

# 大豆オリゴペプチド食の内因性モルヒネ様鎮痛物質分泌に対する効果

白神俊幸\*

ノートルダム清心女子大学人間生活学部食品栄養学科

## Effect of a Soy-derived Oligopeptide Diet on Plasma Levels of Endogenous Morphine-like Analgesic Peptides in Rats

Toshiyuki SHIRAGA

<sup>1</sup>Department of Foods and Human Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Notre Dame Seishin University, Okayama 700-8516

### ABSTRACT

Endogenous morphine-like analgesic peptides, enkephalins, endorphins and dynorphins, show an analgesic effect by binding to their specific receptors, respectively. Previous pharmacological studies indicated that a subcutaneous administration of L-arginine to animals induces an antinociceptive effect by an increase in the brain level of kyotorphin (L-tyrosinyl-L-arginine) kyotrophin is an endogenous analgesic peptide and an enkephalin releaser in the brain, and that an intravenous administration of L-arginine to patients with various kinds of persistent pain resulted in lasting analgesia. It is also reported that a diet containing protein derived from soy had an effect on the analgesia in murine bone cancer pain model. In addition, it is known that digested products of dietary proteins, di- and tripeptides, are absorbed *via* an intestinal H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1 which has a high capacity, and that soy proteins have an excellent nutritional specificity compared with those in the other beans. From these facts, the effect of soy oligopeptides both in the absorption and the analgesic action can be expected. The aim of this study was to investigate the effects of a soy-derived oligopeptide diet on plasma levels of leucine-enkephalin,  $\beta$ -endorphin and dynorphin A in rats. Plasma levels of these opioid peptides in rats fed a diet containing either soy protein isolate or soy-derived oligopeptides were significantly higher than those in rats fed a milk casein diet, respectively. It is, therefore, suggested that a soy oligopeptide diet might be effective for pain control by increasing the plasma opioids. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 59-62, 2007.

\*〒700-8516 岡山市伊福町2-16-9

Key words: morphine-like analgesic peptides, plasma level, analgesia, soy-derived oligopeptide diet, intestinal absorption

痛みは本来生理的な生体警告反応であるが、過剰かつ持続的痛みは除去する必要がある。極度の痛みを抑制する目的で、従来よりモルヒネ等が鎮痛薬として用いられているが、これは生体が有する内因性のモルヒネ様鎮痛物質（オピオイドペプチド）に対する受容体（オピオイド受容体）に結合することで強力な鎮痛作用を示す。内因性オピオイドにはエンケファリン類、エンドルフィン類、ダイノルフィン類が知られており、メチオニンエンケファリンやロイシンエンケファリンは $\delta$ 受容体、 $\beta$ -エンドルフィンには $\mu$ 受容体、ダイノルフィンAは $\kappa$ 受容体に結合することにより生理的な疼痛制御を行う。これらのオピオイドペプチドは、脳を主とする中枢神経系のほか、副腎髄質や消化管などで産生される。

アルギニンは、慢性の強い痛みにも鎮痛作用を示す、天然の鎮痛成分であることが知られている。この鎮痛作用は、アルギニン摂取によって脳内神経ペプチドであるキョートルフィン（アルギニンとチロシンのジペプチド）の合成反応が促進することにより、オピオイドペプチドの一種エンケファリンの放出が促進し、これがオピオイド受容体に結合することによって考えられる。実際、アルギニンをマウスに皮下投与すると、脳内のキョートルフィンの濃度増加に依存して鎮痛効果が現れ<sup>1)</sup>、ヒトにおいても他の治療効果が期待できない難治性の慢性疼痛患者へアルギニンを静脈投与することにより持続性の鎮痛効果が現れることが報告されている<sup>2)</sup>。また、担がんマウスにおいて大豆たん白質食を摂取すると、がん性疼痛が軽減されるという報告がある<sup>3)</sup>。

一般に、食事として摂取されたたん白質は、最終的に小腸においてペプチダーゼによる膜消化を受け、主にジおよびトリペプチドとして、刷子縁膜に局在するペプチド輸送担体PepT1を介して速やかに吸収される<sup>4,5)</sup>。ペプチド輸送系はアミノ酸輸送系に比べ、極めて幅広い基質認識特性と大きな輸送能を有しており、食事由来のペプチドを速やかに体内へ吸収する。ジペプチドやアルギニンなどの一部の遊離アミノ酸によって小腸ペプチド輸送系が誘導されることも明らかになっている<sup>6)</sup>。また、畑の肉と呼ばれる大豆は構成アミノ酸のバランスが良く、他の豆類に比べ可食部当たりのたん白質やアルギニンの量が多い。

以上より、食事による鎮痛効果を考えた場合、大豆由来のたん白質、特に大豆ジ/トリペプチドを主とするオリゴペプチド食として摂取することが、体内への

吸収および鎮痛作用の面から効果が一層期待できるものと考えられる。そこで本研究では、たん白質源としてミルクカゼイン、分離大豆たん白質あるいは大豆オリゴペプチドを含有する食餌を与えたラットにおける内因性モルヒネ様鎮痛物質の量的変化を血漿濃度の面から検討した。

## 方 法

### 試験飼料の調整

飼料組成はAIN-93Mに準じ、たん白質源としてミルクカゼイン、分離大豆たん白質（フジプロ）あるいは大豆オリゴペプチド（ハイニユートAM）を14%含有する飼料を調整し、それぞれAIN-93M-MC（以下MC食）、AIN-93M-SPI（以下SPI食）およびAIN-93M-AM（以下AM食）とした。

### 動物飼育

Wistar系雄ラット（日本チャールス・リバー社、7週齢、約230 g）を一週間馴化飼育した。馴化期間は全ての群にMC食を自由摂取させ、その後三群に分けてそれぞれMC食、SPI食あるいはAM食に切り替えてさらに一週間自由摂取させた。飼育期間中の採餌量および体重は原則として2日毎に測定した。

### 採血および血漿オピオイドペプチドの定量

飼育2週間後、12時間の絶食を行い、ネンブタールによる過麻酔下で、全採血、安楽死を施した。なお、本実験は本学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に則り行った。血液はEDTA（1 mg/mL of blood）およびアプロチニン（0.6 TIU/mL of blood）入り採血管にて血漿分離した。血漿中の各種オピオイドペプチドの濃度は、市販EIAキット（ロイシンエンケファリンはPhoenix Pharmaceuticals社製、 $\beta$ -エンドルフィンおよびダイノルフィンAはPeninsula Laboratories社製）を用いて説明書に従って反応させた後、モデル680マイクロプレートリーダー（Bio-Rad社）にて測定波長450 nmの吸光度を測定することにより定量化した。

## 結 果

ミルクカゼイン（MC）、分離大豆たん白質（SPI）およびオリゴペプチド（AM）食摂取が採餌量および体重変化へ与える影響

全ての群においてMC食を与えた馴化期間の一週間

ならびにその後の試験食の一週間を通じ、原則として試験期間中2日に一度採餌量および体重を測定したが、MC、SPIおよびAM食を摂取した各群間において、これらの指標における有意な差異は認められなかった(データ未掲載)。

### 各種オピオイドペプチドの血漿濃度に与えるSPI食およびAM食の影響

MC食を摂取した群に比較して、SPI食を摂取した群では有意に血漿中ロイシンエンケファリンの濃度が上昇し(約1.5倍)、AM食摂取群においてもSPI食摂取群と同様に血漿濃度が上昇することが明らかとなった(Fig. 1)。また、他のオピオイドペプチドについて血漿濃度の変動に効果があるか否か検討したところ、 $\beta$ -エンドルフィン(Fig. 2)およびダイノルフィンA(データ未掲載)においても、ロイシンエンケファリン同様、それぞれSPI食群およびAM食群においてMC食群に比べて有意に上昇していた(約1.5倍)。さらに興味深いことに、有意な差は認められなかったが、SPI食群に比べてAM食群において血漿濃度が高い傾向がみられた(Fig. 2)。

## 考 察

過去の報告において、動物へのアルギニン投与により、脳内のキョートルフィンの濃度増加に依存して鎮痛効果が現れたことや、ヒトにおいてもアルギニンの投与により持続性の鎮痛効果が現れたことから、栄養素としてのアルギニンの鎮痛効果が実証されている。しかしながら、これらの効果は経口投与によるものではなく皮下あるいは経静脈投与によるものであった<sup>1,2)</sup>。興味深いことに、担がんのモデルマウスにおいて大豆たん白質食を摂取させるとカゼイン食を摂取させた場合に比べ疼痛が軽減されたことから、食餌構成栄養素としての大豆たん白質を経口摂取した場合の鎮痛効果が明らかになり、がん性疼痛の治療へ応用できる可能性が示唆された<sup>3)</sup>。

上述のアルギニン非経口投与による鎮痛効果はエンケファリンの遊離促進によるものと考えられているが、本研究結果より、大豆分離たん白質、特に大豆オリゴペプチドの経口摂取がエンケファリン以外の内因性オピオイドペプチドの血漿濃度についても高める効果が示された。これは、大豆オリゴペプチドがこれらオピオイドペプチドの分泌を促進することにより鎮痛作用の増強に関与する可能性を示唆するものであり、摂取するたん白質の内容により痛みを制御することが可能であることが推察される。したがって、今後は分

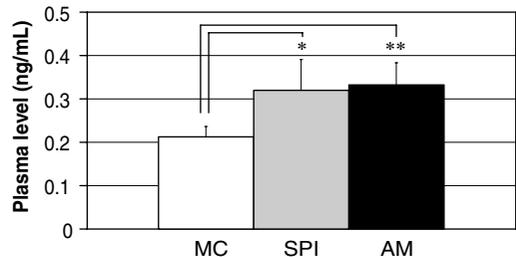


Fig. 1. Plasma level of leucine-enkephalin in rats fed MC, SPI, or AM diet. Data are mean  $\pm$  SD of 5-6 rats. \* $p$ <0.02, \*\* $p$ <0.002 v.s. MC group.

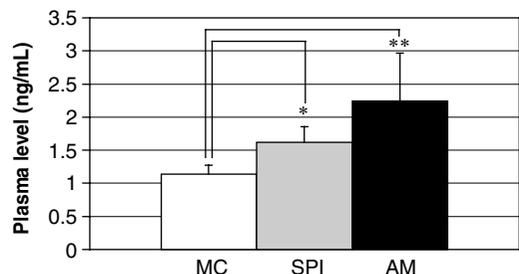


Fig. 2. Plasma level of  $\beta$ -endorphin in rats fed MC, SPI, or AM diet. Data are mean  $\pm$  SD of 5-6 rats. \* $p$ <0.003, \*\* $p$ <0.006 v.s. MC group.

離大豆たん白質およびオリゴペプチド食の鎮痛効果(抗侵害受容効果)を生理学的手法を用いて評価・判定することが必要であると考えられる。また、アルギニン単独の食餌は、生理的に多くの臓器へ影響を及ぼす可能性も考えられるが、今後検討する必要がある。

我々はこれまでに、実験的に腸管粘膜傷害を誘発したラットの試験から、腸管粘膜上皮の萎縮時において、遊離アミノ酸や糖の吸収はそれらの輸送担体の発現低下により障害されるが、ペプチド吸収は保たれ、それはペプチド輸送担体PepT1の発現維持によることを分子レベルで明らかにした<sup>7)</sup>。さらに、ラットにおいて摂取たん白質量、ペプチド食あるいは遊離アミノ酸(フェニルアラニン)食に依存して小腸ペプチド輸送活性が上昇する機構として、PepT1の発現上昇によることをつきとめ、PepT1遺伝子の転写調節にジペプチド、フェニルアラニン、リジンおよびアルギニンが関与することを明らかにしている<sup>6)</sup>。

以上より、腸管の吸収能が低下する術後侵襲時等において、大豆ペプチド栄養によりペプチド輸送活性を誘導することは、栄養状態の改善とともに痛みの制御を可能にするかもしれない。

## 要 約

内因性モルヒネ様鎮痛物質オピオイドペプチドにはエンケファリン類, エンドルフィン類, ダイノルフィン類が知られており, それぞれに特異的な受容体に結合することにより鎮痛作用を示す. アルギニンは, エンケファリンの放出促進を介して鎮痛作用を示すと考えられている. 実際, 動物やヒトにおいて, アルギニンの皮下あるいは静脈投与により持続性の鎮痛効果が現れ, 担がんマウスに大豆たん白質食を摂取させると, 疼痛が軽減される. また, 食事性たん白質が, 主にジおよびトリペプチドとして, 小腸ペプチド輸送系により速やかに吸収されることや, 大豆の栄養特性が優れていることから, 特に大豆オリゴペプチド食は吸収および鎮痛作用の面から効果が一層期待できる. 本研究では, ミルクカゼイン (MC), 分離大豆たん白質 (SPI) あるいは大豆オリゴペプチド (AM) を含有する食餌を与えたラットにおける各種内因性オピオイドの血漿濃度を調べ, MC食群に比べ, SPI食およびAM食群において有意に上昇することを見出した. 以上より, 大豆オリゴペプチドはラットの内因性オピオイドの分泌を促進し, 血中濃度を高めることが明らかになり, 痛みの制御における有効性が示唆された.

## 文 献

- 1) 高木博司 (1990): 脳から単離された活性ジペプチドKyotorphinおよびその前駆物質L-Arginineの生理・薬理作用と慢性疼痛への臨床応用 - Kyotorphin発見10年のあゆみ -. 日本薬理学雑誌, **96**, 85-96.
- 2) Harima A, Shimizu H and Takagi H (1991): Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. *Eur Neuropsychopharmacol*, **1**, 529-533.
- 3) Zhao C, Wacnik PW, Tall JM, Johns DC, Wilcox GL, Meyer RA and Raja SN (2004): Analgesic effects of a soy-containing diet in three murine bone cancer pain models. *J Pain*, **5**, 104-110.
- 4) Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V and Leibach FH (1995): Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, **270**, 6456-6463.
- 5) Miyamoto K, Shiraga T, Morita K, Yamamoto H, Haga H, Taketani Y, Tamai I, Sai Y, Tsuji A and Takeda E (1996): Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim Biophys Acta*, **1305**, 34-38.
- 6) Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, Tamai I, Tsuji A and Takeda E (1999): Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H<sup>+</sup>/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, **116**, 354-362.
- 7) Tanaka H, Miyamoto KI, Morita K, Haga H, Segawa H, Shiraga T, Fujioka A, Kouda T, Taketani Y, Hisano S, Fukui Y, Kitagawa K and Takeda E (1998): Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology*, **114**, 714-723.