



Title	チョウザメ未利用部位由来コラーゲン・ペプチドの調製および血糖上昇抑制作用に関する研究
Author(s)	笹岡, 友季穂
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第13702号
Issue Date	2019-06-28
DOI	10.14943/doctoral.k13702
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/80821">http://hdl.handle.net/2115/80821</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Yukiho_Sasaoka.pdf



[Instructions for use](#)

チョウザメ未利用部位由来コラーゲン・ペプチドの  
調製および血糖上昇抑制作用に関する研究  
(Collagen peptides derived from sturgeon by-products  
improve glucose tolerance in rodents.)

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Life Science

笹岡 友季穂

Yukiho Sasaoka

平成 31 年 (2019)

## 目次

略語	9
緒言	12
第1章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの調製	
目的	20
材料および実験方法	21
材料および試薬	21
1. チョウザメ	21
2. 試薬	21
実験方法	21
1. チョウザメ脂質の薄層クロマトグラフィー分析	21
2. チョウザメ脂質の脂肪酸組成のガスクロマトグラフィー分析	22
3. SCP 試料に残存する脂質の定性および定量分析	23
結果	24
1. SCP の調製	24
2. SCP 調製時に分離された脂質成分	27
3. 超臨界二酸化炭素脱脂法を用いた SCP の調製	30
4. 異なる脱脂法で調製した SCP に残存する脂質成分	32
小考察	37

## 第2章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの血糖上昇抑制作用

目的	41
材料および実験方法	41
材料および試薬	41
1. チョウザメ	41
2. 実験動物および器具	41
3. 試薬	42
実験方法	42
1. 動物の飼育方法	42
2. SCP の調製	43
3. 卵白ペプチドの調製	43
4. 超臨界二酸化炭素脱脂 SCP の調製	43
5. ICR マウスを用いた糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定	44
6. SD ラットを用いた糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定	45
7. ICR マウスを用いた糖負荷試験	45
8. SD ラットを用いた糖負荷試験	46
9. 統計処理	46
結果	48
1. SCP の血糖上昇抑制作用	48
2. SD ラットを用いた経口糖負荷試験における SCP 投与濃度の影響	53
3. SCP と他のタンパク質加水分解物の血糖上昇抑制効果の比較	56
4. 異なる脱脂法で調製した SCP の血糖上昇抑制効果の比較	59
小考察	62

### 第3章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの血糖上昇抑制機構の解明

目的	65
材料および実験方法	66
材料および試薬	66
1. チョウザメ	66
2. 実験動物および器具	66
3. 試薬	66
実験方法	67
1. 動物の飼育方法	67
2. SCP の調製	67
3. $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼ阻害能試験	67
4. 胃内グルコース滞留能試験	69
5. 糞中へのグルコース排泄能試験	70
6. グルコース透過阻害能試験	71
7. SCP 経口糖負荷試験におけるインスリン分泌促進能の測定	71
8. I型糖尿病モデルマウスの作製および糖負荷試験	72
9. GLP-1 分泌促進能試験	74
10. 腸内への SCP 直接投与試験	75
11. SCP 経口投与-腹腔内糖負荷試験	76
12. SCP に含有されるエンドトキシン量の測定	77
13. SCP の静脈内投与試験	78
14. SCP 静脈内投与時のインスリン分泌促進能および GLP-1 分泌促進能試験	79
15. I型糖尿病モデルラットを用いた SCP 静脈内投与試験	80
16. DPP-IV 阻害能試験	81

17. 統計処理	81
結果	83
1. SCP の $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインペルターゼ阻害能	83
2. SCP の胃内グルコース滞留能	86
3. SCP による糞中へのグルコース排泄能	89
4. SCP がグルコースの受動拡散に及ぼす影響	89
5. SCP のインスリン分泌促進能	92
6. SCP が I 型糖尿病モデルマウスを用いた糖負荷試験に及ぼす影響	95
7. SCP の GLP-1 分泌促進能	97
8. 消化管内投与試験における血糖値変化	100
8-1. 腸管に SCP を直接投与した際の血糖値変化	100
8-2. 腹腔内糖負荷による血糖上昇に及ぼす SCP 経口投与の影響	102
8-3. 腹腔内糖負荷および SCP 経口投与試験における血糖値変化および血漿インスリン濃度変化	108
9. 腹腔内糖負荷に起因する血糖上昇に及ぼす SCP 静脈内投与の影響	111
9-1. SCP のエンドトキシン量	111
9-2. SCP を静脈内投与した際の血糖値変化	111
9-3. 腹腔内糖負荷に起因する血糖上昇に及ぼす SCP 静脈内投与タイミングの影響	118
9-4. SCP 静脈内投与時の血漿インスリンおよび総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度の測定	121
9-5. I 型糖尿病モデルラットに SCP を静脈内投与した際の血糖値変化	127
10. SCP の DPP-IV 阻害作用	129
小考察	132

#### 第4章 血糖上昇抑制作用を示すチョウザメコラーゲン・ペプチドの構造解析

目的	144
材料および実験方法	144
材料および試薬	144
1. チョウザメ	144
2. 実験動物	145
3. 試薬	145
実験方法	145
1. 動物の飼育方法	145
2. SCP の調製	145
3. ブタ皮 CP の調製	146
4. チョウザメアテロコラーゲン分解ペプチドの調製	146
5. 人工消化 SCP の調製	147
6. 人工消化カゼインの調製	148
7. アミノ酸混合物の調製	148
8. Sephadex G-50 を用いた SCP の分画	148
9. Sephadex G-25 を用いた F1 画分の分画	149
10. 逆相 HPLC を用いた f1, f2 および f3 画分の分画	149
11. アミノ酸配列分析	149
12. ゲル濾過 HPLC を用いた SCP および Sephadex G-25 分画物の平均分子量の測定	149
13. 人工消化 SCP に含まれる遊離アミノ酸の定量	150
14. Sephadex G-15 を用いた人工消化 SCP の分子量分布の検討	151
15. 経口糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定	151

16. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定	152
17. 経口投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定	153
18. ICR マウスを用いた糖負荷試験	154
19. 統計処理	157
結果	158
1. Sephadex G-50 分画物の血糖上昇抑制作用	158
2. Sephadex G-25 分画物の血糖上昇抑制作用	162
3. 血糖上昇抑制作用を示す SCP の平均分子量	166
4. 血糖上昇抑制作用を示す SCP の構造解析	168
5. 血糖上昇抑制作用を示す SCP のコラーゲン分子内における存在部位	173
6. 人工消化 SCP の消化度	176
7. 人工消化 SCP の分子量分布	178
8. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における人工消化 SCP の血糖上昇抑制作用	180
9. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用	185
10. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly, Pro および Gly-Gly の血糖上昇抑制作用	189
11. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly 投与濃度の影響	193
12. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly 抜きアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用	196
13. 経口投与-腹腔内糖負荷試験における Gly の血糖上昇抑制作用	200
14. 経口糖負荷試験における Gly の血糖上昇抑制作用	203
15. 経口投与-腹腔内糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用	206
16. 経口糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用	210
小考察	213



総合考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 219

謝辞・・ 227

参考文献・・ 229

## 略語

本論文では以下の略語を使用した。

A-SCP: atelo-strugeon collagen peptide

BSE: bovine spongiform encephalopathy

CaCl<sub>2</sub>: calcium chloride

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and  
Flora

CO<sub>2</sub>: carbon dioxide

CP: collagen peptide

Da: dalton

DHA: docosahexaenoic acid

DPP-IV: dipeptidyl peptidase-IV

EC: enzyme commission numbers

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EPA: eicosapentaenoic acid

Et: ethanol

EU: endotoxin unit

FA: fatty alcohol

FFA: free fatty acid

FID: flame ionization detector

GC: gas chromatography

GLP-1: glucagon-like peptide-1

GLUT2: glucose transporter 2

HCl: hydrochloric acid

HPLC: high-performance liquid chromatography

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide

IC<sub>50</sub>: half maximal (50%) inhibitory concentration

KIU: kallikrein inhibitor unit

NaBO<sub>3</sub>: sodium borate

NaCl: sodium chloride

NaHCO<sub>3</sub>: sodium bicarbonate

NaOH: sodium hydroxide

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>: sodium sulfate

MW: molecular weight

MWCO: molecular weight cut-off

PC: positive control

p-NA: *p*-nitroaniline

PL: polar lipid

PP-: pepsin-pancreatin artificial digested-

PPP-: pepsin-pancreatin-pronase artificial digested-

PP-SCP: pepsin-pancreatin artificial digested-SCP

PPP-SCP: pepsin-pancreatin-pronase artificial digested-SCP

SCP: sturgeon collagen peptide

SGLT1: sodium/dependent glucose transporter 1

ST: sterol

STZ: streptozotocin

TFA: trifluoroacetic acid

TG: triglyceride

TLC: thin-layer chromatography

TLC/FID: thin-layer chromatography/flame ionization detector

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid

TMTD: tetramethylthiuram disulfide

U: unit

UN: unknown

V<sub>0</sub>: void volume

## 緒言

古来、人類は魚介類や海藻などの水産物を食料資源として利用してきた。特に、四方を海に囲まれている我国では歴史的に水産物に対する依存度は高く、水産物を生鮮品、干物、練り製品など多様な形態で利用している。また、水産物を食料源としてだけでなく、EPA、DHA といった医薬品原料や、プロタミンといった工業原料、機能性ペプチド、コラーゲン、グルコサミン、キトサンといった高付加価値成分原料としても利用している。この様に、私たちは水産物を高度に利用しているが、水産物には魚類の内臓や貝殻など利用されず廃棄されている部分も多くある。近年、水産資源の減少と環境悪化への配慮から、これら水産廃棄物の有効利用法を新たに開発し、廃棄物を出すことなく水産物をすべて利用しようとする、持続可能な資源循環型社会に向けた研究が活発に行われている。

チョウザメは、アムール川 (黒竜江)、長江およびドナウ川といった大河、湖および北半球の内海など、幅広い水域に生息する。淡水に生息する魚種のなかで最も大きく、種によって体長は 8 m、重量は 1 t 以上まで成長する<sup>1,2)</sup>。魚体が大きく可食部が多いことから、チョウザメ類の肉や魚卵は重要なタンパク質源としてカスピ海沿岸諸国やロシアを中心に食用されてきた<sup>3)</sup>。また、鰾はワインの澱を除く清澄剤 (アイシングラス) としてローマ時代から利用されており、紀元前 600 年のチュニジアではコインの絵柄に採用されるなど、チョウザメの商品価値は古くから認知されていた。今日、チョウザメ類の卵の塩漬け製品はキャビアと呼ばれ、世界三大珍味の一つとして広く知られ高い経済価値を有する。キャビアはペルシア語で「抱卵する魚」を意味し、初めは全ての魚種の魚卵加工品を指していた。しかし、食品加工技術の発達や市場の拡大に伴ってカスピ

海産チョウザメ類の魚卵加工品をキャビアと呼称するようになり、キャビアに高級食材のイメージが定着していった<sup>4)</sup>。1960年代まで、主な生息域であった旧ソビエト連邦、アメリカ合衆国およびイランなどを中心に野生チョウザメは平均20,000 t/年捕獲されており、チョウザメ類から製造されるキャビアの国際流通量は500 t/年程度であった<sup>5)</sup>。その後、世界的な経済発展に伴いキャビアの需要は急拡大し、野生チョウザメの漁獲量は急増した。1977年には、ピーク値である32,078 t/年が漁獲され、1980年代前半まで28,000 t/年近くの野生チョウザメが漁獲された<sup>4)</sup>。1970年代から1990年代まで、キャビアは3,000 t/年製造されていたと推測されている。その後、過剰漁獲<sup>6)</sup>および水質汚染による生息域や産卵場所の減少などの理由によりその資源量も減少し<sup>2,7)</sup>、1980年代後半から1990年代後半にかけてその漁獲量も急落し、1995年には5,000 t/年まで低下した<sup>5)</sup>。このため、1998年から全てのチョウザメ類がCITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 別名ワシントン条約) に登録され、野生、養殖に関わらずチョウザメの国際商取引には輸出許可書が必要となった<sup>8)</sup>。さらに、2007年には違法商取引の管理を目的として国際統一ラベリング制度の導入が採択され、CITES 締約国に対してキャビア製造施設の登録制度を確立し、再使用が不可能なラベルを貼付することが義務化された<sup>7,9,10)</sup>。一方、キャビアの需要は拡大し続け、1995年の西欧諸国におけるキャビア供給量は228 t/年であったのに対して需要量は450 t/年と供給量を大きく上回った<sup>4)</sup>。このような社会的背景から、チョウザメおよびキャビアの生産は漁獲から養殖を中心とした形態へと移行し、2000年代初頭から養殖チョウザメの生産量は急増した<sup>5)</sup>。チョウザメ養殖は、1952年に旧ソビエト連邦において、オオチョウザメ *Huso huso* (別名ペルーガ) の雌とコチョウザメ *Acipenser ruthenus* (別名ステルレット) の雄の交配種であるベステル・チョウザメ *Huso huso* × *Acipenser*

*ruthenus* の養殖が成功したことを皮切りに、フランス、西ドイツ、イタリア、アメリカおよびハンガリー等でも行われるようになった。その後、チョウザメ養殖は世界各国に拡大し、1990年に323 t/年であった養殖生産量は2016年には127,780 t/年に達し<sup>3)</sup>、野生チョウザメの漁獲に依存していた1980年代のチョウザメ生産量の4倍以上となった。近年のチョウザメ養殖の特徴として、中国におけるチョウザメ養殖の急拡大が挙げられる。例えば、養殖の拡大に伴い魚肉の生産量が増加したが、2011年には全世界における51,500 t/年の魚肉生産量のうち86%を中国が占めた。また、高い経済価値をもつキャビアの生産を目的としてチョウザメ養殖は48か国へ拡大しており、ウルグアイやベトナムなど、本来チョウザメが生息していない地域においても養殖が行われつつある<sup>5)</sup>。

日本においても1980年代からチョウザメ養殖が行われており<sup>11)</sup>、宮崎県<sup>12)</sup>をはじめ、北海道<sup>13,14)</sup>、広島県<sup>15)</sup>、岐阜県<sup>16)</sup>などで商業養殖が進められている。北海道では、昭和初期まで石狩川と天塩川に野生のミカド・チョウザメ (*Acipenser mikadoi*) が生息しており、両河川ではチョウザメが遡上する姿が度々目撃され、札幌では6月から8月になると両河川で漁獲されたチョウザメが魚市場に並んだ<sup>17,18)</sup>。しかし、違法漁獲によりミカド・チョウザメの資源量は急減し<sup>19)</sup>、北海道レッドデータブック (<http://rdb.ies.hro.or.jp/>) および環境省のレッドリスト<sup>20)</sup>に絶滅種として記載された。そこで、足立ら<sup>18)</sup>は、北海道沿岸で捕獲されたミカド・チョウザメから採取した卵および精子を受精させて約7,000の受精卵を得て、国内初のミカド・チョウザメの繁殖に成功した。将来、大量増殖によりミカド・チョウザメの野生復帰が期待される。また、北海道沿岸では、ミカド・チョウザメだけでなくダウリア・チョウザメ (*Huso dauricus*) も度々捕獲されているが<sup>21,22)</sup>、これはロシアアムール川で繁殖したものが北海道沿岸に回遊してくると考えられている<sup>18)</sup>。両魚種は北海道の気候に適応しており、高

い海水適応能力を示すことから、海面養殖による産業的利用が期待されている。ダウリア・チョウザメのキャビアは大粒で最高級品となるが、雌の性成熟まで長期間を要することが課題である。今後、早期成熟技術の開発により、北海道の気候に適した個体から良質の魚卵が安定的に量産され、チョウザメ養殖が北海道を代表する産業となることが期待される。また、上記の様に、キャビアや肉を目的とした養殖が国内外で進むにつれて、市場では未利用部位である皮や鰾、腸、軟骨、内臓から高価値を有する成分を抽出して製薬や化粧品に応用し、魚全体をより効果的に利用する動きがみられる<sup>3)</sup>。養殖チョウザメの未利用部位に付加価値を見出すことは、持続可能なチョウザメ養殖に寄与すると考える。

チョウザメは硬骨魚類に分類されるが、体形はサメに似て尾鰭が大きいなどの特徴を有し、皮、骨、鰭および鰾に豊富にコラーゲンが含有される<sup>12,23,24)</sup>。コラーゲンは動物において細胞外マトリクスの主成分であり、Gly 残基が 3 残基に一つ配置される Gly-X-Y (X および Y は任意のアミノ酸) の反復配列をもつポリペプチド鎖から構成され、このポリペプチド鎖が 3 本寄り集まり三重らせん構造という特徴的な分子構造を示す<sup>25-27)</sup>。また、他のタンパク質に比べて、Pro およびヒドロキシプロリン (Hyp) といったイミノ酸の含量が非常に多い (約 20%)<sup>26)</sup>。Hyp 含量はコラーゲンの変性温度と比例しており、生息環境の温度と相関する。そのため、水生動物由来コラーゲンは、ブタやウシ等の家畜動物に比べてイミノ酸含量が少なく、変性温度が低いという特徴をもつ。現在までに、脊椎動物では 27 種類のコラーゲンが確認されており<sup>28)</sup>、皮、硬骨および鰾は主に I 型コラーゲンから、軟骨や脊索は II 型コラーゲンから構成されている<sup>27)</sup>。いずれのコラーゲンも三重らせん構造をとり、ほ乳類の I 型コラーゲンは 3 本のポリペプチド鎖のうち 2 本は同じポリペプチド鎖 ( $\alpha 1$  (I)), 1 本はアミノ酸配列が異なるポリペプチド鎖 ( $\alpha 2$  (I)) から構成される<sup>28)</sup>が、魚類の I 型コラーゲン



は、アミノ酸配列がそれぞれ異なる3本のポリペプチド鎖 [ $\alpha$ I (I),  $\alpha$ II (I) および  $\alpha$ III (I)] から構成されることが明らかとなっている<sup>29)</sup>。一方、II型コラーゲンは、3本とも同じポリペプチド鎖 ( $\alpha$ 1 (II)) から構成される<sup>28)</sup>。細胞外マトリクスであるコラーゲンは生体親和性が高いため、創傷被覆材、化粧品原料、細胞培養用試薬および再生医療向け素材として利用されている<sup>26,30)</sup>。また、コラーゲンの三重らせん構造が変性したゼラチンは、ゲル形成能や保水能等を有しゲル化剤および安定化剤等の食品添加物として長年利用されている<sup>31)</sup>。一方、コラーゲンを加水分解して調製されるコラーゲン・ペプチド (CP) は、コラーゲンおよびゼラチンとしての食経験から安全性が認められており<sup>32)</sup>、コラーゲンに比べて調製が容易で、水に溶けやすく、水産生物から調製した場合でも常温流通が可能であることから、飲料や肌や骨、関節の改善効果を期待する健康食品および医薬品原料としての利用が増加している<sup>33)</sup>。したがって、コラーゲンを抱負に含む養殖チョウザメの皮、骨、鰭、鰾 (未利用部位) を有効利用法の一つとして、CPへの加工が挙げられる。

CPの健康機能性に関しては、抗酸化作用<sup>31,34-39)</sup>やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害作用<sup>38-40)</sup>、血糖上昇抑制作用<sup>41-44)</sup>等が報告されている<sup>31,45)</sup>。このうち、血糖上昇抑制作用の作用機序は、DPP-IV (Dipeptidyl peptidase-IV) によるGLP-1 (Glucagon-like peptide-1) の分解抑制によるインスリン分泌促進であると考えられている。GLP-1は、食物の摂取を刺激として小腸上皮L細胞から分泌される消化管ホルモンであり、膵臓、胃、脳、筋肉、肝臓および心臓等の臓器に作用してインスリン分泌促進や胃排出抑制、食欲低下などを多様な生理作用を発揮する<sup>46-48)</sup>。分泌される活性型GLP-1はアミノ酸30残基からなるペプチド [GLP-1 (7-36) amide] であるが、血管内皮細胞で産生されるDPP-IVにより分泌後速やかにN末端の2残基 (His-Ala) が切断されて不活性型 [GLP-1 (9-36) amide] に変

換され、インスリン分泌促進能を失う<sup>47,49</sup>。DPP-IVは、N末端のアミノ酸配列 X-Pro-Y および X-Ala-Y (X および Y は任意のアミノ酸) を認識し、X-Pro および X-Ala を加水分解する<sup>50</sup>。一方、コラーゲンは Pro の含量が多く<sup>26</sup>、その分解物である CP は N末端のアミノ酸配列が X-Pro であるペプチドを含む<sup>40,42,51</sup>。また、CP を摂取すると、N末端に X-Pro および X-Ala を有するペプチドが血中に検出される<sup>45,52</sup>。すなわち、摂取された CP は血中において DPP-IV の基質として認識され易く、DPP-IV の本来の基質である GLP-1 の分解が競争的に阻害される。その結果、分解を免れた活性型 GLP-1 がインスリン分泌を促進し、血糖値が低下すると考えられている。一方、岸村ら<sup>53</sup>は、水産廃棄物であるヒトデ類の体壁から調製した CP が血糖の上昇を抑制することを見出した。そして、マヒトデ、ニッポンヒトデおよびイトマキヒトデの CP は、胃内でのグルコース滞留時間の延長および小腸でのグルコース吸収の抑制により血糖上昇抑制作用を示すと推察された。胃内滞留時間の延長、すなわち胃排出抑制は GLP-1 の生理作用の一つであることから、ヒトデ類から調製した CP が DPP-IV の拮抗阻害を介して GLP-1 の分解を抑制し、インスリン分泌を促進した可能性も考えられる。したがって、養殖チョウザメの未利用部位から調製した CP も、上記の機序を介して血糖上昇抑制作用を示す可能性は高い。

一方、経済発展に伴う文化的および社会的な生活様式の変化から、世界の糖尿病患者は増加の一途をたどっている。International Diabetes Federation による糖尿病患者数の統計報告<sup>54</sup>によると、2017年における世界の糖尿病の総患者数は4億2,490万人であり、糖尿病とその予備軍の人口は7億7,700万人にのぼると推定されている。また、2045年には総患者数は6億2,860万人に達すると予測されており、糖尿病の予防は喫緊の課題となっている。II型糖尿病は、膵臓が分泌する糖代謝ホルモンであるインスリンと深い関連をもつ。インスリンは、血

中の糖を筋肉および脂肪細胞へ取り込ませて血糖値を下げる唯一のホルモンである。しかし、人種や家系等の遺伝因子、過食、ストレス、肥満、喫煙、運動不足等の環境因子および加齢因子により、膵臓からのインスリン分泌量の低下や筋肉における糖の取り込み効率の低下（インスリン抵抗性）が誘導され、筋肉量減少<sup>55,56)</sup>による糖取り込み量の減少も相乗して恒常的な高血糖状態へと至る<sup>54,57,58)</sup>。高血糖状態は、心臓、血管、眼、腎臓および神経を傷害し、網膜や腎臓の細小血管症、全身の動脈硬化症等を引き起こす。これらの症状が進行すると心疾患、神経障害、白内障、足部潰瘍等の合併症が誘発され、失明、四肢切断、腎不全、死につながる場合もある<sup>54,58)</sup>。血糖降下薬としては、グリニド薬やグアナイド薬、スルホニル尿素薬などが一般的に用いられている。しかし、これらの薬品は糖尿病発症後の対処療法に用いられるものであり、糖尿病の発症を予防するものではない。

II型糖尿病の予防には、糖分や炭水化物、脂肪の摂取を控え、野菜や果物等を取り入れて食事内容を改善することが推奨されている<sup>58)</sup>。例えば、魚および海藻の喫食は、II型糖尿病の発症リスク低減に関連することが明らかになっている<sup>59,60)</sup>。こうした食品成分は、食後血糖値が急激に上昇することを防ぎ、膵臓への負担を軽減することによりII型糖尿病への進行を抑制する。食品成分の利用により食後血糖値の管理を容易に行うことができるならば、糖尿病を予防するための最も有効な手段ではないかと考えられる。

そこで本研究では、養殖チョウザメの持続可能な資源循環型利用を目的として、チョウザメの未利用部位（皮、骨、鰭、鰾）からチョウザメCP (SCP) を調製し、その血糖上昇抑制作用を検証すると共に作用機序の解明を試みた。まず第1章では、SCPの調製および調製時に分離される脂質の分析を行った。次に第2章では、SCPの血糖上昇抑制作用を評価した。続いて、第3章では、SCP

の血糖上昇抑制作用について、①糖の吸収を遅延・抑制する作用経路および②経口摂取された SCP が小腸で吸収されて血中に移行し、GLP-1 およびインスリン分泌を介して血糖上昇を抑制する作用経路に着目して作用機序の解明を試みた。最後に第 4 章では、血糖上昇抑制作用を示す作用物質の特定を試みた。SCP は種々のペプチドおよびアミノ酸混合物であるため、作用物質がコラーゲン分子のどの部位から生じて、どのような構造的特徴を有するのか、また、作用物質の構造と作用機序との間にどのような相関関係があるかは不明である。そこで、次の 2 項目を検討した。第一に、SCP をゲル濾過に供して血糖上昇抑制作用を示す画分を分画して分子量を推定した。そして、ゲル濾過分画物を逆相 HPLC に供して血糖上昇抑制作用を示す画分のアミノ酸配列を分析した。さらに、血糖上昇抑制作用を示すペプチドがコラーゲン分子のどの部位から生じるのかを検討した。第二に、作用物質の構造と作用機序との関係を検討した。すなわち、SCP の人工消化によって生ずるアミノ酸量および分子量変化を分析し、作用物質の消化管消化が血糖上昇抑制作用に及ぼす影響について調べた。そして、SCP のアミノ酸組成を模したアミノ酸混合物を用いた試験により、血糖上昇抑制作用において鍵となるアミノ酸を推察した。

## 第1章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの調製

### 目的

本章では、チョウザメ未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) の有効利用を目的として、チョウザメの未利用部位からコラーゲン・ペプチド (CP) の調製および調製時に分離される脂質の分析を行った。

ウシ、ブタなど家畜由来のコラーゲンおよびその熱変性物であるゼラチンは、ソーセージのケーシング材やゲル化剤の原料として古くから用いられてきた。また、コラーゲンは保湿作用を有する化粧品やアンチエイジング効果を期待する健康補助食品の素材として利用されている。このような社会的背景の中で、特に食品分野においては、分子量の大きなコラーゲンやゼラチンよりも、低分子量のペプチド形態での利用量が増加している。それは、CP が溶解性、分散性、消化吸収性に優れ、且つ、低アレルギー性であることに起因する<sup>61)</sup>。しかしながら、近年、牛海綿状脳症 (BSE) および鳥インフルエンザの流行や宗教上の理由により家畜由来の CP が敬遠される傾向にあり、その代替素材として水産生物由来の CP が注目されている<sup>31,34,62-64)</sup>。

本研究の試料であるチョウザメは、尾鰭が大きいなどサメ類に似た体型を有し、その皮、骨、鰭、鰾はコラーゲンを豊富に含有する<sup>23)</sup>。谷口ら<sup>12)</sup>は、シロチョウザメの脊椎骨に I 型コラーゲンが分布することを報告した。これらの報告から、採卵後のチョウザメから採取される未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) は、家畜に代わる CP の供給源になり得ると考えられた。そこで本章では、採卵後のチョウザメの未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) からチョウザメコラーゲン・ペプチド (SCP) の調製を行った。

また、SCP 調製の最終過程において、僅かに残存する脂質 (0.38 wt%) をエタ

ノール処理によって除去した。一方、毒性や引火性が無く環境負荷の低減が期待されることから、近年、超臨界二酸化炭素による脱脂法が有機溶媒脱脂法の代替法として食品工業において利用されている<sup>65)</sup>。そこで本章では、今後の SCP の実用化に向けて、超臨界二酸化炭素を用いた脱脂法の SCP 調製に対する有用性に関する検討も実施した。

## 材料および実験方法

### 材料および試薬

#### 1. チョウザメ

チョウザメは、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所にて飼育された採卵後および未成熟のベステル・チョウザメを用いた。ベステル・チョウザメ *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* は、オオチョウザメ *Huso huso* (別名ベルーガ) の雌とコチョウザメ *Acipenser ruthenus* (別名ステルレット) の雄の交配種である。ベステル・チョウザメは交配種でありながら繁殖が可能で、雌は比較的短期間 (7~8 年) で成熟するという特長を有する。そのため、ベステル・チョウザメはキャビア生産のためのチョウザメ養殖に広く導入されている。

#### 2. 試薬

パパイン (EC 3.4.22.2) は Sigma および和光純薬工業株式会社 (現 富士フィルム和光純薬株式会社) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社 (現 富士フィルム和光純薬株式会社) より特級グレードのものを購入した。

## 実験方法

#### 1. チョウザメ脂質の薄層クロマトグラフィー分析

脂質の抽出は、Fig. 1-1 に示す方法で行った。留去後のチョウザメ脂質はクロロホルムに溶解して 2% (v/w) の脂質溶液として分析した。

脂質成分の定性分析は、薄層クロマトグラフィー (TLC) により行った。TLC 板はワコーゲル B-5 (20 cm×20 cm×0.25 cm) を塗布した TLC 板を 110°C で 1 時間活性化した。活性化後、2% (v/w) 脂質溶液は TLC 板の原点にスポットした。スポットした TLC 板は展開槽に入れ、展開溶媒 {ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (80 : 20 : 1, v/v/v)} で展開した。展開後、脂質の検出は 50% 硫酸水溶液を風乾した TLC 板に噴霧し、次いで、ホットプレート上で加熱し、脂質を炭化させて行った。

## 2. チョウザメ脂質の脂肪酸組成のガスクロマトグラフィー分析

Figure. 1-1 に示す方法で抽出した脂質は、トルエンを少量加えて残存するエタノールと水分をエバポレーターで留去した。さらに、トルエンは真空ポンプで減圧除去することでチョウザメ脂質を得た。得られたチョウザメ脂質は 7% 3-フッ化ホウ素-メタノール溶液を加え、100°C で 1 時間保持して脂肪酸メチルエステルとした。次に、脂肪酸メチルエステルを TLC で精製した。すなわち、TLC 板はシリカゲル G (Analteck) (10 cm×10 cm×0.25 cm) を用い、100°C で 1 時間活性化した。そして、活性化した TLC 板の原点に脂肪酸メチルエステルをスポットし、展開槽に入れて展開溶媒 {ヘキサン-ジエチルエーテル (85 : 15, v/v)} で展開した。展開後、風乾した TLC 板にローダミン 6G を噴霧して脂肪酸メチルエステルを検出した。次いで、脂肪酸メチルエステル画分を TLC 板から採取した。精製した脂肪酸メチルエステルの組成はガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。GC 分析は GC-18A 型装置 (島津製作所製) を用いて行った [カラムは FAMEWAX (φ0.32 mm×30 m)]。キャリアーガスはヘリウムガス (圧力 : 85 kPa, 流速 : 33 cm/sec, スプリット比 : 50 : 1) を使用し、カラム温度は 170~240°C (4°C/min) の昇温で分析し、検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) で検出し、脂

脂肪酸の同定は標品との比較 [標品 : Supelco 37 Component FAME Mix (Supelco)] で行った。

### 3. SCP 試料に残存する脂質の定性および定量分析

エタノール, 超臨界二酸化炭素および 3%エタノールを含む超臨界二酸化炭素を用いて脱脂した試料, それぞれ SCP (Fig. 1-1), SCP-CO<sub>2</sub> (Fig. 1-3) および SCP-CO<sub>2</sub>・Et (Fig. 1-3), に残存する脂質の分析を行った。脱脂後の SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et に残存する脂質はクロロホルムで抽出した。抽出液はエバポレーターに供してクロロホルムを留去後, 2 mL のメタノールを添加し, メタノールをエバポレーターで留去することにより脱水した。本脱水操作は 3 回行った後, 真空ポンプで減圧することで残存メタノールを留去した。メタノール留去後, 脂質はクロロホルムに溶解して 2%脂質溶液とした。

抽出した脂質成分の定性分析は, 第 1 章 実験方法 1 と同様に TLC により行った。抽出した脂質成分の定量分析は, 薄層自動検出装置 (IATROSCAN MK-6s, Mitsubishi Kagaku Iatron) を用いた薄層クロマトグラフィー/炎イオン化検出 (TLC/FID) により行った。すなわち, 検出器にセットしたクロマロッド (クロマロッド-SIII, 三菱化学メディエンス) を空焼きして活性化した後, クロマロッドの原点に 2%脂質溶液をスポットした。スポットしたクロマロッドは展開槽に入れ, 展開溶媒 {ヘキサン-ジエチルエーテル-蟻酸 (85 : 15 : 0.5, v/v/v)} で展開した。展開後, 風乾したクロマロッドを検出器にセットしてスポットを検出した。データ処理は, インテグレータ (Chromatocorder 21, SY ステロール EM IN ステロール RUMENT) を用いて行った。



## 結果

### 1. SCP の調製

ベステル・チョウザメの未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) から SCP の調製は Fig. 1-1 に示す方法で行った。すなわち, 頭部を切断したベステル・チョウザメから採取した未利用部位を, 塩溶性タンパク質の除去を目的として 10 倍容量 (v/w) の 1% NaCl に一夜ずつ二回浸漬した。その後, 10 倍容量 (v/w) の 0.2 M NaOH, 次いで 10 倍容量 (v/w) の 0.2 M HCl にそれぞれ一夜浸漬して夾雑物を溶解除去し, さらに蒸留水に一夜浸漬した。なお, 各浸漬工程では, 前工程の浸漬液を除去するために未利用部位を水道水で洗浄した。蒸留水で浸漬した未利用部位を包丁で細切し, 試料重量の 2 倍容量 (v/w) の蒸留水と試料重量の 0.2 wt% のパパインを加え, 50°C で 5 時間, 攪拌しながらコラーゲンを加水分解した。次いで, この分解物は 4°C, 10,000×g, 10 分間の遠心分離に供し, 上清を得た。この上清は凍結乾燥に供した後, 得られた粉末を 15 倍容量 (v/w) の 99.5% エタノールに 3 時間浸漬して脱脂し, 4°C, 10,000×g, 10 分間遠心分離して沈殿を得た。得られた沈殿は 60°C に設定したインキュベーターに静置し, エタノールを揮発除去して得られた白色粉末を SCP とした。

SCP 調製における物質収支を Table 1-1 に示す。採卵後のチョウザメ 21 kg から 2.4 kg の未利用部位が得られ, そこから 486 g の SCP (202 g/kg 未利用部位) を調製できた。調製された SCP は白色, 無臭であり, 水への溶解性が極めて高かった。また, 未成熟のベステル・チョウザメを用いた場合も, ほぼ同様の結果が得られた。

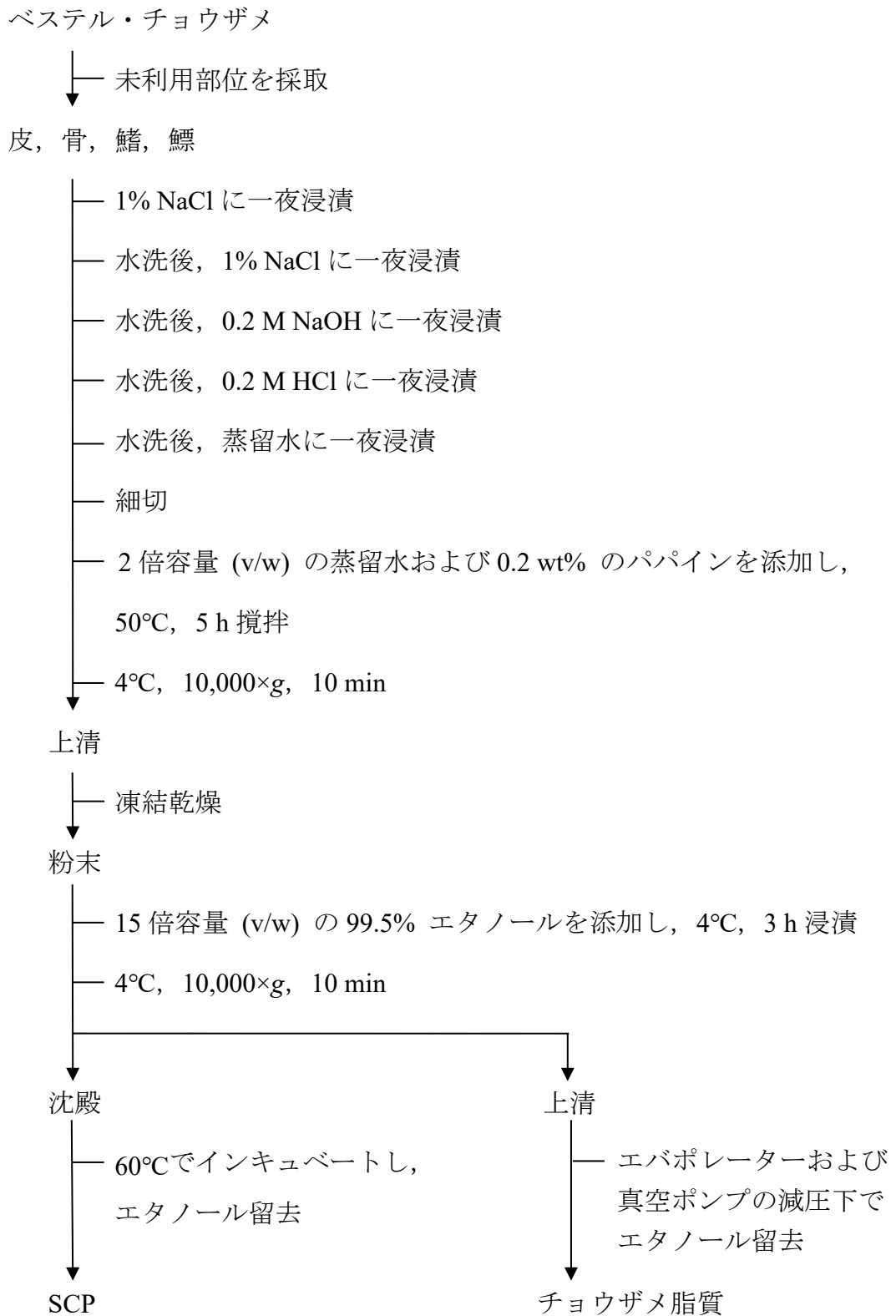


Fig. 1-1 SCP の調製方法

Table 1-1 SCP の調製過程における物質収支

チョウザメ (kg 湿重量)	未利用部位 (kg 湿重量)	SCP (kg)	未利用部位から の 回収率 (%)
21	2.4	0.486*	20

\* : 0.0018 kg の脂質を含む (3.8 mg/g SCP)

## 2. SCP 調製時に分離された脂質成分

チョウザメのゼロエミッション型利用を検討する一環として、本実験では、SCP 調製時に分離されたチョウザメ脂質の分析を行った。

本実験は、第1章 実験方法1および2により行った。

Figure. 1-1 に示す方法で SCP を調製する際に分離されたチョウザメ脂質重量は 2.8 g であった。また、分離されたチョウザメ脂質を TLC による定性分析に供した結果を Fig. 1-2 に示す。図の様に、チョウザメ脂質の主成分はトリグリセリドであり、微量成分として遊離脂肪酸および遊離ステロールが検出された。

また、Table 1-2 に示すように、チョウザメ脂質の主要な脂肪酸は 18:1n-9 (オレイン酸) + 18:1n-11 (7-オクタデセン酸) 19.9%, 16:0 (パルミチン酸) 15.9%, 22:6n-3 (DHA) 9.6%, 20:1n-11 (9-エイコセン酸) + 20:1n-13 (7-エイコセン酸) 6.6%, 16:1n-7 (パルミトレイン酸) + 16:1n-9 (7-ヘキサデセン酸) 5.8%, 14:0 (ミリスチン酸) 5.3%, 20:5n-3 (EPA) 5.2% および 18:2n-6 (リノール酸) 4.7% であり、主要脂肪酸は不飽和脂肪酸であることが判明した。

このように、チョウザメ脂質はオレイン酸、DHA、EPA、およびリノール酸等の有用脂肪酸を結合するトリグリセリドを主成分とすることが明らかになった。これらの結果から、チョウザメの未利用部位は、SCP のみならずチョウザメ脂質の供給源としての価値も有することが示唆された。



Fig. 1-2 チョウザメ脂質の TLC 分析

TLC 板：ワコーゲル B5, 20 cm×20 cm×0.25 cm

展開溶媒：ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (80 : 20 : 1, v/v/v)

front : 展開前線

TG : トリグリセリド

FFA : 遊離脂肪酸

ST : 遊離ステロール

Origin : 原点

Table 1-2 チョウザメ脂質の脂肪酸組成

脂肪酸	wt%	脂肪酸	wt%
12:0	0.04	18:3n-6	0.16
13:0	0.08	18:4n-1	0.15
14:0	5.30	18:4n-3	1.98
14:1n-5	0.08	20:0	0.09
15:0	0.50	20:1n-5	0.09
iso-15:0	0.23	20:1n-7	0.24
anteiso-15:0	0.07	20:1n-9	1.99
16:0	15.88	20:1n-11+20:1n-13	6.62
iso-16:0	0.08	20:2n-6	0.38
16:1n-5	0.33	20:3n-3	0.16
16:1n-7+16:1n-9	5.75	20:3n-6	0.17
16:2n-4	0.24	20:4n-3	1.13
16:2n-6	0.05	20:4n-6	0.72
16:3n-4	0.11	20:5n-3	5.16
16:4n-1	0.16	21:5n-3	0.29
17:0	0.33	22:1n-7	0.08
iso-17:0	0.45	22:1n-9	0.40
17:1n-7	0.46	22:1n-11+22:1n-13	4.51
18:0	1.32	22:5n-3	1.47
18:1n-5	0.53	22:5n-6	0.27
18:1n-7	2.62	22:6n-3	9.57
18:1n-9+18:1n-11	19.85	24:1n-9	0.30
18:1n-13	0.35	24:6n-3	0.23
18:2n-4	0.09	TMTD	0.11
18:2n-6	4.73	Others	39.32
18:3n-3	1.10	Total	100

TMTD : テトラメチルチラウムジスルフィド

Others : 未同定

### 3. 超臨界二酸化炭素脱脂法を用いた SCP の調製

前項において、チョウザメ脂質はオレイン酸, DHA, EPA, およびリノール酸等の有用脂肪酸を結合するトリグリセリドを主成分とすることが明らかになった。そこで、環境負荷の低減が期待され、食品工業において利用されている超臨界二酸化炭素による脱脂法が、エタノール脱脂法の代替として SCP 調製に有用であるか検討した。

ベステル・チョウザメの未利用部位から超臨界二酸化炭素脱脂法を用いた SCP の調製は、Fig. 1-3 に示す方法で行った。すなわち、頭部を切断した魚体から採取した未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) を、1% NaCl に一夜ずつ二回浸漬した。その後、0.2 M NaOH, 次いで 0.2 M HCl にそれぞれ一夜浸漬して塩溶性タンパク質などの夾雑物を溶解除去後、さらに蒸留水に一夜浸漬した。蒸留水で浸漬した未利用部位を包丁で細切し、試料重量の 2 倍容量 (v/w) の蒸留水と試料重量の 0.2 wt% のパパインを加え、50°C で 5 時間、攪拌しながら加水分解した。分解後、この分解物は 4°C, 10,000×g, 10 分間の遠心分離に供し、上清を得た。この上清を凍結乾燥に供して得られた粉末を、250 bar, 45°C で 2 時間、超臨界二酸化炭素処理した。得られた白色粉末を超臨界二酸化炭素処理 SCP (SCP-CO<sub>2</sub>) とした。また、同様の方法を用い、コソルベントとして 3 wt% エタノールを含む超臨界二酸化炭素処理で得られた白色粉末を、3 wt% エタノール含超臨界二酸化炭素処理 SCP (SCP-CO<sub>2</sub>・Et) とした。

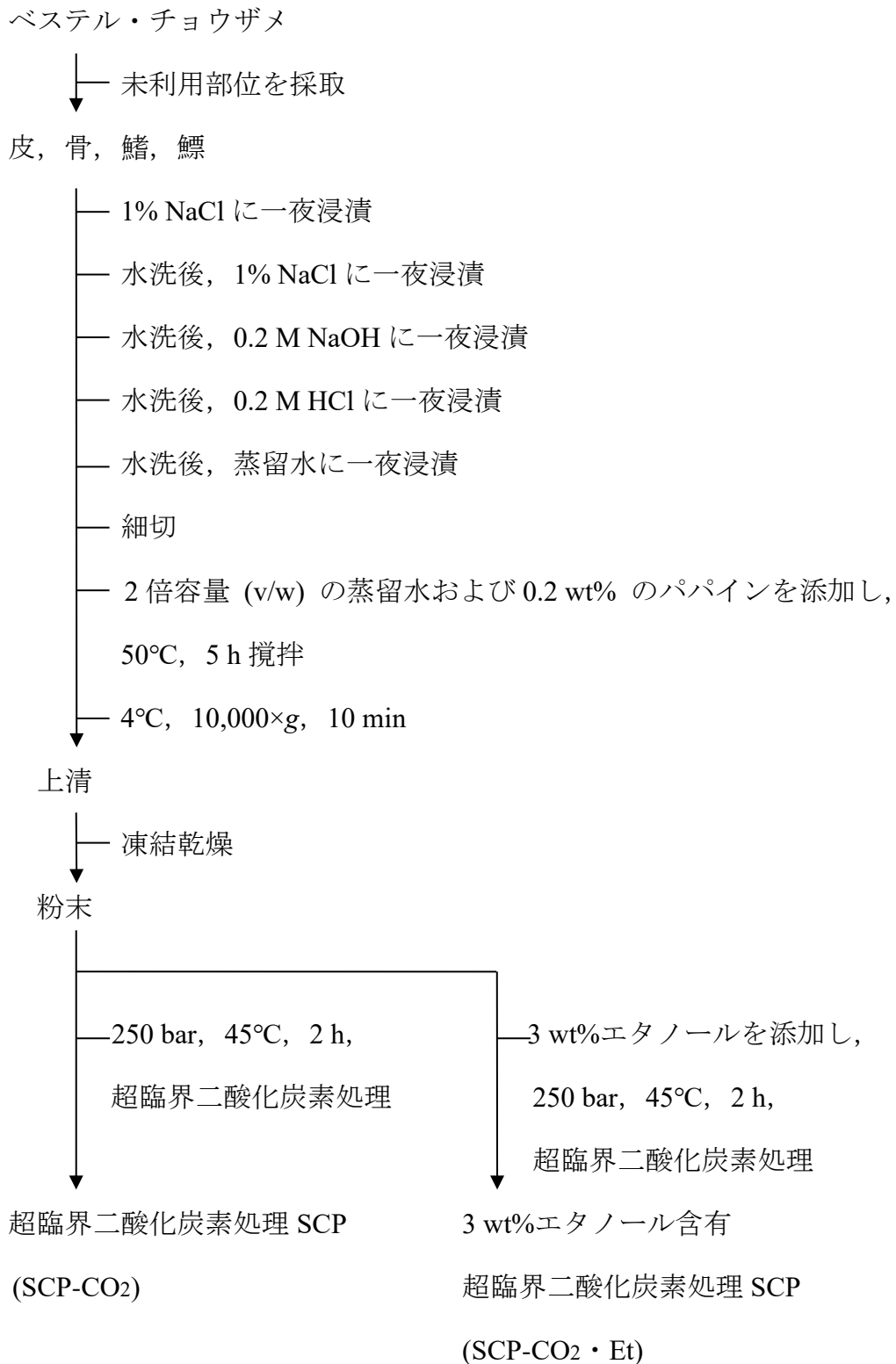


Fig. 1-3 超臨界二酸化炭素脱脂法を用いた SCP の調製方法



#### 4. 異なる脱脂法で調製した SCP に残存する脂質成分

本項では、エタノール脱脂法 (SCP) および超臨界二酸化炭素脱脂法 (SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et) で調製した SCP に残存する脂質の定性および定量分析を行った。

本実験は、第 1 章 実験方法 3 により行った。

SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 中に残存する脂質の重量を Table 1-3 に示す。エタノール脱脂法で調製した SCP の残存脂質重量は 3.8 mg/g SCP であり、脂質残存率は 0.38%であった。超臨界二酸化炭素脱脂法で調製した SCP-CO<sub>2</sub> の残存脂質重量は 2.0 mg/g SCP-CO<sub>2</sub> であり、脂質残存率は 0.20%であった。コントロールとして 3 wt%のエタノールを含む超臨界二酸化炭素脱脂法で調製した SCP-CO<sub>2</sub>・Et の残存脂質重量は 1.8 mg/g SCP-CO<sub>2</sub>・Et であり、脂質残存率は 0.18%であった。

次に、残存脂質を TLC による定性分析に供した結果を Fig. 1-4 に示す。図の様に、SCP は主成分としてトリグリセリド、微量成分として遊離脂肪酸および遊離ステロールが残存していた。一方、SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et は、トリグリセリド、遊離脂肪酸およびステロールが検出されず、代わりに未同定成分のみが検出された。

また、残存脂質を TLC/FID による定量分析に供した結果を Table 1-4 に示す。表の様に、SCP に含まれる脂質成分はトリグリセリドが 94.5%と最も多く、微量成分として極性脂質、脂肪アルコール、遊離ステロールおよび遊離脂肪酸が検出された。SCP-CO<sub>2</sub> に含まれる脂質成分は極性脂質が 40.7%と最も多く、トリグリセリドは 17.9%であり、遊離脂肪酸および遊離ステロールは検出されなかった。SCP-CO<sub>2</sub>・Et に含まれる脂質成分は極性脂質が 56.6%と最も多かったが、トリグリセリドは 2.9%であり、遊離脂肪酸および遊離ステロールは検出されなかった。

また、SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et で検出された未同定成分はいずれも、SCP に残存していた脂質成分とは異なる成分であった。

以上の結果から、SCP 中の残存脂質に含まれるトリグリセリドの割合は、SCP では 94.5%と高値であったが、SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et では低く、特に SCP-CO<sub>2</sub>・Et では 2.9%と低値であることが分かった。従って、超臨界二酸化炭素脱脂法は、エタノール脱脂法よりも脱脂効率が高く、酸化要因であるトリグリセリドを分離出来ることから、SCP の品質や保存性に対して有用な脱脂法であると考えられた。

Table 1-3 異なる脱脂法で調製した SCP に残存する脂質の重量

	SCP の種類		
	SCP <sup>*</sup>	SCP-CO <sub>2</sub>	SCP-CO <sub>2</sub> ・Et
残存脂質重量 (mg/g SCP)	3.8	2.0	1.8
SCP 中の脂質残存率 (%)	0.38	0.20	0.18

\* : エタノール脱脂

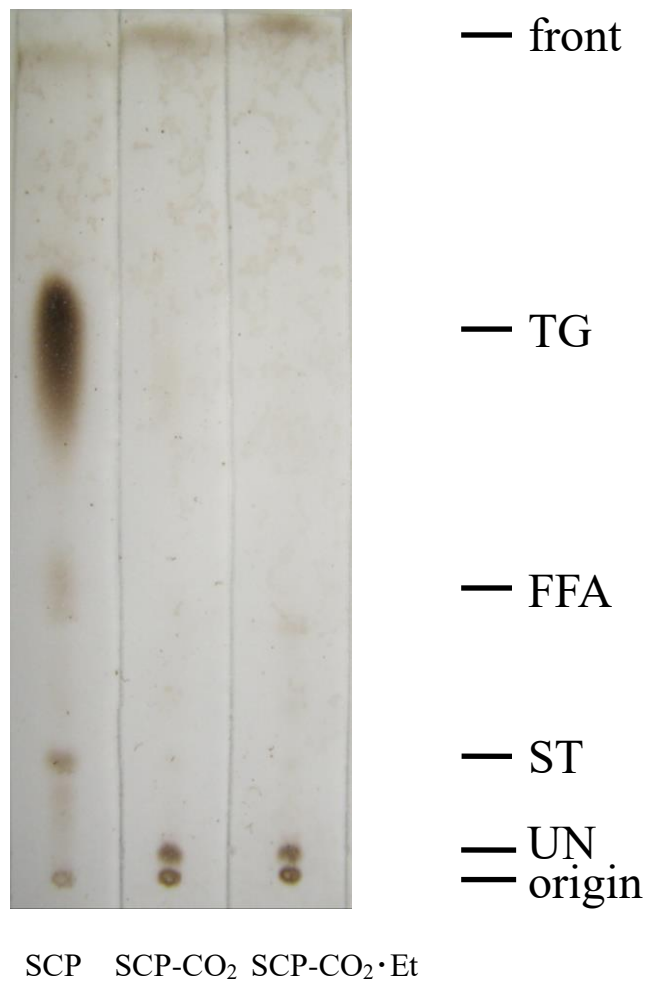


Fig. 1-4 異なる脱脂法で調製した SCP 中に残存する脂質の TLC 分析

TLC 板：ワコーゲル B5, 20 cm×20 cm×0.25 cm

展開溶媒：ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (80 : 20 : 1, v/v/v)

front : 展開前線

TG : トリグリセリド

FFA : 遊離脂肪酸

ST : 遊離ステロール

UN : 未同定成分

origin : 原点

Table 1-4 異なる脱脂法で調製した SCP に残存する脂質の TLC/FID 分析

		SCP の種類		
		SCP*	SCP-CO <sub>2</sub>	SCP-CO <sub>2</sub> ・Et
脂質残存率	%	0.38	0.20	0.18
脂質成分	%			
UN (1)		—	9.4	15.4
FA		1.1	4.4	6.5
TG		94.5	17.9	2.9
FFA		0.6	—	—
ST		1.0	—	—
UN (2)		—	27.7	18.7
PL		2.7	40.7	56.6
計	%	100.0	100.0	100.0

クロマロッド：クロマロッド-SIII

展開溶媒：ヘキサン-エーテル-蟻酸 (85 : 15 : 0.5, v/v/v)

\*：エタノール脱脂

UN (1)：未同定成分 (1)

ST：遊離ステロール

FA：脂肪アルコール

UN (2)：未同定成分 (2)

TG：トリグリセリド

PL：極性脂質

FFA：遊離脂肪酸

—：検出されず

## 小考察

本章では、ベステル・チョウザメ未利用部位から SCP を調製する方法について検討した。その結果、採卵後のベステル・チョウザメ 21 kg から 2.4 kg の未利用部位が得られ、そこから調製された SCP は 486 g (202 g/kg 未利用部位湿重量) であった。野村<sup>66)</sup>はヨシキリザメの真皮からコラーゲンを調製したが、その回収量は 97 g/kg 真皮湿重量であった。それ故、本研究における SCP 回収量はヨシキリザメのコラーゲン回収量と比較して高い値を示している。野村<sup>66)</sup>によるコラーゲン回収量をヨシキリザメの真皮の乾重量で換算すると、その回収量は 713 g/kg 真皮乾重量であり、回収率は 70%におよぶ。谷口ら<sup>12)</sup>によると、シロチョウザメの皮の水分量は 65~69%であり、また皮の湿重量あたりのコラーゲン含有量は 18~21%である。すなわちこれらの魚類では、皮に含まれる固形分のうち半分以上がコラーゲンから構成されていた。一方、本研究の予備試験において、ベステル・チョウザメとダウリア・チョウザメ *Huso dauricus* (別名カルーガ) の交配種であるベスカル・チョウザメ *Huso huso*×*Acipenser ruthenus*×*Huso dauricus* の皮全体を用いて、皮の乾重量と湿重量の比を求めた。その値から、ベスカル・チョウザメの皮から SCP を調製した場合、皮の乾重量あたりの SCP の回収率は約 74%であると算出された。本研究で用いたベステル・チョウザメはベスカル・チョウザメと近縁種であるので、ベステル・チョウザメの皮から調製した SCP の回収率も 70%程度と推察できる。すなわち、皮からの SCP の回収率はヨシキリザメの報告とほぼ等しいのではないかと考えられた。しかしながら、本研究の SCP 回収量はヨシキリザメのコラーゲン回収量より高値を示した。この差異が生じた理由として、抽出方法と原料特性の相違が挙げられる。すなわち、SCP は加水分解により調製されるため、分解されたペプチド結合の数だけ水分子の分子量が SCP の分子量に加算される。従って、コラーゲン分子では

なくペプチドとして抽出したことにより、見かけ上、回収量が増加したと考察した。また、本研究では真皮だけでなく皮全体を用いたことに加えて、骨、鰭およびとりわけコラーゲンを豊富に含む鰾も原料としたためと考察した。さらに、コラーゲン分子としてではなく、ペプチドとして抽出したことも SCP の高い回収率の一因であると考えられた。SCP のアミノ酸組成を分析した結果、主要アミノ酸組成は Gly が 34.3%、Pro が 11.6%、Ala が 11.6%、および Hyp が 6.8% であり、一般的なコラーゲンのアミノ酸組成と類似した (第 4 章にて詳述)。この結果から、調製した SCP が、ベステル・チョウザメの未利用部位に含有されるコラーゲンに由来するものであると判断した。

本研究で調製した SCP は白色、無臭であり、また、水への溶解性が非常に高かった。機能性食品や化粧品の配合原料としての CP は、白色、無臭であることが望ましい<sup>67)</sup>。従って、本研究で調製した SCP が機能性食品や化粧品の原料に適することが示唆された。先に岸村ら<sup>53)</sup>は、マヒトデ体壁から CP を調製する方法を確立した。ヒトデの体壁は脂質含量が極めて少なく脱脂処理が不要である。一方、チョウザメはその皮や鰭に脂質を多く含有し、特に採卵時の性成熟した雌性チョウザメではその含有量が高い<sup>68)</sup>。魚皮由来のコラーゲンあるいは CP は、共存する脂質に由来する魚臭が問題となる<sup>69)</sup>。また、コラーゲンあるいは CP に共存する脂質の酸化は、これらを食品や化粧品素材として利用する際に短所となる。そのため本研究では SCP 調製時に脱脂工程を導入する必要がある、永井の調製方法を一部改変した。その結果、エタノールで脱脂して調製した SCP は無臭であり、調製方法の改変が有効であることが示された。しかし、この脱脂処理はエタノールを多量に必要とする。そこで本研究ではさらに、有機溶媒代替法として超臨界二酸化炭素を用いた脱脂法の検討を行った。超臨界二酸化炭素は、臨界温度・臨界圧力を超えた状態にある二酸化炭素であり、気体様の

高い流動性・拡散性と液体様の浸透性を持つ。超臨界二酸化炭素抽出は 30°C 付近での操作が可能のため、抽出物の熱変性を抑制できる利点がある。さらに、大気圧に戻すことにより、二酸化炭素は容易に抽出物から脱溶媒できる。そのため、本抽出法は、コーヒー豆からのカフェイン抽出、ホップからのエキス抽出など、食品工業で広く用いられている<sup>65)</sup>。Table 1-3 に示した様に、エタノールで脱脂処理を行った SCP では残存脂質重量が 3.8 mg/g CP であったのに対し、超臨界二酸化炭素で脱脂処理を行った SCP-CO<sub>2</sub> では 2.0 mg/g CP、3 wt%エタノールを含む超臨界二酸化炭素で脱脂処理を行った SCP-CO<sub>2</sub>・Et では 1.8 mg/g CP であり SCP の約 1/2 倍量であった。そして、SCP 中の残存脂質に含まれるトリグリセリドの割合は、SCP では 94.5%と高値を示したが、SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et では低く、特に SCP-CO<sub>2</sub>・Et では 2.9%と低値であった (Fig. 1-4 および Table 1-4)。また、チョウザメ脂質は、DHA、EPA、リノール酸、およびオレイン酸+7-オクタデセン酸などの不飽和脂肪酸を多く含有していた (Table 1-2)。しかしながら、不飽和脂肪酸を含む試料中の残存トリグリセリドは、試料の品質劣化の原因となり得る。従って、超臨界二酸化炭素脱脂法は、エタノール脱脂法よりも脱脂効率が高く、酸化要因であるトリグリセリドを分離出来ることから、今後の SCP の実用化においてその品質や保存性向上に対して有用であると考えられる。一方、チョウザメ脂質は、石鹼や化粧品素材となるパルミチン酸やオレイン酸、生理活性機能を有する EPA や DHA を含有していた。このことから、SCP 調製時に分離したチョウザメ脂質も、工業原料や食品素材の供給源として有効利用できる可能性がある。

以上、本章では、チョウザメ未利用部位から高い収率で高品質の SCP を調製した。また、今後の SCP の実用化に向けて、超臨界二酸化炭素脱脂法はエタノール脱脂の代替法として有用であることを明らかにした。さらに、SCP 調製時に



分離されたチョウザメ脂質に有用な脂肪酸が含まれることも見出した。

## 第2章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの血糖上昇抑制作用

### 目的

第1章において、ベステル・チョウザメの未利用部位 (皮, 骨, 鰭, 鰾) からコラーゲンペプチド (SCP) を調製した。本 SCP は白色・無臭で水に易溶であり, 食品および化粧品素材として利用可能と考えられた。先に岸村らはヒトデ類から調製した CP が血糖上昇抑制作用を有することを報告しており, ヒトデ CP をペット用サプリメントとして利用するための研究・開発が成された<sup>70,53)</sup>。しかしながら, チョウザメから調製された SCP の血糖上昇抑制作用については未だ検討されていない。

そこで本章では, SCP の血糖上昇抑制作用を評価することで, その食品素材としての可能性を検討した。

### 材料および実験方法

#### 材料および試薬

##### 1. チョウザメ

チョウザメは, 第1章と同様に, 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所にて飼育されたベステル・チョウザメを用いた。

##### 2. 実験動物および器具

実験動物は, 健康体モデルマウスである ICR マウス (雄性, 日本チャールス・リバー) および健康体モデルラットである SD ラット (雄性, 日本チャールス・リバー) を用いた。

小型血糖測定器は, アキュチェック ST メーター (ロシュ DC ジャパン) およ

びグルコカードダイアメーター (ARKRAY) を使用した。シリンジは、1 および 2.5 mL シリンジ (TERUMO) を用いた。経ロゾンデは、針長 38 mm, 外径×内径=0.92×0.62 mm, Cat No.4202 および針長 78 mm, 外径×内径=1.79×1.19 mm, Cat No.5206 (FUCHIGAMI) を用いた。

### 3. 試薬

鶏卵は市場で購入した。パパインは和光純薬工業株式会社 (現 富士フィルム和光純薬株式会社) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社 (現 富士フィルム和光純薬株式会社) より特級グレードのものを購入した。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育方法

本研究の全ての動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に準じて実施した。

購入した ICR マウス (6 週齢) を一週間予備飼育した。健康状態を確認して実験に使用した。マウスの個体識別は尾へのアニマルマーカ (アズワン) を用いたラベル法により行った。マウスは、予備飼育および実験期間を通じて 23±1°C, 湿度 50±10%, 照明時間 12 時間/日 (午前 8 時～午後 8 時) の環境下で飼育した。マウスは、1 ケージあたり 4 匹収容した (本体部分が透明ポリカーボネイト樹脂製, フタ部分がステンレスワイヤー製, W 220×L 320×H 135 cm, 夏目製作所)。マウスには、実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業) およびイオン交換水 (ポリカーボネイト製給水器, 先管ステンレス製, 夏目製作所) を各々自由に与えた。

予備飼育した SD ラット (12 週齢) の健康状態を確認して使用した。ラットの

個体識別は尾へのアニマルマーカー (アズワン) を用いたラベル法により行った。ラットは、予備飼育および実験期間を通じて  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\pm 10\%$ 、照明時間 12 時間/日 (午前 8 時～午後 8 時) の環境下で飼育した。ラットは、1 ケージあたり 3～4 匹収容した (ステンレスワイヤー製金網ケージ, W 260×L 380×H 180 cm, 夏目製作所) 実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業) およびイオン交換水 (ポリカーボネイト製給水器, 先管ステンレス製, 夏目製作所) を各々自由に与えた。

## 2. SCP の調製

SCP は第 1 章の Fig. 1-1 に示した方法で調製した。

## 3. 卵白ペプチドの調製

卵白ペプチドは、市販の鶏卵から以下の方法で調製した。すなわち、鶏卵から採取した卵白に 2 倍容量 (v/w) の蒸留水および 0.2 wt% パパインを加え、 $50^{\circ}\text{C}$  で 5 時間、攪拌しながら加水分解した。加水分解物は  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10,000\times g$ 、10 分間の遠心分離に供して上清を分取した。凍結乾燥した上清の粉末は 15 倍容量 (v/w) の 99.5% エタノールに 3 時間浸漬して脱脂した。浸漬物は  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10,000\times g$ 、10 分間遠心分離し、沈殿を得た。得られた沈殿は  $60^{\circ}\text{C}$  に設定したインキュベーターに静置し、エタノールを揮発除去して得られた白色粉末を卵白ペプチドとした。

## 4. 超臨界二酸化炭素脱脂 SCP の調製

SCP- $\text{CO}_2$  および SCP- $\text{CO}_2 \cdot \text{Et}$  は、第 1 章の Fig. 1-3 の方法で調製した。

## 5. ICR マウスを用いた糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定

糖負荷試験における試料の調製は以下のように行った。すなわち、試料およびグルコースは蒸留水に溶解した。なお、SCP を生理食塩水に溶解した場合の血糖上昇抑制作用を検証するため、卵白ペプチドを用いた比較試験 (実験方法 7-2) では、試料およびグルコースは生理食塩水に溶解し、対照群として生理食塩水投与群を設定した。

蒸留水投与群に経口投与する試料は、蒸留水と 0.4 g/mL グルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重になるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。生理食塩水投与群に経口投与する試料は、生理食塩水と 0.4 g/mL グルコース生理食塩水溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重になるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。SCP 投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL SCP 水溶液と 0.4 g/mL グルコース水溶液、または 0.15 g/mL SCP 生理食塩水溶液と 0.4 g/mL グルコース生理食塩水溶液をそれぞれ混合して調製した。すなわち、SCP およびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。卵白ペプチド投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL 試料生理食塩水溶液と 0.4 g/mL グルコース生理食塩水溶液を混合して調製した。すなわち、卵白ペプチドおよびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。

また、異なる脱脂法で調製した SCP を用いた糖負荷試験における試料の調製は以下の様に行った。蒸留水投与群に経口投与する試料は、蒸留水と 0.4 g/mL グルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重になるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。SCP 投与群、SCP-CO<sub>2</sub> 投与群および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL SCP,

SCP-CO<sub>2</sub>あるいはSCP-CO<sub>2</sub>・Et水溶液と0.4 g/mLグルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、各種SCPとグルコース投与量がそれぞれ1.5および2.0 g/kg体重となるように試料を調製し、15 mL/kg体重で投与した。

## 6. SDラットを用いた糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定

蒸留水または生理食塩水投与群に経口投与する試料は、蒸留水と、グルコースを蒸留水に溶解した0.4 g/mLグルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が2.0 g/kg体重になるように試料を調製し、15 mL/kg体重で投与した。SCP投与群に経口投与する試料は、SCPを蒸留水に溶解した0.15, 0.3あるいは0.45 g/mL SCP水溶液と0.4 g/mLグルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、SCP投与量が1.5, 3.0あるいは4.5 g/kg体重、またグルコース投与量が2.0 g/kg体重となるように試料を調製し、15 mL/kg体重で投与した。

## 7. ICRマウスを用いた糖負荷試験

### 7-1. 蒸留水およびSCP投与群の比較試験

試験前日にICRマウス(7週齢)の体重を測定し、群間で体重に差がないように6匹ずつ2群(蒸留水およびSCP投与群)に分けた。マウスは試験前日の午後5時より絶食をさせ、16時間後の午前9時より試験を開始した。

はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、小型血糖測定器を用いて初期血糖値を測定した。次いで、各群のマウスに、試料をシリンジおよび経口ゾンデを用いて経口投与した。投与直後の時間を0分としてその後15, 30, 60, 120分の血糖値を測定した。

## 7-2. 生理食塩水, SCP および卵白ペプチド投与群の比較試験

試験前日に ICR マウス (8 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差がないように 7~8 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP および卵白ペプチド投与群) に分けた。糖負荷試験は第 2 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。

## 7-3. 蒸留水, SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群の比較試験

試験前日に ICR マウス (7 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差がないように 6 匹ずつ 4 群 (蒸留水, SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群) に分けた。糖負荷試験は, 第 2 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。

## 8. SD ラットを用いた糖負荷試験

試験前日に SD ラット (12 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差がないように 3~4 匹ずつ 4 群 (蒸留水, 1.5 g-SCP, 3.0 g-SCP および 4.5 g-SCP 投与群) に分けた。糖負荷試験は第 2 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。

## 9. 統計処理

糖負荷試験で得られた各群の血糖値および血糖値総和 (血糖上昇曲線下面積; 初期血糖値を基線とし, 糖負荷後 120 分までの血糖値変動曲線との間の面積を台形公式により算出したもの) は, 平均値および標準誤差を算出し, 各群間の有意差検定を行った。対照群と一試験群の二群間の有意差検定は, 正規性に応じて, Student の *t* 検定または Mann-Whitney の *U* 検定を用いて行った。対照群と複数の試験群および各試験群間の有意差検定は, 正規性に応じて, 一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 法による多重比較検定を, または Kruskal-Wallis 法による分散分析に続けて Steel-Dwass 法または Shirly-Williams 法

による多重比較検定を用いて行った。有意水準は危険率 5% ( $p<0.05$ ) および 1% ( $p<0.01$ ) とし、 $p<0.05$  は統計学的に有意、 $p<0.01$  は統計学的に極めて有意とした。有意差検定は、4Steps エクセル統計第 3 版 (オーエムエス出版, 2011) 付属エクセルアドインソフト Statcel3 または 4Steps エクセル統計第 4 版 (オーエムエス出版, 2015) 付属エクセルアドインソフト Statcel4 を用いた。



## 結果

### 1. SCP の血糖上昇抑制作用

本実験は、第2章 実験方法 5, 6, 7-1 および 8 により行った。

ICR マウスを用いた経口糖負荷試験の結果を Figs. 2-1 および 2-2 に示す。

Fig. 2-1 に示した様に、蒸留水投与群の血糖値は、糖負荷後速かに上昇して 30 分後に最大値 ( $332 \pm 27$  mg/dL) に達し、その後徐々に低下して 120 分後に  $140 \pm 11$  mg/dL となった。一方、SCP 投与群の血糖値は、蒸留水投与群と同様の経時変化を示したが、糖負荷 15 分 ( $236 \pm 14$  mg/dL) および 30 分 ( $240 \pm 17$  mg/dL) 後の血糖値は蒸留水投与群のそれらと比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。また、Fig. 2-2 に示した様に、本糖負荷試験における SCP 投与群の血糖値総和 ( $12,598 \pm 840$  mg/dL  $\cdot$  2h) は、蒸留水投与群のそれ ( $17,698 \pm 1756$  mg/dL  $\cdot$  2h) に対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。

次に、SD ラットを用いた経口糖負荷試験の結果を Figs. 2-3 および 2-4 に示す。

Fig. 2-3 に示した様に、蒸留水投与群の血糖値は、糖負荷後速かに上昇して 60 分後に最大値 ( $184 \pm 14$  mg/dL) に達し、その後徐々に低下して 120 分後に  $127 \pm 8$  mg/dL となった。一方、SCP 投与群の血糖値は、15 分後に最大値 ( $142 \pm 4$  mg/dL) に達し、その後僅かに低下した。糖負荷 30 および 60 分後において、SCP 投与群の血糖値は蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。また、Fig. 2-4 に示した様に、SCP 投与群の血糖値総和 ( $4,579 \pm 335$  mg/dL  $\cdot$  2h) は、蒸留水投与群のそれ ( $6,580 \pm 560$  mg/dL  $\cdot$  2h) に対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。

以上の様に、マウスおよびラットを用いたいずれの糖負荷試験においても、SCP は血糖上昇抑制作用を示した。

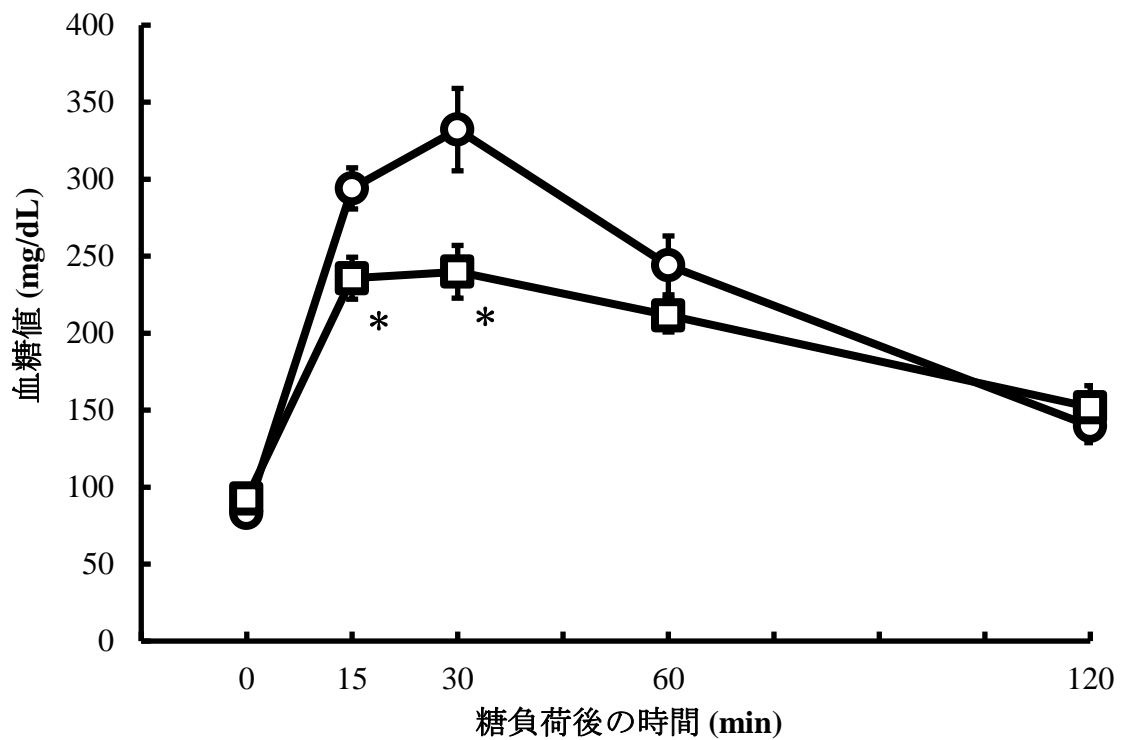


Fig. 2-1 ICR マウスを用いた経口糖負荷試験

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

・糖負荷 15 および 30 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Student の  $t$  検定を用いた)

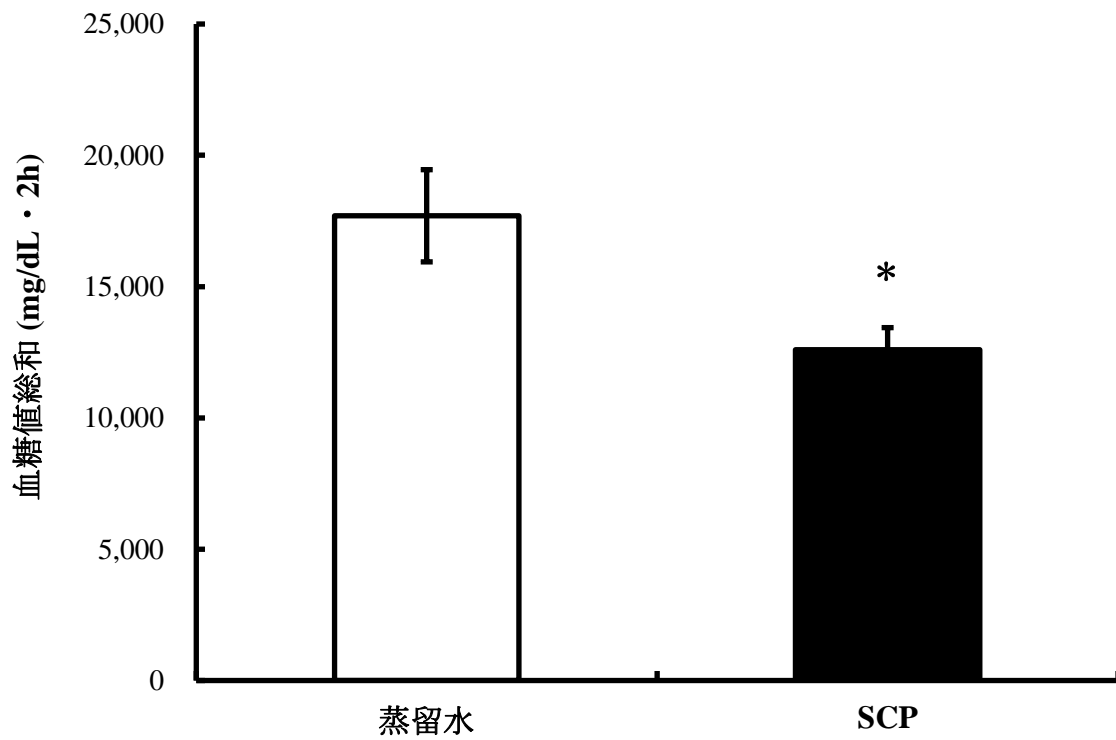


Fig. 2-2 ICR マウスを用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

・両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Student の  $t$  検定を用いた)

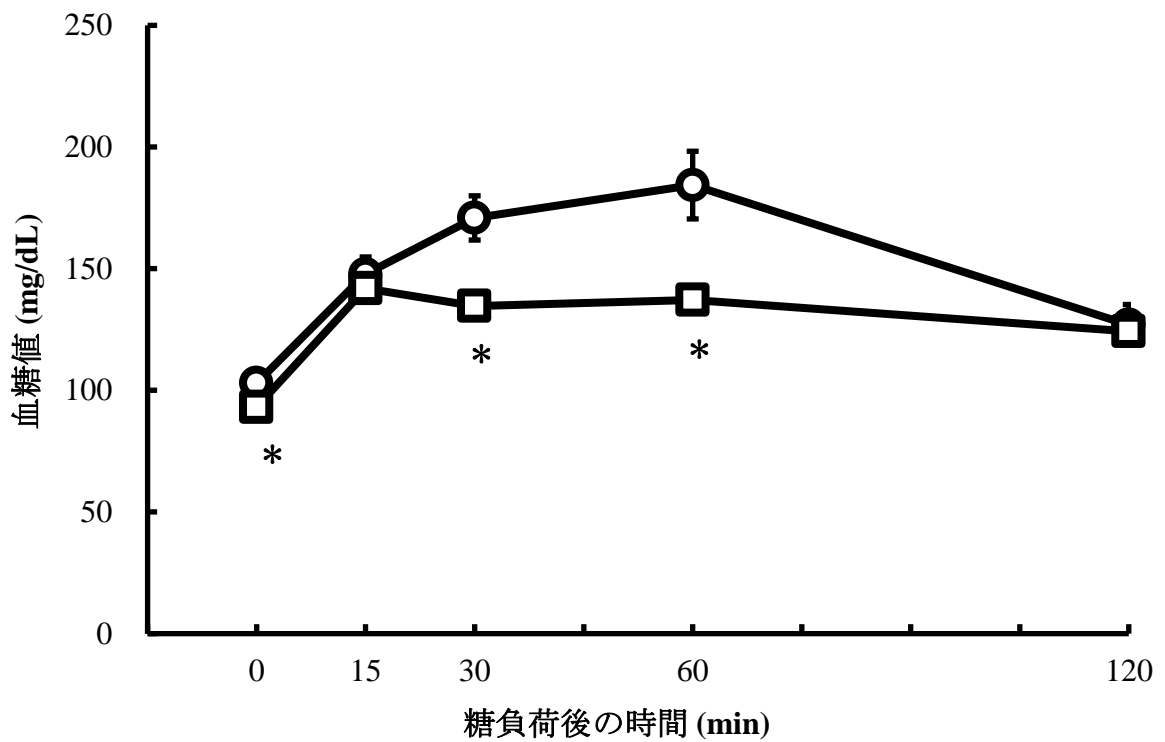


Fig. 2-3 SD ラットを用いた経口糖負荷試験

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

・糖負荷 0, 30 および 60 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

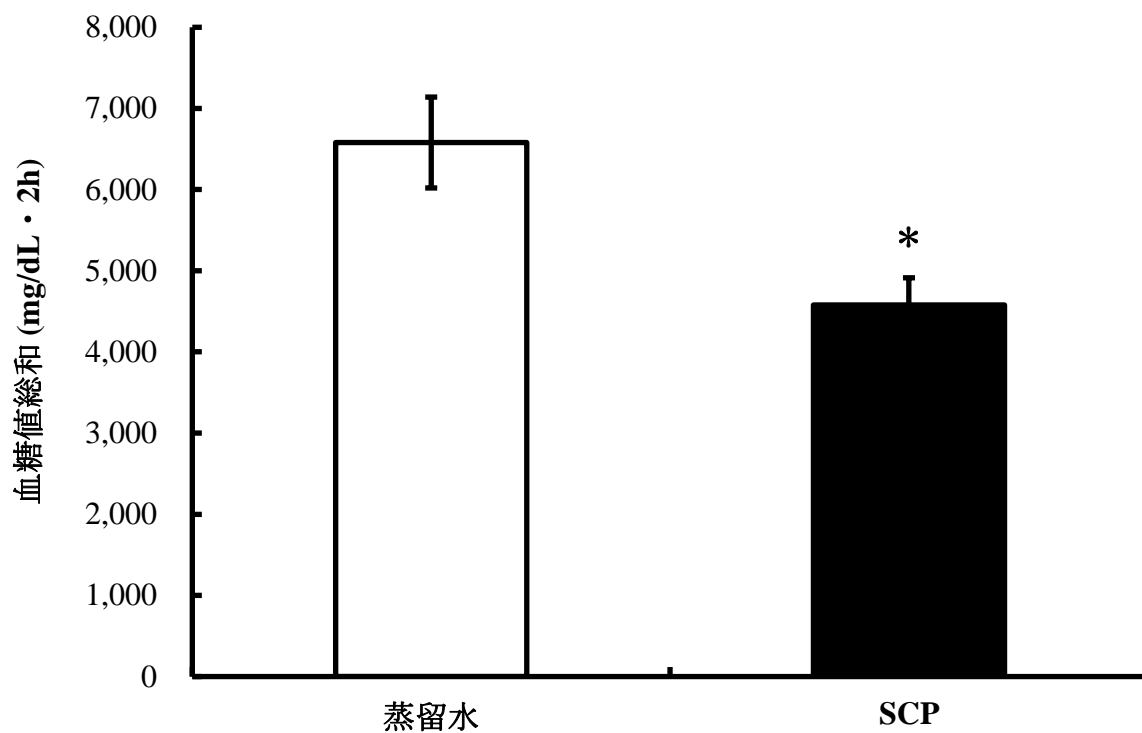


Fig. 2-4 SD ラットを用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

・両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

## 2. SD ラットを用いた経口糖負荷試験における SCP 投与濃度の影響

上記の様に、マウスおよびラットを用いたいずれの糖負荷試験においても、SCP が血糖上昇抑制作用を示すことが明らかになった。そこで本項では、SD ラットを用いた経口糖負荷試験における SCP 投与濃度の影響について検討した。

本実験は、第 2 章 実験方法 6 および 8 により行った。

SD ラットを用いた経口糖負荷試験の結果、Fig. 2-5 に示した様に、蒸留水投与群の血糖値は、糖負荷後速かに上昇して 60 分後に最大値 ( $184 \pm 14$  mg/dL) に達した。その後徐々に低下して 120 分後に  $127 \pm 8$  mg/dL となった。一方、SCP-1.5 g 投与および SCP-3.0 g 投与群の血糖値は、蒸留水投与群と異なり、糖負荷 15 分後に最大値 (それぞれ、 $142 \pm 4$  および  $130 \pm 2$  mg/dL) に達したが、SCP-4.5 g 投与群の血糖値は、糖負荷 30 分後に最大値 ( $141 \pm 0$  mg/dL) に達した。また、いずれの試験投与群の血糖値も、糖負荷 30 分および 60 分後において蒸留水投与群のそれらと比較して有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) に低値を示した。

次に、本試験における血糖値総和を Fig. 2-6 に示す。図に示した様に、蒸留水投与群 ( $6,580 \pm 560$  mg/dL $\cdot$ 2h) に対して、SCP-3.0 g 投与群 ( $2,813 \pm 461$  mg/dL $\cdot$ 2h) , SCP-4.5 g 投与群 ( $3,910 \pm 216$  mg/dL $\cdot$ 2h) , SCP-1.5 g 投与群 ( $4,579 \pm 335$  mg/dL $\cdot$ 2h) の順に血糖値総和が低値を示し、いずれの試験投与群の血糖値総和も蒸留水投与群のそれに対して有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) に低値を示した。

以上のことから、SD ラットを用いた経口糖負荷試験においては、SCP 投与濃度は 3.0 g/kg 体重が最も効果的であることが示唆された。

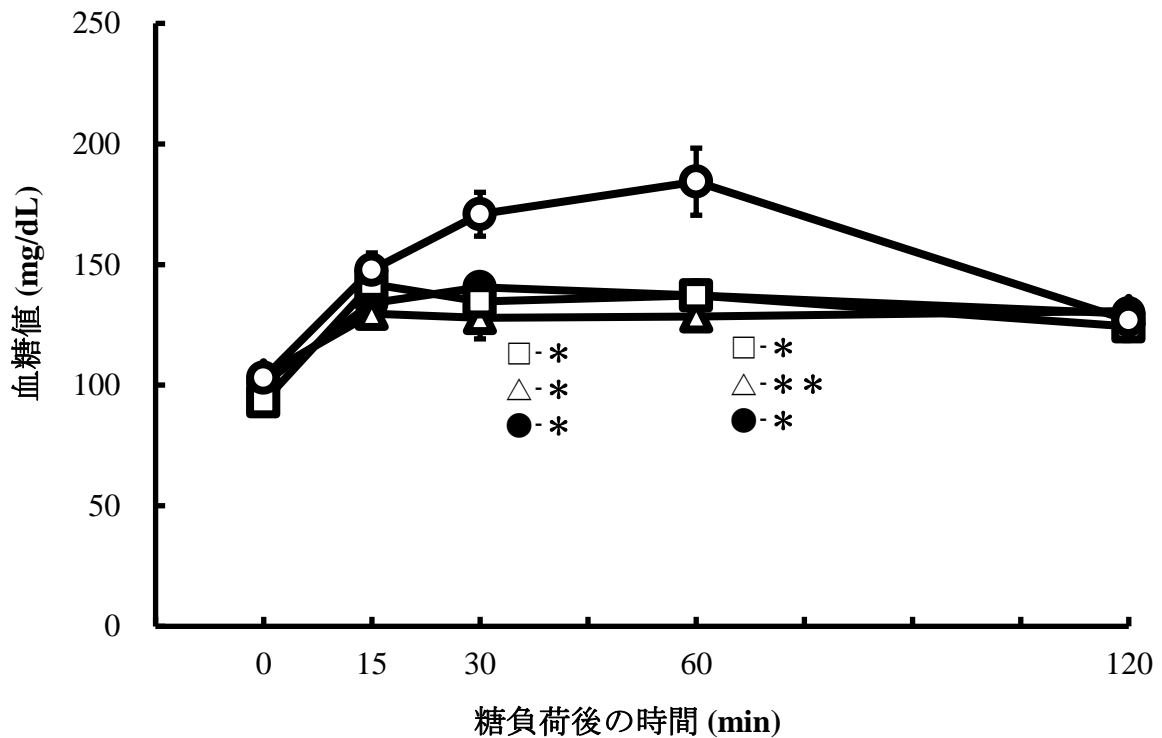


Fig. 2-5 SD ラットを用いた経口糖負荷試験における SCP 投与濃度の影響

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

□: SCP-1.5 g 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

△: SCP-3.0 g 投与群 (3.0 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

●: SCP-4.5 g 投与群 (4.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

・糖負荷 15 分後において、蒸留水投与群と SCP-1.5 g 投与群、SCP-3.0 g 投与群 および SCP-4.5 g 投与群間にそれぞれ有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

・糖負荷 30 分後において、蒸留水投与群と SCP-1.5 g 投与群間および SCP-4.5 g 投与群間に有意 (\*;  $p < 0.05$ )、蒸留水投与群と SCP-3.0 g 投与群間に極めて有意 (\*\*;  $p < 0.01$ ) 差あり。

(Shirly-Williams 法を用いた)

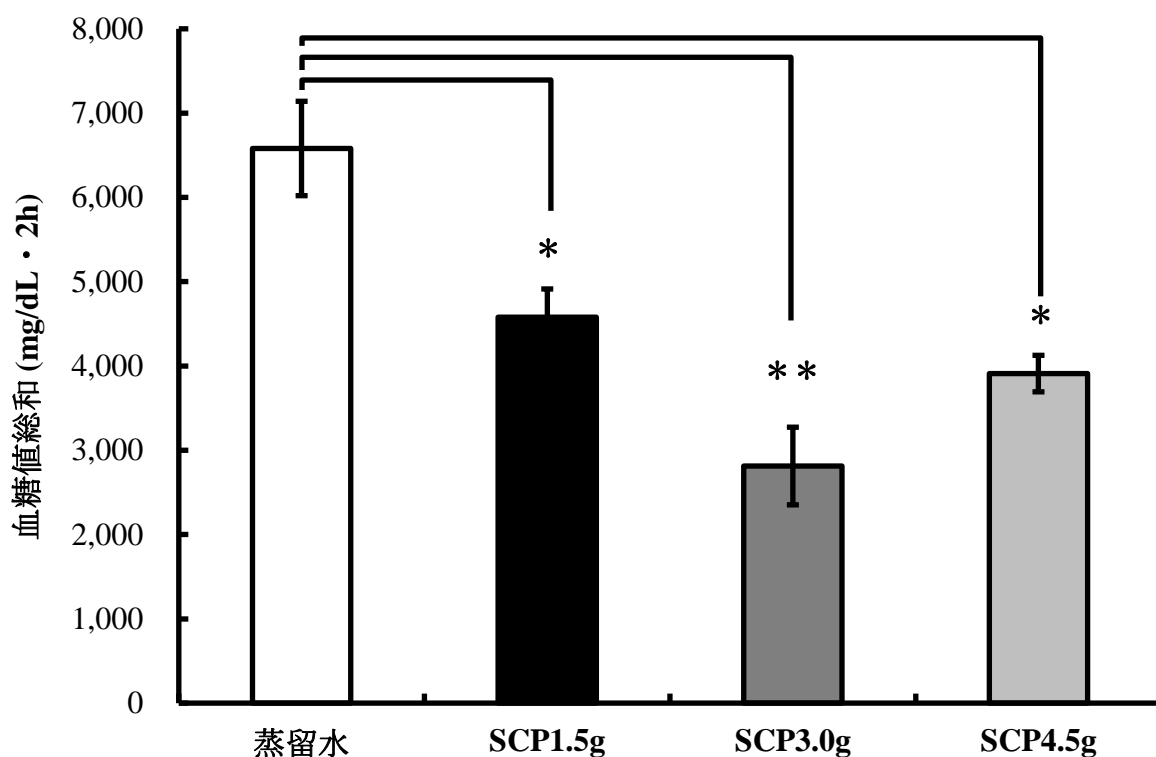


Fig. 2-6 SD ラットを用いた糖負荷試験における血糖値総和に対する SCP 濃度の影響

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

SCP1.5 g: SCP-1.5 g 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

SCP3.0 g: SCP-3.0 g 投与群 (3.0 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

SCP4.5 g: SCP-4.5 g 投与群 (4.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)

- ・ 蒸留水投与群と SCP-1.5 g 投与群間および SCP-4.5 g 投与群間に有意 (\*;  $p < 0.05$ ), 蒸留水投与群と SCP-3.0 g 投与群間に極めて有意に (\*\*;  $p < 0.01$ ) 差あり。

(Shirly-Williams 法を用いた)



### 3. SCP と他のタンパク質加水分解物の血糖上昇抑制効果の比較

マウスおよびラットを用いたいずれの経口糖負荷試験においても、SCP が血糖上昇抑制作用を示すことが明らかになった。そこで本項では、SCP の血糖上昇抑制作用効果を他のタンパク質加水分解物のものと比較するため、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験において検討した。本研究では、日本人が日常的に食する鶏卵の卵白由来タンパク質の加水分解物 (卵白ペプチド) を調製し、SCP の血糖上昇抑制効果を卵白ペプチドのそれと比較した。

本実験は、第 2 章 実験方法 5 および 7-2 により行った。

その結果を Fig. 2-7 に示す。卵白ペプチド投与群の血糖値は、生理食塩水投与群のものとほぼ同様の経時変化を示し、糖負荷後速かに上昇して 30 分後に最大値 ( $238 \pm 19$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下して 120 分後に  $126 \pm 10$  mg/dL となった。生理食塩水投与群と卵白ペプチド投与群の両群間で、各測定時間の血糖値に有意差は認められなかった。一方、SCP 投与群の血糖値は、糖負荷 30 分後に最大値 ( $195 \pm 13$  mg/dL) に達し、その後徐々に低下して 120 分後に  $129 \pm 8$  mg/dL となった。そして、糖負荷 15 分後において、SCP 投与群の血糖値は生理食塩水投与群および卵白ペプチド投与群のそれら対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。糖負荷 30 分後においては、SCP 投与群の血糖値は卵白ペプチド投与群に比べて低い傾向を示したものの、統計学的な有意差はなかった。しかし、生理食塩水投与と比べると有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった。また、本試験における血糖値総和を Fig. 2-8 に示す。図の様に、SCP 投与群の血糖値総和 ( $8,805 \pm 846$  mg/dL  $\cdot$  2h) は、生理食塩水投与群および卵白ペプチド投与群のそれらと比べて有意な差は認められなかったが、値が低い傾向が認められた。

これらの結果から、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験において、SCP は卵白ペプチドよりも高い血糖上昇抑制効果を示す可能性が示唆された。

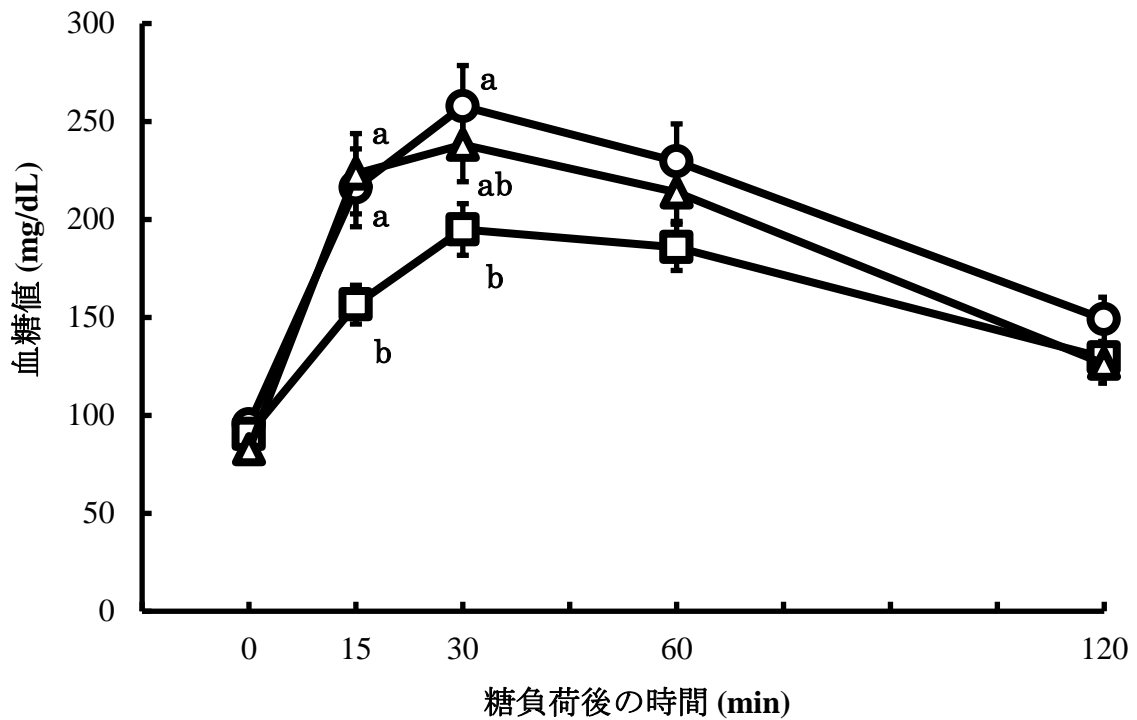


Fig. 2-7 ICR マウスを用いた経口糖負荷試験

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=8)

△: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

- ・糖負荷 15 分後において蒸留水投与群と SCP 投与群および卵白ペプチド投与群と SCP 投与群の間にそれぞれ有意差あり ( $p<0.05$ )。
- ・糖負荷 30 分後において蒸留水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)。

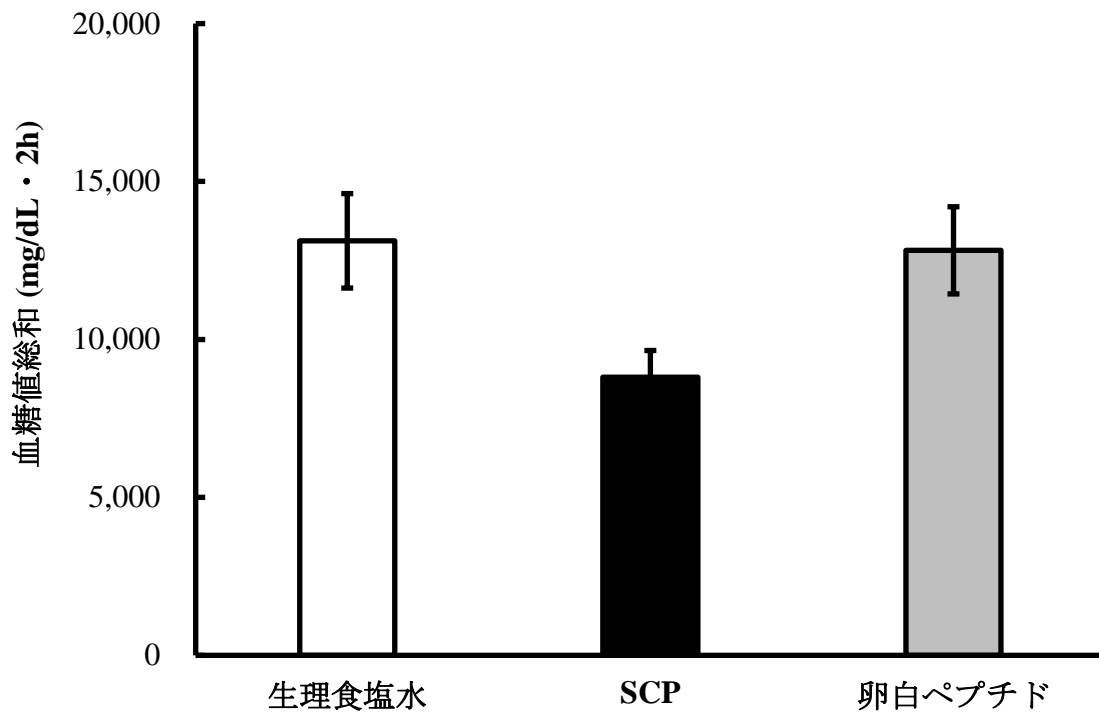


Fig. 2-8 ICR マウスを用いた糖負荷試験における血糖値総和の比較

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP /kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=8)

卵白ペプチド: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

・いずれの群間においても有意差無し。

(Kruskal-Wallis 法を用いた)

#### 4. 異なる脱脂法で調製した SCP の血糖上昇抑制効果の比較

本研究において、超臨界二酸化炭素を用いた脱脂法により 2 種類の SCP (SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et) を調製した。そこで、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験により、SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et の血糖値上昇抑制効果をエタノール脱脂法により調製した SCP のそれと比較検討した。

本実験は、第 2 章 実験方法 5 および 7-3 により行った。

その結果を Fig. 2-9 に示す。図の様に、SCP 投与群の血糖値は、糖負荷 15, 30 および 60 分後に蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。SCP-CO<sub>2</sub> 投与群および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群の血糖値は、糖負荷 15 および 30 分後に蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。また、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 2-10 に示す。SCP 投与群の血糖値総和は、蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。一方、SCP 投与群、SCP-CO<sub>2</sub> 投与群および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群の各群間に有意差は認められなかった。

以上のように、超臨界二酸化炭素を用いた脱脂法で調製した SCP は、エタノール脱脂法で調製した SCP と同等の血糖上昇抑制効果を示した。このことから、超臨界二酸化炭素による脱脂処理は、SCP の血糖上昇抑制機能に影響を及ぼさないことが示唆された。

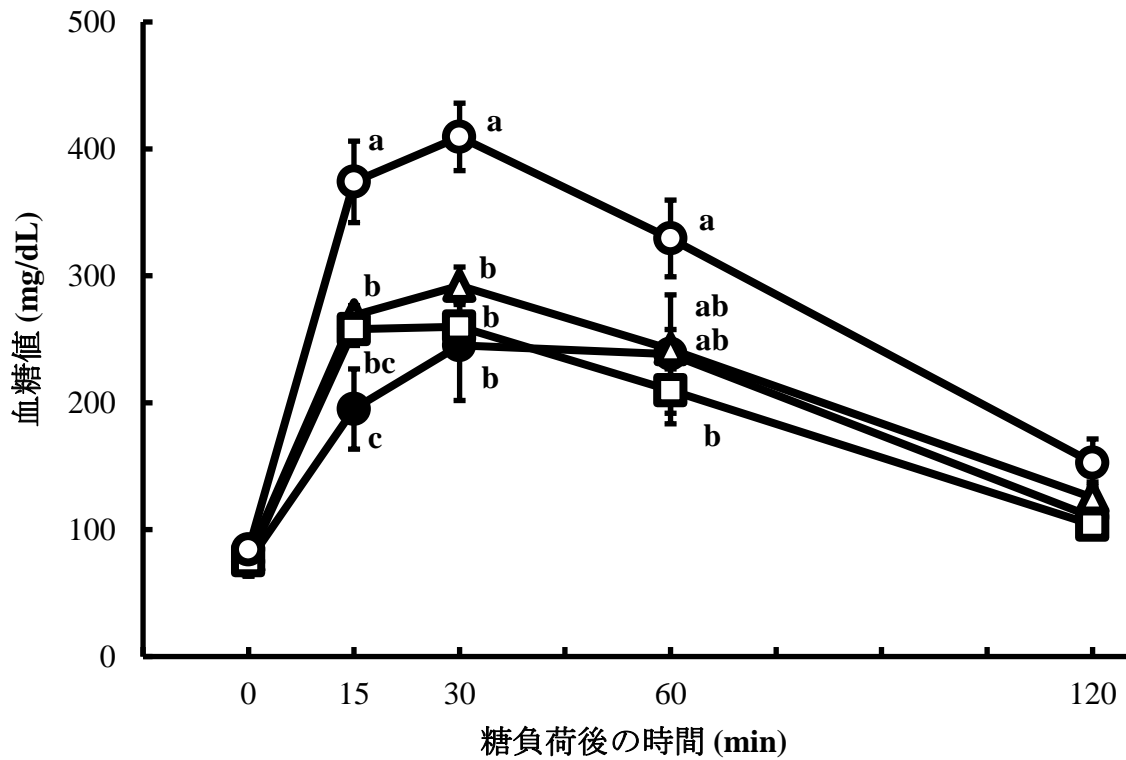


Fig. 2-9 ICR マウスを用いた経口糖負荷試験

- : 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)
- △: SCP-CO<sub>2</sub> 投与群 (1.5 g SCP-CO<sub>2</sub>/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)
- : SCP-CO<sub>2</sub> · Et 投与群 (1.5 g SCP-CO<sub>2</sub> · Et/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

- ・糖負荷 15 後において、蒸留水投与群と SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub> · Et 投与群, SCP-CO<sub>2</sub> 投与群と SCP-CO<sub>2</sub> · Et 投与群の間に有意差あり (p<0.05)。
  - ・糖負荷 30 分後において、蒸留水投与群と SCP, SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub> · Et 投与群の間に有意差あり (p<0.05)。
  - ・糖負荷 60 分後において、蒸留水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり (p<0.05)。
- 糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)。

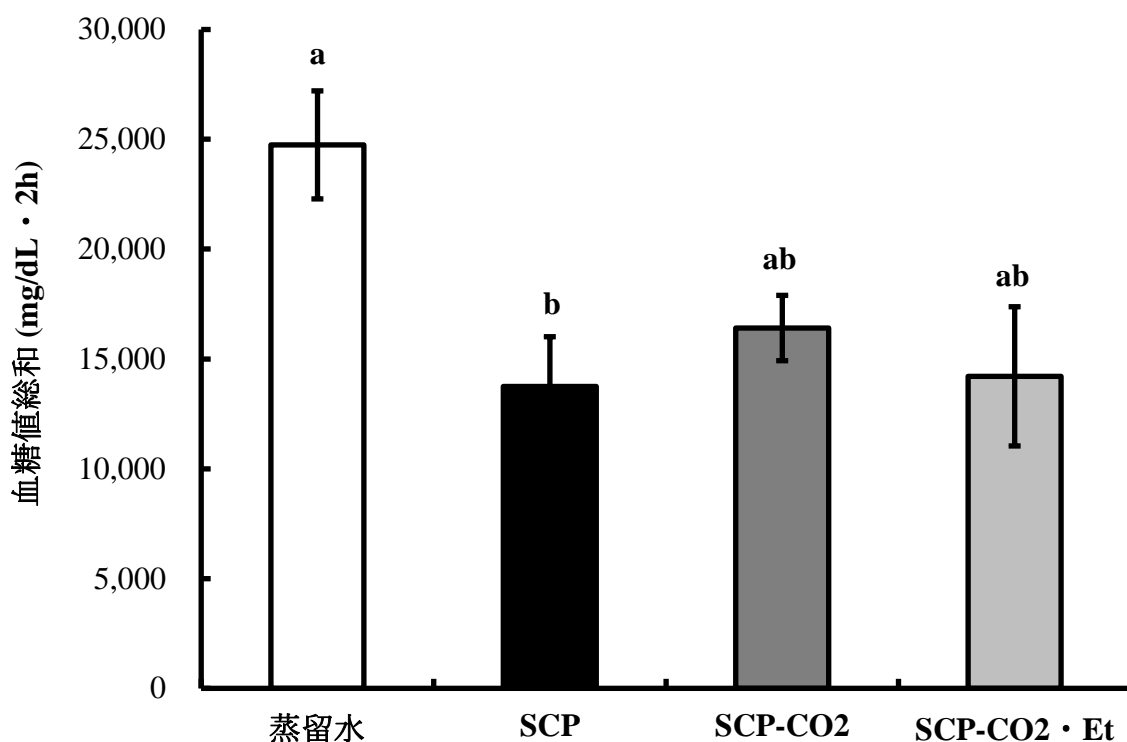


Fig. 2-10 ICR マウスを用いた経口糖負荷試験における血糖値総和の比較

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

SCP-CO<sub>2</sub>: SCP-CO<sub>2</sub> 投与群 (1.5 g SCP-CO<sub>2</sub>/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

SCP-CO<sub>2</sub> · Et: SCP-CO<sub>2</sub> · Et 投与群 (1.5 g SCP-CO<sub>2</sub> · Et/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

・ 蒸留水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり (p<0.05)

異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)。

## 小考察

本章では、最初に、ICR マウスを用いて経口糖負荷試験を行った。その結果、SCP 投与群の血糖値は蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した (Figs. 2-1 および 2-2)。次に、SD ラットを用いて経口糖負荷試験を行った結果、SCP 投与群の血糖値は蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した (Figs. 2-3 および 2-4)。これら結果から、SCP は血糖上昇抑制作用を示すことが明らかになった。本実験では、血糖上昇抑制作用が表れる時間が ICR マウスと SD ラットで異なった。岸村ら<sup>53)</sup>は、マヒトデ体壁由来 CP の糖負荷試験において、ICR マウスでは糖負荷 15 および 30 分後に、SD ラットでは糖負荷 30 および 60 分後に、蒸留水投与群の血糖値に対して有意 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) に低値を示すことを報告した。このような実験動物による差異は、動物の胃の大きさと滞留時間の長さにより生じると考えられる。ラットはマウスよりも胃の容量がより大きいいため、ラットの胃から小腸へのグルコース排出がマウスのそれより遅くなる。そのため、小腸でグルコースの吸収が開始される時間が遅延し、血糖上昇に至る経過時間が延長されたと考えられる。したがって、作用が表れるまでの時間差は実験動物の種類に起因すると考えられた。

SCP が血糖上昇抑制作用を有することが明らかになったため、SD ラットを用いた経口糖負荷試験において、SCP 投与濃度の影響について検討を行った。その結果、SD ラットの体重 1 kg あたり 3.0 g 投与した際に最も強い血糖上昇抑制効果が認められた (Figs. 2-5 および 2-6)。0.45 g/mL SCP 水溶液は 0.3 g/mL SCP 水溶液に比べて濃度が高いため、SCP 水溶液の粘度が増してグルコースの吸収がより強く阻害されると予測したが、0.45 g/mL SCP 水溶液より 0.3 g/mL SCP 水溶液の方がより強い血糖上昇抑制作用を示した。この結果は、SCP 水溶液の粘度はグルコースの吸収阻害に寄与しないが、SCP の濃度は血糖上昇抑制作用に

影響を及ぼすことを示唆する。すなわち、SCP は小腸から吸収された後、生体内で血糖上昇抑制作用を示す可能性がある（これについては第3章で詳述する）。

次に、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験により、超臨界二酸化炭素脱脂を行った SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et の血糖上昇抑制作用を、エタノール脱脂を行った SCP のそれと比較した。その結果、SCP-CO<sub>2</sub> 投与群および SCP-CO<sub>2</sub>・Et 投与群の血糖値は、糖負荷 15 および 30 分後に蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した (Fig. 2-9)。この結果は、超臨界二酸化炭素脱脂処理が SCP の血糖上昇抑制作用に影響を及ぼさないことを示す。一方、超臨界二酸化炭素脱脂処理の際の圧力 (250 bar) により、SCP が分解され低分子化した可能性が考えられる。しかし、CP の血糖上昇抑制作用に関する既報から、CP の分子量と血糖上昇抑制作用の間には相関が無いことが明らかとなっている (第4章にて詳述)。したがって、超臨界二酸化炭素脱脂処理により SCP が低分子化した場合でも、SCP の血糖上昇抑制作用は影響を受けないと考えられる。また、超臨界二酸化炭素脱脂法により高度に脂質を除去した試料に血糖上昇抑制作用が認められたことから、作用物質は脂質ではなくペプチドであることが再確認された。

本研究では、SCP が血糖上昇抑制作用を有すること、そしてその主要因子が CP であることを明らかにしたが、その作用効果を他のタンパク質加水分解物のものと比較し、SCP の血糖上昇抑制剤としての優位性を評価する必要があると考えた。そこで、日本人が日常的に食する鶏卵の卵白由来タンパク質の加水分解物 (卵白ペプチド) を調製し、SCP の血糖上昇抑制効果を卵白ペプチドのそれと比較した。その結果、卵白ペプチドには殆ど血糖上昇抑制作用が認められなかった (Figs. 2-7 および 2-8)。卵白は、オボアルブミンやリゾチームなど種々のタンパク質から構成されるが、コラーゲンを含まない。したがって、血糖上昇



抑制作用は、コラーゲンから調製された CP に特有の作用であると考えられた。Gannon ら<sup>71)</sup>の報告によると、糖尿病患者に種々のタンパク質 (牛肉, 七面鳥肉, ゼラチン, 卵白, カッテージチーズ, 魚肉, 大豆) とグルコースを摂取させた結果, 卵白摂取群を除き, いずれの摂取群も血糖値が低値を示した。特に, 七面鳥肉摂取群, ゼラチン摂取群およびカッテージチーズ摂取群で, 対照群との間に有意差が認められた。牛乳や乳製品は, 食後血糖値の上昇を抑制し<sup>72)</sup>, その作用物質は $\beta$ -ラクトグロブリン,  $\alpha$ -ラクトアルブミンおよびウシ血清である<sup>73)</sup>。一方, ゼラチンは動物の結合組織を加熱して得られる。報告で用いられた七面鳥肉は加熱調理されたものと推測できるため, 七面鳥肉摂取群は七面鳥肉の結合組織に由来するゼラチンを摂取した可能性が高い。したがって, 七面鳥肉およびゼラチン摂取群における作用物質は, コラーゲンが変性したゼラチンである可能性が考えられる。SCP およびゼラチンが血糖上昇抑制作用を示すことは, コラーゲンに特有の三重らせん構造は作用に寄与しないことを示唆する。一方, コラーゲン線維を形成するコラーゲン分子の各サブユニット鎖の大部分は, 「Gly-X-Y」 (X, Y は任意のアミノ酸) の繰り返し配列から成る<sup>27)</sup>。したがって, SCP およびゼラチンは, いずれも類似のアミノ酸配列を有するペプチド, または類似のアミノ酸組成のペプチドと考えられる。すなわち, 血糖値上昇抑制作用は「Gly-X-Y」のアミノ酸配列または Gly を豊富に含むアミノ酸組成に起因する可能性がある (これについては第 4 章で詳述する)。

以上, 本章では, SCP の血糖上昇抑制作用を見出した。また, 高度に脂質を除去した試料も血糖の上昇を抑制することから, SCP が血糖上昇抑制作用の主要因子であり, グルコースの体内動態に何らかの影響を及ぼすことを明らかにした。そこで次章では, SCP が体内でグルコースの挙動に及ぼす影響を検討し, 血糖上昇抑制の作用機構の解明を試みた。

### 第3章 チョウザメコラーゲン・ペプチドの血糖上昇抑制機構の解明

#### 目的

先に福盛田ら<sup>74-77)</sup>は、スルメイカ内臓由来トリプシン・インヒビターの血糖上昇抑制作用について研究を行った。その結果、本インヒビターは、健康体モデル Wistar 系ラットに対しては血糖上昇抑制効果を示さず、2 型糖尿病モデル GK ラットに対してのみ血糖上昇抑制効果を示した。福盛田ら<sup>74-77)</sup>は、本インヒビターがタンパク質分解酵素による消化を受けずに小腸に到達すること、および、本インヒビターのラットへの経口投与により消化ホルモン (ガストリン, ガストロキニン, コレシストキニン) の分泌が有意に増加することを実証した。以上の結果を基に、本インヒビターの血糖上昇抑制の作用機構は、消化ホルモンを介したインスリン分泌促進であると結論した。一方、岸村ら<sup>53)</sup>は、ヒトデ類体壁由来 CP の血糖上昇抑制作用について検討した。その結果、ヒトデ CP は、健康体モデルである Wistar 系ラットおよび ICR マウスに対して血糖上昇抑制効果を示し、スルメイカ由来トリプシン・インヒビターと血糖上昇抑制の作用機構が異なるものと推察された。そして、岸村ら<sup>53)</sup>は、ヒトデ CP の血糖上昇抑制作用機構が、主に胃内でのグルコース滞留時間の延長および小腸でのグルコース透過阻害であると考察した。

第2章において、本研究で調製した SCP も健康体モデル ICR マウスおよび SD ラットに対して血糖上昇抑制効果を示した。そこで本章は、SCP が体内でグルコースの挙動に及ぼす影響 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害能, 胃内グルコース滞留能, 小腸でのグルコース透過阻害能, インスリン分泌促進能, GLP-1 分泌促進能および DPP-IV 阻害能) を検討し、その血糖上昇抑制の作用機構の解明を試みた。

## 材料および実験方法

### 材料および試薬

#### 1. チョウザメ

チョウザメは、第 1 章と同様に、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所にて飼育されたベステル・チョウザメを用いた。

#### 2. 実験動物および器具

実験動物は、健康体モデルマウスである ICR マウス (雄性, 日本チャールス・リバー) および健康体モデルラットである SD ラット (雄性, 日本チャールス・リバー) を用いた。

小型血糖測定器は、アキュチェック ST メーター (ロシュ DC ジャパン) およびグルコカードダイアメーター (ARKRAY) を使用した。シリンジは、1, 2.5 および 5 mL シリンジ (TERUMO) を用いた。経口ゾンデは、針長 38 mm, 外径×内径=0.92×0.62 mm, Cat No.4202 および針長 78 mm, 外径×内径=1.79×1.19 mm, Cat No.5206 (FUCHIGAMI) を用いた。採血管は、Micro hematocrit tubes N-heparinized, 80 IU/mL (NRIS) を用いた。クレンメは、動脈クレンメ 直型 (夏目製作所) を用いた。注射針は、針長 1/2” (13 mm), ゲージ 26G (0.45 mm), 刃形 S・B および針長 3/4” (19 mm), ゲージ 27G (0.4 mm), 刃形 S・B (TERUMO) を用いた。

#### 3. 試薬

パパインは Sigma-Aldrich および和光純薬工業株式会社 (現 富士フイルム和光純薬株式会社) より購入した。ラット小腸アセトン粉末は Sigma-Aldrich より購入した。生理食塩水は大塚製薬株式会社より購入した。ブドウ糖標準液, 西洋

ワサビ由来ペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.7), ウシ膵臓由来アプロチニン, ヘパリンおよびその他の試薬は和光純薬工業株式会社 (現 富士フイルム和光純薬株式会社) より特級グレードのものを購入し, 用いた。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育方法

動物の飼育は, 第 2 章 実験方法 1 と同様の方法で行った。

### 2. SCP の調製

SCP は, 第 1 章の Fig. 1-1 に示した方法で調製した。

### 3. $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼ阻害能試験

#### 3-1. 粗 $\alpha$ -グルコシダーゼ-インベルターゼの調製

ラット小腸アセトン粉末 10 g は 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し, 超音波処理した。その後, 5°C, 1,007×g で 30 分間遠心分離を行い, 得られた上清を粗  $\alpha$ -グルコシダーゼ-インベルターゼとして使用した。マルトース分解活性阻害の測定は粗  $\alpha$ -グルコシダーゼ-インベルターゼを 1/4 倍希釈して使用し, スクロース分解活性阻害の測定は粗  $\alpha$ -グルコシダーゼ-インベルターゼ原液を用いた。

#### 3-2. 試料の調製

終濃度 0, 10, 50, 100, 200 mg/mL の SCP 水溶液を調製した。ポジティブコントロールは, 1-デオキシノジリマイシンを用いた。

### 3-3. グルコース定量発色試薬の調製

グルコース定量発色試薬は、グルコース CII-テストワコー [和光純薬工業株式会社 (現 富士フイルム和光純薬株式会社)] の構成試薬である発色剤の組成に準拠して、500 mL の 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 5.3 mM の 4-アミノアンチピリン、5.3 mM のフェノール、2,900 units (U) のグルコースオキシダーゼおよび 355 U のペルオキシダーゼを溶解して調製した。本発色試薬は、調製ごとに検量線を作成して使用した。検量線は、本発色試薬 3.0 mL にグルコース溶液 (終濃度 0~500 mg/dL) を 20  $\mu$ L 添加し、37°C で 30 分間インキュベートした後、505 nm における吸光度を測定して作成した。

### 3-4. $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼ阻害活性の測定

$\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼ阻害活性は、Ohta らの方法<sup>78)</sup>に準じて行った。すなわち、70  $\mu$ L の 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0)、10  $\mu$ L の 500 mM マルトース溶液またはスクロース溶液および 10  $\mu$ L の SCP 水溶液を試験管内で混合した。そこに 10  $\mu$ L の粗  $\alpha$ -グルコシダーゼ-インベルターゼを添加し、37°C で 1 時間インキュベートしてマルトースおよびスクロースの分解を行った。インキュベート後、2.0 M マレイン酸-トリス-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) を 100  $\mu$ L 添加して酵素反応を停止し、この混合溶液 20  $\mu$ L にグルコース定量発色試薬を 3.0 mL 添加してグルコース重量を定量した。マルトースおよびスクロース分解阻害率は、以下の式により算出した。

分解阻害率 (%) =

$$100 - \frac{\text{試料を添加して反応させた際の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}}{\text{蒸留水を添加して反応させた際の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}} \times 100$$

#### 4. 胃内グルコース滞留能試験

##### 4-1. 試料の調製および投与量の設定

第2章 実験方法5と同様の方法で行った。すなわち、蒸留水投与群に経口投与する試料は、蒸留水と 0.4 g/mL グルコース水溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重になるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。SCP 投与群に経口投与する試料は、SCP およびグルコースをそれぞれ蒸留水に溶解して 0.15 g/mL SCP 水溶液および 0.4 g/mL グルコース水溶液を調製し、これらを混合して調製した。すなわち、SCP およびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で投与した。

##### 4-2. 試料投与、胃摘出および胃内グルコース重量の定量

試験前日に ICR マウス (10 週齢) 24 匹の体重を測定し、群間に差がないように 12 匹ずつ 2 群 (蒸留水および SCP 投与群) に分けた。試験前日の午後 5 時より絶食させ、16 時間後の午前 9 時より試験を開始した。

はじめに、両群のマウスに、試料をシリンジおよび経口ゾンデを用いて経口投与した。試料投与直後の時間を 0 分とし、投与 0, 15, 30, 60, 120 分後にマウスを炭酸ガスで屠殺し、即座に開腹して食道と胃の幽門部をクレンメで結さくした後、胃を摘出した。摘出した胃は解剖バサミで切開後、内部を 1 mL の生理食塩水で 3 回洗浄した。胃内溶液および洗浄液を混合し、5°C で 448×g, 10 分間の遠心分離に供して夾雑物を沈殿除去した。遠心分離後の上清を回収し、上清中のグルコース重量 (胃内グルコース重量) はグルコース定量発色試薬を用いて定量した。胃内グルコース残存率は、以下の式により算出した。

$$\text{胃内グルコース残存率 (\%)} = \frac{\text{胃内グルコース重量 (g)}}{\text{グルコース投与重量 (g)}} \times 100$$

## 5. 糞中へのグルコース排泄能試験

### 5-1. 試料の調製および投与量の設定

第3章 実験方法 4-1 と同様の方法で行った。

### 5-2. 試料投与, 糞回収および糞中グルコース重量の定量

試験前日に ICR マウス (9 週齢) 16 匹の体重を測定し, 群間に差がないように 8 匹ずつ 2 群 (蒸留水および SCP 投与群) に分けた (1 ケージあたり 8 匹ずつ収容)。

両群のマウスに, 試料を経口投与した後, 絶食させた。給水は, イオン交換水を自由摂取させた。翌日, 試料投与から 24 時間の間に排泄された糞を全て回収し, 凍結乾燥して乾燥重量を測定した。次に, 乾燥した糞を乳鉢で粉碎し, 10 倍量 (v/w) の蒸留水を加えてよく混合した後, 20°C, 5 分間超音波処理してグルコースを抽出した。抽出液は, 4°C, 448×g, 10 分間遠心分離し, 得られた上清の容量を測定した後, グルコース定量発色試薬を用いて上清中のグルコース重量 (糞中グルコース重量) を定量した。糞中へのグルコース排泄率は, 以下の式により算出した。

$$\text{糞中へのグルコース排泄率 (\%)} = \frac{\text{糞中グルコース重量 (g)}}{\text{グルコース投与重量 (g)}} \times 100$$

## 6. グルコース透過阻害能試験

### 6-1. 試料の調製

蒸留水群の試料は、蒸留水 1.0 mL と 0.4 g/mL グルコース水溶液 0.5 mL を混合して調製した。SCP 群の試料は、0.3 g/mL SCP 水溶液 1.0 mL と 0.4 g/mL グルコース水溶液 0.5 mL を混合して調製した。

### 6-2. 試料添加および透析外液中グルコース重量の定量

両群の試料は、透析膜 (Spectra/Por 6, SPECTRUM, MWCO 1 kDa) に 1.5 mL ずつ添加した後、蒸留水 50 mL に対して透析した。透析直後の時間を 0 分とし、透析 0, 15, 30, 60, 120 分後の透析外液を 100  $\mu$ L ずつ回収した。回収した透析外液中のグルコース重量は、グルコース定量発色試薬を用いて定量した。グルコース透過率は、以下の式により算出した。

$$\text{グルコース透過率 (\%)} = \frac{\text{透析外液グルコース重量 (g)}}{\text{グルコース添加重量 (g)}} \times 100$$

## 7. SCP 経口糖負荷試験におけるインスリン分泌促進能の測定

### 7-1. タンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製

タンパク質分解酵素阻害剤は、10,000 KIU のアプロチニンを 1 mL の生理食塩水に溶解して調製し、採血量の 5%量 (終濃度 500 KIU) の阻害剤を採血用チューブにあらかじめ添加した。血液凝固防止剤は、1,000 U のヘパリンを 1 mL の生理食塩水に溶解して調製し、採血量の 5%量 (終濃度 50 U/mL) の防止剤を採血用チューブにあらかじめ添加した。



## 7-2. 試料の調製および投与量の設定

第3章 実験方法 4-1 と同様の方法で行った。

## 7-3. 試料投与およびインスリン濃度測定

試験前日に ICR マウス (11 週齢) 16 匹の体重を測定し、群間に差がないように 5 または 6 匹ずつ 3 群 (蒸留水, SCP および卵白ペプチド投与群) に分けた。試験前日の午後 5 時より絶食させ、16 時間後の午前 9 時より試験を開始した。

はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、小型血糖測定器を用いて初期血糖値を測定した。次いで、各群のマウスに、試料を経口投与した。投与直後の時間を 0 分とし、投与 0, 15, 30 分後の血糖値を測定した。また、血糖値測定の際に、マウスの血液 50  $\mu$ L は採血管を用いて尾部静脈より無麻酔下で採血した。ただし、反復採血による生体恒常性の破綻を避けるために、採血は経口投与 0, 15 分後の 2 回のみ行った。採取した血液は、4°C, 2,500 $\times$ g, 10 分間遠心分離に供して血漿を分取した。分取した血漿中のインスリン濃度は、レビス<sup>®</sup>インスリン-マウス (RTU) (シバヤギ) を用いて ELISA 法により定量した。

## 8. I 型糖尿病モデルマウスの作製および糖負荷試験

### 8-1. ストレプトゾトシン (STZ) 投与量, 糖負荷試験用試料の調製および投与量の設定

STZ は 250 mg/kg 体重<sup>79)</sup>となるように秤量した。秤量した STZ は、0.3 mL の冷生理食塩水に溶解して STZ 溶液を調製し、調製後速やかに腹腔内投与した。

糖負荷試験用試料の調製および投与量の設定は、第3章 実験方法 4-1 と同様の方法で行った。

## 8-2. I型糖尿病モデルマウスの作製

ICR マウス (18 週齢) 20 匹の体重を測定し、群間で体重に差がないように 2 群 (生理食塩水腹腔内投与群 4 匹および STZ 腹腔内投与群 16 匹) に分けた。

はじめに、飽食状態における両群マウスの血糖値 (生理食塩水腹腔内投与前飽食時および STZ 腹腔内投与前飽食時血糖値) を尾部静脈より無麻酔下で採血し、小型血糖測定器を用いて測定した。次いで、生理食塩水腹腔内投与群に 0.3 mL の冷生理食塩水および STZ 腹腔内投与群に 0.3 mL の STZ 溶液を腹腔内投与した。投与から 4 日後、両群の飽食時血糖値を測定した。そして、飽食時血糖値が 400 mg/dL 以上の個体を選別<sup>79)</sup>し、I型糖尿病モデルマウスとして使用した。加えて、生理食塩水腹腔内投与群の飽食時血糖値が 200 mg/dL 未満であったことから、STZ 投与群の飽食時血糖値が 200~400 mg/dL 以上の個体を選別し、前述の飽食時血糖値 400 mg/dL 以上の個体と併せて I 型糖尿病モデルマウスとして使用した。

## 8-3. 糖負荷試験

第 3 章 実験方法 8-2 にしたがって選別した I 型糖尿病モデルマウス (18 週齢) 12 匹の体重を測定し、飽食時血糖値および体重の平均値についてそれぞれ群間に差が生じないように 4 匹ずつ 3 群 [蒸留水 (STZ-蒸留水), SCP (STZ-SCP) および卵白ペプチド (STZ-卵白ペプチド) 投与群] に分けた。また、生理食塩水腹腔内投与群 4 匹を蒸留水投与群とした。試験は第 2 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。すなわち、マウスは試験前日より絶食をさせ、絶食から 16 時間後に試験を開始した。はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、小型血糖測定器を用いて初期血糖値を測定した。次いで、各群のマウスに、試料をシリンジおよび経口ゾンデを用いて経口投与した。投与直後の時間を

0分としてその後15, 30, 60, 120分の血糖値を測定した。

## 9. GLP-1 分泌促進能試験

### 9-1. タンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製

タンパク質分解酵素阻害剤は、20.8 mg の EDTA 三カリウムを 600  $\mu$ L の生理食塩水に溶解して調製し、採血量の 5%量 (終濃度 1.735 mg/mL) の阻害剤を採血用チューブにあらかじめ添加した。血液凝固防止剤は、1,000 U のヘパリンを 1 mL の生理食塩水に溶解して調製し、採血量の 5%量 (終濃度 50 U/mL) の防止剤を採血用チューブにあらかじめ添加した。

### 9-2. 試料の調製および投与量の設定

第3章 実験方法 4-1 と同様の方法で行った。なお、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血漿総 GLP-1 濃度と比較するため、試料およびグルコースは生理食塩水に溶解し、対照群として生理食塩水投与群を設定した。

### 9-3. 試料投与および総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度測定

試験前日に ICR マウス (12 週齢) 16 匹の体重を測定し、群間に差がないように 5~6 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP および卵白ペプチド投与群) に分けた。糖負荷試験は第3章 実験方法 7-3 と同様の方法で行った。また、血糖値測定の際に、マウスの血液 125  $\mu$ L は採血管を用いて尾部静脈より無麻酔下で採血した。採取した血液は、4°C, 2,500 $\times$ g, 10 分間遠心分離に供して血漿を分取した。分取した血漿中の総 GLP-1 濃度は、GLP-1 Total ELISA 96-Well Plate Assay (Millipore) を用いて ELISA 法により定量した。

## 10. 腸内への SCP 直接投与試験

### 10-1. 麻酔剤の調製および投与量の設定

麻酔剤は、ペントバルビタールを生理食塩水に溶解 (64.8 mg/mL) して調製した。本麻酔剤は、50 mg/kg 体重となるように、0.77 mL/kg 体重で投与した。鎮痛剤はレペタン注 (大塚製薬) を使用し、0.03 mg/kg 体重となるように、0.15 mL/kg 体重で投与した。

### 10-2. 試料の調製および投与量の設定

蒸留水投与群の腸管ループには、10 mL/kg 体重の蒸留水を投与した。SCP 投与群の腸管ループには、SCP を蒸留水に溶解して 0.6 g/mL SCP 水溶液を調製し、SCP 投与量が 3.0 g/kg 体重となるように、10 mL/kg 体重で腸管ループへ注入した。両群の腹腔内に滴下する試料として、グルコースを生理食塩水に溶解して 0.4 g/mL グルコース溶液を調製し、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で腹腔内に直接滴下した。

### 10-3. 腸管ループの作製、試料投与および血糖値測定

試験前日に SD ラット 8 匹の体重を測定し、群間で体重に差がないように 4 匹ずつ 2 群 (蒸留水および SCP 投与群) に分けた。試験前日の午後 6 時より絶食させ、16 時間後の午前 10 時より試験を開始した。

はじめに、ラットを保定し、調製した麻酔剤および鎮痛剤を腹腔内に投与した。反射行動の喪失を確認した後、腹部中央を正中線に沿って解剖ハサミで開腹した。開腹後、胃から遠位方向に 1 cm の部位をクレンメで結紮し、次いで、結腸と盲腸の境目をクレンメで結紮して腸管ループを作製した。

腸管ループ作製後、糖負荷試験前のラットの尾部静脈から無麻酔下で採血し、

初期血糖値を測定した。次いで、各群のラットの腸管ループに注射針を用いて試料 (蒸留水または SCP) を注入した。

試料注入から 30 分後に血糖値を測定した後、シリンジを用いて 0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内に滴下した。グルコースを腹腔内に滴下した時間を 0 分とし、滴下 0, 15, 30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。

## 11. SCP 経口投与-腹腔内糖負荷試験

### 11-1. 試料の調製および投与量の設定

蒸留水投与群には、10 mL/kg 体重の蒸留水を経口投与した。SCP 投与群には、SCP を蒸留水に溶解して 0.3 g/mL SCP 水溶液を調製し、SCP 投与量が 1.5 g/kg 体重となるように、10 mL/kg 体重で経口投与した。また、両群に腹腔内投与する試料として、グルコースを生理食塩水に溶解して 0.4 g/mL グルコース溶液を調製し、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

### 11-2. SCP 経口投与-腹腔内糖負荷および血糖値測定

試験前日に ICR マウス 12~14 匹の体重を測定し、群間で体重に差がないように 6~7 匹ずつ 2 群 (蒸留水および SCP 投与群) に分けた。試験前日の午後 6 時より絶食させ、16 時間後の午前 10 時より試験を開始した。はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、初期血糖値を測定した。次いで、①各群のマウスに試料 (蒸留水または SCP) を経口投与し、投与から一定時間 (15, 30 分) 経過後、シリンジおよび注射針を用いて 0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内に投与した。グルコース腹腔内投与直後の時間を 0 分とし、0, 15, 30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。または、②各群のマウスに試料 (蒸留水また

は SCP) を経口投与した後, シリンジおよび注射針を用いて 0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内に投与した。グルコース腹腔内投与直後の時間を 0 分とし, 投与 0, 15, 30, 45, 60, 120 分後の血糖値を測定した。または, ③初期血糖値測定後, シリンジおよび注射針を用いて 0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内に投与し, 腹腔内投与から 15 分後, 各群のマウスに試料 (蒸留水または SCP) を経口投与した。グルコース腹腔内投与直後の時間を 0 分とし, 投与 0, 15, 30, 45, 60, 120 分後の血糖値を測定した。

### 11-3. SCP 経口投与-腹腔内糖負荷試験におけるインスリン分泌促進能試験

#### 11-3-1. タンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製

第 3 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。

#### 11-3-2. 試料の調製および投与量の設定

第 3 章 実験方法 11-1 と同様の方法で行った。

#### 11-3-3. 試料投与およびインスリン濃度測定

試験前日に ICR マウス (16 週齢) 16 匹の体重を測定し, 群間に差がないように 5~6 匹ずつ 3 群 (蒸留水, SCP および卵白ペプチド投与群) に分けた。試験は第 3 章 実験方法 7-3 と同様の方法で行った。

## 12. SCP に含有されるエンドトキシン量の測定

### 12-1. 試料の調製

試料は, エンドトキシンおよび  $\beta$ -グルカンフリー蒸留水 (生化学工業) に SCP を溶解し (終濃度 10 mg/mL), 調製した。

## 12-2. エンドトキシン量測定

SCP に含有されるエンドトキシン量は、エンドスペシー ES-24S セット (生化学工業) を用いて、エンドポイント-比色法により定量した。なお、セットに同封された分析証明書より、本セットのエンドトキシン標品の力価は、8 EU/ng エンドトキシンであった。

## 13. SCP の静脈内投与試験

### 13-1. 試料の調製および投与量の設定

生理食塩水投与群は、5 mL/kg 体重の生理食塩水を静脈内投与した。SCP 投与群は、SCP を生理食塩水に溶解した 0.3 g/mL SCP 溶液を、SCP 投与量が 1.5 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で静脈内投与した。SCP-0.15 g 投与群は、SCP を生理食塩水に溶解した 0.03 g/mL SCP 溶液を、SCP 投与量が 0.15 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で静脈内投与した。

0.4 g/mL グルコース溶液は、グルコースを生理食塩水に溶解して調製し、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

### 13-2. 試料投与、グルコース投与および血糖値測定

試験前日に①ICR マウス (10 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差がないように 8 匹ずつ 2 群 (生理食塩水および SCP 投与群) または 6~7 匹ずつ 2 群 (生理食塩水および SCP-0.15 g 投与群) に分けた。または、②ICR マウス (12 または 13 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差がないように 6 匹ずつ 2 群 (生理食塩水および SCP 投与群) に分けた。試験前日の午後 5 時より絶食させ、16 時間後の午前 9 時より試験を開始した。

はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、初期血糖

値を測定した。次いで、マウスを自作の保定器に入れて安静な状態を保ち、①各群の試料をシリンジおよび注射針を用いて尾部静脈より静脈内投与した。静脈内投与後、即座にマウスを保定器から出し、0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内投与した。または、②各群の試料を静脈内投与し、投与から一定時間 (5, 15 分) 経過後、グルコース溶液を腹腔内投与した。グルコース溶液腹腔内投与直後の時間を 0 分とし、投与 0, 15, 30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。

#### 14. SCP 静脈内投与時のインスリン分泌促進能および GLP-1 分泌促進能試験

##### 14-1. タンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製

インスリン分泌促進能試験におけるタンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製は、第 3 章 実験方法 7-1 と同様の方法で行った。また、GLP-1 分泌促進能試験におけるタンパク質分解酵素阻害剤および血液凝固防止剤の調製は、第 3 章 実験方法 9-1 と同様の方法で行った。

##### 14-2. 試料の調製および投与量の設定

生理食塩水および SCP 投与群に対する試料の調製および投与量の設定は、第 3 章 実験方法 13-1 と同様の方法で行った。

##### 14-3. 試料投与、インスリン濃度測定および総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度測定

試験前日に ICR マウス (7 週齢) 28 匹の体重を測定し、群間に差がないように 14 匹ずつ 2 群 (生理食塩水および SCP 投与群) に分けた。試料の静脈内投与およびグルコース溶液の腹腔内投与は、第 3 章 実験方法 13-2 と同様の方法で行った。採血およびインスリン濃度測定は、第 3 章 実験方法 7-3 と同様の方法で行った。



た。ただし、経時的 (糖負荷 0, 15, 30, 60, 120 分後) に血糖値測定した後、個体を安楽死させ腹部大動脈から全採血を行った。

試験前日に SD ラット (7 週齢) 12 匹の体重を測定し、群間に差がないように 6 匹ずつ 2 群 (生理食塩水および SCP 投与群) に分けた。試料の静脈内投与およびグルコース溶液の腹腔内投与は、第 3 章 実験方法 13-2 と同様の方法で行った。インスリン濃度測定用採血およびインスリン濃度測定は、第 3 章 実験方法 7-3 と同様の方法で行った。ただし、反復採血による生体恒常性の破綻を避けるために、採血はグルコース腹腔内投与 0, 15 分後の 2 回のみ行った。また、総 GLP-1 濃度測定用採血および総 GLP-1 濃度測定は、第 3 章 実験方法 9-3 と同様の方法で行った。

## 15. I型糖尿病モデルラットを用いた SCP 静脈内投与試験

### 15-1. 試料の調製および投与量の設定

生理食塩水および SCP 投与群に対する試料の調製および投与量の設定は、第 3 章 実験方法 13-1 と同様の方法で行った。

STZ は、70 mg/kg 体重となるように秤量した。秤量した STZ は、1 mL の冷生理食塩水に溶解して STZ 溶液を調製し、調製後速やかに腹腔内投与した。

### 15-2. I型糖尿病モデルラットの作製

SD ラット (12 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差がないように 2 群 (生理食塩水腹腔内投与群 4 匹および STZ 腹腔内投与群 16 匹) に分けた。

はじめに、飽食状態における両群ラットの血糖値 (生理食塩水腹腔内投与前飽食時および STZ 腹腔内投与前飽食時血糖値) を尾部静脈より無麻酔下で採血し、測定した。次いで、生理食塩水腹腔内投与群に 1 mL の冷生理食塩水、STZ 腹腔

内投与群に 1 mL の STZ 溶液をそれぞれ腹腔内投与した。投与から 4 日後、両群の飽食時血糖値を測定した。そして、STZ 腹腔内投与群のうち、飽食時血糖値が 200 mg/dL 以上のものを選別し、I 型糖尿病モデルラットとした。

### 15-3. 試料投与, グルコース投与および血糖測定

試験前日に I 型糖尿病モデルラット (12 週齢) の体重を測定し、群間に差がないように 3 または 4 匹ずつ 2 群 [生理食塩水 (STZ-生理食塩水) および SCP 投与群 (STZ-SCP 投与群)] に分けた。また、生理食塩水腹腔内投与群 4 匹を生理食塩水投与群とした。試験前日の午後 5 時より絶食させ、16 時間後の午前 9 時より試験を開始した。試料の静脈内投与およびグルコース溶液の腹腔内投与は、第 3 章 実験方法 13-2 と同様の方法で行った。

## 16. DPP-IV 阻害能試験

### 16-1. 試料の調製

終濃度が 1, 2, 3, 4, 5 および 6 mg/mL の SCP 水溶液を調製した。

### 16-2. DPP-IV 阻害活性の測定

DPP-IV (Dipeptidyl peptidase-IV, EC 3.4.14.5) 阻害活性は、DPPIV Drug Discovery Kit (BML-AK499) (Enzo) を用いて、比色法により測定した。DPP-IV 活性の 1 mU は 405 nm における吸光度を 1 分間に  $2.09 \times 10^{-2}$  増加させる活性と定義した。また、1 mU の DPP-IV 活性を 50% に減少させる SCP 濃度を  $IC_{50}$  と定義した。

## 17. 統計処理

試験で得られた各群の血糖値、血糖値総和 (血糖上昇曲線下面積; 初期血糖値

を基線とし、糖負荷後 120 分までの血糖値変動曲線との間の面積を台形公式により算出したもの) および数値は、平均値および標準誤差を算出し、各群間の有意差検定を行った。対照群と一試験群の二群間の平均値の差の検定は、正規性に応じて、Student の  $t$  検定、Welch の  $t$  検定、Mann-Whitney の  $U$  検定、対応のある  $t$  検定または Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。対照群と複数の試験群および各試験群間の有意差検定は、正規性に応じて、一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 法または Scheffé の  $F$  検定による多重比較検定を、または Kruskal-Wallis 法による分散分析に続けて Steel-Dwass 法による多重比較検定を用いて行った。有意水準は危険率 5% ( $p < 0.05$ ), 1% ( $p < 0.01$ ) とし、 $p < 0.05$  は統計学的に有意、 $p < 0.01$  は統計学的に極めて有意とした。有意差検定は、4Steps エクセル統計第 3 版 (オーエムエス出版, 2011) 付属エクセルアドインソフト Statcel3 または 4Steps エクセル統計第 4 版 (オーエムエス出版, 2015) 付属エクセルアドインソフト Statcel4 を用いて行った。

## 結果

### 1. SCP の $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼ阻害能

食品由来成分の小腸における  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害は、血糖上昇抑制の作用機構の一つとして広く知られている。そこで、SCP のラット小腸由来  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼの阻害活性について検討した。

本研究は、第3章 実験方法3 により行った。

SCP の  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼの阻害活性を Figs. 3-1 および 3-2 に示す。1-デオキシノジリマイシン (ポジティブコントロール) は、マルトースの分解を  $100.0 \pm 0.0\%$  阻害し (Fig. 3-1), スクロースの分解を  $90.4 \pm 0.7\%$  阻害した (Fig. 3-2)。一方、SCP は、試験した濃度範囲 (10 から 200 mg/mL) において、200 mg/mL の添加でマルトースの分解阻害は 1.0% 以下であった。また SCP は、インベルターゼのスクロース分解活性を殆ど阻害しなかったが、10 および 50 mg/mL の濃度において僅かに阻害 (それぞれ  $4.7 \pm 1.2$  および  $4.2 \pm 1.1\%$ ) した。以上の結果は、SCP の血糖上昇抑制作用が、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびインベルターゼの阻害によるものではないことを示す。

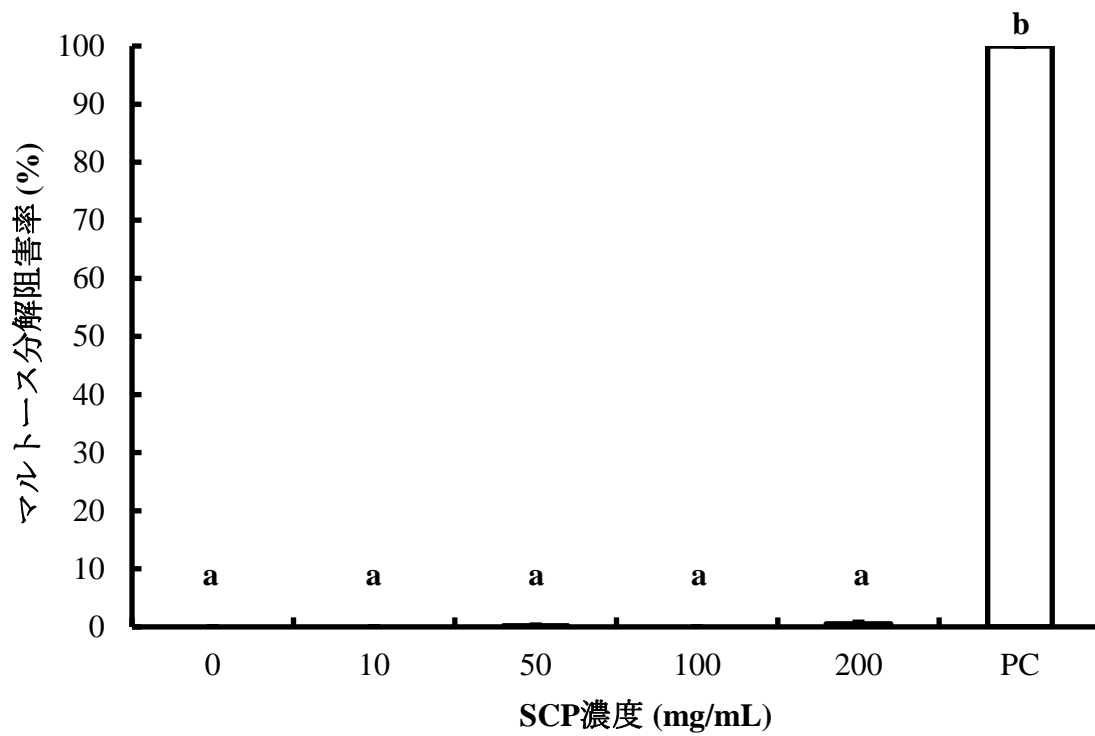


Fig. 3-1 SCP がラット小腸由来  $\alpha$ -グルコシダーゼのマルトース分解に及ぼす影響

PC: ポジティブコントロール (1-デオキシノジリマイシン)

- ・各 SCP 濃度群 (各群 N=4) 間に有意差無し。
- ・各 SCP 濃度群と PC 群 (N=4) の間に有意差あり ( $p < 0.05$ )。

異符号間で有意差あり (Kruskal-Wallis 法を用いた)

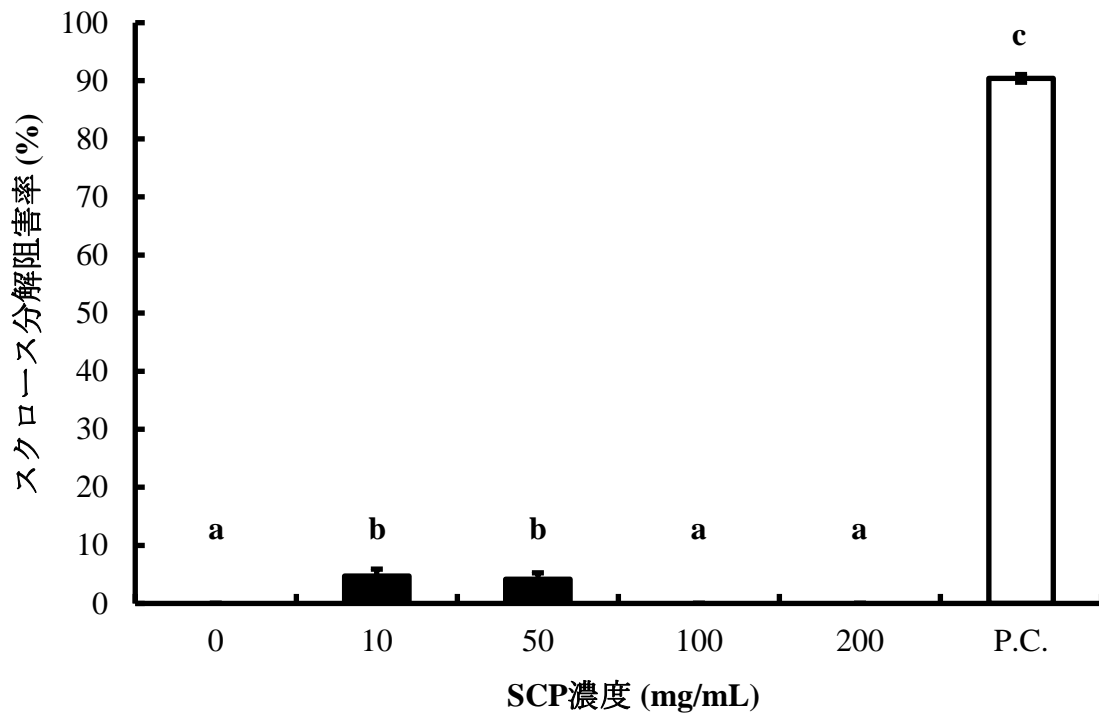


Fig. 3-2 SCP がラット小腸由来インベルターゼのスクロース分解に及ぼす影響

PC: ポジティブコントロール (1-デオキシノジリマイシン)

- ・ 各 SCP 濃度群 (各群 N=3~4) 間に有意差あり ( $p<0.05$ )。
- ・ 各 SCP 濃度群と PC 群 (N=4) の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)

## 2. SCP の胃内グルコース滞留能

胃でのグルコース滞留時間が延長されると胃から小腸へのグルコースの流入速度が低下し、急激な血糖上昇が抑制されると考えられる。そこで、SCP がグルコースの胃内滞留時間に及ぼす影響を検討した。

本実験は、第3章 実験方法4により行った。

胃内のグルコース残存率の経時変化を Fig. 3-3 に示す。縦軸はグルコース投与量 (2.0 g/kg 体重) を 100%とした際の胃内グルコース残存率、横軸は経口投与後の経過時間を示す。蒸留水投与群では胃内グルコース残存率は糖負荷後速やかに低下し、60 分後には  $0.03 \pm 0.0\%$ 、120 分後には  $0.0 \pm 0.0\%$  になった。一方、SCP 投与群においても胃内グルコース残存率は経時的に低下したが、いずれの経過時間においても蒸留水投与群に比べて胃内グルコース残存率が常に高値であり、15 分後には蒸留水投与群の残存率  $22.7 \pm 3.1\%$  に対して SCP 投与群のそれは  $34.6 \pm 1.9\%$  であり、有意 ( $p < 0.05$ ) に高値を示した。また、30 分後においても蒸留水投与群の残存率  $6.6 \pm 2.4\%$  に対して SCP 投与群のそれは  $17.3 \pm 0.8\%$  であり、有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった。

次に、蒸留水および SCP 投与群の 15 分後の胃の外観を、それぞれ Figs. 3-4 および 3-5 に示す。図の様に、蒸留水投与群に比べて SCP 投与群では、明らかに胃の膨らみが大きいことが目視において観察された。

以上の結果は、経口投与された SCP が、共に経口投与されたグルコースを胃に滞留させることを示す。

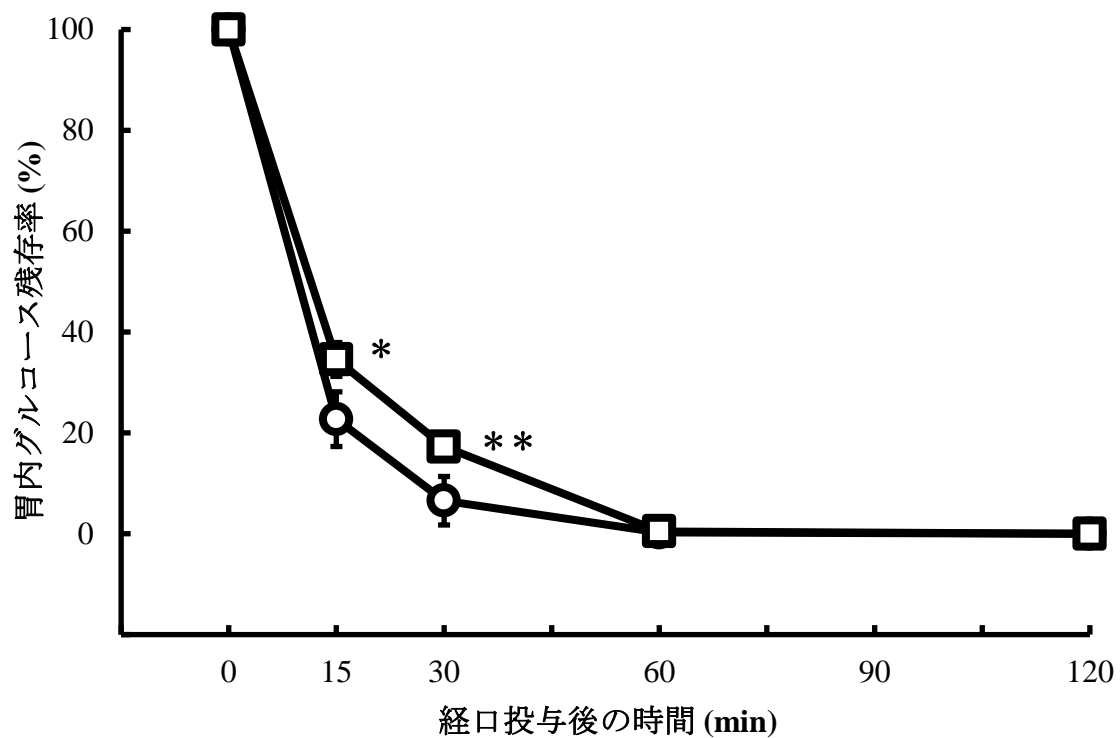


Fig. 3-3 ICR マウスにおける SCP 経口投与時のグルコース胃内残存率の経時的変化

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=1~4)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=1~4)

・糖負荷 15 (\*;  $p < 0.05$ ) および 30 (\*\*;  $p < 0.01$ ) 分後において両群間に有意差あり。

(Student の  $t$  検定を用いた)



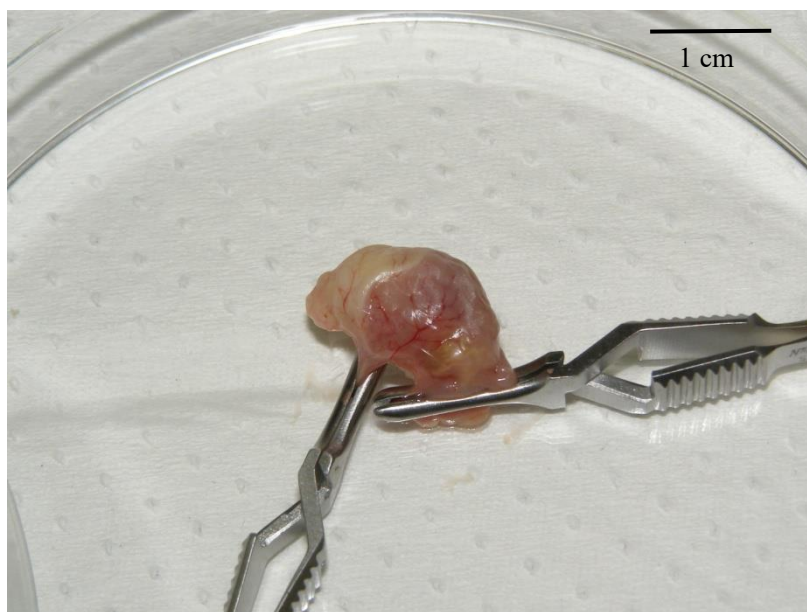


Fig. 3-4 蒸留水投与群の糖負荷 15 分後の胃の外観



Fig. 3-5 SCP 投与群の糖負荷 15 分後の胃の外観

### 3. SCP による糞中へのグルコース排泄能

経口投与された SCP が、小腸でのグルコース吸収に及ぼす影響について検討するため、糞中へのグルコース排泄率を測定した。

本実験は、第3章 実験方法5により行った。

糞中へのグルコース排泄率の測定結果を Fig. 3-6 に示す。縦軸はグルコース投与重量 (2.0 g/kg 体重) を 100%とした際の、糞中へのグルコース排泄率を示す。蒸留水投与群のグルコース排泄率は  $6.4 \pm 0.1\%$ 、SCP 投与群のそれは  $9.3 \pm 0.1\%$  であり、SCP 投与群のグルコース排泄率は蒸留水投与群に対して極めて有意 ( $p < 0.01$ ) に高値を示した。以上の結果は、経口投与された SCP により小腸でのグルコース吸収が阻害され、阻害されたグルコースが排泄されることを示す。

### 4. SCP がグルコースの受動拡散に及ぼす影響

経口投与された SCP が、小腸でのグルコース吸収に及ぼす影響について検討するため、透析膜を用いて SCP のグルコース透過阻害率を測定した。

本実験は、第3章 実験方法6により行った。

透析外液へのグルコース透過率を測定した結果を Fig. 3-7 に示す。縦軸は透析膜へのグルコース添加量 (0.13 g/mL) を 100%とした際の、透析外膜へのグルコース透過率を示している。蒸留水群の 15, 30, 60 および 120 分後のグルコース透過率は、それぞれ  $10.8 \pm 0.1$ ,  $22.5 \pm 0.2$ ,  $39.0 \pm 0.4$  および  $53.4 \pm 0.0\%$  であった。一方、SCP 群の 15, 30, 60 および 120 分後のグルコース透過率は、それぞれ  $6.4 \pm 0.6$  ( $p < 0.05$ ),  $17.4 \pm 0.3$  ( $p < 0.01$ ),  $29.6 \pm 0.1$  ( $p < 0.01$ ) および  $44.2 \pm 0.2\%$  ( $p < 0.01$ ) であり、いずれの透析時間においても蒸留水群のそれらより有意に低値であった。以上の結果は、SCP がグルコースの受動拡散を阻害することを示す。

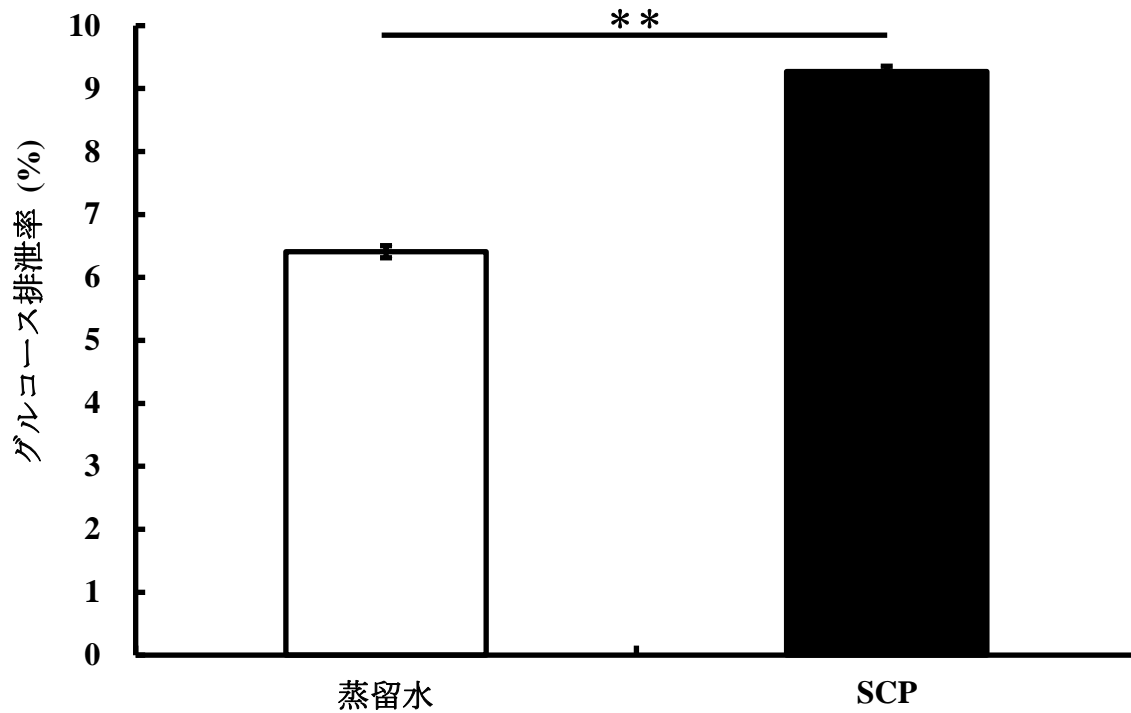


Fig. 3-6 SCP が糞中へのグルコース排泄に及ぼす影響

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=4)

・両群間に有意差あり (\*\*; p<0.01)。

(Student の *t* 検定を用いた)

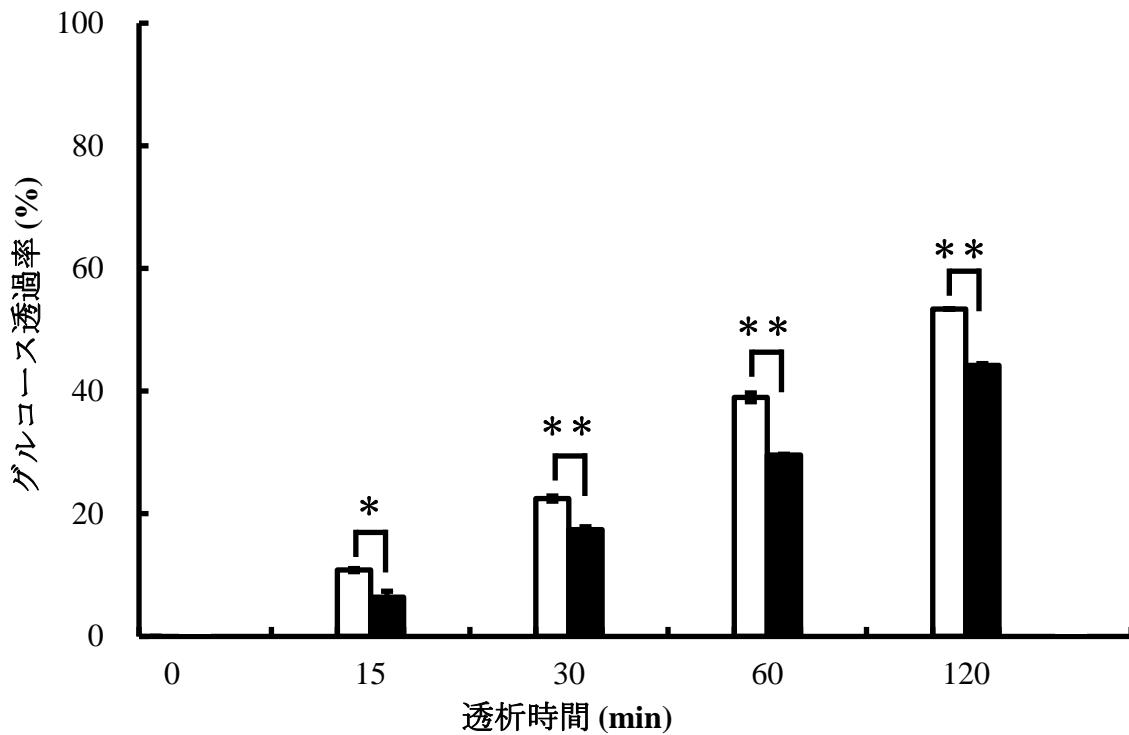


Fig. 3-7 SCP が透析膜のグルコース透過率に及ぼす影響

□: 蒸留水群 (1.0 mL 蒸留水+0.5 mL 40%グルコース水溶液を透析膜に添加, N=3)

■: SCP 群 (1.0 mL 15% SCP 水溶液+0.5 mL 40%グルコース水溶液を透析膜に添加, N=3)

(透析膜内に添加したグルコース量を 100%としたときのグルコース透過率)

・透析 15~120 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ ; \*\*;  $p < 0.01$ )。

(Welch の  $t$  検定を用いた)

## 5. SCP のインスリン分泌促進能

SCP およびグルコースを経口投与した場合における、SCP の血糖値および血漿インスリン濃度に及ぼす影響を検討した。

本実験は、第3章 実験方法7により行った。

ICR マウスを用いた経口糖負荷試験における血糖値測定結果を Fig. 3-8 に示す。蒸留水投与群では、糖負荷 30 分後まで速やかに血糖値が上昇した。SCP 投与群も、蒸留水投与群と同様に、糖負荷 30 分後まで速やかに血糖値が上昇した。その血糖値は、有意差は認められなかったものの、蒸留水投与群のそれらよりも低値を示した。また、卵白ペプチド投与群の血糖値は、蒸留水投与群のそれらと同程度の値を示した。

次に、ICR マウスを用いた経口糖負荷試験における血漿インスリン濃度測定結果を Fig. 3-9 に示す。いずれの群においても、糖負荷後速やかに血漿インスリン濃度が上昇した。糖負荷直後と比較した糖負荷 15 分後の血漿インスリン濃度は、蒸留水投与群では 5.7 倍、SCP 投与群では 4.4 倍、卵白ペプチド投与群では 12.4 倍であった。糖負荷 15 分後の血漿インスリン濃度は、蒸留水投与群に比較して、SCP 投与群では 0.9 倍、卵白ペプチド投与群では 1.6 倍であり、全ての群において糖負荷 0 および 15 分後の間にそれぞれ有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

すなわち、経口投与された SCP がインスリンの分泌を促進する可能性はあるものの、糖負荷 15 分後においては、対照群および比較群に比べて SCP 投与群の血漿インスリン濃度は低値を示すことが確認できた。

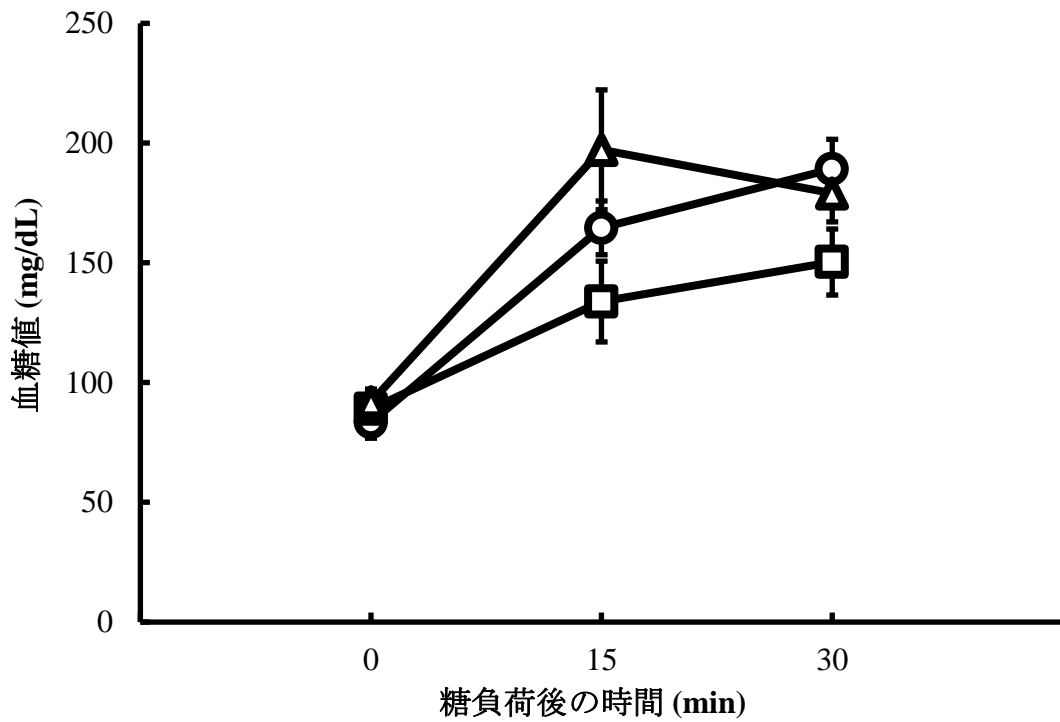


Fig. 3-8 SCP が ICR マウスを用いた糖負荷試験における血糖値に及ぼす影響

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

△: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

・各群間において有意差無し (一元配置分散分析法を用いた)。

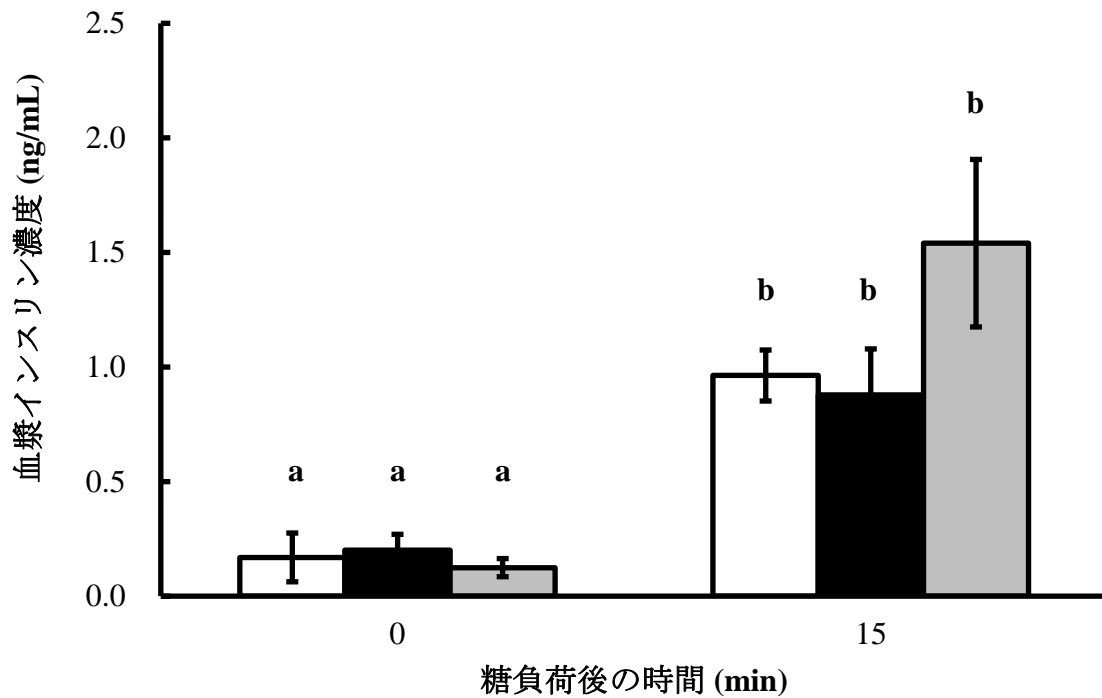


Fig. 3-9 SCP が ICR マウスを用いた糖負荷試験におけるインスリン濃度に及ぼす影響

□: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

■: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

■: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

・全ての投与群において、糖負荷 0 および 15 分後の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

同一群内において、異符号間で有意差あり(対応のある  $t$  検定を用いた)

## 6. SCPがI型糖尿病モデルマウスを用いた糖負荷試験に及ぼす影響

本実験は、第3章 実験方法8により行った。

I型糖尿病モデルマウスを用いた糖負荷試験時の血糖値測定結果をFig. 3-10に示す。蒸留水投与群では、糖負荷後速やかに血糖値が上昇して15分後に最大血糖値 ( $246 \pm 24$  mg/dL) に達し、その後緩やかに低下した。一方、STZ-蒸留水投与群の血糖値は、蒸留水投与群のそれらと比較して著しく高値を示した。すなわち、糖負荷後速やかに血糖値が上昇して60分後に最大血糖値 ( $489 \pm 45$  mg/dL) 達し、その後徐々に低下したが、120分後においても血糖値は  $403 \pm 9$  mg/dL であった。STZ-SCP投与群およびSTZ-卵白ペプチド投与群の血糖値も蒸留水投与群のそれらと比較して著しく高値であったが、有意差は認められなかったものの、STZ-蒸留水群投与と比較して低値であった。以上の結果は、経口投与されたSCPの血糖上昇抑制作用は、インスリン様作用によるものではないことを示す。



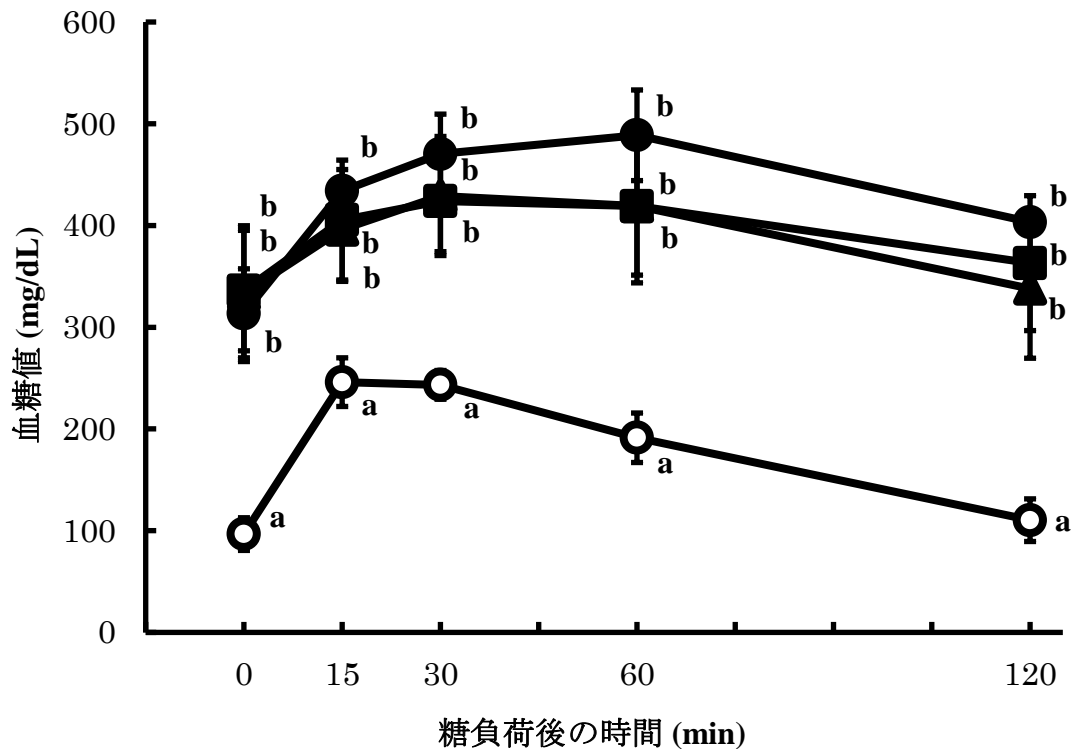


Fig. 3-10 SCP が I 型糖尿病モデルマウスを用いた糖負荷試験に及ぼす影響

- : 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)
- : STZ-蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)
- : STZ-SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=3)
- ▲: STZ-卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=2)

・蒸留水投与群と STZ-蒸留水投与群 (糖負荷 0 分後:  $p < 0.05$ , 15, 30, 60 および 120 分後:  $p < 0.01$ ), STZ-SCP 投与群 (糖負荷 0, 60 および 120 分後:  $p < 0.01$ , 15 および 30 分後:  $p < 0.05$ ) および STZ-卵白ペプチド投与群 (糖負荷 0, 15, 30 および 60 分後:  $p < 0.01$ , 120 分後:  $p < 0.05$ ) の間に有意差あり。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)

## 7. SCP の GLP-1 分泌促進能

SCP の GLP-1 分泌促進能について検討した。本実験は、第 3 章 実験方法 9 より行った。

血糖値測定結果を Fig. 3-11 に示す。生理食塩水投与群では糖負荷後速やかに血糖値が上昇し、30 分後にかけて緩やかに上昇した。また、卵白ペプチド投与群においても糖負荷後速やかに血糖値が上昇し、15 分後に最大血糖値に達し、生理食塩水群より高値を示した。その後、30 分後にかけて血糖値は緩やかに低下した。一方、SCP 投与群も、生理食塩水投与群と同様に糖負荷後速やかに血糖値が上昇し、30 分後にかけて緩やかに上昇したが、生理食塩水投与群よりも低値を示した。

SCP 経口投与時の血漿総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度を示した結果を Fig. 3-12 に示す。生理食塩水投与群および卵白ペプチド投与群では、初期値に比べて 15 分後の血漿総 GLP-1 濃度は減少した。一方で、SCP 投与群では血漿総 GLP-1 濃度は上昇し、15 分後の血漿総 GLP-1 濃度は初期値の 1.4 倍であった。

以上の結果は、経口投与された SCP が GLP-1 の分泌を促進することを示す。

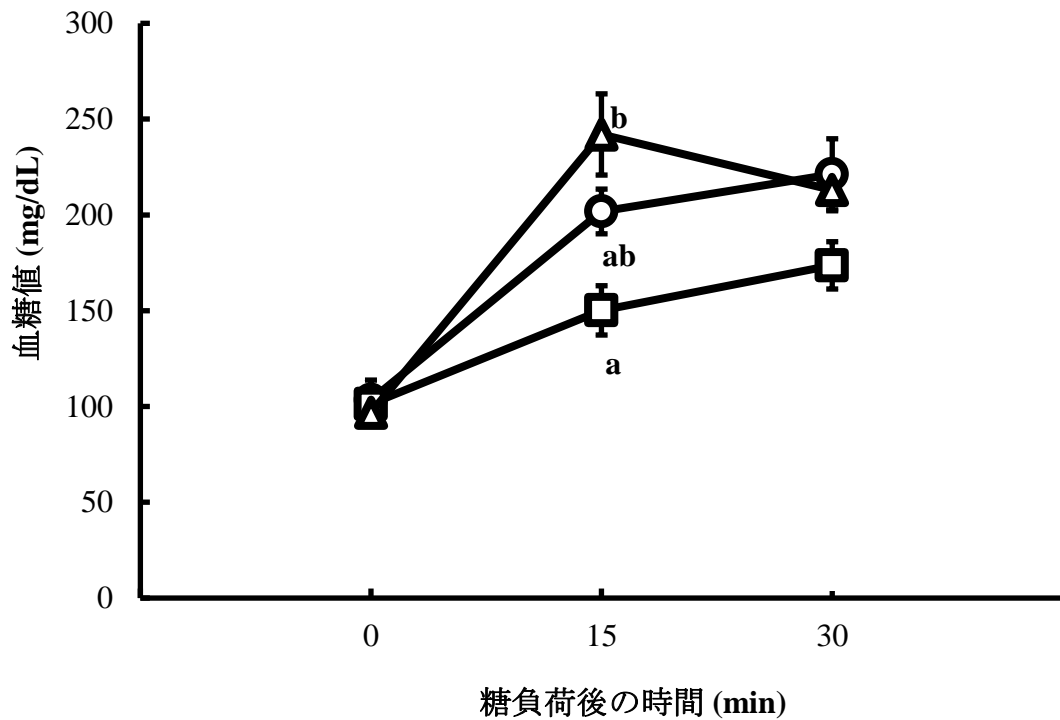


Fig. 3-11 SCP が ICR マウスを用いた糖負荷試験における血糖値に及ぼす影響

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)

△: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

・糖負荷 15 分後において、SCP 投与群と卵白ペプチド投与群の間に有意差あり (p<0.01)。

糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり (Scheffé の F 検定を用いた)

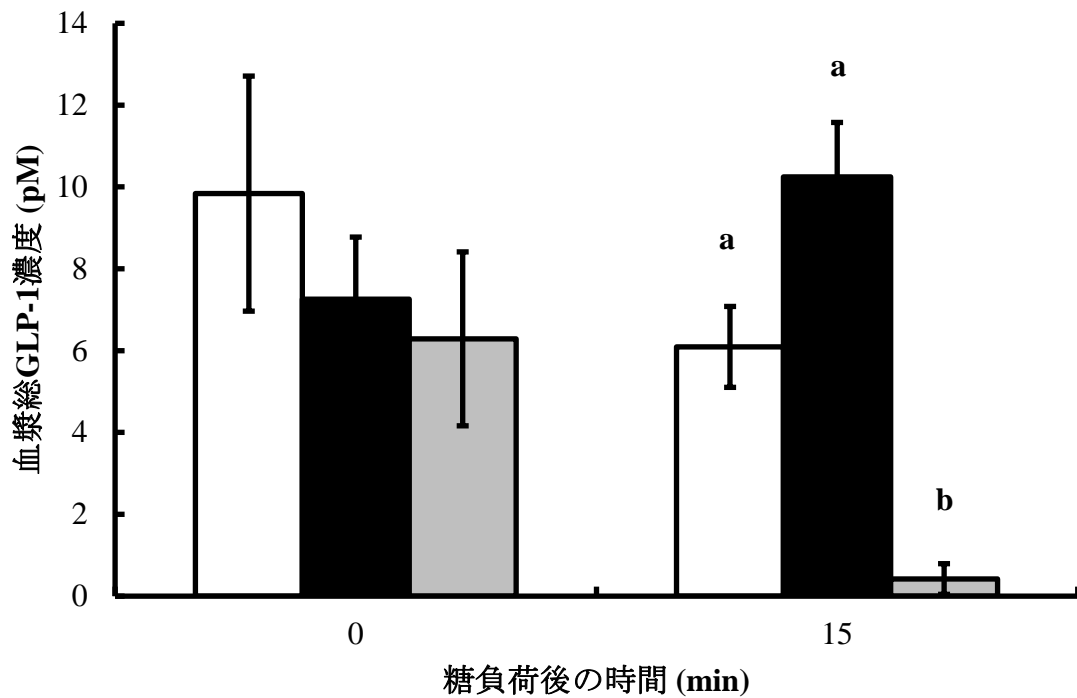


Fig. 3-12 SCP が ICR マウスを用いた糖負荷試験における総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度に及ぼす影響

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=6)
- : 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=5)

・糖負荷 15 分後において、生理食塩水投与群と卵白ペプチド投与群および SCP 投与群と卵白ペプチド投与群の間に有意差あり ( $p < 0.05$ )。

糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)

## 8. 消化管内投与試験における血糖値変化

Figures. 3-9 および 3-12 の結果から、SCP は GLP-1 分泌を介したインスリン分泌により血糖の上昇を抑制する可能性が示された。そこで、消化管中の SCP が上記の機序を惹起することを検証するために、SCP とグルコースをそれぞれ別経路から投与して血糖値変化を測定した。

### 8-1. 腸管に SCP を直接投与した際の血糖値変化

本実験では、胃での影響を除外するためにラットを開腹して腸管ループを作製した。そして、SCP を腸管に直接投与して消化管内に SCP のみが存在する状態にした後、30 分後にグルコースは腹腔内に直接滴下した。

本実験は、第 3 章 実験方法 10 により行った。

SD ラットの腸管ループを用いた糖負荷試験の結果を Fig. 3-13 に示す。縦軸は血糖値、横軸はグルコース腹腔内滴下を 0 分とした時の経過時間を示す。蒸留水投与群では滴下後速やかに血糖値が上昇し、60 分後に最大値 ( $327 \pm 24$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は緩やかに低下し、120 分後には 30 分後とほぼ同じ値 ( $275 \pm 40$  mg/dL) まで低下した。一方、SCP 投与群も、蒸留水投与群と同様に滴下後速やかに血糖値が上昇したが、蒸留水投与群と異なり 30 分後に最大値 ( $273 \pm 24$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は緩やかに低下し、120 分後には 15 分後とほぼ同じ値 ( $191 \pm 23$  mg/dL) まで低下した。以上の結果は、SCP が小腸に到達することが、血糖上昇の抑制に重要であることを示唆している。

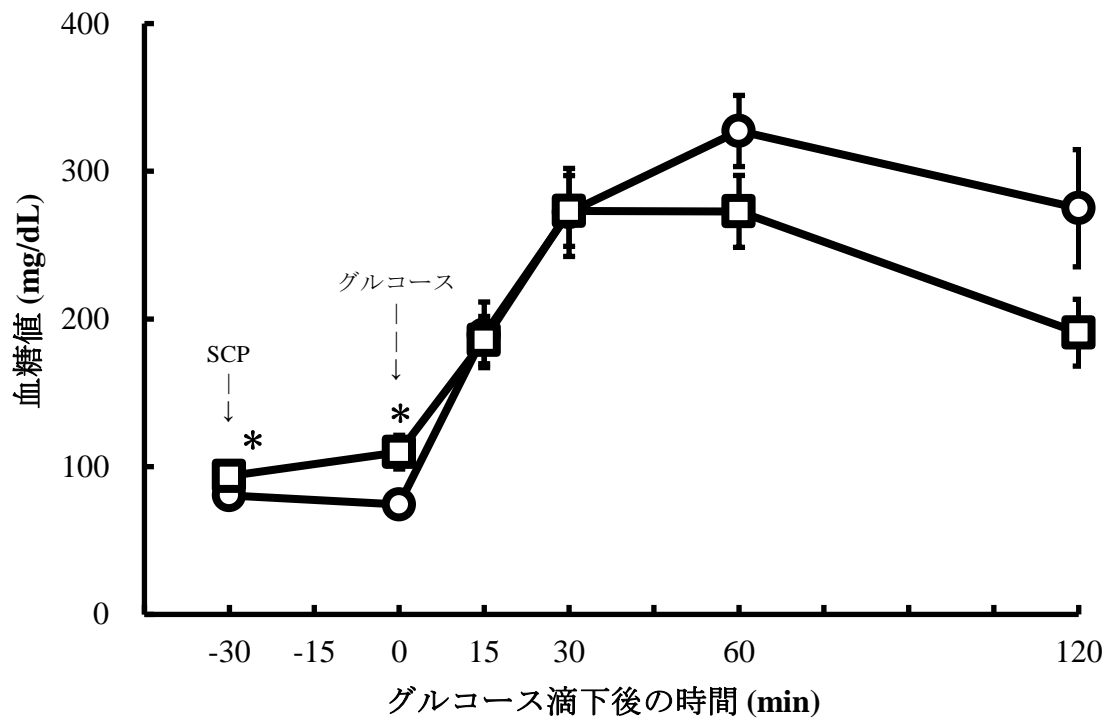


Fig. 3-13 SCP を SD ラットの腸管ループに注入した際の血糖値の経時的変化

- : 蒸留水投与群 (蒸留水を腸管ループへ注入+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内滴下, N=7)
- : SCP 投与群 (3.0 g SCP/kg 体重を腸管ループへ注入+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内滴下, N=7)

- ・グルコース滴下-30 および 0 分後において, 両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。
- ・グルコース滴下 30 分後以降, 有意差は認められないものの, SCP 投与群は蒸留水投与群よりも血糖の上昇が抑制される傾向が認められた。

(Mann-Whitney の  $U$  検定法を用いた)

## 8-2. 腹腔内糖負荷による血糖上昇に及ぼす SCP 経口投与の影響

次に、SCP を経口投与して食道および胃を経て小腸に到達させ、消化管内に SCP が存在する状態にした。一方、グルコースは腹腔内 (SCP 投与経路とは異なる経路) に投与した。

本実験は、第 3 章 実験方法 11-1 および 11-2 により行った。

ICR マウスを用いてグルコース腹腔内投与時間に対して SCP 経口投与時間を -30, -15, 0 および +15 分とした結果を Figs. 3-14~3-17 に示す。

まず、先述した腸管ループ試験と同様に、グルコース腹腔内投与 30 分前に SCP を経口投与した。SCP 経口投与後の血糖値経時的変化を Fig. 3-14 に示す。蒸留水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $489 \pm 13$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後に  $126 \pm 5$  mg/dL まで低下した。一方、SCP 投与群も同様に、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $468 \pm 14$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後に  $148 \pm 17$  mg/dL まで低下した。また、SCP 投与群の血糖値はいずれも蒸留水投与群より低く、60 分後において有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。

次に、SCP の経口投与からグルコースの腹腔内投与までの時間を 30 分前から 15 分前に短縮して SCP を経口投与した。SCP 経口投与後の血糖値経時的変化を Fig. 3-15 に示す。蒸留水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、60 分後に最大値 ( $477 \pm 37$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は低下し、120 分後に  $257 \pm 26$  mg/dL まで低下した。一方、SCP 投与群も同様に、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $364 \pm 33$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後に  $117 \pm 15$  mg/dL まで低下した。また、SCP 投与群の血糖値はいずれも蒸留水投与群よりも低く、60 および 120 分後においてそれぞれ

有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。

さらに、SCP の経口投与と同時にグルコースを腹腔内投与した。SCP 経口投与およびグルコース腹腔内投与後の血糖値経時的变化を Fig. 3-16 に示す。蒸留水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $483 \pm 26$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後に  $193 \pm 21$  mg/dL まで低下した。一方、SCP 投与群も同様に、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $359 \pm 24$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後に  $131 \pm 8$  mg/dL まで低下した。また、SCP 投与群の血糖値はいずれも蒸留水投与群よりも低く、45 および 60 分後、0、30 および 120 分後においてそれぞれ極めて有意 ( $p<0.01$ ) および有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。

最後に、グルコース腹腔内投与 15 分後に SCP を経口投与した際の血糖値経時的变化を Fig. 3-17 に示す。蒸留水および SCP 投与群はほぼ同様の血糖値変化を示し、30 分後にそれぞれ最大値 ( $427 \pm 26$  および  $466 \pm 26$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は徐々に低下し、120 分後にそれぞれ  $179 \pm 22$  および  $182 \pm 21$  mg/dL まで低下した。また、いずれの時間においても蒸留水および SCP 投与群の血糖値に有意差は認められなかった。

前述の結果 (Fig. 3-13) と併せて、以上の結果は、経口投与された SCP が小腸に到達して血糖の上昇が抑制されることを示唆する。また、血糖上昇抑制作用を得るためには、グルコース投与の直前または同時に SCP を経口投与することが必要条件であることを示す。



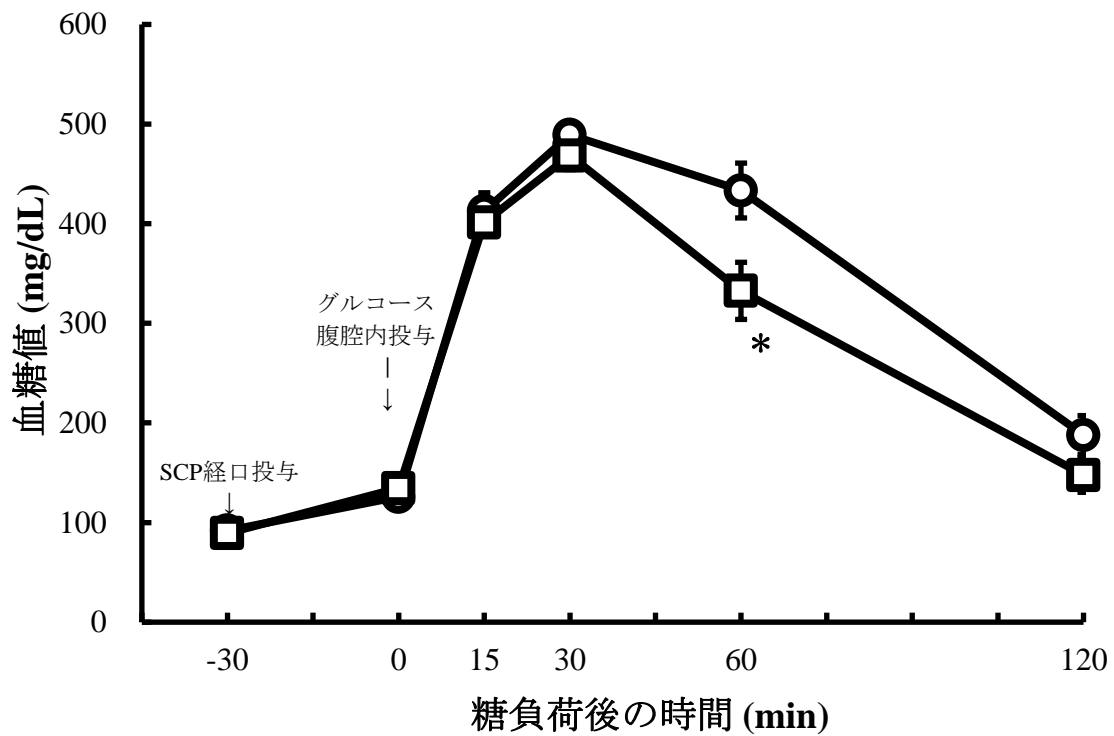


Fig. 3-14 ICR マウスに SCP を経口投与し，その 30 分後にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

○: 蒸留水投与群 (蒸留水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・糖負荷 60 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

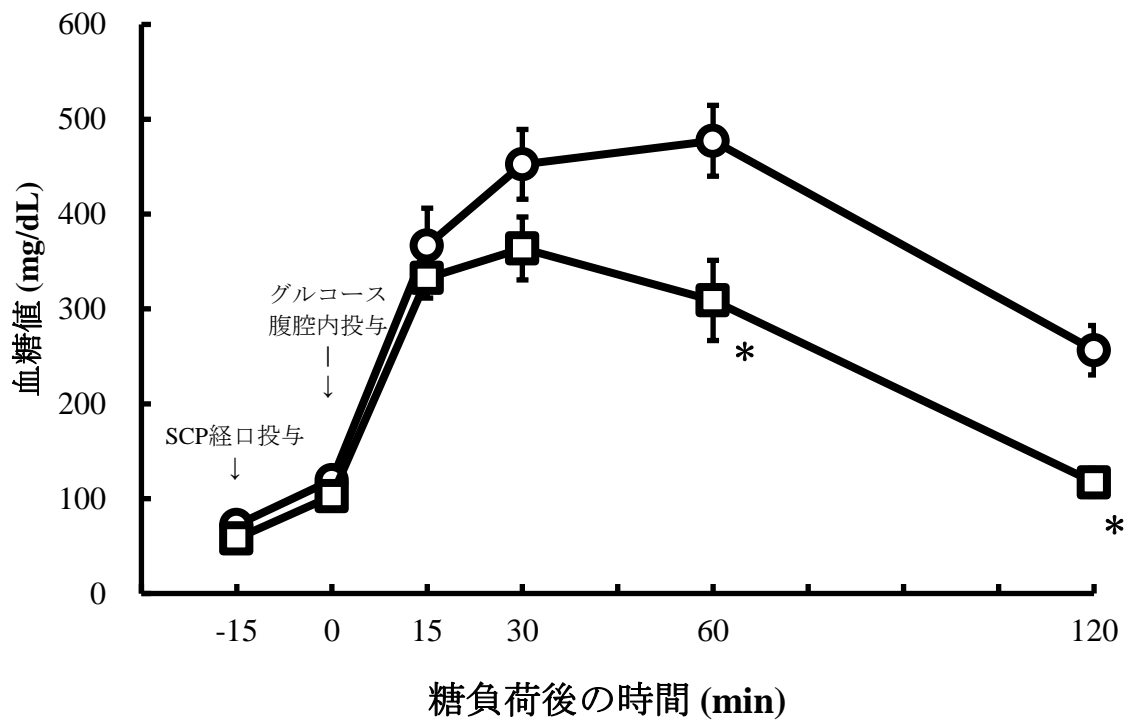


Fig. 3-15 ICR マウスに SCP を経口投与し，その 15 分後にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

- : 蒸留水投与群 (蒸留水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

・糖負荷 60 および 120 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

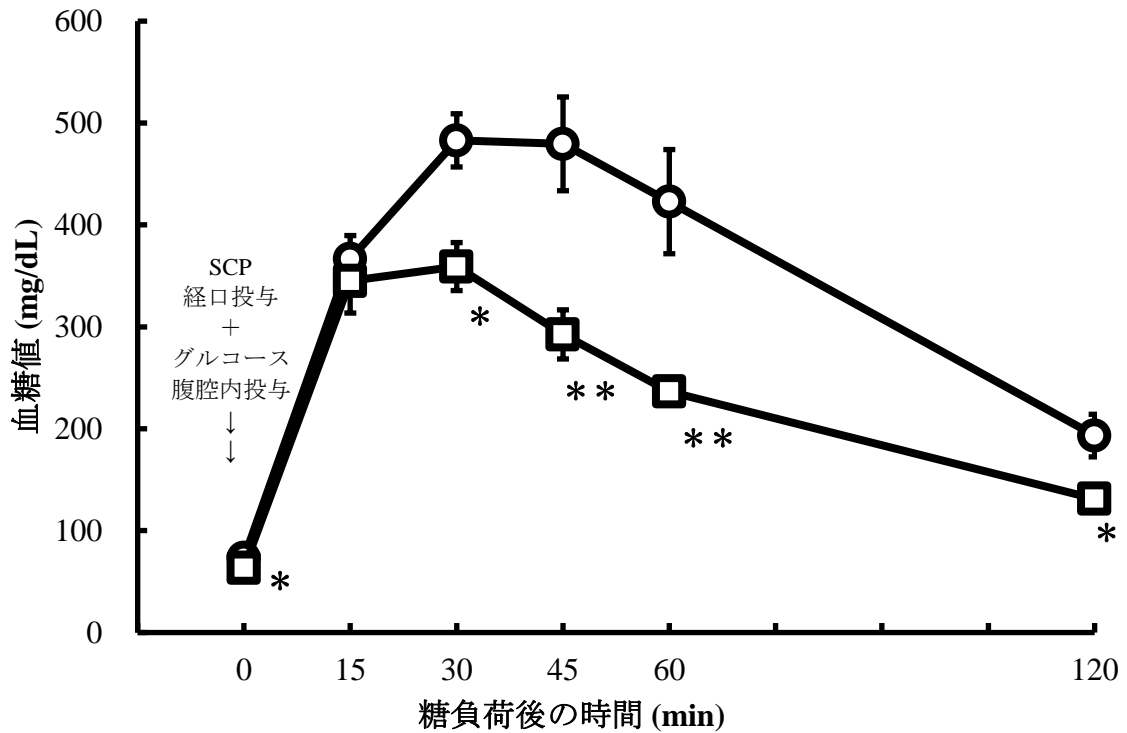


Fig. 3-16 ICR マウスに SCP を経口投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

○: 蒸留水投与群 (蒸留水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・糖負荷 0, 30, 120 分後 (\*;  $p < 0.05$ ) および 45, 60 分後 (\*\*;  $p < 0.01$ ) において有意差あり。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

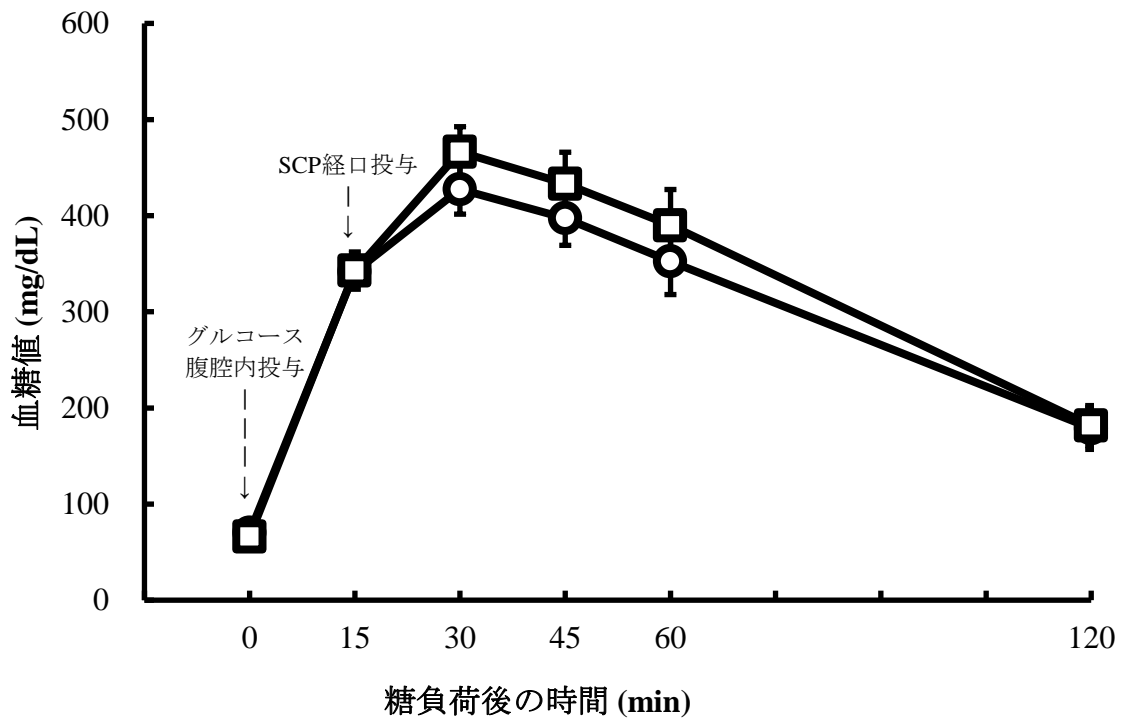


Fig. 3-17 ICR マウスにグルコースを腹腔内投与し、その 15 分後に SCP を経口投与した際の血糖値の経時的変化

○: 蒸留水投与群 (蒸留水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・両群間において有意差無し。しかしながら、SCP 投与群において糖負荷 30 分以降の血糖値が蒸留水投与群より低値を示す傾向が認められた。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

### 8-3. 腹腔内糖負荷および SCP 経口投与試験における血糖値変化および血漿インスリン濃度変化

本実験は、第3章 実験方法 11-3 により行った。

腹腔内糖負荷時に SCP を経口投与した際の血糖値の結果を Fig. 3-18 に示す。生理食塩水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、15 分後にかけて上昇した (2.50 倍)。また、卵白ペプチド投与群においても、血糖値は糖負荷後 15 分後にかけて速やかに上昇したが (2.42 倍)、15 分後の血糖値 ( $237 \pm 3$  mg/dL) は生理食塩水投与群 ( $253 \pm 11$  mg/dL) より低値を示した。SCP 投与群においても、血糖値は上記 2 投与群と同様に 15 分後にかけて上昇したが (2.47 倍)、15 分後の血糖値は卵白ペプチド投与群より低値を示した ( $213 \pm 25$  mg/dL)。

腹腔内糖負荷時に SCP を経口投与した際の血漿インスリン濃度の結果を Fig. 3-19 に示す。いずれの群においても、糖負荷 15 分後の血漿インスリン濃度は上昇した。糖負荷直後に比べて、15 分後の血漿インスリン濃度は、生理食塩水投与群では 4.9 倍、卵白ペプチド投与群では 4.7 倍および SCP 投与群では 15.4 倍であり、卵白ペプチド投与群および SCP 投与群において糖負荷 0 および 15 分後の間にそれぞれ有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、糖負荷 15 分後の血漿インスリン濃度は、生理食塩水投与群に比べて卵白ペプチド投与群では 1.0 倍であったのに対して、SCP 投与群では 1.8 倍であった。

以上の結果は、経口投与された SCP がインスリン分泌を促進することを示している。

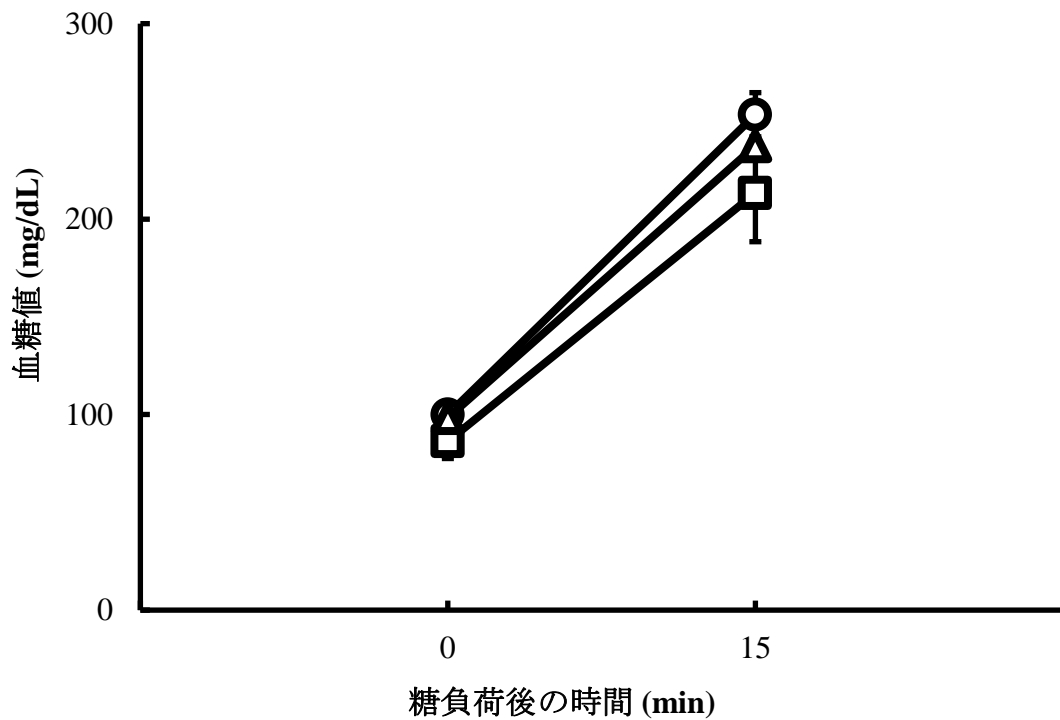


Fig. 3-18 SCP を経口投与しグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- △: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

・各群間において有意差無し。

(Steel-Dwass 法を用いた)

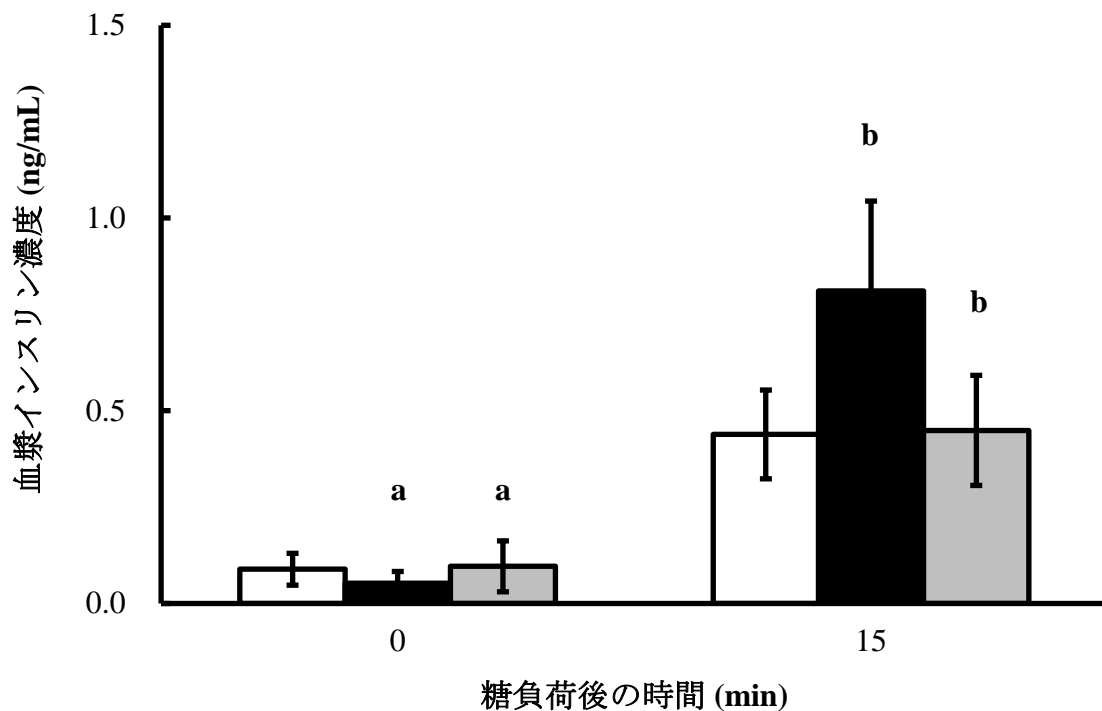


Fig. 3-19 SCP を経口投与しグルコースを腹腔内投与した際の血漿インスリン濃度の経時的変化

□: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

■: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

■: 卵白ペプチド投与群 (1.5 g 卵白ペプチド/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

・ SCP 投与群および卵白ペプチド投与群において、糖負荷 0 および 15 分後の間に有意差あり ( $p < 0.05$ )。

同一群内において、異符号間で有意差あり (Wilcoxon の順位和検定を用いた)

## 9. 腹腔内糖負荷に起因する血糖上昇に及ぼす SCP 静脈内投与の影響

本実験では、SCP を静脈内投与、グルコースを腹腔内投与し、消化管を介さない血中における SCP の作用を検討した。

### 9-1. SCP のエンドトキシン量

SCP を静脈内投与する前に、SCP に含まれるエンドトキシン量を調べた。

本実験は、第 3 章 実験方法 12 により行った。

その結果、Table 3-1 に示す様に、調製日の異なる SCP のエンドトキシン含有量を測定した結果、いずれも 0.1 ng/mg 以下と低値であった。すなわち、SCP に含まれるエンドトキシンが血糖上昇抑制作用に及ぼす影響は小さいことが示唆された。

### 9-2. SCP を静脈内投与した際の血糖値変化

本実験は、第 3 章 実験方法 13 により行った。

SCP 経口投与試験に用いた投与量と同じ 1.5 g/kg 体重の SCP を静脈内投与し、次いで 2.0 g/kg 体重となるようにグルコース溶液を腹腔内投与した際の血糖値変化を Fig. 3-20 に示す。縦軸は血糖値を、横軸は糖負荷後の経過時間を示す。生理食塩水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇して 30 分後に最大値 ( $290 \pm 18$  mg/dL) に達し、その後、120 分後にかけて徐々に血糖値は低下した。SCP 投与群も同様に、糖負荷後血糖値が上昇し、30 分後に最大値に達した ( $217 \pm 24$  mg/dL)。しかし、生理食塩水投与群に比べて SCP 投与群の血糖値は低く、SCP 投与群の血糖値は糖負荷 15 および 30 分後の値が生理食塩水投与群に比べて有意 ( $p < 0.05$ ) に低下した。

SCP を静脈内投与した際の血糖値総和を Fig. 3-21 に示す。縦軸は糖負荷 0 か



ら 120 分後の血糖値の総和を示している。図のように、SCP 投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群に比べて有意差を示さないが低値を示した。

SCP の効果の濃度依存性を検討するため、SCP 経口投与試験に用いた投与量の 1/10 倍量の 0.15 g/kg 体重を設定した。ICR マウスに静脈内投与した際の血糖値変化を Fig. 3-22 に示す。生理食塩水投与群では、血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $411 \pm 24$  mg/dL) に達した。その後、120 分後にかけて徐々に血糖値は低下した。SCP-0.15 g 投与群も同様に、糖負荷後速やかに血糖値は上昇し、30 分後に最大値 ( $319 \pm 44$  mg/dL) に達した。その後、120 分後にかけて徐々に血糖値は低下した。SCP-0.15 g 投与群の血糖値は生理食塩水投与群に比べ低値であり、投与 60 および 120 分後に有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した (それぞれ、 $256 \pm 31$  および  $386 \pm 41$  mg/dL, および  $119 \pm 9$  および  $213 \pm 30$  mg/dL)。

次に、血糖値総和を Fig. 3-23 に示す。SCP-0.15 g 投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群に対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。

以上の結果は、血中の SCP が濃度依存的に血糖の上昇を抑制することを示す。

Table 3-1 SCP のエンドトキシン含有量

ロット	調製日	エンドトキシン含有量
SCP-1	2016/11/22	0.014 ng/mg (0.112 EU/mg)
SCP-2	2016/6/16	0.100 ng/mg (0.800 EU/mg)

EU : エンドトキシンユニット (8 EU/ng エンドトキシン)

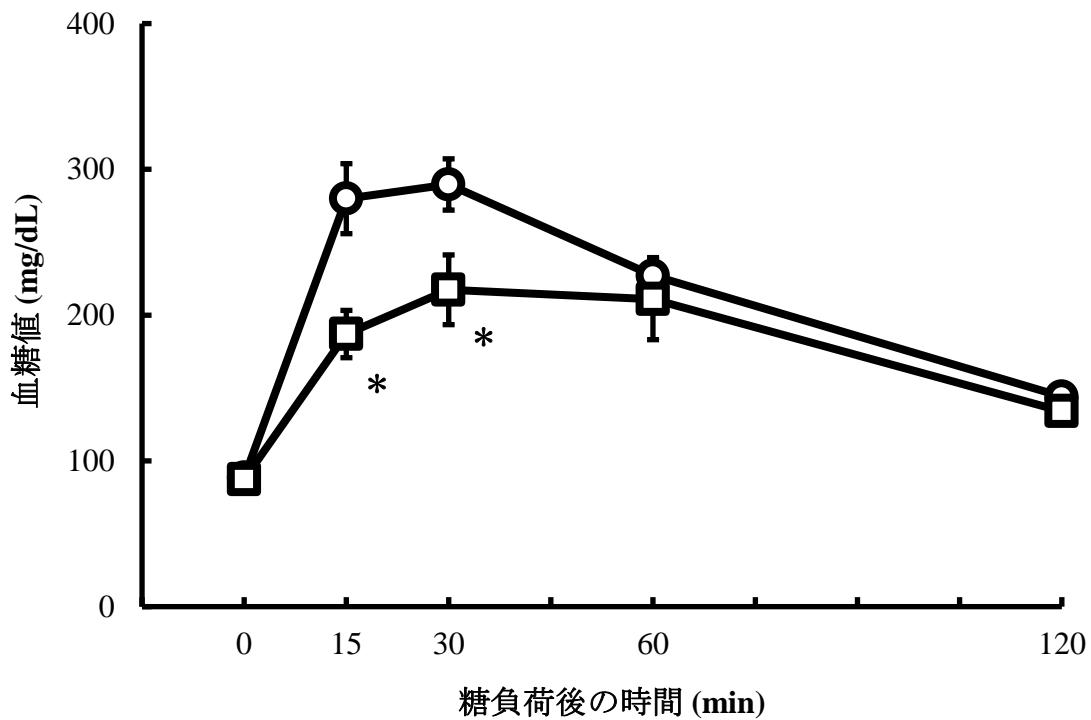


Fig. 3-20 ICR マウスに 1.5 g/kg 体重の SCP を静脈内投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=8)

・糖負荷 15 および 30 分後において両群間に有意差あり ( $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

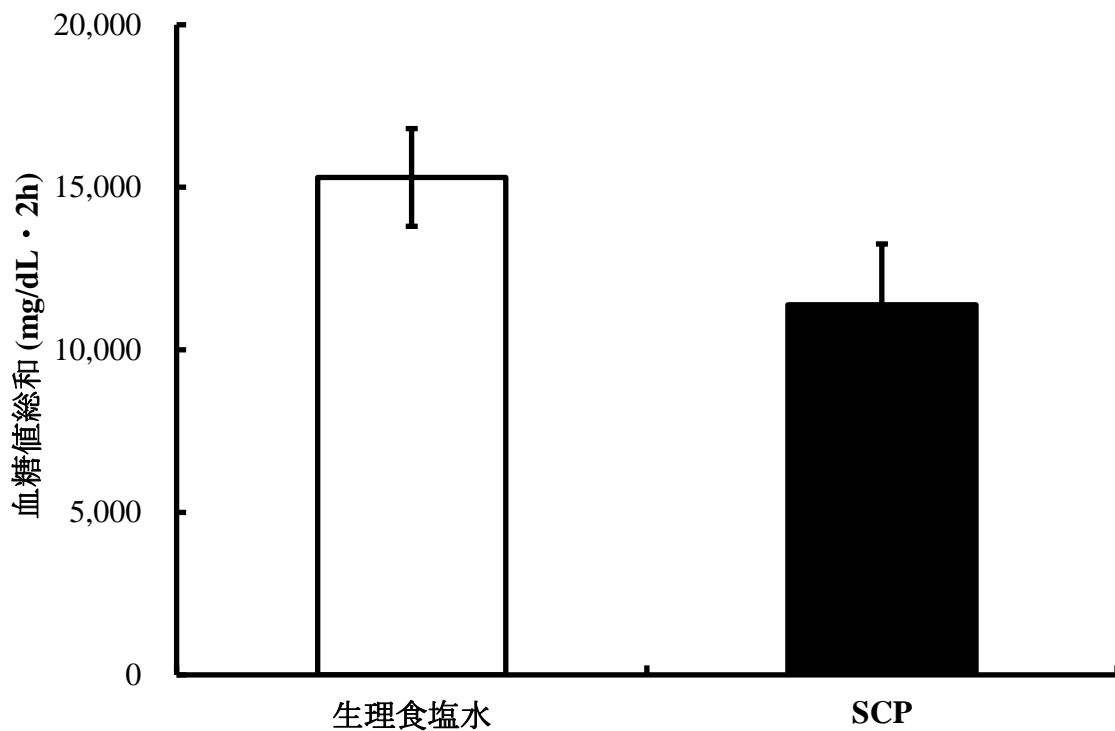


Fig. 3-21 ICR マウスに 1.5 g/kg 体重の SCP を静脈内投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=8)

- ・両群間に有意差は認められないものの，SCP 投与群は生理食塩水投与群よりも血糖の上昇が抑制される傾向が認められた。

(Student の  $t$  検定を用いた)

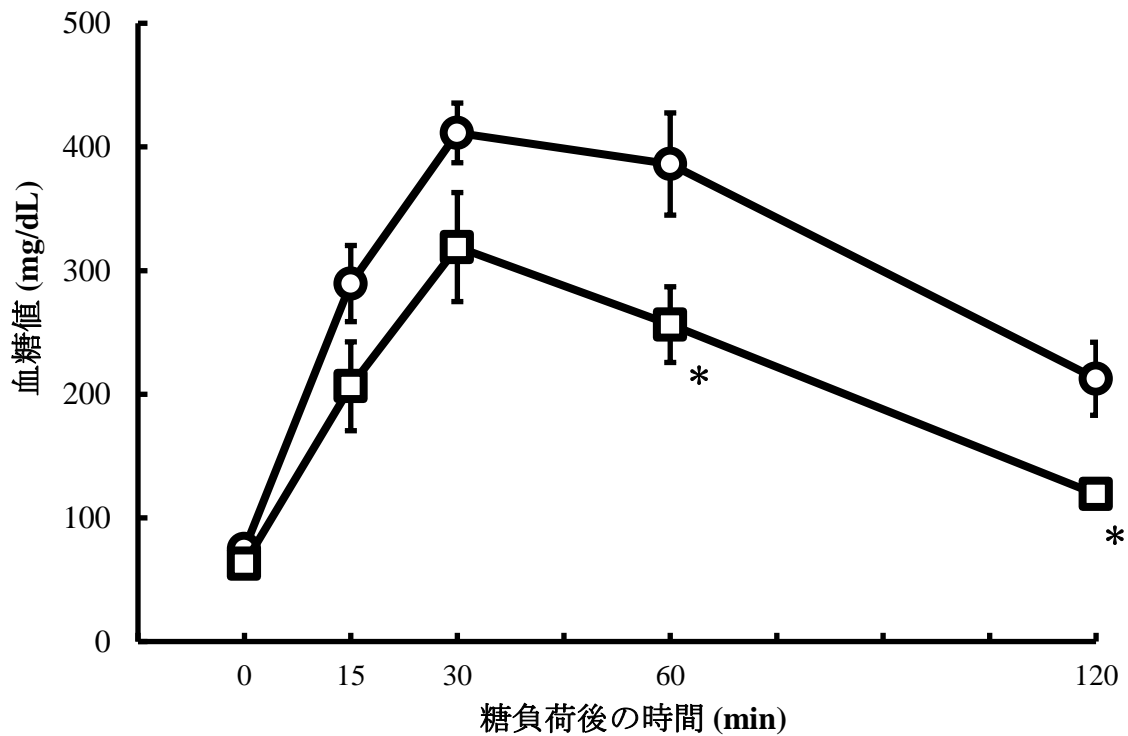


Fig. 3-22 ICR マウスに 0.15 g/kg 体重の SCP を静脈内投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- : SCP-0.15 g 投与群 (0.15 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・糖負荷 60 および 120 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Welch の  $t$  検定を用いた)

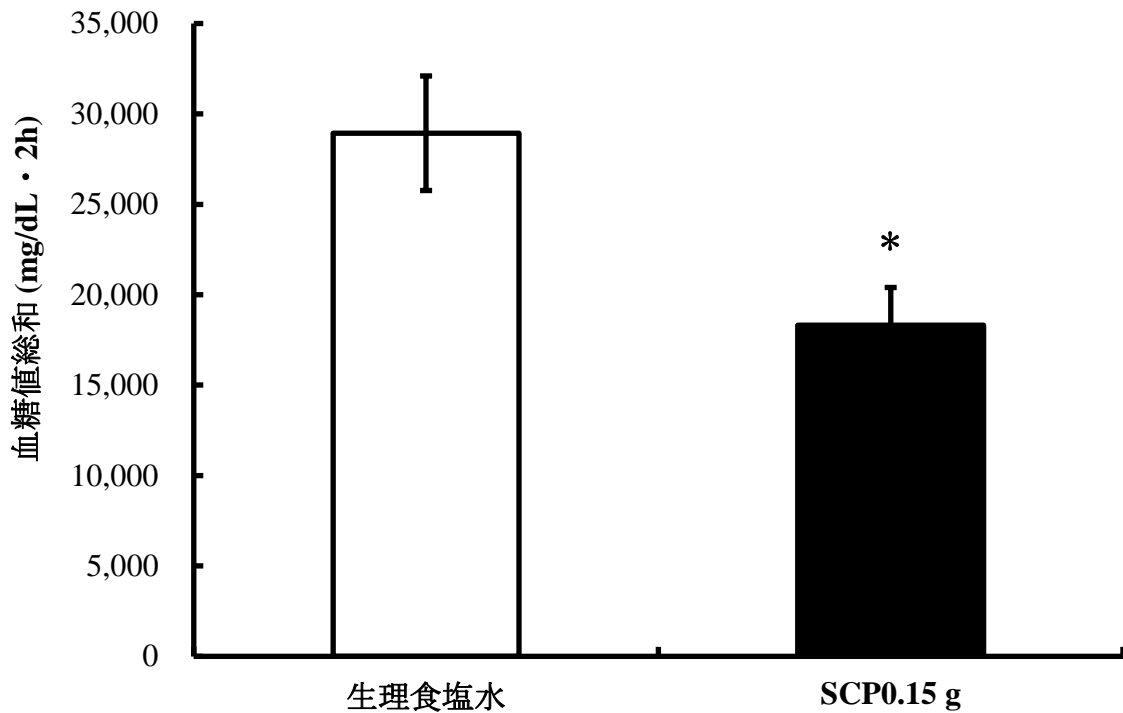


Fig. 3-23 ICR マウスに 0.15 g/kg 体重の SCP を静脈内投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

SCP0.15 g: SCP-0.15 g 投与群 (0.15 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Student の  $t$  検定を用いた)

### 9-3. 腹腔内糖負荷に起因する血糖上昇に及ぼす SCP 静脈内投与タイミングの影響

静脈内投与された SCP の血中滞留時間を検討することを目的として、グルコース腹腔内投与 15 分前に SCP を静脈内投与した。

本実験は、第 3 章 実験方法 13 により行った。

SCP 静脈内投与後の血糖値経時的変化を Fig. 3-24 に示す。生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇し 30 分後に最大値 ( $299 \pm 33$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は減少し 120 分後にかけて徐々に低下した。SCP 投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇し、30 から 60 分後に最大値に達した (いずれも  $262 \pm 41$  mg/dL)。その後、120 分後にかけて徐々に低下した。SCP 投与群の血糖値は、30 分後までは生理食塩水投与群より低値、60 および 120 分後は高値を示したが、両群間に有意差は認められなかった。

そこで、SCP の静脈内投与からグルコースの腹腔内投与までの時間を 15 分前から短縮し、グルコース腹腔内投与 5 分前に SCP を静脈内投与した。SCP 静脈内投与後の血糖値経時的変化を Fig. 3-25 に示す。生理食塩水投与群の血糖値は糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $352 \pm 12$  mg/dL) に達した。その後、120 分後かけて徐々に低下した。SCP 投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $241 \pm 37$  mg/dL) に達した。30 から 60 分後まで一定の値 (いずれも  $235 \pm 20$  mg/dL) を示し、その後、120 分後にかけて徐々に低下した。SCP 投与群の血糖値は、糖負荷後全ての時間において生理食塩水投与群よりも低値を示し、30 分後の値は生理食塩水投与群に対して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であった。

以上の結果は、血中の SCP が血糖上昇抑制作用を呈する時間は、経口投与された SCP が小腸から血中へ移行してからの 15 分間という比較的短時間に限られることを示唆する。

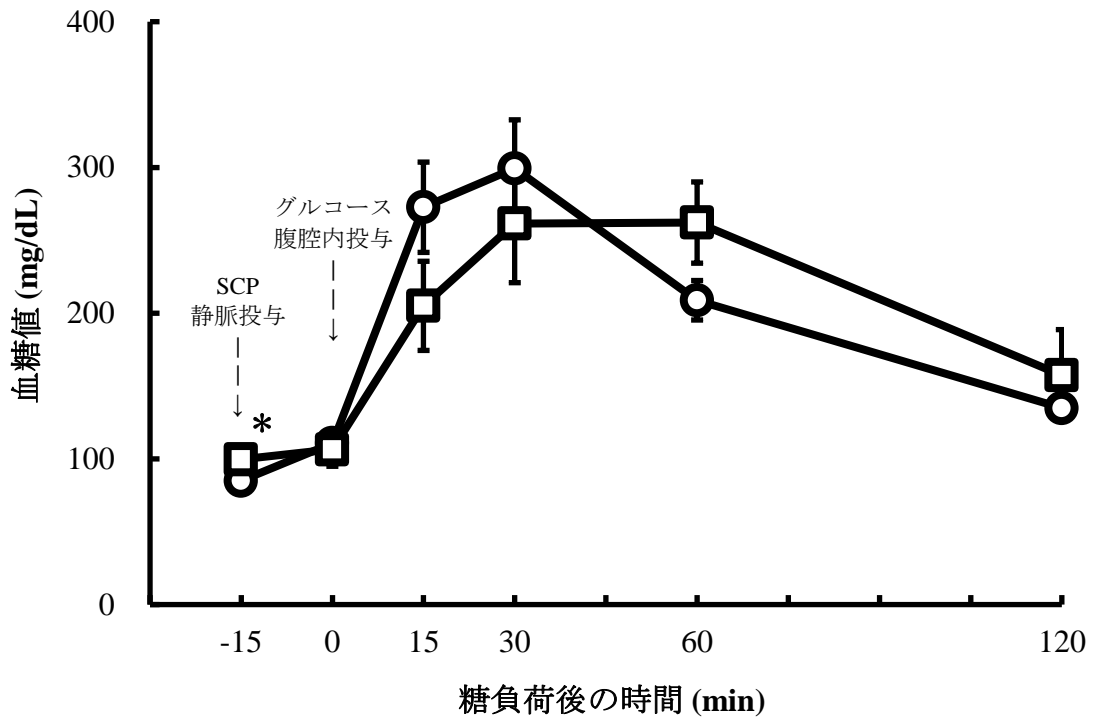


Fig. 3-24 ICR マウスに SCP を静脈内投与し，その 15 分後にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的变化

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

・糖負荷-15 分において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ ).

(Steel-Dwass 法を用いた)



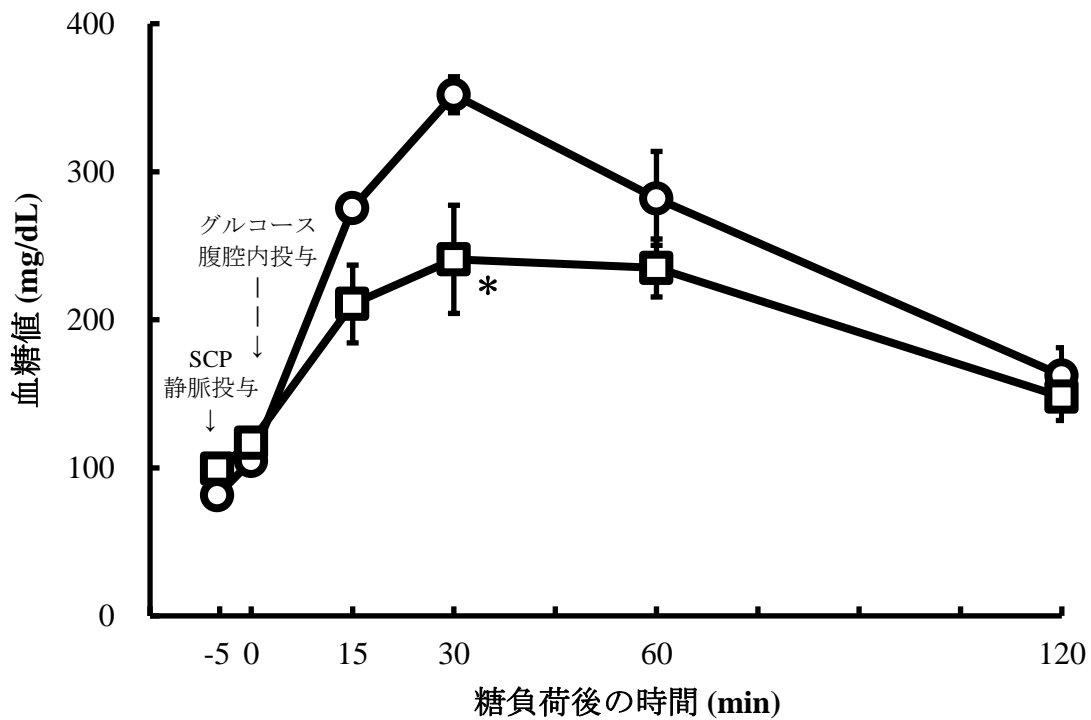


Fig. 3-25 ICR マウスに SCP を静脈内投与し、その 5 分後にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

○: 生理食塩水投与群 [生理食塩水を静脈内投与+グルコース (2.0 g/kg 体重) を腹腔内投与] (N=6)

□: SCP 投与群 [SCP (1.5 g/kg 体重) を静脈内投与+グルコース (2.0 g/kg 体重) を腹腔内投与] (N=6)

・糖負荷 30 分後において両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

#### 9-4. SCP 静脈内投与時の血漿インスリンおよび総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度の測定

SCP を静脈に直接投与した際の血糖上昇抑制機構を検討する一環として、血漿中のインスリンおよび総 GLP-1 濃度変化を測定した。

本実験は、第 3 章 実験方法 14 により行った。

ICR マウスに SCP を静脈内投与、グルコースを腹腔内投与した際の血糖値変化を Fig. 3-26 に示す。グラフは、糖負荷後全ての測定時間において、異なる個体を測定して得た血糖値の平均を示す。生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇して 30 分後に最大値 ( $251 \pm 35$  mg/dL) に達し、その後 120 分後にかけて徐々に低下した。SCP 投与群の血糖値も同様に、糖負荷後速やかに上昇して 15 分後に最大値 ( $184 \pm 33$  mg/dL) に達し、その後 120 分後にかけて緩やかに低下した。糖負荷 30 分後において、SCP 投与群の血糖値 ( $145 \pm 17$  mg/dL) は生理食塩水投与群 ( $251 \pm 35$  mg/dL) より有意に低値を示した。

上述の実験における血漿インスリン濃度変化を Fig. 3-27 に示す。グラフは、糖負荷後全ての測定時間において、異なる個体を測定して得た血漿インスリン濃度の平均を示す。生理食塩水投与群の血漿インスリン濃度は、糖負荷後速やかに上昇して 15 分後に最大値 ( $1.00 \pm 0.19$  ng/mL) に達し、その後 120 分後にかけて徐々に低下した。SCP 投与群の最大血漿インスリン濃度も同様に、糖負荷後速やかに上昇して 15 分後に最大値 ( $1.79 \pm 0.80$  ng/mL) に達し、その後 120 分後にかけて緩やかに低下した。両群間で有意差は認められなかったが、糖負荷 15 および 30 分後において、SCP 投与群の血漿インスリン濃度は低値を示し、60 および 120 分後において、生理食塩水投与群の血漿インスリン濃度は低値を示した。

SD ラットに SCP を静脈内投与し、次いでグルコースを腹腔内投与した際の血糖値変化を Fig. 3-28 に示す。生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに

上昇して 15 分後に最大値 ( $252 \pm 28$  mg/dL) に達し、その後 60 分後 ( $149 \pm 5$  mg/dL) にかけて徐々に低下した。一方、SCP 投与群の血糖値は、糖負荷により上昇したが、急激な上昇は認められず、60 分後 ( $117 \pm 8$  mg/dL) にかけて緩やかに上昇した。また、SCP 投与群の血糖値は生理食塩水投与群に対していずれの時間においても低く、15 および 30 分後において極めて有意 ( $p < 0.01$ )、60 分後において有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であった。

この実験における血漿総 GLP-1 濃度の変化を Fig. 3-29 に示す。生理食塩水投与群の血漿総 GLP-1 濃度は 30 分後にかけて緩やかに低下し、初期濃度 ( $7.0 \pm 1.1$  pM) を上回ることはなかった。一方、SCP 投与群の血漿総 GLP-1 濃度は、糖負荷後速やかに上昇して 30 分後に最大濃度 ( $41.9 \pm 10.3$  pM) に達し、その後 60 分後 ( $28.1 \pm 11.3$  pM) にかけて徐々に低下した。15 および 30 分後の SCP 投与群の血漿総 GLP-1 濃度は、生理食塩水投与群に対して極めて有意 ( $p < 0.01$ ) に低値であった。

以上の結果は、血中の SCP が GLP-1 の分泌を促進し、それによりインスリンの分泌量が増加して、血糖の上昇が抑制されることを示す。

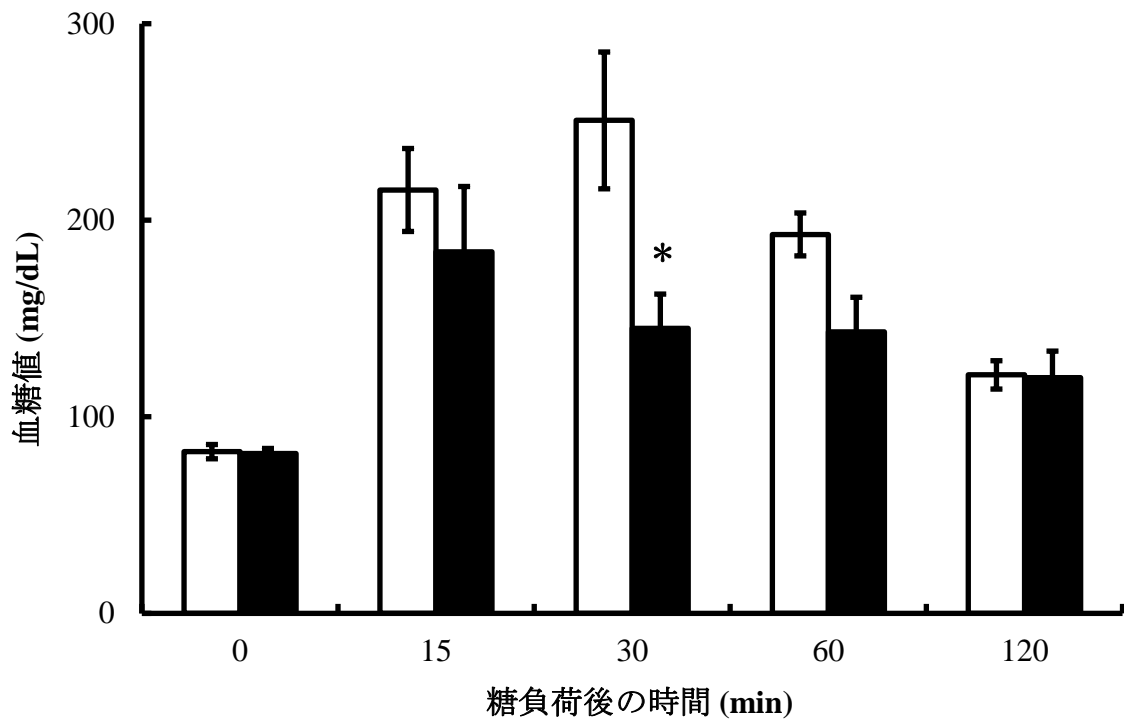


Fig. 3-26 ICR マウスに SCP を静脈内投与し，それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的変化

□: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=3~5)

■: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=3~5)

・糖負荷 30 分後において，両群間に有意差あり (\*;  $p < 0.05$ ).

(Student の  $t$  検定を用いた)

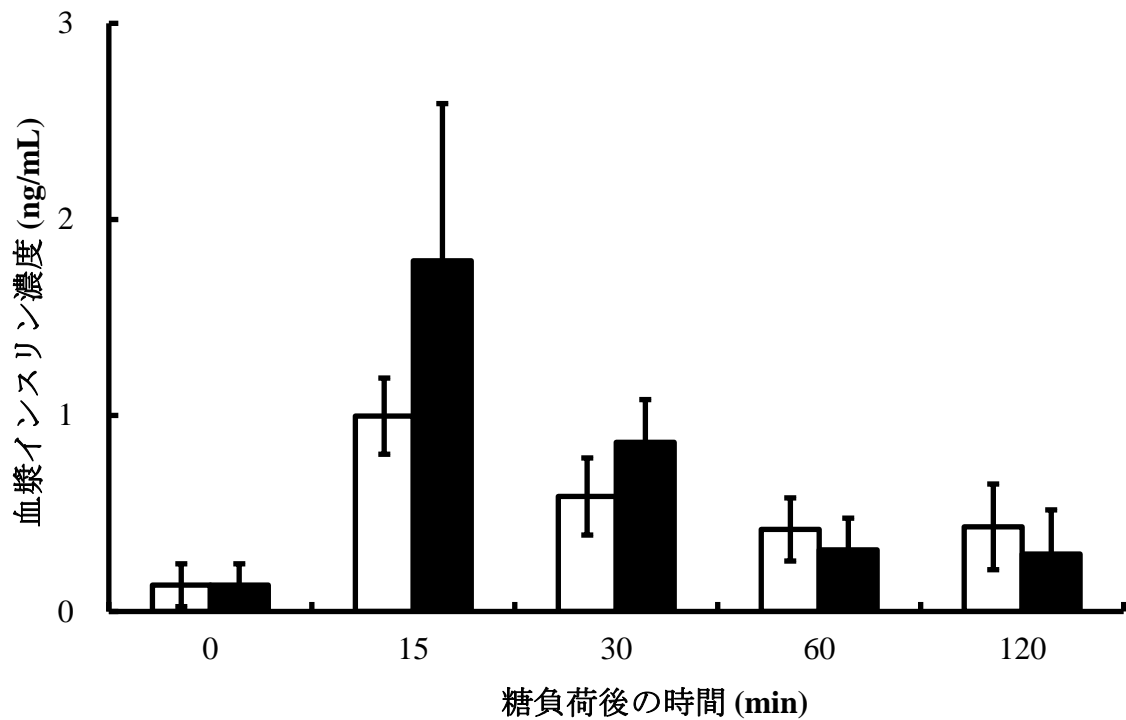


Fig. 3-27 ICR マウスに SCP を静脈内投与し、それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血漿インスリン濃度の経時的変化

□: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=3~5)

■: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=3~5)

・両群間において有意差無し。しかしながら、SCP 投与群において糖負荷 15 および 30 分後の血漿インスリン濃度が高値を示す傾向が認められた。

(Welch の  $t$  検定を用いた)

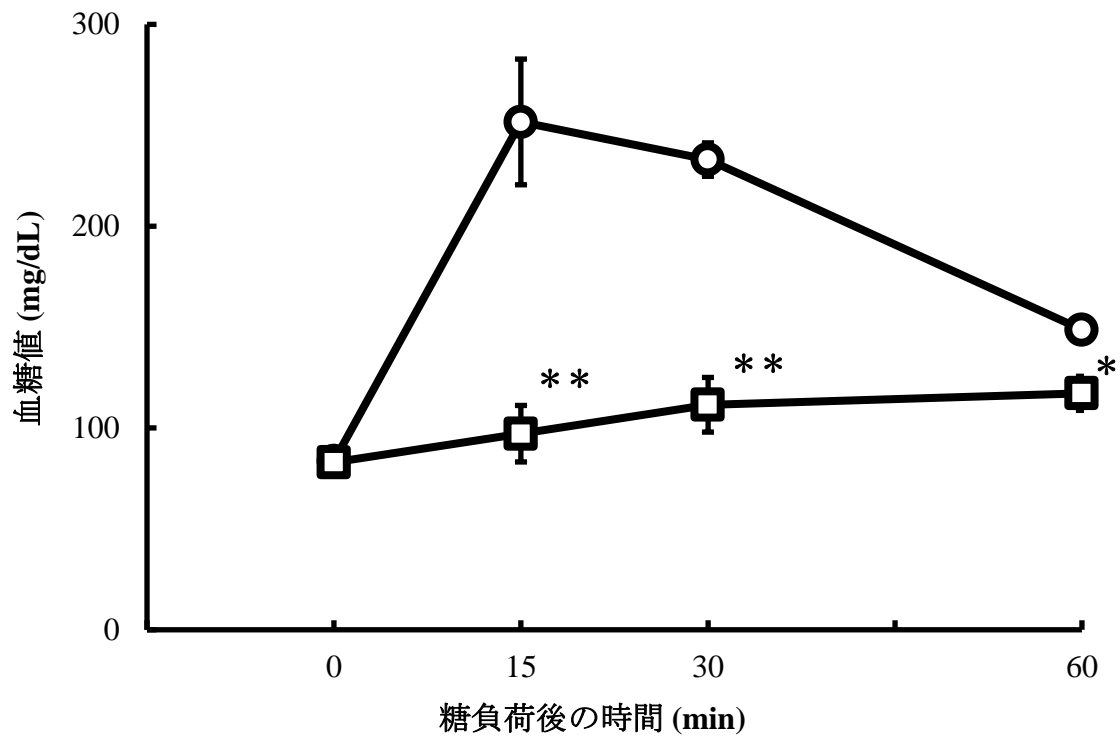


Fig. 3-28 SD ラットに SCP を静脈内投与し、それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血糖値の経時的变化

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

・糖負荷 15, 30 (\*\*;  $p < 0.01$ ) および 60 (\*;  $p < 0.05$ ) 分後において有意差あり。

(Student の  $t$  検定を用いた)

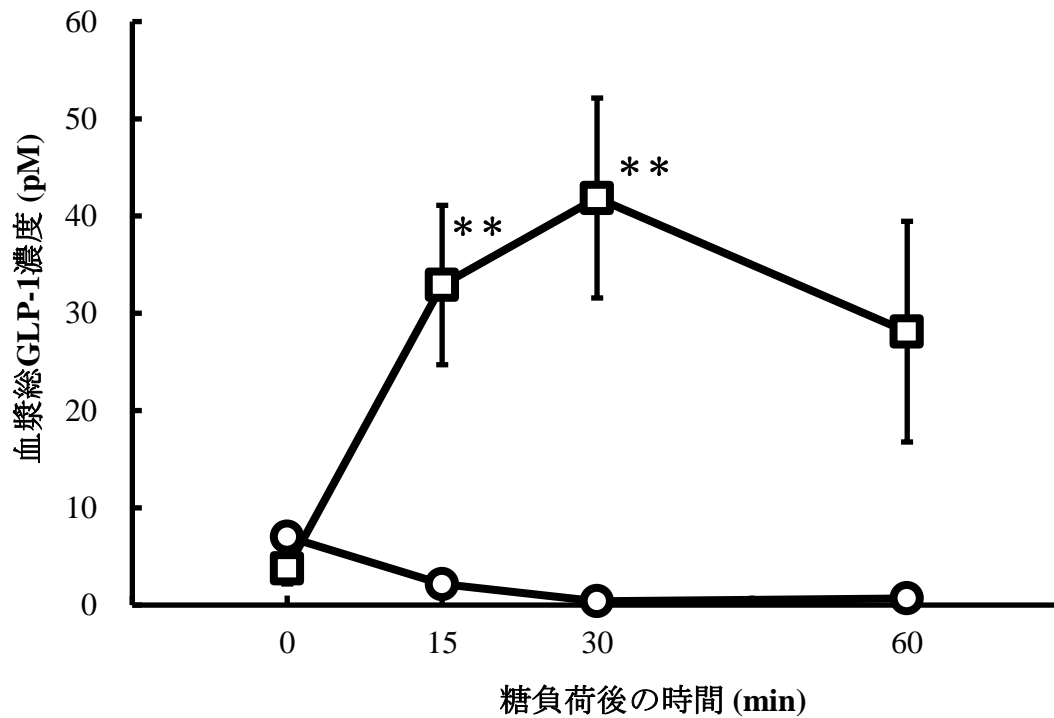


Fig. 3-29 SD ラットに SCP を静脈内投与し、それと同時にグルコースを腹腔内投与した際の血漿総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度の経時的変化

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP /kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

・糖負荷 15 および 30 分後において有意差あり (\*\*;  $p < 0.01$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

### 9-5. I型糖尿病モデルラットに SCP を静脈内投与した際の血糖値変化

本実験は、第3章 実験方法 15 により行った。

I型糖尿病モデルラットに SCP を静脈内投与した際の血糖値変化を Fig. 3-30 に示す。STZ を投与しない生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇し、30 分後に最大値 ( $220 \pm 23$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は緩やかに低下した。STZ-生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速やかに上昇し、60 分後に最大値 ( $541 \pm 1$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は僅かに低下し、120 分後の値は  $469 \pm 19$  mg/dL であった。STZ-SCP 投与群の血糖値は、STZ-生理食塩水投与群と同様に 60 分後に最大値 ( $566 \pm 30$  mg/dL) に達した。その後、血糖値は殆ど変わらず、120 分後の値は  $561 \pm 32$  mg/dL であった。STZ-生理食塩水投与群および STZ-SCP 投与群の血糖値は、STZ を投与しない生理食塩水投与群と比較していずれの測定時間においても有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) に高値を示した。しかし、STZ-生理食塩水投与群の血糖値と STZ-SCP 投与群のそれの間には有意差は認められなかった。以上の結果は、血中へ投与された SCP の血糖上昇抑制作用は、インスリン様作用とは異なる作用機序によることを示している。



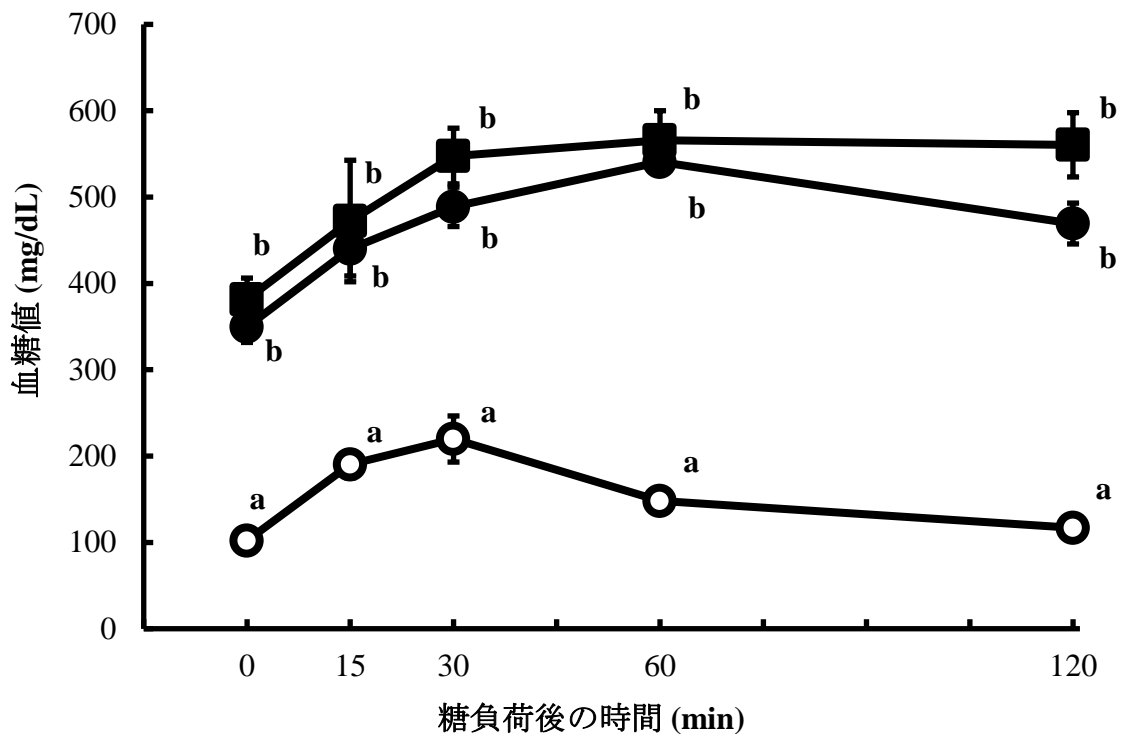


Fig. 3-30 I型糖尿病モデルラットに SCP を静脈内投与し腹腔内糖負荷した際の血糖値の経時的変化

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を健康ラットに腹腔内投与, N=4)

●: STZ-生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重をI型糖尿病モデルラットに腹腔内投与, N=3)

■: STZ-SCP 投与群 (1.5 g SCP /kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重をI型糖尿病モデルラットに腹腔内投与, N=4)

・糖負荷 15 (p<0.05) および 0, 30, 60, 120 (p<0.01) 分後において生理食塩水投与群と STZ-生理食塩水投与群の間に有意差あり。

・糖負荷 0, 15, 30, 60, 120 (p<0.01) 分後において生理食塩水投与群と STZ-SCP 投与群の間に有意差あり。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)

## 10. SCP の DPP-IV 阻害作用

CP は、「Gly-Pro」または「Gly-Ala」配列を構造中に含むことが多い<sup>34,39)</sup>。これらの配列を有するペプチドは、GLP-1 分解酵素である DPP-IV の拮抗阻害剤として報告されている<sup>42,50)</sup>。SCP の主要アミノ酸組成は、Gly が 34.3%、Pro が 11.6%、Ala が 11.6%および Hyp が 6.8%であり、一般的なコラーゲンのアミノ酸組成と類似し、SCP が主としてベステル・チョウザメの未利用部位に含有されるコラーゲンに由来すると考察された (第 4 章にて詳述)。このことから、SCP には「Gly-Pro」や「Gly-Ala」の配列を持つペプチドが比較的多く含有されると予測された。そこで、本研究では SCP が GLP-1 の分解を抑制するか検討するため、その DPP-IV 阻害活性を測定した。

本実験は、第 3 章 実験方法 16 により行った。

SCP の DPP-IV 阻害活性を測定した結果を Fig. 3-31 に示す。縦軸は DPP-IV が基質を分解し生じた p-ニトロアニリン (p-NA) 濃度、横軸は SCP 濃度を示す。図の様に、基質分解物である p-NA 濃度は SCP の濃度依存的 (0~5 mg/mL) に減少し、IC<sub>50</sub> 値は 934 µg/mU であった。

SCP の DPP-IV 阻害作用を、既報と比較した結果を Table 3-2 に示す。他の水産物由来 CP と比較して、SCP はやや高い IC<sub>50</sub> 値を示した。

以上の結果は、*in vitro* において、SCP が DPP-IV 阻害活性を示すが、他の CP と比較すると、SCP の DPP-IV 阻害活性は低いことを示す。

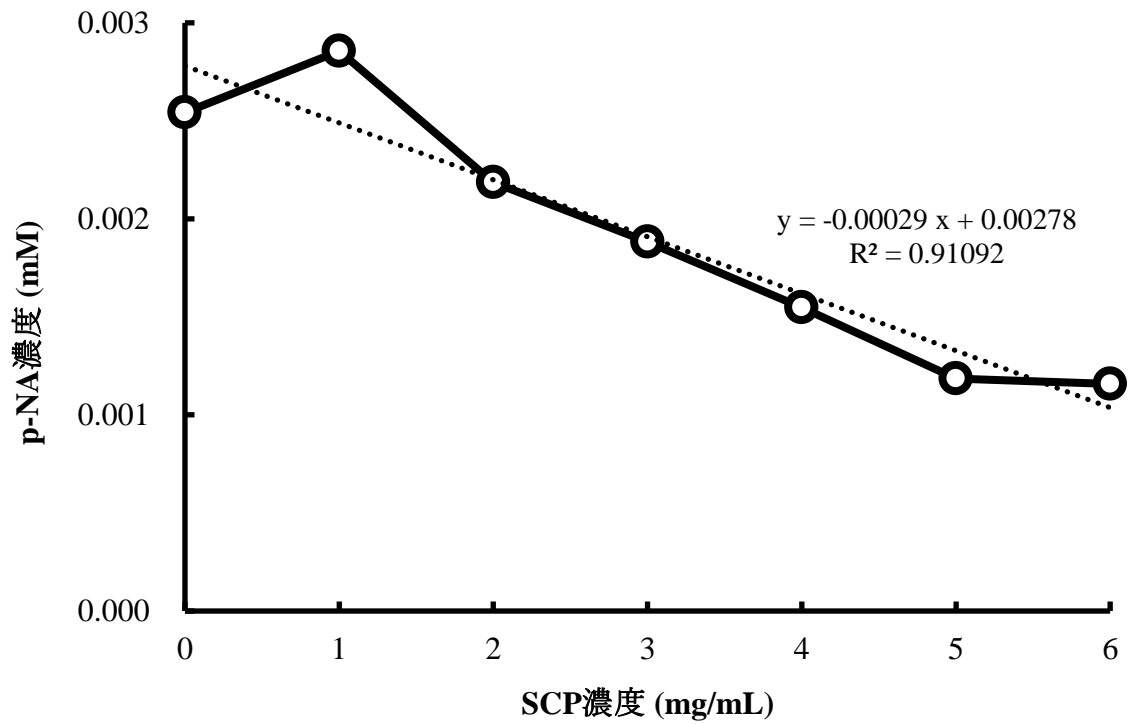


Fig. 3-31 DPP-IV 活性に対する SCP 濃度の影響

図中の各測定値は、3回の測定の平均値。

IC<sub>50</sub> 値 : 934 μg/mU。

Table 3-2 SCP と既報との IC<sub>50</sub> 値の比較

試料	分解に用いた 酵素	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mU}$ )	平均 分子量 (Da)	mol 換算 ( $\mu\text{mol}/\text{mU}$ )	論文
SCP	パパイン	934	1,400*	0.667	本研究
アトランティック クサーモン皮 CP	Flavourzyme	270	< 1,000	0.270	Li-Chan et al. <sup>42)</sup>
Gly-Pro-Ala-Glu	(合成ペプチド)	0.924	372.4	$0.248 \times 10^{-2}$	
Gly-Pro-Gly-Ala	(合成ペプチド)	1.26	300.4	$0.210 \times 10^{-2}$	
ティラピア鱗 CP	(不明)	616	(不明)	(不明)	Iba et al. <sup>43)</sup>
コイ皮 CP	Esperase	425	2,935	0.145	Sila et al. <sup>44)</sup>
	Savinase	521	2,322	0.224	
	Alcalase	504	1,995	0.253	
	Trypsin	479	3,925	0.122	
	Izyme G	714	5,797	0.123	
	Protamex	467	2,325	0.201	
	Neutrase	529	7,878	0.067	
	Prptidase	527	15,053	0.035	

\*: ゲル濾過 HPLC カラムによる溶出位置から推定された SCP の平均分子量 (第 4 章にて詳述)

## 小考察

第2章で、ICR マウスおよびSD ラットを用いた糖負荷試験においてSCP が血糖上昇抑制作用を示すことが明らかになった。そこで本章では、摂取したグルコースの体内挙動に対してSCP がどのような影響を及ぼすか検討し、SCP の血糖上昇抑制作用機構を検討した。

摂取した食品による血糖上昇抑制機構として、次の五項目が考えられる。第一は $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害である。第二はグルコースの胃内滞留時間の延長効果である。胃での滞留時間が延長すると胃から小腸へのグルコースの流入速度が低下する。そのため、小腸でのグルコースの吸収が穏やかとなり血糖の急激な上昇が抑制されると推察できる。第三は小腸でのグルコース吸収阻害である。これは、SCP の作用により小腸におけるグルコースの吸収が阻害され、吸収されなかったグルコースが糞便中に排出されるというメカニズムに基づく。第四はインスリン分泌促進作用である。SCP が直接的もしくは間接的に膵臓に作用してインスリンの分泌を促進させることで、血糖を低下させるというメカニズムが考えられる。さらに第五の働きとして、SCP のインスリン様作用である。すなわちSCP がインスリン非依存的に組織や肝臓に作用してグルコースの取り込みを促進させることで、血糖を低下させるというメカニズムが想定される。そこで本研究では、先の研究<sup>53)</sup>によってCP の血糖上昇抑制作用に関与すると推察されている $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用、胃内グルコース滞留能、小腸内でのグルコース拡散抑制効果、インスリン分泌促進作用、および、SCP のインスリン様作用を検討した。

第一に、食品由来の血糖上昇抑制機構として広く知られる、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害能について検討した。 $\alpha$ -グルコシダーゼは小腸の微絨毛膜表面で膜消化を担う消化酵素の総称であり、オリゴ糖やマルトースなどの二糖類を単糖まで加水

分解する<sup>80)</sup>。Ohta<sup>78)</sup>はエゾイシゲの70%エタノール抽出物が $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有することを見出し、Wistar ラットを用いたショ糖負荷試験において血糖上昇抑制作用を示すことを報告した。そこで、種々濃度の SCP 溶液 (10~200 mg/mL) を用いて SCP の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害を検討したが、いずれの濃度においても SCP は $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を阻害しなかった (Figs. 3-1 および 3-2)。この結果から、SCP の血糖上昇抑制は $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害によるものではないことが示唆された。

第二に、胃内グルコース滞留能を検討した。その結果、SCP は胃内にグルコースを滞留させ、腸への移行を抑制することが明らかになった (Fig. 3-3)。この SCP の経口投与による胃から小腸への移送速度の低下は、解剖による胃の目視においても確認された (Figs. 3-4 および 3-5)。一般に、胃から小腸への移送速度は試料中の固形分量に伴い遅くなるが<sup>81,82)</sup>、SCP 投与群の試料中可溶性固形分 (Brix) は蒸留水投与群のそれに比べて高い (それぞれ、23.3 および 13.3%)。また、タンパク質を摂取すると、摂取したタンパク質が小腸へ一度に移送されるのを防ぐために、胃から小腸への移送速度が著しく抑制される<sup>83)</sup>。このような理由から、SCP 試料と同時に経口投与されたグルコースが、SCP と共に胃内に滞留したと考えられる。

第三に、小腸でのグルコース吸収阻害能を検討した。その結果、蒸留水投与群と比較して、SCP 投与群では糞中のグルコース濃度が極めて有意 ( $p<0.01$ ) に高値を示した (Fig. 3-6)。そこで、SCP によってグルコースが小腸で吸収阻害を受ける機構を検証した。グルコースは小腸内で3つの過程を経て体内に吸収される<sup>83)</sup>。すなわち、(1) 小腸管腔内から微絨毛膜上への移動、(2) SGLT1 (Sodium/glucose cotransporter 1) による微絨毛膜上から上皮細胞中への取り込み、および (3) GLUT2 (Glucose transporter 2) による上皮細胞内から毛細血管への輸

送である。これら3つの過程に及ぼすCPの影響を調査する場合、(2) SGLT1と(3) GLUT2による機構に関しては *in vivo* または *ex vivo* 実験を行う必要がある。しかし、(1) 小腸管腔内から微絨毛膜上への移動については *in vitro* 系でも検討が可能である。そこで本研究では、単純な腸管モデルとして透析膜を使用し、小腸管腔内から微絨毛膜上へのグルコースの移動に対して SCP が与える影響力について検討した。その結果、SCP は全ての測定時間においてグルコースの透過量を有意または極めて有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に抑制した (Fig. 3-7)。

このような現象が生じた原因として、透析膜管内におけるグルコースの拡散速度の低下が考えられる。グルコースが透過するには、透析膜管内から透析膜内壁までグルコースが移動する必要があり、そこに SCP が共存するとグルコースの透析膜管内での移動が阻害され、結果的にグルコースの透過量が抑制されるというものである。消化管内容物は小腸管腔内で層流を形成したまま移動すると報告<sup>84)</sup>されているので、小腸管腔内のグルコースは濃度勾配による分子拡散によって中心から外縁である微絨毛膜へ移動する。そして、微絨毛膜付近のグルコースが吸収されその濃度が減少すると、小腸管腔内のグルコースはさらに微絨毛膜に向かって自己拡散で移動する。透析膜内では乱流や渦による直径方向の攪拌は無く層流が形成されるため、透析膜中のグルコースは中心から透析膜壁に向かって自己拡散で移動すると考えられる。本実験結果は、SCP が、同時に摂取した食物中に含まれるグルコースの消化管内における受動拡散を抑制することで、腸管吸収を妨げる可能性があることを示している。

本実験では比較群を設定していないため、グルコースの拡散抑制作用が SCP に特異的なはたらきであるかは断定できない。しかし、*in vivo* において SCP がグルコースの吸収を阻害するならば、吸収されなかったグルコースは排出されると予想される。そこで、糞中グルコース濃度を測定した結果、経口投与したグ

ルコース量に比べて排出されたグルコース量は、グルコースとともに蒸留水を経口投与した対照群では $6.4 \pm 0.1\%$ であったのに対し、SCP 投与群では $9.3 \pm 0.1\%$ と極めて有意 ( $p < 0.01$ ) に高値を示し、SCP が小腸におけるグルコース吸収を阻害することが裏付けられた。

しかしながら、単糖であるグルコースは消化性糖質であり、摂取量のほとんどが小腸の十二指腸および空腸で吸収されて血中へ移行し、生体のエネルギーとして利用される<sup>85)</sup>。本研究において、投与されたグルコースが小腸を通過して大腸に達し、常在する腸内細菌による発酵を受けて短鎖脂肪酸などに代謝されたとしても、大腸に達するグルコースの量は小腸で吸収される量に比べるとわずかであると考えられている<sup>86)</sup>。実際、Fig. 3-6によると、糞中に排泄されたグルコース量は経口投与したグルコース量の約9%であり、投与された大部分のグルコースは体内に吸収されている。この事実は、SCP の血糖上昇抑制作用が、血中に移行したグルコースを速やかに組織に取り込ませる機構によってもたらされたことを示唆している。

そこで第四に、SCP のインスリン分泌促進能を検討した。ICR マウスに対して SCP とグルコースを共に経口投与し、血漿インスリン濃度を測定した。その結果、SCP 投与群の血糖値は生理食塩水投与群および卵白ペプチド投与群よりも低値を示した (Fig. 3-8)。しかしながら、糖負荷 15 分後の SCP 投与群の血漿インスリン濃度は生理食塩水投与群と同様の値であり、卵白ペプチド投与群よりも低値を示した (Fig. 3-9)。この理由として、SCP 経口投与により血漿インスリン濃度は上昇するが、糖負荷後の短時間で最大血漿インスリン濃度に達し、糖負荷 15 分後では血漿インスリン濃度が減少している可能性が考えられる。

そこで、第五に I 型糖尿病モデルマウスを用いて SCP のインスリン様作用を検討したが、SCP にはそのような作用は見いだせなかった。すなわち、SCP の血



糖上昇抑制作用はインスリン様作用によるものではなく、インスリンの分泌を介した作用であることが示唆された。

Mochida ら<sup>87)</sup>は、トウモロコシ難消化性タンパク質 Zein の加水分解物が小腸の L 細胞を刺激し、インスリン分泌促進能を有する GLP-1 の分泌量を増加させることにより血糖の上昇を抑制することを報告した。この知見を踏まえて、SCP の GLP-1 分泌促進能について検討したところ、SCP 投与マウスの血漿総 GLP-1 (活性型 GLP-1 + 不活性型 GLP-1) 濃度は糖負荷 15 分後に上昇し (Fig. 3-12) , SCP が GLP-1 分泌促進作用を有することが明らかとなった。しかしながら、Figs. 3-9 および 3-11 に示した様に、糖負荷 15 分後において SCP 投与群の血糖値が低値を示すことから、前述のようにインスリン分泌は糖負荷後 15 分以内<sup>88)</sup>に生ずると考えられる。さらに、GLP-1 分泌はインスリン分泌促進に先行することから、SCP の経口投与による GLP-1 分泌促進は、糖負荷後の極めて短時間で生ずる現象であると考えられる。

Figure. 3-5 によると、糖負荷 15 分後では、経口投与した SCP は胃内にまだ多く滞留していた。本論文中にデータは記載していないが、マウスに SCP を経口投与した 15 分後には、投与試料の移動先端が十二指腸と空腸の境界となるトライツ靭帯より 1.0~1.5 cm 遠位方向 (空腸側) に到達しており、胃は大きく膨らんでいた。GLP-1 を分泌する L 細胞は小腸上部の十二指腸から下部の回腸まで広く分布しており、摂取された食品由来成分を直接的・間接的に認識し GLP-1 を分泌する<sup>89)</sup>。したがって、経口投与後、十二指腸に到達した SCP によって L 細胞が刺激され、GLP-1 が速やかに分泌され、その結果インスリン分泌が促進されたことで SCP 投与群の血糖値が低下したと考えられる。

そこで、消化管中の SCP が GLP-1 を介したインスリン分泌促進能を示すことを検証するために、SCP を消化管内に投与し、グルコースを腹腔内に投与して検

討を行った。まず、SD ラットを用いて腸管ループ試験を行った結果、有意差は認められなかったものの、SCP 投与群で血糖の上昇が抑制される傾向が認められた (Fig. 3-13)。この事実は、SCP が胃内滞留の延長と小腸での吸収抑制以外の経路でも血糖の上昇を抑制していることを示唆する。また、SCP が小腸を介して血糖上昇を抑制することを支持する。さらに ICR マウスを用いた SCP 経口投与-腹腔内糖負荷試験を行った結果、SCP 投与群で血糖上昇抑制作用が認められた (Figs. 3-14~3-17)。そして、糖負荷 15 分後の SCP 投与群の血漿インスリン濃度は、生理食塩水および卵白ペプチド投与群より高値を示した (Fig. 3-19)。しかし、SCP の経口摂取からグルコース摂取までの時間差が大きいと血糖上昇抑制作用が得られず、SCP 作用時に既に通常の糖代謝が働き、見かけ上 SCP の効果は低かったと推察される (Fig. 3-17)。GLP-1 は血糖依存的に分泌されることから、これらの結果もまた、消化管内の SCP が GLP-1 を介して血糖上昇抑制作用を示すこと支持している。

前述の経口糖負荷試験 (Fig. 3-9) に対して、腹腔内糖負荷試験では糖負荷 15 分後に比較群に比べ SCP 投与群の血漿インスリン濃度が高値を示した (Fig. 3-19)。その理由として、血中への糖の取り込み機序が異なることが考えられる。すなわち、経口糖負荷では、通常の食事と同様に糖は小腸を介して速やかに血中に取り込まれる。これに対して、腹腔内糖負荷では糖は毛細血管から取り込まれるため、経口糖負荷および経静脈糖負荷と比べて血中に取り込まれる速度はグルコース濃度に関わらず遅い<sup>88,90)</sup>。このように、糖の取り込み機序の違いにより、血糖値の上昇が体に認識され、糖代謝が開始されるまでタイムラグが生じたと考えられる。腹腔内糖負荷試験では GLP-1 分泌およびインスリン分泌が遅れたため、糖負荷 15 分後においても SCP 投与群の血漿インスリン濃度が高値を示したと考えられる。

SCP の経口摂取からグルコース摂取までの時間差が 30 分間では、血糖値は糖負荷 60 分後に有意に低値を示すのみであったが、グルコース摂取までの時間が 15 分前および同時では、糖負荷後の血糖値が最大となる 30 から 120 分後まで有意に低値であった (Figs. 3-14~3-16)。これらの結果は、SCP が腸管内に長時間滞留せず、吸収されて血中に存在している間に血糖値を低下させる可能性も併せて考慮される。すなわち、SCP が小腸で吸収されて血中に移行し、GLP-1 分泌能を有する小腸上皮細胞あるいは GLP-1 分泌機序に関与する標的器官まで移動して、直接的または間接的に血糖上昇抑制作用を発揮するというものである。

そこで、上記の推論を検証するため、ICR マウスの静脈内に SCP を直接投与して血糖値の変化を調べた。まず、経口投与された SCP の全量が腸管から吸収されて血中へ移行したと想定して、経口投与試験と同量の SCP (1.5 g/kg 体重) を静脈内に投与したところ、著しく強い血糖上昇抑制作用が認められた (Figs. 3-20 および 3-21)。さらに、SCP の静脈内投与量を 1/10 (0.15 g/kg 体重) に減らしても血糖上昇抑制作用が認められた (Figs. 3-22 および 3-23)。これらの事象は、経口摂取された SCP が血中に移行して、血糖上昇抑制作用を発揮することを示唆している。そこで、SCP を静脈内に直接投与した際の血漿インスリン濃度および血漿総 GLP-1 濃度の変化を測定した結果、SCP 投与群の血漿インスリン濃度は、生理食塩水投与群に比べて 15 および 30 分後に高値を示した (Fig. 3-27)。また、SD ラットを用いた SCP 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果、SCP 投与群の血漿総 GLP-1 濃度は、生理食塩水投与群に比べて極めて有意に高値を示した (Fig. 3-29)。さらに、I 型糖尿病モデルラットを用いた SCP 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験において、STZ-SCP 投与群の血糖値は低値を示さなかった事実 (Fig. 3-30) から、SCP がインスリン依存的に血糖上昇抑制作用を示すことが確認できた。これらの結果は、腸管管腔内からの直接刺激だけでなく、小腸から血

中へ移行した SCP が、直接、L 細胞を刺激して GLP-1 分泌を促すことを示唆している。

また、Figs. 3-24 および 3-25 によると、血糖上昇抑制作用は、SCP の静脈内投与から腹腔内糖負荷までの時間差が 15 分以内であるときに認められたので、血中に投与された SCP が GLP-1 分泌を介して血糖上昇抑制作用を示すまでに要する時間は 15 分以内であると予想される。これらの結果は、経口投与-腹腔内糖負荷試験の結果 (Figs. 3-14~3-17) と一致することから、SCP は代謝を免れて一定時間血中に滞留していると考えられる<sup>45)</sup>。

本研究では、SCP に含まれるエンドトキシン量を測定した。エンドトキシンは血糖値低下の生物活性を有することが報告されている<sup>91)</sup>。Table 3-1 に示すように、SCP 中のエンドトキシン量は平均して 0.1 ng/mg 以下と低値であった。日本薬局方によると、発熱を誘起するといわれる体重 1 kg あたりのエンドトキシン量は、静脈内投与する注射剤において 5.0 EU/kg である<sup>92)</sup>。静脈内投与試験において投与されるエンドトキシン量は 2.75~18.75 EU/1.5 gSCP・kg 体重と算出された。そのため静脈内投与試験に用いた SCP について、エンドトキシンが血糖値に影響を及ぼした可能性を完全に否定することはできない。一方で、SCP 調製日から 3 か月以内であれば、SCP に含まれるエンドトキシン量は日本薬局方の基準内であることが分かった。なお、調製日よりエンドトキシン量が異なる理由として (0.112 および 0.800 EU/mg)、SCP 保存容器の開封をクリーンベンチなど清浄な環境下で行わなかったため、調製日からの経過日数と比例して試料中のエンドトキシン量が増加したと推察される。

前述の通り、SCP が GLP-1 分泌促進作用を有することが明らかになった。そこで次に、SCP が DPP-IV を阻害して GLP-1 の分解を抑制するか検討した。その結果、SCP は DPP-IV による基質の分解を濃度依存的に抑制した (Fig. 3-31)。

しかしながら、その IC<sub>50</sub> 値は 934 µg/mU と既報に比べて高値を示した (Table 3- 2)。Li-Chan らの報告<sup>42)</sup>によると、アトランティックサーモンの皮から調製した CP (平均分子量<1,000 Da) の IC<sub>50</sub> 値は 270 µg/mU であった。一方で、Sila らの報告<sup>44)</sup>によると、コイの皮から調製した CP (平均分子量 2,935 Da) の IC<sub>50</sub> 値は 425 µg/mU であり、SCP (平均分子量 1,400) のそれより強い値をした。この結果から、阻害活性の強弱は CP の分子量に依存しないことが示唆された。コラーゲンは [Gly-X-Y (X, Y は任意のアミノ酸)] という特有のアミノ酸配列の繰り返し構造を有し、本構造は生物種によらず共通する。したがって、原料のアミノ酸配列が CP の IC<sub>50</sub> 値に影響するとは考えにくい。一方、既報ではパパイン以外の酵素を用いて原料を分解し CP を調製した。Flavourzyme<sup>93)</sup>や Esperase は微生物が産生する複数の酵素の混合物であり、切断部位がそれぞれ異なる。したがって、切り出されるペプチドのアミノ酸配列は異なると予想される。DPP-IV は、切り出されたペプチドの C 末端に位置する Z-Pro または Z-Ala (Z は任意のアミノ酸) を認識し、基質として分解する<sup>50,94,95)</sup>。すなわち、CP の DPP-IV 阻害活性は、Z-Pro または Z-Ala の含有率に依存し、さらに、Z-Pro<sup>96)</sup>または Z-Ala の含有率は CP の調製に用いた酵素に依存すると考えられる。したがって、チョウザメ未利用部位を Flavourzyme または Esperase で分解した場合、調製された CP は本研究の SCP よりも高い DPP-IV 阻害活性を示す可能性が考えられる。

本研究では、作用機序の解明のために、血糖上昇抑制作用が明確に表れる投与量 (ICR マウス : 1.5 g/kg 体重, SD ラット : 3.0 g/kg 体重) を設定している。しかし、食事と共に日常的に SCP を摂取する場合を想定すると、実用的な投与量であるとは言い難い。Hsieh らは、I型糖尿病モデルラットにアトランティックサーモンの皮から調製した CP を毎日 300 mg ずつ 5 週間経口投与し、DPP-IV 阻害を機序とする血糖上昇抑制作用を得たと報告した<sup>97)</sup>。また、Zhu らは、II型糖

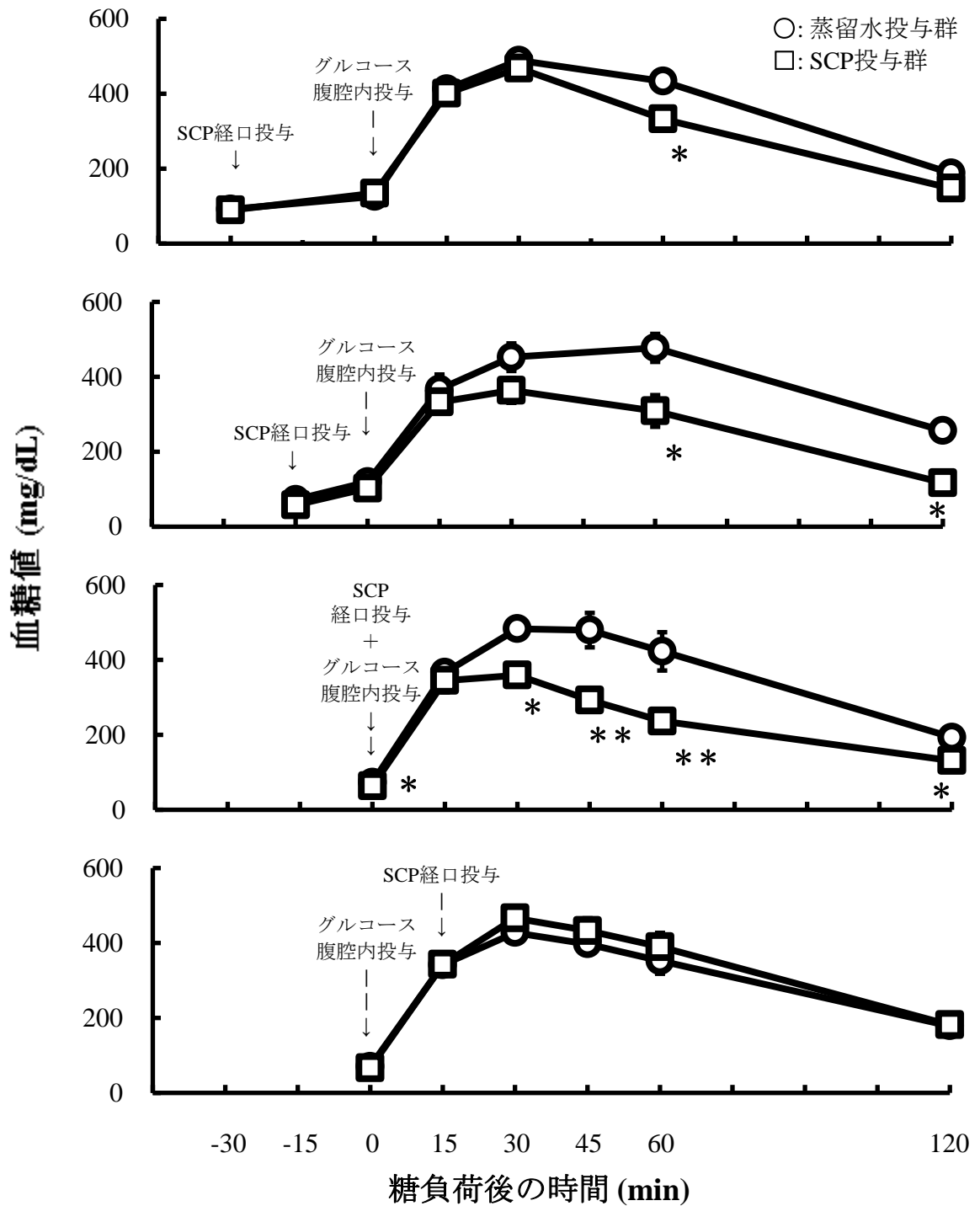
尿病患者に水産物由来 CP を毎日 2 回、6.5 g ずつ 3 か月間摂取させ、糖代謝が改善されたと報告した<sup>98)</sup>。したがって、SCP も同様に投与量を下げても、長期投与することにより血糖上昇抑制作用は得られると考えられる。

以上、本章で得られた結果から、以下の様な SCP の血糖上昇抑制作用機構が示唆された。すなわち、経口摂取された SCP は、(1-1) 胃から小腸へのグルコース移送速度を低下させると共に、(1-2) 小腸でのグルコース吸収を抑制する。また、(2-1) SCP は小腸から吸収されて血中に移行して小腸 L 細胞に作用し、GLP-1 分泌を介してインスリン分泌を促進すると共に、(2-2) SCP は DPP-IV を阻害し、GLP-1 の分解を抑制することにより血糖の上昇を抑制する。そして、Figs. 3-14～3.17 の結果から、血糖上昇抑制用のサプリメントとして経口摂取することを仮定する場合、食後ではなく食事の直前に摂取するのが有効ではないかと考えられた (Fig. 3-32)。

既報において<sup>87)</sup>、経口摂取された食品成分は、小腸 L 細胞を消化管管腔側から刺激し GLP-1 分泌を促進した。そこで、経口摂取された SCP も同様の機序を示すか検討するために、予備検討として、小腸モデル細胞の一つである GLUTag 細胞に SCP を添加し GLP-1 の分泌量を測定した。しかし、SCP 添加群において GLP-1 の分泌量は増加しなかった。一方で、Iba ら<sup>43)</sup>は、異なる小腸モデル細胞である NCI-H716 細胞にティラピア鱗 CP を添加し、GLP-1 の分泌量が増加したと報告した。GLUTag 細胞と異なり NCI-H716 細胞で GLP-1 分泌量が増加した理由として、小腸モデル細胞の性質が異なる<sup>99)</sup>ことが挙げられる。したがって、SCP が小腸 L 細胞を消化管管腔側から刺激する可能性を否定することはできない。しかしながら、本研究では、SCP の静脈内投与により GLP-1 分泌量が増加したことから、血中に取り込まれた SCP も小腸 L 細胞を基底膜側から刺激すると予想された。

一方、血中に取り込まれた SCP が、直接的に膵  $\beta$  細胞を刺激し、機械的にインスリン分泌量を増加させることも予想される。しかし、ICR マウスを用いた予備検討において、グルコースを投与せず SCP のみを静脈内投与または経口投与した結果、いずれの投与経路においても SCP 投与により血糖値が著しく低下することはなかった。したがって、血中に取り込まれた SCP が直接的に膵  $\beta$  細胞を刺激する可能性は低いと考えられる。

前述の通り、血中に取り込まれた SCP が小腸 L 細胞を刺激し GLP-1 分泌を促進することが示唆された。しかしながら、血中の SCP が、どのような機序で小腸 L 細胞からの GLP-1 分泌を促進するのかは不明である。加えて、血中に移行して血糖上昇抑制作用を発揮する SCP 量は、経口摂取した SCP の一部であると考えられた。これに関しては今後、経口摂取された SCP の血中への移行量および GLP-1 分泌作用機構のさらなる検討を行う必要がある。



\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs 蒸留水投与群

Fig. 3-32 腹腔内糖負荷による血糖上昇において SCP 経口投与のタイミングが血糖上昇抑制作用に及ぼす影響 (Figs. 3-14~3-17 を再掲)



## 第4章 血糖上昇抑制作用を示すチョウザメコラーゲン・ペプチドの構造解析

### 目的

第2章において、SCPが血糖上昇抑制作用を有することが明らかとなった。しかし、SCPには様々なペプチドが混在しているため、どのようなアミノ酸配列のペプチドが血糖上昇抑制作用を示すのかは不明である。また、第3章に述べたように、SCPとグルコースとの相互作用および糖代謝促進作用を考察する上で、SCPの分子量、一次構造情報および消化過程における分子量変化に関する情報が必要である。そこで本章では、SCPをゲル濾過および逆相HPLCに供し、血糖上昇抑制作用を示すCPを分画してそのアミノ酸配列を分析した。また、アテロコラーゲン(三重らせんを成すI型コラーゲンの非らせん領域を除いた三重らせん領域)由来ペプチドを調製し、コラーゲン分子のどの部位に由来するペプチドが血糖上昇抑制作用を示すのか検討した。さらに、SCPをゲル濾過HPLCに供し、血糖上昇抑制作用を示すCPの平均分子量を測定した。また、人工消化したSCPをゲル濾過クロマトグラフィーに供し、摂取されたSCPの分子量が消化により体内で変化するか検討した。加えて、SCPのアミノ酸組成をもとにアミノ酸混合物を調製し、血糖上昇抑制作用がペプチド態とアミノ酸態のどちらに起因するか検討した。

### 材料および実験方法

#### 材料および試薬

##### 1. チョウザメ

チョウザメは、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所にて飼育されたベステル・チョウザメを用いた。

## 2. 実験動物

実験動物は健康体モデルマウスである，ICR マウス（雄性，日本チャールス・リバー）を用いた。

小型血糖測定器は，アキュチェック ST メーター（ロシュ DC ジャパン）およびグルコカードダイアメーター（ARKRAY）を使用した。シリンジは，1 および 2.5 mL シリンジ（TERUMO）を用いた。経ロゾンデは，針長 38 mm，外径×内径=0.92×0.62 mm，Cat No.4202 および針長 78 mm，外径×内径=1.79×1.19 mm，Cat No.5206（FUCHIGAMI）を用いた。

## 3. 試薬

ブタペプシン（EC 3.4.23.1）は和光純薬工業株式会社および Sigma から購入した。パンクレアチンおよびトリプシン（EC 3.4.21.4）は和光純薬工業株式会社（現 富士フイルム和光純薬株式会社）から購入した。プロナーゼ E（EC 3.4.24.4）は Merck から購入した。アミノ酸は和光純薬工業株式会社（現 富士フイルム和光純薬株式会社）より購入した。合成ペプチドは株式会社ペプチド研究所より購入した。Sephadex G-50 および G-25 は GE Healthcare UK Ltd.より購入した。生理食塩水は大塚製薬株式会社より購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社（現 富士フイルム和光純薬株式会社）より特級グレードのものを購入した。また，逆相 HPLC およびゲル濾過 HPLC には，HPLC 用グレードの有機溶媒を使用し，試薬調製には全て超純水を用いた。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育方法

本試験では，ICR マウスの健康状態を確認して使用した。マウスの飼育は，第 2 章実験方法 1 と同様の方法で行った。

### 2. SCP の調製

SCP は第 1 章の Fig. 1-1 に示した方法で調製した。

### 3. ブタ皮 CP の調製

市販のブタ皮由来ゼラチン (Sigma-Aldrich) に 20 倍容量 (v/w) の蒸留水と 0.2 wt% のパパインを加え、50°C で 5 時間、攪拌しながら加水分解した。この分解物は 4°C、10,000×g、10 分間の遠心分離に供し、得られた上清は凍結乾燥した粉末を 15 倍容量 (v/w) の 99.5% エタノールに 3 時間浸漬して脱脂した。浸漬物は 4°C、10,000×g、10 分間の遠心分離に供した後、得られた沈殿を 60°C に設定したインキュベーターに静置してエタノールを揮発除去し、得られた白色粉末をブタ皮 CP とした。

### 4. チョウザメアテロコラーゲン分解ペプチドの調製

チョウザメアテロコラーゲンからチョウザメアテロコラーゲン分解ペプチドの調製を以下に示す方法で行った。すなわち、ベステル・チョウザメの皮を採取し、10 倍容量 (v/w) の 1% NaCl に一夜ずつ 2 回、10 倍容量 (v/w) 0.2 M NaOH、0.2 M HCl および蒸留水にそれぞれ一夜浸漬し、夾雑物を除去した。なお、各浸漬工程では、前工程の浸漬液を除去するために試料を水道水で洗浄した。浸漬物を 1 cm 角に包丁で細切し、5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に一夜浸漬して色素を除去した。この浸漬物を 99.5% エタノールに 6 時間浸漬し、脱脂した。試料重量の 100 倍容量 (v/w) の 0.1 M HCl と 1 wt% のブタペプシンを加え、5°C で 72 時間、攪拌しながら 3 重らせんコラーゲンを抽出した。抽出後、抽出液をガーゼで濾過し、終濃度が 1 M となるよう NaCl を添加し、攪拌しながら一夜塩析した。塩析後、10,000×g、15 分間の遠心分離に供し、沈殿を得た。この沈殿は、透析膜 (セルロースチューブ UC36-32-100, エーディア株式会社 : MWCO 10,000 Da) を用いて蒸留水に対して一夜透析し、透析内液を凍結乾燥に供した後、得られた乾燥物をチョウザメアテロコラーゲンとした。調製したアテロコラーゲンに 10 倍容量 (v/w) の蒸留水と原料重量の 0.2 wt% のパパインを加え、50°C で 5 時間、攪拌しながらアテロコラーゲンを加水分解した。次いで、この分解物を 4°C、10,000×g、10 分間の遠心分離に供し、上清を得た。この上清は凍結乾燥に供した後、得られた粉末を 15 倍量 (v/w) の 99.5% エタノールに 3 時間浸漬して脱脂し、4°C、10,000×g、10

分間遠心分離して沈殿を得た。得られた沈殿は 60°Cに設定したインキュベーターに静置し、エタノールを揮発除去して得られた白色粉末をチョウザメアテロコラーゲン分解ペプチド (A-SCP) とした。

## 5. 人工消化 SCP の調製

### 5-1. ペプシン-パンクレアチン人工消化 SCP の調製

管腔内消化を模して、Higuchi ら<sup>100)</sup>の方法を一部改変し、ペプシンおよびパンクレアチンを用いて SCP を連続的に人工消化した。すなわち、試料重量の 10 倍容量 (v/w) の蒸留水を加え、37°Cで 10 分間インキュベートした。インキュベート後、1 M HCl を用いて SCP 水溶液を pH 2.0 に調整し、1 wt%ペプシンを加え、37°Cで 1 時間、攪拌しながら SCP を分解した。分解後、1 M NaHCO<sub>3</sub>を用いて分解液を pH 5.0 に調整した。pH 調整後、4 wt%パンクレアチンおよび 2.5 wt% トリプシンを加えた。酵素添加後、1 M NaHCO<sub>3</sub>を用いて分解液を pH 7.0 に調整した。pH 調整後、終濃度 0.3 mM となるよう 1 mM CaCl<sub>2</sub>を加え、37°Cで 2 時間、攪拌しながら SCP を分解した。分解後、沸騰水に 10 分間インキュベートし、酵素反応を停止した。分解液を 4°C, 10,000×g, 5 分間遠心分離し、上清を得た。上清を凍結乾燥に供し、白色粉末を得た。

得られた白色粉末に、試料重量の 5 倍容量 (v/w) の蒸留水を加え溶解した。この試料溶液を、Sep-Pak (C18 Cartridge, Waters) に供し、有機溶媒による変性や凝集を防ぐためにアセトニトリルによるステップワイズ溶出法 (10, 30, 60, 80%) を用いて脱塩した。なお、Sep-Pak は、使用前に充填剤の 6 倍容量 (v/w) のメタノールおよび蒸留水を送液して平衡化した。得られた各溶出液を、エバポレーターを用いて乾固した。乾固後、蒸留水を加えて再溶解し、すべての溶出液を回収し混合した。混合液を凍結乾燥に供し、得られた白色の凍結乾燥粉末をペプシン-パンクレアチン人工消化 SCP (PP-SCP) とした。

### 5-2. ペプシン-パンクレアチン-プロナーゼ人工消化 SCP の調製

膜消化を模して、ペプシンおよびパンクレアチンを用いて連続的に人工消化

した PP-SCP を，引き続きプロナーゼを用いて人工消化した<sup>100)</sup>。すなわち，第 4 章 実験方法 5-1 と同様の方法で調製された PP-SCP に，原料重量の 20 倍容量 (v/w) の蒸留水を加え溶解した。この溶液に，1 wt% のプロナーゼを加えた。1 M HCl を用いて，溶液を pH 7.0 に調整した。pH 調整後，37°C で 1 時間，攪拌しながら PP-SCP を分解した。分解後，沸騰水に 10 分間インキュベートし，酵素反応を停止した。分解液を 4°C，10,000×g，5 分間遠心分離し，上清を得た。上清を凍結乾燥に供し，得られた白色粉末をペプシン-パンクレアチン-プロナーゼ人工消化 SCP (PPP-SCP) とした。

#### 6. 人工消化カゼインの調製

カゼインの人工消化は，第 4 章 実験方法 5-1 および 5-2 と同様の方法で行った。

#### 7. アミノ酸混合物の調製

高速アミノ酸分析計 L-8900 (日立) を用いて，SCP のアミノ酸組成を分析した。分析結果から各アミノ酸のモル比を算出した。しかし，分析時の加水分解処理により，Asn は Asp として，Gln は Glu として検出される。そこで，Zhang ら<sup>101)</sup> が報告したアムールチョウザメ I 型コラーゲン  $\alpha 1$  および II 型コラーゲン  $\alpha 1$  の全長アミノ酸配列データに基づき，Asn/Asp 比および Gln/Glu 比を算出した。算出した各比率をアミノ酸組成分析結果にかけ戻し，Asn および Gln のモル比を算出した。

算出したモル比に従って市販のアミノ酸を混合し，アミノ酸混合物を調製した。また，SCP のアミノ酸組成から Gly を除外し，Gly 以外のアミノ酸を混合して Gly 抜きアミノ酸混合物を調製した。

#### 8. Sephadex G-50 を用いた SCP の分画

SCP を Sephadex G-50 によるゲル濾過 (カラムサイズ  $\phi 4 \text{ cm} \times 77 \text{ cm}$ ) に供した。蒸留水により 42 mL/h の流速で溶出し，試験管 1 本あたり 6.0 mL 分取した。溶

出液の 230 nm における吸光度を測定し、1 つの画分 (F1) を分画した。

#### 9. Sephadex G-25 を用いた F1 画分の分画

Sephadex G-50 を用いて分画した画分は単一のピークであり、この F1 画分が高い血糖上昇抑制作用を示したことから、F1 画分を Sephadex G-25 によるゲル濾過 (カラムサイズ  $\phi 6.5 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$ ) に供した。蒸留水により 42 mL/h の流速で溶出し、試験管 1 本あたり 6.0 mL 分取した。溶出液の 230 nm における吸光度を測定し、3 つの画分 (f1, f2 および f3 画分) に分画した。

#### 10. 逆相 HPLC を用いた f1, f2 および f3 画分の分画

Sephadex G-25 を用いて分画した f1, f2 および f3 画分を逆相 HPLC に供してさらに細かく分画した。まず、各画分を 0.5 g/mL になるように終濃度 0.1% の TFA を含む超純水に溶解し、Millex-LG 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation) を用いて濾過、脱気した。これを Mightysil RP-18 GP Aqua (カラムサイズ  $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ , 粒子サイズ 5  $\mu\text{m}$ , 関東化学) に 500  $\mu\text{L}$  をインジェクトした。移動相として終濃度 0.1% TFA を含むアセトニトリルによる直線濃度勾配法 (5~20%) を用い、流速 1.0 mL/min, カラム温度 40°C で分離し、220 nm にてペプチドを検出した。なお、0.1% TFA を含むアセトニトリルおよび超純水は Millicup および Millicup-FH (Millipore Corporation) でそれぞれ濾過、脱気したものを使用した。

#### 11. アミノ酸配列分析

f1, f2 および f3 画分を逆相 HPLC に供してペプチドを分取し、凍結乾燥した。乾燥後、プロテインシーケンサー Procise 493 cLC (Applied Biosystems) を用いてペプチドのアミノ酸配列分析を行った。

#### 12. ゲル濾過 HPLC を用いた SCP および Sephadex G-25 分画物の平均分子量の測定

各試料を 1 mg/mL になるように 0.15 M NaCl に溶解し、Millex-LG 0.2  $\mu\text{m}$

(Millipore Corporation) を用いて濾過，脱気した。これを Superdex Peptide 10/300 GL (カラムサイズ  $\phi 10\text{ mm} \times 300\text{-}310\text{ mm}$ ，粒子サイズ  $13\ \mu\text{m}$ ，Amersham Biosciences) に  $100\ \mu\text{L}$  をインジェクトした。移動相として  $0.15\ \text{M NaCl}$  ( $\text{pH } 7.0$ ) [Millicup (Millipore Corporation) で濾過，脱気した] を用い，流速  $0.5\ \text{mL/min}$ ，室温で分離し， $228\ \text{nm}$  (Trp のみ  $280\ \text{nm}$ ) にてペプチドを検出した。また，分子量既知の物質 [リゾチーム (MW ;  $14,307$ )，アプロチニン (MW ;  $6,500$ )，バシトラシン (MW ;  $1,422$ )，シアノコバラミン (MW ;  $1,355$ ) および Trp (MW ;  $204$ )] をロードして得られた結果から分子量と溶出時間の検量線を作製し，加水分解物の分子量を測定した。また，排除限界 ( $V_0$ ) はブルーデキストラン (分子量 ;  $\geq 2,000,000$ ) を用いて明らかにした。

### 13. 人工消化 SCP に含まれる遊離アミノ酸の定量

奥山ら<sup>102)</sup>の方法を一部改変し，以下に示す方法で行った。すなわち，SCP，PP-SCP，PPP-SCP，ペプシン-パンクレアチン人工消化カゼイン (PP-カゼイン) およびペプシン-パンクレアチン-プロナーゼ人工消化カゼイン (PPP-カゼイン) を  $20\ \text{mg}$  分取し，蒸留水を  $10\ \text{mL}$  加えて溶解した。各溶解液  $1\ \text{mL}$  に蒸留水  $9\ \text{mL}$  を加えて  $10$  倍希釈し，測定試料とした。PPP-カゼイン溶解液のみ， $10$  倍希釈溶液  $1\ \text{mL}$  に蒸留水を  $4\ \text{mL}$  加えて  $5$  倍希釈し，測定試料とした。また，未分解のカゼインを  $20\ \text{mg}$  分取し，蒸留水を  $10\ \text{mL}$  加えて溶解し，ネガティブコントロールとした。

遊離アミノ酸の定量および消化度は以下のように決定した。測定サンプルを試験管に  $500\ \mu\text{L}$  分取し， $0.15\ \text{M NaBO}_3$  を  $2\ \text{mL}$  添加し混合した。この混合液に， $0.01\ \text{M Na}_2\text{SO}_3$  および  $0.1\%$  TNBS を  $1:1$  で混合し調製した試液を  $1\ \text{mL}$  加えて，遮光下にて  $37^\circ\text{C}$  で  $1$  時間インキュベートした。インキュベート後， $420\ \text{nm}$  で吸光度測定を行った。Leu を用いて検量線を作成し，遊離アミノ酸量を算出した。算出された遊離アミノ酸量から，以下の式に基づいて消化度を算出した。総ペプチド結合数として，カゼインおよび各カゼイン消化物は  $8.2$  を，SCP および各 SCP 消化物は  $11.1$  を用いた<sup>103)</sup>。

$$\text{消化度 (\%)} = \frac{h \text{ (m hydrolysis equivalents/g 試料)}}{h_{tot} \text{ (m hydrolysis equivalents/g 試料)}} \times 100$$

$h$ : 遊離アミノ酸量

$h_{tot}$ : 総ペプチド結合数

m hydrolysis equivalents: ミリ加水分解等量

#### 14. Sephadex G-15 を用いた人工消化 SCP の分子量分布の検討

SCP, PP-SCP および PPP-SCP を Sephadex G-15 によるゲル濾過 (カラムサイズ  $\phi$  1.6 cm $\times$ 70 cm) に供した。0.15 M NaCl を移動相として 32 mL/h の流速で溶出し、試験管 1 本あたり 1.6 mL 分取した。溶出液の 230 nm における吸光度を測定し、ペプチドを検出した。また、排除限界 ( $V_0$ ) はリゾチーム (MW ; 14,307) をロードすることにより明らかにした。

#### 15. 経口糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定

Sephadex G-50 分画物 (F1 画分), Sephadex G-25 分画物 (f1, f2 および f3 画分), A-SCP, アミノ酸混合物を用いて経口糖負荷試験を行った。試料の調製および投与量は、第 2 章 実験方法 5 と同様の方法で行った。すなわち、Sephadex G-50 分画物 (F1 画分), Sephadex G-25 分画物 (f1, f2 および f3 画分) を用いた経口糖負荷試験における試料の調製は以下のように行った。各画分を凍結乾燥に供した後、得られた粉末をそれぞれ蒸留水に溶解し、0.15 g/mL 画分水溶液を調製した。各画分投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL 画分水溶液と 0.4 g/mL グルコース水溶液をそれぞれ混合して調製した。すなわち、画分およびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。A-SCP 投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL A-SCP 水溶液と 0.4 g/mL グルコース水溶液をそれぞれ混合して調製した。すなわち、A-SCP およびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。アミノ酸混合物投与群に経口投与する試料は、0.15 g/mL アミノ酸混合物水溶液と 0.4 g/mL グルコース水溶液を



それぞれ混合して調製した。すなわち、アミノ酸混合物およびグルコース投与量がそれぞれ 1.5 および 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。

また、Gly を用いた経口糖負荷試験における試料の調製は以下のように行った。なお、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験と試験結果を比較するため、試料およびグルコースは生理食塩水に溶解し、対照群として生理食塩水投与群を設定した。生理食塩水投与群に経口投与する試料は、生理食塩水と 0.4 g/mL グルコース溶液を混合して調製した。すなわち、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。1/3 量 Gly 投与群に経口投与する試料は、0.05 g/mL Gly 溶液と、0.4 g/mL グルコース溶液をそれぞれ混合して調製した。すなわち、Gly 投与量が 0.5 g/kg 体重、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように経口投与する試料を調製し、15 mL/kg 体重で経口投与した。

#### 16. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定

PP-SCP, PPP-SCP, A-SCP, Gly, Gly-Gly, Pro, アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物を用いて静脈内投与-腹腔内糖負荷試験を行った。なお、試料およびグルコースは生理食塩水に溶解した。試料の調製および投与量は、第 3 章 実験方法 13-1 と同様の方法で行った。すなわち、試料を生理食塩水に溶解して 0.3 g/mL 試料溶液を調製し、試料投与量が 1.5 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で静脈内投与した。各投与群に腹腔内投与する試料として、グルコースを生理食塩水に溶解して 0.4 g/mL グルコース溶液を調製し、グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

また、異なる濃度で調製した Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製は以下のように行った。なお、試料およびグルコースは生理食塩水に溶解した。生理食塩水投与群に静脈内投与する試料として生理食塩水を用意し、5 mL/kg 体重で静脈内投与した。Gly-1.5 投与群に静脈内投与する試料として、0.3 g/mL Gly 溶液を調製し、Gly 投与量が 1.5 g/kg 体重となるように、5 mL/kg 体重で静脈内投与した。Gly-0.75 投与群に静脈内投与する試料として、

0.15 g/mL Gly 溶液を調製し，Gly 投与量が 0.75 g/kg 体重となるように，5 mL/kg 体重で静脈内投与した。Gly-0.15 投与群に静脈内投与する試料として，0.03 g/mL Gly 溶液を調製し，Gly 投与量が 0.15 g/kg 体重となるように，5 mL/kg 体重で静脈内投与した。各投与群に腹腔内投与する試料として，0.4 g/mL グルコース溶液を調製し，グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように，5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

#### 17. 経口投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製および投与量の設定

アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物を用いて経口投与-腹腔内糖負荷試験を行った。なお，静脈内投与-腹腔内糖負荷試験と試験結果を比較するため，試料およびグルコースは生理食塩水に溶解し，対照群として生理食塩水投与群を設定した。試料の調製および投与量は，第 3 章 実験方法 11-1 と同様の方法で行った。すなわち，試料を生理食塩水に溶解して 0.3 g/mL 試料溶液を調製し，試料投与量が 1.5 g/kg 体重となるように，10 mL/kg 体重で経口投与した。各投与群に腹腔内投与する試料として，グルコースを生理食塩水に溶解して 0.4 g/mL グルコース溶液を調製し，グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように，5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

また，Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験における試料の調製は以下のように行った。なお，静脈内投与-腹腔内糖負荷試験と試験結果を比較するため，試料およびグルコースは生理食塩水に溶解し，対照群として生理食塩水投与群を設定した。生理食塩水投与群に経口投与する試料として生理食塩水を用意し，10 mL/kg 体重で経口投与した。1/3 量 Gly 投与群に経口投与する試料として，0.1 g/mL Gly 溶液を調製し，Gly 投与量が 0.5 g/kg 体重となるように，10 mL/kg 体重で経口投与した。また，各投与群に腹腔内投与する試料として，0.4 g/mL グルコース溶液を調製し，グルコース投与量が 2.0 g/kg 体重となるように，5 mL/kg 体重で腹腔内投与した。

## 18. ICR マウスを用いた糖負荷試験

### 18-1. Sephadex G-50 分画物を用いた経口糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (10 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように 6 匹ずつ 2 群 (蒸留水および F1 画分投与群) に分けた。試験は、第 2 章 実験方法 7-1 と同様の方法で実施した。すなわち、マウスは試験前日より絶食させ、絶食開始から 16 時間後に試験を開始した。はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、小型血糖測定器を用いて初期血糖値を測定した。次いで、各群のマウスに、試料をシリンジおよび経口ゾンデを用いて経口投与した。投与直後の時間を 0 分としてその後 15, 30, 60, 120 分の血糖値を測定した。

### 18-2. Sephadex G-25 分画物を用いた経口糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (10 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように 6 匹ずつ 4 群 (蒸留水, f1 画分, f2 画分および f3 画分投与群) に分けた。試験は、第 4 章 実験方法 18-1 と同様の方法で実施した。

### 18-3. A-SCP を用いた経口糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (7 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように 6 匹ずつ 3 群 (蒸留水, SCP および A-SCP 投与群) に分けた。試験は、第 4 章 実験方法 18-1 と同様の方法で実施した。

### 18-4. PP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (21 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように 7 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP および PP-SCP 投与群) に分けた。試験は、第 3 章 実験方法 13-2 と同様の方法で実施した。すなわち、マウスは試験前日より絶食させ、絶食開始から 16 時間後に試験を開始した。はじめに、糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し、初期血糖値を測定した。次いで、マウスを自作の保定器に入れて安静な状態を保ち、各群のマウスに試料をシリ

ンジおよび注射針を用いて尾部静脈より静脈内投与した。静脈内投与後、即座にマウスを保定器から出し、0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内投与した。グルコース溶液腹腔内投与直後の時間を0分とし、投与0, 15, 30, 60, 120分後の血糖値を測定した。

#### 18-5. PPP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (16 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように7匹ずつ3群 (生理食塩水, SCP および PPP-SCP 投与群) に分けた。試験は、第4章 実験方法 18-4 と同様の方法で実施した。

#### 18-6. アミノ酸および合成ペプチドを用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (7 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように6匹ずつ5群 (生理食塩水, SCP, Gly, Pro および Gly-Gly 投与群) に分けた。試験は、第4章 実験方法 18-4 と同様の方法で実施した。

#### 18-7. Gly を用いた濃度別静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (10 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように5匹ずつ4群 (生理食塩水, Gly-1.5, Gly-0.75 および Gly-0.15 投与群) に分けた。試験は、第4章 実験方法 18-4 と同様の方法で実施した。

#### 18-8. アミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (19 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように7匹ずつ3群 (生理食塩水, SCP およびアミノ酸混合物投与群) に分けた。試験は、第4章 実験方法 18-4 と同様の方法で測定した。

#### 18-9. Gly 抜きアミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (13 週齢) の体重を測定し、群間で体重に差が無いように7匹ずつ3群 (生理食塩水, アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物投与群) に分けた。試験は、第4章 実験方法 18-4 と同様の方法で実施した。

#### 18-10. Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (11 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差が無いように 6 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP および 1/3 量 Gly 投与群) に分けた。試験は, 第 3 章 実験方法 11-2 と同様の方法で実施した。すなわち, マウスは試験前日より絶食させ, 絶食開始から 16 時間後に試験を開始した。はじめに, 糖負荷試験前のマウスの尾部静脈から無麻酔下で採血し, 初期血糖値を測定した。次いで, 各群のマウスに試料を経口投与し, 投与から一定時間 (15, 30 分) 経過後, シリンジおよび注射針を用いて 0.4 g/mL グルコース溶液を腹腔内に投与した。グルコース腹腔内投与直後の時間を 0 分とし, 0, 15, 30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。

#### 18-11. Gly を用いた経口糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (10 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差が無いように 7 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP および 1/3 量 Gly 投与群) に分けた。試験は, 第 4 章 実験方法 18-1 と同様の方法で実施した。

#### 18-12. アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (12 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差が無いように 7 匹ずつ 4 群 (生理食塩水, SCP, アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物投与群) に分けた。試験は, 第 4 章 実験方法 18-10 と同様の方法で実施した。

#### 18-13. アミノ酸混合物を用いた経口糖負荷試験

試験前日に ICR マウス (9 週齢) の体重を測定し, 群間で体重に差が無いように 7 匹ずつ 3 群 (生理食塩水, SCP およびアミノ酸混合物投与群) に分けた。試験は, 第 4 章 実験方法 18-1 と同様の方法で実施した。

## 19. 統計処理

試験で得られた各群の血糖値，血糖値総和（血糖上昇曲線下面積；初期血糖値を基線とし，糖負荷後 120 分までの血糖値変動曲線との間の面積を台形公式により算出したもの）および数値は，平均値および標準誤差を算出し，各群間の有意差検定を行った。対照群と一試験群のみの二群間の平均値の差の検定は，正規性に応じて，Student の  $t$  検定，または Mann-Whitney の  $U$  検定を用いて行った。対照群と複数の試験群および各試験群間の有意差検定は，正規性に応じて，一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 法または Scheffé の  $F$  検定による多重比較検定を，または Kruskal-Wallis 法による分散分析に続けて Steel-Dwass 法による多重比較検定を用いて行った。有意水準は危険率 5% ( $p<0.05$ ) および 1% ( $p<0.01$ ) とし， $p<0.05$  は統計学的に有意， $p<0.01$  は統計学的に極めて有意とした。有意差検定は，4Steps エクセル統計第 3 版（オーエムエス出版，2011）付属エクセルアドインソフト Statcel3 または 4Steps エクセル統計第 4 版（オーエムエス出版，2015）付属エクセルアドインソフト Statcel4 を用いた。

## 結果

### 1. Sephadex G-50 分画物の血糖上昇抑制作用

本実験は、第4章 実験方法 8, 15 および 18-1 により行った。

SCP を Sephadex G-50 に供した結果、Fig. 4-1 に示すように単一のピークが得られた (F1 画分)。次に、この F1 画分を経口投与した際の血糖値の経時的変化を Fig. 4-2 に示す。縦軸は血糖値、横軸は糖負荷後の時間を示す。蒸留水投与群では、糖負荷後すみやかに血糖値が上昇し、30 分後に最大値に達した。その後、120 分後までに血糖値は徐々に低下し、通常の血糖値変化を示した。一方、F1 画分投与群の血糖値は蒸留水投与群と比較して全ての測定時間で低値を示し、30 分後の血糖値は蒸留水投与群に対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。

また、F1 画分を経口投与した際の血糖値総和を Fig. 4-3 に示す。図の様に、F1 画分投与群は蒸留水投与群に対して血糖値総和が極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。

以上の結果は、SCP の Sephadex G-50 分画物 (F1 画分) が血糖上昇抑制作用を有することを示す。

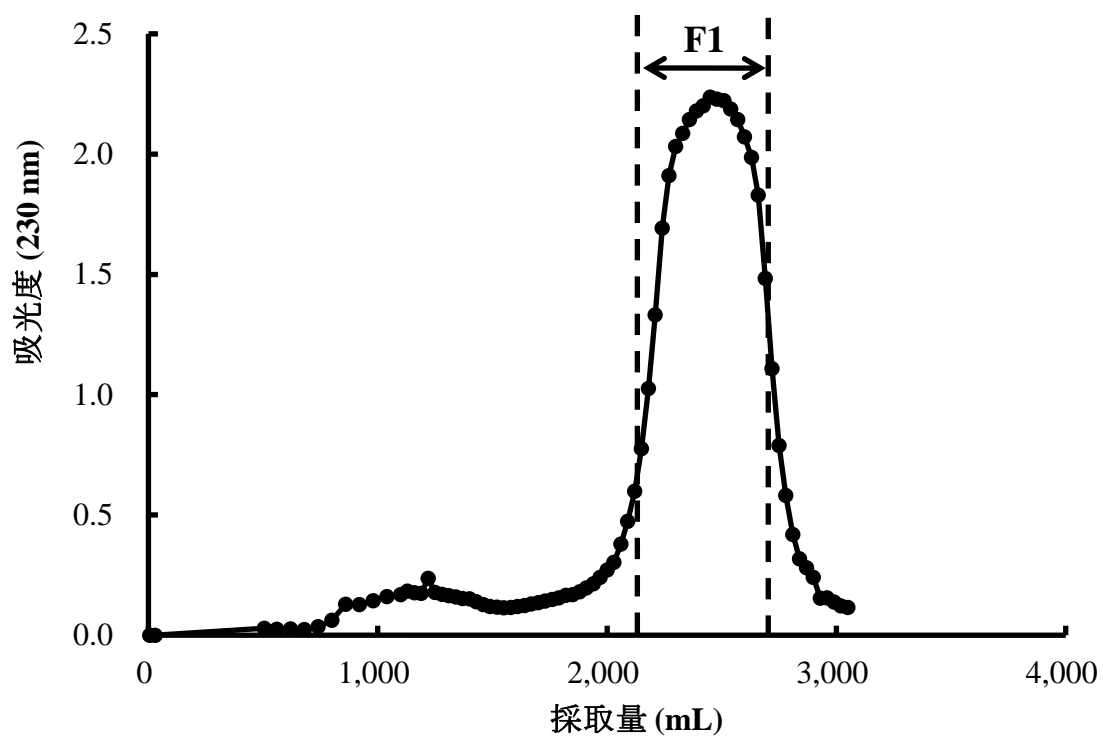


Fig. 4-1 SCP の Sephadex G-50 による分画

カラムサイズ:  $\phi$  4.0 cm $\times$ 77 cm

流速: 42 mL/h

試験管 1 本あたりの採取量: 6.0 mL

F1: F1 画分



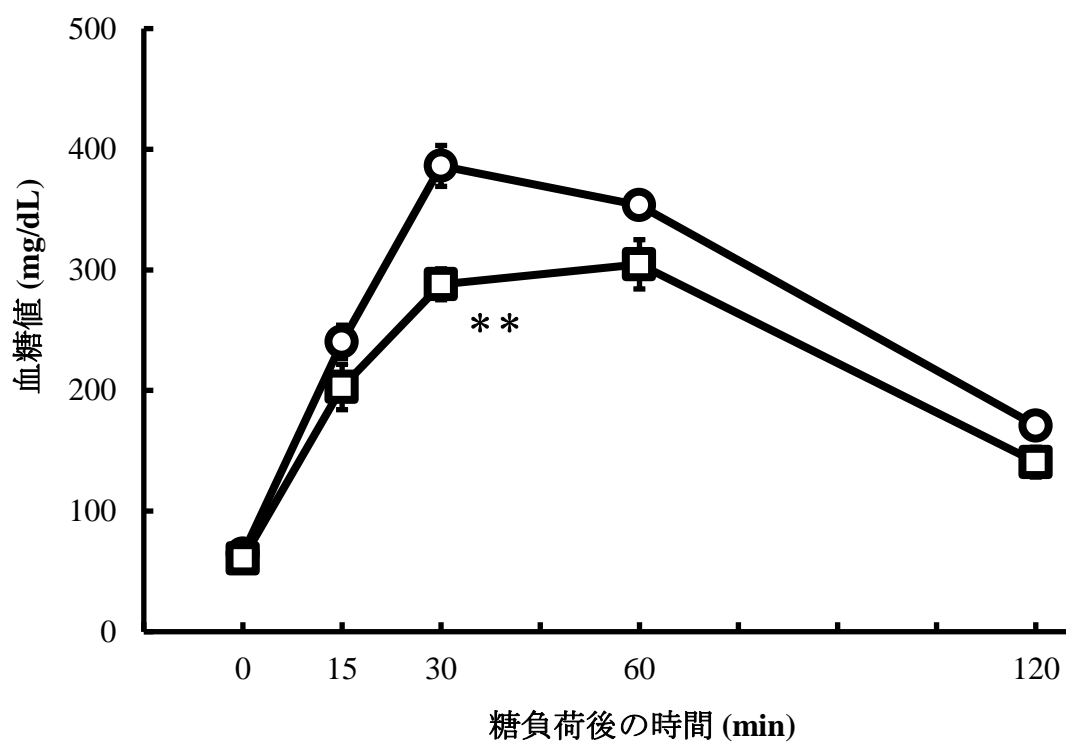


Fig. 4-2 F1画分を用いた経口糖負荷試験

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

□: F1画分投与群 (1.5 g F1画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

・糖負荷 30 分後において両群間に極めて有意に差あり (\*\*;  $p < 0.01$ )。

(Mann-Whitney の  $U$  検定を用いた)

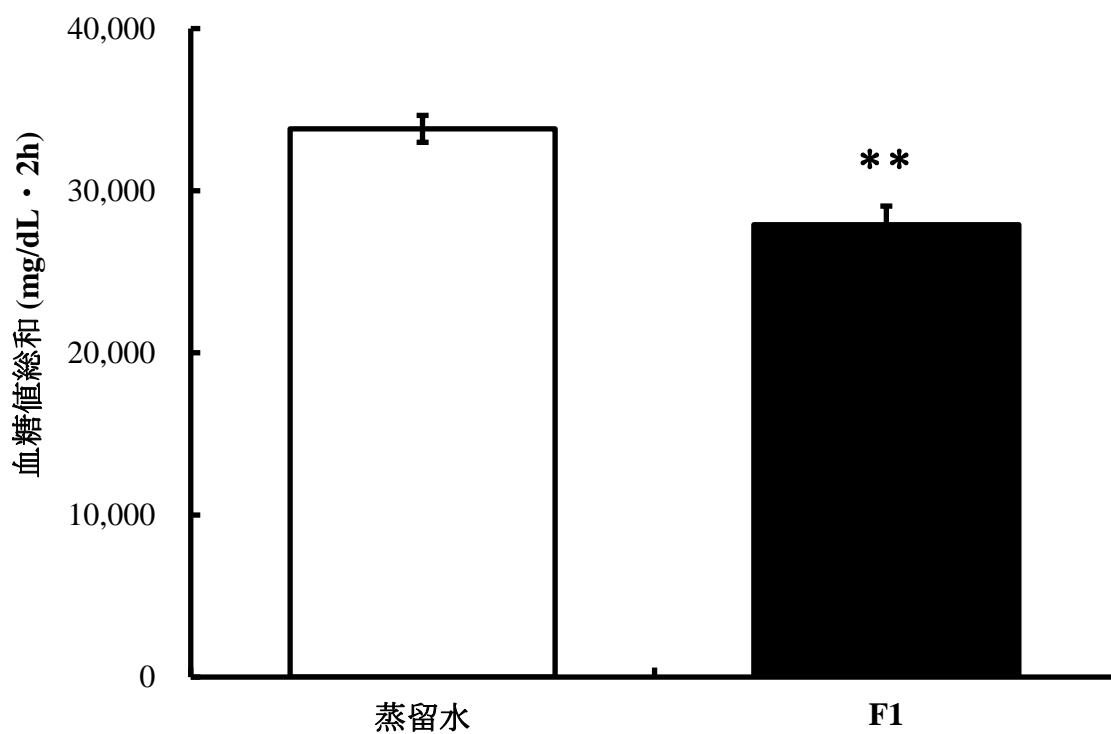


Fig. 4-3 F1 画分を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

F1: F1 画分投与群 (1.5 g F1 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

・両群間に極めて有意に差あり (\*\*;  $p < 0.01$ )。

(Student の  $t$  検定法を用いた)

## 2. Sephadex G-25 分画物の血糖上昇抑制作用

本実験は、第4章 実験方法 9, 15 および 18-2 により行った。

F1 画分を Sephadex G-25 に供した結果、Fig. 4-4 に示すように、f1, f2 および f3 の3つの画分に分画された。f1, f2 および f3 画分を経口投与した際の血糖値の経時的変化を Fig. 4-5 に示す。蒸留水投与群では、糖負荷後速やかに上昇し、30分後に最大値に達した。その後、血糖値は緩やかに低下した。一方、f1 画分投与群の血糖値は、蒸留水投与群と同様に糖負荷 30分後に最大値に達したが、いずれの時間においても蒸留水投与群のそれらより低値を示した。特に 15, 30 および 60分後において蒸留水投与群に対して有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低値を示した。また、f2 画分投与群の血糖値は、蒸留水投与群と同様に 30分後に最大値に達したが、いずれの時間においても蒸留水投与群のそれらより低値を示した。特に 15 および 30分後において蒸留水投与群に対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。また、f3 画分投与群の血糖値は 60分後に最大値に達したが、蒸留水投与群のそれらに対して低値であった。特に、糖負荷 15 および 30分後に蒸留水投与群に対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。

また、f1, f2 および f3 画分を経口投与した際の血糖値総和を Fig. 4-6 に示す。その結果、f1 および f2 画分投与群の血糖値総和は、蒸留水投与群のそれらに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。また、f3 画分投与群は蒸留水投与群に対して有意差は認められなかったが、血糖値総和は低値を示す傾向にあった。また、各試料群間における血糖値総和に有意差は認められなかった。

以上の結果は、SCP の Sephadex G-50 分画物 (F1 画分) を分画して得られた Sephadex G-25 分画物 (f1, f2 および f3 画分) が、SCP と同様に血糖上昇抑制作用を有することを示している。また、血糖上昇抑制作用の強さは、画分間で差があることが明らかとなった。

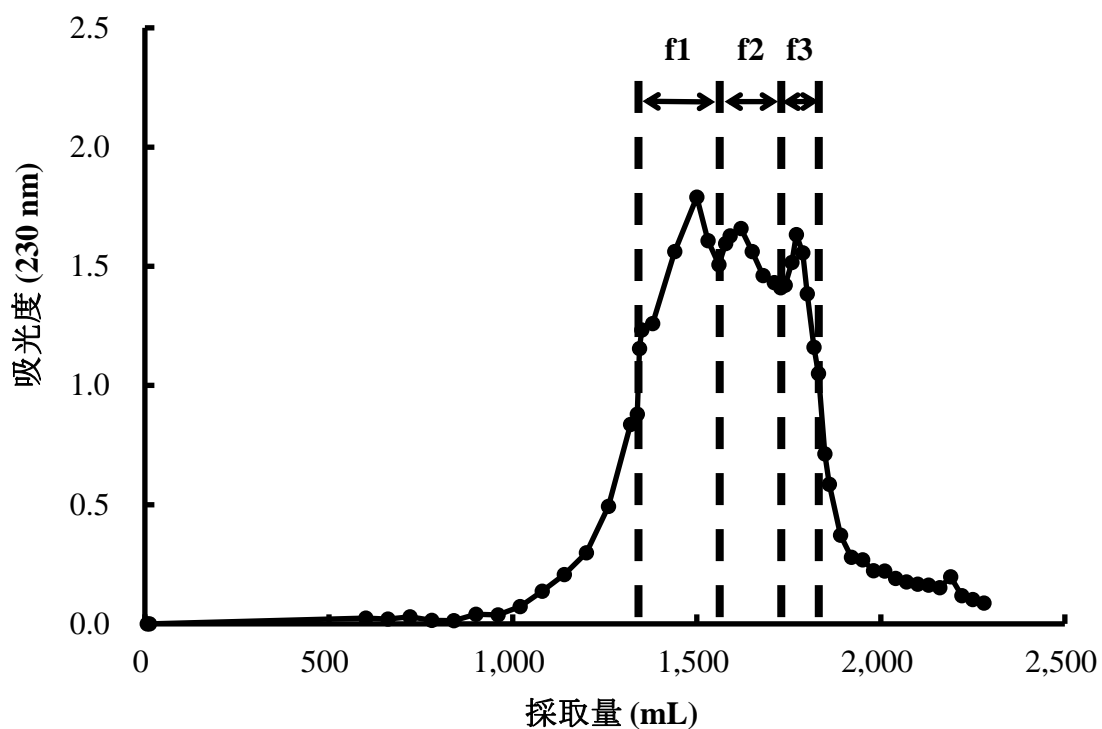


Fig. 4-4 F1 画分の Sephadex G-25 による分画

カラムサイズ:  $\phi$  6.5 cm $\times$ 100 cm

流速: 42 mL/h

試験管 1 本あたりの採取量: 6.0 mL

f1: f1 画分

f2: f2 画分

f3: f3 画分

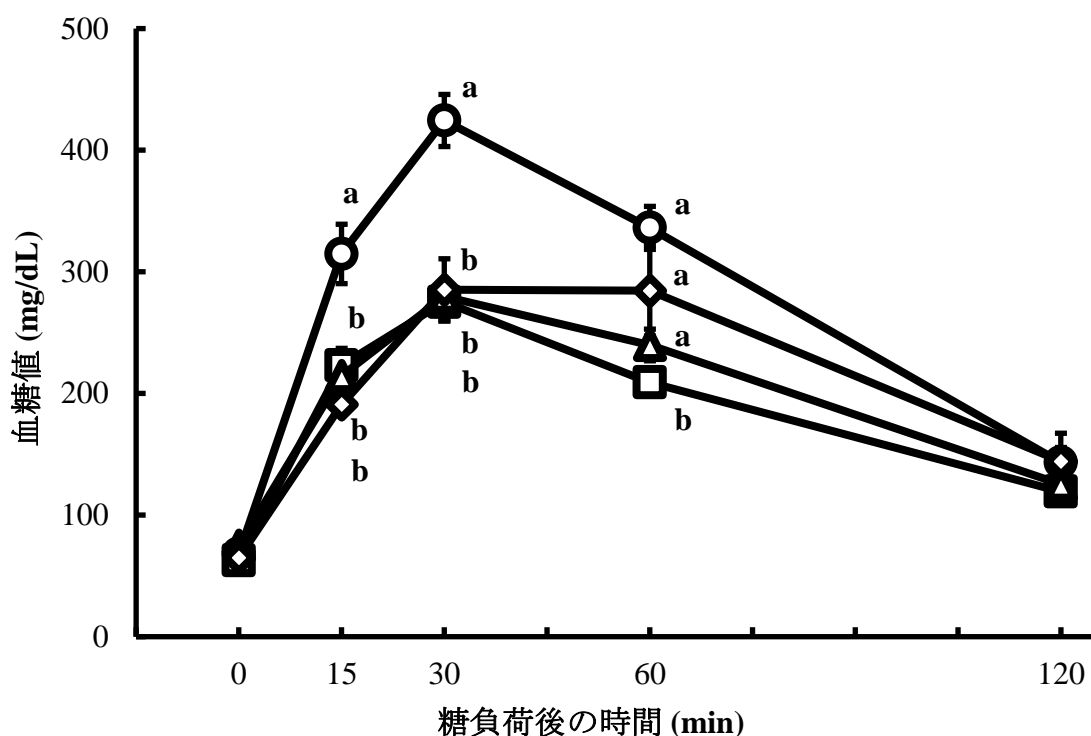


Fig. 4-5 f1, f2 および f3 画分を用いた経口糖負荷試験

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

□: f1 画分投与群 (1.5 g f1 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

△: f2 画分投与群 (1.5 g f2 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

◇: f3 画分投与群 (1.5 g f3 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

- ・蒸留水投与群と f1 画分投与群の間に有意差あり (糖負荷 60 分後:  $p<0.05$ , 15 および 30 分後:  $p<0.01$ )。
- ・蒸留水投与群と f2 画分投与群の間に極めて有意に差あり (糖負荷 15 および 30 分後:  $p<0.01$ )。
- ・蒸留水投与群と f3 画分投与群の間に極めて有意に差あり (糖負荷 15 および 30 分後:  $p<0.01$ )。

糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり(Scheff'e の  $F$  検定を用いた)

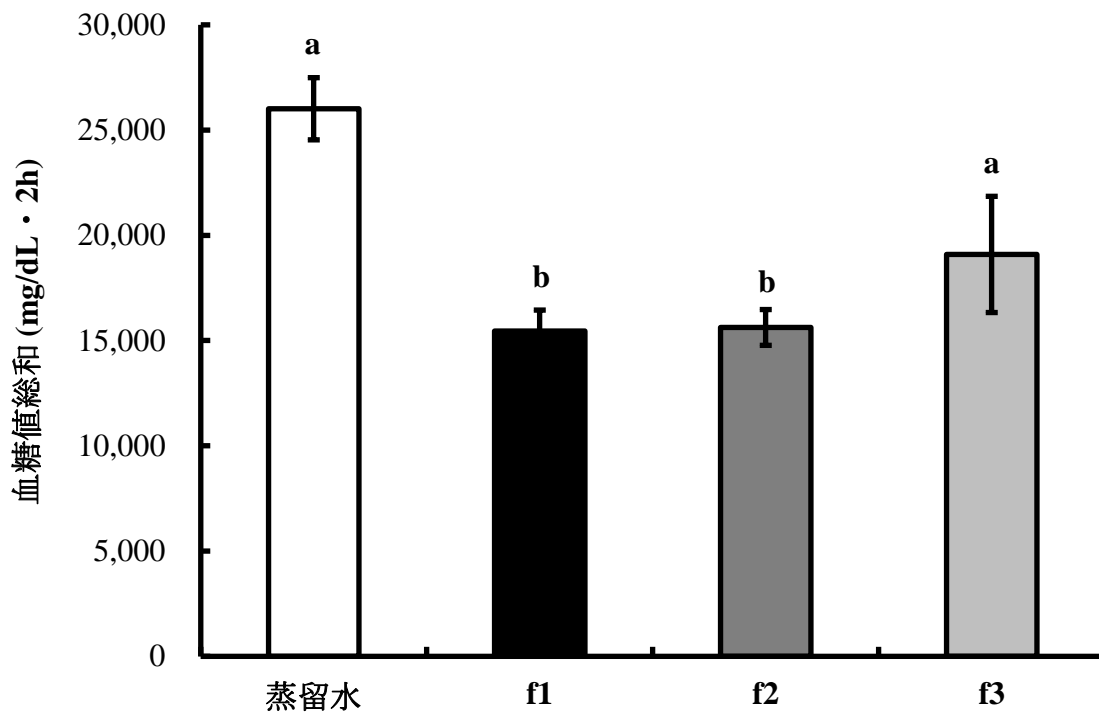


Fig. 4-6 f1, f2 および f3 画分を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

f1: f1 画分投与群 (1.5 g f1 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

f2: f2 画分投与群 (1.5 g f2 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

f3: f3 画分投与群 (1.5 g f3 画分/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

- ・ 蒸留水投与群と f1 画分投与群の間に極めて有意に差あり ( $p < 0.01$ )。
- ・ 蒸留水投与群と f2 画分投与群の間に極めて有意に差あり ( $p < 0.01$ )。

異符号間で有意差あり (Scheffé の  $F$  検定を用いた)

### 3. 血糖上昇抑制作用を示す SCP の平均分子量

本実験は、第4章 実験方法 12 により行った。

SCP および Sephadex G-25 分画物を、ゲル濾過 HPLC カラムを用いて溶出した結果を Fig. 4-7 に示す。その結果、SCP に含まれるペプチドの分子量は 200～10,000 Da の範囲にあった。しかし、多くのペプチドの分子量は 1,400 Da 付近であった。また、Sephadex G-25 分画物をゲル濾過 HPLC に供した結果、f1 画分の分子量は 1,400 Da 強であり、f2 画分の分子量は 1,400 Da 付近であり、f3 画分の分子量は 1,300 Da 付近であった。すなわち、各画分の分子量分布に差は認められるものの、いずれも 1,400 Da 付近に分布した。

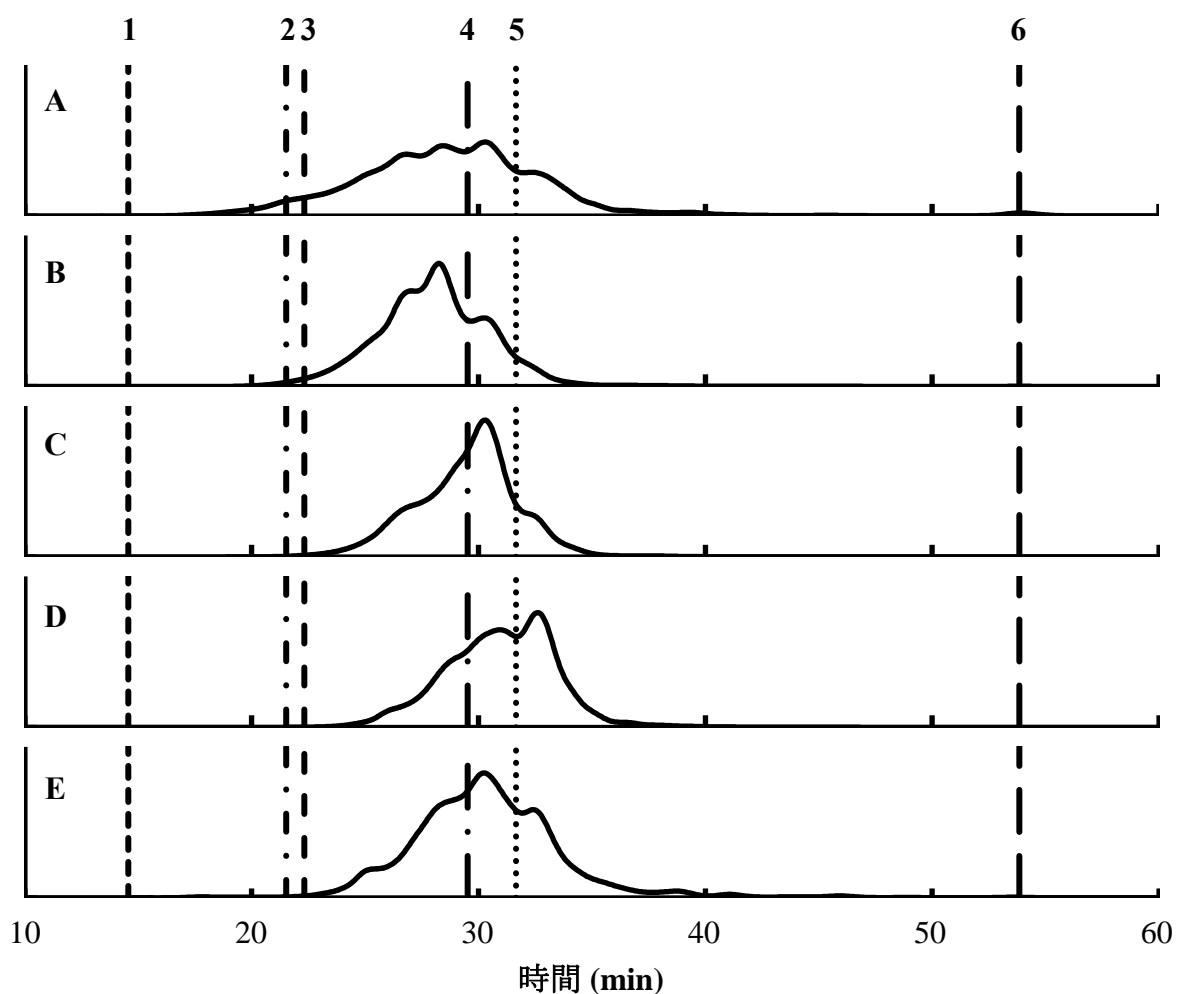


Fig. 4-7 SCP および Sephadex G-25 分画物のゲル濾過 HPLC による分画

A: SCP, B: Sephadex G-25 f1 画分, C: Sephadex G-25 f2 画分,

D: Sephadex G-25 f3 画分, E: ブタ皮 CP

1: ブルーデキストラン (MW ;  $\geq 2,000,000$ ), 2: リゾチーム (MW ; 14,307),

3: アプロチニン (MW ; 6,500), 4: バシトラシン (MW ; 1,422),

5: シアノコバラミン (MW ; 1,355), 6: Trp (MW ; 204)

カラム: Superdex Peptide 10/300 GL (カラムサイズ  $\phi 10 \text{ mm} \times 300\text{-}310 \text{ mm}$ , 粒子サイズ  $13 \mu\text{m}$ , Amersham Biosciences)

流速: 0.5 mL/min

試料: 100  $\mu\text{L}$  負荷

カラム内温度: 室温



#### 4. 血糖上昇抑制作用を示す SCP の構造解析

本実験は、第4章 実験方法 10 および 11 により行った。

Figures. 4-8~4-10 に示すように、f1 画分の逆相 HPLC 分画により、主要な 6 つのペプチド画分 (CPf1-1~1-6) を得た。また、f2 画分の逆相 HPLC 分画により、主要な 5 つのペプチド画分 (CPf2-1~2-5) を得た。さらに、f3 画分の逆相 HPLC 分画により、主要な 7 つのペプチド画分 (CPf3-1~3-7) を得た。

次に、CPf1-1~1-6, CPf2-1~2-5 および CPf3-1~3-7 のアミノ酸配列を分析し、その結果を Table 4-1 に示す。まず、CPf1 および CPf2 を構成する主要なアミノ酸は、Gly, Ala, Pro, Hyp であり、疎水性のペプチド (CPf1-5 および 1-6) は Val や Ile を含んでいた。また、CPf2-1~2-5 を構成する主要なアミノ酸は、Gly, Ala, Pro, Hyp であり、疎水性のペプチド (CPf2-4 および 2-5) は Leu を含んでいた。さらに、CPf1-1~1-6 および CPf2-1~2-5 のいずれの配列にもコラーゲン分子のテロペプチドを除く部位 (三重らせん部位) に特徴的な「Gly-X-Y」 (X, Y は任意のアミノ酸) の配列、もしくはその繰り返し配列が認められた。一方、CPf3-1~3-7 を構成する主要なアミノ酸は、Gly, Ala, Pro であった。また Tyr を含むペプチドが多く、Glu や Phe などのアミノ酸を含むペプチドも存在した。以上の結果は、f1 および f2 画分は主に三重らせん部位に由来するペプチドを含み、f3 画分は三重らせん部位以外に由来するペプチドを含むことを示唆する。

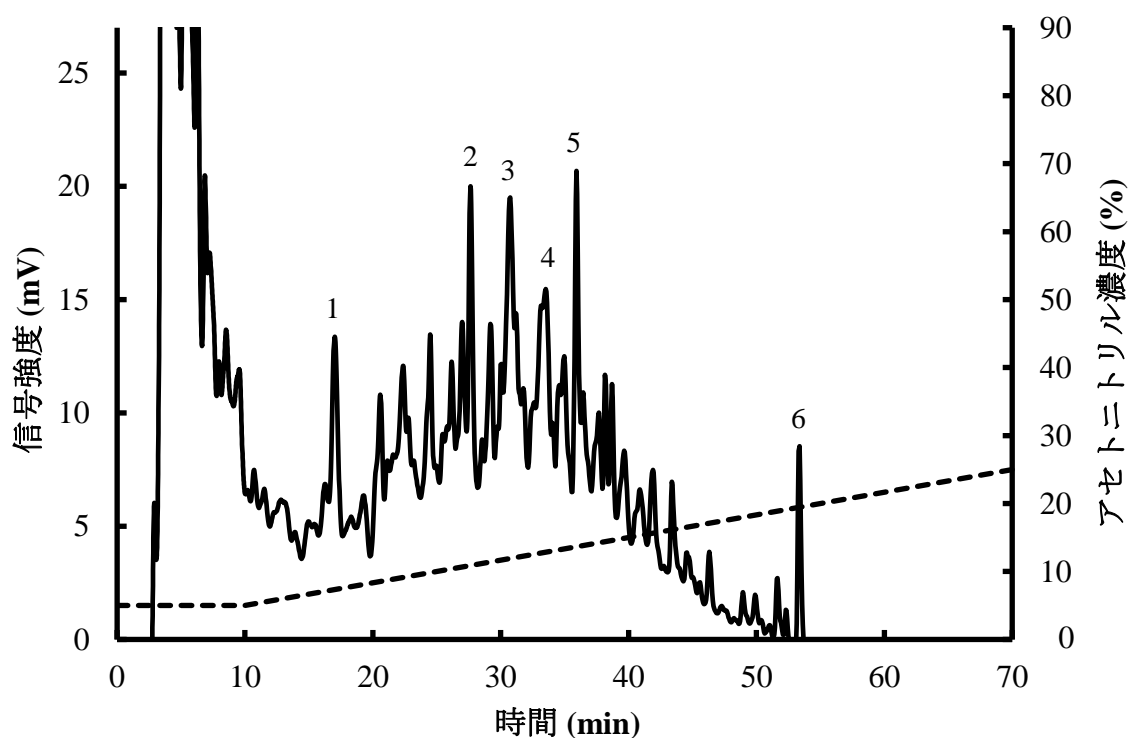


Fig. 4-8 f1 画分の逆相 HPLC による分画

カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua 250-4.6 (カラムサイズ  $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ , 粒子サイズ  $5 \mu\text{m}$ , (株) 関東化学)

流速:  $1.0 \text{ mL/min}$

カラム内温度:  $40^\circ\text{C}$

試料:  $100 \mu\text{L}$  負荷

1: CPf1-1

2: CPf1-2

3: CPf1-3

4: CPf1-4

5: CPf1-5

6: CPf1-6

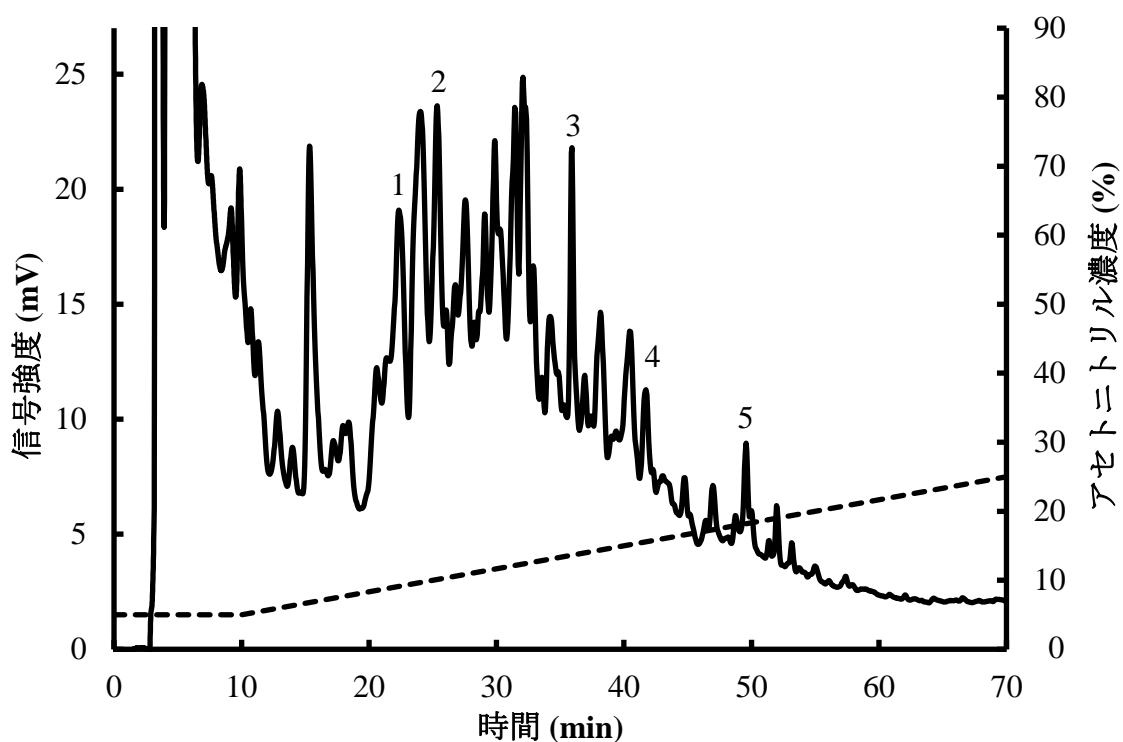


Fig. 4-9 f2 画分の逆相 HPLC による分画

カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua 250-4.6 (カラムサイズ  $\phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm, 粒子サイズ 5  $\mu$ m, (株) 関東化学)

流速: 1.0 mL/min

カラム内温度: 40°C

試料: 100  $\mu$ L 負荷

1: CPf2-1

2: CPf2-2

3: CPf2-3

4: CPf2-4

5: CPf2-5

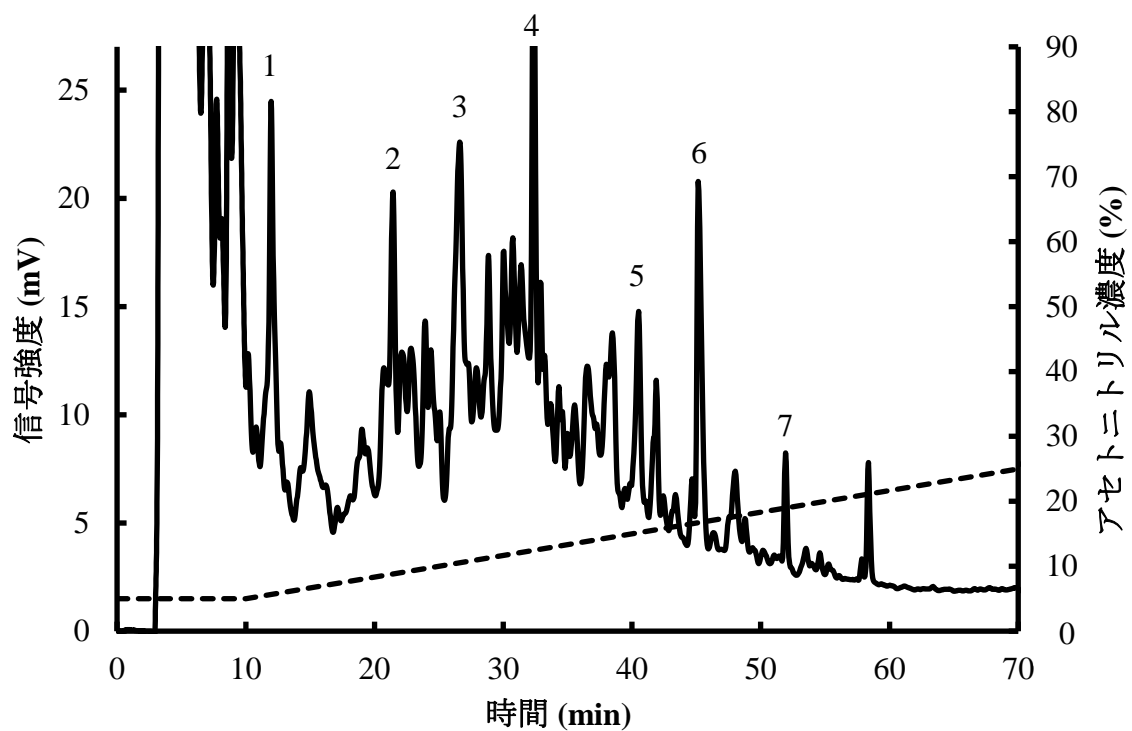


Fig. 4-10 f3 画分の逆相 HPLC による分画

カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua 250-4.6 (カラムサイズ  $\phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm, 粒子サイズ 5  $\mu$ m, (株) 関東化学)

流速: 1.0 mL/min

カラム内温度: 40°C

試料: 100  $\mu$ L 負荷

1: CPf3-1

2: CPf3-2

3: CPf3-3

4: CPf3-4

5: CPf3-5

6: CPf3-6

7: CPf3-7

Table 4-1 f1, f2 および f3 画分のペプチドのアミノ酸配列

画分	ペプチド No.	アミノ酸配列	分子量
f1	f1-1	A-HP-G-P-A-G-P-T-G-K	868.09
	f1-2	A-HP-G-P-V-G-P-A-G-P	835.06
	f1-3	E-HP-G-P-A-G-P-HP-G-P	907.08
	f1-4	E-HP-G-P-A-G-P-HP-G-P	907.08
	f1-5	T-G-G-I-G-G-HP-G-G-S	774.93
	f1-6	A-V-G-P-V-G-P-I-G-P	863.16
f2	f2-1	A-A-G-P-HP-G	484.58
	f2-2	A-HP-G-P-A-G	484.58
	f2-3	G-P-G-G-P-A	454.56
	f2-4	L-HP-G-P-T-G	556.69
	f2-5	G-P-L-G-P-A	510.66
f3	f3-1	A-P-A-G	314.38
	f3-2	G-Y-G-P-G-P-A	617.75
	f3-3	G-G-Y-E	424.46
	f3-4	G-E-Y-G-P	521.59
	f3-5	F-HP-G-G-HP-G-A-K-G	819.01
	f3-6	F-V-A	335.43
	f3-7	A-P-N-P-F-R-H-Y	1001.20

HP: Hyp

## 5. 血糖上昇抑制作用を示す SCP のコラーゲン分子内における存在部位

コラーゲン分子のどの部位に由来するペプチドが血糖上昇抑制作用を示すのか明らかにするために、アテロコラーゲンから調製した A-SCP およびグルコースを経口投与した場合における、A-SCP の血糖値に及ぼす影響を検討した。

本実験は、第 4 章 実験方法 4, 15 および 18-3 により行った。

A-SCP を用いた経口糖負荷試験の結果を Fig. 4-11 に示す。蒸留水投与群では、通常の血糖値変化を示した。A-SCP および SCP 投与群の血糖値は、蒸留水投与群と同様に糖負荷 30 分後に最大値に達し、120 分後には糖負荷 0 分後の血糖値とほぼ同じ値まで低下した。いずれの時間においても、A-SCP および SCP 投与群の血糖値は蒸留水投与群のそれらに比べて低値を示した。特に、15, 30 および 60 分後に蒸留水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低値を示した。

また、A-SCP を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-12 に示す。A-SCP および SCP 投与群の血糖値総和は、蒸留水投与群のそれに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。しかし、A-SCP および SCP 投与群の間に有意差は認められなかった。

以上の結果は、アテロコラーゲン (三重らせん部位) に由来するペプチドが血糖上昇抑制作用をもたらすことを示す。

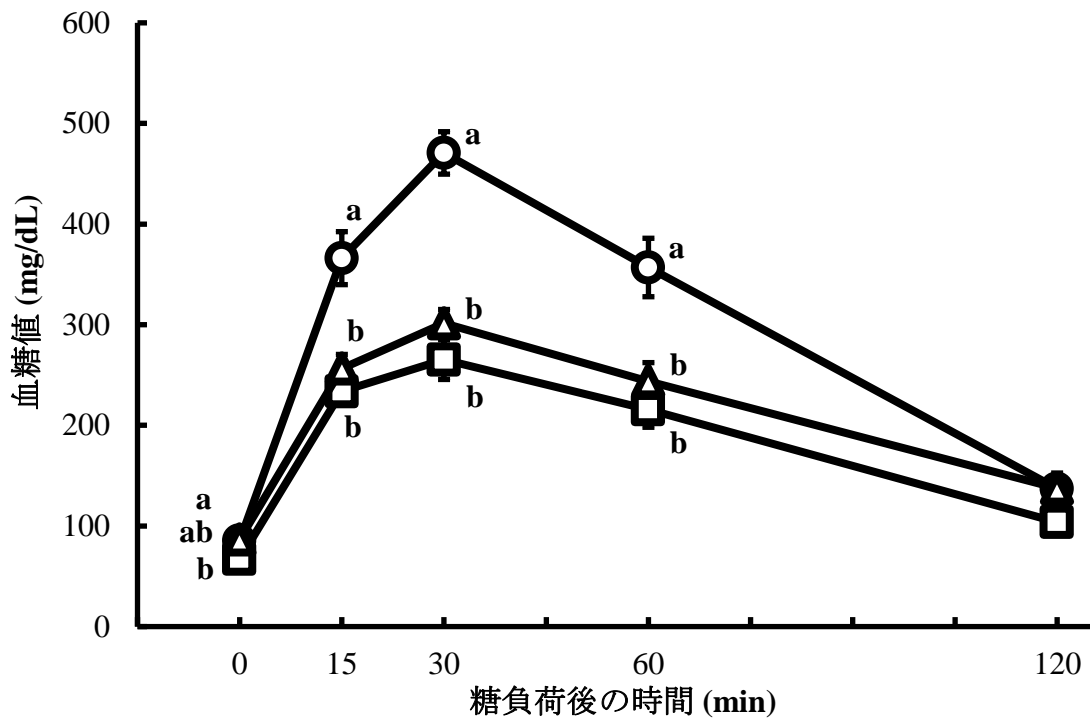


Fig. 4-11 A-SCP を用いた経口糖負荷試験

○: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

△: A-SCP 投与群 (1.5 g A-SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

・蒸留水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり (糖負荷 0 および 60 分後:  $p < 0.05$ , 15 および 30 分後:  $p < 0.01$ )。

・蒸留水投与群と A-SCP 投与群の間に有意差あり (糖負荷 15 および 60 分後:  $p < 0.05$ , 30 分後:  $p < 0.01$ )。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)

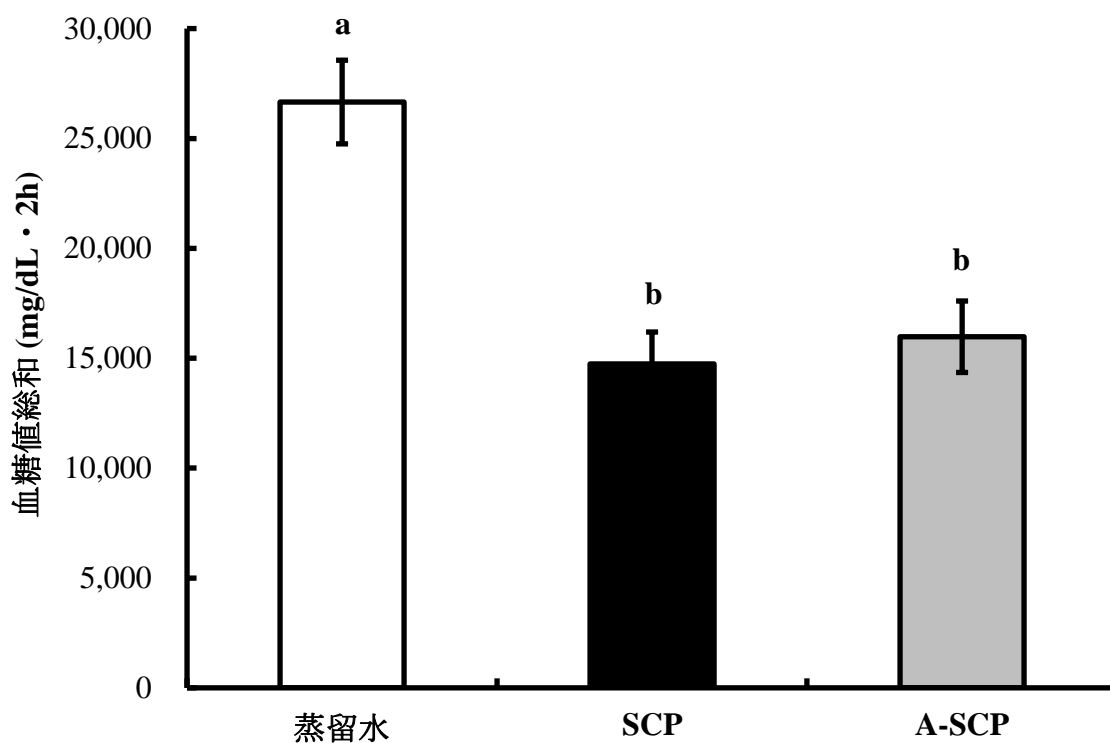


Fig. 4-12 A-SCP を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

蒸留水: 蒸留水投与群 (蒸留水+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

A-SCP: A-SCP 投与群 (1.5 g A-SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重, N=7)

- ・ 蒸留水投与群と SCP 投与群の間に極めて有意に差あり ( $p < 0.01$ )。
- ・ 蒸留水投与群と A-SCP 投与群の間に極めて有意に差あり ( $p < 0.01$ )。

異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)



## 6. 人工消化 SCP の消化度

経口投与された SCP は、消化管において消化による影響を受けて分子量が変化する可能性がある。そこで、SCP を人工消化し、消化度 (遊離アミノ酸量) および分子量の変化を検討した。人工消化は、管腔内消化を模したペプシン-パンクレアチン消化および膜消化を模したプロナーゼ消化により行った<sup>100)</sup>。

本実験は、第 4 章 実験方法 5, 6 および 13 により行った。

PP-SCP および PPP-SCP の消化度を Table 4-2 に示す。表に示すように、未消化のカゼインの消化度は  $3.3 \pm 0.0\%$  であった。また、PP-カゼインの消化度は  $25.0 \pm 0.0\%$  であり、未消化のカゼインのそれより 21.7% 上昇した。さらに、PPP-カゼインの消化度は  $42.7 \pm 0.5\%$  であり、未消化のカゼインのそれより 39.4% 上昇し、PPP-カゼインのそれより 17.7% 上昇した。

一方、SCP の消化度は  $6.1 \pm 0.0\%$  であった。また、PP-SCP の消化度は  $14.8 \pm 0.0\%$  であり、SCP のそれより 8.7% 上昇した。さらに、PPP-SCP の消化度は  $18.3 \pm 0.0\%$  であり、SCP のそれより 12.2% 上昇し、PP-SCP のそれより 3.5% 上昇した。

以上の結果は、SCP が管腔内消化および膜消化に対して一定の消化耐性を有することを示している。

Table 4-2 人工消化カゼインおよび人工消化 SCP の消化度

試料	消化度 (%)
カゼイン	3.3 ± 0.0
PP-カゼイン	25.0 ± 0.0
PPP-カゼイン	42.7 ± 0.5
SCP	6.1 ± 0.0
PP-SCP	14.8 ± 0.0
PPP-SCP	18.3 ± 0.0

## 7. 人工消化 SCP の分子量分布

本実験は、第4章 実験方法 14 により行った。

SCP, PP-SCP および PPP-SCP を Sephadex G-15 に供して溶出した結果を Fig. 4-13 に示す。図に示すように、SCP の溶出結果は単一のピーク (SCP-f1 画分) を示した。一方、PP-SCP および PPP-SCP の溶出結果はそれぞれ3つのピーク (PP-f1, PP-f2, PP-f3 および PPP-f1, PPP-f2, PPP-f3 画分) を示した。SCP-f1, PP-f1 および PPP-f1 画分の分子量は 451.48~14,307 (V0) Da の範囲にあり、吸光度は SCP-f1 > PP-f1 > PPP-f1 画分の順に高値を示した。一方、PP-f2 および PPP-f2 画分の分子量はいずれも 204~451.48 Da の範囲にあり、両者のピークは同様の溶出量に位置した。さらに、吸光度は PPP-f2 > PP-f2 の順に高値を示した。また、PP-f3 および PPP-f3 画分の分子量はいずれも 204 Da 未満であり、両者のピークは同様の溶出量に位置した。吸光度は、PPP-f3 > PP-f3 の順に高値を示した。以上のように、SCP は人工消化によりその分子量分布がやや変化するが、Fig. 4-13 の溶離パターンから明らかなように、人工消化の影響は僅かであることが確認できた。

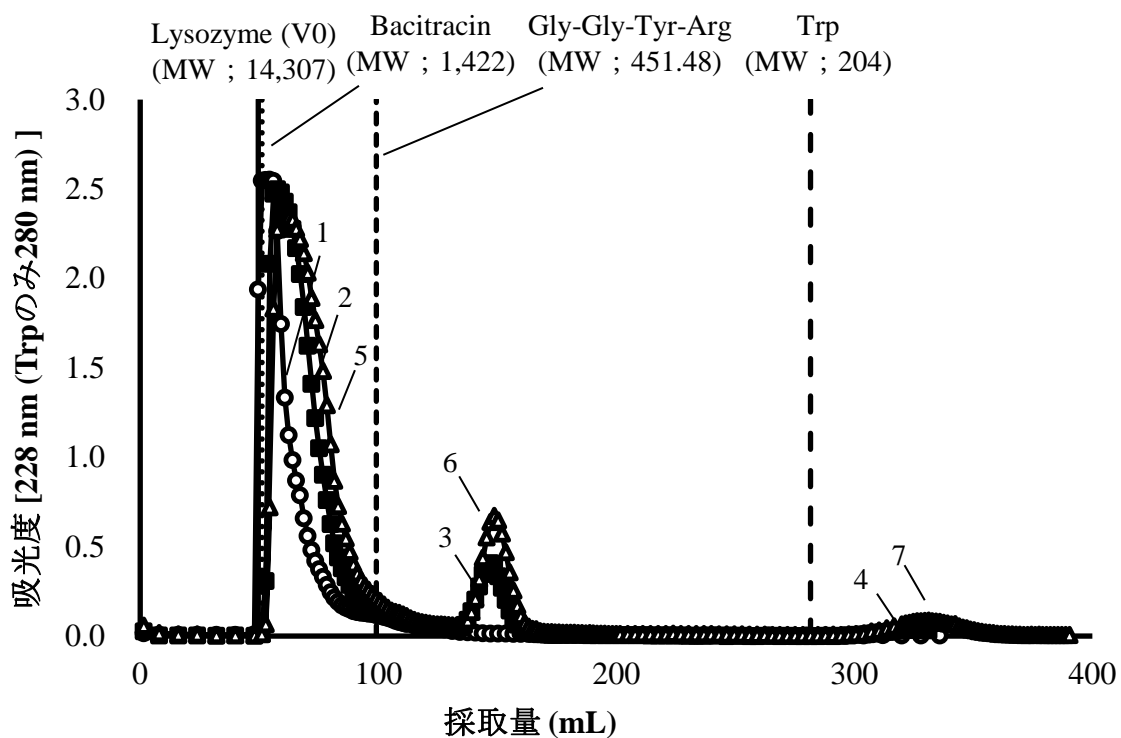


Fig. 4-13 PP-SCP および PPP-SCP の Sephadex G-15 による分画

カラムサイズ:  $\phi$  1.6 cm $\times$ 70 cm

流速: 32 mL/h

試験管 1 本あたりの採取量: 1.6 mL

○: SCP

■: PP-SCP

△: PPP-SCP

1: SCP f1 画分

2: PP-SCP f1 画分

3: PP-SCP f2 画分

4: PP-SCP f3 画分

5: PPP-SCP f1 画分

6: PPP-SCP f2 画分

7: PPP-SCP f3 画分

## 8. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における人工消化 SCP の血糖上昇抑制作用

Figure. 4-13 の結果から、SCP は、生理的な消化過程を模した人工消化により分子量が変化することが明らかとなった。人工消化による組成変化が SCP の血糖上昇抑制作用に及ぼす影響を検討した。本実験は、第 4 章 実験方法 16, 18-4 および 18-5 に準じ行い、人工消化 SCP の投与経路は、消化管における消化の影響を避けるために静脈内投与とした。また、SCP の血糖上昇抑制作用を示した静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (第 3 章 Figs. 3-20 および 3-21) の試験結果と比較するために、グルコース溶液の投与経路は腹腔内投与とした。

PP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-14 に示す。生理食塩水投与群では、糖負荷後すみやかに血糖値が上昇し、30 分後に最大値に達した。その後、120 分後までに血糖値は徐々に低下し、通常 of 血糖値変化を示した。PP-SCP 投与群は、糖負荷後すみやかに血糖値が上昇し、15 分後に最大値に達した。しかし、いずれの測定時間においても、生理食塩水投与群のそれより低値を示した。一方、SCP 投与群は、生理食塩水投与群と同様に 30 分後に最大値に達したが、糖負荷 15 および 30 分後に、生理食塩水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低値を示した。そこで、PP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-15 に示す。SCP 投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群のそれに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。

続いて、PPP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-16 に示す。PPP-SCP 投与群は、生理食塩水投与群と同様の血糖値変化を示したが、糖負荷 15 分後以降は生理食塩水投与群のそれより低値を示した。一方、SCP 投与群は、生理食塩水投与群と同様に 30 分後に最大値に達したが、糖負荷 30 分後に生理食塩水投与群のそれに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。PPP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-17 に示す。生理食塩水投与群の血糖値総和と比べて、PPP-SCP および SCP 投与群のそれらは低値を示す傾向にあった。

すなわち、Figs. 4-15~4-17 により、SCP の血糖上昇抑制作用は、上述の人工消化の影響を受けないことが確認できた。

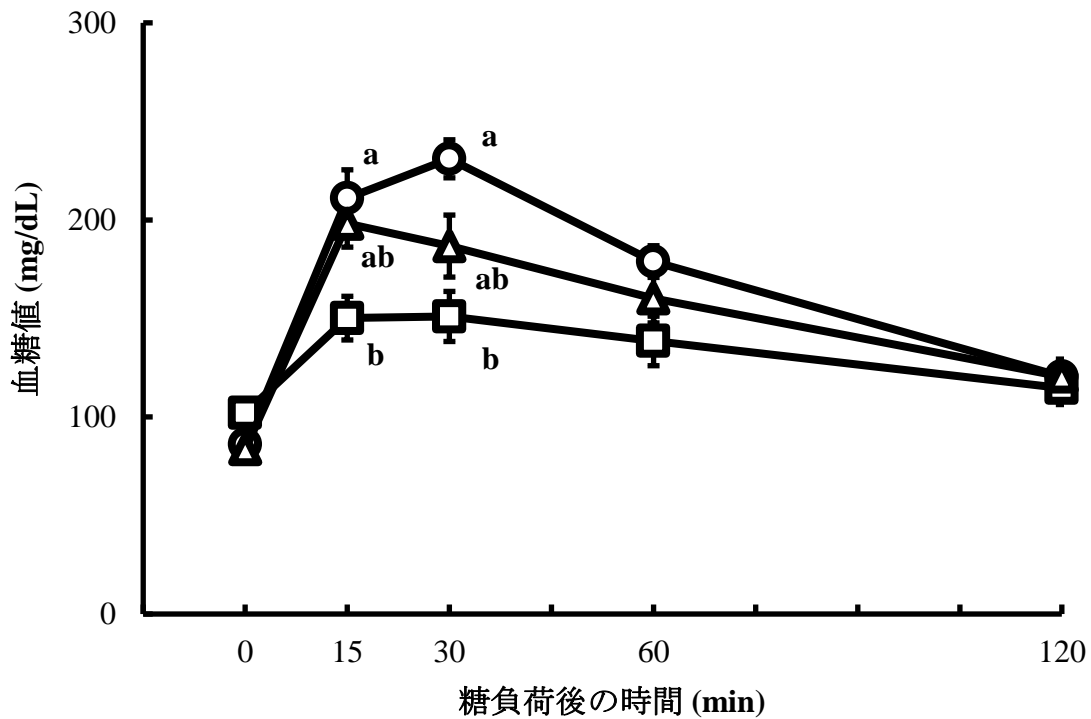


Fig. 4-14 PP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- △: PP-SCP 投与群 (1.5 g PP-SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・糖負荷 15 および 30 分後において生理食塩水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり (それぞれ,  $p<0.05$  および  $p<0.01$ )。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Scheff'e の  $F$  検定を用いた)

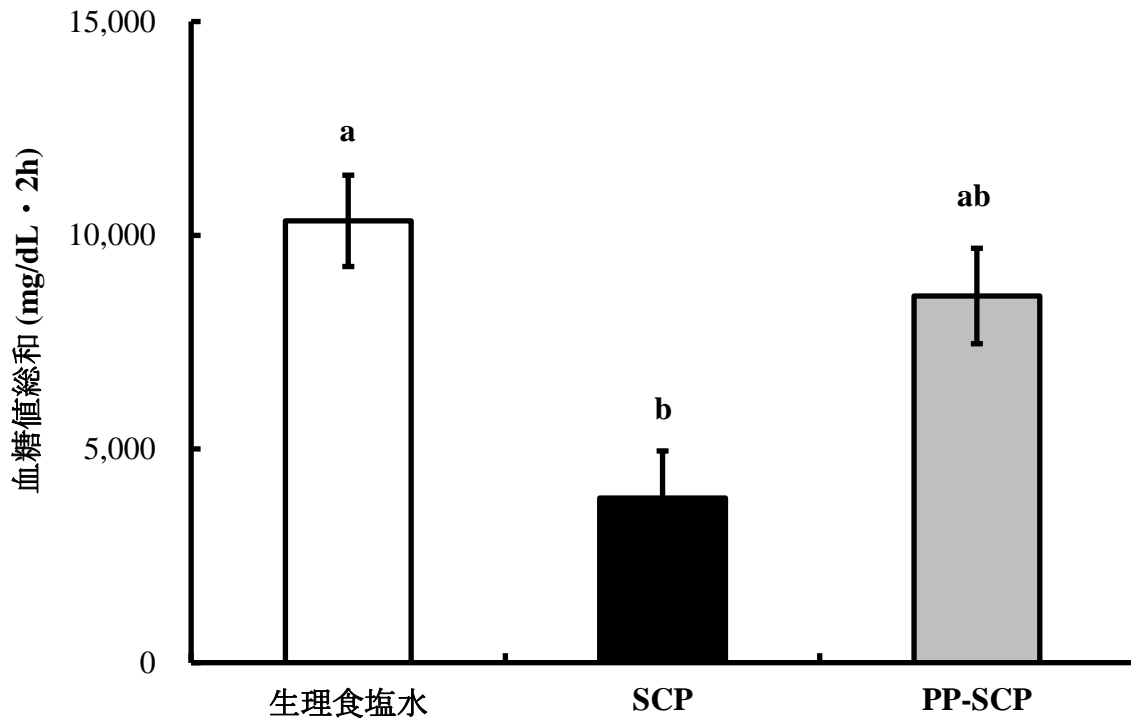


Fig. 4-15 PP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

PP-SCP: PP-SCP 投与群 (1.5 g PP-SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・生理食塩水投与群と SCP 投与群の間に極めて有意に差あり (p<0.01)。

異符号間で有意差あり(Steel-Dwass 法を用いた)

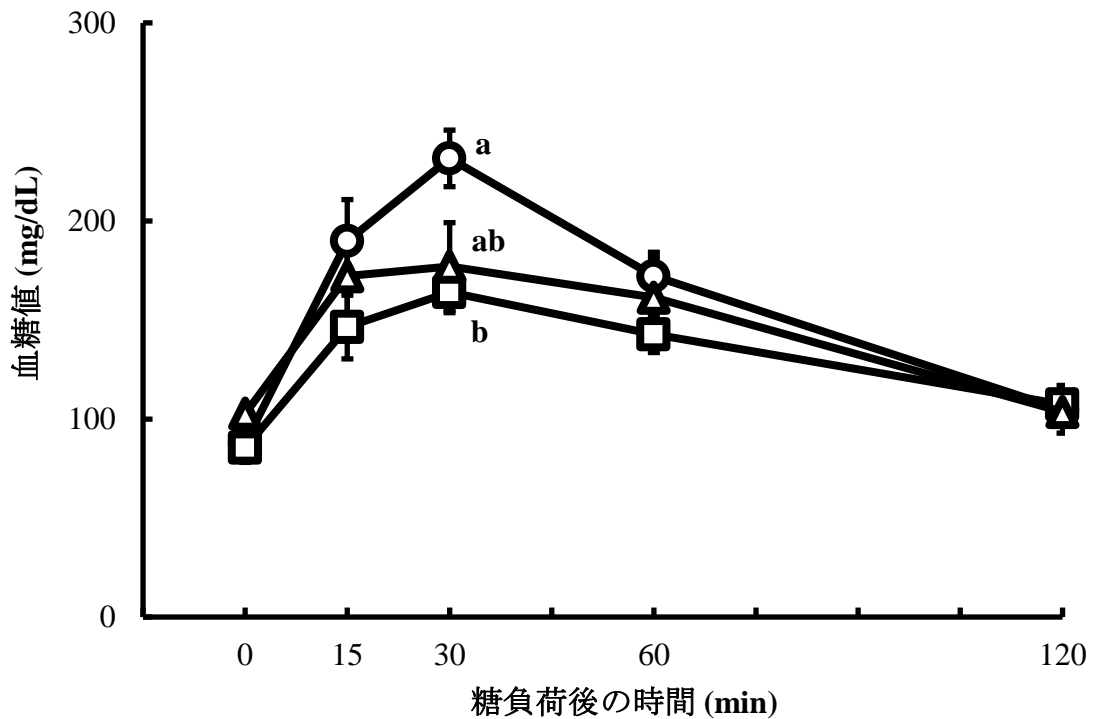


Fig. 4-16 PPP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

△: PPP-SCP 投与群(1.5 g PPP-SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・糖負荷 30 分後において生理食塩水投与群と SCP 投与群の間に有意差あり (p<0.05)。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)



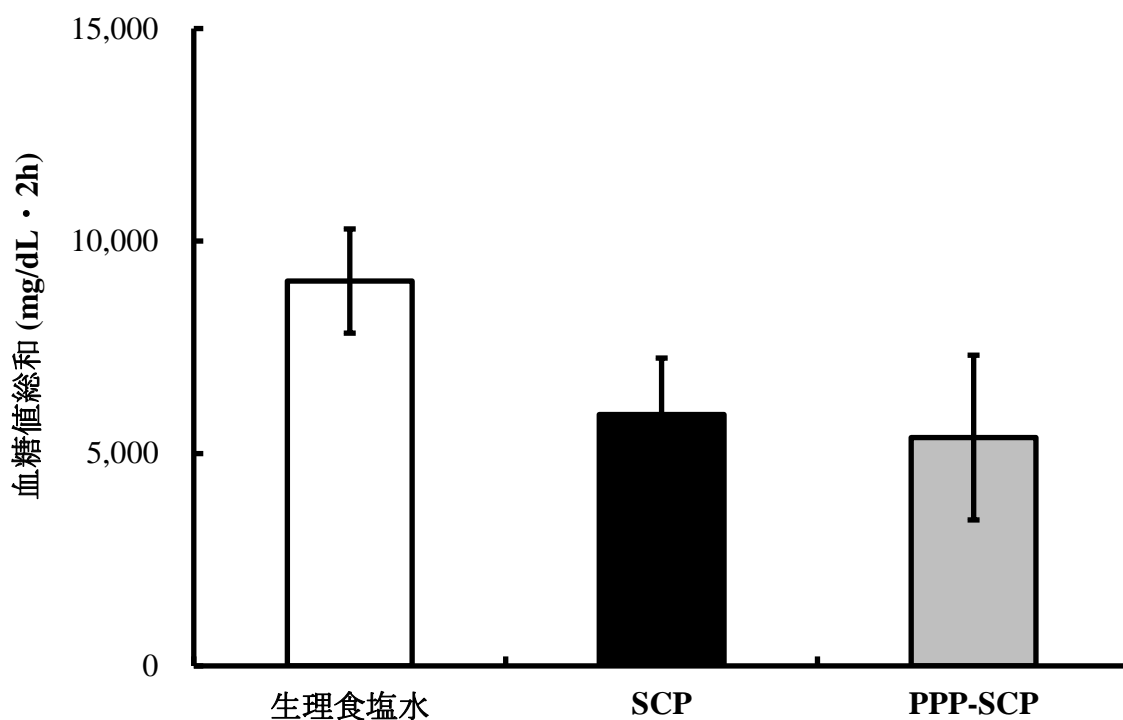


Fig. 4-17 P-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

PPP-SCP: PPP-SCP 投与群 (1.5 g PPP-SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

- SCP および PPP-SCP 投与群は、血糖値総和が低値を示す傾向あり。  
(Tukey-Kramer 法を用いた)

## 9. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用

PPP-SCP を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-16 および 4-17) から、消化管で消化を受けた SCP が血中で血糖上昇抑制作用を示すことが示唆された。しかし、作用物質が、消化により生じたペプチドとアミノ酸のどちらであるか不明である。そこで、SCP のアミノ酸組成を模してアミノ酸混合物を調製し、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験によりその血糖上昇抑制作用を検討した。

本実験は、第 4 章 実験方法 7, 16 および 18-8 により行った。

SCP のアミノ酸組成を Table 4-3 に示す。SCP 構成アミノ酸のうち、Gly が 34.30%を、次いで 11.64%を Pro が占めておりコラーゲンに特徴的なアミノ酸組成を示した。また、Ala が 11.57%, Hyp が 6.77%を示し、他の水産生物由来コラーゲンのアミノ酸組成<sup>69)</sup>と同様の値であった。

アミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-18 に示す。生理食塩水投与群では、通常の血糖値変化を示した。一方、アミノ酸混合物投与群は、糖負荷後すみやかに血糖値が上昇し、15 分後に最大値に達した。しかし、いずれの測定時間においても、生理食塩水投与群の血糖値より低く、糖負荷 30 分後において有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。また、SCP 投与群は、生理食塩水投与群と同様に 30 分後に最大値に達したが、糖負荷 15 および 30 分後に、生理食塩水投与群のそれらに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。また、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-19 に示す。SCP 投与群およびアミノ酸混合物投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群のそれらに対して低値を示す傾向にあった。さらに、SCP 投与群の血糖値総和は、アミノ酸混合物投与群のそれらに対して低値を示す傾向にあった。

以上の結果は、消化により生じた SCP 由来のアミノ酸が血糖上昇抑制作用を有することを示唆する。しかし、未消化の SCP に比べてアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用は弱く、消化により生じたアミノ酸が作用物質であると断定するには至らなかった。

Table 4-3 アムールチョウザメ由来コラーゲンの全長アミノ酸配列データから算出した Asn/Asp および Gln/Glu 比と SCP のアミノ酸組成

アミノ酸	mol%	Asn/Asp および Gln/Glu 比 <sup>10)</sup>	アミノ酸量 (mg/g)
Asp+Asn	5.02	-	-
Asp	-	2.16	41.6
Asn	-	1	19.1
Thr	2.48	-	26.9
Ser	5.02	-	48.0
Glu+Gln	7.28	-	-
Glu	-	1.63	60.5
Gln	-	1	36.9
Gly	34.30	-	234.7
Ala	11.57	-	94.0
Val	1.71	-	18.3
Met	1.10	-	14.9
Ile	1.14	-	13.7
Leu	1.93	-	23.1
Tyr	0.45	-	7.4
Phe	1.40	-	21.1
Hyl	0.91	-	13.4
Lys	2.46	-	32.8
His	0.51	-	7.2
Arg	5.25	-	83.4
Hyp	6.77	-	80.9
Pro	11.64	-	122.2
NH <sub>3</sub>	6.73	-	-
Total	100.00	-	1,000.0

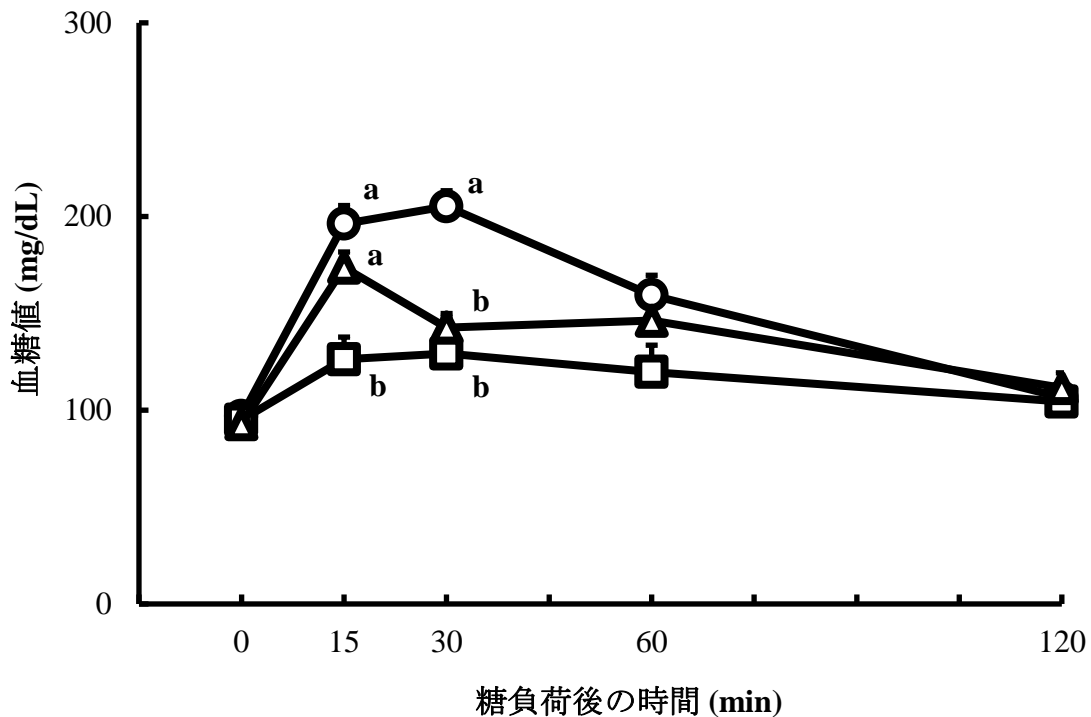


Fig. 4-18 アミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

△: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

- ・糖負荷 15 および 30 分後に生理食塩水および SCP 投与群の間に極めて有意に差あり ( $p<0.01$ )。
- ・糖負荷 15 分後にアミノ酸混合物および SCP 投与群の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。
- ・糖負荷 30 分後に生理食塩水およびアミノ酸混合物投与群の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

糖負荷後の同一時間において、異符号間で有意差あり(Scheffé の  $F$  検定を用いた)

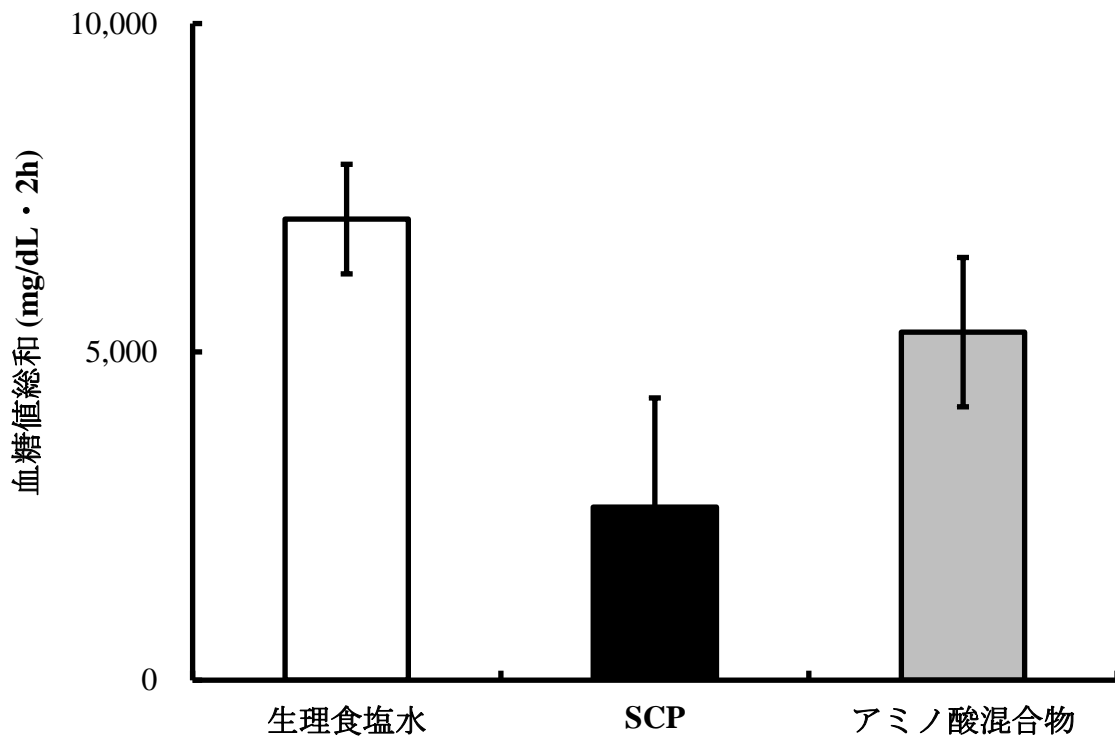


Fig. 4-19 アミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

アミノ酸混合物: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・SCP およびアミノ酸混合物投与群は低値を示す傾向あり。

(Tukey-Kramer 法を用いた)

## 10. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly, Pro および Gly-Gly の血糖上昇抑制作用

アミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-18 および 4-19) より, SCP を構成するアミノ酸混合物が血糖の上昇を有意に抑制した。一方で, 平均分子量 1,400 Da (Fig. 4-7) で, 種々のオリゴペプチド (Table 4-1) から成る SCP も同様に, 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験に (Figs. 4-18, 4-19 および 第 3 章 Figs. 3-20, 3-21) おいて血糖上昇抑制作用を示した。そこで, 血糖上昇抑制作用は作用物質の構造に依存せず, SCP を構成するアミノ酸の種類に起因すると仮定して, コラーゲンに特徴的な構成アミノ酸である Gly, Pro および Gly から構成されるジペプチド Gly-Gly に着目し, その血糖上昇抑制作用を検討した。

本実験は, 第 4 章 実験方法 16 および 18-6 により行った。

Gly, Pro および Gly-Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-20 に示す。生理食塩水投与群の血糖値は, 糖負荷後速やかに上昇して 30 分後に最大値に達し, その後徐々に低下した。一方, SCP 投与群の血糖値は, 60 分後に最大値に達したが, いずれの時間においても生理食塩水投与群に対して低値を示した。また, Gly 投与群の血糖値は 30 分後に最大値に達したが, SCP 投与群のそれと同様にいずれの時間においても生理食塩水投与群に対して低値を示した。さらに, Gly-Gly 投与群の血糖値は, 糖負荷 15 分後に最大値に達したが, SCP および Gly 投与群のそれらと同様に, 生理食塩水投与群に対して低値を示した。しかし, Pro 投与群の血糖値は, 糖負荷 15 分後に最大値に達したが, 生理食塩水投与群のそれに対して高値を示した。また, 糖負荷 30 分後以降は, 生理食塩水投与群の血糖値に対して低値を示したが, SCP, Gly および Gly-Gly 投与群のそれらに対して高値を示した。

Gly, Pro および Gly-Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-21 に示す。SCP, Gly および Gly-Gly 投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向にあった。

すなわち, 静脈内投与において, SCP を構成する Gly が血糖上昇抑制作用に寄与すると考えられた。

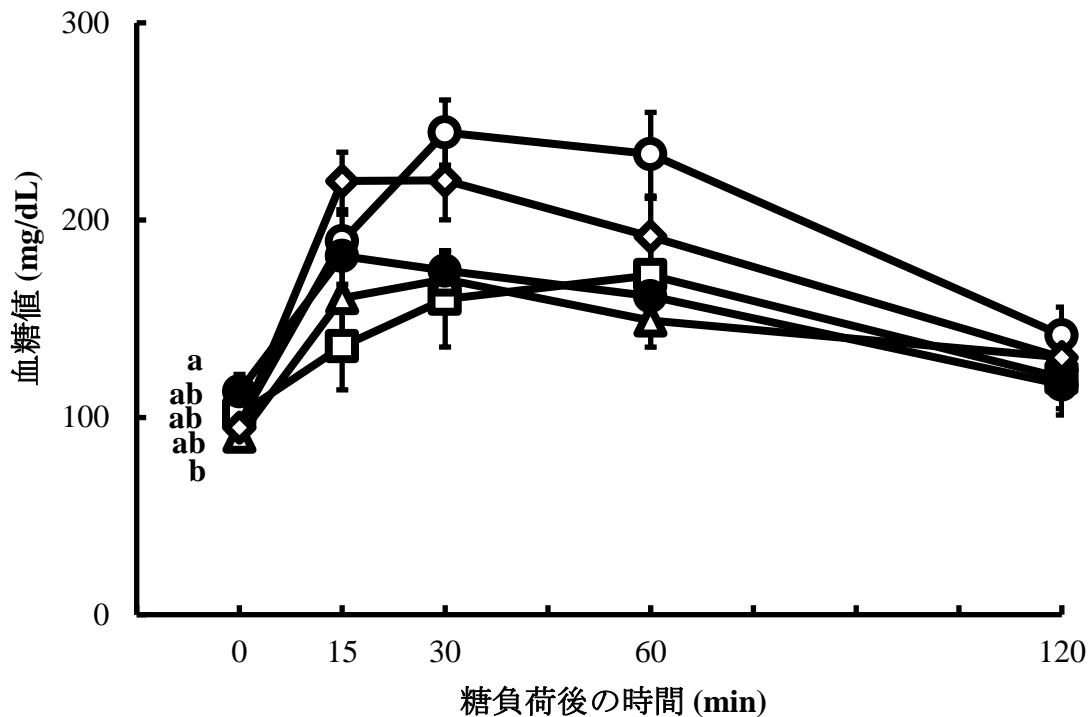


Fig. 4-20 Gly, Pro および Gly-Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重)を腹腔内投与, N=5)
  - : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
  - △: Gly 投与群 (1.5 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
  - ◇: Pro 投与群 (1.5 g Pro/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
  - : Gly-Gly 投与群 (1.5 g Gly-Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- ・糖負荷 0 分後において Gly 投与群と Gly-Gly 投与群の間に有意差あり ( $p < 0.05$ )。  
糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)

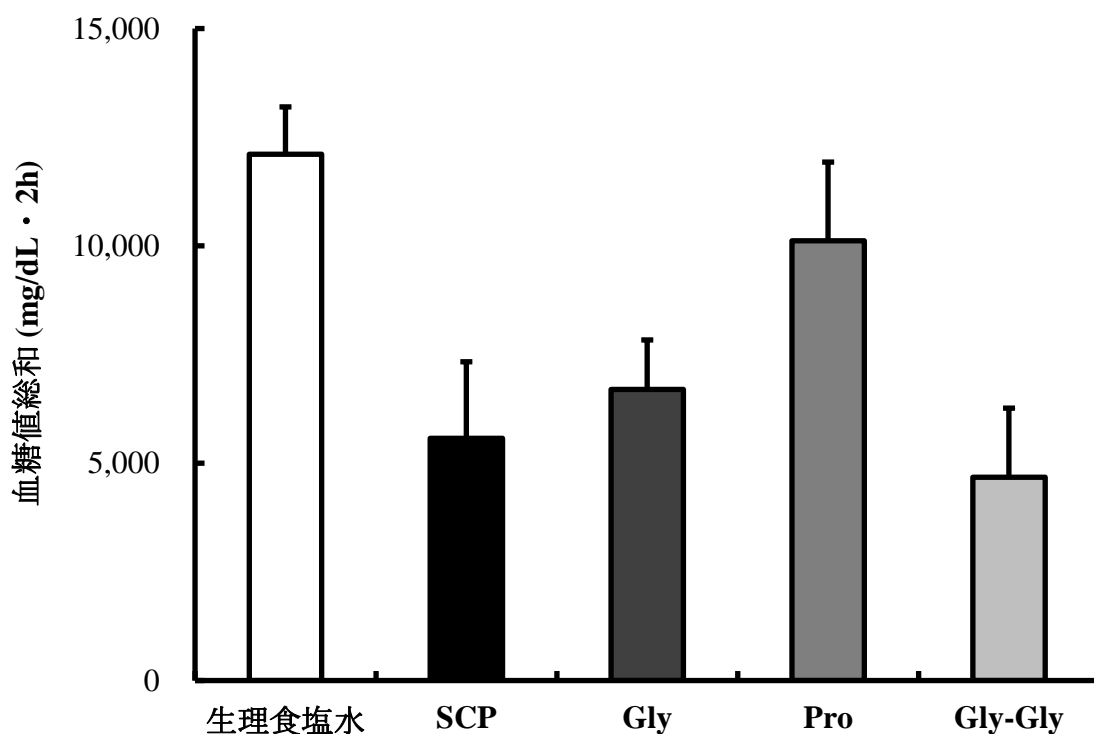


Fig. 4-21 Gly, Pro および Gly-Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

Gly: Gly 投与群 (1.5 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

Pro: Pro 投与群 (1.5 g Pro/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

Gly-Gly: Gly-Gly 投与群 (1.5 g Gly-Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)



- Gly および Gly-Gly 投与群は，血糖値総和が低値を示す傾向あり。
- Pro 投与群は，Gly および Gly-Gly 投与群に比べて血糖値総和が高値を示す傾向あり。

(Steel-Dwass 法を用いた)

## 11. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly 投与濃度の影響

Gly, Pro および Gly-Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-20 および 4-21) より, Gly が血糖上昇抑制作用に寄与することが明らかとなった。そこで, Gly 投与濃度と血糖上昇抑制作用が相関するか検討した。

本実験は, 第 4 章 実験方法 16 および 18-7 により行った。

異なる濃度の Gly 溶液を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-22 に示す。生理食塩水および Gly-0.15 投与群の血糖値は, 糖負荷 30 分後に最大値に達したが, Gly-1.5 および Gly-0.75 投与群のそれらは糖負荷 15 分後に最大値に達した。いずれの測定時間においても, Gly-1.5 投与群 < Gly-0.75 投与群 < 生理食塩水投与群 < Gly-0.15 投与群の順に血糖値は低値であった。

また, 濃度が異なる Gly 溶液を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-23 に示す。Gly-1.5, Gly-0.75 および Gly-0.15 投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向にあった。また, Gly 投与濃度依存的に, 血糖値総和は低値を示す傾向にあった。

すなわち, 静脈内投与において, Gly 投与濃度と血糖上昇抑制作用は相関することが明らかとなった。

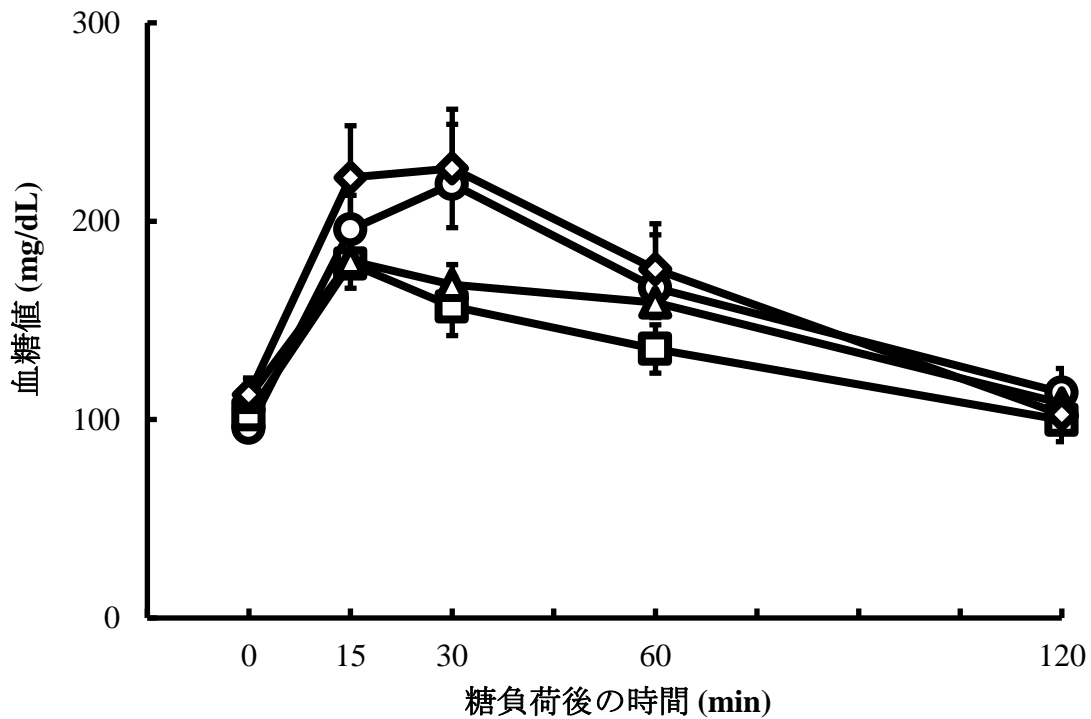


Fig. 4-22 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly 投与濃度の影響

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)
- : Gly-1.5 投与群 (1.5 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)
- △: Gly-0.75 投与群 (0.75 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)
- ◇: Gly-0.15 投与群 (0.15 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

・糖負荷 30 分後以降において, Gly-1.5 および Gly-0.75 投与群で血糖値が低値を示す傾向あり。

(Steel-Dwass 法を用いた)

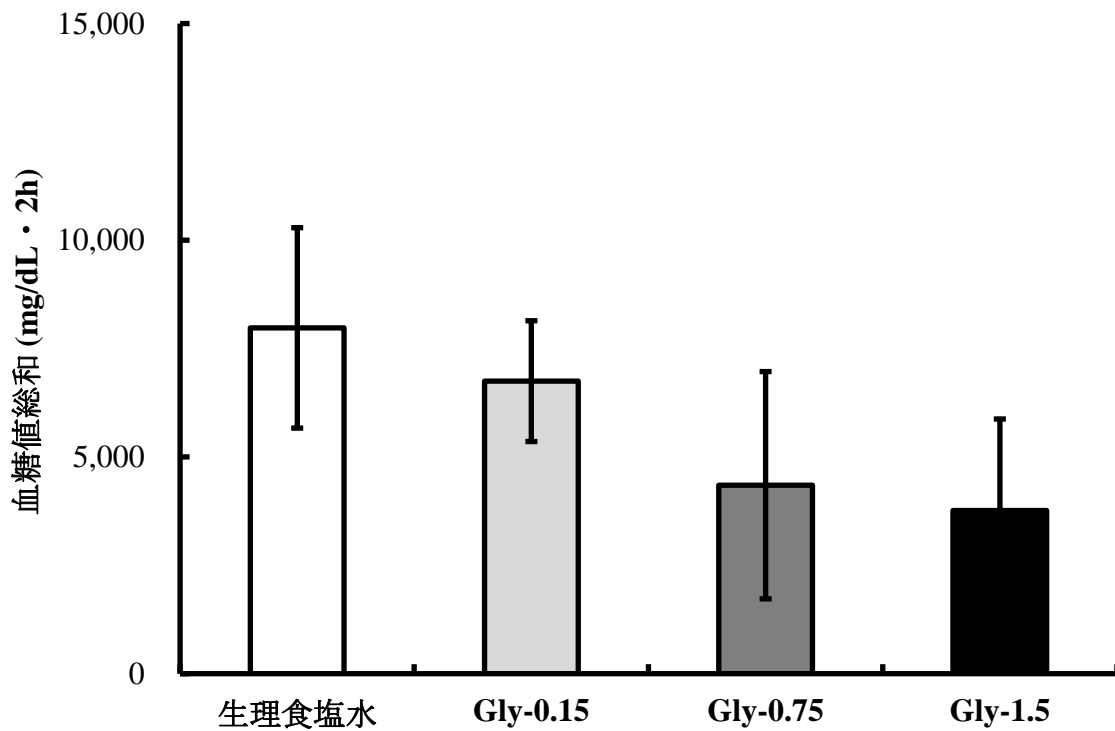


Fig. 4-23 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和に対する Gly 濃度の影響

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=5)

Gly-1.5: Gly-1.5 投与群 (1.5 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース /kg 体重を腹腔内投与, N=5)

Gly-0.75: Gly-0.75 投与群 (0.75 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース /kg 体重を腹腔内投与, N=5)

Gly-0.15: Gly-0.15 投与群 (0.15 g Gly/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース /kg 体重を腹腔内投与, N=5)

・有意差は認められないが Gly 濃度依存的に血糖値総和が低値を示す傾向あり。

(Steel-Dwass 法を用いた)

## 12. 静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における Gly 抜きアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用

Gly を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-20~4-23) より, Gly が血糖上昇抑制作用に寄与することが示唆された。そこで, Gly 抜きアミノ酸混合物を用いて, Gly 投与の有無と血糖上昇抑制作用の有無が相関するか検討した。

本実験は, 第 4 章 実験方法 16 および 18-9 により行った。

Gly 抜きアミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-24 に示す。アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値は, 生理食塩水投与群と同様に糖負荷 30 分後に最大値に達したが, いずれの時間においても生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向にあった。

Gly 抜きアミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-25 に示す。アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向にあった。また, 両群間に有意差は認められなかった。

以上の結果は, 静脈内投与においては, Gly と同様に Gly 以外のアミノ酸も血糖上昇抑制作用を示し, Gly 投与の有無と血糖上昇抑制作用の有無は必ずしも相関しないことを示す。

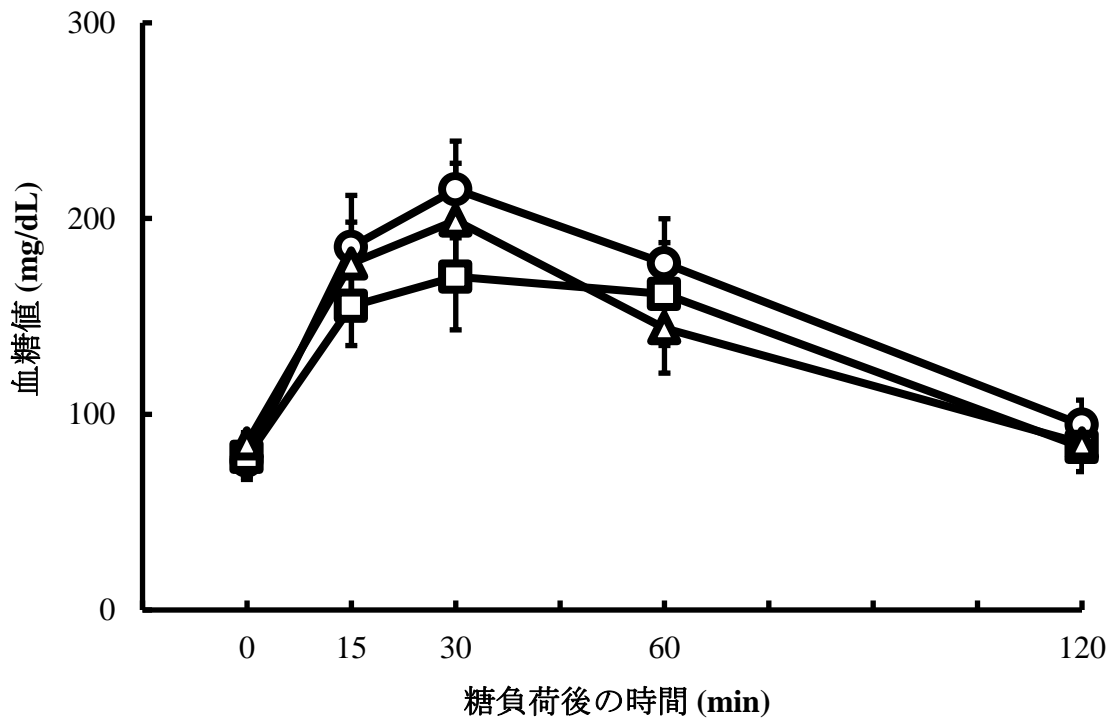


Fig. 4-24 Gly 抜きアミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- : アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- △: Gly 抜きアミノ酸混合物投与群 (1.5 g Gly 抜きアミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・群間に有意差無し。  
(Steel-Dwass 法を用いた)

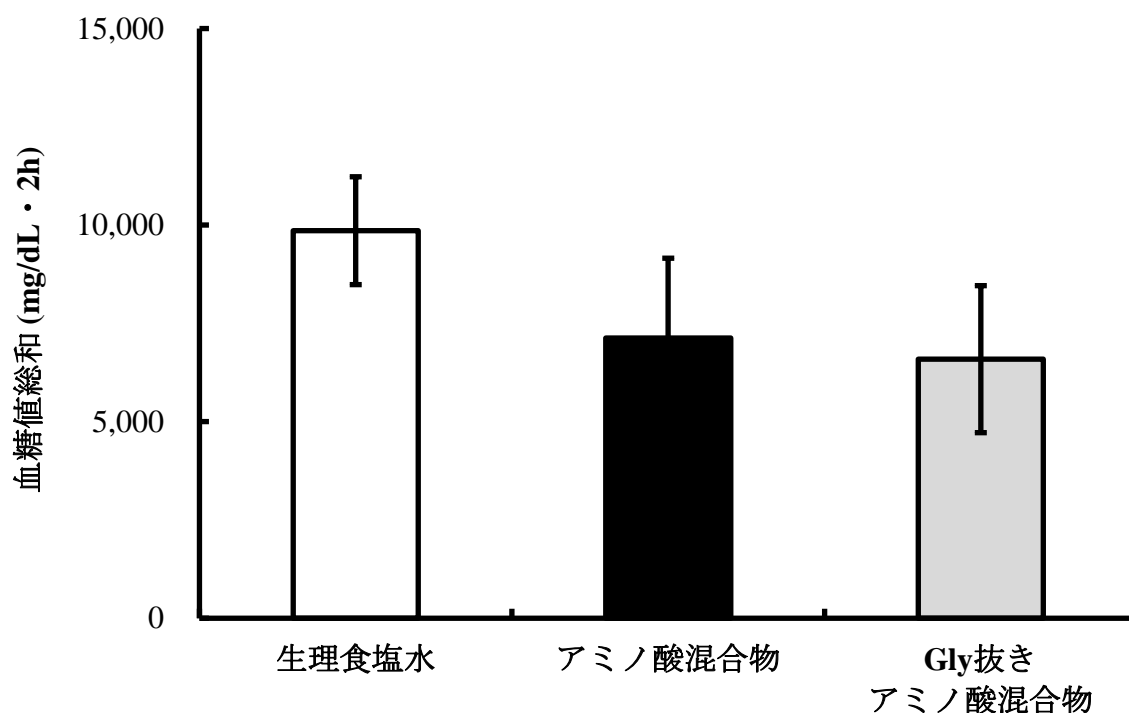


Fig. 4-25 Gly 抜きアミノ酸混合物を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

アミノ酸混合物: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

Gly 抜きアミノ酸混合物: Gly 抜きアミノ酸混合物投与群 (1.5 g Gly 抜きアミノ酸混合物/kg 体重を静脈内投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・群間に有意差は無いが, アミノ酸混合物および Gly 抜きアミノ酸混合物投与

群は、血糖値総和が低値を示す傾向あり。

(Tukey-Kramer 法を用いた)



### 13. 経口投与-腹腔内糖負荷試験における Gly の血糖上昇抑制作用

濃度の異なる Gly 溶液を用いた静脈内投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-22 および 4-23) の結果から, 血中に投与された Gly が濃度依存的に血糖上昇抑制作用を示すことが明らかとなった。そこで, Gly を経口投与した場合について, 血糖上昇抑制作用が得られるか検討した。SCP は, 構成アミノ酸として Gly を約 30% 含有する (Table 4-3)。そこで, SCP および Gly の投与量を, それぞれ 1.5 g/kg 体重および 0.5 g/kg 体重とした。

本実験は, 第 4 章 実験方法 17 および 18-10 により行った。

Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-26 に示す。生理食塩水投与群では, 通常の血糖値変化を示した。一方, SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値は, 15 分後に最大値に達したが, いずれの時間においても生理食塩水投与群のそれに対して低値を示した。

Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-27 に示す。SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向にあった。

すなわち, Gly のみの経口投与により血糖の上昇が抑制されることが明らかとなった。

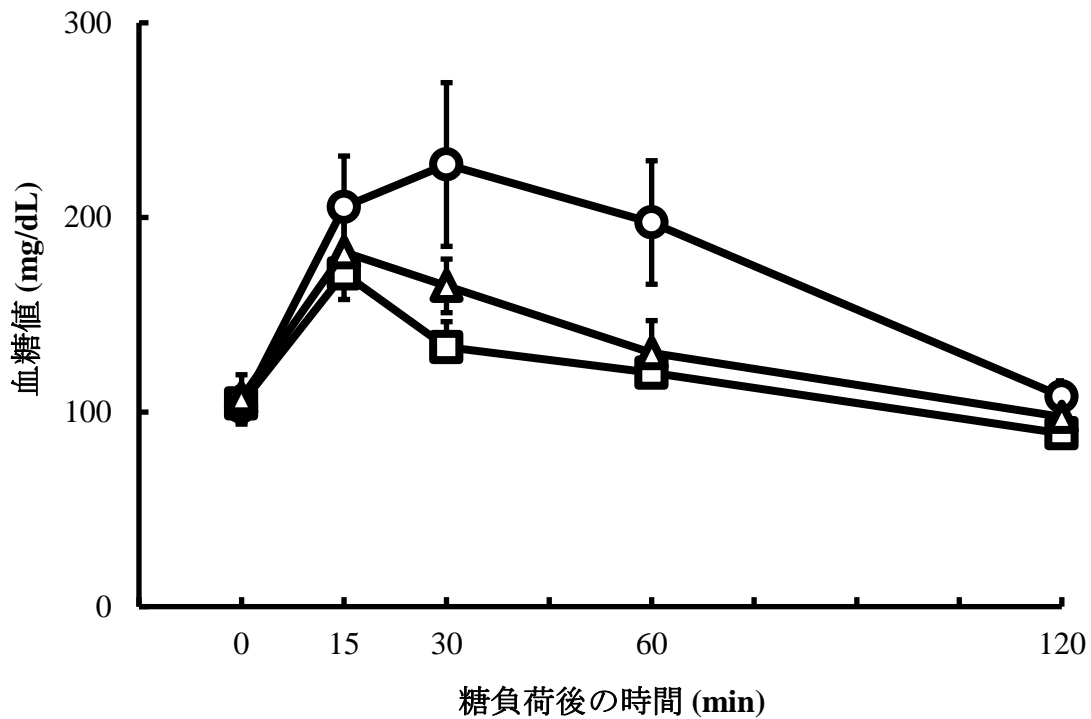


Fig. 4-26 Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)
- △: 1/3 量 Gly 投与群 (0.5 g Gly/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

• SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値は、生理食塩水投与群のそれに対して低値を示す傾向あり。

(Scheff'e の *F* 検定を用いた)

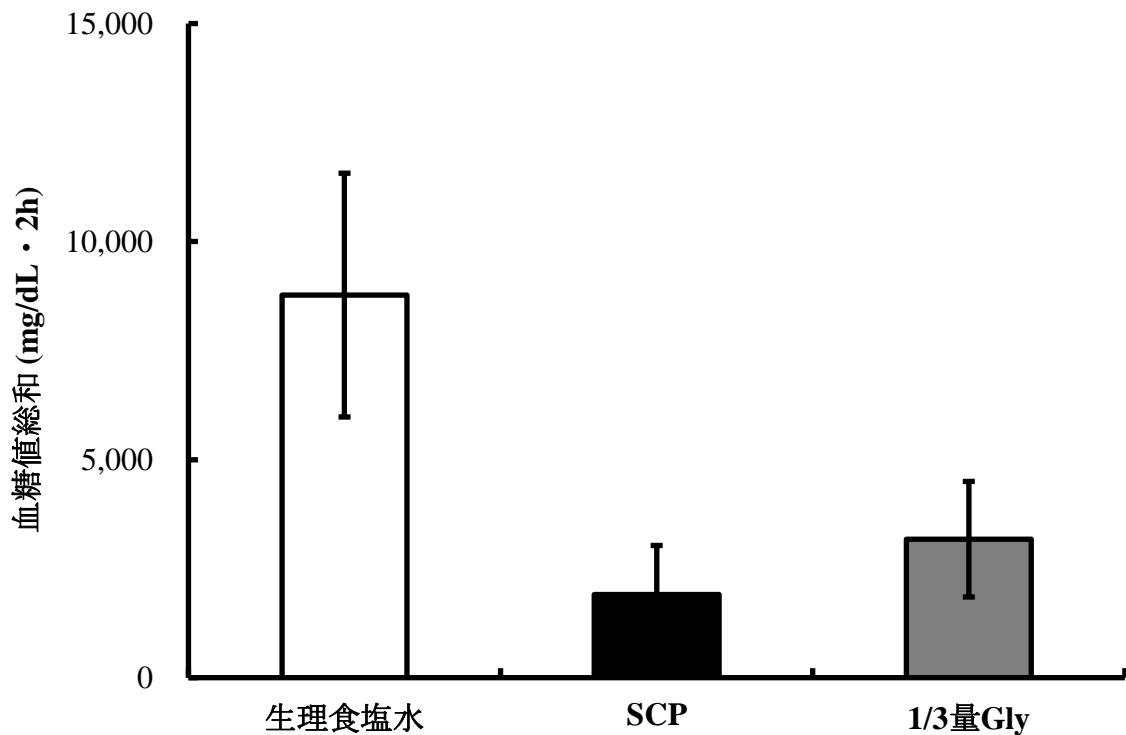


Fig. 4-27 Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

1/3 量 Gly: 1/3 量 Gly 投与群 (0.5 g Gly/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=6)

- SCP および 1/3 量 Gly 投与群は、血糖値総和が低値を示す傾向あり。  
(Tukey-Kramer 法を用いた)

#### 14. 経口糖負荷試験における Gly の血糖上昇抑制作用

Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-26 および 4-27) において、Gly を 0.5 g/kg 体重経口投与した場合に血糖上昇抑制作用が認められた。そこで、経口糖負荷試験においても血糖上昇抑制作用が認められるか検討した。

本実験は、第 4 章 実験方法 15 および 18-11 により行った。

Gly を用いた経口糖負荷試験の結果を Fig. 4-28 に示す。生理食塩水投与群の血糖値は、糖負荷後速かに上昇して 30 分後に最大値に達し、その後徐々に低下した。一方、SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値は、生理食塩水投与群と同様に 30 分後に最大値に達したが、いずれの時間においても生理食塩水投与群に対して低値を示した。

Gly を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-29 に示す。SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群のそれに対して極めて有意 ( $p < 0.01$ ) に低値を示した。

すなわち、腹腔内糖負荷試験のみならず、生理的なグルコース吸収経路を介した経口糖負荷試験においても、Gly の経口投与により血糖の上昇が抑制されることが明らかとなった。

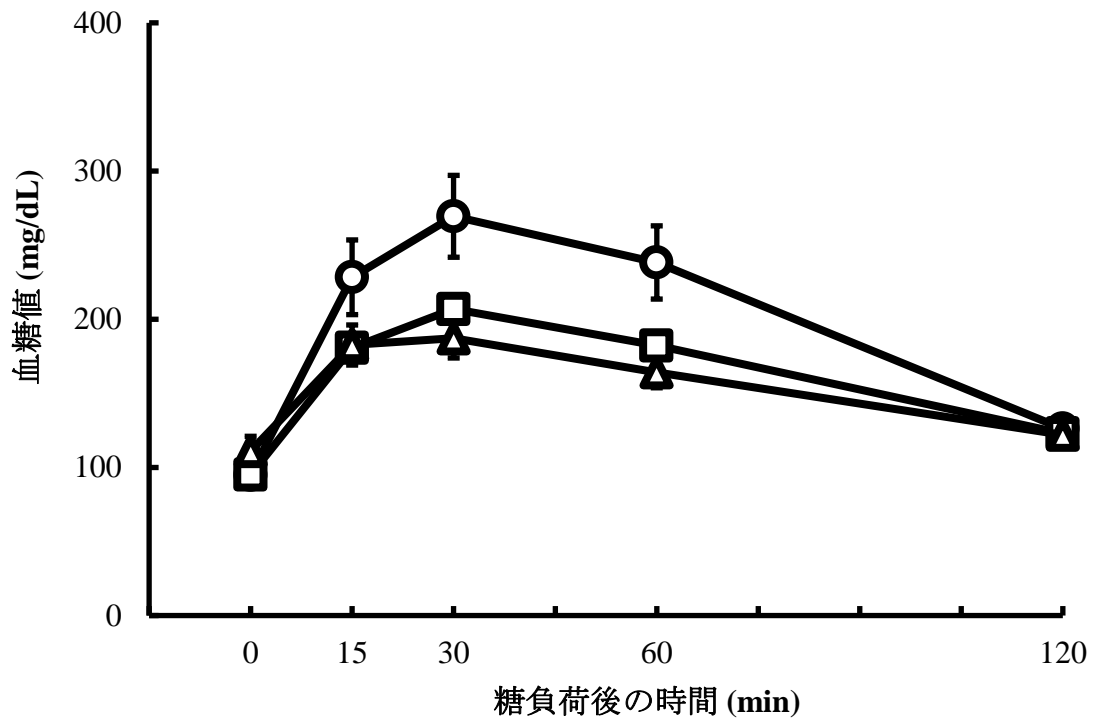


Fig. 4-28 Gly を用いた経口糖負荷試験

○: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

□: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

△: 1/3 量 Gly 投与群 (0.5 g Gly/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

・ SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値は低値を示す傾向あり。

(Steel-Dwass 法を用いた)

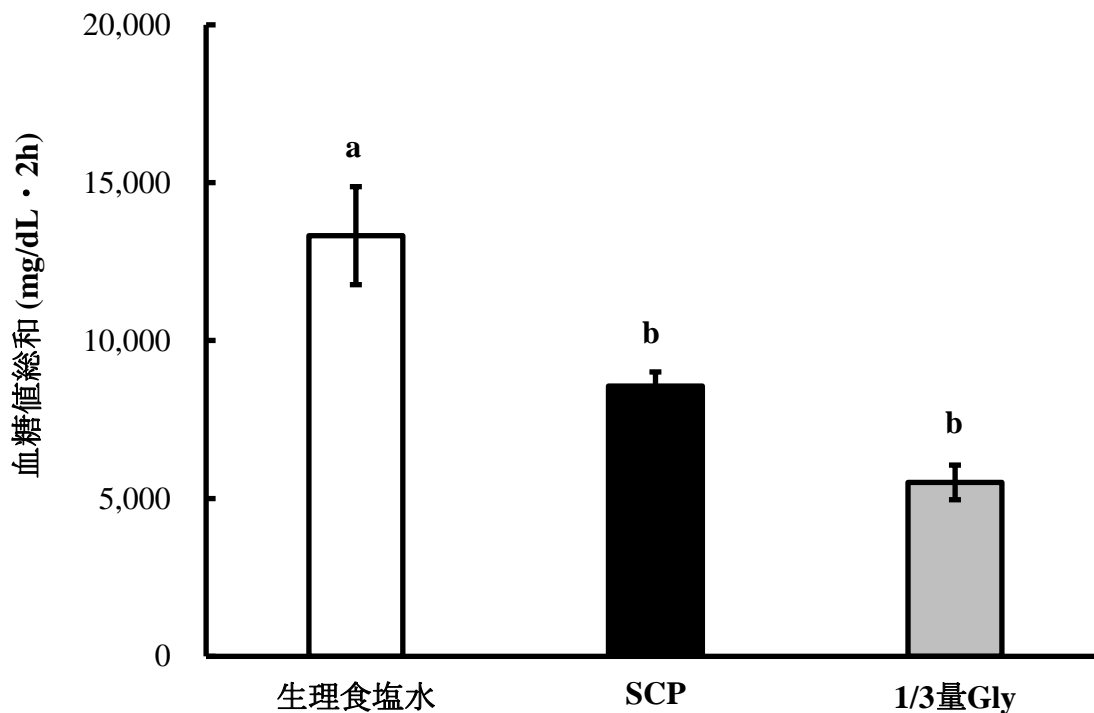


Fig. 4-29 Gly を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

1/3 量 Gly: 1/3 量 Gly 投与群 (0.5 g Gly/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

・SCP および 1/3 量 Gly 投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群のそれに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。

(Scheffé の  $F$  検定を用いた)

## 15. 経口投与-腹腔内糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用

Gly を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-26 および 4-27) より, Gly の経口投与による血糖上昇抑制作用が認められた。そこで, Gly を含有するアミノ酸混合物の経口投与により, 血糖上昇抑制作用が認められるかを腹腔内糖負荷試験により検討した。また, Gly 抜きアミノ酸混合物を経口投与し, Gly の有無と血糖上昇抑制作用の有無が相関するか検討した。

本実験は, 第 4 章 実験方法 17 および 18-12 により行った。

アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験の結果を Fig. 4-30 に示す。SCP およびアミノ酸混合物投与群の血糖値は, 15 分後に最大値に達したが, いずれの時間においても生理食塩水投与群に対して低値を示した。一方, Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値は, 糖負荷 15 および 30 分後において生理食塩水投与群のそれらに対して低値を示したが, いずれの時間においても SCP およびアミノ酸混合物投与群のそれらに対して高値を示した。

アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-31 に示す。SCP および Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれらに対して低値を示す傾向にあった。また, アミノ酸混合物投与群の血糖値総和は, 生理食塩水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した。

以上の結果は, 静脈内投与と異なり, 経口投与においては Gly 投与の有無と血糖上昇抑制作用の有無が相関することを示す。すなわち, SCP を構成する Gly は, 経口投与された SCP の血糖上昇抑制作用に寄与すると考えられる。

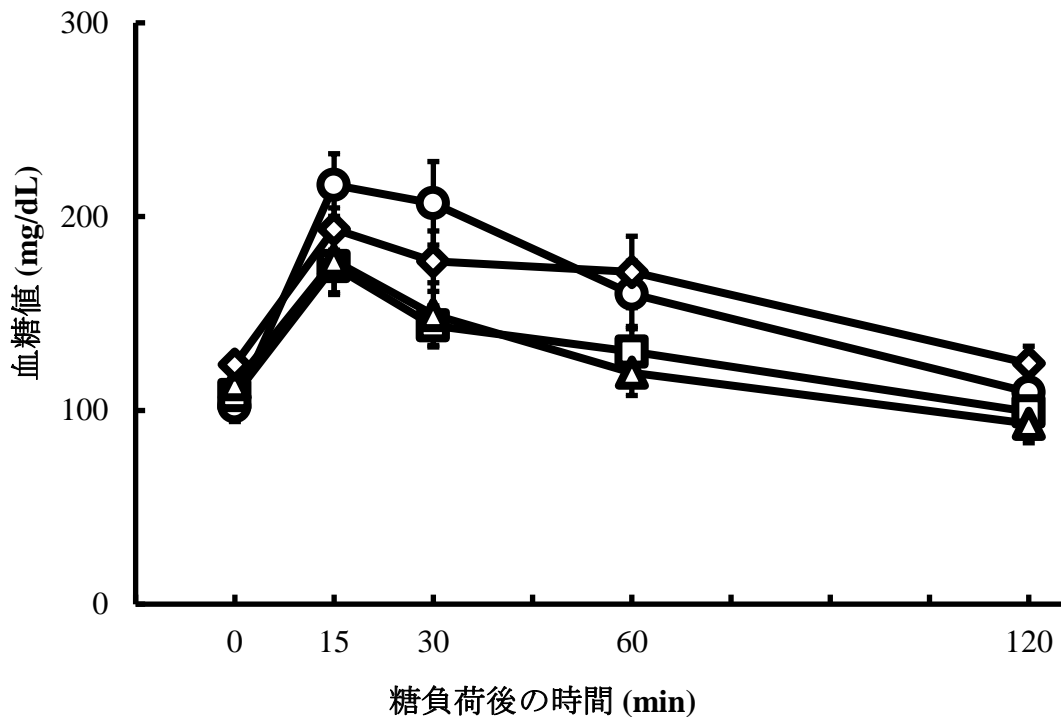


Fig. 4-30 アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- △: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)
- ◇: Gly 抜きアミノ酸混合物投与群 (1.5 g Gly 抜きアミノ酸混合物/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

・ SCP およびアミノ酸混合物投与群の血糖値は低値を示す傾向あり。  
(Steel-Dwass 法を用いた)



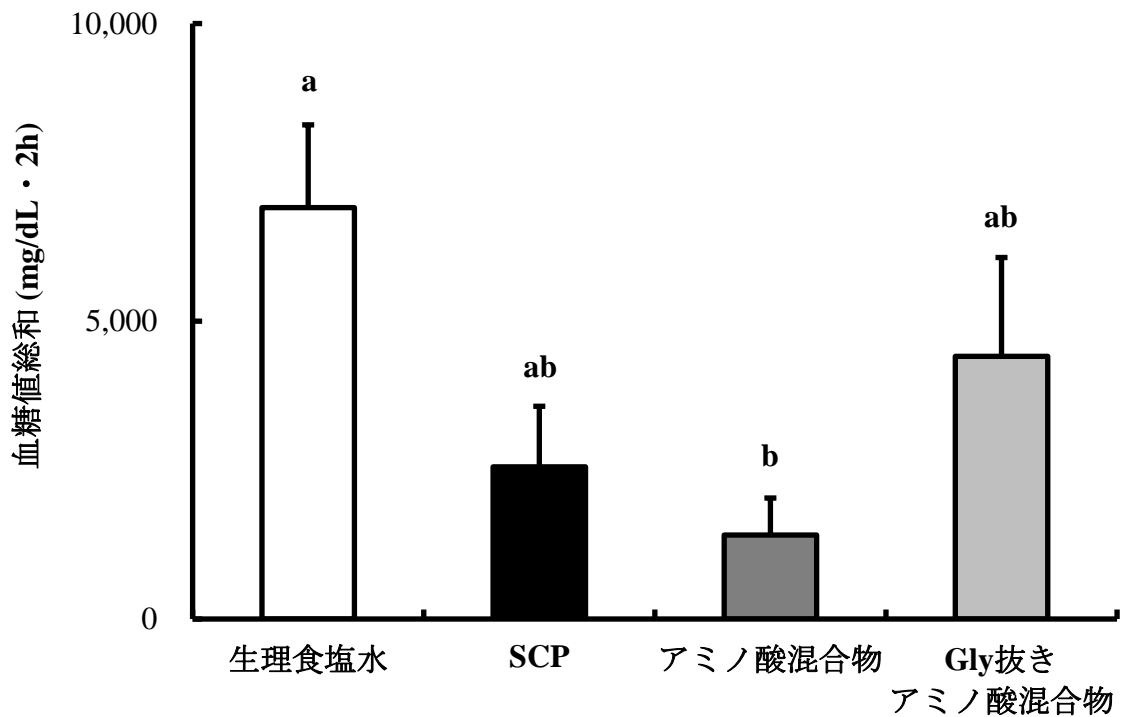


Fig. 4-31 アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

アミノ酸混合物: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

Gly 抜きアミノ酸混合物: Gly 抜きアミノ酸混合物投与群 (1.5 g Gly 抜きアミノ酸混合物/kg 体重を経口投与+2.0 g グルコース/kg 体重を腹腔内投与, N=7)

- ・生理食塩水投与群とアミノ酸混合物投与群の間に有意差あり ( $p<0.05$ )。  
異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)

## 16. 経口糖負荷試験におけるアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用

アミノ酸混合物を用いた経口投与-腹腔内糖負荷試験 (Figs. 4-30 および 4-31) において、血糖上昇抑制作用が認められた。そこで、経口糖負荷試験においても血糖上昇抑制作用が認められるか検討した。

本実験は、第4章 実験方法 15 および 18-13 により行った。

アミノ酸混合物を用いた経口糖負荷試験の結果を Fig. 4-32 に示す。SCP 投与群の血糖値は、60 分後に最大値に達したが、15, 30 および 60 分後において生理食塩水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低値を示した。また、アミノ酸混合物投与群の血糖値は、生理食塩水投与群と同様に 30 分後に最大値に達したが、15, 30 および 60 分後において生理食塩水投与群のそれらに対して有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低値を示した。なお、SCP 投与群との間に有意差は認められなかった。

アミノ酸混合物を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和を Fig. 4-33 に示す。SCP およびアミノ酸混合物投与群の血糖値総和は、生理食塩水投与群のそれらに対して極めて有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。SCP 投与群とアミノ酸混合物投与群との間には有意差は認められなかった。

すなわち、腹腔内糖負荷試験のみならず、生理的なグルコース吸収経路を介した経口糖負荷試験においても、アミノ酸混合物の経口投与により血糖の上昇が抑制されることが明らかとなった。

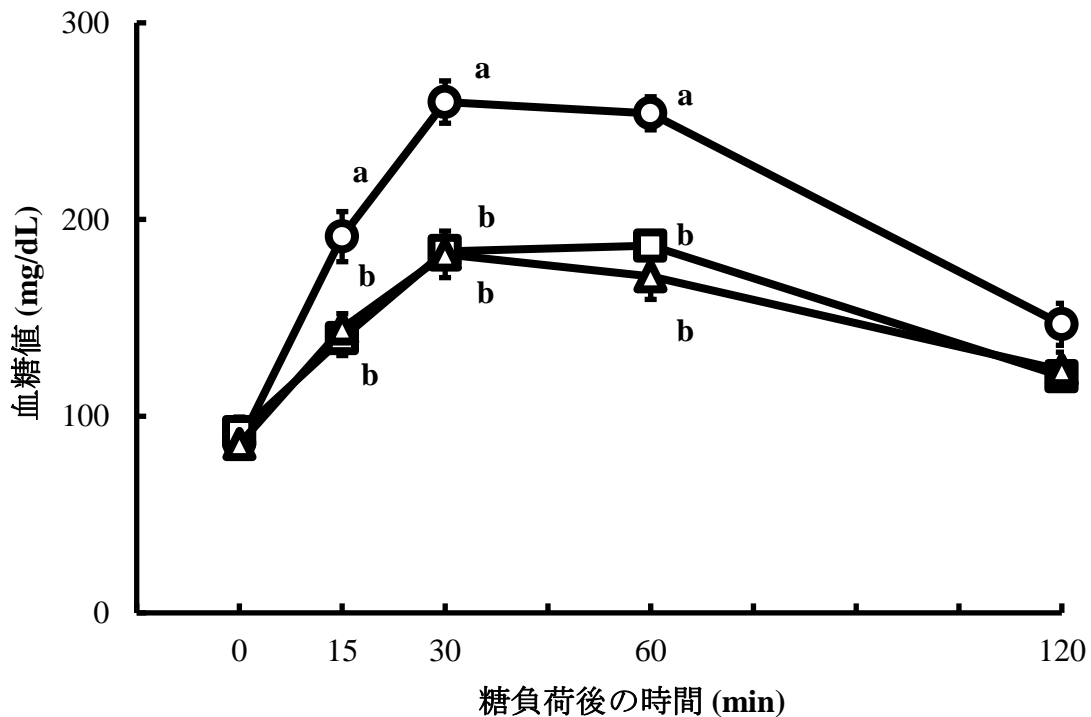


Fig. 4-32 アミノ酸混合物を用いた経口糖負荷試験

- : 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)
- : SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)
- △: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

- ・糖負荷 15 分後において生理食塩水投与群と SCP およびアミノ酸混合物投与群の間に有意差あり (いずれも  $p<0.05$ )。
- ・糖負荷 30 分後において生理食塩水投与群と SCP およびアミノ酸混合物投与群の間に有意差あり (それぞれ,  $p<0.01$  および  $p<0.05$ )。
- ・糖負荷 60 分後において生理食塩水投与群と SCP およびアミノ酸混合物投与群の間に極めて有意に差あり (いずれも  $p<0.01$ )。

糖負荷後の同一時間において, 異符号間で有意差あり (Steel-Dwass 法を用いた)

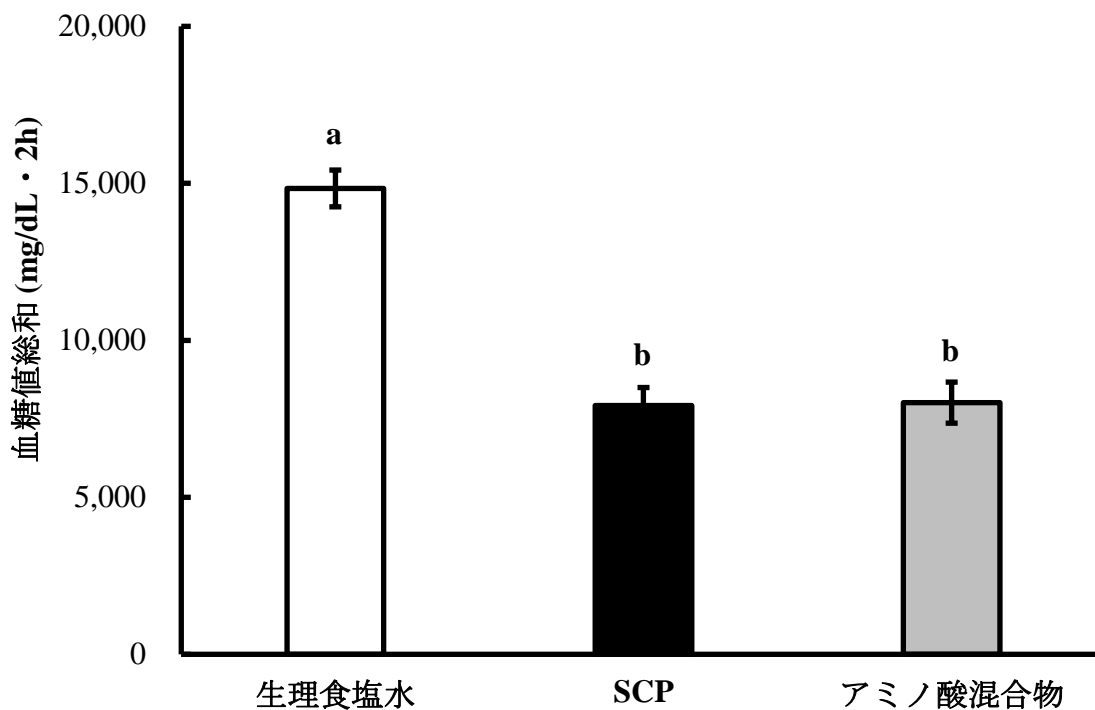


Fig. 4-33 アミノ酸混合物を用いた経口糖負荷試験における血糖値総和

生理食塩水: 生理食塩水投与群 (生理食塩水+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

SCP: SCP 投与群 (1.5 g SCP/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

アミノ酸混合物: アミノ酸混合物投与群 (1.5 g アミノ酸混合物/kg 体重+2.0 g グルコース/kg 体重を経口投与, N=7)

- ・生理食塩水投与群と SCP およびアミノ酸混合物投与群の間に極めて有意に差あり ( $p<0.01$ )。

異符号間で有意差あり (Tukey-Kramer 法を用いた)

## 小考察

第2章より、SCPが血糖上昇抑制作用を有することが明らかとなった。そこで本章では、SCPに含まれる作用物質の構造的特徴、作用物質と作用機序との間の相関関係について検討した。また、作用物質の消化管消化が血糖上昇抑制作用に及ぼす影響について調べた。

まず、SCPをSephadex G-50によるゲルろ過に供した結果、単一のピークが得られた(F1画分)。このことから、SCPは分子量が近似したペプチドの集合体であり、SCP調製時にチョウザメ未利用部位に含まれる大部分のコラーゲンがパインによる加水分解を受けてペプチドになったと考えられた。また、このF1画分を用いて糖負荷試験を行った結果、F1画分に血糖上昇抑制作用が認められ(Figs. 4-2 および 4-3)、本画分に含まれるペプチドは血糖上昇抑制作用を有することが明らかとなった。

次に、血糖上昇抑制作用を担っているペプチドの分子量とアミノ酸配列を詳しく調べるために、F1画分をSephadex G-25によるゲル濾過に供し、3つの画分(f1~f3)を得た。得られた3つのピーク画分を用いた糖負荷試験を行ったところ、いずれの画分にも血糖上昇抑制作用が認められたが、分子量の大きいf1およびf2画分がより高い血糖上昇抑制作用を示した。

そこで、f1、f2およびf3画分を逆相HPLCに供した後、画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列を行った。その結果、f1画分では6つの主要なペプチド画分(CPf1-1~1-6)が、f2画分では5つの主要なペプチド画分(CPf2-1~2-5)が検出された。各画分のペプチドは主にGly, Ala, Pro, Hypで構成されており、コラーゲン分子のテロペプチドを除く部位(三重らせん部位)に特徴的な「Gly-X-Y」(X, Yは任意のアミノ酸)の配列、もしくはその繰り返し配列がいずれの画分にも認められた。よって、CPf1-1~1-6およびCPf2-1~2-5は主に三重らせん部位に由来するペプチドであると推察された。

一方、f3画分の7つの主要なペプチド画分(CPf3-1~3-7)は主にGly, Ala, Proで構成されるペプチドが大部分だったが、TyrやPheを含むペプチドも認められた(Table 4-1)。シベリアチョウザメ*Acipenser baerii*のII型コラーゲンの $\alpha$ (I)

鎖では、Tyr は三重らせん部位ではなくテロペプチド部位に存在し (DDBJ, EU241878), Phe も三重らせん部位よりもテロペプチド部位に多く分布する。テロペプチド部位に Tyr が多く存在することは、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* (DDBJ, BC161663) やニジマス *Oncorhynchus mykiss*<sup>29)</sup> など他の硬骨魚類でも報告されている。本研究の CPf3-5 は三重らせん部位の「Gly-X-Y」の繰り返し配列やその一部であると考えられ、CPf3-3 と CPf3-4 は「Gly-X-Y」の配列と Tyr がともに含まれていることから、三重らせん部位とテロペプチド部位のどちらにも由来すると考えられる。一方、CPf3-1, CPf3-2, CPf3-6 および CPf3-7 は「Gly-X-Y」の配列を含まず、中でも CPf3-6 および CPf3-7 は Phe と Tyr を含むのでいずれもテロペプチド部位に由来する可能性が高い。

以上のように、f1 および f2 画分が f3 画分よりも高い血糖上昇抑制作用を示したことから、血糖上昇抑制作用を有する主要なペプチドは、三重らせん部位に由来すると考えられた。そこで次に、アテロコラーゲンをパパイイン分解して調製したペプチドである A-SCP を糖負荷試験に供し、血糖上昇抑制作用を確認した。その結果、A-SCP で強い血糖上昇抑制作用が認められた。この事実は、血糖上昇抑制作用が、三重らせん部位に特有な「Gly-X-Y」の繰り返し配列を含むペプチドに起因することを示唆している。しかし、有意差は認められなかったものの、テロペプチド由来のペプチドを含む SCP 投与群の血糖値が A-SCP 投与群よりも低値を示したことから (Figs. 4-11 および 4-12), テロペプチド由来のペプチドも血糖上昇抑制作用に対して何らかの関与をしていることが考えられる。

一方、SCP の調製工程では未利用部位からコラーゲンを精製せず、除タンパクした未利用部位にパパイインを添加し、直接的にペプチドへ分解する。ここで、SCP の純度 (コラーゲン含有率) は 87% (SCP の 1,000 アミノ酸残基あたり Hyp 残基数 68 を精製コラーゲンの Hyp 残基数 78<sup>24)</sup> で除したもの) と算出されることから、SCP のうち 13% は非コラーゲン性タンパク質由来のペプチドや、多糖類やミネラルなどの非タンパク質成分に該当する。したがって、非コラーゲン性タンパク質由来のペプチドや非タンパク質成分が、血糖上昇抑制作用を示す可能性も考えられる。しかしながら、Sephadex G-25 を用いた分画により非タンパ

ク質成分を除去し、且つ、三重らせん部位に由来するペプチドを含む f1 および f2 画分が血糖上昇抑制作用を示したことから、主要な作用物質は三重らせん部位由来のペプチドであると考えられた。

パパインは Gly の C 末端側のペプチド結合を切断するので、Gly を C 末端に持つペプチドが生成する。これは、Table 4-1 に示したペプチドに、C 末端側が Gly であるものが多く認められたことと合致する。しかし、パパインが Gly を認識するには「...-Gly-X-Y-Gly-X'-Y'-...」という配列の Y や X' など Gly 以外のアミノ酸も関与するため、パパインは三重らせん部位のすべての Gly を厳密に認識することができない。そのため、パパインで調製した SCP は、「Gly-X-Y」を単位としたヘキサペプチドやノナペプチドを含むと考えられる。したがって、これらのペプチドがそのまま体内で血糖上昇抑制作用を示すのか、体内で消化酵素に消化されて作用を示すのか、ということについては検討が必要である。

食事由来のタンパク質は、消化管においてペプシンおよびパンクレアチンによる消化（管腔内消化）を経た後、微絨毛膜においてジトリペプチダーゼおよびアミノペプチダーゼによる消化（膜消化）を受けてジトリペプチドおよび遊離アミノ酸へと分解され、さらに小腸上皮細胞基質内のペプチダーゼによりアミノ酸に分解され血中へと吸収される。そこで、人工消化した SCP を用いて糖負荷試験を行い、消化管での消化が血糖上昇抑制作用に及ぼす影響を検討した。まず、管腔内消化を模してペプシン-パンクレアチンによる連続消化を行った結果、PP-SCP の消化度は  $14.8 \pm 0.0\%$  であった。また、対照試料としてカゼインを人工消化した結果、PP-カゼインの消化度は  $25.0 \pm 0.0\%$  であり PP-SCP のそれと比べて高値を示した。一方で、PP-カゼインの消化度について、既報<sup>100)</sup>の消化度 (60.6%) に比べて本研究のそれは低値 ( $25.0 \pm 0.0\%$ ) を示したことから、本法では管腔内消化が再現されておらず、消化効率が低いために PP-SCP の消化度が低値 ( $14.8 \pm 0.0\%$ ) を示した可能性も考えられた。しかし、一般的にゼラチンおよび CP はペプシンおよびトリプシンによる分解に対して難消化性を示すとされており、コイ皮、マグロ皮およびイカ外套膜由来ゼラチンをトリプシンで加水分解した場合、消化度は 8.5~11.7% 程度である<sup>37,64)</sup>。したがって、PP-SCP の消



化度は妥当な値であると判断した。そこで、PP-SCP を静脈内投与-腹腔内糖負荷試験に供した結果、PP-SCP 投与群の血糖値は対照群のそれより低値を示した。すなわち、SCP は管腔内でほとんど消化を受けず、血糖上昇抑制作用も低減しないことが示唆された。しかしながら、PP-SCP の消化度は低く、SCP と同様に分子量約 1,400 Da のペプチドを含むことから、消化が血糖上昇抑制作用に及ぼす影響は不明のままである。

そこで、エキソペプチダーゼおよびエンドペプチダーゼの混合物であるプロナーゼを用いて膜消化を模倣し、膜消化が血糖上昇抑制作用に及ぼす影響を検討した。消化管管腔-微絨毛膜における連続的な消化を模して、PP-SCP をさらにプロナーゼ処理した結果、PPP-SCP の消化度は  $18.3 \pm 0.0\%$  に上昇した。一方、Sephadex G-15 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、PP-SCP および PPP-SCP はいずれも分子量 1,400 Da 付近、300~400 Da 付近および 200 Da 以下の溶出位置にピークを示したことから、同一または同様の分子量のペプチドおよびアミノ酸を含むと推定された。すなわち、PPP-SCP の大部分はペプチドから構成されていると考えられた。予備検討において、SCP のプロナーゼ消化物を Sephadex G-15 に供した結果、消化時間の延長に伴うピーク形の顕著な変化は認められなかったことから、SCP はプロナーゼによる分解に対して難消化性を示すと考えられた。したがって、PPP-SCP の消化度および分子量分布の結果は妥当であり、プロナーゼ消化は膜消化を模倣していないと考えられた。しかしながら、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験において、PPP-SCP は PP-SCP に比べて強い血糖上昇抑制作用を示した (PPP-SCP および PP-SCP 投与群の血糖値総和： $5,374 \pm 1,938 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$  および  $8,579 \pm 1,118 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ )。すなわち、PP-SCP の消化度 ( $14.8 \pm 0.0\%$ ) に比べて PPP-SCP のそれ ( $18.3 \pm 0.0\%$ ) は微増であるが、消化による SCP の低分子化が血糖上昇抑制作用に寄与する可能性が考えられた。そこで、消化により SCP の低分子化がさらに進行したと仮定して、SCP のアミノ酸組成を模したアミノ酸混合物を調製し、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験に供した結果、アミノ酸混合物投与群の血糖値総和は低値 ( $5,300 \pm 1,137 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) を示したが、PPP-SCP 投与群のそれと同程度であった。さらに、コラーゲンは

構成アミノ酸の 1/3 が Gly であることから Gly および Gly-Gly を静脈内投与した結果、両群の血糖値総和もまた低値 (Gly および Gly-Gly 投与群の血糖値総和 :  $6,698 \pm 1,138 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$  および  $4,677 \pm 1,590 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) を示したが、PPP-SCP およびアミノ酸混合物のそれらと同程度であった。したがって、消化による SCP の低分子化は血糖上昇抑制作用をやや増強するものの、経口投与された SCP の大部分は管腔内で難消化性を示し、消化が SCP の血糖上昇抑制作用に及ぼす影響は小さいと考えられた。この結果は、SCP がペプチドとして吸収されて血中へ移行し、血糖上昇抑制作用を示す可能性を示唆する。

一方、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験において、コラーゲンに特徴的なアミノ酸の一つである Pro を投与した群の血糖値総和は高値を示した ( $10,118 \pm 1,810 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ )。そこで予備検討として、Gly-Pro の血糖上昇抑制作用を同様の方法で比較した結果、Gly-Pro 投与群の血糖値総和 ( $7,203 \pm 1,158 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) は Pro 投与群のそれ ( $8,856 \pm 1,511 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) より低値を示した (グラフ省略)。さらに、Gly は、投与濃度依存的に血糖値総和は低値を示した (Gly-1.5, Gly-0.75 および Gly-0.15 投与群の血糖値総和 :  $3,765 \pm 2,112 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ,  $4,349 \pm 1,702 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$  および  $6,750 \pm 2,177 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) (Figs. 4-22 および 4-23)。したがって、SCP を構成する Gly が血糖上昇抑制作用に寄与すると考えられた。

しかし、Fig. 4-25 に示すように、静脈内投与試験において、SCP のアミノ酸組成から Gly を除いた Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値総和 ( $6,590 \pm 1,870 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) はアミノ酸混合物投与群のそれ ( $7,128 \pm 2,030 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) と同程度であり両群間に有意差は認められなかった。これまでに、Arg<sup>104-107</sup>), Leu<sup>108</sup>), Gln<sup>109-113</sup>), Trp<sup>114</sup>)による GLP-1 およびインスリン分泌促進作用、または *in vivo* における血糖上昇抑制作用が報告されている。Trp を除き、SCP には Arg, Leu および Gln が含まれているため、Gly 抜きアミノ酸混合物投与群において血糖値が低値を示した可能性がある。

一方で、一連の静脈内投与-腹腔内糖負荷試験では試料投与量を推奨投与容量<sup>115)</sup>内に収めているが、多量のアミノ酸が血中に流入することにより生体の恒

常性に何らかの影響を及ぼし、試料溶液の溶質の構成とは無関係に血糖値が低下した可能性も考えられる。そこで、試料を経口投与し、生理的な吸収経路を介した場合における Gly 抜きアミノ酸混合物の血糖上昇抑制作用を検討した。その結果、静脈内投与-腹腔内糖負荷試験の結果と異なり、Gly 抜きアミノ酸混合物投与群の血糖値総和 ( $4,411 \pm 1,660 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) より、Gly を含むアミノ酸混合物投与群のそれ ( $1,410 \pm 622 \text{ mg/dL} \cdot 2\text{h}$ ) が低値を示した。すなわち、Gly 抜きアミノ酸混合物による血糖上昇抑制作用は、静脈内へ投与されることにより増強された可能性が考えられ、生理的な吸収経路である経口投与においては主に Gly が血糖上昇抑制作用をもたらすと考えられた。

Gly は、交感神経抑制作用による睡眠改善<sup>116,117)</sup>や、酸化ストレス軽減作用による収縮期血圧の改善<sup>118)</sup>、糖化抑制作用による糖尿病合併症の減弱化<sup>119)</sup>など様々な生理作用を示すが、これらに加えて血糖上昇抑制作用<sup>120)</sup>、インスリン<sup>121)</sup>および GLP-1 分泌促進能<sup>122)</sup>を示すことが報告されている。したがって、経口投与された SCP の血糖上昇抑制作用の鍵となる物質は、コラーゲン分子の三重らせん部位に由来する Gly であると考えられる。

## 総合考察

近年、水産資源の持続可能な資源循環型利用に向けた研究が活発に行われている。キャビアや食用肉の製造を目的としてチョウザメ養殖が世界的に拡大するにつれて、養殖チョウザメの未利用部位から高価値の成分を見だし、魚全体を効果的に利用する動きが見られる<sup>3)</sup>。チョウザメの未利用部位(皮、骨、鰭、鰾)はコラーゲンを豊富に含み、これらを加水分解処理に供して得られるSCPには食品素材としての様々な健康機能が期待される<sup>31,34-40)</sup>。そこで本研究では、他の原料から調製されたCPに見出されており<sup>31,41-44,70,53)</sup>、SCPに期待される健康機能として、血糖上昇抑制作用に注目した。そして、SCPの調製と動物実験による機能検証を行い、作用機構の解明に取り組んだ。また、様々なペプチドの集合体であるSCP中の作用成分についても考察した。

本論文では、まず第1章において、チョウザメ未利用部位からSCPを簡便に調製する手法を検討した。そして、1% NaCl, 0.2 M NaOH および 0.2 M HCl への連続浸漬による夾雑物の除去、産業用プロテアーゼ処理、凍結乾燥処理、およびエタノール脱脂処理を経て、原料歩留まりが20%のレベルでSCPが調製できることを示した。得られたSCPは白色・無臭で、水への溶解性が非常に高く、溶液の粘性も極めて低かった。また、脱脂過程で分離した脂質には、DHA, EPA, リノール酸, およびオレイン酸+7-オクタデセン酸など健康性機能をもつ高度不飽和脂肪酸が含まれていたため、SCPを調製する際に回収できる脂質も工業原料として活用できる可能性がある。

続いて第2章では、本論文の主題であるSCPの血糖上昇抑制作用を検討し、SCPが経口投与によって食後血糖の上昇を有意に抑制する機能を持つことを見出した。そして、超臨界二酸化炭素脱脂法を用いて高度に脂質を除去したSCP

(SCP-CO<sub>2</sub> および SCP-CO<sub>2</sub>・Et) を糖負荷試験に供した結果、脂質成分の除去に無関係に血糖上昇抑制作用が確認できた。この結果から、血糖上昇を抑制する作用物質が、脂質画分ではなく SCP であることを確認した。さらに、SCP の血糖上昇抑制効果を卵白の加水分解物 (卵白ペプチド) と比較した結果、卵白ペプチドには殆ど血糖上昇抑制作用認められず、血糖上昇抑制作用は CP に特有の作用であると考えられた。

第 3 章では、SCP の血糖上昇抑制作用機構の解明を試みた。まず、SCP は胃内にグルコースを滞留させ、小腸への移送を遅延させた。これは、タンパク質摂取に対する消化管の生理的反応であり、タンパク質消化物である SCP においても同様の作用があることを確認した。また、SCP は消化物に含まれるグルコースの拡散輸送を阻害し、糞中に排泄される未吸収のグルコースが増加した。しかしながら、SCP 投与群のグルコース排泄率は約 9% と低いことから、実験動物に投与されたグルコースの大部分が体内に吸収されたことは明らかである。すなわち、SCP による血糖上昇抑制作用は、主に血中グルコースの代謝促進に起因すると考えられる。

そこで、SCP の糖代謝促進作用について検討した結果、SCP は小腸を介して GLP-1 分泌量を増加させ、インスリン依存的に血糖上昇抑制作用を示すことを明らかにした。SCP は経口投与後の極めて短時間のうちに GLP-1 分泌を促すことから、胃から移送された SCP が十二指腸部位に存在する L 細胞を直ちに刺激して GLP-1 分泌を促すと考えられた。さらに、SCP を静脈内投与した結果、血漿 GLP-1 およびインスリン濃度が上昇し、血糖の上昇が有意に抑制されたことから、SCP は小腸から血中へ移行して作用効果を示すことが示唆された。また、*in vitro* の実験において SCP は DPP-IV 阻害活性を示したことから、血中へ移行した SCP は、分泌された GLP-1 の分解を抑制する可能性が示唆された。第 3 章

で示したこれらの事実は、SCP が血糖上昇を抑制する作用実態である事を明確に示している。

第3章を通して、SCP のもつ血糖上昇抑制作用機構の概要を明らかにできた。そこで第4章では、血糖上昇抑制作用を示す作用物質の解明を試みた。まず、アテロコラーゲン分解物 (A-SCP) を糖負荷試験に供した結果、血糖の上昇が極めて有意に抑制されたことから、血糖上昇抑制作用はコラーゲン分子の三重らせん部位に特有な「Gly-X-Y」の繰り返し配列を含むペプチドに起因することが示唆された。さらに、コラーゲンの主要な構成アミノ酸である Gly を経口投与したところ、血糖値総和は極めて有意に減少したことから、チョウザメコラーゲンの三重らせん部位に由来する Gly を含有するペプチドの構造が、血糖上昇抑制作用と深く関わるものと判断した。

Gly は経口投与後速やかに血中へ吸収され、最終的に肝臓で分解される<sup>123-125)</sup>。Kawai ら<sup>126)</sup>は、ラットに 2 g/kg 体重の Gly を経口投与した場合、最大血中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) は 30 分、最大血中濃度 ( $\Delta C_{max}$ ) は 4,961  $\mu\text{mol/L}$ 、血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) は 7.9 時間と報告した。第3章において、経口投与された SCP は小腸から吸収されて血中へ移行し、15 分以内に GLP-1 分泌を促進すると考えられた。すなわち、Gly が作用物質あるならば、SCP 投与群の血中 Gly 濃度は 15 分以内に高値を示すと予想される。そこで、予備検討として、ICR マウスに生理食塩水または SCP を経口投与し、投与 15 分後の血液に含まれるアミノ酸量を検討した。まず、血液 1 mL から血漿を調製し遊離アミノ酸量を測定した結果、生理食塩水投与群では 820 nmol、SCP 投与群では 1,000 nmol の遊離アミノ酸が検出された。また、コラーゲンの構成アミノ酸として特徴的な Gly, Pro, Hyp および Hyl の遊離アミノ酸量は、生理食塩水投与群の検出量 (76, 14, 3 nmol および検出限界以下) に比べ SCP 投与群のそれら (247, 69, 35 および 13 nmol)

はいずれも高値を示した。

一方、ペプチド態として血液に含まれるアミノ酸を検討するために、上記の個体とは異なる個体から 1 mL 採血し、調製した血漿を加水分解してアミノ酸量を測定した。その結果、生理食塩水投与群では 6,645 nmol、SCP 投与群では 9,802 nmol のアミノ酸が検出された。採血した個体は異なるが、前述の遊離アミノ酸量を差し引くと、生理食塩水投与群では約 5,800 nmol、SCP 投与群では約 8,800 nmol のアミノ酸がペプチド態として血中に存在する可能性がある。また、Gly、Pro および Hyl は、生理食塩水投与群の検出量 (293, 86 nmol および検出限界以下) に比べ SCP 投与群のそれら (672, 278 および 22 nmol) はいずれも高値を示した (Hyp はいずれの投与群も検出限界以下であった)。前述の遊離アミノ酸量を差し引くと、生理食塩水投与群ではそれぞれ約 217, 72 nmol および検出限界以下、SCP 投与群ではそれぞれ約 425, 209 および 9 nmol のアミノ酸がペプチド態として存在することが明らかになった。

以上の結果には、経口投与された SCP 由来の遊離アミノ酸およびペプチド (外因性) だけでなく、ホルモンや血球成分など血液中の様々なタンパク質由来の遊離アミノ酸およびペプチド (内因性) も含まれる。したがって、SCP 投与群の血中から検出された遊離アミノ酸およびペプチド態アミノ酸が、経口投与された SCP に由来するか断定できない。しかしながら、SCP の経口投与により血中のアミノ酸濃度が増加し、特に Gly および Pro の増加が顕著であることが明らかとなった。この結果は、SCP の経口投与により SCP 由来の遊離アミノ酸もしくはペプチド態アミノ酸が血中に出現することを示唆するものである。また、遊離アミノ酸量に比べて、加水分解後の血漿から検出されたアミノ酸量が高値を示したことから、血中のアミノ酸の大部分はペプチド態で存在すると考えられた。

蕪山ら<sup>45)</sup>は、ラットに CP (平均分子量 5,700 Da) を経口投与した結果、腸管灌流液から分子量 500~1,500 Da の有機化合物が検出され、肝臓灌流液からも分子量 500~1,500 Da の化合物群が検出されたことから、一般的なタンパク質と異なり、CP には特徴的な消化吸収動態が存在すると考察した。また、Iwai ら<sup>127)</sup>は、ヒトが CP (平均分子量 5,000 Da) を摂取すると、血漿中に Hyp を含む低分子ペプチド (分子量 200~500 Da) が検出されることを報告した。Ichikawa ら<sup>52)</sup>はヒトが CP (平均分子量 5,000 Da) を摂取すると、Hyp を含むジペプチドおよびトリペプチドの血漿中濃度は摂取 1~2 時間後にピークに達し、Pro-Hyp および Gly-Pro-Hyp は摂取 7 時間後においても検出されることを報告した。このように、Hyp を含むペプチドは血漿ペプチダーゼに対して高い安定性を示す<sup>45)</sup>。しかし、前述のように SCP 経口投与 15 分後の血中に含まれるペプチド態 Hyp 量は検出限界以下であり、血中濃度は極めて少ないと考えられる。したがって、SCP 経口投与により血中に増加するペプチドは、既報<sup>45,127,128)</sup>に比べて血中安定性が低いと予想された。

一方で、投与 15 分後において SCP 投与群の血中からペプチド態の Gly が検出されたことから、Gly を含むペプチドが血中を滞留しながら血漿ペプチダーゼによって分解されることにより、SCP 経口投与から一定時間経過後も Gly が供給され、血糖上昇抑制作用を司ると考えられた。

第 3 章で述べたように、SCP は DPP-IV の阻害剤となり GLP-1 の分解を抑制する。DPP-IV の基質は、C 末端が Z-Pro または Z-Ala (Z は任意のアミノ酸) の配列をとるペプチドである。本研究から、SCP 経口投与により血中のペプチド濃度が増加することが明らかとなったが、これらのペプチドが DPP-IV の分解能を阻害するかは不明である。これについては、SCP 投与群の血中からペプチドを回収しアミノ酸配列を分析する必要がある。



本研究により、コラーゲンを豊富に含むチョウザメ未利用部位を、SCPの供給源として有効利用できる可能性が見いだされた。また、調製したSCPは血糖上昇抑制作用を有しており、その作用機構および作用物質が明らかとなった。

現在、日本国内におけるチョウザメ活魚の生産者販売価格は1,500円/匹(2kg体重)(キャビアおよびチョウザメ生産の産業化に成功した宮崎県内での聞き取り調査より)である。各部位の重量を頭部1kg、未利用部位0.23kg(Table 1-1より算出)、とすると魚肉の歩留まりは0.77kgと見込まれる。したがって、活魚価格から魚肉価格を逆算すると約200円/100gと算出される。オーストラリア産サーロインステーキの店頭価格(約300~400円/100g、小売店のチラシおよびインターネット広告に掲載されている価格(2019年4月現在)より算出)、および、肉質や風味が類似する競合製品(宮崎県水産試験場職員への聞き取り調査より)であるナイルパーチの魚肉価格[約180円/100g(インターネット広告に掲載されている価格(2019年4月現在)より算出)]に比べるとチョウザメ魚肉価格は高価であり、チョウザメの認知度向上および需要量増加のためには、魚肉だけでなく副産物を含めた総合価値に基づいた養殖コストの算出が必要である。

近年、CPの用途は美容目的や関節痛の改善にとどまらず、褥瘡予防を目的とした病院食や介護食への利用など多岐にわたる。日本ゼラチン・コラーゲン工業組合によると、2017年度の加盟企業によるCP販売量は前年度比19%増の5,800tであり、堅調に増加する国内需要量(4,772t)に加えて、サプリメント素材としての認知度が上昇している海外での需要量(前年度比55%増の901t)が急増している<sup>129)</sup>。水産物由来CPの主要原料には、中国産ティラピアの皮や鱗が挙げられるが、養殖業者の廃業や、産業資源としての水産廃棄物の中国国内需要の高まりから、それらの供給量は減少しており、CP原料の取引価格は一部で1,000円/kgまで上昇している<sup>130)</sup>。国内の水産物由来CP製品の市場価格は約

18,000 円 /kg (インターネット広告に掲載されている価格 (2019 年 4 月現在) より算出) であるが、今後更なる上昇が予想される。したがって、新たな CP 原料供給源としてチョウザメ未利用部位を活用することは、養殖チョウザメの経済価値を高める有効な手段といえる。

このように、本研究成果は、チョウザメ未利用部位の経済価値を高める意義があるが、SCP の製造がチョウザメ未利用部位の経済価値を高める事は疑いがない。例えば、市場で流通している血糖上昇抑制を目的とした特定保健用食品は、サラシアや難消化性デキストリンなどを原料としているが、その摂取コストは一日あたり約 150 円 (希望小売価格より試算) である。Zhu ら<sup>98)</sup>の報告から糖代謝改善効果が得られる SCP 摂取量を 1 日あたり 13g (6.5 g を 1 日 2 回摂取) と仮定すると、許容される摂取コストは 12,000 円/kg SCP と試算される。そこで、本研究の成果を用いて、SCP の製造コストと粗利益を試算した。

まず、上記の 2 kg チョウザメ活魚から採取可能な未利用部位 0.23 kg を 1,000 円 /kg で CP 原料として販売した場合の売上高は 230 円であるが、SCP [0.046 kg/0.23 kg 未利用部位 (Table 1-1 より算出)] として販売した場合の売上高は 552 円と 2.4 倍となる。SCP 製造コストを 4,100 円/kg (ヒトデ由来 CP (歩留まり 1.9%) の製造コスト<sup>53)</sup>を引用)、人件費を 6,000 円/kg (販売価格の 50%として算出) とすると、加工処理により生じる粗利益は、単純計算で 1,900 円/kg (87.4 円 /0.046 kg SCP)となる。チョウザメ未利用部位はコラーゲン含有率が高く SCP 調製時の歩留まりは 20.2%と高値であることから、製造コストの抑制や SCP 製品単価の減少が期待できる。このように、SCP へ加工し健康機能性を付与することにより、チョウザメ未利用部位を高付加価値化することが可能となる。

以上のように、本研究は、チョウザメ未利用部位が SCP の調製に有用であること、および調製された SCP が血糖上昇抑制作用を有した食品素材として活用

できる可能性を明らかにした。すなわち、本論文で述べた各種の知見は、学術的新規性と同時に実用性を兼ね備えており、本研究を踏まえたチョウザメ資源の有効活用が、大いに期待できる。

SCPに限らず、他の原料から調製されたCPの血糖上昇抑制作用については、既に多くの報告例があり、その作用機序は主にGLP-1分泌促進およびDPP-IV阻害であると考えられている<sup>41-44</sup>。本研究結果からも、SCPの血糖上昇抑制作用機序はGLP-1分泌促進が主要な機序であることが確認された。一方で、CP摂取後の体内動態に着目した報告は少なく<sup>45,52,127,128</sup>、小腸から血中へ移行したCPが血糖上昇抑制作用に寄与することを述べた報告は見当たらない。さらに、CPの血糖上昇抑制作用物質について、コラーゲンの三重らせん部位に由来するGlyを含むペプチドが作用と深く関連することを述べた報告例は極めて少ない<sup>71,120</sup>。本論文は、小腸で吸収され血中へ移行したCPが血糖上昇抑制作用を示すこと、および、作用の鍵となる物質はコラーゲン分子の三重らせん部位に由来するGlyであることを解明した。さらに、SCP経口投与により、血中にGlyを含むペプチドが増加することを見だし、このペプチドがSCP経口投与から一定時間経過後もGlyを供給し血糖上昇を抑制すると推察した。このように、CPの血糖上昇抑制作用に関して全く新しい知見を付与した理由から、本論文の学術的価値は高いと考える。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始貴重なる御助言および御指導を頂き，また，本論文の御校閲の労を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院 岸村 栄毅教授ならびに北海道大学大学院水産科学研究院 熊谷 祐也 助教に深甚なる謝意を表します。さらに本論文の作成にあたり，主査の労を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院 佐伯 宏樹 教授，また，副査の労を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院 関 秀司 教授ならびに北海道大学大学院水産科学研究院 都木 靖彰 教授に心より厚く御礼申し上げます。

また，実験試料であるチョウザメを御恵与いただいた北海道大学大学院水産科学研究院 足立 伸次 教授ならびに北海道大学大学院北方生物圏フィールド科学センター 山羽 悦郎 教授に心より感謝いたします。併せて，実験試料の超臨界二酸化炭素処理を行っていただいた釜慶大学校 Byung-Soo Chun 教授に心よりお礼申し上げます。さらに，ガスクロマトグラフィー分析を行っていただいた北海道大学大学院水産科学研究院 安藤 靖浩 准教授，エンドトキシン量の測定を行っていただいた北海道大学大学院水産科学院 Wen Li 氏，ならびにアミノ酸配列分析を行っていただいた北海道大学創成研究機構共用機器管理センター委託分析部門に心より感謝いたします。また，本研究の遂行にあたり，GLUTag 細胞を用いた予備検討を行っていただき，動物実験および細胞実験に関して貴重なる御助言をいただいた北海道大学大学院農学研究院 比良 徹 講師に心よりお礼申し上げます。

なお，本研究の一部は，北海道大学フロンティア基金新渡戸スクール奨学金，一般社団法人 ヤンマー資源循環支援機構ならびにジャックス奨学寄付金の助成により行われました。研究助成申請書の作成にあたり，貴重なる御助言およ

び御指導いただいた北海道大学大学院農学研究院 波多野 隆介 教授，北海道大学高等教育推進機構 繁富 (栗林) 香織 特任准教授に心より感謝いたします。

最後に，本研究の遂行にご協力いただきました北海道大学大学院水産科学研究院 水産資源開発工学講座 食品工学研究室の皆様へ深く感謝いたします。また，本研究の遂行ならびに水産廃棄物の産業利用に関して貴重なる御助言をいただきました北海道立総合研究機構水産研究本部 網走水産試験場 加工利用部 麻生 真悟 部長ならびに北海道立総合研究機構水産研究本部 網走水産試験場 加工利用部 加工利用グループ主査 武田 浩郁 博士に心よりお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) R. Billard and G. Lecointre. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Rev Fish Biol Fisher* 2001 ; 10 : 355-392.
- 2) WWF. Saving sturgeons - A global report on their status and suggested conservation strategy -. WWF, Gland. pp. 2-3, 2016.
- 3) P. Bronzi, J. Gessner and H Rosenthal., An update to 2016 of sturgeon and caviar global scenario. Discussion For a –Production and marketing of caviar and sturgeon products- current status and future, ISS8, Vienna. 2017.
- 4) P. Bronzi, H. Rosenthal and J. Gessner. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *J Appl Ichthyol* 2011 ; 27 : 169-175.
- 5) P. Bronzi and H. Rosenthal. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. *J Appl Ichthyol* 2014 ; 30 : 1536-1546.
- 6) WWF Austria and TRAFFIC. Illegal caviar trade in Bulgaria and Romania - Result of a market survey on trade in caviar from sturgeons (*Acipenseridae*) – WWF, Vienna. pp. 13, 2013.
- 7) WWF. WWF network - sturgeon strategy -. WWF, Gland. pp.7-8, 2017.
- 8) WWF. Conservation -The caviar trade -. Factsheet, WWF, Gland.
- 9) 高橋そよ. チョウザメ目の保全と日本の役割. 私たちの暮らしを支える世界の生物多様性-日本の野生生物取引のいま- トラフィックイーストアジア ジャパン, 東京. 2010 ; 42-47.
- 10) ワシントン条約決議に基づくキャビアの輸出制度開始のお知らせ. プレスリリース (2015年9月18日), 水産庁, 東京. 2015.
- 11) 平岡潔. チョウザメ (第1回) チョウザメ養殖のビジネスとしての可能性.

養殖ビジネス 2017 ; 54 : 62-65.

- 12) 谷口基, 田口智也, 水田尚志. チョウザメの有用成分に関する研究. 平成19年度宮崎県水産試験場事業報告書, 宮崎県水産試験場, 宮崎. 2009 ; 304-310.
- 13) 萩原聖士. 水産学若手の会が考える「内水面養殖」のチカラ (第1回) 北海道におけるチョウザメ養殖研究と産業化への取り組み. 養殖ビジネス 2015 ; 52 : 47-51.
- 14) 堤尚信. チョウザメ (第4回) 北海道美深町のチョウザメ養殖 安定生産と地域振興に向けて. 養殖ビジネス 2017 ; 54 : 38-41.
- 15) 藤本一義. チョウザメ (第5回) 広島蝶鮫のチョウザメ養殖 観賞魚・食肉出荷の強み. 養殖ビジネス 2017 ; 54 : 36-38.
- 16) 石田純也. チョウザメ (第8回) 岐阜県におけるチョウザメ養殖への挑戦とキャビア販売の鍵. 養殖ビジネス 2018 ; 55 : 39-41.
- 17) K. Otaki. The common sturgeons of Hokkaido. Trans. *Sapporo Natural History Soc* 1907 ; 2 : 79-84.
- 18) 足立伸次. 連載 海洋生命統御による食糧生産~北海道大学21世紀COEプログラム~ 第1回 北海道におけるチョウザメ養殖の未来. アクアネット 2008 ; 9 : 56-59.
- 19) M. Havelka, H. Zhou, S. Hagihara, M. Ichimura, T. Fujimoto, E. Yamaha, S. Adachi and K. Arai, Spontaneous polyploidization in critically endangered *Acipenser mikadoi*. *Fisheries Sci* 2017 ; 83 : 587-595.
- 20) (別添資料2) 汽水・淡水魚類のレッドリスト. 環境省レッドリスト, 環境省自然環境局野生生物課, 東京. 2007.
- 21) N. Omoto, M. Maebayashi, A. Hara, S. Adachi and K Yamauchi. Gonadal Maturity in Wild Sturgeons, *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* Caught

- near Hokkaido, Japan. *Environ Biol Fishes* 2004 ; 70 : 381-391.
- 22) 足立伸次, 井尻成保, 萩原聖士, 三坂尚行, 古市明文, 市村政樹. 北海道産  
チョウザメ類保護と養殖産業化のための種苗生産体制整備. 研究開発助成  
事業 2016 年度成果報告書, 公益財団法人 北海道科学技術総合振興セン  
ター, 札幌. 2016 ; 27-29.
- 23) 平井明夫. 「魚の卵のはなし」 成山堂書店, 東京. pp.32-43, 2003.
- 24) X. Zhang, M. Ookawa, Y. Tan, K. Ura, S. Adachi and Y. Takagi. Biochemical  
characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted  
from Bester sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*. *Food Chem* 2014 ; 160 :  
305–312.
- 25) D. J. Hulmes, A. Miller, D. A. Parry, K. A. Piez, and J. Woodhead-Galloway.  
Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing.  
*J Mol Biol* 1973 ; 79 : 137–148.
- 26) 川内義一郎. コラーゲンの基本物性. コラーゲンの製造と応用展開 (谷原  
正夫編) シーエムシー出版, 東京. 2009 ; pp.31-38.
- 27) 藤本大三郎. コラーゲン物語 東京化学同人, 東京. 1999 ; pp.37-40.
- 28) 奥山健二. コラーゲンの分子構造・高次構造. コラーゲンの製造と応用展開  
(谷原正夫編) シーエムシー出版, 東京. 2009 ; pp.5-6.
- 29) 木村茂. 魚類I型コラーゲンの構造と起源. 日水誌 2002 ; 68 : 637-645.
- 30) R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin and F. Berthod. Collagen-based biomaterials for  
tissue engineering applications. *Materials* 2010 ; 3 : 1863-1887.
- 31) M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero and M. P. Montero.  
Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative  
sources: A review. *Food Hydrocoll* 2011 ; 25 : 1813-1827.



- 32) 山本恵一. 機能性食品とコラーゲン. コラーゲンの製造と応用展開 (谷原正夫編) シーエムシー出版, 東京. 2009 ; pp.143.
- 33) 小山洋一. 天然素材コラーゲンの機能性. 皮革科学 2010 ; 56 : 71-79.
- 34) R. Wu, C. Wu, D. Liu, X. Yang, J. Huang, J. Zhang, B. Liao and H. He. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chem* 2018 ; 248 : 346-352.
- 35) S.-K. Kim, Y.-T. Kim, H.-G. Byun, K.-S. Nam, D.-S. Joo, and F. Shahidi. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 2001 ; 49 : 1984-1989.
- 36) E. Mendis, N. Rajapakse and S.-K. Kim. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2005 ; 53 : 581-587.
- 37) A. Alemán, B. Giménez, P. Montero and M. C. Gómez-Guillén. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Sci Technol* 2011 ; 44 : 407-413.
- 38) T. Nagai, T. Nagashima, A. Abe and N. Suzuki. Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) cartilage and skin. *Int J Food Prop* 2006 ; 9 : 813-822.
- 39) A. Alemán, B. Giménez, E. Pérez-Santin, M.C. Gómez-Guillén and P. Montero. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chem* 2011 ; 125 : 334-341.
- 40) H.-G. Byun and S.-K. Kim. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem* 2001 ; 36 : 1155-1162.

- 41) 杉原富人, 井上直樹, 小泉聖子, 芳本忠, 尾山廣. 糖尿病の治療または予防剤. 特許第 5612131 号, 2014.
- 42) C. Y. Eunice, L. Chan, S. L. Hunag, C. L. Jao, K. P. Ho and K. C. Hsu. Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *J Agric Food Chem* 2012 ; 60 : 973-978.
- 43) Y. Iba, K. Yokoi, I. Eitoku, M. Goto, S. Koizumi, F. Sugihara, H. Oyama and T. Yoshimoto. Oral administration of collagen hydrolysates improves glucose tolerance in normal mice through GLP-1-dependent and GLP-1-independent mechanisms. *J Med Food* 2016 ; 19 : 836-843.
- 44) A. Sila, O. Martinez-Alvarez, A. Haddar, M. C. Gómez-Guillén, M. Nasri, M. P. Montero and A. Bougatef. Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatin: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatin polypeptides. *Food Chem* 2015 ; 168 : 478-486.
- 45) 蕪山由己人, 大澤吉弘, 水重貴文. コラーゲン加水分解物の消化吸収動態と生理機能. *アミノ酸研究* 2017 ; 11 : 13-22.
- 46) D. J. Drucker. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006 ; 3 : 153-165.
- 47) L. L. Baggio and D. J. Drucker. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 2131-2157.
- 48) 山下英一郎, 上野浩晶, 中里雅光. 特集 生活習慣と消化器疾患・治療薬 14 消化管ホルモン作動薬の臨床応用. *MEDICINAL* 2012 ; 2 : 132-133.
- 49) 宮川潤一郎, 難波光義. 医学と医療の最前線 インクレチンの糖尿病治療への応用. *日本内科学会雑誌* 2008 ; 97 : 827-835.
- 50) A. J. Kenny, A. G. Booth, S. G. George, J. Ingram, D. Kershaw, E. J. Wood and A. R. Young. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase.

*Biochem J* 1976 ; 157 : 169-182.

- 51) J. A. Ramshaw, N. K. Shah and B. Brodsky. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* 1998 ; 122 : 86-91.
- 52) S. Ichikawa, M. Morifuji, H. Ohara, H. Matsumoto, Y. Takeuchi and K. Sato. 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 : 1-9.
- 53) 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 コンビナート型ヒトデ・トータル利用システムの開発 成果報告書. 農林水産省 農林水産技術会議, 東京. 2009.
- 54) IDF. IDF Diabetes atlas – 8th edition-. International Diabetes Federation, Brussels. pp.16, 40-41, 2017.
- 55) T. J. Kieffer, C. H. McIntosh and R. A. Pederson. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 3585-3596.
- 56) M. Tanaka, S. Masuda, H. Yamakage, T. Inoue, R. Ohue-Kitano, S. Yokota, T. Kusakabe, H. Wada, K. Sanada, K. Ishii, K. Hasegawa, A. Shimatsu and N. Satoh-Asahara. Role of serum myostatin in the association between hyperinsulinemia and muscle atrophy in Japanese obese patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2018 ; 142 : 195-202.
- 57) 糖尿病治療ガイド-2004-2005-. 日本糖尿病学会, 東京. pp.8-13, 2004.
- 58) World Health Organization. Global report on diabetes. World Health Organization,

France. pp.6,12-13, 35-39, 2016.

- 59) A. Nanri, T. Mizoue, M. Noda, Y. Takahashi, Y. Matsushita, K. Poudel-Tandukar, M. Kato, S. Oba, M. Inoue, S. Tsugane and Group JPHC-bPS. Fish intake and type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr* 2011 ; 94 : 884-891.
- 60) B. Liaset, J. Øyen, H. Jacques, K. Kristiansen and L. Madsen. Seafood intake and the development of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Nutr Res Rev* 2019 ; Feb 07 : 1-22. doi: 10.1017/S0954422418000240. [Epub ahead of print]
- 61) 松田憲雄. ウシ等由来物代替原料の動向. *Fragrance J* 2001 ; 11 : 28-33.
- 62) 又平芳春. 海洋性コラーゲンペプチドの特性と機能. *食品加工技術* 2004 ; 24 : 42-49.
- 63) L. Guo, P. A Harnedy, M. B. O'Keeffe, L. Zhang, B. Li, H. Hou and R. J. FitzGerald. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chem* 2015 ; 173 : 536-542.
- 64) M. Abdollahi, M. Rezaei, A. Jafarpour and I. Undeland. Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach. *Food Chem* 2018 ; 242 : 568-578.
- 65) 齊藤貴之, 佐々木有. 超臨界二酸化炭素を利用した有用成分の抽出とその機能評価. *New Food Industry* 2012 ; 54 : 73-79.
- 66) 野村義宏. 廃棄物ゼロを目指したサメの有効利用. 新エネルギー・産業技術総合開発機構 平成 13 年度産業技術研究助成事業研究成果報告書, (独)新エネルギー・産業技術総合開発機構, 神奈川県. 2002 ; 様式第 33-1.
- 67) 肥塚正博. ブタ由来コラーゲン. コラーゲンの製造と応用展開 (谷原正夫

- 編) シーエムシー出版, 東京. 2009 ; pp.85.
- 68) 平岡潔. チョウザメ乾燥品並びにその製造方法及び該チョウザメ乾燥品を使用した調味料. 特開 2005-110564, 2005.
- 69) 野村義宏. マリンコラーゲン. コラーゲンの製造と応用展開 (谷原正夫編) シーエムシー出版, 東京. 2009 ; pp.92-95.
- 70) 麻生真悟, 武田浩郁, 北川雅彦, 宮崎亜希子, 飯田訓之, 蛭谷幸司, 辻浩司, 菅原玲, 岸村栄毅, 佐伯宏樹. ヒトデコラーゲンペプチドを有効成分とする血糖値上昇抑制剤およびヒトデコラーゲンペプチドの製造方法. 特許第 5199919 号, 2013.
- 71) M. C. Gannon, F. Q. Nuttall, B. J. Neil and S. A. Westphal. The insulin and glucose responses to meals of glucose plus various proteins in type II diabetic subjects. *Metabolism* 1988 ; 37 : 1081-1088.
- 72) A. H. Frid, M. Nilsson, J. J. Holst and I. M. Björck. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2005 ; 82 : 69-75
- 73) A. L. Gillespie, D. Calderwood, L. Hobson and B. D. Green. Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell growth and increasing the production and secretion of incretin hormones. *Food Chem* 2015 ; 189 : 120-128
- 74) H. Kishimura, Y. Nagai, K. Fukumorita, K. Adachi, S. Chiba, S. Nakajima, H. Saeki, S. Klomklao, S. Nalinanon, S. Benjakul and B.-S. Chun. Acid- and heat-stable trypsin inhibitory peptide from the viscera of japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *J Food Biochem* 2010 ; 34 : 748-763
- 75) K. Adachi, K. Fukumorita, M. Araki, N. Zaima, S. Chiba, H. Kishimura and

- H. Saeki. Transcriptome analysis of the duodenum in Wistar rats fed a trypsin inhibitor derived from squid viscera. *J Agric Food Chem* 2011 ; 59 : 9001-9010
- 76) K. Adachi, K. Fukumorita, M. Araki, N. Zaima, Z. H. Yang, S. Chiba, H. Kishimura and H. Saeki. Transcriptome analysis of the duodenum, pancreas, liver, and muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats fed a trypsin inhibitor derived from squid viscera. *J Agric Food Chem* 2012 ; 60 : 5540-5546
- 77) H. Kishimura, K. Fukumorita, K. Adachi, S. Chiba, Y. Nagai, S. Katayama, S. Nakajima and H. Saeki. A trypsin inhibitor in the viscera of japanese common squid (*Todarodes pacificus*) elicits insulinotropic effects in diabetic GK rats hypoglycemic effects of squid viscera. *J Food Biochem* 2012 ; 36 : 93-98
- 78) T. Ohta.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of a 70 % methanol extract from Ezoishige (*Pelvetia babingtonii de toni*) and its effect on the elevation of blood glucose level in rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002 ; 66 : 1552-1554.
- 79) ストレプトゾトシン誘発糖尿病動物：I型糖尿病モデル動物. 日本チャールス・リバー(株), 神奈川. 2005.
- 80) 合田敏尚. 栄養素からみた消化・吸収の実際. 消化・吸収-基礎と臨床- (武藤泰敏編) 第一出版, 東京. 2002 ; pp.235-249.
- 81) C. P. Dooley, J. B. Reznick and J. E. Valenzuela. Variations in gastric and duodenal motility during gastric emptying of liquid meals in humans. *Gastroenterology* 1984 ; 87 : 1114-1119.
- 82) 林義峰, 本郷道夫, 佐竹賢三, 豊田隆謙, 後藤由夫, 奥山信一. 胃排出能検査における固形試験食の検討. 日本消化器病学会雑誌 1986 ; 83 : 1298-1303.
- 83) 四童子好廣. 消化・吸収の基礎. 消化・吸収-基礎と臨床- (武藤泰敏編) 第一出版, 東京. 2002 ; pp.54-55.

- 84) 高橋徹. 消化管内容物の粘度とその生理的意義. 消化管の栄養・生理と腸内細菌 (Hindgut club Japan 編) Hindgut club Japan, 京都. 2010 ; pp.113-124.
- 85) 山田和彦. 炭水化物の消化・吸収・発酵とその利用. 栄養学雑誌 2001 ; 59 : 169-176.
- 86) 奥恒行, 中村禎子. 糖質の消化・吸収と発酵・吸収. *Foods Food Ingredients J* 2006 ; 211 : 830-837.
- 87) T. Mochida, T. Hira and H. Hara. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology* 2010 ; 151 : 3095-3104.
- 88) B. Balkan, L. Kwasnik, R. Miserendino, J. J. Holst and X. Li. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. *Diabetologia* 1999 ; 42 : 1324-1331.
- 89) 比良徹. 33.インスリン分泌を促進する消化管ホルモン GLP-1 の分泌を刺激する食品ペプチドの探索と, 消化管における受容機構の解明. 上原記念生命科学財団研究報告集, 公益財団法人 上原記念生命科学財団, 東京都. 2008 ; 22.
- 90) J. Kalmus, P. Okunieff and P. Vaupel. Effect of intraperitoneal versus intravenous glucose administration on laser Doppler flow in murine FSaII tumors and normal skin. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 6313-6317.
- 91) 棚本憲一. エンドトキシンと医薬品の品質管理. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 2008 ; 126 : 19-33.
- 92) 第一七改正日本薬局方 参考情報 G4 エンドトキシン規格値の設定. 厚生労

働省, 東京. 2016.

- 93) M. Merz, T. Eisele, P. Berends, D. Apple, S. Rabe, I. Blank, T. Stressler and L. Fischer. Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *J Agric Food Chem* 2015 ; 63 : 5682-5693.
- 94) G. Püschel, R. Mentlein and E. Heymann. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 1982 ; 126 : 359-365.
- 95) J. R. Bjelke, J. Christensen, P. F. Nielsen, S. Branner, A. B. Kanstrup, N. Wagtmann and H. B. Rasmussen. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 2006 ; 396 : 391-399.
- 96) T. Hatanaka, Y. Inoue, J. Arima, Y. Kumagai, H. Usuki, K. Kawakami, M. Kimura and T. Mukaihara. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem* 2012 ; 134 : 797-802.
- 97) C. H. Hsieh, T. Y. Wang, C. C. Hung, M. C. Chen and K. C. Hsu. Improvement of glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats by Atlantic salmon skin gelatin hydrolysate as the dipeptidyl-peptidase IV inhibitor. *Food Funct* 2015 ; 6 : 1887-1892.
- 98) C. F. Zhu, G. Z. Li, H. B. Peng, F. Zhang, Y. Chen and Y. Li. Therapeutic effects of marine collagen peptides on Chinese patients with type 2 diabetes mellitus and primary hypertension. *Am J Med Sci* 2010 ; 340 : 360-366.
- 99) R. E. Kuhre, N. J. Wewer Albrechtsen, C. F. Deacon, E. Balk-Møller, J. F. Rehfeld, F. Reimann, F. M. Gribble and J. J. Holst. Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716, and STC-1 cells: a comparison to native L-cells. *J Mol*



*Endocrinol* 2016 ; 56 : 201-211.

- 100) N. Higuchi, T. Hira, N. Yamada and H. Hara. Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology* 2013 ; 154 : 3089–3098.
- 101) X. Zhang, N. Azuma, S. Hagihara, S. Adachi, K. Ura and Y. Takagi. Characterization of type I and II procollagen  $\alpha 1$  chain in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) and comparison their gene expression. *Gene* 2016 ; 579 : 8-16.
- 102) 奥山典生. TNBS 法による蛋白質の定量法(酵素比活性測定のための蛋白質微量定量法(特集)). 蛋白質核酸酵素 1973 ; 18 : 1153-1159.
- 103) J. Adler-Nissen. Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. Enzymic hydrolysis of food proteins Elsevier applied science publishers ltd, England. 1986 ; pp.17.
- 104) J. P. Palmer, R. M. Walter and J. W. Ensink. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion. I. in normal man. *Diabetes* 1975 ; 24 : 735-740.
- 105) C. Clemmensen, S. Smajilovic, E. P. Smith, S. C. Woods, H. Bräuner-Osborne, R. J. Seeley, D. A. D'Alessio and K. K. Ryan. Oral L-arginine stimulates GLP-1 secretion to improve glucose tolerance in male mice. *Endocrinology* 2013 ; 154 : 3978-3983.
- 106) M. Hirota, I. Shimizu, C. Ohboshi, T. Nishino and K. Shima. A large molecular form of glucagon-like peptide-1(GLP-1) immunoreactivity is co-released with glucagon from pancreas by arginine in normal subjects. *Clinica Chimica Acta* 1987 ; 167 : 293-302.
- 107) A. Alamshah, A. K. McGavigan, E. Spreckley, J. S. Kinsey-Jones, A. Amin, I. R. Tough, H. C. O'Hara, A. Moolla, K. Banks, R. France, G. Hyberg, M. Norton,

- W. Cheong, A. Lehmann, S. R. Bloom, H. M. Cox and K. G. Murphy. L-arginine promotes gut hormone release and reduces food intake in rodents. *Diabetes Obes Metab* 2016 ; 18 : 508-518.
- 108) R. D. Milner. Stimulation of insulin secretion in vitro by essential aminoacids. *Lancet* 1969 ; 1 : 1075-1076.
- 109) F. Reimann, L. Williams, G. da Silva Xavier, G. A. Rutter and F. M. Gribble. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* 2004 ; 47 : 1592-1601.
- 110) J. R. Greenfield, I. S. Farooqi, J. M. Keogh, E. Henning, A. M. Habib, A. Blackwood, F. Reimann, J. J. Holst and F. M. Gribble. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2009 ; 89 : 106-113.
- 111) G. Tolhurst, Y. Zheng, H. E. Parker, A. M. Habib, F. Reimann and F. M. Gribble. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Endocrinology* 2011 ; 152 : 405-413.
- 112) E. P. Rafferty, A. R. Wylie, C. T. Elliott, O. P. Chevallier, D. J. Grieve and B. D. Green. In Vitro and In Vivo Effects of Natural Putative Secretagogues of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1). *Sci Pharm* 2011 ; 79 : 615-621.
- 113) S. L. Badole, P. P. Bagul, S. P. Mahamuni, R. D. Khose, A. C. Joshi, G. B. Jangam, A. E. Ghule, C. G. Raut, V. M. Khedkar and E. C. Coutinho. Oral L-glutamine increases active GLP-1 (7-36) amide secretion and improves glycemic control in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2013 ; 203 : 530-541.
- 114) R. E. Steinert, N. D. Luscombe-Marsh, T. J. Little, S. Standfield, B. Otto,

- M. Horowitz and C. Feinle-Bisset. Effects of intraduodenal infusion of L-tryptophan on ad libitum eating, antropyloroduodenal motility, glycemia, insulinemia, and gut peptide secretion in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 ; 99 : 3275-3284.
- 115) 被験物質の投与 (投与経路、投与容量) 及び採決に関する手引き. EFPIA (欧州連邦製薬工業協会), ECVAM (欧州代替法バリデーションセンター), ブリュッセル, イスプラ. 2000.
- 116) 安居昌子, 坂内慎. 睡眠改善食品-機能性表示食品成分グリシンを中心として-. *ファルマシア* 2016 ; 52 : 530-533.
- 117) K. Inagawa, T. Hiraoka, T. Kohda, W. Yamadera and M. Takahashi. Subjective effects of glycine ingestion before bedtime on sleep quality. *Sleep Biol Rhythms* 2006 ; 4 : 75-77.
- 118) M. Díaz-Flores, M. Cruz, G. Duran-Reyes, C. Munguia-Miranda, H. Loza-Rodríguez, E. Pulido-Casas, N. Torres-Ramírez, O. Gaja-Rodriguez, J. Kumate, L. A. Baiza-Gutman and D. Hernández-Saavedra. Oral supplementation with glycine reduces oxidative stress in patients with metabolic syndrome, improving their systolic blood pressure. *Can J Physiol Pharmacol* 2013 ; 91 : 855-860.
- 119) N. Alvarado-Vásquez, R. Lascurain, E. Cerón, B. Vanda, G. Carvajal-Sandoval, A. Tapia, J. Guevara, L. F. Montaña and E. Zenteno. Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2006 ; 79 : 225-232.
- 120) M. C. Gannon, J. A. Nuttall and F. Q. Nuttall. The metabolic response to ingested glycine. *Am J Clin Nutr* 2002 ; 76 : 1302-1307.

- 121) M. González-Ortiz, R. Medina-Santillán, E. Martínez-Abundis and C. R. von Drateln. Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Horm Metab Res* 2001 ; 33 : 358-360.
- 122) A. Gameiro, F. Reimann, A. M. Habib, D. O'Malley, L. Williams A. K. Simpson and F. M. Gribble. The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J Physiol* 2005 ; 569 : 761-772.
- 123) T. Yoshida and G. Kikuchi. Significance of the glycine cleavage system in glycine and serine catabolism in avian liver. *Arch Biochem Biophys* 1971 ; 145 : 658-668.
- 124) 菊池吾郎. グリシン開裂反応の機構と生理的意義, 特に高グリシン血症との関連. *日医大誌* 1993 ; 60 : 369-374.
- 125) G. Kikuchi, Y. Motokawa, T. Yoshida and K. Hiraga. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008 ; 84 : 246-263.
- 126) N. Kawai, M. Bannai, S. Seki, T. Koizumi, K. Shinkai, K. Nagao , D. Matsuzawa, M. Takahashi and E. Shimizu. Pharmacokinetics and cerebral distribution of glycine administered to rats. *Amino Acids* 2012 ; 42 : 2129-2137.
- 127) K. Iwai, T. Hasegawa, Y. Taguchi, F. Morimatsu, K. Sato, Y. Nakamura, A. Higashi, Y. Kido, Y. Nakabo and K. Ohtsuki. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2005 ; 53 : 6531-6536.
- 128) H. Ohara, H. Matsumoto, K. Ito, K. Iwai and K. Sato. Comparison of quantity and structure of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral

ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem* 2007 ; 55 : 1532-1535.

129) 健康産業新聞. (第 1645 号, 2018 年 6 月 6 日), UBM ジャパン株式会社, 東京. 2018.

130) 日本経済新聞. (電子版, 2019 年 1 月 31 日), 株式会社日本経済新聞社, 東京. 2019.