

鮭鼻軟骨プロテオグリカンの
皮膚に対する生理機能的な研究

2012. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(弘前大学)
後藤 昌史

目次

	ページ
序論	. . . 1
第 1 章 UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系の構築	
1-1 緒言	. . . 7
1-2 実験材料と器具	. . . 8
1-2-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射	. . . 8
1-2-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面 評価	. . . 9
1-2-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理 的特性評価	. . . 9
1-2-4 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部 評価	. . . 10
1-2-4-1 酸可溶性コラーゲン定量	. . . 10
1-2-4-2 表皮・真皮肥厚測定	. . . 10
1-3 実験方法	. . . 11
1-3-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射	. . . 11
1-3-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面 評価	. . . 13
1-3-2-1 紅斑量	. . . 13
1-3-2-2 経表皮透過蒸散水分量 (TEWL)	. . . 13
1-3-2-3 角層水分量	. . . 13

1-3-3	ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理 的特性評価	・・・	14
1-3-4	ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部 評価	・・・	15
1-3-4-1	皮膚採取	・・・	15
1-3-4-2	酸可溶性コラーゲン定量	・・・	16
1-3-4-3	表皮・真皮肥厚測定	・・・	17
1-3-5	統計解析	・・・	19
1-4	実験結果	・・・	19
1-4-1	ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面 評価	・・・	19
1-4-1-1	紅斑量	・・・	19
1-4-1-2	経表皮透過蒸散水分量 (TEWL)	・・・	21
1-4-1-3	角層水分量	・・・	22
1-4-2	ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理 的特性評価	・・・	23
1-4-3	ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部 評価	・・・	24
1-4-3-1	酸可溶性コラーゲン定量	・・・	24
1-4-3-2	表皮・真皮肥厚測定	・・・	26
1-5	考察	・・・	27
第 2 章	鮭鼻軟骨抽出物 (Salmon Nasal Cartilage Extracts: SNCE) の経口投 与による皮膚抗老化評価		
2-1	緒言	・・・	29

2-2	実験材料と器具	・・・	30
2-2-1	SNCE の調製	・・・	30
2-2-2	ゲルろ過カラムクロマトグラフィー	・・・	30
2-2-3	グルクロン酸測定（カルバゾール硫酸法）	・・・	31
2-2-4	比較試料と試料の強制経口投与	・・・	31
2-2-5	ヘアレスマウスへの UVB 照射	・・・	31
2-2-6	皮膚表面評価（紅斑、TEWL、角層水分量）	・・・	31
2-2-7	皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）	・・・	32
2-3	実験方法	・・・	32
2-3-1	SNCE の調製	・・・	32
2-3-2	ゲルろ過カラムクロマトグラフィー	・・・	32
2-3-3	グルクロン酸測定（カルバゾール硫酸法）	・・・	32
2-3-4	経口投与及び UVB 照射	・・・	33
2-3-4-1	実験① ヒアルロン酸との比較評価	・・・	33
2-3-4-2	実験② SNCE の摂取量違い及びコンドロイチン 硫酸との比較評価	・・・	34
2-3-5	皮膚表面評価（紅斑、TEWL、角層水分量）	・・・	36
2-3-6	皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）	・・・	36
2-3-7	統計解析	・・・	36
2-4	実験結果	・・・	36
2-4-1	ゲルろ過カラムクロマトグラフィー	・・・	36
2-4-2	実験① ヒアルロン酸との比較評価	・・・	39
2-4-2-1	皮膚表面評価	・・・	39
2-4-2-2	皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）	・・・	42

2-4-3	実験② SNCE の摂取量違い及びコンドロイチン硫酸との比較評価	44
2-4-3-1	皮膚表面評価	44
2-4-3-2	皮膚内部評価 (表皮・真皮肥厚)	48
2-5	考察	51
第3章	SNCE から分画した分子量別プロテオグリカン画分の経口投与による皮膚抗老化評価	
3-1	緒言	52
3-2	実験材料と器具	52
3-2-1	グルクロン酸測定 (カルバゾール硫酸法)	52
3-2-2	デキストラン測定 (フェノール硫酸法)	53
3-2-3	SNCE からの分子量別プロテオグリカンの分画 (イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー)	53
3-2-4	ヘアレスマウスへの UVB 照射	54
3-2-5	皮膚表面評価 (紅斑、TEWL、角層水分量)	54
3-2-6	皮膚内部評価 (表皮・真皮肥厚)	54
3-3	実験方法	54
3-3-1	グルクロン酸測定 (カルバゾール硫酸法)	54
3-3-2	デキストラン測定 (フェノール硫酸法)	54
3-3-3	SNCE からのプロテオグリカン分画 (イオン交換カラムクロマト)	55
3-3-4	分子量別プロテオグリカン分画 (ゲルろ過カラムクロマトグラフィー)	57

3-3-5	分子量別プロテオグリカン画分の経口投与及び UVB 照射	・・・	59
3-3-6	皮膚表面評価（紅斑、TEWL、角層水分量）	・・・	60
3-3-7	皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）	・・・	60
3-3-8	統計解析	・・・	60
3-4	実験結果	・・・	60
3-4-1	SNCE からのプロテオグリカン分画（イオン交換カラ ムクロマトグラフィー）	・・・	60
3-4-2	分子量別プロテオグリカン分画（ゲルろ過カラムク ロマトグラフィー）	・・・	62
3-4-3	皮膚表面評価	・・・	64
3-4-4	皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）	・・・	68
3-5	考察	・・・	71
第 4 章 皮膚抗老化メカニズムの検証			
4-1	緒言	・・・	75
4-2	実験材料と器具	・・・	76
4-2-1	血清採取、背中皮膚の採取・乾燥粉末化	・・・	76
4-2-2	分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロフ ァージ培養系への添加実験	・・・	76
4-2-3	炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカイン測定	・・・	77
4-3	実験方法	・・・	77
4-3-1	血清採取、背中皮膚採取・乾燥粉末化	・・・	77
4-3-2	血清及び背中皮膚中の炎症性サイトカイン及び抗炎 症性サイトカイン測定	・・・	78

4-3-3	分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージに対する炎症性サイトカイン産生への影響	・・・	78
4-3-4	統計解析	・・・	79
4-4	実験結果	・・・	79
4-4-1	血清及び背中皮膚中の炎症性サイトカイン及び炎症性サイトカイン測定	・・・	79
4-4-2	分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージに対する炎症性サイトカイン産生への影響	・・・	84
4-5	考察	・・・	86
	総合考察	・・・	88
	謝辞	・・・	91
	参考文献	・・・	92

序論

日本をはじめとする先進諸国は、医学の進歩による寿命の延びや少子化により急速に高齢化社会に突入している。高齢化社会において、人々が長年にわたり充実した生活を送るためには、健康維持ばかりでなく外面の若さを保つこと、すなわち皮膚老化を防ぐことが重要である。しわなどの顔面の皮膚老化を防ぎ、外面の若さを維持することにより精神的に若く健全になり、高齢者の QOL (Quality of Life=生活の質) を向上させることができると思われる。そのため、安全で効果が高い皮膚アンチエイジング技術の開発が期待される。

皮膚老化は、年齢を重ねることによる生理的老化と紫外線 (ultraviolet: UV) により引き起こされる光老化が組み合わさって進行する¹⁾。特に、日常的に太陽光に曝されている顔面のしわなどの皮膚老化は、UV による光老化が大きく関与している。近年、フロンガスなどによるオゾン層の破壊が進行しており、世界の各地で地上に到達する UV 量の増加が報告されており²⁾、一層 UV による光老化に対処していくことが必要である。

UV に暴露された皮膚において、炎症反応の結果紅斑が生じ^{3,4)}、続いて表皮バリア機能が低下し、皮膚内部から水分が蒸散する、すなわち経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss: TEWL) が上昇して、乾燥や肌荒れを生じる⁵⁻⁸⁾。さらに、表皮及び真皮の肥厚^{9,10)} や、真皮コラーゲンの産生能低下及びコラーゲンの架橋化により、表皮及び真皮は柔軟性を失い硬直化することで、しわが生じる¹¹⁻¹⁴⁾ (図 序-1)。また、エラスチンとフィブリンから構成される弾性繊維も変性を受ける¹⁵⁾。従って、特に顔面の皮膚老化の進行は、UV によって誘導される表皮及び真皮の両方での光老化を防ぐことによって効果的に抑制される。

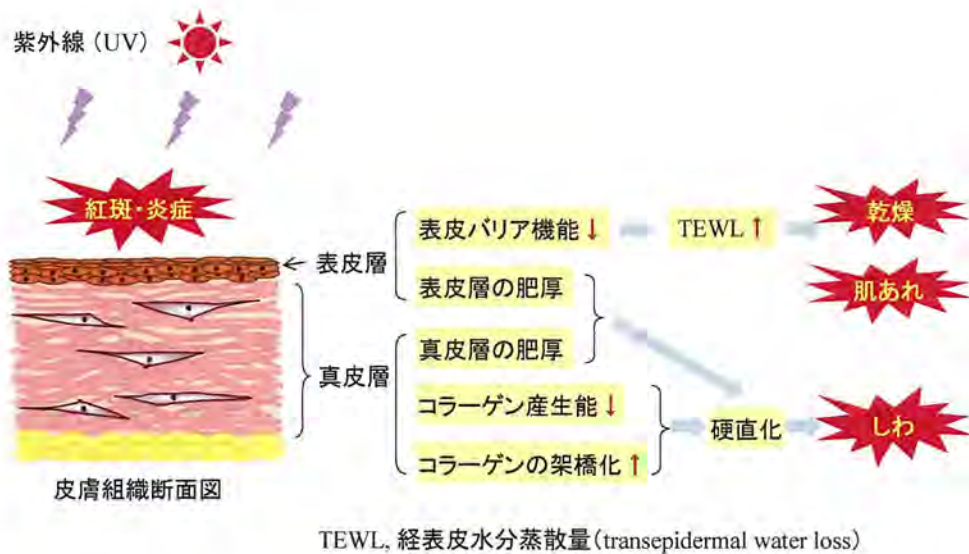


図 序-1. 紫外線による皮膚老化

近年、中高年女性の美容意識の高まりにより、美容食品／飲料／サプリメントの市場が拡大している中、様々な成分の経口摂取による皮膚への影響に関する研究報告がある。コラーゲンを変性させたゼラチンの経口摂取は、動物試験において骨塩量が著しい増加を示し^{16, 17)}、更にコラーゲンペプチドの経口摂取は、豚皮膚で皮膚コラーゲン原線維を強化し¹⁸⁾、ヘアレスマウス実験において、UVにより誘発された皮膚水分量の減少、表皮肥厚と可溶性I型コラーゲンの減少を抑制した¹⁹⁾。ヒアルロン酸の経口摂取は、ヒト試験において皮膚の乾燥と荒れで大きな改善効果を示した^{20, 21)}。大豆イソフラボンの経口摂取は、マウス皮膚でUVによって誘発されたマトリックスメタロプロテアーゼ発現と次に続くコラーゲン分解を抑制した²²⁾。また、緑茶ポリフェノールの経口摂取は、UVBによって誘発されたタンパク質酸化とマウス皮膚のマトリックスメタロプロテアーゼ発現を抑制した²³⁾。しかしこの

ような研究の歴史は浅く、真に光老化を抑制する新たな成分あるいは作用機序の探索は重要である。

一方、プロテオグリカンは、一つの核となるコアタンパク質に、1本あるいは複数の糖鎖が共有結合した糖タンパク質の一種であり^{24,25}、コラーゲンやヒアルロン酸に並ぶ軟骨や皮膚の主要成分である。糖鎖は直鎖状で、硫酸基やウロン酸といった酸により負に荷電している。糖鎖の例としては、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸などが挙げられる。プロテオグリカンは、様々な構造のものが存在し、糖鎖の種類あるいは糖鎖の数により分類されている。たとえば糖鎖の数による分類では、糖鎖が1本のデコリン、糖鎖が2本のバイグリカン、糖鎖が複数のシンデカンやアグリカンなどがある（図 序-2）。

この中でアグリカンは、多数の糖鎖が結合しており、プロテオグリカンの中で最大の分子量サイズであり、牛軟骨のプロテオグリカンのほとんどはアグリカンである。アグリカンは、分子量約 20 万のコアタンパク質に、糖鎖として分子量約 2 万のコンドロイチン硫酸が約 100 本と、分子量が約 6,000 のケラタン硫酸が 30~60 本共有結合した約 250 万の巨大な生体内高分子であることが報告されている^{24, 26-28}。コアタンパク質の N 末端領域には、ヒアルロン酸に高い親和性を持つレクチン様結合サイトを含み、生体内では多数のアグリカンが、ヒアルロン酸の軸に非共有的に結合し、結合部分は分子量 45 k Da のリンクタンパクで安定化され、巨大な複合体となっている²⁹⁻³⁵。さらにコラーゲンと共にネットワーク構造を形成し（図 序-3）、組織の保水能維持や物理的な刺激を和らげるクッションの役割などを果たしている³⁶。

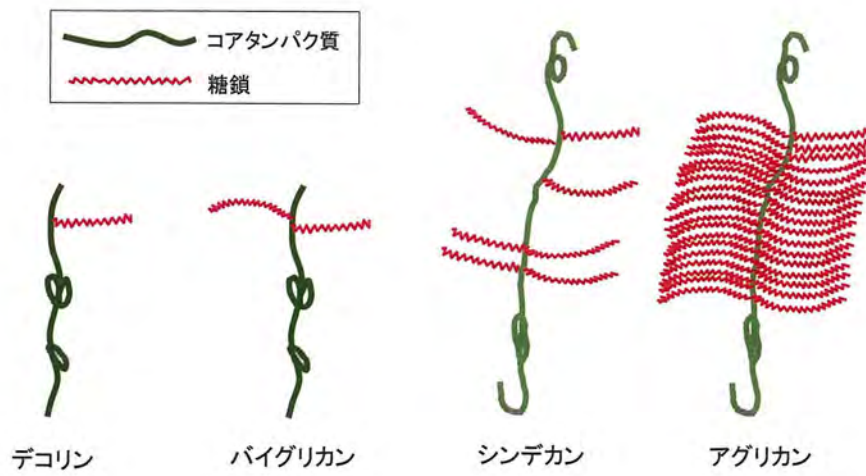


図 序-2. 糖鎖の数による分類の主なプロテオグリカン

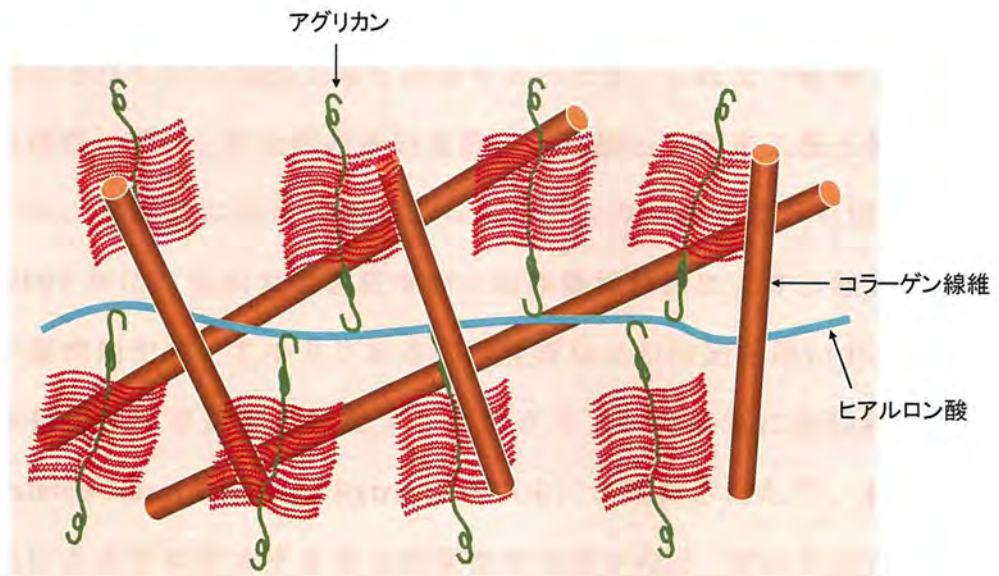


図 序-3. 生体内でのアグリカンのネットワーク構造

また近年の糖鎖研究の進展により、プロテオグリカンは組織構築に寄与するだけでなく、様々な生理活性を持つと考えられるようになった。コアタンパク質には、特異的な配列をもつドメインが存在し、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) を始めとする様々なタンパク質と選択的に結合することにより、多様な生物機能が発揮されると想定され、あるいは、糖鎖部分及びコアタンパク質部分を介して多様な分子群を結集し (scaffolding 機能)、細胞外の様々なシグナル伝達因子の受容環境を設定していると考えられる^{37,38)}。しかし、生体からの抽出・精製が困難であったため、これまで詳細な生理活性は解明されていなかった。

このような中、2001年に弘前大学医学部 高垣啓一教授により、鮭鼻軟骨から食酢を用いた抽出法が開発された³⁹⁾。それまでのプロテオグリカンは牛の気管支軟骨などを原料とし、強力なタンパク変性剤であるグリコール酸を用いて抽出されており製造工程も煩雑であったが、これまで廃棄されていた鮭頭部を原料に使い、安全性の高い食酢による抽出で製造工程も簡略化できることから、飛躍的に低コストでプロテオグリカンの製造が可能となった。さらに2007年に、弘前大学教育学部 加藤陽治教授により、鮭鼻軟骨からタンパク変性剤や酸・アルカリあるいは酵素などの抽出を用いず、脱脂、粉碎及び水抽出により調製されたプロテオグリカンを豊富に含む鮭鼻軟骨抽出物 (Salmon Nasal Cartilage Extracts: SNCE) が開発された⁴⁰⁾。粗精製であるが抽出によるプロテオグリカンの変性や分解がなく、プロテオグリカン本来の構造を保持している特徴があり、さらなる低コスト製造が可能となった。このような革新的なプロテオグリカンの製造方法の開発により、プロテオグリカンの産業への応用の道が開かれた。またこれを機に、弘前大学を中心に鮭鼻軟骨プロテオグリカンの様々な生理機能研究や構造解析研究がスタートした。生理機能研究においては、鮭鼻軟骨プロテオグリカンは軟骨細胞の

増殖を促進し、その分化を維持する機能を有することが報告され⁴¹⁾、また鮭鼻軟骨プロテオグリカンに明らかな線維芽細胞増殖促進効果があることから、鮭鼻軟骨プロテオグリカンに上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor: EGF) 様活性があることが示された⁴²⁾。さらに鮭鼻軟骨プロテオグリカンが、動物実験において経口投与により大腸炎の進行を抑制することが確認された⁴³⁻⁴⁵⁾。構造解析研究においては、これまで牛気管支軟骨などの哺乳類のプロテオグリカンは構造解析が進んでいるが、鮭鼻軟骨プロテオグリカンの構造は解明されてこなかった。最近になり、弘前大学医学部 柿崎育子准教授らは、ナノ LC/MS/MS を使用した鮭鼻軟骨プロテオグリカンのコアタンパク質の分析によって、鮭鼻軟骨プロテオグリカンの大部分がアグリカンであることを示し、鮭鼻軟骨アグリカンのコアタンパク質と結合した糖鎖がコンドロイチン硫酸であり、コアタンパク質に存在するコンドロイチン硫酸の結合領域は 46 箇所あることを報告した⁴⁶⁾。このことから、コンドロイチン硫酸の鎖長などの詳細分析はまだであるが、鮭鼻軟骨アグリカンは 100 万～150 万程度の分子量であることが推測されている。

本研究において、様々な生理活性が秘められていると考えられるプロテオグリカンが皮膚に対しても重要な生理活性を担っていると考えられたため、鮭鼻軟骨プロテオグリカンの飲用による皮膚老化への影響を検証することとした。鮭鼻軟骨プロテオグリカンは、プロテオグリカン本来の構造を保持しており、食品原料としても利用が可能である SNCE を用いることとした。

第 1 章 UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系の構築

1-1 緒言

序論に記載したとおり、顔面などの皮膚老化は UV による光老化が大きく関与する。経口摂取による皮膚老化への影響を調べるためには、皮膚老化モデル動物を使った *in vivo* 評価系をまず構築する必要がある。これまで、ヘアレスマウスに UV を繰り返し照射して光老化を起こさせる研究が数多く報告されており^{5,8-12,19,22,23,47)}、1980 年代に紫外線 A+B (UVA+UVB) でマウス皮膚にシワが生じることが証明されている^{11, 48)}。

UV は、UVA (400-320 nm)、UVB (320-290 nm)、UVC (290-100 nm) に分けられる。UVC はオゾン層によりほとんど吸収され、地表には届かない。UVB もオゾン層でかなりの部分が吸収され、一部が地表に到達する。UVA はオゾン層にほとんど吸収されずに地表に到達する⁴⁹⁾。ヘアレスマウスに照射する UV としては、UVC は毒性が強いため、UVA、UVB あるいは UVA と UVB の混合が使用されているが、UVA はエネルギーが低く、UVB 単独が比較的早く光老化を再現することができることから、最もよく使用されている。これらの報告を参考とし、ヘアレスマウスに繰り返し UVB を照射して皮膚の光老化を再現できる照射条件を検討し、UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系を構築することとした。

なお、本研究で実施した全ての動物実験は、弘前大学農学生命科学部実験動物飼育室内において、弘前大学動物実験に関する規程に基づき実施した。

1-2 実験材料と器具

1-2-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射

ヘアレスマウス Hr-/Kud ♂ (九動 (株))、UVB ランプ GL15E (15 W、436 mm×25.5 mm、310 nm) (三共電気 (株)) を 6 列備えた UVB 照射装置 (図 1)、UVB 強度計 UVX Radiometer & Radiometer Sensor UVX-31 (310 nm) (UVP LLC)、UVB 照射用ケージ (図 2)

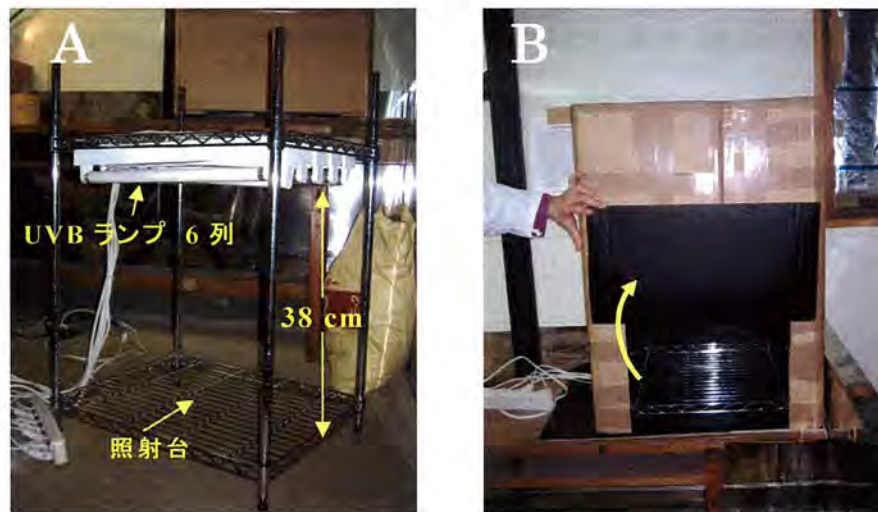


図 1. UVB 照射装置

(A) UVB ランプ (GL15E (15 W、436 mm×25.5 mm、310 nm) (三共電気 (株))) を 6 列備えた UVB 照射装置。UVB 強度計 (UVX Radiometer (UVP LLC)、Radiometer Sensor、UVX-31、310nm (UVP LLC)) のセンサー部分を照射台にセットし、UV 強度が 1.0 mW/cm^2 になるように UVB ランプの高さを調整した (照射位置～UVB ランプ : 38 cm)。 (B) UVB 遮光のため、内側を黒のペイントスプレーで塗りつけ、前面部に UVB 照射用ケージを出し入れできるような扉を設けたダンボール箱で覆って使用。



図 2. UVB 照射用ケージ

市販のキッチン用スプーン立て（幅 12 cm×4 cm、高さ 10 cm）6 個を一体化。底板を上部から 3 cm の位置に固定（1 匹のマウスの収容スペース：幅 12 cm×4 cm、高さ 3 cm）。上部をステンレス網 2 枚で押さえ、ダブルクリップでとめてふたをする。6 匹まで収容可能。

1-2-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価

マルチプローブ式皮膚計測器 MPA5 および各種プローブ（Mexameter, Tewameter, Corneometer）（Courage + Khazaka Electronic GmbH）、デジタルカメラ（IXY DIGITAL）（キャノン（株））、

1-2-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理的特性評価

マルチプローブ式皮膚計測器 MPA580 およびプローブ（Cutometer）（Courage + Khazaka Electronic GmbH）

1-2-4 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部評価

1-2-4-1 酸可溶性コラーゲン定量

細胞破碎装置 (オートミル TK-AM5) ((株) トッケン)、真空乾燥機 VC-360 (タイテック (株))、回転式攪拌機 MTR-103 (アズワン (株))、遠心分離機 H-15FR ((株) コクサン)、マイクロプレートリーダー iMARK (バイオラッドラボラトリーズ(株))、コラーゲン定量キット Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor Ltd.)、無水酢酸 (試薬特級) (関東化学 (株))、プロテアーゼインヒビターカクテル錠 (コンプリートミニ EASY Pack) (Roche Diagnostics GmbH)

1-2-4-2 表皮・真皮肥厚測定

自動パラフィン固定装置 tissue processor (サクラファインテックジャパン (株))、パラフィン包埋装置 (THERMAL CONSOLE, DISRENSING CONSOLE, CRYO CONSOLE (サクラファインテックジャパン (株)))、マイクローム MODEL 1516 (ライカマイクロシステムズ (株))、シランコートスライドガラス (松浪硝子工業 (株))、パラフィン切片転写用フィルム (川本法) Paraffin Transfer Film ((株) ファインテック)、パラフィン転写フィルム密着用具セット ((株) ファインテック)、恒温水槽 (T-72 パラフィン水溶伸展器) ((株) 高島商店)、パラフィン伸展器 MODEL PS-C2 (サクラファインテックジャパン (株))、染色籠・染色バット、光学顕微鏡 CKX41 (オリンパス (株))、デジタルカメラ CAMEDIA C-7070 (オリンパス (株))、ホルマリン固定液 (ティシュー・テック ユフィックス) (サクラファインテックジャパン (株))、ジエチルエーテル (関東化学 (株))、パラフィンワックス II 60 (サクラファインテックジャパン (株))、マイヤーヘマトキシリン溶液 (MERCK KGaA)、

エオシン Y (Waldeck GmbH & Co. KG)、キシレン (Sigma-Aldrich Co. LLC.)、
99 度エチルアルコール (日本アルコール販売 (株))、封入剤 Entellan (MERCK
KGaA)

1-3 実験方法

1-3-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射

本研究に用いた動物は、皮膚への UVB 照射を行なうため、体毛のないヘアレスマウス Hr-/Kud を用いた。また、雌では生理周期により血流が変動し、皮膚状態に影響を与えることが懸念されたため、雄を用いた。

まず、雄ヘアレスマウス Hr-/Kud の UVB 照射での最小紅斑線量 (Minimal Erythema Dose: MED) を測定した。8 匹のヘアレスマウスそれぞれに、段階的に異なる照射量の UVB を照射し、24 時間後に肉眼判定により紅斑が生じる最小の照射量 (MED) を判定した。その結果、MED は 60 mJ/cm^2 であった。

次に照射量検討として、UVB 照射用ケージにヘアレスマウスを入れ、UVB 照射装置内に入れて、5 回/週の頻度で UVB 照射を行なった。1 日あたりの UVB 照射量を 1 週目は 60 mJ/cm^2 (1 MED) とし、2 週目： 120 mJ/cm^2 (2 MED)、3 週目： 180 mJ/cm^2 (3 MED) と段階的に UVB 照射量を上げていき背中皮膚を観測した。その結果、経時的に背中皮膚の紅斑が強くなり、3 週目 (180 mJ/cm^2 (3 MED)) で炎症が激しくやけど様になった (図 3)。やけど様の損傷が生じれば、正しい皮膚老化改善が評価できないことから、UVB 照射量は 1 日あたり 120 mJ/cm^2 (2 MED) を超えない範囲にする必要があることが判明した。

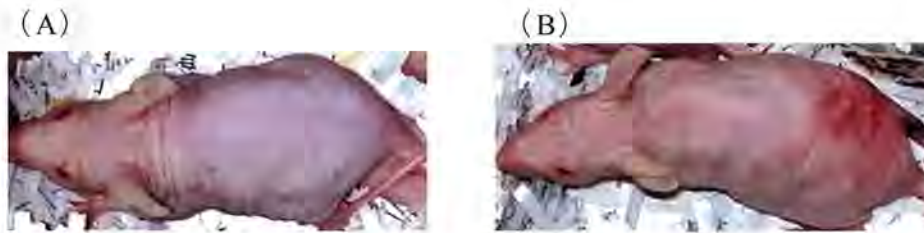


図 3. UVB 未照射及び UVB 180 mJ/cm² (3 MED) 照射後の背中皮膚状態。

(A) UVB 未照射の背中皮膚状態。(B) 5 回/週の頻度で、1 日あたりの UVB 照射量を 1 週目 : 60 mJ/cm² (1 MED)、2 週目 : 120 mJ/cm² (2 MED)、3 週目 : 180 mJ/cm² (3 MED) として照射した後の背中皮膚状態。

次に、繰返し UVB 照射により皮膚光老化を再現できる期間 (回数) を検討した。照射量検討を踏まえ UVB 照射条件は、5 回/週の頻度で、最初の 1 週間は 60 mJ/cm² (1 MED) とし、2 週間目以降は 120 mJ/cm² (2 MED) に固定し、10 週間 UVB 照射を続け (図 4)、皮膚老化に関わる様々な評価を 1 週間ごとに行なった。ヘアレスマウスは 6 週齢を購入し、1 週間の予備飼育の後、UVB 照射用ケージに UVB 照射群のヘアレスマウスを入れ、UVB 照射装置内に入れて UVB 照射を行った。UVB 未照射群、UVB 照射群それぞれ 5 匹ずつとした。

なお、実験動物飼育室内は、12 時間の明暗サイクルで、22±2℃の温度環境であり、餌 (実験動物用飼料 MF (オリエンタル酵母工業 (株))) 及び水は自由に摂取させた。



図 4. UVB 照射スケジュール

1-3-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価

1-3-2-1 紅斑量

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580 (Courage + Khazaka Electronic GmbH)) の Mexameter により、紅斑量を週 1 回の頻度で測定を行った。各マウス背部下半分 5 ヶ所を測定し、平均値及び標準偏差を算出した。また、デジタルカメラを用いて、週 1 回の頻度で背部の撮影を行った。

1-3-2-2 経表皮水分蒸散量 (TEWL)

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580 (Courage + Khazaka Electronic GmbH)) の Tewameter により、経表皮水分蒸散量 (TEWL) を週 1 回の頻度で測定し、皮膚バリア機能を評価した。各マウス背部下半分 3 ヶ所を測定し、平均値及び標準偏差を算出した。

1-3-2-3 角層水分量

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580 (Courage + Khazaka Electronic GmbH)) の Corneometer により、角層水分量を週 1 回の頻度で測定した。各マウス背部下半分 10 ヶ所を測定し、平均値及び標準偏差を算出した。

1-3-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理的特性評価

マルチプローブ式皮膚計測器（MPA580（Courage + Khazaka Electronic GmbH））の Cutometer により、皮膚柔軟性・弾力性を週 1 回の頻度で測定した。各マウス背部下半分 4 ヶ所を測定し、柔軟性及び弾力性それぞれの平均値及び標準偏差を算出した（図 5）。

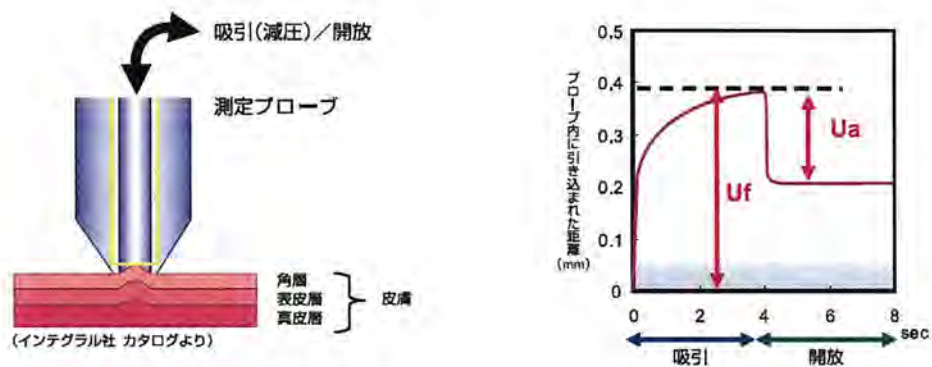


図 5. Cutometer の原理と測定パラメーター

皮膚表面を陰圧でプローブ開口部に吸引し、開口部に引き込まれた皮膚の高さ (Uf) と陰圧を開放したときの皮膚高さの戻り (Ua) をプリズムを用いて測定する。

柔軟性 (R0) = Uf、弾力性 (R2) = Ua/Uf

1-3-4 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部評価

1-3-4-1 皮膚採取

UVB 照射 10 週間後に、背部の皮膚組織採取を行った。ジエチルエーテルを充満させたデシケーターにマウスを入れ、動かなくなったら取り出し、背中皮膚を水を含んだ脱脂綿で 1 回拭き、水を含まない脱脂綿で 1 回拭いた。解剖用ハサミで、図 6 に示した A の部分（背部下半分の中央部 3~4 mm 幅の四角形）を 4 ヶ所採取し、ホルマリン固定液の入った 10 mL 容バイアルビンに入れて、ホルマリン固定を行った（皮膚組織切片作成用）。引き続き図 6 に示した B 部分（背部の下半分）を採取（重量 0.6~1.0 g）し、5 mL 容チューブに入れてドライアイス中で冷却保管した（酸可溶性コラーゲン定量用）。全てのマウスの皮膚採取が終了した後、酸可溶性コラーゲン定量用皮膚組織は、-20℃にて凍結保存した。

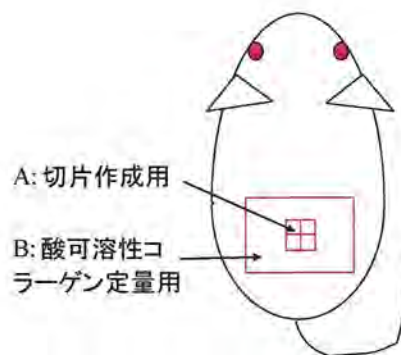


図 6. 皮膚組織採取箇所

1-3-4-2 酸可溶性コラーゲン定量

-20℃にて凍結保存された皮膚組織を取り出し、液体窒素中で凍結させ、細胞破碎装置（オートミル TK-AM5）により粉碎（1200 rpm, 4 min）して凍結粉末化し、真空乾燥機により凍結乾燥させた（凍結乾燥背中皮膚粉末）。

必要量の 0.5 M 酢酸を調製し、プロテアーゼインヒビターカクテル錠（コンプリートミニ EASY Pack (Roche Diagnostics GmbH)）を入れ（0.5 M 酢酸 10 mL に対し 1 錠）、溶解させた。凍結乾燥背中皮膚粉末 3 mg をエッペンチューブに精秤し、上記 0.5 M 酢酸（プロテアーゼインヒビター入り）を 1 mL 加え、回転式攪拌機にセットして低温庫（4℃）にて 24 時間攪拌した。攪拌後、遠心分離（12,000 rpm, 20 min）を行い、上清部（酸可溶性コラーゲン抽出液）を採取した。コラーゲン定量キット（Sircol Soluble Collagen Assay）（biocolor Ltd.）を用いて、マニュアルに基づき上記酸可溶性コラーゲン抽出液のコラーゲン量を測定した。

< Sircol Soluble Collagen Assay (biocolor Ltd.) の測定原理 >

陰イオン性の色素である Sirius Red は、三重らせん構造の天然コラーゲンに存在する塩基性アミノ酸の側鎖基に反応し、不溶性のコラーゲン-色素複合体を形成する（三重らせん構造ではないゼラチンでは、親和性は著しく低下する）。酸可溶性コラーゲン抽出液に Sirius Red を反応させ、コラーゲン-色素複合体を遠心分離により沈殿回収し、アルカリ溶解剤で溶解させて、吸光度測定（540 nm）により酸可溶性コラーゲンを定量する。

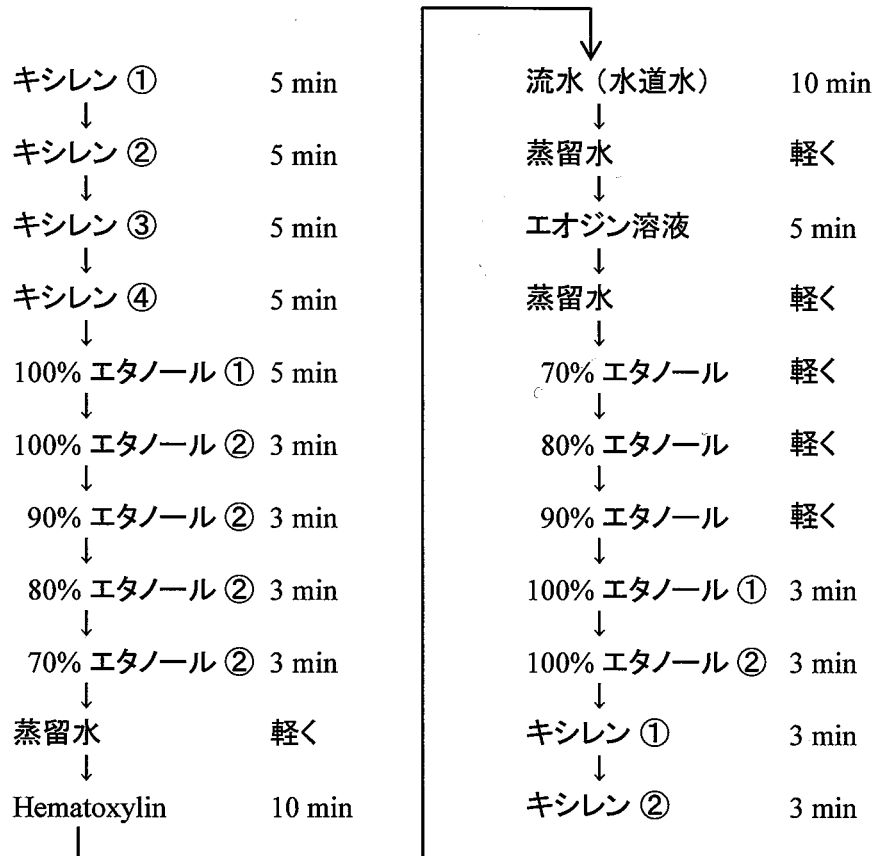
1-3-4-3 表皮・真皮肥厚測定

ホルマリン固定された組織切片を取り出し、水道水に5分間漬けた後、自動パラフィン固定装置 tissue processor にセットし、脱水・脱脂→パラフィン浸透を行なった（所要時間約15時間）。パラフィン浸透が完了した皮膚組織を取り出し、パラフィン包埋装置（THERMAL CONSOLE, DISRENSING CONSOLE, CRYO CONSOLE）を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。

組織切片作成方法は、専用のパラフィン切片転写用フィルムを用いる川本法に従った⁵⁰⁾。マイクロトームにパラフィン包埋ブロックをセットし面出しを行い、予めブロック面より一回り大きく切った切片支持用粘着フィルム（川本法 Paraffin Transfer Film）をパラフィン包埋ブロックの切削面に貼り付け、密着用具で転写フィルムを密着させて、薄切幅 3 μm で切削した。切片が密着した転写フィルムをシランコートスライドガラスに貼り、水温を 40~50°C に設定した恒温水槽にスライドガラスと切片の間に水が入るようにつけてゆっくり引き上げ、切片が密着した転写フィルムをスライドガラスに密着させた。さらに、フィルムの上からローラーをかけてフィルムとスライドガラスの間の水を押し出して密着させ、45~50°C に設定したパラフィン伸展器の上に載せて 6~12 時間乾燥させた。乾燥後、ピンセットで転写フィルムの第1フィルムを取り剥がし、水に約3秒間漬けて第2フィルムを取り除いた後、45~50°C に設定したパラフィン伸展器に載せて、水滴を乾燥させた。

予め、エオジン Y 1.0 g に 0.2% 酢酸水 100 mL を混ぜ合わせて、80% エタノールと混合してエオジン溶液を作成した。切片が密着したスライドガラスを染色籠に並べて入れて、下記の手順で各液の入った染色バットに順次浸漬処理を行った。（10枚1セット）

<H&E 染色 浸漬処理手順>



上記浸漬処理後、再度キシレン中に浸漬し、1枚ずつ取り出して封入剤 (Entellan) を切片上に1滴垂らして、上からカバーガラスを載せて自然乾燥させた。

乾燥後、光学顕微鏡にて倍率×40で観察し、デジタルカメラにて画像を保存した。得られた画像を画像解析ソフトウェア Adobe photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) の‘ものさしツール’を用いて、表皮層及び真皮層のそれぞれ10ヶ所の長さを測定し、表皮層及び真皮層の厚さを求めた¹⁰⁾。

1-3-5 統計解析

数値データは、平均値±標準偏差として示した。有意差検定は、学生用 *t*-検定を使用した。 $p < 0.05$ は、統計学的に有意であり $p < 0.1$ は、有意傾向であると判断した。

1-4 実験結果

1-4-1 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価

1-4-1-1 紅斑量

UVB 照射 0～10 週間後での背中皮膚の外観変化を図 7 に、紅斑変化を図 8 に示す。外観変化は、UVB 照射群では 2 週間後以降背中全体に紅斑が観察され、8 週間後以降は、皮膚が柔軟性を失い硬くなる変化が認められた。紅斑量測定においては、UVB 照射 2 週間後まで急激に紅斑量は有意に上昇し、以降はほぼ横ばいに有意性を保ったまま推移した。



図 7. UVB 照射 0～10 週間後の背中皮膚の外観変化

UVB 照射群を 2 週間ごとに写真撮影。5 匹中 1 匹の写真を示す。

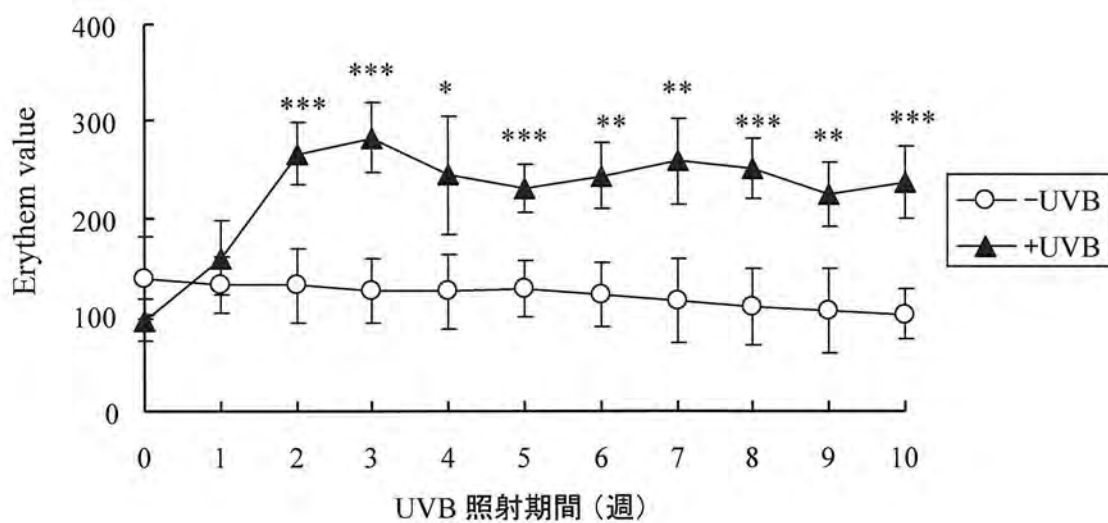


図 8. UVB 照射 0～10 週間後の紅斑量変化

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Mexameter により、週 1 回の頻度で紅斑量を測定 (UVB 未照射群 : 5 匹、UVB 照射群 : 5 匹)。

○, UVB 未照射群; ▲, UVB 照射群

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

1-4-1-2 経表皮水分蒸散量 (TEWL)

UVB 照射 0~10 週間後での背中皮膚の TEWL 変化を、図 9 に示す。1~10 週間の全てにおいて、UVB 未照射群とは有意な TEWL の上昇が見られた。2 週間目で極大となり、3~8 週間後はやや低下するものの 9 週間後以降再び上昇した。

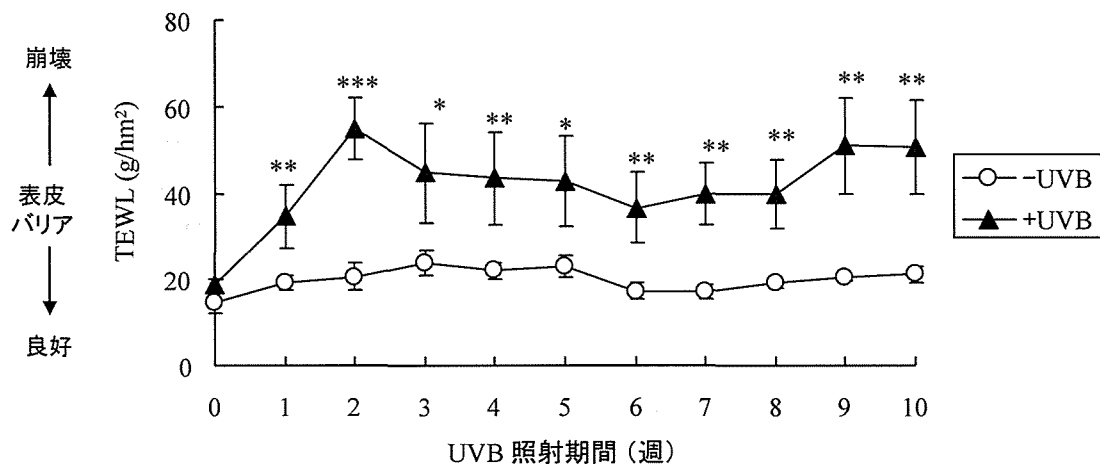


図 9. UVB 照射 0~10 週間後の TEWL 変化

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Tewameter により、週 1 回の頻度で経表皮水分蒸散量 (TEWL) を測定 (UVB 未照射群 : 5 匹、UVB 照射群 : 5 匹)。

○, UVB 未照射群; ▲, UVB 照射群

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

1-4-1-3 角層水分量

UVB 照射 0～10 週間後での背中皮膚の角層水分量変化を、図 10 に示す。1～10 週間後の全てにおいて、UVB 未照射群とは有意な角層水分量の低下が見られた。2 週間後で極小となり、4～5 週間後はやや回復するものの 6 週間後以降再び低下した。

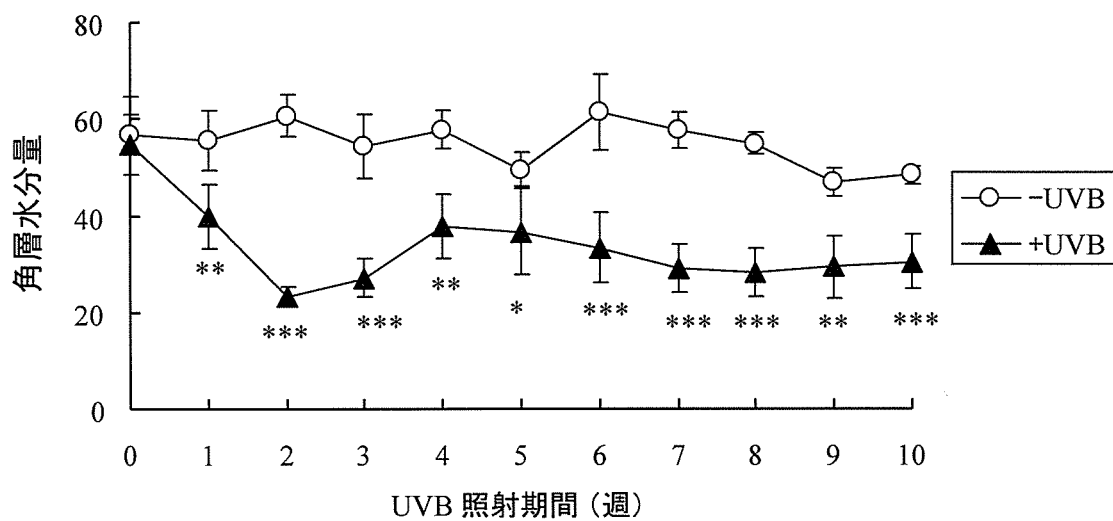


図 10. UVB 照射 0～10 週間後の角層水分量変化

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Corneometer により週 1 回の頻度で角層水分量を測定 (UVB 未照射群 : 5 匹、UVB 照射群 : 5 匹)。

○, UVB 未照射群; ▲, UVB 照射群

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

1-4-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚物理的特性評価

UVB 照射 6~10 週間後の背中皮膚の柔軟性・弾力性の変化を、図 11 に示す。柔軟性・弾力性の両方において 9 週間後以降で低下が見られた。

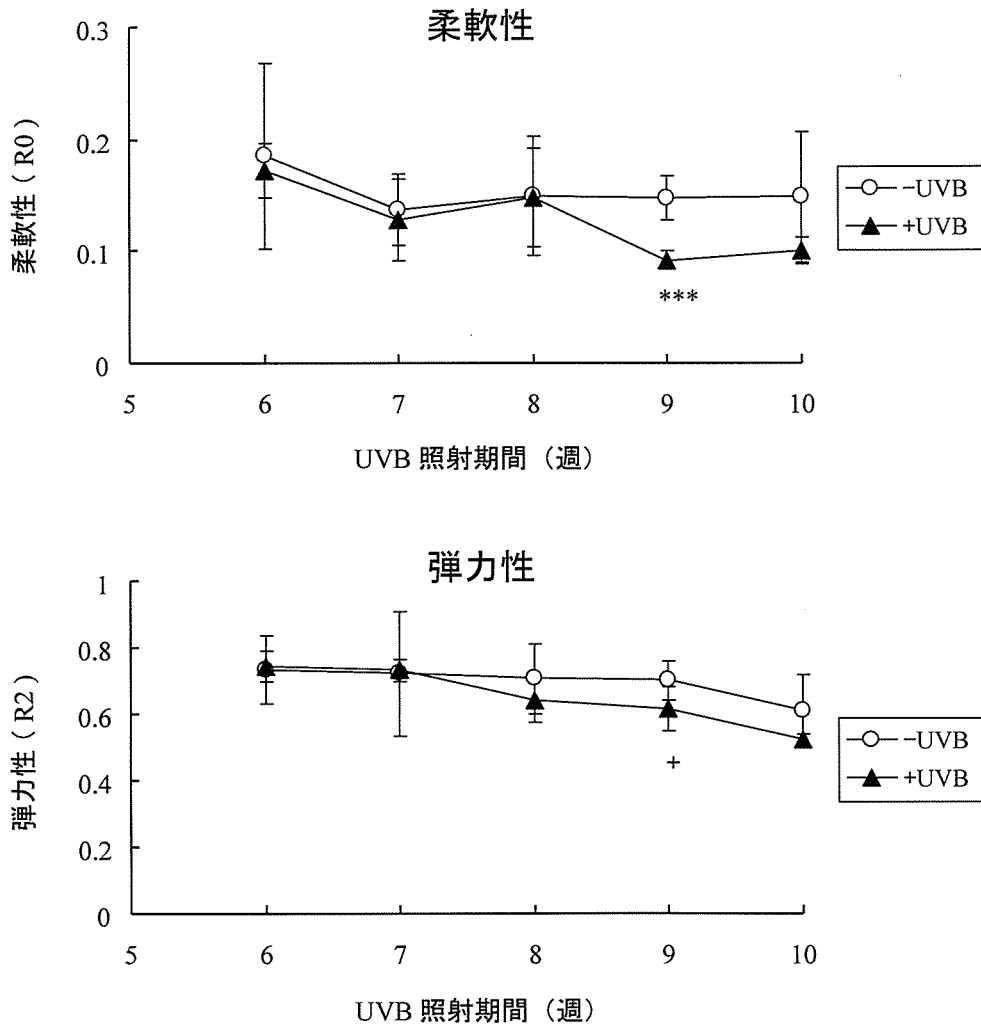


図 11. UVB 照射 6~10 週間後の背中皮膚の柔軟性・弾力性の変化

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Cutometer により、週 1 回の頻度で柔軟性・弾力性を測定 (UVB 未照射群: 5 匹、UVB 照射群: 5 匹)。

○, UVB 未照射群; ▲, UVB 照射群

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

1-4-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚内部評価

1-4-3-1 酸可溶性コラーゲン定量

コラーゲンは、真皮の主要な構成タンパク質であり、3重らせん構造で分子量は約 26 万である³³⁾。線維芽細胞により産生され、コラーゲン同士会合し線維化が起こり成熟していく。線維化する前の未成熟なコラーゲンは酸可溶性を示し、成熟が進むと不溶性となる。すなわち酸可溶性コラーゲン量は、コラーゲン産生能を反映する。

10 週間の UVB 照射終了後の皮膚組織を採取して、粉末乾燥化した背中皮膚中の酸可溶性コラーゲン量測定結果を図 12 に示す。UVB 照射により、酸可溶性コラーゲン量が低下する傾向 ($p < 0.1$) が認められた。すなわち、UVB 照射により、真皮コラーゲン産生能が低下し、コラーゲンの老化が進行することを示唆する。

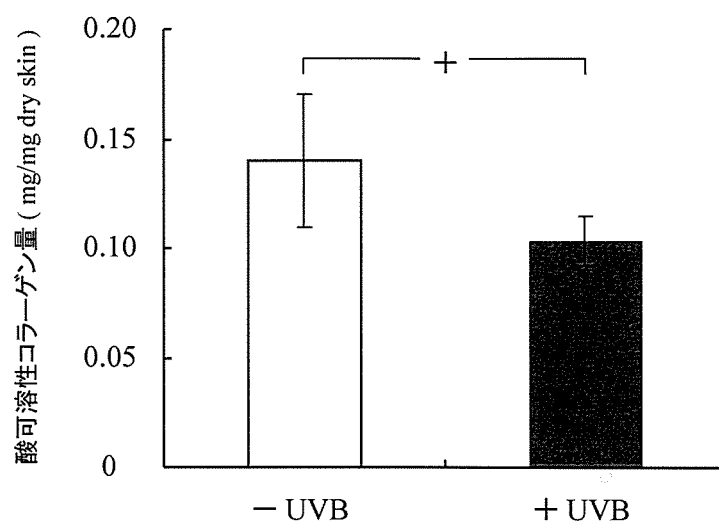


図 12. UVB 照射 10 週間後の背中皮膚（乾燥）の酸可溶性コラーゲン比率

採取した背中皮膚組織（UVB 未照射群：5 匹、UVB 照射群：5 匹）を液体窒素中で凍結させ、細胞破碎装置（オートミル TK-AM5）により粉碎（1200 rpm, 4 min）して凍結乾燥した。凍結乾燥背中皮膚粉末 3 mg に 0.5 M 酢酸（プロテアーゼインヒビター含有）を 1 mL 加え、4℃にて 24 時間攪拌した。攪拌後、遠心分離（12,000 rpm, 20 min）を行い、上清部（酸可溶性コラーゲン抽出液）を採取した。酸可溶性コラーゲン定量キット（Sircol Soluble Collagen Assay）を用いて、マニュアルに基づき、上記酸可溶性コラーゲン抽出液のコラーゲン量を測定した。

—UVB, UVB 未照射群; +UVB, UVB 照射群

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

1-4-3-2 表皮・真皮肥厚測定

10 週間の UVB 照射終了後の背中皮膚の表皮・真皮の組織観察を図 13、表皮・真皮の厚さ測定結果を表 1 に示す。UVB 照射により、表皮及び真皮の著しい肥厚が観察された。

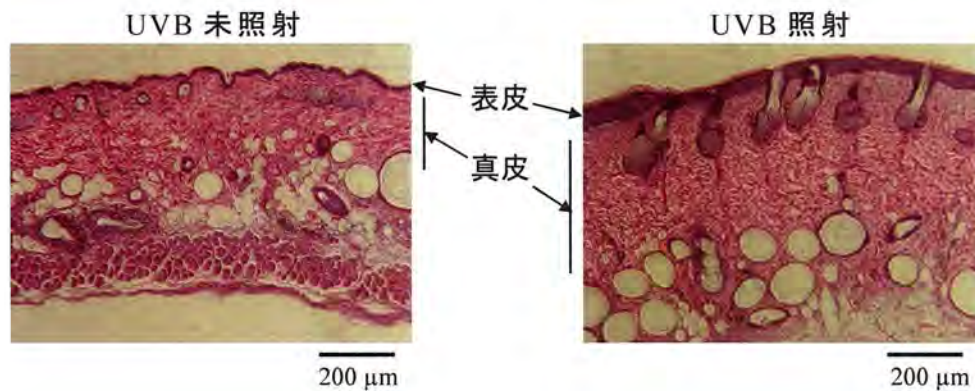


図 13. UVB 照射 10 週間後の背中皮膚断面 (H&E 染色)

ホルマリン固定された組織切片 (UVB 未照射群 : 5 匹、UVB 照射群 : 5 匹) を取り出し、自動パラフィン固定装置 tissue processor によりパラフィン浸透を行い、パラフィン包埋装置 (THERMAL CONSOLE、DISRENSING CONSOLE、CRYO CONSOLE) を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。専用のパラフィン切片転写用フィルムを用いる川本法⁵⁰⁾を用いてマイクロームにより組織切片を作成し、H&E 染色後、光学顕微鏡にて倍率×40 で観察し、デジタルカメラにて撮影した (bar = 200 μm)。

表 1. UVB 照射 10 週間後の表皮及び真皮の厚さ測定

H&E 染色された組織切片の画像 (UVB 未照射群 : 5 匹、UVB 照射群 : 5 匹) を画像解析ソフトウェア Adobe photoshop CS3 の‘ものさしツール’を用いて、表皮層及び真皮層のそれぞれ 10 ヶ所の長さを測定し、表皮層及び真皮層の厚さを求めた¹⁰⁾。

UVB 照射	表皮		真皮	
	厚さ (µm)	t-検定	厚さ (µm)	t-検定
-	18.8 ± 3.0	***	292 ± 28	***
+	72.1 ± 2.0		467 ± 20	

***, $p < 0.001$

1-5 考察

UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系の構築のため、雄ヘアレスマウス Hr-/Kud に 10 週間の累積 UVB 照射を行い、経時での皮膚表面及び皮膚内部への影響を評価した。

皮膚表面において、紅斑量の上昇は過剰な炎症反応を反映し、TEWL の上昇は表皮バリア機能低下を示し^{51,52)}、角層水分量の低下は皮膚の乾燥が進むことを意味する。これら紅斑、TEWL および角層水分量は、いずれも同様な挙動を示し 2 週間後で大きな変化を示した。皮膚表面は、直接 UV が照射することから影響を受けやすく、結果より炎症反応→表皮バリアの崩壊→乾燥の流れで皮膚に悪影響を与えていることが示唆された。2 週間後以降は、いずれの評価もやや回復するが、TEWL と角層水分量は、7~9 週間後以降で再

び悪化した。皮膚の修復機能により一旦良化するが、繰り返される UVB 照射により修復が間に合わなくなり再び悪化するものと思われる。

皮膚内部において、皮膚内部の物理的特性を反映する皮膚柔軟性・弾力性は、表皮と比べて UVB の影響は遅いが、9 週間後で有意な柔軟性の低下及び弾力性の低下傾向が見られた。繰返し UVB 照射は、確実に皮膚内部に到達し、皮膚老化を起こすことが確認された。UVB 照射 10 週間後において、UVB 照射により酸可溶性コラーゲン量の低下、すなわちコラーゲンの老化が進行することを確認し、著しい表皮及び真皮の肥厚が観察された。このコラーゲンの老化及び表皮・真皮の肥厚は、皮膚組織を硬直化させ、しわが発生する原因となる。このように、5 回/週の頻度で 10 週間程度の UVB 照射は、皮膚表面及び内部に影響を及ぼし、皮膚老化を再現することができた。

以上より、UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系での繰返し UVB 照射条件は、1 週間目を 60 mJ/cm^2 、2 週間目以降を 120 mJ/cm^2 とし、5 回/週の頻度で 10 週間（総照射量 = 5.7 J/cm^2 ）あるいは 6 回/週の頻度で 8 週間（総照射量 = 5.4 J/cm^2 ）に設定した。

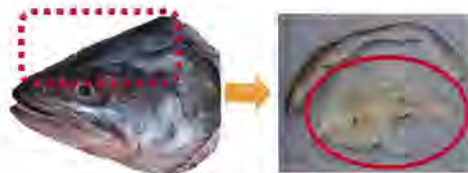
第2章 鮭鼻軟骨抽出物 (Salmon Nasal Cartilage Extracts: SNCE) の経口投与による皮膚抗老化評価

2-1 緒言

2007年に、弘前大学教育学部 加藤陽治教授が開発した鮭鼻軟骨抽出物 (Salmon Nasal Cartilage Extracts: SNCE) は、鮭鼻軟骨からタンパク変性剤や酸・アルカリあるいは酵素などの抽出を用いない低コスト調製法であり、粗精製ながら、プロテオグリカンを豊富に含み、プロテオグリカン本来の構造を保持している特徴がある。製造方法として、まず鮭鼻軟骨脱脂粉末を調製し、鮭鼻軟骨脱脂粉末を水抽出して SNCE を得た。鮭鼻軟骨脱脂粉末は、加藤研究室で調製されたものを恵与していただき使用した。鮭鼻軟骨脱脂粉末の製造手順を下記に示す。

<鮭鼻軟骨脱脂粉末調製方法>

- ① 鮭頭部をスライスし、鮭鼻軟骨を取り出す。



- ② 鮭鼻軟骨をコンパクトチョッパー MKBC-22 (増幸産業 (株)) を用いて 3 mm 角のミンチに粉碎。
- ③ 粉碎された鮭鼻軟骨 100 g に蒸留水 200 g を加え、均一に分散するまで攪拌し、遠心分離 (8,000 rpm、30 min、4℃)。
- ④ 残渣を取り出し、再度蒸留水 200 g を加え、均一に分散するまで攪拌し、遠心分離 (8,000 rpm、30 min、4℃)。

- ⑤ 回収した残渣を凍結乾燥し、粉碎機 MKA-2J（スクリーンメッシュ：0.7 mm）（増幸産業（株））を用いて粉末化。
- ⑥ 粉末化された残渣に対し、10 倍量のエタノールを加え、均一攪拌後遠心分離（3,000 rpm、15 min、室温）し、残渣を回収。この操作を 2 回繰り返す。【脱脂工程】
- ⑦ 脱脂後風乾し、鮭鼻軟骨脱脂粉末を得る。

本章においては、第 1 章に記載した UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系を用いて、SNCE の経口投与による皮膚抗老化効果を評価した。皮膚表面評価として、紅斑量、TEWL、角層水分量、皮膚内部評価として表皮・真皮肥厚を評価した。また、近年、健康食品あるいは美容食品に応用されている素材としてヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸を対照サンプルとして比較評価を行ない、SNCE の摂取量違いについても評価した。

2-2 実験材料と器具

2-2-1 SNCE の調製

鮭鼻軟骨脱脂粉末（弘前大学教育学部 加藤陽治教授より恵与）、マグネット式スターラー SR100（アドバンテック東洋（株））、冷却遠心分離機 SCR205（日立工機（株））、真空乾燥機 VC-360（タイテック（株））

2-2-2 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィー用担体 Sepharose CL-2B（GE Healthcare Bio-Sciences AB）、カラム（エコノカラム φ1×50 cm）（バイオラッドラボラトリーズ（株））、低圧クロマトグラフィーシステム BioLogic LP（バイオラ

ッドラボラトリーズ (株))、フラクシオンコレクターBioLogic Biofrac (バイオ
オラッドラボラトリーズ (株))、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (特級
試薬) (ナカライテスク (株))、リン酸水素二ナトリウム・無水 (特級試薬)
(和光純薬工業 (株))、塩化ナトリウム (試薬特級) (ナカライテスク (株))

2-2-3 グルクロン酸測定 (カルバゾール硫酸法)

カルバゾール (試薬一級) (和光純薬工業 (株))、四ほう酸ナトリウム十
水和物 (試薬特級) (ナカライテスク (株))、D-グルクロン酸 (試薬特級)
(ナカライテスク (株))、メタノール (試薬特級) (ナカライテスク (株))、
濃硫酸 (試薬特級) (ナカライテスク (株))、ガラス試験管、96-well マルチ
プレート (旭硝子 (株))、マイクロプレートリーダー iMARK (バイオラッ
ドラボラトリーズ (株))

2-2-4 比較試料と試料の強制経口投与

ヒアルロン酸 ((株) 中原)、コンドロイチン硫酸 (サケ PG-20) ((株) マ
ルハニチロ) (賦形剤としてデキストリン 50%を含む)、胃ゾンデ

2-2-5 ヘアレスマウスへの UVB 照射

「1-2-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射」に記載のとおり。

2-2-6 皮膚表面評価 (紅斑、TEWL、角層水分量)

「1-2-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価」に記
載のとおり。

2-2-7 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

「1-2-4-2 表皮・真皮肥厚測定」に記載のとおり。

2-3 実験方法

2-3-1 SNCE の調製

鮭鼻軟骨脱脂粉末（弘前大学教育学部 加藤教授より恵与）が 2%となるよう蒸留水を加え、マグネット式スターラーで 30 分間攪拌後、遠心分離（15,000 rpm、30 min、4°C）し、上清を回収し凍結乾燥して SNCE を得た。

2-3-2 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

予め、0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.1）（以下、0.1 M リン酸緩衝液と略す）を調製する。ゲルろ過クロマトグラフィー用担体 Sepharose CL-2B をカラム（エコノカラム φ 1 × 50 cm）に 48 cm の高さに充填し、低圧クロマトグラフィーシステム BioLogic LP にセットし、0.1 M リン酸緩衝液で平衡化する。4 mg の SNCE あるいは 8 mg のコンドロイチン硫酸（サケ PG-20）を 1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液に溶解し、Sepharose CL-2B カラムにアプライして、0.15 mL/min の流速で溶出し、フラクションコレクター BioLogic Biofrac により 1 mL ずつフラクションを採取した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは 4°C で実行した。

2-3-3 グルクロン酸測定（カルバゾール硫酸法）^{53,54）}

予め、四ほう酸ナトリウム十水和物 0.95 g を濃硫酸 100 mL に溶解させた試薬（A）と、カルバゾール 125 mg をメタノールに溶解させた試薬（B）を調製する。試薬（A） 1.0 mL を試験管にとり氷冷する。これに試料 200 μL

を静かに重層し、室温以上にならないように水冷しながらよく混ぜる。ガラス球（ビー玉）を試験管の口に載せてふたをし、沸騰湯浴中で 10 分間加熱し、その後室温まで水冷する。これに試薬（B）を 40 μ L 加えて混合し、さらに 15 分間沸騰湯浴中で加熱する。室温まで水冷し、200 μ L を 96-well マルチプレートに移し、マイクロプレートリーダーにより 530 nm で吸光度を測定する。ブランクは蒸留水 40 μ L を用いる。同時に D-グルクロン酸を用いて検量線を作成し、試料中のグルクロン酸量を求める。

2-3-4 経口投与及び UVB 照射

2-3-4-1 実験① ヒアルロン酸との比較評価

試験群は、1 群 6 匹を 1 ケージに入れ、計 4 ケージとした（表 2）。

表 2. 実験① 試験群

試験試料	摂取量	UVB 照射
蒸留水(コントロール)	—	—
蒸留水(コントロール)	—	+
SNCE	3.5 mg/0.5 mL/day	+
ヒアルロン酸(HA)	3.5 mg/0.5 mL/day	+

ヘアレスマウス Hr-/Kud は、6 週齢を購入し 1 週間の予備飼育の後、胃ゾンデを用いて 5 回/週の頻度で試験終了まで経口投与を続けた。SNCE 及びヒアルロン酸の 1 日あたりの投与量は、3.5 mg とし、0.5 mL の蒸留水に溶かして経口投与した。コントロール群（UVB 未照射群及び UVB 照射群）は、蒸留水 0.5mL を経口投与した。UVB 照射は、経口投与 5 週目より開始した。

最初の1週間は 60 mJ/cm^2 (1MED)、2週間目以降は 120 mJ/cm^2 (2MED) とし、5回/週の頻度で計10週間照射した(図14)。実験動物飼育室内は、12時間の明暗サイクルで、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の温度環境であり、餌(実験動物用飼料MF(オリエンタル酵母工業(株)))及び水は自由に摂取させた。



図 14. 実験① 経口投与及び UVB 照射スケジュール

2-3-4-2 実験② SNCE の摂取量違い及びコンドロイチン硫酸との比較評価

試験群は、1群6匹を1ケージに入れ、計6ケージとした(表3)。

表 3. 実験② 試験群

試験試料	摂取量	UVB 照射
蒸留水(コントロール)	—	—
蒸留水(コントロール)	—	+
SNCE	3.5 mg/0.5 mL/day	+
SNCE	0.875 mg/0.5 mL/day	+
SNCE	0.175 mg/0.5 mL/day	+
コンドロイチン硫酸(CS)	3.5 mg/0.5 mL/day	+

ヘアレスマウス Hr-/Kud は、6 週齢を購入し 1 週間の予備飼育の後、胃ゾンデを用いて 6 回/週の頻度で試験終了まで経口投与を続けた。SNCE の 1 日あたりの投与量は、3.5 mg、0.875 mg、0.175 mg の 3 つの投与量違いとし、コンドロイチン硫酸の 1 日あたりの投与量は 3.5 mg として、それぞれ 0.5 mL の蒸留水に溶かして経口投与した。なお、コンドロイチン硫酸(マルハ PG-20)は、デキストリンが 50%含有されているため、マルハ PG-20 7.0 mg を 0.5 mL に溶かして調製した。コントロール (UVB 未照射群及び UVB 照射群) は、蒸留水 0.5 mL を経口投与した。UVB 照射は、経口投与 4 週間目より開始した。1 日あたりの UVB 照射量として、最初の 1 週間は 60 mJ/cm² (1MED)、2 週間目以降は 120 mJ/cm² (2MED) とし、5 回/週の頻度で計 8 週間照射した (図 15)。実験動物飼育室内は、12 時間の明暗サイクルで、22±2°C の温度環境であり、餌 (実験動物用飼料 MF (オリエンタル酵母工業 (株))) 及び水は自由に摂取させた。



図 15. 実験② 経口投与及び UVB 照射スケジュール

2-3-5 皮膚表面評価（紅斑、TEWL、角層水分量）

「1-3-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価」に記載のとおり。

2-3-6 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

繰返し UVB 照射終了後に、背部の皮膚組織採取を行った。ジエチルエーテルを充満させたデシケーターにマウスを入れ、動かなくなったら取り出し、水を含んだ脱脂綿で背中皮膚を 1 回拭き、水を含まない脱脂綿で 1 回拭いた。解剖用ハサミで、背部下半分の中央部 3~4 mm 幅の四角形状に 4ヶ所採取し、ホルマリン固定液の入った 10 mL 容バイアルビンに入れて、ホルマリン固定を行った。

以降は「1-3-4-3 表皮・真皮肥厚測定」の記載のとおり

2-3-7 統計解析

数値データは、平均値±標準偏差として示した。有意差検定は、スチューデント *t*-検定を使用した。 $p < 0.05$ は、統計学的に有意であり $p < 0.1$ は、有意傾向であると判断した。

2-4 実験結果

2-4-1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

鮭鼻軟骨プロテオグリカンの糖鎖はコンドロイチン硫酸であり、コンドロイチン硫酸はグルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンの 2 糖が反復する糖鎖に硫酸が結合した構造を持つことから、グルクロン酸量は、コンドロイチン硫酸量あるいはプロテオグリカン量を反映する。カルバゾール硫酸法

^{53,54)}により、SNCEのグルクロン酸量を測定した結果、20.8%であった。公益財団法人 日本健康・栄養食品協会が定めた試験法によれば、グルクロン酸量に係数 2.593 を乗ずるとコンドロイチン硫酸量が算出される⁵⁵⁾ことから、SNCEは、54%のコンドロイチン硫酸を含むことが分かった。

次に、SNCE及びコンドロイチン硫酸のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって得られたそれぞれのフラクション(1 mL)のグルクロン酸濃度を、カルバゾール硫酸法により測定した。SNCE及びコンドロイチン硫酸のゲルろ過カラムクロマトグラムを図 16 に示す。使用した Sepharose CL-2B の分画範囲は、デキストランの場合 100,000~20,000,000 の分子量範囲である。SNCEのグルクロン酸量で示された分子量分布は、ボイドボリューム (Vo) 付近に偏っており、コンドロイチン硫酸の分子量分布と比較して、圧倒的に分子量が高い割合が多い。このことから、SNCE中の54%を占めるコンドロイチン硫酸のほとんどは、アグリカンを構成していることが示唆される⁵⁶⁾。

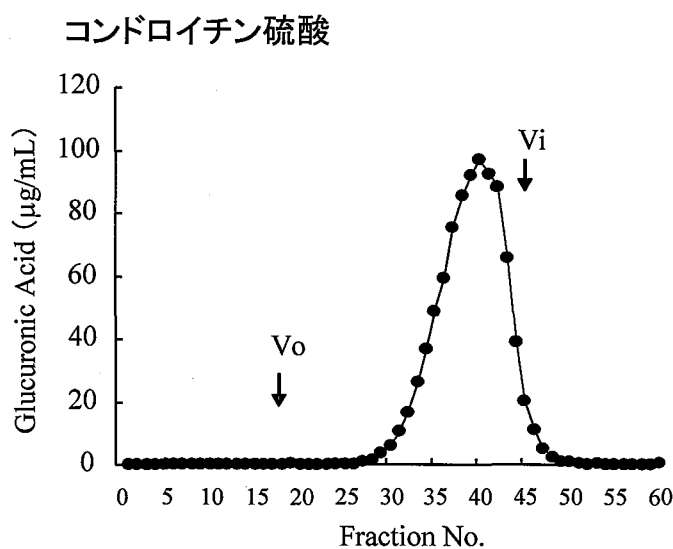
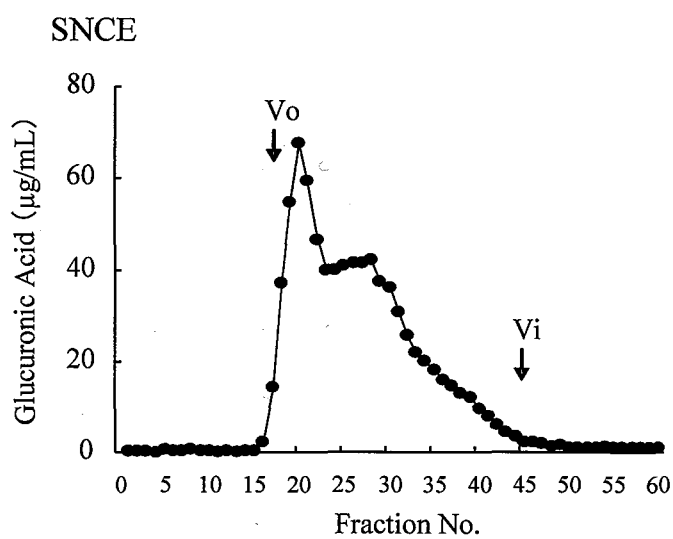


図 16. SNCE 及びコンドロイチン硫酸のゲルろ過カラムクロマトグラム (上段、SNCE ; 下段、コンドロイチン硫酸)

カラム : Sepharose CL-2B ($\phi 1 \times 48 \text{ cm}$)
 溶媒 : 0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.1)
 試料供与量 : 4 mg
 流速 : 0.15 mL/min
 フラクション : 16 mL
 Vo, void volume ; Vi, inner volume

2-4-2 実験① ヒアルロン酸との比較評価

2-4-2-1 皮膚表面評価

皮膚表面評価として、UVB 照射 7 週間後と 10 週間後の紅斑量測定、TEWL 測定及び角層水分量測定を行なった。

紅斑量の結果を図 17 に示す。SNCE は UVB 照射 7 週間後において、UVB 照射による紅斑の増加を抑制する有意傾向が認められた。ヒアルロン酸は、UVB 照射 7 週間、10 週間のいずれも増加の抑制は見られなかった。

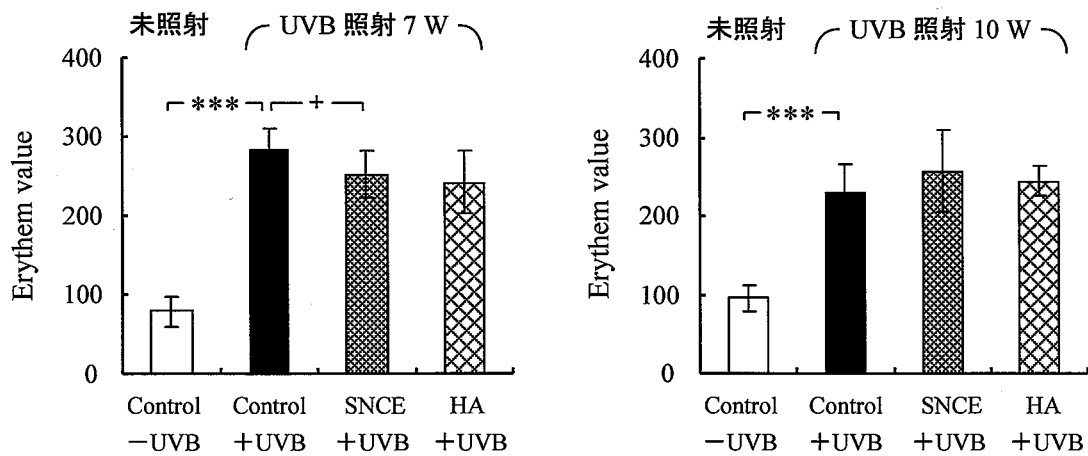


図 17. UVB 照射 7 週間後、10 週間後の紅斑量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Mexameter により、UVB 照射 7 週間後、10 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; HA, ヒアルロン酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

TEWLの結果を図 18に示す。SNCEは UVB 照射 10 週間後において、UVB 照射による TEWL 増加を有意に抑制した。ヒアルロン酸は、UVB 照射 7 週間後、10 週間後のいずれも増加の抑制は見られなかった。

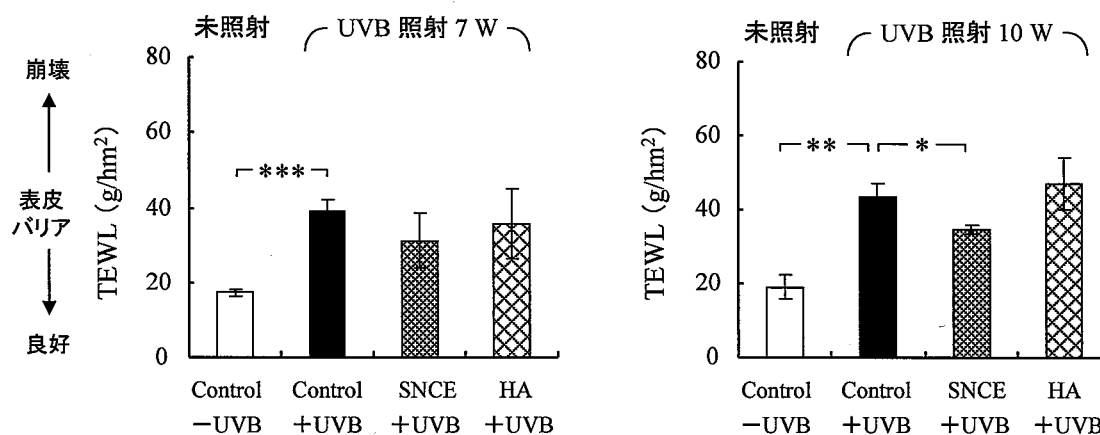


図 18. UVB 照射 7 週間後、10 週間後の TEWL 測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Tewameter により、UVB 照射 7 週間後、10 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; HA, ヒアルロン酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

角層水分量の結果を図 19 に示す。UVB 照射 7 週間、10 週間のいずれにおいても、SNCE、ヒアルロン酸の両方共、UVB 照射による角層水分量の低下を抑制する効果は認められなかった。

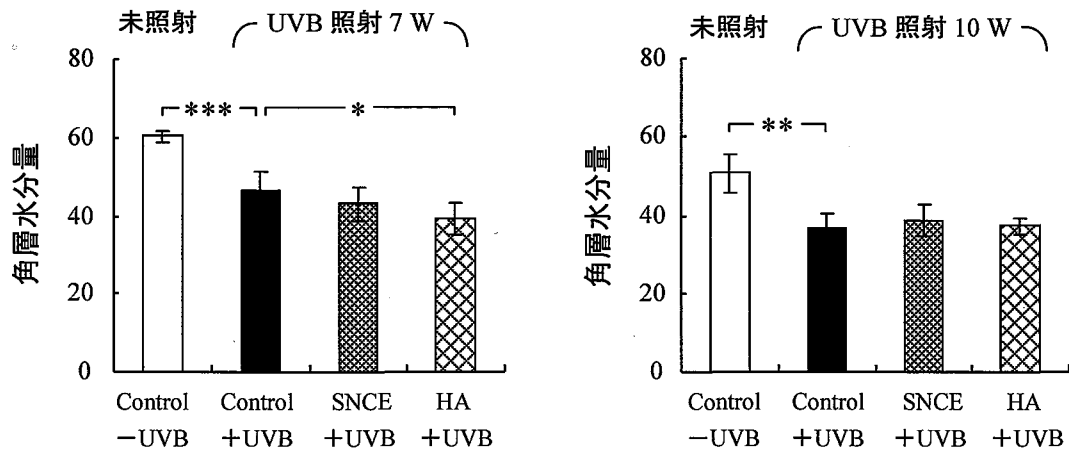


図 19. UVB 照射 7 週間後、10 週間後の角層水分量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Corneometer により、UVB 照射 7 週間後、10 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; HA, ヒアルロン酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

2-4-2-2 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

皮膚内部評価として、UVB 照射 10 週間後の表皮・真皮の厚さを測定し肥厚を評価した。背中皮膚断面の H&E 染色写真を図 20、表皮及び真皮の厚さ測定結果を図 21 に示す。SNCE は、表皮においては有意ではないが、UVB 照射による肥厚を抑制する傾向があると思われる。真皮においては、肥厚を有意に抑制した。ヒアルロン酸は、表皮、真皮の両方で有意差はないが、肥厚を抑制する傾向があった。

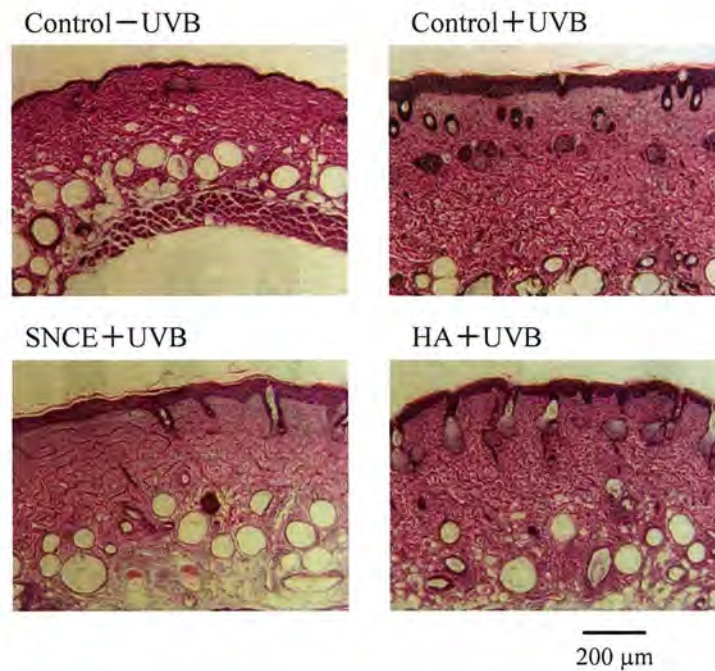


図 20. UVB 照射 10 週間後の背中皮膚断面 (H&E 染色)

ホルマリン固定された組織切片 (各試験群: 6 匹) を取り出し、自動パラフィン固定装置 tissue processor によりパラフィン浸透を行い、パラフィン包埋装置 (THERMAL CONSOLE、DISRENSING CONSOLE、CRYO CONSOLE) を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。専用のパラフィン切片転写用フィルムを用いる川本法⁵⁰⁾を用いてマイクロームにより組織切片を作成し、H&E 染色後、光学顕微鏡にて倍率×40 で観察し、デジタルカメラにて撮影した (bar = 200 μm)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; HA, ヒアルロン酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

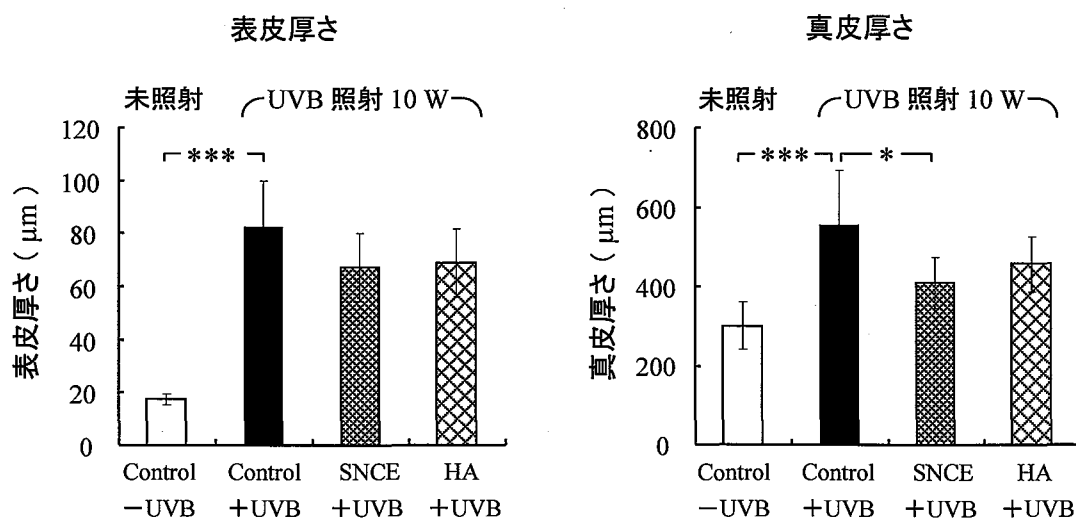


図 21. UVB 照射 10 週間後の表皮及び真皮の厚さ測定

H&E 染色された組織切片の画像（各試験群：6 匹）を 画像解析ソフトウェア Adobe photoshop CS3 の‘ものさしツール’を用いて、表皮層及び真皮層のそれぞれ 10 ヶ所の長さを測定し、表皮層及び真皮層の厚さを求めた¹⁰⁾。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; HA, ヒアルロン酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

2-4-3 実験② SNCE の摂取量違い及びコンドロイチン硫酸との比較評価

2-4-3-1 皮膚表面評価

皮膚表面評価として、UVB 照射 4 週間後と 8 週間後の紅斑量測定、TEWL 測定及び角層水分量測定を行なった。

紅斑量の結果を図 22 に示す。SNCE は、UVB 照射 4 週間後において、濃

度依存的に効果が高く、3.5、0.875 mg/day で有意に UVB 照射による紅斑量の増加を抑制した。コンドロイチン硫酸 (3.5 mg/day) も有意な抑制効果を示した。UVB 照射 8 週間後は、SNCE、CS のいずれも抑制効果は見られなかった⁵⁶⁾。

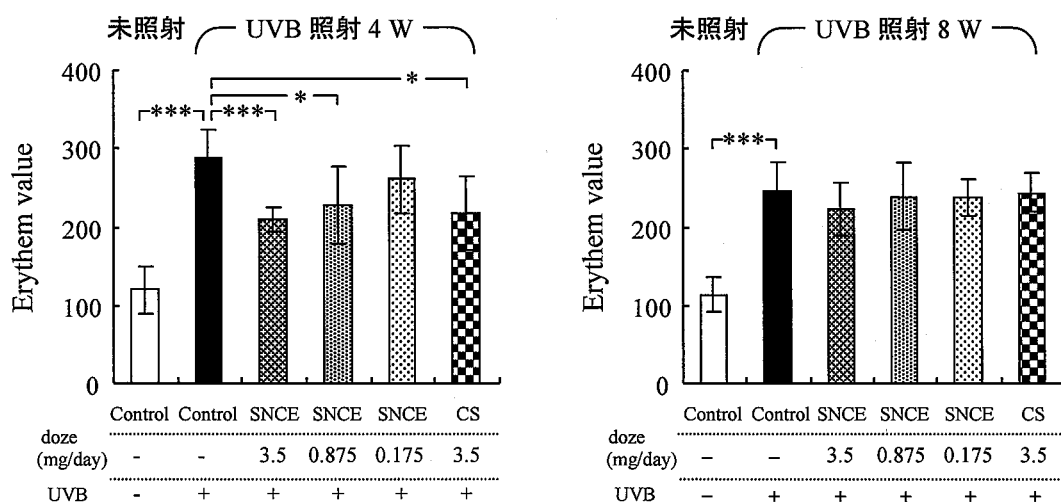


図 22. UVB 照射 4 週間後、8 週間後の紅斑量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Mexameter により、UVB 照射 4 週間後、8 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; CS, コンドロイチン硫酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

TEWLの結果を図 23 に示す。SNCE は、UVB 照射 4 週間と 8 週間の両方において、濃度依存性はなく、3.5、0.175 mg/day で UVB 照射による TEWL の増加を有意に抑制した。コンドロイチン硫酸 (3.5 mg/day) は、UVB 照射 4 週間及び 8 週間では有意な抑制効果は示さなかった⁵⁶⁾。

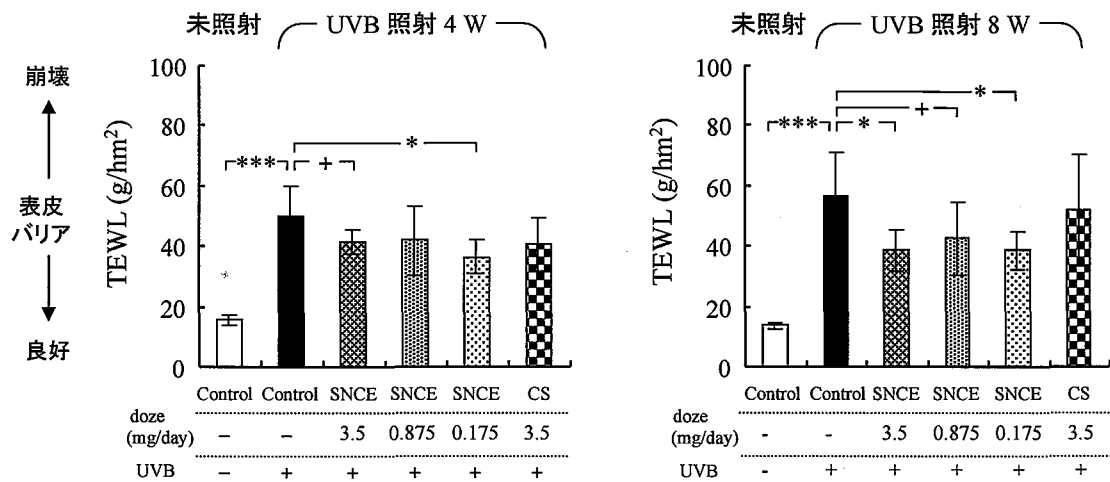


図 23. UVB 照射 4 週間後、8 週間後の TEWL 測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Tewameter により、UVB 照射 4 週間後、8 週間後の紅斑量を測定 (各試験群: 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; CS, コンドロイチン硫酸;
 -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

角層水分量の結果を図 24 に示す。SNCE は、UVB 照射 4 週間後において、3.5 mg/day のみ UVB 照射による角層水分量低下を有意に抑制した。コンドロイチン硫酸 (3.5 mg/day) に抑制効果は見られなかった⁵⁶⁾。

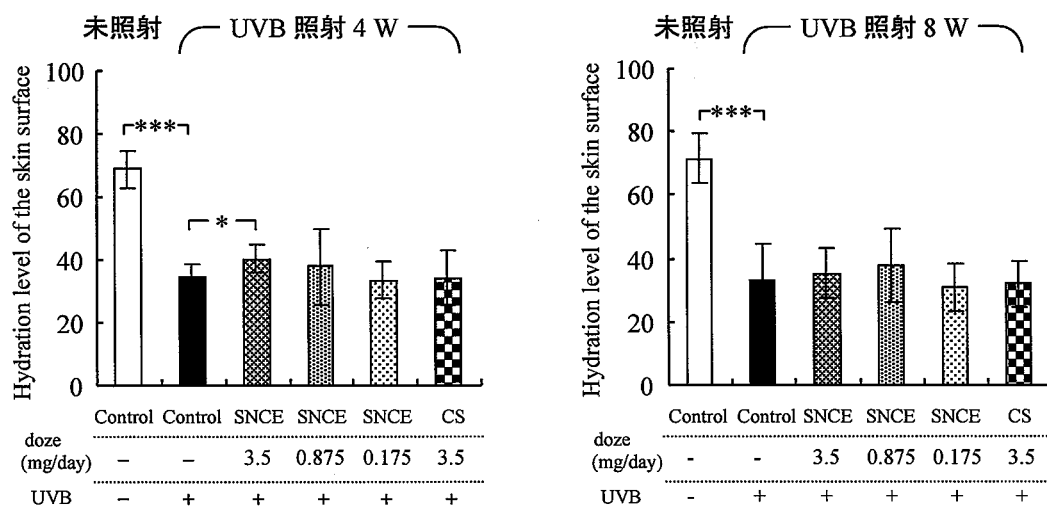


図 24. UVB 照射 4 週間後、8 週間後の角層水分量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Corneometer により、UVB 照射 4 週間後、8 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; CS, コンドロイチン硫酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

2-4-3-2 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

皮膚内部評価として、UVB 照射 8 週間後の表皮・真皮の厚さを測定し肥厚を評価した。

背中皮膚断面の H&E 染色写真を図 25、表皮及び真皮の厚さ測定結果を図 26 に示す。SNCE は濃度依存性はなく、3.5、0.875、0.175 mg/day のいずれも UVB 照射による表皮及び真皮の肥厚を有意に抑制した。コンドロイチン硫酸（3.5 mg/day）は、表皮、真皮のいずれも肥厚抑制効果は認められなかった⁵⁶⁾。

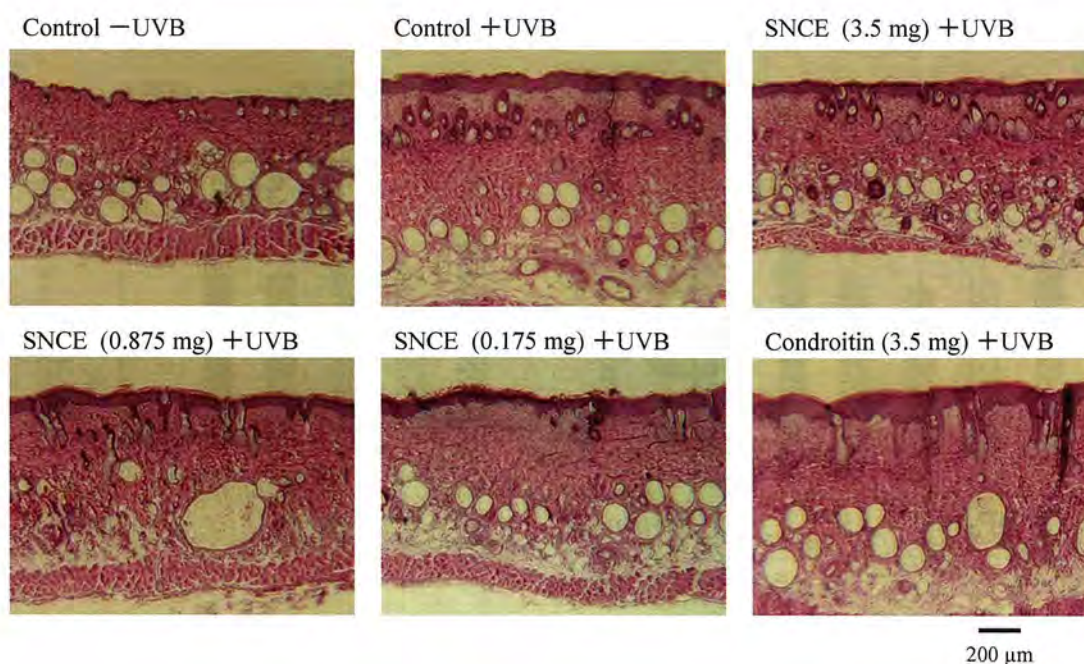


図 25. UVB 照射 8 週間後の背中皮膚断面 (H&E 染色)

ホルマリン固定された組織切片 (各試験群 : 6 匹) を取り出し、自動パラフィン固定装置 tissue processor によりパラフィン浸透を行い、パラフィン包埋装置 (THERMAL CONSOLE、DISRENSING CONSOLE、CRYO CONSOLE) を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。専用のパラフィン切片転写用フィルムを用いる川本法⁵⁰⁾を用いてマイクロームにより組織切片を作成し、H&E 染色後、光学顕微鏡にて倍率×40 で観察し、デジタルカメラにて撮影した (bar = 200 μm)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; CS, コンドロイチン硫酸;
-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

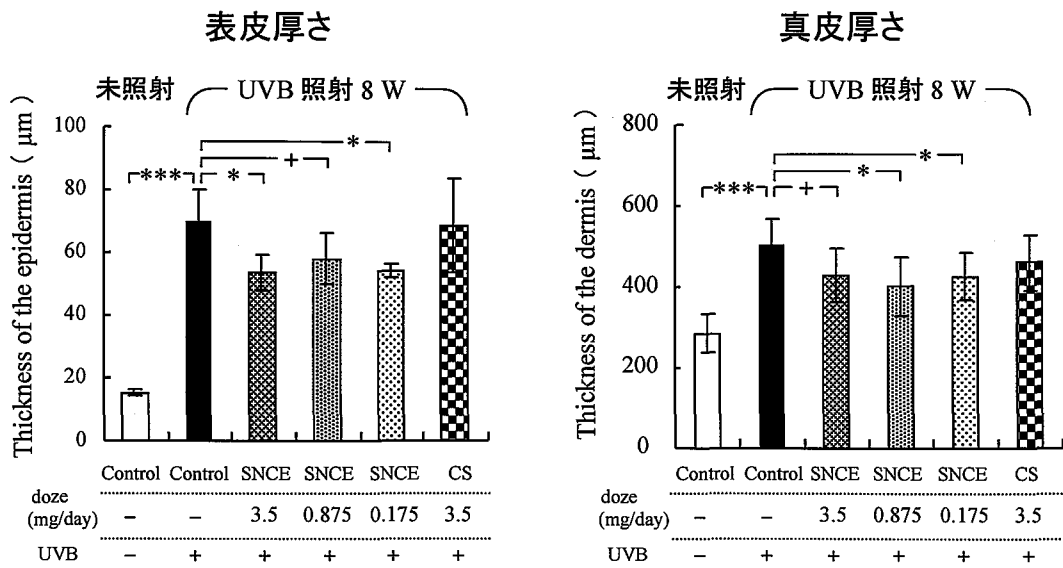


図 26. UVB 照射 8 週間後の表皮及び真皮の厚さ測定

H&E 染色された組織切片の画像（各試験群：6 匹）を 画像解析ソフトウェア Adobe photoshop CS3 の ‘ものさしツール’ を用いて、表皮層及び真皮層のそれぞれ 10 ヶ所の長さを測定し、表皮層及び真皮層の厚さを求めた¹⁰⁾。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; CS, コンドロイチン硫酸;

-UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

2-5 考察

SNCE のゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果、SNCE は分子量が高いプロテオグリカンが約 54%含有されていることを確認した。SNCE の製造工程は、タンパク変性剤や酸、アルカリあるいは酵素を全く使用しないため、SNCE に豊富に含まれるプロテオグリカンは、分解を受けない本来の構造を維持していることが示唆される。

この SNCE の経口摂取による効果を、近年美容食品に汎用されているヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸との比較評価を、UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系において経口投与試験により行なった。SNCE の経口投与は、2 回の評価を通して、皮膚表面における紅斑抑制効果・表皮バリア崩壊抑制効果・角層水分量低下抑制効果が認められ、皮膚内部においては表皮・真皮の肥厚抑制効果が認められ、皮膚老化抑制効果を再現性良く実証した。また、マウス経口投与試験の摂取量としては、通常数 mg/day 以上であるが、SNCE は 0.175 mg/day の摂取量においても優れた表皮バリア崩壊抑制と表皮・真皮肥厚抑制効果を発揮した。一方、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸は、一部評価で UVB 照射による影響を抑制する傾向が見られたが、SNCE と比べて UVB 照射による皮膚老化を抑制する効果は小さかった。本結果より、SNCE は UV 照射による光老化を効果的に抑制する美容食品への応用が期待される。

しかしながら、SNCE はプロテオグリカン以外の成分が半分近く含まれており、示された皮膚抗老化作用はプロテオグリカンによるものと断定できない。そこで、SNCE からプロテオグリカンを分画し、得られたプロテオグリカン画分を用いて、再度 UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系での経口投与試験を行なうこととした。

第3章 SNCE から分画した分子量別プロテオグリカン画分の経口投与による皮膚抗老化評価

3-1 緒言

プロテオグリカンの分画方法としては、プロテオグリカンの糖鎖部分（コンドロイチン硫酸）の硫酸基の存在による、強い負電荷を利用したイオン交換カラムクロマトグラフィーが有効である。溶媒として7 M 尿素緩衝液を用いてプロテオグリカンを非会合状態とし、同溶媒中の塩化ナトリウムの直線勾配で溶離すると、塩化ナトリウム濃度 0.1 M でタンパク質、0.2 M でヒアルロン酸、0.35 M でヘパラン硫酸プロテオグリカン、0.5 M でコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの順で溶離される⁵⁷⁻⁵⁹。鮭鼻軟骨プロテオグリカンは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるので、塩化ナトリウム濃度 0.5 M のフラクションを採取することでプロテオグリカンが分画される。また、SNCE のグルクロン酸（プロテオグリカン量を反映）の分子量分布（図 16 上段）は幅広く複数ピークが存在する。そのため、分画したプロテオグリカンをさらにゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、分子量別に分画することとした。UVB 誘導皮膚老化モデルマウス評価系において、得られた分子量別プロテオグリカン画分の経口投与試験を行い、SNCE の皮膚抗老化効果の活性成分を探索した。

3-2 実験材料と器具

3-2-1 グルクロン酸測定（カルバゾール硫酸法）

「2-2-3 グルクロン酸測定（カルバゾール硫酸法）」に記載のとおり。

3-2-2 デキストラン測定（フェノール硫酸法）

フェノール（試薬特級）（ナカライテスク（株））、濃硫酸（試薬特級）（ナカライテスク（株））、96-well マルチプレート（旭硝子（株））、マイクロプレートリーダーiMARK（バイオラッドラボラトリーズ（株））

3-2-3 SNCE からの分子量別プロテオグリカンの分画（イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー）

イオン交換カラムクロマトグラフィー用担体 DEAE Sephacel（GE Healthcare Bio-Sciences AB）、ゲルろ過クロマトグラフィー用担体 Sepharose CL-2B（GE Healthcare Bio-Sciences AB）、カラム（エコノカラム $\phi 5 \times 20$ cm）（バイオラッドラボラトリーズ（株））、カラム（エコノカラム $\phi 5 \times 50$ cm）（バイオラッドラボラトリーズ（株））、低圧クロマトグラフィーシステム BioLogic LP（バイオラッドラボラトリーズ（株））、フラクションコレクター BioLogic Biofrac（バイオラッドラボラトリーズ（株））、尿素（特級試薬）（ナカライテスク（株））、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（特級試薬）（ナカライテスク（株））、塩酸（特級試薬）（関東化学（株））、リン酸二水素ナトリウム・二水和物（特級試薬）（ナカライテスク（株））、リン酸水素二ナトリウム・無水（特級試薬）（和光純薬工業（株））、塩化ナトリウム（試薬特級）（ナカライテスク（株））、デキストラン（Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 5,000,000–40,000,000）（Sigma Aldrich Co.）、デキストラン（Dextran Standard 1,400,000 from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 1,400,000）（Sigma Aldrich co.）、デキストラン（Dextran Standard 270,000 from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 270,000）（Sigma Aldrich Co.）、限外ろ過装置 Stirred Ultrafiltration Cell 8400（Millipore Corporation）、限外ろ過膜（Filter Code: PLGC、Dia: 76 mm、NMWL: 10,000）（Millipore Corporation）、真空乾

燥機 VC-360 (タイテック (株))

3-2-4 ヘアレスマウスへの UVB 照射

「1-2-1 ヘアレスマウスへの UVB 照射」に記載のとおり。

3-2-5 皮膚表面評価 (紅斑、TEWL、角層水分量)

「1-2-3 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価」に記載のとおり。

3-2-6 皮膚内部評価 (表皮・真皮肥厚)

「1-2-4-2 表皮・真皮肥厚測定」に記載のとおり。

3-3 実験方法

3-3-1 グルクロン酸測定 (カルバゾール硫酸法) ^{53,54)}

「1-2-3 グルクロン酸測定 (カルバゾール硫酸法)」に記載のとおり。

3-3-2 デキストラン測定 (フェノール硫酸法) ^{54,60)}

予め、フェノール 5 g を蒸留水に溶かして、100 mL とした 5%フェノール水溶液を調製する。

試料 200 μ L を試験管にとり、200 μ L の 5%フェノール水溶液を加えてよく混合する。これに、1 mL の濃硫酸を加えてよく混合する。室温に 30~40 分放置後、200 μ L を 96-well マルチプレートにとりマイクロプレートリーダーにより 490 nm で吸光度を測定する。

3-3-3 SNCE からのプロテオグリカン分画 (イオン交換カラムクロマトグラフィー)

予め、下記の 2 つの溶媒 (移動相) を調製する。

< 溶媒 >

溶媒 A : 7 M 尿素 - 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4)

尿素 1,429.4 g に蒸留水を加えて 3,315 mL にメスアップして均一溶解し、2 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 85 mL を加え攪拌しながら塩酸を適量加え pH 7.2 に調整する。

溶媒 B : 7 M 尿素 - 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4、0.75 M 塩化ナトリウム含有)

尿素 1,429.4 g と塩化ナトリウム 149.0 g に蒸留水を加えて 3,315 mL にメスアップして均一溶解し、2 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 85 mL を加え攪拌しながら塩酸を適量加え pH 7.2 に調整する。

イオン交換カラムクロマトグラフィー用担体 DEAE Sephacel をカラム (エコノカラム $\phi 5 \times 20$ cm) に 15 cm の高さで充填し、低圧クロマトグラフィーシステム BioLogic LP にセットし、溶媒 A で平衡化する。200 mg の SNCE を溶媒 A に溶解し、DEAE Sephacel カラムにアプライして、溶媒の流速を 2 mL/min とし、BioLogic LP システムの予めプログラムされた 2 液混合モジュールにより、溶出開始から 1120 mL の溶出の間に、溶媒 B を 0-100% に直線勾配的に置換させ、溶媒中の塩化ナトリウム濃度を 0 \rightarrow 0.75 M に変化させた。また溶出の間、BioLogic LP システムの電気伝導度モジュールにより常

に電導度を測定し、クロマトグラム作成時に、予め測定した溶媒 A (塩化ナトリウム 0 M) と溶媒 B (塩化ナトリウム 0.75 M) の電導度測定値に基づき、電導度を塩化ナトリウムの濃度に変換した。溶出液は、フラクションコレクター BioLogic Biofrac により 16 mL ずつのフラクションとして採取した。イオン交換カラムクロマトグラフィーは、4°C で実行した。

<イオン交換カラムクロマトグラフィー条件>

カラム : DEAE Sephacel (φ 5 cm × 15 cm)

溶媒 : 7 M 尿素 - 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4) (NaCl: 0 → 0.75 M)

グラジエント条件 :

List	Volume(ml)	Buffer	ml/min
01	0 - 1120	0% 溶媒 A → 100% 溶媒 B	2.0
01	1120 - 1440	溶媒 B	2.0

流速 : 2.0 mL/min

フラクション : 16 mL

イオン交換カラムクロマトグラフィー終了後、フラクション (16 mL) 中のグルクロン酸量をカルバゾール硫酸法^{53,54)}により測定した。

横軸にフラクション No.、縦軸にグルクロン酸と塩化ナトリウムの 2 軸を重ね合わせたクロマトグラムにおいて、塩化ナトリウム濃度 0.5 M 付近のグルクロン酸のピーク部分に相当するフラクションを集め、限外ろ過による脱塩を行なった後凍結乾燥し、プロテオグリカン画分を得た。

3-3-4 分子量別プロテオグリカン分画(ゲルろ過カラムクロマトグラフィー)

分子量別に分画するため、分子量マーカーとして下記の3つの分子量違いデキストランを用意した。

<デキストラン分子量マーカー>

- ・ D1 : デキストラン (Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 5,000,000–40,000,000) (Sigma Aldrich Co.)
- ・ D2 : デキストラン (Dextran Standard 1,400,000 from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 1,400,000) (Sigma Aldrich Co.)
- ・ D3 : デキストラン (Dextran Standard 270,000 from *Leuconostoc mesenteroides*、分子量 270,000) (Sigma Aldrich Co.)

予め、0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) (以下、0.1 M リン酸緩衝液と略す) を調製する。ゲルろ過クロマトグラフィー用担体 Sepharose CL-2B をカラム (エコノカラム $\phi 5 \times 50$ cm) に 45 cm の高さで充填し、低圧クロマトグラフィーシステム BioLogic LP にセットし、0.1 M リン酸緩衝液で平衡化する。150 mg のプロテオグリカン画分、あるいは 50 mg のデキストラン分子量マーカー (D1、D2、D3) を 20 ml の 0.1 M リン酸緩衝液に溶かし、Sepharose CL-2B カラムにアプライして、2.0 mL/min の流速で溶出し、フラクションコレクター BioLogic Biofrac により 16 mL ずつフラクションを採取した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは、4°C で実行した。

<ゲルろ過クロマトグラフィー条件>

カラム : Sepharose CL-2B (ϕ 5 × 45 cm)

溶媒 : 0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1)

流速 : 2.0 mL/min

フラクション : 16 mL

次に、プロテオグリカン画分の各フラクション No.の分子量を推定するため、3つのデキストラン分子量マーカーそれぞれのフラクション中のデキストラン量をフェノール硫酸法^{54,60)}により測定し、検量線を作成した。手順としてまず、D1、D2、D3のそれぞれについて、横軸にフラクション No.、縦軸にデキストラン量 (490 nm 吸光度) のクロマトグラムを作成した。最も分子量が高い D1 (分子量 5,000,000–40,000,000) のクロマトグラムにおいて、ボイドボリューム (V_0) に相当するフラクション No.を求め、これを Sepharose CL-2B のデキストラン分画範囲 (100,000~20,000,000) の上限である分子量 20,000,000 とした。D2 (分子量 1,400,000)、D3 (分子量 270,000) は、クロマトグラムの 2 等分する位置のフラクション No.をそれぞれ分子量 1,400,000、270,000 とした。このように求めた分子量 20,000,000、1,400,000、並びに 270,000 と、それに相当するフラクション No.から検量線を作成した。

プロテオグリカン画分のフラクション中のグルクロン酸量は、カルバゾール硫酸法により測定した。横軸にフラクション No.、縦軸にグルクロン酸のクロマトグラムを作成し、グルクロン酸のピークごとにフラクションを集め、それぞれ限外ろ過による脱塩を行なった後凍結乾燥し、分子量別プロテオグリカン画分を得た。

3-3-5 分子量別プロテオグリカン画分の経口投与及び UVB 照射

試験群は、1 群 6 匹で、UVB 未照射のコントロール、UVB 照射のコントロール、UVB 照射の SNCE 経口投与群及び UVB 照射の分子量別プロテオグリカン画分とした。

ヘアレスマウス Hr-/Kud は、6 週齢を購入し 1 週間の予備飼育の後、胃ゾンデを用いて 6 回/週の頻度で試験終了まで経口投与を続けた。第 2 章の SNCE 経口投与の投与量違いでの結果、0.175 mg/day 以上で効果を示した。SNCE のプロテオグリカン含有量は約 54%であるため、プロテオグリカン量としては約 0.1 mg/day である。そこで、本実験での SNCE 及び分子量別プロテオグリカン画分の 1 日あたりの投与量は、プロテオグリカン量として 0.1 mg を含有する量とし、0.5 mL の蒸留水に溶かして経口投与した。コントロール (UVB 未照射、UVB 照射) は、蒸留水 0.5 mL を経口投与した。UVB 照射は、経口投与 4 週間目より開始した。最初の 1 週間は 60 mJ/cm² (1MED)、2 週間目以降は 120 mJ/cm² (2MED) とし、6 回/週の頻度で計 8 週間照射した (図 27)。実験動物飼育室内は、12 時間の明暗サイクルで、22±2°C の温度環境であり、餌 (実験動物用飼料 MF (オリエンタル酵母工業 (株))) 及び水は自由に摂取させた。



図 27. 経口投与及び UVB 照射スケジュール

3-3-6 皮膚表面評価（紅斑、TEWL、角層水分量）

「1-3-2 ヘアレスマウスへの累積 UVB 照射における皮膚表面評価」に記載のとおり。

3-3-7 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

「2-3-6 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）」に記載のとおり。

3-3-8 統計解析

数値データは、平均値±標準偏差として示した。有意差検定は、スチューデント *t*-検定を使用した。 $p < 0.05$ は、統計学的に有意であり $p < 0.1$ は、有意傾向であると判断した。

3-4 実験結果

3-4-1 SNCE からのプロテオグリカン分画（イオン交換カラムクロマトグラフィー）

SNCE のイオン交換カラムクロマトグラムを、図 28 に示す。塩化ナトリウム濃度 0.5 M の位置に、単一のグルクロン酸のピークが確認できた。すなわち、このピークはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることを示す。このピークに相当するフラクションを集めて限外ろ過による脱塩を行なった後、凍結乾燥し、プロテオグリカン画分を得た⁶¹⁾。

ヘアレスマウスへの経口投与試験に用いる量を確保するため、上記のイオン交換カラムクロマトグラフィーを 12 回繰り返した。SNCE 2,400 mg (200 mg × 12 回) から 1085.5 mg のプロテオグリカン画分が得られた。

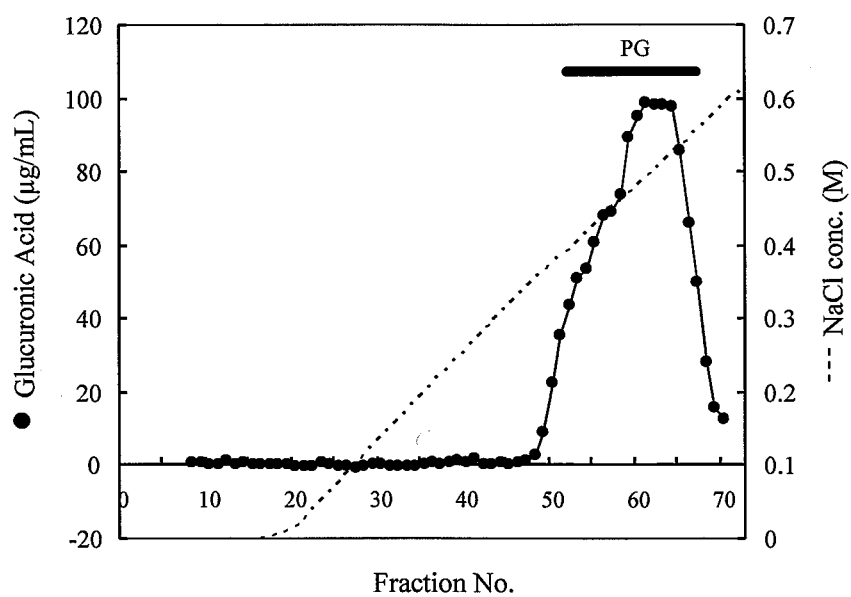


図 28. SNCE のイオン交換クロマトグラム

カラム : DEAE Sephacel (φ 5 cm × 15 cm)

溶媒 : 7 M 尿素 - 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4) (NaCl:
0 → 0.75 M)

試料供与量 : 200 mg

流速 : 2.0 mL/min

●, グルクロン酸; , 塩化ナトリウム濃度 (M)

————— , 回収したプロテオグリカンフラクション

3-4-2 分子量別プロテオグリカン分画（ゲルろ過カラムクロマトグラフィー）

イオン交換カラムクロマトグラフィーにより得られた、プロテオグリカン画分のゲルろ過カラムクロマトグラムを図 29 に示し、デキストラン分子量マーカー（D1、D2、D3）のゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより作成された、フラクション No. と分子量の検量線を図 30 に示す。

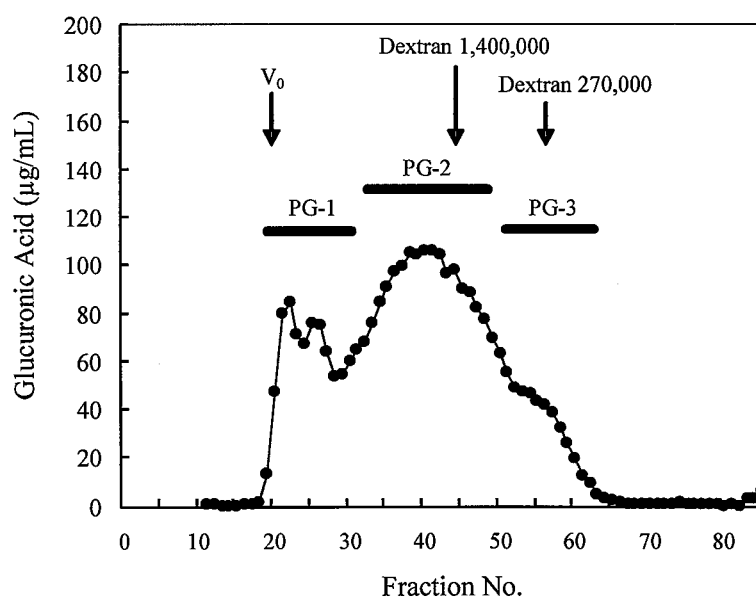


図 29. プロテオグリカン画分のゲルろ過カラムクロマトグラム

カラム : Sepharose CL-2B (φ 5 × 45 cm)
溶媒 : 0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1)
試料供与量 : 150 mg
流速 : 2.0 mL/min
フラクション : 16 mL
V₀, void volume; —, 回収したフラクション

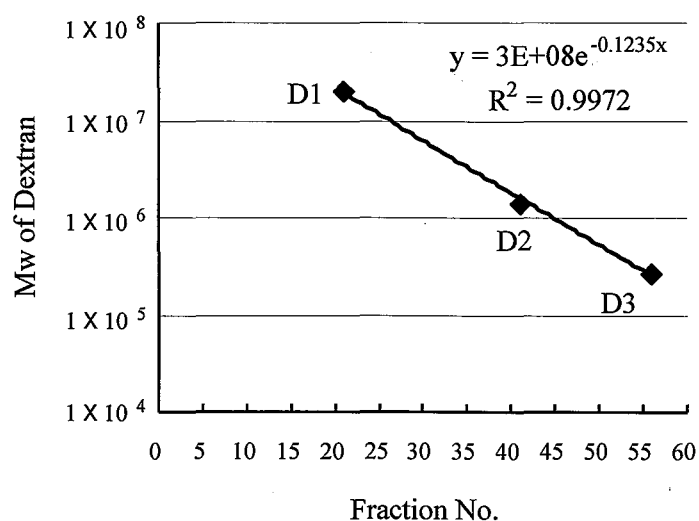


図 30. デキストラン分子量マーカー (D1、D2、D3) のゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより作成されたフラクション No.と分子量の検量線

D1, デキストラン (Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*, 分子量 5,000,000–40,000,000) (Sigma Aldrich Co.) ; D2, デキストラン (Dextran Standard 1,400,000 from *Leuconostoc mesenteroides*, 分子量 1,400,000) (Sigma Aldrich Co.) ; D3, デキストラン (Dextran Standard 270,000 from *Leuconostoc mesenteroides*, 分子量 270,000) (Sigma Aldrich co.)

プロテオグリカン画分のゲルろ過カラムクロマトグラム (図 29) において、大きく 3 つのグルクロン酸のピークが重なって存在していたことより、図 29 の **——** に示すように、この 3 つのピークに相当するフラクションをそれぞれ集め、分子量の大きい順に PG-1、PG-2、PG-3 とした。それぞれ限外ろ過により脱塩し、凍結乾燥を行なった。また、それぞれの分子量は、図 30 の検量線より、PG-1 は 500 万以上、PG-2 は 40 万～500 万、PG-3 は

40 万以下と推定された⁶¹⁾。ただしこれはプロテオグリカンの分子量マーカーがなく、代用としてデキストラン分子量マーカーを用いて得た推定値である。

ヘアレスマウスへの経口投与試験に用いる量を確保するため、上記のゲルろ過カラムクロマトグラフィーを 6 回繰り返した。イオン交換クロマトグラフィーにより得られたプロテオグリカン画分 900 mg (150 mg × 6 回) から、PG-1: 199.0 mg、PG-2: 445.7 mg、PG-3: 152.8 mg が得られた。

3-4-3 皮膚表面評価

皮膚表面評価として、UVB 照射 4 週間後と 7 週間後において紅斑量測定、TEWL 測定、及び角層水分量測定を行なった。

紅斑量の結果を図 31 に示す。分子量別プロテオグリカン画分において、PG-1 は UVB 照射 4 週間後に有意に UVB 照射による紅斑量の増加を抑制し、UVB 照射 7 週間後においても増加抑制の有意傾向を示した。PG-2 は、UVB 照射 4 週間後に増加抑制の有意傾向を示した。PG-3 においては、UVB 照射 4 週間、7 週間のいずれにおいても、増加抑制は見られなかった。UVB 照射による紅斑量増加抑制効果は、PG-1、PG-2 で認められ、特に PG-1 で効果が高かった⁶¹⁾。

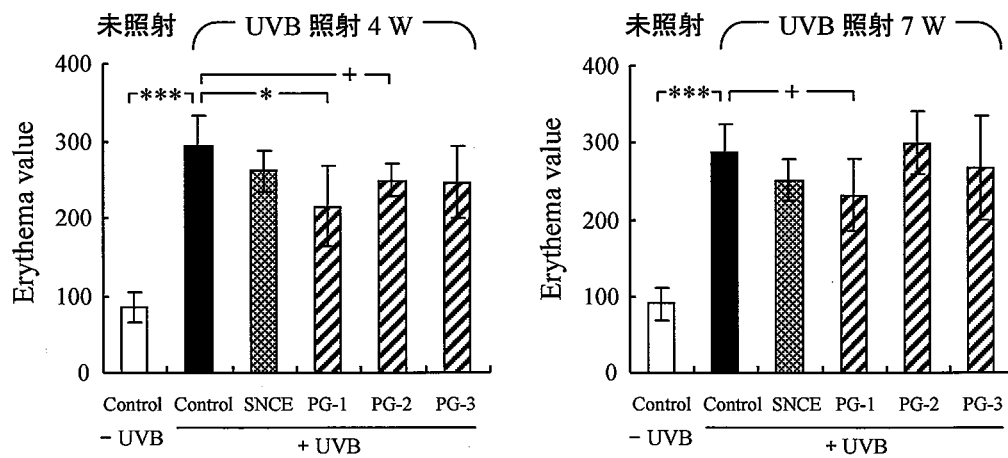


図 31. UVB 照射 4 週間後、7 週間後の紅斑量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Mexameter により、UVB 照射 4 週間後、7 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量 : 500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万 ~ 500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万以下); -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

TEWL の結果を図 32 に示す。分子量別プロテオグリカン画分において、PG-1 は UVB 照射 4 週間後において、有意な差ではないが、ポジティブコントロールである SNCE と同様の値を示し、UVB 照射による TEWL の増加を抑制する傾向があると判断し、UVB 照射 7 週間後においては、増加抑制の有意傾向を示した。PG-2 は、UVB 照射 4 週間後において、有意差はないが、SNCE と PG-1 とほぼ同じ値で増加を抑制する傾向があると判断した。UVB 照射 7 週間後においては、増加抑制効果は認められなかった。PG-3 においては、UVB 照射 4 週間、7 週間のいずれにおいても、増加抑制は見られなかった。TEWL の増加抑制効果は、PG-1 で高く PG-2 にも効果があると考えられた⁶¹⁾。

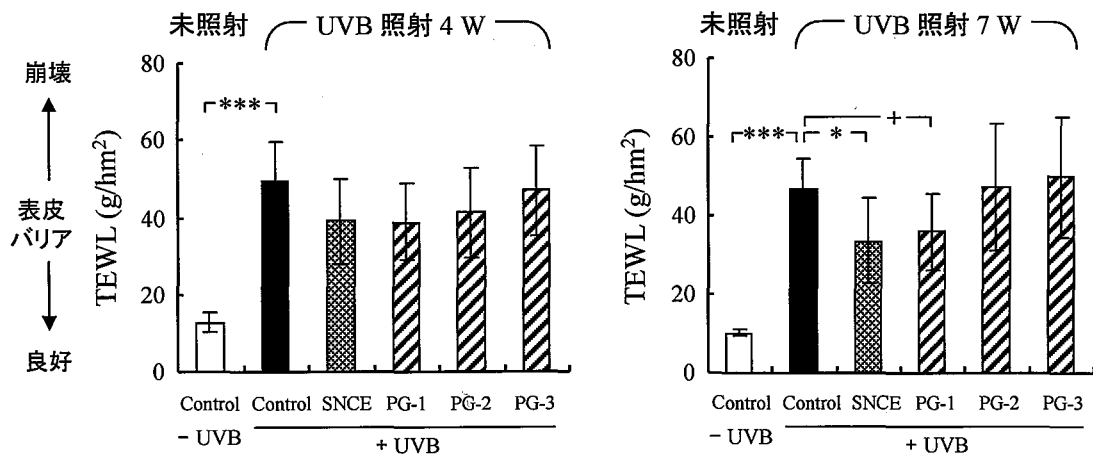


図 32. UVB 照射 4 週間後、7 週間後の TEWL 測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Tewameter により、UVB 照射 4 週間後、7 週間後の紅斑量を測定 (各試験群: 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量: 500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量: 40 万 ~ 500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量: 40 万以下); -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

角層水分量の結果を図 33 に示す。分子量別プロテオグリカン画分において、PG-1 は UVB 照射 7 週間後で、UVB 照射による角層水分量低下を抑制する有意傾向を示した。PG-2 及び PG-3 は、UVB 照射 4 週間、7 週間のいずれにおいても、低下抑制は見られなかった。最も分子量が高い PG-1 が、UVB 照射による角層水分量低下を抑制する効果があると考えられた⁶¹⁾。

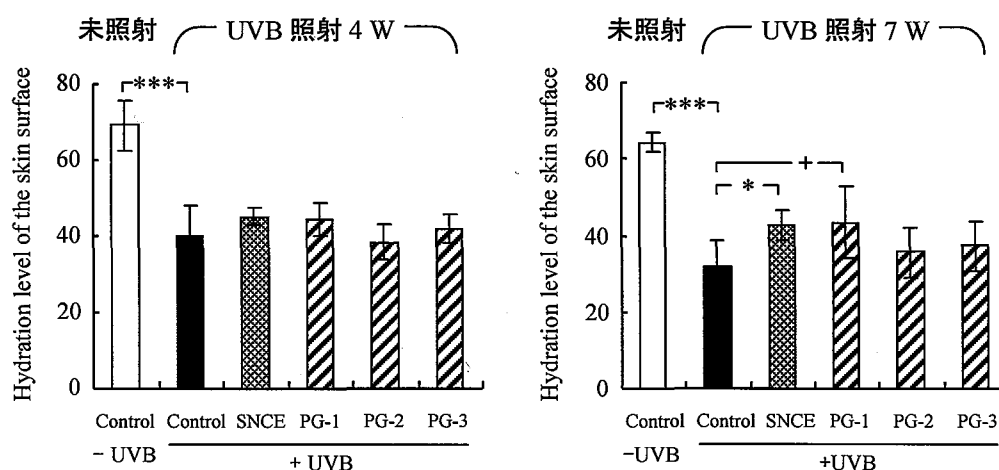


図 33. UVB 照射 4 週間後、7 週間後の角層水分量測定

マルチプローブ式皮膚計測器 (MPA580) の Corneometer により、UVB 照射 4 週間後、7 週間後の紅斑量を測定 (各試験群 : 6 匹)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量 : 500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万 ~ 500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万以下); -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

3-4-4 皮膚内部評価（表皮・真皮肥厚）

皮膚内部評価として、UVB 照射 8 週間後の背中皮膚断面の H&E 染色による肥厚観察、及び表皮・真皮の厚さを測定し肥厚を評価した。

背中皮膚断面の H&E 染色写真を図 34、表皮及び真皮の厚さ測定結果を図 35 に示す。分子量別プロテオグリカン画分において、PG-1 は表皮、真皮の両方で UVB 照射による肥厚を有意に抑制した。PG-2 は表皮の肥厚を抑制する有意傾向を示し、真皮は、値のばらつきが大きく有意差は得られなかったが、PG-1 の値に近く、肥厚を抑制する効果があるものと考えられた。PG-3 は、表皮、真皮の両方において肥厚を抑制する効果は認められなかった。UVB 照射による表皮・真皮の肥厚抑制は、PG-1 及び PG-2 で認められ、特に PG-1 の効果が高い⁶¹⁾。

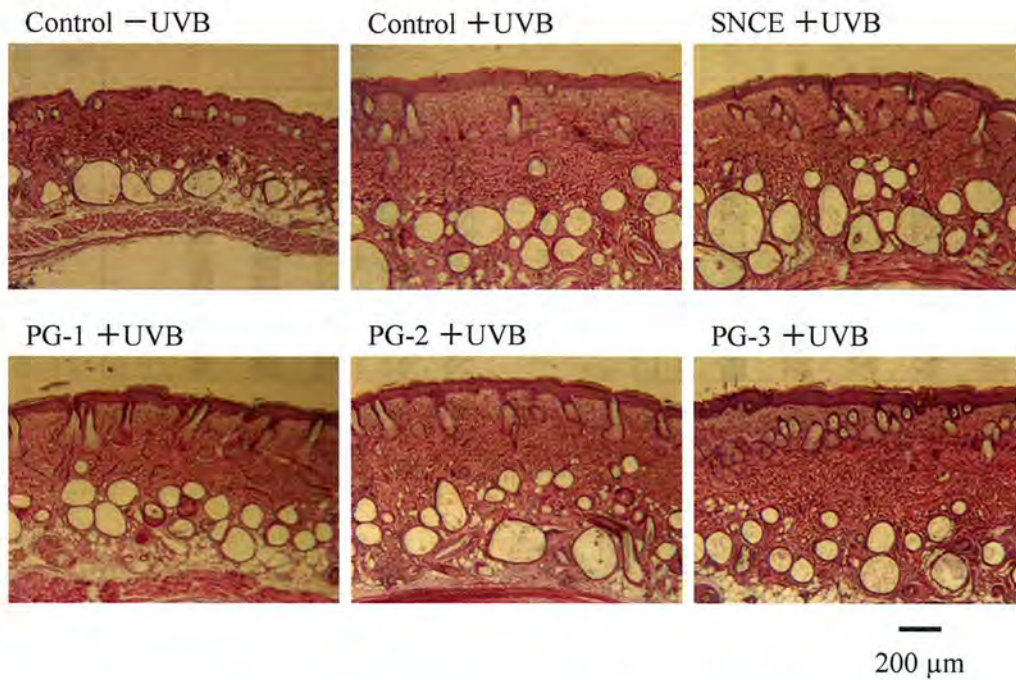


図 34. UVB 照射 8 週間後の背中皮膚断面 (H&E 染色)

ホルマリン固定された組織切片 (各試験群: 6 匹) を取り出し、自動パラフィン固定装置 tissue processor によりパラフィン浸透を行い、パラフィン包埋装置 (THERMAL CONSOLE、DISRENSING CONSOLE、CRYO CONSOLE) を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。専用のパラフィン切片転写用フィルムを用いる川本法⁵⁰⁾を用いてマイクロトームにより組織切片を作成し、H&E 染色後光学顕微鏡にて倍率×40 で観察し、デジタルカメラにて撮影した (bar = 200 μm)。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量: 500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量: 40 万～500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量: 40 万以下); -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

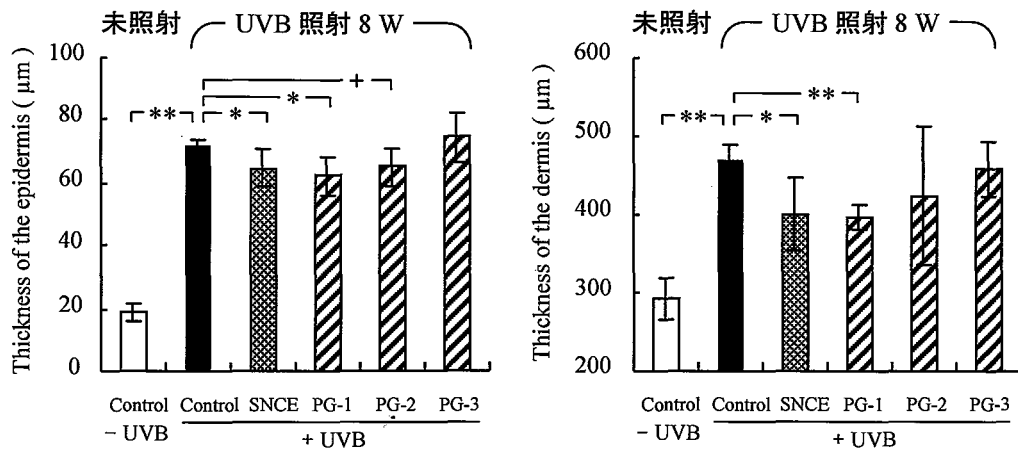


図 35. UVB 照射 8 週間後の表皮及び真皮の厚さ測定

H&E 染色された組織切片の画像（各試験群：6 匹）を、画像解析ソフトウェア Adobe photoshop CS3 の‘ものさしツール’を用いて、表皮層及び真皮層のそれぞれ 10ヶ所の長さを測定し、表皮層及び真皮層の厚さを求めた¹⁰⁾。Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分（分子量：500 万以上）; PG-2, プロテオグリカン画分（分子量：40 万～500 万）; PG-3, プロテオグリカン画分（分子量：40 万以下）; -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

3-5 考察

イオン交換クロマトグラフィーにより SNCE からプロテオグリカンを分画し、さらにゲルろ過クロマトグラフィーにより 3 つの分子量別プロテオグリカンを分画した。これらの画分 (PG-1、PG-2、PG-3) の分子量は、デキストラン分子量マーカーによる検量線により、PG-1 は 500 万以上、PG-2 は 40 万～500 万、PG-3 は 40 万以下であると推定された。

UVB 照射皮膚老化モデルマウス評価系での分子量別プロテオグリカン画分の経口投与試験を行い、皮膚表面評価である紅斑・TEWL・角層水分量、皮膚内部評価である表皮・真皮肥厚の評価を行なった結果、PG-1、PG-2 は UVB 照射による光老化を抑制する効果があり、特に最も分子量が高い PG-1 の効果が高いことが判明した。このことから、プロテオグリカンの経口摂取による光老化抑制効果は、分子量依存的に高分子量が高いほど皮膚抗老化効果が高く、分子量が 40 万以下では全く効果がないことを見出した。

同じプロテオグリカンでありながら、分子量の違いで効果が違うのは、その構造の違いによるものと思われる。序論で述べたように、鮭鼻軟骨プロテオグリカンのほとんどを占めるアグリカンは、100 万～150 万程度の分子量であることが推測されている⁴⁶⁾。すなわち、PG-2 画分は、ほとんどがアグリカンであると考えられる。PG-3 は、分子量が 40 万以下であることから、アグリカンの分解物やその他のプロテオグリカンが考えられる。PG-1 は、アグリカンの分子量よりはるかに大きい (500 万以上) ことから、ヒアルロン酸あるいはコラーゲンとのアグリカン複合体であることが推測される。7 M 尿素緩衝液によるイオン交換クロマトグラフィーは、尿素によるタンパク変性効果によりプロテオグリカンを非会合状態にして分画する方法であるが⁵⁷⁻⁵⁹⁾、7M 尿素によっても会合状態を維持したアグリカン複合体が残存し

ていたためと思われる。

そこで考察のための追加実験として、PG-1, PG-2, PG-3 のそれぞれについて、ヒアルロン酸及びコラーゲンの含有量を測定した。コラーゲン量測定は、PG-1、PG-2、PG-3 の水溶液を調製し、コラーゲン定量キット Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor Ltd.) を用いてマニュアルに基づき測定した。ヒアルロン酸測定は、まず、プロテオグリカン⁵⁹⁾を非会合状態にさせるため、強力なタンパク変性剤であるグアニジン塩酸塩の水溶液に溶解させ⁵⁹⁾、ヒアルロン酸測定キット (生化学バイオビジネス (株)) を用いてマニュアルに基づき測定した。各画分に含まれるヒアルロン酸及びコラーゲンの含有量を図 36 に示す。

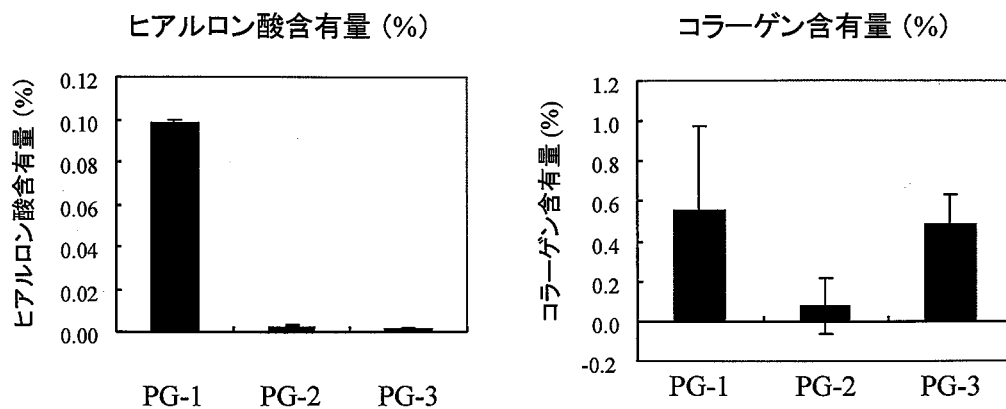


図 36. 分子量別プロテオグリカン画分のヒアルロン酸及びコラーゲン含有量測定

ヒアルロン酸含有量測定：4 M グアニジン塩酸塩-50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で、各分子量別プロテオグリカン画分 (PG-1、PG-2、PG-3) の 1 mg/mL 溶液を調製し、ヒアルロン酸測定キット (生化学バイオビジネス (株)) を用いてマニュアルに基づき測定し、各分画物に含まれるヒアルロン酸含有量 (%) を算出した。

コラーゲン含有量測定：各分子量別プロテオグリカン画分 (PG-1、PG-2、PG-3) の 4 mg/mL 水溶液を調製し、コラーゲン定量キット Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor Ltd.) を用いてマニュアルに基づき測定し、各分画物に含まれるコラーゲン含有量 (%) を算出した。

ヒアルロン酸測定の結果、PG-2、PG-3 には、ほとんど含有されず、PG-1 のみに特異的に含有されている。含有量は約 0.1%で少ないが、ヒアルロン酸は、ブラシの毛のように巨大なアグリカンを多数結合できるため³³⁾、少量で多くのアグリカンの複合体形成が可能である。コラーゲン測定では、PG-1、PG-3 に比べ PG-2 は特異的に少なかった。このことより、PG-1 は、アグリカンとヒアルロン酸の会合体にコラーゲンが組み合わさった複合体であることが示唆された(図 37)。コラーゲンは、アグリカン-ヒアルロン酸間の結合より弱い結合と考えられるため、イオン交換カラムクロマトグラフィーによるプロテオグリカン分画の後、アグリカン-ヒアルロン酸-コラーゲン複合体から外れたコラーゲンが、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの間に PG-3 に混入したものと考えられる。

以上より、アグリカンの経口投与は、優れた光老化抑制効果があり、さらにアグリカンはヒアルロン酸やコラーゲンと複合体を形成することにより、光抑制効果が増強されると考えられる。またアグリカンが分解されるとその効果はなくなることが示唆される。

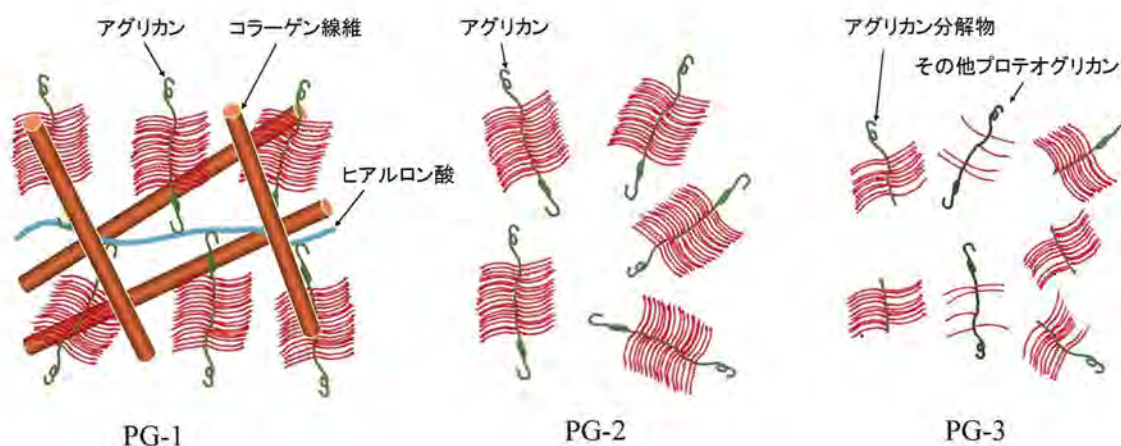


図 37. 分子量別プロテオグリカン画分 (PG-1、PG-2、PG-3) の構造 (仮説)

第4章 皮膚抗老化メカニズムの検証

4-1 緒言

序論で述べた、ゼラチン（熱変性コラーゲン）やコラーゲンペプチドの経口摂取での生理機能研究に基づくその作用メカニズムの研究の結果、ゼラチンやコラーゲンペプチドは、小腸でトリペプチド（Gly-Pro-Hyp）に消化され、さらに小腸の吸収上皮細胞の上部に存在する刷子縁膜において、ジペプチド（Pro-Hyp）に分解されて吸収され、吸収されたジペプチド（Pro-Hyp）が生理活性を示すと報告されている^{62,63}。これまでの評価で、アグリカンの構成成分であるコンドロイチン硫酸の効果は小さかったことと、分子量依存的に高分子量プロテオグリカンの効果が高いことを考慮すると、高分子量プロテオグリカンが分解され体内に吸収されて効果を発揮することは考えにくい。また、巨大な分子サイズの高分子量プロテオグリカンは、そのまま体内吸収されることは考えられない。一方、サケ鼻軟骨プロテオグリカンが、マウス・マクロファージにおいて大腸菌に対する炎症性サイトカイン産生を調節するとの報告がある⁶⁴。これらのことから類推すると、経口投与された高分子量プロテオグリカンは、腸管免疫に作用して炎症性サイトカイン産生を調節し、UV照射による炎症を抑制し、皮膚アンチエイジング効果を発揮することが考えられた。この仮説を検証するため、分子量別プロテオグリカン画分経口投与後の、UV誘導皮膚老化モデルヘアレスマウスの血清及び背中皮膚を採取し、それぞれの炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインを測定した。さらに詳しく、分子量別プロテオグリカン画分の炎症性サイトカインへの影響を調べるため、マウス・マクロファージ細胞株（RAW 264.7）培養系において、各分子量別プロテオグリカン画分の炎症性サイトカイン産生へ

の影響を検証した。

4-2 実験材料と器具

4-2-1 血清採取、背中皮膚の採取・乾燥粉末化

微量採血管 (BD Microtainer SST、REF 365963) (Becton、Dickinson and Company)、遠心分離機 H-15FR ((株) コクサン)、細胞破碎装置 (オートミル TK-AM5) ((株) トッケン)、真空乾燥機 VC-360 (タイテック (株))、ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100) (生化学用試薬) (和光純薬工業 (株))、ダルベッコリン酸バッファー (D-PBS) (Sigma Aldrich Co.)、プロテアーゼインヒビターカクテル錠 (コンプリートミニ EASY Pack) (Roche Diagnostics GmbH)、回転式攪拌機 MTR-103 (アズワン (株))、遠心分離機 H-15FR ((株) コクサン)

4-2-2 分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージ培養系への添加実験

マウス・マクロファージ細胞株 (RAW 264.7) (大日本製薬 (株))、ダルベッコリン酸バッファー (D-PBS) (Sigma Aldrich Co.)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Sigma Aldrich Co.)、RPMI-1640 培地 (Sigma Aldrich Co.)、硫酸ストレプトマイシン (明治製菓 (株))、ペニシリン G カリウム (明治製菓 (株))、ウシ胎児血清 (FBS) (MP Biomedicals、LLC)、Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich Co.)、3.5 cm 組織培養ディッシュ (Greiner Bio-One BVBA/SPRL)

4-2-3 炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカイン測定

マウス TNF- α 用エライザキット (Quantikine Mouse TNF- α Immunoassay) (R&D Systems Inc.)、マウス IL-1 β 用エライザキット (Quantikine Mouse IL-1 β Immunoassay) (R&D Systems Inc.)、マウス IL-6 用エライザキット (Quantikine Mouse IL-6 Immunoassay) (R&D Systems Inc.)、マウス IL-10 用エライザキット (Quantikine Mouse IL-10 Immunoassay) (R&D Systems Inc.)、マイクロプレートリーダー iMARK (バイオラッドラボラトリーズ (株))

4-3 実験方法

4-3-1 血清採取、背中皮膚採取・乾燥粉末化

第3章 (SNCE から分画した分子量別プロテオグリカン画分の経口投与による皮膚抗老化評価) での経口投与・UVB 照射 (8 週間) 実験終了後のヘアレスマウスより、血清及び背中皮膚を採取した。すなわち、エーテルを充満させたデシケーター中に、ヘアレスマウスを入れ昏睡状態にした後、解剖用ハサミで首を切り、微量採血管に血液を採取した。そして、第3章で用いるための組織切片用の背中皮膚採取後に、さらに背中皮膚を採取 (約 2×3 cm) した。血液を採取した微量採血管は 10 回転倒混和し、2 時間～2 時間半静置後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 20°C) を行い、上清の血清をエッペンチューブに回収し、-80°C にて保管した。採取した背中皮膚は、液体窒素により凍結させ、細胞破碎装置 (オートミル TK-AM5) により凍結粉末化を行った後、真空乾燥機 VC-360 により凍結乾燥させた。凍結乾燥粉末は、-20°C にて保管した。

4-3-2 血清及び背中皮膚中の炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカイン測定

予め、0.05% Triton X-100 水溶液を調製し、10 mLにつき1錠のプロテアーゼインヒビターカクテル錠（コンプリートミニ EASY Pack）を溶解させておく。各試料を経口投与された皮膚老化モデルヘアレスマウスの背中皮膚凍結乾燥粉末を15 mg 精秤し、1 mL のプロテアーゼインヒビター入り 0.05% Triton X-100 水溶液を加え、回転式攪拌機 MTR-103 により30分間、室温にて攪拌する。攪拌後、遠心分離（12,000 rpm, 30 min, 4°C）を行い、上清を回収し背中皮膚抽出液とする。

マウス TNF- α 、マウス IL-1 β 、マウス IL-6、マウス IL-10 それぞれのエライザキットを用いて、マニュアルに基づき血清及び背中皮膚抽出液中の炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6）及び抗炎症サイトカイン（IL-10）を、測定した。

4-3-3 分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージに対する炎症性サイトカイン産生への影響

3.5 cm 組織培養ディッシュ に2 mL の血清入り培地（DMEM +10% FBS +100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン +100 μ g/mL ペニシリン G カリウム）を入れ、マウス・マクロファージ細胞株（RAW 264.7）を 2.0×10^5 Cell ずつ播種した。細胞の接着を確認後（6h 後）、D-PBS で1回洗浄し、血清入り培地（DMEM +10% FBS +100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン +100 μ g/mL ペニシリン G カリウム）を1ml 加え、各分子量別プロテオグリカン画分（PG-1, PG-2, PG-3）を10 μ g/ml になるように添加した。コントロールは無添加とし、それぞれのサンプル群は N=3 とした。24 時間培養後 D-PBS で2回洗浄し、無血清培地（PRMI-1640）を1 ml 加え、LPS を100 ng/ml になるように添加

した。コントロールは、LPS 無添加群と LPS 添加群を用意した。24 時間培養後培地を回収し、マウス TNF- α 用、マウス IL-1 β 用、マウス IL-6 用の各エライザキットにより炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) を測定した (図 38)。



図 38. 分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージ培養系への添加実験手順

4-3-4 統計解析

数値データは、平均値 \pm 標準偏差として示した。有意差検定は、スチューデント t -検定を使用した。 $p < 0.05$ は統計学的に有意であり、 $p < 0.1$ は有意傾向であると判断した。

4-4 実験結果

4-4-1 血清及び背中皮膚中の炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカイン測定

UVB 照射 8 週間後の血清中の炎症性サイトカイン測定結果を図 39 に、背中皮膚中の炎症性サイトカイン測定結果を図 40 に示す。炎症性サイトカイン

ンとしては、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 を測定した。血清及び背中皮膚において、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の全てで UVB 照射により有意に上昇した。これは、UVB 照射により炎症が高まることを示す。これに対して、分子量別プロテオグリカン画分投与群においては、全体的に有意な差ではないが、血清と背中皮膚で同様な挙動を示し、PG-1、PG-2 は、UVB 照射による炎症性サイトカイン産生の上昇を抑制する傾向を示した。PG-3 は、いずれのサイトカインにおいても上昇抑制は見られなかった⁶¹⁾。再試験を実施した結果、同様に明らかな有意差は得られなかったが、PG-1、PG-2 投与群において、UVB 照射による炎症性サイトカイン産生の上昇を抑制する傾向を示し、再現性を確認している。

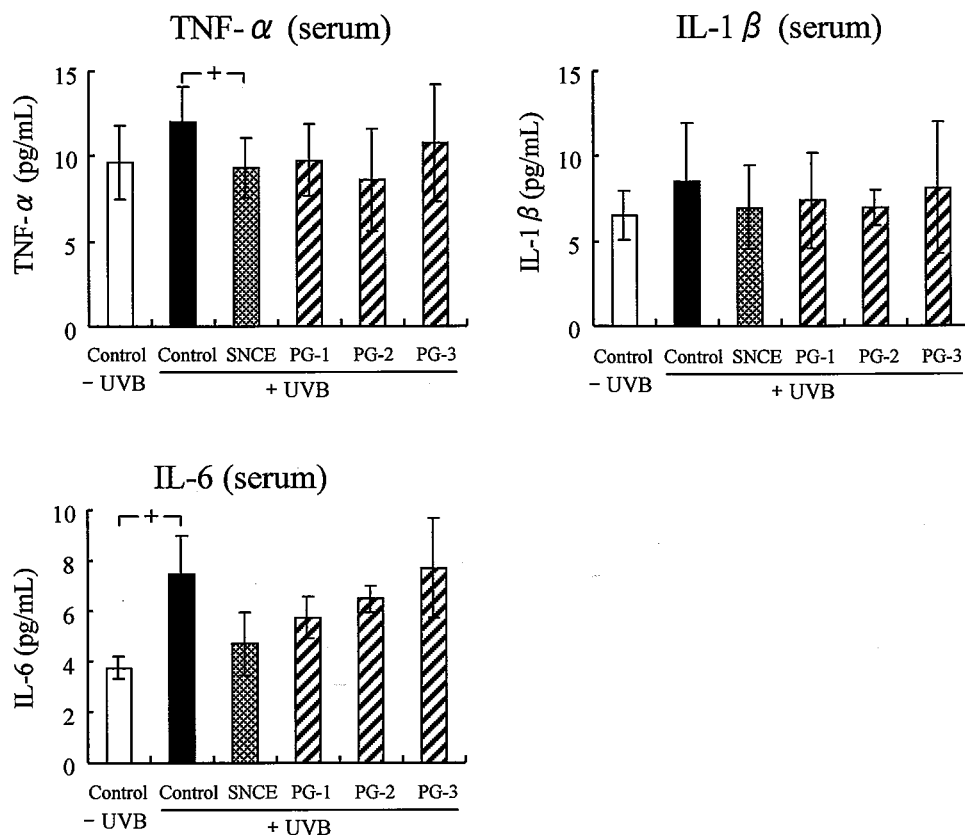


図 39. UVB 照射 8 週間後の血清中炎症性サイトカイン測定

各試験群から採取された血清（各試験群：6 匹）中の炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6）を、マウス TNF- α 、マウス IL-1 β 、マウス IL-6 それぞれのエライザキットを用いて、マニュアルに基づき測定した。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分（分子量：500 万以上）; PG-2, プロテオグリカン画分（分子量：40 万～500 万）; PG-3, プロテオグリカン画分（分子量：40 万以下）; -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

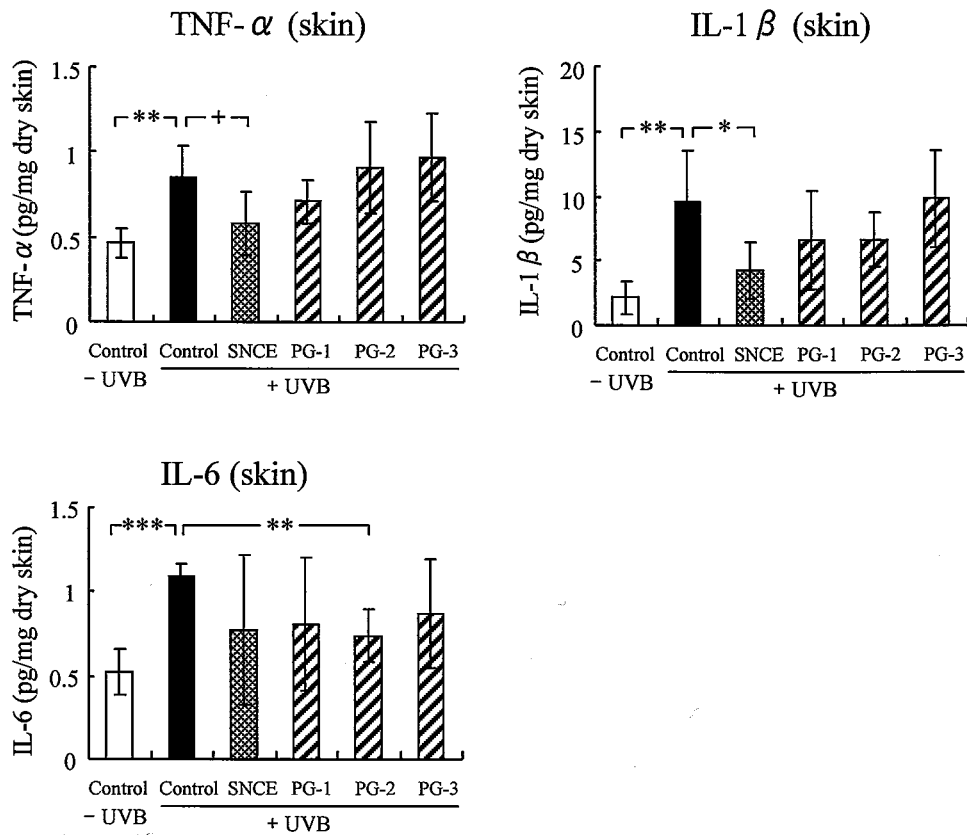


図 40. UVB 照射 8 週間後の背中皮膚中炎症性サイトカイン測定

各試験群から採取された背中皮膚凍結乾燥粉末 15 mg に、1 mL のプロテアーゼインヒビター入り 0.05% Triton X-100 水溶液を加え、30 分間、室温にて攪拌後遠心分離 (12,000 rpm, 30 min, 4°C) を行い、上清を回収し、背中皮膚抽出液とする。背中皮膚抽出液 (各試験群 : 6 匹) 中の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) をマウス TNF- α 、マウス IL-1 β 、マウス IL-6 それぞれのエライザキットを用いて、マニュアルに基づき測定した。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量 : 500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万 ~ 500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万以下); -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

UVB 照射 8 週間後の背中皮膚中の抗炎症性サイトカイン測定結果を図 41 に示す。炎症性サイトカインとしては、IL-10 を測定した。UVB 照射による IL-10 の変動は見られなかった。また、SNCE 及び分子量別プロテオグリカン画分経口投与群においても変動は見られなかった。

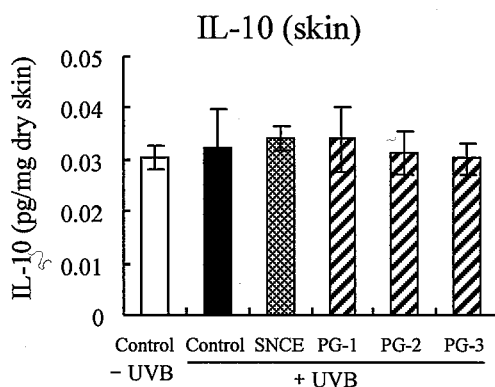


図 41. UVB 照射 8 週間後の背中皮膚中抗炎症性サイトカイン測定

各試験群から採取された背中皮膚凍結乾燥粉末 15 mg に、1 mL のプロテアーゼインヒビター入り 0.05% Triton X-100 水溶液を加え、30 分間、室温にて攪拌後遠心分離 (12,000 rpm, 30 min, 4°C) を行い、上清を回収し、背中皮膚抽出液とする。背中皮膚抽出液 (各試験群 : 6 匹) 中の抗炎症性サイトカイン (IL-10) をマウス IL-10 のエライザキットを用いて、マニュアルに基づき測定した。

Control, コントロール; SNCE, 鮭鼻軟骨抽出物; PG-1, プロテオグリカン画分 (分子量 : 500 万以上) ; PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万 ~ 500 万) ; PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量 : 40 万以下) ; -UVB, UVB 未照射; +UVB, UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

4-4-2 分子量別プロテオグリカン画分のマウス・マクロファージに対する炎症性サイトカイン産生への影響

マウス・マクロファージ細胞株 (RAW 264.7) に各分子量別プロテオグリカン画分 (PG-1, PG-2, PG-3) を添加した後、LPS 刺激を行い、炎症性サイトカイン量 (TNF- α , IL-1 β , IL-6) を測定した (図 42)。TNF- α 測定の結果、LPS 添加により著しく上昇した TNF- α を PG-1、PG-2、PG-3 のいずれも極めて強く抑制した。IL-1 β は、PG-1 に影響は見られなかったが、PG-2 で抑制の傾向が見られた。PG-3 は、むしろ産生を促進させた。IL-6 においては、PG-1、PG-2 で有意な抑制が見られ、PG-3 は産生を促進させた。本実験は 2 回実施し、再現性を確認している。3 つのサイトカイン測定で、挙動は異なるが、総合すると PG-2、PG-1 の順で産生抑制効果は高く、PG-3 は IL-1 β 、IL-6 において逆に産生促進効果が認められた。

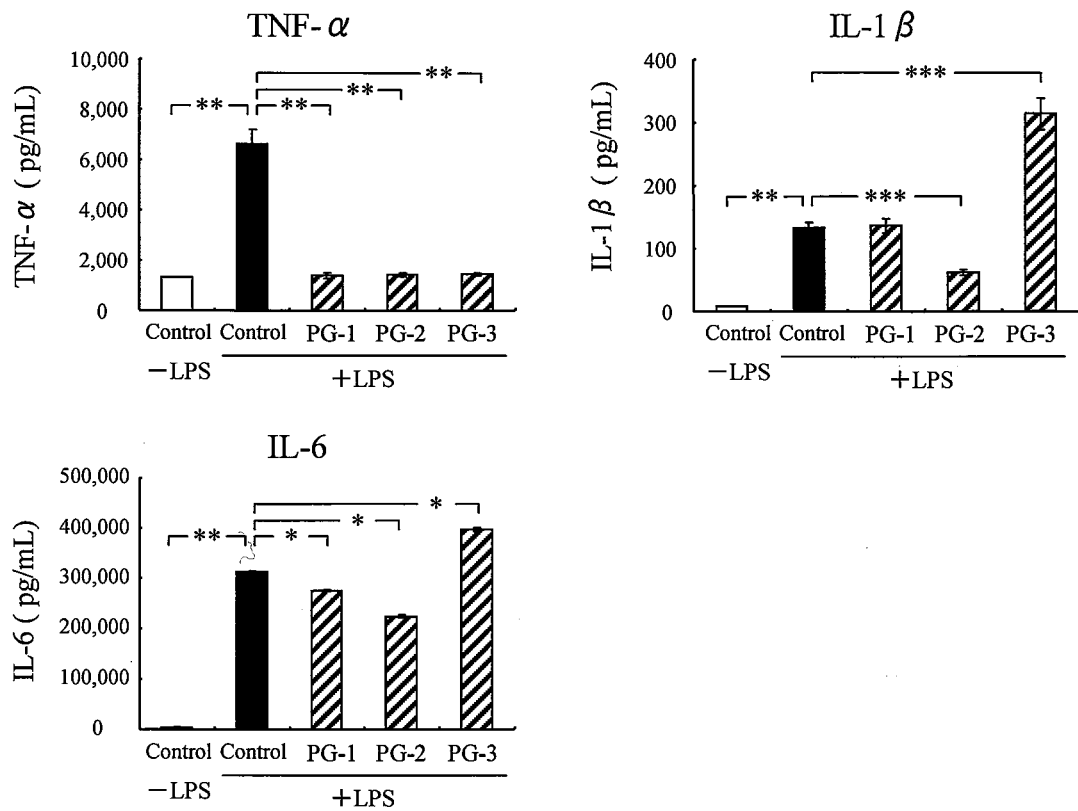


図 42. 各分子量別プロテオグリカン画分前添加後の LPS 刺激したマウス・マクロファージの炎症性サイトカイン産生量

2.0×10⁵ Cell/mL のマウス・マクロファージ細胞株 (RAW 264.7) に、各分子量別プロテオグリカン画分 (PG-1、PG-2、PG-3) を 10 μg/ml になるように添加した。24 時間培養後、無血清培地 (D-MEM) を 1ml 加え、LPS を 100ng/ml になるように添加した。24 時間培養後培地を回収し、エライザキットにより炎症性サイトカイン (TNF-α、IL-1β、IL-6) を測定した。Control, コントロール; PG-1, プロテオグリカン画分(分子量:500 万以上); PG-2, プロテオグリカン画分 (分子量:40 万~500 万); PG-3, プロテオグリカン画分 (分子量:40 万以下); -UVB、UVB 未照射; +UVB、UVB 照射

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; + $p < 0.1$

4-5 考察

分子量 40 万～500 万の高分子量プロテオグリカン画分の経口摂取は、UVB 照射による光老化を抑制する効果が認められることから、光老化が強く影響するしわなどの皮膚老化を効果的に抑制することが示唆された。また、分子量 40 万～500 万のプロテオグリカン画分より、分子量 500 万以上のプロテオグリカン画分でさらに効果が高かった。この作用メカニズムとして、腸管免疫を介した抗炎症作用であることが仮説として考えられた。

炎症は通常、細菌や異物が体内に侵入した時の免疫反応の結果として生じるが、皮膚が UV 照射を受けた場合にも TNF- α 、IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインが誘導される⁶⁵⁻⁷¹。UV 照射により、表皮のケラチノサイトや真皮の線維芽細胞から炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β や IL-6 が産生され、さらにマクロファージの浸潤を誘発して連鎖的な炎症反応が起こる。この結果、血液中でも炎症性サイトカイン濃度が上昇する⁶⁹。

UVB 照射による炎症の蓄積は、初期段階で紅斑を生じ^{3,4}、表皮バリア機能を低下させ乾燥や肌荒れを起こす⁵⁻⁸、その後表皮及び真皮を肥厚させ^{9,10}、表皮及び真皮は硬直化してしわを生じさせる¹¹⁻¹³。すなわち UV 照射による過剰な炎症を抑制することは、皮膚老化を防ぐ上で重要であると考えられる。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 は、自己免疫あるいは炎症性疾患で CD4+CD25+ T 細胞によって誘発される免疫学的抑制の媒介となり^{72,73}、実験的な炎症モデルにおいてマクロファージ、滑膜細胞、T 細胞からの TNF- α と IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている⁷⁴。

そこで、分子量別プロテオグリカン画分を経口投与した皮膚老化モデルヘアレスマウスから血清と背中皮膚を採取し、それらの炎症性サイトカイン量

及び抗炎症性サイトカイン量を測定し、分子量別プロテオグリカン画分の経口投与による抗炎症作用を検証した。その結果、PG-1、PG-2でUVB照射による炎症性サイトカインの上昇を低下させることが確認され、PG-3にその効果は見られなかった。この結果は、腸管免疫を介した抗炎症作用であるとする仮説を支持した。炎症性サイトカインを下方制御するIL-10については、高分子量プロテオグリカン経口投与による影響は見られなかったことにより、IL-10の亢進による炎症性サイトカイン抑制の可能性は低いと考えられる。

また、マウス・マクロファージを用いた *in vitro* 実験において、マウス・マクロファージに分子量別プロテオグリカン画分を添加した後、LPSを添加した結果、PG-1とPG-2に炎症性サイトカイン産生を抑制する生理活性が再確認された。しかし、PG-1よりPG-2で産生抑制効果が高かったことは、ヘアレスマウス投与試験でPG-1が最も光老化抑制効果が高いことと一致しない。*in vivo* のヘアレスマウス経口投与試験と *in vitro* のマウス・マクロファージ培養系試験で大きく違う点は、*in vivo* は経口投与から腸管までの間に胃酸や消化酵素などにより構造変化を受ける可能性があることである。このことから推測すると、アグリカンであるPG-2が腸管免疫への作用が強いが、アグリカンそのものを経口摂取すると、胃酸や消化酵素によって分解される可能性がある。一方、アグリカン-ヒアルロン酸-コラーゲン複合体 (PG-1) は、そのものが自己カプセルとなって、胃酸や消化酵素によるアグリカンの分解を抑えるために、*in vivo* の経口投与試験では最も効果が高くなったのではないかと考えられた。

総合考察

弘前大学で開発された鮭鼻軟骨プロテオグリカン抽出物（SNCE）は、タンパク変性剤や酸・アルカリあるいは酵素を用いない製法により、プロテオグリカンの構造を維持し、また極めて低コストで製造できることより、産業への応用の道が開かれた。本研究では、まだ生理機能が充分解明されていないプロテオグリカンの生理機能研究として、SNCEの経口皮膚抗老化効果について研究を行なった。

第1章では、SNCEの経口摂取による皮膚抗老化の検証のため、UVB照射による皮膚老化モデルマウス評価系を構築した。ヘアレスマウスに繰返しUVB照射を行なうことにより、紅斑（炎症）の発生、表皮バリア機能低下、角層水分量低下、皮膚柔軟性及び弾力性の低下、真皮コラーゲン産生能低下、表皮及び真皮の肥厚が生じ、皮膚光老化を再現することを確認した。

第2章では、構築したUVB誘導皮膚老化モデルマウス評価系を用いて、SNCEの経口投与による皮膚抗老化効果を評価した。評価の結果、SNCEの経口投与は、UVB照射による紅斑増加、表皮バリア機能低下、表皮・真皮の肥厚を著しく抑制する結果となり、SNCEの経口投与は、皮膚の光老化を抑制する効果があることを確認した。この光老化抑制効果は、現在美容食品で汎用されているヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸と比べて高く、またマウス経口投与試験の摂取量としては、通常数 mg/day 以上であるが、SNCEは 0.175 mg/day の少量摂取量においても優れた光老化抑制効果を発揮した。本結果より、SNCEはUV照射による光老化を効果的に抑制する美容食品への応用が期待される。

第3章では、皮膚抗老化の活性成分を確認するため、イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、SNCEから3つの分子量別プロテオグリカンを分画し、第2章に準じたUVB誘導皮膚老化モデルマウス評価系を用いて、これらの3つの画分の経口投与試験を行なった。その結果、高分子量のプロテオグリカン画分であるPG-1、PG-2で皮膚光老化抑制効果があり、効果は分子量依存的で、分子量500万以上のプロテオグリカン画分（PG-1）でより強い効果が認められた。一方、分子量40万以下のプロテオグリカン画分（PG-3）は、皮膚光老化抑制効果は認められなかった。各画分の構造を考察した結果、分子量が40万～500万であるPG-2画分のほとんどはアグリカンであり、分子量40万以下であるPG-3は、アグリカンの分解物やその他のプロテオグリカンであると考えられた。アグリカンの分子量よりはるかに大きい分子量500万以上のPG-1は、ヒアルロン酸及びコラーゲンが特異的に検出されたことから、ヒアルロン酸あるいはコラーゲンとの複合体であることが推定された。すなわち、経口摂取による皮膚抗老化の本質的な活性成分はアグリカンであり、アグリカンが分解されると活性はなくなる。一方アグリカンのヒアルロン酸あるいはコラーゲンとの複合体は、皮膚抗老化を増強させることが推定された。

第4章では、高分子量プロテオグリカンの皮膚抗老化メカニズムについて検証した。分子量別プロテオグリカン画分経口投与後のUV誘導皮膚老化モデルヘアレスマウスの血清及び背中皮膚を採取し、それぞれの炎症性サイトカインを測定した結果、高分子量のプロテオグリカン画分であるPG-1とPG-2に、UVB照射による炎症性サイトカイン産生の抑制効果が確認され、PG-3による抑制効果は認められなかった。このことより、経口投与された高分子量プロテオグリカンは腸管免疫に作用して、UV照射による炎症を抑

制し、皮膚アンチエイジング効果を発揮することが示唆された。また、マウス・マクロファージを用いた *in vitro* 実験において、PG-1 と PG-2 に炎症性サイトカイン産生を抑制する生理活性が再確認され、PG-3 には抑制効果は認められなかった。しかしながら、*in vivo* でのヘアレスマウス投与試験と異なり、PG-1 より PG-2 の方が抑制効果は顕著であった。このことより、アグリカンが本質的に炎症性サイトカイン抑制効果を持ち、経口摂取の場合、アグリカン-ヒアルロン酸-コラーゲン複合体は、胃酸や消化酵素からアグリカンの分解を抑えることで、効果を発揮していることが考えられた。

弘前大学で開発され、本研究で用いた SNCE は、タンパク変性剤や、酸・アルカリあるいは酵素を用いない製法により、結果的に組織中に存在するアグリカン-ヒアルロン酸-コラーゲン複合体がそのまま抽出されていることが考えられ、そのことが経口摂取により優れた光老化抑制効果が発揮される。そのため SNCE は、精製したプロテオグリカンより経口摂取での皮膚抗老化効果に優れていることを見出した。また、低コストで製造できることから、皮膚抗老化素材として非常に優れている。またこれまで廃棄されていた鮭頭部を有効利用できるメリットもある。この“SNCE”が美容食品などの産業に応用され、高齢者の皮膚抗老化に寄与し、QOL を向上させることにより、高齢化社会でも活発な社会の実現に繋がることを願う。

また、プロテオグリカンはまだ謎の多い成分である。本研究において、高分子量プロテオグリカンが経口摂取により皮膚抗老化効果を示し、その作用メカニズムは腸管免疫を介する抗炎症効果であることを示したことは、プロテオグリカンの生理機能研究において新たな知見となる。本研究が今後のプロテオグリカンの生理機能研究が進展する一助になり、さらに新たな生理機能が見出されることを期待する。

謝辞

著者を岩手大学大学院 連合農学研究科に導いて頂き、本研究の実施にあたっては終始丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました岩手大学大学院 連合農学研究科 生物資源科学専攻 生物機能開発学連合講座 片方陽太郎先生に深く感謝の意を表します。また、副査をお引き受け頂き、本研究の審査を行なっていただき、ご助言と励ましを賜りました弘前大学 石黒誠一先生、帯広畜産大学 小嶋道之先生、岩手大学 木村賢一先生に深く感謝の意を表します。本研究に用いた鮭鼻軟骨抽出物を提供して頂き、プロテオグリカンに関してご助言を頂きました弘前大学 教育学部 食物学研究室 加藤陽治先生及び伊藤聖子研究員に深く感謝の意を表します。本研究の動物試験、細胞試験にあたり、ご助言とご協力を頂きました弘前大学 農学生命科学部 生物資源学科 前多隼人先生に深く感謝の意を表します。動物実験及び細胞実験にご協力頂きました弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科 細胞工学研究室 山崎祥他さん、木村亮太さん、三好貞徳さんに感謝申し上げます。本研究実施に当たりご協力とご支援を頂きましたサンスター株式会社 研究開発部 の山本和司部長はじめ関係者一同に感謝申し上げます。弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科 細胞工学研究室の各位には、研究のご協力やご助言を頂いただけでなく、日々の研究生活においても様々な面でご協力頂き感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Jenkins, G., Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev.*, **123**, 801-810 (2002).
- 2) 佐々木 政子, 太陽紫外線の科学. *日本皮膚科学会雑誌*, **108**, 1540-1545 (1998).
- 3) Nose, T., and Tsurumi, K., Pharmacological studies on cutaneous inflammation induced by ultraviolet irradiation (1): Quantification of erythema by reflectance colorimetry and correlation with cutaneous blood flow. *Jpn. J. Pharmacol.*, **62**, 245-256 (1993).
- 4) Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., and Muller, H. K., Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.*, **79**, 547-568 (2001).
- 5) Abe, T., and Mayuzumi, J., The change and recovery of human skin barrier functions after ultraviolet light irradiation., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **27**, 458-462 (1979).
- 6) Holleran, W. M., Uchida, Y., Halkier-Sorensen, L., Haratake, A., Hara, M., Epstein, J. H., and Elias, P. M., Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier function. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **13**, 117-128 (1997).
- 7) 正木 仁, 紫外線の皮膚への作用. *フレグランスジャーナル*, 2004年4月号, 26-33.
- 8) Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Fujimura, T., Ohuchi, A., Kitahara, T., Takema, Y., Kitzmiller, W. J., Visscher, M. O., Tsuboi, R., and Boissy, R. E., Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal

- and dermal changes in human skin xenografts. *Am. J. Pathol.*, **174**, 401-413 (2009).
- 9) Ibbotson, S.H., Moran, M. N., Nash, J. F., and Kochevar, I. E., The effects of radicals compared with UVB as initiating species for the induction of chronic cutaneous photodamage. *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 933-938 (1999).
- 10) 高下 崇, UVB 照射による皮膚硬化に対するアリピユア (α -リポ酸) の影響. *FOOD style 21*, **10**, 1-3 (2006).
- 11) Bissett, D. L., Hannon, D. P., and Orr, T. V., An animal model of solar-aged skin: historical, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367-378 (1987).
- 12) Moloney, S. J., Edmonds, S. H., Giddens, L. D., and Learn, D. B., The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem. Photobiol.*, **56**, 505-511 (1992).
- 13) Ogawa, F., and Sato, S., Roles of oxidative in photoaging and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, **29**, 349-358 (2006).
- 14) 佐田 雅宏, 研谷 啓, 抗シワ・抗老化化粧品 of 展望. *フレグランスジャーナル*, 1996 年 1 月号, 23-30.
- 15) Kligman, L. H., Akin, F. J., Kligman, A. M., Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 181-189 (1982).
- 16) Koyama, Y., Hirota, A., Mori, H., Takahara, H., Kuwaba, K., Kusubata, M., Matsubara, Y., Kasugai, S., Itoh, M., and Irie, S., Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein

- undernutrition. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **47**, 84-86 (2001).
- 17) Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., and Kasugai, S., Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, **21**, 1120-1126 (2005).
 - 18) Matsuda, N., Koyama, Y., Hosaka, Y., Ueda, H., Watanabe, T., Araya, T., Irie, S., and Takehana, K., Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **52**, 211-215 (2006).
 - 19) Tanaka, M., Koyama, Y., and Nomura, Y., Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 930-932 (2009).
 - 20) Kajimoto, O., Odanaka, W., Sakamoto, W., Yoshida, K., and Takahashi, T., Clinical effects of hyaluronic acid diet for dry skin. *J. New Rem. & Clin.*, **50**, 548-560 (2001).
 - 21) Sato, T., Sakamoto, W., Odanaka, W., Yoshida, K., and Urushibara, O., Clinical effects of hyaluronic acid diet for dry and rough skin. *Aesthetic Dermatol.*, **12**, 109-120 (2002).
 - 22) Kim, S. Y., Kim, S. J., Lee, J. Y., Kim, W. G., Park, W. S., Sim, Y. C., and Lee, S. J., Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model. *J. Am. Coll. Nutr.*, **23**, 157-162 (2004).
 - 23) Vayalil, P. K., Mittal, A., Hara, Y., Elmets, C. A., and Katiyar, S. K., Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1480-1487 (2004).
 - 24) Poole, A. A., Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *J.*

- Biol. Chem.*, **236**, 1-14 (1986).
- 25) Bulik, D. A., Wei, G., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Waldrip, W. R., Esko, J. D., Robbins, P. W., and Selleck, S. B., sqv-3, -7, and -8, a set of genes affecting morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*, encode enzymes required for glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 10838-10843 (2000).
 - 26) Hascall, V. C., Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *J. Supramol. Struct.*, **7**, 101-120 (1977).
 - 27) Heinegård, D., and Axelsson, I., Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1971-1979 (1977).
 - 28) Watanabe, H., Yamada, Y., and Kimata, K., Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem.*, **124**, 687-693 (1998).
 - 29) Hardingham, T. E., and Muir, H., Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem. J.*, **139**, 565-581 (1974).
 - 30) Buckwalter, J. A., and Rosenberg, L. C. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J. Biol. Chem.*, **257**, 9830-9839 (1982).
 - 31) Mörgelin, M., Paulsson, M., Hardingham, T. E., Heinegård, D., and Engel, J., Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem. J.*, **253**, 175-185 (1988).
 - 32) Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D., Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.*, **10**, 598-614 (1996).

- 33) Voet, D., Voet, J.G. 著, ヴォート生化学 (上) 第2版. 東京化学同人 (1996).
- 34) Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., and Yang, B. B., Structure and function of aggrecan. *Cell Res.*, **12**, 19-32 (2002).
- 35) Han, L., Dean, D., Daher, L. A., Grodzinsky, A. J., and Ortiz, C., Cartilage aggrecan can undergo self-adhesion. *Biophys. J.*, **95**, 4862-4870 (2008).
- 36) Hardingham, T. E., Fosang, A.J., Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*, **6**, 861-870 (1992).
- 37) 前田 信明, 形態形成を司るプロテオグリカン: 組織再生への応用を目指して. *細胞工学*, **20**, 1074-1083 (2001).
- 38) Toida, T., Chaidedgumjorn, A., and Linhardt, R. J., Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 29-46 (2003).
- 39) 株式会社角弘、高垣 啓一、軟骨型プロテオグリカンの精製方法、特許第 3731150 号 (2005.10.21).
- 40) 国立大学法人弘前大学、プロテオグリカンの抽出法、特開 2009-173702 (2009.8.6).
- 41) 大鹿 周差, 今 淳, 石橋 恭之, 楠 美智巳, 田中 正則, 藤 哲, 高垣 啓一, コラーゲンゲル三次元培養における軟骨由来プロテオグリカンが軟骨細胞に与える影響. *日本結合組織学会*, **36**, 88 (2004).
- 42) 藤田 沙耶花, サケ軟骨プロテオグリカンが示したヒト皮膚線維芽細胞への上皮細胞増殖因子 (EGF) 様活性. 卒業論文, 弘前大学医学部保健学科, (2006).
- 43) 吉原 秀一, 石戸 圭之輔, 一戸 和成, 工藤 大輔, 佐々木 睦男, プロテオグリカンの実験大腸炎 (デキストラン硫酸腸炎) 抑制効果. *日*

本外科学会雑誌, **102** (臨時増刊号), 647 (2001).

- 44) Ota, S., Yoshihara, S., Ishido, K., Tanaka, M., Takagaki, K., and Sasaki, M., Effects of proteoglycan on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.*, **53**, 3176-3183 (2008).
- 45) Mitsui, T., Sashinami, H., Sato, F., Kijima, H., Ishiguro, Y., Fukuda, S., Yoshihara, S., Hakamada, K., and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 209-215 (2010).
- 46) Kakizaki, I., Tatara, Y., Majima, M., Kato, Y., Endo, M., Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **506**, 58-65 (2011).
- 47) 市橋 正光, UVA の皮膚への生物学的作用と皮膚障害. フレグランスジャーナル, 1996 年 3 月号, 10-20.
- 48) 市橋 正光, 皮膚の老化とシワの形成. フレグランスジャーナル, 2004 年 5 月号, 24-30.
- 49) 横山 洋子, UVA 照射によるヒト真皮由来線維芽細胞の I 型コラーゲンおよびグリコサミノグリカンの変動—三次元培養系を用いた検討—. フレグランスジャーナル, 2004 年 5 月号, 36-39.
- 50) 川本 忠文, 非脱灰骨組織の凍結切片作成法. *Med. Technol.*, **31**, 771-777 (2003).
- 51) Abe, T., Studies on skin surface barrier functions. Transepidermal water loss and skin surface lipids during childhood. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **26**, 1659-1665 (1978).
- 52) Baker, H., The effects of dimethylsulfoxide dimethylformamide and dimethylacetamide on the cutaneous barrier to water in human skin. *J. Invest.*

- Dermatol.*, **50**, 283-288 (1968).
- 53) Bitter, T., Muir, H. M., A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962).
- 54) 福井 作蔵 著, 生物化学実験法 1 - 還元糖の定量法 第2版. 学会出版センター (1990).
- 55) 健康食品規格基準集 (その3) . 財団法人 日本健康・栄養食品協会 (1997).
- 56) Goto, M., Ito, S., Kato, Y., Yamazaki, S., Yamamoto, K., and Katagata, Y., Anti-aging effects of extracts prepared from salmon nasal cartilage in hairless mice. *Mol. Med. Report*, **4**, 779-784 (2011).
- 57) Takeuchi, Y., Matsumoto, T., Ogata, E., and Shishiba, Y., Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by mouse osteoblastic cells in culture during the mineralization process. *Biochem J.*, **266**, 15-24 (1990).
- 58) 日本生化学会 編, 新生化学実験講座 第3巻 - 糖質II (プロテオグリカンとグリコサミノグリカン) 第1版. 東京化学同人 (1991).
- 59) 日本生化学会 編, 基礎生化学実験法 第5巻 - 脂質・糖質・複合糖質 第1版. 東京化学同人 (2000).
- 60) Hodge, J. E., Hofreiter, B. T. 著, Whistler, R. I., Wolfrom, M. I. 編, Determination of reducing sugars and carbohydrates. In *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol. 1., Academic press (1962).
- 61) Goto, M., Yamazaki, S., Kato, Y., Yamamoto, K., and Katagata, Y., Anti-aging effects of high molecular weight proteoglycan from salmon nasal cartilage in hairless mice. *Int. J. Mol. Med.* (2012) in press.
- 62) Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., and Ohtsuki, K., Identification of

- food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6531-6536 (2005).
- 63) Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., and Mine, Y., Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J. Pept. Sci.*, **13**, 468-474 (2007).
- 64) Sashinami, H., Takagaki, K., and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan modulates cytokine responses to *Escherichia coli* in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 1005-1010 (2006).
- 65) Oxholm, A., Oxholm, P., Staberg, B., and Bendtzen, K., Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br. J. Dermatol.*, **118**, 369-376 (1988).
- 66) Urbanski, A., Schwarz, T., Neuner, P., Krutmann, J., Kirnbauer, R., Köck, A., and Luger, T. A., Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 808-811 (1990).
- 67) Nishimura, N., Tohyama, C., Satoh, M., Nishimura, H., and Reeve, V. E., Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice. *Immunology*, **97**, 77-83 (1999).
- 68) Nishimura, N., Reeve, V. E., Nishimura, H., Satoh, M., and Tohyama, C., Cutaneous metallothionein induction by ultraviolet B irradiation in interleukin-6 null mice. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 343-348 (2000).
- 69) Kobayashi, S., UVB-induced skin damage and the protection/treatment - effects of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative. *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**, 677-693 (2006).
- 70) Osborne-Hereford, A. V., Rogers, S. W., and Gahring, L. C., Neuronal

- nicotinic alpha7 receptors modulate inflammatory cytokine production in the skin following ultraviolet radiation. *J. Neuroimmunol.*, **193**, 130-139 (2008).
- 71) Bae, J. Y., Choi, J. S., Kang, S. W., Lee, Y. J., Park, J., and Kang, Y. H., Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.*, **19**, 182-190 (2010).
- 72) Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F., An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*, **190**, 995-1004 (1999).
- 73) Goudy, K. S., Burkhardt, B. R., Wasserfall, C., Song, S., Campbell-Thompson, M. L., Brusko, T., Powers, M. A., Clare-Salzler, M. J., Sobel, E. S., Ellis, T. M., Flotte, T. R., and Atkinson, M. A., Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J. Immunol.*, **171**, 2270-2278 (2003).
- 74) Katsikis, P. D., Chu, C. Q., Brennan, F. M., Maini, R. N., and Feldmann, M., Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, **179**, 1517-1527 (1994).