

学 位 論 文 題 名

フコキサンチンの安全性に関する研究 — 一般毒性および変異原性評価と生体内脂質代謝への影 響について —

学位論文内容の要旨

肥満は内臓脂肪の過剰な蓄積により、インスリン抵抗性を誘発するとともに、それを基盤としたⅡ型糖尿病や動脈硬化症などの病態基盤となることが知られている。一方、近年食習慣と糖尿病などの生活習慣病との因果関係が科学的に示されるようになり、それに伴い生活習慣病の予防や改善を目的とした食品素材の探索研究が国内外で活発に行われている。しかしながら、食品成分は医薬品とは異なり、摂取量に関する明確な基準がないものがほとんどであり、特に健康食品やサプリメントでは本来の食品に含まれる量と比較して多量の成分が長期間にわたって摂取される危険性も考えられる。そのような場合、化合物の中には急性および慢性的な毒性を示す成分に加え、それらの症状が明確に表れるまでに時間を要するようなもの、さらには毒性的な症状は見られないものの生体内の様々な代謝系に過剰な作用をもたらし、健康状態を悪化させるような負の作用も懸念されるため、安全性については十分な検討が必要である。

フコキサンチンはワカメ等の褐藻類に特徴的に含まれるキサントフィルで、これまでに抗肥満効果や高血糖改善効果といった、生活習慣病予防に対する有効性が報告されている。これまで報告されている他の食品成分と比較して作用が強いことが特徴であり、機能性食品素材としての開発が世界中で進められている。しかしながら、フコキサンチン自体は非栄養素であり、生体内の代謝については一部報告されているが、食品素材としての安全性については未だ詳細に検討されていない。特に、フコキサンチンは強い体重増加抑制作用を有しているため、その作用機構は糖や脂質代謝に関する生体全体のエネルギー代謝系に関わることが考えられる。そこで、本研究ではフコキサンチンの食品素材としての一般的な毒性評価に加え、肥満や糖尿病病態マウスと健常マウスにおける作用の違いに注目した脂質代謝系機能への影響について詳細に評価することによりその安全性を評価することを目的とした。

第1章ではワカメから抽出・精製したフコキサンチンの安全性を一般的な毒性試験により評価した。単回投与試験では医薬品の毒性試験ガイドラインで定められる、物理的に投与可能な最大限量量の2,000 mg/kgを健常なICRマウスに投与した。その結果、フコキサンチンによる急性毒性は認められなかった。続いて、反復投与試験ではヒト介入試験の報告を参考に500 mg/kg、1000 mg/kgで30日間投与した。その結果、体重推移、一般状態、剖検所見に異常は認められなかった。一方、フコキサンチン投与により血漿中の総コレステロールに有意な上昇が認められた。これについては作用機序の面から安全性を考察する必要があると考えた。遺伝毒性については、細菌を用いた復帰突然変異試験およびマウスを用いた小核試験を行った結果、フコキサンチンおよびその代謝物による変異原性がなく異常所見が見られないことから毒性学的には安全であると結論した。

第2章では糖尿病/肥満KK-*A*^yマウスを用いて、糖、脂質代謝への影響を検討した。フコキサンチン0.2%含有飼料で4週間飼育した結果、これまでと同様に体重および白色脂肪組織(WAT)重量の増加抑制作用が認められた。また、血糖値の改善とともに、血中のインスリン濃度に加え、摂食抑制やエネルギー代謝制御機能を持つレプチン濃度の有意な低下が認められた。一方、インスリンシグナルに異常のない健常なマウスにおいては血糖値低下が認められないことが明らかにされており、インスリン抵抗性の改善により糖代謝が亢進したと推察される。よって、健常な生体に対する過剰な低血糖を引き起こす危

険性はないと考えられ、エネルギー成分の欠乏などの副作用を引き起こさないものとする。一方、フコキサンチン投与群では ICR マウスと同様に血中の総コレステロールの上昇が認められた。また、肝臓脂質の脂肪酸組成を分析した結果、飽和脂肪酸含有率の増加、一価不飽和脂肪酸の低下が認められ、主に肝臓における脂肪酸代謝系への影響が示された。以上、第 1 章および第 2 章の結果より、生体内のコレステロール代謝と肝臓中の脂肪酸代謝に及ぼすフコキサンチンの影響については、その作用機構の解明による安全性への考察が必要であると考えた。

そこで、第 3 章では ICR、KK-*Ay* マウス共通して認められた総コレステロールの上昇作用に関わる作用機構の解明を試みた。フコキサンチン群では、コレステロール代謝の中心的な役割をなす肝臓において、血清中とは反対にコレステロール量の有意な低下が認められた。コレステロール代謝に関わる各種因子の発現量を検討した結果、肝細胞中に HDL からコレステロールを選択的に取り込むスカベンジャー受容体(SR-B1)のタンパク質発現が有意に低下していることがわかった。さらにリポタンパク質プロファイルの解析を行った結果、フコキサンチン摂取群では HDL 粒子のサイズが増大し、その HDL 画分にコレステロールが多量に移行していることが示された。よって、フコキサンチンのコレステロール上昇作用の要因の一部に、SR-B1 を介した HDL-コレステロールの代謝への影響が示された。ヒトの HDL-コレステロール代謝機構では、SR-B1 に加え、マウスには見られない cholesteryl ester transfer protein を介した HDL と他のリポタンパク質間でのコレステロール転送システムがある。従って、本研究でマウスに対して認められた HDL-コレステロール代謝への影響については、ヒトに近いウサギなどを用いて詳細に調べる必要がある。また、食品素材として広く利用を考える場合、高コレステロール血症のヒトへの利用については、十分な検討および注意が必要であると考えた。

第 4 章では、肝臓の脂肪酸組成変化への影響について、その制御因子として 69 位不飽和化酵素(SCD1)に注目して検討した。SCD1 は脂肪酸合成系において中心的な役割を担うとともに、生体内のエネルギー代謝制御に関わるレプチンのターゲット因子であることが知られている。KK-*Ay* マウスの肝臓において、フコキサンチン摂取群では SCD1 の発現量に有意な低下が認められた。それに伴い脂肪酸組成におけるオレイン酸/ステアリン酸の比の減少と WAT 重量の減少、さらにはレプチン濃度の低下に強い相関が認められた。一方、レプチン産生を欠損する遺伝的肥満 ob/ob マウスに対しては、フコキサンチンによる体重の増加抑制作用は認められなかった。その際、肝臓での SCD1 発現を介したオレイン酸含有率の低下が認められず、フコキサンチンによるこれらの作用がレプチンシグナルを介していることが示された。また、フコキサンチンは健常マウスである C57BL/6J マウスの WAT におけるレプチン遺伝子の発現に対して影響を及ぼさないことが報告されている。従って、肝臓の脂肪酸組成の変化がレプチン抵抗性の改善による作用であり、それによる生体内のエネルギー代謝の亢進が KK-*Ay* マウスに対するフコキサンチンの体重増加抑制作用の分子機構の一部であると推察される。ICR マウスでは体重推移に異常は見られず、フコキサンチンによる体重増加抑制作用、それに伴う肝臓の脂肪酸組成の変化は、レプチンシグナルが脆弱した肥満病態に対してのみ発現する効果であり、健常な生体のエネルギー代謝に悪影響をもたらす作用ではないことが示された。

以上、フコキサンチンが肥満を基盤とする生活習慣病予防に有効であるとともに、高齢社会となった現代において重要性を増す健康維持に有望な食品素材であることが示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋	是太郎
副査	教授	宮下	和夫
副査	教授	板橋	豊
副査	准教授	細川	雅史

学位論文題名

フコキサンチンの安全性に関する研究

－ 一般毒性および変異原性評価と生体内脂質代謝への影響について －

内臓脂肪組織への過剰な脂肪蓄積により、インスリン抵抗性、高血圧、炎症などが誘発され、Ⅱ型糖尿病や動脈硬化症のリスクが増大する。これに対して、近年、食習慣と肥満、糖尿病や高血圧などの生活習慣病との因果関係が科学的に解明されるようになり、生活習慣病の予防や改善を目的とした食品素材の探索研究も国内外で活発に行われている。フコキサンチンはワカメ等の褐藻類に特徴的に含まれるキサントフィルで、これまでに抗肥満効果や高血糖改善効果といった、生活習慣病予防に対する有効性が報告されている。その活性は他の食品由来成分と比較して強いことが特徴であり、機能性食品素材へのフコキサンチンの利用が世界中で進められている。しかし、フコキサンチンを含むワカメや昆布などの褐藻類についての食経験はあるものの、フコキサンチンを濃縮した形態あるいはフコキサンチンそのものの安全性についての知見は少ない。フコキサンチンは強い体重増加抑制作用を有しており、その作用機構は糖や脂質を中心とする生体全体のエネルギー代謝系と深く関わっていると推測される。そこで、本研究ではフコキサンチンの食品素材としての一般的な毒性評価に加え、肥満や糖尿病病態マウスと健常マウスにおける作用の違いに注目した脂質代謝系機能への影響を評価した。本研究で得られた成果は以下のように要約される。

1. ワカメから抽出・精製したフコキサンチンの安全性を一般的な毒性試験により評価するため、物理的に投与可能な最大限量(2,000 mg/kg)を健常なICRマウスに投与した。その結果、フコキサンチンによる急性毒性は認められなかった。続いて、反復投与試験ではヒト介入試験の報告を参考に500 mg/kg、1,000 mg/kgを30日間マウスに投与したが、体重推移、一般状態、剖検所見に異常は認められなかった。一方、フコキサンチン投与により血漿中の総コレステロールの有意な上昇が観察された。これについては作用機序の面から安全性を考察する必要があると考えられた。遺伝毒性については、細菌を用いた復帰突然変異試験およびマウスを用いた小核試験を行い、フコキサンチンおよびその代謝物による変異原性がなく、異常所見も見られないことを示した。以上より、フコキサンチンは毒性学的には安全であることを明らかにした。

2. フコキサンチンの糖尿病/肥満KK-*Ay*マウスに対する体重および白色脂肪組織 (WAT) 重量の増加抑制作用を確認した。この際、血糖値と血中のインスリン濃度の改善に加え、摂食抑制やエネルギー代謝制御機能を持つレプチン濃度の有意な低下の起こることも初めて見出した。また、フコキサンチンを過剰摂取しても、健常な生体での体重減少、過度な脂肪減少、低血糖、エネルギー成分の欠乏といった副作用のないことが示された。

3. マウスで認められたフコキサンチン摂取による血清総コレステロール上昇の関連因子について検討し、HDLからコレステロールを肝臓内に選択的に取り込むスカベンジャー受容体 (SR-B1) 発現の低下、HDL粒子サイズの増大、HDL画分へのコレステロールの移行亢進が、フコキサンチン投与で誘導されることを見出した。したがって、フコキサンチンのコレステロール上昇作用の要因として、SR-B1を介したHDL-コレステロールの代謝への影響が明らかにされた。ただし、ヒトのHDL-コレステロール代謝は、マウスとは異なる分子機構に基づいているため、フコキサンチンによる血清総コレステロール増大作用については、ヒトに近いウサギなどを用いたさらなる検討が必要と考えられた。

4. フコキサンチン摂取により、KK-*Ay*マウスの肝臓において、脂肪酸合成系において中心的な役割を果たす δ 9位不飽和化酵素 (SCD1) 発現量の有意な低下を見出した。また、本酵素の発現量減少、オレイン酸/ステアリン酸比の減少、及びWAT重量の減少と、フコキサンチン投与によるレプチン濃度の低下に強い相関のあることを明らかにした。一方、レプチン産生の欠損した遺伝的肥満ob/obマウスに対しては、フコキサンチンによる体重の増加抑制作用は認められず、さらには、肝臓でのSCD1発現を介したオレイン酸含有率の低下も認められないことを明らかにした。以上より、フコキサンチンによるレプチン抵抗性の改善と、それに伴う生体内のエネルギー代謝の亢進が、フコキサンチンの抗肥満・抗糖尿病作用の主な分子機構であることを示した。

以上のように、本研究では、海藻由来カロテノイド、フコキサンチンの安全性について、一般毒性試験、反復投与試験、復帰突然変異試験、小核試験を用いて毒性のないことを明かにした。また、フコキサンチンの特徴的な機能性がなぜ肥満及び高血糖状態のみで発揮され、正常マウスには影響を及ぼさないかについて、レプチンシグナルの発現制御の観点から合理的に説明した。これらの成果は、確かな科学的基盤に基づく水産物由来の安全な抗肥満食品素材の創出に大きく寄与するものと考えられる。よって審査員一同は本研究の申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。