



助教
田中 照佳
博士（農学）

2012年 近畿大学大学院 農学研究科 応用生命化学
応用生命化学専攻 博士後期課程 修了
2012年 近畿大学水産研究所 博士研究員
2013年 ウィスコンシン大学 医学部 博士研究員
2016年 近畿大学 農学部 応用生命化学科
博士研究員
2017年 現職

クロマグロ皮コラーゲンの肝機能保護効果：作用物質は 血中移行する食事由来ペプチド Pro-Hyp か？

1. 背景と目的

肝機能障害の代表的なものとして、肝炎がある。肝炎は、肝臓に炎症が起こり、肝機能が低下し、発熱、黄疸、全身倦怠感などを来す疾患である。肝障害の病態として生体内の酸化ストレスによる代表的なものは、四塩化炭素（ CCl_4 ）誘発性肝障害でモデル化されている。 CCl_4 はミクロソームのチトクロム P450 やミトコンドリアの電子伝達系で1電子還元を受け、トリクロロメチルラジカル（ $\cdot\text{CCl}_3$ ）を発生して広汎なラジカル反応、脂質過酸化反応を誘発し、ネクローシスや Caspase-3 依存性のアポトーシスを惹起する (Basu., 2003; Packer et al., 1978; Mico and Pohl., 1983; Forni et al., 1983)。

コラーゲンは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨を構成する主要タンパク質で、多細胞動物の細胞外基質の主成分でもある。その特異構造とアミノ酸組成およびアミノ酸の特性から、新規な生理機能を持つことが推測される。魚の皮や鱗は、長年魚類廃棄物として扱われてきたが、近年、含有されるコラーゲンが着目されフィッシュコラーゲンとして精製され、商品化されるようになった。しかし、その生理機能の根拠は科学的には十分に解明されておらず、依然未利用のままである部位も多い。

我々は、クロマグロ未利用部位である皮に着目し、クロマグロ皮タンパク質またはクロマグロ皮タンパク質の主要タンパク質であるコラーゲンを、 CCl_4 誘導性肝障害モデルマウスに経口摂取させた。その結果、両摂取群で CCl_4 による肝細胞壊死は有意に抑制され、これらのメカニズムに転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の核内移行への抑制やその下流遺伝子である誘導型

一酸化窒素合成酵素である iNOS の発現抑制が関与することを報告した (Tanaka et al., 2012)。しかし、その作用物質は明らかではない。

一方、Ohara ら (2007) は、コラーゲンの経口摂取によりプロリン (Pro)、ヒドロキシプロリン (Hyp) や Pro-Hyp 等のペプチドが血中に移行することを報告した。そこで、本研究では、マグロコラーゲンの肝機能保護効果の作用物質を検討することを目的に、Pro/Hyp/Pro-Hyp 投与が、CCl₄ 誘導性肝障害にどのような影響を与えるかを検討した。

2. 方法

2.1. 動物：動物実験は、福島県立医科大学規定の拡散防止措置を遵守して行い、「福島県立医科大学動物実験委員会」の審議を経て学長の承認を得て実施した (承認番号：動第 29079 号)。10 週齢の雄性マウスをコントロール群 (Vehicle 投与群、n=8)、CCl₄ 投与群、CCl₄+Pro 投与群 (n=8) CCl₄+Hyp 投与群 (n=8)、CCl₄+Pro-Hyp 群 (n=8) に分けた。Pro/Hyp/Pro-Hyp を 100 µg/kg body weight の用量で CCl₄ 投与の 30 分前に尾静脈より投与した。次に CCl₄ を 40 µl/kg body weight の用量で腹腔内投与し、24 時間後マウスを炭酸ガスにて安楽死させた。静脈より採血を行い、遠心分離により血清を得た後、使用するまで -80°C で保存した。また、肝臓を摘出し 4% - パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて固定した。

2.2. 肝機能マーカーの測定：血清中の肝機能マーカーとして AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ) と ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) の活性をアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼアッセイキット (BioVision, K753-100) を用いて測定した。

2.3. 脂質過酸化マーカーの測定：肝臓の脂質過酸化マーカーとして TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) 値を市販キット (TBARS Assay Kit, Cayman Chemical, 10009055) を用いて測定した。TBARS 値はタンパク質量で補正し、ng/mg ptorein として示した。

2.4. 病理組織学的試験：固定後の肝臓サンプルは O.C.T コンパウンドにより凍結包埋し、使用するまで -80°C で保存した。切片は 5 µm で作製し、その後ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。HE 染色により核が染色されず、胞体の好酸性が増したエリアを細胞壊死領域と判定し、Photoshop を用いてエリア値の定量を行った。

3. 結果

3.1. Pro/Hyp/Pro-Hyp の投与が肝機能マーカー (AST、ALT) に与える影響：本研究では、Pro/Hyp/Pro-Hyp 投与が、CCl₄ 誘導性肝障害にどのような影響を与えるかを検討した。まず、肝機能マーカーである血清 AST および ALT の活性に与える影響について調べた。CCl₄

暴露により血清 AST と ALT 活性はコントロール群と比較し有意に増加した(図 1. A, B)。Pro および Hyp の投与ではコントロール群と差が認められなかったが、Pro-Hyp の投与により CCl₄によって増加した血清 AST と ALT 活性は有意に減少した。

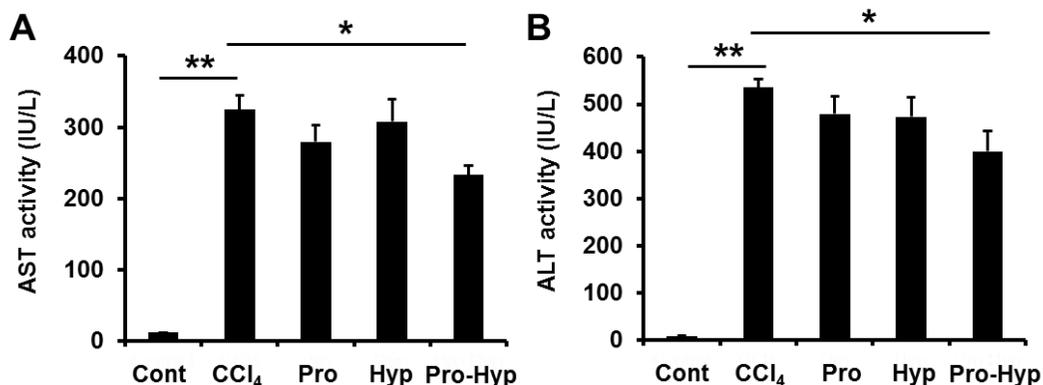


図1. Pro/Hyp/Pro-Hypの投与が血清AST (A)およびALT (B)活性に与える影響

3.2. Pro/Hyp/Pro-Hyp の投与が肝臓 TBARS 値に与える影響：次に肝臓中の脂質過酸化のマーカーとして TBARS 値を測定した。肝臓 TBARS 値は、CCl₄の投与により有意に増加した。Pro-Hyp の投与により CCl₄によって増加した肝臓 TBARS 値は有意に減少した。

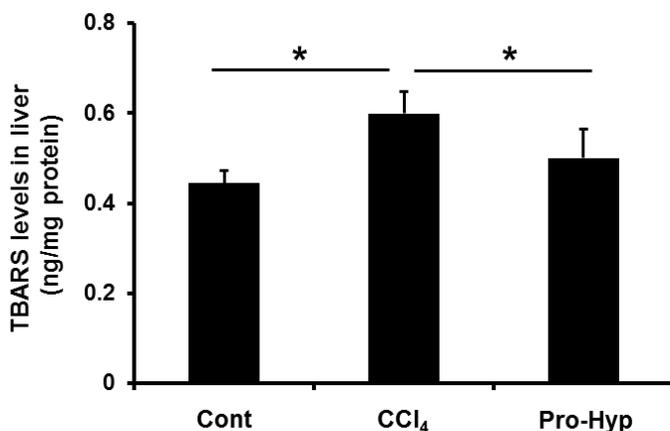


図2. Pro-Hypの投与が肝臓TBARS値に与える影響

3.3. Pro/Hyp/Pro-Hyp の投与が肝臓の細胞壊死領域に与える影響：図1および2の結果は、Pro-Hyp の投与により CCl₄ 誘導性の肝障害が改善されることを示唆している。そこで、肝臓の HE 染色を行い、Pro-Hyp の投与が CCl₄ 誘導性の細胞壊死に与える影響を検討した。しかし、Pro-Hyp の投与が CCl₄ 暴露によって誘導される肝臓の細胞壊死を改善する効果は

認められなかった (data not shown)。

4. まとめ

Pro-Hyp の投与は、CCl₄によって増加する血清 AST・ALT 活性および肝臓 TBARS 値を有意に減少させた。したがって、経口摂取コラーゲンの肝機能保護効果の作用物質の少なくともひとつは Pro-Hyp である可能性が示唆された。しかし、Pro-Hyp の投与による CCl₄ 誘導性細胞壊死の改善効果は認められなかった。現在、Pro-Hyp 投与による明瞭な効果を確認するため Pro-Hyp を複数回投与した際の肝臓壊死に対する影響を検討中である。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援賜りましたサッポロ生物科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology.*, 2003, 189, 113-127.
2. Forni LG, Packer JE, Slater TF, Willson RL. Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study. *Chem Biol Interact.*, 1983, 45, 171-177.
3. Mico BA, Pohl LR. Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine. *Arch Biochem Biophys.*, 1983, 225: 596-609.
4. Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55, 1532-1535.
5. Packer JE, Slater TF, Willson RL. 1978. Reactions of carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl₃·O₂) with amino acids: pulse radiolysis evidence. *Life Sci.*, 1978, 23, 356-362.
6. Tanaka T, Takahashi K, Iwamoto N, Agawa Y, Sawada Y, Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Hepatoprotective action of dietary bluefin tuna skin proteins on CCl₄-intoxicated mice. *Fish Sci.*, 2012, 78, 911-921.

7. 本研究に関する研究発表

Tanaka T, Takahashi K, Tsubaki K, Hirata M, Yamamoto K, Biswas A, Moriyama T, Kawamura Y. Isolation and characterization of acid soluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen. Fish Aquat Sci., 2018, 21: 7.

○**田中照佳**、高橋賢次、平田舞花、山本恵子、**Biswas Amal**、森山達哉、河村幸雄
クロマグロ (*Thunnus orientalis*) 皮コラーゲンの抽出と特性解析
(日本農芸化学会 名古屋大会 平成 30 年 3 月)