

魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究—I

ラットにおけるイワシ筋肉・タチウオ筋肉・カゼイン

およびそれらペプチド画分の細胞性免疫能に及ぼす影響

末綱邦男*¹・前川敬世*²・陳 俊栄*³・山内文男*³

Studies on Biological Active Peptides Derived from Fish and Shellfish — I
Effects of Sardine Muscle, Hairtail Muscle, Casein
and Their Peptides on Cellular Immunologic Response in Rats

Kunio Suetsuna*¹, Keisei Maekawa*², Chen Jing-rong*³,
and Fumio Yamauchi*³

The effects of different type of the dietary proteins and peptides from sardine muscle, hairtail muscle and casein were investigated on the alveolar macrophages (AM) function, natural killer cells (NK) activity and response to mitogens (phytohemagglutinin; PHA, concanavalin A; Con A and bacterial polysaccharides; LPS) in rats. The phagocytosis of opsonized sheep red blood cells (SRBC) by AM of rats fed the sardine peptide diet was significantly higher than those of the other dietary groups. NK activities of rats fed the sardine and casein peptide diets were significantly higher than those of the other dietary groups. In splenocytes the responses to PHA, Con A and LPS were higher in the sardine and casein peptide dietary groups compared with those of the other dietary groups. These observations suggest that immunostimulating peptides would be present in sardine muscle and casein.

1 緒言

ヒトをはじめとするすべての動物は、常時、外界からの病原体や癌原物質の侵入にさらされている。さらに、癌抗原、細胞の破壊に伴う細胞内成分（異物的自己物質）

が出現する中で生存していくため、一連の生体防御機構を有しており、それらの中で免疫反応は最も重要な役割を果たしている。高齢化社会に向い老化に伴う生体防御能の低下で起こる感染症や癌の発生、進展の促進は必ずしも加齢と関連するものではなく栄養条件が深く関与し

水産大学校研究業績 第1416号, 1992年6月19日受付。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No.1416. Received June 19, 1992.

*¹ 水産大学校製造学科食品工学講座 (Laboratory of Food Engineering and Processing, Department of Food Science and Technology, Shimonoseki University of Fisheries)

*² 徳島大学医学部 (Faculty of Medicine, Tokushima University).

*³ 東北大学農学部 (Faculty of Agriculture, Tohoku University).

ている。栄養と免疫能との関係は古くから研究され多くの報告がある。中でも食餌性蛋白質の量と免疫能との関係が、蛋白質エネルギー栄養失調症 (protein energy malnutrition) を中心にヒト¹⁻⁴⁾ および実験動物^{5,6)} で広く研究されている。しかし、食餌性蛋白質の質すなわち食品中の必須アミノ酸の割合が免疫能に及ぼす影響についての報告は少ない。

一方、栄養異常状態では易感染性とか癌の発生、進展の促進がみられることから、宿主防御機構は生体の栄養状態に密接に関係していることが示唆され、種々の栄養状態における体液性ならびに細胞性免疫能についても研究されている。⁷⁾ 岸野らは、すでに低蛋白質食^{8,9)}、ビタミンB₆欠乏食¹⁰⁾、あるいは高ビタミンA食投与¹¹⁾による宿主細胞性免疫能、特に肺胞マクロファージ (AM) 機能の変化について検索し、これら種々の栄養状態下で AM 機能が亢進あるいは低下することを報告してきている。

今回、著者らは、摂餌蛋白質としてイワシ筋肉、タチウオ筋肉およびミルクカゼインを、あるいはこれら蛋白質の代わりにそれらから得られたペプチドに変えた場合の宿主細胞性免疫能、特にオプソニン化羊赤血球 (SRBC) に対する AM の貪食能、脾細胞のナチュラルキラー細胞 (NK) 活性、フォトヘマグルチニン (PHA)、コンカナバリン A (Con A) および細菌性リポポリサッカライド (LPS) 等のマイトジェンに対する反応性を *in vivo* で検討した。

2 実験方法

2.1 実験動物および飼料

特異的病原体が感染していない4週齢のフィッシャー系雄ラット (静岡実験動物株) を用い、Table 1 に示す6群の食餌を与え4週間飼育した。実験食群の蛋白質源として

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Concentrations (%)
Protein or peptide	15
Cornstarch	62
Soybean oil	8
Cellulose	10
Vitamin mixture*	1
Salt mixture*	4

*Prepared by Oriental Yeast Co. Ltd.

は、イワシ筋肉 (S)、タチウオ筋肉 (H) およびミルクカゼイン (C) を用いた。また蛋白質をペプチドに置き換えた実験食群として、イワシ筋肉由来ペプチド (SP)、タチウオ筋肉由来ペプチド (HP) およびカゼイン由来ペプチド (CP) を用いた。常法¹²⁾ によって分析したこれらの蛋白質およびペプチドの粗蛋白質量は、S; 82.6%, H; 90.3%, C; 90.8%, SP; 85.6%, HP; 91.9%, CP; 90.9% であった。また、既報の方法¹³⁾ に従って求めた、アミノ酸組成比を Fig. 1 に示し、さらにペプチドの分子量測定を行った。

各種ペプチドの調製は、イワシ *Sardinops melanosticta*、タチウオ *Trichiurus lepturus* の筋肉あるいはカゼインに2倍量の水を加えたホモジネイトを1N HCl で pH 2.0 に調整し、ペプシン (酵素番号 EC 3.4.23.1) 2% を添加し、37°C で20時間攪拌しながら加水分解を行った。分解反応液を直ちに限外ろ過膜 (アミコン膜 YM-10、分画分子量1万) に通過させ、通過液を強酸性陽イオン交換樹脂 Dowex50W カラム (H⁺型、50-100mesh、φ4.5×20cm) に加えた。カラムを脱イオン水で充分洗浄したのち、2N NH₄OH でペプチドを溶出した。減圧濃縮によりアンモニアを除去した濃縮液を、予め脱イオン水で平衡化した Sephadex G-25 カラム (medium、φ2.5×150cm) に通し、流速30ml/h、各分画量8.6ml でゲルろ過した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーして大量分取したペプチド画分 (分画分子量300~2000)¹³⁾ を凍結乾燥してペプチド粉末を調製した。

2.2 脾細胞、肺胞マクロファージ (AM) の調製

ネンブタール麻酔下でラットの右腎動脈を切断し、脱血後、無菌的に免疫担当臓器である脾臓および胸腺を摘出し、それぞれの重量を測定した。脾細胞は5%牛胎児血清を含む培地シャーレ内で滅菌したステンレススチールのスクリーンに脾臓を通し0.2%酢酸で希釈後、単離した脾細胞数を血球計算盤上で測定した。

ネンブタール麻酔下で動物の両腎動脈を切断し、脱血後開胸し、唾液腺および結合組織を除去した後、気管を露出させた。翼静針付注入セットのチューブを気管内に挿入、留置し、37°C で温めた生理食塩水約5ml で肺を洗浄し、ラット1匹当たり肺洗浄液50mlを得た。洗浄液を1800rpm で10分間遠心分離し、培地で任意に希釈後、血球計算盤で AM 数を測定した。5%牛胎児血清を含む日本製薬製 RPMI1640培地で AM の濃度が $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml になるよう調製後、各培養容器に1mlずつ加えた。

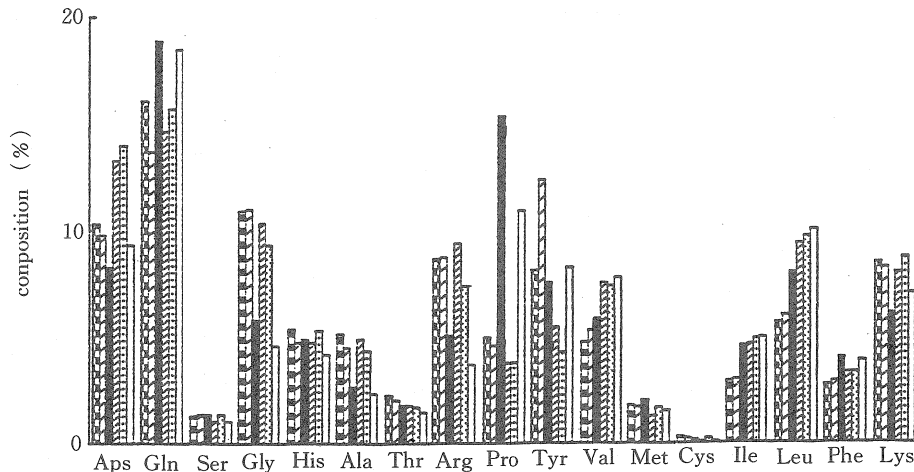


Fig. 1. Amino acid composition of proteins and peptides.

▨ ; Sardine peptide, ▧ ; Hairtail peptide,
 ■ ; Casein peptide, ▩ ; Sardine muscle,
 ▤ ; Hairtail muscle, □ ; Casein,

2.3 オプソニン化羊赤血球に対するAMの貪食能

抗血清を用いてオプソニン化後、7.4M Bqの⁵¹Crでラベルされた羊赤血球 (SRBC) をAMと2時間、37℃で培養することにより貪食を行わせた。AMに貪食されないSRBCは、蒸留水で溶血破壊しリン酸緩衝液で2回洗浄して除去した。その後、0.1N NaOH 0.1mlを加え、細胞を溶解後、Aloka社製ガンマカウンターARC-361型でAM内に貪食されたSRBCの放射能を測定した。

2.4 脾細胞のナチュラルキラー細胞(NK)活性

脾細胞(2×10⁶/ml)を7.4M Bqの⁵¹Crでラベルした腫瘍細胞(Moloney virus-induced T-cell lymphoma; YAC-1)を標的細胞とし、エフェクター細胞と標的細胞の比(E/T比)を100:1または200:1の割合で、37℃の5%CO₂ふ卵器内で4時間培養した。静置後上澄を採取し、ガンマカウンターARC-361型でその放射能を測定しNK活性としてPercent specific lysis (%lysis)を求めた。

2.5 脾細胞のマイトジェンに対する反応

96ウエルのマイクロタイタープレートに脾細胞5×10⁵cells/well加え、T細胞マイトジェンとしてPHA 0.25 μg/ml, Con A 10 μg/ml, B細胞マイトジェンとしてLPS 25 μg/mlとともに培養した。48時間培養後、370K Bqの[³H]-thymidineを各ウェルに加え、さらに24時間37℃で培養を続けた。放射性thymidineを取り込んだ脾細胞をフロー・ラボラトリー社製自動細胞ハーベスターでフィルター上に採取し室温で一晩放置後、シンチレーターと混和した。放射活性をAloka社製液体シンチレーションカウンターLSC-703型により測定した。結果はマイトジェンの刺激によって得られた強度(cpm)を、培地のみとの培養で得られた強度(cpm)と比較したStimulation index (SI)として示した。

2.6 統計学的処理

すべての測定値(1群当り6匹)について平均および標準偏差を求めt検定を行った。検定にあたっては、まず、ペプチド食投与群-蛋白質食投与群間(SP-S, HP-H, CP-C)

で検定を行い、さらに、ペプチド食投与群間 (SP-HP, HP-CP, CP-SP), 蛋白質食投与群間 (S-H, H-C, C-S) で検定を行った。

3 結果

3.1 体重および摂餌量

SP, HP, CP, S, HおよびCを含む飼料でラットを4週間飼育した時の体重変化および摂餌量を測定した結果、実験開始2週間までは体重変化に群間で有意差は認められず、いずれの群も順調な成長をしたが、2週間から4週間にかけてSP食群において成長の遅延がみられた。蛋白質食群に比べペプチド食群において成長の遅延がみられたことは摂餌量の変動と一致した。すなわち、実験開始2週間目から、蛋白質食群に比べペプチド食群において摂餌量の減少

傾向がみられ、特にSP食群での成長遅延が顕著であり、蛋白質—エネルギー栄養失調症 (protein energy malnutrition) の様相を呈した。

2および4週間飼育後のラット体重と、摂取蛋白質またはペプチド1g当りの体重増加量 (g), すなわち蛋白質利用効率 (protein efficiency ratio; PER) をFig.2に示した。この結果、2週間後の体重増加量についてはペプチド食群と蛋白質食群間に有意差がみられなかったが、PERについてはCP食群とC食群間に、また、C食群とH食群間において有意差がみられた。4週間後の体重増加量については、SP食群とS食群間にならびにHP食群とH食群間に有意差がみられた。すなわち、蛋白質食群に比べペプチド食群で成長の遅延がみられた。しかし、PERについては各群間で有意差がみられなかった。

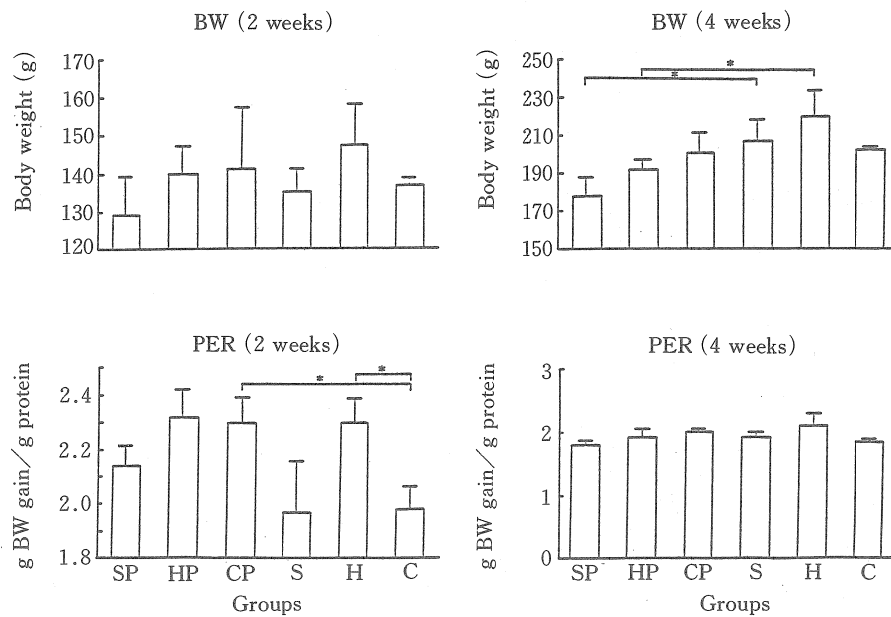


Fig. 2. Body weight (BW) and protein efficiency ratio (PER) in rats fed proteins and peptides.

SP; Sardine peptide, HP; Hairtail peptide, CP; Casein peptide, S; Sardine muscle, H; Hairtail muscle, C; Casein.

Significantly different from protein and peptide dietary groups

(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

3.2 脾細胞数および肺胞マクロファージ (AM) 数

臓器重量0.1g当りの脾細胞数と体重100g当りのAM数をFig. 3に示した。2週間飼育後のラット脾細胞数には有意差は認められなかったが、AM数は、C食群に比べCP食群で、また、C食群に比べH食群で有意に高い値を示した。4週間飼育後のラットの脾細胞数はC食群に比べCP食群で有意に高い値を示したものの、各食群間では有意差が認められなかった。AM数は各食群間で有意差が認められず、 6×10^7 cells/100g 体重前後のAMが肺洗浄によって得られた。

3.3 肺胞マクロファージ(AM)の貪食能

2および4週間飼育後におけるラットのオプソニン化羊赤血球 (SRBC) に対するAM貪食能をFig. 4に示した。2週間飼育後のAM貪食能は、SP食群とS食群間で有意差が認められ、ペプチド食群で高かった。また、SP食群とHP食群間、CP食群とHP食群で有意差が認められ、SP食群、CP食群ともにAM貪食能が高かった。4週間飼育後では、各食群間で有意差は認められなかった。

3.4 脾細胞のナチュラルキラー細胞 (NK) 活性

2および4週間飼育後におけるラット脾細胞のNK活性をFig. 5に示した。2週間飼育後の脾細胞のNK活性はSP食群とS食群間で有意差が認められ、ペプチド食群で高かった。4週間飼育後は、SP食群とS食群間で有意差が認められ、ペプチド食群で高かった。また、SP食群とHP食群間、CP食群とHP食群間で有意差を認め、SP食群、CP食群ともにNK活性が高かった。一方、C食群とS食群間でNK活性に有意差が認められ、C食群で高かった。

3.5 脾細胞のマイトジェンに対する反応

2および4週間飼育後における脾細胞のPHA, Con A およびLPSなどのマイトジェンに対する反応性をFig. 6に示した。4週間飼育後の脾細胞のPHAに対する反応性は、SP食群とS食群間、CP食群とC食群間において有意差を認めた。また、ペプチド食群間では、CP食群とSP食群間、CP食群とHP食群間において有意差を認め、CP食群は他のペプチド食群に比べマイトジェン(PHA)に

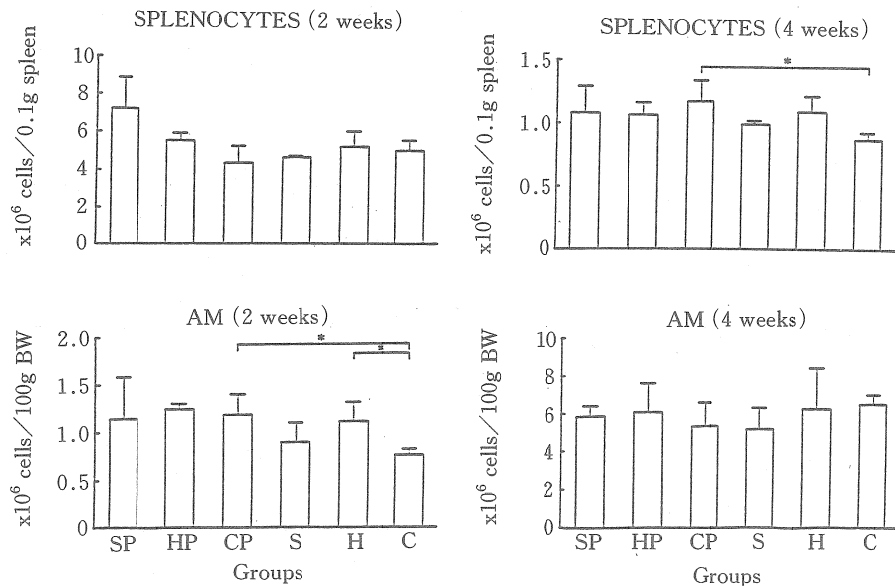


Fig. 3. Numbers of splenocytes and alveolar macrophages (AM).

The abbreviations of the groups were the same as legend in Fig. 2.

する高い反応性を持っていた。

4週間飼育後の脾細胞のCon Aに対する反応性は、CP食群とC食群間において有意差を認めた。また、ペプチド食群間では、CP食群とSP食群間、CP食群とHP食群間において有意差を認め、CP食群は他のペプチド食群に比べマイトジェン(Con A)に対する高い反応性を持っていた。

4週間飼育後の脾細胞のLPSに対する反応性は、CP食群とC食群間において有意差を認めた。また、CP食群とSP食群間、CP食群とHP食群間において有意差を認め、CP食群が他のペプチド食群に比べ高いマイトジェン(LPS)を持っていた。一方、S食群とC食群間でマイトジェン(LPS)に対する反応性に有意差がみられ、S食群で高かった。

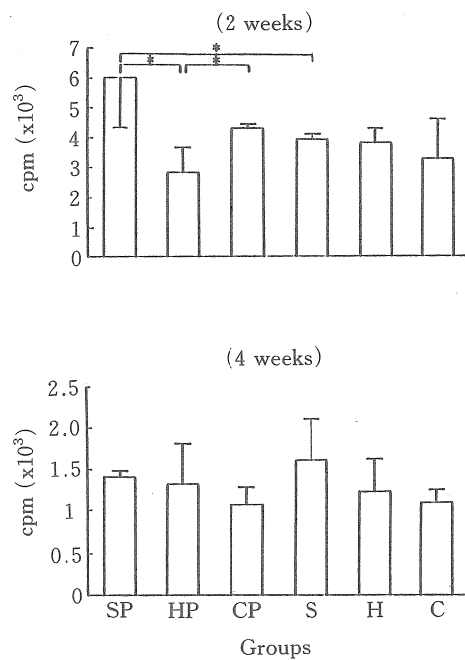


Fig. 4. Plagocytosis of opsonized SRBC by AM of rats fed proteins and peptides. The abbreviations of the groups were the same as legend in Fig. 2.

これらの結果、カゼインペプチド (CP) 食群は他のペプチド食群に比べて明らかに PHA, Con A, および LPS 等のマイトジェンに対する反応性が亢進し、イワシペプチド (SP) 食群もまた、有意差は見られなかったが同様の傾向を示した。また、蛋白質食群との比較においても、カゼインペプチド (CP)、イワシペプチド (SP) はマイトジェンに対する高い反応性を持っていた。

4 考 察

栄養と免疫能に関する研究は当初、栄養不良状態にある乳幼児を対象として始まったものであり、食餌中の蛋白質レベル、特に低蛋白質食投与時の宿主免疫能については多くの報告がある。^{14),15)}しかしながら、本研究のように、宿主細胞性免疫能への影響を食餌蛋白質の質の面について

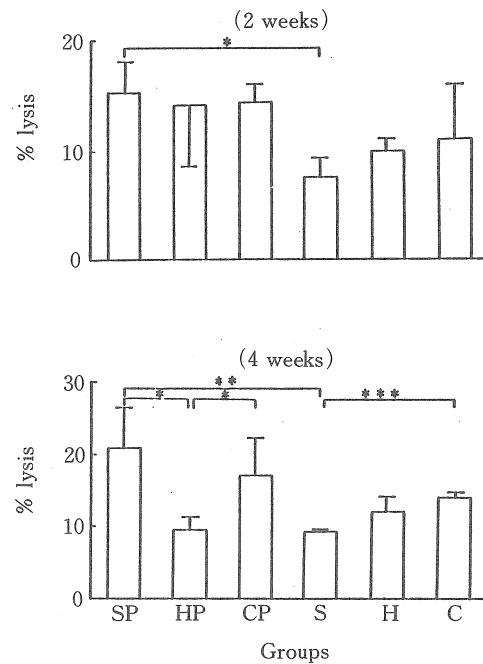


Fig. 5. Natural killer cells (NK) activity in rats fed proteins and peptides. The abbreviations of the groups were the same as legend in Fig. 2.

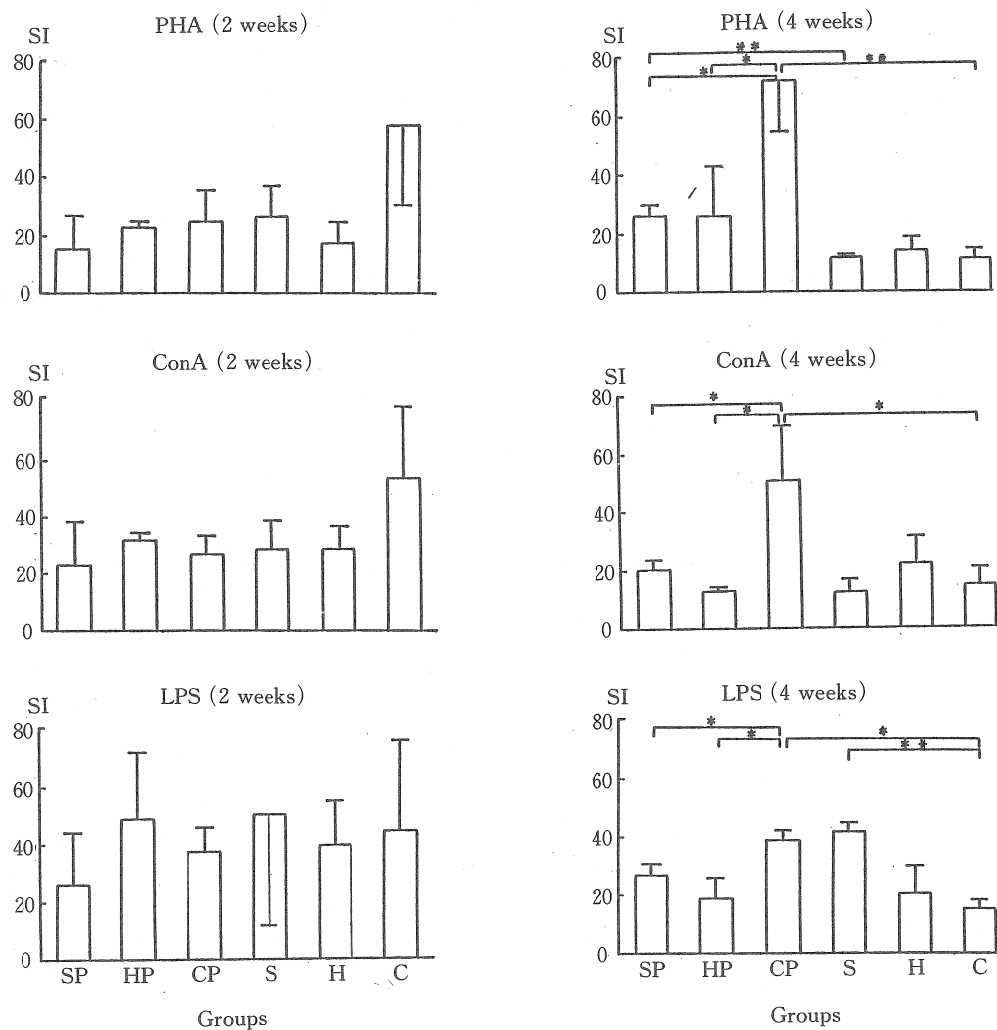


Fig. 6. Effect of PHA, Con A and LPS on mitogenesis of splenocytes. The abbreviations of the groups were the same as legend in Fig. 2.

検討した研究は少ない。Bounous らは¹⁶⁾食餌蛋白質源としてラクトアルブミン、カゼイン、大豆および小麦を用いて、各々20%レベルで3週間投与後のマウスにおける抗体産生細胞数およびPHA、Con A等のマイトジェンに対する脾細胞の応答能への影響を検索し、ラクトアルブミン投与によりいずれの機能も他の3群と比較し、有意に亢進したことを報告している。

本研究では、日本人の主な動物性蛋白質源である魚肉について、赤身魚としてイワシ筋肉、白身魚としてタチウオ筋肉を用い、酵素分解法によりエキスを調製し、さらに、限外ろ過、イオン交換樹脂カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した分画分子量300~2000をピークとし、大きいものは分子量5000から、小さいものは分子量200の範囲のペプチド分画を得た。¹³⁾同様の方法によりカ

ゼイン由来ペプチドを得た。各々ペプチド食を用いた動物実験により、これらペプチドの宿主免疫能の影響について検討した。

AMの食食は、蛋白質食群に比べてペプチド食群で一般に高く、なかでもイワシペプチド(SP)食群、カゼインペプチド(CP)食群は高かった。また、ラット脾細胞のNK活性は、SP食群ならびにCP食群で、蛋白質食群に比べて有意に高かった。さらに、PHA, Con A および LPS等のマイトジェンに対する脾細胞の反応性は、SPならびにCP食群で、蛋白質食群に比べて有意に高かった。特にCP食群においてマイトジェンに対する反応性が著しく高かった。これらのことは、ペプチド中のアミノ酸組成によるものと思われたが、Fig. 1に示すように、アミノ酸組成に大きな差異はなく、またペプチドの分子量分布¹³⁾にも大きな差異がみられないことから、ペプチドのアミノ酸配列の違いすなわち構造の違いが宿主免疫能へ影響を及ぼしていると考えられる。

近年、岩本¹⁷⁾は、マサバを酵素処理した分解物を健康人およびウサギに経口投与すると、末梢血リンパ球のCon A 刺激に対する幼若化反応が有意に上昇し、また、C57BL/6 マウスに経口投与すると抗体産生能が上昇することを報告している。また、藤原^{18,19)}は、食品微生物の菌体ならびにその脱脂乳培養上清を対象としたリンパ球幼若化能について報告している。さらに、D. Migliore-Samour²⁰⁾はトリプシン処理を行った乳カゼインから免疫賦活ペプチドとしてヘキサペプチドおよびトリペプチドを得ている。これらペプチドはマクロファージの食食能を賦活化することが知られ、これらのうちLeu-Leu-Tyrは抗体産生増強作用を併せもち、またGly-Leu-Pheは*Klebsiella pneumoniae*を感染させたマウスの生存率を高めることが報告されている。今回、SP食群ならびにCP食群において、脾細胞の細胞性免疫能が高まったことにより、イワシ、カゼインペプチド中に免疫賦活作用ペプチドが存在している可能性が考えられた。

5 要約

宿主細胞性免疫への影響を食餌蛋白質の質の面から検討する目的で、イワシ筋肉(SP)、タチウオ筋肉(HP)およびカゼイン由来ペプチド(CP)食で飼育したラットについて検討した。なお、蛋白質源としてイワシ筋肉(S)、タチウオ筋肉(H)およびカゼイン(C)食を各々対照とした。ペプチドの調製は、S, H および C ホモジネイトをペプシン分解(37°C, 20時間)したのち、限外ろ過、Dowex 50W (H⁺),

Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーして得られた分子量300-2000¹³⁾のペプチド画分を各々15%添加混餌食として4週間飼育した。摂餌量はSP食群で少なく、そのため体重増加も他の群に比し低い傾向を示していたが、蛋白質利用率(PER)は各群間に有意差は見られなかった。ラット肺胞マクロファージのオプソニン化羊赤血球に対する食食能は、SP食群で有意に高かった。また、ラット脾細胞のナチュラルキラー細胞活性は、SP, CP食群で有意に亢進した。さらに、ラット脾細胞のTおよびB細胞マイトジェン(PHA, Con A および LPS)に対する反応性は、SP, CP食群で有意に亢進した。この結果、イワシ筋肉およびカゼイン由来ペプチド中に免疫賦活ペプチドの存在することが推測された。

6 文献

- 1) D. N. McMurray, V. H. Rey, L. J. Casazza, and R. R. Watson: *Federation Proc.*, **35**, 588 (1976).
- 2) S. G. O. Johansson, T. Melbin, and B. Vahlquist: *Lancet*, **1**, 1118-1121 (1968).
- 3) L. Schlesinger and A. Stekel: *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 615-620 (1974).
- 4) D. G. Jose, and R. A. Good: *Cancer Res.*, **33**, 807-812 (1973).
- 5) H. McFarlane and J. Hamid: *Clin. Exp. Immunol.*, **13**, 153-164 (1973).
- 6) R. G. Bell and L. A. Halzell: *J. Exp. Med.*, **141**, 127-137 (1975).
- 7) A. A. C. Kores, A. E. Axwrod, E. C. Hamill, and D. J. South: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**, 322-326 (1976).
- 8) S. Moriguchi, S. Sone, and Y. Kishino: *J. Nutr.*, **113**, 40-46 (1983).
- 9) S. Moriguchi, S. Sone, K. Tachibana, and Y. Kishino: *Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 323-331 (1983).
- 10) S. Moriguchi and Y. Kishino: *J. Nutr.*, **114**, 888-893 (1984).
- 11) S. Moriguchi, L. Werner, and R. R. Watson: *Immunology*, **56**, 169-177 (1985).
- 12) 科学技術庁資源調査会編: 四訂日本食品標準成分表, 大蔵省印刷局, 東京, 1982, p. 20.
- 13) 末綱邦男: 食工誌, **37**, 7-14 (1990).
- 14) R. J. Dubos and R. W. Schaedler: *J. Exp. Med.*, **10**,

- 935~950 (1959).
- 15) P. M. Newberne, C. E. Hunt, and V. R. Young: *Brit. J. Exp. Pathol.*, **49**, 448~457 (1968).
- 16) G. Bounous, L. Letourneau, and P. A. L. Kongshavn: *J. Nutr.*, **113**, 1415~1421 (1983).
- 17) 岩本三憲・七條茂樹・藤原良一・本田順一・柴田英樹・倉田詠子・横山三男: *最新医学*, **44**, 2426~2430 (1989).
- 18) 藤原茂・門岡幸男・廣田哲二・中里薄志: *栄食誌*, **43**, 203~208 (1990).
- 19) 藤原茂・門岡幸男・廣田哲二・中里薄志: *栄食誌*, **43**, 327~333 (1990).
- 20) D. Migliore-Samour, F. Floc'h, and P. Jollès: *J. Dairy Res.*, **56**, 357~362 (1989).