

ブタ肝臓水解物の成分分析と抗酸化活性及びアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の検討

井上尚典,^{a,b} 浜崎敦子,^b 日高修二,^c 三浦直良,^b 深堀勝博,^d
丸山真杉,^e 河原 聡,^{a,c} 太田一良,^{a,c} 六車三治男^{*,a,c}

Analysis of the Components of Porcine Liver Hydrolysate and Examination of the Antioxidant Activity and Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibiting Activity

Naonori Inoue,^{a,b} Atsuko Hamasaki,^b Shuji Hidaka,^c

Naoyoshi Miura,^b Masahiro Fukahori,^d Masugi Maruyama,^e

Satoshi Kawahara,^{a,c} Kazuyoshi Ohta,^{a,c} and Michio Muguruma^{*,a,c}

^aInterdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki; 1-1 Gakuen Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan; ^bConsumer Healthcare Laboratories, Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd.; 2512-1 Oshikiri, Kumagaya, Saitama 360-0111, Japan; ^cLaboratory of Food Science and Nutrition, Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki; 1-1 Gakuen Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan; ^dConsumer Healthcare Products Development, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd.; 10-11 Nihonbashi Kobuna-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-8351, Japan; and ^eDepartment of Applied Physiology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki; 5200 Kiyotake-cho Kihara, Miyazaki 889-1692, Japan.

(Received December 13, 2011; Accepted September 10, 2012)

Hypertension and oxidant stress predispose to the onset and progression of arteriosclerotic diseases. In this study, the components of two kinds of porcine liver hydrolysates (LH-I and LH-II) were analyzed, and the antioxidant effects and angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibiting effects of LH-I and LH-II were examined *in vitro*. Furthermore, the effects of LH-I and LH-II on the blood pressure were examined in spontaneously hypertensive rats (SHR). The results showed that peptides and amino acids accounted for 70% or more of the constituents of both LH-I and LH-II. The results of gel filtration HPLC showed that most of the nitrogen-containing components were peptides or amino acids with molecular weights of 6000 or less. The DPPH radical scavenging activities of LH-I and LH-II were 55.6 and 38.1 μM Trolox Equivalent/g, respectively. The IC_{50} values for the ACE-inhibiting activity of LH-I and LH-II were 0.18 and 0.31 mg/mL, respectively. Oral administration of 1 g/rat of LH-I or LH-II to SHR resulted in significant lowering of the blood pressure. These findings indicate that both LH-I and LH-II have antioxidant activity and ACE-inhibiting activity. Moreover, both exerted a blood pressure-lowering effect in SHR. The antioxidant activity and ACE-inhibiting activity of LH-I and LH-II are presumed to be based on the actions of the component peptides.

Key words—liver hydrolysate; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition; antioxidation; antihypertensive activity

緒 言

今日社会環境とライフスタイルの著しい変化により飽食化が進み、高血圧、糖尿病、脂質異常症等の生活習慣病が大きな社会問題となっている。厚生労

働省による平成 22 年の人口動態調査¹⁾によれば、日本における三大死因は、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患である。この三大死因のうち心疾患、脳血管疾患はいずれも動脈硬化が原因となって生ずる疾患であり、全死亡の約 26.1%を占めている。

生活習慣病と呼ばれる肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症等は、心筋梗塞や脳梗塞等の動脈硬化性疾患の主要な危険因子である。また、メタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患の危険因子が重積した病態であり、高血圧、肥満、糖尿病、脂質異常症

^a宮崎大学大学院農学工学総合研究科, ^bゼリア新薬工業株式会社中央研究所コンシューマーヘルスケア研究部, ^c宮崎大学農学部応用生物科学科食品機能化学講座, ^dゼリア新薬工業株式会社コンシューマーヘルスケア製品開発部, ^e宮崎大学医学部機能制御学講座

*e-mail: muguruma@cc.miyazaki-u.ac.jp

等の各々の症状が軽度であっても、それら危険因子が重積することによって動脈硬化性疾患の大きなリスクになることが明らかになっている。²⁾ メタボリックシンドロームを有する者は心筋梗塞や脳卒中を発症するリスクが約3倍、³⁾ 新規に糖尿病を発症するリスクが約2-15倍、⁴⁾ 総死亡リスクは約2倍⁵⁾を示すことが報告されている。したがって、高血圧、肥満、糖尿病、脂質異常症等の生活習慣病の予防、改善が、動脈硬化性疾患の発症・進展のリスク軽減に重要であると考えられる。

また、高血圧、肥満、糖尿病、脂質異常症等の動脈硬化性疾患の危険因子は、生体の酸化ストレスを増大させることが明らかにされており、酸化ストレスの増大が動脈硬化形成に重要な役割を果たしていると考えられている。^{6,7)} 近年、機能性食品の研究が盛んに行われており、大豆、乳清、魚のゼラチン等を加水分解処理して得られたペプチドが抗酸化活性を有することが報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ さらに、食肉のタンパク質を加水分解処理して得られたペプチドが、血圧降下に係わるアンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme; ACE)阻害活性を有することが報告されている。¹¹⁻¹⁶⁾ これら機能性食品は、生活習慣病の予防、改善に寄与することが期待されている。

肝臓水解物は、哺乳類の肝臓を酵素と熱処理によって加水分解した医薬品有効成分であり、ペプチドを主成分として各種アミノ酸、ヌクレオチド、ビタミン、ミネラル等を含んでいる。肝臓水解物は肝臓機能障害を起こした患者への含有成分の補充を目的として投与されており、古くより肝臓疾患の治療薬として用いられている。¹⁷⁻¹⁹⁾ 実験的にも肝再生促進作用、²⁰⁾ 色素排泄の促進作用、²¹⁾ 抗肝線維化作用、²²⁾ アルコール代謝促進作用²³⁾等を有することが報告されている。最近、肝臓水解物はアルコール投与後のマウス血清中アセトアルデヒド濃度の上昇を抑制することが報告された。²⁴⁾ 肝臓水解物は栄養補給のための滋養強壮薬の有効成分としても広く用いられている。また、各種の肝臓の酵素分解物が食品原料として用いられている。

さらに哺乳動物由来の肝臓水解物に抗脂質過酸化作用が認められること、²⁵⁾ 加水分解後に脱色、脱臭処理されたブタ由来の肝臓酵素分解物に抗酸化作用及びACE阻害作用が認められること²⁶⁾等が報告さ

れている。

そこで本研究では、医薬品に用いられている2種類のブタ肝臓水解物について、成分分析を行い、抗酸化作用及びACE阻害作用について検討した。さらに高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat; SHR ラット)を用いて、これらの肝臓水解物の血圧に及ぼす影響についても検討した。

材料と方法

1. 使用薬物 ブタ肝臓水解物(LH-I, LH-II)はゼリア新薬工業㈱より供与されたものを使用した。LH-I及びLH-IIは、異なる酵素処理法によって加水分解されたものである。

2. アミノ酸、ペプチド及びタンパク質の定量 遊離アミノ酸は、スルホサリチル酸で抽出後、アミノ酸自動分析法により分析した。トリプトファンは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。また、試料中の全窒素をケルダール法により測定し、これにタンパク質係数(6.25)を乗じた値をアミノ酸、ペプチド及びタンパク質の量とした。ペプチド及びタンパク質の量は、アミノ酸、ペプチド及びタンパク質の量から遊離アミノ酸の総和を差し引いた値とした。

3. 糖の定量 総糖はフェノール硫酸法により定量した。また、試料中の各々の糖(リボース、マンノース、アラビノース、ガラクトース、キシロース、グルコース、セルビオース、ラクトース、マルトース)は2-シアノアセトアミド誘導体化HPLCにより分析した。試料を加水分解せずに分析して得た結果を遊離糖、加水分解して分析して得た結果を結合型糖とし、両者を合算して個々の糖の含量とした。

4. 核酸塩基の定量 核酸塩基は試料を60%過塩素酸により分解後、HPLCにより分析した。

5. 無機物及び水分の定量 無機物は乾式灰化後、ナトリウムは原子吸光光度法により、その他の成分はICP発光分析法により測定した。遊離リンはホスファC-テストワコー(和光純薬工業㈱)を用いて定量した。水分は乾燥減量法により測定した。試料を105°Cで4時間乾燥し、その乾燥減量値(%)を水分とした。

6. ビタミンの定量 ビタミンA及びビタミンEはけん化後、ヘキササン及び酢酸エチルの混液

で抽出し、HPLCにより分析した。ビタミン B₁ 及びビタミン B₂ はタカジアスターゼで処理後、HPLCにより分析した。ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、ニコチン酸、パントテン酸及び葉酸は微生物定量法により分析した。ビタミン C はヒドラジン誘導体化後、HPLCにより分析した。

7. 脂質及びグルタチオンの定量 遊離脂肪酸は NEFA C-テストワコー (和光純薬工業株) を用いて定量した。結合型脂肪酸は試料中の脂質を抽出し、アルカリで加水分解した後、NEFA C-テストワコー (和光純薬工業株) を用いて定量した。コレステロールはコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業株) を、中性脂肪はトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業株) を、胆汁酸は総胆汁酸-テストワコー (和光純薬工業株) を用いて定量した。グルタチオンは OxisResearch™ BIOXYTECH® GSH-400 (Oxis International Inc.) を用いて定量した。

8. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の測定 分子量分布の測定はゲルろ過 HPLC により行った。TSK gel G2000SWXL カラム (7.8 mm I.D. × 30 cm) を LC-10AD 型の HPLC 装置 (株島津製作所) に接続し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 400 mM NaCl を溶出液として、流速 0.5 mL/min、注入量 20 μL で行った。測定中、溶出液は脱気装置 (DGU-14A, 株島津製作所) に通した。検出には紫外可視吸光度計検出器 (SPD-10AVP, 株島津製作所) を用い、波長 280 nm 及び 220 nm で検出した。分子量マーカーとして、ウシ血清アルブミン (68 KDa)、シトクローム C (12 KDa)、アプロチニン (6.5 KDa)、リボフラビン (376 Da) を使用した。

9. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定 DPPH ラジカル消去活性の測定は、DPPH 分光測定法²⁷⁾ に準じて行った。すなわち、400 μM DPPH, 2-morpholino-ethanesulphonic acid (MES) buffer, 20% エタノールを同量ずつ加え、混液を作製した。混液を 0.9 mL 分注し、80% エタノールを 240 μL と分析試料 (1 mg/mL) を 60 μL 加え、20 分間反応させた。その後、BioSpec-1600 型分光光度計 (株島津製作所, 吸光度 520 nm) にて測定した。また、サンプルの代わりに 0.2 mM Trolox (シグマ アルドリッチ ジャパン株) を使って測定し、サンプルの Trolox 相当量を検量線から

求めた。MES buffer は、MES 8.53 g を蒸留水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH 6.0 に調整したものを用いた。Trolox は、80% エタノールに溶解した。LH-I 及び LH-II のラジカル消去活性は、マイクロモル Trolox 相当量/g で表した。

10. ACE 阻害活性の測定 ACE 阻害活性の測定は、Cushman らの方法²⁸⁾ に準じて、ウサギ肺由来 ACE (シグマ アルドリッチ ジャパン株) 及びヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (hippuryl-L-histidyl-L-leucine; HHL, ナカライテスク株) を用いて測定した。すなわち、試料 6 μL に、60 mU/mL ACE 溶液 20 μL 及び 7.6 mM HHL 50 μL を添加し、37°C で 30 分間反応させた。ACE は、ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) で溶解し、HHL は塩化ナトリウム (和光純薬工業株), 0.25 M ホウ酸緩衝液を、それぞれ 0.608 M, 0.1 M になるように蒸留水を用いて調製した溶液で溶解した。その後、0.1 M 塩酸 0.554 mL を加えて反応を停止した。ついで、酢酸エチル (ナカライテスク株) 1.5 mL を加えて、ACE の作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し、2500 rpm (1000 × g), 15 分間の遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を 1 mL 分取し、加熱 (100°C, 10 分間) により、蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸は 1 M 塩化ナトリウム水溶液 1 mL に溶解し、BioSpec-1600 型分光光度計 (株島津製作所) により波長 228 nm の吸光度を測定した。阻害率は、試料の吸光度を S, 試料の代わりに蒸留水を加えて同様に反応させたときの吸光度を C, あらかじめ ACE の反応を停止させてから反応させたときの吸光度を B として次式により求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(C - S) / (C - B)\} \times 100$$

上式により求められる阻害活性が 50% を示すときの濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。

11. 実験動物 8 週齢雄性の SHR ラット (215 - 240 g) を日本チャールス・リバー株より購入し、1 週間予備飼育を行った。室温 23 ± 1°C, 相対湿度 50 ± 10%, 照明時間 12 時間/日の条件下で飼育し、水道水及び飼料 (CRF-1, 日本チャールス・リバー株) は自由摂取させた。本研究は、宮崎大学の動物実験委員会によって定められた宮崎大学動物実験規則に従い、承認を得た上で実施した。

12. 収縮期血圧の測定 コントロール群には蒸留水 (3 mL/匹) を、LH-I 投与群及び LH-II 投

与群には LH-I 及び LH-II をそれぞれ 1 g/3 mL/匹の用量で経口投与した。投与前、投与後 3, 6, 9 及び 24 時間後に、非観血式血圧測定装置 (BP-98A, 株式会社ソフトロン) を用いて尾動脈圧を測定した。なお、SHR ラットは、測定前に 15 分間保温 (37°C) した。

13. 統計学的解析 得られた実験値はすべて平均値±標準偏差 (mean±S.D.) で示した。同一個体で反復測定を行った測定値に対しては次の統計学的検討を行った。測定時間の要因に対応のある二要因の分散分析を行い、有意な測定時間×群の交互作用が認められた場合には、測定時間毎に 3 群について分散分析を行い比較した。さらに測定時間毎の分散分析に有意差が認められた場合には、Tukey の多重比較検定を行った。その他の測定値に対しては 2 群間の検定には Student の *t* 検定を行った。統計学的有意性は危険率 5% を基準として判定した。

結 果

1. LH-I 及び LH-II の一般成分分析 LH-I 及び LH-II の成分を分析した結果を Table 1 に示した。LH-I 及び LH-II のタンパク質含量はそれぞれ約 73.8% 及び 75.0% で、そのうち遊離アミノ酸が約 43.1% 及び 34.9%、ペプチドが約 30.6% 及び 40.1% であった。両肝臓水解物ともに遊離アミノ酸はロイシン、バリン、アラニンの構成比率が高く、シスチン、アルギニン、トリプトファンは比率は低かった。一方、LH-II のチロシン、メチオニンの構成比

率は LH-I と比較して低かった (Table 2)。また、総糖含量は約 3 及び 6% で、グルコース、リボースの構成比率が高く、特に LH-II でグルコースの構成比率が高かった (Tables 1 and 3)。総核酸塩基含量はともに約 1.4% であった (Tables 1 and 4)。無機物はともに約 3%、水分含量は約 4 及び 2% であ

Table 2. Content of Amino Acids in LH-I and LH-II

	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Ala	37.5	31.8
Arg	2.4	1.2
Asp	26.5	17.6
Cystine	N.D.	2.5
Glu	33.4	35.0
Gly	21.3	19.7
His	6.9	9.0
Ile	30.8	26.0
Leu	54.4	48.3
Lys	35.6	27.3
Met	11.0	0.6
Phe	25.3	23.7
Pro	26.4	18.8
Ser	27.2	22.5
Thr	25.0	22.4
Trp	5.8	7.0
Tyr	22.4	2.9
Val	39.2	32.6

N.D.: Not detected.

Table 1. Content of Constituents in LH-I and LH-II

	LH-I (%)	LH-II (%)
Total amino acids, peptides and protein	73.75	75.00
amino acid	(43.11)	(34.89)
peptides and protein	(30.64)	(40.11)
Total saccharides	3.4	5.7
Lipids	0.01	0.02
Total nucleic acid bases	1.38	1.35
Inorganic compounds	2.97	2.89
Moisture	4.42	2.08
Vitamins	0.07	0.10
Glutathione	N.D.	0.42

N.D.: Not detected.

Table 3. Content of Saccharides in LH-I and LH-II

	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Ribose	4.6	6.1
Mannose	0.8	1.3
Arabinose	N.D.	N.D.
Galactose	1.5	4.1
Xylose	N.D.	N.D.
Glucose	6.1	21.2
Cellobiose	N.D.	N.D.
Lactose	0.0	0.1
Maltose	N.D.	N.D.

N.D.: Not detected.

った (Tables 1 and 5). また, LH-I 及び LH-II は水溶性ビタミンを中心に微量のビタミンを含有していた (Tables 1 and 6). それらのビタミンの中ではビタミン B₂, ニコチン酸及びパントテン酸の含量が高かった (Table 6). 脂質は, 総胆汁酸が 0.01 及び 0.02% 検出されたが, それ以外の脂質は検出されなかった (Tables 1 and 7). グルタチオンは, LH-II に 0.42% 含まれており, LH-I では検出されなかった (Table 1).

ゲルろ過 HPLC により LH-I 及び LH-II の分子量分布を分析した結果を Fig. 1 に示した. LH-II は約 11 分にピークがあらわれ, LH-I にはない分子量 1.0×10^5 以上の成分の存在が認められたが, 両肝臓水解物のほとんどは, チロシンとトリプトファンの紫外吸収に由来する 280 nm の溶出パターンから分子量 600–6000 Da の間にピークを有していることが確認された. また, ペプチドの分析の際に使用される 220 nm の溶出パターンも 280 nm の溶出とほぼ同様のパターンを示した.

Table 4. Content of Total Nucleic Acid Bases in LH-I and LH-II

	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Adenine	0.5	0.3
Guanine	3.3	4.1
Cytosine	0.4	1.4
Thymine	1.1	1.1
Uracil	4.1	2.7
Xanthine	1.6	2.1
Hypoxanthine	2.8	1.8

Table 5. Content of Inorganic Compounds in LH-I and LH-II

	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Na	6.5	7.1
P	11.2	9.2
Fe	0.4	0.5
Ca	0.1	0.3
K	10.8	10.9
Mg	0.5	0.7
Zn	0.2	0.2

2. LH-I 及び LH-II の抗酸化活性 LH-I 及び LH-II の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果を Fig. 2 に示した. LH-I 及び LH-II の DPPH ラジカル消去活性は, それぞれ 55.6 及び 38.1 μM Trolox 相当量/g であった.

3. LH-I 及び LH-II の ACE 阻害活性 LH-I 及び LH-II の *in vitro* における ACE 阻害活性を測定し, IC₅₀ 値の算出を行った結果を Fig. 3 に示した. LH-I 及び LH-II の ACE 活性に対する IC₅₀ 値は, それぞれ 0.18 及び 0.31 mg/mL であり, LH-I の ACE 活性に対する IC₅₀ 値は, LH-II の IC₅₀ 値と比較し有意に高かった ($p < 0.05$).

4. LH-I 及び LH-II の SHR ラット血圧に及ぼす影響 LH-I 及び LH-II 単回投与における SHR ラット血圧に及ぼす影響を検討した結果を Fig. 4 に示した. 測定時間の要因に対応のある二要因の分散分析を行った結果, 有意な測定時間×群の交互作用

Table 6. Content of Vitamins in LH-I and LH-II

	LH-I ($\mu\text{g/g}$)	LH-II ($\mu\text{g/g}$)
Vitamin A	N.D.	N.D.
Vitamin B ₁	N.D.	6.6
Vitamin B ₂	60.6	74.2
Vitamin B ₆	5.1	14.5
Vitamin B ₁₂	0.13	0.19
Vitamin C	N.D.	N.D.
Vitamin E	N.D.	N.D.
Nicotine acid	568	692
Pantothenic acid	79	194
Folic acid	1.6	1.8

N.D.: Not detected.

Table 7. Content of Lipids in LH-I and LH-II

	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Free fatty acids	0.0	0.0
Bound fatty acids	0.0	0.0
Cholesterol	0.0	0.0
Triglyceride	N.D.	N.D.
Phospholipid	N.D.	N.D.
Total bile acid	0.14	0.15

N.D.: Not detected.

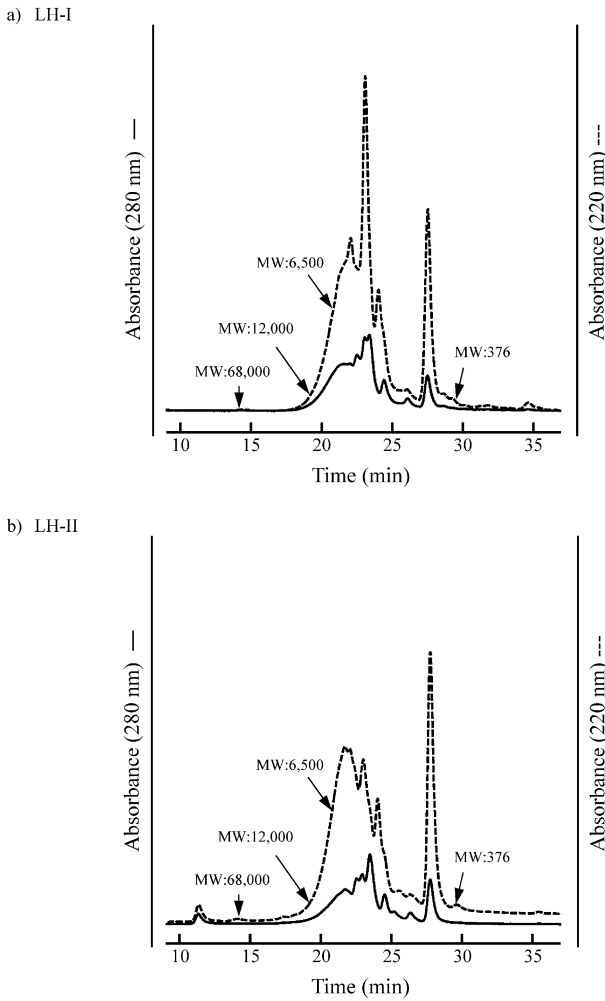


Fig. 1. Gel Filtration HPLC of LH-I (a) and LH-II (b)

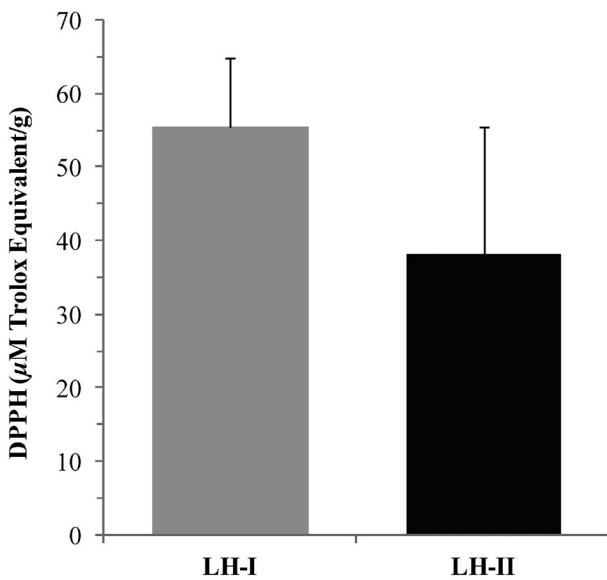


Fig. 2. Antioxidant Activity of LH-I and LH-II
Each column represents the mean ± S.D. of three experiments.

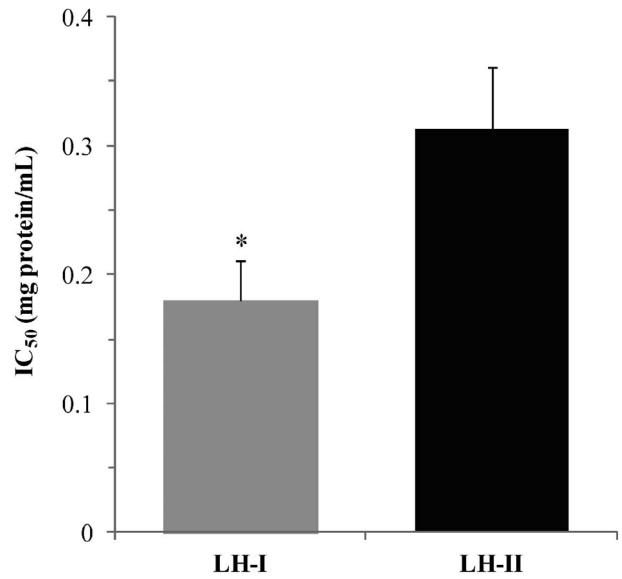


Fig. 3. ACE Inhibitory Activity of LH-I and LH-II
Each column represents the mean ± S.D. of three experiments. *: $p < 0.05$, significant difference from the LH-II group (Student's t test).

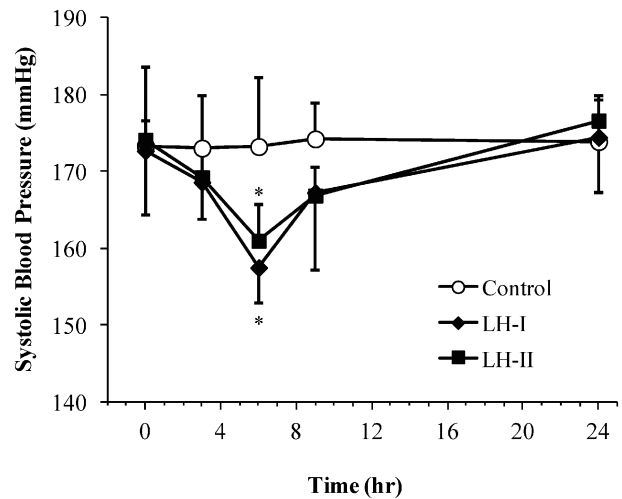


Fig. 4. Effects of LH-I and LH-II on Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats
Each point represents the mean ± S.D. ($n=4-8$). *: $p < 0.05$, significant difference from the control groups (post-hoc Tukey test after two way repeated-measures ANOVA).

用が認められた ($p < 0.05$). そのため、測定時間毎に分散分析を行った結果、投与6時間後において群間の有意差が認められた ($p < 0.05$). そこで投与6時間後の測定値について Tukey の多重比較検定を行った結果、LH-I 及び LH-II に、それぞれコントロール群に対する有意差が認められた ($p < 0.05$).

考 察

肝臓水解物は、哺乳類の新鮮な肝臓を酵素と熱処理によって加水分解したものである。ウシ、ブタ、シロナガスクジラ等の肝臓が用いられているが、その一般組成についてはシロナガスクジラの肝臓由来の肝臓水解物で一部報告²⁹⁾されているものの、ほとんど報告されていない。本研究では2種類のブタ肝臓水解物 LH-I 及び LH-II の一般成分分析を行った。

LH-I 及び LH-II はそれぞれ、ペプチドが約 30.6% 及び 40.1%、遊離アミノ酸が約 43.1% 及び 34.9% であり、ペプチド及び遊離アミノ酸の構成比率に違いがあった。これは、LH-I 及び LH-II が異なる酵素処理法によって加水分解されたことによるものである。遊離アミノ酸は、LH-I 及び LH-II ともにロイシン、バリン、アラニンの構成比率が高かった。一方、シロナガスクジラの肝臓由来の肝臓水解物では、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸の構成比率が高かったが、この違いは種差によるものと考えられる。総糖は約 3% 及び 6%、核酸塩基及び無機物はそれぞれともに約 1.4% 及び約 3%、水分は約 4% 及び 2% を含有していた。また、LH-I 及び LH-II ともに、ビタミンは水溶性ビタミンが微量含まれており、脂質はほとんど含まれていなかった。グルタチオンは LH-II のみに含まれていた。ゲルろ過 HPLC の結果から LH-I 及び LH-II は、含窒素成分のほとんどが分子量 6000 以下の低分子ペプチドあるいはアミノ酸であることが確認された。LH-I は分子量 2600 のペプチドが LH-II に比べ多く認められた。また、220 nm の溶出パターンは 280 nm の溶出パターンとほぼ同様のパターンを示したことから、両肝臓水解物のほとんどはペプチドから構成されていることが示唆された。一般にタンパク質は消化管からほとんど吸収されず、酵素等により分解されたペプチド及びアミノ酸が吸収され易く、さらにアミノ酸に比べペプチドの方がアミノ酸の吸収率が高いことが知られている。³⁰⁾ これらのことから、LH-I 及び LH-II はアミノ酸に加え、低分子のペプチドの含量が高く、アミノ酸の補給に有用であると考えられる。

高血圧、肥満、糖尿病、脂質異常症等は、生体の酸化ストレスを増大させることが明らかとなっており、酸化ストレスの増大が動脈硬化形成に重要な役

割を果たしていると考えられている。^{6,7)} 肝臓水解物は四塩化炭素投与によって誘起される肝障害を抑制することが報告されており、^{31,32)} その作用機序として肝臓水解物の抗酸化作用が酸化ストレスによる肝障害発症を抑制する機序が考えられている。

LH-I 及び LH-II についても DPPH ラジカル消去能を有し、抗酸化作用を有することが確認された。グルタチオンは抗酸化作用を有するペプチドとして広く知られている。LH-II はグルタチオンを含み、このペプチドが抗酸化作用の一部に寄与する可能性が考えられるが、LH-I にはグルタチオンが検出されなかった。これまでにグルタチオンを含有した肝臓水解物において、その抗脂質過酸化作用はグルタチオンのみでは説明できず、他の抗酸化性因子の関与が考えられることが報告されている。²⁵⁾ 近年、大豆、乳清、魚のゼラチン等の加水分解物から抗酸化活性を有するペプチドが見い出されている。⁸⁻¹⁰⁾ 以上のことから、LH-I 及び LH-II にはグルタチオン以外の抗酸化性のペプチドが含まれている可能性が考えられる。

LH-I 及び LH-II は ACE 阻害活性を有することが確認された。さらに SHR ラットを用いて LH-I 及び LH-II の血圧に対する作用を検討したところ、LH-I 及び LH-II 投与後とともに有意な血圧低下が認められた。トリの骨抽出物、¹¹⁾ ブタの骨格筋¹²⁻¹⁴⁾ やウシのゼラチン¹⁵⁾ 等の加水分解物より精製されたペプチドに ACE 阻害活性が見い出されている。LH-I 及び LH-II もまた、肝臓を加水分解した低分子ペプチド混合物であることから、LH-I 及び LH-II の ACE 阻害作用は、含有する活性ペプチドの作用によるものと考えられる。LH-I は、LH-II より高い ACE 阻害活性を有したが、これは LH-I に ACE 阻害活性の高いペプチドが多く含まれていたものと考えられる。ブタ骨格筋の加水分解物から得られた ACE 阻害活性 (IC₅₀ 値: 4.9-27.7 µg/mL) を有するペプチドは、10 mg/kg の経口投与により血圧の低下が認められている。¹²⁻¹⁴⁾ LH-I 及び LH-II の IC₅₀ 値は、ブタの骨格筋の加水分解物から得られたペプチドの約 1/7-1/64 ではあるが、LH-I 及び LH-II は約 4.2-4.7 g/kg に相当する高い用量を投与していることから、LH-I 及び LH-II に含有する ACE 阻害ペプチドによって血圧低下作用を示したものと考えられる。

肝疾患に対する肝臓水解物の臨床用量は、ヒトの体重を 60 kg とした場合、10 mg/kg *p.o.* である。一方、ラット部分肝切除モデル、²⁰⁾ ラットエタノール誘発行動障害モデル、²³⁾ マウス急性アルコール中毒モデル²⁴⁾等の動物試験における肝臓水解物の有効用量は 0.5–5 g/kg *p.o.* であり、げっ歯類とヒトとは種差があるものと考えられる。しかしながら、本研究で認められた LH-I 及び LH-II の血圧低下作用は非常に高用量で認められたものであり、肝臓水解物の服用により直ちに血圧が低下することを示す結果ではない。本研究の結果から、LH-I 及び LH-II を精製することにより高い ACE 阻害活性を有するペプチドの存在が示唆された。同様に、抗酸化作用を示すペプチドの存在も示唆されていることから、これらの活性成分あるいは肝臓水解物に加工を加えることにより、動脈硬化性疾患の発症・進展予防に寄与する可能性が考えられる。

以上、本研究では LH-I 及び LH-II の一般成分組成及び分子量分布を検討し、分子量 6000 以下の低分子ペプチドが多く含まれることを明らかにした。また、LH-I, LH-II ともに抗酸化活性及び ACE 阻害活性を有することが確認され、これらの作用への低分子ペプチドの関与が推察された。さらに、SHR ラットにおいて LH-I, LH-II はともに血圧低下作用を示した。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei10/index.html>, cited 15 May, 2011.
- 2) Nakamura T., Tsubono Y., Kameda-Takemura K., Funahashi T., Yamashita S., Hisamichi S., Kita T., Yamamura T., Matsuzawa Y., *Jpn. Circ. J.*, **65**, 11–17 (2001).
- 3) Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsén B., Lahti K., Nissén M., Taskinen M. R., Groop L., *Diabetes Care*, **24**, 683–689 (2001).
- 4) Nakanishi N., Takatorige T., Fukuda H., Shirai K., Li W., Okamoto M., Yoshida H., Matsuo Y., Suzuki K., Tatara K., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **64**, 59–70 (2004).
- 5) Lakka H. M., Laaksonen D. E., Lakka T. A., Niskanen L. K., Kumpusalo E., Tuomilehto J., Salonen J. T., *JAMA*, **288**, 2709–2716 (2002).
- 6) Keaney J. F. Jr., Larson M. G., Vasan R. S., Wilson P. W., Lipinska I., Corey D., Massaro J. M., Sutherland P., Vita J. A., Benjamin E. J., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 434–439 (2003).
- 7) Harrison D., Griendling K. K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H., *Am. J. Cardiol.*, **91**, 7A–11A (2003).
- 8) Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K., *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2619–2623 (1996).
- 9) Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 588–593 (2005).
- 10) Mendis E., Rajapakse N., Kim S. K., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 581–587 (2005).
- 11) Nakade K., Kamishima R., Inoue Y., Ahhmed A., Kawahara S., Nakayama T., Maruyama M., Numata M., Ohta K., Aoki T., Muguruma M., *Anim. Sci. J.*, **79**, 710–715 (2008).
- 12) Katayama K., Jamhari., Mori T., Kawahara S., Miake K., Kodama Y., Sugiyama M., Kawamura Y., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M., *J. Food Sci.*, **72**, S702–S706 (2007).
- 13) Katayama K., Anggraeni H. E., Mori T., Ahhmed A. M., Kawahara S., Sugiyama M., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 355–360 (2008).
- 14) Muguruma M., Ahhmed A. M., Katayama K., Kawahara S., Maruyama M., Nakamura T., *Food Chem.*, **114**, 516–522 (2009).
- 15) Herregods G., Camp J. V., Morel N., Ghesquie B., Gevaert K., Verduyck L., Dierckx S., Quanten E., Smagghe G., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 552–558 (2011).
- 16) Ahhmed A. M., Muguruma M., *Meat Sci.*, **86**, 110–118 (2010).
- 17) Sanbe K., Fujisawa K., Ueno Y., Kawada H., Okumura H., Iwamura K., Obata H., Hirayama C., Ota Y., Takino T., Suzuki H., Shikata T., Onoda T., *Rinsho to Kenkyu*, **55**, 2842–2853 (1978).
- 18) Fujisawa K., Suzuki H., Yamamoto S., Hirayama C., Shikata T., Sanbe K., *Kan Tan Sui*, **4**, 801–819 (1982).
- 19) Nakajima O., *J. New Remedies & Clinics*, **48**, 1618–1626 (1999).

- 20) Fukuda Y., Sawata M., Washizuka M., Higashino R., Fukuta Y., Tanaka Y., Takei M., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **114**, 233–238 (1999).
- 21) Nagai K., *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, **67**, 633–639 (1970).
- 22) Hirayama C., Kishikawa H., Kume T., Tada H., *Nissin Igaku*, **45**, 528–533 (1958).
- 23) Washizuka M., Hiraga Y., Furuichi H., Izumi J., Yoshinaga K., Abe T., Tanaka Y., Tamaki H., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **111**, 117–125 (1998).
- 24) Kishimoto R., Hasegawa E., Shirakawa Y., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **39**, 199–207 (2011).
- 25) Aimoto T., Hirata M., Hiraki Y., Dote C., Inoue N., Imai K., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 89–93 (1994).
- 26) Muguruma M., Nishi T., Okuno M., Yamashita M., Kawahara S., *Shokuniku ni kansuru Josei Kenkyū Chosa Seika Hokokusho*, **21**, 248–255 (2003).
- 27) Suda I., “Shokuhin Kino Kenkyū ho,” eds. by Shinohara K., Suzuki T., Uenokawa S., KORIN PUBLISHING Co., Ltd., Tokyo, 2000, pp. 218–223.
- 28) Cushman D. W., Cheung H. S., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637–1648 (1971).
- 29) Tachibana K., Aoki K., Kondo S., Fujimoto Y., Kabeno H., Kobayashi Y., *Oyo Yakuri*, **6**, 1523–1530 (1972).
- 30) Adibi S. A., *Gastroenterology*, **113**, 332–340 (1997).
- 31) Ozaki I., *Hokkaido Igaku Zasshi*, **36**, 394–415 (1961).
- 32) Yamazaki S., *Shinryo to Hoken*, **8**, 736–740 (1966).