

## 内因性及び外因性ホルモンペプチドによる生体内での 血圧調節機構の解明に関する研究

松藤, 寛  
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3110936>

---

出版情報：九州大学, 1995, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

第2項 アンジオテンシン代謝物の *in vivo* 生理作用

ACE阻害活性を有するANG代謝物の生体内での血圧降下作用を立証するために、SHRを用いて静注実験を行った。実験にはANGII由来のACE阻害ペプチドで最小単位のVal-Tyr及びその前駆体としてのANGIIIを用い、対照には市販のACE阻害薬であるカプトプリルを用いた。Table 5-2に示したように、全ての試料において拡張期血圧の降下が認められ、中でもVal-Tyrはカプトプリルと同様、危険率1%以下で拡張期血圧を有意に降下させた(20mg/kg; 22.6%, 50mg/kg; 28.0%)。また、その効力はカプトプリル(30 $\mu$ g/kg; 29.0%)との単純比較によりカプトプリルの1/1000程度であると見積もられる。

最大の血圧降下作用をもたらすのに必要な時間は、Val-Tyrでカプトプリルと同様に投与後1~3分であったのに対して、ANGIIIでは4.5分とその発現に時間を要することが明らかとなった。このことは、血圧の経時変化をレノグラムで示したFig.5-2からも明白であった。すなわち、Val-Tyrによる血圧降下作用は速やかに発現し、約5分程度で定常状態に戻ったのに対して、ANGIIIでは発現に至るまで若干のラグはあったが、15分後もその効果は持続していた。著者の知る限りでは、*in vivo*におけるANGIIIの血圧降下作用に関する報告は見当たらない。これは、ANGIIIが*in vitro*において強力なACE阻害活性(Table 5-1; IC<sub>50</sub>=21.9 $\mu$ M)を示す<sup>128,129)</sup>が、生体内においてはANGIIと同等のアルドステロン分泌促進作用を有する“昇圧ホルモン”として位置づけられていること<sup>113,114)</sup>からも当然であると考えられた。

**Table 5-2** Changes in blood pressure of SHR before and after intravenous administration of Val-Tyr and angiotensin III

	Dose		Blood Pressure (mmHg) $\pm$ S.E. (%)		Reduction Ratio (%)	Time (sec) $\pm$ S.E. (%)
			Before	After		
Val-Tyr	20 mg/kg	Systolic	184.8 $\pm$ 3.0	177.6 $\pm$ 3.9	3.9	136.2 $\pm$ 83.1
		Diastolic	127.4 $\pm$ 3.6	98.6 $\pm$ 6.0**	22.6	60.8 $\pm$ 17.6
Val-Tyr	50 mg/kg	Systolic	182.2 $\pm$ 4.0	164.2 $\pm$ 3.8*	9.9	196.2 $\pm$ 159.0
		Diastolic	124.8 $\pm$ 4.3	89.8 $\pm$ 3.7**	28.0	168.4 $\pm$ 127.9
ANG III	20 mg/kg	Systolic	187.2 $\pm$ 6.1	180.6 $\pm$ 8.2	3.5	572.4 $\pm$ 44.0**
		Diastolic	136.0 $\pm$ 10.5	106.2 $\pm$ 12.4	21.9	272.4 $\pm$ 25.5
Captopril	30 $\mu$ g/kg	Systolic	182.2 $\pm$ 10.2	168.0 $\pm$ 6.1	7.8	252.6 $\pm$ 77.3
		Diastolic	118.0 $\pm$ 8.5	83.8 $\pm$ 5.1**	29.0	165.8 $\pm$ 80.7

Blood pressure is shown as mean  $\pm$  SD,  $n=10$ .

Significant differences from "before administration": \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

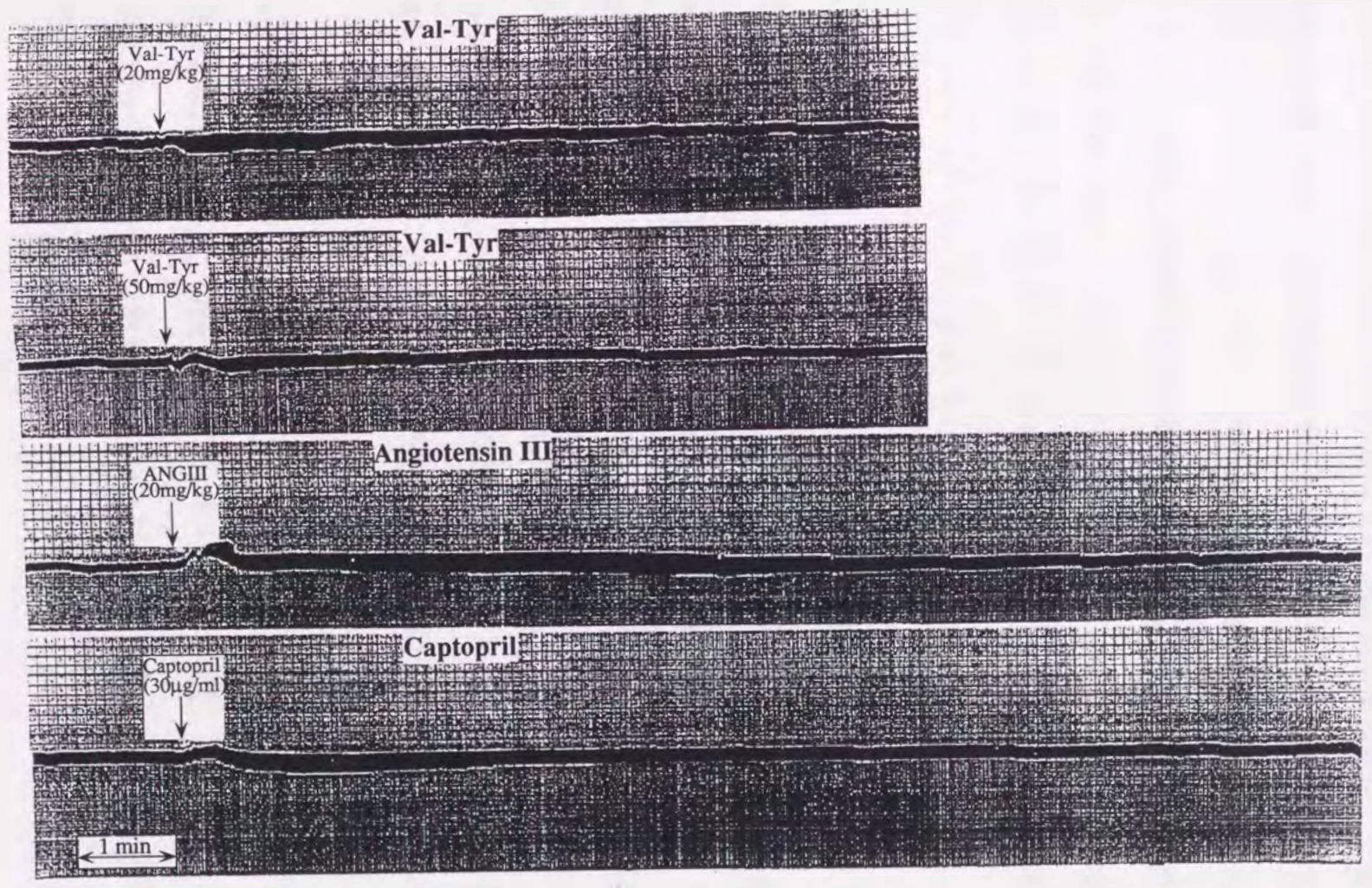
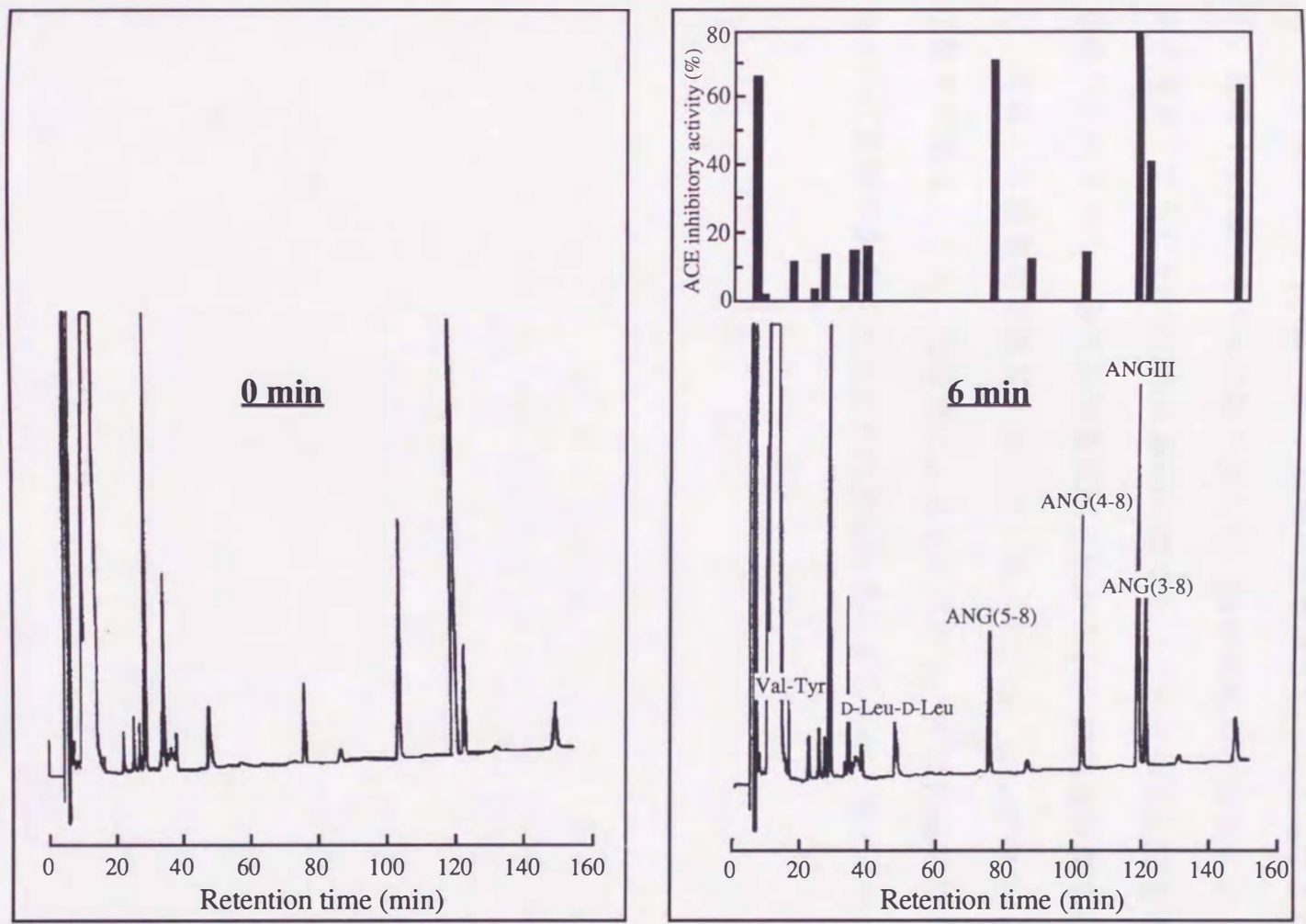


Fig.5-2 Changes in blood pressure after intravenous administration of angiotensin fragments in SHR

本プロトコールにおいても、50mg/kg以上のANGIIIを静注投与した場合、SHRは痙攣、出血、心拍数増大などを引き起こし死亡した（データは示していない）。しかしながら、20mg/kgの投与においてはTable 5-2に示したように顕著に拡張期血圧を低下させた（21.9%）。ANGIIIの血中内での分解速度が後述（Fig.5-3）するように極めて速いことを考慮すると、ANGIIIの血圧降下作用はそれ自身によるものではなく、その代謝物に起因したものであると考えられた。

### 第3項 ラット血漿中でのアンジオテンシン類の代謝挙動

次いで、SHRの血漿を用いて *in vivo*でのANGIIIの分解過程を追求した。すなわち、SHR血漿に十分量のANGIIIを加えてインキュベートし、逆相HPLCにより生成した代謝物を確認した。Cosmosil 5C18-ARカラムを用いてアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出を行ったところ、Fig.5-3に示したように6分のインキュベートによりACE阻害活性を有する4つのピークの増大が認められ、アミノ酸分析により各々はANG(3-8)、(4-8)、(5-8)、Val-Tyrであると同定された。なお、これら代謝物のピークが0分時においても存在していたことは、血漿中におけるANG類（I, II, III）の濃度がpMオーダー<sup>112,130-132</sup>）であり、UV検出されないことから判断すると、*in vivo*での負荷実験により生成し、残存していたものであると考えられた。



**Fig.5-3 HPLC elution profiles from *in vitro* degradation of angiotensin III in SHR plasma**  
 Column: Cosmosil 5C18-AR; Solvent system: 10% to 25% CH<sub>3</sub>CN (150min) in 0.1% TFA;  
 Flow rate: 0.5ml/min; Monitoring absorbance: 220nm; Column oven: 30°C

次に、ANGIIIの分解並びにACE阻害活性を有する代謝物の生成挙動を経時的に追跡した (Fig.5-4)。縦軸は内標準D-Leu-D-Leuにより規格化し、血漿1 ml当たりのmol数で示した。図から明らかなように、反応時間の増大とともにANGIIIは直線的に減少し、これに伴いACE阻害活性代謝物が生成された。各代謝物濃度は5分から10分の遅延時間を経て増大し、それぞれ特異的な消長を示した。従って、*in vivo*でのANGIIIの血圧降下作用は、これら代謝物によるものであり、その持続時間の長さは各々の代謝物の生成に至るまでの遅延効果によるものと考えられた。



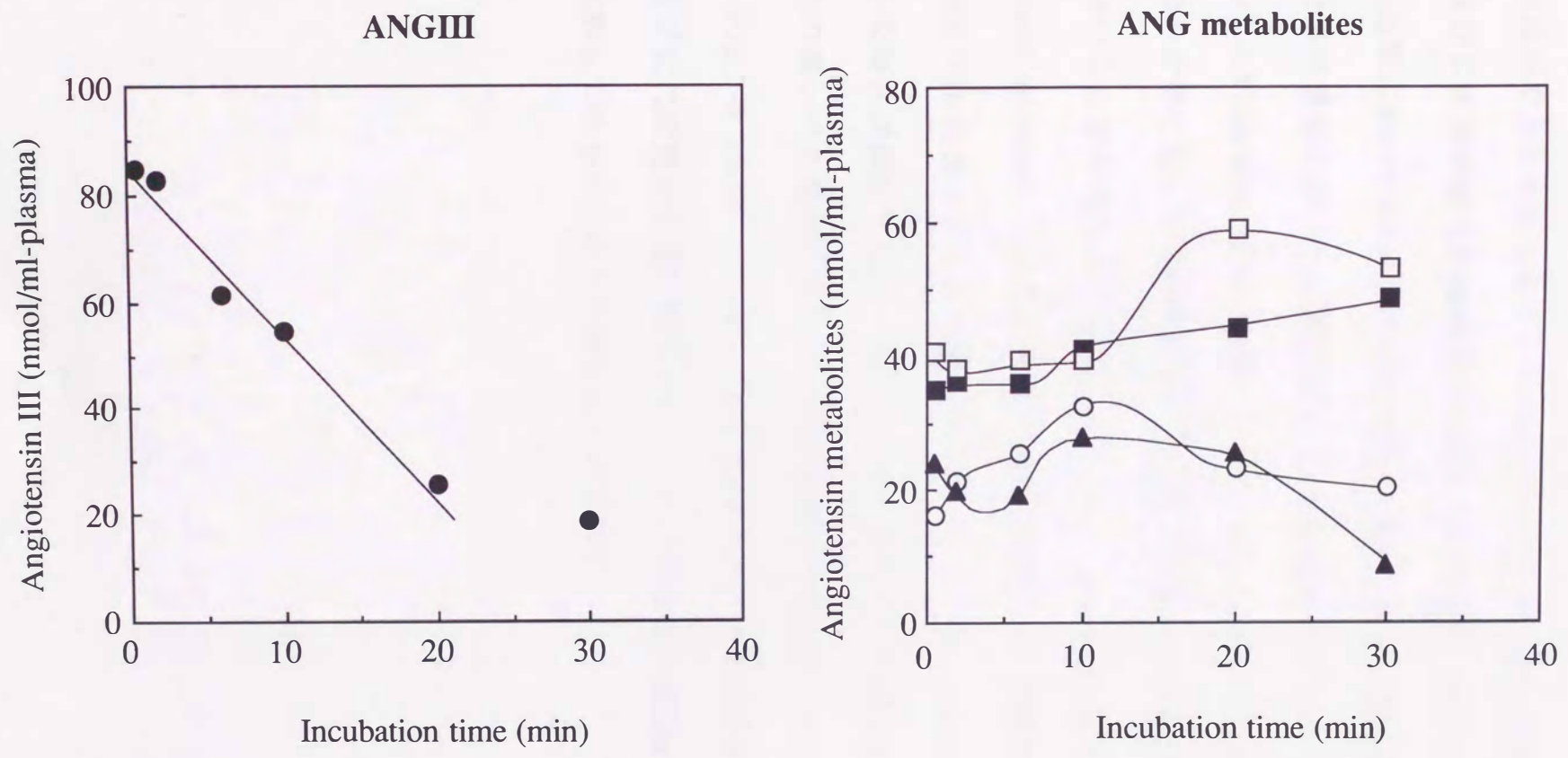


Fig.5-4 Time courses of angiotensin III degradation products in SHR plasma

● ; ANGIII, ○ ; ANG(3-8), ■ ; ANG(4-8), □ ; ANG(5-8), ▲ ; Val-Tyr



正常血圧であるWistar系ラットの血漿を用いて、ANGIII及びANGIIの分解並びに代謝挙動をSHR血漿と比較した。Fig.5-5に示したように、Wistar血漿においてもANGIIIは反応時間の増大とともに直線的に減少し、その分解初速度は両ラット間でほとんど差は認められなかった（左図、Wistar；4.17nmol/ml/min，SHR；4.33nmol/ml/min）。しかしながら、ANGIIの分解に関してはSHR血漿での分解初速度はWistar血漿での約1/2と小さいことが判明した（右図、Wistar；3.08nmol/ml/min，SHR；1.75nmol/ml/min）。また、ACE阻害活性を有する代謝物に関してはANGII及びIII由来ともにはほぼ同一の消長を来したが、Wistar血漿ではより大きな増大が認められた。特に、ANGII由来の代謝物を見るとWistar血漿での高レベル維持に対して、SHR血漿では添加前に比べて逆に減少した（Fig.5-6と5-7）。このことは、SHRではANGIIの分解に関与する酵素並びに代謝物の生成に関与するいくつかの酵素力価がWistar系ラットと比較して小さいことを示唆するものである。

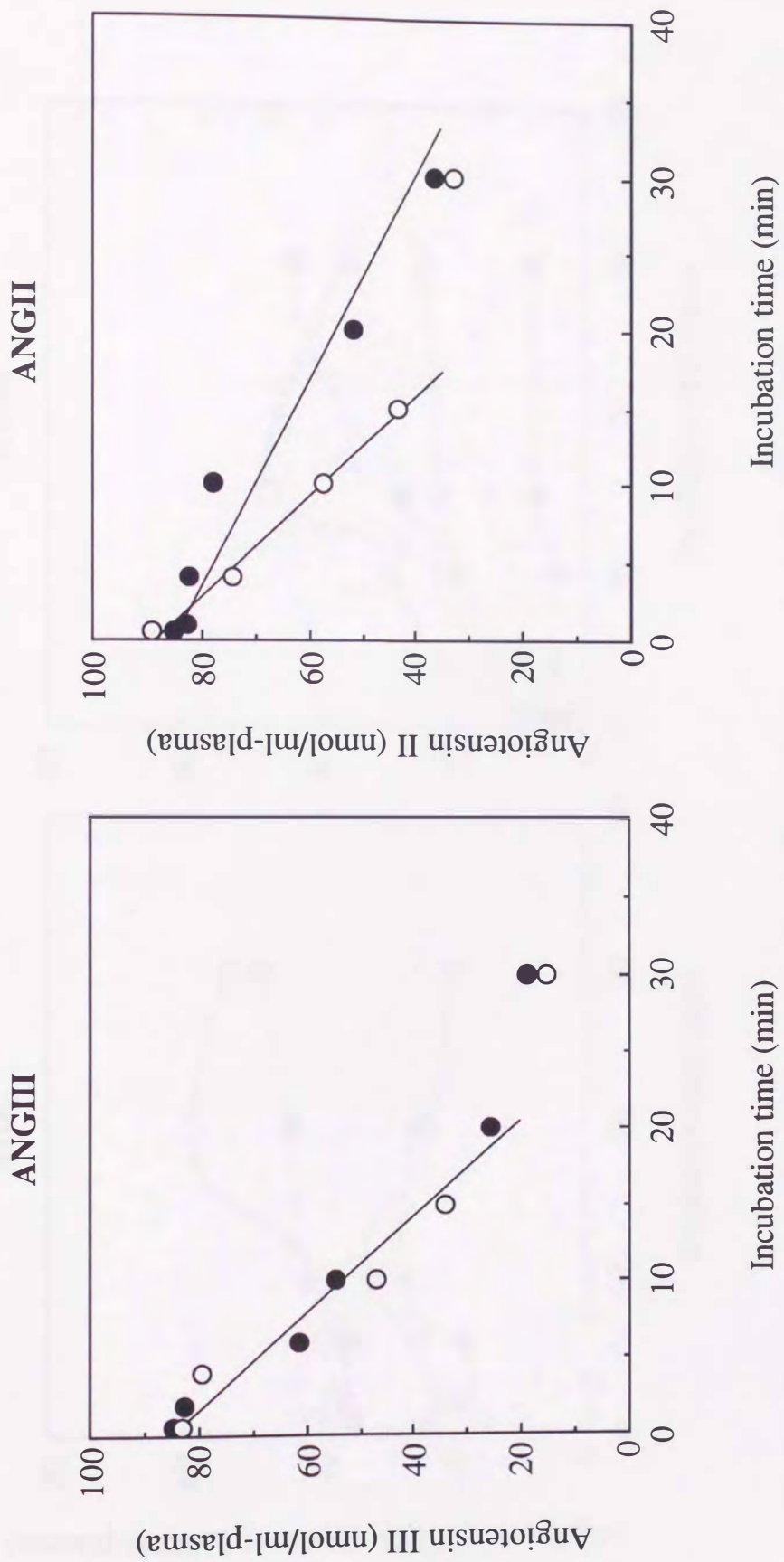


Fig.5-5 Degradation behaviors of angiotensin III and II in SHR (●) and Wistar rat (○) plasma

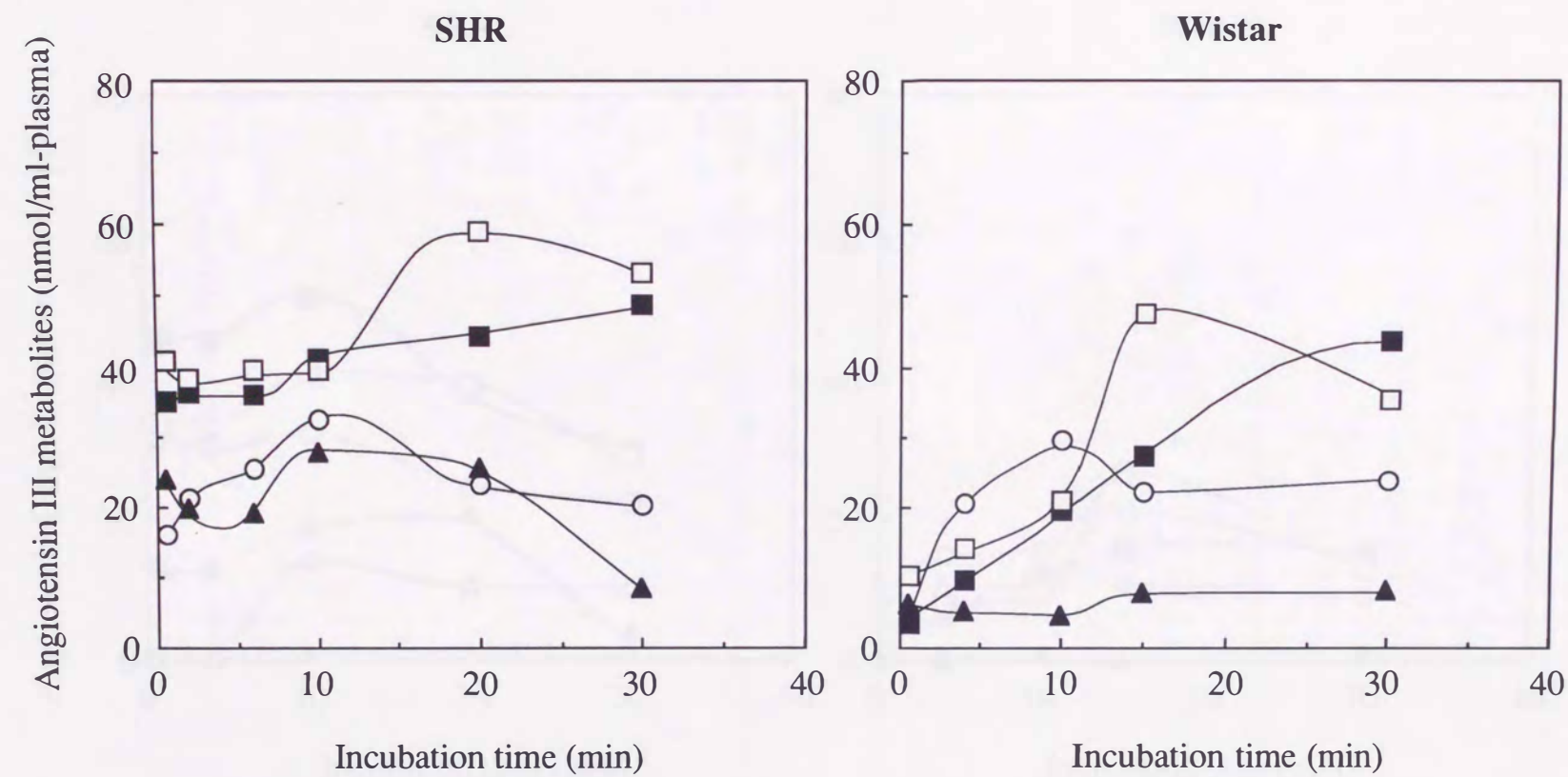


Fig.5-6 Time courses of degradation products from plasma angiotensin III in SHR and Wistar rat

○ ; ANG(3-8), ■ ; ANG(4-8), □ ; ANG(5-8), ▲ ; Val-Tyr

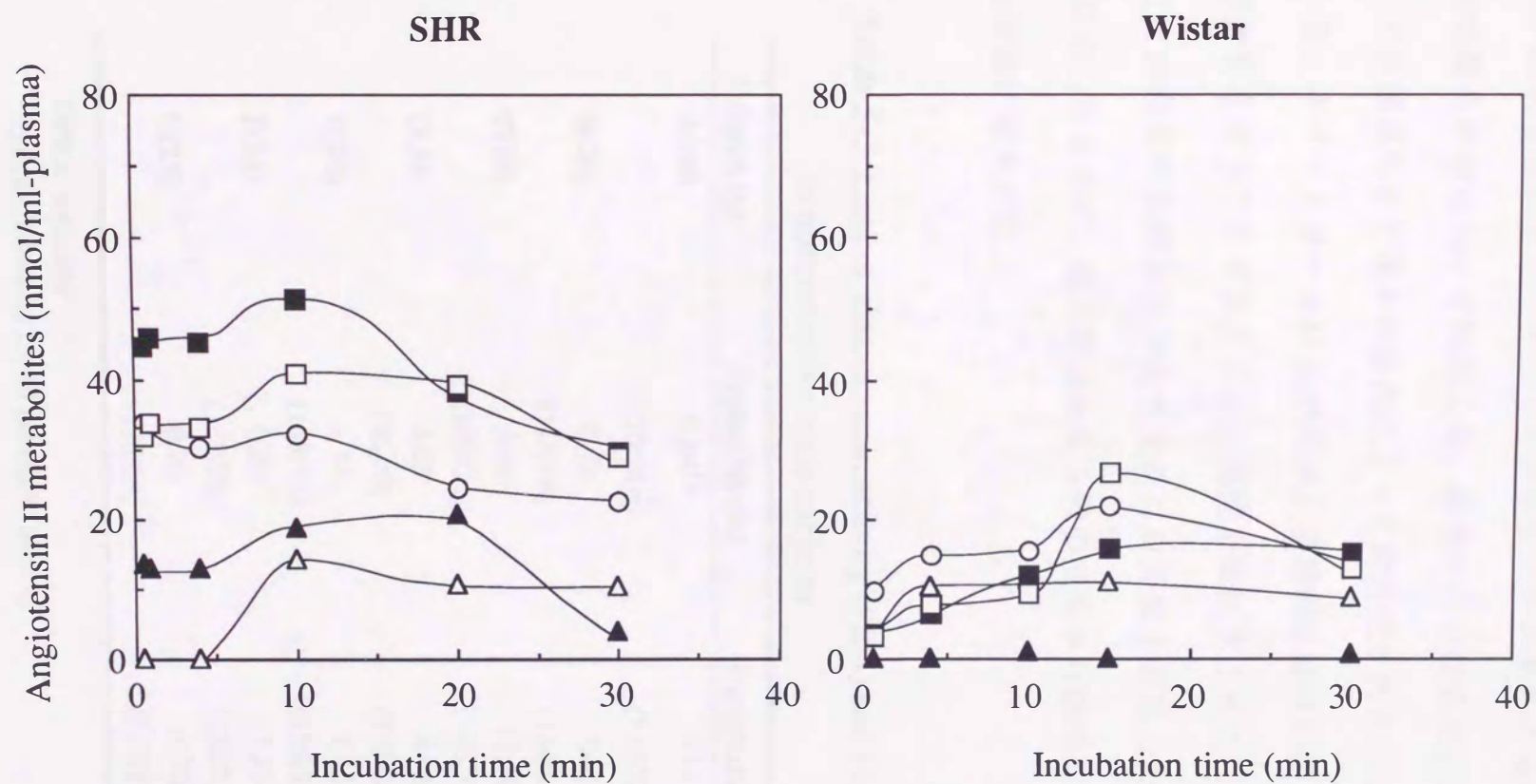


Fig.5-7 Time courses of degradation products from plasma angiotensin II in SHR and Wistar rat

Δ; ANGIII, ○; ANG(3-8), ■; ANG(4-8), □; ANG(5-8), ▲; Val-Tyr

#### 第4項 ヒト血漿中でのアンジオテンシン類の代謝挙動

ヒト血漿を用いてレニン・アンジオテンシン系による生体内での血圧調節機構の詳細について検討した。血漿レニン活性は、減塩食摂取、立位、利尿薬投与など種々の要因によって賦活化されること<sup>18,133)</sup>が知られている。本プロトコールにおいては、安静仰臥位時の採血後、1時間の立位歩行を行うことによりレニン活性を賦活化させた。安静仰臥位後及び立位歩行後の血漿レニン活性並びに血圧値を測定したところ、Table 5-3に示したように、個人差はあるものの立位歩行後のレニン活性及び血圧は確実に増大した。

**Table 5-3** Lists of plasma renin activity (PRA) and blood pressure in normotensive male subjects

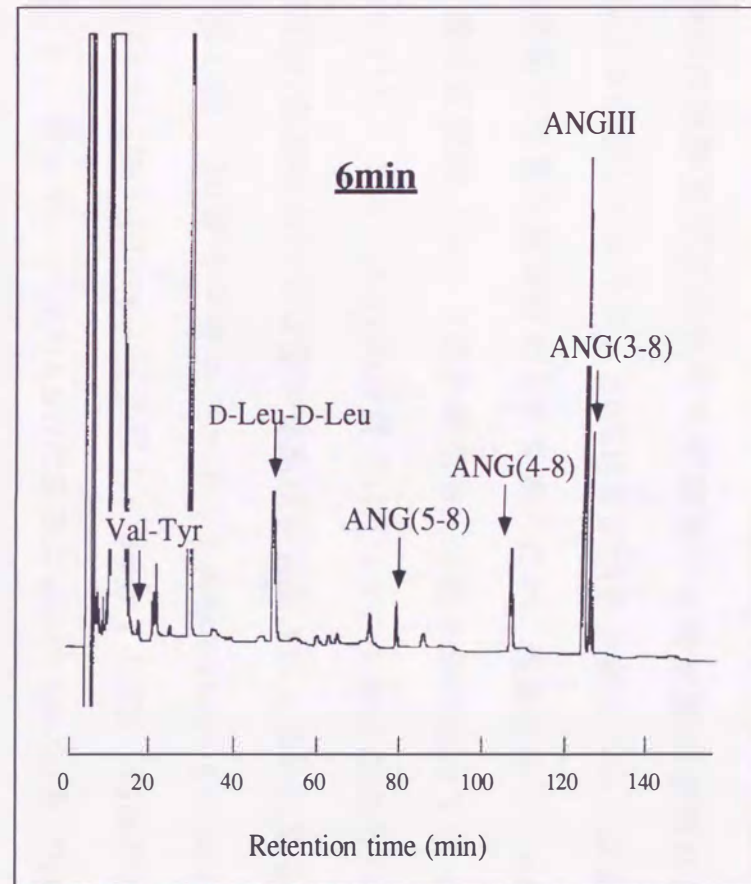
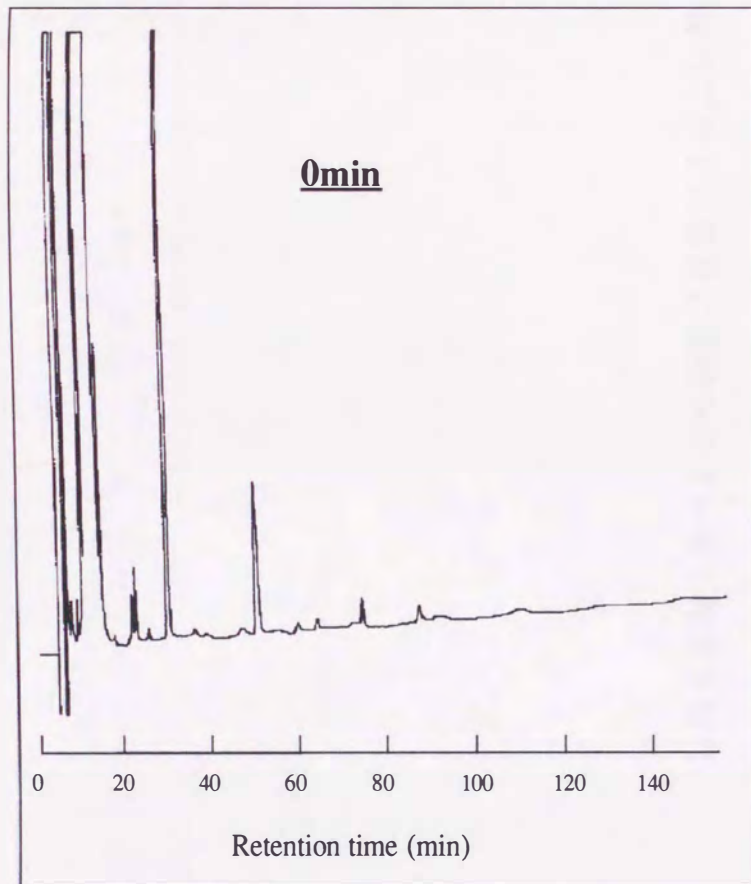
Subject(age)	Supine(30min)	Upright(60min)
A(26)	0.84 <sup>1)</sup> (110/54) <sup>2)</sup>	6.14 (114/72)
B(26)	0.76 (115/66)	1.41 (124/81)
C(24)	4.44 (109/56)	13.30 (116/71)
D(24)	1.05 (96/49)	3.14 (107/63)
E(24)	1.14 (118/71)	4.42 (126/82)
F(24)	0.29 (119/71)	3.15 (138/83)
G(23)	0.96 (108/59)	3.70 (117/73)

1)PRA: ng/ml/hr

2)systolic/diastolic blood pressure: mmHg

そこで、これら安静仰臥位時及び立位歩行時の血漿を用いて、ACE阻害ペプチドの生成速度・存在量、アンジオテンシナーゼ活性などの生理学的因子の比較を行い、R-A系におけるANG代謝物の潜在的生理作用を検証した。

まず、ラット血漿中での生成が確認されたACE阻害活性を有するANG代謝物のヒト血漿での代謝生成を検証した。実験はヒト血漿（Heparin採血管）に対してANGIIIを直接添加し、37℃でインキュベートした後、HPLCによって代謝物を確認した。Fig.5-8に示したように、反応時間6分後の血漿サンプル中にラットと同様ANG(3-8)、(4-8)、(5-8)、Val-Tyrの生成が認められ、ヒト血漿においてもこれら4つのANG由来のACE阻害ペプチドが生成することが初めて明らかとなった。



**Fig.5-8 HPLC elution profiles from *in vitro* degradation of angiotensin III in human plasma**

Column: Cosmosil 5C18-AR; Solvent system: 10% to 25% CH<sub>3</sub>CN (150min) in 0.1% TFA  
 Flow rate: 0.5ml/min; Column oven: 30°C; Monitoring absorbance: 220nm

そこで次に、安静仰臥位後及び立位歩行後の血漿を用いて、ANGII及びIIIの分解並びにそれらの代謝物の生成挙動の群間比較を行った。Fig.5-9に示したように、ANGII及びIIIの分解については仰臥位と立位の両者間で有意な差は認められなかったが、代謝生成したACE阻害ペプチド量は立位時（レニン活性賦活時）に約2倍の増大となった（Fig.5-10と5-11）。また、ANGII分解ではVal-Tyr生成は認められなかったが、ANGIII由来においては僅かな生成が確認され、他の代謝物と同様の挙動を示した（20分インキュベート；1.44nmol/ml-plasma（仰臥位），1.56nmol/ml-plasma（立位），30分；1.02（仰臥位），1.20（立位））。従って、一連のANG代謝系においてANGII及びIII分解関与酵素の活性はその系に依存せず一定であるのに対して、それ以降の分解に関与する酵素群すなわちアンジオテンシナーゼの活性変動がそのままACE阻害ペプチドの消長に反映されていると推定された。



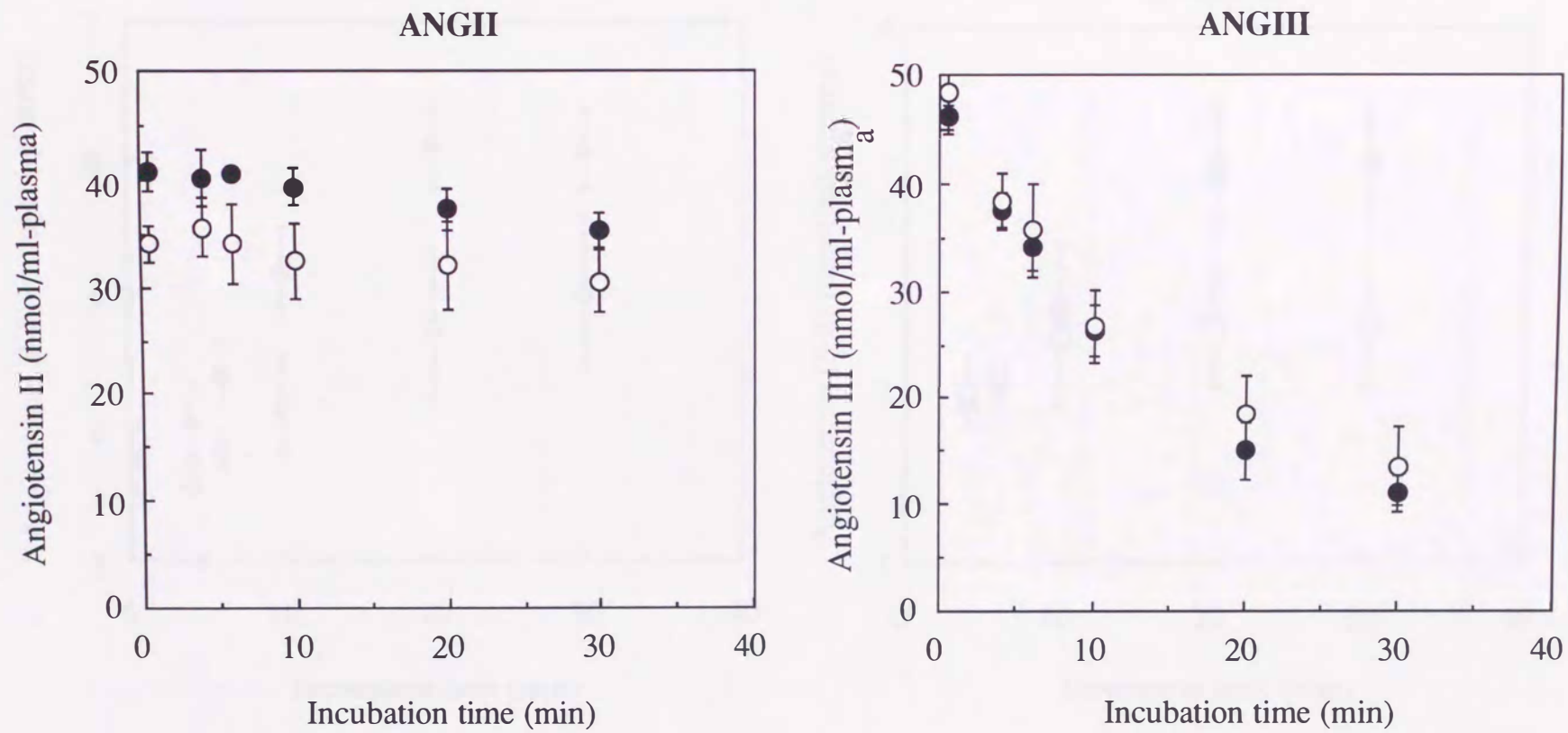
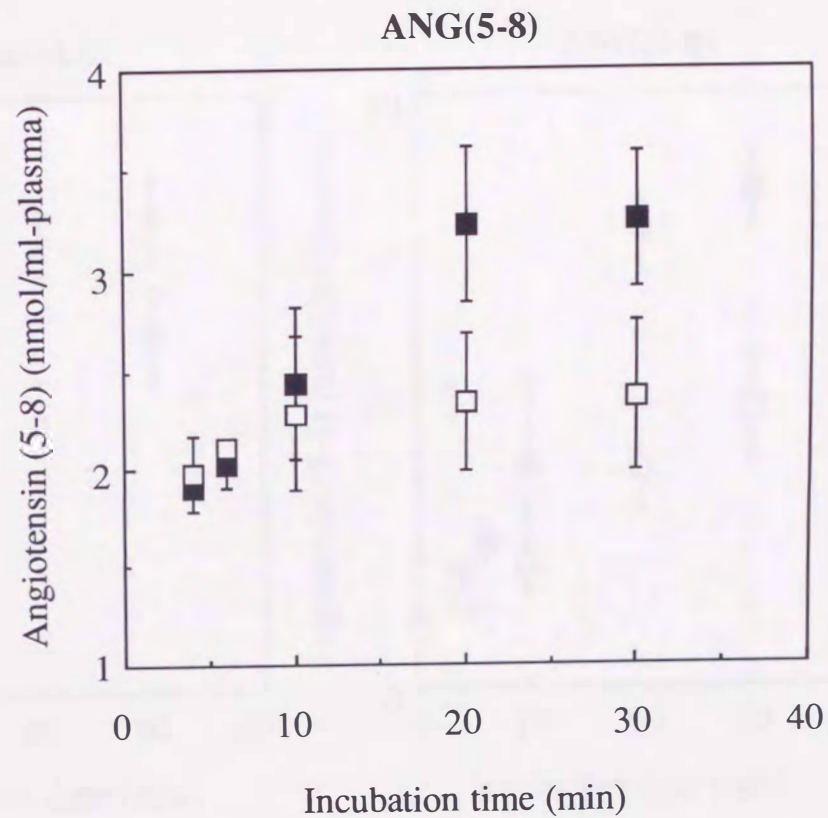
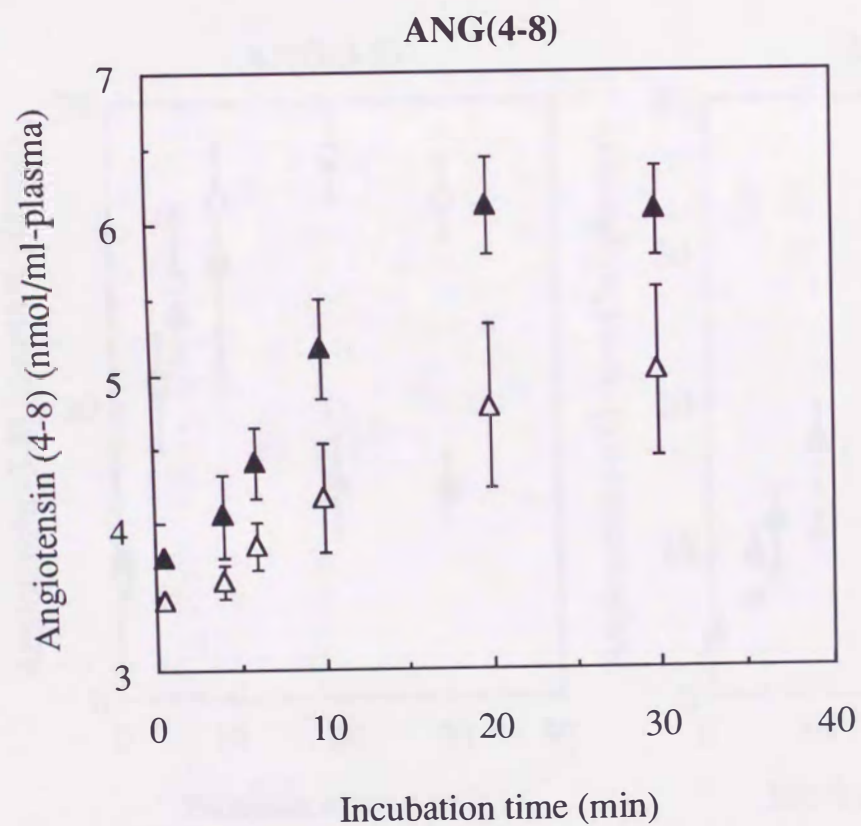
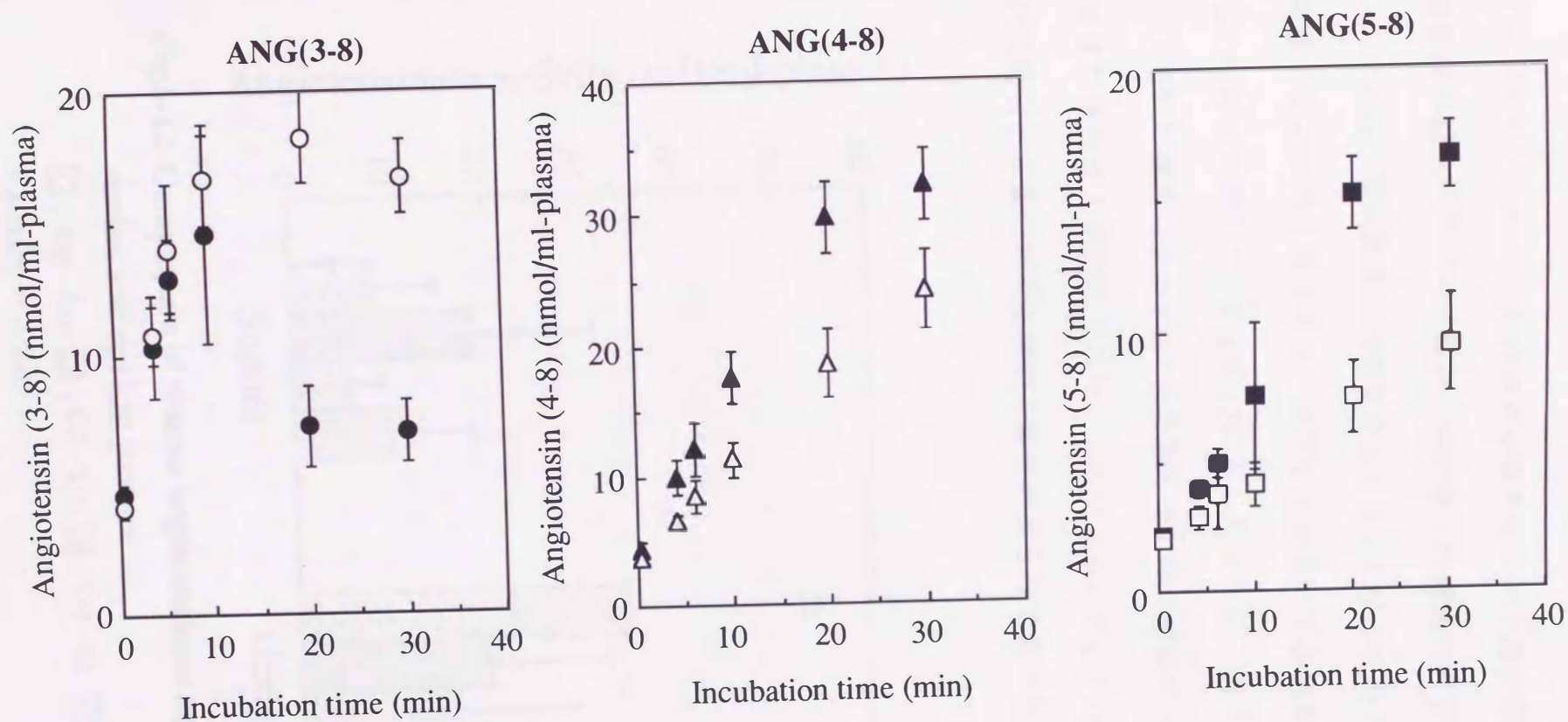


Fig.5-9 Degradation behaviors of plasma angiotensin II and III in the supine (○) and upright (●) posture in normotensive male subjects



**Fig.5-10 Time courses of degradation products from plasma angiotensin II in the supine and upright posture in normotensive male subjects**

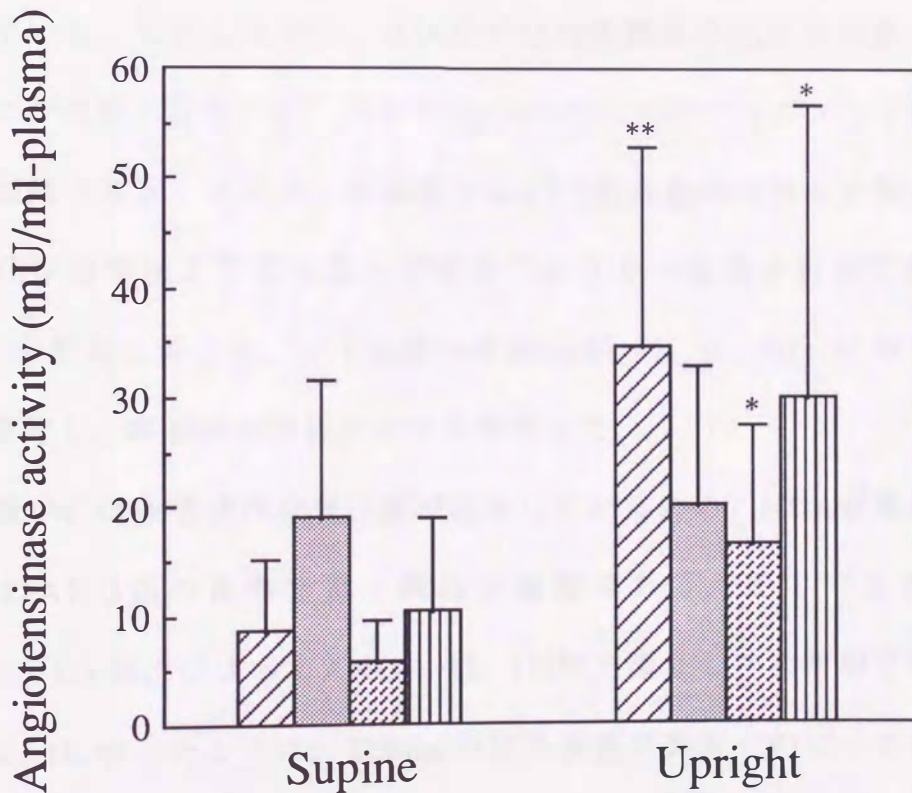
Δ ; ANG(4-8), □ ; ANG(5-8) in supine posture  
 ▲ ; ANG(4-8), ■ ; ANG(5-8) in upright posture



**Fig.5-11 Time courses of degradation products from plasma angiotensin III in the supine and upright posture in normotensive male subjects**

○; ANG(3-8), △; ANG(4-8), □; ANG(5-8) in supine posture  
 ●; ANG(3-8), ▲; ANG(4-8), ■; ANG(5-8) in upright posture

アンジオテンシナーゼはANGを分解するエンド型及びエキソ型の種々の酵素群の総称<sup>28,134-137)</sup>であり、未だ全ての酵素の特定化はなされていない。それ故、特定酵素の活性を把握することは不可能であることから、本実験ではANGIIを構成するジペプチドを用いて各切断の総活性を仰臥位と立位時で比較した。Fig.5-12に示したように、個人差はあるもののレニン活性の賦活によりVal-Tyrを除く全ての切断部位に関する酵素群の有意な活性増大が認められた。このことは、Fig.5-10と5-11で認められた代謝物生成量の増大を明白に裏付けるものであった。



**Fig.5-12 Comparison of plasma angiotensinase activity between supine and upright posture**

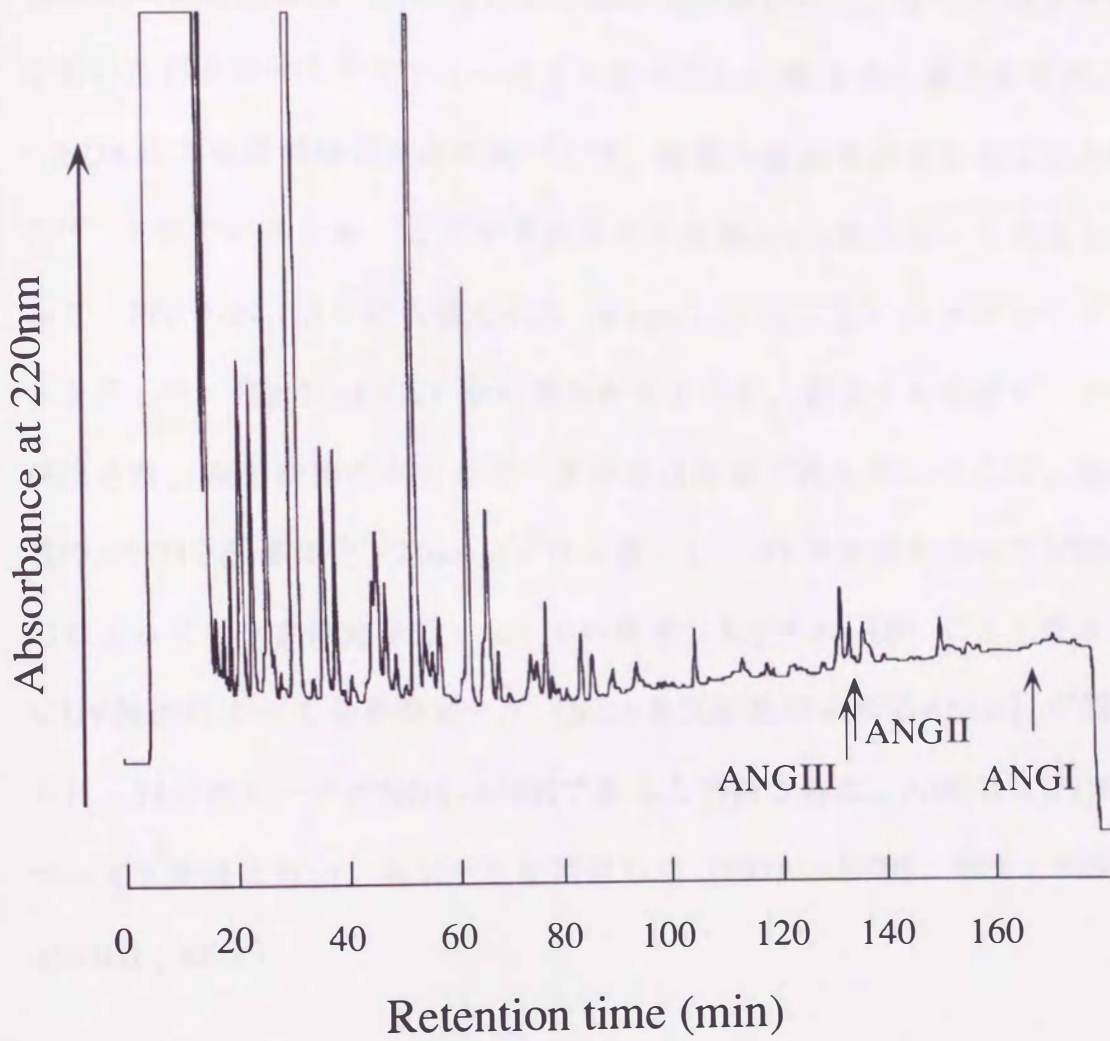
▨ ; Asp - Arg, ■ ; Val - Tyr, ▤ ; Tyr - Ile, ▧ ; Pro - Phe

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 第5項 ヒト血漿中でのアンジオテンシン代謝過程の実際とその生理的意義

(1) ナフタレン-2,3-ジアルデヒド (NDA) 蛍光誘導体化によるヒト血漿中のアンジオテンシン類の高速液体クロマトグラフィー-ANG代謝物の生理機能を実証するためには、生体内での正確な生成量及び外来を含めての存在量を把握することが重要となる。通常、ANG類 (ANGI, II, III) の定量はラジオイムノアッセイ (RIA) 法が頻用され、それらの血中量はピコモル (pM) オーダーであることが報告<sup>112,130-132)</sup>されている。しかしながら、RIA法では対象物質の抗体を作成・精製することが前提となるため、現状ではANGIII以下のフラグメントの定量分析は困難である。そこで、本実験ではANG代謝物の検出を目的として、放射化学的手法より取り扱いが安全でありかつ微量分析が可能な蛍光HPLC分析法に着目し、ヒト血漿中のANG類 (I, II, III) に対する定量法を設定し、本法の有用性について検討した。

血漿中には多種多様な蛋白質が混在しているため、NDA誘導体化法のみでのANG類の直接定量・検出は困難である。そこでまず、逆相HPLC-UV検出によってANGI, II, III相当画分の一次精製を行った。Fig.5-13に示したように、220nmの検出波長で数多くのピークが出現したが、各々の標品と一致するピークは認められなかった (ANGI; 溶出時間166分, II; 135分, III; 134分)。

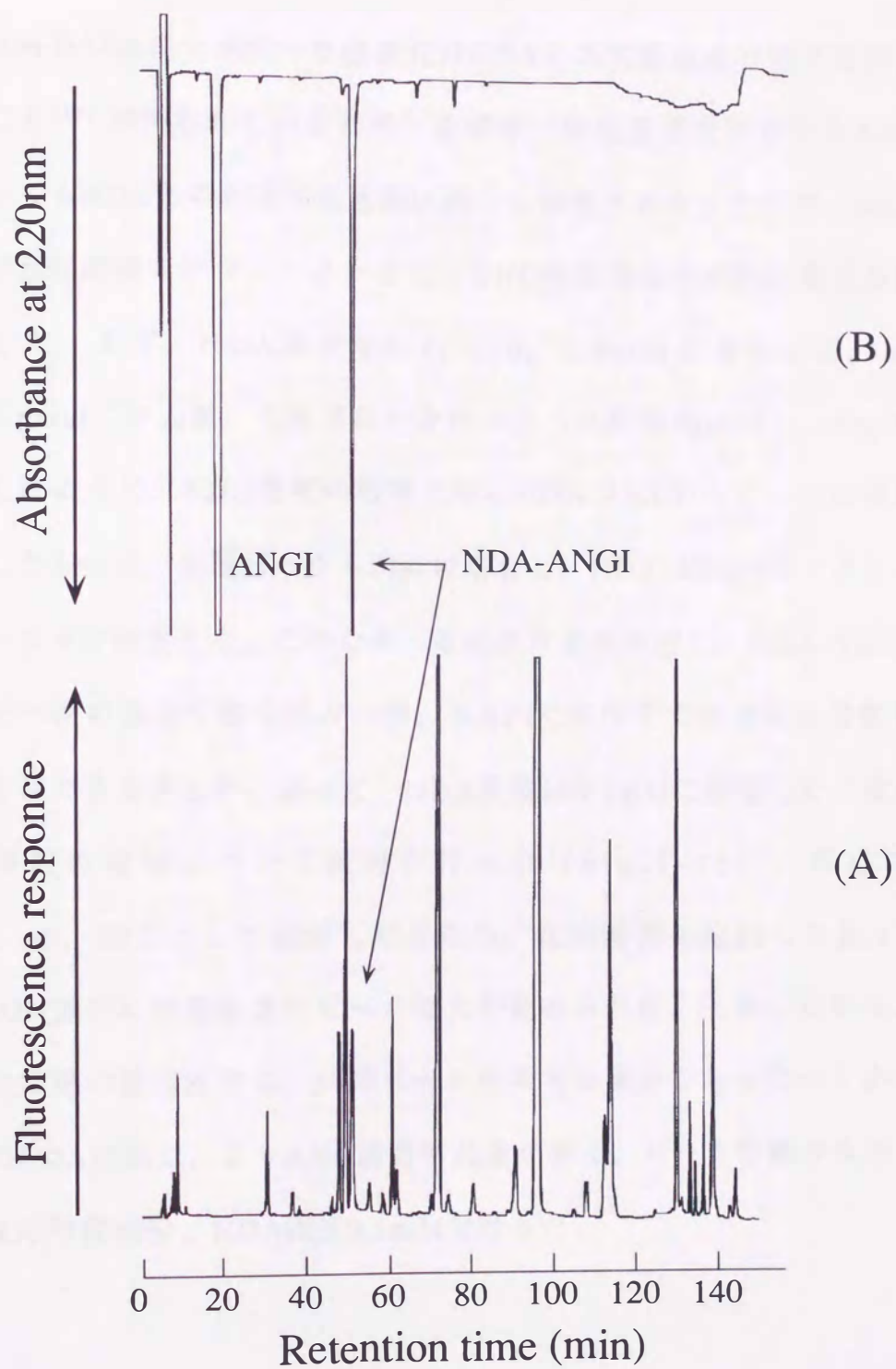


**Fig.5-13 HPLC pattern of human plasma with UV detector**

Column: Cosmosil 5C18-AR; Solvent system: 10% to 25%  
CH<sub>3</sub>CN (150min) in 0.1% TFA; Flow rate: 0.5ml/min;  
Monitoring absorbance: 220nm; Column oven: 30°C.

このことは、ANG類の血中量がピコモルオーダーであり、UV検出器による検出限界を越えていることから妥当であると考えられた。そこで、標品との保持時間の一致により該当部分の分取を行い、さらに同カラムを用いた再クロマトグラフィーにより各々のANG類を含む画分を得た。

NDAによる誘導体化反応においては、複数の副産物が生じることが報告<sup>127)</sup> されているため、まず蛍光検出時の各種ANG類のピーク同定を試みた。Fig.5-14 (A) に合成ANGI (0.8pmol/注入量) のクロマトグラムを示した。Fig.5-14 (A) から明らかなように、数多くの夾雑ピークが検出され、蛍光検出のみでのピーク同定は困難であった。そこで、過剰量のANGIを誘導体化 (20nmol/注入量) し、UV検出器を用いた同時検出によってピーク同定を行った。その結果、Fig.5-14 (B) に示したようにUV検出によって2本のピーク (NDA未反応並びに反応ANGI) が認められ、53分のピークがNDA-ANGIであると判断された。ANGII及びIIIについても同様に行い、各ピークを同定した (NDA-ANGII ; 48分, NDA-ANGIII ; 68分) 。



**Fig.5-14 HPLC patterns of NDA-ANGI with (A) fluorometric and (B) UV detectors**

Column: Cosmosil 5C18-AR; Solvent system: 25% to 40% CH<sub>3</sub>CN (100min) in 0.1% TFA; Flow rate: 0.5ml/min; Column oven: 25°C;  
(A) ANGI:0.8pmol/injection volume; (B) ANGI: 20nmol/injection volume



試料及び試薬の希釈・低濃度化はNDAとの反応速度の低下を引き起こすこと<sup>127)</sup>が知られているため、血漿中に極低濃度で存在するANG類についてもNDAとの誘導体化速度は遅いと推察される。そこで、NDA濃度及び反応時間をパラメーターとしてANG類誘導体化反応の最適条件を検討した。まず、NDA濃度を0.1, 1.0, 2.0mMと増加させ、ANGII (5 pmol/注入量)の誘導体化を行った(反応時間20分)。Fig.5-15に示したように、NDA濃度の増加に伴いNDA-ANGIIのピークは顕著に増大したものの、夾雑ピークも同時に増大し、NDA-ANGIIピークとのオーバーラップが生じた。このため、溶離条件を再検討し、NDA-ANGIIと夾雑ピークの完全分離を試みたが、本HPLC条件下では良好な分離を得ることはできなかった。従って、NDA濃度は0.1mMに設定した。次に、反応時間の増加について検討を行った(Fig.5-15)。反応時間を20, 40, 60分として検討したところ、反応時間の増加につれてNDA-ANGII並びに夾雑物質のピーク増大が認められた。しかしながら、検討した時間の範囲内では、夾雑ピークの増大は僅かであったことから、以後のNDA反応は、よりANG誘導体化量が多く、ピーク分離が良好であった反応時間60分、NDA濃度0.1mMで行った。

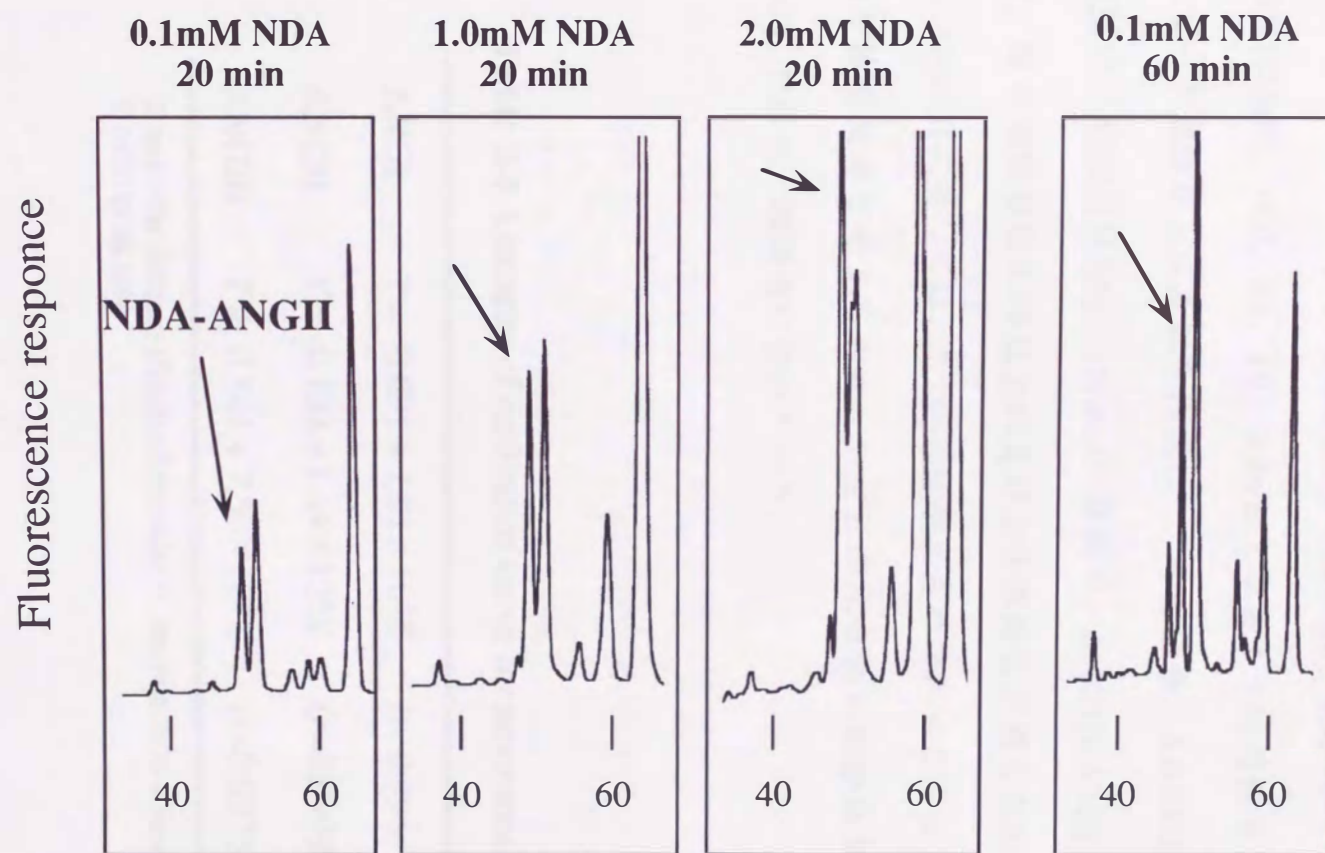


Fig.5-15 Effects of NDA concentration and derivatization time on NDA-ANGII products

本最適誘導体化条件を用いて, ANGI, II, III定量用検量線の作成を行った. すなわち, ANGIはHPLC注入量 (90 $\mu$ l) あたり1000, 500, 100, 50fmolとなるように, ANGIOは500, 100, 50, 10fmolとなるように, ANGIOは500, 100, 50, 10, 5 fmolとなるように溶液を調製し, 得られたピーク面積から検量線を作成した. その結果, ANGIは820~40fmolの範囲で, ANGIOは500~10fmolの範囲で, ANGIOは720~14fmolの範囲で, 各々相関係数0.99以上の良好な直線関係が得られた (Table 5-4). ANGIOに関しては, 7.2fmolは検出されなかったことから, 10fmol程度が検出限界と考えられた. いずれの化合物も変動係数は3.5%以下 ( $n=5$ ) であり, 再現性に優れていた.

**Table 5-4** Linearity of calibration curve for angiotensins

ANGI	$Y = 0.091 + 1.01 \times 10^3 X$	( $r=0.9967$ )
ANGII	$Y = -0.103 + 1.44 \times 10^4 X$	( $r=0.9999$ )
ANGIII	$Y = 0.544 + 7.50 \times 10^2 X$	( $r=0.9975$ )

X axis: the amount (fmol) of peptides in the injection volume  
Y axis: peak area

そこで、本検量線を用いて、ODS-HPLC分画により得られた画分中に存在するANG類を絶対検量線法により算出した (Table 5-5)。その結果、正常血圧男子7名のANG I, IIの平均値は各々304.0 fmol/ml, 27.1 fmol/mlであり、本法により得られたANG II量はRIAキットにより得られた値 (平均; 19.4 fmol/ml) と良好に一致した。また、ANG IIIの定量は血漿10mlを用いてその測定を行ったが、その検出は不可能であり、その血中濃度は1.4 fmol/ml以下と考えられた。ANG IIIは、ANG IIと同等のアルドステロン分泌促進作用を有する昇圧ホルモンであるが、その血中での存在量 (0.4~11 fmol/ml) が極めて少ないこと<sup>112,138)</sup> から、臨床的にはあまり重要視されていない。

血中におけるANG類の濃度は、食塩摂取量や体位などレニン分泌に影響を与える因子によって変動することが知られており、安静仰臥位時のANG I, IIの正常血中レベルはそれぞれ340 fmol/ml以下、9~45 fmol/mlと報告されている (CRC社カタログより)。本法により得られたANG I量はこの許容範囲内であったことから、ANG類の定量法として十分適用性の高い方法であると判断された。

**Table 5-5** Concentrations of angiotensins in human plasma obtained by the present and RIA methods

man (23.5±1.1age)	SBP/DBP <sup>1)</sup> (mmHg)	The present method (fmol/ml)			RIA method (fmol/ml)
		ANGI	ANGII	ANGIII	ANGII
A	110/54	241	20	—	21
B	115/66	275	18	—	12
C	109/56	193	13	—	14
D	96/49	241	31	—	47
E	118/71	268	10	—	13
F	119/71	452	43	—	16
G	108/59	268	55	—	15
	mean	304.0	27.1	<1.4	21.3

<sup>1)</sup> SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure

生体微量成分の定量は、その感度の高さからRIA法が主流となっている。しかしながら、安全性の面からRIA法に代わる微量分析法が求められ、現在キャピラリー電気泳動法や蛍光分析法を用いた試みが成されている。福岡ら<sup>139)</sup>はキャピラリー電気泳動法を用いて、ブラジキニンとその代謝物の同時測定法を確立しているが、検出下限が $10\mu\text{g/ml}$  ( $10\text{nmol/ml}$ )程度であり、血漿を用いた実測定までには至っていない。著者も高感度分析が可能な濃縮ゾーン付きキャピラリーカラムを用いてアンジオテンシン類の定量を試みたが、検出下限が $10\text{pmol/ml}$ 程度であったため定量法の確立には至らなかった。Sakamotoら<sup>140)</sup>は、蛍光誘導体化試薬としてアルギニン残基を含むペプチドに対して高選択性を有しているベンゾインを用いて、血清中のANG類の定量を試みている。しかしながら、ベンゾイン試薬は検出下限が約 $10\text{pmol}/\text{注入量}$  ( $S/N=2$ )と低いため、ANG類の定量は不可能であった。一方、本法で用いたNDAは*o*-フタルアルデヒドのアナログ試薬で第一アミノ基と反応し、著者の知る限り最も高感度 (NDA-アミノ酸; 検出下限 $200\text{fmol}$ 以下/注入量( $S/N=2$ ))な誘導体化試薬<sup>141-144)</sup>である。また、本実験で明らかとなったように、 $0.1\text{mM}$  NDA, 反応時間60分の条件で血漿中のANG I, IIの定量が可能となり、再現性 (3.5%,  $n=5$ )も優れたものであった。従って、本法を用いることによりANG III以下のANG代謝物 (ANG (3-8), (4-8), (5-8), Val-Tyr)の直接定量が可能であることが示唆された。

## (2) ヒト血漿中におけるアンジオテンシン代謝物の定量

本蛍光HPLC分析法を用いて、ヒト血漿中におけるANG代謝物（ANG (3-8), (4-8), (5-8), Val-Tyr）の定量を行い、その生理的意義について検討を行った。なお、血漿からの一次精製はANG I, II, IIIと同様に標品との保持時間の一致により該当部分を分取した（ANG (3-8) ; 136分, (4-8) ; 116分, (5-8) ; 88分, Val-Tyr ; 15分）。

Table 5-6に仰臥位及び立位時における血漿中のANG代謝物の定量値を示した。その結果、個人差はあるものの血漿中にACE阻害活性を有するANG代謝物が100~10000pMで確実に存在することが初めて明らかとなった。また、これら代謝物、特にANG (4-8) 以下の代謝物は前駆体であると考えられるANG I, II, IIIよりも高濃度で存在しており、血中内に長時間滞留することが推察された。さらに、レニン活性を賦活させることにより2~10倍の濃度増加が認められた。中でも、ANG (4-8) 及びVal-TyrはANG I, IIが2倍程度の増加であったのに対して、1オーダーもの顕著な増加を示した。これらACE阻害ペプチドの活性及び血中濃度から判断すると、ACEの阻害の程度は微弱であると考えられる。しかしながら、R-A系が生体内で常時作用していること<sup>22)</sup>を考慮すると、ANG IIの血中濃度に対して10~100倍の濃度で各々の代謝物が存在していたことは、これらペプチドが何らかの生理的意義を有していることを示唆するものである。さらに、R-A系が各臓器に局在化していること<sup>29, 32, 111)</sup>から判断して、これらペプチドが過度の血圧上昇の抑制を担っている可能性が十分に示唆された。

**Table 5-6** Concentrations of plasma angiotensin metabolites in the supine and upright posture in normotensive male subjects

man	Concentration of angiotensin metabolites (fmol/ml)													
	ANGI		ANGII		ANGIII		ANG(3-8)		ANG(4-8)		ANG(5-8)		Val-Tyr	
	supine	upright	supine	upright	supine	upright	supine	upright	supine	upright	supine	upright	supine	upright
A	241	403	20 (21) <sup>1)</sup>	99 (108)	<1.4	<1.4	175	150	418	13798	562	1537	193	3864
B	275	444	18 (12)	46 (30)	<1.4	<1.4	354	402	143	4471	910	1179	— <sup>2)</sup>	521
C	193	379	13 (14)	27 (31)	<1.4	<1.4	157	145	307	2175	438	1506	190	6472
D	241	448	31 (47)	64 (72)	<1.4	<1.4	57	84	233	10141	637	1998	—	321
E	268	522	10 (13)	51 (39)	<1.4	<1.4	36	350	266	3783	440	1425	292	2946
F	452	306	43 (16)	40 (25)	<1.4	<1.4	47	459	191	9660	516	1116	372	5644
G	458	320	55 (15)	58 (41)	<1.4	<1.4	281	407	150	3124	414	1602	151	2888

<sup>1)</sup>RIA method

<sup>2)</sup>no measurement



従って、Fig.5-16に示したように、従来不活性であると考えられてきたANG代謝物がネガティブ・フィードバック的にACEを阻害し、生体内での血圧調節を行っていること、またそれら代謝物の誘導はアンジオテンシナーゼ群が行っており、R-A系の賦活状態に依存して代謝物の生成量を制御している可能性が示唆された。これらの結果は、本態性高血圧症発症機構の解明に重要な知見となり得るものと考えられる。

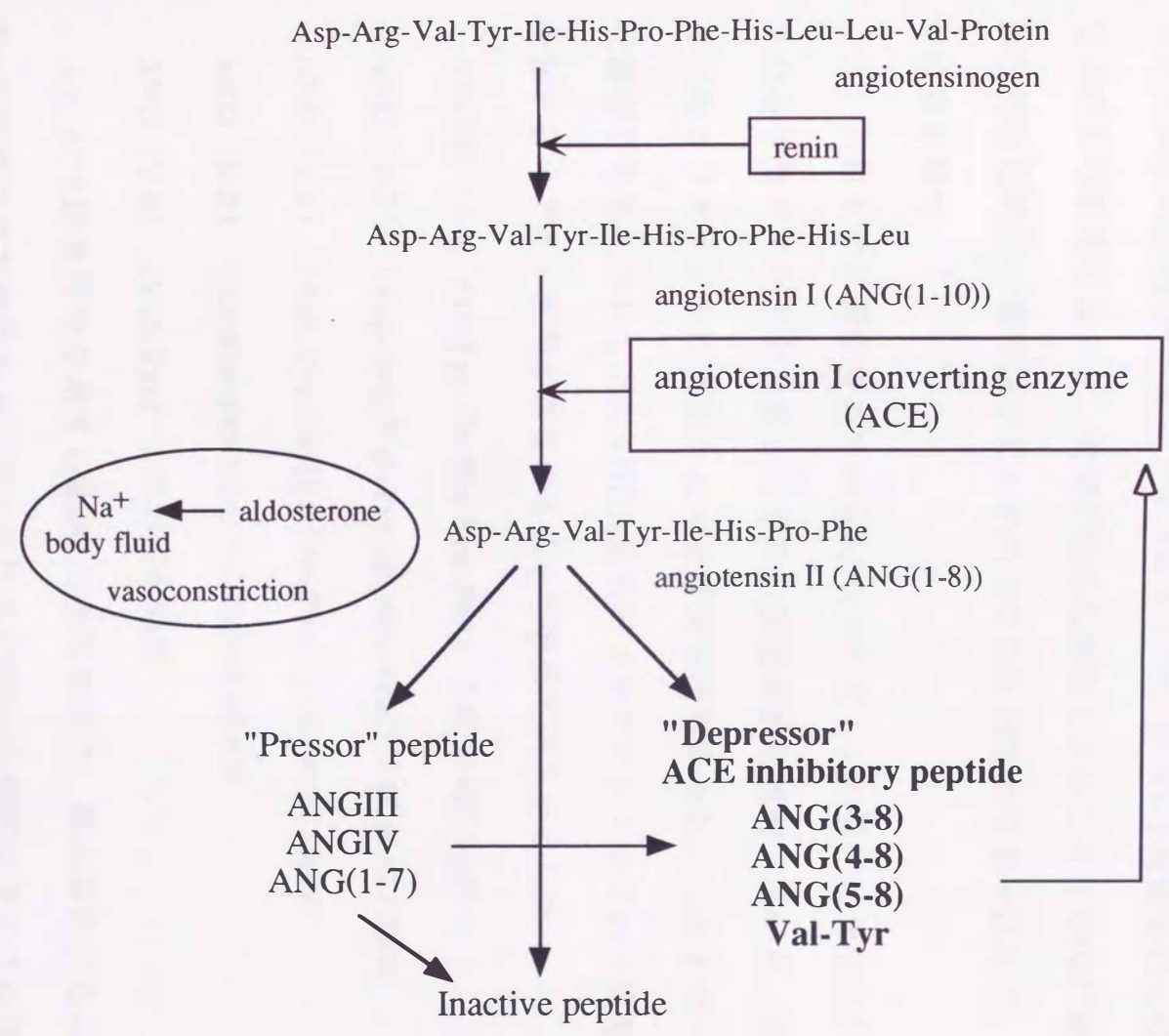


Fig.5-16 Hypothesis of R-A system involved in blood pressure regulation

#### 第4節 小括

イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ分解物より見出されたACE阻害ペプチドArg-Val-Tyrが一連のアンジオテンシン類のN末端側配列に存在していたとの知見に基づき、従来不活性代謝物とされてきたANG代謝物の潜在的生理機能の解明並びに生体内での血圧調節の究明を試みて、以下の結果を得た。

1) これまでに報告されているANGフラグメント及び代謝生成が予測されるフラグメントを合成し、そのACE阻害性を検討した結果、以下の5つのフラグメントに顕著なACE阻害活性が認められ、これまで不活性代謝物であるとされてきたANGII由来のフラグメント中にACE阻害作用を有するペプチド配列が存在することを初めて明らかにした。

ANGIII (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) ; IC<sub>50</sub>=27.9μM

ANG (1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) ; IC<sub>50</sub>=21.1μM

ANG (3-8) (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) ; IC<sub>50</sub>=6.55μM

ANG (5-8) (Ile-His-Pro-Phe) ; IC<sub>50</sub>=11.6μM

ANG (3-4) (Val-Tyr) ; IC<sub>50</sub>=26.0μM

2) ACE阻害活性を有するANG代謝物の中で、最小単位であるVal-Tyr及びその前駆体であると考えられるANGIIIをSHRに対して静注投与したところ、拡張期血圧に対して有意な血圧降下作用を示し、*in vivo*においても血圧降下作用を有するANGフラグメントが存在することを初めて実証した。

3) SHRの血漿中でANGII及びANGIIIをインキュベートした結果, ACE阻害活性を有する4つの代謝物 (ANG (3-8), (4-8), (5-8), Val-Tyr) が確実に生成されることを明らかにした. また, ANGII及びIIIの分解速度を正常血圧であるWistar系ラットと比較したところ, ANGIIIの分解初速度においては有意な差は認められなかったのに対して, ANGIIの分解初速度ではSHRはWistarの約1/2であることが判明した.

4) 臥床時のヒト血漿とレニン活性を賦活させた立位時のヒト血漿を用いてANGII及びIIIの分解及びその代謝物の生成挙動を比較したところ, ANGII及びIIIの分解挙動に有意な差は認められなかったが, ACE阻害活性を有する代謝物の生成はレニン活性の賦活に依存して増大することを明らかにした.

5) レニン活性の賦活に対するアンジオテンシンの分解及び代謝物の生成に関与するアンジオテンシナーゼの活性をANGIIを構成するジペプチドを用いて検討した結果, ジペプチド切断に関与するほとんどの酵素活性はレニン活性の賦活に依存して増大していたのに対して, Val-Tyrの切断に関与する酵素のみ賦活されないことを明らかにした.

6) 蛍光誘導体化試薬であるNDAを用いて, 生体内でのANG類を正確にかつ再現性よく定量する蛍光HPLC分析法を設定した. 本定量法による血漿中のANGII量は, 従来用いられてきたRIA法による測定値と良好に一致しており, ANG代謝物の血中濃度の測定が可能となった.

7) 蛍光HPLC分析法を用いてANG代謝物の血中量を測定したところ, ACE阻害活性を有するANG代謝物がピコモルオーダーで確実に存在して

いることを初めて明らかにした。またこれらの代謝物は、レニン活性の賦活により2~10倍増大することを明らかにした。

## 第6章 総括

近年、高齢者の増加、食事形態の急速な欧風化、ストレスの多い社会状況と相まって、悪性腫瘍（ガン）、高血圧、動脈硬化、糖尿病などの成人病疾病率が増大し、大きな社会問題となっている。これら成人病の中で、高血圧症はそれ自体が致命的となる疾患ではないが、脳血管疾患、動脈硬化、狭心症、心筋梗塞などを助長する危険因子として知られており、その予防・治療法の開発が喫緊の要務となっている。

高血圧症の中でも、その病的発症因子が明らかにされているものは10%程度に過ぎず、約90%は発症原因不明の本態性高血圧症として留保されている。血圧調節は、神経系、体液系、血管系、腎系など多くの因子の相互作用により制御されており、その相互関係の破綻により高血圧症がもたらされると考えられていることから、神経遮断薬、利尿薬、血管拡張薬、アンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害薬など種々の降圧薬が開発・適用されている。現在のところ、これら降圧薬の中で血圧調節因子の一つであるレニン・アンジオテンシン（R-A）系の主要酵素であるACEの阻害薬が、幼若年者から老年者を含めた広範な病態に対する降圧効果に加えて、心保護作用、腎保護作用、インスリン抵抗性改善効果を有し、さらに最も重要な“quality of life”に大きな影響を与えないことから有用であることが知られている。しかしながら、降圧薬として極めて有用とされるACE阻害薬でも永続的な投与を必要とするばかりでなく、咳などの副作用も生ずることから、高血圧発症を抑制予防するには“life style modification”，中でも食生活の改善が重要視されている。

近年、食品のもつ生体調節機能すなわち三次機能を明確化し、目的とする機能性因子を有効に利用し得るよう設計した食品（機能性食品）を日常摂取することで、何らかの疾病によって崩れた生体リズムの回復、あるいは疾病予防に役立てようとする試みがなされ、その機能性物質の検索と生理作用の解明が精力的に行われている。

食品中の蛋白質・ペプチドはその構造の多様性から、様々な生理学的作用を有していることが明らかとなり、これまで数多くの食品蛋白質群からオピオイド作用、カルシウム吸収促進作用、免疫増進作用、血小板凝集作用、易消化・吸収促進作用、ACE阻害作用など種々の生理活性ペプチドが見出されている。これらの中で、血圧上昇抑制作用を有するACE阻害ペプチドについては、現在のところ天然由来の物質検索に終始しており、機能性食品の創製には至っていない。

このような社会的背景に鑑み、本研究では分子レベル及び動物実験を通じて血圧上昇抑制作用を有する機能性食品を設計するとともに、食品由来のACE阻害ペプチドの作用機作をアンジオテンシンの代謝並びに代謝物の生理作用の解明を通じて追求した。本研究論文の概要を各章ごとに要約すると以下のようなものである。

#### アンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害活性の新規測定法（第2章）

高血圧予防とその治療を目的として、ACE阻害性を有する機能性食品を創製するもしくはドラッグをデザインするためには、公定法的な阻害活性測定法の存在が不可欠である。しかしながら、ACE阻害活性測定

ための基準及び公定法は設定されておらず，さらに頻用される測定法も再現性及び定量性に劣ることから，対象物質が同じであっても測定法により阻害活性が異なることも見受けられ，このことが*in vitro*での活性評価に対して大きな障害となっている．そこで，本章において疑似基質であるHip-His-Leuより生成されるHis-Leuを被検物質とし，TNBSとの発色に基づくACE阻害活性測定法を新たに設定した．

TNBSの発色に基づく諸条件を検討したところ，pH9.1，誘導体化時間20分，反応温度37℃，TNBS濃度0.1M，亜硫酸濃度4 mMの条件で最大の発色が得られた．本条件で得られたHis-Leuの検量線は1.0mMまでの濃度範囲において相関係数0.999以上の直線であり，5  $\mu$ Mまで検出可能であった（従来法；30  $\mu$ M）．また，酵素反応停止後の操作が従来法と比較して極めて簡便であり，約30分で阻害率の算出が可能であった（従来法；1～1.5時間）．実試料としてカプトプリル及びイワシ筋肉のペプシン分解物を用いてそれらのACE阻害活性を測定したところ，各々のIC<sub>50</sub>値は良好に一致した．そのIC<sub>50</sub>値算出直線の相関係数は0.999と従来法（0.979）以上であり，より正確にACE阻害活性を評価し得ること，また各々の3回の繰り返し測定における変動係数は2.06%（従来法；4.57%）と極めて再現性に優れていることが明らかとなった．さらに，本法は反応液中に含まれるペプチド，遊離アミノ酸などのアミノ基含有化合物及び糖，有機酸などの夾雑物質の影響を受けることなくACE阻害活性を正確に評価し得る方法であることが判明した．



食品由来ペプチドの生理機能解明と機能性食品素材としての適用性 (I)

～イワシ蛋白質由来の血圧上昇抑制ペプチド～ (第3章)

機能性食品の分子設計と構築を目的として、多獲性であるが故に利用効率の低いイワシを原料として選択し、疎水性アミノ酸残基に富む高活性ACE阻害ペプチドの調製法の設定と機能性食品素材としての適用性を検討した。

イワシ蛋白質をペプシンにより加水分解したところ、その分解物に高いACE阻害活性が認められ、イワシ蛋白質が潜在的な生理機能を有していることが明らかとなった。さらに疎水性ペプチドの効率的な産生を目的として、イワシ蛋白質を予備加熱処理したところ、対未処理と比較して高いACE阻害活性分解物を得ることが可能となった。さらなる機能増強を図るため、ACE活性部位での疎水性アミノ酸残基の重要性に着目し、予備加熱処理を施したイワシ蛋白質のペプシン分解物 ( $IC_{50}=0.62\text{mg protein/ml}$ ) をODS充填カラムで分画したところ、25%エタノール溶出画分に高いACE阻害活性 ( $IC_{50}=0.064\text{mg protein/ml}$ ) が認められ、エタノールによる分解物の逆相分離・精製手段がACE阻害性を向上させる上で極めて有効な方法であることを明らかにした。ODSカラムによる一次精製画分を機能性食品への展開を図るためにラットを用いた *in vivo* 試験に供したところ、アンジオテンシンIのIIへの変換に伴う血圧上昇を明らかに抑制し、*in vitro* のみならず *in vivo* においても活性が発現することを実証した。

ODSカラムによる一次精製画分をさらにSP-Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィー、逆相HPLCで分離した結果、粗精製画分の活性

は単一のACE阻害物質によるものではなく、多くの活性物質により発現したものであることを明らかにした。その中で、3つの主要なACE阻害ペプチドを単離し、そのアミノ酸配列を決定した。(Val-Lys-Ala-Gly-Phe (IC<sub>50</sub>=83μM), Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met (IC<sub>50</sub>=30μM), Leu-Lys-Leu (IC<sub>50</sub>=188μM))。これらのペプチドはこれまでに報告されている種々の起源のACE阻害ペプチドとは異なる新規なものであった。また単離したペプチドのホモロジーを検索した結果、Val-Lys-Ala-Gly-Pheは種々の起源のアクチンにおける17から21番目のアミノ酸配列と完全に一致することを明らかにした。

以上の結果より、イワシ蛋白質中にACE阻害ペプチドが潜在的に存在し、それがペプシン分解によって顕在化すること、またそのODS一次精製物が*in vivo*においても効果があることを明らかにした。しかしながら、本分解物及びその一次精製物はACE活性部位との構造的親和性に基づき疎水性に富む阻害ペプチドを検索していることから、かなりの苦みを有し、食品として直接適用するにはその添加割合に自ら限界を生じざるを得なかった。

#### 食品由来ペプチドの生理機能解明と機能性食品素材としての適用性 (II) ～アルカリプロテアーゼによる機能性食品素材の創製～ (第4章)

第3章で示したように、ACE活性部位との構造的知見に基づく阻害ペプチドの検索は高活性分解物の調製には極めて有効な手段であるが、その分解物は疎水性アミノ酸に富み、かなりの苦みを有するため、その改

善が機能性食品創製には不可欠である。本章では、イワシ蛋白質中に潜在的に存在するACE阻害ペプチドを顕在化・高濃度化し、機能性食品素材として広範な実用性を有する標品の創製を目的として、従来行われていた三次機能についての検討のみならず、二次機能をも考慮に入れた複合機能性物質の検索を行った。

基質特異性が広くかつ種々の疎水性アミノ酸残基を切断する *Bacillus licheniformis* 由来のアルカリプロテアーゼをイワシ筋肉に対して0.3wt% 添加し、17時間加水分解することにより、高いACE阻害活性 ( $IC_{50} = 0.26 \text{ mg protein/ml}$ ) を有し、かつ苦み及び魚臭を示さない優れた分解物 (A-1) の調製を可能とした。A-1中に存在するペプチドサイズを把握するために、GPC分析及び平均ペプチド鎖長測定を行ったところ、本分解物はその93%が分子量250~1000、平均ペプチド鎖長2.90であり、アミノ酸残基数2~4の低分子ペプチド群からなることを明らかにした。さらに、A-1をODS充填カラムに通した結果、高極性溶出 (10%エタノール溶出) 位置において、極めて高いACE阻害活性 ( $IC_{50} = 0.015 \text{ mg protein/ml}$ ) が認められ、その画分が酸性アミノ酸に富むことを明らかにした。本画分を官能評価した結果、うまみ、魚臭ともにほとんど認められず、苦みも非常に弱いと判定され、本画分が適用範囲の広い優れた機能性食品素材であることが示された。

A-1を機能性食品素材として適用するためには、消化管内での安定性、腸管吸収性、生体に対する抗原性、モデル動物での活性発現など数多くの問題をクリアしなければならない。そこで、まず生体内酵素及びブタ小腸液を用いてA-1の消化試験を行った結果、A-1は消化後においても活

性の低下は認められず、消化耐性に優れていることが明示された。また、抗原性の有無をモルモットを用いて検討した結果、経口投与において能動性全身性アナフィラキシー反応、同種受身皮膚アナフィラキシー反応ともに認められないことが明らかとなった。皮下投与においてはわずかに同種受身皮膚アナフィラキシー反応が観察されたが、産生されたIgG抗体はアナフィラキシー反応を誘発しないことを明らかにした。さらに、本態性高血圧症のモデル動物であるSHRを用いて血圧降下作用を検討したところ、A-1注入後3～5分に最大の効果が発現すること、並びに投与量に依存してその効果が増大することを実証した。

A-1中に存在するACE阻害ペプチドをODS処理後、GPC及び逆相HPLCによる2回のカラムワークで、かつ高収率（1～250 $\mu$ g/イワシ筋肉50g）で単離した。単離した13種類のACE阻害ペプチドの構造決定を行ったところ、Val-Phe, Ile-Tyrを除く11種のペプチドがこれまでに報告されている種々の起源のACE阻害ペプチドとは異なる新規なものであった。また、これらのペプチドのほとんどはIC<sub>50</sub>値100 $\mu$ M以下と高活性であり、ジ及びトリの低分子ペプチドであった。その中で、最大の活性を示したLys-Trp（IC<sub>50</sub>=1.63 $\mu$ M）は既知のジペプチドの中で最も高いVal-Trp（IC<sub>50</sub>=1.6 $\mu$ M）と同等の活性を有していた。また、構造的にはArg-Val-Tyrの配列が一連のアンジオテンシン類（アンジオテンシンI, II, III, des Asp[1]-アンジオテンシンI）のN末端側配列と完全に一致することを明らかにした。

以上の結果より、イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼによる分解物はACE阻害機能のみならず、食品品質を損なわない優れた機能性食品素材

であることが明らかとなった。

内因性ホルモンペプチドによる生体内での血圧調節機構の解明  
～レニン・アンジオテンシン系を中心とした血圧調節～ (第5章)

第4章より得られた知見，すなわちACE阻害ペプチドArg-Val-Tyrの配列が一連のアンジオテンシン(ANG)類のN末端側配列に存在しているとの知見に基づき，高血圧症の90%を占めているにもかかわらず未だ発症原因が不明な本態性高血圧症の発症機構，並びに血圧調節機構の究明を行った。

これまでに報告されているANGフラグメント及び代謝生成が予測されるフラグメントを合成し，そのACE阻害性を検討した結果，9種のフラグメントペプチドが阻害活性を示し，中でも5つのフラグメントが顕著な阻害活性(ANGIII ( $IC_{50}=27.9\mu M$ ), ANG(1-7) ( $21.1\mu M$ ), ANG(3-8) ( $6.55\mu M$ ), ANG(5-8) ( $11.6\mu M$ ), ANG(3-4) ( $26.0\mu M$ ))を呈し，これまで不活性代謝物であるとされてきたANGII由来のフラグメント中にACE阻害作用を有するペプチド配列が存在することを初めて明らかにした。そこで，ACE阻害活性を有するANG代謝物の生体内での血圧降下作用を立証するために最小単位であるANG(3-4) (Val-Tyr)及びその前駆体であると考えられるANGIIIをSHRに対して静注投与したところ，拡張期血圧に対して有意な血圧降下作用を示し，*in vivo*においても血圧降下作用を有するANGフラグメントが存在することを初めて実証した。そこで，SHRの血漿中でANGII及びANGIIIをイ

ンキュベートした結果, ACE阻害活性を有する4つの代謝物 (ANG (3-8), (4-8), (5-8), Val-Tyr) が確実に生成されることを明らかにした. また, ANGII及びIIIの分解速度を正常血圧であるWistar系ラットと比較したところ, ANGIIIの分解初速度においては有意な差は認められなかったのに対して, ANGIIの分解初速度ではSHRはWistar系ラットの約1/2であることが判明した.

ヒト血漿を用いてレニン・アンジオテンシン系におけるANG代謝物の潜在的生理作用を検証した. 仰臥位時及び血漿レニン活性を賦活させた立位時のヒト血漿を用いてANGII及びIIIの分解及びその代謝物の生成挙動を比較したところ, ANGII及びIIIの分解挙動に有意な差は認められなかったが, ACE阻害活性を有する代謝物の生成はレニン活性の賦活に依存して増大することを明らかにした. そこで, レニン活性の賦活に対するANGの分解及び代謝物の生成に関与するアンジオテンシナーゼの活性をANGIIを構成するジペプチドを用いて検討した結果, ジペプチド切断に関与するほとんどの酵素活性はレニン活性の賦活に依存して有意に増大していたのに対して, Val-Tyrの切断に関与する酵素のみ賦活されないことを明らかにした. また, 生体内での正確な生成量及び外来を含めての存在量を把握するため, 蛍光誘導体化試薬であるNDAを用いて, 生体内でのANG類を正確にかつ再現性よく定量する蛍光HPLC分析法を設定した. 本定量法による血漿中のANGII量は, 従来用いられてきたRIA法による測定値と良好に一致しており, ANG代謝物の血中濃度の測定が可能となった. その結果, ACE阻害活性を有するANG代謝物がピコモルオーダーで確実に存在していること, 並びにこれらの代謝物はレニン活性の

賦活により2～10倍増大することを初めて明らかにした。

以上の結果より、従来不活性代謝物であると考えられてきたANG代謝物がネガティブ・フィードバック的にACEを阻害し、血圧調節を行っていること、またそれら代謝物の誘導はアンジオテンシナーゼ群が行っており、R-A系の賦活状態に依存して代謝物の生成量を制御している可能性が示唆された。

本研究では、食品の潜在的生理機能としてアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの存在を明確化し、その生体内での作用機作を分子レベル及び動物実験を通じて追求するとともに機能性食品の設計・開発に具体的な指針を与えた。さらに、内因性アンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの存在及びその生理的意義を明確化するとともに生体内でのレニン・アンジオテンシン系を中心とする自己血圧調節機構の一端を解明した。本研究によって得られたこれら諸知見をもとに高血圧予防機能性食品が開発されること並びに高血圧発症機構の解明がなされることを期待する。

## 後 記

終に鑑み、本研究全般にわたり御懇切なる御指導と御助言、さらに御高閲の労をお取り下さいました、九州大学 箴島 豊教授に対し衷心より感謝を表します。

また、本研究にあたり終始御懇篤な御指導を賜りました、九州大学 松本 清教授、松井利郎助手に深甚なる感謝の意を表します。

また、御高閲の労をお取り下さいました、九州大学 川崎晃一教授に対して衷心より謝意を表します。

また、本研究にあたり多大なる御鞭撻を下さいました下田満哉助教授、中島正利教務員、(現)高知大学 受田浩之助教授をはじめ食品分析学教室の教室員の方々に心より感謝の意を表します。

また、試料を提供し、研究にご協力下さいました仙味エキス株式会社 箴島克裕氏、関 英治氏、宝酒造株式会社 松田秀喜氏に深甚なる謝意を表します。



## 参 考 文 献

- 1) 能村哲郎：特集にあたって. 遺伝, 7, 4-6 (1995).
- 2) 国民衛生の動向・厚生指標 (第42巻第9号), 厚生統計協会編, (1995).
- 3) これからの食品開発を考えるIV. 食品と開発, 30(9), 5-20 (1995).
- 4) 千葉英雄・吉川正明：食品起源の生体調節因子—潜在的な生理機能性物質を中心に. 化学と生物, 25(6), 396-405 (1987).
- 5) 千葉英雄・荒井綜一：機能性食品. 化学と生物, 26(1), 34-40 (1988).
- 6) 稲葉 博：食品の機能—その概念と背景, そして今後の展望. *New Food Industry*, 30(8), 1-7 (1988).
- 7) 機能性食品の今後と素材開発の現況. 食品と開発, 26(4), 2-40 (1991).
- 8) 大澤俊彦：「デザイナーフーズ」開発の現状と動向. 食科工, 42(9), 728-735 (1995).
- 9) 蛋白・ペプチドの市場動向を探る. 食品と開発, 30(8), 31-35 (1995).
- 10) 吉川正明・千葉英雄：食品由来の生理活性ペプチド. 食品工業, 33(4), 20-25 (1990).
- 11) 河村幸雄：食品タンパク質由来の生理活性ペプチド. 食品工業, 33(2), 20-30 (1990).

- 12) 水町功子：畜産物に由来する生体調節機能性物質. 食品工業, **33**(2), 31-38 (1990).
- 13) 真島吉也：ペプチド吸収について. 千葉医学, **61**, 389-396 (1985).
- 14) 萩平 博・中坊幸弘：ペプチドの吸収と代謝. 代謝, **27**(11), 993-1000 (1990).
- 15) D. M. Matthews and S. A. Adibi: Peptide Absorption. *Gastroenterology*, **71**, 151-161 (1976).
- 16) D. B. A. Silk, P. D. Fairclough, M. L. Clark, J. E. Hegarty, T. C. Marrs, J. M. Addison, D. Burston, K. M. Clegg, and D. M. Matthews: Use of a Peptide Rather Than Free Amino Acid Nitrogen Source in Chemically Defined "Elemental" Diets. *J. Parent. Enteral Nutrition*, **4**(6), 548-553 (1980).
- 17) V. Brantl, H. Teschemacher, A. Henschen, and F. Lottspeich: Novel Opioid Peptides Derived from Casein ( $\beta$ -Casomorphins). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1211-1216 (1979).
- 18) 荒川規矩男・笹栗 学：“循環器の臨床7－高血圧－”, 国府達郎・山本研二郎編 p.15-34 (1986).
- 19) 萩原俊男・猿田享男・日和田邦男：“ACE阻害薬の全て（改訂版）”, 先端医学社 (1994).
- 20) 尾前照雄：高血圧の治療－最近の進歩と考え方. 治療, **71**(5), 1101-1104 (1989).
- 21) 猿田享男：降圧薬－最近のトピックス. 治療, **71**(5), 1105-1110

- (1989).
- 22) 松尾寿之・鹿取 信：“キニンとアンジオテンシン（生体調節の分子機構）”，大石幸子・加藤久雄・三宅可浩編，講談社（1994）。
- 23) 小池博之・柳沢宏明：“生物活性物質の分子設計”，吉岡宏輔・首藤紘一編，ソフトサイエンス社，p.278-297（1988）。
- 24) 大久保博晶：血圧調節機構の分子生物学的研究－レニン・アンジオテンシン系を中心に．生化学，**63**(12)，1419-1440（1991）。
- 25) L. T. Skeggs, W. H. Marsh, J. P. Kahn, and N. P. Shumway: The Existence of Two Forms of Hypertensin. *J. Exp. Med.*, **99**, 275-282（1954）。
- 26) L. T. Skeggs, J. R. Kahn, and N. P. Shumway: The Preparation and Function of the Hypertensin-Converting Enzyme. *J. Exp. Med.*, **103**, 295-301（1956）。
- 27) 川崎晃一・尾前照雄：“内科シリーズNo.31－副腎疾患のすべて－”，南江堂，p.57-68（1978）。
- 28) J. E. Sealey and J. H. Laragh, in "Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management", ed. by J. H. Laragh and B. M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York, p.1287-1317（1990）。
- 29) 今泉 勉・竹下 彰：循環調節とレニン－アンジオテンシン系．内科，**68**(5)，823-827（1991）。
- 30) 水野兼志：血管壁レニン－アンジオテンシン系の意義．内科，**68**(5)，828-832（1991）。

- 31) H. Okuniushi, M. Miyazaki, and N. Toda: Evidence for a Putatively New Angiotensin II-Generating Enzyme in the Vascular Wall. *J. Hypertens.*, **2(3)**, 277-284 (1984).
- 32) 中尾彰秀・黒川 清：腎内のレニン-アンジオテンシン. 内科, **68(5)**, 833-838 (1991).
- 33) M. A. Ondetti, B. Rubin, and D. W. Cushman: Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science*, **196**, 441-444 (1977).
- 34) 岡本耕造：高血圧モデル動物の生成とそれによる研究の発展. 病態生理, **1(5)**, 459-474 (1982).
- 35) D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, and M. A. Ondetti: Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids. *Biochemistry*, **16(25)**, 5484-5491 (1977).
- 36) A. A. Patchett, E. Harris, E. W. Tristram, M. J. Wyvratt, M. T. Wu, D. Taub, E. R. Peterson, T. J. Ikeler, J. ten Broeke, L. G. Payne, D. L. Ondeyka, E. D. Thorsett, W. J. Greenlee, N. S. Lohr, R. D. Hoffsommer, H. Joshua, W. V. Ruyle, J. W. Rothrock, S. D. Aster, A. L. Maycock, F. M. Robinson, R. Hirschmann, C. S. Sweet, E. H. Ulm, D. M. Gross, T. C. Vassil, and C. A. Stone: A New Class of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Nature*,

- 288, 280-283 (1980).
- 37) T. Sawayama, M. Tsukamoto, T. Sasagawa, K. Nishimura, R. Yamamoto, T. Deguchi, K. Takeyama, and K. Hosoki: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Synthesis and Structure-Activity Relationships of Potent *N*-Benzyloxycarbonyl Tripeptide Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, **37(9)**, 2417-2422 (1989).
- 38) A. G. Hermann: Differences in Structure of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Might Predict Differences in Action. *Am. J. Cardiol.*, **70(8)**, 102C-108C (1992)
- 39) 谷田 博・池上四郎・奥 彬：“有機医薬品化学”，化学同人，p.237-254 (1989).
- 40) G. Oshima, H. Shimabukuro, and K. Nagasawa: Peptide Inhibitors of Angiotensin I-Converting Enzyme in Digests of Gelatin by Bacterial Collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 128-137 (1979).
- 41) S. Maruyama and H. Suzuki: A Peptide Inhibitor of Angiotensin I Converting Enzyme in the Tryptic Hydrolyzate of Casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46(5)**, 1393-1394 (1982).
- 42) 末綱邦男・箴島克裕：イワシおよびタチウオ筋肉由来塩基性ペプチドのアンジオテンシンI変換酵素阻害能について。日水誌，**52(11)**，1981-1984 (1986).

- 43) Y. Kohama, S. Matsumoto, H. Oka, T. Teramoto, M. Okabe, and T. Miura: Isolation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from Tuna Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155(1)**, 332-337 (1988).
- 44) 原 征彦・松崎妙子・鈴木建夫：茶成分のアンジオテンシンI変換酵素阻害能について. *農化*, **61(7)**, 803-808 (1987).
- 45) 斎藤義幸・中村圭子・川戸章嗣・今安 聡：清酒, および副産物中のアンジオテンシンI変換酵素阻害物質. *農化*, **66(7)**, 1081-1087 (1992).
- 46) 厚生省特定疾患肉芽腫性肺疾患調査研究班 (旧サルコイドーシス調査研究班) (班長：三上理一郎)：サルコイドーシスにおける血清アンジオテンシン変換酵素活性の上昇について. *日本医事新報*, **2903**, 23-30 (1979).
- 47) 後藤光弘・水野兼志・松井遵一郎・福地総逸：血清アンジオテンシンI変換酵素活性測定法の検討とその臨床的応用. *日腎誌*, **XXV(2)**, 121-129 (1983).
- 48) J. D. Barret and M. R. Sambhi: Simultaneous Assay of Angiotensin I and II and Determination of Converting Enzyme Activity. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **170**, 326 (1969).
- 49) C. G. Huggins and N. S. Thampi: A Simple Method for the Determination of Angiotensin I Converting Enzyme. *Life Sci.*, **7(part II)**, 633-639 (1968).

- 50) J. M. Conroy and C. Y. Lai: A Rapid and Sensitive Fluorescence Assay for Angiotensin-Converting Enzyme. *Anal. Biochem.*, **87**, 556-561 (1978).
- 51) J. Friedland and E. Silverstein: A Sensitive Fluorimetric Assay for Serum Angiotensin-Converting Enzyme. *Am. J. Clin. Pathol.*, **66**, 416-426 (1976).
- 52) D. W. Cushman and H. S. Cheung: Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971).
- 53) J. Lieberman: A New Confirmatory Test for Sarcoidosis. Serum Angiotensin Converting Enzyme: Effect of Steroids and Chronic Lung Disease. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **109**, 743 (1974).
- 54) 鈴木建夫・石川宣子・目黒 熙：食品中のアンジオテンシンI変換酵素阻害能について. *農化*, **57(11)**, 1143-1146 (1983).
- 55) 西澤 信・大山 徹・長南隆夫・中野道晴・堀 義宏・金島弘恭：北海道産植物のアンジオテンシンI変換酵素阻害作用. *道衛研所報*, **35**, 108-110 (1985).
- 56) 山本節子・戸井田一郎・岩井和郎：血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討. *日胸疾会誌*, **18(5)**, 297-303 (1980).
- 57) Y. Kasahara and Y. Ashihara: Colorimetry of Angiotensin-I Converting Enzyme Activity in Serum. *Clin. Chem.*, **27(11)**, 1922-1925 (1981).

- 58) K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi, and T. Shinoda: The Spectrophotometric Determination of Amine, Amino Acid and Peptide with 2,4,6-Trinitrobenzene 1-Sulfonic Acid. *J. Biochem.*, **47(5)**, 654-660 (1960).
- 59) R. Field, in "Methods in Enzymology", Vol.25, ed by C. H. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, New York, p.464-468 (1972).
- 60) A. K. Hazra, S. P. Chock, and R. W. Albers: Protein Determination with Trinitrobenzene Sulfonate: A Method Relatively Independent of Amino Acid Composition. *Anal. Chem.*, **137**, 437-443 (1984).
- 61) H. M. Neels, M. E. van Sande, and S. L. Scharpe: Sensitive Colorimetric Assay for Angiotensin Converting Enzyme in Serum. *Clin. Chem.*, **29(7)**, 1399-1403 (1983).
- 62) 松本 清・荻久保温子・吉野貴唯・松井利郎・箴島 豊: オイスター蛋白質加水分解エキス中のアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの分離・精製. 日食工誌, **41(9)**, 589-594 (1994).
- 63) 末綱邦男: イワシ筋肉, 大豆, ブタプラズマ由来トリペプチドのアンジオテンシンI変換酵素阻害剤としてのSHRに対する降圧作用. 基礎と臨床, **25(7)**, 2245-2261 (1991).
- 64) S. Maruyama, S. Miyoshi, T. Kaneko, and H. Tanaka: Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activities of Synthetic Peptides Related to the Tandem Repeated Sequence of a Maize Endosperm



- Protein. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(4), 1077-1081 (1989).
- 65) 河村幸雄・杉本敏男・高根俊一・佐竹幹雄：食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド。[1]イワシ筋肉由来の抗血圧上昇性（ACE-阻害）ペプチドの単離と構造決定。微量栄養素研究，第6集，117-121 (1989)。
- 66) H.-S. Cheung, F.-L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, and D. W. Cushman: Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **255**(2), 401-407 (1980)。
- 67) Y. Kohama, H. Oka, Y. Kayamori, K. Tsujikawa, T. Mimura, Y. Nagase, and M. Satake: Potent Synthetic Analogues of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Tuna Muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(8), 2169-2170 (1991)。
- 68) 川上 晃・茅原 紘：トリペプチド（Leu-Lys-Tyr）誘導体の合成とアンジオテンシンI変換酵素との相互作用。栄食誌，**46**(5)，425-429 (1993)。
- 69) S. L. Engel, T. R. Schaeffer, B. I. Gold, and B. Rubin: Inhibition of Pressor Effects of Angiotensin I and Augmentation of Depressor Effects of Bradykinin by Synthetic Peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 240-244 (1972)。
- 70) 杉山圭吉・高田康二・江川 真・山本郁雄・恩塚 博・大場健吉：魚タンパク加水分解物の高血圧抑制作用。農化，**65**(1)，35-43

- (1991).
- 71) 松田秀喜：イワシ筋肉由来のアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドに関する研究. 学位論文 (1993).
- 72) S. Maruyama, K. Nakagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki:  
Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from an  
Enzymatic Hydrolysate of Casein. II. Isolation and Bradykinin-  
Potentiating Activity on the Uterus and the Ileum of Rats. *Agric.  
Biol. Chem.*, **49(5)**, 1405-1409 (1985).
- 73) S. Maruyama, S. Miyoshi, and H. Tanaka: Angiotensin I-  
Converting Enzyme Inhibitors Derived from *Ficus carica*. *Agric.  
Biol. Chem.*, **53(10)**, 2763-2767 (1989).
- 74) Y. Kohama, H. Oka, K. Yamamoto, T. Teramoto, M. Okabe, T.  
Miura, Y. Nagase, Y. Chiba, and T. Fujita: Induction of  
Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity by Acid-  
Limited Proteolysis of Glyceraldehyde 3-Phosphate  
Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161(2)**, 456-460  
(1989).
- 75) T. Hazato and R. Kase: Isolation of Angiotensin-Converting  
Enzyme Inhibitor from Porcine Plasma. *Biochem. Biophys. Res.  
Commun.*, **139(1)**, 52-55 (1986).
- 76) 松田秀喜・石崎俊行・森田日出男・長岡俊徳・箴島克裕・箴島  
豊：ブタ小腸液によるイワシ筋肉由来のアンジオテンシンI変換酵

- 素阻害ペプチドの分解. 農化, **66(11)**, 1645-1647 (1992).
- 77) 丸山工作: 収縮性蛋白質の進化. 蛋白質・核酸・酵素, **28(5)**, 351-359 (1983).
- 78) 広野雅文・渡邊良雄: 原生アクチンの構造と機能. 蛋白質・核酸・酵素, **34(12)**, 1533-1541 (1989).
- 79) 箴島克裕・榊原 進・澤邊 質・北村光一・松田秀喜・箴島 豊: イワシ由来アンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの分離システムの検討. 日食工誌, **40(8)**, 568-576 (1993).
- 80) M. Kohmura, N. Nio, K. Kubo, Y. Minoshima, E. Munekata, and Y. Ariyoshi: Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by Synthetic Peptides of Human  $\beta$ -Casein. *Agric. Biol. Chem.*, **53(8)**, 2107-2114 (1989).
- 81) S. Miyoshi, H. Ishikawa, T. Kaneko, F. Fukui, H. Tanaka, and S. Maruyama: Structures and Activity of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in an  $\alpha$ -Zein Hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55(5)**, 1313-1318 (1991).
- 82) N. Matsumura, M. Fujii, Y. Takeda, K. Sugita, and T. Shimizu: Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bonito Bowels Autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57(5)**, 695-697 (1993).
- 83) N. Matsumura, M. Fujii, Y. Takeda, and T. Shimizu: Isolation and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory

- Peptides Derived from Bonito Bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57(10)**, 1743-1744 (1993).
- 84) M. Fujimaki, M. Yamashita, Y. Okazawa, and S. Arai: Diffusible Bitter Peptides in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein. *Agric. Biol. Chem.*, **32(6)**, 794-795 (1968).
- 85) M. Fujimaki, M. Yamashita, Y. Okazawa, and S. Arai: Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 3. Diffusible Bitter Peptides and Free Amino Acids in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein. *J. Food Sci.*, **35**, 215-218 (1970).
- 86) M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki: Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. Part IV. A Ninhydrin-Negative Bitter Peptide in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein. *Agric. Biol. Chem.*, **33(3)**, 321-330 (1969).
- 87) S. Arai, M. Yamashita, H. Kato, and M. Fujimaki: Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. Part V. A Nondialyzable Bitter Peptide in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein and its Bitterness in Relation to the Chemical Structure. *Agric. Biol. Chem.*, **34(5)**, 729-738 (1970).
- 88) N. Minamiura, Y. Matsumura, J. Fukumoto, and T. Yamamoto: Bitter Peptides in Cow Milk Casein Digests with Bacterial Proteinase. *Agric. Biol. Chem.*, **36(4)**, 588-595 (1972).
- 89) T. Matoba, R. Hayashi, and T. Hata: Isolation of Bitter Peptides

- from Tryptic Hydrolysate of Casein and their Chemical Structure. *Agric. Biol. Chem.*, **34(8)**, 1235-1243 (1970).
- 90) H. Wieser and H.-D. Belitz: Bittere Peptides aus dem Maisprotein Zein durch Hydrolyse mit Pepsin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **159**, 329-336 (1975).
- 91) 岡井秀雄：呈味ペプチド最近の動向. *食品工業*, **33(2)**, 39-47 (1990).
- 92) H. Kato, M. R. Rhue, and T. Nishimura, in "Flavor Chemistry-Trends and Developments", ed by R. Teranishi, R. G. Buttery, and F. Shahidi, ACS Symposium Series 388, Washington, D.C., p.158-174 (1989).
- 93) K. H. Ney: Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Amminosäurezusammensetzung. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **147**, 64-68 (1971).
- 94) H. Shiraiishi, K. Okuda, Y. Sato, N. Yamaoka, and K. Tuzimura: Taste of Proline-containing Peptides. *Agric. Biol. Chem.*, **37(10)**, 2427-2428 (1973).
- 95) H. Wieser and H.-D. Belitz: Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **160**, 383-392 (1976).
- 96) T. Kumazawa, T. Nomura, and K. Kurihara: Liposomes as Model for Taste Cells: Receptor Sites for Bitter Substances Including

- N-C=S Substances and Mechanism of Membrane Potential Changes. *Biochemistry*, **27**, 1239-1244 (1988).
- 97) T. Matoba and T. Hata: Relationship between Bitterness of Peptides and Their Chemical Structures. *Agric. Biol. Chem.*, **36(8)**, 1423-1431 (1972).
- 98) J. Adler-Nissen: Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility. *J. Agric. Food. Chem.*, **24(6)**, 1090-1093 (1976).
- 99) B. Pedersen: Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. *Food Technol.*, **48(10)**, 96-99 (1994).
- 100) 渡辺道子：“食品・医薬品分野における蛋白質テーラリング”，千葉英雄・荒井綜一編，学会出版センター，p.75-93 (1988).
- 101) 中村哲郎・宿野辺幸孝・土岐良一・平野賢一・伊藤浩史：乳カゼインの酵素分解によるペプチド混合物の製造. *日食工誌*, **38(5)**, 377-383 (1991).
- 102) S. Furuya, K. Sakamoto, and S. Takahashi: A New *In Vitro* Method for the Estimation of Digestibility Using the Intestinal Fluid of the Pig. *Br. J. Nutr.*, **41**, 511-520 (1979).
- 103) 江田昭英・森 裕志・稲垣直樹・鶴岡伸夫・加藤 譲：基礎と臨床, **16**, 783-791 (1982).
- 104) 杉山圭吉・恩塚 博・高田康二・大場健吉：魚蛋白質加水分解物の揮発性成分. *農化*, **64(9)**, 1461-1465 (1990).
- 105) M. Watanabe, J. Miyakawa, Y. Suzuki, T. Hirao, T. Yoshizawa,

- and S. Arai: Production of Hypoallergenic Rice by Enzymatic Decomposition of Constituent Proteins. *J. Food Sci.*, **55**(3), 781-783 (1990).
- 106) 奥村史朗・鐘ヶ江裕志・山田耕路・菅野道廣：S-カルボキシメチル化及び加熱 $\beta$ -ラクトグロブリンの蛋白質加水分解酵素処理. *食科工*, **42**(8), 583-587 (1995).
- 107) 中村 良：食品蛋白質の特性と機能に関する分子科学的研究. *食科工*, **42**(8), 720-726 (1995).
- 108) D. Migliore-Samour, F. Floc'k, and P. Jollés: Biologically Active Casein Peptides Implicated in Immunomodulation. *J. Dairy Res.*, **56**, 357-362 (1989).
- 109) K. Yokoyama, H. Chiba, and M. Yoshikawa: Peptide Inhibitors for Angiotensin I-Converting Enzyme from Thermolysin Digest of Dried Bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(10), 1541-1545 (1992).
- 110) 阿部圭志：レニン・アンジオテンシン系とその拮抗物質. b. アンジオテンシン転換酵素の阻害物質. *日本臨牀*, **48**(5), 949-955 (1985).
- 111) V. J. Dzau: Multiple Pathways of Angiotensin Production in the Blood Vessel Wall: Evidence, Possibilities and Hypotheses. *J. Hypertens.*, **7**, 933-936 (1989).
- 112) 国府達郎・日和田邦男：“生化学データブック[1]”，日本生化学編，東京化学同人，p.1363-1369 (1979).

- 113) J. R. Blair-West, J. P. Coghlan, D. A. Denton, J. W. Funder, B. A. Scoggins, and R. D. Wright: The Effect of the Heptapeptide (2-8) and Hexapeptide (3-8) Fragments of Angiotensin II on Aldosterone Secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 575-578 (1971).
- 114) W. B. Campbell, S. N. Brooks, and W. A. Pettinger: Angiotensin II- and Angiotensin III-Induced Aldosterone Release *In Vivo* in the Rat. *Science*, **184**(31), 994-996 (1974).
- 115) D. Regoli, B. Riniker, and H. Brunner: The Enzymatic Degradation of Various Angiotensin II Derivatives by Serum, Plasma or Kidney Homogenate. *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 637-646 (1963).
- 116) R. H. Abhold and J. W. Harding: Metabolism of Angiotensin II and III by Membrane-Bound Peptidase from Rat Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**(1), 171-177 (1988).
- 117) J. A. D. M. Tonnaer, G. M. H. Engels, V. M. Wiegant, J. P. H. Burbach, W. D. Jong, and D. D. Wied: Proteolytic Conversion of Angiotensins in Rat Brain Tissue. *Eur. J. Biochem.*, **131**, 415-421 (1983).
- 118) M. Allard, G. Simonnet, B. Dupouy, and J.D. Vincent: Angiotensin II Inactivation Process in Cultured Mouse Spinal Cord Cells. *J. Neurochem.*, **48**(5), 1553-1559 (1987).
- 119) K. Hermann, M. I. Phillips, and M. K. Raizada: Metabolism of Angiotensin Peptides by Neuronal and Glial Cultures from Rat



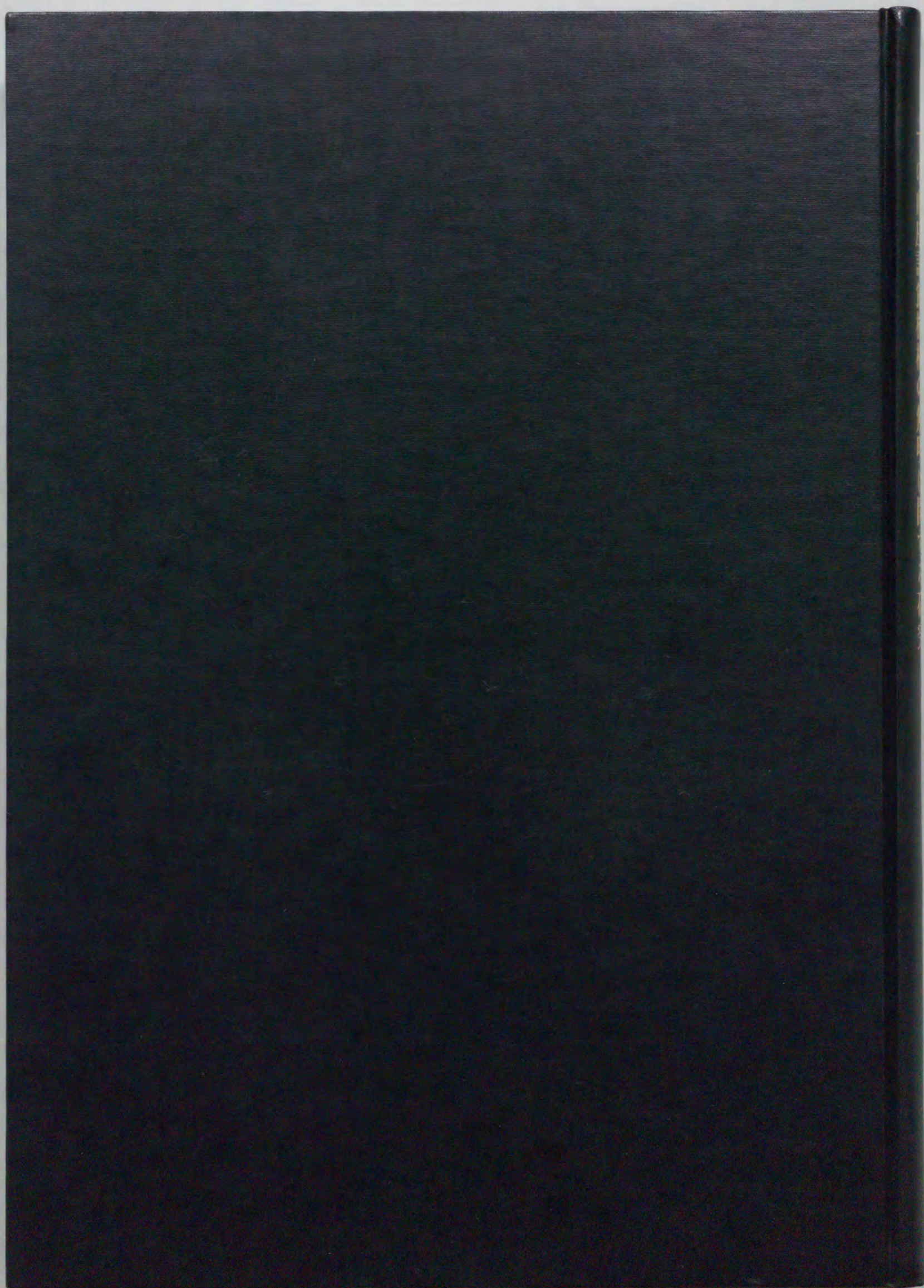
- Brain. *J. Neurochem.*, **52**(3), 863-868 (1989).
- 120) R. A. S. Santos, K. B. Brosnihan, M. C. Chappell, J. Pesquero, C. L. Chernicky, L. J. Greene, and C. M. Ferrario: Converting Enzyme Activity and Angiotensin Metabolism in the Dog Brain Stem. *Hypertension*, **11**[suppl I], I-153-I-157 (1988).
- 121) C. M. Ferrario, K. B. Brosnihan, D. I. Diz, N. Jaiswal, M. C. Khosla, A. Milsted, and E. A. Tallant: Angiotensin-(1-7): A New Hormone of the Angiotensin System. *Hypertension*, **18**[suppl III], III-126-III-133 (1991).
- 122) G. N. Swanson, J. M. Hanesworth, M. F. Sardinia, J. K. M. Coleman, J. W. Wright, K. L. Hall, A. V. Miller-Wing, J. W. Stobb, V. I. Cook, E. C. Harding, and J. W. Harding: Discovery of a Distinct Binding Site for Angiotensin II (3-8), a Putative Angiotensin IV Receptor. *Rugul. Pept.*, **40**, 409-419 (1992).
- 123) J. W. Harding, V. I. Cook, A. V. Miller-Wing, J. M. Hanesworth, M. F. Sardinia, K. L. Hall, J. W. Stobb, G. N. Swanson, J. K. M. Coleman, J. W. Wright, and E. C. Harding: Identification of an AII(3-8) [AIV] Binding Site in Guinea Pig Hippocampus. *Brain Res.*, **583**, 340-343 (1992).
- 124) K. L. Hall, J. M. Hanesworth, A. E. Ball, G. P. Felgenhauer, H. L. Hosick, and J. W. Harding: Identification and Characterization of a Novel Angiotensin Binding Site in Cultured Vascular Smooth

- Muscle Cells That is Specific for the Hexapeptide (3-8) Fragment of Angiotensin II, Angiotensin IV. *Regul. Pept.*, **44**, 225-232 (1993).
- 125) K. L. Hall, S. Venkateswaran, J. M. Hanesworth, M. E. Schelling, and J. W. Harding: Characterization of a Functional Angiotensin IV Receptor on Coronary Microvascular Endothelial Cells. *Regul. Pept.*, **58**, 107-115 (1995).
- 126) N. Jaiswal, R. K. Jaiswal, E. A. Tallant, D. I. Diz, and C. M. Ferrario: Alterations in Prostaglandin Production in Spontaneously Hypertensive Rat Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, **21**(6), 900-905 (1993).
- 127) P. J. M. Kwakman, H. Koelewijn, I. Kool, U. A. T. Brinkman, and G. J. De-Jong: Naphthalene- and Anthracene-2,3-Dialdehyde as Precolumn Labelling Reagents for Primary Amines Using Reversed- and Normal-Phase Liquid Chromatography with Peroxyoxalate Chemiluminescence Detection. *J. Chromatogr.*, **511**, 155-166 (1990).
- 128) B.-S. Tsai and M. J. Peach: Angiotensin Homologs and Analogs as Inhibitors of Rabbit Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **252**(13), 4674-4681 (1977).
- 129) R. A. Snyder and B. U. Wintroub: Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by Des-Leu<sup>10</sup>-Angiotensin I: A Potent

- Mechanism of Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme Regulation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **871**, 1-5 (1986).
- 130) K. Hermann, D. Ganten, T. Unger, C. Bayer, and R. E. Lang: Measurement and Characterization of Angiotensin Peptide in Plasma. *Clin. Chem.*, **34(6)**, 1046-1051 (1988).
- 131) H. Huang, T. Baussant, R. Reade, J. B. Michel, and P. Corvol: Measurement of Angiotensin II Concentration in Rat Plasma: Pathophysiological Applications. *Clin. Exper. Hyper. Theory & Practice*, **A11(8)**, 1535-1548 (1989).
- 132) P. F. Semple, A. S. Boyd, P. M. Dawes, and J. J. Morton: Angiotensin II and Its Heptapeptide (2-8), Hexapeptide (3-8), and Pentapeptide (4-8) Metabolites in Arterial and Venous Blood of Man. *Circ. Res.*, **39(5)**, 671-679 (1976).
- 133) T. Kawasaki, K. Kumamoto, K. Fukiyama, Y. Noda, S. Takishita, and T. Omae: Individual Renin-Aldosterone Responses of Clinically Healthy Young Japanese Men to Dietary Sodium and Posture. *Jap. Heart J.*, **20(5)**, 631-641 (1979).
- 134) A. T. Chiu and M. J. Peach: Inhibition of Induced Aldosterone Biosynthesis with a Specific Antagonist of Angiotensin II. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71(2)**, 341-344 (1974).
- 135) P. A. Khairallah, F. M. Bumpus, I. H. Page, and R. R. Smeby: Angiotensinase with a High Degree of Specificity in Plasma and

- Red Cells. *Science*, **140**, 672-674 (1963).
- 136) A. B. Kurtz and E. D. Wachsmuth: Identification of Plasma Angiotensinase as Aminopeptidase. *Nature*, **221**, 92-93 (1969).
- 137) B. U. Wintroub, C. E. Kaempfer, N. M. Schechter, and D. Proud: A Human Lung Mast Cell Chymotrypsin-Like Enzyme. *J. Clin. Inv.*, **77**, 196-201 (1986).
- 138) 檜垣實男・萩原俊男：レニン-アンジオテンシンの測定と問題点. 内科, **68(5)**, 819-822 (1991).
- 139) 福岡栄介・鈴木 薫・吉成昌郎・奥西秀樹・宮崎瑞夫：キャピラリー電気泳動によるブラジキニンとその代謝物の同時測定法の開発. 分析化学, **43**, 131-137 (1994).
- 140) Y. Sakamoto, T. Miyazaki, M. Kai, and Y. Ohkura: Sensitive Assay for Serum Angiotensin-Converting Enzyme and Separation of Angiotensin Analogues by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr.*, **380**, 313-320 (1986).
- 141) P. d. Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, K. Srinivasachar, L. A. Sternson, and T. Higuchi: Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide Ion: A Rationally Designed Fluorogenic Reagent for Primary Amines. *Anal. Chem.*, **59**, 1096-1101 (1987).
- 142) B. K. Matuzewski, R. S. Givens, K. Srinivasachar, R. G. Carlson, and T. Higuchi: N-Substituted 1-Cyanobenz[*f*]isoindole:

- Evaluation of Fluorescence Efficiencies of a New Fluorogenic Label for Primary Amines and Amino Acids. *Anal Chem.*, **59**, 1102-1105 (1987).
- 143) R. G. Carlson, K. Srinivasachar, R. S. Givens, and B. K. Matuszewski: New Derivatizing Agents for Amino Acids and Peptides. 1. Facile Synthesis of N-Substituted 1-Cyanobenz[*f*]isoindoles and Their Spectroscopic Properties. *J. Org. Chem.*, **51**, 3978-3983 (1986).
- 144) 大倉洋甫・甲斐雅亮・能田 均：蛍光及び化学発光法による生体成分の高感度分析. *分析化学*, **43**, 259-288 (1994).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

