

論文審査の結果の要旨

氏名：山本 祥子

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：コラーゲントリペプチドの吸収・代謝および体内動態の検討と変形性膝関節症ならびに動脈硬化症の症状改善効果に関する基礎的検討

審査委員：(主査) 教授 宮入 伸一

(副査) 教授 鈴木 豊史

教授 藤井 まき子

教授 松本 宜明

本論文は、食品であるコラーゲンの酵素による限定加水分解産物に含まれるトリペプチドの吸収・代謝および体内濃度の推移および変形性膝関節症・動脈硬化症の症状改善効果に関する基礎的検討を述べたものである。近年、小腸上皮細胞の刷子縁膜にトリペプチドおよびジペプチドを体内に輸送する peptide transporter 1 (PEPT1)の存在が明らかにされた。一方、トリペプチド化合物に多様な生物活性が報告されている。例えば、Gly-Pro-Hyp の生理作用として、血液凝固抑制作用、インクレチン分解酵素 (DPP-IV) 阻害作用、精神運動発作の抑制等が見出されている。その様な観点から、申請者はトリペプチド含有率の高い食品試料の経口摂取時のトリペプチドおよびジペプチドの体内濃度の推移や尿中排泄量を基に経口摂取によるトリペプチドの体内移行性や体内濃度の推移を検討すると共に、その経口摂取による変形性膝関節症や動脈硬化症の症状改善の可能性について検討した。なお、glycine を N 末端とするトリペプチド含有率の高い試料を用いていることが本研究の特徴である。

第一章では、ラットに対してトリペプチド含有率 91.8%のコラーゲン限定加水分解物(豚皮由来) (CTP-100/pig)を経口投与し、その血中移行性と体内濃度の推移を腹腔内投与時と比較検討した。なお、試料中の Gly-Pro-Hyp 含有率は全トリペプチドの 34%、Gly-Pro-Ala は 15%、Gly-Ala-Hyp は 4%であった。本検討に先立ち申請者は、まず GC-MS/MS 法を用いたトリペプチドおよびジペプチドの高感度測定法を開発した。CTP-100/pig を経口投与(PO)すると Gly-Pro-Hyp の血中濃度は 30 分時に最高濃度(Cmax)に達し、120 分時には Cmax の 1/3 程度にまで減少した。一方、腹腔内投与(IP)では 10 分時には Cmax 付近に達した(図 1)。なお、Cmax 値は経口と腹腔内投与群間で差異がなく、非投与群の 300 倍に近い高い濃度であった。また、トリペプチドの代謝産物であるジペプチドについては、Gly-Pro-Hyp の N 末端側加水分解物 Pro-Hyp の濃度が顕著に高く、投与形態の如何を問わず Cmax は 30 分時で、非投与群の 67 倍であった。さらに、Gly-[³H]Pro-Hyp を経口投与した際の標識体の体内分布を全身オートラジオグラフィーにより検討し、皮膚、骨、骨髄、骨膜、胸腺、関節軟骨、血管等を中心に幅広く分布し、なかでも結合組織に多い傾向にあることを明らかにした。

第二章では、ヒトを対象としてトリペプチド含量の異なるコラーゲン加水分解物の経口摂取時のトリペプチドおよびジペプチドの体内濃度の推移及び尿中排泄を検討した。用いた食品試料は、前章の CTP-100/pig の他、CTP-50/pig (トリペプチド含有率 51%うち Gly-Pro-Hyp : 7%)およびトリペプチドを含まない従来型のコラーゲン加水分解物 (CTP-0/pig) (Gly-Pro-Hyp : 0%)である。血中 Gly-Pro-Hyp 濃度は、CTP-100/pig と CTP-50/pig では摂取直後から急激に上昇し、30~60 分時に Cmax に達したが、CTP-0/pig の摂取では有意な上昇は観察されなかった。なお、CTP-50/pig 摂取時の Cmax は CTP-100/pig 摂取時の約 50%であった。一方、Pro-Hyp 血中濃度の上昇はどの試料摂取時にも観察され、最高濃度はいずれの場合も 60 分時であった。オリゴペプチドの尿中排泄量は、摂取後 12 時間の蓄尿を用いて検討した。Gly-Pro-Hyp と Pro-Hyp の尿中排泄量は、CTP-100/pig 摂取時が圧倒的に多く CTP-50/pig がそれに続き、CTP-0/pig では Pro-Hyp 以外の排泄は僅かであった。この結果により、コラーゲンの限定加水分解物中のトリペプチド化合物は経口摂取すると、その一部はトリペプチドの状態で消化管から吸収されて血液中に移行すること、さらにその一部は尿中にも排泄されることが明らかになった。

第三章では、コラーゲンを起源とするトリペプチドを含む食品の臨床応用を目指す基礎として、第 1 節では変形性膝関節症への影響を、第 2 節では動脈硬化症への影響を検討した。変形性膝関節症に対する影

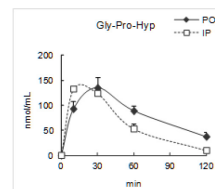


図 1. CTP-100 投与後の血中トリペプチド濃度の推移

響は、まず、施術により半月板に人為的に損傷を与えたウサギモデルを用いて検討した。試料には、トリペプチド含有量が15%の豚皮由来の CTP-15/pig と魚鱗由来の CTP-15/fish および CTP-0/pig を用いた。半月板切除部位の軟骨量は、対照群では減少していたが、CTP-15/pig あるいは CTP-15/fish の投与群では減少の程度は有意に改善されており、損傷部位は回復傾向にあることが確認された。しかし、CTP-0/pig の投与群では影響は観察されず、さらに対照群や CTP-0/pig 投与群では非施術部の軟骨組織も損傷部からの負荷で磨耗・消失していた。一方、CTP-15/pig および CTP-15/fish の投与群ではその磨耗の程度も軽減されていた。以上の結果は、トリペプチド含有コラーゲン限定加水分解物が経口摂取により軟骨組織保護効果を示すことを実験的に示したものである。次に、膝関節に対する保護作用を、ヒトを対象として検討した。被験者(66名)を層別ランダム化法で割付け、試験群は CTP-15/pig を10週間にわたり毎日2g あるいは4g 経口摂取し、対照群はデキストリンを毎日4g 経口摂取とした。水症は摂取開始後5週目には対照群を含む全被験者で若干の改善傾向が現れた。しかし、その改善傾向は、試験群では10週目まで持続的であり、対照群では持続性は認められなかった。また、CTP-15/pig 摂取群では摂取量依存的な圧痛および軋轢音の改善傾向が現れた。なお、CTP-15/pig 摂取による膝関節の変形度、可動域および動揺性の改善は認められなかった。これらの結果は、トリペプチド含有コラーゲン限定加水分解物の経口摂取がヒトにおいても変形性膝関節症の一部症状の改善に寄与する可能性を示唆している。一方、動脈硬化症の治癒に対する効果はヒト健康人を対象に行った。用いた試料は前述の CTP-15/pig であり、一日量6g を朝夕2回に分けて6ヶ月経口摂取した。動脈硬化の指標である血中脂質量、TAGE (toxic advanced glycation end-product) 値、CAVI (cardio-ankle vascular index) 値を実施前と6ヶ月経過後に測定し、CTP-15/pig の経口摂取が動脈硬化の進展に与える影響を検討した。LDL-C/HDL-C 比は、心血管疾患のリスクが高まるとの報告がある量比2.5以上と2.5未満の2群に分けて解析を行った。量比2.5以上のハイリスク群では、LDL-C/HDL-C 比およびTAGE 量が有意に低下した。CAVI 値は全被験者で有意な低下が認められた。これらの結果は、トリペプチド含有コラーゲン限定加水分解物の経口摂取が、動脈硬化プラークが発生しやすい状態下での LDL-C/HDL-C 比の改善、血管の障害がより起きやすい環境下で TAGE 量の低下および血管弾力性の回復をもたらす可能性を示唆している。

申請者は、本論文においてトリペプチド含有コラーゲン加水分解物は経口摂取でもオリゴペプチドの血中移行に優れた食品であることを明らかにした。さらに、ウサギモデルを用いた検討では変形性膝関節症の改善傾向が認められること、軽度の膝痛をもつ被験者では水症・軋轢音を改善する傾向が認められること、また動脈硬化に関する検討では血管弾力性の改善効果が期待できることを示唆した。

以上、本論文は、トリペプチド含量の多いコラーゲン加水分解物はペプチド成分の吸収性に優れ、関節軟骨と血管の機能改善に対し有益な効果を示す可能性を提示している。よって本論文は、博士(薬学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成29年10月19日