発酵乳とアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド Angiotensin I—Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Fermented Milk

中 村 康 則
Nakamura Yasunori
(カルビス株式会社 基盤技術研究所)

はじめに

乳酸菌を使った発酵乳は、栄養に優れた体に良い飲みものとして、古くから長寿との関係が論じられてきた。20世紀初頭にフランス Pasteur 研究所の Metchnikoff 博士が提唱した、いわゆる“不老長寿説”はあまりにも有名である。乳自体が持つ良質な乳たんぱく、乳成分が栄養的に果たす役割が大きいことは間違いないが、乳たんぱくに潜在する機能性ペプチドや乳酸菌自体がもたらす効果についての近年の研究の蓄積を見ると、発酵により巧みに保健効果が創出されてくるであろうことが推察される。事実、発酵乳と保健効果との観点から、これまでに整腸作用¹⁾、抗腫瘍・免疫賦活作用²⁾、血中コレステロール低減作用³⁾、高血圧抑制作用⁴⁾などの効果が報告されている。しかしながら、保健効果と機能性ペプチドや乳酸菌体といった有効成分とのかかわりが科学的に解明されてきたのはごく最近といえる。

現在、生活習慣病が大きな社会問題となり、食品機能を利用して、生活習慣病を予防する試みに大きな期待が寄せられている。著者らは、生活習慣病の中で大きなウェイトを占める高血圧症を予防、改善するために、乳酸菌・発酵食品が果たせる可能性について明らかにしようと、これまで研究を進めてきた。そこで、今回は、発酵乳と保健効果、生理活性ペプチドの観点から、これまでの知見および著者らの研究を述べる。

1. 発酵乳の保健効果

発酵乳の有用性としては乳糖不耐症の軽減⁵⁾や前述のような種々の保健効果が知られる。われわれは、弊社製品「カルビス」のもととなっている発酵乳（カルビス

酸乳）を用いて保健効果を科学的に証明してきた。カルビス酸乳とは、脱脂した牛乳を、乳酸菌として *Lactobacillus helveticus* を主構成菌とするカルビス・スターターで発酵させてできる発酵乳をいう。荒井ら⁶⁾は、発酵乳と寿命の関係に着目し、マウスにカルビス酸乳を終生投与した実験を試み、酸乳を摂取した群が対照群に比べ、寿命が約10%延長することを確認した（図1）。

図1 酸乳を摂取したマウスの生存曲線（荒井ら、1980）

これは、ある意味では、発酵乳の持つ機能性がいかに高く発揮された総合的な結果と考えることができよう。死因の解析より、酸乳がガンや感染症の発生を遅延させたり、循環器系へ影響を与えている可能性が考えられた。そこでさらに、モデル動物等を使った詳細な検討の結果、カルビス酸乳には、抗腫瘍・免疫賦活作用^{7,8)}、血圧降下作用⁹⁾、疲労回復・ストレス低減¹⁰⁾、学習・記憶能力向上¹¹⁾などの効果があることがこれまでに明らかになっている。

2. 乳由来の生理活性ペプチド

食品たんぱくに由来する機能性ペプチドが多く知られているが、中でも乳たんぱくを原料とした報告は多く、機能性ペプチドの潜在性が高い素材といえる。主に、乳

たんぱく質の酵素分解物より見出されており、生理機能の異なる、いくつものペプチドが報告されている。最初に見出されたのは、オピオイドペプチドであり、ウンβカゼイン由来の2つのフラグメントがBrantlら¹²⁾によって報告された。Maruyamaら¹³⁾は、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害ペプチドをウンα_{SI}カゼインの酵素分解物から見出した。乳たんぱく由来のACE阻害ペプチドとしては、これが初めての報告である。

ACEは昇圧への関与が大きい酵素として知られる。腎臓から血中に分泌されたたんぱく分解酵素レニンはペプチドであるアンジオテンシノーゲンに作用し、アンジオテンシンIを生成する(図2)。さらにACEによ

図2 レニン・アンジオテンシン系とカリクレイン・キニン系

てアンジオテンシンIのC末端アミノ酸2残基が切断され、オクタペプチド、アンジオテンシンIIが生成する。これは、非常に強力な昇圧物質であり、主に血管平滑筋収縮作用、副腎からのアルドステロン分泌の促進により血圧上昇を引き起こす。強力なナトリウム貯留ホルモンであるアルドステロンは腎でのNa、水の再吸収促進により、血圧上昇を引き起こす。一方、ACEは降圧系であるカリクレイン・キニン系において、降圧物質ブラジキニンを破壊する作用を持つ。このように、ACEは昇圧物質生成のみならず、降圧物質破壊ということで昇圧への関与が大きい酵素である。したがって、ACE阻害ペプチドは、高血圧改善や予防といった生理機能が期待されるペプチド群である。

このほかにも、乳たんぱくに潜在する機能性ペプチドとして、オピオイドアンタゴニスト¹⁴⁾、免疫活性化ペプチド¹⁵⁾、抗凝血ペプチド¹⁶⁾、腸管内での無機質の吸収促進ペプチド¹⁷⁾などが報告されている。

生理活性ペプチドは、in vitroでは強い効果であっても、体内へ吸収されて効果を発揮できるかどうかが問題となる。それは、消化管内でプロテアーゼによる分解を

受けることなく、安定的に存在するかどうか、腸管よりインタクトな形で吸収されるか、吸収後にインタクトな形のまま標的臓器に到達するのかが等の障壁が大きいためである。どの過程においても、少なくともプロテアーゼの分解といった問題が存在する。これを回避する手段として、消化管プロテアーゼによる乳たんぱくの分解物より、生理活性ペプチドを得る研究がなされてきたといえる。一方で、腸管よりインタクトな形で吸収されるか否かといった問題は依然として解決されていない。現在、一部のペプチドやたんぱく質がインタクトな形で腸管より血液液中に取り込まれるという考えが一般的になっている。近年、われわれの研究も含め、一部の低分子ACE阻害ペプチドに比較的小量の経口摂取で効果の見られるものが報告されている。

3. 発酵乳とACE阻害ペプチド

食品の中からACE阻害物質を検索しようという試みがなされ、野菜、果実、穀物など広範な食品についてACE阻害能力を検索した結果、阻害活性の比較的高い食品の中にヨーグルトが含まれるという報告がなされている¹⁸⁾。また、市販チーズのうちチェダー、ゴーダ、エメンタールの水抽出物にACE阻害能力が高かったという報告¹⁹⁾や、乳酸菌の菌体抽出物中にACE阻害活性が検出されたとの報告²⁰⁾もあるが、いずれも物質の特定には至っていない。しかし、乳酸菌・発酵食品の高血圧に対する有用性を推察させる興味ある知見である。

(1) 発酵乳と高血圧抑制作用

カルピス酸乳の寿命延長効果を認めた実験⁶⁾において、死因の解析より、酸乳が循環器系へ何らかの影響を与えるであろうことが推察された。

そこで、酸乳を7週令より自然発症高血圧ラット

図3 酸乳を摂取したSHRラットの血圧変化

(Nakamura et al., 1996)

(SHR)に長期投与したところ、血圧上昇が抑制されることが認められた²¹⁾(図3)。また、酸乳をSHRラット(24週令)に単回経口投与しても、4~8時間後に有意な血圧降下が認められた⁹⁾。このことから、酸乳には長期摂取による血圧上昇抑制効果および単回摂取での血圧低下作用があることが明かとなった。

(2) 発酵乳とACE阻害ペプチド

カルピス酸乳の高血圧抑制効果を調べるため、有効物質を検索したところ、発酵中にアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性が出現することを認めた²²⁾(図4)。

図4 発酵中のACE阻害活性、菌数、pH、ペプチド量の変化

(Nakamura et al., 1995)

酸乳中のACE阻害物質を各種HPLCを用いて精製した結果、2種の活性物質を単離した。アミノ酸組成、配列およびNMR分析より、これらは、いずれもトリペプチドであり、Val-Pro-Pro(VPP)およびIle-Pro-Pro(IPP)と同定された²²⁾。酸乳中に出現したACE阻害活性のほとんどが、VPPとIPPによるものであることも確認した。

カルピス酸乳スターター中の乳酸菌*L. helveticus*は、他の乳酸菌に比べ、たんぱく分解活性が高く、発酵中に乳たんぱくを分解して多くのペプチドを産生する²³⁾。VPP、IPPのアミノ酸配列は、 β カゼインおよび κ カゼイン中に存在することから、乳酸菌のプロテアーゼ系の働きでカゼインが分解され、発酵中に生成すると考えられる。

これらペプチド(VPP、IPP)の効果を調べるため、酸乳および酸乳と同じACE阻害活性を示す量のVPP、IPPをそれぞれSHRラットに単回経口投与した⁹⁾。いずれも同様に投与数時間後に血圧低下作用を示し、その効果は酸乳と同程度であった(図5)。また、これらペプチドの効果と投与量の関係を調べるため、さまざまな量のペプチドをSHRラットに投与し、6時間

図5 酸乳、ペプチド投与後のSHRラットの血圧変動

(Nakamura et al., 1995)

後の血圧を測定した結果、用量依存的な効果であった⁹⁾。各種乳酸菌で調製した発酵乳を比較した結果では、*L. helveticus*株の多くに、SHRラットに対する血圧降下作用が認められた²³⁾。一方、他の乳酸菌で調製した発酵乳には、SHRラットに対する血圧降下作用も認められなかった。血圧降下作用が見られた*L. helveticus*発酵乳のみからVPP、IPPが検出されたことから、発酵乳の血圧降下作用は*L. helveticus*発酵乳に特異的な効果であり、それは、たんぱく分解活性の強さに起因する血圧降下ペプチドVPP、IPPの産生によるものと考えられた。

一方、酸乳やこれらトリペプチドの過剰量を正常血圧のラット(WKYラット)に投与しても血圧の低下は認められず⁹⁾、血圧を下げすぎる懸念はないと思われた。

(3) 降圧メカニズムの検討

ACEは、肺をはじめ動脈、腎臓などの内皮細胞にも存在することが知られている。そこで、VPP、IPPがどこの組織に到達し、ACEを阻害し効果を発揮しているのか調べた。7週令よりSHRラットへ酸乳を含む飼料を自由摂取させ、長期飼育し、血圧上昇抑制が認めら

図6 酸乳を摂取したSHRラットの各組織ACE活性

(Nakamura et al., 1996)

れた23週令に各組織を摘出し、ACE 活性を測定した²¹⁾。その結果、対照群（基礎飼料）に比べ、酸乳群の腹部大動脈 ACE 活性が有意に低下していた（図6）。一般に、プロリンを含むペプチドは酵素に分解されにくいことが知られている。VPP, IPP ペプチドは、その配列を見ると、プロテアーゼへの耐性が高いペプチドであることから、インタクトなまま吸収され作用を発揮していると推察された。これを、さらに詳しく検証するため、酸乳と生理食塩水（対照）を SHR ラットおよび WKY ラットに単回投与し、6 時間後に各組織の ACE 活性を測定した²⁴⁾。SHR ラットの大動脈 ACE 活性は WKY ラットと比べると10倍も亢進しており、酸乳を投与した SHR ラットの大動脈 ACE 活性のみが対照群 SHR ラットに比べ有意に低下していたことが明らかとなった。また、各組織から VPP, IPP の検出を試み（HPLC操作）たところ、酸乳を投与した SHR ラットの大動脈からのみ VPP, IPP が検出された²⁴⁾。このことから、酸乳中の VPP, IPP が体内に吸収され、異常に亢進している動脈 ACE を阻害し、血圧降下作用を発揮していることが明らかとなった。

(4) ひとにおける効果（臨床試験）

ヒトへの効果を調べるため、高血圧患者30名を対象にし、無作為に2群に分け、毎日95mlの酸乳あるいは疑似酸乳を8週間飲用してもらった²⁵⁾。その結果、酸乳群の収縮期血圧、拡張期血圧に、飲用前に比べ有意な血圧降下が認められた（図7）。この時、副作用的症状や血

液成分などの血圧以外への影響はなかった。一方、対照として与えた発酵させていない疑似酸乳では、血圧を含め大きな変化は認められなかった。

安全性の観点から、正常血圧者26名を対象に前述と同様の試験を行ったが、酸乳を飲用しても血圧をはじめいづれの項目にも変化は見られなかった。さらに、酸乳を一度に大量摂取した場合の消化器系へ与える影響も調べた²⁶⁾。この試験は、健康人60名を対象に、摂取量を5段階（体重60kg あたり100ml～500ml）設定し、未発酵乳を対象とした群間比較試験の形で行われた。酸乳の形態で一度に500ml 摂取しても下痢の発生はなく、酸乳摂取による胃腸症状への影響も、対象群と差がなかった。

おわりに

発酵乳の保健効果のひとつの要因として、乳由来の生理活性ペプチドをとりあげるとともに、乳酸菌・発酵食品と高血圧抑制効果を中心にこれまでの知見や著者らの研究を紹介してきた。これらの結果は、高血圧症を予防、改善するために、ACE 阻害ペプチドを産生する乳酸菌やその発酵乳を利用することが有用であることを示唆している。

われわれは、VPP, IPP を含む酸乳をもとに「カルピス酸乳アミール S」を開発し、1997年6月23日に厚生省より特定保健用食品として「ラクトトリペプチド（VPP, IPP）を含んでおり、血圧が高めの方に適した食品です。」との表示許可を受けた。今後、この商品を通して発酵乳が多くの方の健康に役立つことを期待したい。

参考文献

- 1) Rasic J. L., Kurmann J. A.: *Yoghurt*, Tech Dairy Publ. House, Copenhagen, p. 99 (1978).
- 2) Friend B. A., Farmer R. E., Shahani K. M.: *Milchwissenschaft*, **37**, 708 (1982).
- 3) Mann G. V., Spoerry A.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 464 (1974).
- 4) Yamamoto N., Akino A., Takano T.: *J. Dairy Sci.*, **77**, 917 (1994).
- 5) Alm L.: *J. Dairy Sci.*, **65**, 346 (1982).
- 6) 荒井幸一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡知足: *栄養と食糧*, **33**, 219 (1980).
- 7) 荒井幸一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡知足: *腸内フローラと発癌*, 学会出版センター, 東京, p. 105 (1981).
- 8) 二見晶, 津田久実, 高野俊明, 水谷武夫, 山岡実, 大内尉義, 福地義之助, 折茂肇: *Biomed. Gerontol.*, **18**, 266 (1994).

図7 高血圧患者に対する酸乳の効果

(Hata et al., 1996)

- 9) Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T.: *J. Dairy Sci.*, **78**, 1253 (1995)
- 10) 村松成司, 徳山郁夫, 片岡幸雄, 新堀道夫, 山田雄, 高橋徹三: 千葉体育学研究, **10**, 31 (1987).
- 11) 安井正明, 増山明弘, 高野俊明, 野村正彦, 横越英彦: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.189 (1996).
- 12) Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1211 (1979).
- 13) Maruyama S., Suzuki H.: *Agri. Biol. Chem.*, **46**, 1393 (1982).
- 14) Chiba H., Tani F., Yoshikawa M.: *M. J. Dairy Res.*, **56**, 363 (1989).
- 15) Migliore—Samour D., Jolles P.: *Experientia*, **44**, 188 (1988).
- 16) Fiat A. M., Levy—toledano S., Caen J. P., Jolles P.: *J. Dairy Sci.*, **56**, 351 (1989).
- 17) Sato R., Noguchi T., Naito H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 67 (1986).
- 18) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙: 日本農芸化学会誌, **57**, 1143 (1983).
- 19) 伊藤整, 鎌田信一, 山野秀二, 柿市徳英, 初岡政典, 横山健吉: 医学と生物学, **115**, 375 (1987).
- 20) 伊藤整, 鎌田信一, 山野秀二, 柿市徳英, 初岡政典, 横山健吉: 医学と生物学, **116**, 159 (1988).
- 21) Nakamura Y., Masuda O., Takano T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 488 (1996).
- 22) Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T.: *J. Dairy Sci.*, **78**, 777 (1995).
- 23) Yamamoto N., Akino A., Takano T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 776 (1994).
- 24) Masuda O., Nakamura Y., Takano T.: *J. Nutr.*, **126**, 3063 (1996).
- 25) Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767 (1996).
- 26) 中島久実子, 中村康則, 高野俊明, 秦葭哉: *Pro. Med.*, **16**, 917 (1996).