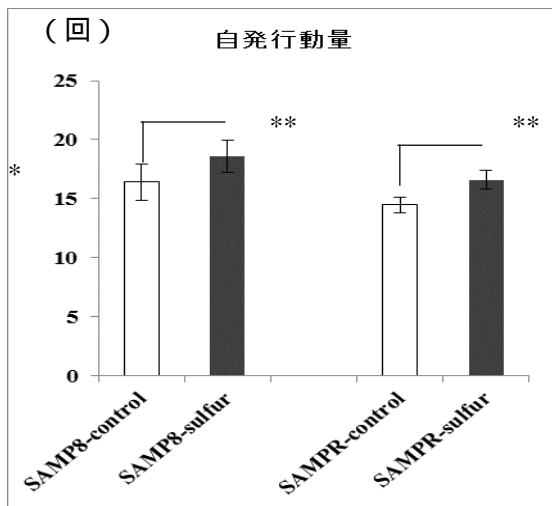


SAMP8 マウス

- ：コントロール食
- ：地獄蒸し餌

本実験で使用した SAMP8 マウスは、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。

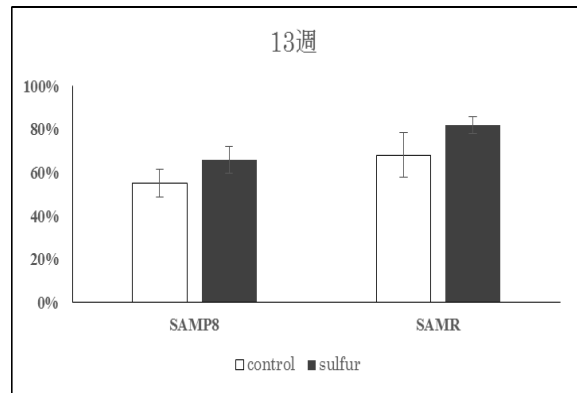
(3) Y 字迷路実験 (自発行動量と空間作業記憶)



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、地獄蒸し食群の方が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。

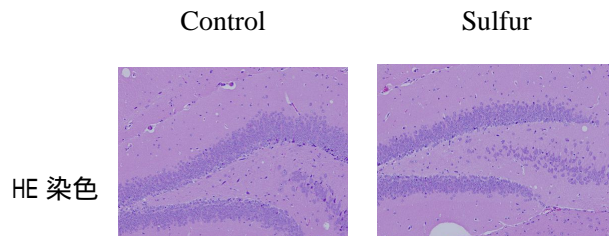
空間作業記憶 (短期記憶、ワーキングメモリー) は、3 回連続して異なるアームへ進入した回数をアームへの総進入回数から 1 を引いた値で除した後、100 を乗することによって求めた。SAMP8 マウスにおいても SAMR マウスにおいても、地獄蒸し食群の方が空間作業記憶は高値であった。コントロール群では SAMP8 マウスが SAMR マウスより記憶力が低下していることから、この週齢では加齢により空間作業記憶は低下していた。さらに地獄蒸し食を摂取させるとこの低下は抑制された。

(4) 新奇物体認識試験



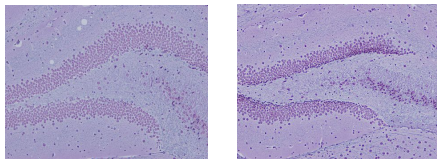
実験開始より 13 週目のコントロール食に関して、SAMP8 マウスでは SAMR マウスよりも低値を示した。これは加齢による認知力の低下である。SAMP8 マウスにおける地獄蒸し食群では、10%の認知力の回復が認められた

(5) マウス脳海馬の組織染色

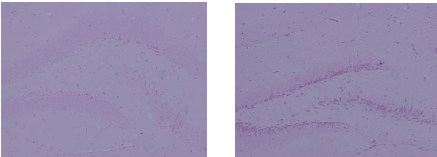


HE 染色

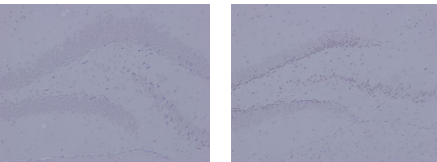
ボディ
アン
染



ガリア
ス染色



コンゴ
レッド
染色



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顆粒細胞層の基底側であり、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。

(6) マウス飼料の構造解析

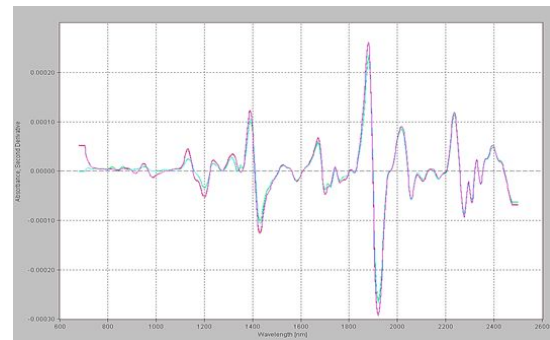
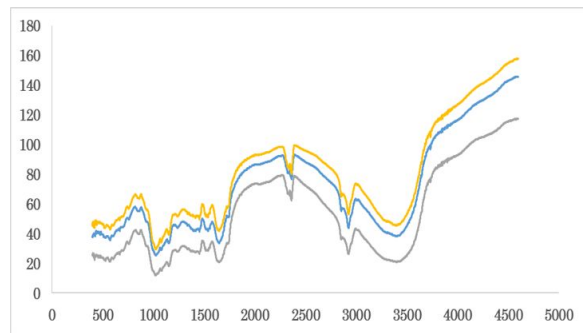
1. 硫黄含有量測定

上記の通り作製した飼料を炭素・硫黄同時分析装置(堀場製作所製 EMIA-520)で解析を行い、硫黄含有量の違いを調べた。

2. 構造変化解析

上記の通り作製した飼料を破碎後、赤外分光法 FT-IR-600(日本分光株式会社)を利用して飼料の構造解析を行った。また近赤外分析装置 SpectraStar2500XL(ピーエルテック)を用いて、詳細部位の解析も行った。

試料名	濃度[mg/g]	
	S	Fe
コントロール	2.4	0.11
水	2.3	0.10
温泉	8.9	0.12



硫化水素の硫黄がどのようにタンパク質や脂質に結合するのかについては、過去の報告はなく、今回の2種の赤外線解析からも解明できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1) 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、大坪素秋、他5名
別府大学大学院紀要 第16号 2014年

2) Possible involvement of food texture in insulin resistance and energy metabolism in male rats.

cho-Rong Bae, Kazuya Hasegawa, Sayaka Akieda-Asai, Yurie Kawasaki, Kazuyo Senba, Youn-Soo-Cha and Yukari Date.

Journal of Endocrinology 2014 222,61-72

[学会発表など](計 1 件)

1) H27年2月28日 サイエンスインカレ
(実験・発表は学生が行った)

会場: 神戸国際会議場

タイトル: 還元性硫黄摂取による脳神経細胞活性化機構の解明

出願状況(計 1 件)

名称: 発明者: 仙波和代

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2017-24738

出願年月日: 2017年2月27日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仙波 和代 (SENBA, Kazuyo)
別府大学・食物栄養科学部・教授
研究者番号 : 30381031

(2)研究分担者

大坪 素秋 (OOTSUBO, Motoaki)
別府大学・食物栄養科学部・教授
研究者番号 : 10211799

大賀 恭 (OHGA, Yasushi)
大分大学・工学部・教授
研究者番号 : 60252508