

博士論文

食品成分の新規機能性解析研究

ーオルニチンの抗疲労効果、ブナハリタケの Nrf2 活性化作用ー

小久保 健

目次

<序論>	3
<第1章 オルニチンの抗疲労効果の検討>	9
第1節 オルニチン投与後の血中アミノ酸動態の評価	10
1. 要約	10
2. 序論	11
3. 実験方法	12
4. 結果	14
5. 考察	26
第2節 オルニチンの mTOR 活性化作用	30
1. 要約	30
2. 序論	31
3. 実験方法	33
4. 結果	35
5. 考察	44
第3節 オルニチンのアルコール性疲労の改善作用	46
1. 要約	46
2. 序論	47
3. 実験方法	49
4. 結果	52
5. 考察	55
第4節 オルニチンの睡眠の体感およびストレスの改善作用	58
1. 要約	58
2. 序論	59
3. 実験方法	61
4. 結果	63
5. 考察	68
<第2章 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用の検討>	71
第1節 PhaseII 酵素誘導活性を有するキノコの探索	72
1. 要約	72
2. 序論	73
3. 実験方法	75

4. 結果	76
5. 考察	78
第2節 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用	79
1. 要約	79
2. 序論	80
3. 実験方法	81
4. 結果	84
5. 考察	89
第3節 ブナハリタケ中 Nrf2 活性成分の分離同定	91
1. 要約	91
2. 序論	92
3. 実験方法	93
4. 結果	94
5. 考察	98
<第3章 総括>	99
<発表論文リスト>	103
<引用文献>	105
<謝辞>	119
<要旨>	120

<序論>

食品には一次機能である栄養機能や二次機能である情緒的機能に加えて、三次機能として生理機能が知られている。近年、数多くの食品含有成分の機能性が報告され、健康機能性食品として世の中で利用されている。

2015年4月より、日本にて食品の機能性表示食品制度が新たに施行された。それまで食品に機能性を表示するためには、国による審査を経た上で保健機能の表示ができる特定保健用食品制度、もしくは栄養成分の機能性の表示ができる栄養機能性食品制度が存在していたが、新たに機能性表示食品制度が加わる事で、食品の有する三次機能に対する関心や注目が今後より一層高まると考えられる。本制度では、商品を販売する事業者の責任において、「どのような科学的根拠に基づいて」、「どのような人が」、「どのように摂取すると」、「どのような機能性があるのか」を明らかにする必要がある。よって、食品の機能性についての産業上の利用の観点から、メカニズムの解明、有効成分の同定、ヒトでの有効性の評価の一貫した研究が今後益々重要になると考えられる。また、一般消費者の機能性を有する食品に対するエビデンスへの要求や科学的な知識も高まっていくと考えられる。

本研究では、数多くの食品素材の中から、遊離アミノ酸のオルニチン及び食用キノコのブナハリタケに注目した。オルニチンには肝機能改善作用、ブナハリタケには血圧抑制作用を中心にこれまでに多くの機能性が知られており、既に産業的に利用がなされている。本研究ではオルニチン及びブナハリタケのこれまで知られていない新たな機能性として、オルニチンの抗疲労効果及びブナハリタケの NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 活性化作用に注目し、それぞれ詳細な検討を行った。

1. オルニチン

オルニチン ($C_5H_{12}N_2O_2$, CAS No.:70-26-8, MW: 132.16, Fig. 1) は、非タンパク質性の遊離アミノ酸の一種である。生体内では、グルタミン酸からピロリン-5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ (P5CDH) およびオルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT) により代謝される反応、もしくはアルギニンからアルギナーゼにより代謝される反応、によって合成される。

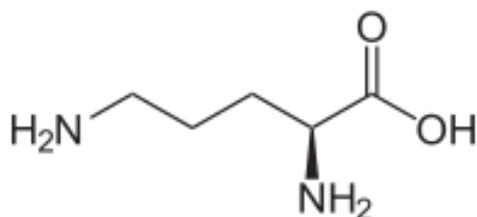


Fig. 1 Structural formula of ornithine.

オルニチンは食品中にはシジミ、キハダマグロ、チーズ、ヒラメなどに多く含まれるが、特にシジミには他の食品と比較してオルニチン含量が高く、100 g (約 35 粒) あたり 15 mg 程度、エキス 100 g あたりで 160 mg 程度、含まれている [1, 2]。一方で、他の遊離アミノ酸と比べると相対的に食品に含まれるオルニチンの量は少ない。「お酒を飲んだ後にはシジミ汁」と言われるように、シジミは肝臓によい食品として広く知られている。また、中国の明の時代に書かれた代表的な本草学研究書 本草綱目に、「シジミは酒毒、黄道を解し、目を明らかにし、小便を利し、脚気、熱気、湿毒を下す」とあるように、古来よりその機能性が注目され利用されてきた。これらのシジミの伝承的な効果の一部はオルニチンに由来するものと推察されている。

オルニチンはタンパク質を構成するアミノ酸ではないが、尿素回路を構成するアミノ酸の一種であり、生体内で重要な役割を担っている (Fig. 2)。尿素回路とは、主に肝臓においてアンモニアを尿素へと代謝する反応であり、ヒトをはじめとした脊椎動物において、窒素代謝における中心的な働きをする代謝経路である [3]。アンモニアはアミノ酸や核酸の代謝、さらに腸内細菌によって恒常的に発生しているが、生体にとっては非常に有毒な物質である [4]。アンモニアを尿素へと代謝し無毒化する尿素回路は、魚類、両生類、哺乳類という進化の過程において、両生類の時代に獲得したもので、哺乳類もこの性質を継承している。哺乳類では、有毒なアンモニアを尿素回路によって尿素へと代謝し、代謝された尿素は尿として体外に排泄される。

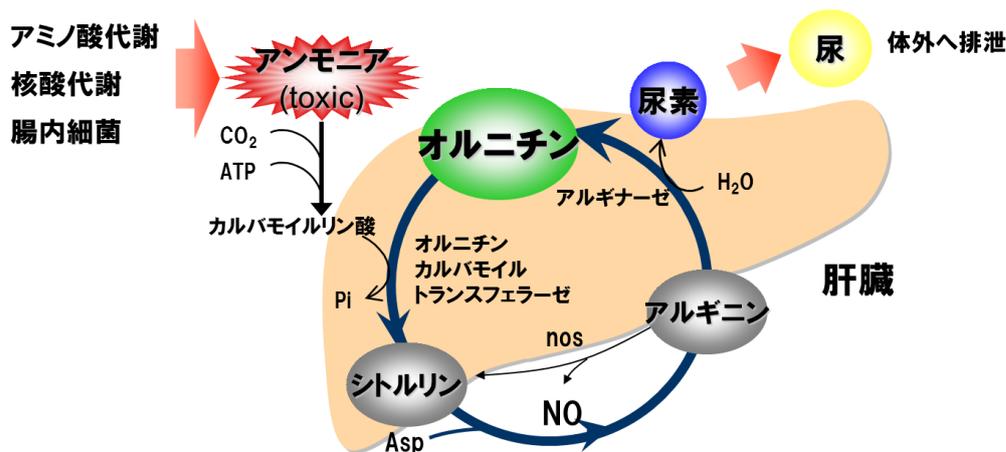


Fig. 2 The reactions of the urea cycle.

オルニチンは尿素回路の構成アミノ酸であるのみならず、オルニチンを摂取することにより、尿素回路が活性化され、アンモニアの解毒が亢進することがこれまでに報告されている[5]。さらに、肝性脳症改善、成長ホルモン分泌促進、免疫賦活、疲労軽減、などの多くの生理作用がある事がこれまでに報告されている[6-11]。これらのオルニチンの作用の中で、最も代表的な作用が肝性脳症の改善作用である。肝性脳症は、臨床的には主に肝不全の重篤な合併症状として生じ、認知機能障害、意識障害、昏睡などの症状が生じる[12]。肝性脳症の原因としては、肝臓の機能障害による尿素回路の低下により、血中アンモニア濃度が上昇し、その結果脳内のアンモニア濃度が上昇することによるとされている。その結果、アンモニアの直接的な神経毒性および脳内アンモニア代謝産物のグルタミン過剰蓄積によるアストロサイトの腫大を引き起こし、症状が引き起こされる[13]。肝性脳症の患者に対してオルニチンを経口もしくは血中投与することで、肝臓の尿素回路の亢進を介して血中アンモニア濃度が低下し、症状が緩和することが報告されている[12, 14-16]。

血中アンモニア濃度の上昇は、肝性脳症以外にも疲労を惹起する因子の一つとしても知られている[4, 17-19]。また、肝障害患者では疲労感が強い事が知られているが、オルニチンの摂取により、疲労感や睡眠の質などの疲労に関連する諸症状が改善することが報告されている[11]。さらに、健常人においても激しい運動時などに血中アンモニア濃度が上昇するが、オルニチンの摂取により運動後の肉体疲労が軽減することが報告されている[10]。

オルニチンの産業上の利用として、欧州ではオルニチンアスパラギン酸塩の形態で、

肝硬変に対する医薬品として 20 年程の使用実績がある。また、米国ではアスリート向けの筋肉増強用途のサプリメントとして主に利用されている。日本では、食薬区分上医薬品に分類され、栄養剤等として少量ながら利用されていたが、2002 年の食薬区分改正により、食品としての利用が可能となった比較的新しい食品素材である。現在、サプリメントを始めとした健康機能性食品としての利用が進んでいる[20]。

オルニチンの安全性については、変異原性試験の一種である微生物を用いた Ames 試験および哺乳類細胞を用いた小核試験において陰性が確認されている（協和発酵バイオ社実施未公表データ）。また、ラットに経口投与した際の半数致死量は、10000 mg/kg 以上である[21]。ヒトにオルニチン 2400 mg を 8 週間摂取させた安全性評価試験において、被験者に重篤な副作用が認められなかった（キリンホールディングス社実施未公表データ）。加えて、海外を含む長年の医薬品等での使用経験から、安全性に特段の問題はないと考えられる。

本研究では、オルニチンの抗疲労を中心とした新たな機能を探索する事を目的として、動物を用いてオルニチンの血中アミノ酸動態の評価、及び mTOR シグナル活性化作用の評価を行った。また、ヒトへオルニチンを単回摂取させた際のアルコール性疲労改善作用の評価、及び長期摂取させた際の睡眠の体感やストレスの改善作用の評価を行った。

2. ブナハリタケ

ブナハリタケ (*Mycoleptodonoides aitchisonii*) とは、エゾハリタケ科に属するキノコで、別名カミハリタケとも呼ばれる (Fig. 3)。初秋から晩秋にかけてブナやカエデの倒木や切り株に発生し、日本では東北地方を中心に食されているが、野生のブナハリタケは近年減少していることから、幻のキノコとも言われている[22]。

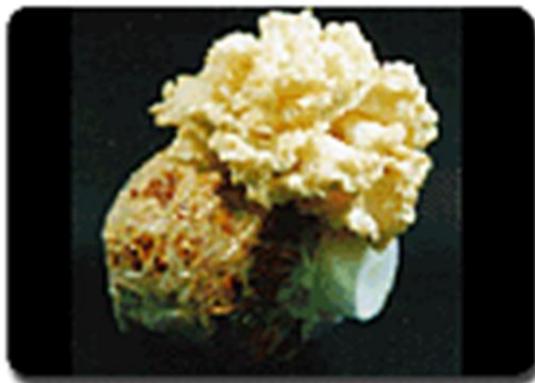


Fig. 3 Photographic imagery of *M. aitchisonii*.

近年、ビール粕を菌床に用いた人工栽培方法が確立され、工業的な生産が可能となった[23]。ブナハリタケにはこれまでに動物実験レベルで、炎症抑制効果、神経成長因子の合成促進効果、抗肥満効果が生理機能として報告されている[24-26]。さらに、ブナハリタケに含まれるジペプチドである Ile-Tyr が、アンジオテンシン変換酵素阻害を介して血圧抑制作用を有することが知られており、血圧が高めの方を対象としたヒトでの摂取試験において効果が確認されている[23, 27, 28]。ブナハリタケの血圧抑制作用を活用した特定保健用食品が 2003 年に表示許可され、商品が上市されていた（現在は商業的理由により販売終了）。

ブナハリタケの安全性については、変異原性試験の一種である哺乳類細胞を用いた小核試験において陰性が確認されている（キリンビール社実施未公表データ）。またラットに経口投与した際の致死量は 10555 mg/kg 以上、無毒性量は 84 mg/kg/day 以上と推定されている（キリンビール社実施未公表データ）。さらに、ヒトへの 4 週間の過剰量摂取試験及び 12 週間の長期摂取試験において顕著な副作用は認められなかった[29]。加えて長年のブナハリタケの食材としての食経験からも、安全性に特段の問題はないと考えられる。

本研究では、ブナハリタケの新たな機能性として Nrf2 活性化作用に着目しその評価を行った。まず、43 種類のキノコより Nrf2 活性化により誘導される PhaseII 酵素の一種である NQO1 の活性を指標にスクリーニングを行い、ブナハリタケの活性の強さを評価した。また、培養細胞へ過酸化水素で誘導した酸化ストレスへのブナハリタケの耐性能を評価した。さらに、ブナハリタケの PhaseII 酵素誘導活性が、*in vivo*においても認められるかを、マウスへの経口投与により評価した。次に、ARE レポーターアッセイおよび Nrf2 ノックアウトマウスを用いた実験を行い、ブナハリタケの効果が Nrf2 の活性化を介する可能性について評価した。更に、ブナハリタケに含まれる活性成分の探索を行った。

<第1章 オルニチンの抗疲労 効果の検討>

第1節オルニチン投与後の血中アミノ酸動態の評価

1. 要約

本節では、オルニチン代謝の基礎的なデータを取得することを目的に、マウスへのオルニチン投与が臓器のアミノ酸代謝にどのような影響を与えるのか、さらにアミノ酸代謝に関連する糖代謝や脂質代謝にどのような影響を与えるのかを、血液、筋肉、肝臓に着目して評価した。オルニチンもしくは生理食塩水を12時間絶食させたマウスに経口投与し、血液、筋肉、肝臓を経時的に回収して、遊離アミノ酸濃度及び糖・脂質関連指標を測定した。

その結果、オルニチンは投与後に体内に吸収され、血液中を循環した後に筋肉や肝臓に取り込まれることが確認された。オルニチン以外に、血液中および筋肉中におけるアラニンやグルタミン濃度の上昇が同様に認められた。これは、オルニチンが筋肉で代謝され血液中に放出されたことによるものと考えられた。

オルニチン投与により血液中グルコースおよびインスリン濃度の上昇が認められたことから、肝臓でのグルコース-アラニン回路が促進し、糖新生が亢進していることが示唆された。また、オルニチン投与により、血液中の非エステル化脂肪酸およびケトン体が減少したことから、脂質代謝が低減していることが考えられた。

以上より、オルニチンはグルコース-アラニン回路によるエネルギー代謝を促進し、脂質のエネルギー産生への利用を抑制する作用を有することが示唆された。

2. 序論

オルニチンは尿素回路を構成するアミノ酸の一種であり、生体にとって有害なアンモニアを解毒する上で非常に重要な働きをしている。オルニチンを摂取することにより、尿素回路が活性化され、アンモニア代謝が促進することが知られている。また、その他の生理機能として肝性脳症改善、成長ホルモン分泌促進、免疫賦活、運動後の肉体疲労軽減などの多くの作用がこれまでに報告されている。

オルニチンの摂取は我々の健康にとってさまざまな効果を有し、古くから利用されているが、効果を発揮するメカニズムは完全には解明されていない。特に、オルニチン投与による血中指標の変動などの基礎的な知見は少ない。そこで、本実験ではオルニチンの新たな機能性を評価するための予備段階として、オルニチン代謝の基礎的なデータを取得することを目的に、マウスへのオルニチン投与後のアミノ酸、グルコース、脂質代謝における影響を血中、肝臓、筋肉に着目して評価した。

3. 実験方法

1) 動物

C57BL/6J 雄性マウス (CLEA Japan) を導入し 1 週間以上馴化を行った。飼育は 12 時間の明暗サイクル (明期: 午前 8 時-午後 8 時)、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30-70% で管理した飼育室で行い、飼料は AIN-93G (CLEA Japan) を与えた。馴化後、体重を基に各群 9 匹の 7 群に群分けし、12 時間の絶食を行った後に試験に用いた。実験は、キリンホールディングス動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った。

2) 試験プロトコル

オルニチン塩酸塩 (協和発酵バイオ) 2 g/kg 、又はコントロール群として生理食塩水をマウスに経口投与し、投与 60, 180, 360 分後に屠殺した。さらに、投与 0 分後として、サンプル投与を行わずに屠殺した。屠殺は、ジエチルエーテル麻酔下で行い、眼窩より採血を行った後に、生理食塩水で灌流して脱血、その後肝臓および腓腹筋を回収し測定に用いた。回収した血液は $1,000 \text{ g} \times 15 \text{ 分}$ 、 4°C で遠心分離し、血漿を回収して測定に用いた。

3) アミノ酸測定

血液中アミノ酸濃度の測定は、以下の方法で行った。血漿に 10% 過塩素酸を等量加え 15 分間氷上で静置してタンパク質変性を行った。その後 $15,000 \text{ g} \times 10 \text{ 分}$ 、 4°C で遠心分離し、上清を回収して血漿アミノ酸分析サンプルとした。サンプルを、Milli-Q 水で 10 倍希釈した後、AccQ-Tag システム (日本 Waters) を用いてアミノ酸測定を行った (分析装置: Acquity UPLC System、カラム: AccQ-Tag Ultra Column $3.9 \times 150 \text{ mm}$)。

肝臓および筋肉中アミノ酸濃度の分析は以下の方法で行った。臓器サンプル約 100 mg に 10 倍量の 5% 過塩素酸を加え、マルチビーズショッカー (安井機械) でホモジェナイズした後、 $15,000 \text{ g} \times 10 \text{ 分}$ 、 4°C で遠心分離し、上清を回収して臓器アミノ酸分析サンプルとした。サンプルを血漿アミノ酸分析と同様に AccQ-Tag システムを用いて分析した。ただし、腓腹筋中のグルタミン酸濃度はカルノシンのピークと重なり適切に測定することが困難であったため、Mass Trak Column $2.1 \times 150 \text{ mm}$ (日本 Waters) を用いて別途測定を行った。

4) 血液中生化学指標測定

血漿グルコース、中性脂肪 (TG)、非エステル化脂肪酸 (NEFA) は、それぞれ Glucose C-Test Wako、Triglyceride E-Test Wako、NEFA C-Test Wako (いずれも和光純薬) を用いて測定した。尿素窒素 (BUN)、ケトン体 (3-HB) は、それぞれ QuantiChrom Urea Assay Kit、EnzyChrom Ketone Body Assay Kit (いずれも BioAssay Systems) を用いて測定した。インスリンは Mouse Insulin ELISA Kit (森永生科学研究所) を用いて測定した。

5) 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で示し、オルニチン投与群とコントロール群間の 2 群の比較は Student's *t* test で行った。P 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 結果

1) オルニチン濃度

オルニチンのマウスへの経口投与により、血液、肝臓、筋肉中オルニチン濃度がどのように変化するかを評価した。結果、血液、肝臓、筋肉中オルニチン濃度はいずれもオルニチン投与後速やかに上昇が認められた (Fig. 1-1-1)。また、血液中オルニチン濃度は投与 1 時間後にピークが認められたのに対し、肝臓、筋肉中オルニチン濃度は投与 3 時間後にピークが認められた。このことから、オルニチンは投与後速やかに小腸から門脈へと吸収され、血液を介して体内を循環することが示唆された。血液中オルニチン濃度の上昇はその後速やかに減少したこと、および肝臓や筋肉中のオルニチン濃度は、血液中よりも遅れて濃度ピークを迎えたことから、吸収されたオルニチンは肝臓や筋肉などに取り込まれ、各臓器で代謝されたと考えられた。

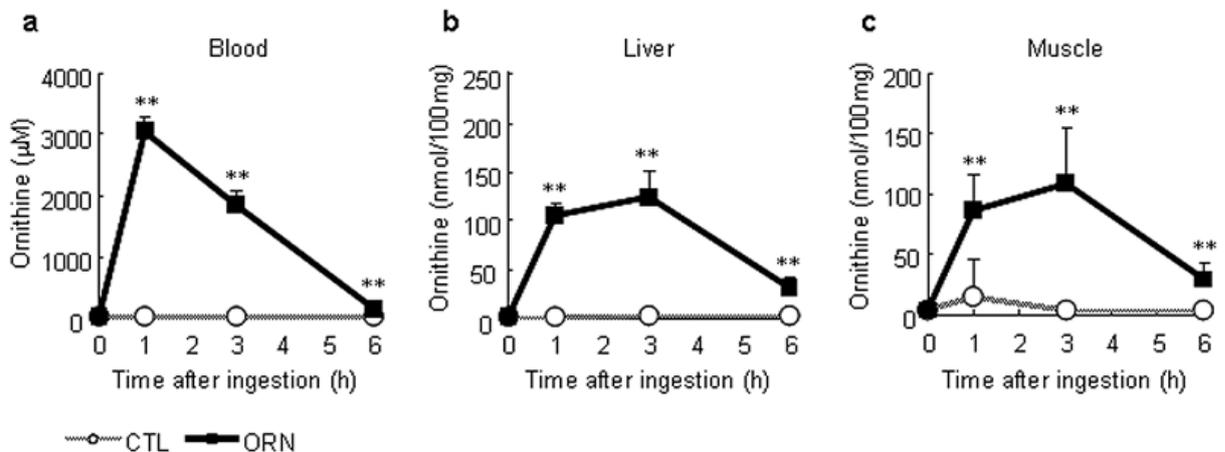


Fig. 1-1-1 Effect of ornithine ingestion on ornithine concentrations in blood (a), liver (b) and muscle (c). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL.

2) アラニン、グルタミン濃度

アラニンおよびグルタミン濃度は、血液および筋肉中で上昇が認められ、変動パターンは両者で類似していた。一方で、肝臓では変動は認められなかった (Fig. 1-1-2)。アラニンおよびグルタミンは、筋肉中で合成され、血中へ放出されることが知られている事から、本実験で認められた血液中濃度の上昇は、主に筋肉で合成されたものに由来していると考えられた。

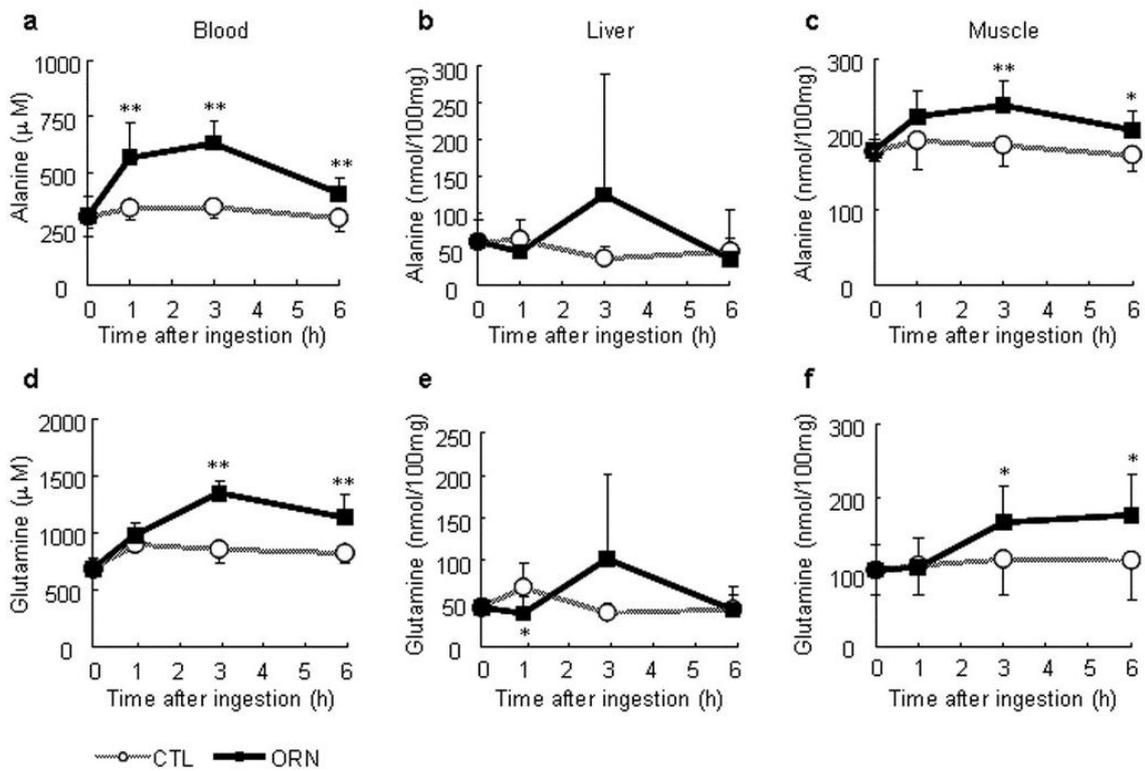


Fig. 1-1-2 Effect of ornithine ingestion on alanine (a-c) and glutamine (d-f) concentrations in blood (a, d), liver (b, e) and muscle (c, f). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL.

3) 分枝鎖アミノ酸濃度

オルニチン投与後、血液中に投与 1 時間後に一過的な分枝鎖アミノ酸 (BCAA) の上昇が認められた。また、筋肉中濃度は投与 1, 3 時間後に有意に上昇した。一方で、肝臓では有意な変動は認められなかった (Fig. 1-1-3)。

絶食下では、筋肉中のタンパク質はアミノ酸へと分解され、エネルギー産生に利用される。筋肉中のタンパク質は主にミオシンからなるが、ミオシンの約 40%は、ロイシン、イソロイシン、バリンの BCAA で構成され、これらは筋肉中でのエネルギー産生に優先的に利用されることが知られている。本実験における筋肉中 BCAA の上昇は、タンパク質から分解された BCAA のエネルギー産生への利用が抑制されていることを示しており、オルニチンが BCAA に代替して優先的にエネルギー産生に利用されていると考えられた。

BCAA は血液からもトランスポーターを介して筋肉中に取り込まれることが知られているが、本実験における血液中 BCAA の一過的な上昇は、筋肉中への取り込みが一過的に抑制されたことを示していると考えられた。

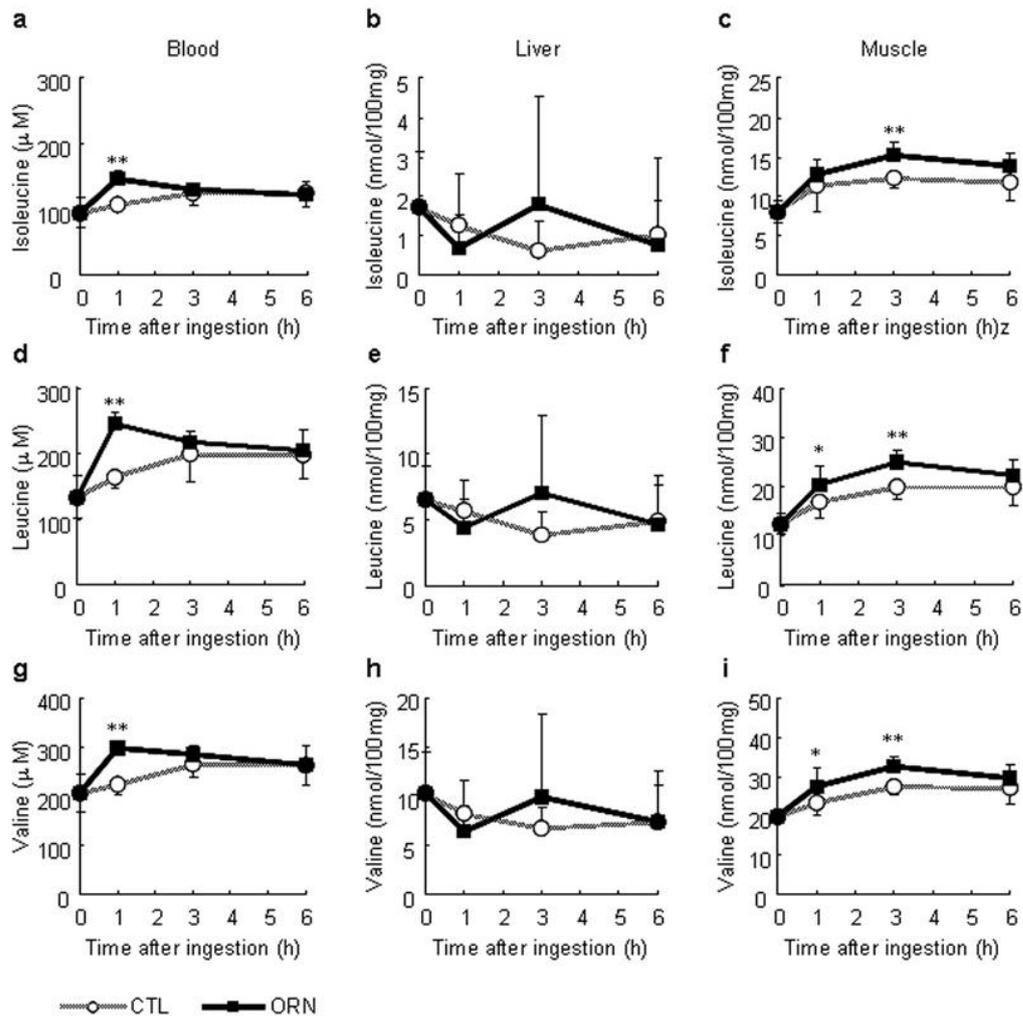


Fig. 1-1-3 Effect of ornithine ingestion on BCAA concentrations, isoleucine (a-c), leucine (d-f), and valine (g-i), in blood (a, d, g), liver (b, e, h) and muscle (c, f, i). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CTL.

4) オルニチン関連アミノ酸濃度

オルニチンは、オルニチンオキソ酸アミノトランスフェラーゼおよびピロリン-5-カルボン酸レダクターゼによる反応により、L-グルタミン 5-セミアルデヒドを介してプロリンへと代謝される。血液、肝臓、筋肉においてプロリン濃度が上昇していたことから、オルニチンはプロリン合成を促進させたと考えられた (Fig. 1-1-4)。

オルニチンは、肝臓においてオルニチントランスカルバモイラーゼによる反応により、尿素回路に関与するアミノ酸の一種であるシトルリンへと代謝される。肝臓においてシトルリンが有意に増加したことから、尿素回路が促進していたことが推測された (Fig. 1-1-4)。

オルニチンと構造が類似しているリジンは、オルニチン投与により血液中では濃度が上昇し、筋肉中では低下した (Fig. 1-1-4)。オルニチンとリジンは同一のアミノ酸トランスポーターを介して取り込まれるため、高濃度のオルニチンは筋肉でのリジンの取り込みに対して競合的に作用したことが一因と推察された。

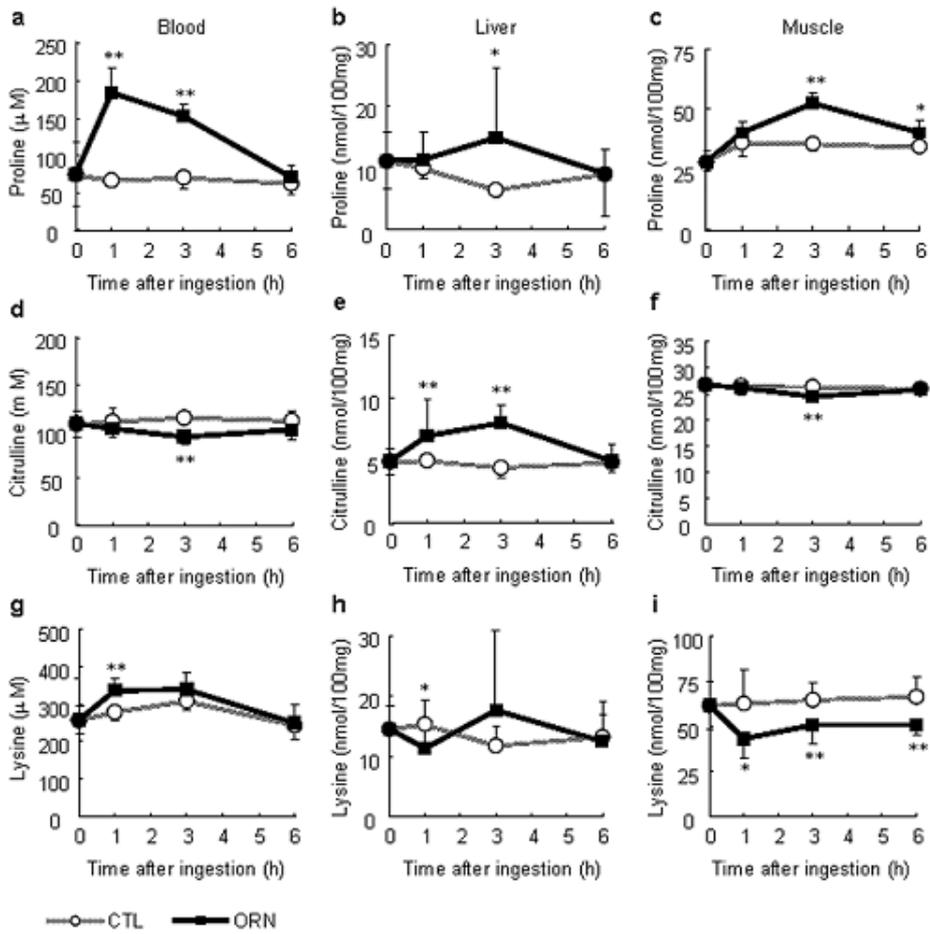


Fig. 1-1-4 Effect of ornithine ingestion on proline (a-c), citrulline (d-f) and lysine (g-i) concentrations in blood (a, d, g), liver (b, e, h) and muscle (c, f, i). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CTL.

5) その他のアミノ酸濃度

オルニチンの投与により、その他の一部アミノ酸において主に血液および筋肉で変動が認められたものの、肝臓での変動は比較的少なかった (Fig. 1-1-5, 1-1-6, 1-1-7)。

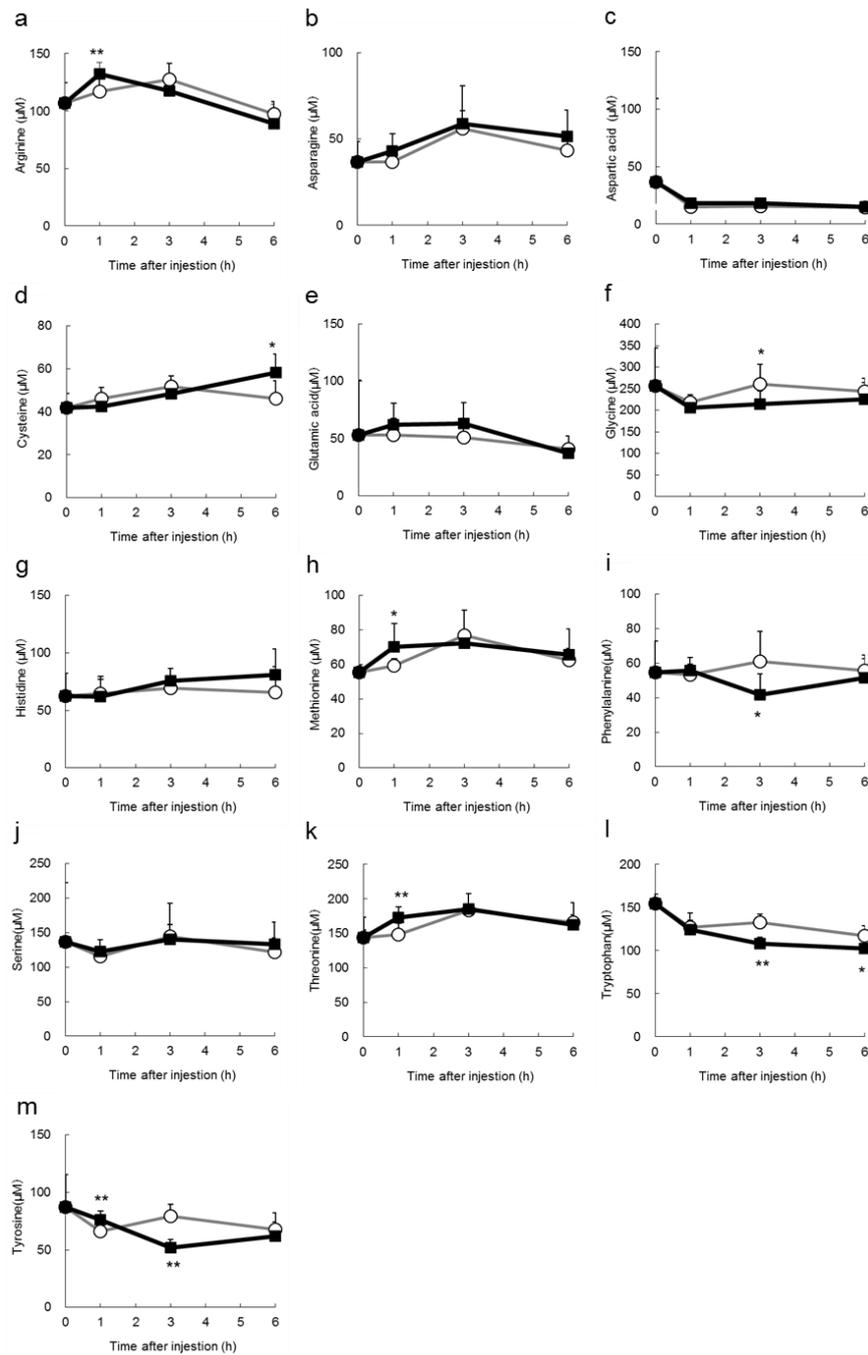


Fig. 1-1-5 Effect of ornithine ingestion on blood amino acid concentrations. Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL.

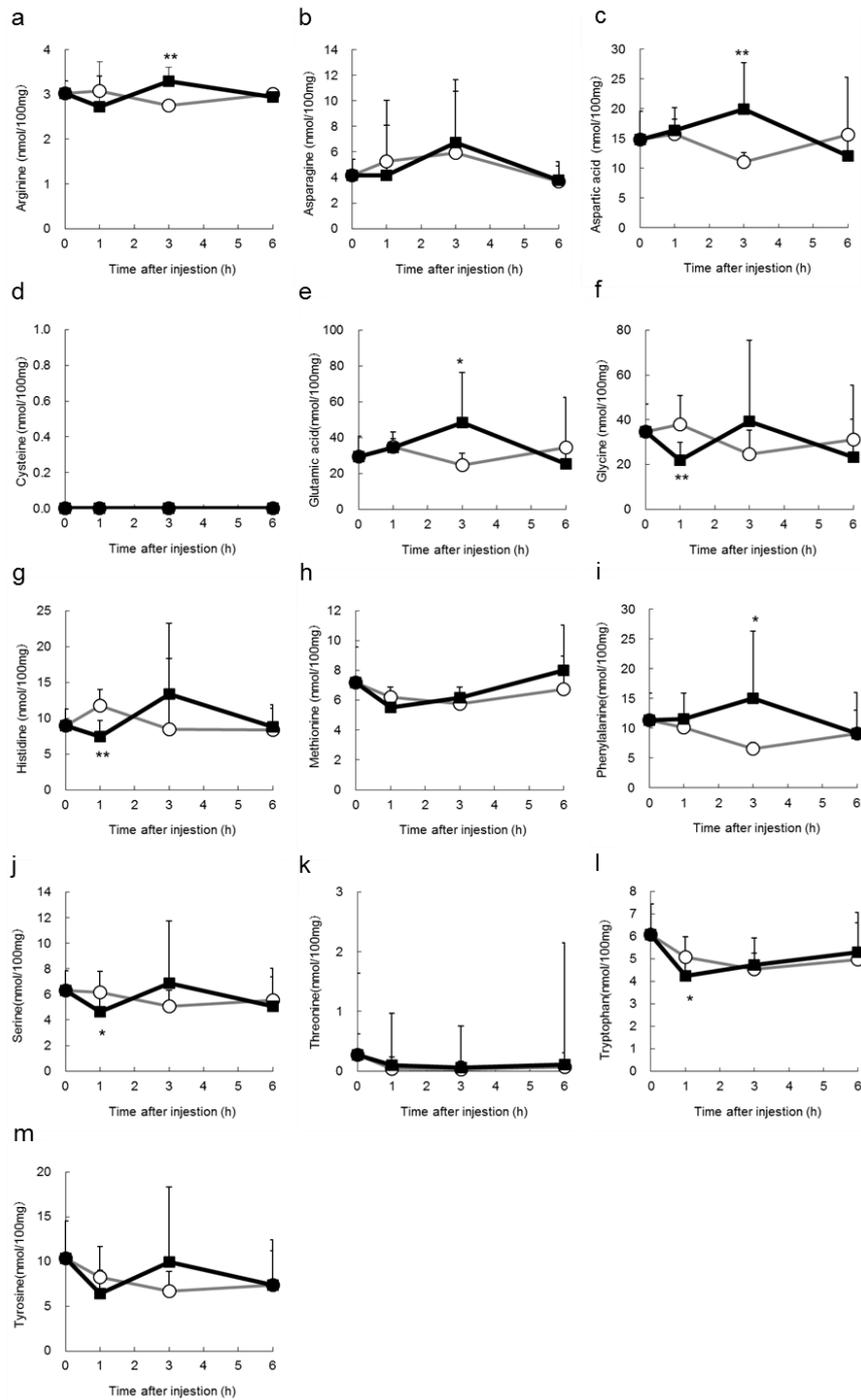


Fig. 1-1-6 Effect of ornithine ingestion on liver amino acid concentrations. Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL.

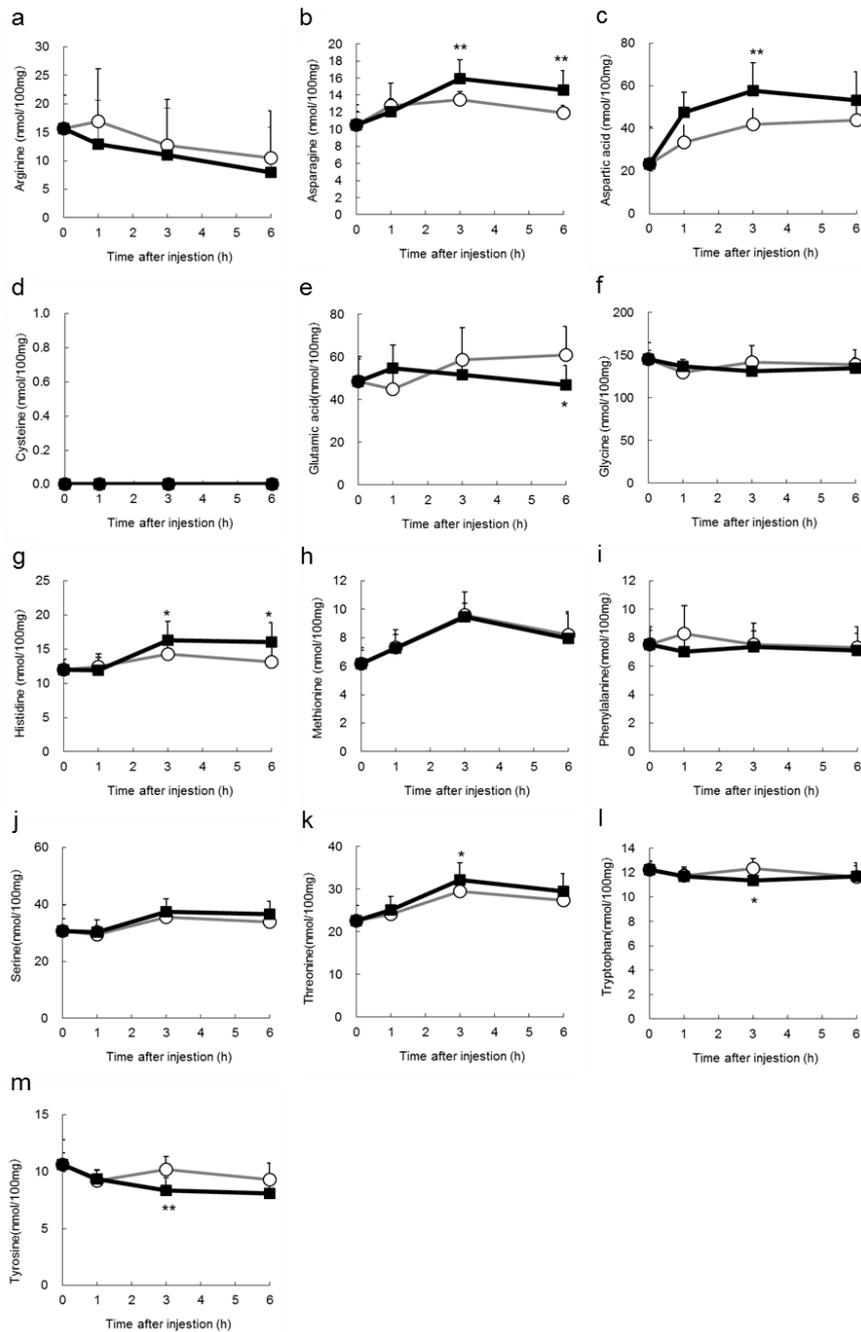


Fig. 1-1-7 Effect of ornithine ingestion on muscle amino acid concentrations. Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL.

5) フィッシャー比

血液中の BCAA 濃度を芳香族アミノ酸（チロシン、フェニルアラニン）濃度で除した値であるフィッシャー比について検討した。フィッシャー比は筋肉における BCAA の異化および肝臓における芳香族アミノ酸代謝の間のバランスを示すものとされている[30]。フィッシャー比はオルニチン投与 1, 3 時間後に有意に上昇した (Fig. 1-1-8)。

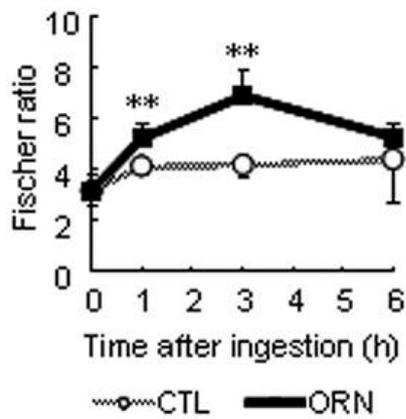


Fig. 1-1-8 Effect of ornithine ingestion on the Fischer ratio. Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., **P<0.01 compared with CTL.

6) その他の糖代謝・脂質代謝に関連する血中指標

絶食によるエネルギー欠乏状態によりグルコース-アラニン回路が亢進することが知られている。アラニンは筋肉において産生され、血液を介して肝臓に運ばれて糖新生によりグルコースへと代謝される。代謝されたグルコースは肝臓より血液へと分泌されて各臓器で利用される。オルニチンの投与により、血液および筋肉におけるアラニン濃度の上昇が認められたことから (Fig. 1-1-2)、オルニチンが糖代謝へ与える影響を評価した。オルニチン投与により血液中グルコース濃度は有意ではないものの上昇傾向が認められた (Fig. 1-1-9)。さらに、血液中インスリン濃度の有意な上昇が認められた (Fig. 1-1-9)。血液中グルコース濃度の上昇傾向は、筋肉におけるアラニンの産生上昇に伴って、グルコース-アラニン回路が亢進したことによるものであると考えられた。

糖新生の過程において、アラニンからアミノ基を脱離する必要があるが、脱離したアミノ基やその代謝物であるアンモニアは、肝臓における尿素回路において生体にとってより無毒な尿素へと代謝され尿中より体外へ排出される。尿素由来の窒素量を示す値である BUN は、オルニチン投与により有意な上昇が認められた (Fig. 1-1-9)。このことは、アラニンや他の糖原性アミノ酸が利用され糖新生が亢進したことを示唆していると考えられた。

血液中の脂質代謝の指標である NEFA、TG、ケトン体について評価した。NEFA およびケトン体はオルニチン投与後早期に有意な減少が認められた (Fig. 1-1-10)。TG は投与 1 時間後でのみ、有意な減少が認められた。NEFA およびケトン体の減少は、脂肪組織からの NEFA の分泌および遊離脂肪酸の β 酸化が抑制された事を示唆している。従って、オルニチン投与により糖新生由来のエネルギー産生が亢進したことで、脂質のエネルギー産生への利用が抑制されたものと考えられた。

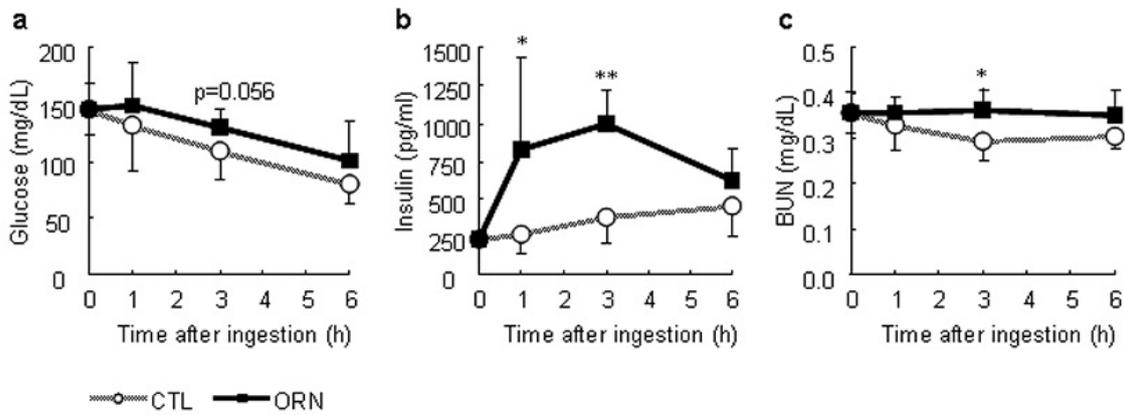


Fig. 1-1-9 Effect of ornithine ingestion on blood glucose (a), insulin (b) and BUN (c). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CTL.

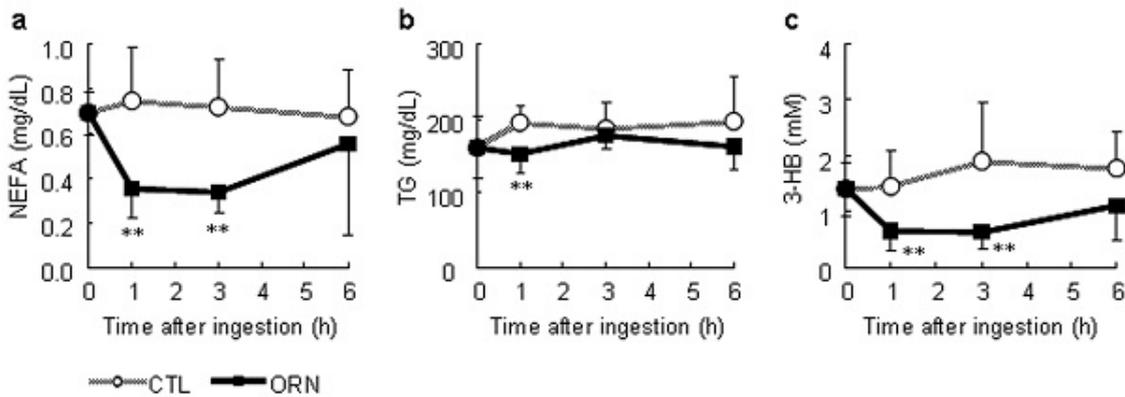


Fig. 1-1-10 Effect of ornithine ingestion on NEFA (a), TG (b) and 3-HB (c). Closed squares and open circles represent ornithine ingestion (ORN) and control (CTL), respectively. Values are means \pm S.D., ** $P < 0.01$ compared with CTL.

5. 考察

本実験では、オルニチン投与による影響の基礎的な知見を得ることを目的に、絶食マウスにオルニチンを投与し、血液、肝臓、筋肉中におけるアミノ酸、グルコース、脂質代謝の影響を経時的に評価した。

血液および臓器中のオルニチン濃度の結果から、オルニチンは経口での投与後に速やかに体内に吸収され、血液を介して肝臓や筋肉へ取り込まれ代謝されることが推測された。オルニチンが経口投与後、筋肉へ取り込まれ代謝されることを示唆した報告はこれまでになく、本実験が初めてである。

オルニチン投与はグルコース-アラニン回路を亢進させることが示唆された。血液中のグルコース濃度はオルニチン投与群で有意ではないものの、全ての測定時間で高値に推移した (Fig. 1-1-9)。また、アラニン濃度は血液および筋肉中で上昇した (Fig. 1-1-2)。インスリン分泌がオルニチン投与群で促進したこともこの事を支持している (Fig. 1-1-9)。グルコース-アラニン回路が亢進したにも関わらず、血液中グルコース濃度が有意に上昇しなかった理由として、絶食下では産生されたグルコースは速やかに脳や筋肉などの各臓器に吸収され、臓器の生物活性を維持するために利用されるためであると考えられた。

糖新生は、主に肝臓において、アラニンなどの糖原性アミノ酸の脱アミノ化反応を介して行われる。アミノ酸から脱離したアミノ基やアンモニアは、尿素回路により尿素へと代謝され、尿より体外に排泄される。オルニチン投与による BUN の増加は (Fig. 1-1-9)、糖原性アミノ酸の脱アミノ化反応により生じたアミノ基に由来していると考えられた。

グルコース-アラニン回路の亢進によるエネルギー産生の促進は、脂質代謝からのエネルギー産生を抑制する方向に影響を与えられられる。従って、少なくとも絶食下において、オルニチンはエネルギー産生を糖代謝に傾ける方向に作用するアミノ酸であると考えられた。

オルニチンは2つの効果でグルコース-アラニン回路を亢進すると考えられる。1つ目は、筋肉におけるアラニンの産生促進であり、2つ目は肝臓における尿素回路の亢進である。1モルのオルニチンから、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT)、1-ピロリン-5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ (P5CDH)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) による酵素反応を経て、2モルのアラニンが産生される (Fig. 1-1-11)。産生したアラニンがグルコース-アラニン回路を亢進させると考えられる。さらに、アラニンからのアミノ基の分離、およびそれに伴う窒素の排泄は糖新生の亢進において重

要である。加えて尿素回路の阻害により糖新生が抑制されること、さらにオルニチンの投与により尿素回路が活性化された結果、糖新生が亢進することが報告されている[5, 31]。本実験においては、肝臓中で尿素回路の構成アミノ酸であるオルニチンおよびシトルリン濃度が上昇し、血液中でBUNが上昇した (Fig. 1-1-1, 4, 9)。この結果は、オルニチン投与により尿素回路が亢進したことを示唆している。以上より、オルニチンの経口投与は筋肉によるアラニン産生促進および尿素回路亢進の作用を介してグルコース-アラニン回路の亢進に寄与すると考えられた。

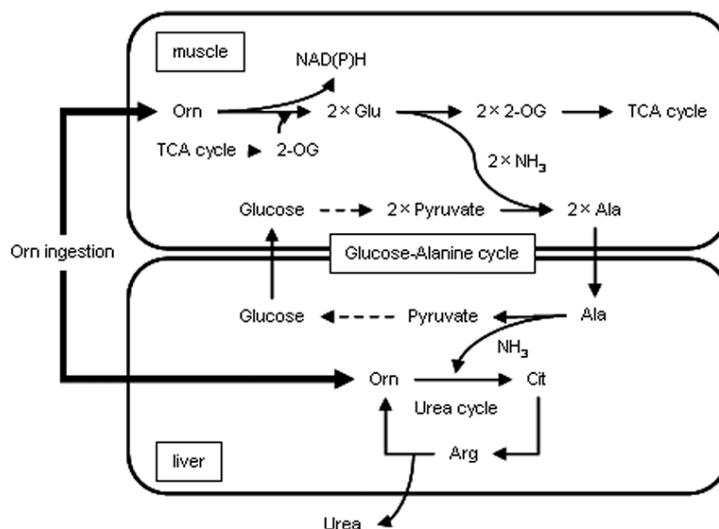


Fig. 1-1-11 Schematic model of the enhancement of the glucose-alanine cycle after ornithine ingestion. Ingested ornithine is incorporated into both muscle and liver. In muscle, 1 mol of ornithine and 1 mol of 2-OG are metabolized into 2 mols of Glu with production of 1 mol of NAD(P)H. ALT metabolizes Glu and pyruvate to 2-OG and alanine. Collectively, 2 mols of Ala, 1 mol of 2-OG and 1 mol of NAD(P)H are generated from 1 mol of ornithine. In liver, Ala is deaminated for gluconeogenesis. The amino group or ammonia liberated from Ala is converted to urea in the urea cycle. Ornithine in muscle and liver augment the glucose-alanine cycle.

オルニチン投与により、アラニンに加えてグルタミン濃度が血液および肝臓中で大きく上昇した (Fig. 1-1-2)。グルタミンは糖新生の前駆体であり、筋肉から血液中へと放出され腎臓を始めとする臓器での糖新生に利用される [32]。アラニンと同様に、オルニチン投与によってグルタミンが上昇することは、糖新生を介した血液中グルコース濃度の上昇に寄与していると考えられた。オルニチンはその一部はグルタミン酸へと代謝されるが、グルタミン酸はグルタミンシンターゼによりグルタミンへとさらに代謝される。よって、投与したオルニチンが直接グルタミンの起源となっていると推察される。さらに、筋肉におけるグルタミン合成は肝臓外でのアンモニア代謝経路に寄与している [33]。よって、肝臓における尿素回路の亢進以外にも、オルニチンの投与により末梢臓器におけるアンモニア代謝を促進している可能性が考えられた。

絶食などのエネルギー欠乏下では、筋肉をはじめとする各臓器は、タンパク質分解により BCAA を作り出しエネルギー源として利用している。オルニチン投与により、筋肉における BCAA 濃度が大きく上昇し、一過的に血液中濃度も上昇したが (Fig. 1-1-3)、この理由として、タンパク質分解による BCAA の産生促進、および BCAA を利用したエネルギー産生の抑制の両者が考えられた。しかし、オルニチンの代謝経路やグルコース-アラニン回路への影響から判断して、後者の寄与がより高いと考えられた。

TCA サイクルの中間体である 2-オキソグルタル酸 (2-OG) や NADH はオルニチンの代謝物から産生される。このことは、ATP は筋肉において産生されている事を示唆している (Fig. 1-1-11)。グルタミンシンターゼは ATP を消費するため、筋肉における ATP の産生には、グルタミンの産生が大きく寄与している。また、フィッシャー比の増加は、筋肉における BCAA の消費が抑制されたことを示唆している (Fig. 1-1-8)。

オルニチン投与後、フィッシャー比は投与 3 時間後をピークに高値となった (Fig. 1-1-8)。フィッシャー比は、筋肉における BCAA の異化反応と肝臓における芳香族アミノ酸の代謝のバランスを示す指標とされている [30]。オルニチンは、BCAA の筋肉における消費の抑制、および芳香族アミノ酸の代謝の促進、の 2 つの作用を介してフィッシャー比を高めたと考えられた。肝性脳症では、高アミノ酸血漿に加えて、BCAA と芳香族アミノ酸のインバランスが生じ、フィッシャー比の減少が認められる [30]。オルニチンの投与は、尿素回路の亢進を介して肝性脳症の改善に有効であることが報告されているが [12, 16, 34]、フィッシャー比の観点からも肝性脳症の改善に寄与していることを示している。

オルニチン投与による筋肉での BCAA の異化の抑制効果は、タンパク質分解の抑制によるものと考えられる。チロシンやトリプトファンなどのアミノ酸の血中濃度が減少

したことはこのことを支持している (Fig. 1-1-5)。オルニチンの投与は、タンパク質合成を促進することや、成長ホルモンの分泌を促進することが知られているが[35-38]、それらに加えて、オルニチンの筋肉に対する直接的な作用が、タンパク質分解の抑制に貢献していることが本実験により示唆された。

オルニチンの投与により、血液中のプロリン濃度が上昇した (Fig. 1-1-4)。プロリンはオルニチンから OAT およびプロリン-5-カルボキシレトリダクターゼによる反応を経て合成されることから、プロリンの増加は投与したオルニチンが直接代謝されて生じたものと考えられた。血液中プロリン濃度のピークは、筋肉中濃度よりも早いタイミングで上昇したことから、オルニチンからプロリンへの代謝は筋肉以外の他の臓器でも起こっていることが考えられた。プロリンは小腸や肝臓で主に合成されるとされているが、本実験では肝臓中のプロリン濃度は上昇しなかったことから、小腸で合成され門脈へと放出されたプロリンによって血液中プロリンが主に上昇したものと考えられた。

オルニチン投与により、血中リジン濃度は上昇したものの、筋肉中では減少した (Fig. 1-1-4)。オルニチンとリジンは共に陽イオン性アミノ酸であり、構造的にも類似している。両アミノ酸共に同一のアミノ酸トランスポーターによって細胞内への取り込みおよび排出が行われる[39]。血液中オルニチン濃度の上昇により、競合的にリジンの筋肉中への取り込みが抑制された結果、血液中および筋肉中のリジン濃度の変動が生じたと考えられた。

本実験では、血液、肝臓、筋肉を評価対象に測定を行ったが、門脈血や尿などの評価も加えてより詳細な動態の考察を行う事が今後の課題である。また、オルニチン以外の尿素回路に関与するアミノ酸であるアルギニンやシトルリンでも同様の評価を行い、結果を比較することで、各アミノ酸の動態の違いやオルニチンを摂取する事の有用性に関する考察を深めることが可能となると考えられる。その他、安定同位体を用いた評価を行う事で、より直接的なオルニチンの代謝や動態を評価することが可能となると考えられる。

オルニチンの経口投与は、尿素回路の活性化を介して、アンモニアの上昇抑制に効果を示すことが知られている。また、成長ホルモン分泌促進作用を始めとする多くの生理機能が知られている。本実験の結果より、オルニチンの生理機能には尿素回路の活性化作用に加えて、グルコース-アラニン回路の亢進作用も寄与している可能性が考えられた。

第2節 オルニチンの mTOR 活性化作用

1. 要約

オルニチンの機能として知られているタンパク質合成促進作用が mTOR シグナルの活性化を介したものであるかを検証するため、ラット肝プライマリー細胞を用いた実験及び、ラットへの経口投与実験を行った。

ラット肝プライマリー細胞にオルニチンを添加し、mTOR 関連因子のリン酸化をウエスタンブロッティングで評価した結果、p70S6K, S6, 4EBP1 のリン酸の亢進が認められた。この効果は、mTOR 阻害剤であるラパマイシンの添加により抑制されたことから、オルニチンは mTOR 活性化作用を有することが示唆された。

次に、ラットを 18 時間絶食させた後にオルニチンを経口投与し、1, 3 時間後の肝臓の mTOR 関連因子のリン酸化を評価した結果、p70S6K, S6 のリン酸化亢進が投与 1 時間後において認められた。一方で投与 3 時間後には変動は認められなかった。肝プライマリー細胞での実験と同様に、オルニチンは生体においても mTOR シグナルを活性化している事が示唆された。

2. 序論

本章第1節において、オルニチンはマウスへの経口投与後に吸収され、血中オルニチン濃度の上昇をさせるという基礎的な知見を得た。さらに尿素回路の代謝物であるシトルリン、アルギニンの血中濃度を上昇させたことから、これまでに知られているように尿素回路を活性化させていることが示された。次に本節では、吸収されたオルニチンが細胞内に取り込まれ尿素回路の活性化以外にどのような作用を及ぼすのかを評価した。

オルニチンには尿素回路の活性化を始めとして多くの生理機能が知られている。その一つに肝臓におけるタンパク質合成促進作用が報告されているが[40]、この詳細なメカニズムについては知られていない。そこで本実験では、タンパク質合成に関連するシグナルである mammalian target of rapamycin (mTOR)に着目し、オルニチンが mTOR 関連因子に及ぼす影響を評価することとした。

mTOR は、フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼファミリーに属し、骨格筋や肝臓における栄養状態のセンサーとして中心的な働きを担う因子である[41, 42]。mTOR シグナルは、転写開始における mRNA の結合過程や、mTOR 下流にある 70 kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), ribosomal protein S6 (S6), eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1)といった転写抑制因子のリン酸化の制御に関与していることが知られている[43, 44]。多くの代謝因子が mTOR を介したタンパク質合成の制御に関わることが知られているが、その内の代表的な内因性活性化因子としてロイシンや、インスリンが知られている (Fig. 1-2-1) [45]。近年、これらに加えて尿素回路に関わるアミノ酸の一種であるシトルリンに、mTOR シグナルの亢進作用がある事が報告された[46]。

シトルリンは生体内では、オルニチンとカルバモイルリン酸との反応により生成されることから、オルニチンで報告されているタンパク質の合成促進作用は、代謝されて生成したシトルリンの mTOR シグナルの活性化を介している可能性が推測された。そこで、本節では、オルニチンが mTOR を介して下流の転写制御因子のリン酸化を促進し、肝臓でのタンパク合成を促進しているのかを、ラット肝プライマリー細胞を用いた添加試験および、ラットへの経口投与試験により評価した。

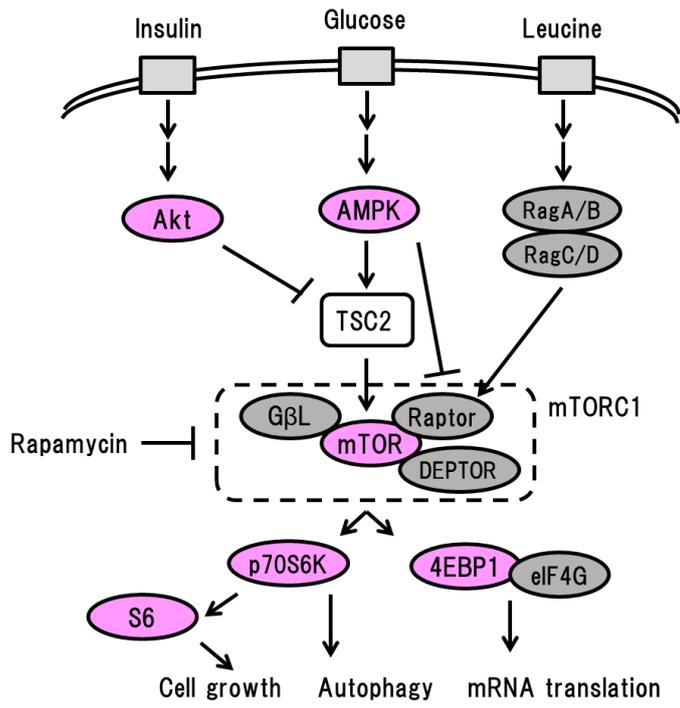


Fig. 1-2-1 mTOR signaling pathway.

3. 実験方法

1) 動物

Wistar 雄性ラット (SLC Japan) 7 週齢を導入し、1 週間以上馴化を行った。飼育は 12 時間の明暗サイクル (明期: 午前 8 時-午後 8 時)、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 30-70% に維持した部屋で行い、飼料は AIN-93G を与えた。実験は、キリンホールディングス動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った。

2) ラット肝プライマリー細胞の調製

ラット肝プライマリー細胞は、既報に従いコラゲナーゼ灌流法を用いて調製した[47]。ラット一匹あたり平均で 6.8×10^7 cell の細胞を回収した。回収した細胞をコラゲナーゼコートした 6 ウェルプレート (直径 35 mm) に 5×10^5 cells/well で播種し、10% FBS, 100 units/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシン含有の DMEM 培地中、 37°C 、5% CO_2 にて一晩培養した。プレートを PBS で洗浄し、プレートに接着しなかった細胞を洗い流した後に実験に使用した。

3) ラット肝プライマリー細胞を用いた評価

ラット肝プライマリー細胞へのオルニチンもしくはロイシン添加による影響を評価した。上記で調製した細胞を、DMEM ベースのアミノ酸不含培地に変更し 20 分間培養した後、0, 5, 10, 20 mM オルニチンもしくは 20 mM ロイシン含有培地でさらに 3 時間培養して、細胞を回収した。

次に、細胞へのオルニチン添加後の培養時間の影響を評価した。上記で調製した細胞をアミノ酸不含培地で 20 分間培養した後、0, 20 mM オルニチン含有培地で 1, 3 時間培養し、細胞を回収した。

さらに、細胞への mTOR 阻害剤添加による影響を評価した。上記で調製した細胞を 0, 1 μM ラパマイシン含有アミノ酸不含培地で 20 分間培養した後、0, 20 mM オルニチン含有培地でさらに 3 時間培養し、細胞を回収した。

全ての実験は各群 3 連で実施した。

4) ラットへのオルニチン経口投与の影響評価

体重に従いラットを各群 5 匹の 4 群に群分けし、実験に用いた。18 時間の絶食後、水もしくは 1.74 g/kg 体重のオルニチン塩酸塩を 25 ml/kg でラットに経口投与した。投与 1, 3 時間後に麻酔下で採血後屠殺し、肝臓を回収した。肝臓は 10 倍量の臓器破碎

液 (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher), pH 7.4) を加えた後、ポッター型ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。ホモジェナイズ液を 10,000 × g, 10 min 4 °C で遠心分離した後、上清を回収し、-80 °C で測定まで保存した。

5) ウェスタンブロッティングによる mTOR 関連因子のリン酸化評価

サンプルのタンパク質濃度は、Lowry 法を用い、BSA を標品として測定した (Bio-Rad)。サンプル 20 µg/lane を SDS-PAGE (Invitrogen) で分離し PVDF 膜 (Bio-Rad) にブロッティングした後、以下の抗体でそれぞれプローブした : phospho-mTOR (Ser2448), mTOR, phospho-p70S6K (Thr389), p70S6K, phospho-S6 (Ser235/236), S6, phospho-4EBP1 (Thr37/46), 4EBP1, phospho-AMPK (Thr172), AMPK, phospho-AKT (Thr308 and Ser473), and AKT (いずれも Cell Signaling)。プローブした膜を、HRP 標識抗-rabbit 二次抗体 (Cell Signaling) および ECL prime western blotting detection system (GE Healthcare) を用いて発色させ、LAS-3000 fluorescence imaging system (富士フイルム) を用いて検出した。

6) 血中指標測定

血漿オルニチン、シトルリン、アルギニン濃度は、次の方法で測定した。血漿に 0.45 N になるように過塩素酸を加え除タンパクし、15,000 g × 10min, 4°C で遠心して上清を回収した。上清を 0.1 N 塩酸で 8 倍に希釈した後、 σ -phthalaldehyde 誘導体で標識しアミノ酸分析装置 (島津) を用いて測定を行った。

血漿成長ホルモンはレビス GH (シバヤギ)、インスリンは Rat Insulin ELISA Kit (森永生科学研究所)、グルコース濃度は Glucose C-Test Wako (和光純薬) を用いて測定した。

7) 統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で示し、オルニチン投与群とコントロール群間の 2 群の比較は Student's *t* test で行った。3 群以上の比較は ANOVA 解析後 Dunnett 法を用いて検定した。P 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 結果

1) ラット肝プライマリー細胞における mTOR 関連因子のリン酸化評価

ラット肝プライマリー細胞へのオルニチンの添加が、mTOR 関連因子のリン酸化に与える影響を評価した。その結果、20mM のオルニチン添加において、コントロールと比較して p70S6k, S6, 4EBP1 のリン酸化亢進が認められた (Fig. 1-2-2)。特に p70S6K, 4EBP1 ではオルニチンの添加濃度依存的にリン酸化の程度が上昇することが認められた。代表的な mTOR シグナル活性化物質として知られるロイシン 20mM の添加では、オルニチン 20mM と同様に p70S6k, S6, 4EBP1 のリン酸化亢進が認められた。この結果は過去のロイシンでの報告と同様であり、本実験で用いた評価系の妥当性が確認された。一方で、mTOR のリン酸化状態は、オルニチン、ロイシン添加時共に変動は認められなかった。

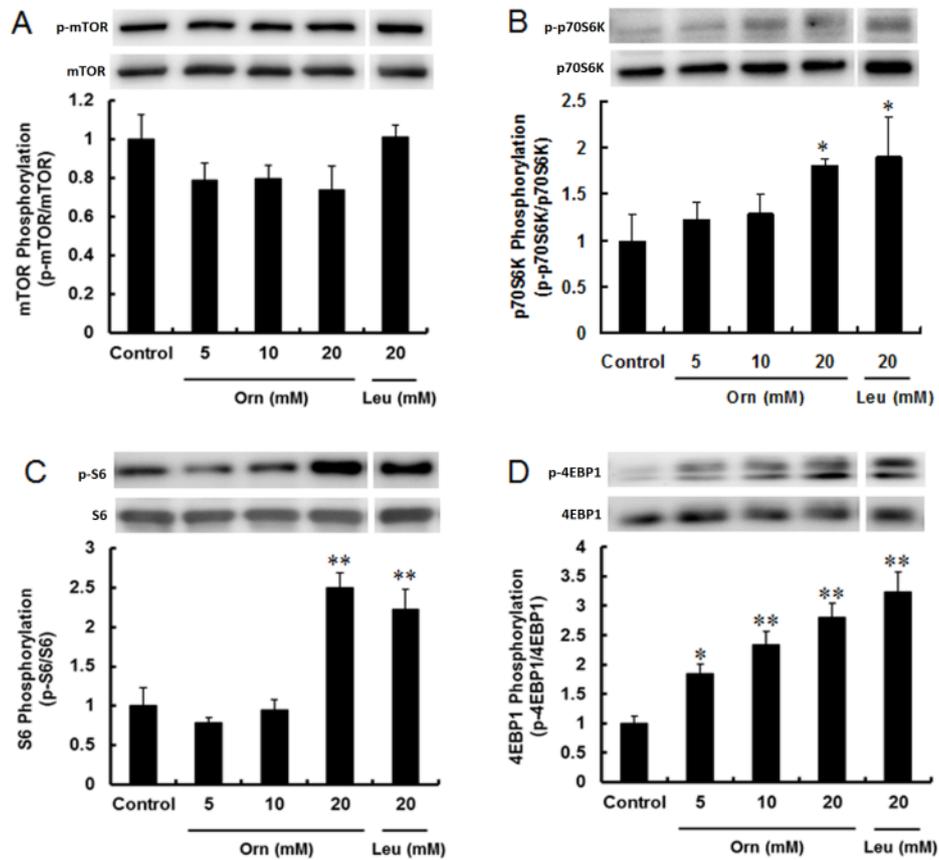


Fig. 1-2-2 Phosphorylation levels of mTOR (A), p70S6K (B), S6 (C), and 4EBP1 (D) in primary cultured rat hepatic cells treated with ornithine or leucine for 3 h. Cell lysates (20 μ g) were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Ratios of phosphorylated proteins to respective total proteins were compared to judge the phosphorylation states. Insets show the representative immunoblot images. Upper images show phosphorylated proteins and lower show total proteins. Right and left images were cut out from the same membrane. Values are mean \pm standard error of the mean, *P < 0.05, **P < 0.01 compared with control.

次に、mTOR 関連因子のリン酸化に与えるオルニチン添加時間の影響を評価した。オルニチン 20 mM 添加後の p70S6K および 4EBP1 のリン酸化の亢進は、添加 1 時間後よりも 3 時間後でより強く認められた (Fig. 1-2-3)。また、S6 のリン酸化の亢進は 3 時間後のみで認められた。この結果より、本実験系においては、オルニチン添加 1 時間後よりも 3 時間後がより適していると考えられた。また、S6 ではコントロールにおいて添加 1 時間後よりも 3 時間後にリン酸化状態が低下していたことから、アミノ酸不含培地によるリン酸化状態の低減が 1 時間後では十分に至っていない可能性が考えられた。この点からも 3 時間後がより評価に適していると考えられた。

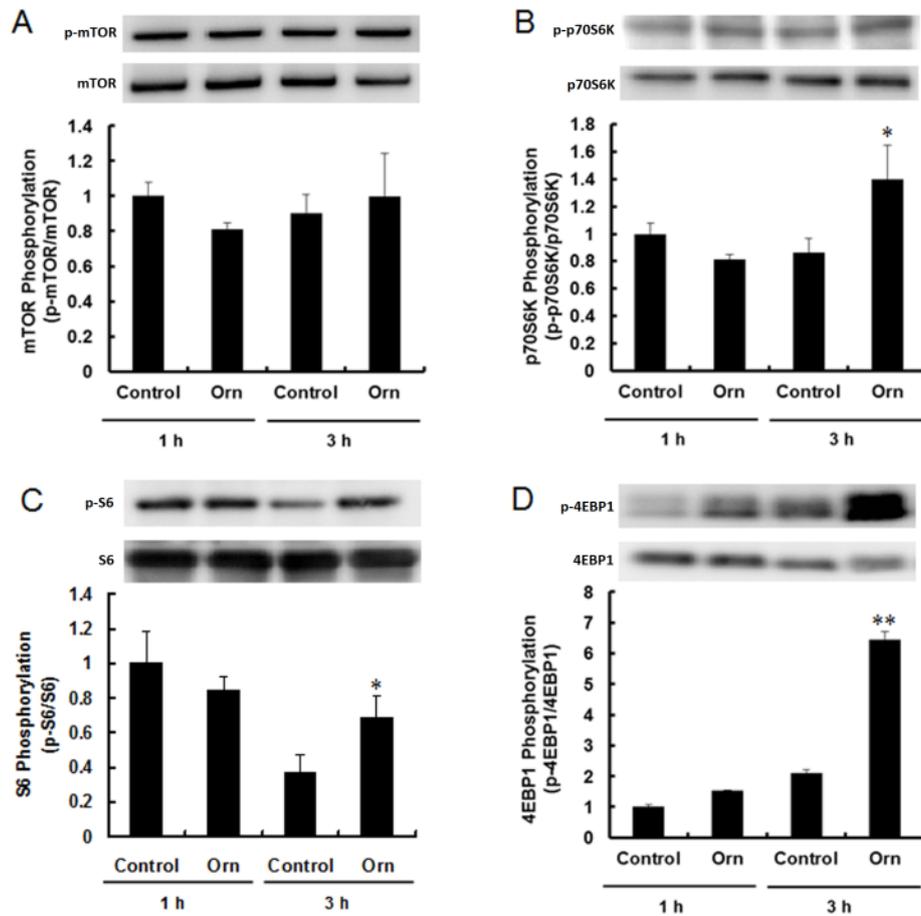


Fig. 1-2-3 Phosphorylation levels of mTOR (A), p70S6K (B), S6 (C), and 4EBP1 (D) in primary cultured rat hepatic cells treated with ornithine (20 mM) for 1 or 3 h. Cell lysates (20 μ g) were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Phosphorylation levels were normalized against total protein. Insets show the representative immunoblot images. Upper images show phosphorylated proteins and lower show total proteins. Values are mean \pm standard error of the mean, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with respective control.

2) ラパマイシン添加によるオルニチンの作用への影響評価

ラット肝プライマリー細胞におけるオルニチンの mTOR 関連因子のリン酸化亢進作用が、mTOR シグナルを介する可能性を評価するため、mTOR 阻害剤であるラパマイシンを前処理した細胞に対してオルニチンを添加し、mTOR 下流因子のリン酸化を評価した。その結果、ラパマイシンの前処理により、p70S6K および S6 において、オルニチン添加によるリン酸化の亢進が阻害された (Fig. 1-2-4)。また、4EBP1 においては、リン酸化の亢進が部分的に阻害された。この結果から、オルニチン添加による mTOR 関連因子のリン酸化の亢進は、主に mTOR シグナルの活性化を介して行われていることが示唆された。

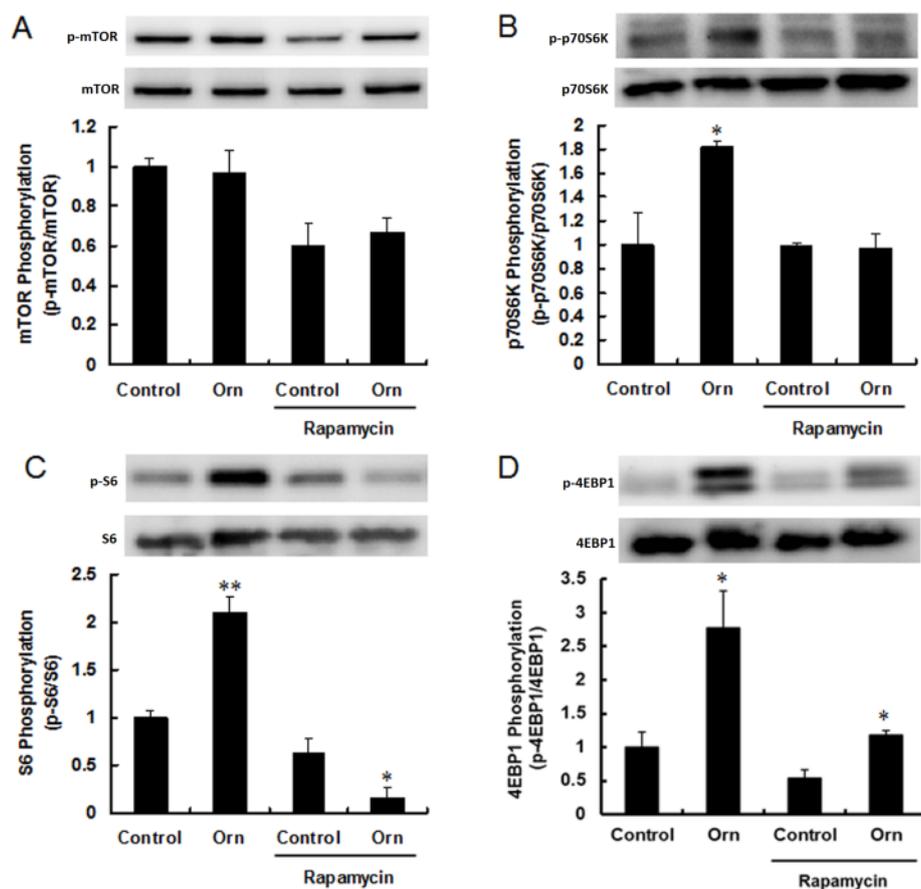


Fig. 1-2-4 Phosphorylation levels of mTOR (A), p70S6K (B), S6 (C), and 4EBP1 (D) in primary cultured rat hepatic cells treated with ornithine (20 mM) for 3 h in the presence or absence of rapamycin (1 μ M). Cell lysates (20 μ g) were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Phosphorylation levels were normalized against total protein. Insets show the representative immunoblot images. Upper images show phosphorylated proteins and lower show total proteins. Values are mean \pm standard error of the mean, *P < 0.05, **P < 0.01 compared with respective control.

3) ラット肝臓における mTOR 関連因子のリン酸化評価

ラット肝プライマリー細胞へのオルニチン添加により認められた mTOR 関連因子のリン酸化亢進が、生体においても認められるのかをラットへの経口投与により評価した。ラットへオルニチンを経口投与し、血液、肝臓を回収して mTOR 関連因子のリン酸化および血中パラメーターを測定した。結果、オルニチン投与後の血中のオルニチン濃度は、コントロール群と比較して投与 1, 3 時間後でそれぞれ 17.5, 20.1 倍上昇した (Table 1-2-1)。一方で尿素回路におけるオルニチンの代謝物であるシトルリンの血中濃度は、1, 3 時間後でそれぞれ 0.9, 0.8 倍の減少となった。アルギニンは変動しなかった。また、オルニチン投与 1 時間後において、血糖値の上昇が認められた。

肝臓の mTOR 関連因子は、オルニチン投与 1 時間後において p70S6K, S6, 4EBP1 のリン酸化亢進が認められた (Fig. 1-2-5)。このリン酸化亢進が、どのようなシグナル伝達によって生じているのかをより詳しく評価するため、mTOR のさらに上流因子の一つである AMPK, Akt のリン酸化について評価した。その結果、いずれの因子もオルニチン投与によって影響を受けなかった (Fig. 1-2-6)。

	1 h		3 h	
	Control	Orn	Control	Orn
Amino acids (μ M)				
Om	26.7 \pm 1.9	466.0 \pm 47.4**	28.6 \pm 1.7	575.7 \pm 37.0**
Arg	63.1 \pm 2.8	72.6 \pm 3.2	74.4 \pm 2.9	65.6 \pm 3.6
Cit	72.9 \pm 1.1	64.3 \pm 2.4*	75.6 \pm 2.3	58.3 \pm 2.1**
Growth hormone (pg/mL)	78.5 \pm 11.1	139.4 \pm 40.5	78.1 \pm 8.8	108.1 \pm 10.9
Insulin (ng/mL)	3.91 \pm 0.14	3.93 \pm 0.49	3.74 \pm 0.65	3.39 \pm 0.79
Glucose (mg/dL)	129.0 \pm 7.4	167.3 \pm 5.7**	127.4 \pm 8.5	130.2 \pm 5.9

Table 1-2-1 Plasma levels of urea cycle amino acids, growth hormone, insulin, and glucose in rats following oral administration of ornithine.

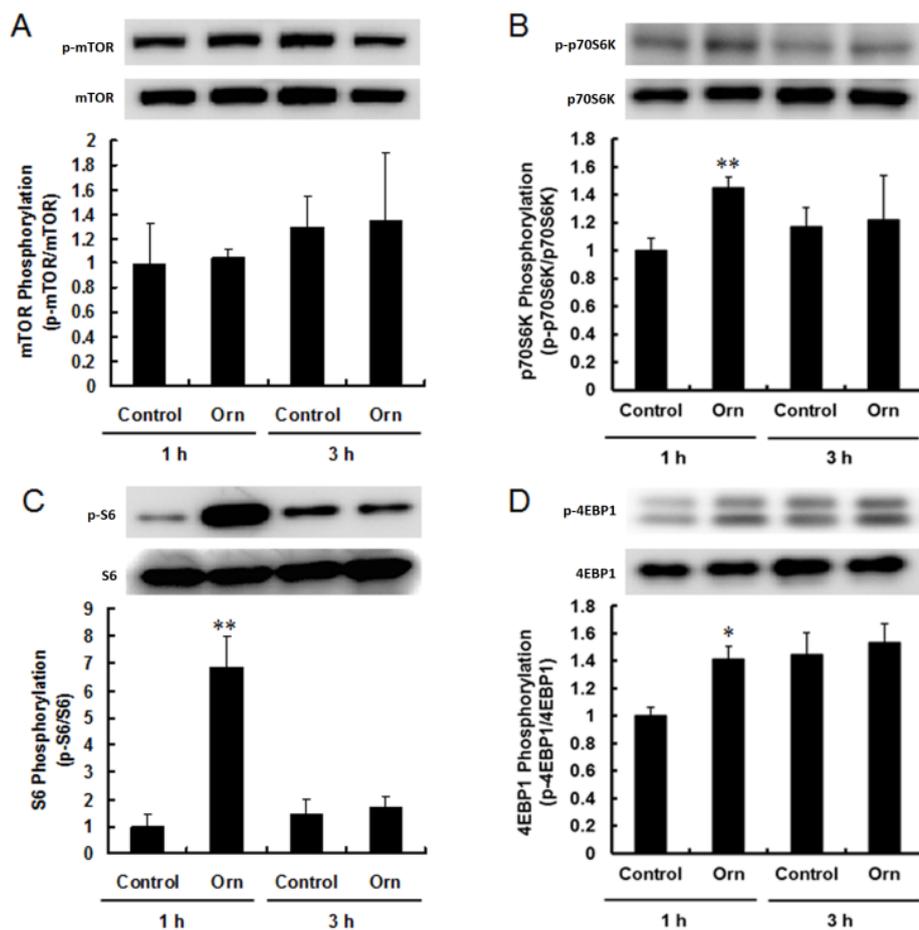


Fig. 1-2-5 Phosphorylation levels of mTOR (A), p70S6K (B), S6 (C), and 4EBP1 (D) in rat liver homogenate. Liver samples were collected 1 or 3 h after oral administration of ornithine (1.74 g/kg body weight). Liver homogenates (20 μ g) were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Phosphorylation levels were normalized against total protein. Insets show the representative immunoblot images. Upper images show phosphorylated proteins and lower show total proteins. Values are mean \pm standard error of the mean, *P < 0.05, **P < 0.01 compared with placebo.

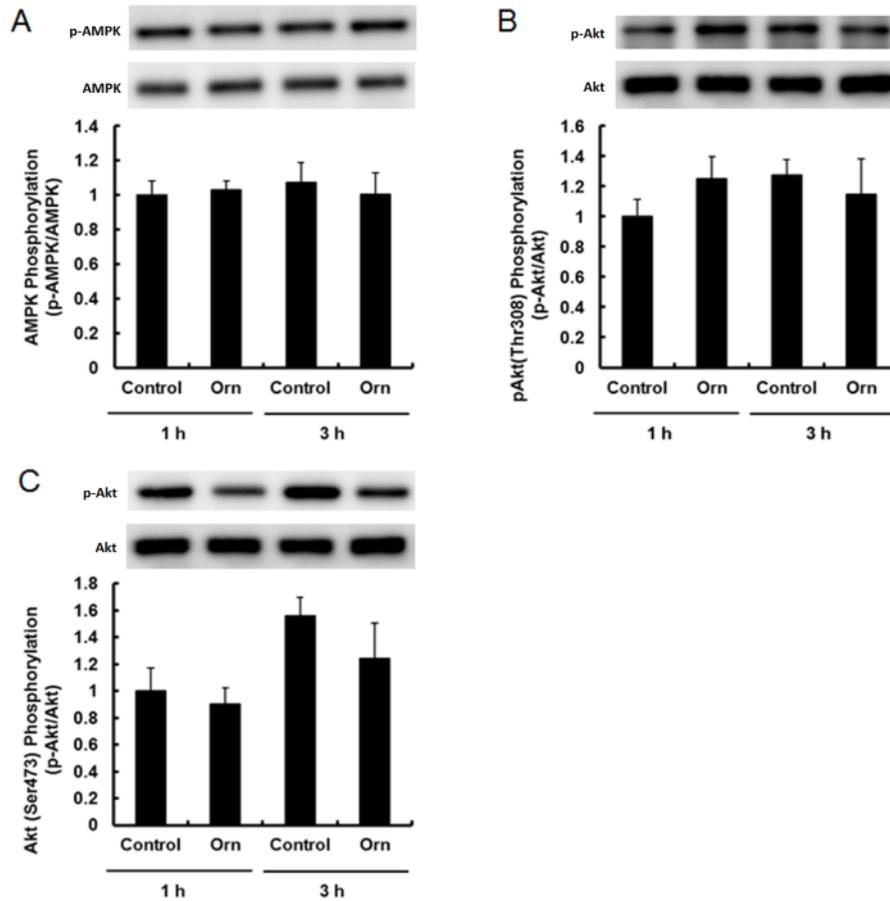


Fig. 1-2-6 Phosphorylation of AMPK (A) and AKT (two phosphorylation sites; B:Thr308, C:Ser473) in rat liver homogenate. Liver samples were collected 1 or 3 h after oral administration of ornithine (1.74 g/kg body weight). Liver homogenates (20 μ g) were subjected to immunoblotting with specific antibodies. Phosphorylation levels were normalized against total protein. Insets show the representative immunoblot images. Upper images show phosphorylated proteins and lower show total proteins. Values are mean \pm standard error of the mean.

5. 考察

オルニチンにはこれまでに肝臓におけるタンパク質合成促進作用が報告されている[40]。本実験では、この効果が mTOR シグナルの活性化を介したものであるとの仮説を検証するため、ラット肝プライマリー細胞へのオルニチン添加、およびラットへのオルニチン経口投与を行って、mTOR 関連因子のリン酸化を評価した。

ラット肝プライマリー細胞をアミノ酸不含培地で培養した後にオルニチンを添加した結果、mTOR 関連因子である p70S6K, S6, 4EBP1 のリン酸化の亢進が添加 3 時間後に認められた (Fig. 1-2-2)。また、この効果は mTOR 阻害剤であるラパマイシンにより抑制された (Fig. 1-2-4)。よって、オルニチンには mTOR 活性化作用を有する可能性が示唆された。本実験では、オルニチン添加 1 時間後に比べ 3 時間後でより強い活性化作用が認められたが (Fig. 1-2-3)、H4IIE 細胞にロイシンを添加した過去の報告では、添加 20 分後に最も強い p70S6K のリン酸化亢進が認められている[48]。両実験系で細胞種などの実験条件が異なるものの、オルニチンの方が効果が現れるのに時間を要したことから、オルニチンはロイシンと異なる機構で mTOR を活性化している可能性が考えられた。

次に、肝プライマリー細胞で認められたオルニチンの mTOR 活性化効果が、*in vivo* においても認められるかを評価するため、絶食下のラットにオルニチンを投与し、肝臓を摘出して mTOR 関連因子を評価した。動物においては、一晩の絶食により肝臓もしくは骨格筋における mTOR 関連因子のリン酸化やタンパク質合成はほぼ完全に抑制された状態になること、さらにその後の食事摂取により速やかに mTOR 活性化が生じる事が知られている[43, 49-51]。また、同様の実験系において、1.35 g/kg のロイシン投与によって mTOR 関連因子のリン酸化亢進が報告されている[46, 52, 53]。そこで本実験では既報に倣い、ラットに 18 時間の絶食を行い飢餓状態にした後、オルニチンを経口投与し 1, 3 時間後の mTOR 関連因子に与える影響を評価した。本実験においてオルニチンの投与量は、ロイシン 1.35 g/kg と等モル量である 1.74 g/kg とした。

オルニチン投与により、p70S6K, S6 のリン酸化亢進が投与 1 時間後において認められた (Fig. 1-2-5)。一方で、投与 3 時間後には効果は認められなかった。以上より、肝プライマリー細胞での結果と同様に、オルニチンはラットへの経口投与においても mTOR 関連因子のリン酸化を促進することが示唆された。また、mTOR 活性を制御する上流因子の一つである AMPK および Akt についてリン酸化を評価したが、いずれもリン酸化の亢進は認められなかったことから、オルニチンはこれら以外のシグナル因子を介して mTOR を活性化していると考えられた (Fig.1-2-6)。

培養細胞を用いた *in vitro* の評価系と、ラットを用いた *in vivo* の評価系を比較し、*in vivo* の評価系の方がより短い時間でオルニチンの影響が認められたことから、生体内では、オルニチンの直接的な作用以外の要因が影響して効果が認められている可能性が考えられた。オルニチンの代謝物であるシトルリンに mTOR 活性化作用が報告されており、オルニチンがシトルリンに代謝されて効果を発揮している可能性が考えられたが、ラットへのオルニチン投与後の血中シトルリン濃度に大きな変動が認められなかったこと、および既報では 4EBP1 でリン酸化亢進が認められ S6 では変化がなかった一方で、本実験では S6 のリン酸化でより強い効果が認められたことから、本実験系でのシトルリンの影響は少ないと推察された。今後、本実験系においてシトルリンとオルニチンを横並びで比較することや、尿素回路活性化剤である n-アセチルグルタミン酸の添加で mTOR 活性化作用が促進されるかを検討することで、シトルリンの関与をより明確にすることが出来ると考えられる。

オルニチンには成長ホルモンの分泌促進作用が知られている [7]。また、肝細胞への成長ホルモンの添加により、mTOR シグナルの活性化が報告されている [54]。本実験においては、有意ではないもののオルニチン投与後に血中成長ホルモンの上昇傾向 ($P<0.1$) が認められたことから (Table 1-2-1)、*in vivo* でのオルニチンの mTOR 関連因子のリン酸化促進作用の一部には、成長ホルモンが寄与している可能性が考えられた。また、血糖値の上昇による影響の可能性も考えられた。なお、第 1 章第 1 節のマウスを用いた実験では、オルニチン投与によりインスリンが上昇したものの血糖値の上昇は限定的であったのに対して、ラットを用いた本実験では血糖値のみ上昇が認められた。このことはオルニチン投与後の血糖値およびインスリンの反応に対して種差が影響する可能性を示している。

本実験で評価した因子以外の mTOR 関連因子及び上流シグナル因子を生体においてより詳細に評価することが、オルニチンの mTOR 活性化機構を解明する上で今後の課題であると考えられた。また、mTOR 活性化による生体への最終的な影響として、タンパク質合成が促進されているかを本実験系で確認する事も重要と考えられた。

本実験により、オルニチンは生体内で mTOR 活性化作用を有することが初めて示された。

第3節 オルニチンのアルコール性疲労の改善作用

1. 要約

本節では、健常人が日常生活で感じる疲労の例としてアルコール性疲労（いわゆる二日酔い）に着目し、アルコール摂取翌朝の疲労や睡眠の体感及び唾液中ストレス指標に対するオルニチンの影響を評価した。また、メカニズム検討の一端としてアルコール代謝に与えるオルニチンの影響を評価した。

実験1では、アルコールへの耐性がフラッシュタイプ[®]の被験者11名に対して、0.4 g/kg 体重のアルコールを摂取させた後にプラセボ食品もしくはオルニチン 400 mg を摂取させた。その後、翌朝起床時の疲労や睡眠の体感について各種アンケートを用いて評価し、さらに唾液を回収してストレス指標を測定した。結果、オルニチン摂取により、アルコール摂取翌朝起床時の体感（目覚め気分、疲れ、だるさ、睡眠時間、怒り・敵意、混乱の項目）が有意に改善した。また、唾液中コルチゾールが有意に低下した。

実験2では、同じくフラッシュの被験者16名に対して、0.4 g/kg 体重のアルコールを摂取させた前後にプラセボもしくはオルニチンを摂取させ、酔いの体感や呼気アルコール濃度などをアルコール摂取180分後まで経時的に評価した。結果、オルニチン摂取によりアルコール代謝に対して有意な影響は認められなかった。

以上の実験1, 2より、アルコール摂取による翌朝起床時の疲労を始めとするネガティブな影響に対して、オルニチン 400 mg の摂取が改善効果を有することが明らかとなった。また、この効果はエタノール代謝の促進を介したものではない事が示唆された。

2. 序論

オルニチン摂取により、肝臓のアンモニア代謝経路である尿素回路が亢進することが知られている[5, 55]。アンモニアは生体にとって有害であるため、通常時は血中アンモニア濃度は低値に維持されているが、重度の肝疾患によりアンモニアの代謝能力が低下した際に上昇することが知られている。その他、激しい運動を行った際にも一過的にアンモニア濃度が上昇することが知られている。オルニチンは、これらの場合に上昇した血中アンモニア濃度を、低下させる。また、血中アンモニア濃度上昇時に併発して起こる疲労感についても、改善効果を有することが知られている[10, 11]。

重篤な肝疾患や激しい運動時以外にも、アルコールの摂取によって一過的に血中アンモニア濃度が上昇することが知られている[56, 57]。アンモニアもアルコールも生体にとっては有害な物質であり、主に肝臓で代謝される。また、それぞれの代謝経路は互いに影響を及ぼすことが報告されている[58]。このため、アルコールの摂取により、肝臓でのアンモニア代謝が低下した結果、血中アンモニア濃度が上昇すると考えられる。

オルニチンはアンモニア代謝の促進作用を有する事から、アルコール摂取時のアンモニア濃度の低減を介して肝臓でのアルコール代謝を助ける可能性がある事が推測される。そこで、本実験では、アルコール摂取翌朝に感じる疲労感に対してオルニチンが与える影響に関して、ヒトで評価を行った。

エタノールの肝臓での代謝は、2つの主要な酵素により行われる。すなわち、エタノールをアセトアルデヒドへと代謝する酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、およびアセトアルデヒドを酢酸へと代謝する酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) である。そのうち、ALDH は特にアジア人においてはアルコールへの感受性やアルコール摂取後の反応を特徴づける主要な因子である[59]。ALDH にはアセトアルデヒドが低濃度の時に主に働く ALDH2 と、高濃度になると働く ALDH1 があり、ALDH2 が通常アルコール代謝において主要な働きを担っている。ALDH2 は 487 番目のリジンがグルタミン酸に変わり不活型となる点突然変異が存在している[60]。また、ALDH2 はホモ 4 量体として機能するが、その内一つでも変異型となると不活化されるため、変異型の遺伝子を有する場合はヘテロタイプにおいても活性が極端に低下する[61]。ALDH2 が野生型/変異型のヘテロタイプの人にはフラッシュヤーと呼ばれ、比較的小量のアルコール摂取により、アセトアルデヒドが体内に蓄積し、短時間で皮膚の紅斑が生じる。他方、ALDH2 が野生型のホモタイプの人にはノンフラッシュヤーと呼ばれ、通常アルコール代謝能力を有する。アジア人では欧米人と比べ ALDH2 の変異型を有するフラッシュヤーの割合が高い事が知られている。

適度な量のアルコール摂取は有益な作用をもたらすこともある一方で、多量のアルコール摂取は健康にとって悪影響を及ぼす。比較的少量のアルコール摂取は入眠時間を短縮し、気分を陽気にさせ、コミュニケーションを円滑にしたりする効果があるが、多量のアルコール摂取は睡眠中の中途覚醒を増加させ、吐き気や頭痛などの症状を引き起こし、不安や抑うつなどの感情を惹起する。また、翌朝においても不快な症状や感情を継続し、翌日の行動に悪影響を及ぼす。特にフラッシュャーは日常生活においてこのようなアルコールのネガティブな効果の影響を受けやすい。そのため、フラッシュャーにおいてアルコール摂取による有害な効果を和らげる簡便な方法が望まれており、オルニチンに改善効果が認められれば、健康機能性食品としての有用性の点で意義が大きい。

本実験では、フラッシュャーを被験者とした2つのランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験により、アルコール摂取による影響に対して400 mgのオルニチンが及ぼす効果を評価した。試験1では、アルコール摂取翌朝起床時の疲労に着目し、オルニチンの効果をアンケートおよび唾液中ストレス指標を用いて主観および客観的に評価を行った。また、試験2ではアルコール代謝速度に及ぼすオルニチンの影響を評価した。

3. 実験方法

1) 被験者

キリンホールディングスの従業員よりボランティア被験者を募集し、健康な日本人成人で、アルコールへの耐性がフラッシャーである者を選定した。試験 1 は、男性 10 名、女性 1 名の計 11 名（平均年齢：35.5 ± 2.4 歳、平均体重：65.4 ± 3.6 kg）で実施した。試験 2 は、男性 11 名、女性 5 名（平均年齢：33.7 ± 1.9 歳、平均体重：60.4 ± 2.7 kg）で実施した。被験者は、投薬治療をしておらず、重篤な疾患の治療歴がなく、アルコール依存症や不眠症の経歴がない者とした。すべての被験者に対し、試験目的や内容を十分に説明した後、インフォームドコンセントに署名を得た上で試験を行った。

試験はヘルシンキ宣言に則り、キリンホールディングスのヒト試験倫理委員会の承認を得た上で実施した。

2) 被験者背景の評価

被験者のアルコールへの耐性はアルコールパッチテストキット（ライフケア技研）を用いて評価した。キットの説明書に従い、パッチを上腕内側に接触させた後に、肌の紅斑症状が認められるかを基準にして判定を行った[62]。

アルコール依存症については久里浜式アルコール症スクリーニングテストを用いて評価し、3 点以下の者をアルコール依存症の疑いがない者とした[63]。また、不眠症についてはアテネ不眠尺度 5 点以下の者を不眠症の疑いがない者とした[64]。

3) アンケート評価

被験者へのアンケートとして、Visual analog scale (VAS)、Oguri-Shirakawa-Azumi sleep inventory MA version (OSA-MA)、Profile of mood states (POMS)、酩酊度調査票を用いた。

VAS は、起床時の気分の状態について問う 7 項目の質問よりなる質問票である。眠さ、目覚めの気分、疲れ、だるさ、睡眠の状態、睡眠の深さ、寝つき、の項目について、左端を非常に良い状態、右端を非常に悪い状態、とした 10 cm の線上において、現在の気分に当てはまる場所に印をつける方法で被験者に回答させた。左端から印までの長さ(mm)を測定し、VAS スコアとした。低い値がより良い状態であることを示す。

OSA-MA は、睡眠の状態について問う 4 択式 16 項目の質問よりなる質問票である[65]。各質問への回答結果より、起床時眠気、入眠と睡眠維持、夢み、疲労回復、睡眠時間の 5 項目の標準化得点を算出した。高い値がより良い睡眠の状態であったことを示

す。

POMS（短縮版）は、気分や感情について問う 5 択式 30 項目の質問よりなる質問票である[66]。各質問への回答結果より、緊張-不安、抑うつ-落込み、怒り-敵意、活気、疲労、混乱の 6 項目の T スコアを算出した。数値はその項目の程度の強さを示す。すなわち、活気以外の項目は低い値がより良い状態を示し、活気は高い値がより良い状態を示す。

酩酊度調査票は、飲酒後に生じる典型的な症状の度合いについて問う 9 択式 5 項目の質問よりなる質問票である。酔いの度合い、高揚感、ふらつき、脱力感、不快感について回答させた。高い値がよりその状態の体感が強い事を示す。

4) 唾液中指標

被験者からの唾液サンプルの回収は、Salivette (Salimetrics) を用いて行った。被験者はスワブと呼ばれる綿を舌下に約 1 分間保持した後、専用のチューブにスワブを回収した。回収後はチューブを冷蔵庫で保管し、保冷剤で冷却して実験室へ持参させた。チューブを 1,500 g で 10 分間遠心分離を行って、スワブと唾液を分離した。回収した唾液は-80°C で測定まで保存した。唾液中のコルチゾール、分泌型イムノグロブリン A (sIgA)、 α -アミラーゼ濃度を、市販のキット (いずれも Salimetrics) を用い、コルチゾール、sIgA は ELISA 法で、 α -アミラーゼは chloro-*p*-nitrophenol 結合のマルトトリオースを基質とした発色法で測定した。

5) 呼気分析

コックのついたテドラー®バッグ (アズワン) 内にできる限り息を吹き込んだ後に、コックを閉めて呼気を回収した。呼気回収後は直ちにサンプル中のエタノール濃度をエタノールガス検知管 (ガステック) を用いて測定した。

6) 片足立ち時間

両目を閉じた状態で、片足で立っていられる時間を片足立ち時間として測定した。この際、軸足と反対の浮かせている足は軽く曲げ、手は腰に当てる様に被験者に指示した。3 度繰り返して測定し、その平均値を片足立ち時間とした。

7) 試験食品

試験食品としてプラセボ食品及び被験食品を作成した。プラセボ食品は結晶セルロー

ス(旭化成ケミカルズ)を白色のハードカプセルに充填し作成した。被験食品は 500 mg の L-オルニチン塩酸塩(オルニチンとして 400 mg を含む、協和ウェルネス)を白色のハードカプセルに充填し作成した。プラセボ食品及び被験食品共に、味やにおいはなく、外観上同一となるように作成した。

8) 試験デザイン

試験はランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験として行った。すなわち、被験者はプラセボ食品もしくは被験食品のいずれかを 1 回目の試験で摂取し、2 回目の試験ではもう一方の試験食品を摂取した。摂取の順番は被験者ごとにランダムに設定し、その設定は試験終了まで第三者が保管することで、被験者および試験実施者にはわからないようにした。被験者に対して、試験実施日の生活リズムは普段と大きく変えないよう指示した。被験者は絶水の時間帯以外は、自由に水を摂取できることとしたが、2 回目の試験で飲水量が大きく異なる事がないよう指示した。前の試験の影響が残ることが無いようにするため、2 回目の試験は 1 回目の試験から 2 日以上の間隔を空けた後に行った。

試験 1 では、オルニチンがアルコール摂取翌朝の体感および唾液ストレス指標に与える影響を評価した。被験者は配布された既定の夕食を就寝時間の 3.5 時間前に摂取し、その後絶食絶水で 2 時間の安静時間を設けた。唾液サンプルを回収した後、エタノール 0.4 g/kg 体重となる様に、アルコール 5% のビールをほぼ同じペースで 30 分かけて摂取した。その 30 分後に試験食品を水と共に摂取し、さらに 30 分後に就寝した。翌朝起床直後に再度唾液を回収した後、VAS、OSA-MA、POMS アンケートに記入を行った。

試験 2 ではオルニチンが飲酒直後の体感および呼気アルコール濃度に与える影響を評価した。被験者は試験開始前に 2 時間の絶食を行った。絶食後、試験食品を摂取し、試験 1 と同様の方法でアルコールを摂取した。その 30 分後に再度同じ試験食品を摂取し、さらに 2.5 時間の安静時間を設けた。アルコール摂取の 0、30、60、120、180 分後に、酔酩度調査票、呼気分析、片足立ち時間測定をそれぞれ行った。

9) 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。プラセボ食品と被験食品との 2 群の比較は、試験 1 は対応のある t 検定で、試験 2 は ANOVA 後に対応のある t 検定で行った。P 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 結果

1) 試験 1

試験実施日の被験者の睡眠時間について、試験食品間の差は認められなかった（プラセボ食品：6.2 ± 0.3 時間、被験食品：6.1 ± 0.3 時間）。飲酒翌朝起床時の体感では、VAS の目覚め気分、疲れ、だるさの項目、OSA-MA の睡眠時間の項目、POMS の怒り-敵意、混乱の項目、においてプラセボ食品と比較し、被験食品摂取時で有意な改善が認められた（Table 1-3-1）。さらに、有意ではなかったものの、その他の全ての項目において、被験食品摂取時で平均値が改善の方向に変動していた。

		Placebo	Ornithine
VAS	Sleepiness	52.1 ± 5.1	38.6 ± 5.6
	Awareness	46.5 ± 5.7	32.6 ± 3.5*
	Feeling of fatigue	44.2 ± 4.8	30.1 ± 4.3*
	Lassitude	48.2 ± 5.4	35.7 ± 5.1*
	Sleeping contentment	40.8 ± 6.1	35.0 ± 5.6
	Deep sleep	40.0 ± 5.3	32.0 ± 5.3
	Falling asleep	34.3 ± 6.5	31.4 ± 6.0
OSA-MA	Sleepiness on rising	41.3 ± 2.0	44.0 ± 1.6
	Initiation and maintenance of sleep	45.4 ± 3.2	48.8 ± 1.9
	Frequent dreaming	48.1 ± 2.5	52.9 ± 2.1
	Refreshing	47.0 ± 2.1	49.7 ± 1.3
	Sleep length	38.0 ± 2.2	44.0 ± 2.3*
POMS	Tension-Anxiety	41.2 ± 2.6	38.4 ± 2.2
	Depression-Dejection	44.4 ± 2.4	43.5 ± 2.1
	Anger-Hostility	41.6 ± 1.0	39.5 ± 1.5*
	Vigor	39.3 ± 2.4	44.9 ± 2.2
	Fatigue	46.3 ± 2.9	41.2 ± 1.3
	Confusion	55.0 ± 2.9	47.8 ± 1.5*

*p<0.05 compared with placebo.

Table 1-3-1 The effects of placebo or ornithine on VAS, OSA-MA and POMS scores the morning after alcohol consumption (experiment 1).

唾液中のストレス指標について、コルチゾール濃度は飲酒翌朝起床時の被験食品摂取時で有意に低下した (Fig. 1-3-1)。一方で、唾液中 sIgA 及び α -アミラーゼに有意な変動は認められなかった。

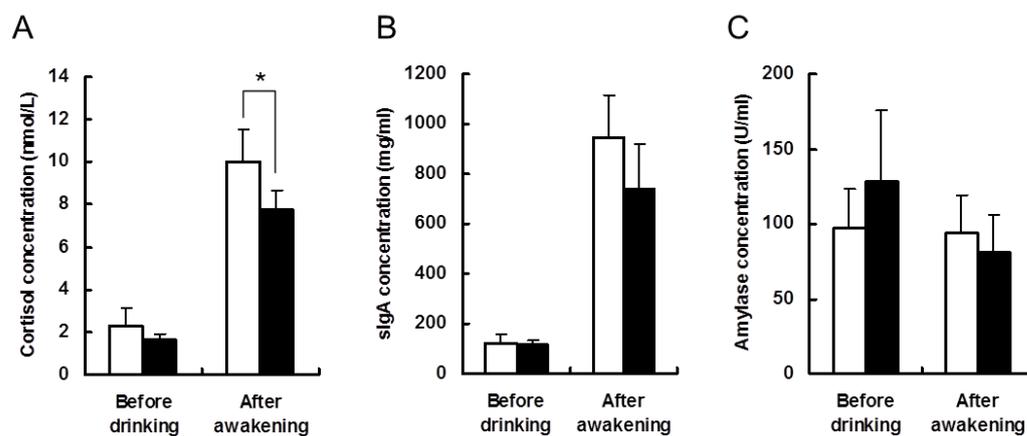


Fig. 1-3-1 Salivary concentrations of (A) cortisol, (B) sIgA and (C) α -amylase before drinking and after awakening (experiment 1). Open bars indicate control and closed bars indicate ornithine. Values are mean \pm SEM, * $p < 0.05$.

2) 試験 2

エタノール摂取後に、酔いに関連する各種項目の体感、呼気エタノール濃度、及び片足立ち時間は顕著に変動した (Table 1-3-2)。また、その影響はエタノール摂取 180 分後においても継続していた。プラセボ食品と被験食品摂取時を比較した結果、いずれの項目においても有意な差は認められなかった。

	condition	Before drinking	Time after drinking (min)				
			0	30	60	120	180
Breath alcohol content (ppm)	Placebo	0.0 ± 0.0	458.3 ± 60.9	320.9 ± 36.2	217.2 ± 18.0	106.3 ± 11.0	48.8 ± 6.0
	Ornithine	0.0 ± 0.0	437.7 ± 53.8	290.9 ± 25.0	216.0 ± 14.9	103.8 ± 9.5	45.3 ± 5.1
One-leg standing time (s)	Placebo	40.6 ± 4.3	25.3 ± 4.7	25.0 ± 3.8	29.8 ± 4.6	34.5 ± 4.7	40.4 ± 5.0
	Ornithine	41.5 ± 5.2	27.3 ± 3.9	23.2 ± 4.4	24.1 ± 3.9	32.3 ± 4.4	37.4 ± 4.6
Drunkness feeling test							
Drunkness	Placebo	1.0 ± 0.0	7.8 ± 0.3	5.8 ± 0.6	5.2 ± 0.5	4.1 ± 0.5	2.8 ± 0.3
	Ornithine	1.0 ± 0.0	7.4 ± 0.3	6.3 ± 0.5	4.9 ± 0.5	4.4 ± 0.5	3.3 ± 0.5
Elation	Placebo	1.8 ± 0.4	7.1 ± 0.4	5.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5	3.9 ± 0.5	2.8 ± 0.5
	Ornithine	1.9 ± 0.3	6.8 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.1 ± 0.5	4.3 ± 0.5	3.1 ± 0.5
Swaying	Placebo	1.1 ± 0.1	5.3 ± 0.6	3.8 ± 0.7	3.0 ± 0.6	2.4 ± 0.4	2.0 ± 0.4
	Ornithine	1.0 ± 0.0	5.1 ± 0.6	3.4 ± 0.6	3.2 ± 0.6	2.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5
Weakness	Placebo	1.8 ± 0.4	3.3 ± 0.7	3.6 ± 0.6	3.4 ± 0.6	2.8 ± 0.5	2.1 ± 0.4
	Ornithine	1.7 ± 0.3	3.5 ± 0.6	3.4 ± 0.8	3.3 ± 0.6	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.5
Discomfort	Placebo	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.7 ± 0.3
	Ornithine	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.1

Table 1-3-2 Breath alcohol content, one-leg standing time and drunkenness feeling test scores before and after alcohol drinking (experiment 2).

5. 考察

本実験では、フラッシュャーを被験者とした2つのヒト試験によって、アルコール摂取によるネガティブな影響に対して、オルニチンが及ぼす影響を評価した。

アルコール代謝に関わる主要な酵素の一つであるALDH2の変異のタイプは、黒人や白人ではほぼ100%が野生型のホモタイプ（ノンフラッシュャー）であるのに対し、モンゴロイドのアジア人では約35%がヘテロタイプ（フラッシュャー）であると報告されている[67, 68]。本実験では、アルコール摂取による影響の程度を被験者間で一定程度に揃えること、及び被験者倫理の面で摂取量を日常生活で摂取する範囲とすることを考慮して、アルコールの摂取による反応がより低濃度で出やすいフラッシュャーをアルコールパッチテストで選別し被験者とした。

欧米人（ノンフラッシュャー）を被験者としたアルコール摂取翌朝の影響を評価する試験では、一般的に0.7-1.6 g/kg 体重程度のアルコール負荷が行われることから、本実験でのアルコール摂取量（0.4 g/kg 体重）は比較的温和な条件であると考えられる[69-71]。実際、被験者へのヒアリングなどから判断し、本実験で認められたアルコール摂取翌朝の影響は、日常生活に支障の出る、いわゆる二日酔いと言われる状態と比べて軽度であり、普段の飲酒機会に近い状況であると考えられた。

実験1では、オルニチン摂取により、アルコール摂取翌朝の体感指標である、VASの目覚め気分、疲れ、だるさの項目、OSA-MAの睡眠時間の項目、POMSの怒り・敵意、混乱の項目、で有意な改善が認められた（Table 1-3-1）。さらに、その他全ての体感指標において、有意ではないもののオルニチン摂取により改善の方向に変動が認められた。実際の睡眠していた時間では試験食品群間に差はないものの、OSA-MAの睡眠時間の項目で有意な改善が認められていることから、オルニチンは同じ睡眠時間であっても体感的に長く寝られたと感じられる快眠効果がある事が示唆された。また、目覚め時の疲労感を改善することが示唆された。

体感の改善に加えて、翌朝起床時における唾液中コルチゾールがオルニチン摂取により有意に改善した（Fig. 1-3-1）。唾液中コルチゾールはストレスの状態を示す指標として知られていることから、オルニチン摂取によるアルコール摂取翌朝の体感改善は、生理的なストレスレベルの改善を介して生じているものと考えられた。

実験2では、実験1で認められた効果がアルコール代謝促進を介して起こっているとの仮説のもとに、オルニチンがアルコール摂取後のアルコール代謝速度に及ぼす影響を評価した。オルニチン摂取により、アルコール摂取に関連した各種体感や身体的な症状に有意な変動は認められなかった（Table 1-3-2）。また、呼気のアルコール濃度に関し

でも群間に有意な差は認められなかった。従って、本実験のオルニチン摂取量においては、オルニチンはアルコール代謝に対して影響を及ぼさないと考えられた。この結果から、実験 1 で認められたアルコール摂取翌朝の体感改善効果は、アルコール代謝の促進以外のメカニズムによるものと推測された。

オルニチンは尿素回路の亢進によりアンモニアの代謝を促進するが[5, 12]、アルコール摂取によりアンモニア代謝能が抑制されることが報告されている[57]。更に、アンモニア代謝の低下と疲労は関連している事が報告されている[4, 19]。従って、オルニチンはアルコール摂取によって生じるアンモニア代謝の低下を改善することによって、アルコール摂取翌朝に感じる疲労感を改善していると推察された。

アンモニア代謝の改善以外に考えられるオルニチンの効果を説明するメカニズムとして、睡眠の質改善が挙げられる。アルコールの摂取は入眠時間を短縮し寝つきを良くする効果があるが、一方で中途覚醒の増加や尿意によって睡眠の質を悪化させる[72]。オルニチンはノンレム睡眠の量を増加させ睡眠改善効果を有することがマウスを用いた実験で報告されている[73]。また、オルニチンの脳室内投与により、鎮静効果が認められることが、ヒヨコを用いた実験で報告されている[74]。さらにオルニチンの一部はグルタミン酸やプロリンへと代謝されるが、これらのアミノ酸には鎮静や睡眠導入効果がある事が知られている[75, 76]。以上より、オルニチンはアルコール摂取によって低下する睡眠の質を改善することにより、翌朝の体感の改善に一部寄与したと考えられた。

翌朝起床時の主観的指標に加えて、客観的指標である唾液中ストレスマーカークルチゾールがオルニチン摂取により改善した (Fig. 1-3-1)。クルチゾールは視床下部・下垂体-副腎系(HPA 系)のストレス反応の指標として過去の多くの研究で利用されており、比較的短期のストレス負荷によって活性化する指標である[77-79]。高架式十字迷路によるストレス負荷により誘導されたマウスのクルチコステロン(霊長類のクルチゾールに相当)濃度が、オルニチンの経口投与により、低下することが報告されている[80]。オルニチンは HPA 系を抑制することを介して、アルコール摂取によって誘導された翌朝起床時のストレス状態を改善していると考えられた。

本実験ではその結果の解釈において以下の限界があると考えられる。実験 1, 2 共に、被験者数が同様の実験と比べて比較的少数(実験 1: 11 名、実験 2: 16 名)であり、さらに実験 1 では女性の被験者が 1 名と性別に偏りがあった。また、被験者をフラッシュャーに限定し、かつアルコール負荷量を比較的少量としたことから、ノンフラッシュャーを被験者とした場合や、より多量のアルコール摂取時の影響に対しても、オルニチンの効果が 400 mg で同様に認められるかは不明である。本実験で認められたオルニチンの

効果をより詳細に検討するためには、被験者の属性やアルコール摂取量を変更した、より大規模の実験が必要であると考えられた。

本実験では、アルコール摂取による影響に対してオルニチンが及ぼす影響を評価した。その結果、アルコール摂取による翌朝起床時の疲労感などのネガティブな影響に対して飲酒後のオルニチン摂取が改善効果を有することが明らかとなった。また、体感の改善に加えて、唾液中ストレス指標であるコルチゾールが低下したことから客観的指標においてもオルニチンの効果が裏付けられた。このオルニチンの効果は、アルコール代謝の促進を介したものではなく、飲酒による睡眠の改善や、睡眠中の疲労回復の促進によるものと推測された。本実験の結果から、オルニチンはアルコール摂取翌朝の心理的及び生理的な悪影響に対して、有用な機能性食品となり得る可能性が示唆された。

第4節 オルニチンの睡眠の体感およびストレスの改善作用

1. 要約

本節では、軽度の疲労を感じている勤労者に対して、オルニチン 400 mg の 8 週間の継続摂取が疲労や睡眠の体感、および血中ストレス指標に対して及ぼす影響をヒトで評価した。

試験はランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間試験により実施した。52 名の疲労の自覚症状を感じる疲れ気味の方に、プラセボもしくはオルニチン 400 mg を就寝前に 8 週間毎日摂取させ、経時的に採血を行って血中ストレス指標であるコルチゾール、DHEA-S を評価した。また、POMS、AIS、OSA-MA といったアンケートにより、睡眠や疲労の体感を評価した。

結果、オルニチン摂取群で血中コルチゾール濃度およびコルチゾール/DHEA-S 比が有意に改善した。また、睡眠や疲労の主観項目の一部で改善が認められた。以上より、オルニチン 400 mg の長期摂取は、ストレスを低減させ睡眠や疲労を改善することが主観および客観的に確認された。

2. 序論

前節の実験において、オルニチンはアルコール摂取によって低下する睡眠の質を改善することにより、翌朝の疲労の体感の改善に寄与する可能性が示唆された。睡眠は日々の生活で蓄積する疲労を回復する時間として非常に重要であり、疲労と睡眠との関連は多くの横断的な研究によって示されている。一例として、睡眠時間の短縮は眠気の増大に加えて疲労の増大を引き起こすことが報告されている[81]。睡眠は日々の生活イベントやその中で受けるストレスなどの多くの心理的な要因によって影響を受け、自律神経系、免疫系、及び内分泌機能を通じて健康の重要なバロメーターとなる[82-86]。このため、睡眠の質や睡眠中の疲労回復の程度は、生活の質や幸福度と密接に関連し、日々の生活において重要な関心事となっている。特に、慢性及び蓄積性の疲労は、仕事を始めとするさまざまな作業において、個々人の効率やパフォーマンス低下に及ぼす影響が大きく、最悪の場合、長期間の過度な疲労の蓄積は過労死を引き起こす可能性さえある社会的に重要な課題である[87]。

疲労は身体的及び心理的な側面を持つ複雑で多元的な概念であり、特に心理的な疲労はストレスと関連が深い[88, 89]。我々の身体はストレスを受けた場合、視床下部-下垂体-副腎系(HPA系)を介してコルチゾールの分泌という身体的な反応を誘導する[90]。このため、コルチゾールはストレスのマーカーとして広く用いられている[91]。

近年、コルチゾールと Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) のバランスが身体ストレス状態を評価する上で、より信頼性の高い指標となりうるという事が報告されつつある[92-94]。DHEA、及びその硫酸エステル体である DHEA-S は、副腎より分泌されるアンドロゲンのうち、最も大量に存在するホルモンで、エストラジオールやテストステロンといった性ホルモンの前駆体である。DHEA-S の血中濃度は年齢と共に減少することが知られている[95-97]。DHEA-S にはコルチゾール濃度を低下させる作用があり、コルチゾールの過剰分泌状態における各種の身体への悪影響を軽減させる[98, 99]。

オルニチンの経口投与により、拘束ストレスによる HPA 系の活性化が抑制されることがマウスのコルチコステロンを評価した研究で報告されている[100]。また、オルニチンの脳室内投与により、ヒヨコのストレス反応が抑制されることが報告されている[74]。これらのオルニチンのストレス反応抑制効果はγアミノ酪酸 (GABA) レセプターを介している事が示唆されている。

上記より、ヒトにおいても経口摂取したオルニチンが中枢神経系に直接的に作用し、ストレスを抑制することで、睡眠や疲労の症状を改善させる可能性が推測された。また、

前節のオルニチン 400 mg 単回経口摂取試験において、飲酒翌朝の疲労の体感や唾液中ストレス指標の改善効果が認められたことから、オルニチンを長期摂取することによって、飲酒条件に関わらずより日常的な疲労感についてもオルニチンの効果が期待できると推測された。

そこで本実験では、ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間試験により、疲労の自覚症状を感じる疲れ気味の方に対する長期間のオルニチンの経口摂取が、睡眠や疲労の体感及び血中のストレス関連指標に対して与える影響を評価した。

3. 実験方法

1) 被験者

被験者はフルタイムで内勤系の職業に従事する 30-60 歳の健康な日本人男女とし、生活リズムが不規則である可能性が高いシフトワーク勤務者は除外した。また、疲れ気味の者を被験者とするため、POMS の疲労項目が 50 以上かつ活気項目が 50 以下の者を対象者とし、肉体疲労によって疲労を感じている者を除くため肉体系労働者は除外した。

喫煙者、妊婦、授乳中の女性、現在投薬治療中の者、重篤な疾患の治療歴のある者、日常的にオルニチンや睡眠疲労等のサプリメントを摂取している者は被験者から除外した。すべての被験者に対し、試験目的や内容を十分に説明した後、インフォームドコンセントに署名を得た上で試験を行った。試験はヘルシンキ宣言に則り、医療法人秋葉原メディカルクリニック倫理委員会の承認を得た上で実施した。

2) アンケート評価

主観的なストレスや睡眠の体感を評価するため、アテネ不眠尺度 (AIS)、POMS、OSA-MA の 3 つのアンケートを用いた。

AIS は 8 項目の質問 (寝つき、睡眠中の中途覚醒、早朝の覚醒、総睡眠時間、全体的な睡眠の質、日中の気分、日中の活動、日中の眠気) より成る睡眠の主観的な状態を評価するアンケートである。各質問は 0-3 点の 4 段階で評価し、総合点の 0-24 点で評価を行った[64]。

POMS 及び OSA-MA については、前節 3. 実験方法の項で示したものと同様の方法で実施した。

3) 血中指標

採血した血液サンプルから血清を回収し、コルチゾール及び DHEA-S を測定した。測定は外部血液検査機関 (ビー・エム・エル) にて行った。

4) 試験食品

前節 3. 実験方法の項で示したものと同様の方法で、プラセボ食品及び被験食品を作成し試験に用いた。

5) 試験デザイン

試験はランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間試験で行い、被験者はプラセボ食品

群もしくは被験食品群のいずれかにランダムに群分けした。試験開始後、被験者はプラセボ食品もしくは被験食品のいずれかの試験食品を8週間毎日就寝前に摂取した。試験期間中、摂取前(0週)及び摂取2, 4, 8週の計4回来院させ、採血を行って血液サンプルを回収した。採血当日は朝8時以降に食事を摂取しないように、またカフェインが含まれた飲料の摂取や喫煙をしないように被験者に指示した。採血は11時から13時の間に、静脈より真空採血管を用いて行った。さらに、被験者には0, 4, 8週にAISを、0, 2, 4, 6, 8週にPOMAを、毎週OSA-MAを記入させた。試験期間中は生活日誌を毎日記載させ、試験食品の摂取状況や、健康状態などを記録させた。

6) 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で示し、プラセボ食品群と被験食品群との2群の比較はANOVA解析後にStudent's *t* testで行った。P値0.05以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 結果

1) 被験者背景

被験者の平均年齢及び各評価項目の試験開始時の値を Table 1-4-1 に示す。試験開始時において、プラセボ食品群及びオルニチン食品群間に有意な差はなかった。また、試験実施期間を通じて被験者に重篤な副作用は認められなかった。

		Placebo group		Ornithine group	
Men (n)		11		10	
Women (n)		15		16	
		Average	SE	Average	SE
Age (years)		43.38	1.56	43.31	1.46
POMS	Tension-anxiety	63.35	1.66	65.23	1.99
	Depression-dejection	65.69	2.32	64.19	2.26
	Anger-hostility	61.85	2.29	63.31	2.28
	Vigor	35.62	1.05	36.88	1.12
	Fatigue	66.96	1.26	68.77	1.28
	Confusion	68.31	1.85	69.77	1.92
AIS		7.96	0.61	8.54	0.54
OSA	Sleepiness on rising	9.37	0.87	7.98	1.10
	Initiation and maintenance of sleep	15.21	1.34	12.12	1.17
	Frequent dreaming	21.73	1.62	23.04	1.40
	Refreshing	10.92	1.09	10.27	0.88
	Sleep length	13.31	1.11	14.71	1.40
Cortisol (µM)		0.21	0.02	0.23	0.01
DHEA-S (µM)		4.25	0.32	4.72	0.44
Cortisol/DHEA-S × 100		5.22	0.40	5.67	0.56

Table 1-4-1 Characteristics of subjects at 0 week.

2) アンケート評価

試験期間中の POMS の変化を Fig. 1-4-1 に示す。摂取開始時（0 週）と比較し、プラセボ食品群、オルニチン食品群共に全ての項目において摂取期間に伴い改善の方向に推移し、試験に参加したことに由来するプラセボ効果が認められた。試験食品群間を比較し“怒り敵意”の項目で摂取 2, 6 週目にオルニチン食品群において有意な改善が認められた。

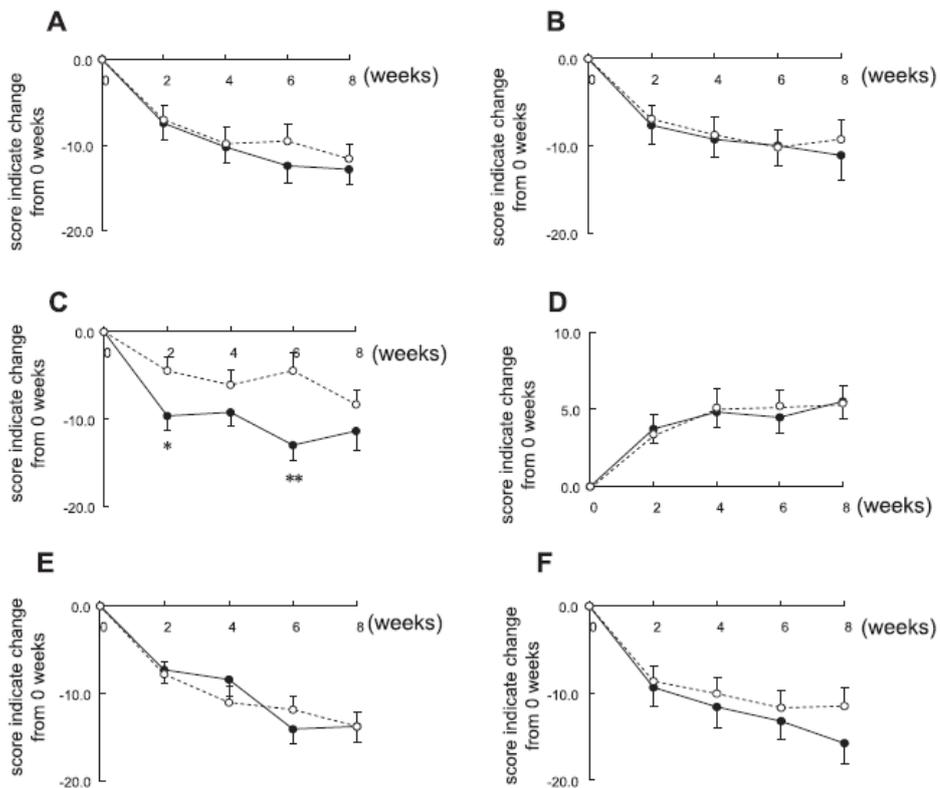


Fig. 1-4-1 Effect of ornithine supplementation on POMS. Means of the change from 0 weeks of each POMS score (A, tension-anxiety; B, depression-dejection; C, anger-hostility; D, vigor; E, fatigue; F, confusion) to 2, 4, 6 and 8 weeks: mean \pm SEM. White circles indicate the placebo and black circles indicate ornithine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with placebo.

試験期間中の AIS の変化を Fig. 1-4-2 に示す。POMS 同様に睡眠の体感も両群共に摂取期間に伴い改善の方向に推移した。試験食品群間を比較し、摂取 4 週目にオルニチン食品群に有意な改善が認められた。

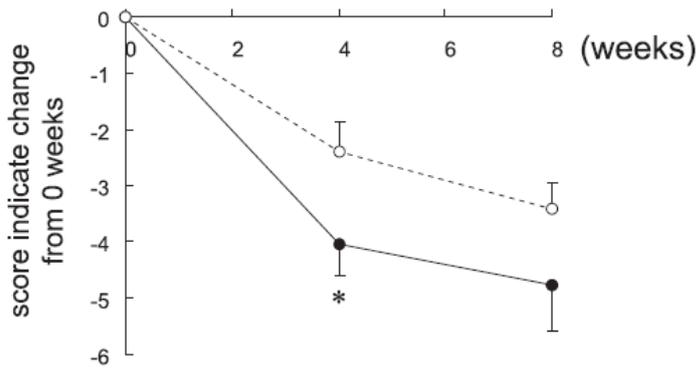


Fig. 1-4-2 Effect of ornithine supplementation on AIS. Means of the change from 0 weeks of each AIS score to 4 and 8 weeks: mean \pm SEM. White circles indicate the placebo and black circles indicate ornithine. * $p < 0.05$ compared with placebo.

試験期間中の OSA-MA の変化を Fig. 1-4-3 に示す。“目覚め気分”、“入眠と睡眠維持”、“疲労回復” の項目においては、摂取期間に伴い両群共に改善の方向に推移した。一方で”睡眠時間“の項目においては、プラセボ食品群は試験期間中ほぼ変化しなかったのに対して、オルニチン食品群では改善の方向に推移した。試験食品群間を比較し、”入眠と睡眠維持“の摂取 4 週目、及び”睡眠時間“の摂取 5, 6, 7 週目に、オルニチン食品群に有意な改善が認められた。

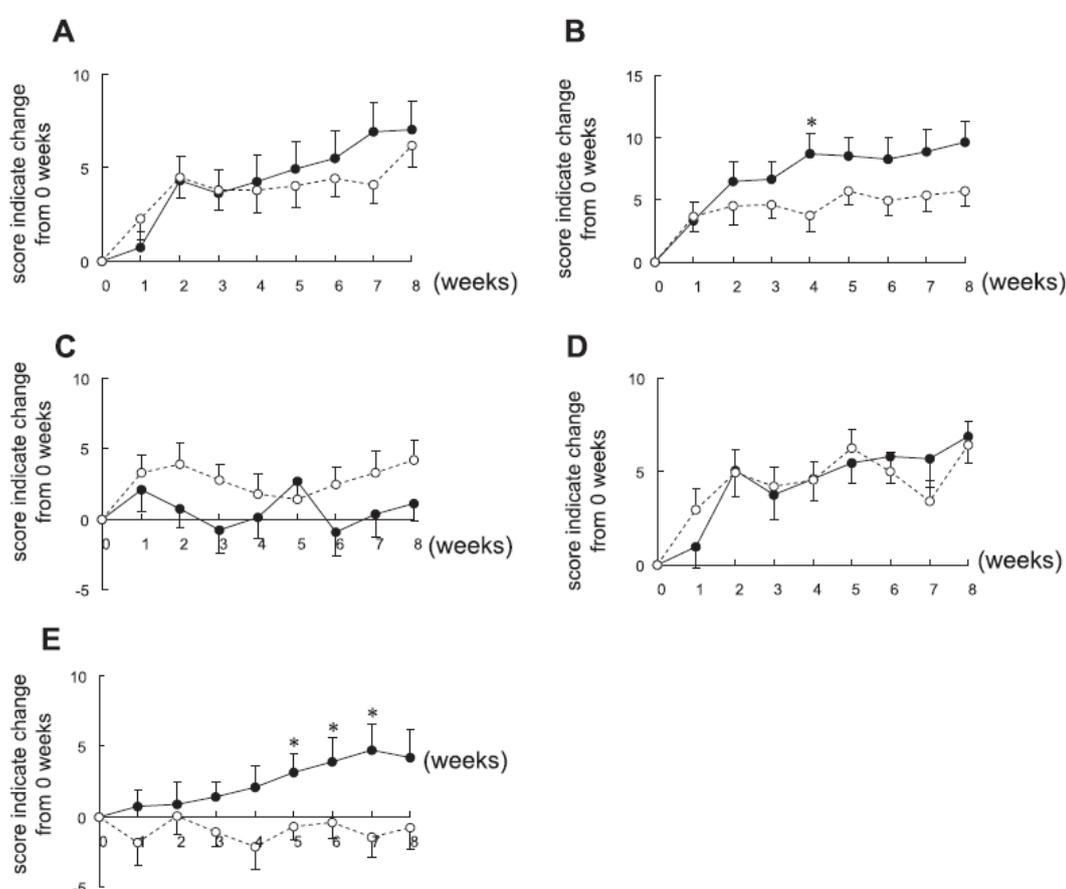


Fig. 1-4-3 Effect of ornithine supplementation on OSA. Means of the change from 0 weeks of each OSA score (A, sleepiness on rising; B, initiation and maintenance of sleep; C, frequent dreaming; D, refreshing; E, sleep length) to every week until 8 weeks: mean \pm SEM. White circles indicate the placebo and black circles indicate ornithine. * $p < 0.05$ compared with placebo.

3) 血中指標

血清 DHEA-S 及びコルチゾールの値を Fig. 1-4-4 に示す。DHEA-S は試験期間中ほぼ変動しなかったものの、コルチゾールはオルニチン食品群で摂取期間に伴い減少の方向に推移した。試験食品群間を比較し、DHEA-S、コルチゾール共に有意な差は認められなかったものの、2つの項目の比（コルチゾール/DHEA-S）においてはオルニチン食品群で摂取4週目に有意な改善が認められた。

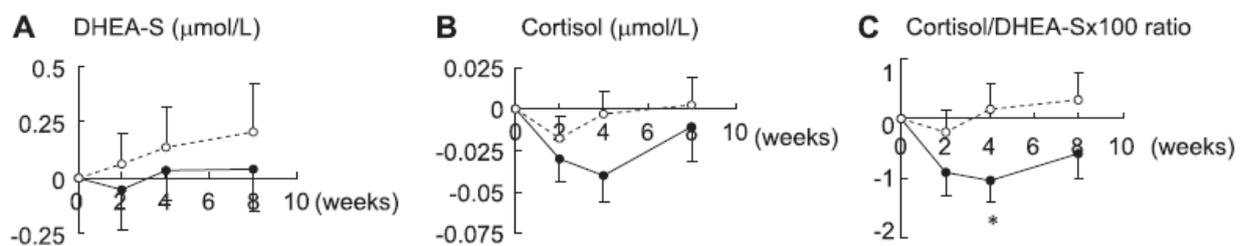


Fig. 1-4-4 Effect of ornithine supplementation on serum stress markers. Means of the change from 0 weeks of each stress marker level (A, DHEA-S; B, cortisol; C, cortisol/DHEA-S) to 2, 4, and 8 weeks: mean \pm SEM. White circles indicate the placebo and black circles indicate ornithine. * $p < 0.05$ compared with placebo.

5. 考察

本実験では、軽度の疲労を感じている勤労者に対して、8週間プラセボもしくはオルニチン 400 mg 摂取させ、睡眠や疲労の体感および血中ストレス指標を評価した。試験期間中にプラセボ食品群及びオルニチン食品群共に被験者に重篤な副作用は認められなかった。このことからオルニチン 400 mg の8週間の長期摂取による安全性に問題はないと考えられた。

本実験によりオルニチンの摂取が、ストレスの客観的な指標であるコルチゾール反応の改善、及び主観的な疲労や睡眠などの体感の改善に効果を及ぼすことが示された。オルニチンの脳室内投与により、急性ストレス負荷したヒヨコに対して鎮静効果が認められることが報告されており、その作用は GABA 受容体を介しているとされている[74]。また、マウスにオルニチンを経口投与し拘束ストレスを負荷した実験において、オルニチンが脳に移行し、脳内のオルニチン濃度が上昇し、その結果血中コルチコステロン濃度を低下させることが報告されている[100]。さらに、オルニチンの代謝前駆体であるアルギニンのヒヨコへの脳室内投与により、投与 10 分後の間脳や端脳のアルギニン及びオルニチン濃度が上昇することが報告されている[74]。一方で、この報告において GABA の濃度は変化しなかった。このことから、オルニチンの鎮静効果は脳内での GABA の合成促進を介したのではないと推測される[101]。HPA 系の制御において、副腎皮質刺激ホルモン (CHR) ニューロンは、GABA による強い抑制制御を受ける。加えて、視床下部傍室核 (PVN) へのストレス由来神経ステロイドで GABA アゴニストである、テトラヒドロデオキシコルチコステロンの投与により、ストレスホルモンの濃度が低下する[102]。本実験では、ヒトにおいてオルニチンの経口投与により血中コルチゾール濃度の低下が認められたが、この結果はこれまでに動物で報告されている HPA 系の活性化抑制を介したストレス低減効果の結果と一致していた。

本実験ではオルニチン摂取により、血中コルチゾール/DHEA-S 比が改善することが確認された (Fig. 1-4-4)。コルチゾールと DHEA-S のバランスの乱れは、肉体的・精神的な疾患の主要な要因の一つであると言われている[103, 104]。実際、コルチゾール/DHEA-S 比はうつ病患者で有意に上昇し、唾液中のコルチゾール/DHEA 比は当日の憂うつな事象の長さに逆相関することが報告されている[105]。また、統合失調症患者におけるコルチゾール/DHEA-S 比は、不安、怒り、抑うつ、敵意のスコアと正の相関を示し、さらに発症年齢、罹患期間とも相関することが報告されている[106]。これらの報告から、オルニチンの投与により本実験で認められたコルチゾール/DHEA-S 比の低減は、怒り敵意や睡眠などの体感指標の改善の結果と相関して生じていると考えられ

た。

POMS の怒り・敵意の項目は、交感神経活性化の結果として変動する項目の一つである。ストレスによって生じる生理的な変化として、コルチゾールやアドレナリン分泌の増加が知られている[107]。アドレナリンは交感神経系の活性化を促進することから、オルニチンの投与は HPA 系のみならず自律神経系に対しても影響を与える可能性が考えられた。本実験では自律神経系やアドレナリン濃度などの評価は実施しておらず、オルニチン摂取後のこれらの指標の変動を評価することが今後の課題として考えられる。

本実験では、睡眠に関するアンケートである AIS や OSA-MA の結果から、オルニチン摂取によりストレスの低減に加えて睡眠の質が改善することも示唆された (Fig. 1-4-2, 1-4-3)。この結果は前節で報告した、フラッシュャーを対象としたオルニチン単回摂取がアルコール摂取後の翌朝起床時の睡眠の体感を改善した結果と一致した。また、マウスにおいてオルニチンがノンレム睡眠の時間を増加させた結果とも相関する結果であった[73]。このことは、オルニチンの摂取によるストレス低減効果の一部は、睡眠の質改善を介して寄与している可能性があると考えられた。本実験では睡眠の質評価は主観指標のみで行っているが、今後脳波測定などの客観的な指標で睡眠の質改善を評価することが重要であると考えられる。

オルニチンの摂取は成長ホルモンの分泌を促進することも報告されている[7, 38]。成長ホルモンは 1 日の中で就寝後に最も多く分泌され、成長ホルモンの分泌量と睡眠の満足度は正の相関を示すことが報告されている[108-110]。よって、オルニチンの効果に成長ホルモンが関与している可能性も考えられた。

セロトニン代謝物である 5-ヒドロキシインドール酢酸は、オルニチン摂取により大脳線条体で増加することが報告されている[100]。また、日中のセロトニン濃度は夜間のメラトニン産生量と関連することが報告されている[111, 112]。よって、オルニチンはサーカディアンリズムを正常に維持し、良質な睡眠を誘発するための重要な栄養素であると言える。

仕事のストレスは生産性にも関わる重要な社会的課題である。本実験で得られた結果は、ストレス対処や睡眠の質維持に対するオルニチンの有効性を示す客観的な報告と考えられる。オルニチンの有用性をより確かなものにするため、オルニチンが自律神経系の制御に及ぼす影響をより詳細に評価することが今後の課題であると考えられる。

本実験の限界として、血中オルニチン濃度を評価していないことが挙げられる。そのため、ストレスマーカーの低減や体感の改善効果がオルニチンの直接的な効果によるものか評価することができていない。また、過去の報告を参考に設定したものの[10]、各

群 26 名という被験者数は明確な結論を導くには十分とは言えないと考えられる。より大規模で詳細な試験を実施することで、オルニチンの効果をより明らかにすることが期待される。

以上より、本実験では軽度の疲労を感じる勤労者にオルニチン 400 mg を 8 週間摂取させた結果、ストレス指標であるコルチゾール/DHEA-S 比や、疲労及び睡眠の体感に有意な改善が認められた。オルニチンはストレスフルな生活を送る勤労者にとって有用なサプリメントとなり得ることが示された。

<第2章 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用の検討>

第1節 PhaseII 酵素誘導活性を有するキノコの探索

1. 要約

日本で古くから食され、多くの生理機能が知られているキノコに着目し、その新たな機能性の探索を行う事を目的として43種類のキノコからNQO1誘導活性を指標にスクリーニングを行った。

結果、43種類のうち大半のキノコ抽出物において、NQO1誘導活性が認められたが、中でも強いNQO1誘導活性を示したキノコとして6種が見出された。このうち、食用のキノコで人工栽培が可能な *Mycoleptodonoides aitchisonii* (ブナハリタケ) が有望と考えられ、より詳細な評価を行う事とした。

2. 序論

キノコは日本では古くから食されている食材である。日本では年間約 45 万トンが生産され、日本人 1 人当たり年間 3.4 kg を消費している[113]。人工栽培によりエノキタケ、ブナシメジ、シイタケ、マイタケなどの品種を中心に 1 年を通して安定的に供給されている。食材としての利用に加えて、古来よりキノコの薬理作用は広く利用されてきた。特に、免疫調節作用、中性脂質低減作用、抗菌作用等が広く知られている[114]。これらに加えて、抗ガン作用についての報告がいくつかの種についてこれまでになされている。

抗ガン作用は主に化学物質の排泄作用と関連しており、その多くは生体異物の除去に関わる PhaseII 酵素の誘導作用や、グルタチオンレベルの上昇に由来している[115]。生体は発ガン性物質が体内に蓄積すると、肝臓などの酵素により解毒し体外に排泄するが、この様な解毒酵素には PhaseI 酵素および PhaseII 酵素の 2 つが存在している。PhaseI 酵素は物質を酸化や加水分解して変換し、PhaseII 酵素は抱合反応により安定化、水溶化した上で排泄する。PhaseI 酵素は、発ガン性物質の前駆体を一過的に活性化することから、PhaseII 酵素を誘導することが抗ガン作用において重要であると考えられている。

PhaseII 酵素の代表的なものとして、主に抗酸化酵素である glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) や heme oxygenase-1 (HO-1)、もしくは解毒酵素である NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) や glutathione S-transferase (GST)が知られている。PhaseII 酵素の発現誘導には、親電子性物質や活性酸素種に反応する antioxidant-responsive element (ARE)と呼ばれる共通の配列が関わっていることが知られている[116]。

ARE 領域に結合し、下流の転写を活性化する因子として NF-E2-related factor 2 (Nrf2)が知られている。Nrf2 は通常時は細胞質内に存在し、Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)が結合することで、プロテアソームによる分解を受けて速やかに除去されているが、Nrf2 活性化因子によりこの結合が阻害され、分解が抑制されることで核内に移行し、PhaseII酵素を始めとする Nrf2 ターゲット遺伝子の発現を促進する (Fig. 2-1-1) [117]。実際、Nrf2 を欠損したマウスでは、通常時には特徴的なフェノタイプは示さないものの、アセトアミノフェン、ブチル化ヒドロキシトルエン、ディーゼル車の排気ガス、タバコの煙などの化学生体異物への耐性が低下することが報告されている [118-120]。

食品由来の成分において、Nrf2 を介した PhaseII 酵素の発現誘導活性を有するもの

として、ブロッコリー等のアブラナ科植物に含まれるスルホラファン(SFN)、ホップに含まれるキサントフモール、ターメリックに含まれるクルクミンなどが報告されている[121-123]。

本実験では、キノコの新たな機能性を探索することを目的に、PhaseII 酵素の中でも代表的な NQO1 の活性を指標にして、各種キノコからスクリーニングを行った。

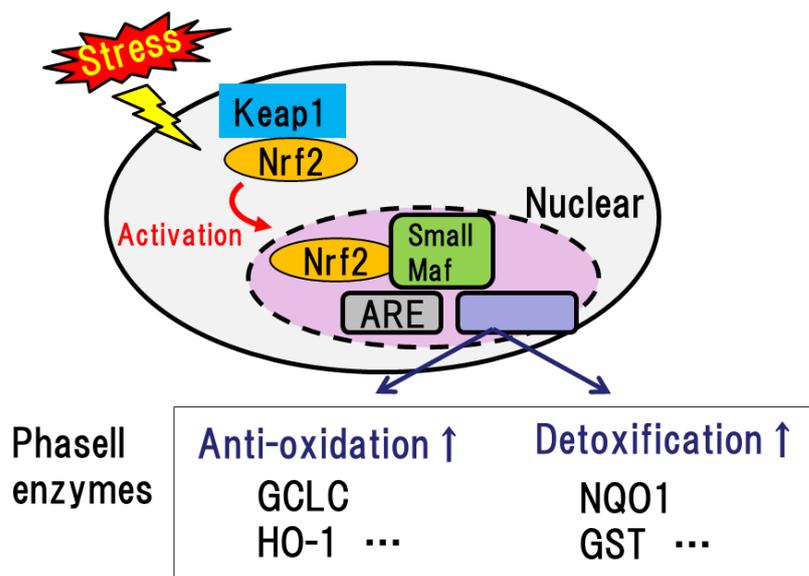


Fig. 2-1-1 Nrf2 signaling pathway.

3. 実験方法

1) 材料

各種キノコのスクリーニング用サンプルは、日本国内で採取した 43 種類のキノコ子実体酢酸エチル抽出物を用いた。サンプルは静岡大学大学院農学研究科 河岸洋和教授保有のものを提供いただいた。

2) 各種キノコの NQO1 酵素誘導能の評価

NQO1 酵素誘導能評価は Prochaska らの報告を一部改変し行った[124]。マウス Hepalclc7 細胞（大日本住友ファーマ）を α -MEM, 10% FBS 培地にて培養した後、96 ウェルプレートに 7×10^3 cell/well で播種した。細胞播種 24 時間後に各種キノコ抽出液を 33 μ g/ml となるように添加し、さらに 48 時間培養した。

培地を捨て、溶解バッファー（0.65 mM Digitonin, 2 mM EDTA-3Na pH7.8）を 50 μ l/well 加えて細胞を溶解させたのち、アッセイバッファー（1 mM MTT, 0.1% BSA, 1 mM Glucose-6-phosphate-Na, 0.01% Tween20, 30 μ M NADP, 5 μ M FAD, 2 U/ml Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 50 μ M Menadion, 25 mM Tris-HCl pH7.5）を 200 μ l/well 加えて 5 分間室温放置し反応させた。さらに、反応停止バッファー（0.3 mM Dicumarol, 0.5% DMSO, 5 mM Potassium phosphate pH7.4）を 40 μ l/well 加え、反応を停止させた後に、610 nm の吸光度を測定して NQO1 活性を評価した。この反応は、NQO1 によりメナジオンがメナジオールに変換され、さらにメナジオールが非酵素的に MTT を青色のフォルマザンへと変換する呈色反応を利用している。実験は各サンプル 3 連で実施し、数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。

4. 結果

1) 各種キノコの NQO1 酵素誘導能の評価

日本国内で採取された 43 種類のキノコ子実体の酢酸エチル抽出物について NQO1 酵素誘導能を評価した結果を Table 2-1-1 に示す。*Lactarius scrobiculatus* (キカラハツタケ), *Ionomidotis frondosa* (クロハナビラタケ), *Trametes hirsuta* (アラゲカワラタケ), *Trametes versicolor* (カワラタケ), *Mycoleptodonoides aitchisonii* (ブナハリタケ), *Craterellus cornucopioides* (クロラッパタケ) にコントロールと比べて特に強い (2.5 倍以上) の NQO1 誘導活性が認められた。その他のキノコについても強弱はあるものの一定の活性が認められた。

	Relative induction of NQO1(fold)
Control	1.0 ± 0.04
SFN	3.5 ± 0.16**
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	3.1 ± 0.08**
<i>Ionomidotis frondosa</i>	2.9 ± 0.05**
<i>Trametes hirsuta</i>	2.9 ± 0.05**
<i>Trametes versicolor</i>	2.7 ± 0.08**
<i>Mycoleptodonoides aitchisonii</i>	2.7 ± 0.10**
<i>Craterellus cornucopioides</i>	2.6 ± 0.02**
<i>Coprinus comatus</i>	2.4 ± 0.02**
<i>Tricholoma sejunctum</i>	2.4 ± 0.03**
<i>Cortinarius praestans</i>	2.4 ± 0.02**
<i>Hydnum repandum</i>	2.2 ± 0.05**
<i>Grifola frondosa</i>	2.1 ± 0.06**
<i>Daedalea dickinsii</i>	2.1 ± 0.09**
<i>Chlorophyllum molybdites</i>	2.1 ± 0.03**
<i>Pleurocybella porrigens</i>	2.0 ± 0.08**
<i>Oudemansiella venosolamellata</i>	2.0 ± 0.02**
<i>Ganoderma lucidum</i>	2.0 ± 0.06**
<i>Suillus laricinus</i>	1.9 ± 0.08**
<i>Panellus serotinus</i>	1.9 ± 0.09**
<i>Agrocybe cylindracea</i>	1.9 ± 0.07**
<i>Xerocomus nigromaculatus</i>	1.9 ± 0.06**
<i>Oligoporus tephroleucus</i>	1.8 ± 0.03**
<i>Sparassis crispa</i>	1.8 ± 0.02**
<i>Lepista sordida</i>	1.8 ± 0.05**
<i>Hericium erinaceum</i>	1.6 ± 0.01**
<i>Lycoperdon perlatum</i>	1.6 ± 0.02**
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1.6 ± 0.03**
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	1.6 ± 0.02**
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1.6 ± 0.02**
<i>Amanita hemibapha</i>	1.4 ± 0.07**
<i>Flammulina velutipes</i>	1.4 ± 0.01**
<i>Sarcodon aspratus</i>	1.4 ± 0.03**
<i>Albatrellus dispansus</i>	1.4 ± 0.02**
<i>Tricholoma flavovirens</i>	1.4 ± 0.02**
<i>Wolfiporia cocos</i>	1.3 ± 0.04**
<i>Chroogomphus rutilus</i>	1.3 ± 0.05**
<i>Tricholoma orirubens</i>	1.2 ± 0.03**
<i>Boletopsis leucomelas</i>	1.2 ± 0.03**
<i>Catahelasma imperiale</i>	1.2 ± 0.02*
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	1.1 ± 0.05*
<i>Gomphus fujisanensis</i>	1.1 ± 0.02*
<i>Fomes fomentarius</i>	1.1 ± 0.03*
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	1.0 ± 0.02
<i>Pholiota nameko</i>	1.0 ± 0.01

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$ compared with the control.

Table 2-1-1 NQO1-inducing activity of various mushrooms.

5. 考察

本実験ではキノコの有する新たな生理作用を探索することを目的として、抗酸化や解毒に関わる PhaseII 酵素の 1 種である NQO1 の誘導活性に注目し、43 種類のキノコ子実体抽出物について評価を行った。

大半のキノコ抽出物中において、NQO1 誘導活性が認められたが、中でも強い NQO1 誘導活性を示したキノコとして 6 種が見出された (Table 2-1-1)。これらのキノコについて、これまでに NQO1 誘導活性は報告されていない。NQO1 誘導活性を有するキノコについてはこれまでに、Shon らにより *Agrocybe cylindracea* (ヤナギマツタケ) および *Phellinus igniarius* (キコブタケ) 培養菌体について、さらに Kim らにより *Polyozellus multiplex* (カラストケ) について報告がされている[125, 126]。このうち、*A. cylindracea* は、既報と実験条件は異なるものの、本実験においても評価を行い 1.9 倍の NQO1 誘導活性を示し、評価した 43 種類の中で中程度の NQO1 誘導活性であった。

強い NQO1 誘導活性が認められた 6 種類のキノコのうち、キカラハツタケ、アラゲカワラタケ、カワラタケは非食用、クロハナビラタケは有毒のキノコである。ブナハリタケ、クロラッパタケは食用可能なキノコであり、特にブナハリタケは人工栽培が可能である。次節以降の実験では、ブナハリタケに注目し、より詳細に PhaseII 誘導活性を評価することとした。

第2節 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用

1. 要約

前節において、43 種類のキノコ類から NQO1 誘導活性を指標にスクリーニングを行った結果、強い活性が認められたキノコの中で、特に食用で人工栽培が可能なキノコとしてブナハリタケに着目した。

ブナハリタケ抽出液 (EAMA) を細胞に添加し一定時間培養した後、細胞に過酸化水素で酸化ストレスを負荷した際の細胞の生存率が向上したことから、酸化ストレス耐性を向上させることが示唆された。また、EAMA をマウスに経口投与し、肝臓及び小腸上皮の PhaseII 酵素を評価した結果、遺伝子発現量及び酵素活性が増加した。

さらに、ARE レポーターアッセイおよび Nrf2 ノックアウトマウスを用いた実験の結果から、EAMA の PhaseII 誘導活性は Nrf2 を介して作用していることが示唆された。ブナハリタケは酸化ストレスへの抵抗性を向上させる有用な食品素材であると考えられた。

2. 序論

ブナハリタケ（別名：カミハリタケ）はエゾハリタケ科に属するキノコで、その名の通りブナやカエデの倒木に発生する[22]。日本では東北地方を中心に食されているが、野生のブナハリタケは近年減少していることから、幻のキノコとも言われている。近年、ビール粕を菌床に用いた人工栽培方法が確立され、工業的な生産が可能となった[23]。ブナハリタケにはこれまでに、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate 誘導の炎症抑制効果、ラット脳における神経成長因子の合成促進効果、アンジオテンシン変換酵素阻害による血圧低下効果、マウスでの抗肥満効果が生理機能として報告されている[24-27]。これらに加えて、前節ではブナハリタケに NQO1 誘導活性がある事を初めて示した。

本節ではブナハリタケの PhaseII 酵素誘導活性をより詳細に評価することを目的として、過酸化水素で誘導した酸化ストレスへの耐性能を評価した。また、in vivo においても誘導活性が認められるかをマウスへの経口投与により評価した。次に、PhaseII 酵素誘導活性が Nrf2 の活性化を介する可能性を評価するため、ARE レポーターアッセイおよび Nrf2 ノックアウトマウスを用いた実験を行った。

3. 実験方法

1) 材料

ブナハリタケは、既報に示された方法で人工栽培した子実体の凍結乾燥物を用いた[127]。ブナハリタケ凍結乾燥物 1.0 kg を 6 L のメタノールで 20 分間抽出し、上清をろ過して減圧乾燥させた。乾燥した抽出物を水：酢酸エチル=1：1 の溶液で分液し、酢酸エチル層を回収して乾燥させ、さらに水に溶解させたものを Ethyl-acetate extract of *M. aitchisonii* (EAMA) として実験に用いた。

C57BL/6N 雄性マウス(チャールズリバー)7週齢を導入し1週間以上馴化を行った。飼料は AIN-76A (エトキシキン不含) を与えた。馴化後、体重を基に各群 7-8 匹の 4 群に分けた後に試験に用いた。Nrf2 欠損型 C57BL/6J マウス系統は理研 BRC (BRC No.01390) より導入し、自家繁殖させたものを実験に用いた[128]。

実験動物の飼育は 12 時間の明暗サイクル(明期:午前 8 時-午後 8 時)、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30-70% に維持した飼育室にて行った。動物実験は、キリンホールディングス動物実験倫理委員会の事前承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った。

2) ブナハリタケの酸化ストレス耐性能の評価

マウスマクロファージ様単核細胞 RAW 264.7 細胞 (アメリカンタイプカルチャー) を RPMI-1640, 10% FBS 培地にて培養した後、96 ウェルプレートに 2.5×10^4 cell/well で播種した。細胞播種 24 時間後に、ポジティブコントロールとしてスルフォラファン (SFN) もしくは EAMA を添加し、さらに 24 時間培養した。過酸化水素を 0, 0.2, 0.4, 0.8 mM 含んだ培地に交換した後、2 時間培養して細胞に酸化ストレスを負荷した。細胞の酸化ストレスへの耐性能は WST-8 cell counting kit (同仁化学研究所) を用い、細胞生存率として評価した。実験は各サンプル 3 連で実施し、数値は平均値±標準誤差で示した。

3) ブナハリタケの PhaseII 酵素遺伝子誘導能の評価

マウスを、control, 15 mg/day EAMA, 30 mg/day EAMA, 1 mg/day SFN の 4 群に分け、150 μl の水に溶解させた各サンプルを、経口投与で 24 時間おきに 3 日間投与した。最終投与のさらに 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺し、速やかに肝臓及び小腸上皮を回収して -80°C で評価に用いるまで保管した。

回収した臓器サンプルから TRIzol 試薬 (インビトロジェン) 及び RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて RNA を抽出し、そこから ThermoScript RT-PCR kit (インビト

ロジェン) を用いて cDNA を合成した。6 ng の cDNA を用いて定量 PCR を行って、各種 PhaseII 酵素の遺伝子発現を評価した。

定量 PCR は、SYBR premix ex taq 試薬 (宝バイオ) を用いて LightCycler 480(ロシュ) で測定した。測定結果は標準遺伝子である *GAPDH* の発現量で補正して求めた。定量 PCR に用いた各プライマー (インビトロジェン) の配列を下記に示す。実験は各群 7-8 匹で実施し、数値は平均値±標準偏差で示した。

NQO1: 5' -ACAGCATTGGCCACACTCCACCA-3'
5' -TGATGGCCCACAGAGAGGCCAAA-3'
GSTM1: 5' -TGCCCGAAAGCACCACCTGGAT-3'
5' -ACCATGGCCTCTTGCCCAGGAA-3'
HO-1: 5' -TGCACGCCAGCCACACAGCACTAT-3'
5' -ACTTGGTGGGGCTGTCGATGTTTCG-3'
GCLC: 5' -TCTGCAAAGGCGGCAACGCTGT-3'
5' -GCATCGGGTGTCCACATCAACTTCC-3'
CYP1A1: 5' -TGGGGCTTGCCCTTCATTGGTC-3'
5' -TCTGGCCGGCCCTTGAAGTCAT-3'
CYP1A2: 5' -TCGGCCATCGACAAGACCCAGA-3'
5' -TGTTACAGGTCCCGGGCTTCA-3'
Nrf2: 5' -ATGCCTTCCTCCGCTGCCATCA-3'
5' -ACGCTCGGCTGGGACTTGTGTTCA-3'
GAPDH: 5' -TCTGCCGATGCCCCCATGTTTG-3'
5' -TGGGTGGCAGTGATGGCATGGA-3'

4) ARE レポーターアッセイ

マウス *NQO1*-ARE 配列 (5' -AGAGTCACAGTGAGTCGGCAAAATT-3') を 3 コピー有した 2 本鎖オリゴヌクレオチドを、pGL3 プロモーターベクター (Promega) の *MluI*-*NheI* 領域に組み込んだ ARE-pGL3 プラスミドを作成した。RAW 264.7 細胞を RPMI-1640, 10% FBS 培地にて培養した後、12 ウェルプレートに 4.0×10^5 cell/well で播種した。細胞播種 24 時間後に ARE-pGL3 プラスミド及び pRL-TK プラスミドを SuperFect transfection reagent kit (Qiagen) を用いて細胞内にトランスフェクションした。2 時間培養した後、SFN もしくは EAMA を含んだ培地に交換し、さらに 24

時間培養した。ARE 下流遺伝子の転写促進により誘導されるルンフェラーゼの活性は、Dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いて測定した。実験は各サンプル 3 連で実施し、数値は平均値±標準誤差で示した。

5) Nrf2-KO マウスを用いた PhaseII 酵素遺伝子誘導能の評価

Nrf2 欠損型及び同系統の野生型マウスに、4% チオグリコール酸を 2 ml 腹腔内投与し、4 日後に PBS で腹腔内を洗浄して腹腔マクロファージを回収した。腹腔マクロファージを 35 mm ディッシュに 2.0×10^6 cell/dish で播種し、RPMI-1640, 10% FBS 培地にて培養した。1 時間後に培地を交換してディッシュに接着しなかった細胞を取り除いた後、SFN もしくは EAMA を含んだ培地でさらに 8 時間培養した。細胞から RNA を抽出して、cDNA を合成し、定量 PCR を行って PhaseII 酵素の遺伝子発現を評価した。実験は各サンプル 3 連で実施し、数値は平均値±標準誤差で示した。

6) 統計解析

サンプル処理群とコントロール群間の比較は Steel test を用いて検定した。P 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 結果

1) ブナハリタケの酸化ストレス耐性能の評価

EAMA で前処理した細胞に過酸化水素で酸化ストレスを誘導し、細胞生存率を評価した結果を Fig. 2-2-1 に示す。過酸化水素 0.4 mM の添加によって細胞生存率は 16.6% に低下したが、EAMA 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群では、細胞生存率がそれぞれ 26.8, 29.6, 44.3% となり、EAMA の酸化ストレスに対する耐性能の向上作用が示された。

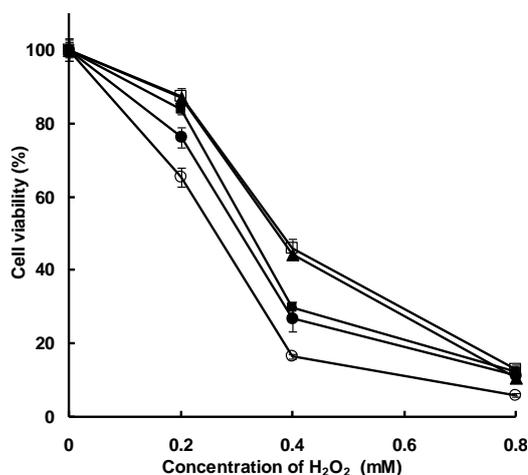


Fig. 2-2-1 Cell protection assay in RAW 264.7 cells from H₂O₂-induced cell death. Cell viability was detected after 2-h exposure to H₂O₂, control (open circle); SFN 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (open square); EAMA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (closed circle); EAMA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (closed square); EAMA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (closed triangle). Data are means \pm standard error of triplicates.

2) ブナハリタケの PhaseII 酵素誘導能の評価

EAMA をマウスに 3 日間経口投与し、肝臓および小腸上皮の PhaseII 酵素の遺伝子発現量を定量 PCR で評価した結果、肝臓において *NQO1*, *GSTM1* が、小腸上皮において *NQO1*, *GSTM1*, *GCLC* が有意に発現上昇した (Table 2-2-1)。

特に、30 mg/day 投与群の *GSTM1* で最も高い上昇 (肝臓: 3.81 ± 1.35 倍、小腸上皮: 3.73 ± 1.93 倍) が認められた。この遺伝子発現の結果と同様に、肝臓における *NQO1* の酵素活性もブナハリタケ投与群で濃度依存的に有意な上昇が認められた (Fig. 2-2-2)。

PhaseI 酵素の *Cyp1A1* および *Cyp1A2* の発現は、30 mg/day 投与群の肝臓において、有意な上昇が認められた。

Gene	Accession number	Relative level of expression (fold)							
		Liver				Small intestinal epithelium			
		Control	SFN (1 mg/day)	EAMA (15 mg/day)	EAMA (30 mg/day)	Control	SFN (1 mg/day)	EAMA (15 mg/day)	EAMA (30 mg/day)
NQO1	NM_008706	1.00 ± 0.21	1.17 ± 0.20	1.53 ± 0.45*	2.84 ± 1.29**	1.00 ± 0.11	1.22 ± 0.15*	1.39 ± 0.13**	1.73 ± 0.28**
GSTM1	NM_010358	1.00 ± 0.14	1.43 ± 0.24**	1.56 ± 0.22**	3.81 ± 1.35**	1.00 ± 0.13	1.70 ± 0.27**	1.51 ± 0.23**	3.73 ± 1.93**
GCLC	NM_010295	1.00 ± 0.16	0.81 ± 0.16*	0.96 ± 0.18	1.20 ± 0.30	1.00 ± 0.16	1.14 ± 0.28	1.33 ± 0.26*	1.39 ± 0.29*
Cyp1A1	NM_009992	1.00 ± 0.23	1.05 ± 0.22	1.16 ± 0.27	1.67 ± 0.46*	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Cyp1A2	NM_009993	1.00 ± 0.21	1.06 ± 0.19	1.20 ± 0.30	1.74 ± 0.46*	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Nrf2	NM_010902	1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.20	1.04 ± 0.20	1.21 ± 0.32	1.00 ± 0.05	1.13 ± 0.10*	1.13 ± 0.14*	1.07 ± 0.06

N.Q.: not quantified.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$, compared with the control.

Table 2-2-1 Transcriptional induction of phase II enzymes by oral administration of EAMA in mice.

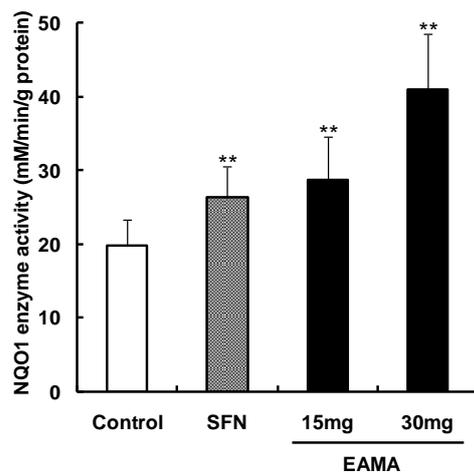


Fig. 2-2-2 Increased NQO1 enzymatic activity in the mouse liver. Mice were orally administered water (control), SFN (1 mg/day) or EAMA (15, 30 mg/day) for 3 days and killed on the fourth day (n = 7–8). The liver homogenate was prepared and enzymatic activity measured. Data are means ± standard deviations of each group (significant as compared with the control, ** $p < 0.01$).

3) ARE レポーターアッセイ

Nrf2 の結合領域である ARE 配列について、EAMA 添加が及ぼす影響をレポーターアッセイで評価した。100 及び 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EAMA 添加により、ARE 下流に結合したルシフェラーゼの活性が有意に増加した (Fig. 2-2-3)。この効果は EAMA の添加依存的に認められた。

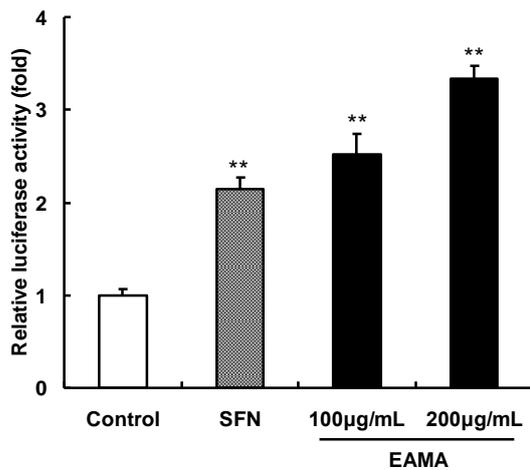


Fig. 2-2-3 Fold induction of luciferase activity by EAMA or SFN in RAW 264.7 cells transiently transfected with ARE-pGL3. Cells were treated with water, SFN (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or EAMA (100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Data are means \pm standard error of triplicates.

4) Nrf2-KO マウスを用いた評価

Nrf2 遺伝子野生型および KO マウスを用いて、EAMA 添加時の PhaseII 遺伝子発現量を評価した。野生型マウス由来の腹腔マクロファージにおいては、EAMA 添加により濃度依的に PhaseII 酵素である *NQO1*, *GSTM1*, *HO-1*, *GCLC* の発現が誘導された (Fig. 2-2-4)。一方で、Nrf2 欠損型マウス由来の腹腔マクロファージにおいては、EAMA 添加によっても *NQO1*, *GSTM1*, *GCLC* の発現上昇は認められなかった。また HO-1 では、発現上昇が認められたものの、その程度は野生型マウス由来腹腔マクロファージで認められた結果と比較して限定的であった。このことから、EAMA による PhaseII 酵素の誘導活性は、Nrf2 の活性化を介して生じていることが示唆された。また、HO-1 の活性化には Nrf2 のみでなく、他の因子の影響も受けていることが示唆された。

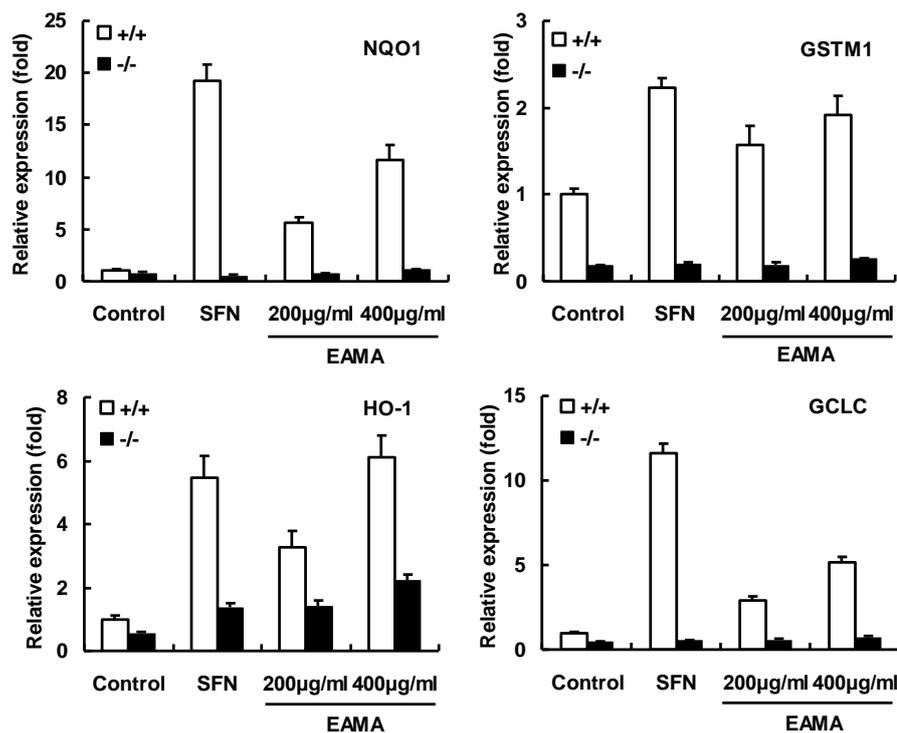


Fig. 2-2-4 Transcriptional induction of NQO1, GSTM1, HO-1 and GCLC in Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} macrophages incubated with water, SFN (0.6 µg/mL) or EAMA (200, 400 µg/mL) for 8 h. Data are means ± standard error of triplicates.

5. 考察

前節では 43 種類のキノコより NOQ1 誘導活性を指標にスクリーニングを行い、その中で活性が強く食用で人工栽培可能なキノコとしてブナハリタケを選抜した。本節ではブナハリタケの PhaseII 酵素誘導活性について *in vitro* もしくは *in vivo* の評価系を用いて、より詳細に評価を行った。

培養細胞に過酸化水素を添加することで、酸化ストレスが生じ細胞生存率が低下することが知られている。培養液中に評価サンプルを添加することで、サンプルが有する抗酸化能や細胞の酸化ストレス耐性能を評価する系として用いられている。本節で用いた実験系では、評価サンプル入りの培地で 24 時間前培養した後、過酸化水素含有の通常培地に入れ替えてさらに培養している。よって、評価サンプルそのものが有する抗酸化活性の影響は受けず、前培養時に評価サンプルが誘導した細胞の酸化ストレス耐性能を評価している。EAMA の添加により、過酸化水素による細胞生存率の低下が抑制された (Fig. 2-2-1)。これは、EAMA により細胞の HO-1 等の PhaseII 酵素が誘導され、酸化ストレス耐性能が向上したためと考えられた。

次に、細胞レベルで認められた EAMA 添加による NQO1 の活性上昇が、生体においても認められるかを評価するため、マウスに EAMA を経口投与し、PhaseII 酵素の発現誘導および NQO1 の酵素活性を肝臓および小腸上皮で評価した。なお、肝臓は PhaseII 酵素代謝の中心的な臓器であること、また小腸上皮は投与したサンプルによる影響を高濃度に受けやすいと考えられることから両臓器について評価した。結果、PhaseII 酵素の発現誘導および NQO1 の酵素活性の上昇が認められたことから、EAMA は摂取後に体内に取り込まれ、生体内においても PhaseII 酵素を誘導することで、酸化ストレスへの抵抗性の向上に寄与することが示唆された (Table 2-2-1, Fig. 2-2-2)。

NQO1 を始めとする PhaseII 酵素の発現誘導は、転写因子 Nrf2 によって制御されている。Nrf2 は通常状態では Keap1 と結合し細胞質内に留まっているが、酸化ストレスに応答して核内に移行し、PhaseII 酵素の遺伝子配列の上流部に共通して位置する ARE 領域に結合して下流の転写を促進することが知られている [117]。上記で認められた EAMA の PhaseII 誘導活性が Nrf2 を介したものであるのかを評価するため、ARE レポーターアッセイ及び Nrf2-KO マウス腹腔マクロファージを用いた評価系で評価した。本実験では、ノックアウトマウスの個体数が経口投与実験を行うに十分な程繁殖できなかったため、少ない個体数で比較的多数の均一な細胞を確保できる *in vitro* 評価系として、腹腔マクロファージを用いて EAMA の評価を行った。

ARE レポーターアッセイでは、EAMA の添加により ARE 下流に配置したルシフェ

ラーゼ活性が濃度依存的に上昇した。また、マウス腹腔マクロファージを用いた検討では、野生型で認められた EAMA 添加による PhaseII 酵素の発現誘導が、Nrf2-KO 型では認められなかった。これらの結果から、EAMA 添加により、Nrf2-ARE シグナルが活性化され、ARE 下流の PhaseII 酵素の発現が誘導されることが示唆された。

酸化ストレスの亢進は、肥満、糖尿病、炎症など幅広い疾患の発症に密接に関与している。Nrf2 は酸化ストレスに対する生体防御機構として、生体の酸化ストレスレベルの恒常性維持に重要な働きを担っている[129]。Nrf2 を活性化することにより、生体が本来有する抗酸化システムを広く活性化できることから、その物質自身が抗酸化作用を有する抗酸化物質と比べ、より効率的に生体の酸化ストレス防御に寄与すると考えられる。本実験においてブナハリタケの Nrf2 活性化作用が確認されたことから、健康機能性を有する食材としての有用性が改めて示された。

第3節 ブナハリタケ中 Nrf2 活性成分の分離同定

1. 要約

第1節及び第2節で確認されたブナハリタケの Nrf2 活性化作用の活性成分を同定することを目的に、NQO1 誘導活性を指標にしてブナハリタケ抽出液の分離同定を行った。

その結果、化合物 **1** (4-acetyl-3-methyl-dihydro-furan-2-one), 化合物 **2** (4-(1-hydroxyethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-one), 化合物 **3** (5-hydroxy-3,4,5-trimethyl-5-H-furan-2-one), 化合物 **4** (1-(4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)ethyl acetate), 化合物 **5** (2-(5-ethyltetrahydrofuran-2-yl)acetic acid), 化合物 **6** ((E)-2-decenedioic acid), 化合物 **7** (1-phenyl-pentane-1,3-diol), 化合物 **8** (2-phenyl-pyran-4-one), 化合物 **9** (dihydro-4-phenyl-2(3H)-furanone), 化合物 **10** (2-phenyl-5,6-dihydro- γ -pyrone), 化合物 **11** (2-(2-formylpyrrol-1-yl)-4-methylvaleric acid) の 11 化合物を同定した。化合物 **2, 4, 5** はこれまでに報告のない新規化合物、化合物 **1, 3, 7, 8, 9** は天然物からこれまでに報告のない化合物であった。

各化合物の NQO1 誘導活性を比較したところ、複数の化合物が活性を示し化合物 **9** が最も強い活性を示した。個々の化合物の活性は比較的弱いものの、ブナハリタケ全体としてキノコ類の中でも強い NQO1 誘導活性や Nrf2 活性化作用を発揮していると考えられた。

2. 序論

本章第1節及び第2節より、ブナハリタケにキノコ類の中でも強い PhaseII 酵素誘導作用があること、その作用は Nrf2 活性化を介して示されることが示唆された。

Nrf2 を活性化させる食品成分としては、ブロッコリー等のアブラナ科植物に含まれるスルフォラファン、ホップに含まれるキサントフモール、ターメリックに含まれるクルクミンなどが知られている[121-123]。また、PhaseII 誘導活性を示す化合物として、7つのタイプがある事が報告されている[130]。

ブナハリタケに含まれる活性成分として、血圧降下作用を有するジペプチド(Ile-Tyr)、小胞体ストレス抑制作用を有する 5-Hydroxy-4-(1-hydroxyethyl)-3-methylfuran-2(5H)-one を始めとする 8 化合物、ドーパミン分泌促進作用を有するフェニルペンタノン類などがこれまでに報告されている[127, 131, 132]。

本節では、ブナハリタケの Nrf2 活性化作用の活性成分を同定することを目的に、ブナハリタケ抽出液中より少量のサンプル量で評価が可能な *in vitro* の系である NQO1 誘導活性を指標に、分画を行った。

3. 実験方法

1) EAMA からの活性成分の分離

活性成分の分離は、第2節と同様の方法で Hepa1c1c7 細胞を用いた NQO1 酵素誘導能評価を指標に行った。クロロホルム-メタノール (40 : 1) で平衡化したシリカゲルオープンカラム (20 mm × 300 mm, 和光純薬) に EAMA 10 g を添加し、溶出液をフラクションコレクターで回収して粗分画を行った。NQO1 誘導能評価で活性を示した画分を乾燥させ、褐色の油状成分 (1.86 g) を回収した。次に YMC pack C₁₈ カラム (250 mm × 10 mm i.d., YMC) に添加し、0.1%ギ酸含有 35-100%のアセトニトリル濃度勾配 30分によって溶出させ、活性を有する Fr. I から Fr. V の 5 画分を得た。各画分の保持時間は、Fr. I (8.5-10 分) , Fr. II (12.5-13.5 分) , Fr. III (15-17 分) , Fr. IV (18.5-21 分) , Fr. V (21-23 分) であった。各画分をさらに Capcel pak C₁₈ カラム (250 mm × 10 mm i.d., 資生堂) を用いて分離し、活性画分 (化合物 1-11) を回収した。各画分の溶出条件は、Fr. I (0.1% ギ酸, 5% メタノール) , Fr. II (0.1% ギ酸, 10% アセトニトリル) , Fr. III (0.1% ギ酸, 18% メタノール) , Fr. IV (0.1% ギ酸, 18% アセトニトリル) , Fr. V (0.1% ギ酸, 30% アセトニトリル) で行った。

2) 分離した活性成分の同定

¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルを Bruker AMX400 Spectrometer (Bruker) を用いて測定した。HR-ESI-MS スペクトルを JMS-T100LP (Jeol) を用いて測定した。

3) 活性成分の NQO1 誘導能の評価

化合物 1-11 を Hepa1c1c7 細胞に 100 μg/ml の濃度で添加し、NQO1 誘導能を評価した。評価は本章第1節 3. 実験方法の項で示したものと同様の方法で行った。また、同様の添加濃度での細胞毒性を WST-8 cell counting kit (同仁化学研究所) で評価した。

4. 結果

EAMA より NQO1 誘導活性を指標に分離精製を行い、活性成分として化合物 **1-11** の 11 化合物を同定した。1 kg の乾燥ブナハリタケ子実体からの化合物の収量は、化合物 **1-11** それぞれ、化合物 **1** (84.0 mg), **2** (111.0 mg), **3** (426.0 mg), **4** (3.0 mg), **5** (3.0 mg), **6** (12.0 mg), **7** (3.0 mg), **8** (3.0 mg), **9** (0.9 mg), **10** (1.5 mg), **11** (1.5 mg) であった (Fig. 2-3-1)。

化合物 **1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11** は HR-ESI-MS および ^1H NMR のデータを既報と照合し、それぞれ、化合物 **1** (4-acetyl-3-methyl-dihydro-furan-2-one) [133], **3** (5-hydroxy-3,4,5-trimethyl-5-H-furan-2-one) [134], **6** ((E)-2-decenedioic acid) [135], **7** (1-phenyl-pentane-1,3-diol) [136], **8** (2-phenyl-pyran-4-one) [137], **9** (dihydro-4-phenyl-2(3H)-furanone) [138], **10** (2-phenyl-5,6-dihydro- γ -pyrone) [139], **11** (2-(2-formyl pyrrol-1-yl)-4-methylvaleric acid) [140] と同定した。このうち、化合物 **1, 3, 7, 8, 9** については、天然物からはこれまでに報告のない化合物であった。

化合物 **2** は HR-ESI-MS, ^1H NMR および ^{13}C NMR の結果より、分子式 $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ と決定し、さらに ^1H - ^1H COSY, HMQC および HMBC 解析の結果から、化合物 **2** の構造を 4-(1-hydroxyethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-one と同定した。同様に化合物 **4** の分子式を $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$ 、構造を 1-(4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)ethyl acetate と同定した。さらに、化合物 **5** の分子式を $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$ 、構造を 2-(5-ethyltetrahydrofuran-2-yl)acetic acid と同定した。化合物 **2, 4, 5** はこれまでに報告のない、新規化合物であった。

化合物 **2, 4, 5** の物理化学的特性を以下に示す。

化合物 **2** [4-(1-hydroxyethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-one]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.17 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6), 1.30 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-8), 2.21 (1H, m, H-4), 2.59 (1H, m, H-3), 3.77 (1H, m, H-7), 3.96 (1H, dd, $J=8.6, 8.6$ Hz, H-5), 4.33 (1H, dd, $J=8.6, 8.6$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 16.6 (C-8), 21.5 (C-6), 38.4 (C-3), 51.3 (C-4), 69.3 (C-7), 69.7 (C-5), 182.9 (C-2); HR-ESI-MS: m/z 145.08653 [(M+H) $^+$; calcd. for 145.08647 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_3$)], $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ 15.9 $^\circ$ (c 0.15, CH_3OH)

化合物 **4** [1-(4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)ethyl acetate]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.18 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-8'), 1.39 (3H, d, $J=5.9$ Hz, H-7'), 2.02 (3H, s, H-1), 2.50 (1H, m, 1H, H-3'), 2.98 (1H, m, H-4'), 4.08 (1H,

m, 1H, H-2'), 4.28 (1H, m, H-2'), 4.52 (1H, m, 1H, H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 10.3 (C-8'), 20.3 (C-1), 20.6 (C-7'), 36.8 (C-4'), 45.3 (C-3'), 63.6 (C-2'), 79.4 (C-6'), 172.4 (C-2), 181.7 (C-5'); HR-ESI-MS: *m/z* 187.09712 [(M+H)⁺; calcd. for 187.09703 (C₉H₁₅O₄)], [α]²⁰_D -3.7° (*c* 0.15, CH₃OH)

化合物 5 [2-(5-ethyltetrahydrofuran-2-yl)acetic acid]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.90 (3H, t, *J*=7.5 Hz, H-7'), 1.40–1.66 (4H, H-3' and H-6'), 2.02–2.14 (2H, H-4'), 2.38–2.54 (2H, H-2), 3.90 (1H, m, 1H, H-5'), 4.34 (1H, m, H-2'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 10.4 (C-7'), 29.6 (C-6'), 32.2 (C-4'), 32.8 (C-3'), 42.3 (C-2), 76.7 (C-2'), 81.1 (C-5'), 175.7 (C-1); HR-ESI-MS: *m/z* 157.08644 [(M-H)⁻; calcd. for 157.08647 (C₈H₁₃O₃)], [α]²⁰_D 2.3° (*c* 0.2, CH₃OH)

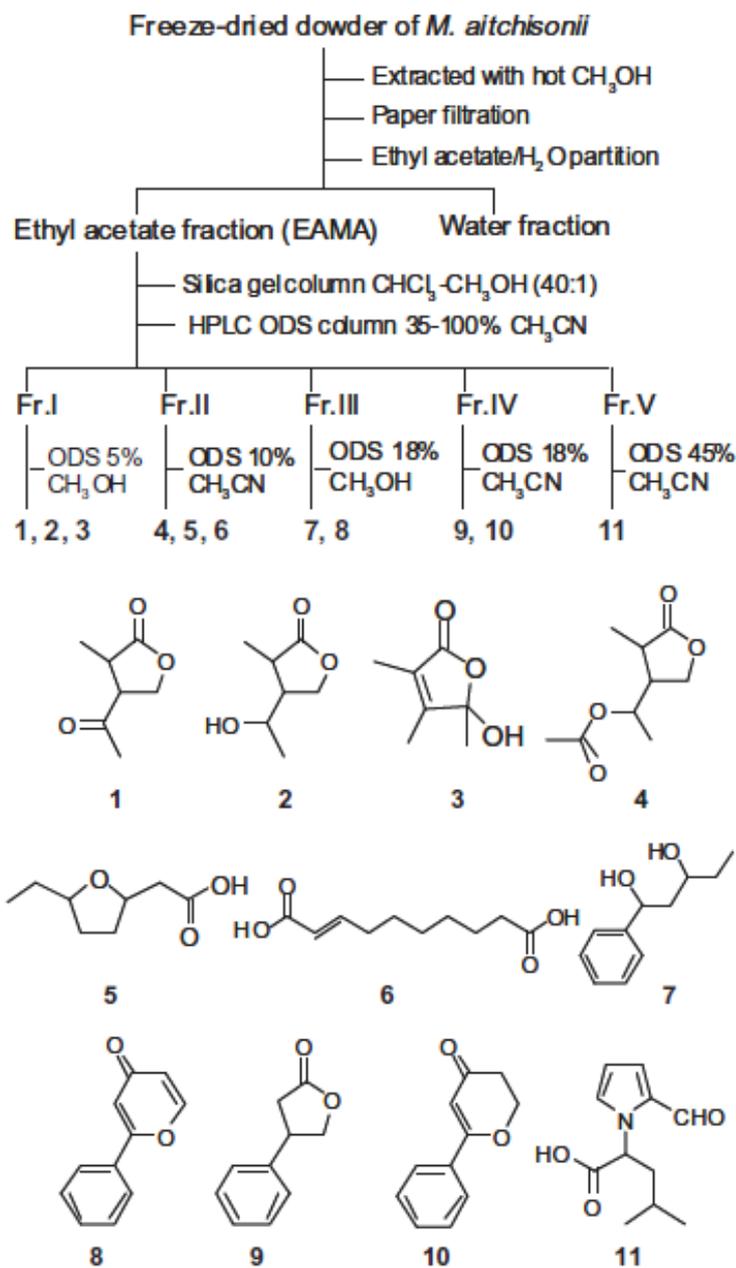


Fig. 2-3-1 Isolation procedure and chemical structures of NOQ1-inducing compounds (1-11) from *M. aitchisonii*.

同定した化合物 **1-11** の NQO1 誘導活性を 100 $\mu\text{g/ml}$ の添加濃度において評価した結果、全ての化合物において NQO1 誘導活性が認められた。特に化合物 **9** が 11 化合物の中で最も高い活性を示した (Fig. 2-3-2)。一方でポジティブコントロールである SFN と比較して単位重量当たりの活性はいずれの化合物も低かった。なお、全ての化合物で本実験の添加濃度で細胞毒性は認められなかった (データ示さず)。

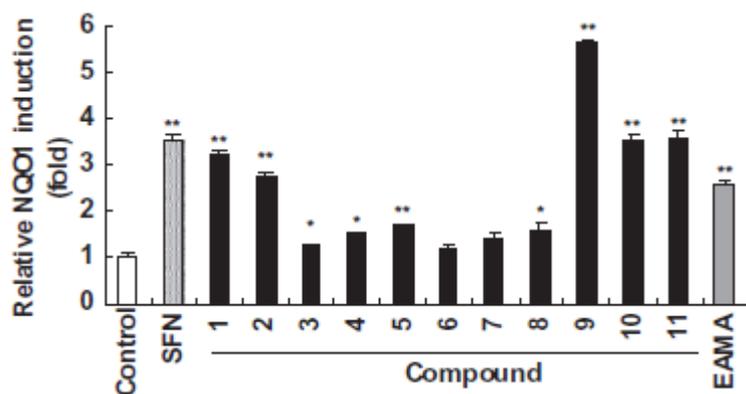


Fig. 2-3-2 NQO1 induction by isolated compounds in Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with water, SFN (0.6 $\mu\text{g/mL}$), compounds **1** to **11** (100 $\mu\text{g/mL}$), EAMA (100 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h. Data are means \pm standard error of triplicates (significant as compared with the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

5. 考察

ブナハリタケ抽出物 EAMA より NQO1 誘導活性を指標に活性成分の分離同定を行い、11 化合物を同定した。同定した 11 化合物を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の同じ濃度で比較したところ、化合物 **9** が最も高い活性を示した (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において 5.6 ± 0.15 倍)。化合物 **2, 4, 5** については、新規化合物であった。さらに、化合物 **1, 3, 7, 8, 9** については、天然物からはこれまでに報告のない化合物であった。

Prestera らは、PhaseII 誘導活性を示す化合物を 7 つのタイプに分類している。すなわち 1) ジフェノール、フェニレンジアミン、キノロン類 2) ミカエル反応受容体類 3) イソチオシアネート類 4) ヒドロペルオキシド類 5) メルカプタン類 6) ヒ素化合物類 7) 重金属類である[130]。同定した化合物のうち化合物 **3, 8, 10** は α , β -不飽和カルボニル基を有していることから、2) のミカエル反応受容体類の一種と分類できると考えられる。Keap1 のシステイン残基、なかでも Cys151, 273, 288 は親電子性物質のセンサーとして重要であるが、ミカエル反応受容体類は Keap1 システイン残基のチオール部に作用し Nrf2 を活性化させることが知られている[141]。その他の同定した化合物は、いずれの分類にも当てはまらないことから、Keap1 のチオール部に作用する可能性に加えて、その他のメカニズムで Nrf2 を活性化させている可能性が考えられた。

本実験においては、NQO1 誘導活性を示す活性成分はブナハリタケ中の単一の化合物とはならず、複数の化合物が活性を示した (Fig. 2-3-2)。このことは、個々の化合物の活性は比較的弱いものの、ブナハリタケ全体としてキノコ類の中でも強い NQO1 誘導活性や Nrf2 活性化作用を発揮している事が示唆された。代表的な Nrf2 活性化素材である SFN と比較して、個々の化合物の比活性は弱いものであった。

以上より、ブナハリタケの摂取は、Nrf2 活性化を介した PhaseII 酵素の誘導により、酸化ストレスに起因する各種の疾患に対して防御効果を有すると考えられた。本研究において、ブナハリタケの健康機能性食品としての有効性が改めて示されたと言える。今後の研究において、より適切な動物モデル系を用いた評価や、ヒトを対象とした摂取試験を行うことで、ブナハリタケの酸化ストレスが関与する各種疾患への予防効果の評価や、ヒトの健康に与える効果について、さらなる解明へと繋がると考えられる。

<第3章 総括>

近年、様々な食品成分の機能性に関する研究が活発に行われており、それらを活用した健康機能性食品が多数発売されている。しかし、一般的に医薬品に比べて食品成分は、動物やヒトでの有効性及び安全性の検証における科学的知見は不足していると言える。日本における少子高齢化や医療費増大の背景から、日々摂取する食品に含まれる疾病予防に寄与する成分を摂取することにより、疾病を未然に予防し健康を維持することが重要であり、健康機能性食品に対する注目が今後より増加していくと考えられる。そのため健康機能性成分の科学的知見を今後さらに蓄積していく必要がある。

2015年4月より、日本において食品の機能性表示食品制度が新たに施行された。この制度では事業者の責任において科学的根拠を基に食品に機能性を表示することができる。製品に機能性を表示し、より根拠が確かで効果が期待できる健康機能性食品として一般消費者に製品を提供していく観点からも、健康機能性成分の科学的知見、特にヒトでの臨床試験データの重要性が今後増していくと考えられる。

本研究では数多くの食品素材の中から、遊離アミノ酸のオルニチン及び食用キノコのブナハリタケに注目した。両素材のこれまでに知られていない新たな機能性として、オルニチンについては抗疲労効果、ブナハリタケについては Nrf2 活性化作用について知見を得た。

オルニチンについて、まずは基礎的な知見を得ることを目的に、マウスに経口投与した際の血液、肝臓、筋肉におけるアミノ酸代謝、糖代謝、脂質代謝への影響を評価した。その結果、オルニチンは投与後に体内に吸収され、血液中を循環した後に筋肉や肝臓に取り込まれることが確認された。また、オルニチンはグルコース-アラニン回路によるエネルギー代謝を促進し、脂質のエネルギー産生への利用を抑制する作用を有することが示唆された。本実験により、尿素回路の活性化に加えて代謝に関する基礎的な知見を得ることができた。次に、オルニチンの機能の一つとして知られているタンパク質合成促進作用が、mTOR シグナルの活性化を介して生じていることを、ラット肝ブライマリー細胞を用いた実験及びラットへの経口投与実験を行い、初めて示した。オルニチンに知られている肝機能改善作用について、尿素回路の活性化以外のメカニズムの一端を明らかにすることが出来たと考えられる。

上記の細胞や動物を用いた検討に加え、ヒトでのオルニチン摂取後の影響について単回及び継続摂取の試験を行って検討した。健常人が日常生活で感じる疲労の例としてアルコール性疲労に着目し、アルコール摂取翌朝の疲労や睡眠の体感及び唾液中ストレス指標に対するオルニチン 400 mg 単回摂取の影響を評価した。その結果、アルコール摂取翌朝起床時の体感（目覚め気分、疲れ、だるさ、睡眠時間、怒り・敵意、混乱の項目）

や唾液中のストレス指標コルチゾールが有意に改善したことから、アルコール摂取による翌朝起床時の疲労を始めとするネガティブな影響に対して、オルニチンが改善効果を有することが明らかとなった。日常生活において、特に本研究で被験者としたフラッシュヤーの方では、飲酒の翌朝においても不快な症状や感情が継続し翌日の仕事や行動に悪影響を及ぼす飲酒のネガティブな影響（いわゆる二日酔い）を受けやすいが、オルニチンがこれらに対して有効な健康機能性食品となり得る可能性が示唆された。また、“お酒の後にはシジミ汁”と言われるが、オルニチンはシジミに多く含まれる成分であることから、伝承的な効果の一端を科学的に解明したとも言える。

次に、軽度の疲労を感じている勤労者に対して、オルニチン 400 mg の 8 週間の継続摂取が疲労や睡眠の体感、および血中ストレス指標に対して及ぼす影響を評価した。その結果、オルニチン摂取群で、睡眠や疲労の主観項目及び血中指標のコルチゾール/DHEA-S 比が改善したことから、オルニチン長期摂取はストレスを低減させ睡眠や疲労を改善することが確認された。疲労の度合いは生活の質や幸福度と密接に関連し、日々の生活において重要な健康の関心事である。特に慢性及び蓄積性の疲労は、仕事の場などにおいて効率やパフォーマンスに及ぼす影響が大きい。本研究の結果から、勤労者を始めとするストレスフルな生活を送る現代人にとって、オルニチンは有用な健康機能性食品となり得ることが示された。2 つのヒトでの試験から、アルコール性疲労や日常生活での疲労に対するオルニチンの効果について、アミノ酸としては比較的低用量の 400 mg でヒトでの効果について初めて示すことが出来た。

ブナハリタケについて、始めに各種キノコの抽出液から NQO1 誘導活性を指標にスクリーニングを行い、強い活性を示したキノコの中で、食用で人工栽培可能なキノコとしてブナハリタケを選抜した。次に、ブナハリタケ抽出液を細胞に添加した後、過酸化水素により酸化ストレスを負荷した結果、細胞の生存率が向上し、酸化ストレス耐性能を向上させることが示唆された。また、ブナハリタケ抽出液をマウスに経口投与し、肝臓及び小腸上皮の PhaseII 酵素を評価した結果、遺伝子発現量及び酵素活性が増加し、生体においても PhaseII 誘導活性を有することが示された。さらに、ARE レポーターアッセイおよび Nrf2 ノックアウトマウスを用いた実験の結果から、ブナハリタケ抽出液の PhaseII 誘導活性は Nrf2 を介して作用していることが示唆された。ブナハリタケには主に血圧低下作用が知られており、特定保健用食品としての表示許可も得ているが、それに加えてブナハリタケの新たな機能性として Nrf2 活性化作用が示された。

ブナハリタケの Nrf2 活性化作用について、抽出液の分離精製を行って活性成分の同定を行った。その結果、ブナハリタケ抽出液より、NQO1 誘導活性を示す化合物とし

て 11 化合物を同定した。その内、3 化合物(4-(1-hydroxyethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-one, 1-(4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)ethylacetate, 2-(5-ethyltetrahydrofuran-2-yl)acetic acid) は、これまでに報告のない新規化合物であった。また 5 化合物は、天然物からこれまでに報告のない化合物であった。これらの化合物の中で、dihydro-4-phenyl-2(3H)-furanone が最も強い NQO1 誘導活性を示した。個々の化合物の活性は比較的弱いものの、ブナハリタケ全体としてキノコ類の中でも強い NQO1 誘導活性や Nrf2 活性化作用を発揮していると考えられた。本研究の結果から、ブナハリタケは Nrf2 を活性化させることで酸化ストレスへの抵抗性を向上させる有用な健康機能性食品素材であると示された。

以上の検討より、食品含有成分の新規機能性として、オルニチンの抗疲労効果、ブナハリタケの Nrf2 活性化作用を示すことが出来た。これらの知見が食品成分の機能性を示唆する科学的知見として活用され、人々の健康維持に貢献できることを期待し、結びとしたい。

<発表論文リスト>

オルニチン：

(第2章 第2節)

- ・(投稿中) Kokubo T, Maeda S, Tazumi K, Miura Y, Kirisako T. L-ornithine induces the phosphorylation of downstream factors of mTOR pathway in liver. *Prev Nutr Food Sci*

(第2章 第3節)

- ・Kokubo T, Ikeshima E, Kirisako T, Miura Y, Horiuchi M, Tsuda A. A randomized, double-masked, placebo-controlled crossover trial on the effects of L-ornithine on salivary cortisol and feelings of fatigue of flushers the morning after alcohol consumption. *Biopsychosoc Med* 2013;18:7(1):6

(第2章 第4節)

- ・Miyake M, Kirisako T, Kokubo T, Miura Y, Morishita K, Okamura H, Tsuda A. Effects of L-ornithine on stress marker and sleep quality in healthy workers by randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutr Jour* 2014;13:53

(その他)

- ・Kokubo T, Ikeshima E, Komatsu M, Kirisako T, Miura Y, Horiuchi M, Tsuda A. L-ornithine-L-aspartate improves alcohol-derived fatigue feeling in flushers -A questionnaire study-. *Jpn Pharmacol Ther* 2012;40(3):205-212
- ・Horiuchi M, Kanesada H, Miyata T, Watanabe K, Nishimura A, Kokubo T, Kirisako T. Ornithine ingestion improved sleep disturbances but was not associated with correction of blood tryptophan ratio in Japanese Antarctica expedition members during summer. *Nutr Res* 2013;33(7):557-564
- ・Komano Y, Kirisako T, Morishita K, Nozawa H, Miura Y, Kamiya U, Tsuda T, Kokubo T. The effect of L-ornithine intake on ammonia secretion from the skin. *Jpn Pharmacol Ther* 2013;41(8):797-801
- ・Misaizu A, Kokubo T, Tazumi K, Kanayama M, Miura Y. The combined effect of caffeine and ornithine on the mood of healthy office workers. *Prev Nutr Food Sci* . 2014;19(4):367-72

ブナハリタケ :

(第3章)

- Kokubo T, Taniguchi Y, Kanayama, M, Shimura M, Konishi, Y, Kawagishi H, Yamamoto M, Shindo K, Yoshida A. Extract of the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii* induces a series of anti-oxidative and phase II detoxifying enzymes through activation of the transcription factor Nrf2. *Food Chemistry* 2011; 129(1):92-99

<引用文献>

- [1] Uchisawa H, Sato A, Ichita J, Matsue H, Ono T. Influence of low-temperature processing of the brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, on the ornithine content of its extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:1228-1234.
- [2] Wu H, Shiau C. Proximate comparison, free amino acids and peptides contents in commercial chicken and other meat essences. *J Food Drug Anal* 2002;10:170-177.
- [3] Shambaugh GE, 3rd. Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. *Am J Clin Nutr* 1977;30:2083-2087.
- [4] Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* 2010;91:200-219.
- [5] Krebs HA, Hems R, Lund P. Accumulation of amino acids by the perfused rat liver in the presence of ethanol. *Biochem J* 1973;134:697-705.
- [6] Phongsamran PV, Kim JW, Cupo Abbott J, Rosenblatt A. Pharmacotherapy for hepatic encephalopathy. *Drugs* 2010;70:1131-1148.
- [7] Demura S, Yamada T, Yamaji S, Komatsu M, Morishita K. The effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on human growth hormone secretion after strength training *Adv Biosci Biotechnol* 2010;01:7-11.
- [8] Bucci LR, Hickson JF, Jr., Wolinsky I, Pivarnik JM. Ornithine supplementation and insulin release in bodybuilders. *Int J Sport Nutr* 1992;2:287-291.
- [9] Moinard C, Caldefie F, Walrand S, Felgines C, Vasson MP, Cynober L. Involvement of glutamine, arginine, and polyamines in the action of ornithine alpha-ketoglutarate on macrophage functions in stressed rats. *J Leukoc Biol* 2000;67:834-840.
- [10] Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O. L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res* 2008;28:738-743.
- [11] Ong JP, Oehler G, Kruger-Jansen C, Lambert-Baumann J, Younossi ZM. Oral L-ornithine-L-aspartate improves health-related quality of life in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy: an open-label, prospective,

- multicentre observational study. *Clin Drug Investig* 2011;31:213-220.
- [12] Staedt U, Leweling H, Gladisch R, Kortsik C, Hagmuller E, Holm E. Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis. A double-blind, randomized study using a four-fold crossover design. *J Hepatol* 1993;19:424-430.
- [13] Haussinger D, Schliess F, Kircheis G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl 3:S256-259.
- [14] Gebhardt R, Beckers G, Gaunitz F, Haupt W, Jonitza D, Klein S, Scheja L. Treatment of cirrhotic rats with L-ornithine-L-aspartate enhances urea synthesis and lowers serum ammonia levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1-6.
- [15] Kircheis G, Nilius R, Held C, Berndt H, Buchner M, Gortelmeyer R, Hendricks R, Kruger B, Kuklinski B, Meister H, Otto HJ, Rink C, Rosch W, Stauch S. Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology* 1997;25:1351-1360.
- [16] Poo JL, Gongora J, Sanchez-Avila F, Aguilar-Castillo S, Garcia-Ramos G, Fernandez-Zertuche M, Rodriguez-Fragoso L, Uribe M. Efficacy of oral L-ornithine-L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. Results of a randomized, lactulose-controlled study. *Ann Hepatol* 2006;5:281-288.
- [17] Dietrich R, Bachmann C, Lauterburg BH. Exercise-induced hyperammonemia in patients with compensated chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1990;25:329-334.
- [18] Nybo L, Dalsgaard MK, Steensberg A, Moller K, Secher NH. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. *J Physiol* 2005;563:285-290.
- [19] Mutch BJ, Banister EW. Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. *Med Sci Sports Exerc* 1983;15:41-50.
- [20] 西村明仁. オルニチンとストレスケア. *食品と開発* 2013;48:13.
- [21] NIIRDN *Drugs in Japan Ethical Drugs*. *Yakugyo Jiho* 1982;6th Edition:164.

- [22] 本郷次雄. 山溪フィールドブックス きのこと. 山と溪谷社 1994.
- [23] 佐藤拓. 我が社の新品種&新技術〈ブナハリタケ薬効の研究〉 血圧、血糖降下作用や抗ガン作用に顕著な効果のブナハリタケ. 特産情報 2001;23:42-45.
- [24] Okuyama S, Terashima T, Kawamura Y, Yokogoshi H. Enhancing effect of *Mycoleptodonoides aitchisonii* on synthesis of nerve growth factor and releasing dopamine in the rat brain. *Nutr Neurosci* 2004;7:41-47.
- [25] Yasukawa K, Kanno H, Kaminaga T, Takido M, Kasahara Y, Kumaki K. Inhibitory Effect of Methanol Extracts from Edible Mushroom on TPA-induced Ear Oedema and Tumour Promotion in Mouse Skin. *Phytother Res* 1996;10:367-369.
- [26] Lee MR, Begum S, Oh DS, Wee AJ, Yun BS, Sung CK. Ameliorating Effect of *Mycoleptodonoides aitchisonii* on High-fat Diet-induced Obese Mice. *Prev Nutr Food Sci* 2014;19:69-74.
- [27] Sakamoto Y, Takeuchi A, Sato T, Obara K, Takai K, Fujino K, Hirose T, Inagaki Y. Identification of antihypertensive substance in an aqueous extract from fruit body *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Pharmacometrics* 2001;61:221-229.
- [28] 益子研土 平, 板垣雪絵, 鮫島浩二, 佐藤拓. ブナハリタケエキス配合飲料摂取による正常高値血圧者および低～中等度軽症高血圧者の血圧降下作用. 薬理と治療 2003;31:239-246.
- [29] 土田隆 益, 長田秀幸, 佐藤拓. ブナハリタケ熱水抽出液長期摂取における有用性および安全性. 薬理と治療 2002;30:31-36.
- [30] Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, Jalan R, Olde Damink SW. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *J Nutr* 2007;137:1579S-1585S; discussion 1597S-1598S.
- [31] Rognstad R. Sources of ammonia for urea synthesis in isolated rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1977;496:249-254.
- [32] Schoolwerth AC, Smith BC, Culpepper RM. Renal gluconeogenesis. *Miner Electrolyte Metab* 1988;14:347-361.
- [33] He Y, Hakvoort TB, Kohler SE, Vermeulen JL, de Waart DR, de Theije C, ten Have GA, van Eijk HM, Kunne C, Labruyere WT, Houten SM, Sokolovic M, Ruijter JM, Deutz NE, Lamers WH. Glutamine synthetase in muscle is

- required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *J Biol Chem* 2010;285:9516-9524.
- [34] Stauch S, Kircheis G, Adler G, Beckh K, Ditschuneit H, Gortelmeyer R, Hendricks R, Heuser A, Karoff C, Malferttheiner P, Mayer D, Rosch W, Steffens J. Oral L-ornithine-L-aspartate therapy of chronic hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Hepatol* 1998;28:856-864.
- [35] De Bandt JP, Cynober LA. Amino acids with anabolic properties. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:263-272.
- [36] Kircheis G, Wettstein M, Dahl S, Haussinger D. Clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2002;17:453-462.
- [37] D'Agata R, Vigneri R. Circadian variations of human growth hormone serum levels. Longitudinal study. *Ann Endocrinol (Paris)* 1971;32:383-387.
- [38] Jeevanandam M, Holaday NJ, Petersen SR. Ornithine-alpha-ketoglutarate (OKG) supplementation is more effective than its component salts in traumatized rats. *J Nutr* 1996;126:2141-2150.
- [39] Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998;78:487-545.
- [40] Tujioka K, Yamada T, Aoki M, Morishita K, Hayase K, Yokogoshi H. Dietary ornithine affects the tissue protein synthesis rate in young rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2012;58:297-302.
- [41] Marshall S. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci. STKE*. 2006;2006:re7.
- [42] Patti ME, Kahn BB. Nutrient sensor links obesity with diabetes risk. *Nat. Med.* 2004;10:1049-1050.
- [43] Proud CG. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313:429-436.
- [44] Reiter AK, Anthony TG, Anthony JC, Jefferson LS, Kimball SR. The mTOR signaling pathway mediates control of ribosomal protein mRNA translation

- in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004;36:2169-2179.
- [45] Kwon G, Marshall CA, Pappan KL, Remedi MS, McDaniel ML. Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 3:S225-232.
- [46] Le Plenier S, Walrand S, Noirt R, Cynober L, Moinard C. Effects of leucine and citrulline versus non-essential amino acids on muscle protein synthesis in fasted rat: a common activation pathway? *Amino. Acids.* 2012;43:1171-1178.
- [47] Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science.* 1979;206:700-702.
- [48] Shigemitsu K, Tsujishita Y, Miyake H, Hidayat S, Tanaka N, Hara K, Yonezawa K. Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS. Lett.* 1999;447:303-306.
- [49] Yoshizawa F, Endo M, Ide H, Yagasaki K, Funabiki R. Translational regulation of protein synthesis in the liver and skeletal muscle of mice in response to refeeding. *J. Nutr. Biochem.* 1995;6:130-136.
- [50] Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 1998;275:E814-820.
- [51] Norton LE, Layman DK, Bunpo P, Anthony TG, Brana DV, Garlick PJ. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. *J. Nutr.* 2009;139:1103-1109.
- [52] Sans MD, Tashiro M, Vogel NL, Kimball SR, D'Alecy LG, Williams JA. Leucine activates pancreatic translational machinery in rats and mice through mTOR independently of CCK and insulin. *J. Nutr.* 2006;136:1792-1799.
- [53] Anthony JC, Anthony TG, Layman DK. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J. Nutr.* 1999;129:1102-1106.
- [54] Hayashi AA, Proud CG. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *Am. J. Physiol. Endocrinol.*

- Metab. 2007;292:E1647-1655.
- [55] Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 2002;22:87-105.
- [56] Cascales C, Cascales M, Santos-Ruiz A. Effect of chronic ethanol or acetaldehyde on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases, aminotransferases and glutamate dehydrogenase. *Rev Esp Fisiol* 1985;41:19-27.
- [57] Rejniuk VL, Schafer TV, Ivnitisky JJ. Ammonia potentiates the lethal effect of ethanol on rats. *Bull Exp Biol Med* 2008;145:741-743.
- [58] Maier KP, Volk B, Hoppe-Seyler G, Gerok W. Urea-cycle enzymes in normal liver and in patients with alcoholic hepatitis. *Eur J Clin Invest* 1974;4:193-195.
- [59] Goedde HW, Harada S, Agarwal DP. Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypothesis. *Hum Genet* 1979;51:331-334.
- [60] Yoshida A, Ikawa M, Hsu LC, Tani K. Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases. *Alcohol* 1985;2:103-106.
- [61] Larson HN, Weiner H, Hurley TD. Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant. *J Biol Chem* 2005;280:30550-30556.
- [62] 牧野輝彦 新, 横井秀輔, 松井千尋, 諸橋正昭. アルコール体質検査簡易法の試験成績. *新薬と臨牀* 2005;52:720-725.
- [63] 樋口進. 成人の飲酒実態と関連問題の予防に関する研究 (平成 16 年度総括研究報告書) . 2004:1-6.
- [64] Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ. Athens Insomnia Scale: validation of an instrument based on ICD-10 criteria. *J Psychosom Res* 2000;48:555-560.
- [65] Yamamoto Y TH, Takase M, Yamazaki K, Shirakawa S, Azumi K. Standardization of revised version of OSA sleep inventory for middle age and aged. *Brain Sci Mental Disorders* 1999;10:401-409.
- [66] McNair D, Lorr M, Dropleman L. Profile of Mood States. San Diego: Educational and Industrial Testing Service 1981.

- [67] Suzuki K, Matsushita S, Ishii T. Relationship between the flushing response and drinking behavior among Japanese high school students. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1726-1729.
- [68] Tsutaya S, Shoji M, Saito Y, Kitaya H, Nakata S, Takamatsu H, Yasujima M. Analysis of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and ethanol patch test as a screening method for alcohol sensitivity. *Tohoku J Exp Med* 1999;187:305-310.
- [69] Collins WE, Schroeder DJ, Gilson RD, Guedry FE, Jr. Effects of alcohol ingestion on tracking performance during angular acceleration. *J Appl Psychol* 1971;55:559-563.
- [70] Finnigan F, Hammersley R, Cooper T. An examination of next-day hangover effects after a 100 mg/100 ml dose of alcohol in heavy social drinkers. *Addiction* 1998;93:1829-1838.
- [71] Stephens R, Ling J, Heffernan TM, Heather N, Jones K. A review of the literature on the cognitive effects of alcohol hangover. *Alcohol Alcohol* 2008;43:163-170.
- [72] 内山真. 睡眠障害の対応と治療ガイドライン. じほう 2002.
- [73] Omori K, Kagami Y, Yokoyama C, Moriyama T, Matsumoto N, Masaki M, Nakamura H, Kamasaka H, Shiraishi K, Kometani T, Kuriki T, Huang Z-L, Urade Y. Promotion of non-rapid eye movement sleep in mice after oral administration of ornithine. *Sleep Biol Rhythms* 2012;10:38-45.
- [74] Suenaga R, Yamane H, Tomonaga S, Asechi M, Adachi N, Tsuneyoshi Y, Kurauchi I, Sato H, Denbow DM, Furuse M. Central L-arginine reduced stress responses are mediated by L-ornithine in neonatal chicks. *Amino Acids* 2008;35:107-113.
- [75] Yamane H, Tsuneyoshi Y, Denbow DM, Furuse M. N-Methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors involved in the induction of sedative effects under an acute stress in neonatal chicks. *Amino Acids* 2009;37:733-739.
- [76] Hamasu K, Shigemi K, Tsuneyoshi Y, Yamane H, Sato H, Denbow DM, Furuse M. Intracerebroventricular injection of L-proline and D-proline induces sedative and hypnotic effects by different mechanisms under an

- acute stressful condition in chicks. *Amino Acids* 2010;38:57-64.
- [77] Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:1-18.
- [78] Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:163-171.
- [79] Buchanan TW, Bagley SL, Stansfield RB, Preston SD. The empathic, physiological resonance of stress. *Soc Neurosci* 2011;7:191-201.
- [80] Kurata K, Nagasawa M, Tomonaga S, Aoki M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M. Orally administered L-ornithine elevates brain L-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutr Neurosci* 2012;14:243-248.
- [81] Akerstedt T, Kecklund G, Selen J. Disturbed sleep and fatigue as predictors of return from long-term sickness absence. *Ind Health* 2010;48:209-214.
- [82] Cohen S, Doyle WJ, Alper CM, Janicki-Deverts D, Turner RB. Sleep habits and susceptibility to the common cold. *Arch Intern Med* 2009;169:62-67.
- [83] Sakami S, Ishikawa T, Kawakami N, Haratani T, Fukui A, Kobayashi F, Fujita O, Araki S, Kawamura N. Coemergence of insomnia and a shift in the Th1/Th2 balance toward Th2 dominance. *Neuroimmunomodulation* 2002;10:337-343.
- [84] Savard J, Laroche L, Simard S, Ivers H, Morin CM. Chronic insomnia and immune functioning. *Psychosom Med* 2003;65:211-221.
- [85] Hachul H, Bittencourt LR, Andersen ML, Haidar MA, Baracat EC, Tufik S. Effects of hormone therapy with estrogen and/or progesterone on sleep pattern in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;103:207-212.
- [86] Irwin M, Clark C, Kennedy B, Christian Gillin J, Ziegler M. Nocturnal catecholamines and immune function in insomniacs, depressed patients, and control subjects. *Brain Behav Immun* 2003;17:365-372.
- [87] Nishiyama K, Johnson JV. Karoshi--death from overwork: occupational health consequences of Japanese production management. *Int J Health Serv* 1997;27:625-641.
- [88] Park J, Ha M, Yi Y, Kim Y. Subjective fatigue and stress hormone levels in urine according to duration of shiftwork. *J Occup Health* 2006;48:446-450.
- [89] Jones DL, Tanigawa T, Weiss SM. Stress management and workplace

- disability in the US, Europe and Japan. *J Occup Health* 2003;45:1-7.
- [90] Mody I, Maguire J. The reciprocal regulation of stress hormones and GABA(A) receptors. *Front Cell Neurosci* 2011;6:4.
- [91] Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav* 2007;90:43-53.
- [92] Michael A, Jenaway A, Paykel ES, Herbert J. Altered salivary dehydroepiandrosterone levels in major depression in adults. *Biol Psychiatry* 2000;48:989-995.
- [93] Osran H, Reist C, Chen CC, Lifrak ET, Chicz-DeMet A, Parker LN. Adrenal androgens and cortisol in major depression. *Am J Psychiatry* 1993;150:806-809.
- [94] Young AH, Gallagher P, Porter RJ. Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. *Am J Psychiatry* 2002;159:1237-1239.
- [95] Morley JE, Kaiser F, Raum WJ, Perry HM, 3rd, Flood JF, Jensen J, Silver AJ, Roberts E. Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7537-7542.
- [96] Nafziger AN, Bowlin SJ, Jenkins PL, Pearson TA. Longitudinal changes in dehydroepiandrosterone concentrations in men and women. *J Lab Clin Med* 1998;131:316-323.
- [97] Binello E, Gordon CM. Clinical uses and misuses of dehydroepiandrosterone. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:635-641.
- [98] Kroboth PD, Amico JA, Stone RA, Folan M, Frye RF, Kroboth FJ, Bigos KL, Fabian TJ, Linares AM, Pollock BG, Hakala C. Influence of DHEA administration on 24-hour cortisol concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 2003;23:96-99.
- [99] Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:241-250.
- [100] Kurata K, Nagasawa M, Tomonaga S, Aoki M, Akiduki S, Morishita K,

- Denbow DM, Furuse M. Orally administered L-ornithine reduces restraint stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice. *Neurosci Lett* 2012;506:287-291.
- [101] Kurata K, Shigemi K, Tomonaga S, Aoki M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M. L-ornithine attenuates corticotropin-releasing factor-induced stress responses acting at GABAA receptors in neonatal chicks. *Neuroscience* 2011;172:226-231.
- [102] Sarkar J, Wakefield S, MacKenzie G, Moss SJ, Maguire J. Neurosteroidogenesis is required for the physiological response to stress: role of neurosteroid-sensitive GABAA receptors. *J Neurosci* 2011;31:18198-18210.
- [103] Dubrovsky B. Natural steroids counteracting some actions of putative depressogenic steroids on the central nervous system: potential therapeutic benefits. *Med Hypotheses* 1997;49:51-55.
- [104] Hechter O, Grossman A, Chatterton RT, Jr. Relationship of dehydroepiandrosterone and cortisol in disease. *Med Hypotheses* 1997;49:85-91.
- [105] Goodyer IM, Herbert J, Altham PM, Pearson J, Secher SM, Shiers HM. Adrenal secretion during major depression in 8- to 16-year-olds, I. Altered diurnal rhythms in salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) at presentation. *Psychol Med* 1996;26:245-256.
- [106] Ritsner M, Maayan R, Gibel A, Strous RD, Modai I, Weizman A. Elevation of the cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:267-273.
- [107] Korunka C, Huemer KH, Litschauer B, Karetta B, Kafka-Lutzow A. Working with new technologies: hormone excretion as an indicator for sustained arousal. A pilot study. *Biol Psychol* 1996;42:439-452.
- [108] Van Cauter E, Plat L, Copinschi G. Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 1998;21:553-566.
- [109] Davidson JR, Moldofsky H, Lue FA. Growth hormone and cortisol secretion in relation to sleep and wakefulness. *J Psychiatry Neurosci* 1991;16:96-102.
- [110] Prinz PN, Roehrs TA, Vitaliano PP, Linnoila M, Weitzman ED. Effect of

- alcohol on sleep and nighttime plasma growth hormone and cortisol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:759-764.
- [111] Harada T, Hirotani M, Maeda M, Nomura H, Takeuchi H. Correlation between breakfast tryptophan content and morning-evening in Japanese infants and students aged 0-15 yrs. *J Physiol Anthropol* 2007;26:201-207.
- [112] Kohyama J. Sleep, serotonin, and suicide in Japan. *J Physiol Anthropol* 2011;30:1-8.
- [113] 林野庁. 平成 25 年度 森林・林業白書. 2014.
- [114] Chang R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev* 1996;54:S91-93.
- [115] Talalay P, Fahey JW, Holtzclaw WD, Prestera T, Zhang Y. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett* 1995;82-83:173-179.
- [116] Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1990;265:14648-14653.
- [117] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004;24:7130-7139.
- [118] Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, Itoh K, Yamamoto M. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;173:154-160.
- [119] Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4611-4616.
- [120] Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004;114:1248-1259.
- [121] Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic

- protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2399-2403.
- [122] Dietz BM, Kang YH, Liu G, Eggler AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, Bolton JL. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1296-1305.
- [123] Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 1999;20:911-914.
- [124] Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem* 1988;169:328-336.
- [125] Shon YH, Nam KS. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J Ethnopharmacol* 2001;77:103-109.
- [126] Kim JH, Lee JS, Song KS, Kwon CS, Kim YK, Kim JS. Polyozellin isolated from *Polyozellus multiplex* induces phase 2 enzymes in mouse hepatoma cells and differentiation in human myeloid leukaemic cell lines. *J Agric Food Chem* 2004;52:451-455.
- [127] Sato T, Takeuchi A, Ishida T, Obara K, Hirose T, Tkai K, Fujino K, Sakamoto Y. Antihypertensive effect of an aqueous extract from fruit body of *Mycoleptodonoides aitchisonii* in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacometrics* 2001;61:177-183.
- [128] Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:313-322.
- [129] 伊東健. Nrf2 酸化ストレス応答系による病態制御. *生化学* 2009;81:447-455.
- [130] Prestera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Adv Enzyme Regul* 1993;33:281-296.

- [131] Choi JH, Suzuki T, Okumura H, Noguchi K, Kondo M, Nagai K, Hirai H, Kawagishi H. Endoplasmic reticulum stress suppressive compounds from the edible mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *J Nat Prod* 2014;77:1729-1733.
- [132] Okuyama S, Sawasaki E, Yokogoshi H. Conductor compounds of phenylpentane in *Mycoleptodonoides aitchisonii* mycelium enhance the release of dopamine from rat brain striatum slices. *Nutr Neurosci* 2004;7:107-111.
- [133] Forzato C, Furlan G, Nitti P, Pitacco G, Marchesan D, Coriani S, Valentin E. A combined experimental and computational strategy in the assignment of absolute configurations of 4-methyl-5-oxo-tetrahydrofuran-3-carboxylic acids and their esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 2005;16:3011-3023.
- [134] Scheffold R, Dubs P. Synthese von Azaprotoanemoninen. *Helv Chim Acta* 1967;50:798-808.
- [135] Noda N, Umebayashi K, Nakatani T, Miyahara K, Ishiyama K. Isolation and characterization of some hydroxy fatty and phosphoric acid esters of 10-hydroxy-2-decenoic acid from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Lipids* 2005;40:833-838.
- [136] Giuseppe B, Marcella B, Enrico M, Massimo M, Samuele R, Letizia S. A Highly Diastereoselective TiCl_4 -Mediated Reduction of beta-Hydroxy Ketones with $\text{BH}_3 \cdot \text{py}$ - A Very Efficient and General Synthesis of *syn*-1,3-Diols. *European J Org Chem* 2001;2001:4679-4684.
- [137] Groundwater PW, Hibbs DE, Hoursthouse MB, Nyerges M. Synthesis and reactions of reduced flavones. . *J Chem Soc Perkin 1* 1997:163-169.
- [138] Bavin PMG, Hansell DP, Spickett RGW. The reaction between styrene oxide and malonic ester. *J Chem Soc* 1964:4535-4538.
- [139] Satoh K, Yamashiro T, Nomura M, Nakata S. [Derivatives of phenylpentanone in cultured mycelium of *Mycoleptodonoides aitchisonii* and the syntheses of their compounds]. *Yakugaku Zasshi* 2008;128:1797-1802.
- [140] Chan TH, Lee SD. 1,4-Dichloro-1,4-dimethoxybutane as a mild reagent for the conversion of primary amines to pyrroles. Synthesis of a pyrrole compound from tobacco. *J Org Chem* 1983;48:3059-3061.

- [141] Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, Eguchi M, Wada Y, Kumagai Y, Yamamoto M. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* 2009;29:493-502.

<謝辞>

本論文をまとめるにあたり、全体にわたり数多くのご教示を賜り、さらに論文審査委員主査をお引き受けくださいました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命科学専攻 佐藤隆一郎教授に深く感謝いたします。

オルニチンのアルコール性疲労改善作用ヒト試験の計画および実行について多くのご指導を頂きました鹿児島大学医歯学総合研究科 堀内正久教授に厚くお礼申し上げます。

ヒトでのストレス評価指標の選定および測定について多大なるご協力を賜りました久留米大学文学部 津田彰教授、久留米大学高次脳研究所 岡村尚昌助教の両先生に心よりお礼申し上げます。

キノコのスクリーニング用サンプルを多数ご提供いただきました静岡大学大学院農学研究科 河岸洋和教授に感謝の意を表します。また、Nrf2 ノックアウトマウスの入手に際して快くご支援いただきました東北大学医学系研究科 山本雅之教授にお礼申し上げます。

ブナハリタケエキス中の活性成分の分離同定について、実験の基礎からご指導いただき、さらに NMR 測定を自ら実施頂きました日本女子大学家政学部 新藤一敏教授に心よりお礼申し上げます。

最後に、本論文は筆者が麒麟ビール株式会社（現麒麟株式会社）入社後に行った研究成果をまとめたものです。著者に研究の機会を与えて下さり、かつ多くのご助言ご協力を賜りました麒麟株式会社 吉田有人博士、三浦裕博士、桐浴隆嘉博士、三宅美加博士、金山雅也研究員、谷口慈将研究員、池島恵美子研究員、田墨恭子研究員、志村雅子研究員、その他多くの同僚の皆様に深く感謝いたします。

<要旨>

序論

近年、様々な食品成分の機能性に関する研究が活発に行われており、それらを活用した健康機能性食品が多数上市されている。しかし、一般的に医薬品に比べて食品成分は、動物やヒトでの有効性及び安全性の検証における科学的知見は不足していると言える。また、2015年4月より新たに施行された食品の機能性表示食品制度では、事業者の責任において科学的根拠を基に食品に機能性を表示することができるようになった。本制度を活用し、一般消費者に機能性を表示した製品を提供することで国民の健康維持増進に寄与するという産業的な観点からも、健康機能性成分の科学的知見、特にヒトを対象とした臨床試験データの重要性が今後増していくと考えられる。

本研究では数多くの食品素材の中から、遊離アミノ酸のオルニチン及び食用キノコのブナハリタケに注目した。オルニチンには肝機能改善作用、ブナハリタケには血圧抑制作用を中心にこれまでに多くの健康機能性が知られており、産業的な利用が行われている。両素材のこれまでに知られていない新たな機能性を探索することを目的として、オルニチンについては抗疲労効果、ブナハリタケについては Nrf2 活性化作用について詳細な研究を実施した。

第1章 オルニチンの抗疲労効果の検討

第1節 オルニチン投与後の血中アミノ酸動態の評価

オルニチンの研究について、まずは基礎的な知見を得ることを目的に、マウスにオルニチンを経口投与した際の血液、肝臓、筋肉におけるアミノ酸代謝、糖代謝、脂質代謝への影響を評価した。その結果、オルニチンは投与後に体内に速やかに吸収され、血液中を循環した後に筋肉や肝臓に取り込まれることが明らかとなった。また、オルニチンはグルコース-アラニン回路によるエネルギー代謝を促進し、その結果として脂質のエネルギー産生への利用を抑制することが示唆された。

本実験により、オルニチンの代表的な生理機能として知られる尿素回路の活性化に加えて、代謝に関する基礎的な知見を得ることができた。

第2節 オルニチンの mTOR 活性化作用

オルニチンの機能の一つとして知られているタンパク質合成促進作用が、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルの活性化を介した物であるかを、ラット肝プライマリー細胞を用いた実験及びラットへの経口投与実験を行い検討した。ラ

ット肝プライマリー細胞にオルニチンを添加し、mTOR 関連因子のリン酸化を評価した結果、代表的な mTOR 下流因子である p70S6K, S6, 4EBP1 のリン酸の亢進が認められた。また、この効果は、mTOR 阻害剤ラパマイシンの添加により抑制されたことから、オルニチンは mTOR 活性化作用を有することが示唆された。次に、ラットを 18 時間絶食させた後にオルニチンを経口投与し、1, 3 時間後の肝臓の mTOR 関連因子のリン酸化を評価した結果、投与 1 時間後において p70S6K, S6 のリン酸化亢進が認められた。オルニチンは生体においても mTOR シグナルを活性化している事が示唆された。

本実験により、オルニチンに既に知られている肝機能改善作用について、尿素回路の活性化以外のメカニズムの一端を明らかにすることが出来たと考えられる。

第3節 オルニチンのアルコール性疲労の改善作用

ヒトでのオルニチン摂取の影響について、単回摂取試験を行って検討した。健康人が日常生活で感じる疲労の例としてアルコール性疲労に着目し、アルコール摂取翌朝の疲労や睡眠の体感及び唾液中ストレス指標に対するオルニチン 400 mg 単回摂取の影響を、ランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験により評価した。その結果、アルコール摂取翌朝起床時の体感（目覚め気分、疲れ、だるさ、睡眠時間、怒り・敵意、混乱の項目）や唾液中のストレス指標コルチゾールが、オルニチン摂取により有意に改善した。

本実験により、アルコール摂取による翌朝起床時の疲労を始めとするネガティブな影響に対して、オルニチンが改善効果を有することが明らかとなった。日常生活において、飲酒の翌朝に感じられる不快な症状や感情などのネガティブな影響（いわゆる二日酔い）に対し、オルニチンが有効な健康機能性食品となり得る可能性が示唆された。また、“お酒の後にはシジミ汁”と一般的に言われるが、オルニチンはシジミに多く含まれる成分であることから、伝承的な効果の一端を科学的に解明したとも言える。

第4節 オルニチンの睡眠の体感およびストレスの改善作用

ヒトでのオルニチン摂取の影響について、長期摂取試験を行って検討した。軽度の疲労を感じている勤労者に対して、オルニチン 400 mg の 8 週間の継続摂取が疲労や睡眠の体感、および血中ストレス指標に対して及ぼす影響を、ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間試験により評価した。その結果、オルニチン摂取群でストレス指標の血中コルチゾール濃度及びコルチゾール/DHEA-S 比が有意に改善した。また、睡眠や疲労の主観項目の一部で有意な改善が認められた。

本実験により、オルニチン 400 mg の長期摂取は、ストレスを低減させ睡眠や疲労を改善することが主観および客観的に確認された。ストレスフルな生活を送る現代人にとって、オルニチンは有用な健康機能性食品となり得ることが示された。

第2章 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用の検討

第1節 PhaseII 酵素誘導活性を有するキノコの探索

ブナハリタケの研究について、まずは日本で古くから食され、多くの生理機能が知られているキノコに着目し、新たな機能性の探索を行う事を目的として 43 種類のキノコから、抗酸化に関連する因子である NQO1 の誘導活性を指標にスクリーニングを行った。結果、43 種類のうち大半のキノコ抽出物において、NQO1 誘導活性が認められたが、中でも強い NQO1 誘導活性を示したキノコとして 6 種が見出された。このうち、食用のキノコで人工栽培が可能な *Mycoleptodonoides aitchisonii* (ブナハリタケ) を選抜し、以降のより詳細な評価を行う事とした。

第2節 ブナハリタケの Nrf2 活性化作用

第1節で選抜したブナハリタケについて、抗酸化や解毒に関わる PhaseII 酵素の制御因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の活性化作用を評価した。ブナハリタケ抽出液 (EAMA) を細胞に添加し一定時間培養した後に、細胞に酸化ストレスを過酸化水素で負荷した際の細胞の生存率が向上したことから、細胞の酸化ストレス耐性能を向上させることが示唆された。次に、EAMA をマウスに経口投与し、肝臓及び小腸上皮の PhaseII 酵素を評価したところ、遺伝子発現量及び酵素活性が増加した。また、Nrf2 結合領域である ARE 配列のレポーターアッセイにおいて、EAMA は ARE 下流因子の転写活性を上昇させた。さらに Nrf2 ノックアウトマウス腹腔マクロファージへの EAMA 添加では、野生型と比較して PhaseII 酵素の遺伝子発現上昇作用が抑制された。

本実験により、ブナハリタケは Nrf2 活性化作用を有し、下流の PhaseII 酵素を誘導することで酸化ストレスへの抵抗性を上昇させることが示唆された。ブナハリタケでこれまでに広く知られている血圧低下作用に加え、Nrf2 を活性化させることで酸化ストレスへの抵抗性を向上させる有用な健康機能性食品素材であることが新たに示された。

第3節 ブナハリタケ中 Nrf2 活性成分の分離同定

第2項で明らかにしたブナハリタケの Nrf2 活性化作用について、活性成分を同定すること目的に、NQO1 誘導活性を指標にして EAMA の分離精製を行った。その結果、

ブナハリタケ抽出液から NQO1 誘導活性を示す化合物として 11 化合物を同定した。その内、3 化合物 (4-(1-hydroxyethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-one, 1-(4-methyl-5-oxotetrahydrofuran-3-yl)ethylacetate, 2-(5-ethyltetrahydro furan-2-yl)acetic acid) は、これまでに報告のない新規化合物であった。また 5 化合物は、天然物からはこれまでに報告のない化合物であった。これらの化合物の中で、dihydro-4-phenyl-2(3H)-furanone が最も強い NQO1 誘導活性を示した。

本研究の結果から、ブナハリタケは個々の化合物の活性は比較的弱いものの、ブナハリタケ全体としてキノコの中でも強い NQO1 誘導活性や Nrf2 活性化作用を発揮していると考えられた。

まとめ

本研究により、オルニチンは疲労改善作用を有する機能性素材として有望であることを、動物及びヒトでの試験により新たに見出した。また、ブナハリタケは、キノコの中でも強い Nrf2 活性化作用を有し、生体の酸化ストレスへの抵抗性を向上させる有用な健康機能性食品素材であることを、細胞及び動物での試験により明らかにした。

これらの知見が食品成分の機能性を示唆する科学的知見として活用され、人々の健康維持に貢献できることを今後期待したい。

以上