異なる種類のペプチドおよびコラーゲンの腸管壁通過現象

鈴 川 一 宏¹⁾ 谷 浩 充²⁾ 小山内 弘 和³⁾
白 土 男女幸³⁾ 中 野 昭 一¹⁾

PENETRATION OF DIFFERENT KINDS OF PEPTIDES OR COLLAGEN THROUGH THE INTESTINAL MEMBRANE

KAZUHIRO SUZUKAWA, HIROMITSU TANI, HIROKAZU OSANAI,
MINAYUKI SHIRATO and SHOICHI NAKANO

Abstract

Penetration of different kinds of peptides or collagen peptide through the intestinal membrane was studied in two experiments using an *in vitro* rat everted intestine penetration model. In Study 1, twelve 11-wk-old rats (Wistar strain) were randomly divided into two groups and penetration of whey peptide (n=6) and soy peptide (n=6) through the intestinal membrane was compared. In Study 2, fourteen 11-wk-old rats (Wistar strain) were divided into a control group (n=7) and a training group (treadmill running at a speed of 20-35 m/min for 15 min/day, 5 days/wk for 4 wk; n=7), and penetration of collagen peptide through the intestinal membrane was investigated in the two groups. In Study 1, the quantity of whey peptide that penetrated through the intestinal membrane was significantly greater than that of soy peptide ($P<0.01$). In Study 2, body weight was significantly lower in the training group than in the control group except during 12 and 12.5 wk of age (13.5 wk; $P<0.01$, others; $P<0.05$). The weights of heart, kidney, and spleen were significantly increased, and the weight of fat was significantly decreased in the training group compared to the control group ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$, respectively). In both groups, a portion of collagen peptide penetrated through the intestinal membrane; but there was no significant difference in quantity between the two groups. In conclusion, the inhibition of weight gain in the training group was possibly caused by decreased feeding from lack of appetite with enforced exercise. These findings suggest that whey peptide penetrated through the intestinal membrane in greater quantities than soy peptide, and collagen peptide is not affected by enforced exercise.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2003, 52 : 99~110)

key word : rat, whey peptide, soy peptide, collagen peptide, intestinal membrane

I. 結 言

一般に、体内に取り入れられた栄養素は、消化管内で管腔内消化、さらに腸管粘膜壁における膜消化を受けて、その最小構成単位に分解されて吸収される。従来、食品中の蛋白質、あるいはある程度の分子量を有する蛋白体が、そのままの形で

腸管粘膜壁を通過し体内に取り入れられた場合、異種蛋白質の抗原として作用し、体内で抗原抗体反応を起こさせ、アレルギー、アナフィラキシーの要因となり危険であると考えられていた¹⁾。しかし、近年、腸粘膜の吸収機序としては受動輸送、能動輸送、促進拡散の他に、成人においても飲作用やパーメーションなどの機構が明らかにされて

¹⁾ 日本体育大学

〒158-8508 東京都世田谷区深沢7-1-1

²⁾ 東邦高等学校

〒465-8516 愛知県名古屋市名東区平和が丘3-11

³⁾ 日本体育大学大学院体育科学研究科 健康科学・スポーツ医科学系

〒158-8508 東京都世田谷区深沢7-1-1

Nippon Sport Science University 7-1-1, Fukasawa, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8508, Japan

Toho Senior High School 3-11, Heiwagaoka, Meitou, Nagoya, Aichi, 465-8516

Graduate School of Health and Sport Science, Nippon Sport Science University 7-1-1, Fukasawa, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8508, Japan

きており、ことに体内で生理機能を発揮する機能性蛋白体については、必ずしも最小構成単位にまで分解されなくても吸収される可能性のあることが明らかにされてきている²⁾。したがって、どの程度の蛋白体はその働きを維持したまま腸管壁を通過し得るかについては問題となるところであろう。

スポーツ選手の多くは、競技力向上を目的として筋力トレーニングを行っている。高強度の筋力トレーニングは筋肥大を起こさせ、最大筋力を必要とする運動パフォーマンスの向上に寄与している。また、筋力トレーニングによる筋肥大のためには、筋蛋白の合成が必要である。そのため、筋蛋白の増加を目的とした多くの蛋白性食品が開発されてきており、スポーツ選手達の多くは通常食の他、種々のサプリメントを摂取している。このように、スポーツ現場では蛋白質の摂取量増大により競技成績の向上を期待する面が見受けられ³⁾、最近ではホエイペプチドおよび大豆ペプチドが利用されているようである。事実、先行研究ではホエイペプチドおよび大豆ペプチドの投与が、ともにヒトでの運動能力を向上させたとしている⁴⁻⁶⁾。また、両ペプチドを比較した場合にはホエイペプチドの方が栄養価は高く、一方、大豆ペプチドは血清コレステロール値を低下させる働きがあり⁷⁾、減量効果を期待するようなスポーツ選手で利用価値が高いとされている^{5,8)}。しかし、経口で摂取した蛋白質も体内に吸収されなければその価値はなく、実際に腸管壁を通過しどの程度の量が吸収されるかについては明らかにされていない。

一方、近年、生体内の至る所に存在する蛋白質としてのコラーゲンペプチドの摂取が注目されてきている。コラーゲンとはアミノ酸スコアからみた栄養価は低いものの、細胞外マトリックスとして最も重要な繊維成分を構成し⁹⁾、靱帯や腱などに多く存在する。事実、スポーツ現場ではこれらを補給する意味からもコラーゲンペプチドを含むサプリメントなどがよく利用されている。高強度運動やコンタクトスポーツでは、腱や靱帯に負荷が加わり損傷も起こしやすく、組織修復のためには

組織におけるアミノ酸の絶対必要量が増すと考えられる。したがって、これらの損傷の修復のために、経口摂取したコラーゲンペプチドが腸管壁を通過することは好ましいと予想される。

そこで本実験では、実験1としてスポーツ選手達にサプリメントとしてよく利用されているペプチドの吸収を評価するために、ホエイペプチドと大豆ペプチドのラットにおける腸管壁通過現象の相異について検討を行った。また、実験2として強制運動を行わせたラットにおけるコラーゲンペプチドの腸管壁通過現象を測定し、強制運動による影響がみられるか否かの実験を試みた。

II. 方 法

A. 実験装置

本実験で使用した腸管壁通過現象を測定するために用いたラットの翻転腸管の作成方法と、腸管灌流装置の概要を図1、2に示した。まず、ラットをネンブタール麻酔下で開腹し、空腸下部から回腸上部にかけて小腸のみを摘出し、図1にみられるように翻転した。その後、直ちにその腸管を空腸側から12cmの長さに切断し、図2に示すAの位置に接続した。次に、この灌流装置の上部(漿膜側)と下部(粘膜側)とに、同じTyrode液を

Fig. 1. Experimental method of everted intestine.

Fig. 2. The application of a new apparatus to the circulation of the penetrated fluid through the intestinal membrane.

等量注入し、5%CO₂を加えたO₂により bubble lift circulation を行い、漿膜側液の灌流経路内に置いた分光光度計(U-2100型ダブルビーム分光光度計：日立社製)により紫外外部吸光の変動を継続的に測定した。この灌流装置を使用した粘膜側に加えた紫外外部吸光物質の漿膜側への移動の測定は、両側に同じ pH, 同じ浸透圧の溶液が入れているものの、漿膜側から粘膜側に約 17 cm の水圧が掛かっており、少なくとも pH, 浸透圧および水圧による受動輸送に抗しての通過、すなわち、能動輸送として測定することが可能である¹⁰⁾。なお、得られたデータは、Microsoft Windows 98 を搭載した Computer (松下電器産業社製) に分析計データ受信ソフト「とったる君」(日製ソフトウェア社)を用いて取り込み、腸管壁通過現象で得られた吸光度の増加面積については自動解析ソフト(日製ソフトウェア社)により算出した。

B. 実験 1

B-1. 実験動物

本実験では10週齢の Wistar 系雄性ラット(日本クレア社)を用い、1 週間の経過観察の後、11 週齢にて実験に供した。なお、飼育期間中の水お

よび飼料(F-2; 船橋農場)については自由摂取とした。

B-2. 齧転腸管の作成

既に報告した手法¹⁰⁾により、11週齢のラットをネンブタール麻酔下で開腹し、空腸から回腸上部を約 16 cm 摘出した。次いで、摘出した腸管を Tyrode 液で洗浄後、粘膜側に触れないよう留意しながら腸管を齧転し、約 12 cm の長さで切断して直ちに齧転腸管を前述した灌流装置に接続した(図 1, 2)。なお、両側の接続した部分約 1 cm を除き、実際に Tyrode 溶液中に浸す腸管部分の有効腸を約 10 cm とするように調節した。

B-3. 試料

本実験では、ホエイペプチド(ALATAL817; 日本プロテン社製, n=6)と大豆ペプチド(ハイニュート DH; 不二製油社製, n=6)を用いた。ホエイペプチドは、牛乳からカゼインと脂肪を除いたホエイ蛋白を酵素処理することによって製造された加水分解物であり、平均分子量は約1,100 ダルトンである。また、大豆ペプチドは大豆蛋白を酵素分解し、オリゴペプチドまで低分子化した平均分子量が約10,000 ダルトンのものである。

B-4. 実験手順

あらかじめホエイペプチドと大豆ペプチドの腸管壁通過現象を測定するに際して、両者の紫外外部吸光度から波長曲線を測定した。その成績から、278 nm に特異的な吸光度を有していることを確認し、既に報告¹⁰⁾した 278 nm の波長で経時的測定を行い腸管壁通過現象を測定した。なお、実際の腸管壁通過現象の測定は、前述した灌流装置を用いて行い、紫外外部吸光度の経時変化により求められた吸光度増加面積により評価した。図 3 に灌流装置を用いて求められた吸光度増加面積の 1 例を示した。すなわち、ラットの齧転した腸管を灌流装置に接続した時点をも 0 分として30分間 Tyrode 液を灌流した後に、実験 1 では粘膜側にホエイペプチドあるいは大豆ペプチドを添加し、さらに30分間の灌流を行った(計60分間)。図にみられるように、粘膜側へ物質を添加する前の30分間の漿膜側の曲線、これは残留血液中血漿蛋白および可溶性組織蛋白の一部と思われるが、この曲

Fig. 3. Penetration through intestinal membrane of peptide.

線を基礎曲線として、粘膜側へ物質添加後の漿膜側の曲線の変化と、前述の基礎曲線との差によって生じる面積を測定し、吸光度増加面積として評価した(図中斜線部)。なお、この時の粘膜側液のホエイペプチドあるいは大豆ペプチド濃度は1.0%濃度に調整した。

次に、60分間の灌流終了直後に漿膜側液の全量を採取し、 -80°C に設定したディープフリーザー内にて凍結保存した。そして、全実験が終了した時点で全検体を加水分解した後にアミノ酸分析を行った。なお、アミノ酸分析には高速アミノ酸分析計 L-8500(日立製作所製)を用い、HPLC 法にて行った。

C. 実験 2

C-1. 実験動物

本実験では10週齢の Wistar 系雄性ラット(日本クレア社)を用い、動物飼育室で1週間の経過観察の後、11週齢から2群に分け、15週齢までの4週間、以下に示す条件飼育を行った。すなわち、1) トレッドミル走行を週5日間行わせた群(Training群; $n=7$)、2) 通常飼育を行う対照群(Control群; $n=7$)の2群である。また、両群ともに飼育期間を通して水および飼料(F-2; 船橋農場)は自由摂取とし、ラットの体重および餌の摂取量を週に2回測定した。なお、ラットは1ケージにつき2~3匹で飼育した。したがって、各群の餌の摂取量は、1ケージにつき1ヶ所備え付け

である餌の摂取量を計測し、各々ケージ毎に1匹あたりの平均値として求めた。

C-2. 強制運動

強制運動を行わせる Training 群には、小動物用トレッドミル(鈴屋製作所製)を用い、1日に1回、週5日間のトレッドミル走行を4週間行わせた。また、トレッドミル走行に際しては電気刺激などを用いず、走行を著しく拒否した場合には尾上方を手で軽く叩く、あるいは手で押して走行を促した。運動負荷については、速度 20 m/min より開始し、徐々に速度を増加させ速度 35 m/min で15分間の走行を行わせた。

C-3. 翻転腸管の作成

実験開始から4週間後の15週齢に、実験1と同様にラットをネンブタール麻酔下で開腹し、摘出した腸管を Tyrode 液で洗浄後に翻転し、その約 12 cm の長さで切断して直ちに前述した灌流装置に接続した(図1, 2)。

C-4. 臓器重量の測定

ラットの腸を摘出した後に脱血死させ、臓器を摘出した。摘出した臓器は Tyrode 液で洗浄した後に重量を測定した。本実験で測定した臓器は、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓および脂肪を湿重量として測定し、各臓器をラットの体重 100 g に対する重量として評価した。なお、脂肪については副睾丸脂肪組織を取り出し脂肪量の指標とした。

C-5. 試料

本実験では、コラーゲンペプチドとして平均分子量が約3,000ダルトンのコラーゲンペプチド(Gelita-Sol. D; ニュートリノヴァ・ジャパン株式会社製)を用いた。

C-6. 実験手順

本実験についても、実験1と同様に 278 nm の紫外部吸光による腸管壁通過現象の測定を行った。すなわち、その測定は、翻転腸管を接続して30分間 Tyrode 液を灌流した後、コラーゲンペプチドを粘膜側の Tyrode 液中に添加し、さらに30分間の灌流を行った(計60分間)。なお、この時の粘膜側液のコラーゲンペプチド濃度は7.5%濃度に調整した。

次に、60分間の灌流が終了した直後の漿膜側液を直ちに採取し、実験1で示した手順と同様にアミノ酸分析を行った。

D. 統計処理

本実験で得られた各測定項目における群間の統計学的有意差の検定は、実験1の場合、吸光度増加面積の成績については、翻転腸管の粘膜側にホエイペプチドと大豆ペプチドをそれぞれ添加した場合の2群間で対応のない t-test を行った。また、粘膜側にホエイペプチドのみを添加した場合、大豆ペプチドのみを粘膜側に添加した場合および粘膜側に何も添加しなかった場合 (Control) の3群間で一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を行い、有意差の認められた場合の多重比較には Fisher の PLSD の方法を用いた。実験2については、Training 群と Control 群において対応のない t-test を行った。なお、本研究における成績の有意差については、いずれの場合も危険率5%水準をもって有意とした。

Ⅲ. 成 績

A. 実験1

A-1. ホエイペプチドおよび大豆ペプチドの吸光度増加面積

灌流装置に接続した翻転腸管の粘膜側にホエイペプチド、または大豆ペプチドをそれぞれ添加してから30分間に増加した漿膜側の紫外部吸光度面積を図4に示した。紫外部吸光度面積の実数値はホエイペプチドが $6.9 \pm 0.3 \text{ cm}^2$ 、大豆ペプチドが $4.6 \pm 0.3 \text{ cm}^2$ で、ホエイペプチドの方が大豆ペプチドよりも有意に高値 ($p < 0.01$) を示していた。

A-2. ホエイペプチドおよび大豆ペプチドのアミノ酸分析

図5に60分間の灌流が終了した直後の漿膜側液中のアミノ酸分析の成績を示した。その結果、ホエイペプチドを添加した場合と何も添加しなかった Control の比較では、すべての項目でホエイペプチドを添加した場合の方が高値を示し、タウリン、アスパラギン酸およびシスチンを除き有意の

Fig. 4. Penetration of whey and soy peptide through the intestinal membrane. Each column and vertical bar represents mean value and standard error of each group, respectively.

Fig. 5. Quantitative analysis of amino-acid composition of the penetrated fluid through the intestinal membrane.

Each column and vertical bar represents mean value and standard error of each group, respectively.

* : significant difference between Whey peptide and Control, $p < 0.05$.

** : significant difference between Whey peptide and Control, $p < 0.01$.

: significant difference between Soy peptide and Control, $p < 0.05$.

: significant difference between Soy peptide and Control, $p < 0.01$.

†† : significant difference between Whey peptide and Soy peptide, $p < 0.01$.

差が認められた(シトルリンとオルニチンは $p < 0.05$, それ以外は $p < 0.01$ であった). また, 大豆ペプチドと Control を比較したところ, すべての項目で大豆ペプチドが高値を示し, アスパラギン酸, シスチンおよびメチオニンを除き有意の差が認められた(チロシンとヒスチジンは $p < 0.05$, それ以外は $p < 0.01$ であった). 次に, ホエイペプチドと大豆ペプチドの比較では, 同程度, あるいはホエイペプチドが大豆ペプチドよりも有意に高値(スレオニン, セリン, プロリン, バリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシン, チロシン, ヒスチジン, リジン, アルギニン; $p < 0.01$)を示した.

B. 実験2

B-1. Control 群と Training 群の体重

両群における体重の経時的な変動を図6に示した. この両群は, 経過観察期間である10週齢から11週齢では両群間に体重の差はみられず, 同様の増加を示していた. しかし, 実験を開始した11週齢以降になると, Control 群では体重が一定の増加を示すのに対して, Training 群では強制運動

Fig. 6. Change of body weight in the two groups. Each symbol and vertical bar represents mean value and standard error of each group, respectively.

* ; significant difference between Control group and Training group, $p < 0.05$.

** ; significant difference between Control group and Training group, $p < 0.01$.

が始まった直後から体重の増加に抑制がみられ, 運動開始と同時に体重が減少し有意差($p < 0.05$)がみられていた. しかし, その後, この有意差は一時的に消失をみるものの次第に Control 群との差が顕著となり, 13週齢以降($p < 0.05$)に再び有意差が認められ, 飼育条件期間終了までその有意差が拡大した($p < 0.05$ および $p < 0.01$).

B-2. Control 群と Training 群の餌の摂取量

Control 群と Training 群における餌の摂取量の経時の変化を図7に示した. 10週齢から11週齢の経過観察期間では餌の摂取量に両群の差はみられなかったが, トレッドミル走行を開始した11週齢から Training 群では Control 群と比較して低値を示し, 15週齢まで Control 群を上回ることにはなかった.

B-3. Control 群と Training 群の臓器重量

臓器重量の成績を表1に示した. Control 群および Training 群を比較したところ, Training 群が Control 群より有意に高値を示していたものは, 心臓($p < 0.05$), 腎臓($p < 0.05$)および副腎($p < 0.01$)であり, 逆に Control 群が Training 群

Fig. 7. Change of food consumption in the two groups. Each symbol and represents mean value of food consumptions in each group. No statistical analysis was carried out.

Table 1. Body weight and organ weights.

Groups		Body weight (g)	Heart (mg/100g B.W.)	Liver (mg/100g B.W.)	Kidney (mg/100g B.W.)	Adrenal (mg/100g B.W.)	Spleen (mg/100g B.W.)	Fat (mg/100g B.W.)
Control (n=7)	mean	393.6	237.6	3447.3	304.3	6.0	209.0	673.1
	±SE	9.6	6.1	125.3	5.6	0.2	4.2	28.1
Training (n=7)	mean	358.6	256.4	3312.7	324.6	7.9	197.4	579.1
	±SE	9.3	4.1	79.2	6.9	0.4	7.0	18.8
	significant difference	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.01	n.s.	p<0.05

n. s. ; not significant

Values are means and standard error.

より有意に高値を示していたものは脂肪 ($p < 0.05$) のみであった。

B-4. Control 群と Training 群の吸光度増加面積

腸管灌流装置を用いて行った紫外外部吸光の測定結果から吸光度増加面積を求めた成績を図8に示した。その結果、Training 群の漿膜側液中にみられた 278 nm の吸光度面積 ($1.7 \pm 0.4 \text{ cm}^2$) は、Control 群の面積 ($2.0 \pm 0.4 \text{ cm}^2$) と比較して低値を示したが、その差は有意なものではなかった。

Fig. 8. Penetration of collagen peptide through the intestinal membrane.

Each column and vertical bar represents mean value and standard error of each group, respectively. There was no statistically significant difference among groups.

B-5. Control 群と Training 群のアミノ酸分析

灌流が終了した直後の漿膜側液中のアミノ酸分析の成績を図9に示した。その結果、両群ともにアラニン (Training 群; $235.5 \pm 14.0 \text{ nmol/ml}$, Control 群; $205.7 \pm 26.8 \text{ nmol/ml}$) が最も高値を示しており、次いでグリシン (Training 群; $208.2 \pm 18.5 \text{ nmol/ml}$, Control 群; $178.1 \pm 24.7 \text{ nmol/ml}$)、プロリン (Training 群; $92.9 \pm 6.9 \text{ nmol/ml}$, Control 群; $77.4 \pm 9.5 \text{ nmol/ml}$) の順に高値を示していた。また、両群の比較では、いくつかの項

Fig. 9. Quantitative analysis of amino acid composition of the penetrated fluid through the intestinal membrane.

Each column and vertical bar represents mean value and standard error of each group, respectively. There was no statistically significant difference among groups.

目で Training 群が高値を示していたものの、検出されたアミノ酸すべての項目において、Control 群と Training 群との間に有意な差が認められなかった。

Ⅳ. 考 察

近年、スポーツ選手達が骨格筋量の増量や、それに伴うパフォーマンスの向上を目的として蛋白質性食品を摂取する傾向が見受けられるようになり、競技特性に応じて数多くの蛋白質性食品が利用されてきている。さらに、最近注目されてきているコラーゲンペプチドは、靱帯や腱などに多く含まれているため、スポーツ現場においてサプリメントとしての摂取が注目されてくる場所である。一般に、蛋白質はアミノ酸まで分解されて吸収されるといわれている。しかし、前述のように、近年、ある程度の蛋白体がその構造や機能を残したまま腸管壁を通過することも報告されてきており、その機序として飲作用やパーメーションの機構が考えられている。また、蛋白質を経口的に摂取したからといって、そのすべてが体内に取り入れられるというものでない。そこで本実験では、蛋白質の種類や性状によってどの程度の蛋白体が、腸管壁を通過し吸収されるか否かについての検討を試みたのである。本実験では、まず実験1としてホエイペプチドと大豆ペプチドを用い、ラット腸管壁通過現象の違いについて比較検討を行った。また、実験2ではラットに強制運動を行わせ、コラーゲンペプチドの腸管壁通過現象を測定し、強制運動による影響がみられるか否かの実験を試みた。

まず、実験1では、あらかじめホエイペプチドおよび大豆ペプチドの紫外外部吸光度曲線について検討した。その成績から、両者ともに278nmに特異的な吸光度を有し、しかも、ペプチド濃度に依存して吸光度の増加がみられた。そこで、灌流装置に接続した齧齧腸管の粘膜側に両ペプチドをそれぞれ添加してから30分間に増加する漿膜側液中の278nmの紫外外部吸光度増加面積について検討を行った。この両者の成績を比較すると、両ペプチドがともに腸管壁を通過し、また、ホエイペ

プチドの方が大豆ペプチドに比して図4のように有意に高値を示していた。

次に、60分間の灌流が終了した直後の漿膜側液を採取しアミノ酸分析を行ったところ、両ペプチドを添加した場合には、何も添加しなかった場合のControlに比して、殆どのアミノ酸項目で図5にみられるように有意に高値を示した。このことは、アミノ酸組成からみても明らかなように両ペプチドがともに腸管壁を通過したことを示している。また、ホエイペプチドと大豆ペプチドを比較すると殆どのアミノ酸について、ホエイペプチドが大豆ペプチドよりも有意に、あるいは高値を示す傾向にあった。したがって、この両ペプチド構成アミノ酸組成を各々比較した場合でも、ホエイペプチドの方が大豆ペプチドよりも腸管壁をより通過しており、この成績は紫外外部吸光度面積の変動と同様の成績であった。

本実験で使用したホエイペプチドおよび大豆ペプチドは、ともに酵素処理によってオリゴペプチドまで分解されている。生体内における蛋白質の吸収については、アミノ酸の他にジペプチドあるいはトリペプチドがそのままの形で膜輸送されるペプチド輸送系の存在が明らかにされており¹¹⁾、蛋白質やアミノ酸よりも吸収が速く¹²⁻¹⁶⁾、アミノ酸がバランスよく吸収される^{12,17,18)}。また、アミノ酸輸送系では側鎖の長さや分子量とが輸送の親和性によく相関するといわれ、必須アミノ酸の優先性が認められている。中埜たち¹⁹⁾は、消化酵素を用いた人工消化試験およびラットを用いたin-vivoの実験で、腸管内におけるペプチドの消化性と腸管から血中へのアミノ酸移行速度から、ホエイ蛋白質とホエイペプチドについて検討を行っている。その結果、ホエイペプチドは小腸への移行速度が速く吸収性にも優れていることを確認している。また、全たち^{20,21)}はペプチド鎖長の異なった2種類の大豆加水分解産物をラットの腸で灌流し、ペプチドの鎖長が吸収に与える影響について検討し、ラット小腸反転腸管の灌流実験としては小ペプチドの方がよく吸収されたとしている。さらに、Glinble たち^{22,23)}も小腸での吸収について鎖長の異なるペプチドを用いて検

討し、低分子ペプチドが高分子ペプチドよりも吸収の速いことを報告している。したがって、ホエイペプチドおよび大豆ペプチドはともに消化吸収性に優れており^{19,24)}、特に、本実験で用いたホエイペプチドおよび大豆ペプチドは、ともに低分子化された蛋白体のオリゴペプチドであることから、腸管壁の通過が認められたものと思われる。また、本実験成績からは、ホエイペプチドが大豆ペプチドよりも通過しやすいことが明らかになった。これら両ペプチドを添加した各々の漿膜側液中のアミノ酸分析結果についてみると、多く通過していたアミノ酸は必須アミノ酸であった。仮に、腸管粘膜をよく通過していた必須アミノ酸が、その膜輸送体によって選択的に通過しやすくなっていたとするならば、必須アミノ酸を多く含むホエイペプチドの方が大豆ペプチドよりも、よく腸管壁を通過する可能性も考えられる。したがって、ホエイペプチドと大豆ペプチドの腸管壁通過量の違いは、一部は分子量の違いによって説明できるが、他の要素もこの通過に影響している可能性が考えられる。

次に実験2について検討した。Training 群における体重の増加は、強制運動を開始した直後に抑制がみられ、週齢を重ねるに従い図6にみられるように Control 群と Training 群の間に顕著な差がみられていた。本実験で Training 群に負荷した 35 m/min のトレッドミル走行は、ラットにおける最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_2\text{max}$) の約80%に相当することが報告されており^{25,26)}、11週齢から行わせる運動としては高強度運動であったものと思われる。一方、餌の摂取量をみると、Training 群では Control 群に比してトレッドミル走行を開始した11週齢から減少し、15週齢まで Control 群より低値を維持しており(図7)、体重と餌の摂取量にみられた本実験の成績は、既報の成績²⁷⁾と類似していた。Training 群でみられた体重の増加の抑制は、少なくともその要因の1つとして運動による消費エネルギーの増大よりも摂取エネルギーの減少であることが考えられる。すなわち、強制運動による交感神経緊張状態が消化管の運動や消化・吸収を抑制し、慢性的に自律神経などに

影響を与えていた可能性²⁸⁾や、水分代謝の変動から消化機能に影響を与え²⁹⁾、食欲不振に陥っていた可能性も考えられる。さらに、表1に示した体重 100 g に対する臓器重量についてみると、Training 群は Control 群と比較して心臓、腎臓および副腎が有意に高値を示していた。また、副腎の重量はストレスをみる指標としてよく用いられているが³⁰⁾、Training 群の副腎重量が Control 群よりも高値を示していたことから、強制運動がラットにとって相当のストレスであったことが推察される²⁷⁾。

また実験2では、コラーゲンペプチドを用いて強制運動を行わせたラットの翻転腸管における腸管壁通過現象について検討した。コラーゲンは、33種類以上の遺伝子からなる蛋白質のスーパーファミリーであり、一般にコラーゲンとしてはポリペプチド鎖の3本が会合し、らせん構造を形成している³¹⁾。コラーゲンは、その分子の種類に対応してI型、II型、III型などと呼ばれているが、皮膚、骨、腱などの主要コラーゲンはI型であり、また、軟骨ではII型が主要となっている³²⁾。近年、コラーゲンペプチドを含んだ食品が盛んに開発されてきているが、コラーゲンペプチドの経口摂取により期待される効果としては、皮膚コラーゲンの代謝促進作用に伴う皮膚の正常化をはじめ、骨のコラーゲン構造を強固にし、骨強度を高める効果や腱を丈夫にする働きなどが期待³²⁾されており、スポーツ選手の摂取食物として今後注目されるであろうことが考えられる。

なお、私たちは本実験で使用したコラーゲンペプチドが 278 nm に特異的な紫外外部吸光を有し、この量的な検量曲線を作成することによって微量定量が可能であることを報告している¹⁰⁾。そこで、本実験でも 278 nm の波長でコラーゲンペプチドの腸管壁通過現象を測定した。その結果、図8のように Control 群および Training 群ともに漿膜側液中の吸光度に増加がみられ、紫外外部吸光を有する蛋白体としてのコラーゲンペプチドが腸管粘膜を通過していた。また、両群の吸光度面積を比較したところ、Training 群は Control 群より低値を示していたものの有意の差はみられなかつ

た。そこで、次にコラーゲンペプチドが通過したと考えられる漿膜側液のアミノ酸構成について検討した。その結果、図9に示すように Control 群および Training 群ともにアラニンが最も高値を示しており、次いでグリシン、プロリンの順に高値であった。本来コラーゲンペプチドは、グリシンを最も多く含んでいるが、本成績ではアラニンが最も高値を示した。理由の1つとしては、実験1のアミノ酸分析の結果からも明らかのように、粘膜側に何も添加しなかった Control についてもアラニンが高値を示しており、グリシンとの差は顕著であった。仮に、実験1の Control におけるアラニンとグリシンの値を、実験2におけるそれらの値から差し引くと、グリシンが最も多くなることが予想される。したがって、残留血液中血漿蛋白および腸粘膜からの可溶性組織蛋白の影響により、実験2ではアラニンが見かけ上、最も高値を示したものと考えられる。一方、Control 群と Training 群とを比較したところ、検出されたアミノ酸項目のすべてについて両群の間に有意の差は認められなかった。

今回のコラーゲンペプチドの腸管壁通過現象からみた成績は、紫外部吸光を有する物質が腸管壁を通過することを立証しているものの、この成績のみから投与したコラーゲンペプチドがその構造や機能を維持したまま腸管壁を通過したか否かについては明らかにはならなかった。さらに、本実験では強制運動の期間を4週間と限定しており、その影響を検討するには短期間であったかもしれない。今後、さらに運動の期間を延長し、コラーゲンペプチドの吸収について検討していく予定である。また、本実験は腸管壁通過現象を測定した in-vitro の実験であり、生体内でのさらなる検討が必要であるとともに、スポーツ現場におけるコラーゲンペプチドの利用の本質についてもさらに検討していく必要があるだろう。

V. 要 約

本実験では、実験1としてホエイペプチドと大豆ペプチドのラット翻転腸管による腸管壁通過現象の比較検討を行った。また、実験2として強制

運動を行わせたラットを用い、コラーゲンペプチドの腸管壁通過現象について検討を行った。

すなわち、実験1では、ラットの翻転腸管の粘膜側にホエイペプチドおよび大豆ペプチドを添加した場合、紫外部吸光度増加面積およびアミノ酸分析の成績から、両者ともに腸管壁を通過したことが認められた。なお、この両ペプチドの腸管壁通過を比較した場合、ホエイペプチドが大豆ペプチドより有意に高値を示し、ホエイペプチドの方が大豆ペプチドよりも腸管壁を通過しやすいことを示していた。

次に、実験2の強制運動を行ったラットでは、体重の増加に抑制がみられ、臓器重量からも運動による生体への影響が認められた。また、Training 群と Control 群における翻転腸管の粘膜側にコラーゲンペプチドを添加した場合には、両群ともにコラーゲンペプチドが腸管壁を通過していた。しかし、この両群のコラーゲンペプチドの腸管壁通過現象には有意の差は認められなかった。したがって、コラーゲンペプチドが腸管壁を通過することは明確であったが、強制運動による腸管壁通過現象には著明な影響はみられなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご協力下さいました明治製菓株式会社ザバス スポーツ&ニュートリション・ラボの杉浦克己所長および同社生物科学研究所機能研究センターの太田篤胤主任研究員に厚く御礼申し上げます。また、貴重なご助言を頂いた日本体育大学の中里浩一講師に謝意を表します。

なお、本研究の一部は平成12年度財団法人水野スポーツ振興会研究助成金および日本学術振興会平成12年度および13年度科学研究費補助金(奨励研究(A))課題番号12780041によった。

(受理日 平成14年12月6日)

参 考 文 献

- 1) 中野昭一, 佐藤恒久, 小原 侃, 村松成一, Insulin および Proteolytic Enzyme の腸管通過, ホルモンと臨床, (1967), **15**, 411-417.
- 2) 中野昭一, 蛋白質・活性ポリペプチドの腸管吸収, 日本医事新報, (1977), **2778**, 132-133.
- 3) 太田富貴雄, 運動とたんぱく質摂取, 臨床栄養, (1992), **80**, 495-502.

- 4) Burke, D. G., Chilibeck, P. D., Davison, K. S., Candow, D. G., Farthing, J., Smith-Palmer, T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.*, (2001), **11**, 349-364.
- 5) 村松成司, 山崎俊輔, 服部洋児, 服部祐児, 柔道選手の運動作業能に及ぼす大豆ペプチド長期摂取の効果, 千葉大学研究, (1994), **18**, 41-48.
Muramatsu, S., Yamazaki, S., Hattori, Y., Hattori, Y. Effect of soy-peptide intake for long term on exercise performances of Judo athletes. *Chiba Journal of Physical Education*, (1994), **18**, 41-48 (in Japanese).
- 6) 三浦孝仁, 竹中省子, 奥野真理, 小原信幸, パワーリフティング選手の運動作業能に及ぼす大豆ペプチド & SIP 長期摂取効果, 岡山大学教育学部研究集録, (1995), **100**, 139-150.
Miura, K., Takenaka, S., Okuno, M., Kohara, N. Effect of soy-bean peptide and soy-bean isolated protein intake over 6 months on work capacity of powerlifters. *Bulletin of School of Education, Okayama University*, (1995), **100**, 139-150 (in Japanese).
- 7) Di Pasquale, M. Amino acids and proteins for the athlete- the anabolic edge, Protein foods vs. protein and amino acid supplements, Chap. 5, CRC Press LLC, Florida, (1997), 89-98.
- 8) 福井健介, スポーツフードへの大豆たん白質・ペプチドの利用, 食品と開発, (2000), **35**(2), 54-56.
- 9) 小出 輝, 林 利彦編, 細胞外マトリックスー基礎と臨床一, 初版, 細胞外マトリックスの主要繊維成分, 愛智出版, 東京, (2000), 2-40.
- 10) 谷 浩充, 鈴川一宏, 清田 寛, 大和 真, 中野昭一, ラット鰓腸管における腸管吸収能について, 日本体育大学研究所雑誌, (2000), **25**, 157-164.
Tani, H., Suzukawa, K., Kiyota, H., Yamato, M., Nakano, S. Study on intestinal absorption in everted intestine. *J. of Res. Inst. of Physical Education, Nippon Sport Science University*, (2000), **25**, 157-164 (in Japanese).
- 11) Matthews, D. M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.*, (1975), **55**, 537-608.
- 12) 山本 茂, 蛋白質, ペプチドおよびアミノ酸の体内利用に関する研究, 日本栄養・食糧学会誌, (1986), **39**, 81-88.
Yamamoto, S. Utilization of protein, peptides and amino acids in whole body. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, (1986), **39**, 81-88 (in Japanese).
- 13) Adibi, S. and Phillips, E. Evidence for greater absorption of amino acids from peptide than from free form in human intestine. *Clin. Res.*, (1968), **16**, 446.
- 14) Craft, I. L., Geddes, D., Hyde, C. W., Wise, I. J., Matthews, D. M. Absorption and malabsorption of glycine and glycine peptides in man. *Gut*, (1968), **9**, 425-437.
- 15) Silk, D. B. A., Marrs, T. C., Addison, J. M., Burston, D., Clark, M. L., Matthews, D. M. Absorption of amino acids from an amino acid mixture simulating casein and a tryptic hydrolysate of casein in man. *Clin. Sci. Mol. Med.*, (1973), **45**, 715-719.
- 16) Hara, H., Funabiki, R., Iwata, M., Yamazaki, K. Portal absorption of small peptides in rats under untrained conditions. *J. Nutr.*, (1984), **114**, 1122-1129.
- 17) Steinhardt, H. J., Adibi, S. A. Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyl-dipeptides in human jejunum. *Gastroent.*, **90**, 577-582.
- 18) 星 猛, 小腸の消化吸収機能に見る進化の妙, 消化と吸収, (1987), **20**, 19-26.
- 19) 中埜 拓, 島谷雅治, 村上雄二, 佐藤則文, 井戸田 正, 乳清タンパク質酵素分解物の消化吸収性, 日本栄養・食糧学会誌, (1994), **47**, 195-201.
Nakano, T., Shimatani, M., Murakami, Y., Sato, N., Idota, T. Digestibility and absorption of enzymatically hydrolyzed whey protein. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, (1994), **47**, 195-201 (in Japanese).
- 20) 全 活, 佐々木雅也, 辻川知之, 藤山佳秀, 馬場忠雄, 平均ペプチド鎖長の異なる2種の大豆ペプチドの腸管吸収の検討, 消化と吸収, (1996), **19**, 20-25.
Chun, H., Sasaki, M., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Bamba, T. Absorption of two types of soybean peptides from everted sacs of rat small intestine. *Dig. Absorpt. (Tokyo)*, (1996), **19**, 20-25 (in Japanese).
- 21) Chun, H., Sasaki, M., Fujiyama, Y., Bamba, T. J. *Clin. Biochem.* Small peptide of soybean hydrolysate is absorbed more rapidly than large peptide in the perfused rat small intestine. *Nutr.*, (1999), **26**, 183-191.
- 22) Grimble, G. K., Keohane, P. P., Higgins, B. E., Kaminski, M. V., Silk, D. B. A. Effect of peptide chain length on absorption of two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, (1986), **71**, 65-69.
- 23) Grimble, G. K., Rees, R. G., Keohane, P. P., Cartwright, T., Desreumaux, M., Silk, D. B. A. Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. *Gastroent.*, (1987), **92**, 136-142.
- 24) 青山敏明, 福井健介, 山本孝史, ラットに強制投与された窒素源の違いが胃内通過時間に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌, (1996), **49**, 46-51.
Aoyama, T., Fukui, K., Yamamoto, T. Effect of various forms of force-fed nitrogen sources on gastric transit time in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, (1996), **47**, 46-51 (in Japanese).
- 25) Brooks, G. A., & White, T. P., Determination of metabolic and heart rate response of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.*, (1978), **45**, 1009-1015.

- 26) 跡見順子, 八田秀雄, 山本順子, 山田 茂, 浅見俊雄, 黒田善雄, ラットのトレッドミル走におけるスピード- VO_2 関係および $\text{VO}_{2\text{max}}$ の測定方法の検討, 東京大学教養学部体育研究室体育学紀要, (1985), **19**, 69-73.
Atomi, Y., Hatta, H., Yamamoto, Y., Yamada, S., Asami, T., Kuroda, Y. Determination of Speed- VO_2 relationship $\text{VO}_{2\text{max}}$ of rats during treadmill exercise. The Proceedings of the Department of Sports Sciences, College of Arts and Sciences, University of Tokyo, (1985), **19**, 69-73 (in Japanese).
- 27) 鈴川一宏, 熊江 隆, 荒川はつ子, 石崎香理, 伊藤 孝, 内山巖雄, 成熟ラットにおける強制運動と睡眠妨害の組み合わせが気管支肺胞洗浄液中細胞に及ぼす影響, 体力科学, (1997), **46**, 389-398.
Suzukawa, K., Kumae, T., Arakawa, H., Ishizaki, K., Ito, T., Uchiyama, I. The combined effects of strenuous exercise and sleep disturbance on cell in bronchoalveolar lavage fluids in mature rats. Jpn. J. phys. Fitness sports med., (1996), **46**, 389-398 (in Japanese).
- 28) 井川幸雄, 運動と消化・吸収および消化器症状, 臨床スポーツ医学, (1989), **6**, 1189-1192.
- 29) 石河利寛, 健康・体力のための運動生理学, 初版, 消化吸収と運動, 杏林書院, 東京, (2000), 173-198.
- 30) 鈴川一宏, 熊江 隆, 荒川はつ子, 内山巖雄, 伊藤 孝, 成熟後ラットへの運動負荷と時差が体重および臓器重量に及ぼす影響, 体力・栄養免疫学雑誌, (1993), **46**, 26-30.
- 31) 小出 輝, 林 利彦 編, 細胞外マトリックスー基礎と臨床ー, コラーゲンスーパーファミリータンパク質, 初版, 愛智出版, 東京, (2000), 94-138.
- 32) 本田真樹, コラーゲンペプチドの機能性研究, 食品と開発, (1998), **33**(4), 46-50.