

[原著]

## ラットの脳神経損傷に対する黒酢の有効性検討

申 敏 哲<sup>1,\*</sup> 原 野 智 樹<sup>1</sup> 西 山 叶 真<sup>1</sup>  
田 中 哲 子<sup>1</sup> 福 永 貴 之<sup>1</sup> 行 平 崇<sup>2</sup>  
土 井 篤<sup>1</sup>

Effect of *Kurozu* on intrastriatal hemorrhage-induced brain damage in rats

Min-Chul SHIN, Touma NISHIYAMA, Tomoki HARANO, Tetsuko TANAKA,  
Takayuki FUKUNAGA, Takashi YUKIHIRA, Atsushi DOI

## 要旨

黒酢には運動パフォーマンスの向上, 神経細胞の新生や保護などの効果があると報告されている。しかし, 脳出血後の運動パフォーマンスの低下と脳神経損傷に対する黒酢の効果は明らかになっていない。本研究では黒酢の摂取が線条体出血モデルラットの運動パフォーマンス低下と神経損傷部位に及ぼす影響について行動学および免疫染色学的手法を用いて検討した。その結果, ローターロッドトレッドミル試験, open field 試験において蒸留水投与群より300mg/kg 黒酢投与群で運動パフォーマンス低下の改善がみられたが, 有意差は認められなかった。しかし, 線条体出血による損傷範囲においては蒸留水投与群に比べ, 300mg/kg 黒酢投与群で損傷範囲の有意な縮小がみられた。細胞死に関連する c-Fos においては, 蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で陽性細胞の有意な減少がみられ, caspase-3においても蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で caspase-3陽性細胞の有意な減少がみられた。これらの結果より, 黒酢の摂取は酸化ストレスの抑制, 抗酸化力の増加を引き起こし, 脳出血による脳損傷部位の細胞死因子 (c-Fos, caspase-3) の発現を減少させることで, 細胞死を抑制させた可能性が示唆された。この細胞死の抑制は脳出血損傷範囲の縮小を引き起こし, 運動パフォーマンスの改善など運動機能低下からの回復も促進させる可能性が示唆された。

キーワード: 黒酢, 線条体出血, ラット, 運動パフォーマンス

## I. はじめに

脳血管障害は我が国における死因として以前は第3位に位置付けられる疾患となっていたが, 昨今の医療技術の進歩により現在は第4位となっている。しかし, 要介護の原因としては依然第1位のままであり, 発症後一命を取り留めた場合でも後遺症が残

ることの多い疾患である。一般的に中枢神経障害としてあげられる麻痺や痙性, 臥床による廃用性の筋力低下が介護の要因となっている<sup>1)</sup>。脳卒中後の片麻痺は, 一般的に時間とともに回復が認められ, 発症後1ヵ月間が顕著であるが, 脳卒中の重症度により片麻痺の回復過程に違いが認められる<sup>2)</sup>。軽症脳卒中の場合, 発症後約1ヵ月で麻痺の回復はほぼ固

所属

<sup>1</sup>熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科<sup>2</sup>帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

\*責任著者: karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

定する傾向にある。一方、中等度から重度の片麻痺では発症後3ヵ月から6ヵ月まで緩やかな麻痺の回復が認められると報告している。これらの報告から、脳卒中後の後遺症改善の為には早期からの治療が望ましいことが示唆される<sup>3)</sup>。Awaparaらによると、脳は血漿からアミノ酸を集めていて、ほとんどのアミノ酸は血漿中よりも濃度が高いことが報告されている<sup>4)</sup>。またアミノ酸はタンパク質の構成成分であり、神経や細胞の新生、保護、回復に重要な役割を果たしている。<sup>5)</sup> さらに一部の報告では、アミノ酸を運動前に摂取することで、より効果的な結果を得られることも示唆されている<sup>6)</sup>。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ている<sup>7)</sup>。黒酢には疲労回復効果やカルシウム吸収促進、高血圧抑制作用、脂質代謝改善作用、血流改善、血糖値上昇抑制など、科学的根拠は乏しいものの酢よりも健康に良いと言われ、古い歴史を持つ健康食材であり、今日では飲料やサプリメントでも広く人気を集めている。近年我々は、黒酢が運動パフォーマンスを向上させることを明らかにした<sup>8)</sup>。しかし、脳出血による運動パフォーマンスの低下や神経損傷部位に対する黒酢の効果については未だ明確にされていない。そこで本研究では黒酢の摂取が線条体出血モデルラットの運動パフォーマンスの低下と神経損傷部位に及ぼす影響について行動学的手法および免疫染色学的手法を用いて検討することを目的とした。

## Ⅱ. 対象および方法

### 1. 実験動物

ホルモンの影響を排除するため、Wister系雄性ラット(220~250g)を20匹用いて、A. Hemorrhage+蒸留水投与群(ICH+DW, n=6), B. Hemorrhage+100mg/kg黒酢投与群(ICH+100mg KZ, n=7), C. Hemorrhage+300mg/kg黒酢投与群(ICH+300mg KZ, n=7)の3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、蒸留水または黒酢は経口投与器を用いてそれぞれのラットの胃に直接投与した。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17-009)。

### 2. 脳内出血モデルラット作製

脳内出血モデルラット作製には、Stereotaxic装置(Model 51900: Muromachi Kikai社製)を使用した。吸入麻酔下で頭蓋骨に小穴をあけた後、Stereotaxic装置により右脳線条体(-0.2mm: anterior, 3mm: lateral and 6mm: depth to bregma)に線条体出血群では0.24Uのコラゲナーゼ(type IV)を含む生理食塩水1.2μlを30gageのHamilton syringeにて注入し脳内出血モデルを作製した<sup>9,10)</sup>。

### 3. 試薬と実験期間

Sham(ICH+DW)群では蒸留水を、黒酢投与群では濃縮した黒酢エキスをそれぞれ100mg/kg, 300mg/kgの濃度で蒸留水に溶かし、出血モデル作製1週間前から経口投与器を用いて1日1回、それぞれの濃度を1mlずつ、毎日胃に直接投与した。運動があるときには運動後に投与した。投与期間は、それぞれ1ヶ月間とした。実験期間および手術日程、各検査値の測定日、運動実施期間、飲料投与日を図1に示す。

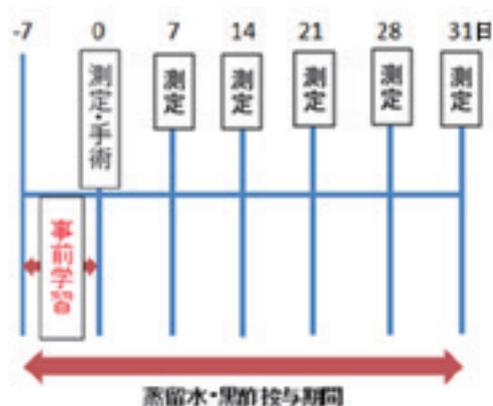


図1. 実験スケジュール

### 4. 行動試験

#### 4-1. ローターロッドトレッドミル試験

ローターロッドトレッドミル試験はラット専用ローターロッドトレッドミル装置(MK-670, 室町)を用い、脳内出血モデル作製1週間前から10rpmの速度で回転するローラー上を走らせ、200秒以上走行可能になるまで訓練を繰り返した。脳内出血モデル作製当日にローターロッドトレッドミル走行時間の測定を3回行い、その平均値を1と計算し、モデル作製後1ヶ月間まで1週間ごと走行時間の変化

を比較検討した。測定では、ラットが0～30rpmまで回転しているローラーから落下するまでの時間を最大300秒まで測定した。

#### 4-2. Open Field 試験

脳内出血による行動の変化を測定するために Open Field 試験を実施した。黒色のボックス (50×50×50cm) 内にラットを置き、自由に行動させ、3分間の行動変化をビデオカメラで記録した (図2)。その後、Image Jを用いて記録した3分間の映像のうち、30秒～2分30秒の2分間の行動変化を解析し、移動距離、平均移動速度を各群で比較検討した。

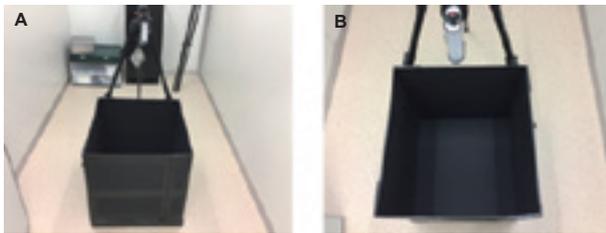


図2. Open Field 試験装置

Open Field 試験装置の全面 (A) と内部 (B)。50×50×50cm 黒色のボックスの上にビデオカメラを設置し、ラットの自由行動を3分間記録した。

#### 5. 酸化ストレス・抗酸化力測定

最終日の行動実験実施後、直ちに3種混合麻酔薬 (メデトミジン0.3mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+酒石酸ブトルファノール5mg/kg) を用いてラットを麻酔し、心臓から採血を行った。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、採血後72時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO (WISMERLL 社) を用いた。測定キットは、酸化ストレスの測定に d-ROMs テスト (正常範囲: 200から300U. CARR) (Diacron 社製)、抗酸化力の測定に BAP テスト (最適値: 2200 $\mu$ M/L 以上) (Diacron 社製) を使用した。d-ROMs テストでは、pH4.8の酢酸緩衝液キュベットを37 $^{\circ}$ Cまで加温し、保温したキュベットに血清20 $\mu$ lを入れた後、呈色液クロモゲン (N, N ジエチエルパラフェニレンジアミン) を20 $\mu$ l入れ混合し、光度計に入れて活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペ

ルオキシドの量を測定した。単位は U. CARR が用いられ、1 U. CARR = 0.08mgH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL になる。BAP テストは、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬入りのキュベットを37 $^{\circ}$ Cまで加温し、三価鉄塩を含む試薬を50 $\mu$ l滴下、混合し赤く呈色させ、光度計で三価鉄イオン濃度を測定後、三価鉄イオンが呈色している試薬に血清を10 $\mu$ l入れて混合すると血清中の抗酸化物質の作用で二価鉄イオンに還元され、脱色される。その色の変化を光度計で計測し、血清の還元力を評価した。

#### 6. 免疫染色法

心臓から採血後、全身血を Phosphate Buffered Saline (PBS) と交換する。その後、4% Paraformaldehyde (PFA) で固定して脳標本を作製し、パラフィン包埋法を用いて、線条体切片を作製した。Nissl 染色を用いて出血による線条体損傷部位を確認した。Nissl 染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりキシレンにてパラフィンを除去後、アルコールで再水和した。その後、クレシルバイオレットで30秒処理後、脱色のため70%エタノールで5秒間処理した。c-Fos と caspase-3染色は、標本からパラフィンを除去後、アルコールで再水和した。内因性ペルオキシダーゼを除去するために0.3%過酸化水素加メタノールで15分間処理した後、スチームクッカーを使用して抗原賦活化液 (pH8, Nichirei) で95 $^{\circ}$ C、40分間処理した。非特異反応を抑制するために2.5% normal goat serum (Vector Laboratories) にて20分間処理した。一次抗体はラット抗 c-Fos (1:100, SANTA CRUZ)、caspase-3 (1:100, Abcam) 抗体を用いて室温で60分間抗原抗体反応を行った。トリス緩衝生理食塩水 (Tris Buffered Saline: TBS) で洗浄した後、二次抗体 (ImmPress Reagent, Vector) を用いて、室温で30分間反応させた後、TBSで再洗浄した。ジアミノベンジジン (Diaminobenzidine: DAB, Dako 社) で発色させた後、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。

## 7. 線条体損傷部位, c-Fos, caspase-3陽性細胞の測定

Cell Sens Dimension (Ver1.7, OLYMPUS) を用いて出血による線条体損傷部位の面積を測定した。損傷部位は『出血による病巣の大きさ/線条体サイズ×100』<sup>8)</sup>にて算出した。c-Fos, caspase-3陽性細胞の測定はLeeら<sup>11)</sup>の方法に準じて測定した。Cell Sens Dimension を用いて200倍の写真を4ヶ所ランダム化して撮影し、250 $\mu$ m×250 $\mu$ m内にある陽性細胞をカウントすることで計測を行った。

## 8. 統計解析

体重, ローターロッドトレッドミル試験, open Field 試験のデータは平均±標準偏差 (S.D.), 脳損傷部位, c-Fos 陽性細胞, caspase-3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

黒酢投与が体重変化に及ぼす影響について検討した。図3は黒酢又は蒸留水投与前を0日とした1週間ごとの体重の推移を示す。脳内出血を起こした後の一週間は体重の増加がみられなかったが, その後徐々に体重の増加を示し, 最終測定日には各群100g程度の増加がみられた。1ヶ月後の体重に関しては各群で若干の体重増加がみられたが, 有意差はなかった。

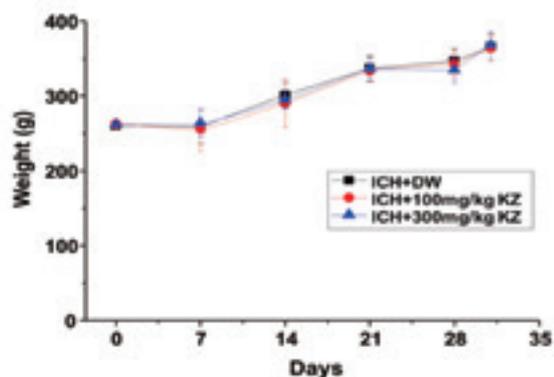


図3. 体重の変化

ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean  $\pm$  SD; n = 6~7

### 2. 黒酢投与が脳出血ラットの運動能力と運動量変化に及ぼす影響

黒酢投与が線条体出血により起こる運動能力と運動量の低下に及ぼす影響を検討するため, ローターロッドトレッドミル試験と open Field 試験を行った。図4は脳内出血モデル作製前の走行時間を1とし, 出血モデル作製1ヶ月間まで, 1週間ごとの走行時間の変化を示す。脳内出血の翌日では各群ともに, 術前の運動能力の90%程度の低下がみられたが, 群間有意差は見られなかった。その後, 運動能力は徐々に回復し, 1ヶ月後では蒸留水投与群で50%程度, 300mg/kg 黒酢投与群では70%程度まで改善されたが有意差はなかった。

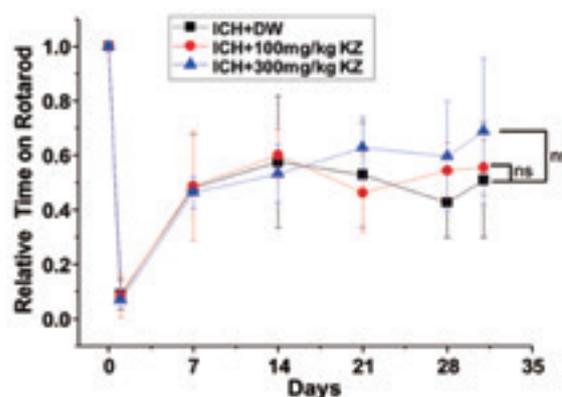


図4. ローターロッドトレッドミル試験

ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean  $\pm$  SD; n = 6~7; ns, no significant

図5はラットの総移動距離と平均移動スピード(運動量)の変化を示す。総移動距離と平均移動スピードにおいて, 脳内出血1日後70~80%まで運動量の低下がみられたが, 群間有意差はなかった。最終測定日の行動距離では, 蒸留水投与群に比べ黒酢投与群で若干の改善がみられたものの有意差はなかったが, 平均移動スピードでは300mg/kg 黒酢投与群でより有意な移動スピードの向上が認められた。

### 3. 黒酢投与が脳出血範囲に及ぼす影響

黒酢投与群は蒸留水投与群と比較して運動能力が改善傾向にあったため, 運動能力の改善傾向と中枢神経系の関係を検討する目的で, 最終日の行動実験実施後, 脳を摘出し, 免疫染色を施行した。まず, 出血による損傷範囲を確認するために Nissl 染色を実施した。コラーゲナーゼ注入後蒸留水を投与した

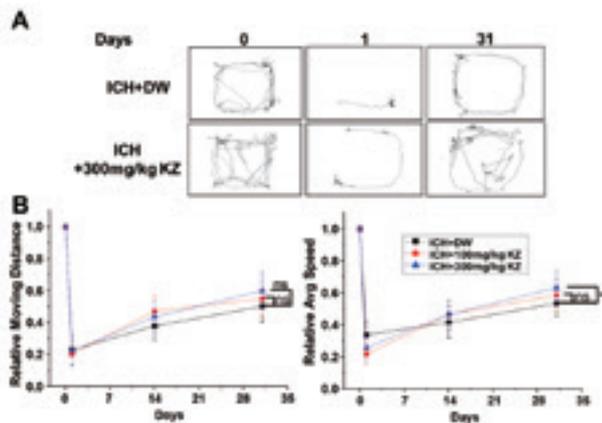


図5. 黒酢投与が脳出血ラットの運動量に及ぼす影響

A, 行動軌跡。B, 移動距離。C, 平均移動速度。ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean ± SD; n = 6~7; \*, P<0.05; ns, no significant

群では線条体の59.1 ± 8.2%の損傷が確認されたが, 300mg/kg 黒酢を投与した群では48.8 ± 5.2%で蒸留水投与群と比較し有意な損傷範囲の縮小が認められた (図6)。

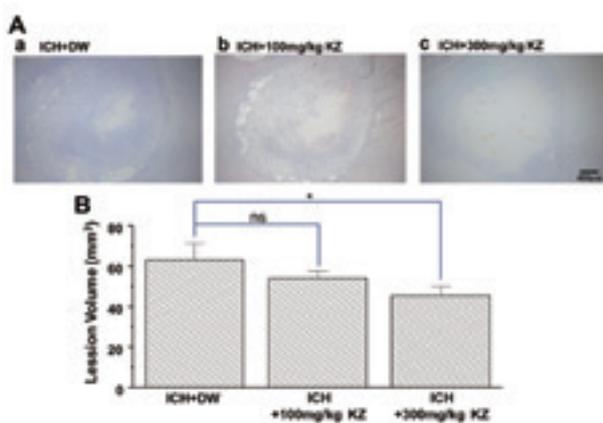


図6. 線条体出血範囲に対する黒酢の効果

A, 線条体内の出血損傷範囲。B, 平均出血範囲。ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean ± SE; n = 6~7; \*, P<0.05; ns, no significant

#### 4. 黒酢投与が細胞死に与える影響

c-Fos は様々な外的刺激により急速かつ一過的に誘導されることから, 神経細胞の反応のマーカーとしてよく使われている。一方, c-myc (max) や Bax と共にアポトーシス関連因子として知られている。また, cysteine-aspartic acid specific protease-3 (Caspase-3) の活性化はアポトーシスの重要な過程の1つであり, caspase-3はアポトーシスの早期に

関連する最も重要なプロテアーゼである。本実験では黒酢投与が線条体出血損傷部位での細胞死に与える影響について c-Fos と caspase-3を用いて検討した。c-Fos においては蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で c-Fos 陽性細胞の有意な減少が見られた (図7)。また, caspase-3においても蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で caspase-3陽性細胞発現の有意な抑制が認められた (図8)。

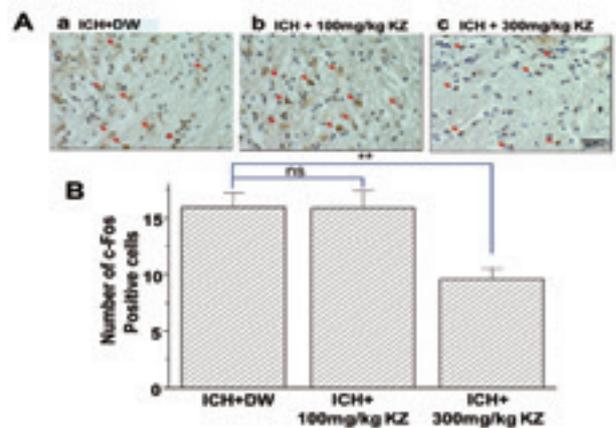


図7. 黒酢投与が c-Fos 陽性細胞発現に及ぼす影響

A, 線条体出血部位での c-Fos 陽性細胞発現。B, 平均 c-Fos 陽性発現量。Red arrows indicates the c-Fos positive cells. ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean ± SE; n = 6~7; \*\*, P<0.01; ns, no significant

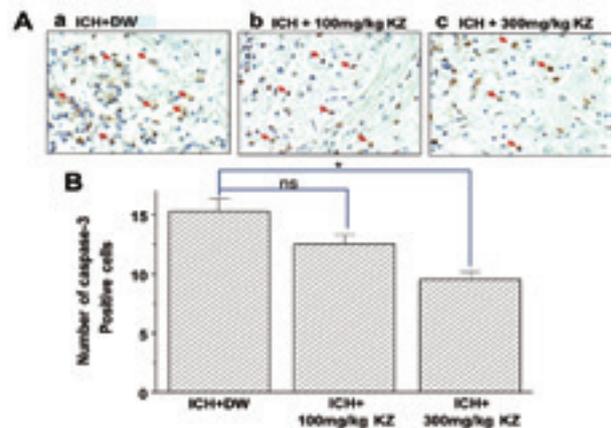


図8. 黒酢投与が caspase-3陽性細胞発現に及ぼす影響

A, 線条体出血部位での caspase-3陽性細胞発現。B, 平均 caspase-3陽性発現量。Red arrows indicates the caspase-3 positive cells. ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean ± SE; n = 6~7; \*, P<0.05; ns, no significant

## 5. 酸化ストレス, 抗酸化力測定

酢にはもともと抗酸化作用があると報告されており, 黒酢は特に抗酸化作用が強く, 効果も高いと報告されている<sup>12)</sup>。従って, 黒酢と酸化ストレスと抗酸化力の関係を検討するために, 血清を用いて酸化ストレスと抗酸化力を測定した。図9は酸化ストレスと抗酸化力の結果を示す。酸化ストレスにおいては蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で酸化ストレスの有意な抑制が見られた(図9 A)。また, 抗酸化力においては蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で抗酸化力の有意な増強が認められた(図9 B)。これらの結果から酸化ストレス度を算出した結果が図9 Cである。BAP/d-ROMs  $\leq 12.5$ の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度の計算結果, 蒸留水投与群に対し黒酢投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

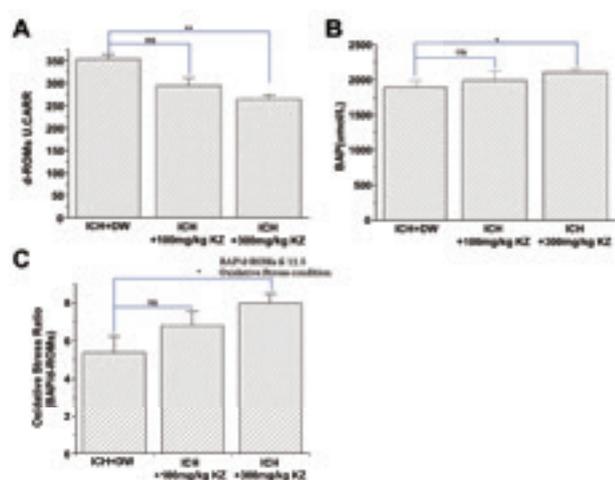


図9. 黒酢投与が酸化ストレスと抗酸化力に及ぼす影響

A, 酸化ストレス。B, 抗酸化力。C, 酸化ストレス度。

ICH, Hemorrhage; DW, 蒸留水; KZ, 黒酢; Mean  $\pm$  SE; n = 6~7; \*, P<0.05; ns, no significant

## IV. 考察

本研究では, 黒酢の投与が線条体出血後の運動パフォーマンス低下と神経損傷部位に及ぼす影響について検討した。その結果, ローターロッドトレッドミル試験と open Field 試験を用いた運動能力に対する検討では, 300mg/kg 黒酢投与群で線条体出血後の運動能力低下に対し蒸留水投与群より改善傾向

がみられた。片山らによると, 黒酢には脳内疲労物質等の発現量を減少させる機能があり, 運動パフォーマンスの上昇に影響を与えると報告されている<sup>8)</sup>。また, 伊藤らは, アミノ酸が脳卒中後の回復に有益な栄養素であり, 全身への酸素供給サポート, 脳卒中後や疲れた脳の回復にも働くと報告している<sup>6)</sup>。これらの報告から, タンパク質を構成するアミノ酸等が多く含まれている黒酢の摂取により, 脳卒中後の回復や疲れた脳の回復に働き, 運動パフォーマンスの改善に影響を与えた可能性が考えられる。

本研究では脳出血により発生する細胞死(アポトーシス)に対する黒酢の効果を脳出血損傷範囲, c-Fos と caspase-3で検討した。その結果, 蒸留水投与群に対し300mg/kg 黒酢投与群で有意な線条体出血後における損傷範囲の縮小, c-Fos と caspase-3陽性細胞の減少が確認された。Yang らは, 線条体出血モデルラットに対する鍼治療において, 線条体中の c-Fos 増加抑制と caspase-3の発現抑制が中枢神経の損傷部位に対する回復を助けることができると報告をしている<sup>10)</sup>。Lee らは線条体出血モデルラットへのトレッドミルランニング訓練を行うことによって損傷範囲の縮小と caspase-3の有意な減少がみられ, アポトーシスが抑制されたことで損傷範囲の縮小につながったと報告している<sup>11)</sup>。c-Fos は様々な外的刺激に急速かつ一過的に誘導されることから神経反応のマーカーとしてよく使われている。様々な転写因子をコードしており, 神経反応を反映した細胞の分化, 増殖, 新生に重要な役割を担っている一方で, c-myc (max), Rax とともにアポトーシス関連因子として知られている。福井らによると, 細胞内シグナリング-核内プロセス変調(c-Fos発現)がアポトーシスを招来すると報告している<sup>9)</sup>。また, caspase-3は caspase 以外の多くのタンパク質を分解し, アポトーシスの実行へと導く最も重要なプロテアーゼである<sup>13)</sup>。脳出血で細胞がダメージを受けることによって, 細胞内にあるミトコンドリアが機能不全に陥る。それに起因して発生する酸化ストレスで中枢神経に常在するミクログリアの活動による炎症反応が起こり, 神経損傷が起こる。アポトーシスは, 神経損傷などによって, TNF $\alpha$ R, Fas, DR3, DR4などの細胞死受容体が活性化されることで誘導される。その細胞死受容体とアポトーシスをつなぐ役割を caspase-3が担っている。黒酢

に含まれている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いる<sup>14)</sup>。酢にはもともと抗酸化作用があると報告されているが、黒酢は特に抗酸化作用が強く、効果も高いとされている<sup>12)</sup>。これらの結果より、黒酢の摂取は抗酸化力の増加を引き起こし酸化ストレスの抑制することで、脳出血損傷部位の細胞死因子 (c-Fos, caspase-3) の発現を減少させ、細胞死を抑制させた可能性が示唆された。そして、この細胞死の抑制は脳出血損傷範囲の縮小を引き起こし、運動パフォーマンスの改善など運動機能低下からの回復も促進させる可能性が示唆された。

Tongらは、黒酢がエネルギー代謝を促進し、脂肪細胞のサイズを抑制することを報告しているため<sup>15)</sup>、本研究では黒酢投与群は蒸留水投与群と比べ体重の減少を期待したが、有意な体重減少は見られなかった。その理由としては、本実験では高脂肪食を使用しなかったことと飲食物の管理等を行っていないこともあり、著しい結果が出なかったと考えられる。また、本研究では、運動パフォーマンス低下において若干の向上しか見られなかった。今回一般的に脳卒中後の回復が顕著にみられる1ヶ月という期間で実験を行ったが、コントロール群と比較して黒酢投与群の脳出血範囲の有意な縮小がみられたことから、この期間を神経機能回復の見込みのある3ヶ月に延長させることで、また別の結果を得られる可能性があるのではないかと考える。以上のことから、黒酢の摂取は脳卒中の回復に脳出血範囲の縮小を通して神経学的回復に働き、運動パフォーマンスの改善に効果を期待できる可能性が示唆された。

## V. 結語

本研究の結果、黒酢の摂取は酸化ストレスの抑制と抗酸化力の増強を引き起こし、脳出血損傷部位の細胞死因子の発現を減少させることで、細胞死を抑制させた可能性が示唆された。この細胞死の抑制は脳出血損傷範囲の縮小を引き起こし、運動パフォーマンスの改善、運動機能低下からの回復も促進させる可能性が示唆された。今後は、実験期間を神経学的回復の起こす見込みのある3か月に設定して検討を行うことと、臨床での効果検討、また、予防効果等の検討も必要であると考えられる。

## 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。

## 利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

## VI. 引用文献

- 1) 原行弘：脳卒中最前線－急性期の診断からリハビリテーションまで－. 福井 暁彦, 藤田 勉, 宮坂 元磨 編集. 脳卒中片麻痺は回復するのか. 医歯薬出版株式会社, pp91-96, 2013.
- 2) 深町翔平, 申 敏哲, 行平 崇：上肢末梢神経電気刺激が脳内出血モデルラットの損傷部位に与える影響. 理学療法学 Supplement, 42 Suppl, No.2, 2015.
- 3) Teasell R, Foley N, Salter K, et al: Evidence-Based Review of Stroke Rehabilitation: executive summary, 12th edition. Stroke Rehabil, 16(6):463-488, 2009.
- 4) Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, et al: Free gamma-aminobutyric acid in brain. J Biol Chem, 187(1):35-39, 1950.
- 5) 川原正博, 水野 大：微量元素と神経疾患：疾患関連タンパク質と金属とのシナプス間隙における相互作用. Biomedical Research on Trace Elements, 26(1):10-22, 2015.
- 6) 伊藤彰博, 東口高志, 梶谷伸顕, 他：身体機能回復に対するNST活動の有用性. 静脈経腸栄養, 21(2):19-24, 2006.
- 7) 濱館直史, 瀬戸加代子, 矢澤一良：黒酢含有食品の体脂肪及びエネルギー代謝へおよぼす影響. 日本補完代替医療学会誌, 11(1):67-74, 2014.
- 8) 片山光一, 山鹿健司：黒酢投与がラットに疲労と運動パフォーマンスに及ぼす影響. 平成27年度熊本保健科学大学リハビリテーション学科卒業研究論文集, 6:73-76, 2016.
- 9) 福井偉功人：ラット坐骨神経絞扼後の痛覚過敏と脊髄細胞のアポトーシス発現. 九州歯学会誌, 53(1):261-268, 1999.

- 10) Yang YJ, Kim YS, Shin MS, et al : Effects of acupuncture on the intrastriatal hemorrhage-induced caspase3 expression and newly cell birth in rats. *Neurol Res*, 29:65-71, 2007.
- 11) Lee HH, Kim H, Lee MH, et al: Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats. *Neurosci Lett*, 352:33-36, 2003.
- 12) 静間 徹, 石渡一夫, 田中千陽, 他 : 黒酢によるデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎の軽減効果. *外科と代謝・栄養*, 47(1):1-7, 2013.
- 13) Degterev A, Boyce M, Yuan J: A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53):8543-8567, 2013.
- 14) 加藤博通, 石川久隆, 樫尾 一, 他 : メラノイジンの酸化分解および還元生成物の抗酸化性について. *日本農芸化学会誌*, 49(3):179-183, 1975.
- 15) Tong LT, Katakura Y, Kawamura S, et al: Effects of Kurozu concentrated liquid on adipocyte size in rats. *Lipids Health Dis*, 9:134. (平成30年12月7日受理)

## Effect of *Kurozu* on intrastriatal hemorrhage-induced brain damage in rats

Min-Chul SHIN, Touma NISHIYAMA, Tomoki HARANO, Tetsuko TANAKA,  
Takayuki FUKUNAGA, Takashi YUKIHIRA, Atsushi DOI

### Abstract

Intracerebral hemorrhage (ICH) is an important public health problem leading to high rates of death and disability in adults. It has been reported that black vinegar (*Kurozu*) can confer benefits such as improvement of exercise performance, promotion of neurogenesis, and protection of cells. However, the effects of *Kurozu* on ICH-induced motor performance decline and nerve injury have not been clarified. In the present study, the effect of *Kurozu* on ICH-induced motor performance decline and neuronal cell death in rats was investigated via behavioral tests, Nissl staining, and immunohistochemistry for c-Fos and caspase-3. The results indicated that *Kurozu* intake improved motor performance decline compared with the distilled water (DW) administered group, but there was no significant difference. However, the size of the ICH-induced nerve injury lesion and apoptotic neuronal cell death in the striatum were significantly suppressed by *Kurozu* intake. *Kurozu* intake also significantly inhibited the oxidative stress and increased the antioxidant levels when compared to the DW administered group. These results suggest that *Kurozu* may inhibit apoptotic cell death by decreasing the expression of c-Fos and caspase-3 in ICH-induced nerve injury areas by suppressing the oxidative stress and increasing the antioxidant level. In addition, inhibition of apoptosis is thought to be due to a reduction of intracerebral hemorrhage, which may have brought about the recovery of motor function, including improvement of exercise performance.

Keywords: *Kurozu*, black vinegar, rat, intracerebral hemorrhage, motor function