

ブタ肝臓水解物の機能性に関する研究  
**(Studies on the Functionality of Porcine Liver  
Hydrolysate)**

井上尚典

2013

# 目 次

	Page
第1章 緒論	1
1. はじめに	1
2. 疾病予防と機能性成分	2
2-1. 抗酸化作用	2
2-2. 血圧低下作用	3
2-3. 血糖上昇抑制作用	5
3. 肝臓水解物	6
4. 本研究の目的	7
第2章 ブタ肝臓水解物の成分分析	8
緒言	8
実験材料と方法	8
1. 供試材料	8
2. アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の定量	9
3. 糖の定量	9
4. 核酸塩基の定量	10
5. 無機物および水分の定量	11
6. ビタミンの定量	11
7. 脂質およびグルタチオンの定量	12
8. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の測定	18
結果と考察	19
要約	29
第3章 ブタ肝臓水解物の抗酸化活性およびアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の検討	30
緒言	30
実験材料と方法	31
1. 供試材料	31
2. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定	31
3. ACE 阻害活性の測定	32
4. 実験動物	32
5. 収縮期血圧の測定	33

	Page
6. 統計学的解析	33
結果と考察	34
要約	40
第4章 メタボリックシンドロームモデルラット (SHR/NDmcr-cp) における肝臓水解物の血糖に及ぼす影響	41
緒言	41
実験材料と方法	42
1. 供試材料	42
2. 肝臓水解物の混餌飼料の調製方法	42
3. 実験動物	44
4. 肝臓水解物の投与プロトコル	44
5. 飼料摂取量および体重の測定	44
6. 収縮期血圧の測定	44
7. 空腹時血糖値の測定	45
8. 空腹時糖化ヘモグロビン (glycated hemoglobin A1c : HbA1c) 値の測定	45
9. 経口糖負荷試験における血糖値および血中インスリン値の測定	45
10. 血漿中のアンギオテンシン II (angiotensin II : AngII) 濃度の測定	46
11. 統計学的解析	48
結果と考察	49
要約	60
第5章 総括	61
SUMMARY	66
謝辞	70
参考文献	71

## 略号表

略号	英語	日本語
ACE	angiotensin converting enzyme	アンギオテンシン変換酵素
AngII	angiotensin II	アンギオテンシン II
ARB	angiotensin II receptor blocker	アンギオテンシン II 受容体拮抗薬
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラ ジル
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FISIC study	Fibrinolysis and insulin sensitivity in imidapril and candesartan	FISIC 研究
GLUT4	glucose transporter type 4	4 型グルコース輸送担体
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
HbA1c	glycated hemoglobin A1c	糖化ヘモグロビン A1c
HDL	high density lipoprotein	高密度リポタンパク質
HHL	hippuryl-L-hystidyl-L-leucine	ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシ ン
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration	50% 阻害濃度
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IPC	Inductively coupled plasma	誘導結合プラズマ
IRS-1	insulin receptor substrate 1	インスリンレセプター基質 1
JSH2009	—	高血圧治療ガイドライン 2009
LDL	low density lipoprotein	低密度リポタンパク質
LH	liver hydrolysate	肝臓水解物
MES	2-morpholino-etanesulphonic acid	2-モルホリノ-エタネスルホン酸
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)	ニコチンアミドアデニンジヌクレ オチド (リン酸)
PI3	phosphatidylinositol 3	ホスファチジルイノシトール 3
p.o.	per os	経口投与
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
SA-HRP	streptavidin-horseradish peroxidase	ストレプトアビジン-西洋ワサビ ペルオキシダーゼ
SHR	spontaneously hypertensive rat	高血圧自然発症ラット
SHR-cp	SHR/NDmcr-cp	—
TFA	trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸

# 第1章 緒論

## 1.はじめに

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（Ministry of Health, Labour and Welfare 2011）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高血圧、肥満、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（Nakamuraら 2001）。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（Isomaaら 2001）、新規に糖尿病を発症するリスクが約2～15倍（Nakanishiら 2004）、総死亡リスクは約2倍（Lakkaら 2002）となる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。

1984年から1986年に実施された文部省（現文部科学省）プロジェクト「食品機能の系統的解析と展開」において、食品には3つの機能（一次機能、二次機能および三次機能）があるという概念付けが行われた。一次機能は食品中の栄

養素が生体に対し短期的かつ長期的に果たす機能（生命維持機能）、二次機能は食品組織、食品成分が感覚に訴える機能（味覚臭覚応答機能）、三次機能は生命に対する食品の調節機能（生体防御、生体リズムの調節、老化抑制、疾患の防止、疾病の回復に係る機能）と概念付けられている。特に三次機能を有する食品は機能性食品と定義され、抗酸化、血圧調節、抗糖尿、抗肥満等、様々な食品の三次機能に関する研究が行われている（荒井ら 2007）。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。

## 2. 疾病予防と機能性成分

### 2-1. 抗酸化作用

生体細胞は、酸素を利用してミトコンドリアでエネルギー生成を行い、ミクロゾームでは薬物代謝、ホルモン代謝等を行っている。これらの酸化過程において酸素の一部が化学反応性の極めて強いスーパーオキシド等の活性酸素種（reactive oxygen species : ROS）になる。ROS の生成は、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生系ばかりでなく、アレルギーや炎症、殺菌過程における好中球やマクロファージの活性化に伴う NAD(P)H オキシダーゼあるいはミエロペルオキシダーゼの活性化（Fantone ら 1985）、虚血再灌流時におけるキサンチンオキシダーゼの活性化（McCord 1985）等によっても促進される。

酸化ストレスとは、生体における ROS の産生と抗酸化防御機構のバランスが崩れ、酸化に傾いた状態であり、ROS の過剰産生または抗酸化能力の低下が酸化ストレスを招くことになる。この ROS は反応性に富み、膜脂質や低密度リポタンパク（LDL）を過酸化して過酸化脂質や酸化 LDL を生成し、また、タンパク質や DNA と反応して酵素機能や遺伝情報伝達に傷害をもたらす。それゆえ、

酸化ストレスは、細胞・組織を傷害し、生体機能を障害することによって、心血管疾患（Madamanchi ら 2005）、癌（Halliwell 2007、Hwang 2007）等の様々な疾患の形成に関与するといわれている。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（Harrison 2003、Keaney ら 2003）。

このような ROS による障害に対して、生体には ROS を消去する防御機構が存在し、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素に加え、グルタチオン、アスコルビン酸、トコフェロール、 $\beta$ -カロテン、ポリフェノール類等の抗酸化物質が生体内の酸化防御機構として働いていることが知られている。

近年では、機能性食品の研究が盛んに行われており、大豆タンパク質、乳清タンパク質、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（Chen ら 1996、Hernández-Ledesma 2005、Mendis ら 2005）。

## 2-2. 血圧低下作用

高血圧治療ガイドライン 2009（JSH2009）によれば、収縮期圧が 130～139 mmHg、拡張期圧が 85～89 mmHg を正常高値血圧、収縮期圧が 140 mmHg 以上、拡張期圧が 90 mmHg 以上を高血圧と定義されており、平成 18 年国民健康・栄養調査（Ministry of Health, Labour and Welfare 2008）では正常高値血圧者は約 1,520 万人、高血圧症有病者は約 3,970 万人、合わせて約 5,490 万人と推定されている。また、JSH2009 では、肥満、糖尿値異常、脂質代謝異常等の危険因子

の有無により、脳心血管リスクの層別化が行われており、リスクの程度に応じて生活習慣指導や降圧薬治療等が行われている。

降圧薬としては、カルシウム拮抗薬、利尿薬、アンギオテンシン変換酵素（angiotensin converting enzyme : ACE）阻害薬、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬（angiotensin II receptor blocker : ARB）等が臨床現場で用いられている。

カルシウム拮抗薬は細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を阻害し、血管平滑筋を弛緩させることで、また、利尿薬は腎尿細管での  $Na^+$ 、水の再吸収を抑制して循環血液量を減少させることで降圧作用を示す。ACE はアンギオテンシン I から 2 個のアミノ酸を切断し、アンギオテンシン II (AngII) を生成する酵素である。また、ACE はキニナーゼ II と同一の酵素であり、ブラジキニンを不活性ペプチドに分解する。ACE 阻害薬は、主要な昇圧物質である AngII の産生と、降圧物質であるブラジキニンの分解を抑制することによって降圧させる。また、AngII はアルドステロンの分泌を刺激し、近位尿細管における  $Na^+$  再吸収や傍糸球体装置における尿細管糸球体フィードバックの感受性を亢進させるので、ACE 阻害薬による AngII の低下は  $Na^+$  利尿をもたらす。さらに AngII は交感神経終末からのノルエピネフリンや視床下部からのバソプレシン遊離促進、圧受容体反射の感受性亢進等の作用があり、その抑制が ACE 阻害薬の降圧機序に一部関与している。また、ブラジキニンの増加は一酸化窒素やプロスタグランジン類を産生することにより降圧機序に寄与している。ARB は AngII 受容体に特異的に結合し、AngII の薬理作用（血管収縮、体液貯留、交感神経亢進作用）を抑制することにより、降圧させる。

近年、食品由来の ACE 阻害ペプチドに関する研究が盛んに行われ、トリの骨抽出物 (Nakade ら 2008)、ブタの骨格筋 (Katayama ら 2007、Katayama ら 2008、

Muguruma ら 2009) やウシのゼラチン (Herregods ら 2011) 等の加水分解物から得られたペプチドが ACE 阻害活性を有することが報告されている。

## 2-3. 血糖上昇抑制作用

糖尿病は、インスリンの作用不足に基づく慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群であり、インスリンの作用不足は、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌の絶対的または相対的な低下とインスリンが作用する標的臓器 (組織、細胞) における作用の障害 (インスリン抵抗性) によってもたらされること (清野 2010) が知られている。近年、インスリン抵抗性とレニン-アンギオテンシン系との関連性について多くの臨床研究が行われており、降圧薬である ACE 阻害薬や ARB が糖尿病の新規発症を抑制することが報告されている (Hansson ら 1999、Yusuf ら 2000、Yusuf ら 2005)。また、インスリン抵抗性と AngII に関しても基礎的研究が多く行われており、AngII をイヌへ投与するとインスリン感受性が低下し血中インスリン濃度が代償的に増加すること (Richey 1999)、AngII をラットに慢性的に投与すると、ROS の産生増加を介して、骨格筋細胞や脂肪細胞による糖の取り込みが減少すること (Ogihara 2002)、高血圧とインスリン抵抗性を合併するトランスジェニックラット (TG (mREN2) 27) において、骨格筋組織の AngII 濃度の増加に伴いインスリン抵抗性が増加すること (Holness ら 1998、Kinnick ら 2002、Blendea ら 2005)、肥満を伴うインスリン抵抗性モデルである Zucker ラットにおいて、骨格筋におけるグルコース取り込みに対するインスリンの作用を ACE 阻害薬が増強すること (Henriksen 1999)、選択的 ARB の急性投与および慢性投与が、経口糖負荷試験における血中グルコースとインスリンの反応を改善し、さらに骨格筋におけるグルコース取り込みの増加、骨

格筋および心筋における GLUT4 の発現増加を引き起こすこと (Henriksen 2001) 等が報告されている。また、*in vitro* 試験においては、培養血管平滑筋細胞において、AngII はインスリンのシグナル伝達を IRS-1、PI3 キナーゼ、Akt 等の様々なレベルで抑制していることが報告されている (Folli ら 1997、Motley ら 2003)

このよう背景から、抗酸化活性および ACE 阻害活性を有するペプチドは、骨格筋細胞や脂肪細胞への糖の取り込みを増加させ、血糖上昇抑制作用を示す可能性が考えられる。

### 3. 肝臓水解物

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 (三辺ら 1978、藤沢ら 1982、中島ら 1999)。実験的にも肝再生促進作用 (福田ら 1999)、色素排泄の促進作用 (長井 1970)、抗肝線維化作用 (平山ら 1958)、アルコール代謝促進作用 (鷺塚ら 1998) 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 (岸本ら 2011)。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 (相本ら 1994)、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および ACE 阻害作用が認められること (六車ら 2003) 等が報告されている。

## 4. 本研究の目的

本論文では、肝臓疾患の治療薬や滋養強壮薬の医薬品原料として用いられている肝臓水解物の新規機能性について探究する目的で研究を行った。

まず、第2章では、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、アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質、糖、脂質、核酸塩基、無機質、ビタミン類、水分等の一般成分分析並びに分子量分布の測定を行った。

第3章では、2種類のブタ肝臓水解物の抗酸化作用および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単回投与の血圧に及ぼす影響についても検討した。

第4章では、メタボリックシンドローム様の異常を自然発症するモデル動物であるSHR/NDmcr-cp (SHR-cp)ラットを用いて、肝臓水解物12週投与の血糖に及ぼす影響について検討した。

## 第 2 章 ブタ肝臓水解物の成分分析

### 緒言

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ものであり、低分子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、ミネラル等を含む。肝臓水解物は、古くより、肝臓機能障害を起こした患者に肝臓の成分を補うことを目的とした肝臓疾患の治療薬として使用されている（三辺ら 1978、藤沢ら 1982、中島ら 1999）。肝臓水解物の作用として、肝再生促進作用（福田ら 1999）、色素排泄の促進作用（長井 1970）、抗肝線維化作用（平山ら 1958）、アルコール代謝促進作用（鷺塚ら 1998）等が実験的に明らかにされている。肝臓水解物は、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（橘ら 1972）されているものの、ほとんど報告されていない。

本章では医薬品原料として用いられている 2 種類のブタ肝臓水解物の一般成分分析を行った。

### 実験材料と方法

#### 1. 供試材料

ブタ肝臓水解物（LH-I、LH-II）はゼリア新薬工業株式会社より供与されたものを使用した。LH-I および 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、ペプチドおよ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、ペプチドおよびタンパク質の量とした。ペプチドおよびタンパク質の量は、アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の量から遊離アミノ酸量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 (Dubois ら 1956) により定量した。すなわち、試料 (糖として 10~80  $\mu\text{g}$ ) を容量 25 mL の Lewis-Benedict 管にとり、水 2.0 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。標準溶液は 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のグルコース溶液を用いた。試料溶液および標準溶液に 5% フェノール 1.0 mL、次いで濃硫酸 5.0 mL を加え、冷水中で 30 分間冷却した後、ブランク試料を対照とし、波長 490 nm における吸光度を測定した。グルコースの検量線は 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで直線的であった。

試料中の単糖 (リボース、マンノース、アラビノース、ガラクトース、キシロースおよびグルコース) および二糖 (セロビオース、ラクトースおよびマルトース) は、2-シアノアセトアミドを用いたポストカラム誘導体化蛍光検出 HPLC 法により分析した (Honda ら 1981、Sakai ら 2007)。試料の水溶液を分析して遊離糖を、トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて 100°C、2 時間加水分解して (Anumula 1994) 結合型糖を測定し、両者を合わせ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。ポンプは LC-10Advp または LC-20AD（株式会社島津製作所）を、検出器は紫外可視吸光度計検出器（SPD-10AVvp または SPD-20AV、株式会社島津製作所）を使用した。

アデニンおよびグアニンの測定には、カラムは CAPCELL PAK C18（ $\phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm、株式会社資生堂）を使用し、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。移動相には、0.1 w/v%ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有 8.5 mmol/L リン酸およびメタノールの混液（95：5）を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。

シトシンの測定には、カラムは Asahipak GS-320 7E（ $\phi$ 7.6 mm $\times$ 250 mm、昭和電気株式会社）を使用し、カラム温度は 30 $^{\circ}$ C とした。移動相には、pH 5.0 に調整した 200 mmol/L リン酸緩衝液を使用し、流速は 0.8 mL/min とした。

チミンおよびウラシルの測定には、カラムは Shodex RSpak KC-811（ $\phi$ 8 mm $\times$ 300 mm、昭和電気株式会社）を使用し、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。移動相には、3 mmol/L 過塩素酸を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。

キサンチンおよびヒポキサンチンの測定には、カラムは Asahipak GS-320 7E（ $\phi$ 7.6 mm $\times$ 250 mm、昭和電気株式会社）を使用し、カラム温度は 30 $^{\circ}$ C とした。移動相には、pH 3.1 に調整した 200 mmol/L リン酸緩衝液を使用し、流速は 0.7 mL/min とした。

上記の核酸塩基は、全て波長 260 nm で検出し、自動積分法によりピーク面積を測定した。

## 5. 無機物および水分の定量

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、鉄、カルシウム、カリウム、マグネシウム、亜鉛は誘導結合プラズマ（ICP）発光分析法により測定した。また、遊離リンはホスファ C-テストワコー（和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品）を用いて定量した（Drewes 1972）。すなわち、ホスファ C-テストワコーの測定キットに含まれている標準液リン酸 31.6 mg/100 mL（無機リン 10 mg/100 mL 相当）を水で希釈して調製し、標準溶液とした。試料約 0.1 g を精密に量り、水を加えて溶解し、正確に 10 mL とし、試料溶液とした。ただし、試料が水に溶解しない場合には、水 5 mL を加え、超音波を用いて均一に分散させた後、水を加えて正確に 10 mL とした。この液を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過した。初めのろ液 2 mL を除き、次のろ液を試料溶液とした。標準溶液および試料溶液 25  $\mu\text{L}$  ずつを量り、それぞれに発色試液 2 mL を正確に加え、よく振り混ぜた後、37°C で 20 分間加温し、直ちに流水で冷却した。これらの液につき、水 25  $\mu\text{L}$  を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 750 nm における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当する無機リンの量を求めた。

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 およびビタミン E はけん化後、ヘキサンおよ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 B<sub>1</sub> およびビタミン B<sub>2</sub> 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 B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、ニコチン酸、パントテン酸およ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. 脂質およびグルタチオンの定量

### (1) 遊離脂肪酸および結合型脂肪酸の定量

遊離脂肪酸は NEFA C-テストワコー（和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品）を用いて定量した（Shimizu ら 1979）。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-テストワコーを用いて定量した。すなわち、NEFA C-テストワコーの測定キットに含まれている標準液オレイン酸 1 mEq/L (282.5 mg/1,000 mL) を水で希釈して調製し、標準溶液とした。試料約 50 mg を精密に量り、エタノール (99.5%) を加えて正確に 10 mL とした。この液を孔径 0.45 μm 以下のメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液を遊離脂肪酸測定用の試料溶液とした。総脂肪酸測定用の試料溶液は以下のように調製した。試料約 0.5 g を精密に量り、クロロホルム・メタノール混液 (2:1, v/v) 25 mL を加えた後、0.5% 塩化ナトリウム 10 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜた。下層を分取し、上層にクロロホルム 20 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜた後、下層を分取した。同様の操作を繰り返した後、全クロロホルム層を集め、これに 0.5% 塩化ナトリウム 15 mL を加えて激しく振り混ぜた。クロロホルム層は窒素気流下、蒸発乾固し、残留物に 0.5 mol/L エタノール性水酸化カリウム溶液 7 mL を加えて溶解し、この液を 100°C で 60 分間加熱した。室温に戻した後、水 10 mL およびヘキサン 25 mL を加えて激しく振り混ぜた。上層を取り除いた後、6M 塩

酸 2 mL を加えた。この液にヘキサン 25 mL を加えて激しく振り混ぜた後、上層を分取した。同様の操作を 2 回繰り返した後、全ヘキサン層を集め、窒素気流下、蒸発乾固した。残留物にエタノール (99.5%) を加えて溶解し、正確に 10 mL とし、総脂肪酸測定を試料溶液とした。必要に応じて、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液を総脂肪酸測定を試料溶液とした。

標準溶液および試料溶液 50  $\mu\text{L}$  ずつを正確に量り、それぞれに発色試液 A を 1 mL 正確に加え、よく振り混ぜた後、37°C で 10 分間加温した。この液に発色試液 B を 2 mL 正確に加え、振り混ぜた後、37°C で 10 分間加温し、直ちに流水で冷却した。これらの液につき、水 50  $\mu\text{L}$  を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 550 nm における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。吸光度の測定は、反応終了後 30 分以内に行った。それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当するオレイン酸の濃度を求めた。結合型脂肪酸の量は、総脂肪酸量から遊離脂肪酸量を差し引いた値とした。

## (2) コレステロールの定量

コレステロールはコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品) を用いて定量した (Allain ら 1974、Richmond 1973)。すなわち、コレステロール E-テストワコーの測定キットに含まれている標準液をエタノール (99.5%) で希釈して調製し、標準溶液とした。試料約 0.5 g を精密に量り、0.5% 塩化ナトリウム 10 mL を加えて溶解した。試料が溶解しない場合は、超音波を用いて均一に分散させた。この液にクロロホルム・メタノール混液 (2:1、

v/v) 25 mL を加え、5 分間激しく振り混ぜた後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。下層を分取し、上層にクロロホルム 20 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜた後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、下層を分取した。同様の操作を繰り返した後、全クロロホルム層を集め、これに 0.5% 塩化ナトリウム 15 mL を加えて激しく振り混ぜた。クロロホルム層を分取し、蒸発乾固した。残留物をエタノール (99.5%) 10 mL に溶解し、試料溶液とした。標準溶液 10  $\mu$ L およびエタノール (99.5%) 90  $\mu$ L を正確に量り、発色試液 1.5 mL を正確に加え、よく振り混ぜた後、37°C で 5 分間加温した。別に試料溶液 100  $\mu$ L を正確に量り、発色試液 1.5 mL を正確に加え、以下標準溶液と同様に操作した。これらの液につき、エタノール (99.5%) 100  $\mu$ L を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 600 nm における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当するコレステロールの濃度を求めた。

### (3) 中性脂肪の定量

中性脂肪はトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品) を用いて定量した (Spayd ら 1978)。すなわち、トリグリセライド E-テストワコーの測定キットに含まれている基準液グリセリン 0.312 mg/mL (トリオレイン 3 mg/mL 相当) を水で希釈して調製し、標準溶液とした。試料約 0.2 g を精密に量り、水を加えて溶解し、正確に 10 mL とし、試料溶液とした。ただし、試料が水に溶解しない場合には、水 5 mL を加え、超音波を用いて均一に分散させた後、水を加えて正確に 10 mL とし、試料溶液とした。標準溶液お

よび試料溶液 20  $\mu\text{L}$  ずつを正確に量り、それぞれに発色試液 3 mL を正確に加え、よく振り混ぜた後、37°C で 5 分間加温した。冷後、必要に応じて、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過した。これらの液につき、水 20  $\mu\text{L}$  を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 600 nm における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当するトリオレインの濃度を求めた。

#### (4) リン脂質の定量

リン脂質はリン脂質 C-テストワコー（和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品）を用いて定量した（Takayama ら 1977）。すなわち、リン脂質 C-テストワコーの測定キットに含まれている基準液塩化コリン 54 mg/100 mL（リン脂質 300 mg/100 mL 相当）を水で希釈して調製し、標準溶液とした。試料約 0.1 g を精密に量り、水を加えて溶解し、正確に 10 mL とし、試料溶液とした。ただし、試料が水に溶解しない場合には、水 5 mL を加え、超音波を用いて均一に分散させた後、水を加えて正確に 10 mL とした。この液を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過した。初めのろ液 2 mL を除き、次のろ液を試料溶液とした。標準溶液および試料溶液 20  $\mu\text{L}$  ずつを量り、それぞれに発色試液 3 mL を正確に加え、よく振り混ぜた後、37°C で 5 分間加温した。これらの液につき、水 20  $\mu\text{L}$  を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 600 nm における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。それぞれの標準溶液に対応する吸

光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当する塩化コリンの量を求めた。

#### (5) 胆汁酸の定量

胆汁酸は総胆汁酸-テストワコー（和光純薬工業株式会社、体外診断用医薬品）を用いて定量した（Mashige ら 1981）。すなわち、総胆汁酸-テストワコーの測定キットに含まれている標準液を用いた。なお、検量線を作成する場合にはこの標準液グリココール酸  $50 \mu\text{mol/L}$  を水で適宜希釈して用いた。試料約  $0.2 \text{ g}$  を精密に量り、 $\text{pH } 4.5$  の酢酸・酢酸カリウム緩衝液 ( $0.1 \text{ mol/L}$ ) / メタノール混液 (3:2, v/v) を加えて溶解し、正確に  $20 \text{ mL}$  とした。この液  $5 \text{ mL}$  を正確に量り、Sep-Pak C18 プラスカートリッジ（日本ウォーターズ株式会社）に添加し、 $\text{pH } 4.5$  の酢酸・酢酸カリウム緩衝液 ( $0.1 \text{ mol/L}$ ) / メタノール混液 (3:2, v/v)  $5 \text{ mL}$  で3回洗浄した後、90%アセトニトリル  $5 \text{ mL}$  で溶出した。溶出液を減圧で蒸発乾固した後、残留物に水  $1 \text{ mL}$  を加えて試料溶液とした。必要に応じて、孔径  $0.45 \mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液を試料溶液とした。標準溶液および試料溶液  $0.2 \text{ mL}$  ずつを正確に量り、それぞれに酵素液  $0.1 \text{ mL}$  を正確に加え、よく振り混ぜた後、 $37^\circ\text{C}$  で加温した。加温開始から正確に  $10$  分後に反応停止液  $0.5 \text{ mL}$  を正確に加え、振り混ぜた。これらの液につき、水  $0.2 \text{ mL}$  を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長  $560 \text{ nm}$  における吸光度  $A_S$  および  $A_T$  を測定した。標準溶液および試料溶液  $0.2 \text{ mL}$  ずつを正確に量り、それぞれに盲検用酵素液  $0.1 \text{ mL}$  を正確に加え、よく振り混ぜた後、 $37^\circ\text{C}$  で加温した。加温開始から正確に  $10$  分後に反応停止液  $0.5 \text{ mL}$  を正確に加え、振り混

ぜた。これらの液につき、水 0.2 mL を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 560 nm における吸光度  $A_{SBI}$  および  $A_{TBI}$  を測定した。それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T - A_{TBI}$  に相当するグリココール酸の量を求めた。

#### (6) グルタチオンの定量

グルタチオンは OxisResearch™ BIOXYTECH® GSH-400 (Oxis International Inc.) を用いて定量した。すなわち、還元型グルタチオン（和光純薬工業株式会社、試薬特級）約 15.37 mg を精密に量り、5%メタリン酸を加えて溶解し、正確に 100 mL とし標準原液とした。なお、検量線を作成する場合には、この液を 5%メタリン酸で適宜希釈して用いた。試料約 0.1 g を精密に量り、5%メタリン酸を加えて溶解し、正確に 10 mL とし、試料溶液とした。必要に応じて、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液を試料溶液とした。標準溶液および試料溶液 0.2 mL ずつを正確に量り、それぞれに緩衝液 1.8 mL および発色液 0.1 mL を正確に加え、よく振り混ぜた後、30%水酸化ナトリウム溶液 0.1 mL を正確に加え、よく振り混ぜた。この液を  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  で 10 分間加温した。これらの液につき、以下のように調製した液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行った。緩衝液 1.8 mL に発色液 0.1 mL、次いで 30%水酸化ナトリウム溶液 0.1 mL を加え、攪拌した後、 $25 \pm 3^\circ\text{C}$  で 10 分間加温し、測定直前に相当する試料溶液 0.2 mL を加えた液を対照とした。標準溶液および試料溶液から得たそれぞれの液の波長 400 nm および 560 nm における吸光度  $A_{400}$  および  $A_{560}$  を測定し、吸光度  $A_T (A_{400} - A_{560})$  を計算した。それぞれの標準溶液に対応す

る吸光度から検量線を作成し、その回帰式より吸光度  $A_T$  に相当する還元型グルタチオンの量を求めた。

#### 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、東ソー株式会社) を LC-10AD 型の HPLC 装置 (株式会社島津製作所) に接続し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 400 mM 塩化ナトリウムを溶出液として、流速 0.5 mL/min、注入量 20  $\mu$ L で行った。測定中、溶出液は脱気装置 (DGU-14A、株式会社島津製作所) に通した。検出には紫外可視吸光度計検出器 (SPD-10AVP、株式会社島津製作所) を用い、波長 280 nm および 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。

## 結果と考察

LH-IおよびLH-IIの成分を分析した結果をTable 1に示した。LH-IおよびLH-IIのタンパク質含量はそれぞれ約73.8%および75.0%で、そのうち遊離アミノ酸が約43.1%および34.9%、ペプチドが約30.6%および40.1%であり、ペプチドおよび遊離アミノ酸の構成比率に違いがあった。これは、LH-Iおよび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。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)。一方、シロナガスクジラの肝臓由来の肝臓水解物 (橘ら 1972) 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く、アルギニン、メチオニン、チロシンの構成比率が低かったが、この違いは種差によるものと考えられる。また、総糖含量は約3%および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 (Table 1 および Table 3)。総核酸塩基含量はともに約1.4%であった (Table 1 および Table 4)。無機物はともに約3%、水分含量は約4%および2%であった (Table 1 および Table 5)。また、LH-Iおよび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 (Table 1 および Table 6)。それらのビタミンの中ではビタミンB<sub>2</sub>、ニコチン酸およ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%および0.02%検出されたが、それ以外の脂質は検出されなかった (Table 1 および Table 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 および LH-II の分子量分布を分析した結果を Figure 1 に示した。LH-II は約 11 分にピークが現れ、LH-I には無い分子量 10×

10<sup>4</sup>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 600～6,000 Da の間にピークを有していることが確認され、LH-I および LH-II の含窒素成分のほとんどが分子量 6,000 Da 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 2,600 Da のペプチドが LH-II に比べ多く認められた。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およびアミノ酸が吸収されやすく、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 (Adibi 1997)。これらのことから、LH-I および 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。

以上、本研究では LH-I および LH-II の一般成分組成および分子量分布を検討し、分子量 6,000 Da 以下の低分子ペプチドが多く含まれることが明らかになった。

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

Component	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)
(Glutathione)	N.D.	0.42
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

N.D. : Not detected

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

Amino Acids	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 3. Content of Saccharides in LH-I and LH-II**

Saccharides	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

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

Nucleic Acid Bases	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**

Inorganic Compounds	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

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

Vitamins	LH-I ( $\mu\text{g/g}$ )	LH-II ( $\mu\text{g/g}$ )
Vitamin A	N.D.	N.D.
Vitamin B <sub>1</sub>	N.D.	6.6
Vitamin B <sub>2</sub>	60.6	74.2
Vitamin B <sub>6</sub>	5.1	14.5
Vitamin B <sub>12</sub>	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

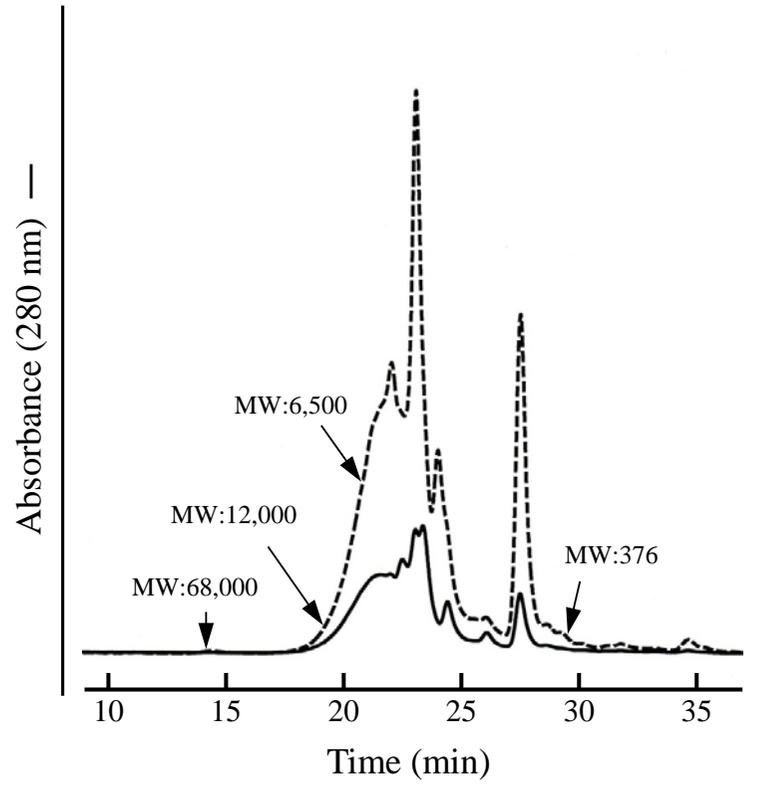
N.D. : Not detected

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

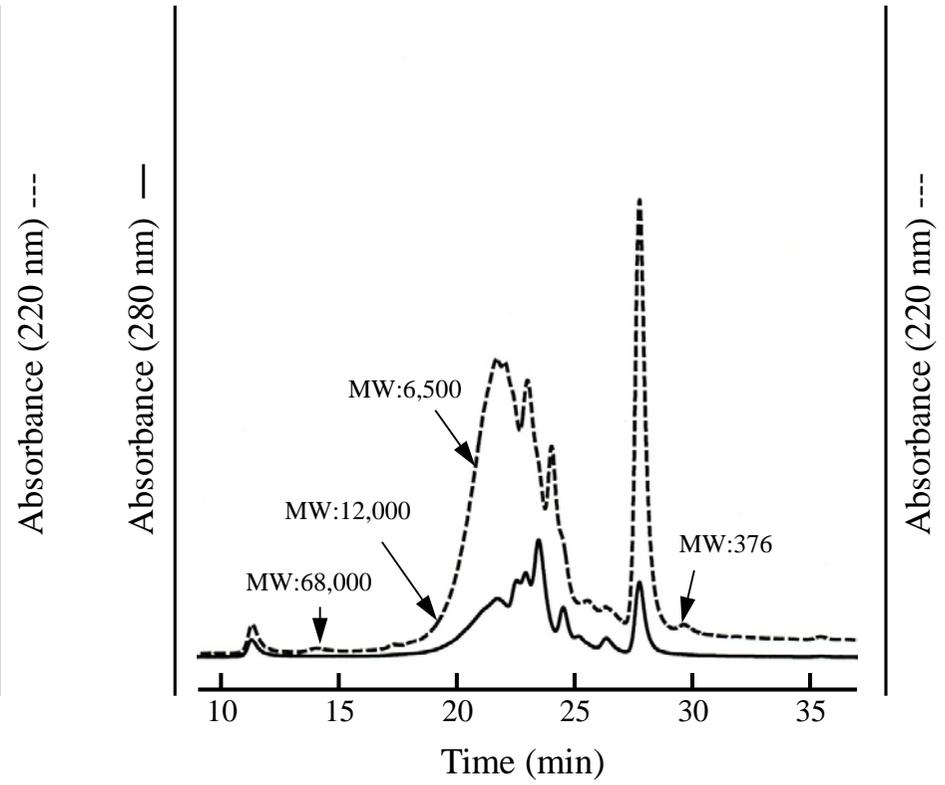
Lipids	LH-I (mg/g)	LH-II (mg/g)
Free Fatty Acids	0.0	0.0
Bound Fatty Acids	0.0	0.0
Cholesterol	0.0	0.0
Triglyceride	N.D.	N.D.
Phospholipid	N.D.	N.D.
Total Bile Acid	0.14	0.15

N.D. : Not detected

(a)



(b)



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

## 要約

本章では医薬品に用いられている 2 種類のブタ肝臓水解物 LH-I および LH-II の一般成分分析を行った。その結果、LH-I および LH-II のタンパク質含量はそれぞれ約 73.8% および 75.0% であり、そのうち遊離アミノ酸が約 43.1% および 34.9%、ペプチドが約 30.6% および 40.1% であることが明らかとなった。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、トリプトファンの比率は低く、類似していた。総糖含量は約 3% および 6% で、総核酸塩基含量はともに約 1.4%、無機物はともに約 3%、水分含量は約 4% および 2% であった。LH-I および 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。脂質は、総胆汁酸が 0.01% および 0.02% 検出されたのみであり、それ以外の脂質は検出されなかった。抗酸化活性を有するグルタチオンは、LH-II に 0.42% 含まれており、LH-I では検出されなかった。また、ゲルろ過 HPLC により LH-I および LH-II の構成ペプチドの分子量分布を分析した結果を両肝臓水解物は分子量約 6,000 Da 以下のペプチドを多く含有していることが明らかとなった。

### 第3章 ブタ肝臓水解物の抗酸化活性およびアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性の検討

#### 緒言

近年、大豆タンパク質、乳清タンパク質、魚のゼラチン等の加水分解物から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（Chen ら 1996、Hernández-Ledesma 2005、Mendis ら 2005）。酸化ストレスは、細胞・組織を傷害し、生体機能を障害することによって、心血管疾患（Madamanchi ら 2005）、癌（Halliwell 2007、Hwang 2007）等の様々な疾患の形成に関与する。また、高血圧、肥満、糖尿病、脂質異常症等の生活習慣病によって酸化ストレスが増大し、動脈硬化形成に重要な役割を果たしている（Harrison 2003、Keaney ら 2003）と考えられており、抗酸化活性を有するペプチドは、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。

ACE はアンギオテンシン I から 2 個のアミノ酸を切断する酵素であり、血圧を上昇させる作用を有する物質として知られている AngII を生成する。ACE 阻害活性を有するペプチドは、AngII 生成を抑制し血圧上昇の抑制が期待されている。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 ACE 阻害活性を有することが報告されており（Katayama ら 2007、Katayama ら 2008、Nakade ら 2008、Muguruma ら 2009、Ahhmed ら 2010、Herregods ら 2011）、様々な食品に由来するタンパク質の加水分解物から新規機能性ペプチドが見い出されている。

第2章での検討において明らかにしたように、肝臓を加水分解した LH-I および LH-II もまた、低分子ペプチドを多く含む物質であることから、抗酸化活性

および ACE 阻害活性を有するペプチドを含有している可能性が考えられる。

そこで本章では、低分子ペプチドを多く含む LH-I および LH-II の抗酸化作用および ACE 阻害作用について検討した。さらに 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。

## 実験材料と方法

### 1. 供試材料

ブタ肝臓水解物 (LH-I、LH-II) はゼリア新薬工業株式会社より供与されたものを使用した。LH-I および 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. 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 (須田ら 2001) に準じて行った。すなわち、400  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{L}$  と分析試料 (1 mg/mL) を 60  $\mu\text{L}$  加え、20 分間反応させた。その後、BioSpec-1600 型分光光度計 (株式会社島津製作所、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 ジャパン株式会社) 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 に調整したものをを用いた。Trolox は、80%エタノールに溶解した。LH-I および LH-II のラジカル消去活性は、 $\mu\text{M}$  Trolox 相当量/g で表した。

### 3. ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性の測定は、Cushman ら (1971) の方法に準じて、ウサギ肺由来 ACE (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社) およびヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (hippuryl-L-hystidyl-L-leucine : HHL、ナカライテスク株式会社) を用いて測定した。すなわち、試料 6  $\mu$ L に、60 mU/mL ACE 溶液 20  $\mu$ L および 7.6 mM HHL 50  $\mu$ L 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 (和光純薬工業株式会社)、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 (ナカライテスク株式会社) 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、2,500 rpm (1,000 $\times$ 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 (株式会社島津製作所) 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時の吸光度を C、あらかじめ ACE の反応を停止させてから反応させた時の吸光度を 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%を示す時の濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を算出した。

### 4. 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・リバー株式会社より購入し、1 週間予備飼育を行った。室温 23 $\pm$ 1°C、相対湿度 50 $\pm$ 10%、照明時

間 12 時間/日の条件下で飼育し、水道水および飼料（CRF-1、日本チャールス・リバー株式会社）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。

## 5. 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 投与群および LH-II 投与群には LH-I および 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 および 24 時間後に、非観血式血圧測定装置（BP-98A、株式会社ソフロン）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。

## 6. 統計学的解析

得られた実験値は全て平均値 ± 標準偏差で示した。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。測定時間と処理について対応のある二要因の分散分析を行い、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。

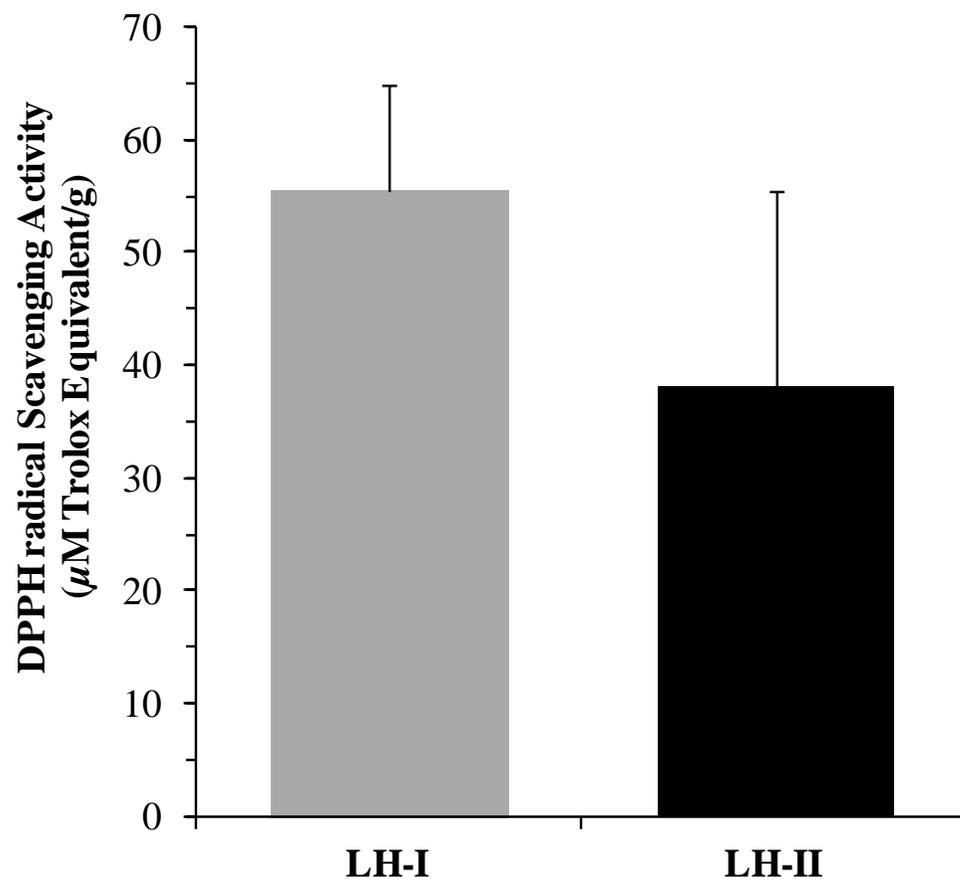
## 結果と考察

LH-I および LH-II の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果を Figure 2 に示した。LH-I および LH-II の DPPH ラジカル消去活性は、それぞれ 55.6 および 38.1  $\mu\text{M}$  Trolox 相当量/g であった。LH-I および LH-II は、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（相本ら 1994）。近年、大豆タンパク質、乳清タンパク質、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（Chen ら 1996、Hernández-Ledesma 2005、Mendis ら 2005）。

以上のことから、LH-I および 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。

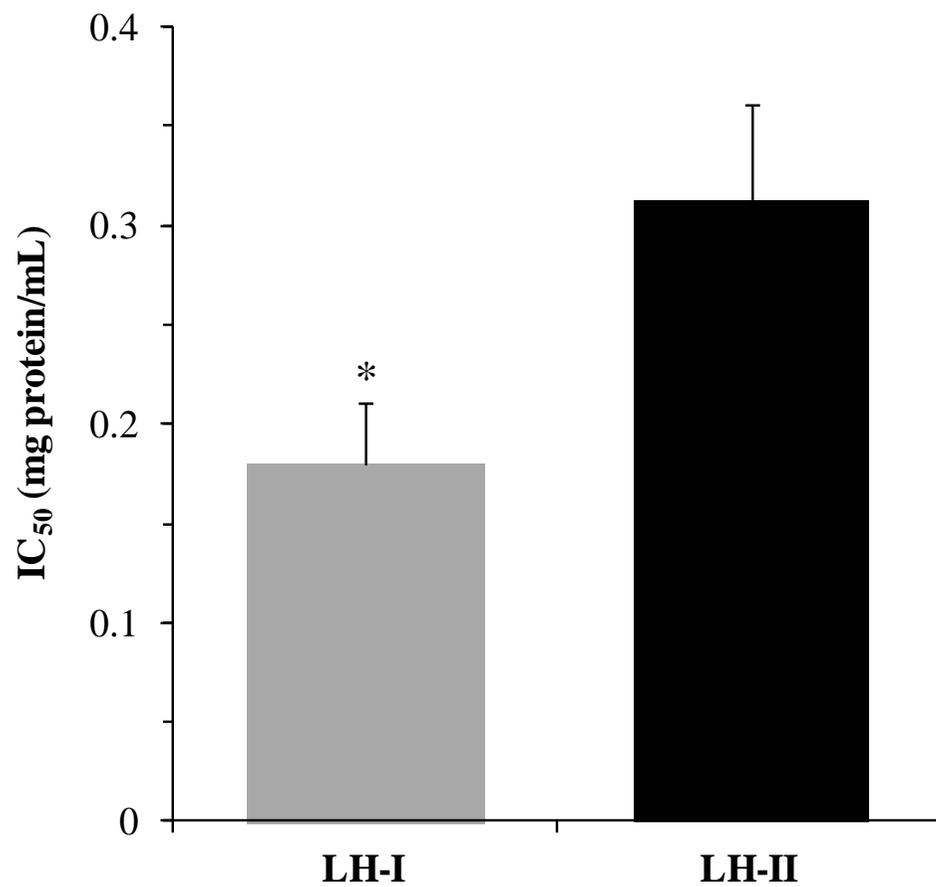
LH-I および LH-II の *in vitro* における ACE 阻害活性を測定し、 $\text{IC}_{50}$  値の算出を行った結果を Figure 3 に示した。LH-I および LH-II の ACE 活性に対する  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 0.18 および 0.31 mg/mL であり、LH-I の ACE 活性に対する  $\text{IC}_{50}$  値は、LH-II の  $\text{IC}_{50}$  値と比較し有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

LH-I および LH-II 単回投与における SHR ラットの血圧に及ぼす影響を検討した結果を Figure 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×処理の交互作用が認められた ( $p < 0.05$ )。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



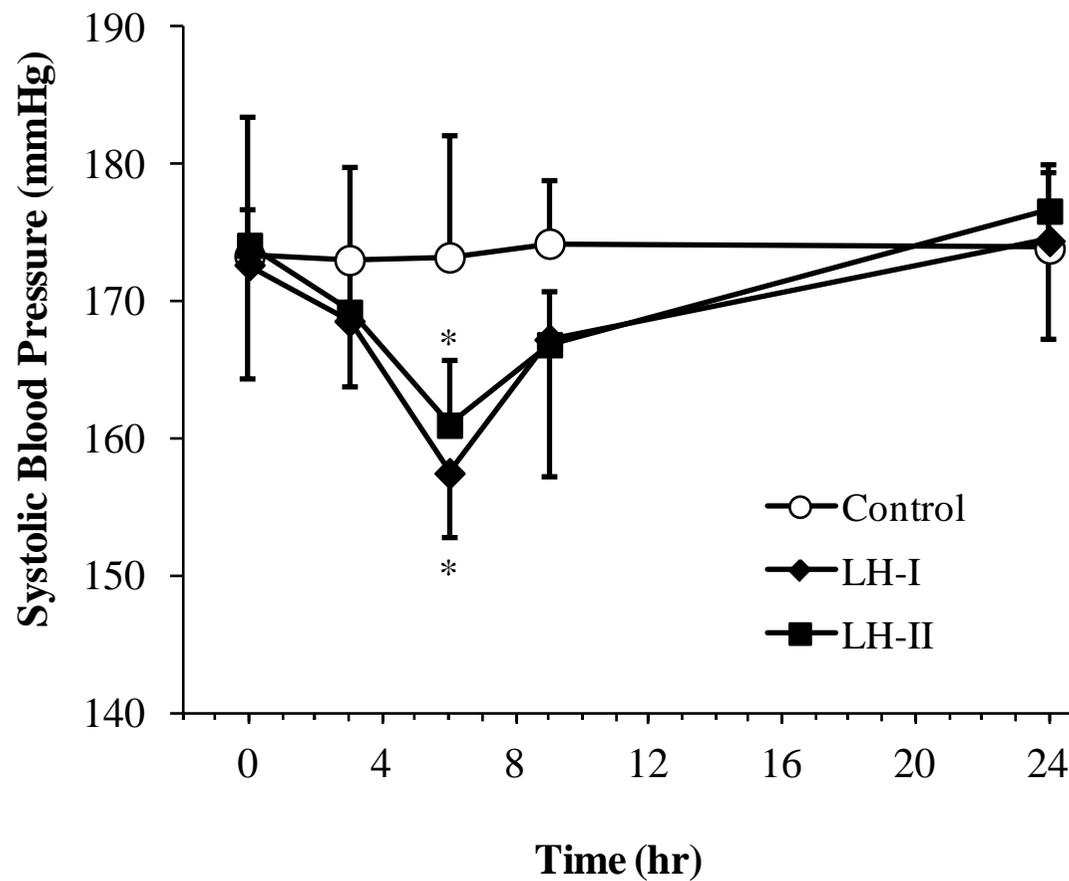
**Figure 2. Antioxidant Activity of LH-I and LH-II**

Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.



**Figure 3. ACE Inhibitory Activity of LH-I and LH-II**

Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \*  $p < 0.05$ , significant difference from the LH-II group (Student's  $t$ -test).



**Figure 4. Effects of LH-I and LH-II on Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats.**

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n=4~8). \*  $p < 0.05$ , significant difference from the control groups (post-hoc Tukey test after two way repeated- measures ANOVA).

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 および 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 ( $p<0.05$ )。

LH-I および LH-II は ACE 阻害活性を有することが確認され、さらに SHR ラットを用いて LH-I および LH-II の血圧に対する作用を検討したところ、LH-I および LH-II 投与後にともに有意に血圧低下させることが確認された。トリの骨抽出物 (Nakade ら 2008)、ブタの骨格筋 (Katayama ら 2007、Katayama ら 2008、Muguruma ら 2009) やウシのゼラチン (Herregods ら 2011) 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 および 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 および 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 ( $IC_{50}$  値 :  $4.9\sim 27.7 \mu\text{g/mL}$ ) を有するペプチドは、 $10 \text{ mg/kg}$  の経口投与により血圧の低下が認められている (Katayama ら 2007、Katayama ら 2008、Muguruma ら 2009)。LH-I および LH-II の  $IC_{50}$  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  $1/7\sim 1/64$  ではあるが、LH-I および LH-II は約  $4.2\sim 4.7 \text{ g/kg}$  に相当する高い用量を投与していることから、LH-I および 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  $60 \text{ kg}$  とした場合、 $10 \text{ mg/kg p.o.}$  である。一方、ラット部分肝切除モデル (福田ら 1999)、ラットエタノール誘発行動障害モデル (鷲塚ら 1998)、マウス急性アルコール中毒モデル

(岸本ら 2011) 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、げっ歯類とヒトとで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 および 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 および 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、LH-II ともに抗酸化活性および 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。

## 要約

高血圧および酸化ストレスは動脈硬化性疾患の発症・進展の要因であることが知られている。本章では、LH-I および LH-II の *in vitro* での抗酸化作用および ACE 阻害作用について検討した。さらに高血圧自然発症モデル動物である SHR ラットを用いて、LH-I および LH-II の血圧に及ぼす影響についても検討した。その結果、LH-I および LH-II の DPPH ラジカル消去活性は、それぞれ 55.6 および 38.1  $\mu\text{M}$  Trolox 相当量/g であった。また、LH-I および LH-II の ACE 阻害活性  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 0.18 および 0.31 mg/mL であった。SHR ラットに LH-I あるいは LH-II 1 g/匹を経口投与したところ、いずれも有意な血圧低下作用を示した。以上、本章では LH-I および LH-II は、ともに抗酸化活性および ACE 阻害活性を有することが確認された。また、SHR ラットにおいて LH-I および LH-II は、ともに血圧低下作用を示した。LH-I および LH-II には分子量約 6,000 Da 以下のペプチドが多く含まれており、これらの抗酸化活性および ACE 阻害活性は、含有するペプチドの作用に基づく可能性が考えられた。

## 第4章 メタボリックシンドロームモデルラット (SHR/NDmcr-cp) における肝臓水解物の血糖に及ぼす影響

### 緒言

食生活の欧米化に伴い、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 19 年の国民健康・栄養調査 (Ministry of Health, Labour and Welfare 2011) によれば、「糖尿病が強く疑われる人」および「糖尿病の可能性が否定できない人」の推計は約 2,210 万人と本邦総人口の約 17.5%を占めており、年々増加の一途をたどっている。

インスリン抵抗性は、インスリン分泌低下とともに 2 型糖尿病発症の重要な因子である (住田 2005)。内臓脂肪型肥満に伴って生じるインスリン抵抗性は、高血圧、高血糖、脂質異常症が同一患者に重複し、心筋梗塞、狭心症等、冠動脈疾患等の発症率が増大するメタボリックシンドロームの病態基盤であると指摘されている (Reaven 1988、DeFronzo ら 1991)。非糖尿病患者の心筋梗塞発症率は初発が 3.5%、再発が 18.8%であるのに対し、糖尿病患者では初発であっても 20.2%の高率となり、再発では 45.0%に達すると報告されている (Haffner ら 1998)。また、インスリン抵抗性は糖尿病の発症に先行する病態と考えられており (住田 2005)、メタボリックシンドロームを有する者は新規に糖尿病を発症するリスクが約 2~15 倍高くなることが報告されている (Nakanishi ら 2004)。

近年、レニン-アンギオテンシン系とインスリン抵抗性との関連が明らかにされてきており、降圧薬である ACE 阻害薬や ARB が糖尿病の新規発症を抑制することが報告されている (Hansson ら 1999、Yusuf ら 2000、Yusuf ら 2005)。さらに、酸化ストレスは、糖尿病の発症・進展の一因であることが知られてい

る (Baynes 1991、Rains ら 2011)。

第3章において、肝臓水解物は抗酸化活性を有すること、ACE 阻害活性を有し、SHR ラットの血圧を低下させることが確認された。また、肝臓水解物は抗酸化活性を有することが報告されている (相本ら 1994)。加えて、糖尿病を併発した慢性肝疾患患者において、肝臓水解物製剤の投与により、肝機能改善に加え、血糖値の低下傾向が示されたとの報告もある (筒井ら 1995)。

そこで本章では、メタボリックシンドローム様の異常を自然発症するモデル動物である SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) ラットを用いて、肝臓水解物投与の血糖に及ぼす影響について検討した。

## 実験材料と方法

### 1. 供試材料

ブタ肝臓水解物 (LH-I) はゼリア新薬工業株式会社より供与されたものを使用した。

### 2. 肝臓水解物の混餌飼料の調製方法

肝臓水解物の混餌飼料は、粉末飼料の 5% を肝臓水解物に代替して調製した。コントロール飼料および肝臓水解物混餌飼料の成分は、Table 8 に示した。

**Table 8. Nutritional Composition of the Diets used in the Present Study**

Ingredients	Control diet (%)	Liver Hydrolysate diet (%)
Moisture	7.2	7.0
Crude Protein	23.7	26.3
Crude Fat	5.2	4.9
Crude Fiber	2.7	2.6
Ash Content	5.8	5.8
Carbohydrate	55.4	53.4
Total	100	100

### 3. 実験動物

8 週齢雄性の SHR-cp ラットを日本エスエルシー株式会社より購入し、1 週間予備飼育した後に実験に使用した。SHR-cp ラットは 1 匹/ケージで飼育し、予備飼育期間中は固形飼料 (CRF-1、日本チャールス・リバー株式会社) を、実験期間中は粉末飼料 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社) を与えた。室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $50\pm 10\%$ 、照明時間 12 時間/日の条件下で飼育し、水道水および飼料は自由摂取させた。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。

### 4. 肝臓水解物の投与プロトコル

SHR-cp ラットをコントロール群と肝臓水解物投与群の 2 群に分け、各群の飼料を 12 週間与え、各実験に用いた。

### 5. 飼料摂取量および体重の測定

飼育期間中、飼料摂取量は 2~3 日毎に測定し、12 週間の総摂取量を算出した。また、体重は 3 週間毎に測定した。

### 6. 収縮期血圧の測定

収縮期血圧は、18 時間絶食後、非観血式血圧測定装置 (BP-98A、株式会社ソフロン) を用いて尾動脈圧を測定した。収縮期血圧の測定は 3 週間毎に行った。なお、SHR-cp ラットは、測定前に 15 分間保温 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) した。

## 7. 空腹時血糖値の測定

空腹時血糖値は、18 時間絶食後、ラット尾静脈への穿刺による採血を行い、自己検査用グルコース測定器（メディセーフミニ、テルモ株式会社）を用いて測定した。空腹時血糖値の測定は 3 週間毎に行った。測定原理は以下のとおりである。血液中のグルコースは、試験紙に含まれるグルコースオキシダーゼと反応し、過酸化水素とグルコン酸を生成する。さらに生成した過酸化水素はペルオキシダーゼの作用により、反応試験部に含まれる 4-アミノアンチピリンと *N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-*m*-トルイジンと反応し、キノン色素が生成される。この赤紫色の呈色を比色定量した。

## 8. 空腹時糖化ヘモグロビン（glycated hemoglobin A1c : HbA1c）値の測定

HbA1c 値は、18 時間絶食後、ラット尾静脈への穿刺による採血を行い、グリコヘモグロビン A1c キット（DCA2000HbA1c カートリッジ、バイエルメディカル株式会社）を用いて測定した。HbA1c 値の測定は 3 週間毎に行った。

HbA1c 値は総ヘモグロビン（Hb）濃度と HbA1c 濃度とを測定し、総 Hb 濃度に対する HbA1c 濃度の百分比から得られる。総 Hb はチオシアンメトヘモグロビン法により測定し、HbA1c はラテックス凝集阻止反応により測定した。検体中の HbA1c 値は次の式で算出した。

$$\text{HbA1c 値 (\%)} = (\text{HbA1c 濃度} / \text{総 Hb 濃度}) \times 100$$

## 9. 経口糖負荷試験における血糖値および血中インスリン値の測定

12 週間飼育した SHR-cp ラットは、経口糖負荷試験の 18 時間前から絶食させた。SHR-cp ラットに D-グルコース溶液（0.75 g/mL）を 2 mL/kg の用量で経口投

与した。血糖値および血中インスリン値は、D-グルコース投与前および投与 30、60、90、120 分後に測定した。血糖値の測定方法は空腹時血糖値の測定と同様に行った。血中インスリン値は、超高感度ラットインスリン測定キット（株式会社森永生科学研究所）を用いて ELISA 法により測定した。すなわち、インスリン標準溶液を検体希釈液で希釈し、標準曲線用インスリン溶液を調製した。抗体固相化プレートを付属のプレート用フレームにセットし、各ウェルに検体希釈液を 95  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。各ウェルに標準曲線用インスリン溶液および検体を 5  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、4°C で 2 時間静置して反応させた。ウェル内の溶液を全て捨て、各ウェルに洗浄液 300  $\mu\text{L}$  を加え、洗浄しウェル内の水気を良く切る操作を 5 回繰り返した。酵素標識抗ラットインスリン抗体溶液を各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、室温で 30 分間静置して反応させた。ウェル内の溶液を全て捨て、各ウェルに洗浄液 300  $\mu\text{L}$  を加え、洗浄しウェル内の水気を良く切る操作を 7 回繰り返した。酵素基質溶液を各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、遮光下室温で正確に 40 分間静置して反応させた。反応停止液を各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注して酵素反応を停止させ、プレートリーダーで波長 450 nm の吸光度を測定した。インスリン濃度は、それぞれの標準溶液に対応する吸光度から検量線を作成し、その回帰式より、算出して求めた。

#### 10. 血漿中のアンギオテンシン II (angiotensin II : AngII) 濃度の測定

12 週間飼育後の SHR-cp ラットの血液を採取し、血漿中 AngII 濃度を Angiotensin II (Human, Rat, Mouse, Canine)-EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) を用いて ELISA 法により測定した (Avrameas 1992、Porstmann ら 1992)。すなわち、採取した血漿 1 mL に Buffer A (1% TFA) を 1 mL 加え、10,000 $\times$ g、4°C

で 20 分間、遠心 (LC-200、株式会社トミー精工) した。次に、SEP-COLUMN (Code RK-SEPCOL-1、Phoenix Pharmaceutica1s, Inc.) に Buffer B (60%アセトニトリル、1%TFA) を 1 mL 加え洗い流し、続いて Buffer A で 3 mL×3 回洗い SEP-COLUMN を平衡化した。平衡化した SEP-COLUMN に遠心した血漿サンプルを入れ、Buffer A (3 mL、3 回) でゆっくり洗い流した後、Buffer B を 3 mL 加えて目的のペプチドを溶出し、ポリプロピレンチューブに収集した。遠心エパレーターにより水分を揮発させ測定サンプルとした。20×Assay buffer concentrate 50 mL を精製水 950 mL に溶解し、Assay buffer を調製した。測定サンプルは Assay buffer を 200  $\mu$ L 加え、希釈した。標準溶液は、Standard peptide に Assay buffer を 1 mL 加えて、1,000 ng/mL 溶液に調製し、さらに希釈して 25 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.2 ng/mL および 0.04 ng/mL の濃度に調製した。一次抗体 (rabbit anti-peptide IgG) およびビオチン化ペプチド溶液は、Assay buffer をそれぞれ 5 mL 加え、調製した。96 ウェルプレートに標準溶液および測定サンプルをそれぞれ 50  $\mu$ L ずつ添加し、さらに空白以外のウェルに一次抗体およびビオチン化ペプチド溶液をそれぞれ 25  $\mu$ L ずつ添加し、2 時間室温で放置した。次に Streptavidin- horseradish peroxidase (SA-HRP) バイアルを 500~1,000 rpm、4°C で 15 秒間遠沈し、Assay buffer 12 mL に SA-HRP 溶液 12  $\mu$ L を加えて調製した。2 時間放置後、ウェル内の溶液を全て捨て、空白以外のウェルに Assay buffer を 300  $\mu$ L 加え、洗浄しウェル内の水気を良く切る操作を 5 回繰り返した。その後、空白以外のウェルに SA-HRP 溶液 100  $\mu$ L を加え、1 時間室温で放置した。1 時間放置後、ウェル内の溶液を全て捨て、空白以外のウェルに Assay buffer を 300  $\mu$ L 加え、洗浄しウェル内の水気を良く切る操作を 6 回繰り返した。次に 100  $\mu$ L の基質溶液を空白も含めた全てのウェルに添加し、1 時

間室温で放置した。放置後ブランクを含めた全てのウェルに 2M 塩酸 100  $\mu$ L を添加し、反応を停止させ、プレートリーダーで、450 nm の吸光度を測定した。AngII 濃度は、標準溶液の吸光度より得られた近似曲線の数式から、算出して求めた。

#### 1 1. 統計学的解析

得られた実験値は全て平均値  $\pm$  標準偏差で示した。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。(測定時間あるいは測定時期) と処理について対応のある二要因の分散分析を行い、交互作用が認められた場合には、(測定時間あるいは測定時期) 毎に分散分析を行い比較した。

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。

## 結果と考察

### 1. 肝臓水解物の体重および総摂取量に及ぼす影響

3週間毎に測定した体重推移を Figure 5 に示した。コントロール群および肝臓水解物投与群は加齢とともに体重は増加した。体重に対して、測定時期の要因に対応のある二要因の分散分析を行った結果、有意な測定時期と処理との間に交互作用は認められなかった。飼料の総摂取量も両群に有意な差は認められなかった (Table 9)。

### 2. 肝臓水解物の収縮期血圧に及ぼす影響

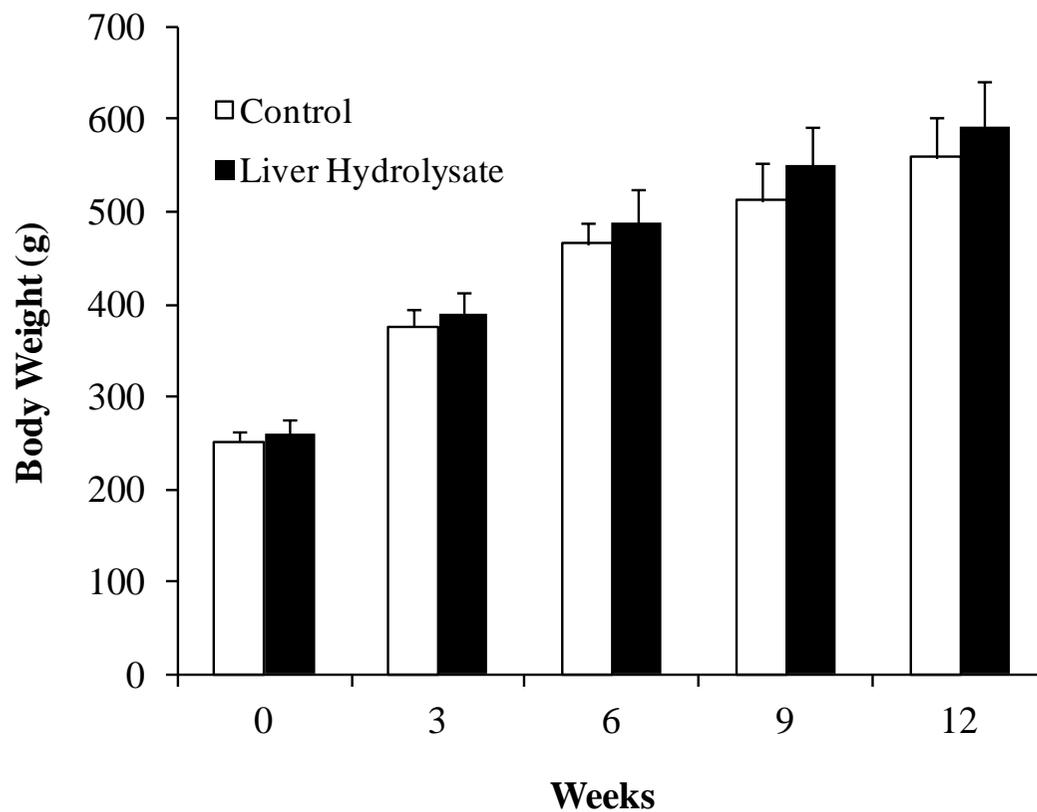
3週間毎に測定した収縮期血圧の結果を Figure 6 に示した。収縮期血圧に対して、測定時期の要因に対応のある二要因の分散分析を行った結果、有意な測定時期と処理との交互作用は認められなかった。

### 3. 肝臓水解物の空腹時血糖値および HbA1c 値に及ぼす影響

3週間毎に測定した空腹時血糖値および HbA1c 値の結果を Figure 7 に示した。空腹時血糖値および HbA1c 値に対して、それぞれ、測定時期の要因に対応のある二要因の分散分析を行った結果、HbA1c 値に対して、有意な測定時期×処理の交互作用が認められた ( $p<0.01$ )。そのため、HbA1c 値に対して測定時期毎に分散分析を行ったが、いずれの時期においても有意差は認められなかった。

### 4. 肝臓水解物の経口糖負荷試験における血糖値および血中インスリン値に及ぼす影響

12週間混餌投与後の SHR-cp ラットの経口糖負荷試験における血糖値および



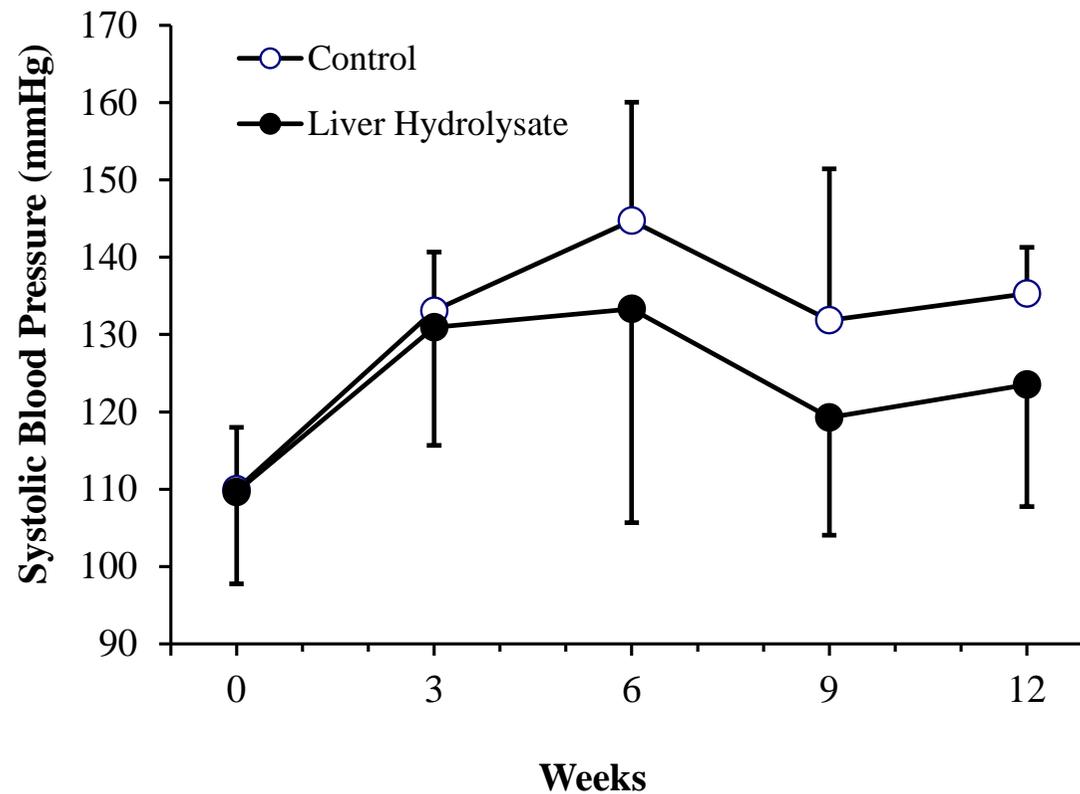
**Figure 5. Effect of Liver Hydrolysate on the Body Weigh in SHR/NDmcr-cp rat.**

The liver hydrolysate-treated group was given diet supplemented with 5% liver hydrolysate for 12 weeks. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats.

**Table 9. Total Food Intake during the Experiment**

Dietary group	Total Food Intake (g)
Control	2601.0 $\pm$ 76.2
Liver Hydrolysate	2560.2 $\pm$ 122.4

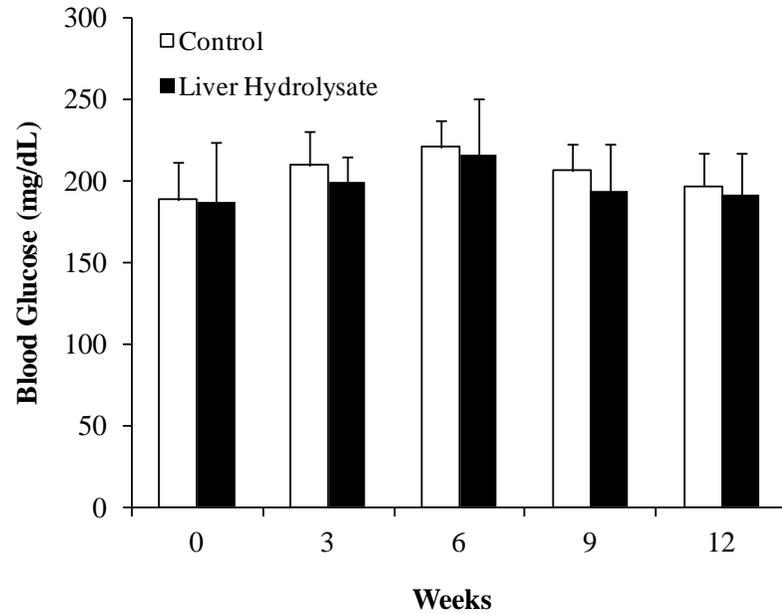
Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats.



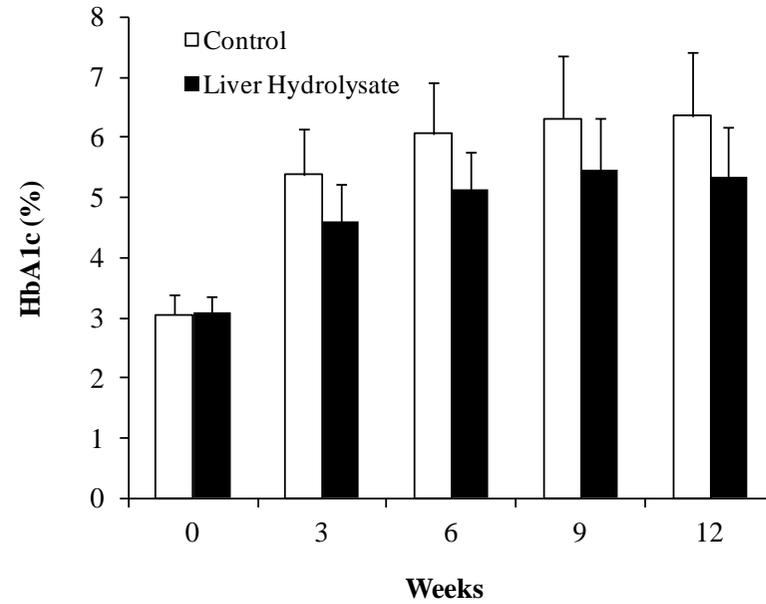
**Figure 6. Effect of Liver Hydrolysate on Systolic Blood Pressure in SHR/NDmcr-cp rat.**

The liver hydrolysate-treated group was given diet supplemented with 5% liver hydrolysate for 12 weeks. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats.

(a)



(b)



**Figure 7. Effect of Liver Hydrolysate on Fasting Blood Glucose (a) and Fasting Serum HbA1c Levels (b) in SHR/NDmcr-cp rat.**

The liver hydrolysate-treated group was given diet supplemented with 5% liver hydrolysate for 12 weeks. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats. Repeated-measures ANOVA revealed a significant interaction between treatment and time for serum HbA1c levels ( $p < 0.01$ ).

血中インスリン値の測定を行った (Figure 8)。

血糖値および血中インスリン値に対して、それぞれ、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、血糖値に対して有意な測定時間と処理の間の交互作用が認められた ( $p<0.05$ )。そのため、血糖値に対して測定時間毎に分散分析を行った。その結果、投与 120 分後において群間の有意差が認められた ( $p<0.05$ )。

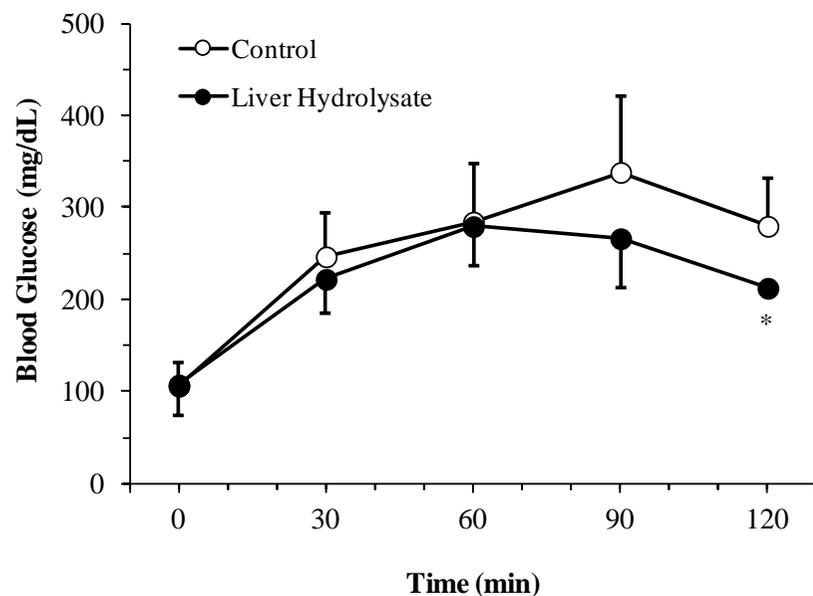
#### 5. 肝臓水解物の血漿中 AngII 濃度に及ぼす影響

12 週間混餌投与後の SHR-cp ラットの血漿中 AngII 濃度を測定した (Figure 9)。その結果、肝臓水解物投与群の血漿中 AngII 濃度は、コントロール群の血漿中 AngII 濃度と比較して有意に低値を示した ( $p<0.05$ )。

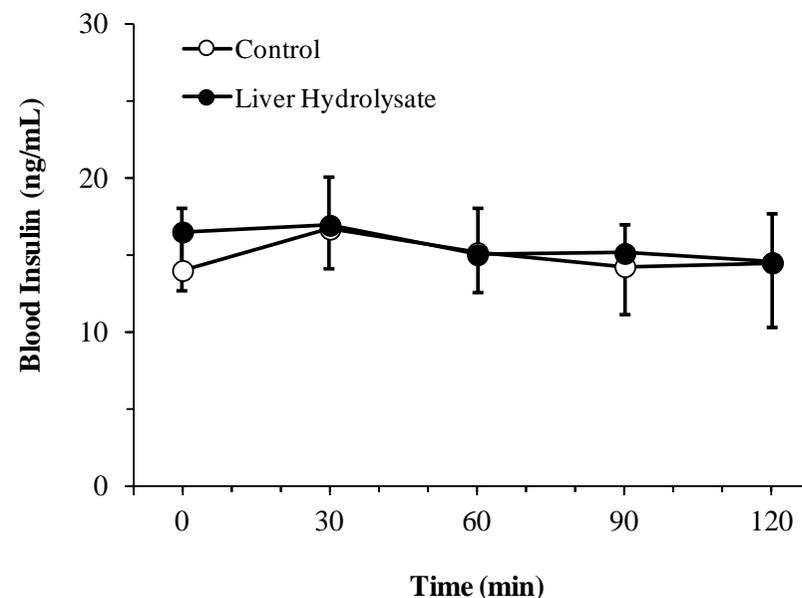
本研究では、レプチン受容体遺伝子変異による過食と遺伝的高血圧により、肥満、高血圧、高血糖、高脂血症、高インスリン血症、インスリン抵抗性といったメタボリックシンドローム様の異常を自然発症する SHR-cp ラット (山本ら 2004) を用いて、ACE 阻害活性および抗酸化活性を有する肝臓水解物投与の血糖に及ぼす影響について検討した。SHR-cp ラットに 5% 肝臓水解物を 12 週間摂取させた後に、D-グルコース経口投与による糖負荷試験を行った結果、肝臓水解物投与は、血中インスリン値に影響を及ぼさなかったものの、糖負荷後の血糖上昇を有意に抑制した。一方、空腹時血糖値に対しては、肝臓水解物投与は影響を及ぼさなかった。したがって、肝臓水解物は SHR-cp ラットのインスリン感受性を改善したと考えられる。

最近の臨床試験である FISIC 研究 (Fogari ら 2011) において、ACE 阻害薬

(a)

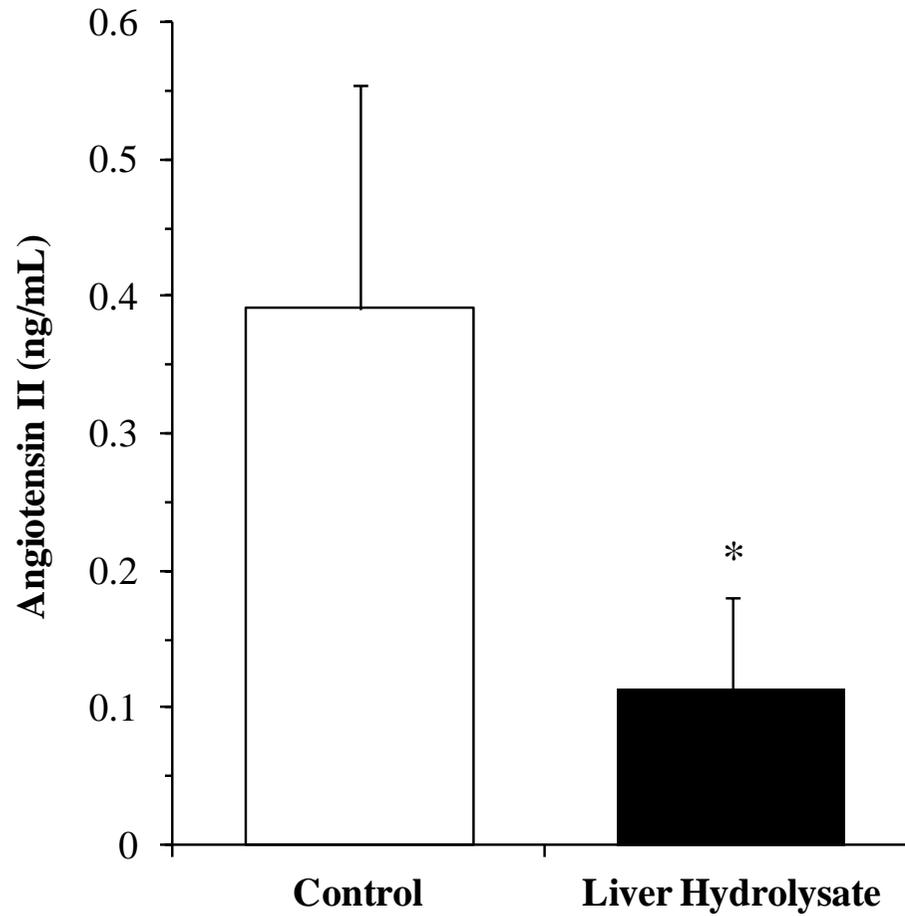


(b)



**Figure 8. Effect of Liver Hydrolysate on Blood Glucose Levels (a) and Blood Insulin Levels (b) after Glucose Loading in SHR/NDmcr-cp rat.**

The liver hydrolysate-treated group was given diet supplemented with 5% liver hydrolysate for 12 weeks. After 18 hours fast, 1.5 g/kg body weight of D-glucose was administered orally. A small amount of blood was collected at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes after administration of D-glucose. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats. Repeated-measures ANOVA revealed a significant interaction between treatment and time for blood glucose levels ( $p < 0.05$ ). \*  $p < 0.05$ , significant difference from the control groups (post-hoc one-way ANOVA at 12-week).



**Figure 9. Effect of 12-weeks Treatment with Lver Hydrolysate on Plasma Angiotensin II Level in SHR/NDmcr-cp rat.**

The liver hydrolysate-treated group was given diet supplemented with 5% liver hydrolysate for 12 weeks. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats. \*  $p < 0.05$ , significantly different from the control group, (Student's  $t$ -test).

のイミダプリルの投与は、高血圧以外に 1 つ以上の心血管疾患危険因子を有する軽症～中等症の高血圧患者のインスリン抵抗性を改善させたが、空腹時血糖値および血中インスリン濃度には影響を与えなかったとの結果が得られている。ACE 阻害薬あるいは ARB は、他の臨床試験 (Sekiya ら 1995、van der Zijl ら 2011) および各種のモデルラット (KK-Ay マウス (Shiuchi ら 2002、Shiuchi ら 2004)、OLETF ラット (織田ら 1997)、Zucker ラット (Henriksen ら 2001)、フルクトース負荷高血圧モデルラット (Navarro-Cid ら 1995)) において、糖負荷時の血糖上昇の亢進を抑制することが報告されている。AngII は、血管平滑筋細胞 (Folli ら 1997) や心筋 (Velloso ら 1996) において、インスリンによる IRS-1 や PI3 キナーゼ等の細胞内シグナル伝達系の活性化を抑制することが報告されており、AngII の生成を抑制する ACE 阻害薬および AngII の受容体を遮断する ARB は、骨格筋および脂肪細胞において IRS-1 のチロシンリン酸化、IRS-1 と PI3 キナーゼの結合、PI3 キナーゼ活性の促進および GLUT4 の細胞膜への移行増加 (Shiuchi ら 2004) を示し、骨格筋へのグルコースの取り込みを促進すること (Henriksen ら 2001、Shiuchi ら 2002) が明らかにされている。骨格筋への糖の取り込みは、糖負荷によって増加した血糖値を低下させる役目を果たすため、ACE 阻害薬による骨格筋のインスリン抵抗性の改善は、糖負荷後の血糖値上昇の亢進に対する改善効果に関与するものと考えられる。本研究において、肝臓水解物を 12 週間投与した群では血漿中 AngII 濃度はコントロール群に比べ低値を示した。第 3 章において、肝臓水解物は ACE 阻害活性を有するペプチドを含有する可能性が示されていることから、本研究における糖負荷後の血糖値抑制効果は、肝臓水解物に含まれる ACE 阻害ペプチドによってインスリン抵抗性が改善し、骨格筋や脂肪細胞への糖の取り込みを促進させたことにより示された可能性が考え

られる。

肝臓水解物を 12 週間投与した群では血漿中 AngII 濃度はコントロール群に比べ低値を示したが、収縮期血圧はコントロール群に比べ低下傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。SHR ラットを用いた試験（河野ら 1986）において、血漿中 AngII 濃度が 16.5 pg/mL のときの血圧が前の週の血圧より上昇しているという結果が得られている。このことから、血圧を低下させる血漿中 AngII 濃度は、16.5 pg/mL より低値であると推測され、肝臓水解物投与群の血漿中 AngII 濃度が約 115 pg/mL と 16.5 pg/mL より高値であったことから、本研究において血圧の低下が認められなかった可能性が考えられる。正常血圧のインスリン依存性糖尿病患者に低用量のカプトプリルを 4 年間投与したところ、糖尿病性腎症の進展が予防されたとの報告（Mathiesen ら 1991）があり、血圧が低下しなくとも血中の AngII 濃度を低く抑えることは、糖尿病患者にとって重要なことと考えられる。

SHR-cp ラットは 14 週齢まで収縮期血圧の上昇が認められ、それ以降 44 週齢まではほぼ定常状態であり、あまり上昇していない（山本ら 2005）。本研究に用いた SHR-cp ラットの収縮期血圧は、両群ともに 6 週目（15 週齢）から 9 週目（18 週齢）にかけて低下しているように見えるが、SHR-cp ラットの収縮期血圧は 14 週齢以降、あまり上昇しないことから、6 週目から 9 週目にかけて低下しているように見えるのは、バラツキによるものと考えられる。

SHR-cp ラットにおいて、抗酸化活性を有するアスタキサンチン（50 mg/kg/day、22 週間投与）がインスリン抵抗性を改善すること（Hussein ら 2007）が報告されている。また、C57BL/6J マウスへの脂肪持続注入により骨格筋のインスリン抵抗性を誘発させるモデルにおいて、グルタチオン（100  $\mu$ mol/kg/hr、4 時間注

入) および抗酸化剤であるテンポール (16  $\mu\text{mol/kg/min}$ 、4 時間注入) の併用投与はインスリン抵抗性の発現を抑制すること (Kim ら 2009)、フルクトース負荷高血圧モデルラットにおいて、抗酸化活性を有するタウリン (300 mg/kg/day、35 日間投与) がインスリン抵抗性を改善すること (El Mesallamy ら 2010) 等、インスリン抵抗性改善と抗酸化作用との関連性が報告されている。第 3 章において、肝臓水解物は抗酸化性のペプチドを有する可能性が示されており、本研究で認められた糖負荷後の血糖値抑制効果には、肝臓水解物の抗酸化性ペプチドに基づくインスリン抵抗性の改善が関与している可能性も考えられる。

本研究において、肝臓水解物は空腹時血糖値に対してはほとんど影響を及ぼさなかったが、HbA1c 値の上昇を抑制させる傾向が認められた。この HbA1c 値の抑制傾向は、肝臓水解物による食後の血糖値の低下を反映した効果であると考えられる。2 型糖尿病患者において、空腹時血糖値よりも食後血糖値が心血管イベント発生のリスク因子であることが報告されている (Cavalot ら 2006)。また、インスリン抵抗性は糖尿病の発症に先行する病態と考えられており、ACE 阻害活性および抗酸化活性を有する肝臓水解物あるいはその精製物は、肝疾患のみならず、インスリン抵抗性を改善し糖尿病の新規発症抑制に寄与する可能性が考えられる。

以上、本研究により、肝臓水解物がメタボリックシンドロームモデル動物である SHR-cp ラットにおいて糖負荷後の血糖上昇の亢進を抑制する効果が示され、肝臓水解物がインスリン抵抗性を改善する可能性が示された。

## 要約

メタボリックシンドロームの病態基盤として、内臓脂肪型肥満に伴って生じるインスリン抵抗性が挙げられている。また、糖尿病患者や糖尿病モデル動物において酸化ストレスの増大を示唆する成績が多く報告されている。本章ではメタボリックシンドローム様の異常を自然発症する SHR-cp ラットを用いて、肝臓水解物投与の血糖に及ぼす影響について検討した。SHR-cp ラットに肝臓水解物 5% 混餌飼料を 12 週間与え、空腹時血糖および HbA1c を 3 週間毎に測定した。12 週間の肝臓水解物給餌後、経口糖負荷試験を行い、血漿中 AngII 濃度を測定した。その結果、経口糖負荷試験において、肝臓水解物投与は、血中インスリン値に影響を及ぼさなかったものの、D-グルコース投与による血糖上昇を有意に抑制した。また、肝臓水解物は空腹時血糖値に対してはほとんど影響を及ぼさなかったが、HbA1c 値の上昇を抑制させる傾向が認められた。投与 12 週間後の血漿中 AngII 濃度はコントロール群に比べ有意に低値を示した。以上の結果から、肝臓水解物は糖負荷による血糖上昇を抑制することが認められ、インスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。また、この作用には、肝臓水解物の ACE 阻害作用および抗酸化作用が関与している可能性が示された。

## 第5章 総括

近年、日本における疾病構造は食生活の欧米化に伴って、心疾患と脳血管疾患による死亡が全死亡の約 26.1%を占め (Ministry of Health, Labour and Welfare 2011)、その予防対策が国民の健康対策の主要な戦略となってきた。これら病態の主な危険因子は、高血圧、肥満、脂質異常症、糖尿病等である。1980 年代後半から一個人に複数個のリスクが集積した状態が、現代における動脈硬化性疾患発症の要因として重要であることが示され、Reaven (1988) はシンドローム X、Kaplan (1989) は deadly quartet (死の四重奏)、DeFronzo ら (1991) は insulin resistance syndrome (インスリン抵抗性症候群) を各々提唱した。メタボリックシンドロームは、高血圧、糖代謝異常、高トリグリセリド血症、低 High density lipoprotein (HDL) コレステロール血症が一個人に多数集積する異常であり、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。

近年、機能性食品の研究が盛んに行われており、大豆タンパク質、乳清タンパク質、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 (Chen ら 1996、Hernández-Ledesma 2005、Mendis ら 2005)、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、血圧降下に関わる ACE 阻害活性を有すること (Katayama ら 2007、Katayama ら 2008、Nakade ら 2008、Muguruma ら 2009、Ahmed ら 2010、Herregods ら 2011) 等が報告されており、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。

また近年、レニン-アンギオテンシン系とインスリン抵抗性との関連が明ら

かにされてきており、ACE 阻害薬や ARB が糖尿病の新規発症を抑制すること (Hansson ら 1999、Yusuf ら 2000、Yusuf ら 2005)、さらに、酸化ストレスは、糖尿病の発症・進展の一因であること (Baynes 1991、Rains ら 2011) 等が報告されており、ACE 阻害活性や抗酸化活性を有するペプチドは、インスリン抵抗性の改善に寄与することが期待される。

本研究では、まず、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、アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質、糖、脂質、核酸塩基、無機質、ビタミン類、水分等の分析を行い、肝臓水解物の一般成分組成を明らかにし、ゲルろ過 HPLC により肝臓水解物の分子量分布を明らかにした。また、*in vitro* 試験において、肝臓水解物の抗酸化作用および ACE 阻害作用について検討した。さらに 2 種類の疾患モデル動物を用い、血圧低下作用および血糖上昇抑制作用について検討した。これらの実験を行い、得られた結果の要約は下記の通りである。

## 1. ブタ肝臓水解物の成分分析 (第 2 章)

医薬品に用いられている 2 種類のブタ肝臓水解物 LH-I および LH-II の一般成分分析を行った。その結果、LH-I および LH-II のタンパク質含量はそれぞれ約 73.8% および 75.0% であり、そのうち遊離アミノ酸が約 43.1% および 34.9%、ペプチドが約 30.6% および 40.1% であることが明らかとなった。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、トリプトファンは低く、類似していた。総糖含量は約 3% および 6% で、総核酸塩基含量はともに約 1.4%、無機物はともに約 3%、水分含量は約 4% および 2% であった。LH-I および 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。脂質は、総胆汁酸が 0.01% および 0.02% 検出されたのみであり、それ以外の脂質は検出されなかった。抗酸化活性を有するグルタチオンは、LH-II に 0.42% 含まれており、LH-I では検出されなかった。また、ゲルろ過 HPLC により LH-I および LH-II の構成ペプチドの分子量分布を分析した結果を両肝臓水解物は分子量約 6,000 Da 以下のペプチドを多く含有していることが明らかとなった。

## 2. ブタ肝臓水解物の抗酸化活性およびアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の検討 (第 3 章)

LH-I および LH-II の *in vitro* での抗酸化作用および ACE 阻害作用について検討した。さらに高血圧自然発症モデル動物である SHR ラットを用いて、LH-I および LH-II の血圧に及ぼす影響についても検討した。その結果、LH-I および LH-II の DPPH ラジカル消去活性は、それぞれ 55.6 および 38.1  $\mu\text{M}$  Trolox 相当量/g であった。また、LH-I および LH-II の ACE 阻害活性  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 0.18 および 0.31 mg/mL であった。SHR ラットに LH-I あるいは LH-II 1 g/匹を経口投与したところ、いずれも有意な血圧低下作用を示した。以上、本章では LH-I および LH-II は、ともに抗酸化活性および ACE 阻害活性を有することが確認された。また、SHR ラットにおいて LH-I および LH-II は、ともに血圧低下作用を示した。LH-I および LH-II には分子量約 6,000 Da 以下のペプチドが多く含まれており、これらの抗酸化活性および ACE 阻害活性は、含有するペプチドの作用に基づく可能性が考えられた。

### 3. メタボリックシンドロームモデルラット (SHR/NDmcr-cp) における肝臓水解物の血糖に及ぼす影響 (第4章)

メタボリックシンドローム様の異常を自然発症する SHR-cp ラットを用いて、肝臓水解物投与の血糖に及ぼす影響について検討した。SHR-cp ラットに肝臓水解物 5% 混餌飼料を 12 週間与え、空腹時血糖および HbA1c を 3 週間毎に測定した。12 週間の肝臓水解物給餌後、経口糖負荷試験を行い、血漿中 AngII 濃度を測定した。その結果、経口糖負荷試験において、肝臓水解物投与は、血中インスリン値に影響を及ぼさなかったものの、D-グルコース投与による血糖上昇を有意に抑制した。また、肝臓水解物は空腹時血糖値に対してはほとんど影響を及ぼさなかったが、HbA1c 値の上昇を抑制させる傾向が認められた。投与 12 週間後の血漿中 AngII 濃度はコントロール群に比べ有意に低値を示した。以上の結果から、肝臓水解物は糖負荷による血糖上昇を抑制することが認められ、インスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。また、この作用には、肝臓水解物の ACE 阻害作用および抗酸化作用が関与している可能性が示された。

本研究では、医薬品原料として用いられている 2 種類の肝臓水解物の一般成分組成および構成ペプチドの分子量分布を明らかにし、さらに *in vitro* での検討において両肝臓水解物に抗酸化作用および ACE 阻害作用を有することを明らかにした。これら活性成分は低分子ペプチドであると推測されたが、同定には至らなかった。今後、抗酸化作用および ACE 阻害作用を有する活性成分の同定が課題であると考えられる。*in vivo* での検討において肝臓水解物は、血圧低下作用および血糖上昇抑制作用を有することを明らかにした。これらの作用は、現在医薬品として用いられている肝臓水解物の 1 日服用量から考えると直ちに血

圧低下や血糖上昇抑制等の作用が認められるものではないが、肝臓水解物を精製または加工等を行うことにより、生活習慣病の予防、改善に寄与するものと考えられる。

## **SUMMARY**

A culture of overeating has developed with the rapid changes in the social environment and lifestyles, and lifestyle-related diseases such as hypertension, diabetes, and dyslipidemia have become major social problems. According to a 2010 demographic survey by the Ministry of Health, Labour and Welfare, the 3 leading causes of death among the Japanese are malignant neoplasm, heart disease, and cerebrovascular disease. Among these 3 main causes of death, both heart disease and cerebrovascular diseases are caused by arteriosclerosis, accounting for approximately 26.1% of all deaths. The main risk factors of arteriosclerosis are lifestyle-related diseases such as obesity, hypertension, dyslipidemia, and diabetes. Metabolic syndrome is a pathology in which hypertension, hyperglycemia, and dyslipidemia occur simultaneously in the same patient with the common basal condition of insulin resistance accompanying visceral fat obesity.

Patients with metabolic syndrome have been reported to have an approximately 3-fold higher risk of developing myocardial infarction or stroke, a 2- to 15-fold higher risk of developing newly-emerged diabetes, and a 2-fold higher risk of death from all causes. Accordingly, the prevention and improvement of lifestyle-related diseases such as hypertension, obesity, diabetes, hypertriglyceridemia, and low HDL cholesterol is thought to be important in reducing the risk of onset or progression for arteriosclerotic diseases.

The relationship between the renin-angiotensin system and insulin resistance has gradually been elucidated, and antihypertensive agents such as angiotensin converting

enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II (Ang II) receptor antagonists have been reported to prevent the onset of diabetes. Moreover, oxidative stress has been reported to be involved in the onset and progression of diabetes and its complications. In recent years, there have been numerous researches into functional foods, and peptides possessing ACE-inhibitory and antioxidant activities have been found in the hydrolysates of proteins from soybeans, whey, meats, and other foods. These functional foods are expected to contribute to the prevention and improvement of lifestyle-related diseases.

Liver hydrolysate is obtained via hydrolysis of mammalian liver. Many peptides, various amino acids, nucleotides, vitamins, and minerals are included in liver hydrolysate.

Liver hydrolysate has been used to treat liver diseases for a long time. In animal experiments as well, liver hydrolysate has been reported to have the effects of promoting hepatic regeneration after partial hepatectomy, increasing the biliary excretion of sulfobromophthalein, preventing liver fibrosis, and promoting the metabolism of alcohol. In recent years, liver hydrolysate has been reported to inhibit the increase of acetaldehyde concentrations after ethanol administration in mice. Liver hydrolysate is widely used as an active ingredient in nutritive and tonic medicine.

In this study, the components of two kinds of porcine liver hydrolysates (LH-I and LH-II) were analyzed, and the antioxidant effects and 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 6,000 or less. The DPPH radical scavenging activities of LH-I and LH-II were 55.6 and 38.1  $\mu$ M Trolox Equivalent/g, respectively. The IC<sub>50</sub> 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.

In the next study, the effect of liver hydrolysate administration on the blood glucose was examined in SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) rats that show spontaneously occurring metabolic syndrome-like abnormalities. The SHR-cp rats were fed diets containing 5% liver hydrolysate for 12 weeks, and the fasting blood glucose and HbA1c were determined every 3 weeks. After administration of the liver hydrolysate-containing feed for 12 weeks, an oral glucose tolerance test was conducted and the plasma AngII concentrations were determined. The liver hydrolysate administration had no effect on the blood insulin levels in the oral glucose tolerance test, but significantly inhibited the D-glucose-induced increases of the blood glucose levels. Furthermore, the liver hydrolysate had almost no effect on the fasting blood glucose level, but tended to inhibit the increase of HbA1c. The plasma AngII concentration after the 12-week administration of liver hydrolysate remained significantly lower than that in the control group. These results indicate that a component of liver hydrolysate inhibits

D-glucose-induced increase of the blood glucose level, and may improve insulin resistance. The ACE-inhibiting effect and antioxidant effect of liver hydrolysate may be involved in this effect.

In this study, we elucidated the nutritional composition and molecular distribution of the component peptides of two kinds of liver hydrolysates used as raw materials for medicine, and we also clearly demonstrated that both liver hydrolysates have an antioxidant activity and ACE-inhibiting activity *in vitro*. These active ingredients were assumed to be low-molecular peptides, but we were unable to identify them. Identification of the active ingredients that have antioxidant and ACE inhibiting effects remains a task for future studies. In studies conducted *in vivo*, it was clearly shown that liver hydrolysate has a blood pressure-lowering effect and an inhibitory effect on increase in blood glucose. In the daily dosage of liver hydrolysate used for medicine, it is not expected that there would be an immediate effect of lowering blood pressure or inhibiting the increase of the blood glucose level, but liver hydrolysate is thought to have the potential to contribute to the prevention and improvement of lifestyle diseases when purified or processed.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、さらに御高  
関の労をお取り頂きました宮崎大学農学部 応用生物科学科 六車 三治男教授  
に対し、心より感謝致します。また、本研究を行う間、数々の御指導と御高関  
の労をお取り頂きました宮崎大学農学部 応用生物科学科 太田一良教授、河原  
聡准教授、窄野昌信教授に心より感謝致します。さらに、動物実験に際し、ご  
協力頂きました宮崎大学医学部 機能制御学講座 丸山眞杉教授に深く感謝致し  
ます。

本研究を進めるにあたり、ゼリア新薬工業株式会社 代表取締役社長 伊部幸  
顕氏、専務取締役研究開発本部長 斎藤 武氏、専務取締役人事部長 遠藤広和氏、  
常務取締役中央研究所長 菅 幹雄氏、前コンシューマーヘルスケア製品開発部  
長 深堀勝博氏、前コンシューマーヘルスケア研究部長 三浦直良氏には大学院  
入学という研究の機会を与えて頂き、さらに研究上の諸便宜もご配慮頂きまし  
た。また、御協力・御支援頂きました宮崎大学農学部 応用生物科学科 畜産食  
品科学研究室（六車・河原研究室）の学生の皆様方、そして、ゼリア新薬工業  
株式会社中央研究所の皆様方に深く感謝致します。

## 参考文献

- Adibi S.A. 1997. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*, **113**, 332-340.
- Ahhmed AM., Muguruma M. 2010. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science*, **86**, 110-118.
- 相本 太刀夫, 平田 巳円男, 平木優子, 土手 千恵子, 井上直人, 今井公江. 1994. 哺乳動物肝臓加水分解物の抗脂質過酸化作用. *薬学雑誌*, **114**, 89-93.
- Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W., Fu P.C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, **20**, 470-475.
- Anumula K.R. 1994. Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, **220**, 275-283.
- 荒井綜一, 清水 (井深) 章子. 2007. 機能性食品の研究-回顧と展望. *日本乳酸菌学会誌*, **18**, 2-6.
- Avrameas S. 1992. Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *Journal of Immunological Methods*, **150**, 23-32.
- Baynes J.W. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405-412.
- Blendea M.C., Jacobs D., Stump C.S., McFarlane S.I., Ogrin C., Bahtyiar G., Stas S., Kumar P., Sha Q., Ferrario C.M., Sowers J.R. 2005. Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *American Journal of Physiology Endocrinology and*

*Metabolism*, **288**, E353-E359.

Cavalot F., Petrelli A., Traversa M., Bonomo K., Fiora E., Conti M., Anfossi G., Costa G., Trovati M. 2006. Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus, particularly in women: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study.

*The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **91**, 813-819.

Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2619-2623.

Cushman D.W., Cheung H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637-1648.

DeFronzo R.A., Ferrannini E. 1991. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, **14**, 173-194.

Drewes P.A. 1972. Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clinica Chimica Acta*, **39**, 81-88.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.

El Mesallamy H.O., El-Demerdash E., Hammad L.N., El Magdoub H.M. 2010. Effect of taurine supplementation on hyperhomocysteinemia and markers of oxidative stress in high fructose diet induced insulin resistance. *Diabetology &*

*Metabolic Syndrome*, **2**, 46-56.

Fantone J.C., Ward P.A. 1985. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: Oxygen metabolites and their relations to human disease. *Human Pathology*, **16**, 973-978.

Fogari R., Zoppi A., Salvadeo S.A., Mugellini A., Lazzari P., Santoro T., Derosa G. 2011. Fibrinolysis and insulin sensitivity in imidapril and candesartan (FISIC study) recipients with hypertension. *Hypertension Research*, **34**, 509-515.

Folli F., Kahn C.R., Hansen H., Bouchie J.L., Feener E.P. 1997. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 2158-2169.

藤沢 洌, 鈴木 宏, 山本祐夫, 平山千里, 志方俊夫, 三辺 謙. 1982. 肝水解物製剤の慢性肝炎に対する治療効果について -二重盲検法による検討-. *肝胆膵*, **4**, 801-819.

福田陽一, 沢多美和, 鷺塚昌隆, 東野雷太, 福田義久, 田中芳明, 武井峰男. 1999. ラットにおける部分肝切除後の肝再生に対する肝臓水解物の効果. *日本薬理学雑誌*, **114**, 233-238.

Haffner S.M., Lehto S., Rönnekaa T., Pyörälä K., Laakso M. 1998. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, **339**, 229-234.

Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *The Biochemical Journal*, **401**, 1-11.

- Hansson L., Lindholm L.H., Niskanen L., Lanke J., Hedner T., Niklason A., Luomanmäki K., Dahlöf B., de Faire U., Mörlin C., Karlberg B.E., Wester P.O., Björck J.E. 1999. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*, **353**, 611-616.
- Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H. 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, **91**, 7A-11A.
- Henriksen E.J., Jacob S., Kinnick T.R., Teachey M.K., Krekler M. 2001. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension*, **38**, 884-890.
- Henriksen E.J., Jacob S., Kinnick T.R., Youngblood E.B., Schmit M.B., Dietze G.J. 1999. ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *The American Journal of Physiology*, **277**, R332-R336.
- Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 588-593.
- Herregods G., Camp J.V., Morel N., Ghesquie B., Gevaert K., Vercruyse L., Dierckx S., Quanten E., Smaghe G. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 552–558.

平山千里, 岸川 汪, 久米只彦, 多田秀敏. 1958. 実験的肝硬変に対する肝エキスの治療効果について. *日新医学*, **45**, 528-533.

Holness M.J., Sugden M.C. 1998. The impact of genetic hypertension on insulin secretion and glucoregulatory control *in vivo*: studies with the TGR(mRen2)27 transgenic rat. *Journal of Hypertension*, **16**, 369-376.

Honda S., Takahashi M., Kakehi K., Ganno S. 1981. Rapid, automated analysis of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography of borate complexes with fluorimetric detection using 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*, **113**, 130-138.

Hussein G., Nakagawa T., Goto H., Shimada Y., Matsumoto K., Sankawa U., Watanabe H. 2007. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Science*, **80**, 522-529.

Hwang E.S., Kim G.H. 2007. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*, **229**, 1–10.

Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsén B., Lahti K., Nissén M., Taskinen M.R., Groop L. 2001. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, **24**, 683-689.

Kaplan N.M. 1989. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of Internal Medicine*, **149**, 1514-1520.

Katayama K., Anggraeni H.E., Mori T., Ahhmed AM., Kawahara S., Sugiyama M., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M. 2008. Porcine skeletal muscle

troponin is a good source of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 355-360.

Katayama K., Jamhari., Mori T., Kawahara S., Miake K., Kodama Y., Sugiyama M., Kawamura Y., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M. 2007. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine skeletal muscle myosin and its antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science*, **72**, S702-S706.

河野節子, 青木みか, 堀 清記. 1986. 飲水量と負荷食塩が SHR の血圧と尿カリクレイン分泌に及ぼす影響. *日本栄養・食糧学会誌*, **39**, 465-471.

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. 2003. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23**, 434-439.

Kim B.S., Cha H.N., Kim Y.W., Kim J.Y., Dan J.M., Park S.Y. 2009. Inhibition of lipid infusion-induced skeletal muscle insulin resistance by cotreatment with tempol and glutathione in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, **110**, 370-380.

Kinnick T.R., Youngblood E.B., O'Keefe M.P., Saengsirisuwan V., Teachey M.K., Henriksen E.J. 2002. Selected Contribution: Modulation of insulin resistance and hypertension by voluntary exercise training in the TG(mREN2)27 rat. *Journal of Applied Physiology*, **93**, 805-812.

岸本律子, 長谷川 悦子, 白川悠子. 2011. マウス急性アルコール中毒モデルの血中エタノールおよび代謝物濃度に及ぼす肝臓水解物の効果. *薬理と治療*, **39**, 199-207.

Lakka H.M., Laaksonen D.E., Lakka T.A., Niskanen L.K., Kumpusalo E., Tuomilehto J., Salonen J.T. 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *The Journal of the American Medical Association*, **288**, 2709-2716.

Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**, 29-38.

Mashige F., Tanaka N., Maki A., Kamei S., Yamanaka M. 1981. Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clinical Chemistry*, **27**, 1352-1356.

Mathiesen E.R., Hommel E., Giese J., Parving H.H. 1991. Efficacy of captopril in postponing nephropathy in normotensive insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *BMJ*, **303**, 81-87.

McCord J.M. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, **312**, 159-63.

Mendis E., Rajapakse N., Kim S.K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 581-587.

Ministry of Health, Labour and Welfare.

<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2.html>, cited 18 October, 2011

Ministry of Health, Labour and Welfare.

<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/12/h1225-5.html>, cited 11 February, 2013.

Ministry of Health, Labour and Welfare.

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikai10/index.html>, cited 15 May, 2011.

Motley E.D., Eguchi K., Gardner C., Hicks A.L., Reynolds C.M., Frank G.D., Mifune M., Ohba M., Eguchi S. 2003. Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- $\alpha$ . *Hypertension*, **41**, 775-780.

Muguruma M., Ahhmed AM., Katayama K., Kawahara S., Maruyama M., Nakamura T. 2009. Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects *in vivo*. *Food Chemistry*, **114**, 516-522.

六車 三治男, 西 俊郎, 奥野真代, 山下 真由子, 河原 聡. 2003. 肝臓酵素分解物の新規生理活性機能の検索. 食肉に関する助成研究調査成果報告 (伊藤記念財団), **21**, 248-255.

長井謙造. 1970. 肝の排泄機構に関する研究 -BPS 排泄に及ぼす肝水解物の影響-. *日本消化器病学会雑誌*, **67**, 633-639.

Nakade K., Kamishima R., Inoue Y., Ahhmed A., Kawahara S., Nakayama T., Maruyama M., Numata M., Ohta K., Aoki T., Muguruma M. 2008. Identification of an antihypertensive peptide derived from chicken bone extract. *Animal Science Journal*, **79**, 710-715.

中島 修. 1999. レバイデン<sup>®</sup>G 顆粒の臨床効果. *新薬と臨床*, **48**, 1618-1626.

- Nakamura T., Tsubono Y., Kameda-Takemura K., Funahashi T., Yamashita S., Hisamichi S., Kita T., Yamamura T., Matsuzawa Y. 2001. Magnitude of sustained multiple risk factors for ischemic heart disease in Japanese employees —A Case-control study—. *Japanese Circulation Journal*, **65**, 11-17.
- Nakanishi N., Takatorige T., Fukuda H., Shirai K., Li W., Okamoto M., Yoshida H., Matsuo Y., Suzuki K., Tataru K. 2004. Components of the metabolic syndrome as predictors of cardiovascular disease and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **64**, 59-70.
- Navarro-Cid J., Maeso R., Perez-Vizcaino F., Cachofeiro V., Ruilope L.M., Tamargo J., Lahera V. 1995. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension*, **26**, 1074-1078.
- 織田直久, 澤井喜邦, 伊藤靖敏, 早川伸樹, 加藤律子, 嶋崎恵子, 杵野武彦, 小竹素子, 西田有子, 浜田 美智子, 榊永留美, 中井 晃, 伊藤光泰, 長坂顕雄. 1997. 自然発症糖尿病ラット (OLETF ラット) の糖代謝障害に対する ACE 阻害剤の効果. *日本内分泌学会雑誌*, **73**, 487-493.
- Ogihara T., Asano T., Ando K., Chiba Y., Sakoda H., Anai M., Shojima N., Ono H., Onishi Y., Fujishiro M., Katagiri H., Fukushima Y., Kikuchi M., Noguchi N., Aburatani H., Komuro I., Fujita T. 2002. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*, **40**, 872-879.
- Porstmann T., Kiessig S.T. 1992. Enzyme immunoassay techniques. An overview.

*Journal of Immunological Methods*, **150**, 5-21.

Rains J.L., Jain S.K. 2011. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, **50**, 567-575.

Reaven G.M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607.

Richey J.M., Ader M., Moore D., Bergman R.N. 1999. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. *The American Journal of Physiology*, **277**, E920-E926.

Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clinical Chemistry*, **19**, 1350-1356.

Sakai S., Otake E., Toida T., Goda Y. 2007. Identification of the origin of chondroitin sulfate in "health foods". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 299-303.

三辺 謙, 藤沢 洌, 上野幸久, 河田 肇, 奥村英正, 岩村 健一郎, 小幡 裕, 平山 千里, 太田康幸, 瀧野辰郎, 鈴木 宏, 志方俊夫, 斧田 大公望. 1978. 二重盲検法による肝水解物の慢性肝炎に対する治療効果. *臨床と研究*, **55**, 2842-2853.

清野 裕, 南條 輝志男, 田嶋尚子, 門脇 孝, 柏木厚典, 荒木栄一, 伊藤 千賀子, 稲垣暢也, 岩本安彦, 春日雅人, 花房俊昭, 羽田勝計, 植木 浩二郎. 2010. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*, **53**, 450-467.

Sekiya M., Yamasaki Y., Tsujino T., Shiba Y., Kubota M., Kawamori R., Kamada T. 1995. Insulin resistance in essential hypertensive patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **29**, 49-56.

- Shimizu S., Yasui K., Tani Y., Yamada H. 1979. Acyl-CoA oxidase from *Candida tropicalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **91**, 108-113.
- Shiuchi T., Cui T.X., Wu L., Nakagami H., Takeda-Matsubara Y., Iwai M., Horiuchi M. 2002. ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension*, **40**, 329-334.
- Shiuchi T., Iwai M., Li H.S., Wu L., Min L.J., Li J.M., Okumura M., Cui T.X., Horiuchi M. 2004. Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension*, **43**, 1003-1010.
- Spayd R.W., Bruschi B., Burdick B.A., Dappen G.M., Eikenberry J.N., Esders T.W., Figueras J., Goodhue C.T., LaRossa D.D., Nelson R.W., Rand R.N., Wu T.W. 1978. Multilayer film elements for clinical analysis: applications to representative chemical determinations. *Clinical Chemistry*, **24**, 1343-1350.
- 須田郁夫. 2001. 抗酸化機能 ①分光学的抗酸化機能評価. *食品機能研究法* (篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川 修一編著), pp218-223, 光琳, 東京.
- 住田安弘. 2005. 肥満症－減量により改善する病態 耐糖能障害. *medicina*, **42**, 216-220.
- 橘 國臣, 青木 清, 近藤繁美, 藤本祐三, 可部野 久俊, 小林泰明. 1972. 肝臓加水分解物に関する研究 (第 1 報) クジラ肝臓加水分解物の急性毒性ならびに肝臓に対する作用. *応用薬理*, **6**, 1523-1530.
- Takayama M., Itoh S., Nagasaki T., Tanimizu I. 1977. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clinica Chimica*

*Acta*, **79**, 93-98.

筒井末春, 村林信行, 斉藤敏二, 竹越 至, 浜坂道夫. 1995. 肝水解物製剤 (レバイデン®) の慢性肝疾患に対する治療効果. *新薬と臨床*, **44**, 1570-1580.

van der Zijl N.J., Moors C.C., Goossens G.H., Hermans M.M., Blaak E.E., Diamant M. 2011. Valsartan improves  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired glucose metabolism: a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, **34**, 845-851.

Velloso L.A., Folli F., Sun X.J., White M.F., Saad M.J., Kahn C.R. 1996. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 12490-12495.

鷲塚昌隆, 平賀義裕, 古市浩康, 泉 順吉, 吉長幸嗣, 阿部 亨, 田中芳明, 玉木元. 1998. エタノール誘発行動障害および致死・肝毒性に対する肝臓水解物の効果. *日本薬理学雑誌*, **111**, 117-125.

山本潤子, 池田克巳, 家森幸男. 2005. メタボリックシンドロームモデル動物としての肥満・高血圧自然発症ラット SHR/NDmcr-cp. *アディポサイエンス*, **2**, 243-248.

山本潤子, 池田克巳, 奈良安雄, 家森幸男. 2004. 肥満・高血圧自然発症ラット SHR/NDmcr-cp. *肥満研究*, **10**, 329-330.

Yusuf S., Ostergren J.B., Gerstein H.C., Pfeffer M.A., Swedberg K., Granger C.B., Olofsson B., Probstfield J., McMurray J.V. 2005. Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation*, **112** 48-53.

Yusuf S., Sleight P., Pogue J., Bosch J., Davies R., Dagenais G. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *The New England Journal of Medicine*, **342**, 145-153.