

S4

중등 정도 고혈압인 사람에서, 정어리 근육 가수분해물로부터 유도된 단색 펩타이드인 Valyl-Tyrosine의 항고혈압 효과

T. Kawasaki¹, E. Seki², K. Osajima², M. Yoshida², K. Asada³, T. Matsui⁴, and Y. Osajima⁴

¹보건과학원, 큐슈대학교, 카스가 816-8589, 일본, ²연구실험실, 센미 에키스 주식회사, 오즈 795-0021, 일본

³아사다클리닉, 아와타카마 796-0075, 일본, ⁴식품공학과, 농과대학, 큐슈대학교, 후쿠오카 812-8581, 일본

요 약

본 연구는 선천성고혈압쥐(SHR)에서와 마찬가지로, 높은 정상혈압 및 중등 정도의 본태성고혈압 환자에서 Valyl-Tyrosine(VY)의 항고혈압 효과 여부를 결정하기 위해 수행되었다. 29명의 지원자에 대하여 무작위 이중맹검 위약검사를 실시하였으며, 3 mg의 VY를 포함하는 100-ml 음료와 100ml-위약 음료를 조제하여 사용하였다. 연구대상은 VY (남16/여1, 45.5±3.2세, 146.4±2.3/90.5±1.8 mmHg) 집단과 위약(P) (남11/여1, 48.8±3.0세, 145.5±2.4/92.3±1.8 mmHg) 집단으로 나누었다. 대조(C)기간 3주 째에 VY-음료 또는 P-음료를 하루 2 번씩 투여하기 시작하여 4주 간의 실험(E)기간 동안 투여하였으며, 그 후 4주 간의 회복기간 동안에는 어느 집단도 음료를 투여 받지 않았다. 혈압(BP)은 매주 측정되었으며, 아침에 앉은 자세에서 측정하였다. 혈액 표본은 C기간과 E기간의 마지막 날 채취하였다. VY 집단에서, 수축기(S) 및 이완기(D) 혈압의 감소는 첫째 주에 각각 9.7 및 5.3 mmHg ($P < 0.001$)이었으며, E기간의 시작에 따른 넷째 주에는 각각 9.3 및 5.2 mmHg ($P < 0.001$)이었다. P 집단에서는 SBP와 DBP 모두 변하지 않았다. VY 집단의 혈압은 회복기간의 끝까지 점진적으로 증가하였다. VY 집단에서, 혈장 안지오텐신(Ang) I과 VY의 농도는 현저히 증가한 반면 Ang II와 알도스테론은 VY 투여 후에 현저히 감소하였다. VY는 SHR에서와 마찬가지로 중등 정도의 고혈압 환자에서도 Ang I-전환효소 억제를 통하여 현저한 항고혈압 효과를 가지는 것으로 보이며, 어떤 부작용도 검출되지 않았다.

핵심 단어: 무작위 이중맹검 위약 연구, 발릴타이로신(Valyl-Tyrosine); 정어리 근육, 항고혈압 효과, 중등 정도 고혈압 환자, 안지오텐신 I-전환효소 억제제

개 요

안지오텐신 I-전환효소(ACE)는 혈압(BP)을 상승시키고 고혈압을 유지하는 중요한 역할을 하고 있다. 레닌-안지오텐신 시스템에서, ACE는 안지오텐신(Ang) I이 그것의 C-말단으로부터 His-Leu을

가수분해 하여 Ang II를 생성한다. ACE는 키닌-칼리크레인(kinin-kallikrein)시스템에서 브라디키닌(bradykinin)을 활성화시킨다. 캅토프릴(captopril)이나 에날라프릴(enalapril) 등과 같은 다양한 ACE 억제제들이 계속 합성이 되고 있으며, 효과적인 항고혈압 약물로 현재 광범위하게 사용되고 있다¹. 그러나 이러한 ACE 억제제들은 브라디키닌의 활성화에 기인하는 하나의 부작용으로 많은 경우에 마른기침을 유발하는 것으로 나타났다².

식품으로부터 여러 개의 ACE 억제 펩타이드 들이 분리 및 확인되었다³⁻⁵. 사람에서 ACE 억제를 통한 식품의 항고혈압 효과는 일부 논문에 보고 되었다⁶⁻⁸. *Bacillus licheniformis* 알칼리성 프로테아제(alkaline protease)에 의한 정어리 근육 가수분해물에서 유도된 Valyl-Tyrosine(VY)는, SHR에서 ACE 억제를 통한 현저한 항고혈압 효과가 있는 것으로 저자들의 이전의 연구에서 확인되었다⁹. 본 연구는 선천성고혈압쥐(SHR)와 마찬가지로 높은 정상혈압 및 중등 정도의 본태성고혈압 환자에서 VY의 항고혈압 효과 여부를 결정하기 위해 수행되었다.

연구대상 및 방법

대 상

본 연구에는 34 명의 임상적으로 건강하고 활동적인 지원자가 참여하였다. 그들은 우선 건강검진을 하였고, 그 결과는 대뇌 및 심혈관계, 신장, 내분비, 또는 대사 질환 같은 심각한 질병은 없었으나, 중등 정도의 고혈압, 고지혈증, 고요산혈증, 또는 중등 정도의 포도당불내증은 관찰되었다. 대조(C)기간 동안 일상적인 혈압은 높은 정상혈압¹⁰ 또는 단계 I 및 II의 고혈압을 보여주었다. 이 중 2 명은 연구가 시작될 때 베타-차단제(β -blocker) 또는 칼슘길항제를 복용하고 있었고, 연구 기간동안 같은 용량을 계속 복용하도록 지시하였다. 연구대상은 VY 또는 위약(P) 집단으로 배정되었다. 모든 참가자는 이 연구의 목적, 절차 및 가능한 위해성에 대하여 충분히 숙지하였으며, 이에 대한 동의를 제출하였다. 본 연구는 큐슈대학 보건과학원 인체연구심사위원회(Human Investigation Review Committee)에 의해 승인되었다.

실험용 음료

단쇄 펩타이드는 이전의 논문에 설명한 대로 만들어졌다¹¹. 정어리 근육은 증류수에 용해하였고, 20% NaOH를 사용하여 산도를 pH 9.0으로 조정하였다. *Bacillus licheniformis* 알칼리성 프로테아제 (Novo사, 2.4L, type FG) 0.3% 첨가 후, 50°C에서 17시간 동안 배양하였다. 단백질 가수분해 후에, 용액은 20% HCl을 사용하여 산도를 pH 6.0으로 조정되었고, 98°C에서 15분 동안 가열되었다. 원심분리 후에 얻어진 상청액은 셀라이트(celite; 규조토의 상품명) 덩어리를 통하여 여과하였다. 알칼리성 프로테아제에 의한 가수분해물은 YMC ODS-AQ 120-S50 컬럼에 넣고 0%, 10%, 25%, 50% 및 99.5% 에탄올로 연속적으로 용출하였다. 이 중 10% 에탄올로 용출된 단쇄 펩타이드가 가장 많은 ACE 억제 활성을 보였다. 최종 음료에는, 고과당 옥수수시럽, 꿀, 스테비아(stevia)추출물, 향신료, 구연산(시트르산) 및 말산(malic acid)이 단쇄 펩타이드 용액에 첨가되었고, 100ml 유리병에 담아 128°C에서 10초 동안 멸균하였다. 위약-음료는 VY-음료와 동일한 방법으로 준비되었으며, 다

만 단쇄 펩타이드 대신 물을 첨가하였다. 표 1은 VY-음료와 위약(P)-음료의 영양성분과 VY 농도를 요약한 것이다. 두 음료에서 성분의 함량은 일반적인 방법으로 분석되었으며, ACE 억제 펩타이드 VY의 함량은 Seki 등¹²의 방법으로 결정되었다.

표 1. VY 및 위약 음료의 성분

	VY-음료	위약-음료
단백질 (g)	2.0	ND
탄수화물 (g)	12.9	12.9
회분 (g)	ND	ND
지질 (g)	ND	ND
섬유소 (g)	ND	ND
수분 (g)	85.1	87.1
열량 (KJ)	249.4	215.9
valyl-tyrosine (mg)	3.0	ND

성분은 음료 100g 당
ND=검출불가

실험계획

무작위 이중맹검 위약검사의 실험계획은 그림 1에 나타난 것처럼 높은 정상혈압과 중등 정도의 고혈압이 있는 29 명을 대상으로 수행되었다. 실험대상은 11주의 실험기간 동안 되도록이면 최대한으로 평소의 식사형태를 바꾸지 않고 또한 생활습관도 변화시키지 않도록 교육받았다.

3mg의 VY¹² 또는 100ml의 위약을 포함하는 100ml 음료를 준비하였고, 실험대상은 이 중 하나의 음료를 복용하였다. 실험(E)기간의 초기에 위약-집단에 있던 5 명이 매주 정기적인 혈압 측정을 수행하는 데 문제가 있어 실험에서 제외되었다. 그래서 각각 17명과 12명의 대상이 VY 또는 위약을 배정 받았다.

C-기간의 3주 중에, 모든 대상은 마지막 주에 P-음료를 받았다. 그 후 E-기간의 4주 동안 VY 또는 위약 음료를 하루 2번 복용하였다. 회복(R)기간의 4주 동안에는 어떤 음료도 복용하지 않았다.

혈압(BP)과 심장박동률(HR)은 매주 3번 연속으로 측정하였는데, 아침 09:00시에 측정대상이 최소한 5분 동안 조용히 앉아 있고나서 그 후에 자동혈압측정계로 측정하였다 (BP-203N, 일본 코마키, Nippon Colin 주식회사). 3번 연속 측정된 혈압의 평균값은 각 개인의 BP와 HR을 나타내는 것으로 사용되었다.

혈액 표본은 C-기간과 E-기간의 마지막 날 12시간 공복 후 아침에 채취하여 Ang I 및 II, VY,

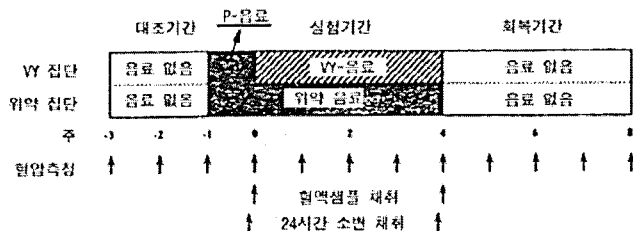


그림 1. 높은 정상혈압과 중등 정도의 고혈압을 가진 대상에서 무작위 이중맹검 위약검사 실험계획서. 빛갈부분, VY-음료: Valyl-Tyrosine 3mg 1일 2회; 탁색부분, P-음료: 위약음료 1일 2회

그리고 알도스테론(aldosterone) 등의 혈액 화학성분을 측정하였다. 또한 24-시간 소변은 각 기간의 마지막 날 채취하여, 24-h 소변의 Na, K, 그리고 크레아티닌(creatinine) 배출량 등을 측정하였다. 사람의 혈장 중에 있는 Ang I 및 II, 그리고 VY는 나프탈렌-2,3-다이알데하이드¹³를 사용하여 형광 HPLC 방법으로 결정하였으며, 혈장 알도스테론(PAC)은 방사선 면역측정법(RIA)으로 결정하였다.

통계적 방법

매주 측정된 수치간의 차이는 Student's paired *t*-test로 평가하였으며, 두 집단 간의 차이는 Student's *t*-test, 윌콕슨 순위합검증(Wilcoxon's rank-sum test), 그리고 ANOVA로 평가하였다. 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현되었으며, $P < 0.05$ 값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

결 과

두 집단의 주요 특징은 표 2에 요약되어 있다. VY-집단과 P-집단은 연령, 신체구성, 알코올 섭취%, 흡연, 고혈압 가족력, 그리고 C-기간의 혈압 등에서 근본적으로 동일하였다. 또한 표 2에 나타난 것처럼, 24-h 소변 Na, K 및 크레아티닌 배출량과 소변 Na/K 비율에서, 두 집단 사이에 유의한 차이는 없었다.

두 집단에서 수축기(S) 및 이완기(D) BP의 변화는 그림 2에 나타나 있다. SBP 및 DBP의 감소는, C-기간의 평균값(SBP는 146.4 ± 2.3 mmHg, DBP는 90.5 ± 1.8 mmHg)과 비교하였을 때, 첫째 주에 각각 9.7 및 5.3 mmHg (모두 $P < 0.001$)이었으며, VY-음료의 투여 시작에 따른 넷째 주에는 각각 9.3 및 5.2 mmHg (모두 $P < 0.001$)이었다. P-집단에서는 SBP와 DBP 모두 유의하게 변하지 않았으나, VY-집단의 혈압은 그림 2에 나타난 것처럼 회복(R)기간의 끝으로 가면서 점진적으로 증

표 2. 두 집단에서 실험대상의 임상적 특징

특징	Val-Tyr집단	위약 집단
실험대상의 수 (남/여)	17 (16/1)	12 (11/1)
연령	45.5 ± 3.2	48.8 ± 3.0
신장 (cm)	166.1 ± 1.9	165.6 ± 2.5
체중 (kg)	65.8 ± 2.1	64.7 ± 3.2
체질량지수 (kg/m ²)	23.8 ± 0.6	23.5 ± 0.8
알코올 섭취 (%)	14/17 (82)	10/12 (83)
흡연 (%)	9/17 (53)	5/12 (58)
HT가족력+ (%)	13/17 (77)	10/12 (83)
수축기BP (mmHg)*	146.4 ± 2.3	145.5 ± 2.4
이완기BP (mmHg)*	90.5 ± 1.8	92.3 ± 1.8
심장박동률 (bpm)*	78.5 ± 2.9	80.5 ± 3.4
소변 Na (mEq/일)	192.6 ± 15.4	174.9 ± 13.7
소변 K (mEq/일)	48.7 ± 2.8	41.2 ± 4.0
소변 크레아티닌 (mg/일)	1430 ± 88	1375 ± 92
소변 Na/K 비율 (mEq/일)/(mEq/일)	4.03 ± 0.27	4.68 ± 0.55

*투여 전 일정기간 중 평균값; HT, 고혈압; BP, 혈압
평균 ± 표준편차

가하였다. 심장박동률(HR)은 실험 전반에 걸쳐 변하지 않았으며, 데이터로 제시하지는 않았지만 두 집단에서 기본적으로 동일하였다. E-기간 및 R-기간 동안 VY-집단에서는 마른기침이나 알레르기 현상 같은 어떤 부작용도 관찰되지 않았다.

실험대상(n=17)은 두 집단으로 나누었는데, 높은 정상혈압을 가진 집단과 (HNBP, n=4) 중등 정도의 고혈압을 가진 집단으로 (HT, n=13) 나누었다. HNBP 집단에서, SBP와 DBP는 대조기간 동안 각각 134.4 ± 2.1 과 81.6 ± 2.6 mmHg로 측정되었고 복용을 시작한 4주 후에는 각각 127.4 ± 4.0 과 74.9 ± 3.4 mmHg로 측정되었으며, 이는 VY-음료에 의해 SBP와 DBP가 유의하게 감소한 것을 보여준다. 반면 HT 집단에서는, SBP와 DBP는 대조기간 동안 각각 149.2 ± 2.0 과 93.8 ± 1.3 mmHg로 측정되었고 복용 후에는 각각 139.2 ± 3.0 과 88.5 ± 2.0 mmHg로 측정되었으며, 이는 역시 VY-음료에 의해 SBP와 DBP가 모두 유의하게 감소한 것을 보여준다. VY-음료의 항고혈압 효과는 HNBP 집단과 HT 집단에서 모두 유의한 것으로 발견되었다. 두 명의 여성을 제외한 실험대상에서 유의성 검증을 수행하였으나, 검증 결과는 두 집단을 합한 것에 의해 영향을 받지 않았다.

그림 3은 두 집단에서 C-기간과 E-기간의 혈장 Ang I 및 II, VY, 그리고 알도스테론 농도를 보여 준다. 그림 3에 나타난 것처럼, C-기간 동안에는 VY 집단과 위약 집단 간에 유의한 차이가 없었다. VY 집단에서는, 혈장 Ang I과 VY는 유의하게 증가한 반면, 혈장 Ang II와 알도스테론은 C-기간에

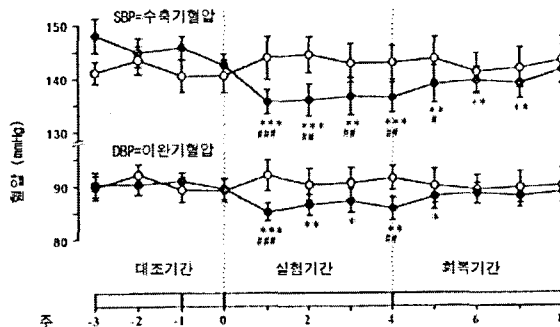


그림 2. 높은 정상혈압과 중등 정도의 고혈압을 가진 실험대상에서 연구기간 동안의 수축기혈압(SBP)과 이완기혈압(DBP). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (대조기간 대비); #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (위약 대비)

-- VY 집단, -- 위약 집단

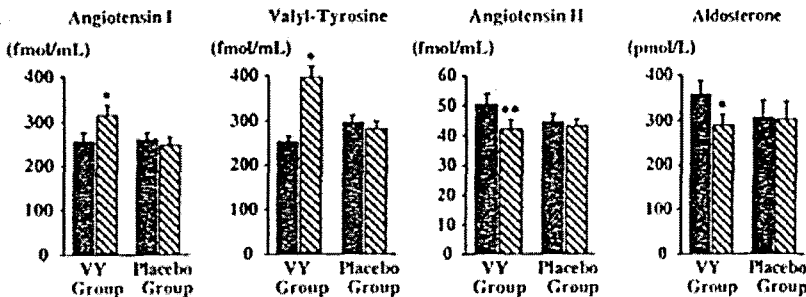


그림 3. VY 집단과 위약 집단에서 실험기간 전과 후의 혈장 안지오텐신 I 및 II, VY, 그리고 알도스테론 농도. *P < 0.05, **P < 0.01 (대조기간 대비) 검은색 막대 = 대조기간, 빗금 막대 = 실험기간 (VY 섭취 후 4주간)

4b

비교하여 E-기간에 유의하게 감소하였다. 위약 집단에서는, E-기간 동안 혈장 Ang I 및 II, VY, 그리고 알도스테론 농도의 유의한 변화는 없었다. VY 집단의 혈청 염소 농도를 제외하고는, 어떤 지표에서도 C-기간과 E-기간 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 두 집단에서 소변 중 Na, K, 크레아티닌 배출량, 그리고 소변 Na/K 비율의 유의한 차이는 없었다.

고 찰

선천성고혈압취(SHR)⁹에 대한 우리의 처음 논문이 나오기 이전에, VY와 Ang (3-4)는 테카펩타이드(아미노기 10개를 함유한 펩타이드)의 최종산물로 여겨졌고 생물학적 활성을 가진다고는 거의 고려되지 않았다. 위의 논문에서 VY는 SHR에 유해한 영향을 주지 않으면서 지속적으로 강압제 역할을 하는 것으로 나타났다. 그래서 이 연구에서는 중등 정도의 고혈압이나 높은 정상혈압을 가진 사람에서 VY-음료의 잠재적으로 이로운 효과 여부를 검토하였다. 복용량은 쥐 실험 자료를 근거로 결정하였다. SBP와 DBP는 E-기간 동안 이 복용량에 의하여 유의하게 감소하였으며, R-기간의 끝으로 가면서 C-기간의 수준이 될 때까지 다시 증가하였다. P-집단에서 혈압은 연구기간을 통틀어 변하지 않았다. 그래서 VY는 중등 정도의 고혈압을 가진 사람 뿐 만 아니라 높은 고혈압을 가진 사람에서도 SHR에서와 같은 정도로 현저한 항고혈압 효과를 나타낼 것이다. 다음 단계로, 혈압강하 효과를 가지는 최소한의 VY 복용량이 결정되어야 한다.

알칼리성 프로테아제에 의해 정어리 단백질로부터 만들어진 평균분자량 315, 평균 사슬길이 2.67인 펩타이드는 쓴 맛이 전혀 없었고 생선 냄새도 거의 없었으며, 펩신 소화 후에 돼지의 장액에 의한 가수분해에 대하여 높은 내성을 보여 주었는데, 이는 SHR에서 잠재적인 ACE 억제 활성화와 혈압 강하 능력을 보여준 것이다⁹. LD₅₀값(mg/kg)이 3000 또는 그 이상인 단쇄 펩타이드의 급성 독성은 구강 섭취에 의해 어떤 항원성도 없었다¹⁴. Val-Tyr의 함량은 단쇄 펩타이드 2 g 당 3 mg 이었고, 단쇄 펩타이드의 총 ACE 억제 활성화의 1.3%를 나타내었다¹².

VY의 항고혈압 기전이 명백하지 않을지라도, VY 투여 개시 후 4주 동안 SBP 및 DBP의 유의한 감소와 함께 Ang I은 유의하게 증가하였고 Ang II와 알도스테론은 유의하게 감소하였고, 이는 VY가 Ang I으로부터 Ang II의 전환을 억제할 지도 모르나 Ang II 수용체 길항제는 아니라는 것을 제시하고 있다. 해로운 부작용이 없는 것을 설명하기 위하여, 키닌효소(kininase) II에 의한 브라디키닌의 축적 외의 항고혈압 기전이 고려되어야 한다. 캄토프릴은 ACE의 다이펩티딜 펩티다제 활성화에 의해 브라디키닌의 분해를 억제하지만, Val-Tyr은 억제하지 않는다¹⁵. 우리

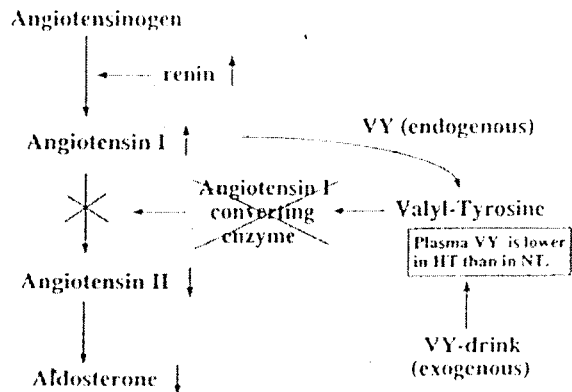


그림 4. 중등 정도의 고혈압을 가진 사람에서 Valyl-Tyrosine의 항고혈압 기전 - 가설

는 그림 4에 우리의 가설을 도식화 하였다. 내인성 혈장 VY 농도는 정상혈압에서 더 높았으며^{16,17,19} 혈장 VY는 외인성 VY 투여에 따라 증가하였는데, 이는 합해져서 혈압의 유의한 감소를 초래했다¹⁷. 그래서 VY는 Ang I의 우세한 대사물질인 것으로 보이며 아마도 ACE를 통하여 혈압을 조절할 것이다^{18,19}.

VY의 생성은 레닌-안지오텐신 시스템과 밀접한 관계가 있을지 모르고 그 이유는 저자의 이전 연구에서 정상혈압인 사람에서 혈장 레닌의 활성화와 함께 혈장 VY는 유의하게 증가하였기 때문이다^{18,19}. VY는 전에는 Ang I로부터 생성되는 직접적이고 우세한 대사물질인 것으로 보였으나, 혈장 VY는 정상혈압인 사람에서 보다 고혈압인 사람에서 유의하게 낮은 것으로 나타났다^{17,19}. 그림 3에 나타난 것처럼, C-기간 동안에는 VY-집단과 P-집단 사이에서 어떤 유의한 차이도 발견되지 않았다. 레닌-안지오텐신 시스템이 활성화 되면, VY의 항고혈압 효과가 더 생길 수도 있으나, 그런 효과는 안지오텐신 II와 알도스테론의 혈장 수준이 이미 높은 본 연구의 대상에서는 관찰되지 않았다. 그래서 이 감압제 효과는 Ang I로부터 Ang II로의 전환에서 나타나는 VY의 피드백 기전에 기인할 수도 있다. 항고혈압 효과는 VY 섭취 2시간 후부터 나타나기 때문에, 혈압은 섭취 후 24시간이 지나 회복되는 것으로 여겨진다. 본 연구에서, 혈압은 VY 섭취 2~3시간 후 아침에 측정되었으므로, 저혈압 효과가 현저하게 나타나는 것으로 보인다. 심지어 섭취를 중단한 후에도, 혈압에 대한 어떤 반동 효과도 없이 약간의 회복이 관찰되었다. 만약 VY-음료를 투여한 건강한 사람에서 시간 경과에 따른 혈액수준의 변화를 관찰했다면, 이 문제는 명확해질 것이다. 고혈압인 사람에서 다이펩타이드인 VY의 항고혈압 효과는 본 논문에서 최초로 제시되었으나, 그 기전은 여전히 풀어야 할 문제로 남아있다.

감사의 글

본 저자들은 루리코 마츠에다와 타에코 쿠보의 뛰어난 기술적 지원과 미호 사네후지의 비서업무 협조에 진심으로 감사를 드립니다.

References

- 1 Kaplan NM. *Clinical Hypertension* (Sixth Edn) Williams & Wilkins: Baltimore, 1994, pp 240-246.
- 2 Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med* 1992; 117: 234-242.
- 3 Ariyoshi Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci Technol* 1993; 4: 139-144.
- 4 Yokokawa K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotech Biochem* 1992; 56: 1541-1545.
- 5 Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneous hypertensive rats. *Biosci Biotech Biochem* 1991; 58: 776-780.
- 6 Sekiya S *et al.* Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1992; 45: 513-517 (in Japanese with English abstract).
- 7 Hata Y *et al.* A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 767-771.
- 8 Fujita H, Yasumoto R, Hasegawa M, Ohshima K. Human volunteers study on antihypertensive effect of 'katsuobushi oligo peptide' II: A placebo-controlled study of 'peptide soup' on blood pressure in borderline and hypertensive subjects. *Jpn Pharmacol Ther* 1997; 25: 2161-2165 (in Japanese with English abstract).
- 9 Matsufuji H *et al.* Antihypertensive effects angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59: 1398-1401.
- 10 The Joint National Committee on Prevention Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1977; 157: 2413-2446.
- 11 Matsufuji H *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotech Biochem* 1994; 58: 2244-2245.
- 12 Seki E *et al.* Val-Tyr, an angiotensin I converting enzyme inhibitor from sardines that have resistance to gastrointestinal proteases. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1995; 69: 1013-1020 (in Japanese with English abstract).
- 13 Matsufuji H *et al.* Fluorometric determination of angiotensins in human plasma derivatized with 2,3-naphthalenedialdehyde. *Bunseki Kagaku* 1995; 10: 783-788 (in Japanese with English abstract).
- 14 Seki E *et al.* Immunologically applicability for foods of short chain peptides derived from sardines. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1995; 69: 1171-1174 (in Japanese with English abstract).
- 15 Seki E *et al.* Effect of Val-Tyr on degradation of bradykinin and angiotensin I. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 1996; 43: 1129-1230 (in Japanese with English abstract).
- 16 Matsui T, Matsufuji H, Kawasaki T, Osajima Y. Determination of endogenous peptides with *in vitro* ACE inhibitory activity in normotensive human plasma by the fluorometric HPLC method. *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61: 1052-1054.
- 17 Matsui T, Osajima Y, Uezono K, Kawasaki T. Metabolism of endogenous Val-Tyr with antihypertensive effect in human plasma. *J Hypertens* 1998; 16 (Suppl 2): s138.
- 18 Matsui T *et al.* Metabolic behavior of angiotensin in normotensive human plasma in the supine and upright postures. *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61: 1814-1818.
- 19 Matsui T *et al.* Plasma concentrations of angiotensin metabolites in young male normotensive and mild hypertensive subjects. *Hypertens Res* 1999; 22: 273-277.