

魚由来コラーゲンペプチド摂取による

ヒト皮膚状態改善作用およびその作用機構解明

Improvement Effects on Human Skin Condition and Elucidation of Its Mechanism

Through the Intake of Fish-Derived Collagen Peptides

2025 年 2 月 15 日

小泉 聖子

目次

緒言	5
第 1 章 魚鱗コラーゲンペプチド摂取による皮膚への効果.....	10
第 1 節 目的.....	10
第 2 節 方法.....	10
第 3 節 結果.....	14
第 1 項 臨床試験全体のフローおよび血液学的・血液化学的有害事象の有無	14
第 2 項 魚鱗 CP 摂取による皮膚への包括的影響.....	17
第 4 節 考察.....	22
第 5 節 小括.....	22
第 2 章 原料部位別 CP によるヒト皮膚状態への影響	24
第 1 節 目的.....	24
第 2 節 方法.....	25
第 3 節 結果.....	28
第 1 項 臨床試験全体のフローおよび血液学的・血液化学的有害事象の有無	28
第 2 項 魚鱗 CP・魚皮 CP 摂取による皮膚状態への影響.....	30
第 3 項 皮膚科学的評価への影響	37
第 4 節 考察.....	39
第 5 節 小括.....	39
第 3 章 魚鱗 CP 摂取による皮膚中最終糖化産物への影響	40
第 1 節 目的.....	40
第 2 節 方法.....	41
第 3 節 結果.....	43
第 1 項 臨床試験全体のフロー	43
第 2 項 血液学的・血液化学的および最終糖化産物量への影響.....	44
第 4 節 考察.....	47
第 5 節 小括.....	48
第 4 章 <i>In vitro</i> 試験による皮膚への作用機構検討	49
第 1 節 線維芽細胞における新生コラーゲン合成、ヒアルロン酸産生、エラスチン合成遺伝子 発現評価	50

第1項 目的	50
第2項 方法	50
第3項 結果	54
第4項 考察	57
第2節 UV照射時による線維芽細胞のコラーゲン合成遺伝子、ヒアルロン酸合成遺伝子、エラスチン合成遺伝子発現評価	58
第1項 目的	58
第2項 方法	58
第3項 結果	60
第4項 考察	63
第3節 表皮角化細胞における保湿性関連遺伝子発現評価	64
第1項 目的	64
第2項 方法	65
第3項 結果	66
第4項 考察	67
第4節 表皮角化細胞におけるターンオーバー関連遺伝子発現評価	68
第1項 目的	68
第2項 方法	69
第3項 結果	70
第4項 考察	71
第5節 <i>in vitro</i> 試験におけるCPのスーパーオキシドディスムターゼ様活性評価	72
第1項 目的	72
第2項 方法	72
第3項 結果	72
第4項 考察	74
第6節 表皮角化細胞におけるエンドセリン1遺伝子発現抑制評価	75
第1項 目的	75
第2項 方法	75
第3項 結果	76
第4項 考察	76
第7節 <i>in vitro</i> 試験におけるCPのチロシナーゼ活性抑制評価	77
第1項 目的	78
第2項 方法	78
第3項 結果	80
第4項 考察	80
第8節 <i>in vitro</i> 試験におけるドーバクロムトートメラゼ遺伝子発現抑制評価	81

第 1 項 目的	81
第 2 項 方法	81
第 3 項 結果	82
第 4 項 考察	82
第 9 節 小括	83
第 5 章 総括	84
謝辞	87
References	88

略語一覧

ACE	: Angiotensin-converting enzyme、アンジオテンシン変換酵素
AD	: Adult、成人
AGEs	: Advanced Glycation Endproducts、最終糖化産物
ALP	: Alkaline phosphatase、アルカリホスファターゼ
ALT	: Alanine transaminase、アラニンアミノトランスフェラーゼ
AQP3	: Aquaporin 3、アクアポリン 3
AST	: Aspartate aminotransferase、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A.U.	: Arbitrary Unit、任意の単位
baPWV	: Brachial-ankle pulse wave velocity、上腕足首脈波伝播速度
BMI	: Body Mass Index、体格指数
Bil	: Bilirubin、ビリルビン
BUN	: Blood urea nitrogen、尿素窒素
CE	: Cornified envelope、コーニファイドエンベロープ
Change rate	: 変化率(%)、 $\text{Change rate (\%)} = (\text{After 12 weeks} - \text{Baseline}) / \text{Baseline} \times 100$ で計算
CP	: Collagen peptide、コラーゲンペプチド
CPK	: Creatinine phosphokinase、クレアチンホスホキナーゼ
DCT	: Dopachrome tautomerase、ドーパクロムトートメラーゼ
DHICA	: 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid、5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸
DPP4	: Dipeptidyl Peptidase-4、ジペプチジルペプチダーゼ-4
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルフリーラジカル
ECM	: Extracellular matrix、細胞外マトリックス
ELISA	: Enzyme-linked immuno-sorbent assay、酵素結合免疫吸着測定法

ET-1	: Endothelin-1、エンドセリン1
FBS	: Fasting blood glucose、空腹時血糖値
FDA	: Food and Drug Administration、アメリカ食品医薬品局
GLP-1	: Glucagon-like peptide 1、グルカゴン様ペプチド 1
Gly	: Glycine、グリシン
GOT	: Glutamic Oxaloacetic Transaminase、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
GPO	: Gly-Pro-Hyp、グリシルプロリルヒドロキシプロリン
GPT	: Glutamic pyruvic transaminase、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
GRAS	: Generally Recognized As Safe、一般的に安全と認められている素材
HbA1c	: Hemoglobin A1c、ヘモグロビン A1c
HCP	: Di- and tripeptide high containing collagen peptides、魚鱗ジ・トリペプチド高含有 CP、 HCP、重量平均分子量 800Da、製品名 DI-PEPTIDE Fish、製品中に Hyp 含有ジ・トリペ プチド量を $\geq 8,000$ ppm 含有
HOMA-R	: Homeostasis model assessment of insulin resistance、インスリン抵抗性指数
Hyp	: Hydroxyproline、ヒドロキシプロリン
IQR	: Interquartile range、四分位範囲
IRB	: Institutional Review Board、倫理審査委員会
IRI	: Insulin、インスリン
ITT	: Intention-to-treat 法
Ivl	: Involucrin、インボルクリン
KRT1	: Keratin-1、ケラチン 1
KRT10	: Keratin-10、ケラチン 10
LAP	: Leucine Aminopeptidase、ロイシナムミノペプチターゼ
LCP	: di- and tripeptide low containing collagen peptides、魚鱗ジ・トリペプチド低含有 CP、

LCP、重量平均分子量 6,000Da、製品名 KER-30DR、製品中に Hyp 含有ジ・トリペプチド量を 50 ppm 含有

LDH : Lactate dehydrogenase、乳酸脱水素酵素

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine、L-ドーパ

MAP : Mean arterial pressure、平均動脈圧

MCH : Mean corpuscular hemoglobin、平均赤血球ヘモグロビン

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration、平均赤血球ヘモグロビン濃度

MCV : Mean corpuscular volume、平均赤血球体積

NB : New Born、新生児

NMF : Natural moisturizing factor、天然保湿因子

OG : Hyp-Gly、ヒドロキシプロリルグリシン

PBS : Phosphate-buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水

PO : Pro-Hyp、プロリルヒドロキシプロリン

PR : Pulse rate、脈拍数

Pro : Proline、プロリン

QoL : Quality of life、生活の質

RBC : Red blood cells、赤血球

RH : Relative humidity、相対湿度

ROS : Reactive oxygen species、活性酸素種

RT-qPCR : Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction、定量的逆転写 PCR

SE : Standard error、標準誤差

SD : Standard deviation、標準偏差

SOD : Superoxide dismutase、スーパーオキシドシスムターゼ

T. Cholesterol : Total cholesterol、総コレステロール

TEWL : Transepidermal water loss、経皮蒸散水分量

T. Protein : Total protein、総タンパク質

T2D : Type 2 diabetes、糖尿病

TGM1 : Transglutaminase-1、トランスグルタミナーゼ 1

UA : Uric acid、尿酸

UV : Ultraviolet、紫外線

WBC : White blood cells、白血球

γ -GTP : γ -glutamyltransferase、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ

緒言

コラーゲンは、水に難溶性の三重らせん状の繊維構造をしたタンパク質として動物の皮や骨などの中に存在している。このコラーゲンを水の中で長時間加熱すると、熱により三重らせん構造がほどけ、水溶液中に変性したコラーゲンが溶け出てきたものがゼラチンである。ゼラチンの溶液は、加熱すると流動性のある液体(ゾル状態)であるが、冷却するとゼラチン分子の一部が元のコラーゲンの状態に戻ろうとしゼリー状に固まる(ゲル状態)。ゼラチンは、加熱と冷却によりゾル-ゲル変化を可逆的に繰り返すという物理的に熱可逆的な性質が特徴である。

人間がコラーゲンやゼラチンを利用するようになったのは古代エジプトからと言われている。当時は動物の皮や骨を煮詰めて作った「膠(にかわ)」が接着剤として利用された。その後、中国ではロバの皮を水で加熱抽出して作られる「阿膠」が漢方として使われるようになった。約 2,500 年前に書かれた中国最古の医学書『五十二病方』に、「膠を煮る時は清水で煮、その量が一挺半(当時の単位)になるまで煮る。膠は溶かせば澄んでくるのである」として漢方の製造方法が記載されており、『神農本草経』や『本草綱目』『中華人民共和国薬典』に至るまで、数々の著書に記載されており、コラーゲンは古代より製造されていたことがわかる。

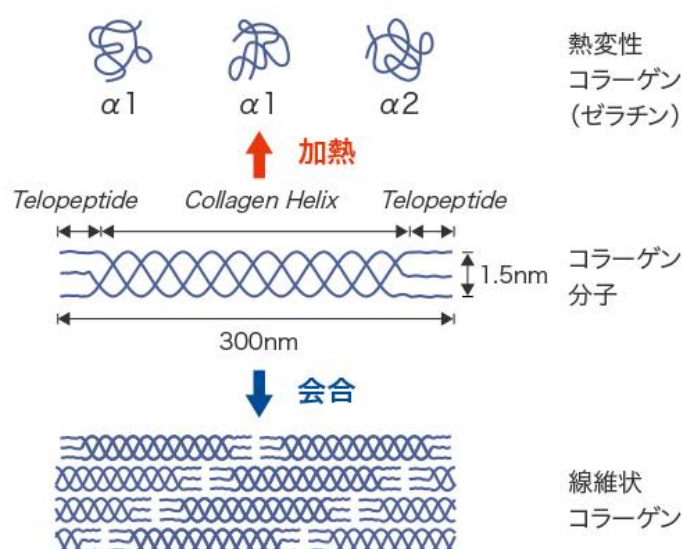


図 1 コラーゲンの構造

構造的観点から見ると、図 1 のように、2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖の 3 本鎖から成り立っており、すべての α 鎖はトリペプチドであるグリシン (Gly)-アミノ酸 X-アミノ酸 Y の繰り返しからなる、アミノ酸約 1,000 残基の 3 重らせん形成領域を持っている。この X 位には、プロリン (Pro)、Y 位には、プロリンが水酸化されたヒドロキシプロリン (Hyp) が高頻度で配置する。この Pro や Hyp が存在することによって、コラーゲンは 3 重らせん構造を取ることができるとされている。一般的に、この Hyp はコラーゲンに特異的なアミノ酸であり、コラーゲン量は Hyp 量を指標に測定される場合もある。

コラーゲンやゼラチンなどをはじめ高分子のタンパク質はそのまま腸管から吸収し、生体内利用することはできない。コラーゲンは他のタンパク質と同様に、体内酵素などによってある程度の分子量まで分解してから吸収される[1]。健康食品においては、有効成分を効率的に摂取できるよう高濃度で配合し、経口摂取するのは食感などから難しい場合がある。ゼラチンの場合には、あらかじめ酵素で低分子化したコラーゲンペプチド (Collagen peptide, CP) が好まれる。摂取しやすい形態として現在、一般的に健康食品で「コラーゲン」と称して販売されている商品に含まれるものは、この「コラーゲンペプチド」である。なお、このようなコラーゲンペプチドの品質や名称についての法的な規制はなく、日本ゼラチン・コラーゲン工業組合より品質の自主規格が示されている。また用語についても混乱を避け、不適切な表現を防止する趣旨により、「コラーゲンペプチド」の他に、「ゼラチンペプチド」、「ゼラチン加水分解物」、「ゼラチン分解物」、「コラーゲン加水分解物」、「コラーゲン分解物」、「低分子ゼラチン」、「水溶性ゼラチン」などの表示例が推奨されている。

一方、世界のゼラチン・コラーゲン市場は堅調に伸び、2021 年時点では 4,787 百万米ドル市場であると言われており、世界においてもゼラチン・コラーゲンを原料とした製品の消費が増えている。国内市場においては、コラーゲン入りを謳った飲料や健康食品が数多く販売されており、特に美容に関する分野での関心が高い。この理由として、皮膚の構成成分である「コラーゲン」が健康食品や化粧品に配合され、皮膚の材料となるであろうというイメージと、実際に利用者の皮膚の状態が改善したという体感性が得られているため、美容領域での認知が広まったと考えられる。コラーゲンは、皮膚や関節に対する効果を利用者が実感しやすいことや、多くの研究により、食品として

体中に取り込まれた特異的なコラーゲンペプチドの構造とそれが機能を発揮するメカニズムに関しても、後付的ではあるが、徐々に明らかとなってきた。さらに、保健機能食品制度の一つである機能性表示制度(2015 年 4 月～)に関心のある消費者がエビデンス重視型へと移行しているため、機能性に関するエビデンスを得ることが必要不可欠となってきた。海外においても、コラーゲンはタンパク質の一つだけではなく、機能性も重要視され、それに伴う臨床試験も数多く報告されている[2-10]。このことから、コラーゲンに関するエビデンスを得ること、更にはそのメカニズムを解明することは必須であり、これらを研究によって明らかにすることは重要である。

食品としての安全性では、食経験が十分にあるだけでなく、健常人において、魚由来のコラーゲン、ゼラチン、および CP を摂取して毒性がみられた報告もない。ラットを用いた 2 年間の経口投与による毒性試験では、最大 8.6 g/kg(体重)/日まで悪影響はなく、モルモットを用いた染色体異常とアレルギー感作では、魚由来 CP の影響は確認されていない[11]。また、Food and Drug Administration(FDA)は Docket Number 77N-0232 にて、ゼラチンが Generally Recognized As Safe (GRAS)であることを宣言している[12]。このように、CP の原料であるゼラチンが安全であることが証明され、加水分解するための酵素が食品添加物用であることを鑑みれば、十分な安全性が担保できていると言える。

しかしながら、独立行政法人 国立健康・栄養研究所による「健康食品」の安全性・有効性情報(2020 年)では、CP はアレルギーを誘発する可能性があり、妊娠中・授乳中の安全性についての十分なデータがないためサプリメントの使用は避けることとしている(<https://hfnet.nibiohn.go.jp/column/detail2204/>)。また、アレルギー物質の表示では、特定原材料に準ずるものとして「ゼラチン」がある。このように、一部の対象者への使用にあたっては注意が必要だが、基本的には十分に安全が確認されている素材である。

CP の機能性を考える上でもっとも重要なのは、生体吸収された後の挙動についてである。CP を経口摂取すると、Hyp を含む CP 由来のジペプチドやトリペプチドがヒト血中に吸収、検出される。そのジペプチドやトリペプチドは、生体内で分解されにくく、血中に数時間存在することが報告され

ている[13-19]。また、CP 摂取量に依存的し、血中に移行するジペプチドやトリペプチドには、Pro-Hyp (PO) や Hyp-Gly (OG)をはじめ、Ala-Hyp、Ala-Hyp-Gly、Pro-Hyp-Gly、Leu-Hyp、Ile-Hyp、Phe-Hyp の形で存在すると報告されている[15,17]。特に、PO は摂取後 60～120 分で血中濃度がピークに達し、最大血中濃度は 1～60 μM である[17]。OG では摂取 60 分後に血中濃度がピークに達し、最大血中濃度は 1～4 μM で存在し、比較的長時間高い濃度で維持されている[15]。

また、血中移行したコラーゲンやゼラチンは摂取後 24 時間以内に PO や Gly-Pro-Hyp(GPO)の形で尿排出される[14,18]。Pro や Hyp を含むペプチド体は、生体内の消化酵素への分解抵抗性[13]があるため、アミノ酸まで分解されることなく、標的組織まで届き、ペプチドトランスポーターを介して細胞内に吸収され、効果を発揮すると考えられる。Kawaguchi らは、安定同位体 ^{14}C でラベル化した PO 摂取をマウスに摂取させることによって、30 分以降から各臓器および皮膚への移行していることを報告している[19]。このように、コラーゲンは、特有の構造を維持したままのペプチドとして吸収されることが明らかにされている。また、CP は体外へ速やかに排出されること[14,18]も示され、長期蓄積できないため、CP の機能性を発揮するためには、毎日定期的な摂取が必要であると考えられている。これを起点とし、CP の機能性研究がより発展することとなった。

また、皮膚への機能性として、Proksch らは、35～55 歳の女性 69 人に、2.5 g または 5.0 g の CP を 8 週間摂取させたところ、皮膚の水分量や弾力性、経皮蒸散水分量、皮膚の荒れは、前後比較では改善するものの、プラセボ群と比較し有意差はなかった[2,3]。Sugihara らは、35～55 歳の皮膚に悩みを持つ女性を対象に、5 g の CP を 8 週間摂取させたところ、UV Spot つまり、皮膚の奥にある隠れシミを有意に減少させたと報告している[6]。しかし、本研究が目的とした皮膚の保湿性、弾力性、シワなど包括的な評価の報告はない。また、CP によるシミへの抑制効果に関するメカニズムも報告されていない。

本研究では、CP の皮膚への包括的な効果を検証するため臨床試験を行い、*in vitro* 試験にて皮膚への作用機構解明を行った(図 2)。第 1 章では、臨床試験において魚由来 CP 摂取することによって皮膚の保湿・弾力性・シワ抑制などの包括的な効果を検証した。また、第 2 章では、原料

違いによる CP を用いて皮膚状態への効果の違いを臨床試験にて検証した。さらに、第 3 章では、CP を摂取することによって皮膚の老化を左右する皮膚中最終糖化産物 (AGEs) の抑制により、皮膚の保湿性、弾力性、シワ抑制に寄与している可能性を検証した。第 4 章では、*in vitro* 試験において、真皮および表皮角化細胞における保湿性因子、弾力性因子の促進、抗酸化因子の促進、表皮ターンオーバー促進、メラニン合成経路における因子抑制を評価し、作用機構解明を行った。

CP 摂取によって皮膚状態が改善することは消費者の QoL を上昇させ、さらには、魚皮 CP を魚鱗 CP と同等の機能性を見いだすことは、廃棄原料の有効利用の幅を広げ、SDGs やサステナビリティの観点からも社会へ貢献できる。

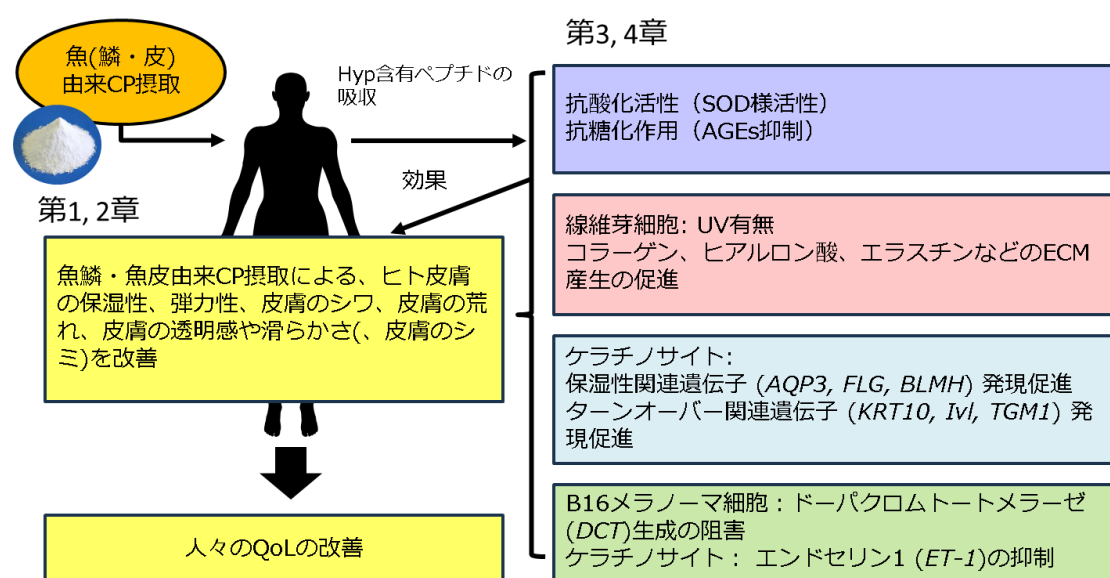


図 2 魚由来コラーゲンペプチド摂取による皮膚状態改善への作用機構

第1章 魚鱗コラーゲンペプチド摂取による皮膚への効果

第1節 目的

緒言で述べたように CP を 2.5～10 g/日で 8～24 週間摂取することによって、皮膚の弾力性、水分量、経表皮水分蒸散量、さらには皮膚荒れが改善することが数多く報告されている[2-6]が、皮膚への効果として保湿性や弾力性、シワ抑制効果のそれぞれの項目において有意な効果が得られはしたものの、すべての項目において包括的に有意差が得ることができていなかった。このことから、本試験は、魚鱗 CP 摂取によって、これらの保湿性・弾力性・シワ抑制など包括的に有意な差が得られることができるかどうかを検証するために実施した。

第2節 方法

プロトコールは Elead Institutional Review Board (IRB) に提出され、2015 年 1 月 31 日の承認後に研究を実施した (IRB 番号:EL-150113018A002)。この研究はヘルシンキ宣言の倫理原則に従って実施され、2015 年 2 月から募集を開始し、5 月まで無作為化プラセボ対照二重盲検試験を実施するものである。

被験者は、年齢 30～60 歳代の女性とし、血液検査により健康であることが確認され、重度の急性腎臓病、心臓病、その他の慢性疾患の検査では陰性であり、化粧品、医薬品、健康機能性食品、または通常の日光曝露に対するアレルギーや皮膚過敏症はないことを確認した。その後、コラーゲンペプチドもしくはプラセボの 2 群にランダムに割り当てた。2015 年 2 月から 5 月までの同じ時点で、12 週間にわたって 1 日 1 回被験食品を摂取させた。皮膚状態の評価は摂取開始後、6 週目および 12 週目に評価した。被験者に対しては、試験中、試験エリアにおいて所定の化粧品以外の化粧品の使用を禁止し、テストに影響を与える可能性のあるマスク、マッサージ、皮膚の剥離剤、レーザーなどのスキンケアおよび紫外線への過度の曝露も禁止した。

魚鱗 CP 群には、20 mL の飲料製品中に 3,000 mg の魚鱗 CP (ニッタゼラチンインディア株式会社製 (インド)、重量平均分子量 3,000Da) を含有した飲料を摂取させた。プラセボ群には、20 mL

のコラーゲンペプチド不含有飲料を用いた。この飲料の色と匂いは、魚鱗 CP 含有飲料とほぼ同等になるように香料と着色剤を加えた(表 1)。

表 1 被験飲料の組成(20 mL 飲料中)

	魚鱗 CP 飲料	プラセボ飲料
エネルギー (kcal)	18.3	6.2
タンパク質 (g)	3.0	0.0
炭水化物 (g)	1.9	1.9
脂質 (g)	0.0	0.0
ナトリウム (mg)	3.3	3.3

皮膚の評価は、摂取前(Baseline)、摂取後 6、12 週間後の 3 回測定した。被験者は顔の化粧を落とし、30 分間温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 ± 10 相対湿度%(RH)の一定の環境に慣らした後、皮膚評価を行った。眼窩周囲の皮膚状態については、シリコンキットを使用して、眼窩周囲のレプリカを作成した。レプリカの作成は、粘着性のあるプラスチックのフレームを眼窩周囲のシワの周りに貼り付け、シリコンを塗布した後に行った。このレプリカは、Skin-Visiometer SV600 (Courage & Khazaki、ドイツ。レプリカを通過する光の強度の分析により皮膚状態を評価[20])を使用して分析した。通過光は、CMOS センサーで測定され、画像解析ソフトウェアを使用して分析され、Lambert & Beer's 法則によって計算された。レプリカは図 3 のように R1:深さ、最高峰と最低谷間の距離、R2:最大の粗さ、R3:平均粗さ、R4:滑らかさ、R5:平均粗さの 5 つで評価した(皮膚の弾力指標と区別するため、結果の表においては WL R1、WL R2、WL R3、WL R4、WL R5 と表記)。また、各被験者の目尻の写真撮影し評価した。

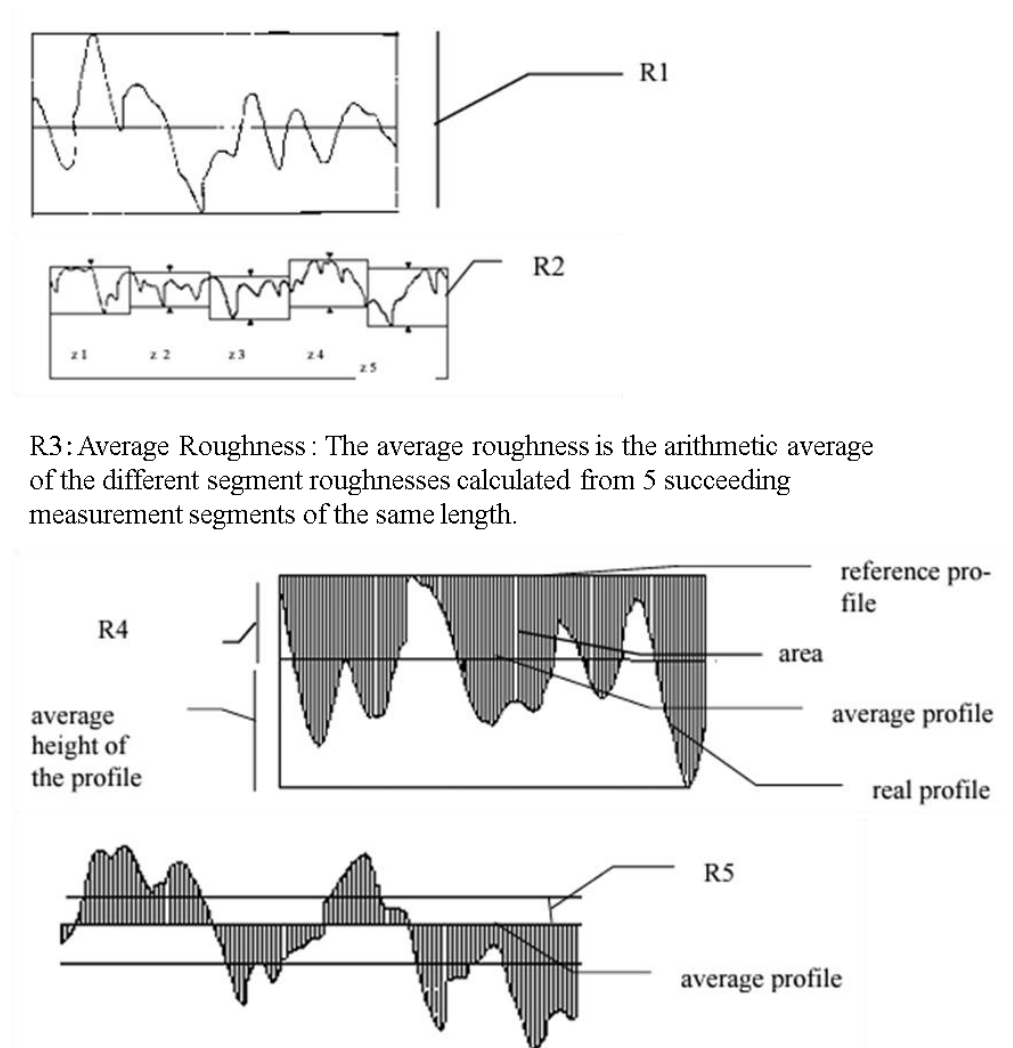


図 3 Visiometer Roughness 評価方法 (CK electronic GmbH 社パンフレット抜粋)

頬の皮膚水分含量は、皮膚表面で分離された電極間の誘電率の静電容量を測定する Corneometer CM825 (Courage & Khazaki、ドイツ) を用いて評価した。3 回測定し平均値を用いた。

頬の皮膚の弾力性は、Cutometer MPA580 (Courage & Khazaki、ドイツ) を用いた。本機器は、皮膚をプローブ (2 mm φ プローブ) の開口部内に減圧により吸引し、規定の時間が経過した後に再び常圧に戻すことにより皮膚を解放し、吸引されていた皮膚の戻り速度などを計算して評価するものである。測定は、モード 1、450 mbar の一定吸引、2 秒の吸引時間と 2 秒の緩和時間で測定し、

図 4 のように機器測定マニュアルに従い、R2、R5、R7 の皮膚の弾力性に関するパラメータを評価し、3 回の平均値を用いた。

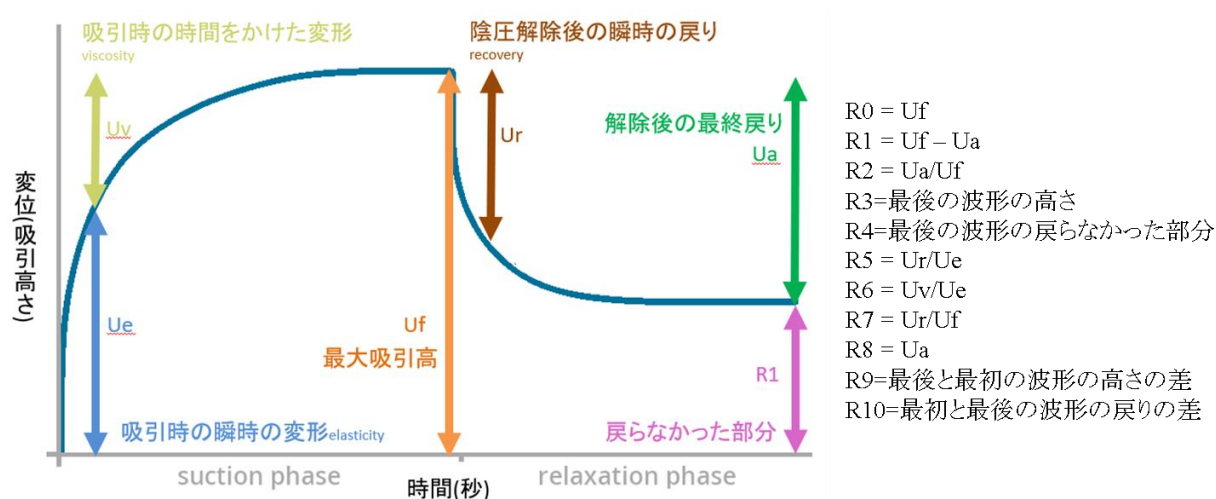


図 4 Cutometer の評価方法

血液検査は、総タンパク質 (T. Protein)、アルブミン (Albumin)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP)、ビリルビン (Bil)、クレアチニン、総コレステロール (T. Cholesterol)、グルコース (Glucose)、ヘモグロビン (Hemoglobin)、ヘマトクリット (Hematocrit)、白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、血小板 (Platelet)、平均赤血球体積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン (MCH)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の項目で実施した。

統計処理として、研究結果は Intention-to-treat (ITT) 法により分析した。ITT 法には、製品摂取後に少なくとも 1 回安全性評価を受けた被験者の結果を含む。統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (自治医科大学埼玉医療センター、埼玉、日本、ver. 1.68) を使用した。EZR を用い、反復測定二次元配置分析を実施した。また、事後検定として群内比較は、対応のある t 検定、群間比較は Tukey test を実施した。有意水準は 95% 信頼水準で、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

第3節 結果

第1項 臨床試験全体のフローおよび血液学的・血液化学的有害事象の有無

臨床試験全体のフローを図5に示す。被験者80名のうち3名が辞退を希望したため参加から除外した。残りの77人の被験者は魚鱗CP飲料またはプラセボ飲料のいずれかを摂取した(魚鱗CP群: 39名、プラセボ群: 38名)。さらに6人の被験者が個人的な理由で製品摂取後に研究から脱落した(魚鱗CP群:2人、プラセボ群:4人)。最終的に71人の被験者がこの研究を完了した(魚鱗CP群: 37人、プラセボ群: 34人)。

表2 被験者の情報

群	被験者数			12週時の平均年齢	体重 (kg)
	摂取前	脱落者	12週目		
プラセボ群	38	4	34	47.37 ± 4.36	57.08 ± 6.35
魚鱗CP群	39	2	37	46.49 ± 5.74	56.19 ± 7.16
Mean ± SD					

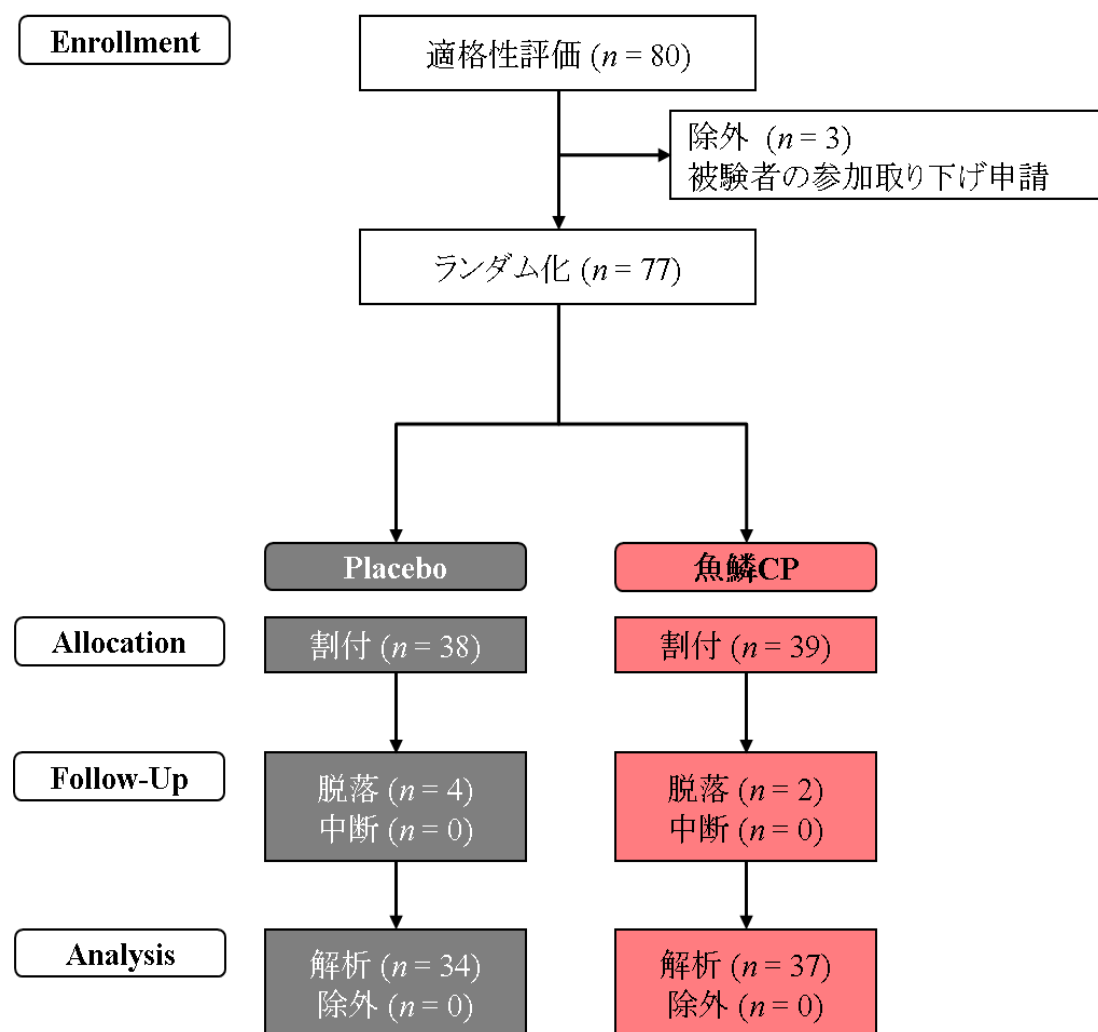


図 5 臨床試験全体のフロー

両群ともに重篤な有害事象、薬物有害反応、その他の有害事象による早期終了はなかった。両群の血液検査の結果は、すべて正常範囲内であった(表 3)。

表 3 血液学的・血液化学的検査

	Placebo (n = 34)		魚鱗 CP (n = 37)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
T. Protein (g/dL)	7.58 ± 0.41	7.26 ± 0.39	7.50 ± 0.34	7.13 ± 0.28
Albumin (g/dL)	4.57 ± 0.19	4.51 ± 0.22	4.63 ± 0.18	4.56 ± 0.21
AST (U/L)	23.6 ± 4.53	17.8 ± 4.40	21.4 ± 3.79	17.1 ± 3.93
ALT (U/L)	19.9 ± 8.54	14.1 ± 6.66	16.4 ± 5.27	13.4 ± 5.85
γ-GTP (U/L)	13.4 ± 6.17	14.6 ± 5.77	14.2 ± 9.70	14.6 ± 8.59
Bil (mg/dL)	13.4 ± 3.19	13.1 ± 3.17	12.1 ± 2.73	12.1 ± 2.84
Creatinine (mg/dL)	0.54 ± 0.08	0.65 ± 0.09	0.56 ± 0.08	0.65 ± 0.08
T. Cholesterol (mg/dL)	187 ± 24.9	189 ± 24.8	183 ± 23.7	183 ± 26.1
Glucose (mg/dL)	89.1 ± 6.49	86.9 ± 7.45	89.1 ± 9.70	85.4 ± 7.44
Hemoglobin (g/dL)	12.8 ± 0.81	12.9 ± 1.09	13.1 ± 0.99	12.9 ± 1.05
Hematocrit (%)	38.3 ± 2.19	40.3 ± 2.91	39.1 ± 3.10	40.6 ± 3.13
WBC (/μL)	5.92 ± 1.30	5.45 ± 1.22	5.49 ± 1.52	5.51 ± 1.22
RBC (Mil/μL)	4.21 ± 0.23	4.32 ± 0.27	4.27 ± 0.35	4.30 ± 0.31
Platelet (/μL)	234 ± 50.5	233 ± 44.3	233 ± 54.2	253 ± 46.5
MCV (fL)	91.0 ± 4.32	93.0 ± 4.51	91.5 ± 4.32	94.5 ± 4.62
MCH (pg)	30.5 ± 1.85	29.7 ± 1.73	30.6 ± 1.72	30.0 ± 1.71
MCHC (%)	33.5 ± 0.69	31.9 ± 1.01	33.5 ± 0.63	31.8 ± 0.85

Mean ± SD

第 2 項 魚鱗 CP 摂取による皮膚への包括的影響

皮膚の水分量及び弾力、皮膚の粗さに関する包括的な評価結果として、平均値および標準偏差を表 4 に示し、それらの変化量の平均値および標準偏差を表 5 に示した。

眼窩周囲の皮膚の粗さは、12 週間後の魚鱗 CP 群では、皮膚の粗さを示す項目の WL R1、WL R2、WL R3、WL R4 が摂取前と比較して統計的に有意に減少した。また、WL R1、WL R3、WL R4 は、12 週間後にプラセボ群と比較して有意に減少した。図 6 に示す被験者では、プラセボ群は、シワ容積を減少させなかったが、魚鱗 CP 群では摂取前および摂取 12 週間後の眼窩周囲のシワ容積を視覚的に減少させた。

頬の皮膚水分量は、魚鱗 CP 群において摂取前と比較し 6、12 週間後に有意に増加した。また、プラセボ群と比較して 12 週間後に魚鱗 CP 群が統計的に有意に増加した。

頬の皮膚の弾力は、摂取前と比較し、魚鱗 CP 群で 6、12 週間後に弾力性を示す R2、R5、R7 が統計的に有意に増加した。また、R2、R5、および R7 は、プラセボ群と比較して、変化量(表 5)において 6、12 週間後に魚鱗 CP 群が有意に増加した。

表 4 皮膚状態の機器評価結果

												<i>p</i> value vs. Placebo			
		Baseline			Week 6			Week 12				Baseline	Week 6	Week 12	
Periorbital wrinkles															
WL R1	Placebo	0.144	±	0.028	0.148	±	0.030		0.149	±	0.029	*	—	—	—
	魚鱗 CP	0.138	±	0.024	0.140	±	0.025		0.133	±	0.019	**	0.3380	0.2070	0.0062 ##
WL R2	Placebo	0.109	±	0.017	0.109	±	0.018		0.109	±	0.016		—	—	—
	魚鱗 CP	0.106	±	0.015	0.106	±	0.015		0.103	±	0.012	*	0.3240	0.4520	0.0573
WL R3	Placebo	0.083	±	0.011	0.082	±	0.010		0.082	±	0.011		—	—	—
	魚鱗 CP	0.082	±	0.010	0.079	±	0.010		0.078	±	0.008	***	0.5020	0.2640	0.0416 #
WL R4	Placebo	0.064	±	0.017	0.069	±	0.021	*	0.068	±	0.018	*	—	—	—
	魚鱗 CP	0.062	±	0.013	0.063	±	0.015		0.059	±	0.011	*	0.5400	0.1530	0.0142 #
WL R5	Placebo	0.019	±	0.006	0.020	±	0.009		0.020	±	0.007		—	—	—
	魚鱗 CP	0.018	±	0.006	0.018	±	0.007		0.018	±	0.006		0.6160	0.2660	0.1300
Skin moisture	Placebo	49.25	±	6.947	50.14	±	6.756		51.44	±	6.539	**	—	—	—
	魚鱗 CP	49.77	±	7.329	53.06	±	7.575	***	55.05	±	7.880	***	0.7530	0.0828	0.0402 #
Skin elasticity															
R2	Placebo	0.740	±	0.050	0.737	±	0.055		0.743	±	0.054		—	—	—
	魚鱗 CP	0.734	±	0.046	0.748	±	0.045	***	0.762	±	0.047	***	0.6040	0.3290	0.1190
R5	Placebo	0.492	±	0.067	0.492	±	0.067		0.494	±	0.069		—	—	—
	魚鱗 CP	0.488	±	0.063	0.512	±	0.060	***	0.518	±	0.066	***	0.8280	0.1740	0.1420
R7	Placebo	0.350	±	0.047	0.354	±	0.046	***	0.356	±	0.052	***	—	—	—
	魚鱗 CP	0.346	±	0.047	0.361	±	0.045	***	0.368	±	0.051	***	0.7320	0.5020	0.3280

単位: Arbitrary Unit, Mean ± SD, ITT 分析、反復測定二次元配置分析の事後検定として群内比較は対応のある *t* 検定、群間比較は Tukey test を実施,

* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001: vs Baseline

p < 0.05; ## *p* < 0.01: vs Placebo

Periorbital wrinkles : WL R1~R5 値が低いほど、皮膚の粗さが低いことを示す

Skin moisture: 値が高いほど、皮膚水分量が高いことを示す, Skin elasticity: R2, R5, R7 値が 1 に近いほど、皮膚弾力性が高いことを示す

表 5 皮膚状態の機器評価結果(変化量)

								<i>p</i> value vs Placebo	
	Group	Week 6			Week 12			Week 6	Week 12
Periorbital wrinkles									
WL R1	Placebo	2.01	±	8.69	3.70	±	8.15	-	-
	魚鱗 CP	1.17	±	7.82	-4.09	±	7.82	0.3610	0.0011 ##
WL R2	Placebo	-1.84	±	6.75	-0.99	±	7.43	-	-
	魚鱗 CP	0.10	±	8.79	-3.02	±	8.79	0.4800	0.0917
WL R3	Placebo	-1.60	±	5.25	-1.50	±	7.74	-	-
	魚鱗 CP	-2.26	±	9.08	-5.12	±	9.08	0.5910	0.1650
WL R4	Placebo	6.57	±	17.8	8.72	±	19.7	-	-
	魚鱗 CP	0.58	±	16.9	-4.20	±	16.9	0.0927	0.1400
WL R5	Placebo	5.88	±	28.7	11.27	±	32.2	-	-
	魚鱗 CP	-1.35	±	18.6	-0.45	±	18.6	0.1060	0.2610
Skin moisture									
	Placebo	1.86	±	6.11	4.02	±	7.62	-	-
	魚鱗 CP	6.65	±	8.80	10.9	±	8.80	0.0092 ##	0.0007 ###
Skin elasticity									
R2	Placebo	-0.26	±	2.67	0.94	±	3.95	-	-
	魚鱗 CP	2.27	±	3.00	4.32	±	3.00	0.0003 ###	0.0420 #
R5	Placebo	0.32	±	5.29	0.57	±	4.88	-	-
	魚鱗 CP	4.86	±	4.73	6.54	±	4.73	0.0001 ###	0.0102 #
R7	Placebo	1.74	±	5.43	2.03	±	8.10	-	-
	魚鱗 CP	4.81	±	4.74	6.81	±	4.74	0.0099 ##	0.0335 #

変化量=Week 6 - Baseline もしくは Week 12 - Baseline、単位:Arbitrary Unit、Mean ± SD

ITT 分析、反復測定二次元配置分析の事後検定として、群間比較を Tukey test にて実施、

$p < 0.05$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$: vs Placebo

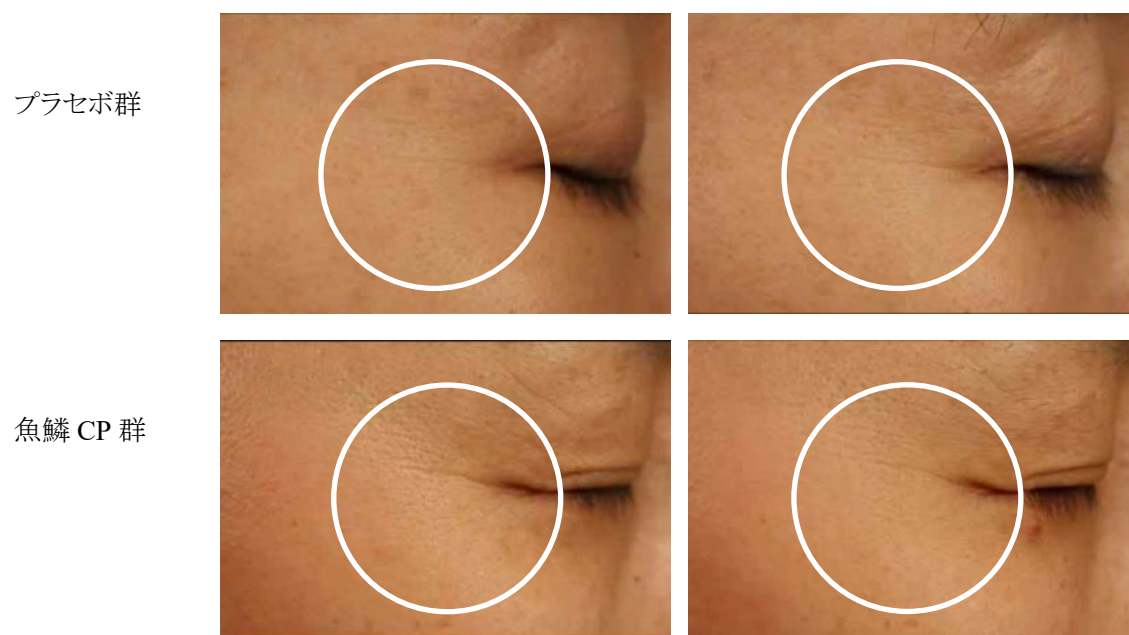


図 6 被験者の写真による評価

表 6 統計検定結果

		Group		Time		Group × Time			
		<i>f</i> value	<i>p</i> value	<i>f</i> value	<i>p</i> value	<i>f</i> value	<i>p</i> value		
Wrinkle	WL R1	2.28	0.136	2.36	0.099	9.81	0.000	***	
	WL R2	1.60	0.210	2.99	0.053	1.83	0.165		
	WL R3	1.75	0.190	7.36	0.001	2.13	0.123	***	
	WL R4	1.89	0.174	1.15	0.320	4.52	0.013	*	
	WL R5	0.53	0.471	0.15	0.859	2.59	0.078		
Wrinkle	WL R1 変化量	17.4	0.000	3.65	0.028	4.37	0.014	***	*
	WL R2 変化量	1.28	0.261	0.57	0.565	2.19	0.116		
	WL R3 変化量	4.05	0.048	1.56	0.213	0.72	0.490	*	
	WL R4 変化量	10.0	0.002	1.83	0.164	0.84	0.433	**	
	WL R5 変化量	5.03	0.028	0.18	0.834	0.54	0.582	*	
Skim moisture		1.68	0.200	40.3	0.000	9.47	0.000	***	***
Skim moisture 変化量		15.2	0.000	16.2	0.000	7.53	0.001	***	***
Elasticity	R2	0.58	0.451	21.8	0.000	9.75	0.000	***	***
	R5	0.64	0.428	12.6	0.000	9.81	0.000	***	***
	R7	0.18	0.675	15.9	0.000	4.65	0.011	***	*
	R2 変化量	7.61	0.007	0.42	0.657	3.20	0.044	**	*
	R5 変化量	13.7	0.000	1.42	0.245	4.79	0.010	***	**
	R7 変化量	7.57	0.008	2.10	0.126	3.44	0.035	**	*

ITT 分析、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 反復測定二次元配置分析

変化量: Week 6 - Baseline もしくは、Week 12 - Baseline

Group: 魚鱗 CP vs Placebo

Time: Baseline vs Week 6 vs Week 12

第4節 考察

今回の臨床試験の結果から、魚鱗 CP の 12 週間の継続的な摂取は、皮膚の保湿性、弾力性、シワ抑制を包括的に改善することが明らかとなった。

皮膚の水分量については、魚鱗 CP に関するこれまでの臨床研究のレビューでは、1 日の摂取量は 1 g から 10 g の範囲であることが示されており、皮膚への効果を報告している。Choi らは、30～48 歳の韓国男女に対して CP を 1 日あたり 3 g 摂取し、4 週間続けると皮膚の水分量および弾力性が Baseline から有意に改善したが、プラセボと比較し有意差はなくシワへの効果は評価していなかった[21]。Proksch E は、45～65 歳の女性に対して CP を 2.5 g/日を 8 週間摂取すると、皮膚のシワが改善されることを示したが、皮膚の水分量および弾力性に関しては評価していなかった[2]。また、35～55 歳の女性を対象に CP を 2.5 g/日および 5.0 g/日の 8 週間摂取すると、皮膚の水分量や弾力性、経皮蒸散水分量、皮膚の荒れは、前後比較では改善するものの、プラセボ群と比較し有意差はなかった[3]。このように皮膚の水分量、弾力性、シワ抑制を包括的にプラセボと比較し有意に改善したという報告はなかった。今回の研究結果では、これらの報告と同様に皮膚の水分量や弾力は前後比較して有意に改善し、さらに、プラセボと比較し水分量、弾力性、シワを包括的に有意に改善した。各種論文からすべての試験期間や実施された人種までは把握できなかったが、テストの季節、被験者の人種による皮膚状態の違いはあるものの、CP 製品の製造方法の違いや吸収性の違いにより、水分量、弾力性、シワのすべてを包括的に改善したと推察される。

第5節 小括

先行研究においては、CP 摂取によって、皮膚の水分量、弾力性、シワなどのすべての項目が有意に改善されたわけではなかったが、本臨床試験において、少なくとも 3 g/日の 12 週間の魚鱗 CP 摂取によって、皮膚の水分量、弾力性、シワを包括的に有意に改善することが明らかとなった。したがって、ヒトの皮膚状態を包括的に改善するには魚鱗 CP の摂取が有効であることを見いだした。また、試験中に有害事象が報告されなかったことから、魚鱗 CP が安全であることも示された。

ただし、今回の試験においては、皮膚状態に関与する交絡因子として、女性の性周期や食生活の追跡を考慮していなかった。これらの因子は、皮膚状態と密接に関係している。エストロゲンが減少すると乾燥やシワにまで影響すると言われている[22,23]。また、食生活においては、トマトのような強い抗酸化成分を含む食品を多く摂取していた場合、光老化抑制効果にもつながる[24]。そのため、これらの評価を今後の研究に反映して評価していくことが望まれる。

第2章 原料部位別 CP によるヒト皮膚状態への影響

第1節 目的

一般的な CP は牛や豚や魚などを原材料とし、更にはそれら動物の皮や骨、鱗などコラーゲンを多く含む部位から製造される。豚と魚の CP 5 g を 8 週間摂取することにより、皮膚の UV spot が有意に減少したり[6]、豚と魚の CP 10 g を 8 週間摂取することにより皮膚水分量が有意に改善することが報告されている[25]。このように、動物種違いによる CP 摂取による皮膚水分量の改善や弾力の改善に関する臨床試験は数多くあるが、本研究のように魚鱗と魚皮由来の CP の原料の部位による違いを比較した臨床試験は存在しない。また、動物由来 CP は動物臭が強く出る、宗教上の理由など様々な要因により、避けられる場合も多く、消費者にとって魚由来 CP は、抵抗感がない、または少ない。

一般的に魚皮は魚鱗よりもおいが強く、品質が劣り、廃棄されることも多い。しかしながら、魚皮 CP においても魚鱗 CP と同等の機能性を有することによって有効利用の幅が広がり、SDGs やサステナビリティの観点からも活用の幅が広がることは、廃棄される部位の有効活用という点で重要である。魚鱗も魚皮も淡水魚のティラピアの鱗と皮という部位が異なるのみで、その後の処理は同様である。つまり、それぞれの原料から抽出されたゼラチンに対して、食品添加物として認定されている酵素を利用することによって加水分解し、それぞれ魚鱗および魚皮 CP が製造できる。今回は、魚鱗と魚皮 CP の製造方法が同じとした場合、CP としての機能性が同等であることを証明するために本試験を実施した。

第2節 方法

本臨床試験は、ヒト試験の設定としてランダム化プラセボ二重盲検研究となるように設計し、2012年1月13日に上海皮膚病病院(上海、中国)の倫理審査委員会の承認を受け、試験期間は、2012年2月15日～4月15日まで実施された。被験者は、プラセボ群と、魚鱗由来の魚鱗 CP と魚皮由来の魚皮 CP をそれぞれ摂取する3つの群に分けられた。各グループ間の平均年齢に有意差がないことを確認した(Tukey test, $p < 0.05$ を有意差ありとした)。ヘルシンキ宣言の原則に従って、この研究はすべての被験者に対してインフォームド・コンセントが実施された。プロトコールは筆者が作成し、上海皮膚病病院(中国、上海)の倫理委員会によって承認され、皮膚の状態評価を専門とする王博士(上海皮膚病病院、上海、中国)によって皮膚の評価が実施された。予備血液検査で異常がないと診断され、同意した被験者85名(プラセボ群28名、魚鱗 CP 群29名、魚皮 CP 群28名)を対象に、年齢が均一になるように乱数表に基づいてランダムに割り当てた。プラセボはマルトデキストリン(松谷化学工業株式会社製、パインデックス TK-16)を用いた。各食品は、他の素材は含めずアルミニウムパウチの小袋に詰め、すべての被験者と研究者にとって区別できないようプラセボを作成した。試験期間中、試験食品1日当たり5.0 g/包を夕食後に摂取させた。

試験食品は、魚鱗由来 CP (魚鱗 CP、重量平均分子量 5,000 Da、新田ゼラチン株式会社製)、魚皮(魚皮 CP、重量平均分子量 5,000 Da、新田ゼラチン株式会社製)を用いた。魚鱗および魚皮 CP のアミノ酸組成を表 7 に示すが、ほとんどアミノ酸組成は変わらなかった。

表 7 被験剤のアミノ酸組成

アミノ酸	魚鱗 CP	魚皮 CP
Gly	24.8	25.1
Ala	10.8	11.1
Val	2.06	2.02
Leu	2.65	2.66
Ile	1.11	1.04
Ser	3.68	3.61
Thr	2.77	2.80
Asp	5.51	5.67
Glu	9.98	10.0
Cys	0.02	0.02
Met	1.34	1.28
Lys	3.38	3.51
Hyl	1.27	1.28
Arg	8.83	9.00
His	0.85	0.81
Phe	2.02	1.99
Tyr	0.40	0.37
Trp	Not Found	Not Found
Pro	12.7	13.2
Hyp	10.9	10.4

単位: g / 100 g

被験者は下記に示す基準に従って選ばれた健康人であり、35 歳から 55 歳までの皮膚荒れや乾燥皮膚を意識している健康な中国人女性とした。BMI (Body Math Index) 指数が 30 未満で、他のサプリメントや健康食品を摂取しておらず、さらに過去 3 か月以内にホルモン療法を受けておらず、検査期間中に妊娠する予定がないものを選定基準とした。試験期間中は、生活習慣を変えないこと、試験食品摂取前の化粧品の使用やアルコールの飲用、暴飲暴食を避けること、極端な運動を避けること、試験期間中の過度の日焼けを避けることとした。なお、試験食品の空袋を回収し、残量を確認した。

皮膚状態の測定および皮膚科医による診断皮膚評価は、摂取前 (Baseline)、摂取後 4 週間、および 8 週間後に実施した。被験者は化粧を洗い流し、測定前に順応室 (温度 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \pm 5\%\text{RH}$) に滞在し 30 分間順応させた。次に、皮膚の水分量および弾力の測定は、第 1 章と同様とし、測定部位は目尻と頬で、それぞれ 3 回測定した。皮膚表面分析は、Visio Face SSA (皮膚表

面分析、Courage and Khazaki、ドイツ）によって、頬の皮膚の荒れ、シワの数、シワの面積、目じりのシワの深さを測定した。皮膚科医による診断皮膚評価は、目じりおよび頬の皮膚状態を上海皮膚病病院が設定した 1～10 のスコアで目視によって皮膚科医専門医としての認定を受けた皮膚科医（王博士）1 名が評価した。スコアが低いほど、皮膚の状態が良好であることを示す。測定項目は、透明感、滑らかさ、目尻小ジワ、目尻の小ジワ、目の下小ジワ、目の下のシワ、目の下のふくらみ、たるみである。

安全性評価の一環として、血液学的パラメータ分析として、T. protein、Albumin、ALT、ALP、 γ -GTP、AST、LDH、Bil、BUN、Creatinine、尿酸(UA)、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)をBaselineと 8 週間後に測定した。

統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing、Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR（自治医科大学埼玉医療センター、埼玉、日本、ver. 1.68）を使用した。皮膚の水分量、弾力性、皮膚表面分析については、反復測定二次元配置分析を実施した。また、事後検定として群内比較は、対応のある t 検定、群間比較は Tukey test を実施した。皮膚科医の評価では、ノンパラメトリック検定として、Friedman 検定を行い、事後検定として、群内比較は Wilcoxon Signed Ranks Test を使用し、群間比較には Mann-Whitney U テストを使用した。有意水準は 95% 信頼水準で、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

第3節 結果

第1項 臨床試験全体のフローおよび血液学的・血液化学的有害事象の有無

85名の女性が登録され、適格性評価を行った後、プラセボ、魚鱗CP、魚皮CPの3群に割つけた。研究期間中に3名の脱落者があったが、個人的な理由で来院が困難であったり、遠方に引越したりしたためであった(図7)。返却された試験食品の袋には残留物は確認されず、摂取率は100%であったと考えられた。血液学的・血液化学的検査(表9)においては、各群ともBaselineおよび8週目の値はいずれも基準値の範囲内であり、研究期間中の有害事象はなかった。

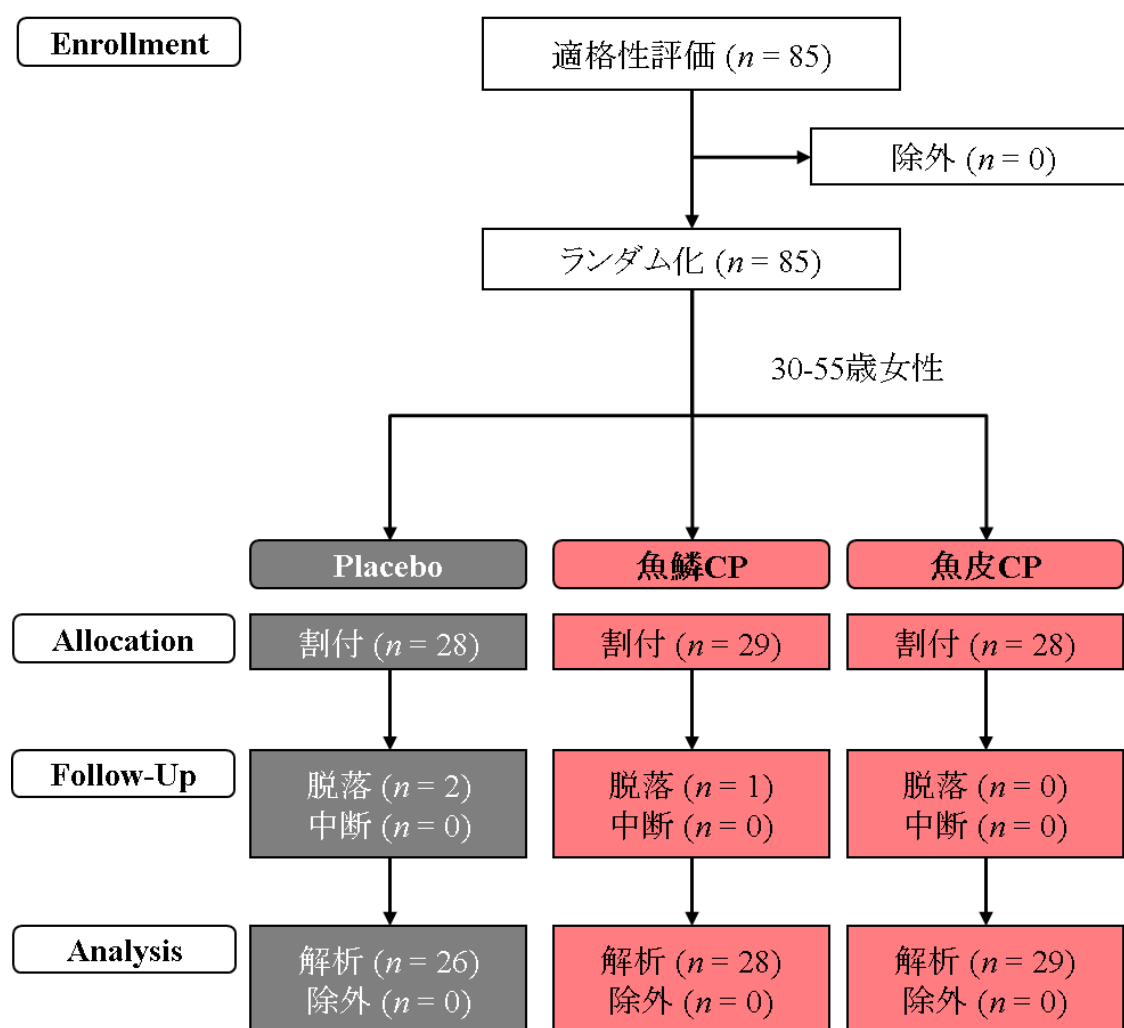


図7 被験者フロー

表 8 被験者情報

	被験者数			8 週後の平均年齢
	摂取前	脱落者数	8 週後	
Placebo	28	2	26	42.31 ± 4.80
魚鱗 CP	29	1	28	43.25 ± 4.06
魚皮 CP	28	0	28	44.07 ± 4.81

Mean ± SD

表 9 血液学的・血液化学的検査

	Placebo		魚鱗 CP		魚皮 CP	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
T. protein (g/dL)	74.7 ± 3.72	71.7 ± 3.91	76.2 ± 3.68	73.5 ± 3.29	79.1 ± 6.42	73.4 ± 3.96
Albumin (g/dL)	43.0 ± 2.49	41.7 ± 1.92	44.7 ± 2.10	41.7 ± 1.71	45.4 ± 2.48	42.0 ± 2.12
ALT (U/L)	19.7 ± 13.1	14.2 ± 5.82	17.2 ± 9.90	18.4 ± 8.36	14.0 ± 6.07	16.8 ± 8.41
ALP (U/L)	109 ± 35.7	92.2 ± 27.1	106 ± 28.3	101 ± 27.3	101 ± 29.3	93.3 ± 28.2
γ-GTP (U/L)	19.3 ± 11.5	17.8 ± 8.47	23.4 ± 10.8	22.8 ± 13.5	17.8 ± 13.1	16.0 ± 6.95
AST (U/L)	22.0 ± 7.69	18.2 ± 3.96	21.7 ± 6.92	19.1 ± 5.37	20.6 ± 2.95	18.6 ± 3.27
LDH (mg/dL)	190 ± 23.7	189 ± 22.0	195 ± 27.4	188 ± 25.9	192 ± 46.2	182 ± 29.9
Total-Bilirubin (mg/dL)	8.10 ± 3.96	9.3 ± 2.69	6.76 ± 2.65	9.10 ± 3.66	8.32 ± 4.61	10.5 ± 4.53
BUN (mg/dL)	4.99 ± 1.06	5.2 ± 1.24	5.03 ± 1.19	4.97 ± 1.10	5.46 ± 1.42	5.21 ± 1.04
Creatinine (mg/dL)	56.1 ± 7.73	60.4 ± 7.07	53.8 ± 7.91	59.4 ± 7.61	55.2 ± 4.89	57.7 ± 8.33
UA (mg/dL)	256 ± 74.3	253 ± 34.2	236 ± 47.5	251 ± 56.0	236 ± 40.8	249 ± 64.1
CPK (U/L)	88.0 ± 25.5	82.2 ± 24.3	83.3 ± 31.8	76.9 ± 27.3	83.9 ± 27.9	84.1 ± 34.8

Mean ± SD

第2項 魚鱗 CP・魚皮 CP 摂取による皮膚状態への影響

魚鱗 CP および魚皮 CP を 8 週間摂取した後の皮膚水分量および皮膚の弾力、皮膚表面分析に関する結果を表 10 に示す。魚鱗 CP 群と魚皮 CP 群は、顔の頬および目尻において、摂取前と比較し共に皮膚の保湿性が有意に高くなり、プラセボ群では摂取前と比較し有意な変化は認められなかった。一方、魚鱗 CP においては、8 週目においてプラセボと比較し有意に高かく、魚皮 CP においては、8 週目でプラセボと有意差はなかったものの、高値傾向を示した。表 11 における保湿性の変化量においては、4 週目と 8 週目で両 CP 群がプラセボと比較して有意に高かった。

魚皮 CP は、頬の R2 評価の 8 週目においてプラセボと比較し有意に弾力性が高かった。魚鱗 CP は、頬における R2、R5、R7 の評価においてプラセボとの比較で有意差はなかったが、頬 R5 評価の 8 週目および目尻 R5 評価 4 週目において、摂取前と比較し有意に弾力性が高かった。

頬において、魚皮 CP 群は 4、8 週目でプラセボと比較して有意に皮膚の荒れが減少し、魚鱗 CP は 8 週目でプラセボと比較し有意に減少した(表 10)。変化量において、魚皮 CP はプラセボと比較し、目じりのシワの数を有意に減少させた(表 11)。

皮膚状態の皮膚の保湿性、弾力性、皮膚表面評価において、4、8 週目ともに魚鱗 CP は魚皮 CP と比較し有意差はなく、両 CP 群は同等であった(図 8)。

表 10 魚鱗 CP および魚皮 CP 摂取による皮膚状態の機器評価結果

										<i>p</i> value vs. Placebo						
		Baseline			Week 4			Week 8			Baseline		Week 4		Week 8	
Skin moisture																
頬	Placebo	25.5	±	14.0	26.7	±	15.7		25.4	±	14.6	-	-	-	-	-
	魚鱗 CP	23.3	±	12.3	27.7	±	12.7	***	28.6	±	12.3	***	0.800	0.957	0.647	
	魚皮 CP	18.7	±	12.3	24.4	±	11.8	***	26.4	±	11.9	***	0.143	0.816	0.963	
目尻	Placebo	72.5	±	11.4	71.8	±	10.5		70.8	±	10.0	-	-	-	-	-
	魚鱗 CP	70.1	±	11.0	75.6	±	9.4	***	78.4	±	8.06	***	0.734	0.405	0.027	#
	魚皮 CP	66.6	±	11.8	73.3	±	11.8	***	77.0	±	12.5	***	0.158	0.863	0.091	
Elasticity																
R2 頬	Placebo	0.736	±	0.058	0.750	±	0.040		0.738	±	0.044	-	-	-	-	-
	魚鱗 CP	0.739	±	0.057	0.745	±	0.044		0.749	±	0.038	0.978	0.908	0.538		
	魚皮 CP	0.745	±	0.048	0.748	±	0.050		0.765	±	0.035	**	0.813	0.982	0.032	#
目尻	Placebo	0.735	±	0.119	0.681	±	0.086	*	0.697	±	0.086	*	-	-	-	-
	魚鱗 CP	0.689	±	0.136	0.673	±	0.097		0.677	±	0.104	0.403	0.960	0.744		
	魚皮 CP	0.730	±	0.123	0.703	±	0.111	*	0.742	±	0.095	0.991	0.683	0.209		
R5 頬	Placebo	0.554	±	0.074	0.577	±	0.114		0.548	±	0.107	-	-	-	-	-
	魚鱗 CP	0.535	±	0.077	0.571	±	0.100		0.581	±	0.076	*	0.592	0.975	0.451	
	魚皮 CP	0.552	±	0.050	0.589	±	0.080	*	0.569	±	0.107	0.996	0.902	0.732		
目尻	Placebo	0.543	±	0.112	0.575	±	0.126		0.550	±	0.101	-	-	-	-	-
	魚鱗 CP	0.494	±	0.115	0.556	±	0.122	*	0.508	±	0.096	0.350	0.842	0.365		
	魚皮 CP	0.505	±	0.145	0.545	±	0.133		0.516	±	0.129	0.532	0.659	0.510		

次ページへ続く

表 10 続き

Elasticity R7	頬	Placebo	0.340	±	0.040	0.359	±	0.051	0.345	±	0.049	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.338	±	0.050	0.351	±	0.052	0.357	±	0.042	0.977		0.819		0.645	
		魚皮 CP	0.347	±	0.038	0.359	±	0.048	0.360	±	0.049	0.834		1.000		0.507	
	目尻	Placebo	0.366	±	0.084	0.350	±	0.075	0.349	±	0.068	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.313	±	0.084	0.327	±	0.077	0.320	±	0.062	0.088		0.581		0.320	
		魚皮 CP	0.336	±	0.099	0.338	±	0.094	0.337	±	0.083	0.445		0.842		0.813	
	シワの数 (目尻)	Placebo	0.021	±	0.004	0.020	±	0.003	0.021	±	0.004	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.021	±	0.005	0.021	±	0.005	0.020	±	0.006	0.998		0.936		0.656	
		魚皮 CP	0.020	±	0.003	0.020	±	0.003	0.018	±	0.004 *	0.744		1.000		0.066	
SSA	シワの面 積 (目尻)	Placebo	0.733	±	0.231	0.727	±	0.203	0.733	±	0.214	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.688	±	0.149	0.679	±	0.141 *	0.674	±	0.145 *	0.730		0.656		0.544	
		魚皮 CP	0.745	±	0.249	0.732	±	0.236	0.721	±	0.230 **	0.977		0.995		0.977	
	シワの深さ (目尻)	Placebo	56.79	±	3.532	56.91	±	2.997	56.52	±	2.242	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	56.60	±	4.394	56.21	±	4.616	55.93	±	4.938	0.987		0.817		0.869	
		魚皮 CP	57.12	±	5.146	56.24	±	4.674 *	55.52	±	4.733 **	0.963		0.831		0.668	
	皮膚の荒 れ(頬)	Placebo	23.69	±	1.705	23.58	±	1.573	23.42	±	1.573	-	-	-	-	-	-
		魚鱗 CP	23.32	±	1.390	22.93	±	1.462	22.32	±	1.605 **	0.652		0.318		0.048 #	
		魚皮 CP	23.07	±	1.437	22.46	±	1.762 *	22.14	±	1.767 **	0.306		0.038 #		0.018 #	

単位: Arbitrary Unit, Mean ± SD

ITT 分析、反復測定二次元配置分析の事後検定として群内比較は対応のある t 検定、群間比較は Tukey test を実施した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Baseline# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Placebo

Skin moisture: 値が高いほど、皮膚水分量が高いことを示す。

Elasticity: R2, R5, R7 値が 1 に近いほど、皮膚弾力性が高いことを示す。

SSA: 皮膚表面の評価。値が低いほど、皮膚のシワや荒れが低いことを示す。

表 11 魚鱗 CP および魚皮 CP 摂取による皮膚状態の機器評価結果(変化量)

										<i>p</i> value vs. Placebo			
			Δ Week 4-Baseline			Δ Week 8-Baseline			Week 4		Week 8		
Skin moisture													
	頬	Placebo	1.15	±	3.74	-0.10	±	3.29	-	-	-	-	
		魚鱗 CP	4.48	±	3.46	5.38	±	3.62	0.021	#	0.000	###	
		魚皮 CP	5.70	±	5.62	7.65	±	5.73	0.001	##	0.000	###	
	目尻	Placebo	-0.73	±	5.16	-1.64	±	4.77	-	-	-	-	
		魚鱗 CP	5.45	±	6.13	8.31	±	8.90	0.001	###	0.000	###	
		魚皮 CP	6.68	±	6.41	10.35	±	7.83	0.000	###	0.000	###	
Elasticity													
R2	頬	Placebo	0.01	±	0.05	0.00	±	0.05	-	-	-	-	
		魚鱗 CP	0.01	±	0.06	0.01	±	0.05	0.825		0.800		
		魚皮 CP	0.00	±	0.04	0.02	±	0.04	0.688		0.341		
	目尻	Placebo	-0.05	±	0.10	-0.04	±	0.08	-	-	-	-	
		魚鱗 CP	-0.02	±	0.09	-0.01	±	0.12	0.267		0.535		
		魚皮 CP	-0.03	±	0.06	0.01	±	0.06	0.502		0.111		
	R5	頬	Placebo	0.02	±	0.12	-0.01	±	0.12	-	-	-	-
			魚鱗 CP	0.04	±	0.11	0.05	±	0.10	0.999		0.205	
			魚皮 CP	0.04	±	0.08	0.02	±	0.10	0.884		0.740	
		目尻	Placebo	0.03	±	0.13	0.01	±	0.10	-	-	-	-
			魚鱗 CP	0.06	±	0.12	0.01	±	0.09	0.669		0.965	
			魚皮 CP	0.04	±	0.11	0.01	±	0.11	0.979		0.990	

次ページへ続く

表 11 続き

Elasticity	R7	Placebo	0.02	±	0.05	0.01	±	0.05	-	-	-	-
		頬 魚鱗 CP	0.01	±	0.06	0.02	±	0.06	0.899		0.578	
		魚皮 CP	0.01	±	0.04	0.01	±	0.04	0.877		0.842	
	目尻	Placebo	-0.02	±	0.09	-0.02	±	0.06	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.01	±	0.05	0.01	±	0.06	0.213		0.294	
		魚皮 CP	0.00	±	0.05	0.00	±	0.06	0.601		0.506	
	シワの数 (目尻)	Placebo	-0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	-	-	-	-
		魚鱗 CP	0.00	±	0.00	-0.00	±	0.00	0.639		0.407	
		魚皮 CP	0.00	±	0.00	-0.00	±	0.00	0.195		0.032	#
SSA	シワの面積 (目尻)	Placebo	-0.01	±	0.03	-0.00	±	0.05	-	-	-	-
		魚鱗 CP	-0.01	±	0.02	-0.01	±	0.03	0.921		0.464	
		魚皮 CP	-0.01	±	0.03	-0.02	±	0.04	0.659		0.104	
	シワの深さ (目尻)	Placebo	0.12	±	1.52	-0.27	±	2.58	-	-	-	-
		魚鱗 CP	-0.40	±	1.66	-0.67	±	2.61	0.492		0.857	
		魚皮 CP	-0.88	±	1.69	-1.59	±	2.89	0.076		0.189	
	皮膚の荒れ (頬)	Placebo	-0.12	±	0.85	-0.27	±	0.94	-	-	-	-
		魚鱗 CP	-0.39	±	1.08	-1.00	±	1.41	0.614		0.110	
		魚皮 CP	-0.61	±	1.21	-0.93	±	1.44	0.222		0.164	

変化量 = Week 4 - Baseline もしくは Week 8 - Baseline、単位: Arbitrary Unit、Mean ± SD

ITT 分析、反復測定二次元配置分析の事後検定として、群間比較を Tukey test にて実施した。

$p < 0.05$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$: vs Placebo

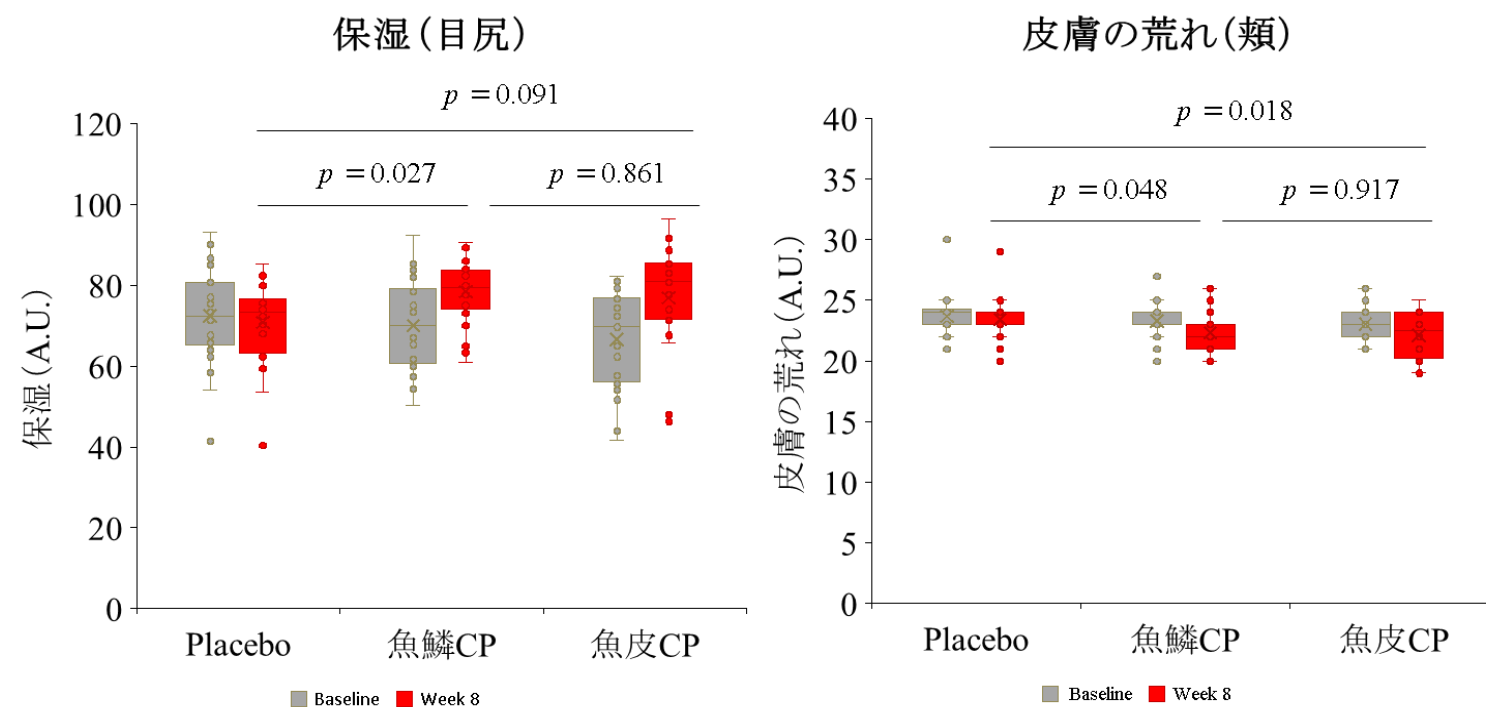


図 8 Placebo、魚鱗および魚皮 CP 群における保湿および皮膚の荒れのスコア分布を示した箱ひげ図

単位: Arbitrary Unit、箱は第 1 四分位数から第 3 四分位数までの範囲を示しており、この範囲は四分位範囲 (IQR) で示し、箱の横棒は中央値、ひげは外れ値を除いた最小値と最大値を示す。外れ値は 1.5 倍 IQR ルールを用いて特定した。

反復測定二次元配置分析の事後検定として Tukey test を実施。

保湿: 値が高いほど、皮膚水分量が高いことを示す。

皮膚の荒れ: 値が低いほど、皮膚の荒れが低いことを示す。

表 12 統計解析結果

		Group		Time		Group × Time			
		<i>f</i> value	<i>p</i> value	<i>f</i> value	<i>p</i> value	<i>f</i> value	<i>p</i> value		
Skim moisture	頬	0.521	0.596	57.85	0.000 ***	12.91	0.000 ***		
	目尻	0.630	0.535	33.58	0.000 ***	13.75	0.000 ***		
Skim moisture 変化量	頬	14.98	0.000 ***	56.72	0.000 ***	13.48	0.000 ***		
	目尻	18.03	0.000 ***	33.52	0.000 ***	13.70	0.000 ***		
Elasticity	頬	R2	0.652	0.524	2.410	0.093	1.417	0.231	
		R5	0.173	0.841	3.677	0.027 *	0.890	0.471	
		R7	0.315	0.731	4.174	0.017 *	0.614	0.653	
	目尻	R2	1.427	0.246	6.247	0.002 **	1.656	0.163	
		R5	1.010	0.369	7.015	0.001 **	0.272	0.896	
		R7	1.442	0.243	0.198	0.821	0.944	0.440	
	頬	R2 変化量	0.057	0.945	2.381	0.096	1.423	0.229	
		R5 変化量	0.800	0.453	3.649	0.028 *	0.882	0.476	
		R7 変化量	0.062	0.940	4.201	0.017 *	0.626	0.645	
	目尻	R2 変化量	1.697	0.190	6.287	0.002 **	1.665	0.161	
		R5 変化量	0.248	0.781	7.012	0.001 **	0.273	0.895	
		R7 変化量	1.697	0.190	0.145	0.866	0.956	0.433	
SSA	シワの数(目尻)		0.779	0.463	8.089	0.000 ***	3.939	0.004 **	
	シワの面積(目尻)		0.575	0.565	5.766	0.004 **	1.589	0.180	
	シワの深さ(目尻)		0.115	0.892	6.114	0.003 **	1.442	0.223	
	皮膚の荒れ(頬)		3.237	0.045 *	17.18	0.000 ***	1.925	0.109	
	シワの数(目尻)変化量		1.074	0.347	8.089	0.000 ***	3.939	0.004 **	
	シワの面積(目尻)変化量		1.519	0.225	5.766	0.004 **	1.589	0.180	
	シワの深さ(目尻)変化量		2.229	0.114	6.114	0.003 **	1.442	0.223	
	皮膚の荒れ(頬)変化量		2.160	0.122	17.18	0.000 ***	1.925	0.109	

ITT 分析, 反復測定二次元配置分析, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$,

変化量: Week 4 - Baseline もしくは、Week 8 - Baseline

Group: 魚鱗 CP vs 魚皮 CP vs Placebo

Time: Baseline vs Week 4 vs Week 8

第3項 皮膚科学的評価への影響

皮膚科医による皮膚科学的スコア評価を表 13 に示した。スコアは 1~10 の値で評価され、値が低い方が皮膚の状態が良いことを示している。目尻の小ジワ、目の下のシワについては、プラセボと比較して摂取前の時点で有意差があったため、統計的評価対象から除外した。透明感では、魚鱗 CP および魚皮 CP 群共にプラセボと比較し 8 週目において有意に改善した。滑らかさでは、魚鱗 CP、魚皮 CP 群ともに摂取前およびプラセボ群との比較において 4、8 週目に有意に改善した。目の下の小ジワでは、両方の CP 群が摂取前に対して有意に改善し、8 週目に魚皮 CP がプラセボ群に対して有意に減少した。目の下のふくらみでは、両方の CP 群が摂取前に対して 8 週目で有意に改善した。たるみでは、両方の CP 群が摂取前に対して 4、8 週目で有意に改善した。

皮膚表面の機器測定による評価および皮膚科医による皮膚科学的スコア評価において、魚鱗 CP および魚皮 CP 群に有意な差は見られなかった。

表 13 皮膚科医による皮膚科学的評価(スコア 1~10)

		Baseline			Week 4			Week8			p value vs. Placebo		
		Baseline			Week 4			Week8			Baseline	Week 4	Week 8
透明感	Placebo	5.0	(3 - 8)		5.0	(3 - 8)	*	5.0	(3 - 8)	***	—	—	—
	魚鱗 CP	5.0	(4 - 7)		5.0	(3 - 6)	***	4.0	(3 - 5)	***	0.9120	0.1510	0.0042 #
	魚皮 CP	5.5	(4 - 7)		5.0	(3 - 6)	***	4.0	(3 - 6)	***	0.6110	0.1050	0.0188 ##
滑らかさ	Placebo	6.0	(4 - 8)		6.0	(4 - 7)	*	5.0	(4 - 7)	***	—	—	—
	魚鱗 CP	6.0	(4 - 7)		5.0	(4 - 7)	***	4.0	(3 - 7)	***	0.4470	0.0323 #	0.0001 ###
	魚皮 CP	6.0	(4 - 7)		5.0	(3 - 7)	***	5.0	(2 - 6)	***	0.0860	0.0018 ##	0.0010 #
目尻の 小じわ	Placebo	3.0	(2 - 5)		3.0	(2 - 5)		3.0	(2 - 5)		—	—	—
	魚鱗 CP	3.0	(2 - 5)		3.0	(2 - 5)		3.0	(2 - 5)		0.8000	0.6840	0.8060
	魚皮 CP	4.0	(2 - 5)		4.0	(2 - 5)	*	3.0	(2 - 5)	***	0.0422 #	0.3750	0.9630
眼の下の 小じわ	Placebo	5.0	(3 - 6)		5.0	(3 - 6)		5.0	(3 - 6)		—	—	—
	魚鱗 CP	5.0	(3 - 6)		5.0	(3 - 6)		5.0	(3 - 6)	*	0.9920	0.8240	0.4800
	魚皮 CP	5.0	(3 - 6)		5.0	(3 - 6)	*	5.0	(3 - 6)	***	1.0000	0.2710	0.0483 #
眼の下 のシワ	Placebo	4.0	(3 - 5)		4.0	(3 - 5)		4.0	(3 - 6)		—	—	—
	魚鱗 CP	5.0	(3 - 7)		4.5	(3 - 6)		4.0	(3 - 6)	*	0.0442 #	0.1270	0.3400
	魚皮 CP	5.0	(2 - 6)		5.0	(2 - 6)		4.5	(2 - 6)	*	0.0348 #	0.1230	0.4700
眼の下の ふくらみ	Placebo	3.5	(3 - 6)		4.0	(2 - 6)		4.0	(2 - 6)		—	—	—
	魚鱗 CP	4.0	(3 - 6)		4.0	(2 - 5)		3.5	(2 - 5)	**	0.3160	0.4000	0.7260
	魚皮 CP	4.0	(2 - 6)		3.0	(2 - 5)	**	3.0	(2 - 5)	***	0.2660	0.6670	0.2630
たるみ	Placebo	3.5	(3 - 5)		4.0	(2 - 5)		4.0	(2 - 5)		—	—	—
	魚鱗 CP	4.0	(3 - 5)		4.0	(2 - 4)	*	3.0	(2 - 4)	***	0.5350	0.6860	0.0942
	魚皮 CP	4.0	(3 - 5)		4.0	(3 - 4)	**	3.5	(2 - 4)	***	0.1040	0.9770	0.4540

単位: Arbitrary Unit, 中央値(最小値-最大値)

ノンパラメトリック検定として、Friedman 検定の事後検定として群内比較は Wilcoxon Signed Ranks Test、群間比較は、Mann-Whitney U Test を実施

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Baseline, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Placebo

スコア 1~10 で評価: 値が小さい方が、皮膚の状態が良いことを示す。

第4節 考察

今まで動物種の違いによる CP 摂取による皮膚水分量の改善や弾力の改善に関する臨床試験は数多くあるが、本研究のように魚鱗と魚皮由来の CP の原料の部位による違いを比較した臨床試験は存在しなかった。現在の CP 原料は魚鱗が主であるが、魚皮も同等の機能があれば、利用面において有益な情報となる。今回の臨床試験の結果から、魚鱗 CP および魚皮 CP の 5 g/日での 8 週間の継続的な摂取は、いずれも皮膚の水分量、弾力性、シワ、透明感および滑らかさを改善することが明らかとなった。また、どの項目においても魚鱗 CP と魚皮 CP との有意な差はなく、皮膚の状態においては同等の機能性を示すことが見いだせた。

第 1 章の結果からも摂取量 (3 g–5 g/日)、被験者人種 (韓国人–中国人) は異なったが、保湿性、弾力性、シワへの効果においては、同様な結果を得ることができた。今回はさらに、皮膚科医による評価によって、透明感や滑らかさなど機器的評価では判定がつきにくい項目においても、有意に改善することが示された。

第5節 小括

出発原料部位が異なるが製造方法は同じである魚鱗または魚皮由来の CP が、皮膚の水分量、弾力性、シワ、透明感および滑らかさの改善に関して高い機能性を示した。

また、原料部位は違っても CP 摂取による皮膚状態に対する生理学的機能は同等であることを示せたことから、製品物性では劣る魚皮においても付加価値が上がり、廃棄することなく有効活用できることが見いだせた。

第3章 魚鱗 CP 摂取による皮膚中最終糖化産物への影響

第 1 章、第 2 章の臨床試験において、魚鱗または魚皮を含む魚由来 CP の摂取は皮膚の保湿性、弾力性、シワを抑制することが明らかとなった。この魚由来 CP の皮膚への影響は、皮膚老化における重要な影響因子である最終糖化産物 (Advanced Glycation End products: AGEs) の蓄積抑制に関係している可能性が高い[26]と推定された。

AGEs とは、体内の糖とタンパク質や脂質が非酵素的な糖化反応により生成される物質である。糖化反応は、体内で常に起こっており、加齢や高血糖状態などによりその反応が促進され、AGEs は生体内に蓄積される。AGEs は、主に 3 つの影響を及ぼすとされている。1 つ目に、コラーゲンやエラスチンの架橋構造を変化させ、本来の機能である皮膚の弾力性や柔軟性を低下させる。そのため、皮膚のハリが失われ、シワやたるみが生じる。特に構造変化に関しては、真皮層のコラーゲン線維の架橋形成において、皮膚の硬さとシワの形成に大きく関与する[27]。2 つ目に、AGEs は、炎症性サイトカインの産生を促進し、慢性的な炎症状態を引き起こし[28]、この炎症は、コラーゲンの分解を促進し、さらに皮膚の老化を加速させると考えられる。3 つ目に、AGEs は、メラノサイトの活動を促進し、メラニンの生成を増やす可能性がある[29]。AGEs によるメラニン生成の増加は、紫外線によるダメージと相乗効果を示す可能性もあり、シミやそばかすの原因となる。これらの作用機序により、AGEs の蓄積は皮膚状態に影響する大きな因子の一つであり、シワ、たるみ、シミ、乾燥などの様々な皮膚の老化現象を引き起こす。

第 1 節 目的

AGEs の蓄積を抑制することは、皮膚のシワ、たるみ、シミ、乾燥などの老化対策として重要である。このことから、魚由来 CP の皮膚状態改善のメカニズム解明の一端として、魚鱗 CP の摂取による皮膚中の AGEs への影響について、臨床試験によって検証した。

第2節 方法

本臨床試験は愛媛大学倫理委員会の承認を受け(承認番号:CRB6180004、承認番号:E19-24)、日本臨床試験システムに登録した(jRCTs061190029)。すべての被験者は、この研究に参加する前に書面にてインフォームド・コンセントを提出した。本試験は2020年3月から2020年6月末まで実施された。

被験者の選定基準は、1)日本人、2)年齢40～90歳、3)ヘモグロビンA1c(HbA1c)値6.0%以下、4)3カ月間少なくとも被験食品について80%の摂取率を維持できることとした。除外基準は、1)重篤な疾患の既往があること、2)肝機能・腎機能検査値に異常があること(2019年12月1日より愛媛大学医学部附属病院の基準値に準拠)、3)心肺機能障害、食物および薬物アレルギー、認知症、糖尿病、または胃腸手術後の病歴のあるもの、慢性または急性感染症の患者、4)この研究の開始時にすでに他の臨床研究に参加している、5)激しいスポーツをしている、6)自主的にダイエット中である、7)妊娠している、8)その他主任研究者が不適切と判断した理由に該当する者とした。

割当担当者は乱数表を用いてランダムな割り当てを行い、被験者を2群に分けた。被験者が摂取した被験食品に関しては、治験責任医師、試験コーディネーター、試験食品管理担当者、臨床研究審査委員会など、すべての試験機関の担当で盲検化が行われた。

試験食品として、魚鱗CPもしくは、プラセボ食品としてマルトデキストリンを5.0 g/日であり、被験者に経口摂取させた。試験食品は、単体で用い他の原料は含まなかった。魚鱗CPとして、商品名;TYPE-S(重量平均分子量 約500～1200 Da、Hyp含有ジペプチド量 $\geq 3,000$ ppm含有、新田ゼラチン株式会社製、大阪、日本)を使用した。プラセボとして、非還元性糖質であるマルトデキストリン(パインデックス #2AG, 重量平均分子量 約1,500Da、松谷化学工業株式会社製、兵庫県、日本)をプラセボとして使用した。表14に、試験した食品サンプルの栄養成分を示す。

表 14 被験食品の栄養成分

	魚鱗 CP 食品	プラセボ食品
エネルギー (kcal)	365	375
タンパク質(g)	77.9	0
脂質 (g)	0.1	0
炭水化物 (g)	14.5	95
水分 (g)	5.5	3.9
		/100 g

被験者には、試験期間中、食事と運動に関して、研究前と同じ日常生活(活動)を維持するよう指示した。

AGEs レベルは、皮膚を通して AGE-Reader (Diagno Optics Technologies BV、フローニンゲン、オランダ)を使用して、皮膚の自家蛍光を測定した。被験者は測定直前に前腕を洗浄したのち、被験者を座らせた状態で、肘から 10～15cm 下の前腕掌面の両側で測定し(実際に目に見える日焼けがある部分を除く)、3 回測定後、平均値を出した。

また、魚鱗 CP の安全性を検証するために、血液学的評価として、血清中の AST、ALT、 γ -GTP、トリグリセリド(TG)、HDL、LDL、UA、空腹時血糖値(FBS)、インスリン抵抗性指数(HOMA-R)、血中 HbA1c、インスリン(IRI)を測定した。また、生化学的評価として、皮膚 AGEs レベル、血圧、平均動脈圧、脈拍数、上腕足首脈波伝播速度を測定した。血液学的および血液化学的評価、生化学的評価は、試験開始前と 12 週間後に評価した。

解析は、血液学的評価および生化学的評価を含むすべての項目について ITT 分析を実施した。データ分析は、SPSS Statistics バージョン 26(日本 IBM、東京、日本)を使用した。反復測定二次元配置分析を実施した。また、事後検定として群内比較は、対応のある t 検定、群間比較は Tukey test を実施した。すべての統計分析は両側検定により分析し、有意水準は 95% 信頼水準で、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

第3節 結果

第1項 臨床試験全体のフロー

最終的な被験者は47～87歳(平均年齢:69±11歳)の合計31人の男女の日本人であった。研究期間中に、魚鱗CP群の被験者1名が個人的な理由で来院が困難のため脱落した(図9)。被験者応募段階において男性が少なかったため、全体的に男性の割合は女性の割合よりも低く、被験者は70代以上であり、全体の61%を占めており、変化のしにくい高齢者を対象とすることにより、本研究の高齢者に多い現象については、好ましいと考えられた。

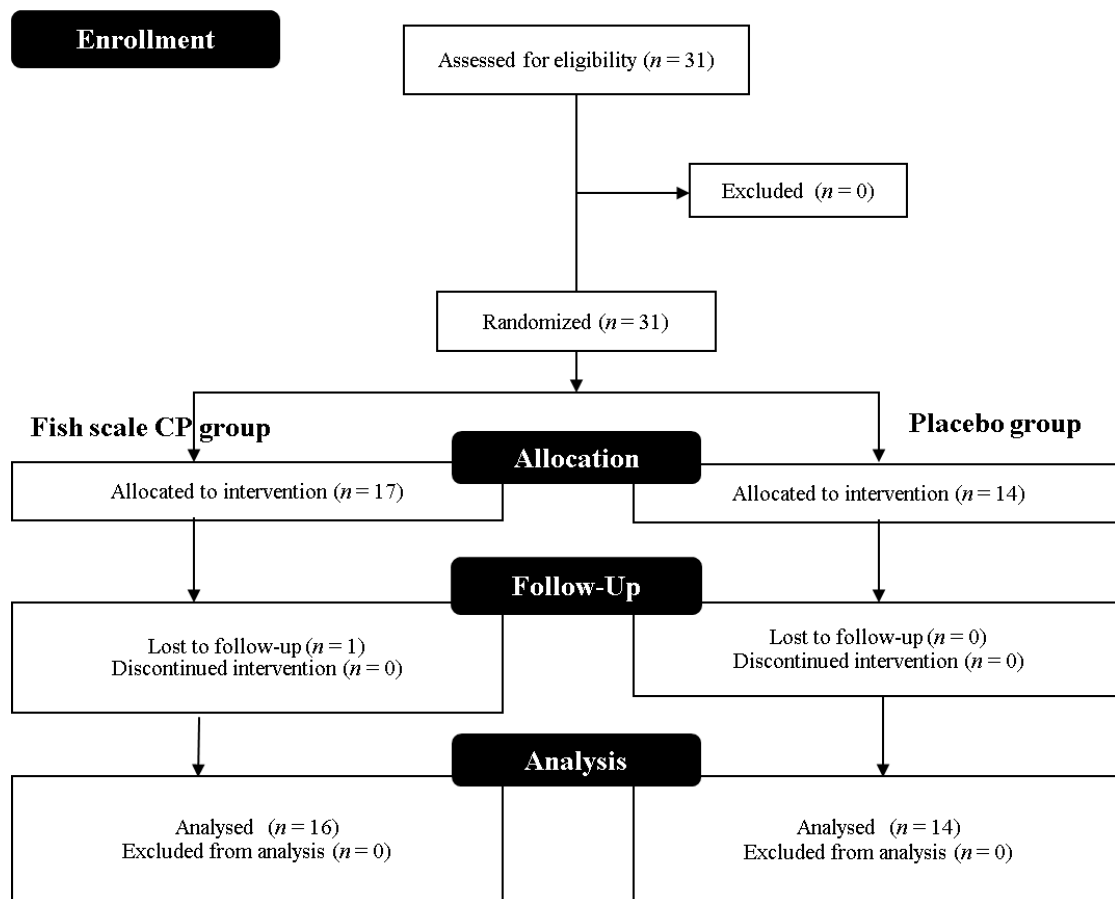


図9 被験者フロー

表 15 被験者情報

	Placebo		魚鱗 CP	
	Baseline	After 12 weeks	Baseline	After 12 weeks
男性(人)	2	2	6	6
女性(人)	12	12	11	10
合計(人)	14	14	17	16
年齢(歳)	67.6 ± 10.4		71.1 ± 10.1	

第 2 項 血液学的・血液化学的および最終糖化産物量への影響

血液学的・血液化学的および生化学的項目における変化を表 16 に示す。12 週間の摂取後、すべての項目において異常値を示した被験者はいなかった。また、血液学的・血液化学的評価や生化学的評価の血圧、MAP、PR、baPWV においては、前後比較において有意な変化はなく、群間比較においても有意差はなかった。

しかしながら、皮膚中の AGEs 量においては、実測値の比較においては有意な差は見られなかったものの、12 週から Baseline からの変化率(Change rate)で比較すると、プラセボ群と比較し魚鱗 CP 群において有意な減少が見られた(表 16, 図 10)。

表 16 血液学的・血液化学的および生化学的パラメータの変化

	Placebo			魚鱗 CP		
	Baseline	After 12 weeks	Change rate (%)	Baseline	After 12 weeks	Change rate (%)
Number (male/female)	14 (2/12)	14 (2/12)	14 (2/12)	17 (6/11)	16 (6/10)	16 (6/10)
Age, years	67.57 ± 10.39	—	—	71.06 ± 10.06	—	—
BMI, kg/m ²	22.15 ± 2.272	—	—	21.58 ± 2.298	—	—
AST, U/L	23.57 ± 3.245	23.14 ± 4.673	-1.465 ± 17.10	24.88 ± 5.487	23.71 ± 3.976	-2.939 ± 13.38
ALT, U/L	21.57 ± 6.956	21.71 ± 9.361	0.298 ± 24.51	19.18 ± 4.914	18.53 ± 5.765	-2.215 ± 21.70
γ-GTP, IU/L	29.93 ± 18.04	24.79 ± 15.03	-13.98 ± 18.60	24.71 ± 11.28	23.71 ± 11.12	-3.627 ± 14.41
TG, mg/dL	110.6 ± 45.01	101.3 ± 53.08	-7.466 ± 31.04	90.59 ± 28.59	86.59 ± 28.09	-1.933 ± 24.28
HDL, mg/dL	61.79 ± 16.06	58.14 ± 12.08	-4.386 ± 9.712	70.12 ± 19.06	65.94 ± 16.30	-5.284 ± 8.167
LDL, mg/dL	117.5 ± 43.05	117.6 ± 37.68	2.835 ± 13.30	120.8 ± 24.33	116.2 ± 23.99	-3.593 ± 9.597
LDL/HDL, A.U.	1.993 ± 0.907	2.114 ± 0.842	8.441 ± 11.75	1.829 ± 0.546	1.859 ± 0.531	2.207 ± 12.38
Uric acid, mg/dL	5.700 ± 1.071	5.486 ± 0.904	-2.323 ± 12.96	5.335 ± 1.140	5.235 ± 0.999	-1.052 ± 10.03
AGEs, A.U.	1.986 ± 0.385	2.050 ± 0.287	4.846 ± 14.20	2.153 ± 0.291	2.053 ± 0.351	-4.726 ± 9.550 #
FBS, mg/dL	99.86 ± 7.972	100.9 ± 16.63	0.524 ± 9.173	99.53 ± 7.686	97.88 ± 5.477	-1.361 ± 5.593
HOMA-R, A.U.	1.344 ± 0.613	1.251 ± 0.997	-10.42 ± 47.45	1.264 ± 0.659	0.998 ± 0.634	-18.22 ± 28.75
HbA1c, %	5.811 ± 0.315	5.854 ± 0.514	0.623 ± 4.398	5.885 ± 0.208	5.879 ± 0.206	-0.084 ± 1.856
IRI, μU/mL	5.343 ± 1.962	4.643 ± 2.952	-13.06 ± 42.57	5.047 ± 2.453	4.035 ± 2.443	-17.25 ± 29.10
SBP, mmHg	132.2 ± 13.12	129.1 ± 17.02	-2.250 ± 10.21	127.5 ± 13.47	125.6 ± 11.91	-1.217 ± 6.482
DBP, mmHg	76.71 ± 8.336	77.21 ± 9.645	0.827 ± 8.786	75.00 ± 7.593	74.00 ± 7.595	-1.084 ± 7.247
MAP, mmHg	94.86 ± 8.991	94.71 ± 9.721	0.074 ± 7.767	91.88 ± 9.154	90.75 ± 8.927	-0.971 ± 7.186
PR, bpm	72.00 ± 6.437	68.79 ± 4.394	-4.135 ± 5.225	68.76 ± 7.248	66.82 ± 6.805	-2.658 ± 5.691
baPWV, cm/s	1,657 ± 234.9	1,631 ± 288.9	-1.458 ± 11.28	1,603 ± 248.9	1,623 ± 234.2	1.787 ± 8.978

Mean ± SD, Change rate (%) = (After 12 weeks – Baseline) / Baseline × 100

ITT 分析、反復測定二次元配置分析の事後検定として群内比較は対応のある *t* 検定、群間比較は Tukey test を実施した。

p < 0.05, vs. Placebo、群内においては、すべての項目において有意差無し

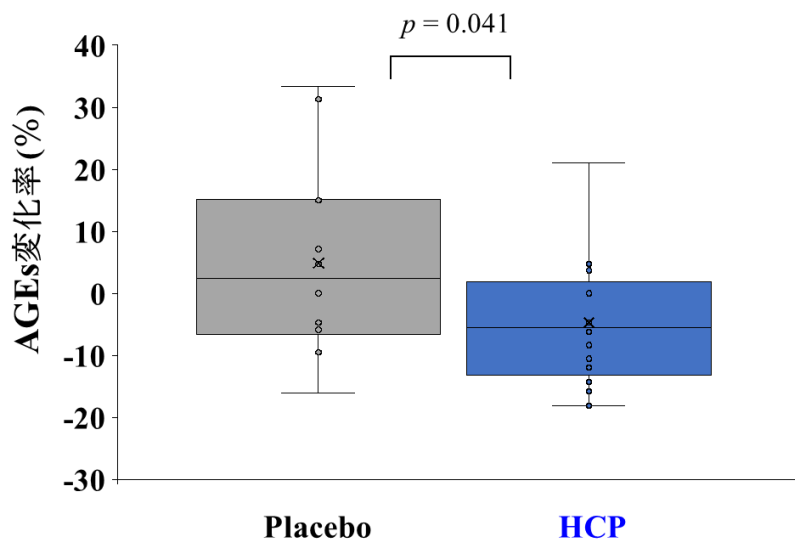


図 10 Placebo 群と HCP 群における AGEs 変化率の分布を示した箱ひげ図

単位:Arbitrary Unit、箱は第 1 四分位数から第 3 四分位数までの範囲を示しており、この範囲は四分位範囲 (IQR) で示し、箱の横棒は中央値、ひげは外れ値を除いた最小値と最大値を示す。外れ値は 1.5 倍 IQR ルールを用いて特定した。

反復測定二次元配置分析の事後検定として、Tukey test を実施。

変化率 (%) = (After 12 weeks – Baseline) / Baseline×100

AGEs 量は糖代謝と強く関わる。糖代謝は男女差によって異なるため表 17 では、男女別に

AGEs 量を再計算した。

表 17 男女別 AGEs 量の変化

			Placebo		魚鱗 CP	
Male	Baseline	2	2.00	± 0.10	6	2.22 ± 0.30
	After 12 weeks	2	2.15	± 0.05	6	2.20 ± 0.40
	Change rate (%)	2	7.89	± 7.89	6	-0.62 ± 12.9
Female	Baseline	12	1.98	± 0.41	11	2.12 ± 0.28
	After 12 weeks	12	2.03	± 0.31	10	1.97 ± 0.30
	Change rate (%)	12	4.34	± 14.9	10	-6.97 ± 6.33 #

単位:Arbitrary Unit , Mean ± SD,

反復測定二次元配置分析の事後検定として、Tukey test を実施。

$p < 0.05$, vs. Placebo

Change rate (%) = (After 12 weeks – Baseline) / Baseline×100

第4節 考察

本研究によって、魚鱗 CP を 12 週間摂取することによって、皮膚中の AGEs が有意に減少することが明らかとなった。

AGEs の変化量は測定直近の食生活を反映している。20 代～50 代の女性は毎日平均 1.9 g のコラーゲンを食品から摂取しているという報告がある[30]。この報告の研究対象となった年齢層は本試験を実施した群層とは異なるが、ほぼ同様のコラーゲン量を付加的に摂取していたと考えられる。また、本試験では、食生活を変化させないように指示していることから、AGEs の変化率は、魚鱗 CP 摂取による効果であると考えられる。

AGEs は、糖代謝と非常に密接に関わっている[31]。男性は女性との筋肉量の違いによりグルコース代謝量が高く[32]、胃腸管におけるグルコースの吸収速度に性差が影響することが報告されているため[33]、男女別に AGEs 量を検証した(表 17)が、男性の n 数が少なかったため、正確な評価はできなかった。AGEs の原因と考えられる性差による筋肉量に由来した糖代謝を検討することができなかったため、今後の研究によって解明していきたい。

友杉らは、毎日 16 g のコラーゲントリペプチドを 6 か月間摂取すると、血中 AGEs レベルが前後比較において有意に低下したことを報告している[34]。AGEs の測定方法や血中と皮膚中という点で大きく異なったが、本試験においても同様の結果が得られた。

さらに、Devasia らは、CP 摂取はインドの糖尿病(T2D)患者への CP 摂取は、インスリン抵抗性、FBS および HbA1c レベルを低下させ、糖尿病を改善したと報告している[9,10]。糖尿病患者の血糖値を下げるメカニズムとして、Iba らは、CP が *in vivo* でインスリン分泌を促進するグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) 分泌を促進し、GLP-1 を非活性化するジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP4) 活性を阻害したことを報告している[35]。このように CP の摂取によって DPP4 の阻害および GLP-1 分泌が促進されることによって、結果として血糖値により皮膚中の AGEs が減少した可能性が考えられる。ただし、本試験の結果は FBS、HbA1c、および HOMA-R は実測値および変化率においてプラセボとの比較、および摂取前後比較において有意な差はなかったことから、T2D 患者より健常者に

においては血糖値関連に関わる因子への CP の影響は少ない可能性がある。つまり、T2D 患者は健常者に比べて GLP-1 分泌が低く、DPP4 レベルが高い状態であるため、CP が血糖などに影響を与え、血糖値の改善に寄与しやすい可能性がある。このように、健常者において血糖値関連に関わる因子への CP の影響は少ないものの、GLP-1 分泌や DPP4 抑制傾向になることで、皮膚中 AGEs が減少したと推察された。また、プラセボに関してはマルトデキストリンを使用しており、エネルギーは同等であり還元性もなく、プラセボ群において摂取前と比較し、有意差はなかったことから、AGEs への増加には影響しなかったと考えられる。

AGEs は、AGEs 受容体の活性化を通じてメラニン生成を促進する[36]。Igase らは、カゼイン加水分解物を含む乳由来ペプチドの摂取は、AGEs を減少させることにより顔の色素沈着を軽減したと報告している[37]。このように、魚鱗 CP を毎日摂取して体内の AGEs を減らすと、顔の色素沈着も減少し、皮膚のシワ、弾力性、乾燥などが軽減される可能性がある[26]。これらのことから魚鱗 CP 摂取により皮膚中の AGEs が減少することによって皮膚のメラニン生成を減弱させる可能性も示唆された。

第 5 節 小括

本研究によって、健常人が 5 g/日の魚鱗 CP を 12 週間摂取することにより、ヒトの皮膚中 AGEs を有意に低下させることを見いだした。糖尿病患者ではなく、健常人において皮膚中の AGEs が減少したことも非常に興味深い結果となった。この結果は、魚鱗 CP 摂取による AGEs 抑制が、第 1 章第 2 章で示した魚鱗 CP によるヒト皮膚における保湿、弾力、シワ、透明感、滑らかさの改善効果に寄与しているという仮説を裏付ける可能性が示唆された。

ただし、魚鱗 CP による AGEs 抑制するメカニズムとして、生成された AGEs を分解促進しているのか、AGEs 自身を生成抑制しているのか解明できていない。また、AGEs には血液中の糖質の量およびタンパク質量が大きく関係するが、今後の研究においては、それらの摂取源である食事の追跡調査、糖代謝に関わる筋肉量の調査を実施し、性別の割合を統一して検証していきたい。

第4章 *In vitro* 試験による皮膚への作用機構検討

以上の研究から、魚由来 CP が皮膚へ好影響を与えることが明らかとなったが、魚由来 CP による培養細胞などを用いた直接的な作用は未だ十分に明らかとなっていない。このことから、以降は *in vitro* 試験において、線維芽細胞および表皮角化細胞、メラノーマ細胞を用いて魚由来 CP を添加による細胞への直接的な効果および CP 自身の抗酸化活性・チロシナーゼ活性抑制効果を検証することを目的とした(図 11)。

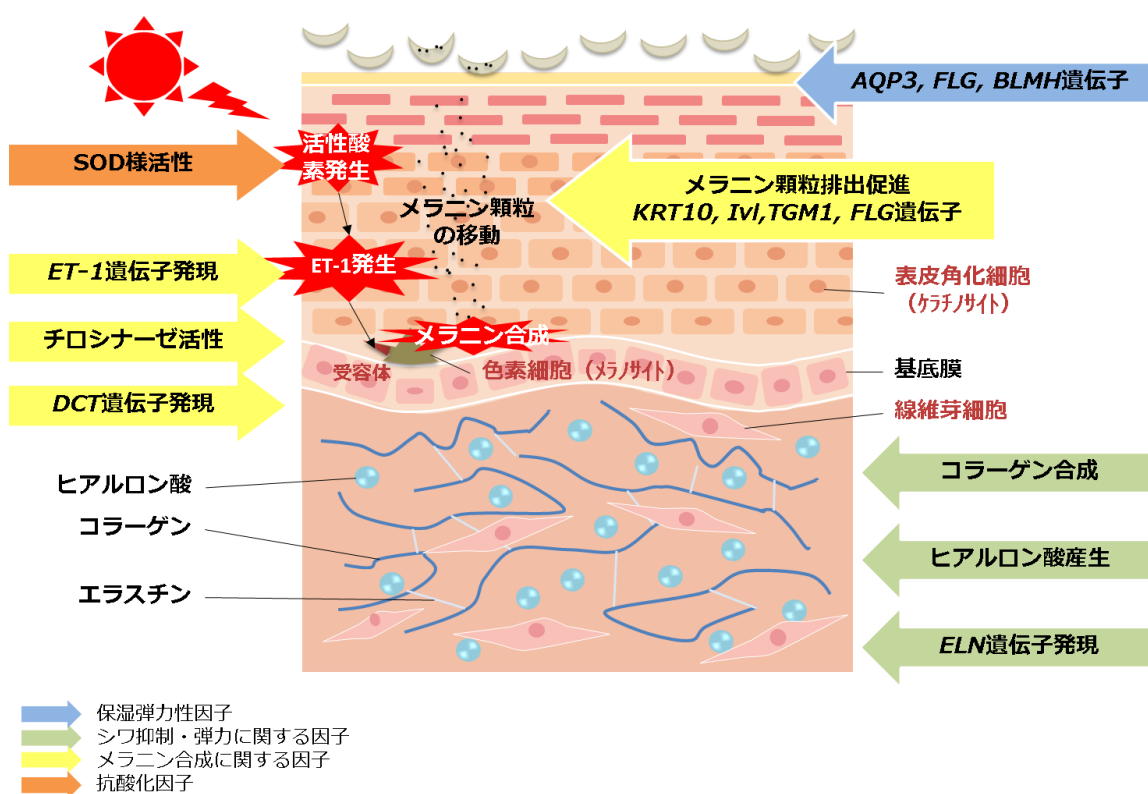


図 11 *in vitro* 試験における皮膚への作用機構模式図

第 1 節 線維芽細胞における新生コラーゲン合成、ヒアルロン酸産生、エラスチン合成遺伝子発現評価

一般的に線維芽細胞は、真皮の主要な細胞成分であるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス (ECM) の産生により、皮膚の構造と機能を維持する上で重要な役割を果たしている。これら ECM の産生は、真皮の水分保持能を高めることによって、いわゆる皮膚のハリやシワ、弾力に大きく影響を与えている[38-40]。

第 1 項 目的

CP による細胞外マトリックスへの作用が、CP 摂取によるヒト臨床試験における皮膚の弾力改善やシワの抑制効果に寄与しているという仮説を裏付けるため、真皮内の線維芽細胞を用いて ECM 産生として新生コラーゲン合成、ヒアルロン酸合成、エラスチン合成遺伝子 (*ELN*) 発現を検証した。また、年齢によってこれらの ECM 産生量が変わると想定されるため、由来細胞の年齢による ECM 量の比較と、Hyp 含有ジ・トリペプチド量の違いについて、新生児由来の細胞と 45 歳由来の線維芽細胞を用いて評価した。

第 2 項 方法

被験剤は、表 18 に示すように魚鱗を原料とするペプチドで、製造方法の違いにより Hyp 含有ジ・トリペプチドが 8,000 ppm 以上含む、魚鱗ジ・トリペプチド高含有 CP (di- and tripeptide High containing Collagen Peptides; HCP、重量平均分子量 800Da)と、このジ・トリペプチドを 50 ppm 含む魚鱗ジ・トリペプチド低含有 CP (di- and tripeptide Low containing Collagen Peptides; LCP、重量平均分子量 6,000Da)の 2 種類を用いた。

表 18 被験剤情報

	魚鱗ジ・トリペプチド 低含有 CP (LCP)	魚鱗ジ・トリペプチド 高含有 CP (HCP)
重量平均分子量	6,000	800
Pro-Hyp	1	8
Hyp-Gly	10	7,387
Ala-Hyp	3	79
Ala-Hyp-Gly	1	198
Glu-Hyp	2	86
Glu-Hyp-Gly	9	7
Phe-Hyp	3	181
Gly-Pro-Hyp	6	8
Leu-Hyp	1	210
Leu-Hyp-Gly	0	3
Pro-Hyp-Gly	0	13
Ser-Hyp-Gly	14	126
ジ・トリペプチド含有量合計	50	8,306

分子量: Da

各種ペプチド含有量単位: ppm

まず、線維芽細胞が生成するコラーゲン合成量について ELISA 法によって評価した。細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF である新生児細胞(ヒスパニック, New Born; NB 略, クラボウ社製、Cat. No. KF-4009, Lot.689524)、45 歳細胞(ヒスパニック, Adult 45; AD45 略, クラボウ社製、Cat. No. KF-4109, Lot.00703)を用いた。培養培地(100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 及び 10%FBS 含有 DMEM/F12 培地(Gibco 社製 Cat. No. 11330-032))に 2×10^4 cells/mL に調製した NHDF 細胞懸濁液を 96 wells plate (NUNC Cat. No. 167008) に 200 µL ずつ播種した(4×10^3 cells/well)。3 日培養後、90%サブコンフルエントになっていることを目視確認後、FBS 不含試験培地に変更した。サンプルを終濃度 0.1%となるように添加し、72 時間接触させた。72 時間の試験培養終了するまで、培地交換はしなかった。72 時間経過後の培養上清を ELISA 法(Takara 社製 Cat. No. MK101 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit)にて、製造業者のプロトコールに従って I 型コラーゲンの合成量を測定した。合わせて、ニュートラルレッド法によって細胞数を測定した。つまり、72 時間後の培養上清回収後、残った培地を捨て、新しい試験培地にて調製した 0.25 mg/mL

のニュートラルレッド試薬(富士フイルム和光純薬株式会社 Cat. No. 140-00932)を、細胞に 200 μ L ずつ添加し、37°Cで 20 分反応させた。PBS(-) 300 μ L で 2 回洗浄し、1%酢酸を含む 50%エタノール溶液を添加し 37°Cで 20 分静置することで細胞に吸収されたニュートラルレッド色素を抽出した。抽出液 100 μ L を新しい 96 well plate に回収し、プレートリーダーにて波長 540 nm にて測定し、検量法により、細胞数を算出した。測定した I 型コラーゲン量を細胞数で割り、細胞数当たりの新生コラーゲン合成率を算出した。

$$\text{新生コラーゲン合成率(\%)} = \frac{(\text{細胞数当たりのサンプル添加群コラーゲン量})}{(\text{細胞数当たりの Blank 群コラーゲン量})} \times 100$$

次に、線維芽細胞が生成するヒアルロン酸量を ELISA 法によって評価した。細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF である NB、AD45 を用いた。培養培地(100 units/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin 及び 10%FBS 含有 DMEM/F12 培地(Gibco 社製 Cat. No. 11330-032))に 2×10^4 cells/mL に調製した NHDF 細胞懸濁液を 96 wells plate (NUNC Cat. No. 167008) に 200 μ L ずつ播種した(4×10^3 cells/well)。1 日培養後、90%サブコンフルエントになっていることを目視確認後、FBS 不含試験培地に変更した。サンプルを終濃度 0.025%となるように添加し、24 時間接触させた。24 時間の試験培養終了するまで、培地交換はしなかった。ヒアルロン酸量は、24 時間経過後の培養上清を、ELISA 法(Hyaluronan Duo Set ELISA: R&D Systems 社製 Cat. No. DY3614)にて、製造業者のプロトコールに従って測定した。合わせて、上記と同様に細胞数を測定した。測定したヒアルロン酸量を細胞数で割り、細胞数当たりのヒアルロン酸産生促進率を算出した。

$$\text{ヒアルロン酸産生率(\%)} = \frac{(\text{細胞数当たりのサンプル添加群ヒアルロン酸量})}{(\text{細胞数当たりの Blank 群ヒアルロン酸量})} \times 100$$

次に、線維芽細胞におけるエラスチン遺伝子発現量を RT-q PCR によって評価した。細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF である NB、AD45 細胞を用いた。培養培地(100 units/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin 及び 10%FBS 含有 DMEM/F12 培地(Gibco 社製 Cat.No. 11330-032))に 4×10^4 cells/mL に調製した NHDF 細胞懸濁液を 100 mm dish に 10mL ずつ播種した(4×10^5

cells/dish)。添加するサンプルとして、LCP と HCP を用いた。サンプルを終濃度 0.025%となるように添加し、24 時間反応させ、TRIzol (Invitrogen 社製, Cat. No.15596018)を用いてプロトコール通りに Total RNA を抽出した後、吸光度 260 nm を測定することによって 1 µg/mL に Total RNA を調製した。Total RNA の純度は A260/A280 で計算し、純度が 1.8 以上のものを使用した。次に、High Capacity RNA to cDNA Kit (ライフテクノロジーズ社製 Cat No.4387406)を用いてプロトコールに従って逆転写を行い、cDNA を得た。RT-qPCR では標的遺伝子として、*ELN* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs00355783_m1)を測定した。補正遺伝子は *GAPDH*(Thermo Fisher Scientific 製: 4352934E)で行った。計算は検量線法を用い、プライマー&プローブは FAM 色素を用いた。PCR は、Step One Plus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 製)を用い、Taqman® fast advanced master mix (Thermo Fisher Scientific 製, Cat. No. 4444557)を用いてプロトコールに従って、初期変性(95°C, 20sec, 1cycle)、アニーリング(95°C, 1sec)、伸長(60°C, 20sec)で 40 サイクル反応した。

下記の計算によりエラスチン遺伝子発現率を算出した。

$$\text{エラスチン遺伝子発現率(\%)} = \frac{(\text{サンプル添加群エラスチン遺伝子発現量})}{(\text{Blank 群エラスチン遺伝子発現量})} \times 100$$

新生コラーゲン合成もヒアルロン酸産生、*ELN* 遺伝子発現試験においても、グラフは、NB の Blank を 100 とした時の相対値で示した。統計処理は、STAT MATE V ソフトを用いた。さらに、信頼率 95%の信頼区間にて Tukey 検定の両側検定にて有意差を計算した。異アルファベット間で $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

第3項 結果

魚由来 CP 添加による細胞増殖抑制は、新生コラーゲン合成においてもヒアルロン酸産生においても見られなかった。

新生コラーゲン合成の結果を、図 12 に示す。Blank の新生コラーゲン量は、NB が高く、AD45 とは有意差はなかったものの NB の 4 分の 1 程度であった。NB では、LCP において Blank と比較し新生コラーゲン合成が有意に高くなったが、AD45 では有意な上昇は見られなかった。一方、HCP は、NB では Blank および LCP よりも有意に高い新生コラーゲン量があり、AD45 においては、Blank と比較し HCP が有意に高くなった。

下川らは、魚由来 CP が線維芽細胞のコラーゲン産生を促進し、皮膚の水分量の増加に寄与する可能性があるとも報告[41]しており、同様の結果が得られた。

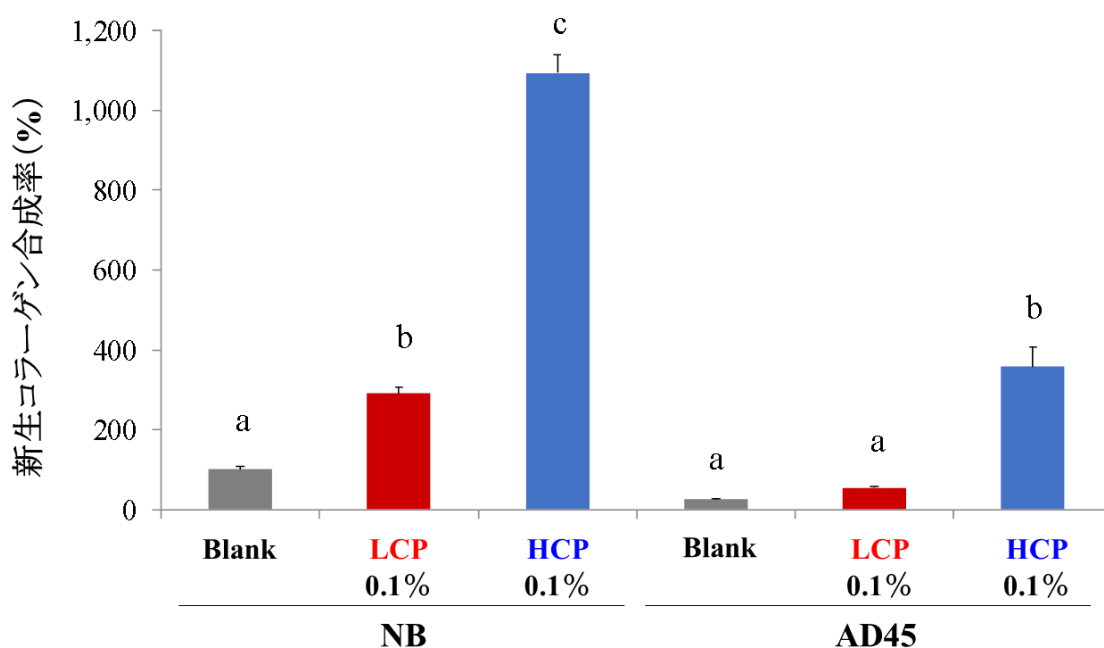


図 12 LCP, HCP 添加による新生コラーゲン合成促進能の評価

正常皮膚線維芽細胞 (NB、AD45) を用いて、ELISA 法によりプロコラーゲン量を測定, Mean ± SE, $n = 3$, NB Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

ヒアルロン酸産生の結果を、図 13 に示す。Blank 同士の比較において、AD45 群のヒアルロン酸量は NB 群に比べて有意に 2 分の 1 程度に減少した。LCP は、NB において有意にヒアルロン酸量を促進しなかったが、AD45 では Blank と比較し有意にヒアルロン酸量を増加させた。HCP においては、NB、AD45 共に Blank と比較し、有意なヒアルロン酸量の産生促進が確認された。

大原らは、コラーゲンペプチド摂取時に血中に増えるとされる PO を添加することによって線維芽細胞の *HAS2* 遺伝子発現が有意に増加することを報告しており[42]、今回は PO を多く含む HCP において有意にヒアルロン酸量が増加したことと一致していた。

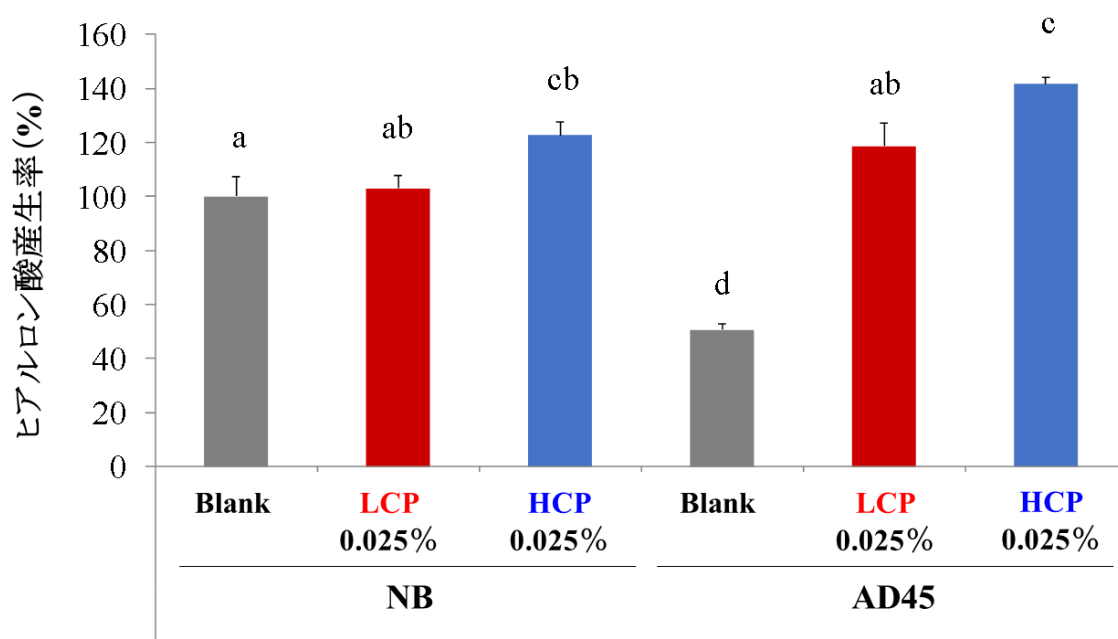


図 13 LCP, HCP 添加によるヒアルロン酸産生促進能の評価

正常皮膚線維芽細胞(NB、AD45)を用いて ELISA 法によりヒアルロン酸測定, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, NB Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

ELN 遺伝子発現量の結果を、図 14 に示す。Blank 同士の比較において、AD45 は NB と比較し *ELN* 遺伝子発現量は 4 分の 1 程度に有意に減少した。NB も AD45 細胞でも、LCP、HCP に限らず *ELN* 遺伝子発現は Blank と比較し有意に改善した。NB および AD45 においても、HCP は LCP と比較し有意差はなかったことから、*ELN* 遺伝子発現においては、CP に含有する Hyp 含有ペプチド量との関連性は低い可能性があると考えられた。

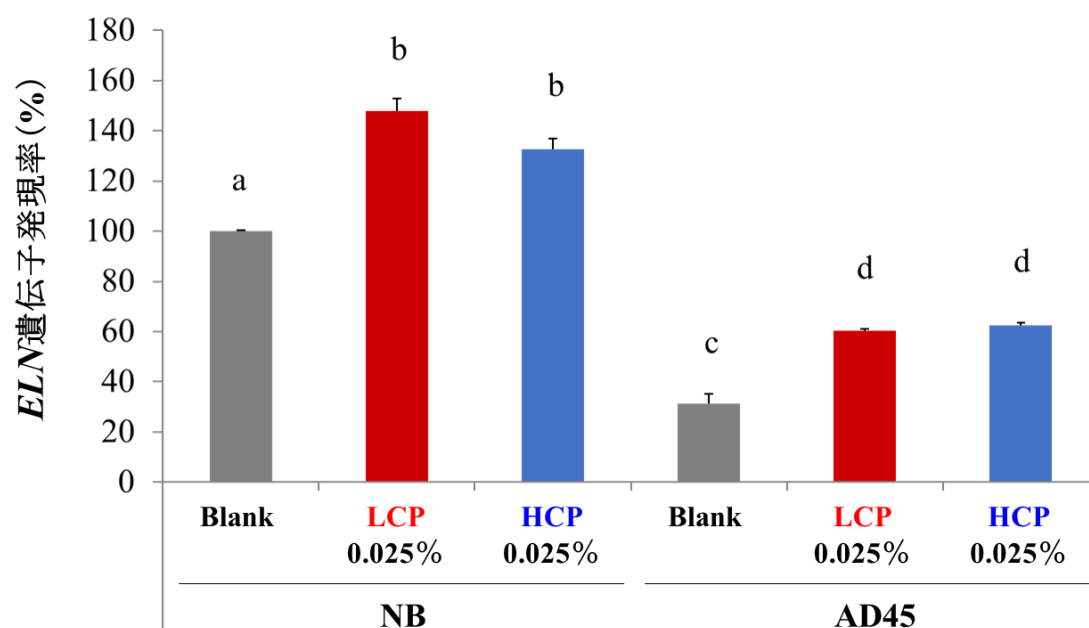


図 14 LCP, HCP 添加によるエラスチン遺伝子 (*ELN*) 発現の評価

正常皮膚線維芽細胞 (NB、AD45) を用いて RT-qPCR 法により *ELN* 遺伝子発現量を測定、ハウスキーピング遺伝子: *GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, NB Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

真皮の線維芽細胞において、年齢を重ねた細胞(AD45)は、新生児由来細胞(NB)と比較し、新生コラーゲン量やヒアルロン酸量及び *ELN* 遺伝子発現量が有意に減少もしくは減少傾向を示すことが確認された。また、細胞の年齢によって反応性は異なるがLCPおよびHCP添加によって、新生コラーゲン合成およびヒアルロン酸産生、*ELN*遺伝子発現を有意に促進した。新生コラーゲン合成およびヒアルロン酸産生においては、LCP よりも HCP が有意に促進することから、これらにはHyp 含有ジ・トリペプチドが影響を与えていることを見いだした。

このことから、臨床試験において皮膚の弾力性や、皮膚のシワが改善したことは、真皮内の ECM が増加し、水分保持量が増えることで、皮膚のハリを与え、皮膚の弾力性やシワが改善したと考えられた。

今後の研究においては、コラーゲン分解やヒアルロン酸分解、エラスチン分解における遺伝子発現量およびタンパク量、活性化レベルを確認していきたい。

第2節 UV照射時による線維芽細胞のコラーゲン合成遺伝子、ヒアルロン酸合成遺伝子、エラスチン合成遺伝子発現評価

前節においては、紫外線 (UV) を照射せず、細胞の年齢と LCP および HCP の効果を検証した。通常の生活をしていく上では、UV による皮膚への影響は無視できない。一般的に UV は、皮膚に様々な悪影響を及ぼす。真皮においては、UV 照射によって、ECM の分解や、炎症反応、酸化ストレス、光老化が進むと言われている[43]。UV は、真皮のコラーゲンやエラスチンを分解する酵素 (マトリックスメタロプロテアーゼなど) の産生を増加させる[38,43]。これにより、コラーゲンやエラスチンの量が減少し、皮膚の弾力性が低下し、シワやたるみなどの老化現象が生じることが分かっている。

第1項 目的

UV 照射時における CP の細胞外マトリックスへの作用が、ヒト臨床試験における CP 摂取による皮膚の弾力改善やシワの抑制効果にも寄与しているという仮説を裏付けるために、第1節とは異なり、UV 照射した後に LCP もしくは HCP を添加することで、コラーゲン合成遺伝子である *Coll1a1*、およびヒアルロン酸合成遺伝子である *HAS 2*、エラスチン合成遺伝子である *ELN* の発現量が変化するかを UV 照射しなかった細胞の遺伝子発現量と比較した。

第2項 方法

細胞は、前節において AD45 をすべて使い切ったため (追加購入不可)、新生児由来正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF(NB) (クラボウ社製、Cat. No. KF-4009, Lot.689524) を用いて評価した。培養培地 (100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 及び 10% FBS 含有 DMEM/F12 培地 (Gibco 社製 Cat. No. 11330-032)) に 4×10^4 cells/mL に調製した NHDF 細胞懸濁液を 100 mm dish に 10 mL ずつ播種した (4×10^5 cells/dish)。3 日培養後、90% サブコンフルエントになっていることを目視確認後、PBS 10 mL に置き換え、UV 照射区はクロストロリンカーで UVB ランプを用い、ディッシ

ュの蓋を開け、照射量が 2.5 mJ/cm² (3500 μW/cm²×7 秒) になるように UVB を照射した。UV 非照射区も PBS に置き換え、次いで試験培地 9 mL (DMEM/F12 培地) に置き換えた。添加するサンプルとして、LCP と HCP を用いた。サンプルを DMEM/F12 培地に 2% になるように溶解し、試験培地に 1 mL 添加し、終濃度 0.2% とした。サンプル添加後、24 時間反応させ、TRIzol (Invitrogen 社製, Cat. No.15596018) を用いてプロトコール通りに Total RNA を調製した。以下、第 4 章第 1 節第 2 項と同様に、Total RNA を調製、逆転写、定量的 RT-qPCR は補正遺伝子 *GAPDH* を用い、PCR 反応、遺伝子発現量の算出および統計的解析を実施した。プライマーは *Colla1* (Thermo Fisher Scientific 製: Hs00164004_m1)、*HAS2* (Thermo Fisher Scientific 製: Hs00193435_m1)、*ELN* (Thermo Fisher Scientific 製: Hs00355783_m1) を用いて測定した。

$$\text{遺伝子発現促進率(\%)} = \frac{(\text{サンプル添加群遺伝子発現量})}{(\text{Blank 群遺伝子発現量})} \times 100$$

第3項 結果

Colla1 遺伝子発現を図 15 に示す。Blank 同士で比較した場合、UV 非照射群と比べ、UV 照射することで *Colla1* 遺伝子発現が有意に低下した。UV 非照射群時において、Blank と比較し LCP に有意差はつかなかったが、HCP 群において有意に *Colla1* 遺伝子発現が高かった。一方で UV 照射時は、LCP、HCP 共に *Colla1* 遺伝子発現は有意に増加しなかった。また、LCP と HCP との比較では、UV 非照射時において、LCP よりも HCP において *Colla1* 遺伝子発現が高い傾向を示した。

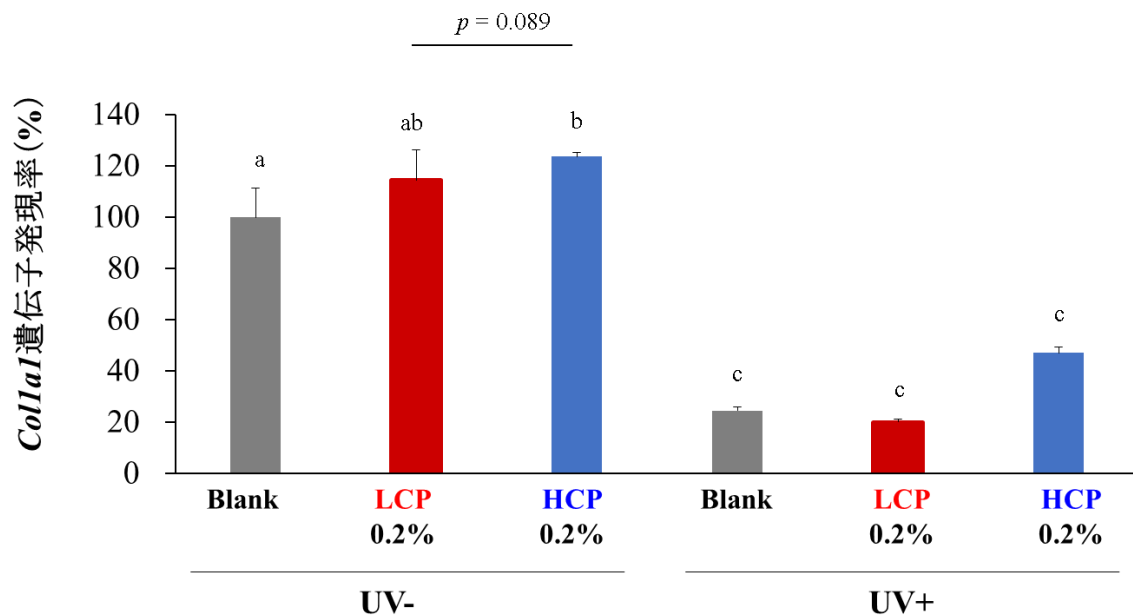


図 15 LCP, HCP 添加による UV 照射時のコラーゲン合成(*Colla1*) 遺伝子発現の評価

正常皮膚線維芽細胞(新生児由来)を用いて、25,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ で UV 照射後、サンプルを添加し 24 時間後 RT-qPCR 法により遺伝子発現量を測定、ハウスキーピング遺伝子:*GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, UV-Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

LCP, HCP 添加による *HAS2* 遺伝子発現結果を図 16 に示す。Blank 同士を比較した際、UV 照射群においては、UV 非照射群と比べ、*HAS2* 遺伝子発現が有意に高かった。UV 非照射群でも UV 照射群でも、それぞれの Blank と比較し LCP、HCP 共に有意に *HAS2* 遺伝子発現が高かった。また、UV 非照射では LCP と HCP の遺伝子発現の有意差はなかったが、UV 照射群においては、LCP よりも HCP において有意に *HAS2* 遺伝子発現が高かった。

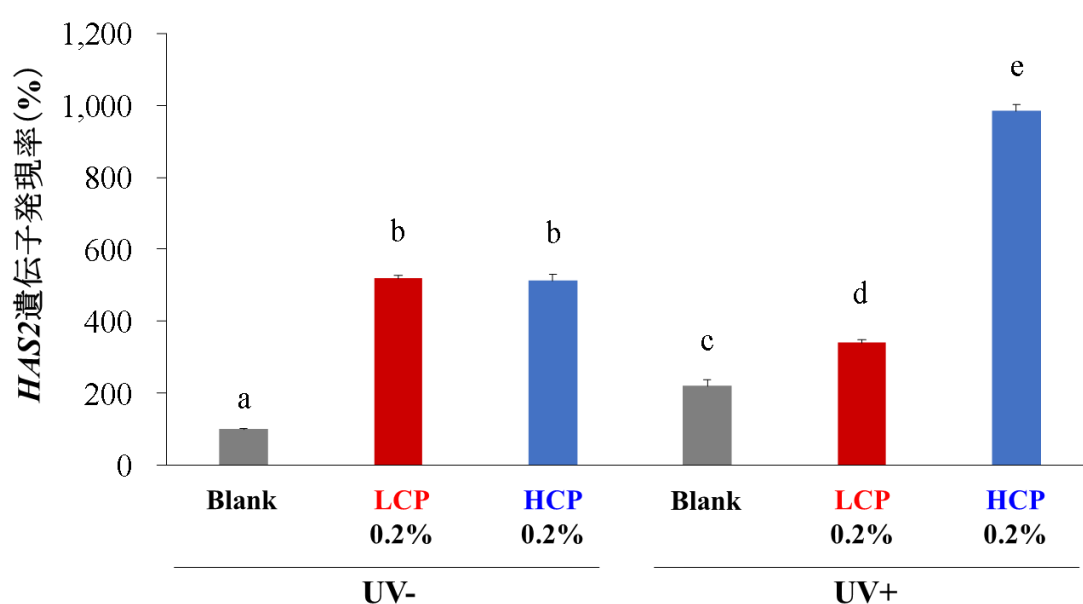


図 16 LCP, HCP 添加による UV 照射時のヒアルロン酸合成 (*HAS2*) 遺伝子発現の評価

正常皮膚線維芽細胞(新生児由来)を用いて、25,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ で UV 照射後、サンプルを添加し 24 時間後 RT-qPCR 法により遺伝子発現量を測定、ハウスキーピング遺伝子:*GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, UV-Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

ELN 遺伝子発現を図 17 に示す。Blank 同士を比較すると、UV 照射群においては、UV 非照射群と比べ、*ELN* 遺伝子発現が4分の1程度まで減少したが有意差は見られなかった。UV 非照射群、UV 照射ともに、Blank や LCP と比較し、HCP は有意に *ELN* 遺伝子発現が促進した。第 1 節の NB のデータとは異なり、UV 非照射群において LCP よりも HCP において有意に *ELN* 遺伝子発現が高かったことは、添加された被験剤濃度の差によるものと想定され、濃度が高いほど *ELN* 遺伝子発現は高くなることが示された。

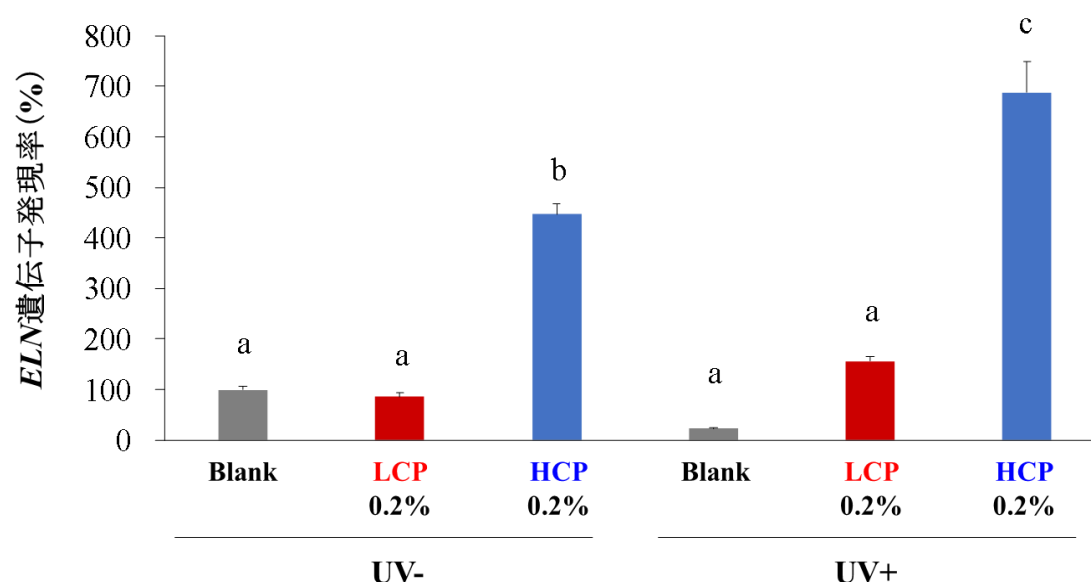


図 17 LCP, HCP 添加による UV 照射時の *ELN* 遺伝子発現の評価

正常皮膚線維芽細胞(新生児由来)を用いて、25,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ で UV 照射後、サンプルを添加し 24 時間後 RT-qPCR 法により遺伝子発現量を測定、ハウスキーピング遺伝子:*GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, UV-Blank を 100 として計算, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

本節では、UV 照射の有無における、LCP および HCP 添加による *Colla1*、*HAS2*、*ELN* 遺伝子発現への影響を検討した。

Blank において、UV 未照射と比較し UV 照射によって、*Colla1*、*ELN* 遺伝子発現が有意もしくは減少傾向を示し、*HAS2* 遺伝子発現は有意に高かった。UV 照射時、LCP 添加によって、*HAS2* 遺伝子発現が有意に増加したが、HCP は、*HAS2* および *ELN* 遺伝子発現を有意に増加した。

以上のことから、UV 照射時、真皮内の *HAS2* および *ELN* 遺伝子発現が LCP、HCP によって増加し、Hyp 含有ジ・トリペプチド量が高いほどこれらの遺伝子発現量が増加した。このことから、Hyp 含有ジ・トリペプチドが *HAS2* および *ELN* 遺伝子発現へ影響し、真皮内の皮膚の弾力性およびシワの改善につながっていることを見いだした。

第4章第1節と同様に、これらの ECM の産生だけではなく、代謝全体として、コラーゲン分解やヒアルロン酸分解、エラスチン分解における遺伝子発現量およびタンパク量、活性化レベルを確認していなかったため、今後の研究において解明していきたい。

第3節 表皮角化細胞における保湿性関連遺伝子発現評価

前節までは、真皮に存在する線維芽細胞による評価を行ったが、第1章第2章の臨床試験における Corneometer による測定は、皮膚表面から約 15 μm の深さの静電容量を測定していることから、真皮ではなく、表皮における保湿性のメカニズムを検討する必要があると考えられた。

表皮の状態に影響する要因として、保湿性因子であるアクアポリン 3 (AQP3) が挙げられる。AQP3 は細胞膜に存在する水チャネルタンパク質であり、水分子を選択的に透過させることで、細胞内外の水量を制御している[44]。また、他の表皮における保湿性因子としては、表皮表面における天然保湿因子 (Natural Moisturizing Factor: NMF) が挙げられる。この NMF は、角質層に水分を保持する役割を持ち、皮膚の乾燥を防ぐ。さらに、フィラグリン (FLG) は、角化細胞の分化過程で発現するタンパク質であり、角化細胞が成熟し、角質層へと移行する過程で生成される。FLG はカクレイン関連ペプチダーゼや、ブレオマイシンヒドロラーゼ (BLMH) などのプロテアーゼによって分解され[45]、NMF を構成するアミノ酸へと変換される。FLG の機能不全は、アトピー性皮膚炎などの乾燥性皮膚疾患の発症に深く関与することが知られており[46]、フィラグリンおよび NMF の産生は重要である。また、ブレオマイシンヒドロラーゼのようなフィラグリン分解酵素によってフィラグリンは NMF へ変換されることから、分解酵素の評価も重要となる。

第1項 目的

CP による表皮角化細胞の保湿性マーカーへの作用が、CP 摂取によるヒト臨床試験における皮膚の保湿改善効果に寄与しているという仮説を裏付けるために、表皮角化細胞を用いて、LCP、HCP 添加によって AQP3、FLG、BLMH 遺伝子発現を促進するかどうかを検証した。

第2項 方法

細胞は新生児由来正常ヒト皮膚角化 NHEK(NB)(クラボウ社製、Cat. No. KK-4009, Lot.08344)を用いた。培養培地(HuMedia-KG2 培地(クラボウ社製 Cat. No. KK-2150S))に 1.25×10^4 cells/mL に調製した NHEK (NB) 細胞懸濁液を 6wells plate に 2 mL ずつ播種した (2.5×10^4 cells/well)。5 日培養後、90%サブコンフルエントになっていることを目視確認後、試験培地に置き換えた。サンプルは、LCP と HCP を用いた。サンプル添加後、24, 48, 72 時間反応させ、TRIzol(Invitrogen 社製, Cat. No.15596018)を用いてプロトコール通りに細胞を回収した。ブレオマイシンヒドロラーゼ合成遺伝子 (*BLMH*) の評価は、24 時間、*AQP3* 遺伝子の評価は 48 時間、*FLG* 遺伝子の評価は 72 時間で回収した細胞を用いた。

以下、第4章第1節第2項と同様に、Total RNA を調製、逆転写、定量的 RT-qPCR は補正遺伝子 *GAPDH* を用い、PCR 反応、遺伝子発現量の算出および統計的解析を実施した。プライマーは、*FLG* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs00856927_g1)、*BLMH* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs00166071_m1)、*AQP3* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs01105469_g1)を用いて評価した。

第3項 結果

図 18 に皮膚の NMF の構成タンパク質の 1 つであるフィラグリン合成遺伝子の *FLG* と、フィラグリンを分解する *BLMH*、および表皮の水分輸送たんぱくであるアクアポリン 3 タンパクの合成遺伝子である *AQP3* の遺伝子発現量の測定結果を示した。Blank と比較し LCP 及び HCP において *FLG* 遺伝子発現は、有意に高かった。また、HCP は LCP と比較し有意に *FLG* 遺伝子発現が高かった。LCP、HCP ともに Blank と比較し有意に *BLMH* 遺伝子発現が上昇したが、LCP および HCP との差は見られなかった。また、Blank と比較し LCP は *AQP3* 遺伝子発現が有意な高値を示さなかったが、HCP は Blank および LCP と比較し *AQP3* 遺伝子発現が有意に高かった。

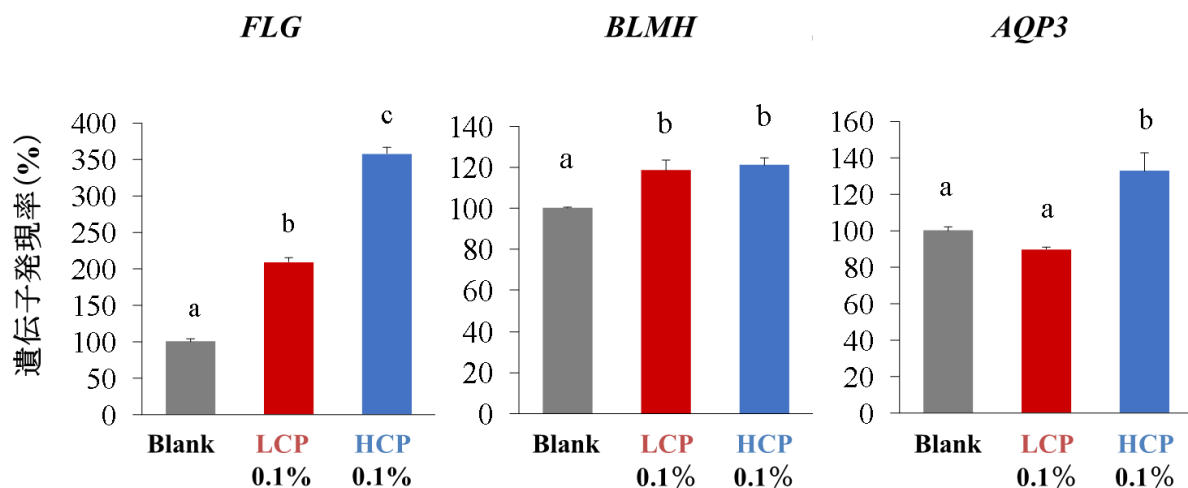


図 18 LCP, HCP 添加による表皮角化細胞における皮膚保湿関連遺伝子発現への影響

正常皮膚表皮角化細胞を用いて RT-qPCR 法により測定, ハウスキーピング遺伝子: *GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

FLG 遺伝子発現においては、Blank と比較し LCP と HCP の両方で有意な増加が認められた。また、HCP が LCP よりも有意に遺伝子発現を増加させた。これらより、CP の作用として NMF の構成タンパク質の 1 つであるフィラグリンタンパクが増加する可能性が示唆された。*FLG* を分解するとされる酵素の 1 つである BLMH が活性化すると皮膚表面の NMF は増加する。本試験においては、Blank と比較し LCP および HCP 添加によって、*BLMH* 遺伝子発現が有意に高くなることが明らかになっている。これらの結果から、NMF の原料である *FLG* が増加し、その *FLG* が BLMH によって分解促進されることで、皮膚表面上の NMF が増加し、最終的に皮膚の保湿性が改善している可能性が示唆された。しかし、BLMH 酵素の活性までは確認できていない。また、分解する他のカクレイン系酵素の活性化や遺伝子発現は確認していないため、今後の研究において解明していきたい。

一方で、*AQP3* 遺伝子発現においては、Blank および LCP と比較し、HCP のみで有意に高かった。このことから、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP によって、*AQP3* 遺伝子発現を促進し、表皮層の水の透過性を高めることで、皮膚の保湿性の改善に寄与する可能性が考えられる。

しかしながら、この研究は遺伝子発現量の評価に留まっており、タンパク質としての増加や、酵素の活性を検討できていないことから、今後の研究において解明していきたい。

第4節 表皮角化細胞におけるターンオーバー関連遺伝子発現評価

第4章の第3節においては表皮の保湿性に着目し関連する遺伝子評価を行ったが、皮膚の色素沈着抑制は、表皮のターンオーバーも関わってくる[47]ため、表皮角化細胞におけるターンオーバーに関連する遺伝子発現の評価を行った。

表皮のターンオーバーは、基底層における細胞増殖から、角質層での細胞剥離に至るまでの複雑な過程であり、様々な遺伝子の発現によって厳密に制御されている[48]。分化関連遺伝子として、ケラチン、インボルクリン、ロリクリン、FLG、トランスグルタミナーゼ1(TGM1)の指標がある。ケラチンは、角化細胞の細胞骨格を構成する中間径フィラメントタンパク質で、角化細胞の分化段階に応じて、異なるケラチンタンパク質が特異的に発現しており、ケラチン10(KRT10)、ケラチン1(KRT1)は分化の指標としてよく用いられる。これらの発現増加は、分化の進行段階を示唆し、間接的に角化細胞のターンオーバーの進行を反映するものである。

一方、インボルクリン(Ivl)、ロリクリン、FLGは、角化細胞の顆粒層に特異的に発現するタンパク質であり、角質層形成に不可欠である。これらの発現は、角質層細胞の分化・成熟の終末期を反映している。TGM1は、角質細胞間脂質の形成に関与する酵素であり、角質層のバリア機能を担うコーニファイドエンベロープ(CE)形成に重要で、分化の進行を制御している。

第1項 目的

皮膚の滑らかさや透明感や色素沈着は、前節の保湿性関連遺伝子だけでなく、表皮のターンオーバーに関わってくる。CPによって表皮のターオーバーが促進されることは、臨床試験におけるCP摂取によって皮膚の滑らかさや透明感に寄与しているという仮説を検証するため、表皮角化細胞にLCPおよびHCPを添加し、ターンオーバーに関する遺伝子発現として、*KRT10*、*Ivl*、*TGM1*遺伝子発現量が亢進するかどうかを検討した。

第2項 方法

細胞は新生児由来正常ヒト皮膚角化 NHEK(NB)を用いて、皮膚のターンオーバー指標として、*KRT10* 遺伝子の評価は、24 時間で回収した細胞で、*Ivl*, *TGMI* 遺伝子の評価は 48 時間で回収した細胞を用いた。以下、第 4 章第 1 節第 2 項と同様に、Total RNA を調製、逆転写、定量的 RT-qPCR は補正遺伝子 *GAPDH* を用い、PCR 反応、遺伝子発現量の算出および統計的解析を実施した。プライマーは *KRT10* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs01043114_g1)、*Ivl* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs00846307_s1)、*TGMI* (Thermo Fisher Scientific 製:Hs01070310_m1)を用いて測定した。

第3項 結果

図 19 に LCP および HCP 添加による *KRT10*, *Ivl*, *TGM1* 遺伝子への影響について評価した結果を示す。Blank と比較し、LCP においては、*KRT10* および *Ivl* 遺伝子発現が有意に高く、HCP においては、*KRT10*、*Ivl*、*TGM1* 遺伝子発現すべてにおいて有意に高かった。さらに *KRT10*, *Ivl* 遺伝子発現において、LCP よりも HCP において有意に遺伝子発現が高いことが見出された。

清水らによるマウス実験では、CP 由来のジペプチドである PO および OG を経口投与すると、経皮蒸散水分量 (TEWL) が有意に減少し、角質層の水分量が有意に増加したことを報告している [49]。この事実と今回の研究の結果を照らし合わせると、PO および OG を多く含む HCP は表皮細胞のターンオーバーを促進するだけではなく、CE 形成をも強化することで、バリア機能を強化し、その結果 TEWL を有意に減少させ、角質層の水分量の増加に寄与していると推察された。

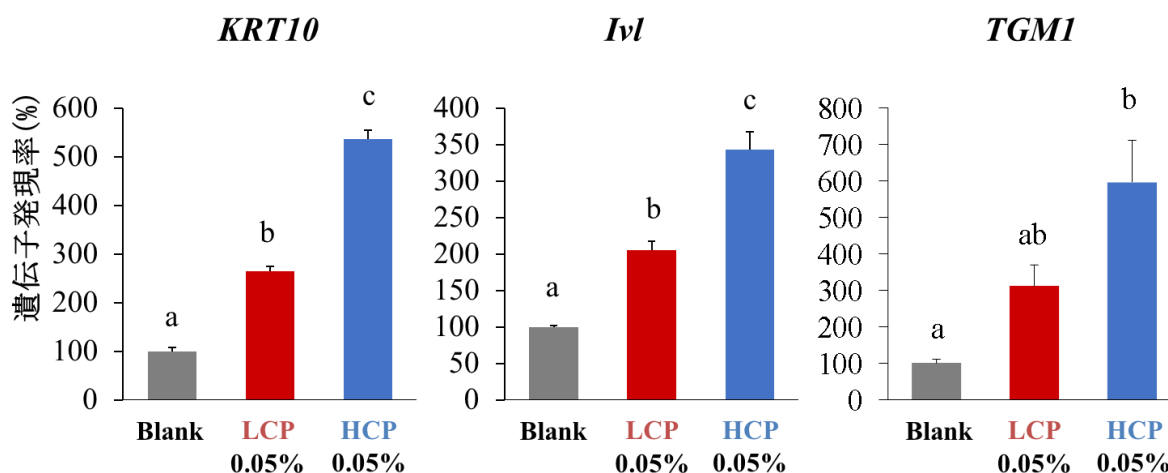


図 19 LCP, HCP 添加による皮膚ターンオーバー因子への影響

正常皮膚角化細胞を用いて RT-qPCR 法により測定，ハウスキーピング遺伝子: *GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

本節において、表皮角化細胞に LCP および HCP の添加により、ターンオーバーに関する *KRT10*、*Ivl*、*TGMI* 遺伝子発現が有意に高くなった。さらに、LCP よりも HCP が有意にこれらの遺伝子発現を促進していることが明らかとなった。

このことから、LCP や HCP は、表皮のターンオーバーの促進により、滑らかさや透明感、さらには皮膚の色素沈着を抑制し、CE を強化することで皮膚の保湿性を高めることに寄与している可能性を見いだした。

第 5 節 *in vitro* 試験における CP のスーパーオキシドディスムターゼ様活性評価

表皮への UV 照射により、DNA 損傷、炎症反応、酸化ストレス、メラニン産生、ターンオーバー異常が起こる。UVB は、ケラチノサイトに炎症性サイトカイン(例:TNF- α 、IL-1 β 、ET-1)の産生を誘導し、炎症性反応を惹起する[43]。この炎症は、赤み、腫れ、痛みなどの症状として現れ、また、全体的な皮膚老化の促進にも繋がる。細胞への UV 照射は、活性酸素種(ROS)の産生を増加させ、酸化ストレスを引き起こす。ROS は、細胞膜やタンパク質、DNA にダメージを与え、細胞の機能障害や老化を促進すると言われている。また、慢性的な UV 曝露により、ターンオーバーが遅延し、角質層の厚さが変化したり、バリア機能が低下する[43]。

また、UV 照射やストレスなどによって発生する ROS は、DNA やタンパク質と反応し、化学修飾するため、老化や発癌との関わりがあると考えられている[43,50]。中でも活性酸素の一つであるスーパーオキシドを消去する Superoxide dismutase (SOD)、および SOD 様物質が注目されている。SOD はスーパーオキシドの分解反応を触媒する酵素であり、スーパーオキシドに由来する酸化ストレスを減少させる役割がある。

第 1 項 目的

in vitro 試験によって LCP、HCP 自身に SOD 様活性があるかどうかを検証した。

第 2 項 方法

LCP、HCP を用いて SOD Assay Kit – WST (富士フイルム和光純薬社製; Cat. No. 345-90191)を用いて、製造業者のプロトコール(<https://www.dojindo.co.jp/technical/protocol/p19.pdf>)に従って、SOD 様活性を測定した。

第 3 項 結果

図 20 に LCP および HCP の SOD 様活性を示し、表示した濃度は最終濃度を示す。LCP およ

び HCP 共に SOD 様活性を持っていることが示されたが、Hyp 含有ペプチドを多く含む HCP の SOD 様活性が LCP よりも高いことが示された。

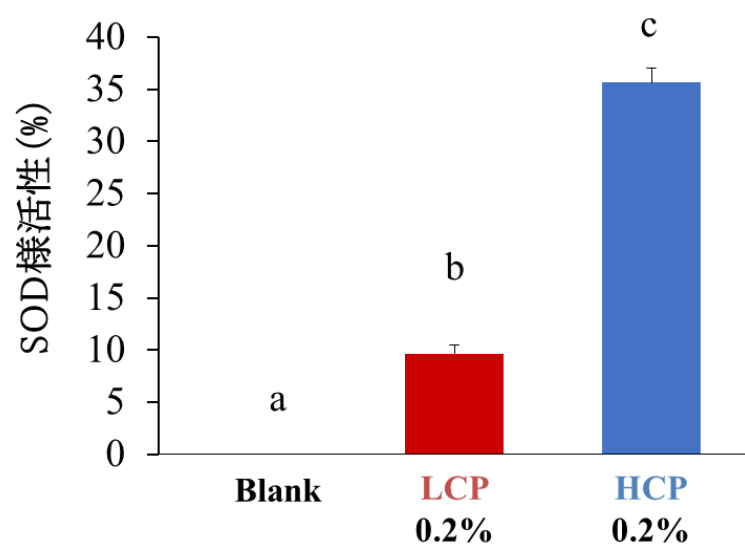


図 20 LCP および HCP の SOD 様活性

SOD Assay Kit で測定, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

LCP、HCP 共に SOD 様活性があることが明らかとなった。さらに、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP が LCP よりも高い SOD 様活性を持っていることを見いだした。CP 自身の SOD 様活性によって、皮膚の酸化ストレスを緩和し、皮膚の色素沈着を抑制している可能性が示唆された。

CP に関する SOD 様活性に関する報告はあまり報告されていない。Sheng らは、チョウザメ由来 CP を 10 mg/mL という高い濃度で評価を行い、ヒドロキシラジカル消去としては 72%以上を示し、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) ラジカル消去能も 47%以上を示していた[51]。本試験とは濃度が 5 倍も異なるため、同等の比較はできないが、CP に SOD 様活性が存在していることは一致していた。

しかしながら、抗酸化活性の内 SOD 様活性しか確認できていないことから、他の抗酸化評価が必要である。さらに、この抗酸化活性をもたらす活性物質(ペプチドも含む)を検証する必要がある。

第 6 節 表皮角化細胞におけるエンドセリン 1 遺伝子発現抑制評価

前節で述べたように、UV は、ケラチノサイトに炎症性反応を惹起したり、ROS 産生を増加させたり、皮膚のシワや色素沈着等の老化を促進する。また、UV によって、ケラチノサイトからエンドセリン 1 (ET-1) と呼ばれるペプチドが分泌され、この ET-1 はメラノサイトを刺激し、メラニン合成経路が促進する[52]。

第 1 項 目的

CP による ET-1 抑制作用が、CP 摂取によって皮膚の色素沈着抑制に寄与するという仮説を検証するため、表皮角化細胞における、LCP および HCP 添加による *ET-1* 遺伝子発現抑制効果を検証した。

第 2 項 方法

細胞は新生児由来正常ヒト皮膚角化 NHEK(NB)を用いて、第 4 章第 1 節第 2 項と同様に、Total RNA を調製、逆転写、定量的 RT-qPCR は補正遺伝子 *GAPDH* を用い、PCR 反応、遺伝子発現量の算出および統計的解析を実施した。プライマーは、*ET-1* 遺伝子 (Thermo Fisher Scientific 製: Hs00174961_m1) の評価は、24 時間で回収した細胞を用いた。

第3項 結果

図 21 に LCP および HCP 添加による *ET-1* 遺伝子発現量の結果を示す。LCP、HCP 共に有意に *ET-1* 遺伝子発現を抑制し、HCP は LCP よりも有意に高い *ET-1* 遺伝子発現抑制効果を示した。

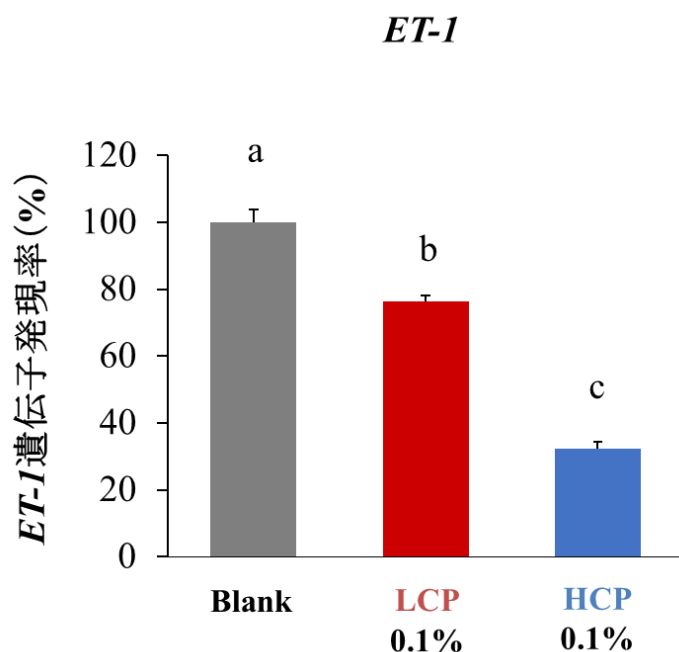


図 21 LCP, HCP 添加による炎症マーカー *ET-1* 遺伝子発現抑制効果
表皮角化細胞を用いて RT-qPCR 法にて遺伝子発現を測定, ハウスキーピング遺伝子: *GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

CP によって表皮細胞における *ET-1* 遺伝子発現を有意に抑制することを明らかにした。また、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP が LCP よりも有意に *ET-1* 遺伝子発現を抑制していることを見いだした。ケラチノサイトから分泌される *ET-1* によって、メラノサイトが刺激され、メラニン合成経路が促進するが、本結果から、この *ET-1* 遺伝子発現を抑制することによって、色素沈着を抑制する可能性が示唆された。

第 7 節 *in vitro* 試験における CP のチロシナーゼ活性抑制評価

以上のことから、UV 照射によって、発生した ROS を SOD 様活性によって抑制し、表皮角化細胞からメラノサイト刺激物質としての *ET-1* 遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。このように表皮角化細胞までのメラニン刺激経路までは検証したが、メラノサイトにおけるメラニン生成経路における CP の影響がわかっていない。

メラニン産生の制御機構は複雑で、メラノサイト刺激ホルモンや、様々な転写因子が関与している[53]。図 22 のメラニン生成経路で示すように、皮膚の酵素チロシナーゼは、メラノサイトにおいてメラニン合成の最初の、そして最も重要なステップを触媒する。チロシナーゼは、チロシンをドーパに、そしてドーパをドーパキノンに変換する酸化反応を触媒する。このドーパキノン、不安定な中間体であり、その後様々な経路を経て、ユウメラニンやフェオメラニンへと変化する。このことから、チロシナーゼの活性は、メラニン生成量を直接的に制御する重要な因子である。ドーパキノンから生成されたドーパクロームは、メラニン合成の第 2 ステップとドーパクロムトートメラーゼ (Dopachrome tautomerase; DCT) により、5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸 (DHICA) に変換させる。DHICA はさらに酵素反応によって変化し、最後に、ユウメラニン (黒褐色) となる。一方で、ドーパキノン、システイン存在下の経路ではフェオメラニン (黄～赤色) へと変化する[53,54]。

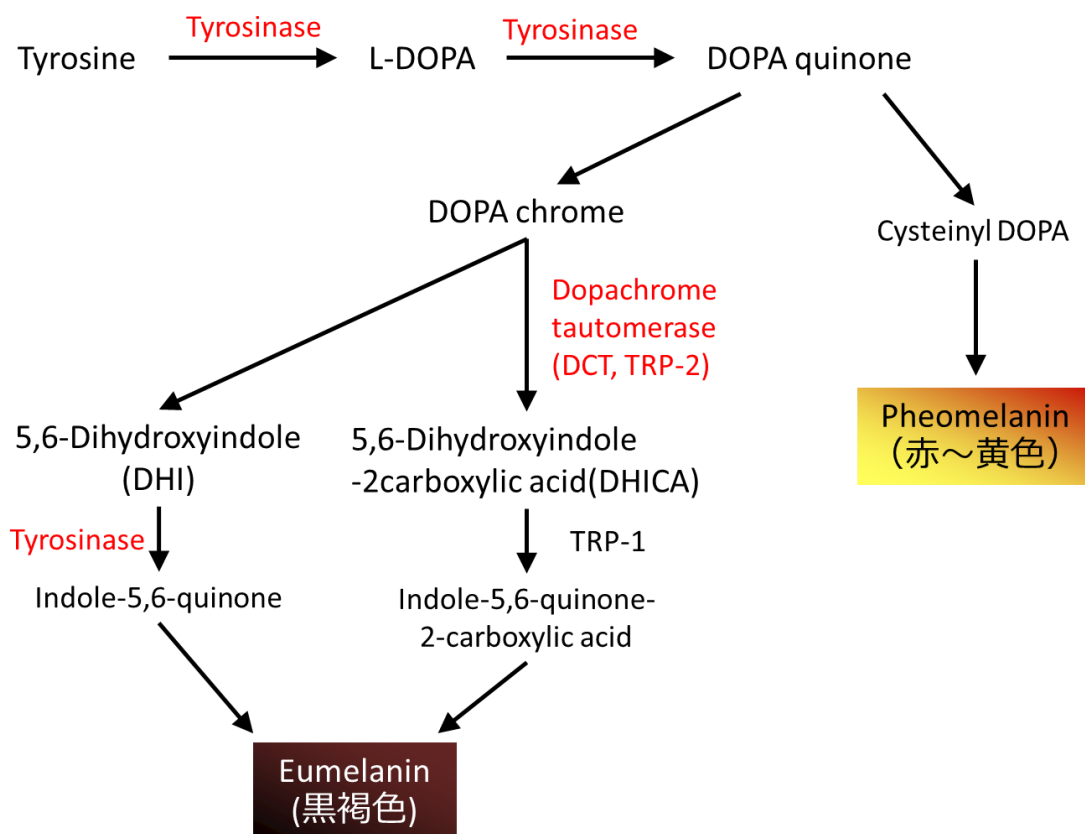


図 22 メラニン生成経路

第1項 目的

メラノサイトにおけるメラニン生成経路における CP の影響は確認されていないことから、メラニン生成経路のうち重要な酵素であるチロシナーゼ活性が抑制するかどうかを、*In vitro* 試験にて LCP、HCP を用いて評価した。

第2項 方法

チロシナーゼは、メラノサイトにおいてメラニン合成における最初に関与する酵素である。このチロシナーゼ活性阻害を *in vitro* 試験によって評価した。酵素液として、マッシュルーム由来チロシナーゼ (Sigma 社製、Cat. No.T3824-25KU) を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解し 300 U/mL に調

製した。基質には L-DOPA (富士フイルム和光純薬社製、Cat. No.D533751)を同緩衝液で 3 mM に調製したものをを用いた。測定用の試料は全て 0.2 M リン酸緩衝液 (pH6.5)に溶解した。96 穴マイクロプレートに表 19 のように試料溶液を加え、37℃で 10 分間反応させた。反応後はプレートリーダーを用いて、475 nm の吸光度を測定した。酵素活性は以下の式にて算出した。

表 19 チロシナーゼ活性評価法

	Blank	試薬 Blank	Sample	Sample-Blank
L-DOPA	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
Sample	-	-	100 μL	100 μL
リン酸 Buffer	150 μL	200 μL	50 μL	100 μL
Tyrosinase Enzyme	50 μL	-	50 μL	-
Total	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL

$$\text{酵素活性(\%)} = \frac{\text{Sample} - (\text{Sample-Blank})}{\text{Blank} - (\text{試薬 Blank})} \times 100$$

第3項 結果

図 23 に LCP および HCP によるチロシナーゼ活性を示す。Blank と比較し LCP および HCP ともにチロシナーゼ活性を有意に促進した。

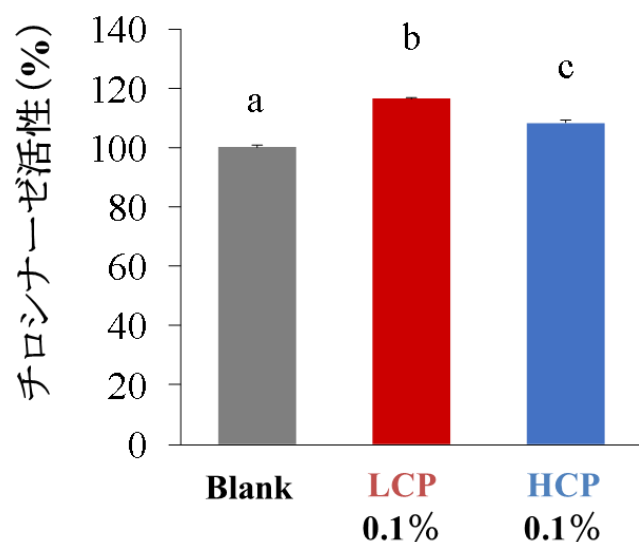


図 23 LCP, HCP によるチロシナーゼ活性評価

比色定量法(475 nm, reaction 10 min)にて測定, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.01$ で有意差あり

第4項 考察

LCP、HCP はチロシナーゼ活性を有意に促進し、メラニン生成の初期段階には LCP、HCP 共に皮膚の色素沈着を促進する可能性が示唆された。LCP、HCP がチロシナーゼ活性を抑制することで皮膚の色素沈着を抑制するという仮説を立てて実験を実施したが、予想に反した結果となった。このことは、マッシュルーム由来チロシナーゼを用いた可能性も否定できないため、今後ヒト由来チロシナーゼを用いた評価を行っていきたい。

第 8 節 *in vitro* 試験におけるドーバクロムトートメラーゼ遺伝子発現抑制評価

第 1 項 目的

第 7 節において LCP および HCP によるチロシナーゼ活性の阻害は見られなかったが、図 22 におけるメラニン生成過程である DCT の抑制は検証できていないため、マウス由来 B16 メラノーマ細胞を用いて DCT 遺伝子発現抑制について評価を行った。

第 2 項 方法

マウス由来 B16 メラノーマ細胞は、理研細胞材料開発室 (Cat.No.RCB1283) より購入した。培養培地 (100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin 及び 10% FBS 含有 DMEM/F12 培地 (Gibco 社製 Cat. No. 11330-032)) に 2×10^4 cells/mL に調製した B16 メラノーマ細胞懸濁液を 6 wells plate に 2 mL ずつ播種した (4×10^4 cells/well)。3～4 日培養後、90%サブコンフルエントになっていることを目視確認後、FBS 不含試験培地に変更した。サンプルを終濃度 0.2% となるように添加し、72 時間接触させた。72 時間の試験培養終了するまで、培地交換はしなかった。以下、第 4 章第 1 節第 2 項と同様に、Total RNA を調製、逆転写、定量的 RT-qPCR は補正遺伝子 *GAPDH* を用い、PCR 反応、遺伝子発現量の算出および統計的解析を実施した。プライマーは、DCT (Thermo Fisher Scientific 製: Mm01225584_m1) 遺伝子発現を測定した。

第3項 結果

結果を図 24 に示す。LCP は *DCT* 遺伝子発現を抑制しなかったのに対し、HCP は Blank と比較し *DCT* 遺伝子発現を有意に抑制した。

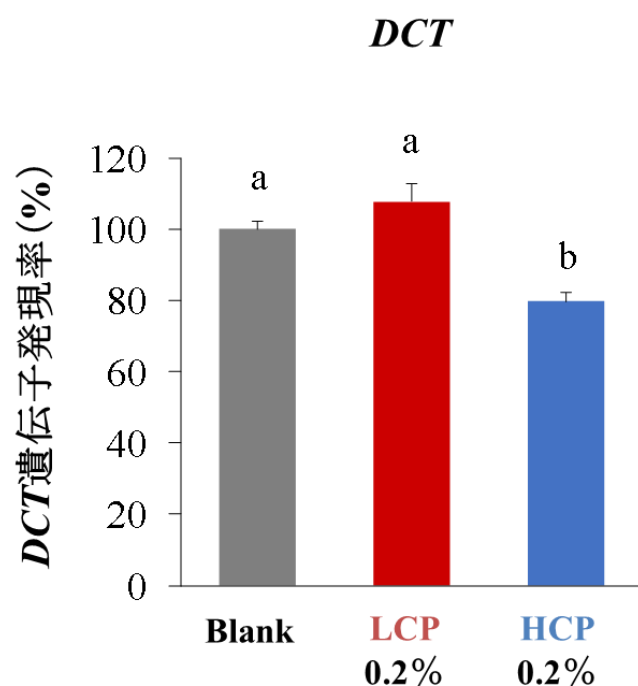


図 24 LCP, HCP 添加による *DCT* 遺伝子発現抑制

マウス由来 B16 メラノーマ細胞を用いて RT-qPCR 法にて遺伝子発現を測定, ハウスキーピング遺伝子: *GAPDH*, Mean $\pm$ SE, $n = 3$, Tukey 検定, アルファベット異符号間にて $p < 0.05$ で有意差あり

第4項 考察

本試験により HCP の添加によって B16 メラノーマ細胞の *DCT* 遺伝子発現を有意に抑制することを明らかにした。また、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP は、LCP と比較し、*DCT* 遺伝子発現を有意に抑制した。このことから、HCP は *DCT* 遺伝子発現を抑制することでユウメラニンの生成を抑制し、皮膚の色素沈着を抑制している可能性が示唆された。

第9節 小括

本章では、真皮および表皮における様々な細胞評価もしくは試験管内での評価によって、第1章2章で得られた皮膚の保湿性・弾力、皮膚の荒れ、滑らかさなどの皮膚状態の改善に関わるメカニズムの一端を解明することができた。

真皮においては、UV 照射の有無にかかわらず、真皮内の ECM 産生を促進することで皮膚にハリを与え、シワやたるみの改善に寄与していることが明らかとなった。表皮においては、保湿関連遺伝子やターンオーバー関連遺伝子発現を促進し、LCP、HCP 自体の SOD 様活性があることによって、皮膚の保湿性の向上および皮膚の滑らかさ・荒れの改善へ寄与していることが明らかとなった。

また、表皮におけるメラニン生成を刺激する *ET-1* 遺伝子発現を HCP が有意に抑制すること、および B16 メラノーマ細胞を用いた試験では、LCP および HCP が *DCT* 遺伝子発現を有意に抑制したことから、ユウメラニン生成過程の *DCT* を抑制することで、ヒト皮膚の色素沈着抑制効果があることも見いだすことができた。

全体的に *in vitro* 試験において、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP の方が LCP よりも効果が高いことが示され、Hyp 含有ジ・トリペプチドがこれらの効果を発揮している可能性が示唆された。

一方で、本研究の作用機構の解明としては不十分であり、LCP、HCP は直接的に細胞へ刺激を与えているのか、それともホルモンなどを介して間接的に作用を与えているのか、上流遺伝子発現を調節しているのか、他のメラノサイト刺激経路への影響などは不明である。さらに、HCP の方が LCP よりも効果が高いことが示されたが、LCP、HCP のどの構成成分が作用しているのか、阻害成分がないかを調査する必要がある、今後の研究において解明していきたい。

第5章 総括

本研究において、魚由来 CP 摂取は、ヒト皮膚状態を包括的に改善し、製品物性で劣る原料部位においても皮膚への生理活性機能は同等であること、健常者においても AGEs 減少に作用すること、皮膚における CP の作用機構を *in vitro* 試験によって明らかにした(図 25)。

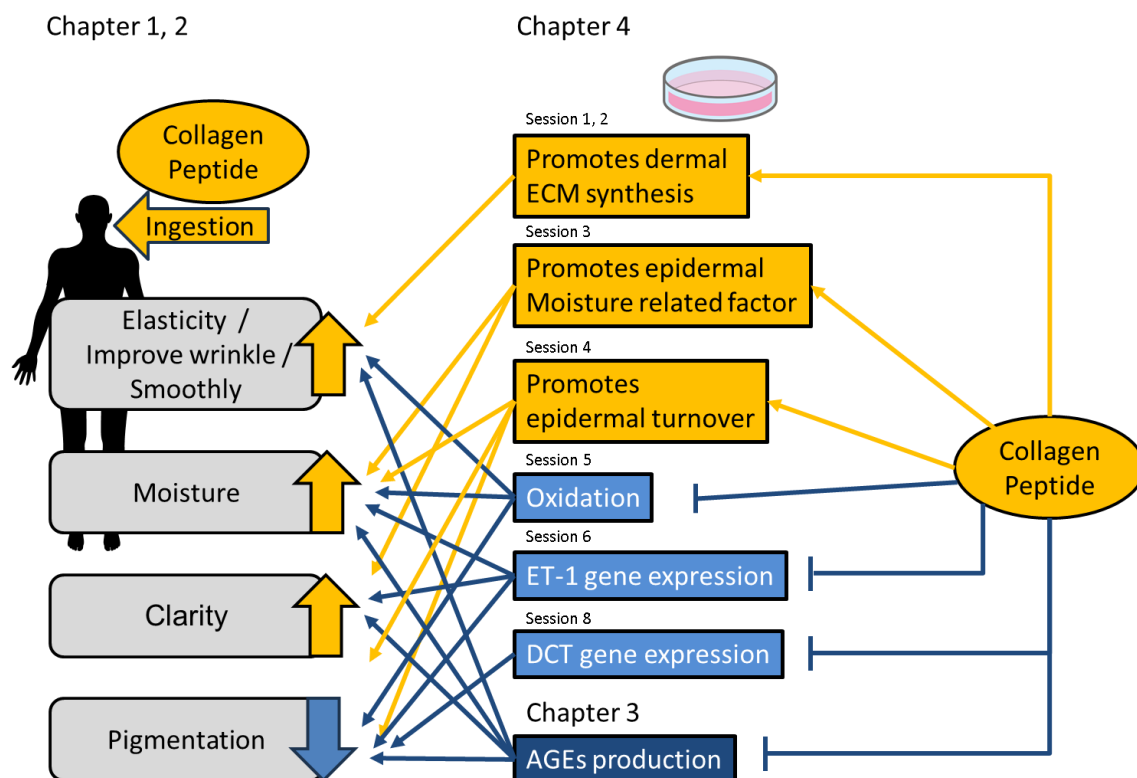


図 25 CP 摂取によるヒト皮膚状態改善作用およびその作用機構のまとめ

第 1 章では、臨床試験において、3 g/日の 12 週間の魚鱗 CP 摂取によって、皮膚のシワ、皮膚の水分量、弾力性を包括的に有意に改善することが明らかとなった。また、試験中に有害事象が報告されなかったことから、魚鱗 CP が安全であることも示された。

第 2 章では、出発原料が異なるが製造方法は同じである魚鱗または魚皮由来の CP が、皮膚の水分量、弾力性、シワ、透明感および滑らかさの改善に関して高い機能性が明らかとなった。また、由来原料は違っても CP 摂取による皮膚状態に対する生理学的機能は同等であることを示せたことから、製品物性では劣る魚皮においても付加価値が上がることで、広く有効利用できることが見

いだせた。

第3章では、臨床試験によって、健常人が5 g/日の魚鱗 CP を12週間摂取することにより、ヒトの皮膚中 AGEs レベルを有意に低下させることを見いだした。糖尿病患者ではなく、健常人において皮膚中の AGEs が減少したことも非常に興味深い結果となった。魚鱗 CP 摂取による AGEs 抑制が、第1章第2章で示した魚鱗 CP によるヒト皮膚における保湿、弾力、シワ、透明感、滑らかさの改善効果に寄与しているという仮説を裏付ける可能性が示唆された。

第4章において、真皮および表皮における様々な細胞評価もしくは試験管内での評価によって、第1章2章で得られた皮膚の保湿性・弾力、皮膚の荒れ、滑らかさなどの皮膚状態の改善に関わるメカニズムの一端を解明できた。つまり、真皮においては、UV 照射の有無にかかわらず、真皮内の ECM 産生を促進することで皮膚にハリを与え、シワやたるみの改善につながっていることが見いだせた。表皮においては、保湿関連遺伝子やターンオーバー関連遺伝子発現を促進し、LCP、HCP 自体の SOD 様活性があることによって、皮膚の保湿性の向上および皮膚の滑らかさ・荒れの改善へつながっていることが明らかとなった。また、表皮におけるメラニン生成を刺激する *ET-1* 遺伝子発現を有意に抑制することと、B16 メラノーマ細胞を用いた試験では、HCP が *DCT* 遺伝子発現を有意に抑制し、ユウメラニン生成過程の DCT を抑制することで、ヒト皮膚の色素沈着抑制効果がある可能性も見いだすことができた。また、*in vitro* 試験において、Hyp 含有ジ・トリペプチドを多く含む HCP の方が LCP よりも効果が高いことが示され、Hyp 含有ジ・トリペプチドが効果を発揮している可能性が示唆された。

しかしながら、臨床試験においては、皮膚状態に関与する交絡因子として女性の性周期や食生活の追跡を考慮できていなかった点や AGEs 抑制効果は見られたものの、その効果のメカニズムが不明であり、今後の研究において反映し解明していきたい。また、作用機構の解明としては不十分であり、LCP、HCP は直接的に細胞へ刺激を与えているのか、それともホルモンなどを介して間接的に作用を与えているのか、上流遺伝子発現を調節しているのか、他のメラノサイト刺激経路への影響などは不明である。さらに、HCP が LCP よりも効果が高いことが示されたが、Hyp 含有ジ・ト

リペプチドの配列同定および Hyp 含有ジ・トリペプチドの吸収性、Hyp 含有ジ・トリペプチド自体の効果について今後の研究において解明していきたい。

最後に、CP は機能性に関心のある消費者がエビデンス重視型へと移行しているため、機能性に関するエビデンスを得ることが必要不可欠となっており[55]、本研究の魚由来 CP 摂取によって皮膚状態を改善するという報告は、エビデンスを重視するようになってきた消費者の理解を得ることができる。また、Zhang らは、効果的なスキンケアは、消費者の QoL にプラスの影響を与える可能性があると報告しており[56]、CP 摂取によって皮膚状態を改善することは、消費者の QoL を高め、最終的には社会的にも貢献できる。さらには、魚皮 CP を魚鱗 CP と同等の機能性を見いだせたことは、廃棄原料の有効利用の幅が広がり、SDGs やサステナビリティの観点からも社会へ貢献できる。これらのことから、CP の摂取は、世界中の社会貢献の一助になると期待される。

謝辞

本学位論文について討論や監修していただきました、城西大学真野博教授、和田政裕教授、高尾浩一教授、主査として清水純教授、副査として、古旗賢二教授、河合洋教授に多忙な中、お力添えを賜り、感謝申し上げます。

第1章での研究は、Elead社での測定の協力の元、試験結果を得ることができました。執筆にご協力いただいた Cheongju University の Kyoung Sik Park 博士、Ju Yeong NS Co. LTD の Chang-ju Kwon 博士、Hwa-young Kim 博士に感謝いたします。また、論文を作成するにあたり、一緒に討論した井上直樹氏、清水麻衣子氏にも心より感謝申し上げます。

第2章で扱った臨床試験は、Shanghai Skin Disease Hospital の Xuemin Wang 博士(逝去)のご協力の元、試験結果を得ました。故 Wang 博士とともに学び、たびたび討論した当社所属の杉原富人氏および井上直樹氏に心より感謝いたします。

第3章での臨床試験は、愛媛大学 伊賀瀬道也先生、岡田陽子先生にはデータの収集を、今井祐記先生にはデータの解析を、三浦史郎先生にはデータの監修を、伊賀瀬圭二先生、大八木保政先生には総監修を実施していただきました。ご尽力いただきました先生方に感謝申し上げます。

最後に、すべての臨床試験にご参加いただきました被験者の皆さまに、御礼申し上げます。

References

- [1] 日本ゼラチン・コラーゲンペプチド工業組合 PR 委員会/技術委員会(合同委員会)監修, コラーゲンからコラーゲンペプチドへ, 2014.
- [2] E. Proksch, M. Schunck, V. Zague, D. Segger, J. Degwert, S. Oesser, Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis, *Skin Pharmacology and Physiology* 27 (2014) 113-119.
- [3] E. Proksch, D. Segger, J. Degwert, M. Schunck, V. Zague, S. Oesser, Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study, *Skin Pharmacology and Physiology* 27 (2014) 47-55.
- [4] N. Inoue, F. Sugihara, X. Wang, Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (2016) 4077-4081.
- [5] F. Sugihara, N. Inoue, X. Wang, Clinical effects of ingesting collagen hydrolysate on facial skin properties-a randomized, placebo-controlled, double-blind trial-, *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 43 (2015) 67-70.
- [6] F. Sugihara, N. Inoue, Clinical effects of collagen hydrolysates ingestion on UV-induced pigmented spots of human skin: a preliminary study, *Health Sciences* 28 (2012) 153-156.
- [7] J. Kim, S.G. Lee, J. Lee, S. Choi, J. Suk, J.H. Lee, J.H. Yang, J.S. Yang, J. Kim, Oral supplementation of low-molecular-weight collagen peptides reduces skin wrinkles and improves biophysical properties of skin: a randomized, double-blinded, placebo-controlled study, *Journal of Medicinal Food* 25 (2022) 1146-1154.
- [8] M. Igase, K. Kohara, Y. Okada, M. Ochi, K. Igase, N. Inoue, T. Kutsuna, H. Miura, Y. Ohyagi, A double-blind, placebo-controlled, randomised clinical study of the effect of pork collagen peptide supplementation on atherosclerosis in healthy older individuals, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2018) 1-3.
- [9] S. Devasia, S. Kumar, S. PS, N. Inoue, F. Sugihara, K. Suzuki, Double blind, randomized clinical study to evaluate efficacy of collagen peptide as add on nutritional supplement in type 2 diabetes, *Journal of Clinical Nutrition and Food Science* 1 (2018) 006-011.
- [10] S. Devasia, S. Kumar, S. PS, N. Inoue, F. Sugihara, S. Koizumi, A. Matsushita, S. VT, A double blind, randomised, four arm clinical study to evaluate the safety, efficacy and tolerability of collagen peptide as a nutraceutical therapy in the management of type II diabetes mellitus, *Journal of Diabetes & Metabolism* 10 (2020) 839.
- [11] T. Husøy, E. Bruzell, B. Granum, R. Hetland, J. Rohloff, T. Wicklund, I.-L. Steffensen, Risk assessment of "Other substances" –collagen from fish skin, *European Journal of Nutrition & Food Safety* 8 (2018) 105-107.
- [12] Food and Drug Administration, Scientific literature reviews on generally recognized as safe

(GRAS) food ingredients gelatin, 1973.

- [13] C. Liu, K. Sugita, K. Nihei, K. Yoneyama, H. Tanaka, Absorption of hydroxyproline-containing peptides in vascularly perfused rat small intestine in situ, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (2009) 1741-1747.
- [14] E. Meilman, M.M. Urivetzky, C.M. Rapoport, Urinary hydroxyproline peptides, *The Journal of Clinical Investigation* 42 (1963) 40-50.
- [15] F. Sugihara, N. Inoue, M. Kuwamori, M. Taniguchi, Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113 (2012) 202-203.
- [16] K. Iwai, Y. Zhang, T. Kouguchi, A.S. Egusa, M. Shimizu, T. Ohmori, Y. Takahata, F. Morimatsu, Blood concentration of food-derived peptides following oral intake of chicken collagen hydrolysate and its angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in healthy volunteers, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 56 (2009) 326-330.
- [17] S. Ichikawa, H. Matsumoto, M. Akiyama, N. Fujimoto, T. Kobayashi, S. Tajima, M. Morifuji, H. Ohara, H. Matsumoto, Y. Takeuchi, K. Sato, Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61 (2010) 52-60.
- [18] S. Yamamoto, K. Deguchi, M. Onuma, N. Numata, Y. Sakaia, Absorption and urinary excretion of peptides after collagen tripeptide ingestion in humans, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 39 (2016) 428-434.
- [19] T. Kawaguchi, P.N. Nanbu, M. Kurokawa, Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 35 (2012) 422-427.
- [20] CK electronic GmbH, Information and Operating Instruction 2005.
- [21] S.Y. Choi, E.J. Ko, Y.H. Lee, B.G. Kim, H.J. Shin, D.B. Seo, S.J. Lee, B.J. Kim, M.N. Kim, Effects of collagen tripeptide supplement on skin properties: a prospective, randomized, controlled study, *Journal of Cosmetic and Laser Therapy : Official Publication of the European Society for Laser Dermatology* 16 (2014) 132-137.
- [22] A.K. Rzepecki, J.E. Murase, R. Juran, S.G. Fabi, B.N. McLellan, Estrogen-deficient skin: The role of topical therapy, *International Journal of Women's Dermatology* 5 (2019) 85-90.
- [23] M.P. Brincat, M.Y. Baron, R. Galea, Estrogens and the skin, *Climacteric* 8 (2005) 110-123.
- [24] X. Zhang, Q. Zhou, Y. Qi, X. Chen, J. Deng, Y. Zhang, R. Li, J. Fan, The effect of tomato and lycopene on clinical characteristics and molecular markers of UV-induced skin deterioration: a systematic review and meta-analysis of intervention trials, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 64 (2024) 6198-6217.
- [25] H. Ohara, H. Matsumoto, K. Ito, K. Iwai, K. Sato, Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from

different sources, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 1532-1535.

[26] N. Dorf, M. Maciejczyk, Skin senescence-from basic research to clinical practice, *Frontiers in Medicine* 11 (2024) 1484345.

[27] C.A. Téllez, T.O. Mendes, L.d. Santos, M.G. Silva, L. Pereira, P. Fávero, P. Singh, A.A. Martin, Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and density functional theory to detect carboxymethyl(lysine) in the human stratum corneum, *Vibrational Spectroscopy* 100 (2019) 40-47.

[28] H.P. Nguyen, R. Katta, Sugar sag: glycation and the role of diet in aging skin, *Skin Therapy Letter* 20 (2015) 1-5.

[29] C.Y. Chen, J.Q. Zhang, L. Li, M.M. Guo, Y.F. He, Y.M. Dong, H. Meng, F. Yi, Advanced glycation end products in the skin: molecular mechanisms, methods of measurement, and inhibitory pathways, *Frontiers in Medicine* 9 (2022) 837222.

[30] C. Noguchi, M. Kobayashi, Y. Koyama, Amount of collagen ingested by Japanese adult women from their diet, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 70 (2012) 120-128.

[31] E. Kassi, A.G. Papavassiliou, Could glucose be a proaging factor?, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (2008) 1194-1198.

[32] R.A. Sicree, P.Z. Zimmet, D.W. Dunstan, A.J. Cameron, T.A. Welborn, J.E. Shaw, Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test— the AusDiab study, *Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association* 25 (2008) 296-302.

[33] C. Anderwald, A. Gastaldelli, A. Tura, M. Krebs, M.P. Schifferl, A.K. Willer, M. Stadler, R.A. DeFronzo, G. Pacini, M.G. Bischof, Mechanism and effects of glucose absorption during an oral glucose tolerance test among females and males, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 (2011) 515-524.

[34] N. Tomosugi, S. Yamamoto, M. Takeuchi, H. Yonekura, Y. Ishigaki, N. Numata, S. Katsuda, Y. Sakai, Effect of collagen tripeptide on atherosclerosis in healthy humans, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 24 (2017) 530-538.

[35] Y. Iba, K. Yokoi, I. Eitoku, M. Goto, S. Koizumi, F. Sugihara, H. Oyama, T. Yoshimoto, Oral administration of collagen hydrolysates improves glucose tolerance in normal mice through GLP-1-dependent and GLP-1-independent mechanisms, *Journal of Medicinal Food* 19 (2016) 836-843.

[36] E.J. Lee, J.Y. Kim, S.H. Oh, Advanced glycation end products (AGEs) promote melanogenesis through receptor for AGEs, *Scientific Reports* 6 (2016) 27848.

[37] M. Igase, Y. Okada, K. Igase, S. Matsumoto, K. Senzaki, M. Ochi, Y. Ohyagi, S.-I. Yamagishi, Casein hydrolysate containing milk-derived peptides reduces facial pigmentation partly by decreasing advanced glycation end products in the skin: a randomized double-blind placebo-controlled trial, *Rejuvenation Research* 24 (2021) 97-103.

[38] J.H. Chung, Photoaging in Asians, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 19 (2003) 109-121.

- [39] I. Masamitsu, A. Hideya, Y. Masaki, N. Yoko, M. Mary, Photoaging of the skin, *Anti-aging Medicine* 6 (2009) 46-59.
- [40] Z. Chengfeng, X. Xiaoxue, J. Min, X. Zhongyi, L. Ziqi, W. Xiuxiu, Anti-aging products and medical cosmeceuticals for skin photoaging, *Skin Photoaging (Second Edition)*, IOP Publishing, 2024, pp. 3-1-3-36.
- [41] 下川雅信, 佐藤有里, 井上正範, 佐藤沙織, 井上肇, 魚由来低分子コラーゲンの皮膚線維芽細胞コラーゲン産生に及ぼす影響, *New Food Industry* 56 (2014) 9-14.
- [42] H. Ohara, S. Ichikawa, H. Matsumoto, M. Akiyama, N. Fujimoto, T. Kobayashi, S. Tajima, Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts, *The Journal of Dermatology* 37 (2010) 330-338.
- [43] A. Fernandes, P.M. Rodrigues, M. Pintado, F.K. Tavaría, A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging, *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 115 (2023) 154824.
- [44] P. Agre, The aquaporin water channels, *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (2006) 5-13.
- [45] Y. Kamata, A. Taniguchi, M. Yamamoto, J. Nomura, K. Ishihara, H. Takahara, T. Hibino, A. Takeda, Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids, *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009) 12829-12836.
- [46] J.M. Batchelor, D.J. Grindlay, H.C. Williams, What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2008 and 2009, *Clinical and Experimental Dermatology* 35 (2010) 823-827.
- [47] 飯田真智子, 革新的なシミ予防・治療法の開発, *コスメトロジー研究報告* 26 (2018) 48-51.
- [48] R. Leon, E. Ellen, A. Rorke, Molecular biology of keratinocyte differentiation, *Environmental Health Perspectives* 80 (1989) 109-116.
- [49] J. Shimizu, N. Asami, A. Kataoka, F. Sugihara, N. Inoue, Y. Kimira, M. Wada, H. Mano, Oral collagen-derived dipeptides, prolyl-hydroxyproline and hydroxyprolyl-glycine, ameliorate skin barrier dysfunction and alter gene expression profiles in the skin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456 (2015) 626-630.
- [50] A. Oulee, G.S. Ahn, S.S. Javadi, J.J. Wu, Phototherapy and DNA damage: a systematic review, *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 16 (2023) 55-58.
- [51] Y. Sheng, Y.T. Qiu, Y.M. Wang, C.F. Chi, B. Wang, Novel antioxidant collagen peptides of siberian sturgeon (*Acipenserbaerii*) cartilages: the preparation, characterization, and cytoprotection of H₂O₂-damaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), *Marine Drugs* 20 (2022) 325.
- [52] S. Jamal, R.J. Schneider, UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells, *The Journal of Clinical Investigation* 110 (2002) 443-452.
- [53] I.F.d.S. Videira, D.F.L. Moura, S. Magina, Mechanisms regulating melanogenesis, *Anais*

Brasileiros de Dermatologia 88 (2013) 76-83.

[54] H. Ando, H. Kondoh, M. Ichihashi, V.J. Hearing, Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase, *Journal of investigative dermatology* 127 (2007) 751-761.

[55] 森藤雅史, 伊藤恭子, 市川里美, 大庭知慧, 北出品美, 皮膚機能を高める食品素材の研究とその実用化, *日本栄養・食糧学会誌* 75 (2022) 19-22.

[56] L. Zhang, A. Adique, P. Sarkar, V. Shenai, M. Sampath, R. Lai, J. Qi, M. Wang, M.A. Farage, The impact of routine skin care on the quality of life, *Cosmetics* 7 (2020) 59.