

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

Effects of Collagen Peptide Ingestion on Healing of Skin Wound in a Rat Model of Pressure Ulcer

中尾 光治¹⁾ 楠畑 雅²⁾ 原 浩祐¹⁾
五十嵐雅陽³⁾ 山崎 則之³⁾ 小山 洋一^{2,4)}

ABSTRACT

Objective Effects of collagen peptide ingestion on healing of skin wound were examined in a rat model of pressure ulcer in comparison with effects of arginine known as a good ingredient.

Methods SD rats aged 8 weeks were fed a low protein diet (AIN-93M ; 10% protein), and pressure ulcers were experimentally induced at 9 weeks of age. 0.2 g/kg/day collagen peptide, or 0.1 or 0.2 g/kg/day arginine was administered twice a day, half of a total daily dose each time. Healing process was compared among the control group and the experimental groups with regard to the daily wound area ratio, sum of daily wound area ratio, time and ratio of healing of pressure ulcer, and biochemical markers of blood.

Results Wound area ratio was significantly smaller in the collagen peptide group and the arginine groups compared with the control group. Sum of daily wound area ratio was significantly smaller in the collagen peptide group but not in the arginine groups. Time and ratio of healing was significantly smaller in the collagen peptide group and the 0.2 g/kg/day arginine group. Collagen peptide-derived hydroxyprolylglycine that promotes wound healing of the skin in blood was significantly higher in the collagen peptide group.

Conclusions The ingestion of collagen peptide promotes healing of pressure ulcers with effectiveness similar to the ingestion of arginine. The action mechanism of collagen peptide may differ from that of arginine. (Jpn Pharmacol Ther 2013 ; 41 : 587-96)

KEY WORDS Pressure ulcer, Wound healing, Collagen peptide, Arginine, Rats

¹⁾ニュートリー株式会社 ²⁾株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所 ³⁾株式会社新薬リサーチセンター ⁴⁾一般財団法人日本皮革研究所
Koji Nakao and Kousuke Hara : NUTRI Co., Ltd. ; Masashi Kusubata : Research Institute of Biomatrix, Nippi Inc. ; Masaharu Igarashi and Noriyuki Yamazaki : New Drug Research Center, Inc. ; Yoh-ichi Koyama : Research Institute of Biomatrix, Nippi Inc. and Japan Institute of Leather Research

はじめに

褥瘡は寝たきりの高齢者に高頻度に生じることから、日本における褥瘡患者数は高齢化とともに今後増加すると考えられる。医療機関における発生率は近年低下傾向にあるとされるが、訪問看護を利用する在宅患者における褥瘡有病率は5.72%との調査結果が報告されている¹⁾。この調査では、在宅褥瘡患者の9割近くが配偶者もしくは家族によって介護されており、対策を講じるうえで人と物がいづれも不足していることが明らかにされている。

このような状況にあつて、食品による栄養補給が褥瘡の防止あるいは治癒促進に有効であれば、患者とその介護者の双方にとって負担の少ない褥瘡対策になると考えられる。低栄養患者における褥瘡予防および治癒促進効果に関する報告もなされ²⁻⁴⁾、サプリメントによる高エネルギーと高蛋白質の補給が推奨されている。また、特定の栄養素としては、各種ビタミン、亜鉛 (Zn) に加えて、アミノ酸の一種であるアルギニンの補給が重要だとされている⁵⁾。

サプリメントとして利用されているコラーゲンは、身体全体の蛋白質の約1/3を占める蛋白質であり、骨や皮膚などに特に多く含まれている。コラーゲンを加熱で変性させて製造するゼラチンを、蛋白分解酵素で限定的に分解したものはコラーゲンペプチドとよばれ、サプリメントとして広範に利用されている。コラーゲンペプチドを摂取すると、関節や皮膚などに有益な作用を及ぼすことがヒト⁶⁻⁸⁾や動物⁹⁻¹¹⁾で報告されている。その作用はラクトアルブミンなどの他の蛋白質よりも強いことから^{9,10)}、単なる蛋白質補給の効果ではないと考えられる。また、摂取したコラーゲンペプチドは遊離のアミノ酸として吸収されるだけでなく、アミノ酸が2~3個結合したオリゴペプチドとしても大量に体内に吸収され、これが生理作用を担う主要な因子だと考えられている^{12,13)}。

コラーゲンペプチド由来のオリゴペプチドは、培養皮膚片を用いた皮膚創傷治癒モデルにおいて治癒促進作用を示すことから¹³⁾、ヒトにおいても褥瘡の治癒を促進する可能性がある。コラーゲンペプチドは一般的な食品成分であり、サプリメントとして広範に利用されていて安全性が高いことから、褥瘡の

治癒を促進することが明らかになれば臨床的応用が期待される。五十嵐ら¹⁴⁾は、ラットの皮膚に圧負荷をかけて褥瘡を作製し、低蛋白質飼料で飼育した褥瘡モデルラットにおいて、L-アルギニンを含む食品が褥瘡の治癒を促進することを報告している。そこで本研究では、この褥瘡モデルラットを利用して、褥瘡治癒を促進するアミノ酸として摂取が推奨されているアルギニン⁵⁾と比較しながら、コラーゲンペプチドの褥瘡治癒に対する作用を検討した。

I 対象と方法

1 被験物質

対照には0.8%クエン酸水溶液を使用した。コラーゲンペプチド(株ニッピ)は、投与量が0.2 g/kg/日となるように0.8%クエン酸溶液にて調製した。アルギニン(プロテインケミカル(株))は、0.1 g/kg/日または0.2 g/kg/日となるように0.8%クエン酸水溶液にて調製した。

2 動物と飼育条件

7週齢のSlc:SD雄ラット(日本エスエルシー(株))を購入し、1週間の検疫期間後に1週間の予備飼育を行った。検疫期間中は普通飼料(固型ラボMRストック、粗蛋白質含量約19%、日本農産工業(株))を与え、予備飼育期間から試験終了までは低蛋白質飼料(AIN-93M、蛋白質含量約10%、Test Diet)を自由に摂取させた。飲料水は水道水を自由に摂取させた。動物は照明時間8:00~20:00(明12時間、暗12時間)、温度22±3°C、湿度50±20%、換気回数13~17回/時間(HEPAフィルターで濾過したオールフレッシュエア方式)の設定環境下の飼育室内で、ステンレス製可動ラックに装着したステンレス製金網2連ケージの1区画(255W×185D×200H mm)に個別に収容した。

なお、本研究は「動物の愛護及び管理に関する法律」〔法律第105号、昭和48年10月1日(平成17年6月22日一部改正)〕、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第88号、平成18年4月28日)および「動物の殺処分方法に関する指針」〔総理府告示第40号、平成7年7月4日(平成19年11月12日一部改正:環境省告示第105号)〕に合致し、(株)新薬リサーチセンターの

動物実験委員会が規定する審議(審議番号 121102A)を通過した後実施した。

3 試験方法

1) 褥瘡モデルの作製

褥瘡モデルの作製は既報¹⁴⁾に準じ、予備飼育終了日に行った。あらかじめ右第三転子上の皮膚を除去した9週齢のラットに、ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg ならびにアロバルビタール 20 mg/kg を腹腔内投与して麻酔し、木製固定板上に腹位に固定した。大腿部と固定板の間にクッションとして脱脂綿を入れ、右第三転子上の皮膚に、ゴム栓(直径 12 mm)をつけた 1.02~1.03 kg のステンレス棒(直径 19 mm, 長さ 50 cm)をのせて 24 時間圧負荷(902.3~911.2 g/cm²)をかけた。圧負荷期間中は、エーテル、ペントバルビタールナトリウム、アロバルビタールの追加麻酔を施した。24 時間後に圧負荷を解除し、5%ブドウ糖液を 10 mL/kg 経口投与した。圧負荷解除の2日後に、エーテル麻酔下にて壊死した皮膚を外科的に除去して褥瘡モデルとした。

2) 群分け

褥瘡モデルラットの皮膚除去部位(創面)を滅菌生理食塩水に浸した脱脂綿で洗浄した後、創面の長径および短径をノギスで測定し、創面積(創面の長径×短径)を算出した。次に、創面積を指標として、層別連続無作為化法を用いて各群 10 匹となるように 4 群に割り付けた。群分け後、いずれの群にも低蛋白質飼料を与えて飼育した。なお、各群の体重に有意差がないことを統計処理で確認した。

3) 被験物質の投与

調製した被験物質は、群分け終了後より 1 日 2 回(1 回目と 2 回目の投与間隔は 8 時間)の頻度で褥瘡部の上皮形成が完了する前日まで 5 mL/kg (2 回合計 10 mL/kg/日)の割合で、0.8%クエン酸水溶液(以下、対照群)、0.2 g/kg/日コラーゲンペプチド(コラーゲンペプチド群)、0.1 g/kg/日アルギニン(0.1Arg 群)または 0.2 g/kg/日アルギニン(0.2Arg 群)を経口投与した。被験物質は、ディスポーザブル経口ゾンデ((有)フチガミ器械)を装着したディスポーザブル注射筒(テルモ(株))に充填して投与した。なお、投与開始日(群分け終了直後)については 10 mL/kg の割合で換算し、1 日の投与量を 1 回で投与した。

4) 創面の処置

群分け終了後より、1 日 1 回、褥瘡部の上皮形成が完了する前日まで以下の処置を行った。すなわち、滅菌生理食塩水に浸した滅菌ガーゼを用いて創面を清拭し、さらに滅菌生理食塩水に浸した滅菌ガーゼ 2 枚を創面にのせた後、伸縮性包帯で固定した。

5) 観察方法

体重は、予備飼育終了日(圧負荷開始日)、群分け日(投与 1 日目)、投与期間中(投与 3, 7, 11, 15, 19, 23 および 27 日目)および治癒日に測定した。ただし、群分け日以降は創面に貼付した伸縮性包帯を除去して測定した。

褥瘡モデル作製および被験物質の投与開始日を 1 日目とし、被験物質の投与開始より上皮形成が完了するまで 1 日 1 回、群分け時と同様に創面積を測定した。また、測定された創面積を用いて、次式により、投与開始時の創面積に対する創面積比(%)および創面積比総和(創面積比曲線下面積)を算出した。また、被験物質投与開始より上皮形成が完了するまでの日数を治癒日数とし、各群の動物数に対する治癒動物の合計匹数を治癒率(%)とした。なお、試験期間を通じて創面の感染が疑われる所見はみられなかった。

$$\text{創面積比}(\%) = [(\text{測定日の創面積}) / (\text{投与開始前の創面積})] \times 100$$

$$\text{創面積比総和}(\% \times \text{日}) = \sum [(n \text{ 日後の創面積比} + (n+1) \text{ 日後の創面積比}) / 2]$$

$$n: \text{投与開始日から治癒前日までの日数}$$

$$\text{治癒率}(\%) = [(\text{治癒動物の合計匹数}) / (\text{各群の動物数})] \times 100$$

6) 採血

群分け時を含めて週 1 回の割合で、毎日の 1 回目の投与から 30 分後に頸静脈より約 0.3 mL 採血し、血漿を 150 μL 分取して -80°C で凍結保存した。さらに、褥瘡部の上皮形成の完了が確認された動物については腹部大静脈より採血を行い、-80°C で凍結保存した。なお、採血はエーテル麻酔下で実施し、採血に使用するディスポーザブル注射針およびディスポーザブル注射筒(テルモ(株))は、あらかじめヘパリンナトリウム注 1 万単位/mL(味の素(株))を用いてヘパリナイズ処理を行った。

7) 血漿の分析

血漿のアルブミンは治癒日において BCG 法 (7070 形自動分析装置, (株)日立製作所) で測定した。また, 血漿遊離アミノ酸および血漿オリゴペプチドの測定は, 投与 8 日目において pentafluorophenyl-propyl-bonded silica column (4.6×250 mm, 5 mm, Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA) と LC/MS/MS system (3200QTRAP, AB Sciex, Framingham, MA; Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用する方法¹⁵⁾に準じて行った。

4 統計処理

体重, 創面積比, 創面積比総和, 治癒日数, 血漿アルブミン, 血漿遊離アミノ酸および血漿オリゴペプチドは, 各群で平均値および標準誤差を算出した。各群間の有意差は, Bartlett 法により等分散性の検定を行い, 等分散の場合はさらに一元配置分散分析を行い, 有意な場合は Tukey 法により平均値の比較を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の *H* 検定を行い, 有意な場合は Tukey 法により平均順位の比較を行った。治癒率における各群間の有意差は, Kaplan-Meier plot を実施し, 試験期間全体についての Logrank 検定により比較を行った。Logrank 検定については, 第 1 種の過誤を調整するため Sidak の方法で多重性の調整を実施した。なお, Bartlett 法, 一元配置分散分析および Kruskal-Wallis の *H* 検定については有意水準を危険率 5%, Tukey 法および Logrank 検定については有意水準を危険率 5% および 1% とした。

また, コラーゲンペプチド群と 0.1Arg 群および 0.2Arg 群の生物学的同等性については, 同等性判定パラメータを創面積比総和に設定し, その対数変換値を指標として分散分析およびその平均値の差の 90% 信頼区間の算出を行って検証した。なお, 分散分析の有意水準は $\alpha=0.05$ ないし 0.10 とした。生物学的同等性は, コラーゲンペプチド群と 0.1Arg 群, コラーゲンペプチド群と 0.2Arg 群のそれぞれの薬力学的同等性判定のパラメータの対数値の平均値の差の 90% 信頼区間が, $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ の範囲にあるとき生物学的に同等とした。

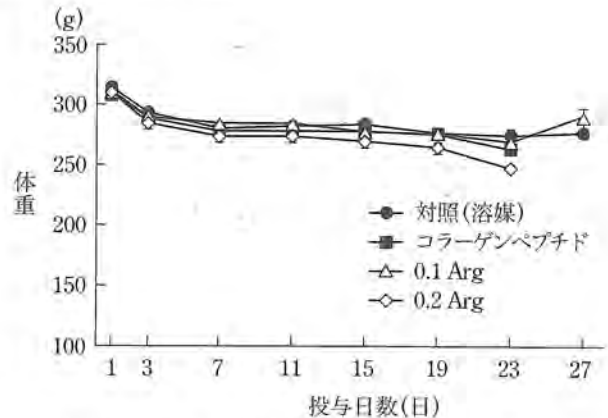


図 1 褥瘡モデルラットの体重推移

グラフは, 投与 19 日目までは 10 例/群の, 23 日目以降は治癒動物を除いた例数の平均値±標準誤差を示す。各群間で有意差なし。27 日目のコラーゲンペプチド群および 0.2Arg 群は, その前日までに全例が治癒したためデータはない。

II 結 果

1 体 重

体重は, 対照群では投与 1~7 日目にかけて約 30 g の減少がみられ, その後は横ばいで推移した (図 1)。コラーゲンペプチド群, 0.1Arg 群および 0.2Arg 群においても対照群と同様な推移を示し, 各群間で有意差はみられなかった。なお, 投与期間中の平均推定摂餌量は 23.8 g/日/匹, 摂餌からの平均推定蛋白質摂取量は 2.38 g/日/匹, 平均コラーゲンペプチド投与量は 0.056 g/日/匹であった。

2 創面積比

創面積比 (図 2) は, 対照群では投与開始翌日より徐々に低下して治癒が進行した。コラーゲンペプチド群でも投与開始翌日より創面積比が徐々に低下し, 対照群と比較して投与 4, 7, 8, 11~13, 17, 19 および 20 日目に有意な低値が認められた。0.1Arg 群では対照群と比較して投与 4 および 7 日目に, 0.2Arg 群では投与 7, 13, 16~21 日目に有意な低値が認められた。

3 創面積比総和

創面積比総和 (創面積比曲線下面積) (図 3) は, 対照群では $723.4 \pm 22.9\%$ ・日を示した。一方, コラーゲンペプチド群では $570.7 \pm 23.9\%$ ・日を示し, 対照群と比較して有意な低値であった。0.1Arg 群で

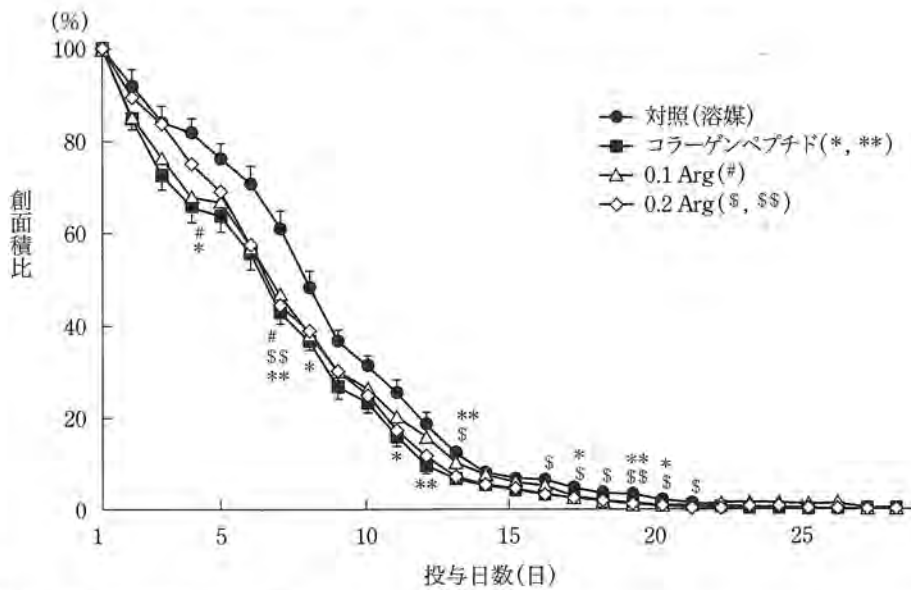


図 2 褥瘡モデルラットの創面積比推移

グラフは、投与 19 日目までは 10 例/群の、20 日目以降は治癒動物を除いた例数の平均値±標準誤差を示す。24 日目以降はコラーゲンペプチド群の全例で治癒したため統計処理を実施していない。

*, #, \$P<0.05, **, \$\$P<0.01 vs. 対照群

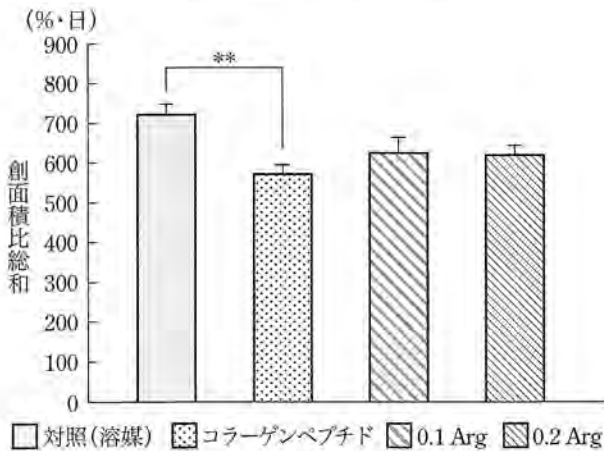


図 3 褥瘡モデルラットの創面積比総和

グラフは 10 例/群の平均値±標準誤差を示す。

**P<0.01 vs. 対照群

は $621.5 \pm 39.6\% \cdot \text{日}$ 、0.2Arg 群では $616.5 \pm 22.8\% \cdot \text{日}$ をそれぞれ示し、対照群と比較して低値となる傾向を示したが有意差は認められなかった。

創面積比総和をパラメータとして、コラーゲンペプチド群と 0.1Arg 群および 0.2Arg 群の同等性について検証した。創面積比総和の対数値の平均値の差の 90% 信頼区間が、対 0.1Arg 群では $\log(0.94) \sim \log(1.23)$ 、対 0.2Arg 群では $\log(0.98) \sim \log(1.19)$

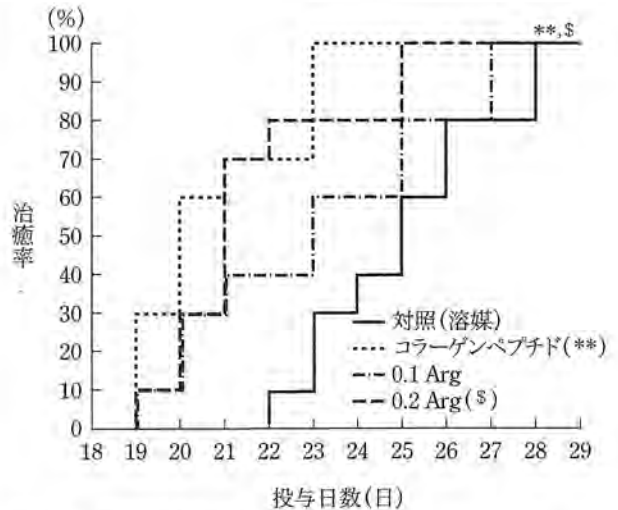


図 4 褥瘡モデルラットの治癒率推移

グラフは 10 例/群のうち治癒した動物の割合 (%) を示す。

\$P<0.05, **P<0.01 vs. 対照群

となり、それぞれ $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ の範囲にあったため、コラーゲンペプチド摂取は 0.1Arg 群および 0.2Arg 群でのアルギニン摂取と生物学的に同等の創面積の縮小効果をもつと判定された。

4 治癒率および治癒日数

治癒率を図 4 に、治癒日数を図 5 に示す。治癒率

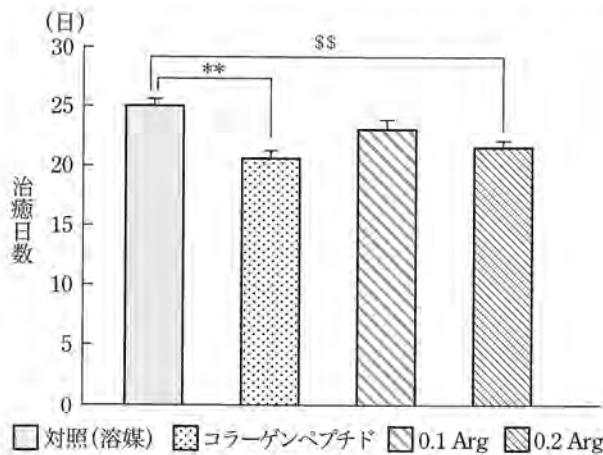


図 5 褥瘡モデルラットの治癒日数
 グラフは 10 例/群の平均値±標準誤差を示す。
 **, \$\$P<0.01 vs. 対照群

表 1 治癒日における血漿アルブミン濃度

群	血漿アルブミン (g/dL)
対照 (溶媒)	2.44 ± 0.04
コラーゲンペプチド	2.51 ± 0.04
0.1Arg	2.57 ± 0.03
0.2Arg	2.56 ± 0.05

表は 10 例/群の平均値±標準誤差を示す。各群間で有意差なし。

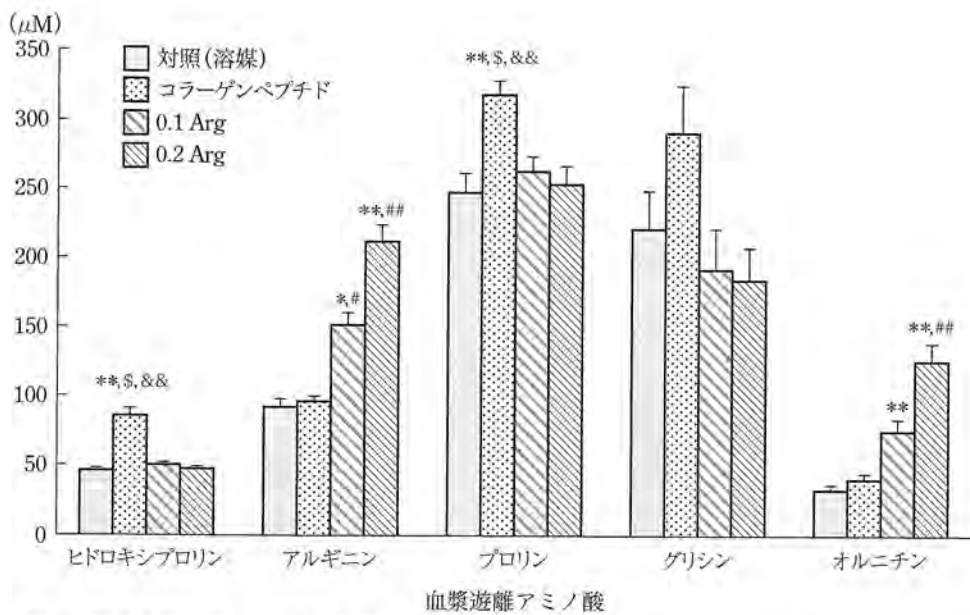


図 6 褥瘡モデルラットの血漿遊離アミノ酸
 グラフは投与 8 日目における 10 例/群の平均値±標準誤差を示す。
 *P<0.05, **P<0.01 vs. 対照群; *P<0.05, **P<0.01 vs. コラーゲンペプチド群; \$P<0.05 vs. 0.1Arg 群; &&P<0.01 vs. 0.2Arg 群

は、対照群では 22 日目から治癒完了が観察され、28 日目に全例が治癒した。一方、他の 3 群では 19 日目から治癒完了が観察された。コラーゲンペプチド群では、他の群よりも早い時期から治癒率の増加が観察された。コラーゲンペプチド群および 0.2Arg 群では対照群と比較して有意差が認められたが、有意差はコラーゲンペプチド群のほうが大きかった。

治癒日数は、対照群では 25.0 ± 0.6 日であった。一方、コラーゲンペプチド群では 20.7 ± 0.5 日であり、対照群と比較して有意な短縮が認められた。0.2Arg 群では 21.5 ± 0.6 日で、有意な短縮が認められたが、0.1Arg 群では 23.0 ± 0.9 日で、対照群と比較して有意差はなかった。

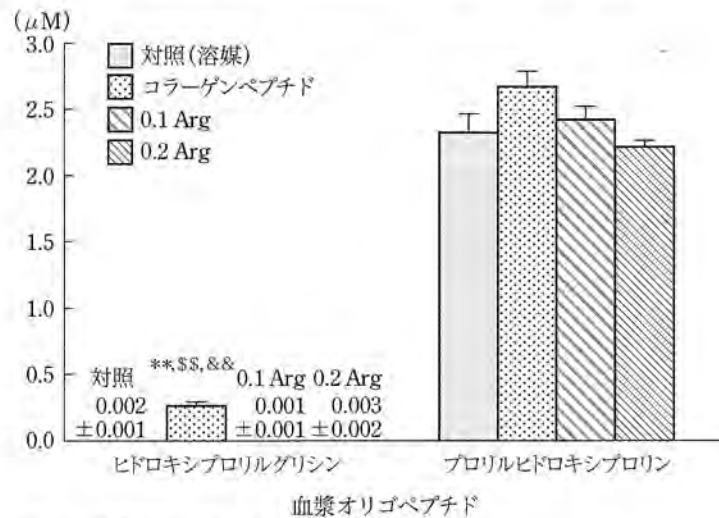


図 7 褥瘡モデルラットの血漿オリゴペプチド
 グラフは投与 8 日目における 10 例/群の平均値±標準誤差を示す。
 ** $P < 0.01$ vs. 対照群; \$ $P < 0.01$ vs. 0.1Arg 群; &S $P < 0.01$ vs. 0.2Arg 群

5 血漿分析

治癒日における血漿中のアルブミン量(表 1)は、各群間で有意差はみられなかった。投与 8 日目における血漿遊離アミノ酸(図 6)については、コラーゲンペプチドに多く含まれるプロリンとヒドロキシプロリンが、対照群、0.1Arg 群および 0.2Arg 群と比較してコラーゲンペプチド群で有意に高値であった。また、アルギニンは対照群およびコラーゲンペプチド群と比較して、0.1Arg 群と 0.2Arg 群とともに有意に高値であった。アルギニンの代謝産物であるオルニチンは、対照群と比較して 0.1Arg 群および 0.2Arg 群でいずれも有意に高値であり、コラーゲンペプチド群に対しても 0.2Arg 群で有意に高値であった。アラニンの対照群に対する 0.1Arg 群の数値、セリンの 0.2Arg 群に対するコラーゲンペプチド群の数値、アスパラギン酸の 0.1Arg 群に対する 0.2Arg 群の数値も有意に高値を示した。

血漿中のオリゴペプチド(図 7)については、コラーゲンペプチド由来と考えられるヒドロキシプロリルグリシン(HypGly)がコラーゲンペプチド群で有意な高値を示した(対照群: $0.002 \pm 0.001 \mu\text{M}$, 0.1Arg 群: $0.001 \pm 0.001 \mu\text{M}$, 0.2Arg 群: $0.003 \pm 0.002 \mu\text{M}$)。また、プロリルヒドロキシプロリン(ProHyp)については、有意差は検出されなかったもののコラーゲンペプチド群で高値を示した。ロイシルヒド

ロキシプロリルグリシン(LeuHypGly)は、対照群に対して 0.2Arg 群で有意に高値を示したが、その血漿中の量はわずかであった。

III 考 察

コラーゲンペプチド経口摂取の褥瘡治療に対する作用を、治療モデルラットを利用して、アルギニンの褥瘡治療促進作用と比較した。

褥瘡治療の指標となる創面積比は、いずれの群でも試験期間を通じて減少したが、コラーゲンペプチド群、0.1Arg 群、0.2Arg 群では対照群と比較して有意な低値が複数の測定日で観察された。これを創面積比総和でみると、コラーゲンペプチド群でのみ対照群に対して有意な低値を示し、明らかな治療促進作用がみられた。また、治療日数についても、コラーゲンペプチド群と 0.2Arg 群で有意な治療日数の減少が観察され、治療促進効果が確認された。しかし、各群のあいだで血漿アルブミン値に差がないことから、このような治療促進作用は血漿アルブミン値の上昇を介したものではないと考えられる。コラーゲンペプチドとアルギニンの生物学的同等性について検証した結果からは、コラーゲンペプチド群は 0.1Arg 群および 0.2Arg 群と同等の創面積縮小効果があることが示され、また、治療率はコラーゲンペ

プチド群で 0.2Arg 群よりも有意差が大きかったことから、コラーゲンペプチドの摂取はアルギニン摂取と同等の治癒促進効果、あるいはそれ以上の作用を示す可能性があると考えられる。

経口摂取されたコラーゲンペプチドは、図 6 に示したように遊離のアミノ酸として吸収されるだけでなく、アミノ酸が 2~3 個結合した状態 (オリゴペプチド) としても大量に吸収される¹²⁾。そのなかで量的にとくに多いのが、ProHyp と HypGly である^{12,16)}。たとえば、ヒトが 9.4~23 g のコラーゲンペプチドを摂取したとき、血液中に検出される ProHyp の濃度は 20~60 μ M の高濃度となり、その後すぐに減少する¹²⁾。図 7 に示すように、本試験においても褥瘡ラットの血漿にこれらのオリゴペプチドが検出された。とくに、HypGly についてはコラーゲンペプチド群で有意な高値を示しており、摂取したコラーゲンペプチドに由来すると考えられる。ProHyp はコラーゲンペプチド群で高値を示しており、摂取したコラーゲンペプチドに由来すると推定されるが、他の 3 群でも検出された。今回使用した低蛋白質飼料 (AIN-93M) に含有されている蛋白質は、ヒドロキシプロリン (Hyp) を含まないカゼインのみであることから、対照群やアルギニン投与群の血漿に検出された ProHyp と、コラーゲンペプチド群で検出された ProHyp の一部は飼料由来ではなく、褥瘡モデル部位でのコラーゲン合成と分解を含む体内のコラーゲン代謝に由来すると推定される。

ProHyp や HypGly は、軟骨細胞¹⁷⁾、滑膜細胞¹⁸⁾、前駆脂肪細胞¹⁹⁾などの機能に影響を与え、皮膚についても、培養皮膚片から遊走する線維芽細胞の増殖を促進し^{13,16)}、また、培養皮膚線維芽細胞におけるヒアルロン酸合成酵素 2 の遺伝子発現とヒアルロン酸合成を促進する²⁰⁾ことから、経口摂取したコラーゲンペプチドの生理作用を担う主要な成分だと考えられている。今回の試験でも、これらのオリゴペプチドが褥瘡の治癒を促進した可能性が考えられる。Hyp はコラーゲンに特徴的なアミノ酸であり、ProHyp や HypGly は他の一般的な蛋白質を摂取した場合には出現しないことから、これらのオリゴペプチドによる作用はコラーゲンペプチドに特徴的だと考えられる。なお、今回の試験におけるコラーゲンペプチドの平均投与量は総摂取蛋白質量の 2.3% に過

ぎず、総摂取蛋白質量としての増加が褥瘡治癒を促進したとは考えにくい。すなわち、コラーゲンペプチドの摂取は、低蛋白質状態における蛋白質補給という意義だけでなく、コラーゲン独自の機序を介した褥瘡治癒促進作用を有すると考えられる。

一方、血漿の遊離アミノ酸については摂取した成分を反映した変化がみられた。すなわち、コラーゲンペプチド群では、コラーゲンペプチドに多く含有される Hyp、プロリンおよびグリシンが高値を示した。また、0.1Arg 群および 0.2Arg 群では、アルギニンとその代謝産物であるオルニチンが投与量に依存して増加した。このような血漿オリゴペプチドと遊離アミノ酸の測定結果は、コラーゲンペプチドとアルギニンが異なる機序で褥瘡の治癒を促進したことを示唆している。

本検討におけるコラーゲンペプチドの投与量は、小山²¹⁾が行った健常女性を対象とした肌に関する二重盲検比較試験を根拠として 0.2 g/kg/日に設定した。平成 23 年国民健康・栄養調査によると、日本人の成人は 1 日に 67.7 g の蛋白質を摂取しており、そのうち動物性蛋白質は 36.2 g である²²⁾。また、食事からのコラーゲン摂取量は 1 日 1.9 g 程度と推定されており²³⁾、36.2 g の動物性蛋白質の摂取と比較すると少量だと思われる。食事以外にサプリメントとして摂取するコラーゲンペプチドの量は通常 1 日 5 から 10 g 程度であることから、本研究で設定した 0.2 g/kg/日の摂取量はヒトでの臨床用量としても適用可能だと思われる。ちなみに、成長期のラットにコラーゲンペプチドを過剰摂取させた報告によると、1.66 g/kg/日という多量のコラーゲンペプチドを 4 週間摂取した場合でも、体重と腎臓などの臓器重量に異常は観察されていない²⁴⁾。本研究では、約 10% の蛋白質を含む低蛋白質飼料に加えて、コラーゲンペプチド群は 0.2 g/kg/日のコラーゲンペプチドを摂取し、0.1Arg 群および 0.2Arg 群ではそれぞれ 0.1 または 0.2 g/kg/日のアルギニンを摂取したが、試験期間中を通じて体重が増加しなかったのは低蛋白質飼料の影響だと考えられる。ちなみに、本試験と同一系統の Slc:SD ラットを固型飼料ラボ MR ストックで飼育した場合の血漿アルブミン濃度は 4.52 ± 0.2 g/dL²⁵⁾であり、本試験では低蛋白質飼料の摂取によって血漿アルブミン濃度が低下し

たことがわかる(表1)。しかし、各群間で体重および治癒日の血漿アルブミン値には有意差がないことから、コラーゲンペプチド投与による有害事象はなかったと推定される。コラーゲンペプチドは冷水にも可溶性であり、十分な精製によってほぼ無臭化できることから、臨床応用に合わせたさまざまな食品化が可能だと思われる。

結 論

低蛋白質飼料で飼育した褥瘡モデルラットに0.2 g/kg/日コラーゲンペプチド、または0.1ないし0.2 g/kg/日アルギニンを用いて1日2回に分けて連続経口投与し、創面積比と治癒率の推移、創面積比総和、治癒日数および血漿分析によって褥瘡治癒促進効果を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

1) コラーゲンペプチドは有害な事象を伴うことなく、アルギニンと同等の褥瘡治癒促進作用を有していた。

2) コラーゲンペプチドの作用は、コラーゲンペプチドの消化産物であるオリゴペプチドを介するものと想定され、アルギニンとは異なる機序によるものと考えられた。

要 約

皮膚の創傷治癒を促進することが示唆されているコラーゲンペプチドを褥瘡モデルラットに連続経口投与して、褥瘡治癒に対する効果をアルギニンと比較した。

8週齢から低蛋白質飼料(AIN-93M、蛋白質含量約10%)で飼育した9週齢のSDラットに褥瘡を作製し、溶媒(0.8%クエン酸水溶液)を対照として、0.2 g/kg/日コラーゲンペプチド、0.1または0.2 g/kg/日のアルギニンを1日2回に分けて毎日経口投与した。

治癒の指標である創面積比(投与開始前の創面積に対する測定日の創面積の比)の治癒完了までの総和は、対照群に対してコラーゲンペプチド群で有意に低値であった。治癒日数はコラーゲンペプチド群と0.2 g/kg/日アルギニン群で有意に短縮された。血漿中のプロリンはコラーゲンペプチド群で、アルギ

ニンは0.2 g/kg/日アルギニン群で有意に高値であった。また、治癒促進作用を有することが示唆されているコラーゲンペプチド由来のヒドロキシプロリルグリシン(HypGly)は、コラーゲンペプチド群でのみ検出され、プロリルヒドロキシプロリン(Pro-Hyp)もコラーゲンペプチド群で高値であった。

以上の結果より、コラーゲンペプチドの摂取は、低蛋白質飼料で飼育された褥瘡モデルラットに対して、アルギニンと同等の褥瘡治癒促進機能、あるいはそれ以上の作用を示す可能性があることが示唆された。また、コラーゲンペプチド由来のオリゴペプチドがその作用に関与し、アルギニンとは異なる機序であることが示唆された。

利益相反：なし。

文 献

- 1) 阿曾洋子, 井上多鶴子, 塚田邦夫, 矢口美恵子, 伊藤美智子, 岡本泰岳ほか. 訪問看護ステーションにおける褥瘡患者の実態: 在宅医療委員会実態調査報告1. 褥瘡会誌 2007; 9 (1): 103-8.
- 2) Langer G, Schloemer G, Knerr A, Kuss O, Behrens J. Nutritional interventions for preventing and treating pressure ulcers. Cochrane Database Syst Rev 2003; 4: CD003216.
- 3) Stratton RJ, Ek AC, Engfer M, Moore Z, Rigby P, Wolfe R, et al. Enteral nutritional support in prevention and treatment of pressure ulcers: a systematic review and meta-analysis. Ageing Res Rev 2005; 4 (3): 422-50.
- 4) Breslow RA, Hallfrisch J, Guy DG, Crawley B, Goldberg AP. The importance of dietary protein in healing pressure ulcers. J Am Geriatr Soc 1993; 41 (4): 357-62.
- 5) 褥瘡予防・管理ガイドライン(第3版). 褥瘡会誌 2012; 14 (2): 165-226.
- 6) Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, et al. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. Curr Med Res Opin 2008; 24 (5): 1485-96.
- 7) 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角層水分量の改善効果. 日食科工会誌 2009; 56 (3): 137-45.
- 8) 高瀬貴仁, 清水和正, 柚木政行, 安田英之, 丸谷礼子, 斎藤安弘ほか. コラーゲンペプチド摂取による肌症状改善効果. 医学と薬学 2011; 65 (4): 563-73.
- 9) Minaguchi J, Koyama Y, Meguri N, Hosaka Y, Ueda H, Kusubata M, et al. Effects of ingestion of collagen peptide

- on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *J Nutr Sci Vitaminol* 2005 ; 51 : 169-74.
- 10) Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, Ueda H, Watanabe T, Araya T, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006 ; 52 : 211-5.
 - 11) Tanaka M, Koyama Y, Nomura Y. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009 ; 73 (4) : 930-2.
 - 12) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2005 ; 53 : 6531-6.
 - 13) Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, et al. Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem* 2009 ; 57 : 444-9.
 - 14) 五十嵐雅陽, 小松美穂, 青木麻美, 森下幸治, 野々村徹, 富田晋平ほか. 低蛋白質飼育・褥瘡モデルラットを用いた L-アルギニンおよび L-グルタミン混合物の経口投与による褥瘡治癒促進効果. *薬理と治療* 2009 ; 37 (9) : 745-50.
 - 15) Yoshida H, Mizukoshi T, Hirayama K, Miyano H. Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2007 ; 55 : 551-60.
 - 16) Shigemura Y, Akaba S, Kawashima E, Park EY, Nakamura Y, Sato K. Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chem* 2011 ; 129 : 1019-24.
 - 17) Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage *in vitro* and *in vivo*. *Osteoarth Cartilage* 2009 ; 17 : 1620-7.
 - 18) Ohara H, Iida H, Ito K, Takeuchi Y, Nomura Y. Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using *in vitro* cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010 ; 74 (10) : 2096-9.
 - 19) Minaguchi J, Tometsuka C, Koyama Y, Kusubata M, Nagayasu A, Sawaya S, et al. Effects of collagen-derived oligopeptide prolylhydroxyproline on differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Food Sci Technol Res* 2012 ; 18 (4) : 593-9.
 - 20) Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol* 2010 ; 37 : 330-8.
 - 21) 小山洋一. コラーゲンの肌への作用・最新研究. *食品と開発* 2009 ; 44 (7) : 10-2.
 - 22) 平成 23 年国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002q1st-att/2r9852000002q1wo.pdf>
 - 23) 野口知里, 小林身哉, 小山洋一. 20代から50代日本人女性における食事由来コラーゲン推定摂取量の特徴. *栄養学雑誌* 2012 ; 70 (2) : 120-8.
 - 24) 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* 2004 ; 22 : 547-53.
 - 25) 日本エスエルシー(株)ウェブサイト <http://jslc.co.jp/inform/2007data/sd2007.pdf>

* * *