

乳由来血圧降下ペプチド素材の開発



①

②

カルピス株式会社 研究戦略部長 山本直之①
カルピス株式会社 発酵応用研究所次長 中村康則②

はじめに

乳酸菌で発酵した乳は、保存性に優れるだけでなく、健康にもよい飲み物として知られている。疫学的研究や実験的手法を通して、発酵乳または乳酸菌自体が、有用な機能を持つことが示されている。有用性に関しては、発酵乳は、寿命延長効果、ガンの進行抑制、インターフェロン産生促進、血中コレステロールレベルの減少、抗菌作用など、多くの有用な機能を持つことが報告されている。しかしながら、有効成分、作用機序およびヒトでの有用性に至る一連の関係について明らかにされた例は少なかった。われわれは、乳酸菌の菌種固有の性質上の特徴を活かした差別的な機能開発を実施した結果、*Lactobacillus helveticus* に特徴的な効果として血圧降下作用を見出し、その関与成分として2種の血圧降下ペプチド Val-Pro-Pro (VPP) および Ile-Pro-Pro (IPP) を発見した。両ペプチドを高生産する菌株の分離、さらに酵素法による乳蛋白質からの両ペプチドの効率生産に成功し、ここで開発したペプチド素材を用い、血圧分野における飲料開発からサプリメント開発、素材販売への展開が可能となり、今日に至っている。

本稿では、血圧降下ペプチドの発見、発酵による生産と実用化、酵素法による製造の確立と実用化、有用性の科学的な検証としてヒト試験による有用性と作用メカニズム解析、に関して

紹介する。

1. 発酵乳中の血圧降下ペプチド

さまざまな乳酸菌種の中で、*L. helveticus* は最も蛋白質分解活性が強く、発酵乳中に多くのペプチドを生産する。発酵乳内に高濃度に生産されるペプチドの保健効果に着目して、さまざまな機能探索をした結果、*L. helveticus* 発酵乳特異的な血圧降下作用を見出した(表1)。その作用には血圧上昇にかかわるアンジオテンシン変換酵素(ACE)を阻害する活性を有する2種のトリペプチド VPP および IPP が主要な役割を果たす事を明らかにした。VPP, IPP 配列は、 β および κ カゼインの配列にみられる。その後の乳酸菌蛋白分解酵素の解析から、複数の酵素の作用により産生されることがわかっている。また、プロリン残基を有するペプチドは分解酵素への耐性が強いことから、Pro-Pro 配列を有する両ペプチドは、これ以上の分解を受けず乳中に残存し、かつ、経口摂取した際に消化酵素による分解を受けにくいというアドバンテージとなっている。

2. 発酵技術の実用化

VPP, IPP を関与成分として含む *L. helveticus* 発酵乳のヒト試験における有効性実証を経て、特定保健用食品としての表示許可を取得し、1997年に「カルピス酸乳アミールS」を発売するに至った。当時、「カルピス酸乳アミールS」は乳酸菌発酵

表1 各種乳酸菌発酵乳の血圧降下作用とペプチド含量の評価

菌種	ペプチド量 (%)	プロティナーゼ活性 (U/ml)	ACE 阻害活性 (U/ml)	血圧降下値 (Δ mmHg)
control (milk) (Lactobacilli)	0.00	—	0	-5.0 \pm 7.3
<i>L. helveticus</i> CP790	0.19	230	58	-27.4 \pm 13.3**
<i>L. helveticus</i> CP611	0.25	367	70	-20.0 \pm 9.6**
<i>L. helveticus</i> CP615	0.18	420	51	-23.0 \pm 13.4**
<i>L. helveticus</i> JCM1006	0.15	182	26	-15.2 \pm 9.3*
<i>L. helveticus</i> JCM1120	0.10	112	34	-6.5 \pm 10.8
<i>L. helveticus</i> JCM1004	0.21	186	48	-29.3 \pm 13.6**
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CP973	0.19	105	22	-0.8 \pm 8.2
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002	0.11	124	28	-4.5 \pm 4.0
<i>L. casei</i> CP680	0.01	35	3	-0.2 \pm 6.6
<i>L. casei</i> JCM1134	0.00	28	9	-7.0 \pm 11.2
<i>L. casei</i> JCM1136	0.09	25	18	-9.6 \pm 7.2
<i>L. acidophilus</i> JCM1132	0.00	28	8	-8.7 \pm 7.8
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM1105 (Streptococci)	0.08	18	16	-3.3 \pm 3.5
<i>S. thermophilus</i> CP1007 (Lactococci)	0.02	35	3	-2.4 \pm 8.1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CP684	0.00	35	4	-7.3 \pm 10.5
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CP312	0.02	18	4	-5.8 \pm 13.9

Significant differences from the control, ** p <0.01, * p <0.05

乳を利用している点で、健康イメージへの受容性が高いことや、他社に先駆けて市場投入したこともあり、差別化された製品コンセプトが認知され大きな話題となった。

その後、VPP, IPP 産生能の高い乳酸菌を得る目的で、蛋白分解能と ACE 阻害活性を指標に菌株の分離と選別を重ね、*L. helveticus* CM4 株の分離・取得に至った。本株使用により、血圧降下ペプチド VPP, IPP の生産性を約 2 倍高めることができ、製品の風味改良や小容量化が可能となった。乳原料を乳酸菌で発酵するだけで安定的に機能性成分を産生し、その後の加工などの処理が不要であり、通常の飲料製造と同じプロセスで製品化できる点は製品コンセプトのみならず、生産コスト面から考えても大きな強みとなった。

3. 酵素法技術の開発

乳酸菌の中で *L. helveticus* は高い蛋白質分解活性を有するが、発酵乳中には未分解の乳蛋白質が未だ多く残存する。発酵乳としての加工適性は高いものの、発酵乳は発酵時に生産される特徴的風味のため様々な食品形態への加工が制限される。また、海外での事業展開などでの輸送上の課題がある。そこで、VPP, IPP の安全で効率的な生産方法として酵素法による技術開発の検討を進めた。乳酸菌酵素研究で蓄積した必要酵素としての要件は判明していたが、数種類の酵素を混合し経済的にも生産に利用可能な酵素群としなければならない課題があった。そこで、低分子のペプチド産生能に優れ、かつ ACE 阻害活性の強い乳蛋白分解物を調整することが出来る食品用酵素群を選抜することで、課題をクリアすることができた。こうして得られた *Aspergillus oryzae* 酵素を用いた生産方法を用いると、VPP, IPP の生産効率は実にほぼ 100% に近いものとなった。

4. 酵素法素材の実用化

酵素法を実用技術として採用し、安定生産技術を開発し、乳原料の安価入手や大規模の酵素処理、濃縮、粉化処理のため海外での大量生産を実施した。工業レベルでのスケールアップにより、数十トンレベルでのカゼイン分解物からの安価生産が可能となり、素材ビジネスとしての可能性を大きく広げた。本原料を活用することで国内においては発酵乳を用いない果汁ベースの飲料にペプチドを添加した特定保健用食品を許可取得し「アミール S 毎朝野菜」として発売した(図1)。また、飲料以外の製品形態の開発が可能となった。酵素法による粉末素材については、B to B 事業において大手国内外食品メーカーへの原料販売が可能となり、米国やアジア諸国における原料販売事業への展開にまで至っている。また、機能性成分の物質特許、用途特許、製造特許など国内外に出願することで、原料供給および特許ライセンスでの事業基盤構築に結びつけた。

5. ヒト試験での有用性検証

前述した発酵乳または酵素法素材を用い、様々な食品形態(発酵乳、果汁飲料、タブレットなど)の製品開発を行っている。それぞれについて、ヒト試験で有用性検証を実施し、これまでに、15 種以上の様々な臨床試験において、いずれも有意な血圧降下作用を確認している。有効性に関しては、近年海外でも同成分を含む食品の有効性試験成績がいくつか報告されて



図1 VPP と IPP を活用した製品の例

いる。これら試験成績をまとめたメタアナリシス解析もなされ、両ペプチド摂取が血圧降下に有用であるとする報告がなされ、本技術への信頼性が広く認められている。一方、安全性に関しても、動物やヒトでの単回投与試験、連続投与(長期)試験などの各種安全性試験によって、その安全性の高さが確認されている。

6. 作用メカニズムの解析

一般的に生体内 ACE を阻害すると血圧降下に至ると言われているが、ペプチド素材が生体内でのこのような作用を示すことを矛盾なく説明した例はほとんどない。特に、血圧降下ペプチドの血中への移行や組織での役割などは殆ど解析されていない。VPP, IPP を動物に経口投与後に各組織を採取する際に変性剤を加えることでペプチド分解をおさえ、VPP, IPP が存在するか検出可能となった。その結果、肺および動脈にその酵素活性阻害に十分な濃度の VPP, IPP が蓄積されることが示された。さらに、蛍光標識した両ペプチドを用いた組織染色により、VPP と IPP が動脈中の血圧調節に重要な役割を果たす血管内皮細胞により高濃度で蓄積されることが明らかになった。また、動脈内の遺伝子変動の解析から医薬品 ACE 阻害剤と同じような酵素阻害が細胞内で起こっていることを確認した。これらのメカニズム解析によりペプチドが実際に生体内で寄与していることを検証している。

おわりに

最近、VPP, IPP は、血管内皮機能障害、動脈硬化、循環器障害を予防する可能性があることを動物実験で確認し、かつ、血管内皮機能改善効果があることをヒト試験で確認した。このように、カゼイン由来ペプチドである VPP および IPP は、血圧のみならず血管・循環器疾患に対して良好な影響を与える可能性がある。

今後、本技術によって開発した VPP, IPP 素材を使った製品がひろまり、多くの方に利用され健康維持に寄与できることを期待している。

謝辞 本研究成果は、共同研究における各分野の専門家の諸先生方、カルピス株式会社・研究開発部門および生産技術にかかわる多くの関係者の尽力によるものであり、ここに深謝いたします。また、本賞選考への推薦をいただきました選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。