鶏卵由来オリゴペプチドの血圧降下作用

吉井 寛*・城 憲秀**・坂村 修**・武山英麿**
大庭理一郎***・井谷 徹**

Antihypertensive Effect of Oligo-Peptide Derived from Hen's Eggs

Hiroshi YOSHII*, Norihide TACHI**, Osamu SAKAMURA**, Hidemaro TAKEYAMA**,
Riichiro OHBA*** and Toru ITANI**

* Fine Chemical Laboratory Co., Ltd., 5-7-8, Shimoshinjo,
Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0021

** Department of Hygiene and Occupational Health, Nagoya City University, Medical
School, 1, Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601

*** Department of Applied Microbial Technology, Faculty of Engineering, Kumamoto
Institute of Technology, 4-22-1, Ikeda, Kumamoto 860-0082

By treating hen's eggs with a commercial crude enzyme preparation having both protease and lipase activities, an oligo-peptide was obtained. Its molecular weight was presumed to be 1000 Da or less. The concentration of the oligo-peptide for inhibiting 50% of angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity (IC_{50}) was 1.22 mg/ml. Some experimental studies have so far been carried out to investigate antihypertensive effect of ACE inhibitory peptides derived from several foods. In most of those studies, however, antihypertensive effect was evaluated after administrating peptides to spontaneously hypertensive rats (SHR) only once. Few studies have been carried out to examine the long-term effect of ACE inhibitory peptides on blood pressure, including the peptide derived from hen's eggs. In this study, the oligo-peptide derived from hen's eggs was orally administered to SHR for 12 weeks and examined for its antihypertensive effect. The blood pressure of the oligo-peptide dosage groups was significantly lower than that of a non-dosage (control) group. In addition, serum ACE activity of the oligo-peptide dosage groups was significantly lowered than that of the control group. These results show that the oligo-peptide derived from hen's eggs can be used as physiologically functional foods and pharmaceuticals to control essential hypertension.

(Received May 18, 1998 ; Re-received Oct. 10, 1998, Accepted Nov. 4, 1998)

食品の持つ生体調節機能を解明し、これを積極的に生体の健全性維持に役立てようという試みが近年盛んに行われている¹⁾。醤油、フィッシュソース（魚醤）、マグロ、酒、納豆などに含有されているペプチドの降圧作用に関する研究もそうした試みの一環として実施されている^{2)~18)}。ペプチドはレニン-アンジオテンシン系に作用し、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 活性を阻害す

ることにより、血圧上昇を抑制すると考えられており^{19)~23)}、高血圧予防の観点から有用性が期待されている。これまでに、フィッシュソース、イワシ、醤油などから抽出した ACE 阻害ペプチドを高血圧自然発症ラット (SHR) に投与することにより、降圧効果を検討した報告^{2)~5)}がある。これらの研究の多くは、ペプチドを1度だけ投与することにより降圧効果を検討したもの

* 株式会社ファイン化学研究所 (〒533-0021 大阪市東淀川区下新庄 5-7-8)

** 名古屋市立大学医学部衛生学教室 (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1)

*** 熊本工業大学工学部応用微生物工学科 (〒860-0082 熊本市池田 4-22-1)

であるが、食品由来のペプチドを長期間経口投与したのもいくつか報告されている^{7)~9)}。しかし、鶏卵由来のペプチドを長期間 SHR に経口投与して、降圧効果を検討したものは報告されていない。鶏卵から ACE 阻害ペプチドが得られれば、血圧降下作用を持つ食品あるいは医薬品としての利用が期待でき、現在日本では鶏卵が生産過剰状態にあり、低価格で大量に入手可能であるため、他の食品由来のペプチドよりも利用価値が大きいと考えられる。

実 験 目 的

本研究では、現在日本で生産過剰状態にある鶏卵から粗酵素を使用して ACE 阻害オリゴペプチドの調製を試み、*in vitro* による ACE 阻害活性および *in vivo* による降圧効果および血清 ACE 活性値抑制効果を検討した。さらに、鶏卵由来のオリゴペプチドの長期 (12 週) 間投与による降圧効果を動物実験により検討し、本オリゴペプチドの本態性高血圧抑制の医薬品、機能性食品としての有用性を実証することを目的とした。

実 験 方 法

1. *In vitro* study

(1) 酵素処理

OHBA らの方法^{24)~27)} により、プロテアーゼ及びリパーゼ活性を併せ持つ粗酵素 (*Rhizopus* 属起源 NewlaseF: 天野製薬(株)) を用いて、鶏卵を加水分解 (温度: 50°C, pH: 4.0, 反応時間: 5 時間) した。次に、得られた溶液の濾液 (濾物は卵黄油として利用) を凍結乾燥し、粉末化してオリゴペプチド粉末 (被験物質) を得た。

(2) 分子量推定

オリゴペプチド粉末を凍結乾燥する前の液体を限外濾過 (分子量 1000 の分子ふるい膜を用いた) することにより、本オリゴペプチドが高分子であるか低分子であるかを推定した。

(3) ACE 阻害活性測定

得られたオリゴペプチド粉末の ACE 阻害活性測定を CUSHMAN らの方法²⁸⁾²⁹⁾ を改良した MARUYAMA らの方法⁶⁾ で測定した。ACE 阻害活性の指標として、ACE を 50% 阻害するときのオリゴペプチド粉末濃度 (mg/ml) を IC₅₀ 値として求めた。

2. *In vivo* study

(1) 動物

雄性高血圧自然発症ラット (SHR) 40 匹を 2 週間予備

飼育し、5 週齢から実験を開始した。実験は、12 hr の明-暗サイクル、温度 23±0.5°C、湿度 50~60% に調節されている名古屋市立大学医学部の動物実験施設の Specific Pathogen Free (SPF) 域内で行い、1 ケージあたりに 1 匹の高血圧自然発症ラット (SHR) を飼育した。実験期間中は標準粉末飼料 (オリエンタル酵母工業(株)) および水は自由に摂取させた。なお、本動物実験は名古屋市立大学実験動物ガイドラインに基づき実施した。

(2) 投与

SHR を 10 匹ずつの 4 群に分け、コントロール群 (0 mg/kg 投与群)、20, 100, 500 mg/kg オリゴペプチド投与群とした。オリゴペプチドは、0.5ml/100g B.W. の生理的食塩水溶液に溶かし、シリンジに付けたゾンデを用いて 1 日 1 回強制的に 12 週間連続で経口投与した。なお、コントロール群には、生理的食塩水のみを同様の方法で投与した。

(3) 体重測定

体重測定は Ishida 社製の自動はかりを用いて毎日行った。

(4) 食餌摂取量測定

標準粉末飼料摂取量を 1 週間に 1 回、分析用電子天秤を用いて測定した。

(5) 飲水摂取量測定

飲水摂取量を 1 週間に 1 回、分析用電子天秤を用いて測定した。

(6) 血圧測定

(収縮期) 血圧測定は、(株) Softron 社製の非観血式自動血圧測定装置 BP-98A を用いて、tail cuff 法により週 1 回行った。

(7) 血液検査

実験終了 (実験開始 85 日目) 時、ネブタール麻酔下で、腹部大静脈から採血し、その血液を用いて、血清 ACE 活性測定を行った。なお、血清 ACE 活性測定は KASAHARA らの方法³⁰⁾³¹⁾ で行った。

実 験 結 果

1. *In vitro* study

オリゴペプチドは鶏卵可食部 100 g あたり約 15 g 得られた。

オリゴペプチドを限外濾過分画した結果、本オリゴペプチドは 90% 以上が低分子 (分子量 1000 以下) であった。

オリゴペプチド粉末の ACE 阻害活性 (IC₅₀ 値) は 1.22

mg/ml であった。

2. *In vivo* study

各群間の食餌摂取量に有意な差は認められなかった。しかし、投与開始 40 日目から、500 mg/kg 投与群の体重は他の群に対して有意に増加した (Fig. 1)。また、投与開始 4 週目からオリゴペプチド投与群の飲水量が非投与群に対して有意に増加した (Fig. 2)。

血圧測定の結果を Table 1 および Fig. 3 に示したが、投与開始 3 週目からオリゴペプチド投与群において、コントロール群に対して有意に血圧が低下した。また、血液検査の結果 (血清 ACE 活性) は Table 2 に示したとおりであるが、血圧値と同様に、オリゴペプチド投与群と非投与群の間に有意な差が認められた。

考 察

高血圧症は、現在我が国の人口の約 20% にあたる 2,000 万人以上が罹患していると推定されている。ヒト高血圧の 90% 以上は、いわゆる本態性高血圧であるといわれている³²⁾。本態性高血圧は、遺伝的素因をもとに、ストレスや、肥満などの種々の環境因子が作用することによって発症する多因子疾患である³²⁾。持続的な高血圧は脳および心血管障害発症の重大な危険因子である³³⁾

Fig. 1 Changes in body weight of SHR

●, Control; □, 20 mg/kg; △, 100 mg/kg; ○, 500 mg/kg

Fig. 2 Changes in water intake of SHR

●, Control; □, 20 mg/kg; △, 100 mg/kg; ○, 500 mg/kg

ため、血圧を適正に管理することは虚血性心疾患や頭蓋内出血の発症を予防する上でも重要である。しかしながら、急激かつ過度の降圧はむしろ心筋梗塞などの心血管事故発生率の上昇³⁴⁾、生存率の悪化³⁵⁾³⁶⁾、副作用発現率の上昇³⁷⁾などの様々な弊害を助長させるため、適度な降圧効果を目的とした服薬や、栄養、休養、運動などの生活習慣の改善による高血圧コントロールが重視されている。血圧の調節には複数の系の作用が関与しており、昇圧調節系としては、レニン-アンジオテンシン系、エンドセリン系、バソプレシン系など、降圧調節系としては、ANP-BNP-CNP系、NO系、アドレノメジュリン系などがある^{38)~40)}。

昇圧調節系の1つであるレニン-アンジオテンシン系は、水・電解質代謝、及び循環調節に関する最も重要な系の1つである⁴¹⁾。ACEはレニン-アンジオテンシン系の酵素であり、不活性ペプチドであるアンジオテンシン I を、強力な昇圧作用を持つアンジオテンシン II に変換する⁴²⁾。また、ACEは血管拡張作用を持つブラジキニンを不活性化する働きを持っている⁴²⁾。ACE阻害剤は、このACEの働きを阻害することによって血圧上昇を抑制するものである⁴²⁾。

本研究の *in vitro* において、鶏卵を加水分解して得られたオリゴペプチドの ACE 阻害率 (IC₅₀) は 1.22 mg/ml であった。この値は、イワシ、サバ、コーンのペプチ

Table 1 Changes in systolic blood pressure during oral administration of the oligo-peptide for 12 weeks in SHR

Dose	Experimental period (weeks)						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	136.8± 8.6	151.0± 7.2	168.8± 9.3	180.9± 2.9	192.4± 8.0	196.5± 4.3	199.6± 8.1
20 mg/kg	140.1±11.2	152.1± 7.3	162.7± 6.9	176.2± 8.1	184.8±10.1*	186.0±10.2**	191.3±10.3*
100 mg/kg	139.5± 7.4	152.3± 6.4	166.3± 7.7	172.5± 6.1**	179.6±11.2**	182.5± 8.5**	189.7± 7.1**
500 mg/kg	141.4±13.6	150.5± 8.8	166.9± 5.5	167.9± 6.8**	175.2± 7.7**	180.0± 7.3**	186.5± 8.7**

Dose	Experimental period (weeks)					
	7	8	9	10	11	12
Control	203.5± 5.5	205.2± 6.1	204.9±12.0	206.8± 4.7	206.4± 8.3	208.7± 5.8
20 mg/kg	193.0± 9.5**	197.9± 5.7**	194.7± 5.3**	197.3± 8.6**	196.2±10.3**	199.1± 8.3**
100 mg/kg	195.8± 5.8**	195.8± 4.3**	197.2± 6.7*	197.5±12.4*	195.9± 9.3**	200.8± 9.5**
500 mg/kg	195.2± 5.6**	195.7± 7.3**	194.3± 9.7*	196.3± 6.9**	191.9± 9.0**	191.7± 7.8**

Values are mean±S.D. of 10 animals. *: P<0.1, **: P<0.05 vs control (Student's t-test).

Fig. 3 Changes in SBP of SHR

●, Control; □, 20 mg/kg; △, 100 mg/kg;
○, 500 mg/kg

ド粗製品の値 1.18~1.86 mg/ml⁽⁴³⁾ と同一レベルの値であり、鶏卵から抽出したオリゴペプチドは、食品含有物としては中程度の ACE 阻害率を有することが明らかとなった。また、本オリゴペプチドは粗製品であるため、分離・精製を行えばさらに強力な ACE 阻害ペプチドの

Table 2 Serum ACE activity of SHR

Dose	Serum ACE activity (IU/l)
Control	42.19±2.15
20 mg/kg	39.76±2.12*
100 mg/kg	38.84±2.12*
500 mg/kg	36.62±3.09*

Values are mean±S.D. of 10 animals.

*: P<0.05 vs control (Student's t-test).

単離が期待できる。

in vivo 実験においては、離乳した直後から血圧が安定するまでの 3 ヶ月間、毎日オリゴペプチドを SHR に投与し、血圧と血清 ACE 活性を測定した。実験開始 40 日目から、500 mg/kg 投与群において、他の群に対して有意に体重が増加していることから、オリゴペプチドを長期間過剰摂取すると体重が増加すると考えられる。食餌摂取量に有意な差は無いが、飲水摂取量はオリゴペプチド投与群と非投与群との間に有意な差が見られたことから、オリゴペプチドを摂取すると飲水摂取量も増加する可能性が示唆された。オリゴペプチドによる降圧効果をみると、全ての投与群において、コントロール群に対して、実験開始 3 週目から血圧が有意に低下している (Table 1)。また、実験開始 3 週目から 6 週目まではオリゴペプチドの投与量が多いほど血圧が低下する傾向が認められた (Fig. 3)。同様に、全ての群において、コン

コントロール群に対して、血清 ACE 活性が有意に減少している。さらに、血清 ACE 活性にはオリゴペプチドの投与量が多くなるほど減少する傾向が認められた (Table 2)。これらのことより、オリゴペプチドの連続投与により、高血圧を自然発症する SHR における血圧上昇を抑制することが可能であることが判明した。血圧降下は内皮細胞の ACE の阻害と関連しているとの報告がある^{44)~46)}。また、血圧降下は血清 ACE 活性と関連しているとも報告されている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。今回の実験結果は、血清中の ACE 活性値が血圧値と関連していることを示しており、鶏卵由来のオリゴペプチドは ACE を阻害し、血圧上昇を抑制するものと考えられた。

以上のことより、鶏卵を加水分解して得られるオリゴペプチドは、生体内においても ACE 阻害活性を有し、遺伝的な血圧上昇の抑制効果があることが明らかとなった。これまで鶏卵由来のペプチドを長期間経口投与した実験は報告されていなかったが、今回の実験結果は、鶏卵由来のペプチドの長期投与により高血圧症の発症あるいは悪化予防が可能であることを示唆している。今後、鶏卵由来オリゴペプチドを分離・精製し、アミノ酸配列の解明や、副作用の検討などを通じ、本態性高血圧抑制作用を持つ機能性食品、さらには医薬品として利用されることが期待される。

要 約

鶏卵由来オリゴペプチドの ACE 阻害活性 (IC_{50}) を測定したところ、1.22 mg/ml であり、本オリゴペプチドは食品由来のペプチドとしては、ACE 阻害活性は中程度であることが判明した。このオリゴペプチドを分離・精製せずに、粗製品のまま SHR に長期間経口投与することにより、本オリゴペプチドの降圧効果を検討した。その結果、オリゴペプチド投与群の血圧はコントロール群に対して有意に低下した。さらに、オリゴペプチド投与群の血清 ACE 活性がコントロール群に対して有意に低下した。これらのことから、本オリゴペプチドを粗製品のままで長期間経口投与することにより、高血圧の発症あるいは悪化防止が可能であることが判明した。

今後、本オリゴペプチドを分離・精製し、アミノ酸配列を解明すれば、本オリゴペプチドの高血圧抑制の機能性食品さらには医薬品としての利用が期待できる。

文 献

1) 河村幸雄：食品工業，33，20 (1990)。

- 2) 受田浩之・松田秀喜・箴島克裕・松藤 寛・松井利郎・箴島 豊：農化，66，25 (1992)。
- 3) 関 英治・箴島克裕・松井利郎・箴島 豊：日食工誌，40，783 (1993)。
- 4) OKAMOTO, A., MATSUMOTO, E., IWASHITA, A., YUSUHARA, T., KAWAMURA, Y., KOIZUMI, Y. and YANAGIDA, F.: *Food Sci. Technol.*, 1, 101 (1995)。
- 5) MARUYAMA, S., MIYOSHI, S., KANEKO, T. and TANAKA H.: *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1077 (1989)。
- 6) MARUYAMA, S., NAKAGOMI, K., TOMIZUKA, N. and SUZUKI, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405 (1985)。
- 7) FUJITA, H., YOKOYANA, K., YATUMOTO, R. and YOTHIKAWA, M.: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Suppl. 1, S 304 (1995)。
- 8) NAKAMURA, Y., MASUDA, O. and TAKANO, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 488 (1996)。
- 9) KARAKI, H., DOI, K., SUGANO, S., UCHIWA, H., SUGAI, R., MURAKAMI, U. and TAKEMOTO, S.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 96 C, 367 (1990)。
- 10) KAWAKAMI, A., KAYAHARA, H. and TADASA, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 709 (1995)。
- 11) MATSUFUJI, H., MATSUI, T., OHSHIGE, S., KAWASAKI, T., OSAJIMA, K. and OSAJIMA, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1398 (1995)。
- 12) MATSUMURA, N., FUJII, M., TAKEDA, Y., SUGITA, K. and SHIZUMI, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 695 (1993)。
- 13) KOHAMA, Y., MATSUMOTO, S., OKA, H., TERAMOTO, T., OKABE, M. and MIMURA, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332 (1988)。
- 14) SAITO, Y., WANEZAKI, K., KAWATO, A. and IMAYASU, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 812 (1994)。
- 15) SAITO, Y., WANEZAKI, K., KAWATO, A. and IMAYASU, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 48, 1767 (1994)。
- 16) KINOSHITA, E., YAMAKASHI, J. and KIKUCHI, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1107 (1993)。
- 17) OKAMOTO, A., HANAGATA, H., KAWAMURA, Y. and YANAGIDA, F.: *Plant Foods for Human Nutrition*, 47, 39 (1995)。
- 18) OKAMOTO, A., HANAGATA, H., MATSUMOTO, E., KAWAMURA, Y. and YANAGIDA, F.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1147 (1995)。
- 19) ROBERT, M.H., PHILIP, W.S., BILLY, S.A.Jr., Bassam A.A. and Mouin G.S.: *Pediatric Research*, 36, 671 (1994)。
- 20) SHIONO, K. and SOKABE, H.: *American Journal of Physiology*, 231, 1295 (1976)。
- 21) ASHIDA, T., YOSHIMI, H., KAWANO, Y., MATSUOKA,

- H. and OMAE, T. : *Clinical and Experimental Hypertension*, **18**, 851 (1996).
- 22) MARKOV, M., HIGASHINO, H., and SUZUKI, A. : *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **Suppl. 1**, S368 (1995).
- 23) MARKOV, M., ZHELYAZKOV, D. and MARKOVA, M. : *Medical Archival*, **27**, 45 (1990).
- 24) OHBA, R., TERAMOTO, Y. and UEDA, S. : *J. Food Sci.*, **58**, 307 (1993).
- 25) OHBA, R., NAKASHIMA, Y. and UEDA, S. : *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 197 (1994).
- 26) OHBA, R., NAKASHIMA, Y. and UEDA, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2159 (1994).
- 27) OHBA, R., IDE, S., YOSHIDA, A., NAGATA, Z. and UEDA, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 949 (1995).
- 28) CUSHMAN, D. W. and CHEUNG, H. S. : *Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637 (1971).
- 29) LIEBERMAN, J. : *American Journal of Medicine*, **59**, 356 (1975).
- 30) 四元秀毅 : *Medical Practice*, **4**, 217 (1987).
- 31) KASAHARA, Y. and ASHIHARA, Y. : *Clinical Chemistry*, **27**, 1922 (1981).
- 32) 村谷博美・柊山幸志郎 : 日本臨床 (高血圧), **50**, 250 (1992).
- 33) LEVY, D., GARRISON, R.J., SAVAGE, D.D., KANNEL, W.B. and CASTELLI, W.P. : *New England Journal of Medicine*, **322**, 1561 (1991).
- 34) PATTY, B.M., HECHBERT, S.R., KOEPESELL, T.D., SICOVICK D.S., RAGHUNATHAN T.E., WEISS N.S., ROSENDAAL F.R., LEMAITRE R.N., SMITH N.L., WAHIA P.W. et al. : *JAMA*, **274**, 620 (1995).
- 35) FURBERG, C.D., PSATY, B.M. and MEYER, J.V. : *Circulation*, **62**, 1326 (1995).
- 36) CRUICKSHANK, J., THORP, J.M. and ZACHARIAS, F.J. : *Lancet*, **1**, 581 (1987).
- 37) PAHOR, M., GURALINK, J.M., FURBERG, C.D., CARBONIN, P. and HAVILIK, R.J. : *Lancet*, **347**, 1061 (1996).
- 38) PRESTON, R.A. and EPSTEIN, M. : *Seminars in Nephrology*, **15**, 138 (1995).
- 39) ROBILLARD, J.E. and NAKAMURA, K.T. : *Biology of the Neonate*, **53**, 201 (1988).
- 40) LOPEZ, M.J., GARBERS, D.L. and KUHN, M. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 23064 (1997).
- 41) 村上和雄 : 日本臨床 (高血圧), **50**, 39 (1992).
- 42) 村上和雄 : 生化学, **65**, 260 (1993).
- 43) 大庭理一郎 : でん粉と食品, **21**, 11 (1996).
- 44) BENNETT, M.A. and THURSTON, H. : *Clinical Science*, **90**, 21 (1996).
- 45) YOUNG, R.H., DING, Y.A., LEE, Y.M. and YEN, M. H. : *American Journal of Hypertension*, **8**, 928 (1995).
- 46) KAHONEN, M., MAKYNEN, H., WU X., ARVOLA, P. and Porsti I. : *British Journal of Pharmacology*, **115**, 859 (1995).
- 47) IKEMOTO, F., TANAKA, M., ITO, S., SONG, G.B., TOMINAGA, M., HIRUMA, M., TAKADA, T., NAKAMURA, N. and YAMAMOTO, K. : *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**, 69 (1986).
- 48) DEMEY, J.R. and VANHOUTTE, P.M. : *Circulation Reserch*, **51**, 439 (1982).
- (平成10年5月18日受付, 平成10年10月10日再受付,
平成10年11月4日受理)