報 文

サケ鼻軟骨熱水抽出物の経口摂取による日焼け抑制効果 —無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験—

(2015年9月25日受付；2016年1月7日採択)

後藤昌史^{1,*}, 末川 裕¹, 花田友香子¹, 柿崎育子², 山本和司¹, 加藤陽治³

¹ サンスター株式会社新規素材活用事業開発プロジェクト (569-1044 大阪府高槻市上土室 5-30-1)

² 弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター糖鎖工学講座 (036-8562 青森県弘前市在府町 5)

³ 弘前大学教育学部食物学研究室 (036-8560 青森県弘前市文京町 1)

The Suntan Suppressive Effect by Oral Ingestion of Hot Water Extract from Salmon Nasal Cartilage: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Parallel-group Comparative Study

Masashi Goto,^{1,*} Yutaka Suekawa,¹ Yukako Hanada,¹ Ikuko Kakizaki,²

Kazushi Yamamoto¹ and Yoji Kato³

¹New Material Business Development, Sunstar Inc. (5-30-1 Kamihamuro, Takatsuki, Osaka 569-1044, Japan)

²Department of Glycotechnology, Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University Graduate School of Medicine (5 Zaiju-cho, Hirosaki 036-8562, Japan)

³Laboratory of Food Science, Faculty of Education, Hirosaki University (1 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8560, Japan)

要旨：サケ鼻軟骨 (Salmon Nasal Cartilage) (以下 SNC とする) 熱水抽出物の摂取による日焼け抑制効果を、ヒト臨床試験により検証した。27 歳から 44 歳の健康な成人女性を対象とし、SNC 熱水抽出物 400 mg/day、SNC 熱水抽出物 200 mg/day またはプラセボを 8 週間連続摂取させ、試験品摂取前 (0 w)、摂取 4 週間後 (4 w)、摂取 8 週間後 (8 w) および摂取終了 8 週間後 (16 w) の各時点において、紫外線照射後の最小紅斑量 (Minimal Erythema Dose, MED)、最小黒化量 (Minimal Tanning Dose, MTD) を測定した。統計解析については、分散分析を行い、有意差が認められたものについてさらに多重比較検定を行った。その結果、MED において、SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群は、0 w から 16 w への経時的な上昇傾向が認められたが、プラセボ摂取群との群間比較での有意差は認められなかった。一方 MTD において、SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群は、プラセボ摂取群との群間比較において、8 w 時点で有意に高く ($p = 0.035$)、16 w 時点で高い傾向 ($p = 0.077$) であった。以上より、SNC 熱水抽出物を 1 日当り 400 mg (SNC 熱水抽出プロテオグリカンとして 169 mg)、8 週間摂取することで、紫外線によって皮膚が黒くなる日焼けを抑制し、紫外線による皮膚ダメージを軽減させる効果があることが示唆された。

キーワード：サケ鼻軟骨、熱水抽出物、プロテオグリカン、紫外線、日焼け

現在の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、外面の若さを保つこと、すなわち皮膚老化を防ぐことが QOL (Quality of Life) の観点で重要である。特に、シミやシワなどの皮膚老化は、加齢による老化と共に紫外線による光老化が大きく影響する¹⁾。皮膚が一定量以上の紫外線照射を受けると、過剰に発生した活性酸素により炎症が起こり紅斑が発生し^{2,3)}、引き続きメラニン新生による遅延型黒化 (以下黒化と略す) が生じる^{4,5)}。このような紫外線曝露が累積されることで、表皮の肥厚やバリア機能の低下による乾燥肌が誘発され⁶⁻⁸⁾、さらには炎

症による皮膚ダメージが蓄積し、シミやシワなどの光老化が誘発される⁹⁻¹³⁾。近年、フロンガスなどによる成層圏オゾン層の破壊進行に伴い、地上に到達する紫外線量の増加が報告されており¹⁴⁾、今後ますます、紫外線に対する防御を意識することが必要である。そこで、日焼けを防ぎ皮膚の光老化を予防するためには、日傘や日焼け止めクリームなどの紫外線防御が必要であるが、それと共に、皮膚自体の紫外線からの防御力を高め、日焼けしにくい肌になることが本質的に重要である。

プロテオグリカンは、コアタンパク質を軸に、1 本ある

*連絡先 (Tel. 072-693-8984, Fax. 072-695-0766, E-mail: masashi.goto@jp.sunstar.com)

**Key words: salmon nasal cartilage, hot water extract, proteoglycan, ultraviolet rays, suntan

いは複数のコンドロイチン硫酸などの糖鎖が共有結合した糖タンパク質の一種であり、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^{15,16)}。プロテオグリカンは、糖鎖部分およびコアタンパク質部分が協調して機能し、多様な生理活性を発揮するものと考えられている¹⁷⁾。組織中の存在形態としては、多数のプロテオグリカンがヒアルロン酸の軸に非共有結合した巨大な凝集体を形成し¹⁸⁻²⁰⁾、さらにヒアルロン酸-プロテオグリカン凝集体はコラーゲンとのネットワーク構造を形成している。それらは保水能力を維持し、軟骨や皮膚などの組織における物理的刺激を和らげるためのクッションとしての役割を果たしている²¹⁻²³⁾。柿崎らは、nano-LC/MS/MS解析により、サケ鼻軟骨 (Salmon Nasal Cartilage) (以下 SNC とする) プロテオグリカンの大部分がアグリカンと呼ばれるプロテオグリカンであり、そのコアタンパクは、哺乳動物と同様に機能的なドメインを全て有することを明らかにした²⁴⁾。また、生化学的な分析と原子間力顕微鏡 (AFM) による観察により、SNC プロテオグリカンの全体像と構造的な特徴を明らかにした上で、ウシ気管支軟骨プロテオグリカンとの構造の違いを示し、これまでの量産技術である酢酸抽出による SNC プロテオグリカンは、低分子化していることを示した²⁵⁾。三浦らは、SNC 粉末から、異なる溶媒で抽出したプロテオグリカンの性質を比較した結果、酢酸、リンゴ酸やクエン酸などの有機酸や水酸化ナトリウムで抽出されたプロテオグリカンの分子量は低分子化され、水抽出で得られたプロテオグリカンについては分子量が高く、天然型に近い状態で抽出されていることを示唆した²⁶⁾。このように、由来動物や抽出溶媒の違いにより得られるプロテオグリカンの構造は異なる。我々は、紫外線照射誘導皮膚老化モデルマウスを用いて、天然型に近い状態のプロテオグリカンを豊富に含む SNC 脱脂粉末^{27,28)}の水抽出物の経口投与実験を行った結果、コンドロイチン硫酸と比べて、皮膚の紅斑発生、表皮バリアの崩壊および皮膚肥厚などの光老化を抑制する効果が高いことを見出した²⁹⁾。

我々は、この天然型に近い状態の SNC プロテオグリカンを食品などへ幅広く応用していくため、SNC の熱水抽出法を開発し、SNC 脱脂粉末の水抽出液と同様に、光老化抑制効果が高い天然型に近い状態のプロテオグリカンを豊富に含む SNC 熱水抽出物の原料化を達成した (原料名：ヒアルコ PG[®])³⁰⁾。熱水抽出法に必要な溶媒は水のみであり、プロセスが単純であるため、酸やアルカリを使用する従来の方法と比較して低コスト製造が実現でき、有効量を配合した食品やサプリメントなど幅広い活用が期待できる。我々は、紫外線による肌ダメージを軽減し光老化を抑制する機能を有する食品への応用検討として、ヒトでの SNC 熱水抽出物摂取による日焼け抑制効果を検証することとした。

1. 実験方法

1) 倫理的事項

本試験は世界医師会によるヘルシンキ宣言に示された倫理規範を踏まえ、被験者の人権保護に配慮し、疫学研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省) に従い、医療法人健昌会福島健康管理センター (大阪) の倫理審査委員会において審査、承認された後に実施した (承認日：2012 年 9 月 13 日)。被験者が試験に参加する前に、あらかじめ倫理審査委員会で承認の得られた説明文書を被験者に渡し、本試験の目的や内容等について十分に説明を行い、被験者が内容を十分に理解し、納得したことを確認した上で、本試験への参加について自由意思による同意を被験者本人より文書で得た。

2) 試験デザイン

試験デザインは、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験とした。

3) 試験実施期間

2012 年 10 月 1 日～2013 年 2 月 11 日

4) 被験者

試験の被験者は、年齢が 25 歳以上 45 歳未満で、Fitzpatrick のスキントイプ³¹⁾がタイプ II (容易に赤くなり、微かに黒くなる) またはタイプ III (赤くなった後、いつも黒くなる) に該当すると自己判断した健康な日本人女性を 2 カ所のモニターバンクの登録者より募集し、試験の目的や内容等を説明し、文書にて同意を取得した (81 名)。同意した被験者に、背景情報として、疾病履歴、アレルギーの有無、皮膚の状態、美容医療やエステ等の実施状況、医薬品や健康食品の摂取状況などについてアンケートを行い、被験者候補であることを確認し、スクリーニング検査として日常生活で太陽光への暴露が少ないと考えられる背部を評価部位として、被験者候補の背中に紫外線を照射し最小紅斑量 (Minimal Erythema Dose, MED) と最小黒化量 (Minimal Tanning Dose, MTD) を測定した。MED は、照射 1 日後に境界のはっきりしたかすかな紅斑を起こすのに必要な最小の紫外線量であり、MTD は、照射 7 日後に肉眼で認められる最小の色素沈着を引き起こすのに必要な紫外線量である³²⁾。測定結果を集計し、MED と MTD が近似しかつ MED および MTD の値が被験者候補全体の中央値に近いことを基準に 44 名を選択し、適格な被験者として試験に登録した。これら被験者を乱数を用いて三群 (SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群 15 名、SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群 14 名、プラセボ摂取群 15 名) の割付表を作成し割付けた。表 1 に、割付けられた被験者の年齢、MED、MTD それぞれの測定値および MTD/MED 比の平均値 ± 標準偏差を示す。それぞれの項目において、三群

表 1. 割付時の被験者の年齢と MED, MTD, MTD/MED 比 (平均値 ± 標準偏差)

	n 数	年齢 (歳)	MED (mJ/cm ²)	MTD (mJ/cm ²)	MTD/MED 比
SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群	15	37.3 ± 4.4	22.3 ± 4.1	28.2 ± 5.6	1.27 ± 0.19
SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群	14	38.6 ± 4.0	22.6 ± 4.3	28.4 ± 6.5	1.27 ± 0.29
プラセボ摂取群	15	38.0 ± 5.2	22.4 ± 4.1	28.2 ± 5.7	1.26 ± 0.17

図 1. SNC 熱水抽出物の CL-2B ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

グルクロン酸の 1.15 mg に相当する SNC 熱水抽出物を 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) 1 mL に溶解し, 0.1 M リン酸緩衝液で平衡化した Sepharose CL-2B ゲルろ過カラム (ϕ 1.0 × 50 cm; GE ヘルスケアジャパン(株, 東京) に供した. その後同じ緩衝液で溶出し, 1 mL ずつ画分を収集し, カルバズール硫酸法により各画分のグルクロン酸濃度を測定した³⁴⁾. 分子量マーカーとして, 3つの分子量違いデキストランをそれぞれ 0.5 mg を上記と同じ操作で溶出し, 1 mL ずつ画分を収集し, フェノール硫酸法により糖量を測定し³⁴⁾, 3点検量線を作成し, 分子量 500 万, 180 万, 40 万の溶出位置を求めた. 分子量マーカー: dextran from *Leuconostoc mesenteroides* (average MW 5,000,000–40,000,000; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), dextran standard 1,400,000 from *L. mesenteroides* (MW 1,400,000; Sigma-Aldrich Corp.) および dextran standard 410,000 from *L. mesenteroides* (MW 410,000; Sigma-Aldrich Corp.).

それぞれの標準偏差から考慮し, 三群間に解析に影響する程度の偏りはないことを確認した.

5) SNC 熱水抽出物の調製

サケの頭部から取り出した鼻軟骨は, 青森県内の水産加工業者より入手した. サイレントカッター NHY-20 (株)長沼製作所, 東京) により細断化した鼻軟骨 (63.1 kg) を流水により水洗した後, 熱水 (160 L, 90°C 以上) 中に投入し攪拌した. 鼻軟骨が全体的に溶解したことを確認できた段階で加熱を止め, 濾過により不溶成分を取り除き, 遠心分離により脂質を取り除いた. その後凍結乾燥により, SNC 熱水抽出物 (3.9 kg) を得た. 本試験に使用する SNC 熱水抽出物のプロテオグリカン含有量は, カルバズール硫酸法³³⁾によりグルクロン酸濃度を決定し, プロテオグリカンの分子量中に占めるグルクロン酸の分子量の比率³⁴⁾から計算した結果, 42.2% であった. また, 前報³⁰⁾に従い, 本試験に使用する SNC 熱水抽出物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供し, 分子量分布を測定した結果, 天然型に近い状態のプロテオグリカン (分子量約 180 万および分

子量 500 万以上のプロテオグリカン) を豊富に含むことが示された (図 1).

6) 試験品の概要

試験品は, SNC 熱水抽出物が配合された 2 つの被験品とプラセボの計 3 つとした. 試験品の原材料組成およびプロテオグリカン含有量と栄養成分を表 2 に示す. 被験品 1 は, SNC 熱水抽出物 400 mg/day, 被験品 2 は, SNC 熱水抽出物 200 mg/day に設定した. 結晶セルロースは, セオラス®ST-02 (旭化成ケミカルズ(株, 東京) を使用した. それぞれの試験品は, 1 日分の 400 mg をブタ由来ゼラチンカプセル (2 号白色, カプセル・ジャパン(株, 神奈川) 5 個に充填し, チャック付きポリエチレン袋に 1 日分として個別収納した.

7) 試験品の使用方法, 使用量および使用期間

試験品は, 1 日に 1 回朝食時に, 5 カプセル (80 mg × 5) を, コップ 1 杯程度の水または微温湯とともに摂取する. 試験品の摂取期間は 8 週間とした.

	被験品 1 (SNC 熱水抽出物 400 mg/day)	被験品 2 (SNC 熱水抽出物 200 mg/day)	プラセボ
＜原材料＞			
SNC 熱水抽出物 (mg)	400	200	—
結晶セルロース (mg)	—	200	400
プロテオグリカン含有量(mg)※	169	84	0
＜栄養成分＞			
エネルギー (kcal)	1.4	0.7	0
タンパク質 (mg)	208	104	0.4
脂質 (mg)	5.6	2.8	0.1 未満
炭水化物 (mg)	122	252	381
ナトリウム (mg)	4.6	2.3	0.1 未満

紫外線照射機器および紫外線照射方法は、日本化粧品工業連合会 SPF (Sun Protection Factor) 測定法基準³⁹⁾に準じた。照射装置は SPF 測定に用いられる紫外線照射装置 (MeV-SPF6P, (株)ワイ・イー・ブイ, 大阪) を使用し、光源は、紫外線領域に異常な放射ピークを持たず連続したスペクトルを放射するキセノンランプ (L9289-01, 浜松トニクス(株), 静岡) を使用し、照射スペクトルは、MeV-SPF 6P のフィルター切り替えにより 290~400 nm とした。1 照射野は 0.5 cm^2 ($\phi 8 \text{ mm}$) で、一度の照射で同時に 6 カ所 (3×2 列) 照射した。紫外線照射量の測定は、PMA2100 (Solar Light Co. Inc., Glenside, USA) (UV センサー, PMA 2103)を使用した。

試験スケジュールを表3に示す。被験者に対して、摂取前（以下0wとする）検査第1日目を行った。まず被験者の背部を蒸留水で湿らせたコットンで洗拭した後、室温を20～25℃に調節した室内にて20分間以上安静待機し、馴化した。馴化後、被験者の背部の6カ所（1照射野は0.5 cm²（φ 8 mm））に、予測MEDおよび予測MTD（スクリーニング検査時のMEDおよびMTD）の両方が中心寄りになるように公比1.1で6段階の線量の紫外線を照射し、翌日（0w検査第2日目）にMEDの判定。7日後（0w検査第8

被験者に対して試験期間中は試験参加前の通常の生活を送るとともに、以下の制限および禁止事項を守るように指導した。

	摂取前				摂取期間						後観察期間		
	0 w 検査				4 w 検査			8 w 検査			16 w 検査		
	1 日 目	2 日 目	8 日 目	9 日 目	1 日 目	2 日 目	8 日 目	1 日 目	2 日 目	8 日 目	1 日 目	2 日 目	8 日 目
来場	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
紫外線照射	●				●			●			●		
MED 判定		●				●			●			●	
MTD 判定			●				●			●			●
試験品の摂取				←						→			
日誌の記録	←									→			

- (1) 試験期間中は、できるだけ規則的な生活を心がけ、日常範囲を大きく逸脱する過度な運動、睡眠不足、ダイエットおよび暴飲暴食を避ける。(制限事項)
- (2) 試験期間中は、日常生活を越えて過度に紫外線を浴びないように注意する。(制限事項)
- (3) 試験期間中は、やむを得ない場合を除き、医薬品を使用しない。医薬品を使用する場合は日誌に医薬品名と使用量を記録する。(制限事項)
- (4) 試験期間中は、美容医療や特別なスキンケア(エステなど)を受けることを禁止する。(禁止事項)
- (5) 評価部位に対して、本試験で検討する有効性と同等もしくは関連する効果効能(美白効果)を標榜あるいは強調した健康食品やサプリメント、スキンケア製品や化粧品、医薬部外品などの使用を禁止する(禁止事項)
- (6) 検査日前3日間は夜更かし、徹夜および激しい運動(息が上がるようなランニング、水泳、登山など)を禁止する。(禁止事項)
- (7) 検査当日は、起床後から検査終了まで入浴(シャワーを含む)を禁止する。(禁止事項)

11) 解析対象者

有効性の解析対象者は、所定の試験スケジュールと検査内容を完了した被験者のうち、以下の解析対象不採用基準に該当する被験者を除いて最終解析者とした。

〈解析対象不採用基準〉

- (1) 試験品の摂取回数が極端に少ない人。
- (2) 各種記録の欠損、制限事項違反など検査結果の信頼性を損なう行為が顕著にみられる人。
- (3) 除外基準に該当していたことが試験組入れ後に判明した人。
- (4) 0w, 4w, 8wのいずれかの検査において、MEDあるいはMTDの判定不能が1回以上あった人。
- (5) その他解析から除外することが適当と考えられる明らかな理由がある人。

なお、(4)の判定不能とは、MED判定時に、6カ所の照射部位全てが一樣に赤くなるあるいは6カ所全てで赤くならない状態、MTD判定時も同様に、6カ所全てが一樣に黒くなるあるいは6カ所全てで黒くならない状態を示す。背中地の肌の色にムラがある人は、測定ブレが大きくなり、判定不能となることがあると予想されたため、測定不能が生じた被験者は、解析対象から外すこととした。

12) 解析方法

MED値、MTD値について、各検査時点の測定値の平均値と標準偏差および、0wに対する各検査時点(4w, 8w, 16w)の増減率(以下増減率と略す)の平均値と標準偏差を算出した。統計学的検定は評価項目ごとに、測定値および増減率について試験品要因(以下群間とする)と時間要因(以下群内とする)を2要因とした反復測定2元配置分散分析を行い、有意差が認められたものについて、さらにDunnnettの多重比較検定を行った。なお、増減率については、0wをベースラインに変換しているため、検定は群間比較のみ行った。解析ツールとして、JMP® ver.10 (SAS Institute Japan 株)を使用し、有意水準は5%未満とした。

2. 結 果

1) 被験者の内訳

スクリーニングを行った被験者候補から適格な被験者として44名を選択し、試験品の摂取を開始させた。試験品を摂取開始した44名全員が8w検査まで完了した。そのうち、0w, 4w, 8wのいずれかの検査期間(紫外線照射からMTD判定までの8日間)中に、風邪により体調が悪化した2名及び頭痛により体調が悪化した1名、計3名(SNC熱水抽出物400mg/day摂取群1名、SNC熱水抽出物200mg/day摂取群1名、プラセボ摂取群1名)は、MEDおよびMTDに影響を及ぼすと考えられる抗炎症作用のある医薬品を使用していたため、有効性解析から除外した。さらに、0w, 4w, 8wのいずれかの検査において、MEDあるいはMTDの判定不能が1回以上あった16名(SNC熱水抽出物400mg/day摂取群6名、SNC熱水抽出物200mg/day摂取群7名、プラセボ摂取群3名)を有効性解析から除外した。また、1名(SNC熱水抽出物200mg/day摂取群)が自己都合により後観察期間である16w検査のみ欠席したが、解析対象不採用基準に該当しないため、当該時点のデータを欠損値として扱い、解析対象者とした。したがって、解析対象者は25名(SNC熱水抽出物400mg/day群8名、SNC熱水抽出物200mg/day群6名、プラセボ群11名)であった。表4に、最終解析者の年齢、0w検査時のMED、MTDそれぞれの測定値およびMTD/MED比の平均値±標準偏差を示す。それぞれの項目において、三群それぞれの標準偏差から考慮し、三群間に解析に影響する程度の偏りはないことを確認した。

表4. 最終解析者の被験者の年齢とMED、MTD、MTD/MED比(平均値±標準偏差)

	n 数	年齢 (歳)	MED (mJ/cm ²)	MTD (mJ/cm ²)	MTD/MED 比
SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群	8	36.9 ± 4.0	22.7 ± 4.3	29.7 ± 7.8	1.31 ± 0.19
SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群	6	37.2 ± 5.1	25.4 ± 6.1	34.0 ± 9.4	1.34 ± 0.21
プラセボ摂取群	11	37.5 ± 5.4	24.4 ± 5.8	30.0 ± 5.4	1.26 ± 0.17

MED、MTDの数値は、0w検査時の測定値を示す。

表 5. MED の測定値および 0 w に対する増減率 (平均値 ± 標準偏差)

摂取群	測定値 (mJ/cm ²)				0 w に対する増減率 (%)		
	0 w	4 w	8 w	16 w	4 w	8 w	16 w
SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群	22.7 ± 4.3	27.7 ± 8.7	30.1 ± 8.8	31.9 ± 8.6 #	20.6 ± 20.0	30.8 ± 19.5	39.3 ± 22.2
SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群	25.4 ± 6.1	27.9 ± 6.6	29.2 ± 6.9	30.9 ± 7.4	10.6 ± 12.2	16.0 ± 15.7	33.4 ± 35.6
プラセボ摂取群	24.4 ± 5.8	26.7 ± 6.0	28.1 ± 6.8	29.3 ± 6.9	10.3 ± 11.3	15.7 ± 16.8	20.5 ± 13.4

#, 群内 (vs. 0 w) での Dunnett test ($p < 0.1$); †, 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.1$); ‡ 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.05$).

図 2. MED の 0 w に対する増減率

† 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.1$), ‡ 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.05$).

2) MED

MED の測定値および増減率を表 5 に, 増減率のグラフを図 2 に示す. また, 群間あるいは群内それぞれの多重比較検定結果を表 5 および図 2 に示す.

測定値についての分散分析の結果, 群内に有意差 ($p < 0.001$) が認められ, 群間及び群間と群内の交互作用に有意差は認められなかった. 引き続き, 各群の時間要因について Dunnett の多重比較検定を行った結果, いずれの群にも有意な差は認められなかったが, SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群において 0 w (22.7 ± 4.3) から 16 w (31.9 ± 8.6) に上昇傾向 ($p = 0.066$) が認められた.

増減率についての分散分析の結果, 群間および群間・群内の交互作用に有意差は認められなかった. 以上より, SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群は, 経時での MED の上昇傾向は見られるが, プラセボ摂取群との有意な差は認

められなかった.

3) MTD

MTD の測定値および増減率を表 6 に, 増減率のグラフを図 3 に示す. また, 群間あるいは群内それぞれの多重比較検定結果を表 6 および図 3 に示す.

測定値についての分散分析の結果, 群内 ($p < 0.001$) および群間・群内の相互作用 ($p = 0.011$) に有意差が認められ, 群間に有意差は認められなかった. しかしながら, 各群の群内について Dunnett の多重比較検定を行った結果, いずれの群も有意差は認められなかった. また, 各検査時点における群間についての Dunnett の多重比較検定を行った結果についても, いずれの検査時点においても有意差は認められなかった.

増減率についての分散分析の結果, 群間 ($p = 0.075$) に

表 6. MTD の測定値および 0 w に対する増減率 (平均値 ± 標準偏差)

摂取群	測定値 (mJ/cm ²)				0 w に対する増減率 (%)		
	0 w	4 w	8 w	16 w	4 w	8 w	16 w
SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群	29.7 ± 7.8	32.9 ± 9.3	34.7 ± 8.7	34.5 ± 8.0	10.5 ± 9.9	17.7 ± 15.6 ‡	17.2 ± 11.8 †
SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群	34.0 ± 9.4	34.6 ± 9.7	33.0 ± 7.1	34.4 ± 7.3	2.2 ± 12.5	-0.4 ± 16.2	10.8 ± 14.2
プラセボ摂取群	30.0 ± 5.4	32.3 ± 7.1	30.5 ± 5.9	31.4 ± 5.7	6.7 ± 8.0	1.6 ± 10.0	5.2 ± 10.8

群内 (vs. 0 w) での Dunnett test ($p < 0.1$); † 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.1$); ‡ 群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.05$).

図3. MTDの0wに対する増減率

†群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.1$), ‡群間 (vs. プラセボ) での Dunnett test ($p < 0.05$).

有意傾向が認められ、群内・群間の相互作用 ($p = 0.036$) に有意差が認められた。引き続き、各検査時点における試験品要因についての Dunnett の多重比較検定を行った結果、SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群は、プラセボ摂取群との群間比較において、8 w 時点で有意に高く ($p = 0.035$)、16 w 時点で高い傾向 ($p = 0.077$) であった。SNC 熱水抽出物 400 mg/day を 8 週間摂取することにより、紫外線照射による皮膚の黒化は抑制されることが示され、摂取を中止した後も効果が持続する傾向が認められた。

4) 有害事象

有害事象の評価対象者は、被験者全員 (44 名) とした。8 週間の摂取期間中、被験者の自己申告、日誌への記載、試験時の問診・観察などにより確認された有害事象を集計し、何らかの有害事象の発生率は、SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群 40%、SNC 熱水抽出物 200 mg/day 摂取群 50%、プラセボ摂取群 47% であった。有害事象の内容として、風邪が最も多く、このほか頭痛、喉の痛み、胃腸炎、胃もたれ、関節痛、腰痛、貧血などであった。これらすべての有害事象は、試験責任医師により試験品とは関連しないと判定された。このことより、SNC 熱水抽出物の摂取による安全性上の問題は認められなかった。

3. 考 察

SNC 熱水抽出物の摂取による紫外線照射による日焼けの抑制効果を確認するため、年齢が 25 歳以上 45 歳未満の健康な女性を募集し、普段紫外線の影響が少ない背中を照射部位として、SNC 熱水抽出物 (400 mg/day, 200 mg/day) あるいはプラセボを摂取してもらい、MED および MTD 測定を実施した。スクリーニング検査により、MED と MTD が近似しかつ MED および MTD の値が被験者候補全体の中央値に近いことを基準に被験者として三群合

せて 44 名で実施した。しかし、0 w, 4 w, 8 w の摂取期間での検査において、MED あるいは MTD の判定ができない場合があった解析除外者が多く、最終解析者として 25 名となった。検査での背中への紫外線照射の部位は重ならないよう照射部位を変えて実施したため、照射範囲は背中の中範囲となるが、背中での測定部位ごとの地肌の色が異なる人の場合、想定された 6 段階の照射量範囲からずれて測定不能となる可能性が高かったものと推察された。また、地肌の色ムラ以外に、試験開始 2 カ月以前ではあるが、夏期の背中の日焼けが十分に収束せず、判定に悪影響を及ぼした可能性がある。

解析の結果、SNC 熱水抽出物 400 mg/day (SNC 熱水抽出プロテオグリカン 169 mg/day) 摂取群の 0 w から 8 w の MTD の増減率は、プラセボ摂取群と比べ有意に上昇したことから、SNC 熱水抽出物の摂取は、紫外線によって肌が黒くなる日焼けを抑制する効果があることが示された。またこの効果は、摂取をやめた 8 週間後も、持続する傾向がみられた。MED に関しては、群内比較において、SNC 熱水抽出物 400 mg/day 摂取群のみに、0 w から 16 w に上昇傾向が認められたが、プラセボ摂取群との群間比較での有意差は認められなかった。紫外線照射後の紅斑は、炎症反応に密接に関係しているため、SNC 熱水抽出物 400 mg/day の摂取により皮膚黒化と同様に紅斑抑制効果もあるものと考えられるが、紅斑反応のピークは、紫外線照射の 12 時間から 24 時間後であり⁹⁾、その後消失していくため、照射 1 日後の測定において、ピークになる時間の個人差がばらつきの要因となり、プラセボ摂取群との有意差が認められなかった可能性があるかと推察される。プラセボ摂取群においても経時的な MED 上昇が見られたが、MED は、夏期で低く、冬期に高くなることが報告されている³⁰⁾。本試験期間 (16 週間) は、10 月 (秋) から 2 月 (冬) であり、MED の変動は、季節変動の要因が影響したものと推察された。また、SNC 熱水抽出物 200 mg/day (SNC

熱水抽出プロテオグリカン 84 mg/day) の摂取は、MED、MTD のいずれもプラセボと比較して有意な差は認められなかった。

我々は、SNC 脱脂粉末の水抽出液からイオン交換カラムクロマトグラフィーに続くゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製したプロテオグリカン画分は、動物レベルで皮膚の紅斑発生、皮膚肥厚などの光老化の抑制効果が高いことを見出している³⁷⁾。また SNC 熱水抽出物についても、イオン交換カラムクロマトグラフィーによりプロテオグリカンを精製分画し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを実施した結果、SNC 脱脂粉末の水抽出と同様のプロテオグリカン分子量分布を示した³⁰⁾。したがって、SNC 熱水抽出物の摂取による日焼け抑制効果は、SNC 熱水抽出物に含まれるプロテオグリカンが関与成分であることが示唆された。

SNC 熱水抽出物の日焼け抑制の作用機序としては、SNC プロテオグリカンによる抗炎症効果が推察される。コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸が炎症反応を調節する作用があることが報告されているが³⁸⁾、SNC プロテオグリカンの炎症反応調節についても複数の報告がある。マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) 培養系において、加熱死菌処理した大腸菌を添加し誘導される TNF- α の産生に対し、SNC プロテオグリカンは、プロテオグリカンの糖鎖成分であるコンドロイチン硫酸に比べ強い抑制効果を有することが報告されている³⁹⁾。このことから、コアタンパクに糖鎖 (コンドロイチン硫酸) が結合したプロテオグリカンの構造が、より抗炎症作用を発揮することが推測された。ヒト末梢血由来の樹状細胞を用いた研究において、SNC プロテオグリカンがサイトカインの作用を調節することにより、免疫機能に影響を与える可能性も示唆されている⁴⁰⁾。また、デキストラン硫酸ナトリウムの摂取により誘発した腸炎モデルラットにおいて、SNC プロテオグリカンの経口投与は、コンドロイチン硫酸の経口投与に比べて強い炎症抑制効果を示し、大腸糞便中の総短鎖脂肪酸量、特に n-酪酸の量が有意に増加したことから腸内環境の改善を示す結果であること、投与されたプロテオグリカンは、消化管内では分解され難いことが示唆されている。そのため、消化され難いプロテオグリカンの全体構造が腸内細菌バランスの変化や腸内環境改善による抗炎症効果に起因していることが推測されている⁴¹⁾。さらに IL-10 ノックアウトマウスの脾臓および腸間膜リンパ節から調製した細胞浮遊液をマウスに移入して惹起させた腸炎に対しても、SNC プロテオグリカンは、体重減少や腸管重量の減少等の症状に対する抑制効果、脾臓および腸間膜リンパ節における TNF- α 、IL-17 などの炎症性サイトカインの産生に対する抑制効果が報告されている⁴²⁾。我々は、SNC 脱脂粉末水抽出物から分画したプロテオグリカンを予め経口投与させたヘアレスマウスに紫外線を照射した後、血清及び紫外線照射部位 (背中) の皮膚中の炎症性サイトカインを測定した。その結果、SNC 脱脂粉末水抽出物から抽出し

たプロテオグリカンは紫外線により誘導された炎症性サイトカインを抑制することを示した³⁰⁾。紫外線により誘導された炎症時に発生する様々な炎症性サイトカインがメラニン生成を活性化することが報告されており⁴³⁾、紫外線による炎症性サイトカインの抑制が、日焼け (黒化) の抑制に繋がっているものと推察される。抗炎症の作用機序として、SNC プロテオグリカンは分解され吸収されるのではなく、プロテオグリカンの構造を保持して腸に留まり、腸管での免疫系に作用して体質改善的に効果を発揮していることが推測されている³⁷⁾。腸管での免疫系に作用して機能を発揮する成分として、乳酸菌が挙げられる。経口摂取された乳酸菌は腸管上皮で認識され、細胞内シグナル伝達因子である MAP キナーゼや転写因子である NF- κ B を介して NK 細胞の活性化、抗体産生の増強、サイトカイン産生の制御など様々な作用により、各種の免疫疾患や炎症性疾患の予防や治療に有効であることがわかってきている⁴⁴⁾。また姫松茸 (*Agaricus blazei* Murill) 抽出物は、腸管上皮の特定のレセプターに結合し、過酸化水素などのメッセンジャーを介して発生した IFN- γ が Th1/Th2 バランスに影響を及ぼして、抗アレルギー効果を発揮すると報告されている⁴⁵⁾。今後、SNC プロテオグリカンの抗炎症作用機序のさらなる詳細なメカニズムの解明に努めたい。

このように、SNC 熱水抽出物は、紫外線による日焼けを抑制し、皮膚ダメージを抑制する有益な食品素材であり、長期的な摂取は、シワやシミなどの光老化を抑制できるものと考えられる。また日焼けや光老化抑制のみではなく、炎症に基づく様々な疾患の改善を手助けできる機能的食品素材として、幅広い分野で今後の高齢化社会における QOL の向上への貢献が期待できる。

謝辞

本研究に際して、試験に協力していただきました被験者の皆様、医療法人健昌会福島健康管理センターの近藤澄夫医師および DRC 株式会社に深く感謝いたします。

文献

- 1) G. Jenkins: Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 801-810 (2002).
- 2) T. Nose and K. Tsurumi: 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).
- 3) G.J. Clydesdale, G.W. Dandie and H.K. Muller: Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.*, **79**, 547-568 (2001).
- 4) 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.
- 5) 近藤靖児, 佐藤吉昭: 太陽光線と皮膚. 「光線過敏症 (第 3 版)」, 佐藤吉昭監修, 金原出版, 東京, pp. 3-17 (2002).
- 6) T. Abe and J. Mayuzumi: The change and recovery of human skin barrier functions after ultraviolet light irradiation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **27**, 458-462 (1979).
- 7) W.M. Holleran, Y. Uchida, L. Halkier-Sorensen, A. Haratake, M. Hara, J.H. Epstein and P.M. Elias: Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier

- function. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **13**, 117–128 (1997).
- 8) S.H. Ibbotson, M.N. Moran, J.F. Nash and I.E. Kochevar: The effects of radicals compared with UVB as initiating species for the induction of chronic cutaneous photodamage. *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 933–938 (1999).
 - 9) D.L. Bissett, D.P. Hannon and T.V. Orr: An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367–378 (1987).
 - 10) S.J. Moloney, S.H. Edmonds, L.D. Giddens and D.B. Learn: The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem. Photobiol.*, **56**, 505–511 (1992).
 - 11) 小川文秀, 佐藤伸一: 酸化ストレスと皮膚—光老化から全身性強皮症まで. 日臨免誌, **29**, 349–358 (2006).
 - 12) 佐田雅宏, 研谷 啓: 抗シワ・抗老化化粧品品の展望. フレグランスジャーナル, 1996年1月号, 23–30.
 - 13) 小林静子: 紫外線B波照射による皮膚障害とその予防・治療— γ -Tocopherol誘導体塗布の効果—. YAKUGAKU ZASSHI, **126**, 677–693 (2006).
 - 14) 佐々木政子: 太陽紫外線の科学. 日皮会誌, **108**, 1540–1545 (1998).
 - 15) A.R. Poole: Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1–14 (1986).
 - 16) H. Watanabe, Y. Yamada and K. Kimata: Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem.*, **124**, 687–693 (1998).
 - 17) 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).
 - 18) T.E. Hardingham and H. Muir: Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem. J.*, **139**, 565–581 (1974).
 - 19) J.A. Buckwalter and L.C. Rosenberg: 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).
 - 20) M. Mörgelin, M. Paulsson, T.E. Hardingham, D. Heinegård and J. Engel: Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem. J.*, **253**, 175–185 (1988).
 - 21) C. Kiani, L. Chen, Y.J. Wu, A.J. Yee and B.B. Yang: Structure and function of aggrecan. *Cell Res.*, **12**, 19–32 (2002).
 - 22) L. Han, D. Dean, L.A. Daher, A.J. Grodzinsky and C. Ortiz: Cartilage aggrecan can undergo self-adhesion. *Biophys. J.*, **95**, 4862–4870 (2008).
 - 23) T.E. Hardingham and A.J. Fosang: Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*, **6**, 861–870 (1992).
 - 24) I. Kakizaki, Y. Tataru, M. Majima, Y. Kato and M. Endo: Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **506**, 58–65 (2011).
 - 25) I. Kakizaki, T. Mineta, M. Sasaki, Y. Tataru, E. Makino and Y. Kato: Biochemical and atomic force microscopic characterization of salmon nasal cartilage proteoglycan. *Carbohydr. Polym.*, **103**, 538–549 (2014).
 - 26) 三浦絢子, 伊藤聖子, 加藤陽治: サケ鼻軟骨粉末から異なる溶媒で抽出したプロテオグリカンの性質の比較. 食科工誌, **60**, 237–241 (2013).
 - 27) 国立大学法人弘前大学, 加藤陽治, 伊藤聖子, 工藤重光: プロテオグリカンの抽出方法, 特許第5252623号, 2013–04–26.
 - 28) I. Kakizaki, A. Miura, S. Ito, T. Mineta, H.J. Seo and Y. Kato: Characterization of proteoglycan and hyaluronan in water-based delipidated powder of salmon cartilage. *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 115–120 (2015).
 - 29) M. Goto, S. Ito, Y. Kato, S. Yamazaki, K. Yamamoto and Y. Katagata: Anti-aging effects of extracts prepared from salmon nasal cartilage in hairless mice. *Mol. Med. Report*, **4**, 779–784 (2011).
 - 30) Y. Suekawa, M. Goto, K. Yamamoto and Y. Kato: Development of hyaluronic acid-collagen-proteoglycan complex (Hyaluco PG) by hot water extraction from salmon nasal cartilage. *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 101–106 (2015).
 - 31) T.B. Fitzpatrick: The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.*, **124**, 869–871 (1988).
 - 32) 上出良一: 紫外線防御の皮膚科学的意義. 粧技誌, **30**, 265–272 (1996).
 - 33) 福井作蔵: 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, 東京, p. 177 (1990).
 - 34) 工藤重光, 伊藤聖子, 吉原秀一, 加藤陽治: プロテオグリカンを主成分とするサケ鼻軟骨粉末の安全性評価. 食科工誌, **58**, 542–547 (2011).
 - 35) 日本化粧品工業連合会 SPF 専門委員会: 日本化粧品工業連合会 SPF 測定法基準. 粧技誌, **26**, 207–214 (1992).
 - 36) 中山靖久: 紫外・赤外線への皮膚に対する作用効果と安全性. 照学誌, **61**, 642–656 (1977).
 - 37) M. Goto, S. Yamazaki, Y. Kato, K. Yamamoto and Y. Katagata: Anti-aging effects of high molecular weight proteoglycan from salmon nasal cartilage in hairless mice. *Int. J. Mol. Med.*, **29**, 761–768 (2012).
 - 38) K.R. Taylor and R.L. Gallo: Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.*, **20**, 9–22 (2006).
 - 39) H. Sashinami, K. Takagaki and A. Nakane: Salmon cartilage proteoglycan modulates cytokine responses to *Escherichia coli* in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 1005–1010 (2006).
 - 40) H. Yoshino, K. Takahashi, S. Monzen and I. Kashiwakura: Effects of proteoglycan extracted from nasal cartilage of salmon heads on maturation of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 311–315 (2010).
 - 41) S. Ota, S. Yoshihara, K. Ishido, M. Tanaka, K. Takagaki and M. Sasaki: Effects of proteoglycan on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.*, **53**, 3176–3183 (2008).
 - 42) T. Mitsui, H. Sashinami, F. Sato, H. Kijima, Y. Ishiguro, S. Fukuda, S. Yoshihara, K. Hakamada and A. Nakane: Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 209–215 (2010).
 - 43) 今川孝太郎, 宮坂宗男: 光が皮膚に与える影響, 日レ医誌, **32**, 444–451 (2012).
 - 44) 加地留美: 乳酸菌の免疫調節作用に関わる細胞内シグナルとその制御, 化学と生物, **50**, 182–187 (2012).
 - 45) G. Bouike, Y. Nishitani, H. Shiomi, M. Yoshida, T. Azuma, T. Hashimoto, K. Kanazawa and M. Mizuno: Oral treatment with extract of *Agaricus blazei* Murill enhanced Th1 response through intestinal epithelial cells and suppressed OVA-sensitized allergy in mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**, 532180 (2011).