

[原著]

黒酢と DHA 摂取がラットの学習と記憶力に及ぼす影響

行 平 崇¹ 田 中 哲 子² 土 井 篤²
小 牧 龍 二² 福 永 貴 之² 申 敏 哲^{2,*}

Effects of *Kurozu* and docosahexaenoic acid (DHA) intake on memory and learning ability in rats

Takashi YUKIHIRA, Tetsuko TANAKA, Atsushi DOI, Ryuji KOMAKI,
Takayuki FUKUNAGA, Min-Chul SHIN

要旨

一般の食酢に比べタンパク質を構成するアミノ酸の他にクエン酸やコハク酸、有機酸やビタミン、ミネラル、メラノイジン等が多く含まれている黒酢の様々な効果が報告されている中で、学習及び記憶力に及ぼす影響に対しては、未だ明らかになっていない。そこで本実験では、黒酢と DHA の摂取がラット学習・記憶力に及ぼす影響について行動学的及び免疫組織学的手法を用いて検討した。その結果、8 方向放射状迷路試験において、黒酢、DHA の単独投与では所要時間の有意な短縮は認められなかったものの、黒酢と DHA の同時投与群では有意な短縮が認められた。Working memory error (WME) では、DHA 単独投与群と黒酢と DHA 同時投与群で有意な WME の減少が認められた。Step-down 試験においても、黒酢と DHA 同時投与群で有意な潜伏期の増加が認められた。また、神経細胞の活性と細胞の増殖を確認するために行った c-Fos と BrdU の免疫染色でも、黒酢と DHA の同時投与群では陽性細胞の有意な増加が認められた。本研究の結果、黒酢の継続的な摂取は DHA と同様に記憶力の中心である海馬を刺激し、細胞新生を促進する事で記憶力の増強に影響を与える可能性が示唆された。また、黒酢又は DHA の単独摂取と比較して、双方を同時に摂取することで相乗効果を得ることができた。今後更なる濃度と実験期間の検討により、黒酢と DHA の効果を明確にすることで、認知症の改善や脳発達障害の改善に応用でき、患者の QOL の向上に繋がっていく可能性が考えられる。

キーワード：黒酢，DHA，ラット，学習／記憶力，海馬

I. はじめに

先天的もしくは後天的に脳の発達が損なわれる発達障害は、子供のみならず成人においても社会生活を送ることに困難を感じる場合があるとされている。逆に一度正常に発達した機能が加齢などの原因によって損なわれる認知症は、2012年現在全国で約462万人と推計されており、今後しばらく高齢化の

一途をたどる我が国においては、介護の面等から地域社会においてもこれまで以上に重要な問題になると考えられる。

近年、発達障害による認知発達の遅れや認知症患者の認知低下などが海馬と関連していることが報告されている¹⁻²⁾。海馬は記憶の形成に係る重要な脳領域である。成長するにつれて神経発生量は減少していくが、海馬や脳室下帯では成熟後も続くこ

所属

¹帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

²熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科

*責任著者：karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

とが確認されている。また海馬での神経発生は、学習や記憶などに重要な役割をすることも示唆されている³⁾。近年、Docosahexaenoic acid (DHA) 投与がラットの海馬において、加齢により減少したアミノ酸量、低下した長期増強 (Long-term potentiation : LTP) の反応性や神経伝達物質の遊離能を若齢ラット程度まで回復させたとの報告があり、DHA は記憶・学習の形成に関連し、脳の正常機能を維持するために主要な役割を担っていることが推察されている⁴⁾。さらに近年、sardine oil よりもクリルオイルの摂取群において、より酸化ヘモグロビンの濃度が高まり、脳の活性化が顕著であることが判明した⁵⁾。

黒酢には、一般の食酢に比べタンパク質を構成するアミノ酸の他にクエン酸やコハク酸、有機酸やビタミン、ミネラル、メラノイジン等が多く含まれ、疲労回復効果やカルシウム吸収促進、脂質代謝改善作用、血流改善、血糖値上昇抑制など、科学的根拠は少ないものの、酢より健康により効果があると言われている。脳の発達、神経細胞の新生、中枢・末梢神経損傷からの回復には、タンパク質の存在が不可欠であるが、タンパク質の構成成分であるアミノ酸に加え、ミネラル成分を豊富に含む黒酢が、脳の発達や神経再生等に及ぼす影響はまだ不明である。従って、本研究では行動学的及び免疫組織学的手法を用いて、黒酢と DHA の単独摂取や同時摂取がラットの学習と記憶力に及ぼす影響について検討した。

II. 対象および方法

1. 実験動物

6週齢の Wistar 系雄性ラット (九動株) を、また DHA に対する対照としては Corn oil を用いて、A. 蒸留水投与群、B. Corn oil 投与群、C. 蒸留水+Corn oil 投与群、D. 100mg/kg 黒酢投与群、E. 1000mg/kg DHA 投与群、F. 100mg/kg 黒酢+1000mg/kg DHA 投与群の6群に分けた。ラットは市販の飼料および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12時間毎に明暗のコントロールをし、室温 25.0℃、湿度 55±5% の条件下で飼育した。動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可を得て行った (登録番号 動15-008)。

2. 実験プロトコール

すべてのラットに対して1週間の適応期間後、行動試験の事前学習期間として3日間設定し、3日目に事前学習終了後行動試験を行った。そして、100mg/kg の BrdU を腹腔内投与した1時間後に蒸留水、Corn oil、DHA と黒酢を4週間継続して経口投与器を用いて 1 ml/day を胃に直接投与した。4週間継続して経口投与した後、行動実験を実施した。

3. 測定項目

3-1. 8方向放射状迷路試験

空間学習と作業記憶の評価には、8方向放射状迷路 (Radial arm maze, RAM) を用い、投与前と投与終了後の計2回評価を実施した。8方向放射状迷路は長さ60cm、幅10cm、高さ15cm のアームが中心の八角形プラットフォーム (直径35cm) から伸び、各アームの先端に凹型カップを置き、8つの凹型カップのうち5つに水を入れ、ラットの水探索行動を測定した⁶⁾。試験に際しては、24時間前より絶水し水探索行動を促した。全てのアームに3度ずつ侵入するよう設定し、水の位置を記憶させる過程を24時間間隔で3日間実施し、4日目に測定を実施した。その後、蒸留水、Corn oil、DHA と黒酢の経口投与を4週間継続し、経口投与後に再び8方向放射状迷路試験を行った。迷路試験はプラットフォーム中央にラットを置いた後自由に行動させ、アームの先端まで侵入し水を摂取するか、凹型カップを覗いた時点でそのアームを選択したものとみなし、ラットが5つ全ての水を摂取した時点で試行終了とした。また、水の入っていないアームへ侵入した際や水を摂取したアームに再度侵入した回数を Working memory error (WME) としてカウントし、所要時間、WME 数の項目において評価した。迷路試験は外部の刺激が無い個室で行った。

3-2. Step-down 試験

短期記憶の評価のために Step-down test を実施した。Step-down test では、50×25×30cm の透明なアクリル製ボックスを用い、ボックスの右側に 5×12×25cm の長さのプラットフォームを備え、左側には 2mm 間隔の一連のステンレス鋼棒 (直径 2mm) を配置した。事前学習では、ラットを 5cm の高さのプラットフォーム上に置き、ステップダウン待ち時間20秒後、ラットがプラットフォーム

ム上から下段のステンレス鋼棒へ降りて約30秒経過した際に、25Vの電気刺激を与え、これを受けたラットがプラットフォーム上へ逃避した時点でボックスから引き抜いた。試験では、事前学習の24時間後、ラットを再びプラットフォーム上に置き、プラットフォーム上から下段のステンレス鋼棒へ完全に降りきるまでの時間を潜伏時間として（カットオフ：5分）計測した。この場合にはラットが下段のステンレス鋼棒に降りてもステンレス鋼棒には電気刺激を与えない⁷⁾。

4. 免疫組織化学的検査

1ヶ月後の8方向放射状迷路試験と Step-Down 試験終了後、ペントバルビタール (10mg/kg, i.p.) にて麻酔後、腹部を切開した。Phosphate Buffered Saline (PBS) を全身血と交換した後、脳標本を作製した。ラットより得られた脳組織を4% Paraformaldehyd (PFA) に浸漬し組織固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームを用い、6µmの厚さで薄切した海馬組織標本を作成した。これら薄切標本にc-Fos (Anti c-Fos, サンタクルズ) と BrdU (Anti-BrdU, アブカム) の免疫染色を行った。その後、顕微鏡用デジタルカメラ (BX51, OLYMPUS) により20倍の写真を撮影し、Cell Sens Dimension (Ver1.7, OLYMPUS) を用いて陽性細胞の数を計測した⁸⁾。

5. 統計解析

体重, WME, 平均所要時間は平均±標準偏差 (S.D.), c-Fos 陽性細胞, BrdU 陽性細胞のデータは平均±標準誤差 (S.E.) をそれぞれ算出した。群間差は一元配置分散分析をし、事後検定として Scheffe 検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は5% ($P < 0.05$) とした。

Ⅲ. 結果

1. 体重の変化に及ぼす影響

図1は各群の体重の変化を示したものである。縦軸は体重, 横軸は蒸留水, Corn oil, DHA または黒酢投与前を0日目として、4週までの体重の推移を示す。経口投与後体重は徐々に増加を示し、最終測定時には各群250g程度の増加を示した。4週後の体重に関してはCorn oil, DHA 投与群で若干

体重増加を示したが有意差は認められなかった。

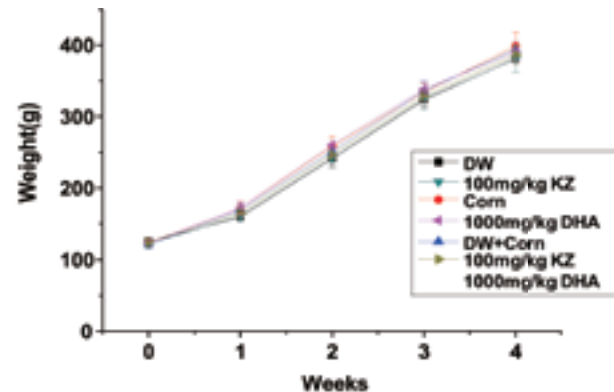


図1. 体重の変化

DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; n=6~7; Mean ± S.D.

2. 8方向放射状迷路試験 (Radial arms maze test)

空間学習・作業記憶に及ぼす影響を測定するために、8方向放射状迷路試験を行った。図2は8方向放射状迷路試験の所要時間を示す。所要時間に関しては、黒酢, DHA 投与群でその対照群の蒸留水, Corn oil 投与群と比較し、若干所要時間の短縮が見られたが、有意差は認められなかった。しかし、黒酢+DHA 投与群では蒸留水+Corn oil 投与群と比べ、有意な所要時間の短縮が認められた ($P < 0.05$)。

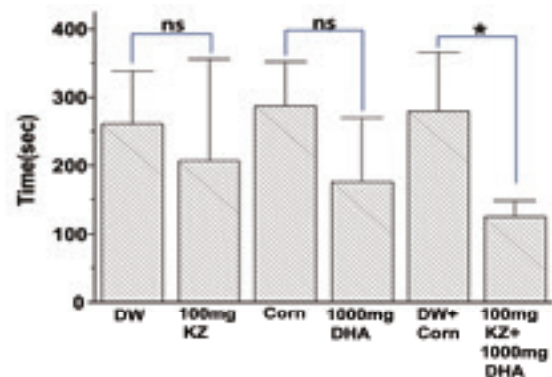


図2. 8方向放射状迷路試験の所要時間

DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; n=6~7; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean ± S.D.

図3はWMEの変化を示す。WMEに関して、黒酢投与群では蒸留水投与群よりWMEの減少が見られたが、有意差は認められなかった。しかし、DHA, 黒酢+DHA 投与群においては、Corn oil 投

与群と蒸留水+Corn oil投与群に比べ、有意なWMEの減少が認められた ($P < 0.05$)。

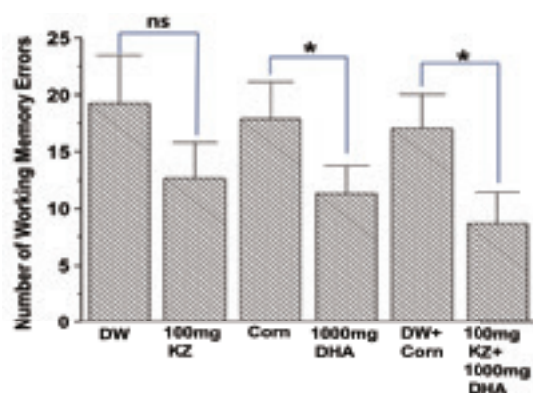


図3. 8方向放射状迷路試験のWME

DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; $n=6\sim7$; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.D.

3. Step-down inhibitory avoidance (step-down) 試験

短期記憶に対する影響を検討するために step-down 試験を行なった。黒酢, DHA 投与群では対照群の蒸留水, Corn oil 投与群より所要時間の短縮が認められたが, 有意差は認められなかった。しかし, 黒酢+DHA 投与群では蒸留水+Corn oil 投与群と比べ, 有意な所要時間の短縮が認められた ($P < 0.05$)。

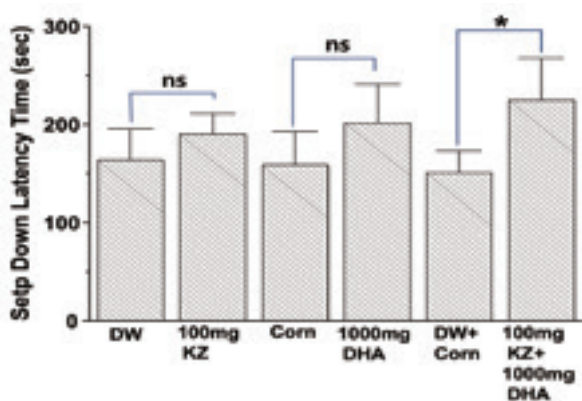


図4. Step-down 試験

DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; $n=6\sim7$; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.D.

4. c-Fos 陽性細胞の変化

本研究では, 神経細胞の活性を検討するため, 細

胞活性マーカーである c-Fos を用いた。c-Fos は他の遺伝子を活性化させる転写因子として働くと考えられている。c-Fos が発現した後に, 様々なカスケード反応が続き, 細胞の反応が変化すると考えられている。図5は c-Fos 陽性細胞の数を示す。c-Fos 陽性細胞については, 黒酢, DHA 投与群では対照群に対し, c-Fos 陽性細胞の増加が見られたが, 有意差は認められなかった。しかし, 黒酢+DHA 投与群では蒸留水+Corn oil 投与群と比較し, c-Fos 陽性細胞の有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。

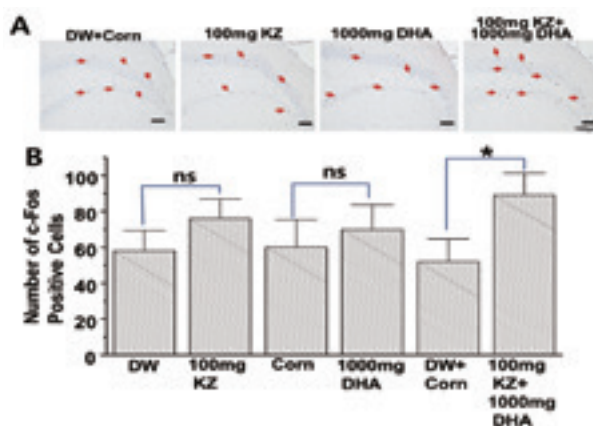


図5. c-Fos 陽性細胞

赤い矢印は c-Fos 陽性細胞を示す。DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; $n=12\sim14$; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.E.

5. BrdU 陽性細胞の変化

細胞の増殖を確認するために, 増殖細胞の検出や DNA 合成の程度を知る上で有用である Bromodeoxyuridine (BrdU) を用いて実験を行った。経口投与1時間前に, BrdU 100mg/kg を毎日1回ラットの腹腔 (I.P. Injection) に投与した。c-Fos 陽性細胞と同様, 黒酢, DHA 投与群では対照群に対し, BrdU 陽性細胞の増加が見られたが, 有意差は認められなかった。しかし, 黒酢+DHA 投与群では蒸留水+Corn oil 投与群と比較し, BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた (図6) ($P < 0.05$)。

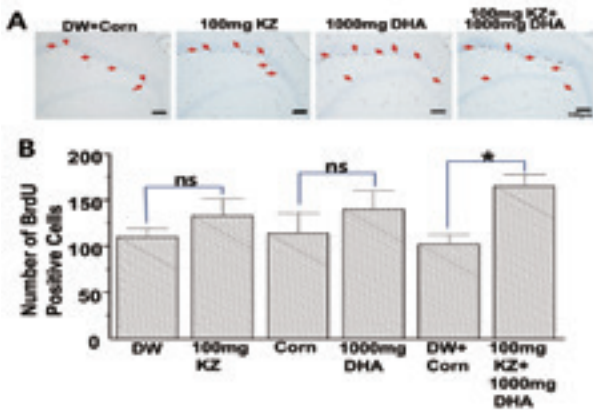


図6. BrdU 陽性細胞

赤い矢印は c-Fos 陽性細胞を示す。DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Corn, Corn oil; DHA, Docosahexaenoic acid; n=12~14; *, P<0.05; ns, no significant; Mean ± S.E.

IV. 考察

黒酢は、一般的に疲労回復、高血圧予防、抗酸化作用、血流の改善といった様々な効果があるとされている。近年我々の研究結果では、黒酢が運動パフォーマンスの促進、神経細胞の保護、脳出血による運動機能の低下改善等に効果的であることを明らかにした。一般の食酢に比べ黒酢にはタンパク質を構成するアミノ酸の他にクエン酸やコハク酸、有機酸やビタミン、ミネラル、メラノイジン等が多く含まれており、特にメラノイジンには強力な抗酸化作用があると報告されており、さらに酢の種類の中でも黒酢は特に抗酸化作用が強く効果も高いとされている⁹⁾。しかし、これらを多く含む黒酢の様々な効果が報告されながらも、記憶関与すると知られている海馬での神経細胞新生、学習及び記憶力に及ぼす影響に対しては、未だ明らかになっていない。そこで本実験では、黒酢とDHAの摂取がラット海馬の細胞新生と学習・記憶力に及ぼす影響について行動学的及び免疫組織学的手法を用いて検討した。

空間学習・作業記憶等を評価するために行った8方向放射状迷路試験では、黒酢又はDHAの単独投与では有意差は認められなかったが、所要時間の短縮が見られた。しかし、黒酢とDHAの同時投与群では所要時間の有意な短縮が認められた。Working memory error (WME) では、DHA単独投与群と黒酢とDHA同時投与群で有意なWMEの減少が認

められた。短期記憶の評価法であるStep-down試験においても、黒酢とDHA同時投与群で有意な潜伏期の増加が認められた。田中らによると、舌への末梢刺激が空間学習・作業記憶、短期記憶を上昇させ8方向放射状迷路試験の所要時間、WME、全選択数の有意な減少とStep-down試験での潜伏期を有意に増加させたと報告している¹⁰⁾。また、Kimらは、クラシック音楽とノイズでの刺激でノイズを聞かせたラットが、8方向放射状迷路試験のエラー数が増加したと報告している¹¹⁾。これらの報告は、聴覚刺激、触覚刺激などの末梢刺激が中枢に刺激を伝達し、記憶力に影響を与えることが出来ること、そしてそれらを検討することにおいて8方向放射状迷路試験とStep-down試験が有用であることを報告している。本研究においても、8方向放射状迷路試験とStep-down試験で同じ傾向であることから、DHAと黒酢の摂取がラット学習と記憶力の改善に影響を与えた可能性が示唆された。

また近年、酸化ストレスとアルツハイマー病、てんかん等の認知機能障害が起こる神経変性疾患との間の因果関係を示す研究が増加しており、酸化ストレスによって誘発される海馬の神経損傷が、抗酸化剤によって予防できることや¹²⁾、酢による抗酸化酵素活性の増強と脳由来神経栄養因子(BDNF)等の活性化は、有意な認知機能の回復をもたらすことなどが報告されている¹³⁾。近年我々の研究結果でも、黒酢は酸化ストレスの抑制と抗酸化作用の増大を介して、脳卒中モデルラットの神経損傷を抑制することで脳卒中による運動能力低下からの回復を促進することを確認した(未発表)。一般の食酢に比べ黒酢にはメラノイジンが多く含まれており、メラノイジンは還元力が強いことや、がんを発生させる活性酸素を強力に消去する作用が認められている⁹⁾。DHAに関しても同様に抗酸化作用を有する報告がなされており、DHAがmethyl mercuric chlorideの毒性からNIH3T3線維芽細胞の保護と抗酸化作用を有すること¹⁴⁾、ラットでのオメガ3脂肪酸の摂取がBDNFレベルの正常化、酸化ストレスによる脳の損傷を抑制して学習障害を改善するとされている¹⁵⁾。また、DHAの発達や認知障害・記憶などに及ぼす影響についても多くの報告があり、疾患モデル動物においてDHAの投与が海馬ニューロンの保護、学習機能障害の改善をもたらすとされている¹⁶⁾¹⁷⁾。今回の研究では酸化ストレスや抗酸化作用

の測定は行っていないが、これらの報告により黒酢やDHAの摂取ラットの記憶力増強は酸化ストレスの抑制と抗酸化作用の増大によりもたらされた結果である可能性が考えられる。

本研究では神経細胞の活性と細胞の増殖を確認するためにc-FosとBrdUの免疫染色を行った。その結果、黒酢又はDHAの単独投与においてはc-Fos、BrdU陽性細胞共に増加傾向にあったものの有意差は認められなかった。しかし、黒酢とDHAの同時投与群では陽性細胞の有意な増加が認められた。矢澤らが行った明度弁別試験法を用いた記憶学習能力の実験では、カツオ油、シソ油、サフラワー油の順で記憶学習能力が優れているという結果が得られている¹⁸⁾。また、藤本らのウイスター系ラットを用いた明暗弁別による学習能力試験においても、DHAが α -リノレン酸よりも優れ、サフラワー油は最も劣る結果になったと報告している¹⁹⁾。EPAとDHAはn-3の高度不飽和脂肪酸の一種であり、魚油に豊富に含まれている。n-3脂肪酸への暴露は、認知及び行動プロセスに関連する成人海馬での神経発生を強化し、LTPを増やすことによってシナプス可塑性を進め、更には樹状突起の分枝と新たな棘形成を促すために、神経伝達物質の発現を調整すると報告されている²⁰⁾。また、c-Fos陽性細胞および海馬における記憶プロセスを学習するための神経新生を増加させることによってシナプス可塑性が強化されると報告している²¹⁾。同様にn-6脂肪酸をn-3脂肪酸に転換させることができることでDHAを豊富にする形質転換マウスが海馬の神経発生を増加させたこととKangらは報告している²²⁾。DHAは、中枢神経系の発達および機能、記憶障害においても重要な役割を果たすことが報告されているが黒酢の場合これらの機能に関する報告は殆どないのが現状である²³⁾。本実験の結果では黒酢投与はDHAと同様にc-FosとBrdU陽性細胞を増加させたが、有意差は認められなかった。しかし、黒酢とDHAの同時投与群では2つの物質の相乗効果による陽性細胞の有意な増加が認められた。これらの結果から、黒酢摂取は記憶の中心部である海馬に影響を与え、DHAと同様な記憶力増強を引き起こしていると考えられる。その理由として、黒酢にもDHAのような抗酸化作用を有することが報告されている^{14,15)}。またHuangらによると、酸化ストレスが持続的に増加するにつれて海馬での神経発生が継続的に抑制されることが報告され、

superoxide radicalを除去する主要な抗酸化酵素であるSuperoxide dismutases (SOD)の欠乏は、海馬で新しいニューロンの生産を大幅に削減することで学習・記憶力に影響を及ぼす可能性を報告している²⁴⁾。これらの報告から、本実験における黒酢の効果は、酸化ストレスの抑制と抗酸化力の増大を介して海馬の神経細胞新生を促進することで、ラットの学習と記憶力強化に影響を与えた可能性も考えられる。しかし、今回の実験で黒酢の効果が良い傾向であったものの、有意差の析出に至らなかった要因としてデータの数や期間検討の不十分性を挙げるができる。また、黒酢とDHAの酸化ストレスと抗酸化作用を検討することでそのメカニズムを明らかにすることができるのではないかと考えられる。

Coleらは、DHAが神経保護脳由来神経栄養因子の脳内レベルを上昇させ、アルツハイマー病を促進することに関与する(n-6)脂肪酸アラキドン酸およびそのプロスタグランジン代謝産物を減少させるため、DHAと抗酸化物質などで適切に設計された栄養補助食品の早期使用がアルツハイマー病等の記憶障害に役立つと主張している²⁵⁾。本研究の結果は、この主張を支持するものとなっており、抗酸化力が強い黒酢をDHAと適切に併用することによって2つの物質の相乗効果を出すことができれば、アルツハイマー病等の認知症と発達障害の予防又は症状改善に寄与できる可能性があると考えられる。

V. 結論

本研究の結果、黒酢の継続的な摂取はDHAと同様に記憶力の中心である海馬を刺激し、細胞新生を促進する事で記憶力の増強に影響を与える可能性が明らかになった。また、黒酢又はDHAを単独で摂取するより、同時摂取することで相乗効果を得ることができた。今後更なる濃度と実験期間の検討により、黒酢とDHAの効果を明確にすることで、認知症の改善や脳発達障害の改善に応用できることで、患者のQOLの向上に繋がっていく可能性が考えられる。

VI. 謝辞

本研究は、熊本保健科学大学学内研究費(2017-C-03)の助成を受け実施した。

Ⅶ. 利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

Ⅷ. 引用文献

- 1) 厚生労働省：「認知症施策推進総合戦略～認知症高齢者等にやさしい地域づくりに向けて～（新オレンジプラン）」（概要）<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou/2300000-Roukenkyoku/0000079008.pdf>（2016年6月10日検索）。
- 2) 総務省統計局：統計からみた我が国の高齢者（65歳以上）—敬老の日にちなんで—。2016, <http://www.stat.go.jp/data/topics/topi900.htm>（2016年6月10日検索）。
- 3) Neves G, Cooke SF, Bliss TV: Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9(1):65-75, 2008.
- 4) 橋本道男：ドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と神経疾患への応用。オレオサイエンス 6(2):71, 2006.
- 5) 韓力, 辻智子：n-3系脂肪酸素材クルルオイルの機能性。J Lipid Nutr, 23(1):23-28, 2014.
- 6) Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC: Fear Memory. *Physiol Rev*, 96:695-750, 2016.
- 7) Kim SE, Ko IG, Kim BK, et al: Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Exp Gerontol*, 45:357-365, 2010.
- 8) Li F, Zhang YY, Jing XM, et al: The influence of forepaw palmar sensorimotor deprivation on learning and memory in young rats. *Neurosci Res*, 63(1):17-23, 2009.
- 9) 三浦理代：メラノイジンの生理機能。日本醸造協会誌, 97(4):253-256, 2002.
- 10) 田中哲子, 行平 崇, 西 健太朗, 他：舌への刺激がラットの記憶力に及ぼす影響。保健科学研究誌, 15:73-82. 2018.
- 11) Kim H, Lee MH, Chang HK, et al: Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev*, 25(2):109-114, 2006.
- 12) Alzoubi KH, Hasan ZA, Khabour OF, et al: The effect of high-fat diet on seizure threshold in rats: Role of oxidative stress. *Physiol Behav*, 196:1-7, 2018.
- 13) Hong SM, Soe KH, Lee TH, et al: Cognitive Improving Effects by Highbush Blueberry (Vaccinium corymbosum L.) Vinegar on Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. *J Agric Food Chem*, 66(1):99-107, 2018.
- 14) Ha DH, Lee JK: Protective Effect of Omega-3 of Polyunsaturated Fatty Acid Docosahexaenoic Acid on the Organic Mercury-Induced Cytotoxicity in Cultured NIH3T3 Fibroblasts. *J Exp Biomed Sci*, 14:187-192, 2008.
- 15) Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F: Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 21(10):1457-1467, 2004.
- 16) Okada M, Amamoto T, Tomonaga M, et al: The chronic administration of docosahexaenoic acid reduces the spatial cognitive deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience*, 71(1):17-25, 1996.
- 17) 橋本道男：ドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と神経疾患への応用。オレオサイエンス, 6(2):67-76, 2006.
- 18) 矢澤一良, 影山治夫：ドコサヘキサエン酸の生理活性。油化学, 40(10):974-978, 1991.
- 19) 藤本健四郎：水産油脂—その特性と生理活性（藤本健四郎編）。恒星社厚生閣, pp111, 1993.
- 20) Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S: n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem*, 20(24):2953-2963, 2013.
- 21) Su HM: Mechanisms of fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem*, 21(5):364-373, 2010.
- 22) Kang JX, Gleason ED: Omega-3 Fatty acids and hippocampal neurogenesis in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(4):460-465, 2013.

- 23) Beltz BS, Tlusty MF, Benton JL, Sandeman DC: Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci Lett*, 415(2):154-158, 2007.
- 24) Huang TT, Zou Y, Corniola R : Oxidative stress and adult neurogenesis--effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. *Semin Cell Dev Biol*, 23(7):738-744, 2012.
- 25) Cole GM, Frautschy SA: DHA may prevent age-related dementia. *J Nutr*. 140(4):869-874, 2010.
(平成30年12月7日受理)

Effects of *Kurozu* and docosahexaenoic acid (DHA) intake on memory and learning ability in rats

Takashi YUKIHIRA, Tetsuko TANAKA, Atsushi DOI, Ryuji KOMAKI,
Takayuki FUKUNAGA, Min-Chul SHIN

Abstract

The beneficial effects of black vinegar (*Kurozu*), which contains high levels of amino acids, minerals, citric acid, succinic acid, organic materials, vitamins, minerals, and melanoidin have been reported, but it's not well known whether *Kurozu* can have any effects on memory and learning ability. Therefore, in the present study, we compared the effect of *Kurozu* and DHA on the memory and learning ability of rats using behavioral tests and immunohistochemistry. We found that in the radial arms maze test, administration of *Kurozu* or DHA slightly shortened the total task completion time but there was no significant difference. However, *Kurozu* and DHA co-administration significantly decreased the total time due to their synergistic effects. DHA or *Kurozu* and DHA co-administration significantly decreased working memory errors (WME). In the step-down test, *Kurozu* and DHA co-administration also significantly increased latency time. In addition, co-administration of *Kurozu* and DHA increased the number of c-Fos- and BrdU-positive cells in the rat hippocampus. These results suggest that net increases in hippocampal neurogenesis from sustained *Kurozu* intake are likely a result of hippocampal activation and neuronal differentiation similar to the effects of DHA, and that such intake could ameliorate memory and learning deterioration in rats. Furthermore, synergy was accepted by administration in both sides in comparison with the independent intake of *Kurozu* or DHA at the same time.

Keywords: *Kurozu*, DHA, memory and learning ability, rat, hippocampus