

## 論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 小久保 健

### 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ー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、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