蛋白質分解酵素処理ローヤルゼリー由来
ペプチド (Ile-Val-Tyr) の血圧降下作用丸山広恵[§], 吉田千絵, 徳永勝彦,
荒木陽子, 三島 敏

アビ株式会社 長良川リサーチセンター

The Effect of a Peptide (Ile-Val-Tyr) Derived
from Royal Jelly Treated with Protease
on Blood Pressure of Spontaneously
Hypertensive RatHiroe Maruyama[§], Chie Yoshida, Katsuhiko Tokunaga,
Yoko Araki and Satoshi MishimaAPI Company Limited NAGARAGAWA
Research Center
692-3 Yamasaki, Nagara, Gifu, 502-0071, Japan

We examined an antihypertensive effect of a peptide (Ile-Val-Tyr, IVY) derived from royal jelly treated with protease, on spontaneously hypertensive rats (SHR). In single oral administration of IVY at doses of 1.0 and 10 mg/kg body weight, systolic blood pressure (SBP) were significantly decreased against the control at doses of 1.0 and 10 mg/kg body weight. SBP was reduced at 1 h after administration of IVY and the effect was continued for 8 h. In repeated oral administration of IVY at doses of 1.0 and 10 mg/kg/day for 28 days, the SBP of the SHR was significantly decreased against the control at 7 day and the effect continued for 28 days. During this experiment, heart rate (HR) and body weight were not changed. The repeated administration of IVY did not affect the SBP and HR of normotensive rat (Wistar Kyoto rat) for 28 days. These results suggest that the antihypertensive effect of IVY is concerned with antihypertensive effect of royal jelly treated with protease.

(Received Feb. 2, 2005 ; Accepted Jul. 12, 2005)

特定保健用食品等の開発において、カルピス酸乳¹⁾、イワシ蛋白²⁾及び小麦³⁾等、様々な食品の持つ生体調節機能を解明しようとする基礎的研究がなされ、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE と略す) 阻害ペプチドが血圧調節機能に関与していることが報告されている。それらは、動物試験及び臨床試験において、血圧降下作用を示すことも知られている^{4)~6)}。

著者らは、特定保健用食品素材の一つとしてローヤルゼリー (RJ と略す) に含まれる蛋白質に着目した。RJ は、蛋白質、アミノ酸、ビタミン等多くの成分を有し、滋養強

壮、自律神経失調症や更年期障害の改善作用の他、様々な薬理作用^{7)~10)}を有することから、古くから健康食品として幅広く利用されてきた。著者らは、蛋白質分解酵素によって処理したローヤルゼリーに ACE 阻害活性を見出した¹¹⁾。さらに、ACE 阻害活性の高い成分の検索を試み、各種クロマトグラフィーにより、6 種の ACE 阻害ペプチドを見出した¹²⁾。その中で、2 種のペプチド Ile-Tyr, Val-Tyr (それぞれ IY, VY と略す) が高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat, SHR と略す) において、血圧降下作用を有することを報告した¹³⁾。また、蛋白質分解酵素処理 RJ については、臨床試験において、血圧降下作用が確認され、その作用は濃度依存的であった¹⁴⁾。蛋白質分解酵素処理 RJ の血圧降下作用解明の一環として、既報¹¹⁾において示された、IY 及び VY と同様、蛋白質分解酵素処理 RJ 中に含まれる比較的強い ACE 阻害活性を有するペプチド Ile-Val-Tyr (IVY と略す) を SHR に経口投与し、血圧及び心拍数に対する作用を検討したので報告する。

1. 実験方法

(1) 使用動物

本試験には、9 週齢雄性 SHR/Hos 及び正常血圧動物として 9 週齢雄性 Wistar Kyoto rat (WKY ラットと略す) を (株) 星野実験動物飼育所より入手して使用した。動物は室温 23~25℃、相対湿度 40~70%、照明時間 12 時間/日 (7:00~19:00)、換気回数 15 回/時間の条件で、日本チャールズリバー社の固形飼料 CRF-1 及び水道水を自由摂取させた。入荷後、2 週間予備飼育を行い、健康状態に異常を認めない動物を試験に用いた。

試験開始時の体重は、SHR, WKY ラットともに 230~275 g であった。

(2) SHR を用いた IVY 単回経口投与試験

予備飼育後、11 週齢で収縮期血圧 (systolic blood pressure, SBP と略す) が 185 mmHg 以上を示す動物を用いた。また、本報の試験において、IVY は (株) ペプチド研究所に依頼合成した純度 95% 以上の合成ペプチドを用いた。

試験開始前の血圧及び体重を指標として、動物を 6 匹ずつ 3 群 (コントロール群, IVY 投与群 (2 群)) に群分けした。IVY 投与群には、IVY を精製水に溶解し、1 回 1.0 及び 10 mg/kg 体重の投与量でゾンデによる強制経口投与を行った。コントロール群には同量の精製水を投与した。投与前及び投与後 1, 2, 4, 6 及び 8 時間の SBP 及び心拍数を測定した。測定は、Softron BP system (BP-98A, Tokyo, Japan) を用い、動物を 37℃ で 10 分間保温して、非観血的に tail-cuff 法にて行った。

(3) SHR を用いた IVY 反復経口投与試験

予備飼育後、SBP が 185 mmHg 以上を示す 11 週齢 SHR を用いた。試験開始前の血圧及び体重を指標として、1 群 6 匹ずつ 3 群 (コントロール群, IVY 投与群 (2 群))

に群分けした. IVY 投与群には, IVY を精製水に溶解し, 1 日 1.0 及び 10 mg/kg 体重の投与量で 1 日 2 回 (午前 10 時及び午後 2 時) に分け, 28 日間反復経口投与した. コントロール群には同量の精製水を投与した. 投与は, ゾンデによる強制経口投与を行った. 血圧測定と心拍数については, IVY の直接的な作用, 即ち ACE 阻害活性を主とする血圧降下と反復投与による持続的な血圧降下を比較するため, 1 週間毎に, 1 回目の IVY 投与前 (午前 9 時) 及び 2 回目の IVY 投与 2 時間後 (午後 4 時) に測定した. 測定は, 実験方法 (2) と同様に tail-cuff 法にて行った.

(4) WKY ラットを用いた IVY 反復経口投与試験

実験方法 (3) と同様の方法で, WKY ラット 6 匹に IVY (10 mg/kg 体重) を 28 日間反復経口投与し, SBP 及び心拍数を測定した.

(5) 統計解析

単回投与試験及び反復投与試験において, コントロール群と IVY 投与群間における SBP 及び心拍数, 体重の統計学的な有意差の検定は, Student's *t*-test により行った. また, IVY 投与群において単回投与前に対して投与後の SBP 測定値について, さらに反復投与前に対してそれ以降の 28 日間投与期間終了までの SBP 測定値については, Dunnet の多重比較検定を行った. 測定値は平均値±標準偏差で表記した. 検定での有意水準は 5% 未満とした.

2. 実験結果及び考察

(1) SHR を用いた IVY 単回経口投与試験

ACE 阻害ペプチドである IVY を用い, 単回投与試験を行った. その結果, Fig. 1 に示すように 1.0 及び 10 mg/kg 体重投与群において, IVY 投与 1 時間後からコントロール群に対して有意な血圧降下作用が認められた. また, 投与前の血圧 (初期血圧値) に対しても, 投与 1 時間後において有意な血圧降下を示した. さらに, IVY 投与 8 時間後まで有意ではないものの, 初期血圧値に対して血圧降下傾向が持続した. 心拍数に関しては IVY 投与群いずれにおいてもコントロール群と比べて有意な差は認められなかった.

既に, 血圧降下作用を有することが報告されている IY 及び VY は¹⁵⁾, 10 mg/kg 体重の投与量において, 投与 1 時間後では初期血圧値に対する血圧の降下値がそれぞれ 16.8 ± 2.5 , 14.8 ± 4.0 mmHg であった. それに対し, IVY (10 mg/kg 体重) 投与群では 16.1 ± 7.6 mmHg の降下であり, IY とほぼ同様の血圧降下能がみられた. また, 既報¹²⁾において, 各ペプチドの ACE 阻害活性値 (IC_{50}) は, IY, VY, IVY それぞれ 8, 20, 18 μ g/ml を示すことを報告した. IY と VY は同程度の ACE 阻害活性を有しており, これらの結果から考えて, IVY も蛋白質分解酵素処理 RJ 中の血圧降下に関与しているペプチドの 1 つであると考えられた.

さらに, 著者らはこれまでに SHR に対し蛋白質分解酵素処理 RJ (2 g/kg 体重) 投与によって, 投与 6 時間後の

Fig. 1 Effect of single oral administration of Ile-Val-Tyr (IVY) on systolic blood pressure (SBP) in spontaneously hypertensive rat (SHR)

●, control; △, IVY 1 mg/kg body weight administration; ■, IVY 10 mg/kg body weight administration.

Significant differences from the administration 0 hr were evaluated by Dunnet test: * $p < 0.05$.

Significant differences from the control were evaluated by Student's *t*-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Each point with a vertical bar represents the mean $\pm$ SD.

血漿及び臓器 (腹部大動脈及び肺) 抽出液中にペプチド (IY, VY, IVY) が蓄積することを確認し, また, 腹部大動脈及び肺において ACE 活性が低下することを報告している¹⁶⁾. この結果は, カルピス酸乳を用いた Matsuda らの報告¹⁷⁾と類似している. 腹部大動脈及び肺において ACE 活性が低下していたことは, ACE が細胞膜結合酵素であり, 特に肺血管内皮細胞膜等に多く含まれていること¹⁸⁾, 即ち, 肺及び腹部大動脈付近において, ACE が多く発現していることも関連している可能性が考えられた. これらのことから, 単回投与試験において, 投与後 1 時間に血圧低下がみられ, 2 時間後にやや戻るものの, 8 時間程度は低下状態を維持していたことは, 投与 1 時間後に一過的に ACE 阻害活性が強く現れ, その後, 徐々に組織に蓄積したペプチドが効果を発揮している可能性が推察された. また, IY 及び VY においても, 同様の結果が認められている¹⁶⁾. それらの機構については今後詳細な検討を要する.

(2) SHR を用いた IVY 反復経口投与試験

IVY を用い, 反復経口投与試験を行った. 各群において, 投与開始前と投与期間中の各測定値との間で Dunnet の多重比較検定を実施したところ, IVY 投与前の測定において, IVY (10 mg/kg 体重) 投与群の投与後 14 日及び 28 日目の SBP は投与開始前の値に比して有意 (14 日目 $p < 0.05$, 28 日目 $p < 0.01$) に低値を示した (Fig. 2-A). しかし, IVY (1.0 mg/kg 体重) 投与群については有意な差はみられなかった. また, IVY 投与 2 時間後の測定において, IVY (10 mg/kg 体重) 投与群の投与後 7 日目以降の SBP は投与開始前の値に比して有意な低値 ($p < 0.01$) を示

Fig. 2 Effect of repeated oral administration of IVY for 28 days on SBP in SHR

A: The SBP was measured before daily administration.

B: The SBP was measured 2hrs after daily administration.

●, control; △, IVY 1 mg/kg body weight/day administration; ■, IVY 10 mg/kg body weight/day administration.

Significant differences from the administration 0 day were evaluated by Dunnett test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Significant differences from the control were evaluated by Student's *t*-test: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$.

Each point with a vertical bar represents the mean $\pm$ SD.

した (Fig. 2-B). 28 日目の投与前及び投与 2 時間後の測定において, IVY (10 mg/kg 体重) 投与群の投与 28 日目では, 初期血圧値に対し, それぞれ 12.8 ± 8.4 及び 16.2 ± 11.0 mmHg の低下を示した. 既報¹³⁾によると, IY (10 mg/kg 体重) 投与群では 15.9 ± 9.5 (投与前), 15.1 ± 10.8 (投与後 2 時間), VY (10 mg/kg 体重) 投与群では, 6.3 ± 6.2 (投与前), 6.7 ± 6.5 (投与後 2 時間) mmHg の低下を示した. IVY は単回投与試験と同様, IY と同程度の効果を示すことが確認された. また IVY (1.0 mg/kg 体重) 投与群では, それぞれ 4.9 ± 6.5 及び 7.1 ± 7.4 mmHg の低下を示した.

同様に, コントロール群及び IVY 投与群間で *t* 検定を実施したところ, 反復投与期間 28 日終了後の SBP は, IVY (1 mg/kg 体重) 投与群では, 投与前及び投与 2 時間後に, コントロールに比して有意に ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 低値を示した. IVY (10 mg/kg 体重) 投与群も同様に, 投与前及び投与 2 時間後にコントロール群の値に比して有意に

($p < 0.01$, $p < 0.01$) 低値を示した (Fig. 2-A, B). 既報¹³⁾と同様に, 投与前及び投与後 2 時間に血圧測定を行い, 投与 2 時間後における一過性の血圧降下についても検討したが, 28 日終了後で -7 mmHg (10 mg/kg 体重), -2.4 mmHg (1 mg/kg 体重) となり, 投与後 2 時間での有意な血圧降下はなかった.

なお, 心拍数は投与前後で群内・群間の差異はみられず, 例えば投与 28 日目投与 2 時間後では, コントロール群, IVY (10.0 mg/kg 体重) 投与群, IVY (1 mg/kg 体重) 投与群の心拍数は, それぞれ 406.5 ± 26.5 , 415.6 ± 59.6 , 410.0 ± 58.3 beats/min であった. IVY 投与群に, 摂食や飲水量等の異常はなく, 全ての投与群の体重においても, 群内・群間の差はみられず, 28 日間投与後の体重はそれぞれ, コントロール群 295.2 ± 13.0 , IVY (10 mg/kg 体重) 投与群 296.1 ± 12.5 , IVY (1 mg/kg 体重) 投与群 300.8 ± 20.1 g であった.

また, IVY (10 mg/kg 体重) を WKY ラットに 28 日間反復経口投与して SBP 及び心拍数を測定した結果, コントロール群及び IVY 投与群の SBP はそれぞれ 117.8 ± 3.0 , 113.1 ± 2.9 mmHg であり, また心拍数はそれぞれ 400.4 ± 12.0 , 406.5 ± 12.2 beats/min であり, 群内・群間の有意差はみられなかった.

これらの結果より, IVY は, IY と同程度の降圧作用を有し, その作用は SHR のみで発現することが明らかとなった. また, 蛋白質分解酵素処理 RJ の血圧降下作用は, IY 及び VY に加え, IVY が関与する可能性が示唆された.

3. 要 約

蛋白質分解酵素処理 RJ 由来 IVY の SHR における血圧降下作用を検討した.

1) IVY について, 1.0 及び 10 mg/kg 体重の投与量で, 単回経口投与試験を行ったところ, IVY 両投与群において有意な血圧低下がみられた. 心拍数等に異常は認められなかった.

2) IVY について, 1.0 及び 10 mg/kg 体重/日の投与量で SHR に対する反復経口投与試験を行ったところ, IVY 両投与群に有意な血圧低下がみられた. 心拍数等に異常は認められなかった.

3) WKY ラットに対し, 10 mg/kg 体重/日の投与量で IVY 投与による血圧及び心拍数への影響を検討したところ, コントロール群と同様であったことから, IVY は正常血圧及び心拍数には影響を及ぼさないと考えられた.

4) 蛋白質分解酵素処理 RJ 由来ペプチドによる血圧降下作用において, IY 及び VY に加え, IVY が関与する可能性が示唆された.

文 献

- 1) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T., Purification and characterization of

- angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, **78**, 777-783 (1995).
- 2) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箴島克裕, 松藤 寛, 箴島 豊, イワシタンパク質加水分解物からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの調製とその分離, *農化*, **65**, 1223-1228 (1991).
 - 3) Matsui, T., Chun-Hui, L. and Osajima, Y., Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Peptide Sci.*, **5**, 289-297 (1999).
 - 4) 渡辺敏郎, 川上文子, 石 知史, Mazumder Tapan Kumer, 永井史郎, 辻 啓介, 段 武夫, 軽症高血圧者の血圧に及ぼす自己消化処理させたアガリクスの影響, *日食工誌*, **50**, 167-173 (2003).
 - 5) 関 英治, 川崎晃一, 吉田真弓, 箴島克裕, 玉屋 圭, 松井利郎, 箴島 豊, イワシタンパク質由来ペプチドならびに Valyl-Tyrosine の降圧作用, *栄食誌*, **52**, 271-277 (1999).
 - 6) 川崎晃一, 関 英治, 箴島克裕, 吉田真弓, 浅田耕造, 松井利郎, 箴島 豊, イワシ蛋白質由来ペプチドの軽症高血圧患者に対する降圧効果, *健康・栄養食品研究*, **1**, 62-71 (1998).
 - 7) 竹中哲夫, ローヤルゼリーの一般化学成分について, *ミツバチ科学*, **3**, 69-74 (1982).
 - 8) Townsend, F., Morgan, F. and Hazlett, B., Activity of 10-hydroxydesenoic acid from royal jelly against experimental leukemia and ascitic tumours. *Nature*, **183**, 1270-1271 (1959).
 - 9) 篠田雅人, 中陳静男, 及川隆幸, 佐藤和憲, 鴨川 旭, 秋山義郎, ローヤルゼリー中の血流増加因子について, *薬誌*, **98**, 139-145 (1978).
 - 10) 藤井 彰, ローヤルゼリーの薬理作用, *ミツバチ科学*, **16**, 97-104 (1995).
 - 11) 鈴木和道, 吉田千絵, 徳永勝彦, 丸山広恵, 二村芳弘, 荒木陽子, 三島 敏, プロテアーゼによるローヤルゼリー分解物のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, *食科工*, **50**, 286-288 (2003).
 - 12) 丸山広恵, 徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 荒木陽子, 二村芳弘, 三島 敏, プロテアーゼ処理ローヤルゼリー中に含まれるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの単離同定, *食科工*, **50**, 310-315 (2003).
 - 13) 徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 丸山広恵, 荒木陽子, 二村芳弘, 三島 敏, 高血圧自然発症ラットに対する蛋白質分解酵素処理ローヤルゼリーの血圧調節作用, *食科工*, **50**, 310-315 (2003).
 - 14) 梶本修身, 丸山広恵, 吉田千絵, 荒木陽子, 三島 敏, 坂本朱子, 梶本佳孝, ローヤルゼリー分解物の正常高値及び軽症高血圧者に対する降圧作用の検討, *健康・栄養食品研究*, **7**, 53-71 (2004).
 - 15) Tokunaga, K., Yoshida, C., Suzuki, K., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y. and Mishima, S., Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rat. *Biol. Phar. Bull.*, **27**, 189-192 (2004).
 - 16) 徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 丸山広恵, 荒木陽子, 二村芳弘, 三島 敏, 高血圧自然発症ラットにおける酵素処理ローヤルゼリーペプチドの血圧降下作用機序, *食科工*, **51**, 34-37 (2004).
 - 17) Matsuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T., Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, **126**, 3063-3068 (1996).
 - 18) Nakamura, Y., Matsuda, O. and Takano, T., Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 488-489 (1996).
- (平成 17 年 2 月 2 日受付, 平成 17 年 7 月 12 日受理)