平成２５年度　戦略的基盤技術高度化支援事業
「動脈硬化の予防＆改善効果を有する機能性食品の開発」

# 研 究 開 発 成 果 等 報 告 書

平成２５年３月

委託者　東北経済産業局
委託先　ゼライス株式会社

目　次

第１章研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

１－２　研究体制

１－３　成果概要

１－４　当該研究開発の連絡窓口

第２章　本論

最終章　全体総括

# 第１章　　研究開発の概要

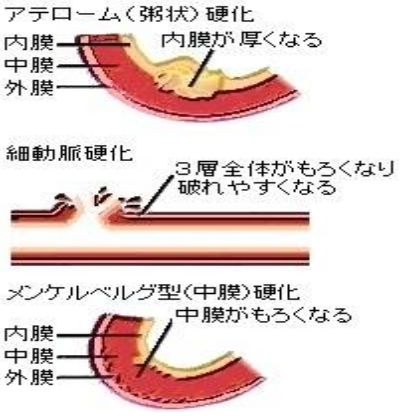
## １－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

### 1―1―1　背景

動脈硬化を基礎疾患とする病気は、心疾患の多くを占める虚血性心疾患(心筋梗塞、狭心症)や、脳血管疾患の半数をしめる脳梗塞・脳出血ばかりでなく、動脈硬化性萎縮腎、下腿の壊疽を引き起こす閉塞性動脈硬化症というように、いずれも死の原因となる重大な病気である。生活の欧米化や高齢化社会の到来によって、これら動脈硬化を基礎疾患とする病気は、悪性新生物(がん・肉腫)とともに日本の二大国民病のひとつとなっており、医療費の増大や健康寿命の観点からも、その対策はきわめて重要になっている。厚生省の「人口動態統計2008年」によると、死亡総数に対する死因別の割合は、１位の悪性新生物27 %、２位の心疾患21 %、３位の脳血管疾患14 %であるが、動脈硬化などの血管の障害を共通の基盤とする心疾患と脳血管疾患の割合の合計は35 %であり、１位の悪性新生物よりもはるかに大きくなっていることが分かる。

動脈硬化の中で、最も大きな原因となっているのが血管内膜にコレステロールなどの脂肪が粥状になって瘤化することによるアテローム性動脈硬化症（表１）である。

表１　動脈硬化の主な分類

| | | |
|---|---|---|
| **アテローム（粥状）性硬化**<br>危険度大　：　心筋梗塞・脳梗塞の原因 | 大動脈や脳動脈、冠動脈などの比較的太い動脈に起こります。動脈の内膜にコレステロールなどの脂肪からなるドロドロの粥状物質がたまってアテロームプラーク（粥状硬化斑）ができ、次第に肥厚することで動脈の内腔を狭めます。 |  |
| **細動脈硬化** | 高血圧による変化で、脳や腎臓の中の細い動脈に起き易く、詰ったり（梗塞）、血管の壁全体が破裂して出血したりします。 | |
| **メンケルベルグ型（中膜）硬化** | 動脈の中膜にカルシウムがたまって硬くなり、中膜が脆くなり、血管壁が破れることもあります。 | |

2～15 歳になるとほとんどの小児の動脈にアテローム性硬化の初期病変が観察され、思春期頃からその割割合は増加しはじめ、20～30 歳までには大動脈表面の約 30 %を病変が占めるまでになる。実際の症状が発生するのは、例えば脂質異常症(高脂血症)で 30 代後半から 45 歳過ぎである。肥満や高血圧、運動不足、喫煙などの原因のある人ほど早く発症する可能性は高い。成人病検診などで脂質異常症や動脈硬化だと診断されたとしても自覚症状がないため放置する人も多いのが現状である。

動脈硬化の治療法は、生活習慣の改善、薬物療法（治療薬摂取）、手術などであるが、患者の状態によって治療法を変える必要がある。その中で最も利用割合の高い薬物治療に使用される医薬品は、高脂血症の改善には優れた効果を発揮するものの根本的な動脈硬化の原因に対応

できず、さらには顔・手足・口中の腫れ、不整脈、発熱、腹痛、発疹、動悸、痙攣、めまい、吐き気などの副作用が少なからず存在してしまうデメリットがある。一方、健康食品・機能性食品による動脈硬化の予防については、現在のところ明確な有効性が認められた成分はない。市場では動脈硬化の予防・改善において副作用が少なく、継続的に摂取可能で、且つ明確な効果の得られる機能性成分の創出が強く求められている。

このような中、ゼライスでは世界で初めてコラーゲンを主原料とする自然由来のアミノ酸であるコラーゲン・トリペプチド（CTP）の開発に成功しており、これを分解・精製した機能性成分トリペプチド含有率を 15%にした CTP-15 が動脈硬化の中でも危険性の高い「アテローム性硬化」に対して予防と改善の効果を示すことが金沢医科大学　勝田省吾教授（現学長）との共同研究で明らかになっている。（表 2）

表 2　従来の機能性成分との比較

| 分類 | 機能性成分 | 血中コレステロールの低下作用 | 動脈硬化の予防 | 動脈硬化の改善 | 副作用 | 入手方法 | 購入 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 食品 | キトサン系 | ○（脂肪吸収を妨げる効果） | △ | ― | ない | コンビニ、スーパーなどで入手可能 | 易 |
| | カテキン系 | ○（脂肪消費向上） | △ | ― | なし | | |
| 医薬品 | スタチン系（高脂血症治療薬） | ◎（コレステロールの生成抑制） | △ | ― | あり | 医師の処方箋なしでは、入手不可能（診察あり） | 難 |
| | フィブラート系（高脂血症治療薬） | ◎（脂肪酸の代謝活性化） | △ | ― | あり | | |
| | ビタミン系（一般用医薬品） | ◎（冷感などの虚血性諸症状も改善） | △ | ― | あり | 薬局／薬店で入手可能 | 易 |
| 機能性食品 | コラーゲントリペプチド（CTP）※1 | ○ | ◎ 発生予防 | ◎ 進行抑制 | なし | コンビニ、スーパーなどでも入手可能 | 易 |

効果大：◎、効果あり：○、間接的効果：△、効果なし：ー

CTP-15 は、細胞及びモデル動物において有効性が確認されている成分である。アテローム性動脈硬化を自覚した 40 歳以降の人々に対して、進行を抑制または改善する効果が期待でき、さらに発症する前の予備軍の人々へは血管の老化・炎症を抑えることにより予防する効果が期待できる成分である。

## 1―1―2　目的及び目標

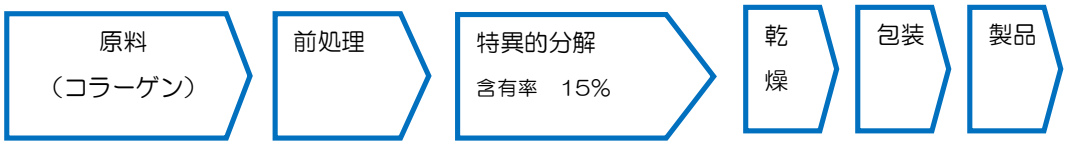
現在製造している CTP-15（トリペプチド含有率 15%） は、皮膚、骨および関節を対象にしており、1 日の摂取量は 4 ｇを推奨している。仮に、従来のトリペプチド含有量 15%のみを有効成分とした動脈硬化の予防と改善効果を示す機能性食品を設計すると、摂取量（16 ｇ）が多くなるだけでなく、毎日の費用が最大 912 円（約 3 万円／月）にもなってしまうため、継続的な摂取が困難になると容易に考えられる。（表 3 参照）　このため、消費者が求め易い成分価格と品質を両立させる新たな分解・精製工程の高度化技術の確立が必要となる。

高度化技術を用いた製造フローを下に示す。

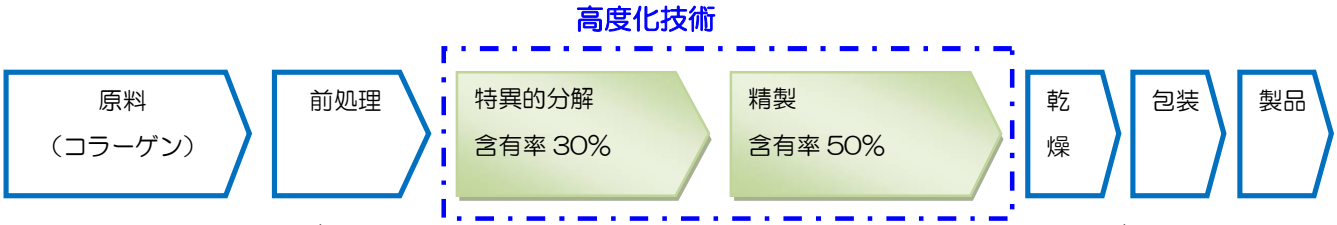
表 3　従来 CTP-15 と新技術 CTP-50 との服用コスト比較

| 有効成分 | 従来 CTP<br>（CTP-15） | | 新技術 CTP<br>（CTP-50） |
|---|---|---|---|
| トリペプチド<br>含有率 | 15 % | | 50 % |
| 標的器官 | 皮膚、骨、関節<br>（動脈硬化に効果なし） | 血管（動脈硬化） | 血管（動脈硬化） |
| 効果をもたらす<br>CTP 摂取量/日 | 4 g | 16 g | 4 g |
| 購入費用/日<br>（定価ベース） | 228 円/日<br>（57 円/ｇ） | 912 円/日<br>（57 円/ｇ） | 480 円/日<br>（120 円/ｇ）<br>ｇ単価は 2 倍になるが摂取量が 1/4 でよく、製品価格が 1/2 に抑えられる。 |

◆従来の製造フロー（CTP-15）　※トリペプチド含有率 15%




◇　高度化技術により低コストでトリペプチドを高純度化させた製造フロー（CTP-50）　※トリペプチド含有率 50%




※工程数は増えるが低コストで CTP の純度を高める技術により、新規の用途展開が期待される成分が開発される。

少ない摂取量でアテローム動脈硬化の改善・予防について目的とする効果を得うるためには、既存の純度の CTP を精製する必要があり、分解工程でトリペプチド含有量を 15 から 30 %へ、更に精製工程で 30 から 50 %にまで引き上げる

ことが必要である。

現在製造しているCTP-15 は、皮膚、骨および関節を対象にした場合には十分な製品であるが、動脈硬化の予防と改善効果を示す機能性食品の素材とするためには、摂取量及び価格の点が障害となり製品化できない。このため消費者が求め易い成分価格と品質を両立させる新たな分解・精製工程の高度化技術の確立が必要となる。すなわち、単なる従来技術の改良だけでは十分な純度の製品を量産できないため、新たな視点の酵素反応制御方法とトリペプチド簡易測定法の開発を含む発酵工程管理技術を高度化することによって、この製品化を実現しなければならない。

そこで、本研究では、これらの課題を解決するために、これまで行われてきた（下記の表４に示したCTP-15 による培養細胞・動物を用いた基礎検討）研究シーズを基礎に研究開発を実施する。

なお、これまで、培養細胞および実験動物（ウサギ）において、有意差のある良好な結果が得られている。（表４参照）さらに、トリペプチドは低アレルギー性や抵抗原性であることも既に確認済みである。

表４　　CTP-15 による培養細胞・動物実験結果

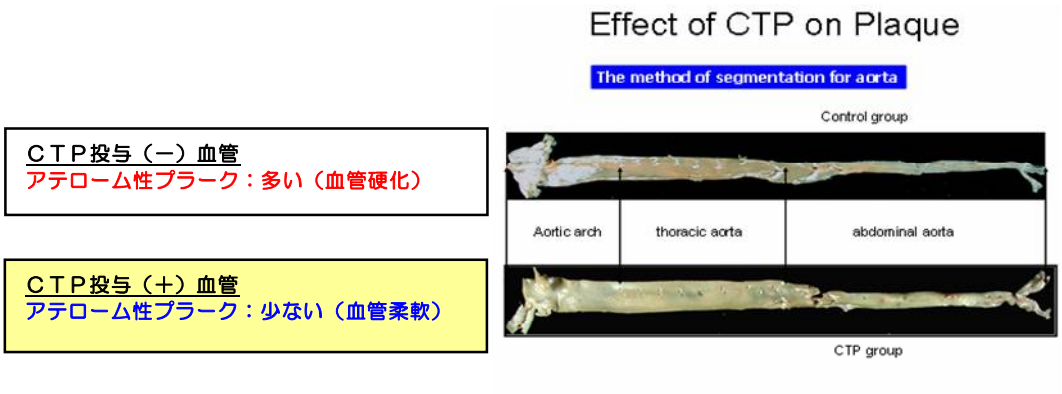
| 実験対象 | 実験結果 |
|---|---|
| 培養細胞 | 動脈硬化を呈する平滑筋細胞の遊走を抑制 |
| | 平滑筋細胞の増殖（マーカー：PCNA）を抑制 |
| 動物 | 血液中のコレステロールを低下 |
| | 血管壁の線維化を防止 |
| | アテローム性動脈硬化の発症・進行自体を抑制 |

参考結果　：　ウサギを使用した実験

試験動物　：　家族性高コレステロール血症モデル

KHC ウサギ：体重約２kg（生後３ヶ月）

結果　　：　CTP-15 投与群は対照群で生じたプラーク面積の 27.4 %に止まり、脂質沈着（プラーク）の発生が強く抑制された。



## 1―1―3　特定ものづくり基盤技術における位置づけ

（十九）　発酵に係る技術に関する事項

（1）食品製造業に関する事項

① 川下製造業者の抱える課題

「ウ．高品質化」

## １－２　研究体制

### 1－2－1　研究組織

委託業者　　：　ゼライス株式会社

| 総括研究代表者（PL） | 総括研究代表者（SL） |
|---|---|
| ゼライス㈱中央研究所 | ゼライス㈱中央研究所 |
| 執行役員・所長　酒井康夫 | 研究開発グループリーダー　金山　徳孝 |

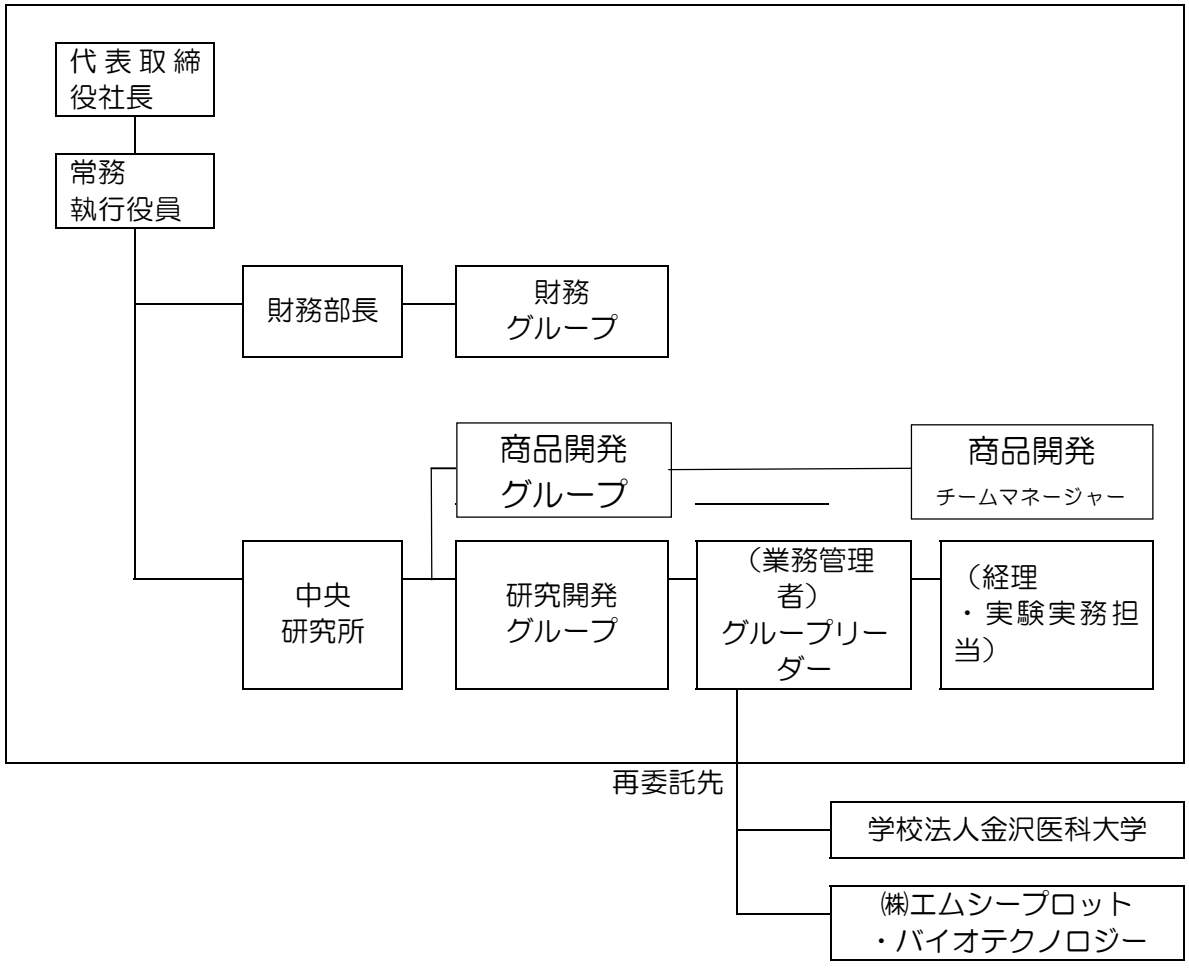
事業管理者　：　ゼライス株式会社

再委託先　　：　学校法人　金沢医科大学
株式会社エムシープロット・バイオテクノロジー

### 1－2－2　管理体制

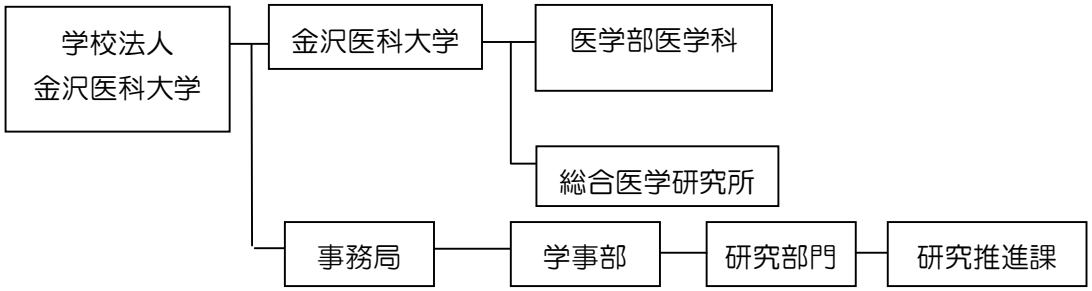
①　事業管理者

【ゼライス株式会社】

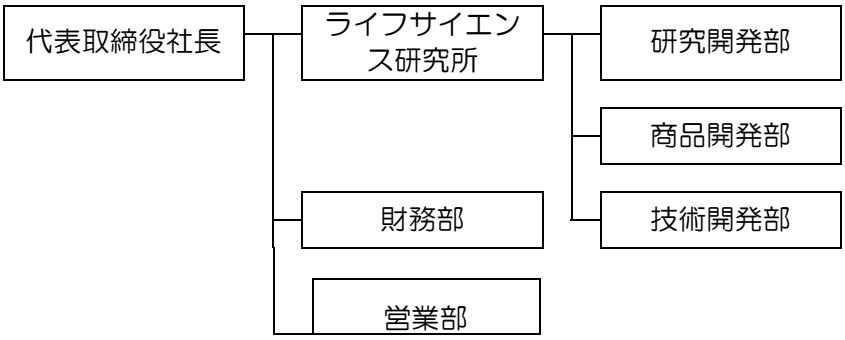


② 再委託先

【学校法人金沢医科大学】（抜粋）




【株式会社エムシープロット・バイオテクノロジー】




## 1−2−3 研究者氏名

【委託事業先】

ゼライス株式会社

| 氏名 | 所属・役職 |
|---|---|
| 沼田　徳暁 | 中央研究所　商品開発グループチームマネージャー |
| 千葉　満 | 中央研究所　商品開発グループ　所員 |
| 山本　祥子 | 中央研究所　研究開発グループ　所員 |
| 酒井　康夫 | 中央研究所　所長 |
| 金山　徳孝 | 中央研究所　研究開発グループ　グループリーダー |

【再委託先】

学校法人金沢医科大学

| 氏名 | 所属・役職 |
|---|---|
| 勝田　省吾 | 学長 |
| 友杉　直久 | 総合医学研究所　教授 |
| 米倉　秀人 | 医学部　生化学Ⅱ　教授 |
| 竹内　正義 | 総合医学研究所　教授 |
| 石垣　靖人 | 総合医学研究所　准教授 |

株式会社エムシープロット・バイオテクノロジー

| 氏名 | 役職・所属 |
|---|---|
| 出口　喜三郎 | ライフサイエンス研究所　所長 |

## １－３　成果概要

分解工程の改善

CTP 含量を 30%とできる製造条件を確立した。

分解工程の工程管理用 CTP 測定法の検討

CTP 測定時間を約 1/3 に、連続注入時の総分析時間を 1/2 に短縮できる分析法を確立した。

CTP-50 の試作製造方法の確立

トリペプチド含有率 50±5%の CTP-50 原末を安定して 10kg 以上製造できるパイロットスケール工程を確立した。

製造コストダウン

開始時 912 円に対し、480 円を達成した。

CTP-50 の製品化

錠剤化製品として完成させた。

安全性試験

毒性試験等にて、食品としての安全性に問題が無いことを確認した。

動脈硬化の進展抑制効果およびアテローム性プラーク血管病変の抑制効果検討

・動物試験

CTP-50 が、石灰化した血管に対しては効果があるか否かを確認するに至らなかった。

・細胞試験

CTP-50 と IL3RA 遺伝子との関連性が示された。

・ヒト試験

健常人 30 例で実施した。男性群 16 名中 13 名で HDL-C の上昇を確認した。また CAVI 値について、女性の 73%（11/15）、男性の 50%（8/15）に改善を認めた。

・動脈硬化関連バイオマーカーへの影響評価（AGE との関連）

全体の平均値では CTP-15 服用による血中 TAGE 量の有意な減少は見られなかったが、例に CTP-15、6 ヶ月服用後に血中 TAGE 量の減少傾向がみられた。

血中 CTP 代謝物測定方法の確立と経口投与時の血中動態の測定

CTP 定量分析法（内部標準法）の良好な分析条件を確立した。ヒト CTP-50 の血中動態を測定し、代謝物の血中濃度変化を確認した。

１－４　当該研究開発の連絡窓口

所属組織名：ゼライス株式会社
所属役職　：中央研究所
フリガナ　：ヤマモト　ショウコ
氏　　名　：山本　祥子
ＴＥＬ　　：022-361-8821
ＦＡＸ　　：022-361-6713
E-mail　　：s.yamamoto@jellice.com

第２章　本論

## 分解工程の改善

図 1 に、従来法における酵素添加量と処理後の CTP 含有率の関係について示した。CTP 含有率は酵素添加量を増加させるに連れて上昇し、CTP25%程度までは直線的な増加傾向が認められる。しかしながら、それ以降含有率は二次曲線的となり、頭打ちとなってしまう。この特性により、従来法では、酵素添加量を 50 倍程度まで増しても CTP 含有率は 35%程度までしか上昇しなかった。

本事業の成果を図２に示した。酵素の反応性を大きく上昇させる要素の発明に成功したことで、酵素添加量を従来製法の 3 倍程度に増しただけで CTP 含有率 30%を達成できる製法を確立した。

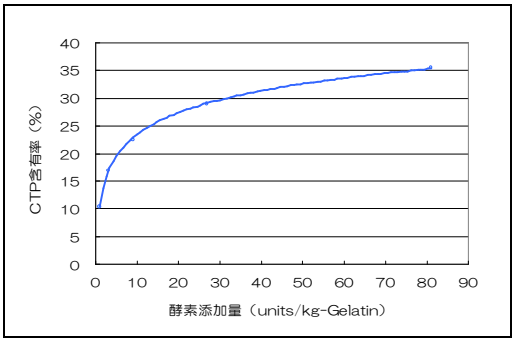



図１　従来製法における酵素添加量と CTP 含有率

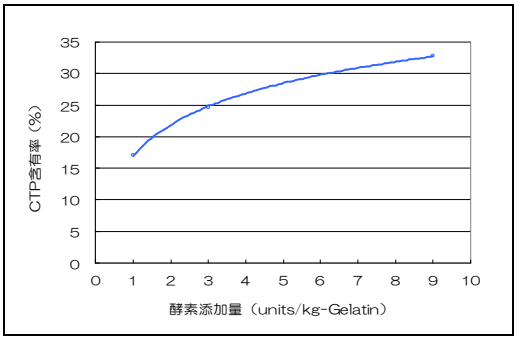



図２　改良製法における酵素添加量と CTP 含有率

## 分解工程における工程管理用 CTP 測定法の検討

従来のトリペプチド測定法は 2 時間を要する方法であったため、サンプリングから測定結果が得られるまでのタイムラグが大きく、酵素分解反応の状況と CTP 生成量のピークをリアルタイムで捉えることができなかった。このため、製造毎に生成量がばらつくことや、無駄な反応時間が生じることが課題であった。

そこで、厳密な工程管理による効率化を実現するために、タイムラグの少ない分析法の検討を行った。カラム、測定条件を改めて検討したほかに、オーバーラップインジェクションの導入ついても併せて検討した。

検討の結果、CTP 分析 1 回あたりの測定時間を従来法の 1/3 の時間まで短縮でき、さらにオーバーラップインジェクションを組み合わせることにより、複数サンプルを連続して分析した場合の総分析時間も従来の約 1/2 にまで短縮できた。

これにより、リアルタイムでの工程管理が可能となり、反応状況をこれまでより正確に把握することが可能となった。酵素反応条件の検討と合わせると反応時間 24 時間の削減に成功し、すぐにに次工程へ進むことが可能となり、工程数が大幅に削減された。

## CTP-50 の試作製造方法の確立

試作工程の確立には、分解工程、精製工程、濃縮工程、噴霧工程を検討する必要がある。

表 5 に、分解工程から精製工程を通しで実施した結果を示した。分解工程での課題は、前項の酵素検討により改善し、安定して分解度 30～34%の中間体を得ることができた。精製工程においてはペプチド溶出のモニタリングと細かい分画から CTP の溶出ピークを正確に算出し、溶出のピークが最もシャープになるように溶出液の条件を見直した。その結果、常に安定して50±5%の製造が可能となった。

表5　H25 年度精製工程の検討結果

| Test No. | 特異的分解における分解度（CTP%） | 吸着処理への仕込み量(kg) | 収量(kg) | 精製物 CTP（%） | 回収率（%） | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | TOTAL | CTP |
| 1 | 33.6 | 19.5 | 11.4 | 50.0 | 58.4 | 86.9 |
| 2 | 33.7 | 18.2 | 10.0 | 51.5 | 55.0 | 84.1 |
| 3 | 33.7 | 20.0 | 11.9 | 50.1 | 59.5 | 88.4 |
| 4 | 33.1 | 20.3 | 11.8 | 50.5 | 57.9 | 88.3 |
| 5 | 33.1 | 20.1 | 11.7 | 51.9 | 58.2 | 91.2 |
| 6 | 30.1 | 19.8 | 11.5 | 46.2 | 58.1 | 89.2 |
| 7 | 33.3 | 20.2 | 11.7 | 53.0 | 58.1 | 92.4 |
| 8 | 33.6 | 19.5 | 10.8 | 50.3 | 55.4 | 82.9 |
| 9 | 32.9 | 20.0 | 11.6 | 50.2 | 58.1 | 88.6 |
| 10 | 31.0 | 19.1 | 11.5 | 47.2 | 60.4 | 91.8 |
| mean | 32.8 | 19.7 | 11.4 | 50.1 | 57.9 | 88.4 |
| MAX | 33.7 | 20.3 | 11.9 | 53.0 | 60.4 | 92.4 |
| MIN | 30.1 | 18.2 | 10.0 | 46.2 | 55.0 | 82.9 |

この精製物は、CTP 含有率は高いものの、液自体の濃度が薄いため、そのまま噴霧工程に供すのは非効率である。そこで、30%以上への濃縮を目指し濃縮工程の検討を実施した。ただし、トリペプチドは熱に弱く、一般的な加熱濃縮装置では分解してしまう。そこで、加熱時間が限りなく短時間で、低温のまま濃縮が可能な濃縮装置を導入し、検討した。

本年度の検討 20 回の実施データを表6に示した。さらに、図3に歩留まり、図4に水分蒸発量、図5に濃縮後の Brix を示した。濃縮物は熱による変化を受けることなく濃縮できた。歩留まりは安定して 95%程度と高水準であった。水分蒸散量と Brix は、水分蒸発量が多ければ多いほど Brix（濃縮度）が高まるという関係にあるが、開始時、蒸散が進まず濃縮率は20%代に留まった（test1～8）。一定の真空度を保つことができないことが原因とみられたことから、真空度の向上と安定についての検討を実施し、最終的に 1 時間あたり 15L 以上の蒸散が可能となり、安定して 30%以上の濃縮物を得ることに成功した。

表6　噴霧乾燥検討 20 回の結果

| test No. | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| サンプル情報 | 濃縮前 | 濃度（%） | 7.1 | 6.6 | 7.4 | 7.5 | 7.4 | 7.1 | 8.1 | 7.1 | 7.3 | 7.3 |
| | | Tp(%) | 47.7 | 52.6 | 51.1 | 50.5 | 51.9 | 46.2 | 53.0 | 50.3 | 50.2 | 47.2 |
| | 濃縮後 | 濃度（%） | 24.3 | 27.9 | 26.3 | 24.4 | 28.6 | 27.6 | 26.7 | 28.0 | 31.5 | 30.2 |
| | | Tp(%) | 52.9 | 55.2 | 52.9 | 49.6 | 50.1 | 48.0 | 50.1 | 51.0 | 48.9 | 48.9 |
| 濃縮工程における歩留り（%） | | | 95.4 | 94.6 | 94.3 | 96.7 | 91.9 | 93.2 | 97.8 | 97.3 | 96.7 | 96.9 |

| test No. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 濃縮条件 | 加熱温度（℃） | 77.3 | 76.5 | 76.6 | 77.0 | 76.4 | 76.3 | 77.0 | 76.3 | 76.7 | 76.7 |
| | 蒸発温度（℃） | 50.8 | 49.3 | 48.7 | 49.2 | 49.9 | 48.4 | 48.8 | 48.2 | 49.4 | 49.6 |
| | 真空度（MPa） | -0.090 | -0.089 | -0.090 | -0.091 | -0.089 | -0.092 | -0.091 | -0.089 | -0.090 | -0.089 |
| 水分蒸発量（L/h） | | 13.6 | 13.5 | 12.6 | 11.6 | 11.6 | 13.1 | 12.5 | 13.8 | 13.4 | 13.9 |

| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7.3 | 7.2 | 7.1 | 7.3 | 6.9 | 6.9 | 6.9 | 6.8 | 7.1 | 7.3 |
| 47.1 | 45.8 | 48.3 | 49.2 | 48.3 | 49.2 | 50.4 | 44.4 | 50.5 | 49.2 |
| 32.3 | 30.9 | 30.2 | 34.3 | 26.6 | 31.4 | 32.0 | 36.0 | 34.2 | 33.8 |
| 48.9 | 50.0 | 49.2 | 50.3 | 49.9 | 50.2 | 50.7 | 46.0 | 50.2 | 49.7 |
| 92.7 | 91.8 | 95.0 | 94.2 | 94.1 | 94.8 | 96.0 | 96.7 | 93.1 | 93.0 |

| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 76.7 | 76.7 | 76.8 | 76.9 | 76.3 | 76.3 | 76.6 | 76.6 | 77.0 | 76.7 |
| 46.3 | 48.0 | 48.7 | 47.7 | 49.0 | 46.2 | 46.9 | 46.0 | 44.2 | 45.0 |
| -0.091 | -0.091 | -0.090 | -0.092 | -0.090 | -0.092 | -0.093 | -0.093 | -0.093 | -0.094 |
| 13.5 | 11.9 | 12.2 | 13.8 | 12.2 | 13.8 | 16.1 | 15.8 | 16.1 | 15.1 |

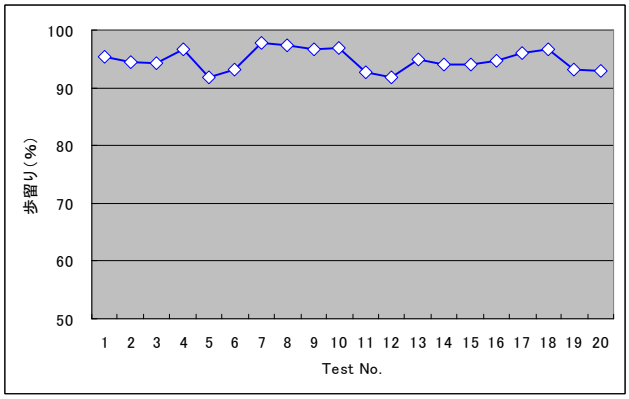



図３　歩留まり

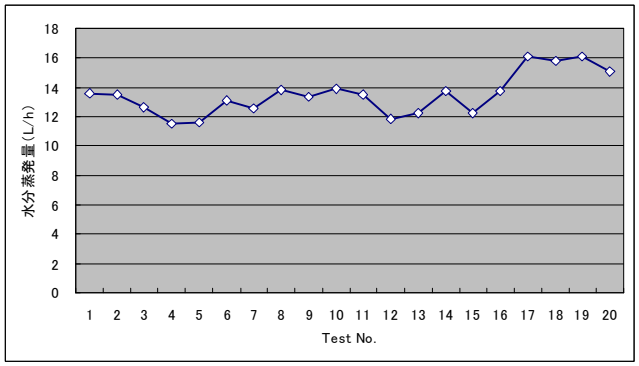



図４　水分蒸発量

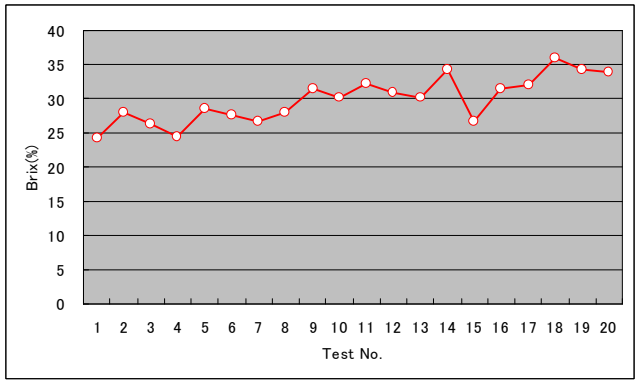



図５　濃縮後のＢｒｉｘ

濃縮された中間体を噴霧工程に供すことで、最終原末が完成する。熱に弱い製品でも変性させずに乾燥することが可能なスプレードライヤーを設計して導入し、検討を実施した。また、ランニングコストを抑えるため、省エネルギー設計とした。

以上の検討の結果、全ての条件で良好な粉末が得られた。歩留まりも全ての条件で 95%以上と良好であった。なお、粉体をその後錠剤化製品に加工する場合、かさ密度を考慮する必要があるが、噴霧圧力を変えることで、僅かではあるがコントロールすることが出来ることが確認できた（表７）。

表7　スプレードライヤーの検討結果

| | 項 目 | | TEST-1 | TEST-2 | TEST-3 | TEST-4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 仕込み量 | 量 | kg | 40.0 | 40.2 | 41.0 | 40.0 |
| | 濃度 | % | 30 | 30 | 30 | 30 |
| SD 粉末 | 回収量 | kg | 11.5 | 11.7 | 11.7 | 11.6 |
| | 歩留まり | % | 95.8 | 97.0 | 95.1 | 96.7 |
| | 水分 | % | 3.2 | 3.1 | 2.8 | 2.8 |
| | 嵩密度 | g | 0.35 | 0.35 | 0.29 | 0.28 |

## 製造コストダウン

酵素条件の検討により、製造原価を半分にまで縮小できた。さらに、分解工程の処理時間を48 時間から 24 時間に短縮できた。精製工程では、CTP 成分の溶出のタイミングを確実に捉えることで、溶媒の使用量の無駄を抑えることができた。噴霧工程ではランニングコストの低い装置ををを導入し、短時間で大量の最終原末を得ることに成功した。これらの工夫により、開始時912 円に対し、最終目標 480 円を達成することができた。

## CTP-50 の製品化

従来のコラーゲン製品は、原料由来の特異臭があり、水や飲料に溶かすと濁りが発生したことから、飲料等として製品化する際には香料や分散剤等を加える必要があった。それに対し、完成した CTP-50 粉末は、無色であり、無味無臭であった。また、水やジュースに非常に溶けやすく、濁りは発生しなかった。従来品と比較し、加工しやすい優れた性状が確認された。

一方で、この粉末を 25℃で静置したところ、高い吸湿性が確認された。健康食品メーカーに販売する場合、粉体をそのまま提供することになる。そこで、湿気を防ぐ包剤で販売し、「湿度を避ける」ことを保管条件として定めることにした。

40℃加速試験の結果、褐変化が確認された。一方、トリペプチド含量には変化は見られなかった。25℃安定性試験では 18 ヵ月後も性状は変化しなかったことから、40℃という熱条件そのものが色の変化に影響していると考えられた。そこで、この粉末の保管条件を「涼しい場所で保管」するよう定めることにした。

末端ユーザー用の製品として、錠剤化品への加工を検討した。有効成分は CTP-50 のみで、錠剤化に必要な最低限の添加物のみを加えた。なお、CTP-50 はこれまでのコラーゲンには無いほど無味無臭であることから、糖衣、香料等を加える必要が無い。

錠剤のサイズは直径 8.0×高さ 5.5mm と、一般的な飲みやすいサイズとし、16 錠で 4ｇの CTP-50 が摂取できるよう設計した。なお、錠剤の硬度は 5kg 以上で、噛まずに飲み込むことを前提とした。

次に、錠剤の安定性について検証した。CTP-50 を除湿剤の無い密閉ガラス容器に入れ、温度 40℃、湿度 75%の環境で保存し、変化を確認した。外観の変化を図６に示した。試験の結果、原末と同様に多少の褐色への変化が確認された。一方で、CTP-50 の含量や崩壊性に変化は無く、味等にも変化はみられなかった。このことから、外観の性状を保持するため、「涼しい場所で保管」することを保管条件として定めることにした。

図６　40℃加速試験での褐変化（外観）

| | １か月 | ２か月 | ３か月 |
|---|---|---|---|
| 外観 | | | |

この錠剤について、含量を規格化すると共に、製品の容器、外観デザインを決定した。

図７に完成した錠剤製品外観を示した。加速試験では密閉環境であることから除湿剤を加えなかったが、実際は毎日開け閉めをするということ、CTP-50 原末が吸湿性が高いことから、製品では蓋に除湿剤を添付した。

最終包剤での 25℃安定性試験では、半年後も錠剤に褐変や含量低下、菌類発生などの異常は確認されておらず、製品として問題ないことが示されている。

図７　錠剤製品の外観

## 安全性試験

CTP-50 の安全性を担保するため、毒性試験等を実施した。実施項目は、急性経口投与毒性試験、28 日間反復投与毒性試験、変異原性試験の 3 試験であった。また、動物への投与量は、ヒト投与予定量（80～100mg/kg）をもとに決定した。その結果、いずれの試験においても異常が見られなかったことから、摂取量 100mg/kg（最大 1000mg/kg）に問題はないことが判明した（表 8）。

表８　安全性試験の結果

| 実施項目 | 内容 | 結果 |
|---|---|---|
| 急性経口投与毒性試験 | ラット、14 日間<br>投与量：2000mg/kg<br>（ヒト投与予定量の 20 倍） | 一般状態観察：異常なし<br>体重推移：優位差なし<br>剖検：異常なし |
| ２８日間反復経口投与毒性試験 | 低用量：500mg/kg<br>高用量：1000mg/kg | 左記投与量下で異常・変化なし |
| 変異原性試験<br>（細菌を用いる復帰突然変異試験） | 用量設定試験<br>本試験 | 陰性<br>（復帰変異コロニー数が院生対象値の２倍未満） |

動脈硬化の進展抑制効果およびアテローム性プラーク血管病変の抑制効果検討：

動物試験

アデニン誘発慢性腎不全モデルにおいて誘発される動脈硬化や動脈石灰化に対するトリペプチド CTP-50 の効果を検討した。

SD ラット（SPF）アデニン飼料を 21 日間投与しアデニン誘発慢性腎不全モデルを作製した。アデニン飼料は、アデニン 0.75% + 蛋白 2.50% 飼料である。通常食は CE-2。アデニン投与は、ラット用金属製胃ゾンデ取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒を用いて強制的に投与した。ラットは、4 群に分類し CTP-50 を投与した。投与回数は午前 8 時、午後 6 時の 1 日 2 回とした。投与期間は 63 日間（3 群）あるいは 42 日間（4 群）とした。屠殺時に、組織染色、RNA 解析用、カルシウム及びリンの定量用の組織として、右腎臓、左腎臓、胸部大動脈、腹部大動脈を採取した。

| 群 | アデニン (%) | 蛋白 (%) | 投与量 (mg/kg/回) | 投与期間 |
|---|---|---|---|---|
| 1. Normal control* | 0 | 25.40 | — | — |
| 2. Injury control* | 0.75 | 2.50 | — | — |
| 3. CTP-50(63 days) | | | 200 | 63日間 |
| 4. CTP-50(42 days) | | | 200 | 42日間 |

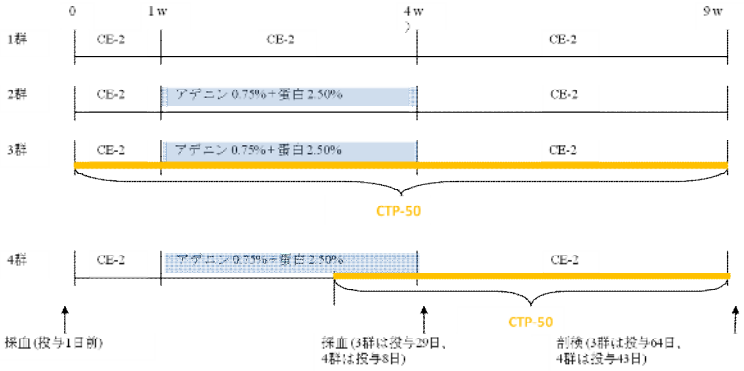



図８　プロトコール

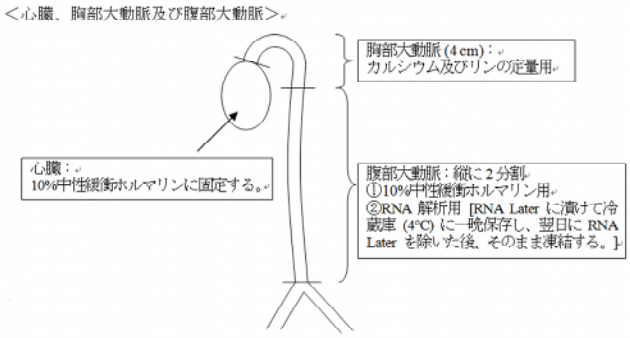



図９　動脈の採取

実施の結果、アデニン投与群（2、3、4 群）には、体重差はなかった（図 10）。アデニン投与群では、著明な尿細管破壊による間質障害がみられたが、アデニン投与群（2、3、4 群）には差はなかった（図 11）。アデニン投与群（2、3、4 群）の腎は、ネフローゼのため腫大していたが、腎重量に差はなかった（図 12）。アデニン投与群（2、3、4 群）では、大動脈中膜に石灰化がみられたが、群間に有意差はなかった（図 13）。胸部大動脈に沈着したカルシウム及びリンは、0.15M HCl 2 mL で抽出し、それぞれ o-CPC 法と PNP/XDH 法で測定した。アデニン投与群（2、3、4 群）では Ca・P 積は上昇傾向にあったが、CTP-50 による差は見られなかった（図 14）。以上の結果から、今回用いたアデニン誘発慢性腎不全モデルでは、腎不全はほぼ均等に誘発されていたが、動脈硬化や動脈石灰化は軽微なものであり、トリペプチド CTP-50 の効果の有無を確認するには至らなかった。

腹部大動脈中の遺伝子発現を確認した結果、およそ 20 種類の遺伝子の変動が観察された。ミクロアレイ解析により、発現変動が認められた遺伝子のうち性格付けがある程度行われていたものは、発現の上昇が推定された遺伝子では 4 種類、低下が測定された遺伝子では 11 種類を確認した。これらの詳細について、今後、学術論文誌から出版、公表する予定である。

なお、これらの遺伝子群についてデータベースを検索すると、細胞の増殖　に関与する可能性が示唆されたものの、その生物学的な意義については不明という結果であった。

残りの遺伝子については、配列情報のみが登録されており、解析は困難であった。ただし、アノテーション情報がある遺伝子でも、血管系制御との関連について既存のデータベースから明らかにすることはできなかった。従って、既に知られている知見からは作用メカニズムを推定することは困難であった。さらに検体数を増やして測定の精度を上げる、さらには遺伝子改変動物等を利用した新たな実験系の構築が必要と考えられる。

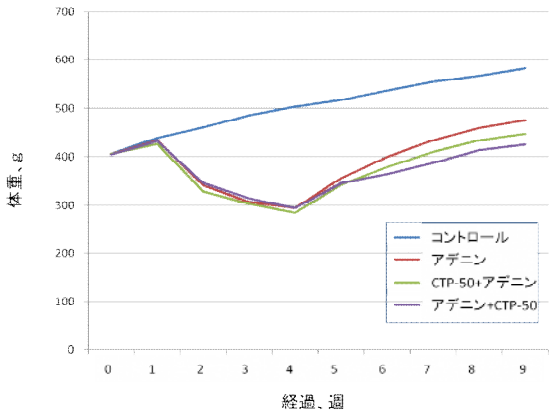



図 10　体重の推移

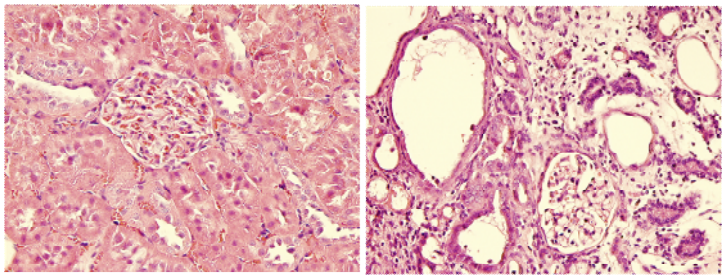


図 11　アデニン腎症の尿細管間質障害

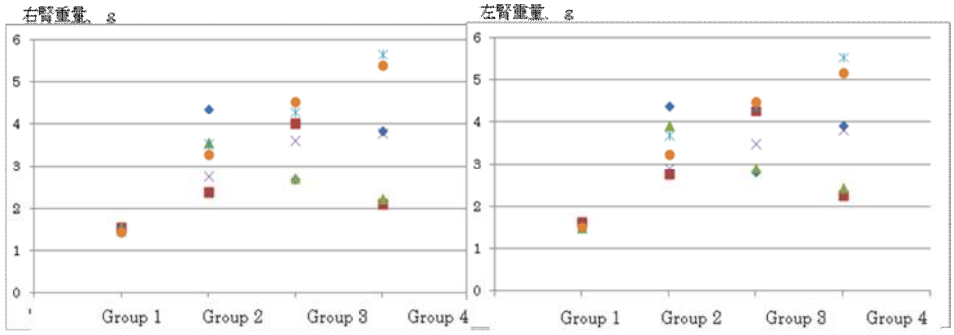



図 12　腎重量

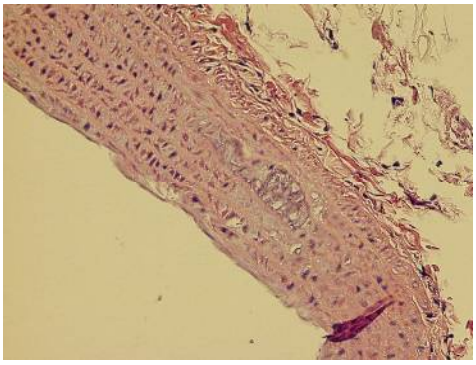


図 13　アデニン誘発血管病変

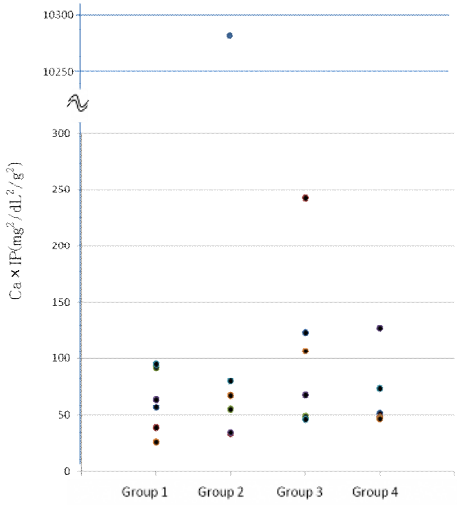



図 14　胸部大動脈へのカルシウム及びリン沈着

動脈硬化の進展抑制効果およびアテローム性プラーク血管病変の抑制効果検討：

細胞試験

○初代培養ヒト大動脈血管内皮細胞（EC）および平滑筋細胞（SMC）のペプチドトランスポーター発現

EC および SMC での 4 種のペプチドトランスポーターの発現を、すでに CTP 作用が明らかにされているヒト骨芽細胞株（hFOB1.19 細胞）と比較しながら解析した。その結果（未公表データを含む）から、EC および SMC でのペプチドトランスポーターの発現は、CTP 作用が確認されているヒト骨芽細胞株と大きな差がないレベルで発言していると判明した。

○EC および SMC の遺伝子発現に対する CTP の影響

SMC において CTP 添加が mRNA の発現変動にどのよういう影響するかを DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、低濃度（10、30μg/ml）ではほとんど遺伝子発現の変化は認められなかった。100 および 300μg/ml の濃度ではいくつかの遺伝子に 1.5～2 倍の発現変化が検出されたが、大きな遺伝子発現変化は認められなかった。図１５にスキャッタープロット（300μg/ml）を示す。

CTP 添加により、大部分の遺伝子に変動は認められないことから、無処理の培養条件下では、CTP 添加が遺伝子発現プロファイルに影響しないことが示唆された。同時に、CTP が細胞に対してほとんど毒性を示さないことが示唆された。

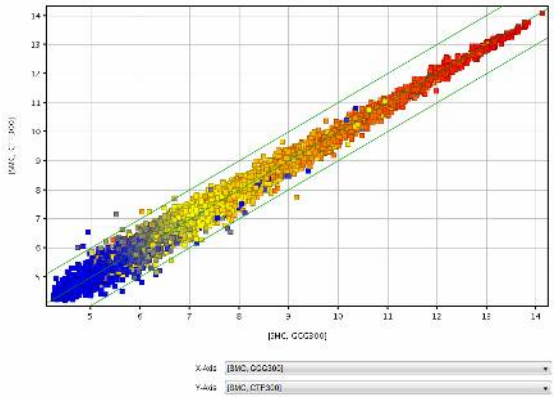


図 15　SMC における CTP 添加が mRNA の発現に与える影響

同様に、無処理の EC において CTP 添加が mRNA の発現変動にどのように影響するかを DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、SMC と同様に、低濃度（10、30μg/ml）ではほとんど遺伝子発現の変化は認められなかった。100 および 300μg/ml の濃度ではいくつかの遺伝子に 1.5～2 倍の発現変化が検出されたが、大きな遺伝子発現変化は認められなかった。図１６にスキャッタープロットを示す。

CTP 添加により、大部分の遺伝子に変動は認められないことから、無処理の培養条件下では、CTP 添加は遺伝子発現プロファイルに影響しないことが示唆された。同時に CTP が細胞に対してほとんど毒性を示さないことが示唆された。

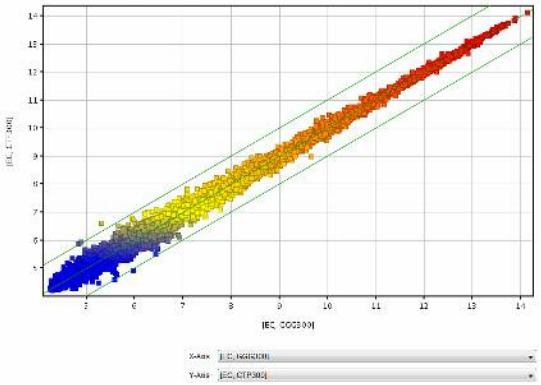


図 16　EC における CTP 添加が mRNA の発現に与える影響

無処理の SMC および EC の両者で発現変動が検出された２種の遺伝子を選択し、定量 PCR（リアルタイム PCR）により発現の検証を行った。その結果、有意な発現変動としては確認できなかった。

無処理の SMC において CTP 添加が microRNA の発現変動にどのように影響するかを DNA マイクロアレイにより解析した。スキャッタープロットを図 17 に示した。mRNA とは異なり、多少の発現変動が観察されたが、mRNA での結果と合わせると、無処理の培養条件下では細胞への影響は少ないのではないかと考えられる。

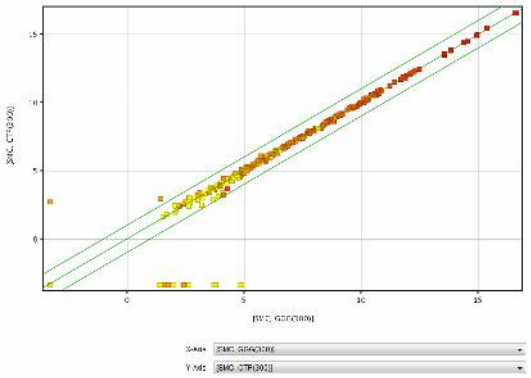


図 17　SMC における CTP 添加が microRNA の発現に与える影響

無処理の EC において CTP 添加が microRNA の発現変動にどのように影響するかを DNA マイクロアレイにより解析した。スキャッタープロットを図 18 に示した。mRNA とは異なり、多少の発現変動が観察されたが、mRNA での結果と合わせると、無処理の培養条件下では細胞への影響は少ないのではないかと考えられる。

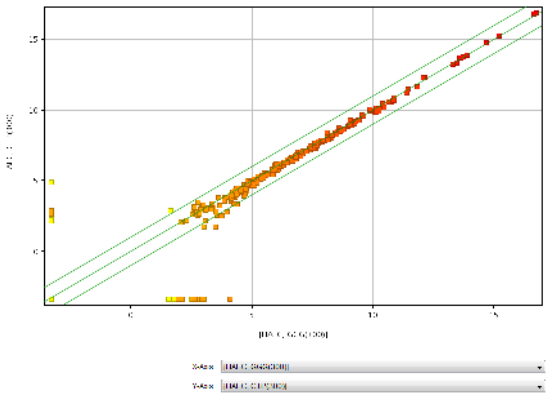


図 18　EC における CTP 添加が microRNA の発現に与える影響

○酸化ストレス（$H_2O_2$ 処理）下の遺伝子発現に対する CTP の影響

顕著な細胞死が生じない条件で $H_2O_2$ 処理（200μM）を行い（図１９）、$H_2O_2$ 処理した血管内皮細胞および血管平滑筋細胞から RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行った。その結果、$H_2O_2$ 処理により発現変動し、CTP 処理により回復を示した遺伝子およびミクロ RNA を複数個同定できた。しかし、ミクロ RNA による遺伝子発現制御に関するこれまでの知見は、mRNA に比べると間接的であるうえに十分とは言えず、mRNA を中心としたメカニズムの解析の方が実際的であると判断した。

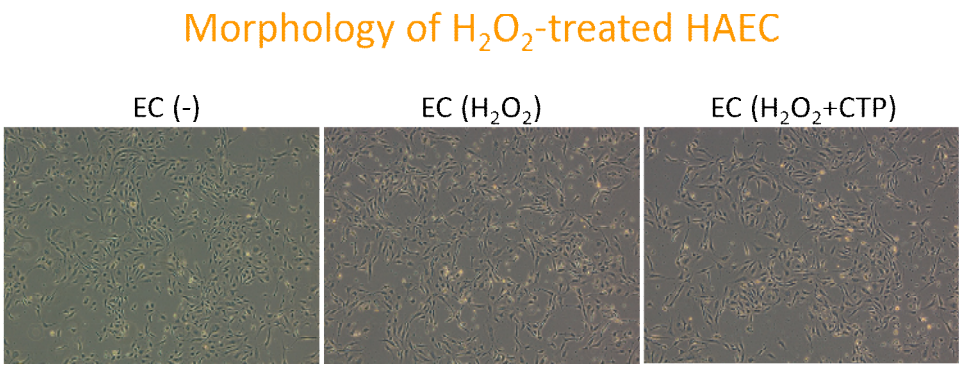



図 19　$H_2O_2$ 処理の有無による細胞形態

図 20 に示す通り、DNA ミクロアレイ解析の結果、血管内皮細胞において、酸化ストレスにより多くの遺伝子が発現低下した（図 20a, b）。そのうち、CTP 処理により回復傾向を示す遺伝子(mRNA)が複数検出された（図 20ｃ，ｄ）。それに対し、発現上昇した遺伝子群に対する大きな影響は認められなかった。血管平滑筋細胞においては、発現上昇した遺伝子群および発現低下した遺伝子群への CTP による大きな影響はともに認められなかった。ミクロ RNA については、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞両者で、酸化ストレスにより発現低下するが CTP 処理により回復傾向を示すミクロ RNA が複数検出された。

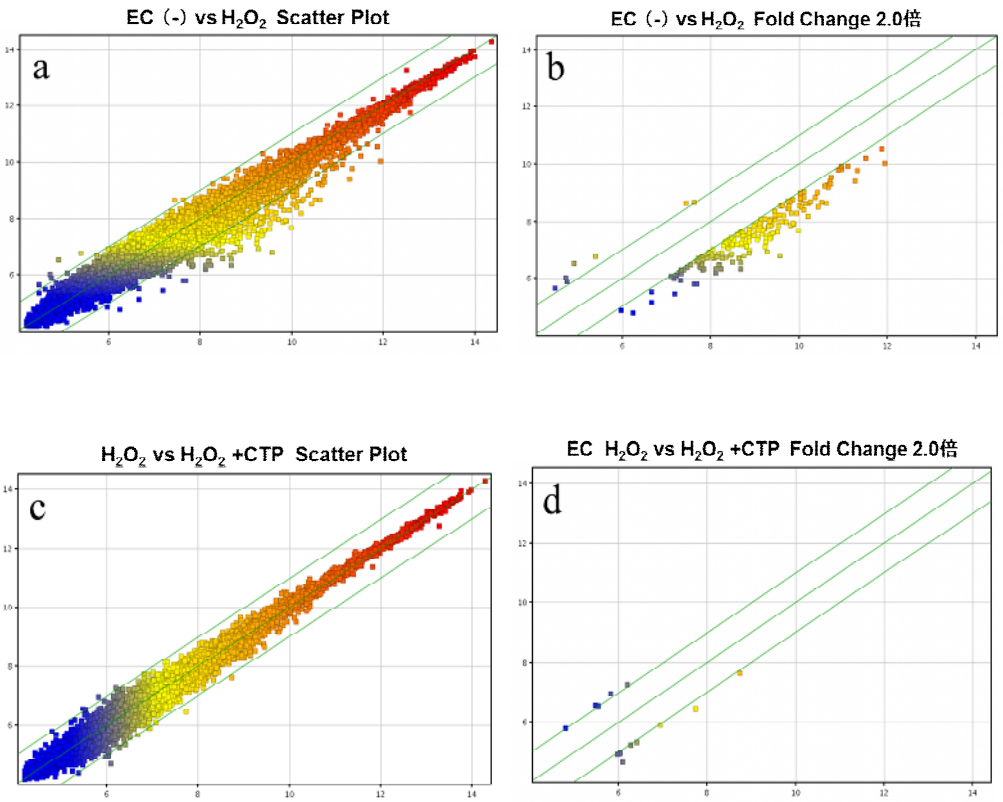



図 20　アフィメトリクス社ミクロアレイによる mRNA 解析結果（Scatter Plot）。(a) EC(-) vs. $H_2O_2$; (b) EC(-) vs. $H_2O_2$, Fold Change 2.0 倍; (c) $H_2O_2$ vs. $H_2O_2$ + CTP; (d) $H_2O_2$ vs. $H_2O_2$ + CTP, Fold Change 2.0 倍.

血管内皮細胞において酸化ストレスにより発現低下するが CTP 処理により回復傾向を示す遺伝子のうち、定量 PCR により発現動態が確認された遺伝子につき、発現抑制による遺伝子機能解析を行った。初代培養大動脈内皮細胞での遺伝子発現抑制は、siRNA を発現するレンチウイルスを内皮細胞に感染させて行った。その結果、当該遺伝子をノックダウンした血管内皮細胞は有意な細胞数低下を示し、当該遺伝子発現の低下が内皮細胞の細胞増殖抑制あるいは細胞死促進を惹起することが示された。

以上の結果より、CTP は、通常の（正常の）状態の細胞の遺伝子発現にはほとんど影響を及ぼさず、このことは添加された CTP 濃度域では細胞毒性もほとんどないことを示すものである。一方、酸化ストレスなどで低下した遺伝子群の発現を回復させることで、血管内皮細胞を保護し、血管障害を抑制するという機構にて、CTP が血管保護・動脈硬化抑制に働くとの推論は可能と考えられる。

なお、以上の考察は、本報告書では未公表としたデータにも基づくものであるが、これらの詳細については今後、学術論文誌から出版、公表する予定である。

動脈硬化の進展抑制効果およびアテローム性プラーク血管病変の抑制効果検討：ヒト試験

これまでの研究により、金沢医科大学とゼライスの共同研究により、ウサギ動脈硬化症において、CTP-15 は血中コレステロールの低下に加え動脈石灰化を減少させ、血管内腔の狭窄を予防改善する効果を持つことが明らかになっている。そこで、今回の CTP-15 の血中脂質代謝異常の改善効果の検証には、総コレステロール、HDL、LDL、中性脂肪に注目した。

32 症例（男 16 例、女 16 例）をエントリーして、CTP-15 16 g/日（CTP-50 で 4 g 相当）の服用研究を開始した。女性 1 例は、服用時の違和感を訴えたため中止した。また男性１名も、別の疾患発症のため中止した。脂質関係項目（HDL-C、LDL-C、TG）は登録前、３カ月、６カ月で採血した。

30 例（男 15 例、女 15 例）において、6 ヵ月間の CTP-15 服用前後の血中脂質関連項目の測定を終了した。表 2 に、全症例、男女別の前後の平均値±SD と、paired t-test での p 値を示した。全 30 例の HDL-C が有意に上昇した。男女で分けた場合、特に男性の HDL-C が有意に上昇を示しており、15 例中 13 例で上昇していた。さらに 5 mg/dl 以上の上昇は 8 例でみられた。TG は、全 30 例で有意な上昇を示したが、男女で分けた場合には有意差は得られなかった。LDL-C については有意な変動は見られなかった。以上の結果から、HDL-C の改善が CTP-15 が脂質代謝に影響を与えていることが示唆された。機序は不明であり、今後の検討が必要である。

表９　CTP-15 の血中脂質代謝への影響

| | HDL-C | | | LDL-C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 前 | 後 | p値 | 前 | 後 | p値 |
| 全 30 例 | 59.8±15.8 | 63.7±15.4 | 0.007 | 128.6±35.7 | 132.1±30.5 | 0.229 |
| 男 15 例 | 48.2±9.3 | 52.9±11.2 | 0.001 | 120.3±29.9 | 126.3±19.7 | 0.288 |
| 女 15 例 | 71.5±11.9 | 74.4±10.8 | 0.242 | 135.6±40.3 | 137.9±38.4 | 0.588 |

| | TG | | |
|---|---|---|---|
| | 前 | 後 | p値 |
| 全 30 例 | 91.6±42.4 | 103.1±42.3 | 0.033 |
| 男 15 例 | 114.7±44.7 | 126.5±45.4 | 0.142 |
| 女 15 例 | 68.5±24.3 | 79.7±21.6 | 0.142 |

血管内での血液の流動性は、凝固系と線溶系のバランスにより巧妙に維持されている。血管の損傷は、血小板と各種血液凝固因子を活性化し、最終的に架橋フィブリンを形成して止血する。凝固系の開始とほぼ同時に線溶系も活性化され、不要な血栓は可溶性のペプチド断片へと分解され血流が確保される。今回、血液流動性の改善効果の検証のために、凝固・線溶能検査：FDP・D ダイマー値を測定した。

32 症例（男 16 例、女 16 例）をエントリーして、CTP 16 g/日の服用研究を開始した。女性 1 例は、服用時の違和感を訴えたため中止した。また男性１名も、別の疾患発症のため中止した。血液流動性の評価項目（D-D、FDP）と動脈硬化の生理的評価項目（CAVI、ABI）は登録前、６カ月で測定した。

30 例（男 15 例、女 15 例）において、6 ヵ月間の CTP-15 服用前後の血液流動性（血栓形成性）の評価項目、および動脈硬化関連項目の測定を終了した。血液流動性の評価項目（D-D、FDP）は全例正常であり、前後の変動は見られなかった。

表 10 に、CAVI と ABI の全症例、男女別の前後の平均値±SD と、paired t-test での p 値を示した。全 30 例で、CAVI が有意に改善した。男女で分けた場合、有意差は得られなかったが、女性の 73%（11/15）、男性の 50%（8/15）に改善を認めた。CAVI は、臨床応用された動脈硬化の指標であり、血圧の影響をなくし、かつ一般臨床医が簡単に測定できる血管機能指標として開発され、定量的に評価できる利点がある。今後、更に症例を増やし、CTP の動脈壁への影響を検討したい。

表 10　CTP-15 の CAVI、ABI への影響

| | CAVI（右） | | | CAVI（左） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 前 | 後 | p値 | 前 | 後 | p値 |
| 全 30 例 | 7.8±0.8 | 7.6±1.0 | 0.048 | 7.8±0.8 | 7.6±1.0 | 0.046 |
| 男 15 例 | 8.1±0.8 | 7.9±0.9 | 0.305 | 8.1±0.7 | 7.9±0.8 | 0.174 |
| 女 15 例 | 7.5±0.8 | 7.3±0.9 | 0.120 | 7.4±0.7 | 7.3±0.9 | 0.194 |

| | ABI（右） | | | ABI（左） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 前 | 後 | p値 | 前 | 後 | p値 |
| 全 30 例 | 1.17±0.07 | 1.15±0.07 | 0.177 | 1.19±0.07 | 1.17±0.08 | 0.170 |
| 男 15 例 | 1.18±0.09 | 1.19±0.06 | 0.683 | 1.22±0.08 | 1.20±0.08 | 0.547 |
| 女 15 例 | 1.17±0.06 | 1.11±0.07 | 0.014 | 1.17±0.06 | 1.14±0.07 | 0.118 |

動脈硬化の進展抑制効果およびアテローム性プラーク血管病変の抑制効果検討：

動脈硬化関連バイオマーカーへの影響評価（AGE との関連）

体内で生成される各種終末糖化産物（advanced glycation end-products, AGEs）の中でも、特にブドウ糖／果糖代謝中間体のグリセルアルデヒドに由来する AGEs（Glycer-AGEs, toxic AGEs（TAGE)と命名）がその受容体である RAGE（receptor for AGEs)を介し、糖尿病血管合併症の発症・進展に強く関わっていることが明らかになってきた。最近では、高血圧症、がん、認知症、非アルコール性脂肪肝炎、不妊症などの多様な疾患の発症・進展にも関与していることが解明され、TAGE-RAGE 系の影響を抑えることが生活習慣病の予防および治療戦略上、必要なことがわかってきた。

これまで、各種病態と血中 TAGE 量との関連性について検討し、1）2 型糖尿病患者だけでなく、非糖尿病者においても TAGE 量と血栓マーカー（PAI-1 やフィブリノーゲン)との間には正の相関があること、2）非糖尿病者において血中 TAGE 量は，炎症あるいは高血糖条件下で上昇することや、アディポネクチンレベルとは逆相関すること、3）血中 TAGE 量と $^{18}$F-fluorodeoxyglucose（FDG)-PET で評価された血管炎症の程度が正相関し、TAGE が動脈硬化巣における血管炎症の程度を反映するマーカーとしての可能性を秘めていること、4）健常者においても、血中 TAGE 量は循環血液中の血管内皮前駆細胞の数の減少や遊走活性の低下との相関がみられ、将来的な動脈硬化の進行と心血管イベントを予測するマーカーとしての可能性が期待されること、などを報告している。

このように、血中 TAGE 量の評価は未病も含めた生活習慣病の予防、早期診断、治療の有効性を評価する有用なマーカーとしての可能性を秘めていることから、今回の動脈硬化への影響を評価するバイオマーカーとして TAGE を選定するに至った。

血中 TAGE 量は、独自に開発した TAGE 特異的抗 TAGE ポリクローナル抗体を用いた競合 ELISA 法により測定した。CTP-15 服用 6 ヶ月間までの血清検体が揃った 29 症例（男 14 例、女 15 例）について、血管炎症の程度を反映する候補マーカーとしての TAGE 測定を終了した。

その結果、全体の平均値では CTP-15 服用による血中 TAGE 量の有意な減少は見られなかったが、個別の TAGE 量の推移を観察すると男女とも 4 例に CTP-15、6 ヶ月服用後に血中 TAGE 量の減少傾向がみられた。

今後、更なる長期服用による血中 TAGE 量の減少から、将来的な動脈硬化の進行と心血管イベントの予防が可能であるかどうかの長期的な検証が必要と思われる。

血中 CTP 代謝物測定方法の確立と経口投与時の血中動態の測定

ゼラチンの酵素消化物であるコラーゲントリペプチド（CTP：GXY）は動脈硬化の予防及び改善する効果を有する機能性食品として期待されている。しかし、その有効性や機能性を調べるためには、経口投与後の CTP およびその代謝物（コラーゲンジペプチド（CDP：XY, GX, YG）の体内動態を調べることが必要である。

血中 CTP および CDP を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(HPLC-MS/MS)を用いて分析した論文は既に報告されている(例えば、参考文献１)。質量分析計は選択性と高感度検出で他の分析法（紫外可視吸光光度計、蛍光光度計）に比べてすぐれているが、検出信号の変動が大きいのが欠点である。そこで、分析対象化合物の安定同位体置換物質を添加し、それぞれの存在比から定量を行う同位体希釈法（内部標準法）（*CTP, *CDP）が勧められている。

CTP&*CTP および CDP&*CDP 標準物質（STD）の MS スペクトルおよび MS/MS スペクトル解析の結果、以下の MS&MS/MS 条件および MRM（マルチプルリアクションモニタリング）フラグメントイオンが適当であることを確認した（表 11）。

表 11　MS イオン&MS/MS（MRM）フラグメントイオン：

| 成分 | MS ion | MS/MS ion |
|---|---|---|
| Tri-peptides(CTp&*CTp) | | |
| GPHyp | m/z 286.2 | m/z 127.1(a2) |
| *GPHyp | m/z 288.2 | m/z 129.1(a2) |
| GPA | m/z 244.1 | m/z 127.1(a2) |
| *GPA | m/z 246.1 | m/z 129.1(a2) |
| GAHyp | m/z 260.1 | m/z 132.1(y1) |
| *GAHyp | m/z 262.1 | m/z 132.1(y1) |
| GPP | m/z 270.1 | m/z 127.1(a2) |
| *GPP | m/z 272.1 | m/z 129.1(a2) |
| Di-peptides(CDp&*CDp) | | |
| PHyp | m/z 229.1 | m/z 132.1(y1) |
| *PHyp | m/z 235.1 | m/z 132.1(y1) |
| GP | m/z 173.1 | m/z 116 (y1) |
| G*P | m/z 179.1 | m/z 122 (y1) |
| AHyp | m/z 203.1 | m/z 132.1(y1) |
| *AHyp | m/z 207.1 | m/z 132.1(y1) |
| PA | m/z 187.1 | m/z 70.0 (Im) |
| *PA | m/z 193.1 | m/z 75.0 (Im) |
| HypG | m/z 189.1 | m/z 86.0 (Im) |
| Hyp*G | m/z 192.1 | m/z 86.0 (Im) |

内部標準法の妥当性を検証した結果、いずれの成分も直線性(0.0-100ng/mL、$R^2$～1)、再現性(RSD:0-8%)共に良好であった。また、マトリックス（PBS、血漿）により、CTP、それぞれ MS/MS（MRM）検出感度は変動するが、＊CTP も同様に変動するために、各ピーク面積比(Area(CTP)/Area(*CTP)を縦軸とする検量線の傾きはほぼ一致した。この事は、各成分の MS/MS(MRM)検出の変動はほぼ補正（相殺）できる事を意味しており、本法では分析毎の検量

線作成は不要となる。

CTP 3 成分の定量下限値(S/N=10)は GPHyp：0.05ng/mL，GPA：0.15ng/mL，GAHyp：0.3ng/mL であった。以上の結果から、CTP 代謝物の血中動態を測定できる良好な分析法が確立したと判断した。

この分析法を用いて CTP-50 を摂取した際の健常人 5 名の血中動態を測定した。結果の一部を図 21 に示した。図 21 の通り、CTP-50 の各成分が高濃度で血中に入ることが確かめられた。特に、GPHyp は、これまでのコラーゲン食品の摂取では殆ど取り入れることが出来なかったことから、CTP-50 によってのみ摂取できる機能性ペプチドである。また、機能性をもつジペプチド代謝物も高濃度で血中に存在することが認められた。過去のコラーゲン食品を経口投与した報告と比較すると、投与量に対する血中濃度が非常に高く、CTP-50 の高い吸収性と高濃度での血中動態が確かめられた。

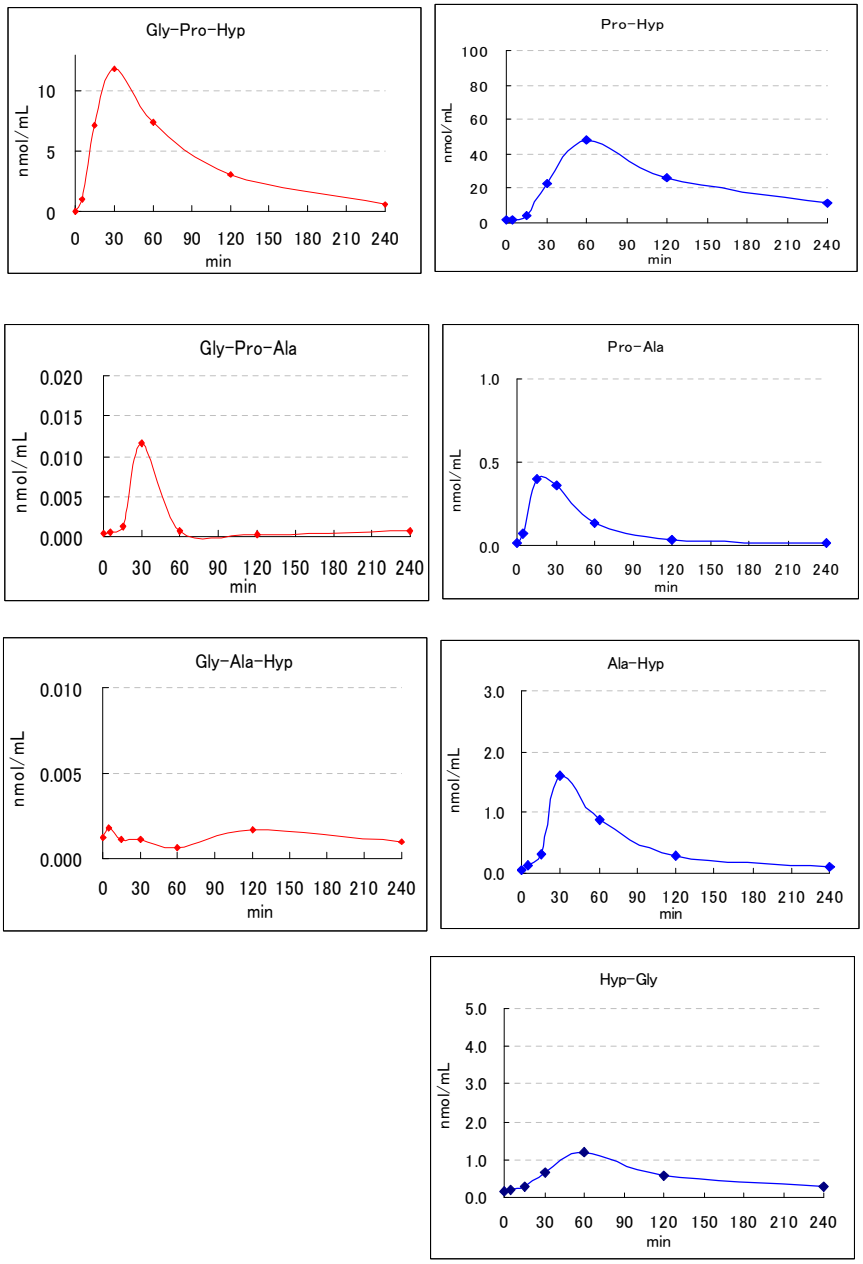



図 21　CTP-50 経口摂取前後(0-240min)の各成分血中濃度の時間変化

## 最終章　全体総括

アテローム性動脈硬化の予防＆改善効果を有する機能性食品 CTP-50 の開発を、有効性検証、分析法検討、製造検討の３方向から実施した。

ヒト試験による有効性検証では、健康食品である制約から、全く動脈硬化の無い、健常人で実施した。健常人においても年齢に伴い動脈硬化は進行することから、その改善を確認することを目的とした。また、被験物質についても、食歴のある製品でのみ実施が認められたことから、従来品の CTP-15 を用い、トリペプチド含量として CTP-50　4g 相当を摂取量した。試験の結果、健常人であることもあり、LDL-C、TG といった動脈硬化指標に大きな変化は見られなかった。一方、HDL-C が優位に上昇した。HDL-C は動脈硬化の直接の指標ではないものの、善玉コレステロールと呼ばれており、これが（正常値内において）高値の人は心筋梗塞・脳卒中などの血管系疾患が起こりにくく、長寿傾向であることといわれている。機序の詳細の解明は今後の研究に託す必要があるが、CTP の動脈への作用の一端が解明されたと考える。さらに、CAVI 検査で、血管弾力性の改善が確認された。これにより、CTP が血管の弾力を健やかに保つ作用に関係している可能性が示された。このように、たった半年間で、健常人の微妙な動脈硬化に対する効果を示したことは、驚くべき結果である。ヒト試験で非常に膨大なデータが得られたことから、今後もさらに解析を進める予定である。また、ヒト試験の第二相として、被験物質を CTP-50 とし、被験者群についてもより疾患に近い群で実施することを計画している。

細胞試験の結果、CTP が低下した IL3RA 遺伝子発現を回復する作用があることが示された。IL3RA 遺伝子の低下は、内皮細胞の細胞増殖抑制あるいは細胞死促進を惹起することが示されたことから、CTP は酸化ストレスなどで低下した IL3RA 遺伝子などの遺伝子群の発現を回復させることで、血管内皮細胞を保護し血管障害を抑制するという機構で、血管保護・動脈硬化抑制に働くと考察される。

食品は、腸内での消化を受けた代謝物のみが血中に運ばれるため、製品中成分が健康作用の活性本体ではない場合が多い。トクホにおいても、現象論で効いた治ったを評価するだけではなく、何が活性本体であるかを把握することまでが求められる。CTP-50 についても、摂取後の血中代謝物を測定することが必要となるため、まずは血中代謝物の分析法の確立を行った。各成分の内部標準を作成し検討した結果、低濃度域まで測定が可能で、精度の高い分析法を確立することに成功した。この方法で血中動態を測定した結果、製品中のトリペプチドがそのまま血液まで届いていることが確認された。一方で、代謝物のジペプチドも高濃度で発生することも確認された。これらのペプチドは、例えば Gly-Pro-Hyp は、血小板との相互作用（引用文献 2）、コラーゲン産生作用（引用文献 3）、中枢神経系への作用（引用文献 4）報告、Gly-Pro-Ala は神経分化促進作用（引用文献 5）、Pro-Hyp は細胞増殖、ヒアルロン酸合成作用（引用文献 6）、関節への作用（引用文献 7）の報告がある。Gly-Pro は血圧下降作用（引用文献 8）、Pro-Ala についてはグルカゴン様ペプチド-分泌促進（引用文献 9）、Ala-Hyp はコラーゲン産生促進作用（引用文献 10）について報告がある。他のコラーゲン食品を摂取した際の過去の報告（引用文献 1）と比較すると、CTP-50 は、摂取量に対して各ペプチド成分の血中性が高いことが明らかとなった。これにより、従来のコラーゲンより少量の摂取で効く仕組みの一端が解明された。今後、代謝物ごとの機能性を研究することで、動脈硬化への効果の機序をより明確にしていくことができると考える。

製造検討の結果、1 ロットにつき目標 8kg を上回る、10kg 以上の製品原末を得る工程として完成させることに成功した。パイロットスケールにおける原末の年間生産量は約 500kg で、初期生産量としては十分である。また、末端製品の一例として、錠剤化製品の製造に成功した。川下企業からは既にプレゼンの依頼、サンプル提供の依頼が来ている状況であり、本事業が終了次第、本格的なサンプルワーク及び営業を開始する予定である。

なお、今後の増産に備え、既に新工場の建設を計画しており、平成 28 年度頃の完成を目指している。

**引用文献**


1 Ichikawa Satomi, Morifuji Masashi, Ohara Hiroki, Matsumoto Hitoshi, Takeuchi Yasuo, Sato Kenji Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate Int J Food Sci Nutr Vol.61 No.1 Page.52-60

2 DL Laskin, T Kimura, S Sakakibara, D J Riley and R A Berg Chemotactic Activity of Collagen-Like Polypeptides for Human Peripheral Blood Neutrophils. J Leukoc. Biol. 1986 39:255-266

3 Japan patent Kokai 2006-56904 (2006.3.2)

4 K Wisniewski, B Artemowicz, A Lutostanska , J Maclowiak and W Koziolkiewicz Central activity of peptide Gly-Pro-Hyp-the main component of collagen degradation products mixture Acta Neurobiol.Exp.1994,54:33-38

5 Japan patent Kokai 2011-111440 (2011.6.9)

6 Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. J Dermatol. 2010 Apr;37(4):330-8

7 Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. Osteoarthritis Cartilage. 2009 Dec;17(12):1620-7

8 Ichimura Toshiaki, Yamanaka Akiko, Maruyama Susumu, Otsuka Tatsuro, Yamashita Eiic hi Antihypertensive Effect of Enzymatic Hydrolysate of Collagen and Gly-Pro in Spontaneously Hypertensive Rats Biosci Biotechnol Biochem Vol.73 No.10 Page.2317-2319 (J-STAGE) (2009)

9 Fumito Shigehara, Naoki Inoue, Seiko Koizui, Tadashi Yoshimoto, Hiroshi Oyama , US Patent 0303448 A1(Nov. 14,2013)

10 Japan Patent 4995155（2012.5.18）