

魚類コラーゲンペプチドのカルシウム結合能及び 卵巣摘出マウスの骨代謝に及ぼす影響

新井 由里香*¹ 西塔 正孝*¹ 石原 賢司*²
加藤 智美*² 佐藤 洋子*² 永井 毅*³

Effects of Fish Collagen Peptides on Calcium Binding Capacity and Bone Metabolism in Ovariectomized Mice

Yurika ARAI*¹, Masataka SAITO*¹, Kenji ISHIHARA*²,
Tomomi KATO*², Youko SATO*², Takeshi NAGAI*³

Abstract

Various mixed solutions of fish collagen peptide and calcium chloride were fractionated with ethanol, in order to evaluate their Ca binding capacity, amino acid composition and spectral properties. The peptides bound 35 to 88 mg/g peptide of Ca. Amino acid composition analysis and Fourier transform infrared spectroscopy suggested that Ca ions mainly adhered to the carboxy groups of the acidic amino acid residues, such as aspartic acid and glutamic acid. Moreover, the Ca solubilization rates of the collagen peptide and Ca binding peptide (CaP) were slightly higher than those of the control. Although the collagen peptides were decomposed into small molecules by protease, their Ca solubilization rates, as evaluated using enzymatic digestion test, were similar to those of the undegraded products; this suggests that Ca must be kept in the ionized state to maintain solubilization.

In this study, ovariectomized mice were fed diets supplemented with 1% or 5% tilapia collagen peptide for 13 weeks. The femur weight was higher in the 5% group than in the sham-operated and ovariectomized groups. The serum Ca concentration in the 5% collagen peptide group was similar to that in the sham-operated group. From these results, it was clarified that tilapia collagen peptide may promote bone metabolism in ovariectomized mice.

Key words: 魚類, コラーゲン, コラーゲンペプチド, カルシウム, マウス

緒 言

経口摂取されたカルシウム (Ca) の吸収は能動輸送と受動輸送の二相混在型であるとされており, 小腸上部の十二指腸や空腸では, ビタミンD依存性Ca結合たんぱく質の作用部位が局在していることから, 能動輸送により吸収され, その吸収速度は, 単位組織重量あたり他の部位の3倍以上であると考えられている¹⁾。小腸下部の回腸では, 受動輸送であるとされているが, Caの総吸収量としては小腸上部よりも大きいとされている。しかし, Caの吸収率は低く, 成人ではおおよそ30%程度である^{2, 3)}。リン酸やフィチン酸などの食品成分とCaが結

合すると小腸内で結晶化し, Caの吸収が阻害されやすい^{1, 4)}。このようなことから, Caの吸収率を高めたペプチドが見いだされ, 乳たんぱく質カゼインの小腸内消化で生成するカゼインホスホペプチド (CPP) などが報告されている^{5, 6)}。CPPは主にカゼインのホスホセリン残基のリン酸基がCaを結合し, リン酸との結合を阻害することで, Caを可溶化し, 小腸下部の上皮内外の濃度勾配を高め, 吸収を促進する。

近年, ブタ骨⁷⁾, シカ骨⁸⁾, 乳清⁹⁾, タラ^{10, 11)} やホキ^{12, 13)} など魚類の皮や骨, 大豆^{14, 15)}, 小麦胚芽^{16, 17)}などを加水分解して得られたタンパク質とCaの結合に関する報告がある。これらのタンパク質加水分解物は, 加水分解条

*¹ 食品生産科学研究室, 女子栄養大学: Kagawa Nutrition University, Laboratory of Food Science and Technology

*² 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所: Fisheries Research and Education Agency

*³ 国立大学法人 山形大学: Yamagata University

件の違いにより、Ca結合能が異なることや、Caとの結合には、主に酸性アミノ酸のカルボキシ基が関与すると推定されている。

魚類コラーゲンペプチドは、フィレを取り除いた後に残った皮や鱗、骨などから生産されている。コラーゲンペプチドは、哺乳動物由来のものを含め、医薬品や化粧品だけでなく、機能性食品としても製造販売されている¹⁸⁾。コラーゲンペプチドの食品における機能性としては、骨代謝¹⁹⁻²²⁾、脂質代謝²³⁾、血圧²⁴⁻²⁶⁾、創傷治癒^{27, 28)}、肌の改善効果²⁹⁻³¹⁾などに関する報告がある。

コラーゲンペプチドのCa結合能及びその特性を評価した報告は少なく、各種ペプチドを比較した研究も見当たらない。また、哺乳動物由来コラーゲンペプチドの摂取による骨代謝への影響に関する報告はあるが、魚類コラーゲンペプチドを使用した報告は少なく、閉経後を想定した卵巣摘出マウスに対してテラピアコラーゲンペプチドの摂取による骨代謝への影響を検討した報告はない。以上のことから、本研究では、魚類コラーゲンペプチドのCa吸収促進作用を検討するため、魚類コラーゲンペプチドにCaを結合させ、そのCa結合能及び特性を評価した。さらに、卵巣を摘出したマウスにテラピアコラーゲンペプチドを与え、骨代謝への影響について検討した。

実験方法

1. 実験試料

アカマツダイ鱗、テラピア鱗、タラ皮及びブタ皮由来のコラーゲンペプチドは株式会社ニッピーより購入した。また、シロサケ皮由来及びトラウト皮由来コラーゲンペプチドは、マルハニチロ株式会社より購入した。

2. エタノール分画物のCa結合能

魚類コラーゲンペプチドのCa結合能を調べるため、Liu, *et al.*¹⁷⁾の方法を一部変更し、濃度比やpH、温度、時間など異なる条件で、各種コラーゲンペプチドと塩化カルシウムの溶液を混合し、反応させた。濃度比の検討では、20, 40, 60, 80及び100mg/mLに調製した各種コラーゲンペプチド溶液と500mM塩化カルシウム溶液を等量混合し（終濃度10, 20, 30, 40または50mg/mLペプチドに対して10mg/mL Ca反応溶液）、攪拌しながら少量の塩酸または水酸化ナトリウム溶液でpH7.0に調製した。30分間攪拌しながら反応させた後、25°Cで10,000×g、10分間の遠心分離を行った。上清に、エタノールを9倍量加えて、攪拌後、20分間遠心分離し、上清を除去した。遊離のCaイオンや低分子物質などを除くため、再びエタノールを加えて、同様に遠心分離し、3回洗浄を行った。沈殿物を真空乾燥機で乾固し、Ca結合ペプチド(CaP)とした。また、塩化カルシウム溶液の代わりに超純水としたものをペプチドコントロール(PC)とした。これらのCa量及びペプチド量をChlorophosphonazo-III

(CPZ-III; 同仁化学研究所)を使用した比色法³²⁾及びDCプロテインアッセイキット(Bio-Rad Laboratories, Inc.)により測定した。Ca結合能はペプチド1gあたりのCa量(mg)として示し、以下の算出式より求めた。

$$\text{Ca結合能 (mg/g)} = \frac{\text{CaPのCa量 (mg)}}{\text{CaPのペプチド量 (g)}} - \frac{\text{PCのCa量 (mg)}}{\text{PCのペプチド量 (g)}}$$

また、pHは4~8、温度は5~80°C、時間は0.5~24時間について検討した。

3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる重量平均分子量

コラーゲンペプチド、PC及びCaPの重量平均分子量をゲルろ過クロマトグラフィー(ゲルろ過HPLC)により分析した。装置には(株)島津製作所製Prominence HPLC 20Aシステムに、カラムSuperdexTM peptide 10/300GL(GE Healthcare Co.)を装着して用いた。カラムオープン温度40°C、流速0.5mL/min、吸収波長230nmに設定して分析を行った。溶離液には0.1%(v/v) TFA-30%(v/v)アセトニトリル溶液を使用した。

検量線のスタンダードには、リゾチーム(分子量14,300; Sigma-Aldrich)、インスリン(分子量5,800; 富士フイルム和光純薬株式会社)、アンセリン(分子量240; Sigma-Aldrich)、Pro-Hyp(分子量228; Bachem AG)、Gly-Gly(分子量132; 富士フイルム和光純薬株式会社)を使用した。解析ソフトウェアはLab solutions GPC Software(株式会社島津製作所)を使用し、検量線を作成して、重量平均分子量を算出した。

4. アミノ酸組成分析

各種コラーゲンペプチド、PC及びCaPを110°Cで24時間6M塩酸を用いて加水分解後、エバポレーターで濃縮乾固した。次に0.02M塩酸を加えて溶解し、高速アミノ酸分析計(L8900, 株式会社日立ハイテクサイエンス)により分析した。

5. フーリエ変換赤外分光法によるCa結合ペプチドの構造解析

フーリエ変換赤外分光法(FTIR)により、コラーゲンペプチド、PC及びCaPの構造解析を行った。サンプル2mgと臭化カリウム200mgを乳鉢で混合し、ミニハンドプレスMHP-1(株式会社島津製作所)により加圧し、錠剤を成型した。これをFTIR(IRAffinity-1, 株式会社島津製作所)により分析し、吸収スペクトルを得た。測定条件は、波長範囲400~4,000cm⁻¹、積算回数100回、分解能4.0cm⁻¹とした。

6. リン酸イオン存在下におけるCa可溶性試験

Caは小腸内でリン酸などの食品成分と結合し、不溶化することで吸収されにくくなるとされていることか

ら、Ca可溶化試験を行った⁹⁾。終濃度1 mg/mLコラーゲンペプチド-0.2 mg/mL Ca -20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) となるように調製し、小型振とう機 (NR-3, タイテック株式会社) で120rpm, 25°C, 2時間攪拌した。その溶液を25°Cで10分間遠心分離 (10,000×g) し、上清のCa濃度及びペプチド濃度を上述と同様に測定した。また、コントロールとしてコラーゲンペプチドの代わりにゼラチン (関東化学株式会社), ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich) または超純水 (Caコントロール) を添加したのも、同様に測定した。

7. 酵素による人工消化試験

20mg/mLコラーゲンペプチド溶液を塩酸でpH2.0に調整後、ブタ由来ペプシン (≥2,500 units/mg, Shigma-Aldrich) を加え (酵素: 基質 = 1: 100), 37°Cで2時間反応させた。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱し、酵素を失活させてペプシン分解物を得た。また、酵素を加えていないものを未分解物Iとし、さらに、コラーゲンペプチドを加えずに酵素のみを加えたものをペプシンコントロールとした。これらの溶液を25°Cで15分間遠心分離 (15,300×g) し、上清を後述の分析に使用した。

一方、ペプシン分解物を水酸化ナトリウム溶液でpH8.0に調整し、ブタ腸由来トリプシン (2,000U/g, 富士フィルム和光純薬株式会社) を加え、37°Cで2時間反応させた (酵素: 基質 = 1: 100)。その後、再び加熱により酵素を失活させ、ペプシン-トリプシン分解物とした。また、酵素を加えていないものを未分解物IIとし、コラーゲンペプチドを加えずに酵素のみを加えたものをペプシン-トリプシンコントロールとした。

得られた各種酵素分解物などは、塩化カルシウム溶液と反応させて、エタノール分画によるCa結合能及びリン酸イオン存在下におけるCa可溶化試験を行った。

8. テラピアコラーゲンペプチドの摂取による卵巣摘出マウスの骨代謝に及ぼす影響

(1) 実験動物及び飼育方法

実験動物は、ICRマウスとし、7週齢で卵巣を摘出したマウス24匹を8週齢で日本エスエルシー株式会社から購入した。また、卵巣を摘出せず、開腹手術をしたマウスを同様に8匹購入した。飼育環境は、温度22±2°C, 相対湿度50±5%, 12時間の明暗周期とし、床敷を入れたケージで飼育した。納入後、1週間順応させた後、試験食を開始した。試験食の飼料は、AIN-93G³³⁾を参照し、普通飼料、テラピアコラーゲンペプチド1%添加飼料及び5%添加飼料の3種類とした (Table 1)。テラピアコラーゲンペプチドの添加量は、卵巣を摘出したラットにブタコラーゲンペプチドを摂取させた場合、骨密度が高くなったとされている1.66g/kg体重/日を参考にした¹⁹⁾。また、成長期のラットに16.6g/kg体重/日を摂取させた場合、腎肥大を起こしたとされていることから、8.30g/kg体重/日として算出した。

Table 1. Composition of experimental diet for each mouse group. (g)

	SHAM	OVX	CP1%	CP5%
Cornstarch	397	397	387	347
Casein	200	200	200	200
Dextrinized cornstarch	132	132	132	132
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Cellulose powder	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35	35	35	35
Vitamin mix (AIN-93VX)	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Tilapia collagen peptides	-	-	10	50
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

SHAM: Sham-operated; OVX: Ovariectomized; CP1%: 1% collagen peptide added; CP5%: 5% collagen peptide added.

卵巣摘出マウスを3つのグループに分け、普通飼料 {Ovariectomized (OVX); n=8}, テラピアコラーゲンペプチド1%添加飼料 {Collagen peptide 1% (CP1%); n=8} 及び5%添加飼料 {Collagen peptide 5% (CP5%); n=8} のグループとした。また、卵巣を摘出せずに開腹手術をしたグループ {Sham-operated (SHAM); n=8} には普通飼料を与えた。飼料と飲水は自由摂取とし、グループごとにケージで3か月間飼育した。

本動物実験は国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所の動物実験委員会 The Animal Experimental Councilの承認を受けて実施した。

(2) サンプリング

マウスは3か月間飼育後、一晩絶食させ、イソフルラン (マイラン製薬株式会社) により麻酔し、開腹して下大静脈から血液を採取した。血液は、15°Cで10分間遠心分離 (9,100×g) した後、上清を回収し、分析に使用するまで-40°Cで保存した。その後、子宮、腎臓、肝臓及び卵巣・腎臓周囲の脂肪を採取し、重量を測定した。また、左大腿骨を採取し、分析に使用するまで-40°Cで保存した。

(3) 血液の生化学的検査及び大腿骨の特性

血清は、CPZ-IIIによりCa濃度を測定した。大腿骨は、100°Cで20時間加熱し、乾燥重量を測定した後、550°Cで36時間加熱して灰化重量を測定した。灰化試料は1%塩酸で溶解し、Ca及びリン含有量を各々CPZ-III及びバナドモリブデン法³⁴⁾により測定した。

9. 統計解析

統計解析ソフトは、SPSS Statistics 24 (IBM) を使用した。*in vitro*の結果は、平均±標準誤差で示した。Ca結合能、アミノ酸組成分析及び人工消化試験は、一元配置

分散分析と Tukey 法による多重比較検定を行い、また、Ca 可溶性試験は一元配置分散分析と Dunnett 法による多重比較検定を行った。また、動物実験の結果は、平均±標準偏差で示した。グループ間の比較は、一元配置分散分析と Tukey 法による多重比較検定を行った。いずれも、有意水準は 5%とした。

実験結果

1. エタノール分画による Ca 結合能及び重量平均分子量

重量比の検討では、アカマツダイ、テラピア及びブタはペプチドと Ca の重量比が 1:1 のときに Ca 結合量が大きく、ペプチド:Ca=1:1 のとき、アカマツダイ 88.7 mg/g、テラピア 76.7mg/g、ブタ 82.9 mg/g であった (Fig. 1A)。タラ、シロサケ及びトラウトでは、重量比間で有意な差は認められず、ペプチド:Ca=1:1 のとき、タラ 35.7mg/g、シロサケ 58.4mg/g 及びトラウト 57.7mg/g であった。pH の検討では、アカマツダイ、テラピア及びタラの Ca 結合量は pH 6~8 で多く、アカマツダイでは 81~83mg/g、テラピアでは 74~79mg/g、タラでは 35~37mg/g であった (Fig. 1B)。シロサケ及びトラウトの

Ca 結合量は、酸性で多く、中性から弱アルカリ性にかけて減少した。反応温度では、シロサケ及びトラウトで 80°C のときに減少したが、その他のサンプルでは 5~80°C まで差はなかった (Fig. 1C)。反応時間では、すべてのサンプルで有意な差は認められなかった (Fig. 1D)。さらに、コラーゲンペプチドサンプル間の比較では、ペプチド:Ca=1:1, pH7, 25°C, 30分間反応させた場合、Ca 結合能は、アカマツダイが最も高く、次にテラピア、シロサケ及びトラウト、タラの順であった。

未反応のコラーゲンペプチドの重量平均分子量は、アカマツダイが 5,200、テラピアが 5,300、タラが 6,900、シロサケ及びトラウトが 1,700、ブタが 4,400 であったが、CaP では、アカマツダイが 7,700、テラピアが 8,200、タラが 11,000、シロサケ及びトラウトが 2,800、ブタが 7,100 であり、すべてのサンプルで未反応のコラーゲンペプチドと比較して高かった。

2. Ca 結合ペプチドのアミノ酸組成及び構造解析

Ca 結合能が高かったアカマツダイ及びテラピアコラーゲンペプチドについてアミノ酸組成を調べた結果、アカマツダイ CaP は、未反応のコラーゲンペプチド

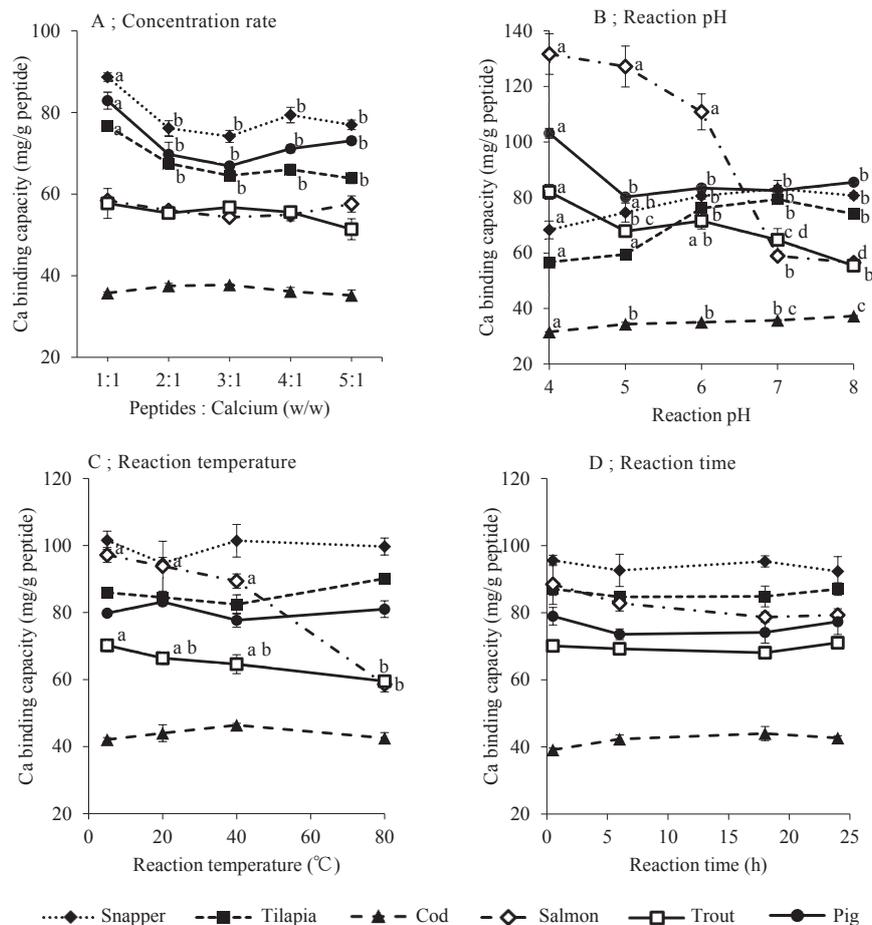


Fig. 1. Calcium binding capacity by the difference of reaction conditions. Data are shown as the means±SE, n=3, and One-way ANOVA procedure followed by Tukey's test was used to evaluate the statistical significance. The different letters on the values indicate significant difference between the reaction conditions ($p < 0.05$).

及びPCと比較してアスパラギン酸及びグルタミン酸残基が多くなり、バリン及びプロリン残基が少なかった (Table 2)。テラピアCaPにおいても、アカマツダイと同様でアスパラギン酸及びグルタミン酸残基が顕著に多くなった。また、アラニン、バリン、プロリン残基などがCaPで少なかった。これらの結果は、ブタコラーゲンペプチドのCaPにおいても類似したアミノ酸残基の増加や減少がみられた。

FTIRを用いた構造解析では、 $1,400\text{cm}^{-1}$ 及び $1,000\sim 1,100\text{cm}^{-1}$ 付近のピークに変化が認められた (Fig. 2)。アカマツダイ及びテラピアコラーゲンペプチドの $1,406$ 及び $1,404\text{cm}^{-1}$ とPCの $1,400\text{cm}^{-1}$ のピークは、CaPでは、各々 $1,412\text{cm}^{-1}$ となった。また、アカマツダイ及びテラピアコラーゲンペプチドの $1,030\text{cm}^{-1}$ とPCの $1,030\text{cm}^{-1}$ 及び $1,032\text{cm}^{-1}$ のピークは、CaPでは、各々 $1,045\text{cm}^{-1}$ 及び $1,042\text{cm}^{-1}$ に変化していた。

3. リン酸イオン存在下におけるCa可溶化試験

コラーゲンペプチド、Ca及びリン酸イオンを反応させた結果、Ca可溶化率は、Caコントロールが3.8%であったのに対し、アカマツダイコラーゲンペプチドは

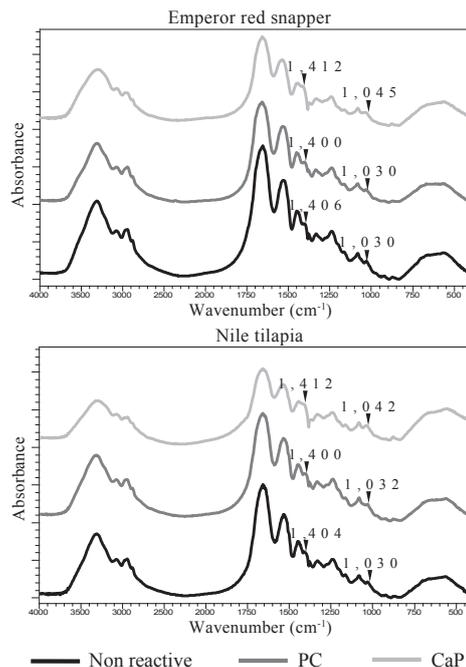


Fig. 2. FTIR spectra of two fish collagen peptides, PCs and CaPs in the regions of 400 to $4,000\text{cm}^{-1}$. PC indicates the control peptide fractionated by ethanol, and Cap indicates the fractionated Ca-binding peptide

Table 2. Amino acid composition of collagen peptides, PCs and CaPs.

	Snapper			Tilapia			Pig		
	Collagen peptide	PC	CaP	Collagen peptide	PC	CaP	Collagen peptide	PC	CaP
Asp	4.2±0.0 ^a	4.4±0.0 ^b	5.0±0.0 ^c	4.1±0.0 ^a	4.4±0.0 ^b	4.7±0.0 ^c	4.3±0.2 ^a	4.8±0.2 ^{ab}	5.3±0.1 ^b
Thr	2.3±0.1 ^a	2.7±0.0 ^b	2.7±0.0 ^b	2.6±0.0 ^a	2.5±0.0 ^b	2.6±0.0 ^{ab}	1.5±0.1 ^a	1.3±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a
Ser	2.8±0.3 ^a	3.3±0.0 ^a	3.4±0.0 ^a	3.7±0.0 ^a	3.2±0.1 ^b	3.3±0.0 ^b	3.4±0.0 ^a	3.6±0.0 ^b	3.5±0.0 ^{ab}
Glu	8.2±0.1 ^a	8.8±0.1 ^b	9.8±0.0 ^c	7.9±0.0 ^a	8.6±0.0 ^b	9.6±0.0 ^c	7.6±0.3 ^a	8.5±0.3 ^a	9.9±0.3 ^b
Gly	34.6±0.5 ^a	34.2±0.3 ^a	34.4±0.1 ^a	34.1±0.0 ^a	34.4±0.1 ^a	34.2±0.1 ^a	33.9±0.3 ^a	34.1±0.1 ^a	34.1±0.3 ^a
Ala	13.0±0.1 ^a	11.6±0.0 ^b	11.3±0.0 ^b	12.2±0.0 ^a	11.4±0.0 ^b	11.0±0.0 ^c	10.3±0.2 ^a	8.7±0.2 ^b	8.3±0.2 ^b
Val	2.1±0.0 ^a	1.6±0.0 ^b	1.4±0.0 ^c	1.7±0.0 ^a	1.5±0.0 ^b	1.3±0.0 ^c	2.2±0.1 ^a	1.6±0.0 ^b	1.3±0.0 ^c
Cys	0.0±0.0 ^a								
Met	0.8±0.1 ^a	0.7±0.0 ^b	0.8±0.0 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.7±0.0 ^b	0.2±0.1 ^a	0.4±0.0 ^a	0.4±0.2 ^a
Ile	0.9±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.6±0.0 ^c	0.9±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.6±0.0 ^c	1.0±0.1 ^a	0.7±0.1 ^a	0.5±0.2 ^a
Leu	1.9±0.0 ^a	1.8±0.0 ^b	1.6±0.0 ^c	2.0±0.0 ^a	1.8±0.0 ^b	1.7±0.0 ^c	2.1±0.1 ^a	2.0±0.0 ^{ab}	1.6±0.2 ^b
Tyr	0.1±0.0 ^a	0.2±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^b	0.1±0.0 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.2±0.0 ^a
Phe	1.2±0.0 ^a	1.1±0.0 ^b	1.0±0.0 ^c	1.2±0.0 ^a	1.1±0.0 ^b	1.0±0.0 ^c	1.1±0.0 ^a	1.1±0.0 ^a	0.9±0.0 ^b
Hyl	0.6±0.0 ^a	0.7±0.0 ^b	0.7±0.0 ^b	0.6±0.0 ^a	0.8±0.0 ^b	0.9±0.0 ^c	0.6±0.0 ^a	0.6±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a
Lys	2.6±0.0 ^a	2.8±0.0 ^b	2.8±0.0 ^b	2.4±0.0 ^a	2.7±0.0 ^b	2.8±0.0 ^c	2.9±0.2 ^a	3.2±0.2 ^a	3.4±0.2 ^a
His	0.6±0.2 ^a	0.7±0.2 ^a	0.5±0.0 ^a	0.4±0.0 ^a	0.5±0.0 ^b	0.6±0.0 ^c	0.3±0.0 ^a	0.4±0.0 ^{ab}	0.5±0.0 ^b
Arg	4.6±0.0 ^a	5.6±0.0 ^b	5.5±0.0 ^c	4.7±0.0 ^a	5.4±0.0 ^b	5.2±0.0 ^c	4.7±0.1 ^a	5.3±0.3 ^b	5.4±0.2 ^b
Hyp	8.3±0.2 ^a	8.8±0.1 ^a	8.7±0.1 ^a	9.0±0.1 ^a	8.9±0.1 ^a	9.2±0.1 ^a	10.1±0.2 ^a	10.6±0.2 ^a	10.7±0.2 ^a
Pro	11.2±0.1 ^a	10.3±0.1 ^b	9.7±0.2 ^c	12.1±0.0 ^a	11.3±0.1 ^b	10.3±0.1 ^c	13.7±0.2 ^a	12.7±0.3 ^b	12.0±0.2 ^b
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

PC indicates the control peptide fractionated by ethanol, and Cap indicates the fractionated Ca-binding peptide. Data of Emperor red snapper and Nile tilapia are shown as the means±SE, n=3, and One-way ANOVA procedure followed by Tukey's test was used to evaluate the statistical significance. The different letters on the values indicate significant difference ($p<0.05$).

5.8%, テラピアコラーゲンペプチドは5.7%, アカマツダイCaPは6.3%, テラピアCaPは6.2%と高かった (Fig. 3)。しかし、ゼラチン及びBSAではCaコントロールと差は認められなかった。

アカマツダイ及びテラピアコラーゲンペプチドのペプシン及びペプシン-トリプシン分解物のエタノール分画によるCa結合能は、未分解物のCa結合能と比較して同程度であった (Fig. 4)。なお、それらペプシン分解物の重量平均分子量は、各々4,000及び4,600であり、ペプシン-トリプシン分解物では、各々2,200及び2,300であった。一方、ペプシン及びペプシン-トリプシン分解物のリン酸イオン存在下におけるCa可溶化率を調べたところ、アカマツダイ及びテラピアのコラーゲンペプチドのペプシン分解物で各々6.8及び6.7%であり、ペプシン-トリプシン分解物は、双方6.0%であった。未分解物のCa可溶化率は酵素分解物と比較して有意な差は認められなかった。

4. テラピアコラーゲンペプチド摂取による卵巣摘出マウスの骨代謝に及ぼす影響

試験期間中のSHAM, OVX, CP 1%及びCP 5%グループの飼料摂取量は、平均して各々5.0, 4.3, 4.0及び4.2g/日/匹であった。体重は、試験食終了時には、各グループ間で差は認められなかった (Table 3)。子宮重量は、SHAMと比較して、OVX, CP 1%及びCP 5%グループで低値を示した。肝臓及び腎臓重量には差はなかったが、卵巣周囲脂肪量は、SHAMと比較してOVX及びCP 5%グループで少なく、腎臓周囲脂肪量は、SHAMと比較してOVX処置グループで少なかった。血清中のCa濃度は、OVXグループで高く、CP 5%グループは、OVXより低く、SHAMと差がなかった。大腿骨の乾燥重量は、CP 5%グループがOVXグループと比較して高い値を示した (Table 4)。また、Ca及びリン含有量においても、OVXと比較してCP 5%グループが多かった。

考 察

タンパク質加水分解物とCaの結合に関する報告では、大豆では66~94mg/g¹⁴⁾、小麦胚芽では18mg/g¹⁷⁾、乳清では75mg/g⁹⁾であったとされている。本研究で使用した魚類コラーゲンペプチドは、最も少なかったタラでpH7のとき36mg/g、多かったアカマツダイ及びテラピアは各々88.7及び76.7mg/gであり、先の報告と同程度かそれ以上の結合能を示した。

アミノ酸組成分析では、アカマツダイ及びテラピアCaPは原料のコラーゲンペプチド及びPCと比較してアスパラギン酸は0.3~0.8%、グルタミン酸は1.0~1.7%多かった。大豆¹⁴⁾、サケ³⁶⁾及びシカ骨⁸⁾由来のCa結合ペプチドには、アスパラギン酸またはグルタミン酸残基が多く含まれていたことや、タラ骨由来のペプチドでは、アスパラギン酸残基がCaと結合していることが報

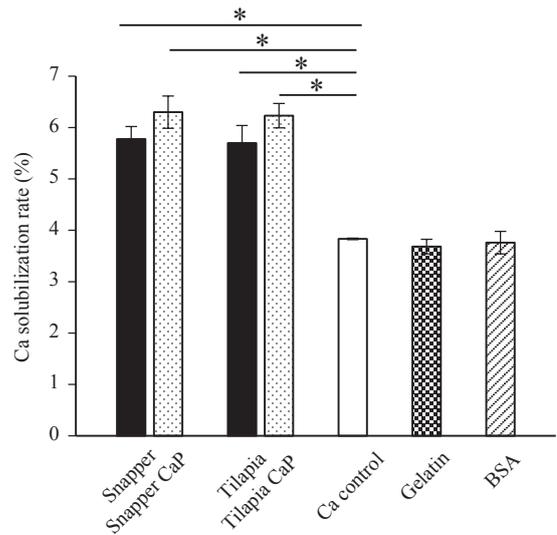


Fig. 3. Calcium solubilization rate in the presence of phosphate ions (%). Snapper and Tilapia show each collagen peptide, and each Cap indicates the fractionated Ca-binding peptide. Data are calculated as a percentage of added calcium, and shown as the means \pm SE, at least $n=3$, and One-way ANOVA procedure followed by Dunnett's test was used to evaluate the statistical significance. The significant difference from calcium control is shown by an asterisk ($p < 0.05$).

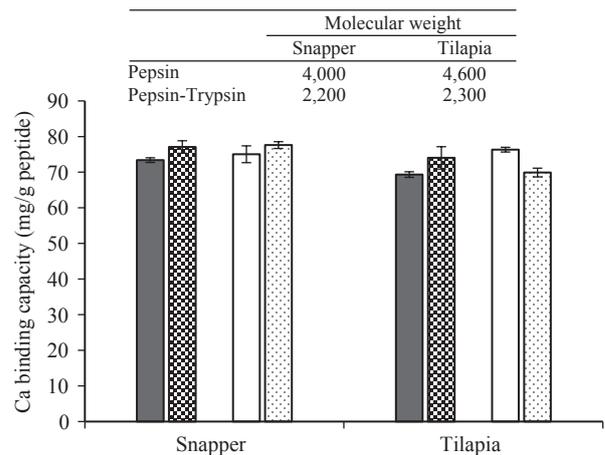


Fig. 4. Calcium binding capacity and Weight-average molecular weight by ethanol fraction of enzymatic degradation products. Data are shown as the means \pm SE, $n=3$.

告されている¹¹⁾。また、アミノ酸とCaの親和性は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンの順で高く、グリシンを含むペプチドでは、Gly-Glu, Glu-Cys-Gly, Gly-Lys-Glyの順で高かったとされている³⁷⁾。さらに、アスパラギン酸とグルタミン酸のジペプチドでは、C末端のCaの親和性は、Glu-Glu, Asp-Glu, Glu-Asp, Asp-Aspの順で高いとされている³⁸⁾。また、本研究のアミノ酸分析方法では、アスパラギン及びグルタミンは、それぞれアスパラギン酸及びグルタミン酸に含まれて分析されているが、ニジマスコラーゲンの一次構造に関する報告では、アスパラギンは3.2%、グルタミンは3.0%であり、アスパラギン酸は4.0%、グルタミン酸は5.0%であると

Table 3. Body and tissue weights and serum properties of each mouse group.

	SHAM	OVX	CP1%	CP5%
Initial body weight (g)	34.0 ± 1.1	35.1 ± 1.3	35.1 ± 1.2	35.1 ± 0.9
Final body weight (g)	57.7 ± 4.8	62.3 ± 7.0	60.5 ± 4.6	63.1 ± 5.0
Uterus (mg/g)	4.2 ± 1.1 ^a	1.0 ± 0.6 ^b	1.3 ± 0.7 ^b	0.9 ± 0.3 ^b
Liver (mg/g)	27.9 ± 2.3	29.0 ± 2.2	28.8 ± 3.5	29.9 ± 4.1
Kidneys (mg/g)	8.2 ± 1.0	7.3 ± 1.0	7.7 ± 0.9	8.2 ± 1.0
Periovarian fat (mg/g)	92.5 ± 16.7 ^a	71.7 ± 9.9 ^b	76.1 ± 15.0 ^{ab}	74.0 ± 8.4 ^b
Perirenal fat (mg/g)	43.6 ± 9.1 ^a	30.2 ± 9.5 ^b	25.0 ± 6.0 ^b	29.6 ± 3.1 ^b
Serum calcium (mg/dL)	9.5 ± 0.4 ^a	11.2 ± 0.8 ^b	10.3 ± 0.8 ^{ab}	9.8 ± 0.6 ^a

SHAM: Sham-operated; OVX: Ovariectomized; CP1%: 1% collagen peptide added; CP5%: 5% collagen peptide added. Data are shown as the means ± SD, n=7-8, and One-way ANOVA procedure followed by Tukey's test was used to evaluate the statistical significance. The different letters on the values indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Left femur properties of each mouse group.

	SHAM	OVX	CP1%	CP5%
Dry weight (mg)	71.8 ± 2.1 ^{ab}	70.5 ± 2.6 ^a	73.7 ± 3.0 ^{ab}	74.9 ± 3.9 ^b
Ash weight (mg)	43.7 ± 2.2	43.0 ± 2.4	43.9 ± 2.3	45.1 ± 2.6
Calcium (mg)	14.7 ± 0.6 ^{ab}	14.4 ± 0.8 ^a	15.0 ± 0.7 ^{ab}	15.6 ± 1.0 ^b
Phosphorus (mg)	7.4 ± 0.3 ^{ab}	7.3 ± 0.4 ^a	7.7 ± 0.4 ^{ab}	7.9 ± 0.4 ^b

SHAM: Sham-operated; OVX: Ovariectomized; CP1%: 1% collagen peptide added; CP5%: 5% collagen peptide added. Data are shown as the means ± SD, n=7-8, and One-way ANOVA procedure followed by Tukey's test was used to evaluate the statistical significance. The different letters on the values indicate significant difference ($p < 0.05$).

されている³⁹⁾。以上のことから、本研究で使用したアカマツダイ及びセラピアコラーゲンペプチドにおいても、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、それらがCaとの結合に関与した可能性が考えられた。

また、FTIRを使用して、コラーゲンペプチドとCaの結合による構造変化を確認することを試みた結果、すべてのサンプルで $1,400\text{cm}^{-1}$ 及び $1,000\text{cm}^{-1}$ 付近のピークに変化が認められた。Byler, *et al.*⁴⁰⁾ 及びWu, *et al.*⁷⁾ は、 $1,400\text{cm}^{-1}$ 付近のピークはカルボキシ基の存在を示し、Caとの結合により、ピークが消失すると報告している。また、CPP及びシカ骨由来ペプチドでは、Caの添加により、C-O及びO-Hの振動を示す $1,000\sim 1,300\text{cm}^{-1}$ 付近のピークが変化するとされている^{8, 41)}。コラーゲンペプチドにおいても構成アミノ酸のカルボキシ基がCaとの結合に関与し、構造が変化した可能性が示唆された。

Caは小腸内でリン酸などの食品成分と結合することで、沈殿物を形成し、吸収されにくくなることから、リン酸イオンとの反応について検討した¹⁾。ペプチド、Ca及びリン酸イオンとの反応では、加水分解をした小麦胚芽タンパク質で、分解物の方がCa結合量は多かったとされている¹⁶⁾。本実験においてCaの可溶化を比較した結果、分子量が約10万と大きいゼラチンではCaが結合しにくく、より分子量の小さいコラーゲンペプチドはCaの可溶化を保つことが考えられた。また、BSAは、ゼラチンと比較すると分子量は66,000と小さいものの、コラーゲンペプチドと比較すると大きいことや、一次構造が大きく異なることがCaの可溶化率に影響したと思わ

れる。さらに、コラーゲンペプチドとエタノール分画によって得られたCaPでは、Ca可溶化率に差はなく、原料であってもCaイオンの状態とすることで、無機Caと比較して可溶化を保つ可能性が示唆された。

人工消化試験では、アカマツダイ及びセラピアともに、ペプシン及びペプシン-トリプシン分解物のCa可溶化率は、未分解物と同程度であり、前述の原料のコラーゲンペプチド及びCaPのCa可溶化率と同様であった。以上のことから、分解物であってもその活性を有しており、小腸内でリン酸イオンと競合し、Caの可溶化を維持できる可能性が考えられた。

さらに本研究では動物実験において、卵巣を摘出したマウスにセラピアコラーゲンペプチドを13週間摂取させ、骨代謝への影響について検討した。ブタコラーゲンペプチドをラットに16.6g/kg体重/日を4週間摂取させた場合、腎肥大を起こしたとされているが¹⁹⁾、マウスにその半量のセラピアコラーゲンペプチド8.30g/kg体重/日を摂取させたCP5%グループでは、他グループと比較して腎重量に差はなく、マウスの場合、8.30g/kg体重/日の摂取では腎肥大は起こさないことが明らかとなった。また、肝臓にも影響はなかったと考える。子宮重量は、卵巣が摘出されていたOVX、CP1%及びCP5%グループで、SHAMと比較して低値を示したことから、卵巣が適切に摘出されていたと判断できる。卵巣を摘出したマウスでは、子宮が小さくなるが、エストラジオールを与えた場合、子宮は卵巣を摘出していないマウスと同程度であったとされている⁴²⁾。

本研究の結果から、血液の生化学的検査では、血中Ca濃度がSHAMと比較してOVXで高くなり、CP 5%はSHAMと差がなかった。ヒトの血中Ca濃度の変動は少なく、厳格に調節されているが⁴³⁾、卵巣摘出マウスの尿中Ca排泄量を検討した報告では、卵巣を摘出していないマウスと比較して、卵巣摘出マウスでは骨吸収が高まっているために、Caの排泄量が多くなり、血中のCa濃度も高かったとされている⁴⁴⁾。CP 1%及びCP 5%グループともにSHAMとは差がなく、テラピアコラーゲンペプチドの摂取は、骨吸収を抑制する可能性が考えられた。大腿骨の特性については、重量がCP 5%グループにおいて、SHAM及びOVXと比較して4~6%高かった。また、Ca及びリン含有量はOVXと比較してCP 5%グループで多かった。テラピア皮由来加水分解物をCaが欠乏している成長期のマウスに投与した場合、大腿骨重量がコントロールと比較して高い値を示したとされている³⁵⁾。また、コラーゲンペプチドは、経口摂取後、消化酵素の作用を受け、アミノ酸またはペプチドの状態で吸収されることが知られており^{45, 46)}、さらに、コラーゲンペプチドは骨芽細胞の活性化に関与する遺伝子Runx2やOsterix, ALP, オステオカルシンなどの発現を増加させることが報告されている⁴⁷⁻⁵⁰⁾。これらのことから、テラピアコラーゲンペプチドが消化酵素の作用を受け、分解されて吸収されたことにより、骨代謝に影響を与えた可能性が考えられる。

しかしながら、経口摂取されたテラピアコラーゲンペプチドのCa吸収率への影響については検討していない。*in vitro*では、テラピアコラーゲンペプチドが中性から弱アルカリ性でCa結合能を有し、リン酸イオンとの反応でも、Caの可溶化を保つため、動物実験などによりCa出納試験を行い、コラーゲンペプチドがCaの吸収を促進するかどうか、調べることも必要と考える。今後、Caとともに消化吸収された魚類コラーゲンペプチドの骨形成や骨吸収への影響が、さらに明らかになることが期待される。

要 約

魚類コラーゲンペプチドと塩化カルシウムの各種混合溶液をエタノールによりそれぞれ分画し、Ca結合能及びそれらの特性を評価した。得られたそれらのペプチドは、ペプチド1gあたり35~88mgのCaを結合していた。アミノ酸組成分析及びFTIRにより、Caイオンは主にアスパラギン酸やグルタミン酸のような酸性アミノ酸残基のカルボキシ基に結合している可能性が示唆された。また、Ca可溶化試験では、コントロールと比較して、コラーゲンペプチド及びCaPのCa可溶化率は、若干高かった。酵素消化試験では、プロテアーゼによりコラーゲンペプチドは低分子化されたが、そのCa可溶化率は、未分解物と同程度であった。Caをイオン化状態とすることでCaの可溶化を維持する可能性が考えられた。

一方、テラピアコラーゲンペプチドを1%または5%

添加した飼料を卵巣摘出マウスに13週間与えた結果、SHAM及びOVXと比較して5%添加グループで大腿骨重量は高値を示した。5%コラーゲンペプチド添加グループの血清Ca濃度はSHAMと同程度であった。これらの結果から、テラピアコラーゲンペプチドが卵巣摘出マウスの骨代謝に影響を及ぼしている可能性が明らかとなった。

文 献

- 1) 内藤 博: カルシウムの腸管吸収と食物要因. *ピフィズス*, **1**, 5-12 (1987)
- 2) Bass, J. K., Chan, G. M.: Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition*, **22**, 1057-1066 (2006)
- 3) Weaver, C. M., Liebman, M.: Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *Br J Nutr*, **88**, S225-S232 (2002)
- 4) 内藤 博: カゼインの消化時生成するホスホペプチドのカルシウム吸収促進機構. *日本栄養・食糧学会誌*, **39**, 433-439 (1986)
- 5) Hiroshi, T., Toshiyuki, G., Taki, S., Yoko, Y., Tamotsu, K.: Dietary Casein Phosphopeptides Prevent Bone Loss in Aged Ovariectomized Rats. *J Nutr*, **126**, 86-93 (1995)
- 6) Cao, Y., Miao, J., Liu, G., Luo, Z., Xia, Z., Liu, F., Yao, M., Cao, X., Sun, S., Lin, Y., *et al.*: Bioactive Peptides Isolated from Casein Phosphopeptides Enhance Calcium and Magnesium Uptake in Caco-2 Cell Monolayers. *J Agric Food Chem*, **65**, 2307-2314 (2017)
- 7) Wu, W., He, L., Liang, Y., Yue, L., Peng, W., Jin, G., Ma, M.: Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis. *Food Chem*, **284**, 80-89 (2019)
- 8) Bi, J., Wang, X., Zhou, Y., Hou, J.: Preparation and Characterization for Peptide-Chelated Calcium of Deer Bone. *Food Sci. Technol. Res.*, **24**, 717-728 (2018)
- 9) Zhao, L., Huang, Q., Huang, S., Lin, J., Wang, S., Huang, Y., Hong, J., Rao, P.: Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode. *J Agric Food Chem*, **62**, 10274-10282 (2014)
- 10) Guo, L., Harnedy, P. A., O'Keefe, M. B., Zhang, L., Li, B., Hou, H., FitzGerald, R. J.: Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chem*, **173**, 536-542 (2015)
- 11) Zhang, K., Li, J., Hou, H., Zhang, H., Li, B.: Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from Pacific cod (*Gadus Macrocephalus*) bone: Molecular properties and calcium chelating modes. *J Funct Foods*, **52**, 670-679 (2019)
- 12) Jung, W.-K., Park, P.-J., Byun, H.-G., Moon, S.-H., Kim, S.-K.: Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chem*, **91**, 333-340 (2005)

- 13) Jung, W.-K., Kim, S.-K.: Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belangerii*) frame. *Eur Food Res Technol*, **224**, 763-767 (2006)
- 14) Bao, X. L., Lv, Y., Yang, B. C., Ren, C. G., Guo, S. T.: A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *J Food Sci*, **73**, C117-121 (2008)
- 15) Lv, Y., Bao, X., Liu, H., Ren, J., Guo, S.: Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by Ca²⁺/Fe³⁺ immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Food Chem*, **141**, 1645-1650 (2013)
- 16) Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., Li, J., Chen, Z.: Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination. *Food Chem*, **239**, 416-426 (2018)
- 17) Liu, F. R., Wang, L., Wang, R., Chen, Z. X.: Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of Peptide-calcium complex. *J Agric Food Chem*, **61**, 7537-7544 (2013)
- 18) 小山洋一: 天然素材コラーゲンの機能性. *皮革科学*, **56**, 71-79 (2010)
- 19) Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., Ishimi, Y.: Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab*, **22**, 547-553 (2004)
- 20) Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., Kasugai, S.: Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, **21**, 1120-1126 (2005)
- 21) Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C.-L., Roux, C., Blais, A.: Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. *Bone*, **46**, 827-834 (2010)
- 22) Guillerminet, F., Fabien-Soule, V., Even, P. C., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., Blais, A.: Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos Int*, **23**, 1909-1919 (2012)
- 23) Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., Suzuki, H.: Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agric Food Chem*, **57**, 10477-10482 (2009)
- 24) Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E., Maruyama, S.: Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 2317-2319 (2009)
- 25) 岩井浩二, 張有做, 河口友美, 雜賀(江草)愛, 清水宗茂, 大森丘, 高畑能久, 森松文毅.: 鶏コラーゲン加水分解物摂取後のヒト血中ペプチドの動態とACE阻害作用. *日本食品科学工学会誌*, **56**, 18-22 (2009)
- 26) 河口友美, 岩井浩二, 清水宗茂, 大森丘, 高畑能久, 鈴木卓弥, 森松文毅, 田辺創一.: 市販コラーゲンペプチドの自然発症性高血圧ラットにおける血圧上昇抑制作用. *日本食品科学工学会誌*, **60**, 142-147 (2013)
- 27) Tokudome, Y., Nakamura, K., Kage, M., Todo, H., Sugibayashi, K., Hashimoto, F.: Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. *Int J Food Sci Nutr*, **63**, 689-695 (2012)
- 28) 中尾光治, 楠畑 雅, 原 浩祐, 五十嵐雅陽, 山崎則之, 小山洋一: 褥瘡モデルラットにおけるコラーゲンペプチド経口摂取の褥瘡治癒促進効果. *薬理と治療*, **41**, 587-596 (2013)
- 29) Tanaka, M., Koyama, Y. I., Nomura, Y.: Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 930-932 (2009)
- 30) Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhuang, Y., Ren, G., Yan, M., Cai, Y., Zhang, X., Chen, L.: The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chem*, **115**, 945-950 (2009)
- 31) 大原浩樹, 伊藤恭子, 飯田博之, 松本 均: コラーゲンペプチド経口摂取による皮膚各層水分量の改善効果. *日本食品科学工学会誌*, **56**, 137-145 (2009)
- 32) Ferguson, J. W., Richard, J. J., O'Laughlin, J. W., Banks, C. V.: Simultaneous Spectrophotometric Determination of Calcium and Magnesium with Chlorophosphonazo III. *Anal Chem*, **36**, 796-799 (1964)
- 33) Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey Jr, G. C.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951 (1993)
- 34) 松原三徳: リン酸の比色定量用発色試薬についてバナドモリブデン酸法による肥料中のリン酸の比色定量法(第1報). *分析化学*, **7**, 505-509 (1958)
- 35) Chen, J., Qiu, X., Hao, G., Zhang, M., Weng, W.: Preparation and bioavailability of calcium-chelating peptide complex from tilapia skin hydrolysates. *J Sci Food Agric*, **97**, 4898-4903 (2017)
- 36) Liu, W.-Y., Lu, J., Gao, F., Gu, R.-Z., Lin, F., Ren, D.-F., Cai, M.-Y.: Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides. *Eur Food Res Technol*, **241**, 851-860 (2015)
- 37) Tang, N., Skibsted, L. H.: Calcium Binding to Amino Acids and Small Glycine Peptides in Aqueous Solution: Toward Peptide Design for Better Calcium Bioavailability. *J Agric Food Chem*, **64**, 4376-4389 (2016)
- 38) Vavrusova, M., Skibsted, L. H.: Calcium binding to dipeptides of aspartate and glutamate in comparison with orthophosphoserine. *J Agric Food Chem*, **61**, 5380-5384 (2013)
- 39) Saito, M., Takenouchi, Y., Kunisaki, N., Kimura, S.: Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of $\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$ $\alpha 3(I)$ heterotrimers. *Eur J Biochem*, **268**, 2817-2827 (2001)
- 40) Byler, D. M., Farrell, H. M.: Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein1. *J Dairy Sci*, **72**, 1719-1723 (1989)
- 41) Gao, A., Dong, S., Wang, X., Li, S., Chen, Y.: Preparation, characterization and calcium release evaluation in vitro of casein phosphopeptides-soluble dietary fibers copolymers as

- calcium delivery system. *Food Chem*, **245**, 262-269 (2018)
- 42) 笹岡利安, 恒枝宏史, 和田 努: エストロゲンと糖代謝. *糖尿病*, **51**, 829-832 (2008)
- 43) Peacock, M.: Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, **5**, S23-30 (2010)
- 44) Vieira Potter, V. J., Strissel, K. J., Xie, C., Chang, E., Bennett, G., Defuria, J., Obin, M. S., Greenberg, A. S.: Adipose Tissue Inflammation and Reduced Insulin Sensitivity in Ovariectomized Mice Occurs in the Absence of Increased Adiposity. *Endocrinology*, **153**, 4266-4277 (2012)
- 45) Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., Sato, K.: Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chem*, **159**, 328-332 (2014)
- 46) Lei, W., Yinghua, Z., Yi, L., Kentaro, A., Chider, C., Cunye, Q., Yan, J., Songtao, S.: INF- γ and TNF- α Synergistically Induce Mesenchymal Stem Cell Impairment and Tumorigenesis via NF κ B Signaling. *Stem Cells*, **31**, 1383-1395 (2013)
- 47) Stock, S. R.: The Mineral-Collagen Interface in Bone. *Calcif Tissue Int*, **97**, 262-280 (2015)
- 48) Kimira, Y., Ogura, K., Taniuchi, Y., Kataoka, A., Inoue, N., Sugihara, F., Nakatani, S., Shimizu, J., Wada, M., Mano, H.: Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **453**, 498-501 (2014)
- 49) Kimira, Y., Odaira, H., Nomura, K., Taniuchi, Y., Inoue, N., Nakatani, S., Shimizu, J., Wada, M., Mano, H.: Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes osteogenic differentiation through Foxg1. *Cell Mol Biol Lett*, **22**, 27 (2017)
- 50) Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y., Yonekura, H.: Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 2680-2687 (2007)