

博士論文

イミダゾールジペプチドの健康機能性  
に関する研究

塩谷 茂信

## 目次

主要略語一覧 .....	1
第1章 イミダゾールジペプチド研究の沿革と本研究の目的 .....	3
1-1. イミダゾールジペプチドの種類と名称 .....	3
1-2. イミダゾールジペプチドの体内代謝とこれまでに報告されている生理機能 .....	4
1-3. 動物組織中のイミダゾールジペプチドの一般的分析法 .....	5
1-4. 動物組織中のイミダゾールジペプチドの含有量 .....	7
1-5. 各種動物エキス中のイミダゾールジペプチド含有量 .....	8
1-6. 動物エキスからのイミダゾールジペプチドの分離精製法に関する先行研究 .....	9
1-7. 本研究の目的 .....	1 2
1-8. 本論文の構成 .....	1 2
第2章 イミダゾールジペプチドの抗酸化活性の解析 .....	1 4
2-1. 緒 言 .....	1 4
2-2. 実験材料および方法 .....	1 6
抗酸化剤および試薬類 .....	1 6
チキンエキス由来アンセリン-カルノシン混合体の調製 .....	1 6
抗酸化活性測定法 .....	1 6
活性酸素溶液の調製 .....	1 6
活性酸素によるタンパク質分解に対する防止効果の測定 .....	1 7
活性酸素による DNA 分解に対する防止効果の測定 .....	1 7
2-3. 実験結果 .....	1 8
2-3-1. イミダゾールジペプチドの従来法での抗酸化活性の評価結果 .....	1 8
2-3-2. タンパク質の分解を指標とした生体内産生 ROS ラジカルに対するイミダゾールジペプチドの抗酸化活性の評価 .....	1 9
各種 ROS ラジカルによるタンパク質の分解作用 .....	1 9
各種抗酸化剤の ROS ラジカルによる卵白アルブミン分解阻止作用 .....	2 0
3 種の ROS ラジカルを同時に消去する抗酸化剤の組み合わせ .....	2 1
2-3-3. DNA 分子の分解を指標とした生体内産生 ROS ラジカルに対するイミダゾールジペプチドの抗酸化活性の評価 .....	2 2
各種 ROS による DNA の分解作用 .....	2 2
各種 ROS の DNA 分解作用に対する天然抗酸化剤の効果の比較 .....	2 3
その他の天然抗酸化剤の ROS ラジカルによる DNA 分子分解に対する阻止作用 .....	2 4
2-4. 考 察 .....	2 5

2-5. 結 論 .....	2 9
第3章 イミダゾールジペプチドの生理機能の探索試験 .....	3 0
3-1. 緒 言 .....	3 0
3-2. 実験材料および方法 .....	3 2
3-2-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響 .....	3 2
ショウジョウバエの飼育 .....	3 2
イミダゾールジペプチドの補給 .....	3 2
イミダゾールジペプチドのショウジョウバエの寿命に及ぼす影響 .....	3 2
統計解析 .....	3 2
3-2-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について .....	3 3
試薬類 .....	3 3
血小板の調製 .....	3 3
血小板凝集抑制作用の測定方法 .....	3 3
統計解析 .....	3 4
3-3. 実験結果 .....	3 4
3-3-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響 .....	3 4
全身の遊離アミノ酸、AMPP、およびジペプチドの分布 .....	3 4
ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響 .....	3 6
3-3-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について .....	3 7
血小板凝集を誘導する血小板刺激剤の添加条件の検討 .....	3 7
ケルセチンおよびその関連物質とタマネギ外皮エキスの血小板凝集阻止作用 .....	3 7
イミダゾールジペプチドおよび天然抗酸化剤のウサギ血小板凝集に及ぼす影響 .....	3 8
3-4. 考 察 .....	3 9
3-4-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響 .....	3 9
3-4-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について .....	4 0
3-5. 結 論 .....	4 1
第4章 イミダゾールジペプチドのヒト介入試験による健康機能性の検証 .....	4 3
4-1. 緒 言 .....	4 3
4-2. 実験材料および方法 .....	4 6
4-2-1. 3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果 .....	4 6
試験デザイン .....	4 6
被験飲料 .....	4 6
試験対象者の条件 .....	4 7
コメットアッセイおよび血液生化学試験 .....	4 7

統計解析 .....	4 8
<b>4-2-2. チキンエキス投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験</b> .....	4 9
試薬類 .....	4 9
改良型逆相-HPLC による血中イミダゾールジペプチドとその構成アミノ酸の測定 ....	4 9
血しょう試料の調製 .....	4 9
被験者への投与と採血 .....	4 9
統計解析 .....	5 0
<b>4-2-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果</b> .....	5 0
試験デザイン .....	5 0
試験参加者 .....	5 0
日常の食事から摂取するアンセリンとカルノシン量のモニター記録.....	5 1
被験食(Active)の組成.....	5 1
認知検査 .....	5 2
安全性の評価 .....	5 2
統計解析 .....	5 2
<b>4-3. 実験結果</b> .....	5 2
<b>4-3-1. 3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果</b> .....	5 2
被験者と飲料摂取状況 .....	5 2
コメントアッセイスコアの改善 .....	5 2
糖および脂質代謝に及ぼす影響 .....	5 3
<b>4-3-2. チキンエキス投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験</b> .....	5 5
原法と改良法の溶離液でのイミダゾールジペプチドとその代謝物の測定 .....	5 5
二重盲検-クロスオーバー法による市販鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能の比較 .....	5 7
<b>4-3-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果</b> .....	5 9
被験対象者 .....	5 9
被験食組成 .....	6 0
被験者の認知機能に及ぼす作用の評価 .....	6 1
臨床上の安全性に関する所見.....	6 2
血中 CRP 値に対するアンセリン投与の影響.....	6 3
<b>4-4. 考 察</b> .....	6 4
<b>4-4-1. 3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果</b> .....	6 4
<b>4-4-2. チキンエキス投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験</b> .....	6 5
<b>4-4-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果</b> .....	6 7
<b>4-5. 結 論</b> .....	6 8

第5章 総括.....	7 0
5-1. 本研究で得られた結果の要旨.....	7 0
5-2. 今後の課題.....	7 2
5-3. イミダゾールジペプチドの機能性素材としての展望.....	7 3
Appendix 1. アルツハイマー病病態モデル細胞系でのイミダゾールジペプチドの効果.....	7 5
A1-1. 研究の背景.....	7 5
A1-2. 実験内容.....	7 5
A1-3. 実験結果.....	7 5
アミロイド- $\beta$ とマクロファージを添加した試験系での実験.....	7 5
抗 APP 抗体誘発神経細胞死の系での実験.....	7 6
APP 遺伝子導入神経細胞の生存に及ぼすチキンエキス由来イミダゾールジペプチドの作用.....	7 7
A1-4. 結果に関する考察.....	7 7
文献.....	7 9
謝辞.....	9 0
論文(業績)リスト.....	9 1

## 主要略語一覧

AAMPs:	amino acid metabolites and products (アミノ酸の代謝物およびその生成物)
ACmix:	anserine-carnosine mixture ((チキンエキス由来精製)アンセリン/カルノシン混合体)
ACS:	anserine/carnosine supplementation ((チキンエキス由来精製)アンセリン/カルノシンサプリメント)
AD:	Alzheimer's disease (アルツハイマー病)
ADP:	adenosine diphosphate (アデノシン-5'-二リン酸)
AGEs:	advanced glycation end-products (最終糖化産物)
BHb:	bovine hemoglobin (牛ヘモグロビン)
BMI:	body mass index (ボディマス指数)
BSA:	bovine serum albumin (牛血清アルブミン)
CRP:	C-reactive protein (C 反応性蛋白)
DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル)
EGCG:	epigallocatechin gallate (エピガロカテキンガレート)
FAA:	free amino acid (遊離アミノ酸)
GG	glycyl-glycine (グリシル-グリシン)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	hydrogen peroxide (過酸化水素)
ClO <sup>•</sup> :	hypochlorous acid radical (次亜塩素酸ラジカル)
HDL:	high density lipoprotein (高密度リポタンパク質)
HO <sup>•</sup> :	hydroxyl radical (水酸化ラジカル)
LDL:	low density lipoprotein (低密度リポタンパク質)
MCI:	Mild Cognition Impairment (軽度認知障害)
MMSE:	Mini Mental State Examination (ミニメンタルステート試験)
MPO:	myeloperoxidase (ミエロペルオキシダーゼ)
NF:	nanofiltration (ナノろ過)
UF:	ultrafiltration (限外ろ過)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	superoxide anion (スーパーオキシドアニオン)
ONOO <sup>•</sup> :	peroxynitrite radical (過酸化亜硝酸ラジカル)
ORAC:	oxygen-radical absorbance capacity (酸素ラジカル吸収能)
Ova:	ovalbumin (卵白アルブミン)
PAF:	platelet-activating factor (血小板活性化因子)
PAGE:	poly-acrylamide gel electrophoresis (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
RNS:	Reactive Nitrogen Species (活性窒素酸化物種)
ROS:	Reactive Oxygen Species (活性酸素種)
SD:	standard deviation (標準偏差)
SDS:	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)

SF: standard food (標準食)  
SOD: superoxide dismutase (スーパーオキシドディスムターゼ)  
V.C: vitamin C (ビタミン C、L-アスコルビン酸)  
V.E: vitamin E (ビタミン E、 $\alpha$ -トコフェロール)

## 第1章 イミダゾールジペプチド研究の沿革と本研究の目的

### 1-1. イミダゾールジペプチドの種類と名称

イミダゾールジペプチド(Imidazole dipeptides)は、イミダゾール環を持つヒスチジンを構成成分とするジペプチドの総称である。従来は HRDP(Histidine-related dipeptides) とか HCDP(Histidine-containing dipeptides)、あるいは個別名称のアンセリン、カルノシンなどと呼ばれてきた[1]。

脊椎動物はヒスチジンとβ-アラニンを結合させるカルノシン合成酵素遺伝子を保有しており、イミダゾールジペプチドの代表的なものであるカルノシン(Carnosine, β-alanyl-L-histidine)が恒常的に生合成されている[2]。そしてヒスチジン環の3位または1位にメチル化が起こったものを、前者をアンセリン(Anserine, β-alanyl-3-methyl-L-histidine)、後者をバレニン、またはオフィジン(Balentine or Ophidine, β-alanyl-1-methyl-L-histidine)と呼んできた。また、哺乳動物の脳内にはヒスチジンとγ-アミノ酪酸(GABA)からなるホモカルノシン(Homocarnosine, γ-aminobutyryl-L-histidine)も存在している。したがって天然に存在するイミダゾールジペプチドはこの4種類が代表的なものとして挙げられる(図1-1)。

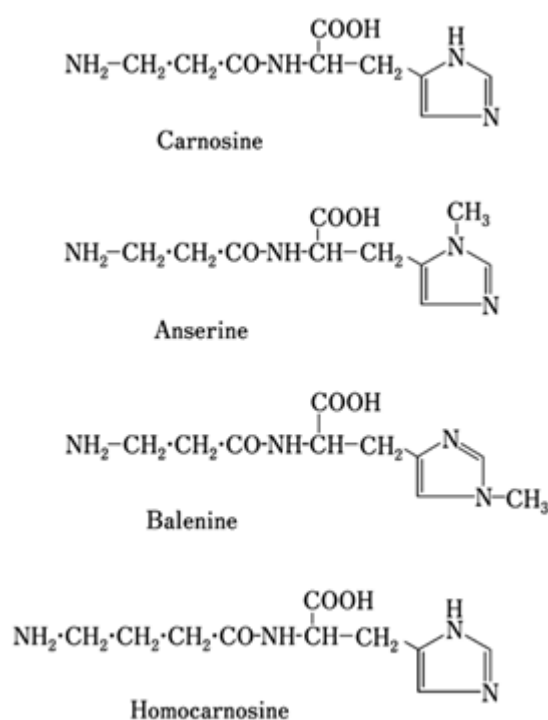


図1-1. イミダゾールジペプチドの構造式

イミダゾールジペプチドのそれぞれの呼称は、それが発見された動物種に由来している。カル



ノシンは 1900 年に Gulewitch ら[3]により食肉(食肉を意味する Carno)エキスから、アンセリンは 1929 年に Ackermann ら[4]によりガチョウ(Anserinae)の筋肉から、そしてバレニン(Valenine)は 1962 年に Suyama ら[5]により鯨(Balaena)の肉から発見されたものである。

## 1-2. イミダゾールジペプチドの体内代謝とこれまでに報告されている生理機能

ヒトを含む脊椎動物では、 $\beta$ -アラニンと L-ヒスチジンを結合させるカルノシン合成酵素(ATPGD-1)が存在しており、哺乳類ではエネルギー消費が活発な骨格筋や脳などの組織に特に多く分布している[6]。一方、血液や各組織にはカルノシン分解酵素であるカルノシナーゼ(Carnosinase)が存在しており、肝臓で生産されて血中に分布する CNDP1 と腎臓などの組織に分布する CNDP2 の 2 種類がある[7]。すなわち、経口摂取されたイミダゾールジペプチドは腸管上皮のペプチドトランスポーター-1 を経由して腸からそのままのペプチドの形で吸収されるが[8]、肝臓や血液中で CNDP1 により一旦分解されて $\beta$ -アラニンとヒスチジンとなる。血中の $\beta$ -アラニンとヒスチジンは骨格筋や脳組織に運ばれてカルノシン合成酵素により再びイミダゾールジペプチドのカルノシンになると考えられている[9]。また、げっ歯類、鳥類および魚類などの骨格筋にはカルノシン-N-メチルトランスフェラーゼが存在しており[10]、カルノシンの一部がメチル化されてアンセリンやバレニンとなり、生体内に存在するイミダゾールジペプチドを構成している。

ヒトにカルノシンを経口摂取させた場合には、血中ではカルノシンは検出されないが、摂取後数時間以内に尿中へカルノシン分子のまま排泄されていることが確認されている[11]。

イミダゾールジペプチドの生理機能はカルノシンを中心に検討されてきたものであるが、これまでに報告されている主な作用をまとめてみると、まず、カルノシンを構成するヒスチジンのイミダゾール環が金属キレート作用を持つことが注目されてきた[12]。特に、嗅覚組織の嗅球に比較的高濃度にカルノシンが存在することから[13]、カルノシンは 2 価金属イオンの運搬体、あるいは嗅覚の神経伝達物資ではないかと推定されてきたのである。さらに、カルノシンは塩基性を示し、生体内 pH 平衡作用を持つことから、運動時に生成される乳酸による組織の酸性化を抑える緩衝作用を通して抗疲労作用を持つ可能性などが指摘されてきた[14]。

抗疲労作用に関連して、イミダゾールジペプチドの抗酸化作用も注目されてきた。動物の細胞内では、酸素を利用するエネルギー生産の過程で活性酸素種(Reactive oxygen Species、ROS)が必ず発生するので、これらの有害作用を抑制するために抗酸化機構が存在している。生体内成分のイミダゾールジペプチドもその抗酸化機構を担うものではないかと考えられてきた[15]。すなわち、生体組織内に存在する遊離アミノ酸やペプチド成分の中でイミダゾールジペプチドは常に 50%以上を占めるものであり、エネルギー消費の激しい組織、例えば高速で長距離運動をする大型回遊魚や渡り鳥の筋肉組織や哺乳類の脳や骨格筋組織に特に集中して存在することから、生体防御の上で重要な機能を果たしているものと推定されてきたからである。さらに、糖とタンパク質が結合してできる最終糖化産物(Advanced glycation end-products, AGEs)の生成抑制作用(抗糖化作用)[16]および脳神経細胞の保護作用[17]なども報告されており、老化や生活習慣病などの予防効果なども期待されてきた。

近年では、老化や老化に伴う生活習慣病、あるいは疲労を促進する ROS の消去作用に加えて、糖尿病に伴う AGEs 生成の抑制作用、アルツハイマー型認知症や虚血状態での脳神経細胞死の防止効果などが注目されるようになってきている[18,19]。しかしながら、イミダゾールジペプチドの生体内におけるこれらの作用、すなわち生理学的機序や抗酸化作用の意義などについては、まだ十分に解明されているわけではない。

### 1-3. 動物組織中のイミダゾールジペプチドの一般的分析法

動物組織中のイミダゾールジペプチドの定量は、通常、アミノ酸自動分析計で行うのが一般的である。しかし、アミノ酸自動分析計による定量では1検体あたり約180分の分析時間が必要であり、多数の検体を測定する場合には迅速性にかかる欠点があった(図1-2)。そこで1件あたり測定時間が15~30分程度で終了する ODS カラムを使用した逆相-HPLC 法[20]が用いられてきた(図1-3)。

しかしながら、これらの定量法ではイミダゾールジペプチドの1種であるバレニンがカルノシンと重複してしまい、バレニンを定量することができなかった。この問題は、Moraら[21]の親水性相互作用クロマトグラフィーに基づく HPLC (hydrophilic interaction chromatography、HILIC-HPLC)法により3種のイミダゾールジペプチドを定量することが可能となり、解決されている(図1-4)。

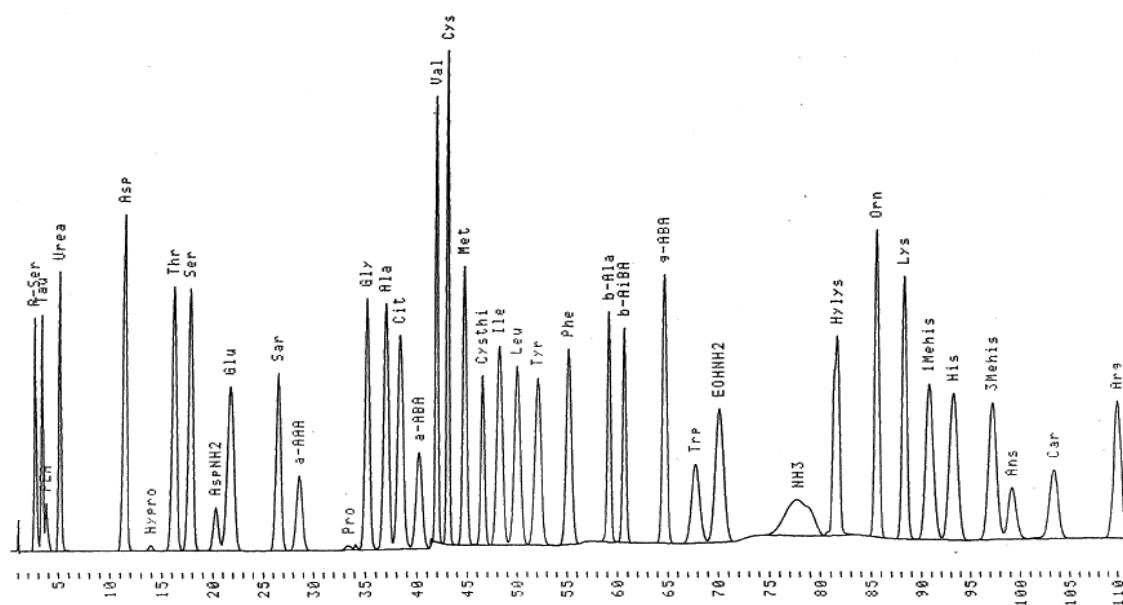


図1-2. アミノ酸自動分析器の標準品クロマトグラム

アンセリン(Ans)およびカルノシン(Car)の保持時間はそれぞれ99分および104分付近である。

(東海物産(株) 社内資料)

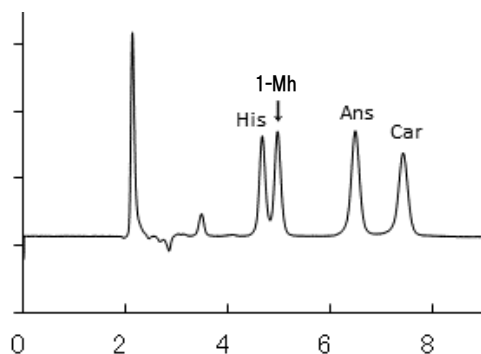


図 1-3. ODS カラムを使用した逆相-HPLC 法による標準品のクロマトグラム

His, L-ヒスチジン；1Mh, 1-メチルヒスチジン；Ans, アンセリン；Car, カルノシン

(東海物産(株) 社内資料)

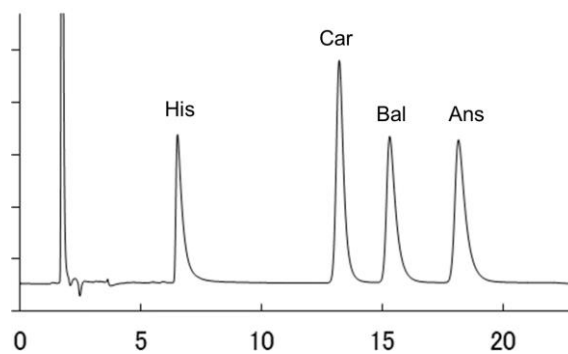


図 1-4. 親水性相互作用カラム(HILIC)を用いる HPLC 法による標準品のクロマトグラム

His, L-ヒスチジン；Car, カルノシン；Bal, バレニン；Ans, アンセリン

(東海物産(株) 社内資料)

また、以上のイミダゾールジペプチドの分析法とは別に、著者らは本研究に先行して、各種動物エキス中に含まれるアンセリンとカルノシンをイミダゾールジペプチド総体として迅速・簡便に定量し、動物エキスの製造工程管理や品質管理に応用できる方法として、ゲルろ過（Gel-Permeation Chromatography、GPC-HPLC）法を開発した(図 1-5) [22]。この分析法ではイミダゾールジペプチドを定量し、同時に共存するその他の物質の変化も検出できるので、各製造工程での製造管理および歩留管理を実施する上で極めて迅速簡便かつ精度の高い分析法であった。また、イミダゾールジペプチドを構成するカルノシンとアンセリンを個別定量することはできないが、これらを合算した総イミダゾールジペプチド含量として定量することが可能であり、その測定精度はアミノ酸自動分析計で個別定量した場合とほとんど同等であった。

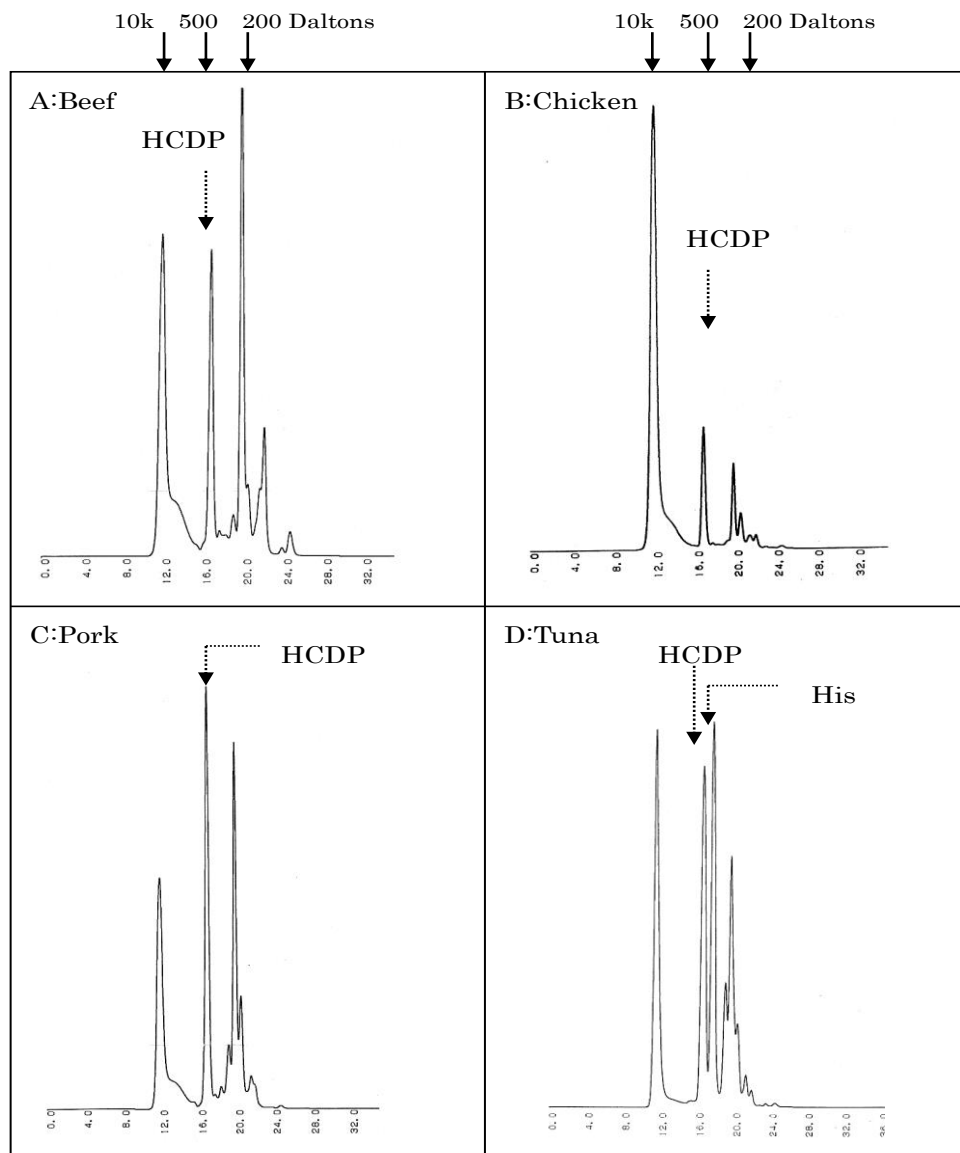


図 1-5. 各種動物エキスの GPC-HPLC クロマトグラム[22]

HCDP:イミダゾールジペプチド混合体 : His : Histidine

上端の矢印は分子量分布を示す

#### 1-4. 動物組織中のイミダゾールジペプチドの含有量

阿部[23]によると、各動物種での筋肉組織中のイミダゾールジペプチドの分布は、ヒト、ブタ、ウシなどの哺乳類ではカルノシンが優勢であり、ヒツジではカルノシンとアンセリンが1:1、水生哺乳類のクジラや爬虫類ではカルノシンとバレニンが1:2、鳥類ではカルノシンとアンセリンが1:3の割合で、そして大型魚類になるとほぼ全てがアンセリンだけになるとされている。これまでに各種分析法を用いて定量された動物筋肉中のイミダゾールジペプチドの含有量をまとめてみると、表1の通りである。

表 1. 各種動物筋肉組織中のイミダゾールジペプチド含有量[23]

動物の種類	カルノシン	アンセリン	パレニン
	(μmol/g)		
ヒト	30	1	0
ブタ	12	0.7	0.8
ウシ	15	2	0.1
ウマ	18	0.2	0
ヒツジ	5	5	0
ウサギ	2	19	0
クジラ	10	0	30
ヘビ	5	0	10
ニワトリ	6	18	0
マグロ	0	30	0
シャケ	0	25	0

### 1-5. 各種動物エキス中のイミダゾールジペプチド含有量

上記したように、動物組織中の遊離アミノ酸を分析したときに、イミダゾールジペプチドはいずれの動物種においても 50 %以上に含まれることが報告されてきた。そこで、著者らも 100 °C、60 分間の加熱抽出で得られた動物エキス中の遊離アミノ酸を、アミノ酸自動分析計を用いて分析した。動物エキス中の遊離アミノ酸は、共通してタウリンとイミダゾールジペプチドが主要な成分として存在していることが判明した(図 1-6)。このタウリンもイミダゾールジペプチドと同様に抗酸化作用を持つ物質として知られている。

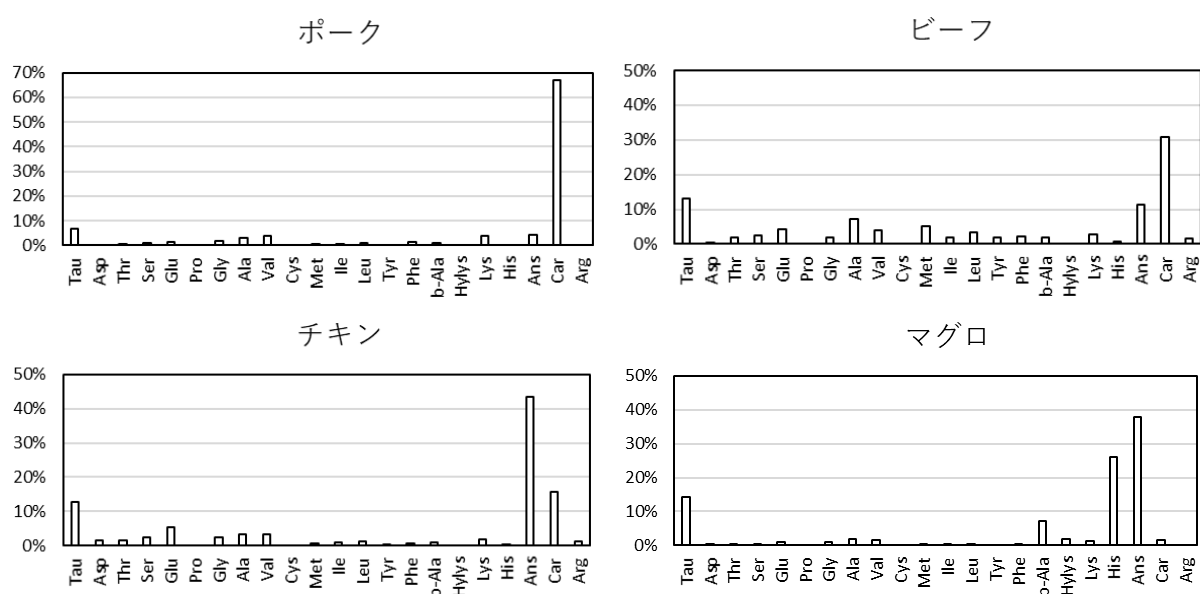


図 1-6. 各種動物エキス中の遊離アミノ酸組成

(東海物産(株) 社内資料)

また、加熱抽出した各種動物エキスについて、HILIC-HPLC 法によりイミダゾールジペプチドの種類を定量したところ、それぞれのイミダゾール含量は図 1-7 に示す通りであった。

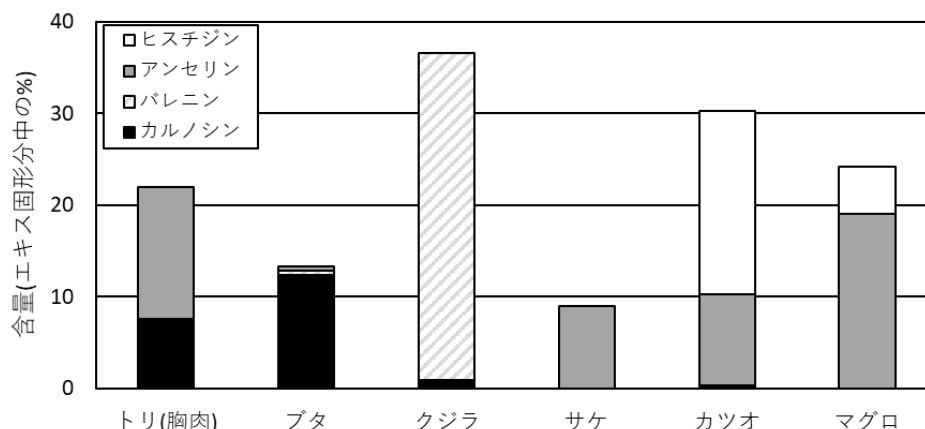


図 1-7. 動物エキス中のイミダゾールジペプチドおよびヒスチジン含量(エキス固形分中%)  
(東海物産(株) 社内資料)

#### 1-6. 動物エキスからのイミダゾールジペプチドの分離精製法に関する先行研究[24]

イミダゾールジペプチドの化学合成品が試薬として市販されているが、カルノシン以外は極めて高価であり、入手が困難である。従って、イミダゾールジペプチドを健康機能性成分として利用し、その生理学的意義について検証するためには、イミダゾールジペプチドを豊富に含む動物エキスからこれらを分離精製する必要がある。

本研究に先行して、著者らはニューフード・クリエーション技術研究組合の研究課題として非産卵鶏(廃鶏)の屠体から得られる鶏肉エキス(チキンエキス)と産卵のために遡上した鮭肉から得られる鮭エキスからイミダゾールジペプチドを工場生産規模で分離精製する方法の開発を進めてきた。チキンエキス中にはイミダゾールジペプチドのカルノシンとアンセリンが約 1:3 の割合で存在し、一方、鮭エキス中のイミダゾールジペプチドはほぼ全量がアンセリンからなっており、カルノシンはほとんど含まれない(図 1-7)。

鶏肉を加熱抽出して得られるチキンエキス中の固形物含有比率は、タンパク質 41 %、遊離アミノ酸 34 %、灰分(塩類)21 %、脂質 4 %である。遊離アミノ酸のうち、イミダゾールジペプチドが占める割合は 50 %以上である。工場生産規模でのイミダゾールジペプチドの分離精製では、タンパク質除去処理として分画分子量 3,000 の限外ろ過(UF)膜処理が適しており、またカルノシンとアンセリンの平均分子量が 240 であるイミダゾールジペプチドを低分子(分子量 100 以下)の塩類と分離する処理には逆浸透膜の一種であるナノろ過(NF)膜処理が適している。しかしながら、チキンエキス中の遊離アミノ酸とイミダゾールジペプチドを UF 膜処理と NF 膜濃縮によって分離するのは困難であった。このことから、UF 膜と NF 膜を連結したろ過処理法に代わる分離精製法

が必要であった。

イミダゾールジペプチドからタンパク質と遊離アミノ酸を分離する方法としては、イミダゾールジペプチドが塩基性(等電点 8.4)を示す性質を利用して、強酸性陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィーが有効であった。チキンエキス中のタンパク質や遊離アミノ酸はほとんどのものが等電点 6 以下の弱酸性のものであるので、イミダゾールジペプチドは弱酸性域で強酸性陽イオン交換体に結合するが、共存するタンパク質や遊離アミノ酸のほとんどは結合できずにイオン交換体を通過する(図 1-8)。

強酸性陽イオン交換クロマトグラフィーでイミダゾールジペプチドと同様にイオン交換体に結合する生体成分としては塩基性クレアチンの代謝産物であるクレアチニンがある。クレアチニンの分子量は 113 であり、平均分子量 240 のイミダゾールジペプチドから分離する方法として NF 膜によるろ過処理が有効であった。この目的を達成できる NF 膜の選択を行い、食塩阻止率 40 % 以上の NF 膜がクレアチニン除去に最適であった(図 1-9、図 1-10)。

強酸性陽イオン交換体クロマトグラフィーと NF 膜ろ過処理を連結した分離精製法は、チキンエキス中のイミダゾールジペプチドだけでなく、鮭エキスなど他の動物エキス中のイミダゾールジペプチドも回収率が 90 % 以上でクレアチニンをほぼすべて除去することが可能であった(図 1-10)。本研究では、この分離精製法によって各種エキスから精製されたイミダゾールジペプチドを用いて、その機能性に関する試験を行った。

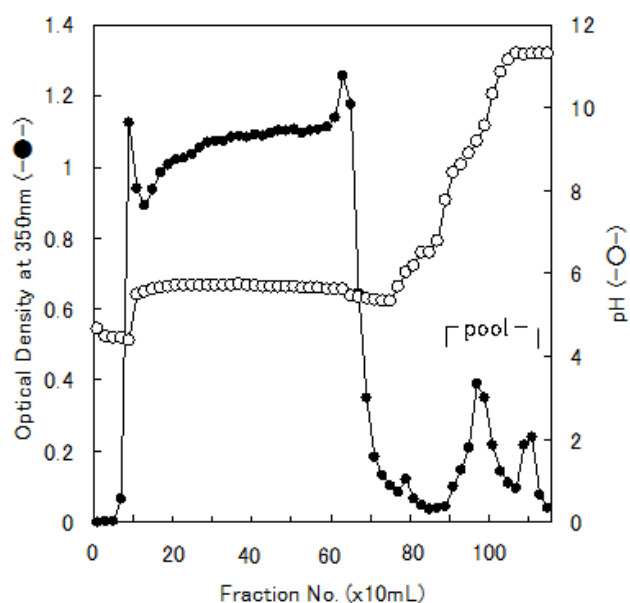


図 1-8. チキンエキスの強酸性陽イオン交換クロマトグラム[24]

フラクション No. 10~70 はカラム通過画分、フラクション No. 90~107 はイミダゾールジペプチド画分として回収

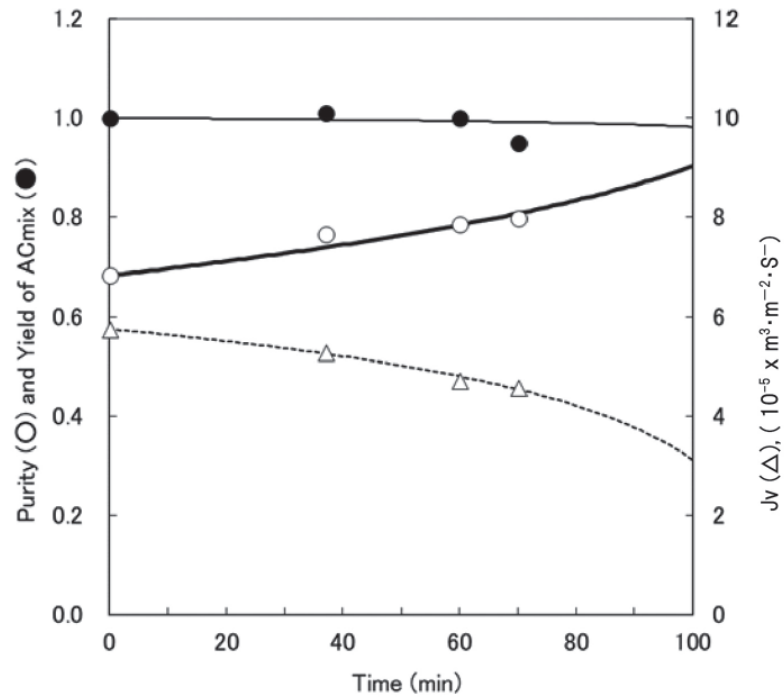


図 1-9. NFT-50 膜を用いて回分濃縮処理を行った際のアンセリン・カルノシンの純度(○)、歩留り(●)および透過流束  $J_v$  (△)の経時変化[24]  
 プロットは実験値、曲線は提案したモデルによる推算値を示す)

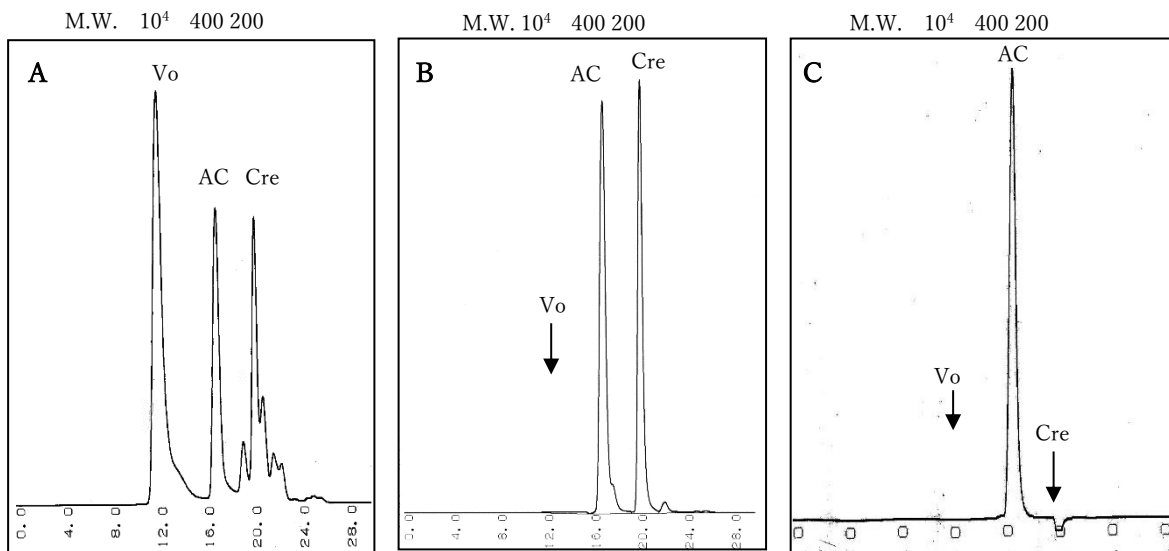


図 1-10. イオン交換-NF 膜ろ過ハイブリッド方式で精製されたイミダゾールジペプチドの GPC-HPLC クロマトグラム[24]  
 A:未処理チキンエキス； B:イオン交換チキンエキス； C:NF 膜濃縮チキンエキス



## 1-7. 本研究の目的

チキンエキスなど、畜肉エキス中に比較的大量に含まれるイミダゾールジペプチドを老化制御や生活習慣病予防効果が期待できる食品素材として利用するために、その健康機能性に関する実証試験をおこなった。上記(1-2 項)したように、イミダゾールジペプチドの生理機能に及ぼす作用について様々なものが報告されてきたが、本研究ではそれらの作用のうち、特に抗酸化作用に焦点をあてて試験を行った。その理由は、イミダゾールジペプチドが持つとされる抗酸化作用は、一般に普及している食品成分の抗酸化作用を測定する試験方法では明らかな抗酸化作用が検出されず、抗酸化剤としての意義が極めて希薄であるにもかかわらず、生体内の遊離アミノ酸の中で最も多量に存在するものであったからである。このことから、本研究ではまずイミダゾールジペプチドの抗酸化作用の様式を調べ、また、異物の蓄積とその刺激により生成が促進される活性酸素種による神経細胞死に及ぼす作用を中心として、生活習慣病予防など健康維持に有益な機能性の探索とその実証試験を行うこととした。

## 1-8. 本論文の構成

本論文は 5 章より構成され、その内容は大きく分けて、イミダゾールジペプチドの抗酸化活性の解析、イミダゾールジペプチドの生理機能の探索試験、およびヒト介入試験によるイミダゾールジペプチドの健康機能性の検証にて構成されている。本論文の構成を図 1-11 に示す。

第 1 章では、イミダゾールジペプチド研究の文献的沿革、イミダゾールジペプチドの定量法、各種動物エキス中のイミダゾールジペプチド含量などについて記述し、あわせて先行研究として行われた動物エキス中のイミダゾールジペプチドの分離精製法についての概要を記述した。第 2 章では、著者が共同研究者として実施したイミダゾールジペプチドの抗酸化活性の解析に関する先行研究を実験方法および実験結果とともに詳説した。第 3 章では、イミダゾールジペプチドの機能性に関する既往の研究として報告されていない新規な作用の探索を行った。第 4 章では、イミダゾールジペプチドの健康機能性食品素材としての有用性をヒト介入試験により検証を行った。第 5 章では、研究成果と今後の課題を含めた全体総括を述べた。

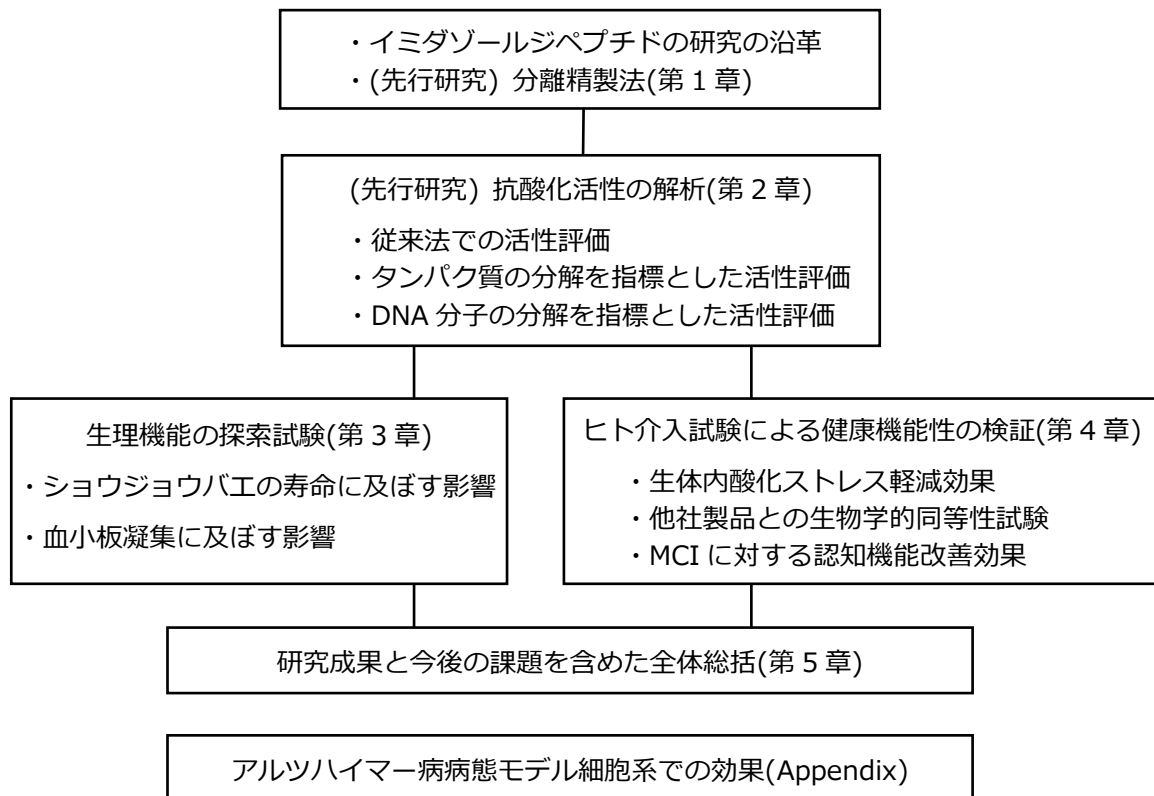


図 1-11. 本論文の構成

## 第2章 イミダゾールジペプチドの抗酸化活性の解析[25-27]

### 2-1. 緒言

1950年代に D. Harman [28]によってヒトの老化は活性酸素種(Reactive Oxygen Species、ROS)などのフリーラジカルによって起こるという、いわゆる Free Radical 理論が提示されて以来、抗酸化剤や食品中に存在している抗酸化作用を有する成分が注目されるようになってきた。実際に、生体内で発生する ROS が遺伝子DNA やタンパク質、脂質などの生体成分を酸化して細胞死を誘発し、その結果、老化を促進し、各種疾病の原因になることが広く知られている[29-31]。

その予防のために抗酸化作用のある成分を食品やサプリメントとして摂取することが奨励されるようになったが、天然の抗酸化物質の抗酸化活性は、古典的なラジカル色素(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl、DPPH)還元法、蛍光発光消去法[32]、および ORAC(Oxygen-radical absorbance capacity)法[33]などの方法で測定されている。特に、1993 年米国・国立老人研究所で開発された ORAC 法は、食品の抗酸化活性を統一した値として表示し、消費者が抗酸化活性の高い食品を選択し、摂取しやすいようにするために、米国や我が国においてその普及が図られてきた測定法である。

イミダゾールジペプチドは生体内で合成される抗酸化活性を有するジペプチドとされてきたが[1]、イミダゾールジペプチドをこれらの方法で測定するとその抗酸化活性は極めて微弱か、あるいはまったく抗酸化活性を示さないものである[32]。本研究では、イミダゾールジペプチドの機能性の中心的な作用と考えられる抗酸化活性について、確認することが極めて重要な課題であった。従来法での測定で抗酸化活性が測定できない原因は不明であるが、従来法で使用するラジカル色素が全て疎水性の物質であり、これに対してイミダゾールジペプチドは親水性であることから、ラジカル色素との反応が起こりにくいと推定し、従来法による測定値を参考にしながら、生体内で産生される活性酸素ラジカルに対する抗酸化作用を中心に検討することとした。

ところで、我々の細胞内では、ミトコンドリアの ATP 回路においてエネルギーが恒常的に生産されている。この生産において呼吸として取り込んだ酸素ガスが必要であるが、取り込まれた酸素ガスの 1 %程度がスーパーオキシドアニオン、すなわち  $O_2^-$  に変換される[34]。その生産量は組織 1 g 当たり 1 日 0.3 mM にもなると計算されているが、この  $O_2^-$  から図 2-1 に示すプロセスで ROS とそれに由来するラジカルが生産される[35]。

生体内産生 ROS は  $O_2^-$ 、過酸化水素( $H_2O_2$ )、そして水酸化ラジカル( $HO\cdot$ )の 3 種類と定義される。これに単球・マクロファージが持つ亜硝酸合成酵素によってアルギニンから生成される亜硝酸も  $O_2^-$  または  $H_2O_2$  と反応して活性窒素酸化物種(Reactive Nitrogen Species、RNS)の 1 種である過酸化亜硝酸ラジカル( $ONOO\cdot$ )を発生させる。さらに、単球と同じく骨髓球(Myelocytes)由来の免疫細胞である好中球(顆粒球)も Myeloperoxidase と呼ぶ酵素により塩素イオンと  $O_2^-$  または  $H_2O_2$  と反応して次亜塩素酸ラジカル( $ClO\cdot$ )を生産する。これらの活性酸素種やラジカルのうち、ミトコンドリア内には  $O_2^-$  に対しては Superoxide dismutase(SOD)、 $H_2O_2$  に対しては Catalase 等の酵素が存在しており、無毒化する機構が存在している。しかし、 $H_2O_2$  が分解してで

きる水酸化ラジカル、次亜塩素酸、および過酸化亜硝酸ラジカルを無毒化する酵素も機構も存在していない。

これらのことから、我々は生体内産生 ROS ラジカルによるタンパク質分解作用を抑制する活性としてイミダゾールジペプチドの抗酸化作用、あるいはラジカル消去能を評価する方法の開発を行うこととした。なお、本論文では  $\text{ClO}\cdot$  と  $\text{ONOO}\cdot$  を含めて ROS ラジカルと表記する。

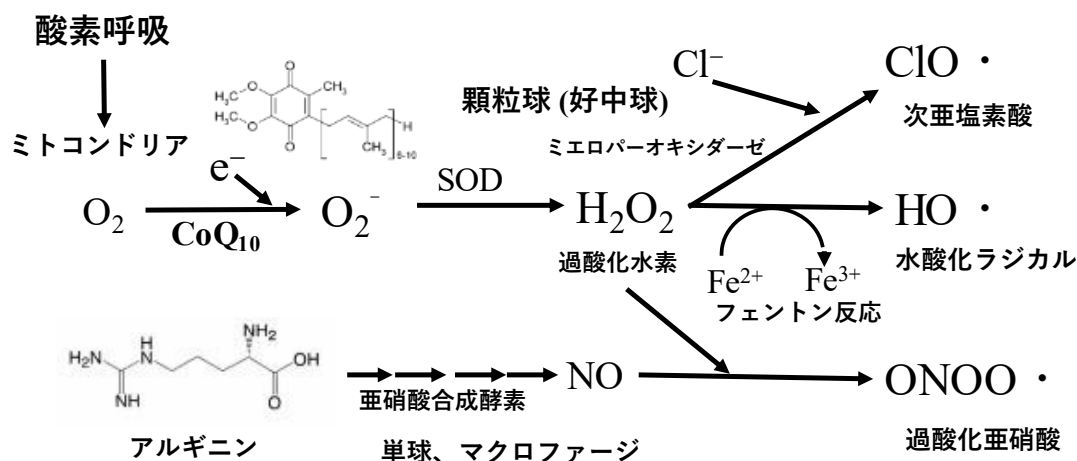


図 2-1. 生体内産生活性酸素種およびラジカル発生の様式図

老化を遅延させ、老化に伴う生活習慣病の発症を予防するために、食事として天然の抗酸化成分を摂取することが極めて重要であるが、天然の抗酸化剤は生体内で産生される ROS の全てに抗酸化作用を示すわけではなく、それらの生理的濃度において、特定の ROS に対して抗酸化作用を強く示すもの、その他の ROS に対しては全く抗酸化作用を示さないものがあることが判明した。これらの知見は生体内産生 ROS ラジカルによるタンパク質分解作用を抑制する活性としてそれぞれの抗酸化剤の特徴を解析したものであるが、老化や生活習慣病の原因となる細胞死は細胞構成成分のタンパク質や脂質が酸化傷害を受けて起こるだけではなく、より直接的には遺伝子 DNA 分子が ROS ラジカルによって傷害されることも重要な原因として含まれる。

生体内産生 ROS ラジカルの中間物質となる  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対するイミダゾールジペプチドを含む天然抗酸化剤の抗酸化作用については、 $\text{H}_2\text{O}_2$  のタンパク質分解作用が極めて微弱であったために試験することができなかった。しかし、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は DNA 分子に対してその他の ROS と同様に分解作用を示すことが判明したので、タンパク質分解阻止作用と同様に、DNA 分子を染色することによって、その分解抑制作用としての抗酸化活性を可視的に観察することが可能であった。

上記の ROS ラジカルに  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えた 4 種の生体内産生 ROS による DNA 分子分解作用に対する抑制作用として、イミダゾールジペプチドおよびその他の天然抗酸化剤の抗酸化活性を試験し、比較することとした。

## 2-2. 実験材料および方法

### 抗酸化剤および試薬類

L-アスコルビン酸(V.C)、(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)、ケルセチン(Qur)、還元型グルタチオン(GSH)、カテキン、クロロゲン酸は和光純薬製を使用した。L-カルノシン(Car)、L-アンセリン HNO<sub>3</sub>(Ans)はシグマ社製を使用した。疎水性抗酸化剤の  $\alpha$ -トコフェロール(V.E)は太陽化学製の微粒子化製品(商品名 Sun ActiveVE-720)を用い、同じく水溶性化した CoQ10 は横浜油脂製、アスタキサンチンはヤエガキ発酵技研製を使用した。Qur は 50 %エタノール溶液とし、その他の抗酸化剤は蒸留水に溶解した。その他の試薬類はすべて和光純薬のものをを使用した。

### チキンエキス由来アンセリン-カルノシン混合体の調製

廃鶏屠体より熱水抽出(95 °C、4 時間)して得られたチキンエキスを Dowex50-X8(シグマ社製)イオン交換クロマトグラフィーおよびNFろ過膜(ダイセンメンブランシステムズ社製、Desal DL)で濃縮脱塩したものをアンセリンとカルノシンの混合体(ACmix)として使用した。アミノ酸自動分析計(日立製作所、L-8500A)で定量した Ans と Car の含有比率は 2.5 : 1.0 であり、その純度は 92 %であった。

### 抗酸化活性測定法

DPPH 法は原法[36]を改変した方法[37]で実施した。AAPH 法は Hirayama らのケミルミネッセンス法に準拠した[32]。また、ORAC 法は日本食品科学工学会が統一化を進めている方法に準拠して行った[38]。

### 活性酸素溶液の調製

次亜塩素酸ラジカル(CIO $\cdot$ )溶液は次亜塩素酸ナトリウムを pH 6.5 の蒸留水で希釈することによって調製した。水酸化ラジカル(HO $\cdot$ )溶液は塩化第二鉄を用いる Fenton 反応により調製した。すなわち、0.1 M FeCl<sub>3</sub>、0.1 M アスコルビン酸および 0.1 M エデト酸ナトリウム(EDTA)溶液をそれぞれ 100  $\mu$ L ずつ小型試験管に取り、0.13 M 過酸化水素を 1000  $\mu$ L 加え、タンパク質溶液に添加して 37 °C、60 分間反応させて過酸化水素より HO $\cdot$  を発生させた(なお試薬は EDTA を除いてすべて使用時に調製した)。

HO $\cdot$  の濃度は添加した 1 分子の過酸化水素から 1 分子の HO $\cdot$  が生成することから、過酸化水素の濃度(mM)として表した。過酸化亜硝酸ラジカル(ONOO $\cdot$ )溶液は Radi ら[39]の quenching reactor を用いる方法を改変して調製した。すなわち、0.6 M 亜硝酸ナトリウム 25 mL と 0.6 M 塩酸と 0.7 M 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を含む溶液 25 mL をそれぞれの注射器に取り(Terumo 社製、30 mL 容)、内径 2 mm、長さ 1.0 cm のシリコン製チューブにそれぞれの注射針を刺して、25 mL/min の流速で混合させながら 25 mL の 1.5 M NaOH を予め入れたビーカーに流し込み、次いで 2 g の酸化マンガン粉末を加えて余剰の過酸化水素を分解した。ろ紙(Advantec Toyo No.2)でろ過して酸化マンガンを除去した後、黄色の反応液の 302 nm における吸光度を分光光度計(日本分光、V-570)で測定して ONOO $\cdot$  の分子吸光係数 1670 M<sup>-1</sup> よりその濃度を算出した。得られた ONOO $\cdot$

の濃度は 53.0 mM であった。これらは 1 mL ずつセラムチューブ(住友ベークライト製、MS-4502)へ小分けし、試験に使用するまで -80 °C で保存した。

### 活性酸素によるタンパク質分解に対する防止効果の測定

牛ヘモグロビン(BHb)、卵白アルブミン(Ova)および牛血清アルブミン(BSA)はいずれもシグマ社製を購入し、平衡化生理食塩水(pH 7.4、Dulbecco's リン酸緩衝化塩、Mediatech 社製)に 2.85 mg/mL になるように溶解して 0.45  $\mu$ m のろ過膜でろ過して 4°C に保存した。

標的タンパク質溶液 175  $\mu$ L、各濃度の抗酸化剤 25  $\mu$ L を 1 mL 容のスπιッツ管(Fisher Scientific 社製)に取り、室温で 30 分間静置した後、各種活性酸素溶液を 25  $\mu$ L と緩衝化生理食塩水 25  $\mu$ L を加え、ClO $\cdot$  の場合は 37 °C、30 分間反応させた。HO $\cdot$  の場合は 37 °C、60 分間、ONOO $\cdot$  の場合は 37 °C、60~120 分間それぞれ反応させた。反応終了後、Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel 電気泳動(SDS-PAGE、第一化学製 10-20 % gradient Gel)用 2 倍濃度のサンプル緩衝液(20%メルカプトエタノール含有)と 1 : 1 に混合し、0.1 % SDS 添加 0.02 M トリス-グリシン緩衝液、pH 8.5 を用いて 40 mA、50 分間電気泳動した。泳動後、Brilliant blue R-250(シグマ社製)溶液で染色し、その後 7 % 酢酸-10 % メタノール脱色液で脱色し、デンストメーター(島津製作所、CS-9300PC)でタンパク質バンドの面積を測定した。タンパク質分解阻止率は次式で計算した。

$$\text{分解阻止率(\%)} = (\text{試料添加のバンド} - \text{非添加対照のバンド}) \div (\text{未処理のバンド}) \times 100$$

### 活性酸素による DNA 分解に対する防止効果の測定

#### DNA の調製：エドト酸ナトリウム(EDTA)の除去

$\lambda$ -phage DNA 溶液(TOYOBIO 社製)100  $\mu$ L に 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.5) 5  $\mu$ L、エタノール 210  $\mu$ L を加えて、TOMY 社製小型遠心機(MX150 型)で 15,000 rpm、10 分間遠心分離した。上清液を廃棄し、氷冷した 70 % エタノール 500  $\mu$ L で洗浄して、再度、15,000 rpm、5 分間遠心分離して上清液を廃棄する洗浄を 3 回繰り返した。次いで、凍結乾燥機で 1 mPa 以下にして 10 分間以上乾燥させて水分を除いた。乾固した  $\lambda$ -phage DNA を 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L の濃度になるように PBS(Phosphate-Buffered Saline、シグマ社製)に溶解し、冷蔵庫に一晩保存した。水分を十分に含んだ DNA を shearing 切断しないようにゆっくりとしたピペット操作で溶解した。

#### DNA 分解反応

反応手順は、上述のタンパク質分解反応に準じて行った。すなわち、3  $\mu$ g の  $\lambda$ -phage DNA を含む 40  $\mu$ L の PBS に対して、PBS に溶解した抗酸化剤 5  $\mu$ L と活性酸素 5  $\mu$ L を加えて総量 50  $\mu$ L となるように分解反応系を構成した。なお、抗酸化剤の濃度は、イミダゾールジペプチドおよびビタミン C(V.C)は 5 mM、グルタチオン(GSH)は 2.5 mM、その他の疎水性抗酸化剤は 0.1~1 mM 濃度で試験した。すなわち、アスタキサンチンは 0.1 mM、ビタミン E および CoQ10 は 1 mM、その他の抗酸化剤は 0.5 mM 濃度とした。まず、DNA 溶液に抗酸化剤を加えてよく混合して 3 分間静置し、次いで活性酸素を加えて、37 °C の恒温インキュベーターに入れ、ClO $\cdot$  ラジカルは 30 分間、HO $\cdot$  ラジカルは 60 分間、ONOO $\cdot$  ラジカルは 120 分間、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は 60 分間反応

させた。

分解反応の停止は、所定の反応時間後に、反応液 17.5  $\mu\text{L}$  に対して、6 倍濃度のアガロースゲル電気泳動用泳動緩衝液に 0.024 % ブロムフェノールブルー(BTB)、300 mM Dithiothreitol、45.5 % glycerol、および 0.5 倍濃度のトリス TAE を含有する停止液 3.5  $\mu\text{L}$  を混合することによって行った。

### **アガロースゲル電気泳動**

電気泳動用緩衝液として 50 倍濃度の TAE 緩衝液を調製した。すなわち、トリスアミノメタン(Trisma Base、Sigma 社製) 24.2 g、氷酢酸 5.71 mL、0.5 M EDTA (pH 8.0) 10 mL に純水を加えて総量 100 mL になるように調製した。0.8 (w/v) %アガロースゲルは、ゲル作製メーカーに適した量を 1 倍濃度の TAE に偏比容を考慮せずにアガロース(分子生物学用 Sigma 社製)を加え、沸騰しないように電子レンジで加熱して溶解させ、60 °C以下まで冷却した後、Mupid 2-plus(Mupid 社製)電気泳動ゲルメーカーに注ぎ入れて室温で固化させた。さらに、アガロースゲルを 1 倍濃度の TAE 緩衝液で満たした泳動槽に浸漬し、反応停止した各試料溶液を一定量(6  $\mu\text{L}$ /well)サンプル穴に注入し、100 V、30 分間電気泳動した。また、 $\lambda$ -phage DNA を制限酵素 HindIIIか、EcoRI と HindIIIで切断した断片を分子量マーカーとして同時に泳動した。泳動後、ゲルを純水中で 1 分間浸漬して緩衝液を洗い出し、Mupid-Stain EYE 染色液(Mupid 社製)で 1 分間染色した。次にゲル容量の 3 倍量の水を加え、DNA 染色バンドが見えてくるまで室温で 20 分間振とうして脱色した。

DNA 分解阻止作用による抗酸化活性の程度は、23.1 Kbp の DNA 分子が完全に保たれている状態を+++、23.1 Kbp のバンドと 4.4 Kbp 以上のバンドが保持されている状態を++、2.0 Kbp 以上のスメアーがあり分解対照より分解が抑えられている状態を+、2.0 Kbp 以下のバンドがあり、分解対照と同程度のものを-、分解対照(P)よりも分解が促進された状態を--と判定した。

## **2-3. 実験結果**

### **2-3-1. イミダゾールジペプチドの従来法での抗酸化活性の評価結果**

DPPH 法と ORAC 法は、ラジカル消去能を抗酸化作用として表すものであり、その活性は抗酸化ビタミン E の誘導体である Trolox の力価に換算する。したがって、数値が大きいほど抗酸化活性が強いと評価する。これに対して AAPH 法は AAPH ラジカル活性の 50 %を抑制する濃度(半阻止濃度、IC<sub>50</sub>)として表すもので、濃度(数値)が小さいものほど抗酸化活性は強いと評価するものである。これらの測定法で天然抗酸化剤の抗酸化活性を測定した結果を表 2-1 に示す。

アンセリンとカルノシンを含む精製イミダゾールジペプチド(ACmix)とその他の抗酸化剤を従来の抗酸化活性測定法で比較すると、ACmix の抗酸化活性は、DPPH 法ではビタミン C と E の約千分の 1 であり、EGCG の 6,700 分の 1 に過ぎないものであった。食品の抗酸化スコアとされる ORAC 法では、ビタミン C の 5 分の 1、ビタミン E の 10 分の 1、お茶カテキンの 125 分の 1 であった。この抗酸化活性は AAPH 法でも同様に、ビタミン C の約 7 万分の 1、ビタミン E の 230 分の 1 に過ぎないものであった。

表 2-1. 各種抗酸化活性測定法による抗酸化力の比較

抗酸化剤	DPPH 法 (Trolox eq mM/M)	ORAC 法 (Trolox eq M/M)	AAPH 法 (IC <sub>50</sub> μM)
AC mix	1.0	0.1	6952.0
ビタミン C	1,064.0	0.5	0.1
ビタミン E	993.0	1.0	30.0
GSH	562.6	12.3	20.0
EGCG	6727.0	N.D.	N.D.
ケルセチン	2555.0	N.D.	N.D.
カテキン	N.D.	12.5	0.2

A Cmix:アンセリン/カルノシン混合体、GSH:還元型グルタチオン、EGCG;エピガロカテキンガレート、N.D.:試験せず

(日本食品科学工学会から許可を受け、文献[25]および[26]内に記載の表を改変して転載)

## 2-3-2. タンパク質の分解を指標とした生体内産生 ROS ラジカルに対するイミダゾールジペプチドの抗酸化活性の評価

### 各種 ROS ラジカルによるタンパク質の分解作用

各種 ROS ラジカルによるタンパク質の酸化的分解を視覚的に観察するために、標的タンパク質として牛ヘモグロビン(BHb、分子量:16,000)、卵白アルブミン(Ova、分子量:45,000)および牛血清アルブミン(BSA、分子量:66000)を用い、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ClO・、HO・および ONOO・の4種の ROS ラジカルによるタンパク質分解作用を SDS-PAGE で試験した(図 2-2)。

各濃度の ROS ラジカルで処理すると H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を除いて、標的タンパク質のバンドは分解により染色性を失い SDS-PAGE ゲル上で視覚的に観察されなくなる。このタンパク質分解作用が最も強いのは ClO・であり、5 mM 濃度で BHb をほぼ完全に分解する作用を示した。ONOO・は試験した最大濃度が 5 mM であったが、BHb に対する分解作用は ClO・より弱いものであった。また、OH・は生体内で最も強い活性酸素と言われてきたが、タンパク質分解作用でみると ClO・や ONOO・より弱く、標的タンパク質を十分に分解するためには 10 mM 以上の濃度が必要であった。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は試験した標的タンパク質に対して 20 mM 濃度でも顕著な分解作用を示さなかった。

この結果より各種抗酸化剤の ROS ラジカルによるタンパク質分解に対する阻止作用の試験では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を除外し、ClO・と ONOO・は 5 mM、HO・は 10 mM の濃度を用いることとした。また、ROS ラジカルの酸化分解作用に対して、最も抵抗性を示したタンパク質は BSA であり、次いで BHb であった。Ova は最も感受性が高いタンパク質であった。このことから、標的タンパク質として Ova を使用することとした。



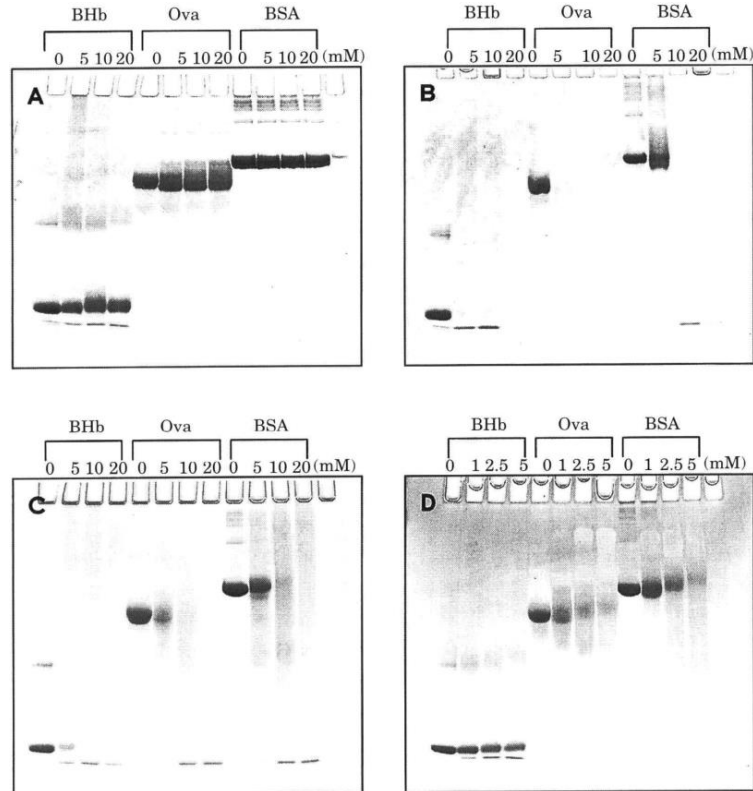


図 2-2. SDS-PAGE を用いた活性酸素種によるタンパク質分解の解析[25]

各タンパク質は生理食塩水(pH 7.4)で 2.85 mg/mL になるよう溶解し、図中の濃度の活性酸素種を添加し、37 °C でインキュベートした。A:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; B:  $\text{ClO}\cdot$ ; C:  $\text{HO}\cdot$ ; D:  $\text{ONOO}\cdot$

### 各種抗酸化剤の ROS ラジカルによる卵白アルブミン分解阻止作用

各種抗酸化剤の抗酸化活性を生体内で産生される ROS ラジカルによるタンパク質分解阻止作用で比較するために、水溶性のイミダゾールジペプチドとビタミン C(V.C)は 5 mM、その他の疎水性抗酸化剤は 0.1~1 mM 濃度で試験した。すなわち、アスタキサンチンは 0.1 mM、ビタミン E は 1 mM、その他の抗酸化剤は 0.5 mM 濃度とした。

3 種の ROS ラジカルによるタンパク質分解作用に対する各天然抗酸化剤の阻止作用は、図 2-3 に示す通りであった。 $\text{ClO}\cdot$  による Ova の分解に対して(図 2-3A)、Car、Ans およびチキンエキス由来の ACmix は強い酸化分解阻止作用を示した。また、同じ水溶性の V.C もイミダゾールジペプチドより若干弱い分解阻止作用を示した。これに対して、疎水性の植物由来抗酸化剤や CoQ10 およびアスタキサンチンなどはほとんど分解阻止作用を示さなかった。一方、 $\text{HO}\cdot$  による酸化分解に対しては、水溶性のイミダゾールジペプチドの分解阻止作用は極めて弱く、V.C は全く阻止作用を示さなかった。これに対して、V.E、CoQ10、アスタキサンチンおよびフェルラ酸など疎水性抗酸化剤は極めて強い分解阻止作用を示した。しかしフラボノイド化合物であるカテキンと EGCG は V.C と同様に全く抗酸化活性である阻止作用を示さなかった(図 2-3B)。

$\text{ONOO}\cdot$  による酸化分解に対しては、試験した抗酸化剤の中で V.C が最も強い分解阻止作用を示した。ついで、カテキン、EGCG そしてフェルラ酸が弱い活性であったが、分解阻止作用を示した。イミダゾールジペプチドにはほとんど分解阻止作用は認められなかった(図 2-3C)。

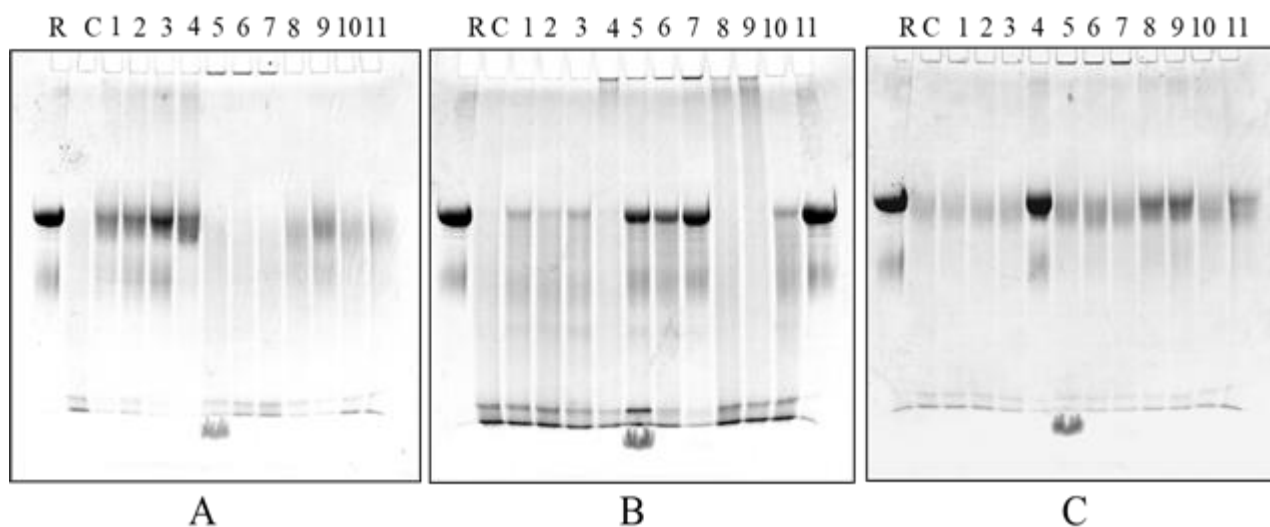


図 2-3. ROS ラジカルによるタンパク質分解に対する抗酸化剤の抑止作用[27]

A：次亜塩素酸( 10 mM)； B：水酸化ラジカル( 10 mM)； C：過酸化亜硝酸( 5 mM)

R：未処理タンパク質； C：抗酸化剤非添加対照； 1：アンセリン(5 mM)； 2：カルノシン(5 mM)； 3：精製チキンエキス(5 mM)； 4：ビタミン C(5 mM)； 5：ビタミン E(1 mM)； 6：CoQ10(1 mM)； 7：アスタキサンチン(0.1 mM)； 8：カテキン(0.5 mM)； 9：EGCG(0.5 mM)； 10：クロロゲン酸(0.5 mM)； 11：フェルラ酸(0.5 mM)

### 3 種の ROS ラジカルを同時に消去する抗酸化剤の組み合わせ

図 2-3 に示した通り、単独の抗酸化剤で 3 種の ROS ラジカルすべてに対して完全にそのタンパク質分解作用を抑制できるものはなかった。このことは、生体内産生 ROS ラジカルを抑制するために抗酸化剤を摂取する方法として、それぞれの ROS ラジカルに対して強く抗酸化作用を持つ抗酸化剤の組み合わせが想定された。そこで、ClO $\cdot$  に対して最も強い抗酸化作用を持つチキンエキス由来の ACmix を、HO $\cdot$  に対して試験した抗酸化剤の中では最も強いフェルラ酸を、そして ONOO $\cdot$  に対して最も強い V.C を組み合わせた抗酸化剤を作製し、試験した。

その結果、単独の抗酸化剤はそれぞれの標的となる ROS ラジカルに対しては抗酸化作用を示したが、標的とならない ROS ラジカルに対しては抗酸化作用を示さなかった。しかし、それぞれの ROS に対して抗酸化作用を示す抗酸化剤 3 種類を配合した場合は、3 種すべての ROS ラジカルによるタンパク質分解を完全に抑制した(図 2-4)。

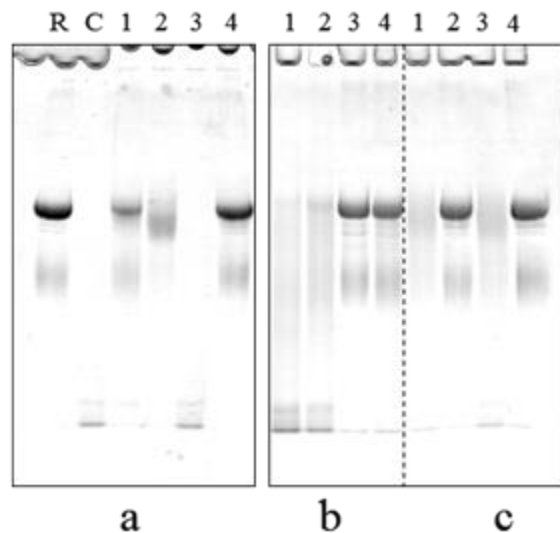


図 2-4. 3 種の ROS ラジカルに対する 3 種の抗酸化剤配合の効果[27]

**a**：次亜塩素酸( 10 mM)； **b**：水酸化ラジカル( 10 mM)； **c**：過酸化亜硝酸( 5 mM)

1：精製チキンエキス(5 mM)； 2：ビタミン C(5 mM)； 3：フェルラ酸(0.5 mM)； 4：3 種配合

### 2-3-3. DNA 分子の分解を指標とした生体内産生 ROS ラジカルに対するイミダゾールジペプチドの抗酸化活性の評価

#### 各種 ROS による DNA の分解作用

生体内で恒常的に産生される 4 種の主要な ROS、すなわち  $\text{ClO}\cdot$ 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{ONOO}\cdot$  および  $\text{H}_2\text{O}_2$  は、 $\lambda$ -phage DNA 分子を濃度依存的に分解する作用を示した。各 ROS の DNA 分解作用の強さを比較してみると、 $\text{ClO}\cdot$  は 0.2 mM、37 °C、60 分間で明らかな分解作用が認められ、2 mM では高分子の DNA が消失して、0.6 Kbp 以下の低分子に分解してしまう結果であった(図 2-5A)。次いで、 $\text{HO}\cdot$  は、1 mM 濃度、37 °C、60 分間の反応で DNA 分子が低分子に分解された(図 2-5B)。

$\text{ONOO}\cdot$  は 3 mM 濃度、37 °C、120 分間の反応で分解が観察され、4 mM 濃度で DNA 分子が分解消失した(図 2-5C)。 $\text{H}_2\text{O}_2$  の場合は、50 mM 濃度、37 °C、120 分間の反応で分解が認められ、200 mM 濃度まで濃度依存的に分解が進んだ(図 2-5D)。

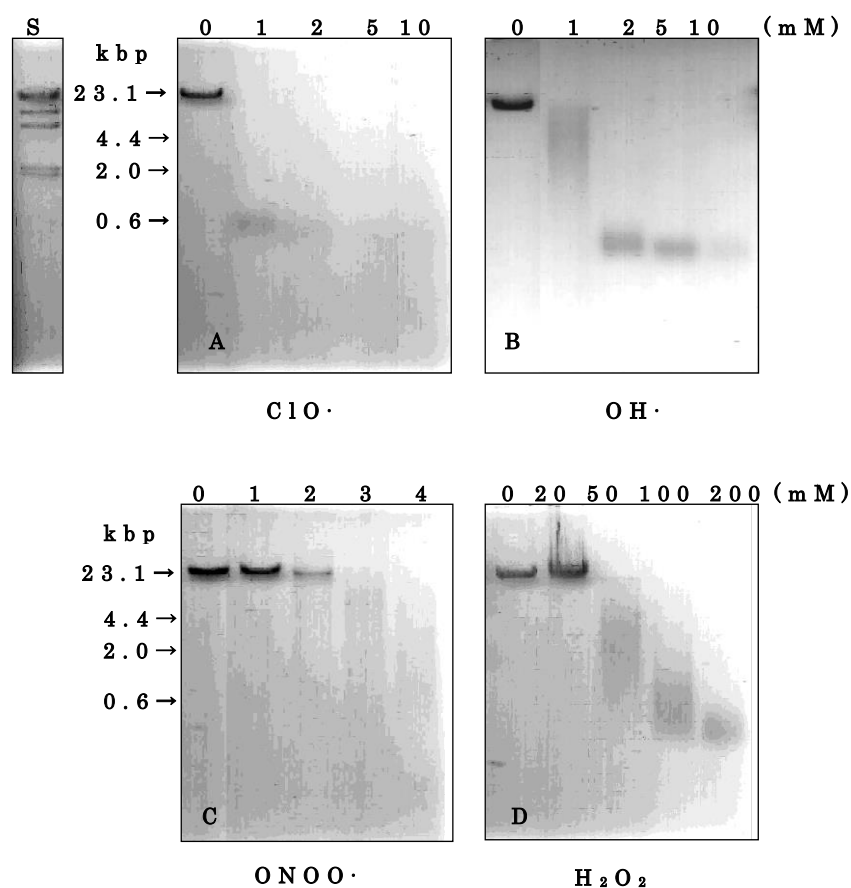


図 2-5. 各種 ROS ラジカルによる DNA 分子の分解作用[26]

ClO：次亜塩素酸；HO：水酸化ラジカル；ONOO：過酸化亜硝酸；H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>：過酸化水素；

(mM)は ROS ラジカルの濃度

### 各種 ROS の DNA 分解作用に対する天然抗酸化剤の効果の比較

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を除く 3 種の ROS ラジカル、すなわち ClO・、HO・および ONOO・を用いたタンパク質分解系の試験で、それぞれの ROS に対して最も強い抗酸化作用を示したチキンエキス由来の ACmix、フェルラ酸および V.C について、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む 4 種の ROS による DNA 分解作用に対する抑制効果を試験した。

ClO・(5 mM)による DNA 分解作用に対しては、タンパク質分解系と同様に ACmix そして V.C が抑制作用を示したが、フェルラ酸は抑制作用を示さなかった(図 2-6A)。

HO・(5 mM)による分解作用に対しては ACmix とフェルラ酸が強く抑制する作用を示したが、V.C はほとんど抑制しなかった(図 2-6B)。また、ONOO・の DNA 分解作用に対しては、V.C と ACmix は強く抑制したが、フェルラ酸は僅かに抑制する程度であった(図 2-6C)。タンパク質分解系では評価できなかった H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による DNA 分解作用では、ACmix が最も強く分解阻止作用を示し、次いでフェルラ酸も分解を抑制する作用を示したが、V.C は全く抑制作用を示さず、陽性対照よりさらに分解が亢進した状態になった(図 2-6D)。

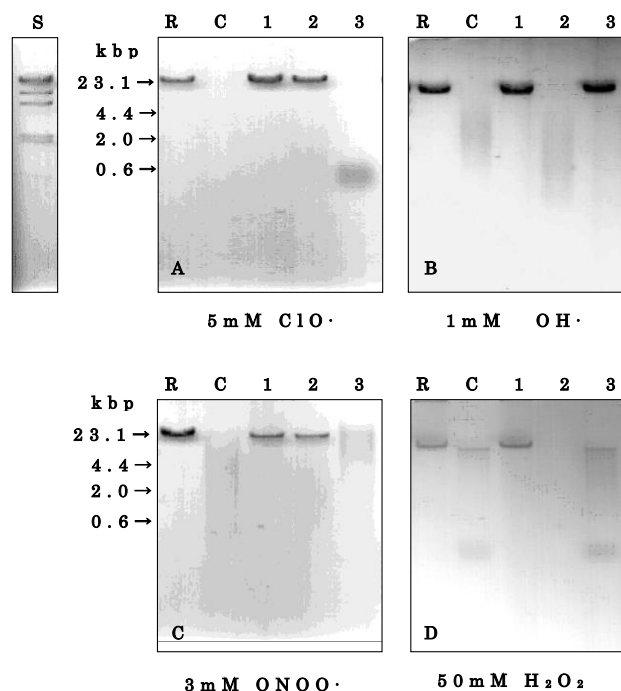


図 2-6.4 種の ROS ラジカルによる DNA 分解に対する抗酸化剤の阻止作用[26]

A:次亜塩素酸(5 mM)； B：水酸化ラジカル(1 mM)； C：過酸化亜硝酸(3 mM)； D：過酸化水素(50 mM)； R：未処理対照； C：抗酸化剤非添加対照； 1：精製チキンエキス(5 mM)； 2：ビタミンC(5 mM)； 3：フェルラ酸(0.5 mM)

### その他の天然抗酸化剤の ROS ラジカルによる DNA 分子分解に対する阻止作用

その他の天然抗酸化剤のこれら 4 種の ROS による DNA 分解作用に対する作用は、表 2-2 に示す通りであった。これら試験した抗酸化剤の作用は、ACmix、V.C、フェルラ酸と同様に、タンパク質分解阻止で観察された作用と同様な傾向をもって DNA 分解を阻止する作用を示した。すなわち、ACmix や GSH などのペプチドは  $\text{ClO}\cdot$  のタンパク質分解と同様に DNA 分解に対しても強い阻止作用を示し、一方、疎水性の抗酸化剤は  $\text{HO}\cdot$  による分解に対して顕著な阻止作用を示した。また、 $\text{ONOO}\cdot$  による DNA 分解に対しては V.C と ACmix 以外には抗酸化作用を示すものはなかった。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による DNA 分解作用に対しては、ACmix 以外では GSH が強い阻止作用を示し、次いで疎水性のアスタキサンチン、クロロゲン酸が抑制作用を示した。しかし、カテキンや CoQ10 などは、フェルラ酸と同様に阻止活性は示さなかった。

表 2-2. DNA 分子分解阻止法による天然抗酸化剤の 4 種の ROS ラジカルに対する抗酸化作用の比較[26]

Antioxidants		CIO radical	OH radical	ONOO radical	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Anserine-NO <sub>3</sub>	(5 mM)	+++	++	+	+++
Carnosine	(5 mM)	+++	—	—	+++
AC mix	(5 mM)	+++	++	++	+++
VC	(5 mM)	++	—	++	—
VE	(1 mM)	—	+	—	—
Coenzyme Q10	(1 mM)	—	++	—	—
Astaxanthin	(0.1 mM)	—	+++	—	++
Catechin	(0.5 mM)	+++	++	—	—
Chlorogenic acid	(0.5 mM)	+	++	—	+++
Ferulic Acid	(0.5 mM)	—	+++	—	—
Glutathione (GSH)	(2.5 mM)	+++	+	—	+++

DNA 分解阻止作用による抗酸化活性の程度は、23.1 Kbp の DNA 分子が完全に保たれている状態を+++、23.1 Kbp のバンドと 4.4 Kbp 以上のバンドが保持されている状態を++、2.0 Kbp 以上のスメア—があり分解対照より分解が抑えられている状態を+、2.0 Kbp 以下のバンドがあり、分解対照と同程度のものを—、分解対照(P)よりも分解が促進された状態を—と判定した。

## 2-4. 考 察

結果に示したように、従来の食品中の抗酸化活性を測定する方法で測定した場合、動物生体内に存在するイミダゾールジペプチドは抗酸化剤として機能しているとは言えないものであった。このことが、ROS ラジカル消去能を持つとされるイミダゾールジペプチドが有効な抗酸化剤として認知されず、消費者一般の中で殆んど知られることがなかった大きな原因ではないかと考えられた。

一方、イミダゾールジペプチドの抗酸化作用評価法として、Hipkiss ら[40, 41]はメチルグリオキサール、マロンジアルデヒドおよび次亜塩素酸をラジカルとして、それらのタンパク質修飾作用に対するカルノシンの保護作用の観点から試験している。その結果、カルノシンはこれら生体内で発生するラジカルのタンパク質修飾に対して強い抗酸化活性を持つことが示された。Hipkiss らが用いたカルノシン濃度 200 mM は生体内ではありえない高濃度であったが、この知見は、イミダゾールジペプチドは人工的に合成されたラジカル色素を消去できないことは事実だとしても、生体内で発生するラジカルに対する抗酸化作用は、従来法による測定では正確に定量できない可能性があることを示唆するものであった。これらのことから、著者らはイミダゾールジペプチドの抗酸化活性を正確に評価するためには、より生体内に近い条件での抗酸化活性測定が必要であると考え、より適切な測定法の開発を行うこととした。

生体内で恒常的に産生される ROS ラジカルの中で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はタンパク質分解作用が最も弱いものであった。最も強いタンパク質分解作用を示したのが CIO・であり、次いで ONOO・と HO・

であった。このことは細胞死や老化を促進する中心的な ROS ラジカルは、これら 3 種のものと推測される結果であった。従来の食品成分中の抗酸化活性を測定する DPPH 法、ORAC 法、あるいは AAPH 法で評価されたイミダゾールジペプチドの抗酸化活性は、ほとんど無いか、あっても極めて微弱なものと判断されてきたが、本研究で検討した生体内産生 ROS ラジカルを標的として測定する方法では、従来の評価とは際立って異なる結果であった。

上記のように、DPPH 法、ORAC 法、および AAPH 法ではイミダゾールジペプチドの抗酸化作用はカテキンや EGCG の数千分の 1 に過ぎなかったが、 $\text{ClO}\cdot$  に対する作用ではカテキンや EGCG よりも極めて強いタンパク質分解阻止作用を示すものであった。また、本研究で明らかになったことは、人工の合成色素ラジカルとは異なり、天然の抗酸化剤は標的となる ROS ラジカルがそれぞれ異なっていることである。この作用が特異的なものかどうかは不明であるが、イミダゾールジペプチドが  $\text{ClO}\cdot$  消去剤として抗酸化活性を有することは極めて重要な機能であると考えられた。さらに、すべての生体内産生 ROS ラジカルに対して均等に抗酸化作用を示す抗酸化剤は、本研究で試験した抗酸化剤の中にはなかったことが挙げられる。このことも天然抗酸化剤の抗酸化活性を理解するうえでは重要なことと考えられた。以上の結果をまとめると、表 2-3 の通りである。すなわち、水溶性のイミダゾールジペプチドとビタミン C は好中球が産生する  $\text{ClO}\cdot$  に対して強い抗酸化作用を持つが、 $\text{HO}\cdot$  に対しては極めて弱い抗酸化作用しか示さなかった。一方、植物由来の疎水性抗酸化剤は生理的濃度では  $\text{ClO}\cdot$  に対する抗酸化作用は極めて弱いものであったが、 $\text{HO}\cdot$  に対しては強い抗酸化活性を示すものであった。 $\text{ONOO}\cdot$  に対しては、イミダゾールジペプチドも植物由来の疎水性抗酸化剤は極めて弱い抗酸化活性であった。しかし、同じ植物由来でも水溶性の V.C は試験した抗酸化剤の中で  $\text{ONOO}\cdot$  に対して最も強い抗酸化作用を示すものであった。

表 2-3. 3 種の ROS ラジカルによるタンパク質分解を阻止する天然抗酸化剤の抗酸化活性[27]

Antioxidants		ClO radical	OH radical	ONOO radical
Anserine	(5 mM)	++	±	—
Carnosine	(5 mM)	++	—	—
AC mixture	(5 mM)	+++	±	—
VC	(5 mM)	++	—	+++
VE	(1 mM)	—	++	—
CoQ10	(1 mM)	—	+	±
Astaxanthin	(0.1 mM)	—	++	±
Catechin	(0.5 mM)	±	—	+
EGCG	(0.5 mM)	+	—	+
Chlorogenic acid	(0.5 mM)	—	±	—
Ferulic acid	(0.5 mM)	—	+++	+

デンストメーターで未処理タンパク質バンドを 100 %として、その分解を 80 %以上阻止したもの(+++), 60 %以上阻止したもの(++), 40 %以上阻止したもの(+), 20 %以上阻止したもの(±), 20 %未満のものを(—)として表した。

また、本研究の問題点として、試験した天然抗酸化剤の濃度が上げられる。ClO・に対するタンパク質分解阻止作用でいうと、本研究で試験したカテキンや EGCG などの疎水性抗酸化剤は強い抗酸化作用は示さなかったが、イミダゾールジペプチドや V.C と同じ 5 mM 濃度になると、それらと同等のタンパク質分解阻止作用を示すことである。しかし、疎水性抗酸化剤の血中濃度、すなわち生理的濃度は、たとえ 500 mg を超える量を経口摂取しても、最大で 50~100  $\mu$ M、すなわち 0.05~0.1 mM 水準である[42-44]。これに対してイミダゾールジペプチドや V.C の組織や血中濃度は 1~10 mM に達する。イミダゾールジペプチドの場合で言えば、エネルギー消費が多い骨格筋などの筋肉組織では 30 mM に達する[23]。

したがって、本研究で使用したイミダゾールジペプチド濃度は生理的な濃度の範囲に含まれるものであるが、疎水性抗酸化剤の濃度は生理的濃度の 5~10 倍程度、高濃度で試験したことになる。したがって、これら疎水性抗酸化剤の生理的濃度から評価すれば、ClO・に対しては抗酸化作用を期待できないことを示唆していると考えられた。また、生体内で恒常的に産生される ROS ラジカルは、すべて  $H_2O_2$  から派生するものであるが、本研究ではイミダゾールジペプチドや他の抗酸化剤の  $H_2O_2$  に対する抗酸化作用を確認することはできなかった。

活性酸素種(ROS)による細胞死の誘発が、生体の加齢に伴う老化現象を起こす原因であることが広く知れるようになってきているが、この ROS はヒトが外界から呼吸や食事として体内に取り込まれるものではなく、ヒトが生命維持のために行うエネルギー生産のための代謝や生体防御のための免疫機構の中で恒常的に生産されているものである。すなわち、呼吸により体内に取り込まれ



た酸素ガス( $O_2$ )がミトコンドリアの電子伝達系と接触することによりその一部が電子を供給されてスーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )と呼ばれる ROS が常に発生している[45]。そしてこの  $O_2^-$  を無毒化する酵素 superoxidedismutase により  $H_2O_2$  が生成され、ここから  $HO\cdot$ 、 $ClO\cdot$  および  $ONOO\cdot$  が生成される。 $H_2O_2$  を含めてこの 4 種の ROS ラジカルが常に生体内で産生されている(図 2-1 参照)。

これらの ROS ラジカルは、有害作用だけでなく、生体防御機構として重要な免疫反応の作動物質でもあり、また感染症や生体内の異常を伝達するシグナル機能を担っているものである[46, 47]。これは植物で観察された現象であるが、危険シグナルの伝達の中でも、 $H_2O_2$  が重要な分子として存在している。そして植物の各組織には ROS ラジカルを制御する機構があり、それを担う物質が抗酸化剤と考えられている。このことから、天然抗酸化剤と言えば植物に由来する V.C、V.E、ポリフェノール化合物、なかでもフラボノイド類やカロテノイド類があげられる。

ヒトなどの哺乳類では、細菌やウイルスの感染や異常細胞の発生、異物の侵入などが起きた場合に、最初に免疫細胞による対応反応が起こるが、その中心となるのが骨髓球由来の白血球である好中球(顆粒球)と単球(マクロファージ)である。これらの細胞が産生する ROS ラジカルを形成する物質が次亜塩素酸と過酸化亜硝酸である。これまでの報告では、ACmix を構成するイミダゾールジペプチドのカルノシンは金属キレート作用を持つことから[48]、 $H_2O_2$  が遷移金属イオンの触媒作用によって分解してできる  $HO\cdot$  (Fenton 反応)の産生を抑制する作用をもつとか、一重項酸素に対して抗酸化剤である[49]、あるいは  $HO\cdot$  に対して抗酸化作用を持つものの、 $ClO\cdot$  や  $H_2O_2$  に対する抗酸化作用はもたない[50]など、試験法の違いによりその抗酸化作用の評価は異なっていた。しかし、本研究の中で観察された好中球が産生する殺菌性 ROS ラジカルである次亜塩素酸に対して特異的に抗酸化作用を示すことは極めて重要であると考えられた。

本研究で行った 4 種の ROS による DNA 分解作用に対する阻止作用として各種天然抗酸化剤の抗酸化作用を評価する試験では、タンパク質分解阻止作用と同様な抗酸化活性として観察された。すなわち、動物組織に存在する親水性のイミダゾールジペプチドである ACmix は V.C と同様に  $ClO\cdot$  に対して強い抗酸化作用を示し、一方、 $HO\cdot$  に対しては植物に多く存在する疎水性のポリフェノール類が、そして  $ONOO\cdot$  に対しては水溶性の V.C が強い阻止作用を示した。そしてタンパク質分解阻止作用の試験では未検討であった生体産生 ROS の材料となる  $H_2O_2$  による DNA 分解作用に対して、イミダゾールジペプチドの ACmix が最も強い抗酸化作用を示すものであった。

また、タンパク質分解阻止作用試験で、 $ClO\cdot$  と  $ONOO\cdot$  に対して強い抗酸化作用を示した V.C は、 $H_2O_2$  と  $HO\cdot$  による DNA 分解に対して、阻止作用ではなく、むしろ分解を亢進させることが示唆される結果であった。一方、フェルラ酸はタンパク質分解阻止作用試験では、 $HO\cdot$  に対して強く抑制効果を示すポリフェノール類の抗酸化剤であったが、 $HO\cdot$  の DNA 分解作用に対してもほぼ同様の作用を持つことが示された。

4 種の ROS ラジカルによる DNA 分解作用に対する阻止作用として各種天然抗酸化剤の抗酸化活性をまとめて見ると(表 2-2)、試験した抗酸化剤の中で 4 種の ROS の DNA 分解作用を全て抑制することが可能であったものは、動物由来の抗酸化剤であるイミダゾールジペプチドの ACmix だけであった。そしてこの作用はタンパク質分解試験では  $ClO\cdot$  による分解作用に限定されるも

のであったが、DNA 分解阻止作用の場合は試験した 4 種の ROS ラジカルすべてに対して抑制作用を示したことは特筆されるべき作用と考えられた。

なお、本研究で得られた ACmix を構成するイミダゾールジペプチドの  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する抗酸化作用については、フェリチンと  $\text{H}_2\text{O}_2$  による脂質酸化反応の阻止作用[51]、スーパーオキシド無力化酵素である Cu,Zn-SOD の  $\text{H}_2\text{O}_2$  による分解の阻止作用[52]、などが報告されており、これらの知見は本研究で観察された ACmix の  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する直接的な抗酸化作用とも一致するものと考えられた。そして、生体内で産生される ROS の基となる  $\text{H}_2\text{O}_2$  は培養細胞での老化形質の誘導を直接促進することなども報告されており[53-55]、動物組織から抽出されるイミダゾールジペプチドはこの  $\text{H}_2\text{O}_2$  の有害作用を消去できる有効な抗酸化成分の一つであると考えられた。また、これらの作用以外に、イミダゾールジペプチドは抗酸化作用だけでなく、生体内酸化ストレスの原因になる炎症性サイトカイン IL-8 の分泌抑制作用[56]や最終糖化産物(AGEs)形成抑制作用[57]なども報告されており、ROS が関わる細胞死の誘発を防止し、健康な状態を維持する食品成分として、今後ますます重要になると思われる。

## 2-5. 結 論

食品中の抗酸化活性を測定するために一般に用いられている既存の方法では、イミダゾールジペプチドの抗酸化活性は殆んど観察されなかった。したがって、抗酸化剤としてのイミダゾールジペプチドの意義は注目されてこなかった。本研究では従来の抗酸化活性測定法に代えて、生体内産生 ROS ラジカルを標的とする抗酸化活性測定法を開発して、イミダゾールジペプチドの抗酸化作用を定量的に測定する方法を開発してきた。その結果、生体内産生 ROS ラジカルによるタンパク質分子と DNA 分子の分解作用を阻止する活性としてイミダゾールジペプチドの抗酸化活性を測定することが可能であった。イミダゾールジペプチドは ROS ラジカルのタンパク質分解作用に対して、 $\text{HO}\cdot$  と  $\text{ONOO}\cdot$  による分解には殆んど阻止作用を示さなかったが、 $\text{ClO}\cdot$  による分解に対して特異的に抑制する活性を示した。すなわち、 $\text{HClO}$  ラジカルスキャベンジャーとしての抗酸化作用が確認された。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む 4 種の ROS ラジカルによる DNA 分子の分解作用では、イミダゾールジペプチドは全ての ROS ラジカルによる分解を強く抑制することが確認された。これらのことから、生体内で発生する ROS ラジカルによる生体成分の傷害に起因する細胞障害や細胞死を防止する上で、イミダゾールジペプチドが極めて重要な抗酸化活性をもつ生体分子であると考えられた。

### 第3章 イミダゾールジペプチドの生理機能の探索試験<sup>[58, 59]</sup>

#### 3-1. 緒 言

前章の試験において、イミダゾールジペプチドは人工的に調製されたラジカルでの抗酸化活性は極めて微弱であるものの、生体内産生 ROS ラジカルに対してイミダゾールジペプチドはその生理的濃度において抗酸化作用を示すことが確認された。特に、免疫系で作用する HClO ラジカルに対して強い抗酸化活性を示すものであった。

イミダゾールジペプチドの抗酸化活性以外の機能性に関して、これまで様々な作用が報告されてきたが<sup>[12-14]</sup>、Boldyrev らの研究による神経保護作用<sup>[60]</sup>や認知症とも深いかわりを持つ ROS ラジカルによるタンパク質変性や糖とタンパク質が結合してできる最終糖化産物(AGEs)の形成阻害作用<sup>[16]</sup>に注目して、健康機能の探索を行った。その理由は、高齢化が進む我が国において、ROS の酸化ストレスに起因する神経細胞や組織の傷害による認知機能の低下(認知症)、さらに加齢に伴う生体組織の老化および心臓血管系の障害など、医療や介護が必要となるこれらの疾患を予防できる食品素材が極めて重要になっているからである。

アミロイド-βの蓄積によって起こるとされるアルツハイマー型認知症の場合は、アミロイド-βが脳組織内に蓄積することにより、炎症反応が起こり、神経細胞死が誘導されることに起因すると言われている<sup>[61]</sup>。炎症反応の中では免疫系の細胞で産生される ROS ラジカルも深く関与するので、イミダゾールジペプチドが異物の蓄積による炎症反応で誘発される神経細胞死を抑制する作用を有するかどうかの確認試験が先行研究として行われた(Appendix 1)。アミロイド-β前駆タンパク質遺伝子を導入したラット神経細胞はアミロイド-βの蓄積により細胞死がおこる。この細胞へ試薬のアンセリンやカルノシンと同様に、チキンエキス由来イミダゾールジペプチドを添加するとアミロイド-β過剰発現による神経細胞死が顕著に抑制されることが確認された。

本研究では、さらに、ショウジョウバエの実験系を用いて酸化ストレスによる寿命の短縮に対してチキンエキス由来イミダゾールジペプチドが延命効果を持つかどうか、また、心臓血管系の障害を起こす原因となる生体内血小板刺激因子による血小板凝集に対して、抗酸化剤としての影響や凝集抑制作用をもつかどうかを、ヒトとウサギ血小板を用いて試験した。

生体内産生 ROS ラジカルの酸化ストレス作用を消去する抗酸化剤を摂取することが、老化の進展を遅らせ、また生活習慣病などの疾病を予防してヒトの寿命を延伸することが期待されている。しかし、寿命に関わる抗酸化剤の効果を評価するためには長期間が必要であり、マウスなどの動物実験でも数年にわたることが多い。そこで、動物の一生に関わる効果の確認試験などでは、ヒトとの相関性を有する寿命の短い線虫(*Caenorhabditis elegans*)やショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)などの昆虫が利用されるようになっている。本研究では、ショウジョウバエを用いてチキンエキス由来のアンセリン-カルノシンを摂食させて、ショウジョウバエ体内の遊離アミノ酸(FAA)組成に及ぼす影響と過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による酸化ストレスを受けた時の寿命に及ぼす効果について試験した。

本研究で用いたショウジョウバエは、ヒトの栄養調節機構や疾患の分子機構を解明するために利用されているものであり、これまで多くのことが解明されてきている[62, 63]。また、多細胞生物における生体内遊離アミノ酸(FAA)組成と疾患との関係やその詳細の多くが不明のままであるが、ショウジョウバエはその解明のために有効である。例えば、血しょう FAA 組成はガンによる影響をうけること[64]、神経系の FAA 組成や濃度変化は生理的に大きな意義を持っており[65]、その FAA 代謝の変化がアルツハイマー病における神経変性の早期指標ともなっている[66-68]。

これまでにショウジョウバエ幼虫の FAA 組成に影響を及ぼす食物成分としてヒドロキシプロリン[69]と尿素[70]の摂取による影響が報告されている。しかし、野生型ショウジョウバエ成虫[71]とオリーブミバエ(*Dacus oleae*) [72]の FAA 含量とプテリジン含量について報告されているものの、実験室系統ショウジョウバエ成虫についての所見はまだ報告されていない。また、タウリン、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)、および種々のジペプチドなどのアミノ酸の代謝物とその生成物(AAMPs, amino acid metabolites and products)は生理活性物質として有益であるが[73-77]、これらの情報は得られていなかった。

本研究では、イミダゾールジペプチドと対照のジペプチドとしてグリシル-グリシン(Glycylglycine)を実験室系統ショウジョウバエ成虫に補給して、その FAA 組成に及ぼす影響と AAMPs について調べた。さらに、食餌中に  $H_2O_2$  を添加して酸化ストレスを加えると、ショウジョウバエの寿命が短縮するが、この酸化ストレス下の寿命延伸に及ぼすチキンエキス由来イミダゾールジペプチドの寿命延伸効果の有無を試験した。

タマネギに含有されるフラボノイド化合物であるケルセチンは水酸化ラジカルを強く抑制する抗酸化作用を持ち、野菜や果物、お茶、ワインなど多くの食品中に含まれており、イミダゾールジペプチドと同様に食事として摂取される重要な抗酸化物質の 1 つである[78]。そしてケルセチンの摂取は、介入研究および観察研究の両方において心血管疾患のリスク低下、低密度リポタンパク質(LDL)の低下、収縮期および拡張期血圧の低下、虚血性心疾患のリスクの低下とも関連していることが報告されている[79, 80]。

これらの作用はイミダゾールジペプチドのヒト試験(4 章)でも観察された健康機能性と類似していることから、本研究では抗酸化活性と血小板凝集抑制作用との間に関連性があるか、そしてイミダゾールジペプチドがヒトの血小板凝集に及ぼす効果の有無について検討を行った。この試験では、ケルセチンが、*in vitro* および *ex vivo* での試験において、血小板凝集の抑制を伴う抗血小板作用を有することが報告されているので[81, 82]、この試験系を用いてケルセチンアグリコン、ケルセチン含有タマネギエキスなどと比較した。

なお、血栓症について簡単に要約すると、血管内での血栓形成は心筋梗塞、アテローム性動脈硬化、虚血および脳卒中につながる重大な問題を引き起こす健康障害である[83]。血小板は、止血と血栓形成で重要な役割を果たしているが[84]、例えば、血管表面に酸化傷害が起これば、その損傷部位では、コラーゲン、アデノシン二リン酸(ADP)およびトロンビンなどのアゴニストが発生して血小板の活性化が起こり、血小板の形状変化と顆粒放出に相俟ってカルシウムイオン濃度の増加が加わり、血小板の凝集が促進されて血栓が形成されるのである[85]。この血小板凝集に対する各種天然エキスの作用を評価する実験系を確立し、水酸化ラジカル消去剤としてのケル

セチンや次亜塩素酸消去剤としてのイミダゾールジペプチド、および過酸化亜硝酸消去剤としてのアスコルビン酸などの天然抗酸化剤による血小板凝集に及ぼす影響について試験した。

## 3-2. 実験材料および方法

### 3-2-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響

#### ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエの多くが変異株の前駆体であるために実験対照として頻繁に使用される実験室株 *w<sup>1118</sup>* を用いて、標準的な実験室食(0.3 (v/v)%のプロピオン酸および 0.35 (v/v)%のブチル *p*-ヒドロキシ安息香酸を抗真菌剤として添加した 10 (w/v)% グルコース、7 (w/v)% コーンミール、4 (w/v)% 酵母エキス、および 0.55 (w/v)% 寒天を含有した培地、以下、SF 食と略記)で飼育した。次に、新たに羽化した各性別の成虫それぞれを 5 日間飼育し、ハエ全身の FAA、AAMPs およびジペプチドの各含量をアミノ酸自動分析計(日立、L-8900 型)で測定した。

#### イミダゾールジペプチドの補給

グリシルーグリシン(グリシン残基 2 つの単純ジペプチド)またはイミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン)を補給した各 SF 食(以下、GG 食および AC 食と略記)でハエを飼育した場合の FAA や AAMPs、ジペプチドの含量が変化するかどうかを試験した。すなわち、0.4 (w/v)% グリシルーグリシンまたは 0.4 (w/v)% チキンエキス由来イミダゾールジペプチド(アンセリン：カルノシン = 3 : 1 の混合物)を SF にそれぞれ添加した GG 食または AC 食を各バイアルに調製し、新たに羽化し雌雄別に分離した *w<sup>1118</sup>* 成虫を各バイアル(20 匹/バイアル)に入れて 5 日間飼育した。次に、5 日齢の成虫 10 匹当りの湿重量を測定し、PBS で 2 回洗浄した後、これらを 2.5 (w/v)% トリクロロ酢酸中でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルを Chromatodisc フィルター(GL サイエンス、東京)でろ過し、アミノ酸自動分析計(日立、L-8900)で分析した。データは全て平均±SD で示した。

#### イミダゾールジペプチドのショウジョウバエの寿命に及ぼす影響

イミダゾールジペプチドをショウジョウバエに摂取させたときに寿命が変化するかどうかを調べた。対照食は、固体培地(1.3 (w/v)% スクロース、1 (w/v)% 寒天)に 0.5 (w/v)% 過酸化水素を添加したものとし、試験食は、本対照食にさらに 0.4 (w/v)% グリシルーグリシンまたは 0.4 (w/v)% アンセリン・カルノシン、0.04 (w/v)% アンセリン・カルノシンのいずれかを添加したものとした。新たに羽化し雌雄別に分離した *w<sup>1118</sup>* 成虫を各バイアル(20 匹/バイアル)に入れて飼育し、生存したハエは 2 日毎に新鮮なバイアルに移した。なお、本寿命試験では試験区として、雌雄それぞれ 60 匹以上のハエの生存率を調べた。

#### 統計解析

統計解析は一元配置 ANOVA で行い、Dunnnett の比較検定で群間比較を行った。p < 0.05 の値

は統計的に有意とした。

### 3-2-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について

#### 試薬類

ケルセチン二水和物(アグリコン)、ルチン、アセチルサリチル酸(アスピリン)、フィブリノーゲン、エピガロカテキンガレート(EGCG)、シクロアリン、アリン、カルノシン、アスコルビン酸、そしてフェルラ酸は富士フイルム和光純薬(株)より購入した。ケルセチン 4'-モノグルコシド、ケルセチン 3,4'-ジグルコシドおよび PAF はフナコシ(株)より購入した。ケルセチン 3-グルクロニド(ケルセチン抱合体)およびアデノシン-5'-二リン酸(ADP)はシグマ・アルドリッチジャパンより購入し、トロンビンは持田製薬(株)より、Ficoll-Paque PLUS は GE ヘルスケア・ジャパン(株)より購入した。試験に使用したその他の試薬類は試薬特級を用いた。

また、天然エキスは、チキンエキス由来の精製イミダゾールジペプチドとケルセチン 7 %および 25 %含有市販タマネギ外皮エキス(東海物産(株)製)を用いた。

#### 血小板の調製

ウサギの動脈血およびヒトの静脈血を試験に用いた。なお、ウサギの採血に際しては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」を遵守して行った。また、ヒトの採血に際しては、ヘルシンキ宣言に基づく東海物産株式会社ヒト試験に関わる倫理規定に従い、倫理委員会の承認を取得して行った(承認番号 2015-01)。採血は 1 カ月以上医薬品の摂取をしていない健康な提供者 5 名(男性 2 名、女性 3 名、平均年齢 43±9 才)からインフォームドコンセントを取得した後に実施した。採血日の食事などについては、特に制限せず、平常の食生活の状態で行った。

洗浄血小板は、Sugatani ら[86]の方法に準じて調製した。具体的には、採血した血液 45 mL に対して、5 mL のクエン酸グルコース溶液(65 mM クエン酸、85 mM クエン酸 3 ナトリウム、110 mM グルコース)を加えて、170×g で室温 10 分間遠心分離した。得られた上清に等量の HEPES 緩衝液(4.2 mM HEPES, 2.6 mM KCl, 137 mM NaCl, 5.6 mM グルコース, pH 7.4)を加えて転倒混合した後、本液 20 mL に対して 10 mL の Ficoll-Paque PLUS 上に重層し、750×g で 20 分間遠心分離した。血小板層を回収した後、HEPES 緩衝液で穏やかに 2 回洗浄し、得られたペレット(血小板)を 0.1 mM EDTA 含有 Tyrode-ゼラチン緩衝液(137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM グルコース, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.25 % ゼラチン, pH 6.5)に懸濁して 1×10<sup>9</sup> 個/mL に調整した。

#### 血小板凝集抑制作用の測定方法

被験試料とした試薬類は、濃度が 20 mM となるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、0.45 μm フィルターでろ過した。なお、血小板凝集抑制試験では、最終濃度が 100 μM になるように添加した。

血小板凝集活性の測定は、アグリゴメーター((株)タイヨウ製 PRP313M)を用いる比濁法で実施した。すなわち、1 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 Tyrode-ゼラチン緩衝液(pH 7.2) 300 μL、血小板懸濁液(1×10<sup>9</sup>

血小板/mL) 100  $\mu$ L および被験試料(または対照 DMSO) 2  $\mu$ L をキュベットに入れ、アグリゴメーター内にて攪拌しながら、37  $^{\circ}$ C で 1 分間保温し、ついで血小板刺激物質溶液 5  $\mu$ L を加えて、濁度の上昇として誘導される凝集を 10 分間記録した。なお、血小板凝集を誘導する血小板刺激剤の作用濃度がウサギとヒトでは異なるので、予めそれぞれの血小板の凝集に必要、かつ十分量になる各刺激剤の最低添加量を確認して、その濃度を用いた(詳細は結果に示した)。また、血小板刺激剤添加後の 10 分間に起こる凝集に対して添加試料が抑制する血小板凝集抑制率は次式により求めた。各試料の血小板凝集抑制率は 3 回測定値の平均値とした。

$$\text{血小板凝集抑制率} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

( $A_0$ : 溶媒 DMSO 添加対照の透過率、 $A_s$ : 試料添加の透過率)

### 統計解析

ウサギ血小板を用いた試験は 3 回測定を行った。ヒト血小板を用いた試験は被験者 5 名の血小板凝集抑制率の平均 $\pm$ 標準誤差として示した。統計解析は、統計解析ソフト EZR (version 1.41、自治医科大学)を用いて、一元配置分散分析に続いて Tukey 法による多重比較試験で行なった。いずれの場合も  $p$  値が 0.05 未満を統計的に有意とした。

## 3-3. 実験結果

### 3-3-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響

#### 全身の遊離アミノ酸、AMPP、およびジペプチドの分布

結果を図 3-1 に示す。SF で 5 日間飼育後、24 時間絶食させたハエ成虫の FAA、AAMPs およびジペプチドの含量を測定したところ、絶食させていない 5 日齢成虫とほぼ同じであることが判明した。消化吸収された SF 由来のアミノ酸は体内の FAA、AAMPs、ジペプチドの各含量に影響を与えられたが、SF はこれら含量にほとんど影響を与えなかった。また、SF のこれら各含量も測定したが、5 日齢成虫のものとは異なっていた。

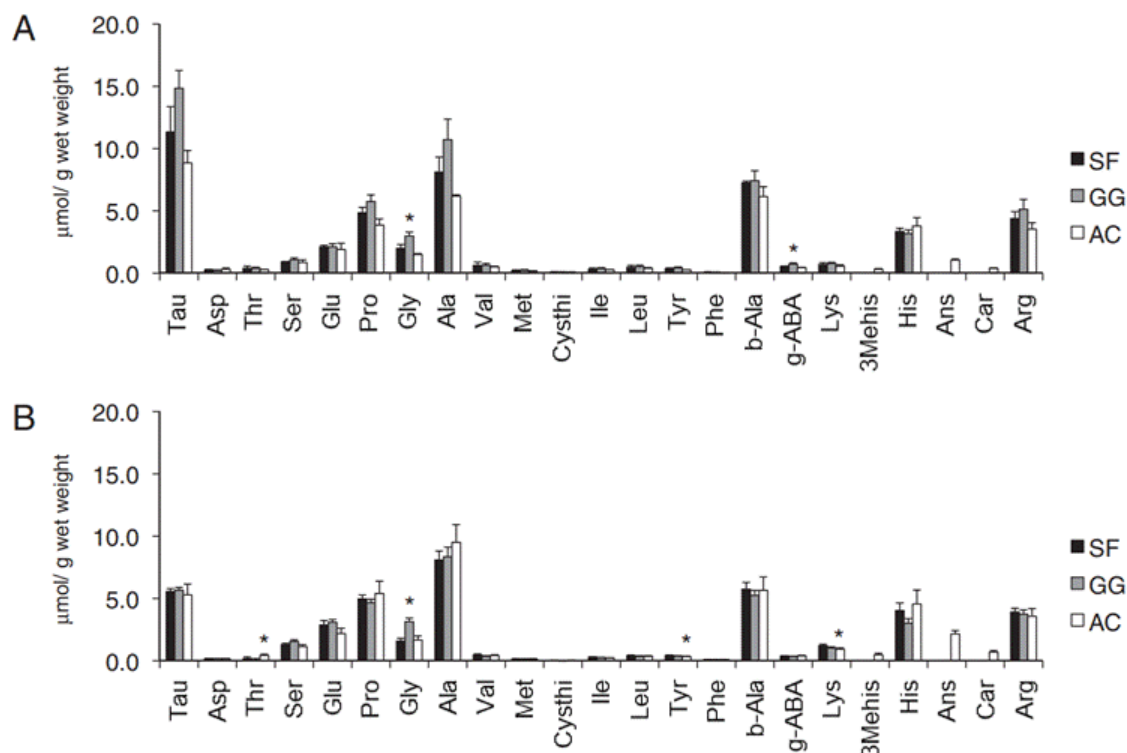


図 3-1. 標準食およびジペプチド富化食で飼育したキイロショウジョウバエ成虫の遊離アミノ酸含量プロフィール(A: 雄、B: 雌) [58]

SF: 標準食、GG: 0.4 (w/v)% グリシルーグリシン含有標準食、AC: 0.4 (w/v)% アンセリン・カルノシン(3:1)含有標準食。ハエ 10 匹ずつの 3 群。データは平均±SD。有意差( $p < 0.05$ )はアスタリスクで表示。

これらの結果から、SF で飼育した 5 日齢ショウジョウバエ成虫の全身で検出された FAA、AAMPs、およびジペプチドの各含量はショウジョウバエ成虫全身中の本来の含量であり、エサの一部などが混入したものではないことが示唆された。また、SF で飼育した 5 日齢ショウジョウバエ成虫の全体で検出された FAA、AAMPs、およびジペプチドの各含量として豊富なものは、タウリン(雄 23 %、雌 13 %)、プロリン(雄 10 %、雌 12 %)、アラニン 5 % (雄 17 %、雌 19 %)、 $\beta$ -アラニン(雄 15 %、雌 14 %)、ヒスチジン(雄 7 %、雌 10 %)、アルギニン(雌雄ともに 9 %)であり、カイコ(*Bombyx mori*)の報告値と同様であった[87]。したがって、これらアミノ酸はショウジョウバエ *w<sup>1118</sup>* 成虫の主要な FAA の構成成分であることが示唆された。

さらに、 $\beta$ -アラニン( $p < 0.01$ )とタウリン( $p < 0.05$ )を除くと、雄雌の FAA 含量に有意差は認められなかった。タウリン含量では雄が雌より 2 倍高値であった(雄雌それぞれ 11.33、5.57  $\mu\text{mol/g}$  湿重量)。一方、SF や GG を摂食した雌では、FAA、AAMPs およびジペプチドの総量はほぼ同じであったが(SF: 41.87、GG: 41.68  $\mu\text{mol/g}$  湿重量)、雄は総量が高く(SF: 48.3、GG: 57.74  $\mu\text{mol/g}$  湿重量)、数種の FAA は GG を摂取した雄(グリシンと GABA、 $p < 0.05$ 、図 3-1A)と雌(グリシン、 $p < 0.05$ 、図 3-1B)で有意に高かった。GG を摂取した雄雌のグリシン濃度の増加は、おそらく GG の消化産物を表していたと推測された。



### ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールペプチドの影響

ショウジョウバエの餌となる固体培地に 0.5 (w/v)% 過酸化水素を予め添加することにより酸化ストレス状態とした条件下で、イミダゾールジペプチドをショウジョウバエに摂取させたときに寿命が変化するかどうかを調べた。

対照食群のハエの平均寿命は、雌雄それぞれで  $83.3 \pm 17.4$  時間、 $99.8 \pm 22.7$  時間であった(図 3-2)。これに対して、0.4 (w/v)% グリシルーグリシン添加食群の平均寿命は雌雄ともに対照食群に比べて有意に低下した(雌雄それぞれ  $78.8 \pm 15.6$  時間、 $84.8 \pm 15.1$  時間)。一方、0.4 (w/v)% アンセリン・カルノシン添加食群の平均寿命は対照食群に比べて延長する傾向を示した。雄の場合は、対照食と比較してイミダゾールジペプチド添加群では統計的有意差は認められなかったが、延長する傾向を示した。しかし雌の場合では対照食と比較して、統計的に有意に延長する効果が認められた( $99.8 \pm 22.7$  時間 vs  $108.0 \pm 20.4$  時間、 $p < 0.05$ )。

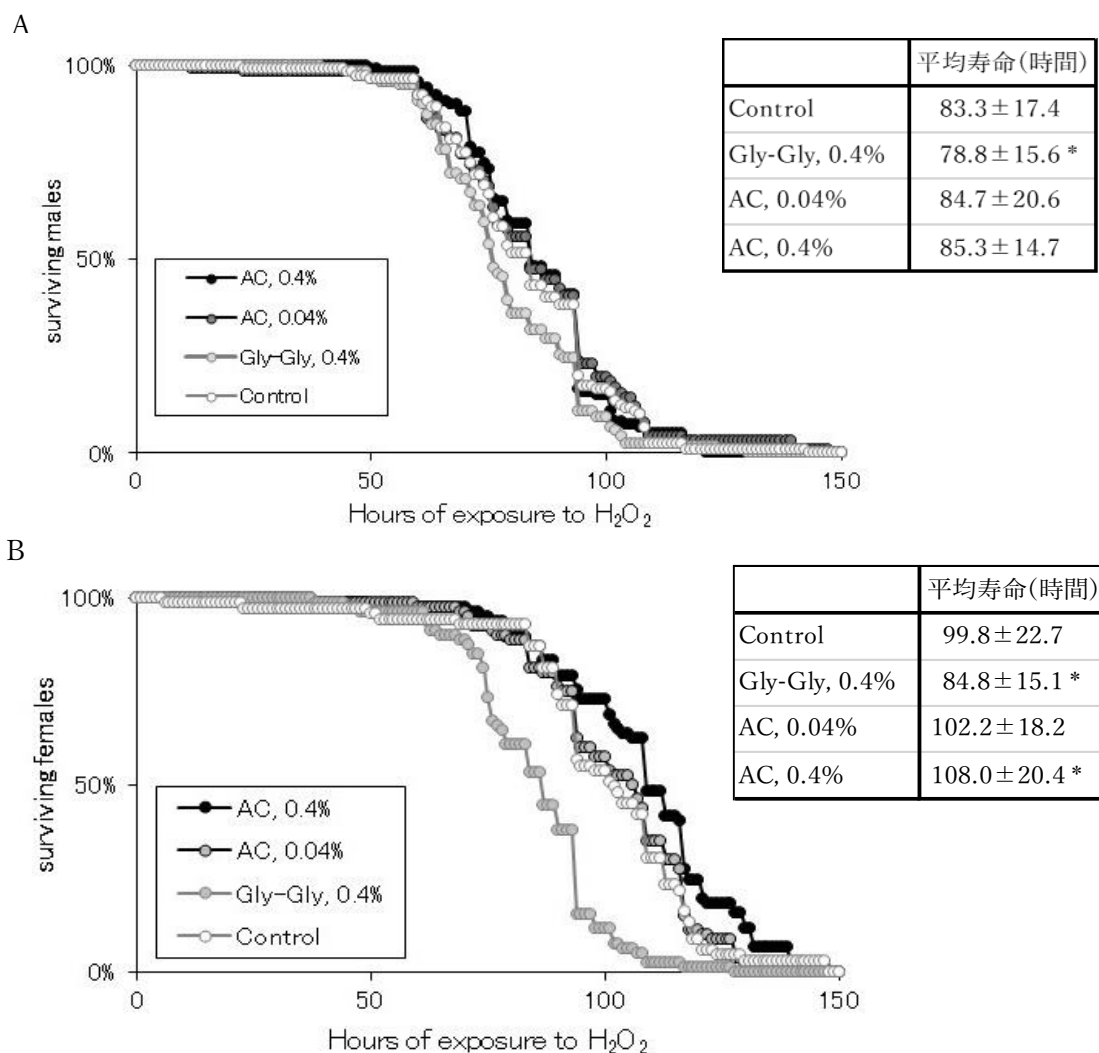


図 3-2. 酸化ストレス状態下でのハエ成虫の寿命に対するイミダゾールジペプチドの効果  
(A) 雄、(B) 雌それぞれの生存曲線および平均寿命

(未発表データ)

以上の結果から、過酸化水素を添加した食事を摂取させてショウジョウバエに酸化ストレスを加えた場合、イミダゾールジペプチドはそれを軽減し、その寿命を延長させることが観察された。この作用は恒常的に生体内産生 ROS ストレスにさらされているヒトの場合に置き換えてみれば、ヒトにおいてもその寿命、特に健康寿命の延伸が期待できる可能性を示すものであった。

### 3-3-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について

#### 血小板凝集を誘導する血小板刺激剤の添加条件の検討

血小板の凝集を誘導するに必要かつ十分な刺激剤 3 種類(ADP、PAF、トロンビン)の最低添加濃度を設定した。ウサギの洗浄血小板を凝集させる刺激剤の濃度は、ADP、PAF、トロンビンそれぞれで 10  $\mu$ M、25 nM、0.03 U/mL であった。一方、ヒトの洗浄血小板ではこれらの濃度では凝集が起こらなかったため、各刺激剤の添加濃度をそれぞれウサギの 10 倍量、100 倍量、および 3 倍量とした。しかし、ADP と PAF ではこの濃度でも凝集は不十分であった。そこで、0.05 %濃度になるようにフィブリノーゲンを予め添加したところ、ヒト血小板の凝集が観察された。フィブリノーゲンを加えて設定したこれらの血小板刺激剤の濃度では、試験した 5 名の提供者全員の洗浄血小板の凝集程度に違いは見られなかった。したがって、この刺激剤の条件でヒト血小板での試験を行うこととした(表 3-1)。

表 3-1. 血小板凝集に用いた刺激剤と添加濃度(最終濃度) [59]

	ウサギ	ヒト
ADP	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M (+フィブリノーゲン*)
PAF	0.25 nM	25 nM (+フィブリノーゲン*)
トロンビン	0.03 U/mL	0.1 U/mL

\* フィブリノーゲンは、刺激剤添加前に予め 0.05 %濃度で加えた

#### ケルセチンおよびその関連物質とタマネギ外皮エキスの血小板凝集阻止作用

タマネギ外皮エキスの血小板凝集抑制作用を評価するために、本エキスの成分であるアグリコンのケルセチン、およびケルセチン 4'-モノグルコシド(配糖体と略記)の各試薬のほかにトロンボキサン A2 阻害剤として知られる血小板凝集抑制作用をもつアスピリンとケルセチンの主要な抱合体の一つであるケルセチン 3-グルクロニド(抱合体と略記)、そしてケルセチンと同じフラボノールの配糖体であるルチンについても試験した。

3 種の刺激因子、すなわちアデノシン - 2 - リン酸(ADP)、血小板活性化因子(PAF)、およびトロンビンで刺激したヒト血小板凝集に及ぼすこれらの抗酸化剤の作用は、ケルセチンを 25 %と 7 %に含むタマネギエキスと試薬ケルセチンが最も強く、ケルセチンの配糖体や抱合体になるとその作用は減弱するものであった(図 3-3)。配糖体と抱合体を比較すると、抱合体のほうが PAF やトロンビンの刺激による血小板凝集抑制作用を保持していたが、配糖体ではその作用が弱いものであった。このことは、ケルセチン配糖体であるルチンでも同じ傾向を示すものであった。

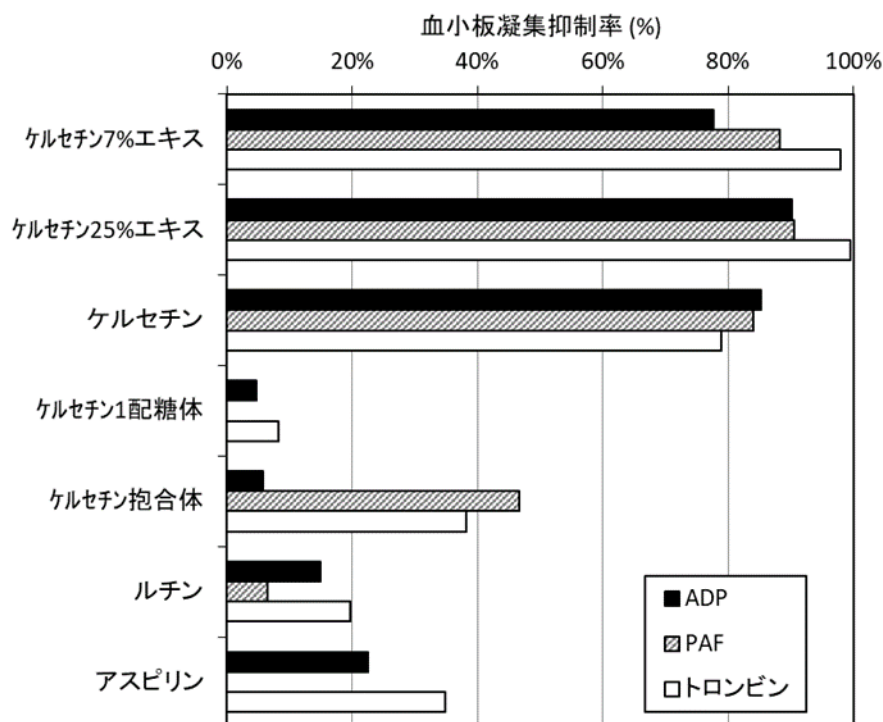


図 3-3. 3 種の刺激剤によるヒト血小板凝集に対するケルセチンおよびその関連物質の抑制作用  
(日本食品科学工学会から許可を受け、文献[59]内に記載の図を改変して転載)

### イミダゾールジペプチドおよび天然抗酸化剤のウサギ血小板凝集に及ぼす影響

食品中に含まれるイミダゾールジペプチドを含む各種天然抗酸化剤の血小板凝集抑制作用について試験した。ケルセチンと同様にタマネギやニンニクに含有されるシクロアリインやアリインはいずれもアミノ酸のシステインから生合成されるものであり、米糠油のフェルラ酸、お茶のエピガロカテキンガレート(EGCG)などと同様に水酸化ラジカルに対して抗酸化作用を持っている。また、アスコルビン酸(ビタミン C)は過酸化亜硝酸に対して強い抗酸化作用を持っている。そしてイミダゾールジペプチドのカルノシンは次亜塩素酸に対して強い抗酸化作用を持っている。これら標的の活性酸素種が異なる抗酸化剤の血小板凝集に及ぼす影響を試験した。

試験した天然抗酸化剤のうち、ケルセチンと同類のフラボノイド化合物である EGCG は、ADP 刺激による血小板凝集に対して極めて強い阻止作用を示した。また、アリインが環状化したシクロアリインはアリインよりも強く血小板凝集阻止作用を示した。これに対して、ヒスチジン環を有するイミダゾールジペプチドのカルノシンには血小板凝集阻止作用は全く認められず、アスコルビン酸およびフェルラ酸の血小板凝集抑制作用も極めて弱いものであった(図 3-4)。

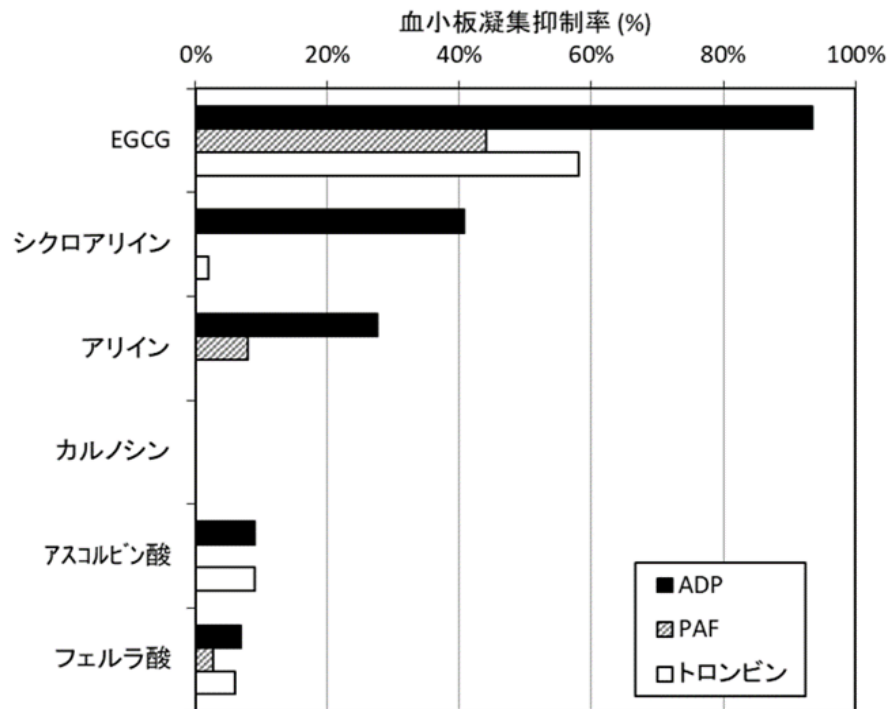


図 3-4. 3 種の刺激因子で誘発したウサギ血小板凝集に対する天然抗酸化剤  
(未発表データ)

### 3-4. 考 察

#### 3-4-1. ショウジョウバエの寿命に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響

アンセリン( $\beta$ -アラニンと 3-メチル-L-ヒスチジンで構成)とカルノシン( $\beta$ -アラニンと L-ヒスチジンで構成)は、哺乳動物や家禽、魚の筋肉組織に豊富に存在しているものである。本研究で行った SF や GG で飼育したハエ成虫では、これらのジペプチドも 3-メチルヒスチジンも検出されなかった。しかし、AC で飼育したハエでは、アンセリンとカルノシンの両方が検出され、既報[88]のカルノシンを給餌したハエ成虫でのカルノシン含量と一致するものであった。このことから、通常条件下で飼育されたショウジョウバエは、哺乳動物や家禽、魚とは異なり、アンセリンとカルノシンを含有しないことが確認された。また、雌成虫のアンセリンおよびカルノシンの濃度は、 $2.85 \mu\text{mol/g}$  湿重量であり、雄の 2 倍であった( $1.44 \mu\text{mol/g}$  湿重量)。

一方、アンセリン、カルノシンおよび 3-メチルヒスチジンは、AC で 5 日間飼育後、24 時間絶食した成体で検出されなかったことから、アンセリンとカルノシンは消化後すぐに排泄されることが示唆された。AC を摂取した成体雌では、SF を摂取した雌と比較して、プロリン、アラニン、およびヒスチジンの含量が増加する傾向が観察された(図 3-1B)。さらに、プロリンとアラニンの増加傾向は GG を摂食した成体雄でも認められている(図 3-1A)。このプロリンとアラニンはグルコースに変換され得る糖原性アミノ酸であることから[89]、グルコース恒常性に関与するいくつかのジペプチドが元々存在していた可能性も示唆している。また、AC を摂取した雄雌では、アン

セリンだけでなく、アンセリン構成成分の 3-メチルヒスチジンも検出された。アンセリンやカルノシン濃度と同様に、雌の 3-メチルヒスチジン濃度は雄の 1.5 倍であり(雌雄それぞれ 0.31、0.48  $\mu\text{mol/g}$  湿重量)、ショウジョウバエはアンセリンを消化するジペプチダーゼ活性を有していることが示唆された。

要約すると、本研究は、通常条件下で飼育したショウジョウバエ実験室株 *w<sup>1118</sup>* 成虫の FAA、AAMPs およびジペプチドの各含量を測定した最新の報告である。これらの含量はエサへ添加したジペプチドに応答して変化しうる可能性を示すものである。そして、イミダゾールジペプチドのアンセリンとカルノシンは、ショウジョウバエがこれらの物質を含む餌を与えられた場合にのみ検出可能であることから、ショウジョウバエはアンセリンとカルノシンを生合成することができないことを示唆している。

ハエにアンセリンを摂取させた場合には、アンセリン構成成分の 3-メチルヒスチジンも検出されていることから、ショウジョウバエ成虫はアンセリンやカルノシンを吸収・消化してモノアミノ酸を産生する能力を有することが示唆される。本研究の結果から、通常条件で飼育されたショウジョウバエはアンセリンを有さないものの、アンセリンジペプチダーゼを有することが強く示唆されるものであった。

過酸化水素を含有する食餌により酸化ストレスを与えたショウジョウバエモデルは、生体内で恒常的に産生される活性酸素種ラジカルにより酸化ストレスを受けるヒトのモデルと考えることが可能である。イミダゾールジペプチドは第 2 章で述べたように、遺伝子 DNA 分子を切断する過酸化水素に対して、その切断を抑制する活性が強いことが確認されている。したがって、食餌に添加された過酸化水素をイミダゾールジペプチドが消去する作用を通して、酸化ストレスを軽減するためにショウジョウバエの寿命が延長する傾向を示したと推測される。

一方、イミダゾールジペプチドと同じジペプチドであるグリシル-グリシンがショウジョウバエの雌雄で寿命を短縮させる結果であった。興味深い知見であるが、その理由は不明である。その原因について、イミダゾールジペプチドと対比しながら検討すべき課題であると考えられた。

### 3-4-2. イミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす影響について

健康寿命を短縮する生活習慣病の二大原因として、認知症と脳血管障害がある。前者は生体内で産生される ROS ラジカルによって神経細胞が傷害されることであり、後者は脂質代謝異常症に加えて ROS ラジカルによる脂質の酸化や血管内皮の傷害から起こるアテローム性動脈硬化症や血栓症による脳梗塞などである。これらの予防として、抗酸化作用を持つ食品成分の摂取が奨励されてきた。

本研究では、抗酸化活性の強さと血栓症の原因となる血小板凝集抑制作用に相関関係があるかどうかを調べる目的で行われたものであるが、抗酸化剤は、生体内で産生される ROS ラジカルに対して、その作用に特異性が見られ、その強弱にも差が認められている。イミダゾールジペプチドは  $\text{ClO}\cdot$  に対して、アスコルビン酸(V.C)は  $\text{ONOO}\cdot$  に対して、そしてフェルラ酸は  $\text{HO}\cdot$  に対して強い抗酸化作用を示す。

タマネギに含まれるケルセチンは、フラボノイド化合物として、その抗酸化作用と血小板凝集阻害作用を持つことが知られてきたが、ケルセチンは米ぬか油に含まれるフェルラ酸と同様に、

ポリフェノール構造を有しており、フェルラ酸と同様に HO・ に対して強い抗酸化作用を示すものである。そして図 3-3 に示した通り、3 種の血小板刺激因子によるヒト血小板凝集を強く抑制する作用を示すものであった。

これに対して、ClO・ に対して強い抗酸化作用をもつイミダゾールジペプチドも、ONOO・ に対して強い抗酸化作用を持つ V.C も血小板凝集に対する阻止作用は極めて弱いものであった(図 3-4)。ケルセチンと同様に HO・ に対して強い抗酸化活性を示すフェルラ酸も、血小板凝集抑制作用はケルセチンより極めて弱いものであった。これらの結果から、試験した 3 種類の血小板刺激因子による血小板凝集に対してイミダゾールジペプチドなどの抗酸化剤がその抗酸化活性を通して血小板凝集を抑制する作用を持っていないことが判明した。このことは、抗酸化活性を有するケルセチンはその分子構造によって独自に血小板凝集抑制作用を発揮していると考えられた。

一方、脳血管系の障害は LDL-コレステロールの酸化や血管内皮細胞の傷害などによるアテローム性動脈硬化の促進によっても起こるものである。したがって、生体内産生 ROS ラジカルを抑制するイミダゾールジペプチドなどの天然抗酸化剤とケルセチンを組み合わせることによって、広範な ROS ラジカルの酸化ストレスを消去し、血栓形成や血管内皮細胞の傷害を間接的に防止することによって血栓症に起因する生活習慣病を予防する効果が期待できるのではないかと考えられた。

### 3-5. 結 論

本章ではイミダゾールジペプチドの健康維持や生活習慣病の予防などが期待できる機能を探索、確認するための試験を行った。既往の研究としてイミダゾールジペプチドがアミロイド-B 過剰発現神経細胞の細胞死を有意に低下させることが確認されていたが(Appendix 1)、これに加えて酸化ストレスを与え続けたショウジョウバエの寿命延長に及ぼす効果、そして脳血管系疾患の原因となる血小板凝集抑制作用についても試験した。ヒトの生理機能と相同性をもつと言われるショウジョウバエにイミダゾールジペプチドを摂取させると体内遊離アミノ酸組成としてイミダゾールジペプチドのアンセリンとカルノシン、そしてそれらの代謝物であるヒスチジンと 3-メチルヒスチジンが検出されたが、その他の遊離アミノ酸組成には特に大きな影響は示さなかった。また、過酸化水素により酸化ストレスを与えたショウジョウバエにイミダゾールジペプチドを摂取させると、雌のショウジョウバエの寿命を有意に延長させることが観察された。雌雄の差については十分に解明できなかったが、ショウジョウバエにはジペプチド分解酵素が存在し、摂取したイミダゾールジペプチドを分解できることが確認された。また、イミダゾールジペプチドのアンセリンの構成アミノ酸である 3-メチルヒスチジン量が雌で雄に対して 1.5 倍高濃度になることが認められた。このことと寿命延長の間に何らかの関連性があるのかどうかは、明らかにすることはできなかった。また、抗酸化剤としてイミダゾールジペプチドの血小板凝集に及ぼす作用について試験したが、水酸化ラジカルを強く抑制するケルセチンと比較して、次亜塩素酸ラジカル消去能が強いイミダゾールジペプチドは水酸化ラジカル消去能が強いフェルラ酸や過酸化亜硝酸ラジカル消去能が強い V.C.と同様に明瞭な血小板凝集抑制作用は示さなかった。このことから、血小板

凝集抑制作用には抗酸化活性が関与するのではなく、ケルセチンのようなポリフェノールの分子形体が関与することが推定された。

これらの結果をまとめると、イミダゾールジペプチドの生活習慣病予防効果として期待できることは、体内酸化ストレスの軽減化と脳神経系細胞の酸化傷害に対する防止効果であると考えられた。

## 第4章 イミダゾールジペプチドのヒト介入試験による健康機能性の検証 [90-92]

### 4-1. 緒 言

著者らが以前の研究において確立した、廃鶏屠体のチキンエキスからイミダゾールジペプチドを分離精製する方法[24]は、鮭などの魚肉エキスに含まれるアンセリンを主体とするイミダゾールジペプチドの分離精製にも適応可能である。そして、これらの原料に含まれるイミダゾールジペプチドのアンセリンとカルノシンは抗酸化作用などでは顕著な相違は認められない。しかし、ヒト血中に存在するカルノシン分解酵素の作用に対して、アンセリンはカルノシンよりも僅かに分解酵素抵抗性を示す。この酵素抵抗性の差異がイミダゾールジペプチドのヒトでの生理機能にどのような影響を及ぼすか明らかなではないが、本章の研究では、イミダゾールジペプチドの抗酸化作用に焦点をあてて、ヒトの生理機能に及ぼす影響やその有効性を検証するために、健康人を対象にしたヒト介入試験を3件実施した。3件それぞれについて以下に詳述する。

第2章で述べたように、老化や生活習慣病は活性酸素種(ROS ラジカル)が引き起こす細胞死と深い関わりを持っている[28, 93, 94]。ROS ラジカルはエネルギー代謝や免疫反応の中で恒常的に生成されることから[35]、抗酸化剤や抗酸化酵素などが老化や高血圧、糖尿病、心血管系疾患、およびガンなどの生活習慣病の進展を防止するために重要な役割を担っている。生体内にはユビキノン(例えば CoQ10)やスーパーオキシド無力化酵素(SOD)、グルタチオンパーオキシダーゼ、およびカタラーゼなどの抗酸化酵素などが存在しており、それらは細胞質内での ROS ラジカル防御系を形成して、タンパク質、脂質、糖質、および DNA などの生体成分をその酸化傷害作用から守る働きをしている[95-97]。しかし、これらの生体内酸化防御機構だけでは不十分な場合もあり、従って、食事やサプリメントとして天然抗酸化剤を摂取することもまた、老化の進行や ROS による生活習慣病の危険性を回避する上で極めて重要であると考えられている。このことに対応して、食品中の抗酸化活性を測定するために人工的 ROS を用いた標準的方法が考案され、一日当たりの推奨される抗酸化剤の摂取量などの指標として使われている[38, 98]。

しかしながら、抗酸化剤の摂取によって慢性疾患たる生活習慣病の危険性を軽減することができたという研究報告は極めて少ない。例えばビタミン C やその他の疎水性ポリフェノール化合物は *in vitro* において特定の ROS に対する強い抗酸化作用と抗遺伝子変異活性を示すが[99, 100]、ヒト試験ではこれらが DNA 酸化傷害の防止効果を持っていないことが報告されている[101]。さらに、天然抗酸化剤の抗酸化活性測定法についてもまだ確立された方法はできていない。皮肉なことであるが、単独の抗酸化剤や抗酸化剤の組み合わせがヒト試験では生活習慣病の抑制に効果がなかったというだけでなく、喫煙者などではむしろ肺ガンの発生頻度が増加し、心血管系の疾患が悪化したという結果も報告されてきた[102-104]。それにも関わらず、天然抗酸化剤の摂取は体内の酸化ストレスバランスの維持に貢献していることは、生活習慣病予防のために抗酸化剤を摂取する方法について、さらに熟慮すべきであることを示唆している。

ヒトの組織では、少なくとも5種類の ROS が恒常的に産生されているが[35]、どの抗酸化剤が



これらの ROS に対して最も有効なものなのか知られていなかった。過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )はミトコンドリアでのエネルギー代謝の典型的な副産物であるが、スーパーオキシドアニオン( $\text{O}_2^-$ )から SOD の作用によって生成される。 $\text{H}_2\text{O}_2$  はカタラーゼによって速やかに再び水と酸素ガスに分解されるが、分解されない  $\text{O}_2^-$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  は水酸化ラジカル( $\text{HO}\cdot$ )、次亜塩素酸ラジカル( $\text{ClO}\cdot$ ) および過酸化亜硝酸ラジカル( $\text{ONOO}\cdot$ )の生成に利用される。Cu や Zn イオンの触媒の存在下で  $\text{HO}\cdot$  は直接  $\text{H}_2\text{O}_2$  から生成され(フェントン反応)、また白血球、好中球、単球・マクロファージによって  $\text{ClO}\cdot$  と  $\text{ONOO}\cdot$  が生成される。この  $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{ClO}\cdot$  および  $\text{ONOO}\cdot$  は生体成分を傷害する作用を持つ ROS ラジカルとして一般的に認知されており、したがって、DNA の酸化やそれに連動する細胞死を防止する抗酸化剤はこれらを主要な標的とする必要がある。

イミダゾールジペプチドであるカルノシンとアンセリンは動物の活発な組織に分布しており、抗酸化活性を持っている[15]。しかしこれらは物理化学的測定法による抗酸化活性測定では弱い活性しか示さないことから[32, 50]、一般には強力な抗酸化剤として認知されて来なかった。Hipkiss ら[41]の知見と同様に、我々も鶏肉から得られたイミダゾールジペプチドが  $\text{ClO}$  ラジカルによるタンパク質分解作用を持っていること、さらにアスコルビン酸が *in vitro* では  $\text{ONOO}$  ラジカルの活性を強力に消去することを観察している(第 2 章)。また、フェルラ酸のような水に僅かに溶解するポリフェノール類は  $\text{HO}$  ラジカルに強い抗酸化活性を示す一方で、 $\text{ClO}$  と  $\text{ONOO}$  ラジカルに対しては微弱な抗酸化活性しか示さないことも判明している。第 2 章で述べたように、これらの知見に基づいて、精製チキンエキスのイミダゾールジペプチド、アスコルビン酸、およびフェルラ酸の配合剤が、ヒトの生体内で発生する複数の ROS ラジカルによる酸化ストレスを抑制する上で有効ではないかという仮説をたてた。

本章の研究では、最初にこの仮説を検証するために、3 種の抗酸化剤を配合した飲料を用いて、中高年男性における末梢血リンパ球の DNA 損傷に及ぼす効果についてオープン方式によるヒト試験を実施した。

チキンエキス中のイミダゾールジペプチドはカルノシンとアンセリンが約 1:3 の比率の混合体として存在している。これを経口摂取すると速やかに腸管から吸収されるが、血中へ移行するとカルノシン分解酵素によりその構成アミノ酸である  $\beta$ -アラニンと L-ヒスチジンに分解される。イミダゾールジペプチドの血中推移を測定するためには、イミダゾールジペプチドとその代謝物である構成アミノ酸を同時定量する必要があるが、その方法としてアセトニトリルを含有する溶離液を用いた逆相-HPLC 法が報告されている[20]。しかし、これらの方法で用いられる溶離液では血しょう成分や除タンパク質剤のピークがオーバーラップするために、血しょう中のイミダゾールジペプチドの代謝物、特に 1-または 3-メチルヒスチジンを同時定量することが困難であった。さらに、チキンエキス由来のイミダゾールジペプチドは数社から市販されており、それらの製品を用いたヒト試験も行われるようになっていたので、各社が製造するイミダゾールジペプチドについて、その腸管での吸収性や血中推移を比較して、生物学的同等性を確認する必要もあった。

本章の研究では、これらの課題を解決するために、我々はアセトニトリルを含有しない溶離液をアイソクラティックの条件で通液してイミダゾールジペプチドとその関連物質の保持時間を長くし、定量が可能な方法に改良することを試み、あわせて我々が用いたチキンエキス由来イミダ

ゾールジペプチドと他社から市販されている同じチキンエキス由来イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性について、経口摂取後の血中濃度推移を比較して検討した。

2050 年までに、世界中で 1 億 3,000 万人以上の認知症患者が発生すると推定されている[105]。それは毎年約 1,000 万人近くの新規症例が発生する予測から推計されたものだが[106]、認知症の最も多い原因となるアルツハイマー病(AD)は神経変性疾患の一つである。そして、AD では、脳内にアミロイド $\beta$ タンパク質が蓄積して起こるものであるが、その蓄積は認知症を発症する 20 年以上前から始まると言われている[107]。認知症が発症した段階では、アミロイド $\beta$ タンパク質のほかにタウタンパク質の蓄積も同時におこり、神経細胞の不可逆的損傷が進行するので AD による認知症を予防する臨床治療の観点からは、認知症を発症する前段階の時期から対処する必要性が広く認識されてきた[108]。しかしながら、認知症の発症を予防するための薬物学的予防法や認知機能のトレーニングなどの日常生活の改善による予防法などについて、現在のところ、有効な処方も予防の指針や根拠などもほとんど示されていない[109]。

最近、AD の病因における神経炎症の役割が注目されているが、脳組織の細胞に加えて、血管や血液細胞も神経炎症に多大な影響を及ぼしていることも知られている[110, 111]。このことから、老人斑となるアミロイド $\beta$ の蓄積や神経変性の抑制以外に、神経炎症に対する薬物学的アプローチが期待されている[112]。さらに、神経炎症には自然免疫系も関与しており[113]、免疫細胞の一つである好中球は Myeloperoxidase(MPO)を介して HClO ラジカルを産生し、これが引き起こす炎症反応が AD の進行を増強していると推測されている[114, 115]。これらのことから、我々は、イミダゾールジペプチドの抗酸化活性が好中球の産生する HClO ラジカルに対して特に強く作用することから、この自然免疫系の影響に注目してきた。

AD と MPO の関係については以下に述べるように具体的に示されてきている。まず、AD 患者では、脳組織で MPO の発現が増加し[114]、また、血中での MPO 活性も増加することが報告されている[115]。さらに、アジアのコホート研究では、MPO rs233227 多型は AD リスクおよび血しょう中の MPO 蓄積と正の相関を有することが示された。また、動物モデル研究でも MPO が AD の発症に関与しており、MPO 活性を阻害すると、AD モデルマウスの認知機能が改善することも報告されている[116]。

イミダゾールジペプチドはエネルギー消費量が多く、従って ROS ラジカル発生量も多い骨格筋や脳組織に高濃度に存在しており[117]、HClO ラジカルに対するスクベンジャーとしての抗酸化活性を有することは[118]、極めて重要なことである。このことを踏まえて、チキンエキス由来のイミダゾールジペプチドサプリメント(ACS、アンセリンとカルノシンの重量比約 3:1 の混合体)1,000 mg/日を被験者に 3~12 ヶ月間投与する試験が行われてきた。健常な被験者では ACS が認知機能低下を抑制し、軽度認知障害(Mild Cognition Impairment, MCI)の被験者では認知機能が正常状態へ回復させる可能性が示されている[119, 120]。

ところで、ヒトの血しょう中にはイミダゾールジペプチドのカルノシンを分解する酵素(カルノシナーゼ、CNDP1)が存在し、経口摂取されたカルノシンは速やかに分解されることが知られている[121]。一方、チキンエキスに含有されるアンセリンはカルノシナーゼの分解作用に抵抗性を示すので、アンセリンとカルノシンの混合体である ACS よりもアンセリン単独のほうが脳組織で

の効果が大きいのではないかと考えられた。事実、動物モデルにおいて、アンセリン単独投与により AD モデルマウスの認知機能低下を防止する作用が観察されている[122]。

本章の研究では、ACS に代えて、アンセリンだけを含有する鮭エキスを精製したアンセリンを被験物質として、認知症の前段階にある MCI の高齢者を対象に認知機能低下の改善と認知機能の正常化の効果について無作為化二重盲検プラセボ対照試験を実施した。なお、この試験でのアンセリンの投与量は ACS の半量である 500mg/日、3 カ月間投与とした。

## 4-2. 実験材料および方法

### 4-2-1.3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果

#### 試験デザイン

本試験の主要評価項目は、抗酸化剤の配合が ROS ラジカル誘発の末梢血リンパ球 DNA 損傷を示すコメットアッセイスコアに反映された生体内酸化ストレスの軽減作用を有するか否かを判定することにした。また、酸化ストレス軽減によって他の生理機能パラメーター、すなわち糖代謝や脂質代謝にどのような影響を及ぼすかについても副次的評価項目として評価を行った。なお、既に報告されている研究を参照して[123]、飲料の基材(マンゴー果汁)は予備的に実施した二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験(n=10)で特別な生理作用を示さなかったこと、さらにマンゴー果汁のビタミン C とカロテノイド含量はそれぞれ 3 mg 以下、および 0.1 mg 以下であったこと、また志願者の中にはプラセボ飲料だけを 8 週間飲用し続けることを拒絶する例もあったので、本試験ではプラセボ対照試験を採用せず、飲用群と非飲用群でのコメットアッセイスコアの推移を比較するオープン試験で行った。ただし、末梢血リンパ球の DNA 酸化傷害を示すコメットアッセイスコアの測定と血液生化学的試験については、ブラインド(盲検試験)の条件で実施した。

また、全ての志願者について、食事制限によるストレスを与えないようにするために、喫煙、飲酒、カフェイン飲料(緑茶、コーヒー、果物ジュース)を摂取することを許容したが、ビタミン A、C、E、および CoQ10 またはイミダゾールジペプチドを含有する抗酸化剤サプリメントの摂取は厳密に禁止した。

#### 被験飲料

3 種抗酸化剤配合飲料は、チキンエキスから精製した 400 mg のイミダゾールジペプチド(アンセリン：カルノシン=2.5：1、純度 90 %以上)、アスコルビン酸(ビタミン C、試薬) 300 mg、フェルラ酸 20 mg(築野ライスファインケミカル株式会社製、純度 95 %以上)および 30 mL のマンゴー果汁を含有していた。この組成は先行文献[124, 125]および動物試験で確認された安全性に基づいて調製されたものである。

被験飲料を摂取する群の被験者は適当な時間帯に 50 mL の被験飲料を一日一本、56 日間(8 週間)飲用した。被験飲料非摂取群(対照群)は抗酸化剤配合の被験飲料を摂取させず、12 週間の間、食事、喫煙、飲酒、運動などの生活習慣を変えことなく通常の状態を保持するようにした。また、生活習慣の内容をモニターするために、全ての志願者から飲酒、喫煙およびサプリメント摂

取の有無を記録した月間報告書を提出して貰い、試験開始前、試験開始 4 週間おきに空腹時血液サンプルを東京金属産業健康保険組合健康センター(千代田区、東京)において採取した。

#### 試験対象者の条件

健常人志願者は、医療を受けていない者および臨床パラメーターに異常を認めない者とした。健常人の除外規定としては、収縮期血圧 150 mmHg 以上、総血清コレステロール 260 mg/dL 以上、空腹時血糖 120 mg/dL 以上とし、さらにアスパラギン酸アミノ移転酵素(AST)、アラニンアミノ移転酵素(ALT)、および  $\gamma$  - グルタミン酸トランスペプチダーゼ( $\gamma$  - GTP)が上限値の 10 % 以上を越える者とした。志願者の区分けに先立ち、DNA 酸化傷害軽減効果の統計的有意差を検出するために必要な症例数を算出した。期待される効果を 30 %以上の軽減と仮定した場合では、少なくとも 11 症例以上と計算された。志願者の選択と同意の下に、摂取群(n = 17 )または生活習慣や季節の変化の影響をモニターする対照群(非摂取群、n= 12 )とした。摂取群の平均年齢は 50.6 歳であり、非摂取群の平均年齢は 49.7 歳であった(表 4-1)。

表 4-1. 志願者の特性 [90]

	Ingestion group	Non-ingestion group	ANOVA
Number	17	12	
Sex	Male	Male	
Age (years)	50.6 $\pm$ 8.1	49.7 $\pm$ 9.8	N.S.
Height (cm)	168.9 $\pm$ 6.3	170.6 $\pm$ 7.1	N.S.
Body weight (kg)	65.9 $\pm$ 8.1	68.4 $\pm$ 7.7	N.S.
Body mass index (BMI)	23.1 $\pm$ 2.4	23.5 $\pm$ 1.7	N.S.
Non-smokers	7	5	N.S.
Smokers	10	7	N.S.
Drinkers	11	6	N.S.

#### コメントアッセイおよび血液生化学試験

血液サンプルを盲験条件で採取し、Collins らの手法に準拠して測定した[126, 127]。測定に先立ち、5 mL の血液サンプルに対して同量の Dulbecco 緩衝化生理食塩水(Mediatech、米国)を加えて、50 mL 容の遠心分離チューブ(Becton Dickson Lab Wear、米国)の中にいれた 20 mL の Ficol-Paque Plas(GE Health Care、米国)の上に重層した。次に血液サンプルを室温、400 x g で 30 分間遠心分離した後、リンパ球層を回収した。2 度リンパ球を緩衝化生理食塩水で洗浄し、10%のジメチルスルフォキシドと 10 %の胎児牛血清(Gibco Invitrogen、米国)を含有する RPMI-1640 培地へ細胞濃度として 10<sup>6</sup>/mL になるように再浮遊させ、0.5 mL ずつに分注して使用するまで -80 °C で保管した。凍結リンパ球を 37 °C で溶融した後、緩衝化生理食塩水で 2 回洗浄し、200 x g、5 分間遠心分離した。コメントアッセイに供したリンパ球の生存率は 90 %以上であった。2 枚の塗末標本を作成して、蛍光顕微鏡(ニコン、E-600、東京)でリンパ球数 200 個以上を観察し、Collins ら

の方法に準拠して 0~4 のコメットスコアに分類し、計測した(図 4-1)。コメットスコアはリンパ球 100 個あたりのスコアとして表わした。

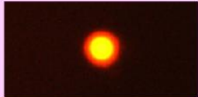
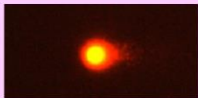
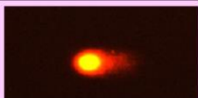
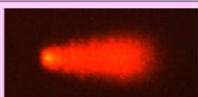
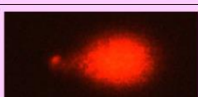
リンパ球DNAの酸化傷害アッセイ (Comet Assay)		
Definition of Comet Assay Score		
Score	Degree of DNA Damage	Figures of comet
0	None, <5%	
1	Low, <5-20%	
2	Medium, <20-40%	
3	High, <40-95%	
4	Total, >95%	

図 4-1. コメットアッセイスコアの基準

また、身長、体重、BMI および血圧は健康管理センターで実施した。血液生化学および血液検査は三菱 BCL 研究所(東京)で実施した。血液生化学検査の項目は、総コレステロール、高密度リポタンパク(HDL)、低密度リポタンパク(LDL)、超低密度リポタンパク(VLDL)ーコレステロール、トリグリセリド、酸化 LDL、グリコアルブミン、乳酸脱水素酵素(LDH)、アミラーゼ、AST、ALT、 $\gamma$  - GTP、アルカリフォスファターゼ(ALP)、血液尿素態窒素(BNU)、尿酸クレアチニン、ヘモグロビン A1C(HbA1C)、C 反応性タンパク(CRP)、および空腹時血糖である。血液検査の項目は、赤血球、白血球、血小板、ヘモグロビン含量およびヘマトクリット値を測定した。

### 統計解析

コメットアッセイおよびその他の臨床検査パラメーターについて被験飲料摂取前(開始前、0 週)と摂取後のそれぞれの検査データ(4 週間隔)について対のある Student の t 検定法を用いて比較した。摂取群と非摂取群の間の差については分散分析(ANOVA)法を用い、いずれも統計的有意差は p 値が 0.05 以下とした。

#### 4-2-2. チキンエキス投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験

##### 試薬類

イミダゾールジペプチドの定量に用いたカルノシン、アンセリン-硝酸塩、L-ヒスチジン、1-および3-メチルヒスチジンはいずれもシグマ-アルドリッチ社(セントルイス、モンタナ州)より購入した。その他の試薬は和光純薬(東京)より購入した。市販のイミダゾールジペプチド粉末製品はいずれも鶏肉エキスから精製されたA社とB社の2種類の粉末を用いた。イミダゾールジペプチドの含量はともに40%であった(表4-2)。

表 4-2. 市販鶏肉由来精製イミダゾールジペプチドの成分定量 [91]

市販品	総含量(%)	アンセリン(%)	カルノシン(%)	A/C 含有比*
A 社製品	40.6	29.6	11.0	2.7
B 社製品	40.1	28.3	11.8	2.4

\* アンセリン/カルノシン

##### 改良型逆相-HPLC による血中イミダゾールジペプチドとその構成アミノ酸の測定

Dunnet ら[20]の逆相-HPLC で用いる溶離液からアセトニトリルを除き、200 mM リン酸二水素アンモニウム/100 mM ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH 2.0)を用いるアイソクラティック法を採用した。また逆相-HPLC カラムは、TSK gel ODS-80Ts(東ソー製、150×4.6 mm, 5 μm)を使い、流速 0.8 mL/min、検出波長 220 nm で測定した。この改良型では、除タンパク質剤としてTCAを用い、試料中のTCAの除去処理を必要としないようにするために、有機溶媒を除いたものである。すなわち、溶離液中の塩とイミダゾールジペプチドおよびその代謝物がイオン対を形成し、中性物質としてカラムを移動させる水系の溶離液のほうが保持時間は長くなるので、0分から25分まで上記の塩類溶液を溶離液としてアイソクラティックの条件で通液した。

##### 血しょう試料の調製

解凍した被験者の血しょう試料から速やかに450 μL 採取し、TCAの最終濃度が5%になるように50% TCA 溶液50 μL を添加して攪拌した後、直ちに4℃、2000 x g、10分間遠心分離してタンパク質を沈殿除去した。上清を0.45 μm のろ過膜(ADVANTEC、DISMIC-13)でろ過してHPLC 測定用の被験試料とした。測定値は2回測定の平均値で表した。また、Dunnett らの溶離液の条件と本報の条件を比較するために、被験者3名のイミダゾールジペプチド摂取前の血しょう試料を用いて、イミダゾールジペプチドおよびその代謝物の標準品を添加して、それぞれの条件でHPLCを行った。

##### 被験者への投与と採血

ヘルシンキ宣言に基づく東海物産株式会社ヒト試験に関わる倫理委員会の承認を経て(承認番号2016-01)、10名の健康な被験者(男性6名、女性4名、平均年齢38.7 ± 10.2歳)からインフォームドコンセントを取得した。また、試験を開始する前にUMIN 臨床試験登録システム

(UMIN-CTR)に登録した(試験 ID : UMIN000023079)。

被験試料の摂取と採血は小川町メディカルクリニック(東京都千代田区)において医師立ち会いのもとで行った。二重盲検クロスオーバー方式による識別不能の条件で包装された 2 社のイミダゾールジペプチド粉末製品を 1 社の製品について 5 名ずつ、温湯に溶解して経口摂取してもらった(イミダゾールジペプチド摂取量として 1 g)。

採血は静脈留置針を用いて、摂取前(0 分)、摂取後 20、40、60 および 120 分に行い、ヘパリン加採血管へそれぞれ 5 mL ずつ採血した。2 週間のウォッシングアウト期間の後に、摂取する市販製品を交換して、再び 1 社の製品について 5 名ずつ、同様に経口摂取してもらった。採血された血液は直ちに氷水中で冷却し、4 °Cにおいて 2000 x g、10 分間遠心分離し、約 1.5 mL の血しょうを採取した。血しょうは直ちに - 80 °Cで凍結保管した。

### 統計解析

分析値を得た後に、二重盲検のキーを開封した。クロスオーバー方式を採用したので、まず 10 名の被験者について、1 回目と 2 回目の各摂取時期による差異の有無と、摂取した市販製品間での差異の有無を調べるために分散分析法(ANOVA 法)で統計解析を行った。また、10 名の被験者のデータを市販品別にまとめて同様に ANOVA 法で差異の有無を解析した。イミダゾールジペプチドとその代謝物の血中濃度推移については、摂取前と摂取後の各経過時間との間の変化として対のある Student の t 検定法で解析した。いずれの場合も p 値が 0.05 未満を統計的に有意とした。

### 4-2-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果

#### 試験デザイン

本試験は、地域在住の MCI 者および全般的に健康な身体状態の志願者を対象として、アンセリンの効果を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照試験とした。本試験を実施するにあたり、東京大学倫理委員会(ID 17-218)の承認を受け、UMIN 臨床試験レジストリに登録した(UMIN000032319)。また、本試験のプロトコルは、ヘルシンキ宣言およびヒトを対象とした医学および健康研究のための倫理ガイドラインに準拠して作成されたものである。試験参加者は担当医師により本試験に登録された。

無作為化割付けは、実薬群(Active 群)と偽薬群(Placebo 群)の被験者数が同数になるように実施された。また、既報の研究結果から[120]、第 1 種危険率を 0.05 および推定される標準偏差(SD)を 1.5 と仮定した効果量 80%の条件で、ミニメンタルステート試験(Mini Mental State Examination、MMSE)スコアの 1.5 ポイントの差を検出するために必要な被験者数を計算した。その結果、被験者数は 30 例であった。また、被験者および臨床試験担当スタッフは全員、追跡調査を含めて、被験薬の割付け情報はブラインド(盲検)とした。また、2 群への割付けは、第三者(イメプロ社、東京)が行い、被験者に割付番号を配布した。

#### 試験参加者

本試験は、介入試験として 2018 年 7 月に開始され、試験実施期間は 12 週間であった。参加者

全員が全般的には健康な状態であり、認知症に罹患していないと判断された者とした。また、認知症検査機関で、モントリオール認知機能評価試験(MoCA) [121]を受けてもらい、そのスコアが 25 以下の参加者を本試験に招聘した。なお、試験開始 1 ヶ月以上前に、参加者全員は本試験の目的および手順の詳細な説明を受け、書面によるインフォームドコンセントを提出した。参加者の選択基準は、(1) ベースライン時(試験開始前)の MoCA スコアが 25 以下[121]、(2) 担当医師が臨床所見から認知症ではないと診断した者とした。

除外基準は、(1) 頭部外傷、脳虚血、脳腫瘍による脳局所病変の急性または亜急性疾患を有する者、(2) 過去 6 ヶ月間に、向精神薬ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン、メマンチン、そしてイミダゾールジペプチドを摂取した者、(3) 重度の精神疾患の既往歴、または精神障害の明らかな症状または徴候を示す者、(4) 就寝時に睡眠薬以外の精神薬を使用している者、(5) サケアレルギーを有する者、(6) 診療施設へ徒歩で出向けない状態の者、(7) 別の試験へ参加しているか、または参加予定の者、(8) 担当医による登録不適格の診断を受けた者[120]である。

### 日常の食事から摂取するアンセリンとカルノシン量のモニター記録

既報[120]で実施したように、通常の食事からアンセリンおよびカルノシンを摂取した量をモニターするために、ベースライン時および追跡調査時に、参加者は 12 週間の食事の中の動物肉(鶏肉、豚肉、牛肉)または魚(サケ、マグロに代表される赤身魚、白身魚、サバに代表される青魚、ウナギに分類)の摂取頻度に関する自己記入式質問票に記入してもらった。

### 被験食(Active)の組成

被験食の組成を決めるために、イミダゾールジペプチド摂取が血中濃度に及ぼす影響を検討することから始めた。高齢のボランティアにアンセリン 750 mg とカルノシン 250 mg を摂取して貰い、摂取前後に静脈血の血しょうを採取してイミダゾールジペプチドの血中濃度推移を測定した。血しょうをトリクロロ酢酸(終濃度 5%)で除タンパクして、Dunnett と Harris の方法[20]を一部改変した HPLC でイミダゾールジペプチドの構成アミノ酸ヒスチジン関連化合物を測定した。図 4-10 に示すように、カルノシンは血中では全く検出されなかったが、アンセリンは検出することが可能であった。

そこで、本試験を計画するにあたっては、アンセリンのみをイミダゾールジペプチドとして含む被験食の調製を行った。鮭の筋肉はアンセリンを豊富に含むため[1]、既報の試験[120]でも使用した陽イオン交換樹脂とナノろ過膜濃縮による精製法で純化した鮭アンセリンを調製した。このアンセリン粉末からはクレアチニンおよび魚製品に特異的な臭気が完全に除去されている品質のものであった。

また、鮭アンセリンの生体内産生ラジカル(ROS ラジカル)に対する抗酸化活性を既報(第 2 章)の方法で試験した。卵白アルブミンに対する ROS ラジカルによる分解は次亜塩素酸ラジカル(HClO)消去剤のアンセリン(Ans)、水酸化ラジカル(HO $\cdot$ )消去剤のフェルラ酸(FA)および過酸化亜硝酸ラジカル(ONOO $\cdot$ )消去剤のビタミン C (V.C)を配合することで、完全に防止できるものであった(図 4-8)。



## 認知検査

被験者の認知機能を評価するために、主要な神経心理学検査として MMSE を用いた。介入試験の開始前後で、すべての被験者から MMSE スコアを得た。また、Alzheimer 病評価スコア (ADAS スコア) [121] のデータを採取して、除外基準に該当するか、認知症に関連した認知機能低下の進行を評価した。

## 安全性の評価

MCI 患者を対象に 12 週間にわたり実施されたこれまでのランダム化比較試験 [120] では、500 mg/日を超えるアンセリン投与と因果関係があると考えられる有害作用は認められなかった。また、本ヒト試験と同量のアンセリン 500 mg を含む有効成分を毎日 12 週間摂取した健康成人ボランティア 10 名を予備的にモニターした。血液生化学検査項目に有害作用や有意な増悪は認められなかった。また、担当医師が、フォローアップ検査を受診した患者に、有害事象の可能性のある症状の有無について聞き取り調査を行った。

## 統計解析

認知機能に対するアンセリンサプリメントの効果を検討するために、二元配置反復 ANOVA (時間 [ベースラインまたは追跡] × 治療 [実薬 (アンセリン) または偽薬]) を実施した。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。データは平均値 ± SD で表した。

## 4-3. 実験結果

### 4-3-1.3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果

#### 被験者と飲料摂取状況

志願者の特性データは表 4-1 に示す通りであった。平均年齢、身長、体重、BMI および喫煙習慣では被験群と対照群の間に有意の差を認めなかった。また血圧、肝機能および腎機能についても両群間に差を認めなかった。被験者は試験中に抗酸化剤サプリメントを摂取せず、喫煙や飲酒の習慣にも変化は認められなかった。摂取群での被験飲料の摂取状況は、朝食時 (n=11)、昼食時 (n=2)、そして夕食時 (n=4) に摂取し、60 日以内に全ての飲料を摂取した。

#### コメットアッセイスコアの改善

飲用前のコメットアッセイスコアは、試験群が 15.1、対照群は 17.4 であったが、4 週後に若干、上昇傾向が認められた。8 週後の摂取群のコメットスコアは顕著に減少しており ( $p=0.045$ )、対照群ではさらに増加する傾向であった。12 週目において (飲用終了後 4 週目)、摂取群のコメットスコアはベースライン (飲用前) からさらに減少を続けていた ( $p=0.0018$ ) が、対照群は高値のままであった (図 4-2)。これらの結果は対のある Student の t 検定で解析されたものであるが、ANOVA 検定によっても同様の結果であった。また、両群における試験前の喫煙者のコメットスコア ( $n=17$ ,  $17.5 \pm 7.6$ ) は非喫煙者 ( $n=12$ ,  $13.6 \pm 7.1$ ) よりも高値であったが、有意差は認められなかった ( $p$

= 0.1669)。

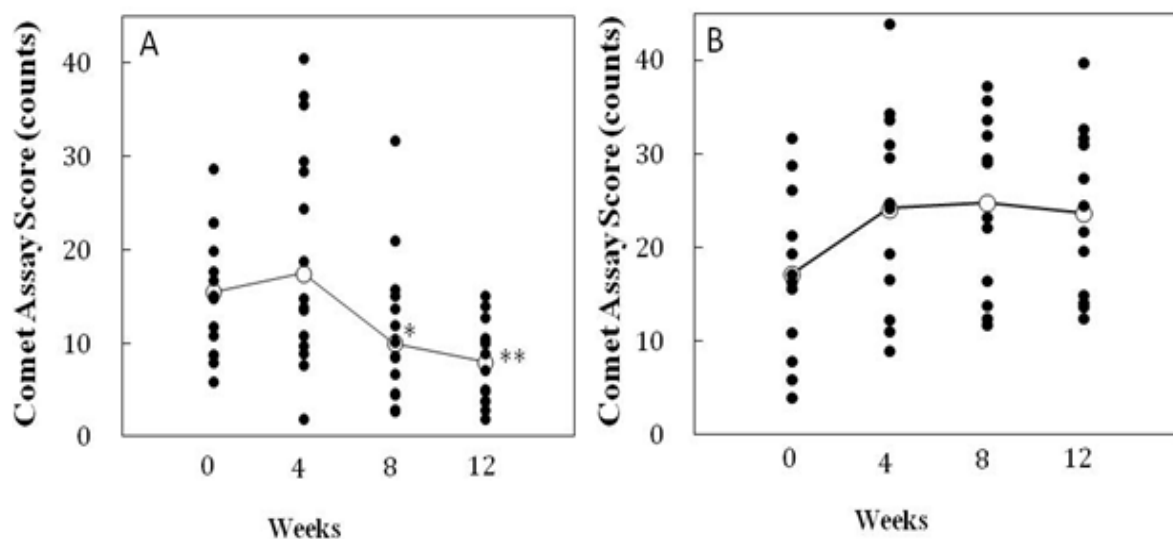


図 4-2. 被験飲料摂取群(A)と非摂取群(B)のコメットアッセイスコアの推移 [90]

白丸は平均値を示す。\* $p = 0.045$ 、\*\* $p = 0.0018$

#### 糖および脂質代謝に及ぼす影響

被験飲料摂取前の血液総コレステロールと LDL コレステロールは摂取群の方が非摂取群の症例よりも高値であったが、被験飲料摂取後にこれらは減少する結果であった(表 4-3)。8 週目において、LDL コレステロールは顕著に減少した( $p = 0.029$ )。一方、総コレステロールも減少したが、この減少は統計的に有意の差ではなかった( $p = 0.072$ )。これに対して対照群では総コレステロールと LDL コレステロールはともにその初期値が摂取群より低値であったが、この値は試験期間中に変化は認められなかった。また、空腹時血糖値も両群ともに変化は認められなかった。

表 4-3. 被験飲料摂取志願者血中の脂質および空腹時血糖値の変化 [90]

Items	0 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
(mg/dL)				
Total Cholesterol	209.8 ± 30.1	205.6 ± 29.4	201.2 ± 28.0 <sup>a</sup>	202.7 ± 30.5
HDL Cholesterol	58.8 ± 14.3	58.4 ± 15.0	57.9 ± 13.7	56.8 ± 12.2
Triglycerides	106.1 ± 57.9	100.9 ± 54.9	111.4 ± 62.4	114.8 ± 74.4
LDL Cholesterol	133.2 ± 29.1	127.0 ± 26.2	121.0 ± 32.1 <sup>b</sup>	123.2 ± 32.1
Fasting Glucose	96.1 ± 11.6	95.8 ± 11.8	93.1 ± 10.6	94.6 ± 9.5
LDL/HDL	2.38 ± 0.80	2.31 ± 0.73	2.27 ± 0.87	2.27 ± 0.78
Body weight (kg)	65.9 ± 8.1	67.0 ± 8.3	67.3 ± 8.3	66.8 ± 8.3
BMI	23.1 ± 2.4	23.2 ± 2.7	23.3 ± 2.8	23.2 ± 2.7

a:  $p = 0.072$ , b:  $p = 0.029$

脂質代謝について、試験前の総コレステロールが 200 mg/dL 以上と以下の被験者に、そして LDL-コレステロール値が 120 mg/dL 以上と以下に層別して解析を行うと(表 4-4)、被験飲料摂取前に高値であった志願者ではその低下が顕著に認められた。

表 4-4. 被験飲料摂取者の総コレステロールと LDL-コレステロールの層別解析 [90]

Weeks	<u>Total cholesterol</u>		<u>LDL cholesterol</u>	
	>200 mg/dL	<200 mg/dL	>120 mg/dL	<120 mg/dL
	(n= 12 )	(n = 5)	(n = 12)	(n = 5)
0	225.6 ± 14.9	172.0 ± 22.0	145.5 ± 12.4	93.8 ± 12.1
4	214.3 ± 23.9	180.2 ± 27.0	136.0 ± 19.2	100.0 ± 23.6
8	209.5 ± 21.4 <sup>a</sup>	181.2 ± 34.2	134.7 ± 17.1 <sup>b</sup>	88.0 ± 37.4
12	211.4 ± 25.7	172.6 ± 26.7	133.8 ± 22.2	90.1 ± 33.4

数値は平均±S.D. 対のある Student's t-test で摂取前と摂取後を比較解析した。a: p = 0.0029; b: p = 0.0039.

また、本試験で使用した被験飲料は腎臓および肝臓の機能に影響せず、試験期間中に有害な事象は認められなかった(表 4-5)。また、HbA1c とグリコアルブミンの飲用前のベースラインはそれぞれ 4.9±0.3 %と 14.2±2.0 %であったが、これらの糖尿病の指標値は被験飲料の摂取により変化は認められなかった。さらに、酸化 LDL は生体内酸化ストレスのマーカーであるが、抗酸化剤飲料の摂取によって変化は認められなかった。また、炎症性酸化ストレスマーカーである CRP と血液検査のパラメーターにも大きな変化は認められなかった。

表 4-5. 全志願者の肝機能、腎機能、および糖尿病指標の変化 [90]

Items	<u>Ingestion group</u>		<u>Non-ingestion group</u>	
	0 weeks	12 weeks	0 weeks	12 weeks
AST (IU/L)	20.8 ± 5.1	22.2 ± 5.6	22.1 ± 6.9	20.8 ± 7.7
ALT (IU/L)	20.2 ± 6.6	22.5 ± 8.5	24.9 ± 11.0	21.9 ± 5.8
ALP (IU/L)	191.4 ± 58.3	202.7 ± 72.7	190.6 ± 46.8	193.7 ± 51.2
γ-GTP (IU/L)	39.5 ± 31.8	36.7 ± 26.6	51.2 ± 33.7	48.3 ± 31.9
Amylase (IU/L)	94.6 ± 33.7	82.7 ± 21.5	82.8 ± 33.1	64.5 ± 18.4
BUN (mg/dL)	13.4 ± 2.5	13.9 ± 3.2	12.8 ± 3.1	12.8 ± 2.6
Creatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
Uric acid (mg/dL)	5.9 ± 0.8	6.5 ± 0.8	5.7 ± 1.5	5.7 ± 1.7
CRP (mg/dL)	0.09 ± 0.10	0.16 ± 0.32	0.11 ± 0.08	0.19 ± 0.35
HbA1C (%)	4.9 ± 0.3	5.0 ± 0.2	4.7 ± 0.5	5.0 ± 0.3
Glyco-Alb (%)	14.2 ± 2.0	13.9 ± 1.0	14.2 ± 1.1	13.8 ± 0.9
Oxi-LDL (U/mL)	6.6 ± 2.1	7.6 ± 2.3	6.7 ± 2.4	7.3 ± 1.9

### 4-3-2. チキンエキスを投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験

#### 原法と改良法の溶離液でのイミダゾールジペプチドとその代謝物の測定

イミダゾールジペプチドおよびその代謝物の各標準品は、Dunnett らの溶離液の条件で完全に分離して測定される(図 4-3A)。しかし、標準品非添加および添加の 3 名の被験者血しょう試料ではいずれも図 4-3B および図 4-3C(被験者の代表例として 1 名の被験者のクロマトグラムを示す)のようになり、TCA で除タンパク処理した血しょうでは TCA と血しょう成分の大きなピークがヒスチジンと 1-および 3-メチルヒスチジンのピークと重なり、定量が不可能な状態となった。

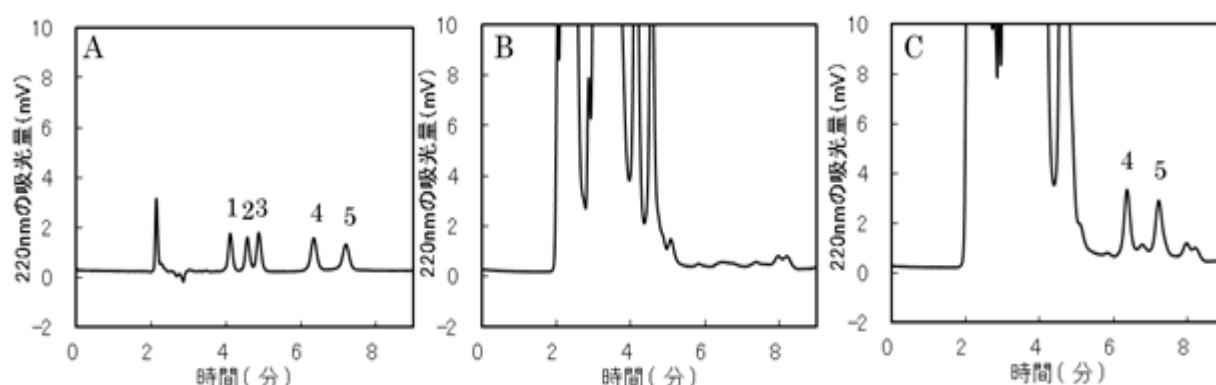


図 4-3. アセトニトリル含有溶離液を用いた HPLC のクロマトグラム [91]

A, 標準品(いずれも 10  $\mu$ M)； B, TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう； C, 標準品(いずれも 20  $\mu$ M)を添加して TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう。 1, 3-メチルヒスチジン； 2, L-ヒスチジン； 3, 1-メチルヒスチジン； 4, アンセリン； 5, カルノシン。 A, B, および C は Dunnett らの溶離液条件にしたがって 4 % アセトニトリルを含有する 200 mM リン酸二水素アンモニウム/ 100 mM ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH 2.0 )を用いて、流速 0.8 mL/min の条件で通液した。

本研究の改良型では原法の除タンパク質剤の除去操作を省略した。すなわち、除タンパク質剤として TCA を使い、HPLC 溶離液からアセトニトリルを除いた 200 mM リン酸二水素アンモニウム/ 100 mM ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH 2.0)のアイソクラティック条件で通液し、目的物質の保持時間の延長を図った。この条件では分析に要する時間が 3 倍程度長くなったが、TCA や妨害物質の除去処理を必要とせず、これらのピークとのオーバーラップを防ぎ、ヒスチジンと 1-および 3-メチルヒスチジンの定量が可能な分離状態となった。図 4-4 に被験者 3 名のうち 1 名の血しょう試料のクロマトグラムを代表例として示す。

また、イミダゾールジペプチドを摂取した後のイミダゾールジペプチドとその代謝物の経時的血中濃度推移を試験に参加した 1 名の被験者の血しょう試料で示すと図 4-5 のクロマトグラムの通りであった。イミダゾールジペプチド摂取後 120 分まで TCA や血しょう成分に影響を受けることなくこれらの物質の定量が可能であった。

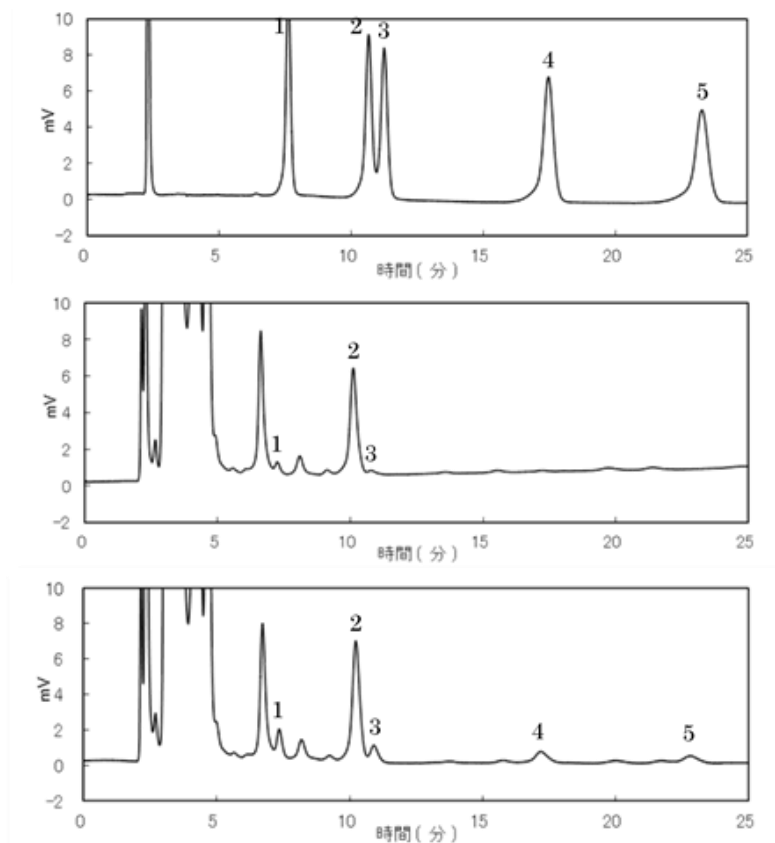


図 4-4. 改良溶離液を用いた HPLC のクロマトグラム [91]

A, 標準品(いずれも 100  $\mu$ M) ; B, TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう ; C, 標準品(いずれも 10  $\mu$ M)を添加して TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう。1, 3-メチルヒスチジン ; 2, L-ヒスチジン ; 3, 1-メチルヒスチジン ; 4, アンセリン ; 5, カルノシン

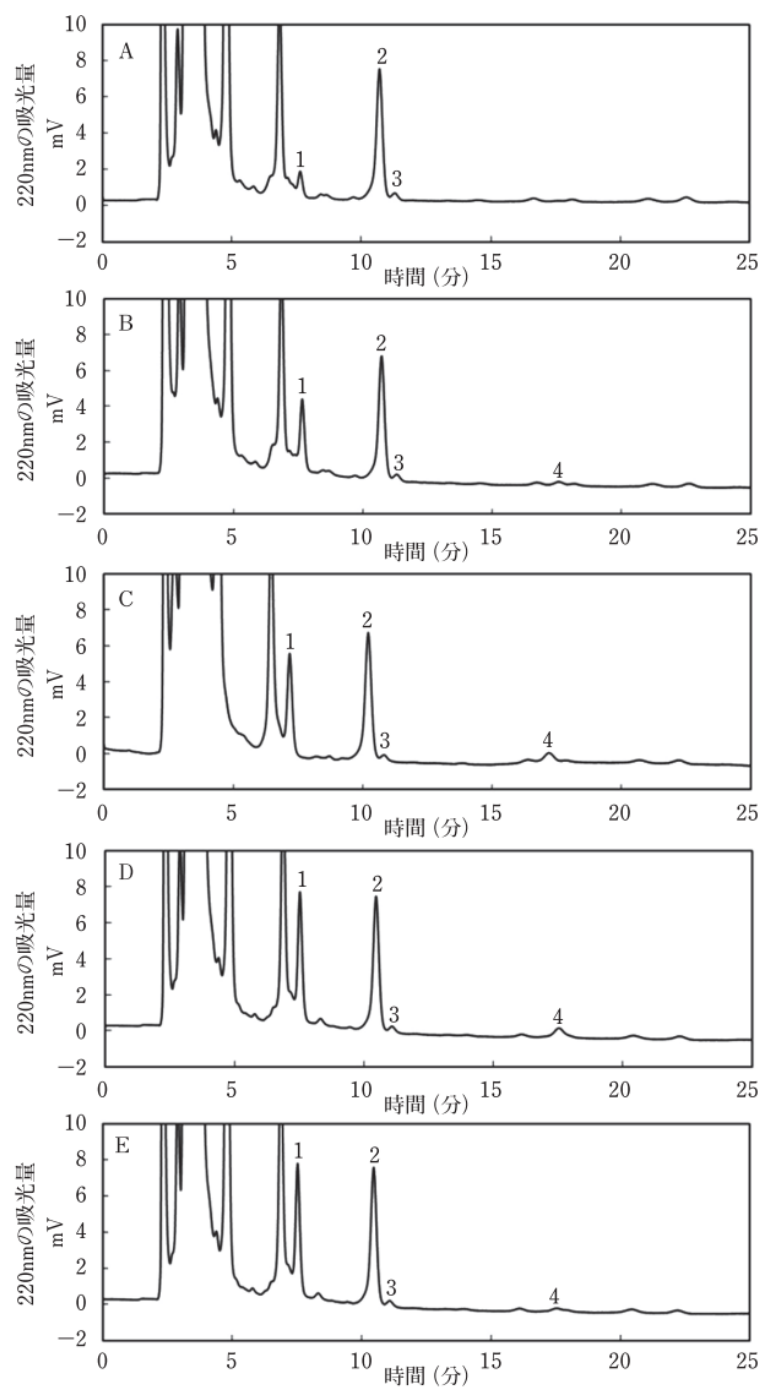


図 4-5. イミダゾールジペプチドおよび代謝物の経時的血中濃度推移のクロマトグラム [91]

A, 0 分(摂取前); B, 摂取後 20 分; C, 摂取後 40 分; D, 摂取後 60 分; E, 摂取後 120 分.

1, 3-メチルヒスチジン; 2, L-ヒスチジン; 3, 1-メチルヒスチジン; 4, アンセリン.

市販イミダゾールジペプチド製品の経口摂取前(A)および摂取後 20～120 分(B～E)に採血した同一被験者血液から血しょうを分離し, TCA で除タンパク質処理した後に図 4-4 と同じ HPLC 条件で測定した.

## 二重盲検-クロスオーバー法による市販鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能の比較

2 社(A 社、B 社)から市販されているチキンエキス由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的

同等性を検討するために、健常者を対象に経口摂取してもらい、二重盲検-クロスオーバー法でその血中移行を調べることによって生物学的利用能(生物学的同等性)を比較した。

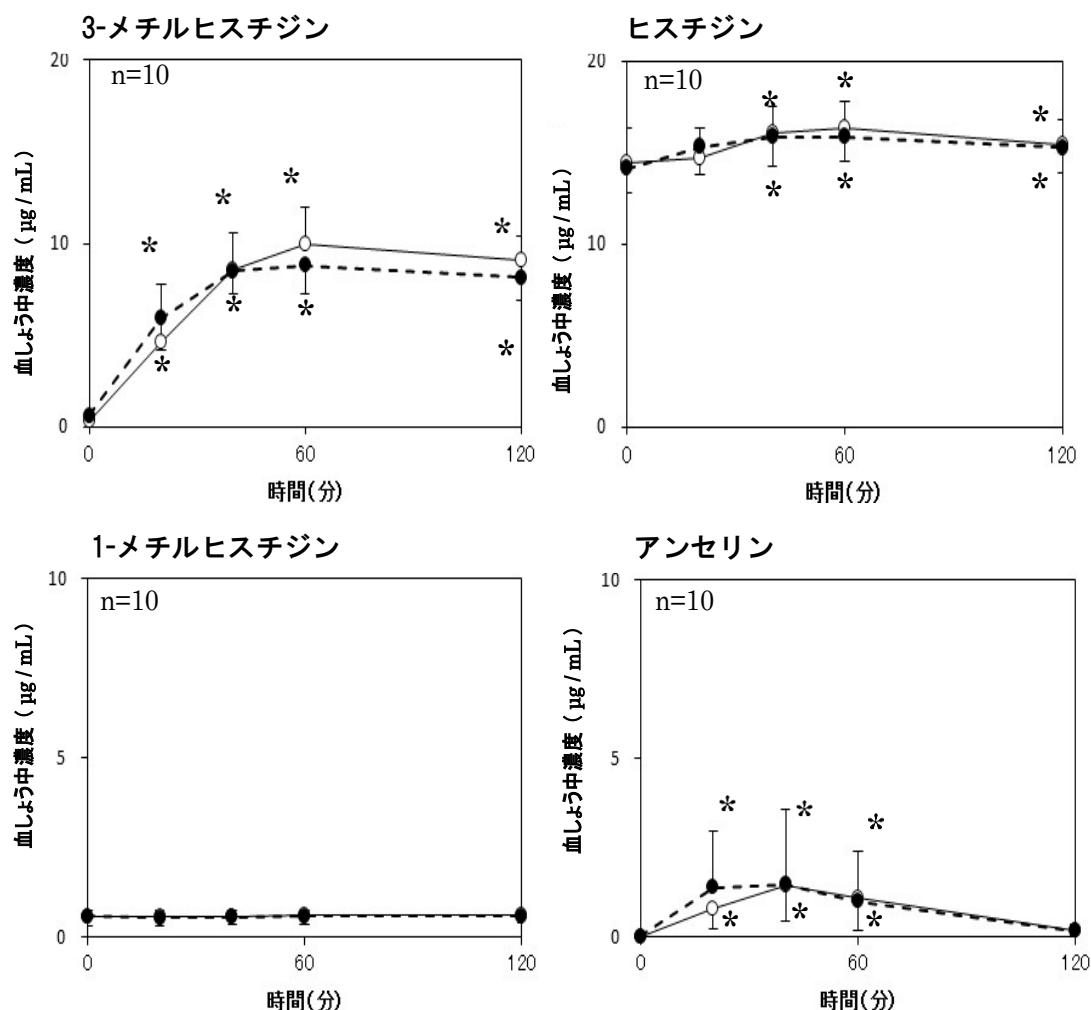


図 4-6. 二重盲検クロスオーバーによる市販鶏肉由来精製イミダゾールジペプチド粉末経口摂取後のイミダゾールジペプチドおよびその代謝物の血中濃度推移 [91]

市販イミダゾールジペプチド A 社製品(●)、および B 社製品(○)それぞれを摂取した後、120 分までの被験者血しょう中の各化合物の血中濃度推移を図 3 と同じ HPLC 条件で測定した。各シンボルは 10 名の平均値、バーは±SD を示す。\* はイミダゾールジペプチド製品の摂取前(0 分)と摂取後の各時間の間で統計的有意差が観察された( $p < 0.05$ , 対のある Student の  $t$  検定法)。

イミダゾールジペプチドの純度の点で製品間に差があったものの、イミダゾールジペプチドとその構成アミノ酸の血中濃度推移には個人間および製品間で大きな変化は認められなかった。すなわち、2 社のイミダゾールジペプチド製品のアンセリンとカルノシンの混合比率は 2.6 : 1 (アンセリン 720 mg、カルノシン 280 mg)であったが、両社の製品を経口摂取しても循環血中ではカルノシンは全く検出することができなかった。これは健康人の血中に存在するカルノシン分解酵素により、カルノシンが速やかに分解されるためと考えられた。一方、カルノシン分解酵素に対

して抵抗性を示すアンセリンの分解速度は遅延するために、経口摂取後に血中で検出することが可能であった。このイミダゾールジペプチドの代謝を反映して、カルノシン構成アミノ酸である L-ヒスチジンとアンセリン構成アミノ酸である 3-メチルヒスチジンが血中で検出された(図 4-6)。

また、アンセリンと 3-メチルヒスチジンの血中最高濃度時間  $C_{max}$  を計測して比較したが、両社の製品ともに 40 分であり、差異は認められなかった(表 4-6)。

以上の結果から、製法や純度が異なった市販のイミダゾールジペプチド製品でも、由来が同じチキンエキスの場合は、ヒト試験の評価においてその利用能はほとんど違いはなく生物学的同等性を有していることが確認された。

表 4-6. 市販イミダゾールジペプチド製品の経口摂取後の血中動態のまとめ [91]

被験食	3-メチルヒスチジン		アンセリン	
	$AUC_{0-2}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$AUC_{0-2}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
A 社製品	$14.6 \pm 2.1$	$9.0 \pm 1.3$	$1.7 \pm 2.2$	$1.7 \pm 2.1$
B 社製品	$16.9 \pm 5.5$	$10.9 \pm 2.7$	$1.6 \pm 1.2$	$1.5 \pm 1.0$
ANOVA	NS	NS	NS	NS

NS: not significant

#### 4-3-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果

##### 被験対象者

本試験の参加者総数 58 名のうち、36 名が心理学的検査と介護者同伴での面接および参加者の病歴や疾患の有無を判断して、MCI と診断された。図 4-7 に示すように、無作為化後に実薬群と偽薬群を各 18 名登録したが、このうち 30 名(各群 15 名ずつ)がフォローアップ試験までを完遂した。表 4-7 にその特性値を示す。また、全員が規則遵守の記録で被験食の摂取率 90 %以上を達成したことを報告した。食事調査から推定された毎日の食事からのアンセリンとカルノシンの摂取量は、2 群間で同等であった。



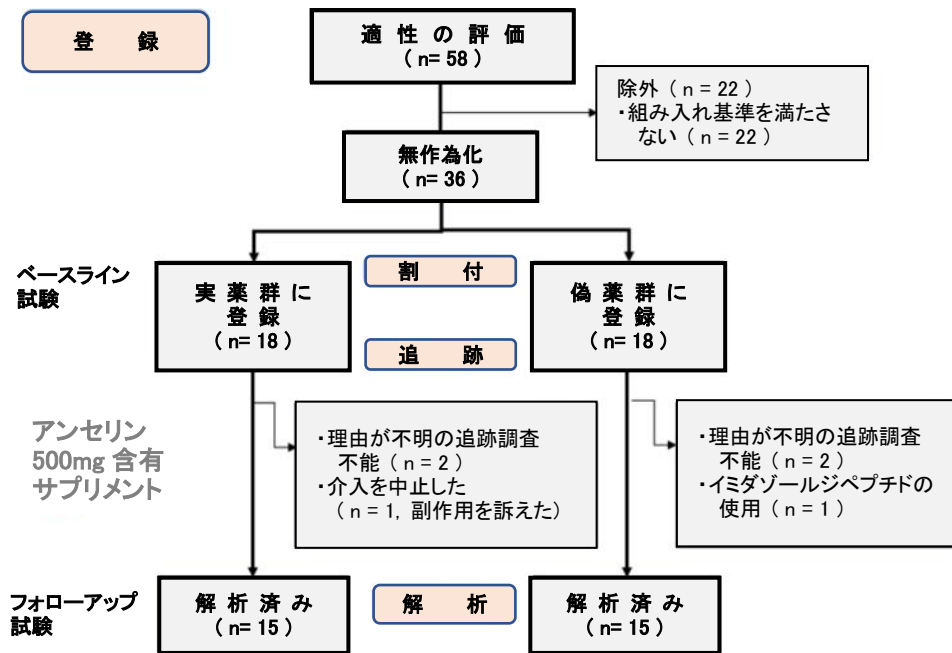


図 4-7. 試験中の被験者数を示すフロー図 [92]

ベースライン試験：介入開始時の試験。フォローアップ試験：開始後 12 週間後の試験

表 4-7. 試験を終了した被験者のベースライン時の特性値 [92]

	実薬群	偽薬群	p 値
年齢	74.5 ± 4.6 <sup>a</sup>	72.0 ± 5.2	0.17
性別 (M/F)	11/4	8/7	0.26
BMI	21.9 ± 2.2	21.4 ± 2.1	0.49
教育歴	15.4 ± 2.5	15.0 ± 1.9	0.62
アンセリン (mg/日)	335 ± 55	368 ± 42	0.71
カルノシン (mg/日)	162 ± 33	171 ± 20	0.86

## 被験食組成

実薬群の組成処方には、サケ肉由来精製アンセリン(> 93 %)が含まれている。実薬群のサプリメントは、アンセリン粉末、デキストリン、マルトース、甘味料(ステビアとスクラロース)、フレーバー、ビタミン C、クエン酸、およびフェルラ酸で構成された。表 4-8 に、1 包に含まれる量を示す。実薬食中のアンセリンを偽薬食はデキストリンに置き換えた。両群に提供されたサプリメントは、視覚、嗅覚、味覚によって区別がつかなかった。

表 4-8. 試験食の組成 [92]

成分	実薬食	プラセボ食
アンセリン	250 mg	0 mg
フェルラ酸(FA)	15 mg	15 mg
ビタミン C (V.C)	75 mg	75 mg
クエン酸	200 mg	200 mg
マルトース	500 mg	500 mg
甘味料	11 mg	11 mg
フレーバー	7 mg	7 mg
デキストリン	942 mg	1192 mg
合計	2000 mg	2000 mg

また、抗酸化活性試験において、アンセリンは強力な HClO スカベンジャーであることが示され、HClO の毒性を特異的に除去した(図 4-8)。フェルラ酸は OH ラジカルの毒性を除去し、ビタミン C は ONOO ラジカルの毒性を除去した。我々は、実薬群の被験者が 1 日当たり 500 mg、朝と夕の両方で 250 mg のアンセリンを摂取するように、1 日に 2 包を提供した。

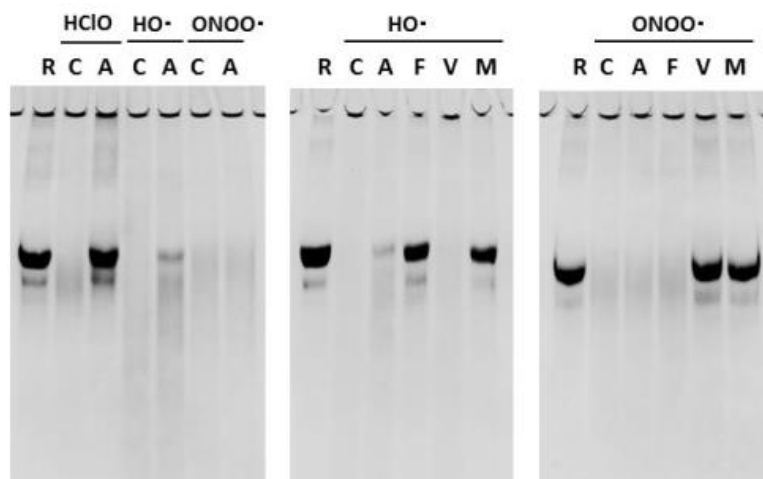


図 4-8. 次亜塩素酸 HClO スカベンジャーとしてのアンセリン [92]

HClO (5.0 mM)、HO· (10 mM)、ONOO· (5.0 mM)。

R : 参照タンパク質、C : 対照、A : アンセリン、F : F A、V : V.C、M : 混合物。

#### 被験者の認知機能に及ぼす作用の評価

表 4-9 は MMSE 試験での結果を示す。主要評価項目である MMSE スコアの変化量(双方向反復 ANOVA (時間 x 処置)、 $F(1,28)=4.8462$ ,  $p=0.036$ )において、実薬食群と偽薬食群の間で有意な差が認められた。図 4-9 に示すように、実薬食群では MMSE スコアが悪化した被験者はいなかったが、偽薬食群では、2 例が MMSE と認知症の境界値(23/24)を下回り、いずれも認知症発症の診断と矛盾しない症状を呈した。ADAScog スコアでは 2 群間のスコア変化に有意差は認められなかった( $p=0.92$ )。実薬食群のスコア変化量は $-0.4 \pm 3.2$ 、偽薬食群のスコア変化量は $-0.3 \pm 2.6$ であった。

表 4-9. 試験を完遂した被験者の MMSE 心理学的試験スコア [92]

	Baseline		Follow-up		Change (Time x Treatment)		
	Active	Placebo	Active	Placebo	Active	Placebo	p value
MMSE	25.5±2.1	26.9±2.8	27.3±1.8	26.9±3.0	1.8±2.0	0±2.5	0.036*

\* P 値は有意差  $p < 0.05$

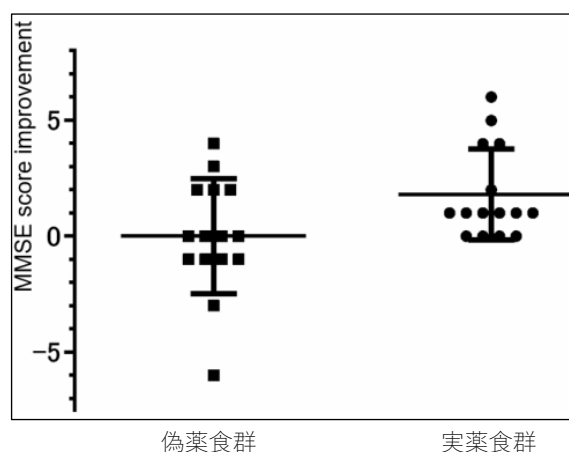


図 4-9. MMSE の得点変化の分布 [92]

点：各個人の改善点。棒：偽薬またはアンセリン投与群の平均±SD

MMSE のスコア変化に対する食事によるアンセリンまたはカルノシンの 1 日摂取量の寄与度を評価するために、重回帰分析を行った(表 4-10. 回帰変動、 $p = 0.0014$ )。その結果、アンセリン補給の 12 週間における MMSE スコアの改善には、毎日のアンセリン摂取は負の効果(部分回帰係数 =  $-0.0109$ 、 $p = 0.0209$ )を、そして毎日のカルノシン摂取の正の効果が認められた。アンセリン補給の有益性は、毎日の食事からアンセリン摂取量が少ない被験者では高いことが示唆された。

表 4-10. 食事によるアンセリンとカルノシンの摂取と MMSE スコア変化量の重回帰分析[92]

Variable	Partial regression coefficient	Standard error	Standard partial regression coefficient	F value	t value	p value <sup>a</sup>
Active/Placebo (1/0)	1.5710	0.6214	0.4426	6.3915	2.5281	0.0176*
Anserine (mg/day)	-0.0109	0.0045	-1.8426	6.0140	-2.4524	0.0209*
Carnosine (mg/day)	0.0240	0.0087	2.0279	7.5088	2.7402	0.0107*

\* P 値は有意差  $p < 0.05$

## 臨床上の安全性に関する所見

実薬食群の被験者 1 名がベースライン時の検査前に熱中症のような自覚症状を呈したため、試験を変更したが、その後、被験食品をほとんど摂取せずに、途中でめまいが生じたために脱落した。実薬食群 2 例および偽薬食群 2 例の 4 例で、試験実施中に理由不明のまま脱落した。このほ

かに、有害事象に関して因果関係がある報告はなかった。

### 血中 CRP 値に対するアンセリン投与の影響

脳におけるアンセリンの作用機序を調べるために、著者らは、経口アンセリン補給の 7 日前後に、上述の RCT の参加者からの 14 人の高齢ボランティアの血液を試験した。血中 CRP の有意な低下が認められた(対応のある t 検定後の  $p = 0.036$ )。アンセリン投与後の MPO および tau-P 181 のレベルに有意差は認められなかった。

本試験とは別途行われた試験では、高齢ボランティアがアンセリン 750 mg とカルノシン 250 mg を摂取し、静脈血サンプルを提供した。摂取前、摂取後 20、40、60、80、および 120 分に得た血しょう試料を、アンセリンおよびカルノシンレベルについて試験した。アンセリンの最高血中濃度時間は 40～60 分であり、血中濃度の半減期は約 1 時間であった。一方、カルノシンは消化吸収されても血中で検出することはできなかった(図 4-10)。

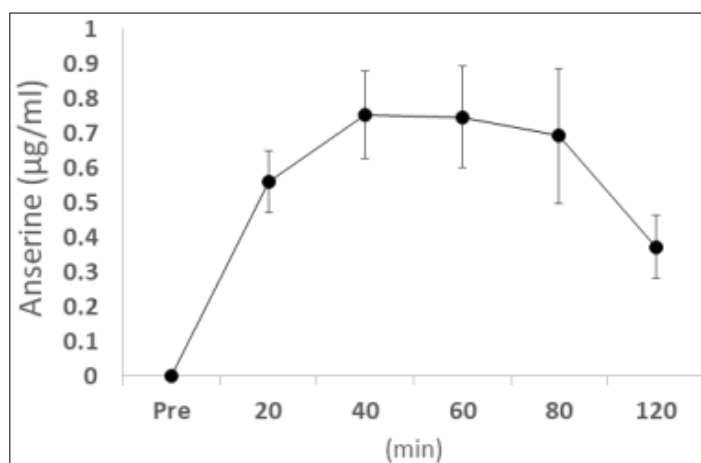


図 4-10. イミダゾールジペプチド摂取後のアンセリンの血中濃度推移 [92]

丸とバーはそれぞれ平均±標準偏差を示す。

アンセリン投与 1 週間後の血中アンセリン濃度と血清 CRP の変化量との関係を検討した(図 4-11)。血中アンセリン濃度と CRP 濃度の低下との間に有意な相関が検出された( $\Delta \text{CRP} = -0.004 \times (\text{血しょう中アンセリン濃度}) - 0.0665$ ;  $n=14$ ,  $R^2=0.79$ ,  $p < 0.05$ )。

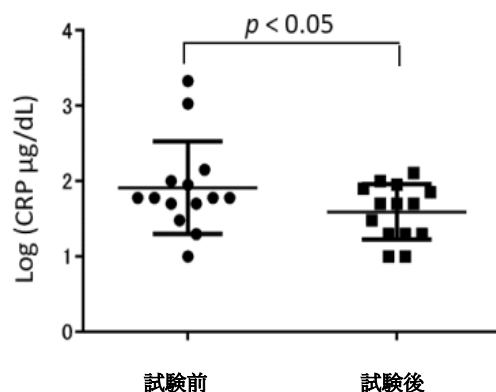


図 4-11. アンセリン投与後の血中 CRP(C-反応性タンパク質)濃度 [92]

ドット：各個体のデータを示す。棒グラフ：平均±標準偏差。

#### 4-4. 考 察

##### 4-4-1. 3 種配合抗酸化飲料の生体内酸化ストレス軽減効果

末梢血リンパ球のコメットアッセイスコアは生体内における酸化ストレスの指標と認識されている。しかしながら、単独の抗酸化剤やその組み合わせがコメットアッセイスコアを低減させたという報告はこれまでほとんどなされていない。本研究では 3 種の異なった抗酸化剤を含有する被験飲料を 8 週間摂取することによって、コメットアッセイスコアが著しく低下することが観察された。さらに、この低下作用は飲用を中断した 4 週間後(12 週目の検査)でも持続しているものであった。一方、対照群では試験期間中、コメットアッセイスコアは高値を持続する傾向が認められた(図 4-2)。生活習慣や抗酸化剤摂取状況のモニタリングでは試験実施計画違反の事例は認められず、両群ともに試験期間を通して飲酒や喫煙などの生活習慣上の変化も認められなかった。被験飲料摂取群で認められたコメットアッセイスコアの減少が飲料摂取より遅れる理由について不明であるが、リンパ球の生体内寿命が平均して数週間から 1 か月程度であることから、この遅れは循環するリンパ球が新たに置き換わる時間差に由来すると推測される。

我々は各種 ROS による DNA 分解に対して抗酸化剤が異なった作用を持っていることを観察している。特にイミダゾールジペプチドは *in vitro* において  $H_2O_2$  を含む 4 種の ROS による DNA 分解を抑制する作用を有している(第 2 章)。しかしながら、イミダゾールジペプチドがコメットアッセイを使用して生体内での DNA 傷害を軽減させるという報告はこれまで行われていなかった。いくつかのヒト試験の報告では単独の抗酸化剤投与ではコメットアッセイスコアの減少効果は認められなかったというものであった[128]。このことから、これらの研究結果は、DNA の酸化は複雑な ROS ラジカル生成ネットワークによって起こされているものであり、したがって単独の天然抗酸化剤や抗酸化作用が類似したもの同士の配合では全ての ROS ラジカルの作用を完全に消去することが困難であることを強く示唆しているものである。したがって、本研究はオープン方式のヒト試験ではあるけれども、図 4-2 に示した結果は多様な抗酸化剤の組み合わせが健常人に DNA 酸化傷害を著しく軽減させることを強く示唆しているものと考えられる。さらに、別

途、我々が行った中年女性を対象とするプラセボ比較・二重盲験法によるヒト試験でも、この抗酸化剤の配合は顕著に DNA 傷害を軽減する作用を持つことが観察されている。

また、本研究では脂質代謝における有益な作用も観察された。被験飲料摂取群のベースライン(0週)の血しょう総コレステロールおよび LDL コレステロール値が高かったために、これらの数値は抗酸化剤配合体の飲料を摂取することによって減少する結果であった(表 4-3)。摂取群を総コレステロールが 200 mg/dL 以上と LDL コレステロールが 120 mg/dL 以上の二つの群に分けて層別解析すると(表 4-4)、8 週目では双方のコレステロールともに有意に減少する結果であった。他方、総コレステロール 200 mg/dL 以下および LDL コレステロール 120 mg/dL 以下では、非摂取群対照と同様に試験期間を通して変化しなかった。

これらの結果から、抗酸化剤配合体は、異常値に近い状態の総コレステロールと LDL コレステロールの血中濃度を低下させる作用を持つが、正常または低値の状態の場合には影響しないことを示すものであった。すでに報告されているように[129, 130]、アスコルビン酸やフェルラ酸の単独、または他の抗酸化剤との併用によって血清総コレステロール、LDL コレステロール、およびトリグリセリドが低下することが知られているが、これらの抗酸化剤または抗酸化剤の配合が生体内酸化ストレスを軽減することによって脂質代謝を改善したものなのかどうかは不明である。これに対して本試験での抗酸化剤の配合は DNA 酸化傷害を軽減する効果と併せて血清中のコレステロール濃度を正常化することができるものであった。ただし、コメットアッセイスコアの軽減作用と同様に、脂質代謝改善に及ぼすそれぞれの抗酸化剤の相互作用やその作用機序については不明であった。今後、単独の抗酸化剤と抗酸化剤の配合の効果を比較するヒト試験が必要である。

(本研究の一部は農水省「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」プロジェクト研究費により行われた)。

#### 4-4-2. チキンエキスを投与後のイミダゾールジペプチドの血中推移の測定－他社製イミダゾールジペプチドとの生物学的同等性試験

多様な機能性を持つイミダゾールジペプチドの吸収と体内への輸送はその他のペプチドや栄養素とは異なった様式で行われている[9]。経口摂取されたイミダゾールジペプチドはタンパク質分解酵素の作用をほとんど受けることなく腸管の受容体[8]を経由して吸収され、門脈血中へ移行する。門脈血中にはカルノシン分解酵素[131]が存在し、ここで速やかにβ-アラニンと L-ヒスチジンに分解されて末梢循環血液により各組織へ輸送、分配される。そしてエネルギー代謝が大きい骨格筋や脳組織などにはカルノシン合成酵素が存在しており[6]、組織中でカルノシンが再合成されて様々な生体機能を発揮していると考えられている。

これに対してヒトの組織ではアンセリンが存在することはほとんどないが、経口摂取されたアンセリンもカルノシンと同様に腸管で吸収され[132]、速やかにカルノシン分解酵素によりβ-アラニンと 3-メチルヒスチジンに分解される。カルノシン分解酵素によるアンセリンの分解では、アンセリンが酵素抵抗性を示すためにその分解速度はカルノシンよりも遅いことが知られているが[133]、ヒトの各組織では迅速に再びカルノシンへ合成されていると考えられる。

多様な生体機能を持つイミダゾールジペプチドの体内動態を解析することは、その生理的意義を理解する上で極めて重要である。ヒトでのイミダゾールジペプチド経口摂取後の血中動態を調べた報告がいくつかあるが[134-136]、血中や尿中にカルノシンが分解されずに存在する結果や血しょう中ではアンセリンが僅かに検出されたがカルノシンは検出されなかった結果などが報告されている。しかしながら、血しょうや組織中のイミダゾールジペプチドの代謝物である 1-および 3-メチルヒスチジンの測定に関してはまだ十分に検討されてこなかった。アミノ酸自動分析計に代わり、各種 HPLC 法でこれらの化合物を定量する方法が開発されてきたが、血しょう成分や除タンパク質剤などの影響で正確にこれらの化合物を定量できなかったことが主な原因であったと考えられる。

本研究では血中のイミダゾールジペプチドとその代謝物を同時に定量できるより適切な測定法を検討するために、血しょう中のイミダゾールジペプチドを定量する目的で開発された Dunnett らの HPLC 法[20]について、さらに改良を加えた。彼らの方法は短時間で分析が可能な利点を持つ一方で、被験試料中の成分や除タンパク質剤などのピークが測定すべき化合物のピークとオーバーラップするために被験試料からこれらの成分や化合物、特に除タンパク質剤を除去する前処理が必要であった。また、原法の 4%アセトニトリルを含有する溶離液はイオン対逆相-HPLC 法では一般的に使用されるものであるが、この溶離液を使用した場合には TCA などの除タンパク質剤や血しょう成分のピークが 3-メチルヒスチジンのピークとオーバーラップし、またヒスチジンと 1-メチルヒスチジンの分離が悪い欠点があった。

アセトニトリルを除いた本研究の溶離液では、図 4-4 に示したように、TCA などの影響を受けることなく、3-メチルヒスチジンの定量が可能であり、1-メチルヒスチジンとヒスチジンとの分離も良好であった。また、このアセトニトリルを含有しない溶離液をアイソクラティックの条件で通液してイミダゾールジペプチドとその代謝物を同時定量する方法は、1 回の測定が終了した後に 40%のアセトニトリル含有溶離液でカラムを洗浄することにより連続して使用することが可能であった。

市販の鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品のヒトでの生物学的利用能を比較するために、この改良した逆相-HPLC 法を用いて、健康な被験者を対象に二重盲検クロスオーバー方式で試験した。イミダゾールジペプチド 1g の経口摂取後の血中濃度推移を測定すると、摂取後 20 分で血中に出現するイミダゾールジペプチドは鶏肉イミダゾールジペプチドの主要成分であるアンセリンではなく、その分解産物である 3-メチルヒスチジンであった。このことは腸管吸収されたイミダゾールジペプチドが門脈血の中でカルノシン分解酵素により速やかに分解されることを示している。そして 3-メチルヒスチジンの約 1/10 の濃度であったがアンセリンが検出された。これはカルノシン分解酵素の分解から免れたアンセリンが血中へ移行してきたものと考えられる。一方、もう一つの成分であるカルノシンは被験者全員で全く検出されなかったが、その構成アミノ酸であるヒスチジンは僅かな増加が観察された。

市販の鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能に関しては、摂取時期や製品間でアンセリンとその代謝物である 3-メチルヒスチジンの血中濃度の変化に大きな差はなかった。さらに、市販製品別に 10 名の被験者に分けてその AUC と Cmax(表 4-6)を比較しても大きな差は認められなかった。このことは製品中のイミダゾールジペプチドを構成するアンセリンとカル

ノシンの含有比率に違いがなければ、腸管吸収や血中移行もほとんど同じであることを示唆するものであった。また、これらの結果はアンセリンを主成分とするマグロエキスを由来イミダゾールジペプチドの経口摂取による血中濃度推移[136]より若干低い値であったが極めて近似しているものであった。

以上のことより、本研究で改良を加えた逆相-HPLC 法による血しょう中のイミダゾールジペプチドとその代謝物の定量法は、イミダゾールジペプチドのヒト血中濃度推移を調べる研究を行なう上で有用であると考えられた。

#### 4-4-3. 軽度認知障害に対する鮭アンセリンの認知機能改善効果

本研究は、天然の HClO スカベンジャーであるアンセリンが MCI 患者の認知機能に及ぼす効果を初めて示したものである。先行研究では、1000 mg/日のチキンエキス由来のアンセリン/カルノシンサプリメント(アンセリン 750 mg とカルノシン 250 mg)の摂取が認知機能の維持に有用であり、脳血流量を維持することが示されていた[119, 120]。これに対して、アンセリン単独で 500mg/日を摂取した本試験では、MMSE スコアの変化をみると、実薬食群で  $1.8 \pm 2.0$ 、プラセボ食群で  $0 \pm 2.5$  であったことから、アンセリン 500 mg/日でも有意な改善効果が発揮されることが判明した。

また、最近行われた久山町のコホート研究において、Hata らは認知症発症リスクと魚類に含まれるアンセリンの代謝産物である  $\beta$ -アラニンの血清濃度との間に逆相関があることを明らかにした[137]。これらの観察結果と一致して、Toh らはメタアナリシスによって、アンセリンの毎日の摂取が、特に記憶領域において認知機能の改善効果を有することを明らかにしている[138]。したがって、経口的にアンセリンを補給することは、認知症リスクが高い高齢者にとって極めて有益であると合理的に推定することが可能である。

イミダゾールジペプチドの認知機能の改善に及ぼすその作用機序について考察してみると、まず、AD の病因における神経炎症が注目を集めるようになってきたことが挙げられるが[110]、既往の研究で、トランスジェニック AD マウスモデルにイミダゾールジペプチドを経口摂取させると、損傷を受けた脳組織近傍に出現するミクログリア細胞の活性化を抑制し、炎症反応の調節に関与することが示唆されている[139]。また、トランスジェニック AD マウスモデルでは、好中球を含む自然免疫系が AD マウスの神経炎症および記憶力低下に関与しており、Zenaro らは、好中球が血管壁に付着し、AD モデルマウスおよび AD 患者の脳の老人斑に向かって脳組織に浸潤することを報告している[140, 141]。また、彼らは AD モデルマウスおよび AD 患者の脳における好中球細胞外トラップ(NET)周囲に MPO が蓄積されることを見出している。一方、好中球の血管壁への吸着に関与する分子である LFA-1 に対する抗体を投与すると、脳組織における老人斑の蓄積が減少し、ミクログリア細胞の活性化が抑制され、AD モデルマウスの記憶機能が改善することが明らかになっている[140]。

AD モデルマウスで MPO 活性を抑制することにより認知機能が改善されることは[120]、逆に AD の進行において、好中球が神経血管壁に付着して MPO を放出し、MPO が HClO ラジカルを産生して神経炎症を引き起こしていることを強く示唆している。先行研究において、カルノシンを補給するとこれらのマウスの血管異常が回復し、AD モデルマウスにアンセリンを摂取させた



場合も同様に脳微小血管周皮細胞の損傷が有意に抑制されることから[139]、図 4-8 に示したように、アンセリンは MPO によって生産される HClO ラジカルのスカベンジャー作用を介して神経炎症を軽減させることにより、これらの効果を発揮させたものと推測される(第 2 章参照)。

本研究の AD に対するアンセリンの作用と一致するその他の疾患における効果について文献的に上げてみると、Peters ら[142]は、糖尿病マウス(db/db)において、アンセリンが糖尿病性腎症を改善し、タンパク尿を半減させることを報告している。また、アンセリンはカルノシンよりも強い抗酸化活性を有することを報告しているが、これはカルノシンやその誘導体による糖尿病性腎症の治療効果と一致するものであった[143-145]。AD および糖尿病性腎症に加えて、網膜変性や肺炎などの様々な疾患においても、アンセリンは炎症に対する抗酸化作用を示すものであり、これらの疾病の原因には必ず好中球を介する MPO 活性が関与しているものであった[146, 147]。

また、本試験に先行して行われたパイロットモニタリング試験では、アンセリン 500 mg を毎日 1 回、12 週間投与した健康な成人ボランティア 10 名において、血中クレアチニンレベルが統計学的に有意に改善することが判明している。これは腎微小血管系に対するアンセリンの潜在的効果を示唆するものである。また、げっ歯類モデルでは、イミダゾールジペプチドによりウイルス誘発性の急性肺障害および MPO 媒介性の敗血症性ショックが軽減され[148, 149]、急性または慢性炎症に対するアンセリンの有効性に関するエビデンスも、経口的アンセリン摂取が内因性 HClO の有害作用を防ぐのに有用であるという考えを支持するものである。

本試験で確認された結果は、アンセリン 500 mg/日、12 週間の摂取が、HClO ラジカルの作用を抑制することにより、MCI の高齢者の認知機能を正常な状態に維持することに有用であることを提示したものである。また、アンセリンによる MPO-HClO 媒介炎症反応の抑制をさらに強化するためには、ビタミン C またはフェルラ酸のような添加剤によって相補的に有効性の向上も期待できることが考えられた。すなわち、ビタミン C とフェルラ酸はそれぞれ AD 患者に良好な効果をもたらすとの報告があるが[150, 151]、ビタミン C は ONOO ラジカルを消去し、フェルラ酸は HO ラジカルを消去するので(図 4-8)、HClO を消去する抗酸化活性を示すアンセリンと相乗作用をもつ可能性があるということである。

以上のことより、HClO ラジカルの強力なスカベンジャーである天然抗酸化剤のイミダゾールジペプチド、なかでもアンセリンは脳微小毛細血管損傷および AD 痴呆に関連する認知機能低下をもたらす MPO - HClO - NETs カスケードを抑制し、認知症の前段階にある MCI の高齢者を認知症へ進行させることなく、正常化させる可能性をもつ機能性素材の一つであることが示された。

#### 4-5. 結 論

著者らの以前の研究で確立した廃鶏屠体のチキンエキスから分離精製したイミダゾールジペプチド素材が、ヒトの生理機能へ有益な効果を発揮できることを確認するために、健康人を対象としたヒト介入試験を実施した。生体内産生 ROS ラジカルによるタンパク質分解阻止作用として選ばれた ClO<sup>-</sup>・消去剤のイミダゾールジペプチド 400 mg、HO<sup>•</sup>・消去剤のフェルラ酸 20 mg、そして ONOO<sup>-</sup>・消去剤の V.C 300 mg を配合した清涼飲料水を 8 週間摂取した試験では、生体内酸化

ストレスの指標である末梢血リンパ球 DNA のコメットアッセイスコアが顕著に低下し、また血中 LDL-コレステロール含量が有意に減少する効果を示した。このことから、生体内で発生する ROS ラジカルによる遺伝子 DNA の酸化傷害を防止するために天然抗酸化剤を摂取する場合には、各 ROS ラジカルに対して抗酸化活性をもつ抗酸化剤の組み合わせが効果的であることが示された。

また市販されている他社の鶏肉イミダゾールジペプチド製品との生物学的同等性について血中濃度推移を指標に試験したが、使用原料、分離精製法、純度に相違があっても鶏肉由来イミダゾールジペプチドの血中濃度推移に大きな変化は認められず、したがって鶏肉イミダゾールジペプチドであればヒト生体内での効果は同じと判断される結果であった。このことは、原料が同じイミダゾールジペプチドであればその生理機能に及ぼすイミダゾールジペプチドの効果などの知見を共有できることを示すものであった。

さらに、好中球 MPO が生産する HClO ラジカルが深く関与すると考えられる神経細胞の酸化傷害、すなわち神経変性による記憶機能の低下に対して、鶏肉イミダゾールジペプチドに代えて鮭エキスのアンセリン単独による改善効果を試験した。その結果、自覚できない記憶力低下状態にある高齢者の軽度認知障害に対して鮭アンセリンは記憶力の低下を防止するだけでなく、記憶力を改善させる効果を示した。アンセリン単独の投与の場合は、鶏肉イミダゾールジペプチドの半量の摂取量でほぼ同等の認知機能改善効果が認められ、アンセリンを摂取した被験者全員が試験期間中に認知症へ進行することがなかった。

これらの結果より、食品成分中の抗酸化活性測定法として一般に普及している試験方法では明確な抗酸化活性を示さないイミダゾールジペプチドが、*in vitro* で確認された生体内産生 ROS ラジカル、特に好中球 MPO が生産する HClO ラジカルに対するスクベンジャーとしての抗酸化活性がヒトの生体内においても健康維持のうえで重要な作用をもっていることが示された。すなわち、老化を促進すると言われる生体内産生 ROS ラジカルによる遺伝子 DNA の酸化傷害をイミダゾールジペプチドは有意に抑制する作用をもつこと、そして好中球 MPO が関与して悪化すると言われる炎症性神経変性の典型的な疾患である認知症の予防に有効な作用をもっていることである。従って、医療や介護が不要な健康寿命の延伸が望まれている高齢化が進む我が国において、イミダゾールジペプチドは健康寿命を損なう身体的老化の進行や認知症発症を遅延させて、高齢者を健康な状態に維持するための有力な食品素材になり得ることを強く示唆するものである。

## 第5章 総括

### 5-1. 本研究で得られた結果の要旨

本研究の第2章ではイミダゾールジペプチドの抗酸化作用に関する検証試験を行った。まず、一般的に普及している食品中の抗酸化活性を定量する方法でイミダゾールジペプチドの抗酸化活性を測定し、抗酸化性食材としてのイミダゾールジペプチドの位置付けを行った。一般的に使用される抗酸化活性測定法は、人工的に作られたラジカル物質を標的にして、それを消去する作用として定量されている。イミダゾールジペプチドはこれら一般的な抗酸化活性測定法で測定すると、極めて弱い抗酸化作用か、抗酸化作用を全く有していないものとして分析された。すなわち、この問題は、イミダゾールジペプチドの抗酸化作用を中心において、その健康機能性を検討する目的の本研究にとり、極めて重大な問題であった。

イミダゾールジペプチドが従来の食品中の抗酸化活性物質試験でほとんど抗酸化活性を示さなかったことに対応し、人工的に作成されたラジカルに代えて、生体内で産生される ROS ラジカルを対象にした抗酸化活性測定法の開発を行った。生体内で恒常的に産生される ROS ラジカルは、細胞内エネルギー生産器官であるミトコンドリアで発生する  $O_2^-$ 、そしてこれから派生する過酸化水素( $H_2O_2$ )、水酸化ラジカル( $HO\cdot$ )、次亜塩素酸ラジカル( $ClO\cdot$ )および過酸化亜硝酸ラジカル( $ONOO\cdot$ )の5種類が主要なものである。 $O_2^-$ を除く4種の ROS ラジカルを標的として、イミダゾールジペプチドの抗酸化活性を測定した。抗酸化活性は、これらの ROS ラジカルのタンパク質および DNA 分子の分解作用を抑制する活性として定量した。その結果、生体内産生 ROS のタンパク質分解作用に対するイミダゾールジペプチドを含む各種天然抗酸化剤の抗酸化活性には ROS ラジカルへの特異性があることが観察された。イミダゾールジペプチドは好中球が産生する  $ClO\cdot$  に対して強い抗酸化作用を示すが、 $HO\cdot$  や  $ONOO\cdot$  には抗酸化作用を示さない性質である。同じ水溶性の V.C は  $ClO\cdot$  と  $ONOO\cdot$  に抗酸化作用を示すが、 $HO\cdot$  には全く抗酸化作用を示さなかった。これに対して、植物由来の疎水性抗酸化剤である V.E、アスタキサンチン、フェルラ酸などは  $HO\cdot$  には強い抗酸化作用を示すが、 $ClO\cdot$  や  $ONOO\cdot$  に対する抗酸化作用は弱い性質をもつものであった。DNA 分子の分解作用に対する抑制作用では、イミダゾールジペプチドは  $H_2O_2$  を含む4種の ROS ラジカルによる分解作用を全て抑制する活性を示した。その他の天然抗酸化剤は、ROS ラジカルのタンパク質分解抑制作用とほぼ同様の活性を示した。すなわち、V.C. は  $ONOO\cdot$  に対して、植物由来の疎水性抗酸化剤は  $HO\cdot$  による分解に対して強い抑制作用を示すものであった。これらの試験結果から、イミダゾールジペプチドは一般に用いられる食品中の抗酸化物質の測定法では抗酸化剤として活性が認められなかったが、生体内産生 ROS ラジカルに対しては、他の天然抗酸化剤と同等の抗酸化作用を有していることが確認された。特に、タンパク質分解抑制試験では、 $ClO\cdot$  消去剤としての作用を持つことが確認され、これは生理的には重要な抗酸化作用として注目されるべきものであった。

本研究の第3章では、イミダゾールジペプチドの機能性に関する既往の研究として報告されていない新規な作用を検索するために、恒常的に酸化ストレスを受ける個体の寿命と脳血管系の疾

患で重要な役割をもつ血小板への作用について試験した。

第3章1では、酸化ストレスを受ける個体の一生(寿命)に及ぼすイミダゾールジペプチドの影響についてショウジョウバエを用いて試験した。過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )による酸化ストレスを受けた時のショウジョウバエの寿命は平均90時間程度であったが、チキンエキスを由来イミダゾールジペプチドを投与したショウジョウバエの雌では寿命が108時間まで延長する結果であった。しかし、雄に対する延命効果は認められなかった。この雌雄に対する効果の相違の理由は不明であるが、雌ではイミダゾールジペプチドの体内代謝(分解)が雄の約1.5倍程度速いことが観察された。このことが雌の寿命を延長させた原因であるかどうかは不明であったが、この試験結果は、イミダゾールジペプチドは $\text{H}_2\text{O}_2$ の酸化ストレスを軽減することを通して寿命を延長させる可能性があることを示唆していると考えられた。

第3章2では、イミダゾールジペプチドのヒト血小板凝集に及ぼす作用を試験した。玉ネギに含まれるケルセチンは強い抗酸化活性を有し、かつ血小板凝集を抑制することが知られている。ケルセチンの抗酸化活性は米ぬか油から精製されたフェルラ酸と同様に $\text{HO}\cdot$ に対して強く発現する。このことから、抗酸化作用を示す標的になるROSラジカルの違いと血小板凝集抑制作用との間に関連性があるか、否かを調べるために、 $\text{ClO}\cdot$ 消去剤のイミダゾールジペプチド、 $\text{ONOO}\cdot$ 消去剤のV.C.、そしてケルセチンと同じ $\text{HO}\cdot$ 消去剤のフェルラ酸などの天然抗酸化剤の血小板凝集に対する影響を調べた。その結果、イミダゾールジペプチド、V.C.およびフェルラ酸はケルセチンが示すような強い血小板凝集抑制作用は示さなかった。ケルセチンと同様に $\text{HO}\cdot$ に対して強い抗酸化作用を持ち、かつ疎水性のフェルラ酸の血小板凝集抑制作用が弱いものであったことから、抗酸化活性と血小板凝集抑制作用の間には相関性がなく、ケルセチンの血小板凝集抑制作用はケルセチン自身が示す作用機序で発現しているものと考えられた。

本研究の第4章では、イミダゾールジペプチドの健康機能性食品素材としての有用性をヒト介入試験により検証を行った。

第4章1では、3種の生体内産生ROSラジカルのタンパク質分解抑制作用試験で選抜された $\text{ClO}\cdot$ 消去剤のイミダゾールジペプチド、 $\text{ONOO}\cdot$ 消去剤のV.C.そして $\text{HO}\cdot$ 消去剤のフェルラ酸の3種の抗酸化剤を配合した清涼飲料水を健常な中年男性が8週間摂取した場合の生体内酸化ストレス軽減作用を試験した。生体内酸化ストレスの指標は末梢血リンパ球DNAの酸化傷害スコア(コメットアッセイスコア)で測定したが、イミダゾールジペプチドを含む3種の抗酸化剤配合飲料は生体内ROSラジカルによって起こると考えられるDNA分子酸化傷害を表すコメットアッセイスコアを顕著に低減させる効果を示した。また、これに付随して血中の総コレステロール値、LDL-コレステロール値など、脂質代謝指標の改善作用も観察された。

第4章2では、同じ素材のイミダゾールジペプチドのヒトにおける健康機能の情報を共有できるようにするために、本研究のイミダゾールジペプチド素材と他社が製造販売している素材の生物学的同等性を経口摂取後の血中濃度推移を測定することで比較した。また、本研究では、われわれが開発した逆相-HPLC法により、血中のイミダゾールジペプチドとその代謝物質を測定した。この分析法では、従来法では必要であった血しょう成分の除去処理を必要とせず、イミダゾールジペプチドとその代謝物質を同時に定量することが可能であった。その分析結果から、同じ素

材のイミダゾールジペプチドであれば精製法や純度に相違があっても、血中濃度推移に大きな変化は認められず、体内への吸収や代謝に大きな差異はないことが確認された。

第4章3では、抗酸化剤としてのイミダゾールジペプチドが好中球 MPO の産生する ClO・消去剤としての作用をもつことから、ClO・による神経炎症と神経細胞の傷害で促進される高齢者の記憶力低下について、それを予防し、改善効果を示すかどうかの検証を行った。通常は、健常人とみなされるが、その半数以上が半年以内に認知症を発症すると言われる軽度認知障害(MCI)の高齢者を対象に、鮭エキスから精製したアンセリンを摂取させて、その記憶力改善に及ぼす効果を試験した。MCI の高齢者に対してアンセリン 0.5g/日を 12 週間投与すると、記憶力の低下が抑えられ、逆に記憶力を改善する効果が認められた。イミダゾールジペプチドを摂取した MCI の被験者は全員が認知症へ進行することなく、数例は認知機能が正常化することが観察された。これらの結果より、鮭由来アンセリン単独でも、鶏肉由来イミダゾールジペプチドと同等の認知機能改善効果を有していることが確認された。

最後のまとめとして、本研究では廃鶏屠体、あるいは魚肉加工廃液などに含まれるイミダゾールジペプチドをイオン交換クロマトグラフィーとナノろ過膜を組み合わせた分離精製法で得られたイミダゾールジペプチドを用いて、その健康機能性について探索および健康機能性の検証試験を行った。イミダゾールジペプチドのカルノシンとアンセリンはともに生体内産生 ROS に対して抗酸化作用を示し、特に好中球 MPO が生産する ClO・に対して強い抗酸化活性をもつことを明らかにした。そしてイミダゾールジペプチドはヒト試験により ROS ラジカルによる生体内酸化ストレスを軽減し、また、認知症の前段階に位置付けられる MCI の高齢者の記憶力改善効果をとおして認知症へ進行することを防止する作用をもつことが証明することできた。

## 5-2. 今後の課題

第4章で述べたように、健常な中年男性に対して3種の異なった抗酸化剤(イミダゾールジペプチド、アスコルビン酸およびフェルラ酸)を含有する被験飲料を8週間摂取することによって、リンパ球 DNA の酸化傷害が著しく低下することがコメットアッセイ法により観察された。また、脂質代謝における有益な作用も観察された。ただし、コメットアッセイスコアの軽減作用と同様に、脂質代謝改善に及ぼすそれぞれの抗酸化剤の相互作用やその作用機序については不明であった。今後、単独の抗酸化剤と抗酸化剤の配合の効果を比較するヒト試験が必要である。

第4章3では、MCI の高齢者に対してアンセリン 0.5 g/日を 12 週間投与すると、記憶力の低下が抑えられ、逆に記憶力を改善する効果が認められた。アンセリンを摂取した MCI の被験者は全員が認知症へ進行することなく、数例は認知機能が正常化することが観察された。これらの有益な効果は、おもにアンセリンが HClO スカベンジャーとして機能したためと考えられるが、経口摂取後の好中球へのアンセリンの取り込みに関する実験データが不足している。また、認知機能に対するアンセリンの有益な効果がどのくらい持続するのかを確認するための長期的な研究が

必要である。

上記の 2 つの試験は、どちらもイミダゾールジペプチドが生体内酸化ストレスを直接的に軽減させた可能性が示唆される。しかしながら、最近の研究では、カルノシンの直接的な抗酸化機構に加えて、異なる分子経路を通じて間接的に抗酸化機能を発揮する可能性があることが報告されている[152]。具体的には、カルノシンは、細胞の抗酸化反応の主要な調節因子である Nrf2（核因子エリトロイド 2 関連因子 2）の活性を調節することができるとのことである。そして、現在のところ、カルノシンがどのように Nrf2 経路を活性化させるのかは不明である。イミダゾールジペプチドの間接的な抗酸化作用についてもさらなる研究が必要である。

第 1 章で述べたとおり、脊椎動物ではカルノシン合成酵素(ATPGD-1)が存在しており、哺乳類ではエネルギー消費が活発な骨格筋や脳などの組織にイミダゾールジペプチドが特に多く分布している[6]。経口摂取されたイミダゾールジペプチドは腸管上皮のペプチドトランスポーター-1 を経由して腸からそのままのペプチドの形で吸収されるが[8]、ヒトとごく一部の動物種のみにおいては、肝臓や血液中でカルノシン分解酵素(CNDP1)によりイミダゾールジペプチドは一旦分解されてβ-アラニンとヒスチジンとなる。そして、血中のβ-アラニンとヒスチジンは骨格筋や脳組織に運ばれて ATPGD-1 により再びイミダゾールジペプチドのカルノシンになると考えられている[9]。本研究においては、イミダゾールジペプチドの経口摂取による健康維持に有益な機能性の実証試験を行なったが、イミダゾールジペプチドを摂取せずとも、その構成アミノ酸であるβ-アラニンとヒスチジンそれぞれを経口摂取すれば同様の有益な効果が得られる可能性が考えられる。さらに、必須アミノ酸であるヒスチジンは、イミダゾールジペプチドと同様に生体内 pH 平衡作用や金属キレート作用、抗酸化活性等の生理作用を有すること、そして、β-アラニンまたはヒスチジンのどちらか一方を長期的に経口摂取した場合でも筋肉中のカルノシン含量が増加したことも報告されている[153]。

しかしながら、一方では、赤血球[122, 154, 155]や血小板[156]がアンセリンを吸収することが示唆されていること、そして、好中球がイミダゾールジペプチドを取り込むことを示唆する報告もいくつかある[157, 158]。したがって、摂取されたイミダゾールジペプチドそのものが好中球や赤血球、血小板に直接取り込まれて、生体内酸化ストレスを軽減している可能性も考えられる。

これまで報告されてきたイミダゾールジペプチド摂取による健康機能性、そして本研究で検証された健康維持に有益な効果を効率的に得るためには、イミダゾールジペプチドまたはその構成アミノ酸をどのように摂取することがより有効であるのかの試験が必要である。

### 5-3. イミダゾールジペプチドの機能性素材としての展望

日本では健康への働きを表示できる食品として保健機能食品がある。保健機能食品には特定保健用食品(トクホ)、栄養機能食品、機能性表示食品の 3 種類がある。そのうちの機能性表示食品

制度は、2015 年 4 月に新たに導入された比較的新しい制度である。これは国の定めるルールに基づき、事業者が食品の安全性と機能性に関する科学的根拠などの必要な事項を、販売前に消費者庁長官に届け出れば、その食品に機能性を表示することが可能となる。2022 年 11 月 29 日時点での全届け出は 6,069 件であり、そのうちイミダゾールジペプチドを機能性関与成分とした届け出は 61 件であり全届け出数に占める割合は約 1 %であった。これらの中でイミダゾールジペプチドの表示しようとする機能性は主に 3 種類に分類され、1 つ目が「血清尿酸値が健常域で高めの方の尿酸値の上昇を抑制すること」、2 つ目が「日常生活での一時的な疲労感を軽減する機能があること」、3 つ目が「加齢によって低下する中高年の方の記憶力(情報を覚え、思い出す力)を維持する機能」である。

筆者が所属する東海物産株式会社においては、第 1 章で述べた強酸性陽イオン交換体クロマトグラフィーと NF 膜濃縮を連結した分離精製法にてチキンエキスおよび鮭エキスそれぞれに含まれるイミダゾールジペプチドを高度精製し、加工食品用の原料として 2011 年より食品メーカーに販売している。イミダゾールジペプチドを機能性関与成分とする食品の機能性表示食品への届け出数は 2018 年から増加し始めているが、東海物産株式会社においてもこの時期からイミダゾールジペプチド製品の販売数量が顕著に増加している。農研機構は、現在、農林水産物の機能性表示食品届け出様式作成例を公開しているが、これにはイミダゾールジペプチドも含まれている。このことから、イミダゾールジペプチドを機能性関与成分とする食品の届出が今後ますます増加することが予想される。

本研究の成果により、イミダゾールジペプチドの摂取が広く国民へ普及し、国民の健康増進の一助になることを願っている。特に、団塊の世代が 75 歳以上となる 2025 年問題は、日本での認知症患者が 700 万人に達すると予測されているほど深刻な問題であり、イミダゾールジペプチドが認知症発症を予防する食品素材、機能性成分としてこの問題の解決に少しでも貢献することができれば、著者の大きな喜びとするところである。

## Appendix 1. アルツハイマー病病態モデル細胞系でのイミダゾールジペプチドの効果

林要喜吉、柳内延也、高齢化に伴う痴呆予防のための機能性食物食材に関する研究：アルツハイマー病病態モデル細胞系を用いた探索(平成 15 年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書 vol.22、2004 年、伊藤記念財団)からの引用

### A1-1. 研究の背景

イミダゾールジペプチドは認知症発症の主要な原因になると言われる好中球および単球-マクロファージが有する Myeloperoxidase(MPO) [160]が生産する次亜塩素酸ラジカルに対して、特異的に抑制する作用を有することが確認されていた(第2章)。そこで著者らが精製したチキンエキス由来イミダゾールジペプチドを用いて行われた旭川医科大学生命科学教室 林 要喜吉教授(現名誉教授)らの *in vitro* でのアルツハイマー病病態モデルに対する神経細胞保護効果について引用する。なお、この試験は後述する本研究のイミダゾールジペプチドによる認知症予防効果を検証するヒト試験の根拠となる研究のひとつである。

### A1-2. 実験内容

アルツハイマー発症モデルとして、1) アミロイド- $\beta$ とマクロファージをラットの神経細胞培養液に添加して、神経細胞死を誘発する系、2) 抗アミロイドタンパク質前駆体(APP)抗体を用いて APP 機能不全により誘発される神経細胞死の系、そして神経細胞内へ APP 遺伝子導入して APP を細胞内で過剰発現させて細胞死を誘発する系の3系統の実験が行われた。これらの実験系は、生体内で神経細胞死を起こす可能性があるものであり、チキンエキス由来のイミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシンの混合体、ACmix)を添加して、直接的な神経細胞死の防止効果を試験したものである。

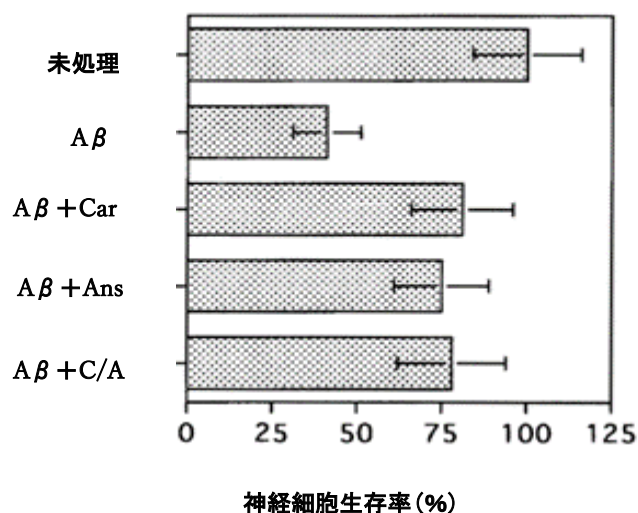
### A1-3. 実験結果

#### アミロイド- $\beta$ とマクロファージを添加した試験系での実験

ラット胎児(18 日齢)から調製した海馬神経細胞に対して、12 時間イミダゾールジペプチドを添加して前培養した後、炎症を起こさせるためにアミロイド- $\beta$ と同系ラットのマクロファージを添加して、神経細胞の生存率を測定している。

アミロイド- $\beta$ タンパク質とマクロファージを添加して誘導した神経細胞死に対して、非添加対照の生存率は 40 %だったが、試薬のカルノシン、アンセリン、そしてチキンエキス由来イミダゾールジペプチド(Ans と Car 混合体)は生存率を 75%以上に改善した(図 A1-1)。



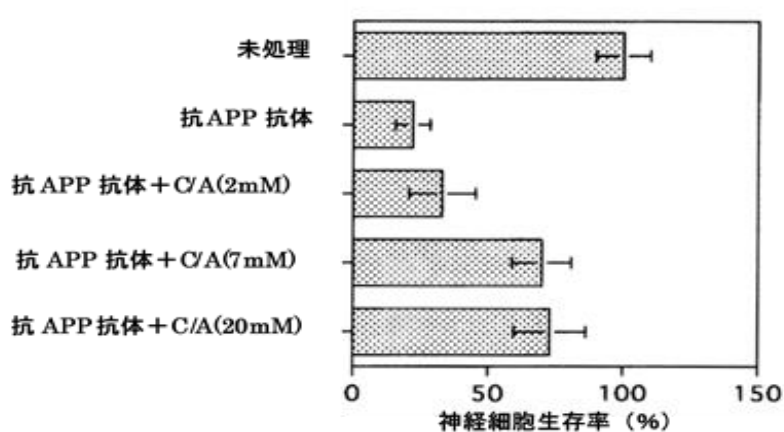


図A1-1. アミロイド- $\beta$ およびマクロファージ添加系でのチキンエキス由来イミダゾールジペプチド(Car/Ans)の神経細胞死防止作用。イミダゾールジペプチドでニューロンを12時間前処理した後、A $\beta$ とマクロファージの両方を培養系に加えた。4日後、細胞を固定し、抗APP抗体で免疫染色した。A $\beta$ ：アミロイド- $\beta$

#### 抗APP抗体誘発神経細胞死の系での実験

抗アミロイド- $\beta$ 前駆体抗体(抗-APP抗体)で神経細胞を処理すると、神経細胞が傷害を受けることが知られているが、この実験系ではチキンエキスから精製したイミダゾールジペプチドを用いて抗-APP抗体誘発神経細胞死の防止効果を調べている(図A1-2)。

対照の神経細胞の生存率が20%以下であったのに対して、イミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン混合体)は濃度依存的に生存率を高め、20 mM濃度での生存率は70%であった。



図A1-2. 抗APP抗体誘発神経細胞死に対するチキンエキス由来イミダゾールジペプチド(Car/Ans)の防止効果

ニューロンを様々な濃度のカルノシンとともに12時間培養した後、APPに対する抗体を各培養ウェルに分注した。ニューロンの生存率は4日後に測定した。

### APP 遺伝子導入神経細胞の生存に及ぼすチキンエキス由来イミダゾールジペプチドの作用

APP 遺伝子を導入して APP を過剰発現させると、大量の APP タンパク質が神経細胞内に溢れて、神経細胞死が誘発されるが[161]、それは経時的に増悪する経路を辿る。チキンエキス由来イミダゾールジペプチド(Car/Ans)は上記のアミロイド- $\beta$ とマクロファージが共存して起こる作用とは異なり、細胞死を完全には抑制できなかったが、APP タンパク質の蓄積によって起こる神経細胞死を遅延させる作用が観察された(図 A1-3)。

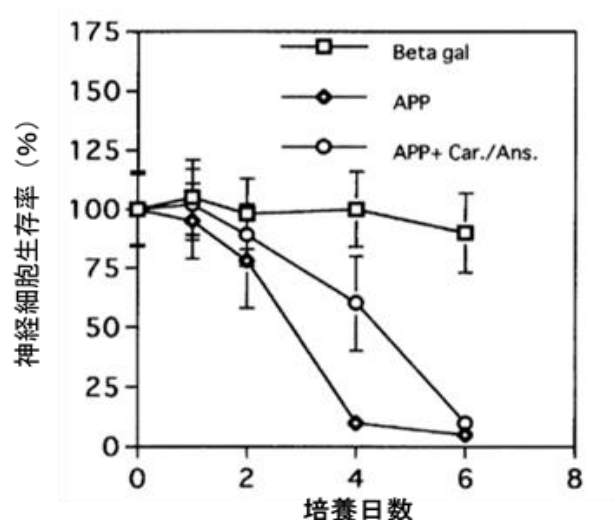


図 A1-3. APP 遺伝子導入神経細胞の細胞死に対するチキンエキス由来イミダゾールジペプチド (Car/Ans)の防止効果

細胞をカルノシン/アンセリン混合体で前処理し、APP 遺伝子または  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のいずれかをニューロンに導入して生存率を測定した。

### A1-4. 結果に関する考察

アミロイド- $\beta$ タンパク質とマクロファージを添加して誘導した神経細胞死は、アミロイド- $\beta$ タンパク質がマクロファージに異物と認識され、マクロファージが活性化されて各種 ROS ラジカルが放出されることによって起こると考えられる。これは典型的な脳内で起こる炎症反応の一つである。この炎症反応にはおそらく MPO により産生・放出される次亜塩素酸も関与していると考えられ、イミダゾールジペプチドは、次亜塩素酸ラジカルに対して強い抗酸化作用を持つことから、炎症反応による神経細胞死を防いだものと推定される。

抗アミロイド- $\beta$ 前駆タンパク質抗体(抗 APP 抗体)と APP 遺伝子導入による APP 過剰発現での神経細胞死を防止するイミダゾールジペプチドの作用は不明である。イミダゾールジペプチドが抗原抗体反応の際に発生する炎症反応や APP タンパク質の重合を抑制することから、神経細胞死が防止されるものと推測された。

これらの試験は、イミダゾールジペプチドがアミロイド- $\beta$ タンパク質や糖尿病で起こる血中の最終糖化産物(AGEs)の蓄積などで起こるアルツハイマー型認知症も予防する可能性を持つ極

めて重要な機能性食品素材であることを強く示唆するものであった。

## 文献

- [1] Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* **93**: 1803-1845.
- [2] Gariballa SE, Sinclair AJ (2000) Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* **29**: 207-10.
- [3] Gulewitsch WS, Amiradzibi S (1900) Über das carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. *Ber Deutsch Chem Ges* **B33**: S1902-S1903.
- [4] Ackermann D, Timpe O, Poller K (1929) Über das anserin, einen neuen Bestandteil der Vogelmuskulatur. *Hoppe-Seil Ztschr Physiol Chem* **B183**: S1-S10.
- [5] Suyama M, Maruyama M (1969) Identification of methylated beta-alanylhistidine in the muscles of snake and dolphin. *J Biochem* **66**: 405-407.
- [6] Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van SE (2010) Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem* **285**: 9346-9356.
- [7] Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T (2003) Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* **278**: 6521-6531.
- [8] Son DO, Satsu H, Kiso Y, Shimizu M (2004) Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biofactors* **21**: 395-398.
- [9] Stellingwerff T, Decombaz J, Harris RC, Boesch C (2012) Optimizing human in vivo dosing and delivery of  $\beta$ -alanine supplements for muscle carnosine synthesis. *Amino Acids* **43**: 57-65.
- [10] Winnick T, Winnick RE (1959) Pathways and the physiological site of anserine formation. *Nature* **183**: 1466-1468.
- [11] Wolf WA, Wilson W (1935) Carnosine and anserine in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* **109**: 565-571.
- [12] Tomba M, Torreggiani A (1999) Hydroxyl radical scavenging by carnosine and Cu (II)-carnosine complexes: a pulse-radiolysis and spectroscopic study. *Int J Radiat Biol* **75**: 1177-1188.
- [13] Biffo S, Grillo M, Margolis FL (1990) Cellular localization of carnosine-like and anserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nervous system. *Neuroscience* **35**: 637-651.
- [14] Harris RC, Marlin DJ, Dunnett M, Snow DH, Hultman E (1990) Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp Biochem Physiol* **A97**: 249-251.
- [15] Hipkiss AR, Brownson C (2000) A possible new role for the anti-aging peptide carnosine. *Cell Mol Life Sci* **57**: 747-775.

- [16] Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P (1995) Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett* **371**: 81-85.
- [17] Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DTJ, Bomero TA, Abbott JN (1998) Toxic effects of  $\beta$ -amyloid (23-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and  $\beta$ -alanine. *Neurosci Lett* **242**: 105-108.
- [18] Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC (2005) Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol* **513**: 145-150.
- [19] Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R, Majid A (2007) Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **38**: 3023-3031.
- [20] Dunnett M, Harris RC (1992) Determination of carnosine and other biogenic imidazoles in equine plasma by isocratic reversed phase ion-pair high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* **579**: 45-53.
- [21] Mora L, Sentandreu MA, Toldrá F (2007) Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. *J Agric Food Chem* **55**: 4664-4669.
- [22] 柳内延也, 塩谷茂信, 水野雅之, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2004) 動物エキス中のヒスチジン含有ジペプチド、アンセリン-カルノシンの HPLC による迅速定量法. *日本食品科学工学会誌* **51**: 87-91.
- [23] Abe H (2000) Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc)* **65**: 757-765.
- [24] 柳内延也, 塩谷茂信, Joosh Baljinnyam, 萩原昌司, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2007) チキンエキスからの機能性ジペプチドの抽出・精製とその利用. *MEMBRANE* **32**: 197-202.
- [25] 柳内延也, 塩谷茂信, 水野雅之, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2004) チキンエキス由来アンセリン-カルノシン混合体の抗酸化活性: 植物由来抗酸化物質との比較. *日本食品科学工学会誌*, **51**: 238-246.
- [26] 高橋真介, 柳内延也, 塩谷茂信, 遠藤準也, 萩原昌司, 鍋谷浩志 (2011) 活性酸素種による DNA 分子切断と食物由来の天然抗酸化剤によるその抑制作用. *日本食品科学工学会誌* **58**: 208-215.
- [27] Yanai N, Shiotani S, Hagiwara S, Nabetani H, Nakajima M (2008) Antioxidant combination inhibits reactive oxygen species mediated damage. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 3100-3106.
- [28] Harman D (1972) Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr* **25**: 839-843.
- [29] Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**: 547-581.
- [30] Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- [31] Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA (2007) A review of the interaction among

- dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* **18**: 567-579.
- [32] Hirayama O, Takagi M, Hukumoto K, Katoh S (1997) Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* **247**: 237-241.
- [33] Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* **14**:303-311.
- [34] 活性酸素の生物学. *化学と生物* **37**:251-259.
- [35] Marnett LJ, Riggins JN, West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* **111**: 583-593.
- [36] Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
- [37] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biochem Biotech* **62**:1201-1204.
- [38] Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**: 4290-4302.
- [39] Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 4244-4250.
- [40] Hipkiss AR, Chana H (1998) Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem Biophys Res Comm* **248**: 28-32.
- [41] Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DTJ, Herwig W (1998) Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochem Biophys Acta* **1380**: 46-54.
- [42] Sugisawa A, Umegaki K (2002) Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J. Nutr* **132**: 1835-1839.
- [43] Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T (1997) Dose-dependent incorporation of tea catechin, (-)-Epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin into human plasma. *Biosci Biotech Biochem* **61**: 1981-1985.
- [44] Hollman PC, van Trijp, JM, Buysman MN, van der. Gaag MS, Mengelers MJ, de Veries JH, Katan MB (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* **418**: 152-156.
- [45] MacCord JM (2002) Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods Enzymol* **349**: 331-341.
- [46] Gapper C, Dolan L (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* **141**:341-345.
- [47] Gechev TS, Hille J (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* **168**:17-20.
- [48] Brown CE (1981) Interactions among carnosine, anserine, ophidine and copper in biochemical

- adaptation. *J Theor Biol* **88**: 245-256.
- [49] Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3175-3179.
- [50] Aruoma OI, Laughton MJ, Halliwell B (1989) Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? *Biochem J* **264**: 863-869.
- [51] Yoon JH, Lee MS, Kang JH (2010) Reaction of ferritin with hydrogen peroxide induces lipid peroxidation. *BMB Rep* **43**: 219-224.
- [52] Choi SY, Kwon HY, Kwon OB, Kang JH (1999) Hydrogen peroxide-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine. *Biochim Biophys Acta* **1472**: 651-657.
- [53] Chen Q, Ames BN (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4130-4134.
- [54] von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* **220**: 186-193.
- [55] Hossain MN, Sakemura R, Fujii M, Ayusawa D (2006) G-protein gamma subunit GNG11 strongly regulates cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 645-650.
- [56] Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M (2008) Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine* **42**: 265-276.
- [57] Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ (2001) Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev* **122**: 1431-1445.
- [58] Shiotani S, Yanai N, Suzuki T, Tujioka S, Sakano Y, Yamakawa-Kobayashi K, Kayashima, Y (2013) Effect of a Dipeptide-Enriched Diet in an Adult *Drosophila melanogaster* Laboratory Strain. *Biosci Biotech Biochem* **77**: 836-838.
- [59] 塩谷茂信, 鈴木貴則, 坂野太研, 柳内延也 (2022) ケルセチン含有タマネギ外皮エキスの血小板凝集抑制作用. *日本食品科学工学会誌* **69**: 45-53.
- [60] Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Tyulina OV, Koshelev VB, Hori N, Carpenter DO (1997) Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Mol Neurobiol* **17**:259-271.
- [61] O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **34**:185-204.
- [62] Ruden DM, De Luca M, Garfinkel MD, Bynum KL, Lu X (2005) Drosophila nutrigenomics can provide clues to human gene-nutrient interactions. *Annu Rev Nutr* **25**: 499-522.
- [63] Bluher M (2008) Fat Tissue and Long Life. *Obes Facts* **1**: 176-182.
- [64] Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F, Moriyama M, Ikeda I, Chiba A, Oshita F, Imaizumi A, Yamamoto H, Miyano H, Horimoto K, Tochikubo O, Mitsushima T, Yamakado M, Okamoto N (2011) Plasma

- free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One* **6**: e24143.
- [65] Pascual-Anaya J, D'Aniello S (2006) Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. A comparative study. *Int J Biol Sci* **2**: 87-92.
- [66] Fonteh AN, Harrington RJ, Tsai A, Liao P, Harrington MG (2007) Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids* **32**: 213-224.
- [67] Bharucha KN (2009) The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism. *Pediatr Res* **65**: 132-137.
- [68] Bakhoun MF, Jackson GR (2011) Demise of the Flies: Why *Drosophila* Models Still Matter. *Prog Mol Biol Transl Sci* **100**: 483-498.
- [69] Rapport EW, Yang MK (1976) Free amino acid patterns in *Drosophila* strains which differ in morphological responses to hydroxyproline ingestion. *Insect Biochem* **6**: 549-552.
- [70] Pierce VA, Mueller LD, Gibbs AG (1999) Osmoregulation in *Drosophila melanogaster* selected for urea tolerance. *J Exp Biol* **202**: 2349-2358.
- [71] Shinoda T (1964) Biochemical studies on *Drosophila melanogaster*. I. free amino acids and pteridines. *Seikagaku* (in Japanese), **36**: 816-820.
- [72] Manoukas AG (1972) Free and peptide-bound amino acids in the insect *Dacus oleae* (GMELIN) grown under natural and artificial conditions. *Comp Biochem Physiol B* **43**: 787-794.
- [73] Nakamura H, Takishima T, Kometani T, Yokogoshi H (2009) Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *Int J Food Sci Nutr* **60** (Suppl 5): 106-113.
- [74] Yamori Y, Taguchi T, Hamada A, Kunimasa K, Mori H, Mori M (2010) Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. *J Biomed Sci* **17** (Suppl 1): S6.
- [75] Hipkiss AR (2011) Energy metabolism, proteotoxic stress and age-related dysfunction - Protection by carnosine. *Mol Aspects Med* **32**: 267-278.
- [76] Kitts DD, Weiler K (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* **9**: 1309-1323.
- [77] Altunbas A, Pochan DJ (2012) Peptide-based and polypeptide-based hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Top Curr Chem* **310**: 135-167.
- [78] Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* **585**: 325-337.
- [79] Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **76**: 560-568.
- [80] Lee KH, Park E, Lee HJ, Kim MO, Cha YJ, Kim JM, Lee H, Shin MJ (2011) Effects of daily



- quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract* **5**: 28-33.
- [81] Oh WJ, Endale M, Park SC, Cho JY, Rhee MH (2012) Dual roles of quercetin in platelets: phosphoinositide-3-kinase and MAP kinases inhibition, and cAMP-dependent vasodilator-stimulated phosphoprotein stimulation. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**: 485262.
- [82] Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove, JA, Gibbins, JM (2004) Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost* **2**: 2138-2145.
- [83] Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B, Gibbins JM (2008) Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* **154**: 918-939.
- [84] Garcia A, Quinton TM, Dorsam RT, Kunapuli SP (2005) Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A<sub>2</sub> generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood* **106**: 3410-3414.
- [85] Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X (2003) A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* **101**: 4423-4429.
- [86] Sugatani J, Fukazawa N, Ujihara K, Yoshinari K, Abe I, Noguchi H, Miwa M (2004) Tea Polyphenols Inhibit Acetyl-CoA:1-Alkyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine Acetyltransferase (a Key Enzyme in Platelet-Activating Factor Biosynthesis) and Platelet-Activating Factor-Induced Platelet Aggregation. *Int Arch Allergy Immunol* **134**: 17-18.
- [87] Osanai M, Yonezawa Y (1984) Age-related changes in amino acid pool sizes in the adult silkworm, *Bombyx mori*, reared at low and high temperature; A biochemical examination of the rate-of-living theory and urea accumulation when reared at high temperature. *Exp Gerontol* **19**: 37-51.
- [88] Yuneva AO, Kramarenko GG, Vetreshchak TV, Gallant S, Boldyrev AA (2002) Effect of carnosine on *Drosophila melanogaster* lifespan. *Bull Exp Biol Med* **133**: 559-561.
- [89] Krebs HA, Notten BM, Hems R (1966) Gluconeogenesis in mouse-liver slices. *Biochem J* **101**: 607-617.
- [90] Yanai N, Niitsuma T, Shiotani S, Hagiwara S, Nabetani H (2014) A Mixture of Histidine-Dipeptides, Vitamin C, and Ferulic Acid Reduces Comet Assay Scores in Normal Middle-Aged Men. *Food Sci Tech Res* **20**: 485-491.
- [91] 塩谷茂信, 鈴木貴則, 米山明, 柳内延也, 萩原昌司, 鍋谷浩志 (2017) HPLC 法によるヒト血しょう中のイミダゾールジペプチドおよびその代謝物の同時定量. *日本食品科学工学会誌* **64**: 437-445.
- [92] Masuoka N, Chenxu L, Haowei L, Inamura N, Shiotani S, Yanai N, Sato K, Sakurai K, Hisatsune T (2021) Anserine, HClO-scavenger, protected against cognitive decline in individuals with mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)* **13**: 1729-1741.

- [93] Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M (1995) Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* **217**: 584-591.
- [94] Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11848-11852.
- [95] Chaudière J, Ferrari-Iliou R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* **37**: 949-962.
- [96] Powers SK, Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **58**: 1025-1033.
- [97] Curtin JF, Donovan M, Cotter TG (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* **265**: 49-72.
- [98] Aruoma OI (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res* **523-524**: 9-20.
- [99] Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* **67**: 1210-1218.
- [100] Kontek R, Drozda R, Sliwiński M, Grzegorzczak K (2010) Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients. *Toxicol In Vitro* **24**: 417-424.
- [101] Retana-Ugalde R, Casanueva E, Altamirano-Lozano M, Gonzalez-Torres C, Mendoza-Nunez VM (2008) High dosage of ascorbic acid and alpha-tocopherol is not useful for diminishing oxidative stress and DNA damage in healthy elderly adults. *Ann Nutr Metab* **52**: 167-173.
- [102] Gaziano JM, Glynn RJ, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyne J, (2009) Vitamin E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the physicians' health study II, a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* **301**: 52-62.
- [103] alpha-tocopherol, beta carotene cancer prevention study group (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers. *N Engl J Med* **330**: 1029-1035.
- [104] Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, (1996) Lack of effect of long term supplementation with beta carotene on the incidence of Malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**: 1145-1149.
- [105] World Health Organization (2018) Towards a dementia plan: a WHO guide.
- [106] Alzheimer's A (2012) 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **8**:131-168.
- [107] Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavedo E, Crutch S, et al (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* **12**:292-323.
- [108] Loera-Valencia R, Cedazo-Minguez A, Kenigsberg PA, Page G, Duarte AI, Giusti P, Zusso M, Robert P, Frisoni GB, Cattaneo A, Zille M, Boltze J, Cartier N, et al (2019) Current and

- emerging avenues for Alzheimer's disease drug targets. *J Intern Med* **286**:398-437.
- [109] Butler M, McCreedy E, Nelson VA, Desai P, Ratner E, Fink HA, Hemmy LS, McCarten JR, Barclay TR, Brasure M, Davila H, Kane RL (2018) Does Cognitive Training Prevent Cognitive Decline?: A Systematic Review. *Ann Intern Med* **168**: 63-68.
- [110] Butler M, Nelson VA, Davila H, Ratner E, Fink HA, Hemmy LS, McCarten JR, Barclay TR, Brasure M, Kane RL (2018) Over-the-Counter Supplement Interventions to Prevent Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer-Type Dementia: A Systematic Review. *Ann Intern Med* **168**: 52-62.
- [111] Shi Y, Holtzman DM (2018) Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nat Rev Immunol* **18**: 759-772.
- [112] Tejera D, Heneka MT (2016) Microglia in Alzheimer's disease: the good, the bad and the ugly. *Curr Alzheimer Res* **13**: 370-380.
- [113] Liu Y, Aguzzi A (2019) Immunotherapy for neurodegeneration? *Science*. **364**: 130-131.
- [114] Gellhaar S, Sunnemark D, Eriksson H, Olson L, Galter D (2017) Myeloperoxidase-immunoreactive cells are significantly increased in brain areas affected by neurodegeneration in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* **369**: 445-454.
- [115] Tzikas S, Schlak D, Sopova K, Gatsiou A, Stakos D, Stamatelopoulos K, Stellos K, Laske C (2014) Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **39**: 557-564.
- [116] Volkman R, Ben-Zur T, Kahana A, Garty BZ, Offen D (2019) Myeloperoxidase Deficiency Inhibits Cognitive Decline in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* **13**: 990.
- [117] Davey C (1957) An ion exchange method of determining carnosine, anserine and their precursors in animal tissue. *Nature* **179**: 209-210.
- [118] Karton A, O'Reilly RJ, Pattison DI, Davies MJ, Radom L (2012) Computational design of effective, bioinspired HOCl antioxidants: the role of intramolecular Cl<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> shifts. *J Am Chem Soc* **134**: 19240-19245.
- [119] Hisatsune T, Kaneko J, Kurashige H, Cao Y, Satsu H, Totsuka M, Katakura Y, Imabayashi E, Matsuda H (2016) Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People. *J Alzheimers Dis* **50**: 149-159.
- [120] Masuoka N, Yoshimine C, Hori M, Tanaka M, Asada T, Abe K, Hisatsune T (2019) Effects of Anserine/Carnosine Supplementation on Mild Cognitive Impairment with APOE4. *Nutrients* **11**: 1626.
- [121] Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* **53**: 695-699.
- [122] Boldyrev A, Abe H (1999) Metabolic transformation of neuropeptide carnosine modifies its biological activity. *Cell Mol Neurobiol* **19**: 163-175.

- [123] Hróbjartsson A, Gøtzsche PC (2001) Is the placebo powerless? An analysis of clinical trials comparing placebo with no treatment. *N Engl J Med* **344**: 1594-1602.
- [124] Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, (1996) Vitamin C pharmacokinetics in health volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Soc Natl Acad Sci USA* **93**: 3704-3709.
- [125] Balasubashini MS, Rukkumani R, Menon VP (2003) Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabet* **40**: 118-122.
- [126] Collins AR, Ma AG, Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* **336**: 69-77.
- [127] Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**: 143-151.
- [128] Møller P, Loft S (2002) Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* **76**: 303-310
- [129] Arad Y, Spadaro LA, Roth M, Newstein D, Guerci AD (2005) Treatment of asymptomatic adults with elevated coronary calcium scores with atorvastatin, vitamin C, vitamin E: the St. Francis Heart Study randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol* **46**: 166-172.
- [130] Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C, Gibson GR, Tuohy KM (2008) Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr* **99**: 110-120.
- [131] Jackson MC, Kucera CM, Lenney JF (1991) Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin Chim Acta* **196**: 193-205.
- [132] Geissler S, Zwarg M, Knütter I, Markwardt F, Brandsch M (2010) The bioactive dipeptide anserine is transported by human proton-coupled peptide transporters. *FEBS J* **277**: 790-795.
- [133] Pegova A, Abe H, Boldyrev A (2000) Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **127**: 443-446.
- [134] Gardner ML, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D (1991) Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol* **439**: 411-422.
- [135] Park YJ, Volpe SL, Decker EA (2005) Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J Agric Food Chem* **53**: 4736-4739.
- [136] Kubomura D, Matahira Y, Masui A, Matsuda H (2009) Intestinal absorption and blood clearance of L-histidine-related compounds after ingestion of anserine in humans and comparison to anserine-containing diets. *J Agric Food Chem* **57**: 1781-1785.
- [137] Hata J, Ohara T, Katakura Y, Shimizu K, Yamashita S, Yoshida D, Honda T, Hirakawa Y, Shibata M, Sakata S, Kitazono T, Kuhara S, Ninomiya T (2019) Association Between Serum beta-Alanine and Risk of Dementia. *Am J Epidemiol* **188**: 1637-1645.
- [138] Toh DWK, Wong CH, Fam J, Kim JE (2021) Daily consumption of essence of chicken improves cognitive function: a systematically searched meta-analysis of randomized controlled

- trials. *Nutr Neurosci* **24**: 236-247.
- [139] Kaneko J, Enya A, Enomoto K, Ding Q, Hisatsune T (2017) Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged AbetaPPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Sci Rep* **7**: 12571.
- [140] Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S, Montresor A, Carlucci T, Nani S, et al (2015) Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med* **21**: 880-886.
- [141] Cruz Hernandez JC, Bracko O, Kersbergen CJ, Muse V, Haft-Javaherian M, Berg M, Park L, Vinarsik LK, Ivasyk I, Rivera DA, Kang Y, Cortes-Canteli M, Peyrounette M, et al (2019) Neutrophil adhesion in brain capillaries reduces cortical blood flow and impairs memory function in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Neurosci* **22**: 413-420.
- [142] Peters V, Calabrese V, Forsberg E, Volk N, Fleming T, Baelde H, Weigand T, Thiel C, Trovato A, Scuto M, Modafferi S, Schmitt CP (2018) Protective Actions of Anserine Under Diabetic Conditions. *Int J Mol Sci* **19**: 2751.
- [143] Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, Pastene DO, Kramer BK, Koppel H, Baelde H, de Heer E, Anna Altomare A, Regazzoni L, et al (2017) Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Sci Rep* **7**: 44492.
- [144] Menini S, Iacobini C, Ricci C, Scipioni A, Blasetti Fantauzzi C, Giaccari A, Salomone E, Canevotti R, Lapolla A, Orioli M, Aldini G, Pugliese G (2012) D-Carnosine octylester attenuates atherosclerosis and renal disease in ApoE null mice fed a Western diet through reduction of carbonyl stress and inflammation. *Br J Pharmacol* **166**: 1344-1356.
- [145] Peters V, Schmitt CP, Zschocke J, Gross ML, Brismar K, Forsberg E (2012) Carnosine treatment largely prevents alterations of renal carnosine metabolism in diabetic mice. *Amino Acids* **42**: 2411-2416.
- [146] Derave W, De Courten B, Baba SP (2019) An update on carnosine and anserine research. *Amino Acids* **51**: 1-4.
- [147] Aratani Y (2018) Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* **640**: 47-52.
- [148] Sun C, Wu Q, Zhang X, He Q, Zhao H (2017) Mechanistic Evaluation of the Protective Effect of Carnosine on Acute Lung Injury in Sepsis Rats. *Pharmacology*. **100**: 292-300.
- [149] Tanaka KI, Sugizaki T, Kanda Y, Tamura F, Niino T, Kawahara M (2017) Preventive Effects of Carnosine on Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. *Sci Rep* **7**: 42813.
- [150] Sgarbossa A, Giacomazza D, di Carlo M (2015) Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients* **7**: 5764-5782.
- [151] Bowman GL (2012) Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: a current review and future direction. *Biofactors* **38**: 114-22.

- [152] Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, Altomare A, D'Amato A, Vistoli G, Carini M (2021) Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res* **55**: 321-330.
- [153] Holeček M (2020) Histidine in Health and Disease: Metabolism, Physiological Importance, and Use as a Supplement. *Nutrients* **12**: 848.
- [154] Hipkiss A (2019) Vulnerability of Human Erythrocytes to Persistent High Glycemic Index Diets: Implications for Ageing and Neurodegeneration: Possible Amelioration by Carnosine. *J Aging Sci* **7**:214.
- [155] Lee BJ, Park JH, Lee YS, Cho MH (1999) Carnosine and Related Compounds Protect Against HOCl-Induced Damage of Biomolecules. *Toxicological Research* **15**:109-115.
- [156] Nikitenko NI, Shavratskii VK, Boldyrev AA, Suslina ZA, Ionova VG (1995) Effect of carnosine and its derivatives on ADP-induced human platelet aggregation. *Vopr Med Khim* **41**:41-43.
- [157] Hu Y, Song F, Jiang H, Nuñez G, Smith DE (2018) SLC15A2 and SLC15A4 mediate the transport of bacterially derived Di/tripeptides to enhance the nucleotide-binding oligomerization domain-dependent immune response in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol* **201**:652-62.
- [158] Lénárt N, Brough D, Dénes Á (2016) Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**:1668-1685.
- [159] Wolf AJ, Underhill DM (2018) Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **18**:243-254.
- [160] Reynolds WF, Rhee J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E (1999) Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **155**:31-41.
- [161] Yoshikawa K, Aizawa T, Hayashi Y (1992) Degeneration in vitro of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* **359**:64-67.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、博士取得の機会を与えてくださり、多くのご指導を賜りました東海物産株式会社 特別研究員 柳内延也 博士および国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構(NARO) 食品研究部門長 鍋谷浩志 博士(現 東京家政大学 栄養学部栄養学科 教授)に心より感謝申し上げます。

博士号の取得にあたり研究の機会を与えていただき、温かく見守って下さった東海物産株式会社 池田隆一 代表取締役社長に心から感謝いたします。

本論文の主査を引き受けていただきました東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 准教授 荒木徹也 博士には、博士論文のまとめから審査までの全般にわたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました。これまでのご指導に深くお礼申し上げます。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 教授 溝口勝 博士、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構(NARO) 食品研究部門長 鍋谷浩志 博士(現 東京家政大学 栄養学部栄養学科 教授)、東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 教授 斎藤幸恵 博士、および同農学生命科学研究科 農学国際専攻 准教授 山本光夫 博士には、大変お忙しい中、本論文の審査をお引き受けいただきました。また、本論文の作成・校正・修正にあたり、大変有益なご指導、ご助言およびご校閲を賜りました。審査をお引き受けいただいた先生方のご指導、ご助言により、本論文をより磨き上げることができたと感じております。謹んで感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究として多くの議論をさせていただき、多大なるご協力およびご助言をいただきました NARO 食品研究部門 萩原昌司 博士、静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科 教授 小林公子 博士および同大学同学科 助教 萱嶋泰成 博士(現 山梨学院短期大学 食物栄養科 教授)に深謝いたします。

研究の遂行から成果のまとめまで、多大なるご協力をいただきました本研究の共同研究者の皆様へに深謝いたします。

本論文を構成する研究は、多くの方々のご支援、ご協力のもとに実施されたものであり、本論文はその研究成果を代表してまとめたものであることをここに記し、改めて東海物産株式会社の皆様そして関係者の方々に感謝いたします。

塩谷 茂信

## 論文(業績)リスト

- 1) 塩谷茂信, 鈴木貴則, 坂野太研, 柳内延也 (2022) ケルセチン含有タマネギ外皮エキスの血小板凝集抑制作用. *日本食品科学工学会誌* **69**: 45-53.
- 2) 塩谷茂信, 鈴木貴則, 米山明, 柳内延也, 萩原昌司, 鍋谷浩志 (2017) HPLC 法によるヒト血しょう中のイミダゾールジペプチドおよびその代謝物の同時定量. *日本食品科学工学会誌* **64**: 437-445.
- 3) Shiotani S, Yanai N, Suzuki T, Tujioka S, Sakano Y, Yamakawa-Kobayashi K, Kayashima, Y (2013) Effect of a Dipeptide-Enriched Diet in an Adult *Drosophila melanogaster* Laboratory Strain. *Biosci Biotech Biochem* **77**: 836-838.
- 4) Masuoka N, Chenxu L, Haowei L, Inamura N, Shiotani S, Yanai N, Sato K, Sakurai K, Hisatsune T (2021) Anserine, HClO-scavenger, protected against cognitive decline in individuals with mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)* **13**: 1729-1741.
- 5) Yanai N, Niitsuma T, Shiotani S, Hagiwara S, Nabetani H (2014) A Mixture of Histidine-Dipeptides, Vitamin C, and Ferulic Acid Reduces Comet Assay Scores in Normal Middle-Aged Men. *Food Sci Tech Res* **20**: 485-491.
- 6) 高橋真介, 柳内延也, 塩谷茂信, 遠藤準也, 萩原昌司, 鍋谷浩志 (2011) 活性酸素種による DNA 分子切断と食物由来の天然抗酸化剤によるその抑制作用. *日本食品科学工学会誌* **58**: 208-215.
- 7) Yanai N, Shiotani S, Hagiwara S, Nabetani H, Nakajima M (2008) Antioxidant combination inhibits reactive oxygen species mediated damage. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 3100-3106.
- 8) 柳内延也, 塩谷茂信, Joosh Baljinnyam, 萩原昌司, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2007) チキンエキスからの機能性ジペプチドの抽出・精製とその利用. *MEMBRANE* **32**:197-202.
- 9) 柳内延也, 塩谷茂信, 水野雅之, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2004) チキンエキス由来アンセリン-カルノシン混合体の抗酸化活性: 植物由来抗酸化物質との比較. *日本食品科学工学会誌*, **51**: 238-246.
- 10) 柳内延也, 塩谷茂信, 水野雅之, 鍋谷浩志, 中嶋光敏 (2004) 動物エキス中のヒスチジン含有ジペプチド、アンセリン-カルノシンの HPLC による迅速定量法. *日本食品科学工学会誌* **51**: 87-91.