

大学間連携等による共同研究「ペプチド摂取後の体調改善における個人差発生メカニズムの解明」に関する報告 (H25-27)

重村 泰毅

(平成 28 年 12 月 8 日査読受理日)

Elucidation of the Mechanisms for Individual Differences in Beneficial Effects After Collagen Peptide Ingestion

SHIGEMURA, Yasutaka

(Accepted for publication 8 December 2016)

キーワード：コラーゲンペプチド, ゼラチン, ヒドロキシプロリン, ヒト血液

Keywords: collagen peptide, gelatin Hydroxyproline, human blood

1. はじめに

本稿は、「平成 25 年度～27 年度東京家政大学大学間連携等による共同研究」として採択された研究「ペプチド摂取後の体調改善における個人差発生メカニズムの解明」成果の一部について報告する。

コラーゲンは生体内で細胞外マトリックスタンパク質として存在する。人体のタンパク質の約 1/3 を占め、主に筋肉細胞を結合する筋細胞間結合組織や、腱、骨などの主要構成成分としての役割を担っている。またコラーゲンの特徴としては、分子内のアミノ酸配列の 1/3 がグリシン(Gly)であり、他のタンパク質にはほぼ含まれないヒドロキシプロリン(Hyp)が存在する。コラーゲンを加熱処理などによって分解すると、ゼラチンへと変性する。ゼラチンは食品素材に多用されており、古くから関節痛の緩和などに効果的であると報告されてきた[1]。また、ゼラチンの摂取によってヒト毛髪や爪などの状態を変える事が報告されており、動物試験においても様々な有益な効果が証明されている[2-3]。ゼラチンは溶解性に乏しいため、その吸収効果を向上させる目的として、ゼラチンを酵素分解した「コラーゲンペプチド」または「ゼラチン加水分解物」とよばれる製品が製造されるようになった。近年、これら製品は「コラーゲン」の商品名で多く流通している。さらに、コラーゲンペプチド摂取後に、動物の皮膚・関節・骨における有益な効果が報告され[4-7]、数週間の長期摂取によるヒトの肌や関節の状態が改善することもこれまでに多く報告されている[8-12]。

この体調改善効果のメカニズムは、長年不明であった。2005 年に Iwai らが、コラーゲンペプチド摂取後のヒト血

液で Hyp を含むペプチドが増加する事を報告した。このペプチドは、Pro-Hyp を主要成分とし、数種類同定されており、さらに摂取から数時間後も μM レベルと非常に高濃度な状態で検出されている[13-16]。この報告から、摂取後血中で検出される Hyp ペプチドが有効成分であると考えられ、Pro-Hyp を中心としたペプチドの生理活性について調べられた研究が多く報告されるようになった。Pro-Hyp が軟骨細胞の分化、線維芽細胞のヒアルロン酸合成の促進、そして線維芽細胞の増殖を促進する事などが報告されている[16-20]。このようにコラーゲンペプチド摂取後の体調改善効果メカニズムの一部が解明されつつある一方で、その効果には個人差が生じる事も報告されている。動物性食材に含まれるコラーゲンは、食事から摂取可能であり、深刻な疾病を劇的に改善するほどの医薬品のような効果は期待できず、通常の体調に戻すような食品成分の機能性と考えている。また、食品成分であるため、各社から販売される製品によって規格が異なり、被験者間で異なる摂取条件も個人差の要因の一つではないだろうか？消費者レベルで異なる摂取条件としては、被験者自身が判断する、またメーカー推奨による摂取量が異なる。しかし、これまでに摂取量によってペプチド濃度がどのように変化するかは、明らかになってきていない。体調改善に寄与する血中ペプチド濃度個人差が、消費者間で異なる摂取量から生じるかを確認する必要がある。そこで、我々は同一被験者が異なる量のコラーゲンペプチドを摂取した際に、ペプチド血中濃度がどのように変化するかについての評価を行った。本研究が、表題の「個人差」を直接的に明らかにする内容では無いが、その要因となる摂取量の影響について明らかにする。本研究では、Iwai らをはじめとする食品ペプチド研究のフロンティアである京都府立大学佐藤健司教授

(現京都大学)との共同研究である「コラーゲンペプチド摂取後の個人差」に関する研究の一部を報告する。

2. 材料・方法

ヒト試験

本試験は、焼津水産化学工業倫理委員会の承認を得て、これまでに報告のあるコラーゲンペプチド摂取・採血試験に従って実施した[13-16]。対象者への同意は口頭および文書で行った。文書は「研究協力同意書」「研究協力同意に係る説明書」「研究協力アンケート」の3種あり、「研究協力同意書」「研究協力アンケート」は、自由意志により対象者に記入してもらい、記入されたものは研究者が回収し、鍵のかかる保管庫内で厳重に保管した。試験には4名の被験者(年齢 25.75 ± 2.99 体重 52.38 ± 7.32)に参加してもらい、それぞれ体重 65kg あたり 2, 10, 25g のコラーゲンペプチド(焼津水産化学工業マリンマトリックス: タラ由来 Hyp 含量 9.30%)を摂取してもらい、摂取試料は表1に示す。摂取前, 摂取 15, 30, 60, 120, 240, 360 分後に採血を行い、血漿中の遊離 Hyp と Hyp- ペプチド濃度を測定した(図1)。

表1 摂取コラーゲンペプチド組成

組成	%
タンパク質	97.00
脂質	0.10
炭水化物	0.00
灰分	0.10
水分	2.80

Hyp 測定

血液中のコラーゲン吸収程度の指標として、コラーゲン特有のアミノ酸である Hyp 量の変化を評価した。血液に3倍量のエタノールを加えて、遠心分離後にタンパク質や高分子ペプチド画分である沈殿を除去した。血中に吸収される短鎖ペプチドを含む上澄を乾燥後、減圧下で6M HCl による 150℃ 1 時間の加水分解を行った。Bidlingmeyer らの方法をもとに、フェニルイソチオシアネート (PITC) による加水分解前後の両試料を誘導化処理し、その誘導化試料を HPLC によって分析した[21-22]。HPLC 分析結果から加水分解前と後の試料中 Hyp 濃度を測定した。さら

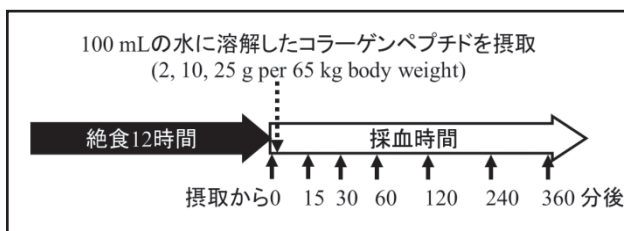


図1 摂取採血試験スケジュール

に下記の式から、ペプチド型 Hyp 濃度を算出した。

$$〔\text{ペプチド型Hyp}〕 = 〔\text{加水分解後Hyp}〕 - 〔\text{遊離Hyp}〕$$

3. 結果と考察

コラーゲンペプチド摂取量による血中濃度の変化

コラーゲンペプチドの摂取量は、体調改善が報告されているヒト臨床研究間でも異なっている。消費者レベルにおいても、摂取量が異なる事が想像され、それによるペプチド血中移行濃度の変化が体調改善作用にも影響を及ぼすのではないかと推測される。そこで、今回我々は同一の被験者に摂取量を変えてコラーゲンペプチドを摂取してもらい、その後の血中移行を評価した。その結果、摂取後血中の遊離 Hyp と Hyp- ペプチド濃度は摂取量依存的に上昇した(図1 & 2)。図1に見られるように、遊離 Hyp は 2, 10, 25g (/ 体重 65kg) 摂取後、最大で 21.54, 54.23, 88.25nmol/mL に到達した。また、摂取前と比較して 2g/65kg 摂取後は有意な血中濃度の上昇が見られなかった。それに対して 10 と 25g/65kg 摂取群では、摂取から 6 時間以降も血中で検出された。

血中 Hyp- ペプチド濃度も同様に、2, 10, 25g (/ 体重 65kg) 摂取後、それぞれ最大で 6.43, 20.17, 32.84nmol/mL に到達した。こちらのケースも 2g/65kg 摂取では、摂取前に比べて有意な濃度上昇は見られなかった。今回摂取前にも Hyp 濃度が微量ながら検出された。Hyp を特異的に含むコラーゲンは生体内(ヒトタンパク質の 1/3)に豊富に含まれる。そのため、遊離またはペプチド型 Hyp が体内の代謝物として血中に存在することが考えられる。また、コラーゲンペプチド摂取から長時間後に Hyp が微量ながら血中で検出されている。以上の事から、本結果で摂取前に検出された Hyp 濃度は、代謝物由来、または絶食直前に摂取した食事由来 Hyp が検出されたと考えられる。

以上の結果から、コラーゲンペプチド摂取量が 2g (/ 体重 65kg) 以下では、血中の Hyp- ペプチド濃度が上昇せず、

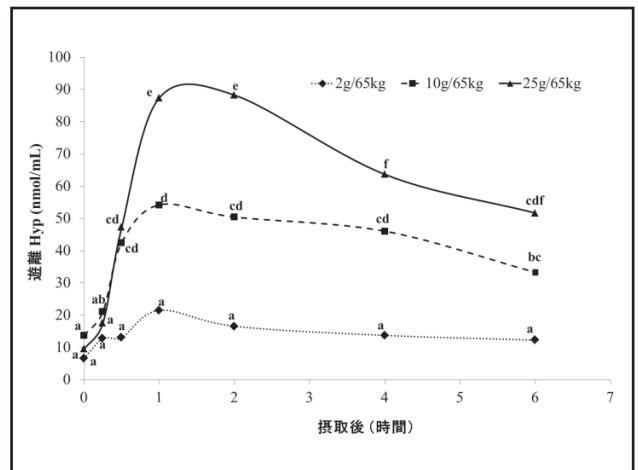


図2 コラーゲンペプチド摂取後血中遊離 Hyp 濃度異なるアルファベット間の値には有意差が見られる

効果的な体調改善は望めない可能性が示唆された。つまり、摂取量の違いが被験者間での状態改善の個人差の一因と考えられる。また、10と25g/65kg摂取後の血中最大濃度に有意差が見られた結果は、今回の試験摂取量範囲では吸収限界が見られなかったことを示している。つまり摂取量を増加させる程、血中濃度が上昇するためペプチド製品の溶解性の改良などから吸収量が効率的に上昇する製品の開発も可能であろう。

しかし、遊離とペプチド型 Hyp より算出した AUC と摂取量との相関関係は最大濃度とは若干異なる結果を示した。血中遊離 Hyp の AUC は、摂取量依存的に増加し、

その相関係数も高いが、ペプチド型 Hyp の AUC は相関係数も低く、体重 65kg あたりの試料摂取 2g と比べて、10g では有意差が無く、25g 摂取で算出される AUC に有意な増加が見られた。

4. おわりに

今回の研究からコラーゲンペプチドの摂取量が体調改善の個人差に影響を及ぼす可能性が考えられた。しかし、これ以外にも被験者の酵素活性や体調などの多くの要因が関わると考えられる。特にペプチドは消化後、小腸トランスポーター Pept1 を通過して血中移行するため、被験者による Pept1 の出現の差などが大きな影響を及ぼす事も予想される[23-24]。現在我々は、個人差のメカニズムの原因解明だけではなく、血中ペプチド移行濃度を上昇させるコラーゲンペプチド摂取方法の開発に着手している。これまでの一連の摂取・吸収試験は、水に溶解したコラーゲンペプチドの摂取試験のみである。消費者レベルでは、水以外の飲料溶媒に溶解して摂取する 경우가多く、溶媒中のマトリックスの影響などが血中濃度にどのような影響を与えるかは不明である。この際、溶媒マトリックスによっては、血中濃度を増加、または減少する可能性が考えられる。この作用から、同じ被験者でも溶媒の変更によるペプチド血中濃度が上昇すれば、個人差による非効率的な状態改善を抑える事も可能である。しかし、実際の消費者は、通常の

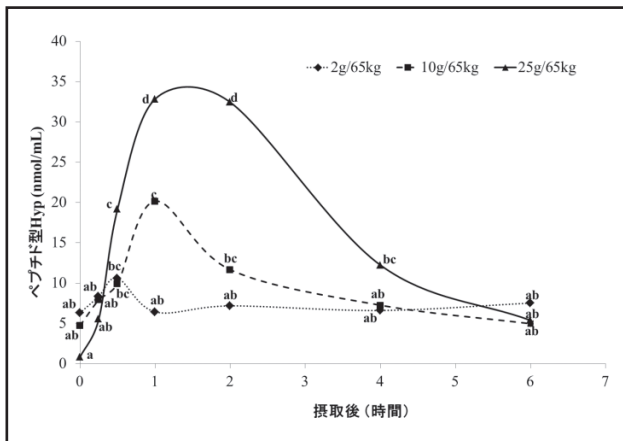


図3 コラーゲンペプチド摂取後血中ペプチド型 Hyp 濃度異なるアルファベット間の値には有意差が見られる

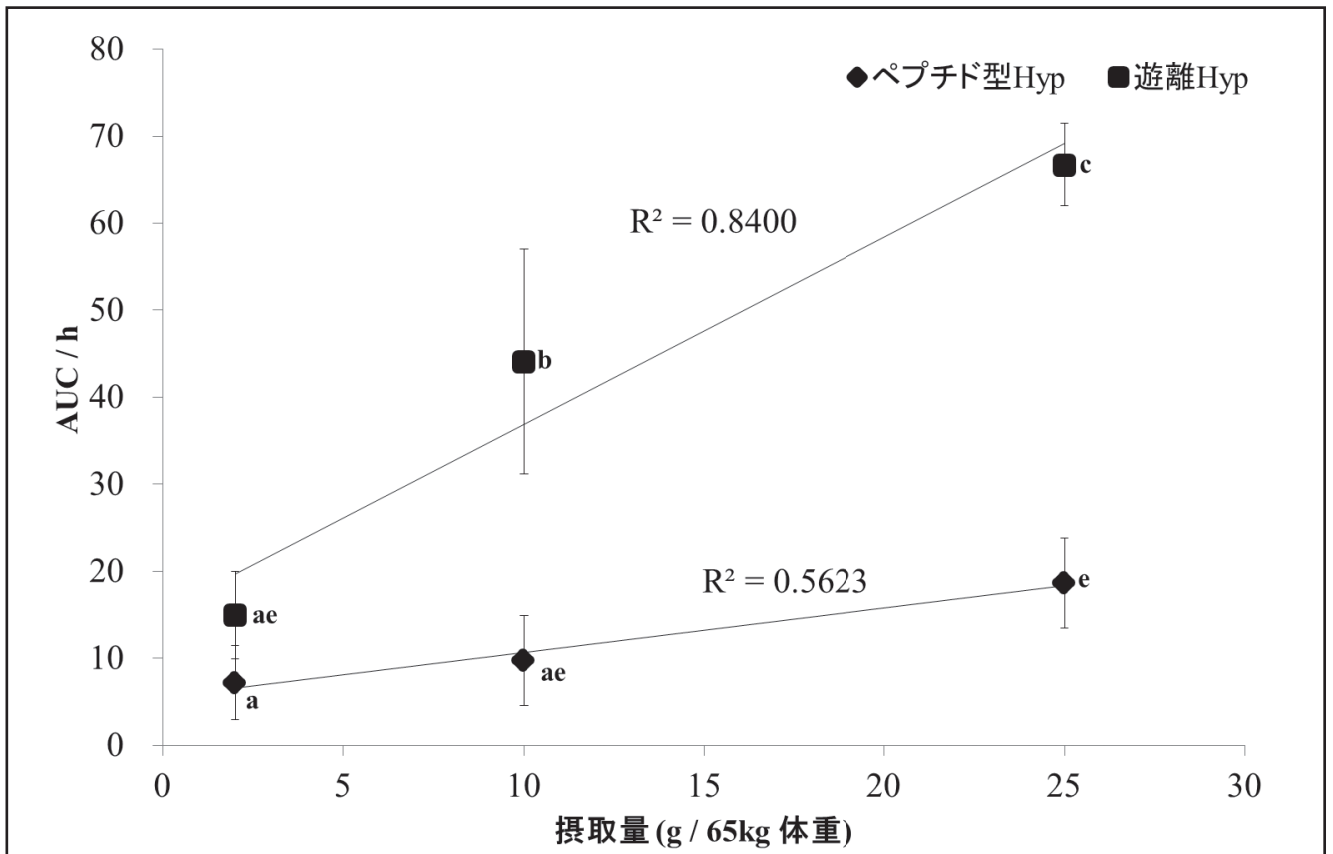


図4 摂取量と各 Hyp より算出した AUC との相関関係異なるアルファベット間の値には有意差が見られる

食生活の中でコラーゲンペプチドを摂取するため、本研究計画のように絶食や試料以外を摂取しない状況では無い。そのため今後の研究では、被験者に通常の食生活を送ってもらう中での試験と、調査が必要である。

本稿には、学術論文に掲載された範囲でのデータのみの報告であり、共同研究によるそれ以外の成果については順次学術論文に投稿、掲載を予定している。

謝辞

本研究にご協力いただきました京都大学佐藤健司教授、焼津水産化学工業株式会社様、東京家政大学佐藤吉朗教授に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminar in Arthritis and Rheumatism*, 30, 87-99.
- 2) Rosenberg, S., Oster, K. A., Kallos, A., & Burroughs, W. (1957). Further studies in the use of gelatin in the treatment of brittle nails. *American Medical Association Archives of Dermatology*, 76, 330-335.
- 3) Scala, J., Hollies, N.R.S., & Sucher, K.P. (1976). Effect of daily gelatine ingestion on human scalp hair. *Nutrition Reports International*, 13, 579-592.
- 4) Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., & Suzuki, H. (2009). Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10477-10482.
- 5) Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., & Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22, 547-553.
- 6) Tanaka, M., Koyama, Y., & Nomura, Y. (2009). Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 930-932.
- 7) Zhuang, Y., Hou, H., Zhao, X., Zhang, Z., & Li, B. (2009). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *Journal of Food Science*, 74, H183-188.
- 8) Clark, K. L., Sebastianelli, W., Flechsenhar, K. R., Aukermann, D. F., Meza, F., Millard, R. L., Deitch, J. R., Sherbondy, P. S., & Albert, A. (2008). 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Current Medical Research Opinion*, 24, 1485-1496.
- 9) Deal, C. L., & Moskowitz, R. W. (1999). Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 25, 379-395.
- 10) Postlethwaite, A. E., Wong, W. K., Clements, P., Chatterjee, S., Fessler, B. J., Kang, A. H., Korn, J., Mayes, M., Merkel, P. A., Molitor, J. A., Moreland, L., Rothfield, N., Simms, R. W., Smith, E. A., Spiera, R., Steen, V., Warrington, K., White, B., Wigley, F., & Furst, D. E. (2008). A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral type I collagen treatment in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis: I. oral type I collagen does not improve skin in all patients, but may improve skin in late-phase disease. *Arthritis and Rheumatism*, 58, 1810-1822.
- 11) Trc, T., & Bohmova, J. (2011). Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *International Orthopaedics*, 35, 341-348.
- 12) Matsumoto, H., Ohara, H., Itoh, K., Nakamura, Y., & Takahashi, S. (2006). Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine*, 7, 386-390.
- 13) Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., & Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6531-6536.

- 14) Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., & Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1532-1535.
- 15) Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 61, 52-60.
- 16) Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129, 1019-1024.
- 17) Minaguchi, J., Tometsuka, C., Koyama, Y., Kusubata, M., Nagayasu, A., Sawaya, S., Shiga, T., Shima, H., Hara, T., & Takehana, K. (2012). Effects of collagen-derived oligopeptide prolylhydroxyproline on differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Food Science and Technology Research*, 18, 593-599.
- 18) Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., & Wada, M. (2009). Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 1620-1627.
- 19) Ohara, H., Iida, H., Ito, K., Takeuchi, Y., & Nomura, Y. (2010). Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 2096-2099.
- 20) Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C., Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2009). Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 444-449.
- 21) Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., & Tarvin, T. L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, 336, 93-104.
- 22) Sato, K., Tsukamasa, Y., Imai, C., Ohtsuki, K., Shimizu, Y., & Kawabata, M. (1992). Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl)-lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 806 - 810.
- 23) Adibi, S. A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*, 113, 332-340.
- 24) Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., & Mine, Y. (2007). Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *Journal of Peptide Science*, 13, 468-474.

Abstract

The presence of hydroxyproline (Hyp) -containing peptides in human blood after collagen hydrolysate ingestion is believed to exert beneficial effects on human health. To estimate the effective beneficial dose of these peptides, we examined the relationship between ingested dose and food-derived Hyp levels in human plasma. Healthy volunteers (n=4) ingested 2, 10, and 25 g (per 65-kg body weight) of collagen hydrolysate. The average plasma concentration of Hyp-containing peptides was dose-dependent, reaching maximum levels of 6.43, 20.17, and 32.84 nmol/mL following ingestion of 2, 10, and 25-g doses of collagen hydrolysate, respectively. Ingesting over 10 g of collagen hydrolysate significantly increased the average concentrations of the free and peptide forms of Hyp in plasma. The Hyp absorption limit was not reached with ingestion of as much as 25 g of collagen hydrolysate. These findings suggest that ingestion of less than 2 g of collagen hydrolysate is not effective for health benefits.