

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02273

研究課題名(和文) 魚類コラーゲンペプチドの医療分野への応用をめざした研究

研究課題名(英文) Studies on the medical application of fish collagen peptides

研究代表者

都木 靖彰 (Takagi, Yasuaki)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：水産廃棄物から得られるコラーゲンペプチド(CP)を「床ずれ」治療もしくは予防用クリームに利用することを目的に、まずCP生産の原料となる精製コラーゲンおよび高純度ゼラチンの製造技術開発をおこなった。その後、酵素を用いて製造したCPを高温高压処理することでさらに低分子化できることを示すとともに、低分子化により抗酸化能が増すことを示した。しかし、高温高压処理によっては皮膚線維芽細胞に対する機能性は高まらず、むしろ長時間の処理によっては細胞遊走が阻害されたりCPの細胞増殖活性化能がなくなった。これらの結果から、適度な高温高压処理により抗酸化能が高く細胞活性化能を持つCPを合成できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の加工残渣に含まれるコラーゲンを分解したCPは様々な生物活性を持つことが知られる。しかし、これまでの研究は基本的に「食べて効く」ことを前提としているが、健康食品用CPが低価格であることが災いして輸入CPにおされ、残念ながら国産魚類由来CPの多くは商品化に失敗している。本研究成果は、国産魚類由来CPの商品化を実現するために必要な、高価な医療用CPの開発と体内で確実に機能することの証明(床ずれのような傷口からは投与したCPが直接体内に侵入するので高濃度で患部に届くことが期待できる)の第一歩となった。

研究成果の概要(英文)：Aiming to percutaneously apply collagen peptides (CPs) as the acute and chronic wound-healing accelerator, new collagen-purification and gelatin-extraction technologies that show excellent yield and collagen content were developed. Then, the effects of subcritical water treatment on antioxidant activity and fibroblast-activating activity of enzymatically hydrolyzed CPs were examined. The subcritical-water treatment further hydrolyzed enzymatically hydrolyzed CPs into smaller peptides and increased CPs' antioxidant activity. However, it did not change fibroblast (L929) migration and proliferation activities of enzymatically hydrolyzed CPs. The more extended treatment inhibited fibroblast migration and decreased CPs' proliferation-promoting activity. These data strongly suggest that the appropriate treatment with subcritical water makes enzymatically hydrolyzed CPs higher antioxidant activity, which is suitable for acute and chronic wound-healing accelerators.

研究分野：水産廃棄物の有効活用

キーワード：コラーゲンペプチド 水産廃棄物利用 創傷治療 褥瘡軽減

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類の加工副生物に含まれるコラーゲンを分解したコラーゲンペプチド(CP)の機能性に関しては、資源の有効活用の観点から研究が多数おこなわれ、CPが抗酸化、ACE抑制、糖吸収抑制、皮膚における抗UVやコラーゲン産生促進などの機能を持つことが主に *in vitro*, *in vivo* (実験動物, ヒト介入) の試験で報告された[]。これらの研究は基本的に経口摂取を前提としているが、CP摂取後 Hyp を持つ小分子量 CP が血液中に現れることも証明された[]。しかし、経口摂取 CP がヒトで機能をもつかに関しては未だに証明不十分とされ (http://www.sciencecomlabo.jp/healthy_food/collagen.html, 明治大学科学コミュニケーション研究所, 検索 H29 年 10 月 8 日), CP を機能性成分とする機能性表示食品の登録もわずか 1 件である (<https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>, 消費者庁・機能性表示食品制度届出データベース, 検索 H29 年 10 月 8 日)。この主たる原因は消化管におけるバリアーが CP の効率的な体内吸収を妨げることである。また、我が国で販売される多くの CP 原料が価格の観点から輸入原料由来であり (<http://www.genryoubank.com/>, 原料・受託バンク, 検索 H29 年 10 月 8 日), これまでの CP 研究は残念ながら当初目標である国産魚類由来副生物の有効活用にうまくつながっていない。国産魚類由来 CP の産業化には、高価な CP の利用法の開発と体内で確実に機能することの証明 (= 消化吸収を経ない投与方法の開発) が必要である。

2. 研究の目的

水産廃棄物から得られる CP を創傷・褥瘡治癒活性化剤として経皮的に投与することを前提として、

- (1) 医療分野での実用化を見据えた CP の効率的生産技術開発
- (2) 創傷・褥瘡治癒の加速化に寄与しうる抗酸化能をもつことの *in vitro* での証明
- (3) CP が創傷・褥瘡治癒に関与する線維芽細胞や、免疫細胞などの細胞遊走, 増殖, 機能の活性化能を持つことの *in vitro* での証明
- (4) CP がドレッシング材から十分に溶出して機能しうることの証明

をおこなう。創傷部からは投与した CP が直接体内に侵入するので、高濃度の CP が患部に届くことが期待できる。また、医療用原料の単価は高いので、実現すれば高価な CP の利用法となる。

3. 研究の方法

- (1) 医療分野での実用化を見据えた CP の効率的生産技術開発
- (2) 創傷・褥瘡治癒の加速化に寄与しうる抗酸化能をもつことの *in vitro* での証明
- (3) CP が創傷・褥瘡治癒に関与する線維芽細胞や、免疫細胞などの細胞遊走, 増殖, 機能の活性化能を持つことの *in vitro* での証明
- (4) CP がドレッシング材から十分に溶出して機能しうることの証明

4. 研究成果

- (1) 医療分野での実用化を見据えた CP の効率的生産技術開発

(i) CP の原料抽出技術の開発

CP 製造の原料となる精製コラーゲン、高純度ゼラチンの抽出方法を確立し、チョウザメ皮膚 (I 型コラーゲン) で従来法に比べて約 2 倍、脊索 (II 型コラーゲン) で従来法に比べて約 7 倍 (収率) の収率を達成した (収率はそれぞれ 56% と 32%, 乾重量ベース, [])。また、皮膚ゼラチンではコラーゲン含量約 99%, 収率 67% を達成した (表 1) []。

ゼラチン抽出技術をスケールアップすることで、産業レベルでの CP 生産が実現できると考えられた。

なお、これまでの多くの文献で、精製したコラーゲンから製造したコラーゲン含量 100% のペプチドのみならず、皮膚組織を酵素処理して得られたペプチドも CP (コラーゲン含量は定量されていない) と呼ばれていることから、本報告でも皮膚組織をまるごと処理して得られたペプチドも CP と呼ぶ。

(ii) ペプチド合成技術の開発

バッチ法による高温高压処理を用いて、皮膚組織そのもの、パパイン可溶性皮膚組織、パパイン可溶性精製皮膚コラーゲン、高純度皮膚ゼラチンから CP を合成することに成功した。HPLC を

表 1 チョウザメゼラチンの収率

原料	ゼラチン抽出の前処理	収率 (%)
チョウザメ頭部	酸	17.4±1.7
	酸	66.6±1.2
チョウザメ皮膚	アルカリ	19.4±0.8
	アルカリ → 酸	57.7±1.8

用いた CP の分子質量分布測定系を開発し、抗酸化および細胞活性化能を持つと考えられる低分子画分（分子質量 1 kDa 以下）の CP は、パパインを用いた酵素法では約 30%しか得られないのに対し、高温高压法では条件により 80%程度得られることを示した。また、複数回の高温高压法による CP 製造実験により、同等の分子質量分布と抗酸化能をもつ CP が再現性よく得られることを示した。加えて、以下に述べる細胞活性試験の結果とあわせ、本研究のバッチ処理条件では高温高压水処理時間は 15 分もしくは 30 分が適当であると決定した。しかし、新型コロナウイルスの拡がりによる研究室閉鎖の影響を受け、連続処理法による CP 作成には至らなかった（2021 年度に独自予算にて研究を進める予定であったが、2021 年 5 月の北海道における新型コロナウイルス拡大の影響で再び研究活動が停止している状態である）。

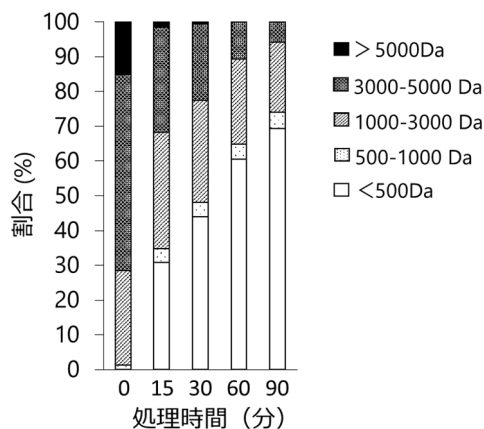


図 1 精製皮膚コラーゲン酵素処理 CP を高温高压処理した際の処理時間と CP の分子量の関係

(2) 創傷・褥瘡治癒の加速化に寄与しうる抗酸化能をもつことの *in vitro* での証明

DPPH および ABTS ラジカルに対する抗酸化能測定系を確立し、精製コラーゲンから製造したコラーゲン含量が高い CP よりも皮膚組織から製造したコラーゲン含量が低い CP の方が抗酸化能が高いことを証明した。また、チョウザメ頭部組織をまるごとペプチド化した CP で特に高い抗酸化能を示すことを明らかにした[]。このことから、高い抗酸化能を示す成分は非コラーゲン性物質であると考えられた。分子質量が小さい試料ほど抗酸化能は高く、高い抗酸化能を持つ CP の製造には酵素処理よりも高温高压処理の方が優れることも示した。また、高純度ゼラチンを原料にして酵素処理を経ることなく高温高压処理を施して製造した CP は、精製コラーゲンを酵素処理した後に高温高压処理を施して製造した CP に比べて ABTS ラジカル消去活性は 1.7 倍、DPPH ラジカル消去活性は約 9.4 倍高かった。すなわち、高温高压処理と酵素処理でペプチドの切断部位が異なり、製造される CP の抗酸化能が異なるものと推定された。

(3) CP が創傷・褥瘡治癒に關与する線維芽細胞や、免疫細胞などの細胞遊走、増殖、機能の活性化能を持つことの *in vitro* での証明

L929 マウス線維芽細胞を用いたスクラッチアッセイ法による遊走能試験と増殖試験法、ICR マウスから採取した腹腔マクロファージや Raw264.7 細胞を用いた貪食能試験法を確立し、以下の成果を得た。
 (i) L929 細胞遊走試験： 精製コラーゲンの酵素処理により製造した CP は細胞遊走に影響を与えないこと、それを高温高压処理して低分子化しても活性に変化がないこと、高温高压水で 90 分処理すると細胞遊走が阻害されること(図 2)を示した。また、皮膚組織の酵素処理により製造された CP では高温高压処理なしでも細胞遊走が阻害され、高温高压処理を施しても阻害効果は低減しなかった。このことから、皮膚組織中のコラーゲン以外の成分に細胞遊走を阻害する効果があること、その成分は高温高压処理で分解しないこと、長時間の高温高压処理ではさらに阻害物質が生成することが示された。これらの結果から、CP はコラーゲン純度の高い原料から合成しなければならず、長時間の高温高压処理もおこなえないことが明らかになった。

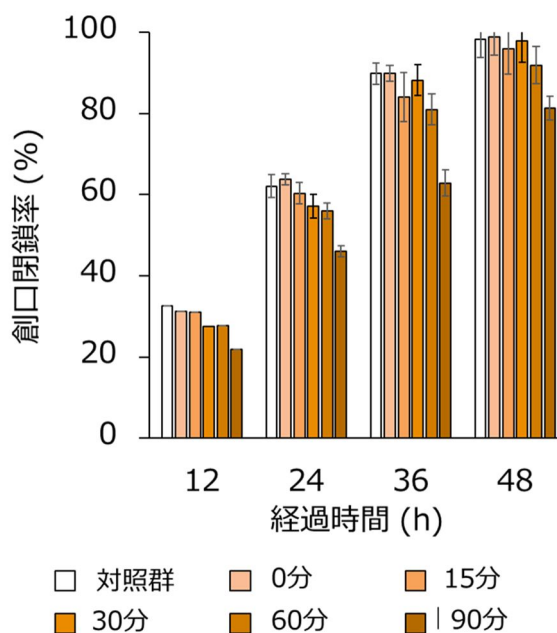


図 2 精製皮膚コラーゲン酵素処理 CP を高温高压処理した際の処理時間と細胞遊走率の関係

(ii) L929 細胞増殖試験： 精製コラーゲンの酵素処理により製造した CP が細胞増殖を活性化すること、それを高温高压処理して低分子化しても活性に変化がないこと、90 分間の処理では逆に増殖促進効果が失われることを明らかにした。皮膚組織の酵素処理により製造された CP の細胞増殖促進活性は精製コラーゲンから製造された CP よりも低いこと、60 分以上の高温高压処理で活性の喪失が著しいことを明らかにした。このことから、細胞増殖促進活性は主にペプチド化したコラーゲンが担っているものと考えられた。すなわち、細胞活性が高い CP の製造にはコラーゲン含量が高い原料を用いる必要があること、過度の高温高压処理はさける必要があることが明らかになった。

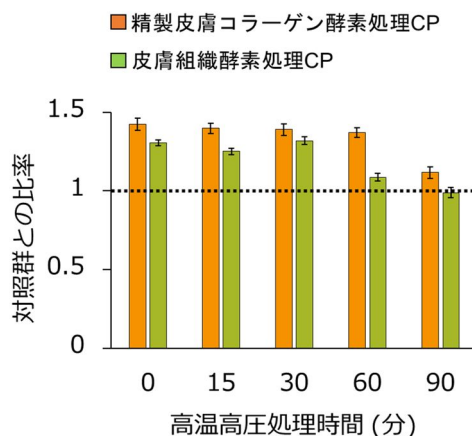


図 3 精製皮膚コラーゲン酵素処理 CP と皮膚組織酵素処理 CP を高温高压処理した際の処理時間と細胞増殖活性化能の比較 (対照群の細胞増殖値を 1 としたときの増殖活性で示す)

(iii) マクロファージを用いた貪食能試験： 精製コラーゲンの酵素処理により製造した CP がマクロファージ (Raw264.7) の大腸菌に対する貪食能を抑制することを発見した。この結果は、CP がマクロファージの過剰反応が起こるような病態 (関節炎など) の炎症を低減する可能性を示すものである。

(iv) 高温高压法で製造した CP が細胞増殖や細胞遊走の阻害効果を示す機構の解明： 既述のように、長時間高温高压処理を施して製造した CP は、細胞遊走を阻害し、細胞増殖活性を失った。高温高压処理を施した試料は茶褐色を示し、処理時間が長くなると色も濃くなった。このことから、高温高压処理により糖とアミノ酸が結合するメイラード反応がおこることが予想された。そこで、メイラード反応の中間産物量を示す波長 294 nm と最終生成物量を示す波長 420 nm の吸光度を測定したところ、高温高压処理時間が延びるほど両波長の吸光度が高くなることを発見した。このことから、高温高压処理により合成されるメイラード反応産物が細胞機能を阻害する可能性が示された。また、反応時間 30 分以上ではアミノ酸の一部が分解していることも明らかにした。細胞活性試験の結果とあわせ、本研究の条件では高温高压水処理時間は 15 分もしくは 30 分が適当であると決定した。

(4) CP がドレッシング材から十分に溶出して機能しうることの証明

新型コロナウイルスの拡がりによる研究室閉鎖の影響を受け、連続処理法による CP 作成には至らなかったため、溶出試験は実行できなかった。

< 引用文献 >

Venkatesan J, Anil S, Kim S-K, and Shim M (2017) Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: a review. *Mar Drugs*, 15: 143. doi: 10.3390/md15050143

Sibiilla S, Godfrey M, Brewer S, Budh-Raja A, and Genovese L (2015) An Overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies. *Open Nutraceut J*, 8: 29-42.

Meng D, Tanaka H, Kobayashi T, Hatayama H, Zhang X, Ura K, Yunoki S, and Takagi Y (2019) The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products. *Int J Biol Macromol*, 131: 572-580. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.091

Islam Md. R (2021) Studies on the industrial applications of gelatin and peptide produced from sturgeon by-products. Ph.D. Thesis, Hokkaido University.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Meng Dawei, Tanaka Hiroyuki, Kobayashi Taishi, Hatayama Hirotsuke, Zhang Xi, Ura Kazuhiro, Yunoki Shunji, Takagi Yasuaki	4. 巻 131
2. 論文標題 The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 572 ~ 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam Md. Rashidul, Yuhi Tomoharu, Ura Kazuhiro, Takagi Yasuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimization of Extraction of Gelatin from the Head of Kalamtra Sturgeon (Huso dauricus × Acipenser scherenkii × Acipenser transmontanus)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 6660 ~ 6660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app10196660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam Md. Rashidul, Yuhi Tomoharu, Meng Dawei, Yoshioka Takeya, Ogata Yumi, Ura Kazuhiro, Takagi Yasuaki	4. 巻 142
2. 論文標題 Purity and properties of gelatins extracted from the head tissue of the hybrid kalamtra sturgeon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 LWT Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 110944 ~ 110944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lwt.2021.110944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Meng D, Tanaka H, Kobayashi T, Zhang X, Ura K and Takagi Y
2. 発表標題 The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products.
3. 学会等名 11th Joint International Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT, HU, KU, ZGU and NUFE (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Islam Md R, Yuhi T, Meng D, Yoshioka T, Ura K and Takagi Y
2. 発表標題 A novel extraction method of gelatin from the head of Kalamtra sturgeon (Huso dauricus × Acipenser scherenkii × Acipenser transmontanus) with some properties.
3. 学会等名 11th Joint International Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT, HU, KU, ZGU and NUFE (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Islam Md R, Yuhi T, Meng D, Ura K and Takagi Y
2. 発表標題 Optimization of pretreatment and extraction conditions for gelatin using the head of Kalamtra sturgeon (Huso dauricus × Acipenser scherenkii × Acipenser transmontanus).
3. 学会等名 11th Joint International Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT, HU, KU, ZGU and NUFE (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 誠一郎 (Yoshida Sei-ichirou) (00806002)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・産業技術環境研究本部 工業試験場・研究職員 (80122)	
研究分担者	松嶋 景一郎 (Matushima Kei-ichirou) (10469679)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・産業技術環境研究本部 工業試験場・主査 (80122)	
研究分担者	柚木 俊二 (Yunoki Shunji) (20399398)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員 (82670)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	畑山 博哉 (Hatayama Hirotsuke) (80614552)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部バイオ応用技術グループ・副主任研究員 (82670)	
研究分担者	佐伯 宏樹 (Saeki Hiroki) (90250505)	北海道大学・水産科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	三輪 佳子 (小玉佳子) (Miwa Keiko) (90630476)	九州大学・工学研究院・特任助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	中国水産科学研究院長江水産研究所		