

MEMOIRS OF THE FACULTY OF AGRICULTURE
OF
KINKI UNIVERSITY

近畿大学農学部紀要

第44号

2011

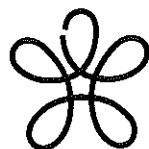
Z18-272

(44)

2011



1201100899474



近畿大学農学部

鶏冠由来低分子ヒアルロン酸の化学組成と ヒト肌への臨床試験による保湿効果

寺下 隆夫*・白坂 憲章*・楠田 瑞穂**・若山 祥夫***

*近畿大学農学部食品微生物工学研究室

**大阪府立大学大学院生命環境科学部生物資源循環工学講座

***株式会社ウイル・サーチ

Chemical composition of low-molecular weight hyaluronic acid from comb (chicken) and maintaining the moisture effect of skin by a clinical test

Takao TERASHITA*, Norifumi SHIRASAKA*, Mizuho KUSUDA**
and Sachio WAKAYAMA***

*Laboratory of Food Microbiological Science and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kin-ki University, 3327-204
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

**Laboratory of Biocycle engineering, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuencho, Naka-Ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

***Willsearch Co Ltd., 3F Kyouritsu-ShinYokohama Building, 2-15-12 Shinyokohama, Kouhoku-Ku, Yokohama,
Kanagawa 222-0033, Japan

Synopsis

The chemical compositions of low-molecular weight (low-MW) hyaluronic acid (HA) from comb and the effect of keeping moisture contents on skin by a clinical test were investigated. The low-MW-HA prepared from comb contained the following components: moisture 22 ~ 2.6%, nitrogen 3.84%, total protein 3.04%, free amino acid 4.08%, N-acetyl-D-glucosamine 0%, HA 13.4% and dextrin (food additives) 75.0%. The main components of the low-MW-HA were two components, MW 1,500 (47%) and MW 5,000 (33%).

We studied the effect of low-MW-HA (Will-HA) on the effect of keeping moisture contents of skin by a clinical test. The clinical test was done in a national hospital in the Peoples Republic of China in 2006. As a result, it was shown that the low-MW-HA have the effect of keeping moisture in the skin.

Keywords: comb, hyaluronic acid, low-molecular weight hyaluronic acid, moisture contents of skin

諸言

ヒアルロン酸 (HA) は、ムコ多糖の一種で N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸が直鎖状に連なった分子量数百万の高分子化合物である。HA は、ヒトをはじめ脊椎動物の組織中に広く分布しており、皮膚や関節、眼球に多く含まれ、皮膚では肌の乾燥を防ぎ、眼球では硝子

体の緩衝作用や組織形状を維持する役割を担っている。1 g で 6 l の水を保持する能力を有する HA は、生体の水分保持に重要であるが、その新たな利用法については多くの可能性を秘めており、美容や老化防止、貧血や関節症、リウマチの改善、活性酸素の消去、傷の治癒速度を速めるなど、健康の維持とも深い拘わりを持っている¹⁻⁴⁾。しかし、加工食品への利用については、

タンパク質ゲル化食品（蒲鉾、うどん、チーズなど）の物性への影響や水分保持効果について検討され、ゲル化強度に影響を与えずに保水性が高まることが明らかにされている以外、ほとんど研究されていないのが現状である⁵⁾。

最近、この高分子HAを塩酸による分解や酵素処理技術を用いて低分子化した低分子HAが開発され、医薬品や化粧品、健康機能性食品への応用研究が盛んにおこなわれるようになってきた。低分子化の主な目的は、高分子HAの吸収性や浸透性を向上させるためであるが、低分子化の際の条件によってどの程度まで分解されているのか、不明な部分も多い。また、現在商業ベースで利用されているHAは、鶏冠由来のものが中心であるが、乳酸菌 *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 が生産する微生物起源のHA⁶⁾が開発され、化粧品の原料などに利用されるようになってきた。

本研究では、HAを主成分とする鶏冠由来の均質物を、プロテアーゼを中心とした食物由来の酵素類処理で低分子化した低分子HAを調製した。さらに、この低分子HAに食品添加物用デキストリンを3倍等量（重量比）加えた粉末状の低分子HA（商品名：W-HA）を実験材料に使用した。実験では、まず、このように調製した低分子HAの化学成分および分子量分布などについて検討した。あわせて、ヒト皮膚の水分改善効果（保湿効果）について実施したW-HA（低分子HA）のヒト経口臨床試験結果について報告する。

研究材料と方法

1. 低分子ヒアルロン酸およびそのカプセルの調製

低分子HA粉末（鶏冠をプロテアーゼを中心とした食物由来の酵素類で分解処理し、食品添加物用デキストリンを3倍等量添加）は（株）らいむ（東京都世田谷区）で調製した。経口臨床試験には、低分子HA粉末をゼラチンカプセルに封入し、服用しやすくした試料（株式会社ウイル・サーチ社にて調製）を使用した。

2. W-HA（低分子HA）の成分分析

1) 水分含有量の測定

水分含有量は、W-HAの1gを105℃、3時間加熱乾燥し、精密天秤で恒量を求め定量した。

2) 全窒素の定量

全窒素はAOAC法に基づくセミマイクロケルダール法⁷⁾によって定量した。

3) 遊離アミノ酸の定量およびアミノ酸組成の分析

総遊離アミノ酸量はNinhydrin法⁸⁾によって定量した。定量には標準アミノ酸としてロイシンの検量線を作成し使用した。また、遊離アミノ酸の組成は、W-HAの50mgを蒸留水に溶解し、ロータリーエバポレーター（60℃）で減圧乾固させ、0.02N塩酸5mlで溶出し、ろ紙でろ過したのち、滅菌フィルターでろ過したろ液の50μlを生体分析用カラムを装着したアミノ酸自動分析機（日立L-8500型）で分析した。一方、W-HA 50mgを0.02N塩酸5mlで溶出し、ろ紙でろ過したのち、滅菌フィルターを通したろ液を直接アミノ酸自動分析する試験区も設けた。

4) タンパク質の定量

タンパク質含有量はLowry法⁹⁾によって決定した。標準検量線の作成には牛血清アルブミンを使用した。

5) N-アセチル-D-グルコサミンの定量

N-アセチル-D-グルコサミン含有量はMorgan-Elson法¹⁰⁾で定量した。

6) グルコサミノグリカンの定量

2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法¹¹⁾による比色定量法で分析した。標準検量線の作成には鶏冠由来HAナトリウム（HARC, 和光純薬から購入）および *Streptococcus zooepidemicus* 由来のHAナトリウム（HASZ, 和光純薬から購入）を用いた。

7) 低分子HA（W-HA）の分子量測定

示差屈折計（Shimadzu製、RID-10A型）を装着した高速液体クロマトグラフィー（HPLC、Shimadzu製）によってW-HAの分子量を推定した。カラムにTSKgel G-2,500PWxl（7.8mmID x 30cm）、移動相（流速1ml/min）として、水を用いて分析を行った。分子量マーカーには分子量400、1,000、2,000、6,000の4種のポリエチレングリコール（Aldrich製）を用いた。

3. ヒトを対象にした低分子HAカプセルの経口投与臨床試験の方法

1) 観察の対象と方法

臨床実験は検査を依頼した中国疾病予防規制セ

ンター 栄養・食品安全局 北京中医薬大学東直門病院で2006年に実施された。被験者の年齢は、38歳から51歳で、投与群の有効被験者は52名中、女性が48名、平均年齢は 44.79 ± 6.44 歳、対照群は55人中、女性42名、平均年齢は 45.53 ± 5.59 歳であった。皮膚水分 ≤ 12 、ランダム数字表を使用してランダム対照デザインを行い、投与群と対照群に分けた。

被験者の選択基準は健康で、心臓、脳、血管、肝臓、腎臓、造血システム関係の疾患および精神病の病歴のないヒトとし、試験の前に、胸部X線、B超音波、心電図、血液検査、尿検査、血液生化学検査などの項目を含んだ全身の健康診断を行い、不合格者は除いた。試験に参加する被験者は、試験期間中に医薬品、健康食品および化粧品を一切使用しないこととした。なお、被験者排除の基準としては、妊娠または哺乳中の女性、アレルギー性体質、心臓、脳、血管、肝臓、腎臓、造血システム関係の疾患および精神病の合併症病歴を持つ者、短期間内に本試験結果に影響し、試験の効能項目に関係のあるものを投与している者、試験の要求にしたがって服用しなかった者などとした。

なお、本研究は中国疾病予防規制センター 栄養・食品安全局 北京中医薬大学 東直門病院生命倫理委員会の承認を得て実施された。

2) 投与方法

低分子HAの投与は、指示された方法と用量(1カプセル中に低分子HAは70mgを含み、被験者には1日2回、1回2カプセル、1日合計4カプセルを30日間、連続経口投与した)に従って行い、対照群はカプセルのみ(プラセボ)を投与した。試験期間中の食事や生活習慣などは変えないこととした。

3) 観察方法

ヒトに対する肌の保湿作用効果試験として角層水分量測定と肌のpH値測定(ドイツ製、SHP88Type)を行った。観察と測定は、広くて風通しの良い場所で、安定した温度と湿度の環境で実施した。検査部位は額の眉の間とし、まず蒸留水で濡らした清潔な綿で検査部位を洗い、拭き取ってから15分以内に皮膚の水分とpH値を測定した。測定は同一の者が行った。なお、一般項目として、投与前と投与後の食事、睡眠、排泄物、精神状態などを観察し、記録した。血液検査

ではHB(ヘモグロビン血色素量、g/dl)、WBC(白血球数、 μ l)、RBC(赤血球数、万/ μ l)、BUN(尿素窒素、mM/l)、CR(クレアチニン、 μ M/l)、TP(総蛋白量、g/dl)、ALB(アルブミン、g/dl)、ALT(GPT、U/l、37℃)、AST(GOT、U/l、37℃)、総ビリルビン量(mg/dl)、CHO(コレステロール、mM/l)、TG(中性脂肪、 μ M/l)、HDC(HDLコレステロール、 μ M/l)を測定した。さらに、尿検査、血液生化学検査などの項目について、投与前と投与後の測定データを比較した。

4) 判断の基準およびデータの統計分析

得られたデータの統計分析には、一般統計用ソフトウェアのSPSS10.0を使用してデータを計算・分析した。グループ間の比較はtテストを行い、同じグループの投与前と投与後の比較は対合tテストを行った。

結果および考察

1) 低分子HA(W-HA)の一般成分

ヒアルロン酸(HA)は動物の体内のあらゆる部分に存在するグルコサミノグリカンのひとつで、高い水分保持機能を有し、細胞間隙に水分を取り込みゼリー状のマトリックスを形成して水を保持する機能を持つ。また、細胞組織そのものを保護し、細菌感染を防止する作用も持っている⁸⁾。このように、HAは皮膚の瑞々しさや潤い、張りの維持に機能する重要な成分であるが、その分子量が80万~120万と極めて巨大で、直接塗布しても、あるいは食しても吸収が容易ではなく利用にあたってはこの点が大きな問題点であった。

そこで、吸収性をよくするために、高分子のHAを低分子化する試みが近年盛んに行われるようになってきた。HAの低分子化は低濃度(0.1~6N)の塩酸で加熱(50~70℃)分解する方法、ヒアルロニターゼで酵素分解する方法、プロテアーゼと併用する方法、自己消化法、あるいはそれらを組み合わせて分解処理する方法などが試みられている。しかし、低分子化によって得られる分子量は80,000という高分子からわずかに411の単量体まで使用する分解方法や分解条件により極めて多岐にわたっている。また、そのいずれもが特許の対象で、公表されていない部分も多く、

詳細は不明である。

著者らは、プロテアーゼを中心とした食物由来の酵素類で処理した低分子HAを使用した。鶏冠由来低分子HAは、わずかに粘質性を帯びた溶液状であるが、これを真空凍結乾燥した。しかし、高濃度では加工食品などに使用しにくいことから、健康機能性成分や食品への応用と保存性の観点から、食品添加物用デキストリンを3倍等量(重量比)添加し、乾燥粉末状とした(W-HA:ウイルヒアルロン酸)。

表1 低分子ヒアルロン酸(低分子HA, W-HA)の一般成分

| | % |
|------------------------------|---------|
| 水分 | 2.2~2.6 |
| 窒素 ¹⁾ | 3.84 |
| 総タンパク質 ²⁾ | 3.04 |
| 遊離アミノ酸 ³⁾ | 4.08 |
| N-アセチルグルコサミン ⁴⁾ | 0 |
| デキストリン(食用添加物用) ⁵⁾ | 75.0 |

¹⁾セミマイクロケルダール法 ²⁾ローリー法
³⁾ニンヒドリン法 ⁴⁾モーガン-エルソン法
⁵⁾実用上W-HAに加えた量

表1は、このように調製した低分子HA(W-HA)の分析結果である。W-HAは食品に利用することを考慮し、表に示すように食品添加物用のデキストリンが75%添加されている。水分は2.2~2.6%、セミマイクロケルダール法⁷⁾による総

窒素含量は3.84%であった。また、Lowry法⁹⁾で求めた総タンパク質含量は3.04%、Ninhydrin法⁸⁾による遊離アミノ酸の総量は、4.08%であった。なお、ヒアルロン酸の最小単位はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンのそれぞれ1分子が結合した分子量411である。今回使用した低分子HAが、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンにまで分解が進んでいないことを確認する目的で、Morgan-Elson法¹⁰⁾により分析した。その結果、N-アセチルグルコサミン含量は0%で、ヒアルロン酸の分解物は全く存在しなかった。

2) 低分子HA(W-HA)中に含まれる遊離アミノ酸組成

遊離アミノ酸組成は、表2に示した。タンパク質構成アミノ酸を含む遊離アミノ酸の25種類が同定された(同定アミノ酸比率57.36%)。しかし、未同定のアミノ酸ピークも多数あり、未同定アミノ酸の総量は42.64%であった。

低分子HA中の遊離アミノ酸では、イソロイシン6.27%、 β -アミノイソ酪酸5.45%の含有量が多く、ついで、アラニン3.52%、タウリン3.30%、フェニルアラニン3.30%、アスパラギン酸2.94%、シスチン2.78%、チロシン2.65%などが多く含まれていた。シトルリン0.92%、1-メチルヒスチジン0.78%などは少なかった。また、必須アミノ酸のバリン、トリプトファン、ヒスチジン

表2 低分子W-HA(HA)の遊離アミノ酸組成

| アミノ酸 | 含有% | アミノ酸 | 含有% |
|-----------------|------|------------------|-------|
| ρ -セリン | 1.71 | シスチン* | 2.78 |
| タウリン | 3.30 | ロイシン* | 2.26 |
| アスパラギン酸* | 2.94 | イソロイシン* | 6.27 |
| スレオニン* | 1.30 | チロシン* | 2.65 |
| セリン* | 2.20 | フェニルアラニン* | 3.30 |
| グルタミン酸* | 2.18 | β -アミノイソ酪酸 | 5.45 |
| グルタミン | 0.48 | オルニチン | 1.05 |
| ザルコシン | 1.81 | リジン* | 1.17 |
| グリシン* | 2.26 | 1-メチルヒスチジン | 0.78 |
| アラニン* | 3.52 | アンセリン | 1.92 |
| シトルリン | 0.92 | アルギニン* | 1.93 |
| α -アミノ酪酸 | 2.18 | 同定総アミノ酸 | 57.36 |
| システイン* | 1.03 | 未知アミノ酸 | 42.64 |
| メチオニン* | 1.97 | | |

*タンパク質構成アミノ酸を示す。

必須アミノ酸:バリン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、シスチン、メチオニン^{a)}、リジン^{c)}、フェニルアラニン^{b)}、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン^{d)}、チロシン^{b)}、システイン^{a)}

a)、b)、c)は置き換え可能なアミノ酸

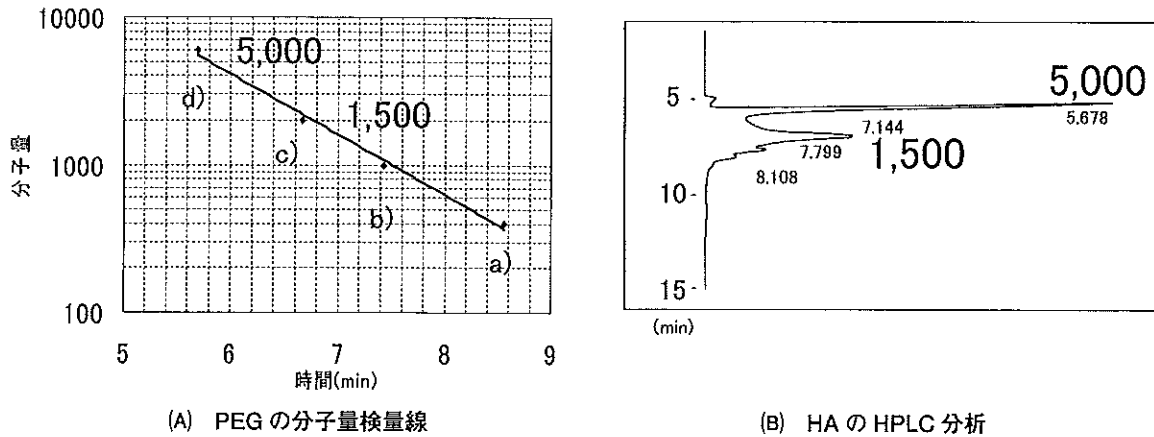


図1 低分子HAのHPLC-GPC

分子量マーカー：ポリエチレングリコール (PEG : a) 400,
 b) 1,000, c) 2,000, d) 6,000
 カラム：TSKgel G2500PWxl (7.8 x 30 cm, TOSOH)
 分析条件：1.0 ml / min, 40°C

は検出されなかった。

3) 鶏冠由来低分子HA (W-HA) 中のヒアルロン酸含有量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法で分析した。分子量マーカーにはポリエチレングリコール (PEG) を用い詳細な分析を行った結果、図1(A), (B)に示したようにW-HAは、分子量5,000と1,520の2成分を主成分とする低分子HAであった。さらに、表3に示すように量的には少ないが、それより低分子の3成分(分子量 1,140, 760, 380)を含んだ合計5成分から構成されることが明らかになった。

また、表3は、食品添加物用デキストリン3倍等量を混合したサンプルとデキストリンのみのサンプルをそれぞれHPLCで分析し、デキストリンのピーク面積を差し引いて算出した本HAの分子量分布とそれらの含有比率を示した結果である。低分子HAは、推定分子量5,000, 1,500, 1,140, 760および380の5種類からなり、HAの構成単位数は、HA 1単位の分子量約400として推定すると、それぞれ、13~14、4、3、2および1分子と算出された。また、これらの重量比構成は分子量の大きい順に33%、47%、10%、6%および4%で、主要成分は分子量1,500程度の4分子成分と分子量5,000程度の13~14分子成分の2成分からなることが明らかになった。なお、HPLC分析結果から算出した低分子HAの含有率は、W-HA中13.4%と算出された。

さらに、グルコサミノグリカンの定量法として

有用な Murata et al. の方法¹¹⁾に従い、2-ニトロフェニルヒドラジンカップリング法によって、W-HA中のHA含有量の分析を試みた。しかし、鶏冠由来のヒアルロン酸ナトリウム (HARC) の検量線にもとづいた定量値は30.23% (302.3 μ g/mg)、乳酸菌由来のヒアルロン酸ナトリウム (HASZ) の検量線にもとづく32.36% (32.36 μ g/mg) となり、実際の含有量 (最大でも25%) をはるかに超える高い定量値を示してしまった。従って、本分析法ではW-HA中に含まれる他の成分が定量値に大きく影響することがわかり、他の成分の排除方法についても検討したが、満足する値を得るには至らなかったことを付け加えておきたい。

4) 皮膚水分とpH値測定結果

ヒト肌に対する保湿作用評価試験としては角層水分量測定、油分量測定、経表皮水分蒸散量測定などがある。また、肌の状態を評価するためには、きめ測定、シワ測定、肌のpH測定、皮膚粘弾性測定、肌表面温度測定、テープストリッピング角層診断および顔画像解析装置による診断などが行われる。今回の臨床試験では、角層水分量測定および肌のpH測定を行なった。

角層水分量は角質層に含まれる水分量を測定するもので、高い数値は潤いのある滑らかな美しい肌を示す。具体的にはCutometerを用い、角層水分量をキャパシタンス値で表現する。潤いのある滑らかで美しい肌では65~75キャパシタンス前後を示し、キャパシタンス45以下では水分不

表3 低分子HAの推定分子量、構成単位数および構成重量比率

| Peak No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|-------|-------|-------|-----|-----|
| 推定分子量 | 5,000 | 1,520 | 1,140 | 760 | 380 |
| 構成単位数 | 13~14 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 構成重量比 (%) | 33 | 47 | 10 | 6 | 4 |

ニワトリ鶏冠分解物に食品添加物用デキストリン3倍等量を添加したサンプルAとデキストリンのみのサンプルBをそれぞれHPLC分析し、差し引いて算出した。

表4 ヒトの皮膚水分・pH値に及ぼす低分子HA投与の影響

| グループ | 人数 | 角質水分量 (キャパシタンス値) | | 肌の pH | |
|------|----|------------------|-----------------|-------------|---------------|
| | | 投与前 | 投与後 | 投与前 | 投与後 |
| 投与群 | 52 | 46.00 ± 9.75 | 67.53 ± 18.60*# | 5.20 ± 0.64 | 5.53 ± 0.64*# |
| 対照群 | 55 | 45.60 ± 7.90 | 55.04 ± 18.33 | 5.10 ± 0.63 | 5.24 ± 0.61* |

*: 同一群の投与前と投与後の比較 p<0.01

#: 投与群と対照群の比較 p<0.01

足の乾燥した肌の状態をあらわす。一方、肌のpHは皮膚表面の皮脂膜のpHを指し、健康な肌ではpH 4.5から5.7の弱酸性を示す。しかし、肌が荒れ、不健康な場合はこの値よりより酸性(pH 4.3以下の酸性)に、あるいはよりアルカリ性(pH 6.0以上のアルカリ性)にシフトすることが知られている。また、男性と女性では若干異なり、男性ではわずかながら女性よりpHは酸性側を示す。

今回の被験者に対する皮膚検査の結果を表4に示した。投与群、対照群とも投与前の角質水分量は45.60~46.00キャパシタンスを示したが、30日間の投与後では投与群のキャパシタンス値の上昇が著しく67.53を示した。これに対し、対照群の投与後ではキャパシタンスの著しい上昇はなく対照群との間に明らかな差が生じ、低分子HA投与の効果が認められる結果を得た(p<0.01)。また、肌のpHについては、投与群と対照群では、投与後にpH値に明らかな差が認められた。また、投与後の投与群と対照群との差は統計学上で有意差ありと判断した。すなわち、投与群の被験者は投与後に皮膚の水分値が上昇し、対照群との間に明らかな差が確認された(p<0.01)。

高分子HAは1gで6lと驚異的な保水力を持つことから、点眼薬や関節内注入医薬品、皮膚の潤いを保つ高級化粧品成分として広く使用されている。石井ら¹²⁾は皮膚の保湿性に及ぼすHAナトリウムの効果について報告している。彼らは、皮膚の保湿性をラットと健康人の皮膚角層コ

ンダクタンスの変化で評価している。そして、HAナトリウム(0.015%)をヘアレスラットに塗布すると、精製水塗布(対照)に比較し、皮膚の水分保持能が向上し、保湿性の改善効果が認められることを報告している。また、梶本ら¹³⁾は平均年齢が27歳前後のヒトを対象とした乾燥肌に対するHA含有食品(240mg/day)の6週間にわたる臨床試験を実施し、経口摂取による皮膚状態の改善効果が認められることを報告している。これらの二つの報告はいずれも鶏冠由来の高分子HAについて行われた試験結果である。一方、吉田ら¹⁴⁾は、微生物発酵由来の高分子HA⁶⁾を含んだ食品のヒト乾燥肌に対する改善効果について検討し、皮膚の水分値が食品を摂取して3週間から上昇を始め、8週間後に最も効果的で、有意な改善を示したことを報告している。

このように、高分子HAについては多くの報告がみられる。しかし、それを肌への浸透性や吸収性の向上を目的に低分子化されたHAについては、このような検討はほとんどないのが現状である。著者らは中国北京の国立病院に依頼し、鶏冠由来の高分子HAを著者らが酵素処理によって低分子化し、その分子量分布を明らかにした低分子HAの経口臨床試験を実施した。この臨床実験は、かなり大がかりなもので、被験者の人数も100名を超えるもので、30日間にわたる試験でその投与効果が明らかになった。今後はこの低分子HAの健康食品や加工食品への利用について検討する予定である。

5) 一般血液検査、血液生化学検査結果

表5 低分子 HA 投与前後の血液性状

| 観察項目 | 投与群 | | 対照群 | |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 投与前 | 投与後 | 投与前 | 投与後 |
| HB (g/dl) | 12.63 ± 1.36 | 13.28 ± 1.38 | 13.07 ± 1.94 | 13.30 ± 1.58 |
| WBC (個/μl) | 5900 ± 1340 | 6250 ± 1430 | 6280 ± 1270 | 5990 ± 1320 |
| RBC (万/μl) | 419 ± 410 | 427 ± 400 | 440 ± 460 | 428 ± 460 |
| BUN (mM/l) | 4.67 ± 1.12 | 4.87 ± 1.34 | 4.92 ± 1.09 | 5.20 ± 1.30 |
| CR (μM/l) | 71.25 ± 13.86 | 64.34 ± 13.74 | 76.18 ± 17.44 | 64.86 ± 11.41 |
| TP (g/dl) | 7.5 ± 0.44 | 7.53 ± 0.38 | 7.61 ± 0.34 | 7.50 ± 0.51 |
| ALB (g/dl) | 4.68 ± 0.23 | 4.73 ± 0.17 | 4.74 ± 0.18 | 4.70 ± 0.34 |
| ALT (U/l, 37°C) | 20.00 ± 14.25 | 20.39 ± 7.95 | 26.95 ± 21.12 | 25.35 ± 9.75 |
| AST (U/l, 37°C) | 22.86 ± 6.71 | 21.92 ± 5.07 | 27.76 ± 12.52 | 22.91 ± 6.66 |
| 総ビリルビン量 (mg/dl) | 1.06 ± 0.57 | 1.21 ± 0.34 | 1.01 ± 0.45 | 1.05 ± 0.30 |
| CHO (mM/L) | 4.63 ± 0.75 | 4.72 ± 0.66 | 5.02 ± 0.87 | 4.97 ± 0.75 |
| TG (μM/L) | 1.53 ± 1.01 | 1.26 ± 0.53 | 1.69 ± 0.92 | 1.20 ± 0.41 |
| HDC (μM/L) | 1.43 ± 0.29 | 1.34 ± 0.28 | 1.55 ± 0.28 | 1.37 ± 0.26 |
| 一般尿検査 | 正常 | 正常 | 正常 | 正常 |

表5に示された各数値は正常範囲内である。

検査は、中国疫病予防規制センター栄養・食品安全局北京中医薬大学東直門病院で2006年に実施された。

なお、経口臨床試験に参加した被験者の一般血液検査や血液生化学検査の結果は表5に示した。低分子HA投与群および対照群の投与前と投与後の被験者の検査結果は、いずれも正常範囲内を示し、低分子HA投与の影響は認められなかった。また、胸部レントゲン検査結果、心電図および超音波の診断結果にも、影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、投与群の被験者に低分子HAを30日間連続服用させた結果、角層水分量および肌のpH値に服用前とは明らかな差が認められ、本剤が皮膚保湿改善効果を持つことが明らかになった。また、本試験の30日にわたる投与で、人体に有害な影響は認められなかった。

要旨

鶏冠由来低分子ヒアルロン酸（低分子HA）の化学成分分析とヒト肌への臨床試験による保湿効果について検討した。低分子HAは2.2%の水分、窒素3.84%、総タンパク質3.04%、遊離アミノ酸4.08%を含んでいた。また、N-アセチル-Dグルコサミンは含まず、HA含有量は13.4%であった。また、加工食品への利用を考慮し、全体の

75%になるように食品添加物用デキストリンを添加した。本低分子HAの主要構成成分は、分子量1,500（47%）と分子量5,000（33%）の2成分で、その他により低分子の3成分の計5成分であった。さらに、2006年、中国北京市の国立病院で臨床試験を実施し、ヒトの肌に対する保湿効果を検討した結果、低分子HAが肌の保湿改善効果を持つことが明らかになった。

文献

- 1) 若山祥夫 (2004) 抗酸化ヒアルロン酸とコラーゲン. pp. 6 ~ 25, (株) ウィル・サーチ出版部, 神奈川.
- 2) 奥田拓道 (2004) 健康・栄養食品事典. p.506, 東洋医学社, 東京.
- 3) Kawagishi H., Tonomura Y., Yoshida H., Sakai S., Inoue S. (2004) Orirubenones A, B and C, novel hyaluronan-degradation inhibitors from the mushroom *Tricholoma orirubens*. *Tetrahedron*, 60, 7049 ~ 7052.
- 4) 八藤 眞 (2005) 生体分子 (グルコサミノグリカン) の低分子化による吸収性. 食の科学

- 12 (通巻 334) , 60-66.
- 5) 西村公雄、内野祥子、佐藤郁夫 (2000) ヒアルロン酸の食品に対する有効利用について、第 47 回日本食品科学工学会大会講演要旨集、p.108
 - 6) Mausolf M., Jungman J., Robenek H., Prehm P. (1990) Shedding of hyaluronate synthase from streptococci. *Biochem. J.* 267, 191 ~ 196.
 - 7) 小原哲二郎・鈴木隆雄・岩尾裕之編 (1969) 食品分析ハンドブック、pp. 35 ~ 43、建帛社、東京.
 - 8) Moore S., Stain W. H. (1954) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Boil. Chem.* 211, 907 ~ 913.
 - 9) Lowry O. H., Rosebrough A. L., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265 ~ 275.
 - 10) Morgan W. T. J., Elson L. A. (1934) A colorimetric method for the determination of N - acetylglucosamine and N - acetylcondor osamine, *Biochem. J.* 28, 988 ~ 995.
 - 11) Murata Y., Miyamoto E., Seo S.- H. and Kawashima S (1991) Colorimetric 2-Nitrophenylhydrazine Coupling Method. *Yakuzaigaku* 51, 246 ~ 249.
 - 12) 石井 宏、北村敏彦、藤堂浩明、櫻井英知、深堀勝博、杉林堅次 (2006) 皮膚保湿性に及ぼすコンドロイチン硫酸ナトリウムとヒアルロン酸ナトリウムの併用効果、薬理と治療 34, 105 ~ 109.
 - 13) 梶本修身・小田中亘・坂本和歌子・吉田一也・高橋丈生 (2001) 乾燥肌に対するヒアルロン酸含有食品の臨床効果—顕微鏡的皮膚表面解析装置による客観的評価結果. *新薬と臨床* 50, 91 ~ 102.
 - 14) 吉田拓史、金光智行、奈良部 均、飛田昌男 (2009) 乾燥肌における微生物発酵ヒアルロン酸含有食品の経口摂取による改善効果、新薬と臨床 58, 143 ~ 155.