

学位論文

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

山本 祥子

略語表

AGEs	: 最終糖化産物
Ala	: アラニン
ALP	: アルカリフォスファターゼ
ALT	: アラニンアミノ基転移酵素
AST	: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	: 血中薬物濃度-時間曲線下面積
BBM	: 小腸上皮細胞の刷子縁膜
BMI	: Body Mass Index
BUN	: 血中尿素窒素
CAIx	: 脈波増大係数
CAVI	: cardio-ankle vascular index
Cmax	: 最高濃度
CMC-Na	: カルボキシメチルセルロースナトリウム
CTP	: コラーゲン・トリペプチド
C 末端	: カルボキシ末端
γ -GTP	: ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼ
Da	: ダルトン
DPP-IV	: ジペプチジルペプチダーゼ IV
Gly	: グリシン
GOT	: グルタミン酸オキザロ酢酸トランスフェラーゼ
GPT	: グルタミン酸ピルビン酸トランスフェラーゼ
HbA1c	: 糖化ヘモグロビン
HDL-C	: 高密度リポタンパク質-コレステロール
HPLC	: 高速液体クロマトグラフィー
Hyp	: ヒドロキシプロリン
IMT	: 内膜中膜複合体厚
JKOM スコア	: Japanese Knee Osteoarthritis Measure スコア
LC	: 液体クロマトグラフィー
LDH	: 乳酸脱水素酵素
LDL-C	: 低密度リポタンパク質-コレステロール
MRM	: 多重反応モニタリング
MS	: 質量分析
m/z	: 質量/電荷
NSAIDs	: 非ステロイド系抗炎症薬

N 末端 : アミノ末端
OARSI : Oseoarthritis Research Society International
PBS : リン酸緩衝生理食塩水
PEPT1 : ペプチド輸送体 1
Pro : プロリン
PWV : 脈波伝播速度
QOL : quality of life
RAGE : Receptor for AGEs
S/N 比 : シグナル/ノイズ比
STD : 標準溶液
TAGE : Toxic AGE
TCA : トリクロロ酢酸
TFA : トリフルオロ酢酸
Tmax : 最高濃度到達時間
UIBC : 不飽和鉄結合能
VAS : Visual Analogue Scale

目 次

序論	3
本論	5
第一章 ラットを用いたコラーゲントリペプチド (CTP)の血中移行性と 体内動態	5
第1節 緒言	5
第2節 実験方法	7
第3節 結果	11
第1項 オリゴペプチド測定系の確立	11
第2項 ラット血漿中に含まれる各オリゴペプチド濃度の基礎値	15
第3項 CTP-100/pig の経口あるいは腹腔内投与による血中トリペプチド およびジペプチド濃度の経時的変化	16
第4項 全身オートラジオグラフィーによる CTP-100/pig に含有される 主要トリペプチド Gly-Pro-Hyp の体内分布	18
第4節 考察	19
第5節 小括	23
第二章 コラーゲン加水分解物摂取時のトリペプチドおよびジペプチドの ヒトにおける体内動態	24
第1節 緒言.....	24
第2節 実験方法.....	25
第3節 結果.....	28
第1項 試料中に含まれるペプチド成分	28
第2項 血中トリペプチドおよびジペプチド濃度の経時的変化	30
第3項 トリペプチドおよびジペプチドの尿への排泄	32
第4節 考察.....	33
第5節 小括	36

第三章 コラーゲントリペプチド (CTP)の臨床応用を目指した	
基礎的検討.....	37
第1節 コラーゲントリペプチドの変形性膝関節症の治癒に対する	
効果の基礎的検討	37
第1項 緒言	37
第2項 実験方法	39
第3項 結果	44
第3項の1 ウサギモデルを用いたコラーゲントリペプチドの	
変形性膝関節症に対する治癒効果の検討.....	44
第3項の2 ヒトを対象としたコラーゲントリペプチドの膝関節に	
対する保護作用の検討(経口摂取)	46
第4項 考察	50
第5項 小括	52
第2節 コラーゲントリペプチドの動脈硬化症の治癒に対する効果の	
基礎的検討	53
第1項 緒言	53
第2項 実施方法	56
第3項 結果	58
第4項 考察	62
第5項 小括	64
結論	65
謝辞	68
引用文献	69

序 論

コラーゲンは、生体内タンパク質の約 30%を占める主要成分で、皮膚や腱などの結合組織等に幅広く存在して臓器・組織の構造と機能の保持に重要な役割を果たす不溶性タンパク質であり、さらに骨や軟骨組織にも分布して全身的に骨格や関節機能の維持にも貢献をしている。コラーゲンは、グリシンが 3 残基ごとに現れる繰り返し配列を特徴としており、その一次構造は一般的に (Gly-X-Y)_n で表わされる。この X はプロリンやアラニン、Y はヒドロキシプロリンやアラニンであることが多く、繰り返し配列としては Gly-Pro-Hyp が最多で、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp がそれに続く [1]。前述の如くコラーゲンは不溶性で難吸収性であるため、美容や健康に関わる健康食品では物性改善を目的として酵素処理を施した加水分解物が製品化されている。Iwai らは、コラーゲンの加水分解物を摂食すると、多様なジペプチドやトリペプチドが血中に出現すること [2]、さらにその血中濃度は摂食量依存的であること [3] を報告しており、コラーゲン由来のペプチドは部分加水分解の状態でも吸収され得ることを示唆した。また、血中に見出されたオリゴペプチドの中には生理活性が認められるものもあり、例えば最多配列に相当する Gly-Pro-Hyp には、血小板との相互作用を作用機序とする凝固抑制作用 [4,5]、インクレチンの分解酵素である DPP-IV の阻害作用 [6,7]、精神運動発作の抑制等の中樞神経系に対する作用 [8] などの多様な生物活性が報告されている。また、それから派生したジペプチドの Pro-Hyp にはヒアルロン酸合成促進作用 [9] や関節軟骨形成促進作用 [10] が、Gly-Pro には血圧低下作用 [11] が見出されている。一方、混合物のため作用機序にせまる報告は無いものの、コラーゲンの加水分解物の摂食でも、関節痛改善効果 [12]、骨密度上昇作用 [13,14]、血圧低下作用 [15]、角質層水分率上昇作用 [16,17]、血管保護作用 [18] などが報告されており、これらは先に述べた血中に見出されるオリゴペプチドの生物活性と密接に関連しているものと考えられている。なお、これらの効果の多くは摂取量依存的であることもこの仮説を支持している。健康食品として従来供されてきたコラーゲンの加水分解物の分子量分布は広く、高分子量ペプチドも多く含まれることから、血中に移行する代謝性オリゴペプチドの配列や血中濃度は、通常のタンパク質性食品の消化・吸収過程に依存しており、この加水分解物の摂取による特定のオリゴペプチドの選択的血中濃度上昇

は期待できない。

近年、消費者庁により設定された機能性表示食品の中には、低分子化コラーゲンを含む製品も多く、平均分子量 1,000 以下にまで加水分解したコラーゲン派生物(コラーゲンペプチド)が使用されている物もある[19]。しかし、含まれる加水分解物の血中への移行性や機能性を比較した報告は無く、コラーゲンの生物学的有用性向上に対する低分子化加工の寄与は不明である。一般に、この低分子化加工には、エンドペプチダーゼ混合物によるランダム分解[19]が適用されており、生成物に配列特異性は無く、その分子量の分布範囲も広い。それゆえ、このようなコラーゲンペプチドの摂食では、消化・吸収により特定のオリゴペプチドの血中濃度を生物活性発現の閾値以上に高めることは容易ではない。一方、コラーゲン・トリペプチド(Collagen tripeptide: CTP)は、ブタや魚皮などのコラーゲンを単一のエンドプロテアーゼで処理して得た加水分解物で、使用した酵素の基質特異性から *N*末端はグリシンである[20]。すなわち、CTP に含まれるトリペプチドは全て(Gly-X-Y)*n* であり、トリペプチドの含有率が 15%~50%、平均分子量 600~1,500 の製品が上市されている。CTP に最も多く含まれるトリペプチドのアミノ酸配列は Gly-Pro-Hyp であり、次いで Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp と前述したコラーゲンの一次構造を反映した含有率となっている。

CTP の有効性については、既に数例の報告がある。すなわち、骨折治癒促進効果[21,22]、光による皮膚の老化促進に対する抑制効果[23]、皮膚の掻痒抑制効果およびヒアルロン酸合成促進効果[24]などである。さらに、遺伝性高コレステロール血症ウサギ(Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbit)では、動脈硬化プラーク数の減少効果やプラーク形成組織におけるマクロファージおよび平滑筋細胞の浸潤抑制効果が観察されている[25]。加えて、培養ヒト大動脈平滑筋細胞では細胞増殖や遊走を抑制する[26]ことから、CTP は動脈硬化進展の予防に有効である可能性も示唆されている。

本論文では、CTP の血中ならびに組織への移行性に関する動態学的検討結果、および変形性膝関節症ならびに動脈硬化症に関する実験治療学的検討結果を詳述する。

本 論

第一章 ラットを用いたコラーゲントリペプチド (CTP)の 血中移行性と体内動態の検討

第1節 緒言

食用コラーゲンは、動物や魚から抽出した不溶性の高分子コラーゲンを酵素を用いた低分子化処理で溶解性を高めた加水分解物(以下、コラーゲン加水分解物)である。従前の研究で、このコラーゲン加水分解物の摂取は、骨や関節、皮膚などの機能改善および血圧の正常化に有効であることが示されている[12-18]。コラーゲン加水分解物の吸収は、通常タンパク質の消化・吸収過程と同じ過程を経る、すなわちアミノ酸まで消化された後に吸収されるものと考えられていたが、コラーゲンを構成するアミノ酸をコラーゲン加水分解物と同量摂取しても有意な効果は認められていない[27]。一方、コラーゲン加水分解物を摂取すると血中に多様なジペプチドやトリペプチドが出現するとの報告[2]があり、さらにそれらオリゴペプチドには生理作用が見出された[4-11]ことから、コラーゲン加水分解物摂取時に見られる生物学的効果は、加水分解物中に存在あるいは消化により生成したオリゴペプチドによるものとのコンセンサスに至っている。事実、血中オリゴペプチド濃度は摂取量に依存している[3]。しかし従来型のコラーゲン加水分解物の場合、摂取量 2 g までは摂取の影響は観られないとの報告もある[3]。以上の様な知見を基に、機能性食品の分野では低分子化処理を施した製品が増えてきているが、加水分解物中に含まれるペプチド鎖の平均分子量と生物活性を有するオリゴペプチドの血中濃度の相関に関する報告はなく、低分子化による機能性向上効果は十分に検証されているとは言い難い。

コラーゲン加水分解物の代謝・吸収は主に小腸で行われるとされており、含有あるいは生成したオリゴペプチドは小腸上皮細胞の刷子縁膜(**brush border membrane: BBM**)に存在する **peptide transporter 1 (PEPT1)**により腸管から血中に移送される[28]。PEPT1は、薬学的には **dopa** や **acyclovir**、**enalaprilat** などのプロドラッグ化体(アミノ酸結合体)の腸管吸収における標的タンパク質としても知られているトランスポーターである[29]。本トランスポーターは、プロトンの濃度勾配を駆動力として、ジペプチドおよびトリペプチドを特異的に移

送するが配列特異性は低い。また、基質親和性は数 mM とあまり高くはないが、移送能力は高い[30-33]。それゆえ、CTP に多く含まれる Gly-Pro-Hyp や Gly-Pro-Ala のようなトリペプチドは腸管から速やかに吸収され、それらの血中濃度の急激な上昇が期待できる。しかし、ブタ BBM から作成した表面に PEPT1 が発現している小胞を用いた Gly-Pro-Hyp の移送実験では、トリペプチドの小胞への取り込みは確認されず、ジペプチドの Pro-Hyp のみを検出したとの知見が報告された。この結果について著者らは、Gly-Pro-Hyp は BBM に共存するアミダーゼ(BBM-bound amidase)に対する感受性が高く、容易に加水分解を受けてジペプチドになると考察している[34]。一方、放射性の Gly-[¹⁴C]Pro-Hyp をラットに経口投与した *in vivo* 実験では、*in vitro* の検討で検出されたジペプチドに加えて intact の Gly-Pro-Hyp も血漿中に見出されており、Gly-X-Y 配列のトリペプチドも一部は加水分解を受けずに血中の移行することが明らかにされている[35]。なお、この研究では血中 Gly-Pro-Hyp 量に関する定量的な考察は行われてはいない。

そこで本章ではトリペプチド含有率が 90%以上の CTP-100/pig を試料とし、経口投与時の吸収および組織への移行性を、ラットを用いて定量的に検討した。

第2節 実験方法

1. コラーゲントリペプチド

Tp-100 (CTP-100/pig)は、ゼライス社より供与を受けた。本品のトリペプチド含有率は91.8%であり、Gly-Pro-Hypは全体の34%で、Gly-Pro-Alaは15%、Gly-Ala-Hypは4%であった。なお、トリペプチドより大きなオリゴペプチドは含まれていない。(第二章に詳述)

2. 試薬

合成ペプチド Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp、Pro-Hyp、Gly-Pro、Pro-Ala、Ala-Hyp、Hyp-Gly は、和光純薬工業より購入した。安定同位体標識トリペプチド $[^{13}\text{C}_2]$ Gly-Pro-Hyp、 $[^{13}\text{C}_2]$ Gly-Pro-Ala、 $[^{13}\text{C}_2]$ Gly-Ala-Hyp はペプチド研究所より、またジペプチド $[^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}]$ Pro-Hyp、Gly- $[^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}]$ Pro、 $[^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}]$ Pro-Ala、 $[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ Ala-Hyp、Hyp- $[^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}]$ Gly はスクラムより購入した。トリチウム標識 Gly- $[^3\text{H}]$ Pro-Hyp は、積水メディカル社にて製造した。アセトニトリル(HPLC-MS grade)、ギ酸、トリフルオロ酢酸(TFA)、トリクロロ酢酸(TCA)は和光純薬工業社製を、生理食塩水は大塚製薬工場社製の日本薬局方生理食塩液を、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline: PBS)はシグマアルドリッチジャパン社製を用いた。

3. ラットへの投与試験

本実験は神奈川県立獣医学大学動物実験指針に基づき実施された。9週齢のWister系ラットは日本クレアより購入した。動物飼育室内は、温度 $23 \pm 2^\circ \text{C}$ 、湿度 $55 \pm 2\%$ に調整し、12時間ごとの明暗サイクルとした。ラットは、固形試料と水を自由摂取させて3日間予備飼育を行った。予備飼育後、群間の平均体重のばらつきが少なくなるように3群に分け、それぞれ経口投与群(n=5)、腹腔内投与群(n=5)、非投与群(n=3)とした。経口投与群は、CTP-100/pigの生理食塩水溶液をゾンデで胃内に直接投与し、10、30、60、120分後に麻酔下で尾先を僅かに切断して採血した。腹腔内投与群は、生理食塩水に溶解したCTP-100/pigを腹腔内に注射し、10、30、60、120分後に尾静脈より数滴の血液を採取した。また非投与群では、尾先からの採血のみ実施した。なお、投与量はいずれの場合も体重1kg当り446mgとした。また、採集した血液は 4°C で15分間遠心

(22,000×g)して血清画分とし、分析まで−80° C にて保存した。

4. 標準溶液の調製

トリペプチドおよびジペプチドは 0.1% TFA 水溶液とし、段階希釈法により濃度の異なる 4 種の標準溶液(STD 1~4)を調製した。各ペプチドの STD1~4 の濃度は、Gly-Pro-Hyp; 7, 35, 175, 351 nmol/mL、Gly-Pro-Ala; 8, 41, 205, 410 nmol/mL、Gly-Ala-Hyp; 8, 39, 193, 386 nmol/mL、Pro-Hyp; 9, 44, 219, 438 nmol/mL、Gly-Pro; 12, 58, 290, 581 nmol/mL、Pro-Ala; 11, 54, 269, 537 nmol/mL、Ala-Hyp; 10, 49, 247, 495 nmol/mL、Hyp-Gly; 11, 53, 266, 531 nmol/mL とした。さらに各 STD1~4 には、安定同位体標識ペプチドを内標準として添加した。なお各 STD に含まれる内標準の濃度は、Gly-Pro-Hyp; 36 nmol/mL、Gly-Pro-Ala; 44 nmol/mL、Gly-Ala-Hyp; 40 nmol/mL、Pro-Hyp; 62 nmol/mL、Gly-Pro; 53 nmol/mL、Pro-Ala; 65 nmol/mL、Ala-Hyp; 52 nmol/mL、Hyp-Gly; 62 nmol/mL とした。

5. 血清試料の調製

ラットへの投与試験で得られた血清 10 μ L に最終濃度が各 STD と同じになるように内標準(0.1% TFA 水溶液)を添加した。次に、調製血清と同量の 4% TCA 水溶液を加えて 4° C で 15 分間遠心(20,000×g)した。次いで、上清をフィルター(0.2 μ m, MF-Millipore)でろ過し、ろ液の一部(10 μ L)を LC-MS/MS 分析に付した。

6. LC-MS/MS (SRM)分析

LC-MS/MS : 高速液体クロマトグラフは UFLC(島津製作所)を、質量分析計は 4000 QTRAP(エービー・サイエックス)を用いた。LC-MS/MS の分析条件は表 1-1 に、モニターイオンならびにフラグメントイオンに関する情報は表 1-2 に示した。データの解析には付属の Analyst software, version 1.4.1 を用いた。検量線法を用いて求めた測定値から、各ペプチドの血中濃度を算出した。さらに、血中濃度の経時的变化から台形法で AUC(血中薬物濃度-時間曲線下面積)を算出した。

表 1-1. LC-MS/MS の測定条件

Column	Sunniest RP-AQUA column (2.1 mm×150 mm), 5 μm
Column oven	30° C
Flow rate	0.2 mL/min
Mobile phase	Eluent A: 0.1% (v/v) formic acid in water Eluent B: 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
Gradient condition (Eluent B in A)	Eluent B: 0 → 10% (0-0.5 min) Eluent B: 10 → 30% (0.5-4.0 min)
Injection volume	10 μL
Ionization	Positive ion electrospray (ESI)
Analysis mode	Multiple reaction monitoring (MRM)
Capillary voltage	4.5 kV
Desolvation voltage	25 V
Collision voltage	30 V
Gas temperature	600° C
Curtain gas	Nitrogen, at 12 L/h, 65 psi

7. 全身オートラジオグラフィー

本試験は、積水メディカル社の動物実験指針に基づき実施した。5 週齢の雄性 Crj:CD(SD) IGS ラットは日本チャールズリバー社より入手した。室温 23±2° C、湿度 55±10%、明暗サイクル 12 時間(6:00~18:00)で 1 週間、環境に馴化させた。飼料(AIN-93G、オリエンタル酵母社製)と水は自由摂取とした。16 時間の絶食後、大塚製薬工場社製の注射用蒸留水に溶解したトリチウム標識 Gly-[³H]Pro-Hyp 溶液 (0.35 mmol, 5 mL)を、ゾンデを用いて胃内に直接投与した。ラットは、24 時間後、エーテル麻酔死させた。次いで速やかに被毛を刈り取り、鼻腔および肛門を 5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)で塞いだ後、ドライアイス冷却アセトン(-78° C)中で凍結した。得られた凍結死体より前肢および尾部を切離した後、マイクロームステージ上の 5% CMC-Na に包埋し、再びドライアイス冷却アセトンを用いて包埋状態で凍結した後、クライオマイクローム(クライオマイクロカット、Leica 社製)を用いて厚さ 35 μm の凍結切片とし、接着テープ(No.810、住友 3M 社製)に張り付けて凍結乾燥した。乾燥後の切片を X 線フィルム(Hyperfilm、アマシャムファルマシアバイオテック社製)に密着させ、4° C 前後で 12 時間暴露した後、X 線フィルムを現像し、全身オートラジオグラムを作製した。

8. 統計解析

統計解析には Stat Flex for Windows の version 5.0(アーテック社製)を用いた。一元配置分散分析を実施後、多重比較検定にて群間の平均値を比較した。なお、有意差は、危険率 $p < 0.05$ を基準とした。

第3節 結果

第1項 オリゴペプチド測定系の確立

まず、各オリゴペプチドの HPLC における保持時間およびマススペクトル分析におけるイオン形式と至適モニターイオンを検討した。図 1-1 は、3 種のトリペプチド Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp のマスクロマトグラムである。ここに示したクロマトグラムは、高感度測定に適した多重反応モニタリング(multiple reaction monitoring: MRM)法により生成したイオンをモニターイオンとしており、それぞれ $m/z = 127$ 、 127 、 132 である。これらトリペプチドの HPLC における保持時間は、Gly-Pro-Hyp および Gly-Pro-Ala は 5.18 分、Gly-Ala-Hyp は 4.75 分であり、前二者を HPLC で分離することはできなかった。一方、質量分析のモニタリングに用いる一次イオンの分子量は、それぞれ 286、244、260 で各イオンおよび分子量が 2 多い各内標準物質を含めてこれら 6 者の分離は良好であり、さらにその一次イオンから生成する二次イオンをモニターイオンとする MRM 法の適用が可能であることが明らかとなった(表 1-2)。したがって、これら 3 種のトリペプチドの LC-MS/MS による高感度測定が可能であることが判明した。

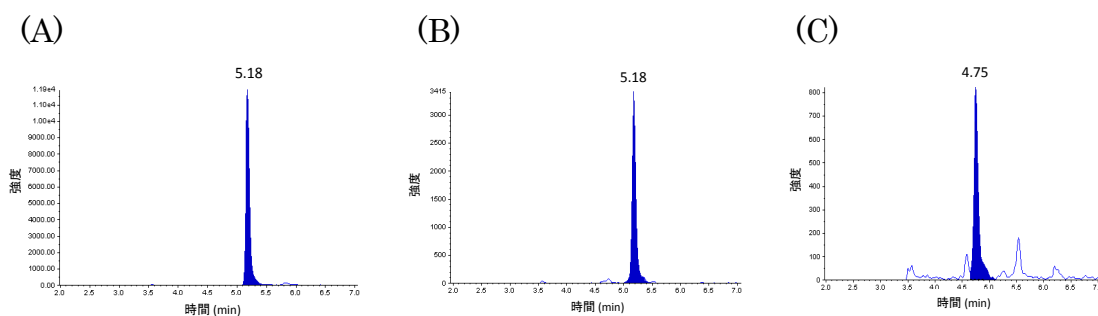


図 1-1. トリペプチドのクロマトグラム

(A) Gly-Pro-Hyp、(B) Gly-Pro-Ala、(C) Gly-Ala-Hyp

検出イオンは、 $m/z = 127$ (A)、 127 (B)、 132 (C)を用いた。

保持時間は、5.18 分(A)、5.18 分(B)、4.75 分(C)。

表 1-2. モニターイオンおよびフラグメント様式

Peptide	一次イオン (m/z)	二次イオン (m/z)	フラグメント様式
Gly-Pro-Hyp	286	127	a2
[$^{13}\text{C}_2$]Gly-Pro-Hyp	288	129	a2
Gly-Pro-Ala	244	127	a2
[$^{13}\text{C}_2$]Gly-Pro-Ala	246	129	a2
Gly-Ala-Hyp	260	132	y1
[$^{13}\text{C}_2$]Gly-Ala-Hyp	262	132	y1
Pro-Hyp	229	132	y1
[$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}$]Pro-Hyp	235	132	y1
Gly-Pro	173	116	y1
Gly-[$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}$]Pro	179	122	y1
Pro-Ala	187	70	Immonium
[$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}$]Pro-Ala	193	75	Immonium
Ala-Hyp	203	132	y1
[$^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$]Ala-Hyp	207	132	y1
Hyp-Gly	189	86	Immonium
Hyp-[$^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$]Gly	192	86	Immonium

a2: *N*末端側 2 つ目のアミド基手前の C-CO 結合の開裂による fragment ion

y1: *C*末端側アミド基の CO-NH 結合の開裂による fragment ion

Immonium: *N*末端側アミド基手前の C-CO 結合の開裂による iminium ion

図 1-2 は、5 種のジペプチド Pro-Hyp、Gly-Pro、Pro-Ala、Ala-Hyp、Hyp-Gly のマスクロマトグラムである。これらジペプチドの保持時間は、4.72~4.75 分とクロマトグラフ上の挙動はほとんど同一であったが、トリペプチドの場合と同様に一次イオンの分子量に重なりが無いことから、適切なモニターイオンの選択により、LC-MS/MS による測定が可能であることが判明した。

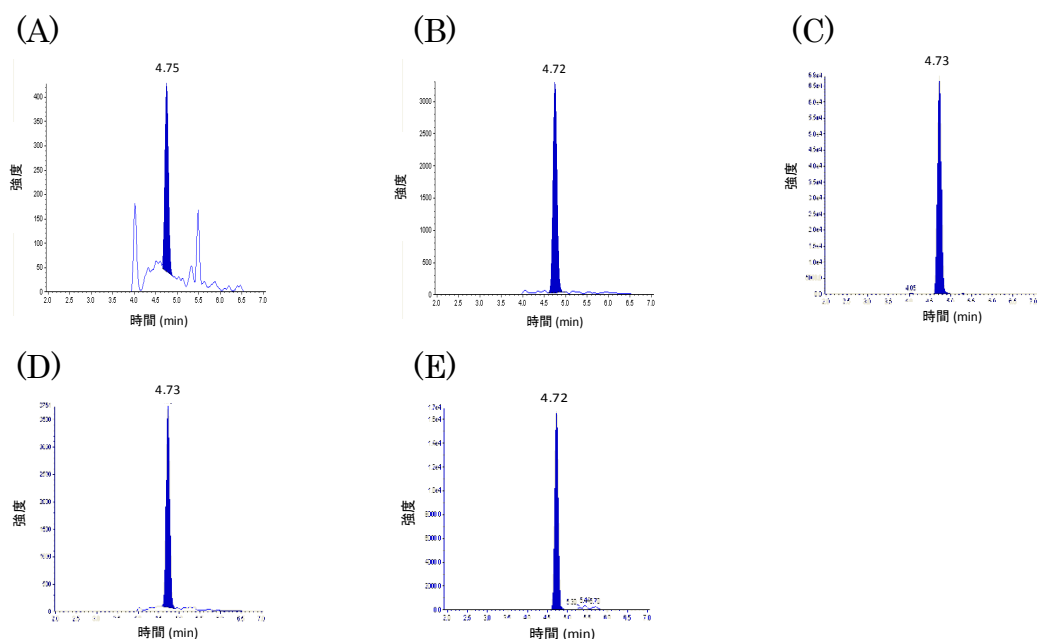


図 1-2. ジペプチドのクロマトグラム

(A) Pro-Hyp、(B) Gly-Pro、(C) Pro-Ala、(D) Ala-Hyp、(E) Hyp-Gly
 検出イオンは、それぞれ $m/z = 132$ (A)、 116 (B)、 70 (C)、 132 (D)、 86 (E)
 を用いた。

保持時間は、4.75 分(A)、4.72 分(B)、4.73 分(C)、4.73 分(D)、4.72 分(E)。

引き続き、トリペプチドおよびジペプチドの溶出におけるピークの形状は良好であったことから、標準溶液(STD1~4)を用いて、ピーク高さ(イオン強度)と注入量に基づいた検量線を作成した。表 1-3 に示した様に、多くのペプチドで測定値の相関係数は 0.99 以上であり、最も値が低かった Pro-Hyp でも 0.981 と良好な相関性が確認された。また、3 回の分析における測定誤差はいずれも 10%以下と再現性も良好であった。本研究における動態解析の対象であるトリペプチド Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Pro の定量下限値は、それぞれ 0.175、0.41 および 1.157 pmol/mL であり、またジペプチド類についても *in vitro* 実験で代謝物として見出された Pro-Hyp が 4.381 pmol/mL で、他に CTP-100/pig からの代謝物として生成が想定される Gly-Pro、Pro-Ala、Ala-Hyp は、それぞれ 1.162、0.054、0.989 pmol/mL と、本分析法はこれらトリペプチドならびにジペプチドの高感度測定に適していることが判明した。なお、各ペプチドの検出下限値ならびに定量下限値は、これまでのオリゴペプチド類の LC-MS/MS による分析例[37]の 1/100~1/200 程度であり、より優れたものであ

った。

表 1-3. 本測定系の直線性、再現性、定量限界および検出限界

Peptide	Correlation coefficient	RSD (%) of STD1	LOQ ¹⁾	LOD ²⁾
			(pmol/mL)	(pmol/mL)
Gly-Pro-Hyp*	0.999	3	0.175	0.035
Gly-Pro-Ala*	0.999	8	0.41	0.123
Gly-Ala-Hyp*	0.999	5	1.157	0.366
Pro-Hyp*	0.981	6	4.381	1.314
Gly-Pro**	0.999	4	1.162	0.348
Pro-Ala**	0.999	2	0.054	0.016
Ala-Hyp*	0.999	10	0.989	0.297
Hyp-Gly*	0.997	1	0.159	0.053

* : LC-MS で測定。 ** : LC-MS/MS で測定。 1) S/N 比=5。 2) S/N 比=2。

第2項 ラット血清中に含まれる各オリゴペプチド濃度の基礎値

前項で有効性を確認した LC-MS(/MS)を用いる高感度測定法により、非処置ラット血清中の各ペプチド濃度を測定した(表 1-4)。ラット血清中には CTP-100/pig に含有されているものおよび代謝産物として想定した全てのオリゴペプチドが確認された。なかでも Pro-Hyp は 3 nmol/mL 前後の濃度を示し、測定したオリゴペプチドの中では最も高濃度であった。また、CTP-100/pig 中の含有率が最も高い Gly-Pro-Hyp も 0.5 nmol/mL 弱の濃度で血中に存在することが判明した。その他、CTP-100/pig に含まれるトリペプチド Gly-Pro-Ala や Gly-Ala-Hyp も検出され、それらの濃度は 0.026 nmol/mL および 0.003 nmol/mL であった。一方、Pro-Hyp 以外のジペプチドは、Gly-Pro が 0.2 nmol/mL、Ala-Hyp が 0.02 nmol/mL、Pro-Ala が 0.05 nmol/mL、Hyp-Gly が 0.03 nmol/mL 程度存在することが明らかとなった。なお、これらの値は、CTP-100/pig に含まれるオリゴペプチドあるいはそれらから生成するジペプチドの体内動態を検討する上での基礎値となるものである。

表 1-4. ラット血中の各オリゴペプチド濃度(基礎値)

Peptide	Peptide concentration mean ± S.D. (pmol/mL)
Gly-Pro-Hyp	484 ± 239
Gly-Pro-Ala	26 ± 3
Gly-Ala-Hyp	3 ± 1
Pro-Hyp	3,034 ± 315
Gly-Pro	214 ± 56
Ala-Hyp	24 ± 5
Pro-Ala	50 ± 14
Hyp-Gly	34 ± 7

n=3 の平均値で示した。

第3項 CTP-100/pig の経口あるいは腹腔内投与による血中トリおよびジペプチド濃度の経時的変化

引き続き、CTP-100/pig 投与時の血中オリゴペプチドの濃度推移を検討した。CTP-100/pig は生理食塩水溶液として、ラットに体重 1 kg 当り 446 mg を経口で、あるいは腹腔内に投与し、投与後 10 分、30 分、60 分および 120 分における血中オリゴペプチド濃度を測定した。なお、投与に用いた CTP-100/pig は混合物で、含まれるトリペプチドは、前述の如く Gly-Pro-Hyp (34%)、Gly-Pro-Ala (15%)、Gly-Ala-Hyp (4%) である。図 1-3 にトリペプチドの血中濃度推移を示す。

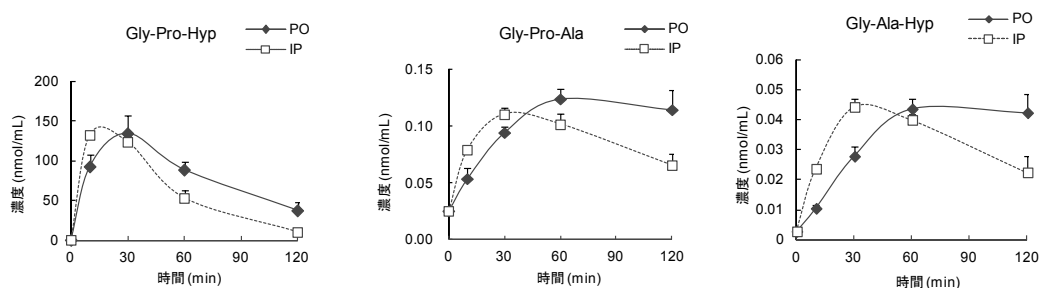


図 1-3. CTP-100/pig 投与後の血中トリペプチド濃度の推移
シンボル◆：経口投与群、□：腹腔内投与群
図中のエラーバーは、標準誤差 (n=5)

Gly-Pro-Hyp の血中濃度は、CTP-100/pig を経口投与すると投与後 10 分時には急激に上昇しており、30 分時に最高濃度(Cmax)に達した後減少に転じ、60 分時には 10 分時とほぼ同等の濃度となり、120 分時には Cmax の 1/3 程度にまで減少した。一方、CTP-100/pig を腹腔内に投与すると、Gly-Pro-Hyp の血中濃度は投与後 10 分時には Cmax 付近に達し、その後減少に転じ、120 分時には基礎値程度の値となった。なお、30 分時の濃度は、10 分時のその 95%程度であった。また、Cmax は経口投与も腹腔内投与もほぼ同等であり、その値は 130 nmol/mL 以上と基礎値の 300 倍近い高い濃度に達していた。これら両者の結果を比べると、Gly-Pro-Hyp の体内移行は比較的速やかに行われること、また AUC 値の比較から移行量は両投与形態間でほぼ同等と見られた。

他の 2 種トリペプチド Gly-Pro-Ala および Gly-Ala-Hyp の体内動態は、概ね同等で、経口投与では 60 分時が、腹腔内投与では 30 分時が Cmax となったが、その値はいずれの場合も投与形態間で有意差はなかった。

次いで、トリペプチドの分解について検討した。生体内には様々なペプチダーゼが存在することから、体内に取り込まれた CTP-100/pig 由来のトリペプチドは、*N*末端側あるいは *C*末端側から加水分解され、ジペプチドとなるものと考えられる。そこで、分解の指標として Pro-Hyp、Pro-Ala、Ala-Hyp、Gly-Pro の血中濃度を測定し、その動態解析を試みた。図 1-4 にジペプチドの血中濃度推移を示す。

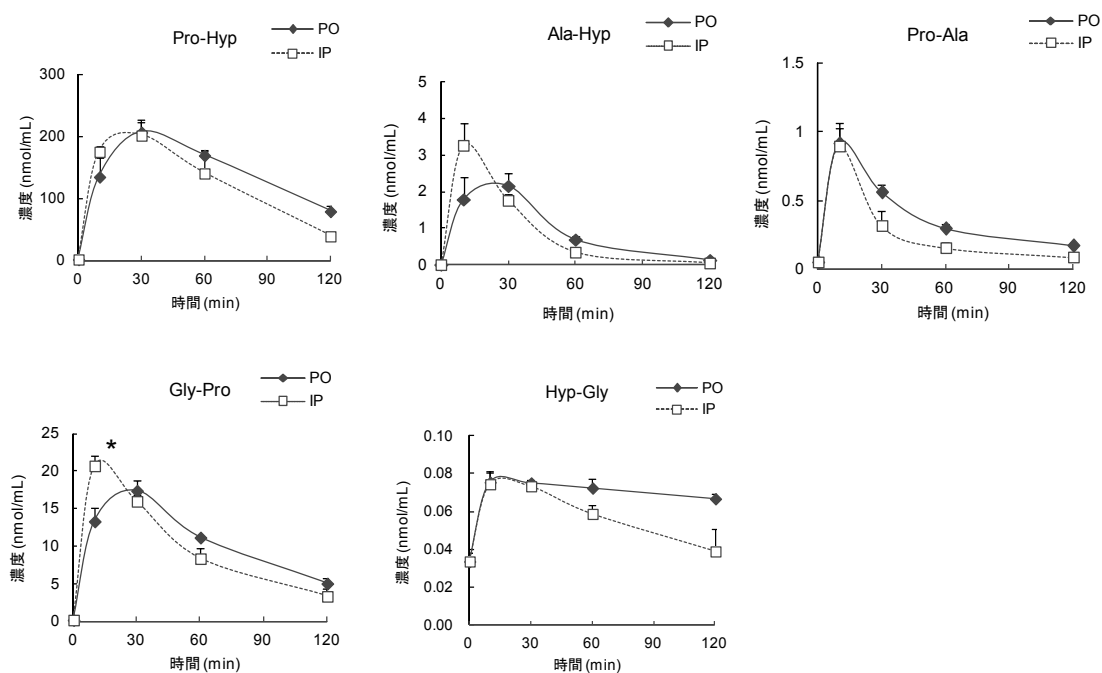


図 1-4. CTP-100/pig 投与後の血中ジペプチド濃度の推移
 シンボル◆：経口投与群、□：腹腔内投与群
 図中のエラーバーは、標準誤差 (n=5)

ジペプチドの中で、最も高い濃度は Pro-Hyp であり、投与形態の如何を問わず C_{max} は 30 分時で、その値はほぼ 200 nmol/mL と基礎値の 67 倍に達した。なお、経口投与と腹腔内投与とを成分ごとに比較したところ、Pro-Hyp、Pro-Ala、Ala-Hyp の 3 成分は C_{max} 、 T_{max} 、AUC 値のいずれについても投与形態間での差異はなく、唯一 Gly-Pro のみで腹腔内投与時の C_{max} が優位に高値であったが、 T_{max} および AUC はこの場合でも投与形態間で有意な差異は認められなかった。CTP-100/pig に含まれるトリペプチドからは生成しない Hyp-Gly をネガティブコントロールとして測定したところ、経口投与・腹腔内投与共に僅かな濃度上昇は見られたものの、10 分時の濃度以上への上昇は認められなかった。

第4項 全身オートラジオグラフィーによる CTP-100/pig に含有される主要トリペプチド Gly-Pro-Hyp の体内分布

次いで、CTP-100/pig に含有されるトリペプチドの組織への移行性を、全身オートラジオグラフィーを用いて検討した。すなわち、Gly-³H]Pro-Hyp を経口投与したラットの全身オートラジオグラムを作成し、放射能の組織分布を観察した。図 1-5 にオートラジオグラムを示す。

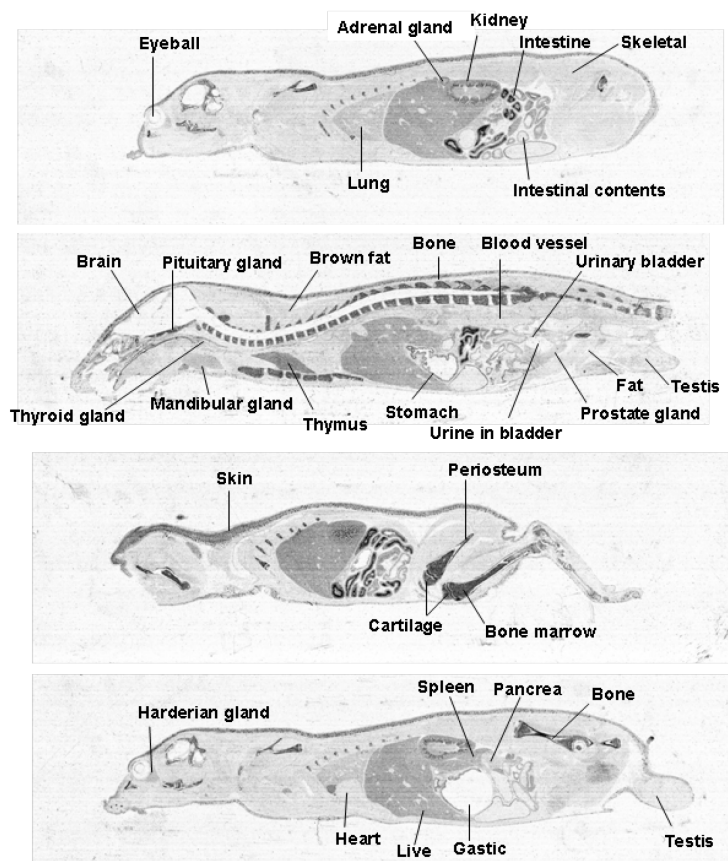


図 1-5. Gly-³H]Pro-Hyp の投与 24 時間後の全身オートラジオグラム
Gly-³H]Pro-Hyp の投与量は 0.5 mmol/kg。

図 1-5 に見られるように、Gly-³H]Pro-Hyp 由来の放射性物質が、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ていることが明らかとなった。なかでも、とりわけ結合組織に多く分布する傾向が観察された。

第4節 考察

本章では、CTP-100/pig をラットに経口投与した場合の血中への吸収性と組織への移行性について検討した。既報の多くは、主に高分子のコラーゲン加水分解物をヒトで経口摂取した際の血中オリゴペプチドについてのものであった [2,36,37]。高分子のコラーゲン加水分解物の摂取時に血中に現れる短鎖のオリゴペプチドは、管腔内酵素(プロテアーゼやペプチダーゼ等)による消化、小腸刷子縁膜のアミダーゼによる膜消化など数々の消化システム [38] を経て生成し、ペプチドトランスポーター PEPT1 の作用により体内に輸送されたものである。一方、CTP-100/pig に含まれるトリペプチドはそのまま PEPT1 の基質になり得ると考えられることから、経口摂取後速やかに消化管から吸収されることが期待される。そこで、Gly-X-Y 配列のトリペプチドを高濃度に含む CTP-100/pig をラットに経口投与し、トリペプチドおよびその加水分解により生成が予想されるジペプチドの血中動態を検討した。

血中オリゴペプチドの測定には LC-MS/MS を用い、定量には安定同位体由来のイオン強度を基準とする同位体希釈法を適用した。これまでに報告された高分子コラーゲン由来の血中オリゴペプチドに関する研究でも測定に LC-MS/MS を用いた例はあるが、精度に劣る外標準法による定量であり、また測定感度も十分ではなかったことから分析対象も比較的高い血中濃度のオリゴペプチドに限定されていた [37]。一方、本研究では低濃度域でも信頼性の高い測定値が得られる同位体希釈法を選択した。S/N 比=5 を基準として定量限界値を求めたところ、トリペプチド Gly-Pro-Hyp では 0.175 pmol/mL であり、表 1-3 に示した 3 種トリペプチドおよび 4 種ジペプチドの定量限界値は 0.054 pmol/mL~4.38 pmol/mL と従来法に比べ本測定法は高感度であった。なお、4 種類の検量線作成用スタンダード(STD-1~4)の測定値を基にした相関係数は全てのオリゴペプチドで 0.98 以上となり、十分な直線性を有していた。さらに、最低濃度(STD-1)の測定値の標準偏差値も 1~10%の範囲と再現性も良好であった。

次いで、本測定法を用いて、コラーゲン加水分解物非投与時の血中トリペプチドおよびジペプチドの測定を行ったところ、通常の血液中でも低濃度ながらトリペプチドやジペプチドが存在することが確認できた。これらは、骨等のコラーゲンを多く含む組織の新陳代謝によって生成したものと考えられる。コラ

ーゲン由来のトリペプチドやジペプチドに骨や皮膚、血管などの細胞に対する生理活性が見出されていること[4-11]から、内在するこれらオリゴペプチドは生体内で何らかの生理学的役割を担っている可能性も考えられる。

次に、経口投与方法と腹腔内投与方法で CTP-100/pig を投与し、血中オリゴペプチド濃度に及ぼす投与形態による差異とその経時的変化を検討した。前者は食品としての摂取法であり、オリゴペプチドは BBM に存在する PEPT1 を介して体内に移送される。一方、後者は成分を直接体内に送入する方法である。CTP-100/pig に含まれる主要トリペプチドは、Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp の 3 種で、それぞれの含有率は 34%、15%、4% である。図 1-3 に示した様に、経口投与では、いずれのトリペプチドにおいても Cmax に至るまでに腹腔内投与に比べて若干ではあるが長時間を要したが、それらの Cmax 値はほぼ同等であった。この結果は、PEPT1 による体内移行が速やかに行われることを示している。一方、Cmax 値はそれぞれの成分で大きく異なり、Gly-Pro-Hyp では 130 nmol/mL を上回るが、Gly-Pro-Ala では 120~130 pmol/mL、Gly-Ala-Hyp では 45 nmol/mL 前後と著しく低値で CTP-100 の含有率を反映する結果とはならなかった。これは、これらトリペプチドの PEPT1 に対する親和性や腸内細菌あるいは BBM 結合性アミダーゼに対する安定性の違いに起因するものと考えられ、興味深い結果である。なお、Cmax の時間(Tmax)について観ると、Gly-Pro-Hyp は腹腔内投与の場合 10 分であり経口投与では 30 分であったが、他の 2 種についてはそれらが 30 分と 60 分であったことから、Gly-Pro-Hyp は血中移行し易いトリペプチドと言える。

血中ジペプチド濃度の推移は、図 1-4 に示した。Pro-Hyp の Tmax は投与形態の如何を問わず 30 分であったが、他の 4 種のジペプチドの Tmax は腹腔内投与では 10 分と早く、経口投与でも Ala-Hyp と Gly-Pro が 30 分、Pro-Ala と Hyp-Gly は腹腔内投与時と同じ 10 分であった。CTP-100 のトリペプチド含有率は 91.8% であり、ジペプチドの混在率は低く、Pro-Hyp が 0.47%、Gly-Pro が 2.0%、Hyp-Gly が 0.05% である。しかし、血中に見出された Pro-Hyp の Cmax は約 200 nmol/mL であり、次いで Gly-Pro では腹腔内投与で 21 nmol/mL、経口投与時には 18 nmol/mL とラットに投与した CTP-100 に含まれるジペプチド量だけでは説明のつかないほどの高い値であることから、これらジペプチドはトリペプチドの加水分解生成物と考えられる。とりわけ、ジペプチド Pro-Hyp

の濃度は高く、主たる前駆物質と考えられるトリペプチド Gly-Pro-Hyp よりも高濃度である。なお、Gly-Pro-Hyp は経口投与時と腹腔内投与時の濃度推移および AUC 値が同じであることを考慮すると、トリペプチドの加水分解反応は体内移行後に起きている可能性が強く示唆される。また、Gly-Pro-Hyp は C 末端側が加水分解されるとジペプチドの Gly-Pro となるが、Gly-Pro の血中濃度も他のジペプチドに比べると高値である。しかし、その値は Pro-Hyp の 1/10 程度であることから、Gly-Pro-Hyp では N 末端側加水分解が C 末端側加水分解に優先するとも考えられる。なお、Gly-Pro の一部は同じく Gly-Pro-Ala から生成する。一方、Gly-Pro-Ala や Gly-Ala-Hyp からの N 末端側加水分解産物と考えられる Pro-Ala および Ala-Hyp は、腹腔内投与時の Cmax 値はそれぞれ 0.9 nmol/mL、3.2 nmol/mL であり、この濃度比は CTP-100 中のトリペプチド Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp の含有率の比を反映していない。これは、N 末側および C 末側加水分解酵素に対するこれら両トリペプチドの感受性の差異と考えられる。また、Pro-Hyp 濃度が異常に高いことから、体内移行後に起こる N 末端側の加水分解反応に関与する酵素の基質特異性は、Gly-Pro-Hyp > Gly-Ala-Hyp = Gly-Pro-Ala の順であろうと推測される。Pro-Hyp の吸収について、Aito-Inoue らは BBM の関与を示唆している[34]。BBM の関与しない腹腔内投与時と経口投与時の血中 Pro-Hyp 濃度の推移を比較したところ、多くのジペプチドにおいて両投与経路間に血中濃度変化の差異は認められなかった。なお、Gly-Pro の場合においてのみ腹腔内投与時の Cmax が有意に高値であったが、Tmax や AUC 値には差は見られず、両投与経路でほぼ同様の濃度変化を示していると言える。

ここで、本研究で得られた結果を基に、前述の BBM 小胞への Gly-Pro-Hyp の取り込み試験においてトリペプチドの取り込みが確認できなかったとの結果[34]について考察を試みる。Aito-Inoue らは BBM 小胞と Gly-Pro-Hyp のインキュベーション時間を最長 8 時間とした。我々の結果は Gly-Pro-Hyp は加水分解を受け易いこと示唆しており、インキュベーション時間が長いと混在するペプチダーゼ等の作用によりトリペプチドの分解が進行し、その結果としてジペプチドのみが検出されたのではないかと推察できる。しかし、放射性標識体を用いてトリペプチドの体内移行研究を行った Watanabe-Kamiyama らは、BBM 小胞へのトリペプチドの取り込み試験がブタの小腸を用いたものであることか

ら、ラットを用いた場合とは種差による結果の違いがある可能性を指摘している[35]。本試験もラットを用いており、結果の違いは種差に起因する可能性も否定はできない。

第5節 小括

本章ではトリペプチド含有率が90%以上のCTP-100/pigを試料とし、経口投与時の吸収および組織への移行性を、ラットを用いて定量的に検討した。その結果オリゴペプチドの体内移行が経口投与時でも腹腔内投与時と同様に進行することを明らかにし、さらに従来の変説に反してトリペプチドのジペプチドへの消化は主に体内移行後に起きていることを示唆した。しかし、これまでのアプローチではジペプチドの生成部位までは明らかに出来ない。そこで、トリペプチドの組織移行を検討することとし、CTP-100/pigの主要トリペプチドであるGly-Pro-Hypの放射性標識体であるGly-³H-Pro-Hypをラットに経口投与して全身オートラジオグラムを作成し、その体内分布を検討した。その結果投与24時間後において、³H-Proを含むトリペプチドあるいはジペプチドが皮膚や骨等を含む結合組織に特異的に移行していることを観察した。また、臨床医より大動脈にも集積があるとの指摘も受けた。

以上、本章ではコラーゲントリペプチドの摂取により生理活性を有するトリペプチドやジペプチドが効率よく体内に移行することを明らかにした。第二章では、コラーゲントリペプチドと従来型のコラーゲン加水分解物をヒトが摂取した場合のオリゴペプチドの血中濃度推移および尿中排泄量を比較する。

第二章 コラーゲン加水分解物摂取時のトリペプチドおよびジペプチドのヒトにおける体内動態

第1節 緒言

コラーゲンあるいはコラーゲンに由来するオリゴペプチドの生物学的効果として、その加水分解物の摂取による関節痛改善効果[12]、骨密度上昇作用[13,14]、血圧低下作用[15]、角質層水分率上昇作用[16,17]、血管保護作用[18]などが報告されている。これらの生物学的効果は加水分解物摂取時に血中に見出される多様なオリゴペプチドの生物活性と密接に関連しており、事実オリゴペプチドの血中濃度に依存する[3,17]。なお、血中オリゴペプチド濃度は加水分解物の摂取量依存的に上昇する[3]。しかし、生物活性の発現が期待できる特定の配列をもったオリゴペプチドの血中濃度を閾値以上に高めるには、従来のコラーゲン加水分解物をサプリメントとして摂取するにはかなりな量が必要となる。例えば、変形性膝関節症寛解や免疫力向上などの効果を得るには、毎日 10 g のコラーゲン加水分解物の経口摂取が必要との報告もある[39,40,41]。また、皮膚組織に対する効果としては、肌質の改善効果には 5 g、肌の弾力性向上には 20 g の経口摂取が必要との報告もある[42,43]。しかし、この量を毎日経口摂取することは非現実的であり、有効成分を効率よく摂取する方法が求められている。そのため、吸収性の向上を目的としてさらに低分子化した製品が開発されて上市されてはいるが、製品に含まれるオリゴペプチドの配列は不規則で、かつ分子量の分布範囲も広い。また、期待する生物活性向上における、低分子化処理の有効性に関する検証もなされていない。

第一章において、CTP-100/pig を経口投与する時、CTP-100/pig の主要成分であり血液凝固抑制作用などの生物活性も見出されている Gly-Pro-Hyp およびその加水分解産物であり関節軟骨形成促進作用などが報告されている Pro-Hyp の血中濃度が急激に上昇することを、ラットを用いた *in vivo* 実験で明らかにした。そこで、本章では、平均分子量の異なる 2 種の CTP (CTP-100/pig と CTP-50/pig) および従来型のコラーゲン加水分解物の経口摂取時の各オリゴペプチドの血中濃度の推移と尿中排泄量を比較検討し、単一エンドプロテアーゼを用いて調製した CTP の優位性を、ヒトを対象とした *in vivo* 試験により検証した。

第2節 実験方法

1. 試料の分子量分布およびペプチド含量の測定

CTP は、ゼライス社より供与を受けた Tp-100(CTP-100/pig)ならびに HACP-50(CTP-50/pig)を用いた。比較対象とする従来型のコラーゲン加水分解物としては、新田ゼラチン社製コラゲネイド(CTP-0/pig)を用いた。なお、本研究で用いた試料はいずれも豚皮コラーゲン由来の製品である。各サンプルを 0.1% (w/v)の濃度で生理食塩水に溶解し、0.45 μm のフィルターを通したものを分析用サンプルとした。サンプルの分子量分布は、以下に示すゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した。カラムは Superdex Peptide gel filtration column (GE ヘルスケアジャパン社製)を用いカラムオープンの温度は 40° C とした。移動相は NaCl (0.15 mM)および CaCl₂ (5 mM)を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)とし、流速は 1.0 mL/分とした。検出には波長 214 nm における UV 吸収を用いた。試料の分子量は、プルラン標準品を用いて作成した検量線に基づいて算出した。トリペプチド Gly-X-Y、ヘキサペプチド(Gly-X-Y)₂、ノナペプチド(Gly-X-Y)₃ の保持時間は、Gly-Pro-Hyp、(Gly-Pro-Hyp)₂、(Gly-Pro-Hyp)₃ の保持時間を基に決定した。トリペプチド含有率は、クロマトグラム上に現れたピークの総面積とトリペプチドに相当するピークの総面積の比として算出した。なお、Gly-Pro-Hyp、Pro-Hyp、Gly-Pro、Hyp-Gly の含量は第一章で述べた LC-MS/MS により測定し、比として表した。

2. 試薬

(Gly-Pro-Hyp)₂ および (Gly-Pro-Hyp)₃ は国産化学社製を、プルラン標品は昭和電工社製 P-82 を用いた。他のオリゴペプチドや試薬については、第一章第2節参照。

3. ヒトでの摂取試験

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、ゼライス株式会社臨床試験倫理委員会の承認を得た上で実施した(承認日：2012年7月3日)。投与試験はゼライス中央研究所の健常男性4名(平均年齢 41.5 \pm 5.9 歳、平均体重 59.6 \pm 2.1 kg)を対象とし、事前に全ての被験者に趣旨および試験内容について説明を行って同意を得た上で実施した。試験は仙台社会保険病院で実施した。被験者は12時

間前から絶食をして試験に臨み、試験開始時に体重 1 kg 当り 80 mg に相当する量の試料を水 100 mL に溶解して経口摂取した。なお、血中の消長や尿中排泄量を検討するトリペプチドはゼラチンの最多配列である Gly-Pro-Hyp とした。なお、その試料中含有量は CTP-100/pig では 5,685 μmol 、CTP-50/pig では 1,170 μmol であったが、CTP-0/pig には含まれていなかった。被験者は、試料摂取後 65 分時および 125 分時に小さいおにぎり(約 60 g、動物性タンパク質を含まない)を食し、また試験時間および採血回数を考慮して脱水予防を目的に 30 分ごとに 30 mL の水を約 15 分かけてゆっくりと飲用した。試料摂取直前と摂取後 5、15、30、60、120、240 分時に、静脈血(約 5 mL)を採取した。採取した血液は、4° C で 10 分間遠心(800×g)し、得られた血漿画分は測定までディープフリーザー(-80° C)に保存した。一方、尿は試料摂取直前にスポット尿を採取し、さらに摂取後 12 時間までの尿を蓄尿した。尿は一部をクレアチニン測定(仙台社会保険病院に依頼)に供し、残りはオリゴペプチド測定までディープフリーザー(-80° C)に保存した。なお、2 週間以上の間隔を設けて、同一の 4 名を被験者として上記のプロトコルにしたがって未試験試料について実験を繰り返し、その都度試料摂取前後の血液および尿を採取した。

4. 標準溶液の調整

標準溶液としてのトリペプチドおよびジペプチドの 0.1% TFA 溶液は、第一章第 2 節の 4 参照。なお、本検討では外標準法を用いた。

5. オリゴペプチド測定用試料の調製

被験者の血液より調製した血漿画分あるいは尿は、10 μL に対して 90 μL の 4% TCA を加えて十分に混和した後、4° C で 15 分間遠心(21,880×g)した。これを LC-MS/MS 分析に供した。なお、検量線範囲を超えたサンプルについては、血漿 10 μL を PBS で 10 倍に希釈した後、上記の処理をして再測定した。CTP-100/pig、CTP-50/pig は、1.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で移動相に溶かし分析した。含まれるジペプチドおよびトリペプチドが微量であったことから、CTP-0/pig については 0.1 mg/mL の濃度で移動相に溶かし分析した。

6. 尿中オリゴペプチドの分析

本検討において測定対象としたオリゴペプチドは、Gly-Pro-Hyp、Pro-Hyp、Gly-Pro、Hyp-Gly であり、第一章 第 2 節の 6 に従って分析した。12 時間の蓄尿中へのオリゴペプチドの排泄量は、尿中のオリゴペプチドの濃度と尿量から算出した。試料非摂取時の蓄尿は実施しなかったため各ペプチドの排泄量は、摂取直前尿中の各ペプチド濃度と尿中クレアチニン濃度から推定したクレアチニン補正值を用いた。すなわち、クレアチニンの排泄量は 24 時間で 1 g とされることから、非摂取時の 12 時間蓄尿中の各ペプチド量はクレアチニン 0.5 g 等量とした。なお、試料摂取前のスポット尿は試料摂取時に毎回採取し、それら全て(n=12)の平均値で表した。

7. 統計解析

第一章第 2 節の 8 に従って実施した。

第3節 結果

第1項 試料中に含まれるペプチド成分

図 2-1 は、ゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムである。CTP-100/pig の平均分子量は約 300 Da でトリペプチド含有率は約 92%であり、それより大きなオリゴペプチドは含んでいなかった。CTP-50/pig の平均分子量は約 600 Da でトリペプチド含有率は約 51%であり、(Gly-X-Y)_n で表されるヘキサペプチドおよびノナペプチドも少量共存した。一方、CTP-0/pig に含まれるペプチド成分の分子量分布は広く、その平均分子量は約 5,000 Da であった。このような広い分布は、プロテアーゼ処理によるランダム分解で低分子化された従来型のコラーゲン加水分解物の特徴といえる。なお、LC-MS/MS により測定した各試料中の Gly-Pro-Hyp 含量は、CTP-100/pig では 34%、CTP-50/pig では 7%、CTP-0/pig では 0%であった(表 2-1)。また、全ての試料に少量ではあるがジペプチド Pro-Hyp、Gly-Pro、Hyp-Gly の存在も確認した。

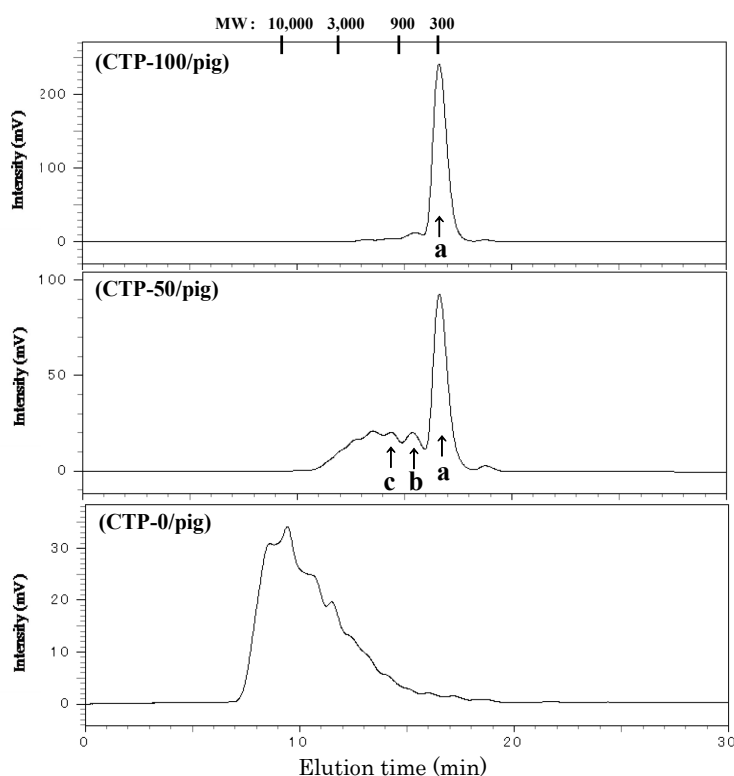


図 2-1. 試料中のペプチド成分の分子量分布

グラフの上部にプルラン標品中の各分子量マーカーの溶出位置を、また各クロマトグラム内の矢印は、オリゴペプチドの溶出位置を示す。なお、a: Gly-Pro-Hyp、b: peak of (Gly-Pro-Hyp)₂、c: peak of (Gly-Pro-Hyp)₃。

表 2-1. 試料中のペプチド含有率

試料	平均分子量 (Da)	総トリペプ チド含有率(%)	ペプチド含有率(%)			
			Gly-Pro-Hyp	Pro-Hyp	Gly-Pro	Hyp-Gly
CTP-100/pig	300	91.80	34.00	0.47	2.00	0.05
CTP-50/pig	600	50.66	7.00	0.17	0.10	0.03
CTP-0/pig	5,000	1.59	0.00	0.01	0.06	0.02

Da: dalton.

第2項 血中トリペプチドおよびジペプチド濃度の経時的変化

試料摂取後のオリゴペプチドの血中濃度変化を図 2-2 に示した。まず、トリペプチド Gly-Pro-Hyp について観ると、CTP-100/pig および CTP-50/pig では摂取直後から濃度が急激に上昇し、30~60 分時に Cmax を迎えた。その後血中濃度は徐々に低下し、240 分時にはほぼ非摂取時のレベルにまで低下した。一方、CTP-0/pig の摂取では Gly-Pro-Hyp の血中濃度の有意な上昇は観察されなかった。Cmax は、CTP-100/pig 摂取時では 21.8 nmol/mL であり、CTP-50/pig では 9.2 nmol/mL と CTP-100/pig の半分程度であった。血中 Pro-Hyp 濃度の上昇はどの試料摂取時にも観察され、Tmax はいずれの場合も 60 分時であった。その後血中濃度は徐々に低下したが、240 分時でも基礎値に比べて有意な高値が保たれていた。一方、Gly-Pro の血中濃度は、CTP-100/pig 摂取時では 240 分時まで徐々に上昇し続け、CTP-50/pig では若干の上昇は観られたものの、その後一定濃度で推移した。また CTP-0/pig 摂取時の増加量は、極めて少ないものであった。CTP-100/pig を摂取した場合、主トリペプチドである Gly-Pro-Hyp の 0 分から 240 分の AUC 値は 41.1 ($\mu\text{mol/mL}$) \cdot 4h であり、トリペプチド含有率が約 50% の CTP-50/pig 摂取時には 19.7 ($\mu\text{mol/mL}$) \cdot 4h と CTP-100/pig 摂取時に比べてほぼ 1/2 であった。また同様に、ジペプチド Pro-Hyp の血中濃度は、AUC 値で比較すると CTP-50/pig 摂取時は 63.2 ($\mu\text{mol/mL}$) \cdot 4h であり、CTP-100/pig 摂取時(120.8 ($\mu\text{mol/mL}$) \cdot 4h)の約 1/2 であった。次に、Hyp-Gly の血中濃度を比較した。本配列はコラーゲン中には最も高頻度に現れる配列ではあるものの、グリシンを N 末端とするトリペプチド Gly-X-Y からは生成し得ないジペプチドである。一方、各試料中のジペプチド Hyp-Gly の含有率は CTP-100/pig では 0.05% であり、CTP-50/pig では 0.03%、CTP-0/pig では 0.02% と極めて小さい(表 2-1)。したがって、本検討で観察した Hyp-Gly の血中濃度は各試料の含有率を反映したものではない。これは、摂取された試料中の Hyp-Gly 配列をもつオリゴペプチドが腸内細菌等により部分加水分解を受けてジペプチド Hyp-Gly が生成し、トランスポーター PEPT1 を介して体内に吸収された結果と考えられる。事実、本検討で使用した試料の中では、血中 Hyp-Gly の濃度は CTP-100/pig 摂取時が最も低い値であった。CTP-50/pig の摂取時には、他の 2 者に比べると Hyp-Gly の血中濃度は急激に上昇した。また、CTP-0/pig 摂取時にはジペプチド Hyp-Gly の血中濃度の上昇は CTP-100/pig とほぼ同程度であ

った。

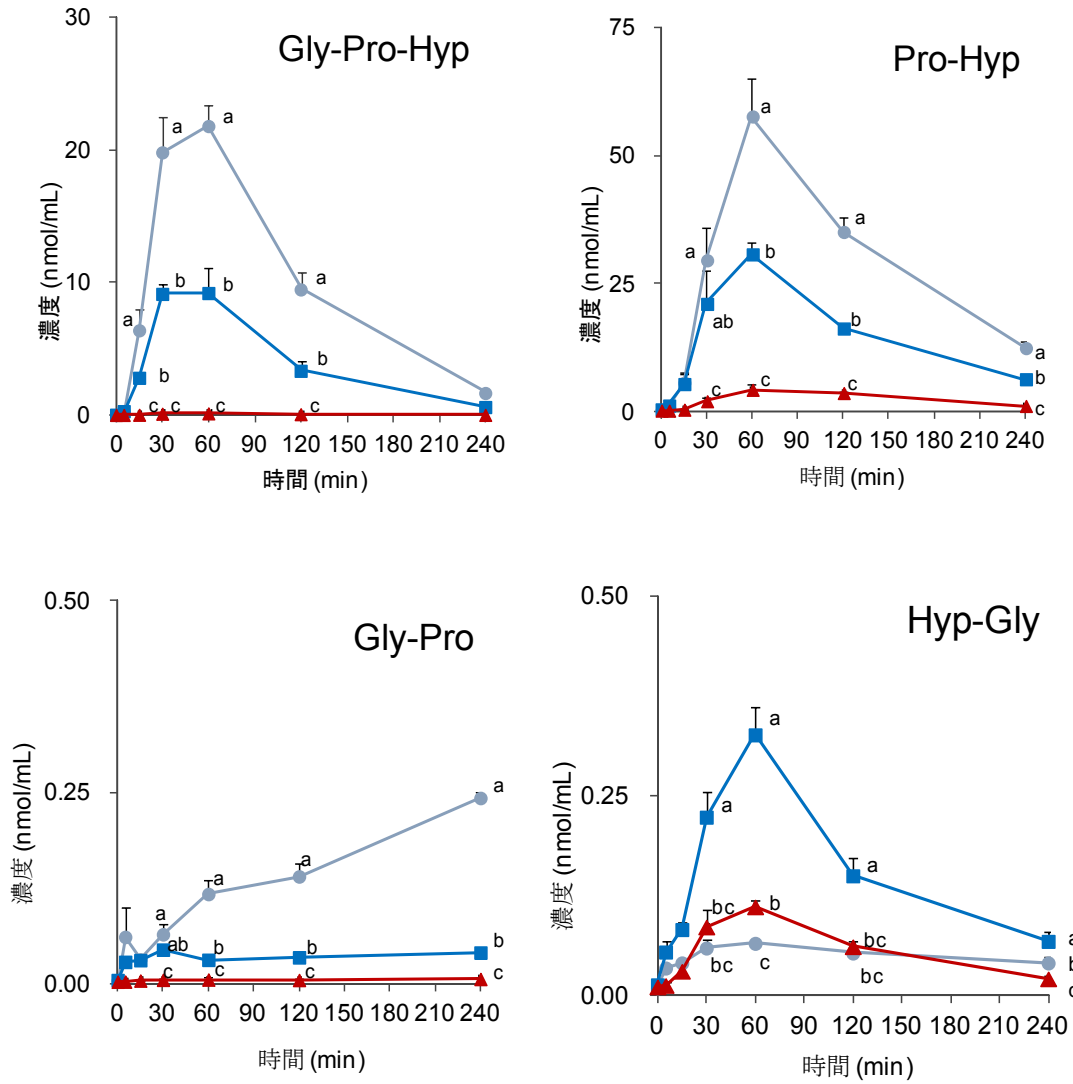


図 2-2. 試験食摂取後の血漿中ペプチド濃度の推移

図中のシンボル●は CTP-100/pig、■は CTP-50/pig、▲は CTP-0/pig を、誤差線は標準誤差を示す(n=4)。また、a, b, c はその測定ポイントにおいて、異なる文字間で有意な差があることを示す($p < 0.05$)。

第3項 トリペプチドおよびジペプチドの尿への排泄

試料摂取後のオリゴペプチドの尿中排泄量を、摂取後 12 時間の蓄尿を用いて検討した。なお、非摂取時の各オリゴペプチドの 12 時間当たりの排泄量は、クレアチニン補正值を用いた。結果を表 2-2 に示す。試料非摂取時の尿中濃度はジペプチド Pro-Hyp が最も高い値を示した。また、ごく低濃度ではあるが、Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro、Hyp-Gly も検出された。試料摂取後のトリペプチド Gly-Pro-Hyp およびジペプチド 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 がそれに続いた。CTP-0/pig では Pro-Hyp 以外の排泄は僅かであった。

いずれの試料摂取時も、最も多く排泄されたオリゴペプチドは Pro-Hyp であり、その量は CTP-100/pig で 1072.97 $\mu\text{mol}/12$ 時間であったのに対して CTP-50/pig ではその 1/3 程度、コラーゲン加水分解物では 1/10 未満であり、3 つのサンプル間で排泄量に大きな違いが見られた。Gly-Pro-Hyp でも同様の傾向が見られ、CTP-100/pig の 122.28 $\mu\text{mol}/12$ 時間に対し、CTP-50/pig では 1/5、コラーゲン加水分解物に至っては 1/250 未満であった。Gly-Pro は、CTP-100/pig では 12 時間当たり 15.79 μmol が排泄されたが、CTP-50/pig と CTP-0/pig ではその 1/7 未満であった。Hyp-Gly の排泄量は試料間で差はなかった。

表 2-2. 尿中に排泄されたオリゴペプチド量

試料	尿中排泄量($\mu\text{mol}/12$ 時間)			
	Gly-Pro-Hyp	Pro-Hyp	Gly-Pro	Hyp-Gly
CTP-100/pig *	122.28 \pm 30.03 ^a	1072.97 \pm 170.91 ^a	15.79 \pm 4.10 ^a	0.43 \pm 0.11 ^a
CTP-50/pig *	24.04 \pm 5.83 ^b	399.75 \pm 68.73 ^b	2.12 \pm 0.68 ^b	0.43 \pm 0.11 ^a
CTP-0/pig *	0.46 \pm 0.08 ^c	86.79 \pm 8.50 ^c	0.74 \pm 0.12 ^b	0.29 \pm 0.03 ^a
摂取前**	0.03 \pm 0.06	2.52 \pm 6.15	0.12 \pm 0.31	0.01 \pm 0.02

*は n=4 の平均値 \pm 標準誤差で、**はクレアチニン補正值で n=12 の平均値 \pm 標準誤差である。a, b, c は、その列において異なる文字間で有意な差があることを示す($p<0.05$)。

第4節 考察

序論で詳述した様に、コラーゲン加水分解物摂取時に血中に見出されるトリペプチドやジペプチドの中には、血液凝固抑制作用[4,5]や血圧降下作用[11]などの有用な生理活性を示すものがある。第一章ではトリペプチド含有率の高いCTP-100/pig (91.8%)をラットに経口投与すると血中オリゴペプチド濃度が急激に上昇することを明らかにした。そこで、本章ではヒトを対象としてコラーゲン加水分解物摂取時のオリゴペプチドの血中移行を検討した。摂取するコラーゲン加水分解物試料としては、平均分子量が300 DaのCTP-100/pig、トリペプチドの含有率が約50%で平均分子量が600 DaのCTP-50/pigおよびトリペプチド含有率が2%以下で平均分子量が5,000 DaのCTP-0/pigの3種を用いた。なお、前述の如く腸に存在するペプチドトランスポーターPEPT1はトリペプチドおよびジペプチドを特異的に輸送する[28]ことから、CTP-100/pigの摂取時には主成分のトリペプチドや混在するジペプチドは容易に血中に輸送されるものと推察した。血中オリゴペプチド濃度の推移(図2-2)を観ると、いずれの試料を摂取した場合でもジペプチドPro-Hypの濃度が最も高く、次いでトリペプチドGly-Pro-Hypであった。同様の傾向は、第一章でラットを用いて検討したCTP-100/pig投与時のオリゴペプチドの血中移行においても観察されており(図1-3および1-4)、かつ非摂取時においても同様であった(表1-4)。CTP-50/pigの平均分子量が600 Daであること、またトリペプチドGly-Pro-Hypの含有率が7%とCTP-100/pigの1/5程度であることを考慮すると、CTP-50/pigに多く存在するヘキサペプチド(Gly-X-Y)_nが消化管内で速やかにトリペプチドに変換され吸収されることを示唆している。また、CTP-100/pig摂取時とCTP-50/pig摂取時のAUC値の比がGly-Pro-HypおよびPro-Hyp共に約1/2であることは、ジペプチドPro-HypはトリペプチドGly-Pro-Hypの加水分解生成物であることを示唆している。一方、Pro-Hypと同様にGly-Pro-Hypから生成すると考えられるGly-Proの血中濃度は、Pro-Hypの血中濃度の1/100以下であり、ラットでも観察したようにヒトにおいてもN末端側の加水分解物であるPro-Hypが優先的に生成する傾向が認められた。なお、CTP-0/pig摂取時にはGly-Pro-Hypの血中濃度の上昇は見られず、Pro-Hypの血中濃度も他の2種に比べると有意に低値であったことから、本研究で用いたコラーゲン加水分解物3種の中ではCTP-100/pigのみならずCTP-50/pigもトリペプチドおよびジペプチドの優れた

供給源であることが明らかになった。また、CTP-100/pig 摂取時の血中 Pro-Hyp 濃度は摂取後 60 分時に Cmax を迎えたが、平均分子量の異なる CTP-50/pig や CTP-0/pig の摂取時においても Cmax は大きく異なるものの Tmax には差異は認められなかった。ここで、平均分子量が CTP-0/pig と同程度の魚鱗コラーゲン(ゼラチン)加水分解物を用いた同様の検討において、血中 Pro-Hyp 濃度の Tmax は摂取後 2 時間との報告[37]がある。コラーゲンの基本配列はほぼ同じであることから、この差は原料生物の種差の影響も若干はあるものの摂取量(80 mg/kg 体重 vs 385 mg/kg 体重)の違いによる所要消化時間の差が主因と考えられる。この結果は、血中ポリペプチド濃度の推移を検討する上で、所要消化時間は考慮すべき重要な因子であることを示唆している。本研究で摂取後 120 分、さらに 240 分時の血中オリゴペプチド濃度をモニターした結果、用いたコラーゲン加水分解物 3 種の Tmax が同じであった。このことから、それぞれの所要消化時間に差異はなく、したがって見出した Cmax および AUC 値の差異は確度の高い結果と判断できる。

トリペプチド Gly-X-Y からは生成し得ないジペプチド Hyp-Gly の血中濃度についての検討では、CTP-100/pig 摂取時と CTP-0/pig 摂取時でほぼ同等の濃度変化が観察された。CTP-100/pig では 91.8%がトリペプチドのため、血中 Hyp-Gly の供給源は試料中に僅かに含まれるジペプチド Hyp-Gly であり、その含有率が 0.05%であることで血中濃度の低さは矛盾なく説明できる。しかし、平均分子量が 5,000 Da の CTP-0/pig では分子中に多く見られる Hyp-Gly 配列から加水分解により遊離したジペプチド Hyp-Gly が供給源になるものと考えられるため、Hyp-Gly の血中濃度が CTP-100/pig と同程度であることの説明には何らかの考察が必要となる。Liu らは、Hyp-Gly をラットに経口投与した場合には血中 Hyp-Gly の濃度は上昇するが、ポリペプチド(Pro-Hyp-Gly)₅を投与した場合にはジペプチド Hyp-Gly は血中に検出されないと報告している[45]。これは、消化管内での高分子ペプチドの加水分解ではジペプチド Hyp-Gly の生成量はそれほど多くないことを示唆しており、従来型のコラーゲンペプチドの摂取時における血中 Hyp-Gly 濃度が低値であることの傍証となるものである。一方、CTP-50/pig の摂取時には、血中 Hyp-Gly 濃度はこの 2 者を大きく上回った。CTP-50/pig も Hyp-Gly をごく僅か(0.03%)に含有するものの、その移行のみで CTP-100/pig や CTP-0/pig を大きく上回る濃度変化が起きたとは考えにくい。

CTP-50/pig の平均分子量は 600 Da であり、Hyp-Gly 配列をもつ比較的分子量の小さなオリゴペプチドが試料中に多く存在し、それらは高分子ペプチドに比べて腸内細菌による加水分解を受け易く、CTP-0/pig に比べるとジペプチド Hyp-Gly が多く生成し、それが血中に移行したものと考えられる。

次にオリゴペプチドの尿中排泄について考察する。Watanabe-Kamiyama らは、ラットの血中 Gly-Pro-Hyp が速やかに腎組織へ取り込まれるという知見を得ている [35]。腎組織に取り込まれたペプチドはその後尿中に排泄されることが考えられることから、ヒトにおいても同様に血中に移行したトリペプチドやジペプチドは尿中に排泄されるものと推察した。そこで、本研究では摂取後 12 時間の蓄尿中のペプチド量を測定し、それらの血中濃度と尿中排泄量の相関を検討した(表 2-2)。コラーゲン加水分解物非摂取時も含めてすべての(蓄)尿検体においてジペプチド Pro-Hyp の濃度が最も高いことが判明した。また、検討した 4 種のオリゴペプチドの尿中排泄量はいずれもコラーゲン加水分解物摂取時には増加したが、CTP-0/pig 摂取時には μmol レベルの有意な濃度にまで上昇したオリゴペプチドは Pro-Hyp のみであった。一方、CTP-100/pig 摂取時には Pro-Hyp の $1,073 \mu\text{mol}/12$ 時間となり、Gly-Pro-Hyp の排泄量はその $1/9$ 量の $122 \mu\text{mol}/12$ 時間であった。血中 Gly-Pro-Hyp の AUC 値が同 Pro-Hyp の AUC 値の $1/3$ であることから考えると、血中あるいは腎組織中でも Gly-Pro-Hyp は加水分解を受けて Pro-Hyp となり尿排泄時の量比が変化したものと考えられる。また、CTP-50/pig 摂取時でも同様の傾向は認められ、血中 Gly-Pro-Hyp と Pro-Hyp の AUC 値の比は $1/3$ であるのに対して Gly-Pro-Hyp および Pro-Hyp の排泄量は、それぞれ $24 \mu\text{mol}/12$ 時間および $400 \mu\text{mol}/12$ 時間であり、その量比は $1/33$ にも減少していた。

第5節 小括

本章では、平均分子量の異なる2種のCTP (CTP-100/pig と CTP-50/pig)および従来型のコラーゲン加水分解物の経口摂取時の各オリゴペプチドの血中濃度の推移と尿中排泄量を比較検討し、単一エンドプロテアーゼを用いて調製したCTPの優位性を、ヒトを対象とした *in vivo* 試験により検証した。その結果、CTP-100/pigの主成分であるトリペプチド Gly-Pro-Hyp は経口摂取時に腸管から体循環に移行することが明らかになった。しかし Gly-Pro-Hyp は、腸内細菌やBBM結合性アミダーゼおよび体内で加水分解を受け易く、血中に見出されたオリゴペプチドの半分以上は Pro-Hyp であった。さらに、血中に移行した Gly-Pro-Hyp は腎組織中に存在するペプチダーゼでも加水分解され、尿中に排泄されるオリゴペプチドの約90%は Pro-Hyp となっていた。また、本研究では平均分子量 5,000 Da の従来型のコラーゲン加水分解物 (CTP-0/pig) も加えて CTP-100/pig および CTP-50/pig の経口摂取時の血中オリゴペプチド濃度の推移も検討したが、CTP-0/pig 摂取時の増加量は、極めて少ないものであり、コラーゲン加水分解物では低分子化加工がオリゴペプチドの血中移行に有効であることが明らかとなった。一方、第一章では、CTP-100/pig に含まれる代表的なトリペプチド Gly-Pro-Hyp、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp の3者間でも血中移行性が異なることを述べた。機能性トリペプチドの生物学的有用性の検証においては、経口摂取した個々の成分が血中に至るまでの酵素分解やトランスポーターとの親和性、血中移行後の代謝など、多くのファクターを総合的に考察する必要がある。一方、代謝により生成するオリゴペプチドの血中濃度は原料に由来するとの報告もある[36]。CTP-100/pig や CTP-50/pig のようにトリペプチドにまで低分子化した場合は、原料による吸収効率の差は限りなく小さくなると推察されるが、Gly-X-Y の X および Y に相当するアミノ酸種による代謝速度や生物学的効果への影響は明らかにはなっていない。また、CTP や CTP と同様にトリペプチドを多く含有するコラーゲン加水分解物の健康増進効果についての報告は多数あるものの、その効果について従来型のコラーゲン加水分解物と比較した報告は無い。そこで第三章では、CTP と従来型のコラーゲン加水分解物の効果の比較も含め、CTP の臨床的效果を検討する。

第三章 コラーゲントリペプチド (CTP)の臨床応用を目指した基礎的検討

第1節 コラーゲントリペプチドの変形性膝関節症の治癒に対する効果の基礎的検討

第1項 緒言

高齢者の膝痛の多くは変形性膝関節症によるものであり[46]、関節軟骨の変性・磨耗に始まり、軟骨下骨の硬化・骨棘や骨嚢胞の形成を経て関節の変形に至る疾患である。その原因は、軟骨組織を構成しているコラーゲンやプロテオグリカンの合成を担当する軟骨細胞の異常化と考えられている[47,48]。本症では、関節裂隙の狭小化と共に骨性増殖が進むと関節の可動域が制限され、さらに症状が進むとすり減った軟骨は荷重負荷による衝撃を吸収できなくなり神経を圧迫して強い痛みを生じるに至る。同時に、関節水症や膝の動揺(ぐらつき)、こわばり等も生じ、歩行や階段昇降等の日常生活動作にも支障をきたすようになることから、罹患者のQOLは著しく低下する。また、過度の運動や運動不足による筋力低下はさらに症状を悪化させる。さらに、肥満も骨への負荷が大きくなるため増悪因子とされている。

Oseoarthritis Research Society International (OARSI)は、変形性膝関節症の治療法として薬物療法と非薬物療法の併用を提唱している[49,50]。ここで言う薬物療法とは非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)やステロイド剤の投与[51]およびヒアルロン酸の関節内注射であり、非薬物療法とは生活様式の変更、運動療法、温熱療法、装具の着用等である。しかし、いずれも対症療法であり根治療法ではない。軟骨保護作用を示すグルコサミンやコンドロイチン硫酸の投与が推奨されてはいるが、「効力を示す場合がある」という限定的な表現である。なお、これらの療法で改善が見られなかった場合は外科手術が必要となる。

Naraokaらは、ウサギ変形性膝関節症モデルの関節部位にトリペプチド含有率の高いCTP-100/pigを直接投与することによって、関節の軟骨分解が抑制され、type II コラーゲン陽性軟骨細胞が増加することを報告した[52,53]。我々は、トリペプチドを含むコラーゲン加水分解物を経口投与するとその一部はトリペプチドのまま血中に移行することを明らかにすると共に、経口投与されたトリペプチドあるいはそれから生成したジペプチドが皮膚、骨、関節軟骨など

の結合組織に選択的に取り込まれることを示した(第一章)。これは、腸管より吸収されたトリペプチドが膝関節に移行して変形性膝関節症の症状改善に効果を発揮する可能性を示唆している。

以上の様な観点から、本節ではコラーゲントリペプチドの変形性膝関節症への効果について述べる。

第2項 実験方法

1. 投与試料(被験物質)

豚皮由来コラーゲントリペプチド(CTP-15/pig)はゼライス社より供与を受けた HACF-01 を、魚鱗由来コラーゲントリペプチド(CTP-15/fish)は同じくゼライス社より供与を受けた HACF-TF を用いた。いずれもトリペプチド含有量が15%であり、平均分子量 1,500 Da であった。また、トリペプチドを含まない豚皮由来コラーゲンペプチド(CTP-0/pig) (平均分子量約 5,000 Da) もゼライス社より供与を受けた。デキストリンはクラスターデキストリン(江崎グリコ社製)を用いた。

2. ウサギ変形性膝関節症モデルへのコラーゲン加水分解物の投与

本実験はハムリー社の「ハムリー株式会社試験研究所の実験動物の管理と使用に関する指針」および「同社動物実験倫理委員会規定」に基づく「同社動物実験承認規定」に従って実施した。12 週齢の Kb1:JW(SPF)系雄ウサギを北山ラベス社より購入した。動物飼育室内は、室温 $22 \pm 3^{\circ} \text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ に調整し、12 時間ごとの明暗サイクルで管理した。固形試料および水を自由摂取させた。8 日間の予備飼育後、体重推移を基準に 24 頭のウサギを CTP-15/pig 投与群(体重: $2.65 \pm 0.04 \text{ kg}$)、CTP-15/fish 投与群(体重: $2.67 \pm 0.04 \text{ kg}$)、CTP-0/pig 投与群(体重: $2.67 \pm 0.04 \text{ kg}$)、対照の非投与群(体重: $2.66 \pm 0.04 \text{ kg}$) の 4 群(n=6)に分け、膝関節半月板の部分切除(1 mm)を行った。手術日の 1 週間前から術後 4 週目終了までの計 5 週間にわたりコラーゲン加水分解物を注射用水溶液に溶かして強制的に毎日経口投与した。コラーゲン加水分解物の投与量は $80 \text{ mg}/3 \text{ mL}/\text{kg}$ 体重とした。なお、CTP-15/pig および CTP-15/fish のトリペプチド相当量は $12 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重であり、CTP-0/pig にはトリペプチドは含まれていない。対照群には注射用水を毎日投与した。最終投与日の翌日に膝関節周辺部位を摘出し、摘出組織は 0.5%塩化セチルピリジニウム含有 10%中性緩衝ホルマリン液で処理してタンパク質を固定した。さらに 10%EDTA で処理して脱灰した後、組織を薄切し、サフラニン O およびファストグリーン染色と鉄ヘマトキシリン染色の二重染色を施した。作製した切片について、組織学的に関節軟骨の状態を評価した。観察項目は、1) 関節軟骨表面の亀裂の程度、2) 軟骨細胞のクラスター形成の程度、3) 軟骨組織の磨耗・消失の程度とし、項目ごとに 0 から

5点で点数化した。なお、標本の作製は株式会社ケーエーシーにて実施した。

3. ヒト変形性膝関節症に対するコラーゲントリペプチドの有効性評価試験の被験者選定法と実施方法

本試験は、ヘルシンキ宣言の精神に則り試験開始前に被験者に対して試験内容および方法などについて十分に説明を行い、事前に文書による同意を得、株式会社総合健康開発研究所の倫理委員会の承認を得た上で実施した。日常生活において軽度の膝関節痛を有する 120 名の健常人の中から、以下の選択基準および除外基準をクリアした者で、なおかつ被験物質の摂取を自ら希望した者 66 名(男性 24 名、女性 42 名、平均年齢 48.4 歳)を被験者とした。選択基準は、① 35 歳以上 70 歳以下、② 軽度の膝関節痛の自覚症状のある(安静時疼痛または運動時疼痛が主症状として継続的に認められる)者、③ 関節リウマチでない者(RF-negative)、④ Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM)スコアが比較的高い者の 4 項目とした。なお、JKOM スコアは日本の生活環境において変形性膝関節症患者が経験している痛みやこわばり、日常生活の状態、ふだんの活動運動機能、健康状態の 5 項目の自記式の膝関節症機能評価尺度である[54]。除外基準は、① 膝痛の治療で通院または投薬を受けている者、② 重度の関節拘縮などでステロイド剤の関節内注入を継続して受けている者、③ 検査結果に影響する可能性のある健康食品(コンドロイチン、グルコサミン含有食品など)を日常的に摂取している者、④ 妊娠または妊娠の可能性のある者または授乳者、⑤ 糖尿病の投薬(食事療法は除く)を受けている者、⑥ 重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者、⑦ 高度貧血のある者、⑧ 理解度不十分などの理由により試験総括医師が本試験を実施するのに不相当と判断した者の 8 項目とした。

本試験は、3 群の二重盲検プラセボ対照無作為化比較試験とした。66 名の被験者を、JKOM スコアおよび年齢において群間に差がないように層別ランダム化法にて割付け、それぞれ CTP-15/pig 4g 摂取群、CTP-15/pig 2g 摂取群、プラセボ摂取群とした。CTP-15/pig 4g 摂取群は CTP-15/pig-pig を 4 g(トリペプチド含量 600 mg)、CTP-15/pig 2g 摂取群は CTP-15/pig を 2 g(同 300 mg)、プラセボ摂取群はデキストリンを 4 g、1 日 1 回、夕食の時間帯に水、ぬるま湯、味噌汁、牛乳やジュースなどに溶かして摂取した。なお、被験物質は無表記のアルミパウチに充填した状態で配布した。試験期間は 10 週間とし、被験物質摂取前、摂取開始後 5 週目および 10 週目に膝関節の状態を評価した。試験期間中は、

コラーゲン、コンドロイチン、グルコサミン含有食品などの摂取は控え、規則的な生活を心がけ、過激な運動や暴飲暴食を慎み、試験開始前の日常生活と同様にするよう指導した。

4. 変形性膝関節症の症状の評価法と治癒効果の判定法

被験者は、被験物質摂取前、摂取開始後 5 週目、10 週目に、体重、体脂肪率、体脂肪量、筋肉量、BMI (Body Mass Index)をバイオスペース社製 InBody3.2 で測定した。また、被験物質摂取前には身長も記録した。収縮期血圧および拡張期血圧はオムロン松坂社製のデジタル自動血圧計(HEM-907)で測定した。被験物質摂取前、摂取開始後 5 週目、10 週目に医師による診断および自覚症状の申告によって変形性膝関節症の病状の評価・判定を行った。医師による診断方法は表 3-1 に示した。

表 3-1. 診断の数値化基準

膝関節の症状	診断基準と数値
変形度	0 : なし, 1 : 15°以下, 2 : 30°以下, 3 : 45°以下, 4 : 45°以上
水症	0 : なし, 1 : 極軽度, 2 : 軽度, 3 : 中度, 4 : 重度
可動域制限	0 : なし, 1 : 120°以下, 2 : 90°以下, 3 : 60°以下, 4 : 30°以下
圧痛	0 : なし, 1 : 極軽度, 2 : 軽度, 3 : 中度, 4 : 重度
軋轢音	0 : なし, 1 : 極軽度, 2 : 軽度, 3 : 中度, 4 : 重度
動揺性	0 : なし, 1 : 5°以下, 2 : 15°以下, 3 : 30°以下, 4 : 30°以上

各症状の項目について、摂取前のスコアと 5 週目、10 週目のスコアを比較し初期値からの差を改善度として評価した。なお、診断は試験を通して同じ医師が行うこととした。自覚症状は、JKOM スコアで評価した。評価項目は、(I)「痛みの程度は Visual Analogue Scale (VAS)での回答とし、(II)「膝の痛みやこわばり」は覚醒時や夜間、歩行時などにおける膝の痛みの程度についての 8 問、(III)「日常生活の状態」はしゃがみこみや立ち上がり、着替え、買い物など日常生活の困難さについての 10 問、(IV)「ふだんの活動」は外出の頻度や困難さについての 5 問、(V)「健康状態」は健康状態の自覚症状についての 2 問である。(II)～(V)の 25 問については、最も重症の機能状態に対する回答肢を選択した場合

を5点とし、5段階で回答をしてもらい、総点をJKOMスコアとした。なお回答は、精度を高めるため観察日前数日間の状況について医師が問診で確認しながら、被験者自身が作成した。さらに、被験物質摂取前、摂取後5週目、10週目には血液検査も行った。なお、採血時は5時間前から水以外の飲食を禁止し、来院後10分以上の安静状態を維持した後に座位にて採血を実施した。検査項目は、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、平均赤血球容積、平均赤血球色素量、平均赤血球色素濃度、総コレステロール量、トリグリセライド量、LDL-コレステロール量、HDL-コレステロール量、総蛋白量、アルブミン量、GOT 活性、GPT 活性、 γ -GTP 活性、尿素窒素量、クレアチニン濃度、尿酸値、電解質量(Na、K、Cl、Ca)、総ビリルビン量、血糖値、C-反応性蛋白量を測定した。なお、測定は株式会社エスアールエルに委託した。また、尿の定性検査を摂取前、摂取開始後5週目および10週目に実施した。検査項目は、ウロビリノーゲン量、潜血(ヘモグロビン)、蛋白質量、ブドウ糖量、ケトン体量、ビリルビン量、pH とした。検査は栄研化学社製試験紙 ウロペーパーII‘栄研’を尿中に浸して直ちに引き上げ、標準色調表と比較して判定した。全ての観察日に医師による診察および問診を行い、有害事象の出現の有無を確認した。

5. 統計解析

被験者背景の群間比較、身体計測値ならびにJKOMスコアのVAS評価の群間比較については対応のない t 検定で行い、経時比較についてはDunnnettの多重比較検定で行った。血液検査値の群間比較については対応のない t 検定で、経時比較については対応のある t 検定で行った。膝関節症機能評価尺度評点を摂取前の改善度として示し、経時比較および群間比較をWilcoxonの符号付き順位検定で行った。なお、統計解析ソフトは、Dr. SPSS II for Windows (エス・ピー・エス・エス社製)を使用し、いずれの検定においても両側検定で有意水準を5%あるいは1%とした。測定値は、全て平均値±標準誤差で表した。

第3項 結果

第3項の1 ウサギモデルを用いたコラーゲントリペプチドの変形性膝関節症に対する治癒効果の検討

コラーゲントリペプチド投与期間(計 5 週間)終了日の翌日に摘出した左脛骨部の組織染色画像を図 3-1 に示した。軟骨は、画像中のサフラニン O により赤色に染色された部位である。施術部位は緑色のサークルで示した部分である。画像 A に示した対照群では、半月板の切除により軟骨の明らかな減少が確認できる。一方、トリペプチドを 15%含有したコラーゲン加水分解物(CTP-15/pig および CTP-15/fish)を投与したウサギの組織染色画像では、同部位の軟骨量が対照群に比べて有意に多いことが観察された(画像 C と D)。しかし、トリペプチドを含まないコラーゲン加水分解物(CTP-0/pig)の投与では、このような治癒効果は観察されなかった(画像 B)。さらに画像中左側の非施術部分について観察すると、対照群や CTP-0/pig 投与群においては、この部位でも反対側の損傷(施術)による負荷が軟骨組織の顕著な磨耗・消失を招くことが認められたが、CTP-15/pig および CTP-15/fish 投与群ではその磨耗の程度が軽減され、コラーゲントリペプチドの軟骨組織保護効果が確認された。

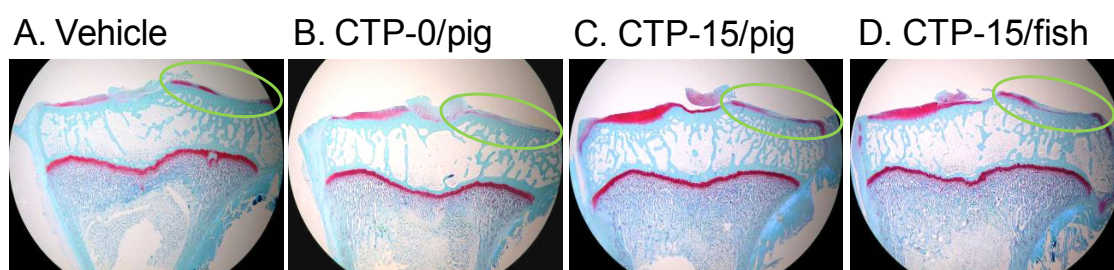


図 3-1. 脛骨軟骨部の組織染色画像

脛骨外側顆の一部を切除して作製した膝関節症のウサギモデルの術後 4 週を経た膝関節部位である。画像 A は対照群、画像 B は CTP-0/pig 投与群、画像 C は CTP-15/pig 投与群、画像 D は CTP-15/fish 投与群である (投与量 : 80 mg/kg)。緑色のサークルは、施術部位を示す。

次いで、施術部位の軟骨組織表面の亀裂の程度、軟骨細胞のクラスター形成の程度、軟骨組織の磨耗および消失の程度をスコア化した。図 3-2 に示すように、CTP-15/pig および CTP-15/fish 投与群では軟骨表面の亀裂の程度が対照群

や CTP-0/pig 投与群に比べて有意に軽度であった(図 A)。また、CTP-15/pig および CTP-15/fish 投与群では軟骨細胞のクラスター形成(図 B)および磨耗・消失の程度が対照群より有意に低値であった(図 C)。なお、CTP-15/pig 投与群と CTP-15/fish 投与群の間ではいずれの評価項目においても差は認められなかった。また、CTP-0/pig 投与群には何ら治癒効果が認められず、いずれも対照群と同等の数値であった。

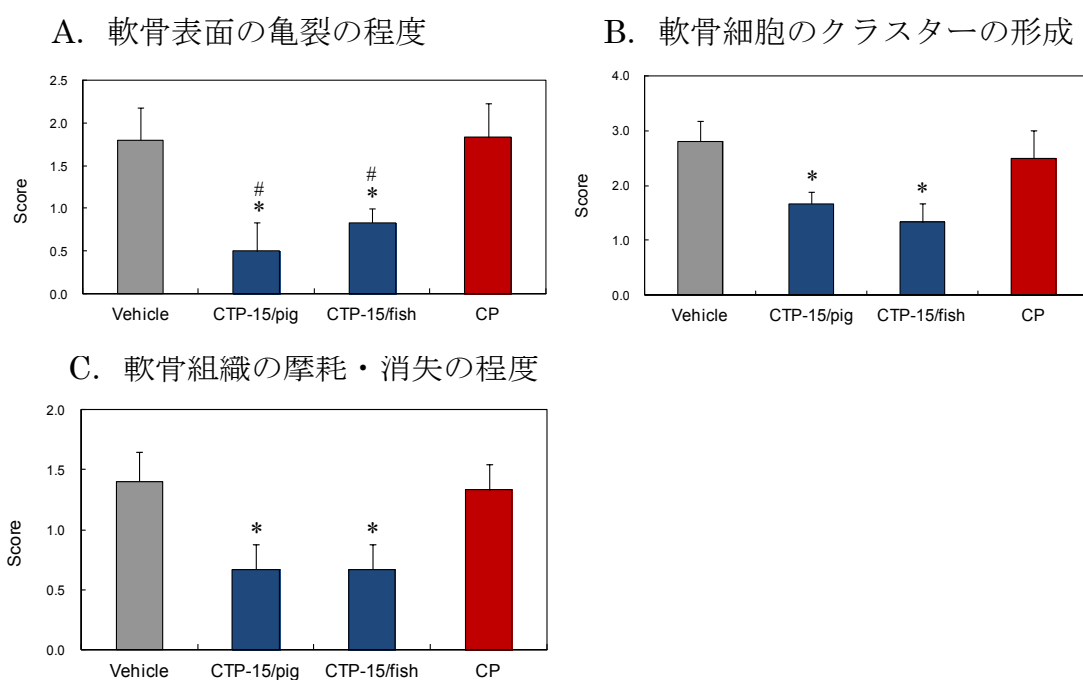


図 3-2. 組織のダメージスコア

図中の誤差範囲は標準誤差 (n=6)。

* : $p < 0.05$ vs 対照群。# : $p < 0.05$ vs CTP-0/pig 投与群。

第3項の2 ヒトを対象としたコラーゲントリペプチドの膝関節に対する保護作用の検討(経口摂取)

被験者 66 名(男性 24 名、女性 42 名)のうち、自己都合によりプラセボ投与群の女性 1 名と CTP-15/pig 4g 摂取群の男性 1 名が途中辞退したため、試験を最後まで実施できた 64 名について解析を行った。被験者の背景を表 3-2 に示した。試験開始前、各群の年齢、身長、体重、BMI、VAS および JKOM スコア(25 問の合計)に差が無いように調整した。体重、体脂肪量、筋肉量、BMI と拡張期血圧は、摂取前、摂取開始後 5 週目、10 週目のいずれの時点においても 3 群間に差は認められなかった。なお、体脂肪率と収縮期血圧については、プラセボ摂取群で摂取前に比べて摂取開始後 5 週目に有意な低下が、さらに収縮期血圧については、CTP-15/pig 2g 摂取群においても摂取開始後 5 週目と 10 週目に有意な低下が観察されたが、いずれも基準値内での変化であった。CTP-15/pig 4g 摂取群ではこれら数値の低下は観察されなかった(データ不提示)。

表 3-2. 被験者群背景

項目	プラセボ摂取群	CTP -15/pig 2g 摂取群	CTP-15/pig 4g 摂取群
人数	21	22	21
年齢	49.2 ± 11.1	48.1 ± 10.8	48.0 ± 7.7
身長(cm)	160.2 ± 8.1	162.5 ± 8.4	162.5 ± 9.4
体重(kg)	58.4 ± 12.5	61.7 ± 10.7	60.9 ± 11.7
BMI	22.6 ± 3.3	23.4 ± 3.6	22.9 ± 2.9
VAS(mm)	35.5 ± 23.6	42.9 ± 21.9	37.2 ± 22.4
JKOM スコア	18.0 ± 12.3	18.0 ± 13.5	17.7 ± 11.8

値は平均値±標準誤差。

膝関節の状態についての医師による診察結果は図 3-3 に示した。「変形度」については、コラーゲントリペプチド摂取による改善は観られなかった。また、試験期間を通じて 3 群間での差もなかった。「水症」については、投与開始後 5 週目にはプラセボ摂取群も含めて全ての試験群で改善が観られたが、10 週目までの経過を観ると、コラーゲントリペプチドを摂取した 2 群では膝関節水の減

少が継続し、摂取期間依存的な改善が確認された。とりわけ CTP-15/pig 2g 摂取群で高い治癒効果が確認され、プラセボ投与群に比べて有意な低値であった ($p<0.05$)。なお、水症の改善効果には摂取量依存性は認められず、2 g 摂取で十分であった。「圧痛」についても、プラセボ摂取群も含めて全ての試験群で改善が認められ、とりわけ CTP-15/pig 4g 摂取群ではその傾向が顕著で、圧痛の改善はコラーゲントリペプチドの摂取量依存的であった。「軋轢音」についても、コラーゲントリペプチドの摂取量に依存して改善が観られ、CTP-15/pig 4g 摂取群では 5 週目、10 週目においてプラセボ摂取群に比べて有意な改善が観られた。なお、「可動域制限」および「動揺性」はいずれの群においても改善は観られず、群間差もなかった。

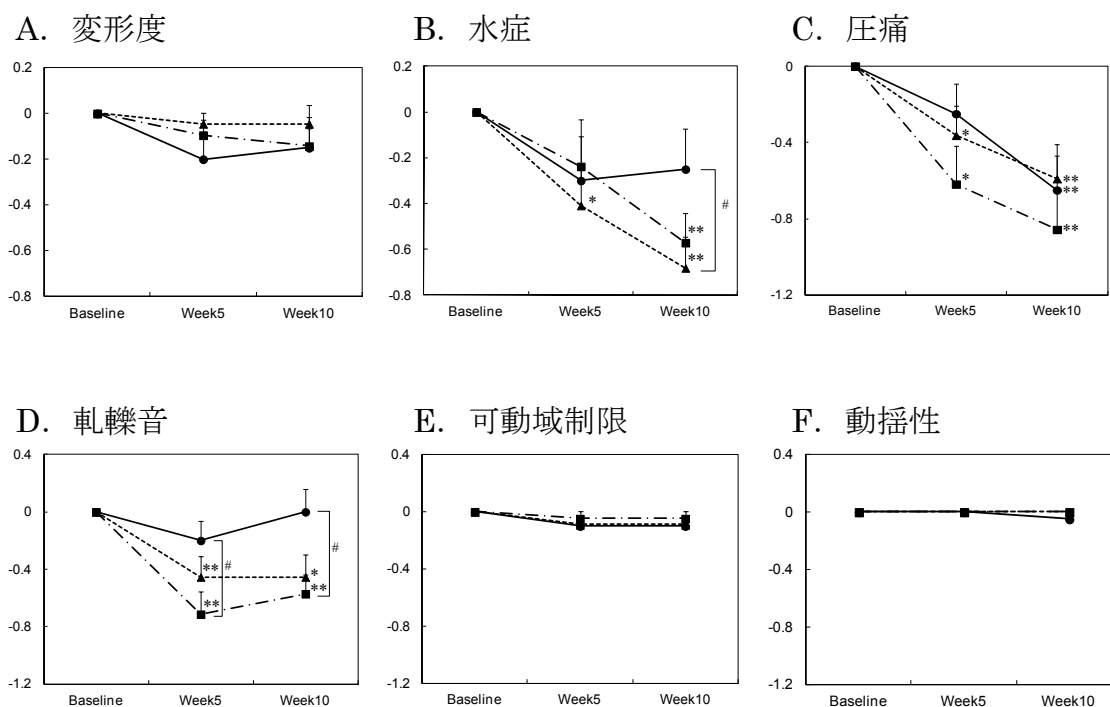


図 3-3. 膝の状態の初期値からの変化

図中の誤差範囲は標準誤差を示す。各群の n 数は、プラセボ摂取群 : n=21、CTP-15/pig 2g 摂取群 : 22 人、CTP-15/pig 4g 摂取群 : n=21。

記号 : プラセボ摂取群(●)、CTP-15/pig 2g 摂取群(▲)、CTP-15/pig 4g 摂取群(■)。

#は群間での有意差を、*は初期値からの有意な変化を示す(いずれも $p<0.05$)。

JKOM スコアについては図 3-4 に示した。VAS 評価による痛みの程度(I)は、摂取開始後 10 週目には CTP 摂取・非摂取に関わらず全ての試験群において有意な改善が観られた。他群に比べて CTP-15/pig 2g 摂取群で 5 週目にスコア上では有意な改善が観られるとの結果となったが、全試験期間を総合してコラーゲントリペプチドの痛み軽減効果はあまり大きなものではないと結論した。膝の痛みやこわばり(II)、日常生活の状態(III)、ふだんの活動(IV)でも、3 群間で有意差はなかったものの、CTP の摂取量が多いほど改善する傾向は観られた。健康状態(V)は、摂取開始後 5 週目において CTP-15/pig 2g 摂取群において有意な改善が観察されたが、10 週目には全試験群で改善が観られるようになり、3 群間で差はないと結論した。II~V の結果を総合した JKOM スコア(IV)は、全ての群において「改善」との結論になった。。

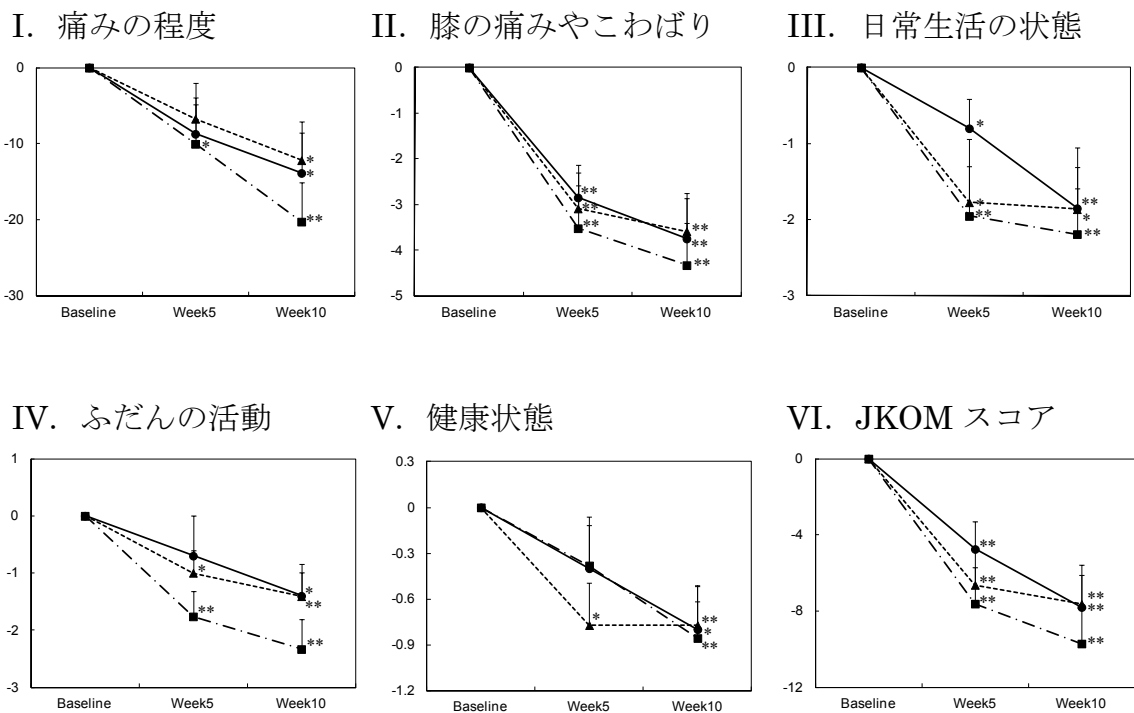


図 3-4. JKOM スコアの初期値からの変化

図中の誤差範囲は標準誤差を示す。各群の n 数は、プラセボ摂取群:n=21、CTP-15/pig 2g 摂取群 : 22 人、CTP-15/pig 4g 摂取群 : n=21。

記号 : プラセボ摂取群(●)、CTP 2g 摂取群(▲)、CTP 4g 摂取群(■)。

血液検査値はいずれの被験者も全ての項目が正常範囲内であった。ただし、血液検査の結果について詳細に比べると、摂取開始後 5 週目の検査では特に記載すべき変動は認められなかった。しかし、10 週目の検査では、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、総コレステロール量は、CTP-15/pig 2g 摂取群でのみ有意な増加が観察された。平均赤血球色素量、平均赤血球色素濃度、 γ -GTP 活性は、プラセボ摂取群でのみ有意な低下が認められた。トリグリセライド量は CTP-15/pig 4g 摂取群で有意な低下が認められた。HDL-コレステロール量と総ビリルビン量は全ての群で有意な上昇を観察した。クレアチニン量とカリウム濃度は、CTP-15/pig 2g 摂取群で有意に低下し、尿酸濃度は CTP-15/pig 4g 摂取群のみで有意な上昇が認められた。また、白血球数、血小板数、平均赤血球容積、LDL-コレステロール量、総蛋白量、アルブミン量、GOT 活性、GPT 活性、尿素窒素量、電解質量(Na、Cl、Ca)、血糖値および C-反応性蛋白量は、全ての試験群において 10 週目でも有意な変化は見られなかった(データ不提示)。

尿定性検査の結果も、摂取開始後 5 週目の検査では何ら変化は認められなかった。しかし、10 週目の検査においては、潜血(ヘモグロビン)の判定がプラセボ摂取群で 1 名が陽性(軽度)から陰性に、CTP-15/pig 2g 摂取群でも 1 名が陽性(軽度)から陰性に变化した。一方、CTP-15/pig 4g 摂取群では 1 名が陽性(軽度)から陰性に、2 名が陽性(中等度)から陽性(軽度)に、1 名が陽性(重度)から陰性になったが、1 名が陽性(中等度)から陽性(重度)へ、1 名が陰性から陽性(重度)へと变化した。ビリルビン量は、CTP-15/pig 4g 摂取群で 1 名が陽性(軽度)から陰性になった。ケトン体量は、プラセボ摂取群では、1 名が陽性(軽度)から陰性に、1 名が陰性から陽性(軽度)になった。CTP-15/pig 2g 摂取群でも 1 名が陽性(軽度)から陰性になったが、CTP-15/pig 4g 摂取群では 1 名が陽性(軽度)から陰性になったものの、1 名が陰性から陽性(軽度)に、1 名が陰性から陽性(中等度)に変化した。pH は、プラセボ摂取群ではアルカリ性側に変化した者が 10 名、酸性側に変化した者が 3 名であった。一方、CTP-15/pig 2g 摂取群ではアルカリ性への変化が 10 名と酸性への変化が 3 名、CTP-15/pig 4g 摂取群ではそれぞれ 6 名と 5 名であった(データ不提示)。

また、全試験期間を通じて、被験物質に起因すると考えられるような有害事象は特に観察されなかったことから、CTP-15/ pig およびクラスターデキストリン摂取による臨床上問題となる所見の惹起は認められなかったと結論した。

第4項 考察

本節では、まず変性膝関節症に対するコラーゲントリペプチドの治癒効果について、ウサギ膝変形性関節症モデルを用いて検討した。被験ウサギに豚皮あるいは魚鱗を原料とするトリペプチド含有率 15%のコラーゲン加水分解物(CTP-15/pig と CTP-15/fish)またはトリペプチドを含まない豚皮コラーゲン加水分解物(CTP-0/pig)を術前1週間から術後4週間にわたり経口投与し、投与終了後に施術により損傷した関節の軟骨表面の亀裂、軟骨細胞のクラスター形成および軟骨組織の磨耗・消失について検討した。その結果、CTPを投与した2群では、CTP-0/pig投与群および溶解用水のみを与えた対照群に比べ、損傷の程度は有意に軽減されていることが明らかになった。また、CTP投与群では、損傷個所近傍の関節部分への悪影響も低減されていた。これは、変形性膝関節症における軟骨破壊をCTPの経口摂取により軽減できることを示唆している。また、CTP-0/pigには軟骨表面の亀裂の治癒効果が認められないことから、ここで観察した治癒効果は投与試料に含まれるトリペプチドによるものと結論できる。一方、トリペプチド含有率の同じCTP-15/pigとCTP-15/fishを投与した2群での治癒効果は同等であったことから、原料生物種の如何に関係なくコラーゲントリペプチドは変性膝関節症に対して有意な治癒効果を現わす可能性が期待できた。

次に、軽度の膝関節痛を有する被験者を対象にCTPの膝痛軽減効果を二重盲検プラセボ対照無作為化比較試験法で検証した。すなわち、トリペプチド含有率15%のCTP-15/pigを2gあるいは4gまたはデキストリン(プラセボ)4gを1日1回、連続10週間摂取し、摂取開始前および摂取開始後5週目と10週目に医師の診断、JKOMスコアによる判定、血液検査、尿検査を実施した。医師による診断では、CTPの摂取による水症、圧痛、軋轢音の低減傾向が確認された。統計的にはCTP-15/pig 2g摂取群で10週目に水症に対する有意な改善効果が認められた。また、軋轢音はCTP-15/pig 4g摂取群で5週目および10週目に改善効果が観察された。JKOMスコアは、プラセボ摂取群を含めた3群間で統計学的な有意差は認められなかったが、平均値ベースでは、膝の痛みやこわばり、日常生活の状態およびふだんの活動においてCTP摂取群で摂取量依存的な改善傾向が観察された。また、膝痛の程度には3群間で統計的差異は観られなかったが、膝痛により低下したQOLに改善傾向が観られており、摂取期間がさ

らに長期に及ぶ場合には改善も望める結果ではないかと考えている。これら JKOM スコアの結果を総合すると、毎日 4 g 以上の CTP-15/pig を長期間摂取することにより、膝関節の状態や膝痛により低下した QOL の改善が期待できるものと考えられる。

コラーゲン加水分解物の膝関節症治癒効果については、Adam と Moskowitz による 2 つの臨床報告がある。前者は、変形性関節症患者 52 名が 1 日当りコラーゲン加水分解物 10 g の摂取 2 ヶ月間を続けると、こわばりや動かす際の痛みなどの改善が観られたと報告している[55]。また、後者は、変形性関節症患者と骨粗鬆症患者に対するコラーゲン加水分解物摂取の影響を検討した複数の報告を総合して詳細に分析し、被験者全体ではコラーゲン加水分解物摂取群とプラセボ摂取群との間に差はみられなかったが、症状の重い患者では有意な改善がみられたと報告している[56]。なお、このコラーゲン加水分解物の平均分子量は 2,000~6,000 Da であり、被験者総数は数百人規模であった。一方、CTP-15/pig の場合、彼らの試験より少ない 4 g (トリペプチド含量 600 mg) の摂取で有効性が確認できた。これは、有効成分であるトリペプチドやその加水分解生成物ジペプチドの吸収効率の差が Adam や Moskowitz の報告より低用量でも改善効果が観られた理由とも考えられる。

血液検査値では統計学的に有意な変化が観られた項目もあったが、いずれも基準値内の値であった。尿定性検査では、潜血(ヘモグロビン)、ケトン体量、蛋白質量などの数項目で、被験物質の摂取により試験期間中に陽性になった例が認められたが、いずれも被験者も血液検査の結果において腎機能およびその他の検査項目に異常が認められなかったため、この変化は生理的変動の範囲内と考えられた。

第5項 小括

本節ではコラーゲントリペプチドの変形性膝関節症への効果について検討した。ウサギ膝変形性関節症モデルを用いて検討した結果、関節の軟骨表面の亀裂の程度、軟骨細胞のクラスター形成の程度および軟骨組織の磨耗・消失の程度について、CTP-15/pig および CTP-15/fish の経口投与では水のみを投与した対照群に比べて有意に軽度であり、トリペプチドを含まない豚皮コラーゲン加水分解物(CTP-0/pig)では対照群との差異が観られなかった。トリペプチド含有率の同じ CTP-15/pig と CTP-15/fish を投与した2群での治癒効果は同等であったことから、原料生物種の如何に関係なくコラーゲントリペプチドは変性膝関節症に対して有意な治癒効果を現わす可能性が期待できた。次に軽度の膝の痛みを有する健常人で10週間の経口摂取試験を行った結果、CTP-15/pig の経口摂取は、膝の水腫や軋轢音などの症状の改善に有効であり、膝関節痛により制限されたQOLの改善にも寄与することが示唆された。さらに、被験者に有害事象が発現しなかったことから、CTP-15/pig は安全性の高い食品素材であると考えられる。

第2節 コラーゲントリペプチドの動脈硬化症の治癒に対する効果の基礎的検討

第1項 緒言

動脈硬化の進展の背景には、2つの病態の存在が知られている。血管内膜病変である粥腫形成(atherosis)と、血管中膜にみられる壁硬化(sclerosis)である。血管内膜では、病変により形成された脆弱なプラークが破裂すると血栓性閉塞が惹起され、さらに症状が進行すると重篤な梗塞へと進展する。一方、中膜では、膜構造維持に重要な役割を担っている硬タンパク質のエラスチンの断片化が起きると保障的に平滑筋細胞とコラーゲンが増加する。すると、それらが石灰化を促して血管壁の硬化を誘発する[57-58]。動脈硬化の進行は緩徐なためその発症や進行は見逃されがちで、梗塞などに伴う重篤な症状が顕在化することを契機に初めて気付かされる場合が多い。それゆえ、脂質異常症や糖尿病、高血圧症など動脈硬化症発症に繋がり易い疾患の罹患者は、血管の状態を形態的・機能的に評価して動脈硬化の進行程度を把握し、重篤な心血管疾患の発症を未然に防ぐ努力が原疾患治療中も求められている。早期の動脈硬化発症を知る指標は、既にいくつか知られている。例えば low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)と high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)の量比(LDL-C/ HDL-C 比)は、心血管イベントと関連する2つのコレステロールのバランスを一元的に把握できる指標であり、内膜中膜複合体厚(intima-media thickness: IMT) や、血管内プラークの発生率と関連している[58]。例えば、LDL-C/HDL-C 比が2.5を上回ると、動脈硬化プラークが急激に増加するとされている[59-60]。これは、脂質異常症等の患者だけでなく、健常人における動脈硬化の危険因子の値とも相関している[61]。また、糖尿病などの糖代謝系の異常で引き起こされる動脈硬化においては、最終糖化産物(advanced glycation end-products : AGEs)が動脈硬化の指標として有効であることが明らかにされている。既に糖尿病の治療指標として用いられている糖化ヘモグロビン(HbA1c)が動脈硬化の指標になることは知られているが、糖代謝系で産生されるグリセルアルデヒドに由来するAGEのToxic AGE (TAGE)も動脈硬化の指標として有効であることが明らかになってきた。なお、TAGEは受容体であるRAGE(Receptor for AGEs)を介して動脈硬化の発症や進展を引き起こすことが報告されている[62,63]。また、TAGEは血管の炎症や急性冠症候群患者におけるプラ

ークの進行とも関連していることから、血清中の TAGE 量の測定は、糖尿病治療の効果判定だけでなく動脈硬化の早期診断にも役立っている[64,65]。

また、cardio-ankle vascular index (CAVI)は、心臓から足首までの動脈の硬さを非侵襲的に評価する指標であり、IMT や脈波の反射波成分の指標である脈波増大係数(CAIx: central augmentation index)、脈波伝播速度(PWV: pulse wave velocity)と正に相関する。特に頸動脈の動脈硬化の予測において CAVI は PWV と同様に診断上有用な指標とされている[66]。ただし、CAVI は PWV とは異なり、血圧の影響を受けずに測定が可能であること[67]から、高血圧患者における動脈の硬さや冠動脈疾患リスクのコントロールにおいても診断指標として用いることが出来るとされている[68]。脂質異常症患者の CAVI の値は、健常者のそれより高値である[69]。1,003 人の糖尿病、高血圧症、脂質異常症の患者を対象としたトライアルの結果では、CAVI の値が高い患者ほど将来的な心血管イベントの発生率が多いとされている[70]。また、CAVI の値は動脈硬化の進展とともに上昇し、9.0 を超えた人の約半数が脳動脈か冠動脈に動脈硬化症を発症すると報告されている[71]。なお、CAVI の値に基づく診断では、加齢によるなだらかな動脈硬化の進展も検出できることから、健常人における僅かな動脈硬化の進展を検出する際にも有効である[72]。

一方、健常人が行う動脈硬化対策としては、食事の管理や運動などが主となるが、近年は機能性食品の摂取も新たな選択肢の一つとなってきた。コラーゲン・トリペプチド(CTP)は、コラーゲン由来の Gly-X-Y 配列のトリペプチド成分含有率が高い食品である。遺伝性高コレステロール血症ウサギ(Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbit)に投与した場合には、血中コレステロール値の低下やプラーク組織におけるマクロファージや平滑筋細胞の浸潤の抑制、動脈硬化プラークの減少が観察され、CTP はアテローム性動脈硬化症の予防・改善に効果を示すことが明らかにされている[25]。また、培養ヒト大動脈平滑筋細胞においても増殖や遊走の抑制作用が観察され、CTP は細胞レベルにおいても動脈硬化進展の予防に有効である可能性が示唆されている[26]。さらに、CTP の主要なトリペプチド成分 Gly-Pro-Hyp が、インスリン分泌を促進するインクレチンを分解する Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4)を競合的に阻害するとの報告もあり[6,7]、CTP には糖代謝の異常を原因とする糖尿病などの発症予防や血糖値低下への寄与も期待されている。コラーゲン(ゼラチン)の摂取に期待さ

れる有益な生物学的効果は、血中に現れる加水分解物の短鎖ペプチドの生理活性に基づくものと考えられているが、CTP 食品を摂取した際の短鎖ペプチドの血中濃度は、高分子コラーゲンを摂取した場合と比較して圧倒的に高濃度であることは第二章でも述べた。さらにその後、血中に移行したトリペプチドが結合組織に選択的に取り込まれること、また血管への局在化も示唆されたことを第一章で述べた。これらのことから、CTP は健常人が動脈硬化を予防する上で有用な機能性食品となることが期待される。

そこで本節では、ヒト健常人を対象に、CTP 単一用量の経口摂取による 6 ヶ月間のオープン試験を実施し、動脈硬化指標である血中脂質、TAGE 値、CAVI 値の変化を追跡することで動脈硬化の進展に与えるコラーゲントリペプチドの影響について検証した。

第2項 実施方法

1. 被験物質

被験物質には、ゼライス社より供与を受けたトリペプチド Gly-X-Y の含有率が 15%以上のコラーゲン・トリペプチド(CTP-15/pig)を用いた。

2. 被験者

被験者は、心血管系疾患および糖尿病の治療を受けていない健常人ボランティア 32名(男 16名、女性 16名)とした。なお本試験は、金沢医科大学の医薬品等臨床研究倫理審査委員会にて承認を受けた後に実施された(承認日：平成 25年 1月 17日、追加承認日：平成 25年 3月 22日、臨床研究番号 285)。

3. 実施方法

実施方法は、単一用量の CTP を経口摂取する 6 か月間のオープン試験とした。被験者は CTP-15/pig を 1 日当たり 16 g (トリペプチド含量 2.4 g)を朝夕の二回に分けて、水、コーヒー、お茶、味噌汁などに溶解して毎日摂取した。

4. 検査方法

採血は、摂取開始前と 6 ヶ月間摂取した直後に実施した。血清採取用採血管を用いて上腕静脈から採血した後 4°C で 10 分間遠心(1600×g)し、上清を採取して血清画分とした。得られた血清について、総コレステロール量(total cholesterol : TC)、中性脂肪量 (triglyceride : TG), HDL-C 量、LDL-C 量、TAGE 量を測定した(測定は株式会社エスアールエルが担当)。得られた血中脂質の値から LDL-C/HDL-C 比を算出し、2.5 以上のハイリスク群と 2.5 未満のローリスク群に分けて解析した。一方、TAGE は、TAGE 特異的な抗 TAGE ポリクローナル抗体を用いる競合的 ELISA 法[73]により測定し、10 units/mL 以上の高値群とそれ以下の低値群に分けて解析した。CAVI の値は、左右両半身について摂取開始前と 6 ヶ月間摂取直後に測定した(フクダ電子社製 VS-1500A)。その他に、一般血液検査として赤血球、白血球、血小板、ヘモグロビン、ヘマトクリット、総タンパク、総ビリルビン、LDH、AST、ALT、ALP、 γ -GTP、Na、K、Cl、Cr、BUN、フェリチン、鉄、UIBC を測定し、全身状態の変化を追跡した。各血中脂質値の診断の基準値は、動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版[74]

に従い、一方ここで言う総コレステロール量は同ガイドラインにおける non HDL-C 量と通常臨床検査値の総コレステロール量の和を基準値とした。

5. 統計解析

測定値は平均値±標準誤差で示した。摂取開始前と6ヵ月間摂取直後の測定値について対応のある *t* 検定 (paired *t*-test) により統計解析を行い、有意水準は 0.05 以下とした。

第3項 結果

CTP-15/pig の経口摂取に際して味に不快感を訴えた女性 1 名と、心疾患(本試験とは無関係の疾患)の治療を開始した男性 1 名が試験途中で離脱したことから、最終的に 30 名(男性 15 名、女性 15 名)平均年齢 53.7 歳(男性 58.1 歳、女性 49.3 歳)を評価対象とした(表 3-3)。

表 3-3. 被験者の背景

被験者数	30	(男性 15、女性 15)
年齢	53.7±7.2	(男性 58.1±1.6、女性 49.3±1.4)

値は、平均値±標準誤差。

全被験者の摂取前後における TC、TG、LDL-C および HDL-C の値は、いずれも正常値の範囲内であったが、トリグリセリド量と HDL-C 量では CTP-15/pig 摂取により有意な上昇が観られた(表 3-4)。

表 3-4 各パラメーターの 6 ヶ月間の変化

	摂取開始前	6 か月間摂取後	<i>p</i>
身長(cm)	162.7 ± 1.5	163.3 ± 1.6	0.316
体重(kg)	61.5 ± 2.4	61.0 ± 2.4	0.911
BMI	22.9 ± 0.6	22.7 ± 0.6	0.055
収縮期血圧(mmHg)	118.6 ± 2.7	115.6 ± 2.6	0.209
拡張期血圧(mmHg)	76.3 ± 1.8	75.1 ± 1.8	0.435
総コレステロール(mg/dL)	206.8 ± 7.1	214.0 ± 5.9	0.400
トリグリセリド(mg/dL)	91.6 ± 7.7	103.1 ± 7.7	0.033
LDL-C (mg/dL)	128.6 ± 6.5	132.1 ± 5.6	0.229
HDL-C (mg/dL)	59.8 ± 2.9	63.7 ± 2.8	0.007

値は、平均値±標準誤差。アンダーバーは有意な差があったものを示す ($p<0.05$)。

LDL-C/HDL-C 比は、全被験者のデータに基づいて解析では、試験前後で有意な変化は観られず、LDL-C/HDL-C 比 2.5 未満のローリスク群(18 名)においても有意な変化は認められなかった。一方、LDL-C/HDL-C 比 2.5 以上のハイリス

ク群(12名)では、CTP-15/pig 摂取により量比の有意な低下が観察された(図 3-5)。

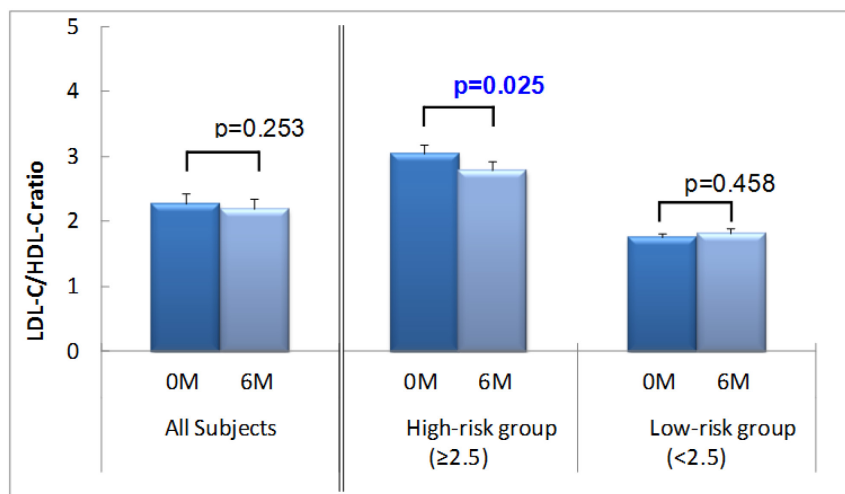


図 3-5. CTP-15/pig 摂取前後の LDL-C/HDL-C 比の変化

図中の誤差範囲は標準誤差。ハイリスク群は n=12、ローリスク群は n=18。

TAGE 値は、全被験者のデータを基にした解析では、CTP-15/pig を摂取するとき有意な低下が認められた(図 3-6)。さらに高値群と低値群に分けて詳細に解析したところ、TAGE 値は高値群(12名)でのみ有意な低下が観察されたことから、全被験者データ解析で認められた TAGE 値の有意な低下は、高値群の値が影響したものである。

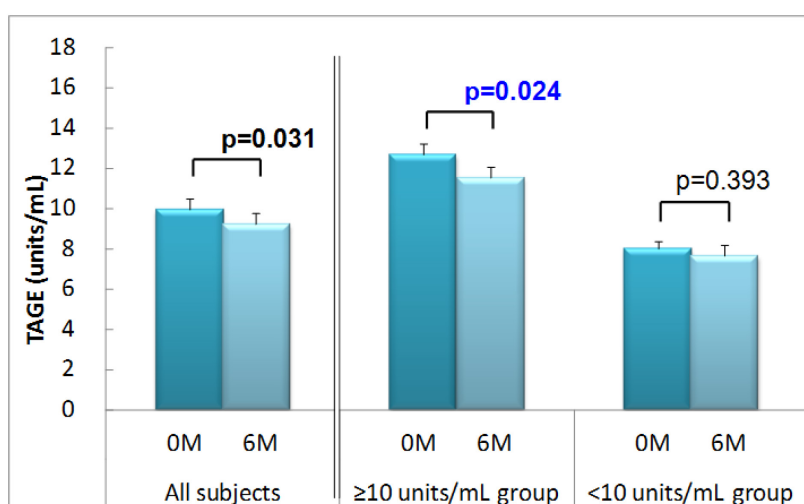


図 3-6. CTP-15/pig 摂取前後の TAGE 値の変化

図中の誤差範囲は標準誤差。高値群は n=12、低値群は n=18。

CAVI 値は、左半身および右半身ともに CTP-15/pig を 6 ヶ月間摂取した直後には有意に低下しており、その低下の程度はいずれも約 0.2 ポイントであった(表 3-5)。

表 3-5. CTP-15/pig 摂取前後の CAVI 値の変化(全被験者)

	摂取開始前	6 か月間摂取後	<i>p</i>
右半身	7.79 ± 0.83	7.60 ± 0.97	0.048
左半身	7.79 ± 0.80	7.61 ± 0.90	0.047

値は、平均値±標準誤差。アンダーバーは有意な差があったものを示す($p<0.05$)。

CAVI 値の低下に影響を与えた因子を特定するため、CAVI の右半身の測定結果との各因子との相関関係を検討した(表 3-6)。

表 3-6. CAVI 値と各因子との相関

	摂取開始前		6 か月間摂取後		摂取前後の変動	
	相関係数	<i>p</i>	相関係数	<i>p</i>	相関係数	<i>p</i>
体重(kg)	0.085	0.198	0.093	0.780	-0.169	0.373
BMI	0.102	0.719	0.090	0.629	-0.032	0.862
収縮期血圧*	0.245	0.049	0.301	0.061	0.089	0.640
拡張期血圧*	0.020	0.207	0.022	0.257	0.010	0.960
総コレステロール	-0.250	0.101	-0.084	0.517	0.027	0.889
トリグリセリド	0.457	0.027	0.375	0.072	-0.064	0.735
LDL-C	-0.240	0.128	-0.016	0.815	-0.059	0.755
HDL-C	-0.309	0.043	-0.264	0.101	0.102	0.590
LDL-C/HDL-C 比	0.049	0.751	0.201	0.354	-0.082	0.664
TAGE	0.321	0.038	0.268	0.152	0.116	0.542
年齢	0.760	0.018	0.660	0.020	-0.100	0.615
性別**	-0.350	<0.001	-0.340	<0.001	0.010	0.947

* mmHg。 **男性:1, 女性:2 とした。アンダーバーは有意な差があったものを示す($p<0.05$)。

試験実施前のデータを基に相関性を調べたところ、CAVI 値と有意な相関を示した因子は、収縮期血圧、トリグリセリド量、HDL-C 量、TAGE 量、年齢、性別であった。しかし、CTP を 6 ヶ月間摂取した後のデータを基に同様に相関を調べたところ、CAVI 値と有意な相関が認められたのは年齢、性別のみであった。さらに、各因子の CTP 摂取前後 6 ヶ月間の変化を比較しても、CAVI 値と有意な相関を示す因子を見出すことはできなかった。

次に、CAVI 値を目的変数として、CAVI 値と実施前において単相関を示した 6 因子(収縮期血圧、トリグリセリド量、HDL-C 量、TAGE 値、年齢、性別)を説明変数として重回帰分析を行った(表 3-7)。

表 3-7. CAVI 値と表 3-6 で有意差が確認された 6 因子との重回帰分析

	摂取開始前		6 か月間摂取後		摂取前後の変動	
	標準回帰係数	<i>p</i>	標準回帰係数	<i>p</i>	標準回帰係数	<i>p</i>
収縮期血圧*	-0.106	0.448	0.014	0.939	0.083	0.691
トリグリセリド	0.231	0.209	0.108	0.620	-0.098	0.651
HDL-C	0.150	0.510	0.198	0.440	0.060	0.778
TAGE	0.099	0.517	0.076	0.656	0.164	0.467
年齢	0.811	≤0.001	0.641	0.006	-0.035	0.895
性別	0.113	0.612	-0.093	0.715	-0.154	0.565
決定係数(R ²)	0.649	≤0.001	0.493	0.013	0.053	0.968

* mmHg。アンダーバーは有意な差があったものを示す($p < 0.05$)。

その結果、試験実施前と CTP 摂取開始 6 ヶ月後において、年齢が CAVI 値に対する独立した寄与因子として選択された。一方、CAVI 値の CTP-15/pig 摂取前後 6 ヶ月間の変化と独立して相関する因子は無かった。

赤血球、白血球、血小板、ヘモグロビン、ヘマトクリット、総タンパク、総ビリルビン、LDH、AST、ALT、ALP、 γ -GTP、Na、K、Cl、Cr、BUN、フェリチン、鉄、UIBC は正常値の範囲内の変化であり、CTP 摂取による健康への悪影響は観察されなかった。

第4項 考察

本節では、コラーゲン由来のトリペプチドを主要成分とする CTP-15/pig の動脈硬化指標への影響を、ヒト健常人を対象としたオープン試験で検証した。動脈硬化プラークの発生と関連する指標である LDL-C/HDL-C 比について、全被験者のデータに基づいて解析を行ったところ、CTP-15/pig 摂取前後で有意な差は認められなかった。しかし、LDL-C/HDL-C 比は、健常人で概ね 2.02(男性 2.25、女性 1.77)[61]であり、量比が 2.5 以上となると心血管疾患のリスクが高まるとの報告がある[60]。そこで、LDL-C/HDL-C 比 2.5 以上と 2.5 未満の 2 群に分けて解析を行った。その結果、量比 2.5 以上の群においては CTP-15/pig 摂取により数値が有意に低下しており、血中脂質のバランスが崩れて動脈硬化プラークが発生しやすい状態では CTP-15/pig の摂取がその改善に有効になることが示唆された。なお、遺伝性高コレステロール血症ウサギに CTP-15/pig を投与した場合には総コレステロール値の低下が確認されている[25]が、本試験ではこの値の低下は確認されなかった。一方、HDL-C 量の有意な上昇が認められた。これは、試験の被験対象が、この場合は血中脂質が正常なヒト健常人であり、他方は病態モデル動物であるという違いが影響していると考えられる。

TAGE 量も、LDL-C/HDL-C 比と同様に高値群でのみ CTP-15/pig 摂取により有意に低下したことから、血中の糖化産物の量が多く血管の障害がよりおきやすい環境下では CTP-15/pig は TAGE 量の低下作用を示すことが示唆された。本試験では、血糖値を測定しておらず、血糖値との関連に直接踏み込めなかったが、CTP-15/pig に含まれる主要トリペプチドの Gly-Pro-Hyp がインクレチンの加水分解酵素である DPP-4 を競合的に阻害するという報告[6-7]があることから、インスリン分泌系を介した血糖値抑制により TAGE 量を低下させている可能性も考えうる。

CAVI 値も全被験者で CTP-15/pig 摂取後に有意な低下が認められ、CTP 摂取による血管弾力性の回復が示唆された。左右一方あるいは両側の CAVI 値の改善は全被験者 30 名中 20 名にのぼり(データ不提示)、摂取前の程度を問わず CAVI 値の改善傾向が認められた。冠動脈疾患のリスク要因を保有する患者では CAVI 値は高値であり、CAVI 値の低下はリスク要因の低減の反映であるとされている[68]。したがって、健常者であっても CAVI 値の低下を招いた事実は、CTP の摂取が将来の動脈硬化リスクの低減に寄与する可能性を示唆したもので

あると言える。なお CAVI 値は、体重減量[75]、高血圧や糖尿病の治療[76-78]、高コレステロール血症の治療[79-80]、高脂血症の治療薬であるイコサペント酸エチルの内服[75]、喫煙者の禁煙[81]などでも値の改善が観られるとの報告もあるが、今回の被験者に該当者はいない。また、本試験では被験者に通常の食生活を送るように指示している。食事の中には緑茶や大豆製品など、生活習慣病や動脈硬化を防ぐといわれている食品も含まれていたことが推察されるが、カテキンや大豆ペプチドは有効性発現には1年以上の長期摂取[82]あるいは高用量の摂取[83,84,85]が必要とされており、本試験期間に対するそれらの影響は除外できるものと考えている。

加齢による動脈硬化の進展により、CAVI 値 が 10 歳につき 0.5 ポイント 程度増加する[72]ことを考えると、6 ヶ月間の CTP 摂取による 0.2 ポイントの低下は、CTP の動脈硬化に対する予防効果の高さを期待させる結果といえる。また、CAVI 値の低下と相関する因子を特定するため、CAVI と各因子の単相関分析および重回帰分析を実施した。しかし、CAVI 値の 6 ヶ月間の変化と独立して相関を示す因子は確認できなかった。これは、本試験で観察した CAVI 値の低下は CTP が血管に対し直接作用した結果である可能性を示している。実際に、Tang らは、CTP が培養ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖と遊走が抑制すること、ならびに I 型コラーゲンの線維形成や IV 型コラーゲンの生成を促進されることを報告しており、摂取された CTP がこのような作用で CAVI 値を低下させた可能性も考えられ得る。なお、本試験ではオリゴペプチドの血中濃度は測定しなかったが、第一章の結果に基づくと本試験でのオリゴペプチドの血中濃度は朝と晩 2 回の CTP-15/pig 摂取時には、CTP-50/pig を 4 g 摂取した場合の 1/2 程度の濃度に達していたものと推測される。今後は、長期間の摂取によりどの程度まで改善されるのか、あるいは動脈硬化症の進展の度合いに対応して、CTP がどの程度有効性を発揮するかについての研究が待たれる。

第5項 小括

本節では、ヒト健常人を対象に、CTP 単一用量の経口摂取による 6 ヶ月間のオープン試験を実施し、動脈硬化指標である血中脂質、TAGE 値、CAVI 値の変化を追跡することで動脈硬化の進展に与えるコラーゲントリペプチドの影響について検証した。本研究により、CTP には上記の 3 つの動脈硬化指標を改善する効果があることが確認できた。動脈硬化を引き起こす危険因子は複数あり、生活習慣が乱れている場合は、健常人であっても複数の因子を保有する場合も少なくない。動脈硬化の複数の危険因子の低減に寄与する CTP は注目すべき食品素材といえる。また、各種動脈硬化指標が高値の被験者に対しても改善効果が確認されたことから、より動脈硬化症が進展した場合にも CTP 摂取は指標改善に有効であることが期待できる。動脈硬化は血管石灰化と血管壁のリモデリングを繰り返しながら徐々に進行していく疾患であるが、心血管系疾患の症状が顕性化・重症化してから診断される症例が多い。予防医学の観点からも、CTP 摂取は今後重要性が増すものと期待される。

結 論

従来、経口摂取したタンパク質成分の吸収は消化管においてアミノ酸にまで加水分解された後に起こるとされてきた。しかし、近年小腸上皮細胞の **BBM** に **peptide transporter 1 (PEPT1)** が存在することが確認され、オリゴペプチドの状態でも血中に移行できることが明らかにされた[28]。この **PEPT1** は、プロトンの濃度勾配を駆動力として、ジペプチドおよびトリペプチドを特異的に移送するが配列特異性は低い。また、基質親和性はあまり高くはないが、移送能力は高い[30-33]。**PEPT1** の発見は、新たな薬物移送システムの可能性を示唆するものであり、実際 **dopa** や **acyclovir**、**enalaprilat** などのアミノ酸結合体がプロドラッグとして開発されている[29]。一方、トリペプチドやジペプチドの中にも弱いながらも生理活性を示すものが見出されており、**Gly-Pro-Hyp** には凝固抑制作用[4,5]、**DPP-IV** の阻害作用[6,7]、精神運動発作の抑制作用[8]が、**Pro-Hyp** にはヒアルロン酸合成促進作用[9]や関節軟骨形成促進作用[10]が、**Gly-Pro** には血圧低下作用[11]が報告されている。しかし、体内に取り込まれたオリゴペプチドはペプチダーゼ等による代謝を受け易く、生理作用の発現には恒常的に摂取して長期間体内濃度を維持する必要がある。それゆえ、オリゴペプチドは、医薬品としての使用より日々一定量を摂取する健康食品としての利用が適当と考えられる。しかし、特定のアミノ配列のオリゴペプチドは高コストで汎用性に乏しいという欠点があり、健康食品として市場に供するには低コスト製品の開発が不可欠である。そのような観点から、**Gly-X-Y** の繰り返し配列を特徴とする安価なコラーゲンを出発原料として作成したオリゴペプチド混合物は、健康食品としての付加価値を持つと考えられる。コラーゲンの特徴は、三アミノ酸残基ごとの **Gly** の存在であることから、特異的に **Gly** の *N* 末端側を加水分解した製品は、特定配列のトリペプチドを多く含むことになる。そこで本研究では、*N* 末端にグリシンをもつトリペプチドを高含有する食品素材である **CTP** について、投与後の体内への吸収性、一般的なトリペプチドとの吸収性の比較、臨床応用を目指した基礎的研究を実施した。

第一章では、ラットへの **CTP-100/pig** の経口投与あるいは腹腔内投与試験の結果、摂取されたトリペプチドが速やかに血中に移行することを示した。さらに、トリペプチドの *N* 末端あるいは *C* 末端側加水分解物であるジペプチドの血

中移行も見られた。経口投与と腹腔内投与でオリゴペプチドの血中濃度に差異見られず、両投与経路ではほぼ同様の濃度変化を示した。放射性同位体標識したトリペプチドをラットに経口投与し、全身オートラジオグラムで成分の体内動態を検討した結果、皮膚、骨をはじめとする結合組織への選択的な移行が観られた。

そこで第二章では、ヒトを対象として、CTP と一般的なコラーゲン加水分解物を摂取した場合とでオリゴペプチドの血中移行を検討した。その結果、CTP を摂取した場合のトリペプチドおよび代謝ジペプチドの血中濃度は一般的なコラーゲン加水分解物を摂取した場合よりもはるかに高かった。さらに、尿中に排泄されるオリゴペプチド量も CTP のほうが高く、オリゴペプチドが高い濃度に保たれたまま体循環していることが示された。

第三章では、CTP の臨床応用を目指した基礎的検討として、変形性膝関節症および動脈硬化症への影響を検討した。はじめに変形性膝関節症モデルウサギに対して CTP-15/pig を経口投与した結果、モデル作成部位の関節軟骨の損傷の程度が有意に軽減された。一般的なコラーゲン加水分解物の投与では治癒効果が認められないことから、CTP による治癒効果はトリペプチドによるものと結論できる。さらに、軽度の膝の痛みを有する被験者を対象に CTP-15/pig の膝痛軽減効果を二重盲検プラセボ対照無作為化比較試験法で検証した結果、水症、軋轢音の有意な改善、圧痛の改善傾向が確認された。膝痛の程度の VAS 値および QOL は統計学的差異を示さなかったものの、CTP-15/pig 摂取群に改善傾向が観られた。これらの結果から、CTP の変形性膝関節症に対する治癒効果が示唆された。次に、動脈硬化症への影響を検証するため、ヒト健常人を対象にオープン試験を実施した。介入の前後で比較した結果、動脈硬化プラークの発生と関連する指標である LDL-C/ HDL-C 比が 2.5 以上の群においては CTP-15/pig 摂取により値が有意に低下した。さらに、終末糖化産物の一つである TAGE の血清中の量も、特に初期値で高値を示した群で有意に低下した。血管弾力性を示す指標である CAVI 値は、全被験者で CTP-15/pig 摂取後に有意な低下が観られた。これらの結果から、CTP には血中脂質、糖化産物、血管弾力性と、性質の異なる複数の動脈硬化指標を改善する効果があることが示された。

以上、CTP は経口摂取でもオリゴペプチドの血中移行に適した食品素材であることが明らかになった。さらに、ウサギモデルを用いた検討で変形性膝関節

症の改善効果が認められた。軽度の膝痛をもつ被験者では、CTP 摂取により有意に水症・軋轢音が改善した。また、動脈硬化に対する効果の検証では血管弾力性の改善が示唆された。これらの結果から、CTP 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有益であることが明らかになった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、ゼライス株式会社中央研究所所長・酒井康夫博士に謹んで感謝の意を表します、動物実験の際、多大なるご協力を頂きました山形大学大学院理工学研究科客員教授・古澤利武博士、神奈川歯科大学・奥寺俊允博士に深く感謝致します。分析法の研究において多大なるご協力、ご指導を賜りました、(株)エムシープロット・バイオテクノロジー・出口喜三郎博士に深く感謝申し上げます。変形性膝関節症に関する研究において様々なご協力・ご指導を賜りました医療法人社団遼山会 関町病院・丸山 公博士、(株)SOUKEN 代表取締役・齋藤正実博士ならびに副所長・増田康博士に深く感謝申し上げます。動脈硬化に関する研究において多大なるご協力・ご指導を賜りました金沢医科大学学長・勝田省吾博士（現・理事）、同大学総合研究所教授・友杉直久博士（現・名誉教授）、同教授・竹内正義博士、同教授・石垣靖人博士、同大学医学部生科学Ⅱ教授・米倉秀人博士に深く感謝申し上げます。

論文をご審査頂き、貴重なご助言を受け賜りました日本大学大学院薬学研究科教授・宮入伸一博士、同教授・松本宜明博士、同教授・藤井まき子博士、同教授・鈴木豊史博士に深く感謝申し上げます。

本研究を実施する機会を与えて頂き、ご協力とご激励を賜りました、ゼライス(株)中央研究所の方々に深く感謝致します。学位取得に際し深いご理解とご激励を賜りましたゼライス(株)社長・稲井謙一氏、常務・小林隆博士に深く感謝致します。

最後に、研究や論文作成のために不在がちになる中でも惜しみない協力をしてくれた家族に心より感謝致します。

引用文献

1. Ramshaw JA, Shah NK, and Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: A context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol.*, 1998; 122: 86–91.
2. Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, and Ohtsuki K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 6531–6536.
3. Shigemura Y, Kubomura D, Sato Y, and Sato K. Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chemistry*, 2014; 159: 328-332.
4. Postlethwaite AE, Seyer JM, and Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1978; 75: 871–875.
5. Laskin DL, Kimura T, Sakakibara S, Riley DJ, and Berg RA. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1986; 39: 255–266.
6. Hatanaka T, Kawakami K, and Uraji M. Inhibitory effect of collagen-derived tripeptides on dipeptidylpeptidase-IV activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2014; 29: 823-828.
7. Hsu K, Tung Y, Huang S and Jao C. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Peptides in Porcine Skin Gelatin Hydrolysates. In: *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, ed by B Hernandez-Ledesma and C Hsieh, doi: 10.5772/51264, InTech-Open Access Publisher, 2013.
8. Wisniewski K, Artemowicz B, Lutostanska A, Mackowiak J, and Koziolkiewicz W. Central activity of peptide Gly-Pro-Hyp-The main component of collagen degradation products mixture. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1994; 54: 33–38.
9. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, and Tajima S. Collagen-derived dipeptide,

proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J. Dermatol.*, 2010; 37: 330–338.

10. Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, and Wada M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthr. Cartil.*, 2009; 17: 1620–1627.
11. Ichimura T, Yamanaka A, Otsuka T, Yamashita E, and Maruyama S. Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009; 73: 2317–2319.
12. Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2000; 30: 87–99.
13. Wu J, Fujioka M, Sugimoto K, Mu G, and Ishimi Y. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J. Bone. Miner. Metab.*, 2004; 22: 547–553.
14. Nomura Y, Oohashi K, Watanabe M, and Kasugai S. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, 2005; 21: 1120–1126.
15. Saiga-Egusa A, Iwai K, Hayakawa T, Takahata Y, and Morimatsu F. Antihypertensive effects and endothelial progenitor cell activation by intake of chicken collagen hydrolysate in pre- and mild-hypertension. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009; 73: 422–424.
16. Matsumoto H, Ohara H, Ito K, Nakamura Y, and Takahashi S. Clinical effects of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Letters*, 2006; 7: 386–390.
17. 大原 浩樹, 伊藤 恭子, 飯田 博之, 松本 均. コラーゲンペプチド経口摂取による皮膚角層水分量の改善効果. *日本食品科学工学会誌*, 2009; 56: 137–145.
18. Kouguchi T, Ohmori T, Shimizu M, Takahata Y, Maeyama Y, Suzuki T,

- Morimatsu F, and Tanabe S. Effects of a chicken collagen hydrolysate on the circulation system in subjects with mild hypertension or high-normal blood pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013; 77: 691–696.
19. 我孫子 義弘. 改訂版にかわとゼラチン. 日本にかわ・ゼラチン工業組合, 丸善, 1987; 376-380pp.
 20. 酒井 康夫, 菊田 達也, 津田 友香, 小島 弘之. 浸透性コラーゲン・トリペプチド(魚皮由来)の化粧品への応用. *Fragrance Journal*, 2006; 34: 54-60.
 21. Tsuruoka N, Yamato R, Sakai Y, Yoshitake Y, and Yonekura H. Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007; 71: 2680–2687.
 22. Hata S, Hayakawa T, Okada H, Hayashi K, Akimoto Y, and Yamamoto H. Effect of oral administration of high-advanced-collagen tripeptide (HACP) on bone healing process in rat. *J. Hard Tissue Biol.*, 2008; 17: 17–22.
 23. Pyun HB, Kim M, Park J, Sakai Y, Numata N, Shin JY, Shin HJ, Kim DU, and Hwang JK. Effects of collagen tripeptide supplement on photoaging and epidermal skin barrier in UVB-exposed hairless mice. *Prev. Nutr. Food. Sci.*, 2012; 17: 245–253.
 24. Okawa T, Yamaguchi Y, Takada S, Sakai Y, Numata N, Nakamura F, Nagashima Y, Ikezawa Z, and Aihara M. Oral administration of collagen tripeptide improves dryness and pruritus in the acetone-induced dry skin model. *J. Dermatol. Sci.*, 2012; 66: 136–143.
 25. Tang L, Sakai Y, Ueda Y, and Katsuda S. Effects of oral administration of tripeptides derived from type I collagen (collagen tripeptide) on atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits. *J. Biosci. Bioeng.*, 2015; 119: 558–563.
 26. Tang L, Sakai Y, Iwai K, and Katsuda S. Effect of collagen tripeptide of Type I collagen on migration, proliferation and collagen synthesis of human aortic smooth muscle cells. *J. Kanazawa. Med. Univ.*, 2009; 34,

93–100.

27. 浅野隆司, 金子いづる, 千場智尋. コラーゲンおよびコラーゲン分解物の経口摂取による皮膚コラーゲンの合成促進効果. *バイオインダストリー*, 2001; 18: 11–18.
28. Abe M, Hoshi T, and Tajima A. Characteristics of transmural potential changes associated with the proton-peptide co-transport in toad small intestine. *J. Physiol.*, 1987; 394: 481–499.
29. Brandsch M. Transport of drugs by proton-coupled peptide transporters: pearls and pitfalls. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2009; 5: 887–905.
30. Steinhardt HJ, and Adibi SA, Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyL-dipeptides in human jejunum. *Gastroenterology*, 1986; 90: 577–582.
31. Hellier MD, Holdworth CD, McColl I, and Perrett D. Dipeptide absorption in man. *Gut*, 1972; 13: 965–969.
32. Cook GC. Comparison of intestinal absorption rates of glycine and glycyLglycine in man and the effect of glucose in the perfusing fluid. *Clin. Sci.*, 1972; 43: 443–453.
33. Adibi SA, and Morse EL. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *Journal of Clinical Investigation*, 1971; 50: 2266–2275.
34. Aito-Inoue M, Lackeyram D, Fan MZ, Sato K, and Mine Y. Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J. Pept. Sci.*, 2007; 13: 468–474.
35. Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, and Komai M. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 835–841.
36. Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Koji I, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J.*

- Agric. Food Chem. 2007; 55: 1532–1535.
37. Ichikawa S, Morifuji M, Ohara H, Matsumoto H, Takeuchi Y, Sato K. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2010; 61: 52–60.
 38. Alpers DH. Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3rd ed; 1994. 1723–1749 pp.
 39. Clark KL, Sebastianelli W., Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, Deitch JR, Sherbondy PS, and Albert A. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Current medical research and opinion*, 2008; 24: 1485–1496.
 40. Kumar, S., Sugihara, F., Suzuki, K., Inoue, N., & Venkateswarathirukumara, S. A double - blind, placebo - controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015; 95: 702–707.
 41. Koyama Y, Kuwaba K, Kusubata M, Hayashida O, Takara T, Tsukada Y. Supplemental ingestion of collagen peptide improves T-cell-related human immune status -Placebo-controlled double-blind study-. *薬理と治療*, 2015; 43: 51–56.
 42. 桑葉 くみ子, 小山 洋一, 小池田 崇史, 塚田 幸宏. コラーゲンペプチド摂取による肌の改善効果 -プラセボ対照二重盲検群間比較試験-. *薬理と治療*, 2014; 42: 995–1004.
 43. Koyama Y, Kuwaba K, Kondo S, Tsukada Y. Supplemental ingestion of collagen peptide suppresses ultraviolet-induced erythema—A randomized double-blind placebo-controlled study—. *薬理と治療*, 2014, 42: 781–790.
 44. 浅野隆司, 金子いづる, 千場智尋. コラーゲンおよびコラーゲン分解物の経口摂取による皮膚コラーゲンの合成促進効果. *バイオインダストリー*, 2001; 18: 11–18.

45. Liu C, Sugita K, Nihei K, Yoneyama K, Yanaka H. Absorption of hydroxyproline-containing peptides in vascularly perfused rat small intestine in situ. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009; 73: 1741–1747.
46. Dieppe PA and Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*, 2005; 365: 965–973.
47. Aigner T and Stove J. Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003; 55: 569–1593.
48. Ishijima M, Nkamura T, Shimizu K, Hayashi K, Kikuchi H, Soen S, Omori G, Yamashita T, Uchio Y, Chiba J, Ideno Y, Kubota M, Kurosawa H, and Kaneko K. Intra-articular hyaluronic acid injection versus oral non-steroidal anti-inflammatory drug for the treatment of knee osteoarthritis: a multi-center, randomized, open-label, non-inferiority trial. *Arthritis Res. Ther.*, 2014; 16: R18.
49. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, and Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2018; 16: 137–162.
50. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, and Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010; 18: 476–499.
51. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, and Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee

osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007; 15: 981–1000.

52. Naraoka T, Ishibashi Y, Tsuda E, Yamamoto Y, Kusumi T, and Toh S. Comparison between the effect of collagen tripeptide and sodium hyaluronan to prevent knee osteoarthritis: A preliminary in vivo study. *Hiroshima Med. J.*, 2011; 62: 107–116.
53. Naraoka T, Ishibashi Y, Tsuda E, Yamamoto Y, Kusumi T, and Toh S. Periodic knee injections of collagen tripeptide delay cartilage degeneration in rabbit experimental osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2013; 15: R32.
54. Akai M, Doi T, Fujino K, Iwaya T, Kurosawa H, and Nasu T. An outcome measure for Japanese people with knee osteoarthritis. *J. Rheumatol.*, 2005; 32: 1524–1532.
55. Adam M. Therapie Der Osteoarthrose – Welche Wirkung Haben Gelatineparaprate? *Therapiewoche.*, 1991; 41: 2456–61.
56. Moskowitz R. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2000; 30: 87–92.
57. Blankenhorn DH and Krams DM. Reversal of atherosclerosis and sclerosis. The two components of atherosclerosis. *Circulation*, 1989; 79: 1–7.
58. Shioi A. Vascular calcification and remodeling in diabetes. *J. Jpn. Angiol.*, 2010; 50: 561–567.
59. Enomoto M, Adachi H, Hirai Y, Fukami A, Satoh A, Otsuka M, Kumagai S, Nanjo Y, Yoshikawa K, Esaki E, Kumagai E, Ogata K, Kasahara A, Tsukagawa E, Yokoi K, Ohbu-Murayama K and Imaizumi T. LDL-C/HDL-C ratio predicts carotid intima-media thickness progression better than HDL-C or LDL-C alone. *J. Lipids*, 2012; 21: 153–159.
60. Noike H, Hitsumoto T, Sakurai T, Sugiyama Y, Sato S and Iizuka T, Takahashi M, Shimizu K, Nakamura K and Ohsawa H. Relationships between intravascular ultrasonographic findings and coronary risk

- factors in patients with normal coronary angiography. *J. Cardiol.*, 2005; 45: 1–10.
61. Murao S, Oka T, Nagamachi N, Honda K, Arakawa Y, Mori Y, and Kohi F. LDL Cholesterol to HDL cholesterol ratio and its relationship with other cardiovascular risk factors in Japanese population. *Ningen Dock*, 2010; 25: 65–70.
 62. Ishibashi Y, Matsui T, Ueda S, Fukami K and Yamagishi S. Advanced glycation end products potentiate citrated plasma-evoked oxidative and inflammatory reactions in endothelial cells by up-regulating protease-activated receptor-1 expression. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2014; 13: 60.
 63. Takeuchi M and Yamagishi S: TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Med. Hypotheses.*, 2004; 63: 449–452.
 64. Tahara N, Yamagishi S, Takeuchi M, Honda A, Tahara A, Nitta Y, Kodama N, Mizoguchi M, Kaida H, Ishibashi M, Hayabuchi N, Matsui T and Imaizumi T. Positive association between serum level of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products and vascular inflammation evaluated by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Diabetes Care.*, 2012; 35: 2618–2625.
 65. Fukushima Y, Daida H, Morimoto T, Kasai T, Miyauchi K, Yamagishi S, Takeuchi M, Hiro T, Kimura T, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y and Matsuzaki M. Relationship between advanced glycation end products and plaque progression in patients with acute coronary syndrome: the JAPAN-ACS sub-study. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2013; 12: 5.
 66. Gomez-Sanchez L, Garcia-Ortiz L, Patino-Alonso MC, Recio-Rodriguez JI, Frontera G, Ramos R, Martí R, Agudo-Conde C, Rodriguez-Sanchez E, Maderuelo-Fernández JA, and Gomez-Marcos MA for the MARK Group. The association between the cardio-ankle vascular index and other parameters of vascular structure and function in caucasian adults: MARK Study. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2015; 22: 901–911.
 67. Shirai K, Utino J, Otsuka K and Takata M. A novel blood

- pressure-independent arterial wall stiffness parameter; cardio-ankle vascular index (CAVI). *J. Atheroscler. Thromb.*, 2006; 13: 101–107.
68. Saiki A, Sato Y, Watanabe R, Watanabe Y, Imamura H, Yamaguchi T, Ban N, Kawana H, Nagumo A, Nagayama D, Ohira M, Endo K, and Tatsuno I. The role of a novel arterial stiffness parameter, cardio-ankle vascular index (CAVI), as a surrogate marker for cardiovascular diseases. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2016; 23: 155–168.
 69. Dobsak P, Soska V, Sochor O, Jarkovsky J, Novakova M, Homolka M, Soucek M, Palanova P, Lopez-Jimenez F, and Shirai K. Increased cardio-ankle vascular index in hyperlipidemic patients without diabetes or hypertension. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2015; 22: 272–283.
 70. Sato Y, Nagayama D, Saiki A, Watanabe R, Watanabe Y, Imamura H, Yamaguchi T, Ban N, Kawana H, Nagumo A, Ohira M, Endo K, Kurosu T, Tomaru T, Shirai K, and Tatsuno I. Cardio-Ankle vascular index is independently associated with future cardiovascular events in outpatients with metabolic disorders. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2016; 23: 596–605.
 71. Kubota Y, Maebuchi D, Takei M, Inui Y, Sudo Y, Ikegami Y, Fuse J, Sakamoto M and Momiyama Y. Cardio-ankle vascular index is a predictor of cardiovascular events. *Artery. Res.*, 2011; 12: 91–96.
 72. Shirai K, Hiruta N, Song M, Kurosu T, Suzuki J, Tomaru T, Miyashita Y, Saiki A, Takahashi M, Suzuki K and Takata M. Cardio-ankle vascular index (CAVI) as a novel indicator of arterial stiffness: Theory, evidence and perspectives. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2011; 18: 924–938.
 73. Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, and Kameda Y. Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Mol. Med.*, 2000; 6: 114–125.
 74. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M and Yokote K. Executive summary

- of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan—2012 version. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2013; 20: 517–523.
75. Satoh N, Shimatsu A, Kotani K, Himeno A, Majima T, Yamada K, Suganami T and Ogawa Y. Highly purified eicosapentaenoic acid reduces cardio-ankle vascular index in association with decreased serum amyloid A-LDL in metabolic syndrome. *Hypertens. Res.*, 2009; 32: 1004–1008.
76. Miyashita Y, Saiki A, Endo K, Ban N, Yamaguchi T, Kawana H, Nagayama D, Ohira M, Oyama T and Shirai K. Effects of olmesartan, an angiotensin II receptor blocker, and amlodipine, a calcium channel blocker, on Cardio-Ankle Vascular Index (CAVI) in type 2 diabetic patients with hypertension. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2009; 16: 621–626.
77. Nagayama D, Saiki A, Endo K, Yamaguchi T, Ban N, Kawana H, Ohira M, Oyama T, Miyashita Y and Shirai K. Improvement of cardio-ankle vascular index by glimepiride in type 2 diabetic patients. *Int. J. Clin. Pract.*, 2010; 64: 1796–1801.
78. Ohira M, Endo K, Oyama T, Yamaguchi T, Ban N, Kawana H, Nagayama D, Nagumo A, Saiki A, Murano T, Watanabe H, Miyashita Y and Shirai K. Improvement of postprandial hyperglycemia and arterial stiffness upon switching from premixed human insulin 30/70 to biphasic insulin aspart 30/70. *Metabolism*, 2011; 60: 78–85.
79. Miyashita Y, Endo K, Saiki A, Ban N, Yamaguchi T, Kawana H, Nagayama D, Ohira M, Oyama T and Shirai K. Effects of pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on cardio-ankle vascular index in type 2 diabetic patients. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2009; 16: 539–545.
80. Miyashita Y, Endo K, Saiki A, Ban N, Nagumo A, Yamaguchi T, Kawana H, Nagayama D, Ohira M, Oyama T and Shirai K. Effect of ezetimibe monotherapy on lipid metabolism and arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index in type 2 diabetic patients. *J. Atheroscler.*

- Thromb., 2010; 17: 1070–1076.
81. Noike H, Nakamura K, Sugiyama Y, Iizuka T, Shimizu K, Takahashi M, Hirano K, Suzuki M, Mikamo H, Nakagami T and Shirai K. Changes in cardio-ankle vascular index in smoking cessation. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2010; 17: 517–525.
 82. Kokubo Y, Hurukawa Y, and Banno M. Prospective study of the preventive effect of intensive dietary soy intake on atherosclerosis in an urban general population (Part II). *Soy Protein Research*, 2012; 15: 6–12.
 83. Ishiguro T, Ikeda R, Mitsui N, Murasawa H, and Maemoto K. Effects of kori-tofu on lipid metabolism. *薬理と治療*, 2014; 42, 359–362.
 84. Anderson JW, Johnstone BM, and Cook-Newell ME. Meta-Analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 333: 276–282.
 85. Takase H, Nagao T, Otsuka K, Kozuma K, Kataoka K, Meguro S, Komikado M, and Tokimitsu I. Effects of long-term ingestion of tea catechins on visceral fat accumulation and metabolic syndrome: Pooling-analysis of 7 randomized controlled trials. *薬理と治療*, 2008; 36: 509–514.