

博士論文

鯉だしの抗疲労作用に関する研究

野 沢 与 志 津

論文の内容の要旨

論文題目 鰹だしの抗疲労作用に関する研究

氏名 野沢与志津

鰹だしは、日本人にとって古来馴染み深く、料理の風味増強作用に利用されてきた一方で、心身機能を賦活化する働き、すなわち疲労に陥りにくい作用を期待させる伝承記録が残っている。疲労とは、過度の肉体的および精神的活動により認められる心身の活動能力・能率の減退状態であり、独特の不快感と休養の願望に紐付く自覚感覚が伴うと定義される。過度の身体活動を避け、十分に休養できる状況であれば疲労状態には至らないと考えられるが、現代社会においてその実現は難しい。生活の質に大きな影響を与える疲労に対して、医薬品ではなく日々の食生活においてその解決策を提供できれば、その社会的意義は大きい。そこで、本研究は、鰹だしが身体活動の持続や回復に関する活動能力、及び活動能に伴い変動する精神状態に与える影響に関して、複合的な研究アプローチにより定量化し、鰹だしと疲労の関連性の解明を試みたものである。本論文は 5 章から構成されており、第 1 章では前述のような研究テーマの背景と目的を論じた。第 2 章と第 3 章では、動物モデルを用いて、鰹だしが末梢組織と中枢組織のそれぞれを主とした身体活動能に与える影響とその作用発現に関して検討した。第 4 章では、鰹だしが心理状態に与える影響に関して、実際にヒトを対象として検討した結果を示した。最後に、第 5 章において総合的な考察を述べた。

1. 鰹だしの身体活動能に与える影響とその機序解析

鰹だしが身体活動能に与える影響を、身体活動の継続と低活動状態からの回復という二つの視点から動物モデルを選定し、強制遊泳モデルでは活動持続時間を、強制歩行モデルでは自発行動量を身体活動能として検討を重ねた。鰹だし 0.86 g/kg 量を投与し、1 時間後に運動を負荷した結果、活動持続時間が有意に長期化することが分かった。鰹だし中のどの成分群が活動持続に影響を与えているかの特定を目的に、鰹だしを分子量により分けた 3 分画物 (LMF、MMF、HMF) を調製した。LMF はアミノ酸・有機酸・核酸・ミネラル及び分子量 1000 以下の低分子量ペプチド、MMF は分子量 1000-6000 のペプチドあるいはタンパク質、HMF は分子量 6000 以上のタンパク質あるいは褐変物質などを含み、各々、約

64/26/10% の割合で鰹だしを構成している。3 分画物をそれぞれ同量投与し、遊泳運動を負荷した結果、MMF あるいは HMF 投与群は、溶媒投与群と同等の運動継続時間を示したが、LMF 投与群で有意な運動時間の延長を示した。これらの結果は、鰹だしの低分子画分中に身体活動を継続させる成分が含まれている可能性を示す。

身体活動中には、糖質や脂質がエネルギー基質となり、活動持続のためのエネルギーが供給される。LMF が身体活動の持続を可能にさせることが分かったため、LMF 投与後の運動中のエネルギー代謝の変化に着目し、解析することとした。LMF を投与した 1 時間後、遊泳運動を負荷し、経時的に糖質及び脂質代謝の関連指標を測定した。運動開始 30 分時点、脂肪組織由来のエネルギー基質である血清遊離脂肪酸と脂肪酸の代謝物である血清ケトン体では、LMF 投与群は溶媒投与群に対して有意に高値を示す一方、糖質代謝産物である血清乳酸や骨格筋中乳酸が低値を示すことが分かった。LMF 投与群では、運動開始 40 分と 50 分後においても脂質酸化利用が継続し、骨格筋中の ATP 含量は運動中のいずれの時点においても高値を示した。これらの結果から、LMF 投与により、身体活動に必要なエネルギー基質としては脂質が選択されたことを示すと共に、その結果として身体活動の持続が可能となり、活動能を向上させていた可能性が考えられた。

2. 鰹だしの中樞機能に与える影響

人は、作業効率や記憶力の低下などの認知機能の低下によって、自身の身体活動能の低下すなわち疲労状態を認識することが多い。本研究では、前述の骨格筋による活動能のみならず、脳活動を担う中枢神経系と鰹だしの関連性の観点からも身体活動能に与える影響を検討した。脳機能維持に重要な役割を担う脳内神経伝達物質ヒスタミンは、唯一ヒスチジンを原料として生合成されることが知られている。鰹だしは遊離態ヒスチジンを豊富に含有しており、その特徴的な成分組成はヒスタミンの生理活性の発現を期待させたことから、鰹だし投与後のマウスの脳内ヒスタミン変化と認知記憶能評価モデルにて仮説検証を試みた。鰹だし投与後に脳内ヒスタミン産生細胞である結節乳頭核を含むように視床下部を切り出し、視床下部中のヒスチジン及びヒスタミン濃度を経時的に測定した結果、いずれも投与後に有意に上昇し、ヒスタミン代謝物であるテレメチルヒスタミンも有意に増加することが分かった。このことは、鰹だし投与によりヒスタミン神経系が賦活化する可能性を示し、当該神経系が関与する認知記憶能への影響を示唆した。

そこで、認知記憶能への影響検証を目的に、げっ歯類の特性を利用した認知記憶モデルを二つ選定し、鰹だしを評価に供した。新奇性を好む特性を利用した新奇物体探索モデルでは、新奇物体に対する探索行動を記憶能として測定した。その結果、溶媒投与群が 2 物体に対してほぼ均等な探索行動を示したのに対して、鰹だし投与群では新奇物体に対して

の探索時間の比率が有意に増加することが見いだされた。このことは、溶媒投与群では事前に獲得した物体に対する記憶が48時間後の測定時には失われていたが、鰹だし投与群では獲得された物体に対する記憶が正確に保持され、その結果として認識経験のある物体と新奇な物体を識別したことを示唆する。

アセチルコリンは、認知記憶能に深い関連を有することが知られる神経伝達物質である。Y字型迷路試験では、このアセチルコリンの受容体阻害剤であるスコポラミン投与により、アセチルコリンの学習記憶障害を誘発させた。その上で、通路選択の特性（直前に選択した通路とは異なる通路を選ぶ）を利用し、Y字型迷路における進路探索行動の変化を空間的短期作業記憶の指標として評価した。その結果、スコポラミン投与群では、溶媒群に比べて有意な自発的交替行動率の減少が認められたが、鰹だし併用群ではスコポラミン群に対して有意な交替行動率の増加を示すことが分かった。本結果は、鰹だし経口摂取がY字型迷路でのスコポラミン誘発健忘障害を改善する、すなわち鰹だしはアセチルコリン以外の機序で認知記憶能の発現に関与する可能性を示唆する。

本事象が、鰹だし中のヒスチジンがヒスタミンに変換されることに起因するのであれば、ヒスタミンの生合成に必要なヒスチジン脱炭酸酵素の阻害剤である α -フルオロメチルヒスチジン (α FMH) を前投与すれば、確認された影響が消失すると考えられた。そこで、 α FMHを用いて鰹だしの作用をY字型迷路試験にて検証した結果、予想通りに鰹だしで見出されたスコポラミン誘発健忘障害の改善作用が消失した。このことは、鰹だしの空間的な短期作業記憶の改善作用がヒスタミン生合成を介していることを示唆する。すなわち、鰹だしの経口投与は、脳内ヒスタミン量を増加させ、中枢ヒスタミン神経系を介して認知記憶能に影響を与え、脳機能を賦活化させる可能性が示唆された。

3. 鰹だしの心理状態に与える影響

身体活動能の低下に付随し、当然ながら心理状態も変化する。ヒトを対象に、鰹だしが疲労関連症状の自覚変化及び心理状態へ与える影響を検討した。第一に、二重盲検群間比較試験にて、鰹だしの疲労関連症状に対する影響を評価した結果、鰹だし摂取群では肩こりや目の疲れという身体症状を自覚する頻度が減少することが分かった。改善が見られたこれらの症状は、いずれも局所的な血流循環の異常が発症の一機序としてあげられていることから、末梢循環の改善を介した疲労関連症状の軽減が起きている可能性が推測された。実際に鰹だしあるいはプラセボを摂取し、摂取直後からの末梢血流量を経時的に測定した結果、鰹だし摂取時にのみ血流量が増加することが確認された。これらの結果は、鰹だし中に末梢血管を拡張させる成分が含有されている可能性を示す。本事象は鰹だしの単回摂取で見出されたが、摂取継続により末梢血管への影響が持続する可能性も考えられた。そ

こで、鰹だし継続摂取前後での末梢血流量の変化と、末梢循環改善によってもたらされる主観的变化の両方に対する影響を検討した。心理状態の変化検出には臨床現場で利用されている主観調査票を、末梢循環状態の評価にはレーザードップラー方式の血流量測定法を選定した。二重盲検交差試験での検討の結果、鰹だし摂取時にのみ末梢血流量が有意に増加し、心理状態も有意に改善することが分かった。興味深いことに、それらの変化量には、有意な相関性があることも確認され、鰹だしが末梢循環の改善を通じて、心理状態に影響を与える可能性が示唆された。

以上、本研究を通じて、鰹だしが抗疲労作用を発現することを示した。また、その作用発現の機序として、1) 脂質分解によるエネルギー基質の利用促進、及び末梢血管拡張による末梢組織への栄養供給路の拡大に基づく円滑なエネルギー供給、2) 脳内ヒスタミン神経の賦活化とそれに起因する認知記憶能及び覚醒感の変化、の二つの経路の可能性を示した。これらの知見は、鰹だし摂取が末梢と中枢の両方向から抗疲労作用を発現するというユニークさを表すと共に、抗疲労作用のみならず多様な生理調節作用を有する可能性を同時に示唆するものであり、我々の食文化に広く定着している食素材が貢献しうる領域は大きい。また本研究により、鰹だしが脳内ヒスタミン神経系に対して影響を与えることが明らかとなったが、今後の脳機能研究の進展とともに、中枢ヒスタミン神経系に着目した疲労の発現機序解明にもつながると考えている。

目次

第 1 章 序論

1-1	鰐だしと民間伝承	1
1-1-1	日本人と鰐	1
1-1-2	鰐の生理作用に関する伝承	2
1-2	疲労研究の概況	3
1-2-1	日本における疲労実態と疲労研究の動向	3
1-2-2	疲労に対する本研究のアプローチ	5
1-3	本研究の目的と構成	5

第 2 章 鰐だしの身体活動能に与える影響とその機序解析

2-1.	目的	9
2-2.	材料と方法	10
2-3.	結果	17
2-4.	考察	20
	図表	23

第 3 章 鰐だしの中枢機能に与える影響

3-1.	目的	35
------	----	----

3-2. 材料と方法	35
3-3. 結果	41
3-4. 考察	44
図表	48

第4章 鯉だしの精神状態に与える影響

4-1. 目的	55
4-2. 材料と方法	56
4-3. 結果	64
4-4. 考察	68
図表	73

第5章 総合討論

86

参考文献

97

謝辞

107

第 1 章 序論

1-1. 鰹だしと民間伝承

1-1-1. 日本人と鰹

鰹（学名 *Katsuwonus pelamis*）は、サバ科に属する暖海・外洋性の中型回遊魚であり、インド洋や太平洋海域に生息している。日本人はいつから鰹を獲ってきたのか、考古遺跡からの報告が参考になる（1）。縄文時代早期（1 万年から 7000 年程前）の神奈川県三浦半島、房総半島、青森市近郊の貝塚から、鰹の骨の出土が報告されている。縄文時代を通じて最も鰹漁が盛んとされる福島県いわき市周辺の貝塚からは、大型の鹿角製の釣り針が出土しており、高度な漁労技術を持っていた縄文人像が推測されている。また、弥生時代後期の袴狭遺跡からは、箱型木製品の側板に鰹の絵（図 1-1）が描かれており、当時の人々にとって鰹が身近な魚種であり、貴重なタンパク質源であったことが推察できる。

「古事記」には“堅魚”の表記が、養老律令の「延喜式」には「日每朝夕大御饌祭」という朝と夕に神々に備える神饌に“乾鰹”を用いていたこと、“堅魚煎汁”を貢納していたとの記述も見られる。

世界の多くの料理において、食材由来の味成分による料理の風味増強を目的に、食材を熱水あるいは水で抽出した「だし」が用いられる。世界的に幅広くかつ一般的に用いられている「だし」は牛あるいは鶏由来であるが、日本では鰹肉由来の「だし」が一般的である。鰹だしは、室町時代末頃から用いられ、江戸時代には汁物や煮物等の料理に広く用いられてきたことが、当時の料理書から分かる（2）。鰹肉から加工された食品である鰹節には、生利節、荒節、枯

節、あるいは本枯節があり、製造工程に違いがある。生鰹の頭と内臓を除き、3枚におろして煮熟し、日乾すれば生利節、焙乾すれば荒節、カビ付け工程を経れば枯節と呼ばれる (3)。カビ付けをした枯節、及び複数回のカビ付けが繰り返された本枯節は、水分量が低値であるために保存性が高まること、及び特有の呈味と香りが特徴である。これらの鰹節は、用途にあわせて使い分けられているが、その抽出物は特有の風味を料理に付与する「鰹だし」として日本人に嗜好されている (4)。鰹だしの風味発現に有効な成分として、味質観点ではグルタミン酸がうま味、ナトリウムが塩味とコク、イノシン酸がうま味と塩味、乳酸が酸味、ヒスチジンが酸味とうま味と関連し (5)、香りに関しては、300-400成分が同定されているが、一成分ではなく多成分により形成されていると報告されている (6)。

1-1-2. 鰹の生理作用に関する伝承

江戸時代の天保年間 1832 年、当時の琉球王府の侍医であった渡嘉敷通寛により食療法の指導書として「御膳本草」が記された。琉球地方、奄美大島近辺、南九州までの地域で食されているものが網羅され、それぞれの食材の生理作用が記載されている。鰹節に関しては「乾鰹」として紹介されており、味は「甘」すなわち美味しいと、効能としては「脾胃を調え、身を肥やす」「諸病に用いて益あり」とある。特定の疾患、特定の状態への効能表現ではなく、疾患に限らずいずれの体調不良に対しても益あり、と解釈できる記述が他の生薬とは異なる特徴である。実際に、鰹だしを豊富に含む料理を体調不良時に食することが現在まで伝承されている。例えば、お椀に厚削りの鰹節を多量に入れ、熱湯を

注ぎ、ネギや卵を入れる沖縄の^{かちゅう ゆ}鰹湯、茶碗に薄削り鰹節を入れ、お茶を入れる鹿児島茶節などである。

江戸時代の元禄 10 年（1697 年）、当時の食物全般について、その食品の滋味・能毒・食法に関して解説した食物本草書「本朝食鑑」が人見必大により編纂された（7）。鰹節の気味は「微温」、主治は「気血を補い、胃腸を整え、筋肉を壮にし、歯牙を固くし、皮膚のきめを密にし、髭髪を美しくする」と記述されている（図 1-2）。「気血を補う」、すなわち、鰹節を食べることで、血液の巡り（血）が良くなり、体内におけるエネルギー（気）が充足すると解釈される。薬膳素材などの効能分類には、身体を温めるあるいは冷やす素材という観点で、「熱」「温」「涼」「寒」の四性が知られている。鰹は「温」に分類されており（8）、すなわち、身体を温める作用を有することが期待される。日本以外に唯一、鰹節を食する習慣がある国としてモルディブが知られている。14 世紀中頃のモルディブ諸島に関する記述において、「鰹節は羊のような味がし、食べると無比の活力をもたらす」と活力増強作用が表現されている（9）。先人の食履歴と体感に基づいた伝承記述によれば、鰹に含まれる栄養素が心身活動を賦活化させること、すなわち心身活動が低下する疲労状態に対しての作用発現が期待され、本研究テーマとして取り組むことにした。

1-2. 疲労研究の概況

1-2-1. 日本における疲労実態と疲労研究の動向

「疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究」の疲労調

査研究班により、一般地域住民 15-65 歳の男女 4000 名を対象にした疲労実態調査の結果、有効回答者 3,015 名の 59.1%が疲労を感じており、その 35.8 %は 6 か月以上続く慢性的な疲労の自覚を回答した (10)。また、慢性疲労が見られる人の半数近くは作業能力が低下していると回答しており、これらの数値に基づく日本での経済損失は年間 1.2 兆円に上るとの報告もある (11)。2012 年、「慢性疲労症候群の実態調査と客観的診断法の検証と普及」研究班が、同一地区で疲労実態調査を実施した結果、1999 年の先の調査と同様の傾向であったことを報告している (12)。

1988 年、米国疾病対策センター (Centers for disease control and prevention; CDC) の Holmes らにより、慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome: CFS) の疾病概念が報告された (13)。慢性疲労症候群とは、健康に生活していた人が原因の明らかでない激しい全身倦怠感に襲われ、強度の疲労感と共に精神神経症状などが長期に続き、健全な社会生活が送れなくなる疾患と CDC により定義されている (14)。疾患の概念が提唱されて以降、アメリカだけでなくカナダ、イギリス、ドイツ、スウェーデンなど多くの国々において CFS 症例の存在が報告され、病態の解明や診断、治療法の開発が進められてきたが、未だに治療法は確立されていない。日本での疲労研究は、1990 年代後半に慢性疲労症候群の存在が定量化されて以降、研究が盛んになってきた。疲労因子の解明に向けては、日常生活が破綻するような強度の疲労状態にある CFS 患者と健常人との対比を試みる、あるいは既にある研究領域を基点として疲労を捉えるという研究戦略がとられてきた。疲労の機序解明及び疲労定量化を目指した研究は多方面から進められており、近年、疲労が学術面でも定義されるようになってきた。

1-2-2. 疲労に対する本研究のアプローチ

疲労とは、過度の肉体的および精神的活動または疾病によって生じた独特の不快感と休養の願望を伴う身体の活動能力の減退状態であり、自発的に活動が開始あるいは維持できない身体活動能が低下した状態とされている（15, 16）。

実際に我々は、自身の活動能力の低下と共に不快感の増幅、意欲喪失、及び眠気の誘発といった心理状態の変化を自覚し、疲労を認識する。本研究では、鰹だしの疲労に与える影響を身体活動能とそれに付随する心理状態の二方向から検証を試みた（表 1-1）。第 2 章と第 3 章では、動物モデルを用いて、鰹だしが末梢組織と中枢組織のそれぞれを主とした身体活動能に与える影響及びその作用発現に関して検討した。その後、第 4 章では、心理状態の変化に焦点を絞り、ヒトを対象に鰹だしの影響を検討した結果を述べる。

1-3. 本研究の目的と構成

本研究は、未だ解決されていない疲労という社会課題に対して、日常の食での解決可能性を探ることを目指し、鰹だしの疲労に対する影響を解明することを目的とした。第一に、身体活動能に与える影響を末梢と中枢の観点から検討した。まず、末梢組織を中心とした活動に関しては、骨格筋機能を主とした身体活動量の変化を評価し、エネルギー産生に着目した機序発現を推測した。次に、中枢組織である脳の活動能に関しては、認知記憶能の変化として評価した。第二に、身体活動能の低下に伴い生じることが知られている疲労関連症状及び心理状態に与える影響を評価した。最後に、鰹だしがいかんして抗疲労作用を発現しているか、末梢と中枢の観点から総合的に可能性を論じた。

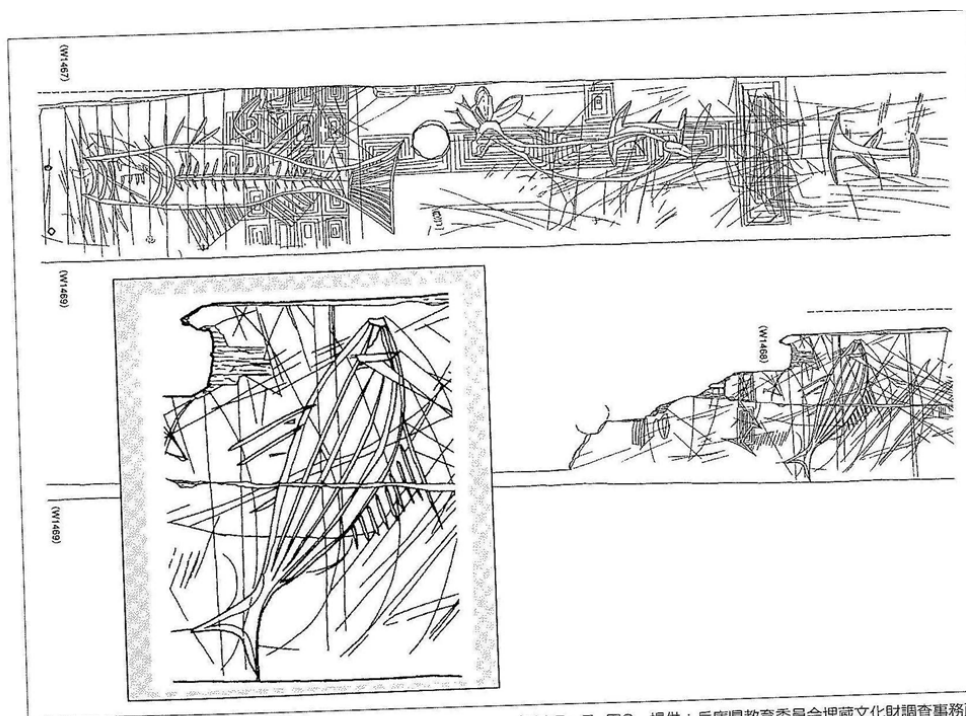


図6 側板の線刻画

(写真5～7, 図6 提供：兵庫県教育委員会埋蔵文化財調査事務)

(文献 1 p. 22 から引用)

図 1-1. 袴狭遺跡から出土した箱型木製品



(文献7から引用、財団法人 味の素食の文化センター所蔵)

図 1-2. 本朝食鑑

表 1. 鯉だしの抗疲労作用に対する研究アプローチ

		活動能	心理状態
組織	末梢（骨格筋）	限界運動時間	主観変化
	中枢（脳）	認知記憶能	
動物種		マウス	ヒト

第2章 鰹だしの身体活動能に与える影響とその機序解析

2-1. 目的

疲労とは、自発的に活動が開始あるいは維持できない身体活動能が低下した状態と定義されている。すなわち、鰹だしの疲労に対する影響を検証するには、活動の持続か、あるいは活動低下状態からの回復という二つの視点が必要である。本章では、それぞれに適した動物モデルを選定し、身体活動能に与える影響を評価し、またその変化の要因について探ることも目指した。

強制遊泳モデルは、水の流れに逆らって泳ぐというマウスの習性を利用し、流水条件下での遊泳活動を持続した時間を身体活動能と判断する。本評価系は、動物での行動評価でしばしば課題となる再現性が克服されているとされ、身体活動量に影響を与える鰹だしの寄与成分群の絞りこみにも適用可能な評価系と考え、活動持続に着目した身体活動能の評価として選定した。他方、低活動状態からの活動回復を評価するためには、ある一定の身体活動を負荷し、自発的な行動量が低下した状態を作り出す必要がある。本検討では、電動式の回転車内での走行運動を負荷した後、一定時間内に自発的に活動した量を低活動からの回復として評価する強制歩行モデルを用いた。身体活動には、活動持続のためのエネルギー供給が必須であることから、鰹だし投与後のエネルギー代謝の変化も解析とした。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 動物

抗疲労作用の検証及び機序解析には、日本チャールズ・リバー株式会社より購入した5週齢雄性CD2F1マウスを用いた。室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、12時間毎の明暗サイクル条件下にて飼育した。身体活動能に与える影響を評価するための強制遊泳モデルと強制歩行モデルでの検討は、明期7:00 a.m.-7:00 p.m.条件下の明期9:00-13:00に実施した。被験物質のエネルギー代謝への影響評価のために行った呼気ガス評価では、暗期7:00 a.m.-7:00 p.m.条件下、暗期7:00-14:00に実施した。動物はポリケージにて飼育し、飲料水を自由に摂取させ、AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂食させた。全ての動物実験は、味の素株式会社の動物実験倫理規定に従い実施した。

2-2-2. 被験物質

鰹肉を工業的に熱水抽出し、その抽出物を凍結乾燥し、均一になるように粉碎した粉末を -25°C で保管し、使用の度に目的の濃度に調製した。鰹だしは、41%がタンパク質あるいはペプチド、23%が遊離アミノ酸、12%が有機酸、5%がミネラル、0.6%が核酸で構成されている（表2-1）。タンパク質及びペプチドは、6N塩酸条件下、 120°C で24時間の加水分解後の遊離アミノ酸量から非加水分解時の遊離アミノ酸量を差し引いた量として算出した。遊離アミノ酸は、アミノ酸分析機L-8500（株式会社日立製作所）の生体アミノ酸分析モードにて分析した。有機酸と核酸は、液体クロマトグラフL-7000（株式会社日立製作所）で測定した。ミネラルは、灰化後に原子吸光分析機SAS760（セイコーインスツル株

式会社)にて測定した。

分子量の大きさにより、鰹だしを3つの分画物に調製した。分子量1000以下分画物(LMF; Low molecular weight fraction)はアミノ酸・有機酸・核酸・ミネラル及び低分子量ペプチドを含み、分子量1000-6000分画物(MMF; Medium molecular weight fraction)はペプチド及びタンパク質を含み、分子量6000以上の高分子量分画物(HMF; High molecular weight fraction)はタンパク質及び褐変物質などの高分子量体を含み、各々、63.7、25.9、10.4%の割合で鰹だしを構成している。分画の手順としては、まず分子量サイズ6000の分画膜NTU3250-C1R(日東電工株式会社)を用いて、MMFとLMFを含む分子量6000以下の成分群とHMFに分けた。次に、MMFとLMF混合溶液を、分子量1000の分画膜Prep/Scale TFF6(メルク株式会社)を用いて、MMFとLMFの2画分にした。鰹だしを3画分に調製した後、MMFとHMF中に遊離アミノ酸・有機酸・ミネラル・核酸が残っていないことを確認した(表2-1)。尚、LMFは分画により高い吸湿性を有する乳酸が濃縮された結果、凍結乾燥による粉末化が不可能であったため、溶液として-25℃で保存した。MMFとHMFは分画後、凍結乾燥により粉末化し、-25℃で保存した。

2-2-3. 強制遊泳モデルにおける鰹だしの身体活動能に与える影響

2-2-3-1. 遊泳時間を指標とした評価

鰹だしとその分画物の身体活動量に与える影響を評価するために、京大松元式運動量測定流水槽(図2-1、有限会社アニテック、以下流水槽と表記)を用いた。本装置は90×45×45cmの亚克力樹脂製で、水を入れるとポンプ循環に

より流水状態を作りだすことができる (17, 18)。一連の評価を通じて、水の深さを 38 cm、水温を $34 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保った。流れに逆らって泳ぐというマウスの習性を利用し、遊泳限界を身体活動能力と判断する評価系である。他の評価系よりも高い再現性を有することもあり、これまでも様々な化合物の身体活動能力の評価に使われている (19-21)。遊泳馴化を目的として、供給水量 6 L/min 条件下にて、5 週齢のマウスに対して、1 回 20 分、1 週間に 2 回の遊泳トレーニングを実施した。遊泳トレーニング後、一定の供給水量下にて限界遊泳時間を 1 日おきに 3 回測定し、その結果に基づき、3 回の限界遊泳時間のばらつきが少ない個体かつ集団としてばらつきが少なくなるように、試験に供する個体を選抜した (22)。マウスの鼻先が 7 秒以上水面下に沈んだ時点を身体活動の限界と判定し、その時点でマウスを引き上げた。

鰹だしを 0.43 g/kg (マウスの体重 1 kg あたり 0.43 g の鰹だしを摂取するように、例えば 25 g のマウスには 10.8 mg の鰹だし摂取に相当するように濃度調製した溶液を投与)、0.86 g/kg、1.72 g/kg あるいは溶媒の蒸留水を 20 ml/kg (マウス 1 kg あたり 20 ml を投与、すなわち 25 g のマウスには 0.5 ml 量を投与) を、ゾンデを用いてマウスに経口投与し、60 分後、遊泳運動を負荷し、限界遊泳時間を測定した。この結果に基づき、鰹だしの分画物 LMF、MMF 及び HMF も 0.86 g/kg になるように 20 ml/kg 量を投与した。運動負荷条件としては、約 10 分で限界活動時間になるような流速 10 L/min を設定した (17)。全ての評価は、日内変動を避けるために明期 10:00-15:00 の間に実施した。

2-2-3-2. LMF が運動中のエネルギー代謝に与える影響

運動時には、運動強度と運動時間によりエネルギー供給源が異なる。LMF が運動中の代謝に与える影響を評価するために、30 分ほどの活動が可能な運動負荷条件として供給水量を 8 L/min に設定した。運動中の糖質・脂質代謝変化を測定する前に、LMF 0.86 g/kg あるいは溶媒投与群の限界遊泳時間を測定し、代謝評価の参考とした。その結果に基づき、溶媒投与群では 15 分と 30 分後、LMF 投与群では 15 分、30 分、40 分、50 分後にそれぞれの血液と筋肉を回収した。各時点においてはマウスの遊泳運動を中断し、エーテル麻酔条件下にて腹部大静脈より採血を行い、血清を分取した。また、採血終了後、左右後肢の腓腹筋と大腿筋を摘出し、液体窒素にて急速凍結後、測定まで -80℃ にて保存した。

血清中の遊離脂肪酸（クリニメイト NEFA 試薬、積水メディカル製）、ケトン体（オートワコー総ケトン体、和光純薬工業製）、及びトリグリセリド（セロテック TG-L、セロテック製）は、小型生化学自動分析装置 7070 型（日立製作所製）にて分析した。筋肉中の乳酸と ATP の測定は、液体窒素で冷却した乳鉢内に凍結した筋肉を入れ、液体窒素下ですりつぶし、組織重量の約 3 倍量の 6%過塩素酸と混合後、除タンパクした上清で測定した。乳酸含量は、乳酸をピルビン酸に酸化させ、同時にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を還元させる反応原理を利用した酵素法にて測定した。1 モルの NAD は、存在する乳酸に対応して 1 モルの NADH に変換されるため、NADH の吸収波長 340 nm での吸光度を測定し、乳酸濃度を算出した（23, 24）。ATP 含量は高感度 ATP 測定キット（Biaffin GmbH & Co KG）にて測定した。運動中の代謝評価のための遊泳運動は、日内変動を避けるために明期 10:00-15:00 に実施した。

2-2-4. 強制歩行評価系における鯉だしの低活動量状態に与える影響

一定の身体活動負荷後、身体活動の回復の程度を自発行動量で評価した（25, 26）。約 20 匹のマウスを 3.3 m/min の速度で 3 時間、電動式回転車内で強制的に歩行するように運動を負荷し（図 2-2）、その後、鯉だし分画物 HMF、MMF、LMF を 0.86 g/kg になるように 20 ml/kg を、対照群には溶媒の蒸留水 20 ml/kg をゾンデで投与した。投与後、外部音の影響を受けない箱の中にマウスを 1 匹ずつ入れたケージを置き、ケージ上部に設置した赤外線センサー（DAS system、ニューロサイエンス製）により、ケージ内のマウスの行動量を測定した。測定装置内に入れた最初の 15 分間は新環境への馴化時間とし、馴化後から 60 分間の行動量を解析対象とした。日内変動をさけるために、明期 8:30-17:30 の間に行った。

2-2-5. 鯉だし投与後の呼気ガス測定

鯉だし投与が生体のエネルギー代謝に与える影響を推定することを目的に、安静条件下にて呼気ガスを分析した。呼気ガス分析は、非侵襲的にエネルギー代謝を評価できることから、ノックアウトマウスの全身性の代謝変化の検証や化合物摂取による代謝変化の解明に用いられてきた（27, 28）。生体呼気ガス分析装置は、測定対象の動物を入れるエネルギー代謝計測チャンバー（MCH-121524 モデル、12 × 15 × 24 cm の透明アクリル樹脂製）、生体ガス分析用質量分析機（RL-600 モデル）、ガスサンプラー（ANI6-A-S）、及び計測制御パソコンから構成されている（図 2-3、装置はアルコシステム社製）。呼気と吸気中の酸素ガス濃度と炭酸ガス濃度から、以下の算出式に則り、酸素消費量と呼

吸商、及び体内で酸化された脂質及び糖質の量を推定した (18)。

<算出式>

- 酸素消費量 $VO_2 = (\text{空气中 } O_2 \text{ 濃度} - \text{呼気 } O_2 \text{ 濃度}) \times \text{送気流量} \times \text{時間}$
- 二酸化炭素排出量 $VCO_2 = (\text{呼気 } CO_2 \text{ 濃度} - \text{空气中 } CO_2 \text{ 濃度}) \times \text{送気流量} \times \text{時間}$
- 呼吸商 $= \text{二酸化炭素排出量 } VCO_2 \div \text{酸素消費量 } VO_2$
- 糖質酸化量 $= (4.51 \times \text{呼吸商} - 3.18) \times VO_2$
- 脂質酸化量 $= 1.67 \times (1 - \text{呼吸商}) \times VO_2$

個体間の食餌摂取のばらつきを排除するために、暗期 7:00-11:00 の 4 時間のみで食餌を摂ることをマウスに訓練した。測定装置内にマウスを入れ、呼気ガスを測定しながら約 2 時間後、LMF を 0.86 g/kg あるいは溶媒を 20 ml/kg 投与し、その後も連続して 200 分間測定した。計測チャンバーには一定流量の空気が送り込まれ、経時的にマウスの呼気を回収し、水分除去後に質量分析機にて酸素ガス濃度と二酸化炭素ガス濃度が算出される。自発行動量変化による代謝への影響を除くため、自発行動量が一時的に上昇することが分かっている暗期終了 2 時間前まで測定した。

2-2-6. 統計解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。溶媒群と鰹だし投与群 (0.43 g/kg、0.86 g/kg、1.72 g/kg)、あるいは溶媒群と鰹だし分画物 (LMF、MMF、HMF 群) との遊泳時間の差異は、溶媒群を対照として一元配置分散分析での Dunnett 検定で評価した。溶媒群と LMF 投与群の 2 群間における糖質・脂質代謝関連指標の差異は、t-test により解析した。酸素消費量、糖質酸化量、及び脂質酸化量

は、時間と被験物質による二元配置分散分析で評価し、その後、同一時間での差異を **t-test** により解析した。解析には、StatView5.0 ソフト (SAS Institute 社製) を使用し、いずれの解析においても有意水準を危険率 5%以下とした。

2-3. 結果

2-3-1. 鰾だしが身体活動の継続に与える影響

身体活動の継続という観点から、鰾だしとその分画物の作用を強制遊泳モデルにて評価した。溶媒 20 ml/kg 投与群と鰾だし 0.43 g/kg、0.86 g/kg、1.73 g/kg 投与群の限界遊泳時間を測定した結果、それぞれ 9.1 ± 0.8 分、 11.0 ± 0.9 分、 12.1 ± 1.0 分、 12.0 ± 1.0 分を示し、鰾だし 0.86 g/kg 投与群と 1.73 g/kg 投与群では溶媒群よりも有意な遊泳時間の長期化を示した（図 2-4）。鰾だしは様々な成分を含有しているため、どの成分群が持久力延長に寄与しているかを明らかにするために分子量により 3 つの画分を調製し、同様の評価に供した。溶媒を 20 mL/kg、LMF、MMF、HMF をそれぞれ 0.86 g/kg を経口投与し、その 60 分後から限界遊泳時間を測定した。その結果、それぞれ 10.7 ± 1.0 分、 14.9 ± 1.3 分、 9.7 ± 0.8 分、 9.7 ± 0.7 分を示し、MMF と HMF を投与されたマウスは、溶媒を投与されたマウスと比較して持久力の延長は見られなかったが、LMF 投与群では対照群に対して有意な遊泳時間の長期化が確認された（ $p < 0.05$ 、図 2-5）

2-3-2. 鰾だしが活動低下状態に与える影響

身体活動低下状態からの回復という観点から、強制歩行モデルにおいて鰾だし投与が自発的活動に与える影響を評価した。一定の身体活動負荷後、溶媒 20 ml/kg あるいは鰾だし分画物 LMF、MMF、HMF を 0.86 g/kg 投与し、身体活動の回復の程度をその後の 60 分間の自発行動量として評価した。その結果、溶媒、鰾だし分画物 LMF、MMF、及び HMF の自発行動量は、それぞれ 89.6 ± 18.4 、 203.9 ± 35.5 、 108.7 ± 16.0 、及び 99.8 ± 15.9 を示した（図 2-6）。HMF あるいは

MMF 投与には、強制歩行後の自発行動量に影響を与えなかったが、LMF は溶媒投与に対して有意に高値を示した ($p<0.01$ 、図 2-6)

2-3-3. 鯉だしが身体活動中の代謝に与える影響

身体活動中の糖質・脂質代謝変化を測定する前に、供給水量を 8 L/min に設定し、LMF 0.86 g/kg あるいは溶媒投与群の限界遊泳時間を評価した。その結果、溶媒群と LMF 群の限界遊泳時間は、それぞれ 35.2 ± 1.5 分と 49.8 ± 3.3 分を示し、LMF 投与群は対象群に対して有意に高い遊泳時間を示した ($p<0.01$ 、図 2-7)。この結果に基づき、LMF あるいは溶媒投与後の運動条件下において、脂質代謝関連指標として血清中の遊離脂肪酸、ケトン体、トリグリセリド、及び糖質関連指標として筋肉中の乳酸、ATP 含量を経時的に測定した (表 2-2)。運動開始 15 分時点では、LMF 群の筋肉中乳酸は溶媒投与群に対して低値を示し、血清中の遊泳脂肪酸とケトン体、及び筋肉中の ATP 量は高値を示した。運動開始 30 分後時点では、LMF 投与群の血清遊離脂肪酸と血清ケトン体が溶媒投与群に対して高値を示し (それぞれ $p<0.1$ 、 $p<0.01$)、筋肉中乳酸濃度は有意に低値を示した ($p<0.05$)。また、運動開始から 40 分と 50 分後の時点においても、30 分時点の傾向が維持されていた。筋肉中 ATP 含量は、LMF 投与群の運動継続中のいずれの時点においても高値を示した。血清トリグリセリドは、いずれの時点においても 2 群間に差異は見られなかった。

2-3-4. 鯉だしが安静時代謝に与える影響

鯉だし投与が安静時代謝に与える影響を評価するために、LMF あるいは溶媒

投与後の呼気ガスを分析した。一日のうち、暗期開始直後の 4 時間だけで食餌をすることをトレーニングした後、体重に差が出ないようにマウスを 2 群に分けた。測定日には、暗期開始の 7:00-10:30 にのみ食餌を与えた後、測定装置に入れた。その 3 時間後、溶媒 20 ml/kg あるいは LMF0.86 g/kg を経口投与し、200 分間の呼気を測定した。酸素消費量は、両群共に投与直後に上昇したが、徐々に減少し安定化した。被験物質投与後の酸素消費量は、対照群に対して LMF 投与群が有意に高値を示し ($p<0.05$)、特に 22.5 分、48.5 分、172-204.5 分で高値であった (図 2-8)。糖質酸化量には、対照群と LMF 群間で差は確認されなかったが (図 2-9A)、脂質酸化量では投与後からの測定時間を通じて、LMF 投与群は対照群に対して有意に高値を示した ($p<0.05$)。鯉だし分画物 LMF は、投与後 29.0 分、74.5 分、120.0 分、及び 172-204.5 分において、顕著に脂質酸化量を増加させることが確認された (図 2-9B)。

2-4. 考察

本章では、鰹だしの身体活動などのパフォーマンスに対する影響を3つの動物評価系にて検討し、主要な以下4点の知見を得た。

- 1) 鰹だし投与は身体活動の持続時間を延長させる。
- 2) 鰹だし中の低分子画分 LMF が身体活動の持続に寄与している。
- 3) 鰹だし中の LMF が活動低下状態からの活動回復を促す。
- 4) 鰹だし中の LMF は安静時の脂質代謝を亢進する。

鰹だしの身体活動に与える影響を検証することを目的に、身体活動の持続という観点から強制遊泳評価系における運動持続時間を、活動低下時からの自発的活動の開始という点から強制歩行後の自発行動量数を評価した。

まず、鰹だし投与後の身体活動能に与える影響を強制遊泳モデルにて評価した。鰹だし投与後の遊泳時間を評価した結果、身体活動持続時間が延長することが確認された（図 2-4）。鰹だし中には、アミノ酸、有機酸、核酸、ミネラル、ペプチド、及びタンパク質等の成分が含有されているが未同定成分も多いことから（表 2-1）、鰹だし中のどの成分群が身体活動持続に効果を発揮しているかの同定を目的に、鰹だしを分子量により分画した3分画物、LMF、MMF、HFMを調製した（表 2-1）。LMF は、アミノ酸、有機酸、核酸、ミネラル及び分子量 1000 以下の低分子量ペプチドを含む。MMF は、分子量 1000-6000 のペプチドあるいはたんぱく質から構成されている。HMF は、分子量 6000 以上のたんぱく質あるいはメラノイジンなどの褐変物質から成る。鰹だし中の3分画物の組成は、LMF/MMF/HFM の順に約 64/26/10%である。これらの鰹だし分画物をマウ

スにそれぞれ同量投与し、身体活動への影響を検証した。その結果、MMF あるいは HMF 投与群は、溶媒投与群とほぼ同等の限界遊泳時間を示すことが分かった（図 2-5）。一方、LMF 投与群は溶媒投与群に対して、有意な運動時間の延長が認められ、この結果は LMF 中に何らかの活性成分が含まれていることを示唆する。次に、一定運動負荷後に低下した自発活動量を鰹だしが回復させるかを検証するために、強制歩行モデルにて鰹だし 3 分画物を評価した。強制歩行運動後に同量の LMF、MMF、HMF を投与した結果、MMF 投与群と HMF 投与群では溶媒投与群と変わらない自発行動量を示したが、LMF 投与群では溶媒投与群に対して有意な自発行動量の回復が確認された（図 2-6）。この結果は、LMF 画分が自発行動量を回復させることを示す。先の強制遊泳モデルでの結果もあわせると、鰹だし摂取は疲労状態に至り難くし、疲労状態からの回復を早めることが示唆された。

なぜ、鰹だし投与により身体活動が継続できるのか。身体活動の継続に必要なエネルギー供給を切り口に、鰹だし摂取が運動中及び安静時のエネルギー代謝に与える影響を評価した。その結果、LMF 投与群は対象群に対して有意に高い遊泳時間を示すことが分かり（図 2-5）、このことは LMF が身体活動の継続に関与することを示唆した。次に、LMF 摂取後の身体活動中の代謝変化を評価するために、15 分後から経時的に糖質・脂質代謝の関連指標を測定した。溶媒投与の運動負荷群では、非運動群に対して血中遊離脂肪酸及びケトン体濃度の上昇が見られ（表 2-2）、エネルギー源として脂質が利用されている状態にあることを示す。運動開始 15 分時点では、LMF 投与群は、対照群に対して筋肉中乳酸が低値を示した。その後の 30 分時点では、LMF 投与群において脂質代謝指標と

される血清遊離脂肪酸と血清ケトン体が有意に高値を示す一方、糖質代謝指標の筋肉中乳酸が低値を示した。LMF 投与群では、運動開始 40 分と 50 分後においても 30 分時点の脂質代謝亢進の傾向が維持され、筋肉中 ATP 含量は運動継続中のいずれの時点においても高値を示した。これらの結果から、LMF 投与が身体活動中の脂質利用を亢進する可能性が考えられた。

強制遊泳モデルでの検討は、LMF 投与 1 時間後に開始し、脂質利用亢進による活動時間持続の可能性が見出されたが、そもそも LMF 投与による安静時代謝に対する影響を調べるために、安静条件下における LMF あるいは溶媒投与後の呼気ガスを分析した。LMF 投与 30 分後及び 180 分後に酸素消費量と脂質酸化量の有意な上昇を確認し、一方で同時間帯での糖質酸化量に変化は見られなかった。LMF 投与により、酸素消費量が増加し、脂質利用が亢進されることが安静条件下においても示唆された（図 2-8、図 2-9）。LMF には脂質自体は含有されておらず、それ自体が基質となっていることは考えにくい。すなわち、鰹だしは LMF 中の成分を介して生体の脂質利用を亢進し、身体活動持続あるいは自発的身体活動の再開に必要なエネルギー産生を増加させ、その結果として身体活動能の低下を抑制したことを示唆する。

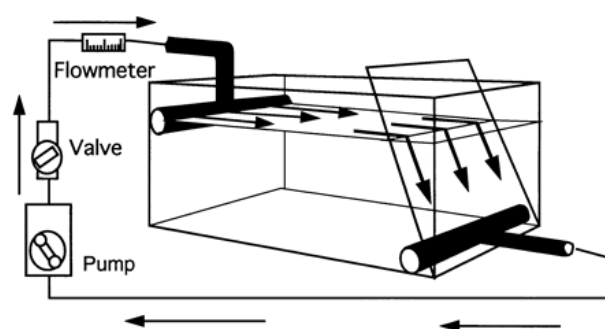
本章の内容は以下によって公表した。

Nozawa Y, Yamada K, Okabe Y, Ishizaki T, Kuroda M (2009) The anti-fatigue effects of the low-molecular-weight fraction of bonito extract in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32: 468-474

表 2-1. 鰹だし及び分画物の成分組成

Nutrient (g/100g)	DBB	LMF	MMF	HMF
Free amino acids	22.7	35.6	0.4	0.3
Alanine	0.8	1.2	0.0	0.0
Anserine	1.2	1.9	0.0	0.0
Arginine	0.4	0.5	0.0	0.0
Asparagine	0.3	0.5	0.0	0.0
Carnosine	0.4	0.5	0.0	0.0
Creatine	1.3	2.1	0.0	0.0
Cystine	0.1	0.2	0.0	0.0
Glutamic acid	0.5	0.8	0.0	0.0
Glycine	0.3	0.5	0.0	0.0
Histidine	10.9	16.5	0.4	0.1
Isoleucine	0.3	0.5	0.0	0.0
Leucine	0.6	1.0	0.0	0.0
Lysine	0.8	1.2	0.0	0.0
Methionine	0.2	0.4	0.0	0.0
Phenylalanine	0.3	0.6	0.0	0.1
Proline	0.5	0.6	0.0	0.0
Serine	0.3	0.4	0.0	0.0
Taurine	2.7	4.4	0.0	0.0
Threonine	0.2	0.4	0.0	0.0
Tryptophan	0.0	0.2	0.0	0.0
Tyrosine	0.3	0.5	0.0	0.0
Valine	0.3	0.7	0.0	0.1
Organic acid				
Lactic acid	11.7	17.2	0.0	0.0
Minerals				
Magnesium	0.3	0.4	0.0	0.1
Potassium	0.6	1.3	0.0	0.0
Sodium	4.1	4.1	0.1	0.2
Nucleic acids				
Inosic acid	0.6	0.5	0.0	0.0
Protein or unknown peptides	40.9	8.0	107.1	66.7

分子量の大きさにより、鰹だしを分子量 6000 以上の高分子量画分（HMF; High molecular weight fraction）、分子量 1000～6000 の中分子量画分（MMF; Medium molecular weight fraction）、分子量 1000 以下（LMF; Low molecular weight fraction）の 3 つに分画した。



(文献 17 から引用)

図 2-1. 運動量測定流水槽

ポンプ循環により水槽内に矢印のような流水状態を作りだす。

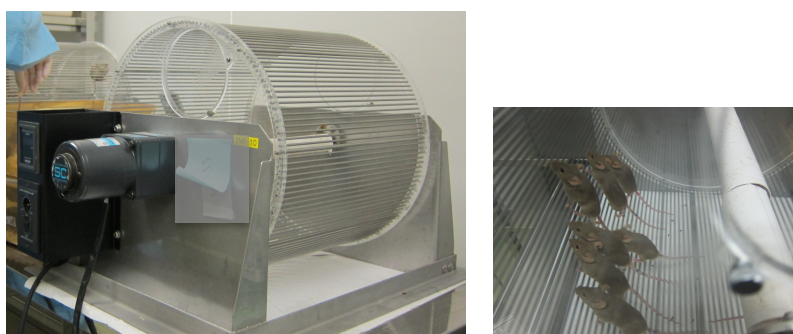
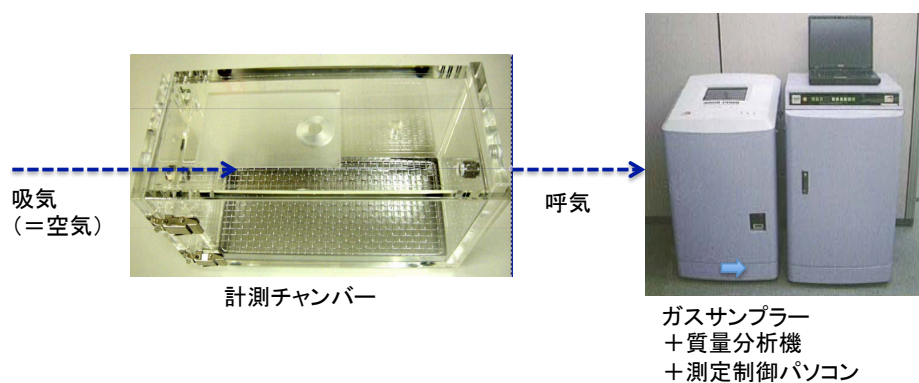


図 2-2. 電動式回転車による運動負荷

電動式の運動負荷回転車内に複数匹のマウスを入れ、装置の回転速度を運動負荷条件として設定し、走行運動を負荷した。3 時間後に被験物質を投与し、外部音の影響を受けない箱内に設置されたケージ内に静置し、そのケージ内を移動した回数をマウスの行動量として測定した。



(写真は (有) アルコシステム社提供)

図 2-3. 動物用エネルギー代謝測定システム

エネルギー代謝計測チャンバー (12 × 15 × 24 cm の透明アクリル樹脂製) にマウスを置き、一定流速で空気を送り込み、定期的にその呼気を収集し、生体ガス分析用質量分析機にて、呼気と吸気中の酸素ガス濃度と二酸化炭酸ガス濃度を測定した。

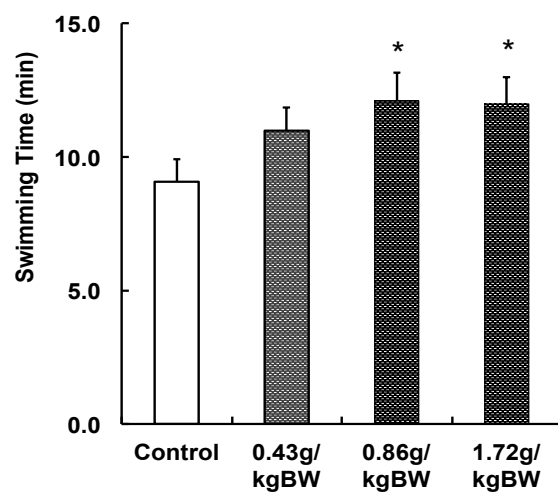


図 2-4. 鰹だし投与後の遊泳運動時間

鰹だし 0.43 g/kg、0.86 g/kg、1.72 g/kg あるいは溶媒を経口投与し、60 分後、遊泳運動を負荷し、限界遊泳時間を測定した。10 L/min の供給水量を強度運動負荷条件として設定した。平均値 ± 標準誤差 (n=9)、* ; $p < 0.05$ で control 群に対して有意差あり。

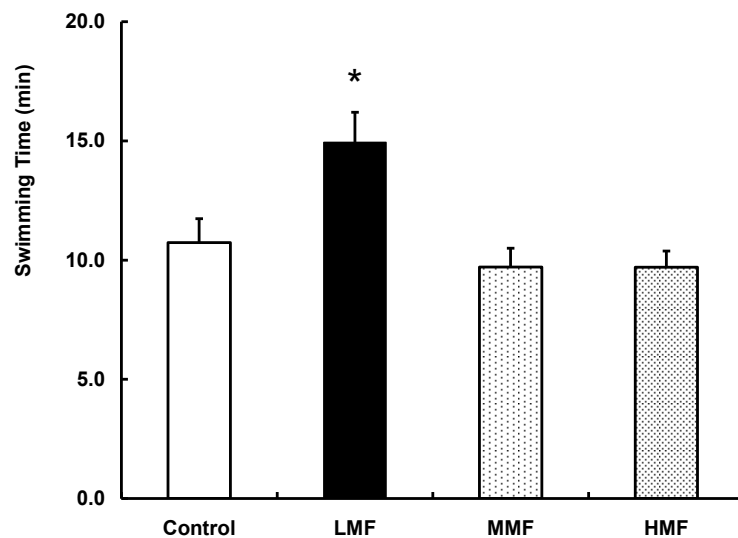


図 2-5. 鰹だし分画物投与後の遊泳運動時間

鰹だしの分画物 LMF、MMF、HMF を 0.86 g/kg あるいは溶媒 20 ml/kg を経口投与し、60 分後、遊泳運動を負荷し、限界遊泳時間を測定した。10 L/min の供給水量を運動負荷条件とした。平均値 \pm 標準誤差 (n=7, 8)、* ; $p<0.05$ で control 群に対して有意差あり。

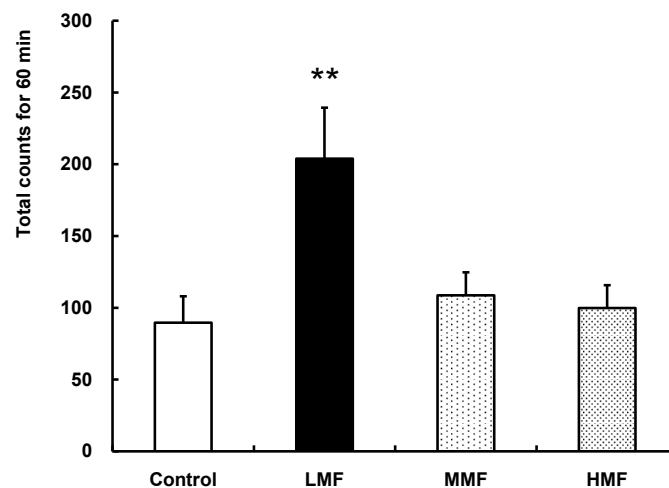


図 2-6. 活動量低下状態に対する鰹だし分画物投与後の自発行動量

一定の歩行運動負荷後、鰹だし分画物 LMF、MMF、HMF を 0.86 g/kg あるいは溶媒 20 ml/kg を経口投与し、その後の 15-75 分の自発行動量を身体活動の回復の程度として評価した。平均値 \pm 標準誤差 (n=20)、* ; $p < 0.01$ で control 群に対して有意差あり。

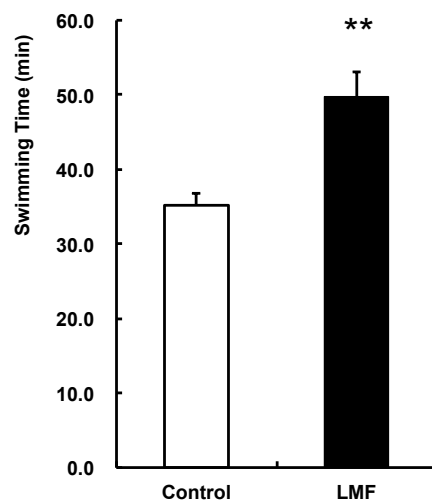


図 2-7. 鰹だし分画物 LMF 投与後の遊泳運動時間

鰹だし分画物 LMF を 0.86 g/kg あるいは溶媒を 20 ml/kg を経口投与し、60 分後、遊泳運動を負荷し、限界遊泳時間を測定した。8 L/min の供給水量の強度運動負荷条件を設定した。平均値 \pm 標準誤差 (n=9, 11)、** ; $p < 0.01$ で control 群に対して有意差あり。

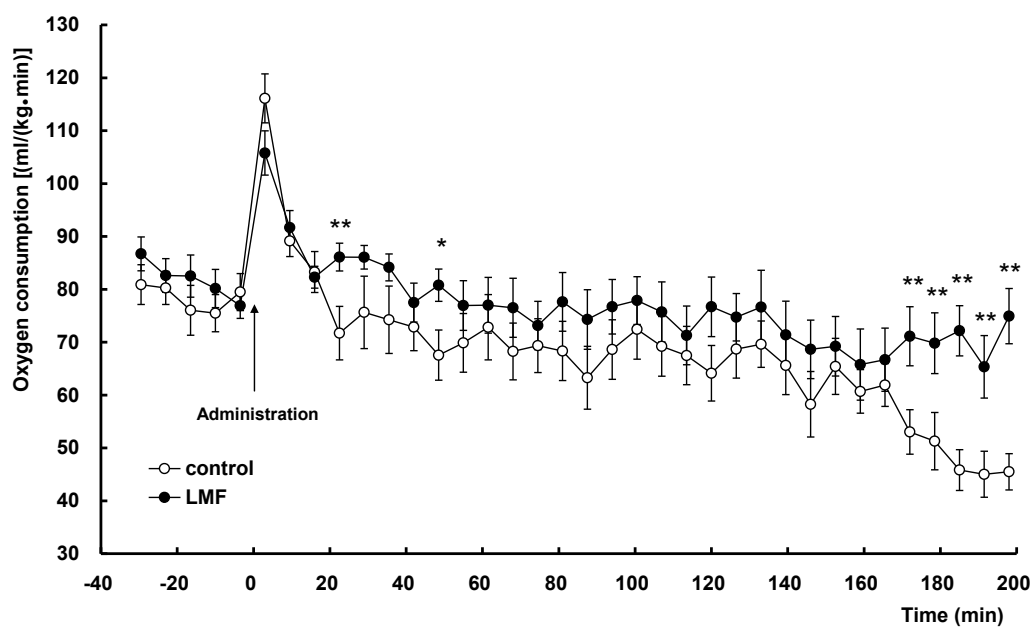
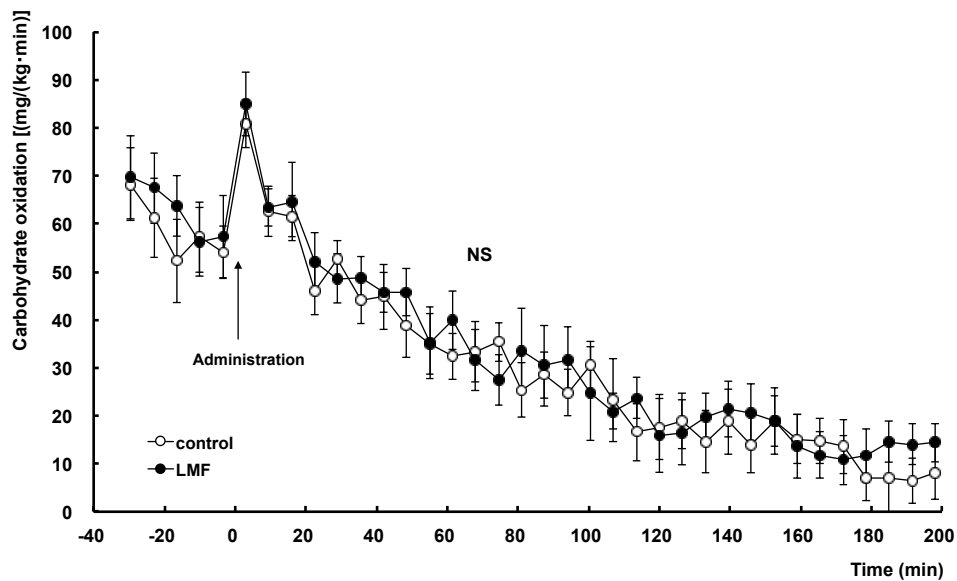


図 2-8. 鯉だし投与後の酸素消費量変化

鯉だし分画物 LMF あるいは溶媒を経口投与し、呼気を測定した。呼気中の酸素ガス濃度、炭酸ガス濃度及び換気量から、酸素消費量を算出した。

平均値 ± 標準誤差 (n=12)、* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$ で control 群に対して有意差あり。

(A)



(B)

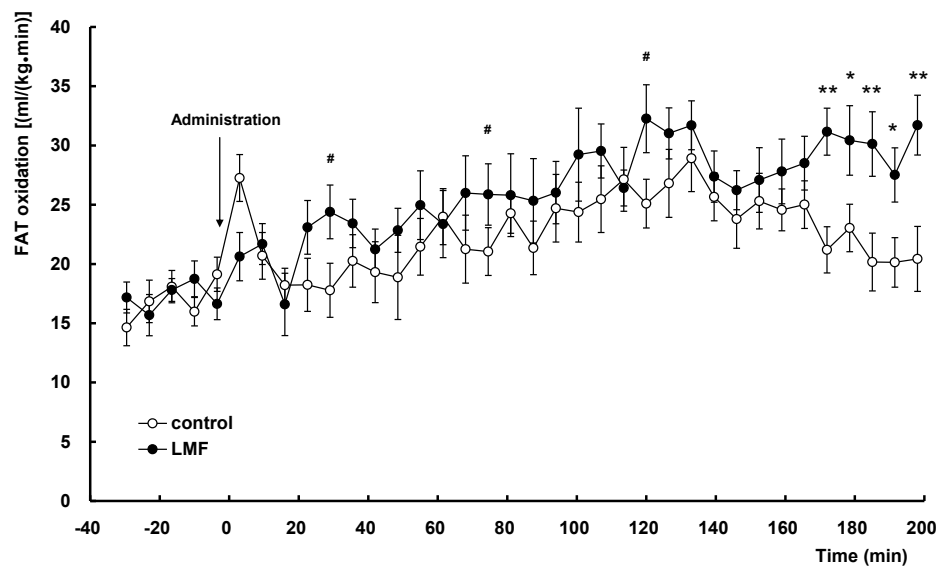


図 2-9. 鰹だし投与後の糖質・脂質酸化量変化

鰹だし分画物 LMF あるいは溶媒を経口投与し、呼気を測定した。呼気中の酸素ガス濃度、炭酸ガス濃度及び換気量から、酸素消費量（図 2-8）と呼吸商を算出し、体内で酸化された糖質 (A) と脂質 (B) の量を推定した。平均値 ± 標準誤差 (n=12)、NS: Not significant vs control 群、# ; $p < 0.1$, * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$ で control 群に対して有意差あり。

表 2-2. LMF 投与後の血液・筋肉中の糖質・脂質代謝関連物質の変化

	NEFA (μ Eq/L)	Ketone bodies (μ mol/L)	Triglyceride (mg/dL)	Muscle lactic acid (μ mol/g)	Muscle ATP (μ mol/g)
NE (Non exercise)	503 \pm 34	148 \pm 10	56.0 \pm 6.4	8.5 \pm 1.2	0.44 \pm 0.10
Control					
15min	806 \pm 83	354 \pm 21	60.7 \pm 3.1	8.2 \pm 0.9	0.34 \pm 0.13
30min	738 \pm 67	350 \pm 42	44.8 \pm 5.6	8.7 \pm 1.3	0.33 \pm 0.09
LMF					
15min	737 \pm 46	517 \pm 96	55.8 \pm 6.1	5.1 \pm 0.8 *	0.55 \pm 0.11
30min	958 \pm 94 #	937 \pm 129 **	53.5 \pm 4.8	5.5 \pm 0.5 *	0.54 \pm 0.09
40min	875 \pm 66	482 \pm 90	59.8 \pm 6.4	5.9 \pm 0.6	0.42 \pm 0.08
50min	927 \pm 86	397 \pm 47	58.0 \pm 5.4	5.9 \pm 0.5	0.36 \pm 0.07

鰹だし分画物 LMF あるいは溶媒投与から 60 分後、供給水量 8 L/min 条件下にて遊泳運動を負荷し、溶媒投与 (control) 群では 15 分と 30 分後、鰹だし低分子量分画物 (LMF) 群では 15 分、30 分、40 分、50 分後に各個体の運動負荷を中止し、血液及び筋肉を採取し、糖質・脂質代謝関連物質を測定した。NEFA (non-esterified fatty acid) ; 遊離脂肪酸、Ketone bodies ; ケトン体、Triglyceride ; トリグリセリド、Muscle lactic acid ; 筋肉内乳酸、Muscle ATP ; 筋肉内 ATP

平均値 \pm 標準誤差 (n=6-8)、# ; $p<0.1$, * ; $p<0.05$, ** ; $p<0.01$ で control 群に対して有意差あり。

第 3 章 鰹だしの中枢機能に与える影響

3-1. 目的

人は、作業の効率性あるいは記憶などの脳機能による活動能の低下により、自身が疲労状態にあると認識することが多い。第 2 章では、身体活動能の中でも特にエネルギー供給に着目した骨格筋を主体とした活動に着目したのに対し、本章では認知記憶の観点から中枢機能に与える影響の検証を目的とした。中枢機能への影響を検討するための切り口を何にすべきか。鰹だしは、同定されている成分の中で特に遊離態ヒスチジンを多く含有し、これは他の食品素材には見られない特徴である。中枢機能活動に重要な役割を果たす脳内神経伝達物質ヒスタミンは、唯一ヒスチジンから生合成されることが知られており、これらの知見は鰹だし投与による中枢ヒスタミンの生理活性を期待させた。

第一に、鰹だしをマウスに経口投与した後、脳内ヒスタミンの産生細胞である結節乳頭核を含む視床下部中のヒスチジン及びヒスタミン濃度を調べた。次に、げっ歯類の特性を利用した新奇物体探索行動と Y 字型迷路での自発的交替行動を指標に、認知記憶能に与える影響を評価した。鰹だしの作用が中枢ヒスタミン神経系を介しているかの検証は、ヒスタミン生合成に必要なヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) の阻害剤である α -フルオロメチルヒスチジン (FMH) の前投与で、鰹だしの認知記憶能に変化がもたらされるかどうかで考察することとした。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 使用動物

雄性 6 週齢 ddY マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、1 週間の予備飼育を行い、実験に供した。事前の検討を通じて、第 2 章の動物モデルとして使用した CD2F1 雄性マウスは、認知記憶評価系での評価に適さない行動を示したことから、既報に基づき ddY 雄性マウスを選定した。室温 $23.2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル（明期；7:00 a.m.-7:00 p.m.、暗期；7:00 p.m.-7:00 a.m.）条件下にて、動物には AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社）と飲料水を自由に摂取させた。それぞれの動物個体は複数の行動試験に供することなく使用し、全ての行動評価は 9:00-13:00 に実施した。なお、本試験は、味の素株式会社の動物実験倫理規定に従い実施した。

3-2-2. 被験物質

第 2 章と同様に、 -25°C 保管の鰹だし粉末を蒸留水に溶解し、目的の濃度に調製して使用した。第 2 章で身体活動量に対して影響を与えることが確認された 0.86 g/kg の投与量を基点に、その 1/2 量及び 2 倍量の鰹だし投与時の脳内ヒスタミン濃度に与える影響を事前に検討し、鰹だしの投与濃度を 1.6 g/kg と設定した。鰹だし溶液及び溶媒は、ゾンデを用いてマウスに経口投与した。

チオペラミド投与液は、チオペラミドマレイン酸（Tocris Cookson, Inc., USA）を 0.3%カルボキシメチルセルロールナトリウム生理食塩液に溶解し、チオペラミド塩基が 2 mg/mL になるように調製し、10 ml/kg を腹腔内に投与した。ヒスタミン H3 拮抗薬であるチオペラミドは、学習記憶能強化が報告されているため

(29)、動物での認知機能評価のポジティブコントロールとした。スコポラミン投与液は、スコポラミン臭化水素酸塩 (Tocris Cookson, Inc.) を生理食塩液に溶解し、スコポラミン塩基 1 mg/kg を皮下に投与した。スコポラミンは、コリン作用性ムスカリン受容体拮抗薬として知られており (30, 31)、学習記憶障害を起こさせることを目的に使用した。パージリン投与液は、パージリン塩酸塩 (Sigma, USA) をリン酸緩衝生理食塩水 (タカラバイオ株式会社) に溶解し、0.5 mmol/kg を腹腔内に投与した。ヒスタミン代謝物であるテレメチルヒスタミンはモノアミン酸化酵素によりすぐに代謝されるため、正確なヒスタミン神経活動を把握するため、モノアミン酸化酵素阻害剤であるパージリンを投与し、テレメチルヒスタミン量を測定した。ヒスタミン生合成阻害剤を用いた検証では、生合成に必要なヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) の阻害剤である α -フルオロメチルヒスチジン (FMH) (32, 33) あるいは生理食塩溶液を腹腔投与し、その 16 時間後に鯉だしあるいは溶媒を経口投与し、さらにその 30 分後にスコポラミンあるいは生理食塩溶液を腹腔内投与した。全ての投与液は、実験の度に調製して使用した。

3-2-3. ヒスチジン、ヒスタミン及びヒスタミン代謝物の測定

鯉だしあるいは溶媒投与後に、経時的なヒスチジンあるいはヒスタミン (HA) 変化を検証するために、Glowinski らの方法に則り、視床下部を採取した (34)。断頭後、速やかに全脳を摘出し、氷上にて視床下部を切り出した。視床下部重量を測定後、液体窒素にて凍結し、含量測定時まで -80°C にて保存した。組織中のヒスタミン含量を測定するために、組織重量の約 5 倍量の 0.2 mol/L 過塩素酸

と内部標準 3-メチルヒスタミンを入れ、超音波にてホモジナイズし、遠心分離後、上清を採取した。その後、マイクロコン MMWL10K (Millipore, MA, USA) にて限外ろ過し、その透過液を分析サンプルとし、ヒスタミン濃度を計測した。ヒスタミンの代謝物であるテレメチルヒスタミンについては、モノアミン酸化酵素 B 阻害剤であるパージリン 0.50 mmol/kg をあらかじめ腹腔に投与した上で、先と同様の手順にて組織を採取し、測定した。調製した分析サンプル 10 μ L を高速液体クロマトグラフィーに供した。

ヒスタミンとテレメチルヒスタミン含量については、ガードカラム (Prepaset CA-ODS, 3.0 x 4mm, Eicom Corp., Kyoto, Japan) をつけた陽イオン交換カラム (Eicopak SC-5ODS, Eicom Corp.) で分離し、励起波長を 335 nm、蛍光波長を 450 nm に設定して、カラムスイッチング式オルトフタルアルデヒド (OPA) ポストカラム蛍光誘導体化法にて測定した (35)。流速 0.5 mL/min で移動相溶液である 220 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 0.1 mol/L 酢酸塩緩衝液-メタノール液 (91:9, v/v) を、流速 0.1 mL/min で反応液である 80 mg/L OPA および 40 μ L/L 2-メルカプトエタノールを含む 2% (v/v) エタノール溶液と 0.5 mol/L 炭酸カリウム溶液を 0.1 mL/min で使用した。組織中のヒスチジン含量については、ヒスタミン測定用に調製した分析サンプルをアミノ酸分析計にて計測した (Model L-8500, Hitachi Co., Tokyo, Japan)。

3-2-4. 新奇物体認識試験

げっ歯類は新奇の物体を認識すると、新奇物体をより多く探索する習性がある。この行動特性が学習行動の系列的理解に活用され、新奇物体認識試験とし

て認識記憶の評価が行われている (36, 37)。実験装置は $30 \times 30 \times 30$ cm の透明な塩化ビニール製の箱を使用した。物体として、ほぼ同じ大きさの 3 種類の物体、陶器製の招き猫の置物、木製で円柱形の鉛筆立て及び樹脂製のブロックを使用した。図 3-1 に測定装置を示した。

馴化操作として、床敷きのある測定装置内にマウスを 5 分間入れて自由に装置内を探索させた。馴化操作の翌日に訓練試行を実施した。訓練試行では実験装置内に 3 種類の物体のうち 2 個を選んで設置した（物体は床の中心線に沿って両サイドの壁からそれぞれ 8 cm の位置に置き、その位置を X1 及び X2 とした）。なお、設置する物体の選択については、動物及び群間で偏りがないようにあらかじめランダムに選択した。被験物質または溶媒を投与した 60 分後にマウスを測定装置内に 5 分間入れ、マウスの行動をビデオカメラ（DCR-SR60、ソニー株式会社）で録画した。訓練試行終了後、マウスをホームケージに戻し、訓練試行の 24 時間後に 2 回目の被験物質または溶媒を投与した。訓練試行の 48 時間後に実施した保持試行では、訓練試行と同様に測定装置内に物体を 2 個設置したが、そのうち 1 個は訓練試行で使用したものとは異なる物体に替え、その位置を Y とした。マウスを実験装置に 5 分間入れ、マウスの行動を録画し、保持試行終了後、マウスをホームケージに戻した。録画画像から、マウスが各物体に対して 1 cm 以内に接近している状態、すなわちマウスが物体に対して頭を向ける、物体に触れる、あるいはにおいを嗅ぐという行為の時間を測定した。訓練試行時においては、総探索時間に対するいずれかの物体への探索時間の割合を、保持試行においては総探索時間に対する新奇物体に対する探索時間の割合を探索嗜好性として算出し、後者を視覚的認知記憶の指標とした。但し、物

体の上に乗っている状態は時間として算出外とした。訓練試行または保持試行において 2 個の物体に対する探索時間の合計が 10 秒未満の動物については、評価対象から除外した。

3-2-5. Y 字型迷路での自発的交替行動試験

げっ歯類には、以前に通った場所に戻るよりも新しい場所を選択するという特性があり、その特性を利用して Y 字型迷路の自発交替行動は空間記憶能の評価に用いられる (38, 39)。実験装置には、1 本のアーム長が 40 cm、アーム壁高が 12 cm、アーム床幅が 3 cm、アーム上部幅が 10 cm である 3 本のアームが、それぞれ 120 度の角度で接続された Y 字型迷路を実験室の床の中央に設置して使用した (図 3-2)。

被験物質または溶媒を投与した 30 分後にスコポラミンを皮下投与し、スコポラミン投与 30 分後にマウスを Y 字型迷路のいずれかのアームの先端に置き、迷路内を 8 分間自由に探索させ、マウスが移動したアームの場所を選択した順に記録した。マウスが測定時間内に各アームを移動した回数をカウントし、これを総進入数とした。この中で連続して異なる三つのアームを選択した組み合わせを調べ、この数を自発的交替行動数とした。自発的交替行動数から自発的交替行動変化率を算出し、短期作業記憶の指標とした (自発的交替行動率 (%) = 自発的交替行動数 ÷ (総進入数 - 2) × 100) (39)。総侵入数が 8 以下であった動物については評価対象から除外した。

3-2-6. 統計解析

測定値は、平均値 \pm 標準誤差で表した。新奇物体認識モデルでは、各群における保持試行での新奇物体に対する探索時間の比率について評価した。それぞれ、溶媒投与群を対照群として、被験物質投与群間にて一元配置分散分析の Dunnett 検定を行った。自発的交替行動評価においては、各実験群における自発的交替行動変化率について溶媒+スコポラミン投与群を対照群として、被験物質+スコポラミン投与群間にて一元配置分散分析での Dunnett 検定を行った。ヒスタミンと代謝物テレメチルヒスタミン量については、対照群と鰹だし投与群の2群間比較を行った。統計ソフトはPrism software package (GraphPad, San Diego, CA) を使用し、両側検定で有意水準は危険率 5%とした。

3-3. 結果

3-3-1. 鰹だしがヒスチジンあるいはヒスタミン神経系に与える影響

鰹だしの経口投与が視床下部中のヒスチジンあるいはヒスタミン量に与える影響を検証するために、脳内ヒスタミンを産生する唯一の細胞である結節乳頭核を含むように視床下部を切り出し、それらの含有量を測定した。鰹だし投与 60 分後には、視床下部中のヒスチジン量は有意に増加することが分かった。視床下部中のヒスタミン量は、投与 60 分後には高値を示し、投与 120 分後にはさらに高値を示すが、投与 240 分後、360 分後には 120 分後のヒスタミン量に対して低値を示した（図 3-3A-C）。

鰹だしのヒスタミン神経系への影響を検証するために、ヒスタミン神経活動が活発な暗期において、溶媒あるいは鰹だし経口投与 2 時間後の視床下部中のヒスタミン（HA）量とその代謝産物であるテレメチルヒスタミン（t-MH）量を測定した。鰹だし投与群の HA 及び t-MH は、溶媒投与群に対して共に有意に高値を示すことが分かった（図 3-4）。

3-3-2. 鰹だしの脳機能活動に与える影響

3-3-2-1. 新奇物体認識能への影響

訓練試行時の探索行動において、一方の物体に対する探索時間の比率を算出した。溶媒群では 48.2%であったのに対して、ポジティブコントロールとしての H3 拮抗薬のチオペラミドと鰹だし群では、それぞれ 49.2%と 51.2%であり、3 群間で 2 個の物体に対する探索行動の偏りはみられなかった。次に、訓練試行の 48 時間後の保持試行において、新奇物体に対する探索時間の比率を算出した。

保持試行における各物体に対する探索時間の合計には 3 群間に差異はなかったが、新奇物体に対する探索時間の比率が溶媒群では 52.4%であったのに対し、チオペラミド及び鰹だし投与群ではそれぞれ 60.0 及び 60.8%であり、対照群と比べていずれも有意な増加が認められた (図 3-5)。

3-3-2-2. Y字型迷路における自発的交替行動変化率への影響

鰹だしを経口投与あるいはチオペラミドを腹腔内投与した 30 分後に、スコポラミンを皮下投与し、さらにその 30 分後に自発的交替行動におけるアームへの総進入数と自発的交替行動変化率を算出した。総進入数に関しては、溶媒群に比べて溶媒+スコポラミン群では、有意ではなかったが増加傾向が認められた。溶媒+スコポラミン群に対しては、チオペラミド投与群では総進入数の有意な減少を示したが、鰹だし投与群についてはいずれも有意な変化を示さなかった。

自発的交替行動の変化率に関しては、溶媒群が 66.4%であったのに対して、溶媒+スコポラミン群の変化率は 49.5%であり、溶媒群に比べて有意な減少が認められた。溶媒+スコポラミン群に対して、チオペラミド、鰹だし投与群の自発的交替行動変化率は、それぞれ 59.3、62.2%であり、いずれも溶媒+スコポラミン群との比較において有意な変化率の増加が認められた (図 3-6)。

3-3-2-3. ヒスタミン合成阻害剤が鰹だしの自発的交替行動に与える影響

ヒスタミン生合成阻害剤である α FMH の有/無条件下において、鰹だしのスコポラミン誘発性健忘に対する影響を Y字型迷路の自発的交替行動変化率にて評価した (図 3-6)。 α FMH 非投与条件下における交替行動率は、対照群の 62.3%

に対してスコポラミン投与群で 47.9%、鯉だしとスコポラミン併用群で 60.6%を示し、鯉だしとスコポラミン併用群はスコポラミン群に対して有意に高値を示した。一方、 α FMH 投与条件下における自発交替行動率は、スコポラミン群では 53.3%、鯉だしとスコポラミンの併用群では 49.2%であった。 α FMH 非投与条件下でスコポラミン群に対して高値を示した鯉だし併用群の交替行動率が、 α FMH 投与条件下ではスコポラミン群と同程度の値 47.5%を示した（図 3-7）。

3-4. 考察

ヒトは、骨格筋を主に使う身体活動能の低下のみならず、作業効率や記憶力の低下によっても自身の身体活動能が減衰していること、すなわち疲労状態にあることを認識する。本章では、鰹だしが中枢機能へ与える影響を鰹だし含有成分の観点から検討した。鰹だしを構成する成分に目を向けると、遊離態のヒスチジンだけが突出して多く含有されていることに気付く（表 2-1）。脳機能に重要な役割を果たす脳内神経伝達物質の一つであるヒスタミンは、脳内でヒスチジンを原料として脱炭酸合成される。そこで、鰹だし投与により脳内ヒスタミンが変化するかを検証するために、脳内ヒスタミンを産生する唯一の細胞である結節乳頭核を含むように視床下部を切り出し、組織中のヒスチジン及びヒスタミン濃度を経時的に測定した。その結果、鰹だし投与により視床下部中のヒスチジン濃度が上昇し、続いてヒスタミン濃度が上昇することが分かった（図 3-3）。脳内ヒスタミン量には日内変動があり、活動期にヒスタミン神経系が活性化することが知られている（40, 41）。そこで、鰹だしあるいは溶媒をマウスの活動期である暗期に投与した結果、鰹だし投与時にはヒスタミン代謝物であるテレメチルヒスタミンが有意に高値を示すことが分かった。このことは、鰹だし投与によりヒスタミン神経系が賦活化することを示す（図 3-4）。増加した視床下部中のヒスタミンは投与 6 時間後には投与前の値に戻ることから、鰹だし投与により増加したヒスタミンは、定常の脳内神経活動に伴い代謝されたと考えられる。

ヒスタミン神経系は後部視床下部の結節乳頭核に細胞が存在し、大脳皮質、海馬、視床、延髄、小脳と神経線維を広く投射し、様々な生理機能の調節に関

与していることが知られている (42-44)。ヒスタミン受容体は H1、H2、H3、H4 受容体の四つのサブクラスが同定され、H3 受容体は神経終末に存在する自己受容体であり、神経伝達物質の遊離を抑制的に調節する機能を有することが報告されている (29)。本検討では、認知記憶能強化のポジティブコントロールとして、この H3 拮抗薬のチオペラミドを用いた。記憶能は、新奇物体探索行動と Y 字型迷路での自発的交替行動を指標に評価した。新奇物体探索評価系は、マウスの新奇性を好むという特性を利用したもので、人為的な強化因子を用いない特徴を有している (36, 37)。新奇物体条件下での探索行動を測定した結果、溶媒投与群が 2 物体に対してほぼ均等な探索行動を示したのに対して、チオペラミド投与群と鯉だし投与群では新奇物体に対しての探索時間の比率を有意に増加させた (図 3-5)。溶媒投与群では、訓練試行で獲得した物体に対する記憶が 48 時間後には失われていたことが示唆された。一方、チオペラミド投与群と鯉だし投与群では、訓練試行時に獲得された物体に対する記憶が正確に保持されていたため、認識経験のある物体と新奇な物体を識別した可能性が示された。

認知記憶能に深い関連を有する神経伝達物質としては、アセチルコリンが知られている (45)。重ねて実施した Y 字型迷路試験では、鯉だしの作用発現の機序を考察するために、アセチルコリンの受容体阻害薬であるスコポラミン投与により学習記憶障害を誘発させ、自発的交替行動の変化を評価した。本評価系は、げっ歯類を Y 字型迷路に入れ進路探索をさせたとき、直前に入ったアームとは異なったアームに入ろうとする習性に基づいた行動であり、空間的な短期作業記憶を測定していると考えられている (38, 39)。学習記憶能の評価は、鯉だし投与により視床下部中のヒスチジン及びヒスタミンが有意に高値を示す条

件下にて実施した。その結果、スコポラミン群では溶媒群に比べて有意な自発的交替行動率の減少が認められたが、鰹だしとスコポラミンの併用群は、スコポラミン群に対して有意な交替行動率の増加を示すことが分かった（図 3-6）。このことは、鰹だし経口摂取が Y 字型迷路でのスコポラミン誘発健忘障害を改善する、すなわち鰹だしはアセチルコリン以外の機序で認知記憶能の発現に関与する可能性を示唆する。

脳内ヒスタミンは、報告されている限りでは、唯一ヒスチジンを原料として生合成される（42）。従って、本検討で確認された鰹だしの作用は、鰹だし中のヒスチジンがヒスタミンに変換されなければ、効果が消失すると予測された。そこで、ヒスタミンの生合成に必要なヒスチジンデカルボキシラーゼ（HDC）の阻害剤である α -フルオロメチルヒスチジン（FMH）を前投与し、鰹だしの空間的な短期記憶に与える影響を検証した。その結果、予想通り、鰹だしのスコポラミン誘発健忘障害の低減作用は消失することを確認した。本結果は、鰹だしの空間的な短期作業記憶に対する作用が、ヒスタミン生合成を介していることを示す（図 3-7）。本検討のように、アセチルコリン神経系を介した学習記憶経路がスコポラミンにより遮断されたとしても、鰹だし投与はヒスタミン神経系の賦活化を介し、その作業記憶障害の程度を抑制したと考えられる。アセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動神経とヒスタミン神経系との両神経系は、相互作用しながら認知記憶能を担っているとの報告もあり（45-47）、アセチルコリンの機能抑制下では、代償的にヒスタミン神経を介した認知記憶能が補強された可能性も考えられる。本章では、鰹だしの経口投与がヒスタミン神経系を賦活化し、認知記憶という中枢機能活動能に作用することが観察された

が、このことは鰹だし摂取により脳機能の維持あるいは減衰を回避できる可能性を示唆する。

本章の内容は以下によって公表予定である。

Nozawa Y, Mimura M, Sugita M, Yamada K, Shibakusa T, Koyama N (2014)

Dried-bonito broth improves cognitive function via the histaminergic system in mice.

Biomedical Research, 35: 311-319

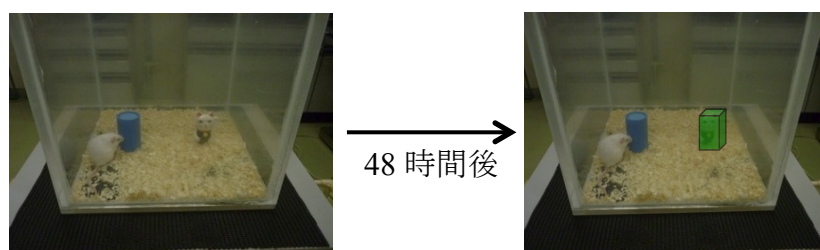


図 3-1. 新奇物体認識測定装置

げっ歯類は新奇物体をより多く探索する習性があり、この行動特性を利用して認識記憶の評価を行った。実験装置は $30 \times 30 \times 30$ cm の透明な塩化ビニール製の箱を使用し、ほぼ同じ大きさの 3 種類の物体（陶器製の招き猫の置物、木製で円柱形の鉛筆立て及び樹脂製のブロック）を認識対象として用いた。

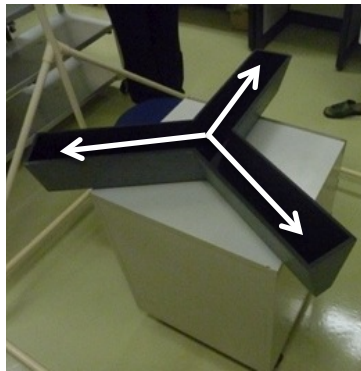


図 3-2. 自発交替行動測定装置

げっ歯類には、以前に通った場所に戻るよりも新しい場所を選択するという特性があり、その特性を利用して Y 字型迷路における自発交替行動を空間記憶能として評価した。実験装置には、1 本のアーム長が 40 cm、アーム壁高が 12 cm、アーム床幅が 3 cm、アーム上部幅が 10 cm である 3 本のアームが、それぞれ 120 度の角度で接続された Y 字型迷路を実験室の床の中央に設置して使用した。

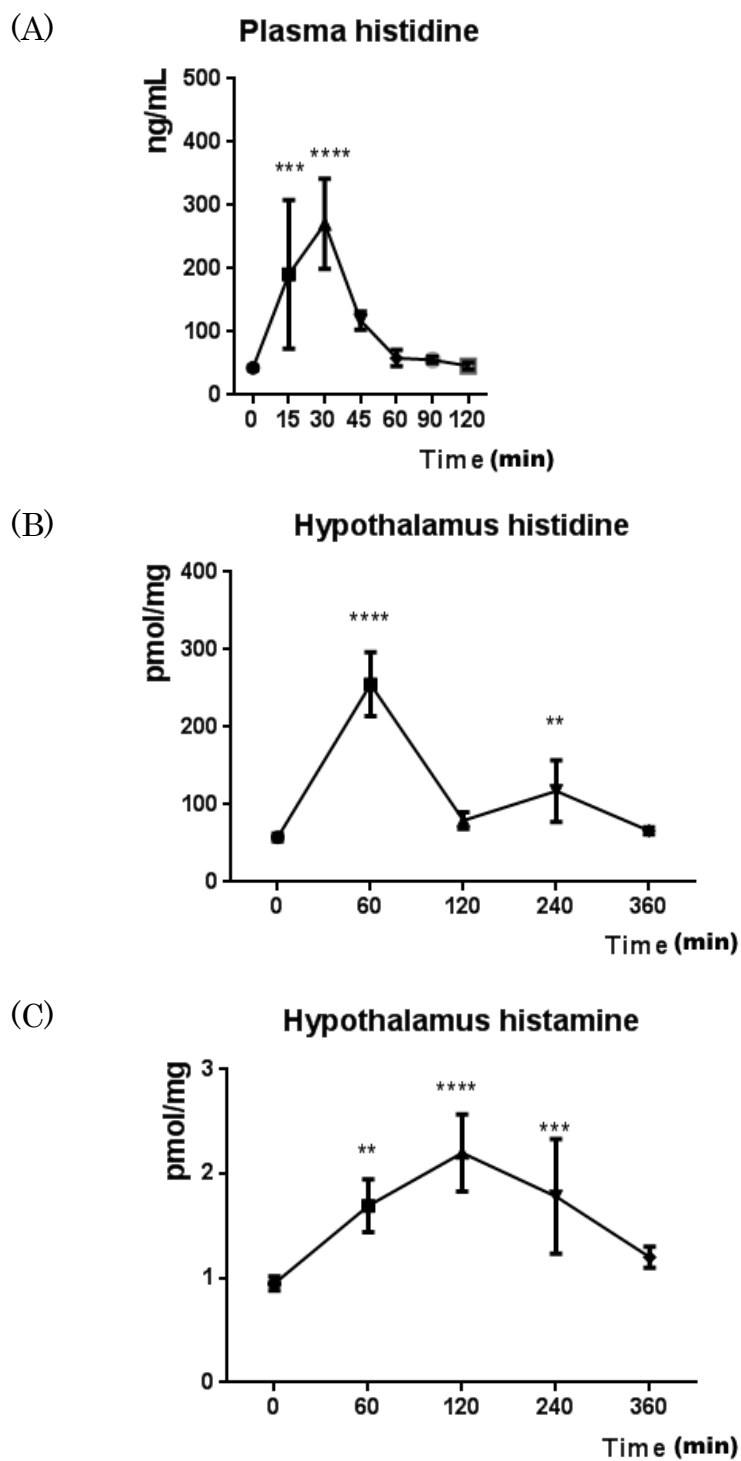


図 3-3. 鰹だし経口投与後のヒスチジン及びヒスタミン量の経時的変化
 (A) 血清中のヒスチジン、(B) 視床下部中ヒスチジン、(C) 視床下部ヒスタミンを示す。平均 ± 標準偏差 (n=5, 6)、** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.01$, **** ; $p < 0.0001$ で time zero に対して有意差あり。

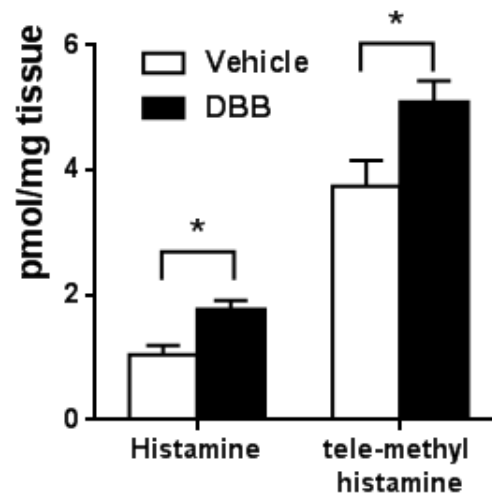


図 3-4. 鰹だし経口投与が暗期のヒスタミン神経系に与える影響

鰹だし (Dried bonito broth, DBB) あるいは溶媒 (Vehicle) を経口投与し、2 時間後の視床下部中のヒスタミンと代謝物であるテレメチルヒスタミンの濃度変化を示す。

平均 ± 標準偏差 (n=5)、* ; $p < 0.05$ で vehicle 群に対して有意差あり。

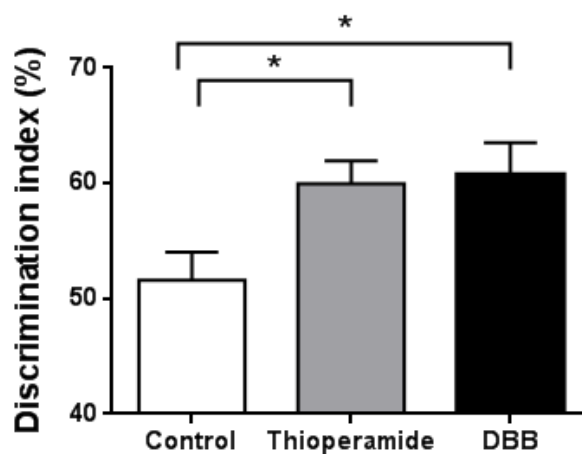


図 3-5. 新奇物体に対する探索時間の割合

訓練試行前と 24 時間後に溶媒 (vehicle)、チオペラミド (Thioperamide)、あるいは鰹だし (Dried bonito broth, DBB) を投与し、訓練試行から 48 時間後に保持試行を実施した。全探索行動に占める新奇物体への探索行動の割合をそれぞれの試行で算出した。保持試行時の新奇物体に対する探索時間割合を示す。

平均 \pm 標準偏差 (n=17-20)、* ; $p < 0.05$ で vehicle 群に対して有意差あり。

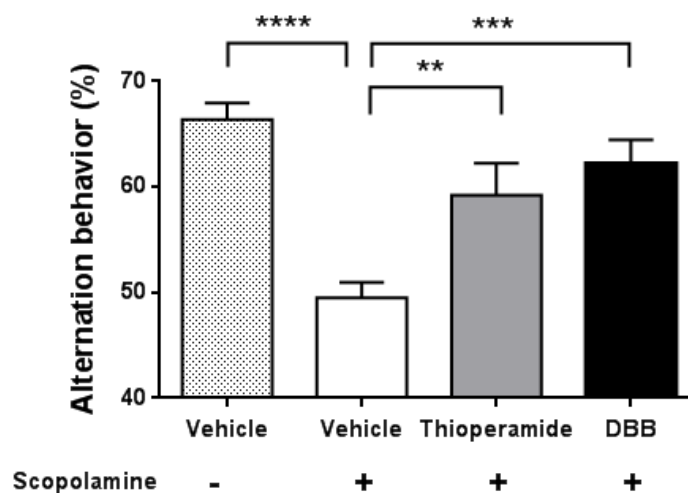


図 3-6. 自発的交替行動の障害に対して鰹だしが与える影響

スコポラミン投与の 30 分前に溶媒 (Vehicle)、チオペラミド (Thio)、鰹だし (Dried bonito broth, DBB) を投与し、その後、Y 字型迷路内にて交替行動数 (連続して異なる 3 本のアームに進入する回数) を数え、全アームへの総侵入数に対する交替行動率として算出した。自発的交替行動変化率 (%) は、自発的交替行動数 \div (総進入数 - 2) \times 100 により算出した。平均 \pm 標準偏差 (n=19, 20)

** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.005$, **** ; $p < 0.001$ vs vehicle + sco 群

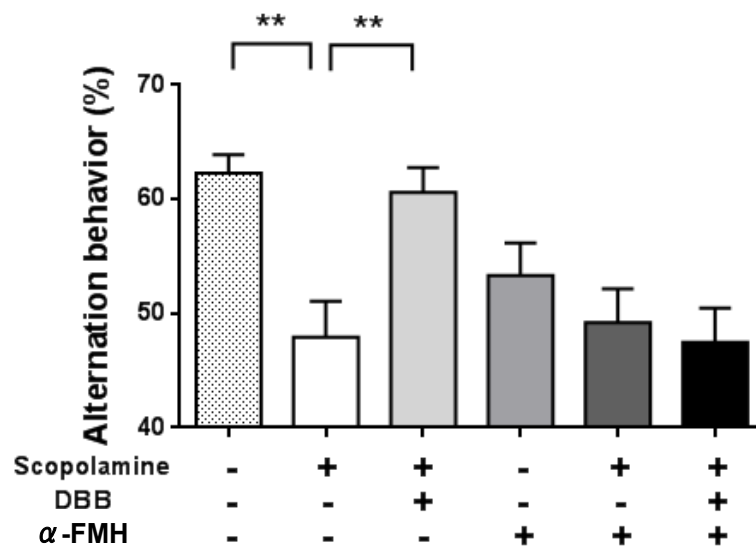


図 3-7. 自発的交替行動の障害に対して鰹だしが与える影響

ヒスタミン生合成阻害剤 α -FMH 有無の両条件下において、溶媒あるいは鰹だし

(Dried bonito broth, DBB) のスコポラミン誘発性健忘に対する影響を Y 字型迷路の自発的交替行動変化率にて評価した。

平均 \pm 標準偏差 (n=9, 10)、** ; $p < 0.01$ vs. scopolamine-alone group.

第4章 鰹だしの心理状態に与える影響

4-1. 目的

第2章と第3章では、鰹だしが身体活動能それ自体に与える影響について、重点的に検討してきた。一方、ヒトは身体活動能の低下と共に、疲労感をその一つとして、様々な心理状態の変化を認識することが多い。そこで本章では、特に疲労関連症状に対する自覚と疲労感・落ち込み・混乱・怒り・活気などの主観的側面に特に焦点をあて、実際にヒトを対象として鰹だしの作用を調べることを目的とした。

ヒトを対象とした研究の場合、倫理面への配慮は当然ながら、目的の評価項目に対する適切な判断をするために、いくつかの条件を満たした試験プロトコルを設計する必要がある。ランダム化と比較、すなわち集団を複数の群に割り付け、一方に目的物質での介入を行い、他方に目的物質を含まないがそれと区別がつかないプラセボ（偽薬）での介入を実施し、それらの差異を観察する。本検討では疲労関連症状の自覚度合い、あるいは気分感情という主観的変化を主要評価項目と位置付けたため、前述の条件に加え、二重盲検法（試験参加者と試験実施者共に試験参加者がどちらの群に属しているのかが分からないようにする）による、より厳密な設計基準で実施することにした。すなわち、二重盲検比較試験にて、鰹だしあるいはプラセボを継続的に摂取する前後での身体症状（肩こりや目の疲れ）、それらの身体症状との深い関連性が報告されている末梢の微小循環状態、及び心理状態を対象とした複数の介入研究を通じ、ヒトが鰹だしを摂取した時の影響を考察することとした。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 鰹だし継続摂取が疲労関連症状に及ぼす影響

4-2-1-1. 試験の概要

本試験は、千代田パラメディカルケアセンター株式会社のヒト試験倫理審査委員会の承認を受けるとともに、ヒト試験の倫理性について記したヘルシンキ宣言の精神に則り、千代田パラメディカルケアクリニックにて試験を実施した。試験概要を図 4-1 に示す。千代田パラメディカルケアセンターにモニター登録している健康な成人男女の中から参加を申し出た被験者 24 名（平均年齢 42.0 ± 2.0 歳、各群に男性 7 名と女性 5 名を含む）を対象に、被験者を 2 群に分け、プラセボを用いた 2 群並行試験を実施した。4 週間の被験食摂取期間中に疲労症状に関する自覚症状を調査した。

4-2-1-2. 被験食

被験者に試験食の中身を識別させないために、市水に鰹節香料・カラメル色素・食塩を混合し、プラセボ食として調製した。試験食には、「本造り一番だしかつお」（味の素株式会社）を使用し、両被験食の栄養組成を表 4-1 に示した。被験食 125mL を紙パックに充填し、毎朝、食事の他に 1 本の摂取を指示した。試験食は、鰹節を削った後、水でだしを抽出、濾過後、高温短時間殺菌された業務用の濃厚鰹だし製品であり、一般的に家庭料理で使用する鰹だしは 3-5% 抽出だしであるのに対し、本製品は 25 g の鰹節を 100 mL の水で抽出するため 25% 抽出だしである。

4-2-1-3. 食事調査

被験者には、測定日の3日前から全ての食事メニューと、日々の食欲・排尿・排便回数などの記録を指示した。回収した調査票をもとに、栄養計算ソフト「エクセル栄養君」（建帛社）を用いて、摂取エネルギー、炭水化物、タンパク質、及び脂質を算出した。また、試験期間前後で食習慣が変わっていないことを確認するために、米、穀物、魚、肉、卵、豆類、乳製品、イモ類、野菜、果物の摂取量も算出した。

4-2-1-4. 身体状態調査

被験食摂取開始時と終了時に、In Body 3.2（株式会社 Biospace）にて体重と体脂肪率を、デジタル血圧計 TM-2655P（株式会社 A&D）にて血圧を測定した。

4-2-1-5. 自覚症状調査票

試験開始3日前から試験終了日まで、毎晩、自覚症状に関する調査票への記入を指示した。調査票は、疲労感・不安・ストレスの強さ、眼の疲れ、肩こり、肌荒れなどの疲労関連の心身状態に関する質問で構成されており（表 4-2）、被験者は各質問項目に対して5段階（例えば、「目の疲れ」を感じる程度を、ごく有った/有った/普通/無かった/全く無かった、の中から選択）で評価した。群別に被験者の評点を1週間分ごとに集計し、1週間ごとにその程度の分布に変化があるかを解析した。

4-2-1-6. 統計解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。身体指標、食事摂取量、及び心理状態指標は、摂取前後での比較解析をした。自覚症状に関する調査票は、試験食群とプラセボ食群別に、1 週間ごとに 4 週までの回答を集計した。症状の程度を回答する頻度をウィルコクソンの順位和検定で解析した。解析には、StatView5.0 ソフト (SAS Institute 株式会社) を使用し、いずれの解析においても有意水準を危険率 5%以下とした。

4-2-2. 鯉だし単回摂取が皮膚末梢血流量に及ぼす影響

4-2-2-1. 試験概要

本試験は、神戸学院大学のヒト試験倫理審査委員会の承認を受けるとともに、ヒト試験の倫理性について記したヘルシンキ宣言の精神に則り実施した。自発的に本試験への参加を申し出、かつ魚アレルギーを有さない神戸学院大学栄養学部 に在籍する女子学生を被験者とした。

18-22 歳の女子学生 19 名の被験者を対象に、ダブルブラインドクロスオーバー試験にて実施した。被験者は、食事から最低 2 時間が経過した後、23 度に保たれた部屋に来室し、安静時間を経た後に、末梢血流量を経時的に測定した。被験食摂取前、摂取 5 分、10 分、15 分、20 分、25 分、30 分、45 分、及び 60 分後時点のそれぞれの時点における末梢血流量を測定した。その 1 か月後に、被験食中の固形分をそれぞれ半量にした被験食を用いて、同様の単回摂取試験を実施した。測定時間は、同一被験者内で変えないよう設定した。

4-2-2-2. 被験食

試験食には、「2-1. 鰹だし継続摂取が疲労関連症状に及ぼす影響」と同等品を用いた。被験者に試験食の中身を識別させず、かつ同等のカロリー摂取になるように、市水に鰹節香料・カラメル色素・食塩・デキストリンを混合し、プラセボ食として調製した。両被験食中の固形分量が半分になるように市水で希釈した「1/2 鰹だし食」と「1/2 プラセボ食」を調製した。被験者は、調製サンプル 125mL を常温にて摂取した。

4-2-2-3. 末梢血流量測定

レーザードップラー血流画像化装置 Peri Scan PIMII (PERIMED 社) を用いて、被験者右手甲の血流量を測定した。日内変動を避けるために、被験者ごとに測定時刻が同じになるように設定した。本測定装置は、皮膚表面から約 0.5 mm までの深さにある主に毛細血管血流量を測定する。血球の様に質量をもって運動している物体にレーザー光が衝突すると、光の周波数がシフトする。一方、静止組織に衝突した光は元の周波数のまま戻ってくる。反射して戻ってくる光は、周波数が変化した光と変化していない光の混合になっている。周波数が変化した光の割合は血球の数に比例し、周波数のシフトの大きさは血球の速度に比例する。この血球数に比例した値と、血流の速度に比例した値をかけた値が、血流量として表示される。

4-2-2-4. 統計解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。被験食摂取前を対照として、

一元配置分散分析での Dunnett 検定にて摂取後の血流量を評価した。被験食投与から 60 分間の血流量は AUC (Area under the curve) として算出し、プラセボ群と鰹だし群での 2 群比較を実施した。2 群間の群間比較では Student t-test を実施し、F 検定にて有意差が見られた場合において Welch 検定を実施した。いずれも両側検定で有意水準を危険率 5%以下とした。

4-2-3. 鰹だし継続摂取が末梢血流量及び心理状態に及ぼす影響

4-2-3-1. 試験の概要

本試験も、神戸学院大学のヒト試験倫理審査委員会の承認を受けるとともに、ヒト試験の倫理性について記したヘルシンキ宣言の精神に則り実施した。試験参加を申し出た順に被験者を 2 グループに分け、食習慣や喫煙習慣を変えずに過ごすこと、及び被験食を朝に摂取することを指示した。

18-22 歳の女子学生 31 名の被験者を対象に、ダブルブラインドクロスオーバー試験にて実施した。被験者に被験食を 2 週間摂取させ、試験期間前後の心理状態・末梢血流量・尿検査を実施した。尚、試験開始日の 1 週間前に、心理状態の調査票への記入練習を実施した。第一試験期間後に 2 週間のウォッシュアウト期間を設定し、第二試験期間前後でも同様の検査を実施した。ウォッシュアウトとは、第一摂取期間の影響を排除することを目指すもので、本検討では鰹だし摂取の影響が残らないと予測され、かつ月経周期による心身変化の変動を最小限にするよう非介入期間を 2 週間と設定した。測定をする時間帯は、同一被験者内で変えないよう設定した。被験者は、食事から最低 2 時間が経過した後、23℃に保たれた部屋に来室し、安静時間を経た後に、末梢血流量・心理

状態・身体計測を連続的に実施した。尚、測定日当日には被験食を摂取しないように指示した。試験概要を図 4-2 に示す。

4-2-3-2. 被験食

被験食には、「2-1. 鰹だし継続摂取が疲労関連症状に及ぼす影響」と同等品を用いた。

4-2-3-3. 食事摂取頻度調査

食事調査には、自記入式の食事摂取頻度調査票（FFQ）を用いた。FFQ に従い、炭水化物、タンパク質、脂質、及びエネルギー摂取量を算出した。試験期間前後で食習慣が変わっていないことを確認するために、「Wdiet for Windows」ソフトウェア（E.G.プロジェクト株式会社）にて、米、穀物、魚、肉、卵、豆類、乳製品、イモ類、野菜、果物の摂取量を算出した。

4-2-3-4. 身体状態調査

被験食摂取開始時と終了時に、計 4 回、デジタル身長計 YL-65D（株式会社ヤガミ）にて身長を、In Body 3.2 にて体重と体脂肪率を、デジタル血圧計 HEM-907（オムロン株式会社）にて血圧と脈拍を測定した。拡張期血圧と収縮期血圧は、3 回の測定結果の平均値とした。

4-2-3-5. 心理状態調査

心理状態の評価には、気分・感情を 5 段階評価する自記入式の主観評価票で

ある日本語版 POMS (Profile of mood states) 調査票を用いた (48, 49)。65 項目の質問から構成されており (表 4-3)、「緊張—不安」、「抑うつ—落込み」、「怒り—敵意」、「活気」、「疲労」、「混乱」の 6 つの成分に分けた解析が可能であり、「活気」以外の指標は低値なほど、気分・感情状態が良好であるとされている (50)。本研究では、試験用紙として「日本版 POMS No.850」(金子書房)を用い、被験者には回答日より前の自身の気分・感情状態を考え込まずに記入することを指示した。算出された成分得点は、年齢と性別を考量した標準化得点へと変換した。試験期間の開始と終了時に、計 4 回実施した。また、「活気」以外の 5 項目を足してから「活気」を引いた値は総合感情指標 (TMD; Total Mood Disturbance) と称され、総合的な感情状態を表す指標として用いた。

4-2-3-6. 末梢血流量測定

4-2-2-3 と同様の手順にて実施した。

4-2-3-7. 尿分析

アリコートカップ (株式会社泉製作所) を用いて、被験食摂取開始時と終了時に、計 4 回、24 時間蓄尿を実施した。尿サンプルを濾過した後、ELISA キット New 8-OHdG Check (日研ザイル株式会社) を用いて、DNA 酸化損傷指標として知られる 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を測定した。尿中 8-OHdG 濃度から、一日の 8-OHdG 産生量を算出した。

4-2-3-8. 統計解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。身体指標、食事摂取量、心理状態指標、血流量、尿中 8-OHdG は、ベースラインからの変化量（被験食摂取後値 - 被験食摂取前値）を算出し、その変化量を四元配置分散分析（被験食、摂取期間、持ち越し効果、被験者個人）で評価した。食事摂取頻度に関しては、ウィルコクソンの符号付き検定により評価した。いずれも有意水準を危険率 5% 以下とした。全データは SAS システムバージョン 8.2（SAS Institute 株式会社）で解析した。

4-3. 結果

4-3-1. 鰹だし継続摂取が疲労関連症状に及ぼす影響

4-3-1-1. 食事摂取量

プラセボあるいは鰹だし摂取前後のエネルギー、炭水化物、タンパク質、及び脂質の摂取量を算出した結果、被験食摂取前と摂取4週間後の食事量に変化が無いことを示した（表4-4）。また、食事記録票の記載事項から栄養計算ソフトで栄養成分を算出した結果、米、麦、肉、魚、卵、豆、乳、イモ、野菜、果物、微量栄養素に関して、試験期間前後で有意な変化は見られなかった（data not shown）。また、日記調査での毎日の食欲、食事・飲水頻度にも有意な変化がないことが分かった。これらの結果から、試験期間を通じて食習慣の大きな変化が起きていないことが確認された。

4-3-1-2. 身体指標

プラセボあるいは鰹だし摂取前後で、体重、体脂肪率、収縮期血圧、及び拡張期血圧に有意な変化はなかった（表4-5）。

4-3-1-3. 疲労関連症状

被験者は、被験食摂取開始3日前から試験終了まで毎日、疲労関連症状に対する程度を調査票に記入した。一週間ごとに回答を集計した結果、疲労感・不安・肌状態に対しては、両被験食群において有意な変化は見られなかった（表4-6）。眼の疲れ、肩こりに関しては、鰹だし摂取群でのみ有意な変化が見られた。鰹だし群では、「眼の疲れを頻繁に感じる」への4週目の回答数が1週目と比較

して減少していた ($p<0.1$)。また、鰹だし摂取群でのみ、「肩こりを非常に頻繁に感じる」への回答数が 1 週目と比較して 3 週目での有意な減少が確認された ($p<0.05$ 、表 4-7)。

4-3-2. 鰹だし単回摂取が末梢血流量に及ぼす影響

鰹だしあるいはプラセボを単回摂取した 19 人の被験者に対して、末梢血流量変化を経時的に測定した。プラセボ摂取時には血流量の変化が見られなかったことに對し、鰹だし摂取時には有意に増加することが分かった (図 4-3A)。摂取 60 分後までの血流量-時間曲線下面積 (AUC; area under curve) を台形法で算出した結果、鰹だし摂取時の AUC_{0-60} は、プラセボ摂取時よりも有意に高値であった (図 4-3B、 $p<0.001$)。

また、鰹だしあるいはプラセボの摂取量は変えずに、溶液に含まれる固形分を半量にした検証を行った。前述の 19 人のうち 3 人が本検討に参加できなかったため、16 人を解析対象とした。半量の鰹だしあるいは半量のプラセボ摂取時の血流量の経時変化を測定し、 AUC_{0-60} を算出した。半量であっても、鰹だし摂取時には有意に血流量が増加することが分かった (図 4-4A、 $p<0.01$)。そして、鰹だし半量摂取時 AUC_{0-60} は、鰹だし全量摂取時 AUC_{0-60} の約 1/2 の値を示し、鰹だしの固形分濃度依存的な反応が確認された (図 4-4B)。

4-3-3. 鰹だし継続摂取が末梢血流量及び心理状態に及ぼす影響

本試験の計画は、90%以上が女性である栄養学部の学生に対して告知され、31 名が被験者として参加した。被験者をランダムに 2 つのグループ A と B に分

けた。グループ B の 2 名が一部の評価に参加できなかったため、29 人を対象に解析した。グループ A、B 及び全被験者の試験開始時の年齢、食事摂取量、身体状態、心理状態、末梢血流量、及び酸化ストレス指標の尿中 8-OHdG を表 4-8 に示した。

4-3-3-1. 食事摂取量の変化

食事摂取頻度調査票 (FFQ; Food Frequency Questionnaire) に基づき、エネルギー摂取量、炭水化物、タンパク質、及び脂質量を算出した結果を表 4-9 に示した。4 元配置分散分析 (群、被験者番号、試験期、被験食) の結果、エネルギー摂取量、炭水化物、タンパク質、及び脂質量のいずれにおいても、試験期間中に有意な変化は見られなかった。また、FFQ の記入に基づき栄養計算ソフトで栄養成分を算出した結果、米、麦、肉、魚、卵、豆、乳、イモ、野菜、果物、微量栄養素に関しても 4 回の測定で有意な変化は見られなかった (data not shown)。これらの結果から、試験期間を通じて食習慣の変化がないことが確認された。

4-3-3-2. 身体状態の変化

身体状態の結果を表 4-9 に示す。身長、体重、体脂肪率、収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数のいずれの身体指標において、試験期間中の有意な変化は確認されなかった。これらの結果は、プラセボあるいは鰹だしがこれらの身体指標には影響を及ぼさなかったことを示す。

4-3-3-3. 心理状態の変化

心理状態に対する影響は、被験食摂取前後の POMS 調査票における各指標とそれぞれの 6 指標から算出される総合感情障害指標の変化で評価した。鰹だし摂取時には、プラセボ摂取時と比較して、5 つの負の感情指標（怒り-敵意、混乱、抑うつ-落ち込み、疲労、緊張）が大きく減少した。一方、正の感情指標である活気に関しては、鰹だし摂取時に増加した。四元配置分散分析の結果、摂取した被験食によって、怒り-敵意 ($p<0.01$)、混乱 ($p<0.01$)、抑うつ-落ち込み ($p<0.01$)、疲労 ($p<0.05$)、緊張-怒り ($p<0.01$)、活気 ($p<0.05$)、総合感情障害指標 ($p<0.0001$) が有意に変化したことが示された（表 4-9）。

4-3-3-4. 末梢血流量の変化

末梢血流量の変化は、プラセボ摂取時よりも鰹だし摂取時に有意に増加した。分散分析の結果、末梢血流量の変化には被験食効果が有意であることが示された ($p<0.0001$ 、表 4-9)。

4-3-3-5. 尿中 8-OHdG の変化

尿中 8-OHdG は、プラセボ摂取時よりも鰹だし摂取時に減少した。この変化には、被験食効果が有意であることが示された ($p<0.05$ 、表 4-9)。

4-4. 考察

本章では、ヒトを対象として、鰹だしが疲労関連症状や心理状態に与える影響を中心に検討した結果、以下3点の事象が見いだされた。

- 1) 鰹だし継続摂取は、疲労関連症状の自覚症状を改善する。
- 2) 鰹だし単回摂取は、末梢血流量を経時的かつ濃度依存的に変化させる。
- 3) 鰹だし継続摂取は、末梢血流量の増加及び心理状態の変化をもたらす。

まず、日常的に疲労感を感じていると推察される中高年を対象にした二重盲検比較試験にて、鰹だしを4週間摂取した前後での疲労関連症状の自覚変化を評価した。その結果、主観的疲労感に関しての有意な変化は検出されなかったが、肩こりや目の疲れという疲労関連症状を自身で感じる頻度が減少することが示された(表4-6、表4-7)。肩こりや目の疲れに関する自覚症状を改善するという結果は、鰹だし4週間摂取で目の疲れが改善する可能性を示唆した予備的な検討結果とも一致する(52)。首や肩のこり、目の疲れやくま、あるいは冷えなどは、いずれも局所的な血流循環の異常が発症の一機序としてあげられ(53, 54)、微小循環の改善によりこれらの症状が低減したとの報告もある(55, 56)。特に、末梢の微小血管血流は、末梢細胞への栄養補給及び老廃物の排除、皮膚温調節などの種々な役割を担っているため(57)、末梢の微小循環に問題を抱えることは様々な生活の質低下を招くこととなる。鰹だし摂取により、微小循環不全に関連する肩こりや目の疲れという自覚症状を改善したということは、鰹だしが末梢循環を改善する作用をもつ可能性が示唆された。

そこで、鰹だしを摂取した後の末梢血流量の変化を検討した。微小循環の状

態は、非侵襲で測定することを優先させ、レーザードップラー方式の測定方法を採用した。その結果、鰹だし摂取時にのみ末梢血流量が経時的に変化することが分かった。鰹だし固形分を半量摂取した場合にも血流量は増加したが、その増加度合いは濃度依存的であった（図 4-3、図 4-4）。これらの結果は、鰹だしが単回摂取時にも末梢血流量を増加させることを示唆している。その理由としては、鰹だし摂取による特異動的作用の反応、あるいは血管拡張物質の存在の可能性が考えられた。前者は、鰹だしの成分の 4 割を占めるタンパク質摂取に伴うエネルギー消費、すなわち特異動的作用による体熱産生と連動した末梢血管拡張を観察した可能性であるが、摂取 5 分での変化と 30 分時点をピークに減少する生体反応の変化は一般的に知られている特異動的作用とは一致せず（58）、別の可能性を示唆した。後者については、低血流量モデル（59）及び摘出血管を用いた検討（60）により、鰹だしが平滑筋弛緩を介して血管を拡張させる可能性が示されていることから、血管に直接的に作用するような血管拡張物質あるいは血管の拡張収縮を担う交感神経活動を抑制する物質が存在することが示唆された。末梢血管の拡張は、放射熱量が増加していることを意味することから、血流量変化と共に体温変化がもたらされている可能性が高い（61, 62）。本研究結果から、鰹だしを摂取した直後から末梢血管が拡張していると考えられる事象は、鰹が四性（温・熱・涼・寒）の中での「温性」に属するという伝承と一致する現象とも捉えられる。

鰹だしの単回摂取が末梢循環に影響を与えることが見出されたが、摂取継続により末梢血管への影響が持続する可能性も考えられた。そこで、鰹だしの継続的な摂取が末梢血流量に与える影響と共に、疲労感やそれに関する落ち込

み・混乱・怒り・活気などの気分感情に対する影響に関して検討を続けた。主観的側面の変化検出には、臨床現場でも利用されている人間の気分や感情などを 6 尺度から測定できる POMS 調査票を用いた。二重盲検交差試験の結果、鰹だし摂取時にのみ心理状態の 6 尺度それぞれが有意に改善することが確認された（表 4-9）。本検討結果も含めた複数試験の pool analysis を実施した結果、鰹だし摂取による疲労感軽減や活気増加がより確信度を高める事象であることが示されている（69）。また、本検討を通じて、鰹だし継続摂取時にのみ末梢血流量が有意に増加することが確認された。使用したレーザードップラー血流画像化装置により測定される血流量とは、血管内を流れる血球の数と血球の速度から算出される。例えば、血管拡張により血管内の血球数が増加した場合、あるいは血管内を流れる血球のスピードが上昇した場合、それぞれで血液量の増加と判断される。本試験では、鰹だし摂取前後に心拍数変化が無いことが確認されたため（表 4-9）、心臓からの拍動回数の増加による流速増加の寄与は低いと考えられ、すなわち鰹だし継続摂取により末梢血管が拡張した可能性が示唆された。末梢血流量が増加する理由として、血管拡張が起きている可能性を先に述べた。

我々の生体内には血管平滑筋弛緩を促す一酸化窒素（NO）が血管拡張因子として存在し、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS により産生される（57）。生体が酸化ストレスの高い状態にある時、スーパーオキシド（ O_2^- ）やヒドロキシラジカル（ $\cdot OH$ ）などのフリーラジカルを有する反応性に富む活性酸素が産生され、それらの活性酸素種により同じく化学的に不安定な活性酸素である NO が分解され、NO の生体利用効率は低下する（63）。被験食摂取前後で、DNA 酸

化損傷指標として知られる 8-OHdG (64, 65) の 24 時間尿中の量を算出した結果、鰹だし摂取時にのみ 8-OHdG 量が有意に低値を示すことが確認された。鰹だし中に含有されるヒスチジンやアンセリンが *in vitro* において抗酸化作用を有すること、鰹だし自体にも *in vitro* での抗酸化作用を有することが知られているが (65-67)、本事象は、経口摂取後の鰹だしが生体内でも抗酸化作用を発現したことを示唆するもので興味深い。鰹だしが生体の酸化ストレス状態を低減するのであれば、鰹だしを継続的に摂取することで NO の生体利用効率を高く維持した結果として血管弛緩が起きている可能性も考えられる。鰹だしの血管に対する作用機序は、いくつかの動物モデルにおいて検討を重ねたが、未だに明確な結論には至っておらず、今後の研究課題として残る。しかし、本章での検討を通じて、鰹だしは末梢循環の改善を通じて、肩こり・目の疲れ・冷えなどの疲労関連症状を改善し、結果として、気分感情状態が大きく改善した可能性が示された。

本章の内容は以下によって公表した。

1. Nozawa Y, Kuroda M, Noguchi T (2007) Consumption of dried-bonito broth acutely increases peripheral blood flow in humans. *Journal of Health Science* 53: 339-343
2. Nozawa Y, Ishizaki T, Kuroda M, Takahashi K, Ebihara S, Itoh T (2007) Ingestion of dried-bonito broth ameliorates blood fluidity in humans. *Journal of Health Science* 53: 543-551

3. Nozawa Y, Ishizaki T, Kuroda M, Noguchi T (2008) Effect of dried-bonito broth intake on peripheral blood flow, mood, and oxidative stress marker in humans. *Physiology & Behavior*, 93: 267-273

本論文に詳細な内容は記載しなかったが、鰹だしの血管に対する機序解明を目的とした動物モデルでの検証と解析については、以下にて公表されている。

- Honda M, Nozawa Y, Ishizaki T, Kuroda M (2009) Ingestion of bonito extract ameliorates peripheral blood flow in mice loaded from overcrowding stress. *Biomedical Research* 30: 129-135
- Honda M, Yamada H, Nozawa Y, Ishizaki T, Kuroda M, Noguchi T (2010) Consumption of bonito extract suppresses the decrease in cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biomedical Research* 31: 129-135
- Honda M, Nozawa Y, Hirano SI, Kuroda M (2012) Vasorelaxant effect of bonito extract on norepinephrine induced contract in rat isolated aorta. *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 40: 723-730

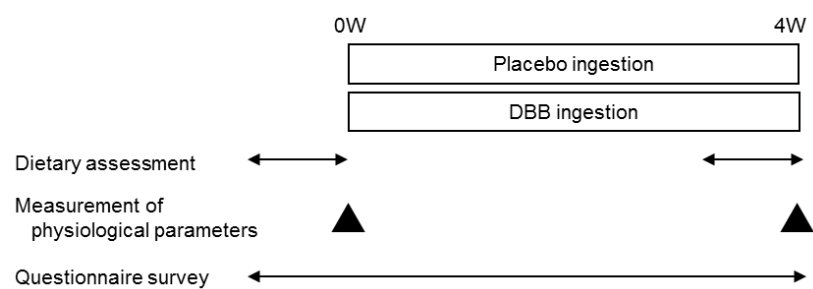


図 4-1. 疲労関連症状に及ぼす影響評価プロトコル

被験者は、プラセボあるいは鰹だしを 1 日 1 回、4 週間摂取した。摂取開始 3 日前からすべての食事を記録し、疲労関連症状の程度を就寝前に回答した。体重、体脂肪率、及び血圧も摂取前後に測定した。

表 4-1. 被験食の成分組成

		Placebo [†]	DBB ^{††}
Energy	(kJ)	4.2	58.6
Protein	(g)	-	3.6
Lipid	(g)	-	-
Carbohydrate	(g)	0.3	-
Ash content	(g)	0.3	0.8
Water content	(g)	99.6	96.1
Sodium	(mg)	120	102

(Per 100ml)

[†] Placebo: Dried-bonito flavor, caramel, and sodium chloride were dissolved in water.

^{††} DBB: Dried-bonito broth

-, Not calculated because the value was lower than 0.1 g/100 g.

表 4-2. 自覚症状調査票

（週間分）										モニターNO.									
		日付		日付		日付		日付		日付		日付		日付		日付			
試験夜の摂取		朝	昼	夜	なし	朝	昼	夜	なし	朝	昼	夜	なし	朝	昼	夜	なし		
起床時前日の疲労感		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく悪い		②有った		③普通		④無かった		⑤全く無かった									
就寝 起床時間		()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝	()	時就寝		
		()	時起床	()	時起床	()	時起床	()	時起床	()	時起床	()	時起床	()	時起床	()	時起床		
起床時の胃のムレ		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく悪い		②有った		③普通		④無かった		⑤全く無かった									
一日の食状		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく悪い		②有った		③普通		④無かった		⑤全く無かった									
食事量	朝	()		()		()		()		()		()		()		()			
	昼	()		()		()		()		()		()		()		()			
	夜	()		()		()		()		()		()		()		()			
	間食	()		()		()		()		()		()		()		()			
アルコール量	無し		cc		無し		cc		無し		cc		無し		cc		無し		
	ビール	x		ビール	x		ビール	x		ビール	x		ビール	x		ビール	x		
	サワー グラス	x	杯	サワー グラス	x	杯	サワー グラス	x	杯	サワー グラス	x	杯	サワー グラス	x	杯	サワー グラス	x	杯	
	日本酒 (合)	x	合	日本酒 (合)	x	合	日本酒 (合)	x	合	日本酒 (合)	x	合	日本酒 (合)	x	合	日本酒 (合)	x	合	
	ワイン グラス	x	杯	ワイン グラス	x	杯	ワイン グラス	x	杯	ワイン グラス	x	杯	ワイン グラス	x	杯	ワイン グラス	x	杯	
	その他	x		その他	x		その他	x		その他	x		その他	x		その他	x		
本日の水分摂取量 (アルコール以外)		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①500ml以下		②500ml~1L		③1L~1.5L		④1.5L~2L		⑤2L以上									
本日の喫煙本数		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①0本		②1~5本		③6~10本		④10~20本		⑤20本以上									
喉の渇き		()		()		()		()		()		()		()		()			
日中の眠気		()		()		()		()		()		()		()		()			
集中力はありましたか		()		()		()		()		()		()		()		()			
目の疲れ		()		()		()		()		()		()		()		()			
肩のこり		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく悪い		②有った		③普通		④無かった		⑤全く無かった									
体調はいかがでしたか		()		()		()		()		()		()		()		()			
肌の状態はいかがでしたか		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく悪い		②良い		③普通		④悪い		⑤すごく悪い									
疲れを顔回に感じましたか		()		()		()		()		()		()		()		()			
不安やストレスを感じましたか		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①全く感じなかった		②感じなかった		③普通		④感じた		⑤すごく感じた									
気分が良い事が多かったですか		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①すごく多かった		②多かった		③普通		④少なかった		⑤全く無かった									
排便回数		(回)		(回)		(回)		(回)		(回)		(回)		(回)		(回)			
排便感		有り 無し		有り 無し		有り 無し		有り 無し		有り 無し		有り 無し		有り 無し		有り 無し			
排便回数		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)		無し 有り (回)			
症状		()		()		()		()		()		()		()		()			
		①普通		②下痢気味		③下痢													
薬品使用																			
その他																			

被験者は、就寝前に各質問項目に対して5段階（例えば、「目の疲れ」を感じる程度を、すごく有った/有った/普通/無かった/全く無かった、の中から選択）で自身の体調を回答した。

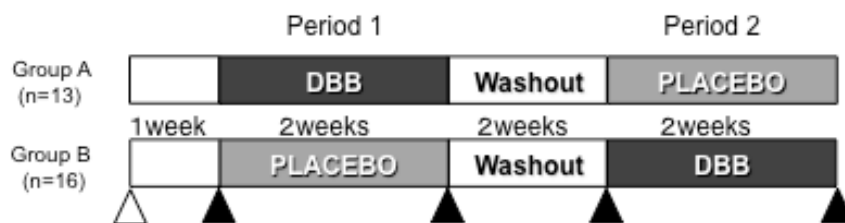


図 4-2. 疲労感及び血流量に及ぼす影響評価プロトコル

被験者は、プラセボあるいは鰹だしを 1 日 1 回、2 週間摂取し、2 週間のウォッシュアウト後に異なる被験食を摂取した。

▲：POMS 調査票、皮膚血流量、及び尿採取を実施した。

△：回答に慣れるために摂取期間開始 1 週間前に POMS 調査票を実施した。

表 4-3. POMS 調査票

1. 人づき合いが楽しい	34. へとへとだ
2. 希望がもてない	35. 他人を信頼する
3. 心の中でふんがいする	36. 気持ちがくつろぐ
4. 陽気な気持ち	37. 孤独でさびしい
5. 考えがまとまらない	38. すぐけんかしたくなる
6. 頭がすっきりする	39. 頭がさえたる
7. がっかりしてやる気をなくす	40. とほくに暮れる
8. めいわくをかけられて困る	41. 内心ひどく腹立たしい
9. つかれた	42. 自分のみじめだ
10. 集中できない	43. 他人にあたたくできる
11. いじわるしたい	44. だるい
12. 自分はほめられるに値しないと感じる	45. 物事がてきばきできる気がする
13. 他人を思いやる	46. 反抗したい
14. うろたえる	47. 気持ちが沈んで暗い
15. 精力がみなぎる	48. もう何の望みもない
16. ゆうつだ	49. 不安だ
17. ふきげんだ	50. 元気でいっぱいだ
18. 神経がたかぶる	51. 自分では何もできない
19. 積極的な気分だ	52. 他人に裏切られた気がする
20. 悲しい	53. 気がかりでそわそわする
21. いらいらする	54. 心配事がなくていい気分だ
22. 物事に気乗りがしない	55. 自分は価値がない人間だ
23. 落ち着かない	56. はげしい怒りを感じる
24. あれこれ後悔する	57. うんざりだ
25. 頭が混乱する	58. 緊張する
26. 生き生きする	59. 何かにおびえる
27. ぐったりする	60. 物事に確信がもてない
28. 怒る	61. 活気がわいてくる
29. 自分は不幸だ	62. ひどくたびれた
30. 他人の役に立つ気がする	63. すぐかっとなる
31. 同情する	64. 罪悪感がある
32. どうも忘れっぽい	65. あれこれ心配だ
33. 気がはりつめる	

(金子書房「日本版 POMS-No.850」から引用)

被験者は、気分・感情を 5 段階評価する自記入式の主観評価票 POMS (Profile of mood states) 調査票に対して、自身の気分・感情状態を記入した。質問票は、65 の質問項目から構成されており、「緊張－不安」は 14, 18, 23, 33, 36, 49, 53, 58, 65 から、「抑うつ－落込み」は 2, 12, 16, 20, 24, 29, 37, 42, 47, 48, 51, 55, 59, 64 から、「怒り－敵意」は 3, 8, 11, 17, 21, 28, 38, 41, 46, 52, 56, 63 から、「活気」は 4, 15, 19, 26, 39, 50, 54, 61 から、「疲労」は 9, 22, 27, 34, 44, 57, 62 から、「混乱」は 5, 10, 25, 32, 40, 45, 60 から、採点方法に従い算出される。

表 4-4. Results of daily intake of energy, carbohydrate, protein, and fat before blood testing per day

	Placebo	DBB
Energy intake (kcal)		
before	2047.4 ± 167.9	1932.8 ± 126.8
after	1938.9 ± 114.3	1893.1 ± 117.6
Carbohydrate (g)		
before	259.3 ± 25.1	235.1 ± 17.3
after	255.1 ± 19.0	256.9 ± 21.0
Protein (g)		
before	77.5 ± 5.7	78.2 ± 5.4
after	70.1 ± 3.4	70.8 ± 5.8
Fat (g)		
before	68.7 ± 6.6	67.7 ± 6.8
after	65.9 ± 5.1	59.7 ± 4.3

Values are means ± SEM (n=12 in each group)

表 4-5. Results of dietary intake energy and physiological parameters before and after ingestion

	Placebo			DBB		
Body weight (kg)						
before	65.3	±	4.2	66.5	±	4.3
after	65.5	±	4.2	66.8	±	4.4
Percentage body fat (%)						
before	22.4	±	2.9	25.3	±	1.6
after	22.5	±	2.9	25.1	±	1.8
Systolic blood pressure (mmHg)						
before	118.5	±	6.2	113.3	±	5.2
after	121.4	±	6.0	114.8	±	5.2
Diastolic blood pressure (mmHg)						
before	74.7	±	4.2	72.6	±	4.5
after	78.6	±	3.7	75.2	±	4.2

Values are means ± SEM (n=12 in each group)

表 4-6. Changes in subjective symptoms after placebo or DBB ingestion

(A) Number of replies related to frequency of feeling fatigue

	Placebo				DBB			
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	1week	2weeks	3weeks	4weeks
Very frequently	2	0	5	0	1	0	3	0
Frequently	24	24	28	18	24	14	16	25
Moderate	40	47	38	43	50	55	43	48
Rarely	17	12	12	19	9	14	22	11
Not at all	1	1	1	4	0	1	0	0

The frequency of 'felt fatigue' was not changed significantly in week 2, 3, and 4 compared to week 1.

(B) Number of replies related to anxiety and stress

	Placebo				DBB			
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	1week	2weeks	3weeks	4weeks
Very frequently	0	0	2	0	0	1	2	0
Frequently	3	6	10	7	10	5	18	7
Moderate	56	60	52	52	61	61	53	55
Rarely	23	14	17	18	13	17	10	22
Not at all	2	4	3	7	0	0	1	0

The frequency of 'felt anxiety and stress' was not changed significantly in week 2, 3, and 4 compared to week 1.

(C) Number of replies related to skin condition

	Placebo				DBB			
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	1week	2weeks	3weeks	4weeks
Very well	0	0	0	3	0	0	0	0
Well	7	3	1	11	8	6	9	8
Moderate	67	75	67	61	73	70	61	73
Bad	10	6	8	7	3	7	12	3
Very bad	0	0	8	2	0	1	2	0

The frequency of 'skin condition' was not changed significantly in week 2, 3, and 4 compared to week 1.

表 4-7. Changes in subjective symptoms after placebo or DBB ingestion

(A) Number of replies related to visual fatigue								
	Placebo				DBB			
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	1week	2weeks	3weeks	4weeks [†]
Very frequently	8	7	8	8	0	0	3	0
Frequently	21	16	24	8	34	23	15	16
Moderate	35	48	44	49	34	43	51	54
Rarely	20	13	7	16	14	17	15	14
Not at all	0	0	1	3	2	1	0	0

[†]: The frequency of 'felt visual fatigue' tended to decrease in week 4 compared to week 1 ($P < 0.1$)

(B) Number of replies related to shoulder stiffness								
	Placebo				DBB			
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	1week	2weeks	3weeks ^{††}	4weeks
Very frequently	11	10	12	9	13	10	2	4
Frequently	15	15	22	11	24	23	22	28
Moderate	46	52	39	47	40	47	54	40
Rarely	12	7	10	14	7	4	6	12
Not at all	0	0	1	3	0	0	0	0

^{††}: The frequency of 'felt severe shoulder stiffness' significantly decreased in week 3 compared to week 1 ($P < 0.05$)

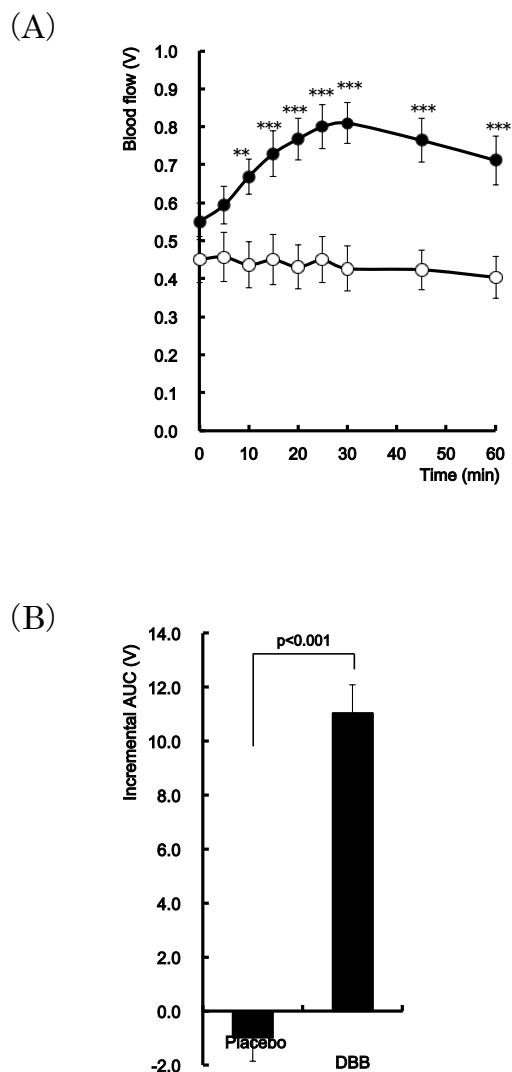


図 4-3. 被験食摂取後の末梢血流量変化

(A) 被験者は、プラセボ (○) あるいは鰹だし (●) を摂取し、摂取直後から 60 分後までの末梢血流量を経時的に測定した。初回評価から 2 週間後に異なる被験食を摂取した。平均値 ± 標準誤差 (n=19) で示した。**p<0.01, p<0.001 で摂取直後に対して有意差あり。

(B) 被験食摂取後から 60 分間の血流増加合計値を AUC₀₋₆₀ として示した。

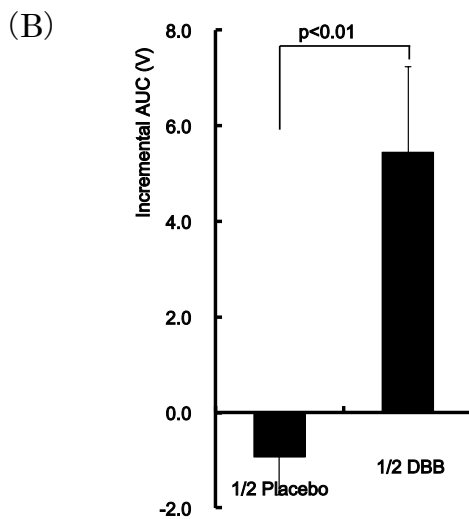
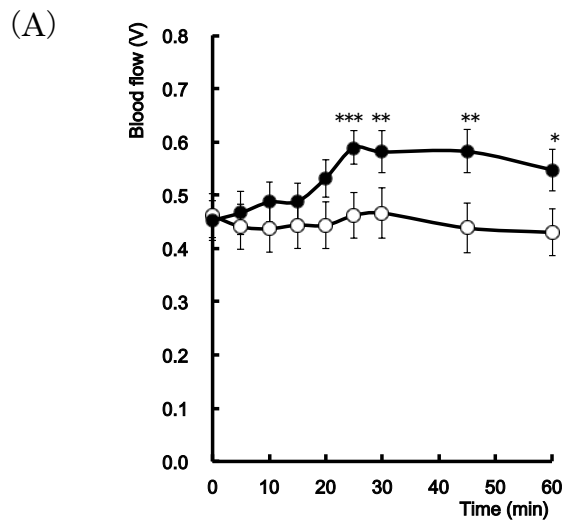


図 4-4. 被験食摂取後の末梢血流量変化

(A) 被験者は、50%濃度に希釈されたプラセボ (○) あるいは鯉だし (●) を摂取し、摂取直後から 60 分後までの末梢血流量を経時的に測定した。初回評価から 2 週間後に異なる被験食を摂取した。平均値 ± 標準誤差 (n=16) で示した。** $p<0.01$, $p<0.001$ で摂取直後に対して有意差あり。

(B) 被験食摂取後から 60 分間の血流増加合計値を AUC_{0-60} として示した。

表 4-8. Subject characteristics of age, dietary intake, physiological parameters, profile of mood states (POMS) score, blood flow and the amounts of urinary 8-OHdG excreted for 24 hours at the start of the study

	Group A (n=13)			Group B (n=16)			Total (n=29)		
Age (yr)	18.8	±	1.3	19.1	±	1.3	18.9	±	1.3
Dietary intake									
Energy (kcal)	1865.8	±	413.5	1765.3	±	486.4	1810.4	±	450.1
Carbohydrate (g)	275.8	±	74.5	259.0	±	57.1	266.5	±	64.8
Protein (g)	64.5	±	13.3	61.2	±	22.0	62.7	±	18.4
Fat (g)	53.2	±	15.4	51.1	±	21.1	52.1	±	18.5
Physiological parameters									
Height (cm)	159.8	±	3.9	158.5	±	3.5	159.1	±	3.7
Body weight (kg)	53.1	±	7.3	51.3	±	6.9	52.1	±	7.0
Percentage body fat (%)	27.1	±	5.8	25.2	±	5.1	26.0	±	5.5
Systolic blood pressure (mmHg)	109.4	±	10.0	98.5	±	6.6	103.4	±	9.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	62.8	±	7.3	57.1	±	5.3	59.6	±	6.8
Heart rate (BPM)	69.5	±	9.8	69.2	±	9.5	69.4	±	9.5
POMS score									
Anger-hostility	51.2	±	7.9	49.5	±	8.8	50.2	±	8.3
Confusion	53.7	±	9.7	53.3	±	7.5	53.4	±	8.4
Depression-dejection	52.8	±	9.0	52.4	±	7.3	52.6	±	8.0
Fatigue	51.8	±	7.2	50.4	±	11.7	51.0	±	9.8
Tention-anxiety	50.2	±	8.6	53.5	±	10.2	52.0	±	9.5
Vigor	48.5	±	7.7	49.3	±	9.0	48.9	±	8.3
Total mood disturbance	211.2	±	33.5	209.9	±	41.9	210.4	±	37.7
Blood flow (Voltage)	0.32	±	0.11	0.37	±	0.11	0.35	±	0.11
8-OHdG (mg/day)	18.4	±	2.8	14.5	±	3.9	16.3	±	3.9

Values are means ± S.D.

表 4-9. Changes in dietary intake, physiological parameters, profile of mood states (POMS) score, blood flow and the amounts of urinary 8-OHdG excreted for 24 hours during placebo and DBB

	Changes [†]					p-value ^{††}
	Placebo		DBB			
Dietary intake						
Energy (kcal)	-18.8	± 272.5	-22.5	± 354.6		0.95
Carbohydrate (g)	-7.0	± 44.8	-0.3	± 53.5		0.70
Protein (g)	1.1	± 12.9	-0.6	± 14.7		0.67
Fat (g)	0.8	± 13.5	-1.2	± 16.6		0.64
Physiological parameters						
Height (cm)	-0.02	± 0.45	0.08	± 0.38		0.41
Body weight (kg)	-0.10	± 0.66	-0.09	± 0.95		0.98
Percentage body fat (%)	-0.25	± 1.16	-0.04	± 1.36		0.51
Systolic blood pressure (mmHg)	-1.62	± 8.24	-3.06	± 7.60		0.33
Diastolic blood pressure (mmHg)	-2.10	± 8.54	-1.13	± 6.62		0.77
Heart rate (BPM)	-0.76	± 8.20	0.97	± 5.51		0.46
Profile of Mood States Survey						
Anger-hostility	0.6	± 6.1	-3.8	± 4.5		0.006
Confusion	2.1	± 6.3	-4.2	± 5.3		0.001
Depression-dejection	-0.7	± 4.8	-4.1	± 4.5		0.005
Fatigue	0.1	± 7.2	-4.5	± 4.0		0.002
Tention-anxiety	-0.3	± 6.3	-5.4	± 4.6		0.001
Vigor	-0.4	± 5.9	3.4	± 5.8		0.03
Total mood disturbance	2.2	± 24.7	-25.4	± 16.1		<0.0001
Blood flow (Voltage)	0.02	± 0.12	0.22	± 0.22		<0.0001
8-OHdG (mg/day)	1.2	± 6.0	-2.1	± 4.9		0.02

Values are means ± S.D. (n=29)

†: Physiological parameters, dietary assessment, each mood factor, blood flow and 8-OHdG were evaluated as change from baseline (placebo, the value measured after placebo ingestion – the value measured before placebo ingestion; DBB, the value measured after DBB ingestion - the value measured before DBB ingestion)

††: Changes in dietary intake, physiological parameters, POMS score, blood flow and the amounts of urinary 8-OHdG were evaluated by analysis of variance with test sample (DBB and placebo), period (period 1 and period 2) and carry-over effect (group A and group B) as within-subject factors.

第 5 章 総合討論

疲労とは、過度の肉体的および精神的活動により認められる心身の活動能力・能率の減退状態であり、独特の不快感と休養の願望に紐付く自覚感覚が伴うと定義されている（15, 16）。本来、過度の身体活動を避け、十分に休養できる状況であれば疲労状態には至らないと考えられるが、現代社会においてその実現は難しい。人々の生活の質に大きな影響を与える疲労に対して、医薬品ではなく日々の食生活においてその解決策を提供できれば社会的意義は大きい。日本料理では、食材由来の味成分による料理の風味増強を目的に鰹だしが利用されてきた一方、鰹だし及びその原料となる鰹に関しては、生理作用に関する伝承記録がある。その記述によれば、鰹だしには心身機能を賦活化する働き、すなわち疲労に陥りにくい作用があると解釈された。本研究は、我々日本人の食文化として定着している素材「鰹だし」に着目し、疲労との関連性を解明することを目指した。疲労の定義に基づき、鰹だしが身体活動の持続や回復に関する活動能力、及び身体の不快症状に対する感覚や心理状態に与える影響に関して、複合的な研究アプローチで検討を重ねた。

本研究から得られた知見に基づき、鰹だしの抗疲労作用発現の全体像を図 5-1 として示した。鰹だしの抗疲労作用発現の機序として、1) 脂質分解によるエネルギー基質の利用促進、及び末梢血管拡張による末梢組織への栄養供給路の拡大に基づく円滑なエネルギー供給、2) 脳内ヒスタミン神経の賦活化とそれに起因する認知記憶能及び覚醒感の変化、の二つの経路の存在が示唆された。これらの二つの経路を担う成分として鰹だしの組成を見直すと、特徴的かつ多量に

含有されているヒスチジンの存在に改めて気付く（表 2-1）。ヒスチジンは、栄養学的必須アミノ酸であり、摂取したヒスチジンの多くは体構成タンパク質の材料となる一方、吸収されたヒスチジンの一部は、脳血管の細胞膜に発現している L システム系のアミノ酸トランスポーターにより血液脳関門を通過し、選択的に脳内へ移行することが報告されている（70）。遊離態のヒスチジンを高含有する鰹だしを摂取することで、その一部は脳内神経伝達物質のヒスタミンに変換されると推察された。そこで、鰹だし投与後に、脳内唯一のヒスタミン産生細胞の結節乳頭核を含むように組織を切り出し、ヒスチジン及びヒスタミン濃度を経時的に測定した。その結果、ヒスチジン、ヒスタミン、ヒスタミン代謝物であるテレメチルヒスタミン濃度が有意に上昇することを示した（図 3-3）。また、ヒスタミン生合成阻害剤と鰹だしの併用投与により、鰹だし単体で確認された認知記憶能に対する作用が消失したことは、鰹だしの作用発現に中枢ヒスタミン神経系が関与していることを支持する結果であった（図 3-7）。

中枢ヒスタミン神経系は、交感神経活動の亢進を介して脂質由来のエネルギー産生量を増加させることが報告されている。具体的には、脳室内にヒスタミンあるいはヒスタミンを放出させる H3 受容体拮抗薬を注入すると、白色脂肪組織からのグリセロール放出が促進され、 β 受容体拮抗薬の前投与で消失することが示されている（71, 72）。第 2 章の強制遊泳モデルでは、鰹だし投与 60 分後に遊泳運動を負荷し、活動継続時間を活動能として評価した。鰹だしを経口投与すると、投与 60 分後には視床下部中のヒスタミン量が有意に増加していることから、遊泳運動開始時には脳内ヒスタミンが量産された状態と推察される。すなわち、鰹だし投与が中枢ヒスタミン神経系を介し、交感神経活動を亢進させ

ることで脂質分解が進み、身体活動の継続に必要なエネルギー基質の供給が円滑になった可能性が考えられる。中枢ヒスタミン神経系を作動させた結果の抗疲労作用の発現であるならば、中枢ヒスタミン神経系を活性化するヒスチジン単体でも、末梢の身体活動能に対して鰹だしと同等の作用発現が期待できると考え、検討を行った。その結果、鰹だし 0.86 g/kg 相当量のヒスチジン 93.7 mg/kg を投与した場合でも、活動時間が長期化する傾向が確認された (図 5-2)。ヒスタミン生合成阻害剤を用いた検証が必要だが、鰹だしの抗疲労作用の一部はヒスチジンで代替できる可能性が見えてきた。

交感神経活動による脂質分解の結果生じたエネルギー基質は、その他の栄養素や酸素と共に、血管を介して全身の組織や細胞に供給される。第 4 章では、鰹だし継続摂取が末梢血流量を増加させることを示した。鰹だし摂取により末梢細胞に運ばれる血流量が増加するということは、エネルギー代謝に必要な酸素やエネルギー基質が末梢細胞に多く供給されることでもある。血管は、交感神経系と副交感神経系の 2 つの自律神経系で構成されており、これら 2 つの自律神経系は一つの臓器に対して拮抗的に働き、血管収縮や血圧などの循環、呼吸、消化、体温調節、代謝などを含む種々の生体調節機構に関与していることが知られている (57)。一般的には、交感神経活動の亢進時には、血管は収縮することが知られており、鰹だしが中枢ヒスタミン神経系を介して交感神経活動を賦活化するとすれば、鰹だし摂取時に観察された末梢血流量増加はそれと相反するように見える。近年、自律神経活動と中枢ヒスタミン神経系との関連に関して、ヒスチジンと β アラニンのジペプチドであるカルノシンを題材に、興味深い報告が出てきた。カルノシンは、血中あるいは脳内で分解されたヒスチ

ジンからヒスタミンに変換されると考えられているが、少量のカルノシン投与時には、腎交感神経活動及び動脈圧が抑制されることで血圧は低下するが、多量投与時には逆に腎交感神経活動及び動脈圧が上昇することが示されている (73, 74)。中枢ヒスタミン神経系を介した交感神経活動は、中枢ヒスタミン量により亢進あるいは抑制の両方に機能することを意味し、すなわち鰹だし単回摂取後の脂質分解と継続摂取後の末梢血管拡張の事象は、この中枢ヒスタミン量の多少で説明できる可能性も考えられる。

ところで、鰹だし継続摂取では、生体内の酸化ストレス指標が有意に減少する事象を第 4 章にて報告した。鰹だし摂取による中枢ヒスタミン神経の交感神経活動を介した血管調節の可能性は前述のとおりだが、それ以外の血管拡張の機序も考えられる。鰹だしは、*in vitro* の摘出血管に対して、内皮非依存的な血管拡張作用を示すことから (59, 60)、中枢ヒスタミン神経系を介さない血管拡張物質が存在する可能性が否定できない。我々の生体内には血管平滑筋弛緩を促す一酸化窒素 (NO) が血管拡張因子として存在する。生体の酸化ストレスの高い状態では、フリーラジカルを有する反応性に富む活性酸素が産生され、それらの活性酸素種により同じく化学的に不安定な活性酸素である NO が分解され、NO の生体利用効率が低下する (63)。鰹だし摂取により、DNA 酸化損傷指標として知られる 8-OHdG (64, 65) の 24 時間尿中の量が有意に低値を示すことが確認され、鰹だしが生体内でも抗酸化作用を発現したと考えられる。従って、鰹だしの継続摂取が生体の酸化ストレス状態を低減するのであれば、NO の生体利用効率を高く維持した結果として血管弛緩が起きている可能性も考えられる。鰹だし中のヒスチジンやアンセリンが *in vitro* において抗酸化作用を有するこ

とは報告されており (66-68)、これらの物質の抗酸化作用により血管に影響を与えた可能性も考えられる。これまでに述べた中枢ヒスタミン産生を介した血管拡張、あるいは抗酸化作用を介した NO の利用効率向上による血管拡張は、いずれも鰹だしが吸収された後、すなわち一定時間が経過しての作用発現と考えられる。しかし、本研究では、鰹だしの経口摂取直後から非常に速やかな反応として、末梢血流量の増加が確認されている (図 4-3A、図 4-3B)。この事象解明には、味覚応答や胃粘膜での神経応答など、別の観点からの検討が必要と考えられる。

鰹だし摂取は、どのように心理状態を良好な方向に移行させるのか。第一には、先に述べたとおり、鰹だし継続摂取に伴う中枢ヒスタミン神経の賦活化を通じた自覚症状変化が推察された。具体的には、中枢ヒスタミン神経の賦活化に伴う覚醒の誘発を通じた活気の上昇、睡眠覚醒リズム調節に基づいた睡眠の質向上による不快感の解消、あるいは日常生活での作業効率や認知能の向上を通じた自覚変化を捉えた可能性が考えられる。鰹だしが中枢ヒスタミン神経系を介して、認知記憶能に影響を与えることを第 3 章にて検証した。これまで、ヒトを対象とした鰹だしの継続摂取により、ある作業負荷時の作業能力の全回答数及び正答数が摂取前時点と比較して有意に増加することが報告されている (75)。鰹だし摂取により、身体活動に伴う疲労感が軽減されたことで作業効率が向上した可能性が言及されているが、本研究で明らかとなった鰹だしのヒスタミン神経系の賦活化とあわせて考えれば、鰹だしが直接的に脳機能活動に影響を与えて作業効率を向上させた可能性、あるいは中枢ヒスタミンによる覚醒感や冴えが心理状態の変化につながった可能性も高い。第二には、末梢への血

流量増加に伴うエネルギー基質の供給が身体活動能を向上させ、間接的に心理状態に対する変化をもたらした可能性である。鰹だし継続摂取が末梢血流量あるいは心理状態に与える影響を第 4 章にて評価したが、特に、鰹だしによる末梢血流量の変化量と心理状態の改善量に着目して、それらの関連性を解析した。心理調査票の各項目と血流量の変化量での相関を解析した結果、6 尺度の統合的な感情指標と血流量変化が、中程度の有意な負の相関を示した。また、疲労、怒り－敵意、混乱、抑うつ－落ち込みの変化量と血流量変化量も、弱いながらも有意な負の相関を示し、反対に活気の変化量とは有意な正の相関を示すことが分かった（表 5-1）。この結果は、疲労感を含む心理状態の変化は微小循環の改善と関連があることを示し、心理状態が末梢循環を介して身体状態と関わっている可能性が示された。

古来、海に囲まれた日本では、環境と漁撈技術に見合った魚種を捕獲し食物としており、その一つが鰹であったと推察される（1）。鰹のように表層回遊性の高速魚は、爆発的な嫌氣的運動に適応した結果、ヒスチジンを豊富に含有すると言われている（76, 77）。嫌氣的な運動をする動物にとっては、ATP 消費に伴い生成するプロトンによる筋肉の pH 低下は、解糖系の酵素の作用を減弱させる。そこで、生理的な pH（pH6.5-7.5）付近に pK を有するヒスチジンあるいはイミダゾール化合物を多量に生体内に有することで、この課題を克服していると考えられている（78）。鰹肉中に豊富なヒスチジンは、微生物により鰹肉中でヒスタミンへと変換され、食中毒様の症状を引き起こすことが知られているが、食品加工技術により鰹肉を鰹節にすることで、鰹肉中のヒスタミン産生を防ぐことが可能となる。加工された鰹節あるいは鰹だしは、タンパク質源としてあ

るいは風味増強用途に利用されてきた一方、気血を補う、温の作用、無比の活力をもたらす、という生体への影響を示唆する記述もある。本研究において、鰹だしに関する民間伝承を生理学的な側面から検証した結果、鰹だしは末梢組織と中枢組織に対する二つの経路を通じて、抗疲労作用を発現するユニークな食素材であることが示された（図 5-3）。

最近、鰹だしの末梢血流増加作用を期待した臨床での応用検討が始まっている。抗癌剤の副作用に伴う末梢血流量低下に対して、鰹だしを併用摂取することで薬剤による血流量低下を抑制し、副作用の出現頻度を軽減し、患者の QOL 改善に寄与することが報告されている（79）。末梢血流調節に関しての詳細な機序を解析することで、末梢循環不全が要因となる他の症状に対しても貢献できる可能性がある。今後は、鰹だしやヒスチジンなどの物質面からの研究も必要だが、生体側、特に脳科学領域からのアプローチも参考になる。最近の報告では、慢性疲労症候群の患者の脳機能解析により、脳神経に炎症反応が広く生じていること、炎症のある脳部位は認知記憶や抑うつなどの神経活動と相関があること、すなわち脳神経の機能低下が脳機能低下と抑うつ症状を引き起こす可能性が示されている（80）。中枢ヒスタミン神経系と疲労の関連性についても、今後の脳科学研究が明らかにしていくと期待される。中枢ヒスタミン神経の観点では、ヒスタミン H3 受容体の拮抗薬は、神経伝達物質の遊離を通じて認知記憶能を高めるという報告と期待から、近年はアルツハイマー病治療薬の創薬ターゲットにもなっている（43）。今後、鰹だし認知記憶能強化が関与するヒスタミン受容体の同定、及び作用発現の解析などを通じ、認知記憶能に対する鰹だしあるいはヒスチジン摂取の有用性を示すことが可能になるかもしれない。

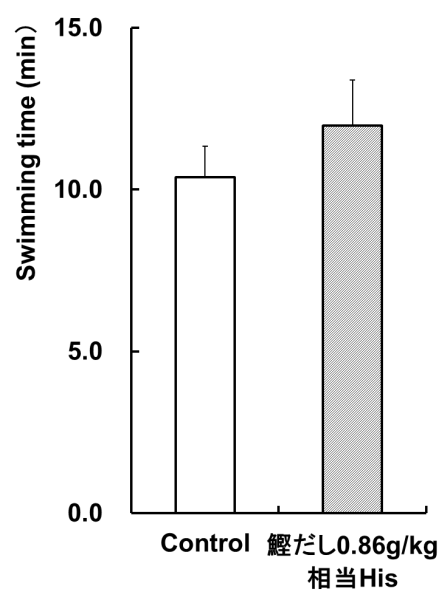


図 5-2. ヒスチジン投与後の遊泳運動時間

鰹だし 0.86 g/kg 相当量のヒスチジン 93.7mg/kg あるいは溶媒を経口投与し、60 分後、遊泳運動を負荷し、限界遊泳時間を測定した。10 L/min の供給水量を強度運動負荷条件として設定した。平均値 \pm 標準誤差 (n=6, 8)、# ; $p < 0.1$ vs. control.

表 5-1. Results of correlations analysis between changes in each POMS score

	ρ -value	p -value
Anger-hostility	-0.29	0.03
Confusion	-0.38	< 0.005
Depression-dejection	-0.28	0.03
Fatigue	-0.36	0.01
Tension-anxiety	-0.20	0.13
Vigor	0.27	0.04
Total mood disturbance	-0.50	< 0.001

ρ -value and p -value are calculated by Spearman's correlation coefficient test (n=58).

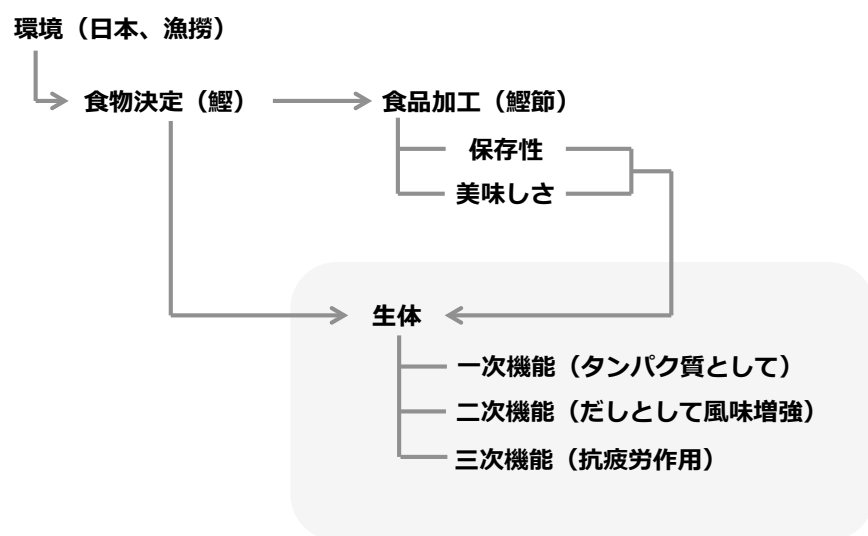


図 5-3. 食文化における鰹だしの抗疲労作用

参考文献

1. 松井章 (2005) 考古学からみたカツオ漁「日本人はなぜかつおをたべてきたのか」 味の素食の文化センター
2. 松下幸子 (2005) 江戸時代料理書にみるだし「日本人はなぜかつおをたべてきたのか」 味の素食の文化センター
3. 宮下章 (2000) 「鰹節」 法政大学出版局
4. **Kohno K, Hayakawa F, Xichang W, Shunsheng C, Yokoyama M, Kasai M, Takeuchi F, Hatae K** (2005) Comparative study on flavor preference between Japanese and Chinese for dried bonito stock and chicken bouillon. J Food Sci 70: 193–198
5. **Fuke S, Konosu S** (1991) Taste-active components in some foods: a review of Japanese research. Physiol Behav 49: 863–868
6. **Yajima I, Nakamura M, Sakakibara H, Yanai T and Hayashi K** (1983) Volatile flavor components of dried bonito (Katsuobushi). Agric Biol Chem 47: 1755-1760
7. 人見必大 (1697) 「本朝食鑑」第9巻 財団法人味の素食の文化センター所蔵
8. 山崎郁子 (1995) 「中医營養学」第一出版
9. **Ibn Battuta** (2001) 「大旅行記」第6巻 平凡社東洋文庫
10. **簗輪眞澄、倉恒弘彦、志水彰、木谷照夫** (2000) 地域における疲労の実態とリスクファクターー愛知県豊川保健所管内の2市4町実態調査ー「疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究業績報告書」：19-44

11. 倉恒弘彦ら (2012) 慢性疲労症候群に対する治療法の確立「疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究業績報告書」：305-332
12. 簗輪眞澄、谷畑健生 (2012) 疲労の量と質の疫学調査「疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究業績報告書」：173-180
13. Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, Komaroff AL, Schonberger LB, Straus SE, Jones JF, Dubois RE, Cunningham-Rundles C, Pahwa S, et al (1988) Chronic fatigue syndrome: a working case definition. Ann Intern Med 108:387-389
14. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cd.gov/cfs/>
15. Chaudhuri A, Behan PO (2004) Fatigue in neurological disorders. Lancet 363: 978-988.
16. Kitani T (2011) Term Committee of Japanese Society of Fatigue Science. Nihon Hirougakkaishi 6: 1
17. Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, Inoue K, Fushiki T (1996) An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. J Appl Physiol 81: 1843-1849
18. Ishihara K, Oyaizu S, Onuki K, Lim K, Fushiki T (2000) Chronic (-)-hydroxycitrate administration spares carbohydrate utilization and promotes lipid oxidation during exercise in mice. J Nutr 130: 2990-2995
19. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T (2006) Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. Am J Physiol 290: 1550-1556

- 20. Koh JH, Kim KM, Kim JM, Song JC, Suh HJ** (2003) Antifatigue and antistress effect of the hot-water fraction from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 26: 691-694
- 21. Kamakura M, Mitani N, Fukuda T, Fukushima M** (2001) Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 47: 394-401
- 22. Mizunoya W, Oyaizu S, Ishihara K, Fushiki T** (2002) Protocol for measuring the endurance capacity of mice in an adjustable-current swimming pool. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1133-1136
- 23. Bergmeyer HU** (1974) "Methods of Enzymatic Analysis" Academic Press, New York
- 24. Bergmeyer HU** (1978) "Principles of Enzymatic Analysis" ed. by Bergmeyer HU, Verlag Chemie, Weinheim/New York
- 25. Nakagawasai O, Tadano T, Tan-No K, Niijima F, Sakurada S, Endo Y, Kisara K** (1999) Changes in β -endorphin and stress-induced analgesia in mice after exposure to forced walking stress. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21: 471-476
- 26. Hanawa M-A, Asano T, Akiyama K, Yabe K, Tsunoda K, Tadano T, Sutoo D** (2000) Effect of Zena F-III(®), a liquid nutritive and tonic drug, on the neurochemical changes elicited by physical fatigue in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 66: 771-778

- 27. Mizunoya W, Haramizu S, Shibakusa T, Okabe Y, Fushiki T (2005)** Dietary conjugated linoleic acid increases endurance capacity and fat oxidation in mice during exercise. *Lipids* 40: 265-271
- 28. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y (2002)** Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 8: 738-742
- 29. Yamamoto Y, Mochizuki T, Okakura-Mochizuki K, Uno, A and Yamatodani A (1997)** Thioperamide, a histamine H3 receptor antagonist, increases GABA release from the rat hypothalamus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19: 289-298
- 30. Bartus RF, Johnson HR (1976)** Short-term memory in the rhesus monkey: disruption from the anti-cholinergic scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* 5:39-46
- 31. Tinsley CJ, Fontaine-Palmer NS, Vincent M, Endean EP, Aggleton JP, Brown MW, Warburton EC (2011)** Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. *Learn Mem* 18: 484-492
- 32. Kollonitsch J, Perkins LM, Patchett AA, Doldouras GA, Marburg S, Duggan DE, Maycock AL, Aster SD (1978)** Selective inhibitors of bio- synthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature* 274: 906-908

- 33. Maeyama K, Watanabe T, Yamatodani A and Wada H** (1982) Effect of α -fluoromethylhistidine, a suicide inhibitor of HDC, on histamine levels in mouse tissue. *Biochem Pharmacol* 31: 2367-2370
- 34. Glowinski J, Iversen LL** (1996) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H] norepinephrine, [3H] dopamine and [3H] dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13: 655-69
- 35. Miyamoto Y, Yoshimoto R, Yumoto M, Ishihara A, Takahashi K, Kotani H, Kanatani A, Tokita S** (2004) Simultaneous fluorometric measurement of histamine and tele-methylhistamine levels in rodent brain by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 334: 89-96
- 36. Ennaceur A, Delacour J** (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioural Brain Research* 31: 47-59
- 37. Clarke JH, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-Garcia JM** (2010) Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 265–267
- 38. Lalonde R** (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 91-104
- 39. Hughes RN** (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 497-505

- 40. Itowi N, Yamatodani A, Kiyono S, Hiraiwa ML and Wada H (1991)** Effect of histamine depletion on the circadian amplitude of the sleep-wakefulness cycle. *Physiol Behav* 49: 643-646
- 41. Mochizuki T, Yamatodani A, Okamura K, Horii A, Inagaki N, Wada H (1992)** Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol Behav* 51: 391-394
- 42. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008)** Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88:1183-1241
- 43. Panula P, Nuutinen S (2013)** The histaminergic network in the brain: Basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 472-487
- 44. Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P (2000)** Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 107-114
- 45. Blandina P, Efofudebe M, Cenni G, Mannaioni P, Passani MB (2004)** Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. *Learning and Memory* 11:1-8
- 46. Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF, Blandina (2001)** Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behav Brain Res* 124:183-194
- 47. Zant JC, Rozov S, Wigren HK, Panula P, Porkka-Heiskanen T (2012)** Histamine release in the basal forebrain mediates cortical activation through cholinergic neurons. *J Neurosci* 32:13244-13254

48. **McNair DM, Lorr N** (1964) An analysis of mood in neurotics. *J Abnorm Psychol* 69:620–627
49. **McNair DM, Lorr N, Droppleman LF** (1992) Manual for the profile of mood states (POMS), revised. Educational and Industrial testing service
50. **Yokoyama K, Araki S, Kawakami N, Takeshita T** (1990) Production of the Japanese edition of profile of mood states (POMS): assessment of reliability and validity. *Jpn J Pub Health* 37: 913-918
51. **横山 和仁、野村 忍、下光 輝一** (2002) 「診断・指導に活かす POMS 事例集」 金子書房
52. **Honda M, Ishizaki T, Kuroda M** (2006) The effect of dried skipjack soup stock on visual fatigue. *J Jpn Soc Food Sci Tech* 53: 443-446
53. **Matsumoto M, Kobayashi N, Hoshina O, Arai S** (2000) Study on the mechanisms associated with dark circles. *J Soc Cosmet Chem Jpn* 34:152-159
54. **Takeuchi T, Nakao M, Nishitani M, Yano E** (2004) Stress perception and social indicators for low back, shoulder and joint pains in Japan: national surveys in 1995 and 2001. *Tohoku J Exp Med* 203:195-204
55. **Matsumoto H, Takenami E, Iwasaki-Kurashige K, Osada T, Katsumura T, Hamaoka T** (2005) Effect of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. *Eur J Appl Physiol* 94:36-45
56. **Heinrich U, Neukam K, Tronnier H, Sies H, Stahl W** (2006) Long term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr* 136:1565-1569

- 57. Ganong WF** (2006) Review of medical physiology, 第 22 版 丸善出版
- 58. Garrow JS, James WPT, Ralph A** (2004) Human Nutrition and Dietetics, 第 10 版 医歯薬出版
- 59. Honda M, Nozawa Y, Ishizaki T, Kuroda M** (2009) Ingestion of bonito extract ameliorates peripheral blood flow in mice loaded from overcrowding stress. Biomedical Research 30: 129-135
- 60. Honda M, Nozawa Y, Hirano SI, Kuroda M** (2012) Vasorelaxant effect of bonito extract on norepinephrine induced contract in rat isolated aorta. Jpn Pharm therap 40: 723-730
- 61. Hibino G, Nadamoto T, Fujisawa F, Fushiki T** (2003) Regulation of the peripheral body temperature by foods: a temperature decrease induced by the Japanese persimmon (kaki, Diospyros kaki). Biosci Biotechnol Biochem 67: 23-28
- 62. Fujisawa F, Nadamoto T, Fushiki T** (2005) Effect of ginger on peripheral body temperature. J Jpn Soc Nutr Food Sci 58: 3-9
- 63. Eguchi H, Fujiwara N, Ookawara T, Suzuki K, Taniguchi N** (2009) Oxidative stress and health. J Anal Bio-Sci 32: 247-256
- 64. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B** (1989) Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 697-701
- 65. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S** (1997) New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with noninsulin-dependent diabetes

mellitus. FEBS Lett 417: 150-152

- 66. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy, Ames BN (1988)** Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. Proc Natl Acad Sci U S A 85:3175-3179
- 67. Suzuki T, Motosugi M (1991)** Antioxidative activity of broiled-dried skipjack (Katsuo-bushi) extracts. J Food Sci Tech 38: 675–680
- 68. Suzuki T, Motosugi M (1996)** Changes in volatile flavor compounds and antioxidant activity of absorbed phenolic compounds of dried bonito stick (Katsuo-bushi) during smoking process. J Jpn Soc Food Sci Tech 43: 29–35
- 69. Kuroda M, Nozawa Y (2008)** Effect of dried-bonito broth on mood states: A pooled analysis of four randomized controlled human trials. Biomedical Research 29: 175-179
- 70. Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR (2006)** Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. J Nutr 136: 218S-26S
- 71. Jørgensen EA, Knigge U, Warberg J, Kjaer A (2007)** Histamine and the regulation of body weight. Neuroendocrinology 86: 210-214
- 72. Masaki T, Yoshimatsu H (2010)** Neuronal histamine and its receptors: implication of the pharmacological treatment of obesity. Curr Med Chem 17: 4587-4592
- 73. Nagai K, Tanida M, Nijima A, Tsuruoka N, Kiso Y, Horii Y, Shen J, Okumura N (2012)** Role of L-carnosine in the control of blood glucose, blood pressure,

- thermogenesis, and lipolysis by autonomic nerves in rats: involvement of the circadian clock and histamine. *Amino Acids* 43: 97-109
- 74. Tanida M, Kaneko H, Shen J, Nagai K (2007)** Involvement of the histaminergic system in renal sympathetic and cardiovascular responses to leptin and ghrelin. *Neurosci Lett* 413: 88-92
- 75. Kuroda M, Ishizaki T, Maruyama T, Takatsuka Y, Kuboki T (2007)** Effect of dried-bonito broth on mental fatigue and mental task performance in subjects with a high fatigue score. *Physiol Behav* 92: 957-962
- 76. 阿部宏喜 (1988)** イミダゾール化合物「魚介類のエキス成分」恒星社厚生閣
- 77. Abe H (1995)** Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function, in "Biochemistry and Molecular Biology of Fishes-Metabolic Biochemistry-" 4 : 309-333, Elsevier Amsterdam
- 78. Okuma E, Abe H (1992)** Major buffering constituents in animal muscle. *Comp. Biochem Physiol* 102A: 37-41
- 79. 上村顕也、須田剛士、上村博輝、兼藤努、土屋淳紀、田村康、高村昌昭、五十嵐正人、川合弘一、山際訓、野本実、青柳豊 (2014)** ソラフェニブの手足症候群に対する濃厚鰹だしの有効性の検証、第50回日本肝臓学会
- 80. Nakatomi Y, Mizuno K, Ishii A, Wada Y, Tanaka M, Tazawa S, Onoe K, Fukuda S, Kawabe J, Takahashi K, Kataoka Y, Shiomi S, Yamaguti K, Inaba M, Kuratsune H, Watanabe Y (2014)** Neuroinflammation in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a ^{11}C -(R)-PK11195 positron emission tomography study. *J Nucl Med* 55: 945-950

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室教授 正木春彦先生に深く感謝致します。先生のご指摘を仰ぐことで、本研究の意義を改めて見直すことができました。

本研究は、味の素株式会社 食品研究所 だし健康機能訴求プロジェクト、加工食品開発工業化センター、健康基盤研究所、食品研究所 技術開発センターと、複数の組織を経て進めました。その間、多くの上司からご指導を賜り、多くの共同研究者や同僚に支援頂きました。厚くお礼申し上げます。本論文の作成にあたり、丁寧なご指導と励ましを賜りました味の素株式会社 佐藤斉博士、降旗泰史博士、井上尚彦博士に深くお礼申し上げます。

本論文の申請に関して、多大なるご支援を賜りました名古屋大学理学研究科 生命理学専攻准教授 吉岡泰先生、元日本大学総合科学研究所教授 大坪久子先生、東京大学名誉教授 大坪栄一先生に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行及び本論文執筆を支えてくれた家族に感謝致します。