

大豆たん白質摂取による加齢性難聴予防への挑戦

谷川 徹^{*1}・柴田 玲²・植田広海¹

¹愛知医科大学耳鼻咽喉科 ²名古屋大学循環器内科

Protection of Age-Related Hearing Impairment by Dietary Beta-Conglycinin

Tohru TANIGAWA^{*1}, Rei SHIBATA² and Hiromi UEDA¹

¹Department of Otolaryngology, Aichi Medical University, Nagakute 480-1195

²Department of Cardiology, Nagoya University, Nagoya 466-8550

ABSTRACT

We aimed to investigate whether dietary beta-conglycinin could protect against age-related hearing impairment in mice. Six-month-old C57BL/6J male mice were fed diets containing beta-conglycinin (n=6) or casein (n=5) for 6 months. Six months after starting these diets, body weights were significantly higher in the casein-fed group than in the beta-conglycinin-fed group ($p<0.01$). Casein-fed mice exhibited increased auditory brainstem response (ABR) hearing thresholds at all frequencies, whereas beta-conglycinin-fed mice exhibited no increased ABR threshold shifts (<30 dB). The ABR threshold shift was significantly different at 4 kHz ($p<0.01$) and 32 kHz ($p<0.05$). Transmission electron microscopic studies revealed that the number of lipofuscin granules in spiral ganglion neurons (SGNs) was significantly increased in the casein group compared to that in the beta-conglycinin group ($p<0.05$). Additionally, morphological damage in the stria vascularis (SV) was more severe in the casein-fed group than in the beta-conglycinin group. Our data suggest that dietary beta-conglycinin could protect against age-related hearing impairment. Six-month-old adiponectin (APN) KO mice showed moderate [>50 dB sound pressure level (SPL)] to severe (>70 dB SPL) hearing losses (in submission). Serum APN was higher in the beta-conglycinin group than in the casein group. These results suggest that increased levels of serum APN in the beta-conglycinin group might afford protection against morphological damage in the SV and SGNs, and, consequently, prevent hearing impairment. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 92-98, 2013.

Key words : soy protein, beta-conglycinin, hearing impairment, obesity, adiponectin

*〒480-1195 愛知県長久手市岩作雁又1-1

高齢化社会の到来とともに、2040年には国民の3人に1人が高齢者となり、この内、40% (1,200万人) 以上の方々が⁸、加齢性難聴（加齢性内耳障害）を発症すると予想される¹⁾。しかし、多くの加齢性難聴者に対し、補聴器で会話の不便さを改善しているのが現状である。

β -コングリシニンは大豆に含まれる主要な貯蔵たん白質である。大豆たん白質は抗肥満作用、抗老化作用などの様々な生理作用を有することが知られている²⁾。一方、近年、肥満により加齢性難聴が促進されることも明らかになってきている^{3,4)}。しかしながら、大豆たん白質 β -コングリシニンにより加齢性難聴を予防しようとする試みは現在までのところなされていない。

そこで本研究では、積極的な大豆たん白質 “ β -コングリシニン” の摂取により、マウス加齢による難聴の予防が可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

方 法

実験動物

C57BL / 6Jマウス（6ヶ月齢オス）を用いた。

マウスはランダムに β -コングリシニン群（n=6）とカゼイン群（n=5）に振り分けた。それぞれの群で投与開始から6ヶ月間同じ餌で飼育し、体重、血清 Adiponectin（APN）、聴力を測定した後に蝸牛を摘出した（Fig. 1）。

飼料

β -コングリシニンおよびカゼイン入りの飼料は不二製油の橘博士より供与を受けた⁵⁾。飼料の組成を Table 1に示す。

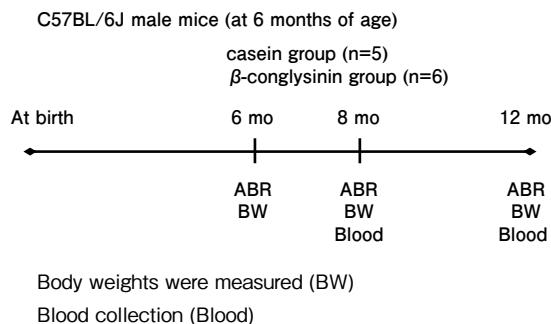


Fig. 1. Experimental procedure.

聴力測定

聴力閾値変化の測定にはAuditory Brainstem Response（ABR）を用いた。刺激音には4, 8, 16, 32 kHzのトーンバースト音を用い、刺激音を5 dBステップとし、512回加算した。

血清APN測定

血清APN濃度測定にはELISA kit（大塚製薬）を使用した。

蝸牛形態の観察

ABRで聴力閾値を測定後、蝸牛を摘出し、2%パラホルムアルデヒド+グルタルアルデヒドで24時間固定を行った。脱水後、包埋し、1.5 μ mの薄切標本を作成してトルイジン青染色を行い光学顕微鏡で観察した。その後、70 nmの超薄切片作成後、uranyl acetateで染色し、透過型電子顕微鏡（JEM-1200EX）でも観察を追加した。

統計学的検討

データは平均±標準誤差で表記し、統計学的検討にはstudent-t検定を用いた。有意水準は5%として検討を行った。

結果と考察

体重

給餌開始前の平均体重は両群で差を認めなかった。カゼイン群の平均体重は、給餌後2ヶ月で38.9±1.0 gであり、 β -コングリシニン群の35.6±1.2 gと比べて増加の傾向にあった（ $p=0.067$ ）。さらに給餌6ヶ月後では、カゼイン群45.6±1.2 g、 β -コングリシニン群38.7±1.2 gと有意（ $p<0.01$ ）な体重差を認めた。これらの結果は過去の報告に一致しており、 β -コングリシニンの持つ抗肥満作用^{5,6)}が発揮されたものと思われた（Fig. 2）。

Table 1. Composition of experimental diet

	Groups	
	Casein	β -Conglycinin
g/100g diet		
Casein	22.7	—
β -conglycinin	—	21.6
Cornstarch	37.35	38.45
Dextrinized cornstarch	13.2	13.2
Sucrose	10	10
Soybean oil	7	7
Cellulose powder	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25

聴力閾値の変化

研究開始前（6ヶ月齢）の聴力レベルは2群間で差を認めなかった（Fig. 3A）。開始後2ヶ月の時点でも、全周波数において、有意な聴力閾値上昇を認めなかった（Fig. 3B）。給餌6ヶ月時点（12ヶ月齢）では、 β -コングリシニン群においては全周波数で聴力が30 dB未満に維持されていた。一方、カゼイン群では β -コングリシニン群に比べて10から15 dBの閾値上昇を認めた。8 kHzと16 kHzでは聴力閾値に有意差を認めなかったが、4 kHzと32 kHzではカゼイン群で有意な閾値上昇を認めた（Fig. 3C）。C57BL/6Jマウスは通常食を与えると12ヶ月齢で50から60 dBの、中～高度の加齢性難聴をきたすことがわかっている⁷⁾。体重測定と聴力閾値の検討から、 β -コングリシニンは肥満の防止だけでなく、加齢性難聴を予防可能であることが明らかになった。

蝸牛の形態

光学顕微鏡による観察では、ラセン神経節（Fig. 4A）、蝸牛血管条（Fig. 4B）において β -コングリシニン群とカゼイン群との間に明らかな差異は認めなかった。

透過型電子顕微鏡による観察で、カゼイン群のラセン神経節細胞は β -コングリシニン群と比べてリポフスチン顆粒、ミエリン部分の空胞、核の陥入などといった障害の出現頻度が増加していた（Fig. 5）。

リポフスチン顆粒は細胞質内の不飽和脂肪酸の過酸化によりリソソーム内に形成される不溶性色素で、固体の老化に伴い神経細胞などでの出現頻度が増加するとされている⁸⁾。らせん神経節細胞におけるリポフスチン顆粒数を定量化すると、カゼイン群では β -コン

グリシニン群に比べて、細胞1個あたりのリポフスチン数が有意に増加していた（ $p<0.05$, Fig. 6）。 β -コングリシニン食が蝸牛に対しても抗老化作用を持つ可能性が示唆された。

蝸牛で血管が最も豊富に存在する部位が血管条である。カゼイン群の血管条でも β -コングリシニン群と比較してリポフスチン顆粒数が増加していた（Fig. 7）。さらに中間細胞や血管周皮細胞内における細胞障害（空胞）の出現頻度が増加していた（Fig. 8）。 β -コングリシニンのもたらす抗動脈硬化作用²⁾が血管条に保護的に働いている可能性も示された。

Adiponectinの関与について

Adiponectin（APN）は脂肪細胞から分泌されるいわゆる善玉ホルモンであり、過食や運動不足の状態では分泌が抑制される⁹⁾。APNには抗肥満作用だけでなく、抗老化作用があることが報告されてきている¹⁰⁾。さらに積極的な大豆たん白質（ β -コングリシニン）摂取によりAPNが増加するとの報告⁵⁾もなされており、我々もAPNに注目した。

Fig. 9に血清APN値の結果を示す。カゼイン食開始2ヶ月後に採血した際のAPN平均値を基準、すなわち100として比較すると、 β -コングリシニン開始2ヶ月後のAPN値は平均129であり、カゼイン群の1.3倍の血中濃度が得られた。同様に比較すると、給餌開始6ヶ月後では、カゼイン群104、 β -コングリシニン群118と開始6ヶ月後でも、APN値はカゼイン群と比べて β -コングリシニン群で全体的に軽度増加していた。

今回認められた血清APNの軽度増加に意味があるのかどうか調べるために、APNノックアウトマウスの聴力を測定した。結果は6ヶ月齢の時点でノックア

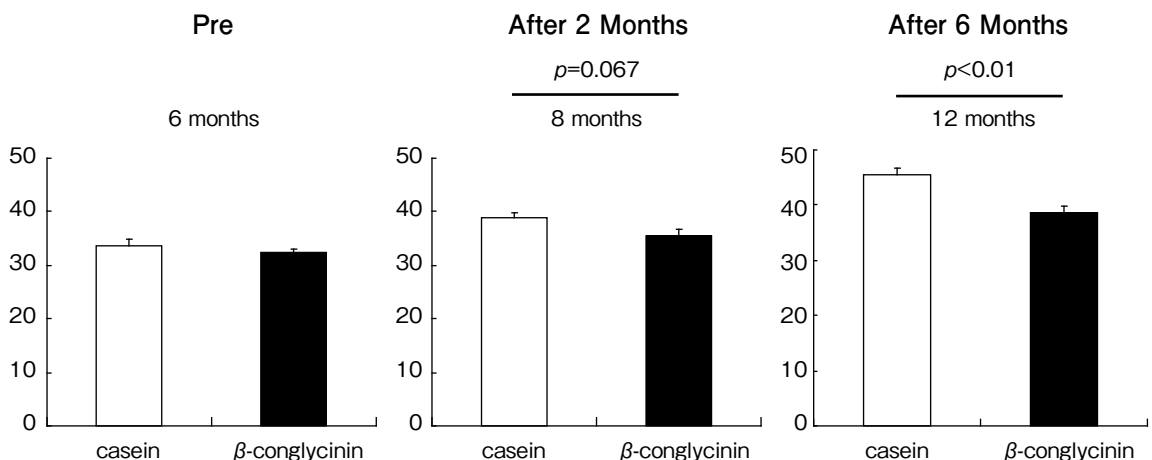


Fig. 2. Body weight of both groups after food intake.

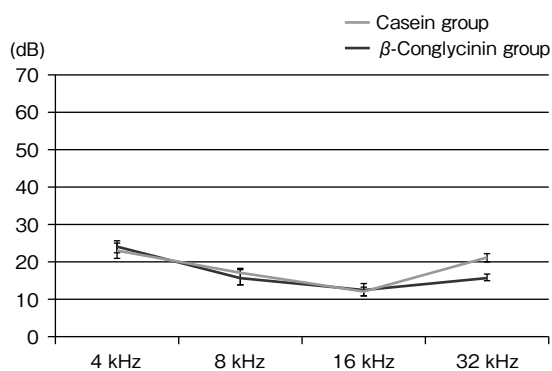


Fig. 3A. ABR thresholds before food intakes (6 months of age).

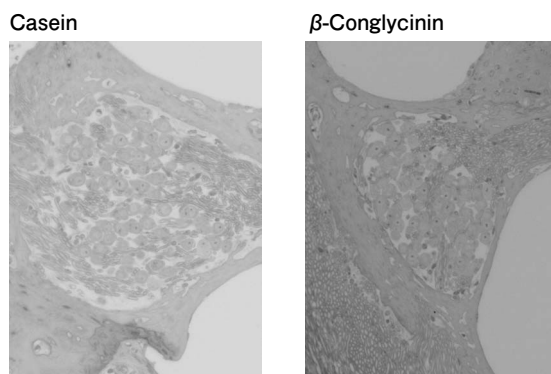


Fig. 4A. Spiral ganglion neurons from basal regions of the cochlear.

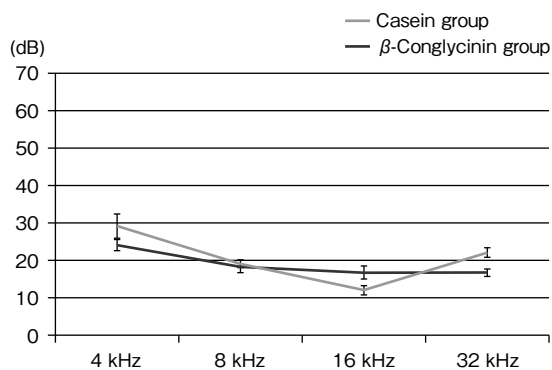


Fig. 3B. ABR thresholds 2 months after food intakes (8 months of age).

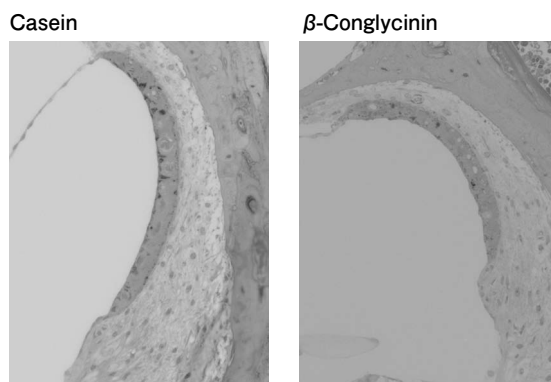


Fig. 4B. Stria Vascularis from basal regions of the cochlear.

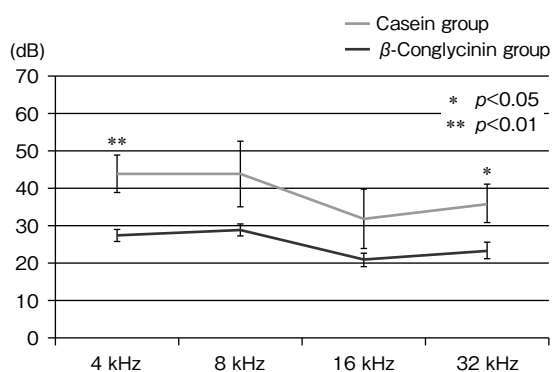


Fig. 3C. ABR thresholds 6 months after food intakes (12 months of age).

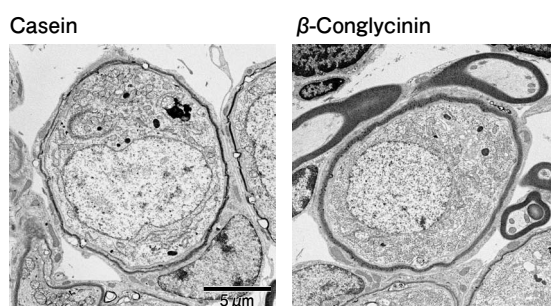


Fig. 5. Ultra structure of the spiral ganglion neurons.

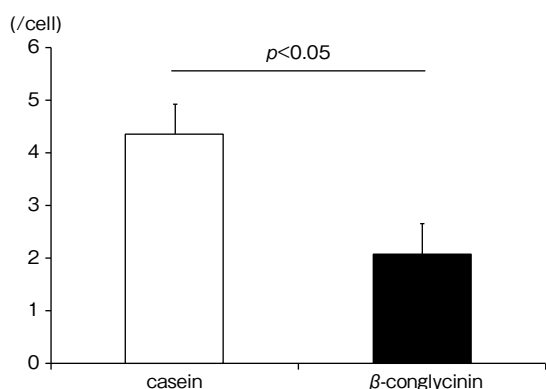


Fig. 6. Numbers of lipofuscin granules in spiral ganglion neurons.

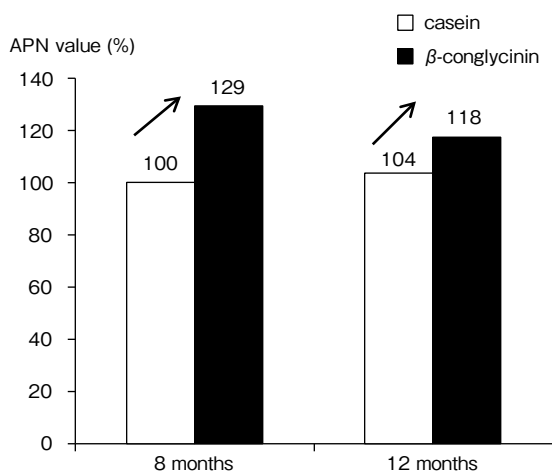


Fig. 9. Effects of protein diet on plasma levels of adiponectin.

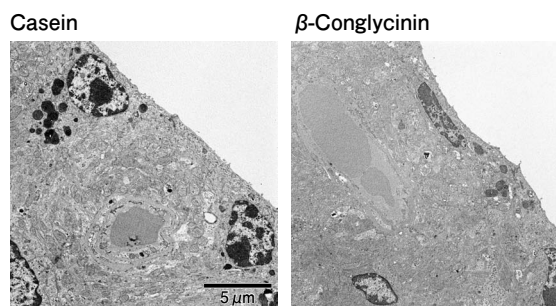


Fig. 7. Ultra structure of the stria vascularis.

ウトマウスは高度難聴をきたしていることがわかった (論文投稿中)。以上の事実はConglycininのもたらす加齢性難聴予防作用にAPNが重要な役割を果たしている可能性を示唆している。今後、APNノックアウトマウスにConglycinin食を投与して更なる検討を加える予定である。

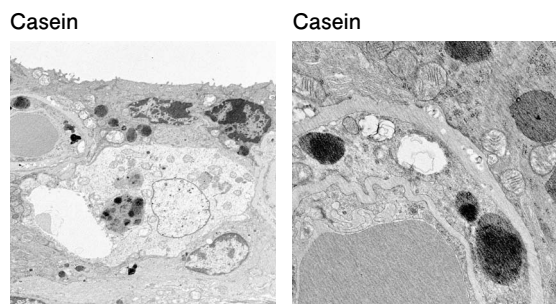


Fig. 8. Ultra structure of the stria vascularis (2).

結 語

β -Conglycininの摂取によりマウス加齢性難聴を予防可能であることが明らかになった。大豆たん白の積極的な摂取は加齢性難聴を予防するオプションの1つになる可能性がある。

要 約

β -コングリシニン（大豆たん白質）を積極的に摂取することで加齢性難聴を予防可能かどうか？マウスを用いて検討した。6ヶ月齢C57BL/6J雄マウスに、 β -コングリシニンを配合した飼料あるいは対照飼料（カゼイン配合）を6ヶ月間、給餌させた結果、有意な体重差が観察された（カゼイン群：45.6 $\pm$ 1.2 g、 β -コングリシニン群：38.7 $\pm$ 1.2 g）。研究開始前（6ヶ月齢）の聴力レベルは2群間で差を認めなかった。給餌開始6ヶ月の時点（12ヶ月齢）では、 β -コングリシニン群においては全周波数で聴力が30 dB未満に維持されていた。一方、カゼイン群では β -コングリシニン群に比べて10から15 dBの閾値上昇を認めた（4 kHzと32 kHzにおいて、カゼイン群で有意な閾値上昇を認めた）。透過型電子顕微鏡による観察で、カゼイン群のラセン神経節細胞はリポ فسチン顆粒、ミエリン部分の空胞、核の陥入などといった障害の出現頻度が増加していた。ラセン神経節細胞におけるリポ فسチン顆粒数を定量化すると、カゼイン群では β -コングリシニン群に比べて、細胞1個あたりのリポ فسチン数が有意に増加していた。カゼイン群では β -コングリシニン群と比較して血管条でもリポ فسチン顆粒数が増加していた。さらに、中間細胞や血管周皮細胞内における細胞障害（空胞）の出現頻度が増加していた。以上から β -コングリシニン摂取により加齢性難聴を予防しうる可能性がマウスレベルで明らかとなった。 β -コングリシニンには、抗肥満作用や、抗加齢作用、血管保護作用を有することが明らかとなっている。我々が見いだした加齢性難聴予防には、どのようなメカニズムが関与しているのか次に検討することとし、これらの作用を有し、 β -コングリシニンにより、増加することが知られているアディポネクチンに注目した。まず、アディポネクチン遺伝子欠損マウスが聴力異常を認めるか否か検討を行った。結果は6ヶ月齢の時点でノックアウトマウスは高度難聴を来していることがわかった（論文投稿中）。次に、 β -コングリシニンの摂取がアディポネクチンの増加を促すか否か検討したところ、既存の報告通り血中アディポネクチン値はカゼイン群と比べて β -コングリシニン群で全体的に軽度増加していた。以上から β -コングリシニン摂取により加齢性難聴を予防しうる、その機序として、 β -コングリシニンのアディポネクチン増加作用が関与している可能性があることが示された。

文 献

- 1) Seidman MD, Ahmad N and Bai U (2002): Molecular mechanisms of age-related hearing loss. *Ageing Res Rev*, **1**, 331-343.
- 2) 高松清治 (2009年3月): 大豆 β コングリシニンの機能性とその展開 第47回近畿アグリハイテクシンポジウム, 京都.
- 3) Hwang JH, Wu CC, Hsu CJ, Liu TC and Yang WS (2009): Association of central obesity with the severity and audiometric configurations of age-related hearing impairment. *Obesity (Silver Spring)*, **17**, 1796-1801.
- 4) Hwang JH, Hsu CJ, Yu WH, Liu TC and Yang WS (2013 Apr 26): Diet-Induced Obesity Exacerbates Auditory Degeneration via Hypoxia, Inflammation, and Apoptosis Signaling Pathways in CD/1 Mice. *PLoS One*, **8**(4), e60730.
- 5) Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotaka M, Horio F and Kohno M (2010): Beta-conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1250-1255.
- 6) Kohno M, Hirotaka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 7) Tabuchi K, Hoshino T, Hirose Y, Hayashi K, Nishimura B, Nakayama M and Hara A (2011): Age-related hearing loss and expression of antioxidant enzymes in BDF1 mice. *Acta Otolaryngol*, **131**, 1020-1024.
- 8) Brunk UT and Terman A (2002): Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, **33**, 611-619.
- 9) Shibata R, Ouchi N and Murohara T (2009): Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ J*, **73**, 608-614.
- 10) Otabe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M and Yamada K (2007): Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E210-218.