

閉経後骨粗鬆症に対する  
シャーケプロテインの効果

2014.3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
応用生命科学専攻

上原 一貴

## 目次

緒言.....	i
第1章 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン投与による骨密度改善効果.....	7
1. はじめに.....	7
2. 実験材料および方法.....	7
2.1 実験材料および試薬.....	7
2.2 試験試料.....	8
2.2.1 試験試料調製法.....	8
2.2.2 アミノ酸分析法.....	8
2.3 卵巣摘出動物作製法.....	10
2.4 動物飼育計画.....	10
2.5 骨密度測定法.....	11
2.6 骨強度測定法.....	11
2.7 統計処理.....	12
3. 結果.....	13
3.1 試験試料のアミノ酸組成.....	13
3.2 動物基礎データ.....	13
3.3 シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与による OVX ラットの大腿骨 骨密度への影響.....	16
3.4 シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与による OVX ラットの大腿骨 骨強度、骨長および骨重量への影響.....	21
4. 考察.....	21

## 第2章 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン加水分解物投与による骨密度改善効果25

1. はじめに.....	25
2. 実験材料および方法 .....	25
2.1 実験材料および試薬 .....	25
2.2 シャークプロテイン加水分解物の調製法および構造解析法 .....	26
2.2.1 加水分解物の調製法 .....	26
2.2.2 加水分解物の分子量測定法 .....	26
2.2.2.1 平均分子量測定法 .....	26
2.2.2.2 低分子量測定法 .....	28
2.2.3 加水分解物のアミノ酸分析法 .....	29
2.2.4 SPH のタンパク質量測定法 .....	30
2.2.5 SPH の薄相クロマトグラフィーによる脂質分析法 .....	30
2.3 動物飼育計画 .....	31
2.4 骨密度測定法 .....	32
2.5 血漿分析法 .....	32
2.6 統計処理 .....	33
3. 結果.....	35
3.1 加水分解物の特徴 .....	35
3.1.1 加水分解物の分子量分布 .....	35
3.1.2 加水分解物のアミノ酸組成 .....	36
3.1.3 SPH 中の脂質の測定 .....	38
3.2 動物基礎データ .....	38
3.3 SPH 投与による OVX ラットの大腿骨骨密度への影響 .....	43
3.4 SPH 投与による OVX ラットの血漿中骨代謝マーカー活性への影響 .....	46
3.5 SPH 投与による OVX ラットの血漿中 Ca 濃度への影響 .....	49

4. 考察.....	49
第3章 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物による分化抑制効果 .....	51
1. はじめに.....	51
2. 実験材料および方法 .....	53
2.1 実験材料および試薬 .....	53
2.2 骨髄細胞の破骨細胞分化における SPH の影響.....	53
2.2.1 細胞培養法 .....	53
2.2.2 TRAP 染色法 .....	54
2.3 RAW264 細胞の破骨細胞分化における加水分解物の影響 .....	54
2.3.1 細胞培養法 .....	54
2.3.2 生細胞数測定法 .....	55
2.3.3 TRAP 活性測定法 .....	55
2.3.4 TRAP 染色法 .....	55
2.4 統計処理 .....	56
3. 結果.....	56
3.1 骨髄細胞の破骨細胞分化における SPH の影響.....	56
3.2 RAW264 細胞の破骨細胞分化における加水分解物の影響.....	56
4. 考察.....	60
第4章 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物の再分画物による分化抑制効果 ...	62
1. はじめに.....	62
2. 実験材料および方法 .....	62
2.1 実験材料および試薬 .....	62
2.2 加水分解物の再分画 .....	63

2.2.1	逆相クロマトグラフィーによる分画法 .....	63
2.2.2	分画物のアミノ酸分析法 .....	63
2.2.3	分画物の質量測定法 .....	64
2.2.4	ペプチドシーケンサーによる N 末端構造解析法 .....	65
2.2.5	SPH の遊離 Trp 濃度測定法 .....	66
2.3	RAW264 細胞の破骨細胞分化における SPH 分画物の影響 .....	66
2.3.1	細胞培養法 .....	66
2.3.2	TRAP 染色法 .....	67
2.4	統計処理 .....	67
3.	結果 .....	67
3.1	分画物の同定 .....	67
3.2	RAW264 細胞の破骨細胞分化における SPH 分画物の影響 .....	74
3.3	RAW264 細胞の破骨細胞分化におけるアミノ酸の影響 .....	75
4.	考察 .....	76
	総括 .....	81
	引用文献 .....	83
	謝辞 .....	92

## 緒言

サメは、食物連鎖の頂点に立つ高次捕食者であり、マグロ延縄漁において混獲されている。サメのヒレは中華料理の高級食材であり、混獲されているサメの大部分はヒレのみを得た後、海洋投棄(いわゆるフィニング)されている。すなわち、サメの商品価値はヒレに依存しており、それ以外の部分は重要視されてこなかった。また、鮮度低下に伴う独特のアンモニア臭を持つことが障害となり、ヒレ以外の利用が進まない原因となっている。サメ・エイ類の年間水揚げ量は国連食糧農業機関(FAO)の調査によると、2011年に約77万トンであり、動物性タンパク質資源としての有効活用が求められている。

日本国内で安定的に水揚げされているサメはヨシキリザメであり、季節変動がなく年間を通して水揚げされている。宮城県気仙沼港では、年間1万トン前後が集約的に水揚げされている。メジロザメ科に属し、世界中の温帯・亜熱帯海域に生息している。平均体長は2.5~3mで、5年で性成熟し、雌は12ヶ月の妊娠後、20~50尾の稚魚を産む。外洋性の硬骨魚、頭足類、鯨の死骸、カメ等を捕食し、マグロ延縄漁に伴い混獲されている。気仙沼では、サメは一部の内臓を除き大部分が利用されている。サメの各部位の有効な成分をFigure 1に示す。

サメ漁獲の最大の目的は、ヒレ製造にある。高級中華食材としてのヒレは、その大部分が乾燥品である。収穫されたヒレは、水にさらした後、温度管理された湯浴で加温され、再び水にさらした後、表皮および軟骨を取り除き、乾燥され製品として出荷されている。中国や東南アジアの経済成長に伴いヒレの需要が高まっており、大部分のサメはヒレのみを採取し、その他はフィニングされており、サメ類の資源の保護とその利用に対して国際的な関心事となっている。サメの各部位の有効成分について以下に概説する。

軟骨は、医薬品および機能性食品としてのコンドロイチン硫酸の原料として利用されている。コンドロイチン硫酸は、その構成糖であるグルコサミンと共に変形性関節症の痛みの軽減に効果があり(Richy *et al.*, 2003)、機能性食品として市販されている。Palmieriらは、ラットおよびイヌに放射能ラベルしたコンドロイチン硫酸を摂取させ、その代謝に関する

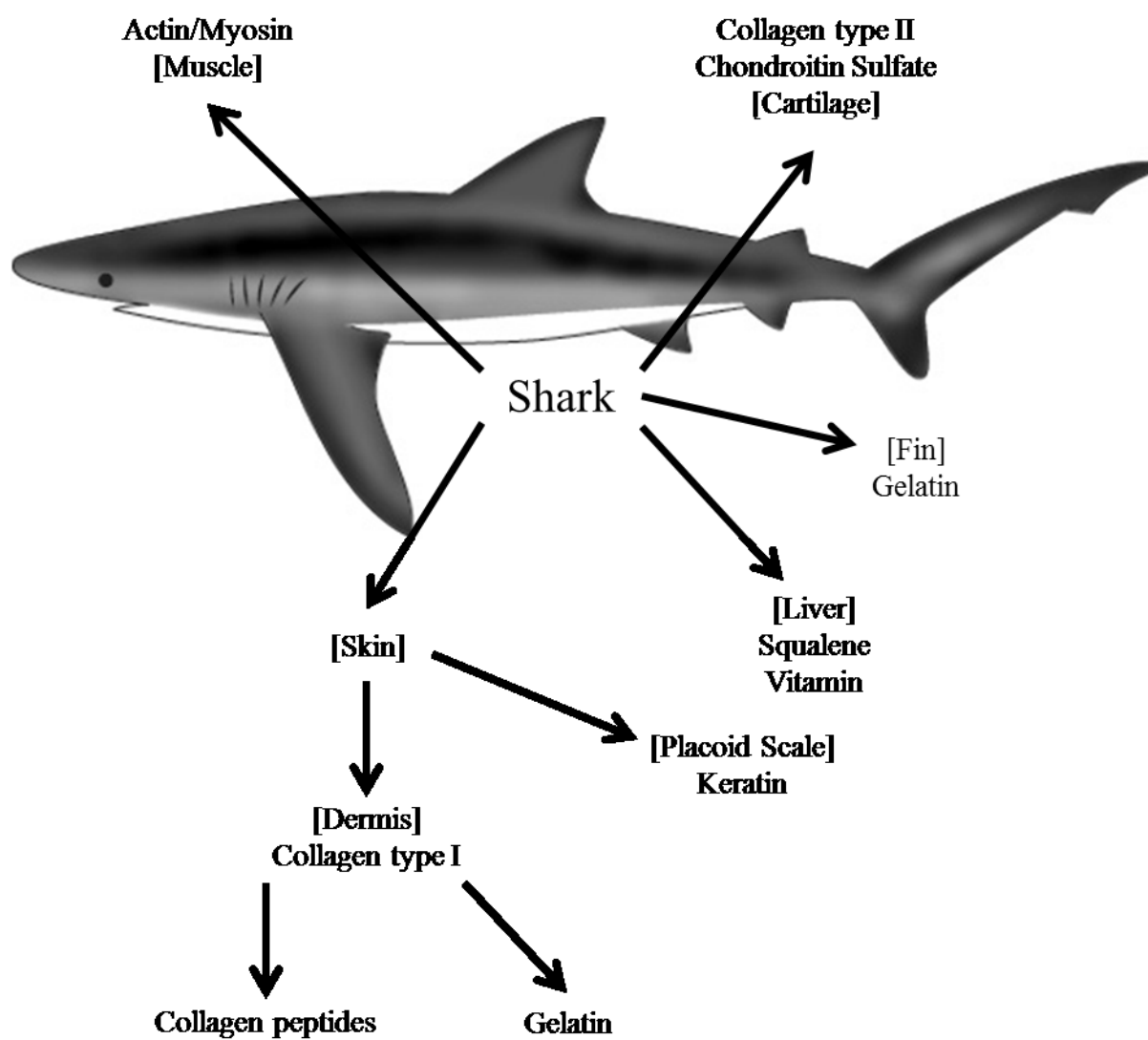


Figure 1 サメの各部位の有効な成分

研究を行い、放射能ラベルしたコンドロイチン硫酸が関節液に存在していることを示した。(Palmieri *et al.*, 1990)。Conte らは、ヒトにおいてコンドロイチン硫酸の代謝について検討し、酵素分解されたコンドロイチン硫酸が血液中に存在することを報告している(Conte *et al.*, 1991)。変形性関節症における痛みの低減効果は、コンドロイチン硫酸が関節液中の高分子量のヒアルロン酸の合成を促進していることによるものと考えられている(McAlindon *et al.*, 2000)。また、サメ軟骨は制ガン剤としても注目されており、Lee らは、腫瘍脈管形成を阻害する物質がサメ軟骨中に存在すると報告している(Lee & Langer, 1983)。Conte および Lane らは、サメ軟骨の医学的応用の解説とヒトにおけるガン組織の抑制について報告している(Conte *et al.*, 1995; Lane, 1991; Lane & Contreras, 1992)。これ以降、サメ軟骨を用いた研究が多くなされており、制ガン効果を期待する機能性食品として販売されている。しかし、アメリカ食品医薬品局(FDA)の調査によりガン治療に対して、経口摂取で効果がないという報告もあり、未だに結論が出ていない。

1916年辻本らは、サメの肝油成分からスクアレンの分離に成功し、その水素付加物であるスクアランは、不凍液として機械の潤滑油に用いられてきた。1950年代前半までは、深海ザメの肝臓中にビタミンAが多く存在することからビタミン補給用の原料として使われていた。しかし、安価な合成ビタミンの普及によりサメ肝油漁業が衰退した。しかし、化粧品用のスクアレンはアトピー性皮膚炎患者のスキンケアの目的で研究されており(谷井 *et al.*, 1991)、スクアレンの水素化合物であるスクアランは高級化粧品原料として利用されている(日本油脂新報社, 1999; 海谷, 1990)。

皮は、鞣され靴やハンドバッグに利用されている。しかし、皮としての利用はそれほど多くなく産業廃棄物となっていたが、当研究室の長年の努力の結果、「水生動物由来の無臭化コラーゲン・ゼラチン等を得る原料皮の製造法」(特許 第 3979576 号)を確立出来たことにより皮の有効利用が可能になり、皮由来コラーゲンを利用した機能性食品、美容院向けのフェイスマスク等への利用が進められている。

肉は奈良時代に干し細肉として朝廷に献上されており、現在でも深海性のサメはアンモ



ニア臭が無くステーキ用として、アンモニア臭のあるものでも湯引きしたものが市販されている。明治、大正期に竹輪蒲鉾としてアブラツノザメが利用されていたが、元来繁殖力の低いサメであったため資源の枯渇を招き、現在では乱獲による天然資源減少を抑制し、バランスのとれた地球環境に配慮した漁業を目指した取り組みが始まっている(野村 *et al.*, 2013)。ヨシキリザメの肉は、魚肉練り製品の増量剤として利用されている。しかし、食品における原材料表記が義務付けられるようになってから、魚肉練り製品にサメと表記しなければならず、イメージの問題から増量剤としての利用が忌避されるようになってきている。サメ魚体の 50%を占める肉の利用価値が低くなると、フィニングされるサメの量が増える恐れがあり、資源としての有効性があるにもかかわらず、経済的問題から利用されないことになる。サメ肉の特徴は、小骨がなく、低脂肪、高タンパク質である。また、非常に筋が多いのが特徴であり、サメ肉の 2.5%(乾燥重量比)が筋を構成するコラーゲンである。サメの商品価値を高めるためには、肉の付加価値を高めることが重要となる。これまでの研究において、魚を食べることで心血管疾患(He *et al.*, 2004)、大腸ガン(Geelen *et al.*, 2007)および総死亡率(Folsom & Demissie, 2004)のリスクを下げることで報告されている。魚肉は高品質のタンパク質源であり、その食理機能についての研究も行われている。スケトウダラ魚肉をタンパク質源としてラットに与えた実験では、血漿中の脂質濃度が減少することを報告している(Shukla *et al.*, 2006)。また、魚肉ペプチドの研究では、脂質異常症モデルでのコレステロールの低下効果(Wergedahl *et al.*, 2004)、降圧効果(Je *et al.*, 2004)、抗酸化効果(Chabeaud *et al.*, 2009; Sampath Kumar *et al.*, 2012)および抗肥満効果(Liu *et al.*, 2013)等が報告されている。ヒトの試験においても、動脈硬化抑制効果、骨粗鬆症予防効果、酸化ストレス低下効果が報告されている(松井 & 川崎, 2000)。しかし、サメ皮由来のコラーゲンの食理機能として、骨粗鬆症の骨密度改善効果を認めているが(Nomura *et al.*, 2005)、これまでサメ肉に関する研究は行われていなかった。

現代日本は、高齢社会を迎え平均寿命は約 80 歳と延び、運動器を長期間使用し続ける時代を迎えている。そこで、日本整形外科学会が 2007 年に提唱したのが「ロコモティブシン

ドローーム(locomotive syndrome)」である。運動器の衰えにより、日常生活での自立度が低下し、要介護になる可能性の高い状態を指す。運動器(locomotive organs)とは、骨・関節・靭帯、脊椎・脊髄、筋肉・腱、末梢神経など、体を支え(支持)、動かす(運動・移動)役割をする器官である。ロコモティブシンドロームの主因の一つが骨粗鬆症であり、分析疫学の手段の一つであるコホート研究によって、骨粗鬆症患者は 1070 万人と推定されている(Yoshimura *et al.*, 2009)。日本は超高齢化社会に突入し、今後さらに患者数が増加すると考えられる。ロコモティブシンドロームは行動範囲を著しく狭め、寝たきりにならざるを得ないなど、クオリティ・オブ・ライフ(QOL)の低下をまねく。ロコモティブシンドロームの予防・改善のために日々の適度な運動が推奨されているが、高齢になると筋肉の衰えや膝の痛みにより満足に運動ができず、更に筋力を落としてしまうという悪循環に陥ってしまう。そこで、抗ロコモティブシンドロームの対策として、機能性食品への期待は高い。

骨粗鬆症は、骨強度の低下によって骨の脆弱性を亢進し、骨折危険率の増大した疾患と定義されている(NIH, 2001)。骨強度は、約 7 割が骨量によるものであり、残りの約 3 割が骨質によって規定されており、骨強度の損失と骨折リスクの増加を特徴とする疾患である(森井 & 藤田, 1996)。骨粗鬆症は単一な疾患ではなく、原発性骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症に分類されている。原発性骨粗鬆症の中でも圧倒的に多いものが成長期以降に発症する閉経後骨粗鬆症である。骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が絶えず行われ、3~6 ヶ月の周期でリモデリングを繰り返す動的組織である。骨吸収と骨形成のバランスの変化によって骨量が示され、吸収が形成を上回ると骨量の減少を引き起こす(青木, 1995)。閉経後骨粗鬆症は、骨代謝のアンバランスによって骨量の減少を引き起こし、骨吸収と骨形成の両者が亢進する高骨代謝回転状態にある。

閉経後骨粗鬆症の治療法としては、エストロゲン補充療法(ERT)が挙げられるが、エストロゲンの胸部および子宮に対する過度な刺激による乳ガンおよび子宮ガン発症の危険性から ERT 代替法の開発が進められてきた。ERT 代替法として食品素材を摂取することで骨粗鬆症を改善する研究が進められている。機能性食品素材の骨と軟骨への応用として、 $\beta$ -ク

リプトキサンチン、大豆イソフラボン、ヘスペリジン、カテキン、フラクトオリゴ糖、乳塩基性タンパク質(MBP)、カゼインフォスフォペプチド(CPP)およびポリフェノール類の骨粗鬆症改善効果について、まとめられている(上原 & 石見, 2011)。また、魚肉由来ペプチドが、骨粗鬆症予防効果があるという報告もあることから(Yoshino *et al.*, 2011)、サメ肉(シャークプロテイン)にも同様の効果を期待し、以下の研究を計画した。

- I. 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン投与による骨密度改善効果の検証
- II. 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン加水分解物投与による骨密度改善効果の検証
- III. 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物による分化抑制効果の検証
- IV. 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物の再分画物による分化抑制効果の検証

## 第1章 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン投与による骨密度改善効果

### 1. はじめに

卵巣ホルモンの欠乏は、閉経後女性に認められる骨粗鬆症の最も重要な危険因子である (Yildiz *et al.*, 1996)。卵巣摘出(OVX)動物は、エストロゲン欠乏に起因する骨粗鬆症を示す有用な動物モデルであり (Ammann *et al.*, 1992)、閉経後骨粗鬆症と類似した症状を示し、骨基質の損失を示す (Heaney *et al.*, 1978)。一般的に認知されている骨粗鬆症は、更年期にエストロゲンが減少することにより骨量減少が起こる閉経後骨粗鬆症である。更年期の女性は、閉経後 5 年で骨量が 20%減り、骨粗鬆症のリスクが最大になると報告されている (Raisz, 2005)。閉経後骨粗鬆症の治療法の ERT は、乳ガンのような致死性の副作用の可能性があり、禁忌による使用制限も考えられている。このため、閉経後骨粗鬆症モデルを用いた ERT の代替法の研究が行われてきた。OVX ラットは、骨粗鬆症対処薬の開発、食品因子の骨粗鬆症への効果を検証するために用いられている。例えば、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート (Feher *et al.*, 2010)、魚油に多く含まれる n-3 脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA) (Matsushita *et al.*, 2008) およびラクトフェリン (Guo *et al.*, 2009)を用いた研究が挙げられる。当研究室において、ヨシキリザメ皮由来コラーゲン経口投与により低タンパク食給餌の OVX ラットの骨密度が増加する結果を報告している (Nomura *et al.*, 2005)。

そこで、本研究では OVX ラットを用い、シャークプロテインの骨粗鬆症改善効果の検証を行った。

### 2. 実験材料および方法

#### 2.1 実験材料および試薬

東京農工大学農学部動物実験委員会の承認のもとに実験を行った(承認番号 18-63)。

Wistar 系雌ラット 17 週齢は三協ラボサービスより購入した。飼料のカゼインおよびセル

ロースパウダーは日本オリエンタル酵母工業社製、スクロースは新三井製糖社製、 $\alpha$  コーンスターチ、 $\beta$  コーンスターチ、AIN-93 ミネラル混合(93G-MX)および AIN ビタミン混合(93-VX)は日本農産工業社製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。

## 2.2 試験試料

### 2.2.1 試験試料調製法

シャークプロテインおよび同じ白身魚のマダラ肉(コッドプロテイン)をアセトンで24時間、ヘキサンで48時間、アセトンで24時間浸漬処理して脱脂した後、流水で一晩水洗いし、凍結乾燥したものをフードプロセッサーで粉末にした。また、これらを食餌タンパク質であるカゼインの代替とし、AIN-93G に基づいた粉末飼料を調製した。食餌組成は Table 1 に示した。

### 2.2.2 アミノ酸分析法

カゼイン、シャークプロテインおよびコッドプロテインのアミノ酸組成を比較するため、Sato らの方法に準じて、アミノ酸分析を行った(Sato *et al.*, 1992)。

封入試験管に試料 10 mg を正秤し、6 N 塩酸を 1 ml 加えて脱気し封管した。封管後、110°C で18時間加水分解を行った。加水分解終了後、封入試験管を開封し、真空乾固した。乾固後、超純水を 1 ml 加えて攪拌し、50  $\mu$ l をダーラム管(マルエム社製)に移して真空遠心機(SPEEDVAC® CONCENTRATOR SPD111V; Thermo Electron 社製)により乾固した。スタンダード溶液 20  $\mu$ l(アミノ酸混合標準溶液 H 型 10  $\mu$ l、5  $\mu$ mol/ml Pro、5  $\mu$ mol/ml Hyp、2.5  $\mu$ mol/ml Hyl 溶液 10  $\mu$ l)は別のダーラム管に取り、真空乾固した。

試料に、メタノール: トリエチルアミン: 超純水=7: 2: 1 に調整した混合液を 10  $\mu$ l 加えて真空乾固した。この操作を3回繰り返した。次いで、メタノール: トリエチルアミン: 超純水: フェニルイソチアネート=7: 1: 1: 1 からなる誘導化液を 20  $\mu$ l 加え、20 分間室温密閉

**Table 1 食餌組成(AIN-93G)**

	<b>Casein</b>	<b>Shark</b>	<b>Cod</b>
<b>Casein</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Shark protein</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0</b>
<b>Cod protein</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>
<b><math>\alpha</math>-Corn starch</b>	<b>13.2</b>	<b>13.2</b>	<b>13.2</b>
<b><math>\beta</math>-Corn starch</b>	<b>40.0486</b>	<b>40.0486</b>	<b>40.0486</b>
<b>Sucrose</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Soybean oil</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>Cellulose powder</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Mineral mix(93G-MX)</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>
<b>Vitamin mix(93-VX)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Choline bitartrate</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>
<b><i>tert</i>-Butylhydroquinone</b>	<b>0.0014</b>	<b>0.0014</b>	<b>0.0014</b>
<b>Total(%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

状態で誘導化した後、真空乾固した。3%アセトニトリル/50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、A 溶離液)を 700  $\mu$ l(スタンダードは 500  $\mu$ l)加えた後、超音波で結晶を破碎した。0.45  $\mu$ m のフィルター(ADVANTEC®東洋濾紙社製)で濾過後、10  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置(東ソー社製)で分析を行った。分析条件は以下の通りである。

- ・ カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D, 15 cm (東ソー社製)
- ・ 流速: 1.0 ml/min
- ・ A 溶離液: 3%アセトニトリル/ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)
- ・ B 溶離液: 60%アセトニトリル溶液
- ・ グラジエント条件: 0 分 A 溶離液 100%、0~15 分 B 溶離液 0→70%、  
15~25 分 B 溶離液 70→100%、25~26 分 B 溶離液 100%、26~28 分 B 溶離液 0%
- ・ カラム温度: 40°C
- ・ 検出: UV-254 nm

### 2.3 卵巣摘出動物作製法

閉経後骨粗鬆症モデルラットを作製するために、卵巣摘出手術および非発症のコントロールとして同様の手術によるストレスを与える偽手術を行った。ハサミ、ピンセット、カンシ、縫合糸等は、オートクレーブ滅菌したものを用いた。イソフルラン麻酔下で背中から脇腹を 1 cm 程度切開し、ピンセットを用いて卵巣を取り出し、輸卵管をカンシで挟み、縫合糸で縛った後、切除摘出した。摘出後、腹部を縫合した。Sham 群は卵巣を取り出し確認し、戻して縫合した。以上の操作を左右両方で行った。

### 2.4 動物飼育計画

粉末飼料のタンパク質源は通常食としてカゼインを用い、試験食としてシャークプロテインおよびコッドプロテインを用いた。投与試験は 17 週齢の Wistar 系雌ラットを用い、飼育 3 日目に、イソフルラン麻酔下で卵巣摘出手術または偽手術を施した。手術前日に平

均体重が等しくなるように OVX 群と Sham 群の 2 群に分けた。全ての動物に手術後 1 週間 AIN-93G 組成に従った 20%カゼインを含む粉末飼料を与えた。手術 1 週間後から試験食の給餌を開始し、4 週間飼育した。各試験群は 6~8 匹とした。飼育計画を Figure 2 に示した。

全ての動物は、常時給餌・給水により飼育した。体重測定は週 1 回、飼料重量測定は 1 または 2 日おきに行った。

## 2.5 骨密度測定法

DICHROMA SCAN PCS-600(Aloka 社製)を用いた二重エネルギー X 線吸収測定法(DEXA: dual energy X-ray absorptiometry)により、右大腿骨の骨密度(BMD: bone mineral density)を測定した。DEXA は、2 種の異なるエネルギーの X 線を照射し、骨と軟部組織の吸収率の差により骨密度を測定する方法であり、単位面積当たりの骨量を算出する。右大腿骨を 70% エタノールに 4°C で数日間浸し、付着している筋肉組織等をピンセットで可能な限り除去した。大腿骨の近位部(骨盤側)から遠位部(膝側)までを 20 部位に分割した各分割部位において骨密度測定を行った。全骨密度は、ばらつきの大い slice No.1 および slice No.20 を除いた slice No.2 から slice No.19 の平均骨密度、骨盤側から近位部(slice No.2-6)、中位部(slice No.7-14)および遠位部(slice No.15-19)の平均骨密度を計算によって求めた。

また、実験動物用 X 線 CT (Latheta LCT-100; Aloka 社製)を用いて全骨密度、皮質骨密度および海綿骨密度を測定した。X 線 CT は、三次元骨密度( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )として算出し、皮質骨および海綿骨の骨密度を選択的に測定することが可能である。

## 2.6 骨強度測定法

骨強度の測定には右大腿骨を用いた。右大腿骨をリン酸緩衝食塩水(PBS(-))に 1 時間浸した後、クリープメーター(RE-33005; 山電社製)による三点曲げ試験を行い、最大荷重(gf)を破断強度とした。



Animals: Female Wistar rats (17 week old)

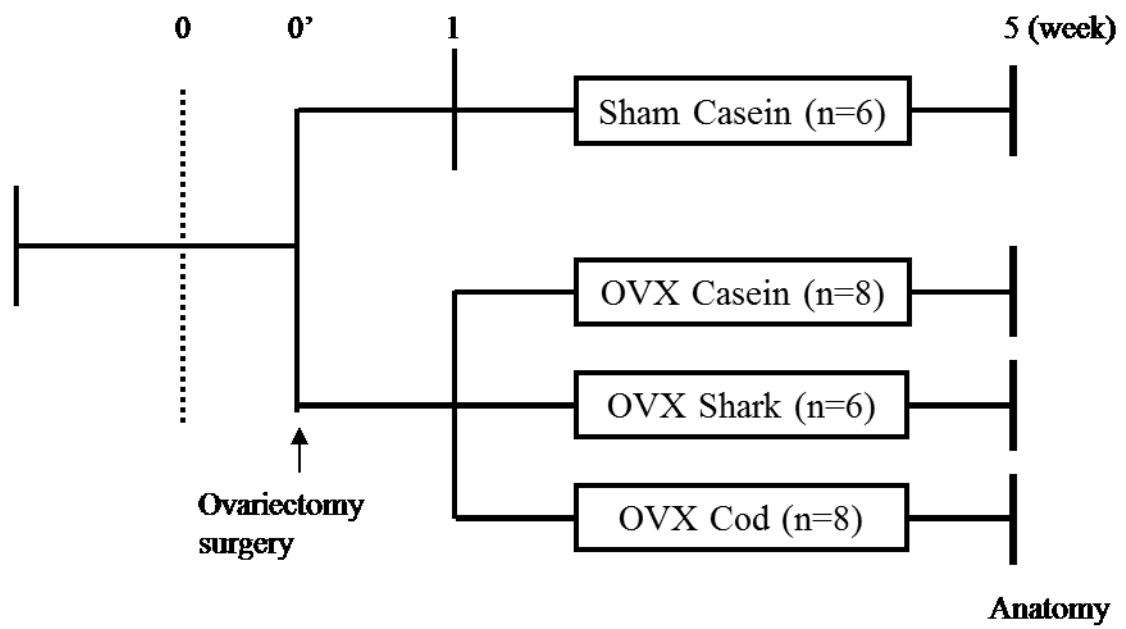


Figure 2 動物飼育計画

## 2.7 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 3 により統計処理を行った。全てのデータは一元配置の分散分析(ANOVA)、次いでダネットの多重比較検定により解析した。

## 3. 結果

### 3.1 試験試料のアミノ酸組成

カゼイン、シャークプロテインおよびコッドプロテインのアミノ酸組成を Table 2 に示した。カゼインに比べ、シャークプロテインでは Glu/Gln、Pro、Tyr および Val で低い値を示し、Gly、Arg、Ala および Met で高い値を示した。シャークプロテインとコッドプロテインでは、シャークプロテインの方が Ile および Leu の値が高かったが、それほど大きな差は認められなかった。これは、どの生物でも肉部分は筋肉で出来ており、主にアクチンやミオシンの組成であると考えられる。

### 3.2 動物基礎データ

最終体重、体重増加量、1日当たりの飼料摂取量および臓器重量を Table 3 に示した。最終体重は、Sham Casein 群が  $262.3 \pm 9.3$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $295.4 \pm 23.1$  g と有意な増加が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、 $295.4 \pm 20.0$  g、 $291.8 \pm 15.3$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。同様に体重増加に関しても、Sham Casein 群が  $19.9 \pm 5.9$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $44.9 \pm 8.2$  g と有意な増加が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、 $42.6 \pm 12.6$  g、 $41.3 \pm 8.3$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。これは、閉経後の女性が肥満に陥りやすい傾向にあることとよく一致している。雌ラットにおいて卵胞ホルモン分泌の低い発情後期から発情間期にかけては脂肪細胞から分泌されるリポ蛋白リパーゼ活性が高く、インスリン分泌と正の相関を示し、脂肪合成が促進することが報告されている(Yamaguchi *et al.*, 2002)。本実験における卵巣摘出による体重増加も、卵胞ホルモンであるエストロゲン欠乏により脂

**Table 2** カゼイン、シャークプロテインおよびコッドプロテインのアミノ酸組成

Amino acid weight ratio (%)	Casein	Shark protein	Cod protein
Aspartic acid/Asparagine	8.2	10.4	11.9
Glutamic acid/Glutamine	24.3	16.3	17.4
Hydroxyproline	0.0	0.3	0.2
Serine	4.6	3.6	4.5
Glycine	1.8	5.4	4.5
Histidine	3.2	2.9	2.4
Arginine	3.7	7.0	6.8
Threonine	4.3	5.2	5.1
Alanine	3.1	7.8	6.5
Proline	6.8	2.8	3.0
Tyrosine	5.3	3.0	3.9
Valine	7.0	5.4	5.1
Methionine	1.8	3.7	3.7
Cysteine	0.2	0.5	0.3
Isoleucine	4.5	5.3	4.0
Leucine	8.7	9.0	7.7
Hydroxylysine	0.0	0.0	0.0
Phenylalanine	5.1	4.1	3.8
Lysine	7.5	7.2	9.2

**Table 3 動物基礎データ**

	Sham	OVX		
	Casein (n=6)	Casein (n=8)	Shark (n=6)	Cod (n=8)
Final body weight (g)	262.3 ± 9.3**	295.4 ± 23.1	295.4 ± 20.0	291.8 ± 15.3
Body weight gain (g)	19.9 ± 5.9**	44.9 ± 8.2	42.6 ± 12.6	41.3 ± 8.3
Food intake (g/day)	13.9 ± 1.0**	17.1 ± 1.4	17.0 ± 1.2	17.0 ± 1.3
Liver weight (g)	8.62 ± 0.49	8.07 ± 0.76	7.95 ± 0.88	8.02 ± 1.16
Kidney weight (g)	1.66 ± 0.10	1.68 ± 0.14	1.72 ± 0.07	1.74 ± 0.11
Spleen weight (g)	0.43 ± 0.05**	0.58 ± 0.09	0.49 ± 0.09	0.47 ± 0.06*
Uterine weight (g)	0.66 ± 0.11**	0.13 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.09

Data are shown as means ± SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

肪が蓄積しやすくなったためであると考えられる。1日当たりの飼料摂取量は、Sham Casein 群が  $13.9 \pm 1.0$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $17.1 \pm 1.4$  g と有意な増加が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、 $17.0 \pm 1.2$  g、 $17.0 \pm 1.3$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

臓器重量については、肝臓重量および腎臓重量で、どの群においても有意な差は認められなかった。脾臓重量においては、Sham Casein 群では  $0.43 \pm 0.05$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $0.58 \pm 0.09$  g で有意な増加が認められた。子宮重量においては、Sham Casein 群が  $0.66 \pm 0.11$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $0.13 \pm 0.04$  g と有意な減少が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は  $0.13 \pm 0.02$  g および  $0.12 \pm 0.09$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。これは卵巣摘出によってエストロゲンが欠乏し、子宮が萎縮したためと考えられ、OVX 全群で減少していた。卵巣は、OVX 群全個体で左右とも無いことを、Sham 群全個体で左右ともあることを確認した。よって、卵巣摘出手術および偽手術は正しく行われていたことを確認した。

### 3.3 シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与による OVX ラットの大腿骨骨密度への影響

DEXA による右大腿骨骨密度測定の結果を Table 4 に示した。全骨密度は、ばらつきの大きい slice No.1 および slice No.20 を除いた slice No.2 から slice No.19 の平均骨密度、骨盤側から近位部(slice No.2-6)、中位部(slice No.7-14)、遠位部(slice No.15-19)の平均骨密度を示した。また、slice No. 3 および 18 の骨密度を Figure 3 に示した。全骨密度において、Sham Casein 群が  $162.0 \pm 5.2$  mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が  $146.8 \pm 6.2$  mg/cm<sup>2</sup> であり、有意な減少を認めた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、 $153.2 \pm 5.7$  mg/cm<sup>2</sup> および  $151.5 \pm 3.4$  mg/cm<sup>2</sup> と OVX Casein 群に比べ高いものであったが有意な差は認められなかった。近位部において、Sham Casein 群が  $168.4 \pm 7.5$  mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が  $152.2 \pm 4.7$  mg/cm<sup>2</sup> で有意な減少を認めた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、

**Table 4** シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与によるOVXラットの  
大腿骨骨密度への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=6)	Casein (n=8)	Shark (n=6)	Cod (n=8)
Whole BMD [sliceNo.2-19] (mg/cm <sup>2</sup> )	162.0±5.2**	146.8±6.2	153.2±5.7	151.5±3.4
Proximal BMD [sliceNo.2-6] (mg/cm <sup>2</sup> )	168.4±7.5**	152.2±4.7	159.8±4.7*	155.5±4.7
Central BMD [sliceNo.7-14] (mg/cm <sup>2</sup> )	145.7±2.6*	137.1±7.5	141.4±5.5	142.2±3.3
Distal BMD [sliceNo.15-19] (mg/cm <sup>2</sup> )	181.6±8.3**	156.8±6.7	165.5±8.3	162.3±4.4

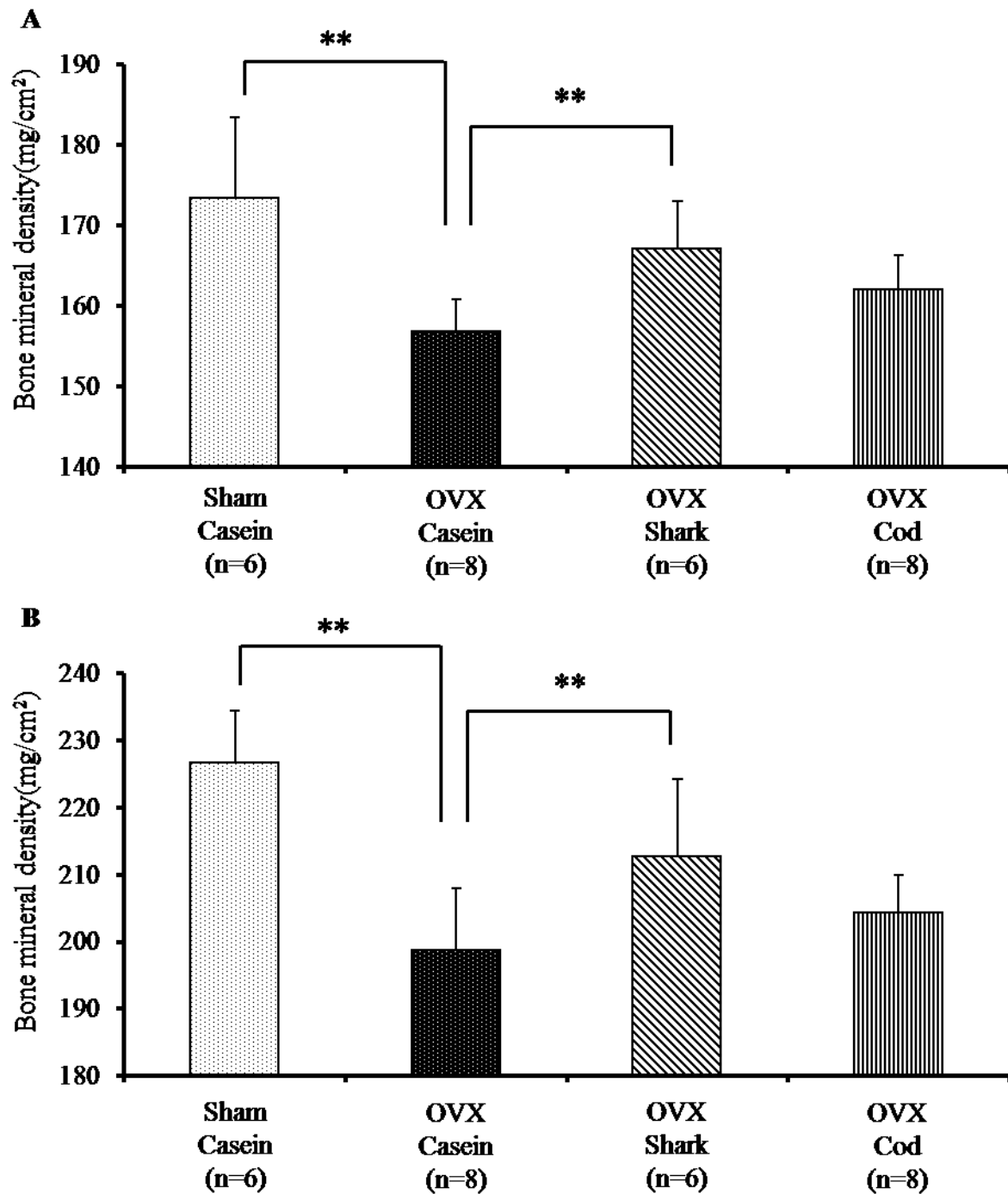
Data are shown as means ± SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

159.8±4.7 mg/cm<sup>2</sup> および 155.5±4.7 mg/cm<sup>2</sup> であり高いものであった。OVX Casein 群に比べ OVX Shark 群で統計的に有意な増加を認めた。中位部において、Sham Casein 群が 145.7±2.6 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 137.1±7.5 mg/cm<sup>2</sup> で有意な減少を認めた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、141.4±5.5 mg/cm<sup>2</sup> および 142.2±3.3 mg/cm<sup>2</sup> であった。OVX Casein 群に比べ統計的に有意な差は認められなかった。遠位部において、Sham Casein 群が 181.6±8.3 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 156.8±6.7 mg/cm<sup>2</sup> で有意な減少を認めた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、165.5±8.3 mg/cm<sup>2</sup> および 162.3±4.4 mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ高いものではあるが、統計的に有意な差は認められなかった。

Figure 3 に示したように、近位部の slice No.3 では、Sham Casein 群が 173.5±10.0 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 156.9±3.9 mg/cm<sup>2</sup> であり、骨密度の有意な減少を認めた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、167.2±5.9 mg/cm<sup>2</sup> および 162.1±4.2 mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ OVX Shark 群で有意な増加を認めた。また、遠位部の slice No.18 では、Sham Casein 群が 226.8±7.6 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 198.8±9.1 mg/cm<sup>2</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、212.7±11.5 mg/cm<sup>2</sup> および 204.4±5.6 mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ OVX Shark 群で有意な増加を認めた。シャークプロテイン投与により、全体的に骨密度の増加が認められた。特に、大腿骨の骨盤近位部の骨密度の増加が顕著であった。同じ白身魚であるコッドプロテイン投与の OVX ラットの骨密度に変化が認められなかったのに対して、シャークプロテイン投与の OVX ラットの骨密度が高くなっていることが興味深い。

X線 CT を用いた骨密度測定の結果を Table 5 に示した。また、大腿骨を 3 等分し、部位ごとに骨盤側から近位部、中位部および遠位部の骨密度を示した。近位部の皮質骨骨密度において、Sham Casein 群が 1089.4±7.9 mg/cm<sup>3</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 1038.0±25.2 mg/cm<sup>3</sup> で有意な減少が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、1064.9±8.2 mg/cm<sup>3</sup> および 1050.1±15.9 mg/cm<sup>3</sup> であり、OVX Casein 群に比べ OVX Shark 群



Data are shown as means  $\pm$  SD.

**\*\***, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.01$ .

Figure 3 シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与によるOVXラットの大腿骨(slice No. 3および18)の骨密度への影響

(A) 近位部(slice No. 3)

(B) 遠位部(slice No. 18)



**Table 5** シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与によるOVXラットの  
大腿骨骨密度への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=6)	Casein (n=8)	Shark (n=6)	Cod (n=8)
<b>Whole</b>				
Total BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	779.2±22.8**	683.0±34.4	708.0±21.0	703.7±13.6
Cortical BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	1111.8±5.6**	1070.2±24.8	1084.8±13.8	1083.6±13.5
Trabecular BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	489.4±25.4**	402.5±20.9	423.0±15.9	416.2±13.6
<b>Proximal</b>				
Total BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	843.4±30.0**	745.9±33.2	776.9±25.4	753.1±21.8
Cortical BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	1089.4±7.9**	1038.0±25.2	1064.9±8.2*	1050.1±15.9
Trabecular BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	577.4±31.7**	499.5±25.8	511.6±27.0	501.1±24.3
<b>Central</b>				
Total BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	837.6±37.4**	773.3±38.2	798.9±20.2	805.7±20.7
Cortical BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	1259.8±8.9*	1235.9±17.5	1246.0±14.8	1246.7±13.1
Trabecular BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	240.0±15.5*	223.1±6.4	227.6±11.1	227.6±14.3
<b>Distal</b>				
Total BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	695.3±21.3**	583.4±37.6	602.7±20.9	606.8±12.7
Cortical BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	995.2±9.8**	940.8±33.1	942.4±21.5	957.3±15.0
Trabecular BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	531.0±24.8**	414.5±26.6	444.1±17.4*	434.3±13.9

Data are shown as means ± SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

で統計的に有意な増加を認めた。また、遠位部の海綿骨骨密度において、Sham Casein 群が  $531.0 \pm 24.8 \text{ mg/cm}^3$  であったのに対し、OVX Casein 群が  $414.5 \pm 26.6 \text{ mg/cm}^3$  であり有意な減少が認められた。OVX Shark 群および OVX Cod 群は、 $444.1 \pm 17.4 \text{ mg/cm}^3$  および  $434.3 \pm 13.9 \text{ mg/cm}^3$  であり、OVX Casein 群に比べ OVX Shark 群で統計的に有意な増加を認めた。その他の部分は OVX Shark 群および OVX Cod 群で OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

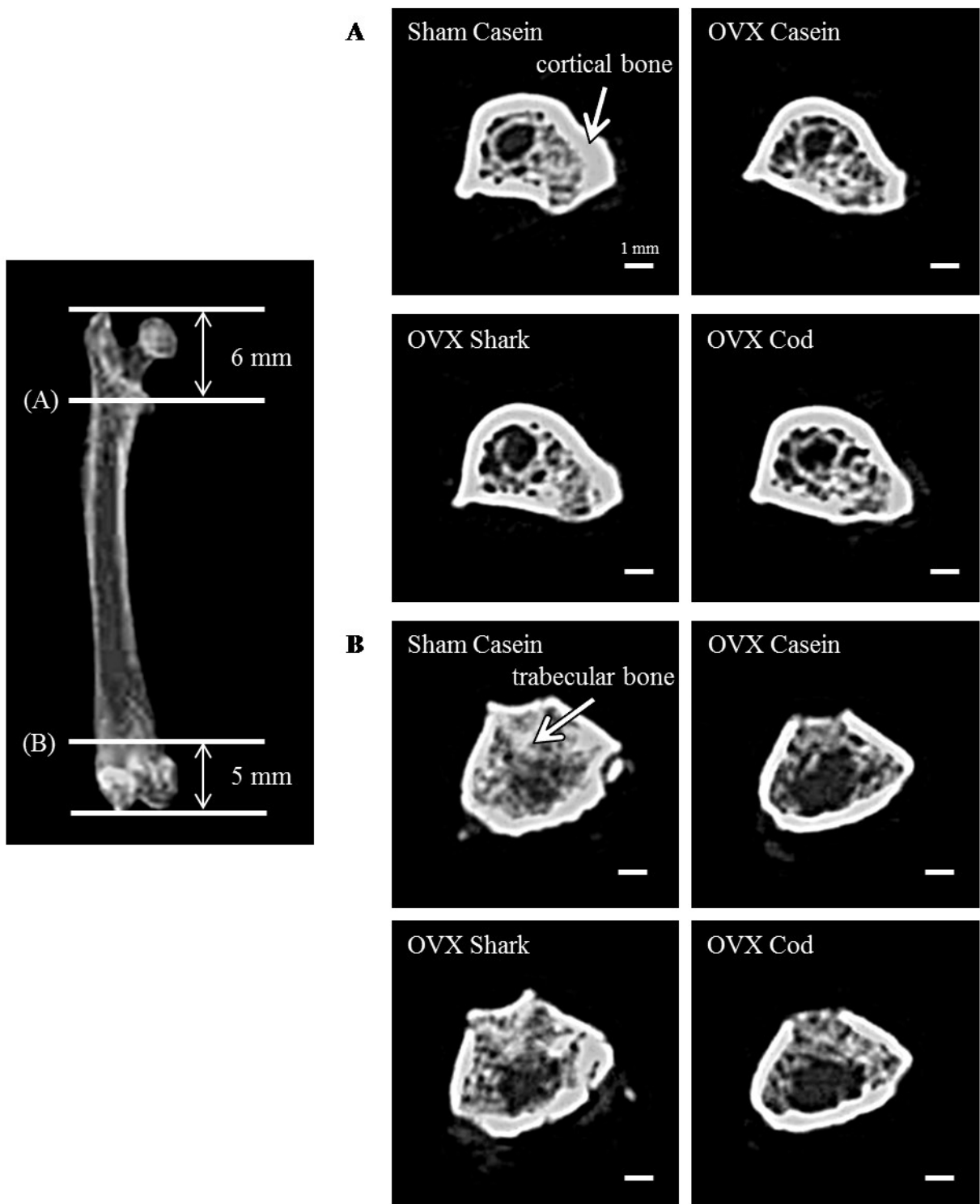
また、X線 CT による骨断面の画像を Figure 4 に示した。骨盤側から 6 mm の部分を近位部とし、膝関節側から 5 mm の部分を遠位部とした。近位部では、外側の白くはっきりとした皮質骨部分で OVX Shark 群の増加が認められた。また、遠位部では、内側の海綿骨部分で OVX Shark 群の増加が認められた。

### 3.4 シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与による OVX ラットの大腿骨骨強度、骨長および骨重量への影響

右大腿骨骨強度、骨長および骨重量測定の結果を Table 6 に示した。右大腿骨の骨強度は、Sham Casein 群の最大荷重は  $12802 \pm 819 \text{ gf}$  であったのに対し、OVX Casein 群では  $11728 \pm 1146 \text{ gf}$  と低い値を示すが有意な差は認められなかった。OVX Shark 群および OVX Cod 群では、 $12608 \pm 671 \text{ gf}$  および  $12321 \pm 1252 \text{ gf}$  であり、OVX Casein 群に比べ高い値となっているが有意な差は認められなかった。骨長および骨重量は、どの群においても有意な差は認められなかった。

## 4. 考察

本章では閉経後骨粗鬆症モデルである OVX ラットを用いて、シャークプロテインによる閉経後骨粗鬆症改善効果について検証した。卵巣摘出に起因するエストロゲン欠乏状態においては、骨代謝が活発な海綿骨で骨損失が起こることが知られている(Kalu, 1991)。本実験では、X線 CT を用いた骨密度測定の結果から、海綿骨だけでなく皮質骨でも骨損失



**Figure 4** シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与によるOVXラットの  
 大腿骨の断面図  
 (A)近位部(骨盤側から6mm)  
 (B)遠位部(膝側から5mm)

**Table 6** シャークプロテインおよびコッドプロテイン投与によるOVXラットの  
大腿骨の骨強度、骨長および骨重量への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=6)	Casein (n=8)	Shark (n=6)	Cod (n=8)
Ultimate load (gf)	12802 ± 819	11728 ± 1146	12608 ± 671	12321 ± 1252
Femur length (mm)	35.67 ± 0.35	35.92 ± 0.99	35.87 ± 0.59	35.97 ± 0.69
Femur weight (g)	0.77 ± 0.01	0.73 ± 0.05	0.76 ± 0.05	0.75 ± 0.02

Data are shown as means ± SD.

が引き起こされていた(Table 5)。この OVX ラットにシャークプロテインを投与したところ DEXA による大腿骨骨密度測定において、近位部で骨密度の有意な増加を認めた(Table 4)。また slice ごとの比較でも slice No. 3 および 18 で骨密度の有意な増加を認めた(Figure 3)。X 線 CT による大腿骨骨密度測定により、近位部での骨密度の増加は、皮質骨の骨密度の増加によるものであることが明らかとなった(Table 5&Figure 4)。皮質骨は、緻密骨といわれるように組織間の空隙が少なく非常に硬いことから、骨強度を高める可能性が示唆された。それに対して、遠位部での骨密度の増加は、海綿骨の骨密度の増加によるものであった。海綿骨は、骨内面に棘状、梁状に存在し、骨梁の網目を形成している。そのため、外力に対して抵抗力が強い構造をしており、骨強度が保たれている(松本, 1997)。同じ骨でも部位により、皮質骨と海綿骨の割合が異なるため(米田, 2002)、近位部では皮質骨、遠位部では海綿骨の骨密度が増加したものと考えられる。しかし、骨強度の有意な増加は認められなかった(Table 6)。一方で、コッドプロテインを投与した群は、骨密度の増加は認められなかった。

これらより、シャークプロテインは骨密度を増加させ骨粗鬆症改善効果を示したが、その効果は穏やかであることが認められた。

## 第2章 卵巣摘出ラットへのシャークプロテイン加水分解物投与による骨密度改善効果

### 1. はじめに

骨密度を高める生理活性ペプチドに関する研究は、牛乳を *Lactobacillus helveticus* によって発酵させた乳清の主成分である Isoleucyl-Prolyl-Proline (IPP) および Valyl-Prolyl-Proline (VPP) (Narva *et al.*, 2004)、鰹節に含まれる Leucine-Lysine-Proline (LKP) (Huttunen *et al.*, 2007) が報告されている。その他、サメ皮由来加水分解コラーゲンも骨粗鬆症モデルにおいて骨密度を高めることが確認できているが、どの構成ペプチドが効果を示すのかを解明できていない(Nomura *et al.*, 2005)。第1章において、シャークプロテイン投与により OVX ラットの大腿骨骨密度を増加させることを認めた。そこで本章では、シャークプロテインの主成分であるタンパク質の分解物に着目し、閉経後骨粗鬆症改善効果の検証を計画した。

シャークプロテインの加水分解には、工業的生産を考慮して商業用酵素による分解を計画した。

### 2. 実験材料および方法

#### 2.1 実験材料および試薬

東京農工大学農学部動物実験委員会の承認のもとに実験を行った(承認番号 20-88)。

Wistar 系雌ラット 16 週齢(15 週齢で卵巣摘出手術および偽手術を施した)は三協ラボサービスより購入した。固形飼料には、日本農産工業社製の一般飼育用固形飼料(ラボ MR ストック)を用いた。粉末飼料のカゼインおよびセルロースパウダーは日本オリエンタル酵母工業社製を、スクロースは新三井製糖社製、 $\alpha$  コーンスターチ、 $\beta$  コーンスターチ、AIN-93 ミネラル混合(93M-MX)および AIN ビタミン混合(93-VX)は日本農産工業社製を、L-シスチンは味の素社製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。

## 2.2 シャークプロテイン加水分解物の調製法および構造解析法

### 2.2.1 加水分解物の調製法

シャークプロテインを酵素により加水分解することにより、平均分子量の異なる加水分解物、約 10,000(High)、約 3,000(Middle)、約 1,000(Low)を調製した。以後、Low をシャークプロテイン低分子加水分解物(Shark protein hydrolysates)として SPH と略す。さらに、コッドプロテインも同様に平均分子量約 1,000 の加水分解物を調製した。コッドプロテイン低分子加水分解物(Cod protein hydrolysates) を CPH と略す。

加水分解物調製の手順を Figure 5 に示した。冷凍のシャークプロテイン(中華・高橋社製)を流水により解凍し、包丁で細切りにした。試料を 80°C で 3 分間攪拌し、手絞りにて水気を切り、試料を回収した。この試料に水を 1:1 で加え、温度を 50°C、pH を 7 に 6 N 塩酸で調製した。酵素分解は、食品タンパク質分解酵素である Alcalase®2.4L FG(novozymes 社製)およびウマミザイム G(天野エンザイム社製)を加え、タンパク質分解を行った。反応時の酵素量および反応時間は、試料の乾燥重量を基準とし、High は、Alcalase を 0.008%加えて 2 時間反応させた。Middle は、Alcalase を 0.167%加えて 2 時間反応させた。SPH および CPH は、Alcalase を 3.333%加えて 30 分反応させ、さらにウマミザイム G を 0.5%加えて 23 時間半反応させた。酵素反応の停止は、85°C で 20 分間加温し、酵素を失活させた。酵素分解物を回収するため遠心分離(冷却遠心機、7780 II; 久保田製作所社製、10565 ×g、5 分間)し、上清を回収し、凍結乾燥した。SPH は、大量に調製する必要があったため、凍結乾燥の代わりにスプレードライヤー(アグロマスタ AGM-35SD; ホソカワミクロン社製)を使用した。

### 2.2.2 加水分解物の分子量測定法

#### 2.2.2.1 平均分子量測定法

調製した加水分解物の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した。

試料 10 mg を正秤し、超純水 500  $\mu$ l に溶解した。これに 45%アセトニトリル/0.1%トリ

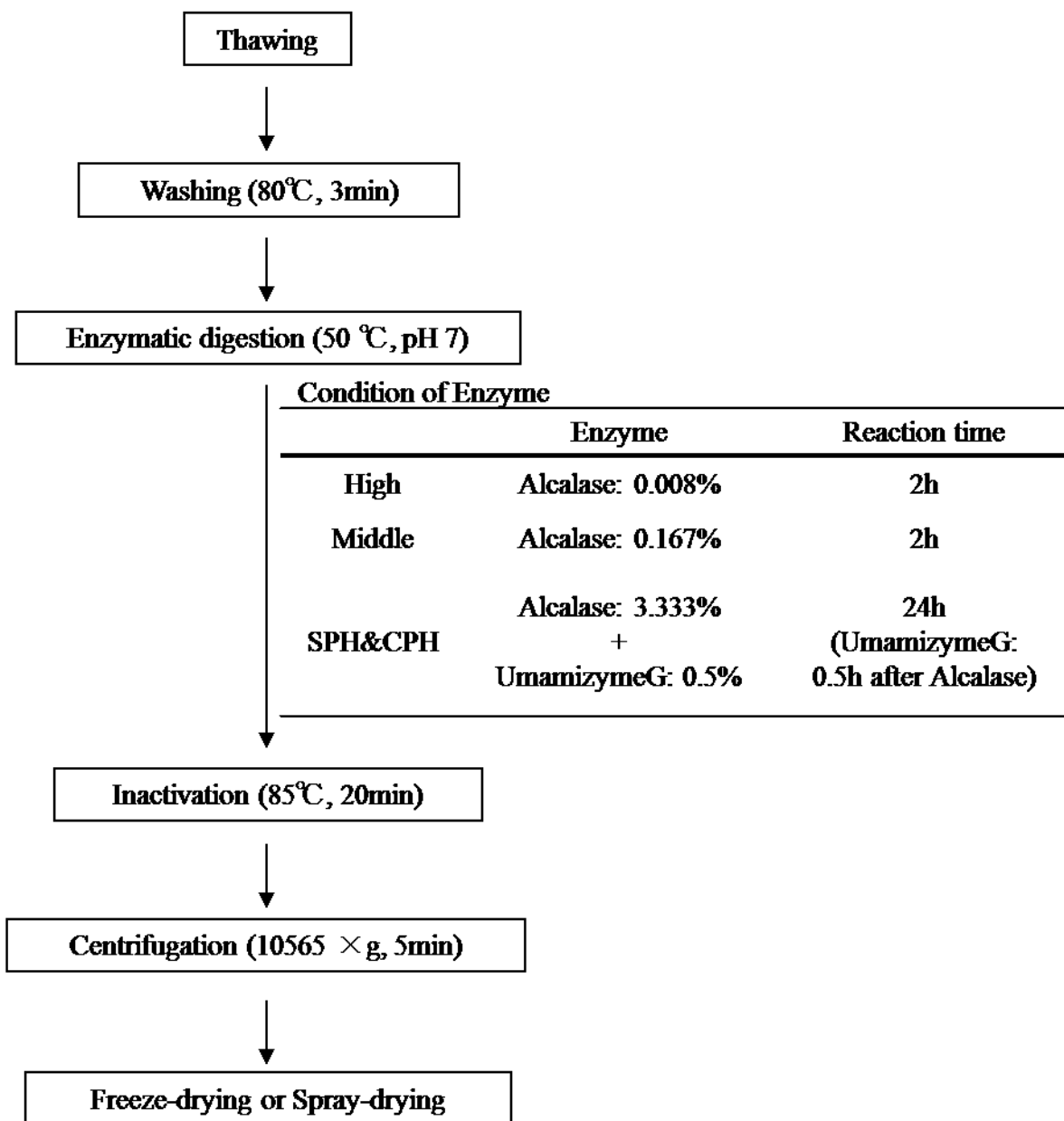


Figure 5 加水分解物の調製法



フルオロ酢酸溶液を 500  $\mu$ l 加えた後、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過し、High および Middle は 50  $\mu$ l、SPH および CPH は 10  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分析を行った。分子量マーカーとして、分子量 46,000 のエチレンオキサイド(東ソー社製)および 12,140、6,430、3,930、1,010、400、106 のポリエチレングリコール (Polymer Laboratories 社製)を使用した。分析条件は以下の通りである。

- ・ カラム: TSKgel G2000SW<sub>XL</sub> 7.8 mm I.D.×30 cm (東ソー社製)
- ・ 流速: 0.5 ml/min
- ・ 溶離液: 45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・ カラム温度: 40°C
- ・ 検出: UV-215 nm

#### 2.2.2.2 低分子量測定法

分子量の小さい SPH および CPH については、低分子量測定用カラムを用いて分子量測定を行った。

試料 10 mg を正秤し、超純水 500  $\mu$ l に溶解した。さらに 45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液を 500  $\mu$ l 加えた後、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過し、10  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分析を行った。分子量マーカーとして、分子量 12,140、6,430、3,930、1,970、1,010、615、194、106 のポリエチレングリコール(Polymer Laboratories 社製)を使用した。分析条件は以下の通りである。

- ・ カラム: TSKgel G2500PW<sub>XL</sub> 7.8 mm I.D.×30 cm (東ソー社製)
- ・ 流速: 0.5 ml/min
- ・ 溶離液: 45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・ カラム温度: 40°C
- ・ 検出: UV-215 nm

### 2.2.3 加水分解物のアミノ酸分析法

High、Middle、SPH および CPH のアミノ酸組成を比較するため、第 1 章 2.2.2 の方法に準じて、アミノ酸分析を行った。

封入試験管に試料 10 mg を正秤し、6 N 塩酸を 1 ml 加えて脱気し封管した。封管後、110°C で 18 時間加水分解を行った。加水分解終了後、封入試験管を開封し、真空乾固した。乾固後、超純水を 1 ml 加えて攪拌し、50  $\mu$ l をダーラム管に移して真空遠心機により乾固した。スタンダード溶液 20  $\mu$ l(アミノ酸混合標準溶液 H 型 10  $\mu$ l、5  $\mu$ mol/ml Pro、5  $\mu$ mol/ml Hyp、2.5  $\mu$ mol/ml Hyl 溶液 10  $\mu$ l)は別のダーラム管に取り、真空乾固した。また、遊離アミノ酸を測定するために試料を 10 mg 正秤し、超純水を 1 ml 加えて攪拌し、50  $\mu$ l をダーラム管に移して真空遠心機により乾固した。

試料に、メタノール：トリエチルアミン：超純水=7: 2: 1 に調整した混合液を 10  $\mu$ l 加えて真空乾固した。この操作を 3 回繰り返す、遊離アミノ酸測定では 1 回を行った。次いで、メタノール：トリエチルアミン：超純水：フェニルイソチアネート=7: 1: 1: 1 からなる誘導化液を 20  $\mu$ l 加え、20 分間室温密閉状態で誘導化した後、真空乾固した。3%アセトニトリル/50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0、A 溶離液)を 700  $\mu$ l(スタンダードは 500  $\mu$ l)加えた後、超音波で結晶を破砕した。0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過後、10  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分析を行った。分析条件は以下の通りである。

- ・カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D,15 cm
- ・流速: 1.0 ml/min
- ・A 溶離液: 3%アセトニトリル/ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)
- ・B 溶離液: 60%アセトニトリル溶液
- ・グラジエント条件: 0 分 A 溶離液 100%、0~15 分 B 溶離液 0→70%、15~25 分 B 溶離液 70→100%、25~26 分 B 溶離液 100%、26~28 分 B 溶離液 0%
- ・カラム温度 : 40°C
- ・検出 : UV-254 nm

## 2.2.4 SPH のタンパク質量測定法

カゼインおよび SPH のタンパク質量の測定は、kjeldahl 法で行った(Kjeldahl, 1883)。

試料 1 g を正秤し、200 ml の硬質分解瓶に入れ、接触剤約 1 g と濃硫酸 10 ml を加え、ドラフト内で緩やかに加熱した。分解物が透明になってから約 1 時間加熱し、室温に戻した後、発熱に注意しながら超純水を添加した。放冷後、100 ml のメスフラスコに洗いこみ、メスアップした。セミマイクロ蒸留装置によりアンモニアを蒸留した。このアンモニアを一定濃度(0.1 N)の硫酸溶液に導き、過剰の酸を 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で滴定して窒素含量を求めた。試料中のタンパク質量は次の式で計算した。

$$\text{タンパク質量(\%)} = 0.0014 \times (B-T) \times F \times K \times (\text{窒素-タンパク質換算係数}) \times 100/S$$

0.0014: 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 1ml に相当する窒素量 (g)

B: 空試験の滴定値(ml)、T: 本試験の滴定値(ml)

F: 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液のファクター、K: 希釈倍率

S: 試料重量(g)

窒素-タンパク質換算係数: 乳類 6.38

その他の食品 6.25

## 2.2.5 SPH の薄相クロマトグラフィーによる脂質分析法

SPH 中に脂質が検出されるかを検証するために薄相クロマトグラフィー(TLC プレート)を用いた。TLC プレートのペプチド分離の展開液は Watanabe らの方法に準じて行った(Watanabe-Kamiyama *et al.*, 2010)。染色は、硫酸発色法、Dittmer-Lester 発色法およびニンヒドリン発色法で行った。

TLC プレート(TLC アルミシート RP-18 F254s; MERCK 社製)を使用し、TLC プレートの下から 7 mm のところに鉛筆で線を引き、SPH、コレステロール、リノレン酸および環状ホスファチジン酸(日油社製)をキャピラリーによってスポットした。展開槽に n-ブタノール: 酢酸: 超純水=20: 3: 7 を約 4 mm 入れ、蓋をして静置した。試験物質のスポットが乾燥

したことを確認し、慎重に展開槽へ TLC プレートを入れた。蓋をし、展開液が上端付近に達するまで、静置した。上端付近まで達したところで取り出し、鉛筆で展開液が達したところに線を引いた。そして、以下の 3 つの方法で染色した。

#### (1)硫酸発色法(非特異的脂質検出試薬)

硫酸発色法は、非特異的に脂質を染色する方法である(Skipski & Barclay, 1969)。

50%濃硫酸を TLC プレートに噴霧し、150°Cで 20 分間加熱した。

#### (2)Dittmer-Lester 発色法(リン脂質検出試薬)

Dittmer-Lester 発色法は、リン脂質を染色する方法である(Dittmer & Lester, 1964)

25 N 硫酸 200 ml に三酸化モリブデン( $\text{MoO}_3$ )8.02 g を静かに煮沸しながら溶解し、A 液を調製した。A 液 100 ml に、粉末モリブデン(Mo)0.36 g を加え、15 分間静かに煮沸し、放冷した後、上澄みをデカンテーションで分け取り、B 液を調製した。等量の A 液と B 液を混合し、混合液の 2 倍量の超純水を加え、完全に溶解した。それを、TLC プレートに噴霧した。10 分室温で静置した後、TLC プレートを超純水に浸した。

#### (3)ニンヒドリン発色法(アミノ基検出試薬)

ニンヒドリン発色法は、アミノ基を染色する方法である(Skipski & Barclay, 1969)。

ニンヒドリン 0.25 g を 100 ml の 50%アセトンに溶解することでニンヒドリン試薬を調製した。TLC プレートにニンヒドリン試薬を噴霧し、110°Cで 10 分間加熱した。

### 2.3 動物飼育計画

15 週齢時に卵巣摘出手術または偽手術を施した Wistar 系雌ラット 28 匹を 16 週齢より固形飼料で飼育し、ラットが 17 週齢になる 3 日前から AIN-93M 組成に従った 14%カゼインを含む粉末飼料に切り替えた。17 週齢になった時点で OVX 群の体重が等しくなるように 14%カゼインを含む粉末飼料を与える群(OVX Casein 群)、カゼインの代わりにタンパク質源を SPH に 10%および 50%置き換えた粉末飼料を与える群(OVX SPH10%群および OVX SPH50%群)の 3 群(n=7)に分け、それぞれの粉末飼料を給餌し 8 週間飼育した。飼育

計画は Figure 6 に、食餌組成は Table 7(2.2.4 のタンパク質量測定の結果、カゼインおよび SPH のタンパク質量は、84.35%および 87.75%であり、タンパク質量を合わせ、動物試料を調製した)に示した。ラットは、解剖の 24 時間前から絶食し、解剖時には、採血、臓器重量の測定、卵巣の有無の確認、大腿骨の切除を行った。絶食による体重減少を考え、解剖前日に測定した体重を最終体重とした。

全ての動物は、常時給餌・給水環境で飼育し、体重測定を 4 日に 1 回、飼料重量測定を 2 日に 1 回行った。

## 2.4 骨密度測定法

DICROMA SCAN PCS-600 を用いた二重エネルギー X 線吸収測定法(DEXA)により、右大腿骨の骨密度(BMD)を測定した。右大腿骨を 70%エタノールに 4°C で数日間浸し、付着している筋肉組織等をピンセットで可能な限り除去した。大腿骨の近位部(骨盤側)から遠位部(膝側)までを 20 部位に分割した各分割部位において骨密度測定を行った。

また、実験動物用 X 線 CT(Latheta LCT-100)を用いて全骨密度、海綿骨密度、皮質骨密度を測定した。

## 2.5 血漿分析法

SPH 投与後の OVX ラットの血漿中アルカリホスファターゼ(ALP)活性、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)活性およびカルシウム(Ca)濃度を測定した。

ヘパリン処理したシリンジを用いて、腹部大動脈採血を行い、1,200 ×g、4°C で 30 分間遠心して血漿を得た。ALP ならびに TRAP の活性は TRACP&ALP Assay Kit(タカラバイオ社製)を用いて行った。Ca 測定にはカルシウム E-テストワコー(和光純薬工業社製)を用いて行った。

Animals: Female Wistar rats (16week old)

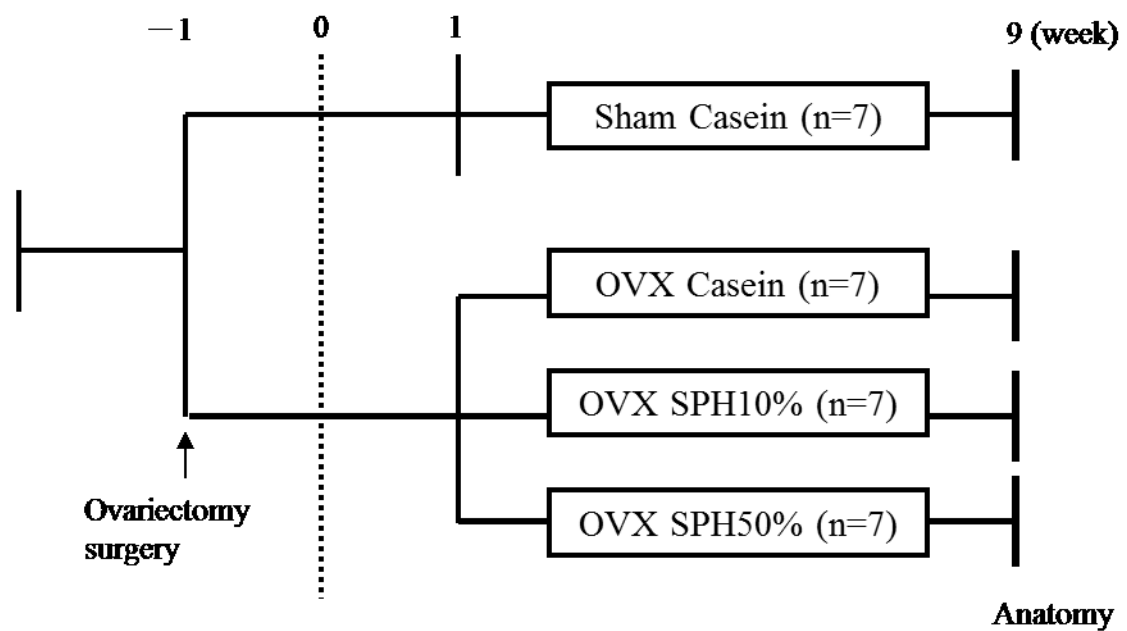


Figure 6 動物飼育計画

**Table 7 食餌組成(AIN-93M)**

	<b>Casein</b>	<b>SPH10%</b>	<b>SPH50%</b>
<b>Casein</b>	<b>16.94</b>	<b>15.25</b>	<b>8.47</b>
<b>Shark protein hydrolysate (SPH)</b>	<b>0</b>	<b>1.60</b>	<b>7.98</b>
<b><math>\alpha</math>-Corn starch</b>	<b>15.5</b>	<b>15.5</b>	<b>15.5</b>
<b><math>\beta</math>-Corn starch</b>	<b>43.63</b>	<b>43.73</b>	<b>44.12</b>
<b>Sucrose</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Soybean oil</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Cellulose powder</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Mineral mix(93M-MX)</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>
<b>Vitamin mix(93-VX)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>L-Cystine</b>	<b>0.18</b>	<b>0.18</b>	<b>0.18</b>
<b>Choline bitartrate</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>
<b><i>t</i>-Buthylhydroquinone</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0008</b>
<b>Total(%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

## 2.6 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 3 により統計処理を行った。全てのデータは一元配置の分散分析(ANOVA)、次いでダネットの多重比較検定により解析した。

## 3. 結果

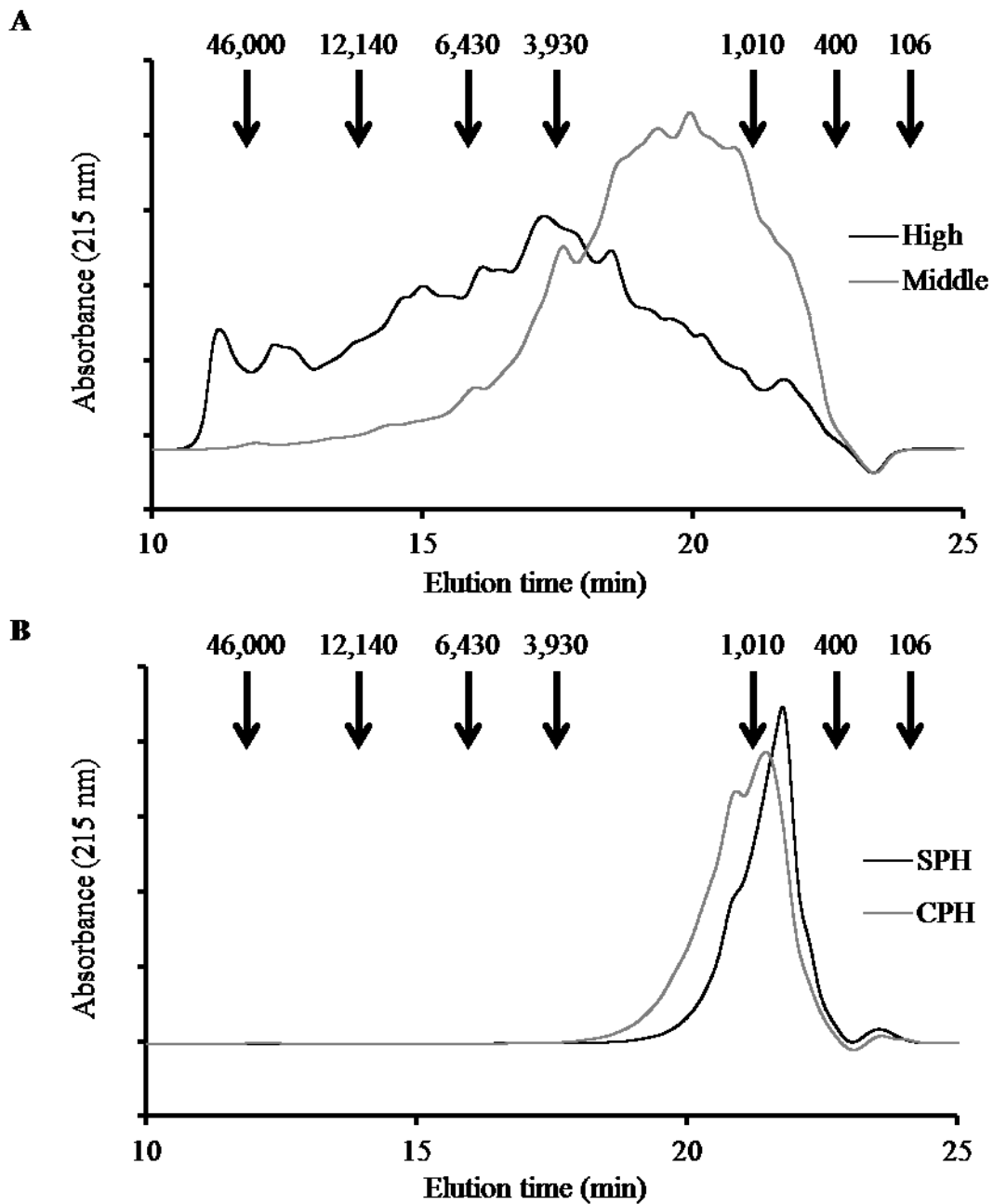
### 3.1 加水分解物の特徴

#### 3.1.1 加水分解物の分子量分布

High、Middle、SPH および CPH の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した結果を Figure 7 に示した。High の分子量は 145,653~213 であり、重量平均分子量は 9,667 であった。Middle の分子量は 109,298~206 であり、重量平均分子量は 2,898 であった。SPH の分子量は 2,796~251 であり、重量平均分子量は 878 であった。CPH の分子量は 3,773~246 であり、重量平均分子量は 1,124 であった。今回使用した Alcalase はエンド型プロテアーゼであり、ポリペプチド内部のペプチド鎖を切断する酵素である。また、ウマミザイム G は、エキソ型ペプチダーゼ/エンド型プロテアーゼの複合酵素であり、エキソ型ペプチダーゼがポリペプチドの端からアミノ酸を切断する酵素である。酵素量と反応時間を変えることで分子量の異なる加水分解物を調製することができた。

低分子加水分解物である SPH および CPH の分子量については、低分子量測定用カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分析を行った。その結果を Figure 8 に示した。SPH は、溶出時間 12.2~16.2、16.2~18.3、18.6、19.9 および 22.9 分にピークを示した。分子量マーカーに用いた 1,010、615、194 および 106 の溶出時間は、13.0、13.9、16.7 および 18.1 分であり、106 よりも遅い時間に加水分解物のピークが検出された。これは、分子量が低すぎるために分子量と一致しない結果となった可能性が考えられる。CPH は、SPH のクロマトグラムと基本的には似ているが、低分子側のピークが小さいものであった。





**Figure 7** 加水分解物のゲル濾過クロマトグラム

(A) HighおよびMiddle

(B) SPHおよびCPH

分子量マーカー(46,000、12,140、6,430、3,930、1,010、400および106)を矢印で示した。

カラム: TSKgel G2000SW<sub>XL</sub> 7.8 mm I.D.×30 cm

流速: 0.5 ml/min

溶離液: 45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液

カラム温度: 40°C

検出: UV-215 nm

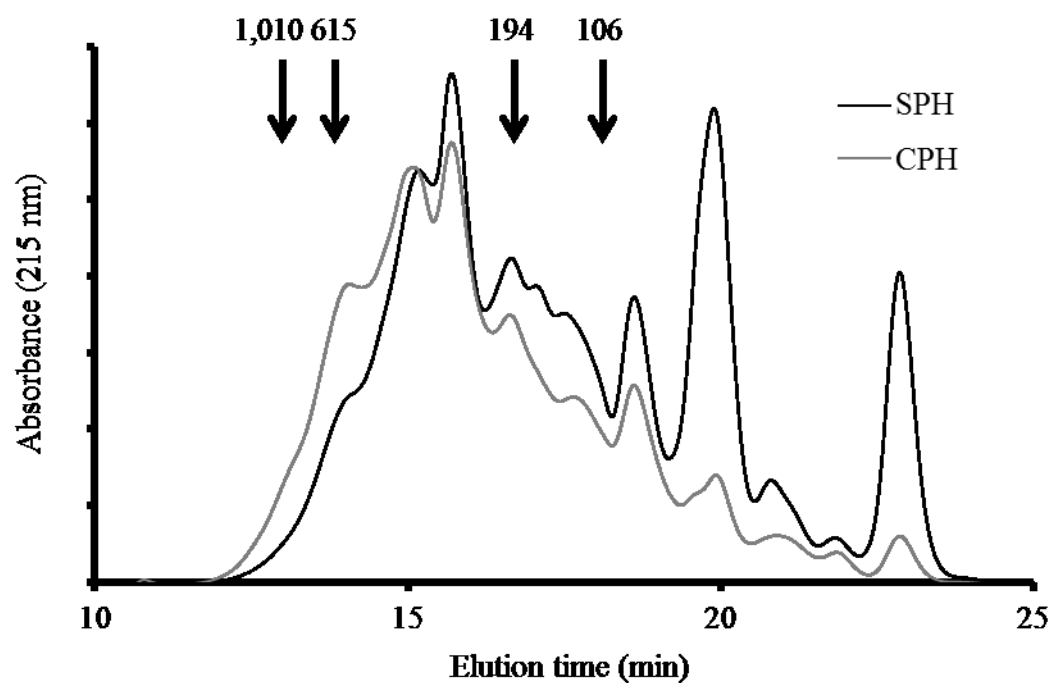


Figure 8 SPHおよびCPHのゲル濾過クロマトグラム  
 分子量マーカー(1,010、615、194および106)を矢印で示した。  
 カラム: TSKgel G2500PW<sub>XL</sub> 7.8 mm I.D.×30 cm  
 流速: 0.5 ml/min  
 溶離液: 45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液  
 カラム温度: 40℃  
 検出: UV-215 nm

### 3.1.2 加水分解物のアミノ酸組成

High、Middle、SPH および CPH のアミノ酸組成を Table 8 および 9 に示した。シャークプロテインの加水分解が進むと Gly、His、Thr、Pro、Tyr、Ile および Phe が増え、Glu/Gln、Arg、Ala、Hyp および Hyl が低下した。コラーゲン特有のアミノ酸である Hyp および Hyl 含量は減少する傾向にある。低分子量の SPH は、約 40%が遊離のアミノ酸であり、Glu/Gln、Leu および Lys 含量が特に高い。CPH と比べると、Asp/Asn および Arg 含量が低いことが示された。

### 3.1.3 SPH 中の脂質の測定

SPH の TLC プレートによる脂質分析の結果を Figure 9 に示した。硫酸発色法により非特異的に脂質が検出できる。この結果、SPH には脂質の検出が認められず、リン脂質検出試薬である Dittmer-Lester 発色法による染色の結果、リン脂質である環状ホスファチジン酸のみ検出できた。そして、ニンヒドリン発色法によるアミノ基の染色の結果、SPH でのみ検出できた。この結果、SPH 中に脂質の検出がされなかったことが確認できた。

## 3.2 動物基礎データ

最終体重、体重増加量、1 日当たりの飼料摂取量および臓器重量を Table 10 にまとめた。最終体重は、Sham Casein 群が  $220.5 \pm 5.1$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $254.2 \pm 16.9$  g であり、有意な増加が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群は、 $254.0 \pm 14.0$  g および  $259.2 \pm 15.0$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。同様に体重増加量に関しても、Sham Casein 群が  $40.6 \pm 4.8$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $65.2 \pm 9.7$  g であり、有意な増加が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群は、 $65.1 \pm 9.7$  g および  $70.5 \pm 11.3$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。1 日当たりの飼料摂取量は、Sham Casein 群が  $12.9 \pm 0.5$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $14.0 \pm 0.8$  g であり、有意な増加が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群

**Table 8 加水分解物のアミノ酸組成**

<b>Concentration of amino acid (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>	<b>High</b>	<b>Middle</b>	<b>SPH</b>	<b>CPH</b>
<b>Aspartic acid/Asparagine</b>	<b>78.23</b>	<b>78.84</b>	<b>75.75</b>	<b>78.99</b>
<b>Glutamic acid/Glutamine</b>	<b>186.09</b>	<b>156.92</b>	<b>123.43</b>	<b>118.70</b>
<b>Hydroxyproline</b>	<b>5.58</b>	<b>2.78</b>	<b>2.30</b>	<b>1.83</b>
<b>Serine</b>	<b>30.41</b>	<b>29.42</b>	<b>31.04</b>	<b>34.79</b>
<b>Glycine</b>	<b>28.33</b>	<b>27.41</b>	<b>30.56</b>	<b>34.28</b>
<b>Histidine</b>	<b>15.15</b>	<b>16.31</b>	<b>19.11</b>	<b>17.20</b>
<b>Arginine</b>	<b>51.89</b>	<b>48.60</b>	<b>32.21</b>	<b>49.28</b>
<b>Threonine</b>	<b>34.46</b>	<b>35.69</b>	<b>43.49</b>	<b>41.97</b>
<b>Alanine</b>	<b>54.83</b>	<b>51.62</b>	<b>43.46</b>	<b>44.99</b>
<b>Proline</b>	<b>25.63</b>	<b>29.51</b>	<b>36.42</b>	<b>37.30</b>
<b>Tyrosine</b>	<b>10.65</b>	<b>15.58</b>	<b>21.00</b>	<b>26.57</b>
<b>Valine</b>	<b>31.01</b>	<b>36.25</b>	<b>41.20</b>	<b>41.69</b>
<b>Methionine</b>	<b>22.02</b>	<b>23.31</b>	<b>23.99</b>	<b>27.19</b>
<b>Cysteine</b>	<b>2.75</b>	<b>2.90</b>	<b>3.20</b>	<b>3.68</b>
<b>Isoleucine</b>	<b>23.64</b>	<b>26.94</b>	<b>33.86</b>	<b>27.16</b>
<b>Leucine</b>	<b>74.81</b>	<b>66.19</b>	<b>58.16</b>	<b>57.18</b>
<b>Hydroxylysine</b>	<b>1.08</b>	<b>0.55</b>	<b>0.42</b>	<b>0.42</b>
<b>Phenylalanine</b>	<b>12.50</b>	<b>17.31</b>	<b>24.23</b>	<b>21.89</b>
<b>Lysine</b>	<b>83.51</b>	<b>74.91</b>	<b>58.44</b>	<b>53.29</b>
<b>Total</b>	<b>772.56</b>	<b>741.02</b>	<b>702.27</b>	<b>718.38</b>

**Table 9** 加水分解物の遊離アミノ酸組成

Concentration of amino acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	High	Middle	SPH	CPH
Aspartic acid/Asparagine	0.15	0.22	9.05	13.50
Glutamic acid/Glutamine	3.38	5.63	49.90	25.81
Hydroxyproline	0.00	0.00	0.00	0.00
Serine	0.07	0.12	9.91	4.42
Glycine	0.02	0.07	2.76	0.76
Histidine	0.00	0.06	10.50	7.33
Arginine	0.00	0.00	12.82	15.54
Threonine	0.08	0.33	18.79	8.78
Alanine	0.29	1.13	14.13	6.95
Proline	0.06	0.16	2.56	0.93
Tyrosine	0.00	0.00	8.80	4.89
Valine	0.64	0.91	21.21	10.68
Methionine	0.08	0.23	13.25	7.82
Cysteine	0.06	0.26	1.96	1.28
Isoleucine	0.33	0.92	17.87	9.48
Leucine	0.31	0.00	49.49	31.53
Hydroxylysine	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine	0.16	0.53	21.05	9.93
Lysine	0.10	0.00	40.33	11.90
<b>Total</b>	<b>5.74</b>	<b>10.57</b>	<b>304.40</b>	<b>171.53</b>

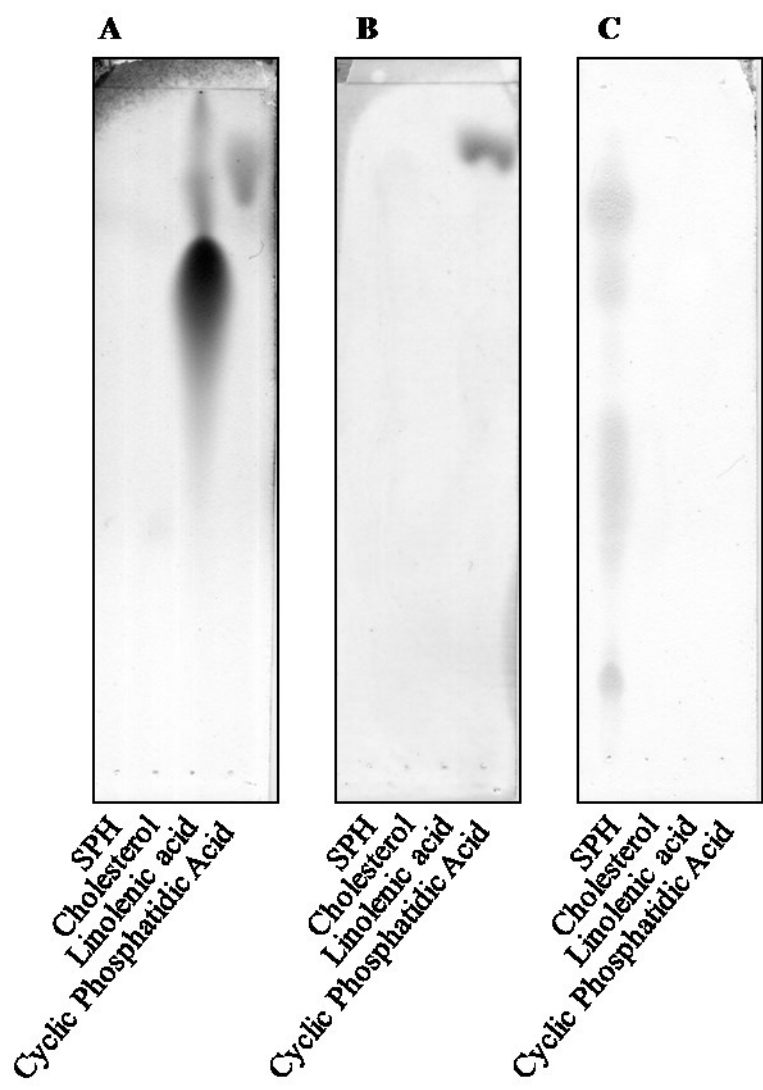


Figure 9 SPHの薄層クロマトグラム  
 (A)硫酸発色(非特異的脂質検出試薬)  
 (B)Dittmer-Lester発色(リン脂質検出試薬)  
 (C)ニンヒドリン発色(アミノ基検出試薬)

**Table 10** 動物基礎データ

	Sham	OVX		
	Casein (n=7)	Casein (n=7)	SPH10%(n=7)	SPH50% (n=7)
Final body weight (g)	220.5±5.1**	254.2±16.9	254.0±14.0	259.2±15.0
Body weight gain (g)	40.6±4.8*	65.2±9.7	65.1±9.7	70.5±11.3
Food intake (g/day)	12.9±0.5*	14.0±0.8	13.8±0.8	14.1±1.0
Liver weight (g)	5.81±0.49	5.48±0.64	5.23±0.45	5.26±0.20
Kidney weight (g)	1.38±0.08*	1.27±0.09	1.34±0.09	1.35±0.07
Spleen weight(g)	0.44±0.03*	0.50±0.03	0.48±0.06	0.49±0.03
Uterine weight (g)	0.64±0.25**	0.13±0.02	0.14±0.04	0.14±0.05

Data are shown as means ± SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

は、 $13.8 \pm 0.8$  g および  $14.1 \pm 1.0$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

肝臓重量は、どの群においても有意な差は認められなかった。腎臓重量は、Sham Casein 群で  $1.38 \pm 0.08$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $1.27 \pm 0.09$  g であり、有意な減少が認められた。脾臓重量は、Sham Casein 群では  $0.44 \pm 0.03$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $0.50 \pm 0.03$  g で有意に増加した。子宮重量は、Sham Casein 群が  $0.64 \pm 0.25$  g であったのに対し、OVX Casein 群が  $0.13 \pm 0.02$  g であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群は、 $0.14 \pm 0.04$  g および  $0.14 \pm 0.05$  g であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。これは卵巣摘出によってエストロゲンが欠乏し、子宮が萎縮したため、OVX 全群で減少していた。卵巣は、OVX 群全個体で左右とも無いことを、Sham 群全個体で左右ともあることを確認した。よって、卵巣摘出手術と偽手術は正しく行われていたことを確認した。

### 3.3 SPH 投与による OVX ラットの大腿骨骨密度への影響

DEXA による右大腿骨骨密度測定の結果を Table 11 に示した。全骨密度は、ばらつきの大きい slice No.1 および slice No.20 を除いた slice No.2 から slice No.19 の平均骨密度、骨盤側から近位部(slice No.2-6)、中位部(slice No.7-14)、遠位部(slice No.15-19)の平均骨密度を示した。また、slice No.17 についての骨密度を Figure 10 に示した。全骨密度は、Sham Casein 群が  $136.5 \pm 3.0$  mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が  $128.7 \pm 3.4$  mg/cm<sup>2</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、 $127.5 \pm 3.4$  mg/cm<sup>2</sup> および  $129.8 \pm 2.7$  mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。近位部において、Sham Casein 群が  $144.1 \pm 3.0$  mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が  $132.6 \pm 3.9$  mg/cm<sup>2</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、 $131.4 \pm 4.0$  mg/cm<sup>2</sup> および  $134.7 \pm 3.1$  mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。中位部において、どの群においても有意な差は認められなかった。遠位部において、Sham Casein 群が  $157.0 \pm 4.3$  mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が

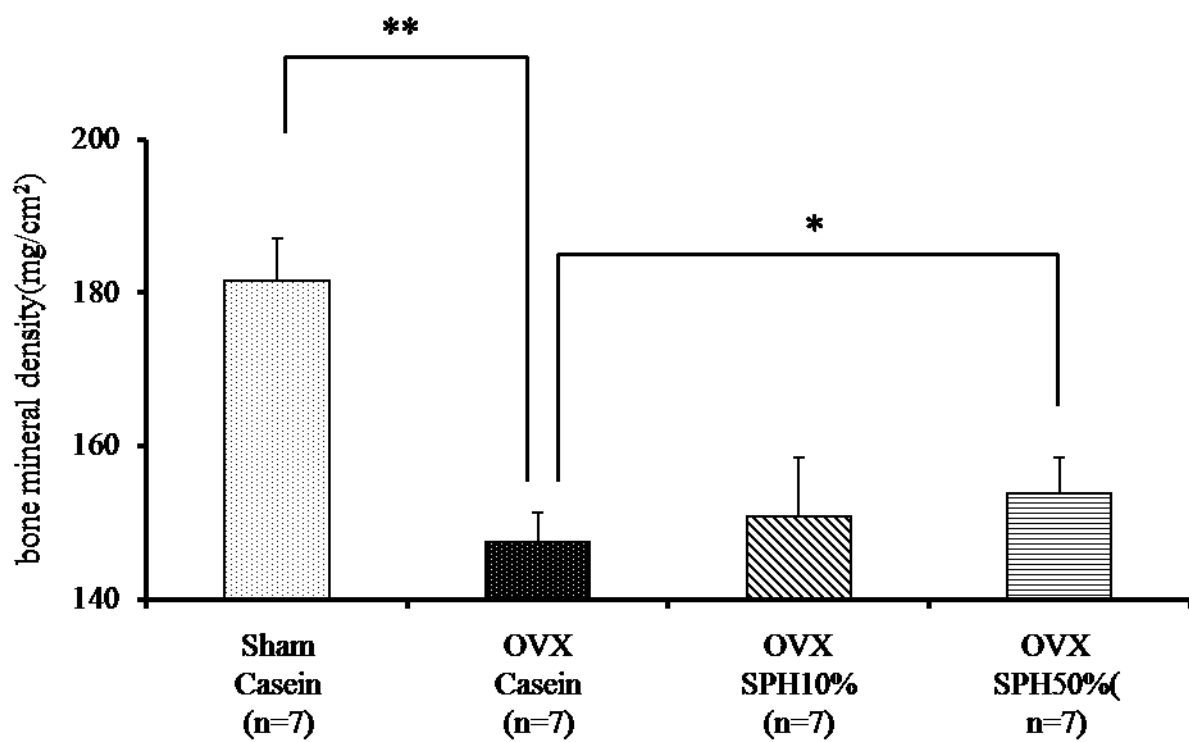


**Table 11** SPH投与によるOVXラットの大腿骨の骨密度への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=7)	Casein (n=7)	SPH10%(n=7)	SPH50% (n=7)
Whole BMD [sliceNo.2-19] (mg/cm <sup>2</sup> )	136.5 ± 3.0**	128.7 ± 3.4	127.5 ± 3.4	129.8 ± 2.7
Proximal BMD [sliceNo.2-6] (mg/cm <sup>2</sup> )	144.1 ± 3.0**	132.6 ± 3.9	131.4 ± 4.0	134.7 ± 3.1
Central BMD [sliceNo.7-14] (mg/cm <sup>2</sup> )	118.8 ± 2.9	120.9 ± 3.4	119.0 ± 3.6	121.1 ± 3.3
Distal BMD [sliceNo.15-19] (mg/cm <sup>2</sup> )	157.0 ± 4.3**	137.2 ± 3.6	137.1 ± 2.9	139.0 ± 2.2

Data are shown as means ± SD.

**\*\***, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.01$ .



Data are shown as means  $\pm$  SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Figure 10 SPH投与によるOVXラットの大腿骨(slice No. 17)の骨密度への影響

137.2±3.6 mg/cm<sup>2</sup>であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、137.1±2.9 mg/cm<sup>2</sup> および 139.0±2.2 mg/cm<sup>2</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

Figure 10 に示したように、遠位部の slice No.17 において、Sham Casein 群が 181.5±5.6 mg/cm<sup>2</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 147.5±3.9 mg/cm<sup>2</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、150.9±7.7 mg/cm<sup>2</sup> および 153.9±4.6 mg/cm<sup>2</sup> と OVX Casein 群に比べ OVX SPH50%群で有意な増加を認めた。このことから 50%SPH の投与により、劇的ではないが卵巣摘出に起因する骨密度の有意な減少を抑制したと考えられる。

X 線 CT を用いた右大腿骨骨密度測定の結果を Table 12 に示した。全骨密度は、Sham Casein 群が 751.4±13.7 mg/cm<sup>3</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 680.2±13.5 mg/cm<sup>3</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、666.9±13.5 mg/cm<sup>3</sup> および 678.8±13.4 mg/cm<sup>3</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。皮質骨骨密度は、Sham Casein 群が 1150.1±8.0 mg/cm<sup>3</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 1133.3±7.3 mg/cm<sup>3</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、1126.8±13.4 mg/cm<sup>3</sup> および 1135.4±9.4 mg/cm<sup>3</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。海綿骨骨密度は、Sham Casein 群が 451.9±14.3 mg/cm<sup>3</sup> であったのに対し、OVX Casein 群が 350.4±13.9 mg/cm<sup>3</sup> であり、有意な減少が認められた。OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、345.7±10.1 mg/cm<sup>3</sup> および 352.8±8.8 mg/cm<sup>3</sup> であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

### 3.4 SPH 投与による OVX ラットの血漿中骨代謝マーカー活性への影響

血漿中 ALP および TRAP 活性測定の結果を Table 13 に示した。ALP 活性は、どの群においても有意な差は認められなかった。TRAP 活性は、Sham Casein 群が 1.24±0.10 units/μl であったのに対して、OVX Casein 群では 0.84±0.14 units/μl で有意な減少が認められた。

**Table 12** SPH投与によるOVXラットの大腿骨の骨密度への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=7)	Casein (n=7)	SPH10%(n=7)	SPH50% (n=7)
Total BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	751.4 ± 13.7**	680.2 ± 13.5	666.9 ± 13.5	678.8 ± 13.4
Cortical BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	1150.1 ± 8.0*	1133.3 ± 7.3	1126.8 ± 13.4	1135.4 ± 9.4
Trabecular BMD(mg/cm <sup>3</sup> )	451.9 ± 14.3**	350.4 ± 13.9	345.7 ± 10.1	352.8 ± 8.8

Data are shown as means ± SD.

\*, \*\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 13** SPH投与によるOVXラットの血漿中骨代謝マーカー活性およびCa濃度への影響

	Sham	OVX		
	Casein (n=7)	Casein (n=7)	SPH10%(n=7)	SPH50% (n=7)
ALP activity(units/ $\mu$ l)	1.89 $\pm$ 0.33	2.01 $\pm$ 0.31	1.93 $\pm$ 0.02	1.98 $\pm$ 0.12
TRAP activity(units/ $\mu$ l)	1.24 $\pm$ 0.10*	0.84 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.20
Ca concentration (mg/dl)	10.2 $\pm$ 0.9	10.0 $\pm$ 0.5	9.7 $\pm$ 0.7	9.9 $\pm$ 0.5

Data are shown as means  $\pm$  SD.

\*, Significant difference from OVX Casein group at  $P < 0.05$ .

OVX SPH10%群および OVX SPH50%群では、 $1.00 \pm 0.27$  units/ $\mu$ l および  $0.92 \pm 0.20$  units/ $\mu$ l であり、OVX Casein 群に比べ有意な差は認められなかった。

### 3.5 SPH 投与による OVX ラットの血漿中 Ca 濃度への影響

血漿中 Ca 濃度を Table 13 に示した。血漿中 Ca 濃度は、どの群においても有意な差は認められなかった。ヒトにおいて血液中の Ca 濃度は、きわめて狭い範囲で厳密に保たれており、正常な範囲より少しでも低下または上昇すると骨からの Ca の溶出が促進され、尿への Ca 排出が促進されることにより Ca 濃度が正常値に戻る。この厳密な制御がラットにも当てはまるとすれば、過剰な骨吸収によって骨中の Ca が多量に血液中に溶出したとしても速やかに尿中に排出してしまうため、血漿中 Ca 濃度への影響はきわめて少ないと考えられる。

## 4. 考察

High、Middle および SPH のアミノ酸組成に大きな差は確認できなかったが、酵素の種類や反応時間の違いにより分子量の異なる加水分解物が調製できることが確認できた。本章では閉経後骨粗鬆症モデルである OVX ラットを用いて、SPH による閉経後骨粗鬆症の骨密度改善効果について検証を行った。閉経後骨粗鬆症において、骨形成と骨吸収の両者が過剰に行われる高骨代謝回転状態となり、過剰な骨吸収に対して骨形成が追いつかないことから骨量減少が引き起こされる(Raisz, 2005)。血漿中の骨代謝マーカー測定の結果から卵巣摘出による骨形成の代謝マーカーである ALP 活性の変化は認められなかったが、骨吸収の代謝マーカーである TRAP 活性の減少が確認された(Table 13)。OVX ラットを用いた研究では、卵巣摘出後に上昇した血清中 ALP および TRAP 活性が 8 週間後には低下することが示されている(Miyazaki *et al.*, 2004)。そのため、卵巣摘出手術から長期間経過すると血中のマーカーは高骨代謝回転状態を示さなくなる可能性がある。本実験は、卵巣摘出から 9 週間後に解剖を行っているため、血中の代謝マーカーは高骨代謝回転状態を反映しないのかも

しれない。

X線CTを用いた骨密度測定の結果から、海綿骨だけでなく皮質骨でも骨損失が確認できている(Table 12)。DEXAによる測定でも、海綿骨の多い近位部および遠位部において骨密度の減少が確認できた(Table 11)。OVXラットにSPHを投与することで大腿骨遠位部(slice No.17)の骨密度の増加を認めている(Figure 10)。SPHは、骨密度を減少を抑制させる働きがあると考えられる。

骨粗鬆症モデルを用いた研究において、骨密度を高める効果を示すタンパク質およびペプチドに関する報告は、乳由来のものが多い。カゼインホスホペプチド(CPP)は、牛乳に含まれる骨粗鬆症抑制物質であり(Tsuchita *et al.*, 1996)、牛乳が他の小魚などのカルシウム源と比べ生体利用効率の高いことが報告されている(Lee *et al.*, 1980; Naito *et al.*, 1972; Tsuchita *et al.*, 2001)。また、乳由来のタンパク質であるホエー(Takada *et al.*, 1997)や塩基性タンパク質(MBP) (Toba *et al.*, 2000)の骨粗鬆症改善効果が報告されている。乳由来のタンパク質は、カルシウム吸収を高めることで骨質を向上させていると考えられる。しかし、当研究室のこれまでの研究で、シャークプロテインはカルシウムの体内利用効率に影響を与えなかった。そのため、SPHによる骨密度減少抑制の要因は、骨代謝に関わる細胞に影響を与えているものであり、SPHを構成しているペプチドに由来するものと考えている。近年の研究において、コラーゲン(Iwai *et al.*, 2005)や大豆タンパク質(佐藤, 2007)は、完全にアミノ酸まで分解されてから吸収されているわけではなく、ペプチドでも吸収されることが報告されている。SPHも、骨密度の減少を抑制するペプチドが存在する可能性が考えられる。

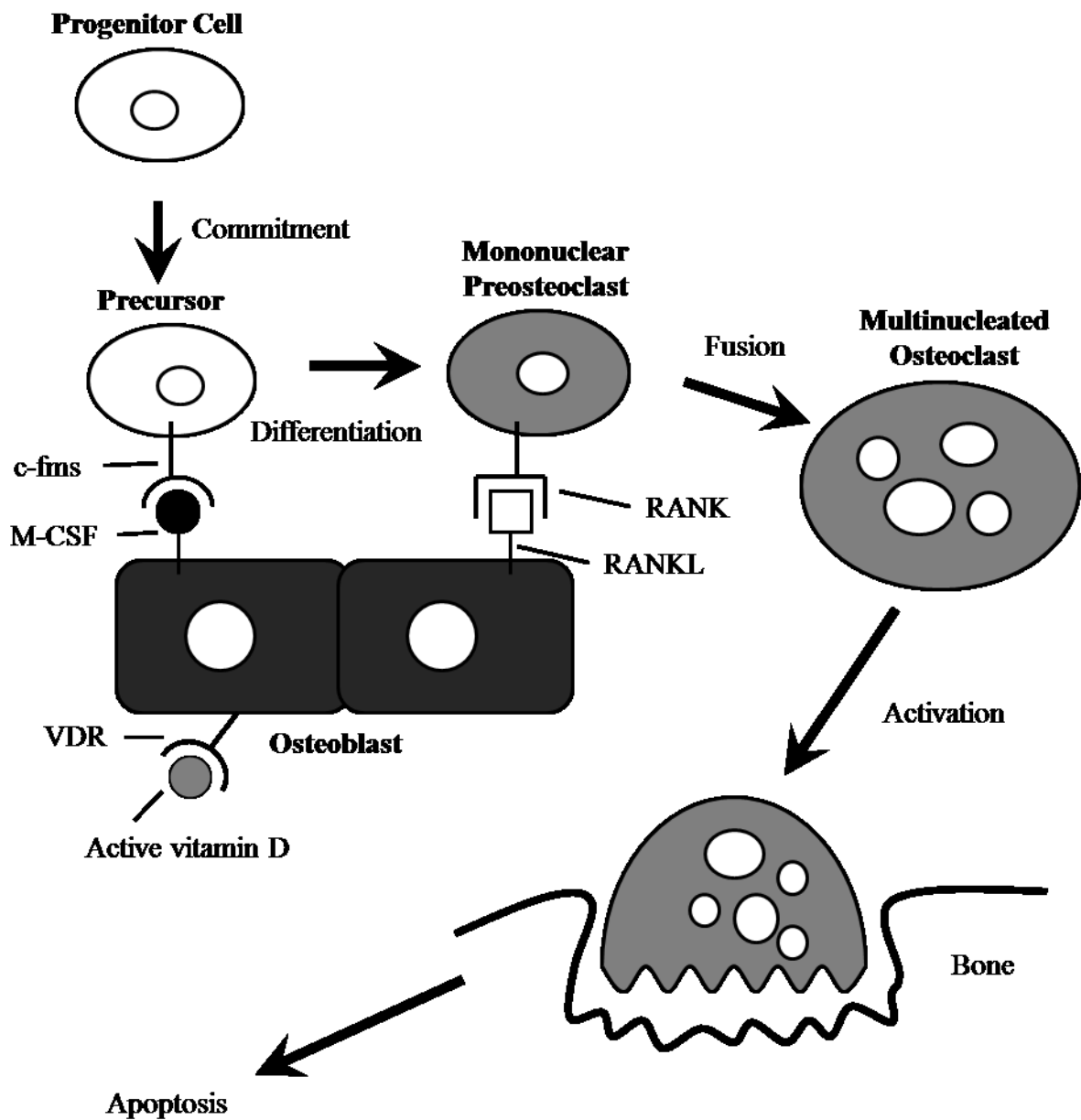
### 第3章 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物による分化抑制効果

#### 1. はじめに

第2章において、SPH投与によりOVXラットの大腿骨遠位部の骨密度の有意な減少を抑制することが明らかとなった。OVXラットは、エストロゲン欠乏状態となることから閉経後骨粗鬆症モデルとして用いられている。エストロゲンは、カスパーゼ-8を活性化させることによって、アポトーシス誘導を引き起こし、破骨細胞数を減少させる(Saintier *et al.*, 2006)。そのため、エストロゲン欠乏状態になると破骨細胞数が増加し、骨吸収が盛んに行われ、高骨代謝回転状態となる。骨吸収を行う破骨細胞は、骨髄中で造血幹細胞から分化することが報告されている。造血幹細胞からの破骨細胞への分化の模式図をFigure 11に示した(Raisz, 2005)。破骨細胞への分化は、骨芽細胞の細胞膜上に発現しているマクロファージコロニー刺激因子(Macrophage Colony-Stimulating Factor: M-CSF)と、破骨前駆細胞が発現するM-CSF受容体(c-fms)との相互作用によって開始される。破骨前駆細胞はNF- $\kappa$ B活性化受容体(Receptor Activator of NF- $\kappa$ B: RANK)を発現する前破骨細胞へと分化する。このRANKと骨芽細胞が発現するリガンド(Receptor Activator of NF- $\kappa$ B ligand: RANKL)が結合することによって、前破骨細胞の分化が進み、多核の破骨細胞さらには骨吸収活性を持つ成熟破骨細胞へと分化する。病的状況下では、炎症性または悪性細胞による可溶性M-CSFおよびRANKLの産生によっても破骨細胞形成が増加するが、通常の骨代謝においては骨芽細胞と破骨細胞の物理的接触により破骨細胞形成が調節されている。

骨粗鬆症の改善を期待する機能性食品として、イソフラボンが特定保健用食品として承認されており(寺本 *et al.*, 2000; 日本医師会 *et al.*, 2011)、吸収されたイソフラボン誘導体が、破骨細胞分化抑制効果を示すことで骨粗鬆症を改善していることが報告されている(Tang *et al.*, 2010)。また、ケルセチン(Woo *et al.*, 2004)、コンパクチン(Woo *et al.*, 2000)およびDHA(Rahman *et al.*, 2008)が成熟破骨細胞への分化を阻害することが報告されている。しかし、ペプチドによる分化阻害効果の研究は、環状ペプチド(WP9QY)(Aoki *et al.*, 2006)お





M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor  
 c-fms: macrophage colony-stimulating factor receptor  
 RANK: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B  
 RANKL: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B ligand  
 VDR: Vitamin D receptor

Figure 11 破骨細胞の分化の様子

よび NBD ペプチド(NF-kappaB essential modulator-binding domain peptide)(Dai *et al.*, 2004)に報告されているのみである。

そこで本章では、SPH の閉経後骨粗鬆症モデルにおける骨密度改善効果の作用機序を明らかにする目的で、ラット大腿骨より採取した初代培養の骨髄細胞および BALB/c マウスの腹水由来マクロファージ細胞株である RAW 264 細胞を使用し、成熟破骨細胞への分化に対する影響について検討を行った。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 実験材料および試薬

Wistar 系雌ラットは三協ラボサービスより購入した。BALB/c マウスの腹水由来マクロファージ細胞株である RAW 264 細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した。ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質(PSN Antibiotic Mixture)は Life Technologies 社製を、 $\alpha$ -MEM 培地は SIGMA 社製を用いた。その他試薬は、和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。

シャークプロテイン加水分解物(High、Middle、SPH)およびコッドプロテイン加水分解物(CPH)は、第 2 章 2.2.1 の方法に準じて調製した。

## 2.2 骨髄細胞の破骨細胞分化における SPH の影響

### 2.2.1 細胞培養法

骨髄細胞の採取と培養法は、Grasser ら、Kim らおよび Roodman の方法を参考にした(Grasser *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2008; Roodman, 1999)。骨髄細胞は体重約 240 g の Wistar 系雌ラットから摘出した大腿骨の膝側骨端に 23G の針(テルモ社製)をゆっくり刺し、骨髄腔に到達したら骨盤側骨端の大腿骨頭部を切断し、10%FBS、1%抗生物質を含む  $\alpha$ -MEM 培地 5 ml で押し出すようにして骨髄細胞を回収した。

骨髄細胞を 48 well plate に  $1 \times 10^6$  cells/well になるよう播種し、10%FBS、1%抗生物質を

含む  $\alpha$ -MEM 培地 500  $\mu$ l/well で培養した。破骨細胞分化因子として活性型ビタミン D( $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: D<sub>3</sub>; SIGMA 社製)を  $10^{-8}$ M で添加し、試験物質として SPH を 10 mg/ml で、また成熟破骨細胞分化抑制効果をもつポジティブコントロールとしてエストラジオール( $17\beta$ -Estradiol: E<sub>2</sub>; SIGMA 社製)を  $10^{-8}$ M で添加し、5%CO<sub>2</sub>、37°C(CO<sub>2</sub> インキュベータ MCO-17AIC; SANYO 社製)で培養した。1 日おきに半分量の 250 $\mu$ l の培地交換を行い、8 日間培養した。

### 2.2.2 TRAP 染色法

成熟破骨細胞数は TRAP 染色キット(プライマリーセル社製)を用いて染色を行い、陽性細胞を計測した。培養終了後の well から培地を除去し、リン酸緩衝食塩水(PBS(-))を 295  $\mu$ l 加えて、細胞を洗浄した。次に 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業社製)を 147.5  $\mu$ l 添加し、5 分間細胞を固定した。その後、固定液を除去し、滅菌水 737.5  $\mu$ l で 3 回洗浄した。発色液(発色基質 3 mg に 50 mM 酒石酸含有緩衝液 5 ml を加えて溶解した)を well に 147.5  $\mu$ l 添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて、1 時間反応を行った。反応後、発色基質液を除去し、超純水を well に 295  $\mu$ l 添加した。そして、成熟破骨細胞と考えられる 3 核以上の TRAP 陽性細胞数を計測した。

## 2.3 RAW264 細胞の破骨細胞分化における加水分解物の影響

### 2.3.1 細胞培養法

RAW264 細胞を 96 well plate に  $8 \times 10^2$  cells/well になるように播種し、10%FBS、1%抗生物質を含む  $\alpha$ -MEM 培地 200  $\mu$ l 中で 5%CO<sub>2</sub>、37°C で 24 時間培養した。その後、破骨細胞分化因子(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: RANKL; SIGMA 社製) を 50 ng/ml を添加し、さらに、E<sub>2</sub>  $1 \times 10^{-8}$  M または High 104.05  $\mu$ g/ml、Middle 38.16  $\mu$ g/ml、SPH 10  $\mu$ g/ml、CPH 13.67  $\mu$ g/ml を加えた。1 日おきに半分量の 100  $\mu$ l を培地交換し、7 日間培養した。試料の添加量については、第 2 章 Figure 7 で示したゲル濾過クロマトグラムの重量平均分子

量から求めた。SPH 10 $\mu$ g/ml が  $1.15 \times 10^{-2}$  M であったことから、他の試料も重量平均分子量から求め、 $1.15 \times 10^{-2}$  M になるように添加した。

### 2.3.2 生細胞数測定法

培養終了後の生細胞数を測定するため Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所社製)を用いて生細胞内の脱水素酵素活性を測定した。培養後の 96 well plate から培地を 100  $\mu$ l 取り除き、Cell Counting Kit-8 溶液を 10  $\mu$ l 添加した。添加後、37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて、2 時間呈色反応を行った。呈色後、マイクロプレートリーダー(infinite M200; TECAN 社製)で 450 nm の吸光度を測定した。計算は、それぞれの吸光度からブランクの吸光度を引き、RANKL(+) Control 群を 1 として相対値で表した。

### 2.3.3 TRAP 活性測定法

破骨細胞の酵素マーカーの一つである酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)活性を TRACP&ALP Assay Kit(タカラバイオ社製)を用いて測定した。培養終了後の well から培地を除去し、生理食塩水(大塚製薬社製)を 200 $\mu$ l 加えて、細胞を洗浄した。そして、細胞抽出用溶液(1% NP-40 含有生理食塩水)を well に 40 $\mu$ l 加え、軽くピペッティングした。反応基質液(*p*-nitro-phenyl phosphate(pNPP) substrate 24 mg を酸性ホスファターゼ用緩衝液 5 ml で十分に溶解させ、酒石酸溶液を 500  $\mu$ l 添加し調製した)を well に 50  $\mu$ l 添加し、37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて、30 分間呈色反応を行った。反応後、0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を 50  $\mu$ l 添加し、マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。計算は、それぞれの吸光度からブランクの吸光度を引き、RANKL(+) Control 群を 1 として相対値で表した。

### 2.3.4 TRAP 染色法

成熟破骨細胞数は、TRAP 染色キットを用いて染色を行い、陽性細胞を計測した。培養

終了後の well から培地を除去し、PBS(-)を 100  $\mu$ l 加えて、細胞を洗浄した。次に 10%中性緩衝ホルマリン液を 50  $\mu$ l 添加し、5 分間細胞を固定した。その後、固定液を除去し、滅菌水 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した。発色液(発色基質 3 mg に 50 mM 酒石酸含有緩衝液 5 ml を加えて溶解した)を well に 50  $\mu$ l 添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて、1 時間反応を行った。反応後、発色基質液を除去し、超純水を well に 100  $\mu$ l 添加した。そして、成熟破骨細胞と考えられる 3 核以上の TRAP 陽性細胞数を計測した。

## 2.4 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 3 により統計処理を行った。全てのデータは一元配置の分散分析(ANOVA)、次いでダネットの多重比較検定により解析した。

## 3. 結果

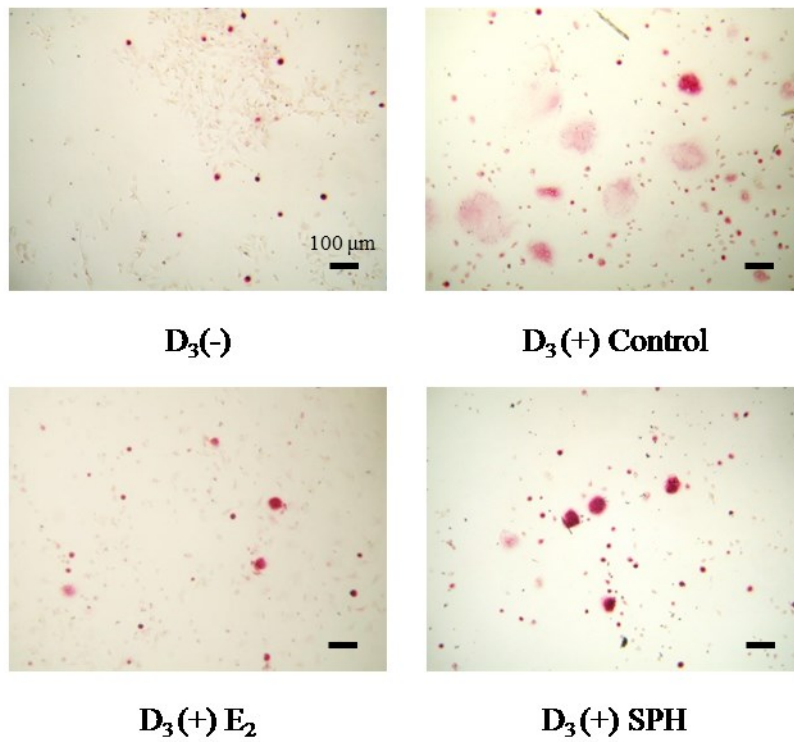
### 3.1 骨髄細胞の破骨細胞分化における SPH の影響

骨髄細胞への D<sub>3</sub> 添加によって誘導される破骨細胞分化に対する E<sub>2</sub> および SPH の影響を Figure 12 に示し、TRAP 陽性成熟破骨細胞の画像を Figure 12A に、細胞数を Figure 12B に示した。D<sub>3</sub>(-)群が 1.4 $\pm$ 1.1 cells/well であるのに対し、D<sub>3</sub> Control 群では 28.7 $\pm$ 4.8 cells/well と有意な増加を認めた。D<sub>3</sub> 刺激による破骨細胞の形成が確認できた。D<sub>3</sub> E<sub>2</sub> 群および D<sub>3</sub> SPH 群は、5.4 $\pm$ 3.2 cells/well および 10.1 $\pm$ 2.6 cells/well であり、D<sub>3</sub> Control 群に比べ両群で成熟破骨細胞数の有意な減少を認めた。

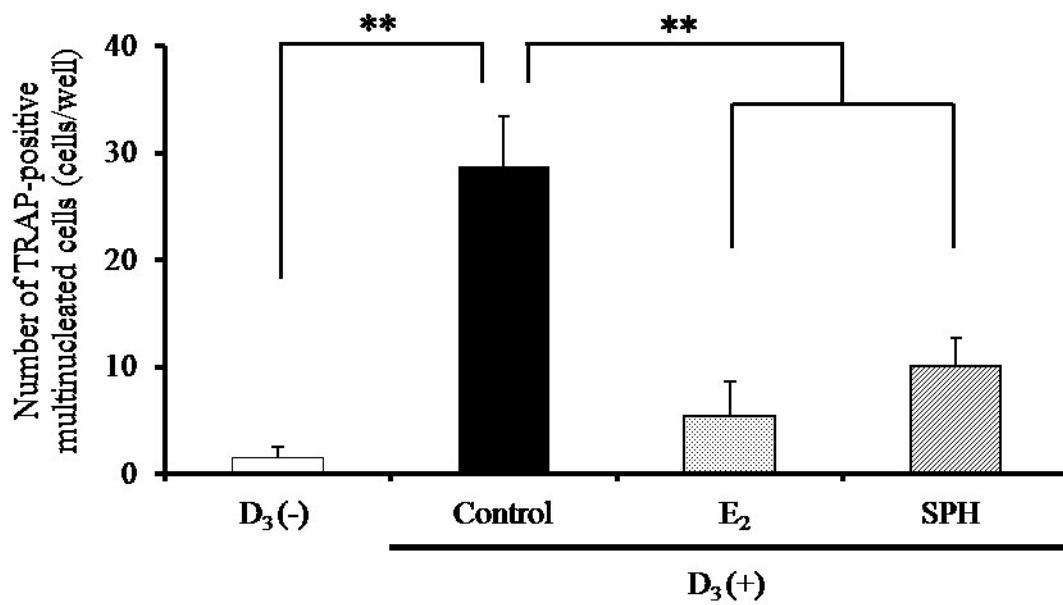
### 3.2 RAW264 細胞の破骨細胞分化における加水分解物の影響

RAW264 細胞への RANKL 添加によって誘導される破骨細胞分化に対する E<sub>2</sub>、High、Middle、SPH および CPH の影響を Table 14 および Figure 13 に示した。RANKL および加水分解物の添加後の生細胞数を Table 14 に示した。RANKL 刺激に対して、全ての群で細胞数の減少または増加の有意な差は認められなかった。

**A**



**B**



Data are shown as means  $\pm$  SD, n=3.

**\*\***, Significant difference from D<sub>3</sub>(+) Control group at  $P < 0.01$ .

Figure 12 骨髓細胞に対するSPHの破骨細胞分化への影響

(A) 骨髓細胞のTRAP染色画像

(B) 成熟破骨細胞数

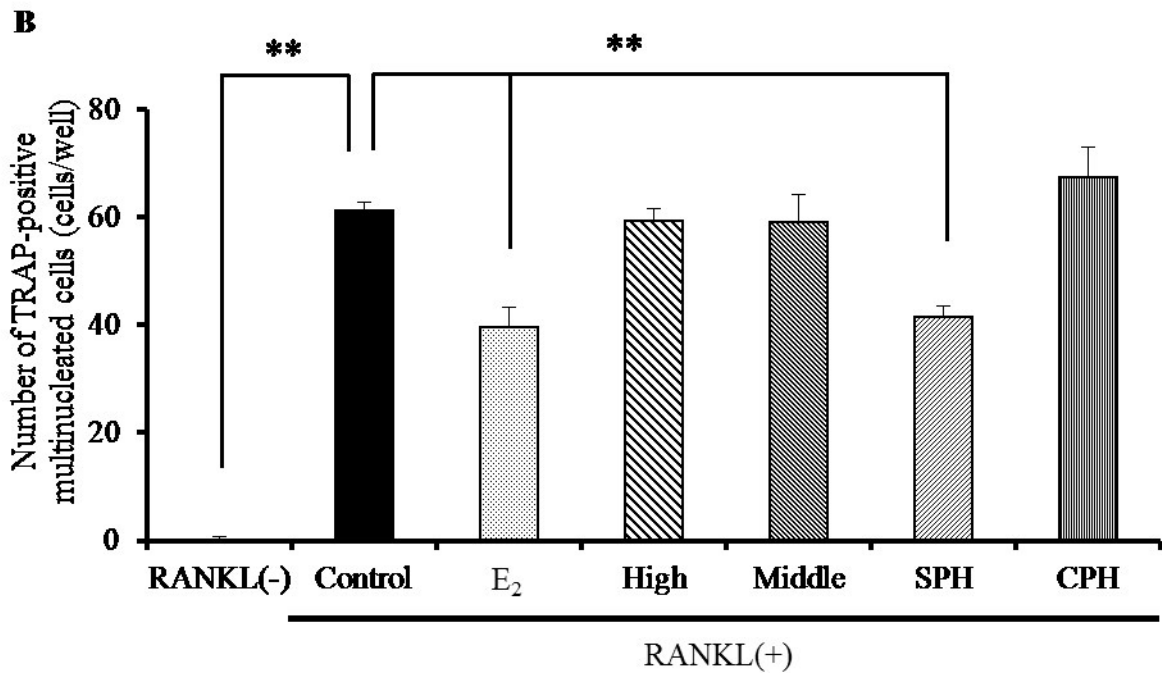
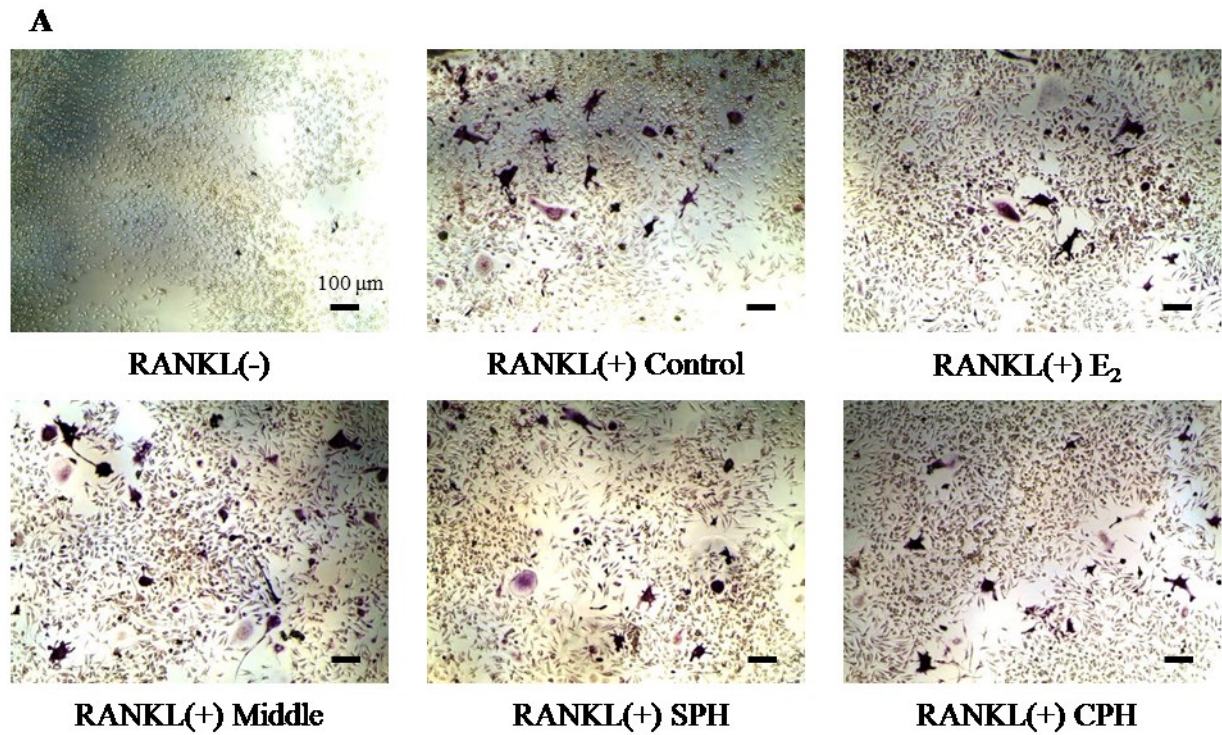
Table 14 RAW264細胞に対する加水分解物の生細胞数およびTRAP活性への影響

	RANKL(+)						
	RANKL(-)	Control	E <sub>2</sub>	High	Middle	SMH	CMH
Cell viability	1.07 ± 0.04	1.00 ± 0.09	1.03 ± 0.01	1.11 ± 0.02	1.09 ± 0.03	1.12 ± 0.02	1.04 ± 0.10
TRAP activity	0.61 ± 0.14**	1.00 ± 0.02	0.98 ± 0.02	1.13 ± 0.15	1.15 ± 0.12	1.10 ± 0.03	1.02 ± 0.07

Data are shown as means ± SD, n=3.

\*\* , Significant difference from RANKL(+) Control group at  $P < 0.01$ .

RANKL(+) Control群の平均値を1としたときの相対値で示した。



Data are shown as means  $\pm$  SD., n=3.

**\*\***, Significant difference from RANKL(+) Control group at  $P < 0.01$ .

Figure 13 RAW264細胞に対する加水分解物の破骨細胞分化への影響

(A)RAW264細胞のTRAP染色画像

(B)成熟破骨細胞数



RANKL および加水分解物の添加による TRAP 活性を Table 14 に示した。RANKL(-)群が  $0.61 \pm 0.14$  であるのに対し、RANKL Control 群では、 $1.00 \pm 0.02$  と有意な増加を認めた。RANKL E<sub>2</sub> 群、RANKL High 群、RANKL Middle 群、RANKL SPH 群および RANKL CPH 群は、 $0.98 \pm 0.02$ 、 $1.10 \pm 0.03$ 、 $1.15 \pm 0.12$ 、 $1.13 \pm 0.15$  および  $1.02 \pm 0.07$  と有意な増減は認められなかった。RAW264 細胞が RANKL 刺激により TRAP 陽性の破骨細胞に分化していることは分かる。破骨細胞分化抑制に関与している E<sub>2</sub> は、TRAP 陽性の単核前破骨細胞への分化の抑制も報告されている(Saintier *et al.*, 2006)。しかし、今回は、E<sub>2</sub> の TRAP 活性の減少は認められなかった。

RANKL および加水分解物の添加による TRAP 陽性成熟破骨細胞の画像を Figure 13A に、細胞数を Figure 13B に示した。RANKL(-)群が  $0.2 \pm 0.3$  cells/well であるのに対し、RANKL Control 群では  $58.4 \pm 4.1$  cells/well と有意な増加を認めた。RANKL 刺激による破骨細胞の形成が確認できた。RANKL E<sub>2</sub> 群、RANKL High 群、RANKL Middle 群、RANKL SPH 群および RANKL CPH 群では、 $38.0 \pm 4.8$  cells/well、 $57.7 \pm 8.4$  cells/well、 $58.6 \pm 4.7$  cells/well、 $39.9 \pm 3.0$  cells/well および  $67.6 \pm 5.6$  cells/well であり、RANKL Control 群に比べ RANKL E<sub>2</sub> 群および RANKL SPH 群で成熟破骨細胞数の有意な減少が認められた。しかし、分子量の大きい RANKL High 群および RANKL Middle 群では、有意な増減は認められなかった。これは、分子量の大きさが関係しているものと思われる。また、コッドプロテイン加水分解物である RANKL CPH 群でも、有意な増減は認められなかった。よって、SPH に特異的に含まれる低分子成分が関係していると考えられる。

#### 4. 考察

本章では骨髄細胞および RAW 264 細胞を用いて成熟破骨細胞分化に対するシャークプロテイン加水分解物の影響を検証した。シャークプロテイン低分子加水分解物である SPH は、活性型ビタミン D 誘導性破骨細胞分化および RANKL 誘導性破骨細胞分化を有意に抑制した(Figure 12&13)。しかし、分子量の異なる High および Middle での有意な抑制は認め

られなかった。第2章 Table 8 に示したように、シャークプロテイン加水分解物である High、Middle および SPH のアミノ酸組成は非常に似ていることから、破骨細胞分化抑制効果を示すのは、酵素分解により低分子化されることによって SPH 中に含まれる成分が関与している可能性が考えられる。

この破骨細胞分化抑制効果は、①破骨前駆細胞から単核前破骨細胞への分化を抑制する、②単核前破骨細胞から多核化した成熟破骨細胞への分化を抑制する、③アポトーシスを誘導して細胞数を減らす、といった作用機序が考えられる。本実験において生細胞数を計測した結果、SPH 添加により細胞数の減少が確認できなかったことから、③アポトーシスを誘導して細胞数を減らすことでの骨粗鬆症改善効果の可能性は低いと考えている。また、RANKL を添加することで TRAP 活性は増加するが、RANKL 存在下で SPH を添加しても TRAP 活性の有意な減少は認められなかった。TRAP 活性を持つ単核前破骨細胞への分化を阻害していないことから、成熟破骨細胞に分化する際の細胞融合を阻害している可能性が示唆された。

## 第4章 破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解物の再分画物による分化抑制効果

### 1. はじめに

第3章において、SPHの骨粗鬆症改善効果が成熟破骨細胞分化抑制によるものであることが明らかとなった。しかし、SPHのどのような成分が破骨細胞分化抑制効果を示すかを検証する必要があると考える。そこで、本章では、SPHを再分画し、どのような成分が破骨細胞分化抑制効果を持つのかを検証することを計画した。

生理活性ペプチドの単離、同定に関する研究は、分析機器の進歩に伴い近年盛んに行われている。アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有するペプチドとして、コラーゲン加水分解物中のGly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Pro(Saiga *et al.*, 2008)、マグロ肉加水分解物中のGly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-Pro-Lys-Thr-Lys-Asp-Thr-Pro(Lee *et al.*, 2010)、甲イカ加水分解物中のVal-Tyr-Ala-Pro、Val-Ile-Ile-PheおよびMet-Ala-Trp(Balti *et al.*, 2010)の単離、同定の報告がある。試験試料を酵素により加水分解し、逆相クロマトグラフィーで分離し、生物活性としてアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を測定することで活性成分を単離している。活性成分の同定は、エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)により質量を測定後、N-末端アミノ酸配列を確定することで同定を行っている。本章でも、SPHを逆相クロマトグラフィーにより分画し、活性成分の確認を成熟破骨細胞分化抑制効果で検証を行い、各種機器分析を行うことで活性成分の同定を検証することを計画した。

### 2. 実験材料および方法

#### 2.1 実験材料および試薬

BALB/cマウスの腹水由来マクロファージ細胞株であるRAW 264細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した。ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質(PSN Antibiotic Mixture)はLife Technologies社製を、 $\alpha$ -MEM培地はSIGMA社製を用いた。

その他の試薬は、和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。

シャークプロテイン加水分解物(SPH)およびコッドプロテイン加水分解物(CPH)は、第 2 章 2.2.1 の方法に準じて調製した。

## 2.2 加水分解物の再分画

### 2.2.1 逆相クロマトグラフィーによる分画法

SPH および CPH に含まれるペプチドを逆相クロマトグラフィーで分画した。

試料を 10 mg 正秤し、超純水を 500  $\mu$ l 加えた後、5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液(A 溶離液)を 500  $\mu$ l 加えた。さらに 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過し、25 $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分画を行った。分画条件は以下の通りである。

- ・ カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D,15 cm (東ソー社製)
- ・ 流速: 1.0 ml/min
- ・ A 溶離液: 5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・ B 溶離液: 50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・ グラジェント条件: 0 分 A 溶離液 100%、0~18 分 B 溶離液 0→30%、  
18 分 B 溶離液 30→100%、18~23 分 B 溶離液 100%、23 分 B 溶離液 100→0%、  
23~28 分 B 溶離液 0%
- ・ カラム温度: 40°C
- ・ 検出: UV-215 nm

比較的大きなピークが 6 つ検出されたため、それらをポリスチレン ラウンド・チューブ (BD Falcon 社製)で 16 回分取し、真空遠心機により乾固した(P1-6 画分)。

### 2.2.2 分画物のアミノ酸分析法

SPH 分画物のアミノ酸組成を比較するため、第 1 章 2.2.2 の方法を改変し、アミノ酸分析を行った。

SPH 分画物を超純水 400 $\mu$ l に溶解し、20 $\mu$ l ダーラム管に移した後、6N 塩酸を 300 $\mu$ l 入れたサンプルビンにダーラム管を入れた。サンプルビンを真空にし、150 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。その後、ダーラム管を取り出し、真空遠心機により乾固した。スタンダード溶液 20  $\mu$ l(アミノ酸混合標準溶液 H 型 10  $\mu$ l、5  $\mu$ mol/ml Pro、5  $\mu$ mol/ml Hyp、2.5  $\mu$ mol/ml Hyl 溶液 10 $\mu$ l) は別のダーラム管に取り、真空乾固した。遊離アミノ酸分析として、SPH 分画物を 20  $\mu$ l ダーラム管に取り、真空乾固した。

試料に、メタノール：トリエチルアミン：超純水=7: 2: 1 に調整した混合液を 10  $\mu$ l 加えて真空乾固した。この操作を 3 回繰り返した。遊離アミノ酸分析のみ 1 回行った。次いで、メタノール：トリエチルアミン：超純水：フェニルイソチアネート=7: 1: 1: 1 からなる誘導化液を 20  $\mu$ l 加え、20 分間室温密閉状態で誘導化した後、真空乾固した。3%アセトニトリル/50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0、A 溶離液)を 500  $\mu$ l 加えた後、超音波で結晶を破碎した。0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過後、50  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分析を行った。

- ・カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D,15 cm
- ・流速: 1.0 ml/min
- ・A 溶離液: 3%アセトニトリル/ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)
- ・B 溶離液: 60%アセトニトリル溶液
- ・グラジエント条件: 0 分 A 溶離液 100%、0~15 分 B 溶離液 0 $\rightarrow$ 70%、  
15~25 分 B 溶離液 70 $\rightarrow$ 100%、25~26 分 B 溶離液 100%、26~28 分 B 溶離液 0%
- ・カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
- ・検出 : UV-254 nm

### 2.2.3 分画物の質量測定法

P6 画分の質量を MS/MS(esquire 6000-15: BRUKER DALTONICS 社製)を使用し、測定した。

P6 画分を超純水 400  $\mu$ l に溶解し、50  $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で再分画を行った。

分画条件は以下の通りである。

- ・ カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D,15 cm
- ・ 流速: 1.0 ml/min
- ・ A 溶離液: 5%アセトニトリル/ 0.1%ギ酸溶液
- ・ B 溶離液: 50%アセトニトリル/ 0.1%ギ酸溶液
- ・ グラジエント条件: 0分 A 溶離液 100%、0~18分 B 溶離液 0→30%、  
18分 B 溶離液 30→100%、18~23分 B 溶離液 100%、23分 B 溶離液 100→0%、  
23~28分 B 溶離液 0%
- ・ カラム温度: 40°C
- ・ 検出: UV-215 nm

精製した P6 画分を MS/MS の electrospray ionization mass spectrometry(ESI-MS)で質量を測定した。測定条件は以下の通りである。

- ・ Polarity: Positive
- ・ Mass Range Mode: Std/Enhanced
- ・ Scan Begin: 50 m/z
- ・ Scan End: 500 m/z
- ・ インジェクト流速: 24  $\mu$ l/min
- ・ Target Mass: 205 m/z

測定した結果を Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4 および BioTools Version 3.0 で解析した。

#### 2.2.4 ペプチドシーケンサーによる N 末端構造解析法

Procise492HT (Applied Biosystems 社製)を用いて、エドマン分解(Edman, 1949; Hunkapiller & Hood, 1983)を行い、N-末端のアミノ酸分析を行った。

## 2.2.5 SPH の遊離 Trp 濃度測定法

Trp は、塩酸加水分解によるアミノ酸分析では、分解されてしまい検出できない。そのため遊離 Trp 濃度を逆相クロマトグラフィーにより測定した。

試料 10 mg を正秤し、超純水を 500  $\mu$ l 加えた後、5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液(A 溶離液)を 500  $\mu$ l 加えた。さらに 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過し、10 $\mu$ l を HPLC LC8020 Model II 装置で分析を行った。スタンダードとして、Phe(2.5  $\mu$ mol/ml) および Trp(2.5  $\mu$ mol/ml)を使用した。また、分画物が遊離アミノ酸かどうかを確認するために Val、Met、Ile、Leu をそれぞれ逆相クロマトグラフィーにより分析した。分析条件は以下の通りである。

- ・カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D,15 cm
- ・流速: 1.0 ml/min
- ・A 溶離液: 5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・B 溶離液: 50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液
- ・グラジエント条件: 0分 A 溶離液 100%、0~18分 B 溶離液 0→30%、  
18分 B 溶離液 30→100%、18~23分 B 溶離液 100%、23分 B 溶離液 100→0%、  
23~28分 B 溶離液 0%
- ・カラム温度: 40°C
- ・検出: UV-215 nm

## 2.3 RAW264 細胞の破骨細胞分化における SPH 分画物の影響

### 2.3.1 細胞培養法

RAW264 細胞を 96 well plate に  $8 \times 10^2$  cells/well になるように播種し、10%FBS、1%抗生物質を含む  $\alpha$ -MEM 培地 200  $\mu$ l 中で 5%CO<sub>2</sub>、37°C で 24 時間培養し、破骨細胞分化因子 (RANKL) を 50 ng/ml を添加した。さらに、エストラジオール(E<sub>2</sub>)  $1 \times 10^{-8}$  M または SPH 分画物を本章 2.2.2 の結果より総アミノ酸重量が 1  $\mu$ g/ml になるよう加えた。1 日おきに半分

量の 100  $\mu\text{l}$  を培地交換し、7日間培養した。また、SPH の分画物について、 $1.15 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $1.15 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 $1.15 \times 10^{-2} \text{ M}$  の濃度になるように調製し、添加実験を行った。

### 2.3.2 TRAP 染色法

第3章 2.3.4 と同様の方法で TRAP 陽性細胞数を計測した。

## 2.4 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 3 により統計処理を行った。全てのデータは一元配置の分散分析(ANOVA)、次いでダネットの多重比較検定により解析した。

## 3. 結果

### 3.1 分画物の同定

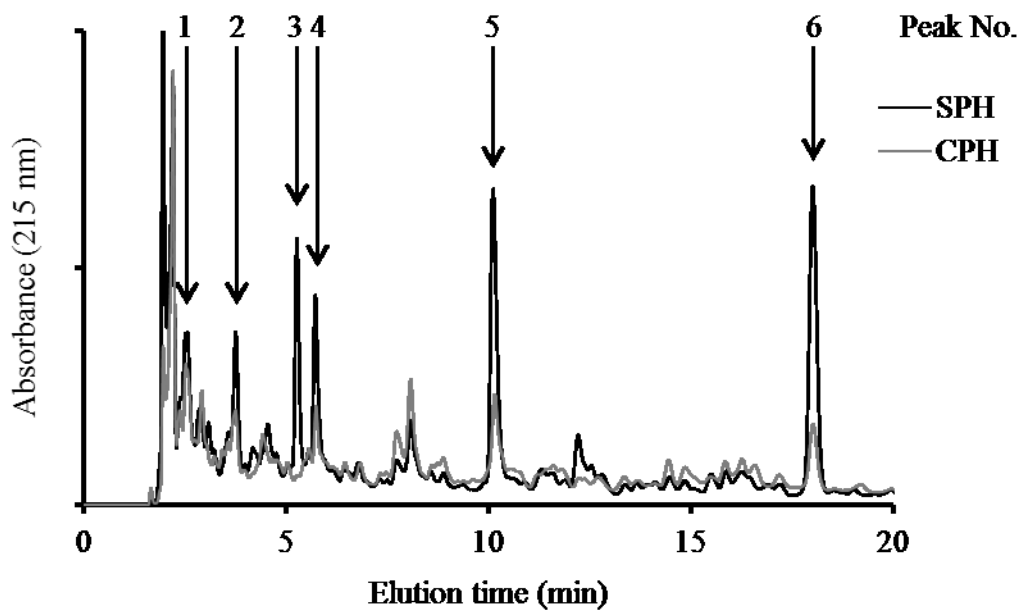
SPH および CPH の逆相クロマトグラムを Figure 14 に示した。SPH の溶出パターンは、CPH に似ているが、各ピークの面積が大きいものであった。また、5.2 分のピークは SPH 特有のものであった。そこで、SPH を逆相クロマトグラフィーにより 6 つに分画した。ピーク番号は、Figure 14 に示した。分画したピーク(P1-6 画分)のアミノ酸組成を Table 15 に、遊離のアミノ酸組成を Table 16 に示した。

P1 画分は、遊離 Val 濃度が  $3.72 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、総アミノ酸に含まれる Val の濃度が  $5.99 \mu\text{g/ml}$  と同程度の濃度であった。よって、P1 画分には遊離の Val が含まれていることが分かった。しかし、ピークの分離が不十分であったため他のアミノ酸やペプチドが多く検出された。

P2 画分は、遊離 Met 濃度が  $29.20 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、総アミノ酸に含まれる Met の濃度が  $28.46 \mu\text{g/ml}$  と同程度の濃度であった。よって、P2 画分には遊離の Met が含まれていることが分かった。

P3 画分は、遊離 Ile 濃度が  $14.02 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、総アミノ酸に含まれる Ile の





**Figure 14** SPHおよびCPHの逆相クロマトグラム

矢印は、分画したピークの番号を示した。

カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D., 15 cm

流速: 1.0 ml/min

A溶離液: 5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液

B溶離液: 50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液

グラジエント条件: 0分A溶離液 100%、0~18分B溶離液 0→30%、

18分B溶離液 30→100%、18~23分B溶離液 100%、

23分B溶離液 100→0%、23~28分B溶離液 0%

カラム温度: 40°C

検出: UV-215 nm

**Table 15 SPH分画物のアミノ酸組成**

<b>Concentration of amino acid (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>
Aspartic acid/Asparagine	4.66	4.26	1.86	1.33	3.86	1.20
Glutamic acid/Glutamine	15.88	14.70	2.06	3.68	7.20	1.62
Hydroxyproline	0.52	0.13	0.00	0.00	0.26	0.13
Serine	5.25	1.79	0.84	0.74	4.31	0.63
Glycine	5.70	3.00	1.58	1.58	5.10	1.13
Histidine	2.48	0.78	0.31	0.31	0.47	0.00
Arginine	5.22	8.35	2.09	0.87	1.91	0.52
Threonine	5.83	2.26	2.02	0.95	1.90	0.48
Alanine	8.72	5.25	1.25	2.05	1.60	0.62
Proline	3.91	4.03	1.50	1.15	2.76	1.15
Tyrosine	0.00	0.00	0.72	5.61	2.53	0.91
Valine	5.99	10.11	2.39	0.80	3.59	0.80
Methionine	0.00	28.46	1.64	1.19	0.75	0.15
Cysteine	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isoleucine	0.00	2.10	11.79	7.21	6.81	0.79
Leucine	0.00	0.13	2.49	73.75	10.35	1.44
Hydroxylysine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine	0.00	0.00	0.00	0.00	95.70	0.66
Lysine	10.80	3.21	0.73	1.02	4.38	0.58
<b>Total</b>	<b>75.08</b>	<b>88.54</b>	<b>33.26</b>	<b>102.23</b>	<b>153.48</b>	<b>12.79</b>

**Table 16 SPH分画物の遊離アミノ酸組成**

<b>Concentration of amino acid (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>
Aspartic acid/Asparagine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glutamic acid/Glutamine	1.76	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00
Hydroxyproline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Serine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Glycine	0.08	0.00	0.08	0.00	0.08	0.08
Histidine	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arginine	1.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Threonine	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Alanine	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Proline	0.35	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00
Tyrosine	0.00	0.00	0.00	3.80	0.00	0.00
Valine	3.72	1.60	0.00	0.67	0.27	0.00
Methionine	0.00	29.20	0.15	0.45	0.00	0.00
Cysteine	0.00	0.00	0.00	0.00	4.48	0.00
Isoleucine	0.00	0.00	14.02	3.01	0.26	0.26
Leucine	0.00	0.00	0.00	68.64	0.66	0.00
Hydroxylysine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
Phenylalanine	0.00	0.00	0.00	0.00	93.89	0.00
Lysine	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Total</b>	<b>9.65</b>	<b>30.80</b>	<b>14.50</b>	<b>76.57</b>	<b>99.62</b>	<b>0.60</b>

濃度が 11.79  $\mu\text{g/ml}$  と同程度の濃度であった。よって、P3 画分には遊離の Ile が含まれていることが分かった。

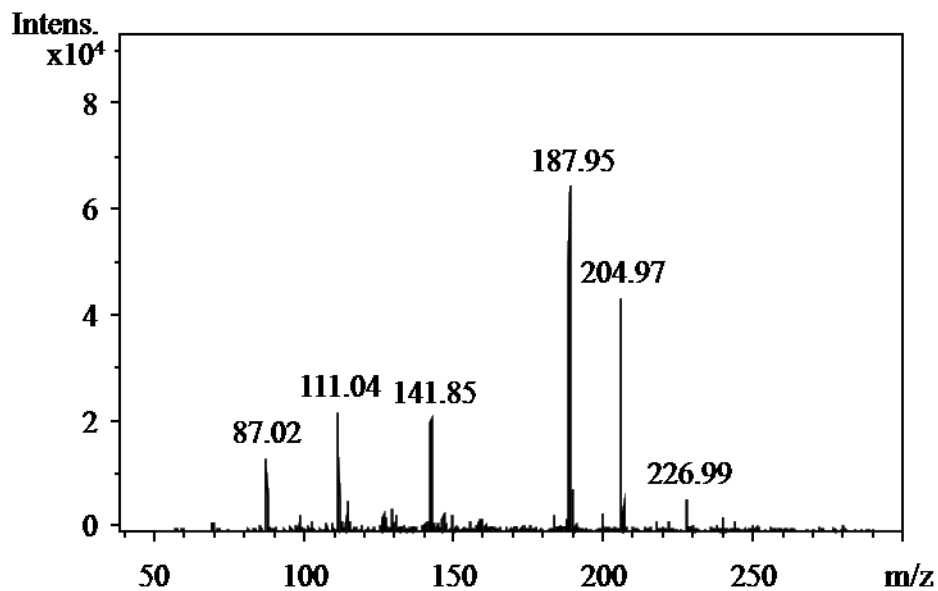
P4 画分は、遊離 Leu 濃度が 68.64  $\mu\text{g/ml}$  であったのに対し、総アミノ酸に含まれる Leu の濃度が 73.75  $\mu\text{g/ml}$  と同程度の濃度であった。よって、P4 画分には遊離の Leu が含まれていることが分かった。

P5 画分は、遊離 Phe 濃度が 93.89  $\mu\text{g/ml}$  であったのに対し、総アミノ酸に含まれる Phe の濃度が 95.70  $\mu\text{g/ml}$  と同程度の濃度であった。よって、P5 画分には遊離の Phe が含まれていることが分かった。

P6 画分は、遊離アミノ酸が 0.60  $\mu\text{g/ml}$  とほとんど検出されなかったことからアミノ酸が数個つながったペプチドであるのではないかと考えられる。

そこで、分離した P6 画分を MS/MS(ESI-MS)を使用し、質量を測定した結果を Figure 15 示した。[M+H]<sup>+</sup> の値において 187.95 および 204.97 m/z が検出された。そのため、P6 画分の質量は 186.94 および 203.96 Da が考えられた。ジペプチドではないかと予想したが、アミノ酸分析の結果、アミノ酸総量が 12.79  $\mu\text{g/ml}$  と他の分画物に比べ非常に低い値となっていた(Table 15)。また、塩酸加水分解のアミノ酸分析では検出できない Trp のモル質量は、204.23 g/mol であり、近い値であった。

そこで、P6 画分について、ペプチドシーケンサーによる N 末端構造解析を行った。その結果、P6 画分は、Trp であることが示された。P1、P2、P3、P4、P5 および P6 画分の主成分として考えられた Val、Met、Ile、Leu、Phe、Trp を逆相クロマトグラフィーにより分析し、溶出時間が同じであるか検証した(Figure 16)。その結果、P1 画分の溶出時間が 2.5 分だったのに対して、Val が 3.1 分であった。また、P2 画分の溶出時間が 3.7 分だったのに対して、Met が 3.7 分であった。また、P3 画分の溶出時間が 5.2 分だったのに対して、Ile が 5.3 分であった。また、P4 画分の溶出時間が 5.7 分だったのに対して、Leu が 5.8 分であった。また、P5 画分の溶出時間が 10.0 分だったのに対して、Phe が 9.9 分であった。また、P6 画分の溶出時間が 17.9 分だったのに対して、Trp が 17.9 分であった。それぞれ若干の差



Molecular Mass [M+H] <sup>+</sup>	Abosolute Abundance	Relative Abundance
187.95	65055	100.00
204.97	44255	68.03
111.04	22655	34.82
141.85	20720	31.85

Figure 15 P6画分の質量分析  
 Polarity: Positive  
 Mass Range Mode: Std/Enhanced  
 Scan Begin: 50 m/z  
 Scan End: 500 m/z  
 インジェクト流速: 24  $\mu$ l/min  
 Target Mass: 205 m/z

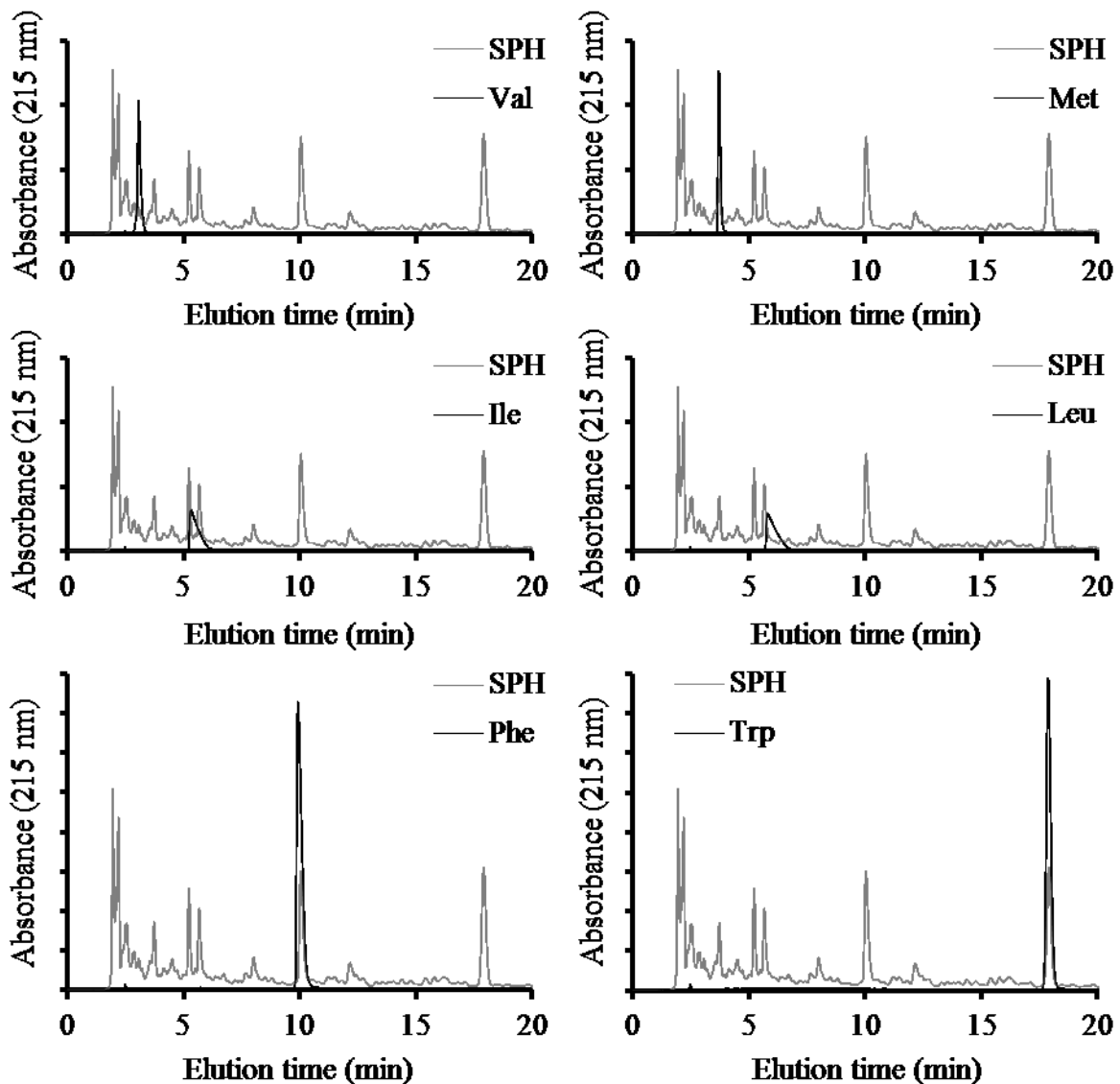


Figure 16 アミノ酸の逆相クロマトグラム

カラム: TSKgel ODS-80TsQA 4.6 mm I.D., 15 cm

流速: 1.0 ml/min

A溶離液: 5%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液

B溶離液: 50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸溶液

グラジエント条件: 0分A溶離液 100%、0~18分B溶離液 0→30%、  
18分B溶離液 30→100%、18~23分B溶離液 100%、  
23分B溶離液 100→0%、23~28分B溶離液 0%

カラム温度: 40°C

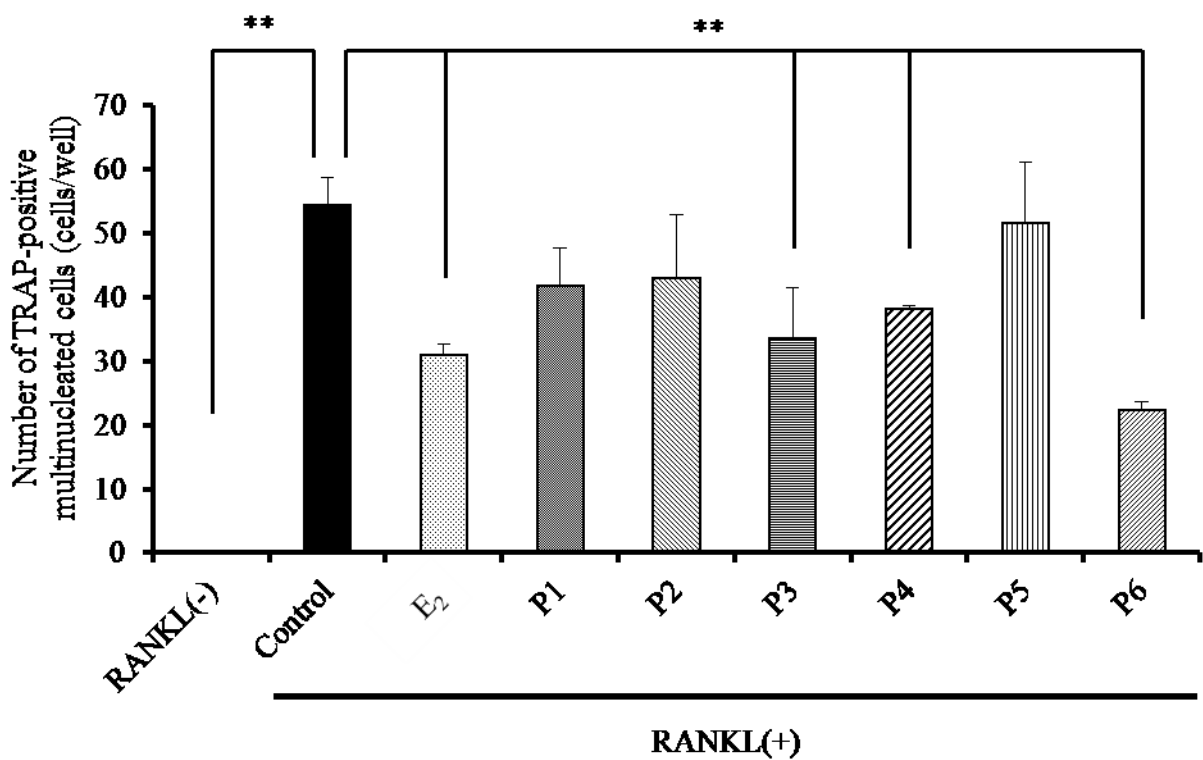
検出: UV-215 nm

はあるが、これは、単一のピークであるためにカラム吸着への若干の影響が出ているのではないかと考えられる。そのため、P1、P2、P3、P4、P5 および P6 画分は、それぞれ Val、Met、Ile、Leu、Phe および Trp が含まれると確認できた。

P6 画分が Trp と分かったことから SPH および CPH に含まれる遊離 Trp の濃度を測定した。アミノ酸分析より既知の値が分かっている遊離 Phe を内部標準とした。SPH 中に含まれる遊離 Trp 濃度は、 $3.97 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、CPH が  $0.81 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった。内部標準とした SPH および CPH 中の Phe の濃度は、それぞれ  $19.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $6.03 \mu\text{g}/\text{mg}$  であったのに対し、第 2 章 Table 9 では、それぞれ  $21.05 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $9.93 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった。これを基準とし、SPH および CPH に含まれる遊離 Trp 濃度を計算した。SPH 中に含まれる遊離 Trp 濃度は、 $4.32 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、CPH が  $1.33 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった。この結果、SPH に含まれる遊離 Trp 濃度は、CPH に比べ約 3.3 倍含まれていることが認められた。

### 3.2 RAW264 細胞の破骨細胞分化における SPH 分画物の影響

RANKL 刺激によって誘導される破骨細胞分化に対する  $E_2$  および SPH 分画物(P1-6 画分)の影響を Figure 17 に示した。RANKL(-)群が  $0.0 \pm 0.0$  cells/well に対して、RANKL Control 群は、 $54.6 \pm 4.2$  cells/well と有意な増加を認めた。RANKL  $E_2$  群、RANKL P1 群、RANKL P2 群、RANKL P3 群、RANKL P4 群、RANKL P5 群および RANKL P6 群は、 $31.0 \pm 1.7$  cells/well、 $41.9 \pm 5.9$  cells/well、 $43.0 \pm 9.8$  cells/well、 $33.7 \pm 7.8$  cells/well、 $38.2 \pm 0.5$  cells/well、 $51.8 \pm 9.3$  cells/well、 $22.4 \pm 1.2$  cells/well であった。RANKL Control 群に比べ、RANKL  $E_2$  群、RANKL P3 群、RANKL P4 群および RANKL P6 群で成熟破骨細胞数の有意な減少が認められた。そのため、P3、P4、P6 の Ile、Leu、Trp が効果を示していることが示唆された。しかし、P6 については、塩酸加水分解で分解される Trp であることから、総アミノ酸量が  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で添加できなかつたため、Trp の直接的効果とは言えない可能性がある。そのため、次にそれぞれのアミノ酸で分化抑制効果が認められるか検証した。



Data are shown as means  $\pm$  SD., n=3.

**\*\***, Significant difference from RANKL(+) Control group at  $P < 0.01$ .

Figure 17 RAW264細胞に対する分画物の破骨細胞分化への影響



### 3.3 RAW264 細胞の破骨細胞分化におけるアミノ酸の影響

RANKL 刺激によって誘導される破骨細胞分化に対する Ile、Leu、Phe および Trp の影響を Figure 18 に示した。RANKL(-)群が  $0.0 \pm 0.0$  cells/well に対して、RANKL Control 群では、 $42.7 \pm 10.5$  cells/well と有意な増加を認めた。

Ile 刺激群である RANKL Ile( $1.15 \times 10^{-4}$  M)群、RANKL Ile( $1.15 \times 10^{-3}$  M)群および RANKL Ile( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群は、 $29.4 \pm 8.8$  cells/well、 $27.9 \pm 2.5$  cells/well および  $30.4 \pm 5.0$  cells/well であった。RANKL Control 群に比べ、全ての濃度の添加群で成熟破骨細胞数の有意な減少が認められた。

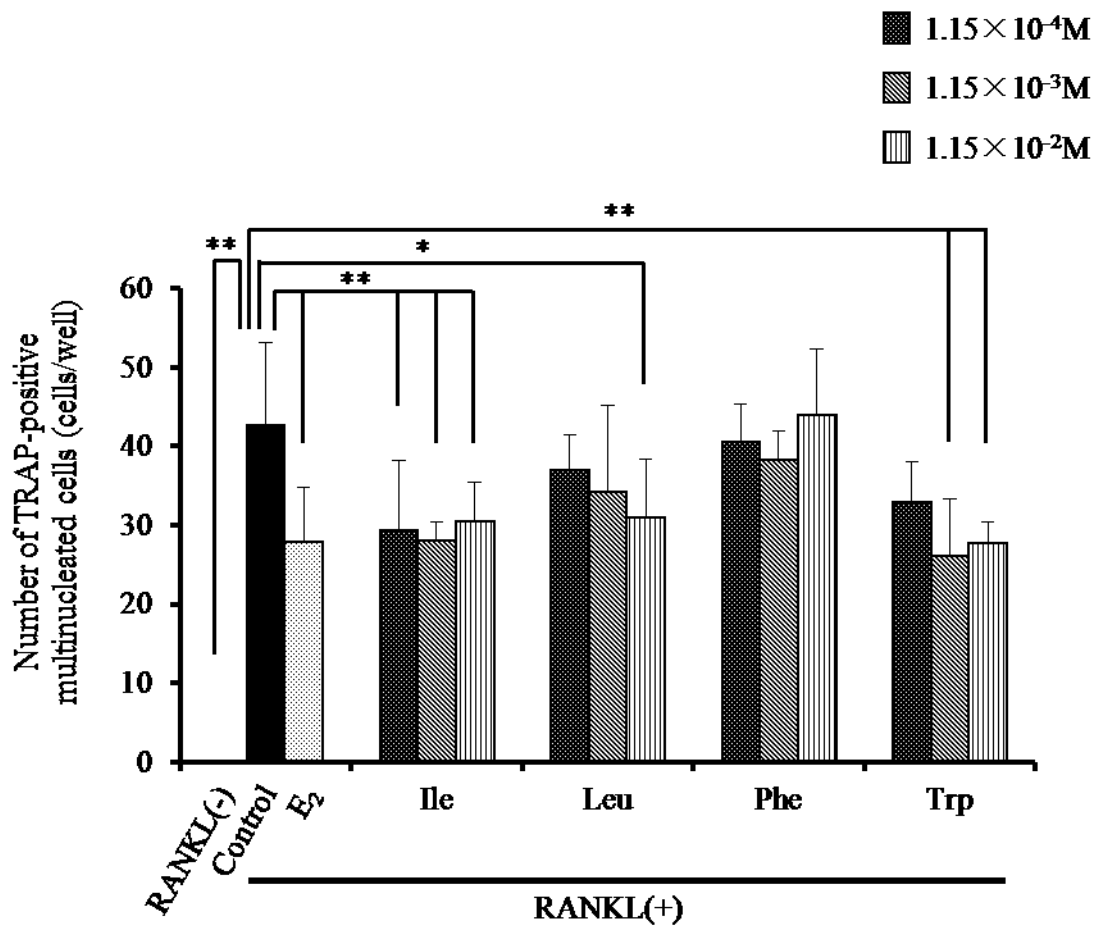
Leu 刺激群である RANKL Leu( $1.15 \times 10^{-4}$  M)群、RANKL Leu( $1.15 \times 10^{-3}$  M)群および RANKL Leu( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群は、 $36.9 \pm 4.6$  cells/well、 $34.1 \pm 11.1$  cells/well および  $30.9 \pm 7.4$  cells/well であった。RANKL Control 群に比べ、RANKL Leu( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群で成熟破骨細胞数の有意な減少が認められた。

Phe 刺激群である RANKL Phe( $1.15 \times 10^{-4}$  M)群、RANKL Phe( $1.15 \times 10^{-3}$  M)群および RANKL Phe( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群は、 $40.4 \pm 4.9$  cells/well、 $38.2 \pm 3.6$  cells/well および  $43.9 \pm 8.4$  cells/well であった。RANKL Control 群に比べ、全ての濃度の添加群で有意な差は認められなかった。

Trp 刺激群である RANKL Trp( $1.15 \times 10^{-4}$  M)群、RANKL Trp( $1.15 \times 10^{-3}$  M)群および RANKL Trp( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群は、 $32.9 \pm 5.2$  cells/well、 $26.1 \pm 7.2$  cells/well および  $27.7 \pm 2.7$  cells/well であった。RANKL Control 群に比べ、RANKL Trp( $1.15 \times 10^{-3}$  M)群および RANKL Trp( $1.15 \times 10^{-2}$  M)群で成熟破骨細胞数の有意な減少が認められた。

## 4. 考察

SPH の逆相クロマトグラムは、CPH と非常に似たものであるが、各溶出ピークの面積の大きいものであった(Figure 14)。SPH の 5.2 分の溶出ピークは、CPH では検出できておらず、SPH 特有のものであった。魚肉の主要タンパク質は、アクチンやミオシンであり、筋肉層を被覆している筋漿膜の主要タンパク質はコラーゲンである。サメ肉は、マダラ肉に



Data are shown as means  $\pm$  SD., n=6.

\*, \*\*, Significant difference from RANKL(+) Control group at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Figure 18 RAW264細胞に対するアミノ酸の破骨細胞分化への影響

比べ筋が多いという特徴があるが、本実験では極力筋を除いたことから、酵素分解物の組成が似たものになっている。しかし、部分的なアミノ酸配列の違いや酵素抵抗性の違いがあることから、逆相クロマトグラムも異なってくる。本実験でも P3 画分のように SPH 特有のピークを検出できた。これは、基本的な構造は類似していても、酵素により分解される部分が多少異なり、溶出パターンが異なると考えられる。

逆相クロマトグラフィーにより 6 つに分画した SPH の再分画物の総アミノ酸組成と遊離アミノ酸組成を比較したところ、P1、P2、P3、P4 および P5 画分は Val、Met、Ile、Leu および Phe であることが分かった(Table 15&16)。

また、P6 画分については、遊離アミノ酸の検出がほとんど無かったことから、ペプチドである可能性が示唆された。そこで、質量分析を行った結果、P6 画分の質量は 203.96 Da であった。ジペプチドではないかと予想したが、アミノ酸総量が 0.101  $\mu\text{g/ml}$  と他の分画物に比べ非常に低い値であった(Table 15)。また、塩酸加水分解のアミノ酸分析では検出できない Trp のモル質量は、204.23 g/mol であり、近い値であった。そこで、P6 画分について、ペプチドシーケンサーによる N 末端構造解析を行った。その結果、Trp であることが分かった。

また、逆相クロマトグラフィーで Trp を分析したところ、P6 画分と同じ溶出時間に Trp が検出できたことから、Trp であることが確認できた(Figure 16)。その濃度を測定した結果、SPH に含まれる遊離 Trp 濃度は、CPH に比べ約 3.3 倍含まれていることが認められた。

次に RAW 264 細胞を用いて成熟破骨細胞分化に対する SPH の再分画物の影響を検証した。成熟破骨細胞分化抑制実験の結果、SPH の再分画物の P3、P4、P6 で RANKL 誘導性破骨細胞分化を有意に抑制した(Figure 17)。よって、Ile、Leu、Trp が効果を示すことが示唆された。しかし、Trp については、細胞添加時に Trp であることが分かっていなかったため非常に濃い濃度で添加してしまった。そのため、破骨分化抑制には、最も効果を示しているように見えるが実際には疑問が残る。そこで、Ile、Leu および Trp の濃度を変えて成熟破骨細胞分化抑制実験を行った。その結果、全てにおいて、破骨細胞分化抑制が認

められた(Figure 18)。

Ile および Leu については、分岐鎖アミノ酸(Branched chain amino acid: BCAA)として知られている。BCAA は、他に Val があり、必須アミノ酸である。BCAA は、経口摂取することで、運動中の筋肉消耗を低減させる有効性が示唆されている(MacLean *et al.*, 1994)。これは、BCAA が筋肉や心臓、脳、肝臓そして他の組織が直接利用しうる有効なエネルギー源であることから、骨格筋でエネルギーとして使われ、筋肉の分解を防ぐと考えられている。また、BCAA は、3 つをバランス良く取ることが望ましいとされている(清水 *et al.*, 2006)。しかし、本研究では、Ile および Leu において、成熟破骨細胞への分化阻害効果を認めている。もし、BCAA が破骨細胞のエネルギー源となっていると考えれば、破骨細胞の分化が促進されると考えられる。そのため、Ile および Leu は、エネルギー源としてではなく、破骨細胞に存在する何らかの受容体の相互作用により分化抑制効果が認められたと考えている。

Trp については、成長期のラットにおいて Trp を欠乏させると骨量減少が起こることが報告されている(Sibilia *et al.*, 2009)。また、体内において Trp から生合成される神経伝達物質であるセロトニンの皮下注射による骨密度の増加および骨強度の向上が報告されている(Gustafsson *et al.*, 2006B)。その効果は、骨芽細胞から産生される RANKL の減少と破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテジェリン(osteoprotegerin: OPG)産生の促進であり、骨芽細胞を介して破骨細胞の分化抑制を報告している(Gustafsson *et al.*, 2006A)。一方で RANKL 誘導による破骨細胞では、セロトニントランスポーター発現が増加し、セロトニンを破骨細胞に直接添加すると分化が促進されることが報告されている(Battaglino *et al.*, 2004)。しかし、本研究では、Trp が破骨細胞に直接作用し、成熟破骨細胞分化を抑制していることを認めた。そのため、Trp がセロトニントランスポーターに何らかの作用を示す可能性が示唆された。

本章の結果より、SPH による破骨細胞抑制効果は、Ile、Leu および Trp である可能性が示唆された。しかし、その作用機序には、不明な部分が多く、今後はその作用機序の解明

が必要である。

## 総括

サメはマグロ延縄漁において混獲されており、ヒレのみを得た後、フィニングされている。サメの商品価値はヒレに依存しており、それ以外の部分は重要視されてこなかった。わが国において、サメは大部分が利用されているが、魚体の 50%を占めるサメ肉(シャークプロテイン)の価格が安価であることから、その高付加価値化が望まれている。そこで、シャークプロテインの高付加価値化を目的として、閉経後骨粗鬆症改善効果について以下の検証を行った。

卵巣摘出(OVX)ラットへのシャークプロテイン投与による骨密度改善効果の検証、OVXラットへのシャークプロテイン加水分解物投与による骨密度改善効果の検証、破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解による分化抑制効果の検証および破骨細胞へのシャークプロテイン加水分解の再分画物による分化抑制効果の検証を行った。

閉経後骨粗鬆症モデルの OVX ラットに対してシャークプロテイン投与による骨密度改善効果を検証した結果、DEXA による大腿骨骨密度測定において、近位部および遠位部で骨密度を増加させることが示された。また、X 線 CT による大腿骨骨密度測定により、近位部は、皮質骨の骨密度の増加によるものであり、遠位部は、海綿骨の骨密度の増加によるものであった。よって、シャークプロテインが閉経後骨粗鬆症改善に有効であることが示唆された。次に、シャークプロテイン中の骨粗鬆症抑制効果をもつ生理活性ペプチドの探索を行うため、シャークプロテインを酵素により加水分解し、シャークプロテイン低分子加水分解物(SPH)を調製した。OVX ラットに対して SPH 投与による骨密度改善効果を検証した結果、DEXA による大腿骨骨密度測定において、遠位部の骨密度を増加させることが示された。そのため、劇的ではないが SPH が閉経後骨粗鬆症改善に有効であることが明らかになった。骨密度の増減は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスの変化によって引き起こされる。そこで、SPH が骨吸収に関与する破骨細胞に直接的な効果を示しているかを検証するために、骨髄細胞および RAW 264 細胞を用いて破骨細胞分化抑制実験を行った。その結果、SPH は、活性型ビタミン D 誘導性破骨細胞分化および

RANKL 誘導性破骨細胞分化を有意に抑制した。しかし、分子量の異なる High および Middle の有意な抑制は認められなかったことから、破骨細胞分化抑制効果を示すのは、SPH 中に含まれる低分子成分が関与している可能性が示唆された。そこで、SPH 中のどの成分が破骨細胞分化抑制効果を持つのか検証するため、逆相クロマトグラフィーにより 6 つに分画 (P1-6 画分) し、破骨細胞分化抑制実験を行った。その結果、P3、P4 および P6 画分の構成成分である Ile、Leu および Trp が破骨細胞の分化を抑制することを認めた。よって、シャークプロテインは Ile、Leu および Trp を含むことで、骨質を高めるものと考えられる。

以上の結果より、シャークプロテインには、閉経後骨粗鬆症の改善効果を示す機能性食品として期待できる。

## 引用文献

- Ammann, P., Rizzoli, R., Slosman, D., & Bonjour, J. P. (1992). Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy x-ray absorptiometry. *J Bone Miner Res*, 7(3), 311-316.
- Aoki, K., Saito, H., Itzstein, C., Ishiguro, M., Shibata, T., Blanque, R., Mian, A. H., Takahashi, M., Suzuki, Y., Yoshimatsu, M., Yamaguchi, A., Deprez, P., Mollat, P., Murali, R., Ohya, K., Horne, W. C., & Baron, R. (2006). A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest*, 116(6), 1525-1534.
- Balti, R., Nedjar-Arroume, N., Adje, E. Y., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *J Agric Food Chem*, 58(6), 3840-3846.
- Battaglino, R., Fu, J., Spate, U., Ersoy, U., Joe, M., Sedaghat, L., & Stashenko, P. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res*, 19(9), 1420-1431.
- Chabeaud, A., Dutournie, P., Guerard, F., Vandanjon, L., & Bourseau, P. (2009). Application of response surface methodology to optimise the antioxidant activity of a saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. *Mar Biotechnol (NY)*, 11(4), 445-455.
- Conte, A., de Bernardi, M., Palmieri, L., Lualdi, P., Mautone, G., & Ronca, G. (1991). Metabolic fate of exogenous chondroitin sulfate in man. *Arzneimittelforschung*, 41(7), 768-772.
- Conte, A., Volpi, N., Palmieri, L., Bahous, I., & Ronca, G. (1995). Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittelforschung*, 45(8), 918-925.
- Dai, S., Hirayama, T., Abbas, S., & Abu-Amer, Y. (2004). The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J Biol Chem*, 279(36), 37219-37222.



- Dittmer, J. C., & Lester, R. L. (1964). A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J Lipid Res*, 5, 126-127.
- Edman, P. (1949). A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem*, 22(3), 475.
- Feher, A., Koivunemi, A., Koivunemi, M., Fuchs, R. K., Burr, D. B., Phipps, R. J., Reinwald, S., & Allen, M. R. (2010). Bisphosphonates do not inhibit periosteal bone formation in estrogen deficient animals and allow enhanced bone modeling in response to mechanical loading. *Bone*, 46(1), 203-207.
- Folsom, A. R., & Demissie, Z. (2004). Fish intake, marine omega-3 fatty acids, and mortality in a cohort of postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 160(10), 1005-1010.
- Geelen, A., Schouten, J. M., Kamphuis, C., Stam, B. E., Burema, J., Renkema, J. M., Bakker, E. J., van't Veer, P., & Kampman, E. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Epidemiol*, 166(10), 1116-1125.
- Grasser, W. A., Pan, L. C., Thompson, D. D., & Paralkar, V. M. (1997). Common mechanism for the estrogen agonist and antagonist activities of droloxifene. *J Cell Biochem*, 65(2), 159-171.
- Guo, H. Y., Jiang, L., Ibrahim, S. A., Zhang, L., Zhang, H., Zhang, M., & Ren, F. Z. (2009). Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutr*, 139(5), 958-964.
- Gustafsson, B. I., Thommesen, L., Stunes, A. K., Tommeras, K., Westbroek, I., Waldum, H. L., Slordahl, K., Tamburstuen, M. V., Reseland, J. E., & Syversen, U. (2006A). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem*, 98(1), 139-151.
- Gustafsson, B. I., Westbroek, I., Waarsing, J. H., Waldum, H., Solligard, E., Brunsvik, A., Dimmen, S., van Leeuwen, J. P., Weinans, H., & Syversen, U. (2006B). Long-term serotonin administration leads to higher bone mineral density, affects bone architecture, and leads to

- higher femoral bone stiffness in rats. *J Cell Biochem*, 97(6), 1283-1291.
- He, K., Song, Y., Daviglus, M. L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A. R., & Greenland, P. (2004). Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation*, 109(22), 2705-2711.
- Heaney, R. P., Recker, R. R., & Saville, P. D. (1978). Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med*, 92(6), 964-970.
- Hunkapiller, M. W., & Hood, L. E. (1983). Protein sequence analysis: automated microsequencing. *Science*, 219(4585), 650-659.
- Huttunen, M. M., Pekkinen, M., Ahlstrom, M. E., & Lamberg-Allardt, C. J. (2007). Effects of bioactive peptides isoleucine-proline-proline (IPP), valine-proline-proline (VPP) and leucine-lysine-proline (LKP) on gene expression of osteoblasts differentiated from human mesenchymal stem cells. *Br J Nutr*, 98(4), 780-788.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., & Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 53(16), 6531-6536.
- Je, J. Y., Park, P. J., Kwon, J. Y., & Kim, S. K. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J Agric Food Chem*, 52(26), 7842-7845.
- Kalu, D. N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*, 15(3), 175-191.
- Kim, H. J., Park, J. B., Lee, J. K., Park, E. Y., Park, E. A., Riew, K. D., & Rhee, S. K. (2008). Transplanted xenogenic bone marrow stem cells survive and generate new bone formation in the posterolateral lumbar spine of non-immunosuppressed rabbits. *Eur Spine J*, 17(11), 1515-1521.

- Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem*, 22, 366.
- Lane, I. W. (1991). Shark cartilage: Its potential medical applications. *Journal of the Advance of Medicine*, 4(4), 263-271.
- Lane, I. W., & Contreras, E. (1992). High rate of bioactivity (reduction in gross tumor size) observed in advanced cancer patients treated with shark cartilage material. *J Neuropathol Med*, 3, 45-47.
- Lee, A., & Langer, R. (1983). Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science*, 221(4616), 1185-1187.
- Lee, S. H., Qian, Z. J., & Kim, S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.
- Lee, Y. S., Noguchi, T., & Naito, H. (1980). Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br J Nutr*, 43(3), 457-467.
- Liu, L., Wang, Y., Peng, C., & Wang, J. (2013). Optimization of the preparation of fish protein anti-obesity hydrolysates using response surface methodology. *Int J Mol Sci*, 14(2), 3124-3139.
- MacLean, D. A., Graham, T. E., & Saltin, B. (1994). Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am J Physiol*, 267(6 Pt 1), E1010-1022.
- Matsushita, H., Barrios, J. A., Shea, J. E., & Miller, S. C. (2008). Dietary fish oil results in a greater bone mass and bone formation indices in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, 26(3), 241-247.
- McAlindon, T. E., LaValley, M. P., & Felson, D. T. (2000). Efficacy of glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis. *Jama*, 284(10), 1241.

- Miyazaki, T., Matsunaga, T., Miyazaki, S., Hokari, S., & Komoda, T. (2004). Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 93(3), 503-512.
- Naito, H., Kawakami, A., & Imamura, T. (1972). In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(3), 409-415.
- Narva, M., Halleen, J., Vaananen, K., & Korpela, R. (2004). Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells in vitro. *Life Sci*, 75(14), 1727-1734.
- NIH Consensus Development Panel. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*, 285(6), 785-795.
- Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., & Kasugai, S. (2005). Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, 21(11-12), 1120-1126.
- Palmieri, L., Conte, A., Giovannini, L., Lualdi, P., & Ronca, G. (1990). Metabolic fate of exogenous chondroitin sulfate in the experimental animal. *Arzneimittelforschung*, 40(3), 319-323.
- Rahman, M. M., Bhattacharya, A., & Fernandes, G. (2008). Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol*, 214(1), 201-209.
- Raisz, L. G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, 115(12), 3318-3325.
- Richy, F., Bruyere, O., Ethgen, O., Cucherat, M., Henrotin, Y., & Reginster, J. Y. (2003). Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch Intern Med*, 163(13), 1514-1522.

- Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol*, 27(8), 1229-1241.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., & Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J Agric Food Chem*, 56(20), 9586-9591.
- Saintier, D., Khanine, V., Uzan, B., Ea, H. K., de Vernejoul, M. C., & Cohen-Solal, M. E. (2006). Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 99(4-5), 165-173.
- Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*, 42(5), 1641-1649.
- Sato, K., Tsukamasa, Y., Imai, C., Ohtsuki, K., Shimizu, Y., & Kawabata, M. (1992). Improved method for identification and determination of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 806-810.
- Shukla, A., Bettzieche, A., Hirche, F., Brandsch, C., Stangl, G. I., & Eder, K. (2006). Dietary fish protein alters blood lipid concentrations and hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in the rat model. *Br J Nutr*, 96(4), 674-682.
- Sibilia, V., Pagani, F., Lattuada, N., Greco, A., & Guidobono, F. (2009). Linking chronic tryptophan deficiency with impaired bone metabolism and reduced bone accrual in growing rats. *J Cell Biochem*, 107(5), 890-898.
- Skipski, V. P., & Barclay, M. (1969). Thin-layer chromatography of lipids. *Methods in enzymology*, 14, 530-598.
- Takada, Y., Kobayashi, N., Kato, K., Matsuyama, H., Yahiro, M., & Aoe, S. (1997). Effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J Nutr Sci Vitaminol*

(Tokyo), 43(2), 199-210.

- Tang, C. H., Chang, C. S., Tan, T. W., Liu, S. C., & Liu, J. F. (2010). The novel isoflavone derivatives inhibit RANKL-induced osteoclast formation. *Eur J Pharmacol*, 648(1-3), 59-66.
- Toba, Y., Takada, Y., Yamamura, J., Tanaka, M., Matsuoka, Y., Kawakami, H., Itabashi, A., Aoe, S., & Kumegawa, M. (2000). Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone*, 27(3), 403-408.
- Tsuchita, H., Goto, T., Shimizu, T., Yonehara, Y., & Kuwata, T. (1996). Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J Nutr*, 126(1), 86-93.
- Tsuchita, H., Suzuki, T., & Kuwata, T. (2001). The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium-fortified milk in growing rats. *Br J Nutr*, 85(1), 5-10.
- Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem*, 58(2), 835-841.
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O. A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mork, S., & Berge, R. K. (2004). Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J Nutr*, 134(6), 1320-1327.
- Woo, J. T., Kasai, S., Stern, P. H., & Nagai, K. (2000). Compactin suppresses bone resorption by inhibiting the fusion of pre-fusion osteoclasts and disrupting the actin ring in osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 15(4), 650-662.
- Woo, J. T., Nakagawa, H., Notoya, M., Yonezawa, T., Udagawa, N., Lee, I. S., Ohnishi, M., Hagiwara, H., & Nagai, K. (2004). Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts. *Biol Pharm Bull*, 27(4), 504-509.

- Yamaguchi, M., Katoh, S., Morimoto, C., Sakayama, K., Shiosaka, T., Masuno, H., & Okuda, H. (2002). The hormonal responses of lipoprotein lipase activity and lipolysis in adipose tissue differ depending on the stage of the estrous cycle in female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(5), 610-617.
- Yildiz, A., Sahin, I., Gol, K., Taner, Z., Uluturk, A., & Biberoglu, K. (1996). Bone loss rate in the lumbar spine: a comparison between natural and surgically induced menopause. *Int J Gynaecol Obstet*, 55(2), 153-159.
- Yoshimura, N., Muraki, S., Oka, H., Mabuchi, A., En-Yo, Y., Yoshida, M., Saika, A., Yoshida, H., Suzuki, T., Yamamoto, S., Ishibashi, H., Kawaguchi, H., Nakamura, K. & Akune, T. (2009). Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*, 27(5), 620-628.
- Yoshino, F., Yoshida, A., Sugiyama, S., Tokutomi, F., Miyamoto, C., Maehata, Y., Kobayashi, K., Wada-Takahashi, S., Maetani, T., Okada, E., Okada, Y., Komatsu, T., Takahashi, S., Wan, J., & Lee, M. C. (2011). Assessment of Anti-Aging Effects of Fish Products Peptide in Middle-Aged Subjects. *Anti-aging medicine*, 8(4), 48-52.
- 青木 虎吉. (1995). 骨と関節の健康科学: 放送大学教育振興会.
- 上原 万里子, 石見 佳子. (2011). 機能性食品素材の骨と軟骨への応用: シーエムシー出版.
- 海谷 篤. (1990). 天然スクアレン,スクアランの用途と最近の原料事情. *油化学*, 39(8), 525-529.
- 佐藤 健司. (2007). 大豆たん白質および大豆ペプチドの経口摂取により血中に移行するペプチドの分離と構造解析. *大豆たん白質研究*, 10, 120-123.
- 清水 俊雄, 志村 二三夫, 篠塚 和正. (2006). 機能性食品素材便覧: 特定保健用食品からサプリメント・健康食品まで (改訂増補版): 薬事日報社.
- 谷井 司, 加藤 順子, 八代 典子, 新藤 季佐, 幸野 健, 濱田 稔夫, 山口 武津雄. (1991). 乾

燥性皮膚疾患に対するスクワランの有用性, 皮膚刺激性および保湿性についての検討. *皮膚*, 33(2), 155-163.

寺本 貴則, 坂本 朱子, 戸田 登志也. (2000). 大豆イソフラボン含有飲料の摂取が尿中骨吸収マーカー量に及ぼす影響. *健康・栄養食品研究*, 3(2), 53-62.

日本医師会, 日本薬剤師会, 日本歯科医師会, 田中 平三, 門脇 孝, 篠塚 和正, 清水 俊雄, 山田 和彦, 石川 広己, 東洋 彰宏. (2011). 健康食品・サプリメント「成分」のすべて: ナチュラルメディシン・データベース: 日本健康食品・サプリメント情報センター.

日本油脂新報社. (1999). スクワラン 化粧品分野で再評価 新規用途は長期展望で. *油脂*, 52(8), 22-23.

野村 義宏, 遠藤 健一郎, 高橋 滉. (2013). サメの活用から気仙沼の復興を目指す. *生物工学会誌*, 91(5), 241-243.

松井 利郎, 川崎 晃一. (2000). 食品タンパク質由来機能性ペプチドによる血圧降下作用: イワシペプチド (Var-Tyr) による降圧食品の開発を中心として. *日本栄養・食糧学会誌*, 53(2), 77-85.

松本 俊夫. (1997). 骨シグナルと骨粗鬆症: 羊土社.

森井 浩世, 藤田 拓男. (1996). 骨粗鬆症 Q&A: 医薬ジャーナル社.

米田 俊之. (2002). 新しい骨のバイオサイエンス: 骨研究の HOT SPOT が疾患までまるごとわかる: 羊土社.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始、多大なるご指導、ご鞭撻を頂きました東京農工大学 農学部 教授 野村義宏 博士に深く感謝致します。

本学位論文作成にあたり、適切なお助言、ご鞭撻を頂きました東京農工大学 農学部 教授 西山敏夫 博士、ならびに宇都宮大学 農学部 教授 東徳洋 博士に深く感謝致します。

また、論文審査では、東京農工大学 農学部 教授 三浦豊 博士、ならびに茨城大学 農学部 准教授 長南茂 博士にご教示頂きました。心より感謝致します。

また、共同研究者として、研究遂行にご協力頂きました東京農工大学 農学部 渡部睦人 氏、株式会社 ホソカワ粉体技術研究所 清水健司 氏、株式会社 中華高橋 代表取締役社長 高橋滉 氏、萱場英晃 氏に深く感謝致します。

また、機器分析に際して適切なるご指導、ご協力を頂きました東京農工大学 工学部 教授 宮浦千里 博士、明治大学 農学部 講師 川口真以子 博士、東京農工大学 農学部 准教授 山形洋平 博士、山形典子 氏に感謝致します。

本研究室 卒業生 小池朋 氏、佐藤憲一 氏、河田紘史 氏、並木郷 氏ならびに 薦野裕加 氏には、ともに実験を行い、研究遂行にご協力頂きました。感謝致します。

本研究を行うにあたり、日々暖かく見守って下さいました応用蛋白質化学研究室の皆様へ感謝致します。

最後に、経済的、精神的に支えて下さいました家族に感謝致します。